

축우 부루셀라병의 ELISA 진단법에 관한 연구

임윤규·이두식·박전홍·양기천·김승호·김공식*
현관중*·김우택*·이영순**
제주대학교 수의학과·제주도가축위생시험소*
서울대학교 수의과대학**
(1992년 9월 25일 접수)

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*

Yoon-kyu Lim, Doo-sick Lee, Jun-hong Park, Ki-chun Yang,
Seung-ho Kim, Kong-sick Kim*, Kwan-jong Hyun*, Woo-tack Kim*,
Yong-soon Lee**

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

Cheju Veterinary Service Laboratory*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University**

(Received Sep 25, 1992)

Abstract : Enzyme-linked Immuno sorbent Assay (ELISA) for the serological diagnosis of *Brucella abortus* was developed and compared with plate agglutination test. Cell wall antigen was extracted from *Brucella abortus* 1119-3 by sonication and with a sodium deoxycholate solution. Optimum protein concentration of coating antigen were 0.4 µg/100 µℓ protein on each microtiter plate well. Horse radish peroxidase (HRP) labeled protein-G was used as a tracer of reacted antibodies. ELISA confirmed the agreeable 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 for the early diagnostic tools of Brucellosis in cattle.

서 론

브루셀라병은 소, 돼지, 양, 말, 개 등에 발병하는 범정가축전염병이며 사람에게도 전염되는 인수공통전염병이다. 소, 돼지 등 가축이 이 병에 걸리면 주로 불임 또는 임신된 가축의 유산(30~40%)을 일으키지만 사람에서는 열병(파상열), 관절염, 오한 등을 일으킨다.¹ 소가 이 병에 걸렸을 때는 불임이나 유산외에는 외형상 별다른 증상을 나타내지 않는다. 따라서 실험실 내에서 혈청학적인 검사를 하여야 이 병의 감염유무를 확인할 수 있다.

Brucellosis는 국내에서는 1958년 제주도 송당목장에서 발생이 보고된 이래 박멸되지 않고 지속적인 발병사례가 보고되고 있다.²⁻⁹

진단법으로는 가축위생연구소의 김 등¹⁰이 평판응집 반응에 의한 진단법을 비교 검토한 이래 1984년 이후 평판응집법을 공정진단법으로 사용하고 있으며¹¹, 그외에 Milk ring, CF 반응 등도 이용되고 있다.¹²

축우에 발병하는 *Brucella abortus*의 진단을 위하여 국외에서는 Latex agglutination test¹³ nylon bead ELISA¹⁴ gel test¹⁵ ELISA^{15, 16} 등의 방법이 이용되었으며, 1988

년 이스라엘의 이섬연구개발회사에서는 *B abortus*의 항체를 소 혈청에서 ELISA법으로 진단하는 kit을 개발한 바 있다.¹⁷

국내에서는 제주도의 발병율이 전국에서 가장 높으며¹⁸, 예방접종은 하지 않고 혈청검사 후 양성을 나타내면 살처분하는 방식을 취하고 있다. 이 병의 방역을 위하여 1985년부터 제주도내의 전 축우를 대상으로 일제검진을 실시하여 양성우를 살처분하고 있으나 근절되지 않고 지속적인 발생을 하고 있으며 근래에는 그 발생이 오히려 증가하는 추세를 보이고 있다.¹⁸ 이에 대한 문제점으로 전년도 검진시 의양성반응을 보여 재차 검사한 결과 음성으로 처리된 소 중에서 금년도에는 양성으로 전환발생하는 경우가 있다하며 이 병으로 유산한 소도 검사하면 음성으로 나타나는 경우가 있다고 한다.¹⁸ 그러므로 검진에 이용되는 방법의 민감도를 높여야 할 필요가 있다.

한편 평판응집반응법에 의해 의양성반응이 나타난 소에 대해서는 최초 채혈한 날로부터 30~60일 이내에 시험관응집반응법으로 재검사를 실시하여야 한다(농림수산부 예규 제 142호). 그러나 이 기간에도 감염확산의 우려가 크다. 그러므로 특히 의양성 판정우에 대하여서는 보다 더욱 감도높은 진단방법을 이용하여 이 병의 감염여부를 신속히 판정, 조치하여 감염 전파기회를 최소화 시켜야 할 필요가 있는 것이다.

본 연구에서는 소의 *Brucella* 감염진단을 위한 ELISA법을 실시하여 현재 공정진단법으로 사용되고 있는 응집반응법과 결과를 비교하였으며 조기진단방법으로서의 ELISA법의 실용가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

항원준비 : 제주가축위생시험소에서 분양받은 *Brucella abortus* 1119-3 배양균을 Jagannath와 Sehgal¹⁹의 방법을 응용하여 준비하였다. 즉, 냉 아세톤으로 냉장온도(4℃)에서 18시간 처리하여 침전된 균체를 생리식염수로 10회 세척하여 10% (w/v) 부유액으로 만든 후 ice bath 내에서 초음파 분쇄하였다(120W×20min, Ohtake Works, Japan). 초음파 처리한 균체액은 원심분리(20,000×g for 20min. at 4℃)하여 침전된 균체분쇄물을 생리식염수로 10회 세척한 후 sodium dodecyl sulfate를 0.01% 되게 용해하여 30℃에서 1시간 방치한 다음 원심분리(60,000×g for 20min.)하였다. 얻어진 상층액은 phosphate buffered saline(PBS)으로 평형된 column PD 10 (Pharmacia, Sweden)을 사용하여 투석하고, Lowry의 방법으로 단백량을 정량한 후 -20℃에 보관하여 cell wall 항원으로서 ELISA에 사용하였다.

공시혈청 : 제주도내에서 1991년도에 검진하여 판정된 소의 혈청중 무작위로 선택한 양성혈청 28건, 음성혈청 15건과 의양성 판정시 및 30~60일후 확정판정한 축우 20두의 혈청 32건을 대상으로 실험을 실시하였다.

항원의 흡착 : ELISA plate(Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)의 각 well에 흡착용 완충액(50mM Carbonate buffer, pH 9.6, containing 0.02% sodium azide)으로 희석한 항원을 100 μl 씩 분주하고 냉장 온도에서 약 16시간동안 정지한 후 PBS로 세척하고, 0.5%의 gelatin PBSZ용액으로 실온에서 30분간 봉쇄한 후 PBS로 세척 및 건조하여 냉장 desiccator에 넣고 보관하며 실험에 사용하였다.

효소면역 측정법 : 동물혈청을 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS로 50배 희석하여 100 μl 씩 각 well에 가하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 3~4회 세척 후 Horseradish peroxidase(HRP)가 표지된 protein G를 임 등²¹의 방법대로 제조 및 사용하여 100 μl 씩 well에 가하고 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 3~4회 세척하고 발색제로 ABTS를 넣었다. 30분간의 발색반응이 지나면 100 μl 의 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 표준편차값을 더한 값을 기준으로 이보다 높은 흡광도를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.^{21,22}

평판응집반응법 : 농촌진흥청 가축위생연구소에서 제조한 부루셀라 진단액을 사용설명서에 의거하여 실험 및 판정하였다.

결 과

흡착항원의 최적농도 : 항원을 단백질농도 20, 4, 1, 0.2 μg/ml 되게 흡착완충액으로 희석하여 흡착시킨 후 평판응집반응법으로 검사하여 비교적 낮은 역가(1:25~1:200)를 보인 혈청시료 몇건(HR6164, HR6190, HR4210, HR4248)을 선택하여 ELISA를 실시하였을 때 Fig 1과 같이 단백질농도 0.4 μg/100 μl 일 때 가장 높은 결합을 보였으므로 이 값을 선택하여 이후의 ELISA에 동일한 조건을 적용하였다.

ELISA의 양성판정기준 : 평판응집반응법으로 판정된 음성혈청 16건으로 ELISA를 실시하였을 때 흡광도의 평균 및 표준편차 즉, Mean±SD=0.113±0.0092로 나타났다. 그러므로 cut off는 Mean+3SD=0.140으로 결정하여 양성 혹은 음성을 판정하였으며 cut off치의 흡광도에 ±0.005인 경우(OD 0.135~0.145) 재시험을 실

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

PAT* (No. of sera)	ELISA	
	Positive	Negative
Positive(27)	24	3
Negative(16)	0	16

* 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	Dubious	→Negative
Positive	10	11	1	NC ³⁾
Dubious	1		2	NC
Negative	1	1	5	NC

PAT : plate agglutination test

TAT : tube agglutination test confirmed 30~60 days after PAT

NC : not confirm

시하거나 판정을 보류하기로 결정하였다.

ELISA와 평판응집반응법에 의한 *Brucella* 항체검출 : 평판응집반응법으로 판정한 양성혈청 27건, 음성혈청 16건에 대하여 ELISA를 실시한 결과 Table 1과 같이 각각 양성 24건, 음성 16건으로 93% (40/43)의 일치율을 보였다.

한편 1차 평판응집반응법으로 의양성의 결과가 나온 후 30~60일후에 재차 채혈하여 2차 시험관응집반응법으로 확정 판정한 20두의 혈청에 대하여 ELISA를 실시한 결과는 Table 2와 같이 다양한 결과를 나타내고 있다. 또한 양성 확정판정 되었던 10두 혈청의 ELISA 결과는 Table 3과 같이 1차혈청에서 이미 OD 0.150 이상의 값을 나타내고 있으며 2차혈청에서 모두 OD치 0.4 이상을 나타내고 있다. 특히 OD 2.0 이하로 나타난 혈

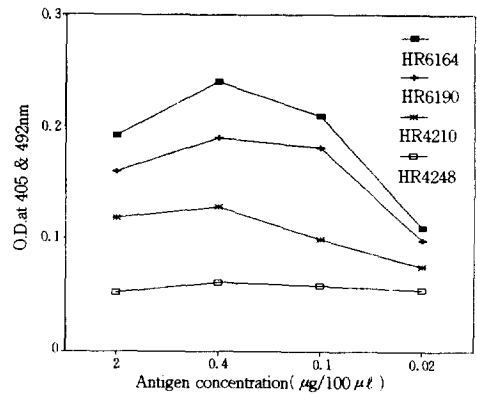


Fig 1. Determination of optimum concentration of Br. antigen for ELISA plate coating.

청은 2차혈청에서 모두 OD가 증가하는 양상을 보였다. 축우 일련번호 SS92의 경우 1차혈청으로는 OD치 0.139로 cut off치에 근접한 값을 보였으나 2차혈청은 OD치 1.042로 높은 역가를 나타내었다. PS844의 경우는 1차 및 2차 혈청이 모두 OD치 각각 0.101 및 0.108로 나타나 기존의 응집반응 양성인 결과와 불일치하였다.

의양성 결과가 나온후 최종적으로 음성판정된 8두의 축우혈청의 1차 평판응집반응시의 혈청은 ELISA로 실시하여 2건 양성(각각 OD 0.570, 0.150), 1건 의양성(OD 0.145), 5건 음성(0.107~0.130)으로 나타났으나 2차 시험관응집반응시의 혈청은 보관되어 있지 않은 관계로 ELISA를 실시하지 않았다.

고 찰

*Brucella*에 감염된 소는 초기에 IgM 항체가 형성되어 2주 후에는 최대치를 기록한다. IgG는 4~6주에 IgM

Table 3. Serological results of ELISA from the dubious sera according to the time of exsanguination

Cow No.	1st.	Exsang.	2nd.	Exsang.	Note **
	OD	Judgement*	OD	Judgement	
PS844	0.101	N	0.148	N	=
SS92	0.139	D	1.042	P	+
PS795	0.156	P	0.401	P	+
KJ4138	0.245	P	0.289	P	+
SS980	0.279	P	0.812	P	+
CH309	0.826	P	1.241	P	+
PS763	0.897	P	1.360	P	+
NC1	1.126	P	1.499	P	+
KJ1610	1.165	P	1.439	P	+
CH317	2.116	P	1.669	P	-
PS972	2.260	P	1.991	P	-
CH342	2.0<	P	1.828	P	-

* N ; negative, D ; dubious, P ; positive

** tendency of OD change from 1st. to 2nd. sera(= ; equal, + ; increase, - ; decrease)

항체를 능가하여 이후 지속하며²³ 또한 높은 역가의 nonagglutinating antibody (IgG subclass)도 갖는다. 한편 이러한 nonagglutinating antibody는 opsonizing activity가 없으며 이 병원균의 제거를 위한 기능도 없어서 Brucella 감염의 만성화를 조장한다고 한다.²³ 더욱이 이 항체는 agglutinating IgM이나 IgG2 항체를 경쟁적으로 차단하여¹² 현재 공정진단법으로 이용되고 있는 평판응집 반응법으로는 검출되지 않으며 오히려 방해현상을 일으킨다. 그러나 ELISA 방법으로는 검출이 가능하다.²³

항원의 재료로 실험에 사용한 *B abortus* No. 1119주(U.S.D.A, Bureau of Animal Industry Stock Antigen)는 strain의 혈청형에 관계없이 항원으로 사용할 수 있다하여 이 실험에서 채택하였다.²⁴

Jagannath와 Sehgal¹⁹에 의하면 ELISA를 실시할 때 plate 흡착용 항원으로서 균체와 cell wall 항원이 sonicate 항원보다 특이도가 더 높았다고 하였으며 그 중 균체 전체를 항원으로 사용하였을 때는 실험과정 중 solid phase로부터 탈락되는 경향을 보였다고 하였으므로 본 실험에서는 cell wall 항원만을 선택하여 ELISA를 실시하였다.

평판응집반응법으로 음성 판정된 16건의 혈청에 대하여 ELISA를 실시하여 얻은 흡광도의 평균과 표준편차를 적용하여 cut off를 결정하였으며 이 값에 0.05의 가감의 경우는 양성 혹은 음성으로 판정치 않고 의양성으로 칭한 후 이후의 측정치에 적용하였다. 이 실험에 공시된 양성혈청 28건 중 3건은 ELISA로 음성판정되었다. 이러한 결과의 차이는 본 실험에서 사용한 tracer 즉, 효소접합체 protein G는 오로지 IgG type의 항체와만 반응하는 성질이 있기 때문에, 이 혈청이 IgG가 형성되기 전단계 즉, IgM만이 형성된 감염초기의 것이라 이를 감지하지 못하였거나 혹은 평판응집반응시 비특이적인 응집반응을 일으켰을 가능성이 있을 것으로 생각된다.

의양성반응을 보인 후 재검사하여 양성으로 최종확정된 축우의 의양성시점의 혈청 12건은 ELISA로 검사하였을 때 10건이 양성, 1건이 음성으로 나타났고 1건은 확정이 어려웠고, 4~6주후에 재차 채혈한 혈청을 ELISA로 검사하였을 때 11건이 양성으로 나타났고 1건은 여전히 음성으로 판정되었다. 한편 의양성시 및 재검사시의 흡광도의 증감을 비교하였을 때 흡광도 2.0 이하를 나타낸 중등도의 항체양성우는 흡광도가 증가하는 경향을 보였다. 그러므로 재검사를 위해 대기하는 30~60일의 기간에 병의 진행이 있었음을 짐작할 수 있었다. ELISA법으로 검사하여 음성으로 나타난 1건의 혈청은 흡광도의 차이 즉, 항체가의 변화가 없었던 것

으로 미루어 평판응집반응검사시 비특이적인 양성을 나타냈던 것으로 생각된다.

이러한 결과를 종합하여 보면 ELISA방법을 이용한다면 평판응집반응법으로 의양성반응을 보인 경우에 대하여 대부분을 확정판정 할 수 있을 것이며 그에 따르는 조치를 신속히 취할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 중요성은 만일 의양성반응우들을 확정판정시까지 한 곳에 격리시켜 놓을 경우 후에 음성판정을 받은 소라 할지라도 이들은 결과적으로 양성우들과 같은 장소에서 일정기간을 같이 사육된 것과 마찬가지로 오염이 된 채 다른 감염되지 않은 집단으로 돌아와 같이 사육되어 또한 병의 전파에 일조를 할 것이므로 검사방법의 민감도는 부루셀라병의 퇴치에 가장 근간이 되는 요소라 할 수 있겠다.

한편 본 실험에서는 많은 수의 혈청을 대상으로한 결과를 얻어내지 못하였고 또한 IgM 항체에 대한 검출방법이 결여되어 있었다. 그러므로 추후 더 많은 동물을 대상으로한 Brucella 항체의 정상치를 조사할 것이며 I-gG와 IgM을 같이 검출할 수 있도록 ELISA 체계를 보완하여야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Meyer ME, Brucella in 'Review of Veterinary Microbiology'. Blackwell Scientific Publication Inc.; 1990; 250~258.
- 2~9. 농림수산부 통계연보. 1983~1990.
10. 김병구, 주병균, 이택성. 부루셀라증에 관한 연구. 가축위생연구소보 1960; 10:9.
11. 농림수산부예규 제 142호 제 10조, 제 15조 1988; 1~11.
12. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. The genus Brucella. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious diseases of domestic animal 8th. ed. 1988; 135~146.
13. Limet JN, Berbinschi A, Cloeckart A, et al. Longitudinal study of brucellosis in mice by immunoassay of lipopolysaccharide-related antigens in blood and urine. *J Med Microbiol* 1988; 26: 37~45.
14. Perera VY, Creasy MT, Winter AJ. Nylon bead enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sub-picogram quantities of Brucella antigens. *J Clin Microbiol* 1983; 18(3): 601~608.
15. Nielson KH, Heck FC, Stiller JM, et al. Interaction of specifically purified isotypes of bovine antibodies to Brucella abortus in the hemolysis in gel test and

- enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 1983 ; 35(1) : 14~18.
16. Tabatabai LB, Deyoe BL. Specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 1984 ; 20 : 209~213.
 17. Yissum Res Devel Co. Reagents, kits and enzyme immunoassays using stabilized nonviable bacteria having an immunoglobulin receptor and an enzyme label. Fr. Demande FR 2,604,259. 1988 ; 21pp.
 18. 제주도가축위생시험소. 제주도내 축우부루세라병 방역대책. -전문가초빙, 방역대책연구(과업)계획(안)-. 1991 ; 3.
 19. Jagannath C, Sehgal S. Enhancement of the antigen-binding capacity of incomplete IgG antibodies to *Brucella melitensis* through Fc region interactions with staphylococcal protein. *A J Immunol Methods* 1989 ; 124 : 251~259.
 20. 임윤규, 우희종, 이영순. Protein G 효소표지면역 반응법에 의한 Sendai virus 항체검출. 한국실험동물학회지 1991 ; 7 : 53~61.
 21. Nicholson B, Caswell P. Enzyme-Linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J Clin Microbiol* 1982 ; 16 : 469~472.
 22. Shoji Y, Itoh T, Kagiya N. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to CAR bacillus. *Exp Anim* 1988 ; 37 : 67~72.
 23. Parma AE, Santisteban G, Margini RA. Analysis and *in vivo* assay of *B abortus* agglutination and non-agglutinating antibodies. *Vet Microbiol* ; 1984 : 9 : 391~398.
 24. Spink WW. The nature of brucellosis. *Minneapolis Univ Minnesota* 1956 ; 202.
-