

ELISA법을 이용한 개 톡소플라즈마병의 조기진단에 관한 연구

서 명 득 · 주 후 돈 · 이 병 훈

경상대학교 수의과대학

(1991. 9. 30 접수)

Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of toxoplasmosis in dogs

Myung-deuk Suh · Hoo-don Joo · Byung-hoon Lee

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received September 30, 1991)

Abstract: This study was conducted to detect the serum antibodies in the experimentally toxoplasma infected dogs and street dogs by use the of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). And this test was performed on the polystyrene microplate by coating with the tachyzoites soluble antigen of *T gondii* (RH strain), incubated with sera diluted then, added with HPO-conjugated rabbit anti-dog IgG and o-phenylenediamine used as a substrate.

Tachyzoites of *T gondii* harvested from mouse peritoneal cavity were purified by 30, 40 and 50% Percoll density gradient centrifugation and used as the source of antigen. The results obtained were summarized as follows;

1. The highest ratio of positive to negative (P/N ratio) was obtained at the level of 1 μ g/ml protein concentration of antigen with the 1/4000 dilution of the conjugate measured by checker-board titration. It was regarded as the optimum concentration of the antigen and conjugate.
2. Cut-off value in this IgG ELISA was 0.375 that was determined by mean absorbance (at 492nm) of IFA negative serum added with the double value of the standard deviation (mean \pm 2 S.D.).
3. Serum ELISA IgG antibodies to *T gondii* in the experimentally infected dogs were detected firstly at the Week 3 after inoculation and the highest titer was recognized at the Week 4, 5 and 6 after inoculation.
4. Stability of the antigen absorbed in the microplates that were preserved at 4°C and -25°C separately were prolonged up to 3 weeks and 10 weeks at 4°C and -25°C, respectively. However the reproducibility was not reliable after the preservation of 4 weeks and longer.
5. Positive rate of the specific antibodies in 312 test sera was 28.5% and there was no significant differences between the male (27.8%) and female (29.5%), respectively.
6. The IgG ELISA was proved to be a specific procedure for the detection of antibodies to canine toxoplasma infection and also evaluated as a screening test for the large scale of test samples in laboratory.

Key words: ELISA, *Toxoplasma gondii*, rabbit antidog IgG, canine

서 론

*Toxoplasma gondii*는 세포내 기생체로 사람을 포함한 지구상의 대부분의 온혈동물을 중간숙주로 하고 고양이과(Felidae) 동물을 종숙주로 하는 원충이다.¹⁻⁵ 이 원충은 대부분의 동물에서 불현성 감염을 일으키나 임신한 동물과 사람에서는 유산을 일으키기도 한다.^{3,5-7}

개에 있어서 톡소플라즈마 감염증은 Mello⁸에 의해 처음 보고 되었고 임상적으로 신경, 근육, 호흡기 및 위장관의 증상을 수반 하며 특히 뇌, 소뇌, 척수와 근육의 병변은 파행과 사지의 점진적 마비를 수반 한다고 하였다.^{2,8,9}

또한 개 톡소플라즈마병은 디스토펜 바이러스 감염증과 관계가 있는 것으로 보고하고 있는 데 Dubey²는 임상적 톡소플라즈마병은 영국에서는 99%, 미국에서는 40%가 디스토펜 바이러스와 혼합감염 되어 있다고 하며 이는 디스토펜 바이러스의 면역억압 작용이 톡소플라즈마에 대한 저항성을 저하 시키기 때문이라고 하였다. 이와같은 사실은 최근에 사람에서 후천성 면역 결핍증(AIDS) 환자가 톡소플라즈마에 의한 뇌막염과 폐렴의 높은 발병을 나타내는 것과 관련되는 사실로 생각되며 면역결핍이 톡소플라즈마병의 임상증상을 유발하는 요인이 된다고도 보고되어 있다.⁶ 그리고 Vanderwagen¹⁰은 본병은 공중보건학적 측면에서 대단히 중요한 질병이며 동물에 있어서 톡소플라즈마 항체의 증명은 사람 주위환경의 본 병원체 오염정도를 시사하는 것으로 오염원의 추적에 중요한 의미를 가진다고 하였다.

현저학적으로 톡소플라즈마에 대한 항체를 증명하는 방법으로 초기에는 Sabin과 Feldman¹³에 의한 색소시험(DT)이 사용되었으나 그후 보체결합반응법(CF)¹¹,¹²이 응용되었다. 그러나 색소시험에서는 accessory factor(AF)라는 특정인의 혈청이 필요하고 또 항원으로서 살아있는 원충을 사용해야 한다는 제약이 있다.^{13,14} 그 후 색소시험법을 대신하는 방법으로 간접적혈구 응집반응(IHA),^{15,16} 피내반응시험,¹⁶ 간접형광항체법(IFA),^{14,17-22} 간접 Latex 응집반응(ILA)²³ 등이 시도되었고 최근에 효소표시 면역검사(ELISA)³,^{4,7,15,20-22,24-30}와 Western blot(EITB)³¹⁻³³이 각광을 받고 있으며 또한, 특히 IgM이나 혈중내 항원을 검출하기 위한 여러가지 방법이 고안되고 있다.^{3,4,24,27,28,31,33}

ELISA법은 처음에 Voller등²⁹의 방법이 개발된 이후에 Waltman등²² 및 Naot와 Remington²⁷에 의하여 이 방법의 유용성이 보고 된 바 있고, 국내에서도 서등⁷

및 전등²⁵이 돼지에서, 김등²⁶은 돼지와 고양이에서 본 방법을 적용하여 항체를 조사한 바 있으며, 문²⁰은 *sarcocystis*와의 교차반응을 ELISA와 IFA로 증명한 바 있다. 그러나 애완동물인 개에서는 ELISA법을 이용한 바가 없으며 저자 등은 본 방법을 이용하여 연구를 수행한 바 약간의 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시 원충주 : 농촌진흥청 가축위생연구소에서 등걸보존된³⁴ *Toxoplasma gondii*(RH strain)의 tachyzoite를 20~25g의 마우스 복강에 연속 계대하면서 실험에 공시하였다.

개의 인공감염 : 간접형광항체법에서 항체(IgG) 음성인 6두의 잠종견을 DHPPL 백신접종을 실시한후 상품화된 개사료를 자유급식 하면서 실험에 공시하였다. 인공 감염방법은 감염 마우스를 경구적으로 섭식케하여 감염 시켰다.

항원 생산 : tachyzoite를 접종한 마우스 복강으로부터 복수액을 PBS로 세척하여 채취한 후 1,800g로 5분간 썩 3회 원심, 세척하여 PBS에 부유시키고 27G 주사침에 수 차례 통과 시켜 응집된 원충과 마우스 복강세포를 분리하였다. 마우스 복강세포를 제거하고 원충을 순수 분리하기 위하여 이 부유액을 40, 50과 60% percoll(Sigma) density gradient에 조심스럽게 중층한 후 2,000rpm에서 30분간 원심하였다. 분리된 세분회중 50과 60% percoll액의 분획에서 분리된 원충을 회수한 후 PBS로 1,800g에 5분간 썩 3회 원심, 세척하고 -70°C에서 동결과 용해를 3회 반복한 다음 조음과 분쇄기에서 15초동안 3회 분쇄하여 12,000g(4°C)에 90분간 원심해서 상층액을 -70°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다.

항원의 단백질농도는 Bradford³⁵의 방법에 따라 측정하여 10mg/ml를 원액으로 하였다.

IgG ELISA법의 수행 : ELISA법은 Voller등²⁹의 방법을 준용하여 다음과 같이 수행하였다.

1) 항원 흡착

항원을 도포완충액(carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, 이하 CBB라함)에 희석하여 E.I.A.용 polystyrene plate(Titertek)의 각 홈에 100 μ l씩 분주한 다음 4°C에서 하룻밤(18시간) 감작시킨 후 PBS-Tween 20(pH 7.4)으로 5분간 썩 3회 세척 하였다.

2) 항원 blocking

PBS-Tween 20에 희석한 3% bovine serum albumin(BSA fraction V, Sigma)을 각 홈에 100 μ l씩 분주한

후 37°C 온습상자에서 1시간 감작시키고 PBS-Tween 20으로 5분간 썩 3회 세척하였다.

3) 폐검원청의 처리

혈청을 PBS-Tween 20으로 2배 단계희석하여 각 흡에 100 μ l씩 분주하고 온습상자에 넣어 37°C에서 1시간 감작시킨 후 PBS-Tween 20으로 5분간 썩 3회 세척하였다.

4) 효소표지 항체의 처리

효소표지 항체(horse radish peroxidase conjugated rabbit anti-dog IgG, Cappel)를 3% BSA에 희석한 후 각 흡에 100 μ l씩 분주하고 온습상자에 넣어 37°C에서 1시간 감작 시킨 후 PBS-Tween 20으로 5분간 썩 3회 세척하였다.

5) 기질의 처리 및 반응 정지

0.05% ortho-phenylenediamine(OPD)과 0.006% H₂O₂가 함유되도록 제조한 0.1M phosphate-citrate buffer (pH5.0)를 각 흡에 100 μ l씩 가하고 암실에 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 2.5M H₂SO₄를 각 흡에 50 μ l씩 넣어 반응을 중지 시켰다.

6) 반응 판독

ELISA reader(Titertek, Multiscan)를 사용하여 492 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

최적 항원농도의 측정: 제조항원이 가장 높은 양성/음성 비(P/N ratio)를 나타내는 최적농도를 측정하기 위하여 Voller등²⁹의 방법에 따라 checker-board titration을 수행하였다. 항원을 CBB(pH9.6)로 단백질농도가 ml당 10, 5, 1 μ g 되도록 희석하여 감작 후 양성과 음성혈청을 1:32에서 1:4096까지 2배 단계희석하여 감작시키고 conjugate를 1:2000으로 반응시켜 가장 높은 P/N ratio를 나타내는 농도를 본 시험에 사용하였다.

최적 conjugate 희석배수 측정: 가장 높은 P/N ratio를 나타내는 conjugate의 희석배수를 측정하기 위하여 항원을 측정된 최적농도로 희석하여 감작한 후 양성과 음성혈청을 1:32에서 1:4096까지 희석하여 감작하고 conjugate를 1:1000, 1:2000, 1:4000과 1:8000으로 각각 반응시켜 가장 높은 P/N ratio를 나타내는 희석배수를 본 시험에 사용하였다.

Conjugate의 특이성 측정: purified dog IgG(Sigma)를 10 μ g/ml에서 0.001 μ g/ml까지 CBB로 단계 희석하여 감작시킨 후 conjugate를 1:1000, 1:2000과 1:4000으로 희석하여 반응시켜 dose-dependent 곡선을 작성하여 특이성을 측정하였다.

간접형광항체법(IFA)에 의한 항체조사: 대조 음성 혈청을 검색코저 Fletcher의 방법¹⁸을 준용하여 tachy-

zoite를 1% formalinized-PBS에 부유시켜 하룻밤 고정된 후 에나멜로 분취한 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후 니닐분투에 넣어 -70°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다.

혈청은 1:32로 희석하여 반응 시키고 FITC-conjugate(rabbit anti-dog IgG, Cappel)는 1:40으로 하여 반응 시킨 후 형광현미경으로 관찰하였으며 Durham 등¹⁷의 판정기준에 따라 tachyzoite의 세포막에 형광을 나타내지 않거나 양극 만이 형광을 나타내는 경우를 음성으로 판정하여 대조 음성혈청으로 공시하였다.

Cut-off value의 측정: IFA에서 검색된 음성혈청 30두를 1:64로 희석하여 ELISA법을 시행한 후 음성혈청 흡광도 상한선을 본 실험의 cut-off value로 정하였으며 다음과 같은 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cut-off value} = \text{mean absorbance} \pm 2 \text{ S.D.}$$

흡착항원의 안정성과 재현성 조사: E.I.A. polystyrene microplate에 최적농도의 항원을 흡착시킨 후 PBS-Tween 20으로 5분간 썩 3회 세척하고 각각의 plate를 polyethylene film으로 공기가 통하지 않도록 포장한 다음 4°C냉장고와 -25°C 냉동고에 각각 분리하여 보존하면서 매 1주 간격으로 양성혈청과 반응시켜 항원역가와 흡광도(OD)를 측정하여 항원의 보존방법 및 보존기간별에 따른 안정성(stability)과 재현성(reproducibility)을 조사하였다.

인공감염 개에 대한 항체 소장조사: 인공 감염시킨 6두의 개에 대한 항체 소장조사는 감염후 매 1주 간격으로 채혈하여 위에서 측정된 최적 항원농도와 최적 conjugate 농도를 기준으로 하여 항체 소장을 조사하였다.

항체보유율 조사: 진주근교에서 도살되고 있는 개 312두의 혈청을 채취하여 -25°C에 보관하면서 항체역가와 보유율을 조사하였다.

결 과

최적 항원농도의 측정: 항원의 단백질농도를 ml당 10, 5, 1 μ g으로 희석하여 최적항원 농도를 측정한 결과는 Fig 1에서와 같이 1 μ g/ml에서 P/N ratio가 10배 이상으로 가장 높아 최적 반응을 보였다.

Conjugate 최적농도 측정: conjugate를 1:1000, 1:2000, 1:4000과 1:8000으로 희석하여 최적농도를 측정한 결과는 Fig 2에서와 같이 1:4000에서 P/N ratio가 가장 높아 최적 반응을 보였다.

Conjugate의 특이성 조사: conjugate의 희석 농도별 purified dog IgG에 대한 dose-dependent 곡선을 작성한 결과는 Fig 3에서 처럼 ml당 dog IgG 0.4 μ g

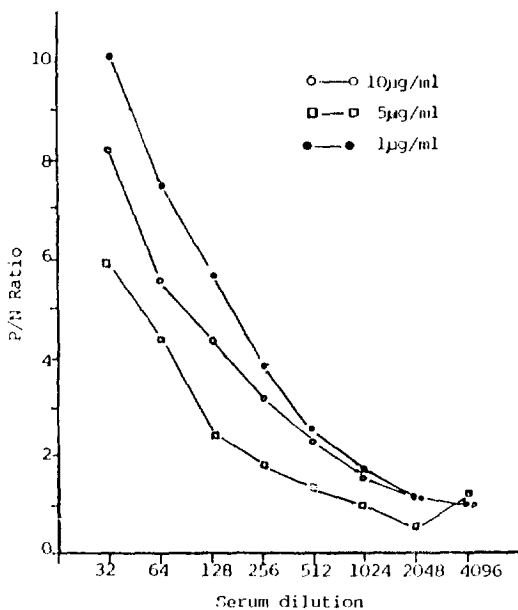


Fig 1. Determination of optimum antigen concentration by checker-board titration.

이하와 3.0µg 이상에서는 일정한 흡광도를 유지하는 sigmoidal형의 곡선을 나타내었고 본 실험에서 측정된 cut-off value는 이 곡선의 경사부에 위치하고 있어 반응 특이성이 인정되었다.

Cut-off value 측정: IFA에서 음성으로 판정된 혈청 30두에 대한 평균 흡광도를 측정한 성적은 Fig 4에

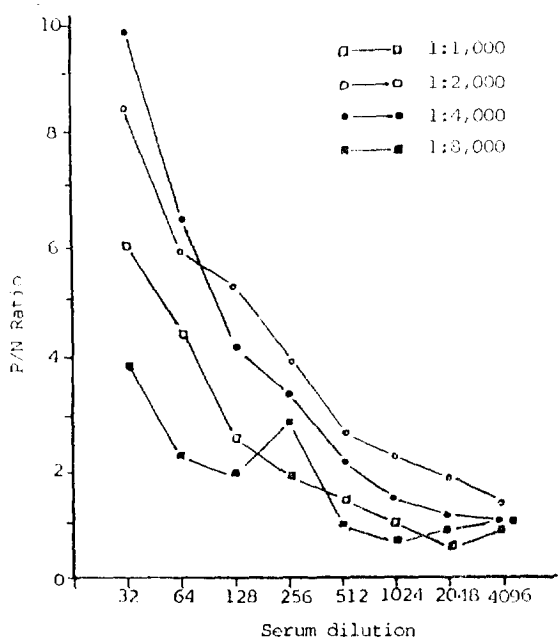


Fig 2. Determination of optimum conjugate concentration by checker-board titration.

서와 같이 평균 0.243이고 표준편차는 0.066으로 cut-off value는 0.375이었으며 이 흡광도를 기준으로 할때 30두 중 4두는 ELISA 양성이고 26두는 음성으로 IFA와 ELISA의 일치율은 87.7%이었다.

인공감염 개의 항체소장 조사: 인공 감염시킨 개의

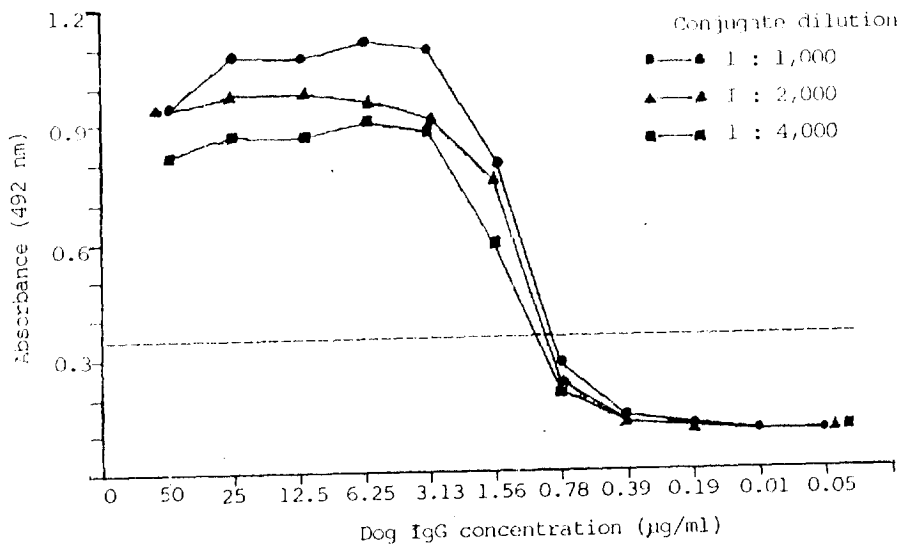


Fig 3. Dose-dependent curve for purified dog IgG.
• broken line (...): cut-off value.

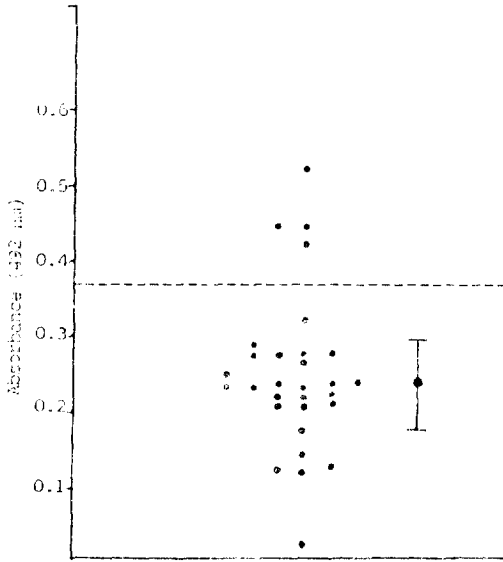


Fig 4. Distribution of absorbance values for negative serum in IFA.

• broken line (---): cut-off value.

항체(IgG) 소장을 조사한 결과는 Fig 5에서와 같이 접종전에는 흡광도 0.172 ± 0.027 (mean \pm S.D.)로 음성이었고 접종후 3주째에는 6두중 3두가 양성으로 흡광도는 0.421 ± 0.252 였으며 모든 개체가 양성반응을 나타낸 것은 접종후 4주째 1.189 ± 0.459 로 항체가 급격히 상승하여 5, 6주째 까지 유지하다가 7주째부터 하강하기 시작하여 그 후 17주째까지는 불규칙하지만 일정한 수준의 항체역가를 유지하였다. 그러나 개체별로는 항체역가의 심한 차이가 있었다.

흡착항원의 보존성 조사 : 항원을 $1\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 후 polystyrene microplate에 $100\mu\text{g/well}$ 씩을 분주하여 흡착시킨후 4°C 와 -25°C 에 각각 분리 보존하면서 매 1주 간격으로 항원의 안정성을 조사한 성적은 Table 1에서와 같이 4°C 에 보존한 것에서는 보존 후

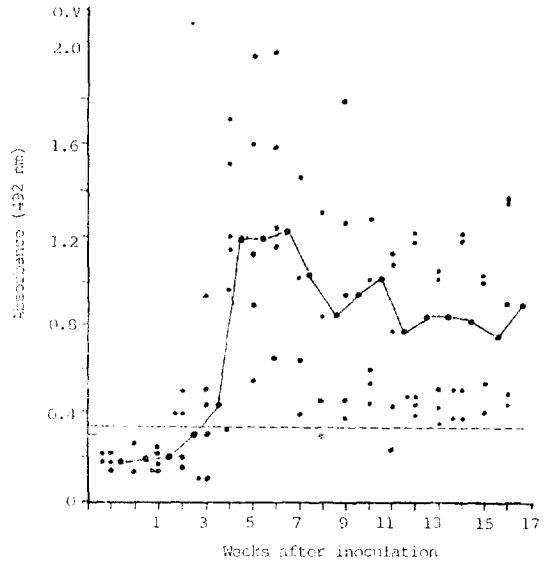


Fig. 5. Fluctuation of IgG antibody titers of dogs infected with *T. gondii* by micro-ELISA.

• broken line (---): cut-off value.

• o.v: over value.

3주째까지는 비교적 안정성과 보존성은 유지되었고, -25°C 에 보존한 것은 10주째 까지 유지되었다.

흡착보존 항원의 흡광도와 반응재현성 조사 : 흡착항원의 흡광도와 반응재현성을 조사한 성적은 Fig 6에서와 같이 흡착항원의 양성 현청 A와 B에 대한 보존적점의 흡광도는 0.623 ± 0.002 와 1.064 ± 0.096 이었으나 4°C 의 보존항원은 보존후 3주째까지는 흡광도 0.610 ± 0.026 과 1.028 ± 0.065 이던 것이 4주째에는 0.244 ± 0.155 와 0.705 ± 0.170 으로 급격한 하강과 누적 표준편차의 증가를 보였고 항체역가(Table 1)도 3주째에는 1 : 256과 1 : 512이던 것이 4주째에는 1 : 32와 1 : 128을 나타내어 2-배이상의 하강을 보임으로서 항원의 반응재현성과 안정성은 인정되지 않았다.

Table 1. Preservation and stability of absorbed antigen in the microplate by storage temperature

Temp	Serum	Weeks after preservation											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5°C	A	128*	128	256	256	32	<16	<16	<16	16	<16	16	<16
	B	1024	1024	512	512	128	64	64	64	64	16	64	16
-25°C	A	128	128	128	128	128	128	128	64	128	64	128	32
	B	512	512	512	512	256	1024	512	512	512	1024	512	256

* Numbers are reciprocal titer of positive serum.

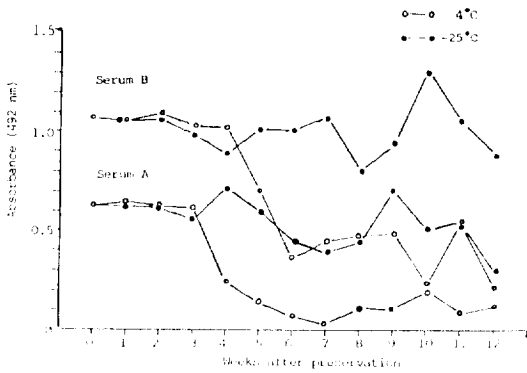


Fig 6. Absorbance values and reproducibility of absorbed antigen in microplates by storage temperature.

-25°C에 보존한 항원은 A혈청과 반응시 4주째까지는 0.602 ± 0.067 이었으나 5주째에는 0.447 ± 0.094 를 나타내었고 그 이후 부터는 불규칙하였다. 그러나 B혈청과의 반응시에는 보존 후 6주째까지는 1.080 ± 0.080 이던 것이 7주째에는 0.803 ± 0.104 로 하강하였고, 그 이후 다소 불규칙하였으나 10주째까지는 1.057 ± 0.132 를 유지하였다. 이 때 항체의 역가(Table 1)는 1:128과 1:512를 보여 항원의 보존성은 인정되었지만 누적 표준편차가 현저히 증가하여 효능도의 재현성은 인정되지 않았다.

항체보유율 조사: 야외에서 채취한 312두의 개에 대한 항체보유율을 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 89두(28.5%)가 양성이고 성별로는 수컷 180두중 50두(27.8%), 암컷 132두중 39두(29.5%)가 양성으로 나타나 성별의 차이는 유의성이 없었다($p < 0.05$).

Table 2. Results of IgG antibody detection for the test dog sera by micro-ELISA

Sex	No examined	No. of positive	Positive rate(%)
Male	180	50	27.8
Female	132	39	29.5
Total	312	89	28.5

역가별 항체보유율: 항체양성을 나타낸 89두의 항체 역가를 측정 한 결과는 Table 3에서와 같이 1:64가 37두(41.6%)로 가장 많았고 1:128이 15두(16.9%), 1:256이 19두(21.3%), 1:512가 10두(11.2%), 1:1024가 3두(3.4%), 1:2048과 1:4096이 각각 2두(2.2%), 그리고 1:16384가 1두(1.1%)였다.

Table 3. Results of reciprocal antibody titers for the positive dog sera by micro-ELISA

Reciprocal titer	No. of heads	%
64×	37	41.6
128×	15	16.9
256×	19	21.3
512×	10	11.2
1024×	3	3.4
2048×	2	2.2
4096×	2	2.2
8192×	0	0.0
16384×	1	1.1
Total	89	100.0

고 찰

ELISA법을 이용해서 사람이나 동물의 기생충 감염에 대한 항체 및 항원의 검출이 여러 학자들에 의해서도 되어왔다.^{3,3,15,23,24,27,36} 특히 특소플라즈마 감염증은 불현성감염이 대부분 이어서 진단이 힘든 까닭에 혈청학적 진단에 많이 의존하고 있는 실정이다.^{4,12,15,24,27,36-38}

국내에서는 서등⁷, 전등²⁵, 김등²⁶ 그리고 문²⁰은 폐지에서, 김등²⁶은 고양이에서 ELISA법을 항체검출에 이용 한 바 있고, 최등²³은 ILA법으로 동물원의 동물에서 항체검출을 보고하는 등 여러 동물에서 항체가 증명되었으나 개에서의 항체조사는 수행된 바가 없다.

ELISA법은 Vollcr등²⁹에 의해 처음 시도된 이래 여러 연구자들의 검토가 있었던 데^{15,22,24,30} 다른 혈청학적 진단법에 비하여 매우 민감하다고 보고한 바 있다. 그러나 ELISA법의 특이성과 민감성은 항원의 정제정도에 좌우 되는 데^{31,39,40} 이는 제조 항원 내에 여러 종류의 단백질 성분이 같이 존재하는 경우에는 항원 흡착시 간섭현상으로 인하여 민감성이 저하되고 또한 *sarcocystis*, *cryptosporidium*, *besnoitia* 등과 교차반응^{3,4,20,30}이 일어나며 rhumatoid factor(RF)와 anti-nuclear antibodies(ANA)가 존재할때 위양성의 원인이 된다고 하였다.^{3,4,33}

이에 저자 등은 최등³¹과 Conelissen등³⁹의 방법에 준하여 항원으로 사용한 *toxoplasma*의 tachyzoite를 percoll density gradient 원심분리법을 이용하여 순수 분리한 후 항원을 정제하여 checker-board 법에 따라 최적항원농도를 측정 한 바, 항원을 1μg/ml의 농도로 했을 때 P/N ratio가 가장크고 위양성과 위음성반응을

나타내지 않았다.

따라서 percoll 처리하여 순수 분리한 항원이 ELISA 법에 이용될 수 있는 가장 좋은 것으로 생각된다.

서등⁷은 돼지 특소플라즈마병의 ELISA법에 의한 항체 측정시 conjugate의 농도를 1:3,200으로 했을 때 그리고 Yen등³⁰은 항원농도는 1 μ g/ml, conjugate는 1:3,200이 특소플라즈마항체 검출의 최적농도라고 하였다.

저자 등은 이 시험에서 제조한 항원을 1 μ g/ml의 농도로 그리고 conjugate는 1:4,000으로 했을 때 최적반응을 나타냄으로서 서등⁷과 Yen등³⁰이 보고한 conjugate 농도와는 약간의 차이가 있었다.

Tijssen등²⁸은 ELISA법에서 cut-off value를 결정함에 있어 t-분포를 이용하여 99.5%의 신뢰구간에서 결정하는 방법과 음성혈청의 흡광도 상한선(mean \pm S.D)으로 결정하는 방법을 제시 하였는데, 전자는 확정된 음성과 양성혈청이 없거나 표본의 수가 작을 때에는 위양성과 위음성의 결과를 나타내는 단점이 있으므로 저자들은 후자의 방법을 택하여 95%의 신뢰구간에서 음성과 양성이 판정되는 mean \pm 2 S.D.에 의하여 구한 흡광도 상한선을 cut-off value로 결정하였다.

Tijssen등²⁸은 면역글로블린의 양에 따른 dose-dependent 곡선은 sigmoidal형으로 나타나며 그 경사부에서 가장 정확한 역가가 측정된다고 하였다. 저자들이 dog IgG를 이용하여 dose-dependent 곡선을 작성한 결과도 sigmoidal형이었고 흡광도치의 cut-off value가 그 경사부에 위치하고 있어 그의 성적과 일치하였다.

Waltman등²², 서등⁷ 그리고 문²⁰은 돼지에서 ELISA법으로 특소플라즈마를 인공감염시킨 후 2주째에 항체를 검출할 수 있다고 보고 하였으나 저자들의 실험에서는 3주째 처음으로 항체 양성을 나타내는 개체가 있었고 4주째가 지나서야 모든 개체에서 양성으로 판정되어 이들의 성적과는 약간의 차이가 있었다. 그러나 IgG-ELISA법에서는 특소플라즈마 항체를 조기에 검출할 수 없고 IgM-ELISA법에서는 감염 후 1주째에 항체가 검출된다고 보고한 Lappin등^{3,4}의 성적과는 일치하였다. 그리고 서등⁷과 문²⁰이 돼지의 IgG항체는 감염 후 6주째에 최고치에 도달하여 그 이후 부터는 서서히 하강하여 개체에 따라 항체 지속기간이 상이하다고 보고 한 성적과도 비슷하였다.

Voller등²⁹은 최적농도의 항원을 microplate에 흡착시켜 4°C에 보존했을 때에는 항원의 안정성과 반응의 재현성은 3주간 유지 될 수 있다고 보고하였다. 저자들의 시험에서 4°C에 3주간의 보존에서는 Voller등²⁹의 성적과 일치하는 결과를 얻었다. 그러나 -25°C에

보존했을 때는 10주 까지도 항원의 안정성은 유지되었지만 반응재현성은 4주 이후 부터는 불규칙하였다.

따라서 흡착항원을 4°C 또는 -25°C에 4주 이상 보존했을 때는 항원의 안정성과 반응재현성은 불확실한 것으로 생각된다.

개에 대한 특소플라즈마병의 항체보유율은 외국의 경우 Miller와 Feldman³⁷은 색소시험법에서 59%, Lainson¹¹은 보체 결합반응 시험에서 42.5%, Vanderwagen¹⁰은 간접적현미경 응집반응에서 5%라고 보고하였으며, Germano,¹⁹ Lozano등⁴¹ 그리고 Maya⁴²는 간접형광항체법에서 90%, 79.5%, 52.5%라고 각각 보고 하였다. 그리고 Ahmed¹는 간접형광항체법으로 다른 질병과의 관계를 기술한 보고에서 leptospira병과 distemper에 이환된 개에서는 62.7% 그리고 tumor가 확인된 개에서는 28.8%의 항체보유율을 보고 한 있다.

저자들의 본 조사에서 국내의 일부 지역이긴 하지만 경남지역의 도살되는 개 312두에서 ELISA법에 의한 항체보유율은 28.5%이었다. 이와같은 결과는 다른 여러 연구자들이 조사 보고한 성적에 비하면 항체보유율은 비교적 낮은 편이었는데, 이는 검사방법의 차이도 있겠으나 고양이와 개의 직속빈도가 낮은 데서 기인된 것이거나 애완동물로서의 고양이의 사육두수가 적어 특소플라즈마의 전파에도 그 영향이 있었던 것으로 추측된다. 그러나 앞으로 고양이와 개에서의 특소플라즈마의 감염율은 더욱 확대하여 조사할 필요가 있다고 생각된다.

Dubey²와 Vanderwagen¹⁰은 개의 항체보유율 조사에서 성별의 차이는 없다고 하였고, 서등⁷도 돼지에 대한 조사에서 성별 항체보유율은 차이가 없다고 보고 하였다. 저자들의 성적에서도 암컷과 수컷은 각각 29.5%와 27.8%로 암수간의 유의성은 발견할 수 없었다. 그리고 항체양성인 야외개 89두에 대한 항체 역가별 분포에서 대부분의 개가 1:1024 이하의 항체가를 보임으로서 비교적 낮은 항체가를 나타내었다.

Voller,²⁹ Waltman등²²은 ELISA법이 특소플라즈마병의 혈청학적 진단법으로 활용될 경우 다른 방법에 비하여 민감하고 그 비용이 저렴하여 screen test에 이상적이라고 하였고 최근 Remington²⁷은 사람의 특소플라즈마병의 진단에는 IgM-ELISA법이 더 좋은 방법이라고 하였으며 Lappin등^{22,23}은 고양이에서 본 병의 조기진단에 IgM-ELISA가 유용하다고 하였다. 또한 Lappin등^{3,4}은 고양이에서 현존내 항원을 검출하는데 double-sandwich ELISA법을 사용하였고, Kasper등^{32,33}은 단클론성 항체로 항원을 증명하는 등 여러가지 방법이 시도되고 있다. 그리고 Kasper등^{32,33}은

Western blot(EITB)를 이용하여 톡소플라즈마의 발육단계별 항원 특이성을 증명하였고 국내에서도 최등³¹이 톡소플라즈마 세포막 단백질의 항원성을 증명한 바 있다.

이와 같이 동물에 있어서의 본 병의 진단법도 표준화가 이루어지는 것이 시급하며 특히 종속주인 고양이에서 단클론성 항체에 의한 항원내 항원을 직접 증명할 수 있는 기술의 개발이 시급하다고 생각 된다.

결 론

개 톡소플라즈마병의 신속, 정확한 진단법을 개발코저 *toxoplasma* 인공감염개와 도살되는 개로부터 채취한 혈청을 대상으로 하여 horse radish peroxidase conjugated rabbit anti-dog IgG(γ)를 이용한 ELISA법의 실험실진단 이용 가능성을 검토하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항원 제조에 사용된 *Toxoplasma*의 tachyzoite는 percoll density gradient 원심분리법으로 percoll 농도 50~60%에서 가장 순수하게 분리할 수 있었으며 항원의 단백질 농도는 1 μ g/ml, conjugate는 1:4,000의 농도로 했을 때 ELISA법에서 양성과 음성의 한계비(P/N ratio)가 가장 높았고 최저반응을 나타내었다.

2. Conjugate의 희석농도별 purified dog IgG(Sigma)에 대한 dose-dependent 곡선은 dog-IgG의 농도가 1ml 당 0.4 μ g 이하와 3.0 μ g 이상 일때 일정한 흡광도(OD)를 유지하는 sigmoidal형을 나타내어 dog IgG와 conjugate의 특이성이 인정되었다.

3. 개의 음성혈청에 대한 평균 흡광도(OD)는 0.243 \pm 0.066으로 cut-off value는 0.375로 측정되었다.

4. 인공감염개에서 혈청중의 IgG 항체는 *toxoplasma* 접종후 3주 째에 처음으로 출현하였으며 4주 째에는 6두 모두에서 출현하여 4~6주 째에는 최고 항체가를 보였고 그 후 부서는 약간 하락하여 17주째 까지도 일정한 역가가 지속되었다.

5. Polystyrene microplate에 흡착시킨 항원의 안정성과 반응재현성은 4 $^{\circ}$ C 보온에서는 3주까지 유지되었고 -25 $^{\circ}$ C 보온에서는 10주까지 안정성은 인정되었으나 반응재현성은 인정되지 않았다.

6. 도살되는 개 312두로부터 채취한 혈청에서 항체 보유율은 28.5%(89두)였으며 성별로는 암컷이 29.5%(39두), 수컷이 27.8%(50두)로 암수의 차이는 유의성이 없었다.

7. ELISA법은 개 톡소플라즈마병의 진단을 위한 민감하고 특이성이 높은 혈청학적 진단법으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Ahmed, BA, Gaafar, SM, Weirich, WE et al. Relationship of toxoplasma infecti on to other diseases in dogs. *Veterinary Parasitology* 1983;12:199~203.
2. Dubey, JP. Toxoplasmosis in dogs. *Canine Pract* 1985;12:7~28.
3. Lappin, MR, Greene, CE, Pretwood, AK et al. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *Am J Vet Res* 1989;50(9):1580~1585.
4. Lappin, MR, Greene, CE, Pretwood, AK, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. *Am J Vet Res* 1989;50(9):1586~1590.
5. Mello, U. Un cas de toxoplasmose du chien observe a turin. *Bull Soc Patho exot* 1910;3:359~363.
6. Luft, BJ, Remington, JS. Toxoplasmic encephalitis(AIDS commentary). *J Infect Dis* 1988; 157(1):1-6.
7. 서명득, 장동화, 주후돈. ELISA를 이용한 폐지 톡소플라즈마병의 조기진단에 관한 연구. 대한수의학회지 1989;29(4):567~575.
8. Averill, DR, deLahunta A. Toxoplasmosis of the canine nervous system: clinicopathologic findings in four cases. *J Am Vet Med Assoc* 1971;159(9):1134~1141.
9. Green, CE, Cook, JR et al. Clindamycin for treatment of toxoplasma polymyositis in a dog. *J A V MA* 1985;187(6):631~634.
10. Vanderwagen, LC, Behymer, DE, Riemann, HP et al. A survey for toxoplasma antibodies in northern califonia liverstock and dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1974;164(10):1034~1037.
11. Lainson, R. Toxoplasmosis in England II. Toxoplasma infections in dogs: the incidence of complement-fixing antibodies among dogs in London. *Ann Trop Med Parasit* 1956;50:172~186.
12. Mun JB. Serological survey of toxoplasmosis on swine by complement fixation inhibition test in

- Korea. *Bull Vet Res Lab* 1965;11(1):19~25.
13. Sabin, AB and Feldman, HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science* 1948;108:660~663.
 14. Walton, BC, Benchoff, BM, and 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.
 15. Balsari, A, Poli, G, Molina, V. ELISA for toxoplasma antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests. *J Clin Pathol* 1980;33:640~643.
 16. Suh, MD and Jang, DH. Studies on passive haemagglutination test and skin test for toxoplasmosis in swine. *Korean J Vet Res* 1972;12(1):51~55.
 17. Duram, TM and Colvin, HM. Pre-market evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagents. *J Clin Microbiol* 1978;7(3):255~260.
 18. Fletcher, S. Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Pathol* 1965;18:193~199.
 19. Germano, PML, Erbolato, EB, Ishizuka, MM. Serological survey of toxoplasmosis in dogs with the indirect immunofluorescent test in Campinas city. *Fac Med Vet* 1981;22(1):53~58.
 20. Moon, MH. Serological crossreactivity between sarcocystis and toxoplasma in pigs. *Korean J Parasit* 1987;25(2):188~194.
 21. Violand, SA, Mitchell, TG. and Kleeman, KT. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a quantitative indirect fluorescent antibody test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1982;16(2):341~344.
 22. Waltman, WD, Dreesen, DW, Prickett, MD. 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.
 23. Choi, WY, Yoo, JE, Nam, HW. Toxoplasma antibodies by indirect latex agglutination tests in zoo animals. *Korean J Parasit* 1987;25(1):13~23.
 24. Camargo, ME., Ferreira, AW, Mineo, JR. Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immunol* 1978;21(1):55~58.
 25. 全 永, 金東成, 朴根植等. 돼지의 톡소플라즈마 병에 대한血清學的 調査試驗. 農事試驗研究論文集. 1988;30(3):51~55.
 26. 金承浩, 金永珠. 濟州道에 있어서 toxoplasma 抗體分布에 關한 研究-1. 돼지, 고양이 및 食肉取拔者에 있어서의 toxoplasma 抗體分布에 대하여. 대한수의학회지. 1989;29(3):333~342.
 27. Naot, Y and 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.
 28. Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier inc. 1987;329~419.
 29. Voller, A, Bidwell, DE, Bartlett, A. A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* 1976;29:150~153.
 30. Yen, CCC, Yeh, JM and 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.
 31. Choi, WY, Nam, HW, Yoo, JE. Membrane protein and their antigenicity of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasit* 1988;25(3):155~162.
 32. Kasper, LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1989;57(3):668~672.
 33. Kasper, LH, Bradley, MS and Pfefferkorn, ER. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;132(1):443~449.
 34. 全 永, 李榮玉, 金相義等. 톡소플라즈마 原蟲(RH株)의 凍結保存에 關한 研究. 農事試驗研究論文集 1988;30(1):46~50.
 35. Harris, ELV and Angal, S. Protein purification methods. IRL press 1989;10~18.
 36. 강호조, 문무홍, 신중옥. 재래산양의 toxoplasma 항체조사. 경상대학 축산진흥연구소보. 1973;1:91~94.

37. Miller, LT, Feldmann, HA. Incidence of antibodies for toxoplasma among various animal species. *J Infect Dis* 1953;2:118~120.
38. 서두석. 전남지역의 톨 toxoplasma 감염조사연구. 대한수의사회지 1979;15(8):447~450.
39. Cornelissen, AWCA, Overdulve, JP and Hoenderboom, J.M. Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology* 1981;83:103~108.
40. Kenny, GE and Dunsmoor, CL. Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1983;17(4):655~665.
41. Lozano, ML., Campos, BM, Manas, AI, Reyes, MA. Sero-epidemiological study of canine toxoplasmosis in the province of Granada. *Vet Bull* 1986;57(8):661~662.
42. Maya, JJ. Serological survey of toxoplasmosis in dogs in Mexico City and its importance in public health. Summary of thesis. *Vet Bull* 1986;56(6):753~753.