

## 효소면역법에 의한 닭 전염성 후두기관염 바이러스 항체 측정에 관한 연구

임숙경, 위성하, 최정옥\*, 고흥범\*

전라남도 가축위생시험소 동부지소, 전남대학교수의과대학\*

## Detection of Antibody to Infectious Laryngotracheitis Virus by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Suk-kyoung Im, Sung-Ha Wee, Chung-Ok Choi\*, Hong-Bum Koh\*

East Branch of Chonnam Veterinary Service Laboratory

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University\*

### Abstract

In order to establish and enzyme-linked immunosorbent assay to ILTV, field virus strain of ILTV was propagated in chorioallantoic membrane of the embryonated eggs, purified and used as antigen. The antisera selected from the field samples and immunized chickens based on serum neutralization test were used as the standard positive and negative sera in all tests.

It was found that optimal antigen concentration was  $2\mu\text{g}$  of protein per well and a 1 : 100 dilution of standard serum showed low background optical density with negative serum and high P/N values of positive sera.

A 1 : 500 dilution of the rabbit anti-chicken IgG peroxidase conjugate produced a high P/N values and thirty minutes was chosen as suitable time to read the optical density of the enzyme substrate reaction and optical density was consistent during the 16 hours after stopper was treated.

When coated antigen was kept on microplate for varying time up to 16 hours at  $4^{\circ}\text{C}$  or  $37^{\circ}\text{C}$ , no significant difference was observed between the treatment. The coated antigen could be kept without change of antigenicity for at least one month at  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  and room temperature.

When blocking buffer containing bovine serum albumin was mixed directly with conju-

gate and serum at 10% level induced higher P/N values compared to blocking antigen coated microplate with the same blocking buffer. The coefficient of correlation between ELISA and SN test was 0.577.

When antibody response of chickens, vaccinated with ILTV, was examined by ELISA and SN test, antibody rising and decay pattern between the two test was similar until 11 weeks of age. However 12 weeks onward antibody titer checked on by SN test was slightly lower than that tested by ELISA.

**Key words** : infectious laryngotracheitis virus, enzyme linked immunosorbent assay, serum neutralization test, P/N value.

## 서 론

닭 전염성 후두기관염(Avian Infectious Laryngotracheitis : ILT)은 alphaherpesvirinae에 속하는 fowl Herpesvirus I<sup>1)</sup>, 즉 ILTV에 의해 발생하는 질병으로 1925년 May와 Tittsler<sup>2)</sup>가 최초로 본 병의 발생을 보고한 이래 호흡기증상을 주증으로 하여 전세계적으로 발생되고 있다. 우리나라에서는 1980년초까지 발생 보고가 없었으나, 1982년 2월 강화도에서 최초로 이 병이 확인되어 그 후 6개월 이내에 전국적으로 유행한 전염병이다.<sup>3, 4, 5)</sup>

본 병은 호흡곤란, 기침, 결막염, 비루, 객담, 혈담등의 호흡기증상과 설사, 식욕감퇴, 산란율 감소등의 다양한 임상증상<sup>6)</sup>으로 일령에 관계없이 발생되며, 일단 감염된 닭은 회복되더라도 병원 바이러스를 상당기간 보유하고 있어 이 병의 근절에 어려움 문제점이 있다.

최근에는 한 해에 미국에서 200건, 캐나다에서 73건의 보고<sup>7)</sup>가 있으며, 영국에서는 mild strain에 의해 전형적인 호흡기증상을 수반하지 않고 발생<sup>8)</sup> 되고 있어 정확한 진단에 어려움이 많다.

본 병의 진단 방법으로는 병원체를 분리 동정하는 것이 가장 정확한 방법이지만 긴 시간과 복잡한 실험과정을 필요로 하는 단점이 있으며, 기

관 상피세포에서 핵내 봉입체를 확인하는 진단 방법<sup>9)</sup>이 있으나, 봉입체 출현 기간이 짧고 다른 핵내 봉입체 형성 바이러스와 감별에 곤란한 단점이 있다. 혈중항체 검사방법으로는 Agar Gel Precipitation(AGP)<sup>10)</sup> Serum Neutralization (SN)<sup>11, 12)</sup>, Fluorescent Antibody(FA)<sup>13, 14)</sup>, Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA : 효소면역법)<sup>15-19)</sup> 등 여러가지 방법이 이용되고 있다. 이 중 AGP는 간편하지만 민감성이 떨어지는 반면 SN은 정확하고 민감하지만 시간과 비용이 많이 소요되며, 복잡한 실험과정을 필요로 하기 때문에 최근에는 신속하고 간편하면서도 민감한 효소면역법이 바이러스성 질병<sup>20, 21)</sup>은 물론 세균<sup>22)</sup>, 기생충<sup>23)</sup> 등의 질병의 진단<sup>24)</sup>에 많이 이용되고 있다.

본 병에 대한 효소면역법을 적용한 연구는 1982년 Meulemans와 Halen<sup>16)</sup>이 ILTV 백신접종계군의 항체 검출에 있어서 효소면역법의 높은 특이성을 시사한 이래 1983년 York 등<sup>18)</sup>은 비특이 반응을 줄이기 위해 혈청 및 microplate의 처리, 희석용액의 성분변화등 여러가지 방법을 시도하였다. 그후 1985년 Adair 등<sup>15)</sup>은 혈청학적 진단 방법인 AGP, SN, FA를 ELISA와 비교하여 ELISA가 SN만큼 정확하기 때문에 민감도가 낮은 FA방법을 보완하며 신속하게 처리할 수 있는 방법임을 시사하였다. 1988년 York

와 Fahey<sup>19)</sup>는 ILTV의 단크론 항체를 이용하여 바이러스를 분리 동정해 내는 것만큼 정확하면서도 신속하게 진단할 수 있는 ELISA법을 개발했으며, 같은 해 Ohkubo 등<sup>17)</sup>은 avidin-biotin의 강력한 상호작용을 이용한 ELISA법을 시도하여 SN과의 상관관계가 100%임을 나타냈다.

본 연구는 국내에서 아직 시도되지 않은 ILTV에 대한 ELISA법을 확립하여 백신접종계군의 항체가를 screen함으로써 백신 효능검사 및 백신의 접종시기 결정에 이용할 뿐만 아니라 다른 호흡기 질병과의 감별 진단에 이용하고자 하는 목적으로 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

본 실험에서 사용된 바이러스는 전남대학교 수의과대학 실험실에 의뢰된 병계로부터 분리한 ILTV를 사용하였다.

### 혈청

SN 및 ELISA에 사용된 혈청은 실험실에서 분리한 ILTV로 면역시킨 닭에서 채혈한 혈청과 가검 의뢰된 병계로부터 채취한 혈청 중 중화항체가 기준으로 선별하여 표준혈청으로 사용하였다. 강양성(strong positive), 약양성(weak positive), 음성(negative) 혈청의 SN가는 각각  $2^5$ ,  $2^2$ ,  $2^0$ 이었다.

### 발육란 및 백신접종계군

세포 배양 및 바이러스 증식용 발육란과 백신접종용 닭은 양계장(고창양계)에 구입하여 사용하였다.

### 계태아 간(肝) 세포 배양

세포 배양은 13-14일령의 발육란에서 간장을 무균적으로 적출하여 phosphate buffered saline(PBS : 8g NaCl, 1.15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1L, pH 7.2)으로 세척한 후 세절한다

음 다시 PBS로 2회 세척하였다. 세절된 간 조직을 0.25% trypsin PBS용액으로 15분씩 2회 소화시켜 16겹 거어즈에 여과한 후 그 여액을 원심분리하여 상청액을 버린 후 침전 세포를 5% fetal calf serum이 함유된 Minimal Essential Medium(MEM) 증식배지에  $8 \times 10^5$  /ml 되도록 부유시켜 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기내에서 배양하였다. 단층세포는 배양 1-2일 후에 형성되었다.

### 중화시험용 항원

9~11일령 발육란의 난각을 옥도정기와 알콜로 소독하여 인공기실을 만든 후 ILTV를 장노막에 0.1ml 접종하여 37°C에서 5일간 배양하였다. 장노막의 pock부분을 수거하여 유제한 후 3,000rpm에서 20분간 원심하여 세포 성분을 제거한 뒤 -70°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다.

### 중화시험

ILTV에 대한 중화시험은 microplate에 배양한 계태아 간(肝) 세포를 이용하였다. 혈청은 U자형 microplate에서 MEM배지로 2배수 계단 희석하여 0.025ml에 100TCID<sub>50</sub>가 되도록 조정된 동량의 바이러스와 혼합한 다음 37°C에서 1시간 작용시켰다. 단층이 형성된 microplate의 배양액을 제거한 후 한 well당 작용시킨 바이러스와 혈청 혼합액을 0.025ml씩 분주하고 37°C에서 40분간 흡착시킨후 0.5% fetal calf serum이 함유된 MEM배지를 넣어 37°C에 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 5일간 배양한 후 세포 변성 효과를 관찰하였다. 세포 변성이 완전히 나타나지 않은 최고 혈청 희석배수의 역수를 중화항체가로 하였다.

### 효소면역법용 항원제조

항원정제는 York 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다.

SN시험용 항원을 초음파 분쇄기로 12-16 Amplitude Micron(AM)에서 1분간 처리하여 고속원심분리기(Beckman JA-10 rotor)로 4°C,

5,500×g에서 30분간 원심하여 세포성분을 제거하고 상층액을 다시 초고속원심분리기(Beckman 70 Ti rotor)를 이용하여 4℃에서 80,000×g로 30분간 원심 후 상층액은 버리고 농축된 바이러스를 3ml PBS에 부유시켰다(50×농축). Sucrose를 PBS에 5% 농도차이로 30%부터 65%되게 녹인 후 10 pound 10분 고압 멸균하여 Beckman초고속원심분리기(SW-28 rotor)의 원심관에 65% sucrose 5ml, 30% sucrose 12ml를 중층시킨 후 3ml의 50배 농축 바이러스를 그 위에 조심스럽게 넣어 4℃, 80,000×g에서 1시간 30분간 원심하였다. 30%와 65% sucrose 사이에 형성된 band를 투석막에 넣고 4시간 동안 4번 PBS를 교환하면서 투석한 바이러스를 30%부터 65%까지 5%간격으로 중층시킨 후 그 위에 넣어 Beckman초원심분리기(SW-28 rotor)로 4℃에서 80,000×g로 1시간 30분간 원심하였다. 35%와 40%에 형성된 band를 채취하여 투석막에 넣고 4시간동안 4번 PBS를 교환하면서 투석시킨 바이러스에 NaN<sub>3</sub>를 0.01%농도가 되게 넣어 시험관에 0.5ml씩 분주하여 -70℃ 보관하면서 항원으로 사용하였다. 항원은 Lowry 등<sup>25)</sup>의 방법에 의해 단백질 함량을 측정하였다.

#### 효소표지항체 및 Substrate

효소표지항체로는 horseradish-peroxidaseconjugated rabbit antichicken IgG (#Lot 15757, Cappel Labs, Cochranville, Pennsylvania)를 PBS에 10배 희석한 후 -70℃에 보관하고, 사용할 때는 bovine serum albumin(BSA : #Lot 126F-0052 Sigma chemical Co, U.S.A)이 4% 포함된 PBST(PBS+0.05% Tween 80)에 희석하여 사용하였다.

발색제로는 orthophenylenediamine(OPD : #Lot 93F-5017 Sigma chemical Co, U.S.A)을 사용하였으며, substrate로서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하였다. phosphate-citrate buffer(PCB, pH 5.0, 25.7m, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24.3ml 0.1M C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>(OH)(COOH)<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O, 50ml H<sub>2</sub>O) 10ml를 4mg

의 OPD와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용직전에 첨가하였다.

#### ELISA술식

ELISA는 Meulemans 등<sup>16)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다.

**항원 coating** : 항원은 50mM carbonatebicarbonate buffer(1.5g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.9g NaHCO<sub>3</sub>, 1L, pH 9.6)로 단백질양이 well당 4,000ng에서 31.25ng까지 함유되도록 22.5배에서 2,880배까지 계단희석하여 96 well ELISA용 plate에 well당 100μl씩 넣고 37℃에서 1시간, 3시간, 12~16시간, 4℃에서 12~16시간 각각 처리하였다. plate에 coating시킨 항원의 보존성 및 보관적정 온도를 알아보기 위해 항원을 37℃에서 1시간 coating시킨 후 여액을 제거하고 washing후 실온, 4℃, -20℃, -70℃에 30일간 보관하여 즉시 처리한 것과 비교하였다.

**세척** : 세척은 각 단계마다 washing buffer인 PBST(PBS+0.05% Tween 80)를 multichannel pipette(Labsystems, Pultitie 7,00880 Helsinki, Finland)으로 20μl씩 각 well에 부드럽게 넣고 3분간 정체시킨 후 plate를 뒤집어 강하게 뿌려 일시에 제거하는 방법으로 3회 반복하였다. 세척용 buffer는 4℃에 보관하면서 1주일 이내에 사용하였다.

**혈청희석** : 표준혈청은 PBST+4% BSA로 12.5배에서 1,600배까지 희석하여 well당 100μl씩 넣고 37℃에서 1시간 작용시킨 후 ELISA반응을 검사하였다. 가검혈청은 1 : 100의 한 단계만 희석하여 사용하였다.

**효소표지항체 처리** : 항원과 혈청을 작용시킨 후 효소표지항체는 PBST+4% BSA용액으로 250배에서 32,000배까지 희석하여 Well당 100μl씩 넣고 37℃에서 1시간 작용시켰다.

**substrate 처리 및 발색정지** : substrate는 각 well에 100μl씩 넣고 60분까지 작용시킨 후 15분, 30분, 60분에 판독하여 비교하였고, 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 동량 넣어 발색을 정지시켰으며, 발색 정지 후 1시간, 2시간, 4시간, 16시간후까지 흡

광도와 P/N치(음성혈청치에 대한 양성혈청치) 변화를 검사하였다.

판독: 판독은 ELISA판독기(Bio-Tek, Instruments, Inc. Kinetics Reader Model EL 312)를 이용하여 파장 490nm에서 흡광도를 측정하였으며 흡광도는 P/N치를 산출하여 SN 항체가와 비교하였다.

#### 통계처리

SN항체가와 P/N치의 상관관계는 직선회귀식  $Y=a+bx$  ( $b=\frac{\sum xY}{\sqrt{\sum x^2}}$ ,  $a=Y-bx$ ) 및 상관계수  $r=\frac{\sum xY}{\sqrt{\sum x^2} \cdot \sqrt{\sum Y^2}}$ 로 나타냈다. 상관관계의 유의성은 T-test로 검정하였다.

#### 백신접종

3주령 산란계 15수를 구입하여 10수는 국내에서 생산된 ILT백신(생독백신, 30후기 03, 중앙가축전염병연구소)을 ILT백신 희석액 30ml에 희석하여 0.03ml씩 점안 접종하였으며, 3주후인 7주령에 ILT백신 희석액 10ml에 희석하여 0.03ml씩 한쪽눈에 재접종하였다. 5수는 대조군으로 격리시켜 사육하였다. 모든 계군은 1주 간격으로 채혈하여 37℃에서 4시간 정치한 후 혈청을 분리하여 CBC bottle에 넣어 56℃ 항온수조에서 30분간 비동화시켜 -20℃에 보관하였다.

## 결 과

#### 효소면역법의 표준화시험

##### Coating 항원의 적정농도

정제항원의 단백질량은 900 $\mu$ g/ml이었다. 96 well microplate의 각 well에 4,000ng에서 31.25ng이 함유되도록 22.5배에서 2,880배까지 희석하여 100 $\mu$ l씩 넣어 나타난 흡광도와 P/N치는 표 1과 같다. 항원량이 많을수록 흡광도도 높아지는 경향이 있으나 2,000ng으로 coating시켰을 때 강양성혈청에서 가장 높은 P/N치를 나타냈으며, 약양성혈청에서도 4,000ng으로 coating시켰을 때와 유사한 P/N치를 나타냈다.

#### 혈청 희석농도의 결정

정제항원을 일정하게 하였을 때 혈청 희석배수에 따른 흡광도와 P/N치의 결과는 표 2와 같다. 혈청 희석배수가 낮을수록 흡광도는 높게 나타나고 있다. 그러나 음성혈청의 경우 혈청 희석 1:25에서 1:400사이의 흡광도는 거의 일정함을 알 수 있다. 강양성혈청은 혈청 희석 1:100에서 P/N치가 가장 높게 나타났으며, 약양성혈청은 12.5배에서 100배까지의 희석배수에서 유사한 P/N치를 보였다.

#### 효소표지항체의 적정농도

정제항원을 일정하게 하고 표준혈청을 1:100 희석하여 37℃에서 1시간 작용시킨 후 conjugate를 1:250에서 1:32,000까지 희석하여 작용시킨 결과는 표 3과 같다. conjugate농도가 높을수록 흡광도는 높아지는 경향이 있지만 P/N치는 강양성 및 약양성혈청 모두 1:500에서 가장 높았으며 음성혈청은 1:500 및 1:1,000의 희석배수에서 유사한 흡광도를 나타냈다.

Substrate 처리시간 및 정치시간의 OD에 대한 영향

substrate를 60분까지 작용시켰을 때 OD값의 변화는 그림 1과 같이 양성 및 음성혈청 모두 흡광도에 변화가 없었다. 발색정지후 2시간까지는 양성 및 음성혈청의 흡광도는 높아졌으나, 16시간까지 관찰한 결과 P/N치에 있어서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다(그림 2).

#### 항원 coating의 방법

항원의 처리 온도와 시간에 따라 항원 coating 정도에 차이가 있는지 알아보기 위하여 4℃에서 12~16시간, 37℃에서 1시간, 3시간, 12~16시간 처리하여 비교한 결과를 표 4에 나타냈다. 4℃와 37℃에 over night 처리했을 때 37℃에서 흡광도는 높았지만 P/N치의 차이는 인정되지 않았으며 37℃에서 시간을 연장하였을 때도 양성 및 음성혈청의 흡광도 및 P/N치에 있어서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

#### Coating antigen의 보존성

coating된 항원의 온도와 시간의 경과에 따른

보존성을 알아보기 위해 37℃에서 1시간 coating시킨 후 -70℃, -20℃, 4℃, 실온에서 30일 동안 보관했던 plate와 즉시 처리한 것과 비교한 결과는 표 5와 같다. 즉시 처리한 경우 흡광도가 약간 높았지만 1개월 보관 기간동안 온도에 따른 흡광도의 차이는 강양성, 약양성 및 음성혈청 모두 인정되지 않았다.

#### Blocking 및 BSA 농도 결정

항원이 coating 되지 않는 부위를 blocking하기 위해 항원 coating 후 blocking buffer(PBS +0.05% Tween 80+4% BSA)를 well당 100 $\mu$ l

씩 넣고 37℃에서 1시간 작용시킨 것과 serum과 conjugate를 blocking buffer에 희석하여 blocking시킨 것과 비교한 결과는 표 6과 같이 후자의 방법이 음성혈청의 background도 낮고 양성 혈청의 흡광도도 높게 나타났다. diluent buffer(PBS+0.05% Tween 80)에 BSA의 농도를 20%, 10%, 4%, 1% 및 0% 되게 넣어 blocking한 결과 BSA농도가 낮을수록 양성 및 음성혈청의 흡광도는 높았으나 10%에서 음성혈청의 background를 배제하면서 높은 P/N치를 얻을 수 있었다(그림 3).

Table 1. Optical density(OD) and P/ N values depending on coating antigen concentration

Amount of protein /well(ng)	Strong positive		Weak positive		Negative OD
	OD	P /N	OD	P /N	
4,000.00	0.67	3.53	0.47	2.47	0.19
2,000.00	0.63	3.94	0.39	2.44	0.16
1,000.00	0.46	3.54	0.28	2.15	0.13
500.00	0.27	2.70	0.17	1.70	0.10
250.00	0.17	2.13	0.14	1.75	0.08
125.00	0.18	2.25	0.12	1.50	0.08
62.50	0.14	1.75	0.09	1.13	0.08
31.25	0.13	1.86	0.09	1.29	0.07

ng : nanogram    P /N : Positive /Negative    OD : Optical Density

Table 2. Optical density(OD) and P/ N values depending on standard serum dilution in ELISA

Serum dilution	Strong positive		Weak positive		Negative OD
	OD	P /N	OD	P /N	
12.5	0.58	2.64	0.40	1.82	0.22
25.0	0.52	3.25	0.34	2.13	0.16
50.0	0.47	3.36	0.25	1.79	0.14
100.0	0.41	3.42	0.22	1.83	0.12
200.0	0.36	3.00	0.19	1.58	0.12
400.0	0.32	2.75	0.18	1.50	0.12
800.0	0.20	2.00	0.14	1.40	0.10
1,600.0	0.18	1.80	0.12	1.20	0.10

P/ N치와 SN가의 비교  
 ELISA의 P /N치와 SN가와의 상관관계를 알  
 아보기 위하여 백신접종계군의 혈청 총 56개를  
 가지고 실험한 결과는 그림 4와 같다. P /N치와  
 SN가간의 상관관계는  $r=0.577(Y=2.93+0.$   
 424x)로 매우 낮은 상관관계를 나타냈으며 상관  
 관계는 높은 유의성을 보였다( $P<0.01$ ).  
 백신접종계군의 항체 보유  
 백신접종한 시험계군의 항체 소장을 SN가와

Table 3. Optical density(OD) and P/ N values depending on the different concentration of horseradish peroxidase conjugated rabbit antichicken IgG in ELISA

Conjugate dilution	Strong positive		Weak positive		Negative OD
	OD	P /N	OD	P /N	
250	0.96	4.17	0.51	2.22	0.23
500	0.70	4.38	0.39	2.44	0.16
1,000	0.39	3.00	0.29	2.23	0.13
2,000	0.23	2.30	0.16	1.60	0.10
4,000	0.14	2.00	0.11	1.57	0.07
8,000	0.11	1.83	0.13	2.17	0.06
16,000	0.08	1.33	0.10	1.67	0.06
32,000	0.07	1.40	0.06	1.20	0.05

Table 4. Influence of antigen coating methods on ELISA

Coating methods	Strong positive		Weak positive		Negative OD
	OD	P /N	OD	P /N	
4°C, 12-16hrs	0.59	2.36	0.46	1.84	0.25
37°C, 1hr	0.51	2.04	0.40	1.60	0.25
37°C, 3hrs	0.67	2.31	0.52	1.79	0.25
37°C, 12-16hrs	0.70	2.41	0.54	1.86	0.29

Table 5. Influence of holding conditions of coated antigen on ELISA

Holding conditions (Temp, Duration)	Strong positive		Weak positive		Negative OD
	OD	P /N	OD	P /N	
37°C, Immediate	0.59	2.95	0.43	2.15	0.20
RT, 1 month	0.46	3.07	0.30	2.00	0.15
4°C, 1 month	0.57	3.35	0.33	1.94	0.17
-20°C, 1 month	0.51	3.40	0.30	2.00	0.15
-70°C, 1 month	0.52	2.74	0.32	1.68	0.19

RT : Room Temperature

P/N치로 표시한 것은 그림 5와 같다. 1차 백신 접종 후 SN가와 ELISA의 P/N치 모두 약간 상승하였으며, 2차 백신접종 후에는 booster효과로 높게 상승하였다. SN가는 10주령( $3.63 \pm 0.75\text{Log}_2$ )과 11주령( $3.63 \div 0.63\text{Log}_2$ )에 가장 높은 값을 나타냈으며, ELISA의 P/N치는 11주령( $4.62 \pm 0.52$ )에 가장 높았다. 그 후 ELISA의 P/N치는 계속 높은 값을 유지하였으나 SN가는 대체로 낮게 유지되었다.

Table 6. Comparison of blocking methods in ELISA

Conditions	Strong positive		Weak positive		Negative
	OD	P/N	OD	P/N	OD
Plate blocking	0.39	2.05	0.26	1.37	0.19
Diluent blocking	0.46	2.71	0.29	1.71	0.17

Plate blocking : plate was coated with 4% BSA in PBST.

Diluent blocking : serum and conjugate were diluted with 4% BSA in PBST.

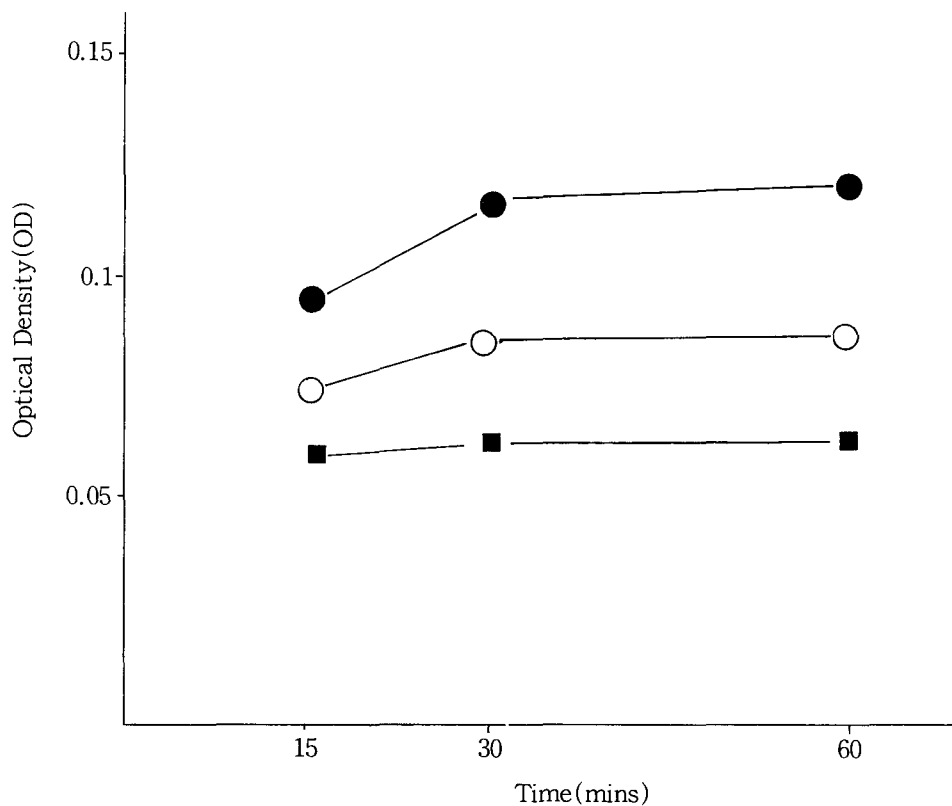


Fig 1. Comparison of reaction time of enzyme and substrate in ELISA(● : Strong positive ○ : Weak positive ■ : Negative).



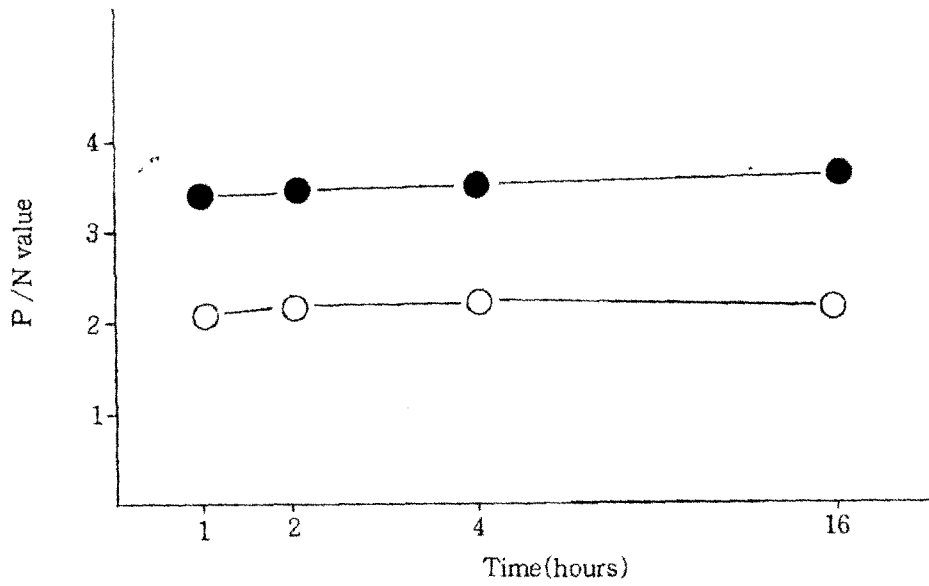


Fig 2. Effect of reading time after stopper treatment in ELISA(● : Strong positive ○ : Weak positive).

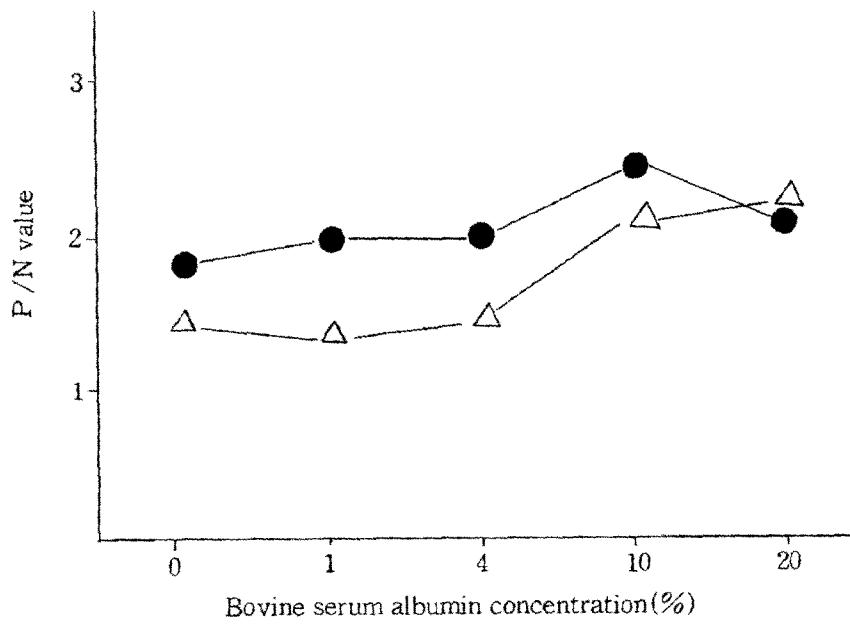


Fig 3. Influence of BSA concentration in diluent buffer on P/ N value when mixed with and conjugate(● : Strong positive △ : Weak positive).

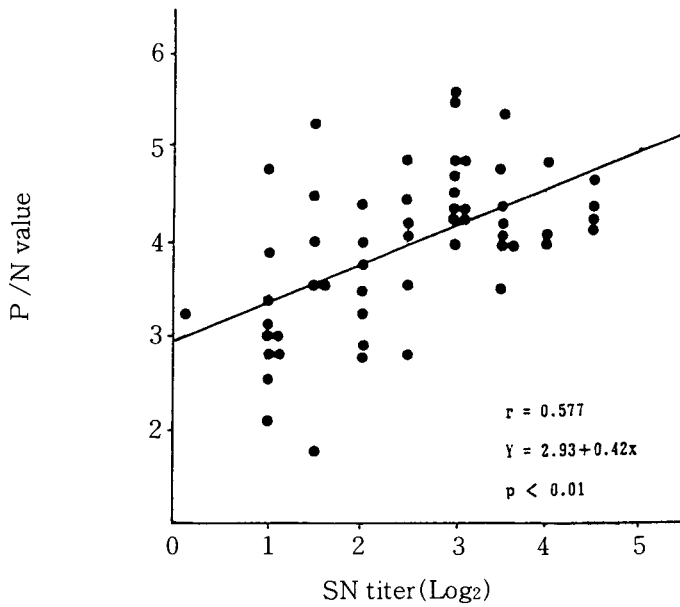


Fig 4. Comparison of SN titer to ELISA P/ N value(56 samples from vaccinated chickens were tested).

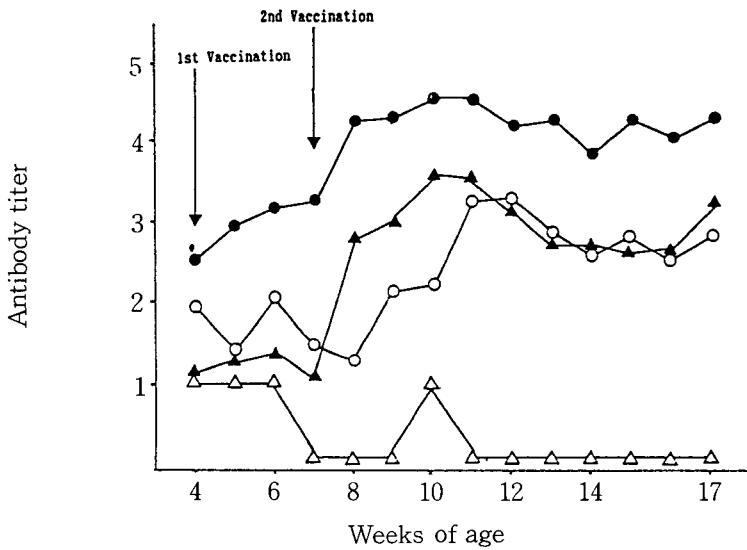


Fig 5. Immune response to infectious laryngotracheitis virus of chickens vaccinated at 4 and 7 weeks of age (● : Mean P/ N value of chickens vaccinated with ILTV at 4 and 7 weeks of age ○ : Mean P/ N value nonvaccinated control chickens ▲ : SN titer(Log<sub>2</sub>) of chickens vaccinated with ILTV at 4 and 7 weeks of age △ : SN titer(Log<sub>2</sub>) of nonvaccinated control chickens).

## 고 찰

ELISA법에 의한 ILT검사는 1982년 Meulemans 등<sup>16)</sup>이 최초로 시도하여 특이성이 높음을 시사한 이래 여러 학자들에 의해 기존의 항체 측정 방법인 AGP나 FA보다 민감하며 SN만큼 정확하면서 신속하게 처리할 수 있다는 것이 밝혀졌으며, 야외감염계군의 감염여부 판정과 백신 접종계군의 백신효능을 측정하는데 널리 이용되고 있는데 국내에서는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 민감도가 높은 ELISA법을 통해 백신접종계군의 항체가를 screen하여 백신효능 및 접종시기 결정과 야외감염계군의 다른 호흡기 질병과의 감별 진단에 이용하고자 하였다.

본 연구에서는 야외 분리주를 발육란의 장노막에 접종 증식시켜 정제한 후 ELISA용 plate인 polystyrene microplate에 coating하였다. 적정항원농도는 ml당 20 $\mu$ g으로 coating시켰을 때 가장 높은 P/N치가 나타났다. 이 농도는 Meulemans 등<sup>16)</sup>이 10 $\mu$ g, Ohkubo 등<sup>17)</sup>이 5 $\mu$ g으로 보고한 것보다 많은 단백질이었다.

항원을 coating 처리하는데 있어서 온도와 시간은 연구자에 따라 차이가 있는데 Meulemans 등<sup>16)</sup>은 37 $^{\circ}$ C에서 1시간, Adair 등<sup>15)</sup>은 4 $^{\circ}$ C에서 overnight, Ohkubo 등<sup>17)</sup>은 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리하였다. 본 실험에서는 4 $^{\circ}$ C에서 12~16시간, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간, 3시간, 12~16시간 처리한 다음 나타난 결과를 비교한 바 표 4와 같이 37 $^{\circ}$ C와 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 처리하였을 때 37 $^{\circ}$ C에서 양성 및 음성혈청 모두 흡광도는 높았으나 P/N치의 차이는 인정되지 않았으며, 37 $^{\circ}$ C에서도 시간이 경과할수록 흡광도 및 P/N치는 높아졌으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 이는 York 등<sup>18)</sup>이 rabbit anti-ILT antibody를 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에 overnight 처리하여 비교해 본 결과 37 $^{\circ}$ C에서 더 높은 흡광도를 얻은 성적과 유사하다.

coating된 항원의 적정보관온도 및 보존성 실험을 위해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 coating시킨 후 실온,

4 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -70 $^{\circ}$ C에 30일간 보관한 후 즉시 처리한 것과 비교해 본 결과 -70 $^{\circ}$ C에 보관했던 plate를 제외하고는 모두 높은 P/N치를 나타내어 항원성의 변화는 인정되지 않았으며, 특히 4 $^{\circ}$ C와 -20 $^{\circ}$ C에서 보관된 plate가 비교적 높은 P/N치를 나타내 보관 온도로는 4 $^{\circ}$ C와 -20 $^{\circ}$ C에 항원성을 잃지 않고 오래 보관할 수 있을 것으로 생각된다(표 5).

Meulemans 등<sup>16)</sup>은 혈청을 각각 1:100, 1:200, 1:500으로 희석하여 12번 반복한 실험의 결과 신뢰성에 있어서 모두 10%이내였으며, York 등<sup>18)</sup>은 희석배수가 높을수록 비특이 반응은 낮아지는 경향이 있으나, 1:160 희석배수에서도 비특이 반응이 높게 나타난 혈청이 있으며, 특히 12주령 이상의 닭에서 흔하게 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서는 표 2에 나타난 바와 같이 음성혈청은 1:100에서 낮은 흡광도를 나타낸 반면 양성혈청은 가장 높은 P/N치를 나타냈기 때문에 screen 목적으로 항체검사를 실시할 경우 혈청 희석배수를 1:100으로 하면 비특이 반응을 배제하면서 양성 case를 검출하는데 적당할 것으로 여겨진다.

효소표지항체는 1:4,000과 1:16,000 희석배수 사이에서 음성혈청의 background가 매우 낮게 나타나 본 실험에서 사용한 것과 같은 동일한 효소표지항체를 사용한 Meulemans 등<sup>16)</sup>이 1:10,000에서 낮은 background를 나타낸 것과 유사하였다. 그러나 P/N치는 1:500으로 희석된 효소표지항체에서 가장 높게 나타났다.

York 등<sup>18)</sup>은 enzyme과 substrate의 작용시간을 60분까지 판독하여 비교하였는데 30분 이후에는 작용비율이 낮아져 30분이면 충분하다고 보고하였다. 본 실험에서도 60분까지 작용시켜 판독한 결과 30분 이후에는 음성 및 양성혈청 모두 흡광도에 변화가 없어 substrate를 작용시킨 30분후에 발색을 정지시켜 곧바로 흡광도를 측정하였다. 그리고 발색을 정지시킨 직후부터 16시간 경과후까지 흡광도와 P/N치의 변화를 판독한 결과 Fig 2에서 보는 바와 같이 2시간 경과

후까지는 흡광도 및 P/N치는 약간 상승하였으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았고 그 이후에는 일정하였다. 그러므로 substrate를 처리하여 30분만에 발색을 정지시킨 후 즉시 판독한 것이 가장 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 발색을 정지시킨 후 아무때나 판독을 하여도 일정한 결과를 관찰할 수 있다고 생각된다. 발색제로는 York 등<sup>18)</sup>과 Adair 등<sup>15)</sup> 및 York 등<sup>19)</sup>은 5-aminosalicylic acid(5-AS)를 사용하여 450nm에서, Ohkubo 등<sup>17)</sup>은 2-azino-di-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid(AB-TS)를 사용하여 405nm에서 각각 판독하였으며 본 실험에서는 Meulemans와 Halen<sup>16)</sup>이 사용한 OPD를 사용하여 490nm에서 판독하였다.

비특이 반응을 줄이기 위한 많은 실험이 시도되었는데 Meulemans와 Halen<sup>16)</sup>은 carbonate-bicarbonate buffer로 항원을 coating하였지만 항원에 결합하는 음성혈청이 있었으며, York 등<sup>18)</sup>은 혈청과 plate 및 용액의 성분을 변화시켜 보았으나 비특이 반응을 줄이지 못하였다. 그 후 Ohkubo 등<sup>17)</sup>이 avidin-biotin의 강력한 상호작용을 이용하여 ELISA법을 개발하여 좋은 효과를 얻었다. 본 실험에서는 blocking방법을 비교해 본 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 blocking buffer에 serum과 conjugate를 희석하여 blocking한 것이 음성혈청의 background도 낮았으며, P/N치도 높아 효과적이었다. BSA함량이 낮을수록 음성혈청의 background는 높아졌는데 York 등<sup>18)</sup>은 BSA가 첨가되지 않더라도 비특이 반응에는 큰 영향을 끼치지 않는다고 하였으나 본 실험에서는 BSA의 함량이 10%일 때 음성혈청의 background를 배제하면서 높은 P/N치를 얻을 수 있었다(그림 3).

ELISA법에 의한 P/N치와 SN항체가와의 상관관계를 분석한 결과 그림 4에서 보는 바와 같이 Ohkubo 등<sup>17)</sup>이 기존의 ELISA법에 의해 나타낸 성적( $r=0.77$ )보다 낮은  $r=0.577$ 의 상관관계를 나타냈다. 이는 SN에서 검출되는 항체와 ELISA법에 의해서 검출되는 항체가 동일하지

않기 때문이라고 생각된다. 즉 본 실험에서 사용한 효소표지항체가 antichicken IgG이기 때문에 ELISA에 의해 검출되는 항체는 모두 IgG인데 비해서 SN반응에서는 그외의 항체도 검출되리라 여겨진다.<sup>27, 28)</sup>

백신접종계군의 항체 보유를 비교한 결과 11주령 이후에는 ELISA에서는 항체가 높은 수준으로 유지되었으나 SN에서는 약간 하락하는 성적을 나타냈지만 1차 백신접종하였을 때 약간 상승하는 것과 2차 백신접종 후에는 기왕 반응으로 높은 항체를 나타내는 것등은 일치하였다. Meulemans와 Halen<sup>16)</sup>, York 등<sup>18)</sup>은 일령이 높아질수록 비특이 반응이 증가한다고 보고하였는데 본 실험에서도 control계군을 비교해 본 결과 11주령부터 증가하였는데 이는 Slaughter 등<sup>29)</sup>은 닭의 immunoglobulin은 polystyrene plate에 비특이적으로 흡착하는 경향이 강하기 때문이라고 하였으며, Meulemans와 Halen<sup>16)</sup>은 혈청속에 존재하는 IgM이 coating되지 않고 남아 있는 항원에 비특이적으로 작용한다고 보고하였다. 따라서 ILTV에 대한 항체를 screen함에 있어서 기존의 ELISA법으로는 상관관계( $r=0.577$ )가 낮기 때문에 ELISA법이 효과적이라면 우리나라에서도 Choi 등<sup>30)</sup>에 의해 생산된 ILTV에 대한 단크론 항체나 avidin-biotin의 강력한 상호작용을 이용한 ELISA법을 개발하여 백신접종계군의 항체를 screen하여 백신의 효능 및 접종시기 등을 결정하는데 이용할 수 있으며, 다른 호흡기 질병과의 감별 진단 및 field strain과 vaccine strain간의 감별에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

야외감염계군에서 분리한 바이러스를 발육관의 장노막에서 증식시켜 정제한 항원과 실험실에 의뢰된 병계로부터 채취한 혈청 및 ILTV로 면역시켜 얻은 혈청을 중화항체를 기준으로 양성 및 음성 표준혈청으로 정하여 ELISA를 시

도한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 정제항원은 ELISA plate의 well당 2 $\mu$ g으로 coating하였을 때 높은 P/N치를 나타냈다.

2. 표준혈청은 1:100에서 음성혈청의 background 흡광도가 낮았으며, 양성혈청의 P/N치도 높게 나타나 가검혈청은 1:100으로 희석하였을 때 screen용 희석배수로 적당하였다.

3. 효소표지항체는 1:500 희석배수에서 높은 P/N치를 나타냈다.

4. enzyme와 substrate의 작용 시간은 30분이면 충분하였으며, 발색제를 처리하였는데 처리 직후부터 16시간까지 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

5. 항원 coating조건을 37 $^{\circ}$ C와 4 $^{\circ}$ C에서 시간을 다르게 하여 비교해 본 결과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

6. coating된 plate를 -70 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C, 실온에 30일간 보관한 후 즉시 처리한 것과 비교한 결과 항원성의 변화는 인정되지 않았다.

7. blocking방법은 항원을 coating한 microplate를 blocking buffer로 처리한 것보다 serum과 conjugate를 직접 희석하여 blocking한 것이 비특이 반응을 더욱 줄일 수 있었다. 이때 buffer에 넣는 bovine serum albumin함량은 10%일 때가 효과적이었다.

8. 백신접종계군에 대한 ELISA에 의한 P/N치와 SN가와의 상관관계는  $r=0.577$ 이었다.

9. 백신접종계군에서 ELISA와 SN test로 항체의 소장을 검사한 바 11주령까지는 유사한 추이를 보였으며 그 이후에는 ELISA의 P/N치가 SN가보다 더욱 높게 유지되었다.

#### 參考文獻

1. Russell P H and Edingtons N. 1985. Verinary virus. Burlington Press Ltd., Cambridge, : 151-155.

2. May H G and Tittsler R P. 1925. Tracheo-laryngitis in poultry. J Am Vet

Med Assoc, 67 : 229-231.

3. Chio C O, Kim Jae H and Kim Jun H. 1985. Outbreaks of infectious laryngotracheitis in korea, In Veterinary Virus Diseases. Ed by A.J. Della-porta, Academic press, : 355-356.

4. 김순복, 김봉환. 1982. 삼천포 지방에 집단발생한 닭의 후두기관염 대한수의사회지, 18(9) : 20-23.

5. 최정욱. 1982. 닭 전염성 후두기관염. 대한수의사회지, 18(7) : 22-26.

6. Jordan F T W. 1966. A review of the literature on infectious laryngo-tracheitis (ILT). Avian Dis, 10 : 1-26.

7. Adams W W, Hargreaves R C, Hughes E, et al. 1986. American association of avian pathologists 1985 summary of disease reports. Avian Dis, 30 : 856-892.

8. Curtis P E and Wallis A S. 1983. Infectious laryngotracheitis. Vet Rec, 112 : 486.

9. Armstrong W H. 1959. A slide smear technique for diagnosis of laryngotracheitis. Avian Dis, 3 : 80-84.

10. Jordan F T W and Chubb R C. 1962. The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis in its differentiation from fowl fox. Res Vet Sci, 3 : 245-255.

11. James R Andreasen Jr, Johe Brown J, Glisson J R, et al. 1990. Reproducibility of virus-neutralization test for infectious laryngotracheitis. Avian Dis, 34 : 185-192.

12. Skeeles J K and Houghton G E, Blove R J. 1986. Studies on the use of two readily available virus for a constant virus dilution serum micro-neutralization test for infectious laryngotracheitis virus. Arkan Agric Exp Stn Bull, 895 : 1-6.

13. Hitchner S B, Fabricant J and Bagust T J. 1977. A fluorescent antibody study of the pathogenesis of ILT. *Avian Dis*, 21 : 185-194.
14. Ide P R. 1978. Sensitivity and specificity of the fluorescent antibody technique of detection of infectious laryngotracheitis virus. *Can J Com Med*, 42 : 54-62.
15. Adair B M, Todd M D, Mckillop E R, et al. 1985. Comparisons of serological tests for detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian path*, 14 : 461-469.
16. Meulemans G and Halen P. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum. *Avian path*, 11 : 361-368.
17. Ohkubo Yukihiko, Shibata Kenji, Mimira Tsuguo, et al. 1988. Labeled avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody to infectious laryngotracheitis virus in chicken. *Avian Dis*, 32 : 24-31.
18. York J J, Fahey K J and Bagust T J. 1983. Development and evaluation of an ELISA for detection of antibody to infectious laryngotracheitis virus in chicken sera. *Avian Dis*, 27 : 409-421.
19. York J J and Fahey K J. 1988. Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Path*, 17 : 173-182.
20. Bidwell D E, Bartlett A and Voller A. 1977. Enzyme linked immunoassay for virus disease. *J Infect Dis(Suppl)*, 136 : 274-278.
21. Saifuddin Md and Colin R Wilks. 1990. Immunosorbent assay to detect and quantify adenovirus in chicken tissues. *Avian Dis*, 34 : 239-245.
22. Cummins D R and Reynolds D L. 1990. Use of an avidin-biotin enhanced dot-immunobinding assay to detect antibodies for avian mycoplasma in sera from Iowa market Turkeys. *Avian Dis*, 34 : 321-328.
23. Carlson P L. 1984. Adaptation of enzyme-linked immunoassay for detection of avian and murine antibodies to *Eimeria*. *Avian Dis*, 28 : 1115-1119.
24. Wardiey R C and Crowthero J R. 1982. The ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis. *Curr Top Vet Med Anim Sci*, 22 : 1-319.
25. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275.
26. 연세대학교 응용통계학과편. 1990. 미니텡. 자유아카데미, : 5-24, 169-179, 205-241.
27. Nandapalan N, Wilcox G E and Penhale WJ. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus. *Avian Dis*, 26 : 171-176.
28. Zellen GK and Thorsen J. 1986. Standardization and application of the enzyme linked immunosorbent assay for infectious bronchitis. *Avian Dis*, 30 : 695-698.
29. Slaght SS, Yang TJ and L Van der Heide. 1979. Adaptation of enzyme-linked immunosorbent assay to avian system. *J Clin Microbiol*, 10 : 698-702.
30. 최정옥, 이정길, 조성만 등. 1988. 닭 전염성 후두기관염 바이러스에 대한 단클론성 항체 생산. *가금학회지*, 15(3) : 199-206.