

소 브루셀라병의 혈청학적 진단법 비교실험

허 진, Ibulaimu Kakoma¹, 정재명², 이현진, 백병걸*

전북대학교 수의과대학, ¹일리노이대학교 수의과대학, ²전라북도 축산위생연구소
(접수 2007. 8. 2, 게재승인 2007. 9. 21.)

Comparison of a new ELISA with other serodiagnostic tests for bovine brucellosis

Jin Hur, Ibulaimu Kakoma¹, Jae-Myong Jeong²,
Hyeon-Jin Lee, Byeong-Kirl Baek*

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea

¹ *Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana, 2001 S. Lincoln Ave, IL 61802, USA*

² *Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Jeonju, 560-860, Korea*

(Received 2 August 2007, accepted in revised form 21 September 2007)

Abstract

A novel enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) is described and compared with other established serologic tests for bovine brucellosis, namely the rose bengal test (RBT), the complement fixation test (CFT), and the tube agglutination test (TAT) approved and used in Korea. A total of 109 bovine serum samples were tested using all the 4 assays and analyzed as to specificity, sensitivity, reproducibility and predictive value. The ELISA showed 100% agreement with the CFT. The least agreement between ELISA was observed with the TAT. The agreement between the ELISA and the RBT was not significantly different from that observed between the CFT and the ELISA. It is concluded that the new assay would be a good candidate for routine serologic survey for brucellosis in Korea. A protocol combining the ELISA

*Corresponding author

Phone : +82-63-270-2559 Fax : +82-63-270-3780

E-mail : bkbaek@chonbuk.ac.kr

and the CFT would increase the power for detection of serologically positive individuals and herds.

Key words: Bovine brucellosis, ELISA, Complement fixation test, Rose bengal test, Tube agglutination test

서론

소 브루셀라병은 암소에서는 유산을 수소에서 고환염 및 전립선염 등 번식장애를 일으키는 전염성 질병으로 가축뿐 아니라 사람에도 감염되어 파상열, 관절염, 오한 등을 일으키는 인수공통전염병으로 공중위생상 매우 중요하기 때문에 전 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있다¹⁻⁵⁾.

소 브루셀라병은 국내에서 1955년 미국에서 도입한 젖소에서 혈청학적 검사 결과 양성우가 처음으로 검색되었으며, 그 이듬해인 1956년에 병원균이 분리되었으며 그 후 브루셀라병을 근절하기 위해 매년 진단 및 살처분 정책을 실시하고 있지만 최근 그 발병은 전국적으로 만연되고 있는 실정이다⁶⁻⁹⁾.

소 브루셀라병의 진단은 유산물과 유분비물 그리고 사후 적출한 조직으로부터의 균 분리이며, 다른 방법으로 *Brucella* 항원에 특이 세포 매개성 또는 혈청학적인 반응으로 검색할 수 있다⁵⁾.

소에서 브루셀라병을 혈청학적으로 검사하기 위한 진단방법에는 complement fixation test (CFT), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), fluorescence polarisation assay (FPA), buffered *Brucella* antigen tests (rose bengal test, RBT), buffered plate agglutination test, BPAT) 등이 사용되고 있으며, 이들 진단법 중 ELISA와 FPA 그리고 RBT 및 BPAT 등이 screening test로 적합한 진단법으로 알려져 있으며, 이들 진단법에서 양성으로 판정된 혈청의 최종 판정을 위해 적합한 진단법으로는 CFT나 ELISA 등이 적합한 진단법으로 보고

되고 있다^{5,10,11)}.

소 브루셀라병에 있어서 그 어떤 진단방법도 단독으로는 개체뿐만 아니라 집단 검색에 있어 정확한 진단에는 많은 어려움이 있다⁵⁾. 즉 브루셀라병 진단에 사용되고 있는 혈청학적 검사 방법들 상호간의 일치율에는 상당한 차이가 있는 것으로 보고된 바^{12,13)}, 진단 방법에 따라서 감염률이 15에서 6%까지 차이가 나는 것으로 알려져 있어 진단방법의 선택은 대단히 중요하다¹⁴⁾. Serum agglutination test (SAT)는 international trade의 목적을 위해서는 부적합하다고 생각되어지고 있으며⁵⁾, CFT는 SAT보다 진단학적으로 더욱 특이적이고 표준화된 단위를 가지고 있어 CFT가 비록 진단법이 복잡하고 좋은 실험실 시설과 정확한 역가치 판정과 시약들을 정확하게 관리 할 수 있는 고도의 숙련된 기술자가 필요하지만 전 세계적으로 확정 진단법으로 인정되고 있는 실정이다. 최근에 개발된 ELISAs와 fluorescence polarisation assay (FPA)는 기술적으로 진단함에 있어 CFT보다 간편하며 용이하기 때문에 CFT와 자주 비교되고 있으며 특이도 또한 CFT의 결과와 비슷하기 때문에 최근 이들 진단법들의 사용이 더욱 추천되고 있는 실정이다^{5,15,16)}. 국가적으로나 지역적으로 브루셀라병의 근절을 위해 ELISA나 FPA뿐만 아니라 RBT도 또한 그 진단법이 간단하며 민감도가 높기 때문에 screening test로 적당한 진단법으로 알려져 있다. 그러나 이들 진단법에 의해 양성으로 관찰된 가검물은 적당한 확정 진단법에 의해 재검을 받아야만 한다⁵⁾.

따라서 본 연구는 국내 젖소에서 브루셀라병의 정확한 검사를 위해 브루셀라병으로 살처분되었거나 음성으로 판정된 혈청을 대상으로 하여

indirect ELISA (ELISA)를 TAT, CFT, RBT 등으로 그 결과를 상호 비교하여 국내에서의 사용 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

진단 항원

TAT와 CFT 그리고 RBT용 진단 항원은 수의과학 검역원으로부터 제공받아 실험에 사용하였으며, ELISA용 항원은 Svanova 사 Brucella-Ab I-ELISA 진단 kit (Svanova Biotech AB, Sweden)을 사용하였다.

가검혈청

혈청은 1993년부터 2004년까지 경기도, 충남·북, 제주도 그리고 전북 등지에서 브루셀라병 감염 양성, 의양성, 음성 등으로 판정된 소 혈청 109건을 실험에 사용하였다.

진단방법

TAT, CFT¹⁷⁾ 그리고 RBT¹⁸⁾는 국가 공인 진단법에 따라 실험을 수행하여, 항체 역가를 측정 한 후 그 결과를 판독하였으며, ELISA는 제조사의 방법에 따라 실험을 수행한 후 제조사에서 정한 기준에 따라 그 결과를 판독하였다. 즉, kit에 동봉된 음성 표준 혈청을 포함한 가검 혈청에 대한 흡광도치를 동봉된 양성 표준 혈청에 대한 흡광도치로 나눈 후 100을 곱한 다음 나온 수치 (percent positivity; PP)가 25보다 크면 양성으로, 25 이하면 음성으로 판정하였다.

결 과

브루셀라병 검색시 RBT에 준하여 양성 과 음성으로 판정된 소의 ELISA와 BRT 결과 비교

야외에서 브루셀라병 검색에 사용되는 RBT

와 OIE에서 권장한 방법에 따라 제조된 항원을 이용한 Svanova사 제품의 Brucella-Ab I-ELISA 진단 kit을 이용한 항체역가를 비교한 결과는 Table 1과 그림 1에서 보는 바와 같다. 즉, 109 두 중 RBT에서 양성으로 판정된 38두에서 35두는 ELISA에서 양성으로 관찰되었지만 나머지 3두는 ELISA에서 PP가 25 이하로 음성이었으며, RBT에서 음성으로 판정된 71두 중 2두는 ELISA에서 PP 25 이상으로 양성으로, 그리고 나머지 69두는 음성으로 관찰되었다.

Table 1. ELISA results against 109 brucellosis positive and negative sera diagnosed by rose bengal test

	ELISA	RBT	
		Positive	Negative
Positive	37	35	2
Negative	72	3	69
Total	109	38	71

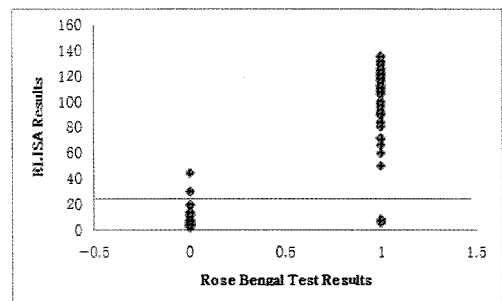


Fig 1. Distribution of absorbance in ELISA against brucellosis positive and negative sera determined by rose bengal test

TAT의 항체 역가와 ELISA 결과 비교

브루셀라병 검색에 사용되는 TAT와 Svanova 사 제품의 Brucella-Ab I-ELISA 진단 kit을 이용한 항체역가를 비교한 결과는 Table 2와 그림 2에서와 같았다. 즉, 109 두 중에서 TAT에서 양성으로 판정된 36두

중 33두는 ELISA에서 양성으로 관찰되었지만 나머지 3두는 ELISA에서 음성으로 관찰된 반면, TAT에서 의양성으로 판정된 26두 중 3두는 ELISA에서 양성으로 그리고 나머

지 23두는 음성으로 관찰되었으며, TAT에서 음성으로 판정된 47두 중 46두는 ELISA에서 음성으로 그리고 나머지 1두만 양성으로 관찰되었다.

Table 2. ELISA results against 109 brucellosis positive and negative sera determined by tube agglutination test

ELISA	Tube agglutination test										
	Negative	Suspected positive				Positive					
		≤1:25	±1:50	1:50	±1:100	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	≥1:3200
Positive	37	1	0	3	0	5	13	7	4	2	2
Negative	72	46	10	7	6	2	0	0	1	0	0
Total	109	47	10	10	6	7	13	7	5	2	2

± : Serum-antigen mixture is partially clear and gentle shaking does not disrupt the flocculi

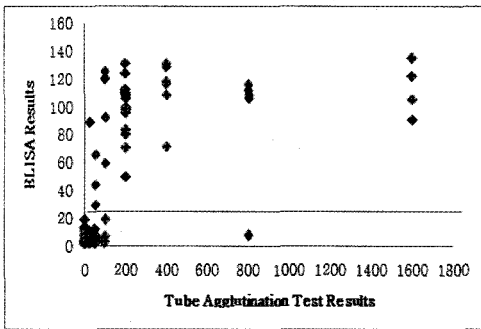


Fig 2. Distribution of absorbance in ELISA against brucellosis positive, suspect and negative sera determined by tube agglutination test

CFT 항체역가와 ELISA 결과 비교

브루셀라병 확정검사에 사용되는 CFT와 ELISA의 항체역가를 비교하여 본 결과 Table 3과 그림 3에서 보는 바와 같이 109두 중 CFT에서 양성인 37두 모두 ELISA에서 양성으로, CFT에서 음성인 72두 모두 ELISA에서 음성으로 관찰되었다.

ELISA와 CFT 및 RBT 그리고 TAT 항체역가의 상관관계

ELISA와 CFT 및 RBT 그리고 TAT 항체

Table 3. ELISA results against 109 brucellosis positive and negative sera diagnosed by complement fixation test

ELISA	Complement fixation test					
	Negative	Positive				
		≤1:10	1:20	1:40	1:80	≥1:160
Positive	37	0	11	11	6	9
Negative	72	72	0	0	0	0
Total	109	72	11	11	6	9

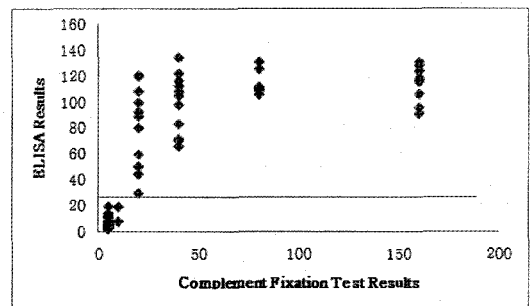


Fig 3. Distribution of absorbance in ELISA against brucellosis positive, suspect and negative sera diagnosed by complement fixation test

역가의 상관관계를 비교하여 본 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 ELISA와 CFT에서 양성인 37두가 RBT에서는 35두에서 양성으로 관찰

되었고 이 35두는 TAT에서 33두는 양성, 1두는 의양성 그리고 나머지 1두는 음성으로 관찰되었으며 ELISA와 CFT에서는 양성이었지만 RBT에서 음성으로 관찰된 2두 모두 TAT에서 의양성으로 관찰되었다. 그리고 ELISA와 CFT에서 음성으로 관찰된 72두 중 69두는 RBT에서도

음성으로 관찰되었고 이 69두 중에서 44두만이 TAT에서 음성으로, 22두는 의양성으로 그리고 2두는 양성으로 관찰된 반면, ELISA와 CFT에서는 음성이었지만 RBT에서 양성으로 관찰된 3두가 TAT에서는 각 1두씩이 양성, 의양성, 음성으로 관찰되었다.

Table 4. Correlation of ELISA, complement fixation test and rose bengal test results against 109 sera diagnosed by tube agglutination test

ELISA		CFT		RBT		TAT			
						Positive	33		
Positive	37	Positive	37	Positive	35	Suspected	1		
				Negative	2	Negative	1		
Negative	72	Negative	72			Suspected	2		
						Positive	1		
						Positive	3	Suspected	1
						Negative		Negative	1
								Positive	2
						Negative	69	Suspected	22
						Negative	44		

고 찰

소 브루셀라병에 있어서 buffered Brucella antigen tests 즉, RBT와 buffered plate agglutination test, 그리고 ELISA나 fluorescence polarisation assay (FPA) 등이 집단 또는 개체별 screening tests로 사용되고 있으며, 그 어떤 진단법도 단독으로는 개체별 또는 발병지역에서 브루셀라병을 정확하게 진단하기에는 적합하지 않으며 모든 진단법은 특히 개체별 screening에 있어서 제약을 받고 있는 실정이다⁵⁾. 본 실험에서도 국내 소에서 브루셀라병을 좀 더 빠르고 신속하면서 정확하게 검색하기 위한 한 방법으로 최근 OIE 등에서 권장하고 있는 *B abortus*의 lipopolysaccharide (LPS)를 이용한 ELISA⁵⁾ 진단 kit을 국내에서 사용되고 있는 각종 브루셀라병 검색 진단법과 비교하기 위해 1995년부터 2004년까지 브루셀라병으로 판정되어 살처분 되었거나 음성으로 판정된 109두의

소 혈청을 대상으로 하여 TAT와 CFT 그리고 RBT 등으로 그 결과를 상호 비교하여 본 결과, 국내에서 소 브루셀라병 screening test로 주로 사용되고 있는 RBT에서 양성으로 판정된 38두 중 35두가 ELISA와 CFT에서 양성이었고 나머지 3두는 ELISA에서 음성기준치인 PP 25보다도 낮은 10이하로 관찰되었으며 CFT에서도 역가가 1:10이하로 음성으로 관찰되었고 TAT에서는 양성 (1:800) 1두, 의양성 (1:±50) 1두 그리고 음성 (1:25) 1두로 각각 관찰되었다. RBT에서 음성으로 판정된 71두 중 2두는 ELISA에서 PP 29이상으로 그리고 CFT에서는 1:20의 역가 관찰되었으며 TAT에서는 1:50으로 의양성 반응이 관찰되었다. 이는 최근 개발되어 전 세계적으로 그 사용이 증가하고 있는 *B abortus* LPS를 이용한 ELISA 경우 민감도에 있어서는 RBT의 결과와 일치하거나 그 이상이라는 보고^{5,15,19)}와 일치한 결과가 관찰되어 국내에서 소 브루셀라병 진단을 위한 screening test로 ELISA 또한 RBT와 더불어

어 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

최근에 비록 TAT가 국제 무역에 있어서 불만족스러운 진단법으로 여겨지고는 있으나, 소 브루셀라병의 근절을 위해 수년간 성공적으로 사용되어져 왔고 또한 어떤 나라에서는 여전히 근절을 위한 주요 진단법으로 사용되어지고 있다⁵⁾. 본 실험에서도 109두의 소 혈청으로 TAT와 ELISA를 상호 비교하여 본 결과, TAT에서 양성으로 판정된 36두 중 33두는 ELISA와 CFT 그리고 RBT 모두에서도 양성의 결과가 관찰된 반면, TAT 항체가 1:100의 2두와 1:800의 1두는 ELISA에서 PP가 20이하로 음성으로 관찰되었으며, 같은 가검물에서 RBT의 경우에는 TAT 역가 1:100의 가검물 모두에서는 응집반응이 관찰되지 않았지만 1:800의 가검물에서는 응집반응이 관찰되었다. 그리고 TAT에서 항체가 높을수록 ELISA에서도 대체로 높은 PP 수치가 관찰되었으며, TAT에서 음성으로 관찰된 47두 중 46두는 ELISA와 CFT 모두에서 음성으로 관찰된 반면 1두는 PP가 89이상의 매우 높은 수치로 양성으로 관찰되었는데 이는 RBT에서도 응집반응이 관찰되었고 CFT에서는 1:20으로 양성으로 관찰되었다. TAT에서 의양성으로 관찰된 26두 중 23두는 ELISA와 CFT에서 음성으로 관찰되었고, 나머지 3두는 ELISA에서 PP가 25이상이고 CFT에선 1:20 이상으로 양성으로 관찰된 반면 RBT의 경우에는 2두는 음성을 그리고 나머지 1두는 양성으로 관찰되었다.

이상의 결과는 최근 개발되어 전 세계적으로 그 사용이 증가하고 있는 *B. abortus* LPS를 이용한 ELISA는 민감도에 있어서는 RBT의 결과와 일치하거나 그 이상이며, 특이도에 있어서는 CFT의 결과와 일치하거나 좀 더 정확하다고 보고된 결과^{5,15,19)}와 일치함을 확인할 수 있었다.

그리고 비록 CFT가 그 진단법을 수행함에 있어 좋은 실험실 설비와 고도의 숙련된 기술자를 요하지만 전 세계적으로 확정 진단법으로 인정되고 있으며 또한 사용⁵⁾되어 오고

있어, CFT와 ELISA를 비교하여 본 결과, CFT에서 양성과 음성으로 관찰된 모든 혈청은 ELISA에서도 같은 결과가 관찰되었는데 이는 최근 개발되어 전 세계적으로 그 사용이 증가하고 있는 *B. abortus* LPS를 이용한 ELISA는 민감도에 있어서는 RBT의 결과와 일치하거나 그 이상이며, 특이도에 있어서는 CFT의 결과와 일치하거나 좀 더 정확⁵⁾하다고 알려져 있는데 본 실험에서도 CFT에서 음성인 소 혈청 모두 ELISA에서 음성이었고 또한 RBT에서 양성인 경우에는 ELISA에서 대다수의 가검물에서 양성이었으며 또한 RBT에서 음성인 한 가검물은 ELISA와 CFT 모두에서 양성으로 관찰되어 OIE에서 규정한 내용과 일치할 뿐만 아니라 오히려 국내에서 소 브루셀라병 검색에 있어 screening test로 RBT 보다 좀 더 적합한 진단법임을 확인할 수 있었다. 그리고 ELISA의 PP 값은 CFT 역가가 1:80까지는 역가가 증가할수록 ELISA PP의 값도 증가하였지만 1:80이상의 경우에는 CFT 역가가 증가하였음에도 불구하고 ELISA PP 값이 별 차이가 나지 않았음이 관찰되었다.

결론

국내에서 소 브루셀라병을 좀 더 정확하게 진단하기 위한 일환으로 최근 OIE 등에서 권장하고 있는 *B. abortus*의 LPS를 이용한 ELISA kit을 국내에서 1995년부터 2004년까지 브루셀라병으로 판정되어 살처분되었거나 음성으로 판정된 109두의 소 혈청을 대상으로 하여 RBT와 CFT 그리고 TAT 등과 그 결과를 상호 비교하여 본 결과, RBT에서 양성으로 판정된 38두 중 35두는 ELISA에서도 양성으로 관찰되었으며, RBT에서 음성으로 판정된 71두 중 69두는 음성으로 그러나 나머지 2두는 ELISA와 CFT에서 양성으로 그리고 TAT에서는 1:50의 항체역가가 관찰되어 의양성으로 판정되었고 CFT에서 양성 또는 음성으로 판정된 모든 혈청이 ELISA에서 같은 결과가 관찰되어 ELISA가

screening test와 확정 진단법 모두에서 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Ariza J, Servitje O, Pallares R, et al. 1989. Characteristic cutaneous lesions in patients with brucellosis. *Arch Dermatol* 125 : 380-383.
2. Berger TG, Guill MA, Goette DK. 1981. Cutaneous lesions in brucellosis. *Arch Dermatol* 117 : 40-42.
3. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, et al. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Press : 261-267.
4. Tekkoke KIH, Berker M, Ozcan et al. 1993. Brucellosis of the spine. *Neurosurgery* 33 : 838-844.
5. Vallat B, 2004. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 5 eds. Office International Des Epizooties. Paris : 409-438.
6. 박동권, 이창희. 1959. 우리나라에 발생한 축우 *Brucella* 중에 대하여. *수의계* 3 : 192-195.
7. 손준용, 이길웅, 유재창 등. 1986. Zoonosis 부루셀라증에 관한 연구. *국립보건원보* 23 : 281-295.
8. 임윤규, 양기천, 이경갑, 등. 1995. SDS 처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 혈청학적 교차반응 연구. *대한수의학회지* 35(1) : 143-148.
9. 정석찬, 조동희, 남향미 등. 2007. 국내 소 *Brucella*병의 발생 및 연구동향. *한국수의공중보건학회지* 31(2) : 91-103.
10. Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V, et al. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet Microbiol* 90 : 461-477.
11. Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 90 : 447-459.
12. 김금화, 안수환, 박용호 등. 1982. 부루셀라병 검색에 사용되는 여러가지 혈청진단법의 비교 연구. *대한수의학회지* 22(2) : 149-153.
13. Lambert G, Amerault TE. 1962. Comparative study of three serological tests for detecting the response in cattle to virulent *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 23 : 529-537.
14. Flores-Castro R, Carmichael LE. 1980. Canine brucellosis. *Curr Vet Ther* 7 : 1303-1305.
15. Nielson K, Kelly L, Gall D, et al. 1996. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev Vet Med* 26 : 17-32.
16. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EMA, et al. 1993. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 12 : 435-450.
17. Alton GG, Jones LM, Angus RD, et al. 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.
18. Morgan WJB, MacKinnon DJ, Lawson JR, et al. 1969. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet Rec* 85 : 636-641.
19. Wright PF, Tounkara K, Lelenta M et al. 1997. International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev Sci Tech* 3 : 824-832.