

Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단용 kit 개발에 관한 연구

서명득 · 주후돈* · 데이빗 마스**

경상대학교 수의과대학
농촌진흥청 수의과학연구소*
뉴질랜드 농수산성 왈라스빌 가축위생연구소**
(1995년 5월 4일 접수)

Development of diagnostic kit(Test-MT) for the microplate latex agglutination test of toxoplasmosis in animal

Myung-deuk Suh, Hoo-don Joo*, Daivd Maass**

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
Veterinary Research Institute, Rural Development Administration*
Wallaceville Animal Research Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries of New Zealand**
(Received May 4, 1995)

Abstract : The present study was conducted to develop a toxoplasma latex agglutination test antigen(Test-MT) and evaluate the toxoplasma latex agglutination(LA) test using a newly-made "Test-MT kit" by comparing with the Toxo-MT kit(Eiken chemical co, Tokyo). Also, the specificity and sensitivity test were made by comparing with IFA test and IgG-ELISA.

Tachyzoite suspensions of *Toxoplasma gondii*(RH strain) were ultracentrifuged for 30min at 60,000×g(4℃) and the supernatant was used as a water-lysate antigen. Polystyrene latex particles of 1.0μm in diameter(Polyscience co) were used for the preparation of sensitized latex-antigen suspension(Test-MT).

The frequency distribution of LA titers in Test-MT showed two peaks at < 1:32 and 1:128. The borderline titer for positive test in Test-MT was determined to be 1:64. But the frequency distribution of LA tites in Toxo-MT showed two peaks at < 1:16 and 1:64. The positive borderline was determined to be 1:32.

Agreement of reactions between Test-MT and Toxo-MT kit by LA test was shown 92.5% in bovine sera and 97.0% in swine sera, respectively.

From the results obtained here it was determined that the sensitized latex-antigen, Test-MT kit, for the microtiter agglutination test prepared as same as by the procedure described in the previous paper(Suh and Lee, 1993) was useful as a highly specific, sensitive and stable immunotiteration reagent for serodiagnosis of toxoplasma infection in animal sera.

Key words : canine, toxoplasmosis, latex, protozoan disease

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 대학교수 국비 해외파견(공동연구) 학술조성비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr Myung-deuk Suh, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

서 론

동물의 톡소플라즈마병은 원충인 *Toxoplasma gondii* (이하 Tp)에 의한 원충성 질병으로 포유동물과 조류 및 사람에게 까지 감염을 일으키는 인수공통감염병으로 공중 위생 및 보건위생상 매우 중요한 질병이며 특히 고양이를 제외한 다른 동물들은 이 원충의 중간숙주로 알려져 있다^{1,4}. 뉴질랜드나 호주등 면양산업이 발달한 나라에서는 면양의 유산을 일으키는 가장 중요한 질병의 하나로 이들 나라에서는 면양에서 Tp에 의한 유산을 예방하기 위하여 Tp생독백신을 개발하여 이용하고 있다^{5,11}. Tp원충은 임신한 동물과 사람에게 감염되면 유사산과 태아기형을 일으키고^{1,3,12} 특히 사람에서 Tp감염과 후천성면역결핍증과는 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다^{13,15}.

Tp가 동물이나 사람에게 감염되면 대부분의 예에서 불현성 감염으로 경과하는 경우가 많아서 이 병의 조기진단에는 어려운 점이 대단히 많다. 그래서 이 병의 조기확진을 위해서는 숙주나 환자로 부터 원충을 직접 증명하는 방법¹⁶⁻¹⁸보다 혈청학적 진단법^{16,19,29}을 주로 이용하고 있다.

동물이나 사람에서 Tp에 대한 항체를 증명하는 방법으로는 색소시험법^{16,19,21,25} (DT), 보체결합저지반응^{30,31} (CFI), 간접적혈구 응집반응^{21,27,32} (IHA), latex 응집반응^{12,20,21,24,29,32,41} (LA), 간접형광항체법^{19,26,30,42,47} (IFA), 직접형광항체법⁴⁸ (DFA), 효소면역측정법^{26,28,31,36,49,50} (ELISA) 및 western blot 등¹³ 여러가지가 이용되고 있다.

이와같이 여러가지 진단법들이 개발, 이용되고 있으나 각각의 진단법마다 그 이용에 있어서 정확성과 특성 등이 다르고 또한 실험실에서 이용하는 데는 많은 시간과 특수한 장비가 이용되어야 하는 단점도 있다^{26,31,37,47}. 그래서 최근에 와서는 진단의 정확성과 진단효율을 동시에 기할 수 있는 간이진단법 즉 "진단 kit" 개발에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다^{45,46}. 특히 일본에서는 1970년대 후반에 여러 학자들^{12,45,46}에 의해 latex 응집반응용 kit(이하 Toxo-MT라 함)가 개발되어 Tp병의 진단에 널리 이용되고 있을 뿐 아니라 상업용으로도 시판되고 있다.

국내에서는 최 등^{20,35,36} 이 사람에서, 이 등^{37,38}이 돼지에서, 서 등⁴³이 개에서 그리고 최 등³⁸은 동물원의 야생동물들의 Tp항체조사에 "Toxo-MT kit"를 이용한 바 있으나 이들은 모두가 일본에서 구입하여 사용하였을 뿐 직접 생산하여 사용하지는 않았다.

그러나 서 등⁵¹은 latex응집반응용 진단액(이하 Test-TM라 함)을 실험적으로 생산하여 일본의 Toxo-MT와

비교시험을 수행한 바, 국내에서도 이 Test-MT를 Tp 진단용 kit로 이용할 수 있는 가능성을 보고하였다.

따라서 저자들은 서 등⁵¹이 보고한 연구결과에 대한 몇가지 문제점을 보완하고 확대실시하여 국내의 각종 동물에 대한 Tp병의 신속정확한 진단법으로서 "Test-MT kit"를 생산하여 이용할 수 있다는 결론을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용원충주 : 농촌진흥청 가축위생연구소(현 수의과학연구소)에서 분양받은 *Toxoplasma gondii*(RH-strain)의 tachyzoite를 20~25g의 마우스 복강내에 매 3~4일간격으로 연속계대하면서 실험에 사용하였다.

사용개 및 양성혈청 : Letex 응집반응용 kit⁴⁵인 Toxo-MT(Eiken chemical co)와 IFA에서 Tp항체 음성인 생후 8개월에서 12개월령의 잡종개에 Tp감염 마우스를 경구적으로 섭식케 하여 인공감염시킨 후 42일째에 채혈하여 Toxo-MT에서 혈청항체가 1:128인 것을 양성혈청으로 그리고 인공감염 전에 채혈한 혈청은 음성대조로 사용하였다.

항체조사에 사용한 혈청 : 도견장에서 채취한 개혈청 310예, 도축장에서 채취한 소와 돼지혈청 각 200예를 항체조사에 사용하였고 Test-MT kit와 Toxo-MT kit간의 반응일치를 비교에 사용하였다.

Latex입자 : 직경이 0.8, 1.0 및 1.5 μ m인 polystyrene latex bead(Polyscience co)를 사용하였다.

항원감작용 및 혈청회색용 완충액 : 완충액은 서와 이⁵¹의 방법에 따라 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였고, 혈청회색용 완충액은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 NaCl이 300mM, bovine serum albumine(Fraction V, Sigma, 이하 BSA라 함)이 0.5% 그리고 Tween-20(이하 T-20이라 함)이 0.01%가 함유되도록 제조(이하 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer, pH 7.4라 함)하여 사용하였다.

항원생산 : 항원생산은 서와 이⁵¹의 방법에 따라 생산하였으며 항원의 총단백량은 biconchonic acid assay (BSA: Pierce)법²²으로 측정하였다.

Latex 응집반응 진단액(Test-MT)의 제조 : 서와 이⁵¹의 방법에 따라 polystyrene latex bead의 직경의 크기별로 0.2% bead 부유액을 만들어 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 항원과 결합시킨 후 항원감작용 완충액으로 4,000 \times g에서 20분간 원심하고 그 상층액은 버리고 침전되어 있는 감

작항원(latex-antigen)은 0.5% BSA가 함유되어 있는 같은 완충액으로 희석하여 Test-MT를 제조하여 4℃에 보관하면서 시험에 사용하였다.

Latex 응집반응 : Polystyrene latex bead 직경의 크기 별로 제조한 Test-MT의 역가측정은 U자형 microplate (Green cross Co)를 사용하여 Kobayashi et al³² 및 서와 이⁵¹의 반응술식에 따라 수행하였다.

반응의 판독 : 반응판독은 서와 이⁵¹의 판독기준에 준하여 응집상이 가장 강하게 나타난 것을 3으로 하여 2, 1, 0.5 및 0의 순으로 판독하였으며 혈청희석배수 1:32 또는 그 이상을 양성으로 판정하였다.

간접형광항체시험(IFA) : 개혈청에 대한 IFA는 서 등⁴³ 및 Durham과 Colvin⁴⁷의 방법에 준하여 실시하였으며, conjugate는 rabbit-anti-dog IgG FITC(Cappel co)를 1:40으로 희석하여 사용하였다.

IgG ELISA 시험 : 돼지혈청에 대한 IgG-ELISA는 서 등³¹의 방법에 준하여 실시하였으며 conjugate는 horse radish peroxidase[swine IgG(γ)goat, KPL Inc]를 1:3, 200으로 희석하여 사용하였다.

Test-MT의 특이성과 민감성 조사 : Test-MT와 Toxo-MT의 특이성과 민감성은 개혈청(IFA)과 돼지혈청

(IgG-ELISA)을 사용하여 비교하였다.

Test-MT와 Toxo-MT와의 반응일치율 조사 : Toxo-MT를 대조로 하여 시제품인 Test-MT와의 반응일치율은 서와 이⁵¹ 그리고 Kobayashi et al³²의 방법에 따라 도살장에서 채취한 돼지와 소혈청 각 200예를 사용하여 비교하였다.

Test-MT의 보존성조사 : 시제품인 Test-MT는 제조한 날부터 4℃ 냉장고에 보관하면서 1~2개월 간격으로 역가를 측정하고 16개월까지 보존성을 조사하였다.

결 과

Latex bead의 크기에 따른 Test-MT의 반응 재현성 : Latex bead의 크기(직경)에 따른 Test-MT의 생산 lot 별 반응상의 적합성 여부를 조사한 성적은 Table 1에서와 같이 직경 1.5 μ m의 polystyrene bead로 생산한 Test-MT에서 5 lot 중 2 lot(40%), 1.0 μ m에서는 35 lot 중 31 lot(88.5%) 그리고 0.8 μ m에서는 15 lot 중 5 lot(33.3%)만이 적절한 응집상을 나타내었다.

표준 양 · 음성 혈청에 대한 Test-MT의 역가별 반응

Table 1. Reproducibility of latex agglutination reaction by different sizes of polystyrene latex bead

Diameter(μ m) of latex beads	No of production lot (A)	No of optimum binding lot (B)	Percent(%) (B/A)
P-1.5	5	2	40.0
P-1.0	35	31	88.5
P-0.8	15	5	33.3

재현율 : 직경 1.0 μ m의 polystyrene bead로 제조하여 반응상이 적절한 것으로 판정된 Test-MT 31 lot에 대한 역가 분포를 조사한 성적은 Fig 1에서와 같이 표준 개 양성 혈청과의 반응에서 512 \times 인 것이 8 lot(25.8%), 1024 \times 가 14(40.2%), 2048 \times 가 5(16.2%), 4096 \times 가 3(9.6%) 그리고 8192 \times 가 1 lot(3.2%)이었다. 표준 음성 혈청에 대한 역가 분포는 31 lot 중 역가 8 \times 에서 3 lot(9.7%), 16 \times 는 4(12.9%), 32 \times 는 7(22.6%), 64 \times 는 14(45.2%) 그리고 128 \times 에서는 3 lot(9.6%)이었다.

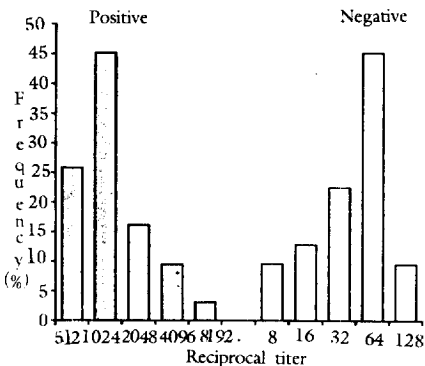


Fig 1. Frequency of reciprocal titers of Test-MT antigen against standard canine serum.

소와 돼지혈청에 대한 Test-MT와 Toxo-MT의 양성
과 음성한계선 비교 : 소와 돼지혈청으로 Toxo-MT를
대조로 하여 Test-MT와의 반응으로 양성과 음성한계
를 비교한 성적은 Fig 2에서와 같이 41예의 소혈청의
경우 Toxo-MT에서는 8× 이하의 음성은 20예(48.
8%), 16×인 의양성은 10예(24.4%), 32×의 양성
은 2예(4.8%) 그리고 256×는 1예(2.4%) 이었다.
그러나 Test-MT에서는 16× 이하를 음성으로 하였을
때 41예 중 음성은 11예(26.8%), 32×의 의양성은
9예(22.0%), 양성인 64×는 6예(14.6%), 128×
는 11예(27%) 그리고 256×는 4예(9.8%)이
었다.

47예의 돼지혈청의 경우 Toxo-MT에서는 8×
이하의 음성은 28예(59.6%), 16×의 의양성은
12예(25.5%), 양성인 32×는 0이었고 64×
는 2예(4.3%), 128×는 1예(2.1%), 256×
는 2예(4.3), 512×와 1024×는 각각 1예
(2.1%)이었다. 그러나 Test-MT에서는 16×
이하를 음성으로 하였을 때 47예 중 음성은
20예(42.6%), 의양성은 32×는 15예(31.9%),
양성인 64×는 5예(10.6%)이었고 128×
는 4예(8.5%), 256×는 2예(4.3%) 그리고
512×는 1예(2.1%)이었다.

양성반응의 비교에서 Toxo-MT(대조)의 32×
를 양성한계선으로 하였을 때 시제품인 Test-
MT에서는 64×가 양성한계선으로 구분되었다.

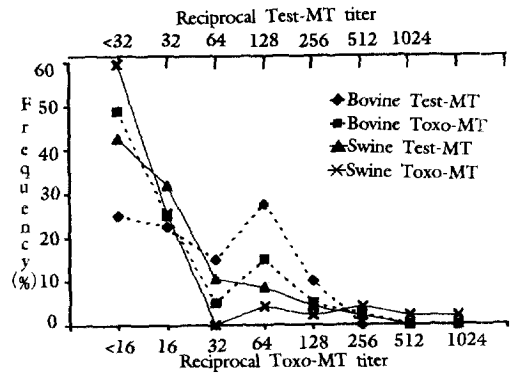


Fig 2. Distribution of reciprocal antibody titers of bovine and swine serum by Test-MT and Toxo-MT.

Test-MT와 Toxo-MT의 개혈청에 대한 항체역가별
반응일치율 : 개혈청에 대한 양자의 항체역가별 반응일
치율은 Table 2에서와 같이 8× 이하에서는 34.4%,
16×는 47.6%, 32×는 100%, 64×는 75.0%, 128×
는 66.7% 그리고 256× 이상에서는 100%이었다.

Table 2. Comparison of distribution and agreement in reciprocal antibody titers of canine sera by Test-MT and Toxo-MT

Reciprocal Test-MT titer	Reciprocal Toxo-MT titer									Total	% positive by Toxo-MT
	<8	8	16	32	64	128	256	512	1024		
<8	8	4								12	(0)
8	6	3	2							11	(0)
16		5	1							6	(0)
32	3	9	8		2	1				23	(13.0)
64		7	3		2					12	(16.7)
128		4	6	1	3		1			15	(33.3)
256			1	1	1	1		1		5	(80)
512						1	1		1	3	(100)
Total	17	32	21	2	8	3	2	1	1	87	(19.5)
% positive by Test-MT	(0)	(34.4)	(47.6)	(100)	(75)	(66.7)	(100)	(100)	(100)	(40.2)	

IFA에 의한 Test-MT와 Toxo-MT간의 특이성과 민감성 비교 : IFA로 310예의 개혈청에 대하여 Test-MT와 Toxo-MT와의 특이성과 민감성을 비교한 성적은

Table 3에서와 같이 양자의 특이성은 전자는 96.0% 그리고 후자는 98.0%로 비슷하였으나 민감성은 76.5%와 64.7로 약간의 차이가 있었다.

Table 3. Comparison of specificity and sensitivity between Test-MT and Toxo-MT of 310 sera collected from cross-breed dogs by IFA

Antigen (kit)	IFA		Specificity (%)	Sensitivity (%)
	+	-		
	(17)	(273)		
Test-MT +(25)	13	12	96.0	76.5
- (285)	4	281		
Toxo-MT +(17)	11	6	98.0	64.7
- (293)	6	287		

IgG-ELISA에 의한 Test-MT와 Toxo-MT간의 특이성과 민감성 비교 : IgG-ELISA로 200예의 돼지혈청에 대하여 Test-MT와 Toxo-MT와의 특이성과 민감성을

비교한 성적은 Table 4에서와 같이 양자의 특이성은 전자는 97.3% 그리고 후자는 98.4%로 비슷하였으나 민감성은 43.8%와 25.8%로 큰 차이가 있었다.

Table 4. Comparison of specificity and sensitivity between Test-MT and Toxo-MT of 200 swine sera collected from abattior by IgG ELISA

Antigen (kit)	IgG ELISA		Specificity (%)	Sensitivity (%)
	+	-		
	(16)	(184)		
Toxo-MT +(12)	7	5	97.3	43.8
- (188)	9	179		
Toxo-MT +(7)	4	3	98.4	25.0
- (193)	12	181		

IgG-ELISA의 OD치에 의한 양성과 음성의 한계구분 : Test-MT와 Toxo-MT에서 양성으로 판정된 돼지와 개혈청을 IgG-ELISA OD치(absorvance value, 405nm)로 양성과 음성의 한계를 구분한 성적은 Table 5에서와 같이 양자의 혈청에서 양성인 경우에는 OD치가 0.8nm이상이었고 음성에서는 0.32nm 이하로 측정되었다.

Test-MT와 Toxo-MT의 진단 일치율 : 소와 돼지혈청 각 200예에 대한 Test-MT와 Toxo-MT간의 진단 일치율을 조사한 성적은 Table 6에서와 같이 소혈청에서는 200예중 185예(92.5%)가 양 반응에 일치하였고 15예(7.5%)는 일치하지 않았으며 돼지혈청 200예에서는 194예(97.0%)가 일치하였고 6예(3.0%)는 일치하지 않았다.

Table 5. Comparison of IgG-ELISA OD values(405nm) between Test-MT and Toxo-MT of swine and canine sera

Serum	Antigen (kit)	No of examination	IgG-ELISA OD(mean±SD)(nm)	
			positive	negative
Swine	Test-MT	225	0.82±0.44	0.32±0.087
	Toxo-MT	225	0.94±0.53	0.32±0.087
Canine	Test-MT	310	0.98±0.48	0.27±0.093
	Toxo-MT	310	1.02±0.42	0.27±0.093

Table 6. Qualitative agreement between Test-MT and Toxo-MT of bovine and swine sera collected from abattoir

Serum	Agreement				Disagreement			Grand total (%)	
	Test-MT	+	-	Total	Test-MT	-	+		Total
	Toxo-MT	+	-	(%)	Toxo-MT	+	-		(%)
Bovine		7	178	185	2	13	15	200	
		(3.0)	(89.0)	(92.5)	(1.0)	(6.5)	(7.5)	(100)	
Swine		6	188	194	1	5	6	200	
		(3.0)	(94.0)	(97.0)	(0.5)	(2.5)	(3.0)	(100)	

시제품 Test-MT의 보존성 : 직경이 1.0µm의 polystyrene bead로 제조한 Test-MT kit 6 lot를 생산하여 4℃ 냉장고에 보관하면서 표준양성 및 음성혈청으로 보존성을 조사한 성적은 Table 7에서와 같이 6 log중 1

lot(lot 3)에서만 음성혈청에 대한 역가의 변동이 있었을 뿐 다른 lot에서는 16개월까지의 보존에서 회석배수 2-fold 이상의 역가변화는 관찰할 수 없었다.

Table 7. Reproducibility and stability of Test-MT preserved at 5℃ refrigerator

Months after preservation	Serum	Lot No					
		1	2	3	4	5	6
1	P	1024	512	1024	1024	512	1024
	N	32	32	32	16	32	16
2	P	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	N	32	32	32	16	32	32
3	P	1024	1024	1024	2048	1024	1024
	N	32	32	16	32	32	16
6	P	1024	512	1024	1024	1024	1024
	N	32	32	32	32	32	32
9	P	1024	1024	1024	1024	2048	1024
	N	16	16	32	32	16	32
12	P	1024	1024	1024	1024	2048	512
	N	16	16	32	32	16	32
14	P	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	N	32	16	32	16	32	16
16	P	1024	512	1024	1024	512	1024
	N	32	32	64	16	32	32

P: positive canine serum, N: negative canine serum

고 찰

Latex응집반응에 사용하는 혈청회석용 완충액과 항원회석용 완충액에 대하여는 Lunde와 Jacobs²³, Bozdeh와 Jira³³, Singer와 Poltz⁵² 그리고 Oreskes와 Singer et al⁵³에 의하여 검토되었다. 서와 이⁵¹도 우리나라에서 처음으로 latex bead를 이용한 latex응집반응용 Test-MT(kit)를 생산하여 이 반응에 관련되는 여러가지 조건을 검토한 바, 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 그리고 혈청회석용 완충액은 300~600mM의 NaCl이 첨가된 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4)가 적합하였다고 보고 하였다. 따라서 여기에 사용한 각종 완충액은 서와 이⁵¹의 방법에 따라 제조한 완충액을 사용하였기에 회석용완충액에 대한 검토는 더 하지 않았다.

서와 이⁵¹는 latex응집반응용 latex-antigen(Test-MT) 제조에서 직경 0.8 μ m인 polystyrene latex bead를 사용하였던 바, 이 bead는 Tp 수용성 항원의 감작에 적합하여 Test-MT를 생산할 수 있었다고 보고 하였다.

저자들은 latex bead 크기에 따라 Test-MT의 반응 적합성에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 latex bead 직경이 1.5, 1.0 및 0.8 μ m인 3가지를 종류를 사용하여 Test-MT를 생산하여 시험관내 microtiteration한 바, 직경 1.0 μ m latex bead로 생산한 Test-MT에서 가장 적합한 반응상을 나타내었는데 이는 서와 이⁵¹의 성적과는 차이가 있는 것으로 보아지며 Tsubota와 Ozawa⁴⁵는 0.8과 1.0 μ m보다는 0.9 μ m의 latex 입자를 사용했을 때 가장 적합한 반응을 나타내었다고 보고하였는 바, 이 또한 서와 이⁵¹ 그리고 저자들의 성적과도 약간의 차이가 있다. 이와같은 차이는 다른 여러 연구자들이^{15,25,34,36,54} latex 응집반응에 관련되는 여러가지 조건들을 검토하면서 언급한 바와같이 항원제법, 감작시간과 조건, 항원의 농도, 사용되는 완충액 및 첨가제 등등의 요인들에 기인된 것으로 생각된다.

그리고 저자들은 latex bead입자의 크기가 1.0 μ m인 것으로 제조한 Test-MT 31 lot를 양성 개혈청으로 latex반응상의 적합성 여부를 검정한 성적에서 31 lot 전부가 512 \times 이상의 항원역가를 보였으며 14 lot(40.4%)는 1024 \times 그리고 1 lot(3.2%)는 8192 \times 의 역가를 보였고 음성의 개혈청으로 검정한 성적에는 31 lot 중 3 lot(9.6%)를 제외한 28 lot(90.4%)가 양성 한계선인 64 \times 이하를 나타내었다. 이와같은 성적으로 보아 여기에서 생산된 Test-MT는 역가검정에서 적합한 것으로 판단되었다. 그러나 이와같은 동일한 실험실 조건에서

생산된 제품이라 하더라도 제조한 lot에 따라 항원역가에 차이가 있을 수 있으므로 실제 야외응용에 있어서는 반드시 항원역가에 대한 적절한 검정기준이 마련되어야 한다고 생각된다.

일본에서 생산되어 시판되고 있는 Toxo-MT에 의한 반응의 판정기준은 혈청회석배수 8 \times 이하는 음성, 16 \times 는 의양성 그리고 32 \times 이상은 양성으로 판정되고 있다. 따라서 저자들이 제조한 Test-MT에 의한 반응판정기준을 Toxo-MT를 대조로 하여 비교(Fig 2)한 바, Toxo-MT는 혈청회석배수 32 \times 에서 양성과 음성의 한계가 명확히 구분되었으나 Test-MT에서는 64 \times 에서 이 한계가 구분될 수 있었다. 이와같이 Toxo-MT와 Test-MT간에는 혈청회석배수 1-fold의 차이가 있었는데 이는 항원의 제조과정에서 Toxo-MT는 latex bead의 크기가 0.9 μ m이고 이 시험에서는 1.0 μ m로서 latex 입자의 크기에 따라 결합되는 항원단백양과 회석용완충액의 차이 및 항원입자의 비중 등 여러가지 요인에 의한 것으로 추측되나 이 문제는 앞으로 장시간의 시간을 가지고 충분히 더 검토되어야 할 과제의 하나라고 생각된다.

Test-MT와 Toxo-MT의 개혈청 87예에 대한 항체역가별 반응일치를 조사에서 혈청회석배수 32 \times 이하에서는 양자간의 반응일치율은 불규칙하였으나 64 \times 이상에서는 높은 일치율을 보였는데 이는 앞에서도 언급한 바와 같이 두 MT항원간의 성상에 관련되는 여러가지 요인에 의한 것으로 생각된다. 한편 Test-MT는 32 \times 이하의 낮은 역가에서 Toxo-MT와의 반응일치율이 불규칙하게 나타나는 경향이었는데, 이에 대한 여러가지 요인의 재검토가 있어야 할 것으로 보아진다.

서 등⁴⁵은 IFA와 LA에 의한 개 Tp병의 항체조사에서 두 반응간에는 유의성이 없다고 하였는 바, 이는 양자간에는 특이성과 민감성에 큰 차이가 없다는 것을 암시해 준 것으로 생각된다. 그러나 저자들의 이 시험에서 개혈청에 대한 IFA와의 비교성적에서 Test-MT와 Toxo-MT의 특이성에서는 각각 99.0%와 98.0%로 비슷하였으나 민감성에서는 76.5%와 64.7%로 약간의 차이가 있었는데 이는 두 MT간의 질적인 문제와 관련이 있을 것으로도 생각되나 특히 민감성에 대해서는 금후 더 검토되어야 할 것이 아닌가 생각된다.

서 등³⁷은 돼지 그리고 서 등²⁸은 개의 Tp병 항체조사에 IgG-LEISA를 이용하였던 바, 이 법은 특이성과 민감성이 높아 Tp병의 조기 항체조사에 좋은 방법이라고 보고하였다. 저자들이 IgG-ELISA로 돼지혈청에 대해 Test-MT와 Toxo-MT와의 특이성과 민감성을 비교한

성적에도 IFA와의 비교성적에서와 같이 두 MT간의 특이성은 97.3%와 98.4%로 아주 같았으나 민감성은 43.8%와 25.0%로 큰 차이가 있었다. 이와같이 Toxo-MT에서는 특이성과 민감성이 다 같이 높는데 반하여 Test-MT에서는 특이성은 Toxo-MT와 차이가 없었으나 민감성에서는 약간 떨어지는 경향을 보였는 바, 이에 대하여도 금후 정밀한 검토가 한번 더 있어야 할 것으로 생각된다.

서 등²⁸은 IgG-ELISA를 이용한 개 Tp병의 혈청학적 조사에서 음성혈청에서의 평균 OD치(492nm)는 0.243 ± 0.066 로 cut-off value는 0.375로 측정되었다고 하였다. 저자들의 이 시험에서 돼지혈청의 경우 음성은 0.32 ± 0.087 그리고 개에서는 0.27 ± 0.093 으로 서 등²⁸의 0.375와 아주 비슷하였다. 그리고 이 시험에서 돼지와 개의 양성혈청에 대한 IgG-ELISA에서 OD치가 0.80이상일 때 Test-MT나 Toxo-MT에서 양성으로 판정되었다. 이때 양성은 음성에 비하여 약 3배 이상의 OD치를 나타낼 때 양성으로 판정됨을 알 수 있었다.

서 등²⁸은 개 Tp병의 항체조사에서 LA와 IFA의 반응일치율은 91.3%, Opel et al¹²은 산양에 대한 항체조사에서 LA와 IFA의 반응일치율은 96.8%라고 보고한 바 있고, Kobayasi et al¹²은 Toxo-MT에 의한 LA법은 DT법과는 94.4% 그리고 IFA법과는 95.5%의 반응일치율을 보임으로써 특이성과 민감성이 높다고 하였다.

저자들이 소와 돼지혈청 각 200예에 대하여 Test-MT와 Toxo-MT간의 반응일치율을 조사한 성적에서 소혈청에서는 92.5% 그리고 돼지혈청에서는 97.0%이었다. 이와같이 두 MT간에는 아주 높은 반응일치율을 보이고 있는데, 이는 다만 양성과 음성을 구별하는 데에서 나타난 결과일 뿐, 혈청역가별의 분포에 따른 양자간의 반응일치율은 약간의 차이가 있을 것으로 추측된다.

시제품인 Test-MT(kit) 6 lot를 생산하여 4~5°C 냉장고에 보존하면서 kit의 역가변동을 조사한 성적에서 18개월간 보존에서도 1 lot를 제외하고는 전혀 역가의 변화를 인정할 수 없었던 것으로 보아 시제품인 Test-MT는 1년이상 장기간 보존할 수 있다고 생각되나 대체로 진단액의 보존은 6개월 내지 1년간의 유효기간을 두고 사용하는 것이 일반적이다. 이와같은 일반적인 예에 비추어 여기에서 생산된 Test-MT kit도 약 1년간의 유효기간을 두고 사용하는 것이 안전할 것으로 생각된다.

이상에서와 같이 저자들이 국내에서는 처음으로 latex bead를 이용해 개발한 Tp병 진단용 kit인 "Test-

MT"는 국내의 소, 돼지 및 개 등에 대한 Tp병의 신속 정확한 진단을 위한 진단용 kit로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

동물의 특소플라즈마병에 대한 현행의 혈청학적 진단법보다 신속·정확하고 간편하게 이용할 수 있는 진단법을 개발코져 latex bead를 이용한 microtiter용 진단 kit를 제조하여 국내여건에서 이의 실용성을 검토한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Polystyrene latex bead의 크기(직경)가 0.8, 1.0 및 $1.5\mu\text{m}$ 인 3종으로 제조한 Test-MT중 $1.0\mu\text{m}$ 로 제조한 것에서 반응 재현율이 85.5%로서 가장 좋은 반응상을 보였다.

2. 표준양성 및 음성혈청에 대한 Test-MT의 역가별 반응 재현율은 31 lot중 항원역가 $512 \times$ 인 것이 8 lot (25.8%) 그리고 $1024 \times$ 가 14(40.2%), $2048 \times$ 5(16.2%), $4096 \times$ 3(9.6%) 그리고 $8192 \times$ 가 1 lot(3.2%)이었다.

3. Test-MT와 Toxo-MT의 소와 돼지혈청에 대한 양성과 음성의 한계선은 Test-MT는 혈청희석배수 $64 \times$ 이상 그리고 Toxo-MT는 $32 \times$ 이상이였다.

4. Test-MT와 Toxo-MT는 혈청희석배수 $64 \times$ 이상에서 두 MT간의 반응일치율은 비슷하였으나 그 이하의 낮은 역가에서는 약간의 차이가 있었다.

5. IFA에 의한 Test-MT와 Toxo-MT의 특이성은 96.0%, 98.0%로 높았으나 민감성은 76.5%와 64.7%로 Test-MT에서 높았고, ELISA법에서의 특이성은 97.3%와 98.4%로 양자가 비슷하였으나 민감성은 43.8%와 25.0%로 Test-MT에서 높았다.

6. Test-MT와 Toxo-MT에서 양성인 소와 돼지혈청의 ELISA OD치는 0.8nm이상이었었고 음성은 0.32nm 이하로 측정되었다.

7. Test-MT와 Toxo-MT간의 반응일치율은 소 혈청에서는 200예중 185예(92.5%) 그리고 돼지 혈청에서는 200예중 194예(97.0%)로 높은 일치율을 보였다.

8. 시제품 "Test-MT" kit는 4~5°C에서 18개월간 보존할 수 있었으며 이 kit는 국내 각종 동물의 Tp병 진단용으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Benjamin JL. *Toxoplasma gondii*. Parasitic infections in the compromised host. edited by Peter D. Walzer, New York and Basel: Marcel Dekker Inc, 1989; 179-253.
2. Levine BJ, Brooks RG, Conley FK, et al. Taxonomy of toxoplasma. *J Protozool* 1977; 24: 36-41.
3. Levine ND. Veterinary protozoology. 1st ed. Ames: Iowa state University Press, 1985; 248-254.
4. Vanderwagen LC, Behymer DE, Riemann HP, et al. A survey for toxoplasma antibodies in northern califonia livestock and dogs. *JAVMA* 1974; 164(10): 1034-1037.
5. Wilkins MF, O'Connell E, Te Punga WA. Toxoplasmosis in sheep I. Effect of a killed vaccine on lambing losses caused by experimental challenge with *Toxoplasma gondii*. *NZ Vet J* 1987; 35: 31-34.
6. Wilkins MF, O'Connell E, Te Punga WA. Toxoplasmosis in sheep II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after and intervenous challenge with *Toxoplasma gondii*. *NZ Vet J* 1988; 36: 1-4.
7. Wilkins MF, O'Connell E, Te Pung WA. Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *NZ Vet J* 1988; 36; 86-89.
8. Buxton D, Uggla A, Lövgren K, et al. Trial of a novel experimental *Tosoplasma* ISCOM vaccine in pregnant sheep. *Br Vet J* 1989; 145: 451-457.
9. Buxton D, Thomson K, Maley S, et al. Vaccination of sheep with a live incomplete strain(S 48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant, *The Veterinary Record* 1991; 129: 98-93.
10. Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today* 1993; 9(9): 335-337.
11. Arajo FG. Immunization against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today* 1994; 10(9): 358-360.
12. Tsubota N, Hiraoka KI, Sawada Y. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis; (2) Evaluation of the microtiter test as a serologic test for toxoplasmosis in man. *Jpn J Parasitol* 1977; 26(4): 286-290.
13. Louis MW, Stephen AU, Herbert T, et al. Western blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and toxoplasmic encephalitis; antigenic diversity among toxoplasma strains. *J Infect Dis* 1988; 157(1): 7-13.
14. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAVMA* 1984; 17: 913-917.
15. Suzuki Y, Remington JS. Importance of membrane-bound antigens of *Toxoplasma gondii* and their fixation for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1990; 28(10): 2354-2356.
16. Choi WY. The isolation of from pork and the dye test of swine sera. *J Catholic Med Coll* 1969; 16: 229-235.
17. Mun JB. Serological survey of toxoplasmosis on swine by complement inhibition test in korea. *Bull Vet Res Lab* 1965; 11(1): 19-25.
18. 문무홍. 도축돈에서 toxoplasma의 분리와 분리주에 대한 병원성 시험. 한국수의공중보건학회지 1991; 15(1): 111-125.
19. Bryce CW, Benchoff BM, Brooks WH. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15(2): 149-152.
20. Choi WY, Yoo JE, Chung CS. Toxoplasma antibodies by latex agglutination test in national seoul mental hospital patients. *Korean J Parasit* 1983; 21(2): 281-285.
21. Dubey JP, Thulliez PH. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *JAVMA* 1989; 194(9): 1297-1299.
22. Harris ELV, Angal S. Protein purification methods. IRL press, 1989; 10-18.
23. Lunde MN, Jacobs L. Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* 1967; 53: 933-936.
24. Makioka A, Kobayashi A. Evaluation of a commercial kit for toxoplasma direct agglutination test.

- Jpn J Parasitol* 1989; 38(4): 179-183.
25. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite(toxoplasma). *Science* 1948; 108: 660-663.
 26. Shirley AV, Mitchell TG, Kleeman KT. Comparison of an enzyme-linked immunoassay and a quantitative indirect fluorescent-antibody test with the conventional indirect fluorescent-antibody test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1982; 16(2): 341-344.
 27. 서명득, 장두환. 돼지 toxoplasmosis의 간접적혈구 응집반응과 피내반응에 관한 연구. 대한수의학회지 1972; 12(1): 51-58.
 28. 서명득, 주후돈, 이병훈. 효소표시 면역검사법을 이용한 개톡소플라즈마병의 혈청내 항체검출에 관한 연구. 대한수의학회지 1991; 31(4): 491-500.
 29. Tress AJ, Crozier SJ, Buxton D, et al. Serodiagnosis of voine toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titers after experimental oocyst-induced infections. *Res Vet Sci* 1989; 46: 67-72.
 30. Lainson R. Toxoplasmosis in england II. Toxoplasma infections in dogs: the incidence of complement-fixing antibodies among dogs in London. *Ann Trop Med Parasitol* 1956; 50: 172-186.
 31. 서명득, 장동화, 주후돈. ELISA를 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기진단에 관한 연구. 대한수의학회지 1989; 29(4): 567-575.
 32. Kobayashi A, Hirai N, Suzuki Y. Evaluation of a commercial toxoplasma latex agglutination test. *Jpn J Parasitol* 1977; 26(3): 175-180.
 33. Bozdeh V, Jira J. Latex-agglutination test mit dem toxoplasma antigen. *Deut Gesundh* 1961; 16: 2398-2400.
 34. Choi WY, Yoo JE, Nam HW. Toxoplasma antibodies by indirect latex agglutination test in zoo animals. *Korean J Parasit* 1987; 25(1): 13-23.
 35. Choi WY, Nam HW, Youn JH, et al. Toxoplasma antibody titers by indirect latex agglutination test in patient of kangnam st. mary's hospital and cheju medical center. *Korean J Parasit* 1989; 27(3): 171-175.
 36. Choi WY, Nam HW, Youn JH, et al. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Korean J Parasit* 1992; 30(1): 83-90.
 37. 이주홍, 이순선, 이국천. Latex 응집반응에 의한 경남지방의 한우 및 돼지 혈중의 *Toxoplasma gondii*항체조사. 가축위생 및 보건사업 결과. 가축위생연구소 1980; 239-244.
 38. 이병훈, 황보원, 변유성 등. 경남 중부지역에서의 Latex응집반응을 이용한 돼지 톡소플라즈마병 항체 분포 조사. 가축위생시험연구논문집 1992; 3: 14-21.
 39. Makioka A, Kobayashi A. Use of a purified major surface protein of *Toxoplasma gondii* in a latex agglutination test. *Jpn J Parasitol* 1989; 38(2): 100-105.
 40. Nurata K. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in zoo animals and other animals. *Jpn J Vet Sci* 1989; 51(5): 935-940.
 41. Murata K. A serological survey of *Toxoplasma gondii* using modification of the toxoreagent latex test. *Tec Method* 1982; 361-362.
 42. Opel U, Charleston WAG, Pomroy WE, et al. A survey of the prevalence of toxoplasma infection in goats in new zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescent test. *Vet Parasitol* 1991; 40: 181-186.
 43. 서명득, 이병훈, 이응구. Latex 응집반응과 간접형광항체법을 이용한 개톡소플라즈마병의 혈청학적 진단. 대한수의학회지 1992; 32(4): 641-647.
 44. Suzuki Y, Kobayashi A. Detection of circulating antigens by latex particles coated with anti-toxoplasma antibodies during acute infections with *Toxoplasma gondii* in mice. *Jpn J Parasitol* 1985; 34(3): 149-153.
 45. Tsubota N, Ozawa H. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis; (1) Preparative conditions and stability of the reagent. *Jpn J Parasitol* 1977; 26(4): 276-285.
 46. Tsubota N, Hiraoka K, Sawada Y. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis; (3) Evaluation of the microtiter test as a serological test for toxoplasmosis in some animals. *Jpn J Parasitol*

- 1977; 26(4): 291-298.
47. Durham TM, Colvin HM. Premarket evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagents. *J Clin Microbiol* 1978; 7(3): 255-260.
 48. 전영, 서명득. 톡소플라즈마병에 관한 연구. I. 직접형광항체법에 의한 감염장기내 톡소플라즈마 원충검출. 농사시험연구보고 16집(가축위생편) 1974; 35-40.
 49. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassay for parasitic diseases. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1976; 70(2): 98-106.
 50. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, et al. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Path* 1976; 29: 150-153.
 51. 서명득, 이응구. Latex응집반응을 이용한 톡소플라즈마병 진단액 개발에 관한 연구. 대한수의학회지 1993; 33(4): 623-632.
 52. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. I. Application to serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1956; 21: 888-892.
 53. Oreskes I, Singer JM. The mechanism of particulate carrier reactions I. adsorption of human- γ -globulin to polystyrene latex particles. *J Immunol* 1961; 86: 338-343.
 54. Harlow, Lane. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 25-27.