

수산생물의 생산과 관리에 관한 기초연구 : ELISA법을 이용한 *Edwardsiella tarda*의 직접 검출

정순윤 · 손상규* · 정준기 · 허민도 · 정현도[†]

부경대학교 수산과학대학 어병학과, *국립수산진흥원 병리과

어류의 감염 조직으로부터 edwardsiellosis의 원인균인 *Edwardsiella tarda*를 whole cell 자체로 직접 검출할 수 있는 solid phase ELISA법을 연구하였다. *A. hydrophila* ATCC7966, *V. anguillarum* HUF5001, *Y. ruckeri* 11-4, *E. ictaluri* 및 *Streptococcus* sp. NG8206 등의 어병세균에 대해 ELISA법으로 실시한 교차반응 분석에서 *A. hydrophila* ATCC7966 균주와 *V. anguillarum* HUF5001 균주가 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청에 대해 높은 교차반응을 나타내었으나, 항혈청을 *A. hydrophila* ATCC7966 FKC로 흡착시킴으로써 교차반응을 제거할 수가 있었다. 그러나, 응집항체가 측정 결과와는 달리, ELISA 분석에서는 *E. tarda* 분리 균주간의 교차반응이 매우 높은 것으로 나타났다. Tissue homogenate내에 있는 항원을 검출함에 있어, 조직내의 지질이나 단백질 성분이 함께 분석용 plate에 coating되어 감도가 훨씬 감소하므로 ELISA법의 적용을 위해서는 감염 조직의 homogenate를 PBS에 100배 이상 희석한 후 진단을 실시해야 하는 것으로 나타났다. Tissue homogenate내에 있는 생균을 항원으로 하여 직접 검출할 때에는 검출한계가 1×10^6 cells/ml로 나타나 FKC 항원의 사용에 비하여 더 증가된 감도를 보여주었다. 결론적으로 본 ELISA법은 양식장에서 발생한 edwardsiellosis를 진단함에 있어서 특이적이고 신속하며 민감한 방법으로 확인되었다.

Key words : Diagnosis, ELISA, Cross-reaction, Edwardsiellosis, Viable-cell antigen

Edwardsiellosis의 원인균인 *Edwardsiella tarda*는 자연계에 널리 분포하여 뱀(Sakazaki, 1967), 타조와 도마뱀(White *et al.*, 1969), 갈매기(Berg and Anderson, 1972) 그리고 칠면조(Winsor *et al.*, 1981) 등 여러 종류의 동물로부터 분리되었으며, 사람에게서는 간에서의 농양, 뇌막염을 일으키며(Jordan and Hadley, 1969), 위장염과 관련되어 심한 설사를 일으키는 것으로 보고되

어 있다(Farmer *et al.*, 1985). 그러나 이 균은 사람이나 동물에 대한 병원성보다는 수중 상재 세균으로 어류에서 어떤 스트레스하에서 발병하여 큰 피해를 주는 조건성 병원체로서 널리 알려져 있다. 지금까지의 보고에 의하면, 뱀장어(Wakabayashi and Egusa, 1973; Kanai *et al.*, 1977), 차넬메기(Meyer and Bullock, 1973), 송어(Kusuda *et al.*, 1976), 붉돔(Kusuda *et al.*,

[†] Corresponding author

1977), 메기(Wyatt *et al.*, 1979), 틸라피아(Kubota, 1981; Miyashita, 1984), chinook salmon (Amandi *et al.*, 1982), 넙치(Nakatsugawa, 1983; Kanai *et al.*, 1988) 그리고 잉어(Sae-Oui *et al.*, 1984) 등 담수어 및 해산어의 여러 어종에서 광범위하게 발병된다고 보고되었으며, 우리나라에서도 뱀장어, 탈라피아와 넙치에서 보고되었고(Chun, 1988; Oh and Chun, 1988), 특히 넙치 양식에서 큰 피해를 일으키고 있다. 감염시 일반적인 임상 증상으로는 복수에 의한 복부팽만, 안구백탁, 체색흑화, 항문 부위의 출혈이나 탈장 그리고 간, 신장, 비장이나 아가미에 작은 흰색 결절이 생긴다(Meyer and Bullock, 1973; Kanai *et al.*, 1988). 이러한 증상을 보이는 edwardsiellosis를 포함한 각종 세균성 질병의 발생시, 지금까지의 일반적인 진단법으로서는 병어의 외부 증상이나 해부학적 경험에 의해 추정 진단을 하거나, 기본적인 현미경 관찰을 통한 원인균의 검경, 감염 조직이나 혈액으로부터 원인균의 분리 및 배양 후 여러가지 생화학적 성상을 검사함으로써 원인균을 동정하여 확정 진단을 하는 것이 일반적이었다. 경우에 따라서는 TCBS, SS, DSSS 등의 선택배지를 이용하여 여러가지 생화학적 성상 검사를 거치지 않고 추정 진단을 하여 시간적으로 단축을 꾀하기도 하였다. 그러나 일단 발병하게 되면 단기간에 대량폐사를 일으키는 질병에 대해서는 신속한 진단이 요구되므로 이러한 진단법으로써는 적절히 대처할 수가 없다. 따라서 질병 발생시 원인균의 동정을 위해서는 보다 정확하고 신속한 진단법이 요구되어, 새로운 진단법의 개발에 보다 더 많은 관심을 기울이게 되었다. 그러므로 현재에는 항원·항체의 특이적 결합을 바탕으로 한 면역혈청학적 기법, 예를 들면, FIA(Fluorescence-Immunoassay: Johnson *et al.*, 1981), coagglutination test

(Yoshimizu and Kimura, 1985), RIA(Radio-Immunoassay: Hsu and Leong, 1985), hemagglutination assay, ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Hattori *et al.*, 1984; Burreson and Fritzell, 1986; Adams, 1991) 그리고 immunodot blot assay(Hsu *et al.*, 1989) 등과 같은 여러 방법이 개발되어 널리 사용되고 있다. 이들 방법 중 ELSA는 정량적이고 신속, 정확, 경제적이며 많은 수의 sample을 한꺼번에 진단할 수 있고 검출한계 또한 매우 낮아서 어류의 질병 진단에 널리 사용되고 있다.

본 연구에서는 edwardsiellosis의 원인균인 *Edwardsiella tarda*를 solubilization 또는 추출 등의 복잡한 방법을 사용하지 않고 보다 간단하게 어류에 감염되어 있는 세균자체를 항원으로 해서 직접 검출할 수 있는 ELISA법을 연구하여 양식현장에서 보다 간편하고 신속하게 세균성 감염을 진단할 수 있도록 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

평균 체중 30~50g이고 병력이 없는 건강한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 동해와 남해 연안의 양식장에서 직접 분양받아, 실험실의 50 l 사육조에 사용하고, 수온을 22℃로 유지시키면서 실험에 사용하였다.

실험균

Edwardsiella tarda Edk-2, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Vibrio anguillarum* HUF5001, *Yersinia ruckeri* 11-4, *Edwardsiella ictaluri* 및 *Streptococcus* sp. NG8206 등의 타 실험실에서 직접 분리한 기존 균주와 우리나라

Table 1. Origin of *Edwardsiella tarda* isolates at different aquatic farms of Korea and Japan

Strains	Fish	Organ	Locality	Year
Edk-2	Eel	.	Japan	1988
H4	Flounder	Liver	Yeongil	1993
RE8	Flounder	Liver	Pohang	1993
EE1	Flounder	Liver	Yeongil	1994
YE1	Flounder	Liver	Yeusoo	1994
NUF49	Eel	.	Nagasaki	1984
NUF251	Flounder	.	Nagasaki	1986

동해안과 남해안 양식장의 넙치 병어로부터 본 실험실에서 직접 분리한 *E. tarda* H4, RE8, EE1, YE1 균주 및 일본 나가사끼대학 수족생리학 실험실에서 분양받은 *Edwardsiella tarda* NUF49와 NUF251 균주를 사용하였다(Table 1). 실험균은 TSB(tryptic soy broth)배지에서 25℃, 20시간 배양하여 실험에 사용하였다. 균주의 보존은 배양액의 20%가 되도록 glycerol을 첨가하여 잘 현탁한 후 -75℃에 보존하였다.

항원의 제조

항원은 세균의 whole cells 자체를 formalin으로 불활화시킨 FKC(formalin-killed cells)와 생균을 항원으로 사용하였다. FKC는 TSB 배지에서 25℃에서 20시간 배양한 후, 배양액의 0.5%가 되도록 formalin을 하룻밤 동안 처리하여 불활화시켰다. 이 불활화된 균액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 집균하고, 0.01M 멸균 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)로 3회 세척하여 formalin을 제거하였다. 세척된 불활화균을 2×10^{10} cells/ml의 농도가 되도록 멸균 PBS로 재현탁 하였다. FKC 현탁액의 균수 농도는 formalin을 처리하기 직전에 TSA 배지에서 colony forming unit (cfu)를 측정하여 결정하였

다. 생균은 TSB 배지에서 25℃, 20시간 배양한 후, 배양액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 집균하고, 0.01M 멸균 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하여 사용하였다.

토끼 항혈청의 제조

체중 1.5kg의 토끼에 4×10^{10} cells/ml의 *E. tarda* Edk-2 균주의 FKC와 Freund's complete adjuvant(FCA)를 1:1로 혼합한 1ml을 각 개체당 최소 10군데의 피하에 나누어 주사하였다. 3주와 5주 후 동량의 항원을 Freund's incomplete adjuvant(FIA)와 1:1로 혼합하여 동일한 방법으로 boosting 하였으며, 마지막 boosting 2주 후 토끼의 귀에 있는 혈관으로부터 0.2ml을 채혈하여 응집항체를 확인한 후 심장을 천자하여 전체혈하였다. 혈액은 상온에서 30분간 방치한 뒤 4℃에서 하룻밤 동안 놓아둔 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청은 0.1%가 되도록 NaN_3 를 첨가한 후 적당량씩 분주하여 -75℃에 보관하였다.

응집항체가 측정

FKC와 생균을 이용하여 응집항체를 측정 비교하였다. FKC의 경우, 현탁액을 4mg/ml의 농도가 되도록 맞추어 사용하였으며, 생균의 경우에는, 각 균주를 TSB 배지에서 25℃, 20시간 배양하여 10,000×g에서 20분간 원심분리후 집균하고, 0.01M 멸균 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 세척된 배양균액을 595nm에서 흡광도가 4.0정도가 되게 재현탁하여 사용하였다. 측정은 U형 96 well plate에 연속적으로 2배씩 희석된 항혈청을 각 well에 50μ씩 가하고 준비된 항원을 50μ씩 첨가하여 실온의 습윤상자에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 응집괴가 형성되지 않는 최대 희석배수를 응집항체가로 결정하였다.

ELISA법

1) 토끼 항혈청의 흡착

A. *hydrophila* ATCC7966 2×10¹¹cells/ml의 FKC 500μ를 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 0.01M PBS(pH 7.2)로 3회 세척한 후 1:100으로 희석한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청 1ml에 현탁시켜 25℃에서 1시간 동안 교반하면서 흡착시켰다. 그리고 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 이용하였다.

2) 교차반응 분석

Aeromonas hydrophila ATCC7966, *Vibrio anguillarum* HUF5001, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri* 및 *Streptococcus* sp. NG8206 균주와 여러 다른 *E. tarda* 균주의 사균인 FKC와 생균으로 ELISA를 실시하여 교차반응을 비교하였다. 각각의 FKC와 생균을 PBS에 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ 및 10²cells/ml로 희석한 항원 50μ를 60℃에서 2시간 건조시켜 coating하여 ELISA를 실시하였다.

3) Tissue homogenate의 적정 희석배수 결정

멸균 PBS로 넵치의 간 조직 homogenate를 1:25, 1:50, 1:100 및 1:200으로 희석한 후 *E. tarda* Edk-2 FKC를 가하여 농도가 10⁶cells/ml이 되도록 가하고 다시 한번 homogenization을 실시하여 혼합 하였다. 이 혼합물 50μ를 분석용 plate의 well에 넣고 60℃에서 2시간 건조시켜 coating하고 이를 ELISA의 항원으로 사용하였다.

4) 최적화된 ELISA법

중류수 또는 적정 농도로 PBS에 의해 희석된 넵치 간의 homogenate에 혼합된 whole cell 항원 50μ를 well에 넣고 60℃에서 2시간 건조시켜 coating시킨 후, Tween 20이 0.1% 첨가된 PBS (PBST-20)로 3회 세척하고 2% BSA 200μ를 well에 채워넣어 37℃에서 1시간 반응시켰다. PBST-20으로 3회 세척한 후 PBS로 1:1000으로 희석된 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청 75μ (응집항체가 1:25600)를 well에 채워넣어 37℃에서 30분간 반응시켰다. 다시 PBST-20으로 3회 세척하고 1:1000으로 희석한 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma Chem. Co., St. Louis) 75μ를 채워, 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS T-20으로 3회 세척한 후 2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)가 포함된 pH 5.0의 0.05M phosphate-citrate 완충용액(Sigma Chem. Co.)을 well당 200μ씩 채워넣고, 30분 후 ELISA reader(BIO-TEK EL312e)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Table 2. Cross-reaction of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum against several formalin-killed and viable cells of fish pathogens by agglutination test

Fish pathogens	Agglutination titer with FKC	Agglutination titer with viable cells
<i>E. tarda</i> Edk-2	1:25600	1:12800
<i>E. tarda</i> H4	1:160	1:640
<i>E. tarda</i> RE8	1:160	1:640
<i>E. tarda</i> YE1	1:80	1:640
<i>E. tarda</i> EE1	1:320	1:640
<i>E. tarda</i> NUF49	1:160	1:1280
<i>E. tarda</i> NUF251	1:80	1:640
<i>A. hydrophila</i> 7966	<1:20	<1:20
<i>V. anguillarum</i> HUF5001	<1:20	<1:20
<i>Y. ruckeri</i> 11-4	<1:20	<1:20
<i>E. ictaluri</i>	<1:20	<1:20
<i>Streptococcus</i> sp. NG8206	<1:20	<1:20

응집항체가 측정에 의한 토끼 항혈청의 교차반응 분석

E. tarda Edk-2에 대한 토끼 항혈청이 여러 다른 *E. tarda* 균주 또는 다른 종의 어병세균에 대한 교차반응을 FKC와 생균 항원을 사용하였을 때 나타나는 응집항체가로 비교하였다 (Table 2). *E. tarda* Edk-2 FKC에 대하여 1:25,600으로 매우 높은 응집항체가를 나타내는 토끼 항혈청은 다른 *E. tarda* 분리균주에 대해서는 1:80~320정도의 교차반응을 보였고, 다른 종의 어병세균과는 1:20 이하로 나타나 낮은 교차반응을 보여주었다. 응집항체가 측정을 위하여 일반적으로 사용되는 FKC 항원 대신에 직접 생균을 사용하였을 때에는 *E. tarda* 균들간에는 1:640~1280 정도의 교차반응을 보임으로써 FKC 사용의 경우에 비하여 높은 교차반응을 나타내었고 다른 종의 어병세균에 대하여서

는 여전히 1:20 이하로 나타나 교차반응이 증가하지 않았다.

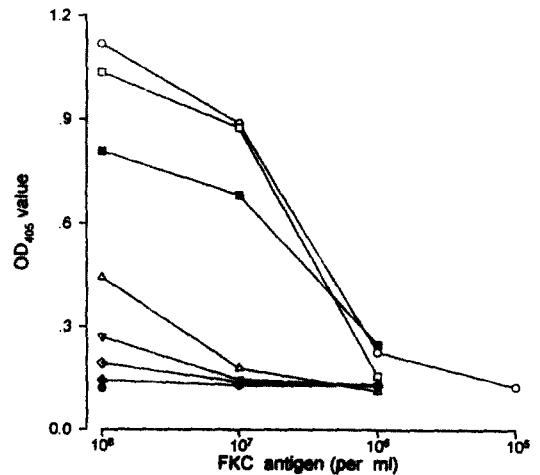


Fig. 1. Cross-reactivity of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum against FKC of fish pathogens. ○, *E. tarda* Edk-2; □, *E. tarda* EEL; ■, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966; △, *Vibrio anguillarum* HUF5001; ▽, *Y. ruckeri* 11-4; ◇, *E. ictaluri*; ●, *Streptococcus* sp. NG8206; ●, negative control.

FKC를 항원으로 하는 ELISA법에 의한 토끼 항혈청의 감도 및 교차반응 분석

제조한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청이 다른 *E. tarda* 분리균주 및 종이 다른 어병세균의 FKC를 항원으로 한 ELISA에서 나타내는 감도 및 교차반응을 비교 분석하였다(Fig. 1, Fig. 2). Plate에 부착시킨 *E. tarda* Edk-2 FKC의 농도가 10^6 cells/ml 이하로 되는 점에서부터 감도는 급격히 감소하여 부착시킨 FKC의 농도가 10^3 cells/ml 이하가 되면 양성과 음성 반응

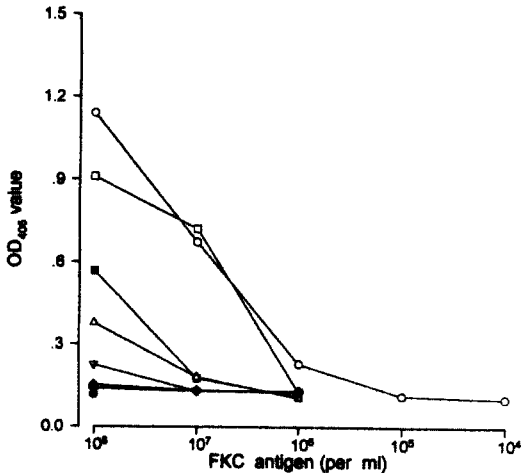


Fig. 2. Specificity of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum pre-adsorbed with *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 against FKC of fish pathogens. ○, *E. tarda* Edk-2; □, *E. tarda* EE1; ■, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966; △, *Vibrio anguillarum* HUF5001; ▽, *Y. ruckeri* 11-4; ◇, *E. ictaluri*; ◆, *Streptococcus* sp. NG8206; ●, negative control.

을 명확히 구별하기 어려웠다. 교차반응은 응집 항체가 분석에 의한 결과(Table 2)와는 달리 *E. tarda* 균주 FKC들 간에는 높은 교차반응을 보여주었고 다른 종의 어병세균 FKC에 대하여서는 여전히 낮은 교차반응을 보여, 본 방법에서 토끼 항혈청은 다양한 *E. tarda* 균주들에 대하여 특이성을 가지는 것으로 나타났다. 그러나 사용된 다른 어병세균의 FKC 중 *A. hydrophila*

ATCC7966에 대하여서는 높은 교차반응을 나타내어 종이 다른 각각의 어병세균에 대하여 교차반응의 정도가 다르게 나타날 수 있음을 보여주었다. 이러한 *A. hydrophila*에 대한 교차반응을 제거하기 위하여 토끼 항혈청을 *A. hydrophila* ATCC7966 FKC에 흡착시킨 후 여러 어병세균에 대한 ELISA법을 적용시켰을 때, *E. tarda*균에 대한 감도의 감소는 일어나지 않고, *A. hydrophila* ATCC7966 균주에 대해서는 교차반응의 정도가 매우 감소된 것을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 항원(10^8 cell/ml)을 사용하였을 때는 낮은 교차반응이 일어나고 있었다(Fig. 2).

생균을 항원으로 하는 ELISA법에 의한 토끼 항혈청의 감도 및 교차반응 분석

생균을 직접 plate에 부착시켜 실시한 ELISA의 결과를 생균대신 FKC를 부착시킨 경우 또는 응집항체가 의한 교차반응의 분석 결과와 비교하고자 하였다. Fig. 3에서 보여주듯이 생균을 이용한 ELISA가 FKC를 이용하는 것에 비하여 높은 O.D.치와 함께 감도에 있어서도 생균의 부착농도가 $10^2 \sim 10^3$ cells/well까지에서도 양

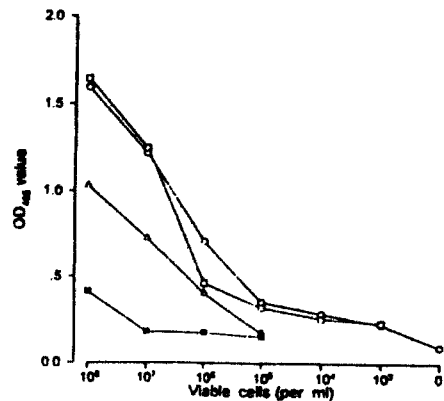


Fig. 3. Cross-reactivity of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum against viable pathogens of fish. ○, *E. tarda* Edk-2 cells; □, *E. tarda* EE1 cells; ■, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966; △, *Vibrio anguillarum* HUF5001 cells.

Table 3. Effect of the different dilution-rates of tissue homogenates on the sensitivity of ELISA.

Dilution-rates	O.D. ₄₀₅
1:25*	0.36
1:50	0.51
1:100	0.96
1:200	1.05
PBS	1.18

* Diluted homogenate of flounder liver contained 10^6 cells/ml of *E. tarda* FKC

성반응을 나타내었고 다른 *E. tarda* 분리균주에 대한 교차반응도 FKC를 사용한 경우에 비하여 전혀 감소하지 않았다. 그리고 교차반응의 분석에서는 FKC를 사용한 ELISA의 결과와는 달리 *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 균주가 10^6 cells/ml의 고농도에서는 약간의 교차반응을 보여주었지만, 그 이하의 농도에서는 낮은 교차반응을 보여주었다. 그러나 *Vibrio anguillarum* HUF5001 균주는 FKC 때와는 전혀 다르게 생균을 이용한 ELISA에서 오히려 더 높은 교차반응을 보였다(Fig. 3). 이러한 *Vibrio anguillarum* HUF5001 균주의 교차반응은 *Aeromonas hydrophila* ATCC7966으로 흡착시킨 토끼 항혈청을 사용하여 ELISA를 실시하였을 때 거의 제거되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

조직 homogenate내의 *E. tarda*균 검출

각기 다른 농도가 되게 PBS로 희석하여 조제된 조직 homogenate에 *E. tarda* Edk-2 FKC를 혼합하여 10^6 cells/ml 농도가 되게 한 후 ELISA법을 실시하여 조직 homogenate가 ELISA의 결과에 미치는 영향을 분석하였다(Table 3). 조직 homogenate의 농도가 1:100 이하로 희석된 상태에서는 ELISA의 O.D.치가 급격히 감소하였고 그 이상의 희석액을 사용시에는 결과에

영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고

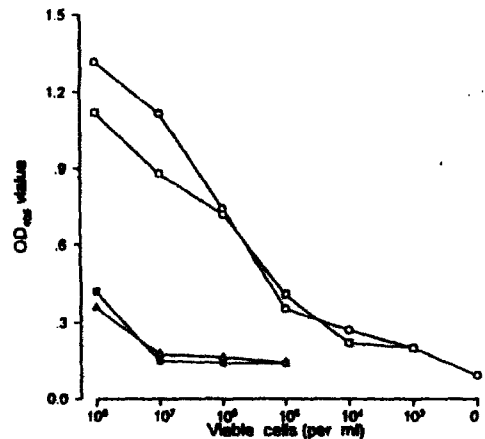


Fig. 4. Specificity of rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum pre-adsorbed with *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 against viable pathogens of fish. ○, *E. tarda* Edk-2 cells; □, *E. tarda* EE1 cells; ■, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 cells; △, *Vibrio anguillarum* HUF5001 cells.

조직 homogenate를 1:200으로 희석하고 여기에 생균 *E. tarda* Edk-2를 각기 다른 농도로 첨가한 후 plate에 부착시켜 ELISA법을 실시하였을 때(Fig. 5) 감출한계 및 background가 조직 homogenate가 없을 경우에 (Fig. 4) 대비하여 차이를 보이지 않았으므로, 현장에서 병어 조직내의 *E. tarda* 검출을 위해서는 조직 homogenate를 100~200배로 희석하여 사용하여야 하는 것

으로 나타났다.

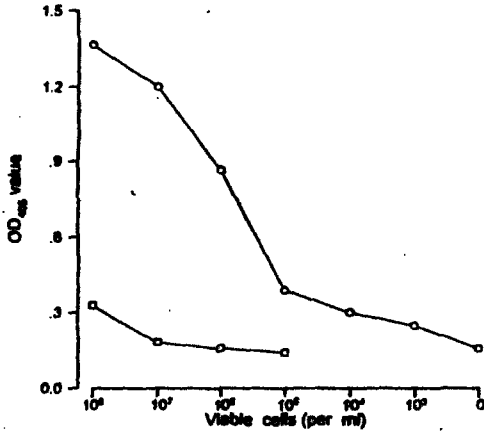


Fig. 5. ELISA with viable cell in tissue homogenate
○, *E. tarda* Edk-2 cells; □, *A. hydrophila* ATCC7966 cells.

고 찰

ELISA는 정량적이고 신속, 정확, 경제적이며 많은 수의 sample을 한꺼번에 진단할 수 있고 검출한계 또한 매우 낮아서 어류의 질병 진단에 널리 사용되고 있다. 넙치의 혈청내에 존재하는 항체를 검출하기 위한 ELISA법이 보고되었지만(Furuta et al., 1994), 어류의 혈액내에 존재하는 항체를 검출하기 위해서는 어류 항체내의 분리나 순수성, 생성된 항체의 양적 문제 등의 여러 어려움이 있다. 이에 비하여 감염 조직으로부터 항원을 검출하는 방법은 먼저 한 종류의 원인균에 대하여 한 종류의 항체를 준비하며, 준비된 항체는 어종에 관계없이 모든 어류에 적용 가능하다는 잇점과 아울러 어류의 혈액내에 존재하는 항체를 검출하는 방법보다 감도도 높다고 알려져 있다(Adams and Thompson, 1990). 그러나 감염 조직으로부터 항원을 검출하기 위해 tissue homogenate를 초음파나 가열 또는 특수 buffer 등으로 추출한

soluble 항원이 분석에 사용되어졌을 뿐, 감염되어 있는 세균 자체를 항원으로 하여 분석한 시도는 그리 많지 않고, 다만 Adams and Thompson(1990)과 Olea et al.(1993)이 시도한 연구는 있으나, 실험 조건의 적정화를 위한 항원간의 비교 분석에 대한 결과는 되어 있지 않다.

응집항체가 측정법은 특히 항체량을 측정하는 매우 간단한 방법이다. 그러나 이 방법은 세균이라는 매우 크고 무거운 항원을 분자 단계의 항체가 서로 물리적으로 결합하여 격자구조를 형성하는 것이므로 ELISA 등에 비하여 항체의 결합력이 커야 한다. 즉 polyclonal 항체내에 있는 저결합력 항체분자 또는 Edk-2 주항원에 결합하는 항체라 하더라도 다른 *E. tarda*의 주항원에 대해서는 낮은 결합력을 나타내는 항체분자들이 응집항체가 측정에서는 큰 역할을 담당하기가 어렵다. 이에 비하여 ELISA법에서는 거대 항원을 연결시킬 필요가 없고 다만 항체 자신의 항원에 대한 결합만 일어나면 되기 때문에 낮은 결합력을 나타내는 항체분자들이 충분히 높은 역할을 나타낼 수 있게 된다. 본 방법에서 사용한 *E. tarda* Edk-2에 대한 polyclonal 토끼 항혈청내에는 Edk-2 균주에 대해서는 강한 결합력을 가지나 다른 *E. tarda* 균주에 대해서는 낮은 결합력을 갖는 항체분자가 상당부분 차지할 것이다. 이러한 항체분자는 응집항체가 측정에서는 격자구조를 형성하는데 참여하기 어렵지만 ELISA법의 분석에서는 상당한 역할을 하게 될 것이므로 응집항체가 측정에서는 낮게 나타나던 *E. tarda* 간의 교차반응이 ELISA법에서는 높게 나타나는 결과를 보였을 것이다(Fig. 1).

Polyclonal 항체를 이용한 면역혈청학적 방법으로 세균 감염을 진단하는데 많은 문제점을 일으키는 것은 교차반응이다. 본 실험에서도

Aeromonas hydrophila ATCC7966과 *Vibrio anguillarum* HUF5001이 제조된 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청과 교차반응을 나타내었다. 그것은 두 균이 가지고 있는 표면 항원의 특성이 *E. tarda* 가 가지고 있는 항원결정기 부위와 유사한 것이기 때문일 것이다(Fig. 1). 그러나 *Aeromonas hydrophila* FK로 흡착시킨 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청을 ELISA에 사용하였을 때 종이 다른 균주에 대한 교차반응이 대폭 감소하였으나 *E. tarda* 균주들에 대한 반응에는 거의 영향을 미치지 않아(Fig. 2) 종이 다른 균주간의 교차반응에 관여하는 항체의 양은 전체 항체량에서 극히 일부분일 뿐이라는 것으로 추정할 수 있었다. 생균을 사용한 교차반응 분석에서는 FK의 분석과는 달리 *Vibrio anguillarum* 균이 *Aeromonas hydrophila* 보다는 높은 교차반응을 나타내어(Fig. 3), formalin처리시 각 세균에 따라 서로 다른 표면 항원의 변화가 일어날 수 있음을 추정하게 하였다. 더구나, *Aeromonas hydrophila* 로 흡착시킨 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청을 사용하면 *Vibrio anguillarum* 에 대한 교차반응이 크게 감소하는 것으로 나타나(Fig. 4), 생균에서 교차반응을 나타내는 부위는 Gram negative로서의 특성을 나타내는 공통항원 부위 또는 극히 미미하게 변화된 특수 항원 부위 등일 것으로 생각되어 진다. 그러므로 가장 높은 교차반응을 나타내는 균주로 흡착시킨 항체를 사용한다면 Gram negative 균 전체에 대한 교차반응을 감소시킬 수 있는 가능성이 매우 크다고 할 것이나, 이에 대해서는 보다 많은 균주, 특히 교차반응이 높은 균주들에 대한 분석이 뒤따라야 할 것이다.

그리고 본 실험에서 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청 ELISA 법과 응집항체가 분석 모두에서 생균을 사용하는 것이 FK를 사용하는

것에 대비하여 유사하거나 보다 나은 반응을 보인다는 것(Fig. 4, Table 2)은 생균의 세포막 등이 FK에 비하여 ELISA 분석용 plate에 대한 부착능력이나 응집항체가 분석을 위한 격자 구조를 형성하는데 더 좋은 유연한 상태에 있기 때문인 것으로 추정된다. 다만 *E. tarda* Edk-2 생균에 대하여서 만든 오히려 토끼 항혈청의 역가가 증가하지 않는 것으로 나타나는 것은 변형된 생성유도 항원(viable *E. tarda* Edk-2)과 유사항원(*E. tarda* 분리균)과의 반응에 관여하는 항체들이 갖는 친화력 차이 등이 혼합적으로 관여하기 때문일 수도 있을 것이다.

현장에서의 적용에 있어서 edwardsiellosis는 간 등의 장기조직에서 작은 결절을 형성하므로 조직내에 세균이 다량으로 존재하게 된다. 이러한 것은 하 등(1995)의 결과에서 잘 나타나 *E. tarda* 에 자연 감염되어 외적증상이 나타나고 있는 넙치병어는 간조직내에 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g 농도로 감염된 것을 보고한 바 있다. 이렇게 높은 농도의 세균수는 본 ELISA법의 검출한계인 10^7 cells/ml보다 $10^3 \sim 10^4$ 배 높으므로 감도의 증강을 위해 100~200배 희석하여 사용된 감염 조직 homogenate 제조에 의한 감염균의 농도 감소는 진단에 큰 장애요인으로 되지는 않을 것이다.

결론적으로 본 연구의 ELISA법은 병어로부터 균을 분리할 필요가 없을 뿐만 아니라 간단하고 신속하게 edwardsiellosis를 진단할 수 있는 방법으로, 앞으로 *E. tarda* 이외의 다른 어병 세균에 대해서도 충분히 실시할 수 있는 방법이라고 할 수 있다.

사 사

본 연구는 1996년도 교육부 해양/수산과학분야 학술연구 조성비의 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- Adams, A : Detectiion of *Vibrio parahaemolyticus* biotype alginolyticus in penaeid shirimp using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture*, 93 : 101-108, 1991.
- Adams, A. and Thompson, K : Development of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. *J. Aquat. Anim. Health*, 2:281-288, 1990.
- Amandi, A., Hiu, S. F., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L.: Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 1380-1384, 1982.
- Berg, R.W. and Anderson, A.E. : Salmonella and *Edwardsiella* in gull feces : a source of contamination in fish processing plants. *Appl. Microbiol.*, 24 : 501-503, 1972.
- Burreson, E. and Fritzell, L.J. : The seasonal antibody response in juvenile summer flounder (*Paralichthys dentanus*) to the hemoflagellate *Trypanosoma bullocki*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:394-402, 1986.
- Chun, S. K. : Detection and control of bacterial disease of cultured eel in Korea. *Bull. Kor. Fish Pathol.*, 1:5-30, 1988.
- Farmer, J. J. ■, Davis, B. R., Hickman-Brener, F. W., McWhoter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Whathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'Hara, C. M. O., Morris, G. K., Smith, P. B. and Brener, D. J. : Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clinic. Microbiol.*, 21 : 46-76, 1985.
- Furuta, T., Iida, T., Trongvanichnam, K., Sakaguchi, I. and Wakabayashi, H. : Indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of Japanese flounder serum antibody. *Internatioal Symposium on Aquatic Animal Health*, Sep. 1994.
- Ha, J. I., Park, K. H., Sohn, S. G., Park, M.A., Lee, J. S., Choi, D. L and Jeong, H. D. : 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 : 223-242, 1995.
- Hattori, M., Kudana, H., Ishiguro, S. and Izawa, H. : Reaction patterns of five strains of IPN virus in enzyme-linked immunosorbent assay. *Jpn. J. Vet. Res.*, 46 : 57-64, 1984.
- Hsu, Y. L., Chiang, S. Y., Lin, S. T. and Wu, J. L. : The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immuno dot blot method. *J. Fish Dis.*, 12 : 561-571, 1989.
- Hsu, Y. L. and Leong, J. C. : A comparion of detection methods for infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 8 : 1-12, 1985.
- Jordan, G. W. and Hadley, W. K. : Human infection with *Edwardsiella tarda* *Ann. Int. Med.*, 70 : 283-287, 1969.
- Johnson, K. G. R, Wobeser, G. and Rouse, B. T. : Indirect fluorescence antibody technique for detection of RM bacterium of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Bd.*

- Can., 31 : 1957-1959, 1981.
- Kanai, K., Wakabayashi, H. and Egusa, S. : Comparison of intestinal microflora between healthy and diseased cultured eels. *Fish Pathol.*, 12 : 199-204, 1977.
- Kanai, K., Tawaki, S. and Uchida, Y. : An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. *Fish Pathol.*, 23 : 41-47, 1988.
- Kubota, S., Kaige, N., Miyazaki, T. and Miyashita, T. : Histopathological studies on Edwardsiellosis of tilapia-1. Natural infection. *Bull. Fac. Fish Mie University*, 9 : 155-165, 1981.
- Kusuda, R., Toyoshima, T., Iwamura, Y. and Sako, H. : *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu Bay. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 42(3) : 271-275, 1976.
- Kusuda, R., Toyoshima, T., Iwamura, Y. and Sako, H. : Characteristics of *Edwardsiella* spp. from an epizootic of cultured crimson sea breams. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43(2) : 129-134, 1977.
- Meyer, F. P. and Bullock, G. L. : *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl. Microbiol.*, 25 : 155-156, 1973.
- Miyashita, T. : *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathol.*, 17 : 5-50, 1984.
- Nakatusgawa, T. : *Edwardsiella tarda*, isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol.*, 18 : 99-101, 1983.
- Oh, M. J. and Chun, S. K. : Characteristics and antigenicity of *Edwardsiella tarda* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Kor. Fish Pathol.*, 1 : 77-85, 1988.
- Olea, I., Bruno, D. W. and Hasting, T. S. : Detection of *Renibacterium salmoninarum* in natural infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. and Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquaculture*, 116 : 99-110, 1993.
- Sae-Oui, D., Muroga, K. and Nakai, T. : A case of *Edwardsiella tarda* in cultured colored carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, 19 : 197-199, 1984.
- Sakazaki, R. : Studies on the Asakusa group of Enterobacteriaceae (*Edwardsiella tarda*). *Jpn. J. Sci. Biol.*, 20 : 205-212, 1967.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S. : *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 39 : 931-936, 1973.
- White, F. H., Neal, F. E., Simpson, C. F. and Walsh, A. F. : Isolation of *Edwardsiella tarda* from an ostrich and an Australian skink. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 55 : 1057-1058, 1969.
- Winsor, D. K., Bloebaum, A. P. and Mathewson, J. J. : Gram-negative, aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild turkey vultures (*Cathartes aura*) in west central Texas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 : 1123-1124, 1981.
- Wyatt, L. E., Nickerson, R. I. and Vanderzant, C. : *Edwardsiella tarda* in fresh water catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 : 710-714, 1979.
- Yoshimizu, M. and Kimura, T. : A coagglutination test with antibody sensitized *Staphylococci* for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral diseases of fish. *Fish Pathol.*, 20 : 243-261, 1985.

Study on the production and management of aquatic animals: direct detection of *Edwardsiella tarda* using an enzyme linked immunosorbent assay

Soon Yoon Chung, Sang Gyu Sohn*, Joon-Ki Chung, Min-Do Huh and Hyun Do Jeong

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

*Division of Pathology, National Fisheries R & D Agency, Pusan 626-900, Korea

Solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect the whole cells of *Edwardsiella tarda* from infected tissues of flounder. Cross-reaction test was performed by ELISA against fish pathogens such as *A. hydrophila* ATCC7966, *V. anguillarum* HYUFP5001, *Y. ruckeri* 11-4, *E. ictaluri* and *Streptococcus* sp. NG8206. Rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 sera highly cross-reacted with *A. hydrophila* ATCC7966 and *V. anguillarum* HUF5001. However, the cross-reaction was removed by using the anti-serum pre-adsorbed with *A. hydrophila* ATCC7966 FKC. The intra-species cross-reaction among *E. tarda* isolates was very high. ELISA with the whole cell antigens present in tissue homogenate appeared with highly decreased sensitivity, presumably by the coating of lipid or proteins in tissues. Thus, it would be necessary to use the infected tissue homogenates diluted more than 100 times with PBS for diagnosis. Interestingly, compared with the using of FKC antigen, the direct detection of viable cells in tissue homogenate showed more sensitive results with detection limit of 1×10^3 cells/ml in buffer or diluted tissue homogenate. Consequently, the ELISA method developed in this study was specific, rapid and sensitive for diagnosing edwardsiellosis.

Key words : Diagnosis, ELISA, Cross-reaction, Edwardsiellosis, Viable-cell antigen