

GOVP1199707875

36.089

L2930

1995

95년, 단년도 과제
최종 보고서

어류 edwardsiellosis의 진단 kit 개발

Development of diagnostic kit for edwardsiellosis

1996. 11.

부경대학교

이병학과

농림부

최 종 보 고 서

1995년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 “어류
edwardsiellosis의 진단 kit 개발”의 최종보고서를 별첨과 같이
제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 자체평가 의견서 8부
3. 최종보고서 디스켓 1매

1996. 11.

주관연구기관 : 부 경 대 학 교

총괄연구책임자 : 정 현 도

주관연구기관장 : 부경대학교 총장

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림수산부 장관 귀하

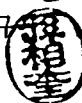
본 보고서를 “어류 edwardsiellosis의 진단 kit 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996. 11.

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 정 현 도

연 구 원 : 손 상 규



요 약 문

I. 제 목

어류 edwardsiellosis의 진단 kit 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

Edwardsiellosis는 주로 여름을 중심으로 봄, 가을에 걸쳐 수온이 높은 계절(7 ~ 9월)에 주로 발생하였으나 최근 순환식 수조를 이용한 가온 양식이 발달함에 따라 연중 고수온 상태가 되어 계절에 관계없이 빈번히 발생하여 그 심각성이 더욱 부각되어지고 있는 질병이다. 그러나 이제까지 이러한 edwardsiellosis를 포함한 여러 어류 질병 발생시 이에 대한 진단으로서는 병어의 외부 증상 관찰 후 경험에 의하여 병명을 진단하거나 기초적인 현미경적 검경을 근거로 기생충과 세균성 질병을 구분하였고 세균성 질병인 경우 영양 배지 또는 선택 배지를 사용하여 감염조직으로부터 원인균을 분리한 후 여러 가지 복잡한 생화학 검사를 거쳐 원인균을 동정하므로서 단기간에 대량폐사를 가져오는 어류 질병에 신속히 대응할 수 없었다. 더불어서 원인이 *Edwardsiella tarda*에 의한 것이라고 판명이 되더라도 어떠한 약제가 한국형 병원균에 가장 효과를 발휘 할 수 있는 지가 구체적으로 조사되어 있지 않아 개요적으로 외국의 예를 기준으로 하거나 약제를 개발한 제약회사의 추천에만 의존하고 있어 최대의 효율적인 대책 마련이 되지 못하고 오히려 내성균 유도 현상만 종종 일으키고 있다. 그러므로 현재 우리나라 양식업계에서 가장 빈번히 발생하고 있는 세균성 질병에 대하여 현장 적용이 가능한 진단법의 개발과

함께 효율적인 치료 대책의 마련을 위하여서는 먼저 실험실이나 연구소에서 실시하고 있는 특수 첨단 진단법을 특수한 장비가 없는 현장에서 보다 간단히 실시할 수 있는 개량 또는 변형된 형태의 기법으로 발전시켜 이를 보편화 시킬 수 있는 연구가 있어야 할 것이며 나아가서는 현재 우리나라에 만연되어 있는 *Edwardsiella tarda*는 어떠한 항원적 특성과 항생제에 대한 감수성을 갖고 있는지에 대한 분석과 같은 기본 정보의 확립도 필수적으로 이루어져야 할 것이다.

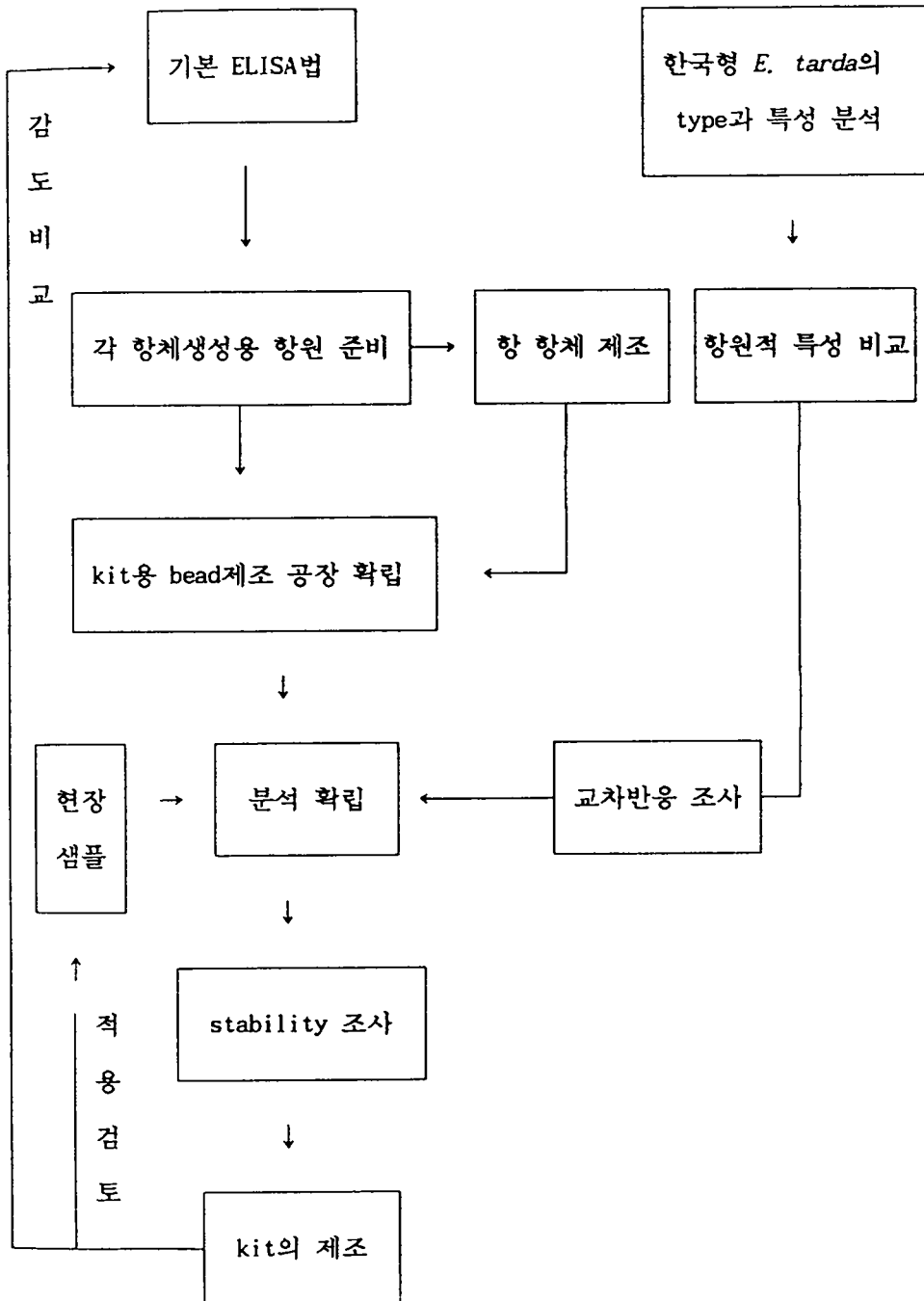
Ⅲ. 연구개발내용 및 범위

최근 세계 각국의 고밀도 집약적 양식의 발달과 더불어 어류질병 진단의 방법도 상당히 진전되어 사람을 대상으로 하여 많이 사용되어지던 ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay), FIA(Fluorescence-Immunoassay) 그리고 RIA (Radio-Immunoassay)법 등과 같은 여러 첨단의 면역 혈청학적인 기법들이 어병 진단에 많이 적용되고 있으며 현재 우리나라에서도 이러한 시대적 조류에 발 맞추어 이러한 면역 혈청학적 진단법의 연구 및 개발에 노력하고 있다. 그러나 이들 방법들은 여러 특수 장비와 전문적인 지식과 기술이 필요하므로 현장 또는 간단한 장비만을 갖춘 실험실에서 어류 질병 발생시 직접 적용하기에는 많은 어려움이 따른다. 따라서 이러한 어려움을 개선하여 실험실은 물론 현장에서 신속하고 간단하게 사용 할 수 있는 고도의 기법을 응용한 진단법의 개발이 시급히 요구되어 지고 있다. 그러나 면역 혈청학적 기법은 항체와 항원의 결합 후 효소를 처리하여 색깔의 변화를 읽는 것이므로 항체의 양적 문제 그리고 항원의 조제 문제 등 여러가지가 현장에서 적용하는데 어려움이 많고 더욱 중요한 것은 수산용으로 상업화되어 있는 시약이나 제품이 전혀 없다는 것이다. 이러한 점이 양식업에 종사하는 분들이 고도응용기법을 기피하

는 원인이 될 것이다. 본연구에서 응용한 ELISA 기술은 현재 상당히 진전되어 있고 연구용으로는 그 감도가 항원 10 ng/ml 농도까지 측정 가능한 것으로 알려져 있지만 이는 모든 실험 조건이 완전하였을 때의 경우일 것이다. 또 ELISA 실시에는 많은 조건과 단계별 적정 구성이 필요하여 일반인이 정확히 이해하고 사용할 수는 없다. 그러나 상품화된 임상진단 시약 등과 같이 Yes, No 만을 판정하게끔 할 수 있다면 즉, 항원의 정량화보다는 정성적 분석에 보다 큰 의미를 부여한다면 인간에 적용하던 기법과 같이 수산용 질병 진단 kit 의 개발은 가능하고 보편화시키는데도 큰 문제는 없으리라고 생각된다. 그러므로 본연구에서는 다음 페이지의 그림과 같은 흐름으로 연구를 진행하였다.

결론적으로 최종단계를 제외한 모든 ELISA의 과정과 반응을 미리 반응시키거나 단순화함과 동시에 특정기구 필요없이 정성적으로 어류 질병을 분석할 수 있는 modified 된 ELISA법의 시도가 수산과학에서는 활발히 추진되지 않았다는 것이 현재의 기술상태이므로, 본 연구에서는 이를 도입하기 위한 기초 조건을 확립하고 이의 이용 가능성을 조사하였다. 동시에 한국형 세균이 어느 정도 서로간에 항원적 유사성을 갖고 있으며, 질병치료시 치료 약제에 어느 정도 민감한지를 밝혀 국내 양식현장에 직접 적용시킬 수 있는 진단과 대책에 정보를 제공 확립하고자 한다.

Conceptual flow chart of the research.



IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

짧은 연구기간에 여러 균주, 항체, 병원성 등의 분석이 잘 되어 있어 충분한 기본 data는 확립되어 있지만 다른 항원(즉, 다른 질병 원인균)을 초기항원으로 사용하여 분석된 기본 data가 있었다면 보다 광범위한 본 방법의 활용에 대한 좋은 예가 될 수 있었을 것이나, 이에 대한 연구는 본 연구의 proposal 범위 밖이며 보다 긴 연구 기간이 필요하므로 다음 계획에서 고려해 보아야 할 사항이다.

본 연구에 의한 기법과 대책은 특별한 교육이나 사전 지식이 없어도 손쉽게 어촌지도시 현장 종사원 등에 전수시킬 수 있으며, 또 단시일내에 단회 실시에 의한 여러 질병 동시 진단, 그리고 대책 마련의 grouping화가 가능하여 어류의 생산을 증가를 위한 획기적 전기가 마련되게 될 것이다. 또 조금만 더 집중적인 연구가 계속된다면 본 방법의 상업화나 상품화가 폭넓은 어류 질병을 대상으로 하여 이루어지게 될 것이다. 이는 본 연구와 동일한 원리이나 한 항원결정 부위에만 결합하는 단일 항체를 이용한 새로운 진단법 개발과 같은 2단계 기술 개발을 위해서도 중요한 유도 요인이 된다할 것이다.

SUMMARY

Optimization and standardization of solid phase enzyme immunoassay were done for the diagnosis of edwardsiellosis in fish. The analyzed immobilization of antibody with peroxidase saturation method showed the optimized result by using partially purified 50 μ g/ml of rabbit anti *E. tarda* Edk-2 antibody in sodium bicarbonate buffer for overnight incubation to cover the surface of polystyrene beads. As the blocking agent, 2% BSA was more effective compared with gelatin and skim milk. The addition of 3% PEG6000 in the diluent of biotin conjugated antibody resulted in some enhancing effects for the reaction of biotin conjugated antibody with bound antigen on bead. Optimized immunoreaction was observed in the treatment of 50 μ g/ml of biotin conjugated antibody followed extravidin-peroxidase diluted 1:2000 in PBS. The detectable concentrations of the this method were 1 \times 10⁵cells/ml and 5 \times 10⁵cells/ml expressed as the source of antigen amount for EDTA extraction and heat extraction, respectively. Cross reactivity test were carried out against antigens of other fish pathogens such as *V. anguillarum* LS-174, *A. salmonicida* MT004, *A. hydrophila* ATCC7966, *Y. ruckeri* 11-4, *Pseudomonas* sp. and *Streptococcus* sp. NG8206. None of these fish pathogens caused a positive reaction. However high cross-reaction was observed against *E. tarda* isolated from flounder in aquatic farms of Korea. By using a PBS buffer containing a 0.1% diethylene glycol monopentyl ether as a homogenized tissue diluent, the enhanced reaction between antigen and antibody was observed for the detection of heat extracted antigens in

organs of fish. The detection limits of antigen in different tissues of different species of fish such as liver, kidney, and spleen of tilapia and flounder were analyzed and appeared to be 5×10^5 cells/ml and not depended upon the kinds of tissue on species of fish. Immobilized beads with rabbit antibody were more stable in PBS at 4°C compared to air dried once and can be used for the detection of *E. tarda* infection in liver tissue of flounder even after 4 weeks preservation in PBS. Consequently, the modified ELISA was specific , and it offers a rapid and sensitive means of diagnosis for edwardsiellosis quantitatively during outbreaks in field without special instruments.

요 약

Edwardsiellosis를 진단하기 위한 면역학적 진단 kit를 최적화, 표준화하였다. Peroxidase 포과법에 의한 immobilization 분석에서 부분 정제한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청은 sodium bicarbonate 완충용액에 50 μ g/ml 농도로 희석하여 overnight 반응시켜 주었을때 polystyrene bead 표면의 항체 immobilization이 최적화 되었다. blocking제로는 2% BSA가 gelatin과 skim milk보다는 효과적이었고, PEG6000을 표지화 항체 희석액에 3% 첨가 사용시 biotin 표지화 항체와 항원간의 결합이 증가하였다. 50 μ g/ml biotin 표지화 항체와 1:2000으로 희석된 extravidin-peroxidase를 차례로 처리하였때 최적의 반응을 나타내었다. EDTA 추출 항원은 1 \times 10⁵cells/ml, 열 추출 항원에서는 5 \times 10⁵cells/ml의 다른 검출한계를 나타내었으며, 종이 다른 어병세균인 *V. anguillarum* LS-174, *A. hydrophila* ATCC7966, *Y. ruckeri* 11-4, *A. salmonicida* MT004, *Pseudomonas* sp. 와 *Streptococcus* sp.와는 반응하지 않는 specificity를 보여주었으며, 넙치 병어로부터 분리한 한국형 *E. tarda*와는 높은 교차반응을 나타내었다. 조직내 항원검출시 diethylene glycol monopentyl ether를 0.1% 첨가하여 사용함으로써 항원, 항체의 반응이 증가하였다. 조직 농도가 다른 조직 열 추출 항원의 감도는 동일하였으며 틸라피아와 넙치의 간, 신장, 비장 조직내 항원 검출한계도 5 \times 10⁵cell/ml로 동일하였다. 토끼 항체를 immobilization시킨 bead는 건조한 상태에서 보관하는 것보다 PBS 완충용액 내에서 보관하는 것이 더 안정적이며, PBS 완충용액에 보관하였을 때 bead에 immobilization된 항체의 activity가 4주정도 유지되었다. 현장에서 채집한 *E. tarda*가 감염된 넙치의 간조직을 사용하여 본 방법으로 진단 가능하였다. 따라서 본 연구에서 실시한 진단법은 양식 현장에서 edwardsiellosis에 걸린 병어의 조직으로부터도 항원을 직접 검출해 낼 수 있는 면역학적 진단 kit로서 개발할 수 있을 것이다.

CONTENTS

Submission	1
Abstract	2
I. Title	2
II. Purposes	2
III. Specificity	3
IV. Next application	6
Summary(English)	7
Summary(Korean)	9
Contents(English)	10
Contents(Korean)	13
Main subjects	15
Section I. Introduction	15
Section II. Materials and methods	20
1. Bacteria	20
2. Preparation of antigen	20
3. Preparation of rabbit anti- <i>E. tarda</i> antibody	21
4. Preparation of mouse anti- <i>E. tarda</i> antibody	21
5. Agglutination test	23
6. Precipitation of antibody	23
7. Preparation of biotin-labeled antibody	23
8. Optimization and standardization	24
9. Preparation of heat extracted antigen with tissue homogenate	26

10. Addition of detergent in heat extracted antigen with tissue homogenate	26
11. Stability analysis	26
12. Application on field	27
13. ELISA	28
14. Discrimination index	29
Section III. Results	32
1. Analysis of antibody	32
2. Analysis of precipitated antibody	32
3. Optimization of ELISA	34
4. Sensitivity against heat and EDTA extracted antigen	44
5. Cross-reaction against <i>E. tarda</i> and other species of bacteria	49
6. Analysis with mouse anti- <i>E. tarda</i> Edk-2 antibody	49
7. Analysis with rabbit anti- <i>E. tarda</i> H-4 antibody	54
8. Effect of detergents on the detection limit of antigen in tissue	54
9. Effect of the concentration of tissues on the detection limit of antigen	57
10. Analysis of stability	57
11. Characteristics of the isolated <i>E. tarda</i> in Korean farms against several different antibiotics	62
12. Proportion of resistant strains among the isolated <i>E. tarda</i>	65

13. Application on field	65
Section IV. Discussion	71
Section V. References	78

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
I. 제 목	2
II. 연구개발의 목적 및 중요성	2
III. 연구개발 내용 및 범위	3
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	6
요 약(영문)	7
요 약(국문)	9
목 차(영문)	10
목 차(국문)	13
본 문	15
제 1절. 서 론	15
제 2절. 재료 및 방법	20
1. 실험군	20
2. 항원 제작	20
3. 토끼 항혈청 제작	21
4. Mouse 항혈청 제작	21
5. 응집항체가 측정	23
6. 항체 침전	23
7. Biotin 표지화 항체 준비	23
8. 최적화, 표준화 실험	24
9. 조직을 사용한 열 추출 항원 제작	26
10. 조직을 사용한 열 추출 항원에 detergent 첨가 실험	

.....	26
11. Stability 실험	26
12. 현장 실험	27
13. ELISA	28
14. 판별지수	29
제 3절. 결 과	32
1. 면역 처리한 항혈청 분석	32
2. 침전된 항체 분석	32
3. Solid phase ELISA법의 최적화, 표준화	34
4. EDTA 추출 항원과 열 추출 항원의 검출 한계 비교	44
5. <i>E. tarda</i> 간의 교차반응 정도와 다른 어병 세균과의 반응 여부	49
6. Mouse anti- <i>E. tarda</i> Edk-2 항체 사용한 실험 결과	49
7. Rabbit anti- <i>E. tarda</i> H-4 항체 사용한 실험 결과	54
8. Tissue내의 항원 검출에 detergent가 미치는 영향	54
9. 어류 조직이 항원 검출 한계에 미치는 영향	57
10. 안정성 분석	57
11. 우리나라 양식장으로 부터 분리한 <i>E. tarda</i> 균의 항생제에 대한 특성 분석	62
12. 분리된 <i>E. tarda</i> 중 내성균의 특성을 갖는 균주의 비율 분석	65
13. 현장 적용 결과	65
제 4절. 고 찰	71
제 5절. 참고 문헌	78

어류 edwardsiellosis의 진단 kit 개발

제 1절. 서 론

최근의 우리나라 양식산업에 있어서 생산력 증대를 위한 고밀도 양식이 성행함에 따라 양식 어류에 다양한 질병이 발생되고 있어 생산력의 저하, 품질 하락 등과 같은 큰 손실을 가져오고 있다. 이런 어류 질병 중에서 *E. tarda*가 원인인 edwardsiellosis는 수온이 높은 계절(7~9월)에 주로 발병하지만 최근 순환식 수조를 이용한 가온 양식이 발달함에 따라 지금은 계절과 관계없이 연중 빈번이 발생하여 큰 피해를 입히고 있는 질병이다. Japanese eel에서 edwardsiellosis의 발생이 보고(Wakabayashi, 1973)된 이래로 chinook salmon(Amandi et al., 1982), 틸라피아(Kubota et al., 1981), mullet(Kusuda et al., 1976) 잉어(Sae-Dui et al., 1984), 차널 메기(Meyer and Bullock, 1973), crimson sea bream(Kusuda et al., 1977), 그리고 넙치(Nagatsugawa, 1983) 등 담수어 및 해산어의 여러 어종에서 광범위하게 발병된다고 알려져 있으며, 임상적 증상으로는 복수에 의한 복부 팽만, 안구 백탁, 체색 흑화, 탈장, 항문 부위의 출혈, 그리고 간, 신장, 비장, 그리고 아가미에 작은 흰색의 결절 형성 등으로 알려져있다(Kubota et al., 1981).

그런데, edwardsiellosis를 포함하여 어류에 발생하는 모든 질병들은 물이라는 생활 환경의 특징때문에 짧은 기간에 높은 폐사율을 나타내므로 적절한 대책이 신속히 이루어지지 않는다면 엄청난 손실을 초래하기도 한다. 질병에 대한 신속한 대책을 세우려면 무엇보다도 신속, 정확한 진단이 우선되어야 하는데, 지금까지는 경험을 바탕으로 병어의 외부 증상이나 내부 소견을 보고 추정 진단하거나 현미경을 통한 원인체 검경, 감염 조직이나 혈액에서 원인체

의 분리 후 복잡한 생화학 검사를 실시하거나 CPE 관찰 등으로 확정 진단하였으므로 단기간 높은 폐사율을 나타내는 어류 질병의 진단법으로는 적절하지 못하였다. 따라서 신속하고 정확한 진단법의 개발이 요구되어져 왔는데 이들 다수가 항원·항체의 특이적 결합을 바탕으로한 면역 혈청학적 기법인 ELISA(Enzyme-Linked Immunoassay), FIA(Fluorescence-Immunoassay), RIA(Radio-Immunoassay), heamagglutination assay, coagglutination test, 그리고 immunoblot assay 등과 같은 방법이다. 세계 각국에서는 면역혈청학적인 기법을 이미 어병의 진단에 있어서 널리 사용하고 있으며 이에 대한 많은 보고도 있어왔다(Kawahara & Kusuda, 1986; Hsu & Leong, 1985; Kimura & Yoshimizu, 1984; Burreson & Fritzell, 1986; Woo & Matthews, 1987). 특히, 이들 방법 중 ELISA는 정량적이고 신속, 정확, 경제적이며, 많은 수의 sample을 한꺼번에 진단할 수 있고 검출한계 또한 매우 낮아서 어류의 기생충성, 세균성 그리고 바이러스성 질병 진단에 널리 사용되고 있다. 그리하여 *Diplostomum spathaceum*(Whyte *et al.*, 1987), *Anguillicola crassus*(Hoglund & Pilstrom, 1994), *Amyloodinium ocellatum*(Smith *et al.*, 1992), *Telogaster opisthorchi*(McArthur & Segupta, 1982) 그리고 *Cryptobia salmositica* Katz(Jones & Woo, 1987; Sitja-bobadilla & Woo, 1994) 등과 같은 기생충 질병 대한 항체 검출, 세균성 질병의 진단에 있어서는 *Renibacterium salmoninarum*(Hus & Bowser, 1991; Pascho & Mulcahy, 1987; Yolken 1982), *Aeromonas salmonicida*(Adams & Kim, 1990; Austin *et al.*, 1986; Smith, 1981), *Flavobacterium branchiophilum*(MacPhee *et al.*, 1995), *Yersinia ruckeri*(Olesen, 1991; Munei, 1985), 그리고 *Vibrio*(Song *et al.*, 1992) 등에 대한 항원·항체 검출, 그리고 바이러스성 질병에 있어서도 IPN(Rodak *et al.*, 1988), IHN(Medina *et al.*, 1992), VHS(Way & Dixon, 1988), SVC(Rodak *et al.*, 1993), EHNV(Whittington *et al.*, 1994) 그리고

rhabdovirus(Dixon & Hill, 1984)의 항원·항체 검출에 이르기까지 거의 모든 어류 질병의 진단에 있어서 광범위하게 사용되어 왔다.

그러나 ELISA는 전문적 지식과 특정 장비를 필요로 하는 실험실적인 기법이며 수산용으로 상업화되어 있는 시약이나 제품이 전혀 없으므로 양식 현장에서 직접 질병을 진단하기에는 많은 어려움이 따른다. 이런 현장 적용의 문제점을 해결하기 위해서는 단순한 과정의 특정 장비를 필요로 하지 않는 정성적으로 어류 질병을 분석할 수 있는 kit화된 진단법이 필요하였다. 따라서 기존의 ELISA법을 현장에서도 편리하게 사용할 수 있는 kit화된 진단법으로 개발을 위한 접근 방법으로 먼저, 항체를 coating시키는 solid phase로써 사용하기에 불편한 96 well microtiter plate 대신에 보다 간편하게 사용할 수 있는 것들로의 대체를 위한 시도가 있었으며 반응 결과도 reader기로 읽어서 정량적으로 분석하는 것이 아니라 solid phase 자체의 색깔변화로 정성적인 분석만을 하기도 하였다. 복잡한 여러 반응 과정도 간단히 몇 단계만으로 압축시켜서 누구나 쉽게 질병을 진단하는데 적용할 수 있는 방법에 대해서 상당수의 연구가 추진되어 왔다. 이러한 접근 방법으로 좀더 다루기 쉽고 질병 여부를 시각적으로 간단히 판단할 수 있는 진단법에 대해서 Austin 등(1986)은 plastic stick(knives, cocktail stirrers, tongue depressor)을 사용하여 enteric redmouth와 furunculosis를 진단하는데 적용한 바 있으며, Sakai 등(1987)은 *Renibacterium salmoninarum* 검출에 nitrocellulose membrane을 항원을 고정시키는 solid phase로 사용하고 membrane 자체의 색깔 변화를 통하여 진단한 바 있으며, nylon pegs(dipstick)으로 IPN을 진단한 David 등(1994)의 보고가 있었다.

하지만 지금까지는 어류 질병을 진단할 수 있을 정도로 완전히 kit화되어 충분한 감도를 가진 방법은 보고된 바 없으며 국내에서는 아직 ELISA법에 대한 시도가 대중화되어 있지 않으므로 본 연구는 면역혈청학적인 이론을 현장

에 밀접하게 접근시키기 위한 방법으로 edwardsiellosis를 하나의 model로 하여 보다 기본적인 정보와 새로운 응용 결과에 대한 분석을 시도하였다. 먼저 본 실험에서는 96 well polystyrene microtiter plate 대신에 Matsubara 등(1985)이 어류 항체량 측정을 위하여 사용한 바 있고 Freed 등(1982)과 Morissette 등(1991)이 음식물에 있는 Stahylococcal enterotoxins을 검출하는데 사용한 바 있는 polystyrene bead를 어류 감염 세균의 항원 검출을 위한 solid phase로 사용하고 insoluble 기질을 처리하여 bead 자체의 색깔 변화를 유도하여 특수 장비없이 보다 간편하게 edwardsiellosis를 진단하고자 하였다. 그리고 polyclonal 토끼 항혈청을 solid phase에 고정시키고 항원을 반응시킨 뒤 biotin 표지화 항체를 상용하여 항원을 captuer하는 sandwich법으로 병어에 존재하는 항체 측정보다 활용범위가 넓고 해석이 쉬운 병어의 조직내에 있는 항원을 직접 검출하고자 하였다. 이 방법의 반응성과 민감성을 향상시키기 위해서 각 주요 단계의 분석적인 진행을 통해서 면역학적 진단 kit를 최적화, 표준화하였으며 다른 어병세균과의 교차반응을 통해서 specificity를 평가하고, 다른 혈청형이 존재하는 현장 적용의 가능성을 알아보기 위해서 양식 현장 병어로 부터 분리한 여러 균주들과의 교차반응 실험을 실시하였으며, 최종적으로 현장 병어를 본 실험의 진단법으로 진단하였다.

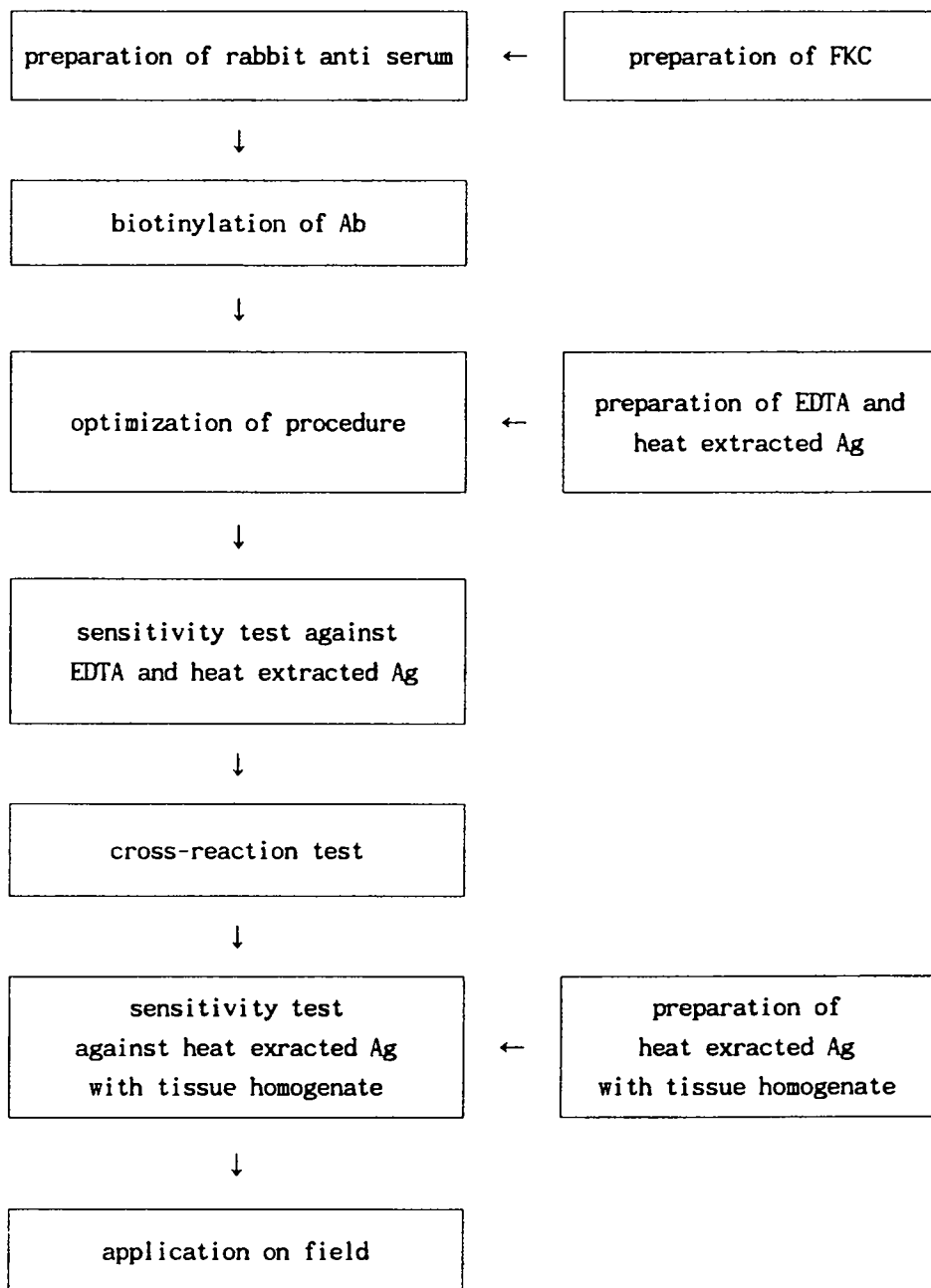


Fig. 1. Flow chart of overall experiments.

제 2절. 재료 및 방법

1. 실험균

Edwardsiella tarda Edk-2, *Vibrio anguillarum* LS-174, *Aeromonas salmonicida* MT004, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Yersinia ruckeri* 11-4, *Streptococcus* sp. NG8206, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella ictaruri* 표준균주와 우리나라 동해안과 남해안 양식장의 넙치 병어로부터 분리한 *E. tarda* H-4, YE1, RE8, RE11, RE17, EE1, NY2 분리균주를 사용하였다. 분리균주를 분리한 지역, 장기, 그리고 년도는 Table 1에서 나타내었다. 실험균은 TSB(tryptic soy broth) 액체배지에서 25℃, 16~18시간 동안 배양하였으며, *V. anguillarum* LS-174는 1.5% NaCl이 첨가된 TSB 액체 배지를 사용하여 동일한 방법으로 배양하여 항원 제작에 사용하였다. 보존균주는 액체 배양액에 glycerol을 20%로 첨가하여 -75℃에 보존하면서 필요시 꺼내어서 사용하였다.

2. 항원 제작

항원은 FKC(formalin-killed cells), 열 추출 항원(Heat extracted antigen), 그리고 EDTA 추출 항원(EDTA extracted antigen)을 제작하였다. FKC는 토끼와 mouse의 항혈청 제작시 토끼와 mouse를 면역시키는 항원과 항혈청의 응집 항체가 측정시 항원으로 하였고, 열 추출 항원과 EDTA 추출 항원은 표준화된 본 ELISA법의 감도 분석에 이용하였다. FKC는 TSB 액체배지에 25℃에서 16~18시간 동안 배양한 후 0.5% formaline을 처리하여 4℃에서 overnight 동안 정치시켰다. 이 불활성화된 균액을 원심분리 후 집균하여 0.15M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) 완충용액에 3회 세척한 후 PBS 완충용액에 100mg/ml의 농도로 현탁하여 준비하였다. 열 추출 항원은 배

양한 세균액을 원심분리 후 집균하여 PBS 완충용액으로 3회 세척하고 0.1M sodium bicarbonate (NaHCO₃) 완충용액에 100mg/ml의 농도로 현탁시켰다. 이 현탁액을 100℃에서 30분간 증탕 처리하고 13,000rpm, 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 준비하였다. EDTA 추출 항원은 PBS 완충용액으로 3회 세척한 후 50mg/ml의 농도로 20mM EDTA(Ethylenediamine tetraacetate, pH 7.2) 용액에 현탁하였다. 이 현탁액을 45℃에서 30분간 증탕 반응시키고 10% power level(Vibra Cell, 375W Sonicator, medium tip)에서 1분간 초음파 처리 후 상등액을 취하여 pH 8.0, PBS에 48시간 투석하여 준비하였다. 준비된 3종류의 항원은 0.1% NaN₃를 첨가하여 냉장보관하였다. BSA(bovine serum albumin)을 표준 단백질로 사용하여 280nm에서의 O.D.치로 linear regression을 실시하여 standard curve를 작성하였으며 이 standard curve를 기준으로하여 solubilized 항원의 단백질 농도 분석하였다. 본 항원 제작의 방법은 Fig. 2에 도식화하여 나타내었다.

3. 토끼 항혈청 제작

토끼에 *E. tarda* Edk-2와 H-4의 FKC를 FCA(Freund's complete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 각 개체당 20mg씩 피하주사하였다. 3주와 5주 후 동량의 항원으로 FIA(Freund's incomplete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 동일한 방법으로 boosting 하였으며, 마지막 boosting 2주 후 토끼의 귀에 있는 혈관으로부터 0.2ml을 채혈하여 응집항체를 확인한 후 심장으로부터 전채혈하였다. 혈액은 상온에서 30분간 방치한 뒤 4℃, overnight 동안 정치시킨 후 원심분리하여 항혈청을 얻었으며, 0.1% NaN₃를 첨가하여 적당량씩 나누어 -75℃에 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

4. Mouse 항혈청 제작

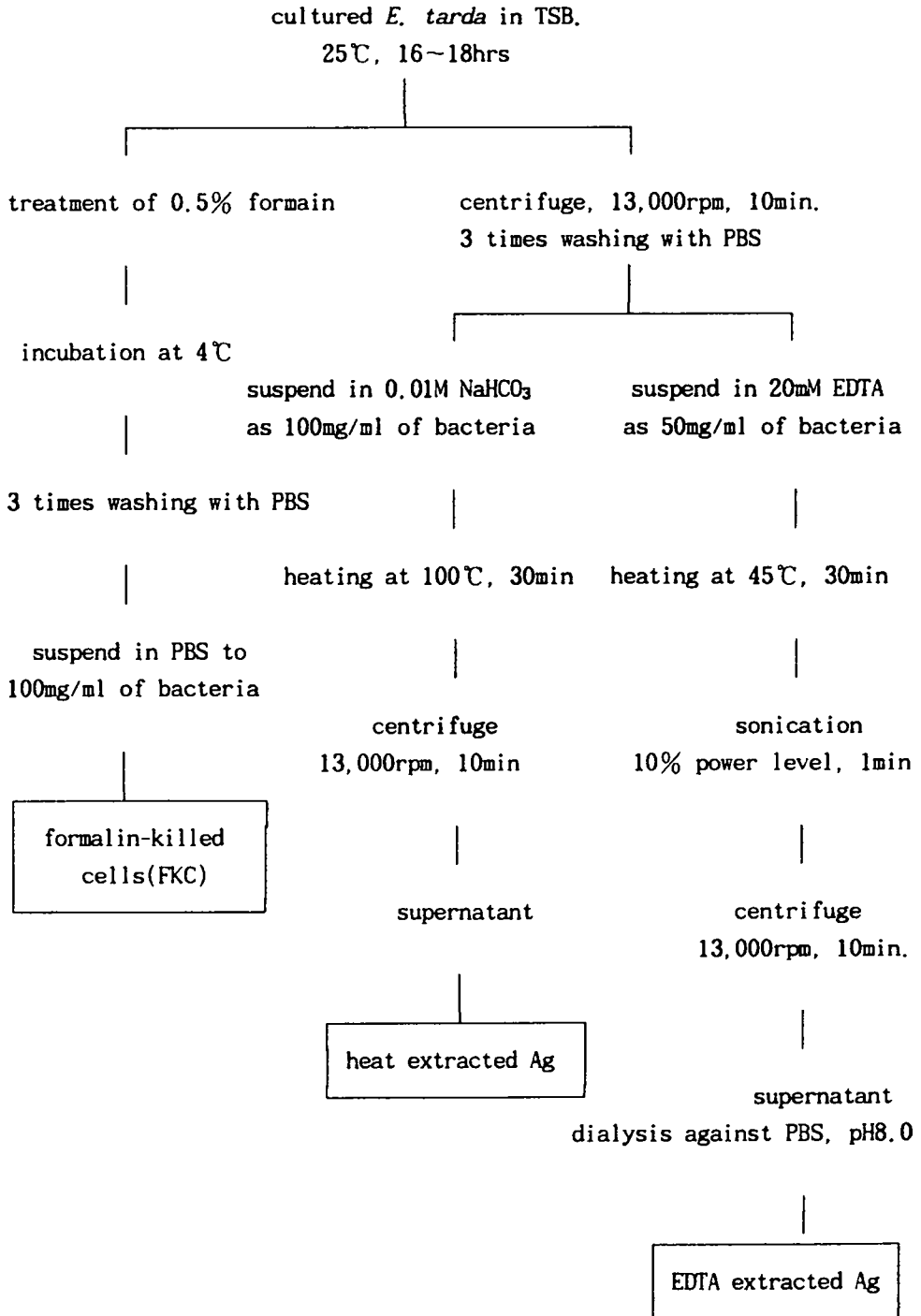


Fig.2. Flow chart for the preparation of different bacterial antigens.

E. tarda Edk-2의 FKC를 FCA(Freund's complete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 각 개체당 4mg씩 피하주사한 후 3주째 동량의 항원으로 FIA(Freund's incomplete adjuvant)와 1:1로 혼합하여 동일한 방법으로 boosting하였다. Boosting 후 1주째 심장을 통하여 전체혈하였으며 토끼 항혈청과 동일한 방법을 항혈청을 얻어 응집항체를 확인한 후 냉장 보관하였다.

5. 응집항체 측정

U형 96 well plate에 연속적으로 2배 희석된 항혈청을 각 well에 50 μ l씩 가하고 4mg/ml 농도로 준비된 항원을 50 μ l씩 첨가하여 습윤기에서 실온, overnight동안 반응시킨후 응집괴가 형성되는 최대 희석 배수를 응집항체가로 결정하였다.

6. 항혈청 침전

혈청내 상당량 존재하는 항체보다 분자량이 크거나 작은 단백질 분자들을 제거하기 위해서 "salting out"을 실시하였다. 토끼 항혈청에 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 23%의 농도가 되도록 가하여 실온에서 1시간동안 천천히 교반하면서 반응시킨 후 13,000rpm, 10분간 원심분리하여 침전된 큰 단백질 분자를 pellet으로 모아 제거하였다. 그리고 침전되지 않은 그 상등액에 다시 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 최종농도 45%가 되도록 가한 후 같은 방법으로 반응시킨 후 원심분리하여 침전되지 않은 작은 단백질 분자들을 상등액으로 분리하였다. 45% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 침전된 pellet을 동량의 pH 7.2, PBS 완충용액에 현탁하고 pH 8.0, PBS 완충용액에서 48시간 투석하여 용액내 남아있는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 제거하였다. 280nm에서 흡광도를 측정하여 단백질량을 분석하고 응집항체가의 측정에 의하여 *E. tarda* Edk-2와 H-4에 대한 항체역가를 분석하여 부분 정제된 Ig의 순수 정도를 평가하였다.

7. Biotin 표지화 항체 준비

침전시킨 토끼 항혈청은 5mg/ml의 농도로 0.1M sodium bicarbonate(NaHCO₃) 완충용액(pH 8.3)에 희석하였고 biotin-N-hydroxysuccinimide ester(biotin-NHS)를 2mg/ml로 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹였다. 항체 1mg에 대하여 준비된 biotin-NHS를 25 μ l씩 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 pH 8.0, PBS 완충용액에서 48시간 투석시킨 후 0.1% NaN₃를 첨가하여 냉장보관하였다.

8. 최적화, 표준화 실험

가. peroxidase 포화법

Polystyrene beads에 immobilization 후 항체가 고정되지 않은 부분을 평가하기 위해서 peroxidase 포화법을 실시하였다. 항체 immobilization후에 PBS에 간단히 세척하고 extravidin-peroxidase(264 purpurogallin units/ml)를 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응시켰다. pH 7.2, 0.15M PBS 완충용액에 0.1% BSA와 0.1% Tween 20이 첨가된 washing buffer에 간단히 세척한 후 기질에서 10분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 항체 농도, 반응 시간과 완충용액이 immobilization에 미치는 영향

최적의 immobilization 방법을 선택하기 위하여 beads를 증류수에 간단히 세척한 후 항체를 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 0.15M PBS(pH 7.2)와 0.01M sodium bicarbonate(pH 9.6) 완충용액에 희석하여 25 $^{\circ}$ C에서 3시간, overnight 동안 반응시킨 후 전술한 peroxidase 포화법을 실시하였다.

다. 전처리 고정법

전처리 고정법을 실시한 것과 전처리를 하지않고 immobilization 하였을 때의 polystyrene beads에 항체의 부착 능력을 비교하고자 하였다. 전처리 고정법에는 0.25% glutaraldehyde 또는 95% ethanol를 상온에서 3시간 반응시키는 2가지 방법과 상온에서 1시간 동안 0.25% glutaraldehyde 또는 95% ethanol과 반응시킨 후 항체와 25℃에서 1시간 반응시키고 다시 0.25% glutaraldehyde 또는 95% ethanol에 상온에서 30분간 처리하는 방법으로 총 4가지 방법을 조사하였다. 이 4가지 고정법을 실시한 후 immobilization하여 peroxidase 포화법과 판별지수로써 비교하였다. 판별지수는 2% BSA로 25℃에서 3시간 동안 blocking하고 5µg/ml EDTA 추출 항원과 50µg/ml biotin 표지화 항체를 차례로 37℃, 30분간 반응시킨 후 1:1000으로 희석한 extravidin-peroxidase를 상온에서 30분간 반응시켰다.

라. Blocking제

Blocking제와 농도에 따른 비특이적 항체 결합의 방지 효과를 분석하기 위해서 비포화 농도인 10µg/ml에 immobilization 시킨 후 비특이적 결합을 막아주는 blocking제로 흔히 사용되고 있는 BSA, gelatin, skim milk를 0.5, 1, 2%의 농도로 25℃, 3시간 반응시켰다. 이후에 항원, biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase를 전처리 고정법에서 실시한 ELISA법과 동일한 방법으로 반응시킨 후 판별지수로써 비교하였다.

마. PEG 첨가 실험

항체와 결합한 항원과 biotin 표지화 항체 사이의 반응을 증가시키기 위한 방법으로 biotin 표지화 항체의 희석액에 1, 2, 3, 4% PEG 6000을 첨가하였다. 50µg/ml의 항체로 immobilization 시킨 후 2% BSA로 blocking하여 1µg

/ml EDTA 추출 항원을 반응시켰다. 이후에 0~4% PEG가 첨가된 용액에 biotin 표지화 항체를 50 μ g/ml의 농도로 희석하여 반응시키고 1:1000으로 희석한 extravidin-peroxidase를 처리하여 판별지수로써 비교하였다.

바. Biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase의 농도 결정

Avidin-biotin법을 사용하는 본 연구방법의 적절한 biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase의 농도를 알아보기로자 1 μ g/ml EDTA 추출 항원을 처리한 후 12.5 μ g/ml과 50 μ g/ml 농도의 biotin 표지화 항체에 대해서 1:500, 1000, 2000, 4000으로 희석한 extravidin-peroxidase를 반응시켰다.

9. 조직을 사용한 열 추출 항원 제작

건강한 틸라피아와 넙치의 간, 신장과 비장 조직을 분리한 후 조직 g당 1:10과 1:100의 PBS 완충용액과 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 cells/g 농도의 FKC를 첨가하여 tissue tearor로 30초간 homogenation을 실시하였다. 이 homogenate를 100℃에서 30분간 증탕처리하고 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

10. 조직을 사용한 열 추출 항원에 detergent 첨가 실험

틸라피아 간조직을 사용한 열 추출 항원을 SDS, Tween 20, CHAPS(3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonate), MEGA-9(nonanoyl-N-methylglucamide), diethylene glycol monopentyl ether와 N-dodecyl-n,n-dimethyl-3-ammonio-1-propanensulfonate이 0.1%로 첨가된 PBS 완충용액으로 1:100으로 희석하여 ELISA법을 실시하였다.

11. stability 실험

항체를 immobilization시킨 bead의 보관시 온도, bead 상태, 그리고 보관 기간에 따른 항체의 activity 변화를 측정하고자 하였다. 항체를 immobilization시킨 beads를 2% BSA에 25℃, 30분간 blocking 처리한 후 건조시킨 상태에서 4℃와 25℃에서 보관하거나 0.1% sodium azide 첨가된 PBS 완충용액에 보관하였을때 1주, 4주, 8주, 12주째에 immobilization된 항체의 activity를 측정하였다. 건조시킨 beads 제작은 immobilization과 blocking 후에 PBS 완충용액에 간단히 세척하여 60℃에서 30분간 건조하여 제작하였고 ELISA를 실시하기전에 PBS 완충용액에서 30분간 hydration시켰다. 동일한 실험 조건을 유지하기 위해서 동일한 batch의 EDTA 추출 항원, biotin 표지화 항체, 그리고 extravidin-peroxidase를 실험기간동안 -20℃에 냉동보관하면서 실험하기 직전에 녹여서 사용하였다.

12. 현장 실험

우리나라 동해와 남해에 위치한 6군데의 낚치를 사육하는 양어장에서 edwardsiellosis의 임상적 증상을 나타내는 병어를 채집하였다. 무균적으로 병어의 간을 분리하여 총 세균수 측정을 위한 viable counting과 *E. tarda* 항원 검출을 위한 ELISA법을 실시하였다. Viable counting은 간조직과 멸균 PBS 완충용액을 1:1로 섞어서 homogenation을 실시한 후 10배씩 연속적으로 희석하여 TSA 평판배지에 100 μ 씩 떨어뜨려서 도말하였다. 25℃에서 24시간동안 배양하여 평판배지에서 자란 총 colony를 counting하고 개별적 세균 동정을 위하여 tooth stick으로 BHI배지 상에서 명확한 single colony 형태를 보이는 것을 무작위적으로 SS배지로 옮겨 48시간 후 black colony가 되는 것을 확인하였다. SS배지에서 특이한 형태와 전형적인 *E. tarda* 형태의 colony 5개를 선택하여 API 20E Kit로 균 종류를 동정하였으며 ELISA법은 직접 tissue homogenate를 96 well plate에 coating 후 biotin labeled anti-*E. tarda* 항체

를 사용하여 분석하였다. 병어로 부터 채취된 liver는 -70℃에서 보관하면서 필요시 녹인 후 homogenation과 heat extraction을 한 후 10배 희석하여 본 진단 kit로 진단을 실시하였으며 육안적으로 명확한 양성 반응을 보일 때 (+)로 하였다.

13. ELISA

가. 토끼 항혈청만을 이용한 ELISA법

Polystyrene beads(1/4 inch, Wako pure chemical)를 증류수에 간단히 세척한 후 45% 침전시킨 *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* H-4에 대한 토끼 항혈청을 50 μ g/ml의 농도로 0.01M sodium bicarbonate(pH 9.6) 완충용액으로 희석하여 습윤상자에서 25℃에서 overnight 동안 immobilization 시켰다. Immobilization된 beads를 PBS 완충용액에 녹인 2% BSA로 25℃, 3시간 동안 반응시켜 immobilization되지 않은 부분을 blocking한 후에 pH 7.2, 0.2% Na₂S₂O₃를 첨가된 PBS 완충 용액에 냉장보관하였다. 항원과 50 μ g/ml 농도의 biotin 표지화 항체를 습윤상자에서 37℃, 30분간 반응시키고, 1:2000으로 희석한 extravidin-peroxidase (Sigma chem. co.)는 상온에서 30분간 반응시켰다. 0.1% BSA가 첨가된 PBS 완충용액을 항원과 extravidin-peroxidase의 희석액으로 사용하였고 biotin 표지화 항체 희석액은 3% PEG 6000을 첨가한 용액을 사용하였으며 각 단계가 끝날때마다 pH 7.2, 0.15M PBS 완충용액에 0.1% BSA와 0.1% Tween 20이 첨가된 washing buffer에 간단히 세척하였다. 기질반응은 DMF(dimethylformamide, Sigma chem. co.)에 녹인 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma chem. co.)을 0.014% urea hydrogen peroxide가 첨가된 0.05M phosphate-citrate 완충용액, pH 5.0(Sigma chem. co.)에 첨가한 insoluble 기질에 5분간 반응시켰다. 그리고 기질 반응이 끝난 beads를 증류수로 간단히 세척한 후 0.014% urea hydrogen peroxide와 0.2 μ g/ml

2,2'-Azino-bis(3-Ethyl-benzthiazoline-6-Sulfonic acid)가 함유된 0.05M phosphate-citrate 완충용액, pH 5.0인 soluble 기질에 5분간 반응시킨 후 flat bottom의 96 well polystyrene microtiter plate에 200 μ l 첨가하여 ELISA reader(Bio-Tek EL312E)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 ELISA법을 Fig. 3에서 도식화하였다.

나. mouse 항혈청을 이용한 ELISA법

2차 항체로써 토끼 항혈청을 사용하는 방법과 mouse 항혈청을 사용하는 방법의 감도와 교차반응을 분석하였다. 항원을 반응시킨 후 *E. tarda* Edk-2에 대한 mouse 항혈청을 1:500으로 희석하여 습윤상자에서 37 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시키고 이후에 1:1000으로 희석한 biotin conjugated goat anti-mouse IgG antibody(Sigma chem. co.)와 습윤상자에서 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 extravidin-peroxidase와 기질 처리 과정은 토끼 항혈청만을 이용하는 방법과 동일하게 실시하였다. 본 ELISA법은 Fig. 4에서 도식화하였다.

14. 판별지수

본 실험의 immunoreactivity를 평가하기 위해서 판별 지수(discriminaton index)를 구하였다. 판별지수는 (positive O.D.치 - negative control O.D.치)/negative control O.D.치 \times 100 = % 로 구해진 값으로 이 수치가 50% 이상일때 positive로 판정하였다.

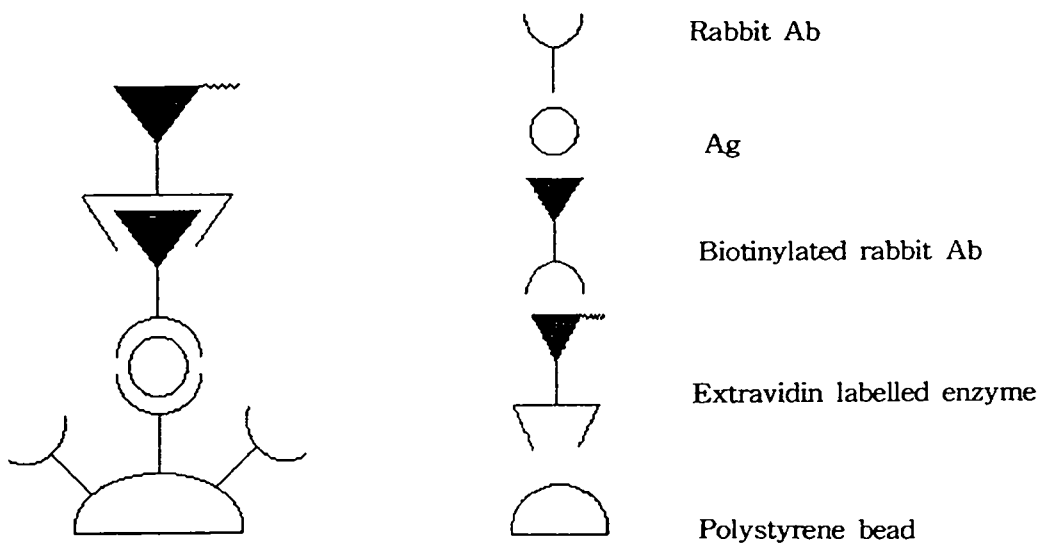


Fig. 3. Diagram of ELISA using rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 and H-4 antibody for the detection of antigen in tissue.

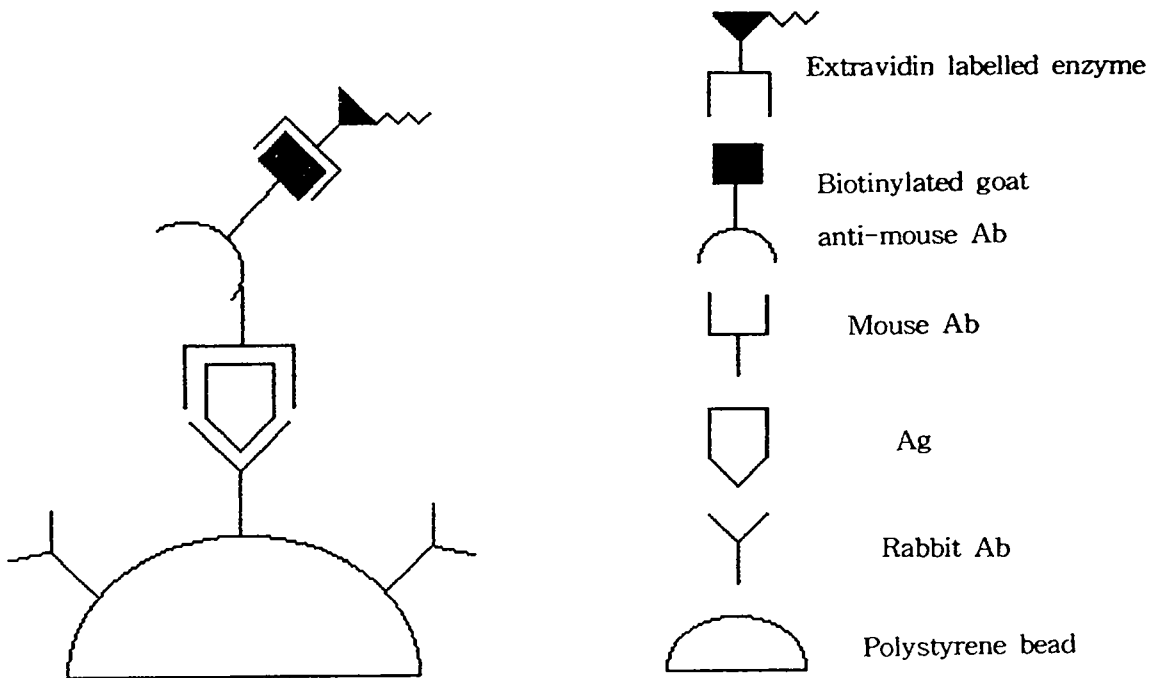


Fig. 4. Diagram of ELISA using mouse antibody as a secondary antibody.

제 3절. 결 과

1. 면역 처리한 항혈청 분석

E. tarda Edk-2와 H-4에 대한 토끼 항혈청과 *E. tarda* Edk-2에 대한 mouse 항혈청의 *E. tarda* 여러 균주와 다른 어병 세균과의 교차 반응을 응집 항체가로 나타내었다(Table 1). *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청은 1:51,200으로 매우 높은 응집항체가를 나타내었지만 넘치 병어에서 분리한 한국형 *E. tarda*와의 반응에서는 1:160~320으로 낮은 교차반응이 나타났고 다른 어병 세균과는 1:10이하~1:20로 교차반응이 매우 낮거나 나타나지 않았다. *E. tarda* H-4에 대한 토끼 항혈청은 1:640으로 비교적 낮은 응집항체가를 나타내었으나 Edk-2에 대한 항혈청과는 다르게 같은 분리균주인 *E. tarda*에 대해서는 높은 교차반응을 나타내었고, 다른 어병세균에 대해서는 교차반응을 나타내지 않았다. *E. tarda* Edk-2에 대한 mouse 항혈청은 1:1,280의 항체가를 나타내었지만 넘치에서 분리된 *E. tarda*균주와 다른 어병세균들과는 교차반응을 나타내지 않아 균의 epitope에 대한 인지도가 각 항체생성의 속주에 따라 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

2. 항체의 침전

일반적으로 토끼 Ig은 40% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액에 침전되는 것으로 알려져 있으므로 본 실험에서는 23% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 처리하여 분자량이 큰 단백질을 제거한 후 45% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 재침전시키는 ammonium sulfate를 이용한 염의 분자량 크기별 제거법으로 Ig를 분리하였다. *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청을 염분리법을 실시하였을때 그 수율은 총혈청 단백질의 36.5%였고 응집항체가에 있어서는 분리시키기 전과 동일한 1:51,200을 나타내어 단백질 mg당 응집항체가는 분리시키기 전 1:479에서 분리시킨 후에

Table 1. Cross-agglutination test of produced antibodies against different strains of bacteria.

Antigens	Antibodies		
	Rabbit anti- <i>E. tarda</i> Edk-2	Rabbit anti- <i>E. tarda</i> H-4	Mouse anti- <i>E. tarda</i> Edk-2
<i>E. tarda</i> Edk-2	1:51200	1:80	1:1280
<i>E. tarda</i> H-4	1:320	1:640	1:10이 하
<i>E. tarda</i> YE1	1:160	1:320	1:10이 하
<i>E. tarda</i> RE8	1:320	1:640	1:10이 하
<i>E. tarda</i> RE11	1:160	1:320	1:10이 하
<i>E. tarda</i> RE17	1:160	1:320	1:10이 하
<i>E. tarda</i> EE1	1:320	1:320	1:10이 하
<i>E. tarda</i> NY2	1:320	1:640	1:10이 하
<i>V. anguillarum</i> LS-174	1:20	1:10	1:10이 하
<i>A. salmonicida</i> MT004	1:20	1:10 이 하	1:10이 하
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	1:20	1:10 이 하	1:10이 하
<i>Y. ruckeri</i> 11-4	1:10이 하	1:10 이 하	1:10이 하
<i>Streptococcus</i> sp. NG8206	1:20	1:10 이 하	1:10이 하
<i>E. ictaruri</i>	1:10이 하	1:10 이 하	1:10이 하

1:2044로 약 4.3배정도 증가하였다(Table 2). 또한, *E. tarda* H-4에 대한 토끼 항혈청의 경우도 분리시키기 전과 분리시킨 후의 응집 항체가 1:640으로 동일하고 단백질량에 있어서는 60% 줄어들었기 때문에 mg당 응집항체가 1:5.8에서 1:11.5로 약 2배 정도 증가하였다(Table 3). 염분리법에 의하여 개괄적으로 분리된 Ig의 순수정도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 분리된 2nd precipitate된 것은 55,000 dalton 근처에서 Ig의 heavy chain으로 생각되어지는 band가 25,000 dalton 근처에서도 light chain으로 생각되어지는 band가 뚜렷하게 나타나 상당한 수준의 분리가 되었음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 1st precipitate와 2nd supernatant에서는 Ig 이외의 단백질들이 강한 band를 형성하여 혈청내 전체 단백질 중 25%를 차지하는 Ig는 거의 회수되어지고 그 외의 크고 작은 단백질들이 다수 제거되었음을 다시 한번 확인할 수 있었다(Fig. 5 & 6).

3. Solid phase ELISA법의 최적화 및 표준화

가. Bead 표면에서의 항체 immobilization법들의 효율 비교

Immobilization시 항체의 농도와 solid phase와의 반응 시간, 항체 희석용 완충용액을 달리하여 최적의 조건을 분석하였다. 완충용액으로는 0.01M sodium bicarbonate(pH 9.6)로써 항체 희석 후 overnight 동안 solid phase와 반응시켰을때 항체의 고정부분이 최대화되어 이후 처리된 peroxidase의 binding이 가장 최소로 되는 것으로 나타났으며, 항체 농도에 따라서 O.D.치가 급격히 감소하다가 50 μ g/ml 이상의 농도부터는 완만한 감소를 나타내어 50 μ g/ml 항체량이면 충분히 bead의 표면을 immobilization시킬 수 있는 포화 농도임을 알 수 있었다(Fig. 7). Glutaraldehyde와 ethanol에 1회 또는 2회 처리하는 4가지 전처리 고정법을 실시한 것과 아무런 전처리를 거치지 않고 immobilization하였을 때의 polystyrene bead에 항체의 부착 능력을

Table 2. Partial purification of antibody from the rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 serum using saturated ammonium sulfate precipitate.

Fraction	Protein concentration (mg/ml)	Total protein (mg)	Yield (%)	Agglutination titer (1:)	Specific activity
Whole serum	103	412		51200	479
1st precipitate	31.5	78.8	19	1600	51
1st supernatant	33.2	332	80.6	3200	96
2nd precipitate	25.1	138	33.5	51200	2044
2nd supernatant	7.4	192.4	46.7	200	27

Table 3. Partial purification of antibody from the rabbit anti-*E. tarda* H-4 serum using saturated ammonium sulfate precipitate.

Fraction	Protein concentration (mg/ml)	Total protein (mg)	Yield (%)	Agglutination titer (1:)	Specific activity
Whole serum	111	555		640	5.8
1st precipitate	36	90	16	160	4.5
1st supernatant	35	458	82.5	80	2.3
2nd precipitate	55.8	223	40	640	11.5
2nd supernatant	5.2	234	42.2	< 10	< 1.9

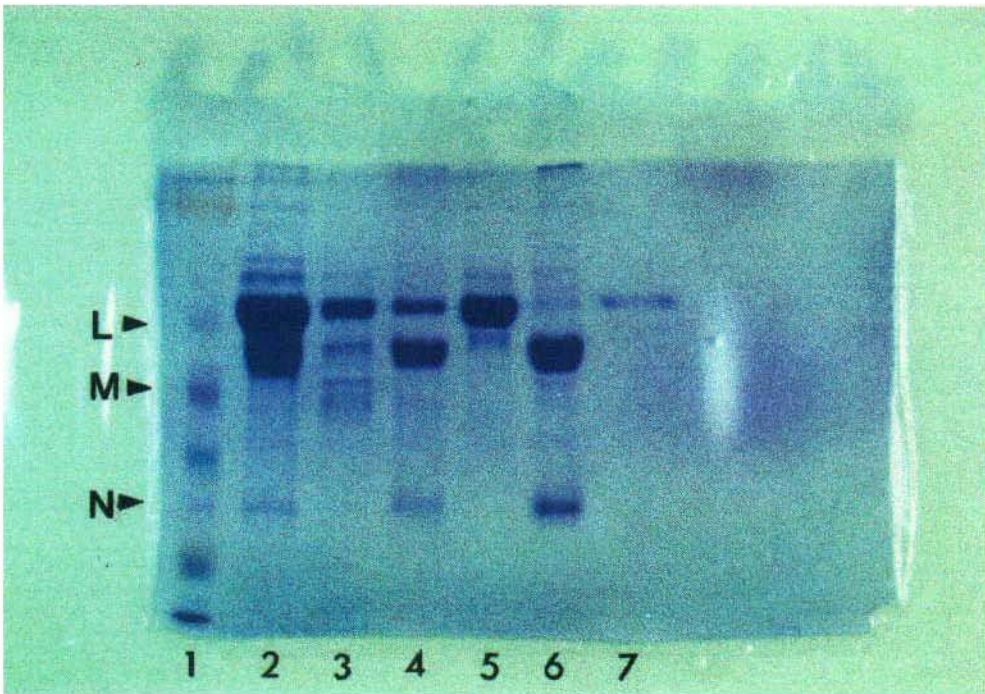


Fig. 5. Electrophoresis of 45% ammonium sulfate precipitated rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 antibody on a 12% polyacrylamide gel(SDS-PAGE) stained with Coomassie Brilliant Blue. Line 1 is standard of molecular weight. Line 2 is whole serum, line 3 is 1st precipitate, line 6 is 2nd precipitate and line 7 is 2nd supernatant. L, 60 Kda.; M, 42 Kda.; N, 22 Kda.

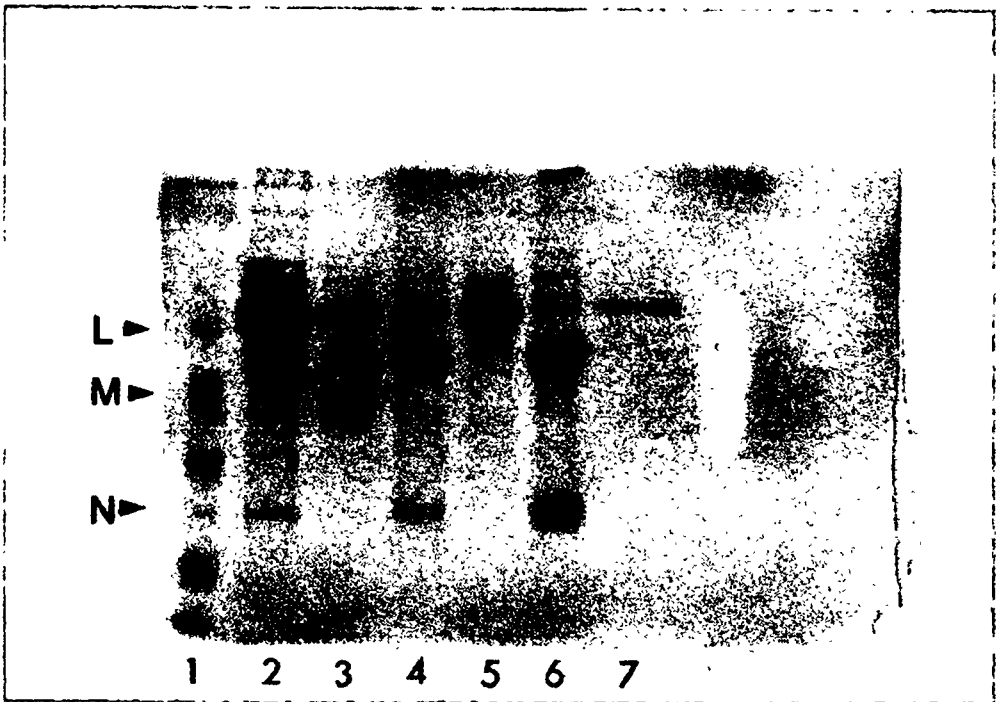


Fig. 5. Electrophoresis of 45% ammonium sulfate precipitated rabbit anti-*E. tarda* Edk-2 antibody on a 12% polyacrylamide gel(SDS-PAGE) stained with Coomassie Brilliant Blue. Line 1 is standard of molecular weight. Line 2 is whole serum, line 3 is 1st precipitate, line 6 is 2nd precipitate and line 7 is 2nd supernatant. L, 60 Kda.; M, 42 Kda.; N, 22 Kda.

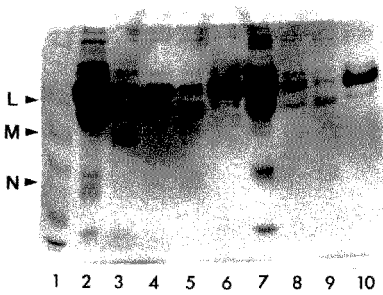


Fig. 6. Electrophoresis of 45% ammonium sulfate precipitated rabbit anti-*E. tarda* H-4 antibody on a 12% polyacrylamide gel(SDS-PAGE) stained with Coomassie Brilliant Blue. Line 1 is standard of molecular weight. Line 2 is whole serum, line 3 is 1st precipitate, line 5 is 2nd precipitate and line 6 is 2nd supernatant. L, 60 Kda.; M, 42 Kda.; N, 22 Kda.

peroxidase 포화법을 실시한 후 판별 지수(discrimination index)로 구하여 비교하였다. Immobilization시킨 항체의 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도에서는 포화 정도가 0.25% glutaraldehyde에 2회 고정시킨 것이 다른 고정법과 차이를 보였으나, 포화 농도인 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 5가지 방법 모두다 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 8). 그러나, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ EDTA 추출 항원을 처리한 positive 결과와 희석액만을 처리한 negative control의 차이를 나타내는 판별 지수는 0.25% glutaraldehyde를 2회 처리한 것이 394%, 1회 처리한 것이 382%, 고정법으로 전처리하지 않고 sodium bicarbonate 완충용액에 immobilization한 것이 396%으로 고정법을 사용하여도 유사한 결과를 보였으므로 이후의 모든 실험에서는 복잡한 전처리 과정을 실시하지 않고 증류수에 세척 후 즉시 항체를 bead에 immobilization 시켰다(Table 4).

나. Blocking제의 효과 분석

비포화 농도인 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 immobilization시킨 후 비특이적 결합을 막아주는 blocking제로 흔히 사용되고 있는 BSA, gelatin, skim milk를 각각 0.5, 1, 2% 농도로 25°C 에서 3시간 동안 처리하였다. BSA 처리시 비교적 낮은 negative O.D. 치와 231, 245, 289% 높은 판별지수를 나타내어서 각각의 농도에서 다른 blocking agent와 비교하여 높은 negative O.D. 치를 나타낸 gelatin과 낮은 positive O.D. 치를 보여주는 skim milk보다 좋은 결과를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 2% BSA를 blocking agent로 사용하여 25°C 에서 3시간동안 처리하였다(Table 5).

다. PEG가 표지화 항체의 특이 결합에 미치는 영향

Soluble 항원과 항체의 결합을 증가시키기 위하여 biotin 표지화 항체의 희석액으로 1, 2, 3, 4%의 PEG6000이 첨가된 용액을 사용하였다. 그 결과

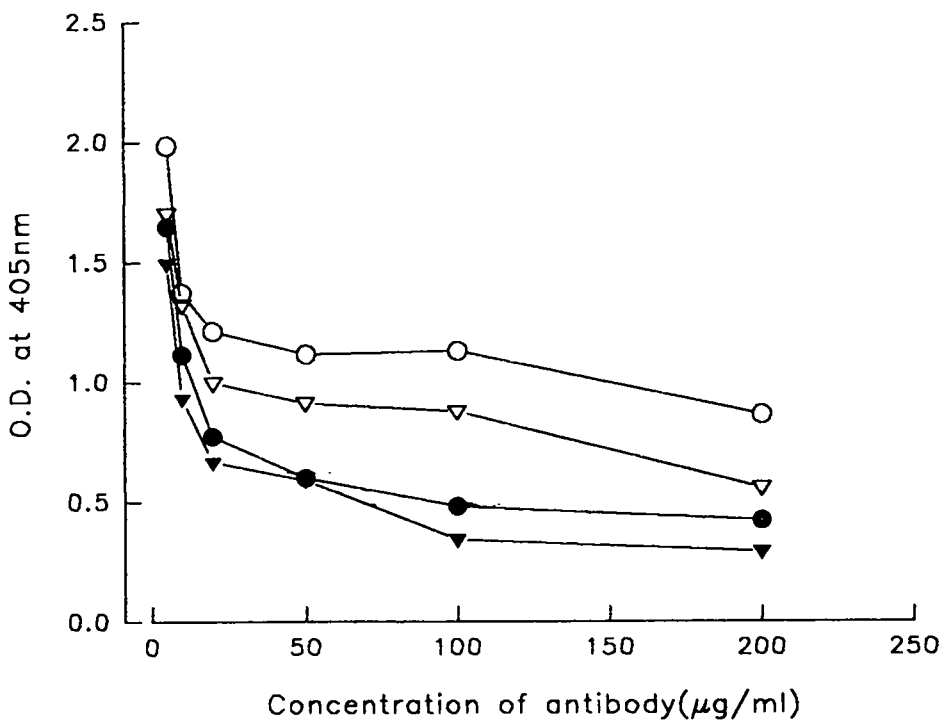


Fig. 7. Sautraton level on bead with increasing concentration of antibody under different immobilization buffers and times. \circ , immobilized in pH 7.2 PBS buffer containing antibody at 25°C for 3hrs; \bullet , immobilized in pH 7.2 PBS buffer containing antibody at 25°C for overnight; ∇ , immobilized in pH 9.6 sodium bicarbonate buffer containing antibody at 25°C for 3hrs; \blacktriangledown , immobilized in pH 9.6 sodium bicarbonate buffer containing antibody at 25°C for 3hrs.

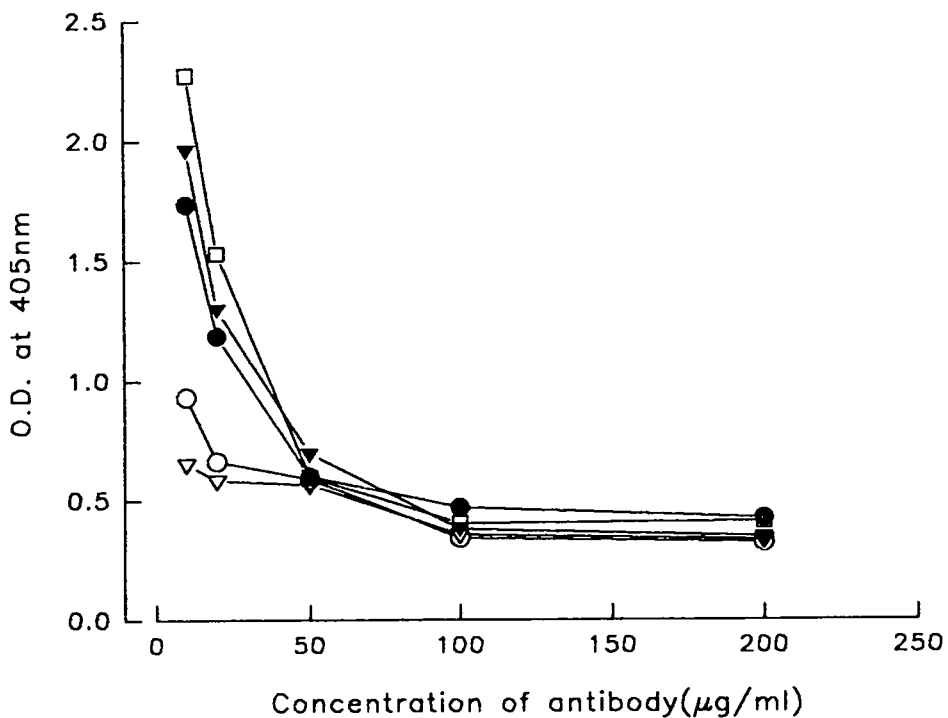


Fig. 8. Sautraton level on bead with increasing concentration of antibody under different fixing methods. ○, used in 0.01M sodium bicarbonate buffer(pH 9.6) without fixing step; ●, treated with 0.25% glutaraldehyde once; ▽, treated with 0.25% glutaraldehyde twice; ▼, treated with 95% ethanol once; □, treated with 95% ethanol twice.

Table 4. Immunoreactivity of antibody-coated bead evaluated by the comparison of a positive and negative control.

	Fixing methods					
	PBS ^a	Carbonate ^b	G1 ^c	G2 ^d	E1 ^e	E2 ^f
Positive ¹	1.014*	1.107	1.109	1.096	1.013	0.839
Negative ²	0.285	0.223	0.230	0.222	0.240	0.253
Discrimination index(%)	256	396	382	394	323	232

^a used in 0.15M PBS(pH 7.2) without fixing step

^b used in 0.01M sodium bicarbonate buffer(pH 9.6) without fixing step

^c treated with 0.25% glutaraldehyde once

^d treated with 0.25% glutaraldehyde twice

^e treated with 95% ethanol once

^f treated with 95% ethanol twice

¹ treated with 5 μ g of EDTA extracted antigen per ml on immobilized bead.

² treated with PBS instead of antigen on immobilized bead.

* O.D. value at 405nm

Table 5. Effects of different blocking agents on positive and negative control.

	Blocking agents								
	BSA			Gelatin			Skim milk		
	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%	0.5%	1%	2%
Positive ¹	0.910*	0.770	0.728	0.822	0.814	0.663	0.498	0.454	0.419
Negative ²	0.275	0.223	0.215	0.320	0.276	0.230	0.285	0.248	0.240
Discrimination index(%)	231	245	289	157	195	188	75	83	75

¹ treated with 5 μ g of EDTA extrated antigen per ml on immobilized bead.

² treated with PBS instead of antigen on immobilized bead.

* O.D. value at 405nm

positive, negative control O.D.치가 모두 농도가 증가함에 따라 O.D.치도 증가하였지만, 3%농도까지는 negative 결과의 O.D.치 증가폭이 작았으나 4% PEG 농도에서는 큰 폭으로 증가하였다. 그러므로 본 실험에서는 139%의 판별 지수를 보이는 3%농도로 사용하는 것이 적당한 것으로 나타났다(Fig. 9).

라. Extravidin-peroxidase 적정 농도 결정

12.5 μ g/ml과 50 μ g/ml biotin 표지화 항체에 대해 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000로 희석한 extravidin-peroxidase(264 purpurogallin units/ml)를 처리하여 판별지수를 구하였다. 12.5 μ g/ml의 biotin 표지화 항체를 처리한 것은 반응이 전체적으로 미약하였고, 50 μ g/ml biotin 표지화 항체를 사용하였을 때 extravidin을 1:500으로 희석 사용시 positive O.D.치가 0.601로 가장 높았으나 negative control O.D.치 또한, 0.273으로 높았기때문에 1:1000이나 1:2000 보다는 판별지수가 낮았으며 1:1000과 1:2000의 희석배수를 사용시 판별지수 상으로는 140%와 139%로 유사하였으나 negative control의 O.D.치가 0.241과 0.196이었으므로 이후의 모든 실험에서는 biotin 표지화 항체는 50 μ g/ml의 농도로 처리하고 extravidin-peroxidase는 1:2000으로 희석하여 사용하였다 (Fig. 10).

4. EDTA 추출 항원과 열 추출 항원의 검출 한계 비교

1 $\times 10^{10}$ cell/ml의 농도의 whole cell을 사용하여 열 추출시킨 항원과 5 $\times 10^9$ cell/ml 농도에서 추출시킨 EDTA 추출 항원을 희석하여 검출한계를 알아보았다. 판별지수가 50% 이상인 positive 결과를 나타내는 검출한계는 열 추출 항원은 5 $\times 10^5$ cell/ml이었고, EDTA 추출 항원은 1 $\times 10^5$ cell/ml이하로 나타나 EDTA 추출법에 의하여 조제된 항원이 보다 높은 반응성을 보여주었다(Fig. 11 & 12).

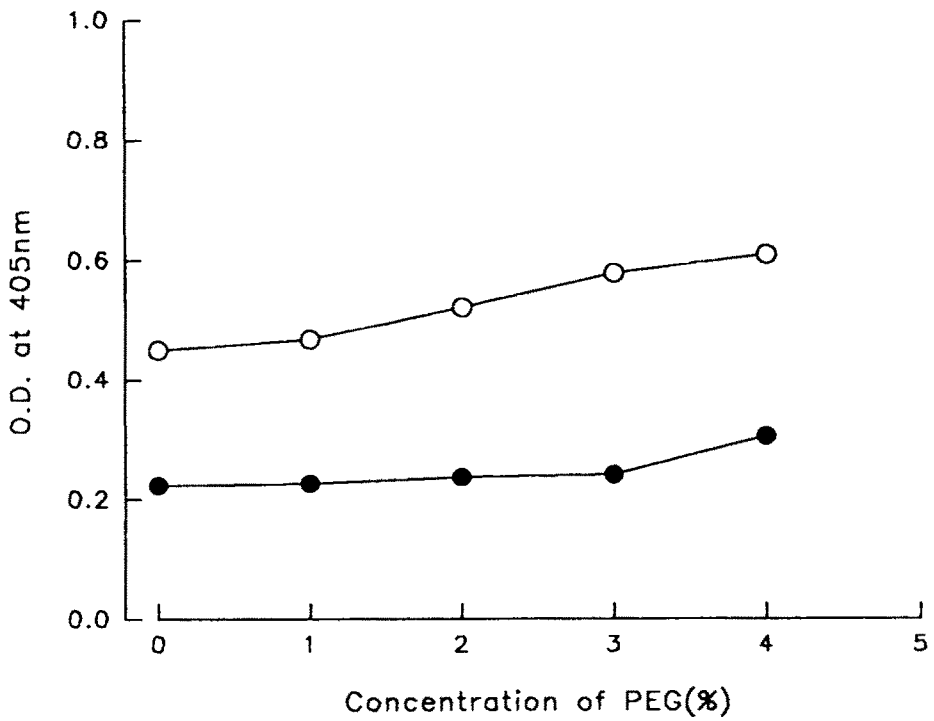


Fig. 9. Influence of increasing concentrations of PEG on the reaction of biotinylated anti-*E. tarda* antibody and antigen. ○, positive control; ●, negative control.

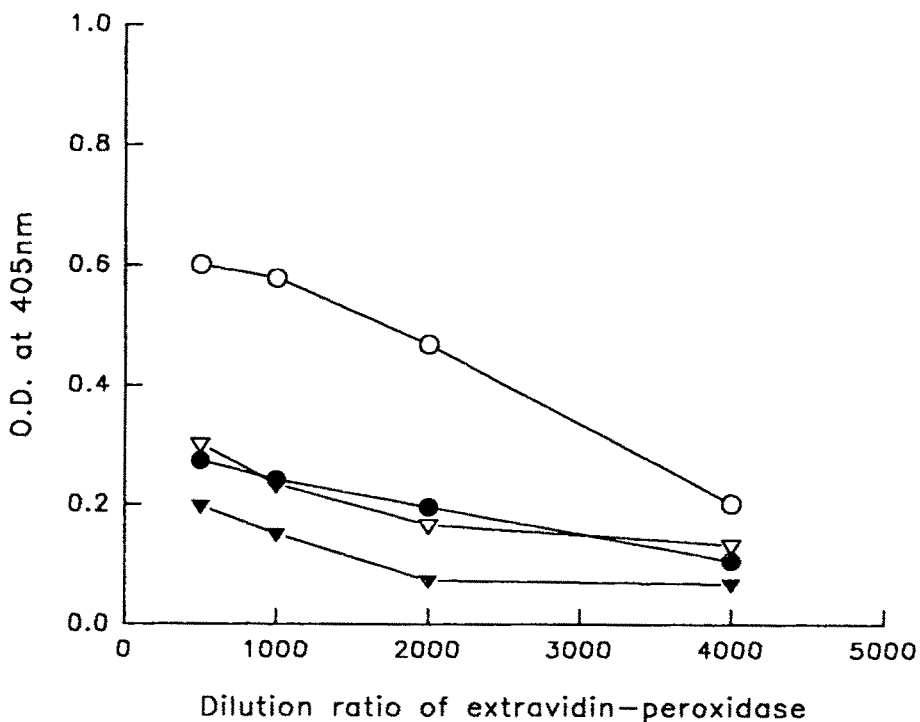


Fig. 10 Effect of extravidine-peroxidase and biotinylated anti-*E. tarda* antibody concentration on the positive and negative control by sandwich ELISA on bead. ○, used 50 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as positive control; ●, used 50 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as negative control; ▽, used 12.5 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as positive control; ▼, used 12.5 µg/ml biotinylated anti-*E. tarda* antibody as negative control.

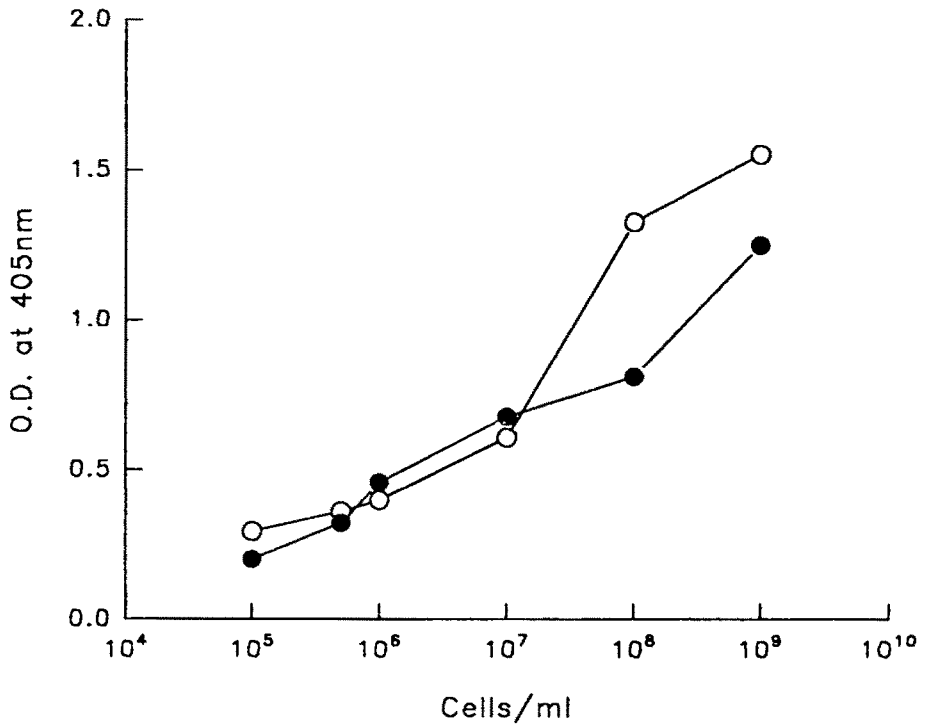


Fig. 11. Detection level of sandwich ELISA on bead against antigens prepared different ways. ○, heat extracted antigen; ●, EDTA extracted antigen. ※ O.D. value of negative control : 0.196

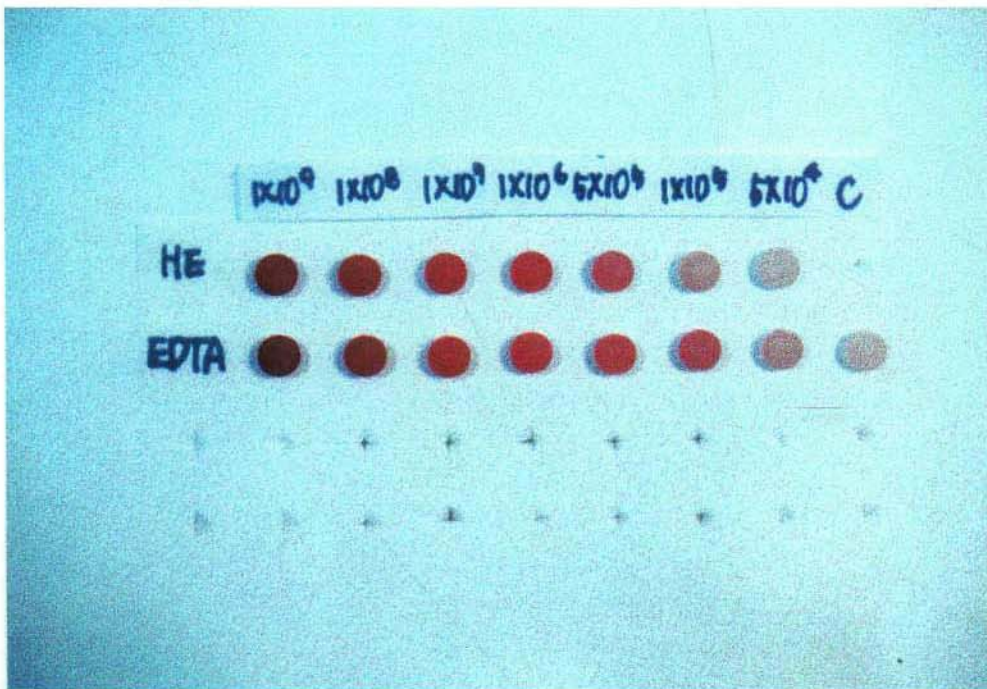


Fig. 12. Detection level of sandwich ELISA on bead against antigens prepared different ways. HE, heat extracted antigen; EDTA, EDTA extracted antigen; c, negative control.

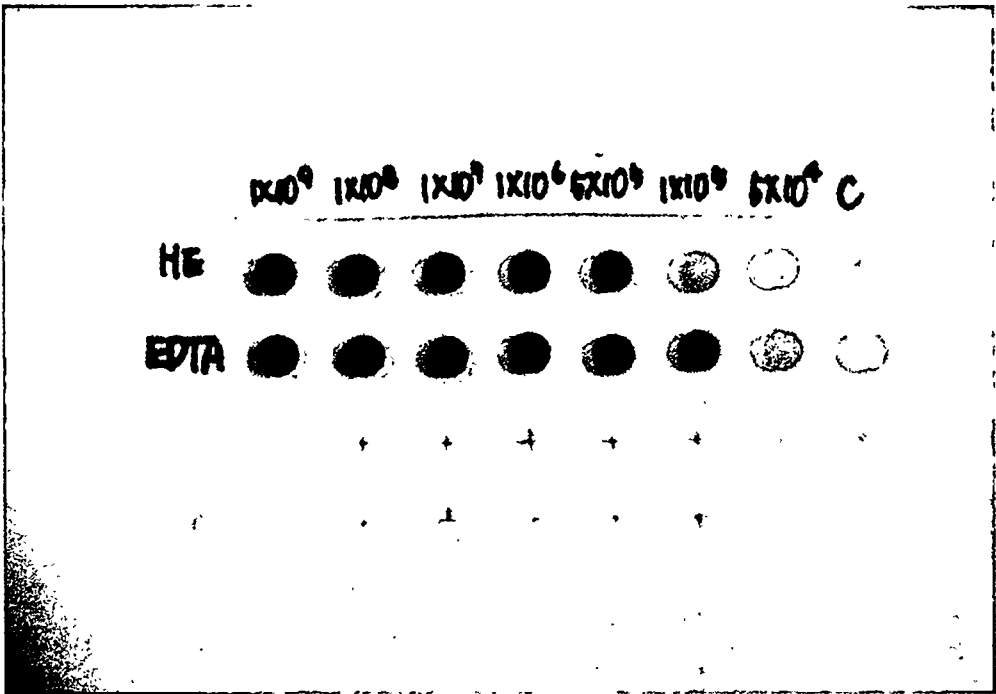


Fig. 12. Detection level of sandwich ELISA on bead against antigens prepared different ways. HE, heat extracted antigen; EDTA, EDTA extracted antigen; c, negative control.

5. *E. tarda*간의 교차반응 정도와 다른 어병세균과의 반응 여부

일본에서 분리된 *E. tarda* Edk-2항원에 대한 토끼 항혈청을 이용하는 본 진단 kit가 넙치 병어에서 분리한 한국형 *E. tarda*를 항원으로 하였을 때 나타나는 교차반응 정도를 열추출 항원을 사용하여서 알아보았다. Table 6에서 보는 바와 같이 Fig. 11의 결과와 비교해보았을 때 한국형 *E. tarda* 모두에서 10^6 cell/ml 이하를 검출해 낼 수 있는 반응도를 나타내었다. 다른 어병세균들과의 반응을 실험결과, *Vibrio anguillarum* LS-174, *A. hydrophila* ATCC7966 과 *Y. ruckeri* 11-4, *A. salmonicida* MT004, *Pseudomonas* spp. 와 *Streptococcus* sp. 에 있어서 고농도인 10^8 /ml에서도 negative control과 유사한 O.D.치를 나타내어 *E. tarda*를 제외한 다른 종의 세균에 대한 교차반응은 없는 것으로 나타났다(Table 6 & Fig. 13, 14).

6. Mouse anti-*E. tarda* Edk-2 항체의 사용

Sandwich ELISA법을 사용하는 본 실험에서 앞의 최적화 실험은 immobilization 항체와 biotin 표지화 항체를 동일한 polyclonal 토끼 항체를 사용하였다. 방법을 달리하여 immobilization용으로 토끼 항체를 사용하고 항원과 반응시킨 후 이중인 mouse 항체를 secondary 항체로 사용하였다. 이후 1:500으로 희석된 goat anti-mouse peroxidase conjugated를 처리하여 전술한 실험들과의 감도를 비교하고자 하였다. *E. tarda* Edk-2의 열추출 항원에 대해서 검출한계가 5×10^5 cells/ml로 토끼 항체만을 사용한 방법의 검출한계인 5×10^5 cells/ml과 1×10^5 cells/ml과 유사하고, 현장의 병어로부터 분리한 *E. tarda* YE1과 RE8 균주의 검출한계 또한 1×10^6 cells/ml 정도로 큰 차이를 나타내지 않았지만 background는 토끼 항혈청만을 사용한 것보다 낮았다(Fig. 15).

Table 6. Intra-species cross-reaction by sandwich ELISA on bead.

Serotype	Number of bacteria for heat extrated antigen(cells/ml)			
	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
H-4	0.488* (149 [†])	0.441(125)	0.380(94)	0.227(16)
YE1	0.735(275)	0.624(218)	0.366(87)	0.258(32)
RE8	0.715(265)	0.550(180)	0.270(37)	0.248(27)
RE11	0.741(278)	0.536(173)	0.309(58)	0.200(2)
RE17	0.683(248)	0.556(184)	0.287(46)	0.202(3)
EE1	0.693(253)	0.620(216)	0.398(103)	0.209(7)
NY2	0.747(281)	0.451(130)	0.261(33)	0.196(0)
EDK-2	0.810(313)	0.677(245)	0.458(134)	0.200(2)

* O.D. value at 405nm

[†] Discrimination index(%)

※ O.D. value of negative control : 0.196

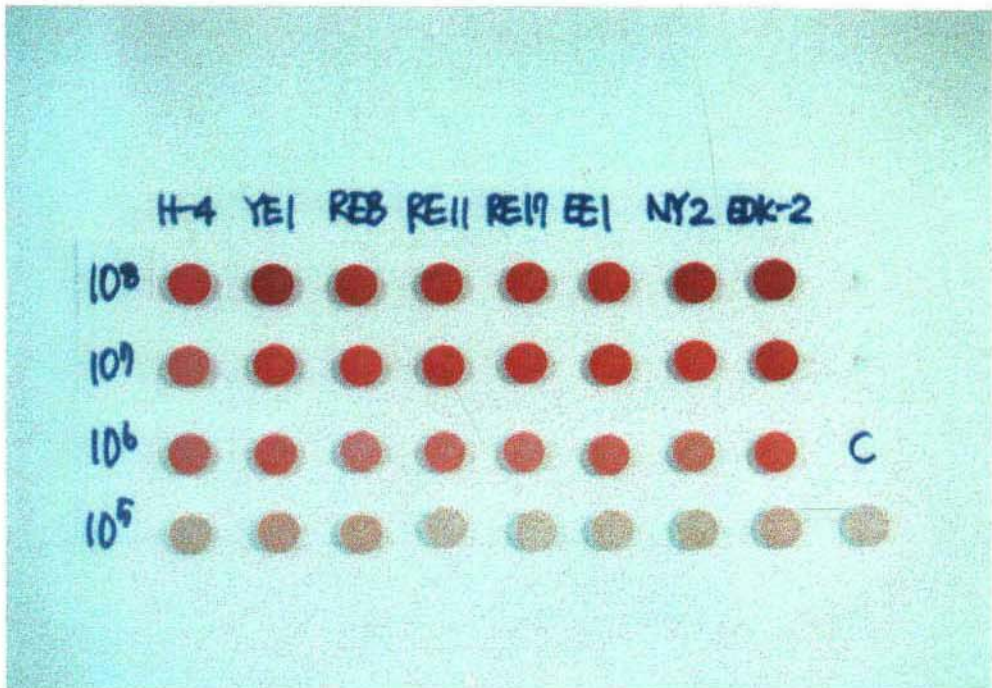


Fig. 13. Intra-species cross-reaction level of sandwich ELISA on bead. H-4, *E. tarda* H-4; YE1, *E. tarda* YE1; RE8, *E. tarda* RE8; RE11, *E. tarda* RE11; RE17, *E. tarda* RE17; EE1, *E. tarda* EE1; NY2, *E. tarda* NY2; EDK-2, *E. tarda* Edk-2; C, negative control.

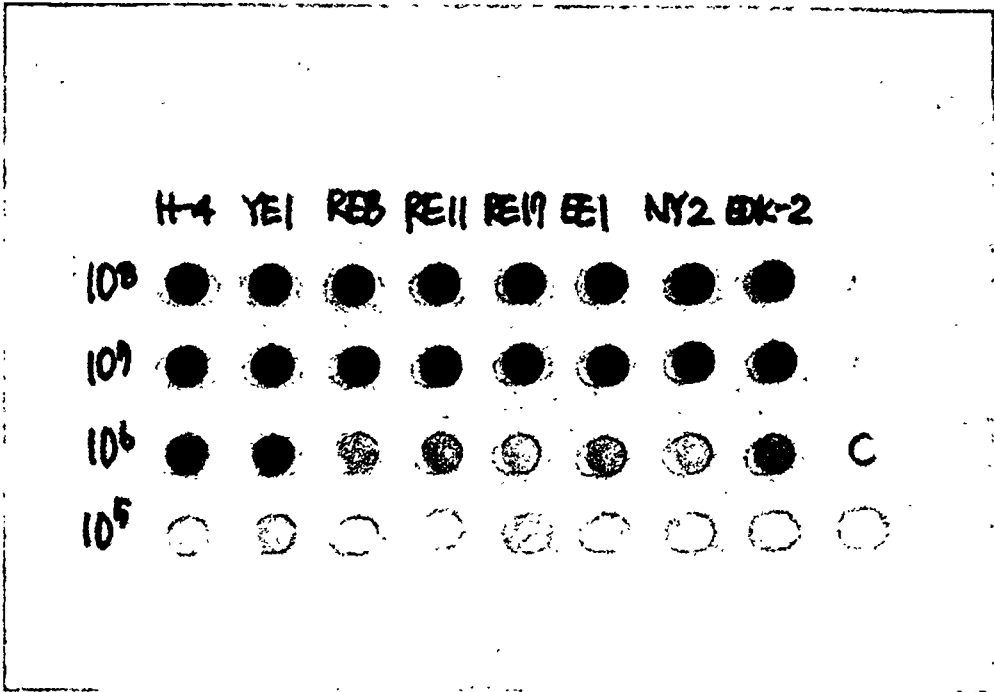


Fig. 13. Intra-species cross-reaction level of sandwich ELISA on bead. H-4, *E. tarda* H-4; YE1, *E. tarda* YE1; RE8, *E. tarda* RE8; RE11, *E. tarda* RE11; RE17, *E. tarda* RE17; EE1, *E. tarda* EE1; NY2, *E. tarda* NY2; EDK-2, *E. tarda* Edk-2; C, negative control.

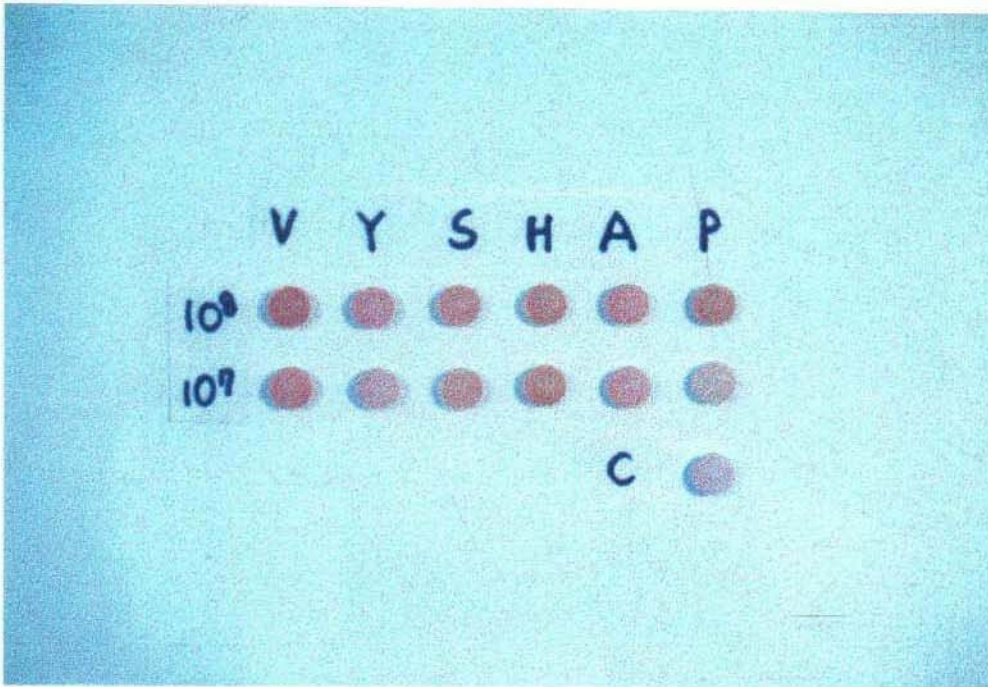


Fig. 14. Specificity of sandwich ELISA on bead. V, *Vibrio anguillarum* LS-174; Y, *Yersinia ruckeri* 11-4; S, *Streptococcus* sp. NG8206; H, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966; A, *Aeromonas salmonicida* MT004; P, *Pseudomonas* sp.; C, negative control.

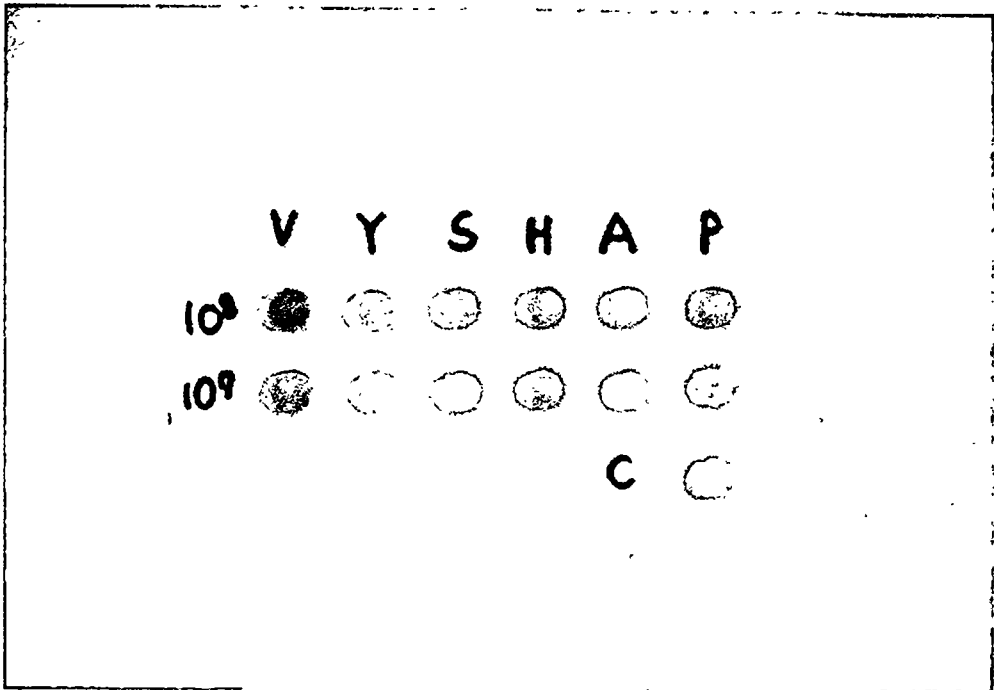


Fig. 14. Specificity of sandwich ELISA on bead. V, *Vibrio anguillarum* LS-174; Y, *Yersinia ruckeri* 11-4; S, *Streptococcus* sp. NG8206; H, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966; A, *Aeromonas salmonicida* MT004; P, *Pseudomonas* sp.; C, negative control.

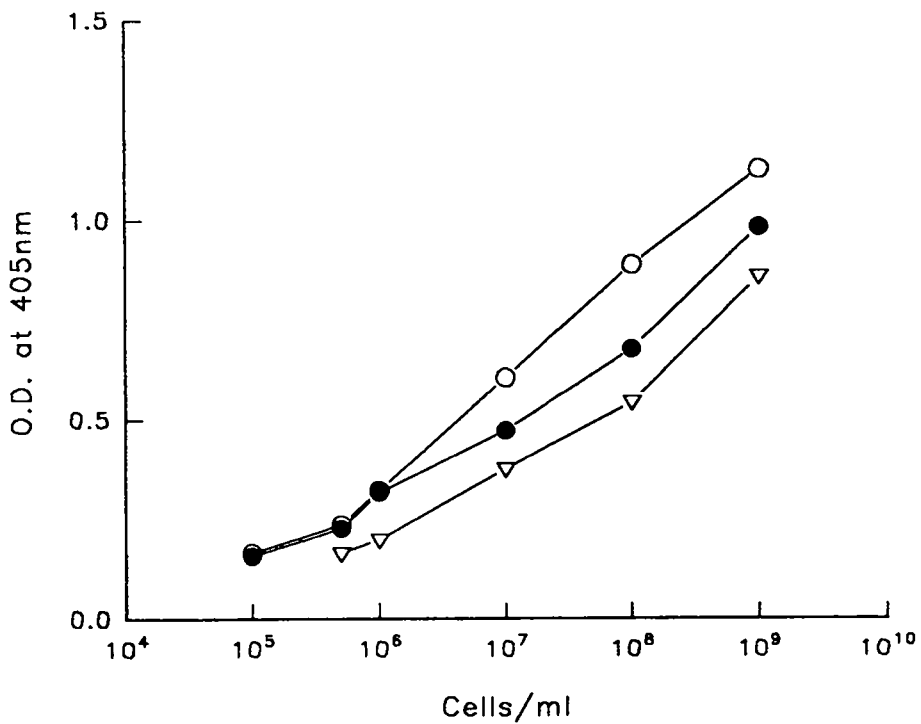


Fig. 15. Detection level of sandwich ELISA on bead with mouse anti-*E. tarda* Edk-2 antibody as a secondary antibody. ○, heat extracted antigen of Edk-2; ●, heat extracted antigen of YE1; ▽, heat extracted antigen of RE8. * O.D. value of negative control : 0.135.

7. Rabbit anti-*E. tarda* H-4 항체를 사용한 실험 결과

본 실험에서는 Edk-2를 면역처리하여 얻은 항체를 사용하여 분석방법의 표준화 및 최적화를 연구하였다. 이렇게 확립된 분석 방법을 다른 균주를 항원으로 하였을 때도 적용 가능한지를 알아 보았다. 병어로부터 분리한 H-4 균주를 토끼에 면역처리하여 항혈청을 침전시켜서 Edk-2 항체의 실험과 마찬가지로 immobilization용과 biotin시킨 2차 항체로 사용하여 *E. tarda* Edk-2와 H-4등의 병어로부터 분리한 균 또는 다른 어병 세균과의 교차반응을 분석하였다. 생성된 토끼는 1:640의 비교적 낮은 응집 항체가 나타내었지만 본 실험 방법을 적용하였을 때 Table 7에서 보는 바와 같이 병어로부터 분리한 균주에 대해서 1×10^5 cells/ml의 검출한계를 나타내어 한국형 *E. tarda*에 대해서 Edk-2보다는 약간 더 높은 감도를 보이고 다른 어병세균과의 교차반응은 없었다(Table 7).

8. 조직내 항원검출에 detergent가 미치는 영향

조직에 각 농도의 whole cell을 첨가하여 열 추출시킨 후 0.1% SDS, Tween 20, CHAPS, MEGA-9, Diethylene glycol monopentyl ether와 N-Dodecyl-n, n-dimethyl-3-ammonio-1-]propanensulfonatedetergent 를 첨가한 희석액에 희석하였다. Detergent를 첨가한것이 detergent를 첨가하지 않은 것에 비해 높은 O.D. 치를 나타내었는데, 1:100으로 희석된 homogenate extract 사용시 10^8 cell/ml에서는 SDS처리시에 1.235, 10^7 cell/ml에서는 Tween20 처리시에 0.871로 가장 높은 O.D. 치를 나타내었으나 tissue homogenate만 사용한 negative control에서는 어떤 detergent도 첨가하지 않은 것이 0.172로 가장 낮았다. 그러나 판별지수상에서 0.1% diethylene glycol monopentyl ether가 가장 좋은 효과를 보여주어 향후의 실험에서는 nonionic 계면활성제인 0.1% diethylene glycol monopentyl ether를 첨가제로 사용하였다(Table).

Table 7. Detection level and intra-species cross-reaction of sandwich ELISA on bead with rabbit anti-*E. tarda* H-4 antibody.

Serotype	Number of cells for heat extracted antigen(cells/ml)						
	1×10^8	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5	5×10^4
H-4	1.074* (543)	0.918 (450)	0.638 (282)	0.591 (254)	0.476 (185)	0.362 (117)	0.201 (20)
YE1	1.002 (500†)	0.803 (381)	0.656 (293)	0.538 (248)	0.476 (185)	0.311 (86)	0.170 (2)
RE8	0.944 (465)	0.852 (410)	0.770 (361)	0.667 (299)	0.607 (263)	0.402 (141)	0.231 (38)
RE11	1.005 (502)	0.893 (434)	0.617 (269)	0.537 (222)	0.463 (177)	N. D.	N. D.
RE17	0.818 (390)	0.754 (351)	0.662 (296)	0.550 (229)	0.453 (171)	0.371 (122)	N. D.
EE1	0.901 (440)	0.809 (384)	0.743 (345)	0.637 (281)	0.539 (223)	0.299 (79)	0.200 (20)
NY2	0.823 (393)	0.770 (361)	0.692 (314)	0.664 (298)	0.487 (192)	0.299 (79)	N. D.
Edk-2	0.821 (392)	0.711 (326)	0.459 (175)	0.186 (11)	N. D. †	N. D.	N. D.

* O.D. value at 405nm

† Discrimination index(%)

† N. D. : not determined

※ O.D. value of negative control : 0.167

Table 8. Effect of detergents on the detection level of antigen in tissue homogenate.

Number of cells (cell/ml)	Detergents						
	Control ^a	SDS ^b	Tween ^c	CHAPS ^d	MEGA-9 ^e	Diethyl ^f	Dodecyl ^g
1 × 10 ⁸	0.840* (388)	1.235 (340)	1.165 (273)	1.133 (359)	1.030 (375)	1.063 (437)	1.050 (372)
1 × 10 ⁷	0.707 (311†)	0.851 (203)	0.871 (179)	0.853 (245)	0.798 (268)	0.869 (339)	0.807 (186)
Control ¹	0.172	0.281	0.312	0.247	0.217	0.202	0.282

¹ liver homogenate heat extracted without antigen

^a diluted in PBS buffer

^b diluted in PBS buffer containing 0.1% SDS

^c diluted in PBS buffer containing 0.1% Tween 20

^d diluted in PBS buffer containing 0.1% CHAPS

^e diluted in PBS buffer containing 0.1% MEGA-9

^f diluted in PBS buffer containing 0.1% diethylene glycol monopentyl ether

^g diluted in PBS buffer containing 0.1% N-dodecyl-n,n-dimethyl-3-ammonio-1-propan-ensulfonate

* O.D. value at 405nm

† Discrimination index(%)

9. 어류 조직이 항원 검출 한계에 미치는 영향

틸라피아 간조직을 1:10과 1:100의 조직 농도로 희석하여 각 농도의 FKC를 첨가하여 열 추출 시킨 항원의 검출한계와 1×10^9 cells/g의 항원을 첨가하여 제작한 열 추출 항원을 PBS로 연속적으로 희석했을때의 검출한계를 비교하였다. 3가지 다른 조직 농도에서 모두다 검출한계가 5×10^5 cells/ml로 조사되었고 조직 농도가 증가하였어도 negative control의 O.D.치는 변화있는 증가를 보이지 않았으므로 감염이 비교적 약하게 된 어류에서 조직을 열 추출할 때 희석배율을 적게하더라도 항원을 검출하는데 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러나 1:10으로 희석한 homogenate를 희석액으로 사용하였을때 약간의 O.D.치 감소 현상이 나타나 고농도의 조직은 항원과 항체 반응을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 16 & 17). Edwardsiellosis가 여러 어종의 담수어와 해산어에서 발병하므로 다른 어종에서 각 장기별 검출한계가 차이가 있는지 알아보기 위하여 담수에서의 대표적 양식어인 틸라피아와 해산어에서의 대표적 양식어인 넙치의 간, 비장, 신장 조직을 g당 1:100의 PBS 완충용액과 항원을 각각 첨가하여 열 추출시켰을때의 검출한계를 비교하였다. 그 결과 어종과 조직에 상관 없이 5×10^5 cells/ml로 동일하였고 background도 유사하였다(Table 9).

10. 안정성

Immobilization된 bead를 4℃와 25℃에서 PBS 완충용액 내에서 보관할때와 건조한 상태에서 각각 보관하였을때 immobilization된 항체의 activity를 가장 잘 유지할 수 있는 보관 방법을 알아보려고 하였다. Fig. 18에서 보는 바와 같이 PBS 완충용액 내에서 보관하는 것은 4주째까지는 positive의 O.D.치가 처음의 O.D.치와 유사한 0.5 정도를 유지하다가 8주째에는 0.3 정도로 immobilization된 항체의 activity가 현격하게 저하되었다. bead를 60℃에서

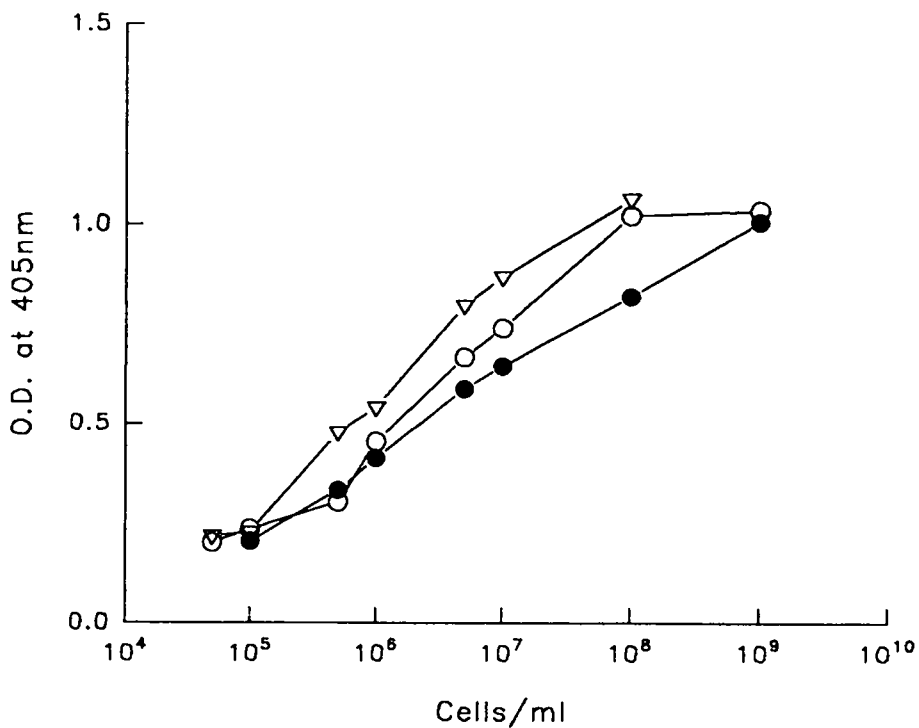


Fig. 16. Effect of the concentration of tissue homogenate on the detection level of heat extracted antigen. ○, heated antigen with PBS buffer, O.D. value of negative control : 0.196; ●, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:10 in PBS buffer, O.D. value of negative control : 0.194; ▽, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:100 in PBS buffer, O.D. value of negative control : 0.202.

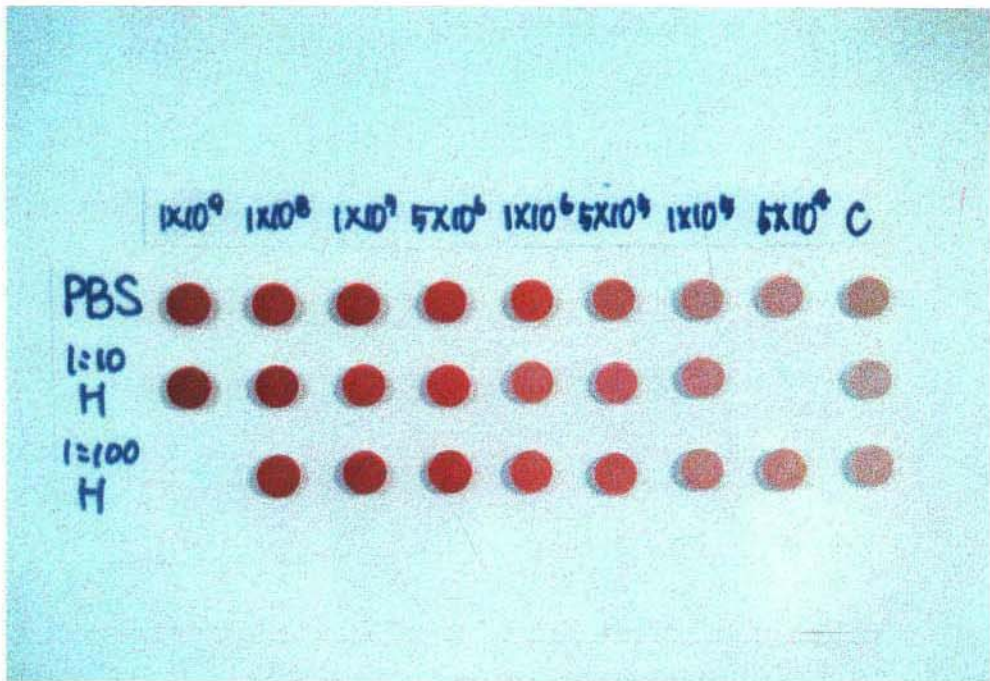


Fig. 17. Effect of the concentration of tissue homogenate on the detection level of heat extracted antigen. detection level. PBS, heated antigen with PBS buffer; 1:10 H, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:10 in PBS buffer; 1:100 H, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:100 in PBS buffer.

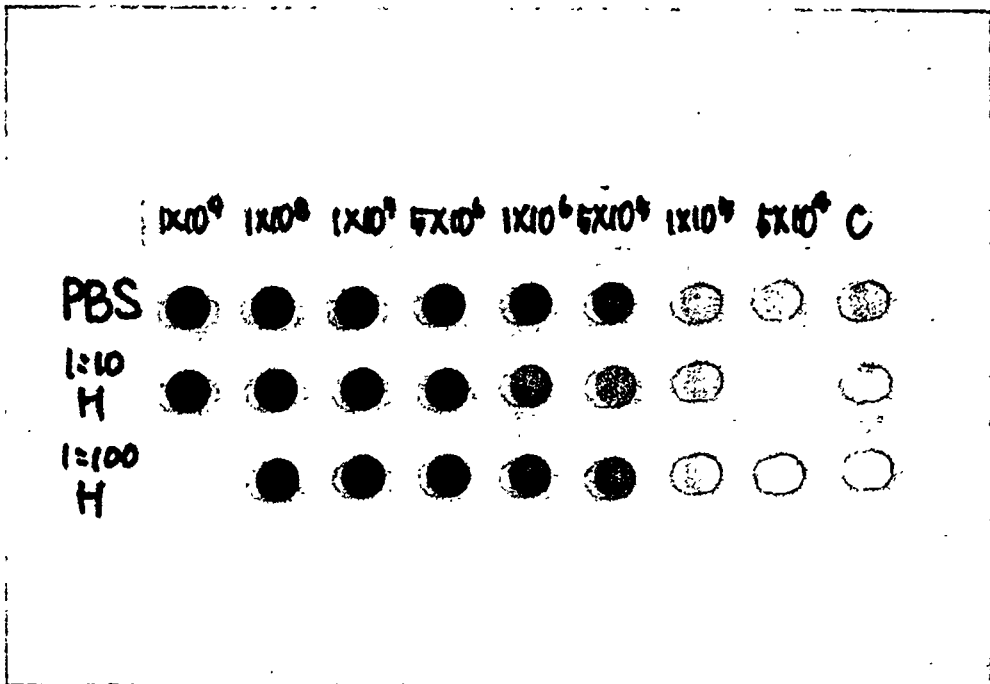


Fig. 17. Effect of the concentration of tissue homogenate on the detection level of heat extracted antigen. detection level. PBS, heated antigen with PBS buffer: 1:10 H, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:10 in PBS buffer: 1:100 H, heated antigen with tissue homogenate diluted 1:100 in PBS buffer.

Table 9. Detection level of heat extracted antigen from different tissues of different fishes.

Fish	Organ	Number of bacteria for the preparation of heat extracted antigen (cells/ml)						Negative
		1×10^8	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5	
Tilapia	Liver	1.063 * (462)	0.869 (330)	0.798 (295)	0.541 (168)	0.479 (139)	0.228 (13)	0.202
	Spleen	1.153 (479) [†]	0.873 (389)	0.801 (303)	0.555 (179)	0.362 (82)	0.201 (1)	0.199
	Kidney	1.114 (423)	0.908 (326)	0.823 (286)	0.576 (170)	0.455 (114)	0.259 (22)	0.213
Flounder	Liver	1.046 (396)	0.909 (331)	0.800 (279)	0.582 (176)	0.448 (112)	0.249 (18)	0.211
	Spleen	1.190 (480)	0.896 (337)	0.803 (292)	0.536 (161)	0.354 (73)	0.225 (10)	0.205
	Kidney	1.011 (368)	0.885 (310)	0.782 (262)	0.493 (128)	0.353 (63)	0.231 (7)	0.216

* O.D. value at 405nm

[†] Discrimination index(%)

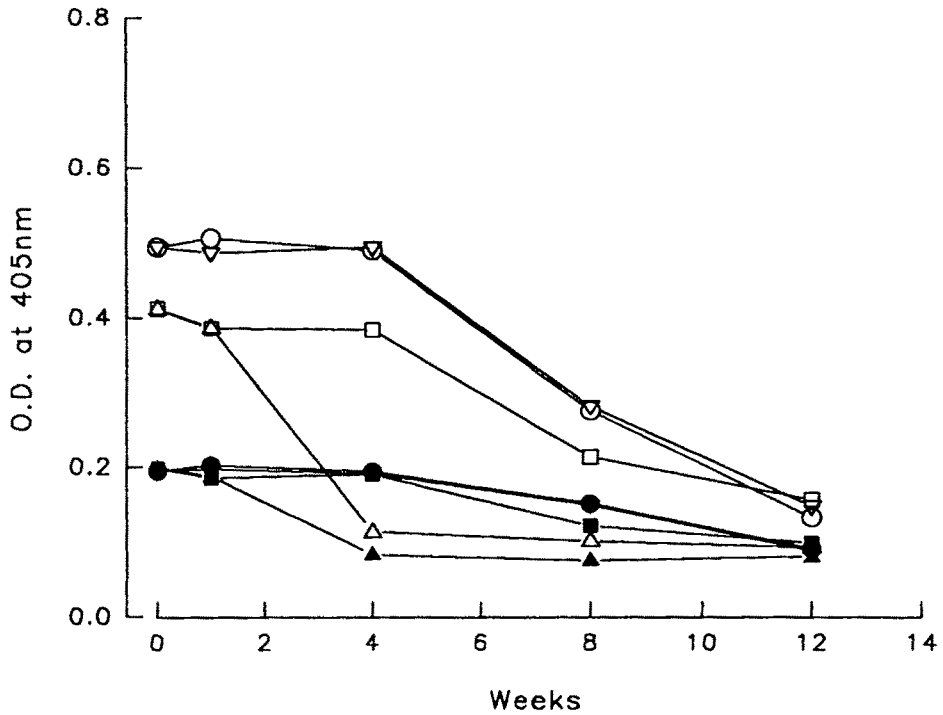


Fig. 18. Activity of immobilized bead depend upon the preserved temperature and period on different condition. ○, stored in PBS buffer at 4°C; ●, stored in PBS buffer at 4°C as negative; ▽, stored in PBS buffer at 25°C; ▼, stored in PBS buffer at 25°C as negative; □, stored under dry condition at 4°C; ■, stored under dry condition at 4°C as negative; △, stored under dry condition at 25°C; ▲, stored under dry condition at 25°C as negative.

30분간 건조하여 제작하는 경우는 보관 온도와 상관없이 PBS에서 보관하는 것에 비교해서 positive의 반응이 낮아서 판별지수에서 46%의 차이가 나며 25℃의 경우는 보관하는 동안에도 4주째 그 activity가 현격하게 저하되어서 bead를 건조한 상태에서 보관하는 것보다 PBS 완충용액에 보관하는 것이 immobilization된 항체의 activity를 유지하는데 더 유리한 것으로 평가되었다(Fig. 18).

11. 우리나라 양식장으로 부터 분리한 *E. tarda*균의 항생제에 대한 특성 분석.

1994-1995년 까지 동해안과 남해안 일대의 넙치 배양장으로 부터 edwardsiellosis의 증상을 보이는 넙치를 채취하여, 각 병어의 장기(간장, 비장, 신장)를 TSA평판 배지에 도말하여 22℃ 18시간 배양하였다. 얻어진 세균 집락을 다시 SS배지에 접종하고 22℃ 18시간 배양한 후에는 중심부가 검고 가장자리가 투명한 세균집락을 얻을 수 있었으며 좀 더 정확히 동정하기 위해 API 20E test를 실시하여 *Edwardsiella tarda*로 확인 동정하였다. 동정된 균에 대하여 수산용 약제로 자주 사용되고 있는 5가지 항생제에 대하여 감수성 분석을 실시하여 edwardsiellosis에 대한 대처방안 강구에 기본 data를 제공하고자 하였다. 본 실험에 사용된 항생제는 Oxytetracycline(OTC : Sigma), Oxolinic acid(OA : Sigma), Chloramphenicol(CM : Sigma), Florphenicol(한국동물약품주식회사, Aquafen : florphenicol 2.5% 함유), Norfloxacin(대성미생물연구소, quinabic : norfloxacin nicotinate 7% 함유)을 사용하였으며 내성 분석을 위하여 사용된 기법은 Brilliant black을 균의 viability 측정에 사용하는 것으로 96 well plate에 broth, dye, 세균 그리고 2 fold로 희석된 항생제를 혼합하고 18시간 배양한 후 색깔의 변화가 blue→yellow로 되지 않는 최소의 항생제 농도를 MIC로 하였다. 분석된 결과는 Table 10에 나타내었다.

Table 10. Minimum inhibitory concentration of 21 *E. tarda* strains against five different antimicrobial agents.

단위 : $\mu\text{g/ml}$

OStrains	OTC	OA	CM	NF	FP
RE 1	62.5	1.563	200	0.684	1.563
RE 2	3.906	0.391	3.125	0.342	0.781
RE 3	0.977	0.391	1.563	0.171	0.781
RE 4	0.487	0.781	3.125	0.684	0.781
RE 5	1.953	0.195	1.563	0.171	0.781
RE 6	0.489	0.195	3.125	0.171	0.781
RE 7	0.489	0.195	3.125	0.684	0.781
RE 8	0.977	0.391	3.125	0.171	0.781
RE 9	15.625	0.391	3.125	2.734	1.563
RE10	0.977	0.098	1.563	0.171	0.391
RE11	6.25	0.781	6.25	0.684	50
RE12	0.489	0.195	1.563	0.171	0.781
RE13	62.5	1.563	200	0.684	3.125
RE14	1.953	0.195	3.125	0.171	0.781
RE15	3.906	0.391	6.25	0.684	6.25
RE16	125	1.563	12.5	2.734	25
RE17	0.489	0.195	3.125	0.171	0.781
RE18	0.977	0.391	3.125	0.684	12.5
RE19	62.5	0.781	50	21.875	100
RE20	0.489	0.781	3.125	0.684	0.781
RE21	15.625	1.563	12.5	5.469	0.781

Table 11. Distribution of MIC values of the isolated strains.

MIC value($\mu\text{g/ml}$)	OTC	OA	CM	NF	FP
0.049미만					
0.049~0.098					
0.098~0.195		7		8	
0.195~0.391		6		1	
0.391~0.781	6	4		8	14
0.781~1.563	4	4			1
1.563~3.125	2		14	2	1
3.125~6.25	3		2	1	1
6.25~12.5			2		1
12.5~25	2			1	1
25~50			1		1
50~100	3				1
100~200	1		2		
200이상					
계	21	21	21	21	21

12. 분리된 *E. tarda* 중 내성균의 특성을 갖는 균주의 비율 분석

Table 10에서 분석된 MIC의 각 항생제에 대한 농도별 분포를 보면 Table 11과 같다. 이때 내성균의 정의를 일반적인 규칙에 따라 최소 MIC값을 갖는 균의 4배이상의 MIC값을 갖는 것으로 한다면 (현장에서 최소 MIC값의 4배이상의 MIC값을 나타내는 균주는 치료하기가 어렵다.), OTC는 42.9%, OA는 19%, CM은 14.3%, NF는 19% 그리고 FP은 24%의 내성균 분포를 보였다. 그러나 OA에 대해서는 MIC값이 좁은 범위에서 분포되어 있으나 나머지 4가지 항생제에 대해서는 그 범위가 넓게 분포되어 있어 *edwardsiellosis*의 치료시 내성균 문제가 심각하게 될 수 있는 것은 OTC, CM, NF, FP이며 비교적 완화된 내성균 출현의 형태로 나타날 수 있는 것은 OA임을 알 수 있었다.

13. 현장 적용 결과

개발된 연구 결과를 현장의 병어를 대상으로 하여 직접 실시하여 그 결과를 분석하고 이때 어떠한 문제점이 현장 적용에서 나타났는지 조사하여 보므로써 실험실과 현장 적용의 결과를 서로 보완할 수 있는 방안 제시를 해 보고자 하였다.

먼저 동해안(경주 근교)과 남해안 양식장에서 채집된 넙치 병어(Fig. 19), 특히 *edwardsiellosis*의 외부 증상을 보이는 어류에 대하여 준비된 Kit를 사용하여 진단함과 동시에 분리된 세균을 API 20E 세균 동정 Kit로도 균의 종류를 identify하였다. 많은 병어는 *E. tarda* 감염 외에도 secondary infection 특히 *Pseudomonas*에 의하여 질병이 진행되고 있는 복합 감염 상태에 있었다.

Fig. 20과 Table 13에서 보는 바와 같이 본 연구실에서 준비한 진단 kit를 사용하였을 때 쉽게 항원균주의 존재에 대한 판단이 가능하여 *edwardsiellosis* 진단 kit로서의 충분한 활용성을 보여 주고 있다. 그러나 몇가지 점을 자체적으로 분석하므로써 보다 많은 정보의 축적을 해 나가고자 한다.

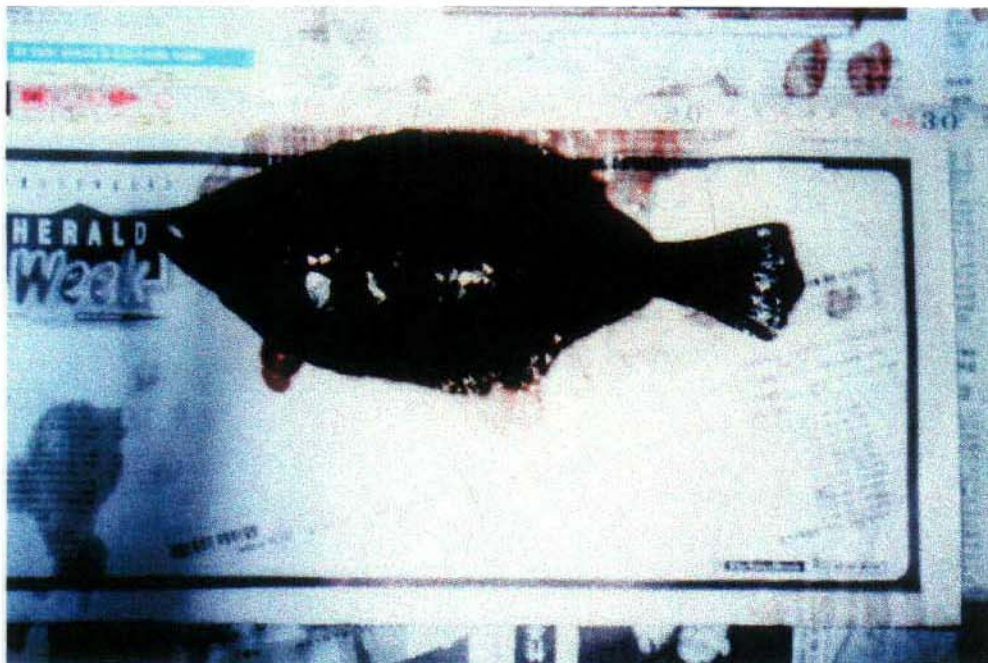


Fig. 19. Gross sign of *E. tarda* infected flounder.



Fig. 19. Gross sign of *E. tarda* infected flounder.

Table 12. External signs and bacterial numbers in the liver of diseased fish

양어장 ¹	sample 수	외부증상	평균 세균 수 ² /g tissue (BHI 배지 사용)
동해 1	2	안구돌출, 탈장 있음, 복수 미약 체색 변화, 장기 nodule은 있음	$8.3\sim 9.7\times 10^9$
동해 2	3	ulcer 있음, 안구돌출, 체색흑화 kidney 액화, nodule 없음	$2.0\sim 3.0\times 10^8$
동해 3	2	장기 nodule 있음, 탈장, 안구돌출 복수 있음	$5.1\sim 6.4\times 10^9$
남해 1	3	spleen 증대, 탈장, 체색 흑화, 복수, nodule 있음	$2.3\sim 5.2\times 10^9$
남해 2	1	복수, 탈장 있음, ulcer 없음, nodule 있음, kidney 액화	3.0×10^9
남해 3	2	탈장, ulcer 있음, 복수, hemolysis 있음, nodule 없음	$6.7\sim 6.8\times 10^8$
합	13		

2: 채취된 병어의 liver의 homogenate를 BHI배지에서 counting하였다.

1: 양어장의 이름은 주인들이 익명으로 할 것을 요구하였다.

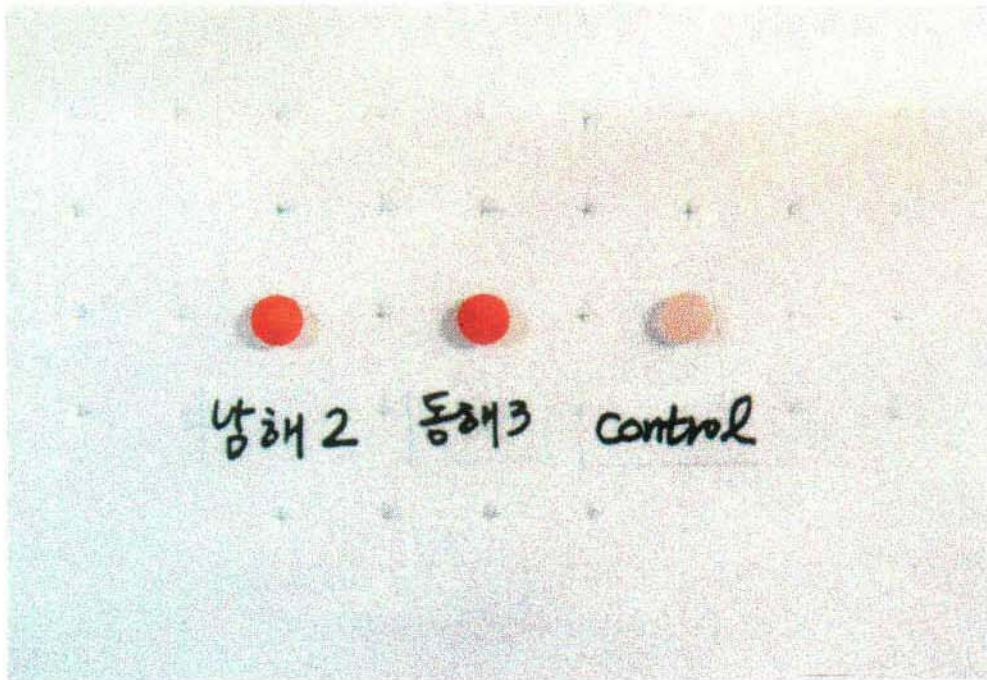


Fig. 20. Result of sandwich ELISA for the detection of *E. tarda* in the tissue of infected of flounder naturally.

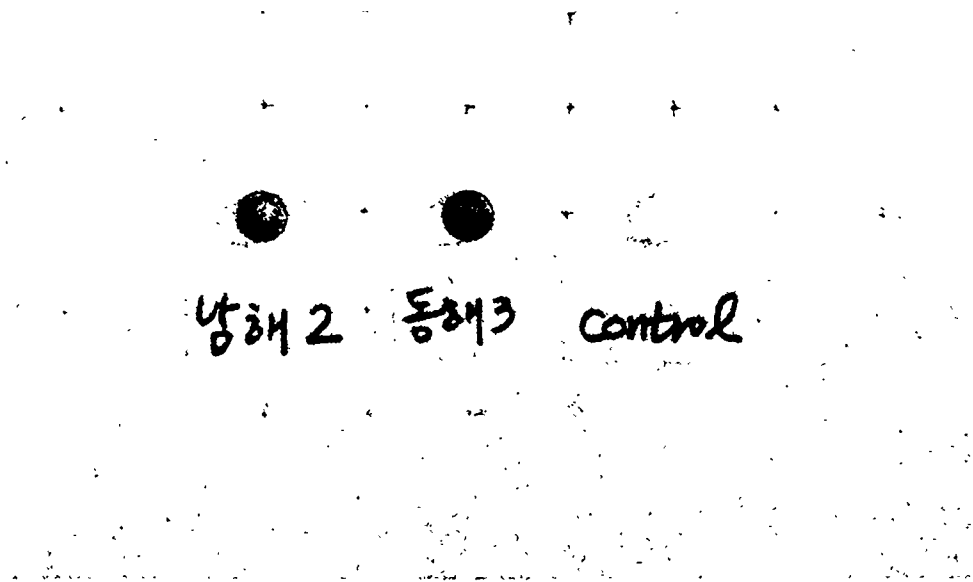


Fig. 20. Result of sandwich ELISA for the detection of *E. tarda* in the tissue of infected of flounder naturally.

Table 13. Identification of bacteria and its comparison with the result of immunological analysis.

양어장	SS배지 (black colony/40)	API 20E 확인	ELISA법	Kit 사용
동해 1	18~32/40	<i>E. tarda</i> , <i>Pseudomonas</i>	4, 1	+, ±
동해 2	3 ~12/40	<i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i>	0, 0, 1	-, -, -
동해 3	34~39/40	<i>E. tarda</i>	5, 5	+, +
남해 1	23~27/ 4	<i>E. tarda</i> , <i>Pseudomonas</i>	3, 2, 2	+, +, -
남해 2	38/40	<i>E. tarda</i>	5	+
남해 3	6~9/40	<i>Cytobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	1, 0	-, -, -

- 1: BHI에서 자란 colony 40개를 무작위적으로 tooth stick으로 SS배지에 옮긴 후 검은 colony로 되는 숫자를 헤아렸습.
- 2: 무작위적으로 5개의 colony를 동정한 것임.
- 3: 표준 균주 사용시의 결과를 5(O.D 0.6이상)로 한 것임.
- 4: 육안적으로 control과 명확한 구별이 가능할 때, +로 하였습.

제 4절. 고 찰

ELISA법은 지금까지 어류 질병의 진단시 조직내 항원을 직접 검출하기 위한 방법으로 많이 보고된바 있지만 전문적 지식과 특수장비가 필요하므로 양식 현장에서 어병 진단시 이 방법을 적용하기에는 많은 어려움이 따랐다. 이런 문제점을 해결할 목적으로 본 실험에서는 polystyrene bead라는 solid phase 상에서의 ELISA법을 표준화하고 최적화시켜 어류의 항원을 분석하는 진단 kit 화에로의 응용방법들을 개발하는 연구를 실시하였다.

질병의 진단에 있어서 ELISA법은 원인체의 자극에 의해서 병어에서 생성되는 항체를 검출하는 방법과 병어의 조직이나 혈액속에 존재하는 항원을 검출하는 2가지 방법으로 나뉘어진다. 항체를 검출하는 방법은 질병이 급성으로 오는 경우나 미약할 경우 항체의 생성이 극히 미약하여 검출되지 않는 경우가 많으며 기술적으로 이 방법을 사용하는데 있어서 한 질병에 대해서 어류마다 각각의 어류 항체에 대한 2차 항체를 준비해야 하는 번거로움의 단점이 있다. 이에 비하여 항원 검출 방법은 검출 감도도 좋으며 한 질병에 대해서는 한 종류의 항체를 준비하며 모든 어류에 적용가능하다는 이점을 가지고 있다. 이러한 항원을 검출하는데 있어서는 solid phase에 항원을 coating시키고 항원과 특이적으로 반응하는 효소가 결합된 1차 항체를 사용하는 direct법과 항원과 결합하는 1차 항체를 사용하고 1차 항체와 특이적으로 반응하는 효소가 결합된 2차 항체를 사용하는 indirect ELISA법이 있으며 solid phase에 항체를 coating시키고 항원을 반응시킨 뒤 2차 항체를 항원과 결합시키는 sandwich ELISA법이 사용되어 진다. Indirect/direct ELISA법은 조직내 항원 외의 다량 존재하는 단백질이나 지질 등이 항원이 solid phase와 결합하는 것을 inhibition한다는 보고(Poulos *et al.*, 1994)가 있었으므로 병어의 조직내에서 항원을 검출하고자 하는 본 연구 목적에 있어서 장애 요소로 작용하였다.

그리고 monoclonal 항체를 사용한 Song 등(1992)의 보고에서 indirect ELISA 법의 경우는 검출한계가 10^6 cells/ml이었고 sandwich ELISA법은 10^4 cells/ml로 약 100정도의 감도차이를 보일뿐아니라 sandwich법이 indirect법보다 검출한계에 있어서 뛰어나다는 다수의 보고에 의해서 본 연구에서는 avidin과 biotin의 강한 affinity를 이용한 sandwich ELISA법을 실시하였다.

응집항체가 1:51,200인 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청의 적절한 immobilization 항체 농도를 알아본 결과, $50\mu\text{g/ml}$ 가 포화농도로 결정되었고, immobilization시 사용하는 완충용액은 salt 농도가 높은 PBS보다는 sodium bicarbonate 완충용액이 bead와 항체 결합을 용이하게 하는 것으로 보이며, 충분한 반응 시간을 주는 것이 bead 표면에 항체를 immobilization하는데 중요하다라는 것을 확인하였다(Fig. 7). 0.25% glutaraldehyde와 95% ethanol을 사용한 전처리 고정법을 실시하였지만 Morissette 등(1990)과 Divis 등(1994)의 보고에서 고정효과가 있다는 보고와 달리 본 실험에서는 유사한 판별지수를 나타내었으므로 복잡한 절차를 거치는 고정법을 사용하지 않고 bead를 증류수에 간단히 세척한 즉시 immobilization 시켰다(Fig. 8). 비특이적 결합을 막아주는 blocking제 선택에 있어서는 BSA가 가장 좋았는데 negative control의 O.D. 치에 있어서는 skim milk도 비교적 낮았지만 positive 결과가 다른 blocking제에 비해서 낮아 skim milk내의 거대 분자량 단백질 등이 immobilization되어 있는 항체의 기능을 충분히 발휘하지 못하게 하는 효과가 어느 정도 있는 것으로 추정 할 수 있었다(Table 5). Biotin 희석액에 PEG 6000을 첨가하여 사용하였을때 농도가 증가함에 따라 반응 정도도 증가하였는데 이 결과는 Hellsing과 Richter(1974)의 polymers가 soluble 항원과 항체사이의 반응을 촉진시킨다는 보고 결과와는 일치하였고, Morissette(1991) 등에 의한 보고에서와 같이 PEG농도가 증가함에 따라서 negative control의 농도도 증가 경향이 나타났다. 그러나 4% 농도로 사용하였을때 biotin 표지화 항

체와 항원 사이의 반응을 3배이상 증가시킨다는 결과와는 일치하지 않았고 본 실험에서 농도로 3% 선택하면 약 50% 이상 증가된 O.D.치를 보여주었다 (Fig. 9). Avidin-biotin system을 사용한 ELISA법을 사용하는 만큼 background 문제를 고려한 biotin 표지화 항체와 extravidin-peroxidase의 적정 사용 농도를 결정하였다. Biotin 표지화 항체의 농도를 각각 12.5 μ g/ml와 50 μ g/ml로 하고 extravidin-peroxidase의 농도를 달리한 실험을 실시하였을때 12.5 μ g/ml biotin 표지화 항체를 처리한 반응은 extravidin-peroxidase 농도와 상관없이 반응이 전체적으로 미약하였고 50 μ g/ml농도 처리시는 140%와 139%의 유사한 판별지수와 낮은 negative control의 O.D.치 때문에 1:2000으로 희석한 농도를 적정 농도로 결정하였다(Fig. 10).

앞의 모든 표준화된 방법을 시행한 결과 본 실험의 면역학적 진단 kit는 검출한계가 EDTA 추출 항원에서는 1×10^5 cell/ml이었고 열 추출 항원에서는 5×10^5 cell/ml로 EDTA 추출 항원이 5배정도 높은 것으로 나타나 항원의 제작 방법에 따라 항체와 반응할 수 있는 표면 항원이 양이나 질이 상당한 변화가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 11 & 12). 다른 어병세균인 *V. anguillarum* LS-174, *A. hydrophila* ATCC7966, *Y. ruckeri* 11-4, *A. salmonicida* MT004, , *Pseudomonas* sp. 와 *Streptococcus* sp.를 1×10^8 cell/ml 고농도로 반응시켜도 교차반응이 나타나지 않아 본 방법의 specificity를 확인 할 수 있었으며 일본에서 분리된 Edk-2 항원에 대한 토끼 항혈청의 한국형 *E. tarda* 분리 균주에 대하여서 높은 교차반응을 나타내어 각기 다른 항원성의 *E. tarda*가 감염될 수 있는 현장 적용에서도 폭 넓게 사용되어 질 수 있는 것으로 생각된다(Fig. 13 & Table 6). 그러나 응집 반응법으로 항체의 cross-reaction을 조사해 보면, 면역원이 되는 *E. tarda* Edk-2에 대해서 1:51,200의 항체가 나타내고 bead immobilization 항체로 사용한 *E. tarda* Edk-2에 대한 토끼 항혈청이 한국형 *E. tarda* 균주에 대해서는 1:100~200의

응집항체가 나타내어 약 100배 정도의 낮은 교차반응을 보여주어 본 연구의 ELISA 방법을 실시한 결과와 상당한 차이를 보였다. 이것은 Romestand 등이 1993년에 vibriosis를 진단한 보고에서 serotype I형인 *V. anguillarum* V62 균주에 대한 polyclonal토끼 항혈청으로 실시한 indirect ELISA법을 실시한 결과와 유사하였다. 이 보고에서도 같은 농도의 항원이 존재하는 조직을 연속적으로 희석하면서 반응시켰을 때 homologous 항원을 검출하는 것은 serotype III형인 VIII 항원을 검출하는 것과 비교하여 10배정도밖의 차이를 보이지 않았지만 응집 실험에서는 교차반응이 일어나지 않았다. 이는 affinity에 의한 차이로 응집시에는 정확한 epitope에 강한 affinity를 가진 항체들만이 응집 반응에 관여 하지만 ELISA법에서는 유사 균주의 유사 epitope에 약한 affinity를 가진 항체들도 반응을 하여 높은 교차반응 보이는 것으로 생각되어진다.

조직내의 항원을 검출하는데 있어서는 조직내 lipid와 같은 소수성 물질들에 의한 항원, 항체 반응의 방해작용으로 검출한계가 항원만을 사용했을때의 검출한계보다 높아지고 또, 높은 background value도 유발한다고 알려져 있는데 이런 방해작용을 줄이는 방법으로 Yolken(1982)과 Mirisette 등(1991)이 사용한바 있는 detergent를 homogenate 희석액에 첨가하여 사용하였다. Mirisette 등(1991) 보고에서는 detergent의 사용으로 높은 효과를 얻었으나 본 실험결과에서는 diethylene glycol monopentyl ether만이 증가된 판별 지수를 나타내었지만 background는 오히려 약간 증가하는 것으로 나타났는데 이는 단백질로만 구성된 cheese와 상당량의 지방이 함유된 tissue homognate 라는 sample의 차이에 의한 것으로 사료된다(Fig. 9). 조직내 항원 검출한계는 tissue homogenate와 PBS를 희석액으로 사용하였을때 각각 5×10^5 cell/ml 까지 검출되어 감염이 비교적 약하게 된 어류로부터 조직을 열 추출하여 유리된 항원을 분석하고자 할때 조직 마쇄물이 희석이 적게되어 있게되는 어류

조직내의 불순물질이 조직내의 항원을 검출하는데 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 16 & 17). 본 연구의 현장 적용 실험에서 나타난 바와 같이 edwardsellosis의 임상적 증상을 보이는 어류에 존재하는 viable cell의 수는 약 10^8 cell/g tissue이므로 이 진단 kit는 edwardsiellisis를 충분히 진단할 수 있는 감도를 가졌다고 하겠다. 또 Jesus 등(1995)에 의한 coagglutination법을 진단 kit화 시킨 방법에 의한 검출한계가 $10^8 \sim 10^{10}$ cell/ml인 점을 감안한다면 매우 높은 감도를 나타내는 것이다. 그리고 담수어인 틸라피아와 해산어인 넙치의 간, 신장, 비장에서의 검출한계나 경향이 동일하므로 edwardsiellosis에 감염되는 여러 다른 어류에서 *E. tarda*를 검출하는데 본 연구 방법이 별무리가 없을 것으로 생각되어 진다(Table 9).

흥미있는 것은 우리나라의 양식현장의 병어로부터 직접 분리한 H-4 균주를 토끼에 면역처리하여 얻은 1:640의 응집항체를 나타낸 항혈청을 침전시킨 후 전술한 방법과 동일하게 immobilization용과 biotin용 항체로 사용하여 일본에서 분리된 *E. tarda* Edk-2, 남해와 동해의 넙치병어로부터 분리한 H-4 그리고 종이 다른 어병 세균과의 교차반응을 분석하였을 때 현장병어로부터 분리한 여러 *E. tarda* 균주에 대해서 1×10^5 cells/ml의 검출한계를 나타내어 한국형 *E. tarda*에 대해서는 Edk-2보다 조금 더 좋은 감도를 보면서 종이 다른 어병세균과의 반응을 보이지 않았다. 일반적으로 응집항체와 ELISA 결과와 유사한 경향을 보인다는 보고와는 달리 본 항혈청의 응집항체가 1:640으로 낮게 나타났음에도 불구하고 1:51,200인 Edk-2 항혈청보다도 좋은 감도를 보이는 것은 특이할만하다. 그렇지만 Dopazo 등(1992)의 보고에서도 immunodot의 방법의 경우 TRV(turbot rotavirus)를 항원으로 하고 TRV, ARS(Atlantic salmon rotavirus in Canada), HBR(Atlantic salmon rotavirus in the USA), 그리고 SBR(striped bass rotavirus)에 대한 토끼 항혈청의 titer를 조사하였을 때는 1 : 3000, < 10, < 10, 그리고 < 10였는데 ELISA법으로 분석하였을

때는 1 : 4096, 1024, 2048, 그리고 1024로 완전히 다른 결과가 나타났으며, Muriel(1985)도 혈청학적인 기법에 따라서 다른 결과를 보고한 바 있다. 이것은 혈청학적인 기법에 따라서 항원-항체의 반응에 관여하는 항체들의 특성이 동일하지 않기 때문이라고 생각되어지며 본 연구의 결과도 이러한 이유에서 교차 반응에 있어서 사용한 면역원에 의해서 차이가 나타나는 것으로 보인다. 따라서 현장적용을 목적으로하는 본 진단 kit에 있어서 항원성이 강한 한국형 *E. tarda*을 항혈청을 얻는데 더 좋은 결과를 얻을 수도 있을 것으로 기대된다.

ELISA법의 다른 방법으로서 biotin 표지화된 goat anti-mouse IgG 항체를 처리하는 1단계가 늘어나는 mouse 항혈청을 사용한 실험에서는 토끼 항혈청만을 사용한 것보다 background에 있어서 조금 낮았을뿐 검출한계는 동일하였다.

Immobilization된 항체는 bead를 PBS에 보관하거나 건조한 상태로 보관하거나 보관 온도와 관계없이 8주째면 inactivation되었으며, 건조한 상태에서 보관하는 것보다는 0.2% Na₂S₂O₃ 첨가한 PBS 완충용액에 보관하는 것이 4℃와 25℃의 보관 온도에 상관없이 immobilization 된 항체의 activity를 유지하는데 좋았다.

결론적으로 현장에서의 활용은 순조로운 결과에 도달하는데 무리가 없었으나 infected tissue homogenate의 heat extract 사용에 따른 background 문제가 각 개체별로 약간씩 있는 것으로 생각된다. 이러한 문제 극복을 위해서 본 연구에서는 항원·항체 결합시 surfactant 등을 사용하여 background 최소화를 위해서 노력하였고 약 30~40%의 감소 효과도 보았지만 아직 모든 개체에서 zero 수준의 background를 얻지는 못하였으므로 충분한 시간을 가지고 조금씩 개선해 나가야 하리라고 생각된다. 또 남해 1 양어장과 같이 전형적인 *E. tarda* 감염 증세를 보이며 충분한 숫자의 세균이 조직 내에 있음에도 불구하고

하고 본 방법에서 (-)결과를 보여주는 균주가 있을 수 있으므로 이에 대한 충분한 대비책 마련도 중요할 것이다.

그리고, 앞으로 항체의 affinity를 질적으로 일정하게 유지하기 위해서는 affinity 측면에서 polyclonal antibody에 비해 손색이 없는 monoclonal antibody를 사용하는 방법이 위한 최종 단계로 접근되어야 할 것이며 항체, 효소, 그리고 기질 처리에 있어서 1단계나 2단계만으로도 가능한 방법이 모색되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구의 변형된 ELISA법은 병어로부터 균을 분리할 필요가 없을 뿐아니라 viable cell뿐만 아니라 pus등에 다량으로 존재하는 dead cell까지도 검출할 수 있는 장점과 기술적인 측면에서도 기존의 ELISA법이 각 단계 별로 피펫을 이용하여 시약을 첨가하여 soluble 기질의 발색반응을 리더기로 읽는 방법을 벗어나 bead를 각 단계별 시약에 담그고 insoluble 기질을 처리함으로써 bead 표면의 색깔 변화로서 육안적으로 간단히 질병을 진단할 수 있는 방법이라 할 수 있다.

제 5절. 참고 논문

- Adams, A. and Kim, T. : Development of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. J. Aquatic Animal Health, 2 : 281-288, 1990.
- Amandi, A., Hiu, S. F., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L. : Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon(*Oncorhynchus tshawytscha*). Appl. Environ. Microbiol., 43 : 1380-1384, 1982.
- Austin, B., Bishop, I., Gray, C., Watt, B. and Dawes, J. : Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. J. Fish Dis., 9 : 469- 474, 1986.
- Burreson, E. and Fritzell L. J. : The seasonal antibody response in juvenile summer flounder(*Paralichthys dentatus*) to the haemoflagellate *Trypanosoma bullocki*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 12 : 394-402, 1986.
- Davis, P. J., Laidier, L. A., Perry, P. W., Rossington, D. and Alcock, R. : The detection of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic carrier fish by an integrated cell-culture and ELISA technique. J. Fish Dis., 17 : 99-110, 1994.
- Dixon, P. F. and Hill, B. J. : Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Aquaculture, 42 : 1-12,

1984.

Dopazo, C. P., Toranzo, A. E., Samal, S. K., Roberson, B. S., Baya, A., and Hetrick, F. M. : Antigenic relationships among rotaviruses isolated from fish. *J. Fish Dis.*, 15 : 27-36, 1992.

Freed, R. C., Evenson, M. L., Reiser, R. F. and Bergdoll, M. : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 1349-1355, 1982.

Gudmundsdottir, S., Benediktsdottir, E. and Helgason, S. : Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples : a comparison of using double sandwich ELISA and isolation on selective medium. *J. Fish Dis.*, 16 : 185-195, 1993.

Helsing, K. and Richter, W. : Immunochemical quantitation of dextran by a polymer enhanced nephelometric procedure. *J. Immunol. Methods*, 5 : 147-151, 1974.

Hoglund, J. and Pilstrom, L. : Purification of adult *Aguillicola crassus* whole-worm extract antigens for detection of specific antibodies in serum from the European eel (*Anguilla anguilla*) by ELISA. *Fish & Shellfish Immunol.*, 4 : 311-319, 1994.

Hsu, H. M. and Bowser, P. R. : Development and evaluation of a monoclonal-antibody-based enzyme-linked-immunosorbent assay for the diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* infection. *J. of Aqua. Animal Health*, 3 : 168-175, 1991.

- Hsu, Y. L. and Leong, J. C. : A comparison of detection methods for infectious haematopoietic necrosis virus. J. Fish Dis., 8 : 1-12, 1985
- Hsu, Y. L., Chiang, S. Y., Lin, S. T., and Wu, J. L. : The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immuno dot blot method. J. Fish Dis., 12 : 561-571, 1989.
- Johnson, K. G. R., Wobeser, G. and Rouse, B. T. : Indirect fluorescence antibody technique for detection of RM bacterium of rainbow trout(*Salmo gairdneri*). J. Fishries Research Board of Canada, 31 : 1957-1959, 1981.
- Jones, S. R. M. and Woo, P. T. K. : The immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. J. Fish Dis., 10 : 395-402, 1987.
- Kawahara, E. and Kusuda, R. : Direct fluorescence antibody technique for diagnosis of bacterial disease in eel. Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 53 : 393-399, 1987.
- Kubota, S. S., Kaige, N., Miyazaki, T. and Miyashita, T. : Histopathological studies on Edwardsiellosis of tilapia-1. Natural infection. Bull. Fac. Fish Mie University, 9 : 155-165, 1981.
- Kusuda, R., Toyoshima, T., Iwamura, Y. and Sako, H. : Characteristics of *Edwardsiella* spp. from an epizootic of cultured crimson sea breams. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 43(2) : 129-134, 1977.

- Kusuda, R., Toyoshima, T., Iwamura, Y. and Sako, H. : *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets(*Mugil cephalus*) in Okitsu Bay. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 42(3) : 271-275, 1976.
- McArthur, C. P. and Segupta, S. : A rapid micro-method for screening eel sera for antibodies against *Telogaster opisthorchis* MacFarlane. J. Fish Dis., 5 : 67-70, 1982.
- MacPhee, D. D., Ostland, V. E., Lumsden, J. S. and Ferguson, H. W. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) to estimate the quantity of *Flavobacterium branchiophilum* on the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org., 21 : 13-23, 1995.
- Matsubara, A., Mihara, S. and Kubada, R. : Quantitation of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51 : 921-925, 1985.
- Meyer, F. P. and Bullock, G. L. : *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish(*Ictalurus punctatus*). Applied Microbiol., 25 : 155-156, 1973.
- Meyers, T. R., Short, S., Farrington, C., Lipson, K., Geiger, H. I. and Gates, R. : Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and fluorescent antibody test(FAT) for measuring the prevalences and levels of *Renibacterium salmoninarum* in wild and hatchery stocks of salmonid fishes in Alaska, USA. Dis. Aquat. Org., 16 : 181-189, 1993.

- Morissette, C., Goulet, J. and Lamourex, G. : Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *A. Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 836-842, 1992.
- Munoz, C., Nieto, A., Gaya, A., Martinez, J. and Vives, J. : New experimental criteria for optimization of solid-phase antigen concentration and stability in ELISA. *J. Immunol. Methods*, 94 : 137-144.
- Muriel, C. D. : Indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens : *Yersinia ruckeri* and egdved virus. *Aquaculture*, 49 : 197-208, 1985.
- Nakatsugawa, T. : *Edwardsiella tarda*, isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol.*, 18 : 99-101, 1983.
- Pascho, R. J., Elliott, D. G. and Streufert, J. M. : Brood stock segregation of spring chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* by use of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the fluorescent antibody technique(FAT) affects the prevalence and levels of *Renibacterium salmoninarum* infection in progeny. *Dis. Aquat. Org.*, 12 : 25-40, 1991.
- Pascho, R. J. and Mulcahy D. : Enzyme-linked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonid bacterial kidney disease. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 44 : 183-190, 1987.

- Poulos, B. T., Lightner, D. v. and Trumper, B. : Monoclonal antibodies to a penaeid shrimp parvovirus, infectious hyperdermal and hematopoietic necrosis virus(IHHNV). *J. Aquatic Animal Health*, 6 : 149-154, 1994.
- Rodak, L., Pospisil, Z., Tomanek, J., Vesely, T., Obr, T. and Valicek, L. : Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 11 : 225-235, 1988.
- Rodak, L., Pospisil, Z., Tomanek, J., Vesely, T., Obr, T. and Valicek, L. : Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of spring viraemia of carp virus(SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio* L.. *J. Fish Dis.*, 16 : 101-111, 1993.
- Romalde, J. L., Magarinos, B., Fouz, B., Bandin, I., Nunez, S. and Toranzo, A. E. : Evaluation of BIONOR Mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Org.*, 21 : 25-34, 1995.
- Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F. and Bouix, G. : An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.*, 15 : 137-143, 1993.
- Sae-Oui, D., Muroga, K. and Nakai, T. : A case of *Edwardsiella tarda* in cultured colored carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, 19 : 197-199.
- Sakai, M., Koyama, G., Atsuta, S., and Kobayashi, M. : Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a modified

- peroxidase-antiperoxidase(PAP) procedure. Fish Pathol., 22(1) : 1-5, 1987.
- Sitja-Bobaldilla, A. and Woo, P. T. K. : Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibodies against the pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, and protection against cryptobiosis in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), inoculated with a live vaccine. J. Fish Dis., 17 : 399-408, 1994.
- Smith, S. A., Levy, M. G. and Noga, E. J. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibodies to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in *Oreochromis aureus*. Veterinary Parasitology, 42 : 145-155, 1992.
- Song, Y. L., Lee, S. P., Lin, Y. T. and Chen, C. C. : Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis. Dis. Aquat. Org., 14 : 43-50, 1992.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S. : *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillmortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39 : 931-936, 1973.
- Whittington, R. J., Philbey, A., Reddacliff, G. L. and Macgown, A. R. : Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus(EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) : findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. J. Fish Dis., 17 : 205-218, 1994.
- Whyte, S. K., Allan, J. C., Secombes, C. J. and Chappell, L. H. : Cercariae and diplostomules of *Diplostomum spathaceum*(Digenea)

elicit an immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*

Richardson. J. Fish Biology, 31 : 185-190, 1987.

Yolken, R. H. : Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids. Review of Infectious Diseases, 4 : 35-68, 1982.

자 체 평 가 의 건 서

과 제 명: 어류 edwardsiellosis의 진단 kit 개발
연구기간: 1995.11.20 - 1996.11.15. (단년도 과제)
토의날짜: 1996. 8. 29.

————— 0 ————— 0 —————

1. 연구의 의미 부여에 대하여

고밀도 집약적 양식을 지향하게 되어있는 어류 양식 산업에서 발생하는 여러 질병 중에서 세균성 질병이 발생율이나 피해량의 대부분을 차지하고 있을 뿐만 아니라 대부분의 세균성 질병 발생은 단기간에 어류의 대량폐사를 가져오게 되므로서 이에 대한 신속한 진단법 개발과 대책의 수립이 요구된다. 이러한 어류의 대표적인 세균성 질병 중에서 edwardsiellosis 는 극동 지역 특히 일본, 대만 등에서 자주 발생하며 우리나라에서도 담수어 및 해산어에서 대단히 빈번히 발생되어 큰 피해를 입히는 대표적인 어류 감염성 질병이다. 그러므로 현재 우리나라 양식업계에서 가장 빈번히 발생하고 있는 edwardsiellosis에 대하여 현장 적용이 가능한 진단법의 개발연구는 여러 다른 감염성 질병을 대처하는 중요한 기준을 제시 할 수 있으므로 본연구에서 선택한 질병 종류와 의미는 우수하다고 할 수 있다.

2. 연구내용의 적정성에 대하여

면역 혈청학적 기법은 항체와 항원의 결합 후 효소를 처리하여 변화된 기질의 농도를 특수 기기를 사용하여 읽는 것으로 항체의 양적 문제 그리고 항원의 조제 문제 등 여러가지가 현장에서 적용하는데 어려움이 많다. 더욱 중요한 것은 수산용으로 상업화되어 있는 시약이나 제품이 전혀 없으므로 양식업

에 종사하는 분들이 고도기술의 응용기법을 기피하는 원인이 되고있다. 그러므로 사람용으로 상품화된 임상진단 시약 등과 같이 항원의 정량화보다는 정성적 분석에 보다 큰 의미를 부여하여 수산용 질병 진단 kit의 개발을 시도한 본연구는 매우적절한 접근방법이라고 할 수 있다. 즉 모든 ELISA의 과정과 반응을 미리 반응시키거나 단순화함과 동시에 특정기구가 필요없이 정성적으로 어류 질병을 분석할 수 있는 modified 된 ELISA법의 시도가 수산과학에서는 활발히 추진되지 않았으므로 본 연구에서와 같이 주어진 kit의 색깔변화를 간단히 직접 현장에서 볼수 있게하는 방법의 개발은 대단히 흥미로운 연구이며, 복잡한 개념을 요구하는 첨단의 기법을 시각적 변화라는 가장 보편적이면서 명확한 방법으로 현장에 접근하였다고 평가 할 수 있다.

3. 연구수행의 결과에 대해서

부분 정제된 항 *E. tarda* 항체의 bead 표면 고착 정도의 분석을 구체적으로 분석하고 동시에 고착 정도의 증강을 위해서 여러 가지 fixing법도 함께 검토되어져 있다. 그리고 이후의 과정에서 항체의 non-specific binding을 최소화하기 위하여 여러 blocking제의 채택과 surfactant의 첨가 효과도 비교적 자세히 분석되어져 있다. 두 조건의 확립 후 biotin-labeled 항체 및 extravidin-peroxidase의 농도 변화가 bead의 표면에서 나타나는 색깔의 변화에 어떠한 영향을 미치는지도 확인하여 여러 제반 ELISA 과정이 진단 Kit의 개발에 어떠한 영향을 미치는지 잘 분석되어져 있다. 특히 항원의 diluent로서 tissue homogenate를 사용하므로써 현장 병어 내에 각기 다른 농도의 병원균 수가 있을 때를 대비한 실험도 수행되어져 있다고 평가된다. 사용된 진단 Kit의 specificity test를 위하여 *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, 그리고 *Streptococci* 등의 균주를 항원으로 사용했을 때 bead에서 거의 색깔 변화를 볼 수 없어 좋은 specificity를 보였다. 더구나 항원·항체의 반응 증가를 위하여 non-ionic detergent 효과를 분석한 것은 최신 정보의 새로운 활용이라고 평가되어진다. 양식 현장에서 채집된 *E. tarda* 균주

의 여러 항생제에 대한 내성 분석과 MIC 결정, 그리고 새로운 dye를 이용한 항생제 sensitivity 분석은 상당히 높이 평가할만 하며, 앞으로도 이러한 항생제 내성 연구가 수행되어져 우리 나라의 질병 현황 파악과 예방 대책 마련을 위한 정보 제공이 필요할 것이라고 평가된다. 짧은 연구기간에 여러 균주, 항체, 병원성 등의 분석이 잘 되어 있어 충분한 기본 data는 확립되어 있지만 다른 항원(즉, 다른 질병 원인균)을 초기항원으로 사용하여 분석된 기본 data가 있었다면 보다 광범위한 본 방법의 활용에 대한 좋은 예가 될 수 있었을 것이나, 이에 대한 연구는 본 연구의 proposal 범위 밖이며 보다 긴 연구기간이 필요하므로 다음 계획에서 고려해 보아야 할 사항이다.

4. 연구의 활용에 대해서

많은 *E. tarda* 균주를 현장에서 직접 채취하여 이의 특성을 ELISA법과 본 연구에서 개발한 kit 이용법으로 분석, 비교되어 있다. 더구나 어류 질병의 대책 마련에 중요한 기본 data가 될 수 있는 현장 병어로 부터 채취된 *E. tarda*의 각 항생제에 대한 내성 분석과 MIC 결정은 그 자체로서도 현장애로 기술개발이라고 평가되어진다. Kit 개발을 위해 현장에서 직접 사용하기에 편리한 열추출 항원의 사용과 조직의 homogenate를 diluent로 사용한 것은 보다 현장에 접근시킨 방법이라고 평가된다. 동해안과 남해안의 양식장에서 직접 채취한 병어와 이로 부터 분리한 *E. tarda* 균주를 사용하여 진단 kit의 활용 가능성을 분석하였으며 이때 채취된 여러 다른 어류 질병 관련 세균과의 cross-reaction 분석에서도 본 연구의 명확한 현장 접근과 응용 가능성을 충분히 보여 주고 있다고 생각된다. 우리 나라 양식 현장의 주 지역인 동해, 남해에서의 현장 결과로 보아 기타 지역의 *E. tarda* 균주에 대해서도 충분히 본 연구의 결과를 적용시킬 수 있다고 평가된다.

5. 결론

Edwardsiellosis를 진단하기 위한 면역학적 진단 Kit를 최적화하고 표준화 하였으며 이를 뒷받침하기 위하여 양식 현장에서 채취한 *E. tarda* 균주와의 cross-reaction, 그리고 각 균주의 항생제에 대한 내성 분석도 실시되어져 있어 진단과 대책 마련에 좋은 정보와 방법을 제시한 연구라고 평가된다.

토 론 자 : 정현도 (연구책임자, 부경대학교 어병학과)
손상규 (연구원, 수산진흥원)

토론 참여자 : 박남규 (부경대학교 생물공학과)
정준기 (부경대학교 어병학과)
이형호 (부경대학교 생물공학과)
허민도 (부경대학교 어병학과)
김기홍 (부경대학교 어병학과)

주 관 기 관 : 부 경 대 학 교 총 장