

## Classical Swine Fever Virus gp55 항원에 대한 Muscle Fluid 항체 측정

정재윤, 정병렬<sup>1</sup>, 김봉환\*

경북대학교 수의과대학, <sup>1</sup>국립수의과학검역원

(게재승인: 2003년 5월 23일)

## Detection of Antibodies to Classical Swine Fever Virus gp55 in Muscle Fluid

Jae-yun Jung, Byeong-yeal Jung<sup>1</sup> and Bong-hwan Kim\*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

<sup>1</sup>National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang, Korea

(Accepted: May 23, 2003)

**Abstract:** The objective of the present study was to investigate the use of fluid released from muscle samples as an alternative to serum for ELISA to detect classical swine fever(CSF) virus antibodies in slaughter pigs.

The optimal correspondence between serum 1:20 OD values and muscle fluid OD values was achieved at a muscle fluid dilution of 1:2. Significant correlation was found between serum and neck muscle ELISA ( $r_s=0.880$ ,  $p<0.0001$ ,  $\kappa=0.82$ ; specificity of 97.0% and sensitivity 90.6%). The semimembranous muscle showed similar correlation in CSF ELISA ( $r_s=0.877$ ,  $p<0.0001$ ,  $\kappa=0.75$ ; specificity of 94.1% and sensitivity 89.1%). High correlation was obtained between serum and mesenteric lymph node in the CSF ELISA ( $r_s=0.937$ ,  $p<0.0001$ ,  $\kappa=0.87$ ; specificity of 97.1% and sensitivity 93.0%). Measurement agreement between serum ELISA and muscle fluid ELISA was calculated and expressed as limits of agreement. The correspondence of ELISA of serum and muscle fluid indicated limits of agreement. Above 95% of all muscle fluid values were distributed within this limits of agreement. Among the samples used for ELISA for detecting CSFV antibodies, mesenteric lymph node had the most correlation and agreement with serum ELISA. F-test for comparison of variances showed no significant difference between the serum and muscle fluid.

In conclusion, muscle fluid is a useful postmortem alternative to serum to detect CSFV antibodies.

**Key words:** classical swine fever(CSF), hog cholera(HC), muscle fluid, ELISA

### 서 론

돼지콜레라(Hog Cholera, HC: Classical Swine Fever, CSF)는 *Flaviviridae*과의 *Pestivirus*속으로 분류되는 classical swine fever virus(CSFV)에 의한 전신성 열성 전염병으로 이병율과 폐사율이 매우 높은 OIE List A 질병이다 [23,

27]. 현재 CSF는 미국, 캐나다, 스칸디나비아 제국, 영국, 아일랜드 등 몇몇 EU국가, 호주 및 뉴질랜드, 일본을 제외한 전 세계에서 발생하고 있다 [28]. 국내에서는 1947년 처음 발생보고가 있는 이후 전국적으로 만연하여 양돈산업에 가장 큰 피해를 입히는 전염병이 되었다. 1952년 가토화 약독바이러스 생독백신(ROVAC)의

\*Corresponding author: Bong-hwan Kim  
Kyungpook National University, Daegu, Korea  
Tel: +82-53-950-5972, Fax: +82-53-950-5955, E-mail: bhkim@knu.ac.kr

개발과 1967년 조직 배양순화바이러스 생독백신(LOM vaccine)의 출현으로 돼지 콜레라 발생은 현저히 감소하였으나 최근까지 매년 계속 발생하고 있다 [1, 5].

CSFV는 주로 경구 감염후 편도 내에서 증식한 후 림프관이나 혈류를 통해 림프조직, 뇌 등 모든 조직으로 전이된다. 급성 감염은 발열, 후구마비, 전신성 출혈증상이 특징이고 만성형으로 진행되는 경우에는 보행장애, 성장지연, 백혈구 감소증이 지속적으로 나타난다 [9]. Virus 주의 병원성에 따라 다양한 폐사율을 나타내고 불현성 감염으로 감염원이 되기도 한다.

CSFV 항체 검사법에는 IFA(indirect fluorescent antibody test), END법(exaltation of Newcastle disease virus) [2, 6, 15], FAN(fluorescent antibody neutralization), monoclonal antibody(MCA)를 이용한 NPLA (neutralizing peroxidase linked assay) [17, 24, 29], 교차면역 전기영동법, 한천내 침강반응, 개량 보체결합반응 및 CSFV의 당단백을 이용한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법 [7, 19] 등이 알려져 있다. END법 및 NPLA법은 국내에서 CSFV에 대한 항체를 측정하는 방법으로 이용되고 있으나 [2, 6, 8], 대량의 screening을 할 때 시간이 많이 걸리고 술식이 복잡해서 최근에는 당단백 항원을 이용한 ELISA법 [7]이 널리 이용되고 있다.

ELISA법은 질병의 모니터링과 진단을 위해서 유용하게 활용되고 있다. 특정 돈군내 질병유무, 전파상황, 역학조사, 백신의 접종유무 및 접종시기 판단 등을 할 수 있고 대량의 가검물을 신속하게 처리할 수 있는 장점이 있다. 또한 돈군의 위생관리와 예방 대책을 수립하기 위한 기초 자료로 활용할 수 있다 [16, 28]. 특히 항체 검출은 바이러스 검출을 하지 못한 경우나 임상증상을 나타내지 않는 감염 돈군을 감지하기 위해서 특별한 프로그램의 마지막 단계에서 의심되는 농가에 대한 유용한 진단방법이 될 수 있다 [28]. 혈청을 시료로 이용하는 혈청학적 검사법으로는 도축돈이나 폐사한 돼지 또는 시중에 유통중인 돈육에서 항체검사를 하기는 불가능하다. 이러한 경우 혈청 대신에 다른 시료를 이용한 항체 검사법이 개발되어 이용되고 있다. Toxoplasmosis의 진단을 위해서 돼지 근육조직의 추출물이 Sabin-Feldman dye test에서 사용되었고[12], Salmonellosis에 대한 진단에서 혈청을 대신한 돼지 [20]와 소 [13]의 muscle fluid를 이용하여 감염여부를 진단하는 기법이 개발된 바 있다. Aujeszky's disease virus 항체 감지를 위해 muscle fluid가 사용되었다 [18].

본 실험에서는 ELISA법을 이용해서 CSFV 항체를 측정하는데 muscle fluid가 대체적인 시료로 사용할 수 있는지 알아보고자 도축돈의 혈청과 muscle fluid를 이용한 ELISA법을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료의 채취

2001년 8월부터 2002년 7월까지 대구 및 경북 도축장의 도축돈 110두를 대상으로 혈액과 neck muscle, mesenteric lymph node, semimembranous muscle을 채취한 후 실험실로 운반하였다. 혈액은 4℃에서 하룻밤 정치하여 혈청을 분리하였고, 근육과 장간막 림프절은 Nielsen 등 [20]의 방법에 준하여 -20℃에서 하루동안 냉동시켜 다음날 4℃에서 해동시킨 후 muscle fluid를 얻었다. 혈청과 muscle fluid를 Eppendorf tube에 옮긴 후 -20℃ 냉동고에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

### Muscle fluid titration

Muscle fluid의 적정희석농도를 결정하기 위해서 Nielsen 등 [20, 25]의 방법에 따라 각각 10두의 양성돈과 음성돈에서 유래된 muscle fluid를 dilution buffer로 1:20, 1:10, 1:8, 1:5, 1:2배 희석하여 checkerboard titration하였다. Positive muscle fluid와 negative muscle fluid에 대하여 maximum P/N ratio를 나타내고 20배 희석 혈청 OD 값과 일치하는 희석배수를 희석농도로 결정하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

CSFV 항체검사를 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay kit(ELISA kit: 대성미생물)를 사용하였으며, 제조 회사의 protocol에 따라 검사하였다. 방법을 요약하면 특이 항원(CSFV gp55)이 코팅된 ELISA plate에 1% blocking reagent를 분주해 37℃에서 1시간 반응시킨 후 20배 희석한 검사혈청, 양성 및 음성 대조군을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 37℃에서 1시간 반응시킨 뒤 PBS-Tween 20으로 5회 세척하였다. 여기에 anti-porcine HRP conjugate 100  $\mu$ l를 가하고, 37℃에서 1시간 반응시킨 후 다시 5회 세척한 다음 tetramethylbenzidine(TMB)용액으로 10분간 발색시킨 뒤 hydrofluoric acid 용액으로 발색을 정지시켰다. 405 nm ELISA reader(BIO-rad 550)로 OD치를 측정해서 다음 술식에 의한 S/P ratio가 0.14 이상이면 양성, 0.14 미만이면 음성으로 판독하였다.

$$S/P \text{ ratio} = \frac{(\text{가검혈청의 흡광도}) - (\text{음성대조혈청 흡광도 평균값})}{(\text{양성대조혈청 평균OD값}) - (\text{음성대조혈청 평균OD값})}$$

### Muscle fluid ELISA

Muscle fluid 항체를 조사하기 위해 가검혈청은 1:20

으로 희석하여 사용하였으며, muscle fluid는 maximum positive - negative ratio (P/N max)를 나타내고 혈청 OD 값과 일치하는 희석배수를 결정하여 위와 같은 방법으로 실험하였다.

**Statistical analysis**

본 실험에서 얻은 수치는 SPSS 통계 패키지를 이용하여 분석하였다. 혈청과 muscle fluid ELISA 결과의 상관도를 측정하기 위해서 Spearman 순위 상관계수(Spearman rank correlation coefficient;  $r_s$ )를 이용하였고 양측검정(two-tailed test)으로 유의확률(p-value)을 계산하였다 [13]. 일치도를 평가하기 위해서 limits of agreement [10, 20] 와 Kappa test [4, 13, 22]를 사용하였으며, 각 sample간의 difference(serum OD - muscle fluid OD) 값을 계산하였다. 즉 차이평균(mean difference;  $X_d$ )과 차이의 표준편차(standard deviation of the differences;  $SD_d$ )를 구하였고, limits of agreement(l.a.)는  $X_d \pm 2SD_d$  로 계산하였다. 혈청과 muscle fluid sample들간의 분산을 분석하기 위해서 F-test를 수행하였으며 [20], 유의수준은 5%미만으로 정하였다.

**Specificity and sensitivity**

혈청과 muscle fluid ELISA의 specificity와 sensitivity는 아래의 술식에 따라 측정하였으며 [13], 혈청 ELISA 검사결과를 "gold standard"로 간주하였다.

$$\text{Specificity} = \frac{d}{(b+d)}; \text{Sensitivity} = \frac{a}{(a+c)}$$

- a: 혈청과 muscle fluid 모두 양성
- b: 혈청은 음성, muscle fluid는 양성
- c: 혈청은 양성, muscle fluid는 음성
- d: 혈청과 muscle fluid 모두 음성

**결 과**

**Optimal muscle fluid dilution**

2001년 8월부터 2002년 7월까지 대구 및 경북지방 도축장에서 도축된 돼지 중 각각 10두의 양성개체와 음성개체를 이용하여 실험한 결과는 Fig. 1(백신항체 양성) 및 Fig. 2(백신항체 음성)에 있는 바와 같다. Fig. 1. (백신항체양성)에서 점선으로 나타낸 혈청 ELISA의 평균 OD값인 1.20(S/P ratio: 0.91)과 일치하는 muscle fluid의 희석배수는 1:2였고, Fig. 2. (백신항체음성)에서 혈청

ELISA의 평균 OD값 0.22(S/P ratio: 0.01)와 일치하는 희석배수도 1:2였다. 또한 muscle fluid 1:2 희석배수에서 P/N ratio 값이 neck muscle은 5.09, mesenteric lymph node는 5.23, semimembranous muscle은 4.61로 최대값을 나타내어, 본 실험에서 muscle fluid 희석배수를 1:2로 결정하였다.

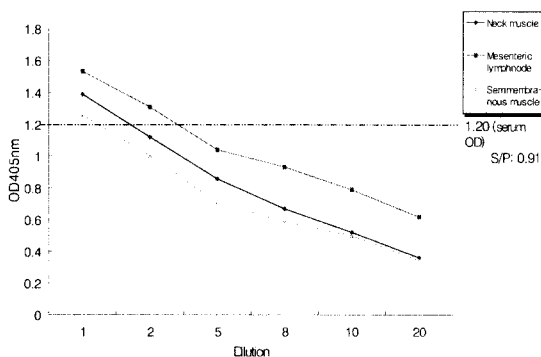


Fig. 1. Optimal dilution of muscle fluid by comparing the ELISA results with CSFV positive serum.

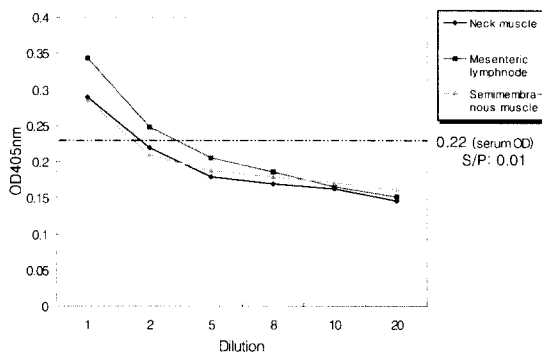


Fig. 2. Optimal dilution of muscle fluid for by comparing the ELISA results with CSFV negative serum.

**혈청과 muscle fluid를 이용한 ELISA 상관도**

Spearman 순위상관계수(Spearman rank correlation coefficient;  $r_s$ )와 양측검정(two-tailed test)으로 유의확률(p-value)을 계산한 결과 유의한 상관관계가 있었다(Table 2).

혈청과 neck muscle ELISA 결과와의 상관계수( $r_s$ )는 0.880 ( $p < 0.0001$ ), semimembranous muscle의 상관계수( $r_s$ )는 0.877 ( $p < 0.0001$ )로 나타났고, 혈청과 mesenteric lymph node ELISA 결과와의 상관계수( $r_s$ )는 0.937( $p < 0.0001$ )을 나타내었다. 혈청과 mesenteric lymph node ELISA 결과가 나머지 두 sample에 비해 더 높은 상관관계가 있음을

알 수 있었다(Table 2).

**Table 2.** Spearman rank correlation coefficient( $r_s$ ) and level of significance in serum and muscle fluid

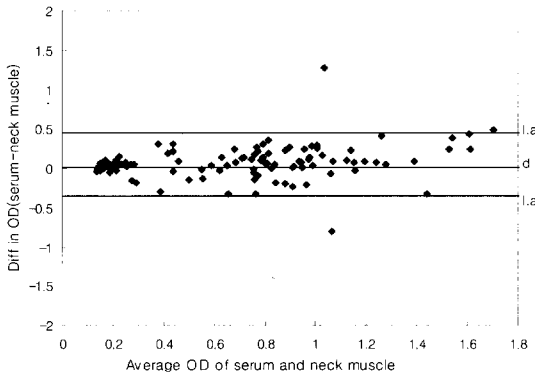
	Neck muscle	Mesenteric lymph node	Semimembranous muscle
$r_s$	0.880*	0.937**	0.877*
p	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

\* correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

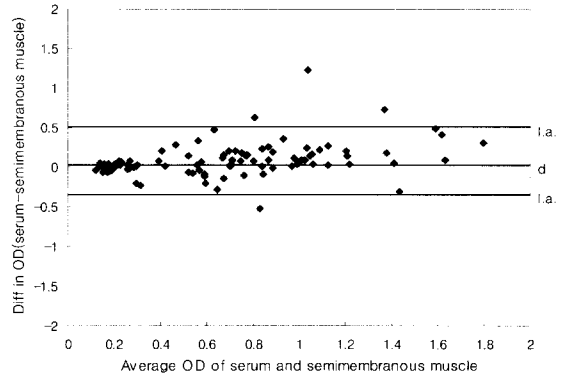
\*\* correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Limits of agreement**

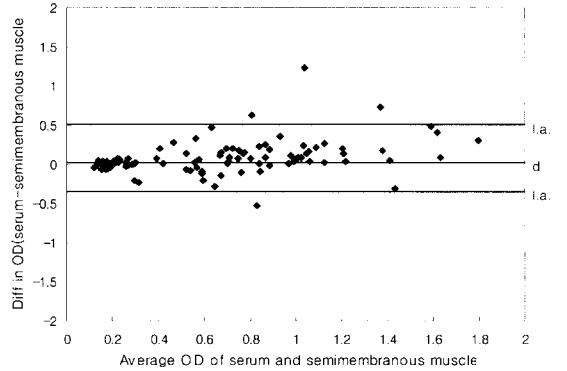
혈청과 muscle fluid sample들을 비교하기 위해서 혈청과 muscle fluid ELISA 결과들의 평균(average OD of serum and muscle fluid)에 대해서 혈청과 muscle fluid의 차이(Difference of serum OD - muscle fluid OD)에 대응하는 곳에 점을 찍어서 나타내었다. 그리고 차이의 평균(d)과 limits of agreement(l.a.)를 표시하였다. HCV의 항체 검출을 위해 혈청과 muscle fluid를 이용한 ELISA 결과들 사이에서의 일치도는 높았다. Neck muscle로 ELISA 실험을 한 결과 109두 중 106두(97.2%), mesenteric lymph node는 106두 중 104두(98.1%), semimembranous muscle은 99두 중 95두(95.9%)가 limits of agreement 범위 안에 분포하였다. (Fig. 3~5). 그러나 neck muscle, mesenteric lymph node, semimembranous muscle 사이에서의 일치도는 약간의 차이를 나타내었다(Table 3).



**Fig. 3.** Individual sample comparison of serum and neck muscle.



**Fig. 4.** Individual sample comparison of serum and mesenteric lymphnode.



**Fig. 5.** Individual sample comparison of serum and semimembranous muscle.

**Table 3.** Mean of OD(serum) - OD(muscle fluid) (d), standard deviation of differences (SD), limits of agreements (l.a.) in mesenteric lymph node and muscle fluid

Sample	No	d	SD	l.a.
Neck muscle	109	0.07	0.2	-0.33 to 0.47
Mesenteric lymph node	106	-0.11	0.16	-0.43 to 0.21
Semimembranous muscle	99	0.1	0.22	-0.34 to 0.54

각 muscle fluid의 차이의 표준편차(standard deviation of differences)와 limits of agreement 값은 Table 3에 있는 바와 같다. Mesenteric lymph node에서 차이의 표준편차가 가장 적었고, limits of agreement 범위는 가장 좁게 나타났다.

## 분산분석

혈청과 각 muscle fluid sample들간의 OD값에 대한 분산을 분석하기 위해서 F-test를 수행한 결과 혈청, neck muscle, mesenteric lymph node 및 semimembranous muscle 각각의 관계에서 유의한 차이를 보였다(Table 4). F값은 sample간 평균을 sample내 평균으로 나눈 비율로 5.378이고 p값이 0.001로 유의수준 5%내에서 유의한 차이를 나타내어, 각 sample간의 평균 OD값이 모두 같지 않았다. 이는 각 sample들간에 차이를 보이는 집단이 적어도 하나 이상이 있다는 것을 나타내 주는 것인데, 어떤 sample들간에 유의한 차이를 보이는지를 확인하기 위해서 Post Hoc Test(사후검정)를 실시한 결과는 Table 5에 있는 바와 같다. 혈청에 대한 neck muscle, mesenteric lymph node, semimembranous muscle의 유의확률(p-value)은 각각 0.669, 0.241, 0.200으로써 유의수준 0.05에서 차이가 없다고 할 수 있었다. 그러나 muscle fluid내 neck muscle과 mesenteric lymph node에서 유의확률은 0.015를 보였고, mesenteric lymph node와 semimembranous muscle 사이에서의 유의확률은 0.001을 나타내어 이들 두 muscle fluid 집단간에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

**Table 4.** Comparison of OD value in serum, mesenteric lymph node and muscle fluid with ELISA

Sample	No.	Mean $\pm$ S.D.	F (p)
Serum	110	0.7 $\pm$ 0.45	5.378 (0.001)
Neck muscle	109	0.6 $\pm$ 0.40	
Mesenteric lymph node	106	0.8 $\pm$ 0.50	
Semimembranous muscle	99	0.5 $\pm$ 0.39	

## Specificity, sensitivity와 Kappa test

CSFV의 백신항체 검출에 혈청을 이용한 ELISA법의 cut-off value와 비교해서 specificity, sensitivity와 Cohen's kappa( $\kappa$ )통계량을 구한 성적은 Table 6에 있는 바와 같다.

위의 결과들을 종합해보면 CSFV 항체 검사에서 muscle fluid를 이용한 ELISA결과의 상관관계와 일치도 모두 높았다. 이같이 ELISA법을 이용한 CSFV 항체검사에 혈청을 대체해서 muscle fluid가 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

돼지콜레라(Hog cholera; Classical swine fever)는 CSFV에 의한 급성 전염병으로 이병율과 폐사율이 매우 높은

**Table 5.** Post Hoc multiple comparisons in serum, mesenteric lymph node and muscle fluid

Sample (A)	(B)	Difference of mean (A - B)	p
Serum	neck muscle	0.066	0.669
	mesenteric lymph node	-0.110	0.241
	semimembranous muscle	0.120	0.200
Neck muscle	serum	-0.066	0.669
	mesenteric lymph node	-0.177*	0.015
	semimembranous muscle	0.051	0.825
Mesenteric lymph node	serum	0.110	0.241
	neck muscle	0.180*	0.015
	semimembranous muscle	0.230*	0.001
Semimembranous muscle	serum	-0.120	0.200
	neck muscle	-0.051	0.825
	mesenteric lymph node	-0.230*	0.001

\* The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Table 6.** Comparative detection of CSFV antibodies in serum, mesenteric lymph node and muscle fluid with ELISA

Sample	Serum		Specificity (%)	Sensitivity (%)	$\kappa$
	+	-			
Neck muscle	68	1	97.0	90.6	0.82
	7	33			
Mesenteric lymphnode	66	1	97.1	93.0	0.87
	5	34			
Semimembranous muscle	56	2	94.1	89.1	0.75
	9	32			

질병이다. 전 세계적으로 발생하며 국내에서 1947년에 처음 발생이 보고된 이후 계속 발생하여 양돈산업에 가장 큰 문제가 되는 질병이다. 돼지콜레라는 대부분의 경우, 접촉감염에 의해 전염되고 만성감염의 경우 폐사할 때까지 지속적으로 바이러스를 배출하며 양돈농가에 경제적으로 큰 손실을 초래해 [11, 14, 26] OIE (Office International des Epizooties; 국제수역사무국)에서 List A 질병으로 지정하고 이 병이 발생하고 있는 나라의 돼지, 돈육 및 돈육제품은 비 발생국가로 수출할 수 없도록 “국제동물위생규약”으로 규정하고 있다 [3, 21]. 최근 일본이 이 병의 박멸을 목표로 실질적인 방역 대책을 수립, 추진하고 있어 대일 수출에 적지 않은 타격이 예

상되어서, 우리 나라에서도 돼지콜레라 근절 사업이 국가적 차원에서 1997년부터 시행되고 있다. 그간의 성과로 1999년 8월 경기도에서 5건 발생한 이후 발생이 종식되어 2001년 12월 1일부터 돼지콜레라 백신접종 중단과 함께 청정화를 선포하였었다. 불행하게도 2002년 4월 강원도 철원에서 돼지콜레라가 발생하였으며, 최근에는 강화도와 김포에서 돼지콜레라가 발생하여 비상이 걸린 상태이다.

일본 등에서는 돼지콜레라 백신을 접종하지 않은 돼지의 돈육만을 수입함으로 돈육에서 돼지콜레라 항체가 검출되면 불합격처리 될 뿐 아니라 여러 문제가 수반되므로, 돈육으로부터 CSFV 항체를 검출할 수 있는 기법의 확립이 필요하게 되었다. 따라서 본 실험에서는 ELISA법으로 CSFV의 항체를 측정하는데 muscle fluid가 혈청을 대체할 수 있는지 조사하였다.

우선 10두 개체를 사용해서 muscle fluid의 희석배수 결정을 위한 실험결과 1:20으로 희석한 혈청 OD값은 muscle fluid를 1:2로 희석하였을 때 일치하고 P/N ratio 값이 최대를 나타내어, 이 배수를 희석 농도로 정하였다. 혈청 ELISA 결과를 "gold standard"로 정해서 CSFV 항체를 검출하는데 muscle fluid ELISA 검사의 상관관계와 일치도가 높았다. 몇몇 개체의 mesenteric lymph node, muscle fluid 양이 부족해 항체검사에 이용할 수 없어서, 이들 sample은 실험에서 제외하였다.

혈청과 muscle fluid ELISA 결과들과의 상관도를 Spearman rank correlation coefficient( $r_s$ )와 양측검정으로 유의확률(p-value)을 나타내었다. 혈청과 neck muscle ELISA ( $r_s=0.880$ ,  $P<0.0001$ ), 혈청과 semimembranous muscle ELISA ( $r_s=0.877$ ,  $P<0.0001$ )결과와 혈청과 mesenteric lymph node ELISA ( $r_s=0.937$ ,  $P<0.0001$ ) 각각의 결과들에서 높은 상관관계가 있었다. 혈청과 muscle fluid ELISA 결과 사이의 일치도를 limits of agreement로 검증한 바, 모든 muscle fluid sample이 이 범위 안에 95%이상 분포하였다. 그 중에서 mesenteric lymph node는 106두 중 104두로 98%가 limits of agreement 범위 안에 분포하여 일치도가 가장 높게 나타났다. 혈청과 각 muscle fluid 세 sample들간의 분산을 분석하기 위해서 F-test를 수행한 결과 혈청과 muscle fluid 각각의 관계에는 유의수준 0.05에서 유의한 차이를 나타내었다. 그러나 사후검사 결과 혈청에 대한 muscle fluid들과의 유의한 차이는 없다고 할 수 있었고, muscle fluid내의 neck muscle과 mesenteric lymph node, mesenteric lymph node와 semimembranous muscle 간에는 유의한 차이가 있다고 할 수 있었다. 이는 시료를 채취하는 과정에서 부위별로 오염된 정도가 다르고 근육에서 나온 muscle fluid의 양이 부위

별로 달라서 차이를 보이는 것으로 추정되는데, 앞으로 오염을 최소화하는 시료채취 방법의 정립과 이에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 각 muscle fluid의 specificity, sensitivity, kappa value를 비교한 바 mesenteric lymph node를 사용한 ELISA 결과가 neck muscle이나 semimembranous muscle 결과치 보다 specificity (97.1%), sensitivity (93.0%)와 kappa value 값이 0.87로 가장 높게 나타났다. 반면 semimembranous muscle을 이용한 ELISA 결과는 specificity (94.1%), sensitivity(89.1%)와 kappa value 값이 0.75로 가장 낮게 나타났다. Salmonella muscle fluid ELISA [20]에서 specificity는 0.91-1.0, sensitivity는 0.80-0.89, Aujesky's disease에서 muscle fluid를 이용한 ELISA의 specificity와 sensitivity는 각각 98.3%, 93.2%이었다 [18]. 본 실험과 이들 성적을 비교하면 Salmonella muscle fluid ELISA의 sensitivity 보다 조금 높았고 Aujesky's disease muscle fluid ELISA 결과와 비슷한 specificity와 sensitivity를 보였다. 이는 검사방법 차이이거나 상품화된 ELISA kit 차이 및 그 외 다른 요인이라 생각되므로 이에 대한 연구가 좀더 이루어져야 할 것으로 보인다.

앞의 결과들을 종합해 보면 CSFV 항체검출에 muscle fluid ELISA의 상관관계와 일치도가 높게 나타나 muscle fluid가 혈청에 대체될 수 있음을 확인할 수 있었고, mesenteric lymph node를 이용한 결과의 상관관계와 일치도가 가장 높게 나타났다. 따라서 muscle fluid는 수출·입 돈육은 물론 사후 도체검사에서 HCV 항체 검출에 유용하게 이용될 수 있으리라 판단된다. 그러나 mesenteric lymph node가 HCV의 항체검출에서 가장 적합한 sample 부위라고 결론을 내는 것은 무리일 수 있다. 다양한 지역과 더 많은 개체에서 유래하는 혈청, muscle fluid sample들이 실험되어야 할 것으로 보인다.

Muscle fluid는 혈청, 림프액 및 유리된 세포 내액의 혼합물로 구성되며 혈청의 생리적 희석액으로 간주될 수 있다 [20]. 그러나 구성성분의 명확한 생화학적 특성이 밝혀지지 않아 생화학적, 면역학적 연구들이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 다른 질병에서의 혈청학적 진단으로 muscle fluid의 대체 가능성 등 그 잠재성을 더 조사해야 할 것으로 사료된다.

이상의 실험으로 ELISA법을 이용한 돼지콜레라 항체검사에 muscle fluid가 대체될 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 결 론

종돈과 일반 도축돈을 대상으로 ELISA법으로 CSFV 항체가를 측정하는데 muscle fluid가 혈청을 대신하여

사용할 수 있는지를 확인하고자 실험을 실시하였다.

ELISA법으로 도축돈의 CSFV 항체를 검사하는데 muscle fluid를 사용해 실험한 결과, 적정 희석 배수는 1:2였다. 각 sample의 상관관계와 정확도를 비교한 바 혈청과 neck muscle ELISA 간에 유의한 상관관계( $r_s=0.880$ ,  $p<0.0001$ )가 인정되었으며 sensitivity는 90.6%, specificity는 97.0%,  $\kappa$  value가 0.82를 나타내었다. 혈청과 semimembranous muscle 사이의 결과도 유의한 상관관계( $r_s=0.877$ ,  $p<0.0001$ )를 나타내었으며 specificity는 94.1%, sensitivity는 89.1%,  $\kappa$  value가 0.75로 측정되었다. 혈청과 mesenteric lymph node 사이의 결과에서는 두 sample 보다 높은 상관관계( $r_s=0.937$ ,  $p<0.0001$ )가 있었고 specificity는 97.1%, sensitivity는 93%,  $\kappa$  value가 0.87로 측정되었다. ELISA법으로 CSFV의 항체를 조사하는데 muscle fluid를 이용한 결과의 일치도를 측정하기 위해서 limits of agreement를 적용한 바, 모든 muscle fluid sample이 이 범위 안에 95%이상 분포하였다. ELISA법으로 CSFV의 항체검출에 mesenteric lymph node를 사용한 결과의 상관관계와 일치도가 가장 높게 나왔다.

이상의 결과와 같이, ELISA법으로 CSFV 항체를 측정하는데 muscle fluid가 혈청을 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. 권혁진, 강병직, 문재봉, 김선중. 조직 배양순화 돼지 콜레라 병독(LOM850) 점종돈의 항체소장에 대하여. 가축위생연구소보. 1968, **14**, 53-57.
2. 권혁진, 윤석민, 하용공. END법을 이용한 돼지콜레라 바이러스 및 이에 대한 중화항체가 측정법 개량에 대한 시험. 대한수의사회지. 1991, **12**, 725-728.
3. 김봉환, 조광현, 박노찬, 권현일. 대구근교에서 1996년에 발생한 돼지 콜레라의 역학적 특성. 대한수의사회지. 1997, **33(9)**, 544-553.
4. 박선일, 한홍율. 수의 임상역학 및 통계. 한길아카데미. 1999.
5. 유영진, 강병직, 오화택, 박동권. 조직배양에서의 가토화 돈콜레라 병독의 증식과 증식병독의 면역에 관한 연구. 농사시험연구소보. 1963, **6(3)**, 73-76.
6. 이종복, 김병한, 안수환, 송재영. 돼지콜레라에 대한 연구. 2. 단클론성 항체를 이용한 돼지콜레라 진단. 농시논문집(가축위생편). 1989, **31(4)**, 35-40.
7. 이동규. 돼지콜레라 바이러스의 외피당단백질을 추출 정제하는 방법. 특허 공보. 1990, **2871**, 71-76.
8. 전윤성, 예재길, 서익수. '83 돈콜레라 유행시의 면

역모돈과 자돈의 END혈청중화항체가 조사. 대한수의학회지. 1985, **25(1)**, 69-75.

9. 최원필, 송희중, 김순제. 수의전염병학. 경북대학교 출판부. 1997, 213-216.
10. Bland, J. M. and Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet., 1986, **1(8476)**, 307-310.
11. Edwards, S., Fukusho, A., Lefevre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehle, P. and Westergaard, J. Classical swine fever the global situation. Vet. Microbiol. 2000, **73(2-3)**, 103-119.
12. Hagiwara, T. and Katsube, Y. Detection of toxoplasma infection in pork by Sabin-Feldmans dye test with meat extract. Jpn. J. Vet. Sci. 1981, **43**, 763-765.
13. Hoorfar, J., Wedderkopp, A. and Lind, P. Detection of antibodies to salmonella lipopolysaccharide in muscle fluid from cattle. Am. J. Vet Res. 1997, **58(4)**, 334-337.
14. Harkness, J. W. Classical swine fever and its diagnosis: A current view. Vet. Rec. 1985, **116(11)**, 288-293.
15. Kumagai, T. New *in vitro* method(END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture I. Establishment of standard procedure. J. Immunol. 1961, **81**, 245-256.
16. Kim, B. H. and Joo, H. S. Elimination of respiratory pathogens in endemically infected swine herds by nursery depopulation. Korean J. Vet. Res. 1997, **37(4)**, 755-763.
17. Lai, S. S. and Ho, W. H. Application of monoclonal antibody on dot immunoassay for the detection of hog cholera viral antigens and antibodies. J. Chinese. Soc. Vet. Sci. 1989, **15**, 19-25.
18. Le Potier, M. F., Fournier, A., Houdayer, C., Hutet, E., Auvigne, V., Hery, D., Sanaa, M. and Toma B. Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. Vet. Rec. 1998, **143**, 385-387.
19. Moser, C., Ruggli, N. and Tratschin, J. D. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. Vet. Microbiol. 1996, **51**, 41-53.
20. Nielsen, B., Ekeroth, L., Bager, F. and Lind, P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of salmonella infection in slaughter pig herds. J. Vet. Diagn. Invest. 1998, **10**, 158-163.

21. OIE: Hog cholera(classical swine fever). In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2nd ed. 1992, 109-122.
22. Siegel, S. and Castellan, N. J. Nonparametric statistics, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co, New York, 1988.
23. Terpstra, C. Hog Cholera: An update of present knowledge. Br. Vet. J. 1991, **147**, 397-406.
24. Terpstra, C., Bloemraad, M. and Gielkens, A. L. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. Vet. Microbiol. 1984, **9**, 113-129.
25. Trottier, Y. L., Wright, P. F. and Lariviere, S. Optimization and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. J. Clin. Microbiol. 1992, **30**, 46-53.
26. Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W. and Barlough, J. E. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th ed. Comstock. 1988, 729-740.
27. Volker, M. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. Vet. Microbiol. 2000, **78**, 93-102.
28. Van Oirschott, J. T. Hog Cholera. In: Diseases of Swine 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 159-172.
29. Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Vet. Microbiol. 1987, **12**, 101-108.