

조직인공소화법과 ELISA를 이용한 국내 출하돈의 선모충 (*Trichinella spiralis*) 감염실태 조사

서흔수 · 우계형¹ · 윤희정^{2*}

한국화이자동물약품(주)

¹동경대학교 농업생명과학부

²서울대학교 수의과대학

(제작승인: 2004년 4월 22일)

The survey of *Trichinella spiralis* infection in finishing pigs using the pepsin-digestion method and ELISA in Korea

Hunsu Seo, Gye-Hyeong Woo¹, and Hee-Jeong Youn^{2*}

Pfizer Animal Health Korea Ltd., Seoul 143-210, Korea

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan

²College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: April 22, 2004)

Abstract : *Trichinella spiralis* is one of the important zoonotic parasites with a wide variety of vertebrates hosts in nature. The purpose of this study were to analyze ESP(Excretory-Secretory Protein) antigen, to evaluate ELISA for the serological diagnosis of Trichinosis, and to survey *T. spiralis* infection in finishing pigs using the pepsin digestion method and ELISA in Korea. In the analysis of ESP antigen by SDS-PAGE and Western blot, 4 major bands (70, 55, 52.6, and 49 kDa) were revealed from the ESP antigen. Predilection sites of *T. spiralis* were the diaphragm, the tongue, masseter muscles, intercostal muscle, and hindlimb in orders in the experimentally infected rats. Sera from 581 swine were tested by ELISA with ESP antigen. The 54 (9.3%) sera were suspected as positive reactors, however, these 54 sera were determined as false positives by the use of Western blotting. This study demonstrated that the ELISA was not suitable for the examination of *T. spiralis* in pork. The diaphragm muscle samples of 251 finishing pigs were tested by the method of pepsin-digestion for the presence of *Trichinella* larvae, however, *T. spiralis* was not detected from the samples. We could not find out *T. spiralis* infection in pig in Korea pork.

Key words : *Trichinella spiralis*, pepsin digestion, ESP antigen, Western blotting, ELISA

서 론

선모충(*Trichinella spiralis*)은 광범위 속주를 지닌 인수공통 기생충으로써, 호주와 텐마크를 제외한 전 세계에서 발생하는 것으로 보고되어 있다 [33-35]. 최근 국내에서도 오소리의 고기를 생식한 사람에게 빌병보고가 이루어져 국내에도 발생가능성이 매우 높은 기생충이다[31].

선모충은 수컷의 길이는 1.4-1.6 mm 정도, 암컷의 길이는 3-4 mm 정도인 선충으로, 수컷의 죽도 길이는 몸

길이의 1/3 정도이며 꼬리는 두 개의 작은 배설강 조직편(cloacal flaps)을 가지고 있으며 교접자(spicules)는 없다. 선모충의 암컷은 성숙하는 유충(developing larvae)을 자궁내에 가지고 있다. 전통적인 형태학적 분류로는 선모충(*Trichinella* sp)을 적절하게 분류하지 못하기 때문에 유전학적, 생화학적, 생리학적 특징에 의해 크게 5종류와 3개의 phenotypes로 나누는데, *T. spiralis* Owen, 1835, *T. nativa* Britov and Boev, 1972, *T. pseudospiralis* Owen, 1935, *T. nelsoni* Britov and Boev, 1972, 그리고 *T. britovi*

*Corresponding author: Hee-Jeong Youn
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1267, Fax: +82-2-888-0659, E-mail: younhj@snu.ac.kr]

Pozio *et al.*, 1992의 5종과 T5, T6, T8 등이 그것이다 [20, 21]. 유전학적 특징으로 *T. spiralis*는 6개의 unique allozymes를 가지고 있으며, *T. nativa*는 2개의 unique allozymes를, *T. pseudospiralis*는 12개의 unique allozymes를, *T. nelsoni*는 4개의 unique allozymes를, 그리고 *T. britovi*는 1개의 unique allozyme만을 가지고 있다. 그러나 T5, T6, T8의 분류는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다 [20, 21].

진단방법으로써는 Trichinelloscopy를 이용한 검사법, 조직인공소화법, ELISA, PCR, Western blotting, indirect fluorescent antibody test 등이 이용되고 있다 [19, 27]. 선충류의 면역학적 진단 항원으로는 crude somatic protein(CSP) antigen보다 excretory-secretory protein(ESP) antigen이 더 특이성이 높다고 알려져 있다. 또 encysted muscle larvae를 24시간 배양한 후, 여기에서 얻은 ESP antigen은 돼지의 선모충증을 진단하는데 특이 항원으로 작용한다는 것이 알려졌다. 또 이 항원은 CSP antigen에서도 발견되며, 분자량은 45-53 kDa 정도를 나타낸다 [13]. 선모충증 진단에서의 ESP antigen은 비특이적인 반응이 자주 나타남으로써, ELISA를 이용한 진단 기법의 개발에 큰 장애요소로 작용한다고 보고 되었다. 그러나 이 ESP antigen을 chromatography를 이용하여 정제하면 특이성을 높일 수 있다는 것도 밝혀졌다 [32]. 식육검사에서 혈청학적 진단법의 적용은 부적절하다. 그 이유는 감염 후 약 19일이 지나기 전까지는 항체가 생성되지 않아 의음성(false negative)을 나타낼 수 있기 때문이다 [28, 29].

미국 Pennsylvania에서 1,170마리의 raccoon, 384마리의 opossum, 201마리의 muskrat, 168마리의 fox, 51마리의 skunk 그리고 17마리의 mink의 혀를 채취하여 조직인공소화법을 이용하여 선모충의 감염여부를 조사한 결과, 2.6%의 raccoon, 2.9%의 opossum, 6.7%의 gray fox, 15.1%의 red fox, 3.9%의 skunk, 그리고 5.9%의 mink에서 선모충에 감염된 것으로 조사되었다 [23]. 그리고 캐나다 New Brunswick에서 1989년부터 1991년까지 544마리의 black bear를 조사한 결과 0.37%의 양성을 보였다 [6]. 또한 캐나다의 전 지역에서 5,380 마리의 돼지혈청을 채취하여 ELISA를 이용하여 선모충의 항체여부를 조사한 결과 0.026%에서 양성을 나타냈다 [28, 29]. Bolivia에서는 조직인공소화법을 이용하여 100마리의 돼지를 조사한 결과, 25%에서 선모충이 발견되었고 ELISA를 이용하여 188마리의 돼지혈청을 조사한 결과 11.2%에서 양성을 나타내었다 [3]. 국내에서도 ELISA를 이용한 선모충에 대한 검사가 일부 이루어졌으나 803 돼지혈청에서 9례의 의양성이 Western blot analysis에서 모두 음성임을 보고하였다 [37].

Rat와 mouse를 이용한 실험동물의 실험에서 *T. spiralis*

*nativa*를 1,000마리 이상을 예방접종한 뒤 *T. spiralis* *spiralis*를 공격 접종한 결과, 선모충의 예방효과가 매우 우수하다는 것이 밝혀졌다 [28, 29]. 또 muscle larvae antigen(MLA)을 50 ug 씩 1주일 간격으로 2회 예방접종한 뒤 300마리의 선모충을 공격 접종한 결과, 선모충 성충의 수가 감소하고 성장이 둔화되며 항체의 생성이 증가되는 것이 확인되었다 [36].

대만에서 1962년부터 1989년까지, 사람에서 모두 118건의 선모충 감염증이 발생하여 5,400명의 환자와 95명의 사망자가 발생하였다. 역학조사 결과, 대부분의 발생 지역이 시골이었고 결혼식이나 축제 등에서 완전히 익히지 않은 돼지고기나 야생 돼지고기를 먹음으로써 발생하였다 [11]. 사람에서의 임상증상은 주로 열을 동반한 설사와 근육통, 안면 수종 등이 나타나며, 드물게는 열을 동반하지 않는 오랜 기간의 설사증상이 나타나기도 한다 [1]. 사람으로의 감염경로는 주로 선모충에 감염된 돼지고기나 야생동물의 식육을 잘 익히지 않고 먹거나 혹은 생식하였을 때에 주로 발생한다. 돼지에서 이제까지 알려진 선모충의 감염요인은 크게 2가지인데, 첫 번째는 쥐가 야생숙주와 사육돼지의 중간매개체 역할을 하여 사육돼지에서 선모충 감염율을 높이는 것이고, 두 번째는 돼지의 cannibalism 때문이다 [15].

사람에서 선모충의 감염을 예방하기 위해서는 돼지고기를 잘 익혀 먹어야 하며 [11], 야생동물과 사육돼지와의 접촉을 차단하고 매개체 역할을 하는 설치류를 구제해야 한다 [15].

치료약제로는 mice를 이용한 동물실험결과 cambendazole [18]과 oxfendazole [22] 등이 우수한 효과를 나타낸다고 보고되었다. 또 thiabendazole은 fumarate reductase activity를 억제하여 선모충의 근육내 유충에 작용하는 것으로 나타났다 [7].

따라서 본 연구에서는 전기영동과 Western blotting을 이용하여 *T. spiralis*의 분비항원을 분석하고, 인공 감염시킨 rat의 조직검사를 통해 돼지 선모충이 가장 많이 감염되는 부위를 확인하고, 이를 토대로 국내 사육중인 돼지에서의 선모충의 감염여부를 조직인공소화법을 통하여 알아보고자 하였다. 또 ELISA를 이용하여 국내에서 도축 출하되는 돼지에서 선모충에 대한 항체의 역가를 측정함으로써 혈청학적 진단법으로써의 이용가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

선모충(*Trichinella spiralis*)

T. spiralis 타이주로씨, 농림부 국립수의과학검역원 해외전염병과에서 분양받아 사용하였다.

실험동물 및 기생충 계대

농림부 국립수의과학검역원에서 분양받은 6주령의 SPF 랫드를 사용하였고, 조직인공소화법을 이용하여 얻은 선모충의 유충을 5,000마리씩 랫드에 경구 투여하였다.

조직인공소화법 및 선모충 배양방법

*T. spiralis*를 준비한 랫드에 약 5,000마리씩 감염시킨 후, 3개월 후에 랫드를 경추 탈골시킨 다음, 지방과 근막 등을 제거하고 근육만을 얻은 뒤, 여기에 1% pepsin-acid solution(pepsin 2 g, hydrochloric acid 10 ml, DW 1,000 ml)을 근육량의 10배로 하여 비이커에 잘 섞은 뒤 hot plate magnetic stirrer 위에 올려놓고, 37°C에서 3-4시간 소화시켰다. 소화시킨 용액을 30분 이상 정체시킨 후, 상층액 2/3를 제거하였다. 여기에 다시 37°C 수돗물을 부은 뒤 30분 이상 정체시켰다. 이와 같은 방법을 상층액이 맑아질 때까지 실시한 뒤, penicillin (500 unit/ml)과 streptomycin(500 µl/ml)이 첨가된 DMEM으로 3회 세척하고 원심분리하여 세척하였다. McMaster egg counting chamber를 사용하여 유충의 수를 측정하였다. Well당 1,500-2,000마리의 유충이 들어가게 DMEM으로 희석하고, 이것을 96 well cell culture plate(Costar)에 100 µl 정도를 넣은 뒤, 5% CO₂ incubator(forma scientific)에서 24시간 배양한 후, 무균 작업실에서 multi micropipette를 이용하여 ESP antigen을 얻었다.

SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 사용하였다 [14]. 10% acrylamide gel (DW 12.5 ml, 4× stock 7.5 ml, acrylamide 10.0 ml, 10% ammonium persulfate 150 µl, TEMED 15 µl)을 만든 뒤 dual gel caster에 loading한 뒤 4°C의 냉장고에서 over night 시켰다. Separating gel이 굳은 뒤, stocking gel(DW 6.2 ml, 4× stock 2.5 ml, acrylamide 1.3 ml, 10% ammonium persulfate 50 µl, TEMED 10 µl)을 separating gel 위에 loading한 뒤 comb를 꽂고, stocking gel이 굳은 뒤 comb를 제거하고 물을 쏴서 무너진 stocking gel을 정리하였다. 여기에, 배양하여 얻은 ESP antigen 5 µl와 2× sample buffer(0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanal) 5 µl를 혼합하여 eppendorf tube에 넣고 cab을 씌운 뒤 100°C의 물에 3분간 중탕처리한 뒤 얼음에 끓어둔 후 원심분리하고, 준비된 전기영동 장치에 upper tank와 lower tank에 tank buffer (0.025M Tris pH 8.3, 0.192M glycine, 0.1% SDS)를 부은 뒤, marker와 sample을 20 µl 씩 loading하고, marker가 바닥에 올 때 까지 60 V에서 90분 정도 전기영동하였다. Coomasian

blue (0.125% Coomasian blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid)로 2시간 염색하고 destaining solution(50% Methanol, 10% Acetic acid)으로 탈색시킨 뒤 특이적인 밴드를 확인하였다. 이 때 marker로는 prestained marker (Sigma)를 사용하였다.

Western blotting

국내 돼지 혈청에서 ELISA 양성으로 확인된 혈청을 Western blotting을 이용하여 최종적으로 양성 여부를 확인하였다. ESP 항원 10 µl를 2× sample buffer와 섞어 8분간 중탕처리 한 뒤 10% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에 gel을 떼어내서 차가운 transfer buffer(25 mM tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 10-15분간 담가둔 후, gel을 nitrocellulose paper에 얹고, +전극 쪽에서부터 porous pad, Whatman 3 mm paper, nitrocellulose paper, gel, Whatman paper, porous pad 순으로 electrotransfer kit에 장착한 후 transfer buffer를 채운 뒤, 250-300 mA로 1시간 정도 transfer 하였다. 전사 완료 후 nitrocellulose paper를 Ponceau S용액(Ponceau S 2 g, trichloroacetic acid 30 g, sulfosalicylic acid 30 g, DW 100 ml)에 2분 정도 염색하여 단백질이 제대로 transfer 되었는지 확인하고 standard size marker의 위치를 연필을 이용하여 표시한 뒤, 종류수에서 5분간 nitrocellulose paper를 셋어 준 뒤 blocking buffer(5% skim milk)를 넣어 상온에서 1시간 정도 흔들며 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후, ELISA 양성 혈청과 SPF 돼지에 선모충을 인공감염시켜 얻은 선모충 양성 혈청을 200배(ELISA titer : 1.150)로 희석하여 2시간 정도 상온에서 흔들며 반응시켰다. Nitrocellulose filter를 옮겨 TBS에 넣고 5분간 3회 세척하였다. 0.5% skim milk에 1/2,000으로 희석한 secondary antibody (phosphatase labeled goat anti-swine IgG, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL)를 넣고 1시간 동안 흔들며 반응시킨 뒤, TBS로 3회 세척한 후 BCIP/NBT을 phosphatase substrate(KPL)로 발색시켜 밴드를 확인하였다. 한원분석을 위해 사용한 Western blotting의 1차 항체는 선모충을 감염시킨 후 3개월 된 랫드의 혈청을 사용하였다. 2차 항체는 alkaline phosphatase labeled goat anti-rat IgG (KPL)를 사용하였고 BCIP/NBT를 phosphatase substrate (KPL)로 하여 발색시켜 밴드를 확인하였다.

ELISA

ELISA는 Gamble 등 [9]의 방법을 변형하여 사용하였다. *T. spiralis* ESP antigen을 BCA protein assay reagent (Pierce)를 이용하여 단백질의 농도(1.190 mg/ml)를 측정

한 후 도포 완충액(coating buffer, pH 9.6)으로 0.1 µg/ml 되게 희석하여 polystyrene ELISA microplate(Nunc)의 각 well에 100 µl 씩 넣어 4°C에서 24시간 반응시켰다. Washing buffer(PBS-T, pH 7.4)로 각 well을 5분간 3회 세척하고 5% bovine serum albumin(BSA)으로 37°C에서 1시간 blocking 처리하였다. Washing buffer로 5분간 3회 세척하고, 5% BSA로 1:800, 1:1,600과 1:3,200으로 희석한 시험 혈청을 각 well에 100 µl 씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 washing buffer로 3회 세척하고 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, USA)의 1:2,000 희석액을 100 µl 씩 각 well에 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 다시 5분간 3회 세척하였다. 여기에 ABTS(2,2'-azino-di-ethyl benzothiazolic sulfone-6)를 well 당 100 µl 씩 첨가하여 20분간 발색시킨 후, 1 mM HCl 50 µl 씩을 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA 판독기(Molecular device, E max precision microplate reader, IDEXX)를 사용하여 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물의 부위(근육)별 선모충 분포 조사

준비한 3마리의 SPF 랫드에 선모충(*T. spiralis*) 약 5,000마리씩을 감염시킨 후, 3개월 후에 랫드의 혀, 교근, 전지, 늑간, 횡격막, 복부, 축상(軸上)근과 후지에서 근육을 채취하였다. 10% neutral buffered formalin에 고정한 후 일반적인 조직 처리 과정(trimming, processing)을 거쳐, 3-4 µm 정도의 두께로 절편하였다. 이 조직을 염색하지 않고 현미경으로 백배 시야에서 다섯 곳을 관찰하여 피낭유충(encysted larvae)의 수를 세어 평균치를 산출하였다.

국내 출하 돼지의 선모충 감염여부 조사

국내에서 출하되고 있는 돼지에서의 선모충(*T. spiralis*)의 감염실태를 조사하기 위해, 대구, 부여, 제천, 청주, 춘천, 부산지방에 위치한 도축장에서 횡격막을 50 g 이상 채취하여 근막과 지방을 제거한 후, 1% 펩신용액을 이용한 조직인공소화법을 이용하여 선모충의 감염여부를 조사하였다.

돼지 혈청에 대한 항체조사

국내에서 사육되고 있는 돼지에서의 선모충 감염여부를 알아보기 위해, 강원도, 경기도, 충청남도, 충청북도, 전라남도, 전라북도, 경상남도와 경상북도 등 8개도의 가축위생시험소에서 채취하여 국립수의과학검역원으로 보낸 돼지의 혈액에서 혈청을 분리하여, ELISA를 이용하여 국내 사육돼지의 *T. spiralis*의 항체 보유 여부를 조사하였다.

결 과

SDS-PAGE에 의한 분비항원 분석

DMEM 배지에서 얻은 선모충 분비항원을 전기영동을 이용한 항원분석 결과, 70, 55, 52.6 및 49 kDa 크기의 4개의 주요항원을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Western blotting을 이용한 분비항원의 분석

DMEM 배지에서 얻은 선모충 분비항원에 대한 Western blotting을 이용하여 분석한 결과, 70, 55, 52.6 그리고 49 kDa 크기에서 4개의 주요항원을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

실험동물의 부위(근육)별 선모충 분포

인공 감염시킨 3마리의 랫드에서 피낭유충의 분포를 조사한 결과, 가장 많은 수의 피낭유충이 발견된 부위는 횡격막으로 모두 42마리의 피낭유충이 발견되었다. 두 번째로 많이 발견된 부위는 혀로써 28마리의 유충이 발견되었고, 그다음이 교근으로써 14마리의 유충이 발견되었다. 네 번째로 많이 발견된 부위는 늑간과 복부로써 각각 6마리가 발견되었고, 후지에서 4마리, 전지와 축상근에서도 각각 3마리씩 선모충의 피낭유충이 발견되었다(Table 1).

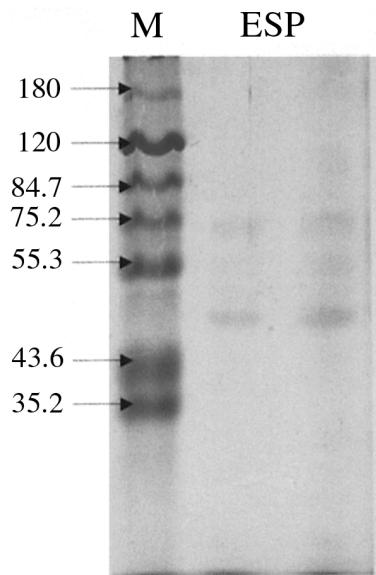


Fig. 1. Electrophoretic analysis of excretory-secretory protein antigens of *T. spiralis* by 10% sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Lane M : molecular weight marker, Lane ESP : excretory-secretory protein antigens.

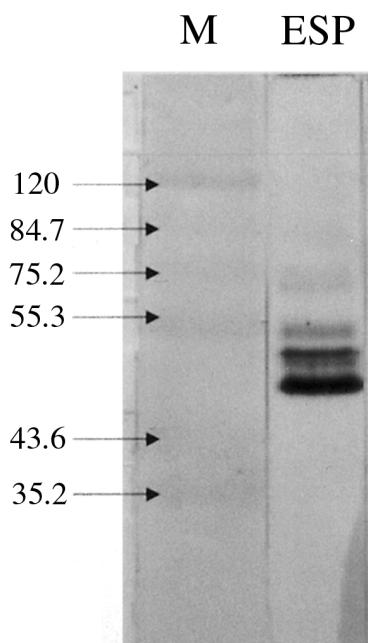


Fig. 2. Immunoblotting of ESP antigens of *T. spiralis*. ESP antigens were electrophoresed in 20 SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose paper and immuno-reacted with antiserum raised in SPF rats. Lane M : molecular weight marker, Lane ESP : excretory-secretory protein antigens.

Table 1. Number of larvae observed from defined tissues of infected rats

Muscle	No. of larvae/5 sight ($\times 100$)
Diaphragm	42
Tongue	28
Masseter muscle	14
Hypochondrial region	6
Intercostal muscle	6
Pelvic limb	4
Epaxial muscle	3
Thoracic limb	3

국내 출하돼지의 근육내 선모충 감염여부

국내 6개 도축장에서 채취한 총 251두의 횡격막에서 피낭유충 감염여부를 조직인공소화법을 이용하여 조사한 결과, 전 두수에서 음성을 나타냈다(Table 2).

국내 출하돼지 혈청의 선모충에 대한 항체유무

총 581개의 혈액표본에서 ELISA를 이용한 혈청내 항체 유무조사를 조사하였다. 국립수의과학검역원에서 SPF 돼지에 인공 감염시켜 얻은 양성혈청의 IgG 항체

Table 2. Regional distribution of *Trichinella* infection in finishing pigs collected from slaughter houses

Areas	No. of samples	No. of positives
Daegu	40	0
Buyeo	80	0
Jechon	40	0
Chungju	40	0
Chunchon	20	0
Busan	31	0
Total	251	0

Table 3. Seroprevalence against *T. spiralis* in pigs

Provinces	No. of samples	Results	
		No. of positive	No. of suspected positive
Gangwondo	96	3	12
Gyeonggido	65	1	3
Chungchongnamdo	100	3	12
Chungchongbukdo	67	-	2
Chollannamdo	39	1	1
Chollanbukdo	96	-	4
Kyungsangnamdo	96	-	7
Kyungsangbukdo	22	2	3
Total(%)	581	10(1.7)	44(7.6)

ELISA values of positive and negative serum : over 1.150 and below 0.407

가는 1.150이었으며, 감염시키기 전의 음성혈청의 항체 가는 0.407이었다. 음성혈청의 항체가 2배 이상(0.815)을 양성으로 판정하였고, 혈청의 항체가가 0.450 이상의 혈청을 의양성으로 판정하였다. 조사 결과, 10개의 혈청이 항체 양성반응을 나타냈으며 44개의 혈청에서 의양성을 나타냈다(Table 3).

선모충에 대한 ELISA 양성 돼지 혈청의 Western blotting

국내 양돈장에 대한 ELISA를 이용한 선모충 감염 조사 결과, 양성과 의양성으로 판정된 54마리의 혈청에 대하여 Immunoblotting을 실시한 결과 모두 음성으로 판

Table 4. Immunoblot analysis of pig sera shown positive or suspected positive against *T. spiralis* by ELISA

Result of ELISA	No. of tested	Results of immunoblot
Positive	10	Negative
Suspected positive	44	Negative
Total	54	Negative

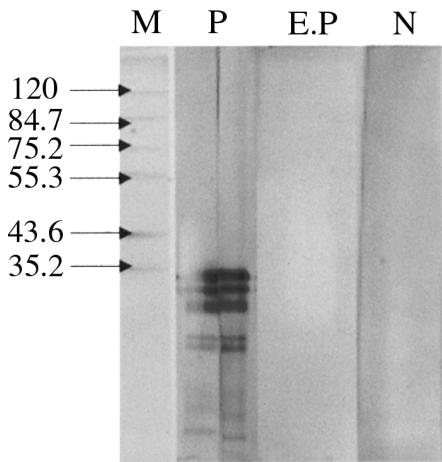


Fig. 3. Western blot of pig sera shown positive against *T. spiralis* by ELISA. Lane M : molecular weight marker, Lane P : Serum of *T. spiralis* artificially infected pig, Lane E.P. : Serum shown positive against *T. spiralis* by ELISA, Lane N : *T. spiralis* negative serum.

정되었다(Table 4, Fig. 3).

고 찰

선모충(*Trichinella spiralis*)은 광범위 숙주를 갖는 인수공통 기생충으로써 국내에서도 이미 오소리 고기를 먹은 사람들로부터 발생보고가 이루어진 기생충이다 [31].

Mahannop 등(1995)은 사람에서 선모충(*T. spiralis*)의 근육내 피낭유충의 ESP 항원을 전기영동을 통해 분석하고 Coomassian Brilliant blue로 염색해 본 결과, 94 kDa에서 26 kDa에 걸쳐 94, 83, 67, 65, 62, 58, 57, 55, 53, 49, 47, 43, 42, 41, 39, 38, 37, 35, 33, 32, 31, 28, 27, 26 kDa에서 밴드를 확인하였고, Con A-peroxidase를 이용하여 염색해 본 결과 122, 109 kDa에서 2개의 밴드를 추가로 확인하였다. 또 이를 Western blotting을 이용하여 분석해 본 결과 109 kDa에서 특이 항원을 확인하였다 [17]. 또한 Ko와 Wong(1992)은 피낭전 유충(PRE, Pre-encysted larvae)과 피낭유충(EL, Encysted larvae)의 분비항원을 조사한 결과 PRE에서는 분자량이 20-15 kDa에 해당하는 항원을 분비하고, EL에서는 분자량이 53, 47, 45 kDa에 해당하는 항원을 분비함을 보고하였다. 또 PRE의 분비 항원은 면역원성이 뛰어난 45-53 kDa에 해당하는 단백질이 결여되어 있어서 면역학적 진단항원으로써는 부적절하다고 하였다 [13]. 본 실험에서 선모충의 분비항원을 분석한 결과, 70, 55, 52.6, 49 kDa 등 4개의 주요한

polypeptide를 관찰할 수 있었다. 55, 52.6, 49 kDa의 밴드는 Mahannop 등(1995)이 보고한 결과와 거의 유사한 것이나, 70 kDa의 밴드는 본 실험에서는 관찰되었으나 Ko와 Wong(1992)과 Mahannop 등(1995)의 분석 보고 [13, 17]에는 없는 것으로, 사람과 mouse의 근육에서 회수한 선모충의 분비항원에서는 나타나지 않고, 실험동물로 사용한 랫트에서 회수한 선모충의 분비항원에서만 나타나는 것으로 추측된다. Arriga 등(1995)은 선모충의 surface antigen과 선모충에 자연 감염된 돼지와 인공 감염된 돼지의 혈청을 이용하여 Western blotting을 실시한 결과, 105, 72, 67, 52 및 47 kDa에서 밴드를 확인하였다고 보고하였다 [2]. 그러나 본 연구에서는 선모충의 ESP antigen과 선모충을 인공 감염시킨 후 얻은 돼지 혈청을 이용한 Western blotting 결과, 33, 32, 31, 28 및 27 kDa에서 밴드를 확인할 수 있었다. Arriga 등(1995)의 실험 [2]과 본 연구에서 관찰된 밴드의 위치가 다른 것은 사용한 항원의 차이에서 발생한 것으로 생각되며, 랫트 혈청과 돼지 혈청을 사용한 Western blotting에서 관찰되는 밴드가 다르게 나타나는 것은 동물 종의 차이에 의한 면역반응의 차이에 의한 것으로 생각된다.

특히, 선모충은 면역원성이 뛰어난 분자량 45-50 kDa에 해당하는 특이단백질을 분비하는 것으로 알려져 있는데, 면역시킨 토키의 항체가 반응하는 분자량 43 kDa의 단백질도 그 중의 하나로 생각된다 [5]. Silberstein과 Despommier(1984)는 분자량이 43 kDa에 해당하는 단백질은 분자량 48 kDa에 해당하는 당단백질(glycoprotein)과 유사하다고 하였는데 [25], 그 근거로써는 분비항원 중에서 30 kDa 이상의 major protein이라는 점과, calcium과 EDTA 존재시 전기영동상에서 metal binding protein이라는 점, 그리고 단클론항체인 8A4.3.1.1과 반응한다는 점을 들 수 있다 [10].

또, 선모충(*T. spiralis*)은 분자량이 각각 86, 80, 70, 50, 47 그리고 20 kDa에 해당하는 CWE(Crude Worm Extracts)항원을 가지고 있는 것으로 보고되었다 [12].

선모충이 분비하는 단백질의 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나, 유일하게 기능이 알려진 superoxide dismutase는 다헥성 백혈구(polymorphonuclear leucocytes)의 공격을 방어하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다 [22]. L1단계의 유충은 장관내 세포에 침입한 첫날 저장된 단백질을 세포내로 모두 분비하는데 이 단백질의 세포내 기능은 알려져 있지 않다 [4].

진단방법으로는 Trichinelloscopy를 이용한 검사법, 조직인공소화법, 혈청학적 방법으로 ELISA, Western blotting, indirect fluorescent antibody test 등, 그리고 PCR 등이 이용되고 있다 [19, 27]. 국내 양돈장의 선모충 항체보유 여부를 조사하기 위해, 총 581개의 혈액표본에

서 ELISA를 이용한 조사 결과, 10개의 혈청이 항체 양성반응을 나타냈으며 44개의 혈청에서 의양성을 나타냈다. 그러나 이 양성반응혈청은 Western blotting을 이용한 검사 결과 음성으로 밝혀졌는데, 이는 ELISA에 사용한 분비항원의 비특이적인 반응 때문으로 생각된다. Gamble과 Graham(1984)은 *T. spiralis* 성충의 분비항원은 *Trichuris suis*의 성충과 *Ascaris suum*의 충란과 교차반응을 나타낸다고 보고하였다 [8]. 선모충은 45-50 kDa에 해당하는 polypeptide 이외에, 분자량이 70 kDa에 해당하는 항원을 관찰하였다. 이로 인해 ELISA 혈청반응에서 false positive가 나타난 것으로 생각된다. 이 실험 결과로 보아 ELISA를 이용한 식육검사는 부적절하다고 생각된다. ELISA는 비특이적인 반응이 자주 나타나고 혈청변환 이전과 감염 후 700일 정도가 지난 항체가 소실된 이후에는 진단가치가 떨어지기 때문에 ELISA를 이용한 역학조사시 주의가 필요하다 [16]. Serrano 등 (1992)은 선모충의 분비항원을 이용한 ELISA가 93.1-98.9%의 특이성을 나타낸다고 보고하였다 [22]. 그러나 Smith(1988)는 선모충에 감염된 돼지에서의 혈청변환(seroconversion)은 19일에서 26일 사이에 주로 이루어지며, 경감염된 돼지에서는 26일이 지나도 혈청변환이 이루어지지 않기 때문에, 이 시기에 혈청학적 진단은 부적절하다고 하였다. 또 100마리의 유충을 감염시킨 돼지에서 ELISA 진단시 양성을 나타내었으나, 조직인공소화법을 이용한 진단에서는 유충을 발견하지 못한 사례를 보고하였다 [27]. 위와 같은 이유로 역학조사에서 ELISA를 이용하는 것은 적절하나, 식육검사에서 ELISA를 이용하는 것은 부적절하다고 하였다 [26, 28, 29].

인공 감염시킨 3마리의 rat에서 선모충의 피낭유충의 분포를 조사하여, 돼지에서 선모충이 가장 많이 감염되는 부위를 유추하고, 이를 토대로 가장 유효성 있는 검사 부위를 설정하여 하였다. 가장 많은 수의 피낭유충이 발견된 부위는 횡격막으로, 모두 42마리의 피낭유충이 발견되었다. Smith(1988)는 돼지에서 선모충이 횡격막, 혀, 그리고 교근의 순으로 가장 많이 감염되는 것으로 보고하였다. 또한 말에서는 혀가 가장 유효성 있는 부위라고 하였다 [27]. 이와 같은 결과로 보아 조직인공소화법을 이용한 선모충 진단시, 혀와 횡격막이 가장 유효성 있는 검사 부위로 생각된다. 이를 근거로 국내 6개 도축장에서 채취한 총 251두분의 횡격막에서 피낭유충 감염여부를 조직인공소화법을 이용하여 조사한 결과, 전두수에서 음성을 나타냈다. 이와 같은 결과로 보아 국내 출하돈은 선모충에 감염되어 있지 않는 것으로 추정된다.

사육돼지의 감염원은 야생동물로 추정되는데, 여기에

설치류가 매개체가 되어 사육돼지에 선모충을 전파시키는 것으로 추정된다. 따라서 야생동물에서의 돼지선모충 감염실태조사가 절실히 필요하다. 미국 Illinois 주에서 사육되고 있는 raccoon, coyote, red fox에서 선모충의 감염실태를 조사한 결과, 1.3%의 raccoon과, 10%의 coyote, 그리고 5%의 red fox가 선모충에 감염된 것으로 조사되었다. 특히 raccoon, coyote, red fox의 고기는 사람에게 식용으로 사용되고 있기 때문에 이들의 선모충 감염은 큰 의미가 있다 [30]. 또, 미국 Pennsylvania 주에서 사육되고 있는 1,170마리의 raccoon, 384마리의 opossum, 90마리의 grey fox, 73마리의 red fox, 51마리의 skunk, 17마리의 mink, 그리고 5마리의 fox의 혀를 채취하여 조직인공소화법을 이용하여 선모충의 감염여부를 조사한 결과, 2.6%의 raccoon, 2.9%의 opossum, 6.7%의 grey fox, 15.1%의 red fox, 3.9%의 skunk, 5.9%의 mink, 그리고 40%의 fox가 선모충에 감염된 것으로 확인되었다 [23]. 그러나 국내에서 사육되고 있는 야생동물에서의 선모충의 감염여부는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 국내 야생동물에서의 선모충 감염실태조사가 절실히 필요하다고 생각된다.

사람에서 선모충증(trichinellosis)의 진단은 Trichinelloscopy를 이용하여 근육내의 피낭유충(encysted larvae)을 직접 확인하는 방법을 주로 이용하는데, 감염이 가벼운 경우나 장내 감염시기에는 피낭유충을 발견하기가 어렵고, 시간이 많이 소요되는 단점이 있다 [17]. 또 ELISA와 같은 면역학적 진단법을 이용하기도 하는데, ELISA는 진단의 가치 뿐만 아니라 치료약물의 효능을 평가하는 방법으로도 이용된다. 그러나 선모충에 감염된 후 23일 이전이나 700일이 경과한 후에는 ELISA를 이용한 진단은 의음성을 나타내므로 주의를 요한다 [16]. SDS-PAGE나 Western blotting 분석방법에 의하면, 사람에서의 특이항원은 94, 67, 63, 39 kDa의 분자량을 가진 단백질로 나타난다고 하였다 [1].

ELISA를 이용한 선모충 검사시, 분비항원(ESP antigen) 생산이 매우 까다롭고, 이 항원을 이용한 ELISA 검사시 비특이적인 반응이 많이 나타나므로 이를 개선하기 위해 gene cloning을 이용한 항원생산이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 SDS-PAGE와 Western blotting을 이용하여 선모충의 ESP antigen중에서 특이항원을 확인하고, ELISA를 이용하여 국내 사육중인 돼지의 혈청내 항선모충 항체 중 IgG 항체를 측정함으로써 혈청학적 진단법으로써의 이용가능성을 알아보고, 인공 감염시킨 랙드

의 조직검사를 통해 돼지 선모충이 가장 많이 감염되는 부위를 확인하고, 이를 토대로 국내 사육중인 돼지에서 선모충의 감염여부를 조직인공소화법을 통하여 알아본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

- SDS-PAGE에 의하여 분비항원(ESP antigen)을 분석해 본 결과, 4개(75, 55, 52.6, 49 kDa)의 주요밴드가 확인되었으며, 선모충의 주요 항원으로 알려진 P50 group 중에서는 55, 52.6, 49 kDa이 확인되었다.

- 국내 사육중인 돼지를 ELISA를 이용하여 선모충 감염여부를 조사한 결과 8개 지역 581마리 중 54마리(9.3%)가 혈청 양성 및 의양성 반응으로 의심되어 immunoblotting한 결과 모두 음성으로 판정되었다.

- 실험동물을 통한 선모충의 근육내 분포정도는 횡격막이 가장 많았으며, 혀, 교근, 늑간, 후지 순이었다.

- 국내 출하돼지에 대한 선모충 감염조사를 근육(횡격막)의 조직인공소화법으로 실시해 본 결과, 6개 지역의 251마리에서 모두 음성이었다.

이상의 실험에서 국내 출하중인 돼지에서 선모충(*T. spiralis*)에 감염되어 있는 것을 확인하지 못했다.

참고문헌

- Andrews, J. R. H., Ainsworth, R. and Abernethy, D.** *Trichinella pseudospiralis* in human: Description of a case and its treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994, **88**, 200-203.
- Arriga, C., Yepez, M. L., Morilla, A. and Ortega, P.** Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larva antigens in serum samples of experimentally and infected swine. *Vet. Parasitol.* 1995, **58**, 319-326.
- Bjorland, J., Brown, D. J., Gamble, H. R. and McAaley, J. B.** *Trichinella spiralis* infection in pigs in bolivian altiplano. *Vet. Parasitol.* 1993, **47**, 349-354.
- Capo, V., Silberstein, D. and Kojima, S.** Immunocytolocalization of two protection-inducing antigens of *Trichinella spiralis* during its enteral phase in immune and non-immune mice. *J. Parasitol.* 1986, **72**, 931-938.
- Despommier, D. D., Gold, A. M., Buck, S. W., Capo, V. and Silberstein, D.** *Trichinella spiralis*: Secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Exp. Parasitol.* 1990, **71**, 27-38.
- Duffy, M. S., Greaves, T. A. and Burt, M. D.** Helminths of the black bear, *Ursus americanus*, in New Brunswick. *J. Parasitol.* 1994, **80**, 478-480.
- Fornelio, A. C., Caabeiro, F. R. and Gonzalez, A. J.** The mode of action of some benzimidazole drugs on *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. 1987, **95**, 61-70.
- Gamble, H. R. and Graham, C. E.** Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am. J. Vet. Res.* 1984, **45**, 67-74.
- Gamble, H. R., Anderson, W. R., Graham, C. E. and Murrell, K. D.** Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet. Parasitol.* 1993, **13**, 349-361.
- Gold, A. M., Despommier, D. D. and Buck, S. W.** Partial characterization of two antigen by L1 larva of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, **41**, 187-196.
- Khamboonruang, C.** The present status of trichinellosis in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1991, **22**, 312-315.
- Ko, R. C. and Fan, L.** Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. Pseudospiralis*. *Parasitology*. 1996, **112**, 89-95.
- Ko, R. C. and Wong, T. P.** *Trichinella spiralis*: Specificity of ES antigens from pre-encysted larvae. *J. Helminthol.* 1992, **66**, 38-44.
- Laemml, U. K.** Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, **227**, 680-685.
- Leiby, D. A., Duffy, C. H., Murrell, K. D. and Schad, G. A.** *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: Transmission in the rat population. *J. Parasitol.* 1990, **76**, 360-364.
- Mahannop, P., Chaicumpa, W., Setasuban, P., Morakote, N. and Tapchaisri, P.** Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory-secretory (ES) Antigen. *J. Helminthol.* 1992, **66**, 297-304.
- Mahannop, P., Setasuban, P., Morakote, N., Tapchaisri, P. and Chaicumpa, W.** Immunodiagnosis fo human trichinellosis and identification of specific antigen for *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 1995, **25**, 87-94.
- McCracken, R. O., Garcia, A., Nierste, D. M. and Dock, D.** The effect of dosage regimen on the efficacy of cambendazole against *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 1985, **15**, 309-312.
- McCracken, R. O., Nierste, D. M., Moss, J. and Garcia, A.** Oxfendazole: Regimen dependent expression of drug efficacy against *Trichinella spiralis*. *Int. J.*

- Parasitol. 1984, **14**, 277-281.
20. **Pozio, E., Rosa, G. L., Murrell, K. D. and Lichtenfelis, J. R.** Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 1992, **78**, 654-659.
21. **Pozio, E., Rosa, G. L., Rossi, P. and Murrell, K. D.** Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J. Parasitol. 1992, **78**, 647-653.
22. **Rhoades, M. L.** *Trichinella spiralis*: identification and purification of superoxide dismutase, Exp. Parasitol. 1983, **56**, 41-54.
23. **Schad, G. A., Leiby, D. A. and Murrell, K. D.** Distribution, prevalence and intensity of *Trichinella spiralis* infection in furbearing mammals of Pennsylvania. J. Parasitol. 1984, **70**, 372-377.
24. **Serrano, F., Perez, E. and Navarrete, I.** *Trichinella* Strain, pig race and other parasitic infections as factors in the reliability of ELISA for the detection of swine Trichinellosis. Parasitology. 1992, **105**, 111-115.
25. **Silberstein, D. S. and Despommier, D. D.** Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse, J. Immunol. 1984, **132**, 898-904.
26. **Smith, H. J. and Snowdon, K. E.** Comparative assessment of a double antibody enzyme immunoassay test kit and a triple antibody enzyme immunoassay for the diagnosis of *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis nativa* infection in swine. Can. J. Vet. Res. 1989, **53**, 497-499.
27. **Smith, H. J.** Comparison of pepsin-digestion and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichinosis* in swine. Can. J. Vet. Res. 1988, **52**, 63-66.
28. **Smith, H. J.** Evaluation of the ELISA for the serological diagnosis of Trichinosis in Canadian swine. Can. J. Vet. Res. 1987, **51**, 194-197.
29. **Smith, H. J.** Vaccination of rats and pigs against *Trichinella spiralis spiralis* using the subspecies, *T. Spiralis nativa*. Can. J. Vet. Res. 1987, **51**, 370-372.
30. **Snyder, D. E.** Prevalence and intensity of *Trichinella spiralis* infection in Illinois wildlife. J. Parasitol. 1987, **73**, 874-875.
31. **Sohn, W. M., Kim, H. M., Chung, D. I. and Yee, S. T.** The first human case of *Trichinella spiralis* infection in Korea. Korean J. Parasitol. 2000, **38**, 111-115.
32. **Su, X. and Prestwood, A. K.** Isolation of *Trichinella*-specific antigens for diagnosis by gradient monoclonal antibody affinity chromatography. J. Parasitol. 1990, **76**, 842-848.
33. **Takahashi, Y., Mizuno, N., Araki, T., Okuda, H. and Nakashima, T.** Immunocytochemical localization of antigenics in adult worms of *Trichinella spiralis* recognized by fisher rats. Parasitol. Res. 1994, **80**, 291-296.
34. **Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Tokuda, C. and Araki, T.** Direct evidence that the cuticle surface of *Trichinella spiralis* muscle larvae shares antigenicity with stichocyte α -granules and the esophagus-occupying substance. J. Parasitol. 1990, **76**, 290-293.
35. **Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Shimazu, K. and Araki, T.** *Trichinella spiralis*: The in situ localization of muscle larva antigens recognized by humans. Exp. Parasitol. 1990, **70**, 107-110.
36. **Wakelin, D., Goyal, P. K., Dehlawi, M. S. and Hermanek, J.** Immune response to *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* in mice. Immunology. 1994, **81**, 475-479.
37. **Wee, S. H., Lee, C. G., Joo, H. D. and Kang, Y. B.** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Trichinella spiralis* antibodies and the surveillance of selected pig breeding farms in the Republic of Korea. Kor. J. Parasitol. 2001, **39**, 261-264.