

수산 생물의 생산과 관리에 관한 기초연구 : 항체 감작 *Staphylococcus aureus*에 의한 Coagglutination Test기법을 이용한 Edwardsiellosis의 신속 진단

하재이 · 손상규* · 허민도 · 정현도
부경대학교 어병학과 · *국립 수산 진흥원 병리과

Study on the Production and Management of Aquatic Animal : Rapid and Optimized Diagnosis of Edwardsiellosis by Coagglutination Test with Antibody Sensitized *Staphylococcus aureus*

Jai Yi HA, Sang Gyu SOHN*, Min-Do HUH and Hyun Do JEONG

Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

* Pathology Division, National Fisheries Research and Development Agency, Pusan 626-900, Korea

To avoid the self-agglutination of *Staphylococcus aureus* sensitized with rabbit antibody in the absence of antigen, we determined the optimum concentration of rabbit antibody for sensitization. It was analyzed by using three different kinds of *S. aureus* strains at various concentrations of antibody. The optimized coagglutination test using the *S. aureus* sensitized with rabbit antibody was applied to the diagnosis of edwardsiellosis in field and in laboratory. The presence of *E. tarda* as low as 10 µg/ml was detected by this method. Moreover, it showed good coagglutination results against several different forms of antigens such as FKC, EDTA or heat extracted antigen of *E. tarda*. *E. tarda* strains, isolated from the flounders suffering from edwardsiellosis in fields, showed some cross-reactions to the *E. tarda* 219 analyzed by both agglutination and coagglutination test with rabbit anti-*E. tarda* 219 antibody. The degree of cross-reactions analyzed was enough to apply the coagglutination test for the diagnosis of edwardsiellosis in field. Thus, even 1,000 fold diluted tissue homogenate of infected flounder naturally contained enough *E. tarda* as an antigen to show good coagglutination with *S. aureus* sensitized with rabbit anti-*E. tarda* 219 antibody. The successful application of this method to the homogenate and heat extract of tissues from naturally or artificially infected flounder or tilapia proved that coagglutination test was a simple and rapid reliable diagnostic technique suitable for using in laboratory and field without any special equipments.

Key words : edwardsiellosis, coagglutination, diagnosis, heat extracted antigens, cross-reaction

서 론

대부분의 *S. aureus* 균주는 세포벽의 peptidoglycan에 공유결합으로 protein A (MW. 42,000)를 표면에 가지고 있다. Protein A는 토끼나 돼지의 모든 immunoglobulin과 강하게 결합하며 사람이나 쥐의 immunoglobulin과도 IgG3 또는 IgG1 등의 isotype을 제외

하고는 잘 결합하는 것으로 알려져 있다. 이러한 protein A와 토끼등의 immunoglobulin과의 결합은 antigen binding site에 의한 결합이 아니고 IgG 등의 Fc 부위와의 친화력에 의하는 것이다. 그러므로 protein A와 immunoglobulin의 결합은 immunoglobulin이 항원과 결합하는 능력에는 전혀 지장을 주지 않으면서 이루어지고 있는 것이라고 할 수 있다.

이러한 protein A의 특징은 항체를 분리해 내는 affinity chromatography 등에 많이 사용되어지기도 하고 protein A를 표면에 갖고 있는 *S. aureus* 세균 자체를 특이항체로 감작 시킨 후 세균, 독소등의 진단용 분석에 응용되어져 *pneumococci*나 β -hemolytic *streptococci*의 serotyping (Kronval, 1970 and 1972; Edward and Larson, 1974) 등에 reverse passive agglutination 또는 coagglutination 법으로 적용되어지기도 하였다. 또한 *Neisseria gonorrhoeae*나 *Haemophilus influenzae* 또는 Hepatitis B virus의 표면항원 검출을 위해서 사용되어져 좋은 결과를 보여주기도 하였다 (Christensen et al., 1973; Suksong and Dajani, 1977; Rajagaplan and Jacob-John, 1982). 최근에는 Yoshimizu 등 (1985)이 IPN (Infectious Pancreatic Necrosis) 바이러스, BKD (Bacterial Kidney Disease) 세균, *Vibrio* 세균등의 진단에 이러한 원리를 slide agglutination 법으로 변형 적용하여 보고 한 바도 있다.

본 연구에서는 어류의 여러 어종에 대하여 병원성이 있는 *E. tarda* (Kubota et al., 1981; Minaga et al., 1983; Nakatsugawa, 1983)에 specific 한 토끼 항체를 Cowan type I *S. aureus* 균주 (Verwey, 1940)의 표면에 있는 protein A와 결합시킨 후 96 well plate 상에서의 coagglutination 법을 실시하여 순수 분리된 *E. tarda* 균주 자체 또는 edwardsiellosis 병어의 조직내에 있는 *E. tarda*의 항원을 진단해 내기 위한 연구를 하였으며 (Fig. 1) 동시에 이러한 방법을 현장의 병어 및 분리된 여러 다른 *E. tarda* strain들에도 적용하여 그 cross-reaction을 조사하므로써 직접적인 양식현장에의 적용가능성을 분석하였다.

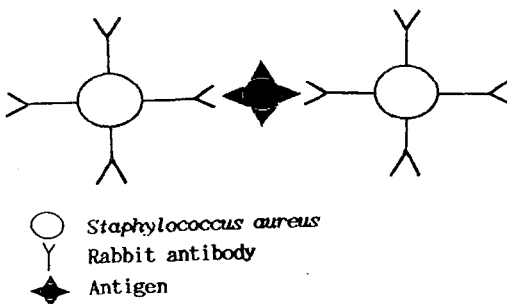


Fig. 1. Coagglutination test using *S. aureus* sensitized with specific rabbit-antibody.

재료 및 방법

1. 어 류

질병이 없는 건강한 틸라피아 (100 g \pm 20 g)를 부경대학교 부속 양어장에서 분양받아 실험어로 하였으며 25 \pm 2 $^{\circ}$ C 되는 수온에서 사육하며 실험에 사용하였다.

2. 세균의 배양 및 동정

실험에 사용한 균주중 *E. tarda* 219는 일본의 뱀장어로 부터 분리한 것을 Miyazaki 대학의 Dr. T.Aoki로부터 입수하였다. 현장분리 *E. tarda*는 여수와 포항근교의 넘치양식장 4곳에서 채집한 병어 (체중 500 \pm 60 g)의 liver를 SS 배지에 도말하여 25 $^{\circ}$ C의 배양기에서 24시간 배양후 자란 단일집락을 다시 SS 배지에 3번 이식하여 순수 배양을 한 후 분리된 균주를 BHI broth 10 ml에서 24시간씩 2번 식균하여 활성화 시킨 후 PBS 완충용액으로 2번 세척하고 다시 PBS 완충용액 5 ml에 재현탁시켜 Gram 염색 및 운동성 조사를 실시한 후 각 균주가 갖는 생화학적 특성을 API 20E kit를 사용하여 조사하였다. 조사된 특성들은 일반균주 이상의 특성이 수록되어 비교 검색할 수 있는 ATCC의 API identification program을 사용하여 조사된 후 (백병원 임상 병리실 협조) 본 실험에서 사용하고자 하는 균주로서의 특성이 identification possibility로서는 98% 이상, T test에서는 0.96이상임을 확인하고 실험을 실시하였다. 확인된 균주는 broth 배양후 여러개의 microtube에 옮긴후 30% glycerol을 가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 필요시 한개씩 꺼내서 사용하였다.

3. 병어의 채취

1993년 9월에 포항근교의 넘치양식장 3곳과 여수근교의 넘치양식장 1곳에서 채취한 병어중 전형적인 edwardsiellosis 증상을 보이는 병어를 취하여 미부혈관으로 부터 전체혈을 실시하여 병어의 혈청을 취하고 내부장기는 SS 배지에 도말하였다. 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양후 나타난 검은 집락에 대하여 다시 API 20E test를 실시하여 *E. tarda*균의 감염을 확인하였다. 분리된 *E. tarda*와 혈청 그리고 내부장기는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 사용하였다.

4. 항원의 조제

FKC (Formalin Killed Bacteria)는 상법에 따라 조제하였으며 EDTA 추출 항원은 50 mg/ml 의 농도로 세균을 20 mM의 EDTA (pH 7.2) 용액에 현탁하고 45 °C에서 30분간 incubation후 10% power level (375W sonicator, medium tip)에서의 sonication을 거친후 0.1 M PBS 완충용액 (pH 8.0)에서 48시간 투석하여 조제하였다. 열탕 추출 항원은 세균을 0.1M sodium carbonate 완충용액에 100 mg/ml 농도로 현탁후 100°C에서 30분간 처리후 10,000 g에서 원심분리하여 상등액을 취하였다 (Austin and Austin, 1989).

5. 단백질량의 측정

Bradford 방법 (Bradford, 1976; Fredrick et al., 1987)에 따랐으며 BSA를 표준단백질로 하였다.

6. Agglutination test

U형 96 well plate에 연속적으로 2배씩 희석된 항혈청을 각 well에 50 µl씩 가하고 준비된 *E. tarda* FKC (5 mg/ml)를 50 µl씩 첨가하여 반응시켰다. Plate는 humidified chamber에서 6시간 이상 상온에서 incubation 시킨 후 cell button이 생성되지 않는 최대희석배수를 agglutination titer로서 결정하였다.

7. Coagglutination test를 위한 병어조직의 조제
병어로 부터 분리된 간 또는 신장에 장기 무게의 3 배에 해당하는 PBS 완충용액 (pH 7.2)을 가하여 homogenation을 실시하고 0.1% NaNO₃를 첨가하여 4°C에서 보관하였으며 그중 일부는 100°C에서 30분간 가열하고 10,000 g에서 15분간 원심분리한 상등액을 조직의 열탕 추출 항원용으로 사용하였다. 준비된 조직항원들은 연속적으로 2배씩 희석하여 coagglutination test에 사용하였다.

8. 토끼 항체로 감작 시킨 *S. aureus*의 조제

100 mg/ml로 현탁시킨 *S. aureus* (Sigma Chem. Co.) 500 µl를 취하여 2번 세척후 (10,000 g, 5분) 1/300로 희석한 토끼 항-*E. tarda* (agglutination titer는 16,400) 항체 500 µl와 혼합시켜 상온에서 30분동안 incubation 시킨후 원심분리하여 그 상등액과 *S. aureus*를 분리하였다. 상등액은 agglutination법으로 토끼 항체의 *S.*

*aureus*에 대한 흡착율을 조사하였으며 항체감작 *S. aureus*는 PBS 완충용액으로 2번 세척후 5 mg/ml로 현탁하여 coagglutination test에 사용하였다.

9. 항체감작 *S. aureus*를 이용한 coagglutination test

각 *E. tarda* strain의 FKC, 연속희석된 병어 내부장기의 homogenate 또는 열탕 추출 항원들의 각 50 µl씩과 항체감작 시킨 *S. aureus* (5 mg/ml) 50 µl를 각각 U자형 96 well plate에서 혼합시킨 후, 습윤상자에 넣어서 6시간 이상 상온에서 incubation 후 coagglutination을 보이는 최소농도를 분석하였다.

결 과

Coagglutination test를 위한 *S. aureus*의 감작

항체감작 시킨 *S. aureus*를 항원과 혼합하여 coagglutination test를 할 때 가장 중요한 것은 negative control이다. Table 1에서와 같이 감작을 위하여 과잉의 토끼 항체를 사용하면 항원의 첨가 없이도 항체감작 *S. aureus*은 좋은 negative control을 보여주지 않았다. 즉 *S. aureus* 50 mg에 agglutination titer가 16,400인 토끼-*E. tarda* 219 항혈청을 1.7 µl 이상 첨가하면 (즉 300배 희석된 항혈청 500 µl+50 mg의 *S. aureus*) 항체감작 *S. aureus*은 항원의 첨가없이도 약간의 self-agglutination이 나타나 96 well plate에서 coagglutination법을 사용 하는데 어려움이 있음을 확인하였다. 물론 본 실험에 사용한 토끼 항혈청에 *S. aureus*를 감작 시키고 난후 혈청을 원심 분리하고 상등액을 분석해 보면 모두 agglutination titer가 5 이하로 나타나 본 실험에서 사용한 *S. aureus*은 첨가한 토끼 항체 모두를 흡착할 수 있는 충분한 양임을 알 수 있었다. 흥미 있는 것은 균주의 특성에 따라 이러한 self agglutination은 다르게 나타나 Sigma Chem. Co.로 부터 구입한 Cowan type I 이 가장 좋은 결과를 보여주어 *S. aureus*의 strain 종류가 coagglutination test에는 중요한 요소가 됨을 알 수 있었다. 그러므로 최적의 항체감작 *S. aureus* 제조를 위해서는 적당농도의 토끼 항체를 사용하여야 하며 96 well에서 생성된 button을 육안으로 관찰하기 가장 좋은 *S. aureus*의 양은 0.25~0.5

Table 1. Self agglutination of different strains of *S. aureus* depending upon the antibody concentrations used for sensitization

Strains of <i>S. aureus</i>	Dilution rate of rabbit serum for sensitization	Wet weight of bacteria (mg/well)			
		0.5	0.25	0.13	0.6
Cowan type I (Sigma)	100	1 ^{*2}	—	—	—
	300	5	3	0.5	—
	600	5	3	1	—
ATCC 12598	100	0.5	—	—	—
	300	1	0.5	—	—
	600	5	2	—	—
General <i>S. aureus</i> ^{*3}	100	—	—	—	—
	300	0.5	—	—	—
	600	0.5	0.5	—	—

*1: Agglutination titer against *E. tarda* 219 was 16400

*2: Relative size of button observed with naked eye. The appeared button size of 0.5 mg/ml of unsensitized *S. aureus* was used as 5.

(—) means no button formation.

*3: Isolated from human feces

Table 2. Minimum detectable concentrations of *E. tarda* 219 antigen formed with different methods by coagglutination test

Different forms of <i>E. tarda</i> antigen	Minimum detectable concentrations of antigenic protein ($\mu\text{g/ml}$)
FKC in PBS	6.3~12.5 ^{*1}
FKC in NLHE ^{*2}	5~10
Heat extract of FKC with PBS	0.5~1.0
EDTA extract of FKC	0.13~0.5
Heat extract of FKC with NLHE	0.33~0.5
<i>A. salmonicida</i>	>1000 ^{*3}
<i>A. salmonicida</i> with NLHE	>1000 ^{*4}

*1, *3, *4: Wet weight of bacteria

*2 : Heat extract of normal carp liver diluted 100-fold with PBS buffer (NLHE) was used as a diluent for coagglutination test instead of PBS buffer itself.

mg/well 임을 결정 할 수 있었다.

여러 형태의 항원 및 현장 분리 *E. tarda*에 대한 coagglutination test

300배 희석된 토끼-*E. tarda* 219 항혈청 500 μl 와 습중량 50 mg의 비율로 감작 시킨 *S. aureus*를 사용하여 *E. tarda* 219의 여러 다른 항원 형태에 대한 감도를 분석하여 보았다. Table 2에서와 같이 *E. tarda* 219 whole cell FKC는 습중량으로 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 까지 항체감

작 *S. aureus*를 coagglutination 시킴을 알았고 그것은 100배 희석된 carp liver homogenate의 열탕 추출물을 diluent로 사용할 때도 비슷한 감도 (8.6 $\mu\text{g/ml}$)를 보여주었다. 즉 100 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열하여 얻은 carp liver의 추출물 내에는 여러 단백질, 지방 등이 다량으로 함유되어 있으나 whole cell 형태의 세균이 *S. aureus*와 coagglutination 하는데에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. *E. tarda* 219 균주를 열탕 추출하여 얻은 항원은 단백질 양으로 0.5~1.0 $\mu\text{g/ml}$ 까지 감작 시킨

Table 3. Minimum detectable concentrations of different *E. tarda* strains isolated from flounder cultured-farms by coagglutination test

Strains of <i>E. tarda</i> (FKC)	Minimum detectable concentration*1 (µg/ml)	Agglutination titer against rabbit anti- <i>E. tarda</i> 219 serum
219	6.3~15.6	16400
H4	31.3	3200
S4	31.3	3200
D1	31.3~62.5	1600
C1	500	<160
<i>A. salmonicida</i>	>5000	2

*1: Wet weight of bacteria for coagglutination

Table 4. Application of coagglutination test for the diagnosis of edwardsiellosis in flounder cultured-farms

<i>E. tarda</i> strains and Target tissues of infected flounder	Antigens	
	Heat extract	Infected tissue homogenate
Normal liver+219 FKC*1	600*2	4000~8000*3
S3 Liver	600	4000
Kidney	240	1000
S4 Liver	120	800~1000
Kidney	240	1000~2000
H4 Liver	120	1000
kidney	120	2000
D1 Liver	240	800~1000
Kidney	240	1600~2000
219 infected tilapia liver*4	600	4000~12000
S4 infected tilapia liver*5	120	1000

S3, S4, H4, D1 flounders suffering from edwardsiellosis were collected from different farms in Korea.

*1 : Mixture of normal flounder liver and 219 FKC (60 mg/g of liver)

*2, *3: Maximum dilution rate that can be detected with coagglutination test.

Heat extract antigens were prepared from the infected tissue homogenate of flounder.

*4, *5: Liver of moribund tilapia induced by *i.p.* injection of *E. tarda* 219 or *E. tarda* S4 (5×10^6 cells/Kg body weight)

*S. aureus*과 반응하므로 FKC 열추출시 유출되는 지방, 단백질 등은 coagglutination의 감도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. EDTA로 추출한 *E. tarda*의 단백질도 열탕추출 항원과 동일 또는 보다 민감한 coagglutination 결과를 보여 주었으며 cross-reaction이 없는 *A. salmonicida* FKC는 PBS 또는 carp liver 추출 물을 희석액으로 사용하여도 전혀 반응하지 않아 좋은 negative control의 결과를 보여주었다.

항체감작 *S. aureus*의 coagglutination 법에 의한 현장병어의 감염진단

현장의 병어로 부터 순수분리한 *E. tarda* strain H4, S4, D1에 대한 토끼-*E. tarda* 219 항 혈청이 나타내는 cross-reaction은 agglutination titer 수치 비교로서 약 20%로 나타났으나 C1 균주와는 거의 반응하지 않음을 Table 3은 보여 주고 있다. 즉 C1 균주는 본 실험에서 토끼 항 혈청생산균주로 사용한 219와는 전혀

고 찰

다른 serotype이지만 다른 3 균주는 219 strain과 상당히 유사한 serotype임을 알 수 있었다. 이러한 cross-reaction 경향은 토끼 *E. tarda* 219 항 혈청으로 감작시킨 *S. aureus*를 이용하여 순수 분리된 각 균주의 FKc에 대하여 실시한 coagglutination test에서도 나타나 H4, S4, D1 strain의 FKc는 219 보다는 높고 C1 보다는 훨씬 낮은 최소감지농도를 보여주므로서 본 방법의 신빙성을 입증하여 보이고 있다 (Table 3).

현장에서 채집된 병어로 부터 감염균의 순수 분리 없이 직접 감염 조직 내에 있는 세균이라는 항원의 존재를 간단하고 신속히 진단하기 위하여 homogenated tissue 및 그 조직의 열탕 추출물을 사용하여 coagglutination 법을 실시 하였다 (Table 4). 먼저 건강한 넙치의 liver 1g에 60 mg의 *E. tarda* 219 strain을 가하여 homogenate를 만든 후 coagglutination test를 실시 하였을 때 4,000~8,000배 희석 후에도 detection 되었으며 219 균주를 tilapia에 인공감염 시킨 후 4일 뒤 폐사직전 상태에 있는 tilapia liver의 homogenate를 사용하여도 4,000~12,000배 희석농도까지 detection 되어 본 방법의 높은 감도를 확인할 수 있었다. 자연 감염된 넙치 병어의 조직을 사용했을 때에는 그 감도가 219 균주에 비해 약 20% 정도가 되어 Table 3의 cross-reaction test 결과와 일치함을 알 수 있었다. 더구나 S4 균주를 인공 감염시킨 tilapia의 liver도 자연 감염된 S4 넙치의 liver와 비슷한 detection range를 보여 인위감염된 병어의 조직내에 있는 *E. tarda* 세균의 숫자는 자연감염 병어에서의 숫자와 비슷할 것으로 추정할 수 있었다. 또한 219 균주로 인공감염 시킨 moribund tilapia liver와 60 mg의 219 균주가 인위적으로 첨가된 건강한 넙치의 liver homogenate에 대한 분석에서도 서로 비슷한 검출한계를 보여주어 인위감염된 병어나 자연감염된 병어는 서로 유사한 숫자의 세균을 조직 내에 함유하고 있을 것임을 추정할 수 있었다.

조직을 열탕 추출한 상등액은 비교적 낮은 희석배수에서만 검출되어 조직의 homogenate를 사용하는 것보다 감도가 낮은 것으로 나타났지만 각 시료간의 감지농도가 보여주는 경향은 cross-reaction 결과나 조직의 homogenate를 사용한 결과와 밀접한 연관관계가 있게 나타나 본 방법의 확실성을 보여주고 있다.

Protein A는 대개의 *S. aureus* strain이 세포벽의 한 구성성분으로 가지고 있으며 특히 Cowan Type I series strain이 높은 농도의 protein A를 가지고 있다. 이 분자의 정확한 생리적 기능은 밝혀져 있지 않지만 여러 동물들의 immunoglobulin Fc 부위와 높은 친화력을 가지고 있다는 것 만은 명확히 밝혀져 있다 (Kronvall et al., 1970; Mayer and Klostergaard, 1983). 이러한 특징을 이용한 slide coagglutination 진단법 개발은 Kimura (1981, 1984), Yoshimizu 등 (1985)에 의해서 BKD, IPN 질병 등에 응용되어진 보고가 있다. 본 연구에서는 토끼 항-*E. tarda* 항체로 edwardsiellosis를 보이는 어류의 질병을 96 well plate 상에서 정성적이고 정량적으로 진단하는데 응용하고자 할 때의 문제점과 최적의 조건을 확립하고자 하는 것을 목적으로 하였다.

과잉의 항-*E. tarda* 항체로 감작 시키면 조사된 3종의 *S. aureus* species 모두에서 self-agglutination 이 되는 현상을 보였다. 그것은 Protein A 분자와 토끼 항체의 Fc 부위가 결합하고 나면 부착한 polyclonal 항체의 Fab 부위는 free 상태로 있게 되므로 이것이 다른 *S. aureus*와 nonspecific binding을 하거나 또는 과잉의 부착 Fc 부위가 또다른 *S. aureus*의 protein A 분자와 결합하는 등의 이유때문일 수도 있을 것이다. 그러므로 우리는 96 well plate 상에서 최적의 button 상태를 보기 위한 토끼 항체의 농도 및 *S. aureus* 세포의 농도를 결정하였다 (Table 1). 최적화된 조건에서 *E. tarda* FKc와 coagglutination test를 실시 하였을 때 10 µg (습중량)/ml의 농도까지 감지 할 수 있는 것으로 나타났다 (Table 2). 일반적으로 BHI (Brain Heart Infusion) broth에서 24시간 배양한 *E. tarda*는 10^{10} ~ 10^{11} cells/ml의 농도를 나타내며 이는 약 3~30 mg의 습중량을 보이므로 coagglutination test는 최소 3×10^7 cells/ml의 *E. tarda*가 존재하여야 감지된다는 것을 의미한다고 할 수 있을 것이다. 열탕 추출 항원이나 EDTA 추출 항원의 경우 절대 수치로는 대단히 민감한 것으로 나타났지만 습중량 50 mg의 *E. tarda*를 열탕 추출 하거나 EDTA 추출 한 후 상등액의 단백질을 조사하면 각기 약 1 mg과 0.5 mg으로 나타남

로 Table 2의 각 수치를 세균 습증량으로 환산한다면 각기 약 25~50 µg/ml과 13~50 µg/ml의 최소감지농도로 표시할 수 있을 것이다. 그러나 실험에 따른 오차 한계가 상당히 있으므로 정확한 비교는 하기 어렵다. Sample의 희석액으로 PBS 대신에 조직의 열탕 추출물을 100배 희석한 것을 사용하였을 때 각 항원 형태에서 대개 최소감지농도가 약간 낮아지는 것으로 나타났는데 이는 고농도의 지방이나 단백질이 agglutination 형성을 보다 쉽게 하여 주기 때문으로 추측된다. 그러나 약 20 배보다 덜 희석된 조직의 열탕 추출액을 희석액으로 사용시에는 추출된 조직내부 물질들의 침전등으로 coagglutination test를 실시하기가 어려웠다.

토끼 항-*E. tarda* 219 혈청에 대한 현장 분리균주들의 agglutination titer와 coagglutination test에 의한 최소감지농도는 서로 신빙성 있는 상관관계를 보여 주었으며 (Table 3) C1 균주를 제외하면 조제된 항체감작 *S. aureus*는 조직내의 여러 한국형 *E. tarda* 항원과 충분히 coagglutination 할 수 있는 것으로 판명되었다. 그래서 토끼 항-*E. tarda* 219 혈청으로 감작 시킨 *S. aureus*를 현장에서 채집된 edwardsiellosis 넙치 또는 인공감염시킨 병어의 조직에 대해서 coagglutination test를 실시해 보았다. 토끼의 219 항혈청에 대해서 agglutination titer 수치로 약 20% 정도의 cross-reaction을 보이는 S4, D1 현장병어 넙치의 조직 homogenate는 약 1000배 이상 희석하여도 coagglutination test에서 positive 결과를 보여 주었다. 또 S3 병어에서도 유사한 검출한계를 보여주어 S3 균주도 219 균주와 agglutination titer 수치로서 10~20%의 cross-reaction이 있을 것임을 추정케 해 주었다. 다만 *E. tarda* D1은 어류항체를 이용한 cross-reaction 분석 (Ha et al., 1995) 보다 좀더 높은 cross-reaction 정도를 보였는데 그것은 토끼 항체가 인식하는 *E. tarda*의 epitope가 어류항체가 인식하는 부위와 다르거나 또는 단순히 coagglutination과 agglutination 법이라는 기술적 차이에 의한 것일 수도 있다. 흥미있는 것은 FKc의 열탕추출 항원과 조직 homogenate를 각기조제한후 혼합하여 분석하면 FKc 자체를 사용한 결과와 유사한 반응도를 보이거나 (Table 2) 감염균이 혼합되어 있는 조직 자체를 사용하여 항원을 열탕추출 하면 감도가 상당히 감소하는 것을 볼수 있었는데 (Table 3)

그것은 아마 조직의 지방, 단백질 등과 *E. tarda*균의 항원이 열에 의하여 complex를 형성하고 이는 coagglutination법에 의해서 상당부분이 감지되지 않는 것으로 추정되어 지므로 현장에 보다 직접적으로 본 방법을 적용하기 위해서는 이러한 차이에 대한 구체적인 연구가 있어야 할것이다.

결론적으로 항체감작 된 *S. aureus*를 이용한 coagglutination test는 특별한 지식이나 기술 또는 장비없이 현장에서 간단히 실시 할 수 있는 진단법이며 그 신속성과 정확성은 항원분석을 정성과 정량적으로도 실시할 수 있게 해주는 방법이다.

요 약

여러 다른 *S. aureus* strains 및 토끼항체를 사용하여 항체감작을 시킬 때 나타나는 *S. aureus*의 자체응집을 방지키 위한 분석과 함께 coagglutination의 최적 조건을 확립하였다. 적정화된 coagglutination기법을 실험실과 현장에서의 edwardsiellosis의 진단에 응용하였을 때 약 10 µg/ml의 *E. tarda*까지 검출 할 수 있었다. 더구나 이 방법은 *E. tarda*의 FKc, EDTA 또는 열탕추출 항원에 대해서 까지 좋은 진단결과를 보여주었다. 현장에서 edwardsiellosis에 감염된 어류로부터 직접 분리된 *E. tarda* 균주들은 토끼 항체생성을 위해 사용된 *E. tarda* 219와 응집항체법및 coagglutination법에서 모두 교차반응을 보여 주었다. 이러한 교차반응의 정도는 현장에서 나타나는 여러다른 *E. tarda* 균주에 감염될 수 있는 어류의 질병진단에 사용하기에 충분한 정도로 나타났으며 감염어의 조직마쇄물을 1000배 이상 희석하여도 토끼 항 *E. tarda* 항체로 감작시킨 *S. aureus*와 coagglutination 될수 있는 양의 *E. tarda*를 함유하고 있었다. 자연감염 또는 인위감염된 넙치, 틸라피아의 조직마쇄물, 열탕추출항원에 대한 이 방법의 적용 결과는 본방법이 특별한 장비없이 현장에서 질병진단 기법으로 사용할 수 있다는 것을 보여 준다.

사 사

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구 조성비(수산

과학 분야, 특정과제)에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Austin, B. and D. A. Austin. 1989. Methods for microbiological examination of fish and shellfish; Antigen analysis and preparation. Ellis Horwood Lim., England, pp. 103~104.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248~254.
- Christensen, P., G., Kalmeter, S. Gonson, and G. Kronval. 1973. A new method for serological identification of *Neisseria gonorrhoeae* with anti-gonorrhoeal antibody absorbed to protein A-containing *Staphylococci*. Infection and Immunity, 7, 881~885.
- Edward, E. A. and G. L. Larson. 1974. New method of grouping beta hemolytic *streptococci* directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized proteins A-containing *Staphylococci*. Applied Microbiol., 28, 972~976.
- Fredrick, M., A., B. Roger, and S. Kevin. 1987. Current protocols in molecular biology; Quantification of proteins. Green Publishing associates and Wiley-Interscience, 10-1-1.
- Ha, J.Y., K. H. Park, S. G. Shon, M. A. Park, J. S. Lee, D. L. Choi and H. D. Jeong. 1995. Development of immunological method for rapid diagnosis of fish disease; New ELISA technique to detect the specific antibody in diseased fish of edwardsiellosis. Bull. Nat. Fish. Dev. Agency, 49, 233~242.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu. 1981. Rapid method for detection of BKD of salmonid by coagglutination of antibody sensitized protein A containing *Staphylococci*. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. 47, 1173~1183.
- Kimura, T., M. Yoshimizu, and H. Yasuda. 1984. Rapid, simple serological diagnosis of IPN by coagglutination test using antibody-sensitized *Staphylococci*. Fish Pathology, 19, 25~33.
- Kronvall, G., U. S. Seal, and J. Finstad. 1970. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of gamma-G globulin using *Staphylococcal* protein A. J. Immuno., 104, 140~147.
- Kronvall, G. 1972. A rapid slide-agglutination method for typing *pneumococci* by means of specific means of specific antibody absorbed to protein-A containing *Staphylococci*. J. Med. Microbiol., 6, 187~190.
- Kuboda, S.S., N. Kaige, T. Miyazaki and T. Miyasita. 1981. Histopathological studies on edwardsiellosis of tilapia-1. Natural infection. Bul. Faculty of Fisheries, Mie University 9, 155~165.
- Mayers, G. L. and J. Klostergaard. 1983. The use of protein A in solid-phase binding assays; A binding assays; A comparison of four microiodination techniques. J. Immunol. Methods, 57, 235~246.
- Minagawa, T., T. Nakai, and K. Muroga. 1983. *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. Fish Pathology, 117, 243~250.
- Nakatsugawa, T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from young flounder. Fish Pathology, 18, 99~101.
- Rajagaplan, M. S. and T. Jacob-John. 1987. Sensitivity of passive bacterial agglutination for detection of hepatitis B antigen. J. Clinical Microbiol., 16, 549~551.
- Suksnong, M. and A. S. Dajani. 1977. Detection of *Hemophilus influenzae* type b antigen in body fluids, using specific antigen-coated *Staphylococci*. J. Clinical Microbiology, 5, 81~85.
- Verwey, W. F. 1940. A type specific antigenic protein derived from *Staphylococcus*. J. Exp. Med., 71, 631~664.
- Yoshimizu, M. and T. Kimura. 1985. A coagglutination test with antibody-sensitized *Staphylo-*

cci for rapid and simple diagnosis of bacterial
and viral diseases of fish. J. Fish Pathology, 20,
243~261.

1996년 5월 8일 접수
1996년 9월 2일 수리