

혈구응집억제반응과 효소면역측정법을 이용한 닭 뉴캐슬병 바이러스에 대한 혈중항체가 비교

한성태¹, 이청산, 곽학구, 송종한, 이종인

충청북도축산위생연구소

(접수 2003. 8. 13, 게재승인 2003. 9. 8)

The comparative study on Newcastle disease virus antibody titer by hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay

Sung-Tae Han¹, Cheong-San Lee, Hak-Koo Kwak,
Jong-Han Song, Jong-In Lee

*Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungwon, 363-931, Korea
(Received 13 August 2003, accepted in revised form 8 September 2003)*

Abstract

This study was conducted to investigate the similarity between hemagglutination inhibition (HI) test and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) titers and sample to positive ratio (S/P ratio) of Newcastle disease (ND) virus. To perform this study, the 372 sera of broiler chicks and 120 sera of layers and breed chicks were collected from slaughter house and farms, respectively.

As a result of HI test out of different chicks, the positive percentage of ND antibody titer of broiler, layer and breeder, when a standard positive HI titer were '2', was 84.4%, 100% and 100%, respectively. The positive percentage of ND antibody titer by ELISA was shown 38.4%, 100% and 100% and S/P ratio were also shown 81.5%, 98.2% and 99.2%, respectively. The results of comparative survey with same sera by two experimental methods were as follows;

In low HI titer, ELISA titer was not similar to HI titer, but S/P ratio was similar to it. In high HI titer, ELISA titer and S/P ratio were similar to HI titer. Therefore, HI titer was more similar to S/P ratio than ELISA titer.

Key words : HI titer, ELISA titer, Newcastle disease virus

¹Corresponding author

Phone : +82-43-220-5614, Fax : +82-43-220-5619

E-mail : hst017@hanmail.net

서 론

뉴캐슬병은 1927년 영국 뉴캐슬 지방에서 처음으로 확인된 것을 계기로 최초 발생한 지방명을 따서 뉴캐슬병이라 명명하게 되었다¹⁾.

이 질병은 닭, 꿩, 메추리 등에 발생하는 급성바이러스성 전염병으로 OIE list A 질병이며 원인체는 *Paramyxovirus*의 PMV-1에서 PMV-9 중 PMV-1에 속한다. ND virus는 감염계군의 임상증상에 따라 viscerotropic velogenic, neurotropic velogenic, mesogenic, lentogenic 또는 respiratory, asymptomatic enteric 등 5가지 병원성으로 분류된다. 강병원성의 경우 호흡기계, 소화기계, 신경계 등 범장기성으로 임상증상을 나타내며, 병의 경과가 매우 빠르게 진행되어 면역이 불완전한 계군에서는 100% 까지 치사율을 가져오기도 하는 광범위한 감염숙주 영역을 가지고 있는 1종 법정 전염병이다¹⁾.

현재 닭 뉴캐슬병에 대한 혈청검사는 혈구응집억제반응(hemagglutination inhibition, HI test)으로 검사하고 있으며, 이 방법은 뉴캐슬병이나 산란저하증, 전염성기관지염, 가금인플루엔자 등에 대한 항체검사에 가장 일반적으로 사용하는 방법으로서 정확도가 비교적 높고 검사도 간편하여 널리 이용되고 있다. 이 방법은 혈구를 응집할 수 있는 일부 질병 원인체에 대해서만 검사가 가능하며 혈구응집반응시 혈구응집소(hemagglutinin)에 대한 특이항체가 가검혈청 내에 존재하면 혈구응집이 억제되고, 이러한 혈구응집 억제 정도의 많고 적음을 측정하면 혈청내의 항체수준을 알 수 있다.

닭 혈청내의 뉴캐슬병 바이러스에 대한 항체 역가를 측정할 수 있는 다른 시험방법으로 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 있으며 이 방법을 이용하면 HI반응보다 짧은 시간에 많은 시료를 검사할 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서는 관내 도계장과 양계농가로부터 채혈한 혈액을 분리한 가검혈청을 사용하여 HI반응법과 ELISA 두 실험을 비교 실험하였고, 또한 동일한 혈청으로 각각 HI반응과

ELISA간의 유사성을 알아보고자 실험하였다.

재료 및 방법

가검혈청

시료의 채취기간은 2002년 4월부터 7월까지이며 관내 도계장에서 도축되는 35~40일령 육계 372수(31농가별 12수)와 산란계 16~90주령 120수(12농가별 10수), 종계 20~35주령 120수(6농가별 20수)의 혈액을 1500 rpm, 10분 동안 원심침전분리 후 혈청을 취하고 항온수조에서 56°C에서 30분간 비동화시켜 가검혈청으로 사용하였다.

실험재료

혈구응집반응과 응집억제반응에 사용한 진단액은 대성미생물회사의 제품을, 닭 뉴캐슬병 바이러스 항체를 측정하는 진단키트는 IDEXX사의 제품을 각각 사용하였고 검사방법 및 실험결과치의 분석 방법도 각각 그 제조회사에서 제시한 방법에 따라 실험하였다.

실험방법

혈구응집반응(HA test)^{2~4)}

닭 뉴캐슬병 항체가 없는 닭에서 채혈한 혈액에 동량의 Alserver's 액을 가하여 원심관에 옮긴 후 1,500 rpm에서 10분간 원심침전하여 상층액과 백혈구를 제거시킨 후 다시 PBS를 가하여 3회 세척한 후 침전된 적혈구 용적을 감안하여 닭 적혈구가 1%가 함유되도록 PBS에 부유시켰다.

96 well microplate에 항원(양성대조혈청 포함)을 2진법으로 계단희석하고 최종 희석배수의 항원과 PBS 혼합액을 버린 다음 1% 적혈구 부유액을 동량 넣은 후 잘 흔들어 혼합하였으며, 희석이 끝난 후 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독하였다.

혈구응집억제반응(HI test)

96 well microplate 전체에 PBS를 각각 25 μ l씩 넣고 가검혈청을 25 μ l씩 AI~HI well에 주

입하였으며, 가로방향으로 2진 희석한 다음 4HA unit 항원을 전 well에 넣고 잘 흔들어 준 후 실온에서 30분간 반응시켰다.

적혈구(1%)를 25 μ l씩 전 well에 주입 후 plate를 잘 흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제정도를 관찰하였다. 이때 양성 혈청도 동일한 방법으로 시행하였다.

결과 판독은 HI titer 2 이상을 양성으로 하고 HI titer는 log₂값으로 산출하였다.

효소면역측정법(ELISA)⁸⁾

뉴캐슬병 바이러스 항원이 코팅되어 있는 96 well plate에 가검혈청과 양성 및 음성대조 시액을 대조 well과의 발색정도(흡광도)를 비교하여 항체가를 측정하였다.

가검혈청을 혈청희석제로 500배(1:500) 희석하고 음성 및 양성대조 혈청과 희석한 가검혈청을 100 μ l씩 주입 후 실온에서 30분 정치하였다. Plate를 3~5회 세척하고 HRPO conjugate를 각 well에 100 μ l씩 주입하였고, 재차 실온에서 30분간 배양 후 위와 동일한 방법으로 세척하였다. 그 후 TMB 기질을 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 15분간 배양 후 정지액을 각 well에 100 μ l씩 넣어 ELISA reader로 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과 계산방법

가검혈청의 S/P Ratio 산출은 [가검혈청 A(650) - 음성대조의 평균흡광도(NC_x)] / [양성대조의 평균흡광도(PC_x) - NC_x]로 하였으며, 결과는 S/P가 0.2 이하일 때 음성, S/P가 0.2 이상일 때 양성(ELISA titer가 396 이상으로 ND virus에 대한 항체가 추정)으로 판독하였다.

ELISA에 대한 titer(log₁₀ titer)는 1.09 × (log₁₀ S/P ratio) + 3.36으로 계산하였으며, 그 결과 ELISA titer가 2,000 이상일 경우 방어항체수준(양성)으로 판독하였다.

비교실험용 혈청

비교실험을 위한 시료는 가검혈청 중 육계에 서는 역가가 가장 낮은 농가(A농가)와 가장 높은 농가(B농가) 각각 1호씩 선정하여 12수씩 24수를, 산란계(C)와 종계(D)는 특별한 기준 없이 무작위로 12수씩 선정하여 검사하였으며 모든 시료는 3회 반복 실험한 평균값을 비교하였고, HI titer와 ELISA titer는 소수점 첫째자리, 효소면역측정법의 S/P ratio는 소수점 넷째 자리에서 반올림하였다.

결 과

혈구응집억제 항체가

가검혈청을 혈구응집억제반응으로 검사한 결과는 Table 1과 같다. 육계는 372수중 314(84.4%)수가 양성, 58(15.6%)수가 음성으로, 산란계와 종계는 240수 모두 양성으로 나타났다. 평균 HI 역가는 육계가 3.66, 산란계 7.66, 종계 7.63으로 나타났다.

효소면역측정법에 의한 항체가

Table 2에서와 같이 효소면역측정법에 의한 항체유무 검사결과 S/P ratio에서는 육계는 372수 중 303(81.5%)수가 양성, 69(18.5%)수가 음성이고 산란계와 종계는 240수 모두 양성으로 나타났다.

Table 1. The results of HI test according to broiler, layer and breeder

Class	No of tested	No of positive(%)	No of negative(%)	Mean HI titer
Broiler	372	314 (84.4%)	58 (15.6%)	3.60
Layer	120	120 (100%)	0 (0%)	7.66
Breeder	120	120 (100%)	0 (0%)	7.63
Total	612	554	58	6.30

Kit 제조회사에서 제시한 야외바이러스에 대해 방어할 수 있는 역가인 ELISA titer 2,000 이상 되는 것은 산란계와 종계의 경우 100%의 방어 가능한 역가를 보였으나 육계에서는 372 수 중 38.4%(143수) 수준으로 나타났다. 이 값은 Table 1의 HI 역가인 양성 314(84.4%)수에 비해 171(46%)수로 낮은 수치를 보였다.

비교시험 결과

Table 3의 결과와 같이 HI titer 2 이상을 양

성 판정기준으로 했을 때 역가가 가장 낮은 육계 농가(A농가)는 12수 중 8수가 양성, 4수가 음성으로 나타났고 S/P ratio에서는 12수 중 7수에서만 ND 항체를 검출할 수 있었다. ELISA titer로는 3수 양성에 9수 음성으로 나타났다. HI test에서 양성 7번과 12번은 S/P ratio에서 음성으로 HI test에서 음성 1번은 S/P ratio에서 양성으로 나타났다.

B농가에서의 HI 역가는 4~9의 범위, C와 D 농가에서는 각각 6~10, 5~10의 범위까지로

Table 2. The results of ELISA according to broiler, layer and breeder

Class	No of tested	S/P ratio		ELISA titer	
		No of positive(%)	No of negative(%)	No of positive(%)	No of negative(%)
Broiler	372	303 (81.5)	69 (18.5)	143 (38.4)	229 (61.6)
Layer	120	120 (100.0)	0 (0.0)	120 (100.0)	0 (0.0)
Breeder	120	120 (100.0)	0 (0.0)	120 (100.0)	0 (0.0)
Total	612	543 (88.7)	69 (11.3)	383 (62.6)	229 (37.4)

Table 3. The comparative survey of HI test and ELISA

Farms	Class	No of samples												Mean
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	
A (Broiler)	HI titer	1	3	2	0	3	1	2	2	0	2	3	2	1.75
	S/P ratio	0.259	4.14	3.975	0.037	2.346	0.062	0.012	0.704	0.198	0.284	0.235	0.136	1.03
	ELISA titer	525	10766	10310	63	5803	111	18	1563	392	581	473	260	2572.08
B (Broiler)	HI titer	9	7	8	8	6	7	4	7	8	8	4	6	6.83
	S/P ratio	10.85	7.817	13.943	8.903	6.126	8.069	6.96	7.52	8.610	8.114	4.220	6.834	8.16
	ELISA titer	30811	21416	40240	24676	16418	22168	18868	20529	23954	22304	10962	18496	22570.17
C (Layer)	HI titer	10	8	9	8	11	8	8	6	8	8	8	6	8.17
	S/P ratio	11.481	6.037	8.074	8.037	15.173	7.802	7.469	5.988	6.691	5.728	6.691	5.136	7.86
	ELISA titer	32763	16259	22322	22210	44398	21503	20505	10347	20765	15354	9810	10766	20559
D (Breeder)	HI titer	9	10	8	6	7	10	5	8	9	8	9	9	8.17
	S/P ratio	9.654	12.074	7.506	6.148	5.296	11.012	6.494	8.210	8.901	6.642	9.593	9.889	8.45
	ELISA titer	27123	34611	20616	16585	14096	31306	17605	22732	18811	18043	26936	27843	23025.58

HI titer 및 ELISA titer에서 모두 양성으로 판정되었다. 한편 몇몇 시료를 제외하고는 대부분의 경우에서 HI titer, S/P ratio 및 ELISA titer의 값이 함께 올라갔다.

고 찰

뉴캐슬병의 근절과 예방을 위해 백신의 개발 및 접종방법 개선 등 많은 연구활동과 현장 적용이 꾸준히 이뤄지고 있지만 여전히 이 질병이 근절되지 않고 있으며 이 질병 때문에 양계농가의 경제적 피해와 수출부진에 따른 국가적 경쟁력이 떨어지고 있다.

뉴캐슬병 발생의 주요원인은 백신접종을 실시하지 않거나 실시했다라도 방어수준의 항체가 형성되지 않았기 때문이며 나아가 질병 유입 차단을 위한 농장의 차단방역의 실패에서 그 원인을 찾을 수 있다.³⁾

현재 국내에서 지속적으로 뉴캐슬병이 발생함에 따라 예방접종의 필요성은 대부분 인식하고 있지만 농가 여건에 맞는 백신 선택, 접종방법과 시기선택, 정기적 혈청검사 등이 미흡하기 때문에 적정 방어항체수준을 형성하지 못하게 된다⁵⁻⁷⁾.

특히 육계의 경우 단기간 내 출하와 입추로 인해 빈번한 백신접종에 의한 스트레스에 기인한 증체율 저하와 마이코플라즈마 감염 등의 우려로 B1, LaSota와 같은 생독백신 접종을 기피하는 경향이 있으며 농가의 정기적 혈청검사는 더욱 어려워지는 실정이다.

본 연구 조사에서도 육계의 항체형성 수준은 84.4%에 달했지만 질병 방어수준의 항체 역가 4를 기준으로 하였을 때는 48.4%로, 항체 역가 5를 기준으로 하였을 때는 35%로 감소함을 알 수 있었으며, ELISA titer의 양성률 38.4%와 비교하면 HI titer 5와 비슷한 수치를 보였다.

Table 1과 2에서와 같이 육계 372수 중 HI test에서 314(84.4%)수가 양성으로 S/P ratio에서 양성 303(81.5%)수와 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 3의 비교시험결과 전반적인 성적을 보면 HI titer가 상승할수록 S/P ratio와 ELISA titer도 함께 상승하였지만 HI 역가가 낮을 때 보다 높을 때 동반한 변화 정도가 더 일치하는

것을 볼 수 있었다.

각각의 실험방법으로 1 plate당 검사소요 시간은 HI test(8~12수)가 대략 3.5 시간, ELISA(90수)는 2.5 시간정도 소요되었으며 실험 후 폐기되는 소모품의 양도 전자가 더 많았다.

결 론

본 연구의 비교시험에서 혈구응집억제반응과 효소면역측정법의 실험결과 값에서 유사성을 조사했으며 결과는 다음과 같다.

낮은 응집억제역가(HI titer, 4 이하)에서 ELISA titer는 유사성이 없고 S/P ratio만 유사성이 있었다. 높은 응집억제역가에서는 ELISA titer와 S/P ratio 모두 유사성이 있음을 알 수 있었다. 혈중항체를 진단할 수 있는 양성 수치는 HI titer가 '2' 일 때 유사했고 ELISA titer의 방어항체수준은 HI titer가 '4' 내지 '5' 일 때 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

참고문헌

- Whiteman CE, Bickford AA. *Avian disease manual*. 3th ed : 56~62.
- Jordan FTW, Pattison M. 1996. *Poultry disease*. 4th ed : 139~155.
- 김순태, 박인화, 김성국 등. 2001. 뉴캐슬병 생독백신 접종 후 야외 분리 바이러스에 대한 면역성 조사. *한국가축위생학회지* 24(2) : 147~159.
- 이정원, 허철호, 이종환 등. 2001. 도축 육계에서 뉴캐슬병 바이러스에 대한 혈중항체가 조사. *한국가축위생학회지* 24(3) : 217~222.
- 최원필, 송희종, 김순재 등. 1997. *수의전염병학*. 경북대학교출판부 : 423~427.
- 김우호. 1992. *동물바이러스학*. 강원대학교출판부 : 40~41.
- 채효석. 1997. *바이러스실험법*. 전라북도가축위생시험소 : 135~171.
- 조정근. 2000. 전염성F낭병에 대한 혈청학적 연구. *대한수의학회지* 23 : 271~279.