

## Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단액 개발에 관한 연구

서 명 득·이 응 구  
경상대학교 수의과대학  
(1993년 7월 28일 접수)

### Development of antigen for the microplate latex agglutination test on toxoplasmosis in animals

Myung-deuk Suh, Eung-goo Lee  
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
(Received July 28, 1993)

**Abstract** : This study was conducted to develop a sensitized latex-antigen for serodiagnosis of toxoplasmosis in animals.

Tachyzoites of *T. gondii* (RH-strain) harvested from mouse peritoneal cavity were purified through the filtration of polycarbonate membrane (pore size, 3.0  $\mu\text{m}$ , Costar Co.) and disrupted by ultrasonicator.

The tachyzoite suspension was ultracentrifuged for 30 min at 60,000  $\times g$  (4 $^{\circ}\text{C}$ ) and the supernatant was used as a water-lysate antigen. Polystyrene latex particles of 0.8  $\mu\text{m}$  in diameter (Sigma) were used for the preparation of sensitized latex-antigen suspension.

The several parameters including the preparation conditions, incubation buffer, serum dilution buffer and stability of agglutination reactions were evaluated and the results obtained were summarized as follows :

1. The antigen consisting of a water-lysate of *T. gondii* tachyzoites was adsorbed onto polystyrene latex particles of 0.8  $\mu\text{m}$  in diameter by adding a latex suspension to an equal volume of diluted antigen solution and by incubating the mixture at 37 $^{\circ}\text{C}$  under different conditions.

2. The optimum incubation buffer used for the antigen sensitization was 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0).

3. The optimum serum dilution buffer used for the latex agglutination test was 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer (pH 7.4) containing 300 mM NaCl. But 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer (pH 7.4) containing 300-600 mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween-20 improved the agglutination patterns and cleared the background of microplate well without the effects on LA titer.

4. The time required for antigen sensitization was 40 and 60 min in incubation buffer (pH 8.0) at 37 $^{\circ}\text{C}$ . But the optimum time for antigen sensitization was min at 37 $^{\circ}\text{C}$ .

5. The optimum quantity of antigen adsorbed on latex particles for proper agglutination was the range of 20 to 32  $\mu\text{g}$  of latex particles.

6. The optimum concentration of the latex-antigen suspension for the proper agglutination reaction was determined as 0.2% (w/v).

\* 이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음

7. The specificity, rapidity and simplicity of the latex-particle agglutination test suggested that it might be adaptable to large scale serum screening.

**Key words** : canine, toxoplasmosis, latex, protozoan disease.

## 서 론

*Toxoplasma gondii*는 사람과 조류를 포함한 대부분의 온혈동물을 중간숙주로 하고 고양이과(felidae) 동물을 종숙주로 하는 편성세포질내 기생체인 원충이며<sup>1-3</sup> 임신한 사람과 동물에서는 유사산과 태아 기형을 일으키고<sup>1-4</sup> 최근에는 후천성면역결핍증(AIDS)환자에서 뇌염의 원인체로 중요시 되고 있다.<sup>5-7</sup>

이 원충에 의한 톡소플라즈마병은 사람과 동물에서 대부분 불현성 감염으로 경과하므로 이 병의 진단에는 원충을 직접 증명하는 방법<sup>8-10</sup> 보다 혈청학적진단법을 널리 이용하고 있다.<sup>8, 11-21</sup> Vanderwagen<sup>22</sup>은 톡소플라즈마병은 인수공통질병으로서 공중보건학적 측면에서 대단히 중요한 질병이며, 동물에서 톡소플라즈마 항체를 증명하는 것은 사람의 주위 환경에서 본 병원체의 오염 정도를 시사하는 것으로 오염원의 추적에 중요한 의미를 가진다고 하였다.

톡소플라즈마에 대한 항체를 혈청학적으로 증명하는 방법으로는 색소시험법(DT)<sup>8, 11, 13, 17</sup>, 보체결합반응(CF)<sup>23, 24</sup>, 간접적혈구응집반응(IHA)<sup>13, 19, 25</sup>, latex 응집반응(AL)<sup>4, 12, 13, 16, 21, 25-39</sup>, 간접형광항체법(IFA)<sup>11, 18, 23, 35, 40</sup>, 직접형광항체법(DFA)<sup>41</sup>, 효소면역측정법(ELISA)<sup>18, 20, 24, 28, 42, 43</sup> 및 western blot<sup>5</sup> 등이 이용되고 있다.

이중 가장 기본적으로 정확성이 높다고 인정되는 색소시험법은 항원으로서 살아 있는 총체와 accessory factor로 특정인의 혈청이 필요하며 고도의 숙련도를 요구하여 표준화 되기 어렵고<sup>17</sup>, 최근 각 실험실에 보편화 되어 있는 간접형광항체법과 효소면역측정법은 실험대상동물이 바뀔때 마다 conjugate를 각각 준비하여야 하며, 형광 현미경 또는 ELISA reader를 이용하여 판독하여야 하는 어려움이 있다.<sup>18, 24, 36, 40</sup>

그러나 최근에 널리 이용되고 있는 latex 응집반응은 그 진단 술식이 간단하며 특이성 있는 시약 및 고가의 장비를 준비하지 않아도 실험실에서 뿐만 아니라 야외에서도 판독이 가능한 장점이 있다.<sup>4, 12, 21, 27-29, 38, 39</sup>

Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>는 톡소플라즈마 latex응집반응 microtiter용 진단액을 개발하여 그 제조조건과 안정성을 검토하였고, Tsubota et al<sup>39</sup>은 돼지, 고양이, 마우스 그리고 토끼에서 혈구응집반응용 진단액과의 비교시험에

서 반응일치율이 90% 이상이었음을 보고하였다. Tsubota et al<sup>39</sup>은 사람에 대한 latex 응집반응(Toxo-MT)과 간접적혈구응집반응(Toxo-test)의 비교시험에서 반응일치율은 90.7% 그리고 Kobayashi et al<sup>25</sup>은 사람에서 색소시험법과의 비교시험에서 94%로 이 진단액이 실용화 가능성을 시사하였다. Dubey와 Thulliez<sup>13</sup>은 고양이에서, Murata<sup>33</sup>는 동물원에 있는 야생동물에서, Opel et al<sup>35</sup>은 양에서 톡소플라즈마 항체검출에, Suzuki와 Kobayashi<sup>37</sup>는 마우스의 혈중내 항원 검출에 latex 응집반응을 적용하기도 하였다.

국내에서는 최 등<sup>12, 28, 29</sup>이 사람에서, 이 등<sup>30, 31</sup>이 돼지에서, 서 등<sup>36</sup>이 개에서 그리고 최 등<sup>27</sup>이 동물원에 있는 야생동물에서 톡소플라즈마 항체검출에 본 방법을 적용한 바 있으나 이들은 모두가 일본에서 시판, 사용되고 있는 "Toxo-MT"를 구입하여 사용하였으며 latex 응집반응용 진단액을 직접 제조하여 사용한 예는 없다.

이에 저자들은 혈청학적진단법으로 톡소플라즈마병을 보다 간편하고 신속하게 진단하고자 latex particle을 이용한 microtiter용 진단액을 제조하고 그 제조 조건과 실용화 가능성을 검토한 바 약간의 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**공시 원충주** : 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양 받은 *Toxoplasma gondii*(RH-strain, 이하 Tp라 함)의 tachyzoite를 20-25g의 마우스 복강내에 연속 계대 유지하면서 실험에 공시하였다.

**공시혈청** : Latex 응집반응용 Kit<sup>38</sup>인 Toxo-MT(Eiken chemical Co.)와 간접형광항체법(이하 IFA라 함)에서 Tp 항체 음성인 생후 8개월에서 12개월령의 잡종개에 Tp 감염 마우스를 경구적으로 섭식케 하여 인공감염 시킨 후 42일째에 채혈하여 혈청여가가 1 : 128(Toxo-MT)인 것을 양성혈청으로, 인공감염 전에 채혈한 혈청을 음성혈청으로 공시하였다.

**Latex 입자** : 직경이 0.8 μm인 polystyrene latex bead (Sigma)를 사용하였다.

**항원감작용 및 혈청희석용 완충액** : 항원감작용 완충액으로는 0.1M sodium phosphate buffer (SPB, pH 7.2), 0.1M Tris-HCl buffer (Ph 8.0) 및 0.1M carbonate-bicarbonate buffer (CBB, pH 9.6)를, 혈청희석용 완충액으로

는 0.1M sodium phosphated buffer (SPB, pH 7.2), 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 그리고 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 NaCl이 150 및 300mM의 농도가 되도록 첨가한 buffer (이하 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer, pH 7.4 라 함)를 사용하여 checker-board titration 한 후 최적 항원 감각용 완충액과 혈청회석용 완충액으로 결정하였다.

**혈청회석용 완충액에 사용된 첨가제 :** 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer (pH 7.4)에 bovine serum albumine (BSA, Fraction V, Sigma)이 0.5% 그리고 Tween-20 (이하 T-20 이라 함)이 0.005, 0.01, 0.03, 0.05%가 각각 함유되도록 제조하여 혈청회석용 완충액의 최적 농도를 결정하였다.

**항원생산 :** Tp tachyzoite를 체중 20~25g의 마우스의 복강내에 접종하고 3~4일 후 복강으로 부터 원충을 PB-S (pH 7.4)로 채취한 후 1,800×g에서 10분간 3회 원심 세척하여 PBS에 부유시키고 26G 주사침에 수회 통과시켜 응집된 원충과 마우스 복강세포를 분리하였다. 원충을 순수분리하기 위하여 polycarbonate membrane (pore size, 3.0 μm; Costar Co.)에 원충부유액을 여과한 후 PBS로 1,800×g에서 10분간 2회 원심 세척하고 멸균증류수에 부유시킨 다음, 초음파 분쇄기에서 30초 동안 10회 분쇄한 후 60,000×g (4°C)에서 30분간 원심하여 상층액을 -70°C에 보관하면서 항원으로 사용하였다. 항원의 총단백량은 bicinchoninic acid (BCA; Pierce) assay법<sup>14</sup>으로 측정하였다.

**Latex 응집반응용 진단액의 제조 :** Polystyrene latex bead 부유액을 항원감작용 완충액으로 4,000×g에서 20분간 원심 세척한 다음, 같은 완충액으로 2% (w/v) 되게 부유시키고 여기에 동량의 항원을 가한 다음 감각조건과 시간을 달리하여 감각시켰다.

감작이 끝난 다음 4,000×g에서 20분간 원심한 다음, 그 상층액은 latex particle에 감작되지 않은 항원의 양을 측정하기 위하여 채취하고 같은 완충액으로 2회 원심 세척하였다. 침전되어 있는 감작항원 (latex-antigen)은 0.5% BSA가 함유되어 있는 같은 완충액으로 농도를 달리하여 진단액을 제조하였으며 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**Latex 응집반응의 수행 :** U자형 microplate (Green cross Co)의 각 홈에 혈청회석용 완충액 25 μl 씩을 분주한 다음, 피검혈청을 혈청회석배수 1:4에서 1:2048까지 2배 단계 희석하였다. 여기에 제조한 진단액 (latex-antigen)을 각 홈에 25 μl 씩 분주하여 가볍게 진탕시킨 후 실온에서 하룻밤 반응시켜 응집상을 관찰하여 결과를 판독하였다.

**응집상의 판독 :** 강한 응집이 일어나 홈 둘레로 부터

떨어져 응집되어 있는 것을 3, 홈 전체에 응집이 일어난 것을 2, 홈의 1/2 이상 응집된 것을 1, 치밀한 침강상 주위로 약간 응집된 것을 0.5 그리고 치밀한 침강상 만을 보인 것을 0으로 판독하였다.

## 결 과

**항원감작용 및 혈청회석용 완충액의 결정 :** 항원감작용 완충액과 혈청회석용 완충액의 조성을 달리하여 피검혈청에 대한 혈청역가를 checker-board titration 한 결과는 Table 1에서와 같이 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.2)와 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 혈청을 희석하였을 경우에는 적합한 응집상을 관찰할 수 없었으나 혈청회석용 완충액인 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 NaCl을 첨가하였을 때 양성과 음성이 구별되는 응집상이 관찰되었고, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 항원을 감작하고 300mM NaCl을 함유한 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer (pH 7.4)로 혈청을 희석하였을 때에는 응집상과 침강상이 더욱 명확하게 나타났다.

**혈청회석용 완충액의 NaCl 농도 결정 :** 응집반응상과 NaCl의 농도와의 상관관계를 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 NaCl의 농도가 200mM 이하에서는 혈청회석배수가 높을수록 응집상이 불규칙하였으나 300~400mM의 농도에서는 응집상과 침강상이 명확하게 나타났다.

**첨가제와 반응상의 비교 :** 300mM NaCl이 함유된 혈청회석용 완충액에 BSA를 0.5% 그리고 T-20을 각 농도별로 첨가하여 피검혈청의 역가와 응집상을 조사한 성적은 Table 3에서와 같이 BSA는 0.5% 그리고 T-20은 0.01%가 함유되도록 첨가하였을 때 최적의 응집상과 침강상을 나타내었다.

**Latex 감작항원의 농도 결정 :** Latex-antigen의 농도별로 피검혈청의 역가와 응집상을 조사한 성적은 Table 4에서와 같이 latex-antigen의 농도가 0.15%와 0.1% 일 때는 혈청회석배수가 높을수록 응집상이 불규칙하였으며 0.5%에서는 양성혈청역가의 하강을 보였고, 0.2%에서는 최적의 응집상과 침강상을 나타내었다.

**항원의 감작조건 결정 :** 항원의 감작조건에 따른 응집반응상을 조사한 성적은 Table 5에서와 같이 4°C에 하룻밤 감작하였을 때에는 피검혈청의 희석배수가 높을수록 응집상과 침강상이 불규칙하였으나 37°C, 60분간 감작에서는 최적의 응집상과 침강상을 나타내었다.

**항원의 감작시간 결정 :** 항원의 감작시간과 결합된 항원량에 따른 응집반응상을 조사한 성적은 Table 6에서와 같이 37°C, 20분과 120분 감작에서는 피검혈청의 희석배수가 높을수록 불규칙한 반응상을 나타내었고

**Table 1.** Determination of antigen incubation buffer and serum dilution buffer

Antigen incubation buffer	Serum dilution buffer	Serum	Reciprocal serum titer										Control
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
0.1M SPB (pH7.2)	SPB	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
		N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Tris-HCl	P	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	*Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0
		N	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	**Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	0.5
		N	3	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5
0.1M Tris-HCl (pH8.0)	SPB	P	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2
		N	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Tris-HCl	P	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		N	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	2
	*Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0
		N	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	**Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	3	2	2	2	0.5	0	0	0
		N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1M CBB (pH9.6)	SPB	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
		N	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Tris-HCl	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
		N	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	*Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2
		N	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	**Tris-HCl-NaCl	P	3	3	3	2	2	2	2	2	0.5	0	2
		N	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Antigen concentration : 2mg/ml.

Incubation condition : 37°C. 60mins.

\* containing 150mM NaCl, \*\* containing 300mM NaCl

Score : agglutination pattern

P : Positive canine serum

N : Negative canine serum

37°C, 40분과 60분 감각에서는 반응상의 큰 차이는 없었으나 60분 감각에서 최적의 반응상을 나타내었다.

**감작시 항원의 농도 결정 :** 감작시 요구되는 항원의 농도별과 latex particle에 결합되는 항원단백결합량 및 혈청역가와의 관계를 조사한 성적은 Table 7에서와 같이 항원액의 단백질농도는 0.75~1.7mg/ml이고 latex입자 1mg당 항원단백결합량이 19.5~32µg일때는 혈청역가에 큰 차이가 없는 적합한 응집상과 침강상을 나타내었으나 항원단백농도가 0.42mg/ml 이하이고 latex입자와의 항원단백결합량이 13.75µg 이하일 때는 항체 과잉에 의한 양성혈청 역가의 상승을 그리고 음성혈청에서는 불안정한 응집상과 침강상을 나타내었다.

## 고 찰

Lunde와 Jacobs<sup>15</sup>는 latex응집반응에서 혈청희석액으로 생리식염수를 사용하였고 다른 완충액이 필요치 않다고 하였으며, Bozdeh와 Jira<sup>26</sup>는 특수플라즈마 latex응집반응에 pH 8.2의 완충액을 사용하였다. Singer와 Plotz<sup>44</sup> 그리고 Oreskes와 Singer<sup>45</sup>는 rheumatoid factor 측정용의 가토 γ-globulin의 등전점과 latex입자의 안정성을 기하기 위하여 pH 8.0~8.2의 완충액을 사용하는 것이 적합하다고 하였다.

저자들의 성적을 이들의 성적과 비교할 때 항원감작용 완충액과 혈청희석용 완충액의 pH는 같은 범위내에 있었으나 혈청희석용 완충액의 경우에는 Lunde와 Jacobs<sup>15</sup>가 생리식염수 이외의 다른 완충액이 필요치 않다고 한 성적과는 차이가 있었다.

Tsubota와 Ozwa<sup>38</sup>는 특수플라즈마 latex응집반응 mic-

**Table 2.** Determination of optimal NaCl concentration of serum dilution buffer

Concentration of NaCl(mM)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
		4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
25	P	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	N	2	2	1	0	0	2	2	2	2	2	2
50	P	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	N	2	2	2	1	0	0	2	2	2	2	2
100	P	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	N	2	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2
150	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
	N	2	1	0	0	0	0	0	1	2	2	2
200	P	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
	N	1	1	0	0	0	0	0	2	2	2	2
300	P	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0	0	0
	N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	P	3	3	2	2	0	1	0.5	0	0	0	0
	N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	P	3	3	2	2	2	2	0.5	0	0	0	0
	N	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Antigen concentration : 2mg/ml

Incubation condition : 37°C, 60mins

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4)

**Table 3.** Relations between the additives of serum dilution buffer and LA titer

Additives NaCl(mM)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
		4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
Not added	P	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0	0	0
	N	2	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5% BSA	P	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0	0	0
	N	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5% BSA/ 0.05% T-20	P	3	1	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0
	N	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5% BSA/ 0.03% T-20	P	3	1	1	1	1	0.5	0	0	0	0	0
	N	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0.5% BAS/ 0.01% T-20	P	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	0	0
	N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5% BSA/ 0.005% T-20	P	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	0
	N	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Antigen concentration : 2mg/ml Incubation condition : 37°C, 60 mins

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4) containing 300mM NaCl

rotiter용 진단액(Toxo-MT)의 생산과 이용성 검토에서 latex입자의 안정성을 기하고 항원감작시에는 항원의 불활화를 막기위하여 항원감작용 완충액의 pH는 7.0~10.0의 범위가 적합하고, 혈청희석용 완충액의 pH는 7.0~9.0의 범위가 요구된다고 하였으며 혈청희석용 완충액으로는 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)와 0.2M amino-

methylpropanol-HCl buffer(pH 8.0)가 정상적인 응집반응과 항체가를 나타내었다고 하였다.

그러나 저자들은 이 시험에 공시한 항원감작용 및 혈청희석용 완충액의 pH와 완충액의 조성을 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>와의 그것과 동일하게 제조하여 응집반응을 수행하였으나 응집상과 침강상을 관찰할 수 없었다. 따라

**Table 4.** Optimal concentration of the sensitized latex-antigen suspension

Latex-antigen conc.(%)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
		4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
0.25	P	3	2	2	2	2	0.5	0	0	0	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.20	P	3	2	2	2	2	1	0.5	0	0	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.15	P	3	2	2	2	2	2	0.5	0	0.5	0.5	0.5
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5
0.10	P	2	2	2	2	2	0.5	0.5	0.5	2	2	2
	N	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0.5	2

Antigen concentration : 2mg/ml Incubation condition : 37°C, 60 mins

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4) containing 300mM NaCl, 0.5% BSA, and 0.01% T-20

**Table 5.** Relations between incubation condition, amount of antigen bound to latex particles and LA titer

Incubation condition	Bound antigen /unit latex particle weight(μg/mg)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
37°C 60 min	25.7	P	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0	0	0
		N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C Overnight	21.8	P	3	3	2	2	2	2	0.5	0	0.5	0.5	0
		N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Antigen concentration : 2mg/ml.

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4) containing 300 mM NaCl, 0.5% BSA, and 0.01% T-20

**Table 6.** Relations between incubation time, amount of antigen bound to latex particles and LA titer

Incubation time (min)	Bound antigen /unit latex particle weight(μg/mg)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
20	22.2	P	3	3	3	3	3	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0
		N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	24.8	P	3	3	3	3	1	1	0.5	0	0	0	0
		N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	27.7	P	3	3	3	3	2	2	1	0	0	0	0
		N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	25.2	P	3	3	3	3	2	2	0.5	0	0	0.5	0
		N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Antigen concentration : 2mg/ml. Incubation condition : 37°C

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4) containing 300 mM NaCl, 0.5% BSA, and 0.01% T-20

서 이들 완충액에는 어떤 다른 요인으로서 염류가 관여할 것으로 추측되어 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 환경을 감작하고 여기에 NaCl 300mM을 첨가한 완충액을 혈청희석용 완충액으로 하여 반응시켰을 때에는 응집상과 침강상을 관찰할 수 있었다.

이와같은 결과로 보아 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>의 성적과는 달리 latex응집반응에는 적정농도의 NaCl이 첨가되어야 하는 것으로 추측되었으며 한편 Suzuki와 Kobayashi<sup>37</sup> 그리고 최 등<sup>27~29</sup>이 latex 응집반응에 NaCl이 함유된 P-BS(pH 7.4)를 그리고 Suzuki와 Remington<sup>7</sup>이 직접응집

**Table 7.** Relations between antigen concentration, amount of antigen bound to latex particles and LA titer

Antigen concentration (mg/ml)	Bound antigen /unit latex particle weight(μg/mg)	Serum	Reciprocal serum titer										Control
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
1.7	32.0	P	3	3	3	3	2	2	1	0.5	0	0	0
		N	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.84	23.7	P	3	3	3	3	2	2	1	0.5	0	0	0
		N	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	19.5	P	3	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0	0
		N	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.42	13.75	P	3	3	3	3	3	2	2	1	0.5	0	0
		N	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0.21	7.75	P	3	3	3	3	3	2	2	1	2	2	3
		N	3	3	1	0.5	0	0	0	0	0	0	3
0.10	5.25	P	3	3	3	3	3	2	2	1	1	0	0
		N	1	1	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05	2.7	P	3	3	3	3	2	2	2	2	1	1	0
		N	3	3	1	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
0.03	0.76	P	3	3	3	3	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0
		N	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

Antigen incubation buffer : 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)

Incubation condition : 37°C, 60 mins

Serum dilutio buffer : 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer (pH 7.4) containing 300mM NaCl, 0.5% BSA, and 0.01% T-20

반응에 0.1M PBS (pH 7.2)를 사용한 점을 고려할 때 이들 응집반응에 있어서는 NaCl이 함유된 완충액이 요구되는 것으로 생각된다.

따라서 저자들은 이 시험에서 혈청희석용완충액에 가해지는 NaCl의 적정농도의 범위를 정할 필요가 있다고 판단되어 이의 첨가농도를 최저 25mM에서 최고 600mM까지 각각 다르게 하여 시험한 결과, 25~200mM 이하 일때에는 혈청희석배수가 높을수록 응집반응이 불규칙하였으나 300~600mM의 농도에서는 정상적인 응집상과 침강상을 나타내었다. 이와같은 결과로 보아 latex 응집반응에 있어서 latex 감작항원과 피검혈청이 1:1의 비율로 혼합될 경우 혈청희석용 완충액 중에는 NaCl가 300mM(생리식염수 농도) 또는 그 이상의 농도가 함유되어야 정상적인 응집반응이 일어날 수 있다는 것을 암시해 주는 것으로 생각되었다.

이에 저자들은 이 시험의 수행과정에서 생리식염수 농도에 가장 가까운 300mM의 NaCl을 첨가한 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4)를 혈청희석용 완충액으로 결정하였다.

Suzuki와 Remington<sup>7</sup>은 독소플라즈마 latex 응집반응용 항원제조에서 formalin으로 고정시킨 Tp tachyzoite 항원 부유액에 1% BSA를 첨가했을 때 좋은 반응결과를 얻었다고 하였으며, Harlow와 Lane<sup>46</sup>은 항원·항체 반응에 sorbent(T-20), 온도 및 pH 등이 큰 영향을 미

친다고 하였다.

저자들은 이 시험에서 응집상과 침강상을 관찰할 때 Plate 홈의 상층에 약간의 부유물이 생성되어 있어 이의 제거가 필요하다고 생각되어 혈청희석용 완충액(0.1M Tris-HCl-NaCl buffer)에 첨가제로서 0.5% BSA 그리고 T-20의 농도를 각각 다르게 첨가하여 응집반응을 실시한 바, 0.5% BSA와 0.01% T-20을 첨가한 0.1M Tris-HCl-NaCl Buffer를 사용했을 때 부유물이 제거되었으며 최적의 응집상과 침강상을 나타냄으로써 반응상이 더욱 개선되었다. 이와같은 결과로 보아 Harlow와 Lane<sup>46</sup> 및 Suauki와 Remington<sup>7</sup>이 언급한 바와 같이 BSA와 T-20은 latex 응집반응에서 비특이적인 반응을 제거해 주는데 중요한 역할을 하는 것으로 믿어진다.

Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>는 독소플라즈마 latex 응집반응 microtiter용 진단액(Toxo-MT)을 처음 개발하면서 이 진단액의 응용에 필요한 제조조건과 안정성을 검토하였는데 그중 polystyrene latex particle의 크기(직경)에 따른 적합성 시험에서 0.8μm와 1.0μm보다 0.9μm의 latex 입자를 사용했을 때 가장 적합한 반응을 나타내었다고 보고하였다. 저자들은 이 시험에서 직경 0.8μm의 latex 입자를 사용하였던 바, Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>의 성과 같은 결과를 얻었으며 0.8μm의 latex 입자도 이 진단액 생산에 사용될 수 있다고 믿어진다.

Latex 입자와 감작시 항원액의 농도를 2mg/ml<sup>2</sup>으로

고정하고 latex 입자와 감작시킨 latex-항원 부유액(latex-antigen suspension)의 적정 농도를 조사한 시험에서 부유액의 농도가 0.15%와 0.1% 일 때에는 피검혈청의 희석배수가 높을 수록 응집상이 불규칙 하였고, 0.25%에서는 양성혈청역가의 하강을 보였으며 0.2%에서는 적합한 응집반응을 나타냄으로서 이는 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>가 0.1% 부유액이 최적의 농도라고 보고한 성적과는 차이가 있었는데 이와같은 결과는 latex 입자의 크기와 감작항원의 단백질결합량의 차이에서 기인된 것으로 추측된다.

Latex 입자에 독소플라즈마 항원액을 감작할 때 최적 조건으로서 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>는 37°C, 40분이라 했고, Lunde와 Jacobs<sup>15</sup>는 4~5°C, 72시간 그리고 Bozdech와 Jira<sup>26</sup>는 37°C, 2시간 이라 하였다. 저자들의 항원감작조건 시험에서는 4°C에서 하룻밤 감작시키는 것 보다는 37°C, 60분간 감작시켰을 때 적합한 반응을 나타내어 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>의 성적과는 대체로 일치 하였으나 다른 연구자들<sup>15, 26</sup>의 성적과는 차이가 있었다.

Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>는 latex 입자 1mg당 항원단백결합량과 항체가의 관계조사에서 항원단백결합량이 22.4~37.6 µg/mg 일때 최적의 항체가를 얻었다고 보고하였다. 저자는 항원단백결합량을 24.8~27.7 µg/mg으로 하고 감작시간을 40분과 60분으로 했을 때 응집상과 혈청역가에는 큰 차이가 없었던 것으로 보아 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>의 성적과 일치하는 것으로 보인다.

한편 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>는 직경 0.9 µm의 latex 입자를 사용하여 항원의 단백질농도가 0.89~1.78 mg/ml 일때 latex 입자 1mg당 항원단백결합량은 20~40 µg이라 하였고, Makioka와 Kobayashi<sup>16</sup>는 특이항원인 P30을 사용했을 때 60~70 µg이라 하였다. 저자들의 시험에서는 항원액의 단백질농도가 0.75~1.7mg/ml일때 항원단백결합량은 19.5~32.0 µg/mg이었으며 이때 혈청역가에는 큰 차이없이 정상적인 응집상과 침강상을 보였다. 그러나 항원액의 단백질농도가 0.42~0.03 µg/mg이고 항원단백결합량이 13.7~0.76 µg/ml 일 때에는 불규칙한 응집반응상을 나타내었다. 이와같은 결과는 Tsubota와 Ozawa<sup>38</sup>가 latex 입자 1mg당 항원단백결합량이 22.4~37.6 µg/mg 일때 최적의 항체가를 얻었다고 보고한 성적과는 일치하였으나 Makioka와 Kobayashi<sup>16</sup>의 성적과는 큰 차이가 있었다. 이러한 결과는 연구자들<sup>16, 38</sup>의 항원제조과정의 차이에서 온 것으로 추측된다.

이상과 같이 검토된 제조조건하에서 제조된 latex 응집반응 microtiter용 진단액의 실용화를 위해서는 기존의 진단법과 반응일치율을 비교 검토하고 진단특이성의 검정과 진단액의 보존성 및 안정성 시험이 이루어져야

할 것으로 생각된다.

## 결 론

독소플라즈마병의 혈청학적 진단법으로 알려져 있는 현행 각종 진단법보다 신속하고 정확하며 간편하게 이용할 수 있는 진단액을 개발코져 latex particle을 이용한 microtiter용 진단액(Kit)을 생산하여 이의 제조 및 응용에 관련되는 제조조건을 검토한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 직경이 0.8 µm인 polystyrene latex bead는 독소플라즈마 수용성 항원을 감작시킨 latex-antigen의 생산에 이용될 수 있었다.

2. Latex 응집반응에 적합한 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)였으며혈청희석용 완충액은 300~600mM의 NaCl의 첨가된 0.1M Tris-HCl-NaCl buffer(pH 7.4)가 적합하였다.

3. 혈청희석용 완충액에 0.5% BSA와 0.01% Tween-20을 첨가하였을 때 latex 응집반응상은 더욱 개선되었다.

4. 항원액의 감작에 소요되는 시간은 37°C에서 40분과 60분이 적합하였다.

5. Latex 입자와 항원액의 감작시 항원액의 농도를 0.75~1.7 mg/ml으로 하였을 때 Latex 입자와 결합되는 항원단백결합량은 20~32 µg이었으며 이들 농도에서 최적의 응집반응을 나타내었다.

6. Latex 응집반응용 시제품인 latex-antigen 부유액의 사용 농도는 0.2%(w/v)가 적정 농도였다.

7. Micro-latex 응집반응은 민감하고 특이성이 높아 신속하고 정확한 독소플라즈마병의 진단법으로 이용될 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Benjamin JL. *Toxoplasma gondii*. Parasitic infections in the compromised host. edited by Peter D. Walzer, Marcel Decker Inc., New York and Basel. 1989 ; 179~253.
2. Levine BJ, Brooks RG, Conley FK, et al. Taxonomy of toxoplasma. *J Protozool* 1977 ; 24 : 36~41.
3. Levine ND. Veterinary protozoology. 1st ed. Iowa state University Press Ames. 1985 ; 248~254.
4. Tsubota N, Hiraoka KI, Sawada Y. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis ; (2)Evaluation of the microtiter test as a serologic test for toxoplasmosis in man. *Jpn J Parasitol* 1977 ; 26(4) : 286~290.



5. Louis MW, Stephen AU, Herbert T, et al. Western blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and toxoplasmic encephalitis : antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. *J Infect Dis* 1988 ; 157(1) : 7~13.
6. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAVMA* 1984 ; 17 : 913~917.
7. Suzuki Y, Remington JS. Importance of membrane-bound antigens of *Toxoplasma gondii* and their fixation for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28(10) : 2354~2356.
8. Choi WY. The isolation of form pork and the dye test of swine sera. *J Catholic Med Coll* 1969 ; 16 : 229~235.
9. Mun JB. Serological survey of toxoplasmosis on swine by complement inhibition test in Korea. *Bull Vet Res Lab* 1965 ; 11(1) : 19~25.
10. 문무홍. 도축돈에서 toxoplasma의 분리와 분리주에 대한 병원성 시험. 한국수의공중보건학회지 1991 ; 15(1) : 111~125.
11. Bryce CW, Benchoff BM, Brooks WH. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg* 1966 ; 15(2) : 149~152.
12. Choi WY, Yoo JE, Chung CS. *Toxoplasma* antibodies by latex agglutination test in national seoul mental hospital patients. *Korean J Parasit* 1983 ; 21(2) : 281~285.
13. Dubey JP, Thulliez Ph. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *JAVMA* 1989 ; 194(9) : 1297~1299.
14. Harris ELV, Angal S. Protein purification methods. *IRL press*. 1989 ; 10~18.
15. Lunde MN, Jacobs L. Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* 1967 ; 53 : 933~936.
16. Makioka A, Kobayashi A. Evaluation of a commercial kit for toxoplasma direct agglutination test. *Jpn J Parasitol* 1989 ; 38(4) : 179~183.
17. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite(toxoplasma). *Science* 1948 ; 108 : 660~663.
18. Shirley AV, Mitchell TG, Kleeman KT. Comparison of an enzyme-linked immunoassay and a quantitative indirect fluorescent-antibody test with the conventional indirect fluorescent-antibody test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1982 ; 16(2) : 341~344.
19. 서명득, 장두환. 돼지 toxoplasmosis의 간접적혈구 응집반응과 피내반응에 관한 연구. 대한수의학회지 1972 ; 12(1) : 51~58.
20. 서명득, 주후돈, 이병훈. 효소표시 면역검사법을 이용한 개톡소플라즈마병의 혈청내 항체검출에 관한 연구. 대한수의학회지 1991 ; 31(4) : 491~500.
21. Tess AJ, Crozier SJ, Buxton D, et al. Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis : an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titers after experimental oocyst-induced infections. *Res Vet Sci* 1989 ; 46 : 67~72.
22. Vanderwagen LC, Behymer DE, Riemann HP, et al. A survey for toxoplasma antibodies in northern california livestock and dogs. *JAVMA* 1974 ; 164(10) : 1034~1037.
23. Lainson R. Toxoplasmosis in england II. Toxoplasma infections in dogs : the incidence of complement-fixing antibodies among dogs in London. *Ann Trop Med Parasitol* 1956 ; 50 : 172~186.
24. 서명득, 장동화, 주후돈. ELISA를 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기 진단에 관한 연구. 대한수의학회지 1989 ; 29(4) : 567~575.
25. Kobayashi A, Hirai N, Suzuki Y. Evaluation of a commercial toxoplasma latex agglutination test. *Jpn J Parasitol* 1977 ; 26(3) : 175~180.
26. Bozdece V, Jira J. latex-agglutination test mit dem toxoplasma antigen. *Deut Gesundh* 1961 ; 16 : 2398~2400.
27. Choi WY, Yoo JE, Nam HW. Toxoplasma antibodies by indirect latex agglutination test in zoo animals. *Korean J Parasit* 1987 ; 25(1) : 13~23.
28. Choi WY, Nam HW, Youn JH, et al. Toxoplasma antibody titers by indirect latex agglutination test in patient of kangnam st. mary's hospital and cheju medical center. *Korean J parasit* 1989 ; 27(3) : 171~175.
29. Choi WY, Nam HW, Youn JH, et al. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Korean J parasit*

- 1992 ; 30(1) : 83~90.
30. 이주홍, 이순선, 이국천. Latx 응집반응에 의한 경남지방의 한우 및 돼지 혈중의 *Toxoplasma gondii* 항체조사. 가축위생 및 보건사업 결과. 가축위생연구소 1980 ; 239~244.
  31. 이병원, 황보원, 변유성 등. 경남 중부지역에서의 Latex 응집반응을 이용한 돼지 톡소플라즈마병 항체분포조사. 가축위생시험연구논문집 1992 ; 3 : 14~21.
  32. Makioka A, Kobayashi A. Use of a purified major surface protein of *Toxoplasma gondii* in a latex agglutination test. *Jpn J Parasitol* 1989 ; 38(2) : 100~105.
  33. Murata K. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in zoo animals and other animals. *Jpn J Vet Sci* 1989 ; 51(5) : 935~940.
  34. Naginton J, Martin AL, Balfour AH. A rapid method for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* using modification of the toxoreagent latex test. *Tec Method* 1982 ; 361~362.
  35. Opel U, Charleston WAG, Pomroy WE, et al. A survey of the prevalence of toxoplasma infection in goats in new zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence test. *Vet Parasitol* 1991 ; 40 : 181~186.
  36. 서명득, 이병훈, 이응구. Latex 응집반응과 간접형 광학체법을 이용한 개 톡소플라즈마병의 혈청학적 진단. 대한수의학회지 1992 ; 32(4) : 641~647.
  37. Suzuki Y, Kobayashi A. Detection of circulating antigens by latex particles coated with anti-toxoplasma antibodies during acute infections with *Toxoplasma gondii* in mice. *Jpn J Parasitol* 1985 ; 34(3) : 149~153.
  38. Tsubota N, Ozawa H. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis ; (1) Preparative conditions and stability of the reagent. *Jpn J Parasitol* 1977 ; 26(4) : 276~285.
  39. Tsubota N, Hiraoka K, Sawada Y. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis ; (3) Evaluation of the microtiter test as a serologic test for toxoplasmosis in some animals. *Jpn J parasitol* 1977 ; 26(4) : 291~298.
  40. Durham TM, Colvin HM. Premarket evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagents. *J Clin Microbiol* 1978 ; 7(3) : 255~260.
  41. 전영, 서명득. 톡소플라즈마병에 관한 I. 직접형 광학체법에 의한 감염 장기내 톡소플라즈마 원충검출. 농사시험연구보고 16집(가축위생편) 1974 ; 35~40.
  42. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassay for parasitic diseases. *Trans Roy Soci Trop Med Hyg* 1976 ; 70(2) : 98~106.
  43. Voller A, Bidwell DE, Brtlett A, et al. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Path* 1976 ; 29 : 150~153.
  44. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. I. Application to serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1956 ; 21 : 888~892.
  45. Oreskes I, Singer JM. The mechanism of particulate carrier reactions I. Adsorption of human- $\gamma$ -globulin to polystyrene latex particles. *J Immunol* 1961 ; 86 : 338~343.
  46. Harlow and Lane. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988 ; 25~27.