

한국 재래 산양의 전염성 농피성 피부병에서 orf virus의 검출과 B2L 유전자를 통한 계통발생학적 분석

박진호 · 김국중* · 최 욱 · 김은하 · 한재철** · 어성국 · 이준화 · 조매림 · 송희종 · 채준석¹

전북대학교 수의과대학, 생체안전성 연구소

*김동물병원

**전라북도 축산진흥연구소 익산지소

Molecular Detection and Characterization of Orf Virus from Outbreak of Contagious Pustular Dermatitis in Korean Indigenous Goats

Jin-ho Park, Guk-jung Kim*, Euk Choi, Eun-ha Kim, Jae-cheol Han**, Sung-kook Eo, John-hwa Lee, Mae-rim Cho, Hee-jong Song and Joon-seok Chae¹

College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

*Kim's Animal Clinic, Hwangdeung, Iksan, Jeonbuk 570-814, Korea

**Livestock Development and Research Institute, Iksan branch, Jeonbuk 570-390, Korea

Abstract : Orf virus (ORFV), a member of genus Parapoxvirus (family-Poxviridae), a causative agent of contagious ecthyma in sheep and goat leading to a condition commonly known as vesicular dermatitis. Recently, twelve goats from Iksan in Jeonbuk province were observed with clinical signs like necrotic vesicular lesions around the mucosa of mouth, nasal cavity, eye, ear, teats, abdomen and groin. Based on these clinical symptoms, contagious ecthyma infection was suspected. The skin scrapping was collected from lesions for isolation of DNA and subsequent PCR amplification of ORFV specific 235 bp region of B2L gene. All of the samples were found positive by PCR analysis. Sequencing and further phylogenetic analysis of the PCR product revealed 100% identity to Japan isolate of ORFV (Okinawa, GenBank accession number AB080769), and showed 99.6% of similarity to New Zealand strain (NZ-2, GenBank accession number U06671). It was concluded that ORFV strain detected in the present study is homologous to Japan isolate and New Zealand strain. The PCR test based on amplification of B2L gene is a highly useful tools for rapid and specific diagnosis of contagious ecthyma.

Key words : Orf virus, contagious ecthyma, B2L gene, PCR amplification, phylogenetic tree.

서 론

산양이나 면양 등에 주로 발병하는 전염성 농피성 피부염 (contagious pustular dermatitis; CPD, 또는 contagious ecthyma) 은 Poxviridae, Parapoxvirus속에 속하는 orf virus(ORFV)에 의하여 유발되는 급성 전염성 질병이다^{8,15,21}. 면양을 사육하는 나라에서는 이 질병이 다발되기 때문에 목축업에 커다란 피해를 유발하는 것으로 잘 알려져 있으며^{1-2,9,20,23,26}, 일본과 우리나라의 산양에서도 그 발생이 인정되고 있다^{13,14,18,25}.

CPD는 orf virus에 오염된 토양이나 기구로부터 경구적으로 또는 피부의 창상이나 좌상을 통한 경피적으로 virus가 직접 전파되어 형성된다⁷. ORFV는 상피친화성을 가진 double-strand DNA virus로서, 건조와 열과 같은 자연환경에도 저항성이 높아 그 근절이 어려운 것으로 알려져 있다^{13,21,26}. CPD의 임상증상으로는 감염 동물의 구강점막, 비강점막, 유

두, 지간 부위에 홍반, 수포나 농포의 형성, 궤양 등의 특징적인 병변이 나타난다고 보고되어 있다^{5-6,9,22}. 그리고 4-5개월령의 어린 면양이나 산양에서 중증의 임상증상이 나타나며, 질병의 발현 또한 오래 지속된다고 알려져 있다³.

CPD의 진단으로는 병변부위의 가검물에서 ORFV의 분리, 전자현미경을 이용한 virus 입자의 관찰, 그리고 혈청학적인 검사법 등을 통하여 진단을 실시해왔으며^{4,10,28}, 최근 들어 ORFV의 특이적인 유전자만을 증폭시켜 진단하는 중합효소 연쇄반응법에 의한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{11,16,27}. 한편, CPD의 예방법으로는 생백신을 이용하여 실시하면 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있으며⁹, 유전자 재조합 백신에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다¹⁷.

현재 국내 산양의 사육형태는 소규모에서 대규모의 집단적 사육형태로 변모하고 있지만, 이 질병에 대한 홍보나 예방법 등에 대한 사양가의 인식은 전무한 상태이다. 또한, 급성 전염성 질병인 전염성 농피성 피부염에 대한 신속한 진단법, 방역체계, 그리고 병인론 등에 대한 연구 또한 전혀

¹Corresponding author.
E-mail : jschae@chonbuk.ac.kr

이루어지지 않고 있는 실정이다.

최근 전북지역의 한 농가에서 사육중인 산양의 전 두수(12두)에서 CPD의 전형적인 임상증상이 관찰되었다. 이에 본 연구자 등은 분자 유전학적인 방법인 PCR법을 이용하여 신속하고 정확하게 진단을 수행하였고, 증폭된 유전자의 염기서열을 토대로 계통발생학적인 관계를 규명하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

전염성 농피성 피부염 발생

2003년 5월, 전북 익산지역의 한 농가에서 사양 중인 재래 산양의 전 두수인 12두에서 구강주위와 비강점막 등에 출혈성 수포나 농포와 같은 전염성 농피성 피부염의 전형적인 병변이 관찰되었다(Fig 1). 이번 증례에서 관찰된 증상으로는

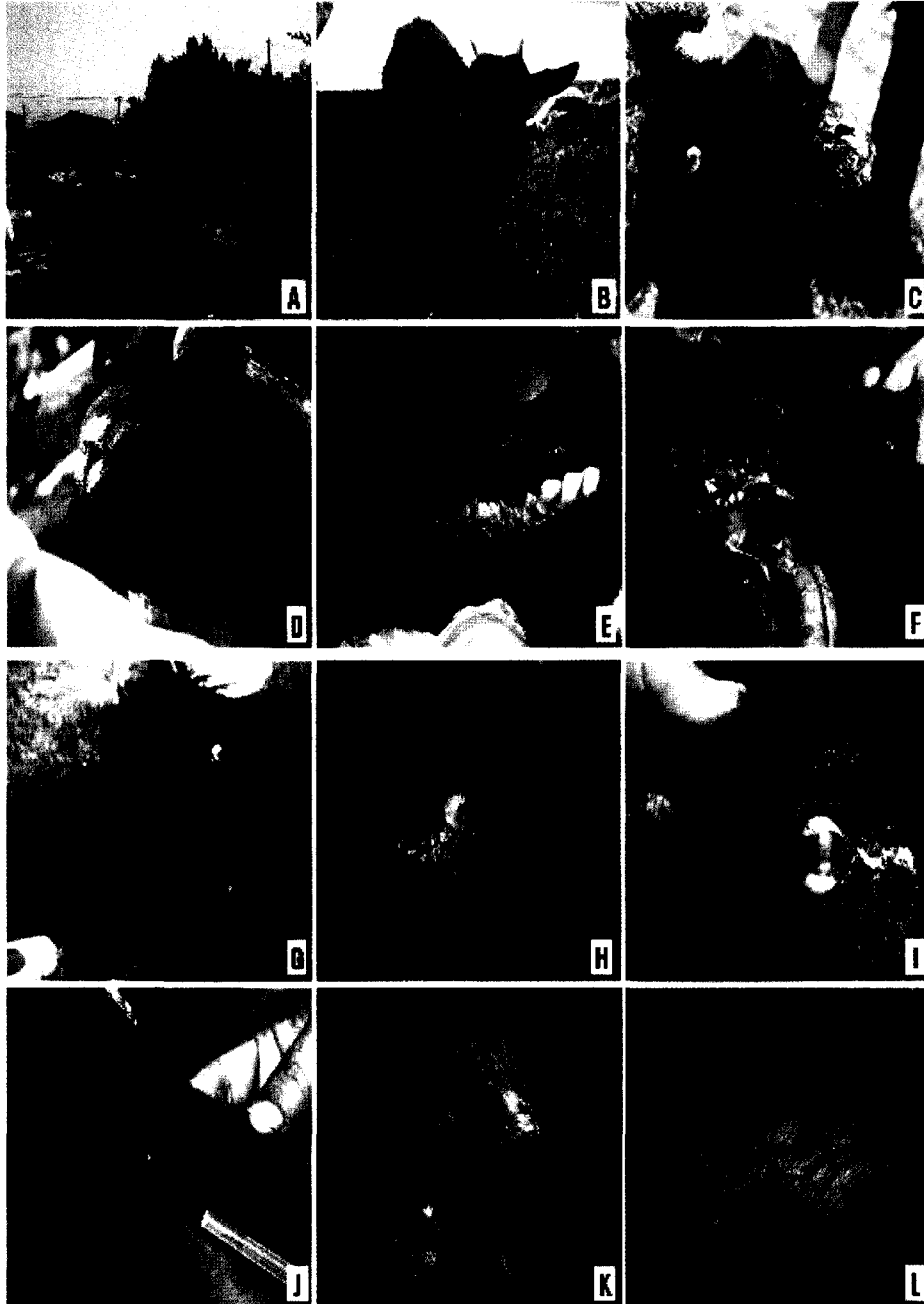


Fig 1. Clinical symptoms of orf virus infected Korean indigenous goats. A: Farm located in Iksan, Jeonbuk province, B: Hemorrhage around the mouth and nose, C: Necrotic vesicular lesions around lip and nasal cavity, D: Hemorrhagic vesicular lesions of nasal cavity, E: Vesicular lesions in mucosa of oral cavity, F: Hemorrhagic vesicular lesions on mucosa of oral cavity, G: Hemorrhage in nose and corneal opacity, H: Edema and opaqueness on cornea of eye, I: Corneal hemorrhagic opaqueness in eye, J: Vesicular lesion in the ear, K: Vesicular lesion around teat, L: Hemorrhagic vesicular lesion in groin.

입과 코 주위의 출혈, 구강과 비강내 점막의 수포성 병변이나 출혈성 수포, 그리고 유두나 복부, 귀 부위의 수포성 병변 등이 주요 증상으로 관찰되었다. 또한, 임상증상이 심한 염소에서는 안구의 혼탁과 부종이 앞의 증상과 동반되어 관찰되었다. 이환된 동물은 대증 요법으로서 penicillin과 kanamycin을 4-5일 동안 처치한 결과 모두 완치되었다.

효소중합연쇄반응

병변 조직으로부터 병원체(ORFV)의 유전자를 직접 증폭하기 위하여 출혈성 수포가 발생한 구강주위, 비강점막, 유두 부위 등의 병변조직을 각각 절제한 후, 1.5 ml의 Eppendorf tube 내에서 분쇄하였다. DNA의 추출은 QIamp Tissue Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 실시하였고, GeneQuant pro-spectrophotometer(Biochrom Ltd., England)를 이용하여 추출된 DNA의 농도와 순도를 측정하였다. 추출된 DNA는 -20°C에서 보관하면서, PCR의 template DNA로 사용하였다.

ORFV N2 strain의 B2L gene에 특이적으로 반응할 수 있도록 primer express software program(PE Applied Biosystems, USA)을 이용하여 각각의 primer를 설계하였다. 예상되는 semi-nested PCR의 최종 증폭산물의 크기는 235 bp가 되도록 조정하였다. PCR은 PTC-200 Thermal cycler(MJ Research, Waltham, USA)를 이용하였다.

1차 PCR에 사용한 primer로는 B2L-F1(5'-GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT-3')와 B2L-R(5'-TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT-3')를 사용하였다¹¹. 총 50 µl의 반응액 내에 5 µl의 10X PCR buffer, 2.5 mM의 dNTP, 2.5 U의 Taq-polymerase(Promega, USA), 각각 5 pmole의 primer를 혼합하였다, 그리고 조직으로부터 추출된 200 ng의 DNA를 template로 첨가하였다. 반응조건으로는 pre-denaturation을 94°C에서 9분간 1회 수행한 후에, denaturation과 annealing, extension을 각각 94°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 30회 수행하였다.

Semi-nested 2차 PCR에는 B2L-F2(5'-GCG AGT CCG AGA AGA ATA CG-3')와 B2L-R primer를 사용하였다¹¹. 총 50 µl의 반응액내에 앞서와 동일한 조성으로 혼합하였고, 1차 PCR 산물 중 1 µl를 template DNA로 사용하였다. 반응조건으로는 denaturation과 annealing, extension을 각각 94°C에서 1분간, 50°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 5회 실시하였고, 다시 94°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 25회 반복하였다.

증폭 후에 PCR 산물을 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 분리하였고, ethidium bromide(EtBr)로 DNA의 염색을 실시하여 UV transilluminator 상에서 PCR 증폭 여부와 증폭산물의 크기를 still video documentation system(Gel Doc 2000, Bio-Rad, USA)으로 관찰하였다.

유전자 염기서열 분석

효소중합연쇄반응의 증폭산물은 염기서열 분석을 위하여

GGXTM PCR DNA Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech Inc, England)를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였고, 이를 pGEM-T easy(Promega, USA) vector에 결합시켰다. 이에 형성된 재조합 plasmid를 TOP10F⁺ *E. coli* competent cells 내에 삽입하여 형질전환시켰다. 재조합 클론은 ampicillin 선택표지와 colony PCR 증폭을 이용하여 선별하였다. 재조합 plasmid DNA는 Quantum Plasmid Miniprep Kit(Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 제작사의 방법에 준하여 추출하였다. 유전자 염기서열은 dideoxy chain termination 방법에 준하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)와 ABI Prism Sequence analysis software(Version. 2.1.1)를 이용하여 분석하였다.

염기서열의 유사성 및 형질계통학적 분석

증폭된 유전자 단편은 염기서열을 분석한 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 BLAST 2.2.8을 이용하여 유사유전자를 검색하였다. 분석된 유전자 염기서열은 BLAST network service를 이용하여 비교하였다. 그리고 분석된 유전자의 동일성을 파악하기 위하여 Multalin Program (Version 5.3.3)과 Multiple Sequence Alignment Program (AlinX, Vector NTI Suite Version. 5.2.1.3., InforMax Inc, USA)을 이용하여 multi-alignment를 수행하였다. 또한, 형질계통학적 분석은 Multiple sequence alignment program (AlinX, Vector NTI Suite v. 5.2.1.3., InforMax Inc, USA)을 이용하여 수행하였다.

결 과

ORFV B2L 유전자 증폭

CPD가 발생한 병변조직에서 추출한 DNA로부터 예상된 크기인 235 bp의 ORFV B2L 유전자 단편이 semi-nested

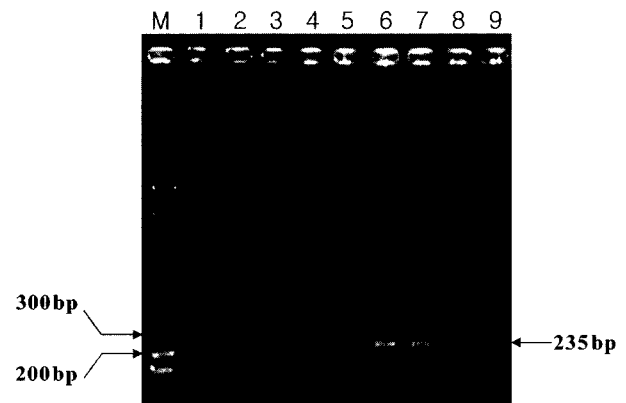


Fig 2. Detection of B2L gene encoding p37K major envelope antigen of ORFV by nested PCR. M: 100 bp DNA ladder (Genepia, Korea), Lane 1: negative control, Lane 2-5: DNA from blood samples, Lane 6-9: DNA from tissue of vesicular lesions.

	10	20	30	40	50	60
Orf virus Jeonbuk	GTGAGTCCGA	GAAGAATACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTTGAG	GTGGAAGTTC	GTGGCTGTGG
Orf virus Okinawa isolate	GCGCGTCCGA	GAAGAATACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTTGAG	GTGGAAGTTC	GTGGCCGGTGG
Orf virus NZ-2 strain	GCGCGTCCGA	GAAGAATACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTCGAG	GTGGAAGTTC	GTTCGCCGTGG
Orf virus S-1 strain	GCGAGTCCGA	GAAGAATACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTCGAG	GTGGAAGTTC	GTGGCCGTGG
Orf virus Iwate isolate	GCGAGTCCGA	GAAGAATACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTCGAG	GTGGAAGTTC	GTGGCCGTGG
Pseudocowpox virus VR634 strain	GCGAGTCCGA	GAAGAAGACG	CCGCCCCCGG	AGTGGTTCAG	GTGGAAGTCC	GTGGCCGTGG
BPS virus Ishikawa S strain	GCGAGTCCGA	GAAGAACACG	CCGCCCCCGG	CATGGTCCAG	GTGGAAGTCC	GTGGCCGTGG
Red deer parapoxvirus DPV strain	GCGAGTCCGA	GAAGAAGATG	CCGCCCTCCG	CGTGGTTGAG	GTGGAATCCG	GTGGCCGTGG
Sealpoxvirus Phocavitulina	GCGAGTCCGA	GAAAAAACG	CCGCCGCCAG	AGTGGTTCAT	GTGGAAGTCC	GTGGCCGTGG
	70	80	90	100	110	120
Orf virus Jeonbuk	GCGTGACGAT	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	ACGGCTGCTT	GGAGTCCACG	ACCATGGAGC
Orf virus Okinawa isolate	GCGTGACGAT	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	AGGGGATCTT	GGGCTCCACG	ATCATGGAGA
Orf virus NZ-2 strain	GCGTGACGAT	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	AGGGGACCTT	GGGCTCCACG	ATCATGGAGT
Orf virus S-1 strain	GCGTGACGAC	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
Orf virus Iwate isolate	GCGTGACGAC	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
Pseudocowpox virus VR634 strain	GCGTGACGAT	GGCGCAGCAG	AGCCGCGTGA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
BPS virus Ishikawa S strain	GCGTGATCAT	GGCGCAGCAC	AGCCGCGAGA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
Red deer parapoxvirus DPV strain	GCGTGATCAT	CGAGCAGCAC	ATGCGCGTGA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
Sealpoxvirus Phocavitulina	GCGTTATCAT	GGCGCAGCAG	AATCGCGTAA	ACGGCACCTT	CGGCTCCACG	ATCATGGAGT
	130	140	150	160	170	180
Orf virus Jeonbuk	TAAAGGTGTT	GTACCTGTTC	ATGAGGTCCC	CGGCCAAGTG	CTTGTGGGTG	GAGTACACGC
Orf virus Okinawa isolate	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	CGGCCAGGCG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGGC
Orf virus NZ-2 strain	AGAAGGTGTT	GTACCGGTTT	ATGAGGTCCC	TGGCCAGGTG	CGGGTGGGTG	GAGTACACGC
Orf virus S-1 strain	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	CGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
Orf virus Iwate isolate	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	AGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
Pseudocowpox virus VR634 strain	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	AGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
BPS virus Ishikawa S strain	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	AGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
Red deer parapoxvirus DPV strain	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCCC	AGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
Sealpoxvirus Phocavitulina	AGAAGGTGTT	GTAGCGGTTT	ATGAGGTCAA	AGGCCAGGTG	CTTGTGGGTG	GAGTAGAGCC
	190	200	210	215		
Orf virus Jeonbuk	CCAAGTTTTT	AATGGTGGCT	AGCGAGCCGC	CGGTA		
Orf virus Okinawa isolate	CCAGGTTCTT	GATGGTTTGG	ATGGACCCGC	CGGTG		
Orf virus NZ-2 strain	CCAGGTTCTT	GATGTTGGAG	ATGGAGCCGC	CCGTG		
Orf virus S-1 strain	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGAGCCGC	CCGTG		
Orf virus Iwate isolate	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGACCCGC	CCGTG		
Pseudocowpox virus VR634 strain	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGACCCGC	CCGTG		
BPS virus Ishikawa S strain	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGACCCGC	CCGTG		
Red deer parapoxvirus DPV strain	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGACCCGC	CCGTG		
Sealpoxvirus Phocavitulina	CGAGGTTCTT	GATGGTGGAC	ACGGACCCGC	CCGTG		

Fig 3. Comparison of ORFV B2L gene sequences from this study with the existing sequences in GenBank database using multi-alignment program. Orf virus Jeonbuk: amplified ORFV B2L gene sequence from native goats in Jeonbuk province, AB080769; ORFV Okinawa strain, U06671; Newzealand NZ2 strain, AB044796; Japan S1 strain, AB044795; Japan Iwate strain, AB044792; Japan Pseudocowpox VR634 strain, AB044801; bovine papular stomatitis(BPS) strain, AB044794; Japan Reddeer-parapoxvirus DPV strain, F414182; Germany Sealpoxvirus Phocavitulina strain.

2차 PCR을 통하여 각각 증폭되었고, 음성대조로 사용한 건 강한 산양의 혈액에서는 유전자 증폭이 이루어지지 않았다 (Fig 2). 또한, 임상증상이 나타난 산양의 혈액에서는 증폭된 유전자 단편을 확인할 수 없었다(Fig 2. Lane 2-5).

B2L 유전자 염기서열

ORFV Jeonbuk strain으로부터 증폭된 B2L 유전자의 염기서열은 GenBank에 등록되어 있는 유사성이 높은 데이터를 추출하여 alignment를 수행한 결과 재래 산양의 수포성 병변으로부터 증폭된 235 bp의 유전자가 ORFV의 B2L 유전자 단편임을 확인할 수 있었다(Fig 3).

형질계통학적 분류

분석된 유전자의 동일성을 알아보기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 유사성이 높은 데이터를 추출하여 multi-alignment를 수행하였다. 그 결과 증폭된 ORFV B2L 유전자의 염기서열이 Okinawa strain(AB080769)과 100%로 일치함을 알 수 있었다. 그리고 Newzealand NZ2(U06671)와는 99.5%, 그리고 Japan S1(AB044796)과 Japan Iwate(AB044795) strain과는 각각 99.1%의 높은 동일성을 나타내었다. 또한,

Table 1. Identity levels of the nucleotide sequences of amplified ORFV B2L gene fragment (235 bp) in this study (Jeonbuk strain) among different strains and related species

ORFV strains and related species	Genbank Access-Identity Number	(%)
Orf virus strains		
Okinawa strain	AB080769	100
Newzealand NZ2	U06671	99.5
Japan S1	AB044796	99.1
Japan Iwate	AB044795	99.1
Related species		
Pseudocowpox Japan VR634	AB044792	96.7
Bovine papular stomatitis	AB044801	85.6
Reddeerparapoxvirus Japan DPV	AB044794	84.7
Sealpoxvirus Germany Phocavitulina	F414182	79.5

Japan Pseudocowpox VR634(AB044792), bovine papular stomatitis(AB044801), Japan Reddeerparapoxvirus DPV(AB044794), 그리고 Germany Sealpoxvirus Phocavitulina(F414182) strain과도 96.7-79.5%의 동일성을 나타내었다(Table 1).

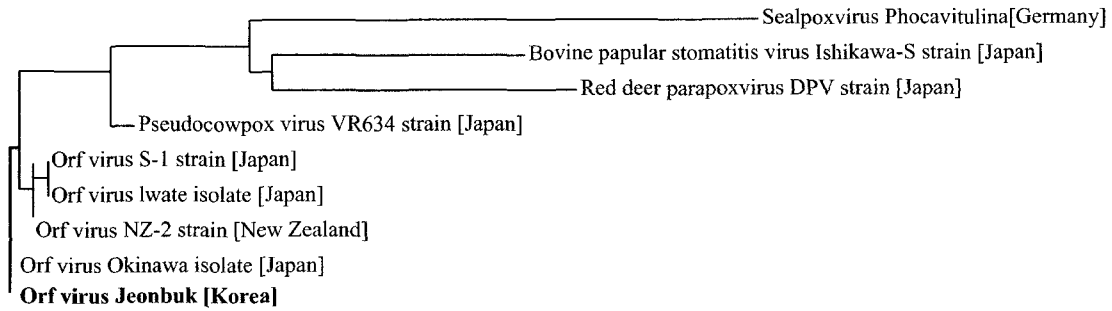


Fig 4. Phylogenetic tree of ORFV B2L sequences inferred using the Sequence Distance method and the sequence neighbour joining algorithm. Orf virus Jeonbuk: ORFV B2L gene from native indigenous goats in Jeonbuk province.

한편, 분석된 B2L 유전자의 염기서열을 토대로 형질계통학적 분석을 수행한 결과, 전북지역에서 관찰된 ORFV는 Okinawa strain과는 동일한 가지로 분류되었고, New Zealand NZ2, Japan S1, Japan Iwate strain과도 매우 근접한 가지에 존재함을 알 수 있었다(Fig 4).

고찰

전염성 농피성 피부염(CPD)은 orf virus에 감염된 동물의 구강점막, 비강점막, 유두, 지간 부위에 홍반, 수포나 농포의 형성, 그리고 궤양과 같은 출혈성 수포 병변을 일으키는 급성 전염성 질병이다^{5,6,9,22}. 특히 연령이 어린 면양이나 산양에서는 높은 이환율과 중증의 임상증상이 나타나는 것으로 알려져 있다³. 그리고 피부에 발현된 수포나 괴사와 같은 진행성 병변에 2차적인 세균감염으로 인한 전신적인 질병이 유발되면, 사육농가에 심각한 경제적 손실을 일으킨다고 보고되어 있다^{1-2,9,20,23,26}. 또한, 감염동물과 접촉이 빈번한 사람에게 쉽게 전파되어 피부에 수포성 구진을 일으키는 인수공통 전염병으로도 잘 알려져 있다^{7,22}.

최근 전북지역의 한 농가에서 사육중인 산양의 전 두수(12두)에서 CPD의 전형적인 임상증상이 관찰되었다. 이번에 CPD가 발생한 전북 익산지역의 산양 사육농가에 대한 병력을 살펴보다라도 사육중인 전 두수에서 구강주위, 비강점막, 안구주변, 유방, 귀, 그리고 복부 등에 출혈성 수포 병변과 같은 전형적인 CPD의 증상이 나타났고, 구강 주위 병소의 통증과 병소의 진행성 병변으로 인한 식욕부진이 동반되어 관찰되었다. 또한, 이번 증례에서는 임상증상이 심한 염소에서 특이적으로 안구의 부종과 혼탁이 동반되어 관찰되었다. 그러나 ORFV 감염과 관련되어 유발되는 각막혼탁이나 부종과 같은 안구의 병변에 대해서는 전혀 보고되어 있지 않았다. 이번 증례에서 관찰된 안구의 병변이 직접적인 ORFV의 감염 때문인지, 다른 병원체와 혼합 감염되어 유발되었는지는 밝혀지지 않았다. 하지만, ORFV의 감염으로 인하여 안구 병변이 유발될 수 있다면, 이는 축산농가의 생산성에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 원인으로 작용할 것이다. 따라서 이러한 안구 병변의 발생과 ORFV의 감염과의 상관관계

는 연구되어야 할 것으로 생각된다.

우리나라 산양의 사육 형태는 최근 들어 영세적인 소규모에서 대규모의 집단적 사육형태로 급격히 변모해 가고 있다. 따라서 이와 같은 대규모 사육형태로의 변화를 위해서는 이환율이 높고, 전파속도가 매우 빠른 전염성 질병에 대한 효과적인 예방법, 신속한 진단법, 이환 동물의 관리법, 그리고 방역 등에 대한 체계적인 대책이 확립되어야 할 것으로 본다. 그러므로 우리나라에서도 급성 전염성 질병인 CPD에 대한 예방법이나 신속한 진단법에 대하여 연구의 필요성이 있으며, 사육 농가에 대한 교육과 방역체계에 대한 대책을 마련해야 할 것으로 생각된다.

ORFV에 대한 진단법으로는 병변가검물에서 virus의 분리, 전자현미경을 이용한 virus 입자의 관찰, 그리고 혈청학적인 검사법 등이 연구되어 있다^{4,10,28}. 국내에서도 이미 전 등¹⁴이 재래 흑염소로부터 분리한 ORFV에 대하여 연구를 하였는데, 그 결과 분리된 virus의 45 K와 37 K의 단백질이 주요 면역원성을 지니고 있다고 보고하였다. 하지만, 이 연구에서 수행되어진 virus의 분리를 통한 입자의 관찰이나 단백질의 성상분석, 그리고 혈청학적인 검사법 등은 ORFV의 진단에 많은 시간과 노력 그리고 항상 진단할 준비가 되어있어야 하며 비용이 많이 소요된다는 단점이 있다. 따라서 신속하게 진단이 요구되는 CPD와 같은 급성 전염성 질병의 경우에는 신속하고 민감성이 특이적으로 높은 진단법의 확립이 요구된다. 따라서 외국에서는 상기의 진단법 대신 ORFV의 특이적인 유전자만을 선별적으로 신속하게 증폭시켜서 진단하는 PCR 법이 이미 개발되어 이용되고 있다^{11,16,27}. 하지만, 아직까지도 국내에서는 유전자를 이용한 ORFV에 대한 진단법이 보고되지 않았으며, 또한 CPD의 예방 연구에 필수적으로 요구될 항원 및 기능성 단백질을 지시해주는 유전자들에 대한 연구도 보고되지 않았다. 이에 본 연구자 등은 ORFV의 주요 표면 항원 단백질인 p37 K를 특이적으로 지시해주는 B2L 유전자에 대하여 특이적으로 반응할 수 있는 primer쌍을 합성한 후에, 이를 이용하여 산양의 병변 조직에서 분리된 DNA로부터 ORFV B2L 유전자 단편을 직접 PCR로 증폭하였다^{12,24}. 효소중합연쇄반응의 대상으로 한 ORFV B2L 유전자는 병변을 나타내는 전 두수에서 semi-nested 2차

PCR을 통하여 증폭되었다. Inoshima 등¹¹은 ORFV의 검출을 위하여 표준주와 가검물로부터 DNA를 추출하여 PCR을 동시에 수행한 바 있다. 그 결과, 표준주를 이용한 군에서는 1차 PCR로도 대상으로 한 유전자를 충분히 증폭할 수 있었지만, 병소부위에서 채취한 가검물로부터는 semi-nested PCR을 수행하여야만 ORFV B2L 유전자의 증폭을 관찰할 수 있다고 보고 하였다. 그 이유로는 병소에 존재하는 ORFV의 DNA copy수가 표준주에 비하여 상대적으로 적기 때문인 것으로 추정하였다. 이 연구 결과에서도, 앞서와 마찬가지로 1차 PCR 만으로는 대상으로 한 유전자의 증폭을 관찰하지는 못하였지만, semi-nested 2차 PCR을 통해서는 채취한 가검물 모두에서 B2L 유전자를 증폭할 수 있었다. 따라서 가검물로부터 직접 ORFV를 진단하기 위해서는 보다 민감하게 반응할 수 있는 대상 유전자에 대한 연구도 수행될 필요가 있다고 생각된다. 또한, 임상증상이 발현되는 산양의 혈액으로부터는 virus의 유전자 단편을 전혀 증폭할 수 없었던 점으로 보아 병소의 조직으로부터 유전자를 추출하여 진단에 활용해야 할 것으로 판단된다.

한편, 증폭된 유전자의 염기서열을 계통발생학적으로 비교 분석하였다. 그 결과, 이번 전북지역에서 검출된 ORFV는 형질계통학적으로 일본에서 분리된 Okinawa strain(AB080769)과 100% 동일한 것으로 밝혀졌다. 그리고 Newziland NZ2(U06671), Japan S1(AB044796), Japan Iwate(AB044795) 주와도 99% 이상의 매우 높은 동일성이 있는 것으로 분석되어졌다. 따라서, 이번 연구결과 전북 익산지역에서 사육 중인 산양에 공통적으로 발생한 출혈성 수포 병변은 Poxviridae, Parapoxvirus 속에 속하는 orf virus로 인하여 전염성 농피성 피부염이 유발된 것으로 밝혀졌다. 하지만, 국내에 존재하는 ORFV의 보다 심도 있고 다양한 연구를 위해서는 이번 연구에 이용된 B2L 유전자 뿐 아니라, 주요 항원단백질 중의 하나인 p45 K를 지시해주는 유전자 및 다른 유전자들과의 비교 분석에 대한 연구도 지속적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 현재 CPD에서 이용되고 있는 생-백신을 사용한 예방법보다, 더욱 효과적이고 안전한 예방법으로 각광 받고 있는 분자생물학적인 재조합 백신을 통한 예방법을 개발하기 위해서는 앞서 열거한 기능성 단백질 등을 지시해 주는 유전자들에 대한 다양하고 체계적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

산양이나 면양 등의 피부에 괴양성 병소를 일으키는 전염성 농피성 피부염(contagious ecthyma)은 Poxviridae, Parapoxvirus 속에 속하는 orf virus에 의하여 유발된다. 최근 전북지역의 한 농가에서 사양중인 산양의 전 두수(12두)에서 구강(구순) 주위, 비강점막, 안구주변, 유방, 귀, 복부 등에 출혈성 수포 병변과 안구백탁, 안구충혈, 통증으로 인한 식욕부진 등과 같은 전염성 농피성 피부염의 전형적인 임상증상이 관찰되었다. 따라서 ORFV의 주요 표면 항원단백질(p37 K)을 지시해

주는 B2L 유전자를 임상증상이 발현된 산양의 병변조직으로부터 추출한 DNA로부터 semi-nested PCR법에 의해 증폭하였다. 또한 증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 일본의 Okinawa 분리주와 100% 동일한 것으로 밝혀졌으며, 뉴질랜드 NZ-2주, 일본의 S-1주 그리고 Iwate 분리주와도 99% 이상의 유사성을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 ORFV B2L 유전자를 증폭하기 위한 semi-nested PCR법은 CPD의 진단에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Buttner M. Ecthyma of sheep and goats. Tierarztl Prax 1985; 13: 163-169.
2. Crumbie A. The orf virus: a disease of the farming community. Community Nurse 1998; 4: 44-45.
3. Dela Concha-Bermejillo, Guo A, Zhang J, Waldron D. Severe persistent orf in young goats. J Vet Diagn Invest 2003; 15: 423-431.
4. Dieterich RA, Spencer GR, Burger D, Gallina AM, VanderSchalie J. Contagious ecthyma in Alaskan musk-oxen and Dall sheep. J Am Vet Med Assoc 1981; 179: 1140-1143.
5. East NE, Birnie EF. Diseases of the udder. Vet Clin North Am Large Anim Pract 1983; 5: 591-600.
6. Fenner F. Poxviruses. In: Fields, B.K., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds), Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia PA: Lippincott-Raven. 1996: 2673-2702.
7. Freeman G, Bron AJ, Juel-Jensen B. Ocular infection with orf virus. Am J Ophthalmol 1984; 97: 601-604.
8. Guss SB. Dairy goat herd health problems. J Am Vet Med Assoc 1975; 167: 1076-1079.
9. Haig DM, Mercer AA. Ovine diseases. Orf. Vet Res 1998; 29: 311-326.
10. Housawi F, Abu M, Elzein EM, al Afaleq AI, Amin MM. Sero-surveillance for orf antibodies in sheep and goats in Saudi Arabia employing the ELISA technique. J Comp Pathol 1992; 106: 153-158.
11. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 2000; 84: 201-208.
12. Inoshima Y, Murakami K, Wu D, Sentsui H. Characterization of parapoxviruses circulating among wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). Microbiol Immunol 2002; 46: 583-587.
13. Inoshima Y, Yamamoto Y, Takahashi T, Shino M, Katsumi A, Shimizu S, Sentsui H. Serological survey of parapoxvirus infection in wild ruminants in Japan in 1996-9. Epidemiol Infect 2001; 126: 153-156.
14. Jun MH, Cho SW, Chang KS, Cho YS, An DJ, An SW. Studies on isolation of Contagious Pustular Dermatitis (Orf) Virus from native black goats and its immunogenicity. J Kor Soc Virology 1995; 25: 189-198.
15. Linnabary RD, Powell HS, Holscher MA, Walker BK. Contagious ecthyma (Orf) in a goat herd. Vet Med Small Anim Clin 1976; 71: 1261-1263.
16. Mangana VO, Markoulatos P, Koopopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. J Virol Methods 1999; 77: 75-79.
17. Mercer AA, Yirrell DL, Whelan EM, Nettleton PF, Pow I, Gilray JA, Reid HW, Robinson AJ. A novel strategy for

- determining protective antigens of the parapoxvirus, orf virus. *Virology* 1997; 229: 193-200.
18. Mikami T, Onuma M, Yonemichi H, Okada K, Fujimoto Y. Isolation of paravaccinia virus from sheep. *Nippon Juigaku Zasshi* 1978; 40: 109-113.
 19. Nettleton PF, Brebner J, Pow I, Gilray JA, Bell GD, Reid HW. Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Vet Rec* 1996; 138: 184-186.
 20. Reid HW. Orf, In Martin, W. B., and Aitken, I. D. (eds), *Diseases of sheep*, 3rd ed. Oxford: Blackwell Science. 2000: 261-266.
 21. Robinson AJ, Balassu TC. Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet Bulletin* 1981; 51: 771-782.
 22. Robinson RA. Sheep and goat zoonoses. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1983; 5: 711-717.
 23. Samuel WM, Chalmers GA, Stelfox JG, Loewen A, Thomsen JJ. Contagious ecthyma in bighorn sheep and mountain goat in western Canada. *J Wildlife Dis* 1975; 11: 26-31.
 24. Sullivan JT, Mercer AA, Fleming SB, Robinson AJ. Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology* 1994; 202: 968-973.
 25. Suzuki T, Minamoto N, Sugiyama M, Kinjo T, Suzuki Y, Sugimura M, Atoji Y. Isolation and antibody prevalence of a parapoxvirus in wild Japanese serows (*Capricorniscrispus*). *J Wildlife Dis* 1993; 29: 384-389.
 26. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Contagious pustular dermatitis (orf), In Hagan's and Brunner's *Microbiology and Infectious disease of domestic animals*, 8th ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates. 1998: 587-590.
 27. Torfason EG, Gunadottir S. Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections. *J Clin Virol* 2002; 24: 79-84.
 28. Ueda N. Detection of orf virus cross-reacting antigens with other poxvirus antigens using monoclonal antibodies. *J Wakayama Med Soc* 1996; 47: 443-451.