

돼지 생식기호흡기증후군 바이러스항체 검색에 있어 간접형광항체법(IFA)과 효소면역법(ELISA)의 진단효율 비교

박최규 · 류영수* · 이창희** · 정종욱***

수의과학연구소 · 건국대학교 수의학부*
제주대학교 수의학과** · 대한사료공업(주)***
(1998년 2월 23일 접수)

Comparison between indirect immunofluorescent antibody(IFA) test and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)

Choi-kyu Park, Young-soo Lyoo* , Chang-hee Lee** , Jong-wook Jung***

National Veterinary Research Institute, 48 Anyang 6-dong, Anyang, Korea 430-016
CVM, Kon-Kuk University, Mojin-dong, Seoul, Korea 143-701*
Che-Ju University, Cheju, Korea 690-756**
Dae-Han Livestock & Feed Co., Ltd., Seoul, Korea 100-092***

(Received Feb 23, 1998)

Abstract : An establishment of effective control measures to PRRSV infection in swine industry depends on a sensitive and specific diagnosis to detect either viral antigen and/or antibodies to PRRSV. Several diagnostic methods are available to detect antibodies against PRRSV, including IPMA, IFA and ELISA tests have been successfully developed. Sensitivity of the indirect immunofluorescent assay in MA-104 cells using Korean field isolate PL96-1 was superior to that of VR-2332 and field isolate PL96-2. Sensitivity and specificity of the IFA test with PL96-1 were comparable to those of commercial ELISA test kit but ELISA test was more sensitive for the detection of declining antibodies to PRRSV in finishing pigs. In this study we concluded that IFA and ELISA test could be utilized to detect antibodies to PRRSV and the results generated from these two tests were comparable and there were no significant difference between these two tests.

Key words : PRRS, IFA, ELISA.

서 론

돼지 생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)은 모돈의 유·사산 및 허약자돈 분만, 육성·비육돈의 호흡기 피해 등을 유발하는 질병으로 그 경제적 피해가 심각하기 때문에 전세계적으로 양돈업에 있어 가장 중요한 질병중의 하나로 인식되고 있다^{1,2}. 원인체인 PRRS 바이러스는 마 동맥염 바이러스(equine arteritis virus), 설치류의 LDV(lactate dehydrogenase-elevating virus), 원숭이의 출혈열 바이러스(simian haemorrhagic fever virus) 등과 함께 *Arteriviridae* 로 새로이 분류된 positive sense RNA 바이러스로^{3,4} 국내에서는 1993년 처음 바이러스 분리보고가 되었으나⁵ 보관혈청에 대한 특이항체 검사결과에 따르면 이미 80년대 후반부터 발생이 되고 있었던 것으로 판단된다⁶. 돈군의 PRRS 감염을 진단하기 위해서는 바이러스 분리동정, 바이러스 항원의 증명, 바이러스 특이항체의 검출 등 다양한 방법을 이용할 수 있으나 예방접종을 실시하지 않은 돈군의 경우는 혈청학적 진단법을 이용하여 감염여부를 쉽게 확인할 수 있을 뿐만 아니라 감염상황에 대한 역학정보도 얻을 수 있어 유용한 진단법으로 이용되고 있다.

PRRS 바이러스의 혈청학적 진단법으로는 혈청중화시험^{7,8}, 면역효소단층법(immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)⁹, 간접형광항체법(indirect immunofluorescent antibody test, IFA)¹⁰, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{11,12} 등이 보고되어 있으며, 이중 IFA와 ELISA 방법이 세계적으로 가장 많이 이용되고 있다. 우리나라에서는 신 등⁶과 류 등¹³에 의해 확립된 IFA 방법이 주로 이용되어 왔으며, 최근에는 ELISA kit가 수입되어 PRRS 바이러스 항체진단에 이용되고 있다. ELISA 방법은 민감도가 높고, 다량의 시료를 처리할 수 있는 장점 때문에 많은 실험실에서 PRRS 바이러스의 항체진단에 이용될 것으로 판단된다. 이 연구에서는 야외에서 채취한 돼지 혈청을 대상으로 국내분리주로 제작한 IFA kit와 최근 미국에서 도입된 시판 ELISA kit를 이용하여 PRRS 바이러스 특이항체를 검출하고 두 진단법간의 특이성과 민감도 등 진단효율을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

공시바이러스 및 세포주 : PRRS 바이러스 국내 분리주(PL96-1, 96-2)는 모돈의 번식장애와 자돈의 심한 호흡기증상을 보이는 농장에서 순수분리한 바이러스들로서 원숭이 신장유래세포인 MA-104세포에 7대 계대배양한 후 시험에 공시하였으며, 바이러스의 역가는 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml이었다. 미국 분리주 VR-2332는 MA-104세포에 3회 계대배양한 후 사용하였으며, 바이러스의 역가는 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml이었다.

검사혈청 : 전국적으로 종돈장 및 일반 양돈장으로부터 채취된 돼지 혈청 6,200에 중에서 IFA 검사결과 및 돼지 연령을 고려하여 264점의 혈청을 선발하여 시험에 공시하였다.

간접형광항체법 : 간접형광항체법을 위한 바이러스 접종 plate 제작 및 검사방법은 류 등¹³의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 세포배양용 96-well strip microplate(Costar, USA)에 MA-104세포를 monolayer가 형성될 때까지 배양한 다음, PRRS 바이러스($1\sim 2 \times 10^3$ TCID₅₀/ml)를 well당 100 μ l씩 접종하였다. 접종후 5% CO₂ incubator(37 $^{\circ}$ C)에서 48시간동안 배양한 다음, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 1~2회 세척한 후 100% cold methanol을 첨가하여 10분간 실온에서 고정하였다. 고정이 끝난 plate는 공기건조시킨 다음, -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 사용하였다. 검사할 돼지 혈청은 56 $^{\circ}$ C에 30분간 비동화 처리한 다음, PBS로 1:10 희석하였고, 희석한 혈청 100 μ l를 IFA용 plate의 각 well에 첨가하였다. 양성대조혈청 및 음성대조혈청 역시 100 μ l씩 접종한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 PBS를 well당 300 μ l씩 가하여 3~5회 세척한 다음, 용액을 완전히 제거하고, 적정농도로 희석한 형광표식 2차 항체(FITC-conjugated rabbit IgG fraction to swine IgG, Cappel, USA) 용액을 well당 50 μ l씩 첨가한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS로 세척하고 용액을 완전히 제거한 다음, 형광현미경으로 경검하여 황록색의 PRRS 바이러스 특이형광을 발하는 세포를 관찰하여 결과를 판정하였다.

효소면역법(ELISA) : 미국에서 개발되어 현재 우리나라에 수입, 시판되는 PRRS 항체진단 ELISA kit(HerdCheck PRRS virus antibody test kit, IDEXX, USA)를 사용하였고, 제조회사에서 추천하는 실험방법에 따라 검사를 실시하였다.

결 과

Table 1. Sensitivity of IFA tests using Korean isolates and VR-2332 strain for the detection of antibodies to PRRS virus in swine sera

| Virus strains | No. of positive by dilution of tested serum(n = 20) | | | | | | | |
|-------------------------|---|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-----------|
| | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 40 | 1 : 80 | 1 : 160 | 1 : 320 | 1 : 640 | 1 : 1,280 |
| VR-2332 | 20 | 19 | 15 | 11 | 4 | 1 | - | - |
| Korean isolate (PL96-1) | 20 | 20 | 16 | 13 | 7 | 4 | 2 | - |
| Korean isolate (PL96-2) | 20 | 18 | 15 | 10 | 6 | 2 | - | - |

간접형광항체 plate 제작 및 민감도 조사 : 미국 분리주(VR-2332)와 2종의 국내 분리주(PL96-1, PL96-2)를 각각 MA-104 세포에 감염시킨 후, 감염시간대별로 36시간에서 72시간까지 6시간 간격으로 고정하고, gnotobiotic piglet에 고도 면역시켜 얻어진 PRRSV 양성혈청을 이용하여 간접형광항체반응을 실시하여 결과를 판독, 비교하였다. 미국 분리주 접종 plate는 66시간 및 72시간대에서 가장 좋은 반응을 관찰할 수 있었으나 국내 분리주는 접종후 48시간대에 가장 좋은 반응을 관찰할 수 있었다. 따라서 66시간에 고정된 미국 분리주 접종 plate와 48시간에 고정된 국내 분리주 접종 plate를 대상으로 반응의 민감도를 비교하였다. PRRS 바이러스 항체 양성인 야외 혈청시료 20점을 PBS로 1 : 10으로 희석한 후 다시 2배수 계단희석한 다음, 각 plate에 접종하여 간접형광항체반응을 실시한 결과, 분리주간의 민감도에는 유의차가 인정되지 않았다(Table 1).

간접형광항체법 및 ELISA : 국내 분리주(PL96-1)를 접종하여 제작한 간접형광항체 plate를 이용하여 야외 돼지 혈청에 대하여 PRRS 항체검사를 실시하였고, 항체 양성 및 음성혈청시료를 돼지 일령별로 자돈(30일령 이하), 이유자돈(31~70일령), 육성·비육돈(71~150일령) 및 성돈으로 구분하였다(Table 2). 간접형광항체법으로 PRRS 항체 양성인 돼지 혈청 179점을 대상으로 ELISA를 실시한 결과, 2점을 제외한 177점이 양성을 나타내었고, 간접형광항체법으로 PRRS 항체 음성인 돼지 혈청 85점에 대한 ELISA 시험결과, 음성이 75점, 양성이 10점이었다(Table 2). IFA에 대한 ELISA의 양성일치율(ELISA 양성혈청수/IFA 양성혈청수)은 98.9%(177/179)로 IFA로 양성인 혈청은 ELISA로도 양성을 확인할 수 있었다. 반면에 IFA에 대한 ELISA의 음성일치율(ELISA 음성혈청수/IFA 음성혈청수)은 88.2%(75/85)로 IFA 음성인 혈청시료

중에서 10점이 ELISA로 양성반응을 나타내었다. 전체시료 264점중 양성검출율은 IFA가 67.8%(179/264)이었고, ELISA가 70.8%(187/264)로 나타나 IFA에 비해 ELISA 방법이 양성검출의 민감도가 높음을 확인하였다(Table 2).

Table 2. Comparison of efficiency between ELISA and IFA test for the detection of the antibodies to PRRS virus from swine sera

| Serum source | No. of tested | Positive/Negative | |
|-----------------|---------------|-------------------|--------|
| | | IFA | ELISA |
| Piglet | 32 | 21/11 | 22/10 |
| Nursery | 50 | 31/19 | 29/21 |
| Grower/Finisher | 95 | 63/32 | 68/27 |
| Breeder | 87 | 64/23 | 68/19 |
| Total | 264 | 179/85 | 187/77 |

고 찰

돼지 생식기호흡기증후군으로 인한 생산성 피해를 방지하기 위한 다양한 노력들이 이루어지고 있다. 이미 이 질병에 감염된 양돈장은 예방접종을 실시하여 피해를 줄이거나 조기이유방식, 성장단계별 격리사육방식 등 청정돈 사육기법을 도입 등 질병근절을 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다¹⁴⁻¹⁶. 반면에 비감염 양돈장은 질병의 농장내 유입을 방지하기 위하여 차단방역 및 도입돈 위생관리에 중점을 두고 있다. 그러나 여러 양돈장에서는 돈군에 대한 질병감염상황 파악이나 도입돈에 대한 질병 사전검사 등 기초적인 방역정보가 없이 자돈이나 종돈을 구입, 입식하고 있으며, 이로 인한 질병감염과 그 피해가 심각한 실정이다. PRRS에 대한 효과적인 방

제대책을 세우기 위해서는 정확한 진단과 이를 근거로 한 감염상황의 파악이 우선적으로 이루어져야 하며, 혈청학적 진단은 바이러스의 감염여부 뿐만 아니라 일령별, 돈군별 감염상황을 용이하게 파악할 수 있으므로 매우 유용하게 활용될 수 있다. IFA 방법은 바이러스를 감염시킨 세포를 이용하는 방법으로 실험실 조건이나 야외 감염바이러스의 type에 따라 진단의 민감도 및 특이성에 차이가 있을 수 있다. PRRS 바이러스는 strain간에 변이가 심한 바이러스로 유럽, 미국 및 캐나다에서 분리된 표준주간의 유전적 변이가 인정되며^{17,18}, 같은 지역내의 분리주들 간에도 상당한 변이가 있는 것으로 보고가 되고 있다^{19,20}. 이러한 분리주간의 변이는 진단시에도 작용하여 특정지역에서는 그 지역의 분리주를 이용하여 진단할 때, 다른 strain의 바이러스를 이용하는 것보다 진단의 특이성이나 민감도를 높일 수 있을 것으로 판단된다^{18,21}. 국내에서 분리된 PRRS 바이러스의 유전적 특성에 대한 보고는 거의 없는 실정이지만 미국 및 유럽 분리주에 특이적인 primer를 이용해 PCR 반응을 실시한 결과, 미국 분리주 특이 primer를 사용했을 때 강한 양성반응을 나타냄을 보고한 바 있어²² 국내 분리주의 유전적 특성이 미국 분리주와 비교적 유사한 것으로 보여진다. 국내 분리주 2주(PL96-1, 2)와 미국 분리주를 각각 MA-104 세포에 접종하여 IFA 진단용 plate를 제작한 후 돼지 혈청의 회석배출별로 항체검사를 실시한 결과, 국내 분리주 PL96-1를 이용하였을 때 최소 2배 이상 더 회석하여도 항체검출이 가능하였다(Table 1). 이러한 결과가 바이러스의 변이에 의한 차이인지, 단순한 실험조작상의 차이인지는 유전적 특성의 차이나 변이여부를 밝히기 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

ELISA 방법은 아직 국내에서는 개발된 바가 없고 최근 외국의 개발제품을 수입하여 일부 실험실에서 이용하고 있다. ELISA 방법은 민감도가 높고, 다량의 시료를 용이하게 처리할 수 있는 장점이 있으나 실험실 조건이나 실험자의 기술수준에 따라 검사결과에 오차를 초래할 가능성이 있고, 실제로 ELISA 방법을 이용하고 있는 각 실험실마다 검사결과에 일부 차이가 있음이 알려져 왔다. 야외 양돈장에서 채취한 돼지 혈청 264점을 대상으로 ELISA 및 IFA로 항체검사를 실시한 결과, ELISA는 "양성두수/음성두수"가 187/77이었고, IFA는 179/85이었다(Table 2). 이들 두 시험법간의 진단상의 오차 여부를 확인하기 위하여 두 진단법의 양성 및 음성일치율을 확

인한 결과, 각각 98.9%(177/179) 및 88.2%(75/85)로 나타나 일치도가 비교적 높음을 알 수 있었다.

두 진단법간의 항체 진단결과에 차이가 난 요인을 알아보기 위해 각각의 검사시료를 검토한 결과, IFA로 항체 음성인 시료가 ELISA로 항체 양성으로 나타난 개체는 연령상으로 보아 주로 100일령 이후의 비육돈과 성돈에 속하는 개체들로 항체소실기의 낮은 수준의 항체가 IFA로는 검출이 되지 않으나 민감도가 높은 ELISA 방법으로는 검출이 가능하였던 것으로 판단된다.

결론

PRRS 바이러스의 항체진단법으로 주로 이용되고 있는 IFA와 ELISA 방법의 진단효율을 비교하기 위하여 야외 돼지 혈청을 대상으로 검사를 실시하였다. 우리나라에서 주로 사용되어 왔던 IFA 방법과 더불어 ELISA 방법 역시 PRRS 바이러스의 항체진단을 수행하는데 공히 이용될 수 있을 것으로 판단되며, 이 연구결과는 IFA 또는 ELISA 방법을 이용하여 PRRS 바이러스 항체진단을 수행하는 각 실험실에 참고가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Benfield DA, Collins JE, Jenny AL, Loula TJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Disease of swine 7th edition*, Iowa state university press. 1992.
2. Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Vet Microbiology*, 55: 187-196, 1997.
3. Meulenberg JJM, Hulst MM, de Meur EJ, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome(PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 192:62-72, 1993.
4. Conzelman KK, Visser N, Van Woensel P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of arterivirus group. *Virology*, 193:329-339, 1993.
5. Kwean CH, Kwon BJ, Lee HJ, et al. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)

- in Korea. *Korean J Vet Res*, 34:77-83, 1994.
6. Shin JH, Kang YB, Kim YJ, *et al.* Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. *RDA J Agri Sci*, 35:572-576, 1993.
 7. Morrison RB, Collins JE, Harris L, *et al.* Serologic evidence incriminating a recently isolated virus(ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome(SIRS). *J Vet Diagn Invest*, 4:186-188, 1992.
 8. Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, *et al.* A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*, 6: 289-292, 1994.
 9. Wensvoort G, Terpstra C, Laak EA, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Quart*, 13:121-130, 1991.
 10. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, *et al.* An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*, 4:144-147, 1992.
 11. Albina E, Leforban Y, Baron T, *et al.* An enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Ann Rec Vet*, 23:167-176, 1992.
 12. Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. Comparative study of a blocking enzyme linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol Methods*, 51:125-128, 1995.
 13. Lyoo YS, Park CK, Chang CH. Diagnostic manual for animal diseases. *I-Kong world press*, Seoul, Korea. 1997.
 14. Park CK, Lyoo YS, Choi SH, *et al.* An elimination of microbiological pathogens in the newly established swine herd from contaminated farm by modified medicated early weaning. *Proc 14th IPVS*, p486, 1996.
 15. Christianson WT, Connor JC, Crowe CK, *et al.* Elimination of PRRS virus with isowean. *Proc 13th IPVS*, p68. 1994.
 16. Dee SA, Joo HS. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec*, 135:6-9, 1994.
 17. Wensvoort G, de, Kluyver EP, Luijtze EA, *et al.* Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome(SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest*, 4:134-138, 1992.
 18. Mardassi H, Mounir S, Dea S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 75:681-685, 1994.
 19. Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, *et al.* Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol*, 77:1271-1276, 1996.
 20. Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, *et al.* Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol*, 142:993-1004, 1997.
 21. Drew TW, Meulenberg JJM, Sands JJ, *et al.* Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 76:1361-1369, 1995.
 22. Lee CH, Park CK, Lyoo YS. Demonstration of porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus in boar semen samples from the farm suffered reproductive failures. *Korean J Vet Sci*, 37:27, 1997.