

<原 著>

Acriflavine 및 重金屬이온反應에 依한 Brucella R型菌 檢出에 關한 研究

全南大學校農科大學獸醫學科

康 炳 奎

STUDIES ON THE AGGLUTINATION REACTION OF BRUCELLA R-FORM BY ACRIFLAVIN AND HEAVY METAL IONS

Department of Veterinary medicine, Agricultural College Chonnam University
Byong-Kyu Kang

(本論文의 要旨는 1965年度 第9回
大韓獸醫學會에서 發表하였음)

Summary

1. To evaluate the quantitative relationship between S-R variation in Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16 M induced by homologous immune serum treatment was studied by means of tube agglutination reaction with acriflavine and various heavy metal ions.
2. It is possible to differentiate the variation of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16 M through the tube agglutination reaction with acriflavine and heavy metal ions, especially Pb, Cu and Mn ions are available.
3. Any typical differences between the solvent; distilled water and 0.85% physiological saline solution, to evaluate the S-R variation by means of agglutination reaction with acriflavine and various heavy metal ions were not observed.

I. 緒 言

Brucella 診斷抗原液의 製造에 있어서 R型菌乃至 Non-smooth型菌(以下 NS型菌이라 함)이 包含되어서는 아니된다 함은 오래前부터 認定되어 온 事實이다. 그런데 近來에 Renoux 및 Mahaffey¹⁾는 Br. abortus S型菌에 依하여 製作된 抗血清中에 NS型菌抗體가 存在함이 報告되었고 이어 Buddle²⁾은 Newzealand와 Australia의 緬羊에서 分離된 5株의 分離菌을 S 및 R相의 Brucella菌과 比較하였든바 acriflavine과 煮沸에 凝集하고 緬羊에 如前히 病原性を 갖는 菌株를 分離하였으며 全혀 S菌型은 分離못하였음을 報告한바 있다. 이와같이 變異型菌의 存在는 때로는 菌力의 消失이나 免疫學的 變異를 意味하며 動物實驗時는 勿論 診斷液製造 및 單相血清製造時 뿐만 아니라 實際 疫學的의 面에 있어서의 R型抗原의 吟味의 必要性을 느끼게 하여 왔다.

一般的으로 微生物의 生物學的 性狀이 여러가지 原因에 依하여 不可逆的인 變異를 일으키는 現象은 日常 經驗하는 바이며 오늘날 細菌의 抗

原을 變換시키는 因子로써 알리어져 있는 것으로서는 Avery, Macleod 및 McCarty³⁾의 DNA, Zinder 및 Lederberg의 bacteriophage,⁴⁾ Bruner 및 Edwards⁵⁾의 吸收血清下의 培養, weil 및 Binder⁶⁾의 同種菌體抽出物存在下의 培養 等 數 많은 報告가 있으며, Brucella 菌屬의 變異에 對하여도 Ando⁷⁾ 等 Buddle,²⁾ Renoux 및 Mahaffey,¹⁾ Warner⁸⁾ 等의 業績이 報告되었고 Shinizu 및 Shibata⁹⁾에 依해서 R型 Brucella 菌을 抗原으로 한 凝集反應의 手技도 檢討 報告되어 있다.

Brucella 菌屬에 對한 變異性狀檢査方法으로는 Obligue-light法을 爲始로 acriflavine, 熱 및 酸에 對한 凝集性, W. Braun¹⁰⁾이 唱導한 DL-Alanin 加寒天培地上의 發育所見 등이 있으나 特히 集落의 形態觀察에 依한 變異型菌의 發見은 Brucella 菌屬에 있어서는 形成集落이 微細하여 그 發見이 容易치 않고 때로는 看過되는 可能性의 存在도 否定할수 없는 事實이다. 特히 Braun은 NS菌에 對하여 1:500倍 acriflavine 水溶液에 例外없이 凝集을 일으키며 또한 R型도 acriflavine에 凝集한다 하여 곧 兩者를 同一視함은 妥當치 않음을 指摘하고 있으며 또 여러가지 中間段階의 型도 存在한다는 shibata 一連¹¹⁾의 報告는 Ahn¹²⁾이 Shigella flexneri 菌에 對한 抗原 變異性狀檢討에서 同種 抗血清에 原來의 S型菌이 갖는 程度의 凝集을 일으키나 acriflavine에

도 亦是 凝集을 일으키는 集落이 存在함을 認定한 事實에서 Brucella 菌屬에 있어서도 보다 더 細密한 變異檢出手技의 確立이 要求된다 하겠다.

Acriflavine은 S-R變異檢査에 널리 應用되는 藥劑로써 White¹³⁾ 等은 Million 反應으로써 腸內細菌의 R型檢出에 意義가 있음을 밝혔고, Okamoto¹⁴⁾ 等은 本反應의 細密한 研究에서 Millon試藥中의 Hg 化合物이 重要な 役割을 하고 있음을 알아, Millon 試藥뿐만 아니라 Cu SO₄, AgNO₃, ZnCl₂ 等 各種 重金屬鹽이 거의 모든 細菌에 있어서 R型菌이 凝集을 일으킴을 알아 이를 重金屬이온反應 (Heavy metal ion reaction)이라 하였으며 Hiroshi¹⁵⁾는 Br. melitensis의 變異性狀檢査에 10% CuSO₄ 및 Millon 試藥을 使用 變異型菌確認을 爲한 한 方法으로 應用하였음을 報告한바 있다.

前述한 바와 같이 NS型菌으로써 羊에는 病原性을 가지나 S型菌이 發見되지 않는 Br. ovis가 各國에서 分離되었음과 아울러 Renoux의 報告와 같이 Br. abortus S型菌中에 Ovis 抗原이 存在한다는 事實에서 S型抗原의 吟味의 必要가 생겼으므로 本實驗에 있어서는 從來의 變異型菌檢出方法에 依하여 確定된 S型及 R型菌에 對해서 acriflavine 및 各種 重金屬 ion에 依한 보다 더 定量的變異性狀檢出方法에 對한 몇가지 檢討을 實施하여 그 結果를 報告하고자 한다.

칠면조에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
Eimeria meleagridis	小 腸	世 界	無	Tyzzar 1927
E. meleagrimitis	空腸. 12指腸. 回腸	"	中等~強	Tyzzar 1929
E. dispersa	12指腸. 小腸	North America	弱	Tyzzar 1929
E. gallopavonis	回腸. 直腸. 盲腸	North America 인 도	不 明	Hawing 1952
E. adenoides	盲腸. 直腸. 有性世代. 盲腸直腸. 小腸下部	世 界	強	Mooret Brown 1951
E. inocua	小 腸	North America	없 음	Moor et Brown 1951
E. subrotunda	12指腸. 空腸. 回腸上部	North America	없 음	Moore Brown et carton 1954
Isospora heissini	不 明	USSR	不 明	Svaubaev 1955
Crypto sporidium meleagridis	不 明	不 明	"	Slavin 1955

人에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的의 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
Isospora belli	小 腸	세 계 特 히 열 대 지방	弱	Wenyon 1923
Isospora hominis	小 腸	세 계 特 히 열 대 지방	弱	Railliet et Lucet 1891
Isospora natalensis	不 明	Africa	不 明	Eldon dew 1953

豚에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的의 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
Eimeria deblickei	小腸. 大腸	세 계	弱	Douwes 1921
E. perminuta	不 明	"	不 明	Henry 1931
E. polita	不 明	Europ North America	不 明	Pellerdy 1949
E. scabra	小腸 (纖毛上皮 細胞)	不 明	不 明	Henry 1931
E. scrofae	不 明	Europ	不 明	Galli valerio 1935
E. spinosa	不 明	North America USSR	弱	Henry 1931
Isospor almataensis	小腸. 12指腸下部 回盲部	North America USSR	弱	Paihuk 1953
I. almataensis	不 明	USSR	不 明	Paichuk 1953

犬. 猫. 狐. 멧크에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的의 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
Isospora bigemina	小 腸	세 계	強	Stiles 1891
Isospora felis	小腸. 結腸. 盲腸	세 계	輕中程度	Wenych 1923
Isospora rivolta	小 腸	세 계	없 음	Grassi 1879

緬羊. 山羊. 鹿에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的의 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
Eimeria ahsata	不 明	North America	最 強	Hones 1942
E. arloingi	小 腸	세 계	있 으나 不 明 한 點 이 많 다	Marotel 1905 Martin 1909
E. crandallis	不 明	North America	不 明	Hones 1942
E. fanrei	小 腸	세 계	弱	Moussu et marotel 1902 Martin 1909
E. graulosa	不 明	North America Europ	不 明	Christensen 1938
E. gilruthi	第四胃 小腸	세 계	不 明	Chatton 1910 Reichenow et Carini 1937
E. intricata	不 明	세 계	不 明	Spiegel 1925
E. ninakohlyakOvae	小 腸	세 계	最 強	Yakimoff et rastegaieff 1930
E. pallida	不 明	North America	不 明	Christensen 1938
E. parva	小腸全域 Gametocyte 盲腸. 結腸. 小腸	세 계	中 等 度	Kotlan mócsy et vajda 1929

<i>E. punctata</i>	不明	North America	不明	Landers 1955
--------------------	----	---------------	----	--------------

牛에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
<i>Eimeria alabamsis</i>	回腸. 回盲部. 濃染 感染. 盲腸結腸上部	North America	非病原性	Christensen 1941
<i>E. auburnensis</i>	不明	North south America 歐洲. Austraria	強	Christensen et porter 1939
<i>E. bovis</i>	盲腸. 結腸. 回腸 終部	세 계	最 強	Zublin 1908 Fiebiger 1912
<i>E. brasiliensis</i>	不明	東北 America 歐洲. Africa. USSR	不明	Torres et ramos 1939
<i>E. bukidnonesis</i>	不明	南北 America USSR	弱(下痢)	Tubangui 1931
<i>E. canadensis</i>	不明	北 America USSR	弱	Bruce 1921
<i>E. cylindrica</i>	不明	北 America 歐洲. 인도 Austraria	強	Wilson 1931
<i>E. ellipsoidalis</i>	小 腸	北 America 歐洲. Austraria	弱	Becker et frye 1929
<i>E. pellifa</i>	不明	北 America	不明	Supperer 1952
<i>E. Zurni</i>	盲腸. 結腸. 直腸 小腸	세 계	最 強	Rivolta 1878 Martin 1909
<i>E. bombayensis</i>	不明	인 도	不明	Rao et hiregauday 1954
<i>E. mundaragi</i>	不明	인 도	不明	Hirgauday 1956
<i>Isospora aksaica</i>	不明	USSR	不明	Basanov 1952
<i>Isospor sp</i>	不明	North America	不明	

家兔에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
<i>Eimeria stiedae</i>	肝膽管上皮	세 계	強	Lindemann 1865 Kisskalf et hartmann 1907
<i>E. magna</i>	空腸. 廻腸	"	最 強	Péred 1925
<i>E. Perforans</i>	小腸. 盲腸	"	弱	Leuckart 1879 Stuiter et swellengrebel 1912
<i>E. media</i>	小 腸	"	中等度	Kessl 1929
<i>E. irresidua</i>	小 腸	"	強	Kessel et jankiewicz 1931
<i>E. piriformis</i>	小腸. 大腸	歐 洲	不明	Kostlan et pospesch 1934
<i>E. neoleporis</i>	小腸後部. 大腸	세 계	輕度強	Carvalho 1942
<i>E. Coecicola</i>	回腸後部. 盲腸	歐洲. USSR	弱	Cheissin 1946
<i>E. elongata</i>	不明	歐 洲	不明	Marotel gulhon 1941
<i>E. intestinalis</i>	小 腸	歐洲. USSR	中等度	Kheisin 1948
<i>E. matsubayashii</i>	回腸始部寄生	日 本	中等度	Tsunoda 1952

鷄에 Coccidium의 寄生部位 및 病原性的 有無와 分布

原 虫 名	寄 生 部 位	分 布	病 原 性	發 見 者
<i>Eimeria tenella</i>	盲 腸	세계各地	最 強	Reilliet et Lucet 1891
<i>E. necatrix</i>	1~2代小腸 3代盲腸 (Gamete schizont) (Gametocyte)	"	"	Johnson 1930
<i>E. brunetti</i>	第1代 Schizont小腸 全域. 2代小腸後部 直腸盲腸	北 美	強	Levine 1942
<i>E. acervulina</i>	小腸中部	세 계	中等度	Tyzzler 1929
<i>E. maxima</i>	小腸中部後部	"	"	Tyzzler 1929
<i>E. mitis</i>	小腸全體	"	輕 度	Tyzzler 1929
<i>E. praecox</i>	盲腸上腸上部	"	非病原性	John son 1930
<i>E. hagani</i>	小腸前半	北美. 인도	輕 度	Levine 1938
<i>Isospora gallinae</i>	不 明	歐 洲	不 明	Scholtg seck 1954
<i>Isospora heissini</i>	不 明	USSR	不 明	Svanbaev 1955
<i>Wenyonella gallinae</i>	小腸末部	인 도	強	Ray 1945
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	不 明	不 明	不 明	Levine 1961

II. 實驗材料 및 方法

1. 供試菌株: 本實驗에 使用한 菌株는 美國 california 獸醫科大學 Dr. M. E. Meyer부터 分讓받은 *Br. abortus strain 19*와 *Br. melitensis 16M*을 Albimi 斜面寒天培地에 繼代한 것이며 實驗繼續中에는 後述의 Trypticase soy 寒天培地에 培養하였다.

2. 使用培地: 本實驗을 爲한 液體 및 固形培地의 組成은 다음과 같다.

Bacto tryptose bouillon, (g/l)	
Tryptose, Difco	20.0
Sodium chloride	5.0
Distilled water	1,000.0
Bacto tryptose soy agar, (g/l)	
Tryptose, Difco	20.0
Sodium chloride	5.0
Glucose	1.0
p-Aminobenzoic acid	0.05
Sodium citrate	全量의 1%
Agar, Difco	20.0
Distilled water	1000.0

3. 免疫血清: Albimi 斜面寒天培地에 約 48時間 培養菌을 生理的食鹽水에 浮遊 100°C 10分間 加熱殺菌한 다음 約 2.0kg의 家兔의 耳靜脈에 注射하여 얻은 血清이며, 免疫方法은 Edwards 및 Ewing¹⁶⁾의 腸內細菌抗血清製造方法에 準하여 實施하였다. 抗血清의 凝集價는 *Br. abortus strain 19* 및 *Br. melitensis 16 M* 各各 5120 倍로써 凝集反應術式 및 凝集價의 判定은 國際法(FAO/WHO)¹⁷⁾에 準하여 實施하였다. 同抗血清은 小試驗管에 各各 分注 凍結保存하였으며 實驗時 溶解 使用하였다.

4. R變異菌株: Bacto tryptose 斜面寒天培地에 48時間 培養한 *Br. abortus strain 19* 및 *Br. melitensis 16M* 1白金耳量을 同種 抗血清을 1% 로 加한 Bacto tryptose bouillon 3ml에 加하여 37°C 6日間 培養한 다음 同一한 方法으로 抗血清 加 Bacto tryptose bouillon에 繼代培養 하였으며 繼代培養時 Bacto tryptose 寒天平板培地에 培養하여 形成되는 集落에 對하여 變異性狀을 檢査하였다.

5. 變異性狀檢査: 各各의 集落에 對하여 0.2% acriflavine 水溶液으로 Slide glass上에 있어서

凝集反應을 實施하여 가장 著明하게 凝集을 이
르키는 集落을 繼代培養하여 同種 抗血清에 對
한 平板法凝集反應을 實施하였으며 熱凝集은 菌
液을 100°C 30分間 作用하여 凝集의 有無를 觀
察하였고 酸凝集은 PH 2.2~5.4 Buffer solu-
tion 1ml씩을 準備, 이에 等量의 菌液을 加하여
37°C 18~24時間 두어 凝集의 有無를 檢査하였
다.

6. Acriflavine 및 重金屬 이온 反應 : 0.5%
acriflavine 및 0.5M 重金屬이온(Lead acetate,
Cupric sulfate, Cobaltous acetate, Mangan-
eous chloride, Mercuric chloride, Zinc chlo-
ride, Ferric chloride) 0.5ml를 倍數로 稀釋한
反應管 稀釋系列에 約 0.05ml(5mg/ml)의 菌液
을 加한 다음 37°C 24時間 處置한 다음 凝集의
狀況을 檢査하였다. 溶媒의 差異에 차르는 反應
態度를 보기 爲하여는 生理的食鹽水와 再蒸溜水
의 두가지를 使用하였다. 凝集度의 判定은 完全
凝集 絮狀 및 沈澱物의 著明 程度에 따라 卍,
卍, 卍, 卍로 區別하였으며 全혀 凝集을 이르지
않는 것을 陰性으로 取扱하였다. 언제나 菌
液과 溶媒만의 對照管을 두었으며 最終陽性凝集
과 陰性을 나타내는 試驗管은 Agglutinoscope에
依한 對照管과의 比較로써 그 結果를 確認하였
다.

III. 實驗成績

1. S.R型菌確認을 爲한 0.2% acriflavine,
生理的食鹽水, 免疫血清 및 其他 變異性狀檢討:
表1에 表示한 바와 같이 Br. abortus strain
19 및 Br. melitensis 16M의 R型菌은 Slide
glass上的 平板法凝集反應에 있어서 0.2% acri-
flavine 水溶液에 各各 強하게 凝集을 이르켰으
나 生理的食鹽水에 있어서는 acriflavine에서 같
은 強한 凝集所見은 보이지 아니하였으며 同種
抗血清에 對한 平板法凝集反應에 있어서는 S相
의 兩菌株는 다 같이 強力한 凝集所見을 보였으
나 R相에 있어서는 그 抗原性이 消失되어 있음
을 볼 수 있었다. ←(Table 1 位置)

R相의 確認을 爲한 同種 抗血清에 依한 試驗

管法凝集反應의 結果는 表2에서 보는 바와같이
S型菌은 抗血清稀釋 5120倍에서 凝集을 이르킴
에 反하여 R型菌은 抗血清稀釋 10倍에서도 凝
集을 이르키지 아니하였다. ←(Table 2 位置)

本實驗에 있어서의 S相의 菌은 實驗에 供用하
기 前에 隨時 acriflavine及 抗血清에 依한 平板
法凝集反應의 反復 實施로 定型的 S型菌임을 任
意選擇法에 依하여 選定한 것이며 R型菌은 0.2
% acriflavine에는 凝集하나 同種 抗血清에는
凝集을 이르키지 않는 R相菌을 本實驗에 使用하
였다.

以上과 같이 S.R相의 確認을 爲하여는 acri-
flavine 및 抗血清에 依한 平板法凝集反應과 抗
血清에 依한 試驗管法凝集反應의 實施와 同時에
熱凝集 및 酸凝集性狀을 檢査하여 S.R型菌임을
各各 確認하도록 하였다.

그런데 1% 同種 抗血清을 加한 培養液中에서
의 R相의 出現은 各各 10本の 中試驗管注入培
養에서 培養後 6日에서 集落總數 100個 乃至
300個内外의 發育을 認定한 平板上에 全혀 R相
을 認定치 못하 것으로부터 거의 全部가 R相으
로 變하여 있음을 볼 수 있는 등 R相의 出現은
tube에 依한 動搖가 甚함을 볼 수 있었다. 또한
同種 抗血清作用後의 形成集落에 對한 acrifla-
vine 및 抗血清에 依한 平板法凝集反應檢査에
있어서는 acriflavine에 多小 凝集을 이르키며 抗
血清에도 如前히 抗原性을 보이는 등 여러가지
程度의 反應態度를 보이는 것도 있었다. 本實驗
에 있어서는 acriflavine과 抗血清에 對하여 定
型的 S相 및 R相을 갖는 菌을 選定하여 다음 實
驗을 實施하였다.

2. Acriflavine 水溶液에 依한 S.R型菌의 試
驗管法凝集反應 : acriflavine 水溶液의 生理的食
鹽水 및 蒸溜水 稀釋系列에 있어서의 S 및 R型
菌의 試驗管法凝集反應의 結果는 表3에 表示한
바와 같다. Br. abortus strain 19 및 Br. meli-
tensis 16M의 R相은 다 같이 蒸溜水中에서 ac-
riflavine 稀釋倍數 128倍에서 生理的食鹽水中
에서는 512倍에서 凝集됨을 볼 수 있었으며 S相
에 있어서는 全혀 凝集됨을 認定할 수 없었다.

Acriflavine을 이용한 試驗管法凝集反應에 있어서는 溶媒間의 差異에서 볼 때 生理的食鹽水가 蒸溜水보다 좋은 反應價를 보이고 있음을 볼 수 있다. ←(Table 3 位置)

3. 各種 重金屬이온에 對한 試驗管法凝集反應

(A) Lead acetate, $Pb(CH_3 \cdot COO)_2 \cdot 3H_2O$;

各種 濃度の lead acetate 水溶液中에서의 S相 및 R相菌의 試驗管法凝集反應의 結果는 表4에 表示한바와 같다. 大概 acriflavine 水溶液에서와 同一한 反應態度를 보이고 있음을 R相에서는 볼 수 있으나 S型菌에서는 生理的食鹽水中에서 凝集價가 낮기는 하나 Br. abortus strain 19에서는 8倍, Br. melitensis 16M에서는 16倍에서 陽性 凝集所見을 보이고 있으며 蒸溜水中에서는 Acriflavine에서와 같이 陰性結果를 보였다. ←(Table 4 位置)

그런데 lead acetate에 依한 反應態度에서 問題가 되는 것은 定型的 S相菌이 lead acetate에 對한 性狀인데 이는 Ahn¹²⁾이 Shigella flexneri 菌의 S-R變異檢討에서 各種 中間段階로 推定되는 SR 또는 SSR는 acriflavine 水溶液中에서는 定型的 S相型菌과 全히 區別키 困難하나 Pb ion 反應에서는 이를 區別할 수 있었다는 報告에서 생각컨대 本實驗에 있어서는 acriflavine 및 其他 性狀에서 從來의 變異性狀檢査方法에 依하여 S型菌이라 確定된 S相에서 이러한 結果를 보이고 있음은 多小間 어떠한 變異의 素因을 갖고 있지 않았는가 疑問되는 바이며 純粹分離된 S相型菌과의 比較試驗이 없는 以上 무어라 斷定하기는 大端히 困難하다. 다만 Brucella菌屬에 있어서는 長期間의 人工培養에서 頻繁히 變異株의 出現이 可能하다는 事實과 本實驗에 供與한 保存菌株도 그러한 可能性을 생각할 수 있다는 點에서 lead acetate에 依한 反應態度는 더욱 興味있는 課題를 示唆하는듯 하다.

(B) Cupuric sulfate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;

Cu ion에 對한 反應態度는 表5에 表示한바와 같다. acriflavine이나 lead acetate에서와 大概 同一한 結果를 보이고 있었으나 Br. melitensis 16M에 있어서 Pb ion에서 보다 낮은 濃

度에서 Pb ion에서와 비슷한 S相型菌의 態度를 볼 수 있었다. ←(Table 5 位置)

(C) Cobaltous acetate, $Co(CH_3 \cdot COO)_2 \cdot 3H_2O$;

Co ion 存在下의 反應에서는 表6에서 보는바와 같이 acriflavine에서와 비슷한 結果를 보이고 있으나 그 反應價는 若干 低下한것 같다. 溶媒間의 差異는 認定할 수 없었으며 Pb 및 Cu ion에서와 같이 S相型菌에서 볼 수 있었든 凝集所見은 認定할 수 없었다. ←(Table 6 位置)

(D) Manganese chloride, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

表7에 表示된 바와 같이 Mn ion에 依한 反應에 있어서도 大概 acriflavine에서와 同一하였으며 菌株間이나 溶媒間의 差異에 따르는 著明한 差異는 없었다. ←(Table 7 位置)

(E) Ferric chloride, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$;

Fe ion 存在下에서는 非特異的인 反應樣相을 보이었으며 使用菌液 및 方法에 統一을 期하였어도 結果는 恒常 不定하였으며 Brucella菌屬에 있어서의 S, R變異檢査에는 利用할 수 없음을 알았다.

IV. 考 察

本實驗에서 實施한 Br. abortus strain 19 및 Br. melitensis 16M株의 S, R變異에 對한 檢討는 腸內細菌에 있어서 Brunner 및 Edwards⁹⁾가 吸收血清에 依한 變異誘發의 可能性을 利用하여 獲得된 Brucella R型菌에 對한 acriflavine 및 重金屬이온 反應에 依한 보다 더 定量的이 되고 確實한 變異性狀檢出手技의 豫備的 檢討라고 할 수 있다. 그러나 問題는 Renoux 등이 報告한바 있는 S型菌에 依하여 免疫된 血清中에 S型菌抗體以外的 다른 抗體가 證明되며, Buddle이 in vivo에서의 NS型乃至 R相의 性狀을 갖는 菌型의 分離랄지 또한 in vitro에서 S-R解離는 容易하게 일어날 수 있다는 點에서 볼 때에는 同種 抗血清作用에 依하여 誘發된 R相型菌이 이러한 菌相과 同一한 것인지의 如何는 根本的인 免疫遺傳學的인 解決없이는 무어라 斷定키 困難하나 다만 R型菌에 依한 血清學的 診斷이 可能

과 함께 究明하여 간다면 in vivo나 in vitro에서 S相에서 R相으로 變하는 過程을 밝히며 아울러 試驗管内 population change 機構의 究明은 所謂 self-limiting disease라 불리는 Brucella病의 病勢解析에 어떠한 실머리가 되지 않을까 생각되는 바이며 이러한 意味에서 acriflavine을 爲始로 各種 重金屬이온이 變異性狀變化 過程에 있어서의 變異程度를 알아내는 어떠한 指標로서의 한 役割을 할 수 있거나 아니한가 생각된다.

表 4에서 본 바와 같이 0.2% acriflavine 平板法凝集反應 및 其他 抗血清, 熱, 酸에 對한 性狀으로서는 全혀 S相이라 確定된 것에서 Pb ion에 多少 陽性反應을 보이고 있음은 本供試菌의 培養途中의 性狀變化에 基因함인지 定型的 S相菌이 갖는 性狀인지는 對照菌株에 對한 檢討가 없었기 때문에 本實驗에 있어서는 무어라 斷定키 困難함은 實驗成績에서 言及한바 있지만 다만 Ahn¹²⁾이 Shigella flexneri菌에서 疑心스러운 S相(SSR)菌에서 定型的 S相菌檢出에 가장 Pb ion에 依한 重金屬이온反應이 優秀한 成績을 보였다는 報告와 아울러 생각할 때 Brucella菌屬에 對해서도 Pb ion이 S相의 確認이랄찌 R相으로의 變異程度를 追究함에 有効한 手段이 되지 않을까 생각된다.

一般的으로 細菌의 S→R 變異는 S相이 갖는 Polysaccharide 表左性抗原成分의 喪失과 lipoid 成分의 增加가 R相에 認定되며 親水性에서 疎水性으로의 變化가 鹽이나 acriflavine에 依한 被凝集性을 增加시킴은 알려져 있는 事實이다. 그리고 免疫學의 面에 있어서는 acriflavine이나 各種 重金屬 ion은 非特異性物質이나 細菌이 이러한 化學的物質에의 特殊한 親知性의 差異는 各種 細菌이 여러가지 狀態에 있어서 菌體成分의 差異를 意味하는 것으로서 變異程度의 檢出을 爲한 어떠한 方法을 알려여 주는듯 하다.

供試된 菌은 어느것이나 in vitro의 狀態이기 때문에 本實驗에 있어서도 培養基의 成分이나 其他 여러가지 要因이 過然 本重金屬 이온反應에 어떠한 影響을 끼치며 특히 Brucella菌屬에

어서는 色素에 對한 感受性의 問題랄찌 Huddleson의 penicillin 感受性株라 할찌 各種 生物學的 性狀과 重金屬이온反應과의 關聯性은 앞으로 追究하여야 할 問題라고 생각된다.

V. 結 論

1. 同種 抗血清作用下에 培養하여 誘發한 Br. abortus strain 19 및 Br. melitensis 16M株의 S相菌 및 R相菌에 對하여 acriflavine 및 重金屬이온反應에 對하여 檢討하였다.

2. S. R變異性狀檢査를 爲하여 acriflavine 뿐만 아니라 重金屬이온 특히 Pb, Cu, Co, Mn ion은 S. R相의 變異性狀檢査에 利用할 수 있었다.

3. 本反應實施를 爲한 溶媒로써 生理的食鹽水 및 蒸溜水間에는 그다지 顯著한 差異는 認定치 못하였다.

Reference

1. Renoux, G and Mahaffey L. W. : Sur l'existence probable de nouveaux antigenes des Brucella., Ann. Inst. Pasteur., 88. 528-532. 1955.
2. Buddle M. B. : Studies on Brucella ovis(n.sp.) A cause of Genital disease of sheep in New Zealand and Australia., Jour. Hygiene., Cambridge., 54. 351-364., 1956.
3. Avery O. T., Macleod C. M. and McCarty : Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types., Jour. Exptl. Med., 79. 137-158. 1944.
4. Lederberg J. and Edwards P. R. : Serotypic recombination in Salmonella., J. Immunol., 71. 232-240. 1953.
5. Brunner D. W. and Edwards P. R. : Changes induced in the O antigens of Salmonella., J. Bacteriol., 55. 499., 1947.
6. Weil A. J. and Binder M. : Experimental type transformation of Shigella paradysenteriae(Flexner.); proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 66. 349-352. 1947.
7. Ando K. and Kawashima H. : Studies on the variation of Brucella strain., Bull. Nat. Inst.

- Anim. Hlth., 23. 55-69. 1954. (in Japanese, English Summary).
8. Warner J. and Huddleson I. F. : Studies in Brucellosis. Part 3. The antigenic properties of several colonies types of the S, R, and mucoid forms of the genus Brucella., Michigan state College, Agre. Exp. Sta. Memoir., 6. 68-76. 1952.
 9. Shimizu T. and Shibata S. : A technique of agglutination test with R-type Brucella as antigen., Nation. Inst. Ani. Hlth. Quart., 2. 1. 15-20. 1962.
 10. W. Braun. : Quoted from Jap. Jour. of Bac. 13. 8. 710-713. 1958.
 11. Shibata S., Isayama Y. and M. Murate. : Studies on the classification of Brucella. (5). Experiments on Non-smooth type of Br. abortus., Jap. J. of Bact. 13. 8. 710-713. 1958.
 12. T. W. Ahn. : Studies on the agglutination reaction of Sh. flexneri by acriflavine and heavy metal ions. (1). The relationship between the agglutination reaction and the S-R variation of Sh. flexneri., The Korean Medical Jour. 5. 10 94-107. 1960.
 13. White P. B. Note on intestinal bacilli with special reference to smooth and rough races., J. Path. and Bact., 32. 85-95. 1929.
 14. Okamoto A. : Quoted from Nissing Igaku. 32 894. 1943.
 15. Hiroshi H. : Influence of bile and phenol on Brucella melitensis. (1). Studies of variation. Bull. Nat. Inst. Ani. Hlth. 3. 1959. (English summaries of the studies on Brucellosis in Japan.)
 16. Edwards P. R. and Ewing W. H. : Identification of enterobacteriaceae., Burges Publ. Co., Minneapolis, Minn. U. S. A. 1962.
 17. 家畜衛生検査法 上巻. 石井進編 農業技術協會 16: -173. 1963.

Table 1. Agglutination behaviors of S-form and R-variant of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M. (Slide test).

Strain	Reagent	0.2% acriflavine solution	Saline	Homologous anti-serum
Br. abortus strain 19	S*	-	-	+
	R*	+	±	-
Br. melitensis 19M	S	-	-	+
	R	+	±	-

Remark: "*" S and R are designated according to its behavior on the slide agglutination reaction by acriflavine, antiserum and the heat or acid agglutination test.

Table 2. Agglutination test of s-form and R-variant of Br. Abortus strain 19 and Br. melitensis 16M.

Strain	Form	Homologous anti-serum dilution									
		10x	20x	40x	80x	160x	320x	640x	1280x	2560x	5120x
Br. abortus strain 19	S	4	4	4	4	4	4	4	4	3	1
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br. melitensis 16M	S	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Remark: Test tube agglutination results by International Method (FAO/WHO).

Table 3. Test tube reaction of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M by acriflavine.

Strain	Solvent	Form	Dilution of Acriflavine(0.5%)										
			2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1028x	
Br. abortus strain 19	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4*	4	4	4	3	3	3	—	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	
Br. melitensis 16M	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	2	—	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	

Remark: "*" in titers are degree of agglutination.

Table 4. Test tube reaction of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M by lead acetate.

Strain	Solvent	Form	Dilution of Pb(CH ₃ COO) 2.3H ₂ O(0.5mol)										
			2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1028x	
Br. abortus strain 19	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4*	4	4	4	4	4	4	3	3	—	
	Saline	S	3	3	2	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	
Br. melitensis 16M	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	3	3	—	
	Saline	S	3	3	2	1	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	4	2	—	

Remark: "*" in titers are degree of agglutination.

Table 5. Test tube reaction of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M by cupric sulfate.

Strain	Solvent	Form	Dilution of CuSO ₄ . 5H ₂ O(0.5mol)										
			2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1028x	
Br. abortus strain 19	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4*	4	4	4	4	3	3	1	1	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	3	2	1	—	
Br. melitensis 16M	D. W.	S	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	
	Saline	S	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	3	2	1	—	

Remark: "*" in titers are degree of agglutination.

Table 6. Test tube reaction of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M by cobaltous acetate.

Strain	Solvent	Form	Dilution of Co(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 4H ₂ O(0.5mol)										
			2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1028x	
Br. abortus strain 19	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4*	4	4	4	4	3	3	—	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4	4	4	4	4	2	2	—	—	—	
Br. Melitensis 16M	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	3	3	—	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	3	3	3	3	2	1	1	—	

Remark: "*" in titers are degree of agglutination.

Table 7. Test tube reaction of Br. abortus strain 19 and Br. melitensis 16M by manganous chloride.

Strain	Solvent	Form	Dilution of MnCl ₂ · 4H ₂ O(0.5mol)										
			2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1028x	
Br. abortus strain 19	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4*	4	4	4	4	4	3	—	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	4	4	4	3	3	2	2	2	2	—	
Br. melitensis 16M	D. W.	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	4	4	4	4	4	1	—	—	
	Saline	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		R	4	4	3	3	1	—	—	—	—	—	

Remark: "*" in titers are degree of agglutination.

발 (축) 전

신 장 가 축 병 원

경기도 광주군 공수의사

원 장 한 상 구

경기도 광주군 동부면 신장리