

Dot-immunoassay를 이용한 Aujeszky's disease virus 항원 및 항체 검출

전무형 · 조용성 · 장경수
충남대학교 수의과대학 미생물학교실
(1994년 7월 27일 접수)

Detection of antibodies and antigens of Aujeszky's disease virus using dot-immunoassay

Moo-hyung Jun, Young-sung Cho, Kyung-soo Chang

Lab of Veterinary Microbiology, College of Veterinary Medicine,
Chungnam National University
(Received July 27, 1994)

Abstract : To establish more specific and simple diagnostic methods for detection of the antibodies and antigens of Aujeszky's disease virus(ADV), we designed indirect dot-immunoassay(IDI) and double sandwich dot-immunoassay(DSDI) using the solid phases of nitrocellulose paper and polystyrene plate. The diagnostic efficacy of these methods was investigated.

As the sensitivity of IDI was tested by various virus concentration, the specimens with the virus titer above $10^{4.0}$ TCID₅₀/0.2ml showed positive reaction, but that below $10^{1.0}$ TCID₅₀/ml revealed negative. Tonsil emulsion at the virus titer of $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.2ml showed the highest sensitivity as diluted by 1/100. In detection of ADV antigens from the various tissues of the rats and pigs infected with ADV, IDI using monoclonal antibody showed the higher specificity as compared with IDI using polyclonal antibody and virus isolation method.

The efficacy of the DSDI for detection of ADV antibody was compared with other tests. The sensitivity of DSDI was higher than virus neutralization(VN) and agar gel immunodiffusion test(AGID). Meanwhile, specificity of DSDI was lower than AGID, but similar to IDEA. In comparison with VN test, DSDI showed 96.9% agreement to VN test that is the highest of three tests. In general, application of polyclonal antibody in both tests caused the higher sensitivity but the lower specificity.

Key words : dot-immunoassay, Aujeszky's disease virus, diagnosis.

서 론

오제스키병(Aujeszky's disease; AD) 일명 가성광견병(pseudorabies)은 Herpesviridae에 속하는 Aujeszky's

disease virus(ADV)에 기인하여 발병되는 전염병으로써 돼지, 소, 양, 개, 고양이, 닭 등의 가축을 위시하여 각종 실험동물 및 야생동물에서도 발병되는 숙주영역이 넓고 폐사율이 높은 질병이다^{1,2}. 본 병은 돼지를 제외하고

모든 가족에서 소양종, 경련, 마비, 광폭 등의 신경증상을 나타내고 4-5일내에 폐사하는 치명적 경과를 취한다. 돼지에서는 자돈의 폐사 및 임신모돈의 유사산을 일으켜 피해를 주며 성돈에서는 불현성감염되어 자연계에서 보독동물(carrier)역할을 하게 된다¹².

본 병은 유럽과 미주지역을 위시하여 인도, 동남아 제국, 대만, 뉴질랜드, 일본 등지에서 발생되어 축산업에 막대한 피해를 주고 있으며 본 병 박멸을 위한 연구가 각국에서 활발히 진행되고 있다¹². 우리나라에서는 1987년 6월 경남 양산지역 양돈장에서 처음 발생된 이래 충남 및 경기지역에서 지속적으로 발병하여 양돈농가에 피해를 주고 있다³⁴. 그러나 역학적으로 본 병은 일정 지역에 국한하여 발병하고 있기 때문에 예방접종은 허용되지 않고, 보독돈을 색출 제거하는 test and culling법으로 방역하고 있으며 효능 높은 킬단법의 개발과 응용이 요망되고 있다.

본 병의 킬단법으로는 혈청중화시험⁵⁶, 간접적혈구응집시험³, enzyme linked immunosorbent assay^{7,8}, radioimmunoassay¹², 보체결합시험¹², agar-gel immunodiffusion test^{9,14,15}, counter electrophoresis¹², immunodiffusion enzyme assay^{13,16,17,18}, latex agglutination test⁷, 혈광합체시험 및 nucleic acid hybridization test¹² 등이 보고된 바 있다. 우리나라에서는 합체집중법으로 중화항체시험법과 immunodiffusion enzyme assay(IDEA) 등을 이용한 효소면역시험법을 주로 사용하고 있으며, 항원중법으로는 세포배양법이나 혈광합체법을 이용하고 있다^{34,19,20}. 그러나 이와같은 방법들은 대개 시술시 많은 기구, 시설 및 숙련된 인력 등이 있어야 하며, 시간이 많이 소요되며 술식이 복잡하다는 단점이 있다. IDEA법은 국내에서 널리 보급되어 사용되고 있으며 ADV항체를 스크리닝하는데 효과적인 것으로 알려져 있지만 항원검출이 불가능하고, 항체의 정량적 측정이 곤란하다는 문제점이 있다. 그러므로 보다 신속정확하고 술식이 간편한 항체 및 항원검출법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

Nitrocellulose paper나 polystyrene plate와 같은 solid phase를 이용한 dot-immunoassay(DI)는 cytomegalovirus²¹, hog cholera virus²², African swine fever virus²³ 및 *Brucella abortus*²⁴ 등 세균이나 바이러스성 감염증에서 항체와 항원을 검출하기 위해 연구된 바 있고 비교적 간편하고 특이성이 높은 것으로 보고된 바 있으나, AD에서는 응용된 바 없다.

본 연구에서는 nitrocellulose paper 및 polystyrene plate를 이용하여 indirect 또는 double sandwich model로 DI를 확립하고, 국내 이환돈으로부터 분리한

ADV를 인공감염시킨 흰쥐와 돼지 크리코 야외에서 획득한 가검재료를 대상으로 ADV 혈중항체와 항원의 검출효능을 구명하고자 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스 : 돼지신장에서 유래된 PK-15세포주를 공시하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium에 우태아혈청(Gibco, USA)을 5-10%로 첨가하고 penicillin(100IU/ml) 및 streptomycin sulfate(100µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. ADV는 전 등³⁵이 분리한 NYJ-87-1주를 PK-15세포주에 계대증식시켜 역가를 조정하여 사용하였다. 바이러스분리 및 역가측정은 Hsiung²⁵의 방법에 따라 수행하였다.

실험동물 : 임상적으로 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 15수와 virus neutralization test(VN)에서 합체음성으로 확인된 3-4주령의 자돈 11두를 공시하였다. 흰쥐 10수에는 $10^{3.0}$ TCID₅₀/0.2ml의 ADV 0.5ml를 비강으로 접종하였고, 8두의 자돈에는 $10^{6.0}$ TCID₅₀/0.2ml의 ADV 3.0ml를 비강으로 접종하였으며, 남은 동물은 대조군으로 PK-15세포 배양액을 접종군과 같은 방법으로 각각 투여하였다.

ADV항원 정제 : DI에 공시한 ADV항원은 안 등¹⁹의 방법을 응용하였다. 약술하면 PK-15세포주에 ADV($10^{6.0}$ TCID₅₀/0.2ml)를 접종한 후 37°C에서 배양한 다음 세포변성이 70-80% 일어난 때 감염세포를 수확하여 65°C에서 2시간 동안 바이러스를 불활성화하고, Tris EDTA완충용액으로 제조한 0.5% Triton X-100 용액을 첨가하여 4°C에서 90분동안 바이러스 표면항원을 추출하였다. 추출된 항원을 40,000G에서 1시간 동안 초원심분리하여 상층액을 수확하여 -60°C에 보관사용하였다.

ADV polyclonal antibody 및 monoclonal antibody : 돼지 유래 ADV hyperimmunized polyclonal antibody (Pab)는 박 등⁴의 연구에서 VN 역가가 256으로 밝혀진 혈청을 공시하였고, ADV monoclonal antibody(Mab)는 가족위생연구소에서 분할반은²⁶ AD-86-29를 공시하였다.

기타 혈청학적 시험 : 실험동물의 혈청 중 ADV항체 검출을 위해 VN test, immunodiffusion enzyme assay(IDEA, PAD-kit; 종양가축전염병연구소) 및 agar gel immunodiffusion(AGID) test는 Hill et al⁵, Pfeiffer와 Schipper¹⁵ 및 조 등⁹의 방법을 응용하여 수행하였다.

Indirect dot-immunoassay(IDI) : Lai와 Ho²⁷ 및 Pan

et al²³의 방법을 응용하여 다음과 같이 수행하였다. ADV 정제항원, ADV에 감염된 PK-15세포 또는 ADV에 감염된 흰쥐와 자돈에서 채취한 비즙, 분변, 폐, 편도, 간장, 뇌 및 신장조직을 교질화한 다음 0.1M bicarbonate-carbonate buffer(pH 9.0)로 적정 비율로 희석한 것을 1×10cm크기의 nitrocellulose paper(NCP, Bio-rad)에 20μl씩 적하하고 20-25℃에서 2-3시간 동안 흡착시켰다. 그리고 3% gelatin용액에 30분간 blocking한 다음 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 세척하였다. ADV Mab(VN titer ; 160-320)나 Pab(VN titer ; 256)를 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate(Cappel Co, USA) 또는 rabbit anti-porcine peroxidase conjugate(Cappel Co, USA)를 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 Tris buffer로 세척하였다. 그리고 0.01% H₂O₂ saline용액에 3, 3-diaminobenzidin(1mg/ml)을 가한 substrate를 NCP위에 적량 가하여 실온에서 약 30분간 반응시켜 흑갈색의 반점이 발색될 때에 NCP를 증류수에 넣어 반응을 중지시키고 건조하여 보관하였다. 결과 판독은 흑갈색 반점의 농도에 따라 -, ±, 1+, 2+ 및 3+로 표시하고, 1+이상을 양성으로 판정하였다(Fig 2). 매 시험마다 음성대조틀

lystyrene plate(96 wells, Costar Co, USA)에 적하하고 4℃에서 18시간 흡착시킨 다음 1% bovine serum albumin을 한방울씩 적하하여 blocking하고 PBS로 3회 세척하였다. 그 다음 정제된 ADV항원(100μg/ml)을 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 여기에 단계 희석된 돼지 가검혈청을 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 다음, goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate 또는 rabbit anti-porcine peroxidase conjugate를 가하고 37℃에서 30분간 반응시키고 Tris buffer로 세척한 다음 위의 항과 같은 방법으로 substrate를 작용시켜 발색시키고 같은 요령으로 결과를 판독하였으며, 혈청 희석배수 2이상에서 특이반응이 관찰되는 것을 양성혈청으로 하였다(Fig 2).

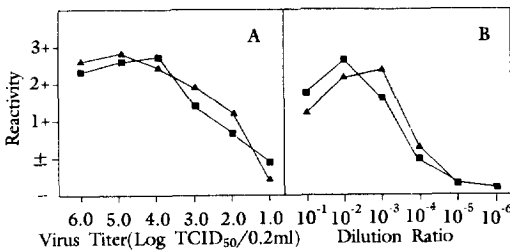


Fig 1. Effects of concentration on indirect dot-immunoassay. A : PK-15 cells infected with ADV. B : the emulsion of tonsil with ADV titer of 10^{4.5}TCID₅₀/0.2ml. The specimens were applied on nitrocellulose paper at room temperature for 3 hrs. Hyper-immunized polyclonal antibody(▲) and monoclonal antibody(■) against ADV were reacted.

두었으며 대조시험의 반응이 1+ 미만일 때 유효한 것으로 하였다.

Double sandwich dot-immunoassay(DSDI) : Lai와 Ho²² 및 Pan et al²³의 방법을 응용하였다. 약술하면, ADV Mab(VN titer ; 640)를 0.1M bicarbonate-carbonate buffer(pH 9.0)으로 처리한 flat-bottomed po-

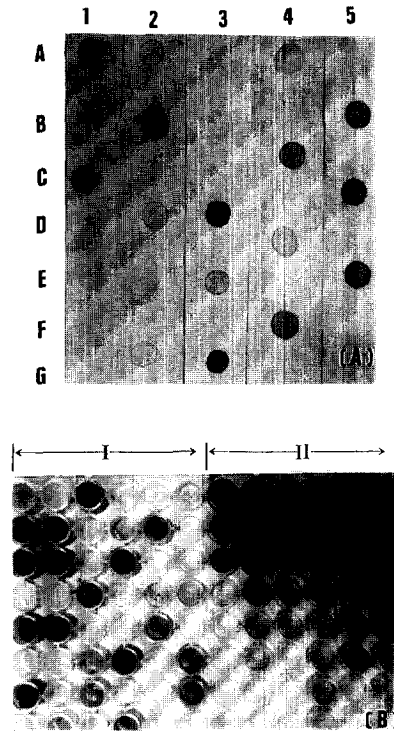


Fig 2. Detection of ADV antigens and antibodies by indirect dot-immunoassay [A] and double sandwich dot-immunoassay [B], respectively. [A]: All tissues were homogenated and diluted by 1/100. Lanes 1; tonsil, 2; nasal swabs, 3; lung, 4; kidney, 5; brain. The examples of the final reading; 3xA; -, 1xB; ±, 4xA; 1+, 2xA; 2+, 1xA; 3+ [B]: I; the results of test samples, II; the patterns of antibody titration.

결 과

ADV의 역가에 따른 반응 : $10^{7.0}$ TCID₅₀/0.2ml 역가의 ADV를 십진단계 희석하여 NCP에 흡착시켜 ADV 역가에 따른 IDI의 감수성을 시험한 바, $10^{3.0}$ TCID₅₀/0.2ml 이상에서 모두 1+ 이상의 양성반응이 관찰되었고, $10^{2.0}$ TCID₅₀/0.2ml 이하에서는 감수성이 떨어져 $10^{1.0}$ TCID₅₀/0.2ml에서는 음성이었다(Fig 1A). 또한, ADV감염후 4주되는 돼지로부터 획득한 $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.2ml의 역가를 가진 편도선을 교질화하고 십진단계 희석한 것을 NCP에 흡착시키고 IDI를 수행한 바, 10-1000배 희석한 시료에서 양성반응, 그리고 10000배 이하에서는 음성반응이 관찰되었으며, 반응감도는 100배에서 가장 높았다(Fig 1B).

ADV감염 흰쥐에서 ADV검출 : ADV에 실험감염된 흰쥐를 접종후 10일째에 살처분한 후 편도선, 폐, 간, 신장 및 뇌 조직을 채취하여 ADV Pab와 Mab를 이용하여 IDI를 실시하고 동시에 바이러스 분리를 시도한 바(Table 1), 항원검출율은 감염군에서 Pab를 이용한 경우 38.6%, Mab에서는 31.8% 그리고 바이러스분리에서는 29.5%순으로 Pab에서 높았다. 이러한 경향은 편도선과 폐에서 주로 나타났다. 그러나 Pab는 대조군에서 8.0%의 비특이적 양성반응을 나타내었다.

ADV감염 돼지에서 ADV검출 : ADV에 감염된 자돈을 감염 7일째 비즙을 채취하고, 4주째에 살처분하여

편도, 폐, 간장, 신장 및 뇌조직을 채취하여 IDI와 바이러스분리를 시험한 바(Table 2), 바이러스 접종군에서 항원검출율은 Pab를 이용한 경우 34.8%, Mab에서 25.0% 그리고 바이러스분리에서 14.1%순으로 Pab에서 높았고, 이런 경향은 전 가검물에서 관찰되었다. Pab의 경우 대조군에서 15.6%의 비특이적 양성반응이 관찰되었다. 또한 위의 결과(124건)에 대해 바이러스분리법을 기준으로 하여 상관성을 분석한 바(Table 3), Mab를 이용한 IDI가 Pab를 이용한 경우 보다 음성일치율(100:94.3)과 양성일치율(56.6:35.1)이 각각 높았다.

돼지에서 ADV항체 검출 : ADV실험 감염자돈으로부터 2일 간격으로 채취한 혈청에 대해 VN, DSDI, AGID 및 IDEA법으로 항체검출을 시험한 바, DSDI(Fig 2)와 IDEA에서는 감염후 4일 부터 양전반응이 관찰되었고 10일에는 전 두수가 양성으로 판정되어 높은 감수성을 보였고, VN과 AGID는 6일 및 8일부터 각각 양전반응이 관찰되어 상대적으로 낮았다(Table 4). 또한 실험감염돈의 혈청과 야외가검혈청으로 구성된 98개의 가검물에 대한 검사결과를 VN을 기준으로 하여 비교한 바, DSDI법은 감수성이 AGID보다 높았고(96.1:86.5) IDEA와는 유사하였으며(96.1:98.1), 음성혈청에 대한 특이성은 AGID보다 낮고 IDEA 보다 높았다. 그리고 VN에 대한 일치율은 96.9%로써 3가지 방법중 가장 높았다(Table 5).

Table 1. Detection of Aujeszky's disease virus in the various tissues from the rats infected with Aujeszky's disease virus by indirect dot-immunoassay

Group	No of rats	No of Tests	Tonsil		Lung		Liver		Kidney		Brain		Total (%)
			10^{-2}	10^{-3} ++	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	
Infected*	13	IDI-p	9/10	6/10	4/8	4/8	2/8	1/8	1/8	0/8	5/10	3/10	34/88(38.6)
		IDI-m	9/10	6/10	4/8	3/8	1/8	0/8	0/8	0/8	3/10	2/10	28/88(31.8)
		VI	8/10	7/10	2/8	3/8	0/8	0/8	0/8	0/8	3/10	3/10	26/88(29.5)
Control	5	IDI-p	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	4/50(8.0)
		IDI-m	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/50(0.0)
		VI	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/50(0.0)

* ADV at $10^{3.0}$ TCID₅₀/0.2ml was inoculated intranasally. The tissues were taken at the 10th day post infection.

+ No of positive/No of rat tested, ++ Dilution ratio of tissue emulsion.

IDI-p and IDI-m ; indirect dot-immunoassay using polyclonal and monoclonal antibody, respectively. VI ; virus isolation using PK-15 cell.

Table 2. Detection of Aujeszky's disease virus antigens in the various tissues from the piglets infected with Aujeszky's disease virus by indirect dot-immunoassay

Group	No of swine	Tests	Nasal swabs		Tonsil		Lung		Liver		Kidney		Brain		Total (%)
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻³⁺⁺	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	
Infected*	8	IDI-p	5/8	4/8	6/8	5/8	2/7	0/7	1/8	1/8	1/8	0/8	4/7	3/7	32/92(34.8)
		IDI-m	4/8*	4/8	5/8	4/8	1/7	0/7	0/8	0/8	0/8	0/8	3/7	2/7	23/92(25.0)
		VI	3/8	4/8	3/8	2/8	0/7	0/7	0/8	0/8	0/8	0/8	1/7	0/7	13/92(14.1)
Control	3	IDI-p	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	5/32(15.6)
		IDI-m	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/32(0.0)
		VI	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/32(0.0)

* ADV at 10^{6.0}TCID₅₀/0.2ml was inoculated intranasally. The tissues were taken at the 4th week post infection. Nasal swabs were taken at the 7th days pi.

IDI-p and IDI-m ; indirect dot-immunoassay using polyclonal and monoclonal antibody, respectively. VI ; virus isolation using PK-15 cell.

+ No of positive/No of rat tested, ++ Dilution ratio of tissue emulsion.

Table 3. Relationships among the results from dot-immunoassay and virus isolation method in detection of ADV in the porcine tissues of ADV-infected piglets

		Virus Isolation		Total
		Positive	Negative	
IDI-p	Positive	13(35.1)	24	37
	Negative	5	82(94.3)	37
IDI-m	Positive	13(56.5)	10	23
	Negative	0	101(100.0)	101

IDI-p and IDI-m ; indirect dot-immunoassay using polyclonal and monoclonal antibody, respectively.

Table 4. Comparison of the results from double sandwich dot-immunoassay, virus neutralization, agar gel immunodiffusion and immunodiffusion enzyme assay for detection of ADV antibody from the experimentally infected piglets

Days after* infection	VN	DSDI	AGID	IDEA
0	0/8(0)	0/8(0)	0/8(0)	0/8(0)
2	0/8(0)	0/8(0)	0/8(0)	0/8(0)
4	0/8(0)	2/8(2-4)	0/8(0)	1/8(2)
6	1/8(4)**	4/8(4-16)	0/8(0)	1/8(2-4)
8	5/8(4-16)	8/8(4-64)	2/8(2-4)	4/8(2-4)
10	5/8(8-32)	8/8(16-64)	5/8(2-4)	8/8(4-16)
12	8/8(8-64)	8/8(16-64)	5/8(2-8)	8/8(4-32)
14	8/8(8-64)	8/8(16-32)	8/8(25-16)	8/8(8-64)
16	8/8(8-64)	8/8(16-64)	8/8(2-32)	8/8(4-64)
28	8/8(4-32)	8/8(4-64)	8/8(2-32)	8/8(2-32)

* ADV at 10^{6.0}TCID₅₀/0.2ml was inoculated intranasally, ** No of positive/No of tested(range of titers)

Table 5. Relationship among the results from double sandwich dot-immunoassay, virus neutralization, agar gel immunodiffusion and immuno-diffusion enzyme assay in detection of ADV antibody for testing 98 porcine sera

Tests	Results by VN		Sensitivity	Specificity	%Agreement against VN test*
	Positive(n=52)	Negative(n=46)			
DSDI					
Positive	50	1	96.1	97.8	96.9
Negative	2	45			(p<0.001)
AGID					
Positive	45	0	86.5	100	92.9
Negative	7	46			(p<0.001)
IDEA					
Positive	51	4	98.1	91.3	94.9
Negative	1	42			(p<0.001)

+ Percent agreement is determined by number of positive and negative sera on which both tests agreed/the total number of sera examined. The significances were determined by chi-square test. Sensitivity and specificity were calculated by relation to VN.

고 찰

Aujesky's disease virus(ADV)는 Herpesviridae의 alpha-herpesvirinae에 속하며, double-stranded DNA를 가지며 100-150nm로 피포체를 형성하고 광범위한 숙주영역을 가지고 있다. ADV는 자돈에 감염되었을 때 비교적 심한 병변을 보이고 임신돈에서 번식장애를 나타내지만 성돈에서는 대개 불현성감염을 일으키며 보독돈이 되어 주요한 전염원의 역할을 하게된다^{1,2}. 본 병의 방역을 위해 여러나라에서 백신을 이용하고 있으나 방어효과가 불확실하고 보독동물을 양산하는 단점과 야외감염돈과 백신접종돈을 혈청학적으로 구분하는데 문제점이 대두되고 있기 때문에^{26,27} 본 병이 한정된 지역에서만 발생하는 우리나라는 test and culling법으로 방역하고 있다. 이러한 여건에서 신속하고 정확한 진단법의 개발이 절실히 요구된다.

우리나라는 ADV는 항체검출법으로 VN법과 IDEA를 주로 사용하며, 항원검출법으로는 조직배양세포를 이용한 바이러스분리법과 Mab를 이용한 형광항체법을 응용하고 있다^{3,4,19,20}. 본 시험에서는 solid phase로 nitrocellulose paper와 polystyrene plate를 이용하여 dot-immunoassay를 표준화한 다음 그 효능을 시험하였다. 이 방법은 Lai et al²², 황 등²¹, Pan et al²³ 및 Wu²⁴에 의해 hog cholera, human cytomegalovirus infection 및 African swine fever 및 *Brucella abortus* 진단에 응용된

바 있었으나 AD에서 시도된 바는 없었다.

본 실험에 들어 가기전 예비시험으로 solid phase에 ADV항원과 항체의 흡착조건 그리고 항원-항체 반응조건에 대한 실험을 수행하여, ADV항원 농도는 40-60µg/ml 그리고 작용시간은 실온에서 1.5-3.5시간이 적합하며, 4℃에서 18시간 처리와 실온에서 3시간 처리시 차이가 없음이 밝혀졌고, 또한 NCP는 제원간에 차이가 없으나 polystyrene plate에서는 제원간에 차이가 있음이 관찰되었다. 또한 ADV가 감염되어 있는 세포 즉 PK-15세포나 tissue emulsion에 따라 IDI의 항원 검출효과가 다르게 나타난 것은(Fig 1A, B) 본 진단법의 야외 응용시 유의해야 할 자료라 사료된다.

항원검출시험 결과(Table 1, 2)에서 흰쥐에서는 IDI와 바이러스분리법간에 검출율에 현저한 차이가 없었으나, 돼지에서는 바이러스분리법이 현저히 낮은 검출율이 나타난 것은 가검물 채취시기와 즉 항체형성 상태와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 이와같은 사실은 접종 후 7일째에 채취한 돼지비듬의 바이러스분리율은 다른 장기에 비해 높았다는 사실에서 입증되고 볼 수 있다. 또한 중화항체가 4-6에 도달한 ADV 감염돼지에서 바이러스분리는 음성이지만 IDI에서 높은 양성율이 관찰된 사실은 본 방법이 기존의 세포배양에 의한 바이러스분리법에 비해 조직내에 존재하는 ADV항원을 검출함으로써 바이러스분리법으로써 검출되지 않는 보독동물을 검색할 수 있는 장점이 있을

것으로 사료된다.

IDI를 이용한 항원 검출시험에서(Table 1, 2) polyclonal antibody는 monoclonal antibody를 이용시 보다 감수성이 높았으나 전자는 음성대조군에서도 비특이적 양성반응이 나타나 IDI에서 특이성을 높이기 위해서는 반드시 Mab를 사용해야 함을 알 수 있었으며, ADV항체검출을 위한 DSDI에서는 Mab만 사용하였다. 고안된 DSDI법으로 ADV인공감염된 자돈의 혈청으로 부터 ADV항체를 일차별로 검사한 결과(Table 4), VN이나 AGID보다 감수성이 높고 양전반응을 조기에 검출할 수 있음이 밝혀졌고, 기존의 VN과 비교시 감수성과 특이성도 높다는 사실이 입증되었다(Table 5). 그러나 본 실험과정을 통해서 볼 때 DSDI는 시험에 관련된 요인들이 많고 표준화시키는데 술식이 복잡하여 야외에서 사용하기는 부적절한 것으로 사료되었다. 그러나 nitrocellulose paper와 ADV Mab를 이용한 IDI는 술식이 비교적 간편하고 감수성과 특이성이 높아 매우 유용하게 응용될 수 있으리라 사료된다.

결 론

Aujeszky's disease virus(ADV)의 항원과 항체를 신속 간편하고 정확하게 검색할 수 있는 진단법을 확립하기 위해 indirect dot-immunoassay(IDI) 또는 double sandwich dot-immunoassay(DSDI)를 고안하고 이를 이용한 일련의 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ADV 농도에 대한 IDI 감수성을 시험한 바, 10^{30} TCID₅₀/0.2ml 이상의 역가에서는 모두 양전반응을 보였고, 10^{10} TCID₅₀/0.2ml에서는 음성반응을 나타내었다. 10^{45} TCID₅₀/0.2ml 역가를 가진 감염돈의 편도선 유제에서는 100배 희석시 반응이 가장 강하게 나타났다.
2. ADV 실험감염된 흰쥐와 자돈에 대해 항원검출을 시도한 바, 바이러스 분리법에 비해 nitrocellulose paper에 monoclonal antibody를 처리한 IDI법이 특이성이 높았으며, polyclonal antibody를 이용할 경우 감수성은 높으나 비특이반응이 관찰되었다.
3. DSDI의 ADV항체검출 효능을 ADV 실험감염된 돼지에서 수행한 바, 감수성은 VN 및 AGID법 보다 높았다. 또한 98건의 혈청에 대해 VN, AGID 및 IDEA로 동시에 시험한 결과를 VN을 기준으로 하여 비교한 바, DSDI가 AGID 보다 감수성이 높았으며, 특이성은 AGID 보다 낮으나 IDEA보다 높았다. VN에 대한 일치율은 96.9%로 3가지 방법중 가장 높았다.

참 고 문 헌

1. Wittmann G. Aujeszky's disease. *Rev Sci tech OIE* 1986; 5(4): 959-977.
2. Kluge JP, Bera GW, Hill HT, et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease) In Leman AD, Straw BE, Mengeling WL. ed: Diseases of Swine, 7th ed, Ames Iowa, Iowa State Univ Press 1992; 312-330.
3. 전무형, 조성환, 안수환 등. 이환자돈으로부터 오제스키병 바이러스 분리와 생물학적 성장. 대한수의학회지 1988; 24(3): 163-171.
4. 박정우, 전무형, 안수환 등. 국내분리 Aujeszky's disease virus의 실험적 감염 자돈에 대한 바이러스학적 연구. 대한수의학회지 1990; 30(2): 177-186.
5. Hill TH, Crandell RA, Kanitz CL, et al. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies. *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* 1977; 20: 17.
6. Moenning V, Woldensenbet P, Freg HR, et al. Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease in swine. *Vet Res* 1982; 130: 264.
7. Schoenbaum NA, Beran GW, Murphy DP. A study comparing the immunologic responses of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum virus neutralization and latex agglutination test. *J Vet Kiagn Invet* 1990; 2: 29-34.
8. Snyder ML, McMahan DL, Workman EF, et al. An improved enzyme-linked immunosorbent assay for the sero-detection of pseudorabies infection. *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* 1985; 28: 383-396.
9. 조효권, 전무형. Agar-gel immunodiffusion test를 이용한 돼지 혈청중 Aujeszky's disease virus항체 검출에 관한 연구. 대한수의학회지 1990; 30(3): 297-307.
10. Afshar A, Dulac GC. Immunoperoxidase plaque staining for the detection of pseudorabies virus. *Can J Vet Res* 1986; 50: 118-119.
11. Sato K, Tanak Y, Kurogi H, et al. Detection of antibody to pseudorabies virus in swine sera by indirect immunoperoxidase plaque staining. *J Clin Microbiol* 1988; 1: 79-81.
12. Gutekunst DE, Pirtle EC, Mengeling WL. Development and evaluation of a microimmunodiffusion

- test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am J Vet Res* 1978; 39(2): 207-210.
13. Thawley DC, Joo HS, Johnson ME, et al. Evaluation of the radial immunodiffusion enzyme assay for the detection of antibodies to pseudorabies virus. *J Am Vet Med Ass* 1985; 186: 1080-1083.
 14. Johnson ME, Thawley DG, Solorzano RF, et al. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. *Amer J Vet Res* 1983; 44: 28-30.
 15. Pfeiffer NE, Schipper IA. Evaluation of pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. *Amer J Vet Res* 1979; 40: 595-598.
 16. Allan GM, McNulty MS, Todd D, et al. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet Microbiol* 1985; 10: 481-468.
 17. Jestin A, Onno M. Detection of Aujeszky's disease virus in nasal cell of fattening pigs by immunoassay. *Res Vet Sci* 1990; 48: 129-135.
 18. Roszkowski J, Barntoszoze M, Zadura J, et al. Use of immunoenzyme technique for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. *Vet Res* 1978; 1102: 462-463.
 19. 안수환, 권창희, 이증복 등. 단크론성항체를 이용한 돼지가성광견병 진단법 개발에 관한 연구. *대한바이러스학회지* 1987; 17(1): 45-50.
 20. 권창희, 안수환, 김용희 등. 돼지 가성광견병에 관한 연구 1. 가성광견병 바이러스에 대한 單크론성 항체 생산 연구. *農試論文集* 1986; 27(3): 289-296.
 21. 황응수, 박순미, 박정규 등. 면역효소염색법을 이용한 인형 거대세포바이러스(Human Cytomeglovirus)의 정량. *대한미생물학회지* 1992; 27(3): 289-296.
 22. Lai SS, Ho WC. Application of monoclonal antibody on dot immunoassay for detection of hog cholera viral antigens and antibodies. *J Chinese Soc Vet Sci* 1989; 15: 19-25.
 23. Pan IC, Huang TC, Hess WR. New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever. *J Clinical Micro* 1982; 16: 650-655.
 24. Wu YS. Dot-immunoassay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine serum. In Proceedings of the 5th AAAP Animal Science Congress. Vol 3. Taipei. Taiwan 1990; 187.
 25. Hsiung GD. Diagnostic virology. Yale Univ. Press. USA. 1982.
 26. Platz KB, Hill HT, Seymour CL, et al. Evaluation of a diagnostic antigen for the detection of Aujeszky's disease virus-infected subunit-vaccinated pigs. *Vet Microbiol* 1986; 11: 25-40.
 27. Van Oirschot JT. Induction of antibodies to glycoprotein in pigs exposed to different doses of a mildly virulent strain of Aujeszky's disease virus. *Vet Res* 1988; 112: 599-603.