

TaqMan 실시간 PCR법에 의한 개 전염성 간염 바이러스의 검출

왕혜영 · 최재용 · 이미진 · 박진호 · 조매림 · 한재철 · 최경성 · 채준석*

전북대학교 수의과대학 생체안전성 연구소
(게재승인: 2004년 7월 20일)

Detection of infectious canine hepatitis virus by TaqMan real-time PCR method

Hye-young Wang, Jae-yong Choi, Mi-jin Lee, Jin-ho Park, Mae-rim Cho, Jae-cheol Han, Kyoung-seong Choi and Joon-seok Chae*

Bio-Safety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: July 20, 2004)

Abstract : The aim of this work was the validation of a rapid real-time PCR assay based on TaqMan technology for the unequivocal identification of infectious canine hepatitis (ICH) virus, to be used directly on DNA purified from blood specimens. A real-time PCR system targeting at the E3 ORFA gene sequence of canine adenovirus type 1 was optimized and validated through comparative analysis of samples using conventional PCR system. The real-time PCR assay based on TaqMan technology could disclose 23 (37.7%) out of 61 samples as PCR positive. In contrast, 18 (29.5%) samples were found PCR positive when conventional PCR was applied on these samples. The use of the ABI Prism 7700 sequence detection system allowed the efficient determination of the amplified product accumulation through a fluorogenic probe. The entire real-time TaqMan PCR assay, including DNA extraction, amplification, and detection could be completed within 3 hours. The detection method of real-time TaqMan PCR assay was 1,000 times more sensitive than conventional PCR. Real-time TaqMan probe and primer set developed and optimized in this study is a sensitive, rapid and accurate method for detection of ICH virus and can be effective screening tool for the detection of ICH in a diagnostic laboratory routines.

Key words : infectious canine hepatitis, canine adenovirus, E3 ORFA gene, real-time PCR

서 론

개 전염성 간염(infectious canine hepatitis, ICH)은 canine adenovirus(CAV) type 1에 의하여 유발되는 바이러스성 질병이다 [1, 2, 13, 18, 26]. DNA virus의 일종인 CAV는 Adenoviridae의 Mastadeno virus속에 속하며, 직경 70-80 nm의 정 20면체인 구상 대칭 바이러스이다 [1, 11, 17]. CAV type 1 (CAV-1)은 전염성 간염을 유발하며, type 2 (CAV-2)는 호흡기 감염증을 유발하는 것으로 알려져 있다 [1, 13, 18]. 이중 CAV-1은 전염성이 매우 강하며, 감염된 동물과의 접촉이나 오염된 매개물 또

는 외부기생충에 의해 주로 전파된다 [2, 25]. 이 질병으로부터 회복된 개와 여우는 CAV-1의 주요 보균자 역할을 하게 되며, virus를 6-9 개월 동안 노내로 배설한다고 한다 [2, 26, 27]. 비강이나 구강점막을 통하여 편도에 침입된 CAV-1은 전신적인 바이러스혈증을 유발한 후에, 간, 신장 그리고 눈과 같은 신체의 여러 조직세포를 손상시키는데, 이중에서도 특히 간세포를 손상시키는 특징이 있다 [1, 13, 29, 30].

임상병리학적 검사 소견의 특징으로는 혈중 혈소판수의 감소, 비정상적인 혈소판 기능, 그리고 prothrombin time의 연장 등과 같은 disseminated intravascular

이 논문은 2003년도 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI, No. 2003-5).

*Corresponding author: Joon-seok Chae

Bio-Safety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-3881, Fax: +82-63-270-3778, E-mail: jschae@chonbuk.ac.kr]

coagulation(DIC)이 유발되었을 때에 나타나는 전형적인 혈액학적 변화상이 관찰된다 [1, 29]. 그리고 혈청 내의 alanine transaminase(ALT)나 aspartate transaminase(AST) 등과 같은 간 transaminase와 담즙산의 농도 증가, 저혈당증과 같은 혈청학적 변화상과 함께, 뇨검사에서는 빌리루빈뇨증이나 단백뇨증이 관찰된다 [1, 25, 28].

진단방법으로는 앞서 열거한 임상증상이나 임상병리학적인 소견의 변화상과 함께 가검물로부터 virus의 분리, 병리조직학적 검사, 혈구응집저지시험이나 효소결합항체면역법과 같은 면역학적 검사법 등이 이용되어져 왔다 [6, 13-15, 30]. 하지만, 이러한 진단방법은 여러 가지 실험단계 등을 거치고 혈청형의 규명까지 필요로 하는 복잡한 과정으로 많은 노력과 최소 2~3일의 시간이 요구되며 [30], canine distemper나 leptospirosis, 또는 혈액응고장애를 유발하는 살서제 중독증과도 감별 진단을 해야만 확진을 할 수 있는 단점이 있었다 [3, 6, 14].

근래에 들어 개발되어진 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction; PCR)은 검사하고자 하는 병원체의 특이적인 유전자만을 기하급수적으로 증폭시켜서 진단하는 방법이기 때문에, 기존의 진단 방법 보다 그 특이성과 민감성, 그리고 신속성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 [9, 10, 16, 18, 22]. ICH의 경우에도 이미 외국에서는 CAV-1과 CAV-2를 감별진단할 수 있는 방법이나 canine coronavirus(CCV), canine parvovirus(CPV), 그리고 canine distemper virus(CDV) 등과 같은 개의 주요 바이러스 병원체와 감별할 수 있는 진단법에 대한 여러 가지 연구가 수행되어져 왔다 [17, 18, 24]. 하지만, PCR법 역시 검사하고자 하는 가검물 내에 대상으로 하는 병원체가 극소량만 존재하는 경우에는 특이한 nested PCR을 한번 더 수행해 주어야만 대상 유전자를 증폭할 수 있고 [5, 16], 그리고 증폭된 유전자의 크기와 그 염기서열을 분석하여 예상한 유전자가 선택적으로 증폭되었는가를 확인해 보아야 하는 번거로움이 아직까지도 남아 있다 [5, 16].

실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 최근의 PCR 방법으로서, 이는 형광 probe에 기초한 exonuclease 기법을 사용하기 때문에 크기가 작은 증폭산물의 검출에도 용이하다고 알려져 있다. 그리고 특이성과 민감성 모두 기존의 일반 PCR법 보다 크게 향상된 것으로 알려져 있으며, 진단에 소요되는 시간 또한 단축시켜 준다는 장점이 있다 [7, 11, 19, 20, 22, 23, 25, 28].

그러나 국내에서는 ICH에 대한 역학조사와 같은 체계적인 연구는 물론이고, PCR법 등을 이용한 진단법이 보고되지 않았다. 특히, 국내의 애완동물 진료에 담당하고 있는 임상수의사들에 의하면 CPV나 CDV 등은 신속한 진단을 내릴 수 있는 간이 검사 키트가 이미 상용

화되어 임상에 적용하고 있지만, ICH의 경우에는 신속히 진단할 수 있는 진단법이 확립되어 있지 않고 있다. 따라서 ICH에 대한 환자는 예방접종 여부와 같은 병력 청취나 임상증상, 그리고 임상병리학적 소견을 통한 추정진단에 전적으로 의존하고 있는 현실이기 때문에 진료에 어려움이 많다. 따라서 발병이 의심되는 경우에 즉시 진단을 내려야 하는 ICH와 같은 전염성 질병의 경우에는 신속하고 명확한 진단방법의 확립이 요구된다.

따라서 본 실험에서는 일반 동물병원으로부터 ICH로 의심되는 환자의 가검물을 의뢰받아 일반적인 PCR법과 TaqMan 시스템을 이용한 실시간 PCR법으로 ICH에 대한 진단을 수행하였고, 각각의 특이성, 신속성, 효율성, 그리고 민감성 등을 종합적으로 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료

2002년 9월부터 2003년 3월 동안 일반 동물병원으로부터 ICH로 의심되어 본 실험실에 의뢰된 61마리의 가검물을 실험에 공시하였다. 가검물로는 EDTA 항응고액이 처리된 신선한 혈액을 사용하였다. 특이도를 검사하기 위한 음성대조 DNA로서는 CAV-2, CDV, CCV, CPV, leptospira, parainfluenza, *Bordetella bronchiseptica*의 국내에서 유통되고 있는 백신주와 개 genomic DNA를 사용하였다. PCR에 사용할 genomic DNA는 의뢰된 혈액 샘플로부터 즉시 DNeasy™ 96 blood kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 200 µl의 혈액을 lysis buffer와 20 mg/ml의 proteinase K를 첨가하여 완전히 용해시킨 후에, DNeasy mini column을 이용하여 100 µl의 genomic DNA만을 회수하였다. 추출된 genomic DNA는 GeneQuant Pro spectrophotometer (Biochrom Ltd., England)를 이용하여 그 농도와 순도를 측정하였으며, PCR의 template DNA로 사용하였다. PCR을 위한 양성 대조로는 백신주(Daesung Microbiological Labs, Korea)를 사용하여, 앞서 수행한 동일한 방법으로 추출하였다.

Primer와 Probe 제작

PCR을 위한 대상 유전자는 CAV-1의 E3 ORFA 유전자(GenBank accession No. M60937)를 대상으로 선정하였다 [11, 21]. 이를 위하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공되는 Blast search를 통하여 유사염기 서열을 추출한 후 MultAlin program [9]을 이용하여 분석하였다. 또한, 분석된 자료를 ABI Primer Express program(PE Applied Biosystems version 1.5, USA)을 이용하여 적합한 부분의 primer와

probe를 선정하였다. 그 결과, 예상되는 증폭산물이 E3 ORFA 151 bp의 크기가 되도록, CAV1-E3F (5'-CACATGCCACATAAGCGAAA-3')와 CAV1-E3R(5'-CATACGGCATCTGGTGGCAGT-3') primer를 제작하였다(Genotech, Korea). 또한, TaqMan PCR을 위하여 CAV1-E3P(5'-6FAM-TTTCCAAGGATGGCCTATACATCGCCA-TAMRA-3') probe를 제작하였다. FAM(6-carboxyfluorescein)과 TAMRA(6-carboxytetramethylrhodamine)는 각각 reporter와 quencher dye로서 탐식자의 양말단에 부착하였다.

중합효소연쇄반응

PCR의 반응액으로는 총 20 µl 내에 SuperTaq 10× Reaction buffer I과 II, 2.5 mM의 dNTP, 각각 10 pmol의 HeT-F와 -R primer, 2.5 U의 Taq DNA polymerase(Super Bio Co., Ltd, Korea), 그리고 앞서 추출된 100 ng의 template DNA를 첨가하였다. 반응조건으로는 pre-denaturation을 95°C에서 5분간 1회 수행한 후에, denaturation과 annealing, polymerization을 각각 95°C에서 1분간, 56°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 40회 수행하였다. 그리고 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다. 유전자 증폭기로는 PTC-200 thermocycler(MJ Research, Waltham, USA)을 사용하였다.

증폭된 유전자 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하여 분리하였고, ethidium bromide(EtBr, Sigma, St Louis, MO)로 DNA의 염색을 실시하였다. PCR 증폭 여부와 증폭산물의 크기는 still video documentation system(Gel Doc 2000, Bio Rad, USA)을 이용하여 관찰하였고, DNA size marker로는 100 bp DNA ladder (Genepia, Korea)로 사용하였다.

유전자 클로닝 및 염기서열 분석

증폭된 유전자는 QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 PCR 산물을 추출하였다. 추출된 DNA를 pGEM-T easy(Promega, USA) vector에 결합시켰다. 또한 PCR 검출 시 표준균주로부터 증폭시킨 CAV-1의 E3 ORFA 유전자 또한 pGEM-T easy vector를 이용하여 재조합 plasmid DNA를 구축한 후, 양성 대조군으로 공시하였다(Fig. 1).

이에 형성된 재조합 plasmid를 TOP10F' *E. coli* competent cells 내에 삽입하여 형질전환 시켰다. 재조합 클론은 선택 표지인 ampicillin(50 µg/ml)을 이용하여 선별하였으며, 재조합 plasmid DNA는 alkaline lysis 방법에 준하여 plasmid mini prep kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였다. 유전자 염기서열은 dideoxy chain termination 방법에 준하여 automatic sequencer (ABI

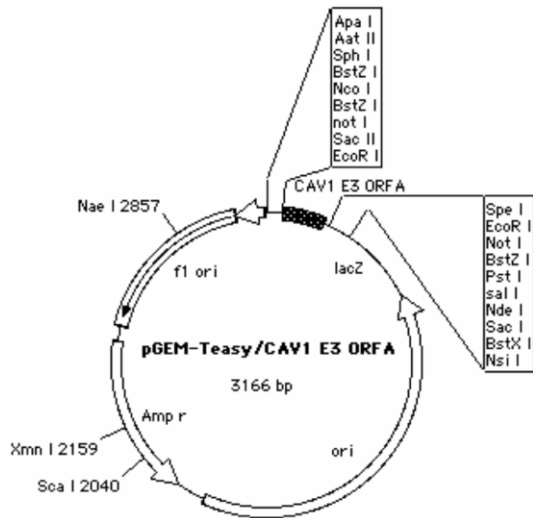


Fig. 1. Plasmid map of pGEM-Teasy/E3ORFA with infectious canine hepatitis E3 ORFA gene fragment.

prism® 377, Applied Biosystem, USA)와 ABI Prism Sequence analysis software(version. 2.1.1)를 이용하여 분석하였다. 또한, 분석된 유전자 염기서열은 BLAST network service를 이용하여 비교하였다.

TaqMan real-time PCR

TaqMan 실시간 PCR을 위한 반응액은 총 25 µl에 각각 10 pmol의 CAV1-E3F와 CAV1-E3R primer, 2.5 µmol의 probe, TaqMan Univ. PCR Master Mix(Perkin Elmer, USA), 그리고 앞서 추출된 100 ng의 template DNA를 혼합하여 사용하였다. 실시간 유전자 증폭기는 7700 Sequence Detector(SDS 7700, ABI Prism, USA)를 사용하였으며, 50°C에서 2분(uracil N-deglycosylase digest), 95°C에서 15초, 55°C에서 1분 20초간 총 40 cycle을 수행하였다. 증폭 결과는 Sequence Detector (Ver. 1.7, ABI, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

CAV-1 진단을 위한 CAV1-E3 primer의 특이성

ICH를 진단하기 위하여 제작된 CAV1-E3 primer 쌍이 CAV-1에만 특이적으로 반응하는 지를 알아보기 위하여 먼저 CAV-1과 CAV-2에 대한 비교를 위한 PCR 반응에 있어서 CAV-1에서만 증폭된 밴드를 확인할 수 있었으며, 3개의 대조용 CAV-2와 2개의 *B. bronchiseptica*에 있어서는 전혀 증폭산물을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

개에서 주로 발병하는 바이러스성 질병의 병원체 중,

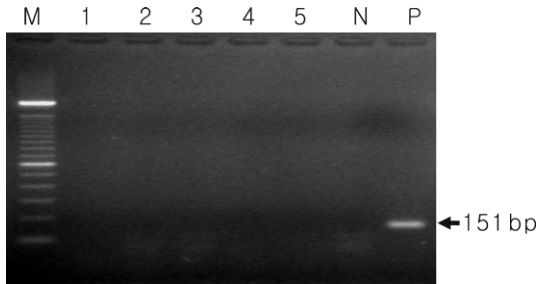


Fig. 2. Specificity of canine adenovirus type 1 E3 ORFA primers used for conventional. M: 100 bp DNA ladder, lane 1: canine adenovirus type 2 (CAV-2) 1, lane 2: CAV-2 2, lane 3: CAV-2 3, lane 4: *Bordetella bronchiseptica* 1, lane 5: *B. bronchiseptica* 2, lane N: canine genomic DNA, lane P: positive control(CAV-1).

CDV, CCV, CPV, leptospira, parainfluenza 그리고 정상 개 혈액 유전자로부터 각각 DNA를 추출한 후에 일반 PCR과 TaqMan 실시간 PCR을 수행한 결과, 일반적인 PCR과 TaqMan 실시간 PCR 모두에서 CAV-1만 특이적으로 ICH 유전자 단편만을 증폭할 수 있었으며, 대조군으로 사용한 원인체 DNA에서는 각각의 PCR 모두에서 증폭하지 않았다(Fig. 3).

일반 PCR과 TaqMan 실시간 PCR의 검출 민감성

ICH 검출을 위한 일반 PCR 법과 TaqMan 실시간 PCR 법과의 민감성을 비교 분석하기 위하여 앞서 구축된 pGEM T easy/CAV1 E3 ORFA plasmid (Fig. 1) DNA를 10^9 부터 10^0 copy 까지 연속적으로 10배씩 희석한 후, PCR의 Template DNA로 각각 사용하였다. 그 결과 일반 PCR을 이용한 진단법에서는 10^3 copy의 plasmid DNA를 첨가한 부분까지 CAV-1 E3 ORFA 유전자가 증폭되었다(Fig. 4A). 한편, 실시간 PCR을 이용한 진단법에서는 1 copy까지 E3 ORFA 유전자가 증폭되었는데, 10^9 copy를 첨가한 반응액에서는 15 cycle부터 형광색소를 감지하여 E3 ORFA 유전자가 증폭되었고, 1 copy를 첨가한 반응액에서는 33 cycle부터 E3 ORFA 유전자가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 따라서 TaqMan 실시간 PCR을 이용한 진단법이 일반 PCR을 이용한 진단법 보다 약 1,000배 정도 민감성이 높은 것을 알 수 있었다.

임상시료에서의 CAV-1 유전자 검출 효율성

일반 동물병원으로부터 ICH로 의심되어 의뢰된 61마리의 혈액에서 추출된 DNA로부터 CAV-1의 특이 유전자 검출을 실시하였다. 그 결과, 총 61개의 시료 중 일반 PCR을 이용한 진단법에서는 18개(29.5%)에서,

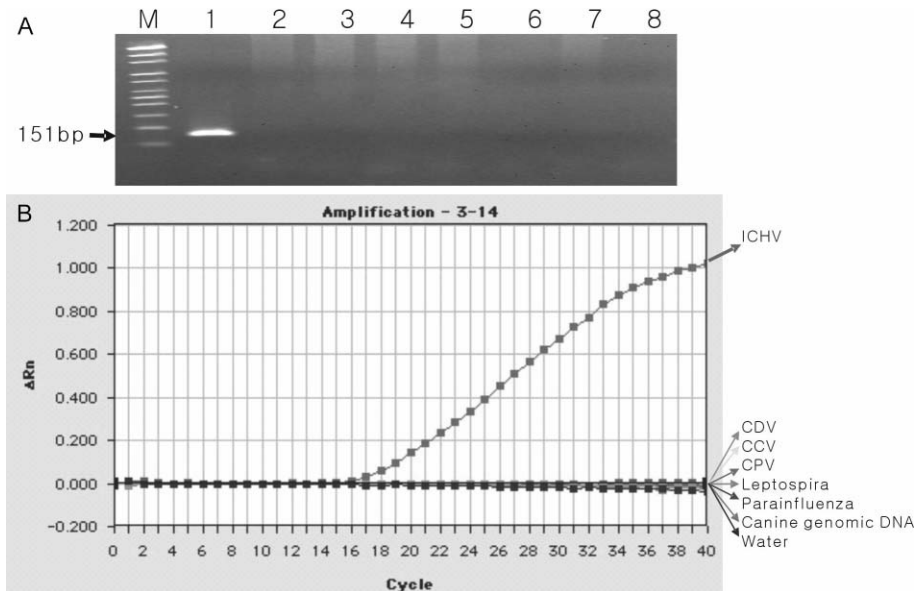


Fig. 3. Specificity of canine adenovirus type 1 E3 ORFA primers used for conventional and TaqMan real-time PCR. A: Specificity tested by conventional PCR. M: 100 bp DNA ladder, lane 1: infectious canine hepatitis virus (ICHV), lane 2: canine distemper virus (CDV), lane 3: canine coronavirus (CCV), lane 4: canine parvovirus (CPV), lane 5: leptospira, lane 6: parainfluenza, lane 7: canine genomic DNA, lane 8: water control. B: specificity test by TaqMan real-time PCR.

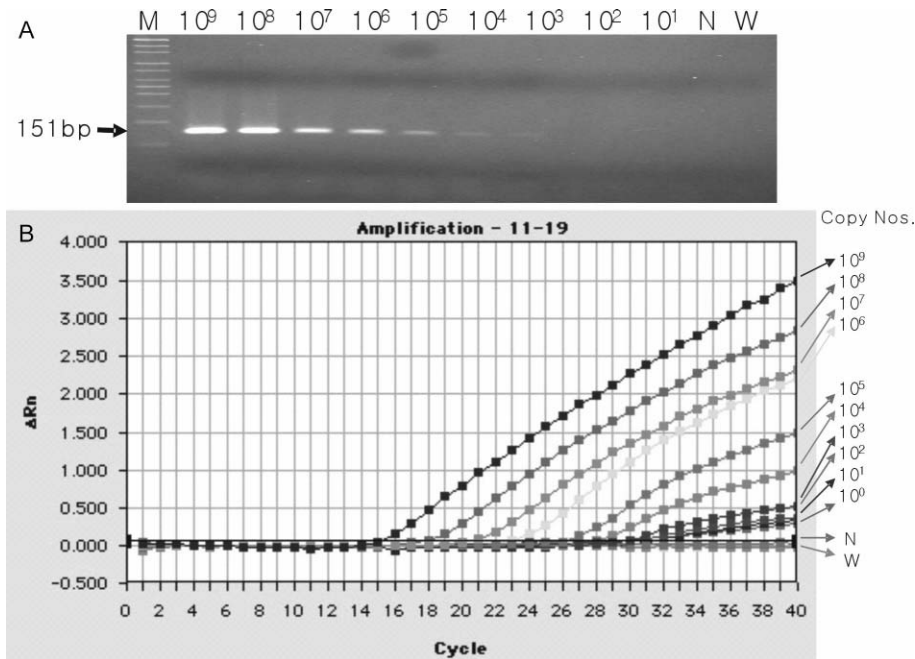


Fig. 4. Comparison of sensitivity of conventional PCR and Real-time TaqMan PCR for detection of infectious canine hepatitis virus. A: Amplification of CAV-1 E3 ORFA gene using conventional PCR with 10-fold serial dilution of plasmid DNA template. Serial dilutions were made using adenovirus plasmid DNA by cloning. A minimum of 10^3 copy of DNA could be detected after 40 cycles. B: Standardization of Adenovirus E3 ORFA gene in the TaqMan real-time PCR assay. Serial dilutions were made using Adenovirus plasmid DNA by cloning. A minimum of 1 copy of DNA could be detected after 40 cycles. The intensity of fluorescence is given on the y axis (ΔRn =reporter signal [FAM]/passive reference signal [TAMRA]).

Table 1. Comparison of conventional and TaqMan real-time PCR methods for detection of infectious canine hepatitis virus from canine bloods ($P < 0.005$)

Number of blood samples	Amplified by conventional PCR	Amplified by TaqMan real-time PCR
61	18(29.5%)	23(37.7%)

TaqMan 실시간 PCR을 이용한 진단법에서는 23개 (37.7%)에서 CAV-1 E3 ORFA 유전자의 증폭이 관찰되었다(Table 1). 따라서 TaqMan 실시간 PCR을 이용한 ICH 진단법이 일반 PCR을 이용한 진단법 보다 8.2% 정도 진단의 효율성이 높은 것을 알 수 있었다($P < 0.05$).

또한, 혈액 시료에서 일반 PCR법과 TaqMan 실시간 PCR법의 CAV-1에 대한 검출의 민감도를 비교해 보았다. 먼저, 임상 시료를 대상으로 한 실험에서 PCR 양성 반응을 나타낸 두개의 시료를 선별하여 추출된 DNA를 10배씩 연속적으로 희석하여 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 부터 $1 \text{ fg}/\mu\text{l}$ 로 조정하였다. 이를 가지고 각각 PCR을 수행하여 본 결과, 일반 PCR에서는 각각 1 ng에서 100 pg 까지, TaqMan

실시간 PCR에서는 10 fg 까지 CAV-1 E3 ORFA 유전자가 증폭되었다(Fig. 5). 따라서 앞서와 마찬가지로, 가검물을 대상으로 한 ICH 진단법도 TaqMan 실시간 PCR법이 일반 PCR법 보다 약 1,000배에서 10,000배 정도의 민감성이 높은 것을 알 수 있었다.

고 찰

전염성 질병의 경우에는 발병 즉시, 신속하고 명확한 진단을 통하여 즉각적인 처치를 수행함으로써 질병으로 인한 피해를 최소화 할 수 있다. ICH와 같이 전염성이 높은 질병에 대해서는 그 병원체에 대한 특이적이고, 신속하게 진단할 수 있는 진단법이 확립되어 있다면 정확한 진단에 도움이 될 것이다. 근래에 개발되어 아직까지도 꾸준히 연구되고 있는 PCR을 이용한 진단법은 그 특이성과 민감성, 그리고 신속성이 기존에 사용되어진 혈청학적 방법이나 생화학적 방법을 이용한 진단법보다 효과적이며, 바이러스 항원을 검출한다는 데 의미가 있다 하겠다 [4, 5, 15]. 특히, 가검물에 존재하는 병원체의 수가 낮은 경우나 병원체의 분리가 까다로운 경우에서

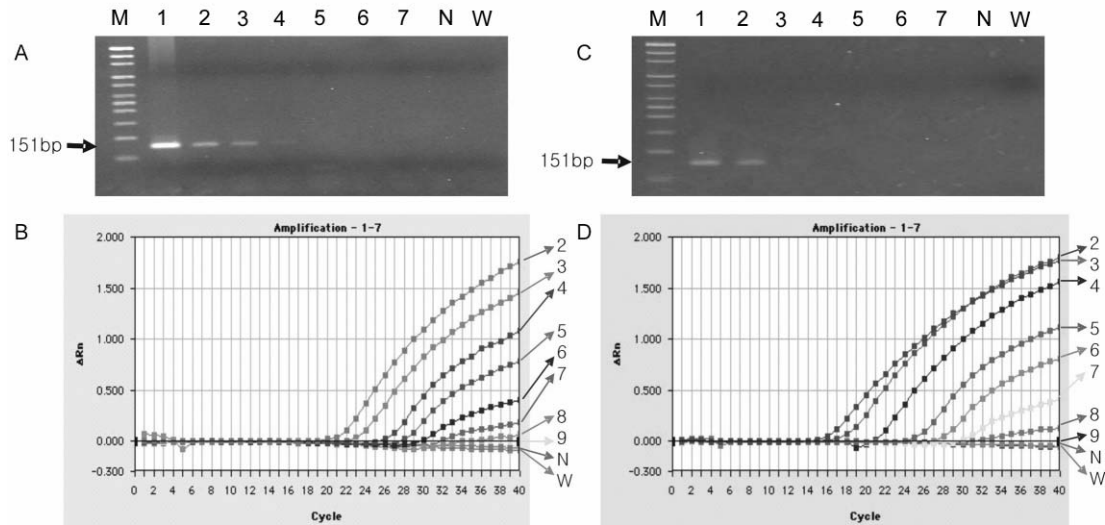


Fig. 5. Amplification of canine adenovirus type 1 E3 ORFA gene using conventional PCR and real-time TanMan PCR with 10-fold serial dilution of template DNAs from two clinical positive samples (A and B, sample 1; C and D, sample 2). A: A minimum of 100 pg (lane 4) of DNA could be detected by conventional PCR. C: A minimum of 1 ng (Lane 3) of DNA could be detected by conventional PCR. B and D: A minimum of 10 fg (lane 8) of DNA could be detected. The intensity of fluorescence is given on the y axis(ΔRn =reporter signal[FAM]/passive reference signal[TAMRA]). Lane 1, 100 ng/ μ l; lane 2, 10 ng/ μ l; lane 3, 1 ng/ μ l; lane 4, 100 pg/ μ l; lane 5, 10 pg/ μ l; lane 6, 1 pg/ μ l; lane 7, 100 fg/ μ l; lane 8, 10 fg/ μ l; lane 9, 1 fg/ μ l; lane N, negative control; lane W, water control.

도 PCR을 적용한 진단법이 기존의 방법을 적용한 진단법에 비하여 월등히 높은 검출성적을 나타낸다고 보고되어져 있다 [5, 16]. 이러한 이유로 이미 외국에서는 주요 전염성 병원체에 대하여 일반 PCR과 실시간 PCR을 이용한 진단법이 활발히 연구되어 오고 있다 [7, 11, 19, 23, 25, 28]. 그러나 ICH에 대한 실시간 PCR법이 아직까지 연구되어지지 않는 상태이며, 더욱이 우리나라에서는 이러한 방법들을 이용한 ICH의 진단법이 전혀 수행되고 있지 않다.

ICH 만을 특이적으로 진단하기 위하여 이번에 제작된 E3 ORFA primer 쌍은 일반 PCR과 실시간 PCR 모두에서 CAV-1에만 특이적으로 반응을 하였고, 대조군으로 사용한 CDV, CCV, CPV, leptospira, parainfluenza와는 전혀 반응을 하지 않았다. 이러한 결과로 보아, E3 ORFA primer 쌍을 이용한 PCR법은 ICH와 같은 전염성 질병에 대한 진단의 특이성이 매우 높다는 점을 확인할 수 있었으며, ICH에 대한 일반 및 실시간 PCR 진단법을 확립할 수 있게 되었다.

한편, 일반 PCR법은 반응이 끝난 증폭 산물을 agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후에 EtBr 염색을 하고, 다시 UV transilluminator 상에서 관찰해 주어야 하는 번거로운 과정을 거쳐야만 반응여부를 판정할 수 있었으나, 실시간 PCR법은 증폭된 산물을 Sequence Detector(Ver.

1.7, ABI, USA) 프로그램을 이용하여 곧바로 컴퓨터 모니터 상에서 확인할 수 있게 되었다 [11, 19, 23, 28]. 따라서 실시간 PCR법은 기존의 PCR법에서 반드시 거쳐야만 하는 번거로운 과정을 생략할 수 있기 때문에 훨씬 더 신속하게 반응여부를 파악할 수 있게 되었으며, 또한 증폭되는 유전자가 반응액에 첨가되는 probe와도 2중으로 반응을 하여야만 검출될 수 있다는 특징 때문에 그 진단의 특이성이 훨씬 높아졌다고 할 수 있겠다 [11, 19, 23, 28].

이번 실험에서는 일반 PCR과 실시간 PCR의 ICH에 대한 검출의 민감성과 신속성, 그리고 효율성을 비교 분석해 본 결과 실제적으로 실시간 PCR법을 적용한 경우에는 DNA 추출부터 반응 종료까지 약 3시간 정도 내에 ICH에 대한 감염여부를 확인할 수 있었기 때문에, 기존의 PCR법 보다 약 절반정도의 시간만이 소요되는 것을 알 수 있었다. 따라서 진단의 신속성이 시급히 요구되는 전염성 질병의 경우에는 기존의 PCR법 보다 실시간 PCR법이 보다 더 유용하다고 할 수 있겠다. 또한, ICH의 표준균주로부터 구축된 plasmid DNA를 이용한 민감성의 비교 분석에서도, 실시간 PCR을 이용한 진단법이 일반 PCR을 이용한 진단법 보다 약 1,000배 정도의 민감성이 높다는 점도 알 수 있었다.

또한, 전북지역의 동물병원으로부터 ICH로 의심되어

실험실에 의뢰된 61개의 임상 시료를 이용하여, 앞서 확립된 ICH에 대한 PCR 진단법의 효율성을 비교 분석해 보았다. 그 결과, 실시간 PCR을 이용한 ICH 진단법이 일반 PCR법 보다 진단의 효율성이 약 8% 정도 높은 것 ($P<0.05$)을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞서 얻어진 PCR 기법에 따른 진단의 민감성 차이가 가검물의 검출 효율성에 영향을 미치는 것으로 생각되어졌다. 따라서 공시된 가검물 중 양성반응을 나타낸 2개를 선택하여 각각의 PCR 진단법에 대한 민감성을 직접 비교 분석해 보았다. 그 결과, 일반 PCR에서는 각각 1 ng에서 100 pg의 DNA까지, 실시간 PCR에서는 100 fg의 DNA까지 CAV-1의 유전자가 증폭되었다. 즉, 가검물에 대한 ICH 진단의 민감성 비교에서도 실시간 PCR법이 일반 PCR법 보다 약 1,000배에서 10,000배 정도로 높은 것으로 밝혀졌기 때문에, 앞서 밝혀진 가검물에 대한 진단의 효율성이 차이가 나타나는 것으로 사료된다.

ICH는 CDV와 혼합 감염되는 경우나 또는 ICH와 임상증상이 유사하게 나타나는 CDV 감염의 경우에는 임상증상 만을 가지고 감별진단이 매우 어려운 상황이었으나, 본 진단법을 이용한다면 빠른 시간 내에 정확한 감별진단을 할 수 있을 것으로 생각한다.

결론적으로, 가검물 내에 검출하고자 하는 병원체의 수가 소량이거나 병원체만을 순수하게 분리한 후 PCR을 수행할 수 없을 때, 가검물로부터 병원체를 직접 진단해야 하는 경우에는 기존의 적용해 오던 PCR법 보다 실시간 PCR법을 적용하는 것이 ICH의 진단에 더욱 효과적이라고 생각된다. 따라서 이러한 방법을 적용한 진단법을 임상에서도 상용화시켜 나간다면, 이를 통하여 얻어지는 신속하고 정확한 진단으로 임상수의사들이 보다 정확한 진료를 행할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

개 전염성 간염에 대한 효과적인 진단법을 확립하기 위하여 TaqMan 실시간 PCR법과 일반 PCR법에 대한 각각의 효율성을 비교 분석하였다. 이를 위하여 CAV-1에 특이적으로 반응하도록 E3 ORFA primer 쌍을 설계하였고, 일반 PCR과 TaqMan 실시간 PCR을 수행하여 보았다. 그 결과, E3 ORFA primer 쌍은 각각의 PCR에서 대조군으로 사용한 CDV, CPV, CCV, leptospira, parainfluenza, *B. bronchiseptica* 그리고 정상 개의 유전자는 전혀 증폭되지 않았지만 특이적으로 ICH의 원인체인 CAV-1에서만 증폭한 점으로 보아 ICH의 진단에 특이적인 primer 쌍임을 알 수 있었다. 그리고 CAV-1 검출에 대한 각각의 민감성을 비교 분석해 본 결과, 실시간 PCR법이 일반 PCR법 보다 약 1,000배 정도로 검출

의 민감성이 높은 것을 알 수 있었다. 또한, 일반 동물 병원으로부터 ICH로 의심되어 의뢰된 61마리의 혈액 시료에서 CAV-1의 검출을 각각 수행하여 비교하여 본 결과, 일반과 실시간 PCR법에서 각각 18개(29.5%)와 23개(37.7%)에서 양성반응을 보여 TaqMan 실시간 PCR법이 일반 PCR법 보다 8.2% 정도의 진단 효율성이 높은 것을 알 수 있었다($P<0.05$). 한편, 가검물에서 추출된 DNA로 ICH에 대한 검출의 민감성을 각각 비교해 보았다. 그 결과, 가검물을 대상으로 한 ICH 진단의 민감성도 TaqMan 실시간 PCR법이 일반 PCR법 보다 약 1,000배에서 10,000배 정도 높은 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아, ICH의 정확한 진단을 위해서는 일반 PCR법 보다 TaqMan 실시간 PCR법이 더욱 신속하고, 민감하며, 그리고 효과적인 진단 방법임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Appel, M. J. Canine adenovirus type 1(infectious canine hepatitis virus). In: Horzinek, M. C.(series ed.), Virus infectious of vertebrates, Vol. I. Virus infections of carnivores, p. 29-43, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987.
2. Cabasso, V. J. Canine viruses. II. Infectious canine hepatitis and rabies control. Southwest. Vet. 1953, **6**, 137-141.
3. Cabasso, V. J. Infectious canine hepatitis virus. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1962, **101**, 498-514.
4. Chen, W., Martinez, G. and Mulchandani, A. Molecular Beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. Anal. Biochem. 2000, **280**, 166-172.
5. Chouinard, L., Martineau, D., Forget, C. and Girard, C. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. J. Vet. Diagn. Invest. 1998, **10**, 320-325.
6. Cooney, M. K. Adenoviruses. pp. 135-146, In E. H. Lennette, ed., Laboratory diagnosis of viral infectious. Marcel Dekker, New York. 1985.
7. Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Jones, V. E., Kaczmarek, E. B. and Fox, A. J. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. J. Clin. Microbiol. 2000, **38**, 1747-1752.
8. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 1988, **16**, 10881-10890.

9. **Craig, E. G.** Infectious canine hepatitis and canine acidophilic cell hepatitis. In: Craig, E. G. (Edied.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. p. 242-250. Saunders, Philadelphia, 1990.
10. **Darai, G., Rosen, A., Delius, H. and Flugel, R. M.** Characterization of the DNA of canine adenovirus by restriction enzyme analysis. Intervirology. 1985, **23**, 23-28.
11. **Desjardin, L. E., Chen, Y., Perkins, M. D., Teixeira, L., Cave, M. D. and Eisenach, K. D.** Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1998, **36**, 1964-1968.
12. **Dragulev, B. P., Sira, S., Abouhaidar, M. G. and Campbell, J. B.** Sequence analysis of putative E3 and fiber genomic regions of two strains of canine adenovirus type 1. Virology. 1991, **183**, 298-305.
13. **Green, C. E.** Infectious canine hepatitis. In: Green, C. E. (ed.), Infectious Diseases of the Dog, and Cat. pp. 242-251. Saunders, Philadelphia, 1990.
14. **Horwitz, M. S.** Adenoviral diseases. In B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope. eds., Virology. pp. 477-495. Raven Press, New York. 1985.
15. **Hervas, J., Gomez-Villamandos, J. C., Perez, J., Carrasco, L. and Sierra, M. A.** Focal mesangial-sclerosing glomerulonephritis and acute-spontaneous infectious canine hepatitis: structural, immunohistochemical and subcellular studies. Vet. Immunol. Immunopathol. 1997, **57**, 25-32.
16. **Hu, R. L., Huang, G., Qiu, W., Zhong, Z. H., Xia, X. Z. and Yin, Z.** Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. Vet. Res. Commun. 2001, **25**, 77-84.
17. **Kiss, I., Matiz, K., Bajmoci, E., Rusvai, M. and Harrach, B.** Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction. Acta. Vet. Hung. 1996, **44**, 253-258.
18. **Kobayashi, Y., Ochiai, K. and Itakura, K.** Dual infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in a dog. J. Vet. Med. Sci. 1993, **55**, 699-701.
19. **Lyon, W. J.** TaqMan PCR for Detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in Pure Cultures, Raw Iysters, and Synthetic Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 2001, **67**, 4685-4693.
20. **Ma, L., Bluysen, H. A. and De Raeymaeker, M.** Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. J. Virol. Methods. 2001, **93**, 181-188.
21. **Morrison, M. D., Onions, D. E. and Nicolson, L.** Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1. J. Gen. Virol. 1997, **78**, 873-878.
22. **Nlesters, H. G. M., Park, D. S., Lee, Y. J., Cho, J. H., Lappalainen, M. and Chae, J. S.** Hepatitis B virus DNA assay using TaqMan PCR system. Korean J. Lab. Med. 2002, **22**, 246-252.
23. **Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. and Lillehaug, D.** Application of 5'-nuclease PCR assay for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. Appl. Environ. Microbiol. 2000, **66**, 4266-4271.
24. **Pratelli, A., Martella, V., Elia, G., Tempesta, M., Guarda, F., Capucchio, M. T., Carmichael, L. E. and Buonavoglia, C.** Severe Enteric Disease in an Animal Shelter Associated with Dual Infections by Canine Adenovirus Type 1 and Canine Coronavirus. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health 2001, **48**, 385-392.
25. **Pusterla, N., Chang, C. C., Chomel, B. B., Chae, J. S., Foley, J. E., DeRock, E., Kramer, V. L., Lutz, H. and Madigan, J. E.** Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California. J. Wildl. Dis. 2000, **36**, 494-499.
26. **Rubarth, S.** An acute virus disease with liver lesions in dogs (hepatitis contagiosa canis). A pathologico-anatomical and aetiologic investigation. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1947, **24**, 1-222.
27. **Sasaki, N., Nakai, M., Iwamoto, I., Konishi, S. and Ikegami, T.** Studies on infectious hepatitis of dogs. II. The distribution of the disease in Japan, and its immunization. Jpn. J. Vet. Sci. 1956, **18**, 113-118.
28. **Vishnubhatla, A. D., Fung, Y. C., Oberst, R. D., Hays, M. P., Nagaraja, T. G. and Flood, S. J. A.** Rapid 5' Nuclease(TaqMan) Assay for Detection of Virulent Strains of *Yersinia enterocolitica*. Appl. Environ. Microbiol. 2000, **66**, 4131-4135.
29. **Whetstone, C. A., Draayer, H. and Collins, J. E.** Characterization of canine adenovirus type 1 isolated from American black bears. Am. J. Vet. Res. 1988, **49**, 778-780.
30. **Willis, A. M.** Canine viral infectious. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 2000, **30**, 1119-1133.