

# *Neospora caninum* 간접형광항체진단법 개발 및 국내 가축에서의 항체가 조사

조영미 · 강승원 · 최은진 · 정우석 · 윤용덕 · 황우석\*

국립수의과학검역원  
서울대학교 수의과대학\*  
(1998년 1월 28일 접수)

## Development of indirect fluorescent antibody test and the prevalence of the antibody titer for *Neospora caninum* of domestic animal in Korea

Young-mi Cho, Seung-won Kang, Eun-jin Choi, Woo-seog Jeong, Yong-dhuk Yoon, Woo-suk Hwang\*

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-016, Korea  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*

(Received Jan 28, 1998)

**Abstract** : The present study was undertaken to develop the kit for indirect immunofluorescence antibody test(IFAT) and to investigate the prevalence of *N caninum* in cattle and dogs in Korea. The neo-antigen kit of IFAT developed in our laboratory was proved diagnostic efficacy by compared with the kit of veterinary medical reserch and development(VMRD). A survey of *N caninum* infections among cow and dogs in elevn areas of southern part of country was performed using a IFAT. The infection rate of 190 nationwide cattle was 8.4%(16/190) but was 75%(45/60) at P area in Chunnam province where the cattle showed the abortion repeatedly. Any of the dogs was not *N caninum* -positive in the Kangwon and Kyonggi areas.

**Key words** : *Neospora caninum* , Ab titer, IFAT, protozoan parasite.

### 서 론

*N caninum* 은 최근에 밝혀진 원충성 기생충으로 소에

서는 유사산울, 개에서는 상행성 마비, 연하곤란, 턱마비, 근육발육부전 및 심장마비 등을 일으키는 원인체로서 1988년까지 *Toxoplasma gondii* 로 오인받아 왔으나<sup>10</sup>, Dubey *et al*<sup>7-10</sup>에 의해 구조적으로 *T gondii* 와 유사하지

만 다른 기생충으로 규명되어 *N. caninum* 으로 명명되었다<sup>7</sup>. 그 후 미국에서 *N. caninum* 에 대한 역(逆)조사를 실시한 결과, 1957년경부터 이미 다수의 개에서 존재했던 것으로 확인되었으며<sup>8</sup>, 1988년 Dubey *et al.*<sup>7-10</sup>에 의해 감염견으로부터 *N. caninum* 이 최초 분리보고되었다<sup>7</sup>.

*N. caninum* 의 생활환은 현재까지 명확히 규명되지 않았으며, 다만 식육동물들 중 숙주로 하는 톱소플라스마와 동일한 것으로 추측되고 있으며, 생활환 중 tachyzoite와 tissue cyst만이 밝혀진 상태이고 확실한 숙주는 밝혀지지 않았다<sup>10</sup>.

1991년 미국 캘리포니아주에서는 *N. caninum* 을 유우 유사산의 주요 원인체로 인정하여<sup>23</sup> 그 후 *N. caninum* 과 관련지어 유사산을 진단하기 시작하였고, 그 밖의 여러 나라 즉, New Zealand<sup>16</sup>, Mexico<sup>1</sup>, Canada<sup>5</sup> 그리고 South Africa<sup>11</sup>에서 유우 유사산의 주요 원인으로 인정 보고되었다. 이와같이 *N. caninum* 은 경제적 측면에서 유우 유사산의 주요 원인체로 매우 중요시되어, 외국에서는 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 국내에서는 최근까지도 *N. caninum* 에 대한 연구가 극히 초기단계로 활발한 연구가 필요하며 특히 진단법 확립이 시급한 실정이다.

*N. caninum* 의 진단은 H&E 염색 조직표본의 현미경 관찰, 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)<sup>17</sup>, 효소면역항체검사법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)<sup>12</sup>, 간접형광항체검사법(Indirect immunofluorescence antibody test, IFAT)<sup>15</sup>, 면역조직염색법(Immunohistological staining techniques)<sup>13</sup> 등이 이용되고 있다. 이 중에서 간접형광항체검사법은 특이성이 높고 생체검사를 할 수 있다는 잇점 때문에 많이 사용되고 있는 진단법이다.

이에 본 실험에서는 IFAT를 통하여 *N. caninum* 의 혈청학적 진단법을 확립하고 국내에서의 *N. caninum* 에 대한 항체가 조사를 실시하였다.

## 재료 및 방법

공시원충주 : 본 실험에 사용된 *N. caninum* 은 미국 Agricultural research service(ARS)의 J.P. Dubey로부터 NC-1 strain을 분양받아 사용하였다.

원충배양에 사용된 세포주 : ATCC No. CRL 1586인 Africa green monkey kidney(Vero) cell을 사용하였다. 기본배지는 Minimum Essential Medium Alpha Medium( $\alpha$ -MEM, Gibco)으로 하였고, 비동화시킨 5% Fetal bovine serum(FBS,

Gibco)과 100U/ml Penicillin, 40 $\mu$ g/ml Streptomycin을 첨가하였다. 세포배양은 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 공급한 37 $^{\circ}$ C incubator에서 수행하였으며, 배양된 세포가 70~80%의 monolayer를 형성하였을 때 원충 계대에 사용하였다.

원충의 증식 : 원충 계대배지는 기본배지인  $\alpha$ -MEM에 비동화시킨 3% FBS, 2mM L-glutamine, 40 $\mu$ g/ml Streptomycin, 100U/ml Penicillin, 1 $\times$  MEM amino acids solution (Gibco), 1 $\times$  MEM non-essential amino acids solution(Gibco), 1 $\times$  MEM vitamin solution(Gibco)를 첨가하고 7.5% NaHCO<sub>3</sub>를 첨가하여 pH 7.4~7.5로 조정하여 사용하였다. 4 $\times$  10<sup>5</sup>개의 NC-1 tachyzoite를 70~80% monolayer가 형성된 Vero cell에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, incubator에서 배양하였다.

원충의 순수분리 : 배양중인 원충이 증식하여 40~50%가 세포밖으로 유출시 배양세포와 tachyzoite를 scraping하여 centrifuge tube에 수거하였다. 이를 23-gauge 주사기로 back and forth 하여 세포를 파괴시켜 세포내에 존재하는 원충을 유리시켰다. 이를 4 $^{\circ}$ C, 200 $\times$ g로 5분 원심분리한 다음 tachyzoite가 포함된 상층액을 취하여 2000 $\times$ g로 10분 원심하였다. 상층액을 제거한 후 pelleted tachyzoite를 Hank's balanced salts solution(HBSS, Sigma)으로 재부유시켜 위와 동일한 방법으로 3회 원심, 세척하였다. 세척후 원충을 PBS에 재부유시켜 3 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 동일하게 원심하였다. Pelleted tachyzoite를 PBS에 부유시켜 hemocytometer를 이용, 3 $\times$  10<sup>6</sup>/ml 농도로 조정하여 실험에 사용하였다.

항혈청 생산 : 순수분리한 NC-1 tachyzoite를 토끼에 마리당 4 $\times$  10<sup>7</sup>개를 접종하였다. 최초 2 $\times$  10<sup>7</sup>개의 tachyzoite를 정맥내 접종하였고, 그 후 10일 간격으로 1 $\times$  10<sup>7</sup>개의 tachyzoite를 2회 추가 피하접종하였다. 최초 접종 30일후 채혈하여 IFA test로 항체역가를 측정한 후 항혈청으로 사용하였다.

항원준비와 IFAT kit 제작 : 원충의 순수분리에서와 동일하게 원심세척후 PBS로 부유시켜 hemocytometer를 이용하여 3 $\times$  10<sup>6</sup>/ml로 항원을 준비하였다.

준비된 항원을 12-well multispot slide 각각의 well에 3 $\times$  10<sup>4</sup>/ml의 항원을 10 $\mu$ l씩 분주하여 실온에서 건조시켰다. 건조된 slide를 순수한 cold acetone에 10분간 고정시킨 후 건조하여 foil로 포장하고 -70 $^{\circ}$ C에 보관, 실험시마다 꺼내어 사용하였다.

작성된 IFAT의 유용성 검사 : 소 50두의 야외혈청을

본 실험에서 작성한 IFAT kit와 미국 Veterinary medical research and development(VMRD) kit를 구입하여 동일한 조건을 적용 다음과 같이 IFA test를 실시하였다. -70℃ 보관되어 있는 IFAT kit를 꺼내어 실온에서 건조시킨 다음, 실험에 사용하였다. 비동화시킨 가검혈청을 serum diluting buffer( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.19gm,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.22gm, NaCl 8.55gm, bovine serum albumin 10.0mg/l, pH 7.2)로 이진회석하여 각 well당 20 $\mu$ l씩 분주 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 FA rinse buffer( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.85gm,  $\text{NaHCO}_3$  8.4gm, NaCl 2.125gm/l, pH 9.0)로 10분간 세척한 다음, fluorescein-labeled goat anti-bovine IgG를 1:80으로 회석하여 각 well에 20 $\mu$ l 분주한 후 동일하게 반응시켰다. 반응 후 재세척한 다음 mounting buffer 하여 현광현미경으로 관찰하였다. 혈청 회석배율 1:200 이상에서 형광을 발하면 양성으로 판정하였다.

야외적용시험 : 전국의 항체가 조사를 위하여 지역별로 소 190두와 전라도지역의 유사산이 계속되는 A, B 두 목장을 선정하여 각각 소 30두를 채혈하여 공시재료로서 실험에 사용하였다. 강원지역의 동물병원에 내원한 실내견 130두와 경기 포천일대의 방견 120두를 채혈하여 공시재료로서 실험에 사용하였다.

## 결 과

Table 2. Infection rate of *Neospora caninum* in Korea by IFA test

Surveyed districts (country or city)	No. of examined	Ab Titer				Positive	Positive rate(%)
		1:100	1:200	1:400	1:800		
Kangwon	20	-	1	-	1	2	10
Chungbuk	20	1	2	1	-	3	15
Chungnam	20	-	2	-	1	3	15
Chonnam	20	-	-	-	-	-	-
Chonbuk	20	-	-	-	-	-	-
Kyonggi	20	-	-	1	2	2	10
Inchon	10	-	-	-	4	4	40
Kyongnam	20	-	-	-	-	-	-
Pusan	10	-	-	1	2	2	20
Kyongbuk	20	-	-	-	-	-	-
Taegu	10	-	-	-	-	-	-
Total	190	3	5	3	8	16	8.4

작성한 neo-antigen kit의 유용성 검증 : 본 실험에서 생산된 항혈청의 IFA titer는 1:3,200이었으며, 작성한 IFAT kit의 유용성을 검증하기 위해 미국 VMRD kit와 본 실험에서 작성한 kit에 소혈청을 적용하여 검사하여 Table 1과 같은 결과를 나타내었다. 판정일치도를 분석하기 위해 kappa value를 이용, 실험결과를 비교분석한 바, 작성한 kit와 미국 VMRD kit간에 0.896의 kappa value를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Analysis of reproducibility by kappa value

Analysis	VMRD Kit		Total
	Positive	Negative	
Positive	36(a)	0(b)	36(P <sub>1</sub> )
Negative	2(c)	12(d)	14(q <sub>1</sub> )
Total	38(P <sub>2</sub> )	12(q <sub>2</sub> )	50

Kappa value :  $K = 2(AD-BC)/p_1 q_2 + p_2 q_1 = 0.896$ .

전국 지역별 항체가 조사 : 각 지역에서 채혈한 소 190두에 대한 IFAT 실시결과 190두중 혈청 회석배율 1:100 에서 3두, 1:200에서 5두, 1:400에서 3두, 1:800 이상에서 8두가 양성을 나타내었다. 혈청 회석배율 1:200 이상에서 형광을 나타낼 때 양성으로 판정하여, 190두중 16두가 양성으로 판정되어 8.4%의 양성율을 나타내었다 (Table 2).

**Table 3.** Antibody positive rate of *Neospora caninum* in two farms in Chunnam province by IFA test

Farm	No. of examined	Ab Titer				Positive	Positive rate(%)
		1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
A	30	-	4	8	14	26	87
B	30	1	2	11	6	19	63
Total	60	1	6	19	20	45	75

**Table 4.** Antibody positive rate of *Neospora caninum* in Kyonggi province dog by IFA test

Surveyed districts	No. of examined	Ab Titer				Positive	Positive rate(%)
		1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Kangwon	130	-	-	-	-	0	0
Kyonggi	120	-	-	-	-	0	0
Total	250	-	-	-	-	0	0

유사산 지역의 항체가 조사 : *N caninum* 감염에 의한 유사산이 반복되어 발생하는 전남지역의 A, B 두 목장의 소, 각 30두를 항체조사한 결과 A목장은 30두중 26두가, B목장은 30두중 11두가 양성을 나타내어 각각 87%와 63%의 항체 양성율을 나타내었다. 또한 총 60(45/60)두중 혈청희석배율 1:200이상에서 45두, 1:400 이상에서 39두, 1:800 이상에서 20두가 양성을 나타내어 75%의 항체 양성율을 보였다(Table 3).

개에서의 항체가 조사 : 강원지역의 동물병원에 내원한 실내견 130두와 경기도 P지역 일대의 방견 120두에 대한 항체가 조사결과 모두 음성을 나타내었다(Table 4).

## 고 찰

*N caninum* tachyzoite는 감염된 동물의 axon, schuwann cell, neuron, ependymal cell, retinal cell, astrocyte 등의 신경세포, 대식세포, 섬유아세포, 혈관내피세포, 뇨세관상피세포 및 간세포 등의 세포질에서<sup>4,6,7,9,14</sup>, tissue cyst는 뇌, 척수, 망막<sup>7,8</sup>과 같은 조직에서 발견되므로 진단상의 제한이 많아 간편하고 생체검사가 가능한 진단방법이 요구되어 본 실험에서는 간접형광항체검사를 실시하고자 IFAT kit를 작성하였다. 작성한 kit의 유용성을 검증하기 위하여 미국 VMRD kit와 본 실험에서 작성한 IFAT kit에 소 50두의 혈청을 각각 적용하여 비교 검사

하였다. 판정일치도 분석시 일반적으로 사용되는 kappa value의 해석은 0.75 이상이면 일치도 아주 좋음(excellent), 0.45 이상 0.75 미만이면 일치도 좋음(fair or good), 0.45 미만시 일치도 낮음(poor)으로 판정한다<sup>18</sup>. 소 가검혈청 50두의 판정일치도 분석결과 혈청희석배율 1:200 이상에서 kappa value가 0.896으로 나타나 아주 좋은 일치도를 보였다. 따라서 본 실험에서 작성, 실험한 간접형광항체검사법으로 혈청학적 진단이 가능한 것으로 규명되었다. 이에 전국지역별 소에서의 *Neospora* 항체가를 조사한 결과 8.3%의 양성율을 나타내었다. 이는 *N caninum* 원충분리는 아직까지 되지않았으나 현재 우리나라에 감염되어 있는 것으로 확인할 수 있었다. 또한 전남지역의 유사산이 계속되는 A, B 두목장의 경우 항체가 검사결과 각각 87%, 63%의 감염율을 보였으며, 총 75%의 감염율을 나타내어(Table 3) 전국지역별 항체양성을 8.3%에 비교하여 매우 높음을 알 수 있었다. 이에 *Neospora*에 의한 반복 유사산의 피해를 확인할 수 있었다. 강원도 지역의 동물병원에서 수집한 실내견 130두와 경기도 P지역의 방견 120두의 항체가 조사결과 모두 음성을 나타내어 이것으로 우리나라 개에서의 *Neospora* 감염여부를 확인할 수 없었다. 이는 조사지역이 좁고 검사견수도 적어 더욱 조사하여 볼 필요가 있겠으나 국내견에서의 *Neospora*에 의한 피해는 아직까지 확인할 수 없었다. 이로써 국내 소 사육농장에서의 *Neospora*에 의한 피해가 확인되

었으나 그 피해정도와 발생범위, 발생시기 등에 대한 조사는 이번 시험에서 수행되지 않았으므로 앞으로 더욱 많은 연구가 요구되고 있다.

## 결 론

간접형광항체법(IFAT)을 개발하여 *N. caninum*의 혈청학적진단법의 이용가능성과 국내 11개 지역 가축에서의 항체가 조사를 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제작한 IFAT kit와 미국 VMRD kit로 IFAT를 실시한 검사결과를 비교분석하여 판정 일치도에 유의성이 있음을 규명하였다.
2. 국내 11개 지역의 소 190두에 대한 *N. caninum* 항체가 조사결과 8.4%(16/190)의 양성율을 나타내었다.
3. 유사산이 반복되어 일어나는 경기 P지역의 소 60두에 대한 *N. caninum* 항체가 조사결과 75%(45/60)의 높은 양성율을 나타내어 *Neospora*에 의한 피해를 확인할 수 있었다.
4. 경기도와 강원도 지역의 개 250두에 대한 *N. caninum* 항체가 조사결과 양성반응을 나타내는 개체를 발견할 수 없어 개에서의 피해는 극히 낮은 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Abbit B, Craig TM, Jones LP, et al. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. *J Am Vet Assoc*, 203:444-448, 1993.
2. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, et al. Neospora-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 198:241-244, 1991.
3. Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, et al. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol*, 28:110-116, 1991.
4. Bjerkas I, presthus J. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 97:459-468, 1989.
5. Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, et al. Bovine neonatal encephalitis associated with a *Neospora* pro-

- tozoan. *Can Vet J*, 35:111-113, 1994.
6. Cumming JF, de Lahunta A, Suter MM, et al. Canine protozoan polyradiculoneritis. *Acta Neuropathol*, 76:46-54, 1988.
7. Dubey JP, Carpenter CA, Speer MJ, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J AM Vet Med Assoc*, 192:1269-1285, 1988.
8. Dubey JP, Koestner A, Piper RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 197:857-860, 1990.
9. Dubey JP, Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res*, 50:1578-1579, 1989.
10. Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. *Parasitology Today*, 9:452-458, 1993.
11. Jardin JE, Dubey JP. Canine neosporosis in South africa. *Vet Parasitol*, 44:291-294, 1992.
12. Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. Evaluation of *Neospora caninum* recombinant antigens for USR in an Enzme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3:275-279, 1996.
13. Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res*, 50:1981-1983, 1989.
14. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool*, 36:458-463, 1989.
15. Wounda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol*, 83:545-547, 1997.
16. Wounda W, van den Ingh TSGAM, Van Knapen F, et al. Neospora abortus bij het rund in Nederland. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 117:599-602, 1992.
17. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of Experimentally infected nude mice by the polymerase chain Reaction (PCR). *J Parasitol*, 82:272-279, 1996.
18. 안윤옥 외 3인. 실용의학통계론. 서울대학교 출판부, 서울:142-145, 1989.