

동물에서 *Coxiella burnetii* 항체를 진단하기 위한 경쟁효소면역법 개발

조동희 · 김용주 · 위성환 · 조미영 · 권창희 · 강영배 · 박용호* · 조상래**

국립수의과학검역원
서울대학교 수의과대학* · 연세대학교 의과대학**
(2000년 1월 4일 접수)

Development of competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Coxiella burnetii* antibody in animal

Dong-hee Cho, Yong-ju Kim, Sung-hwan Wee, Mi-young Cho, Chang-hee Kweon,
Yung-bai Kang, Yong-ho Park*, Sang-nae Cho**

National Veterinary Research and Quarantine Service
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*
College of Medicine, Yonsei University**

(Received Jan 4, 2000)

Abstract : *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) is the causative agent of Q fever in animal and human. The distribution of the disease has been documented around world. In this study we developed the competitive enzyme linked immunosorbent assay(cELISA) and compared it with indirect immunofluorescent assay(IFA). A monoclonal antibody(Mab) against *C. burnetii* and a peroxidase-conjugated anti-mouse IgM were used as an indicator system competing against antibody in animal serum or as an indicator of the absence of antibody. Sera were considered antibody positive when the percentage inhibition index(PI index) is upper than 30. PI index is calculated as $100 - [\text{sample OD}/\text{Mab OD}] \times 100$. Among 162 bovine serum samples, 23 samples were antibody positive both in cELISA and IFA. And 156 samples showed same results. From goat with experimentally induced infection with *C. burnetii* the antibody was detected 20 days early in cELISA compared to IFA. On the basis of present findings, it was demonstrated that cELISA is a reliable diagnostic method for the detection of specific antibodies against *C. burnetii* infection.

Key words : *Coxiella burnetii* , cELISA, monoclonal antibody.

서 론

*C. burnetii*는 Q열의 병원체로서 사람 뿐만 아니라 소, 양, 사슴, 고양이, 개 등의 가축에도 감염되는¹ 세포내 기생 리케치아의 일종으로 사람에서는 다양한 증상들을 나타내지만 가축은 특별한 증상없이 불현성 감염으로 경과하면서 균체를 유산 분비물이나 우유중에 배설한다. 국내에서는 간접형광항체법에 의해 소에서 18.2%의 항체 양성율과² 사람에서 원인을 알 수 없는 고열환자 178명중 2명이 항체 양성이 보고된 바 있다³. 동물들의 경우 소 이외의 감염항체 조사는 이루어지지 않고 있는데 현재 우리나라에서 Q열을 진단하기 위하여 사용되고 있는 간접형광항체법이 각각의 해당되는 동물종에 특이적으로 반응하는 이차항체를 필요로 하지만 국제 구매거나 제작할 수 없다는 것이 하나의 원인이 되고 있다. 이러한 결점을 극복하기 위해 Protein A 나 G를 특이항체를 대신해서 사용해 보기도 하였지만 동물종에 따라 결합력이 다르고 완충액의 pH, 이온농도 등에 의해 쉽게 영향을 받기 때문에 널리 사용되지 않고 있는 실정이다^{4,5}.

따라서 본 실험에서는 단클론항체를 이용한 경쟁효소면역법을 확립하여 가축에 사용되던 간접효소면역법과 비교함으로써 소 이외의 동물에 대한 진단가능성을 알아보도록 하였다.

재료 및 방법

*C. burnetii*의 증식 및 단클론항체의 작성 *C. burnetii* nine mile strain을 SPF 송원에서 증식하여 -70℃에 보관한 것을 L929 세포에 접종하여 15일간 증식시켰으며 L929 세포에서 *C. burnetii*가 제대로 증식되었는지 는 도립판미경에서 세포변성효과를 관찰하여 확인후 -70℃에 보관하면서 실험에 이용하였다. 단클론항체는 williams *et al*⁶이 기술한 방법에 준하여 작성하였으며 항원은 냉동고에 보관중인 것을 1% formaldehyde로 불활화하여 접종하였다. 융합된 세포로부터 분리되는 특이적인 단클론항체는 *C. burnetii* 항원에 대한 간접형광항체법을 실시하여 확인하였고 이때 이차항체로는 anti-Mouse IgG, A, M(KPL 074-1807)을 사용하였다. 작성된 단클론항체의 isotype은 monoclonal antibody isotyping kit(Pierce Co)를 사용하여 확인하였다.

cELISA항원 정제 : 냉동고에 보관중인 cELISA 항원을 정제하기 위해서 2,500 rpm에서 20분간 원심하여(한일과학 5KR) 파쇄된 세포를 제거한 다음 상층액을 10,000g에서 1시간 원심하여 항원을 농축하였다. 이 항원을 Nonidet P40(No28324 Surfact-Amps®NP-40, Pierce Co.)으로 18시간 처리하고 PBS(53.9mM Na₂HPO₄, 12.8mM KH₂PO₄, 72.6mM NaCl, pH 7.8)에 현탁된 Sephacryl S500으로 충전시킨 column(지름 17mm, 길이 35cm)에 항원을 2ml 주입하고 나서 1 ml씩 분획을 수거하여 실험에 사용하였다. 각각의 분획마다 단백질 양은 BCA protein assay kit(Pierce Co.)를 사용하여 측정하였으며 단클론항체에 특이적인 분획을 확인하기 위해 *C. burnetii*에 대한 단클론항체(Q95)로 간접 ELISA를 실시하였다. 단클론항체에 대한 이차항체로는 anti-Mouse IgM(KPL 074-1803)을 이용하였다.

검사재료 : 1996년에 경기도 지어 16개 목장으로부터 62두의 소 현장을 채취하였으며 채취 현청들은 56℃에서 30분간 비동화시킨 다음, 항체정사시험에 공시하였다.

간접형광항체법 : 간접형광항체법은 강 등²이 기술한 방법에 준하여 실시하였으며 20배 이상의 혈청희석 배율에서 항광을 발하는 것을 양성으로 판정하였다.

경쟁효소면역법(cELISA) : 항원은 0.05M carbonate buffer로 희석하여 18시간 이상 4℃에서 코팅한 다음 사용하였다. cELISA를 실시하기 위해서 항원을 털어 버린 다음 Tween 20이 0.05% 첨가된 PBS(PBST)로 10배 희석된 약 위험성을 50배 넣어 항원과 실온에서 5분간 반응시키고 100배 희석된 단클론항체(Q95) 50μl를 넣었다. 37℃에서 1시간 반응시키고 PBST로 5회 세척한 다음 anti-mouse IgM HRP conjugate(KPL 074-1803)를 3,000배 희석하여 반응 및 세척후 ABTS로 발색하여 흡광도(405nm)를 측정하였다. 양성 및 음성의 판단기준은 야외현장에 의한 단클론항체(Q95)의 발색억제 백분율(Percentage Inhibition, PI)을 구하여 30 이상인 경우 양성으로 하였으며, PI값은 100-[Sample OD/Mab OD]×100에 의해 구하였다.

산양에서의 *C. burnetii* 인공감염 및 채혈 : 간접형광항체법에 의해 음성으로 확인된 산양 2두에 3% 포르말린으로 불활화된 *C. burnetii* (10⁷ EID₅₀/ml)를 1 ml씩 양쪽 눈부근육에 접종하였다. 접종후 주기적으로 정맥에서 채혈하여 간접형광항체법 및 경쟁효소면역법을 실시하였다.

결 과

간접형광항체법을 이용한 단클론항체의 특이성 및 isotype 확인 : 제작된 단클론항체(Q95)는 *C burnetii* nine mile strain에 대한 간접형광항체법에서 강하게 반응함을 확인할 수 있었으며(Fig 1) isotype은 IgM으로 확인되었다.

Fig 1. Indirect immunofluorescent assay of the *C burnetii* nine mile strain with monoclonal antibody(Q95)

Sephacryl S500을 이용한 *C burnetii* 항원의 정제 및 단클론항체(Q95)에 대한 특이항원 확인 : L929 세포에서 증식시킨 항원을 NP40으로 처리후 column을 이용하여 정제하였을 때 주요한 3개의 peak를 확인하였으며(Fig 2) 이중 간접효소면역법으로 측정하였을 때 Q95에 특이적으로 반응하는 부위는 첫 번째 peak(분획13~17)이었다(Fig 3).

Fig 2. Fraction profile of *Coxiella burnetii* antigen after chromatography with Sephacryl S500.

적정 항원농도의 설정 : 간접형광항체법으로 확인된 양성 및 음성 혈청을 이용하여 각각의 항원농도에 따른

Fig 3. Identification of specific antigen responding to *Coxiella burnetii* monoclonal antibody(Q95).

PI 수치를 살펴본 바 항원희석배수 32배 이상에서는 양성 및 음성의 수치가 크게 차이나는 것을 확인할 수 있었다. 한편 이때 양성혈청이 나타나는 흡광도가 4~32배 까지는 항원을 희석할수록 오히려 증가하였고, 64배 이상의 희석배수에서는 양성혈청의 흡광도가 너무 낮아지기 때문에 적정 항원희석배수로서 64배를 설정하여 사용하였다. 이때 Q95는 1.2 정도의 OD를 나타내었다(Fig 4).

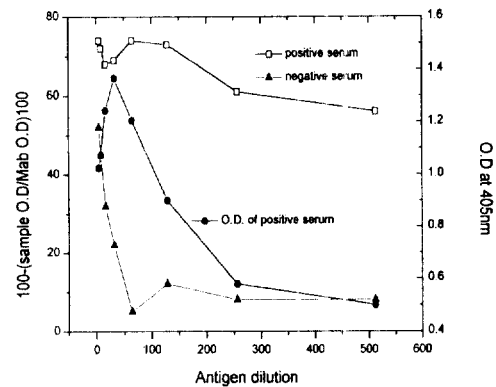


Fig 4. Titration of antigen concentration with positive and negative sera in ELISA.

간접형광항체법과의 상관성 : 162두의 소 혈청으로 간접형광항체법(IFA)과 cELISA를 실시하였다. 총 162두의 혈청중 156두에서 두 검사법에서의 양성 및 음성결과가 일치하여 진단일치율은 96.3%이었다(Table 1, Fig 5).

*C burnetii*를 인공적으로 감염시킨 산양에서의 접종 후 항체가 변화 : 개발된 cELISA 및 IFA 방법을 이용하여 *C burnetii*가 인공감염된 산양에서의 항체가를 측정해본 결과, IFA 방법에 의해서는 감염후 30일이 지나야

Table 1. Comparison of indirect immunofluorescent assay(IFA) and competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) result

IFA	No.	cELISA	
		Positive	Negative
Positive	26	23	3
Negative	136	3	133
Total	162	26	136

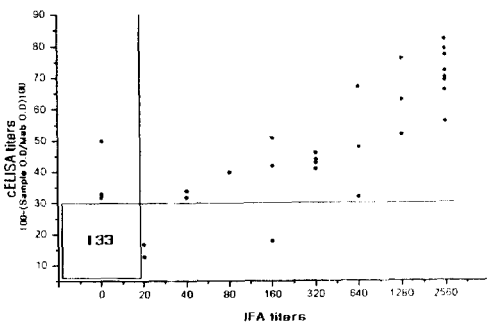


Fig 5. Comparison of bovine sera titer in IFA and cELISA. Vertical and horizontal bars indicate the threshold titer and inhibition index respectively.

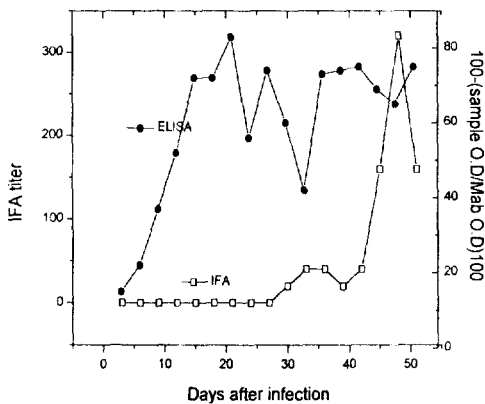


Fig 6. Comparison of antibody response in goat by IFA and cELISA after artificial infection with *Coxiella burnetii*.

양성으로 확인되었지만 cELISA를 이용할 경우 감염후 10일 이후부터 양성으로 확인되었다(Fig 6).

고 찰

C burnetii 는 난황낭, 계태아세포, L cell⁷이나 Vero 또는 HeLa 세포 등에 배양시에 증식하고 있다. 본 실험에서는 L cell을 이용하여 15일 정도 *C burnetii* 를 배양하고 NP40을 이용하여 정제하였다. 정제후 단클론항체를 반응시켰을 때 Sephacryl S500 column의 첫 번째 peak 유래 항원에서 특이성이 확인되어 진단항원으로 사용하였다 (Fig 1, 2). 단백질 농도를 확인했을 때는 15, 22, 33번째 분획에서 최고 농도를 확인할 수 있었지만 단클론항체에 대한 반응은 13, 14, 15번째 분획에서 흡광도가 높게 나타나 항원농도가 일정 정도 되면 더이상 흡광도에 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 이러한 추측은 정제된 항원을 사용하여 적정농도를 확인했을 때 32배 정도에서 최고의 흡광도를 보임으로서 확인되었으며 양성 및 음성혈청 사이의 흡광도 차이를 크게 하기 위해 항원은 64배로 희석하여 사용하였다. 이러한 현상은 적정농도 이상의 반응농도에서는 오히려 그 반응이 억제되는 'hook effect'가 원인인 것으로 알려져 있다⁸.

단클론항체를 이용한 경쟁효소면역법은 기본적으로 진단의 효율성을 높일 수 있는 여러가지 장점이 있다. 무엇보다도 단클론항체를 이용하기 때문에 비특이반응을 줄일 수 있으며 특정한 항체군(class)만 검출하는 것이 아니고 모든 종류의 특이항체와 경쟁을 하기 때문에 특이항체에 대한 항원의 모든 반응을 동시에 검사할 수 있다. 즉, 간접형광항체법에서는 한가지 항체 class에 대한 반응만 측정할 수 있지만 경쟁효소면역법을 이용할 경우 IgG 뿐만 아니고 IgM, IgA 등 단클론항체 특이항원에 반응하는 모든 종류의 항체에 대해서도 검사가 가능하다. 이런 특징들 때문에 산양에 인공접종한 후 간접형광항체법과 경쟁효소면역법을 이용하여 진단했을 때 경쟁효소면역법이 약 20일 정도 먼저 양성을 확인할 수 있었던 것으로 생각된다. 이런 장점들과 함께 여러 숙주에 감염되는 질병의 특성상 각각의 동물에서 O열을 진단할 경우 IFA 법에서는 별도의 이차항체를 제작 또는 구입해야만 하지만 경쟁효소면역법을 실시할 경우 이러한 단점이 근본적으로 해결될 수 있다.

이상의 실험결과로 *C burnetii* nine mile strain으로 제작된 단클론항체(Q95)는 경쟁효소면역법을 수행하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었으며 경쟁효소면역법은 간접형광항체법에 비해 감염된 개체를 조기에 검사할 수 있었다. 현재까지 큐열의 감염숙주는 사람을 포함하여 소, 돼지, 산양, 개, 고양이, 조류, 낙타, 사슴 그

리고 야생 맹금류 등이 알려져 있다^{1,9}. 따라서 이 연구의 결과는 이차항체 제작이 어려운 야생동물의 경우에도 적용이 가능하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Little TWA. Q fever-an enigma. *Br Vet J* . 139:277-283, 1983.
2. 강영배, 윤희정, 박봉균 등. 소의 Q열 진단을 위한 간접 면역형광항체 진단기법 및 *Coxiella burnetii* 제 1기 항원에 대한 항체분포 실태조사. *농업과학논문집(가추위생)*, 35(1):659-668, 1993.
3. 조상래, 이미경, 이재면 등. 우리나라 주민의 혈청내 Q Fever 원인체 *Coxiella burnetii* 의 Phase 항원에 대한 항체분포. *대한미생물학회지*, 27(3):283-288, 1992.
4. Biberefeld P, Ghetic V, Sjoquist J. Demonstration and assaying of IgG antibodies in tissues and on cells by labeled staphylococcal protein. *A J Immuno Methods* , 6:249-253, 1975.
5. Kronvall G, Grey HM, Williams RC. Protein A reactivity with mouse immunoglobulin. *J Immunol* , 105: 1116-1119, 1970.
6. Williams JC, Johnston MR, Peacock MG, *et al* . Monoclonal antibodies distinguish phase variants of *Coxiella burnetii* . *Infect Immun* , 43(1):421-428, 1984
7. Burton PR, Stueckenmann J, Welsh RM, *et al* . Some ultrastructural effects on persistent infections by the rickettsia *Coxiella burnetii* in mouse L-cells and green monkey kidney(Vero) cells. *Infect Immun* , 21:556-566, 1978.
8. Fernando SA, Wilson GS. Studies of the 'hook' effect in the one-step sandwich immunoassay. *J Immuno Methods* , 151:47-66, 1992.
9. Atef KS, Boulos AMB, Douglas MW. Evaluation of a competitive enzyme immunoassay for detection of *Coxiella burnetii* antibody in animal sera. *J Clin Microbiol* , 30(6):1595-1597, 1992.