한국가축위생학회지 제35권 제4호 (2012) Korean J Vet Serv, 2012, 35(4), 269-273 pISSN 1225-6552, eISSN 2287-7630 http://dx.doi.org/10.7853/kjvs.2012.35.4.269

Korean Journal of Veterinary Service

Available online at http://kives.org

<Original Article>

소 브루셀라병 표준시험관응집반응법 진단효율 평가

성소라 · 김지연* · 허 문 · 이기찬 · 구정희 · 강성일 · 이향근 · 김숙미 · 정석찬 농림수산검역검사본부 동식물위생연구부 세균질병과 브루셀라병 OIE 표준실험실

Evaluation on diagnostic efficiency of the standard tube agglutination test for bovine brucellosis

So-Ra Sung, Ji-Yeon Kim*, Moon Her, Kichan Lee, Jeong-Hui Gu, Sung-Il Kang, Hyang-Keun Lee, Suk-Mi Kim, Suk-Chan Jung

OIE Reference Laboratory for Brucellosis, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

(Received 31 October 2012; revised 27 November 2012; accepted 30 November 2012)

Abstract

A confirmatory serological test, the standard tube agglutination test (STAT) is evaluated for the diagnostic efficiency in brucellosis Korea. A total of 345 bovine samples were collected from regional veterinary branch under national brucellosis monitoring program from January 2010 to June 2012 in Korea. These samples were diagnosed as suspected serum and brucellosis positive by the Rose Bengal test (RBT) and the STAT, respectively. The STAT was compared and evaluated with three serological test such as the indirect-enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA), competitive-enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) and fluorescence polarisation assay (FPA) prescribed for international trade by OIE. Among the 345 bovine serum samples, 302 (87.5%) were diagnosed as positive in the STAT, while 215 (62.3%), 223 (64.6%) and 194 (56.2%) serum samples were diagnosed as positive for brucellosis in the I-ELISA, C-ELISA and FPA, respectively. The STAT showed quite high positive results as compared with three prescribed tests of OIE. FPA, I-ELISA and C-ELISA have shown 60.6%, 64.9% and 67.2% correlation, respectively as compared to the STAT. However correlations of three prescribed tests ranged high 84.1~97.7%. Especially, correlation between I-ELISA and C-ELISA is quite high, 97.7%. These results suggest that the STAT has shown many false-positive reactions. Therefore, additional serological test, such as ELISAs and FPA, would be necessary to adopt as a confirmatory test in the national surveillance program of bovine brucellosis in Korea.

Key words: Brucellosis, Serological test, STAT, FPA, ELISA

서 론

브루셀라병은 소, 돼지, 개, 양, 말 등에서 발생하는 세균성 전염병으로 가축전염병예방법상 제2종 가축 전염병인 동시에 세계동물보건기구(OIE) 지정전염병이다. 또한, 사람에게도 감염되는 인수공통전염병으로 공중위생상 매우 중요한 질병이다(Kim 등, 1982;

OIE, 2008; Quinn 등, 1994; Hur 등, 2007).

감염된 소의 유산태아 또는 분만 시 배설되는 태반이나 분비물, 젖소의 우유 등이 주요 전염원이 된다. 사람에서는 브루셀라균에 감염된 소, 돼지, 개, 양, 말등 가축을 통해 병원균이 상처 난 피부나 결막을 통해 전파되거나 멸균처리 되지 않은 유제품을 섭취하면 전염된다. 브루셀라병에 감염된 가축의 암컷에서는 불임증과 임신 후기 유산을 일으키고 수컷에서는 고환염, 전립선염 등 번식장애를 보이며, 사람에서는

^{*}Corresponding author: Ji-Yeon Kim, Tel. +82-31-467-1829, Fax. +82-31-467-1778, E-mail. kimjiyeon75@korea.kr

지속적 또는 간헐적인 발열, 오한, 두통, 체중감소, 근 육통 등의 증상이 나타난다(George, 1995; Timoney 등, 1988; WHO, 1986).

브루셀라병은 한번 발생하면 농장 내에서 계속된 유산, 사산을 일으키는 특징이 있어 피해가 크다. 국내에서는 "결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령"에 의하여 브루셀라병 검색 및 살처분 정책을 시행하고 있다. 살처분을 시행할 경우 보상금 지급 규정에 따라 보상받게 되지만 최대 80%의 보상률로 농가는 물론 보상금을 지급해야 하는 국가에도 큰 경제적 손실을 끼치고 있다(농림수산식품부, 2011).

소 브루셀라병을 진단하기 위해 우리나라 및 OIE 에서 권장하는 혈청학적 진단 방법에는 Rose Bengal test (RBT), standard tube agglutination test (STAT), fluorescence polarisation assay (FPA), indirect-enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA), competitive-enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) 등이 있다 (OIE, 2008; 농림수산식품부, 2009; Alton 등, 1975; Nielsen, 2002; Godfroid 등, 2002). 국내에서는 "결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령"에 따라 1차 검사로 RBT를 사용하고, 양성 진단을 받은 개체에 대하여 2차 확인 검사인 STAT를 사용하고 있다(농림수산식품부, 2009). 그런데 이들 진단법은 만성적인 감염의 경우 응집력이 약화될 수 있고 또한, 교차반응의 발생등 문제점이 생길 수 있다(Bae 등, 2010).

RBT는 방법이 간단하고 고가의 장비 없이 실험할 수 있고, 민감도가 높은 장점이 있으나 비특이 반응 이 나타나는 단점이 있으므로 주로 1차 스크린 검사 로만 사용하고 있다. STAT는 고가의 장비가 필요 없 어 비용적인 면에서 효율적이고 실험 방법이 간단하 다. 그러나 가검 혈청 희석배수에 따른 응집 상태는 경험이 풍부한 실험자에 의해 판정되어야 하며(OIE, 2008; Morgan 등, 1978) 48~72시간의 긴 반응시간이 필요한 것도 단점 중 하나이다. FPA는 기술적인 면 에서 간편하고 반응시간이 짧아 시간을 절약할 수 있 고 특이도가 높다. 그러나 측정 전용 기기가 필요하 고 소량의 혈청 차이로도 판정 결과가 확연히 달라지 는 민감함을 보인다. ELISA 기법은 최근에 개발된 진단 기법으로 특이도 및 정확도가 높은 기법으로 알 려졌다(Wright 등, 1993; Wright 등, 1997; Nielsen 등, 1995; Nielsen 등 1996; Nielsen 등 2005). 하지만 진단 키트와 별도의 검출 장비가 요구되므로 비용이 많이 소요된다(MacMillan 등, 1990; Muñoz 등, 2005; Stack 등, 1999; Weynants 등, 1997). 브루셀라병 진단에 사 용되고 있는 혈청학적 진단 방법들 상호 간 일치율이 낮게는 6%, 높게는 15%까지 차이가 나는 것으로 보고되고 있어 정확한 진단을 위해서 진단 방법 선택의 중요성을 알 수 있다(Lambert와 Amerault, 1962).

현재 국내에서는 브루셀라병 검색 및 살처분 정책에 의하여 1세 이상의 암소 및 수소는 최소한 1년에 1회 이상 브루셀라병 정기검진을 받아야 한다(농림수산식품부, 2009). 계속되는 검진으로 인해 농가의 브루셀라병 발생은 많이 감소하고 있으나 최근 브루셀라병 발생이 없던 농가에서 STAT에 1~2두가 양성판정받은 농가의 비율이 급격히 증가하고 있어 이에대한 정확한 진단이 필요한 실정이다. 따라서 현재 2차 확인 검사로 사용하고 있는 STAT와 OIE에서 권장하고 있는 FPA, I-ELISA, C-ELISA와의 비교 시험을 통해서 현재 사용하고 있는 진단법의 효율성을 알아보고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

가검혈청

혈청 시료는 2010년 1월부터 2012년 6월까지 강원 도, 경기도, 충청도, 전라북도, 경상남도, 광주광역시 등지에서 시행한 검진 사업에서 STAT 검사 결과 브루셀라 양성 또는 의양성 판정받아 살처분 된 소 345 두의 혈청을 사용하였고, 검사 전 56°C에서 30분간비동화 시킨 후에 사용하였다.

진단방법

STAT는 농림수산검역검사본부에서 제조한 진단액을 0.5% phenol saline으로 1:100으로 희석하여 사용하였고, 혈청을 희석된 진단액에 1:50, 100, 200, 400으로 희석하여 37℃에서 48~72시간 반응시킨 후 응집 상태를 관찰하였다. 응집 결과에 따라 혈청 희석배수 100배 이상에서 응집이 일어난 혈청은 양성, 50배 이상 100배 미만에서 상층액이 반투명하고 응집이 일어난 것은 의양성, 50배 미만에서 응집이 일어나거나 없는 것은 음성으로 판정하였다.

FPA는 FPA kit (Diachemix, USA)와 함께 제공된 실험 방법에 따라 FPA buffer 1 메에 가검혈청 10 μl를 첨가하고 10분 후 conjugate 10 μl를 첨가한 후 2분 후에 측정하였다. Positive control과 negative control도

Table 1.	Correlation of FPA	I-ELISA.	C-ELISA with S'	TAT

STAT -		FPA (%)		I-ELISA (%)		C-ELISA (%)	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive ≥1:100	302	180 (59.6)	122 (40.4)	198 (65.6)	104 (34.4)	206 (68.2)	96 (31.8)
Negative <1:50	43	14 (32.6)	29 (67.4)	17 (39.5)	26 (60.5)	17 (39.5)	26 (60.5)
Total	345	194 (56.2)	151 (43.8)	215 (62.3)	130 (37.7)	223 (64.6)	122 (35.4)

같은 방법으로 측정 후 정해진 판정 기준에 따라 가 검혈청의 수치에서 negative control의 수치를 제외한 값이 10 초과이면 양성, 10 미만이면 음성으로 판정 하였다.

ELISA는 ELISA kit (Svanova, Sweden)의 실험 방법에 따라 수행한 후에 정해진 기준에 따라 그 결과를 판정하였다. I-ELISA는 percent positivity가 40 미만이면음성, 40 이상이면 양성으로 판정하였고, C-ELISA는 percent inhibition가 30 미만이면음성, 30 이상이면양성으로 판정하였다.

결 과

STAT와 FPA, I-ELISA 및 C-ELISA의 연관성

전체 345두 중 STAT에서 302두(87.5%)가 양성, 43 두(12.5%)가 음성으로 판정되었다. FPA, I-ELISA 및 C-ELISA는 각각 194두(56.2%), 215두(62.3%) 및 223 두(64.6%)가 양성으로 판정되었다(Table 1). STAT와 FPA의 상관관계를 비교한 결과 전체 345두 중 209두 인 60.6%가 일치하였고, I-ELISA와는 224두인 64.9%, C-ELISA와는 232두인 67.2%의 일치율을 보였다. STAT을 기준으로 FPA, I-ELISA, C-ELISA와의 상관관계가 낮게는 60.6% 높게는 67.2%로 일치율이 대체로 높지 않은 것을 확인할 수 있었다.

FPA와 I-ELISA 및 C-ELISA의 연관성

FPA를 기준으로 I-ELISA, C-ELISA의 비교 결과를 나타낸 Table 2에서 FPA와 I-ELISA의 상관관계를 분 석한 결과 전체 345두 중 290두가 일치하여 84.1%의 일치율을 보였고, C-ELISA에서도 I-ELISA와 같이 290두가 일치하여 84.1%의 일치율을 보였다. STAT와 I-ELISA, C-ELISA 사이의 상관관계보다 FPA와의 상 관관계가 낮게는 16.9% 높게는 19.2%로 더 높은 것 을 확인할 수 있었다. 또한, 양성 일치율이 91.2~93.3%, 음성 일치율이 72.2~74.8%로 음성보다 양성 개체 간의 일치율이 16.4~21.1% 정도 더 높은 경향을 보였다.

Table 2. Correlation of I-ELISA and C-ELISA with FPA

FPA		I-ELIS	SA (%)	C-ELISA (%)		
		Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	194	177 (91.2)	17 (8.8)	181 (93.3)	13 (6.7)	
Negative	151	38 (25.2)	113 (74.8)	42 (27.8)	109 (72.2)	
Total	345	215 (62.3)	130 (37.7)	223 (64.6)	122 (35.4)	

I-ELISA와 C-ELISA 및 FPA의 연관성

I-ELISA와 C-ELISA 간의 상관관계는 337두가 일치하여 97.7%의 높은 일치율을 보였다. FPA와도 292두가 일치하여 84.6%의 일치율을 나타내었다. STAT와의 상관관계보다 낮게는 24%, 높게는 30.5% 더 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 3). 또한, I-ELISA와 C-ELISA의 비교 시험 결과를 보면 I-ELISA에서 양성 215두가 C-ELISA에서도 마찬가지로 양성으로 판정되어 일치율이 100%로 나타났고, I-ELISA 음성 130두 중 C-ELISA에서 양성이 8두인 6.2%로 낮았고, 음성은 122두로 93.8%의 높은 일치율을 확인할 수 있었다.

Table 3. Correlation of C-ELISA and FPA with I-ELISA

I-ELISA		C-ELI	SA (%)	FPA (%)		
		Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	215	215 (100)	0 (0)	177 (82.3)	38 (17.7)	
Negative	130	8 (6.2)	122 (93.8)	15 (11.5)	115 (88.5)	
Total	345	223 (64.6)	122 (35.4)	192 (55.7)	153 (44.3)	

고 찰

소 브루셀라병은 유방염, 유산 등의 임상 증상과

원인균 분리 또는 혈청학적 검사 등에 의해서 진단될수 있다. 소 브루셀라병 혈청학적 진단법에는 1차 검사법으로 RBT 등이 이용되고 있고, 2차 확인 검사법으로는 STAT, FPA, ELISA 등이 이용되고 있다(OIE, 2008). 현재 우리나라는 2차 확인 검사법으로 미국식에 따라 STAT를 이용하고 있는데, STAT와 다른 2차확인 검사법의 결과가 일치하지 않는 경우가 발생하고 있다. 따라서 본 연구에서는 2010년 1월부터 2012년 6월까지 우리나라 검진사업에서 STAT에서 브루셀라 양성 또는 의양성으로 판정받은 소 345두의 혈청 시료를 대상으로 2차 확인 검사법인 STAT, FPA, I-ELISA, C-ELISA와 비교 시험을 진행하였다.

먼저 우리나라에서 현재 2차 확인 검사법으로 사용 중인 STAT로 실험해 본 결과 345두 중 302두 (87.5%)가 양성, 43두(12.5%)가 음성으로 판정되었으며 FPA에서는 양성과 음성이 각각 194두(56.2%), 151두(43.8%), I-ELISA에서는 215두(62.3%), 130두(37.7%), C-ELISA에서는 223두(64.6%), 122두(35.4%)로 판정되었다. 결과를 보면 STAT의 양성 진단율이 FPA, I-ELISA, C-ELISA보다 22.9~31.3% 더 높은 것을 볼수 있었다.

STAT를 기준으로 FPA, I-ELISA, C-ELISA의 상관 관계 비교한 결과 각각 60.6%, 64.9%, 67.2%의 일치 율을 나타내었고, FPA와 I-ELISA, C-ELISA 사이의 상관관계를 보면 개체의 차이는 조금 있지만, 각각 84.1%의 일치율을 보였다. 또한, I-ELISA와 C-ELISA 의 상관관계는 97.7%로 매우 높은 일치율을 보였다. Gall과 Nielsen (2004)은 브루셀라 진단법에 대한 연 구 결과에서 민감도와 특이도가 STAT는 각각 75.9, 95.7%이고, FPA는 97.5, 98.9%, I-ELISA는 96.0, 93.8%, C-ELISA는 97.7, 90.5%를 보인다고 보고하였 다. 이 4가지 진단법 중에서는 STAT가 75.9%로 다른 진단법에 비해서 민감도가 약 20% 정도 낮아 진단법 간에 차이가 컸으며, 특이도는 90.5~98.9%로 진단법 간에 그 차이가 상대적으로 적었다. 마찬가지로 이번 연구의 2차 확인 검사법 간의 상관관계 비교 결과에 서 볼 수 있듯이 STAT와는 60.6~67.2%의 낮은 일치 율을 확인할 수 있었고, FPA, I-ELISA, C-ELISA법 사 이에서는 84.1~97.7%의 높은 일치율을 보여 주고 있 다. 이번 연구 결과를 보면 STAT에서 위양성 반응이 나타날 가능성이 높은 것을 확인할 수 있었고, 다두 발생 농가에서는 브루셀라 양성 진단율이 높았지만 적은 두수 발생 농가에서는 의양성 비율이 높은 것을 볼 수 있었다. 그러므로 정확한 브루셀라병 진단을 위해서는 더욱 정확한 2차 확인 검사법을 도입하거나 병용할 필요가 있고, 우리나라에서 소 브루셀라병의 확산을 방지하기 위해서는 조기에 신속 정확하게진단할 수 있는 진단법의 도입 및 확립이 요구되고있는 실정이다(Hur 등, 2007).

이번 연구 결과를 바탕으로 현재 이용되고 있는 2차 확인 검사법인 STAT보다 FPA나 I-ELISA 또는 C-ELISA가 상호 간에 일치율이 더 높다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 1차 검사인 RBT 검사 후 2차확인 검사가 요구될 때 기존 STAT을 대체하여 사용하거나 STAT와 병용하여 추가 확인 진단법으로 사용하여 진단의 효율성을 제고하고 위양성 살처분으로 인한 경제적 손실을 최소화할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 이러한 효율적인 진단법을 적용하여국내 브루셀라병 청정국 선언을 앞당기는데 일조할 것으로 여겨진다.

결 론

브루셀라병 혈청학적 진단법 중 2차 확인 검사법으로 현재 사용하고 있는 STAT와 OIE에서 권장하고 있는 FPA, I-ELISA, C-ELISA와의 비교 시험을 통하여 진단의 효율성을 비교 평가하였다. STAT는 다른 진단법에 비해서 위양성 비율이 높게 나타나 상호 간의 일치율이 떨어지는 단점이 있다. 그에 비해 FPA나 I-ELISA 또는 C-ELISA는 상호 간의 높은 일치율을 보이고 있어 이 진단법들을 2차 확인 검사법으로 활용한다면 진단의 정확도를 더 높일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 농림수산검역검사본부 수의과학기술개 발연구사업(과제번호: C-AD13-2011-13-01)의 연구비 로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

농림수산식품부. 2009. 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령. 제 2009-147호.

농림수산식품부. 2011. 살처분 가축 등에 대한 보상금 등 지급 요령. 제 2011-24호.

- Alton GG, Jones LM, Pietz DE. 1975. Laboratory techniques in brucellosis. pp. 7-80. 2nd ed. WHO Monograph series.
- Bae JH, Kim SE, Jo SR, Jeong EH, Jang EH, Kwon HN, Park DY, Lee KC. 2010. Extraction and verification of highly immunologenic antigen for diagnosis of bovine brucellosis. Korean J Vet Serv 33: 135-141.
- Gall D, Nielsen K. 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev Sci Tech Off Int Epiz 23: 989-1002.
- George WB. 1995. Handbook of zoonoses. pp. 9-39. 2nd ed. CRC press, London.
- Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V, Walravens K, Letesson JJ, Tibor A, Mc Millan A, Spencer S, Sanna M, Bakker D, Pouillot R, Garin-Bastuji B. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet Microbiol 90: 461-477.
- Hur J, Kakoman I, Jeong JM, Lee HJ, Baek BK. 2007. Comparison of a new ELISA with other serodiagnostic tests for bovine brucellosis. Korean J Vet Serv 30: 385-391.
- Kim KH, Hwan AS, Park YH, Kim DS. 1982. Comaprison of six serological methods for the diagnosis of bovine brucellosis. Korean J Vet Res 22: 149-153.
- Lambert G, Amerault TE. 1962. Comparative study of three serological tests for detecting the response in cattle to virulent *Brucella abortus*. Am J Vet Res 23: 529-533.
- MacMillan AP, Greiser-Wilke I, Moennig V, Mathias LA. 1990.

 A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. Dtsch Tierarztl Wochenschr 97: 83-85.
- Morgan WJB, Mackinnon DJ, Gill KPW, Gower SGM, Norris PIW. 1978. Brucellosis diagnosis: standard laboratory techniques. pp. 1-53. 2nd ed. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Muñoz PM, Marín CM, Monreal D, González D, Garin-Bastuji B, Díaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyón I, Blasco JM. 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clin Diagn Lab Immunol 12: 141-151.
- Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol 90: 447-459.
- Nielsen K, Kelly L, Gall D, Balsevicius S, Bosse J, Kelly W, Nicoletti P. 1996. Comparison of enzyme immunoassays

- for the diagnosis of bovine brucellosis. Prev Vet Med 26: 17-32.
- Nielsen K, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. 1995. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Immunol Immunopathol 46: 285-291.
- Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Robles C, Bermudez R, Renteria T, Moreno F, Ruiz A, Massengill C, Muenks Q, Jurgersen G, Tollersrud T, Samartino L, Conde S, Forbes L, Gall D, Perez B, Rojas X, Minas A. 2005. Towards single screening tests for brucellosis. Rev Sci Tech Off Int Epiz 24: 1027-1038.
- OIE. 2008. Bovine brucellosis. pp. 624-659. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 6th ed. Office International des Epizooties.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 1994. Clinical veterinary microbiology. pp. 261-267. Esevier limited, London.
- Stack JA, Perrett LL, Brew SD, MacMillan AP. 1999.

 Competitive ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. Vet Rec 145: 735-736.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JF. 1988. Hagan Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. pp. 135-152. 8th ed. Cornell University Press, Ithaca and London.
- Weynants V, Gilson D, Cloeckaert A, Tibor A, Denoel PA, Godfroid F, Limet JM, Letesson JJ. 1997. Characterization of smooth lipopolysaccharide and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. Infect Immun 65: 1939-1943.
- WHO. 1986. Joint food and agriculture organization of the United nations/world health organization expert committee on brucellosis. pp. 740. 6th ed. World Health Organization Technical Report Series 740, Geneva.
- Wright PF, Nisson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. Rev Sci Tech 12: 435-450.
- Wright PF, Tounkara, Lelenta M, Jeggo MH. 1997. International reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Rev Sci Tech 3: 824-832.