

Detection of Infectious Bursal Disease Virus by Double Antibody Sandwich ELISA

Woo-Jin Jeon¹, Byung-Sik Chang², Mi-Ja Park¹, Eun-Kyoung Lee¹, Hoo-Don Joo²,
Jun-Hun Kwon¹ and Kang-Seuk Choi^{1*}

¹National Veterinary Research Institute, National Veterinary Research and Quarantine Service Anyang, Gyeonggi, Republic of Korea; ²JenoBiotech Inc, Chuncheon, Gangwon, Republic of Korea

Received : June 16, 2008

Revised : August 25, 2008

Accepted : September 1, 2008

Infectious bursal disease virus (IBDV) is responsible for a highly contagious disease of poultry causing severe immunosuppression in chickens. A double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) was developed to detect IBDV from clinical samples. Two kinds of anti-IBDV antibodies, monoclonal antibody R63 and chicken anti-IBDV sera, were used for DAS-ELISA. Detection limit of IBDV by DAS-ELISA was approximately $10^{2.7}$ EID₅₀/ml. The DAS-ELISA detected IBDV from most (13/14) of vaccine products including mild, intermediate and intermediate-plus types. The DAS-ELISA also detected IBDV from all (19/19) of field Korean isolates including very virulent and intermediate-plus phenotypes. Our results indicate that the DAS-ELISA would provide useful diagnostic tool to detect IBDV from clinical samples as well as rapid quantitative detection of IBDV.

Key Words: Antigen detection, Diagnosis, ELISA, Infectious bursal disease

서 론

닭전염성F낭병 (infectious bursal disease, IBD)은 전염성과 치사율이 높은 닭의 급성 전염병으로 infectious bursal disease virus (IBDV)가 원인체이다. IBDV에 감염된 닭은 F낭내 B 임파구가 급속히 파괴됨으로써 심한 면역 억제를 초래되고 그로 인하여 타 질병에 대한 감수성이 증가되고 예방백신에 대한 면역반응 저하를 유발하게 한다. 또한, 3주령 내지 6주령의 어린 연령의 닭은 IBDV에 대한 감수성이 매우 높아, 이 연령의 계군에 발생할 경우 spike 형태의 폐사가 수일간에 걸쳐 집중적으로 일어나는 특징을 가지고 있다 (23).

IBDV는 분류학적으로 *Birnaviridae*의 *Avibirnavirus*에 속하며, genome은 이중나선으로 된 두 개의 RNA segments (segment A와 segment B)를 가지고 있다 (6). Segment A는 두 개의 open reading frames (ORFs)을 함유하고 있으며, 이중 ORF1은 VP2 (outer capsid), VP3 (inner capsid) 및 VP4 (protease)를, ORF2는 VP5 단백질 (nonstructural protein)을 발현한다. 이중 VP2 및 VP3는 IBDV capsid를 구성하는 주요 단백질이다 (3,8). 특히, VP2는 주요 숙주 방어단백질로서 바이러스 중화항체를 유발하는 epitopes를 가지고 있다 (4). Segment B는 RNA-dependent RNA polymerase 활성을 가진 VP1 단백질을 발현한다 (22).

IBDV는 두 가지의 serotype (serotype 1 및 serotype 2)이 존재한다 (16). Serotype 1은 닭에서 병원성을 나타내지만, 칠면조에서 주로 분리되는 serotype 2는 닭에서 병원성을 나타내지 않는다 (11). Serotype 1은 닭에서의 병원성 및 항원적 특성에 따라 mild, intermediate, intermediate plus, classical virulent, antigenic variant, very virulent phenotype으로 분류하고 있다 (23). 이중 mild, intermediate, inter-

*Corresponding author: Kang-Seuk Choi, DVM, MS, PhD. National Veterinary Research Institute, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Gyeonggi, 430-824, Republic of Korea. Phone: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814 e-mail: choiks@nvrqs.go.kr

**This work was supported by a grant (M-AD15-2007-07-01) from National Veterinary Research & Quarantine Service.

mediate plus에 속하는 IBDV strains들은 병원성이 약하여 닭에 감염이 되더라도 폐사를 거의 유발하지 않아 백신 strain으로 많이 활용되고 있다 (23). Classical virulent phenotype의 경우 30%에서 60%까지 폐사를 유발할 수 있으며, very virulent phenotype의 경우 70%에서 100%의 폐사를 유발할 수 있다 (5,24). Antigenic variant phenotype의 경우 닭에서의 폐사는 거의 없으나, F양의 심한 위축을 유발하는 특징을 가지고 있다 (2,17). 분자생물학적 기법이 발달함에 따라 IBDV의 VP2 단백질 유전자 염기서열 비교 분석과 계통분석학적 기법 (phylogenetic analysis)으로 IBDV strain의 phenotype을 분류하고 있다 (7,12,23).

국내의 경우 1980년에 classical IBDV의 발생이 처음 보고되었으며 (1), 1992년 9주령 산란계에서 병원성이 증가된 very virulent IBDV의 발생이 확인되었다 (15). 그 이후 국내 백신접종정책 실시에도 불구하고 야외에서 IBD 발생이 지속적으로 발생하여 양계산업에 피해를 주고 있는 실정이다. 그러므로, IBDV에 의한 질병 피해 최소화는 예방백신 접종뿐만 아니라 철저한 차단방역 그리고 신속 진단 등을 통하여 질병발생의 오염원과의 접촉을 조기에 차단하는 시키는 것이 중요하다.

현재 IBD의 진단은 임상증상, 발생피해, 백신접종 내역 등을 종합적으로 고려하여 IBD로 의심되는 경우 감염 닭에서 항원 검출 및 바이러스 분리 동정에 의해 이루어진다. IBD 진단을 위해 적용되고 있는 항원 검출방법으로는 한천겔침강반응법 (agar gel immunoprecipitation, AGP)과 역전사 중합효소연쇄반응법 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 등이 있다.

최근 15종의 H형 조류인플루엔자바이러스 (H1-H15)를 동시에 신속 검출하기 위한 방법으로서 두 가지 종류의 항체를 이용한 double antibody sandwich (DAS)-ELISA가 보고된 바 있다 (26). IBDV의 경우 classical, antigenic variant, very virulent IBDV를 감별 분석하기 위한 목적으로 protein A와 항-IBDV 단클론 항체를 이용한 antigen capture (AC)-ELISA가 적용되고 있다 (7,9,18,21,23).

본 연구에서는 IBDV serotype 1 특이 단클론 항체 R63 (19,20)와 항-IBDV 닭 면역혈청을 이용한 DAS-ELISA 방법을 개발하였으며, 개발된 DAS-ELISA를 이용하여 IBDV의 검출 민감도와 특이도를 조사하고, IBDV의 정량적 검출과 야외 의심사례에서 IBD 신속 진단에의 적용가능 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

본 연구를 위하여 사용한 공시 IBDV는 very virulent (VV) type IBDV 국내분리주 12주, intermediate plus(I+) type 국내분리주 7주 등 field strain 19주, intermediate (I) type D78 백신 strain 1종 이었다. 이들 공시 IBDV들은 모두 국립수의과학검역원에서 보유중인 IBDV strain들로서, 국내에서 분리된 IBDV field strain에 대한 구체적인 정보는 Table 1에서 보는 바와 같다. 이들 바이러스는 RT-PCR에 의한 IBDV 특이 유전자 검출, IBDV VP2 단백질 유전자 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석에 근거하여 IBDV로 동정되었다. 국내분리주 15주는 바이러스를 증식시킨 발육계란의 chorioallantoic membrane (CAM)을 유제 (homogenization)하여 사용하였으며, 국내분리주 4주는 감염 닭의 조직 (F낭 또는 맹장편도)을 유제한 상태로 실험에 사용하였다. 모든 바이러스 시료는 실험에 사용할 때까지 -70℃에 냉동 보관하였다. 이중 IBDV D78 strain은 DAS-ELISA 양성 항원으로, 정상 SPF (specific pathogen free) 발육계란의 CAM 유제액을 음성 항원으로 각각 사용하였다. 또한, 국내 시판중인 IBDV 생독백신제품 15종 (intermediate-plus type 백신 5종, intermediate type 백신 6종, mild type 백신 4종)을 백신 회사들로부터 확보하여 본 연구에서 사용하였다. 이들 백신들은 백신 바이러스를 증식시킨 발육계란 CAM 유제액으로 제조되었다. 대조 바이러스로서 국립수의과학검역원에서 보유하고 있는 Newcastle disease virus (NDV) La Sota strain, infectious bronchitis virus (IBV) M41 strain, 그리고 avian influenza virus (AIV) H9N2 MS91 strain을 사용하였다. 또한, 대조 음성 검사 시료 5점 (NS1-NS5)은 IBDV에 감염된 적이 없는 5건의 닭 병성감정 의뢰 조직 시료를 상기와 동일한 방법으로 발육계란내 접종하여 얻은 CAM 유제액이었다.

IBDV의 감염량 (embryo infectivity dose 50%, EID₅₀)은 바이러스를 계단 희석하여 SPF 발육계란내 접종시 50% 감염율을 보이는 희석배수의 역수로 측정하였다.

2. 단클론 항체

본 연구에 사용된 단클론 항체 R63은 미국 American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 융합세포주를 구입하여 사용하였다. 단클론 항체를 대

Table 1. Field IBDV strains used for evaluation of DAS-ELISA

Virus Sample	IBDV Strain	Phenotype ^a	History			
			Region	Year	Breed ^b	Passage ^c
VV1	SH92	VV	Chungnam	1992	L	CE5
VV2	07D29	VV	Chungnam	2007	B	CE1
VV3	06Q44	VV	Chungbuk	2006	B	CE2
VV4	06D62	VV	Gangwon	2006	B	CE1
VV5	05Q66	VV	Chungnam	2005	B	CE2
VV6	07D4	VV	Chungbuk	2007	B	CE1
VV7	05D99	VV	Gyeonggi	2005	KNB	CE2
VV8	07D6	VV	Jeonbuk	2007	B	CE1
VV9	05D62	VV	Jeonnam	2005	B	CE2
VV10	04Q10	VV	Jeonnam	2004	B	BF
VV11	03099	VV	Gyeonggi	2003	B	CE2
VV12	07D11	VV	Gyeonggi	2007	B	CE1
IP1	03243	I+	Jeonnam	2003	B	CE2
IP2	07D24	I+	Chungbuk	2007	B	BF
IP3	05D110	I+	Chungnam	2005	L	CE2
IP4	05D58	I+	Chungbuk	2005	B	CE1
IP5	05D42	I+	Jeonbuk	2005	B	BF
IP6	03244	I+	Jeonbuk	2003	B	CE2
IP7	05D21	I+	Gyeonggi	2005	B	CT

^a VV, very virulent; I+, intermediate plus. The phenotype was determined by phylogenetic analysis based on the VP2 protein gene of IBDV.

^b B, broiler; L, layer; KNB, Korean native boiler

^c CE, chicken embryo (passage no.); BF, bursa of Fabricius; CT, cecal tonsil

량으로 생산하기 위하여, pristane (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 미리 감작시킨 Balb/c 마우스에 융합세포주 세포 (약 10^7 cells/mouse)를 복강내 주입하여 복강내 종양 형성과 복수액 (ascitic fluid) 생성을 유도하였다. 접종 후 7일에서 14일 사이에 복강내 생성된 복수액을 무균적으로 수확하였다. 수확된 복수액은 Affi-Gel Protein A (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단클론 항체를 정제하였다. 정제된 단클론 항체는 실험에 사용하기 전에 BCATM protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다.

3. 항-IBDV 면역 닭 혈청 제작

항-IBDV 면역 닭 혈청은 IBDV에 대한 항체가 부재한 SPF 닭을 면역하여 제작하였다. 60일령 SPF 닭 6수에 IBD 시판백신 (Bur706)을 수당 2 doses를 점안으로 2주간격으로 2회 반복 접종한 다음 마지막 접종 35일 후에

채혈하였다. 각 면역 개체로부터 혈청 6점을 IBD 항체 검출용 ELISA 키트 (IDEXX, Portland, ME, USA)로 항체 수준을 측정함으로써 고도면역 면역혈청을 선별하였다. 선별된 면역혈청은 소분하여 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 냉동 보관하였다.

4. Double antibody sandwich ELISA

IBDV를 검출하기 위한 DAS-ELISA는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 0.01 M PBS 용액으로 희석한 단클론 항체 R63 (최종희석농도 4 µg/ml)을 MaxisorpTM ELISA plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 well당 50 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 부착시켰다. 그 후 세척용 완충용액 (0.002 M PBS, 0.2% tween 20)으로 3회 반복 세척한 후 10% (w/v) 조식유제액을 blocking buffer (0.01 M PBS, 0.02% tween 20, 3% skimmed milk)로 1:5 희석한 항원검사용 시료를 well당 50 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안

반응시켰다. 대조음성으로 SPF 닭 F낭 유제 상층액을, 대조양성으로 IBDV P4주를 감염시킨 SPF 닭의 F낭 유제 상층액을 포함시켰다. 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 항-IBDV 고도면역혈청 (1:1,000 희석)을 well 당 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 horseradish peroxidase (HRP)가 부착된 anti-chicken immunoglobulins antibody (100 ng/ml) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)를 well당 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 TMB 용액 (Sigma)을 well당 50 μ l씩 첨가하여 10분간 실온에서 발색시킨 다음, 반응중지용액 (1 M HCl)을 well당 50 μ l씩 첨가하여 발색을 중지시켰다. 흡광도는 ELISA reader (TECAN, Grödig, Austria)를 이용하여 A450 nm에서 측정하였다. DAS-ELISA의 양성 판정 기준치 (cut-off)는 음성 항원 (정상 계태아의 CAM 유제액)의 평균 흡광도의 2.5배를 곱한 값으로 설정하였다.

5. RT-PCR

Genomic viral RNA는 상기의 CAM 유제액으로 제조한 공시 바이러스액으로부터 추출하였으며, 추출방법은 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 제조사의 권장방법을 따랐다. RT-PCR은 one-step RT-PCR kit (Qiagen)을 사용하여 제조사의 권장방법에 따라 실시하였다. RT-PCR은 또한 Jackwood와 Sommer-Wagner (13)가 사용한 RT-PCR 반응 온도와 시간 조건에 따라 실시하였다. RT-PCR을 위한 Jackwood와 Sommer-Wagner (12)가 사용한 PCR primer sequences (forward primer 5'-GCCCAG-AGTCTACACCAT-3', reverse primer 5'-CCCGGATTATGTC-TTTGA-3')를 사용하여 VP2 유전자의 743 bp (position: nt 738~1191)가 증폭되도록 설계되었다. PCR 산물은 1% (w/v) agarose 겔에서 전기영동한 다음 한천겔 영상분석기 (Geldoc XR, Biorad)을 이용하여 743 bps 크기의 핵산 증폭 여부로 판단하였다. 증폭된 핵산의 증폭 정도는 한천겔 영상분석기에 내장된 Quantity One 1-D Analysis Software를 이용하여 겔내 전체 DNA 증폭량 대비 증폭된 핵산의 상대 정량(%)으로 분석하였다. 증폭된 핵산은 direct sequencing을 실시하여 진위 여부를 최종 판단하였다.

결 과

1. DAS-ELISA 조건 확립

본 연구의 DAS-ELISA에 IBDV 항원을 검출하기 위하여 단클론 항체 R63이 coating 항체로, 항-IBDV 닭 면역혈청이 검출항체로 사용되었다. DAS-ELISA의 최적 조건을 설정하기 위하여 항원으로서 IBDV D78주 (발육란 CAM 유제 상층액)를 사용하였다. SPF 계태아의 CAM 유제 상층액을 음성 대조항원으로 사용하였다. Endpoint titration에 의하여 DAS-ELISA의 최적 조건을 조사한 결과 단클론 항체 R63의 농도는 4 μ g/ml, 항-IBDV 닭 면역혈청 (203239)은 1:1000 희석배수로 결정되었다. DAS-ELISA의 양성 판정 기준치 (cut-off)는 음성 대조항원 (정상 계태아의 CAM 유제액)의 평균 흡광도의 2.5배를 곱한 값으로 설정하였다. 본 연구에서 사용한 음성 항원의 평균 흡광도는 0.21이었기 때문에 검사 시료내 IBDV 검출여부 판정을 위한 cut-off치는 흡광도 0.53 (0.21×2.5)로 결정하였다.

2. DAS-ELISA에 의한 IBDV 정량

본 연구에서 개발한 DAS-ELISA에 의한 검사 시료내 함유되어 있는 IBDV의 검출 한계를 조사하였다. 이를 위하여 IBDV D78 strain를 $10^{4.6}$ EID₅₀/ml부터 계단 희석한 다음 그 바이러스 희석액을 사용하여 DAS-ELISA를 실

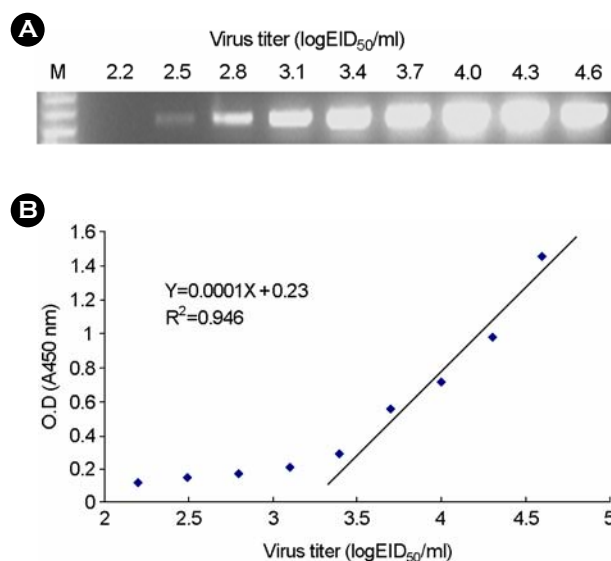


Figure 1. Quantitative titration of IBDV D67 strain by DAS ELISA (B) and comparison with RT-PCR assay (A).

시하고, 동일한 바이러스 희석액으로 RT-PCR법으로 실시한 결과와 비교 조사해 보았다 (Fig. 1). 그 결과 ELISA의 경우 약 $10^{3.4}$ EID₅₀/ml 이상의 바이러스 역가에서 바이러스 역가와 ELISA 흡광도간 높은 상관성을 나타내었다 ($R^2=0.946$). 상기에서 설정한 cut-off 기준치인 흡광도 0.53을 기준으로 하였을 때, IBDV 검출 한도는 5×10^3 EID₅₀/ml 즉, $10^{3.8}$ EID₅₀/ml이었다. 동일 바이러스 시료에 대하여 RT-PCR을 실시한 결과, RT-PCR의 검출 한도는 $10^{2.5}$ EID₅₀/ml이었으며, DAS-ELISA ($10^{3.8}$ EID₅₀/ml)보다 약 16배 ($10^{1.2}$ EID₅₀/ml) 민감하게 바이러스를 검출하였다.

3. DAS-ELISA에 의한 IBDV vaccine strain의 검출

DAS-ELISA를 사용하여 국내 시판중인 intermediate-plus type 백신 5종, intermediate type 백신 6종, mild type 백신 4종 등 총 15종의 IBDV 생독백신제품으로부터 IBDV의 검출 여부를 조사하고 그 결과를 RT-PCR 결과와 비

교하였다 (Fig. 2). 그 결과, 14종의 시판용 IBDV 생독백신제품으로부터 IBDV를 검출할 수 있었으며 (ELISA 흡광도 0.53 이상), IBDV 백신 1종 (mild type 제품 Q)은 ELISA 흡광도가 0.52로 거의 cut-off 수치의 doubtful 판정 수준의 결과를 나타내었다. 그러나, 이들 IBDV 생독백신들은 RT-PCR에서 모두 양성반응을 나타내었다. RT-PCR에 의해 증폭된 각 IBDV 핵산 증폭산물들의 증폭 정도를 상대적으로 비교 평가하기 위하여 DNA량을 상대 정량하여 분석한 결과, 각 증폭산물간에 다양한 수준 (1.4%에서 9.1%)의 핵산 증폭량을 보였다. DAS-ELISA에서 doubtful 수준의 반응성을 나타낸 백신제품 Q는 RT-PCR에서도 매우 약한 반응성 (상대 정량 1.9%)를 보였다. 양성 대조항원 (D78 strain, $10^{4.6}$ EID₅₀/ml)은 DAS-ELISA에서 평균 ELISA 흡광도 3.3의 양성반응을 나타내었다. 대조음성 바이러스로 사용한 NDV (La Sota strain), IBV (M41 strain) 그리고 AIV H9N2 (MS91 strain)는 DAS-

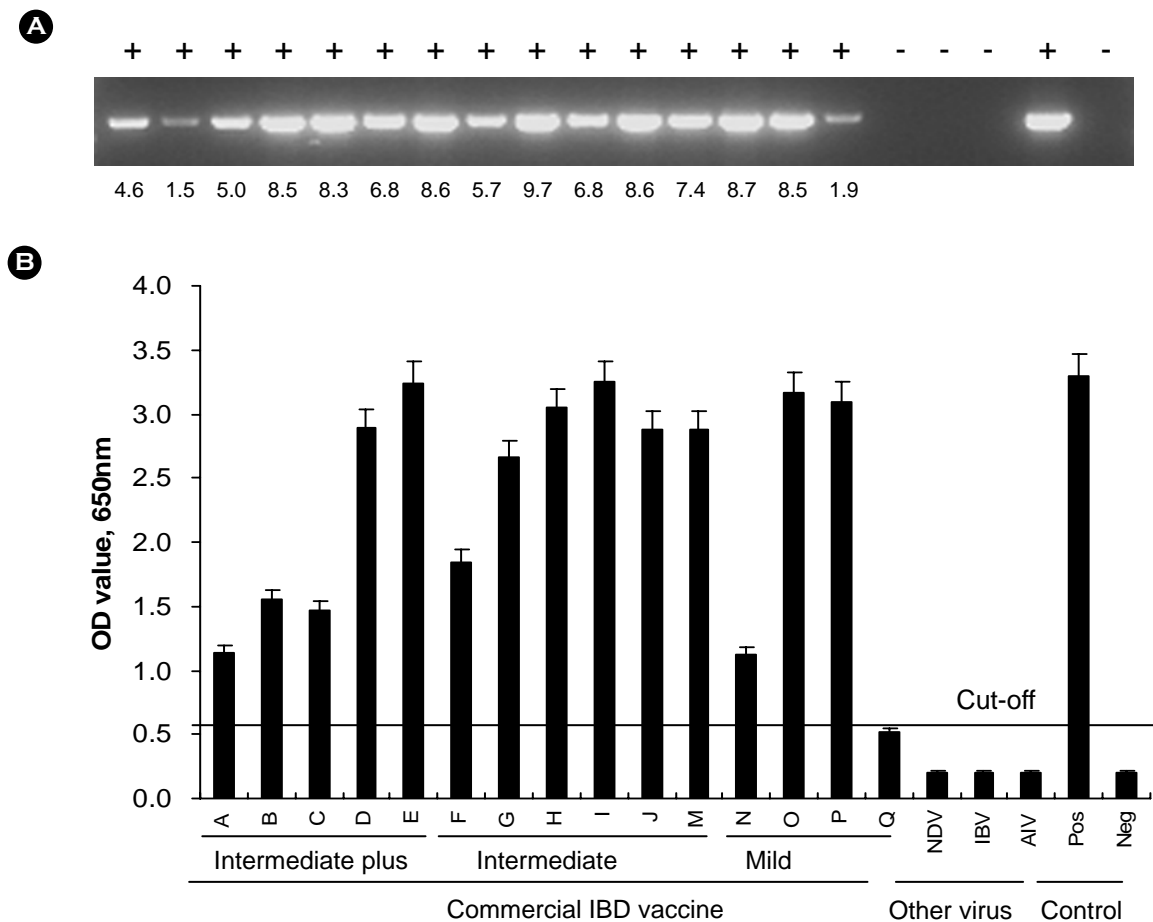


Figure 2. Detection of IBDV in commercial IBDV vaccines by DAS-ELISA (B) and comparison with results of RT-PCR (A). Data in the RT-PCR (A) represents relative quantity percent of each amplified DNA to total DNA amplified in the gel.

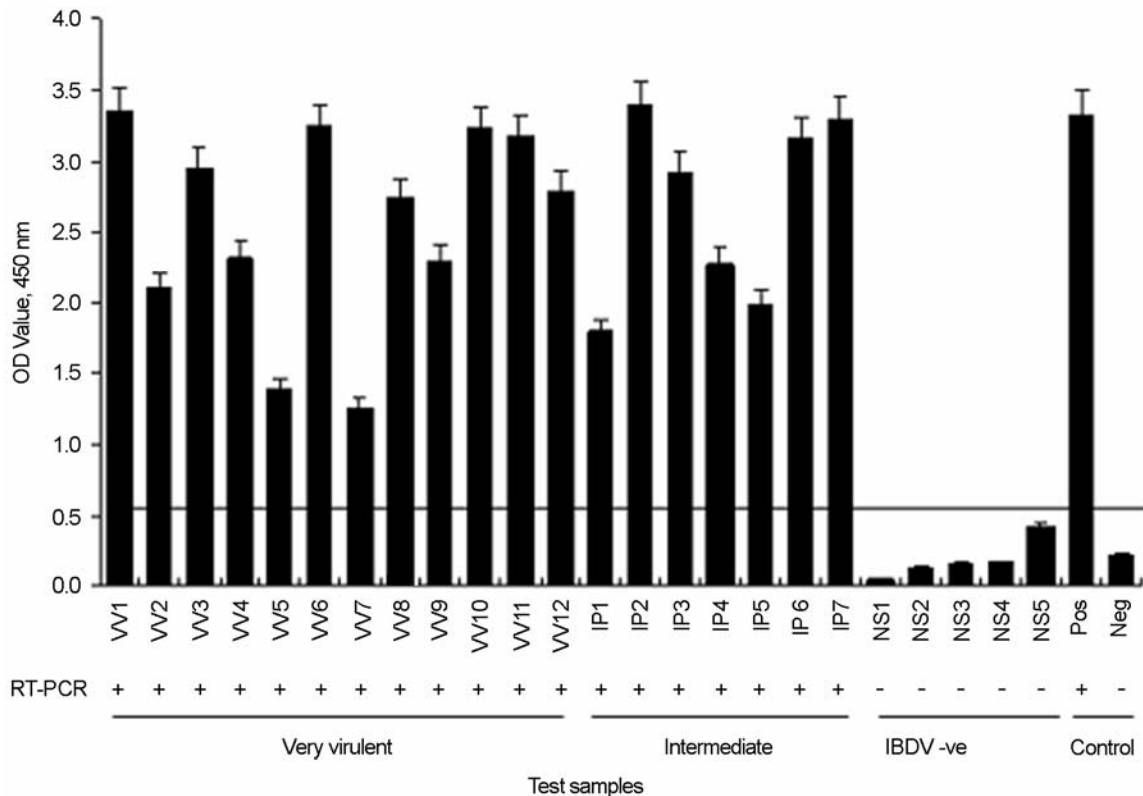


Figure 3. Detection of field isolates of IBDV by DAS-ELISA. Line (OD 0.53 at 450 nm) represents cut-off.

ELISA와 RT-PCR 검사 결과 모두 음성이었다.

4. DAS-ELISA에 의한 IBDV 국내분리주의 검출

본 연구에서 개발한 DAS-ELISA가 IBDV 국내분리주를 검출할 수 있는지 여부를 조사하고, 그 결과를 RT-PCR법과 비교하였다. DAS-ELISA 검사 결과, very virulent type 분리주 12, intermediate-plus type 분리주 7주 등 총 19종의 IBDV 국내분리주 모두 양성반응 (흡광도 0.53 이상)을 보였으며, 1.3에서 3.4의 ELISA 흡광도를 보였다. 한편, 대조로 사용된 5개의 IBDV 음성시료는 모두 DAS-ELISA에서 음성반응을 나타내었다.

고 찰

IBD 진단을 위한 바이러스 검사방법은 현재 IBDV 항체부재 발육계란에 의심시료를 접종하여 바이러스 증식 여부를 검사하여 최종 판정하고 있다 (23) 그러나, 바이러스 분리검사 방법은 검사 비용과 수 일 간의 검사 기간이 소요되는 문제점이 있다. 그러한 연유로, 민감도와

특이도가 높고 단시간에 검사 결과를 판단할 수 있는 장점을 가지고 있는 RT-PCR이나 real-time RT-PCR법이 IBDV 진단의 대체 진단법으로서 많이 활용되고 있다. 유전자 진단법은 분자생물학적 전문지식과 관련 검사 장비를 구비한 연구실에서는 매우 효율적이거나 그렇지 않은 일반 실험실에서 적용하기에는 한계점을 가지고 있다. 그러므로, 현재 많은 병성감정 실시기관에서는 검사 비용이 저렴하고 간편하게 사용할 수 있는 한천겔 침강반응법 (AGP)으로 IBDV 항원검사를 실시하고 있는 실정이나 수 일 이상의 검사시간과 낮은 민감도가 단점으로 지적되고 있다.

현재 신속 대량검사에 적합한 항원 검출방법으로서 AC (antigen capture)-ELISA가 개발된 바 있다. 이 방법은 ELISA plate상에 protein A를 coating한 다음, 다양한 종류의 IBDV 단클론 항체를 부착시킨 후 첨가한 IBDV strains과의 반응성을 측정하여 IBDV의 phenotype을 감별하는 연구에 주로 적용되어 왔다 (7,9,18,21,23). 이와 반대로, 본 연구에서는 모든 IBDV strains에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 ELISA plates에 직접 coating한 다

음 검사 시료내 IBDV 존재 여부를 검출하여 감염 닭의 IBDV 감염 여부를 판정하는 진단 목적으로 개발하였다. 그러므로 본 연구의 DAS-ELISA는 기존의 개발된 ELISA에 비해 반응단계를 한 단계 줄이고, 검사 시료내 IBDV 검출 여부 판정만으로 단순화시킴으로서 대량 신속검사에 적합하도록 하였다. 본 연구에서 개발한 DAS-ELISA는 고도의 전문기술이 필요 없이 수 시간 이내에 일반 실험실에서도 검사 결과를 판정할 수 있도록 하였고, 본 연구의 DAS-ELISA가 민감도 또한 높기 때문에 상지에서 언급한 기존 항원 검사방법을 대체하는 방법으로 사용될 것으로 판단된다.

본 연구에서는 발육계란의 CAM을 유제하여 증식한 바이러스 시료를 대상으로 주로 평가하였으나, 실제 병성감정에 적용될 수 있는 감염 닭의 F낭 조직 등 시료에서도 성공적으로 IBDV를 검출할 수 있었다. 그러므로, 본 연구의 DAS-ELISA는 IBDV 특이 단클론 항체를 검사 시료내 IBDV를 포획하기 위한 항체로 사용하였기 때문에 실제 감염 닭의 F낭 조직 등에 존재하는 IBDV 검출하는 데 있어서 비특이적 반응 또는 반응저해 요소 등에 의한 영향을 미미할 것으로 판단된다. 이것은 단클론 항체로 IBDV를 포획하는 AC-ELISA에서도 F낭 조직 유제액에서 성공적으로 IBDV가 검출되었다는 점이 이를 뒷받침한다 (20). 본 연구에서 적용한 DAS-ELISA는 시료내 IBDV의 검출 한계가 $10^{3.7}$ EID₅₀/ml였다. 실험적으로 감염시켰을 때 감염 닭의 F낭 조직내 최소한 $10^{5.0}$ EID₅₀/ml 이상의 IBDV가 분포하고 있음 (3,25)을 감안한다면 본 연구의 DAS-ELISA는 IBDV 감염의심 닭의 F낭으로부터 IBDV를 검출하기에 충분한 민감도를 가지고 있다고 판단된다. 또한, 대량검사가 가능한 ELISA 방법을 사용하고 있기 때문에 대량검사 또는 신속 진단이 요구되는 IBDV 병성감정이나 항원 예찰에 적용하기에도 유용할 것으로 판단된다.

최근의 국내 연구자들의 연구 결과 (13,14)에 의하면, intermediate plus, classical, very virulent 등 다양한 형태의 serotype 1 IBDV가 야외 농장에서 분리되고 있기 때문에, 이들 바이러스들을 모두 검출할 수 있도록 IBDV serotype 1 strains에 공통적으로 반응하는 단클론 항체 R63 (19,20)을 사용하였다. 예상했던 바와 같이, 단클론 항체 R63를 이용한 DAS-ELISA는 본 연구에서 사용한 IBDV 국내분리주 및 백신 strain들을 모두 검출하였다. 이것은 IBDV VP2 단백질상에 존재하는 단클론 항체 R63의 바

이러스 단백질 반응 부위가 국내분리주들 사이에서도 여전히 공통적으로 존재하고 있다는 것을 의미하며, 국내 유행하는 IBDV를 진단하는 데 적합한 항체임을 말해주는 것이다.

Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 15종의 국내시판 IBDV 생독백신을 검사하였을 때, DAS-ELISA는 백신 바이러스들의 phenotype에 관계없이 검사한 14종의 제품에서 IBDV를 검출하였다. 이들 제품들은 DAS-ELISA로 검출 가능한 $10^{3.7}$ EID₅₀/ml 이상의 바이러스를 함유하고 있다는 것을 말해준다. 다만, 나머지 1종의 제품은 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 백신 Q는 ELISA에서 양성 판정기준치에 근접한 음성 결과를 보였는데, RT-PCR을 실시한 결과에서도 유전자 증폭농도가 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 이것은 백신 Q내 바이러스 함량이 상대적으로 적은 데에서 기인하였을 가능성이 높다고 보여진다. 비록 이들 IBDV 생독백신제품들 대부분은 DAS-ELISA에 의해 IBDV 검출이 가능하였지만, 검사한 생독백신들간에 ELISA 흡광도 (1.12 내지 3.2)에서 차이가 크게 나타났다. 이러한 차이는 크게 두 가지의 요인에 의해 기인하였을 것으로 추정된다. 첫 번째, DAS-ELISA에서 사용한 단클론 항체의 IBDV strain별 반응성의 차이에 의한 가능성이 있다. 즉, 본 연구에서 사용한 단클론 항체 R63가 IBDV에 공통적으로 반응하는 항체이긴 하지만, IBDV strain들과의 항원-항체 반응 정도에서 차이 (10)에서 일부 기인한 것으로 보인다. 예를 들면, Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 백신 A와 백신 N는 DAS-ELISA에서 1.13과 1.12의 비슷한 흡광도를 나타내었지만, RT-PCR 결과 백신 A (상대 정량 4.6%)는 백신 N (1.9%)보다 2.4 배의 유전자 증폭농도를 나타내었다. 두 번째, 검사한 백신 제품내 바이러스 함량의 차이에 의한 가능성이 있다. Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 바이러스 함량과 ELISA 흡광도가 94.6% 상관성을 보였다는 점을 감안해 볼 때 검사한 백신들간 흡광도의 차이는 IBDV 함량 차이도 어느 정도 관련이 있다고 보여진다.

현재 국내 IBDV 생독백신의 경우 현재 바이러스 정량은 SPF 발육란 접종법에 의존하고 있는 실정이며, 이 경우 최소 일주일 이상의 기간이 소요되는 단점이 있다. 또한, Fig. 1에서 보여주는 바와 같이, DAS-ELISA는 $10^{3.7}$ EID₅₀/ml 이상의 바이러스 감염 역가에서 바이러스 함량과 ELISA 흡광도간 상관성을 감안하면 바이러스 정량 또한 가능하므로 IBDV 생독백신의 함량검사에도 적용이

가능할 것으로 여겨진다. 즉, IBDV 생독백신 최소 바이러스 함량이 10^{20} EID₅₀/dose 이상을 요구하고, 시판 IBDV 생독백신제품의 경우 vial당 천 수분 (1000 doses/vial) 이상의 바이러스 함량을 동결보존형태로 시판되기 때문에 백신을 ml당 100수분되게 희석한 다음 titration DAS-ELISA로 검사한다면 정량이 가능할 것으로 보인다. 그러므로 본 연구의 DAS-ELISA는 SPF 발육란 검사법에 비해 검사 시간이 수 시간 이내로 단축되고, 검사 방법 또한 일반 실험실에서도 사용하기에 간단하기 때문에 IBDV 생독백신의 함유량을 신속 정밀 검사하는 데 유용할 것으로 판단된다.

결론적으로, 본 연구의 DAS-ELISA는 의심사례에서의 IBDV 병성감정뿐만 아니라 생독백신의 바이러스 함량 평가에도 적용하기에 유용할 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

- 1) 이영옥, 김순재, 최정옥, 전무상, 박근식: 국내총계의 infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 농사시험보고서 (축산, 가축위생편). **23**: 136-142, 1981.
- 2) Abdel-Alim GA, Saif YM: Pathogenicity of cell culture-derived and bursa-derived infectious bursal disease viruses in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* **45**: 844-852, 2001.
- 3) Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, Crowther RA: Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* **71**: 325-330, 1997.
- 4) Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN: Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol* **75**: 11974-11982, 2001.
- 5) Chettle N, Stuart JC, Wyeth PJ: Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec* **125**: 271-272, 1989.
- 6) Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL: Bimaviridae. pp 561-569. In Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Ed), Academic Press, London, 2004.
- 7) Eterradossi N, Arnould C, Toquin D, Rivallan G: Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol* **143**: 1627-1636, 1998.
- 8) Fahey KJ, Erny K, Crooks J: A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol* **70**: 1473-1481, 1989.
- 9) Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR: Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis* **35**: 365-373, 1991.
- 10) Hassan MK, Saif YM, Shawky S: Comparison between antigen-capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **40**: 562-566, 1996.
- 11) Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD: Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis* **32**: 757-759, 1988.
- 12) Jackwood DJ, Sommer-Wagner S: Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* **365**: 369-375, 2007.
- 13) Kim TK, Yeo SG: Cloning and nucleotide analysis of segment A gene of infectious bursal disease virus detected in Korea. *Virus Genes* **26**: 97-106, 2003.
- 14) Kwon HM, Kim DK, Hahn TW, Han JH, Jackwood DJ: Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. *Avian Dis* **44**: 691-696, 2000.
- 15) Kwon YK, Mo IP, Seong HW, Kang MI, Koh HB, Lee JG, Yang CK: Studies on the Pathogenicity of infectious bursal disease virus (SH/92) isolated in Korea. *RDA J Agri Sci* **37**: 637-647, 1995.
- 16) McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Conner TJ, McCracken RM, Collins DS, Allan GM: Isolation and serological studies with infectious bursal diseases from fowl, turkey and duck: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol* **9**: 395-404, 1980.
- 17) Rodriguez-Chavez IR, Rosenberger JK, Cloud SS, Pope CR: Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture), III: pathogenicity. *Avian Pathol* **31**: 485-492, 2002.
- 18) Sapats SI, Ignjatovic J: Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol* **145**: 773-785, 2000.

- 19) **Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW:** Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis* **32**: 527-534, 1988.
 - 20) **Snyder DB, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA, Marquardt WW:** Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis* **32**: 535-539, 1988.
 - 21) **Snyder DB, Vakharia VN, Savage PK:** Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United States. *Arch Virol* **127**: 89-101, 1992.
 - 22) **Spies U, Müller H, Becht H:** Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* **8**: 127-140, 1987.
 - 23) **van den Berg TP:** Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* **29**: 175-194, 2000.
 - 24) **van den Berg TP, Morales D, Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, Zierenberg K, Zhang MF, Zhu YP, Wang CQ, Zheng HJ, Wang X, Chen GC, Lim BL, Muller H:** Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol* **33**: 470-476, 2004.
 - 25) **Winterfield RW, Fadly AM, Bickford A:** Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken: persistence of the virus and lesions. *Avian Dis* **16**: 622-632, 1972.
 - 26) **Zhang A, Jin M, Liu F, Guo X, Hu Q, Han L, Tan Y, Chen H:** Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of avian influenza viruses. *Avian Dis* **50**: 325-330, 2006.
-