

## 닭 전염성 기관지염에 관한 연구 : II. 간접 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 의한 항체가 측정

장 정 호 · 김 선 중  
서울대학교 수의과대학  
(1989. 8. 1 접수)

### Studies on avian infectious bronchitis: II. Standardization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibody measurement

Chong-ho Chang, Sun-joong Kim  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received Aug 1, 1989)

**Abstract:** Critical parameters affecting sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus (IBV) were standardized. By adopting the optimized conditions an equation calculating ELISA antibody titers from the observations at single serum dilution was formulated.

The purified antigen of IBV Mass-41 strain was dispensed into polystyrene microplate wells at a concentration of 300ng per well(100 $\mu$ l) and the plates were coated by completely drying at 37°C. Diluted chicken serum and horseradish peroxidase conjugated goat anti-chicken IgG were added in order in 100 $\mu$ l volumes per well and allowed to react for 30 minutes each at room temperature. Just before use and after each reaction the plates were washed three times with distilled water. Finally o-phenylenediamine solution was added as an enzyme substrate. After incubation for another 15 minutes at room temperature absorbances were read at 492nm. Hyperimmune serum against Mass-41 strain was used as internal reference positive(IRP) serum. After repeated titration of IRP and negative serum, a constant titer of IRP was determined. Serum titrations were carried out for various sample sera together with IRP and negative sera and the observed titers of sample sera were corrected by reflecting the ratio between observed and constant titers of IRP serum. These corrected titers of the sample sera were plotted against sample/positive(S/P) OD ratios. All the OD's measured in the serum titrations were also corrected by subtracting negative serum OD.

The following equation was formulated from the above data;

$$\text{Log}_{10} \text{ELISA titer} = 5.568(\log_{10} \text{S/P}) + 4.161$$

Thus it was possible to calculate ELISA titer by measuring absorbance at 1/400 single serum dilution.

Titer measured by cross ELISA tests employing Mass-41 strain and three local IBV isolates were similar. These results suggest that the ELISA tests standardized in this study can be used for evaluating not only vaccinal immunity but also for infection status against field IBV's.

**Key words:** infectious bronchitis virus, ELISA.

## 서 론

닭 전염성기관지염(avian infectious bronchitis: IB)은 IB 바이러스(IVB)에 의해서 발생하는 닭의 급성 전염병으로 전파속도가 빠르고 기관라음, 기침, 재채기 등의 호흡기 증상과 더불어 육성중인 닭에서는 폐사 및 증체저하와 산란중인 닭에서는 산란율 및 난질의 저하를 일으킨다.<sup>1</sup> 어린병아리가 IB에 감염되면 수란관에 영구적인 손상을 입어 무산제가 되기도 하며 마이코플라스마균 및 뉴캐슬병바이러스와 더불어 기낭염을 일으키는 병원체이다.<sup>2</sup>

IB는 1930년 미국에서 최초로 관찰된 이래 세계각국에서 발생하고 있으며 국내에서는 김 등<sup>3</sup>에 의해 IBV에 대한 항체보유율이 보고된 이후 이등<sup>4</sup>과 한과 김<sup>5</sup>에 의해 국내 IB 발생이 보고되었다.

IB의 진단방법은 병계로부터 IBV를 분리, 동정하는 방법과 혈청학적 진단방법들을 이용 IBV에 대한 항체 수준을 측정하는 방법이 있다. IBV를 병계로부터 분리동정하는 방법은 IBV가 일반 배양세포에서 거의 증식되지 않으며, 증식이 되는 배양세포에서도 여러대에 걸쳐 발육계란에 계대한후 배양세포에 적응시키는 과정을 거쳐야만 세포변성효과를 나타내며<sup>6</sup> 어떤 IBV는 이러한 방법으로도 적응이 되지 않는 경우도 있다.<sup>7</sup> 발육계란 접종법에 의하여 IBV를 분리하는 경우에는 IBV의 특징적인 병변을 관찰하기 까지는 최소한 4~6대를 계대배양해야만 하는 등 많은 시간과 재료가 필요하다.<sup>8</sup>

IBV에 대한 항체수준을 측정하는 혈청학적 진단기법 중 혈청중화시험법에는 발육계란 중화시험<sup>9</sup> 기관배양 중화시험<sup>8,10</sup>, 배양세포 중화시험,<sup>11</sup> plaque 감소시험<sup>12,13</sup> 등이 있으나 이들 시험법들 역시 발육계란이나 배양세포에 적응과정이 필요할 뿐만 아니라 시험재료 및 실험조작의 복잡성 때문에 일반적인 혈청반응법으로 이용하기에는 제약을 받고 있다. 따라서 혈청 중화시험법은 IBV의 항체가 측정보다는 항원의 검출이나 혈청형의 분류에 많이 사용되고 있다.<sup>10,14-17</sup>

한천 겔 침강반응도 IBV 항체를 검출하는데 이용되는 혈청반응법중의 하나로 술식이 간편하지만 항체가의 정량이 어렵고, 중화항체에 비해 항체의 출현이 늦으며 일찍 소실되는 단점이 있다.<sup>18-20</sup>

보체 결합반응<sup>21,22</sup>과 형광 항체법<sup>11,23</sup>을 이용한 IBV 항체측정은 그 술식이 복잡하여 거의 사용되고 있지 않거나, 주로 항원의 검출에 이용이 되고 있다.<sup>24</sup>

IBV에 phospholipase를 처리하면 적혈구를 응집하는 능력이 있음이 밝혀진 후<sup>25</sup> 혈구응집역제시험(HI)이 개발되어 현재까지 널리 이용되고 있다.<sup>19,20,26-29</sup> 그러나

HI시험도 바이러스의 농축이나 효소의 처리등이 쉽지 않고 혈청형간의 반응성의 차이가 있는 단점이 있다.<sup>26,27,30-32</sup>

가장 최근에 개발된 혈청학적 진단법인 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 Engvall과 Perlmann<sup>33</sup>에 의하여 그 원리가 밝혀지고, Voller et al<sup>34</sup>에 의해 microplate에 ELISA를 적용한 이후 사람과 동물의 여러 세균성, 원충성, 바이러스성 질병들의 원인체와 항체검출에 이용되고 있다.<sup>35</sup> IBV의 항체가 측정에 ELISA를 이용한 경우로는 Mockett과 Darbyshire<sup>36</sup>가 처음보고한 이후 많은 사람들에 의해 보고된 바 있으며 kit 형태로 상품화된 것들도 있다.<sup>20,29,37-40</sup> ELISA는 다른 혈청 진단법들에 비해 빠른 시간내에 간단한 조작으로 손쉽게 할 수 있으며 반응의 민감도, 재현성이 매우 뛰어나고 항원이나 항체만을 달리할 경우 동일한 조작으로 모든 종류의 항원, 항체검출에 이용될 수 있을뿐만 아니라 실험조작의 자동화, 결과의 computer 처리가 가능하고 사용하는 장비나 시약이 비교적 저렴하고 안정성이 높다는 점 등 여러가지 장점이 있다.<sup>35</sup>

그러나 ELISA를 수행하는데 있어 연구자들 사이에 차이점들이 있어 그 방법들이 완전히 정립되어 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 다른 혈청학적 진단법들의 단점을 극복할 수 있는 간접 ELISA 방법으로 IBV에 대한 항체 측정법을 정립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스 및 발육계란:** Infectious bronchitis virus (IBV)의 Massachusetts-41(Mass-41) 주는 시판되는 IB생백신으로부터 유래한 바이러스이며(Sterwin Laboratories, Inc., Millsboro, Delaware) 국내분리 IBV로는 82-5, 86-1, 86-28, 86-44, 86-50<sup>5</sup>과 B4, 86-26, 86-325, 87-3, 87-52, 88-54 등 (김 등, 미발표)을 사용하였다.

바이러스 증식에 사용한 발육 계란은 SPF 송봉농장에서 구입한 specific pathogen free(SPF) 종란을 실험실에서 부화하면서 사용하였다.

**혈청:** IBV 면역혈청은 고도면역(hyperimmune) 혈청, 회복기(convalescent) 혈청 및 야외계군에서 채취한 것을 사용하였다.

Mass-41 및 분리주 82-5, 86-1, 86-28, 86-44, 86-50에 대한 고도면역혈청은 9주령의 SPF 닭을 flexible film isolator<sup>41</sup>에 격리사육하면서 점안으로 1차 접종하고 4주후 formalin으로 불활화한 바이러스를 aluminum gel에 흡착시켜 2차 접종하고 1주후에 채취한 혈청이

다.<sup>5</sup>

분리주 87-3, 87-52, 88-54에 대한 회복기 혈청은 9주령의 닭을 flexible film isolator에 기르면서 각 바이러스를 점안점종하고 4주후 채혈한 혈청이며, 분리주 B4, 86-26, 86-325는 2주령의 SPF 닭에 각 바이러스를 기관 및 점안으로 점종하고 2주후 채혈한 혈청이다(김 등, 미발표).

Mass-41 고도면역 혈청은 항원과 conjugate의 역가 측정, coating 조건비교 실험 등에서는 양성혈청으로, 혈청 역가측정에서는 internal reference positive(IRP) 혈청으로 사용하였으며, IBV 음성혈청은 5주령의 SPF 닭에서 채취한 혈청을 사용하였다.

야외계군 혈청은 IB에 감염된 것으로 추정되는 계군에서 채취한 것을 사용하였다.

모든 면역혈청은 2~5수로부터 받은 것을 같은 비율로 혼합하여 사용하였다.

**항원의 제조 :** IBV를 9~10일령의 발육제한의 노막강에 접종, 4일간 증식시킨후 노막강액(allantoic fluid: AF)을 채취하여 virus 재료로 사용하였다. 채취한 AF를 9,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 다시 90,000×g에서 90분간 원심분리하고 침전물을 0.05M TEN buffer(0.05M Tris-hydrochloride, 1mM EDTA, 0.15M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.05% Tween-20, pH 7.4)에 부유시켜 30%와 50%의 discontinuous sucrose gradient에 올려 90,000×g에서 4시간 원심 분리하였다(Sw28Ti rotor, Beckman). 원심후 30%와 50% sucrose의 interface에 형성된 band를 채취하여 생리식염수로 10시간 투석한후 항원으로 사용하였다. 항원의 단백질량은 Lowry et al<sup>42</sup>의 방법에 의하여 측정하였으며 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

**항원 coating:** 정제한 항원을 0.1M carbonate-bicarbonate buffer(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 9.6)에 희석하여 96 well의 ELISA 용 polystyrene microplate(Cat. No. 011-010-3350, Dynatech Laboratories Inc., Virginia, USA)에 well당 100μl씩 분주하였다. 항원의 coating 조건비교시험을 제외한 모든 시험에서는 분주한 항원액을 37°C에서 완전 건조시켜 coating하였다. 37°C에서 완전 건조되는 데는 약 30시간이 소요되었다.

항원의 coating 조건 비교시험에서는 위에 설명한 방법과 항원액을 분주한 후 실온에서 3시간 방치후 4°C에서 overnight 하고난 후 microplate를 털어서 항원액을 제거하는 방법을 비교하였다.<sup>37,43</sup>

Coating이 끝난 plate는 4°C에서 보관하면서 사용하였으며, 사용하기전에 PBS-T buffer(0.5M NaCl,

2.5mM KCl, 1.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.0mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 1회 세척하고 증류수로 2회 세척한후 사용하였다. Microplate의 모든 세척은 microplate washer(Microplate washer S8/12, Titer-teck)를 사용하여 실시하였다.

**효소표시 2차항체(conjugate)와 기질 :** Conjugate는 horseradish peroxidase(HRPO) conjugated goat anti-chicken IgG를 구입하여 사용하였다(Cat. No. 14-24-06, Kikegaard Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD20879, USA). 동결건조한 0.5mg의 conjugate를 20ml의 phosphate buffered saline-glycerol (1:1)에 녹여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Conjugate의 역가측정때 희석액으로는 TEN buffer를 사용하였다.

발색제로 사용한 기질은 o-phenylenediamine hydrochloride(OPD)로 Sigma사와 동아제약으로부터 구입하여 사용하였고, citrate buffer(0.1M sodium citrate, 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4.0)에 0.4mg/ml 농도로 하여 사용하였다.<sup>35,44</sup> OPD는 buffer에 용해한후 30분 이내에 사용하였다.

**ELISA방법 :** 본 실험에 이용된 간접 ELISA 방법은 Engvall과 Perlman<sup>33</sup>이 개발한 것을 Voller et al<sup>45</sup>이 개량한 방법을 사용하였다.

혈청들을 TEN buffer에 희석하여 항원이 coating된 plate에 well당 100μl씩 분주하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난후 증류수로 3회 세척하고 TEN buffer에 희석한 conjugate를 100μl씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시킨후 증류수로 3회 세척하였다. 이어서 OPD 기질액을 100μl씩 분주하고 실온에서 15분간 반응시키고 micro ELISA reader(Multiskan MC, Titertek)를 이용 492nm에서 흡광도(optical density: OD)를 측정하였다.

모든 시험은 반복 또는 3반복실시하여 평균치로 표시하였다.

**단일 혈청희석법에 의한 항체가 측정 :** 단일 혈청희석법에 의한 항체가 측정은 혈청을 1/400로 희석하여 ELISA 방법에 따라 실시하였으며 internal reference positive(IRP) 혈청에 대한 sample의 OD비, 즉 sample/positive(S/P)비는 다음 술식에 의거 계산하였다.

$$S/P = \frac{\text{Sample serum OD} - \text{Negative serum OD}}{\text{IRP serum OD} - \text{Negative serum OD}}$$

비교 시험에 사용한 IBV 항체측정용 ELISA kit (Flock Check)는 Agri-Tech System 사(Portland, Maine, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 이 kit는

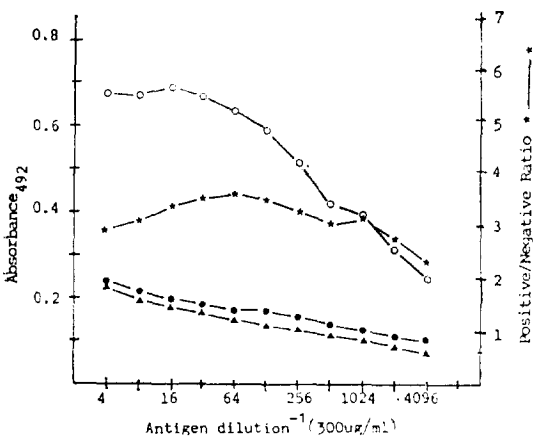
IBV Mass-41주 항원을 coating한 것으로 kit에 포함된

HRPO conjugate, OPD substrate, 희석액들을 사용하였으며 kit 제조회사의 권장방법대로 혈청을 1/50로 희석하여 사용한 것 이외에는 본 시험에서 사용한 방법과 동일한 방법으로 실시하였다.

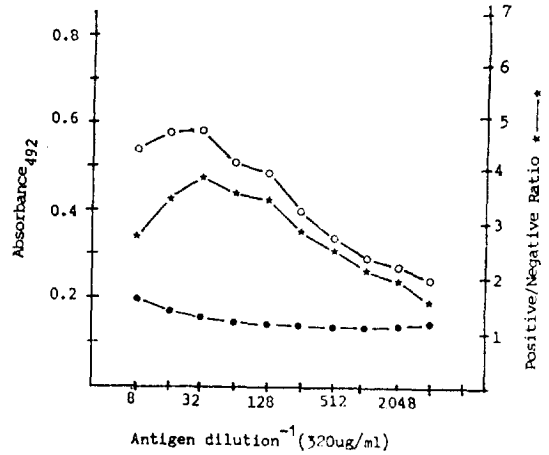
## 결 과

**IBV 항원의 적정농도 :** Microplate에 coating할 IBV 항원의 적정량을 결정하기 위하여 2회 생산한 항원을 사용하여 실험을 하였다.

단백농도 300 $\mu$ g/ml인 첫번째 생산한 항원(No. 1)과 단백질농도 320 $\mu$ g/ml인 두번째 생산한 항원(No. 2)을 1/4 또는 1/8부터 1/4096까지 2진희석하여 microplate well당 100 $\mu$ l씩 분주하여 coating하였다. No. 1 항원에는 혈청과 conjugate를 모두 1/50로 희석한 것을 사용하였고 No. 2 항원에 대하여는 혈청 1/100희석, conjugate 1/50로 희석한 것을 넣어 반응시켰다. Fig 1에서 보는 바와 같이 No. 1 항원에 대하여 양성혈청의 OD는 항원희석배수 1/4부터 1/16 희석배수까지는 항원농도(단백농도 75 - 18.75 $\mu$ g/ml)에 관계없이 높은 값(0.672~0.686)을 보였으며 항원희석 1/16 부터는 항원농도가 감소함에 따라 OD도 점차 감소하였다. 음성혈청과 PBS(혈청대조)의 OD는 항원희석 1/4배에서 각각 0.232와 0.223으로 양성혈청에 비하여 현저하게 낮았으며 항원농도에 비례하여 점차 감소하였다.



**Fig 1.** Determination of optimal antigen concentration(antigen batch No. 1). Dilution of serum and conjugate was 1:50.  
positive serum ○—○  
negative serum ●—●  
PBS ▲—▲



**Fig 2.** Determination of optimal antigen concentration(antigen batch No. 2). Dilutions of serum and conjugate were respectively 1:100 and 1:50.

positive serum ○—○  
negative serum ●—●

No. 2 항원도 No. 1 항원과 비슷한 경향을 보였다 (Fig 2).

한편 양성혈청과 음성혈청의 OD비(positive/negative ratio: P/N ratio)는 No. 1 항원 희석 1/8~1/1024 범위에서는 3.0~3.7로서 항원농도에 따른 뚜렷한 차이를 보여주지 않았다. No. 2 항원의 P/N비는 항원희석 1/16~1/128 범위에서(단백농도 20~2.5 $\mu$ g/ml) 3.4~3.7로서 비교적 높게 나타났다(Fig 1, 2).

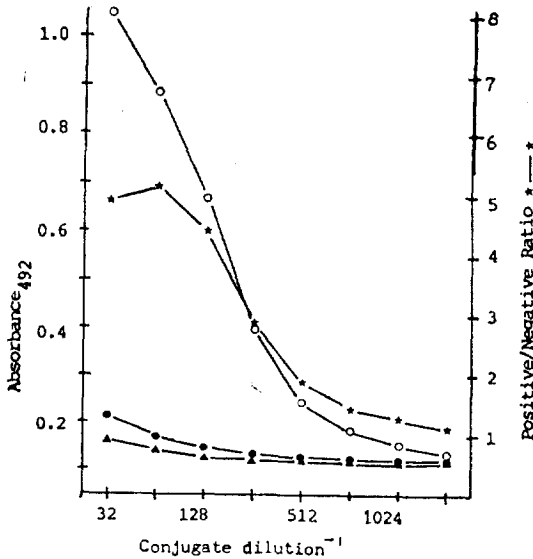
이상의 실험결과에서 높은 P/N비를 고려하여 적정 항원 농도를 3 $\mu$ g/ml로 결정하였다.

**Horseradish peroxidase(HRPO) conjugated goat anti-chicken IgG의 적정 희석배수 :** 0.5mg의 HRPO conjugated goat anti-chicken IgG를 20ml의 PBS-glycerol에 녹인것을 원액으로 하고 이것을 1/32 부터 1/4096까지 2진희석하여 정량하였다. 이때 항원의 농도는 0.3 $\mu$ g/well이었고 혈청희석은 1/50로 하였다.

Fig 3에서 보는바와 같이 양성혈청의 OD는 본 실험에서 사용한 가장 낮은 희석배수인 1/32에서 1.041로 가장 높았으며 희석해감에 따라 급격히 감소하였으나, P/N비는 conjugate 희석배수 1/64에서 5.1로서 가장 높았으며 희석배수 1/256 부터는 급격히 감소하였다 (Fig 3).

이후의 실험에서는 높은 P/N비를 감안하여 conjugate 희석배수를 1/50로 결정하였다.

**항원의 coating 조건 비교 :** 이 실험에서는 37°C에서

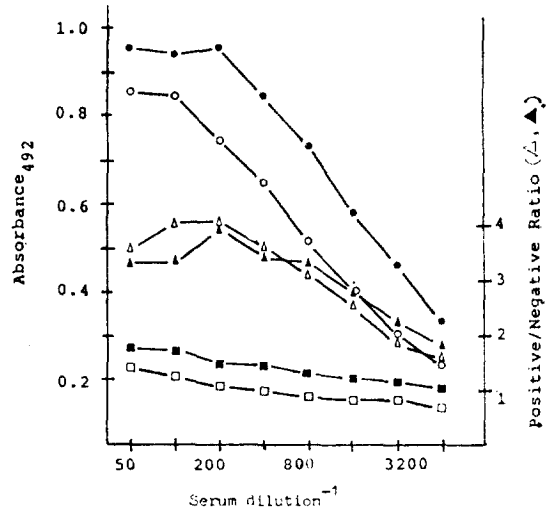


**Fig 3.** Titration of conjugate. Stock conjugate solution was prepared by dissolving 0.5mg freeze dried conjugate in 20ml of PBS-glycerol. Antigen concentration was 0.3 $\mu$ g/well and serum dilution was 1:50.  
 positive serum ○—○  
 negative serum ●—●  
 PBS ▲—▲

완전진조시키는 coating 방법(37°C 법)과 실온에서 3시간 방치후 4°C에서 overnight 한다음 항원액을 제거하는 방법(4°C 법)을 비교하였다.

Fig 4는 두 조건에서 coating한 항원에 대한 양성 및 음성혈청의 각 희석도별 OD 및 P/N값을 표시한 것이다. 4°C법에 비하여 37°C 법으로 coating한 plate에서 양성 및 음성혈청 모두 높은 흡광도를 보여주었다. 이러한 coating 조건에 따른 흡광도의 차이는 혈청희석배수에 영향을 받지 않았다. 반면에 두 항원 coating 조건에서 P/N 값은 차이를 보이지 않았다. 이러한 항원 coating 조건에 대한 야의혈청의 OD 및 sample/negative(S/N) 값도 Fig 4에 제시된 것과 유사한 결과를 보여주었다. 즉 1번 혈청과 8번 혈청만이 1/100~1/200 범위에서 37°C 법에 비하여 4°C 법의 OD가 높게 나타났을 뿐 나머지 모든 혈청은 모든 희석범위에서 4°C 방법보다 37°C 방법에서 OD가 높게 나타났다. 그러나 S/N비는 두 coating 방법간에 뚜렷한 차이를 보여주지 않았다(Table 1).

**Internal reference positive serum의 constant ELISA titer 결정 :** 양성혈청의 ELISA 역가를 측정함



**Fig 4.** Comparison of antigen coating conditions on absorbance values of standard positive(○,●) and negative(□,■) sera. Antigen coating (0.3 $\mu$ g/well) was accomplished either by incubating antigen filled plates at 37°C till completely dry (closed symbols) or by incubating at room temperature for 3 hours followed by overnight incubation at 4°C (open symbols). The remaining antigen fluid of the 4°C coating method was removed by tapping on absorbent tissues.

에 있어서 반복측정에 따른 역가의 변동을 조사하였다. 그러기 위하여 Mass-41 면역혈청을 1/50부터 2진 희석하여 반응케 한다음 흡광도를 측정하였다. 그리고 측정된 OD 값에서 음성혈청의 대응희석도의 OD값을 뺀 값(corrected OD)을 구하였다.

ELISA 역가를 얻기 위하여 positive-negative threshold(PNT) baseline을 결정하였는데 이 선은 반복된 역가측정시 음성혈청의 각희석도별 OD값들에 대한 표준편차를 구하고 이들 표준편차 값들의 평균에 3곱한 값으로 하였다. ELISA 역가는 혈청의 corrected OD 값이 PNT선과 교차하는 지점의 희석배수로 하였고, 혈청희석 범위내에서 실측한 OD값이 PNT선을 통과하지 않을때는 직선관계식을 이용하여 구하였다.<sup>46</sup>

8반복 실험시 Mass-41 면역혈청의 ELISA 역가는 1,914부터 23,977까지 다양하게 나타났고 이런반복실험시 관찰되는 ELISA 역가의 극심한 변동을 극복하기 위하여 반복실험에서 양성혈청의 corrected OD 값이 혈청 희석배수에 대하여 직선관계를 나타내는 OD값들의 평균치들로 회귀식을 만들고 이 직선식으로부터 ELISA 역가 8629를 구하여 internal reference positive(IRP)

**Table 1.** Effects of antigen coating conditions on the absorbance and mean sample/negative (S/N) ratios of field serum and negative serum samples

Serum No.	Antigen coating condition*	Serum dilution					S/N ratio***
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
1	37°C	.799**	.707	.578	.507	.372	2.51
	4°C	.844	.735	.555	.407	.294	3.14
2	37°C	.927	.870	.738	.600	.454	3.04
	4°C	.878	.775	.588	.449	.319	3.34
3	37°C	.987	.884	.756	.624	.448	3.13
	4°C	.809	.702	.538	.397	.301	3.05
4	37°C	1.018	.975	.909	.798	.677	3.75
	4°C	.842	.773	.666	.524	.410	3.60
5	37°C	1.015	.926	.790	.632	.510	3.28
	4°C	.824	.735	.569	.447	.331	3.23
6	37°C	1.138	1.132	1.074	.935	.803	4.36
	4°C	.923	.889	.839	.716	.570	4.45
7	37°C	.937	.925	.810	.686	.544	3.32
	4°C	.846	.812	.717	.578	.446	3.82
8	37°C	.912	.935	.778	.693	.514	3.27
	4°C	.919	.870	.765	.669	.497	4.19
negative serum	37°C	.270	.241	.238	.211	.204	
	4°C	.207	.182	.176	.160	.156	

\* Antigen coating conditions were the same as described in Fig 4.

\*\* Mean absorbance.

\*\*\* Sample/negative serum absorbance ratio.

혈청의 constant titer로 하였다(Fig 5).

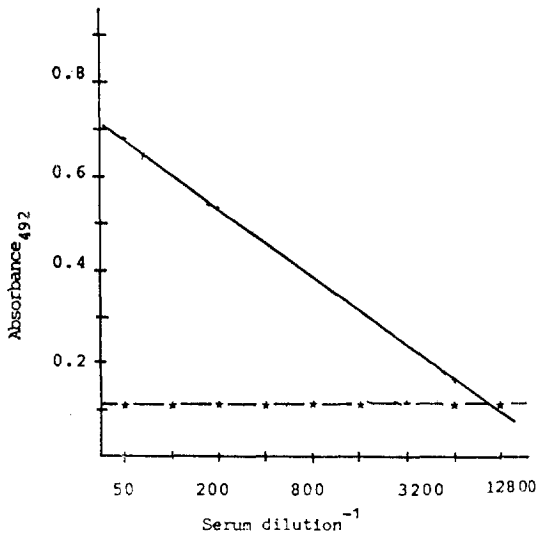
이후의 실험에서의 OD값은 모두 음성혈청의 OD값을 뺀 corrected OD 값으로 사용하였다.

계단회색방법에 의한 면역혈청 및 야외혈청의 ELISA 역가 측정 : IBV의 면역혈청 또는 야외혈청을 1/50 부터 2진 희석하여 ELISA 역가를 측정하였는데 Fig 6은 titration한 혈청중 ELISA 역가가 대표적으로 높은 것(H), 중간정도인 것(M), 그리고 낮은 것(L)의 혈청 희석배수에 따른 OD값을 나타낸 것이다. 혈청 H는 1/400부터 1/6400까지, 혈청 M은 1/200 부터 1/6400 까지, 그리고 혈청 L은 1/50 부터 1/400까지는 비교적 비슷한 slope를 가지는 직선식을 보여준 반면에 그 밖의 희석범위에서는 직선식에서 벗어남을 알 수 있었다.

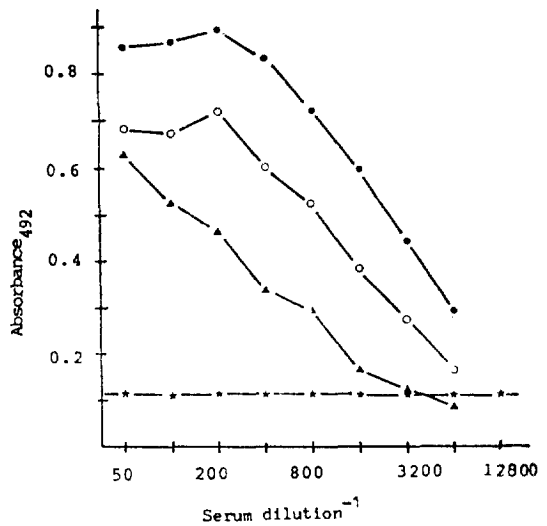
Table 2는 동일한 항혈청을 두번에 걸쳐서 역가측정을 한 성적으로서 1/200~1/3200 희석범위에서의 OD, observed titer 및 혈청을 2진 희석할때마다 감소하는 평균 OD값, 즉 slope를 나타낸 것이다. 실험 1에서 각 혈청의 희석범위에서의 slope는 0.071~0.091이었으며 평균 0.081이었다. 같은 혈청에 대한 실험 2에서의

slope는 0.110~0.123 범위였으며 평균 0.117로 실험 1보다 약 1.4배 증가하였다. 한편 observed titer는 실험 1에서보다 실험 2에서 2.5배(1번 혈청) 내지 4.8배(3번 혈청)까지 높게 나타났다. 이러한 반복실험시의 observed titer의 현저한 차이는 OD 및 slope의 현저한 변동때문으로 Mass-41 면역혈청의 반복실험에서와 유사하였다. 따라서 이후 실험에서 observed titer를 계산할 때는 앞서 실험에서 결정된 IRP의 constant titer(8629)가 해당실험에서 동시에 역가측정을 하여 얻은 IRP 역가로 변동된 정도를 sample의 역가에 곱하는 방법으로 실험때마다 발생하는 역가의 변동을 감소시켰다.

단일 혈청희석도에서의 Sample과 Positive 혈청의 OD비(S/P)의 변화 : 단일 혈청희석에 의한 S/P비의 변화를 알아보기 위하여 두번에 걸쳐 제조한 항원에 대하여 고도면역(hyperimmune) 혈청, 회복기(convalescent) 혈청, 그리고 야외 혈청들을 1/400로 희석하여 OD를 측정하였다. 이때 Mass-41 혈청을 IRP 혈청으로 사용하였고 sample 혈청과 IRP 혈청들은 모두 음성혈청값을 빼준 corrected OD를 사용하여 S/P비를



**Fig 5.** Determination of the constant ELISA titer of internal reference positive(IRP) serum. The titer (8629) was expressed as the reciprocal of serum dilution at which the regression line meets positive-negative threshold baseline (0.113). The regression line was constructed from the values obtained after 8 separate titrations of the IRP serum.



**Fig 6.** Relationship between serum dilution and absorbance of antisera with high, medium and low titer.

PNT baseline  $\text{---} \ast \text{---}$

구하였다.

Table 3에서 보는바와 같이 동일한 batch의 항원에 대한 반복실험에서의 각 혈청들의 S/P비는 비슷하였으

**Table 2.** Variations of absorbances, slopes and observed titers of 4 serum samples between experiments

Experiment No.	Serum No.		Serum dilution					Mean slope	Observed titer	
			1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200			
1	1	OD	.392*	.302	.207	.117	.057	.084	1640	
		Slope	.090	.095	.090	.060				
	2	OD	.372	.271	.197	.105	.062	0.78	1553	
		Slope	.101	.074	.092	.043				
	3	OD	.430	.318	.226	.132	.065	.091	1782	
		Slope	.112	.092	.094	.067				
	4	OD	.355	.255	.186	.108	.072	.071	1485	
		Slope	.100	.069	.078	.036				
	Mean slope			.101	.083	.059	.052	.081		
	2	1	OD	.626	.400	.389	.250	.168	.111	4167
			Slope	.129	.111	.139	.082			
		2	OD	.643	.518	.413	.244	.176	.117	4160
Slope			.125	.105	.169	.068				
3		OD	.734	.671	.587	.413	.295	.110	8475	
		Slope	.063	.084	.174	.118				
4		OD	.685	.552	.421	.306	.192	.123	4951	
		Slope	.133	.131	.115	.114				
Mean slope			.133	.108	.149	.096	.117			

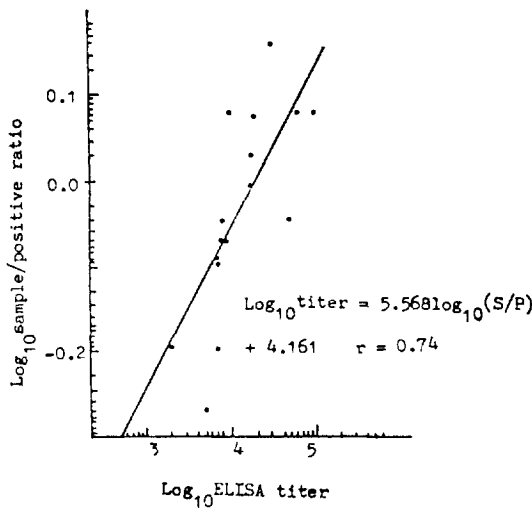
\* Absorbance at 492nm after correction by subtracting absorbance values of the negative serum at the respective serum dilution.

**Table 3.** Variations of sample/positive ratios of hyperimmune(HI), convalescent(C) and field(F) serum samples at single serum dilution(1/400)

Exp. No. Serum	Antigen batch 1					Antigen batch 2					Total mean	SD	CV (%)
	1	2	3	4	Mean	5	6	7	8	Mean			
HI-1	.818*	.822	.867		.836	.913	.778	.825		.839	.837	.042	5
HI-2	.734	.852	.762		.783	.749	.745	.825		.773	.778	.044	6
HI-3	.862	1.104	1.032		.999	1.072	.684	.762		.839	.919	.160	17
C-1				.173	.173	.141	.179	.197	.154	.168	.169	.020	12
C-2				.535	.535	.395	.561	.605	.470	.508	.513	.074	14
C-3				.468	.468	.397	.594	.596	.474	.515	.506	.078	15
F-1		1.375	1.396		1.356	.811	1.038	1.260		1.036	1.196	.208	20
F-2		.941	1.139		1.040	.731	.995	.906		.879	.943	.132	14
F-3		.888	1.240		1.064	.725	.991	.888		.868	.946	.170	18
Negative**	.161	.238	.176	.153	.182	.130	.115	.121	.109	.121	.148	.038	26
Positive**	.530	.846	.651	.454	.620	.517	.327	.344	.343	.410	.503	.161	32

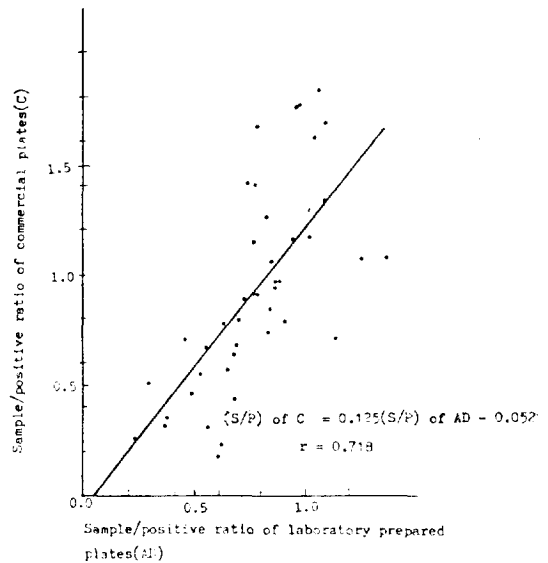
\* Sample/positive ratio.

\*\* Figures for negative and positive (IRP) sera were absorbance values.



**Fig 7.** Relationships between sample/positive ratios at 1/400 serum dilution and observed ELISA titers.

며 두 항원 batch 간에도 큰 차이를 보이지 않았다. 즉 각 혈청들의 S/P비의 평균에 대한 표준편차의 분산계수(CV)가 5~19.6%로 항원 batch간 또는 반복실험간에 S/P비는 변동이 적음을 알 수 있었다. 한편 음성혈청과 IRP 혈청의 평균 OD에 대한 CV는 26%와 32%로 S/P비에 비하여 변이가 크게 나타났다.



**Fig 8.** Comparison of sample/positive ratios between commercial and laboratory prepared plates.

**혈청 단일회석법에 의한 ELISA역가 측정:** 계단회석 방법에 의하여 observed titer가 측정된 16개의 혈청에 대하여 회석배수 1/400에서 S/P비를 구하고, 이 단일회석도에서의 S/P비와 observed titer와의 관계를 그래프에 그렸다(Fig 7).



이때 각 혈청들의 observed titer는 constant IRP titer의 변동비를 반영시킨 것을 사용하였다.

이들 S/P비와 observed titer로부터 다음과 같은 회귀식을 구하였으며 이때 상관계수  $r=0.74$  ( $p<0.01$ ) 이었다.

$$\text{Log}_{10} \text{ELISA titer} = 5.568(\text{log}_{10} \text{S/P ratio}) + 4.161$$

**상표화된 kit와의 S/P비 비교**: 42개의 IBV 면역혈청과 야의혈청들을 가지고 Agri-Tech사의 IBV 항체측정용 ELISA kit와 본 실험에서 항원 coating한 plate를 사용하여 단일 혈청희석법으로 S/P비를 비교하였다. Agri-Tech사의 kit에서는 혈청을 1/500로, 실험실 kit는 1/400로 단일희석하였으며 IRP 및 음성혈청은 본 실험에서 사용한 것들을 공동으로 사용하였다. Agri-Tech사의 plate에 사용된 conjugate, 희석액, 기질 등은 kit에 포함되어 있는 것을 사용하였고 실험실 것은 실험에 사용한 conjugate, 희석액, 기질액들을 사용하

**Table 4.** Homologous and heterologous sample/positive absorbance(S/P) ratios between infectious bronchitis virus strains

Serum	Antigen				
	Mass-41	86-28	86-44	86-325	B-4
Mass-41*	1.00**	1.00	1.00	1.00	1.00
86-28	0.85	0.77	0.85	0.69	1.15
86-44	1.10	0.96	1.16	0.67	0.68
86-325	NT	0.21	0.27	0.36	0.29
86-50	1.03	0.77	0.90	0.54	0.68

\* Mass-41 antiserum was used as internal reference positive serum (IRP).

\*\* S/P ratio.

NT: not tested.

**Table 5.** Relationship between infectious bronchitis virus strains tested by ELISA

	Mass-41	86-28	86-44	86-325
Mass-41	100*	106	97	NT
86-28		100	96	72
86-44			100	66
86-325				100

NT: not tested

\* Percent relationship was calculated from the Archetti-Horsfall formula<sup>47</sup>

$$r = \sqrt{r1 \times r2} \times 100(\%)$$

r1 or r2 =

$$\frac{\text{S/P ratio of serum against heterologous strain}}{\text{S/P ratio of serum against homologous strain}}$$

여 동일한 방법으로 ELISA를 실시하였다.

두 kit간의 S/P비는 Fig 8에서 보는바와 같이 높은 상관관계를 보여 주었다( $r=0.72$ ,  $p<0.01$ ).

**IBV 분리주간의 교차 ELISA시험**: 교차 ELISA 시험에 의한 IBV주 간의 관계를 조사하기 위하여 Mass-41주 및 국내분리주를 같은 항원농도(300ng/well)로 coating하고 각각의 면역혈청을 1/200 및 1/400 희석배수에서 OD를 구하고 같은 희석배수에서의 IRP에 대한 평균 S/P비를 계산하였다. Table 4 및 5에서 보는바와 같이 각 면역혈청의 동종항원과 이종항원에 대한 S/P비는 모두 유사하게 나타났으며 각 주간에는 66~106%의 관련성을 보여주었다.

## 고 찰

간접 ELISA에서 이상적인 항원 coating은 양성혈청에 특이적으로 반응하면서 혈청 희석배수에 민감하게 반응되도록 하는 것이다. 본 실험에서 일반적인 coating 방법인 4°C coating법과 37°C에서 완전건조하는 방법을 비교하였다. 이 실험의 전제는 모든 coating 조건이 동일할 경우 증발이 거의 되지않아 항원농도에 변화가 없는 4°C 법보다 37°C 완전 건조시키는 경우 건조과정에서 항원의 농도는 포화농도로 증가하는데 반하여 coating 되는 표면은 거의 일정하게 유지됨으로써 보다 많은 양의 항원이 coating될 수 있다는데 두었다.

그러나 항원 coating조건 비교시험에서 보는바와 같이 4°C 법보다 37°C 완전 건조법에서 양성혈청의 OD가 증가하였으나, 음성혈청의 OD도 역시 증가함으로써 특이적인 OD의 증가는 없었다. 이러한 결과는 4°C 법이 37°C 법보다 항원의 coating 속도는 늦지만 overnight 함으로서 항원의 포화 coating이 이루어졌고 37°C 완전건조는 빠른 시간에 포화 coating이 되고 그 이후는 비특이적인 coating이 이루어져 음성혈청의 OD 값이 높아졌다고 생각된다.<sup>35,43,44,48</sup>

간접 ELISA로 혈청의 항체가를 측정하는 방법으로는 혈청 단계희석에 의한 역가측정(serial titration)과 단일 혈청희석법이 있다.

혈청 단계희석법은 단일 혈청희석법에 비교하여 조각이 복잡하고 비경제적 이기 때문에 실용적으로 사용하는데 제약이 있으나<sup>48</sup> ELISA 실험법을 정립하는데는 필수적인 방법이다. 혈청 단계희석법에 의한 ELISA 역가를 결정하는 방법에는 측정된 sample의 OD를 변환하는 방법과 PNT baseline을 정하는 방법에 따라 여러가지 방법이 제시되고 있다.<sup>20,36,49-52</sup> 본 실험에서 혈청의 단계희석에 의한 ELISA 역가 측정에는 Snyder

et al<sup>46</sup>이 제시한 double regression method(DRM)를 수정하여 사용하였다. DRM은 sample 혈청의 매 회석도에서의 OD값으로부터 같은 실험, 같은 회석도에서 측정된 음성혈청의 OD값을 빼주는 방법으로 corrected OD를 계산하고 PNT 선은 별도의 반복된 실험에서 음성혈청의 모든 회석도에서의 OD값의 평균에 대한 표준편차 값을 3배한 값으로 하는 방법이다. DRM에 의한 ELISA 역가 결정은 매 실험에서 sample 혈청의 OD 값이 음성혈청의 OD값과 같은 정도로 변하며 이러한 방법으로 계산한 sample 혈청의 slope는 항상 일정하다는 전제가 성립될 때 적용될 수 있는 방법이다.<sup>46,54</sup>

그러나 본 실험에서 Mass-41 혈청의 반복 역가측정시, 그리고 면역혈청과 야외혈청의 역가측정에서 보는 바와 같이 sample의 OD값의 변동은 음성혈청의 OD값의 변동정도와 같지 않으며 같은 혈청의 slope 역시 실험마다 현저한 차이를 보이고 있다. 따라서 본 실험에서는 IRP로 사용한 Mass-41 혈청의 ELISA 역가 측정을 여러번 반복하여 OD의 평균값으로부터 DRM으로 ELISA 역가를 측정하여 이를 IRP 혈청의 constant 역가로 하였다. 다른 혈청의 역가측정때 마다 IRP 혈청도 동시에 역가측정을 하여 IRP 혈청의 constant 역가로부터 해당실험에서 측정된 IRP 혈청의 observed titer로 변동된 비율을 sample의 observed titer에 곱하여 줌으로서 DRM의 결함을 보정하였다.

Sample 혈청과 음성혈청의 OD는 같은비로 변한다는 전제하에서 sample과 음성혈청의 OD(S/N)비를 이용한 ELISA역가 측정법은 여러사람에 의해 보고되었으나<sup>40,55,56</sup> 최근 Islam과 Jones<sup>49</sup>는 간접 ELISA에 의한 reovirus에 대한 항체가 측정에서 이러한 전제가 옳지 않다고 보고한 바 있다.

단일 혈청회석법에 의한 ELISA 역가 측정을 위한 회귀식을 계산하는 과정에서 단일회석도의 OD값을 표시하는 방법도 sample 혈청의 OD와 음성혈청의 OD비, 즉 S/N비를 이용하는 방법등 여러가지가 있으나 본 실험에서는 앞에서 설명한 이유로 인하여 sample 혈청과 같이 IRP 혈청 및 음성혈청의 OD도 측정하여 계산한 corrected OD 값으로 sample 혈청과 IRP 혈청의 OD비, 즉 S/P를 이용하여 실험에 따른 변이를 극소화 하였다. 이러한 방법은 본 실험에서 채택한 방법과 같은 방법을 이용하는 제품화된 kit와 본 실험에서 제조한 plate간에 S/P비가 높은 상관성을 보여줌으로서 이를 더욱 입증하고 있다.

본 실험에서 단일 혈청 회석법으로 ELISA 역가를 측정할 때 혈청 회석배수를 1/400으로 정한 것은 혈청 역가측정에 사용한 모든 hyperimmune serum, conva-

lescent serum 및 field serum들이 이 회석배수에서 혈청회석 배수와 OD 사이에 직선관계식이 성립되기 때문이다. 그러나 혈청 역가측정에 사용한 혈청보다 낮거나 높은 역가를 가지는 혈청은 이 회석배수에서 직선관계식을 성립하지 못한다. 이런 경우에는 혈청을 단일회석 대신 2단계 또는 3단계 회석범위에서 측정을 하거나 먼저 실험한 결과를 보고 재 실험때 회석을 더 많이 하여 측정하는 방법을 사용할 수 있다.

교차 ELISA 실험 결과 Mass-41주 및 국내분리주간에 차이를 인정할 수 없었다. 이는 사용한 IBV주들이 Mass-41주와 동일한 serotype이거나 serogroup common 항원에 반응하는 때문인 것으로 추측된다. Marquardt et al<sup>57</sup>과 Zellen과 Thorsen<sup>58</sup>도 IBV의 여러 serotype을 항원으로 사용하여 간접 ELISA 방법으로 실험한 결과 serotype의 구별이 불가능하다고 보고한 바 있다. 이러한 결과로 보아 본 실험에서 정립된 간접 ELISA 방법은 IBV 백신 면역정도를 측정할 뿐만 아니라 serotype이 다른 IBV에 감염되어 형성된 항체도 측정할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

닭 전염성기관지염 바이러스(IBV)에 대한 항체가를 간접 enzymelinked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 측정하는데 있어서 적절한 기준들에 대한 시험을 거친후 단일 혈청회석법으로 항체가 측정을 시도하였다. 정제한 Mass-41주 IBV 항원을 ELISA용 polystyrene microplate에 항원 단백질농도가 3 $\mu$ g/ml 농도가 되게 조정후 well당 100 $\mu$ l씩 분주후 37°C에서 완전 건조시키는 방법으로 coating하였다. 회석한 검사용 닭 혈청과 horseradish peroxidase conjugated goat antichickn IgG 100 $\mu$ l씩을 차례로 첨가, 실온에서 30분씩 반응시켰으며 coating된 plate를 사용하기 전과 각 단계 반응이 끝난 후에는 중류수로 3회씩 세척하였다. Conjugate에 대한 substrate로는 o-phenylenediamine을 사용하였으며 실온에서 15분간 반응시킨후 optical density(OD)를 측정하였다.

Internal reference positive(IRP) 혈청으로는 Mass-41주 고도면역 혈청을 사용하였으며 IRP 혈청과 음성혈청을 여러번 반복 titration하여 IRP의 constant ELISA titer를 정하였다. IRP 혈청, 음성혈청, 그리고 여러개의 sample 혈청, 즉 국내 분리주에 대한 고도 면역혈청, 회복기 혈청 및 야외계군 혈청을 동시에 titration하여 sample 혈청의 observed titer를 IRP 혈청의 constant titer에 대한 상대 titer로 변환하였다. 이들 sample 혈청의 상대 titer를 1/400 혈청 회석도에

서의 IRP의 OD에 대한 sample 혈청의 OD비(S/P)에 대하여 plotting하였다. 이때 모든 OD는 음성혈청의 OD를 뺀 corrected OD를 사용하였다. 이 plotting으로부터

$\log_{10}$  ELISA titer =  $5.568(\log_{10} S/P) + 4.161$ 의 식을 구하였다. Sample 혈청을 1/400으로 단일 희석하여 OD를 측정 후 위식에 대입하여 고도의 유의성이 있는 ELISA titer를 측정할 수 있었다. Mass-41주 및 3주의 국내 분리 IBV주와 교차 ELISA 시험을 실시한 결과 각 면역 혈청들은 모든 항원에 대하여 유사한 ELISA 역가를 보여줌으로써 야의 감염제균에 대한 항체 조사에도 응용될 수 있게 되었다.

### 참 고 문 헌

- Hofstad MS. Avian infectious bronchitis. *In Disease of Poultry*, 8th ed. Ames: Iowa State Univ Press, 1984;429~443.
- Duff RH, Macdonald JM, McMartin DA, et al. Infection of day-old chicks with infectious bronchitis (IB) virus and subsequent anatomical abnormalities. *Vet Rec* 1971;88:315.
- 김순재, 이영옥, 김선중 등. 특정 전염성병원체에 대한 국내종계의 항체 보유상황. *대한수의학회지* 1980;20:59~64.
- 이영옥, 김재홍, 김재학 등. 전염성기관지염의 국내 발생. *대한수의학회지* 1986;26:277~282.
- 한태욱, 김선중. 닭 전염성기관지염에 관한 연구. I. 야의계균으로부터의 바이러스 분리와 동정. *서울대학교 수의대논문집* 1988;13:161~170.
- Chomiak TW, Luginbuhl RE, Jungherr EL. The propagation and cytopathogenic effect of an egg-adapted strain of infectious bronchitis virus in tissue culture. *Avian Dis* 1958;2:456~465.
- Cowen BS, Hitchner SB. Characterization of new infectious bronchitis virus isolate. III. Cell-culture adaption of Clark 333. *Avian Dis* 1975;19:6~11.
- Larose RN, van Roekel H. The effects of rapid embryo passage upon the infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1961;5:157~167.
- Johnson RB, Newman JA, Wills FK. Titration of infectious bronchitis virus in tracheas of susceptible and immune chickens. *Avian Dis* 1969;13:632~635.
- Johnson RB, Marquardt WW. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum method in chicken tracheal cultures. *Avian Dis* 1975;19:82~90.
- Wooley RE, Brown J. Correlation of cytopathic effect, fluorescent antibody microneutralization, and plaque reduction test results for determining avian infectious bronchitis virus antibody. *J Clin Microbiol* 1977;5:361~364.
- Lukert PD. A plaque-reduction method for the detection of neutralizing antibodies for infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1966;10:305~313.
- Gillette KG. Plaque formation by infectious bronchitis virus in chicken embryo kidney cell cultures. *Avian Dis* 1973;17:369~378.
- Hitchner SB. A virus neutralization screening test: Its limitations in classifying field isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 1973;2:103~109.
- Hopkins SR. Serological comparison of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. *Avian Dis* 1974;18:231~239.
- Cowen BS, Hitchner SB. Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. *Avian Dis* 1975;19:583~595.
- Hopkins SR. Typing field isolates of infectious bronchitis virus by the plaque-reduction test. *Avian Dis* 1978;22:71~81.
- Witter RL. The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis* 1962;16:478~493.
- Gough RE, Alexander DJ. Comparison of serological tests for the measurement of the primary immune response to avian infectious bronchitis virus vaccine. *Vet Microbiol* 1977;2:289~301.
- Monreal G, Bauer HJ, Wigmann J. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian IBV. *Avian Pathol* 1985;14:421~434.
- Bracewell CD. A direct complement fixation test for infectious bronchitis virus using heat-inactivated chicken sera. *Vet Rec* 1973;92:452~454.
- Marquardt, WW. Infectious bronchitis: Detection

- of viral antigen in eggs and antibodies in chicken serum by complement-fixation. *Avian Dis* 1974;18:105~110.
23. Coria MF. Intracellular avian infectious bronchitis virus: Detection by fluorescent antibody techniques in nonavian kidney cell cultures. *Avian Dis* 1969;13:540~547.
  24. Lukert PD. Differentiation of avian infectious bronchitis virus serotypes by immunofluorescence. *Avian Dis* 1969;13:847~852.
  25. Bingham RW, Madge MM, Tyrell DAJ. Hemagglutination by avian infectious bronchitis virus-a coronavirus. *J Gen Virol* 1975;28:381~390.
  26. Alexander DJ, Bracewell CD, Gough RE. Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis virus. *Avian pathol* 1976; 5:125~134.
  27. King DJ, Hopkins SR. Evaluation of the haemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Dis* 1983;27:100~112.
  28. Holmes HC, Finney PM. Haemagglutination inhibition antibody titers in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus vaccines. *Vet Rec* 1985;116:587~588.
  29. Perrotta C, Furtek C, Wilson RA, et al. Standardized enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: comparison with hemagglutination-inhibition and virus-neutralization assays for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Dis* 1988;32:451~460.
  30. Lashgari MS, Newman JA. Preparing hemagglutinating antigen from isolates of IBV. *Avian Dis* 1982;26:508~519.
  31. King DJ. Observations on the preparation and stability of infectious bronchitis virus haemagglutination antigen from virus propagated in chicken embryos and chicken kidney cell cultures. *Avian Dis* 1984;28:504~513.
  32. King DJ, Hopkins SR. Rapid serotyping of IBV isolates with the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis* 1984;28:727~733.
  33. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972;109:129~135.
  34. Voller A, Bidwell DE, Hult G, et al. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull Wild Hlth Org* 1974;51:209~221.
  35. Mockett APA, Darbyshire JH. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for antibodies to avian IBV. *Avian Pathol* 1981;10:1~10.
  36. Tijssen P. *Practice and theory of enzyme immunoassays*. Amsterdam: Elsevier Science Pub Co Inc, 1985.
  37. Garcia G, Bankowski RA. Comparison of tissue-culture virus-neutralization test and the enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibodies to infectious bronchitis. *Avian Dis* 1981;25:121~130.
  38. Snyder DB, Marquardt WW, Mallinson ET, et al. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to IB, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. *Avian Dis* 1984;28:12~24.
  39. Case JT, Ardans AA. Nonspecific reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay caused by binding of immunoglobulins in situ to egg-propagated IBV. *Avian Dis* 1986;30:149~153.
  40. Zellen GK, Thorsen J. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for IB. *Avian Dis* 1986;30:695~698.
  41. 김선중. 시험계 사용용 격리사용상의 조립과 적용. 서울대학교 수의대논문집 1986;11:171~178.
  42. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265~275.
  43. York JJ, Fahey KJ, Bagust TJ. Development and evaluation of an ELISA for the detection of antibody to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *Avian Dis* 1983;27:409~421.
  44. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and

- EMIT. *Methods in Enzymol* 1980;70:419~438.
45. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. A guide with abstracts of microplate applications. Virginia: Dynatech Laboratories Inc, 1979.
  46. Snyder DB, Marquardt WW, Russek E. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. II. Comparison of computational methods for measuring antibody titer in a single serum dilution. *Avian Dis* 1983;27:474~484.
  47. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterogenous immune serum. *J Exp Med* 1950;92:441~462.
  48. Islam MR, Jones RC. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody titer against avian reovirus using a single dilution of serum. *Avian Pathol* 1988;17:411~425.
  49. DeBoer GF, Gielkens ALJ, Hartog L, et al. The use of ELISA for detection of exogenous and endogenous avian leukosis viral antigens in basic breeding flocks. *Avian Pathol* 1983;12:447~459.
  50. Lana DP, Marquardt WW, Snyder DB. Comparison of whole blood dried on filter paper and serum for measurement of the temporal antibody response to avian IBV by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 1983;27:813~821.
  51. Snyder DB, Marquardt WW, Kadavil SK. Ciliary activity: A criterion for associating resistance to IBV infection with ELISA antibody titer. *Avian Dis* 1983;27:485~490.
  52. Cheng YQ, Lee LF, Smith EJ, et al. An enzyme-linked immuno-sorbent assay for the detection of antibodies to Marek's virus. *Avian Dis* 1984;28:900~911.
  53. Smart IJ, Grix DC. Measurement of antibodies to infectious avian encephalomyelitis virus by ELISA. *Avian Pathol* 1985;14:341~352.
  54. Snyder DB, Marquardt WW, Mallinson ET, et al. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian Dis* 1983;27:261~270.
  55. Briggs DJ, Skeeles JK. An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Pasteurella multocida* in chickens. *Avian Dis* 1984;28:209~215.
  56. Briggs DJ, Whitfill CE, Skeeles JK, et al. Application of the positive/negative ratio method of analysis to quantitate antibody response to infectious bursal disease virus using a commercially available ELISA. *Avian Dis* 1986;30:216~218.
  57. Marquardt WW, Snyder DB, Schlotthober BA. Detection and quantification of antibodies to IBV by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 1981;25:713~722.
  58. Zellen GK, Thornsen J. Determination of the antigenic relationships among six serotypes of infectious bronchitis virus using the enzyme-linked immunosorbent assay and serum neutralization test. *Avian Dis* 1987;31:455~458.