

Peroxidase-antiperoxidase(PAP) 복합체법을 이용한 돼지콜레라의 면역조직화학적 진단

문 운 경·조 희 택
경상남도 가축위생시험소
김 순 복
경상대학교 수의과대학
(1990. 2. 2 접수)

Immunohistochemical diagnosis of hog cholera with peroxidase-antiperoxidase(PAP) complex method

Oun-gyeong Moon, Hee-tack Cho
Gyeongnam Provincial Institute of Animal Health
Soon-bok Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Feb 2, 1990)

Abstract: The present study was intended to use the peroxidase-antiperoxidase method for the identification of hog cholera virus(HCV) in the lymphatic organs of HCV-infected pigs. Sections were incubated with primary antibody (rabbit anti-HCV polyclonal or mouse anti-HCV monoclonal), followed by incubation with linkserum (goat anti-rabbit IgG) in excess and rabbit or mouse PAP complex.

The viral antigen was localized mainly in the cytoplasm of lymphoid cells and macrophages. Positive reaction cells were frequently detected in the marginal areas of the germinal centers of the spleens, and also found in the tonsils and lymph nodes.

The method approved to be highly specific for the identification of the virus and allowed a precise localization of the viral antigen in infected cells.

Key words: Immunohistochemistry, hog cholera, peroxidase-antiperoxidase(PAP).

서 론

돼지콜레라는 1947년 국내에서 첫 발생이 알려진 이래, 70년대부터 점차 집단발생의 양상을 띠기 시작하여² 오늘날 양돈산업에서 가장 위협적인 질병으로 인식되고 있고 여기에다 설상가상으로 3년전부터는 돼지콜레라와 유사한 오제스키병³ 이 국내에서 발생하여 전국적으로 확산되어 가고있는 실정이며, 따라서 돼지콜레라의 신속한 감별진단은 방역대책 수립에 중요한 과제로 대두되고 있다.

바이러스성 질병의 진단에 면역조직화학적 방법을 이용하면, 조직내에서 직접 바이러스 항원을 검출하기 때문에 세포배양 등을 통한 바이러스 분리동정의 복잡한 과정을 거치지 않고서도 수 시간 이내에 확진이 가능하며, 혈중항체 음성인 감염초기에도 진단할 수 있을 뿐아니라, 일반적으로 바이러스성 질병의 혈청학적 진단을 위한 혈청검사 양성개체에서 백신항체 보유군으로부터 흔히 혼란을 일으키는 감염개체를 감별할 수 있고^{4,5} 또한 경비를 절약할 수 있는 이점을 갖고 있기 때문에 매우 효율적인 진단법으로 알려져 있다.

Peroxidase-antiperoxidase(PAP) 방법은 Sternberger 등⁶에 의해 처음 개발되었으며 unlabeled enzyme bridge 법의 마지막 두 과정을 하나로 결합시켜 PAP 복합체를 형성함으로써 항혈청의 유효도는 무관하게 peroxidase와 antiperoxidase는 3:2의 비율로 구성된 오작현의 링구조에 의해 안정되어 기존의 어떤 면역조직화학적 방법들 보다 감수성이 뛰어나며, Moriarty 등⁷은 PAP 법을 부신피질자극호르몬의 역가측정에 이용한 결과 radioimmunoassay 방법보다 더욱 감응도가 높다고 하였다.

형광항체법⁸⁻¹¹을 이용한 조직내 돼지콜레라 바이러스 항원의 검출은 이미 오래전부터 잘 알려져 왔으나, 비특이 반응이 많아 판독이 애매할 때가 빈번하며 형광현미경을 반드시 갖추어야 하고 또한 반응후에 특이형광이 신속하게 사라지기 때문에 사진을 찍어서 결과를 보존해야 하는 등의 단점들이 있다.^{12,13}

이러한 형광항체법의 결점을 보완하고 특이성을 더욱 높이고자 하는 노력의 결과로서 여러가지 새로운 면역조직화학적 방법들이 개발되어 사용되고 있으며^{4,5,14}, 그 중에서 면역형광항체법 보다 특이성과 감수성에서 100~1,000배 정도 우수하다⁷고 알려진 PAP를 이용하여 조직절편내에서 돼지콜레라 바이러스 항원을 검출코자 이 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물: 경남가축위생시험소와 경상대학교 수의과 대학 병리학교실에 병성감정 의뢰된 가점물 중에서 임상, 병리해부 및 조직학적 검사결과 돼지콜레라로 판정된 4개 농장의 2~5개월령 자연감염돈 10두를 실험동물로 공시하였으며, 편도선, 비장, 경부임파절 및 뇌조직을 함께 절취하여 -70°C 에 보관하면서 냉동절편 재료로 이용하였다.

1차항체: 가토 항돼지콜레라바이러스 고도면역혈청(rabbit anti-HCV/HIS)을 생산하기 위해서 건강한 토끼의 이정맥에다 가토화돼지콜레라 약독백신(Rovac, 대성미생물) 1ml씩을 1개월 간격으로 3회 접종하였으며, 마지막회 접종 3주후 채혈 분리한 혈청은 56°C 에서 30분간 비등화 시킨다음 1차항체로 사용하였다. 단크론성항체(mouse anti-HCV/MCA; 425-5)는 가축위생연구소 유전공학연구실에서 생산한 것을 분양받아 사용하였다.

조직절편: 냉동절편은 동결저장조직과 paraformaldehyde고정 조직을 냉동절편기에서 약 $3\mu\text{m}$ 두께로 박절하였으며 아세톤에 10분간 고정한 후 4°C 냉장고에 보관하면서 제작당일 면역염색하였다. 파라핀절편을 위

에서는 일반적인 방법에 따라 paraplast 포매하였으며 일부는 트립신으로 전처리^{15,16} 한 후에 염색하였다.

PAP 염색¹⁷⁻²¹: 조직절편은 먼저 sodium phosphate buffer, pH7.6(PBS)로 잠시 수세한 후에 0.3% 과산화수소 메탄올용액에 25분간 처리하였으며, PBS 수세에 이어 2%정상산양단백에 10분간 전처리하였다.²⁵⁻²⁹ 다음 1차항체로서 rabbit anti-HCV/HIS 또는 mouse anti-HCV/MCA를 2% 정상산양단백에다 50~100배로 희석하여 30~60분간 잠자시킨 후 3분간씩 PBS로 6회 수세하였다. 그리고 2차항체로서 goat anti-rabbit IgG 또는 goat antimouse IgG(Sigma)를 PBS로 300~500배 희석하여 60분간 반응 시킨후 3분간씩 6회 수세하였다. 이어서 3차항체로서 rabbit PAP 또는 mouse PAP(Sigma)를 PBS에다 100~200배 희석하여 60분간 반응시킨 후, 3분간씩 6회 수세한 다음 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride(Sigma, DAB)로 25°C 부란기내에서 약 30분간 발색시켰으며 이때 발색정도를 광학현미경으로 관찰하면서 적당한 반응시간을 선택하여 슬라이드를 수세하였고 일부는 헤마톡실린으로 대조염색하여 마운팅하였다. 면역염색은 모두 실온에서 가능한 한 광선에 노출되지 않도록 주의하면서 진행되었고, 대조로서 1차항체 무처리군을 함께 관찰하였다.

결 과

조직절편에서 돼지콜레라 바이러스 항원을 검출하기 위해 PAP 염색을 실시한 결과, 편도선, 비장, 그리고 임파절에서 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며, Table 1에서 보는 바와같이 양성세포 검출율은 비장에서 가장 높았고(Fig 1), 그 다음이 편도선, 임파절의 순이었다. 임파절에서는 배중심의 가장자리에 집단으로 많이 분포하고 있었으며(Fig 2), 비적수에서는 대개 고

Table 1. Detection of hog cholera virus(HCV) antigens in the frozen sections with peroxidase-antiperoxidase technique

Organ	Result	
	HIS*	MCA*
Tonsil	8/10**	4/5
Spleen	9/10	4/5
Lymph node	6/10	3/5

* Hyperimmune serum(HIS) or monoclonal antibody(MCA) was incubated as a primary antibody.

** No. of pigs showing positive reaction/No. of pigs tested.

립성으로 산재하고 있었다(Fig 3). 양성반응을 나타낸 세포들은 주로 임파구들이었으며 대식세포계에서도 종종 관찰되었고, 이들 세포들은 흔히 세포질에서 암갈색의 강한 색소침착을 일으켰다(Fig 4,5). 편도선에서의 양성반응세포는 임파소절내에서 주로 관찰되었다(Fig 6).

바이러스 항원검출에 있어 냉동절편에서 상대적으로 비특이 반응이 적고 특이반응의 발색이 현저하여 관찰이 용이하였으나, 파라핀절편에서는 트립신처리군(Fig 7)과 무처리군 모두 양성반응이 미약하였다.

1차항체로서 면역혈청과 단클론성항체를 사용해 본 결과, 두가지 모두 우수한 검출율을 보였으나(Table 1). 면역혈청은 최소한 60분간의 감작시간을 필요로 하였으며 그 이하에서는 반응이 아주 미약하거나 거의 반응하지 않았고, 단클론성항체는 30분 감작시킨 예에서도 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig 8).

조직절편의 두께에 따른 면역조직화학적 염색의 감응도를 측정하기 위해서 1~8 μ m의 두께로 각각 시험한 결과, 4 μ m이하에서는 모두 좋은 검출효과를 나타내었으나 그 이상에서는 반응이 미약하였으며, 여러가지 조건들을 고려할때 3~4 μ m 두께의 절편에서 가장 좋은 결과를 얻을수 있었다.

DAB 발색제의 반응온도와 시간 간의 상관관계를 측정하기 위하여 15~50°C 사이의 여러조건하에서 각각 발색상태를 관찰한 결과, 15°C 이하에서는 발색이 현저하게 지연되었고 45°C 이상에서는 신속한 발색과 더불어 비특이적으로 배경이 강하게 발색되어 판독에 어려움이 따랐으며, 18~25°C에서 30분 정도 발색시키는 것이 판독에 가장 적합한 것으로 생각되었다.

면역염색에서 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위하여 0.3%과산화수소 메탄올용액으로 전처리하였으며, 2차항체에 대한 비특이반응을 줄이기 위하여 1차항체 처리전에 2% 정상산양혈청으로 사전감작시켰으며, 처리하지않은 대조군에 비해 비특이반응을 현저히 감소시킬 수 있었다.

고 찰

이 실험에 공시한 자연감염동물들은 임상 및 부검소견이 돼지콜레라의 것과 일치하였으며 병리조직학적으로는 중추신경계의 비화농성 뇌염과 임파구괴사 및 세망내피세포계의 활성화등을 볼 수 있었다.

돼지콜레라 바이러스의 자연감염은 구강인두를 통해 주로 일어나고³⁰, 일차적으로 편도선의 임파구와 대식세포에서 증식하여 감염 2~6일째 바이러스혈증을 일으킨 다음, 신체 각 부위의 임파성장과 상피세포로

파급하여 본격적으로 증식하게 된다.^{3,10} 이 실험에서 면역조직화학적으로 바이러스 항원검출이 용이할 것으로 예상되는 편도선, 비장 및 임파절에 대해 PAP를 적용해 본 결과, 감염초기의 일차 증식부위로서 검출율이 가장 좋을 것으로 예상되었던 편도선이 오히려 비장에 비해 저조하였고, 편도선에서는 편도염(tonsillar crypt) 상피세포에서 형광항체 양성세포가 흔히 검출된다는 다른 보고^{8,30}와는 달리, 임파소절내에서 양성세포들이 주로 관찰되었으며 상피 세포에서는 거의 볼 수 없었다.

Mengeling과 Packer³¹는 인공감염돈에서 편도선, 혈청, 임파절, 회장종말부, 흉선 및 비장의 순으로 바이러스 분리빈도가 높다고 하였으며, 감염 2일째 혈청에서 그리고 3일째 편도선과 임파절에서 분리되었다고 보고하였다. 이 실험에서 면역조직화학적으로 바이러스 검출효과가 가장 좋았던 장기는 비장이었으며 그 다음이 편도선, 임파절의 순이었고, 임파구와 대식세포에서 주로 관찰되는 이들 양성반응은 세포질내에 국한하여 흔히 강하게 나타남으로써 바이러스의 복제부위가 세포질임을 말해 주고 있었다.

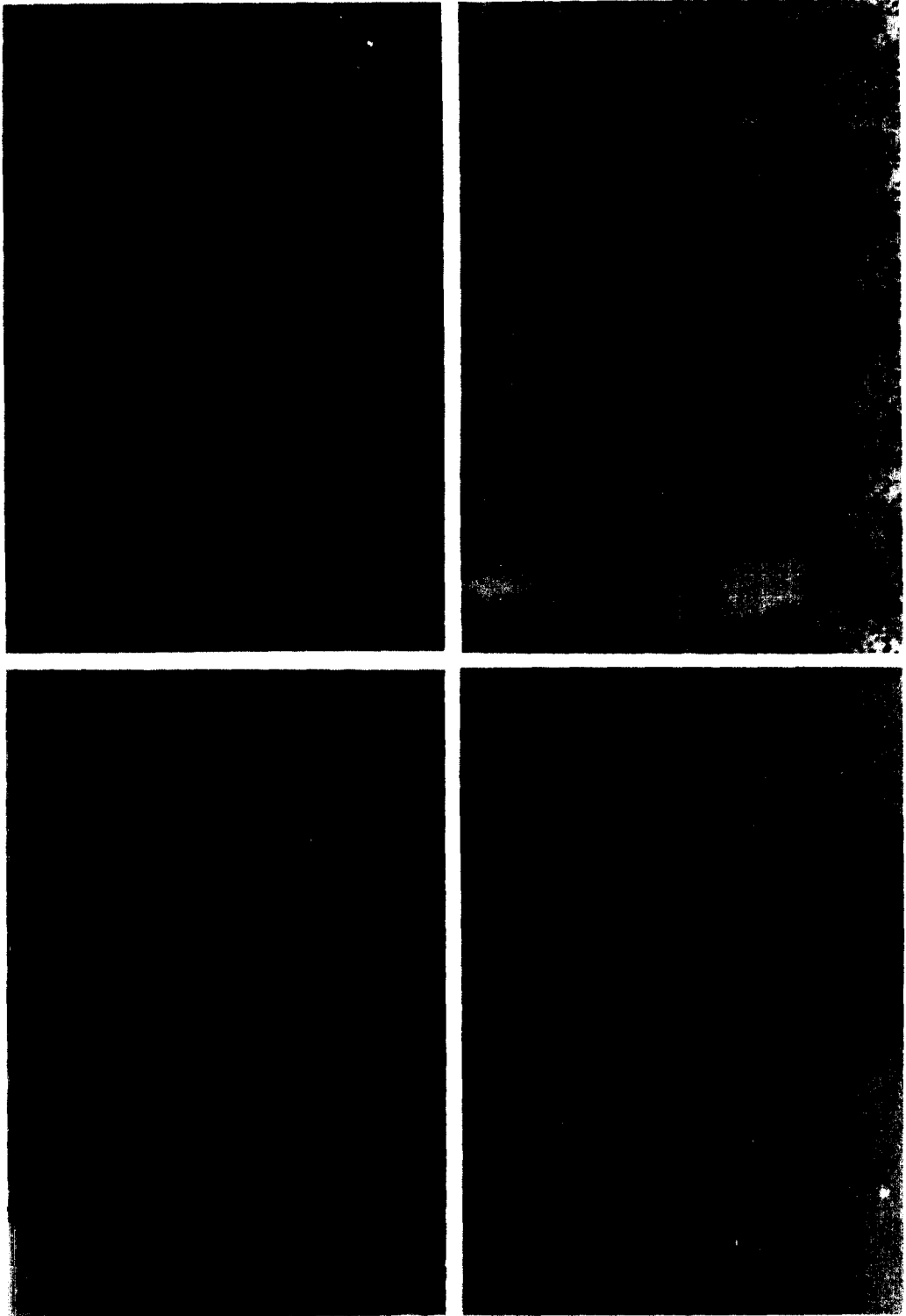
비장내에서의 양성반응세포는 주로 배중심의 가장자리에서 많이 검출되었으며, 이는 돼지콜레라 바이러스가 B임파구에 감염하여 괴사를 일으킨다는 보고¹⁰와 일치하는 소견으로 해석되었다. 중추신경계의 대뇌, 소뇌 및 척수조직에서는 양성반응세포가 드물게 관찰되어 진단상 시료채취 부위로는 적합하지 못하였다.

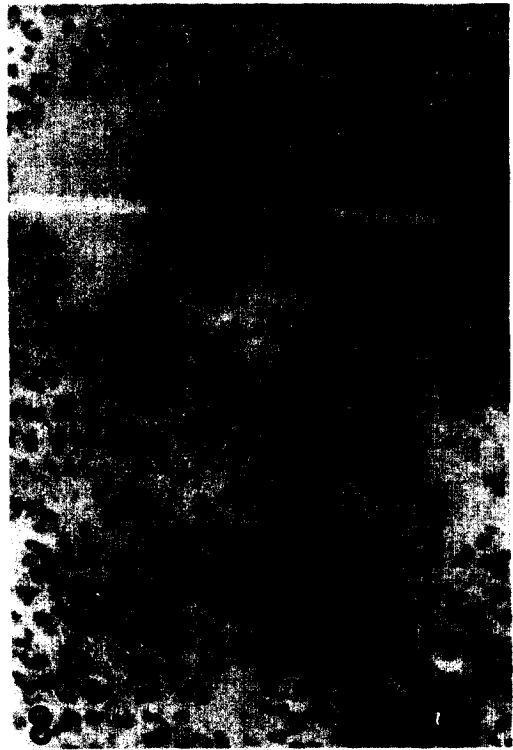
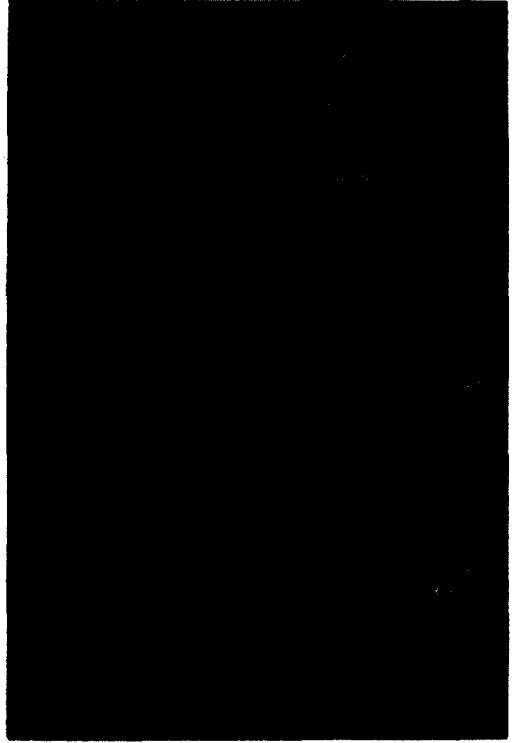
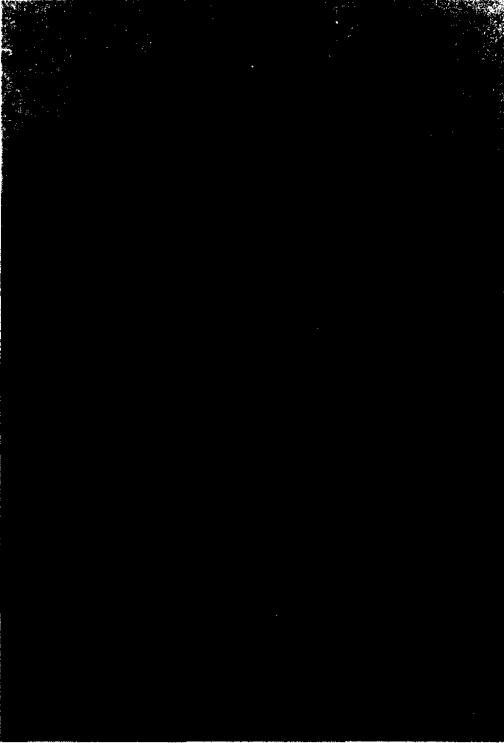
조직절편의 두께에 따른 면역조직화학적 염색의 감응도를 측정하기 위하여 1~8 μ m 두께로 시험한 결과, 두께가 얇을수록 좋은 결과를 얻을 수 있었으나 3 μ m 이하의 두께로는 절편제작이 쉽지않아 냉동절편기를 이용할때는 3~4 μ m정도가 적합하다고 생각되었다.

결론적으로 PAP 염색법은 조직내 돼지콜레라 바이러스 항원검출에 있어 높은 특이성을 나타냄으로써 앞으로 야외에서 돼지콜레라의 진단을 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것이며, 이외에도 감별이 어려운 다른 여러가지 질병의 진단에 PAP의 응용 가능성은 매우 높다고 생각된다.

결 론

돼지콜레라 바이러스의 면역조직화학적 동정을 위하여 자연감염돈의 임파성장기 조직절편에 대해 Peroxidase-antiperoxidase법을 적용하였으며, 모든 절편은 1차항체로서 가토 항돼지콜레라바이러스 고도면역혈청 또는 단클론성항체로 감작시킨 다음 산양 항가토 IgG를 2차항체로 결합시켰다.





양성반응세포들은 비장, 편도선, 임파선의 순으로 관찰되었으며, 바이러스 항원은 주로 이들 장기의 임파구와 대식세포의 세포질에서 검출되었다.

이상의 결과에서 PAP 복합체법은 앞으로 돼지콜레라의 진단에 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Legends for figures

All are frozen-sectioned but Fig 7, and immunostained with PAP method

Fig 1. Dark brown deposits, indicating the presence of viral antigen, appeared in the spleen. $\times 50$.

Fig 2. Positive cells are found in the marginal area of the germinal center. A serial section of the same block as Fig 1, and counterstained with hematoxylin. $\times 50$.

Fig 3. Positive cells are scattered in the white pulp as well as red pulp. Counterstained with hematoxylin. $\times 50$.

Fig 4. Positive pigmentation is found in the cytoplasm of infected cells of the spleen. $\times 200$.

Fig 5. Positive pigmentation in lymphoid cells and macrophages of the lymph nodes. $\times 125$.

Fig 6. Positive cells in the tonsil. $\times 50$.

Fig 7. Positive cells in the paraplasm section of paraformaldehyde-fixed spleen. $\times 50$.

Fig 8. A strong positive cell incubated with monoclonal antibody in the spleen. $\times 125$.

참 고 문 헌

- 강병직, 권혁진, 김선중, 조희배양순화 돼지콜레라 생독백신의 야외접종시험, 농사시험연구보고, 농촌진흥청. 1971;14:27~33.
- 권영방, 김순복, 정운익 등. 가축질병검색 및 병성감정. 시험연구보고서, 가축위생연구소. 1974~Press, 1985:1988.
- Russel PH, Edington N. 12.8 Swine fever. *Veterinary viruses*. Cambridge: The Burlington 132~133.
- Brandtzaeg P. Tissue preparation methods for immunohistochemistry. Bullock GR, Petrusz P. *Techniques in Immunocytochemistry*. 1st ed. London: Academic Press Inc 1982;1:1~75.
- Pool CW, Buijs RM, Swaab DF, et al. 1. On the way to a specific immunocytochemical localization. Cuello AC. *Immunohistochemistry*. IBRD handbook series: *methods in the neuroscience*. New York: John Wiley & Sons, 1984;1~46.
- Sternberg LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry; preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18(5):315~333.
- Moriarty GC, Moriarty CM, Sternberger LA. Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex: A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J Histochem Cytochem* 1973;21(9):825~833.
- Chevillat NF, Mengeling WI. The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever), histologic immunofluorescent, and electron microscopic studies. *Lab Invest* 1969;20:261~274.
- Maess J, Liess B. Untersuchungen mit der Immunofluoreszenz zur Laboratoriums Diagnose der europäischen Schweinepest. *Zbl Vet Med B* 1966;13:660~670.
- Oirschot JTV, Jong DD, Huffels NDNHJ. Effect of infections with swine fever virus on immune functions. I. Response of lymphocytes from blood and lymphatic organs from infected and natural pigs to anti-immunoglobulin serum and protein A. *Vet Microbiol* 1981;6:41~57.
- Ressang AA, Boer JLD. The indirect fluorescent antibody technique as a method for detecting serum antibodies against hog cholera. *Zbl Vet Med B* 1969;16:706~716.
- Richter-Reichhelm HB, Trautwein G, Bente K, et al. Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. II. Immunopathological findings in the fetus. *Zbl Vet Med B* 1980;27:243~252.
- Valnes K, Brandtzaeg P. Unlabeled antibody

- peroxidase-antiperoxidase method*combined with direct immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 1981;29(6):703~711.
14. Kim SB. Immunohistochemistry for detection of Aujeszky's disease virus antigens: Immunogold-silver method in tissue sections. *Korean J Vet Res* 1988;28(2):365~369.
 15. Beust BRV, Suter MM, Summers BA. Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet Pathol* 1988; 25:251~255.
 16. Ducatelle R, Coussemont W, Hoorens J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody enzyme method. *Am J Vet Res* 1980;40(11): 1860~1862.
 17. Bedett CD. Immunocytochemical demonstration of cytochrome c oxidase with an immunoperoxidase method: A specific stain for mitochondria in formalin-fixed and paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985;33(5):446~ 452.
 18. Cherrington JM, Ghalib HW, Sawyer MM, et al. Detection of viral antigens in bluetongue virus infected ovine tissue, using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Am J Vet Res* 1985; 46(11):2356~2359.
 19. Ducatelle R, Coussemont W, Hoorens J. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Res Vet Sci* 1982;32:294~302.
 20. Itoh G. Immunohistochemical demonstration of Fc receptors of human lymph node cells using peroxidase-antiperoxidase (IgG). *J Histochem Cytochem* 1980;28(3):271~275.
 21. Sandusky GEJr, Wirhtman KA. Application of the peroxidase-antiperoxidase procedure to the localization of pituitary hormones and calcitonin in various domestic animals and human beings. *Am J Vet Res* 1985;46(3):739~749.
 22. Staats JJ, Kocan KM, Hair JA, et al. Immunocytochemical labeling of *Anaplasma marginale* theiler in *Dermatocentor andersoni* stiles with peroxidase-anti-peroxidase technique. *Am J Vet Res* 1982;43:979~983.
 23. Straus W. Factors affecting the sensitivity and specificity of the cytochemical reaction for the anti-horseradish peroxidase antibody in lymph tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1980;28 (7):645~652.
 24. Marco A, Ramos JA, Dominguez L, et al. Immunocytochemical detection of listeria monocytogenes in tissue with the peroxidase-antiperoxidase technique. *Vet Pathol* 1988;25:385~387.
 25. Bartoszcze M, Roszkowski J. The use of the indirect immunoperoxidase method for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. *Zbl Vet Med B* 1979;26:253~256.
 26. Chasey D. A simple and rapid immunoperoxidase test for the detection of virus antigens in tissue culture. *Vet Rec* 1980;106:506~507.
 27. Lansdrop PM, van der Kwast TH, Boer MD. Stepwise amplified immunoperoxidase(PAP) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *J Histochem Cytochem* 1984; 32(2):172~178.
 28. Ordronneau P, Lindstrom PBM, Petrusz P. Four unlabeled antibody bridge techniques; A comparison. *J Histochem Cytochem* 1981;29(12):1397 ~1404.
 29. Vacca LL, Abrahams SJ, Haftchi NE. A modified peroxidase-antiperoxidase procedure for improved localization of tissue antigen; Localization of substance P in rat spinal cord. *J Histochem Cytochem* 1980;28(4):297~307.
 30. Ressang AA. Studies on the pathogenesis of hog cholera. I. Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. *Zbl Vet Med B* 1973a;20:256~271.
 31. Mengeling WL, Packer RA. Pathogenesis of chronic hog cholera: Host response. *Am J Vet Res* 1969;30:409~417.