

## 송아지의 실험적 크립토스포리디움증

위성환 · 이정길\* · 강영배 · 주후돈 · 주이석 · 박용호 · 최상호

수의과학연구소  
전남대학교 수의과대학\*  
(1994년 9월 27일 접수)

### Experimental cryptosporidiosis in calves

Sung-hwan Wee, Chung-gil Lee\*, Yung-bai Kang, Hoo-don Joo,  
Yi-seok Joo, Yong-ho Park, Sang-ho Choi

National Veterinary Research Institute, RDA  
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University\*  
(Received Sept 27, 1994)

**Abstract** : Four Holstein calves 7-day-old were infected with *C parvum* oocysts for parasitological and pathological investigations of bovine cryptosporidiosis. Of those calf 1 was orally administered with  $7 \times 10^6$  oocysts of *C parvum* isolated from a Korean mouse (VRI-CN91), and calf 2 with same number of *C parvum* oocysts provided by Washington State University (WSU). The rest (calf 3 and 4) were orally administered with  $1 \times 10^8$  oocysts of VRI-CN91 strain. Calf 1 commenced to discharge oocysts in feces at days 6 post inoculation (PI), and it reached a peak  $1.4 \times 10^7$  oocysts per gram of feces (OPG) on day 8 PI. Calf 2 commenced to discharge oocysts in feces at day 4 PI, and it reached a peak  $3.75 \times 10^6$  OPG on day 7 PI. Calf 3 and 4 commenced to discharge oocysts in feces at day 3 and day 4 PI, and it reached a peak on day 7 PI (calf 3,  $7.8 \times 10^6$  OPG; calf 4,  $1.7 \times 10^6$  OPG).

Clinically, the calves began to show mucoid-watery diarrhea at day 3 to 5 PI, and the sign lasted 5 to 7 days. Calf 2 died on day 9 PI with a severe dehydration. On necropsy the intestine was found to be congested and hemorrhagic. Protozoan oocysts were observed mainly in the ileum and occasionally in jejunum. The results in the present study indicate that the Korean isolate was pathogenic in calves.

**Key words** : cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, diarrhea, calves

## 서 론

송아지 cryptosporidiosis는 1971년 8개월령의 송아지에서 처음 보고<sup>1</sup> 되었지만 이 질병을 일으키는 *Cryptosporidium*은 신생 송아지 설사증후군의 중요한 원인체로 취급되고 있다<sup>2,9</sup>. *Cryptosporidium*에 감염된 송아

지는 임상적으로 설사증상 이외에 식욕감퇴, 체중감소, 탈수 등을 나타내는데 일반적으로 폐사율은 낮다<sup>2,5,9,11</sup>. 그러나 설사와 관계되는 바이러스나 세균 등과 혼합 감염되면 폐사율은 높아진다<sup>11,12,13</sup>.

저자 등은 국내 BALB/c 마우스에서 분리한 *C parvum*을 몇 종의 실험동물과 한우 송아지에 감염시켰던

결과 숙주 특이성이 없음을 증명한 바 있다<sup>14,15,16</sup>. 그러나 국내에서 분리된 *C parvum*의 병원성에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 이 실험에서는 우리나라의 마우스에서 분리한 *C parvum*과 워싱턴 주립대학교에서 분양 받은 *C parvum*을 각각 젖소 송아지에 감염시킨 다음 기생충학적 및 병리학적조사를 실시하였으며, 그 병원성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

원충 : 국내 마우스에서 분리한 *C parvum*(VRI-CN 91)<sup>14,15</sup>과 워싱턴 주립대학교에서 소에 계대되고 있는 *C parvum*(WSU)을 분양 받아 사용하였다.

실험동물 : 7일령의 젖소 송아지(Holstein) 4두를 선정하고 그 분변을 DMSO-modified acid-fast 염색법<sup>17</sup>으로 검사하여 *C parvum*에 감염되어 있지 않았음을 확인한 후 실험에 사용하였다.

송아지의 감염 : 4마리의 송아지에 *C parvum*을 감염시킨 내용을 Table 1에 요약했다.

Table 1. Infection of calves with *Cryptosporidium parvum* in the experiment

Calf No	Inoculation	Strain of <i>C parvum</i>	No of oocysts
1	oral	VRI-CN91*	$7 \times 10^6$
2	oral	WSU**	$7 \times 10^6$
3	oral	VRI-CN91	$1 \times 10^8$
4	oral	VRI-CN91	$1 \times 10^8$

\* Isolated from a mouse in Korea

\*\* Provided by Washington State University, USA

분변검사 : *C parvum*을 감염시킨 날부터 매일 분변을 채취하여 동량의 2.5% potassium dichromate 용액에 잘 혼합한 다음 냉장고(4℃)에 보관하였다. 그중 일부를 단계적으로 80 mesh부터 250 mesh(61μm porosity)까지 거른 다음 DMSO-modified acid-fast 염색법<sup>17</sup>으로 분변내의 오오시스트를 확인하면서 분변 1g당 오오시스트의 수(Oocysts per gram; OPG)를 측정하였다.

임상조건 : 매일 채취된 분변의 성상을 육안적으로 관찰하여 임상적으로 설사가 발현되는지를 확인하였다.

조직표본제작 및 감염부위 조사 : 실험중 폐사된 1마리 송아지의 위와 장을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직을 일반 병리조직의 처리방법으로 처리한 후 hematoxylin & eosin으로 염색하여 원충의 감

염부위를 확인하였다.

주사전자현미경 표본제작 및 원충의 형태 관찰 : 조직표본 제작에 사용된 부위의 일부를 5mm의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde에 전고정한 후 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. 탈수과정을 거쳐 금이온으로 coating하였으며, 주사전자현미경(Hitachi S-570)으로 원충의 형태를 관찰하였다.

## 결과

$7 \times 10^6$ 개의 *C parvum* 오오시스트에 감염된 송아지가 분변으로 배출하는 오오시스트의 경시적인 변화는 Fig 1과 같다. VRI-CN91에 감염된 송아지 (calf 1)는 감염 후 6일째부터 분변으로 오오시스트가 배출되기 시작하여 8일째에 가장 많은 오오시스트가 배출( $3.75 \times 10^6$  OPG) 되었다. 그러나 감염 후 15일째부터는 분변에서 오오시스트가 배출되지 않았다. WSU를 감염시킨 송아지(calf 2)는 감염 후 4일째에 처음으로 분변에서 오오시스트가 검출되어 감염 후 7일째에 가장 많은 오오시스트를 배출( $1.4 \times 10^7$  OPG) 되었지만 9일째에 폐사되었다.

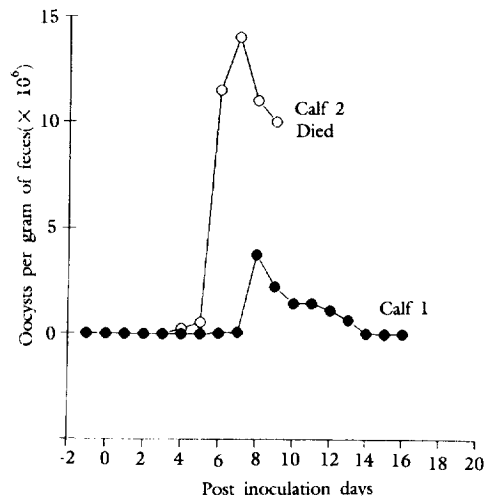


Fig 1. Patterns of oocyst discharge of calf 1 and 2 experimentally infected with  $7 \times 10^6$  *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated from a mouse in Korea (●) and provided by Washington State University, USA(○), respectively.

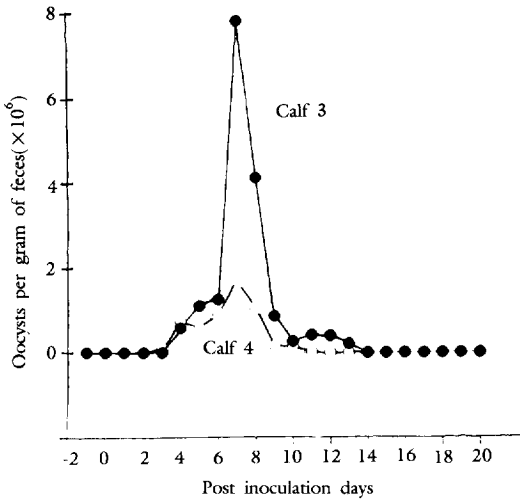


Fig 2. Patterns of oocyst discharge of calf 3 and 4 experimentally infected with  $1 \times 10^8$  *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated from a mouse in Korea.

VRI-CN91를  $1 \times 10^8$ 개 경구 감염시킨 송아지가 분변으로 배출하는 오오시스트의 경시적인 변화는 Fig 2와 같다. 감염 후 3일째(calf 4)와 4일째(calf 3)에 분변으로 오오시스트가 배출되었는데, 두마리 송아지 모두 감염 후 7일째에 가장 많은 오오시스트를 배출하였다(calf 3;  $7.8 \times 10^6$  OPG, calf 4;  $1.7 \times 10^6$  OPG).

감염된 송아지는 모두 수양성 설사를 나타냈는데 감염 후 3일-5일째부터 5-7일간 계속되었다. 그중 calf 2는 설사가 지속되는 동안 탈수가 특히 심하였으며 감염 후 9일째에 갑자기 폐사하였다.

심한 탈수현상으로 폐사된 calf 2의 부검소견은 육안적으로 공장상부와 결장하부 및 직장을 제외하고는 십이지장부터 결장에 이르기까지 전반적으로 충·출혈이 있었으며, 특히 회장부위가 심하였다(Figs 3, 4). 심장과 간은 정상보다 비대해 있었고, 다른 실질장기는 정상이었다.

십이지장, 공장, 회장등에서 용모의 위축과 부분적인 상피세포의 탈락이 광학현미경으로 관찰되었다. 원충은 회장 부위에서 가장 흔하게 관찰되었고 공장에서는 드물게 관찰되었으며 다른 부위에서는 관찰되지 않았다. 회장 상피세포 표면 및 용모 사이에서 관찰된 원충은 세포내로 침투되어 발육중이거나 상피세포 표면에 부착된 모습으로 관찰되었다(Figs 5, 6). 주사전자현미경으로 관찰된 원충은 구형으로 2.5-3 $\mu$ m의 크기였

으며(Fig 7), 성숙된 원충이 떨어져 나간 자리는 구형의 구멍으로 관찰되었다(Fig 8).

## 고 찰

본 연구는 우리 나라의 마우스에서 분리한 *C parvum*(VRI-CN91)과 워싱턴 주립대학교에서 분양 받은 *C parvum*(WSU)을 젖소 송아지에 감염시킨 다음 기생충학적 및 병리학적 조사를 실시하여 *C parvum*의 병원성을 확인하기 위해 시도되었다. *C parvum*으로 오염된 농장에서 어린 송아지가 자연적으로 감염된 후 분변중으로 오오시스트를 배출하는 시기가 생후 2주 이내로 알려져 있다<sup>2,5,6,7,18</sup>. 그러나 *C parvum*이 송아지에 감염된 후 오오시스트가 분변으로 배출되기까지는 4일 정도의 잠복기를 갖기 때문에<sup>11</sup> 실제로는 생후 10일 이전의 송아지에 감염되고 있음을 알 수 있다. 따라서 어린 송아지에서 많은 자연감염 예가 보고<sup>2</sup>되는 것은 연령이 어릴수록 감수성이 높다는 것이며, 이런 근거로 본 실험에서는 7일령의 어린 송아지를 사용하였다.

본 실험에서는 *C parvum*에 감염된 송아지가 오오시스트를 배출하는 시기를 전후로 하여 수양성 설사를 나타냈으며, 오오시스트의 수는 최고  $1.7 \times 10^6$ - $1.4 \times 10^7$ 개의 OPG를 나타냈다. 따라서 *Cryptosporidium*에 감염되어 임상적으로 설사를 나타내는 경우, OPG가  $10^6$ - $10^7$ 개 었다는 기존의 성적<sup>11,19</sup>과 일치하였다. 이러한 사실은 *C parvum*이 신생 송아지 설사에 중요한 원 인체라고 보고한 결과<sup>2,3,4,5,6,12</sup>를 뒷받침하는 것이다. 한편 한우 송아지에  $1 \times 10^6$ 개의 오오시스트를 경구 감염시킨 결과, 분변 gram당  $4.9 \times 10^5$ 개의 오오시스트가 함유되어 있었으며 설사가 관찰되지 않았던 것은<sup>15</sup> 본 실험( $7 \times 10^6$ 개의 오오시스트) 보다 적은 수의 오오시스트를 감염시켰으며, 한우 송아지의 연령도 본 실험에서 사용한 젖소 송아지보다 높았기 때문에 설사를 나타내지 않았을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 감염시킨 오오시스트의 수와 분변으로 배출되는 오오시스트의 수가 비례하지는 않았다. 한편, Anusz et al<sup>20</sup>은 3-6일령의 송아지에  $10^6$ 개의 *C parvum* 오오시스트로 인공적으로 감염시킨 후 분변으로 배출되는 오오시스트를 ELISA로 측정하였던 바 개체에 따라서 분변중의 오오시스트의 수에 의해 판단되는 OD치가 일정하지 않았음을 보고하였다. 이러한 결과들을 종합해보면 감수성이 높은 송아지라 할지라도 개체의 차이에 의해 체내에서 원충의 증식에 영향을 주는 것으로 생각된다. 따라서 일정한 오오시스트의 수에 의

해 감염이 성립되더라도 병원성을 발현할 수 있을 정도의 원충 증식은 감염된 송아지 개체의 저항성에 의해서도 차이가 날것으로 판단된다. 또한 이 실험에서 심한 탈수로 폐사된 calf 2는 WSU(송아지분리주)를 접종한 것으로, VRI-CN91(마우스분리주)를 감염시킨 송아지보다 더 많은 오오시스트를 분변으로 배출했다. 또한 본 실험과는 별도로 WSU와 VRI-CN91를 동일한 수의 오오시스트로 마우스에 감염시켰을 때 VRI-CN91를 감염시킨 마우스의 분변에서 더 많은 수의 오오시스트가 분변으로 배출되었다(미발표자료). 이러한 결과는 이 원충이 숙주특이성은 없으나 송아지에서 분리한 원충은 송아지에서, 마우스에서 분리한 원충은 마우스에서 증식이 더 잘 이루어질 수 있음을 나타내 주는 것이다. 따라서 *C parvum*에 감염된 개체에서의 원충증식의 결과로 임상적으로 발현되는 병원성의 강약은 어느 동물에서 유래된 strain인가와 감염된 개체의 저항성에 의해 상당히 영향을 받을 것으로 사료된다.

Calf 2의 병리 및 조직학적 소견으로는 위장관에 전반적으로 충·출혈을 나타냈는데 *C parvum*이 관찰된 회장부위에 병변이 더욱 심했던 것은 원충의 증식으로 상피세포에 손상을 주어 손상된 상피세포에 병원성을 가진 세균이나 바이러스의 침입으로 인한 2차감염에 의한 것으로 생각된다. 따라서 rotavirus, reovirus, coronavirus나 *Escherichia coli*, *Salmonella* spp 등과 혼합 감염된 경우에는 병원성이 강하게 나타나 폐사율이 높아질 수 있다는 기존의 성적<sup>8,10,12,13</sup>들을 고려하면 본 실험에서 폐사된 송아지는 이 원충이 증식될 때 바이러스나 세균과 혼합 감염되어 병원성이 더욱 강하게 나타나 폐사된 것으로 생각되었다.

소에서의 *Cryptosporidium*의 기생부위는 위<sup>21</sup>, 공장<sup>1</sup>, 회장<sup>2,3,4,7,12,22</sup>, 결장<sup>2</sup>등으로 알려져 있다. 그러나 위에 기생하는 이 원충은 크기나 형태학적 특징으로 보아 *C muris*로 분류되었다<sup>21</sup>. 이러한 성적을 종합하면 *C parvum*의 발육환은 소장 및 대장에서 이루어지며, 회장이 주요 기생부위라고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서 광학현미경 및 주사전자현미경에 의해 원충의 기생부위

가 주로 회장에서 관찰된 것은 기존에 보고된 내용들과 일치하는 것이다.

## 결론

7일령의 젖소 송아지 4두중 우리 나라 마우스에서 분리한 *C parvum*(VRI-CN91)과 워싱턴 주립대학교에서 분양 받은 *C parvum*(WSU)을 두마리의 젖소 송아지에 각각  $7 \times 10^6$ 개씩 경구적으로 감염(calf 1, 2)시키고, 다른 두마리에는 VRI-CN91를  $1 \times 10^8$ 개 감염(calf 3, 4)시킨 후 기생충학적 및 병리학적 조사를 실시하였다.

Calf 1 (VRI-CN91)은 감염 후 6일째부터 분변으로 오오시스트가 배출되기 시작하여 8일째에 가장 많은 오오시스트가 배출( $3.75 \times 10^6$  OPG)되었다. Calf 2(WSU)는 감염 후 4일째에 처음으로 분변에서 오오시스트가 검출되어 감염 후 7일째에 가장 많은 오오시스트를 배출( $1.4 \times 10^7$  OPG) 하였지만 9일째에 폐사되었다.  $1 \times 10^8$ 개의 오오시스트를 경구 감염시킨 송아지군은 감염 후 3일째와 4일째부터 분변에서 오오시스트가 검출되었는데, 감염 후 7일째에 가장 많은 오오시스트가 배출(calf 3;  $7.8 \times 10^6$  OPG, calf 4;  $1.7 \times 10^6$  OPG)되었다. 감염된 송아지는 감염 후 3일-5일째부터 5일간 수양성 설사를 나타냈는데 이 시기는 오오시스트가 배출되는 시기와 거의 일치하고 있었다.

Calf 2의 부검소견은 육안적으로 공장상부와 결장하부 및 직장을 제외하고는 십이지장부터 결장에 이르기까지 전반적으로 충·출혈이 있었으며, 특히 회장부위가 심하였다. 원충은 회장부위에서 가장 흔하게 관찰되었고, 공장에서는 드물게 관찰되었다. 따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때 국내 마우스에서 분리한 VRI-CN91에 감염된 송아지가 OPG가 높고 심한 수양성 설사를 나타내는 것으로 보아 VRI-CN91은 송아지에서 병원성을 발현하는 것으로 판단된다.

## Legends for figures

Fig 3. The intestine of Calf 2, 9 days after infected with *Cryptosporidium parvum* (Washington strain). A, upper parts of the jejunum; B, middle parts of the ileum.

Fig 4. The intestine of Calf 2, 9 days after infected with *Cryptosporidium parvum* (Washington strain). A, upper part of the jejunum showing slight pathological lesion; B, middle part of the ileum showing severe patho-

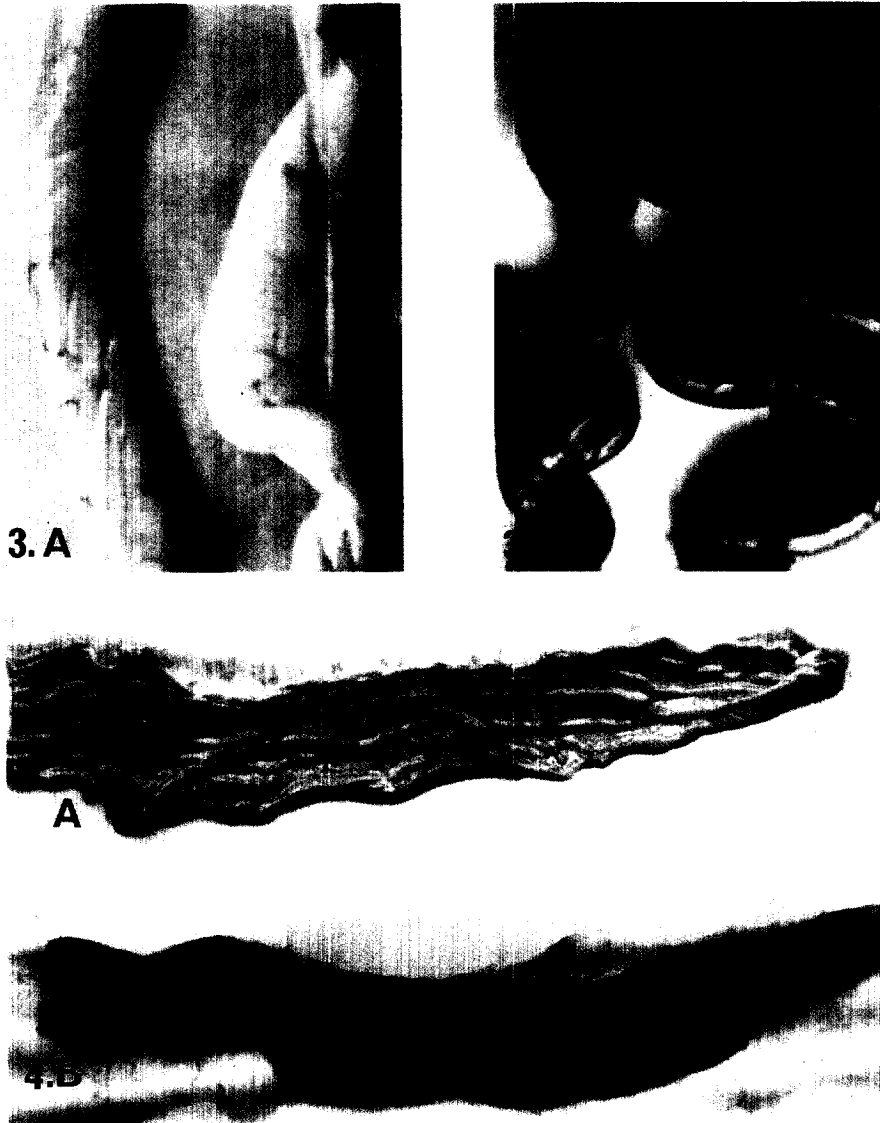
logical lesion with congestion and hemorrhage.

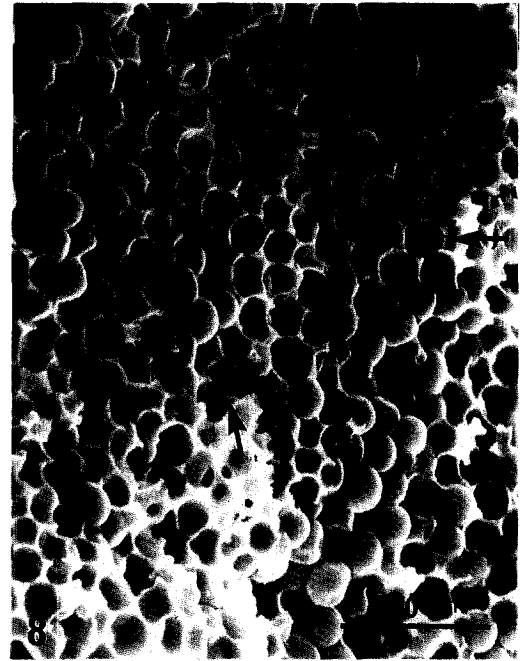
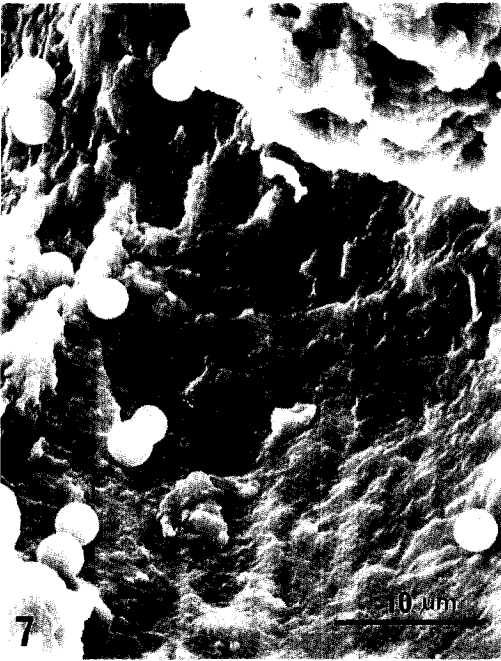
Fig 5. Photomicrograph of the ileum of Calf 2 experimentally infected with *Cryptosporidium parvum* oocysts. Arrows indicate numerous parasites associated with the villous brush border ( $\times 200$ ).

Fig 6. Endogenous stages of *Cryptosporidium parvum* on brush border of the ileum of Calf 2 ( $\times 1,000$ ).

Fig 7. Scanning electron micrograph of endogenous developmental stages of *Cryptosporidium parvum* in the ileum of Calf 2.

Fig 8. Scanning electron micrograph of numerous *Cryptosporidium parvum* in the epithelial cells of the ileum of Calf 2. Arrows indicate hollow spaces from which oocysts were fell off.





### 참 고 문 헌

1. Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol* 1971; 8: 479-484.
2. Meuten DJ, van Kruinigen HJ, Lein DH. Cryptosporidiosis in a calf. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165: 914-917.
3. Morin M, Lariviere S, Lallier R. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can*

*J comp Med* 1976; 40: 228-240.

4. Pohlenz J, Moon HW, Cheville NF, et al. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172: 452-457.
5. Anderson BC. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 178: 982-984.
6. Anderson BC, Hall RF. Cryptosporidial infection in Idaho dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 484-485.

7. Noble TA, Kuttin E, Yakobson B, et al. First diagnosis of bovine cryptosporidiosis in Israel. *Revue Vet* 1982; 39: 10-15.
8. Heine J, Pohlenz JFL, Moon HW, et al. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves mono-inoculated with *Cryptosporidium* species. *J Infect Dis* 1984; 150: 768-775.
9. Peeters JE, Villacorta I, Vanopdenbosch E, et al. *Cryptosporidium parvum* in calves: Kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (Immunoglobulin A [IgA], IgG and IgM) after natural and experimental infections. *Infect Immun* 1992; 60: 2309-2316.
10. Tzipori S, Smith M, Halpin C, et al. Experimental cryptosporidiosis in calves :clinical manifestation and pathological findings. *Infect Immun* 1983; 53: 124-128.
11. Angus KW. Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton. Florida: CRC Press, 1990; 83-103.
12. Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, et al. Cryptosporidia associated with rotavirus and an *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. *Vet Rec* 1980; 106: 458-459.
13. Angus KW. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. *In Practice* 1987; 9: 47-49.
14. 위성환, 강영배, 주후돈 등. 국내 마우스로 부터 분리된 *Cryptosporidium*의 실험용 마우스로의 감염실험. 농사시험연구논문집(가축위생편) 1992; 34: 43-48.
15. 위성환, 이정길, 주후돈 등. 국내 마우스에서 분리된 *Cryptosporidium parvum*의 송아지로의 감염 시험. 기생충학잡지 1992; 30: 259-262.
16. 김행옥, 위성환, 주후돈 등. 마우스, 랫트, 기니피그에 대한 *Cryptosporidium parvum*의 실험적 감염. 한국수의공중보건학회지 1993; 17: 375-380.
17. Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide (DMSO)-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 952-953.
18. Ongerth JE, Stibbs HH. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in western Washington. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1069-1070.
19. Current WL. Cryptosporidiosis. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 1334-1338.
20. Anusz KZ, Mason PH, Riggs MW, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2770-2774.
21. Anderson BC. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet Pathol* 1987; 24: 235-238.
22. Landsverk T. Cryptosporidiosis and the follicle-associated epithelium over the ileal Peyer's patch in calves. *Res Vet Sci* 1987; 42: 299-306.