

免疫螢光抗體法에 의한 방어의 類結節症 迅速 診斷

方鍾得 · 鄭丞姬 · 田世圭*

國立水產振興院 病理科

*釜山水產大學校 魚病學科

Rapid diagnosis of Pseudotuberculosis in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) by immunofluorescent antibody technique

Jong-Duek BANG · Sung-Hee JUNG · Seh-Kyu CHUN*

Pathology Division

National Fisheries Research & Development Agency

Kyongnam 626-900, Korea

*Department of Fish Pathology

National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) infected by *Pasteurella piscicida* have been occurred to mass mortality without showing apparent surface lesions in cage culture farms. In this case, it is necessary to consider countermeasure by rapid diagnosis of infected fish. The purpose of the present study was to investigate usefulness of the direct fluorescent antibody technique (FAT) for rapid diagnosis of pseudotuberculosis of cultured yellowtail caused by *P. piscicida*.

Antibody produced by inoculating rabbit with formalin killed pseudotuberculosis bacteria antigen (strain KNP-2). Immunoglobulin-G (IgG) was purified from antisera by DEAE-cellulose column chromatography and conjugate with fluorescein isothiocyanate. Fluorescein-labeled antisera was purified by sephadex G-25 gel column chromatography. The fluorescein/protein molar ratio of labeled antisera was determined as 8.8-9.5.

Diagnosis of cultured yellowtail was examined in cage culture farms which located in Tongyung, kyungnam from July to October 1990. The causative bacteria of pseudotuberculosis could be detected within two hours after the specimens were transferred to the laboratory for FAT, and it showed that FAT could be adapted as a rapid and accurate diagnostic method of pseudotuberculosis in yellowtail.

緒 論

最近 魚類養殖의 增加와 더불어 生産量이 늘어나면서 疾病으로 인한 被害도 增加하고 있을 뿐 아니라 發生되는 疾病의 樣狀도 多樣하고 治療도 어려운 實情이다.

魚病對策을 爲하여는 早期診斷에 依한 治療對策이 講究되어야 하는데 細菌性 疾病의 경우 通常 使用되고 있는 平板塗抹 培養法은 初期段階의 感染魚로부터 原因菌의 檢出이 어렵거나 發病魚라 할지라도 原因菌을 檢出하는데 4-5 日이 所要되어 被害를 입고난 以後에 對策을 講究하게 되는 경우가 많다. 또한 現地 調査의 경우 培地가 汚染되기 쉽고 混合感染 및 斃死魚에 있어 原因菌의 檢出이 어려울때가 많다.

그래서 魚病診斷에 數日이 要求되는 平板塗抹 培養法 보다 正確하고 迅速한 原因菌 檢出方法의 確立이 要請되는 實情이다. 本 研究에서는 疾病의 迅速 診斷을 爲한 直接螢光抗體法의 有用성을 養殖방어의 類結節症을 對象으로 檢討하였기 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 抗血清製造

保存中인 방어 由來 *Pasteurella piscicida* KNP-2를 1.5% NaCl를 첨가한 Tryptic soy agar(TSA, Difco)培地에 初代 培養하여 形成된 集落을 Brain heart infusion (BHI, Difco)培地에 接種하였다. 26°C에서 48時間振盪 培養하여 여기에 포르마린을 0.4% 濃度되게 첨가해서 4°C cold chamber에 하룻밤 放置하였다. 세척을 爲하여 滅菌生理食鹽水(0.85% NaCl)를 이용하여 원심분리기로 3회 세척후 完全히 죽은 菌體를 吸光度計(Spectrophotometer, UV-visible, DMS 70, Varian)로 280nm 波長에서 optical density(OD)가 2.0되게 菌液을 멸균 生理食鹽水로 調整後 아주반트(Adjuvant, complete freund, Difco)와 1:1 되게 첨가한 後 주사기로 잘 混合하여 免疫用 抗原을 만들었다.

免疫方法은 體重 2kg의 뉴질랜드 화이트種 토기(♂)에 抗原을 주사기로 2ml되게 取하여 토기의 兩쪽 뒷다리 발가락사이 皮下에 0.4ml씩, 등쪽 肩胛骨 皮下에 나머지 1.2ml를 注射하였다. 注射 1個月後 同方法으로

製造한 抗原을 同一部位에 再接種하여 10日後에 試驗 採血하여 抗體價의 增加를 確認한 後 採血하여 血清을 分離하여 抗體精製時까지 -20°C에 보관하고, 製造한 抗血清은 microtiter法에 依해 凝集素價를 調査했다.

2. 免疫글로브린 精製

Johnstone and Thorpe(1982)의 方法에 따라 抗血清으로부터 免疫글로부린 G(immunoglobulin-G, IgG)를 精製했다. 즉 抗血清에 sodium sulfate를 조금씩 넣어 最終 濃도가 18% (w/v)가 되도록 녹인다. 混合된 血清을 25°C에서 30分間 定值하여 鹽析시킨 後 25°C에서 30分間 3000xg로 원심분리하여 上層液을 버리고 침전물에 증류수로 녹인후 다시 sodium sulfate를 14% (w/v)되게 첨가하여 同一方法으로 鹽析시킨 後 원심분리하여 上層液을 버리고 침전물에 증류수를 加해 녹인다. 이것을 注射器로 取해 透析用주머니(dialyzer tubing, 分子量 12,000)에 넣고 PBS(Phosphate buffered saline, PH 6.3 : NaH₂PO₄ 14.5g/l, Na₂HPO₄ 4.3g/l)로 4°C cold chamber內에서 하룻밤 magnetic stirrer 攪拌하면서 투석하였다. 同時에 同一한 PBS(pH 6.3)로 活性化시킨 DEAE-cellulose (fine mesh, Sigma)를 충전하여 하룻밤 定值시킨 DEAE-cellulose ion exchange column(1×30cm)에 透析된 試料을 넣고 同 PBS(pH 6.3)로 溶出하여 Fraction collector(LKB)로 2.0ml씩 分画하였다. 이 分画에 含有된 단백질量은 吸光度計로 280nm에서 OD값을 測定하여 結定하였다. 또한 各 分画의 活性度는 microtiter法으로 凝集素價를 調査하여 活性이 있는 IgG가 어느 分画에서 溶出되는지를 確認하였다.

3. 螢光標識 抗體製造

DEAE-cellulose ion exchange chromatography에 依해 分離된 IgG 溶液을 0.25M carbonate buffer (pH 9.0, NaHCO₃ 19.74g/l, Na₂CO₃ 1.59g/l)로 4°C cold chamber 內에서 하룻밤 透析시킨후 FITC(fluorescein isothiocyanate, Sigma)를 0.05mg/mg protein 濃도가 되게 넣어 잘 混合한후 25°C에서 2時間 定置하여 結合시켰다. 未結合된 IgG와 分離하기 爲하여 Sephadex G-25 column chromatography를 사용하였다. 使用된 se-

phadex G-25(Sigma)는 PBS(pH 7.2, NaCl 8.00g/ℓ, KCl 0.20g/ℓ, KH₂PO₄ 1.15g/ℓ)에 활성화시킨 후 column (1 × 30cm)에 충전하였다. 流出은 固 PBS(pH 7.2)를 사용하여 2.0ml씩 分画하였다. 이들 分画은 吸光度計로 280nm 및 495nm의 波長에서 各各 OD값을 測定한후 螢光色素對蛋白 物比 즉 FITC/protein molar ratio = $\frac{2.87 \times A_{495}}{A_{280} - 0.35 + A_{495}}$ 의 값을 計算했다.

螢光物質(FITC)과 結合된 IgG 즉 螢光標識抗體(以下 標識抗體)의 活性度는 microtiter 法으로 調査하였다.

4. 參照菌株와의 交叉性 調査

試驗에 使用된 菌株는 Table 1과 같이 방어 由來의 *Vibrio anguillarum* YT-85901, *Streptococcus* sp. ST-2 및 本 試驗에 抗原菌株로 使用한 *Pasteurella piscicida* KNP-2와 넙치 由來의 *Streptococcus* sp. ST-66 및 *Edwardsiella tarda* FE-36이었다. 이들 菌株와의 交叉性을 알아보기 爲하여 各 培養菌을 PBS로 1mg/ml 濃度되게 菌液을 만들어 slide glass에 培養菌塗抹標本을 만들어 10% 아세톤에 固定시켰다. 여기에 2 倍씩 段階別로 1,024倍까지 稀釋한 標識抗體를 各標本の 塗抹部位에 듬뿍 떨어뜨려 溫氣가 유지되는 상자내에 넣어 30℃에서 30分間 反應 시킨후 PBS(pH 7.2)를 利用하여 5 分間씩 溶液을 바꾸어가면서 3 回세척후 선풍기로 건조시켜 螢光抗體標本을 만들었다. 標本은 封入 劑(Glycine 0.42g, NaOH 0.021g, NaCl 0.51g, Na₂CO₃ 0.03g, DW 30ml, glycerol 70ml)로 封入하여 어둡게 한 곳에서 螢光顯微鏡(Nikon, Labophot)으로 觀察하였다.

5. 自然感染魚에 對한 診斷

1990年 7月부터 10月까지 慶南 統營郡 住所 海上 가두리 養殖場(Fig. 1)을 對象으로 直接螢光抗體法에 依한 방어의 類結節症 診斷은, 現地에서 試料魚의 患部, 腎臟, 脾臟 및 腦 組織을 無菌的으로 떼내어 슬라이드 그라스에 試料別로 壓印塗抹하여 標本을 만든후 10% 아세톤에 10分間 固定後 實驗室로 移送하였다. 이렇게 前處理된 標本을 上記 螢光抗體標本 製作方法과 同一한 方法으로 標本을 만들어 螢光顯微鏡으로 檢鏡하였다.

細菌培養法에 依한 診斷은 直接螢光 抗體法에서 使用한 試料魚의 同一한 部位의 組織을 利用하여 現地에서 無菌的으로 1.5% NaCl을 첨가한 TSA 平板培養에 塗抹 接種한 것을 實驗室로 移送하여 26℃에서 48~72 時間 培養하였다. 分離菌은 純粹 分離 培養過程을 通하여 集落의 無色透明 및 粘稠性과 그림 染色性, 運動性 等を 調査하여 簡易 同定하고 抗原菌株 KNP-2의 抗血清과의 슬라이드 凝集反應으로 *P. Piscicida*임을 確認하였다.

結 果

1. IgG 精製

製作한 抗血清의 抗原菌株 KNP-2에 對한 凝集素 價는 1 : 1024였다. 이 血清中에 있는 IgG를 分離하기 爲하여 DEAE-cellulose ion exchange chromatography에 依해 溶出한 分画을 吸光度計로 波長 280nm에서 OD값을 測定한 結果는 Fig. 2와 같다. 各 分画의 吸光度 값은 1 개의 peak를 나타내는 曲線이었으며 活性을

Table 1. Organisms used for test

organism	Strain number	Source	Fish
<i>Vibrio anguillarum</i>	YT-85901	NFRDA*	Yellowtail
<i>Streptococcus</i> sp.	ST-2	NFRDA	Yellowtail
<i>Streptococcus</i> sp.	ST-66	NFRDA	Flat fish
<i>Edwardsiella tarda</i>	FE-36	NFRDA	Flat fish
<i>Pasteurella piscicida</i>	KNP-2	NFRDA	Yellowtail

* NFRDA : National Fisheries Research and Development Agency

14 *Rapid diagnosis of pseudotuberculosis*

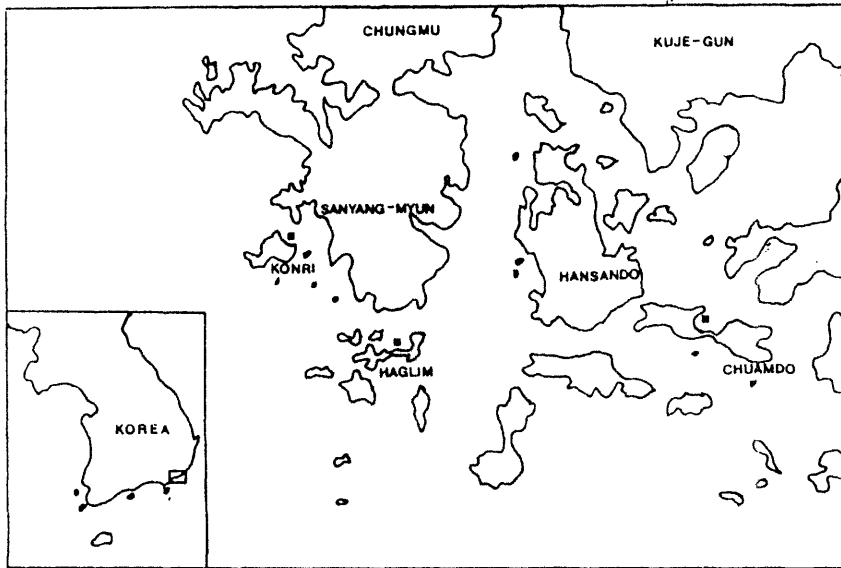


Fig. 1. Location of sampling stations.

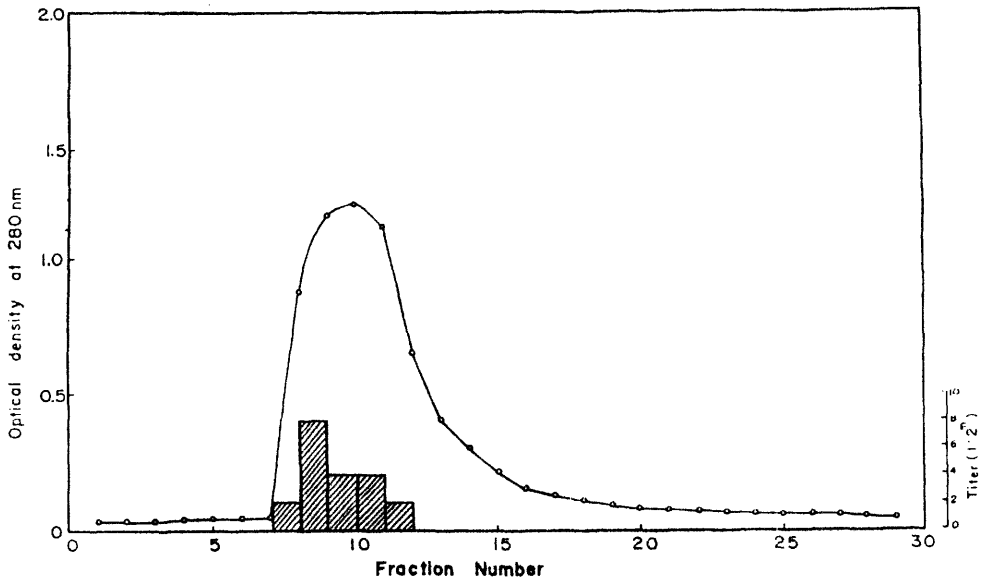


Fig. 2. Elution profiles of anti-rabbit sera from DEAE-cellulose ion exchange chromatography column was eluted with 0.07M sodium phosphate buffer(pH 6.3) and the volume of each fraction was 2.0 ml
Optical density at 280 nm Titer(1 : 2ⁿ)

나타내는 分画은 8, 9, 10, 11, 12였다. 이 中 活性이 가장 높은 分画은 peak 直前 部分인 分画 9였으며

抗體價는 256이었다. 여기서 活性이 높은 IgG을 나타낸 分画 9와 10을 取해서 標識抗體製造에 使用하였다.

2. 標識抗體精製

分離한 IgG에 FITC를 結合시킨후 sephadex G-25 gel chromatography를 통해 溶出된 分画을 280nm와 495nm 波長에서 吸光度를 測定하여 나타낸 曲線은 Fig. 3 과 같다. 分画의 吸光度 値는 2 개의 peak pattern을 나타내었고 標識抗體의 活性이 높은 部分은 첫번째 peak였으며 그 中에서도 分画 78.9에서 活性을 나타내었다. 여기서 가장 높은 活性을 나타내는 分画은 7 이었으며 活性이 높은 7 과 8 을 取하여 直接螢光抗體法에 使用하였으며 이것의 FITC/protein의 mole比는

8.8-9.5이었다.

3. 參照菌株와의 交叉性

參照菌株에 抗原菌株 *P. piscicida* KNP-2 標識抗體를 反應시킨 結果는 Table 2 와 같다. *V. anguillarum* YT85901, *Str. sp.* ST-2 와 *Str. sp.* ST-66에서는 標識抗體의 稀析 倍數가 1~2 까지는 螢光強度가 認定되었으나, 2~4 倍 以上 稀析할 경우 反應이 認定되지 않았다. 또한 抗原菌株인 *P. piscicida* KNP-2 와는 128 倍까지 螢光強度가 認定되었다.

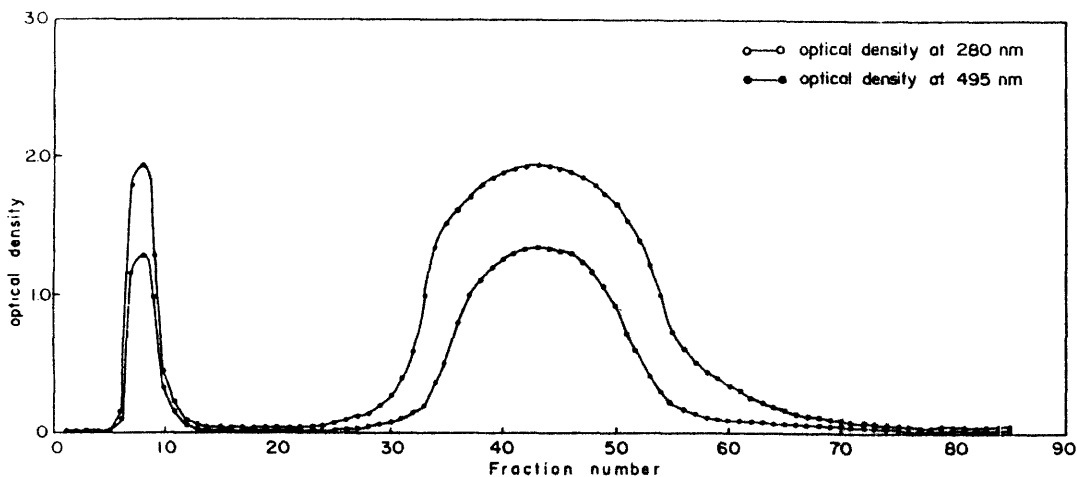


Fig. 3. Elution profiles of FITC-labeled anti-rabbit Ig antibody from sephadex G-25 Gel filtration chromatography. The column was eluted with PBS(pH 7.2) and the volume of each fraction was 2.0 ml optical density optical density at 280 nm optical density at 495 nm

Table 2. The staining titer of *Pasteurella piscicida* KNP-2 fluorescent antibody against various fish pathogens.

Antigen	Dilution of fluorescent antibody								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>V. anguillarum</i> YT 85901	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. st-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. st-66	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. tarda</i> FE-36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. piscicida</i> KNP-2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

+++ : intense fluorescence, ++ : clear fluorescence, + : distinct fluorescence, - : no definite fluorescence.

16 Rapid diagnosis of pseudotuberculosis

4. 自然感染魚에 對한 診斷

가두리 養殖場에서 방어를 對象으로 類結節症 診斷 試驗 結果는 Table 3과 같다.

表에서와 같이 調查地域에 있어 類結節症은 8月부터 發生한 것으로 나타났으며 8月에 있어 昆里 地域에서는 本疾病의 發生으로 많은 斃死를 일으켰으나 그外 地域에 있어서는 斃死現象이 없었다. 9月以後에는 일시에 大量斃死는 없었으나 累積斃死量이 增加하는 경향을 보였다. 이는 各養殖場이 類結節症外 連鎖球菌에 混合感染되어 斃死量이 增加한 것으로 생각된다.

考 察

疾病을 迅速하게 診斷하는 代表的인 方法中에 免疫 螢光抗體法은 醫學 및 獸醫學分野에서 使用해 오던 것으로 魚病分野에의 適用은 最近에 와서 이루어 지고 있다. 細菌性 疾病에 있어 菌의 檢出이 어렵거나 培養하는데 時間이 많이 所要되는 연어과 어류의 細菌性 疾病 診斷에는 Johnson and wobeser(1974), Bullock and stuckey(1975), Laidler(1980) Ernie and Michael(1987), R. J. Pascho et al.(1987) 등의 報告가 있고 類結節症에 對하여는 Kitao and Kimura(1974), Ku-

suda and kawahara(1987) 등의 報告가 있다.

방어의 類結節症은 外見上 뚜렷한 症狀이 없이 죽기 때문에 適切한 對策을 講究해 보지도 못하고 大量의 被害를 입게되는 경우가 많다. 本疾病의 경우 初期感染魚는 外見狀 診斷이 곤란할 뿐 아니라 보통 使用하는 平板塗抹 培養法은 診斷하는데 4~5 일이 所要되기 때문에 이 期間동안 病은 重症으로 進展되어 많은 被害를 입게 된다. 또한 類結節原因菌인 *P. piscicida*는 平板培地上에서 培養 速度가 느리기 때문에 混合感染의 경우 純粹分離가 곤란하여 診斷上 어려움이 많다. 그래서 疾病의 早期에 迅速診斷하는 效果의인 診斷方法이 要求되는 實情이다.

本 實驗에 使用한 抗原菌株 *P. piscicida* KNP-2는 1988~1989年度에 本 試驗의 現地診斷과 同一한 地域의 養殖방어에서 分離한 菌株中의 代表菌株로써 同一한 血清型을 나타내어 免疫螢光抗體法의 適用이 가능한 것으로 나타났다.

IgG 分離時 分画曲線上 높은 活性을 나타내는 部分이 peak 部分인 것은 Johnstone and Thorpe(1982)의 結果와 一致하는 경향을 보였으며 IgG로부터 製作한 標識抗體의 FITC/protein의 mole比 8.8~9.5는 Johnstone and Thorpe(1982)의 2~5와는 差異를 나타내었다.

Table 3. Detection of the causative bacteria of pseudotuberculosis from yellowtail using the fluorescent antibody technique(FAT) and cultural method

Sampling	Date of sampling	No. of fish tested	FAT		Culture	
			No. of positive	No. of negative	No. of positive	No. of negative
Konri	Jul. 18, 1990	12	0	12	0	12
Haglim	Jul. 18, 1990	5	0	5	0	5
Konri	Aug. 13, 1990	15	9	6	2	13
Haglim	Aug. 13, 1990	4	1	3	0	4
Chuamdo	Aug. 13, 1990	5	2	3	0	5
Konri	Sep. 21, 1990	5	3	2	1	4
Haglim	Sep. 21, 1990	8	1	7	0	8
Konri	Oct. 18, 1990	5	4	1	3	2
Haglim	Oct. 18, 1990	6	2	4	0	6
Chuamdo	Oct. 18, 1990	5	2	3	1	4

Table 4. Detection of pathogenic bacteria from yellowtail farm occurred mass mortality

Bacteria	*Number of detected by		**Number of detected by	
	FAT	culture	FAT	culture
<i>Vibrio anguillarum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Streptococcus</i> sp.	5/5	0/5	5/5	5/5
<i>Pasteurella piscicida</i>	5/5	0/5	3/5	2/5

* dead fish, yellowtail(70-100g)

** live fish, yellowtail(75-100g)

參照菌株의 交叉性은 標識抗體를 4倍以上 稀釋할 경우 交叉性을 除去할 수 있었고 抗原菌株 *P. piscicida* KNP-2에 對하여는 1:32까지 明確한 螢光強度를 나타냄으로 診斷試驗에는 標識抗體를 32倍로 稀釋하여 使用하는 것이 타당한 것으로 나타났다.

自然感染魚에 對한 診斷試驗에 있어 8월에 採集한 試料魚는 平板塗抹培養法으로 類結節原因菌의 檢出이 곤란하였는데 이는 昆里 地域을 除外한 학림, 주암도 地域 養殖場은 初期感染 狀態로써 菌量이 적을 뿐 아니라, *Vibrio* spp.等 優點菌의 出現으로 集落 形成이 늦은 *P. piscicida*는 集落이 形成되지 않다가 優點細菌에 덮혀버려 分離가 곤란하였다. 그러나 螢光抗體法으로는 初期 感染魚에서도 感染菌體의 確認이 可能하였다 (plate, Fig. 2).

1990年 8월에 많은 斃死魚가 發生한 昆里 地域 방어 養殖場에 있어 죽은지 12時間 以內的 방어를 對象으로 病原菌을 調査한 結果는 Table 4와 같다.

試料魚는 *Strepto.* sp. 및 *P. piscicida*로 混合感染되어 斃死한 것으로 나타났다.

菌檢出 結果에서 보면 平板塗抹 培養法으로는 自然 病原菌의 檢出이 不可하였으나 螢光抗法으로는 可能하였다. 이것은 *Vibrio* spp. 를 포함한 海産常存 細菌들의 번무로 因하여 菌의 分離가 不可能했기 때문이다. 그러나 同一 가두리內에 있는 生存魚에 對해서는 *Str.* sp. 및 *P. piscicida*가 平板塗抹 培養法으로는 檢出되었으나 螢光抗體法보다는 多少 檢出率이 낮은 경향을 보였다.

또한 螢光抗體法은 現場에서 移送하여온 塗抹標本을 2時間內에 原因菌을 確認할 수 있어 魚病迅速診斷에 本 方法의 適用이 效果의인 것으로 나타났다.

要 約

방어의 類結節症 迅速診斷을 爲한 免疫螢光抗體法의 有用性을 檢討하기 爲하여 原因菌으로 免疫된 抗血清에서 免疫글로브린 G(IgG)를 分離하여 FITC標識 抗體를 精製하였다.

精製된 標識抗體는 螢光強度가 1:32였으며 이 標識抗體를 利用하여 1990年 7월부터 10월까지 慶南 統營郡 所在 방어 養殖場을 對象으로 類結節症診斷 試驗을 實施한 結果 直接螢光抗體法으로 2時間內에 原因菌의 迅速診斷이 可能하고 菌檢出面에서도 平板塗抹 培養法보다 效果의인 것으로 나타났다.

參 考 文 獻

- Bullock G. L. and H. M. Stuckey(1975) : Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Board can.*, 32(11), 2220-2227.
- Ernie G. H. Lee and M. R. Gordon(1986) : Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners.
- Johnson G. R. and Wobeser G.(1974) : Indirect fluorescent antibody technique for detection of RM bacterium of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board can.*, 31(2), 1957-1959.
- Johnstone A. and R. Thorpe(1982) : Immunochemistry in practice. Black and scientific publications.

18 *Rapid diagnosis of pseudotuberculosis*

Oxford, The Great Britain, P. 259.

Kimball D. C. and T. M. William (1971) : An immunofluorescent technique for detecting *Aeromonas liquefaciens* in fish utilized in Lunar exposure studies. Trans. Amer. Fish. Soc., 3, 575-578.

Kitao T. and M. Kimura(1974) : Rapid diagnosis of pseudo tuberculosis in yellowtail by means of the Fluorescent Antibody Technique. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(9), 889-893.

楠田理一・河原榮二郎(1987) : 直接よび間接螢光抗

體法によるづり主要病原細菌の識別. 日水誌, 53(3), 389-394.

Loidler L. A.(180) : Detect and identification of the bacterial disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique. J. fish disease, 3, 67-89.

infected yellowtail. x657.

2. Direct fluorescent antibody staining of an impression smear preparation of the spleen taken from infected yellowtail. x657.

Explanation of Plate

1. Direct fluorescent antibody staining of an impression smear preparation of the kidney taken from infected yellowtail. x657.
2. Direct fluorescent antibody staining of an impression smear preparation of the spleen taken from infected yellowtail. x657.