

소 부루셀라병의 진단을 위한 효소면역측정법

임 윤 규*

An Immunosorbent Assay Using Horseradish Peroxidase Labeled Protein G for the Detection of Antibodies to *Brucella abortus* in Cattle

Yoon-Kyu Lim*

Summary

For the serological diagnosis of *Brucella abortus* antibody in Cattle, an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. Cell well antigen was purified. Optimum protein concentration of coating antigen were 0.4 μ g on each microtiter plate well. Horse radish peroxidase (HRP) labeled protein-G was used as tracer of bound antibodies. ELISA confirmed the coincident results of 40 cases out of 43 cases by plate agglutination test. ELISA diagnosed positive cases (10 out of 12) and negative cases (1 out of 12) with dubious sera by plate agglutination test. From this results ELISA could be used as an early diagnostic tools of Brucellosis in cattle.

서 론

Brucellosis는 소 돼지 양 말 개 등에 발명하는 법정가축전염병이며 사람에게 있어서 치료의 장기화 등으로 더욱 문제가 되는 인수공통전염병이다. 소 돼지 등 가축이 이 병에 걸리면 주로 불임 또는 임신가축의 유산을 일으키지만 사람에서는 열병(과상열) 관절염 오한 등을 일으킨다(Meyer, 1990). 소가 이병에 걸렸을때는 불임이나 유산의 예는 외형상 별다른 임상증상을 나타내지 않는다. 따라서 혈액을 채혈하여 실험실내에서 검사하여야

이병의 감염유무를 확인할 수 있다.

Brucellosis는 국내에서는 1958년 제주도 송당목장에 발생이 보고된 이래, 지속적인 발병사례가 보고 되고 있다(농수산부 통계연보, 1983~1990).

진단법으로는 가축위생연구소의 김 등(1960)이 평판용집반응에 의한 진단법을 비교 검토한 이래 1984년 이후 평판용집법이 공정진단법으로 사용되고 있으며, 그외 Milk ring, CF 반응 등이 이용되고 있다.(Thmoney et al., 1988)

소의 *Brucella abortus* 감염 진단을 위하여 국외에서는 Latex agglutination test (Limet et al., 1988), nylon bead ELISA (perera et al.,

* 농과대학 수의학과 (Dept. of Veterinary Medicine, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

1983), gel test (Nielson et al., 1983), ELIAS (Tabatabai and Deyoe, 1984) 등의 방법이 이용되었으며, 이스라엘의 이설연구개발회사에서는 Br. abortus의 항체를 소 혈청에서 ELISA법으로 진단하는 kit을 개발한 바 있다(Citri, 1988).

국내에서는 제주도의 발병율이 전국에서 가장 높다(제주도 가축위생시험소, 1991). 이병에 대해서는 예방접종은 하지 않으며, 혈청검사 후 양성을 나타내면 살처분하는 방식을 취하고 있다. 이병의 방역을 위하여 1985년부터 제주도내의 전체 소를 대상으로 일제검진을 실시하여 양성우를 살처분하고 있으나 근절되지 않고 지속적인 발생을 하고 있으며, 근래에는 오히려 그 발생이 증가하는 추세를 보이고 있다. 이에 대하여 지적된 문제점 중, 전년도 검진시 의양성으로 음성처리된 소 중에서 양성으로 전환발생하는 경우가 있다 하므로(제주도 가축위생시험소, 1991), 검진에 이용되는 방법의 민감도를 높여야 할 필요가 있다. 특히 평판응집반응법에 의해 의양성으로 처리된 축우에 대해서는 최초 채혈한 날로부터 30~60일 이내에 재검사를 시험관응집반응법으로 실시하여야 하는 바(농림수산부 예규 제142호), 이 기간에도 감염 확산의 우려가 있다. 그러므로 특히 의양성 판정우에 대하여서는 이병의 감염여부를 신속히 판정하여 감염의 전파를 최소화 시켜야 할 필요가 있을 것이다.

본 연구에서는, 소의 *Brucella abortus* 감염의 혈청학적 진단을 위하여 기존의 혈청학적인 검사법보다 일반적으로 민감도가 높다고 알려진 효소면역 측정법을 실시하여, 현재 공정진단법으로 사용되고 있는 응집반응법과 비교하여, 조기의 진단법으로서의 가능성 여부를 알아보기 위하여 실험하였다.

재료 및 방법

항원준비 : 제주도 가축위생시험소에서 분양받은 *Brucella abortus* 1119-3 배양균을 Jagannath와 Sehgal(1989)의 방법에 준하여 제조하였다. 즉, 냉 아세톤으로 냉장온도(4°C)에서 18시간 처리하여 침전된 균체를 생리식염수로 10회 세척한 후

10%(w/v)의 부유액으로 만든다음, ice bath 내에서 초음파 분쇄하였다 (120 w x 20 min., Ohtake Works, Japan). 초음파 처리한 균체액은 원심분리 (20,000 x g, for 20min. at 4°C)하여 침전된 균체분쇄물을 생리식염수로 10회 세척한후 sodium deoxycholate를 0.1% 되게 용해하여 22°C에서 18시간 방치한 다음 원심분리(60,000 x g, 20분)하였다. 얻어진 상정액은 phosphate buffered saline (PBS)으로 방법으로 단백량을 정량한 후, -20°C에 보관하여 cell wall 항원으로 ELISA에 사용하였다.

공시혈청 : 혈청은 제주도의 소들 중 1991년도에 검진하여 판정한 혈청증 무작위로 선택한 양성혈청 28건, 음성혈청 15건과, 의양성 판정시 및 30~60일후 확정판정한 20두의 혈청 32건을 대상으로 실시하였다.

항원의 흡착 : ELISA plate (Nunc-Immuno Module, Polysord U16, Denmark)의 각 well에 흡착용 완충액 (50mM Carbonate buffer, pF 9.6, containing 0.02% sodium azide)으로 희석한 항원을 100 μ l씩 분주하고 냉장온도에서 약 16시간동안 정치한후 PBS로 세척하고, 0.5% gelatin-PBS로 실온에서 30분간 봉쇄한후 PBS로 세척 및 건조하여 냉장 desicator에 넣고 보관하며 실험에 사용하였다.

효소면역 측정법 : 동물혈청은 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS로 50배 희석하여 100 μ l씩 각 well에 가하고 실온에서 1시간동안 반응 시켰다. 3~4회의 세척후 Horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 protein G를 임 등(1991)의 방법대로 제조 및 사용하여 100 μ l씩 well에 가하고 1시간동안 실온에서 반응 시킨다음 3~4회 세척하고 발색제로 ABTS를 넣었다. 30분간의 발색반응이 지나면 100 μ l의 0.005% sodium azide 수용액을 넣어 반응을 정지시키고 즉시 reader를 이용하여 파장 405nm와 492nm의 대조 파장으로 흡광도를 측정하였다. *Brucella abortus* 항체 양성의 판정은 평판응집반응으로 판정한 음성 동물혈청으로 실시한 ELISA 흡광도의 평균값에 3배 표준편차를 곱한 더한 보다 높은 흡광도를 나타낼 때 양성으로 판정하였다(Nicholson and Caswell, 1982; Shoji

et al., 1988).

평판응집반응법: 대성미생물연구소에서 제조한 '브루셀라 진단액'을 사용 설명서에 의거하여 실험 및 판정하였다.

결과 및 고찰

인수공통전염병인 Brucella 병은 소에 있어서 불임 유 사산으로 인하여 축산 경영에 많은 손실을 가져온다. 소 이외의 다른 가축에 있어서도 이와 비슷한 증상을 나타내며, 사람에게 있어서는 환축과 접촉이 많은 축산업자나 수의사 도부 식육업자등이 이병에 잘 걸리며, 그 증세로는 고열과 관절염 오한등을 일으키며 심하면 죽기까지 한다. 이 세균이 체내에 침입하면 탐식세포에 의하여 탐식되며 이 속에서 죽지않고 생존하며 오히려 증식한다. 그리고 체내 각 임파절로 이행한다(Meyer, 1990). 그러므로 사람에서 이병의 치료를 위해서는 장기간의 항생제 투여를 요한다.

이 병의 방역을 위하여 국내에서는 예방접종을 실시하고 있지는 않으며, 감염우를 진단하여 살처분 하는 방법을 취하고 있다. 현재 제주도에서의 본병 방역의 문제점중 하나는 감염초기의 낮은 항체가의 감염우가 동정시험법인 평판응집반응법으로 검출이 되지않는 경우가 있다는 점이다. 이의 해결을 위해서는 보다 민감도 높은 진단법을 개발하여 실무에 적용시켜야 할 것이다.

Brucella에 감염된 소는 초기에 IgM 항체가 형성되어 2주 후에는 최대치를 기록하며 IgG는 4~6 주에 IgM 항체를 능가하여 이후 지속한다고 한다.³³ Brucella의 감염우는 높은 역가의 nonagglutinating antibody(IgG1 subclass)를 갖으며 이 항체는 현재 동정진단법으로 이용되고 있는 평판응집반응법으로는 검출되지 않는데 반하여, ELISA 방법으로는 검출이 가능하다. 한편 이러한 nonagglutinating antibody는 opsonizing activity가 없으며, 이 병원균의 제거를 위한 기능도 없어서 Brucella 감염의 만성화를 조장한다고 한다(Parma et al., 1984). 더욱이 이 항체는 agglutinating IgM이나 IgG2 항체를 경쟁적으로 차단한다고 한다(Timoney et al, 1988) 그러므로 응집반응법을 이용하여 감염진단을 시도할 때는

위음성(false negative)의 결과가 나올 가능성이 있으며, Brucella 박멸 프로그램에 있어서 위음성 결과의 존재는 위양성의 존재보다 더욱 불리한 여건이다.

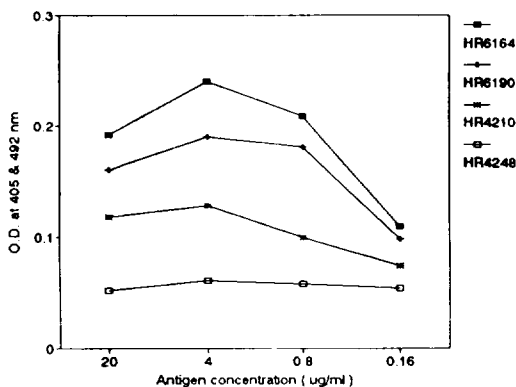


Fig. 1. Optimal concentration of Brucella antigen.

실험에 사용한 *Br. abortus* No. 1119(USDA, Bureau of Animal Industry Stock antigen)의 항원은 진단을 위한 면역학적인 방법을 이용할 때 strain의 혈청형에 관계없이 적용시킬수 있다고 보고되어(Spink, 1956) 이 실험에서 채택하였다.

Jagannath와 Sehgal(1989)에 의하면, ELISA를 실시할때 plate 흡착용 항원으로 균체전체를 사용한 것과 Cell wall 항원이 sonicate 항원보다 더욱이도가 높으며, 한편 균체전체를 사용하였을 때는 실험정중 Solid phase로부터 탈락되는 경향을 보였다 하므로, 본 실험에서는 Cell wall 항원만을 사용하여 ELISA를 실시하였다.

흡착항원의 최적농도는 항원을 단백질농도 20, 4, 0.8, 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 흡착원층액으로 희석하여 흡착시킨 후, 평판응집반응법으로 검사하여 양성판정한 혈청시료 몇건을 선택하여 ELISA를 실시하였으며, Tabel 1과 같이 단백질농도 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 가장 높은 결합을 보였으므로 이 값을 선택하여, 이후의 ELISA에 동일한 조건을 적용하였다.

ELISA의 양성판정기준인 cut off value를 결정하기 위하여, 평판응집반응법으로 판정된 음성혈청 16건으로 ELISA를 실시하였을때, 흡광도의 평균 및 표준편차는 0.113 \pm 0.0092 로 나타났다. 그러므로 Cut off는 평균+표준편차 \times 3 값인 0.140

으로 결정하여 양성 혹은 음성을 판정하였으며, Cut off치의 흡광도에 ± 0.0005 인 경우 (OD 0.135-0.145) 재시험을 실시하거나 판정을 보류하여, 양성 혹은 음성으로 판정치 않고 의양성으로 칭한 후 이 후의 측정치에 적용 하였다.

ELISA와 평판응집반응법에 의한 *Brucella* 항체 검출을 양상을 비교하기 위하여, 평판응집반응법으로 판정한 양성혈청 27건, 음성혈청 16건에 대

Table 1. Comparative results of ELISA and plate agglutination test on *Brucella abortus* antibody detection in 43 cow sera

PAT*(No. of sera)	ELISA (OD range)	
	Positive	Negative
Positive (27)	24 (0.547-2.5)	3 (0.108-0.126) (0.108-0.126)
Negative (16)		16 (0.099-0.132)

* PAT : Plate Agglutination Test

Table 2. Detection of *Brucella abortus* antibody with ELISA in the cow sera which were dubious to determine

ELISA	PAT ¹⁾ TAT ²⁾	
	Dubious	Positive
Positive	10	11
Dubious	1	
Negative	1	1

1) PAT : plate agglutination test

2) TAT : tube agglutination test

하여 ELISA를 실시한 결과, Table 1과 같이 각각 양성 24건, 음성 16건으로 93%이었다. 이런 결과는 현재 사용되고 있는 공정시험법과 큰 차이를 나타내지 않는 것이라 생각된다.

한편 1차 평판응집반응법으로 의양성의 결과가

나온 후 30~60일 후에 재차 채혈하여 2차 시험관 응집반응법으로 확정 판정한 12두의 혈청에 대하여 ELISA를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 확실한 판단을 내리기 위하여 일정 기간후 재차검사한 결과와 초기의 ELISA 결과는 거의 일치하는 것으로 나타났다. 그러므로 초기에 ELISA방법의 사용은 조기에 감염여부를 판정할 수 있으며 그 기간 내에 있을 수 있는 감염전파를 막을 수 있을 것으로 생각된다. 이 실험에서 공시된 양성혈청 27건 중 3건은 ELISA로 음성판정되었다. 이러한 결론은 실험에서 사용한 tracer 즉, 효소접합체가 protein G로서 오로지 IgG만을 검출해 내는 성질이 있기 때문에 IgG가 형성되기 전단계의 IgM만이 형성된 혈청인 경우이거나, 평판응집반응시 비특이적인 응집반응을 일으켰을 가능성이 있다.

이상과 같은 ELISA의 결과는 현재 공정진단법으로 사용되고 있는 응집반응법과 대부분 일치하고 있으며 오히려 조기판단에 도움을 주고 있다. 그러므로 정밀한 품질관리 하에서 제조한 kit을 사용한다면 더욱 신뢰도가 높은 진단방법으로 수용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

소에 발병하는 *Brucella abortus* 감염증의 혈청학적 진단을 위하여 효소면역측정법을 실시하였다. 사용항원으로서 균체의 세포벽 항원을 정제하였으며, 항원의 최적 흡착농도는 평판 각 well당 단백질량 0.4 μ g이었다. 항원과 반응한 항체를 추적하기 위한 표지물질로는 Horseradish peroxidase와 결합시킨 protein G를 사용하였다.

효소면역측정법으로 측정된 결과는 43건의 시료 중 40건이 평판응집반응법의 결과와 일치하였다. 또한 평판응집반응법으로 검사한 12건의 의양성 시료는 ELISA로 검사하였을때 10건이 양성, 1건이 음성으로 조기에 판단되었다.

참 고 문 헌

제주도가축위생연구소, 1991. 제주도내부축우부부세

라병방역대책-전문가초빙, 방역대책연구(과업)

- 계획(안) -
- Jagannath, C., and S. Sehgal, 1989. Enhancement of the antigen-binding capacity of incomplete IgG antibodies to *Brucella melitensis* through Fc region interactions with staphylococcal protein A. *J. Immunol. Methods* Vol. 124, 251~259
- 김병구, 주병균, 이택성. 1960. 부루셀라증에 관한 연구. 가축위생연구소보, 10:9
- 임윤구, 우희중, 이영순. 1991. Protein G 효소표지면역반응법에 의한 Sendai Virus 항체검출. 한국실험동물학회지 7권 2호, 53~61
- Limet, J. N., A. Berbinschi, A. Cloeckaert, C. L. Cambiaso and P. L. Masson, 1988. Longitudinal study of brucellosis in mice by immunoassay of lipopolysaccharide-related antigens in blood and urine. *J. Med. Microbiol.* Vol. 26, No. 1, 37~45
- Meyer, M. E. 1990. Brucella in 'Rev. Vet. Microbiol.': Ed. by Biberstein, E. L. and Yuan, C. Z. 250~258
- Nicholson, B. and P. Caswell, 1982. Enzyme-Linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 16, 469~472
- Nielson, K. H., F. C. Heck, J. M., Stiller, and B. Rosenbaum, 1983. Interaction of specifically purified isotypes of bovine antibodies to *Brucella abortus* in the hemolysis in gel test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sic.* Vol. 35, No. 1, 14~18
- 농림수산부예규 제142호 제10조~제 15조
1988. 1. 11.
농수산부 통계연보. 1983
농수산부 통계연보. 1984
- 농수산부 통계연보. 1985
농수산부 통계연보. 1986
농수산부 통계연보. 1987
농수산부 통계연보. 1988
농수산부 통계연보. 1989
농수산부 통계연보. 1990
- Parma, A. E., G. Santisteban and R. A. Margini, 1984. Analysis and in vivo assay of *B. abortus* agglutination and non-agglutinating antibodies. *Vet. Microbiol.* Vol. 9, 391~398
- Perera, V. Y., M. T. Creasy and A. J. Winter, 1983. Nylon bead enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subpicogram quantities of *Brucella* antigens. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 18, No. 3, 601~608
- Shoji, Y., T. Itoh and N. Kagiya, 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to CAR bacillus. *Exp. Anim.* Vol. 37, 67~72
- Spink, W. W. 1956. The nature of brucellosis. *Minneapolis Univ. of Minnesota* 202
- Tabatabai, L. B. and B. L. Deyoe, 1984. Specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 20 No. 2, 209~213
- Timoney, J. F., J. H. Gillespie, F. W. Scott and J. E. Barlough, 1988. The Genus *Brucella*. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious diseases of domestic animal 8th. Ed. 135~146
- Citri, N. 1988. Reagents, kits, and enzyme immunoassays using stabilized nonviable bacteria having an immunoglobulin receptor and an enzyme label. Yissum Res Devel Co. Fr. Demande FR 2, 604, 259. pp. 21