

소 傳染性鼻氣管炎 바이러스에 대한 monoclonal
antibody 生産과 診斷法 개발
II. Monoclonal antibody를 이용한
소 傳染性鼻氣管炎의 診斷

全茂炯 · 金德煥 · 安壽煥* · 李重馥* · 閔元其
충남대학교 농과대학 수의학과
농촌진흥청 가축위생연구소*
(1988. 7. 29 접수)

**Application of monoclonal antibody to develop diagnostic techniques for
infectious bovine rhinotracheitis virus. II. Diagnosis of infectious bovine
rhinotracheitis by using monoclonal antibody**

Moo-hyung Jun, Duck-hwan Kim, Soo-hwan An,* Jung-bok Lee,* Won-gi Min
*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University,
Veterinary Research Institute, Rural Development Administration**

(Received July 29, 1988)

Abstract: To develop more specific and sensitive diagnostic methods for infectious bovine rhinotracheitis, 7-C-2 monoclonal antibody specific to polypeptides of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) was applied in indirect immunofluorescence antibody assay (IFA), indirect immunoperoxidase assay (IPA) and radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA).

It was found that IBRV infected in MDBK cells could be detected as early as 8 hours post infection by IFA, and that IFA was more rapid and specific to identify IBRV antigen than IPA. The diagnostic efficacy of RIDEA and SN test was studied with 88 bovine sera. It was evident that RIDEA could eliminate the false positive reaction encountered in serum neutralization (SN) test, being more rapid and sensitive than the latter. Highly significant correlation coefficient ($r=0.76$, $p<0.01$) was evaluated between the titers of sera and the diameters of RIDEA.

Tracheal membranes and sera collected from 96 slaughtered cattle with lesions in respiratory organs were examined to detect IBRV antigen and antibody by IFA, RIDEA and SN test. It was presented that positive rates were 32.3% in IFA, 20.8% in RIDEA and 21.9% in SN test, and that coincidence rate between RIDEA and SN test were 100% in positive sera and 98.7% in negative sera.

In conclusion, it was assumed that application of monoclonal antibody could improve the diagnostic efficacy of IBR by enhancing sensitivity and specificity of IPA, IFA and RIDEA.

Key words: monoclonal antibody, diagnosis, IBRV

* 본 연구는 韓國科學財團 研究支援(1986~1987)에 의하여 수행되었음.

서 론

소전염성비기관염 (infectious bovine rhinotracheitis; IBR)은 Herpesviridae에 속하는 Infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)의 감염에 의해 발병하는 소의 전염병으로써 상부기도염, 결막염, 외음부질염, 유산 및 너염 등을 일으키는 소의 중요한 호흡기계 질병 중 하나이다.¹⁻³

본 병은 호흡기계 또는 생식기 계통의 임상증세와 역학적 소견으로 추정적 진단은 가능하나 Parainfluenza virus 및 Adenovirus 감염증과 잘 구별되지 않으며 *Pasteurella spp.*, *Hemophilus spp.*, *Mycoplasma spp.* 등이 2차적으로 복합감염 되었을 때는 감별진단이 어렵다.^{1,2} IBR의 실험실 진단을 위해 현재 주로 사용하고 있는 방법은 혈청중화시험 및 형광항체법 그리고 호흡기 점막, 결막 또는 유산태아에서 바이러스를 분리동정하는 방법이 주로 이용된다. 그러나 혈청중화시험과 바이러스 분리법은 많은 시간과 장비 및 고도의 기술이 요구되며 형광항체법은 IBRV의 polypeptide 구조의 복잡성 때문에 기존의 polyclonal antibody로는 진단에 여러가지 문제가 대두되고 있다.^{4,5,6} 이에 저자들은 세포융합에 의한 hybridoma를 작제하여 IBRV에 대한 9주의 monoclonal antibody를 생산하였고 이 항체에 대한 생물학적 특성 검사를 수행하여 보고한 바 있다.⁴

본 고에서는 생산된 항체중 특이성과 효능이 가장 높은 7-C-2 monoclonal antibody을 주로 이용하여 간접형광항체법, immunoperoxidase assay, radial immunodiffusion enzyme assay 방법으로 IBRV의 항원 또는 항체 진단시험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스 및 세포배양 : IBRV로는 PQ 7주를 포함하여 8주의 국내분리주를 공시하였고, 세포는 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 또는 bovine kidney (BK) 세포주를 일란세포 배양법으로 배양유지 하였다. 세포배양액은 주로 Minimum essential medium (Gibco)에 8~10% 되게 우태아혈청을 가하고 penicillin (200iu/ml), streptomycin (20µg/ml) 및 kanamycin (40µg/ml)을 가하여 사용하였다.^{7,8}

Monoclonal antibody: 공시한 7-C-2 monoclonal antibody의 생물학적 특성은 Table 1에 요약된 바와 같다.⁴

혈청중화시험 : 표준 마이클로프레이트 방법을 사용

Table 1. Summary of characteristics of monoclonal antibody used for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus

Clone	Characteristics
7-C-2	—Isotype: IgG 2a
	—Epitope analysis: Specific to neutralizing epitope of 72K envelope polypeptide
	—Reacted with IBRV including Colorado, PQ-7 and 7 domestic isolates
	—Not crossreacted with Adenovirus 7, Parainfluenza III viruses and other herpesviruses

하였다.^{8,9} 즉 단계회석된 비동화혈청 100 µl와 동량의 10 또는 100 TCID₅₀/0.1 ml의 IBRV를 혼합하여 well에 넣고 37°C에서 1시간 감작시킨 후 well 당 2×10⁴ cells/0.1 ml의 MDBK 세포를 첨가하여 3일간 세포번성 억제효과를 관찰하였다. 중화역가는 IBRV에 의한 세포번성효과를 완전히 억제하는 항체의 최고 회석배수의 역수로 표시하였다.

간접형광항체법 : MDBK 세포를 cover slip에 배양하고 IBRV를 점종 감염시킨 후 경시적으로 cover slip상의 감염세포를 아세트론으로 고정하였다. 고정후 monoclonal antibody를 50 µl씩 적하하여 시료를 완전히 덮은 후 37°C 습윤상자에서 45분간 반응시키고 phosphate buffered saline (pH 7.2, PBS)로 3회 세척하였다. 다음 FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin을 1:40으로 회석하여 50 ml를 취하여 시료에 덮고 37°C 습윤상자에서 다시 반응시킨 후 PBS로 세척하고 glycerol로 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다.

Radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA): monoclonal antibody를 0.06 M carbonate 완충액에 적정농도로 회석하여 직경 60 mm 폴리스타이렌 샬레에 5 ml씩 분주하고 4°C에서 15시간 반응시킨 후 샬레를 PBS로 3회 세척하였다. 다음 5 ml의 정제된 IBRV 항원을 가하고 실온에서 2시간 반응시켜 특이항원을 부착시켰다. 반응이 끝난 샬레를 다시 PBS로 3회 세척하였으며 3% bovine serum albumin (BSA)-PBS 3 ml를 주입한 후 실온에서 1시간 두어 blocking 하였다. 그후 PBS로 1회 씻고 1% purified agar를 6 ml씩 분주도포하여 응고시켰다. 여기에 한천면치 셋트로 구멍을 낸 뒤 가검혈청과 표준양성 또는 음성혈청을 15 µl씩 주입하고 37°C에서 12시간 반응시켰다. 그후 아가층을 제거하고 0.05% Tween 20-PBS로 3회 세척하고

다시 anti-bovine Igs peroxidase conjugate 1,000배 희석액을 실온에서 1시간 재반응시켰다. 2차반응이 끝난 사례를 0.05% Tween-PBS로 3회 세척한 후 발색제 (amino salicylic acid + H₂O₂)를 1% 아가에 첨가하여 3 ml씩 분주한 후 실온에 정치하여 반응환의 직경을 관찰하였다.¹⁰⁻¹²

indirect immunoperoxidase assay (IPA): MDBK 세포를 cover slip에 배양하고 1~10⁵ TCID₅₀/0.2 ml의 IBRV를 접종한 후 4시간부터 48시간까지 경시적으로 cover slip을 채취하여 냉장 아세톤으로 고정하고 건조시킨 후 3% BSA-PBS를 수방을 적하하여 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. 그후 PBS로 1회 세척하고 monoclonal antibody를 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 0.05% Tween 20-PBS로 세척하고 rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Cappel Co. USA)로 1시간 동안 반응시킨 후 tris buffer로 세척하고, aminoethyl carbazole과 hydrogen peroxide 혼합액을 가하여 15~30분간 작용시켰다. 그 다음 Mayer's hematoxyline으로 감별염색하고 glycine buffer로 mounting하여 경경하였다.^{13,14}

야외가검출에 대한 진단시험: 도축장에서 계류중인 한우 175두에 대해 혈청을 채취하고 이들 중 도살 후 호흡기계에 병변을 보이는 소 96두의 기관점막 상피층을 절취하여 슬라이드글라스에 도말하였다. 그 다음 냉장 아세톤에 10분간 고정시킨 후 7-C-2 monoclonal antibody를 이용하여 간접형광항체법으로 IBRV 항원 증명시험을 하였다. 또한 채취한 혈청을 방사면역확산 효소법 (RIDEA)과 혈청중화시험으로 IBRV 항체를 조사하였다.

결 과

시험관내 감염 IBRV 항원검출: 7-C-2 monoclonal antibody를 이용하여 시험관내 배양된 MDBK 세포에 감염시킨 IBRV PQ7주의 검출시험을 간접 형광항체법과 indirect immunoperoxidase assay (IPA) 방법으로 수행하였다. 그 결과 Table 2에서 요약된 바와 같이 최초 양성반응은 10^{4.0} TCID₅₀/0.2 ml의 IBRV를 접종한 후 8시간에 간접형광항체법에서 검출되었고 (Fig 1), IPA에서는 10^{5.0} TCID₅₀/0.2 ml IBRV를 접종한 후 12시간에 검출되었다 (Fig 2). 또한 10 TCID₅₀/0.2 ml 이하 미량의 IBRV를 접종했을 때는 접종 후 24시간에 간접형광항체법에서 양성반응이 관찰되었고 48시간에는 두 방법 공히 양성으로 나타났다. 이 시험에서 IPA 보다 간접형광항체법이 IBRV 항원을 더욱 신속히 검출할 수 있고 미량의 항원을 측정할 수 있었다.

Table 2. Detection of infectious bovine rhinotracheitis virus from experimentally infected MDBK cells by using indirect immunofluorescence (IFA) and indirect immunoperoxidase assays (IPA) with monoclonal antibody

Virus inoculum (TCID ₅₀ /0.2 ml)	Hours post infection				
	4	8	12	24	48
1	N/N*	N/N	N/N	P/N	P/P
10	N/N	N/N	S/N	P/S	P/P
10 ²	N/N	N/N	P/N	P/P	P/P
10 ³	N/N	S/N	P/N	P/P	P/P
10 ⁴	N/N	P/N	P/S	P/P	P/P
10 ⁵	N/N	P/S	P/P	P/P	P/P

* Results of IFA/Results of IPA.

N=negative. S=suspected. P=positive.

Table 3. Comparison of serum neutralization (SN) test and radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA) for the detection of antibody against infectious bovine rhinotracheitis virus

SN titers	No. of samples subjected	Results of RIDEA	
		Positive(%)	Negative(%)
<2	41	2(4.9)	39(95.1)
2	7	6(85.7)	1(14.3)
4	6	5(83.3)	1(16.7)
8	4	4(100)	0
16	6	6(100)	0
32	13	13(100)	0
64	2	2(100)	0
128	9	9(100)	0
Total	88	47	41

Table 4. Coincidence rate between the results of radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA) and serum neutralization (SN) test against infectious bovine rhinotracheitis virus

RIDEA	SN test		Total
	Positive	Negative	
Positive	45(95.8)	2(4.3)	47
Negative	2(4.3)	39(95.1)	41
Total	47	41	88

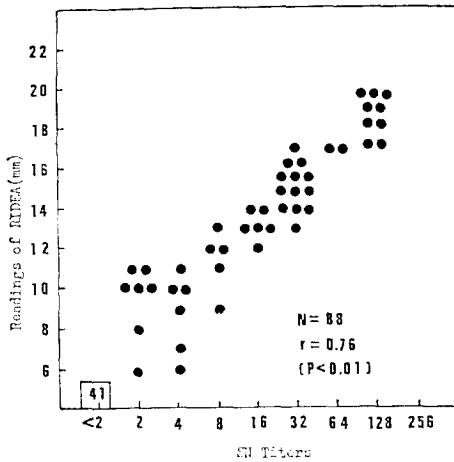


Fig 5. Relationship between diameters of radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA) and serum neutralization (SN) antibody titers to infectious bovine rhinotracheitis virus.

Table 5. Variations of the diameter readings of radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA) to infectious bovine rhinotracheitis virus

SN titers	No. of samples subjected	RIDEA diameter readings(mm)±SD(%)
<2	39	all less than 6.0
2	7	9.3±1.9(20.4)
4	6	9.7±2.0(23.0)
8	4	12.8±1.1(8.6)
16	6	14.0±1.0(7.1)
32	13	14.7±1.1(7.5)
64	2	17.0±0(0)
128	9	18.3±0.8(4.4)

$$\% = \frac{\text{population SD}}{\text{arithmactical mean}} \times 100$$

혈청중화시험과 RIDEA의 비교: 혈청중화항체가 <2 내지 128배인 혈청 88개에 대해 RIDEA를 실시한 결과를 요약하고 (Table 3) 비교하였다 (Table 4). 공시한 88개 혈청중 혈청중화항체가 2 이하인 음성혈청은 41개였으며 RIDEA에서는 이중 39개 (95.1%)가 음성이었고 2개는 양성으로 나타났다. 그리고 중화항체가 2~4배인 13개 혈청 가운데 11개가 RIDEA에서 양성이었고 2개가 음성으로 나타났다. 중화항체가 8배 이상인 34개 혈청에서는 두 방법이 100% 일치하였다 (Table 3).

88건의 혈청에 대한 시험결과를 분석하여 일치율을 비교한 바 두 방법간의 양성일치율은 95.8%이고 음성 일치율은 95.1%로 나타났으며 불일치율은 4.3%였다 (Table 4). 또한 혈청중화시험에서 얻어진 항체가와 RIDEA의 반응직경과의 상관관계를 도식화하고 분석한 바 상관계수는 0.76으로 고도의 유의성 ($p < 0.01$)이 인정되었다 (Fig 5).

중화항체가와 RIDEA의 반응치: 혈청중화항체가와 RIDEA의 반응직경을 비교한 바, 중화항체가가 2 이하인 39개 혈청에서는 반응직경이 모두 6.0 mm 이하였으며, 중화항체가 2인 7개의 혈청에서는 9.3 ± 1.9 mm로 나타났으며, 중화항체가가 증가할수록 반응직경은 커져서 128의 항체가에서는 18.3 ± 0.8 mm의 반응치를 보였다 (Fig 3 및 Table 5).

야외가검물에 대한 진단시험: 한우 175두로 부터 채취한 혈청 및 기관점막 상피조직에 대한 IBRV 항원 및 항체 검출시험을 실시하였던 바, 공시한 96건 중 형광항체법으로 31건 (32.3%)에서 양성반응이 나타났고 (Fig 4), RIDEA에서는 20건 (20.8%), 중화항체시험에서는 21건 (21.9%)이 각각 항체 양성으로 판정되었다 (Table 6).

시험방법간 일치율을 비교해 보면, 형광항체법 및 RIDEA 시험간에 양성일치율은 64.5%이고 음성일치율은 100%로 나타났으며, 형광항체법에서 양성으로 판정된 31건중 11건 (35.5%)이 RIDEA 시험에서는 음성으로 나타났다 (Table 7). 또한 RIDEA 법과 혈청중화시험간 일치율을 비교해 보면 양성일치율은 100%였고

Table 6. Diagnosis of IBR virus antigen and antibody in the slaughtered cattle with various degree of lesions in respiratory systems

Lesion* score	No of cattle tested	Potive rate (%)		
		IFA	RIDEA	SN
0	14	0/14(0)	0/14(0)	1/14(7.1)
I	39	11/39(28.2)	5/39(12.8)	5/39(12.8)
II	22	10/22(45.5)	5/22(22.7)	5/22(22.7)
III	21	10/21(47.6)	10/21(47.6)	10/21(47.6)
Total	96	31/96(32.3)	20/96(20.8)	21/96(21.9)

* Lesion scores were recorded according to pathological changes of trachea and lung: 0=none, I=slight, II=moderate, III=severe. IFA=indirect immunofluorescent antibody assay, RIDEA=radial immunodiffusion enzyme assay, SN=serum neutralization test.

Table 7. Coincidence rate between the results obtained from 96 field specimen by indirect immunofluorescence antibody test and radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA)

RIDEA	IFA test		Total
	Positive	Negative	
Positive	20(64.5)	0(0)	20
Negative	11(35.5)	65(100)	76
Total	31	65	96

Table 8. Coincidence rate between the results obtained from 96 field specimen by radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA) and serum neutralization(SN) test

SN test	RIDEA		Total
	Positive	Negative	
Positive	20(100)	1(1.3)	21
Negative	0(0)	75(98.7)	75
Total	20	76	96

음성의 경우는 98.7%의 일치율을 나타내었다(Table 8).

고 찰

소견염성비기관염은 IBRV에 기인하여 발생되는 질병으로 다양한 임상증세를 나타내지만 우리나라에서는 호흡기형에 의한 피해가 크다.^{1,2,15,16} 호흡기형은 대개의 경우 Parainfluenza virus-III, Adenovirus와 복합감염 되었거나 *Pasteurella spp.*, *Hemophilus spp* 및 *Mycoplasma spp* 균들이 2차 감염되어 임상적으로 진단이 어려울 뿐만 아니라, 기존의 형광항체시험 및 혈청중화시험에 의한 실험실진단법에서도 진단의 특이성, 신속성 및 재현성에 문제가 대두되고 있다. 또한 최근에는 IBRV가 다른 동물의 herpesviruses와 교차반응할 가능성이 있으며 독주간에도 항원적 변이가 존재한다는 보고가 있으므로^{9,17,18,19} IBRV 항원기에 특이하게 반응하는 새로운 개념의 진단법이 요구되고 있었다.

본 연구의 목적은 IBRV 항원에 대해 특이적으로 반응하는 monoclonal antibody를 이용하여 간접형광항체법, indirect immunoperoxidase assay 및 radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA) 방법을 사용하

여 배양세포에 감염된 IBRV의 검출시험을 수행하고 도축장에서 채취한 소의 가검물에 대한 항원 및 항체 검출시험을 하여 보다 효과적이고 정확한 진단법을 고안하기 위한 기초자료를 얻고져 수행하였다.

IBRV의 항원구조는 상당히 복잡하여 Misra *et al.*,⁶ Collins *et al.*^{20,21} 및 Bolton *et al.*⁵은 이 바이러스는 33종 이상의 structural polypeptide로 구성되어 있고 그 중 11종은 당단백질로 되어 있다고 보고하였다. 이렇게 다양한 단백질 중 대부분은 IBRV의 특이 구성단백질이지만 그중 일부는 변이에 의해 생성되었거나 또는 다른 herpesvirus와 교차하기 때문에 기존 polyclonal 항체를 이용한 혈청학적 진단보다 monoclonal antibody를 이용한 진단이 특이성이 더 높을 것이라는 이론이 성립될 수 있다.

본 시험에서는 저자 등이 작제하여 그 성상을 이미 보고한⁴ 9주의 monoclonal antibody 중에 특이성과 IBRV 항원과 결합력이 가장 높은 7-C-2 clone을 선정하여 (Table 1) 시험관내에 배양된 MDBK 세포에 감염된 IBRV 항원 진단시험을 수행하였던 마 형광항체법으로는 10^{4.0} TCID₅₀/0.2 ml의 바이러스를 접종한 세포에서 접종후 8시간 만에 양성판정 할 수 있었고, IPA 방법으로는 접종 후 12시간에 양성판정이 되어 형광항체법이 IPA 방법보다 더 감수성이 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 형광의 강도가 polyclonal antibody를 사용했을 때보다 훨씬 강하고 선명하여 양성판정이 용이하였고 야외가검물을 세포에 접종하여 세포변성 효과가 출현하는 18시간대 보다 10시간 정도 앞당겨 IBRV 검출이 가능함을 알 수 있었다.

또한 충남 및 경기지역에서 사육중인 88두의 젖소에서 채취한 혈청에 대해 IBRV 항체검출시험을 혈청중화반응 및 본 시험에서 고안한 RIDEA 법으로 수행하여 비교하였던 바, 두 방법간의 양성 일치율은 95.8%, 음성 일치율은 95.1%였으며 (Table 4), 고도의 상관관계가 인정되었다(Fig 5). 이 결과 RIDEA 방법이 중화항체법 보다 false positive가 적고 정확도가 높다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 대전지역 도축장에서 채취한 96건의 소 혈청에 대한 시험에서도 증명되었다. 여기에서 간접형광항체법과 RIDEA의 양성 일치율은 64.5%이고 음성 일치율은 100%로써 형광항체법에서 높은 양성율이 나타났다(Table 7). 이것은 RIDEA에서는 IBRV 항체를 검출한 것이고 형광항체법에서는 기관점막상피세포내에 존재하는 IBRV항원을 검출하였기 때문에 생긴 차이로서 호흡기관에 병변이 있는 경우에 32.3%에서 IBRV 항원이 감지되어 항체 보유율보다 높다는 사실이 밝혀졌다(Table 6). 기관점

막극소의 높은 IBRV 항원의 존재와 항체보유의 상관관계를 좀 더 추시하기 위해서는 기관점막으로부터 바이러스분리 및 기관점막상피세포에 있을 가능성이 있는 IBRV virus-associated antigen에 대한 연구를 하여야 할 것으로 사료된다.

본 시험에서 7-C-2 monoclonal antibody를 이용하여 수행한 간접형광항체법과 IPA 및 RIDEA 방법은 모두 특이성이 높은 것으로 인정되었다. 특히 새로 고안한 RIDEA 방법은 pseudorabies virus 항체 검출에 이용된 방법¹⁰⁻¹²을 응용한 것으로 진단에 약 15시간이 소요되는 간편하고 신속한 방법이다. 그러나 시험결과 재현성을 높이기 위해 사용 시약의 균일성과 시험기법의 표준화가 전체되어야 한다. 또한 정제된 항원의 순도와 성상이 불명하고 IBRV 항원·항체의 결합기의 작용기전에 대해 아직 잘 밝혀져 있지 않으므로^{5,20,21,22} 본 RIDEA 시험의 특이성과 정확성을 구체적으로 증명하기는 어려우나 7-C-2 clone을 이용하므로써 기존 polyclonal antibody를 이용한 경우보다 특이성을 높일 수 있음이 여러 시험을 통해 추정되었다.

Monoclonal antibody를 이용한 IPA 및 RIDEA 시험 방법을 더욱 개량하고 간소화하여 소견염성비기관염의 혈청역학적 조사 및 병인기전 연구에 폭넓게 응용하여야 한다고 사료된다.

결 론

소견염성비기관염 바이러스에 대한 monoclonal anti-

body를 이용하여 간접형광항체법, indirect immunoperoxidase assay(IPA) 및 radial immunodiffusion enzyme assay(RIDEA) 법으로 IBRV 항원 및 항체검출시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

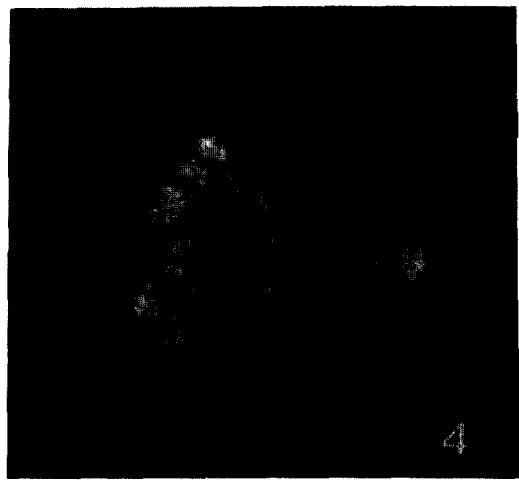
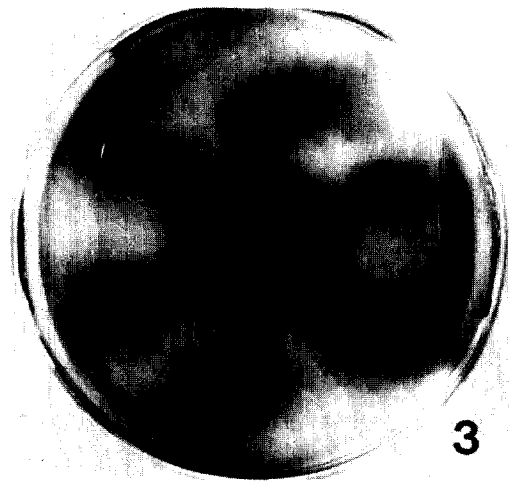
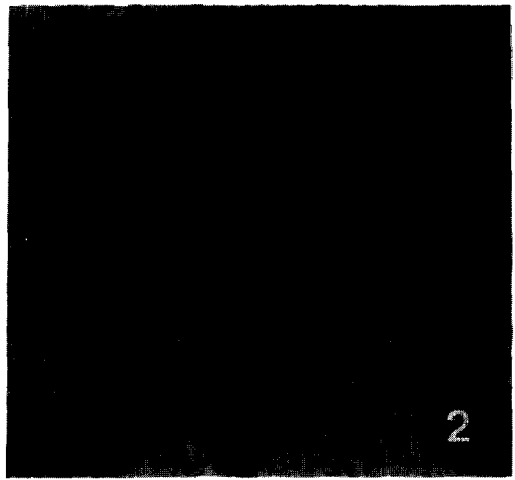
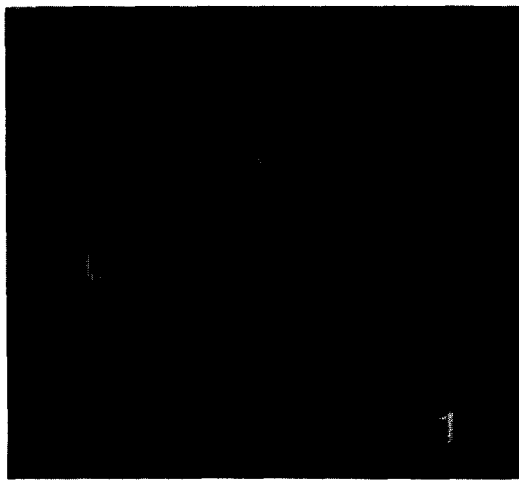
1. 7-C-2 monoclonal antibody를 이용하여 MDBK 세포에 감염된 IBRV를 형광항체법 및 IPA법으로 진단한 바 접종후 8시간 부터 항원검출이 가능하였으며 형광항체법은 IPA 보다 특이성이 더 높았다.

2. 88개의 혈청에 대해 혈청중화시험과 새로 고안한 RIDEA를 실시한 바 RIDEA에서는 false positive를 제거할 수 있었고 중화항체가 8배 이상에서는 두 방법이 100% 일치하였다. 또한 중화항체역가와 RIDEA 반응치 간에는 상관계수 0.76으로 고도의 유의성이 인정되었으며, RIDEA의 반응치로써 중화항체역가를 판정할 수 있었다.

3. 도축장에서 호흡기 병변을 나타낸 96두의 소에서 채취한 기관점막조직과 혈청을 간접형광항체법, RIDEA 및 혈청중화시험으로 검사한 바 형광항체법으로는 32.3%, RIDEA에서는 20.8% 그리고 혈청중화시험에서는 21.9%가 양성으로 판정되었다.

4. 도축된 소에서 채취한 96건의 혈청에 대한 RIDEA법과 혈청중화시험 간에는 양성예에서는 100%, 음성예의 경우는 98.7%의 일치율을 나타냈다.

5. IBRV에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 간접형광항체법, IPA 및 RIDEA 법으로 항원 및 항체 검출시험을 한 바 특이성이 높은 것으로 밝혀졌다.



Legends for figures

- Fig 1.** Specific immunofluorescence patterns of MDBK cells infected with IBR virus at $10^{2.0}$ TCID₅₀/0.2 ml. The cells were stained at 12 hrs post inoculation by indirect immunofluorescent method using 7-C-2 monoclonal antibody. $\times 200$
- Fig 2.** Positive reaction for IBR virus in indirect immunoperoxidase assay using 7-C-2 monoclonal antibody. Specific dark brown color (arrows) was developed around MDBK cells infected with IBR virus at titer of $10^{2.0}$ TCID₅₀/0.2 ml. The cells were tested at 24 hrs p.i. $\times 200$
- Fig 3.** Typical patterns of radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibody against infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine sera. Central; positive serum. Peripheral; negative sera.
- Fig 4.** The cells of tracheal membrane of cattle showing specific immunofluorescence in the cytoplasm. Smears of tracheal membrane were tested by indirect immunofluorescent antibody test using 7-C-2 monoclonal antibody. $\times 200$

참 고 문 헌

1. Kahrs RF. Infectious bovine rhinotracheitis, In: *Viral diseases of cattle*. Ames: Iowa state University, 1981; 135~156.
2. Gibbs EPJ and Rweyemamu MM. Bovine herpes viruses, I. Bovine herpes viruse I. *Vet Bull* 1977; 47:317~343.
3. Kahrs RF. Infectious bovine rhinotracheitis; A review and update. *J Am Vet Med Ass* 1977; 171:1055~1064.
4. Jun MH, Kim DH, An SH et al. Application of monoclonal antibody to develop diagnostic techniques for infectious bovine rhinotracheitis virus. I. Production of monoclonal antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus. *J of Kor Soc of Virology* 1987; 17:139~147.
5. Bolton DC, Zee YC and Ardans AA. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 1983; 8:57-68.
6. Misra V, Blumenthal RM and Babiuk LA. Proteins specified by bovine herpes virus I (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J Virol* 1981; 40:367~378.
7. Freshney RI. The culture environment; Preparation and Sterilization, In: *Culture of animal cells, A manual of basic technique*, New York: Alan R Liss Inc, 1984; 55~128.
8. Kuchler RJ. Culturing and Handling cells *in vitro*; Milieu for maintaining and Growing animal cells *in vitro*. In: *Biochemical methods in cell culture and Virology*. Pennsylvania: Dowden, Hutchinson & Ross Inc. 1977; 3~116.
9. Armstrong JA, Pereira HG and Andrewes CH. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the herpesvirus group. *Virology* 1961; 14:276~285.
10. Van Oirschot JT. Induction of antibodies to glycoprotein I in pigs exposed to different doses of a mildly virulent strain of Aujeszky's disease virus, *Vet Rec* 1988; 122:599~603.
11. An SH, Kweon CH, Lee JB et al. Modified radial immunodiffusion assay for diagnosis of pseudorabies infection in swine. *J Kor Soc Virology* 1987; 17:45~50.
12. Thawley DG, 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.
13. Chung UI, Kang MI, Jean YH et al. Application of immunocytochemical methods for detecting infectious bovine rhinotracheitis virus in tissues. *Res Rept RDA(L&V)* 1987; 29:89~94.
14. Curran RC and Gregory J. Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin section of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *J Clin Path* 1978; 31:974~983.
15. Reed DE, Lungap TJ and Anson MA. Characterization of herpesviruses isolated from lactating cows with mammary pustular dermatitis. *Am J Vet Res* 1977; 38:1631~1634.
16. Roberts AW and Carter GR. Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from the milk of a cow with mastitis. *J Am Vet Med Ass* 1974; 164:413.
17. Bush CE and Pritchett RF. Immunologic comparison of the proteins of pseudorabies(Aujeszky's disease) virus and bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 1986; 47:1708~1712.
18. Bush CE and Pritchett RF. A comparison of the genomes of bovine herpesvirus type 1 and pseudorabies virus. *J Gen Virol* 1985; 66:1811~1817.
19. Blue WT and Plummer G. Antigenic relationship among four herpesviruses. *Infect Immunol* 1973; 7:1000~1002.
20. Collins JK and Chesebro B. Synthesis, processing and cell surface expression of Friend and xenotropic murine leukemia virus gp 70 antigen on Friend virus induced erythroleukemia cell clones. *J Immunol* 1980; 125:1325~1331.
21. Collins JK, Butcher, AC, Riegel CA et al. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J Virol* 1984; 52:403~409.
22. Zee YC and Chung WS. Monoclonal antibodies

against infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhea. *Proceedings on production and utilization of monoclonal antibody for control of animal diseases*. Sep. 2-7. 1986; Suwon, Korea, 4-1-4-17.

23. Collins JK, Bulla GA, Riegel CA et al. A single dilution enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1. *Vet Microbiol* 1985; 10: 133-147.
