

ELISA를 이용한 돼지 톡소플라스마병의 조기 진단에 관한 연구

서명득 · 장동화 · 주후돈
경상대학교 수의과대학
(1989. 7. 14 접수)

Use of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine

Myung-deuk Suh, Dong-hwa Jang, Hoo-don Joo
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received July 14, 1989)

Abstract: This study was conducted to evaluate the possibility of application of a micro-enzyme-linked immunosorbent assay (micro-ELISA) for the serodiagnosis of specific toxoplasma antibodies in swine sera and this test was performed as a microplate system by coating the polystyrene plates with toxoplasma soluble antigen, incubated serially diluted sera, then added horse radish peroxidase labelled goat anti-swine IgG(r) conjugate followed by o-phenylenediamine as substrate.

The color development by enzyme-substrate reaction was determined by the photometric reading [ELISA reader at 490nm (OD)] and visual reading.

The soluble antigen was prepared from the tachyzoites in mouse peritoneal cavity.

A total of 1,200 swine sera from pig slaughter-house and a total of 116 swine sera from pig breeding station (S-C farm) were tested for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*.

The results obtained were summarized as follows:

1. The optimal reactions of indirect ELISA for the test sera were determined by the dilution of antigen 1:256 and 1:3,200 of horse radish peroxidase conjugate [anti-swine IgG (r)].
2. The specific toxoplasma antibody (IgG) in pigs infected with Tp artificially were detected as the serum titers of 1:64 or 1:128 at one week postinfection.
3. Of a total of 1,200 swine sera from pig slaughter-house 505 samples of sera were detected as positive (42.1%) and of a total of 116 swine sera from S-C pig breeding station 68 samples of sera as positive (58.6%).
4. The specific antibody (IgG) detection rates against a total of 1,200 test sera from pig slaughter-house were not significant between male (43.1%) and female (40.7%).
5. The indirect ELISA was proved to be a sensitive and specific procedure for the serodiagnosis of swine toxoplasmosis and also evaluated as an effective screening test for the large scale of test samples in laboratory.

Key words: ELISA, *Toxoplasma gondii*, goat antiswine IgG, swine

이 논문은 1988년도 문교부 지원 한국 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

서 론

톡소플라스마병은 원충성 질병으로 포유동물과 조류 및 사람에게 까지 감염을 일으키는 인수공통전염병이며 공중위생 및 보건위생상 매우 중요한 질병의 하나이다.¹ 이병의 원인체는 주로 숙주동물의 세포내에서 증식하고 조직내에서는 cyst를 형성하며 일반적으로 큰 돼지에서는 무증상 감염을 일으키지만 새끼돼지 또는 어린 돼지에서는 설사 등의 소화기 및 호흡기 증상과 신경증상을 보이는 경우가 대부분이나 임신된 돼지에서는 유산을 일으키는 것이 주요 특징이기도하다.¹

톡소플라스마병에 대한 항체를 혈청학적으로 증명하는 방법에는 보체결합반응^{2,3}, 색소시험^{4-7,15}, 피내반응 시험⁸, 적혈구응집 반응^{5,6,8-11,15,21}, 형광항체법^{3,7,11-14} 등의 여러 가지가 이용되고 있다.

그러나 최근에 와서 Voller et al¹⁵⁻²⁰이 microplate를 이용한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(이하 ELISA라함) 법을 발표한 이후 사람에서 톡소플라스마병의 혈청학적 진단법으로 ELISA법^{3,5,6,11,13,14,22-24}이 보고되었고, 돼지 톡소플라스마병의 진단법으로도 ELISA법²⁵⁻²⁷이 보고되었으며, 국내에서는 Moon²⁸이 sarcocystis와 toxoplasma의 혈청학적 교차반응에 ELISA법을 이용한 바 있다. 이와 같이 최근에 와서 각종 질병의 진단에 ELISA법이 이용되면서부터 첨단 과학인 유전공학에 까지 이 방법이 응용되고 있어 이에 의한 각종 질병의 진단법 연구가 절정에 와 있는 실정이다.

이에 저자들은 국내에서 발생되고 있는 돼지 톡소플라스마병의 새로운 진단법을 개발코저 이 방법을 응용하여 연구를 수행하였던 바 약간의 기초 성적을 얻었기에 이를 보고코저 하는 바이다.

재료 및 방법

공시돼지 : 국립종축원 사천지원에서 생산된 생후 8주령의 자돈 4두를 구입하여 인공유 및 육성돈 배합 사료를 급여하면서 사육하였고, toxoplasma 인공감염 전에 혈청희석배수 1:100 이하에서 ELISA로 toxoplasma 항체 음성으로 판정한 후 인공 감염에 공시하였다.

Toxoplasma 항원 : 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양 받은 *Toxoplasma gondii* (RH주, 이하 Tp라함)를 체중 20~25g의 마우스 복강에 접종하고 접종후 3~4일 후에 복강액을 생리적 식염수로 채취, 세척하여 집중하고 집중된 충체를 0.5% formalinized PBS (pH 7.2)로 2,000rpm에서 10분간씩 3회 세척한후 상

층액을 버리고 침전물(충체)에 5배량의 멸균증류수를 가하고 -30°C 냉동고에서 동결한 후 용해하는 과정을 10회 반복한 다음 12,000G(5°C)에서 1시간 고속 원심 분리하여 상층액을 채취하여 항원으로 공시하였다.

양성 혈청 : 인공감염 자돈에서 Tp 감염후 경정맥으로부터 1주 간격으로 채취하여 micro-ELISA에서 1:4,096 이상의 역가를 가진 혈청을 대조 양성 혈청으로 공시하였다.

음성 혈청 : Tp 무감염 자돈으로부터 채취한 혈청중 micro-ELISA로 혈청희석배수 1:100 이하에서 음성으로 판정된 혈청을 대조 음성혈청으로 공시하였다.

Conjugate : Horse radish peroxidase labelled affinity purified antibody [swine IgG (r) goat, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.]를 공시하였다.

Microplate : E.I.A. Polystyrene microtration plate (flat bottom, Linbro/Titertek)을 사용하였다.

혈청항체(IgG) 측정(ELISA) : Voller et al²⁰ 및 Waltman et al²⁶을 modify하여 다음과 같이 수행하였다.

i) 항원 coating : 항원 원액을 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 농도별로 희석한 다음 microplate well당 100 μ l씩을 분주한 후 4°C 냉장고에서 하룻밤 감작시키고 PBS/T(phosphate buffered saline+0.05% Tween 20, pH 7.4)로 5분간씩 4회 세척하였다.

ii) 항원 blocking : coating antigen을 세척한 후 1% bovine serum albumin(BSA)을 100 μ l/well씩을 첨가한 다음, 37°C incubator(moist chamber)에서 1시간 처리후 PBS/T로 5분간 4회 세척하였다.

iii) 항혈청 및 피검혈청 희석 : 혈청은 2배 단계 희석법으로 PBS/T를 사용하여 희석한 다음 100 μ l/well씩 가하고 37°C incubator(moist chamber)에서 1시간 처리 후 PBS/T로 5분간씩 4회 세척하였다.

iv) conjugate희석 및 첨가 : horse radish peroxidase를 1% BSA/PBS-T를 사용 농도별로 희석하여 100 μ l/well씩을 첨가한 다음 37°C incubator(moist chamber)에서 1시간 처리후 PBS/T로 4회 세척하였다.

v) substrate 처리 및 반응 정지 : 0.05% OPD와 0.006% H₂O₂가 함유 되도록 제조한 0.1M phosphate citrate buffer(pH 5.0)를 100 μ l/well씩을 첨가한 다음 실온에서 30분후에 2.5N H₂SO₄를 50 μ l/well씩을 가하여 반응을 정지시켰다.

vi) 반응 판독 : 반응의 결과는 ELISA reader(MR 700 microplate reader, Dynatech)를 이용하여 490nm에서 혈청항체의 optical density values(OD)를 판독하였다.

최적 항원농도와 conjugate 희석배수 측정: 제조한 항원의 최적 농도와 conjugate의 최적 희석배수는 대조 양성혈청과 음성혈청에 대한 chequerboard titration 법¹⁵에 준하여 결정하였다.

인공감염 돼지에 대한 항체조사: 자돈 4두를 사용하여 Tp를 경구적으로 인공감염 시키고 매 1주 간격으로 채혈하여 위에서 측정한 최적 항원 농도(1:256)와 최적 conjugate 농도(1:3,200)를 기준으로 하여 항체 소장을 조사하였다.

도살장으로부터 채취한 혈청에 대한 항체조사: 진주도살장에서 매 일별로 100두씩 총 1,200두를 대상으로 채혈하여 혈청을 분리한 다음 -30°C 냉동고에 보관하면서 항체조사에 공시하였다.

중돈장 돼지에 대한 항체조사: 진주근교 S-C 중돈장에서 채혈한 성돈 116두의 혈청을 대상으로 계절별 항체조사를 실시하였다.

결 과

최적 항원농도 측정: Tp 제조항원을 2배 단계희석

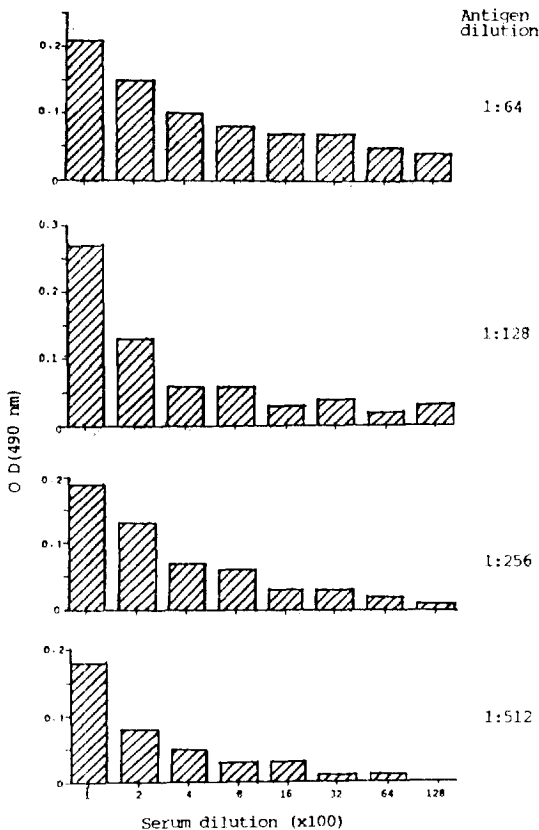


Fig 1. Measurement results of optimal antigen concentration by micro-ELISA.

하여 최적농도별로 최적 농도를 측정한 결과는 Fig 1에서와 같이 항원희석 1:256에서 가장 적절한 반응을 나타내었다.

최적 conjugate 농도 측정: 본 시험에 공시할 최적 conjugate 농도를 측정한 결과는 Fig 2에서와 같이 1:3,200에서 가장 적절한 반응을 나타내었다.

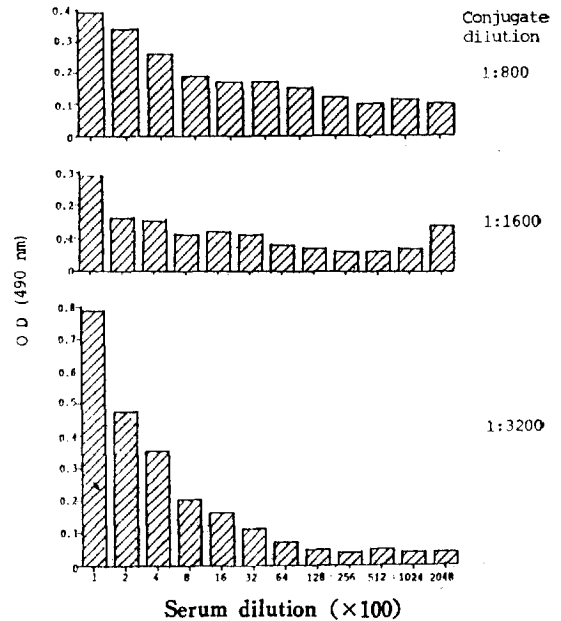


Fig 2. Measurement results of optimal conjugate concentration by micro-ELISA.

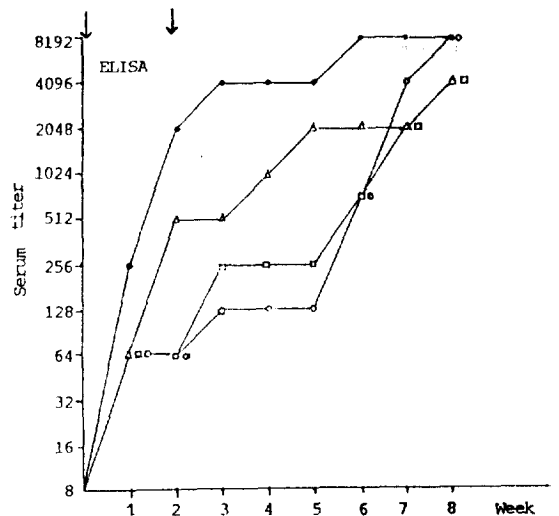


Fig 3. Fluctuation of IgG antibody titers of pigs infected with *Toxoplasma gondii* (●-●: P1, △-△: P2, □-□: P3, ○-○: P4, ↓: oral administration of Tp).

Table 1. Results of visual and photometric reading for the sera collected from 1200 heads of pigs at abattior by micro-ELISA

Sample	Visual reading	Photometric reading				End-point titer
		Absorbance threshold at 0.340 (490nm)	Heads (%)	Mean OD (\pm SD)	Ratio*	
Negative	—	—	695(57.9)	0.16(\pm 0.09)	1	<100
Weak positive	+	+	181(15.1)	0.54(\pm 0.16)	3.4	100~200
Strong positive	##~###	+	324(27.0)	1.63(\pm 0.84)	10.2	\geq 400

* The ratio = $\frac{\text{Absorbance value of test samples}}{\text{Absorbance value of reference negative samples}}$

인공감염돼지에 대한 항체가(IgG) 측정 : Tp를 인공 감염시킨 돼지에 대한 항체가소장을 조사한 성적은 Fig 3에서와 같이 Tp 접종 1주째에 4두 모두가 1:64 이상의 혈청역가를 나타내었고, 2주째 2차 접종후에는 혈청역가가 계속 상승하였으며 2두에서는 1차 접종후 8주째 까지 높은 혈청역가(1:8,192)를 보이었다.

육안적 판독과 OD치의 구분 : ELISA에 의한 음성과 양성 구분은 Table 1에서와 같이 혈청희석배수 1:100에서 육안적 판독으로 (-)이고 OD치가 0.340(490 nm) 이하인 것을 음성으로, 1:100과 1:200에서 육안적 판독으로 (+)이고 평균 OD치가 0.50 \pm 0.16인 것을 약양성으로, 그리고 1:400 이상에서 (##)이고,

Table 2. Results of IgG antibody detection for the dilutions of sera collected from pigs at abattior by micro-ELISA

Serum titer (\times 100)	No. of heads	%
<1*	695	57.9
1**	84	7.0
2	97	8.1
4	101	8.4
8	66	5.5
16	65	5.4
32	37	3.1
64	26	2.2
128	11	0.9
256	9	0.8
512	8	0.7
1,024	1	0.1
Total	1,200	100.0

* Negative; serum titer: <100 \times , OD₄₉₀: \leq 0.340

** Positive; serum titer: \geq 100 \times , OD₄₉₀: \geq 0.350

평균 OD치가 1.63 \pm 0.84인 것을 강양성 (##, ###)으로 하여 OD치에 의한 음성과 양성 구분은 3배 이상의 차이를 두었으며, 이에 따라 도살장의 도살돼지 1,200두에 대한 Tp 감염률을 조사한 결과 약양성(+)이 181두(15.1%)이고 강양성(##, ###)은 324두(27.0%)로 양성률은 42.1%(505두)이었고, 음성률은 57.9%(695두)이었다.

도살돼지로 부터의 특소플라스마 항체(IgG) 보유율 : 도살장에서 도살되는 돼지 1,200두에 대한 혈청 역가별 항체보유율을 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 혈청희석배수 1:400에서 101두(8.4%)로 가장 많았고, 1:12,800에서 11두(0.9%), 1:25,600에서 9두(0.8%), 1:51,200에서 8두(0.7%) 그리고 1:102,400에서 1두(0.1%)로 1:10,000 이상의 혈청 역가를 보인 것은 29두(2.5%)이었다.

항체보유돼지에 있어서 혈청역가와 OD치의 비교 : 도살장 돼지에서 양성으로 판정된 505두의 혈청에 대하여 혈청희석배수별 역가와 OD치를 비교한 성적은 Fig 4에서와 같이 혈청희석배수 1:100~1:200의 역가군은 181두(35.8%) 이었고 이 중에서 OD치 0.40~0.69 범위의 것이 127두(70.2%), 1:400~1:800의 역가군은 167두(33.1%) 이었고 이 중 OD치 0.70~0.99 범위의 것이 65두(39%)로 가장 많았으며, 1:1,600~1:3,200의 역가군은 102두(20.2%)이었고 이 중 OD치 2.50 이상이 30두(29.4%)를 차지하였으며 1:6,400~1:12,800의 역가군은 37두(7.3%)이었고 이 중 OD치 2.50 이상이 30두(81.1%)이었다. 그리고 1:25,600~1:102,400의 역가군은 18두(3.6%)이었으며 이 중 OD치 2.50 이상은 15두(83.3%)이었다.

도살돼지에 대한 성별 항체(IgG) 보유율 : 도살돼지로 부터 채취한 1,200두의 성별 항체보유율 조사성적은 Table 3에서와 같이 숫컷은 701두중 302두(43.1%) 그리고 암컷은 499두중 203두(40.7%)로 숫컷에서의

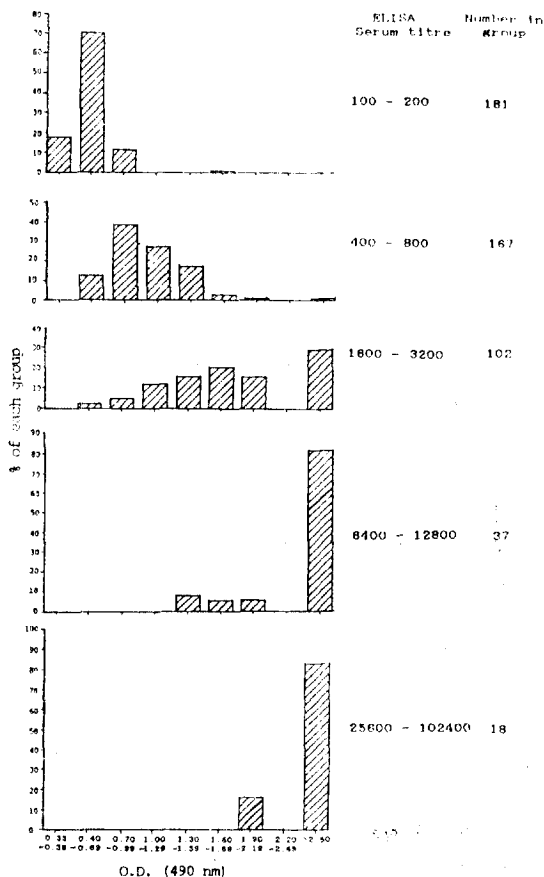


Fig 4. Comparison of OD values and serum titers for the sera of each group from 505 positive individuals by micro-ELISA.

Table 3. Results of IgG antibody detection for the sera collected from pigs at abattior by sex in micro-ELISA

Sex	Heads examined	No. of** positive	No. of* negative	Positive rate(%)
Male	701	302	399	43.1
Female	499	203	296	40.7
Total	1,200	505	695	42.1

* Negative; serum titer: $\lt; 100\times$, \leq 0.340

** Positive; serum titer: $\geq 100\times</math>, \geq 0.350$

양성률이 약간 높았다.

도살돼지에 대한 계절별 항체(IgG) 보유율: 돼지 톡소플라스마병의 계절별 항체 보유율을 조사한 성적은 Table 4에서 보는 바와 같이 봄 47.7%, 여름 47.0%, 가을 45.3%이었고 겨울은 28.3%로 다른 계절에 비해

Table 4. Seasonal prevalence of toxoplasma antibody for the sera collected from pigs at abattior by micro-ELISA

Season	Heads examined	No. of positive**	No. of negative*	Positive rate(%)
Spring	300	143	157	47.7
Summer	300	141	159	47.0
Autumn	300	136	164	45.3
Winter	300	85	215	28.3
Total	1,200	505	695	42.1

* Negative; serum titer: $\lt; 100\times$, \leq 0.340

** Positive; serum titer: $\geq 100\times</math>, \geq 0.350$

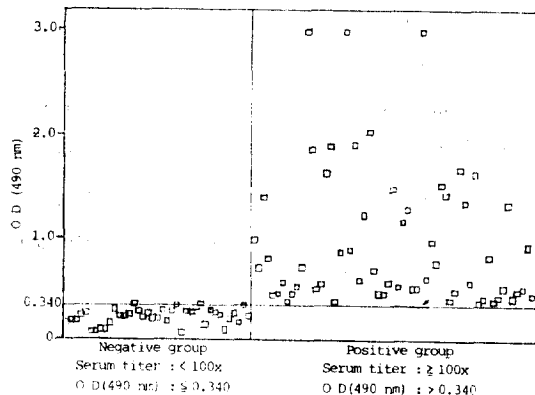


Fig 5. Comparison of the distribution of OD values between positive and negative group in S-C pig farm by micro-ELISA.

여 낮은 편이었다.

육안적 판독에서의 음성군과 양성군의 OD치 분포 비교: ELISA의 육안적 판독에서 혈청희석배수 1:100 이하의 음성혈청 48두(음성군)와 1:100 또는 그 이상에서 양성으로 판독된 68두(양성군)에 대한 OD치의 분포를 비교한 성적은 Fig 5에서와 같이 음성군은 모두 OD치가 0.340 이하 이었고 양성군은 그 보다 높은 OD치의 분포를 보였다.

S-C 종돈장 돼지에 대한 톡소플라스마 항체 보유율: 진주 근교의 S-C 종돈장에서 사육하고 있는 성돈 116 두를 대상으로 하여 톡소플라스마 항체 보유율을 조사한 성적은 Table 5에서와 같이 양성률은 116두중 68두(58.6%)이었고 음성률은 48두(41.4%)이었으며 혈청희석배수 1:25,600 이상에서의 양성에는 없었고 1:100과 1:200에서 각각 13.8%의 양성률을 나타내었다.

S-C 종돈장의 양성돼지에 대한 혈청역가와 OD치의 비교: 양성으로 판독된 68두에 대한 혈청역가와 OD치

Table 5. Results of toxoplasma antibody detection for the sera collected from S-C pig farm

Serum titer($\times 100$)	No. of heads	%
<1	48	41.4
1	16	13.8
2	16	13.8
4	8	6.9
8	7	6.0
16	9	7.8
32	6	5.2
64	5	4.3
128	1	0.9
256	0	0.0
512	0	0.0
1,024	0	0.0
No. of negative*	48	41.4
No. of positive**	68	58.6
Total	116	100.0

* Negative; serum titer: $<100\times$, $OD_{490} : \leq 0.340$

** Positive; serum titer: $\geq 100\times$, $OD_{490} : \geq 0.350$

의 분포를 조사한 성적은 Table 6에서와 같이 혈청역가가 높을수록 OD치가 높았으며 혈청역가가 낮을수록 OD치도 낮은 분포를 보였다.

Table 6. Comparison of OD values and serum titers for the sera of 68 positive individuals of S-C pig farm

OD(490nm)	Serum titers ($\times 100$)											Total (%)
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
>2.5						2	4	1				7 (10.3)
2.20~2.49												0 (0.0)
1.90~2.19					1	1						2 (2.9)
1.60~1.89				1	1	3	1					6 (8.8)
1.30~1.59			2	1	3							6 (8.8)
1.00~1.29		1		1	1							3 (4.4)
0.70~0.99		2	4	3	2							11 (16.2)
0.40~0.69	9	13	2	1								25 (36.8)
0.35~0.39	7				1							8 (11.8)
Total (%)	16 (23.5)	16 (23.5)	8 (11.8)	7 (10.3)	9 (13.2)	6 (8.8)	5 (7.4)	1 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	68(100.0)

고 찰

ELISA법을 이용한 사람의 톡소플라스마병 진단은 여러 학자들에 의해 많은 연구와 검토가^{3,5,6,11,13,14,21,23,24} 있었으나 돼지에서는 이병의 진단을 위해서 ELISA법을 이용한 많은 연구가 수행 되지는 못하였다.^{25,26,28} 돼지 톡소플라스마병에 대한 ELISA법의 이용은 Yen et al²⁵에 의하여 처음으로 시도 되었는데 그는 ELISA법을 Latex agglutination test(이하 LA라 함)와 비교한 성적에서 ELISA가 LA보다 더 민감하다고 하였으며, 최적 항원농도와 최적 conjugate 농도를 측정할 결과 항원은 $1\mu\text{g/ml}$, conjugate는 1:3,200이 톡소플라스마항체 검출의 최적 농도라고 하였다.

저자들의 이 시험에서는 제조한 항원을 희석배수별로 최적농도를 측정하였던 바 항원희석배수 1:256에서 항원과 양성혈청간의 변이가 가장 적고 안정된 반응을 보이었으며, conjugate는 1:3,200에서 항원과 양성혈청간의 변이가 가장 적고 OD치도 가장 안정하며 높게 측정됨으로서 이 결과는 Yen et al²⁵의 성적과 일치 하였다.

Waltman et al²⁶ 및 Naot와 Remington¹³은 톡소플라스마병의 항체를 조기에 검출하기 위해서는 ELISA가 가장 좋은 방법이라고 하였다. 저자들도 돼지에서 톡소플라스마 항체를 조기에 검출할 목적으로 인공감염 돼지에 대한 항체가의 출현을 조사하였던 바 감염 후 1주째에 혈청희석배수 1:64 또는 1:128의 역가를 보임으로서 ELISA에 의한 조기진단이 가능하다고 보

아진다. 그러나 Moon²⁸이 *sarcocystis*와 *toxoplasma* 인공감염 돼지에서 IgG 항체는 IFA와 ELISA에서 모두 감염 2주째에 처음으로 검출되었다고 보고한 성적과는 약간 차이가 있다. 그리고 Moon²⁸은 6주째에 최고 항체를 보이고 그 이후 부터는 하강한다고 하였는데 저자들의 시험에서는 6주째 부터 최고역가에 도달하여 8주째 까지 지속됨으로서 항체가의 최고치를 나타내는 시기는 Moon²⁸의 성적과 일치하였으나 지속기간은 약간의 차이가 있었는데 이와 같은 결과는 돼지의 개체 차이에서 온 것으로 생각 된다.

Voller et al¹⁸은 *toxoplasma*의 항체검출을 위한 혈청희석배수는 1:200에서, Waltman et al은 1:100에서 그리고 Loon과 Veen³은 1:100에서 음성인것을 대조로 하여 ELISA를 수행했을때 좋은 결과를 얻었다고 하였다. 저자들도 피검혈청 1:100을 starting point로 하여 도살돼지 1,200두의 혈청을 two-fold 단계희석법으로 micro-ELISA에 의한 육안적 판독과 OD치에 따른 항체가(IgG)를 조사하였던 바 음성률은 57.9%(695두)이었고 양성률(약양성과 강양성)은 42.1%(505두)이었다.

여기에서 OD치에 의한 음성(평균 OD: 0.16±0.09)과 약양성(평균 OD: 0.54±0.16) 그리고 강양성(평균 OD: 1.63±0.84)과의 한계구분은 음성대 양성의 비율 1:3.4의 차이를 두어 판독하였다. 이러한 판독기준은 Voller et al²⁰의 방법에 따른 것으로 음성과 양성의 한계구분에 좋은 지침이 되었다고 생각 된다.

한편 도살장 돼지 1,200두의 혈청을 대상으로 하여 혈청희석배수별 항체가(IgG) 조사에서는 1:100 이하(음성)가 695두(57.9%)이었고 1:400에서 101두(8.3%)로 가장 많았고 1:12,800 이상이 29두(2.5%)나 있었는데 이와 같이 혈청희석배수 1:10,000 이상에서도 많은 예에서 항체가 검출되는 것으로 보아 ELISA는 다른 방법에 비해서 고도의 특이성이 있는 항체 검출방법이라는 것을 간접적으로 시사해 주고 있다.^{11,13-15,19,21,26}

한편 도살장 돼지중 항체보유돼지 505두를 혈청역가군별로 OD치의 분포를 조사한 바 1:800 이하의 혈청역가군에서는 OD치가 2.50 이상인 것은 없었으며, 1:1,600~1:3,200의 역가군 102두 중에서는 OD치가 2.50 이상인 것은 30두(29.4%), 1:6,400~1:12,800의 역가군에서는 37두중 30두(81.1%) 그리고 1:25,600~1:102,400의 역가군에서는 18두 중 15두(83.3%)로서 혈청역가가 높은 돼지군에서 OD치가 2.50 이상을 차지하는 비율이 높은 현상을 보이었다.

도살장 돼지 1,200두에 대한 항체보유율 조사에서

음성률은 57.9%(695두) 그리고 양성률은 42.1%(505두)이었으며 성별로는 숫컷이 701두중 302두로 43.1% 그리고 암컷은 499두중 203두로 40.7%의 양성률을 보임으로서 성별에 의한 차이는 크지 않았다.

국내에서 돼지 톡소플라스마병의 항체보유율을 조사한 성적을 보면 Mun²은 13.4%, Suh와 Jang⁸은 25.3%, 서²⁹는 57.7%라고 보고하였으며 강 등³⁰은 재래산양에서 34%, Choi et al¹⁰은 동물원 동물에서 15.6%의 항체보유율을 보고한 바 있다. 이들의 보고성과 저자들의 성적(42.1%)을 비교 하면 차이가 다양한데 이와 같은 결과는 연구자의 항체 조사방법과 조사시기 등의 차이에서 온 것으로 생각되기도 하나, ELISA의 specificity와 sensitivity가 다른 방법보다 높다는 데서도 그 원인을 찾을 수 있다고 추측된다.

계절별 돼지 톡소플라스마항체 보유율의 조사에서는 봄, 여름, 가을은 45.3%~47.7%로 별 차이가 없었으나 겨울은 28.3%로 다른 계절에 비하여 상당히 낮은 편이었는데 이와 같은 결과는 톡소플라스마병의 전파에 관련되는 여러가지 역학적인 면이 고려될 수 있다고 보아진다.

Yen et al²⁵은 ELISA 시험에서 항원을 1μg/ml, conjugate 1:3,200 그리고 반응시간을 2시간으로 했을때 음성 대조혈청의 OD는 최고 0.312, 최저 0.164 그리고 평균 0.231로 양성과 음성의 한계치를 0.312로 정하였다. 저자들은 음성과 양성의 OD 한계를 정함에 있어 micro-ELISA의 육안적 판독으로 혈청희석배수 1:100에서 음성이고 OD치 0.340(평균 OD: 0.16±0.09)을 음성 최고치로 하여 S-C 종돈장의 성돈에서 채취한 116두를 대상으로 한 OD 음성군과 양성군을 비교한 성적을 분석해 보면 혈청희석 배수 1:100에서 음성으로 판독된 48두 모두가 음성 최고 OD치인 0.340 이하를 나타내었고 1:100 이상에서 양성으로 판독된 68두 모두가 OD치 0.350 이상을 나타냄으로서 이 시험에서 micro-ELISA의 육안적 판독과 OD치에 의한 음성과 양성의 한계구분은 Yen et al²⁵의 성적(OD 0.312)과 거의 일치하는 것으로 보아 적절한 것으로 생각된다.

야의 사육돼지(S-C 종돈장)에 대한 톡소플라스마항체 보유율을 조사한 성적에서 대상 돼지 116두중 음성률은 41.4%(48두)이고 양성률은 58.6%(68두)로 도살장 돼지를 대상으로한 조사성적(42.1%) 보다 약간 높은 양성률을 보이었는데 이 종돈장에서는 혈청희석배수 1:100과 1:200에서 각각 13.8%, 1:400~1:6,400에서는 4.3~7.8% 그리고 1:12,800에서는 0.9%(1두)가 양성률을 보이었고 1:25,600 이상에서는 1예도 없

었다. 그리고 양성예 68두에 대한 OD치와 혈청역가와
의 비교에서는 혈청희석배수 1:100~1:200에서 32두
(47.0%)이고 OD치도 1.00 이하로 OD 0.40~0.69의
범위가 대부분 이었다. 이와 같이 도살장의 도살패지
와 종돈장의 성돈에 대한 혈청역가와 OD치를 비교해
보면 두 군에서 현격한 차이가 있음을 알수 있는데 그
원인은 역학적인 면과 사양관리에 기인한 것이 아닌가
추측되나 정확한 것은 더 검토되어야 할 것이다.

Waltman et al²⁶은 ELISA를 돼지 톡소플라스마병
의 혈청학적 진단법으로 응용한 바, 이 방법은 DT,
IFA 및 IHAT보다 예민하며 신속하고 정확하여 돼지
톡소플라스마병의 screening test에 이상적이고 또한
이병의 조기 진단법으로도 정확한 결과를 얻을 수 있
다고 하였으며, Naot와 Remington¹³은 IgM-ELISA는
급성 톡소플라스마병의 조기진단에 더 예민한 반응이
라고 하였다. 이와 같이 여러 연구자들의 결과에서 논
한 바와 같이 간접 ELISA는 톡소플라스마병의 조기진
단에 이용될 수 있는 좋은 방법임에는 틀림 없으나 한
편으로는 이 방법에 공시되는 항원의 양적, 질적문
제^{3,14,24} 그리고 IgG-ELISA 및 IgM-ELISA^{13,21,23}의
장단점의 검토연구는 물론, 돼지 톡소플라스마병의 조
기 진단을 위한 간접 ELISA의 표준화(standardiza-
tion)²²를 기하는 문제가 시급히 해결되어야 할 과제라
고 생각된다.

결 론

돼지 톡소플라스마병의 신속, 정확한 조기진단법을
개발코져 toxoplasma 인공감염돼지와 도살장의 도살패
지 및 종돈장의 성돈에서 채취한 혈청을 대상으로 하
여 horse radish peroxidase labelled goat antiswine
IgG (r) conjugate를 이용한 간접 ELISA의 실험실
진단 이용 가능성을 검토하였던 바 다음과 같은 결론
을 얻었다.

1. 제조한 항원은 1:256, conjugate는 1:3,200의
농도로 희석했을때 간접 ELISA에서 가장 적절한 반응
을 나타내었다.

2. 인공감염돼지에서 간접 ELISA에 의한 IgG 항체
가는 Tp 접종후 1주째에 1:64~1:128을 나타내었고
접종후 6주째에 최고역가를 보이었으며 8주째까지 지
속되었다.

3. 도살장 도살패지에서의 Tp 항체양성율은 1,200
두중 42.1%(505두)이었고 성별로는 숫컷이 43.1%
(302두), 암컷이 40.7%(203두)이었으며 계절별로는
겨울(28.3%)이 봄(47.7%), 여름(47.0%), 가을(45.3
%)보다 훨씬 낮았다.

4. 도살장의 도살패지에서는 혈청역가가 높을수록
높은 OD치를 나타내었고 종돈장 성돈에서의 혈청역가
와 OD치는 낮은 경향을 보이였다.

5. 종돈장의 성돈에서의 항체양성률은 116두중 68두
로 58.6%이었으며 음성률은 48두로 41.4%이었다.

6. ELISA는 돼지 톡소플라스마병의 조기진단을 위
한 민감하고 특이성이 높은 혈청학적 진단법으로 확인
되었다.

참 고 문 헌

1. Levine ND. *Veterinary protozoology*. Ames: Iowa State University Press, 1985:248~256.
2. Mun JB. Serological survey of toxoplasmosis on swine by complement fixation inhibition test in Korea. *Bull Vet Res Lab* 1965;11(1):19~25.
3. Loon BV, Veen JVD. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. *J Clin Pathol* 1980; 33:635~639.
4. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science* 1948;108:660~663.
5. Milatovic D, Braveny I. Enzyme-linked immunosorbent assay the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 1980;33:841~844.
6. Lin TM, Albert SP, O'Connor GR. Standardized quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1980;11(16):675~681.
7. Walton BC, Benchoff BM, Brooks WH. Comparison of the fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med and Hyg* 1966;15(2):149~152.
8. Suh MD, Jang DH. Studies on passive haemagglutination test and skin test for toxoplasmosis in swine. *Korean J Vet Res* 1972;12(1): 51~55.
9. Jacobs L, Lunde MN. A haemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasit* 1957;43:308~314.
10. Choi WY, Yoo JE, Nam HW, et al. Toxoplasma antibodies by indirect latex agglutination tests in zoo animals. *Korean J Parasit* 1987; 25(1): 13~23.

11. Balsari A, Poli G, Molina V, et al. ELISA for toxoplasma antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests. *J Clin Pathol* 1980;33:640~643.
12. Fletcher S. Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Pathol* 1965;18:193~199.
13. Naot Y, Remington JS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1980; 142(5):757~766.
14. Walls KW, Bullock SL, English DK. Use of the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1977;5(3)273~277.
15. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, et al. A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* 1976;29:150~153.
16. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine, theory and practice. *Bull World health organ* 1976;53: 55~65.
17. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine, theory and practice. *Bull World health organ* 1976;54: 129~139.
18. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976;70(20):98~106.
19. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978;31:507~520.
20. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), A guide with abstracts of microplate applications Dyna- tech Laboratories, Inc, 1979;1~40.
21. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, et al. Immunoglobulin Menzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immunol* 1978;21(1):55~58.
22. Denmark JR, Chessum BS. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of toxoplasma antibody. *Medical Laboratory Science* 1978;35:227~232.
23. Duermeyer W, Wielaard F, Gruijthuijsen HV, et al. Enzymelinked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin Mantibodies against *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1980; 12(6):805~806.
24. Violand SA, Mitchell TG, Kleeman KT. Comparison of an enzyme-linked immunoassay and a quantitative indirect fluorescent-antibody test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1982;16(2):341~344.
25. Yen CCC, Yeh JM, Chang CN. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of toxoplasmosis in swine. *J Chin Soc Vet Sci* 1981;7:35~41.
26. Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. *Am J Vet Res* 1984;45(9):1719~1725.
27. Haritani M, Shimura K, Iwabuchi I, et al. Demonstration of *Toxoplasma gondii* antigen in stillborn piglets using immunoperoxidase technique. *Jpn J Vet Sci* 1988;50(4):954~956.
28. Moon MH. Serological crossreactivity between sarcocystis and toxoplasma in pigs. *Korean J Parasit* 1987;25(2):199~194.
29. 서두석. 전남지역의 돈 *Toxoplasma* 감염조사 연구. *대한수의사회지* 1979;15(8):447~450.
30. 강호조, 문무홍, 신종욱. 재래산양의 *Toxoplasma* 항체조사. *경상대학 축산진흥연구원소보* 1973;1:91~94.