

牛白血病 Virus 抗体測定을 위한 酵素免疫法¹⁾

崔 源 弼

慶北大學校 農科大學 獸醫學科

Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bovine Virus Antibody

Choi, Won Pil

Dept. of Veterinary Medicine, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to bovine leukemia virus(BLV) is described and compared its sensitivity with that of the agar gel immunodiffusion test (ID) with BLV glycoprotein (gp) antigen using 263 sera collected in Korea and Japan.

There was 98.5 per cent agreement between ELISA and ID when ELISA value, the value of tested serum (T) was divided with that of standard negative serum (N) after the value of control was eliminated from T and N (T-C / N-C), of 1.5 or greater was considered positive. One hundred and forty four (99.6%) of 145 sera which were positive by ID were greater than 1.5 by ELISA, and 115 (97.5%) of 118 sera which were negative by ID were less than 1.5 by ELISA.

As a result, it suggest that the ELISA test using BLV-gp antigen provides a useful serological tool for the diagnosis of BLV infection.

緒 論

牛白血病은 임-과系細胞의 異常增殖을 主徵으로 하는 腫瘍性疾病으로 牛에서 多發하고 있으며, 우리나라를 위시하여^{3,5)} 그 分布는 거의 全世界에 이르고 있다.^{2,4,6,7,9,13)}

牛白血病의 病型 中에서 流行型은牛白血病 virus (BLV) 에 의하여 일어나는 傳染病으로

현재 血清反應을 포함한 여러가지 診斷法이 確立되어 있고, 유-롬의 일부 나라에서는 防疫對策도 樹立되어 있다.

流行性牛白血病의 血清學的 診斷이 可能해 짐으로서, 종래의 임-과球의 增加를 基準으로 하는 方法^{1,3)} 보다 感度, 容易性 및 正確性的의 견지에서 血清反應의 우수성이 증명되고 있다.^{8,9,12)} 현재까지 알려진 血清反應은 gel 內沈降反應 (ID), 間接螢光抗体法, 補體結合反

1) 本 研究은 北海道大學 獸醫學部 家畜傳染病學教室에서 實施하였으며 伊澤久夫教授 및 教官들에게 深甚한 謝意를 表하는 바임.

應(CF), 中和試驗 및 radioimmunoassay 등이 있으며, 이들 중 BLV의 糖蛋白質을 抗原으로 한 ID(gp-ID)가 간편하며 또한 좋은 結果를 나타내고 있다.^{8,9,10,12)}

한편, 최근에 血清 抗体測定에 있어서 신속하고 感度가 높은 酵素免疫法(ELISA)을 應用한 BLV의 抗体測定方法이 研究報告되고 있으나^{11,14)} 이들 報告는 陽性 및 陰性의 判定基準值를 설정함에 있어서 差異를 보이고 있으며 또한 ID의 成績과 ELISA의 成績 사이에 약간의 不一致性을 지적하고 있다. 따라서 앞으로 더 많은 研究가 뒷받침되어야 할 필요성이 要求되고 있다.

本 研究에서는 BLV의 gp-ID用 抗原³⁾을 사용하여 BLV 抗体測定을 위한 ELISA 術式의 確立과 gp-ID와 ELISA의 成績을 比較檢討하여 ELISA의 感度を 알고져 한다.

材料 및 方法

抗原 : Dr. Onuma⁷⁾ (北海道大學 獸醫學部 家畜傳染病學教室)로 부터 분양받은 ID用의 BLV-gp抗原이며, BLV가 持續感染되고 있는 細胞(cell line A-77thv+)의 培養液을 濃縮한 것으로 標準 抗BLV羊(V₃₄) 血清에 대한 CF에서 4單位가 되도록 처리된 것이다. 上記 gp抗原을 다시 50배로 稀釋하여 사용하였으며, 이 抗原은 ELISA를 위한 予備試驗에서 V₃₄ 血清에 대한 安全性과 牛바이라스性 下痢의 抗血清에 대하여 交叉反應이 認定되지 않음이 확인된 것이다.

血清 : 乳牛, 韓牛(韓國) 및 肉牛(日本) 등 263血清을 供試하였다. 이들 血清은 BLV에 대한 gp-ID陽性이 145例, 陰性이 118例 이었던 것으로 ELISA試驗에서는 이들 血清을 0.05% Tween20과 0.5% 牛血清 albumin(BSA)이 포함된 PBS(PH 7.4)로서 10배 稀釋하여 사용하였다.

ELISA試藥 : Horseradish Peroxidase를 抗牛 IgG 兔血清 抗体에 標識한 (Milse Lab. Inc., U. S. A) 것으로 0.01% BSA 加

PBS로 300배 稀釋한 것을 사용하였다.

酵素活性을 위한 基質 : 每 使用前에 4 mM 5-amino salicylic acid(0.8mg/ml 증유수) 溶液을 만들고 1N NaOH 로 PH 6.0으로 補定하여, microplate에 分注 即前에 H₂O₂를 0.05% 되도록 加하여 使用하였다.

ELISA 術式 : 間接 micro-ELISA 法은 E. Voller et al (1976)¹⁵⁾의 方法에 準하였다.

1) 0.05M carbonate buffer (PH 9.6)로서 300배 稀釋된 BLV의 gp抗原을 microplate의 各孔當 100 μ l 를 分注하여, 37 $^{\circ}$ C, 하룻밤 放置하여 乾燥시킨 후

2) 0.05% Tween20 加 PBS로서 3회 洗滌

3) 10배 稀釋된 可檢血清 100 μ l 를 各 2개의 孔에 注加하여 37 $^{\circ}$ C, 2시간 反應시킨 후, 上記 2)와 같이 洗滌.

4) ELISA試藥을 各孔에 100 μ l 注加하여 37 $^{\circ}$ C, 30分 反應시킨 後, 上記 2)와 같이 洗滌.

5) 基質인 5-amino salicylic acid 를 各孔에 100 μ l 注加하여 室溫(暗所)에서 1시간 作用시킨후 492nm의 吸光計(Multi-Micro-elisa Reader AM115, Dynatech)로 測定하였다.

6) 對照로서 各 microplate當 BLV의 標準, 陽性 및 陰性血清을 各 2孔씩 두었고, 上記 術式중에서 血清만을 注加하지 않은 2개 孔을 두었으며, 血清을 注加하지 않은 2개 孔의 平均 吸光值를 對照值(C)로 하였다.

判定基準 : 可檢血清(T) 및 標準 BLV 抗体陰性血清(N)의 吸光值(C)를 除한 후, T/N值로서 ELISA價를 算定하였다. (T-C/N-C).

ID反應 : BLV의 gp抗原을 이용한 ID反應은 Onuma et al⁷⁾ 과 Phillips et al¹⁰⁾의 方法에 準하였다.

結果 및 考察

BLV의 血清抗体測定을 위한 microplate ELISA法の 確立과 ELISA價와 gp-ID의 結果를 比較檢討하여 血清抗体의 陽·陰性判定의 基準値와 ELISA의 感度を 알기 위하여 乳牛, 韓牛 및 肉牛의 血清中, gp-ID에서 陽性인 血清 145例와 陰性인 血清 118例에 대한 ELISA價를 測定한 成績은 圖와 같다.

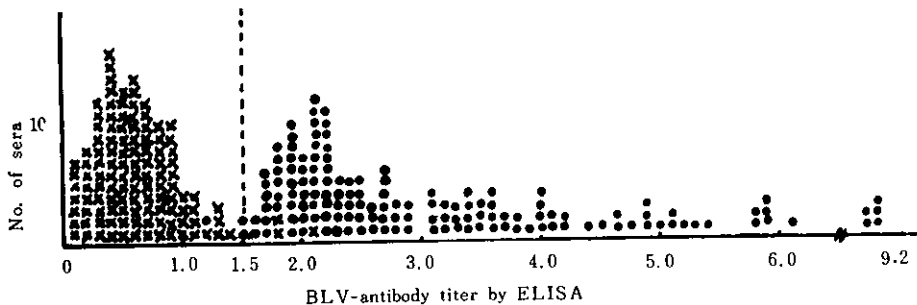


Fig.1. BLV-antibody titer by ELISA compared with gp-ID positive and negative sera.

- x: BLV-ID negative sera (118 case)
- : BLV-ID positive sera (145 case)

내었으며, 이들중 대부분이 1.7以上の ELISA價를 나타내고 있었다. 이상의 成績에서 ELISA價 1.5를 BLV의 血清抗体陽性 및 陰性の 基準値로 생각하면, gp-ID 反應에서 陰性이었던 것이 ELISA價에서 3例(2.5%)가 陽性反應을 나타내었고, gp-ID 反應에서 陽性血清이 ELISA에서 陰性으로 判定된 것은 1例(0.4%)로서, 총 213例에서 gp-ID 反應과 ELISA에 의한 成績과의 差異가 생긴 것이 4例(1.5%)이며, 98.5%가 서로 一致되고있다. 한편 上記 4血清中 ELISA 陽性 2血清과 陰性 1血清은 이미 Onuma, et al⁹⁾ (1975)의 CF反應에 供試되었던 血清으로, CF反應成績이 ELISA의 成績과 一致되고 있어서 ELISA의 感도가 gp-ID보다 높다는 것을 證明해 주고 있다.

따라서 ELISA에 의한 BLV의 抗体測定에 있어서 ELISA價가 1.5以上の 것을 陽性判定의 基準値로 定함이 타당한 것으로 思料된다.

BLV의 血清抗体測定을 위하여 ELISA

gp-ID反應에서 陰性인 血清 118例의 ELISA價는 0.2~2.1의 範圍이었고, 3例를 제외한 115例의 血清이 ELISA價 1.4以下の 數値를 나타내었으며 대부분이 1.0以下 이었다. 한편 gp-ID反應에서 陽性이었던 145例에서는 ELISA價가 1.2~9.2로서 1例(1.2)를 제외한 144例가 1.5以上の 數値를 나타

法을 應用한 研究는 Fbli et al (1981)¹⁰⁾ 과 Todd et al (1980)¹⁶⁾ 의 報告가 있다. Poli et al은 BLV標準血清(1:20稀釋)에 대한 ID에서의 強한 沈降線이 認定되는 BLV-gp抗原을 사용하였던, 血清檢査에서 陽性 및 陰性の 基準을 492nm의 吸光計에서 吸光度가 224m μ 인 것을 陰性, 237m μ 以上인 것을 陽性으로 한 結果, ID와의 比較에서 440例中 95%가 一致되었으며, ELISA가 ID보다 약간 우수하였음을 인정하고 있다. 한편 Todd et al은 fatal lamb kidney細胞培養 上層液을 超遠心分離法으로 100倍 濃縮한 BLV를 抗原으로 하였고, BLV의 標準抗血清(P)과 陰性血清(N)을 對照로 하여 449nm의 吸光値를 P/N로 算出하였다. 즉 標準 BLV 抗体陰性 血清値로서 被檢血清의 吸光値를 나누어서 1.5以上の 値를 陽性基準으로 한 結果 ELISA와 ID 사이에 95~98%의 一致性을 인정하고 있다. 本實驗에서 사용한 BLV의 gp抗原은 補體結合反應에서 4單位의 抗原價가 되도록 만들어진 gp-ID用的 抗原을 다시

50배 稀釋하여 ELISA의 抗原으로 使用하였으며, BLV 抗体 陽性 및 陰性 判定基準을 설정함에 있어서 血清만을 加하지 않은 對照孔의 平均 吸光值(C)로 被檢血清의 吸光值(T) 및 標準 陰性血清의 吸光值(N)를 除한 후 Todd et al의 方法과 같이 T/N로 하였다.

本 實驗에서 BLV의 抗体陽性 基準을 1.5 以上으로 하였을 때 ELISA의 成績과 gp-ID의 成績이 98.5%의 一致性과 ELISA가 gp-ID보다 약간 우수 함이 확인되었다. Todd와 같이 陽性判定基準値는 1.5로서 같지만, 血清만을 加하지 않은 孔의 平均 吸光值를 除하여 증으로서 BLV의 抗体 有無 및 抗体量에 따른 ELISA值의 正確性 및 抗体量의 差異에 따른 ELISA值가 쉽게 區別될 수 있었다고 思料된다.

이상에서, gp-ID 用의 적은量的 抗原을 使用하여 gp-ID에서의 成績과 同一 또는 더 우수한 結果를 얻음으로서, 本 ELISA法이 BLV의 血清抗体의 測定 및 BLV의 感染診斷에 實用性이 充分하다고 思料된다.

摘 要

牛白血病virus에 대한 血清抗体의 測定을 위한 間接酵素免疫法(ELISA)의 確立 및 ELISA法의 感度を 알기 위하여 寒天 gel 免疫擴散法(ID)과 比較檢討하였으며 韓牛, 乳牛 및 肉牛 등 264頭의 血清을 供試하였다.

血清을 加하지 않은 孔의 吸光值(C)로서 血清值를 除한 후, 標準BLV抗体陰性血清值(N)로서 被檢血清值(T)를 나눈值(T-C/N-C)가 1.5以上인 것을 BLV抗体 陽性으로 하였을 때 gp-ID의 成績과 98.5%(259/263)가 一致되었다.

gp-ID 陽性血清 145例중 144例가ELISA 陽性으로 99.6%, gp-ID 陰性血清 118例중 115例가 ELISA陰性으로 97.5%가 一致되었다.

이상에서와 같이 gp-ID用의 BLV 抗原을 使用한 ELISA法은 gp-ID와 同等 또는 더

感도가 우수한 BLV의 血清抗体測定法 임이 입증되었으며 實用性이 充分하다고 思料된다.

引 用 文 獻

- 1) Bendixen, H. J. 1959. Studies on leukosis in cattle. 3. Control of leukosis herds using hematological examination. Nord. Vet. Med. 11;73 11; 733
- 2) Bendixen, H. J. 1965. Bovine enzootic leukosis. Advances in Vet. Sci. 10; 129
- 3) Choi, W. P. 1982. Survey for antibodies to bovine leukemia virus in dairy and Korean native cattle. Korean J. Vet. Res. 22; 23-26.
- 4) Flensburg, J. C. and B. Streiffert. 1977. The control of bovine leukosis in Denmark, epidemiologic and diagnostic aspects. Nord. Vet. Med. 29; 49
- 5) Jun, M. H. 1981. Epizootiological aspects of bovine leukosis in Korea. Seminar on animal health problems in the Asian and Pacific Region. 1-6
- 6) Olson, G., H.E. Hoss, J. M. Miller, and L. E. Baumgartener. 1973. Evidence of bovine c-type(leukemia) virus in dairy cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass. 10; 129
- 7) Onuma, M., C. Olson, D. M. Driscoll. 1976. Properties of two isolated antigens associated with bovine leukemia virus infection. J. Natl. Cancer Inst. 57; 571
- 8) Onuma, M., C. Olson, L. E. Baumgartener, and L. D. Pearson. 1975. An ethersensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. J. Natl. Cancer Inst. 55; 1155
- 9) Onuma, M., T. Honma, and T. Mikami. 1979. Isolation of a enzootic forms of bovine leukosis. J. Comp. Path. 80; 159
- 10) Phillips, M., J.M. Miller, and M.J. Van Der Maaten. 1978. Isolation of a precipitin antigen from cell cultures persistently infected with leukemia-virus. J. Natl. Cancer Inst.

- 60; 213
- 11) Poli, G., A. Balsari, A. Toniolo, W. Panti, and G. Vacirca. 1981. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for bovine leukemia virus antibody. *J. of Clinic. Micro.* 13; 46-48
 - 12) Ressang, A. A. 1976. Hematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis of enzootic bovine leukemia (EBL). *Vet. Microbiol.* 1; 159
 - 13) Theilen G.H., D.L. Dungworth, J. Lengyel, and L. S. Rosenblatt. 1964. I. Epizootiological and hematological aspects. *Health Lab. Sci.* 1; 96
 - 14) Toff, D., B. M. Adair, and G. Wibberley. 1980. An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet. Rec.* 9; 124-126
 - 15) Voller, A., D. Bidwell, and A. Bartlett. 1976. *Manual of clinical immunology.* p. 506-512. Eds. N. Rose and H. Friedman. American Society for Microbiology.