

효소면역법을 이용한 *Brucella abortus* 항체 검출에 관한 연구

심항섭, 국정희, 정봉수, 고태오, 조중현, 박유순

경기도가축위생시험소

Studies on enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of antibody to *Brucella abortus*

Hang-Sub Shim, Jung-Hee Kook, Bong-Su Chung,
Tae-Oh Ko, Jung-Hyun Cho, Yu-Soon Park

Kyunggi Veterinary Service Laboratory

Abstract

In order to establish a rapid, sensitive and specific diagnostic method for detection of antibody to *Brucella abortus*, a enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was adapted. The diagnostic efficacy of the established ELISA was compared with that of the standard tube agglutination test for *B abortus*.

1. It was found that the optimal concentration of antigen for this ELISA was 5 μ g/ml, the optimal dilution of conjugate was 1 : 2000, and the optimal dilution of serum was 1 : 200, respectively.

2. Cut off value in this ELISA was 1,102 that was determined by mean absorbance(at 492nm) of tube agglutination test negative serum added with the triple value of the standared deviation.

3. The relationship between the tube agglutination test and ELISA was shown high corresponding rate with sensitivity(96.3%) and specificity(98.1%).

4. The efficacy of the ELISA for detection of *B abortus* antibody was compared with tube agglutination test in brucellosis outbreak farm. The sensivity of ELSIA was higher than tube agglutination test.

Key words : *Brucella abortus*, ELISA, Tube agglutination test

서 론

*Brucella abortus*는 소에서 유산 및 불임증을 일으키는 부루셀라병의 원인체이며, 사람에도 감염하여 파상열, 관절염, 오한 등을 일으키는 공중위생상 중요한 세균이다^{1,2,3}.

*B abortus*는 그람음성의 비운동성 단간균으로 숙주의 세망세포내에 기생하며 일시적인 균혈증, 유산 및 불임 외에 특별한 증상 없이 만성 감염상태를 유지하기 때문에 효과적인 치료 및 예방이 어려운 질병으로 세계 여러지역에서 발생하고 있다^{4~6}. 부루셀라병은 우리나라에서 1959년 처음 보고된 이후 현재까지 지속적으로 발생되어 축산업에 많은 경제적 손실을 입히고 있으며, 본 병의 근절을 위해 감염축을 색출하여 살처분하는 test and slaughter법으로 방역을 실시하고 있다^{7~11}.

부루셀라병 진단법으로는 평판응집반응, 시험관응집반응, Latex응집반응, 보체결합반응, 효소연계면역흡수시험, 아가-겔 면역확산시험, milk ring test(MRT), card test 등이 있으며^{12~20}, 국제수역사무국에서는 1차스크린검사법으로 로즈벡갈법과 평판응집반응을 실시하고 확진법으로 특이성과 민감성이 높은 보체결합반응 및 효소면역시험법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 추천하고 있으며, 국내에서는 MRT, 평판응집반응, 로즈벡갈법을 병용하여 부루셀라병의 1차 검색을 실시한 후 시험관응집반응법 및 보체결합반응으로 확진하고 있다^{10,21}.

이중 시험관응집법은 경제적인 장점이 있고 특이성이 비교적 높으며 술식이 간단하다는 장점이 있어 가장 보편적으로 사용되고 있으나, 이 방법은 시간이 많이 소요되며 재현성이 떨어지고 가양성반응이 나타나는 단점이 있어 보체결합반응 등이 병용 실시 되고 있으나 이는 술식이 복잡하고 시간이 많이 소요되는 단점이 있어 실용화 되어 있지 않아 이에 대한 보완이 요망되고 있다^{21~23}.

또한 이들 진단법을 통한 질병검색이 매년 실시됨에도 1991년 이후 부루셀라병의 발생이 계속 증가되고 있어 본 병의 방역체계 및 진

단법에 대한 체계적인 정비 및 문제점 해결 방안이 요구 되는 실정이다^{24~26}.

그람음성균의 outer membrane protein은 lipopolysaccharide 및 polysaccharide와 더불어 항원성 및 면역원성이 높은 것으로 알려져 있으며, 질병 진단용 항원 및 병원성 분석재료로 이용되고 있다^{27~32}. 특히 이들을 이용한 ELISA법은 항체의 검출에 특이성 및 감수성이 매우 높을 뿐만 아니라 술식이 간편하고 대량 검사할 수 있다는 잇점 때문에 최근 여러 감염성 질병의 검사에 많이 이용되고 있는 진단법이다^{33~36}.

이러한 ELISA법을 이용하여 미국 등 유럽에서는 부루셀라병의 검색 및 항원분석에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 있으나, 국내에서는 이에 대한 연구가 미진한 실정이며 부루셀라병을 진단하기 위한 표준화된 ELISA법의 개발과 효용성에 대한 연구 및 기법이 확립될 필요성이 요망되고 있다^{17,31,37~39}.

본 연구에서는 부루셀라병을 검사하는 현행의 시험관응집반응법의 단점을 보완하고자 ELISA법을 이용하여 부루셀라 항체검출을 위한 표준화시험을 수행하였으며 확립된 ELISA법의 항체검출 효능을 시험관응집 반응법과 비교 실험하였다.

재료 및 방법

1. 공시균주 및 가검혈청

공시균주는 수의과학연구소에서 분양받아 보관 중인 *B abortus* 1119-3균주를 사용하였으며, 가검혈청은 경기지역에서 부루셀라병 검진 결과 양성 및 음성으로 판정된 소의 혈청 335두를 시험에 공하였다.

2. 시험관응집반응법

시험관응집반응은 Alton 등¹⁸)과 Morgan 등¹⁹)의 방법에 준하여 수행하였다.

약술하면 항원은 *B abortus* 1119-3을 배양하여 채균 및 살균 가열한 후 집균하여 0.5%석탄산이 함유된 생리식염수로 농도를 조절한 균부유액(제조원, 수의과학연구소)을 사용하였

으며, 가검혈청을 항원과 25배, 50배, 100배, 200배 및 400배되게 혼합하여 37°C에서 48시간 반응시킨 후 응집유무를 관찰하여 100배이상에서 응집된 경우 양성으로 판정하였다.

3. 효소면역시험(ELISA)법

1) 항원 제조

Brucella OMP 항원은 Verstrate⁴⁰⁾ 및 Kim³³⁾ 등의 방법을 응용하여 제조하였다.

약술하면 *B abortus* 1119-3균주를 *Brucella* agar(Difco)에 접종하여 10% CO₂하의 incubator에서 5일간 배양한 후 0.5% formalin saline로 집균하여 4000g에서 30분간 원심한 침전물을 3회 세척한 후 0.5% formalin saline으로 균을 사멸시켜 균 농후액을 sonication하여 4000g에서 30분간 냉장원심하고 상층액에서 whole-membrane fraction을 얻기 위해 100,000g에 1시간 원심한 후 gel상의 침전물을 10mM Hepes buffer에 2% N-lauroyl-sarcosine(Sigma)을 첨가한 용액에 용해하여 4°C에서 overnight 한 후 100,000g에서 1시간 원심한 후 상층액을 버렸다. 침전물은 주로 N-lauroylsarcosine에 불용성인 outer membrane protein이며 10mM Tris-HCl (pH 7.2)로 용해하여 투석하였고 추출한 항원을 Lowry법으로 단백질을 정량한 후 -70°C에 보관하며 농도를 조절하여 항원으로 사용하였다.

2) 본실험

B abortus 항체를 검출하기 위한 ELISA법은 Voller 등⁴¹⁾의 방법에 따라 표준화하였다.

약술하면 항원을 carbonate buffer(pH 9.5)를 이용하여 항원농도를 시험목적에 따라 20~0.1µg/ml으로 희석하고 이것을 microplate(96 well Costar)에 50µl씩 분주하여 4°C에서 18시간 흡착시킨 후 0.05% Tween 20-PBS으로 3회 세척하여 0.1% gelatin PBS T 100µl을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켜 blocking한 후 세척액으로 3회 세척하였다. 혈청은 0.05% Tween 20-PBS에 시험목적에 따라 50배~400배 희석하여 100µl씩 주입하였다. 또한 시료 1개 당 duplicate로 실시하였으며, 혈청을 주입하지 않은 blank well을 두었고 시료는 37°C에서 1시간

반응시킨 후 3회 세척하여 50µl의 peroxidase-conjugated rabbit antivovine IgG를 시험목적에 따라 1,000~4,000배 희석액을 가하고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 다시 세척하였다. 그리고 발색지시 substrate로 citrate buffer(OPD 0.4 mg/ml, 30% H₂O₂ 0.4µl/ml)를 50µl 가하고 37°C에서 15분 반응시킨 후 2.5N H₂SO₄로 반응을 정지시켜 495nm에서 ELISA reader로 OD치를 측정하였다.

결 과

1. 항원 및 conjugate 의 적정농도

본 실험에서 *Brucella* OMP항원 및 conjugate의 적정 농도를 정하기 위해 항원을 20µl/ml에서 0.1µl/ml으로 conjugate를 1 : 1,000부터 1 : 4,000배까지 희석하여 항원 및 conjugate의 희석농도에 따른 ELISA 반응을 비교한 바 Fig 1과 같다.

양성혈청과 음성혈청과의 OD치가 가장 큰 항원농도 및 conjugate 희석배수인 항원농도 5 µl/ml 및 1 : 2,000배로 결정하였다.

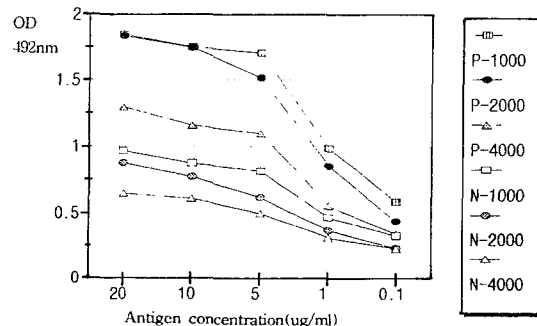


Fig 1. Standardization of antigen and conjugate concentration in ELISA

2. 혈청의 적정희석배수 측정

본 실험에서 혈청의 적정 희석배수를 정하기 위해 항원 및 Conjugate의 적정희석농도를 각각 5µl/ml 및 1 : 2,000 배로 희석하고 양성혈청 및 음성혈청을 각각 1 : 50 배부터 1 : 400배 희석하여 각 희석 단계별 OD치를 조사한 결과는

Fig 2와 같다.

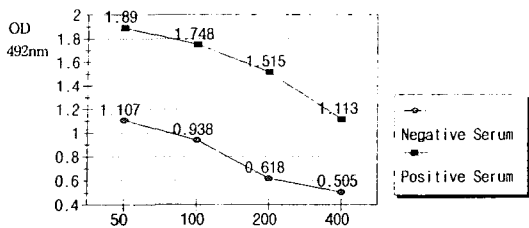


Fig 2. Determination of optimum serum dilution in ELISA

혈청 50배희석에서 양성은 1.89, 음성은 1.107, 혈청 100배희석에서 양성은 1.748, 음성은 0.938, 200배 희석에서는 양성은 1.515, 음성은 0.618, 400배 희석에서 양성 1.113, 음성은 0.505로 각각의 혈청 희석배율에서 양성과 음성혈청의 차이가 1.8배이상 차이가 있었으나 이 중 혈청 희석 200배에서 양성과 음성의 차이가 2.45배로

가장 높아 본 실험에서 혈청 희석 배율을 200 배로 정하였다.

3. 부루셀라 ELISA의 양성기준 및 시험관응집 반응법과의 결과비교

부루셀라병 음성우 214두 및 양성우 82두에 대한 ELISA OD치의 분포는 Fig 3과 같다.

음성혈청 ELISA 흡광도 OD치는 0.346에서 1.598의 분포를 보였으며 평균 OD 치는 0.655 였고 표준편차는 0.149였다, 양성혈청의 ELISA 흡광도 OD치는 0.645에서 1.827의 분포를 보였다. 본 실험에서의 Cut-off는 음성 OD치 평균값에 3배의 표준편차값을 더한 값(1.102)을 기준으로 정하여 이보다 높은 흡광도를 양성으로 판정하였으며, 음성 OD치 평균값에 2배의 표준편차를 더한 값(0.953)이상을 의양성으로 판정하였다.

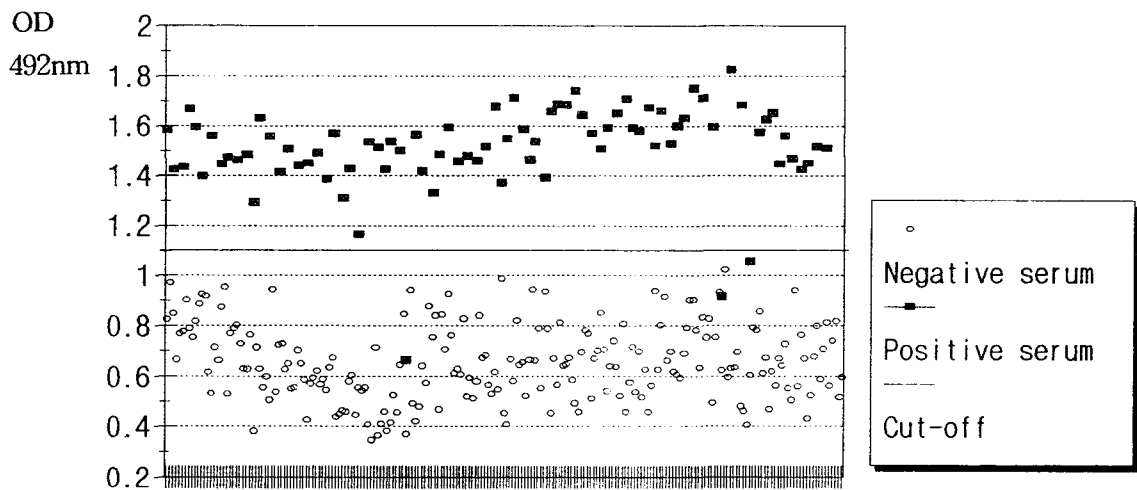


Fig 3. Distribution of OD results for ELISA on Brucella reactor cattle.

Table 1. Comparison of the ELISA reaction and tube agglutination test in cattle

Tube agglutination test	No of cattle tested	ELISA		
		Positive reactor	Dubious reactor	Negative reactor
Positive reactor	82	79(96.3)	1(1.2)	2(2.4)
Dubious reactor	39	14(35.9)	10(25.6)	15(38.4)
Negative reactor	214	1(0.9)	3(1.4)	210(98.1)

위의 ELISA 판정 결과를 기준으로 시험관 응집반응결과와 비교한 바 Table 1에 나타낸 바와 같다. 즉 시험관응집반응 양성우 82두 중 ELISA법에서 양성 79두(96.3%), 의양성 1두(1.2%), 음성 2두(2.4%)로 나타났으며, 시험관응집반응 의양성우 39두중 ELISA법에서 양성 14두(35.9%), 의양성 10두(25.6%), 음성 15두(38.4%)로 나타났고, 시험관응집반응 음성우 214두 중 ELISA법에서 양성 1두(0.9%), 의양성우 3두(1.4%), 음성우 210두(98.1%)인 것으로 나타났다.

4. 시험관응집반응과 ELISA법의 항체 검출능 비교

시험관응집반응과 본 실험에서 고안된 ELISA법과의 부루셀라병 항체의 검출능력을 비교하기 위해 부루셀라 양성발생 농가에서 1~3개월 간격으로 7회동안 개체별로 검사한 결과를 비교한 바 Table 2와 같다.

부루셀라병이 발생한 1개 농가의 23두에 대해 시험관응집반응으로 검사한 결과 13두가 양성우로 검출되었고 ELISA법에서는 시험관응집반응 양성우 13두와 의양성 및 음성으로 검출된 2두에서 양성이 검출되어 총 15두가 양성우로 검출되었으며, ELISA법으로 음성으로 확인된 7두는 시험관응집시험에서 전두음성으로 확인되었다.

고 찰

*B abortus*의 감염에 의해 발병하는 부루셀라병은 소에서 유산, 고환염 등 번식장애를 일으키는 질병으로 사람에도 감염하여 파상열, 관절염 등을 일으키는 인수공통전염병으로 우리나라를 비롯한 세계여러나라에서는 본 병의 근절을 위해 Test and slaughter법으로 방역을 하고 있으며 이러한 여건에서 신속하고 정확한 진단법이 요구되고 있다¹²⁾.

*B abortus*는 감염숙주의 세망세포계 존재하여 감염우의 혈액, 유즙, 질분비액, 정액으로부터 분리가 쉽지 않고, 원인균 분리가 장시간 소요되며, 만성이나 불현성 감염의 경우 특이한 증

상이 없어 임상적으로 진단이 어렵기 때문에 혈청학적 진단법이 널리 이용되고 있다^{3~5)}.

본 병의 혈청학적 진단은 오래동안 주로 시험관응집반응법 및 보체결합반응으로 수행되어 왔다. 그러나 이들 방법은 시간이 많이 소요되고 재현성이 떨어지고 가양성이 나타나거나, 술식이 복잡하다는 단점이 있는 것으로 알려져 있으나 국내에서는 진단법 개선 등에 대한 연구가 부진한 상태이다^{10,21,39)}.

본 연구에서는 시험관응집시험과 보체결합반응시험의 단점을 보완하기 위해 여러 바이러스성 및 세균성 질병 진단에 응용되고 있는 효소면역반응법을 *B abortus* 항체검출에 이용하고자 일련의 시험을 수행하게 되었다.

*B abortus*의 항원성상에 대한 연구는 여러 학자들에 의해 연구된 바 감염동물의 면역반응을 일으킬 수 있는 주요 항원물질로는 cell envelope의 구성성분인 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide 그리고 outer membrane protein 등이 있음이 보고되어있다. 이중 OMP는 감염동물에서 균체의 다른 성분보다 먼저 림프구와 반응함으로써 감염에 대해 주요한 방어항체를 생산하는 항원물질로 간주되었고, 여러 연구자들에 의해 OMP가 세포면역반응을 높여주는 면역원 임이 지적된 바 있다^{17,28,29,31,37)}.

이들 항원은 특히 시험관응집반응 및 보체결합반응 등에서 가양성으로 문제시 되는 *Yersinia enterocolitica* 등과 OMP의 성분 및 성상이 차이가 있는 것으로 알려져 있어 본 실험의 항원으로 사용하였다⁴²⁾.

본 시험에 앞서 ELISA법에 적용되는 여러 요인들을 표준화 하기위해 항원의 농도, 혈청 희석배수, conjugate 배율 등에 대한 예비시험과, 또한 혈청학적 면역반응에서 항원과 항체 비율은 반응의 감수성에 중요한 영향을 미치며 항원의 농도가 지나치게 높거나 낮으면 반응능이 저하된다고 알려져 있어⁴¹⁾ 예비시험으로 항원과 항체의 반응조건에 대한 실험을 수행한 결과 부루셀라 OMP 항원의 농도를 5 μ l/ml, conjugate의 희석배수를 1 : 200배, 혈청의 희석배수를 200배로 반응을 시켰을 때 P/N ratio의

Table 2. Comparison of the results from Tube agglutination test(TAT) and ELISA for detection of *B abortus* antibody from brucellosis infected farm

Individual No	Tests	Periods of test						
		1st(11.5)	2nd(11.28)	3rd(12.21)	4th(1.29)	5th(4.30)	6th(6.28)	7th(9.5)
1	TAT	N	N	N	N	N	N	N
	ELISA	N	N	N	N	N	N	N
2	TAT	N	N	N	N	N	P	
	ELISA	D	N	N	NT	N	P	
3	TAT	D	P					
	ELISA	D	P					
4	TAT	N	N	N	D	D	N	N
	ELISA	N	N	N	N	P	P	D
5	TAT	P						
	ELISA	P						
6	TAT	P						
	ELISA	P						
7	TAT	P						
	ELISA	P						
8	TAT	P						
	ELISA	P						
9	TAT	P						
	ELISA	P						
10	TAT	P						
	ELISA	P						
11	TAT	D	D	D	D	NT		
	ELISA	D	D	P	P	NT		
12	TAT	N	D	N	N	N	N	N
	ELISA	N	N	N	N	N	N	NT
13	TAT	N	N	N				
	ELISA	N	N	N				
14	TAT	N	N	N	N	N	N	
	ELISA	N	N	N	N	N	N	
15	TAT	N	P					
	ELISA	N	P					
16	TAT	N	N	N	N	N	N	N
	ELISA	N	N	N	N	N	N	N
17	TAT	N	N	N	N	N	N	N
	ELISA	N	N	N	N	N	N	N
18	TAT	N	P					
	ELISA	N	P					
19	TAT	D	D	D	D	D	P	
	ELISA	P	D	P	NT	P	P	
20	TAT	D	D	NT				
	ELISA	D	D	NT				
21	TAT	N	N	N	N	N	N	N
	ELISA	N	N	N	N	N	N	N
22	TAT	D	P					
	ELISA	D	P					
23	TAT	D	D	N	D	P		
	ELISA	N	D	D	D	P		

※ P : Positive reaction, D : Dubious reaction, N : Negative reaction, NT : Not tested

차이가 가장 높아 본 실험의 반응의 조건으로 표준화 하였다.

또한 ELISA법에 의한 부루셀라 양성기준을 시험관응집반응 음성우의 OD치 및 표준편차의 값에 따라 Cut-off를 정하였다^{17,29)}. 이상의 표준화 기법으로 시험관응집반응과 ELISA법의 반응결과를 비교한 바 민감도가 96.3%, 특이성이 98.1%로 두 방법 간의 결과가 유사한 것으로 나타났다.

각 진단법의 부루셀라병에 대한 검출효능을 조사하기 위해 부루셀라병이 발생한 1개 농가 23두를 대상으로 시험관응집반응과 ELISA법 결과를 비교한 바 시험관응집반응으로 13두, ELISA법으로 15두를 부루셀라양성우로 검출하게 되어 ELISA법이 시험관응집반응보다 민감도가 높은 것으로 나타났다. 시험관응집반응의 경우 혈중 IgG 중 80%이상을 차지하는 non-agglutinating antibody IgG1은 비교적 검출하지 못하는 것으로 알려졌으며 주로 혈중에 소량을 차지하는 IgG2 및 IgM에 주로 반응하는 것으로 알려져 있어 본 실험에서 고안된 ELISA법에 비해 검출능력이 낮은 것으로 생각된다. 또한 각 개체의 항체가 역가분포를 살펴보면 음성개체의 경우의 양성반응이 거의 나타나지 않고 계속적으로 음성반응으로 나타났으나, 양성개체의 경우 의양성이 2회이상 지속되다 양성으로 전환되는 것을 확인할 수 있어 부루셀라병의 조기근절을 위해서는 양성농가에서 발생한 의양성우의 관리가 중요한 것으로 나타났다.

이상의 본 실험에서 얻어진 일련의 결과를 보면 ELISA법이 시험관응집반응법보다 술식이 비교적 간편하고 특이성 및 감수성이 높은 것으로 나타났으며, 본 진단법을 실제 부루셀라병의 검사에 적용하기 위해서는 ELISA법에 사용된 제조항원의 항원성 및 면역원성 등에 대한 추가적인 실험이 요구된다.

결 론

본 연구에서는 *Brucella abortus* 항체를 신속하며 간편하고 정확하게 검출할 수 있는 방법을

고안하기 위해 효소면역(ELISA)법을 확립하고자 일련의 실험을 하였으며, 확립된 ELISA법의 *B abortus* 항체검출효능을 시험관응집시험과 비교 실험을 실시한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *B abortus* OMP 항원 및 conjugate의 적정농도를 정하기 위해 항원을 20~0.1 μ l/ml로 희석하고 conjugate를 1000~4000배 희석하여 비교시험하였던 바 적정항원농도 및 conjugate 희석배수는 5 μ l/ml과 1 : 2,000배로 나타났으며 혈청의 적정 희석배수는 200배인 것으로 나타났다

2. ELISA반응의 양성기준을 정하기 위해 음성우 214두에 대해 검사를 실시하여 cut-off를 정한 바 OD치가 1.102이상을 양성으로 정하였다.

3. 시험관응집반응과 ELISA법을 비교한 바 시험관응집반응 양성우 82두 중 ELISA에서 양성 79두(96.3%), 의양성 1두(1.2%), 음성 2두(2.4%)로 나타났으며, 시험관응집반응 음성우 214두 중 양성 1두(0.9%), 의양성 3두(1.4%), 음성 210두(98.1%)로 나타났다.

4. 부루셀라 양성농장에 대해 시험관응집반응과 본 실험에서 고안된 ELISA법과의 부루셀라병 검색능을 비교하기 위해 총 23두에 대한 검사결과를 비교한 바 시험관응집반응으로 13두, ELISA법으로 15두가 양성우로 검출되었다.

참고문헌

1. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic animals*, 8ed. Cornell Univ Press.
2. Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, et al. 1991. *Manual of Clinical Microbiology* 9ed. American Society for Microbiology.
3. Myer ME. 1990. *Brucella of 'Review of Veterinary Microbiology'*. Blackwell Scientific Publication Inc. 250~258.
4. Nicoletti P, Jones LM, Berman DT. 1978. Adult vaccination with standard and redu-

- ced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. *JAVAMA* 173(11) : 1445~1449.
5. Morgan WJ, Richards RA. 1974. The diagnosis, control and eradication of bovine brucellosis in Great Britain. *Vet Rec* (94) : 510~517.
 6. Matays Z, Fujikura. 1984. Brucellosis as a world problem. *Developments in Biological Standardization* 56 : 3~20.
 7. 박동권, 이창희. 1959. 우리나라에서 발생한 축우 *Brucella*병에 대하여. *수의계* 3(2) : 392~395.
 8. 박동권. 1959. *Brucella*증에 대하여. *수의계*. 3(2) : 396~403.
 9. 정종식, 조병준, 박청규. 1988. 경북지방 젖소로부터 *Brucella abortus*의 분리 및 균형별. *대한수의학회지* 28(2) : 339~343.
 10. 김금화, 안수환, 박용호 등. 1982. 부루셀라병에 사용되는 여러가지 혈청진단법의 비교연구. *대한수의학회지* 22(2) : 149~153.
 11. 우종태. 1986. 홀스타인 유우로 부터 *Brucella abortus*의 분리와 분리균의 성장에 관한 연구. *서울대 수의대논문집*. 11(1) : 103~118.
 12. Alton GG, Maw J, Rogerson BA, Mcperson GG. 1975. The serological diagnosis of bovine brucellosis : An evaluation of the complement fixation, serum agglutination test and Rose Bengal tests. *Aust Vet J* 51 : 57.
 13. Cameron HS. 1957. A Comparison of blood and whey brucellosis tests on 20,000 cows. *JAVMA* 1 : 130.
 14. Nicolette P. 1967. Utilization of the card test in brucellosis eradication. *JAVMA* 151 : 1778.
 15. Lord VR, Rolo MR, Cherwonogrodzky JW. 1989. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp. in cattle by use of an agar gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. *Am J Vet Res* 50 : 1813~1816.
 16. Nielsen K, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR, et al. 1989. Enzymelinked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am J Vet Res* 50 : 5~9.
 17. Tabatabai LB, Deyoe BL. 1984. Specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine antibody *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 20 : 2209~2213.
 18. Alton GG, Johnes LM. 1967. *Laboratory techniques in brucellosis*. World Health Organization Geneva.
 19. Morgan WJB, MacKinnon DJ, Gill KPW, et al. 1978. *Brucellosis diagnosis standard laboratory techniques*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
 20. Hall SM, Confer AW, Tabatabai LB, et al. 1984. Detection of serum antibody to *Brucella abortus* in cattle by use of a quantitative fluometric immunoassay. *J Clin Microbiol* 20(6) : 1023~1027.
 21. 김종만, 정석찬, 박정문 등. 1988. 부루셀라 양성우에서 분리한 균의 성장과 혈청학적 진단법 비교. *농사시험논문집* 30(2) : 1~6.
 22. Sutherland SS. 1985. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 22(1) : 44~47.
 23. Ahvoen P, Sievers K. 1969. *Yersinia enterocolitica* infection associate with *Brucella* agglutinins. Clinical features of 24 patients. *Acta Med Scand* 185 : 121~125.
 24. 심향섭, 고태오, 유성중 등. 1996. 경기도에서 발생하는 유우부루셀라병에 관한 연구. *한가위지* 19(3) : 189~198.
 25. 농림수산부. 1989~1995 농수산통계연보.
 26. 김우택, 이완수, 김공식. 1991. 제주도내 축우 부루셀라병 발생상황 조사. *한가위지* 14

- (2) : 104~109.
27. Schnaitman CA. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 104(2) : 890~901.
 28. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, et al. 1995. Surface exposure of outer membrane porotein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species. Studied by enzymelinked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* 63(10) : 3945~3952.
 29. Hunter BH, Bibb WF, Shih CN, et al. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of *Brucella melitensis* to measure immune response to *Brucella* species. *J Clin Microbiol* (24) : 566~572.
 30. Lentsch RH, Batema RP, Wagner JE. 1981. Detection of *Salmonella* infections by polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Immunol* 14(3) : 281~287.
 31. Cloeckaert A, Kerkhofs P, Limet JN. 1992. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis : immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 30(12) : 3168~3174.
 32. Deneer HG, Potter AA. 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 57 : 798~804.
 33. Kim CJ, Nagaraja KV. 1991. An agar gel enzyme assay(AGEA) for simple detection of *Salmonella enteritis* antibodies in chicken sera. *Diagn Microbiol infec Dis* 14 : 203~208.
 34. Nicolet J, Krawinkler M, Baumgartner A. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Vet Res* 42(12) : 2139~2142.
 35. Bundo K, Morita K, Igarashi A. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on *Japanese encephalitis virus* III. Assay on antibody titers in swine sera. *Trop Med* 24 : 87~102.
 36. Nassau E, Parsons ER, Jonhson GD. 1976. The detection of antibodies to *Micobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Tubercle* 57 : 67~70.
 37. Schurig GG, Hammerberg C, Finkler BR. 1984. Monoclonal antibodies to *Brucella* surface antigens associated with the smooth lipopolysaccharide complex. *Am J Vet Res* 45(5) : 967~971.
 38. Aparico ED, Marin C, Urmeneta BA, et al. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 32(5) : 1159~1165.
 39. 임운규, 이두식, 박전홍 등. 1993. 축우 부루셀라병의 ELISA진단법에 관한 연구. *대한수의학회지* 33(1) : 131~135.
 40. Verstreat DR, Creasy MT, Caveney NT, et al. 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* : Isolation and characterization. *Infect Immun* 35(3) : 979~989.
 41. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) : A guide with adstracts of microplate applications*. 1979. Dynatech Europe Brough House.
 42. Verstreat DR, Winter AJ, 1984. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 46(1) : 182~187.