

형광항체법 및 END법에 의한 돼지 콜레라 감염돈에서의 바이러스 검출

가축위생연구소 김 선 중·강 병 직

Detection of Hog Cholera Virus from the Artificially Infected Pigs by Fluorescent Antibody Technique and END Method

S. J. Kim & B. J. Kang

Veterinary Research Laboratory, Anyang, Korea

ABSTRACT

Hog cholera (HC) virus detection from the artificially infected pigs was made using fluorescent antibody technique (FAT) and END method. It was observed that the swine origin virulent was detected in most of the organs tested at the early stage of the infection, while the tissue culture attenuated virus was detected only in blood (transitionally), lung, and tonsil.

서 언

돼지콜레라 바이러스는 숙주 특이성이 높아서 돼지 이외에 적당한 실험 동물이 없어 시험 연구에 많은 지장을 초래하고 있었다.

그러나 Kumagai(1961)⁴⁾ 등은 돼지고환 세포를 이용한 END법으로 돼지콜레라바이러스의 검출 및 정량이 가능함을 보고하였으며, Solorzano(1962)⁹⁾ Mengeling (1963, 1967)^{7,8)} Stair(1963)¹⁰⁾ 등은 형광항체법을 돼지콜레라 바이러스의 검출에 응용할 수 있음을 보고한 이후 미국

의 많은 연구자의 검토가 가해져서 술기가 개량되었으며, 이 두가지 방법은 돼지콜레라바이러스 연구에 유용하게 이용되고 있다.

저자 등은 이 두가지 방법을 이용하여 강독 및 약독 돼지콜레라 바이러스를 접종한 돼지 체내에서의 바이러스의 추이를 비교 조사하여 돼지콜레라 바이러스 검출의 특이성과 검출의 시기 등을 규명하고자 본 시험을 실시하였다.

재 료 및 방 법

1. 돼지콜레라 바이러스

가. 강독 돼지콜레라 바이러스: 1962년 일본국 농림성 가축위생시험장에서 분양받은 ALD주를 당 연구소에서 다시 돼지에 6대 제대한 감염돈의 혈액 및 비장 유제액을 동결 건조하여 보존한 것을 돼지 고환 단층배양 세포에 2대 제대 배양한 바이러스액을 사용 하였다.

나. 약의 분리 돼지콜레라 바이러스: 1968년 당 연구소에 의뢰된 가검돈 장기에서 분리, 동정한 돼지콜레라 바이러스로서 돼지 고환 단층배양 세포에 2대 제대배양한 바이러스액을 사용하였다.

다. 약독 돼지콜레라 바이러스(LOM): 1964년 일본국 동물의약품검사소에서 분양받은 조직배양 순화 돼지콜레

라 바이러스를 소 신장 단층배양 세포에 배양한 바이러스액을 사용하였다.

2. 돼지

돼지콜레라 항체를 보유하고 있지 않은 생후 약 2개월 된 돼지를 사용하였다.

3. END법

돼지콜레라 바이러스의 검출, 정량 및 혈중의 중화항체가 측정에 Kumagai⁴⁾ 등이 보고한 END법을 이용하였다.

4. 형광항체법

돼지콜레라 바이러스의 검출에 이용된 형광항체법은 National Disease Laboratory (NADL)⁸⁾에서 발표된 방법에 의거하였다.

가. 면역혈청 : 돼지콜레라 중화항체를 보유하고 있지 않은 6개월령의 건강한 돼지에 LOM 바이러스 7×10^{10} TCID 50/ml를 근육내에 주사하고, 90일 후에 ALD 바이러스 2ml 10^6 LD 50/ml를 근육 내에 재접종하고, 35일 후에 ALD바이러스 감염돈의 혈액 500ml를 피하에 주사하고, 25일 경과 후에 전체혈하였다.

이 면역혈청은 END법에 의한 중화 항체가 조사에서 혈청희석 65,536배라는 높은 항체가 있었다. (그림 1)

나. 형광항체 제조 과정중의 중화 항체가 변동 및 염색역가 : 형광항체 제조 과정에 있어서 γ -globulin 분획을 얻기 위한 반복된 혈청 침전 과정 및 형광색소 결합후의 비특이 물질 제거 과정에서 중화항체 역가에 미치는 영향을 조사하였던바 형광색소의 결합시까지는 본래의 항체 역가를 유지 하였으나 투석 및 sephadex column 통과와

장기분말 흡착에 의한 비특이 물질 제거 과정에서 본래의 역가의 1/32로 현저하게 역가가 저하되었으며 염색역가는 16배이었다. (표 1)

다. 돼지콜레라 형광항체 시제품의 특이성 조사. 시험적으로 제조된 돼지콜레라 형광항체의 특이성을 알 고져 돼지 신장 및 소 신장의 단층배양 세포에 ALD 바이러스, 야외분리 바이러스 및 LOM 바이러스를 10진 희석하여 접종하고 END법과 비교하여 감염가를 조사하였던바 END법과 거의 동일한 역가를 보이는 한편 돼지콜레라 항혈청에 의해 바이러스가 중화되어 특이반응이라고 인정 되었다.

한편 일본뇌염 바이러스(Nakayama주) 및 Swine influenza 바이러스에 감염된 세포에서는 이 형광항체로서는 염색 반응이 없었다. (표 2)

시 험 결 과

인공 감염된 돼지 장기에서의 돼지콜레라 바이러스 검출.

각종 돼지콜레라 바이러스를 생후 약 2개월령의 돼지 콜레라 항체를 가지고 있지 않은 돼지의 근육 내에 접종하고 경일적(經日的)으로 1두씩 도살하여 채취한 각 장기를 유제 원심한 상청액에 대하여 END법으로 바이러스를 검출함과 동시에 이 상청액을 돼지 신장 단층배양 세포에 접종하고 37°C에 3시간 흡착시킨 후 Earles BSS로 3회 세포를 세척한 다음 37°C에 1일간 배양한 후 형광항체법으로 바이러스 검출을 시도하였다.

그 결과는 표 4와 같이 조직배양 순화 바이러스를 접종한 돼지에 있어서는 접종 4일 후에 폐, 편도선 및 혈액에서 바이러스가 검출 되었으며, 접종 5~6일후에는 폐에서만 바이러스가 검출 되었다.

야외에서 분리된 돼지유래 바이러스를 접종한 돼지에서는 접종 3일 후에 신장, 폐, 간에서 바이러스가 검출 되었으며 4일 후에는 위장, 비장, 악하임파절 및 혈액을 제외한 6개 장기에서 그리고 5일 후에는 전체 장기에서 바이러스가 검출 되었다.

한편 돼지유래 ALD 바이러스를 접종한 돼지에서는 접종 1일 후에 비장에서 3일 후에 폐, 간, 비장, 편도선,

신장, 악하임파절에서 각기 바이러스가 검출되었고 4일 후부터는 모든 장기에서 바이러스가 검출되었다.

한편 END법과 형광항체법에서의 바이러스 검출을 상호 비교하면 각 바이러스 감염돈의 초기 혈액에서는 END법에서 바이러스 검출이 불가능하였으나 형광항체법에서 검출이 가능한 예가 있었다.

그러나 각 장기에서는 두가지 방법에 의한 바이러스검출 결과가 일치하였다.

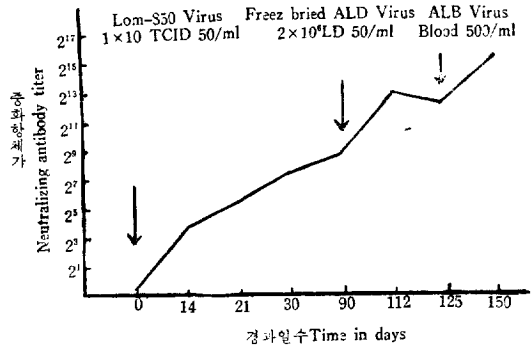


그림 1. 돼지콜레라 바이러스를 접종한 돼지 혈청의 중화 항체가
Fig. 1. Hyperimmunization of swine against HC virus.

표 1. 형광항체 제조과정중의 중화항체가 변동 및 염색역가
Table 1. Variation of neutralizing antibody titer and staining titer during the process of preparing fluorescent antibody.

제 조 과 정 Process	항 혈 청 Antiserum	γ -globulin	Labelled	비특이물질 제거후 γ -globulin final product
중 화 항 체 가 Antibody titer	65,536	65,536	65,536	2,048
염 색 역 가 Staining titer				16

표 2. 형광항체법과 END법에 의한 돼지콜레라 바이러스 역가
Table 2. HC virus titers measured by FAT and END method.

검출 방법 Test method	사용 세포 Culture cell	바이러스주 Virus strain	바이러스 희석 Virus dilution					
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
형광항체법 FAT	돼지 신장 Swine kidney	A L D 주	++	++	++	++	++	--
		야외분리주 Field isolated	++	++	++	+-	--	--
		조직배양순화주 TC attenuated	++	++	++	++	++	--
	소 신장 Bovine kidney	A L D 주	--	--	--	--	--	--
		야외분리주 Field isolated	--	--	--	--	--	--
		조직배양순화주 TC attenuated	++	++	++	++	++	--
E N D 법	돼지 고환 Swine testicle	A L D 주	++	++	++	++	++	--
		야외분리주 Field isolated	++	++	++	--	--	--
		조직배양순화주 TC attenuated	++	++	++	++	++	--

TC: Tissue Culture

+ : 바이러스 검출양성
Virus detected

- : 바이러스 검출 음성
Virus not detected

표 3. 인공감염된 돼지 장기에서의 돼지콜레라 바이러스 검출(형광항체법 및 END법)
Table 3. HC virus detection from the organs of the artificially infected pigs. (FAT and END method)

접종 바이러스주 Virus inoculated	접종된 돼지의 경과 일 수 Days after inoculation	채취 장기에서의 바이러스 검출 tested organs									
		뇌 Br.	신장 Ki.	췌장 Pan.	폐 Lu.	간 Li.	비장 Sp.	장간막림파절 Mes. L.N.	악하임파절 S.M. L.N.	편도선 toncil	혈액 blood
조직배양순화주 TC attenuated	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	5	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
야외분리주 Field isolated	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A L D 주	1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	4	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Br.: Brain Ki.: Kidney Pan.:Pancrease Lu.:Lung Li.:Liver Sp.: Spleen Mes.L.N.:Mesenteric Lymphnode

S.M.L.N.: Submaxillary Lymphnode

END 법에 의한 바이러스 검출 : + 양성
Virus detection by END method positive negative

형광항체법에 의한 바이러스 검출 : ● 양성 ○ 음성
Virus detection by FAT positive negative

고 찰

돼지콜레라 바이러스의 검출 및 정량에 Kumagai⁴⁾ 등의 DND법과 Solorzano⁵⁾ 등, Mengeling^{7,8)} 등, Stair¹⁰⁾ 등, Aiken¹⁾ 등에 의해 술기가 확립된 형광항체법은 돼지콜레라 바이러스의 검출 및 진단에 이미 이용되고 있다.

이 시험에서는 강독주(ALD), 야외분리주 및 약독주(LOM)를 각기 돼지에 접종하고 돼지 체내에서의 바이러스 증식성을 END법과 형광항체법을 이용하여 조사하였다.

인공감염돈의 혈액에서 바이러스를 검출할 때 감염 초기에 END법에서는 바이러스 검출이 불가능한 예에서도 형광항체법에서 검출이 가능하였다.

이는 Lin⁶⁾이 보고한 바와 같은 결과를 얻었으며 Lin⁶⁾은 이 현상은 감염 초기의 돼지 혈중에는 interferon이 생성되어 바이러스와 공존하고 있기 때문이라고 설명하고 있다.

그러나 각 장기에서의 돼지콜레라 바이러스 검출에 있어서는 END법과 형광항체법은 본질적으로는 차이를 인정할 수 없는 것으로 생각되었으나 형광항체법은 END법에 비해 바이러스 검출에 소요되는 시일을 단축할 수 있어 돼지콜레라의 진단을 신속히 할 수 있다는 장점을 지니고 있다.

형광항체법에 있어서는 Mengeling^{7,8)} 등이 보고한 바

와 같이 배양세포의 세포질에 형광항원이 형성되었으며 Plaque를 형성하며, 동시에 Stair¹⁰⁾ 등이 보고한 바와 같이 강독과 약독 바이러스간의 형광항체에 대한 강도의 차이가 인정되었다.

한편 강독 바이러스와 약독 바이러스의 돼지 체내에서의 증식 양상 조사에서 돼지유래의 강독 바이러스(ALD주와 야외분리주)는 4일 또는 5일 후에 전장기에서 바이러스가 검출되었지만 조직배양순화 약독 바이러스(LOM)는 일시적으로 혈액에서 검출되었고 장기로서는 폐에서만 바이러스가 검출되어 강독에 비해 돼지 체내에서의 증식 양상에 차이가 있었다.

Carbrey²⁾ 등, Ailen¹⁾ 등 및 Lin³⁾ 등의 보고에 의하면 약독 바이러스 감염은 편도선 악하임과결절의 2~3장기에 극한하여 바이러스 항원이 형성된다고 한 것과 비교하면 조직배양 순화 바이러스(LOM)도 일부 장기에 극한되어 증식된다는 사실과 일치되었다.

한편 조직배양순화 약독 바이러스(LOM)는 소 신장 세포에서 잘 증식되나 배양세포 계대의 경력이 없는 돼지유래의 강독 바이러스(ALD주 및 야외분리주)는 소 신장 단층배양 세포에서 증식되지 않는다는 것을 이용하여 배양세포순화 바이러스와 돼지유래 바이러스와의 식별이 가능하다고 생각된다.

적 요

1. 형광항체를 제조하기 위해서는 고도 면역혈청이 소요되는 바 3회 접종으로 중화항체가 혈청회색 65,536 배의 높은 항혈청을 얻을 수 있었다.
2. 형광항체 제조 과정중 형광색소의 결합에서는 거의 항체가의 저하가 없었으나 비특이 물질 제거 과정에서 현저히 저하되어 형광항체 정제 후는 항체가가 1/32로 저하되었으며, 염색 역가는 16배 이었다.
3. 시험제조된 돼지콜레라 형광항체는 돼지콜레라 바이러스에 특이적으로 반응을 일으켰다.
4. 돼지콜레라바이러스의 역가 측정에서 END법과 형광항체법은 거의 일치되는 성적을 얻었다.

5. 돼지유래 돼지콜레라 바이러스(ALD주, 야외분리주)는 소 신장 세포 배양에서는 증식되지 않았다.
6. 인공감염된 돼지 장기에서의 바이러스 검출에서는 돼지유래 강독 바이러스는 초기에 전 장기에서 검출된데 비해 조직배양순화 약독바이러스는 혈액(일시적), 편도선 및 폐에서 바이러스가 검출되었다.
7. 인공감염된 돼지 장기에서의 바이러스 검출은 END법과 형광항체법에서 일치되었으나 감염초기의 돼지 혈액에서는 END법에서 바이러스가 검출되지 않은 예에서도 형광항체법에서는 바이러스가 검출되었다.

SUMMARY

1. A higher neutralizing antibody titer, of 65,536 was obtained by three successive inoculation with Hog cholera virus.

2. The antiserum titer remained unchanged when fluorescent stain was labelled but the titer was significantly decreased to 1/32 of the original after the removed

of nonspecific substance of the labelled globulin.

3. Experimentally produced fluorescent antibody reacted specifically with H.C. virus.
4. In the titration of H.C. virus, a Concordant results was observed between FAT and END method.
5. Swine origin H.C. virus was not able to grow in the bovine kidney culture cell.
6. While the swine origin H.C. virus could be detected from the organs of the artificially infected pigs in the

early stage of the infection, tissue culture attenuated virus was detected only in blood (transitionally), tonsil, and lung.

7. Virus detection from the organs of the artificially infected pigs was possible by FAT and END. method. However, in the early stage of infection the virus was detected from the blood sample by FAT while the END method was failed.

인 용 문 헌

1. Ailen, J.M., K.H. Hoopes and E.L. Stair, 1964. Rapid Diagnosis of Hog Cholera: A Direct fluorescent-Antibody Technique. Proc. Book. 101 st Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass. 282~284.
2. Carbrey, E.A. 1965. Routine Laboratory Diagnosis. of Hog Cholera Employing the Fluorescent Antibody Tissue Culture Technigue. Report of the Faoloie Intern. Meet. on Hog Cholera and African Swine Fever. Rome, Italy, May 31-June 5. 25.
3. Diagnostic Services, National Disease Laboratory, Coverslip Tissue Culture, Fluorescent Antibody Technique For the Detection of Hog Cholera Virus. (Mimeograph)
4. Kumagai, T., T. Shimizu, S. Ikeda and M. Matumoto. 1961. A New in Vitro Method (END) for Detection and Measurement of Hog Cholera Virus and Its Antibody by means of Effect of HC Virus on Newcastle Disease Virus in Swine Tissue Culture. I. Establishment of Standard Procedure. J. Innumol. 87: 245~256.
5. Lin Tsai Chun, Byung Jik Kang, Yukio Shimizu, Tetsuo Kumagai, and Jiro Sasahara. 1969. Evaluation of the Fluorescent Antibody-Cell Culture Test for Det-ection and Titration of Hog Cholera Virus. Nat. Inst. Anim. Helth Quart. 9:10~19.
6. _____. 1968. Staties of the Hog Cholera Virus Infection by means of the Fluorescent Antibody Technique. (ph. D. thesis)
7. Mengeling, W.L., E.C. Pirtle and J.P. Torrey. 1963. Identification of Hog Cholera Viral Antigen by Immunoflourescence: Application as a Diagnostic and Assay Method. anad. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27:249~252.
8. _____. 1967. Evaluation of the flouorescent Antibodsy-Cell culture Test for Hog Cholera Diagnosis, Amer. J. Vet. Res. 28:1653~1659.
9. Solorzano, R.F.. 1962. An in vitro test for hog Cholera, Ph.D. Thesis, Pennsylvania State University, University Park, Pa
10. Stair, E.L., M.B. Rhodes, J.M. Aiken, N.R. Underdahl and G. Young. 1963. A Hog Cholera Virus-Fluorescent Antibody System. Its Potential Use in Study of Embryonic Infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113: 656~660.