

효소면역법에 의한 닭 전염성 기관지염 바이러스 항체검사

송 현 제 · 최 정 옥

전남대학교 수의과대학

(1991. 9. 23 接受)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Avian Infectious Bronchitis Virus

Hyun-Jae Song and Chung-Ok Choi

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju, Korea

(Received September 23, 1991)

SUMMARY

In order to establish ELISA method to detect antibody against IBV various factors involved were examined. Antigen was prepared from Massachusetts type IBV which is known to be one of serotypes distributed most widely. The virus was grown in embryonated SPF chicken eggs. Allantoic fluid harvested was processed to ultracentrifugation and sucrose density gradient centrifugation to produce a purified antigen. The antisera selected from the field samples based on hemagglutination inhibition test were used as the standard positive and negative sera for this study and the results obtained were summarized as follows.

1. It was found that ELISA test was satisfactory when the purified antigen was coated on the plate in the amount of about 40ng protein per well. In case of the phospholipase treated hemagglutinating antigen it gave satisfactory results when the each well was coated with 1.2 to 2.5 hemagglutinating unit which was equivalent to 40 to 90ng of protein.
2. There was no significant difference in the ratio of optical density of positive to that of negative serum whether the coated antigen was held for 1 hour at 37°C or it was held overnight at 4°C. The coated antigen could be kept in dried state without change of antigenicity for at least one month of experimental period at 4°C.
3. There was a big variation in the optical density and P/N values depending on the maker of the plates and on the plate of the same maker.
4. It was found that background optical density was negligible when serum was diluted more than 1 : 50 and serum dilution of 1 : 100 appeared to be appropriate as a routine test dilution to screen the antibody.
5. Optical density was fairly constant 15 minutes afterward from the time substrate was treated and during the 4 hours after stopper was treated.
6. There was a low correlation ($r=0.42$) between ELISA and HI test. However, when 74 serum

samples were tested for the IBV antibody, 98.7% were found to be positive by both tests in which titers of 2^6 or more by HI test and P/N values of 1.4 or more by ELISA were considered to be positive.

7. Day-old IBV vaccinated chickens shows a similar antibody decay and rising pattern until 8 weeks of age by the two tests, ELISA and HI.

I. 緒 論

닭 전염성 기관지염(Avian infectious bronchitis; IB)은 Coronavirus에 속하는 Infectious bronchitis virus(IBV)에 의해서 발생하는 급성전염병¹⁵⁾으로 1931년 봄에 North Dakota에서 Shalk와 Hawn이 최초로 본 병의 발생을 보고한³¹⁾ 이래 주로 어린 닭에서 발생 보고가 있었으나 1940년대에 산란계에서 호흡기 질병과 산란을 저하가 나타났고, 1950년대 중반에 백신개발로 그 피해가 감소하였으나 아직도 전세계적으로 발생하여 양계산업에 큰 피해를 주고 있는 질병이다¹⁵⁾.

본 병의 임상증상은 6주까지의 어린 일령에서 기관지염, 기침, 콧물 등의 호흡기 증상을 나타내며 심한 경우 25%까지 폐사를 보인다. 육성 중인 닭에서는 증체를 저하 및 사료효율 감소를 보이며 산란중인 닭에서는 기형란, 이상란을 산란하며 산란율 및 난질의 현저한 저하가 나타난다¹⁵⁾.

Winterfield와 Hitchner³²⁾는 최초로 IBV 감염닭에서 신장염 및 신중의 유발을 보고하였다. 주로 어린 일령에서 간질성 신장염을 보이며¹⁾ sodium 배출이 증가하여 배뇨증가에 기인한 급성 신장장애를 일으켜 폐사에 이른다⁶⁾. 이 병은 또 코라이자, 마이코플라즈마균, 대장균 등 세균이나 호흡기 질병을 유발하는 다른 바이러스와 복합감염으로 질병의 피해가 훨씬 심해진다^{15,17)}.

우리 나라에서는 IBV의 감염이 1960년대에 혈청학적으로 확인되었으나 임상증상은 확인되지 않았다^{37,39)}. 김 등³⁸⁾은 1980년 면역확산법으로 항체분포 조사를 실시하여 개체별로 16.9%, 계군별로는 55.3%가 감염되었다는 것을 밝혔다. 최근 이 등⁴⁰⁾이 산란율이 감소한 농장에서 혈구응집억제(Hemagglutination inhibition; HI)반응으로 IB 항체를 중

명하고 발병계군과 동거시킨 SPF 닭에서 3주의 IBV를 분리 동정함으로써 국내에서 최초로 IB가 실제로 발생한다는 사실을 보고하였다. 그 뒤 한과 김⁴²⁾은 야외계군으로부터 발육계란 및 계태아 간세포배양과 기관배양 등에 의해 5주의 IBV를 분리 동정하였다.

IBV는 지금까지 많은 혈청형이 보고되어 왔다. Hopkins¹⁶⁾는 조직배양한 신세포에서 Plaque reduction test로 8종의 혈청형을 보고하였으며, 지역이나 농장에 따라 다른 혈청형이 유행할 수 있기 때문에 최근에도 여러 나라에서 새로운 혈청형이 보고되고 있다^{8,9,12,13,19,30)}.

이 등⁴⁰⁾은 Massachusetts 41형을 사용하여 HI 반응에 의해 야외 닭의 항체분포를 조사한 결과 높은 항체가를 보여주었기 때문에 우리 나라에 유행하고 있는 혈청형이 마사추셋형이 아닌가 추정했었으나 King¹³⁾이 최근 국내 분리주를 가지고 다른 혈청형과 비교해 본 결과 마사추셋형이 아닌 것으로 보고한 바 있다.

현재까지 IBV에 대한 혈청항체검사법으로는 한천내침강반응¹²⁾, 신장세포배양에서 중화시험¹⁶⁾, 기관조직배양에서 중화시험⁷⁾, 형광항체반응⁶⁾, HI반응^{2,4,14,20)}, 효소면역법(ELISA)^{5,11,24,27,28,36)}등 여러 가지 방법이 이용되고 있다. 그 중 HI 방법은 간편하기 때문에 가장 많이 사용되고 있는 방법 중의 하나이다.

원래 이 바이러스는 혈구응집능이 없으나 trypsin이나 phospholipase C 등의 효소로 처리하면 혈구응집능을 갖는다는 사실을 Alexander 등³⁹⁾이 최초로 밝혔으며 그 후 여러 학자들이 항체가 측정^{2,4,14,20)}과 혈청형 분류^{3,18,21,22)} 및 새로운 혈청형을 알아보기 위해^{13,19,34)} HI 반응을 이용했다.

본 병에 대한 ELISA는 1981년에 Mockett와 Darbyshire²⁶⁾, Marquardt 등²⁴⁾이 보고한 바 있

며 국내에서는 1988년 한과 김⁴²⁾이 상품화된 ELISA Kit를 이용하여 분리바이러스를 시험점중한 계군의 항체가 측정에 이용한 적이 있다.

ELISA는 중화시험이나 HI 반응보다 항체검출이 신속하고 민감하며^{24,26)} serotype-specific 하지 않기 때문에 광범위한 혈청형을 검색할 수 있는 장점이 있다^{28,29)}. Zellen과 Thorsen³⁵⁾에 의하면 6개의 serotype 간의 교차시험에서 동종간에는 100% 상관관계일 때 이종간에는 72%의 상관관계를 보여준다고 보고하였다.

본 연구에서는 IBV 야외감염제와 백신접종 계군의 혈중항체 측정방법으로서 기존의 중화시험이나 HI 검사방법보다 용이하고 혈청형에 크게 영향을 받지 않는 ELISA 방법을 확립하고자 ELISA에 영향을 주는 여러 가지 요인을 검토하고 HI 가와의 상관관계를 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 바이러스

IBV로는 가축위생연구소에서 분양받은 Mass-41과 녹십자에서 분양받은 H-120주를 사용하였다.

2. 혈 청

ELISA 반응 및 HI 반응에 이용된 혈청은 실험실에 의뢰된 병계에서 채취한 혈청 중에서 임의로 선발한 39개의 혈청과 IBV를 실험점중한 계군에서 채취한 35개의 혈청을 사용하였다. 그중 HI 가를 기준으로 3개의 양성혈청과 1개의 음성혈청을 선발하여 표준혈청으로 사용하였다. 3개의 양성혈청 A, B, C는 HI 가가 각각 2¹⁵, 2¹⁰, 2⁸이었으며 음성혈청은 HI 가가 2³이었다.

3. 혈구응집(HA) 및 억제반응

HA 및 HI 반응에 사용한 표준항원은 마사추셋형 IBV로 만든 항원으로 SPAFAS에서 구입하였으며 plate는 V-plate를 사용하였다. HA 반응은 King과 Hopkins²⁰⁾, HI 반응은 Gelb와 Killer¹⁴⁾의 방법에 따라 실시하였다.

4. 효소면역 반응용 항원

항원은 Zellen과 Thorsen³⁵⁾의 방법에 따라 다음

과 같이 실시하였다.

H-120주를 5.9EID₅₀/0.1ml 되게 11일령 SPF 발육란(송봉 SPF 농장 유래)의 요막강에 접종하고 45시간 배양하였다. 발육란은 4°C에서 4시간 정지시켰다가 노막강액을 총 500ml 채취하였다. 노막강액은 Zellen과 Thorsen³⁵⁾의 방법에 의해 정제하여 100배 농축한 바이러스를 -20°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다. 항원의 단백질함량은 Loury 등²³⁾의 방법에 의해 결정하였다.

5. 효소표지항체와 substrate

효소표지항체로 horseradish-peroxidase-conjugated rabbit antichickens IgG(Lot # 15757, Cappel Labs, Cochranville, Pennsylvania)를 PBS에 10배 희석한 후 0.5ml씩 분주하여 -70°C에 보관하고 사용할 때는 PBS-T(PBS+0.05% Tween 20, pH 7.2)로 500배 또는 1,000배로 희석하였다.

발색제는 Orthophenylenediamine(OPD: Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri)을 사용하였으며 substrate로는 H₂O₂를 사용하였다. Phosphate-citrate buffer(PCB: 25.7% 0.2M Na₂HPO₄·12H₂O, 24.3% 0.1M C₃H₄(OH)(COOH)₃, pH 5.0] 10ml에 4mg의 OPD와 20μl의 30% H₂O₂를 사용 직전에 첨가하였다.

6. ELISA 방법

ELISA 방법은 Case 등⁵⁾과 Mockett와 Cook²⁹⁾의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 간접법으로 실시하였다.

1) 항원 coating: 2가지 항원 즉 정제항원과 HI 반응용 항원(SPAFAS)을 coating하여 비교하였으며 coating한 항원을 건조시켜 4°C에 보관하면서 보존성도 검사하였다. 또한 ELISA용 plate의 제조원에 따라 결과에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 국내에서 구입이 용이한 3가지 제품을 비교하였다.

항원은 탄산완충액(50mM carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)으로 단백질량이 well 당 10ng에서 160ng까지 함유되도록 25배에서 400배 계단 희석하여 96well ELISA용 microplate에 well 당 50 μl씩 넣고 습도를 유지하면서 37°C에서 한시간 또는

4°C에서 12~16시간 처리하였다. 건조 항원의 항원성 검사는 항원을 37°C에서 1시간 coating 시킨 후 여액을 제거하고 세척액으로 3회 세척하고 건조시킨 것과 세척하지 않고 건조시킨 항원을 비교하였다.

2) 세척 : 각 처리후 세척은 세척액인 PBS-T를 multipipette으로 150 μ l씩 각 well에 넣고 2분 후 강하게 세척액을 뿌려 일시에 제거하는 방법으로 3회 반복하였다. 세척액은 4°C에 보관하면서 2주 이내에 사용하였다.

3) Blocking : 항원이 coating 되지 않은 부위를 blocking 하기 위하여 blocking buffer (1% Bovine serum albumin+PBS+0.05% Tween 20)를 50 μ l씩 well에 넣고 37°C에서 1시간 작용시켰다.

4) 혈청희석 : 표준양성 및 음성혈청을 PBS-T 용액으로 12.5배에서 1,600배까지 혈청에 따라 다양하게 희석하고, 항원농도를 일정하게 하였을 때의 ELISA 반응을 검사하였다. 가검혈청은 1:100의 한 단계만 희석하여 사용하였다.

5) 효소 표지항체 처리 : 효소 표지항체는 500배 또는 1,000배 희석한 것을 well 당 50 μ l씩 넣고 1시간 작용시켰다.

6) Substrate 처리 및 발색정지 : Substrate는 50 μ l씩 각 well에 넣고 30분후에 2.5M H₂SO₄를 동량 넣어 발색정지시켰으며 발색정지후 1시간, 2시간, 4시간 후에 흡광도와 P/N 치(음성혈청에 대한 양성혈청치) 변화를 검사하였다.

7) 판독 : 판독은 ELISA 판독기(Titertek, Multiskan MCC/340MKII, Flow Lab.)를 이용하여 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였으며 파장

을 달리 하였을 때(405nm, 450nm)와 비교하였다. 흡광도는 P/N 치를 산출하여 HI 항체가와 비교하였다.

8) 통계처리 : Plate 제조원에 따른 흡광도의 변이는 변이계수(%)와 P/N 치의 상관관계는 채 등의 방법에 따랐다¹¹⁾.

7. IBV 백신 시험접종

시중에서 구입한 1일령의 갈색산란계 30수에 국내에서 생산된 IB백신(Cunnecticut와 Massachusetts형의 혼합생독백신, 중앙가축전염병연구소)을 양쪽 눈으로 0.03ml씩 접종하였다. 백신접종전과 접종후 1주일 간격으로 10주령까지 5수씩 취하여 채혈한 다음 혈청을 분리하여 -20°C에 사용전까지 보관하였다.

III. 결 과

1. Coating에 알맞는 항원농도

정제항원의 단백질량은 ml 당 80 μ g이었다. 따라서 25배에서 400배까지 희석하여 well 당 50 μ l씩 넣었을 때 단백질량은 희석배수에 따라 well 당 160ng에서 10ng씩 들어간 것이 된다. 항원량을 달리 하였을 때 흡광도와 P/N 치는 Table 1과 같다. 항원농도가 높을수록 양성혈청의 흡광도와 P/N 치가 높아지는 경향이 있으나 음성혈청은 항원량이 40ng 이하에서는 큰 변화가 없으나 80, 160ng으로 항원량이 높아지면 background 흡광도가 비례적으로 높아졌다. 한편, 정제항원은 well 당 40ng(1:100)과 8ng(1:500)으

Table 1. Optical density(OD) and P/N values of standard positive serum depending on the concentration of purified antigen in ELISA

Antigen		Positive A		Positive C		Negative
Dilution(1:)	Protein(ng)	OD	P/N	OD	P/N	OD
25	160	1.85	3.48	1.55	2.92	0.53
50	80	1.26	3.36	1.00	2.66	0.38
100	40	0.91	3.35	0.69	2.33	0.30
200	20	0.75	2.95	0.48	1.90	0.25
400	10	0.68	2.41	0.47	1.66	0.28

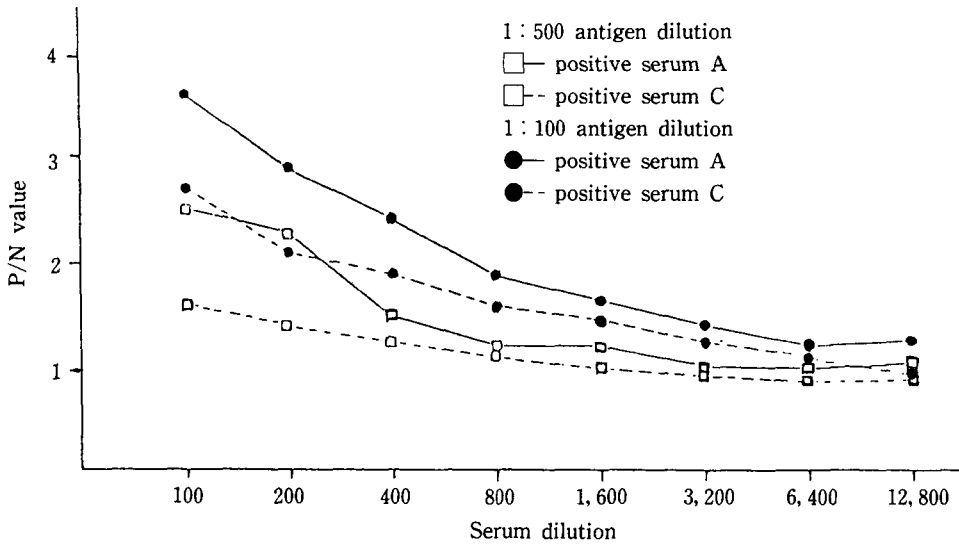


Fig. 1. Comparison of P/N values depending on antigen concentration by ELISA.

Table 2. Optical density(OD) and P/N values of standard positive serum depending on the concentration of phospholipase treated Massachusetts type antigen in ELISA

Antigen		HA	Positive A		Positive B		Negative
Dil(1 :)	Protein (ng)	unit	OD	P/N	OD	P/N	OD
50	180	5.00	0.50	2.95	0.80	4.72	0.17
100	90	2.50	0.54	3.22	0.77	4.66	0.17
200	45	1.25	0.51	3.34	0.79	5.14	0.15
400	23	0.63	0.42	2.67	0.68	4.32	0.15
800	11	0.31	0.40	2.49	0.66	4.10	0.16

로 coating 시킨 후 2가지 양성혈청의 희석 배수에 따른 P/N 치는 Fig. 1과 같이 40ng 으로 coating 시킨 것이 현저히 높은 P/N 치를 보였다.

Phospholipase 효소처리한 항원은 항원농도가 11.25ng 에서 180ng 까지 높아졌는데도 즉 HAunit 로 0.3에서 5unit 로 높였으나 음성 혈청의 흡광도는 거의 일정한 치를 보여주었으며 양성혈청의 흡광도도 차이가 크지 않았다. 그러나 흡광도와 P/N 치는 항원이 45~90ng 일때 즉 1.2~2.5 HA unit 일때가 높게 나타났다(Table 2).

2. 혈청희석농도 결정

혈청 희석배수에 따른 흡광도와 P/N 치의 결과는 Fig. 2와 같다. 음성혈청의 흡광도는 25배 이하의 희석배수에서는 0.34이상으로 나타났으나 50배에서 200배의 희석배수에서는 0.2에서 0.25범위를 보여 큰 변화가 없었다. 양성혈청은 희석배수가 낮을수록 흡광도는 높았으나 P/N 치는 혈청희석배수 12.5배에서 400배까지 큰 차이를 보이지 않았다.

3. 항원 coating 방법의 비교

항원 coating 이 처리온도와 시간에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위하여 37°C 1시간 처리한 것과 4°C에서 12~16시간 처리한 것을 비교한 결과는

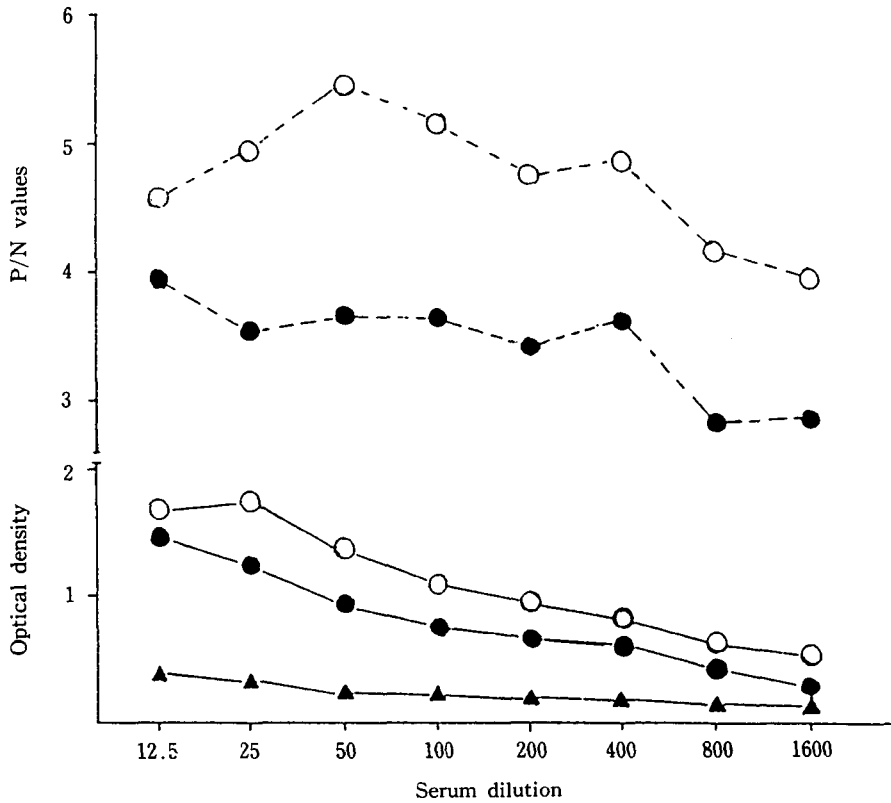


Fig. 2. Optical density and P/N values depending on serum dilution.

● ; positive serum A, ○ ; positive serum B, ▲ ; negative serum

Table 3과 같다. 양성혈청 A 1 : 10희석한 것의 흡광도는 37°C 1시간 처리한 것에서 3.64(P/N치 2.68), 4°C 12~16시간 처리한 것에서 3.38(P/N치 2.22)로 37°C, 1시간 처리한 것이 약간 더 높게 나타

났으나 유의차는 없었다.

4. 효소 표지 항체 희석농도 결정

정제 항원을 40ng 씩, 표준혈청을 1 : 100 희석하여 37°C 1시간 작용시킨 후 conjugate를 1 : 500, 1 : 1,

Table 3. Effect of holding methods of coated antigen on ELISA for IB antibody

Serum	Dilution(1 :)	Holding for 1hr, at 37°C		Holding for 12~16hrs, at 4°C	
		OD	P/N	OD	P/N
Positive A	10	3.64	2.68	3.38	2.22
	100	2.73	2.01	2.80	1.83
Positive C	10	3.44	2.53	2.91	1.91
	100	2.26	1.67	1.88	1.23
Negative	10	1.79	1.00	1.64	1.00
	100	1.36	1.00	1.52	1.00

Table 4. Comparison of ELISA between two different concentrations of enzyme conjugate

Serum	Dilution(1 :)	OD and P/N values depending on conjugate dilution			
		1 : 500		1 : 1000	
		OD	P/N	OD	P/N
Positive A	50	2.17	3.45	2.12	4.70
	100	1.77	2.82	1.61	3.59
	500	1.01	1.61	0.83	1.80
Positive C	50	1.59	2.53	1.09	2.42
	100	1.27	2.03	0.91	2.02
	500	0.65	1.04	0.48	1.08
Negative	50	0.70	1.00	0.49	1.00
	100	0.55	1.00	0.41	1.00

Table 5. Influence of reading time after stopper treatment in ELISA

Reading time	Positive A		Positive C		Negative
	OD	P/N	OD	P/N	OD
0	1.05	2.92	0.79	2.20	0.36
1hr	1.03	2.94	0.77	2.21	0.35
2hrs	1.02	2.93	0.76	2.19	0.35
4hrs	1.01	2.89	0.76	2.17	0.35

* : Stopper was added 30minutes after substrate was treated.

000 회석하여 각각 작용시킨 결과 양성 및 음성혈청에 대한 흡광도는 1 : 1,000 회석에 비해 1 : 500 회석에서 전반적으로 약간 높았다(Table 4). P/N 치는 양성혈청 A에서 1 : 500 회석한 것보다 1 : 1,000 회석한 것이 높았으나 양성혈청 C에서는 두 회석배수에서 같은 P/N 치를 나타냈다.

5. Substrate 처리 및 정지시간의 영향

Substrate 를 작용시키고 나서 발색정지시킨 후 4

시간까지 관독한 성적은 Table 5와 같다. Substrate 처리를 하면 orange 색을 띄다가 stopper 를 처리하면 진황색을 띄었으며 stopping 후 4시간까지 흡광도나 P/N 치는 변화가 없었다.

6. 파장과 흡광도

OPD 를 발색제로 사용하여 파장을 달리하였을 때 흡광도를 비교한 결과는 Table 6과 같다. 파장 405 nm 과 450nm 에 비해 492nm 에서 가장 높은 흡광도

Table 6. Optical density and P/N values at different wavelength in ELISA

Wavelength	Positive A		Positive C		Negative
	OD	P/N	OD	P/N	OD
492nm	0.91	3.05	0.69	2.33	0.30
450nm	0.40	2.73	0.31	2.09	0.15
405nm	0.10	1.68	0.09	1.42	0.06

와 P/N 치를 나타냈다.

7. Coating 항원의 보존성 및 ELISA plate 제품 간의 비교

Coating 항원의 보존성을 알아보기 위해 4°C에서 30일동안 보관했던 plate와 보관하지 않은 것과의 비교한 결과는 Table 7과 같다. 양성 혈청 A 50배 희석에서 보관하지 않았던 plate(흡광도; 2.17, P/N 치; 3.45)에 비해 보관했던 plate(흡광도; 1.95, P/N 치; 4.17)가 흡광도는 낮았지만 P/N 치는 높아 보존성은 좋았다. 항원 coating 한 후 건조하기 전 세척 유무에 따른 항원성은 세척하지 않고 바로 건조시킨 것이 흡광도는 약간 더 높았으나(2.259) P/N 치에 있어서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

ELISA plate의 제조원에 따라 흡광도 평균치와 변이계수의 차이를 보여서 B 제품이 well 간에 가장

고른 흡광도를 나타냈다(Table 8).

8. P/N 치와 HI 가의 비교

ELISA 의 P/N 치와 HI 가의 상관관계를 알아보기 위하여 백신접종계군에서 취한 혈청과 가검물에서 채취한 혈청 총 74개를 가지고 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. P/N 치와 HI 가 간에 상관관계는 $r=0.42$ (직선회귀식; $y=0.984+0.132X$)로 매우 낮은 상관관계를 보였다. 그러나 HI 가가 6 이상을 양성으로 하였을 때 혈청 74개중 72혈청이 양성을 보이고 P/N 치 1.4이상을 양성치로 보면 74개중 71개 혈청이 양성을 보여서 양성일치율은 98.7%였다.

9. 백신접종 시험계군의 항체 소장

백신접종한 시험계군의 항체수준을 HI 가와 P/N 치로 표시한 것은 Fig. 4와 같다. HI 가(log₂)는 1 일령에서 9.4+1.51로 가장 높다가 점점 하강하여 6

Table 7. Effect of drying and keeping of coated antigen in ELISA.

Serum	Dilution(1:)	OD and P/N value depending on storage period					
		Time 0 ¹ , Wet		Time 0 ² , Dry		Time 1 month ³ , Dry	
		OD	P/N	OD	P/N	OD	P/N
Positive A	50	2.17	3.45	2.26	3.56	1.95	4.17
	100	1.77	2.82	2.01	3.17	1.49	3.18
	500	1.01	1.61	1.29	2.04	0.85	1.82
Positive C	50	1.59	2.53	1.87	2.94	1.54	3.28
	100	1.28	2.03	1.55	2.44	1.19	2.54
	500	0.65	1.04	1.92	1.45	0.63	1.34
Negative	100	0.70	1.00	0.69	1.00	0.50	1.00
	500	0.56	1.00	0.58	1.00	0.44	1.00

¹tested immediately after antigen coating at 37°C, 1hr

²tested immediately after drying the coated antigen

³tested 1 month after drying the antigen

Table 8. Comparison of ELISA results depending on the source of microplate.

Source of plate	No. of wells measured	Optical density				Coefficient of variation(%)
		Lowest	Highest	Mean	S.D.	
A	96	1.08	2.46	1.23	0.14	11.38
B	96	2.08	2.47	2.27	0.09	3.96
C	96	0.92	1.47	1.07	0.07	6.54

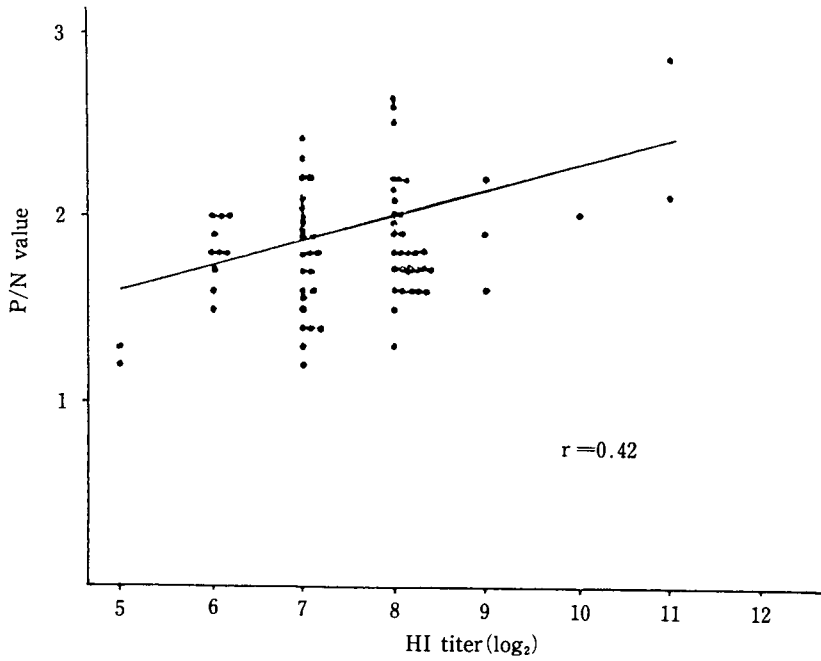


Fig. 3. Comparison between hemagglutination inhibition test and ELISA for IB antibody detection.

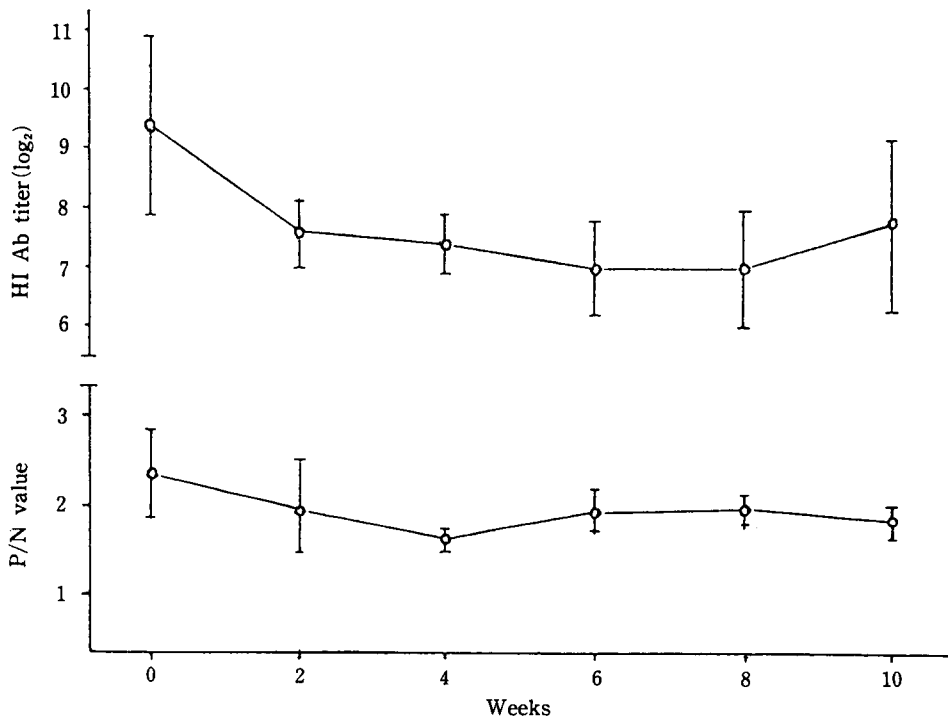


Fig. 4. Antibody responses measured by HI and ELISA of chickens vaccinated with live IB at day-old.

주째 7.0+0.71로 최저치를 보였으며 그런 수준으로 지속되다가 10주째에 7.8+1.48로 약간 상승하고 있다. 한편 P/N 치도 1일령때 2.36+0.46으로 가장 높은치를 보여주다가 점차 하강하여 4주째에는 1.65+0.08로서 가장 낮은 P/N치를 보여주고 있다. 그 다음 10주째까지 약간 상승하는 곡선을 보이지만 대체로 10주를 제외하고는 HI와 유사한 곡선을 보여주었다.

IV. 고찰

ELISA를 이용하여 IBV의 항체가 측정은 1981년에 Mockett와 Darbyshire²⁶⁾, Marquardt 등²⁴⁾이 최초로 시도하여 기존의 항체 검사방법인 중화시험이나 HI반응보다 빠르고 더 민감하거나 최소한 같은 정도로 예민하다는 것을 밝힌 이래 여러 학자들에 의해서 그 특이성, 민감도 및 재현성에 대해서 검토되어졌고^{5,36)} 최근에는 여러 나라에서 야외감염계군의 감염 여부 판정과 백신접종계군에서 백신효능을 측정하는데 이용하고 있다^{27,28)}. 그러나 국내에서는 한과 김²²⁾이 상품화된 ELISA kit를 이용하여 야외분리주에 대한 항체가를 측정하는데 이용한 보고가 있을 뿐 항원을 제조하여 ELISA를 표준화한 보고는 없다가 1989년 장과 김⁴³⁾이 본 실험과 유사한 결과를 본 연구자와 같이 발표한 바 있는데 double regression method을 수정하여 OD값을 계산한 것을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다.

ELISA법에 의한 항체검사는 중화항체 검사나 HI항체검사에 비해 빠르고 간편하다는 장점 외에도 여러 혈청형에 광범위하게 교차반응이 일어나기 때문에 한가지 혈청형으로 제조한 항원을 이용하여 야외계군의 감염 여부를 혈청형에 관계없이 검사할 수 있다는 장점이 있다^{29,33)}. 그러나 혈청형을 결정하는데는 ELISA방법을 이용하기 어렵다는 단점도 있다. 세계적으로 분포율이 가장 높은 혈청형인 마사추셋형의 IBV를 SPF종란에서 증식시켜 정제한 다음 시중에서 구입이 가능한 polystyrene microplate에 coating을 시도하였다. P/N치를 기준으로 가장 알맞는 항원농도는 well당 단백질량을 40ng 넣었을 때였다(Table 1, Fig. 1). 이는 Case 등⁵⁾이 보고한

50ng에서 가장 높은 P/N치를 나타낸 성적과 유사하다.

Mockett와 Darbyshire²⁶⁾는 ELISA항원으로 phospholipase 효소 처리한 항원 즉 혈구응집항원을 well당 1HA unit로 coating하였을 때 ELISA에 의한 항체검사가 잘 되었다고 보고하였는데 본 실험에서는 1.2~2.5 HA unit를 넣었을 때 높은 P/N치를 보여주었다(Table 2). 이는 IBV를 혈구응집항원으로 준비한 것을 그대로 HI반응과 ELISA에 동시에 이용할 수 있다는 것을 보여주는 성적으로서 같은 항원으로 많은 sample을 screen할 때는 ELISA에 이용하고 혈청형 결정 등보다 정밀한 검사에는 HI반응을 이용하면 이상적일 것으로 생각된다.

항원을 coating처리하는데 온도와 시간은 연구자에 따라 차이가 있는데 Mockett와 Darbyshire²⁶⁾, Mockett와 Cook²⁷⁾은 37°C에서 1시간 처리하고 Case 등⁴⁾과 Zellen과 Thorsen³⁶⁾은 실온에서 overnight 처리하였다. Perrotta 등²⁹⁾은 37°C 1시간 처리와 25°C 1시간 처리간에 큰 차이가 없다고 보고하였다. 본 실험에서는 Table 3에 나타난 바와 같이 37°C에서 1시간 처리와 4°C에서 overnight 작용시킨 것과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러므로 신속한 처리가 필요할 때는 37°C 1시간 처리로 충분할 것으로 생각된다. 그리고 coating항원을 보존하기 위해서 항원 coating후 흡착하지 않는 항원을 washing하여 제거한 다음 건조한 것과 washing하지 않고 그대로 건조한 것을 비교했을 때 차이를 보이지 않았다. 그러므로 시간과 노력을 절약하기 위해서 washing하지 않고 그대로 건조시켜 4°C에 보관한다면 항원성을 잃지 않고 오래 보관할 수 있을 것으로 생각되며 본 실험에서는 30일간 보관하였을 때 즉시 사용한 것과 차이를 보이지 않았다(Table 7).

ELISA용 plate가 동일한 회사제품으로 동일 box 내의 제품 중에서도 어떤 plate는 coating이 잘 안되는 현상을 실험도중 몇번 경험했기 때문에 3회사 제품과 비교해 본 결과 B제품이 A, C제품에 비해 색도가 높게 나타났고 well간의 편차가 가장 낮아 가장 양호한 것으로 나타났다(Table 8). Case 등⁵⁾은 plate의 batch에 따라 재현성이 약간의 차이를 보이므로 흡광도로 plate 간을 비교한다는 것은 어렵기 때

문에 각 plate 마다 양성과 음성표준혈청을 대조로 두어 P/N 치로서 표현하였는데 본 실험에서도 plate의 제조원과 well에 따라 흡광도에 있어서 차이를 나타냈기 때문에 표준양성과 음성혈청을 각 plate 마다 같이 검사하여 이를 대조로 이용 ELISA에 의한 항체가를 P/N 치로 나타내므로써 plate, 실험재료, 장소 및 시간의 다름에 따라 생기는 성적의 차이를 보완하고자 했다.

Mockett와 Darbyshire(1981)²⁶⁾는 혈청희석이 1:100 이하일 때는 비특이반응이 나타난다고 하였으나 Case 등⁵⁾은 1:50 희석했을 때 양성혈청과 음성혈청 사이에 가장 뚜렷한 흡광도의 차이를 보였다고 보고하고 있다. 본 실험에서도 음성 혈청 희석배수가 1:50일 경우 비특이 반응이 인정되지 않았기 때문에 screen 목적으로 항체검사를 실시할 경우 혈청희석배수를 1:100으로 하면 비특이반응을 배제하면서 양성 case를 검출하는데 충분할 것으로 여겨진다(Fig. 2).

효소표지항체는 Table 4에서 보는 바와 같이 1:500이나 1:1,000 희석배수간에 비슷한 성적을 보였는데 이는 동일한 효소표지항체를 사용하여 Case 등⁵⁾이 1:400~800에서 가장 높은 P/N 치를 나타낸 것과 유사하다. Case 등⁵⁾은 substrate 작용후 30분까지 흡광도가 양성혈청이나 음성혈청이나 간에 계속 상승하였기 때문에 시간단축 목적으로 15분에 판독하였다고 보고하였다. 본 시험에서는 그들의 성적과 달리 15분과 30분 후의 측정치에 있어서 큰 차이를 보이지 않았으나 충분한 발색반응 시간을 주기 위해 substrate 작용후 30분에 발색정지를 시켜 곧바로 흡광도를 측정하였다. 그러나 Table 5에서 보는 바와 같이 발색정지 직후나 4시간 경과 후까지 흡광도에 유의성 있는 차이가 인정되지 않았기 때문에 substrate 처리후 15분만에 발색정지시킨 후 즉시 판독하는 것이 가장 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며 발색정지만 시켜 놓으면 시간이 어느 정도 경과한 후에 판독하여도 된다는 것을 알 수 있다.

Marquardt 등²⁴⁾과 Mockett와 Cook²⁷⁾는 P-nitrophenyl phosphate를 발색제로 사용하여 400 nm 및 405nm에서 판독하였고 Monreal 등²³⁾은

5-amino-2-hydroxybenzoic acid를 사용하여 490 nm에서, Zellen과 Thorsen³⁰⁾은 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS)를 사용하여 414nm에서 판독하였다. 그러나 본 실험에서는 Table 6에 나타낸 바와 같이 파장을 달리하여 405nm, 450nm, 492nm에서 흡광도를 비교하여 본 결과 492nm에서 가장 높은 흡광도와 P/N 치를 나타냈다. 이는 발색제로 OPD를 사용했기 때문에 나타나는 차이로 생각된다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 ELISA에 의한 P/N 치와 HI 항체가와의 상관관계를 분석한 결과는 $r=0.42$ 로서 매우 낮은 상관관계를 나타냈다. 이것은 Mockett와 Darbyshire²⁶⁾의 결과($r=0.44$)와 비슷하다. 그러나 낮은 상관관계일지라도 HI 항체가가 2° 이상을 양성으로 판정하고 P/N 치 1.4 이상을 양성으로 기준하였을 때 양성율은 98.7%의 높은 일치율을 보이고 있다. 이는 HI 반응에서 검출되는 항체와 ELISA에 의해서 검출되는 항체가 서로 약간 다르기 때문이라고 생각된다. 본 실험에서 사용한 효소표지 항체가 Anti-igG이기 때문에 ELISA에 의해 검출되는 항체는 모두 IgG인데 비해서 HI 반응에서는 그 이외의 항체도 검출되리라 여겨진다.

인공감염시킨 실험계군의 항체소장을 HI와 ELISA 방법으로 비교한 성적은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1주에서 10주까지 조사기간 중 10주를 제외하고는 대체로 일치하고 있다. 본 실험에 사용한 계군은 시중에서 구입한 닭이기 때문에 높은 수준의 모체이행항체가 1일령에 검출되었으며 서서히 하강하여 6주와 8주 사이에 HI가 27을 유지하다가 10주때는 2°로서 약간 상승하는 양상을 보여주고 있다. 이는 Yachida 등³¹⁾의 경우 1일령때 2° HI가 6주령때 2'로 하강하는 모체이행항체의 소장을 보인 것과 비교하면 본 실험에서는 1일령때 접종한 백신에 의해서 6주령때 완전히 하강하지 않고 상당히 높은 수준으로 유지되는 것으로 생각된다.

V. 요약

세계적으로 가장 출현빈도가 높은 혈청형인 마사추세팅 IBV를 발육란에서 증식시킨 다음 요막강액을

채취, 바이러스를 농축 정제하여 항원으로 사용하고 야의 IBV 감염계균에서 채취한 혈청중 HI 반응에 의해 양성 및 음성혈청을 선발, 표준혈청으로 사용하여 ELISA 를 시도한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 정제항원은 ELISA plate 의 well 당 40ng 단백량으로 coating 하였을 때 높은 P/N 치를 나타냈고 혈구응집항원은 well 당 1.2~2.5 HA unit 로 coating 하였을 때 정제항원과 유사한 결과를 보였다.
2. 항원의 coating 시 온도와 시간은 37°C, 1시간이나 4°C에 12~16시간 처리하였을 때 P/N 에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았으며 항원을 건조시켜 4°C에 1개월 보관하여도 항원성의 변화를 인정할 수 없었다.
3. 제품이 다른 3종류의 plate 에서 항원 coating 의 차이를 비교한 결과 제품간에 항원 coating 의 균일도와 농도에 있어서 뚜렷한 차이가 인정되었다.
4. 음성혈청희석배수 1 : 50에서도 비특이반응은 인정되지 않았으며 가검혈청은 1 : 100희석했을 때 높은 P/N 치를 보여서 screen 용 희석배수로 적당하였다.
5. Substrate 처리한 후 발색 정도는 15분 이후에는 일정하여 30분까지 변화가 없었으며 이때 발색정지제를 처리하였을 때 처리직후부터 4시간까지도 흡광도에 있어서 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.
6. 74개의 혈청에 대해 ELISA 에 의한 P/N 치와 HI 항체가와의 상관관계는 $r=0.42$ 였으며 HI 가 2°이상, P/N 치 1.4이상을 기준으로 하였을 때 양성 case 의 일치율은 98.7%였다.
7. 백신접종 시험계균에서 ELISA 와 HI test 에 의한 항체 소장 비교에서는 10주제를 제외하고는 양 test 에서 유사한 추이를 보였다.

VI. 引用文獻

1. Albassam, M.A., Winterfield, R.W., Thacker, H.L. 1986. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 30 :

468-476.

2. Alexander, D.J., Allan, W.H., Biggs, P. M. et al. 1983. A standard technique for hemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. Vet. Rec. 113 : 64.
3. Alexander, D.J., Bracewell, C.D., Gough, R.E. 1976. Preliminary evaluation of the hemagglutination ad hemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. Avian Path. 5 : 125-134.
4. Box, P.G., Holmes, H.C., Finney, D.M. et al. 1988. Infectious bronchitis in laying hens : The relationship between hemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. Avian Path. 17 : 349-361.
5. Case, J.T., Ardams, A.A. Bolton, D.C. et al. 1983. Optimization of parameters for detecting antibodies against infectious bronchitis virus using and enzyme linked immunosorbent assay : Temporal response to vaccination and challenge with live virus. Avian Dis. 27 : 196-210.
6. Coneron, R.J., Marshall, A.T. 1985. Pathogenesis of infectious bronchitis nephritis; 2. Studies of water and electrolyte balance in colostomised chickens. Avian Path. 14 : 509-520.
7. Cook, J.K.A., Brown, A.J., Bracewell, C.D. 1987. Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. Avian Path. 16 : 505-511.
8. Cook, J.K.A. 1983. Isolation of a new serotype of infectious bronchitis-like virus from chickens in England. Vet Rec. 112 : 104-105.
9. Cook, J.K.A. 1984. The classification of

- new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Path.* 13: 733-741.
10. Csermelyi, M., Thijssen, R., Orthdl, F. et al. 1988. Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralization of immunofluorescent foci. *Avian Path.* 17: 139-148.
 11. Darbyshir, J.H. 1982. Studies on avian infectious bronchitis virus by ELISA. In the ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis. Martinus Nijhoff Publishers. 252-255.
 12. Doi, M., Yamakami, Y. et al. 1982. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. *Avian Dis.* 26: 946-956.
 13. EL-Houadfi, M.D., Jones, R.C., Cook, J.K.A. et al. 1986. The isolation and characterization of six infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Dis.* 15: 93-105.
 14. Gelb, J. Jr, Killian, S.L. 1987. Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.* 31: 513-522.
 15. Hofstad, M.S. 1984. Avian infectious bronchitis: In *Disease of Poultry*, 8th ed. Iowa State Univ Press, Ames. Iowa. 429-443.
 16. Hopkins, S.R. 1974. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. *Avian Dis.* 18: 231-239.
 17. Hopkins, S.R., Yoder, J.H.W. 1984. Increased incidence of airsacculitis in broilers infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Dis.* 28: 386-396.
 18. King, D.J., Hopkins, S.R. 1984. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolated with the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.* 28: 727-733.
 19. King, D.J. 1988. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. *Avian Dis.* 32: 362-364.
 20. King, D.J., Hopkins, S.R. 1983. Evaluation of the hemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Dis.* 27: 100-112.
 21. Lashgari, M.S., Newman, J.A. 1984. Determination of the antigenic relationships within the Massachusetts(M41) type of infectious bronchitis virus using the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.* 28: 444-452.
 22. Lashgari, M.S., Newman, J.A. 1984. Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.* 28: 435-443.
 23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewisfarr, A. et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 24. Marquardt, W.W., Snyder, O.B., Schlotthober, B.A. 1981. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 25: 713-722.
 25. Mockett, A.P.A., Cook, J.K.A., Huggins, M.B. 1987. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its

- detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian Path.* 16 : 407-416.
26. Mockett, A.P.A., Darbyshire, J.H. 1981. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Path.* 10 : 1-10.
 27. Mockett, A.P.A., Cook, J.K.A. 1986. The detection of specific IgM to infectious bronchitis virus in chicken serum using an ELISA. *Avian Path.* 15 : 437-446.
 28. Monreal, G., Bauer, H.J., Wiegmann, J. 1985. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), hemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Path.* 14 : 421-434.
 29. Perrotta, C., Furtek, C. et al. 1988. A standardized enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: Comparison with hemagglutination inhibition test and virus neutralization assays for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Dis* 32 : 451-460.
 30. Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M. et al. 1986. Isolation, characterization and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus(strain PL-84084). *Avian Path.* 15 : 367-383.
 31. Schalk, A.F., Hwan, M.C. 1931. An apparent by new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78 : 413-422.
 32. Toro, H., Schemera, B., Kaleta, E.F. 1987. Serological differentiation of avian infectious bronchitis field isolates using an enzyme immunoassay: presence of Dutch strains in West Germany. *Avian Dis.* 31 : 187-192.
 33. Winterfield, R.W., Hitchner, S.B. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23 : 1273-1279.
 34. Yachida, S., Sawaguchi, K., Aoyama, S. et al. 1983. Application of hemagglutination-inhibition test for infectious bronchitis. *계병연보.* 19 : 185-192.
 35. Zellen, G.K., Thorsen, J. 1987. Determination of the antigenic relationships among six serotypes of infectious bronchitis virus using the enzyme-linked immunosorbent assay and serum neutralization test. *Avian Dis.* 31 : 455-458.
 36. Zellen, G.K., Thorsen, J. 1986. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis. *Avian Dis.* 30 : 695-698.
 37. 김순재·황길윤·이창희. 1964. 닭의 전염성 기관지염에 대한 실태조사. *가축위생시험소 사업보고서.* 174-176.
 38. 김순재·이영옥·김선중 등. 1980. 특정전염성 병원체에 대한 국내 종계의 항체보유 상황. *대한수의학회지.* 20 : 59-64.
 39. 유태석. 1968. 닭의 전염성 기관지염 바이러스에 대한 연구, 전염성 기관지염 바이러스에 대한 항체 분포 조사. *대한수의학회지.* 8 : 24-29.
 40. 이영옥·김재홍·김재학 등. 1986. 전염성 기관지염의 국내 발생. *대한수의학회지.* 26 : 277-282.
 41. 채영석·구자옥·서학수 등. 1987. 기초생물통계학. *향문사.* 59-202.
 42. 한태욱·김선중. 1986. 닭 전염성 기관지염에 관한 연구. I. 야외계군으로부터의 바이러스 분리 와 동정. *서울대학교 수의대 논문집.* 13 : 161-169.
 43. 장정호·김선중. 1989. 닭 전염성 기관지염에 관한 연구. II. 간접 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)에 의한 항체가 측정, *대한수의학회지,* 29 : 503-515.