

돼지 옴 감염증 진단을 위한 바이오센서 연구

조한근 지차호

A Biosensor for Diagnosis of Swine Sarcoptic Mange

H. K. Cho C. H. Jee

Abstract

In this study, a biosensor was developed to rapidly diagnose the swine sarcoptic mange (*Sarcoptes scabies* var. *suis*). The ELISA was modified to reduce the processing time for rapid diagnosis. The biosensor consists of a biological reaction part, and a measurement and control part. The biological reaction part was designed for using micro-pumps and valves for fluid transportation, and the measurement control part composed of a photodiode, a light-emitting diode for light measurement, and a microcomputer to implement assay. A polystyrene cuvet was used as a reaction chamber. Signal output was read as the rate of change in optical density at 645 nm. Eighteen pigs diagnosed with sarcoptic mange and 19 control pigs were tested. Fifteen *sarcoptes*-infested pigs showed positive results (83.3% sensitivity). Sixteen control pigs showed negative results (84.2% specificity). The system could execute a diagnosis cycle in about 45 min. The results suggest that this biosensor is useful for the rapid diagnosis of swine sarcoptic mange.

Keywords : Biosensor, ELISA, Swine sarcoptic mange (*Sarcoptes scabies* var. *suis*)

1. 서론

돼지 옴진드기는 개선축과에 속하는 옴벌레로서 직경 400 μm 의 원형 모양이며, 흰색 또는 적색을 띤다. 돼지 옴진드기는 돼지 피부 속에 굴을 파고 왕성한 활동으로 심한 가려움증과 함께 피부염증을 만들어 삼출물이 응고되어 딱지를 형성하게 한다. 피부의 과도한 각피화와 결합조직의 증식이 진행되면 피부는 대단히 비후되고 추벽이 생기며 동시에 탈모현상이 확대되며, 세균에 의한 2차적 감염을 일으키기도 한다. 이러한 병원성으로 양돈산업에서 돼지 옴진드기는 생산성 저하에 의한 경제적 피해에 심각한 영향을 주는 것으로 전 세계적으로 잘 알려진 중요한 외부 기생충이다.

국외자료에 의하면 감염된 모돈 1마리는 돼지 옴진드기로 인하여 연간 10~15일의 출하지연 등으로 미화 \$84~\$115의 경제적 손실을 입는 것으로 알려져 있다. 스웨덴, 네덜란

드, 이태리, 스페인, 미국 및 벨기에 등에서 돼지 옴진드기의 감염율은 20~80%로 보고된다(Davis 등 1966, Melancon 1998, Smets and Vercruyse 2000). 국내에서도 돼지 옴진드기는 '중돈장 위생관리요령 및 위생·방역관리 우수중돈장 인증요령(농림부 고시)' 등에서 나타난 바와 같이 7가지 검사대상 질병(돼지 오제스키병, 위축성 비염, 부루세라병, 적리, 독소 플라즈마병, 유행성 폐렴, 돼지 옴진드기) 중에 포함되어 있어 그 중요성이 인정된다.

돼지 옴진드기 감염증의 진단에는 피부 채취, 긁는 지수 (scratching index : SI) 및 피부병변 지수(average dermatitis score : ADS) 등에 의해 주로 감염정도를 관찰하는 전통적인 방법이 사용되고 있다. 현재 시행중인 우수 중돈장 인증요령(농림부 고시 제1996-58호)에서 돼지옴진드기 감염증의 검사 방법은 10마리의 돼지 귀에서 채취한 피부 가검물을 현미경으로 검사하는 것으로 노력과 시간이 많이 소요되는 문제점

This article was submitted in July 2005, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in October 2005. The authors are Han-keun Cho, KSAM member, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Cha-Ho Jee, Professor, Dept. of Veterinary Medicine, Chungbuk National University. The corresponding author is Han-keun Cho, Professor, Dept of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; Fax : +82-43-271-4413; E-mail : <hkcho@cnu.ac.kr>

을 갖고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 혈청학적 진단법은 Wooten과 Gaafer(1984)가 수동혈구응집법(passive hemagglutination assay)을 이용하여 돼지에서 돼지 옴진드기 항체의 검출을 시도한 후, 많은 학자들이 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 돼지 옴진드기 체항원으로 그에 대한 항체검출을 시도하였다. ELISA는 기존의 전통적인 옴진드기 진단법인 피부채취법에 비해 정확하고 편리하며 많은 가검물을 한번에 처리할 수 있기 때문에 매우 유용한 검사법으로 인정받고 있는 실정이다. 이 효소면역흡착법은 전통적인 방법에 비해 정확하고 경비, 시간 및 노력 등은 단축되었으나, 시료를 실험실로 운반해야 하거나, 시약 준비, 반응 및 분석시간 등이 많이 요구된다. 면역분석법을 이용하여 현장에서 사용 가능한 측정장치는 아직 개발되지 않은 실정이다.

본 연구는 돼지 옴진드기 감염증을 신속히 진단할 수 있는 바이오센서를 개발하고 진단 성능을 평가하기 위하여 수행되었으며, ELISA에 기초하여 정확한 진단이 가능하고 비전문가도 사용할 수 있고 운반이 간편하도록 휴대형으로 개발하였다.

2. 재료 및 방법

실험실에서 개발된 효소면역 흡착법(지 등, 2001)을 바이오센서에 적합하도록 변형하였다. 기본 ELSIA의 진단시간 단축실험을 위해 돼지옴진드기, 혈청 및 집 먼지 진드기 체항원을 준비하여 사용하였다. 실험용 바이오센서를 제작하여 실험방법에 따라 기초 성능과 진단 성능을 평가하였다.

가. 효소면역흡착법(ELISA)

지 등(2001)이 발표한 돼지 옴진드기 감염증 진단을 위한 실험실용 ELISA를 수정하여 진단에 소요되는 처리시간을 단축하였다. 이를 위해, 준비된 돼지 옴진드기 체항원을 도포 완충액(carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석하여, 효소면역흡착용 플레이트의 각 반응조(well)에 100 μl 분주하였다. 항원이 분주된 플레이트를 37°C 배양기에서 1시간 반응시킨 후 4°C에서 18시간 감작시켰다. 감작 후 항원액을 제거한 다음 인산완충액(phosphate buffer saline (PBS)-Tween 20, pH 7.4)으로 3회 세척하고 0.05% PBS-Tween 20을 완전히 제거하였다. 항원 블로킹(blocking)은 5% 탈지분유가 함유된 PBS-Tween 20을 항원흡착 플레이트의 각 반응조에 100 μl 씩 분주한 후 37°C 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 혈청 희석배수는 여러 번의 실험을 통해 흡광도(OD, optical

density)가 가장 효율적으로 반응하는 50배로 PBS-Tween 20과 희석하여 각 반응조에 100 μl 씩 분주하고 24°C 배양기에 15분간 반응시킨 후, 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 2차 항체(alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-swine IgG, Sigma)는 PBS-Tween 20으로 50배 희석하여 각 반응조에 100 μl 씩 첨가하여 24°C에서 15분간 반응시킨 후에 세척액으로 3회 세척하며, 기질을 각 반응조에 100 μl 씩 첨가한 후 빛을 차단시켜 실온에서 10분 반응 후 ELISA reader (ELx808, BIO-TEK)를 사용하여 645 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

나. 돼지 옴진드기 및 열청

1) 수집

돼지 옴진드기는 관내 도축장에서 도축되는 돼지 중에서 귀에 딱지가 형성된 돼지의 피부부를 긁어 돼지 옴진드기(*Sarcoptes scabiei* var. *suis*)를 분리한 후 회수하였으며 혈청은 돼지옴진드기가 감염된 돼지의 경정맥에서 채취한 혈액을 5분간 원심 분리(1,000 g)하여 양성 혈청을 수집하였다.

2) 항원성 확인

돼지 옴진드기 체항원의 항원성을 확인하기 위해 Gershoni와 Palade(1983)의 방법에 따라 Western blot을 실시하였으며 자세한 방법은 지 등(2001)의 논문에 설명된 바와 같다.

다. 집 먼지 진드기 체 항원

진단법의 개발을 위해서는 많은 양의 돼지 옴진드기 체항원 시료가 필요하지만, 돼지 생체에서 회수하기 어렵기 때문에 인공배양이 가능한 집먼지 진드기로부터 돼지 옴진드기의 공통체항원을 연속적 용출법으로 분리하여 만든 용출 단백질(eluted proteins)로 돼지 옴진드기 체항원을 대체하여 사용하였다(김과 지, 2004).

1) 수집

집먼지 진드기는 우리나라의 우점종 중 배양이 잘 되는 세로무늬 진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*)를 선택하였으며 연세대학교 의과대학 기생충학 실험실에서 분양 받은 집먼지 진드기를 실험실에서 배양하였다.

2) 연속적 용출

연속적 용출은 Gonzalez 등(1998)의 방법에 따라 용출장치(Prep cell, Model 491, Bio-rad, USA)를 이용하였다. 연속적 용출장치에 전원 공급장치, 버퍼 순환 펌프, elution pump,

그리고 자외선 모니터, 수집기, 기록계로 구성된 GradiFrac system(Pharmacia Biotec, USA)을 연결한 후 준비한 시료 3 ml 를 loading하고 12 W로 일정하게 전기영동을 하였다. 용출펌프(elution pump)를 이용하여 용출 완충용액의 속도는 1 ml /min으로 고정하였으며 collector를 이용하여 튜브 한 개당 2.5 µl씩 용출 완충용액을 받았다.

라. 실험용 바이오센서

돼지 옴진드기의 신속한 진단용 바이오센서 개발을 위해, 임과 조(2005)가 잔류농약 측정 연구에서 개발한 바이오센서를 기본 모델로 하여 실험용 바이오센서를 제작하였다. 표 1은 실험용으로 제작된 바이오센서의 주요 부품에 대한 규격과 제조회사에 대한 설명이며, 그림 1은 바이오센서의 생물반응부의 개략도를 보여준다. 그림 2는 바이오센서의 제어용 블록선도를 보여준다.

반응공정이 시작되면 1차 항체용 밸브가 열리고 시약펌프와 혼합용 펌프가 작동되고 배양시간이 5분간 지속된다. 다음

은 세척공정으로 큐벳을 배수하고 밸브와 펌프를 세척하고 혼합용 펌프를 작동한다. 다음은 항체표시공정으로서 2차 항체용 밸브가 열리고, 시약 펌프가 작동되고, 배양시간이 5분간 지속된다. 다음은 세척공정이 진행된다. 이어 현상공정이 진행되어 기질밸브가 열리고 시약펌프가 작동되고 배양시간이 5분간 지속되고 흡광도를 계산한다. 끝으로 세척공정에서는 기질밸브가 세척되고, 세척액을 추가하게 된다. 상세한 제어 알고리즘은 표 2에 요약되어 있다.

마. 실험 방법

1) ELISA 소요시간의 단축

일반 ELISA의 경우 반응 및 배양과정에 2~4시간이 소요되므로, 신속한 옴진드기 진단이 가능하도록 실험실용 ELISA(지 등, 2001)를 수정하여 소요시간의 단축 가능성을 조사하였다. 일반적인 ELISA의 경우 희석비가 200배 이상이므로 반응시간 단축을 위해서는 농도의 증가가 필요해, 1차 항체의 희석비를 100배, 50배, 및 25배로 증가하면서 실험하였다. 25

Table 1 The major parts of the biosensor

Parts		Specification	Model and Manufacturer
Biological reaction part	Cuvet	Quartz cell 12.5 mm ² ×45 mm	T-5 (NSG Precision cells Inc, NY, USA)
	Micropump	50 µL /stroke	LPLA1220050L (The Lee Co., CT, USA)
	Microvalve	2-way solenoid	LFAA1201710H (The Lee Co., CT, USA)
	Microvalve	3-way solenoid	LFAA1201410H (The Lee Co., CT, USA)
	Tubes	1.6 mm, ID	Viton (Sigma Co, USA)
Measurement and control part	LED	645 nm,	HLMP-4101 (Hewlett Packard, CA, USA)
	Photodiode	400~1100 nm	BPX61 (Siemens Inc., CA, USA)
	Signal processing	4th order Butterworth Filter	Manufactured in laboratory
	Display	LCD	Samsung Elec. Co. (Suwon, Korea)
	Microcomputer	AVR	ATmega 8535 (Atmel corp, CA, USA)

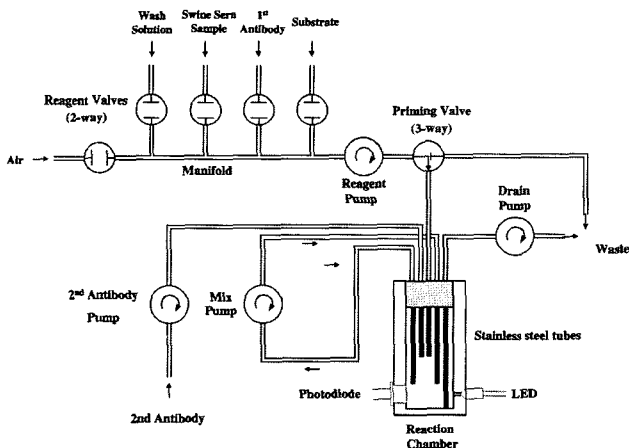


Fig. 1 Scheme of a biological reaction part of the biosensor.

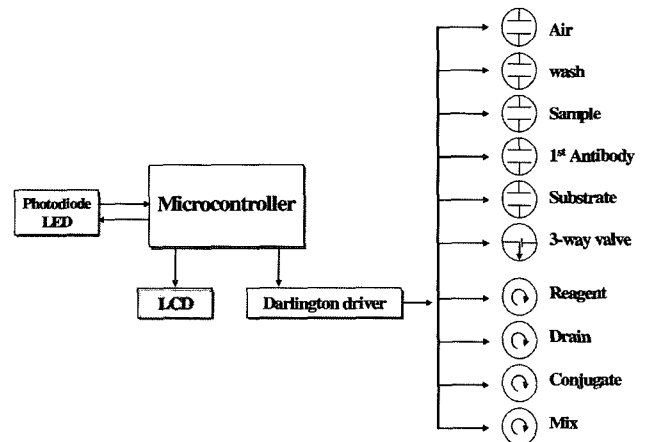


Fig. 2 Control block diagram for the biosensor.

배 이상으로 증가시킬 경우, 항체의 과다소모로 진단의 경제성이 낮아져 25배를 상한값으로 하였다. 또한 항체 농도에 따라 배양시간을 15분, 10분, 및 5분으로 단축하면서 흡광도를 측정하였다.

반응을 시작하기 전에 음진드기 항원으로 수작업을 통해 큐벳에 코팅시킨다. 코팅된 큐벳은 냉동고(-20°C)에 보관하여 사용하였다. 희석된 항체는 실온에서 변질될 가능성이 있으므로 변질을 최소화하기 위해 냉장고(4°C)에 보관하며 사용하였다.

준비가 완료되면 큐벳 면에 이물질이 묻지 않도록 주의하며, 블럭에 삽입하고, 표 2의 순서로 펌프 및 밸브를 작동하여 시약을 주입하여 반응시킨다. 최종 단계로 양성 또는 음성 혈청에 대한 출력 값은 액정표시장치에 의해 출력전압으로 결과를 읽는다. 액정표시장치에 출력된 전압을 식 (1)에 대입하여 흡광도 값을 계산한다. 여기서 OD는 흡광도이며 $V_{out}(0)$ 는 흡광도 측정을 위한 대조액으로 증류수를 사용하여 측정할 입사광의 세기를 나타내며, $V_{out}(t)$ 는 큐벳을 투과한 투과광의 세기를 나타낸다.

$$OD = \log\left(\frac{V_{out}(0)}{V_{out}(t)}\right) \quad (1)$$

2) 기초 성능 평가

바이오센서의 생물반응부에 사용된 펌프의 성능평가를 위해 증류수를 이용하여 정밀저울(XT220A, Precisa instrument

corp., Switzerland)로 측정하였다. 계측제어부의 정확도와 표준편차를 측정하기 위해 증류수를 이용하여 반복측정 및 시간에 따른 출력 값의 변화를 조사하였다(임과 조, 2005).

3) 진단 성능 평가

바이오센서의 진단 성능 평가를 위하여 돼지 음진드기에 감염이 확인된 돼지 18마리로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 본 연구에서 개발된 센서의 진단 성능 평가를 실험하였다. 항체 농도 및 배양시간은 분석 시간을 단축할 수 있도록 최적화한 조건을 이용하였다. 또한 비교시험을 위한 대조구로서 감염 경력이 없는 19마리의 돼지로부터 혈청을 수집하여 진단 실험을 실시하였다.

측정된 흡광도(OD)는 음성반응을 나타낸 대조구의 흡광도 측정값을 수정하는 비율로서 양성 대조구의 백분율로 나타낸다. 즉(시료의 OD-음성 대조구의 OD)/(양성 대조구의 OD - 음성 대조구의 OD)로 표시한다. 실험실에서의 기초실험을 통해 수작업에 의한 검출결과와 비교하여, 변환된 OD 값이 30% 이상이면 양성으로, 30% 미만이면 음성으로 간주하였다.

센서를 이용한 진단과 전통적 방법에 의한 진단 결과와의 상관관계를 통해 감수성(sensitivity)과 특이성(specificity)을 규명하였고, Fisher의 완전 2x2 분할표를 이용하여 상관관계를 분석하였다. 이를 위해 Matlab 프로그램과 fisherextest 함수(MBE Toolbox, Cai 등 2005)를 사용하였고, 유의성 기준은 P 값<0.01으로 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. ELISA 소요시간의 단축

그림 3은 1차 항체의 희석비 변화와 배양시간 변화에 따른 음성반응 대 양성반응의 흡광도 비를 나타낸다. 흡광도 비율이 높아지면 양성과 음성의 구별이 명확해지므로, 음진드기 진단을 위해서는 흡광도 비율이 높은 조합을 선택하는 것이 바람직하다. 전반적으로 1차 항체의 농도가 증가할 때 흡광도 비는 높아지는 것으로 나타났고, 반면 배양시간이 짧아질 때 흡광도 비는 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 진단에 적절한 희석비와 배양시간으로 각각 1:100과 15분으로 결정하였다.

나. 기초 성능평가

각 펌프별로 운반되는 양을 정밀저울로 10회 측정한 결과 0.3%의 정확도를 나타냈다. 표 2의 순서에 의해 증류수를 운반한 결과 시료 운반에 3분, 큐벳 세척에 5분, 배양에 15분 및 항원-항체 반응에 22분으로 전체 검출 시간은 45분이 소

Table 2 Control sequence for the biosensor

Binding cycle
<ul style="list-style-type: none"> • 1st antibody valve (600 μl), Reagent pump (15 strokes) • Mix pump (33 strokes) • Incubate 5 min (24°C)
Washing cyclex5
<ul style="list-style-type: none"> • Drain cuvet • Washing valve (1.2 ml), Reagent pump (30 strokes) • Mix pump (36 strokes)
Antibody Labeling cycle
<ul style="list-style-type: none"> • 2nd antibody valve (1ml), Reagent pump (20 strokes) • Incubate 5 min (24°C)
Washing cyclex5
Development cycle
<ul style="list-style-type: none"> • Substrate valve (1ml, Reagent pump (32 strokes) • Incubate 5 min (24°C) • A/D converter • Calculate OD rate (10 s)
Cleaning cycle
<ul style="list-style-type: none"> • Clear substrate valve • Add washing solution

요되었다.

흡광도 측정 시스템의 재현성(reproducibility)과 유효성(validity)을 조사하기 위해 1 ml의 증류수를 넣은 큐벳을 블록에 삽입 및 제거동작을 반복하며 연속 측정된 흡광도 값 20개의 평균값을 30회 반복 실시한 결과, 출력전압은 3.4 V, 표준편차는 0.003 V로 정밀도는 99.9%로 나타났다. 계측 시스템으로부터 시간변화에 따라 일정한 전압이 출력되었으며 160분 이후에 0.3%의 감소현상이 나타났다. 따라서 장시간 사용의 경우 출력 값의 오차가 있을 것으로 예상되며 이의 보완이 필요할 것이다.

다. 진단 성능 평가

표 3은 감염된 돼지와 대조구로 감염되지 않은 돼지에 대한 진단 결과를 보여준다. 표 3에서 보는 바와 같이 센서를 이용한 진단 결과 감염된 돼지 18마리 중에서 15마리의 경우가 양성으로 판명되었다. 대조구로 사용된 감염되지 않은 19마리 돼지 중, 16마리의 경우 음성으로 진단이 되었다. 따라서 감수성(sensitivity)은 83.3%, 특이성(specificity)은 84.2%로 나타났다. 이와 같은 결과는 Lower(2001) 등이 실험실에

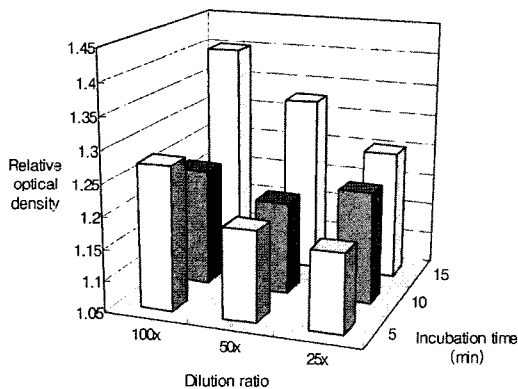


Fig. 3 Optical density for the various dilution ratio of 1st antibodies and the various incubation times.

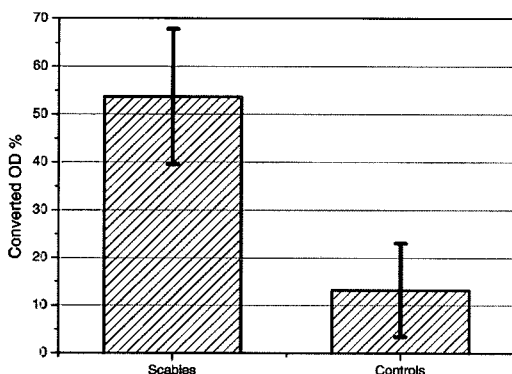


Fig. 4 Mean and standard deviation in results of the scabies biosensor.

Table 3 Results of the scabies biosensor: cases and controls

	Scabies cases	All controls
Positive sera	15	3
Negative sera	3	16
Total	18	19

서 개를 대상으로 실시한 ELISA 진단 결과인 감수성 84.2%와 특이성 89.5%에 상당히 근접하는 것으로 확인되었다. 그림 4는 감염으로 진단된 돼지와 비감염으로 진단된 돼지의 변환된 OD 값의 평균과 표준편차를 나타낸다. 음진드기에 감염된 돼지의 변환 OD 값의 평균은 53.7%이고, 표준편차는 14.1%로 나타났고, 음진드기에 감염되지 않은 돼지의 평균은 13.2%이고, 표준편차는 9.8%로 나타났다. Fisher의 완전검정 결과, 센서 진단방법과 전통적인 피부채취에 의한 진단방법과는 상관관계가 매우 높은 것으로 나타났다(P 값<0.0001).

4. 요약 및 결론

본 연구의 목적은 돼지 음진드기의 신속한 진단을 위해 실험실 용 효소면역분석법을 기본으로 한 바이오센서의 개발과 진단 성능평가에 있으며 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

기존의 ELISA는 돼지 음진드기의 진단을 위해 최소 2시간 이상이 소요된다. 따라서 시간을 단축시키기 위해 1차 항체의 농도를 증가하고(희석비 1:100), 배양시간을 15분으로 단축한 경우, 진단시간을 45분으로 단축하여 비교적 빠른 진단이 가능한 것으로 확인되었다. 또한 개발된 바이오센서의 감수성은 83.3%, 특이성은 84.2%로 나타났고, Fisher의 완전검정 결과, 전통적 피부채취에 의한 진단방법과는 상관관계가 매우 높은 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Cai, J. J., David, K. S., Xuhua, X. and Yuen, Kwok-yung. 2005. Software MBET Toolbox : a Matlab toolbox for sequence data analysis in molecular biology and evolution. BMC Bioinformatics, 6:64. or <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/6/64>.
2. Davies, P. R., Bahnson, P. B., Cgass, J. J., Marsh, W. E. Garcia, R., Melancon, J. and Dial, G. D. 1966. Evaluation of the monitoring of popular dermatitis lesions in slaughtered swine to assess sarcoptic mite infestation. Vet Parasitol, 62: 143-153.

3. Gershoni, J. M. and Palade, G. E. 1983. Protein blotting : principles and application. *Anal Biochem*, 131:1-15.
4. Gonzalez, J. M., Gonzalez, A. J. and Caabeiro, F. R. 1998. Purification of *Trichinella spiralis* tubulin : Comparison of several analytic procedures. *Vet. Parasitol*, 77:115-121.
5. Lower, S., Kimberly, L. M., Medleau, Hnilica, K. and Bigler, B. 2001. *Veterinary Dermatology*, 12, 315-320.
6. Melancon, J. J. 1998. Sarcoptic mange in swine : current prevalence. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 20:87-95.
7. Smets, K, J. and Vercruyse, J. 2000. Evaluation of different methods for the diagnosis of scabies in swine. *Vet Parasitol*, 90:137-145.
8. Wooten, E. L. and Gaafer, S. M. 1984. Detection of serum antibodies to sarcoptic mange mite antigens by the passive hemagglutination assay in pigs infested with *Sarcoptes scabiei* var. suis. *Vet Parasitol*, 15:317-323.
9. 김재원, 지차호. 2004. 연속적 용출법을 이용한 개옴과 집먼지 진드기의 공동항원의 분리. *J. of Veterinary medicine and Biotechnology*, (5)1:69-78.
10. 임종근, 조한근. 2005. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 신속한 측정을 위한 생물반응 및 계측제어 시스템 개발. *바이오시스템 공학*, (30)2:114-120.
11. 지차호, 이삼선, 장래훈. 2001. ELISA를 이용한 돼지 옴 감염증의 진단. *대한수의학회지*, (41)4:565-570.