

韓牛로부터 分離한 바베시아 原虫의 同定

全 永

農村振興廳 家畜衛生研究所

緒 論

McCulloch 및 Hall,⁴⁾ 石原,¹³⁾ 小倉¹⁴⁾ 그리고 井野場¹⁵⁾는 韓國에 分布하는 소의 바베시아原虫은 *Babesia bigemina* 라고 發表한바 있고 以後 權 등⁷⁾에 依하여 *Haemaphysalis longicornis* 진드기가 媒介體로 밝혀 짐으로써 日本에 分布하는 *Babesia* spp.와 同一하다고 推定된바 있다.

石原¹²⁾는 *B. bigemina* 와 *Babesia* spp.의 原虫에 依한 形態學的鑑別診斷은 困難하다고 하였으나 Goldman²⁾ 등과 Leelang 및 Perie³⁾는 間接螢光抗體法을 應用하여 바베시아 種類間的 同定이 可能함을 밝혔다.

本試驗은 最近 著者들¹⁰⁾이 確立시킨 間接螢光抗體法을 利用하여 韓牛바베시아原虫의 種類를 同定할 目的으로 日本에서 導入한 既知의 *B. bigemina* 와 *Babesia* spp.를 使用하여 形態學的比較觀察과 血清學的交叉反應試驗을 試圖하여 成績을 얻었기에 報告한다.

材料 및 方法

바베시아原虫株 : 韓牛바베시아原虫은 1973年 韓牛에서 分離한 原虫株이다.¹⁰⁾ *Babesia* spp.(Miyake strain)는 1976年 7월에 日本 農林省 家畜衛生試驗場 九州支場의 石原로부터 保虫血液을 分讓받은 原虫株이며 同時에 *Babesia bigemina* (Kochinda strain)도 分讓받았다.

間接螢光抗體試驗用 抗原標本生産 : 脾臟剔出한 犢牛에 韓牛바베시아 30ml, *Babesia* spp. 80ml, *B. bigemina* 25 ml의 感染耐過牛 血液을 接種한 후 血液塗抹標本을 檢鏡하여 原虫이 多數出現한 時期에 採血하고 슬라이드 硝子에 厚層血液塗抹標本을 만들어 -60°C에 保存使用하였다.¹⁰⁾

間接螢光抗體生産 : 바베시아 未感染牛의 血清에 Na₂SO₃을 處理하여 分離한 γ -globulin을 家兔에 免疫시켜

얻은 抗血清蛋白에 螢光色素 FITC를 結合시킨 후 Sephadex G-25와 DEAE cellulose에 通過시켜 非特異性物質을 除去하여 生産하였다.¹⁰⁾

間接螢光抗體染色法 : 바베시아 抗原標本에 稀釋한 牛血清을 處理한 후 間接螢光抗體로 染色하고 螢光顯微鏡에서 觀察하여 抗原에 鮮명한 螢光反應이 認定되는 것을 陽性 그리고 無反應인 것을 陰性으로 判定하였다.

實驗感染牛의 바베시아原虫에 對한 形態學的觀察 : 間接螢光抗體試驗用 抗原生産에 供試한 脾臟剔出牛의 血液에서 檢出된 原虫에 對하여 形態의 觀察과 形態別出現率을 調査하였다.

實驗感染牛의 抗體檢査 : 韓牛바베시아 感染耐過牛의 血液 30ml, *Babesia* spp. 約 7% 感染血液 30ml *B. bigemina* 約 0.1% 保虫血液 25 ml를 健康한 犢牛에 皮下 接種한 후 5~20日 間隔으로 2~3 ml의 血液을 採血하여 血清을 分離하였으며 間接螢光抗體試驗에 供試할때 까지 -25°C에 凍結保存하였다. 抗體力價는 稀釋한 血清을 處理한 抗原에서 鮮명한 螢光反應이 認定되는 最高稀釋血清倍數로 하였다. 血清學的 交叉反應試驗은 *Babesia* spp.와 *B. bigemina* 抗原에 對한 抗血清間的 交叉反應程度를 調査하였다.

結 果

間接螢光抗體試驗用 抗原生産 : 脾臟剔出한 犢牛에 感染血液을 接種한 후 血液塗抹標本檢査에서 原虫이 多數出現한 時期는 *Babesia* spp.가 感染後 10日에 11% 感染되었고 *Babesia bigemina* 에서는 17日에 7% 感染되어 이때에 슬라이드 硝子에 抗原標本을 生産할 수 있었으며 이것을 -60°C에 保存使用하였다.

바베시아原虫株別 形態學的觀察 : 本調査는 抗原標本을 生産하기 爲하여 感染시킨 脾臟剔出牛의 血液塗抹標本을 檢鏡하여 檢出된 原虫의 形態를 觀察한 結果 그림 1에서와 같이 韓牛바베시아 原虫과 *Babesia* spp. 및 *B. bigemina* 에서는 肉眼的으로 共히 原虫의 크기

Type	I	II	III	IV	V	Other
Form						Single
						Trigeminate
						Quadrigenate
						and Irregular Form
<i>Babesia</i> spp.(Korean Strain)	+*	++++	++	+++	+	+
<i>Babesia</i> spp. (Miyake Strain)	+	++++	+	+++	+	+
<i>Babesia bigemina</i> (Kochinda Strain)	++++	++	++	+++	+	++

* + : 1~9% of organisms

+++ : 20~29% of organisms

++ : 10~19% of organisms

++++ : More than 30% of organisms

Fig.1. Morphological observation of *Babesia* spp.in erythrocyte.

Table 1. Results of Immunofluorescence Test

Antigen	Antiserum Against	Days after Inoculation and IFA Titer*							
		0	5	10	20	30	50	70	90
<i>Babesia</i> spp. (Miyake Strain)	<i>Babesia</i> spp. (Korean strain)	0*	0	25	500	500	500	250	250
	<i>Babesia</i> spp. (Miyake strain)	0	0	50	250	500	500	250	250
	<i>B. bigemina</i> (Kochinda strain)	0	0	0	25	50	50	50	50
<i>Babesia bigemina</i> (Kochinda Strain)	<i>Babesia</i> spp. (Korean strain)	0	0	0	0	25	50	50	50
	<i>Babesia</i> spp. (Miyake strain)	0	0	0	50	50	50	50	50
	<i>B. bigemina</i> (Kochinda strain)	0	0	25	100	250	250	250	250

* Indirect fluorescent antibody titer

* 0: $\angle 1:25$ of IFA titer

와 形態가 相互類似하여 正確한 鑑別診斷이 困難하였다. 그러나 原虫의 形態別 出現率에 있어서 韓牛바베시아와 *Babesia* spp.의 原虫은 平行形의 雙虫이 많이 出現하였으나 *B. bigemina*에서는 特히 圓形 또는 橢圓形의 原虫이 많이 出現하였다.

血清學的 交叉反應試驗: 間接螢光抗體法으로 血清學的 交叉反應試驗을 實施한 結果 表1에서와 같이 *Babesia* spp. 抗原에 對한 *Babesia* spp.의 抗體消長은 10일부터 1:50의 抗體價가 出現한 후 20일에 1:250 그리고 30일에 1:500이었으나 1:1,000에서 弱한 反應을 나타냈으며 70~90일까지는 1:250의 力價를 보였다. 또한 韓牛

바베시아의 抗體消長에서는 10일부터 1:25의 抗體價가 出現하여 20일에 1:500이었으나 1:1,000에서 弱한 反應을 보였고 70~90일까지는 1:250의 抗體價를 나타내었다. 그리고 *B. bigemina*의 抗體消長은 20일에 1:25의 抗體價가 出現하였고 30~90일까지는 1:50의 力價를 維持하였다.

한편 *B. bigemina* 抗原에 對한 *B. bigemina*의 抗體消長은 10일부터 1:25의 抗體價가 出現하였고 20일에는 1:100이었으며 30~90일까지는 1:250의 最高抗體價를 나타냈다. 또한 *Babesia* spp.의 抗體消長은 20일에 1:50의 抗體價가 出現하여 90일까지 持續하였으나 70

~90日에는 1:100에서 弱한 反應을 나타내었다. 그리고 韓牛바베시아의 抗體消長은 30日부터 1:25의 抗體價가 出現한 후 50~90日까지 1:50의 力價를 維持하였으나 70~90日에는 1:100에서 弱한 反應을 나타내었다

本試驗成績에서 *Babesia* spp. 抗原에 對한 *Babesia* spp.와 韓牛바베시아의 最高抗體價는 兩株 共히 1:500이었으나 *B. bigemina*에서는 1:50이었다. 한편 *B. bigemina* 抗原에 對한 *B. bigemina*의 最高抗體價는 1:250이었으나 *Babesia* spp.와 韓牛바베시아에서는 兩株 共히 1:50이었으므로 *Babesia* spp.(Miyake strain)와 韓牛바베시아는 同種交叉反應이라고 생각되고 또한 이들은 *B. bigemina*에 對하여 異種交叉反應이라고 思料된다.

考 察

石原^{12,13)}는 *Babesia bigemina*(Kochinda strain)와 *Babesia* spp.(Miyake strain)의 原虫에 對한 形態學的 鑑別診斷이 困難하다고 하였으며 Soulsby⁵⁾와 石原¹²⁾에 依하면 *B. bigemina*, *B. argentina*, *B. berbera*, *B. major*, *Babesia* spp.(Miyake strain)의 原虫은 赤血球의 中央部에 寄生하나 *B. bovis*와 *B. divergens*의 原虫은 赤血球內의 邊緣에 位置한다고 하였다. 또한 *B. bigemina*와 *Babesia* spp.의 原虫은 赤血球의 半經보다 길다고 하였고 *B. major*, *B. argentina*, *B. bovis*, *B. berbera*의 原虫은 赤血球의 半經程度이고 *B. divergens*는 半經以內이라고 하였지만 一般的으로 虫體에 依한 形態學的 種類同定은 매우 어려운 것으로 알려져 있다.

本試驗에서는 *B. bigemina*, *Babesia* spp. 韓牛바베시아의 原虫形態는 相互 共히 同形の 虫體가 모두 出現하여 石原¹²⁾가 發表한 바와 같이 正確하게 鑑別診斷이 困難하였다. 그러나 原虫의 形態別 出現率을 調査한 結果 *B. bigemina*와 *Babesia* spp.를 어느 程度 鑑別診斷에 應用할수 있으리라고 생각되나 이들 原虫의 混合 感染時의 鑑別診斷은 追試할 必要가 있으며 最近 李 및 崔⁹⁾는 野外發症韓牛의 血液塗抹標本檢査에서 圓形의 原虫이 많이 檢出되었다는 報告와 아울러 過去의 成績을 補完하기 爲하여 앞으로 *B. bigemina* 原虫의 分離와 分布率調査가 要望되고 또한 *B. argentina*의 感染與否에 對해서는 徐 및 Hoyte⁸⁾의 組織切片法을 利用하여 調査할 수 있으리라고 생각된다.

間接螢光抗體法으로 바베시아 種類를 同定한 試驗에 關하여 Leeplang 및 Perie³⁾는 *B. bigemina* 抗原에 對한 最高抗體價는 *B. bigemina*가 1:2,560이었으나 *B.*

bovis, *B. divergens*, *B. major*는 모두 1:80이라고 하였으며 Goldman²⁾등은 *B. bigemina* 抗原에 對한 *B. bigemina*의 最高抗體價는 1:256이었으나 *B. berbera* 抗體價는 陰性이라고 하였고 Brocklesby¹⁾등은 英國의 *B. major* 抗原에 對한 *B. major*의 最高抗體價는 1:2,560이었으나 *B. bigemina* 抗體價는 1:40이므로 *B. major* 種이 分布한다고 報告한 바 있다. 또한 Leeplang 및 Perie³⁾는 同種抗原抗體間에서 抗體價가 높았으나 異種抗原抗體間에는 力價가 낮았다고 發表함으로써 種類同定試驗에 應用할 수 있음을 發表하였다.

德久¹¹⁾가 *B. bigemina*와 *Babesia* spp.에 對하여 試驗한 成績을 本試驗의 結果와 比較檢討하여 보면 *Babesia* spp. 抗原에 對한 *Babesia* spp.의 最高抗體價는 1:1,280이라고 하였으나 本試驗에서는 1:500의 力價를 보였고 30日에서 1:1,000에서 弱한 反應을 나타냈으므로 거의 같은 成績이었고 *B. bigemina*의 抗體價는 1:80이라고 하였으나 本試驗에서는 1:50의 力價를 보였으며 70日에는 1:100에서 弱한 反應을 나타냈다. 한편 *B. bigemina* 抗原에 對한 *B. bigemina*의 最高抗體價는 1:1,280이라고 하였으나 本試驗에서는 1:250이었으며 이것은 Goldman 등²⁾이 試驗한 力價와 같았고 *Babesia* spp.의 力價는 1:80이라고 하였으나 本試驗에서는 1:50이었고 70日 以後에는 1:100에서 弱한 反應을 보였으므로 매우 같은 成績이라고 생각된다.

本試驗에 있어서 韓牛바베시아의 最高抗體價는 *Babesia* spp.의 力價와 같았으므로 兩株는 同種이라고 思料되나 *B. bigemina*와는 異種이라고 생각된다.

바베시아 感染斃死率에 關하여 Udall⁶⁾은 *B. bigemina*⁵⁾가 成牛에서 90%, 2年牛에서 50% 以上, 1年牛는 25% 그리고 9個月齡 以下에서는 生存耐過한다고 하였으며 小倉¹⁴⁾는 *Babesia* spp. (Japanese strain)의 感染斃死率은 約 10%라고 記述한 바 있다. 따라서 日本은 現在 *B. bigemina*에 對해서 法定傳染病으로 指定하고 있으나 *Babesia* spp.는 病原性이 弱하여 非法定傳染病으로 되어 있다.

石原¹³⁾는 *B. bigemina*의 媒介體를 *Bophilus*진드기라고하고 *Babesia* spp.의 媒介體는 *Haemaphysalis*진드기라고 報告하였으나 *Babesia* spp.가 新種인지 또는 어떤 種인지 아직 決定하지 못하고 있는 實情이다.

現在 韓牛바베시아原虫의 媒介體는 *Haemaphysalis*진드기로 밝혀졌고⁷⁾ 本試驗의 血清學的 交叉反應에서 *Babesia* spp.와 同種으로 생각되는 바 앞으로 韓牛바베시아의 種類를 決定하기 爲해서는 *B. major*와의 比較試驗이 要望된다.

結 論

韓牛에서分離한 바베시아原虫의種類를同定할目的으로日本에서既知의 *Babesia* spp. (Miyake strain)과 *B. bigemina* (Kochinda strain)原虫을導入하여韓牛바베시아와의形態學的,血清學的比較試驗을實施하였던바다음과같은結論을얻었다.

1. 形態學的觀察에서韓牛바베시아와 *Babesia* spp.는平行形의雙虫이특히 많았으나 *B. bigemina*에서는圓形 또는橢圓形의虫體가 많이出現하였다.

2. 間接螢光抗體試驗에서 *Babesia* spp. 抗原에對한 *Babesia* spp.와韓牛바베시아의最高抗體價는兩株共히 1:500이었으나 *B. bigemina*의抗體價는 1:50이었다.

3. *B. bigemina* 抗原에對한 *B. bigemina*의最高抗體價는 1:250이었으나 *Babesia* spp.와韓牛바베시아에서는兩株共히 1:50이었다.

4. 韓牛바베시아原虫은日本の *Babesia* spp. (Miyake strain)와同種으로생각된다.

謝辭:本試驗研究를爲하여指導하여주신金龍熙科長과金東成科長께그리고本實驗에直接助力하여준金香淑讓에게眞心으로感謝드립니다.

參 考 文 獻

1. Brocklesby, D.W., Zwart, D. and Perie N.M.: Serological evidence for the identification of *Babesia major* in Britian. Res. Vet. Sci. (1971) 12:285.
2. Goldman, M., Pipano E. and Rosenberg, A.S.: Fluorescent antibody test for *Babesia bigemina* and *B. berbera*. Res. Vet. Sci. (1972) 13:77.
3. Leeflang, P. and Perie, N.M.: Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species

- of cattle. Res. Vet. Sci. (1972) 13:342.
4. McCulloch R.N. and Hall, W.T.K.: The Problem of the control of cattle ticks and cattle tick fever in the Republic of Korea. Department of Exernal affairs, Camberra (1970) p.16.
5. Soulsby, E.J.L.: Helminths, Arthropods and Protozoa of domenicated animals. 5 ed., Balliere, Tindall and Cassell (1965) p.697.
6. Udall, D.H.: The Practic of Veterinary Medicine. Published by the Author, Ithaca, New York. (1954) p.709.
7. 權寧邦, 全永, 李炳都, 韓台愚: 소의大型피로플라즈마病的媒介 및治療에關한研究. 家畜衛生研究所試驗研究報告 (1970) p.78.
8. 徐明得, Hoyte, H.M.D.: 臟器塗抹法과組織標本法에依한 *Babesia bigemina*와 *B. argentina*의形態學的鑑別에關한研究. 大韓獸醫學會誌(1977) 17:51.
9. 李鉉凡, 崔源弼: 韓牛에서의바베시아病的自然發生例에對하여. 大韓獸醫學會誌 (1976) 16:173.
10. 全永, 李澤柱: 間接螢光抗體法에依한韓牛바베시아原虫의血清學的診斷에關한研究. 農事試驗研究報告 (1975) 17(V):35.
11. 徳久修一: 牛の寄生虫病の血清學的診斷法ならびに豫防ワクチンの開發に關する研究. 農林水産技術會議事務局 (1976) 83:42.
12. 石原忠雄: 牛のいわゆるピロプラスマ病について. 家畜保健衛生技術研究會 (1971) 9:35.
13. 石原忠雄: 日本における牛のバベシア病とタイレリア病. 日本農林省 家畜衛生試驗場研究報告 (1971) 62:128.
14. 小倉喜佐次郎: 獸醫微生物學. 養賢堂, 東京(1964) p.661.
15. 井野場条次郎: 朝鮮産牛のバベシア. 中央畜醫學雜誌 (1925) 38(6): 13.

Identification of a Strain of *Babesia* Isolated from Korean Cattle

Yeong Jeon, B.S., M.S.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Abstract

In order to identify unknown *Babesia* spp. which was isolated from Korean cattle, the morphology

of Korean strain was compared with that of *Babesia bigemina* (Kochinda strain) and *Babesia* spp. (Miyake strain). Immunofluorescent technique was used to identify the serological character of the parasites.

The results obtained were summarized as follows:

1. Korean strain was morphologically very similar to *Babesia* spp. (Miyake strain) which mostly showed parallel-bigeminate forms, while *B. bigemina* (Kochinda strain) was mostly round and oval forms.

2. By the indirect fluorescent antibody technique:

a) Anti-*Babesia* spp. and Korean *Babesia* spp. sera showed a higher antibody titers with *Babesia* spp. (Miyake strain) antigen (1:500) than with *B. bigemina* (Kochinda strain) antigen (1:50).

b) Anti-*Babesia bigemina* sera showed a lower titer with *Babesia* spp. antigen (1:50) than with *B. bigemina* antigen (1:250).

3. On the basis of morphological and serological confirmations, a *Babesia* strain isolated from a Korean cattle was very similar, if not identical, to Miyake strain of *Babesia* spp.