

放射性同位元素로 處理한 雛白痢菌의 凝集反應에 대한 比較試驗

徐 富 甲

서울産業大學 獸醫學科

緒 論

雛白痢에 대한 凝集反應은 Gage⁸⁾와 Rettger⁹⁾에 의하여 처음으로 실시된 이래, Schaffer⁹⁾는 染色抗原에 의한 全血平板凝集反應法을 提唱한 바 있으나 Bivins²⁾는 凝集反應에서 보는 非特異性 때문에 여기에 사용되는 抗原은 多價抗原이어야 한다고 주장하였다. 그리고 Aoki 등¹⁾은 그러한 非特異反應은 寒天內沈降反應을 함으로써 제거될 수 있음을 밝혔다. 우리나라에서도 崔¹¹⁾ 등은 寒天 gel 內 沈降反應의 역가가 凝集反應에 의한 것과 일치한다는 보고를 하였다. 그러나 이들 실험에 사용된 抗原은 加熱내지는 化學的 方法에 의해서 만들어진 것이었을 뿐, 放射性同位元素로 照射處理한 抗原은 아니었으며, 또 이러한 抗原으로 凝集反應을 實驗한 예는 아직 없다. 다만 Chun⁴⁾ 등이 *Mycobacterium tuberculosis* 나 *Salmonella typhi* 등 그 밖의 몇가지 細菌에 대하여 cobalt-60⁶⁾ (γ 線)으로 照射한 抗原으로 凝集反應을 실시한 報告가 있다.

따라서 本人은 *Salmonella pullorum* 의 標準型菌株에 일정한 線量의 γ 線(⁶⁰Co)을 照射하여 얻은 不活化된 診斷用抗原과 前述했던 加熱 및 formalin 으로 處理한 抗原의 凝集性을 比較 調查하였다.

材料 및 方法

集菌方法: 標準 雛白痢菌을 nutrient 寒天平板培地에 서 18時間 培養한 후 典型的인 集落을 선정하여 本菌의 發育을 현저하게 높이기 위하여 Stokes 및 Bayne¹⁰⁾法에 따라 tryptcase soy agar 에 yeast extract 를 가한 여러개의 斜面培地에 37°C 에서 18시간 培養하였다. 그리고 凝固水を 버린 다음 각 斜面에 無菌生理食鹽水를 1.0 ml 씩 注入하여 수차례 흔들어서 集落을 洗滌脫落함으로써 集菌하였다.

集菌한 雛白痢菌浮遊液은 McFarland Scale No. 10 정도의 농도이었으며, 이것을 20 ml 씩 無菌小瓶에 분주하여 곧 眞空 冷凍乾燥시켜 4°C 에 保存하였다.

細菌의 放射性同位元素照射: 4°C 에 保存중인 眞空 冷凍乾燥細菌이 들어있는 10개의 小瓶을 10,000 Ci의 γ 線(⁶⁰Co)으로 線量率 25~35 kilo-Röntgen(이하 k^R)/h 인 조건하에서 일정한 거리와 시간에 맞추어 100, 200, 300.....1,000 K^R 線量順으로 10段階別 照射를 하였다. 그와 같이 照射한 각 병속의 冷凍乾燥細菌에 대한 生存여부를 확인하기 위하여 이것을 새로운 nutrient 寒天培地에 각각 移植하여 培養해 보고 最少線量으로 不活性化된 菌株만을 無菌生理食鹽水로 McFarland Scale No. 2가 될 정도로 저희석한 다음, 無菌硝子球를 여러개 넣고 1시간 強振盪하고 濾過한 濾液을 4°C 에 保存하였다.

細菌의 加熱 및 Formalin 處理: 純粹分離培養한 非眞空冷凍乾燥 菌浮遊液의 일부에는 1% formalin 를 첨가하고, 다른 일부에 대해서는 80°C 에서 30분간 加熱하여 不活化한 다음 여과하고 McFarland Scale No. 2로 하여 4°C 에 보존하면서 사용하였다.

抗原: 사용된 抗原은 γ 線照射와 加熱 및 1.0% formalin 處理를 한 3가지 보존 浮遊液이었다. 家兔高度 免疫用抗原에는 보호제를 同量加入하였고, 凝集反應用 抗原은 保護제를 가입하지 않았다.

家兔高度免疫血清: 건강한 體重 2.5 kg 이상된 白色 家兔 15두를 준비하여, 5두에게는 보존되었던 γ 線照射 抗原을 다른 5두에게는 加熱處理抗原을 그리고 나머지 5두에게는 1.0% formalin 處理 抗原을 각각 10% sodium glutamate 에 혼합하여 각 家兔마다 0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 4.0 ml 및 8.0 ml 씩 5회에 걸쳐 耳靜脈에 주사한 다음 7일만에 全採血하여 抗血清을 얻어 15두분을 各瓶에 分注하여 56°C 에서 30분간 非動化한 후 -30°C 에 凍結保存하였다.

凝集反應: 本試驗에 사용된 凝集原은 前述했던 3가지 抗原이었으며, 그것을 100배로 재희석하였다. 그리고 대응抗血清은 高度免疫시킨 5두분씩의 3가지 家兔 抗血清과 10수분의 雛白痢陽性 닭血清을 5배로 부터 1,280배까지 0.4% 식염수로 階段稀釋하여 凝集反應을 比較試驗하였다.

모든 凝集反應에 사용된 稀釋液은 0.4% NaCl 용액

으로 통일하였고, 對照用 正常血清도 56°C에서 30분간 非動化하였다.

특히 凝集反應 結果判定에 所要되는 最適時間을 정하기 위해서는 γ 線照射로 處理된 抗原을 豫備試驗으로 決定된 規定稀釋度로하고, 앞의 3가지 家兔抗血清을 5배로 부터 1,280배까지 階段稀釋하여 1時間, 2時間, 3時間, 6時間, 12時間, 18時間 및 24時間別로 凝集反應을 실시하면서 관찰하였다.

그리고 10수의 雜白痢 陽性血清에 대한 凝集反應 比較試驗은 정하여진 γ 線照射處理 凝集抗原으로만 16例의 家兔抗血清에 대하여 행하였다. 술식은 試驗管内 凝集反應을 실시하여 凝集力價를 比較判定하였다. 이때의 反應溫度는 37°C이고 12時間 反應시켰다.

結 果

γ 線照射菌에 대한 成績: γ 線을 線量別로 照射處理한 雜白痢菌을 Stokes 및 Bayne 培地の 斜面에 移植培養하였던바, 200 k^R 이상의 線量에서는 發育되지 않았으므로, 本菌이 不活性化되는데 필요한 γ 線의 最少量 限界가 200k^R임을 알게 되었다.

家兔抗血清의 凝集比較試驗: 준비했던 3가지의 處理 凝集抗原과 이것에 의하여 만들어진 5例씩의 3가지 家兔抗血清에 대한 交叉凝集反應을 37°C에서 24時間 比較試驗을 하였더니 表 1에서 보듯이 어떤 경우이던 γ 線照射抗原에 의한 凝集性이 높았다. 즉 γ 線照射 家兔

抗血清에서는 5例가 모두 640배이었고, formalin 處理 家兔血清에서는 160배이었으나, 加熱處理 家兔抗血清에서만은 他に 比하여 比較的 낮은 40배이하의 陽性反應을 보였다.

한편 formalin 이나 加熱處理를한 兩 抗原의 各 抗血清에 대한 凝集性은 前者에서 보다 낮아 40~80배이었고 特히 加熱處理를한 抗原에 의한 凝集性은 모든 경우 40배이하로 낮았다.

時間別 凝集反應: 規定濃도로 희석한 γ 線照射抗原만으로 3가지의 家兔抗血清을 5배~1,280배까지 階段

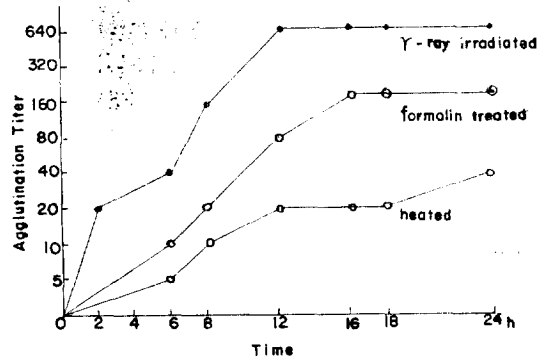


Fig. 1. Agglutin titers of rabbit antiseraprepared by the inoculation of γ -ray irradiated, formalin-treated or heated, and tested with γ -ray irradiated *Salmonella pullorum* antigen.

Table 1. Agglutinability of *Salmonella pullorum* Prepared by γ -Ray Irradiation, Formalin Treatment or Heating and Tested with Rabbit Specific Antisera

Antigens	No. of γ -Ray Irradiated Rabbit Antiserum					
	1	2	3	4	5	
γ -Ray Irradiated	640	640	640	640	640	
Formalin Treated	80	80	160	160	160	
Heat Treated	20	40	40	40	40	
Antigens	No. of Formalin Treated Rabbit Antiserum					
	γ -Ray Irradiated	320	320	320	320	160
	Formalint Reated	40	40	80	80	80
	Heat Treated	20	20	40	40	40
Antigens	No. of Heat Treated Rabbit Antiserum					
	γ -Ray Irradiated	40	40	80	80	80
	Formalin Treated	40	40	40	80	80
	Heat Treated	20	20	40	40	40

稀釋하여 37°C에서 前述했던 대로 時間差別 凝集性を 比較 관찰하였던 바, 圖 1에서 보듯이 γ 線照射 家兔抗血清에서는 反應후 2時間에 20배의 凝集性を 보이더니 12時間만에 最高凝集性を 보이면서 24時間까지 640배를 維持하였다.

한편 formalin이나 加熱處理를 한 兩 家兔抗血清에 있어서는 反應후 6時間에 5~10배를 보이더니 12時間부터 18時間 사이에 反應이 完結되었다. 그러나 前者에서 보다 凝集性は 弱하였으며 그중에서 加熱處理 家兔抗血清은 24時間이 되어야 40배의 낮은 凝集力價를 나타냈다.

陽性 닭 血清의 凝集反應: 이 試驗은 平板凝集反應法에 의하여 陽性判定된 10수분의 離白痢 닭血清에 대하여 線照射凝集原만으로 試驗管内凝集反應을 실시한 것이다. 즉 γ 線照射 抗原으로 陽性 닭 血清을 0.4% 食鹽水로 5배로부터 1,280배까지 段階稀釋하여 37°C에서 12時間反應을 하였던 바, 高度免疫家兔抗血清의 凝集성에 가까운 成績을 얻었다. 여기서 1,280배인 것 1例와 80배인 것 1例를 제외하고 나머지 可檢血清에서는 320배가 3例 640배인 것이 3例로 320~640배 범위의 것이 全體 10例중 6例이었다.

考 察

冷凍乾燥된 細菌을 放射性同位元素로 照射하였을 때 菌體의 分子構造에 영향을 미쳐서 發育이 停止된다는 Lea⁶⁾의 科學的인 理論과 Carpenter³⁾에 의한 放射性同位元素를 照射한 細菌이 最少限度量的 酸素를 섭취하고 있을 뿐 그의 分裂과 增殖은 完全히 停止되는 동시에 病原性도 소실된다는 學理的인 根據 아래 著者は 冷凍乾燥한 離白痢菌의 標準菌株에 200 K^R의 γ 線을 照射함으로써 그의 發育과 增殖을 停止시킬 수 있었다. 이 抗原이 과연 formalin 處理나 加熱處理를 한 각 抗原에 의한 離白痢 陽性 닭血清과의 凝集성이 어떻게 다른가를 比較하였던 바 表 1에서 보듯이 同系間의 反應結果에 있어서나 異系間의 凝集성에 있어서, 모두 γ 線照射 試驗群보다 낮은 凝集性を 보이였다. 그러나 이들 反應중 γ 線照射 抗原에 의한 凝集反應에 있어서 γ 線照射 家兔抗血清과의 凝集力價는 640배로 formalin이나 加熱處理에 의한 家兔抗血清에서의 320배나 80배보다 높은 力價를 보인 것은 뜻있는 比較試驗이 되었다고 생각된다. 여기서 加熱處理 試驗群의 凝集성이 他에 比하여 40배 이하로 낮은 이유를 考察컨데 Luzzio 등의 理論과 일치되는 바 加熱에 의한 菌體成分의 變

質에 기인된 것으로 생각된다. 凝集反應에 사용된 모든 稀釋液은 0.4% NaCl 용액으로 限定한 것은 高濃度 食鹽水로 인한 自發的 凝集을 막아 抗原과 抗體間의 反應을 촉진하기 위해서였다.

時間別 凝集反應에서는 圖 1에서 보는 바와 같이 反應溫度를 37°C로 固定할 때 이 試驗에서 어떤 경우이던 反應후 12時間이상만 되면 凝集反應過程중 最高의 安定域을 형성할 수 있음을 알 수 있으며 특히 γ 線照射 試驗群에서는 他에 比하여 더욱 뚜렷한 凝集性を 보였다고 믿어진다.

그리고 表 2에서 보는 바와 같이 10수의 離白痢 陽性 닭血清에 대한 凝集反應結果에서도 高度免疫된 家兔抗血清보다는 多少 못하지만 거의 같은 水準의 凝集力價인 320~640배를 보인 것은 만족스러운 결과라고 생각된다. 따라서 현재 사용하고 있는 判定基準凝集力價인 40~50배보다 약 13곱 가량 높은 差異가 있다는 사실로 미루어 보아, 結局 本 凝集反應의 比較試驗結果가 離白痢病을 診斷하는데 있어서 應用될 수 있다는 假定을 提示한 實驗의 意義가 있는 것으로 생각한다.

結 論

γ 線(⁶⁰Co)照射를 한 標準型 *Salmonella pullorum*을 診斷用抗原으로 하여 高度免疫 家兔抗血清과 離白痢 陽性 닭血清에 대한 試驗管内 凝集試驗으로 이들의 凝集性を 比較實驗한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. γ 線을 照射한 離白痢菌 抗原에 의한 凝集反應에서 formalin이나 加熱處理한 抗原인 때의 凝集性보다 優秀하였다.
2. 離白痢 陽性 닭血清에 대한 試驗管内 凝集試驗의 最適反應 判定時間은 37°C에서 12時間째이었다.
3. γ 線照射抗原에 의한 陽性 닭血清의 凝集力價는 320~640배이었다.

參 考 文 獻

1. Aoki, S., Kashiwazaki, M., Sato, S., Watass, H. and Sakamoto, C.: Application of agar gel precipitin test to the diagnosis of Pullorum disease. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (1963) 3 : 175.
2. Bivins, J.A.: A survey of the incidence of serological variants of *Salmonella pullorum* in Michigan. Poultry Sci. (1948) 27 : 629.
3. Carpenter, C.M., Nayler-Foote, A.W.C., Taplin,

- G. V., Lawrence, C.A. and Drake, C.L.: Preliminary report on vaccines prepared from gamma irradiated *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella suis*. Ann. Rev. Tuberc. Pulm. Dis. (1959) 76 : 374.
4. Chun, S.Y., Choi, T.K. and Lew, J.: Immunological studies on gamma ray (^{60}Co) irradiated *Salmonella typhi*. The K.C. Hour. of Med. (1964) Vol. 6, No. 6, 651.
5. Gage, G.E., Paige, B.H. and Hyland, H.W.: On the Diagnosis of infection with *Bacterium pullorum* in the domestic fowl. Mass. Agr. Exp. Sta. Bulletin (1914) No. 148.
6. Lea, D.E.: Action of radiation on living cells. Cambridge Univ. Press. London. (1955) p. 25.
7. Luzzio, A.J., Bashnell, L.D. and Erwin, L.E.: **The antigenic variation of *Salmonella pullorum*** Poultry Sci. (1953) 32 : 7.
8. Rettger, L.F., McAlpine, J.G. and Warner, E.: A comparative study of the routine macroscopic agglutination and intracutaneous test for *Bact. pullorum* infection in poultry breeding stock. J. Am. Vet. Med. Ass. (1930) 77 : 47.
9. Schaffer, J.M., MacDonald, A.D., Hall, W.J. and Bunyea, H.: A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. J. Am. Vet. Med. Ass. (1931) 79 : 236.
10. Stokes, J.L. and Bayne, H.G.: Growth rates of *Salmonella* colonies. J. Bact. (1957) 74 : 200.
11. 최재윤, 이시영, 이창구 : 추백리진단에 있어서 혈청응집과 한천겔 침강반응과의 비교시험, 가축위생연구소보 (1970) 16 : 1.

A Comparative Experiments for Tube Agglutination Test of *Salmonella pullorum* Antiserum with γ -Ray (^{60}Co) Irradiated *Salmonella pullorum*

Boo Kap Seo, D.V.M., Ph.D.

Department of Veterinary Medicine, The City College of Seoul

Abstract

An agglutinability between naturally infected positive chicken serum of pullorum disease and hyperimmunized rabbit antiserum was compared. And the following results were obtained and summarized.

1. On the agglutinability, *Salmonella pullorum* antigen which irradiated γ -ray was more excellent than another both formalized and heated antigen.
2. Time of judgement as positive titer in the tube agglutination test to the naturally infected positive chicken serum was it most suitable for 12 hours at 37°C.
3. Agglutination titer of positive immune chicken serum against γ -ray irradiate *Salmonella pullorum* were as 320~640x,