

이미지 분석을 이용한 살모넬라 신속 진단키트의 측정감도 향상

이상대¹ · 김기영^{1*} · 박섯별¹ · 문지혜¹

¹국립농업과학원 농업공학부

Improvement of the detection limit of rapid detection kit for *Salmonella* Typhimurium using image analysis system

Sangdae Lee¹, Giyoung Kim^{1*}, Saet-Byeol Park¹, Ji-Hea Moon¹

¹Department of Agriculture Engineering, National Academy of Agricultural Sciences

Received on 20 August 2012, revised on 19 September 2012, accepted on 21 September 2012

Abstract : The objective of this study was to improve the detection limit of rapid detection kit for *Salmonella* Typhimurium by image analysis system. The rapid detection kit was comprised of four elements: sample pad, conjugate pad, nitrocellulose pad and absorbent pad. Gold nanoparticle and *Salmonella* antibody were used as a tag and a receptor. *Salmonella* antibody and goat rabbit IgG antibody were used as test and control lines on nitrocellulose membrane. The color intensity of test line began to increase from 10⁵CFU/mL of *Salmonella* sample. A multiple linear regression analysis was employed to explain the relationship between predicted and measured number of *Salmonella* cells. The developed model could successfully predict the cell number of *Salmonella* with validation against extra-experimental result.

Key words : *Salmonella*, Lateral flow immunoassay, Multiple linear regression analysis

I. 서론

식중독을 일으키는 대표적인 원인균 중 하나인 살모넬라는 주로 비가열식품이나 식품의 2차 오염을 통해 식중독 사고를 일으키고, 저온에서도 생육이 가능하기 때문에 여름철뿐만 아니라 겨울에도 감염증상이 확인되고 있다. 이로 인해 살모넬라에 의한 식중독 사고는 우리나라뿐만 아니라 선진국에서도 식중독을 발생시키는 주요 원인이 되고 있다. 전통적인 식중독균 검출방법은 식중독균의 증식배양, 선택배양 및 검사에 최소 3일의 시간이 필요하기 때문에 식중독 사고가 발생한 후 원인균을 밝히기 위해 사용되며, 조기에 식중독 사고를 예방하는 것은 현실적으로 매우 어렵다.

이러한 문제를 해결하기 위해 최근에 가장 많은 관심을 받고 있는 기술들은 바이오센서를 이용한 기술과 효소의 촉매반응을 이용하여 신호를 측정하는 기술, 형광물질을

표지물질로 이용하는 기술, 그리고 측방 유동형 간이 진단키트를 이용한 기술 등이 있다. 이들 방법 중에서 바이오센서는 생물학적 측정인자를 이용하여 분석물질을 선택적으로 검출하는 것이 가능하고 측정 감도가 높은 장점으로 인해 다양한 위해물질을 검출하는데 사용되고 있다(Cho et. al., 2010; Kim et. al., 2009; Mata et. al., 2010). 표지물질을 이용하는 대표적인 기술인 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbant assay)은 다양한 물질을 높은 측정감도로 분석하는 것이 가능한 반면 분석결과를 얻기까지 수 시간이 필요하여 실험실에서 주로 사용하고 있다(Medina-Torres et. al., 2010; Velappan et. al., 2008). 특히, 측방 유동형 간이 진단키트는 시료에 분석물질이 일정 기준이상 존재하면 색의 변화가 나타나고 이것을 사람의 눈으로 판단하는 육안검사에 주로 사용되므로 구조가 간단하고 사용이 쉬울 뿐만 아니라 빠른 검사가 가능하여 의학, 수의학, 식품, 환경 등 다양한 분야에서 현장 검사용으로 사용되고 있다(Choi et. al., 2004; Posthuma-Trumpie et. al., 2009). 또한 여기에 광학측정기기를 적용

*Corresponding author: Tel: +82-31-290-1899

E-mail address: giyoung@korea.kr

하여 색의 강도를 측정하면 분석물질의 양을 정량적으로 분석하는 것이 가능하고 고가의 측정기기나 전문인력을 필요로 하지 않으므로 분석비용이 저렴한 장점이 있다 (Juntunen et. al., 2012; Mirasoli et. al., 2012).

본 연구에서는 현장 검사용으로 적합한 측방 유동형 간이 진단키트를 이용하여 식중독의 대표적인 원인균인 살모넬라균을 검출하였다. 그 다음 소형 CCD 카메라로 제작된 이미지 분석 시스템을 이용하여 측방 유동형 간이 진단키트의 검출한계를 향상시키고 다중회귀분석을 수행하여 살모넬라 균수의 정량분석이 가능하도록 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 살모넬라 균주

살모넬라 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행(Korea Collection for type Culture, Korea)에서 분양 받은 *Salmonella* Typhimurium KCTC 12401을 brain heart infusion(BHI) (Difco, NJ, USA) 배지에 접종 후 37°C에서 18시간 활성화하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 살모넬라의 균수는 살모넬라 균주를 pH 7.4, 20 mM phosphate buffered saline(PBS)(Sigma, MO, USA) 로 희석하여 XLD4(Difco, NJ, USA) 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 후 표준평판법으로 측정하였다.

2. 측방 유동형 간이 진단키트

측방 유동형 간이 진단키트는 Fig. 1과 같이 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 그리고 흡수패드(Millipore, MA, USA)로 구성된다. 시료패드는 검사용 시료를 공급하는 부분이고 결합패드에는 시료에 포함되어 있는 식중독균과 반응하여 색 변화를 나타내는 식중독균 항체와 금 나노입자 결합물질이 전처리되어 있다. 니트로셀룰로오스 막에서는 결합패드를 통과한 시료가 이동하면서 검출점과 표준점에 결합되어 색 변화를 나타내고 흡수패드는 니트로셀룰로오스 막을 통과한 여분의 시료를 흡수하여 저장한다.

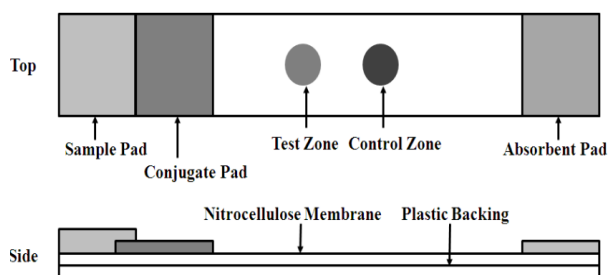


Fig. 1. Schematic diagram of a lateral flow immunoassay test kit.

입자 결합물질이 전처리되어 있다. 니트로셀룰로오스 막에서는 결합패드를 통과한 시료가 이동하면서 검출점과 표준점에 결합되어 색 변화를 나타내고 흡수패드는 니트로셀룰로오스 막을 통과한 여분의 시료를 흡수하여 저장한다.

본 실험에 사용된 식중독균 검출용 간이 진단키트의 전처리 방법은 본 연구진의 기존 연구결과를 참고하였다 (Kim et. al., 2011). 결합패드는 2% bovine serum albumin(BSA)(Sigma, MO, USA)와 10% sucrose(Sigma, MO, USA)가 포함된 pH 7.4, 20 mM Tris buffered saline(TBS)(Thermo Scientific, IL, USA)에 담가 용액을 충분히 흡수시킨 후 37°C에서 4시간 동안 건조하여 전처리하였다. 니트로셀룰로오스 막은 PBS에 담가 용액을 충분히 흡수시킨 후 37°C에서 1시간 동안 건조한 후 사용하였다. 전처리된 니트로셀룰로오스 막의 검출점은 PBS에 용해된 0.5 mg/mL polyclonal Salmonella antibody (Fitzgerald, MA, USA)로 제작되었으며 표준점은 PBS에 용해된 0.5 mg/mL rabbit IgG (Pierce, IL, USA)으로 제작되었다. 그리고 표준점과 검출점에 사용되는 용액의 양을 정확히 알기 위해 마이크로피펫(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)을 이용하여 원형으로 제작하였다.

살모넬라 균과 결합하여 색 변화를 나타내는 살모넬라 항체-금 나노입자 결합체는 pH 6.6 버퍼에서 살모넬라 항체(ViroStat, ME, USA)와 40 nm 금 나노입자(Bioassay works, MD, USA)를 반응시켜 제작하였다. 제작된 살모넬라 항체-금 나노입자 용액은 전처리된 결합패드에 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 건조하여 사용하였다.

전처리된 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 그리고 흡수패드는 시료패드에 공급된 시료가 연속해서 흐르도록 각각의 끝부분을 3 mm씩 겹쳐서 조립하였다.

3. 이미지 분석 시스템

이미지 분석 시스템은 Fig. 2(a)와 같이 소형 CCD카메라 (CYLOD, BC, Canada), 근접촬영용 마이크로렌즈(MENGEL ENGINEERING, Virum, Denmark), 백색 LED조명(LVS, Incheon, Korea), LED 조명 조절기(LVS, Incheon, Korea), 카메라 고정용 지그, 암실용 케이스, 컴퓨터, 그리고 ImageJ ver. 1.45s 프로그램(NIH, MD, USA)으로 구성된다. 소형 CCD카메라는 크기가 44×41×25.5 mm인 12 비트 ADC, 1.3 메가픽셀 흑백카메라로 USB 2.0 통신에 의해 컴퓨터와

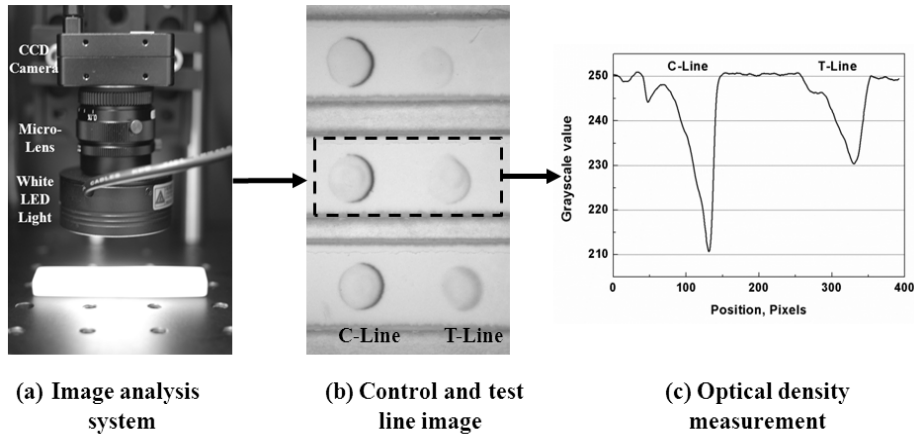


Fig. 2. Image analysis method for the lateral flow immunoassay test kit.

연결된다. 마이크로렌즈는 working distance(WD)가 57.8~502.8 mm이고 F값이 2.2인 렌즈를 선정하였다. 마이크로렌즈의 WD가 길면 피사체까지의 거리가 멀어져 전체 이미지 분석 시스템의 크기가 커지므로 CCD카메라와 마이크로렌즈 사이에 두께 1.5 mm인 링을 추가하여 WD를 약 20 mm까지 조절하였다. 지름 38 mm인 백색 LED조명은 CCD 카메라와 결합된 마이크로렌즈에 연결된다. 카메라 고정용 지그는 CCD카메라를 고정하고 높이를 정밀하게 조절하기 위해 이용되며 암실용 케이스는 외부의 빛을 차단하기 위해 사용된다.

CCD 카메라에서 얻어진 이미지는 컴퓨터에 저장되고 저장된 이미지는 ImageJ 프로그램을 이용하여 optical density를 측정하였다.

4. 살모넬라 검출 실험방법

살모넬라 검출용 간이 진단키트를 이용한 실험은 살모넬라균을 PBS에 $10^2 \sim 10^9$ CFU/mL로 희석한 시료를 이용하였으며 농도 별로 15회씩 반복하여 실험하였다. 실험결과와 Fig. 2(b)와 같이 살모넬라 균수에 따라 다르게 나타나는 간이 진단키트의 표준점과 검출점의 색의 밝기변화를 이미지 분석 시스템으로 측정하였다. 이미지 분석 시스템에서 측정된 이미지는 ImageJ 프로그램을 이용하여 Fig. 2(c)와 같이 optical density를 측정한 다음 표준점과 검출점의 최소 optical density(C_{peak} 와 T_{peak})와 각각의 면적(C_{area} 와 T_{area}), T_{peak}/C_{peak} , T_{area}/C_{area} 를 계산하였다. 검출 실험이 정상적으로 수행되었음을 나타내는 표준점은 항상 일정한 발색강도를 나타내고 검출점은 살모넬라균의 수에 따라 발색

강도가 변화하게 된다. 따라서 검출점의 T_{peak} 와 T_{area} 값은 살모넬라균수에 따라 변화된다. 또한 표준점과 검출점의 비로 계산되는 T_{peak}/C_{peak} 와 T_{area}/C_{area} 값은 실험조건이 달라지더라도 항상 일정한 값을 유지하게 된다. 간이 진단키트의 검출한계는 살모넬라 균이 없는 시료에서 측정된 검출점의 값을 기준으로 표준편차를 계산하고 표준편차의 3 배를 기준값에 더하여 정하였다.

또한, 실험결과를 이용하여 살모넬라 균수를 정량적으로 분석할 수 있는 예측식을 개발하기 위해 DataFit 8.0 프로그램(Oakdale Engineering, PA, USA)을 이용하여 다중회귀분석을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 이미지 분석 시스템을 이용한 측정결과

간이진단 키트의 표준점과 검출점 이미지로부터 측정된 C_{peak} 와 T_{peak} , C_{area} , T_{area} 를 이용하여 T_{peak}/C_{peak} 와 T_{area}/C_{area} 를 계산하였다. Fig. 3(a)과 같이 표준점과 검출점에서 측정된 최소 optical density 값을 이용하여 계산된 T_{peak}/C_{peak} 에서 살모넬라의 검출한계는 10^5 cfu/mL이었으며 Fig. 3(b)와 같이 표준점과 검출점의 optical density 면적값을 이용하여 계산된 T_{area}/C_{area} 에서 살모넬라의 검출한계는 10^6 cfu/mL이었다. 이러한 결과는 간이진단 키트를 이용한 Kim 등(2011), SPR 바이오센서를 이용한 Cho 등(2010), 나노양자점 결합을 이용한 Kim 등(2010)의 연구결과와 비교하여 더 우수한 결과이다.

Fig. 4(a)와 4(b)는 본 연구에서 개발된 간이진단 키트

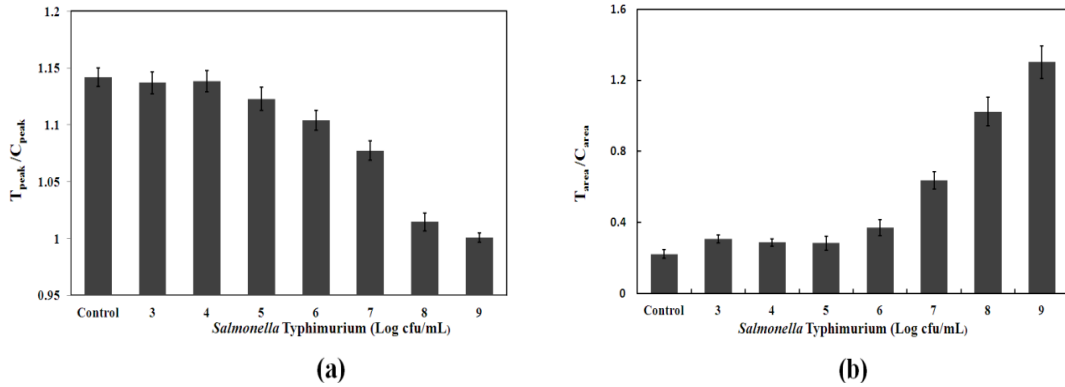


Fig. 3. T_{peak}/C_{peak} and T_{area}/C_{area} values of *Salmonella* Typhimurium calculated by the image analysis.

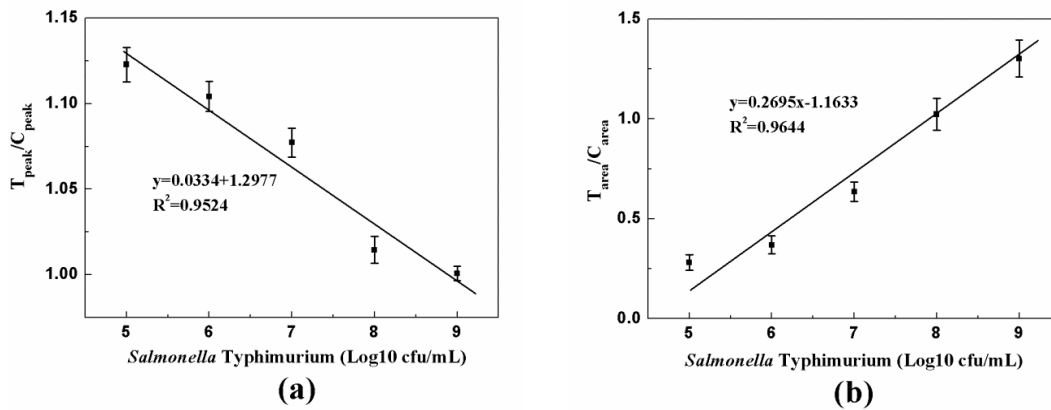


Fig. 4. Linear regression equations of (a) T_{peak}/C_{peak} and (b) T_{area}/C_{area} to various concentrations of *Salmonella* Typhimurium.

Table 1. Multiple linear regression analysis for *Salmonella* Typhimurium in the range of 10⁵ to 10⁹ cfu/mL.

Salmonella Typhimurium (Log10 cfu/mL)	Y=a+bX ₁ +cX ₂ +dX ₂ ²				R ²
	a	b	c	d	
	-232.268	2.436	458.62	-220.800	0.9801

* X₁=T_{peak}/C_{peak}, X₂=T_{area}/C_{area}

의 살모넬라 검출범위인 10⁵에서부터 10⁹ cfu/mL 범위에서 T_{peak}/C_{peak}와 T_{area}/C_{area}를 이용하여 수행된 단순회귀분석 결과들을 나타낸다. 분석결과 T_{peak}/C_{peak}의 결정계수(R²)는 0.9524, T_{area}/C_{area}의 결정계수는 0.9644로 나타났다. 살모넬라의 검출한계를 결정할 때는 T_{peak}/C_{peak} 값을 이용하는 것이 더 적절하였으나, 살모넬라 균수의 정량분석을 위한 예측식을 개발할 때는 선형성이 더 우수한 T_{area}/C_{area} 값을 이용하는 것이 더 유리한 것으로 나타났다.

2. 다중회귀분석을 통한 예측식 개발

살모넬라 검출용 간이진단 키트에 이미지 분석 시스템을 적용함으로써 간이진단 키트의 검출한계를 향상시키는 것

뿐만 아니라 살모넬라 균수를 정량적으로 분석하는 것이 가능하다. 이를 위해 선행 실험결과를 이용하여 다중회귀 분석을 수행하였다. 다중회귀분석을 위한 변수로는 앞에서 계산된 T_{peak}/C_{peak}와 T_{area}/C_{area} 값들을 이용하였다. 또한 두 개의 변수가 모두 통계적으로 유의한 결과를 나타내므로 이를 이용하여 다중회귀분석을 수행한다면 더욱 유용한 예측식을 개발할 수 있을 것이다. DataFit 프로그램을 통해 개발된 다중회귀방정식들 중에서 회귀방정식이 단순하고 결정계수가 가장 높은 다중회귀방정식을 선정하였다. 선정된 회귀식은 Table 1과 같으며 결정계수가 0.9801로 T_{peak}/C_{peak}와 T_{area}/C_{area} 값을 이용한 단순회귀분석 결과보다 높은 선형성을 갖는 것으로 나타났다. 개발된 다중회귀 방정식을 검증하기 위해 10⁵ cfu/mL에서 10⁹ cfu/mL까지

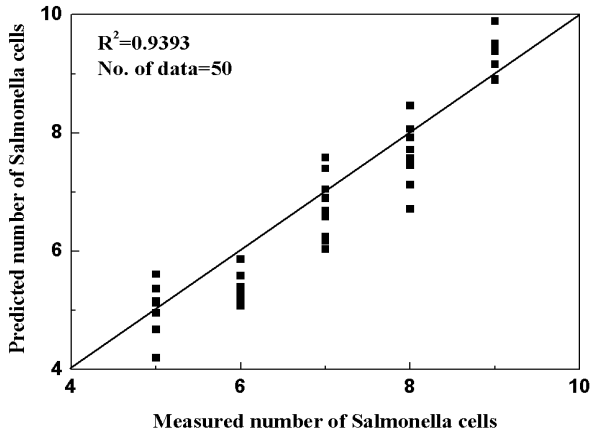


Fig. 5. Results of multiple regression analysis between measured and predicted numbers of *Salmonella* Typhimurium.

각 농도별로 10개씩 간이진단 키트를 제작하여 추가실험을 수행하고 다중회귀방정식에 의해 계산된 살모넬라 균수와 측정된 살모넬라 균수를 비교하였다. Fig. 5는 본 연구에서 개발된 다중회귀방정식의 검증결과를 나타내며 결정계수가 0.9393으로 우수한 선형성을 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 개발된 다중회귀방정식을 이용하여 살모넬라의 균수를 정량적으로 예측하는 것이 가능하였다.

IV. 요약

식중독을 일으키는 대표적인 원인균인 살모넬라를 검출하기 위해 측방 유동형 간이진단 키트를 제작하였다. 또한, 제작된 간이진단 키트의 검출한계를 향상시키고 살모넬라 균수를 정량적으로 분석하기 위해 이미지 분석 시스템을 적용하였다. 그 결과 간이진단 키트의 검출한계는 10^6 cfu/mL에서 10^5 cfu/mL로 향상시킬 수 있었다. 살모넬라 균수의 정량적 분석을 위해 T_{peak}/C_{peak} 와 T_{area}/C_{area} 값을 이용하여 다중회귀분석을 수행하였으며 개발된 다중회귀방정식 중에서 가장 단순하고 결정계수가 높은 다중회귀방정식을 선정하였다. 추가로 제작된 간이진단 키트를 이용하여 개발된 다중회귀방정식을 검증한 결과 결정계수가 0.9393으로 우수한 선형성을 나타내었다. 본 연구에서 개발된 다중회귀방정식을 이용하여 더 정확하게 간이진단 키트에서 측정된 살모넬라 균수를 예측하는 것이 가능하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연

구개발사업(과제번호: PJ008440)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고 문헌

- Cho HK, Kim GY, Kim WH, Sung MS. 2010. Detection of pathogenic *Salmonella* using a surface plasmon resonance biosensor. *Journal of Biosystems Engineering* 35(2): 116-123. [In Korean]
- Choi S, Choi EY, Kim DJ, Kim JH, Kim TS, Oh SW. 2004. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). *Clinica Chimica Acta* 339: 147-156.
- Juntunen E, Myrskylainen T, Salminen T, Soukka T, Pettersson K. 2012. Performance of fluorescent europium(III) nanoparticles and colloidal gold reporters in lateral flow bioaffinity assay. *Analytical Biochemistry* 428(1): 31-38.
- Kim G, Moon JH, Om AS, Yang GM, Mo CY, Kang SW, Cho HK. 2009. Evaluation of antibody immobilization methods for detection of *Salmonella* using impedimetric biosensor. *Journal of Biosystems Engineering* 34(4): 254-259. [In Korean]
- Kim G, Yang GM, Kim YH, Mo CY, Park SB. 2010. Detection of pathogenic *Salmonella* with a composite quantum Dot. *Journal of Biosystems Engineering* 35(6): 458-463. [In Korean]
- Kim G, Yang GM, Park SB, Kim YH, Lee KJ, Son JY, Kim HJ, Lee SR. 2011. Rapid detection kit for *Salmonella* typhimurium. *Journal of Biosystems Engineering* 36(2): 140-146. [In Korean]
- Mata D, Bejarano D, Botero ML, Lozano P, Constanti M, Katakis I. 2010. Screen-printed integrated microsystem for the electrochemical detection of pathogens. *Electrochimica Acta* 55: 4261-4266.
- Medina-Torres C, Weese J, Staempfli H. 2010. Validation of a commercial enzyme immunoassay for detection of clostridium difficile toxins in feces of horses with acute diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24(3): 628-632.
- Mirasoli M, Buragina A, Dolci LS, Simoni P, Anfossi L, Giraudi G, Roda A. 2012. Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples. *Biosensors and Bioelectronics* 32: 283-287.
- Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen AV. 2009. Lateral flow (immune)assay: its strengths, weakness, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393: 569-582.
- Velappan N, Clements J, Kiss C, Valero-Aracama R, Pavlik P, Bradbury ARM. 2008. Fluorescence linked immunosorbant assays using microtiter plates. *Journal of Immunological Methods* 336: 145-141.