



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166962
(43) 공개일자 2022년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0075890
(22) 출원일자 2021년06월11일
심사청구일자 2021년06월11일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
유한상
경기도 과천시 별양로 111, 506동 603호(별양동, 주공아파트)
신민경
경상남도 진주시 새평거리 30, 105동 2101호(평거동, 엠코타운더프라하)
(74) 대리인
특허법인이룸리온
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

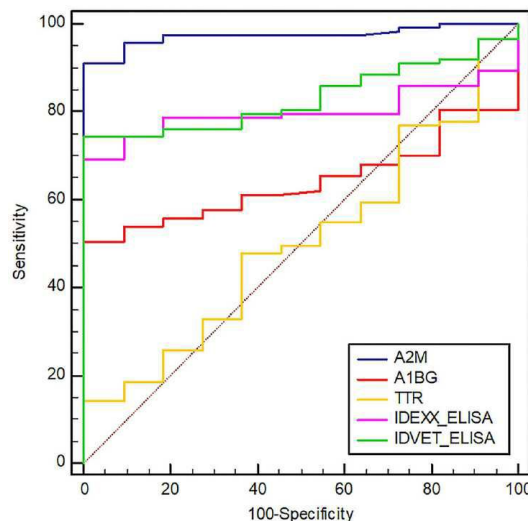
(54) 발명의 명칭 알파-2-마크로글로불린을 유효성분으로 포함하는 요네병 진단용 바이오마커 조성물 내지 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin) 측정을 이용한 요네병 진단용 바이오마커 조성물 내지 이의 용도 에 대한 것이다.

본 발명의 바이오마커는 JD 진행의 여러 단계 동안 MAP에 감염된 개체의 혈청 내에서 숙주 단백질 발현의 차이를 밝혀 무증상 감염에 대한 향상된 감도를 제공할 수 있어 개체 무리에서 JD를 근절하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 바이오마커는 ELISA 법을 이용하여 검출됨으로써 질량분석 등 다른 방법을 이용하는 경우에 비하여 효율적으로 요네병을 진단할 수 있으며 현장에서 바로 적용할 수 있다. 또한 기존 요네병 진단을 위한 상용 ELISA 키트보다 우수한 요네병 진단 효과를 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/35 (2013.01)

(72) 발명자

박현의

경상남도 진주시 강남로 45, 103동 702호(주약동,
금호석류마을)

박홍태

경기도 시흥시 서울대로264번길 12, 202동 2005
호(정왕동, 시흥배곧 C2블럭 호반 씨밋플레이스 아
파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545023103

과제번호 918020044SB010

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 서울대학교 산학협력단

연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업

연구과제명 소 요네병원인체, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, 신규병원성인자 규

명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울대학교 산학협력단

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin)의 단백질 수준 또는 그의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 요네병 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 요네병은 반추동물에서 발병되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 반추동물은 소, 염소, 양 또는 산양인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 반추동물은 증상 반추동물 및 무증상 감염 반추동물을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 및 압타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 조성물을 포함하는 요네병 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

i) 개체로부터 분리된 시료에서 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin)의 단백질 수준 또는 그의

mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

ii) 상기 측정된 수준이 정상 대조군 수준보다 증가하는 경우 요네병으로 분류하는 단계;
를 포함하는 요네병 진단방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액, 분변, 분리된 조직, 분리된 세포 및 타액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 진단방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin) 측정을 이용한 요네병 진단용 바이오마커 조성물 내지 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 세계적으로 낙농업에 상당한 경제적 피해를 입히는 요네병 (JD, Johne's disease)은 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버쿨로시스(Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, MAP) 로 인한 반추 동물의 만성 육아 종성 장염이다. MAP의 주요 숙주는 소, 양, 염소 및 사슴을 비롯한 사육 반추 동물이며 비반추동물에도 감염되는 사례들이 발견되고 있다. 또한 MAP와 크론병, 다발성 경화증, 제1 형 당뇨병, 류마티스 관절염과 같은 인간 자가 면역 질환이 연관되어 있다는 증거들이 발견되고 있어 공중 보건학적으로도 중요한 질환이다.

[0004] JD의 두드러진 임상적 특징은 지속적인 설사, 점진적인 체중 감소, 우유 생산 감소 및 장기간의 잠복기 후 쇠약이다. 질병이 진행되는 동안 감염된 소는 분변을 통해 MAP을 배출하며 이는 결과적으로 물, 사료, 우유 및 주변 환경을 오염시킨다. 군체의 세포벽에 포함되어 있는 미콜산(mycolic acid) 성분으로 인해 MAP는 건조함, 낮은 pH 및 고온 또는 저온을 포함한 가혹한 환경 조건을 견디며, 목초지에서 MAP 1 년 이상 생존할 수 있고, 물에서는 훨씬 더 긴 기간 동안 생존할 수 있다. MAP에 오염된 물질의 섭취는 감염의 주요 경로이다. 따라서 JD의 통제를 위해서는 농장에서 무증상 분변 배출개체(subclinical fecal shedder)의 신속한 탐지 및 도태가 필요하다.

[0005] JD의 진단은 크게 두 가지 범주로 나뉜다. 대변, 우유, 초유 및 장 조직과 같은 임상 표본에서 MAP의 존재를 PCR 및 세균 배양으로 확인할 수 있다. 감염된 동물의 분변 샘플을 이용한 세균 배양은 JD 진단을 위한 표준이며 살아 있는 MAP를 직접 검출하는 유일한 방법이다. 그러나 눈에 보이는 콜로니의 관찰은 느린 성장 속도로 인해 접종 후 최소 4 주 이상의 시간을 필요로 한다. 특히 무증상 단계의 감염개체들은 각기 다른 질병 진행률을 나타내기 때문에 분변을 통한 균의 배출이 간헐적으로 일어나 결과적으로 감염된 동물에 대해 위음성 결과를 초래할 수 있다. PCR을 통한 IS900, ISMap02 및 f57과 같은 MAP 특이적 유전자의 검출은 신속하고 한번에 비교적 많은 양의 샘플을 처리할 수 있다. 그럼에도 불구하고 PCR 기반 검출에는 몇 가지 한계가 있다. 첫째, 분변 샘플 내의 여러가지 PCR 억제성분이 반응을 방해하여 위음성 결과를 초래할 수 있다. 둘째, 숙주 및 기타 세균 유래 DNA의 비특이적 증폭으로 인해 위양성 결과를 초래할 수 있다. 셋째, 대부분의 무증상 감염된 동물은 일반적으로 간헐적으로 MAP을 배출하기 때문에 위음성 결과가 나타날 수 있다. 기존에 개발되어 있는 MAP 진단용 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)는 혈청 내의 MAP 특이적 항체를 확인할 수 있는 방법으로 한번에 많은 양의 샘플을 처리할 수 있다. 그러나 무증상 감염 개체들은 MAP에 특이적인 항체를 가지고 있지 않은 경우가 대부분이라 위음성 결과를 나타낼 수 있다. 또한 Mycobacterium bovis, Fasciola hepatica, 비결핵성 mycobacteria와 같은 다른 병원균과의 동시 감염은 면역 반응을 변화시켜 정확한 진단을 방해할 수 있다. 즉, 무증상 감염된 동물을 탐지할 수 있는 진단기법이 JD의 통제 및 박멸을 위해 시급히 필요한 실정이다.

[0006] 바이오마커는 질병이 진행되는 동안 생리적 변화를 나타내는 측정 가능한 지표이다. 많은 연구에서 MAP에 감염된 동물에서 잠재적인 바이오마커를 확인하고자 MAP에 감염된 모델에서 숙주 전사체를 분석하고 상향 조절되는 여러 유전자를 발견하여 바이오마커 후보를 식별하려는 노력이 있었다. 그러나 이러한 유전자의 mRNA 발현과 단백질 발현은 항상 높은 상관관계를 보이지는 않았으며 비교적 작은 샘플 크기로 수행되었다는 한계점이 존재하

였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Seo JH, Youn JH, Kim EA, Jun JS, Park JS, Yeom JS, et al. Helicobacter pylori antigens inducing early immune response in infants. J Korean Med Sci. (2017) 32:1139-46. doi: 10.3346/jkms.2017.32.7.1139
- (비특허문헌 0002) Seth M, Lamont EA, Janagama HK, Widdel A, Vulchanova L, Stabel JR, et al. Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. PLoS ONE. (2009) 4:e5478. doi: 10.1371/journal.pone.0005478

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에 본 발명자들은 기존 진단 방법인 상업용 ELISA 키트 및 분변 PCR 등 의 민감도를 개선하여 MAP 노출 및 무증상 MAP 감염 소를 진단하기 위한 JD 바이오마커를 제공하고자 예의 노력한 결과, 혈청 단백질 알파-2-글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin)이 감염된 동물에서 더 나아가 특히 무증상 사례에서 JD의 진단에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin) 측정을 이용한 요네병 진단용 바이오마커 조성물 내지 이의 용도 를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin) 의 단백질 수준 또는 그의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 요네병 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 요네병은 반추동물에서 발병되는 것이다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 반추동물은 소, 염소, 양 또는 산양인 것이다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 반추동물은 증상 반추동물 및 무증상 감염 반추동물 을 포함하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 및 아파타머(aptamer) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 요네병 진단 키트 를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것이다.
- [0020] 본 발명은 또한 i) 개체로부터 분리된 시료에서 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin) 의 단백질 수준 또는 그의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및
- [0021] ii) 상기 측정된 수준이 정상 대조군 수준보다 증가하는 경우 요네병으로 분류하는 단계;

- [0022] 를 포함하는 요네병 진단방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액, 분변, 분리된 조직, 분리된 세포 및 타액 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 바이오마커는 JD 진행의 여러 단계 동안 MAP에 감염된 개체의 혈청 내에서 숙주 단백질 발현의 차이를 밝혀 무증상 감염에 대한 향상된 감도를 제공할 수 있어 개체 무리에서 JD를 근절하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 바이오마커는 ELISA 법을 이용하여 검출됨으로써 질량분석 등 다른 방법을 이용하는 경우에 비하여 효율적으로 요네병을 진단할 수 있으며 현장에서 바로 적용할 수 있다. 또한 기존 요네병 진단을 위한 상용 ELISA 키트보다 우수한 요네병 진단 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 건강한 대조군(Healthy control), 무증상 shedder(Subclinical shedder) 및 증상 shedder (Clinical shedder) 그룹으로 MAP 감염 단계에 따른 소의 혈청 단백질의 대표적인 2 차원 겔 전기 영동 결과를 나타낸다. pI 범위는 상단에 표시하였다.

도 2는 MAP 감염 단계에 따라 소의 혈청 샘플에서의 바이오마커(Alpha-2-macroglobulin, Alpha-1-beta-glycoprotein, Transthyretin; (1)~(3)) 발현 수준 및 상용 ELISA 진단키트(IDEXX ELISA, IDVet ELISA; (4), (5))로 소의 혈청 샘플을 검출한 결과를 나타낸다. 상기 소의 혈청 샘플은 총 126 마리 소의 혈청 샘플을 다음과 같은 5 개로 그룹화했다. (a) 건강한 대조군 (HC, n = 11) : 요네병(JD)이 없는 농장에서 선택, 배설물 PCR에 대해 음성, 두 상용 키트 모두 ELISA 음성. (b) MAP 노출 그룹 (E, n = 20) : JD-양성 농장에서 선택, 배설물 PCR의 경우 음성, 두 상용 키트 모두 ELISA 음성. (c) 무증상 shedder 그룹 (SCS, n = 27) : 두 상용 키트에 대해 대변 PCR 양성 및 ELISA 음성. (d) 무증상 비 shedder 그룹 (SCNS, n = 50) : 적어도 하나의 상용 키트에 대해 대변 PCR 음성 및 ELISA 양성. (e) 증상 shedder 그룹 (CS, n = 18) : 최소 하나의 상용 키트에 대해 대변 PCR 양성 및 ELISA 양성 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001). A2M, A1BG, TTR, IDEXX 및 IDVET ELISA의 최적 컷오프 값은 각 그래프에서 빨간색 실선으로 표시하였다.

도 3은 선택된 바이오마커(A2M, alpha-2-macroglobulin; A1BG, alpha-1-beta glycoprotein; TTR, transthyretin) 및 두 상용 ELISA (IDEXX 및 IDVET)의 ROC(Receiver operating characteristic) 곡선을 나타낸다. A2M, A1BG, TTR, IDEXX 및 IDVET ELISA의 ROC 아래 영역은 각각 0.973, 0.641, 0.512, 0.796 및 0.828 이었으며, 최적 컷오프 값은 각각 27.56, 11.93, 190.13, 8.92 및 4.37 이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명의 “shedder(shedder)”는 분변으로 MAP가 배출되는 개체를 의미할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 “증상 반추동물”은 요네병의 주요 증상을 나타내는 반추동물을 의미할 수 있으며, “무증상 감염 반추동물”은 MAP 등 요네병 원인균에 감염되었지만 잠복기 또는 요네병 초기 등의 이유로 요네병의 주요 증상이 나타나지 않는 반추동물을 의미할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 “진단(diagnosis)”은 넓은 의미로는 개체의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 바람직하게는 요네병 원인균 감염으로 발생할 수 있는 요네병 및 이의 발병 위험성을 판단하는 것이다.
- [0033] 본 발명자들은 감염 단계가 다른 혈청 샘플을 사용하여 JD에 대한 12 개의 단백질 바이오마커를 발견했다. 발견된 바이오마커 중 생물학적 중요성에 따라 3 가지 단백질 (A2M, A1BG, TTR)이 선택되었다. A2M은 숙주 방어를 위해 광범위한 프로테아제를 포획하는데 관여하는 큰 당 단백질이다. A2M은 단백질 분해 활성화를 통한 구조적 재배열 과정을 통해 우리와 같은 구조를 사용하는 병원체 및 올가미 프로테아제의 다양한 프로테아제에 대해 사

용 가능한 미끼 영역을 보유하고 있다. 마이코박테리아 프로테아제는 숙주 세포의 침입을 촉진하고 감염 중에 성장을 촉진하며, 이후 세포 내 생존 및 질병 진행에 중요한 역할을 한다. 프로테아제를 억제하는 것 외에도 A2M은 사이토카인과 TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, bFGF, β -NGF, PDGF 및 TGF- β 와 같은 성장 인자의 생물학적 활성을 조절한다. MAP 감염의 초기 단계에서 IFN- γ , IL-12, TNF- α 및 IL-6과 같은 전 염증성 사이토카인은 Th1 우성 면역 반응을 나타내는 건강한 대조군과 비교하여 MAP에 감염된 동물에서 현저하게 증가했다. 반대로, 면역학적 변화는 Th1에서 Th2로 발생하며 질병의 진행은 병원체에 의한 숙주 면역 반응의 조절을 암시한다. 따라서 MAP에 감염된 동물에서 A2M의 상향 조절은 질병 진행 동안 면역 반응의 조절과 관련이 있을 수 있다. A2M은 주로 간에서 합성되며 그 생산은 TNF- α , IL-1 및 IL-6와 같은 다양한 사이토카인에 의해 영향을 받는다. 이와 관련하여, A2M의 상향 조절은 MAP에 감염된 동물에서 매우 풍부한 전 염증성 사이토카인에 의해 유도될 수 있다. 본 발명에서 A2M 수준은 노출 및 무증상 사례를 포함하여 MAP에 감염된 동물에서 상당히 높았다. 따라서, A2M은 MAP에 감염된 동물과 비감염된 동물 사이의 구별을 위한 유망한 바이오마커일 수 있다.

[0034] A1BG는 면역 글로불린 유사 도메인을 포함하는 면역 글로불린 슈퍼 유전자 패밀리에 속하는 혈장 당단백질이다. TTR은 갑상선 호르몬과 레티놀의 수송에 관여하는 4량체 혈장 단백질이다. A1BG는 건강한 대조군에 비해 노출된 그룹에서만 유의하게 상승했다. 또한, 무증상 비 췌드 그룹에서 상승된 혈청 TTR 수준이 검출되었다. 그러나 감염되지 않은 소와 감염된 소 사이에는 일관된 변화가 없어 JD에서 A1BG 및 TTR은 바이오마커로서 활용할 수 없었다. 이는 *M. bovis*에 감염된 소에 비해 감염 후 12개월 (PI)에 실험적으로 MAP에 감염된 소에서 혈청 A1BG의 상향 조절을 제안한 이전 연구와 상반된다(비특허문헌 2). 또한 혈청 A1BG 수준은 3개월 PI에서 MAP에 감염된 소에서 상향 조절되었고 동시에 감염되지 않은 소에서는 감소했다. 또한, 실험적으로 MAP에 감염된 소는 비감염 소에 비해 3개월 PI에서 혈청 내 TTR의 풍부도가 증가했으며, 비감염 소에 비해 혈청 TTR 수준이 10개월까지 일관되었다. 본 발명의 A1BG와 TTR 발현의 차이는 샘플의 기원에 의해 설명될 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 적어도 1세 이상의 자연 감염 소의 혈청 샘플을 사용했지만 [비특허문헌 2]에서는 생후 6주에 실험적으로 감염된 신생아 송아지를 사용했기 때문에 성체 소에 비해 면역 반응이 다르다.

[0035] 본 발명에서 A2M ELISA가 무증상 MAP에 감염된 동물의 검출을 위해 두 개의 상용 ELISA 키트보다 더 높은 AUC 값과 감도를 산출했음을 나타냈다. 실제로 A2M ELISA는 무증상 사례를 포함하여 MAP에 감염된 동물의 검출에 대해 우수한 진단 성능을 보여주었다. A2M ELISA는 무증상 췌드 동물의 85.18%를 검출한 반면 IDEXX 및 IDVET ELISA 키트는 0%를 검출했다. 또한 A2M ELISA는 무증상 비 췌드 사례의 90%를 감지했으며 IDEXX 및 IDVET ELISA 키트는 각각 96%와 52%를 감지했다. 유사하게, A2M ELISA는 증상 췌드 동물의 100%를 검출한 반면 IDEXX 및 IDVET ELISA 키트는 각각 94.44 및 88.88%를 검출했다. 종합하면 A2M ELISA는 특히 무증상 췌드 그룹에서 MAP에 감염된 동물의 탐지율을 향상시켰다.

[0036] MAP에 노출된 동물은 분변 PCR과 상업용 ELISA 키트 모두에 대해 음성이었다. 그러나 노출된 모든 동물은 MAP에 감염된 동물과 함께 사육되었으며 일부 노출된 동물은 서로 다른 시점에서 대변 PCR 양성을 나타내어 노출된 그룹 내에서 MAP 감염의 높은 가능성을 시사했다. MAP 노출 및 무증상 췌드 그룹의 혈청 A2M 수준은 건강한 대조군 그룹보다 유의하게 높았지만 다른 두 바이오마커의 혈청 수준에서는 관찰되지 않았다. 더욱이, 상승된 혈청 A2M 수준은 무증상 췌드, 무증상 비 췌드 및 증상 췌드 그룹에서 일관되었다. 따라서 증가된 혈청 A2M 수준은 초기 단계에서 MAP 감염에 대한 숙주 면역 반응과 관련이 있을 수 있다.

[0037] 본 발명은 다양한 감염 단계에서 JD에 대한 숙주 혈청 바이오마커에 관한 귀중한 정보를 제공한다. 또한 조직학적 관찰 및 사이토카인 분석 및 조직 세균 배양의 결과와 같은 각 동물의 자세한 감염 상태는 통계 분석을 위한 보다 신뢰할 수 있는 정보를 제공한다.

[0039] 따라서, 본 발명은 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin)의 단백질 수준 또는 그의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 요네병 진단용 바이오마커 조성물을 제공할 수 있다.

[0040] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 요네병은 반추동물에서 발병되는 것이며, 상기 반추동물은 소, 염소, 양 또는 산양인 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 반추동물은 소인 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 반추동물은 증상 반추동물 및 무증상 감염 반추동물을 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 및 애포타머(aptamer)로 이

루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

- [0043] 상기 "항체"란, 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 요네병 진단용 바이오마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조, 분리 및 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다. 또한 본 발명의 항체는 상업적으로 입수한 것일 수 있다.
- [0044] 상기 "압타머"란, 올리고핵산 또는 펩타이드 분자일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0046] 상기 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0047] 상기 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다.
- [0048] 상기 "안티센스"란, 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 요네병 진단 키트를 제공할 수 있다.
- [0051] 상기 요네병은 상기 바이오마커 조성물에서 대상으로 하는 요네병과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것일 수 있으며, 바람직하게는 ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트인 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 키트는 통상적으로 사용되는 발현 수준 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다. 예를 들어, 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 키트는 평가 대상체로부터 샘플을 획득하기 위한 샘플 추출 수단을 포함할 수 있다. 샘플 추출 수단은 바늘 또는 시린지 등을 포함할 수 있다. 키트는 액체, 기체 또는 반고체일 수 있는, 추출된 샘플을 수용하기 위한 샘플 수집 용기를 포함할 수 있다. 키트는 사용 지침을 추가로 포함할 수 있다. 상기 샘플은 A2M이 존재하거나 분리될 수 있는 임의의 개체 샘플일 수 있다. 예를 들어, 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액, 분변, 분리된 조직, 분리된 세포 및 타액 일 수 있다. 개체 샘플에서 A2M의 측정은 전체 샘플 또는 가공된 샘플 상에서 수행될 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한 i) 개체로부터 분리된 시료에서 알파-2-마크로글로불린(A2M, Alpha-2-macroglobulin)의 단백질 수준 또는 그의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

- [0057] ii) 상기 측정된 수준이 정상 대조군 수준보다 증가하는 경우 요네병으로 분류하는 단계;
- [0058] 를 포함하는 요네병 진단방법을 제공할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액, 분변, 분리된 조직, 분리된 세포 및 타액 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 혈청인 것일 수 있다.
- [0060] 상기 요네병은 상기 바이오마커 조성물에서 대상으로 하는 요네병과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

[0064] 동물 주제

[0065] 충청남도 1 개 농장과 강원도 2 개 농장에서 소를 선정했다. 혈청 단백질에 대한 단백질체 분석을 위해 분변 qPCR 분석 결과와 ELISA로 검출된 혈청 MAP 항체 수준에 따라 28 마리의 소를 선별하여 다음과 같이 3 개의 그룹으로 분류했다: (1) 건강한 대조군 (n = 10), 요네병(JD)이 없는 농장에서 선택, 분변 PCR 및 혈청 ELISA에 대해 음성; (2) 무증상 췌대 그룹 (n = 8), 대변 PCR 양성 및 ELISA 음성; (3) 증상 췌대 그룹 (n = 10), 전형적인 JD 임상 징후를 나타내고, 대변 PCR 및 ELISA에 양성. 바이오마커 후보의 평가를 위해 두 개의 상용 ELISA 진단 키트 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA; ID Screen Paratuberculosis Indirect, ID Vet, Montpellier, France)를 사용하여 검출된 혈청 샘플에 대한 ELISA 결과에 따라 126 마리의 소가 선택되었고, IS900 및 ISMap02 를 표적으로 하는 qPCR로 대변 샘플에서 MAP을 검출하였다. 구체적으로, 126 마리의 소를 다음과 같이 4 개의 그룹으로 나누었다: (1) 건강한 대조군 (n = 11), JD가 없는 농장에서 선택, 배설물 PCR 음성, 두 상용 키트 모두 ELISA 음성; (2) MAP 노출 그룹 (n = 20), JD 양성 농장에서 선택, 배설물 PCR에 대해 음성, 두 상용 키트 모두 ELISA 음성; (3) 무증상 췌대 그룹 (n = 27), 두 상용 키트에 대해 대변 PCR 양성 및 ELISA 음성; (4) 무증상 비 췌대 그룹 (n = 50), 적어도 하나의 상용 키트에 대해 대변 PCR 음성 및 ELISA 양성; (5) 증상 췌대 그룹 (n = 18), 하나 이상의 상용 키트에 대해 전형적인 JD 임상 징후를 나타내고, 대변 PCR 양성 및 ELISA 양성. Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 꼬리 정맥 정맥천자로 혈액 샘플을 수집했다. 혈청은 2,500g에서 10 분 동안 원심 분리하여 분리되었다. 분리된 혈청을 1.5mL 튜브에 옮겨 사용하기 전까지 -80 °C 에서 보관했다. 동물 연구는 서울 대학교 동물 윤리 위원회 (SNU-200525-4)의 검토와 승인을 받았다. 하기 [표 1] 은 혈청 프로파일링을 위해 선택된 28 마리 동물의 특성을 나타낸다. 하기 [표 2] 는 바이오마커 후보의 평가를 위해 선택된 126 마리 동물의 특성을 나타낸다.

표 1

		건강한 대조군 (n=10)	무증상 췌대 (n=8)	증상 췌대 (n=10)
나이, 년수, mean ± SD		2.80 ± 1.31	3.50 ± 1.51	5.42 ± 1.61
성별, 여성		10 (100)	8 (100)	10 (100)
MAP 분리		0 (0)	1 (12.5)	8 (80)
분변 PCR 양성		0 (0)	8 (100)	10 (100)
혈청 ELISA S/P 비율, mean ± SD	IDEXX	4.06 ± 1.85	7.31 ± 4.15	235.93 ± 27.67

표 2

[0067]

		건강한 대조군 (n=11)	노출 (n=20)	무증상 췌터 (n=28)	무증상 비-췌터 (n=50)	증상 췌터 (n=18)
나이, 년수, mean ± SD		5.69 ± 1.6	4.33 ± 1.6	3.83 ± 2.33	4.73 ± 1.43	5 ± 1.71
성별, 여성		11 (100)	20 (100)	28 (100)	50 (100)	18 (100)
MAP 분리		0 (0)	0 (0)	1 (3.6)	0 (0)	14 (77.8)
분변 PCR 양성		0 (0)	0 (0)	28 (100)	0 (0)	18 (100)
혈청 ELISA S/P 비율, mean ± SD	IDEXX	3.73 ± 1.82	8.58 ± 11.74	5.84 ± 7.79	114.21 ± 54.14	207.67 ± 102.30
	IDVet	2.49 ± 1.24	8.01 ± 5.59	2.69 ± 2.16	90.25 ± 77.14	183.35 ± 60.99

[0069]

건강한 대조군, 무증상 췌터 및 증상 췌터 그룹의 평균 ELISA 샘플/양성 (S/P) 비율은 각각 4.16, 7.31 및 235.93이었다. 그룹 간 소의 평균 연령은 크게 다르지 않았다. 건강한 대조군, MAP 노출, 무증상 췌터, 무증상 비 췌터 및 증상 췌터 그룹의 평균 IDEXX ELISA S/P 비율은 각각 3.73, 8.58, 5.84, 114.14 및 207.67 이었다. 유사하게, 이들 그룹의 평균 IDVET ELISA S/P 비율은 각각 2.49, 8.01, 2.69, 90.25 및 183.35 이었다.

실시예 2

[0071]

단백질 식별

[0072]

MALDITOF/MS 분석을 통해 총 12 개의 중요한 영역을 확인하고 의미있는 단백질 목록을 작성했다.

[0073]

혈청 단백질에 대한 2차원 겔 전기영동(2-DE) 분석을 위해 폴링된 혈청 샘플을 세 그룹으로 준비했다. Calbiochem ProteoExtract 제거 키트 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)는 제조업체의 지침에 따라 폴링된 혈청 샘플에서 알부민과 IgG를 제거하는데 사용되었다. 2-DE 샘플을 사용한 2-DE 및 이미지 분석은 이전에 설명한대로 수행되었다(비특허문헌 1). 혈청 단백질 샘플을 40mmol/L HCl(Tris-hydrochloride, pH 7.2) 및 1mmol/L EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 로 세척하고 9.5mol/L 요소, 4 % CHAPS(3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate) 및 35 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)로 용해시켰다. 8 mol/L urea, 4 % CHAPS, 10 mmol/L dithiothreitol (DTT) 및 0.2 % carrier ampholytes (pH 3.0-10.0)를 포함하는 재수화 용액을 가용화된 단백질 샘플 (30 µg)과 혼합하고 재 팽창 트레이 (Bio-Rad)에서 pH 3.0-10.0의 IPG(immobilized pH gradient) 스트립 (7cm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 적용했다. IEF(isoelectric focusing)은 단백질 IEF 세포 (Bio-Rad)를 이용하여 수행되었으며, 미리 설정된 3 단계는 첫 번째 컨디셔닝 단계 (15 분, 250Vh), 선형 전압 램핑 단계 (3 시간, 4,000Vh) 및 최대 전압 램핑 단계 (최대 30,000 Vh)로 이루어졌다. IEF 후, 스트립은 6 mol/L 요소, 2 % SDS(sodium dodecyl sulfate), 20 % 글리세롤, 2 % DTT 및 0.01 % 브로모 페놀 블루(bromophenol blue)를 함유하는 0.375 mol/L Tris 완충액 (pH 8.8)으로 평형화되었다. 평형화된 스트립을 2.5 % 요오도 아세트 아마이드(iodoacetamide)로 보충된 동일한 완충액으로 다시 평형화시켰다. 2D SDS-PAGE는 12.5 % 분리형 폴리아크릴 아마이드 겔 (polyacrylamide gel, 8-10cm)을 사용하여 겔 당 20mA에서 스테킹 겔없이 하루동안 수행되었다.

[0074]

겔에서 분리된 단백질 반점은 은 염색으로 시각화하고 Fluor-S MultiImager (Bio-Rad)를 사용하여 스캔되었다. PDQUEST 2D Gel Analysis Software 버전 6 (Bio-Rad)을 사용하여 각 샘플의 스팟 강도를 분석했다. 은 염색 후, 2-DE 겔에서 개별 반점을 잘라내어 1.5mL 튜브로 옮겼다. 그 다음, 30mmol/L 포타슘 페리시아나이드 (potassium ferricyanide)와 100mmol/L 티오 황산나트륨(sodium thiosulfate)을 혼합하고 (1 : 1 비율) 혼합물 100 µL를 시료에 첨가하여 갈색이 사라질 때까지 볼 텍싱했다. 반응을 멈추기 위해 증류수를 샘플 3x 로 첨가했다. 그런 다음, 500 µL의 200 mmol/L 중탄산 암모늄을 첨가하여 20 분 동안 겔을 덮었다. 용액을 버리고 겔 조각을 100 µL 아세토니트릴(acetonitrile)로 탈수시킨 후 진공 원심 분리를 사용하여 건조시켰다. In-gel 분해는 12.5 ng/mL 트립신이 있는 소화 완충액을 단백질 반점을 포함하는 겔 조각에 첨가하고 얼음 위에서 45 분 동안 인큐베이션했다. 다음으로 효소 용액을 제거하고 효소가 없는 완충액 20 µL를 첨가하여 효소 반응 동안 밤새

37 °C 에서 수화를 유지했다. 그 후 겔 조각을 30 분 동안 격렬하게 볼텍싱하였다. 소화된 용액을 새로운 1.5mL 튜브에 옮기고 진공 원심 분리를 사용하여 건조시켰다. 마지막으로, 샘플을 2 µL 0.1 % TFA(trifluoroacetic acid)에 용해시켰다.

[0075] 펩티드 질량 핑거 프린팅을 위해 50 % 아세토니트릴(acetonitrile)과 0.1 % TFA에 α-cyano-4-hydroxycinamic acid (40mg/mL)을 포함하는 매트릭스 용액을 준비했다. 동일한 부피의 매트릭스 용액을 샘플 용액에 추가하고 2 µL을 매트릭스 지원 레이저 탈착/이온화 비행 시간 (MALDI-TOF)/TOF 타겟 플레이트로 옮기고 빠르게 건조하고 탈 이온수로 세척했다. 실온에서 10 분 동안 건조시킨 후, 혼합 용액을 ABI 4800 Plus TOF-TOF 질량 분석계 (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)를 사용하여 MALDI-TOF-질량 분석 (MS) 및 MS/MS 분석을 수행했다. 장치는 분석을 위해 200Hz Nd:355nm YAG 레이저 작동으로 설정되었다. 신호/노이즈 비율이 > 25 인 피크가 선택 되었으며, 1kV 모드 및 1,000-1,250 회의 연속 레이저 노출에서 MS/MS 분석에 가장 강한 10 개의 이온이 사용되었다. NCBI (National Center for Biotechnology Information) 단백질 데이터베이스 (버전 20140415, 2,845 서 열, 921,323 잔기)의 Bos taurus 단백질을 분자량 범위가 ± 15 % 인 모든 MALDI-TOF-MS 스펙트럼 분석에 사용되었다. 2-DE는 50ppm의 펩타이드 질량 정확도를 허용했다. Protein Pilot V.3.0 데이터베이스 소프트웨어 (MASCOT V.2. 3.02 데이터베이스 검색 엔진 포함)는 50ppm의 질량 허용 오차에서 MS/MS 스펙트럼 데이터를 분석 하는데 사용되었다. P = 0.05의 통계적으로 유의미한 임계 값을 사용하여 개별 펩티드 이온 점수를 검출했다.

표 3

[0077]

Spot No.	단백질 이름	ID(NCBI)	MW(Da)	pI	예상 값	상승 그룹
1	Complement C3	A0A4W2D411	190190	8.36	3.20E-04	무증상 쉼터
2	Transthyretin	A0A4W2BU20	15831	5.91	2.40E-04	무증상 쉼터
3	Apolipoprotein A-IV	V6F7X3	42963	5.3	6.70E-24	무증상 및 증상 쉼터
4	Alpha-2-macroglobulin	R9QSM8	134613	5.75	1.40E-04	무증상 및 증상 쉼터
5	IgM heavy chain constant region	2232299	48512	5.68	3.10E+02	무증상 및 증상 쉼터
6	Complement component 3d	Q693V9	34593	6.68	1.10E-20	증상 쉼터
7	Alpha-1B-glycoprotein precursor	Q2KJF1	54091	5.29	2.40E-05	증상 쉼터
8	Kallikrein G	A0A1R3UGP4	28249	9.07	3.40E-02	무증상 및 증상 쉼터
9	Complement component C9 precursor	A0A3Q1MU98	58618	5.66	1.10E-08	증상 쉼터
10	Uncharacterized protein	A0A3Q1M3L6	41077	5.16	7.90E-04	증상 쉼터
11	hIgG1 heavy chain constant region	7547266	36510	6.09	2.70E-08	-
12	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	F1MMD7	101620	6.22	5.00E-03	-

[0079] 그 결과, 상기 [표 3] 및 [도 1] 에서 나타나는 바와 같이 2 개의 단백질 (보체 C3(Complement C3) 및 TTR(Transthyretin))은 건강한 대조군에 비해 무증상 쉼터 그룹에서만 풍부했으며, 4 개의 단백질 (보체 성분 3d(Complement component 3d), A1BG 전구체(Alpha-1B-glycoprotein precursor), 보체 성분 C9 전구체 (Complement component C9 precursor) 및 특성화되지 않은 단백질(Uncharacterized protein))은 증상 쉼터 그룹에서만 풍부했다. 또한, 4 개의 단백질 (아포지질단백질 A-IV(Apolipoprotein A-IV), A2M(Alpha-2-macroglobulin), IgM 중쇄 불변 영역(IgM heavy chain constant region) 및 칼리크레인 G(Kallikrein G))은 무증상 및 증상 쉼터 그룹 모두에서 풍부했다. hIgG1 중쇄 불변 영역 또는 소 혈청 알부민의 확인은 면역 글로빈 및 알부민의 불완전한 제거 가능성을 시사했다. A2M, A1BG 및 TTR은 진단 성능의 추가 평가를 위해 선택되었다.

실시예 3

[0081] 바이오마커 ELISA

[0082] 혈청 ELISA 및 대변 PCR의 결과를 기반으로 서로 다른 감염 그룹 내 각 바이오마커 후보의 혈청 수준을 확인하고자 하였다.

[0083] 각 동물의 혈청에서 선택된 세 가지 바이오마커 (A2M(alpha-2-macroglobulin), A1BG(alpha-1-beta glycoprotein), 및 TTR(transthyretin))의 정량적 검출을 위해 시판되는 ELISA 키트를 제조업체 지침(MyBioSource, San Diego, CA, USA)에 따라 사용했다. A2M, TTR 및 A1BG의 검출 범위는 각각 0.156-10 $\mu\text{g/mL}$, 312.5-5,000 ng/mL 및 2.5-50 ng/mL 이었다. ELISA 키트의 분석 내 및 분석 간 CV는 각각 <8 % 및 <10 % 이었다. 혈청 샘플에서 각 바이오마커의 농도를 결정하기 위해 표준 곡선이 생성되었다.

[0084] 그 결과, [도 2] 에 나타나는 바와 같이, 혈청 A2M 수준은 MAP 노출 (E, $p < 0.01$), 무증상 췌대 (SCS, $p < 0.0001$), 무증상 비-췌대 (SCNS, $p < 0.0001$) 및 증상 췌대 (CS, $p < 0.0001$) 그룹이 건강한 대조군보다 더 높았다. 혈청 A1BG 수치는 건강한 대조군보다 MAP 노출 군에서 유의하게 높았고 ($p < 0.05$), MAP 노출 군보다 무증상 췌대 그룹에서 유의하게 낮았다 ($p < 0.01$). 또한, 무증상 췌대 그룹은 무증상 췌대 그룹보다 더 높은 혈청 A1BG 수준을 보여주었다 ($p < 0.01$). 혈청 TTR 수치는 건강한 대조군보다 무증상 비 췌대 군에서 유의하게 높았지만 ($p < 0.05$) 다른 감염군 간에는 유의한 차이가 없었다.

실시예 4

[0086] 선택된 바이오마커의 진단 유틸리티

[0087] 상용 ELISA 키트와 비교하여 후보 바이오마커 단백질의 진단 성능을 그룹별로 제시했다 (표 4). 증상 췌대에 해당하는 그룹 1, 2 및 3의 모든 개체는 A2M ELISA에서 양성이었다. 특히 무증상 비 췌대이고 시판 키트 중 하나에서만 양성을 보인 그룹 5와 6의 26 마리 중 25 마리는 A2M-ELISA에 의해 양성으로 진단되었다. 무엇보다 무증상 췌대에 속하는 그룹 7 과 노출 군에 속하는 그룹 8 의 각각 A2M-ELISA를 이용한 진단에서 각각 27 마리 중 23 마리, 20 마리 중 18 마리가 양성으로 진단되었다 (표 3). ROC 곡선 분석은 바이오마커 기반 ELISA를 사용하여 서로 다른 감염 그룹 간의 차별 가능성을 제안했다. AUC 및 최적 컷오프 값이 계산되었다 (도 3). 건강한 대조군 ($n = 11$)과 감염된 소 그룹 ($n = 115$)을 모두 비교했을 때 A2MELISA는 AUC = 0.973 (95 % 신뢰 구간 [CI] : 0.946-1.000, $p < 0.0001$)으로 탁월한 차별력을 나타냈다. 민감도는 90.4 %, 특이도는 100 % 이었다. 반대로 A1BG ELISA는 AUC = 0.641 (95 % CI : 0.543-0.739, $p = 0.0048$), 민감도 50.4 %, 특이도 100 %로 불량한 판별력을 나타냈다. 유사하게, TTR ELISA는 AUC 값 0.512 (95 % CI : 0.348-0.677, $p = 0.8840$), 민감도 15.7 %, 특이도 100 %로 열악한 차별력을 보여주었다. IDEXX 상용 ELISA 키트는 AUC 값 0.796 (95 % CI : 0.720-0.872, $p < 0.0001$), 민감도 67.83 %, 특이도 100 % 로 공정한 차별력을 보여주었다. 또한 IDVET 상용 ELISA 키트는 AUC 값 0.828 (95 % CI : 0.753-0.904, $p < 0.0001$), 민감도 73.04 %, 특이도 100 %로 우수한 식별 능력을 보여주었다. 세 가지 바이오마커를 사용하여 얻은 ROC 곡선과 두 가지 상용 키트를 사용하여 얻은 ROC 곡선을 비교하면 A2M이 우수한 진단 성능을 보여 주었다 (도 3).

표 4

	그룹			A2M		A1BG		TTR		IDEXX ELISA		IDVET ELISA	
	PCR	IDEXX ELISA	IDVET ELISA	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
1	P	P	P	15	0	7	8	1	14	15	0	15	0
2	P	P	N	2	0	1	1	0	2	2	0	0	2
3	P	N	P	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
4	N	P	P	21	3	17	7	1	23	24	0	24	0
5	N	P	N	23	1	13	11	3	21	24	0	0	24
6	N	N	P	2	0	1	1	2	0	0	2	2	0
7	P	N	N	23	4	2	25	8	19	0	27	0	27

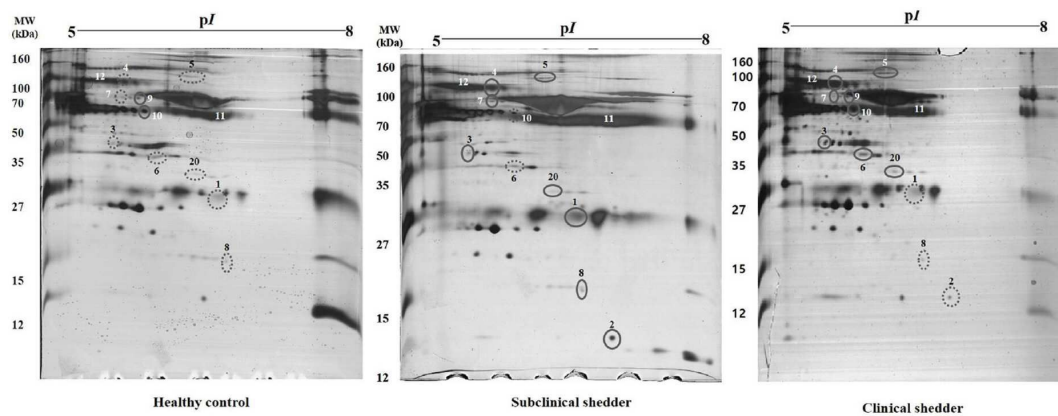
8	N	N	N	18	2	16	4	2	18	0	20	0	20
9	N	N	N	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11

[통계 분석]

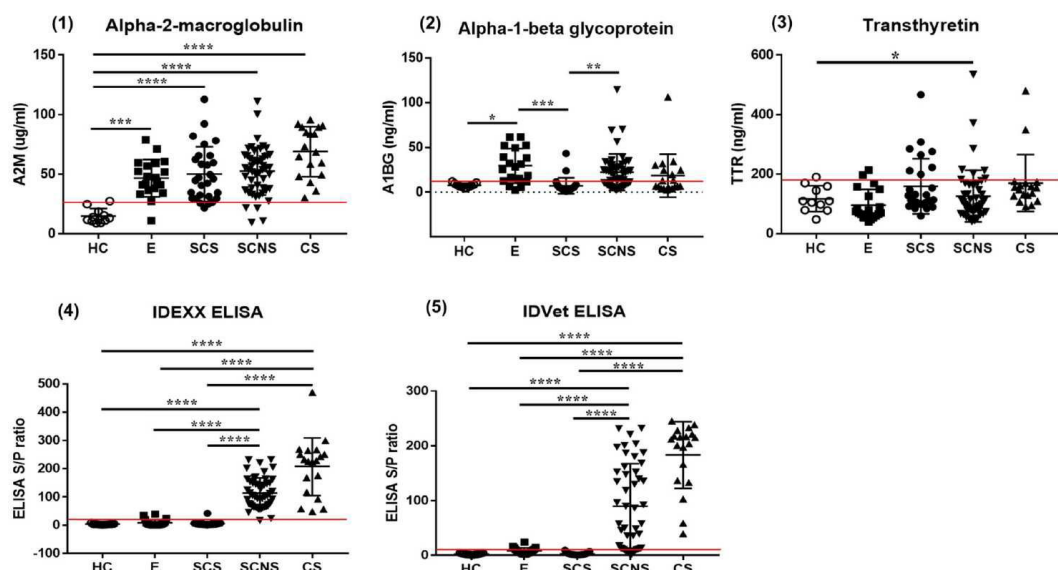
다른 감염 그룹 간의 Tukey 사후 테스트를 통한 ANOVA는 GraphPad Prism 소프트웨어 버전 7.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행되었다. 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 수신기 작동 특성 (ROC) 곡선 분석은 곡선 아래 영역 (AUC) 및 각 바이오마커 후보에 대한 최적의 컷오프 값을 결정하기 위해 수행되었다. ROC 곡선 분석은 MedCalc 소프트웨어 버전 19.4 (MedCalc Software, Ostend, Belgium)를 사용하여 수행되었다. 최적의 컷오프 값은 최대 Youden Index ($J = Se + Sp - 1$)를 나타내는 값으로 결정되었다. 서로 다른 감염 그룹과 건강한 대조군을 구별하는 능력은 다음과 같은 의미로 결정되었다. 구체적으로 AUC 값이 0.9 이상인 바이오마커는 가장 우수한 판별능력을 보유한 것으로 간주되었다. AUC 값 ≥ 0.8 및 <0.9 는 우수한 판별능력을 갖는 것으로 간주되었다. AUC 값 ≥ 0.7 및 <0.8 은 중간정도의 판별능력을 가진 것으로 간주되었다. AUC 값 <0.7 은 판별능력이 낮은 것으로 간주되었다.

도면

도면1



도면2



도면3

