Original Article | Journal of Biosystems Engineering

J. of Biosystems Eng. 37(6):420-428. (2012. 12)
http://dx.doi.org/10.5307/JBE.2012.37.6.420

eISSN : 2234-1862
pISSN : 1738-1266

돼지증식성회장염 신속검진 기술개발(1) – 돼지 분변에서의 로소니아균 검출을 위한 항원, 항체 준비 –

김혁주[1]* · 홍종태[1] · 유병기[1] · 김기영[1] · 이진주[2] · 김 석[2]

[1]농촌진흥청 국립농업과학원, [2]국립경상대학교 수의과대학

Development of rapid diagnosis technology for porcine proliferative enteropathy (1) - Preparation of the samples and antibody for rapid detecting the lawsonia in pig feces -

Hyuck Joo Kim[1]*, Jong Tae Hong[1], Byeong Kee Yu[1], Gi Young Kim[1], Jin Ju Lee[2], Suk Kim[2]

[1]*National Academy of Agricultural Science, RDA., Suwon, Korea*
[2]*College of Veterinary mcdicine, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam, Korea*

Received: September 20th, 2012; Revised: November 29th, 2012; Accepted: December 3rd, 2012

Abstract

Purpose: Porcine proliferative enteropathy(PPE), caused by the obligate intracellular bacterium *Lawsonia intracellularis*, is a widely distributed disease throughout the world causing substantial economic loss. The bacterial pathogen invades the intestinal epithelial cells which causes hyperplasia of the infected cells and leads to the process of disease pathogenesis. For diagnosing PPE in a pig farm in earlier stage, a rapid diagnosing test equipment is needed for farmers. To test the equipment appropriately, we prepare the samples and antibodies for rapid detecting the *Lawsonia intracellularis* in pig feces. **Methods :** To prepare the PPE infected samples, we sampled PPE suspected pig feces in a pig farm. To manufacture a anti-*Lawsonia intracellularis* antibody for capturing the *Lawsonia intracellularis*, the rabbit-anti LsaA synthetic peptide polyclonal antibody was inoculated to rabbits. To select the couple of antibodies which is most well sandwiched with the bacteria, ELISA test was done with PPE infected ileum samples. Finally, to verify the PPE infected feces which would be used to test the rapid kit, PCR test was done on the sampled PPE suspected feces **Results :** The rabbit-anti LsaA synthetic peptide polyclonal antibody is developed, and is verified to capture the bacterial well through the fluorescence antibody test. Also, we found that the monoclonal antibody and the polyclonal antibody could be used as couples for sandwiching the bacteria. Finally, through the PCR test for samples of pig feces, we could prepare the 150 PPE positive samples and 50 PPE negative samples. **Conclusions :** The manufactured polyclonal antibody and the imported monoclonal antibody could be used to capture the bacteria using the sandwich techniques. Also, the prepared PPE infected negative and positive samples could be used to test the performance of the rapid kit to capture the bacterium *Lawsonia intracellularis*

Keywords: Porcine proliferative enteropathy (PPE), rapid diagnosis, pig feces, *Lawsonia intracellularis*

서 론

최근 우리나라의 양돈생산 현황을 보면 모돈 95만두, PSY(모돈 두당 년간 자돈 생산두수, Produced pigs per a sow per a year)가 20두, 출하두수 1,300만두 가운데 사육환경이 열악하여 폐사율이 많아 MSY(모돈 두당 년간 자돈 판매두수, Marketted pigs per ayear per asow)는 '09년도 한국 15.2두인데 반해 네덜란드 26두, 덴마크 25.6두로 유럽 선진 축산국의 약 60% 수

***Corresponding author:** Hyuck Joo Kim
Tel: +82-31-290-1867; **Fax:** +82-31-290-1860
E-mail: agrihj@rda.go.kr

Copyright ⓒ 2012 by The Korean Society for Agricultural Machinery
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Figure 1. PPE infected pigs and its feces.

준에 그치고 있는 실정이다(2009, Inter PIG). 이와 같이 한국 양돈업의 생산성이 선진국에 비해 낮은 것은 여러 가지 원인이 있어, 농식품부에서도 양돈산업의 MSY 20두 이상을 목표로 많은 사업을 추진하고 있다. 생산성 저하의 많은 원인 중에서 하나가 돼지의 질병이며, 양돈장에서 흔히 나타나는 것이 돼지 증식성 회장염(Porcine proliferative enteropathy, PPE)이다, 이는 돼지의 설사병으로서 분변을 통해 전염이 되고, 질병의 원인이 되는 균은 로소니아 인트라셀롤라리스균 (Lawsonia intracellularis)이다. 발병시기는 포유돈을 제외한 전 돈군에서 발생하며, 회장이 비후해지고 주름이 발생하게 되어 돈군 내 위축돈이 발생하며, 이유돈의 경우 설사 및 폐사, 육성돈은 설사(증체율 저하)등이 나타난다. 모돈의 경우는 회장염으로 인한 자궁내막염 및 난소에 대한 질병이 발생할 수 있고, 이를 조기에 발견하지 못할 경우 번식장애가 발생할 수 있어 돼지 폐사율이 증가하게 된다. 특히 출혈성 회장염의 경우는 급격한 출혈과 함께 갑작스런 폐사가 일어나므로 매우 유의해야 하는 질병이다. Figure 1에서는 회장염 감염돼지의 전형적인 증상을 나타내었다(Jeong et al., 2008).

경상대학교 수의과대학에서는 '08년도에 경상남도 관내 양돈장을 대상으로 하여 회장염 감염 실태조사를 실시한 결과 조사 대상 양돈장 전체의 53.2%가 감염되었으며, 전체 조사된 155개의 샘플 중의 35.2%가 감염된 것으로 나타나, 그 심각성이 매우 심한 것으로 나타났다(Jeong et al., 2008). 또한, 경상남도 축산진흥연구소 중부지소에서는 2006~2007년도에 임상적으로 회장염 의심이 되었던 농가에서 분변을 채취하여 45농가 420건을 PCR법으로 검사한 결과 농가별 양성농가는 26농가가 감염되어 57.8%의 감염률을 보였으며, 검사 건수별로는 420건 중 113건이 양성으로 판정되어 26.9%의 감염률을 보였다. 그리고 도축장에 출하되는 돼지의 회장 말단 부분의 점막 부분을 스크래핑한 시료를 검사한 결과 188농가의 1,075건 중 109건이 양성으로 판정되어 10.4%의 감염률를 보였다(Park, 2009).

이와 같은 회장염 등의 저감을 위해서는 농장단위에서 질병 감염을 상시 모니터링하여 조기에 질병확산을 방지할 수 있는 조치를 취하는 것이 중요하다. 현재 돼지의 병원체에 대한 진단 방법은 감염돼지의 부검검사와 죽이지 않고 진단하는 혈청검사 및 분변검사 등이 있다. 이러한 검사는 실험실내에서 PCR, 형광항체법, 면역조직염색법 등의 방법으로 분석되고 있으나, 소요시간이 길어 질병발생시 신속한 대응이 어려워 초기 감염돼지의 처치는 대부분 육안판정에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 돼지 회장염을 조기에 발견하여 해당 돼지의 처리 및 전염 예방를 위하여 분뇨를 이용한 신속 간이 검진의 개발이 필요한 실정이다. 본 연구는 첫 번째 논문으로서 돼지 분변에서 로소니아균을 검출하기 위한 항체, 항원 준비 및 PCR을 이용한 분변 시료 준비에 대하여 보고하고자 하며, 다음 논문에서는 신속 검진장치를 이용한 회장염 간이검진을 실시하고 그 결과를 살펴보았다.

재료 및 방법

가. 합성 항원과 항체 준비

항체는 항원검출의 중요한 요소이므로 저렴한 가격으로 지속적 공급이 가능하여야 한다. 현재 전 세계적으로 간이검진을 위한 항체가 개발되어 상용화된 것은 없으며, 다만 면역 염색방법을 통하여 로소니아균체의 확인을 위하여 개별 연구실 단위에서 혈청이 만들어졌거나 면역형광검출을 위하여 판매되고 있는 제품이 유일하다.

본 연구에서는 로소니아 균의 검출을 위하여 경상대학교 수의과대학과 공동으로 로소니아균에 대한 항체를 제조하였는데, 로소니아균의 표면 단백 (*Lawsonia intracelularis* surface antigen A; LsaA) 에 대한 합성항원을 작제하여, 토끼에 반복 접종한 후 polyclonal antibody를 제조하였다. 토끼 2마리를 이용하였으며 제조 방법 및 항체에 의한 균체 확인 내용은 다음과 같다.

MKKSIKEYLIEKNYSNAEILIRSGQVKINNEVVFTPSFLI
KDSDKILIEQKKEFVSRGAYKLLAAIEAFKLDFENKVILDIGASTGGFSQVSLNYGAKLVYALDVGNNQLDYKLRQNSKIKSLEQTNLKSISKQ
MFEVEIDKVVCDVSFISLKEVYKVVEHILKTNDDWIVLLKPQFEASSKYVEKGGFVLEQFHPFLIDRSISQASEHNFKFIDKIT
SPIKGQKSKNAEYIP

Figure 2. LsaA amino acid sequence of *L. intracellularis* (*underlined is used for peptide*).

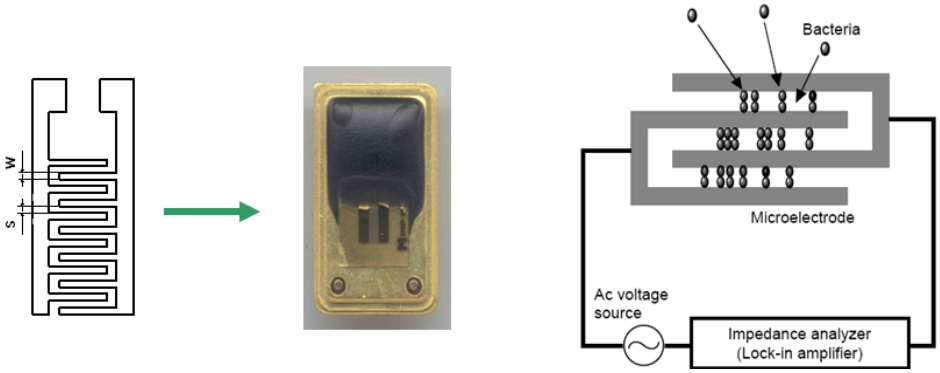

Figure 3. Biosensor system with impedence measurement system.

1) LsaA 합성항원 및 항체 준비

LsaA synthetic peptide를 이용한 PPE 진단을 수행하기 위하여 Watarai 등(2004)의 보고에 기초하여 LsaA synthetic peptide를 국내 Y(사)에 의뢰 제작하여 항원 및 항체 생산에 사용하였다(Fig. 2). 항체 생산을 위하여 합성된 peptide는 토끼에 반복 접종하여 rabbit-anti LsaA synthetic peptide polyclonal antibody를 얻었다. 또한, 일본 오비히로 대학의 Watarai 교수팀으로부터 받은 *Lawsonia intracellularis* 감염 토끼로부터 얻어진 polyclonal항체 (Wataria et al., 2005)를 준비하였다.

2) 형광항체법을 이용한 항체와 로소니아균의 반응 확인

제조된 항체가 로소니아 균에 반응하는지를 확인하기 위하여, 항체를 이용하여 분변 및 장관 조직 내의 로소니아 균을 관찰하였으며, 그 과정을 요약하면 다음과 같다. 먼저 장유제액 준비를 위하여 출혈성 증식성회장염(Proliferative hemorrhagic enteropathy, PHE)에 감염된 비육돈을 부검을 통하여 감염돈의 소장 말단 3분의 1 부위와 맹장, 결장 상부 등을 채취하여 시험에 사용하였다. 감염부위가 돼지증식성회장염(Porcine proliferative enteropathy, PPE)으로 인한 병변 부위임을 확증하기 위해 간접형광항체법(indirect immunofluorescence antibody test, IFAT)으로 *L. intracellularis* 균의 감염 여부를 확인 하였다. 이를 확인하기 위하여, 확보된 장유제액에 대해 일본 오비히로 대학의 Watarai 교수팀으로부터 받은 *Lawsonia intracellularis* 감염 토끼로부터 얻어진 polyclonal항체(Wataria et al., 2005)와 브라질 UFMG 수의과 대학의 Roberto 교수팀으로부터 받은 polyclonal 항체(Guedes et al., 2003)를 이용하여 IFAT 방법으로 로소니아균을 확인하였다. 또한 회장염 의심돼지의 분변을 정제하여 동일한 방법으로 로소니아 균의 감염 여부를 확인하였다.

3) 임피던스형 바이오센서를 이용한 항체의 로소니아균 반응 확인

위와 같이 제조된 항체가 로소니아균과 반응하는가를 확인하기 위하여 바이오센서를 이용하여 검출 시험을 실시하였다. 측정시스템은 임피던스형 전극 센서의 표면에 로소니아균을 검출할 수 있는 항체가 고정된 임피던스형 검출부, 신호 계측 시스템으로 이루어져 있으며 상세 내용은 다음과 같다(Fig. 3). 검출부는 균 검출을 위한 항체를 신규로 도포하기 위하여 유리기판 위에 65쌍의 맞물린 전극가지로 구성된 금 전극을 형성하였다. 전극폭은 10 ㎛, 간극은 5 ㎛로 하였다. 임피던스 전극 센서의 표면에 로소니아균을 검출할 수 있는 분자식별부를 형성하기 위하여 제조된 항체를 사용하여 분자식별부 제작하였으며, Figure 3과 같이 로소니아 항체를 임피던스 금 전극의 표면에 화학적 공유결합을 이용하여 고정화 시켰다.

4) 진단키트 타당성 검토를 위한 ELISA pair test

앞서 언급한 바와 같이 본 연구에서는 여러 가지 항체를 종류별로 준비하였다. 이에 따라, 간이검진장치 제작에 앞서 항체 조합별로 sandwich 결합성을 알아보기 위하여 ELISA pair 테스트를 실시하였다. 사용된 항원은 전처리된 회장염 감염 돼지의 양성 장유제액을 사용하였으며, 항원-항체 결합 방법은 sandwich 방식으로 하였다. 시험방법은 sandwich ELISA test protocol (Young In Frontier Co., ltd) 을 사용하였으며 Figure 4에 시험 원리와 과정을 나타내었다. 항원과 항체의 샌드위치 반응이

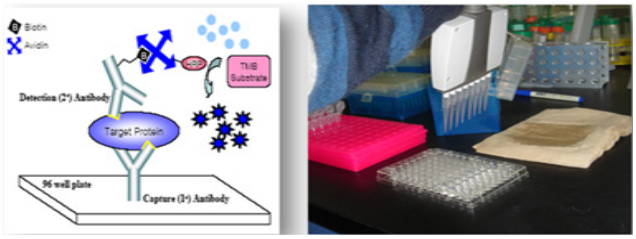

Figure 4. Principle of sandwich ELISA and photo of test.

있으면, TMB를 첨가 후 색상의 변화를 일으키며 이를 spectrophometer를 이용하여 OD(optical density)를 측정하여 반응의 정도를 파악하게 된다. 반응 후 색상이 변하지 않으면 반응이 없는 것으로 본다.

나. PCR법에 의한 분변 및 장유제액 시료 준비

1) 돼지 분변 및 장관으로부터 bacterial DNA 정제

간이검진 장치를 이용한 시험을 위하여, PCR 방법으로 회장염 양성 및 음성 분변 및 장유제액을 제작하였다. 우선, 분변 내 로소니아균 정제를 위하여, 분변 약 1 g에 5 mL의 멸균 PBS를 넣고 30초간 강하게 vortex 한 후, 100 x *g*, 5분간 원심분리를 수행한다. 원심분리 후 상층액을 채취하여 1.2 mm 실린지 필터로 필터링을 한 후 PCR 또는 면역형광염색을 위한 전처리액을 준비한다(Figure 7).

걸러진 상층액으로부터 *L. intracellularis* 균의 DNA를 정제하기 위하여 Suh 등(2001)의 방법을 사용하였다. 간단히 설명하면, 얻어진 분변 0.2 g을 lysis buffer 950 μL(5M guanidine thiocyanate, 22 mM EDTA, 0.05 M Tris-Cl; pH 6.4, and 0.65% Triton X-100)에 부유한 후 60 min 동안 실온에서 반응한 후 14,000 x *g*에서 20초간 원심을 수행하여 상층액을 50 μL의 diatomaceous earth suspension(20% diatomaceous earth, 0.17 M HCl)에 섞은 후 실온에서 10분간 반응한 후 다시 원심(14,000 x *g*, 20 s) 통해 상층액을 제거하여 pellet을 56℃에서 건조시키고 20 μL TE buffer(Tris; 10 mM, EDTA; 1 mM, pH 0.8)에 부유하였다. 부유 후 14,000 x g, 20 min 원심을 통해 상층액을 시험에 사용하였다.

또한, 장관조직으로부터의 회장염 진단을 위한 PCR 수행 전처리 과정은 다음과 같다. 회장염 의심 돼지의 부검을 통해 얻어진 장관 조직(Figure 6)을 scrap 하여 tissue grinder을 이용해 균질화 하였다. 균질액은 Suh 등(2000)의 방법을 사용하여 DNA 정제를 수행하였으며, 방법은 상기한 분변으로부터 DNA 정제한 동일한 방법을 이용하였다.

2) PCR 증폭

PCR 증폭을 수행하기 위하여 2 sets의 primer을 작제 하였는데 이는 Suh 등(2000)과 Suto 등(2003)의 방법을 참조하여

Pig feces in PBS　　Centrifugation　　Filtering

Figure 5. Pre-treatment process of lawsonia in pig feces.

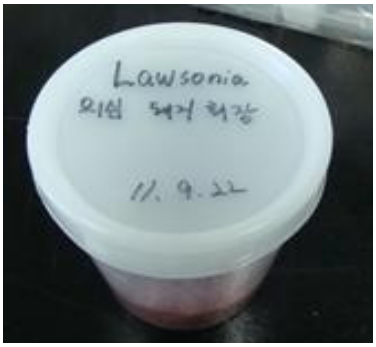

Figure 6. PPE infected ileum.

Figure 7. PCR reactor.

Figure 8. Electrophoresis apparatus.

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR conditions to detect *L. intracellularis*

Primer	DNA sequence	expected size	PCR programs
LI-1F	5'-GCAGCACTTGCAAACAATAAACT-3'	210 bp	95℃-300 s 95℃-30 s 56℃-30 s 72℃-60 s 72℃-300 s (45 cycles)
LI-1R	5'-TTCTCCTTTCTCATGTCCCATAA-3'		
LI-2F	5'-TATGGCTGTCAAACACTCCG-3'	319 bp	
LI-2R	5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3'		

바이오니아 사에 의뢰하여 작제하였다. 작제된 primer는 LI-1F, LI-1R(예상 size 210 bp), LI-2F, LI2-R (예상 size 319 bp)로 명명하였다. 각각의 nucleotide sequence와 PCR program을 Table 1에 나타내었다. PCR mixture의 조건은 5 μL template DNA와 10 μL의 PCR premixture(Intron, Korea), 1 μL 의 각 primer(100 pM), DW 3 μL를 첨가하여 최종 volume가 20 μL 가 되도록 하여 반응 하였다. PCR 반응이 끝난 sample은 ethidium bromide 가 최종농도 0.5 μg/μL 로 함유된 agarose gels 에 전기영동하여 254 nm의 UV transilluminator (Bio-Rad) 하에서 확인하였다. Figure 7과 Figure 8에 사용된 PCR 반응기(Bioneer, MyGenie96)와 전기영동기(Advance, Mupid-2plus)를 나타내었다.

결과 및 고찰

가. 항체 제조 결과

1) 제조된 항체의 농도조사

제작된 항체의 농도를 조사하였으며 결과는 아래의 Table 2에 나타내었다. 아울러 동일한 방법으로 일본에서 제조하여 수입된 항체의 농도도 함께 조사하였다. 제작된 항체의 농도조사는 spectrophotomer(Biochrom, Libra S32PC)를 이용하여 측정하였다.

2) 형광항체법을 이용한 항체의 항원에 대한 반응 확인

Figure 9와 10에 각각 전처리된 분변과 장유제액을 이용하여 PCR 양성과 음성으로 판별된 시료에 대하여 형광항체법를 이용하여 제조된 항체가 항원과 반응함을 알수 있다.

3) 임피던스 센서를 이용한 항원과 항체의 반응 확인결과

표준버퍼 내에 로소니아 균체를 희석하여 로소니아 농도 변화에 따른 임피던스 신호 변화를 측정 및 분석하였다. PBS 버퍼에 로소니아균(약 10^9 cfu/mL 추정)을 10, 100, 1000배로 희석한 후 실험에 이용하였으며, 임피던스 바이오센서에 3분간 반응시켜 측정하고, PBS 버퍼로 3회 세척한 다음 재측정하였다. 또한, 입력 주파수를 10~500 Hz까지 변화하면서 시험을 실시한 결과, 입력 주파수별 임피던스 값의 변화가 아래의 Table 3과

Table 2. Test result of concentration of antibodies

Antibody		Local		Imported	
		LsaA-R1	LsaA-R2	LsaA-JP	Bio 323
		polyclonal	polyclonal	polyclonal	monoclonal
concentration (mg/mL)	1	6.50	5.82	5.82	-
	2	6.44	5.65	5.65	-
	avg	6.47	5.74	5.74	0.2
Remarks		Tested by spectrophometer			spec. provided by supplier

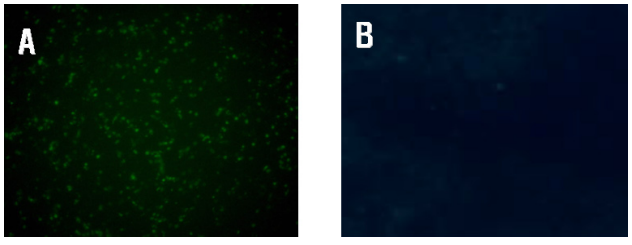

Figure 9. (A) The feces PCR positive and (B) the feces of PCR negative.

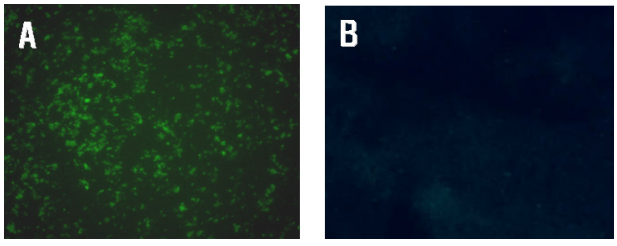

Figure 10. (A) The ileum lysate of PCR positive and (B) the ileum lysate of PCR negative.

Table 3. Measured Impedence by various input frequency

Concetration (CFU/mL) / Frequency (Hz)	1/1000	1/100	1/10	around 10^9 cfu/mL
10	183.2313	183.1306	183.3064	183.5954
100	181.3719	181.1234	181.9987	183.2174
200	180.8663	180.8229	200	182.9374
500	180.5304	180.6193	181.3731	182.3564

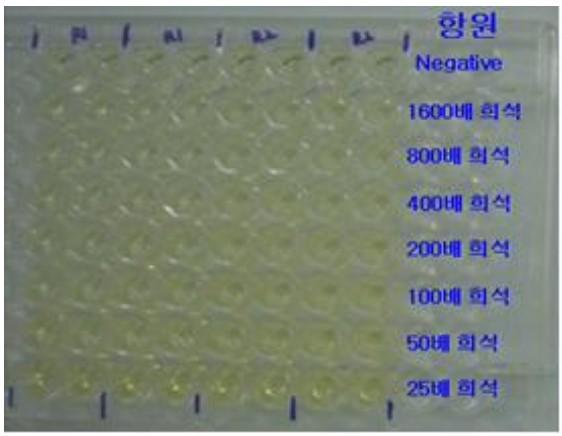

Figure 11. ELIZA test for LsaA-R1, R2 pair.

같이 나타났다.

이상에서의 시험결과를 분석하면, 입력 주파수 200 Hz에서 시료내의 세균 농도가 높아짐에 따라 약 10^8 CFU/mL의 농도에서부터 임피던스의 값이 증가하였으며, 임피던스 신호는 세균 농도 증가에 따라 높아져서 10^9 CFU/mL의 농도에서 그 크기가 급격하게 증가하였고, 따라서, 임피던스 바이오센서 검출부의 항체가 로소니아균을 잘 포획함을 확인함에 따라서 간이진단의 가능성이 있는 것으로 판단하였다. 그러나, 본 시스템은 고가의 장비가 필요하므로 현장에서의 간이진단에는 이용에는 어려움이 있다.

4) Sandwich 방식의 ELIZA pair test를 이용한 로소니아균 검출 실험결과

LsaA-R1과 LsaA-R2 항체를 이용하여 테스트를 진행한 결과를 Figure 11에 나타내었다. 경상대학교 수의과 대학에서 제조한 회장염 진단 돼지의 장유제액을 1/25~1/1600까지 희석하여, TMB 시약 처리후 색깔의 변화가 없어 항원-항체 반응은 나타나지 않은 것으로 판단되었다. 이러한 결과는, DNA 염기서열의 일부를 잘라서 만든 peptide를 이용하여 생산된 polyclonal 형태의 동일한 항체를 사용하는 경우 샌드위치 결합이 어려운 때문인 것으로 판단되었다. 이에 따라, Table 4에서는 LsaA-R1, R2와 Bio 323 항체와의 ELIZA 테스트 결과를 나타내었다. Table에서 나타낸 바와 같이 항원-항체 반응은 나타나지 않은 것으로 판단되었다. 자체 제작한 항체는 polyclonal 형태이고, 수입된 항체는 monoclonal 형태이어서 결합에 유리할 것으로 판단하였으나 반응은 없는 것으로 나타났는데, 이는 자체 제작한 항체의 항원 포집능력이 떨어지기 때문인 것으로 판단된다.

이어서, 일본에서 수입된 LsaA-JP polyclonal 항체와 유럽산

Table 4. ELISA test for Bio323-LsaA-R1, R2 pair (OD : Optical density)

Antibody / Lswsonia in media	LsaA-R1(2.5 ug/mL)		LsaA-R2(2.5 ug/mL)		Bio323 (1/20)			
	Bio323 (capture 1/20)				LsaA-R1(2.5 ug/mL)		LsaA-R2(2.5 ug/mL)	
	anti-mouse HRP				anti-rabbit HRP			
	Test1	Test2	Test1	Test2	Test1	Test2	Test1	Test2
0	0.087	0.102	0.08	0.082	0.155	0.148	0.107	0.088
1/640	0.1	0.097	0.085	0.1	0.135	0.133	0.084	0.123
1/320	0.091	0.088	0.081	0.086	0.116	0.138	0.091	0.091
1/160	0.105	0.091	0.098	0.102	0.12	0.135	0.099	0.125
1/80	0.142	0.129	0.127	0.139	0.187	0.185	0.169	0.174
1/40	0.146	0.139	0.154	0.155	0.341	0.242	0.189	0.184
1/20	0.201	0.192	0.2	0.202	0.362	0.294	0.219	0.216
1/10	0.177	0.219	0.256	0.211	0.339	0.195	0.273	0.269
Result	No reaction				No reaction			

Table 5. ELISA test for Bio323-LsaA-JP pair (OD : Optical density)

Antibody / Lswsonia in media	Bio323 (capture 1/20)		LsaA-JP (Capture2.5 ug/mL)	
	LsaA-JP (detector2.5 ug/mL)		Bio323 (Detector 1/20)	
	Filter sample	No filter sample	Filter sample	No filter sample
0	0.707	0.675	0.186	0.199
1/64	0.756	0.495	0.187	0.17
1/32	0.901	0.679	0.155	0.163
1/16	1.137	1.016	0.135	0.143
1/8	1.223	1.201	0.132	0.134
1/4	1.641	1.627	0.13	0.111
1/2	2.24	1.561	0.245	0.106
1	2.794	2.993	0.776	0.13
Result	Reaction		No reaction	

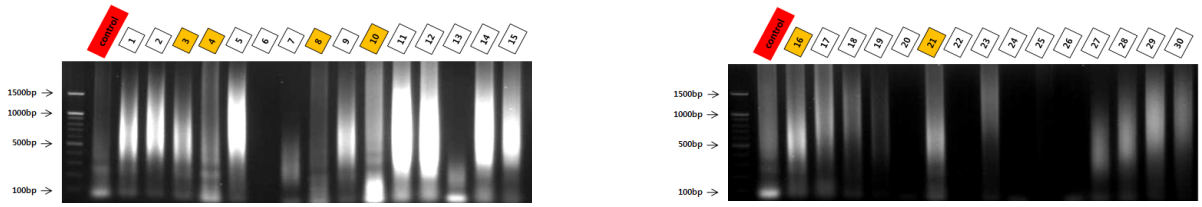

Figure 12. PCR result for detecting Lawsonia (positive: lane 3, 4, 8, 10, 16, 21).

Table 6. PCR test result

Sample No.	Result	Sample No.	Result	Sample No.	Result	Sample No.	Result
1	-	51	-	101	-	151	양성
2	-	52	-	102	-	152	-
3	양성	53	양성	103	-	153	-
4	양성	54	-	104	-	154	-
5	-	55	양성	105	-	155	-
6	-	56	-	106	-	156	-
7	-	57	-	107	-	157	-
8	양성	58	-	108	-	158	-
9	-	59	-	109	-	159	-
10	양성	60	-	110	-	160	양성
11	-	61	-	111	-	161	-
12	-	62	-	112	-	162	-
13	-	63	-	113	-	163	-
14	-	64	-	114	-	164	양성
15	-	65	-	115	양성	165	양성
16	양성	66	-	116	양성	166	-
17	-	67	-	117	양성	167	-
18	-	68	-	118	-	168	-
19	-	69	-	119	양성	169	-
20	-	70	양성	120	양성	170	-
21	양성	71	양성	121	양성	171	-
22	-	72	-	122	-	172	-
23	-	73	-	123	-	173	-
24	-	74	-	124	-	174	-
25	-	75	-	125	-	175	양성

Table 6. Continued

Sample No.	Result	Sample No.	Result	Sample No.	Result	Sample No.	Result
26	-	76	-	126	-	176	양성
27	-	77	-	127	-	177	-
28	-	78	-	128	양성	178	-
29	-	79	-	129	-	179	-
30	-	80	-	130	-	180	양성
31	양성	81	양성	131	-	181	-
32	-	82	-	132	-	182	양성
33	-	83	-	133	-	183	-
34	-	84	-	134	양성	184	-
35	-	85	-	135	-	185	-
36	-	86	양성	136	양성	186	-
37	-	87	-	137	-	187	-
38	양성	88	-	138	-	188	-
39	-	89	-	139	양성	189	-
40	-	90	양성	140	양성	190	양성
41	양성	91	-	141	-	191	양성
42	-	92	-	142	-	192	양성
43	-	93	-	143	-	193	-
44	-	94	-	144	양성	194	양성
45	-	95	-	145	-	195	-
46	-	96	-	146	양성	196	양성
47	-	97	양성	147	-	197	양성
48	-	98	-	148	양성	198	양성
49	양성	99	-	149	양성	199	-
50	-	100	양성	150	양성	200	-

인 Bio X(사)의 Bio 323 monoclonal 항체를 이용하여 ELISA 테스트를 실시하였으며, Table 5에 결과를 나타내었다. Table에서 나타난 바와 같이 LsaA-JP를 Detector로 하고 Bio 323을 Capture로 한 경우 항원항체 반응 있는 것으로 나타나, 서로 pair가 될 수 있는 것으로 판단되었다. 그러나 항원항체 반응을 보인 Bio323-LsaA-JP 조합의 경우 항원을 투입하지 않은 상태인 background OD 값이 지나치게 높아서 ELIZA 방식의 로소니아균 검출을 실용화하는 데에는 어려움이 있는 것으로 판단하였다.

나. 로소니아 감염 돼지 분변 준비를 위한 PCR 테스트 결과

경남 도내 도축장 및 양돈장 방문하여 채취한 분변 200점에 대한 PCR을 수행하여 돼지증식성회장염 감염을 조사해본 결과 양성의 경우 210 및 319 bp에서 증폭된 산물이 확인 되었으며 (Figure 12), 결과적으로 200개의 분변 샘플 중 50개의 분변에서 PCR반응에 양성으로 나타났다 (Table 6).

본 실험을 토대로 경남 도내 도축장 및 양돈장에서 채취한 분변 200점에 대한 PCR 검사결과 50점에서 양성반응으로 약 25%의 감염이 확인되었으며, 150점에서 음성으로 판명되어 약 75%의 비감염으로 확인되었다. 이렇게 양성 및 음성으로 확인된 분변은 간이검진장치의 항원으로 사용되었고, 이에 대한 결과는 두 번째 논문에서 보고하기로 한다.

균체의 신속검진을 위한 기술로서는 임피던스 바이오센서, ELISA test kit, Rapid Lateral flow immunoassay(Rapid kit) 등이 있을 수 있으며 살모넬라 검출 등에 이용되어지고 있다(김기영, 2011). 그러나, 임피던스형의 바이오센서나 ELISA test kit 등은 실험실에서의 측정과정을 거쳐야 하므로 농가 현장에 사용하기에는 부담이 있으며, 이에 따라 다음 논문에서는 로소니아 단클론 항체 및 다클론 항체를 이용한 rapid kit을 이용한 회장염 간이검진을 실시하였다. 또한 분변 잠혈 진단키트를 이용하여 분변 내의 출혈을 검출하여 회장염과의 연관성을 관찰하고 그 결과를 살펴보았다.

요약 및 결론

돼지 회장염을 조기에 발견하여 해당 돼지의 처리 및 전염 예방를 위하여 분뇨를 이용한 신속 간이 검진의 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 회장염 간이검진을 위한 바이오센서를 개발을 위한 항체와 항원을 준비하고 PCR 테스트를 실시하였으

며, 그 결과는 다음과 같다.

(1) 돼지 회장염의 원인균인 로소니아균을 포획하기 위해서는 항체가 필요하며, 이를 위하여 경상대학교 수의과대학에 의뢰하여 항체를 제작하였다. 항체는 Watarai 등(2004)의 보고에 기초하여 LsaA synthetic peptide를 국내 Y(사)에 의뢰하여 작제하고, 합성된 peptide를 토끼에 반복 접종하여 rabbit-anti LsaA synthetic peptide polyclonal antibody를 얻었다. 이를 이용하여 형광항체법을 이용하여 전처리된 장유제액 및 분변에서 회장염 검출이 가능하여 회장염 확진판정에 사용가능함을 확인하였다.

(2) 합성된 항원이 제조된 항체와 잘 결합함을 확인하기 위하여 임피던스형 측정시스템을 구성하여 검출 시험을 실시하였다. 시험결과, 항원 농도가 높아짐에 따라 임피던스의 값이 증가하여 센서 검출부의 항체가 항원을 잘 포획함을 확인하였다. 그러나, 본 시스템은 고가의 장비가 필요하므로 현장에서의 간이진단에는 이용에는 어려움이 있다.

(3) 자체 제작한 polyclonal 로소니아 항체(LsaA-R1, LsaA-R2)와 수입된 polyclonal(LsaA-JP) 및 monoclonal (Bio 323) 항체 간의 sandwich 결합성을 살펴보기 위하여 ELISA테스트를 실시한 결과 capture로 Bio323 monoclonal 항체를, detector로서 LsaA-JP를 이용했을 경우에 항체 반응이 있는 것으로 나타났다. 그러나, 이 경우에도 background 반응이 높아 진단키트로 이용하기에는 어려움이 있는 것으로 판단되었다.

(4) 또한, 시험에 사용될 회장염 양성이 확인된 장유제액과, 역시 양성과 음성이 판정된 분변 시료를 확보하기 위하여, PCR 시험을 실시하였다. 경남 도내 도축장 및 양돈장에서 채취한 분변 200점에 대한 PCR 검사결과 50점에서 양성반응으로 약 25%의 감염이 확인되었으며, 이를 이용하여 간이검진장치의 시험에 이용하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ006412)의 지원에 의해 수행되었다.

References

Guedes, R. M. C. and C. J. Gebhart. 2003. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. Vet. Micrbiol. 2534:1-8.

Inter PIG. 2009. Repot for pig production cost. http://www.porkboard.or.kr/board/board_view.asp?code=F02&idx=11376&num=121&sel=&txt=

Jeong, H. 2008. Development of rapid diagnostic method for porcine proliferative enteropathy and characterization of *Lawsonia intracellularis* isolated from pigs in Korea. Ph-D thesis.

Kim, G., G. Yang, S. B. Park, Y. H. Kim, K. J. Lee, J. Y. Son, H. J. Kim and S. R. Lee. 2011. Rapid detection kit for *Salmonella typhimurium*. J. of Biosystems Eng. 36(2) : 140-146.

Park, D., A. Park, E. Jung, J. Bae, G. Lee, B. Hwang and M. Lee. 2009. Survey of porcine proliferative enteritis for the pig farms in Gyeongnam district. Korean J Vet Serv 32(4) : 361-368.

Suh, D. K., S. K. Lym, Y. C. Bae, K. W. Lee, W. P. Choi and J. C. Song, 2000. Detection of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic specimens by one-step PCR. 1:33-37.

Suh, D. K., W. P. Choi and J. C. Song. 2000. Duplex PCR for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis* and *Salmonella in swine*. Kor. J. Vet. Publ. Hlth. 24:27-34.

Suh, D. K., W. P. Choi and J. C. Song. 2001. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* and Salmonella spp. on selected swine farms in Kyongpook province by duplex PCR. Kor. J. Vet. Publ. Hlth. 25:179-184.

Suto, A., S. Asano, Y. Goto, J. Murata, T. Mori, and M. Adachi. 2003. Survey of porcine proliferative enteritis in the Tohoku district of Japan. 2003. J. Vet. Med. Sci. 66: 547-549

Watarai M., Y. Yamato, N. Horiuchi, S. Kim, Y. Omata, T. Shirahata and H. Furuoka. 2004. J. of Vet.Med.Sci. 66:735-737

Young In Frontier Co., ltd, ELISA test protocol. http://www.abfrontier.com/support/elisa.do