

세망내피증 바이러스 항체검출을 위한 ELISA 표준화

성환우* · 이수정

강원대학교 수의학과

(게재승인: 2005년 11월 23일)

Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to avian reticuloendotheliosis virus

Haan Woo Sung*, Su Jeong Lee

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Accepted: November 23, 2005)

Abstract : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to reticuloendotheliosis virus (REV) at single serum dilution was standardized. REV HI, one of the Korean field isolates, was inoculated into chicken embryo fibroblast (CEF) cells and was harvested from the culture fluids and cells after 10 to 12 days. Viruses were purified by centrifugation at the 107,000×g for 12 hours on 20, 30, 45% (W/V) sucrose gradient. Virus specific fraction was collected and used as ELISA antigen. To standardize ELISA, the optimal concentration of coating antigen (1 µg/well) and conjugate (1/1000) was determined by corrected OD (OD value of positive serum-OD value of negative serum) and P/N ratio (OD value of positive serum/OD value of negative serum). To calculate ELISA titer by measuring absorbance at 1/400 single serum dilution, serum titrations were carried out for various sample sera together with standard positive and negative sera. The observed titers of serum samples were plotted against sample/positive (s/p) ratios at 1/400 serum dilution. From the above data, the ELISA titers could be calculated by the equation of \log_{10} ELISA titer = 2.2763 (\log_{10} s/p) + 3.482 ($r = 0.93$). For evaluating the sensitivity, the standardized method were compared with conventional agar gel immunodiffusion (AGID) test method using serum samples collected from REV infected field chicken flocks. Fifty seven of 60 samples (95%) were positive for REV by ELISA, whereas only 11 (18.3%) samples were positive by AGID test. This results suggested that the ELISA tests developed in this study could be used for detection of antibodies to REV with high sensitivity.

Key words : detection of antibody, ELISA, reticuloendotheliosis virus

서 론

세망내피증(reticuloendotheliosis; RE)은 RE virus (REV)의 감염으로 칠면조, 닭, 오리, 거위 등에서 주로 발생한다 [2-3, 13, 16].

닭에서의 세망내피증은 선위염, 깃털의 이상, 증체율의 저하 및 면역능력의 저하가 나타나는 runting disease syndrome [5-6, 11, 14]이 나타나기도 하며 마렝병 증양이나 백혈병 증양과 유사한 만성증양이 발생되기도 한

다 [17, 19, 20-21]. 또한 REV에 감염된 닭들은 면역능력의 저하로 말미암아 전염성후두기관염, 계두, 콕시듐증 및 살모넬라 감염증 등의 다른 질병 감염에 대한 저항성이 크게 감소하며 [8-10] 마렝병이나 뉴캐슬병 등에 대한 백신 면역이 저하되는 것으로 보고되고 있다 [19, 22].

국내에서의 RE 발생은 흥선과 F낭 등의 면역 장기가 위축되고 괴저성 피부염 등으로 지속적인 폐사가 있는 계군으로부터 REV가 분리되어 발생이 확인된 바 있으

*Corresponding author: Haan Woo Sung

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[Tel: +82-33-250-8680, Fax: +82-33-244-2367, E-mail: sunghw@kangwon.ac.kr]

며 항체검사 결과 조사 계군의 34% 정도가 감염되어 있는 것으로 알려져 있다 [1].

REV 감염확인은 항체조사 및 항원검출로서 가능하다. REV에 대한 항체검사는 바이러스 증화시험이나, 간접형광항체법, 한천겔침강법 및 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 반응 등이 이용되고 있다 [4, 12, 15, 19].

본 실험은 국내 분리주를 이용하여 단일 혈청회색배수에서의 ELISA 항체 검출법을 개발하고자 시험하였다.

재료 및 방법

바이러스 및 혈청

ELISA용 항원제조에 사용한 REV는 국내분리주 REV-HI [1]를 사용하였다.

실험에 사용한 REV 양성 및 음성혈청은 SPAFAS (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 야외 계군 혈청은 REV에 감염된 계군에서 채취한 혈청을 사용하였다.

항원제조

ELISA용 항원은 국내분리주 REV-HI를 계태아섬유아세포(chicken embryo fibroblast; CEF)에서 배양하여 제조하였다. 즉, 단층세포가 형성된 CEF 세포에 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml 용량의 바이러스를 첨가할 유지배지의 1/10 양으로 접종하여 1시간 흡착시킨 다음 유지배지를 첨가하여 배양하였다. 배양후 4-5일째 2차 배양(subculture)하여 다음날 유지배지로 교환시킨 후 5-6일간 배양한 다음 배지와 세포를 채취하였다. 채취한 세포와 배양액을 3회 동결 용해한 다음 4,500×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 채취하였다. 채취한 상층액을 48,000×g (XL-90 ultracentrifuge Type 19 rotor; Beckman, USA)에서 4시간 원심분리하여 바이러스를 침전시킨 후 원액의 1/100양이 되도록 TNE buffer (100 mM NaCl, 10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)로 재부유시켰다. 재부유된 바이러스를 20%, 30%, 45%(w/w)의 discontinuous sucrose gradient에 올려 107,000×g (XL-90 ultracentrifuge SW 41 Ti rotor; Beckman, USA)에서 12시간 원심분리하여 30%와 45% sucrose 사이에 형성된 층을 수거하여 적당량의 PBS로 희석한 다음 90,000×g에서 2시간(SW 41 Ti rotor; Beckman, USA)동안 원심분리하여 침전된 바이러스를 TNE buffer에 풀어준 다음 항원으로 사용하였다. 항원의 단백질량은 Lowry 등 [7]의 방법으로 측정하였다.

ELISA

1) 항원 흡착(coating)

정제한 항원을 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M

Na₂HCO₃, 0.1 M NaHCO₃, pH 9.6)에 희석하여 96well의 polystyrene microplate(Nunc, USA)에 well당 100 μl 씩 분주하고 4°C에서 12시간 이상 정치하여 항원을 흡착시켰다.

항원의 흡착 조건 비교시험에 있어서는 pH가 9.6과 13.0인 흡착용 희석용액을 비교하였고 비교시험을 제외한 모든 시험에서는 pH 9.6의 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer를 흡착용 희석액으로 하였다. 흡착이 끝난 plate는 4°C에 보관하면서 사용하였다.

2) ELISA 과정

항원을 흡착시킨 plate는 사용전 세척용 PBS로 3회 세척한 뒤 3% BSA(Sigma, USA)를 넣은 PBS를 well당 100 μl 씩 분주하여 실온에서 90분간 반응하였다.

검사 혈청을 1% BSA가 첨가된 희석용 PBS로 1/50부터 2진희석하여 적정 희석농도를 결정하였다. 비교시험 이외의 모든 실험은 희석용 PBS에 혈청을 1/400로 희석하였고 well당 100 μl 씩 분주하여 실온에서 45분 반응시킨후 세척용 PBS로 3회 세척하였다. 세척후 Horseradish Peroxidase conjugated goat anti-chicken Immunoglobulin(KPL, USA)을 1,000배 희석하여 well당 100 μl 씩 넣고 실온에서 45분간 반응시키고 3회 세척하였다.

세척 후 ABTS(2,2-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate); KPL, USA) peroxidase substrate를 well당 100 μl 씩 분주하여 실온에서 5분간 반응시켰다.

반응이 끝난 후 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 well당 50 μl 씩 분주하여 반응을 정지시켰으며 결과는 micro ELISA reader(Dynatech, USA)를 이용하여 410 nm에서 흡광도(optical density: OD) 값을 측정하였다.

양성 및 음성 혈청의 OD값에 대한 수정 OD(corrected OD) 값은 양성혈청 OD 값에서 음성혈청 OD 값을 뺀 값으로 하였으며 P/N ratio는 양성 혈청 OD 값을 음성 혈청 OD 값으로 나눈 값으로 하였다.

또한 단일혈청 희석배수 항체가 측정은 혈청을 1/400로 희석하여 ELISA 방법에 따라 실시하였으며 internal reference positive(IRP) 혈청에 대한 시료의 OD비 즉, sample/positive(s/p)비는 다음 술식에 의거 계산하였다.

$$S/P = \frac{\text{sample serum OD} - \text{Negative serum OD}}{\text{IRP serum OD} - \text{Negative serum OD}}$$

한천겔 면역확산법(Agar-gel immunodiffusion test)

pH 7.4인 한천겔 배지(barbital sodium 6.98 g, Barium chloride(Anhydrous) 6.0 g, pH 7.4)에 purified agar 10 g,

NaCl 74 g, sodium azide 1 g을 넣고 열을 가해 완전히 녹인후 겔판을 만들고 직경이 2 mm인 구멍을 뚫어 중앙엔 항원을 그리고 나머지는 검사혈청을 넣었다. 이때 반드시 한 구멍엔 양성 혈청을 함께 넣었으며 한천 겔이 건조되지 않도록 humid chamber에 넣고 실온에서 반응시켰다. 48~72시간 후 결과를 판독하였다.

결 과

REV 흡착항원 적정량

단백농도 1,000 µg/ml의 정제된 REV 항원을 흡착용 용액에 1/10~1/10,240까지 2진 희석하여 microplate well당 100 µl씩 분주하여 4°C에서 12시간 흡착하였다. 양성 및 음성 혈청은 1/50, conjugate는 1/1,000로 희석하여 ELISA를 실시하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 양성혈청의 OD는 항원희석배수 1/10~1/40까지는 항원농도(단백농도 10 µg~2.5 µg/well)에 관계없이 높은값(1.86~1.96)을 보였으며 1/80부터는 항원농도가 감소함에 따라 OD도 감소하였다. 음성혈청의 OD는 항원희석 1/10~1/40에서 0.25~0.26으로 양성혈청에 비해 현저히 낮았으며 항원농도에 비례하여 점차 감소하였다. 양성혈청과 음성혈청의 OD비(P/N ratio)는 항원희석 1/10~1/160에서는 7.5~7.3으로 별 차이가 없었으며 1/320부터는 항원희석배수에 따라 현저히 감소하였다. 이상의 결과에서 수정 OD값 및 P/N ratio를 고려해 볼 때 ELISA 항원 흡착시 정제 항원량은 well당 630 ng까지 가능하였다. 따라서 이후의 모든 실험에서는 정제 항원량을 10 µg/ml로 희석하여 well당 100 µl씩(REV 정제항원 1,000 ng/well) 흡착하였다.

항원 흡착 조건 비교시험에서 흡착용 용액을 pH 9.6과 13.0을 비교하였을 때 pH 9.6의 용액이 pH 13.0보다 수정 OD 값이 훨씬 높았으며 P/N ratio도 항원희석 1/5~1/160(단백농도 200 µg/ml~6.3 µg/ml)에서 pH 9.6은 6.3~5.5로 pH 13.0일 때 3.8~3.6 보다 높았다. 따라서 pH 9.6 carbonate-bicarbonate buffer가 항원 coating buffer로 적합한 것으로 판단되었다.

Horseradish peroxidase(HRP) conjugated goat anti-chicken immunoglobulin의 적정희석배수

HRP conjugated goat anti-chicken immunoglobulin의 ELISA 검사시 적정희석 농도를 알기위해 1/125~1/16,000까지 2진희석하여 반응시켰다. 이때 혈청희석은 1/50로 하였고 well당 항원 흡착량은 1,000 ng이었다. Fig. 2에서 보는바와 같이 양성혈청의 OD는 가장 낮은 희석배수인 1/125에서 1.89로 가장 높았으나 P/N ratio는 conjugate 희석배수 1/1,000에서 6.2로 가장 높았기에 conjugate 희석배수를 1/1,000로 결정하였다.

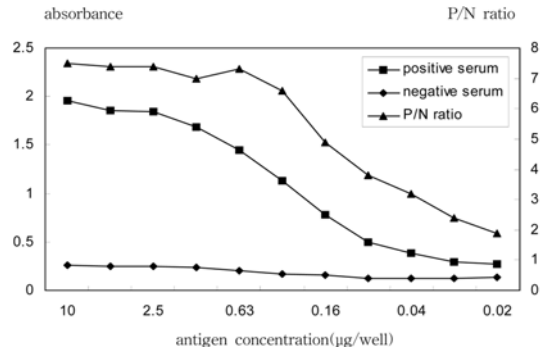


Fig. 1. Determination of optimal antigen concentration. Dilution of serum and conjugate were respectively 1 : 50 and 1 : 1,000.

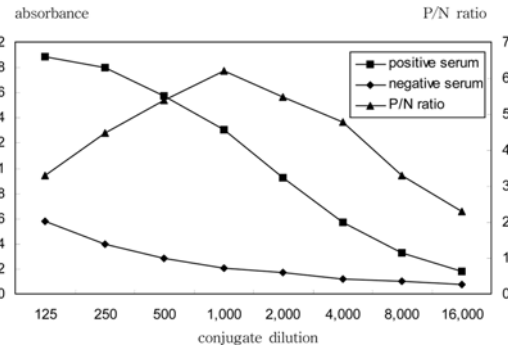


Fig. 2. Titration of conjugate. Antigen concentration was 1 µg/well and serum dilution was 1 : 50.

Positive-negative threshold(PNT) baseline

PNT baseline을 결정하기 위하여 REV 표준 음성혈청을 1/25부터 1/51,200까지 2진희석하여 7회 반복측정하였다. 반복된 역가측정시 음성혈청의 각 희석도별 OD 값들에 대한 평균값과 표준편차를 구하고 이들 표준편차 값들의 평균에 3배한 값인 0.17로 결정되었다. Observed titer는 혈청의 수정 OD값이 PNT baseline과 교차하는 지점의 혈청희석배수로 하였다.

혈청 적정 희석배수 결정

REV의 면역혈청 또는 야외혈청을 1/25부터 2진희석하여 ELISA역가를 측정하였다. Fig. 3은 그중 ELISA역가가 높은것과 중간정도인것 그리고 낮은것의 혈청희석에 따른 수정 OD값을 나타낸 것이다. 혈청희석배수 1/100 이하 또는 1/1,600 이상에서는 수정 OD값이 직선범위에 속하지 않는 것으로 나타나 이들 범위에서는 측정 단일 희석배수로 결정하기에는 부적합한 것으로 판단되

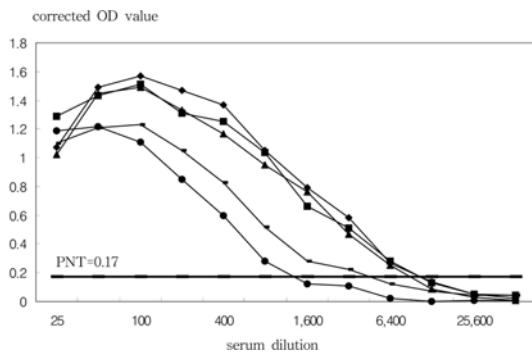


Fig. 3. Relationship between serum dilution and corrected OD values of antisera with high and low titer.

었다. 비교적 직선범위에 포함되는 혈청희석배수중 희석의 편리성 등을 고려하여 1/400을 적정 희석배수로 결정하였다.

단일 혈청희석배수에서의 ELISA역가 측정

혈청희석배수 1/400에서 observed titer가 조사된 18개의 혈청을 양성혈청의 역가에 대한 상대 역가로 변환하여 양성혈청의 수정 OD값에 대한 시료혈청의 수정 OD 비 즉, S/P ratio를 구하고(Table 1)이 S/P ratio와 측정 역가와의 관계식을 구한 결과 $\log \text{ELISA titer} = 2.2763 \log \text{s/p} + 3.482$ ($r = 0.93$)이었다.

한천겔 면역확산법과의 항체 검출을 비교

감염된 계군 60수의 혈청을 한천겔 면역확산법과 ELISA법으로 항체를 검사한 결과 한천겔 면역확산법으로는 60수중 11수(18.3%)가 양성으로 검출되었으나

Table 2. Sensitivity of ELISA for detection of antibody against REV

flock (weeks)	Agar-gel immuno diffusion test	ELISA
A (10)	2/20	17/20
B (30)	5/20	20/20
C (40)	4/20	20/20
total	11/60(18.3)*	57/60 (95)

* number of positive/number tested (%)

ELISA법으로는 57수(95%)가 양성으로 검출되어 ELISA 검사법이 보다 민감한 것으로 추정되었다(Table 2).

고 찰

높은 민감도와 대량검사의 편리성 때문에 많은 연구자들에 의해 ELISA를 이용한 항체 검출법들이 개발되어 왔다(2, 18, 19). 세망내피증에 대한 ELISA 항체 검사법은 Smith와 Witter [15]에 의해 보고되었고 whole cell antigen을 이용한 방법도 [12] 보고된 바 있으나 whole cell antigen을 이용한 방법은 비특이 반응이 나타나는 단점이 있다. Smith와 Witter [15]의 방법과 유사하게 정제된 항원을 사용한 본 실험에서는 항원 흡착 단백질은 well당 630 ng까지 가능하여 이들의 보고와 유사하였다.

본 실험 결과 항원 흡착 단백질 농도 결정에 있어서 양성혈청의 OD값 및 P/N ratio는 항원 단백질 농도가 well당 630 ng까지 거의 변동이 없는 것으로 나타났고 항원이 630 ng 이상일 경우에도 well에 흡착되는 양은 거의 비슷하였다. 이는 항원이 630 ng 이상일 경우에는 well 단위 면적당 흡착되는 양은 동일하기 때문으로 판

Table 1. Relationships between sample/positive ratios at 1/400 serum dilution and observed ELISA titers

serum No.	observed ELISA titer (log 10)	log s/p at 1/400 serum dilution	serum No.	observed ELISA titer (log 10)	log s/p at 1/400 serum dilution
1	4.05	0.202	11	3.47	0.017
2	3.97	0.133	12	3.92	0.166
3	3.36	-0.015	13	3.24	0.015
4	4.00	0.16	14	3.69	0.153
5	3.10	-0.016	15	3.26	-0.027
6	4.14	0.218	16	3.18	-0.229
7	3.92	0.229	17	3.95	0.254
8	3.31	-0.03	18	2.70	-0.354
9	3.74	0.170			
10	3.53	0.059			

단된다.

세망내피증은 야외에서 발생시 증상 등이 다양하여 진단을 위해서는 바이러스 검사 및 항체검사가 필요하다. Smith와 Witter(15)는 ELISA법을 한천겔 면역확산법보다 민감도가 높은 바이러스 중화시험법과 비교한 결과 ELISA법은 중화시험법과 거의 동등한 정도의 민감도가 있는 것으로 보고한 바 있다. 한천겔 면역확산법은 결과 판독까지 적어도 48시간이상의 시간이 소요되지만 ELISA 검사는 4시간 전후가 소요된다. 따라서 이 실험을 통하여 개발된 ELISA 검사법을 야외 감염체의 혈청검사에 이용할 경우 민감도가 높으면서 신속한 검사가 가능한 장점이 있을 것으로 기대된다.

결 론

세망내피증 바이러스 항체를 검출하기 위한 ELISA법을 개발하기 위하여 시험한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 세망내피증 바이러스에 대한 항체검사용 ELISA 항원의 흡착 단백질량은 microplate well당 630 ng까지 가능하였다.
2. Well당 1 µg의 정제항원을 흡착 시킨 후 단일 혈청 희석배수 1/400에서의 ELISA 항체가는 $\log \text{ELISA titer} = 2.2763(\log S/P) + 3.482(r = 0.93)$ 의 식으로 계산 가능하였다.
3. 감염된 계군의 60수 혈청을 한천겔 면역 확산법 및 ELISA법으로 항체를 검출한 결과 한천겔 면역 확산법으로는 60수중 11수(18.3%)가 양성으로 검출되었으나 ELISA법으로는 57수(95%)가 양성으로 검출되어 검출율이 높았다.

참고문헌

1. 성환우, 김선중, 김재홍, 송창선, 모인필, 김기석. 닭 세망내피증의 국내 발생. 농업논문집 1996, **38**, 707-715.
2. Bagust TJ, Grimes TM, Dennett DP. Infection studies on a reticuloendotheliosis virus contaminant of a commercial Marek's disease vaccine. Aust Vet J 1979, **55**, 153-157.
3. Dren CN, Nemeth I, Sari I, Ratz F, Glavitz R, Somogyi P. Isolation of a reticuloendotheliosis-like virus from naturally occurring lymphoreticular tumors of domestic goose. Avian Pathol 1988, **17**, 259-277.
4. Ianculescu M. Reticuloendotheliosis antigen for the agar gel precipitation test. Avian Pathol 1977, **6**, 259-261.

5. Jackson CAW, Dunn SE, Smith DI, Gilchrist PT, MacQueen PA. Proventriculitis, "Nakanuke", and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys(HVT). Aust Vet J 1977, **53**, 457-458.
6. Kawamura H, Wakabayashi T, Yamaguchi S, Taniguchi T, Takayanagi N, Sato S, Sekiya S, Horiuchi T. Inoculation experiment of Marek's disease vaccine contaminated with a reticuloendotheliosis virus. Natl Inst Anim Health Q(Tokyo) 1976, **16**, 135-140.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, **193**, 265-275.
8. Motha MXJ. Effects of reticuloendotheliosis virus on the response of chickens to infectious laryngotracheitis virus. Avian Pathol 1982, **11**, 475-486.
9. Motha MXJ, Egerton JR. Effect of reticuloendotheliosis virus on the response of chickens to Salmonella typhimurium infection. Res Vet Sci 1983, **34**, 188-192.
10. Motha MXJ, Egerton JR. Outbreak of atypical fowl pox in chickens with persistent reticuloendotheliosis viraemia. Avian Pathol 1987, **16**, 177-182.
11. Mussman HC, Twiehaus MJ. Pathogenesis of reticuloendotheliosis virus disease in chicks-an acute runting syndrome. Avian Dis 1971, **15**, 483-502.
12. Nicholas RAJ, Thornton DH. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to avian reticuloendotheliosis virus using whole cell antigen. Res Vet Sci 1987, **43**, 403-404.
13. Robinson FR, Twiehaus MJ. Isolation of the avian reticuloendothelial virus (strain T). Avian Dis 1974, **18**, 287-288.
14. Scofield VL, Bose HR. Depression of mitogen response in spleen cells from reticuloendotheliosis virus-infected chickens and their suppressive effect on normal lymphocyte response. J Immunol 1978, **120**, 1321-1325.
15. Smith EJ, Witter RL. Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis 1983, **27**, 225-234.
16. Witter RL, Peterson IL, Smith EJ, Johnson DC. Serological evidence in commercial chicken and turkey flocks of infection with reticuloendotheliosis virus. Avian Dis 1983, **26**, 753-762.
17. Witter RL, Crittenden LB. Lymphomas resembling lymphoid leukosis in chickens inoculated with reticulo-

- dotheliosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1979, **23**, 673-678.
18. **Witter RL, Lee LF, Bacon LD, Smith EJ.** Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with reticuloendotheliosis virus. *Infect Immun* 1979, **26**, 90-98.
 19. **Witter RL, Purchase HG, Burgoyne GH.** Peripheral nerve lesions similar to those of Marek's disease in chickens inoculated with reticuloendotheliosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1970, **45**, 567-577.
 20. **Witter RL, Sharma JM, Fadly AM.** Nonbursal lymphomas induced by nondefective reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol* 1986, **15**, 467-486.
 21. **Witter RL, Smith EJ, Crittenden LB.** Tolerance, viral shedding, and neoplasia in chickens infected with non-defective reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis* 1981, **25**, 374-394.
 22. **Yoshida I, Sakata M, Fujita K, Noguchi T, Yuasa N.** Modification of low virulent Newcastle disease virus infection in chickens infected with reticuloendotheliosis virus. *Natl Inst Anim Health Q(Tokyo)* 1981, **21**, 1-6.