

돼지에서 감염의 조기진단 지표로서의 Haptoglobin 적용에 관한 연구

문진산 · 남향미 · 구복경 · 주이석 · 정석찬 · 김종염 · 박용호 *

농촌진흥청 수의과학연구소

서울대학교 수의과대학*

(1996년 1월 29일 접수)

Haptoglobin as an early indicator of infection in pigs

Jin-san Moon, Hyang-mi Nam, Bok-gyeong Ku, Suk-chan Jung,
Yi-seok Joo, Jong-yeom Kim, Yong-ho Park

National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, Korea

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, Korea*

(Received Jan 29, 1996)

Abstract : Seras of pigs with clinically normal and infectious conditions were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) to demonstrate the specific changes in protein profile. In the sera from pigs with infection, haptoglobin with a 40KDa protein was found to be increased as compared to that of sera from normal pigs. As a rapid detection method for monitoring infections at large-scale farms, one of acute phase protein, haptoglobin, was selected to compare the concentrations between infectious and non-infectious conditions. Haptoglobin concentrations were low in pigs with clinically normal conditions but significantly increased in pigs with Aujesky's disease, hog cholera and parvo-virus infection. The studies provide that haptoglobin can be used as an indicator to monitor infections early at farm level.

Key words : pig, acute phase protein, haptoglobin.

서 론

양돈업의 집약화 및 다두사육으로 인하여 제한된 공간에서 사육되는 돼지에서 준임상형 상태의 질병을 진단하기란 매우 어렵다. 또한 임상적으로 정상적인 돼지의 불현

성 감염기에 질병 감염유무를 진단할 수 있는 검사법 개발은 효율적인 예방대책수립 및 양돈업의 생산성 향상을 위해서는 매우 중요한 문제이다¹⁻³.

사람과 동물에서 급성기 반응은 감염, 염증, 암 또는 조직손상에 대한 비특이성 반응으로서 이것은 혈액내의 여러 가지 간세포 유래 급성기 단백질의 농도변화, 발열 및

Address reprint requests to Dr. Jin-san Moon, National Veterinary Research Institute, RDA. Anyang 430-016, Republic of Korea.

내분비적, 대사적, 면역학적 그리고 신경학적 변화를 특징으로 한다^{4,5}.

사람과 동물에서 알려진 주요 급성기 단백질로는 C-reactive protein, serum amyloid A(SAA), haptoglobin, fibrinogen, ceruloplasmin, complement 등이 있는데 이러한 중요한 급성기 단백질은 일반적으로 질병을 일으키는 인자에 비특이적으로 반응하여 생성됨으로써 생체의 병리학적 과정의 작용과 정도를 나타내는 지침으로서 활용되고 있다^{4,6}.

그 중 haptoglobin은 반추류의 주요 급성기 단백질로서 자연감염이나 실험감염 및 유방염 심부농양 그리고 급성감염성의 번식성, 호흡기성 염증상태 등을 조사하는데 매우 유용하다고 보고되고 있으며^{4,7} 또한 Eurell 등³은 haptoglobin이 돼지의 위축성 비염 감염시에도 매우 증가한다고 보고하였다.

급성기 단백질 측정을 위한 분석기법은 빠른 시간내에 신속하고, 손쉽게 수행할 수 있어야 한다. 현재 haptoglobin을 검출할 수 있는 측정법으로는 hemoglobin 결합능을 이용한 peroxidase-guanicol method법이 널리 이용되고 있는 실정이다^{8,9}.

이와같이 선진외국에서는 최근 동물에서 염증자극후에 증가하는 급성기 단백질을 질병 감염유무와 농장 전체의 위생상태를 측정하는 건강상태의 지표로 설정하고 있으나², 국내에서는 아직까지 급성기 반응에 대한 확립된 정보가 거의 없으며 질병진단에도 적용되고 있지 않은 실정이다. 따라서 질병 감염초기에 생체의 건강상태를 조기검색할 수 있는 haptoglobin 측정법을 확립하고, 감염 및 비감염 상태의 돼지 혈청으로 부터 haptoglobin치를 측정하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

시험혈청 : 외견상 건강하고 혈액학적으로 정상범주를 나타낸 육성돈 20두와 인공적으로 감염시킨 돈 콜레라 7두, 오제스키 감염돈 5두, 파보 감염돈 4두 등 총 36두의 돼지 혈청을 실험에 사용하였다. 또한 95년 5월에 경기지역 도축장에 출하된 돼지 80두의 혈청을 채취하여 haptoglobin을 측정하였다.

SDS-PAGE : 정상돈 및 감염돈의 혈청내 주요 단백질 양상을 비교하기 위하여 Sekiguchi 등¹⁰의 방법에 준하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 즉, 혈청 원액을 20mM Tris/cl (pH 7.5)를 이용하여 1:10으로 희석한 다음, 희석된 혈청

을 sample buffer(0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol)와 동량으로 혼합하여 100°C에서 2분간 가열한 후 10,000rpm에서 원심한 상청액으로 전기영동법으로 실시하였다. SDS-PAGE는 12% acrylamide gel을 사용하여 60V에서 12~15시간 전기영동한 다음, 0.125% comassie brilliant blue로 염색하고 탈색한 후 나타난 분획을 molecular weight marker(Sigma, MW-SDS-70 kit)와 비교하여 단백질 분자량을 계산하였다.

Haptoglobin 측정방법 : 혈장이나 혈청내 haptoglobin의 정량분석은 Jones & Mould⁹의 guaiacol-peroxidase 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, standard haptoglobin으로는 사람의 haptoglobin(Sigma)을, blank로는 종류수를 각각 사용하였다. 검사방법은 먼저 ELISA용 plate에 standard haptoglobin, 종류수, 가검혈청 50μl씩을 각각 분주한 뒤 적절한 haptoglobin 측정방법의 확립을 위한 조건을 조사하고자 농도를 여러 단계로 달리한 methaemoglobin(Sigma) 용액 50μl를 반응시켰다. 10분후에 guaiacol용액(guaiacol 6.82g, 1M acetic acid 183ml, D.W 700ml, pH 4.0) 150μl를 모든 well에 분주한 후 곧바로 사용직전에 희석된 hydrogen peroxide(Sigma) 50μl를 첨가한다. 5분간 반응시킨 후 5분간격으로 30분까지 ELISA(Ceres UV900) 흡광도 490nm에서 curve fit program을 이용하여 측정하고 검사 결과를 분석하였다. 모든 실험성적은 2개 well의 평균치를 구하였다.

결 과

정상돈과 감염돈의 SDS-PAGE에 의한 혈청 단백질 비교 분석 : 혈액소견상 정상범주를 나타낸 20두의 정상돈과 임신말기에 유산 및 사산을 일으키고 중화항체가가 2048배 이상인 돼지 파보바이러스 감염돈 4두와, 중화항체가가 2배에서 1024배 까지의 돼지 콜레라 감염돈 7두, 신경증상을 보이면서 중화항체가가 64배 이상인 오제스키 양성돈 5두의 혈청내 단백질 양상을 비교 조사하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 감염돈에서는 40KDa의 haptoglobin 밴드를 뚜렷하게 확인할 수 있었으나 정상돈에서는 희미한 형태를 나타내었다(Fig 1).

ELISA법에 의한 haptoglobin 측정기법 확립 : Haptoglobin의 정량분석법 확립을 위하여 돼지의 haptoglobin과 생화학적으로 유사한 사람의 haptoglobin을 이용하여 조건을 설정하였다. 즉, methemoglobin과 hydrogen perox-

ide 시약의 농도와 반응시간을 각각 달리하여 측정한 결과 Fig 2에서 보는 바와 같이 methaemoglobin 농도가 0.5mg/ml, hydrogen peroxide가 0.01M, 반응시간 10~20분이 가장 적절한 조건인 것으로 나타났다.



Fig 1. SDS-PAGE profile of haptoglobin from porcine sera. Lane 1; marker, 2; Haptoglobin(human), 3~4; Normal 5~6; Parvo virus-infected, 7~8; Aujeszky's disease virus-infected, 9~10; Hog cholera virus-infected.

정상돈과 감염돈의 haptoglobin치 : 확립된 ELISA법에 의하여 정상돈 20두와 돼지파보, 오제스키, 돈콜레라 감염돈 총 16두에 대한 혈청내 haptoglobin치를 측정한 결과 정상돈은 평균 haptoglobin치가 22mg/dl이었으나, 오제스키 감염돈은 143mg/dl, 파보감염돈은 261mg/dl, 돈콜레라시는 88mg/dl 이상의 높은 haptoglobin치를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Serum haptoglobin concentrations in pigs with viral infectious disease and in normal healthy pigs

Condition	Number of pigs	Mean(\pm S.D) serum haptoglobin concentration(mg/dl)
Aujeszky's	5	143 \pm 23
Parvo	4	261 \pm 31
Hog cholera	7	92 \pm 18
Normal	20	22 \pm 8

야외 도축돈에서의 haptoglobin 농도의 분포율 : 경기 지역의 야외 도축돈 80두에 대하여 haptoglobin치를 측정한 결과 Table 2에서와 같이 25~40mg/dl가 31두(35%)로

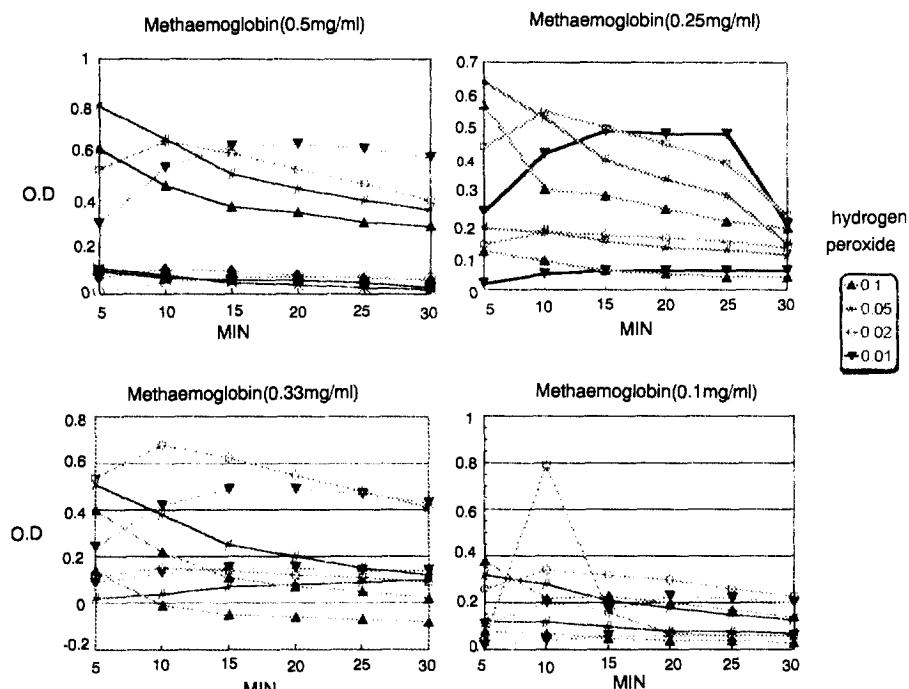


Fig 2. Changes of haptoglobin concentrations in a high haptoglobin(25mg/dl) serum(upper two curves series) and low haptoglobin(1mg/dl) serum(lower two curves series) \times at 490nm using methaemoglobin and peroxide with four different concentration.

Table 2. Distribution of serum haptoglobin values in 80 slaughtered pigs

Serum haptoglobin concentration(mg/dl)	No. of Positives(%)
< 25	17 (21.2)
25-40	31 (38.7)
40-60	19 (23.7)
60-100	10 (12.5)
> 100	3 (3.7)
Total	80 (100)

서 가장 높은 분포율을 나타내었으며, 25mg/dl 이하는 17두(21.2%)로 나타났다. 한편 감염돈이라고 의심할 수 있는 40mg/dl 이상은 39.9%의 분포율을 나타내었다.

고 찰

양돈장에서 기르는 돼지의 건강상태를 검색하고자 할 때 명백한 임상증상을 나타냈을 경우에는 질병의 감염여부를 확인할 수 있지만, 준임상상태에서는 질병의 감염유무를 확인할 수 없어 질병을 조기에 검출하기 위한 시도가 여러가지 측면으로 시도되고 있다². 현재 질병 진단시 가장 널리 이용되고 있는 혈액검사는 동물의 생리적 변화에 따른 변화유무가 심하므로 특히 홍분되었을 때 결과해석을 어렵게 만드는 등 고도의 전문적인 지식이 필요하다. 또한 혈청학적 검사법은 가치있는 진단법이지만 정확한 임상적 상태를 알려주지 못한다. 즉, 그 동물이 감염원에 노출되었는지에 대한 정보는 제공할 수 있으나 그 동물의 감염여부를 확인하기는 어려우며 그 동물이 그 질병의 원인이 되어 폐사하였는지 여부도 쉽게 판단할 수 없다^{7,11}. 또한 비감염성 문제들 즉, 과밀사, 환기불량, 위생불량, 곰팡이 독소, 영양결핍 등에 의해 야기되는 질병진단에는 많은 한계점을 나타낸다. 이와같이 현재의 진단법으로는 여러가지 제한점이 있어 지금 현재 동물집단내에 무슨일이 일어나고 있는지에 대한 신속한 정보를 제공할 수 있는 새로운 진단법 개발이 필요하다. 그리하여 최근에는 사이토카인 및 급성기 단백질을 측정함으로써 이러한 문제점을 해결하려는 많은 시도를 하고 있다^{1,2,5}.

따라서 본 연구에서는 정상돈과 감염돈의 혈청내 단백질 양상의 변화유무를 비교 분석하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 감염돈에서는 40kDa의 뚜렷한 haptoglobin 밴드를 확인할 수 있었다. 이 밴드는 최근 Morimatsu 등¹²의 연구결과 haptoglobin의 감염 및 조직 손상시 증가하는 급성기 단백질로서 각각 하나의 α -chain

과 β -chain으로 구성되어 있으며, 그 분자량이 각각 16-23kDa과 35~40kDa의 분자량을 나타냈다는 보고에 비추어 볼 때 β -chain인 것으로 사료된다.

Haptoglobin의 정량적 측정을 위한 기법들이 다양하게 기술되어 있으며 그 중 특이적 급성기 단백질 분석을 위한 immunoassay가 개발되었으나, 이 방법들은 대부분 수의학적 실험실 범주를 넘어선 것들로서, 종특이성이 있으며, 검사샘플수를 대량화 할 수 없는 등 사용상 많은 단점들이 있다^{7,13}. 한편 peroxidase기법은 haptoglobin이 hemoglobin 또는 methaemoglobin과 결합함으로써 생긴 복합체의 peroxidase 활성화에 근거를 두었기 때문에 수행하기가 쉽고 빠르며 검사샘플수의 대량화가 가능하고, 컴퓨터 그램에 의해서 자동화 할 수 있는 장점을 지녔으므로^{2,9} 개체별 또는 농장별 측정을 통하여 질병조기 경보시스템을 구축할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 인식을 기초로 하여 haptoglobin 정량분석을 위해서 peroxidase법의 원리를 이용한 ELISA법을 개량하고자 methaemoglobin과 hydrogen peroxide 시약의 농도와 반응 시간 등을 설정하였다. 확립된 ELISA법에 의해서 정상돈과 감염돈의 haptoglobin치를 측정한 결과, 정상돈은 평균 22mg/dl 이었으나, 감염돈은 90mg/dl의 높은 농도를 나타내었다. 정상돈과 감염돈의 이와같은 높은 차이는 Eurell¹이 6주령의 정상 돼지에서 haptoglobin치가 최고로 39.5mg/dl과 그 이후 25mg/dl를 보였다는 결과와 Eurell 등³이 인공적으로 위축성 비염으로 감염시킨 돼지의 haptoglobin치가 감염전에는 30~40mg/dl 이었지만 감염후 1일째부터 증가하기 시작하여 감염 7일째에는 110mg/dl를 나타냈다는 보고에서도 시사된 바와 마찬가지로 haptoglobin치가 감염증의 indicator로서 매우 유용함을 나타낸 것이라 사료된다¹⁴⁻¹⁶. 다만, 건강상태의 진단을 haptoglobin 치의 측정만으로 결론지어서는 안될 것이다, 혈청내에 높은 농도로 haptoglobin이 존재함은 감염인자의 존재와 밀접한 관련성이 있기 때문에 haptoglobin 검사법은 준임상형 질병 검출을 위한 최초의 지침으로서는 매우 유용할 것이라고 생각된다. 즉 haptoglobin 분석을 돼지들의 준임상형 및 불현성감염기의 질병을 대규모 농장에서 스크린하는데 일차적으로 먼저 응용하고, 이차적으로 특이적 혈청학적 검사법이나 미생물학적 검사방법을 수행하면 비용이나 시간을 절약할 수 있어 진단효율을 개선할 수 있을 것으로 사료된다^{1,17}.

앞으로 이러한 작업을 위하여 기생충 감염증 등과 같은

기타 질병시나, 중독증, 수태, 분만, 식욕결핍이나 수송시와 같은 생리적 변화상태, 신생축에서 일어날 수 있는 변화 등에 대해 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

결 론

정상돈과 급성 바이러스성 질병 감염돈 36두의 혈청내 단백질 양상을 비교 조사하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 감염돈에서 40kDa의 특이 급성기 단백질인 haptoglobin을 확인할 수 있었다. Haptoglobin의 정량분석을 위하여 정제된 haptoglobin을 이용하여 변형된 guaiacol or peroxidase method에 의해서 조건을 설정한 다음, 정상돈과 감염돈의 haptoglobin치를 조사하였다. 그 결과 정상돈은 평균 22mg/dl의 haptoglobin의 농도를, 감염돈은 90mg/dl 이상의 haptoglobin 농도를 나타내었다. 돼지의 혈청내 haptoglobin 측정법은 감염증의 지침으로서 매우 유용하다고 생각된다. 이 modified ELISA 진단법은 대량의 샘플을 신속히 검사하고 그 결과도 빨리 산정할 수 있으며, 비전문가들도 발색반응의 정도를 보고 그 결과를 쉽게 판독할 수 있기 때문에 농장별 질병조기경보 시스템을 구축할 수 있어 질병 방제에 크게 이바지 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Eurell TE, Bane DP, Hall WF. Serum haptoglobin concentration as a an indicator of weight gain in pigs. *Can J Vet Res*, 56:6-9,1992.
2. Carlton J. Measuring whole herd health with acute phase proteins. *Swine Practitioner*, 12-14, 1994.
3. Eurell TE, Eurell JC, Bane DP, et al. Serum haptoglobin is associated with experimentally-induced atrophic rhinitis in swine. proc Minnesota swine Health program. 18, 1990.
4. Kemt J. Acute phase proteins : their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J*, 148:279-282, 1992.
5. Pfeiffer A, Rogers KM, O'Keeffe L, et al. Acute phase protein response, food intake, live weight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. *Research in Veterinary Science*, 55: 360-366, 1993.
6. Saini PK, Webert DW. Application of acute phase reactants during antemortem and postmortem meat inspection. *JAVMA*, 198:1898-1991, 1991.
7. Skinner JG, Roberts L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. *Veterinary Record*, 134:33-36, 1994.
8. Skinner JG, Brown RAU, Roberts L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Veterinary Record*, 128:147-149, 1991.
9. Jones GE, Mould DI. Adaptation of guaiacol(peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration system. *Research in Veterinary Science*, 37:87-92, 1984.
10. Sekiguchi K, Kato HN, Moto Y. Specific increase of a 35K protein in the sera of cows with Fatty Liver. *Jpn J Vet Sci*, 48:745-751, 1986.
11. Peeffer A, Rogers KM. Acute phase response of sheep : changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and major blood cell types associated with pulmonary damage. *Reserach in veterinary science*, 46:118-124, 1989.
12. Morimatsu M, Sarikaputti M, Syuto B, et al. Bovine haptoglobin : single radial immuno diffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute phase sera. *Vet Immunol Immunopathol*, 33:365-372, 1992.
13. Sheffield CL, Kamps-Holtzapple C, De Loach JR, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody against bovine haptoglobin and its use in an ELISA. *Vet Immunol Immunopathol*, 42: 171-183, 1994.
14. Krawer TT, Ahrens FA, Frank D. Acute phase response to salmonella in a pig liver perfusion model. *Vet Immunol Immunopathol*, 38:241-251, 1993.
15. Yoshin O, Katoh N, Takahash K, et al. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipiodosis, and identification of the protein as haptoglobin. *Am J Vet Res*, 53:951-956,1992.
16. Murata H, Miyamoto J. Bovine Haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *Br Vet*, 149:277-283, 1993.
17. Conner JG, Eckersall PD. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science*, 44:82-88, 1988.