

중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 고양이 혈액내에서의 *Toxoplasma gondii* 검출에 관한 연구

서명득·주보현

경상대학교 수의과대학
(1999년 8월 19일 접수)

Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in the blood of cats

Myung-deuk Suh, Bo-hyun Joo

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Aug 19, 1999)

Abstract : This study was conducted to detect the toxoplasma-specific DNA in peripheral blood collected from cats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* (RH strain) and from domiciled cats by B1 gene-base polymerase chain reaction(PCR). The sensitivity of oligonucleotide primer, T-1 & T-2, designed from toxoplasma B1 gene amplification method was compared with parasite detection by mouse inoculation(MI). And also, latex agglutination test(LAT) and indirect fluorescent antibody test(IFAT) were conducted to detect the fluctuation of serum antibodies compared with the detection of toxoplasma by PCR and MI.

Toxoplasma B1 gene PCR was shown consistently high sensitivity and the results obtained by PCR agreed completely with those from MI. All blood samples collected before infection with *T gondii* gave negative results by PCR and MI. Also, toxoplasma B1 gene PCR was not cross reaction with *Neospora caninum* DNA and normal cat leucocyte as controls.

The toxoplasma-specific DNA was detected by PCR in blood of 5 cats experimentally infected with *T gondii* 6 days after infection and the detection of this specific-DNA was long lasted in blood for 64 days after infection.

The detection of toxoplasma-specific DNA by PCR could be identified as few as 10 tachyzoites and the isolation of *T gondii* by MI could be isolated as few as 1 tachyzoite from tenfold serial dilution of *T gondii* with normal cat blood, respectively.

In healthy domiciled cats, the toxoplasma-specific DNA and the parasite were detected and isolated in blood from 3 of 56(5.3%) cats by both PCR and MI, respectively. In the results of

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단연구지원비(자유공모과제)에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Myung-deuk Suh, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

antibody test from the total 56 heads of healthy domiciled cats, the positive rates are 15(26.7%) by LAT and 19(33.9%) by IFAT.

These results suggest that PCR detection of toxoplasma can be applied as a sensitive and specific diagnostic and research tool.

Key words : *Toxoplasma gondii*, PCR, cat, B1 gene, LA test, IFA test.

서 론

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 거의 모든 온혈동물과 조류를 중간숙주로 하는 원충으로 전세계에 걸쳐 분포하며 동물과 사람에서는 톡소포자충증(toxoplasmosis)을 일으키는 인수공통 감염병의 하나이다^{1,2}. 사람이 톡소포자충에 감염되었을 때에는 대부분의 경우 무증상으로 내과하거나 경미한 증상을 일으키는 것이 보통이다. 그러나 임신부가 감염되었을 경우 태반감염에 의한 신생아의 기형 또는 유·사산이 일어날 수 있으며 특히 장기이식 환자, 암 환자 그리고 후천성 면역결핍증(AIDS) 환자 등이 감염되었을 때에는 치명적인 결과를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁻³. 특히 가축중 돼지와 양에서는 유·사산을 일으켜 경제적인 손실이 가장 큰 것으로 알려져 있다^{1,2}. 톡소포자충은 고양이와 종숙주이며 고양이 체내의 생활사는 *Isospora phase*와 *Toxoplasma phase*로 이루어지는 것으로 알려져 있으며 대부분의 경우 분변과 함께 배설되는 톡소포자충의 oocyst를 통하여 동물이나 사람에게 감염되거나 또는 감염동물의 근육이나 유즙을 섭취함으로써 전파가 이루어지며 감염된 고양이는 특이한 임상증상이 나타나지 않아 진단에 어려움이 있다^{1,2,4}.

현재까지 동물이나 사람에서 톡소포자충증을 진단하는데 이용되고 있는 방법은 주로 혈청학적 진단법으로 색소시험법(dye test)⁵, 간접형광항체법(IFA)^{6,7}, Latex 응집반응(LAT)⁸, 효소표지면역검사법(ELISA)^{9,10} 등이 알려져 있으나 이러한 혈청학적 진단법은 어디까지나 역학적인 추정진단법으로 이용될 뿐 현증이나 확진을 위한 진단법으로의 가치는 유보될 수 밖에 없다. 이와같은 이유로 ELISA를 이용한 생체중의 항원검출법¹¹과 단클론성 항체를 이용한 혈액중 항원검출법¹²이 개발되었으나 이들 방법은 확진율을 높일 수 있는 방법이긴 하지만 교차반

응에 의한 의양성 반응의 제거와 단클론성 항체생산에 시간과 비용이 많이 소요되는 것이 단점으로 지적되고 있다.

Burg *et al*¹³은 톡소포자충의 genome 내에 있는 B1 gene이 톡소포자충에 높은 특이성을 가지고 있으며 이 gene은 strain간의 교차 보존성이 높아 PCR에 유용하게 사용될 수 있다고 하였으며 이 B1 gene을 이용한 PCR은 면양¹⁴과 말¹⁵ 그리고 고양이¹⁶에서 톡소포자충을 진단하는데 유용하게 이용될 수 있다고 보고되어 있다. 이와같이 최근에는 분자생물학 분야의 연구가 급속하게 이루어짐에 따라 수의학 분야에서도 이에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

따라서 본 실험에서는 톡소포자충의 종숙주인 고양이를 모델로 PCR에 의한 톡소포자충의 진단기법을 개발코져 고양이에게 톡소포자충을 실험적으로 감염시키고 급성기의 혈액중 톡소포자충의 검출을 시도하였으며 사육되는 고양이를 대상으로 혈청학적 검사 및 PCR로써 톡소포자충을 진단하고자 하였다.

재료 및 방법

공시원충주 : 수의과학검역원으로부터 분양받은 *Toxoplasma gondii* RH주를 마우스의 복강에 연속 계대하면서 시험에 사용하였다.

공시동물 : 생후 10주령 이상된 고양이를 일반 백신과 구충제를 투여한 후 6주간 관찰하고 LAT와 분변검사에서 톡소포자충 감염 음성인 고양이를 선발하여 사용하였고 마우스는 생후 4주령 이상된 BALB/c 마우스를 사용하였다.

고양이의 인공감염 : 2×10^6 개의 톡소포자충 tachyzoite를 마우스 복강내로 접종한 후 4일째 폐사직전의 마우스를 고양이에게 경구적으로 섭취케 하여 감염시켰다. 인

공감염 고양이로부터 혈액채취는 2일 간격으로 그리고 혈청은 1주일 간격으로 채취하여 사용하였다.

Oocyst 검사 : 고양이의 분변중 oocyst 분리는 인공 감염후 2일 간격으로 분변을 채취하여 Dubey¹⁷의 sucrose solution centrifuge 법을 준용하여 수행하였다. 5g의 분변을 15ml의 tap water에 부유시킨 후 100mesh 동망체에 여과하여 이물을 제거한 다음 400g에서 5분간 원심한 후 상층액을 제거하고 침전물에 sucrose solution(SP;1.237)을 가하여 80g에서 10분간 원심한 후 맨 윗층의 상층액을 dropper로 흡인하여 슬라이드 글라스에 놓은 다음 cover slip을 덮어 광학현미경으로 oocyst를 검사하였다.

PCR에 의한 primer의 특이성 : PCR에 사용된 primer T-1과 T-2의 특이성은 다음과 같은 대조군을 설정하여 조사하였다. 마우스 복강에서 채취된 톡소포자충의 tachyzoite를 멸균 PBS(pH 7.2)에 3회 원심·세척하고 27G 주사침에 수회 통과시켜 마우스 복강세포와 원충을 분리하였다. 마우스 복강세포를 제거하고 원충을 순수 분리하기 위해 polycarbonate membrane(pore size, 3.0µm; Costar)에 여과하여 순수분리한 톡소포자충을 양성 대조군으로 사용하였다. 대조용 백혈구는 LAT에서 항체음성인 고양이의 혈액을 Histopaque 1077(Sigma)을 사용하여 백혈구만을 분리하여 멸균 PBS(pH 7.2)로 3회 세척한 후 음성 대조군으로 하였다. 음성 대조군인 *Neospora caninum*은 수의과학검역원으로부터 genomic DNA를 분양받아 PCR을 수행하였다.

혈액으로부터 toxoplasma genomic DNA 추출 : DNA의 분리는 Wastling *et al*¹⁴의 방법을 준용하여 다음과 같이 수행하였다. 즉, heparin 처리된 혈액은 Histopaque 1077(Sigma)을 이용하여 buffy coat만을 수집하였다. 400µl의 K buffer[10mM Tris(pH 7.4), 150mM NaCl, 0.5% SDS]에 protease K(Sigma)를 100µg/ml 농도로 첨가하여 앞에서 수집한 buffy coat에 가한 후 50℃에서 2시간동안 반응시켰다. 여기에 동량의 phenol/chloroform을 첨가하여 vortex 하고 15,000rpm에서 5분간 원심한 후 상층액을 분리하였으며 이와같은 과정을 2회 반복하였다. 최종 수거된 상층액에 1/10 용량의 3M sodium acetate와 2.5배 용량의 absolute ethanol을 가한 후 -70℃에서 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% cold ethanol로 세척하고 공기중에서 건조시킨 후 50µl의 TE buffer(pH 8.0)에 재부유시켜 -20℃에 보관하면서 시험에 사용하였다. 양성 대조군과 음성 대조군도 위와 동일한 방법으로

DNA를 분리하여 PCR에 사용하였다.

PCR의 수행 : 본 실험에 사용한 primer는 Stiles *et al*¹⁶가 설계한 B1 gene-base primer로 (주)바이오니아에서 합성 정제한 21bp의 sense primer T-1(5'-GGAACCTGCATC-CGTTTCATGAG -3')과 20bp의 antisense primer T-2(5'-CA-GACGAATCACGGAAGT -3')를 사용하였다. 추출한 template DNA 10µl를 PCR용 tube에 취하고 10×의 PCR buffer [100mM Tris(pH 9.0), 500mM KCl, 1% Triton X-100], 0.1µM의 primer T-1과 T-2, 2.5mM의 MgCl₂, 250µM의 dNTP (Takara) 그리고 1.0U의 *Taq* polymerase(Takara)를 가한 후 총량이 50µl가 되도록 3차 증류수를 가하여 PCR 분석시료로 사용하였다. PCR 분석기기는 PTC-100(MJ Reserch, Inc.)을 사용하였으며 시료의 증폭과정은 먼저 94℃에서 4분간 가열하여 변성을 유도하고 94℃에서 1분간의 denaturation, 52℃에서 1분간의 annealing 그리고 72℃에서 1분간의 extension의 3단계로 총 35회 반복하였으며 72℃에서 8분간 더 extension을 실시하였다. 증폭산물을 확인하기 위하여 PCR product 10µl를 6× gel loading dye(Promega)에 혼합하였고 Ethidium bromide를 0.5µg/ml의 농도로 첨가한 1.2% agrose gel에 전기영동한 후 UV transilluminator 상에서 자외선을 조사하여 증폭산물을 확인하였다.

PCR의 민감성 : 톡소포자충 tachyzoite가 고양이 혈액 1ml중 10⁷개가 함유되도록 한 것을 원액으로 하여 10¹개까지 단계희석한 후 각 희석단계별의 tachyzoite 검출여부를 PCR과 마우스접종법(MI)으로 비교하였다. MI법에 공시된 동물은 4주령된 BALB/c 마우스로 각 희석단계별로 1회에 2마리씩을 사용하여 tachyzoite를 복강내에 접종하였으며 1차 접종후 폐사되거나 tachyzoite가 확인되지 않았을 때에는 4일 간격으로 3회까지 blind passage한 후 마우스의 폐사 또는 tachyzoite 검출(확인)여부에 따라 최종 한계치(희석배수)를 결정하였다.

Latex 응집반응(LAT) : LAT에 사용된 항원(진단액)은 서 등⁸의 방법에 따라 U자형 microplate의 각 홈에 혈청희석용 희석액[0.1M Tris(pH 7.4), 300mM NaCl, 0.5% BSA, 0.01% Tween-20] 25µl씩을 분주하고 피검혈청을 혈청 희석배수 1 : 4에서 1 : 2,048까지 2배 단계희석하였다. 여기에 제조된 진단액을 각 홈에 25µl씩 분주하여 가볍게 진탕시킨 후 실온에서 하룻밤 정제시켜 응집상을 관찰하였다. 반응의 판독은 응집상이 가장 강하게 나타나는 것을 3으로 하여 2, 1, 0.5 및 0의 순으로 하였으며 혈청 희석배수 1 : 64 또는 그 이상을 양성으로 판정하였다.

간접 형광항체법(IFAT) : Flechter⁷와 Duram과 Colvin⁶의 방법을 이용하여 톡소포자충 감염 마우스 복강액을 채취한 후 1,500rpm에서 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하고 톡소포자충 tachyzoite가 1μ당 300개가 함유되도록 1% formalinized-PBS(pH 7.2)에 부유시켜 하룻밤 고정시킨 다음 슬라이드 글라스에 에나멜로 구획하고 각 구획에 고정시킨 톡소포자충 부유액을 1μ씩 도말하여 실온에서 건조시킨 후 -70℃ 냉동고에 보관하면서 항원으로 사용하였다. 반응은 혈청을 1:32로 희석하여 37℃ incubator에서 항원과 30분간 반응시킨 후 1:50으로 희석한 FITC conjugate (rabbit anti-cat IgG, Sigma)를 가하여 30분간 반응시킨 다음 형광현미경으로 관찰하여 양성과 음성으로 판정하였다.

집 고양이로부터 *T gondii*의 검출 : 진주지역에서 사육되고 있는 56두의 고양이를 대상으로 혈액과 혈청을 무균적으로 채집하여 PCR과 MI법으로 총체 검출을 시도하였고 동시에 LAT 과 IFAT를 이용하여 혈청학적 조사를 실시하였다.

결 과

톡소포자충 감염 고양이 분변으로부터 oocyst 분리 와 PCR에 의한 혈액중 총체 특이 DNA 검출 : 분변중의 oocyst는 감염후 12일째 1마리에서, 14일째부터 22일째까지는 5마리 모두에서, 24일째에는 3마리 그리고 26일째에는 1마리에서 분리되었으며 26일 이후에는 분리할 수 없었다(Fig 2). Primer T-1과 T-2를 이용한 감염 고양이의 혈액에 대한 PCR에서는 감염후 6일째부터 총체의 특이 DNA가 검출되기 시작하여 12일째부터 48일째까지 전 개체에서 확인할 수 있었으며 이후 50~54일째까지는 3마리에서, 54일~62일째까지는 2마리에서 그리고 64일째에는 1마리에서 총체의 특이 DNA를 확인할 수 있었다(Fig 1, 2). 한편 대조군인 *Neospora caninum*(Lane 11)과 normal cat leucocyte(Lane 12)에서는 특이반응이 없었으며 음성 대조군(Lane 13)에서도 위양성 반응이 없음을 확인할 수 있었다.

톡소포자충 감염 고양이에 대한 LA와 IFA 항체가의 변화 : 인공감염 고양이에 대한 LAT와 IFAT에 의한 항체가의 변화를 측정된 결과는 Fig 3에서와 같이 IFAT에서는 접종 2주째부터 양성반응이 나타나기 시작하여 감염 6주째까지 급속히 증가하여 6주째에 최고 항체가 1:

Fig 1. Detection of *T gondii* specific-DNA by PCR from experimentally infected cat blood. M : 1kb DNA ladder. Lane 1~5 : 2, 8, 16, 24, 32 days after infection, respectively. Lane 6~10 : 40, 48, 53, 60, 68 days after infection, respectively. Lane 11 : *Neospora caninum*, Lane 12 : normal cat leucocyte, Lane 13 : no template DNA(negative control), Lane 14 : positive control.

Fig 2. Detection of oocyst by fecal examination and toxoplasma specific-DNA by PCR from the blood of 5 cats experimentally infected with *T gondii*.

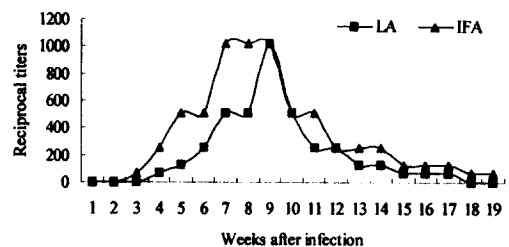


Fig 3. Fluctuation of antibody titer in cat experimentally infected with *T gondii* by LAT and IFAT.

1,024를 보인 후 8주째까지 이 역가가 유지되었으며 그 이후로부터 점차 감소하였으나 감염 18주째까지 양성반응을 보였다. LAT에 의한 항체가의 변화는 감염 3주째부터 양성반응을 보였으며 점차 증가하여 감염 8주째

에 최고 항체가 1:1,024를 나타내었고 그후 점차 감소하였으나 감염 16주째까지는 양성반응을 나타내었다.

톡소포자충 감염 고양이에서 항체가의 변화에 따른 총체 특이 DNA 검출의 변화 : 항체가의 변화에 따른 분변중 oocyst 검출과 혈액중 총체 특이 DNA 검출의 관계를 조사한 성적은 Fig 4에서와 같이 총체 특이 DNA는 항체가 상승하기전 감염초기 1주째부터 검출되기 시작하여 10주째까지 검출이 가능하였으며 oocyst는 항체가 상승하기전 2주째부터 배출되기 시작하여 4주째까지 지속되었으나 혈중 항체가가 상승하여 최고치에 도달하기 전인 4주째 이후부터는 검출되지 않았다.

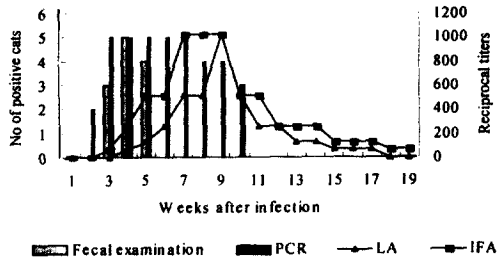


Fig 4. Comparison of results by PCR, fecal examination and serological tests in 5 cats experimentally infected with *T gondii*.

PCR과 MI법에 의한 톡소포자충 검출효과 비교 : 고양이 혈액 1ml당 톡소포자충 tachyzoite를 10^7 개부터 10^1 개까지 10배 단계희석하여 PCR에 의한 각 희석단계별 총체 특이 DNA 검출효과와 동일한 각 희석단계별 희석액을 각각 마우스에 접종한 후 총체의 분리효과를 비교한 성적은 Fig 5에서와 같이 PCR에서는 10개/ml의 총체까지 검출되었고 MI법에서는 3대까지 blind passage한 결과 1개의 총체까지도 분리할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Comparison of toxoplasma specific DNA detection by PCR and isolation of toxoplasma by mouse inoculation with serial dilution of *Toxoplasma gondii* in blood of cat

| No of tachyzoite | Detection of parasite | | | | | | | |
|------------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 | 10^1 |
| 1st passage | + | + | + | + | - | - | - | - |
| MI 2nd passage | ND | ND | ND | ND | + | + | + | - |
| 3rd passage | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | + |
| PCR | + | + | + | + | + | + | + | - |

MI: mouse inoculation, ND: Not did.

Fig 5. Detection limit of toxoplasma specific-DNA by PCR from the blood of cat.

M: 1kb DNA ladder, Lane 1~8: tenfold serial dilution of toxoplasma tachyzoite, Lane 1: 10^7 , Lane 2: 10^6 , Lane 3: 10^5 , Lane 4: 10^4 , Lane 5: 10^3 , Lane 6: 10^2 , Lane 7: 10^1 , Lane 8: 10^1 , Lane 9: *Neospora caninum*, Lane 10: normal cat leucocyte, Lane 11: no template DNA(negative control), Lane 12: positive control.

집 고양이에 대한 톡소포자충의 항체 보유율과 PCR에 의한 특이DNA 검출 : 집에서 사육된 고양이 56두를 대상으로 하여 LAT와 IFAT에 의한 톡소포자충 항체 보유율과 PCR에 의한 혈액중 총체 특이 DNA 검출율을 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 LAT에서는 56두중 15두(26.7%)가 양성이었다고 IFAT에서는 19두(33.9%)가 양성이었다. MI법으로는 3두(5.3%)에서 톡소포자충이 분리되었다. LAT에 의한 항체역가별 분포는 1:64에서 10두, 1:128에서 3두 그리고 1:256와 1:512에서는 각각 1두이었다. IFAT의 항체 역가별 분포는 1:32에서 2두, 1:64에서는 8두, 1:128에서 7두 그리고 1:256와 1:512에서 각각 1두이었다. 56두의 고양이에서 채취한 혈중에서의 PCR에 의한 특이 DNA는 3두(5.3%)에서 검출되었다. PCR에 의한 특이 DNA 검출과 MI법으로 톡소포자충이

Table 2. Antibody titer in sera and detection of *T gondii* in blood collected from domiciled cats

| Cat ID | Antibody titer | | Parasite | | Cat ID | Antibody titer | | Parasite | |
|--------|----------------|-----|----------|----|--------|----------------|-----|----------|----|
| | LA | IFA | PCR | MI | | LA | IFA | PCR | MI |
| 1 | - | - | - | - | 29 | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | 30 | 64 | 128 | - | - |
| 3 | - | - | - | - | 31 | - | - | - | - |
| 4 | - | 32 | - | - | 32 | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | 33 | 128 | 128 | - | - |
| 6 | - | 64 | - | - | 34 | - | - | - | - |
| 7 | - | 32 | - | - | 35 | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | 36 | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | 37 | - | - | - | - |
| 10 | - | 64 | - | - | 38 | 512 | 512 | + | + |
| 11 | - | - | - | - | 39 | 64 | 64 | - | - |
| 12 | - | - | - | - | 40 | - | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | 41 | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | 42 | 64 | 64 | - | - |
| 15 | - | - | - | - | 43 | 64 | 128 | + | + |
| 16 | 64 | 128 | - | - | 44 | - | - | - | - |
| 17 | - | - | - | - | 45 | - | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | 46 | 64 | 64 | - | - |
| 19 | - | - | - | - | 47 | - | - | - | - |
| 20 | 64 | 64 | + | + | 48 | - | - | - | - |
| 21 | 128 | 128 | - | - | 49 | - | - | - | - |
| 22 | - | - | - | - | 50 | - | - | - | - |
| 23 | 256 | 256 | - | - | 51 | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | 52 | 128 | 128 | - | - |
| 25 | - | - | - | - | 53 | - | - | - | - |
| 26 | 64 | 128 | - | - | 54 | - | - | - | - |
| 27 | 64 | 64 | - | - | 55 | 64 | 64 | - | - |
| 28 | - | - | - | - | 56 | - | - | - | - |

MI: Mouse inoculation.

분리된 3두는 LAT와 IFAT에서 모두 양성이었다고 동일한 개체에서 총체 특이 DNA와 특소포자충이 분리되었다.

고 찰

특소포자충의 급성 감염기에는 tachyzoite형이 증식하여 림프관과 혈류를 통해 여러 조직과 장기에 전파되어 분비물과 배설물에서 항원 혹은 원충의 증명이 가능하므로 이 시기에는 가검재료를 마우스에 접종하여 총체를 분리해내는 마우스접종법(MI)이 가장 신뢰할 수 있는 방법이다¹⁸. 특소포자충의 감염을 증명하는 방법으로는 MI법과 세포배양법이 유리하나 이들 방법은 동물사육 시설이나 특수기법을 이용해야 하는 등 여러가지 어려움이 있고 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다¹⁹. Lappin *et al*¹¹은 ELISA를 이용하여 급성 감염기의 혈중 항원을 검출함으로써 특소포자충의 증명이 가능하다 하였으나 이 역시 감염후 시간이 경과함에 따라 혈액중 IgG가 증가하여 면역복합체가 형성되므로 진단효율이 떨어지는 단점이 있다고 하였다.

최근에 와서 PCR을 이용한 특소포자충증 진단법은 특소포자충의 일부 DNA를 시편관내에서 연쇄적으로 증폭시킨 후 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출해내는 방법으로 거의 100%의 특이성을 보여주고 있다¹³⁻¹⁶. PCR에 의한 특소포자충의 진단에 많이 사용되고 있는 primer는 30kDa 단백질 유래의 P30과 특소포자충 genome 내의 B1 gene이다^{13,14}. Burg *et al*¹³은 primer로써 특소포자충 genome내의 B1 gene을 이용하여 PCR을 수행한 성적에서 B1 gene이 특이성과 민감성이 우수하여 이를 이용한 PCR 기법이 특소포자충 진단에 유용하게 이용될 수 있다고 하였으며 Wastling *et al*¹⁴은 B1 gene과 P30을 primer로 하여 양자의 진단효과를 비교하였던 바 B1 gene은 P30에 비하여 위음성(false negative)을 50% 정도 감소시킬 수 있고 또한 높은 민감성을 가지고 있어 기존의 진단법으로 이용되고 있는 MI법과 비슷한 진단효과를 가져올 수 있다고 하였다.

이 실험에서는 고양이에 특소포자충 tachyzoite를 인공 감염시킨 후 B1 gene 유래의 primer T-1과 T-2를 사용하여 PCR에 의한 급성 감염기의 특소포자충 분리를 시도하였던 바 감염후 6일째부터 64일째까지 혈액중의 총체 특이 DNA를 검출할 수 있었고 *Neospora caninum* 과 고양이 백혈구와는 반응하지 않는 것으로 보아 이 primer

의 특이성을 인정할 수 있었다. 한편 증폭된 DNA나 template DNA의 오염에 의한 위양성(false positive)의 출현 여부를 조사코져 PCR mixture에 template DNA 대신 증류수를 첨가한 mixture를 음성 대조군으로 한 시험에서도 위양성의 출현을 인정할 수 없었다.

Beutler *et al*²⁰은 항응고제로써 heparin과 EDTA를 사용할 경우 이들 성분은 적혈구내의 heme 성분과 함께 PCR의 민감성을 떨어뜨린다고 하였으며 Higuchi²¹는 heme과 porphirin이 Taq polymerase의 활성효과를 떨어뜨려 PCR의 민감성을 감소시킨다 하였다. 한편 Stiles *et al*¹⁶은 고양이의 혈액을 10배 단계 희석하여 PCR을 수행한 결과 1ml당 특소포자충 tachyzoite가 100개 이상 함유되었을 때 DNA band를 검출할 수 있었다고 하였으나 본 성적에서는 10개 이상일 때도 검출할 수 있었다. 이와같은 결과는 PCR에 사용할 genomic DNA의 추출에서 Stiles *et al*¹⁶의 방법과는 달리 EDTA를 사용하여 채취한 혈액을 그대로 사용하지 않고 Histopaque를 이용한 농도구배 원심분리로 buffy coat만을 분리하여 2회의 phenol 추출을 한 genomic DNA를 PCR에 사용함으로써 반응억제요소들을 최소화한 데에 기인된 것으로 생각된다.

Lappin *et al*¹¹은 ELISA 법으로 특소포자충을 인공 감염시킨 고양이의 혈액중 항원검출실험에서 감염 42일째 이후에는 항원 검출율(양성율)이 저하된다고 보고하였다. 본 성적에서도 PCR에 의한 혈액중의 총체 특이 DNA 검출은 개체에 따라서는 감염 48일째 이후에는 검출이 불가능한 경우도 있었지만 대부분의 개체에서는 64일째까지 검출이 가능하였다. 이와같은 결과는 Lappin *et al*¹¹의 주장과 일치하는 것으로 생각되나 PCR에 의한 총체 특이 DNA 검출은 감염후 64일째까지도 가능하므로 ELISA 법에 비하여 진단효과가 높은 것으로 생각된다.

Lappin *et al*¹¹은 bradyzoite를 고양이에 인공감염시켰던 바 감염후 5일째부터 13일째까지 분변중의 oocyst 검출이 가능하였고 Frankel²²도 tachyzoite, bradyzoite 및 oocyst를 각각 고양이에 인공감염시켰던 바 tachyzoite 감염에서는 18일째부터 32일째까지, bradyzoite 감염에서는 3일째부터 14일째까지 그리고 oocyst의 감염에서는 21일째부터 48일째까지 분변중의 oocyst 검출이 가능하다고 하였다. 본 성적과 이들의 성적으로 미루어 보아 oocyst가 고양이 분변중에 출현하는 시기는 인공감염시 특소포자충의 발육단계(형태)에 따라 다양하게 나타날 수 있는 것으로 생각된다.

Lappin *et al*⁹은 ELISA에 의한 혈중 항체의 증명은 감염의 증거는 될 수 있으나 톡소포자충 감염초기나 급성 감염기에는 항체의 증명이 불가능하며 충체가 혈액중에서 조직이나 장기로 이행하여 만성기를 경과한 후에도 장기간 혈중 항체가 유지됨으로 ELISA 법으로는 급성기의 진단은 어렵다고 하였으며 Chavkin *et al*¹⁰도 항체의 증명만으로는 확진이 어렵다 하였다. 본 성적에서도 감염초기 약 3주간은 항체의 유의한 증가를 보이지 않아 조기진단에 어려움이 있었다. 서 등²³과 Waltman *et al*²⁴은 ELISA 법에 의한 톡소포자충 인공감염 돼지의 항체 증명에서 감염후 2주째부터 양성반응을 보여 6주째에 최고치에 도달한다고 하였으며 Lappin *et al*¹⁵은 인공감염 고양이에서 IgG 항체는 3주째부터 양성반응을 나타낸다고 하였다. 이들의 성적증 후자는 본 실험성과 일치하였으나 전자와는 차이가 있었는데 이는 돼지와 고양이라는 동물간의 개체 차이에 따른 것으로 생각된다.

톡소포자충의 혈청학적 진단에서는 혈중 IgG 또는 IgM 항체를 검출함으로써 진단이 가능하나 rhuematoid factor(RF)와 anti-nuclear antibodies(ANA)가 존재할 때에는 위양성(false positive)이 나타날 수 있는 경우도 있다⁹. 그러나 PCR을 이용할 경우에는 이러한 요인들을 배제할 수 있어 위양성 반응을 감소시킬 수 있고 특히 PCR 기법은 톡소포자충의 급성 감염기이거나 감염초기의 진단에 유용하게 이용될 수 있다고 믿어진다.

Derouin *et al*¹⁹과 Hitt 와 Filice²⁵는 톡소포자충증의 급성 감염기 확진을 위해서는 MI법이 가장 확실한 진단법이라고 하였다. 저자의 성적에서도 MI법은 10⁷개의 충체까지도 감염을 확인할 수 있어 민감한 진단법으로 인정되나 이 방법은 마우스 사육시설의 완비와 blind passage 등으로 많은 시간과 공간이 필요한데 반하여 PCR 기법에 의한 진단은 수시간 내에 신속·정확한 진단이 가능하므로 톡소포자충의 진단에 매우 유용하게 사용될 수 있다고 생각한다.

Teutsch *et al*²⁶은 ELISA 및 IFA를 이용하여 고양이에 대한 톡소포자충 항체 분포조사에서 집 고양이(domiciled cat)에서는 12.5% 그리고 야의 고양이(stray cat)에서는 18.5%의 양성율을 보고 하였고, Childs *et al*²⁷은 ELISA에 의한 검사로 집 고양이에서는 14.4% 그리고 야의 고양이에서는 44.4%의 양성율을 보고하여 양자간의 항체 보유율에는 큰 차이가 있다고 하였다. 김과 김²⁸은 ELISA와 IFA에 의한 제주도내 고양이의 톡소포자충 항체조사에

서 ELISA에서는 37% 그리고 IFA에서는 25.4%가 양성이었다고 보고하였다. Dubey²⁹는 dye test로 510두의 집 고양이와 157두의 야의 고양이를 대상으로 한 조사에서 전자의 경우 26주령 이상된 고양이에서는 37.5% 그리고 후자에서는 57.9%가 양성이었으나 어린 고양이에서는 훨씬 낮은 양성율을 나타내었다고 보고하였다. 이 실험에서는 집 고양이 56두를 대상으로 톡소포자충 항체조사를 실시하였던 바 LAT에서 15두(26.7%) 그리고 IFA에서는 19두(33.9%)가 양성으로 나타나 김과 김²⁸의 성적과 유사하였으나 다른 보고자와는 상당한 차이가 있었다. 이와같이 고양이에서의 톡소포자충 양성율은 보고자에 따라 차이가 있음을 알 수 있고 동시에 고양이는 톡소포자충의 전파숙주로서 중요한 역할을 하고 있다는 것을 암시해주는 것으로 생각된다.

Dubey²⁹는 dye test에서 1:64 이상의 역가를 가진 11마리의 새끼 고양이 조직을 마우스에 접종하여 9마리(81.8%)에서 톡소포자충을 분리하였다고 보고하였다. 그러나 이 실험에서는 56두중 LAT와 IFAT 양쪽 반응에서 모두 양성으로 판정된 15두의 혈액을 재료로 한 PCR와 MI법에서 3두(20%)로부터 충체 특이 DNA 검출과 톡소포자충을 각각 분리할 수 있어 Dubey²⁹의 성적과 큰 차이를 보였는데 이는 접종재료의 차이에 기인한 것으로 Dubey²⁹는 뇌, 골격근, 심근 등을 재료로 하여 급성기를 경과한 톡소포자충의 cyst를 대상으로 하였고 본 실험은 급성기의 혈액중 톡소포자충을 대상으로 하였고 기 때문에 이러한 차이가 있는 것으로 생각되며 또한 조사대상의 성장환경 등도 관여한 것으로 사료된다.

Davidson *et al*³⁰은 고양이가 feline immunodeficiency virus(FIV)와 톡소포자충에 중복감염된 경우에는 톡소포자충 항체가 상승을 보기가 어렵다고 하였으며 Schalm³¹은 톡소포자충에 감염된 후 carrier 상태인 고양이에서도 골수장애로 인한 임파종증이 발생했을 때에는 혈중 항체의 증가없이 톡소포자충증이 발생하는 경우도 있다고 하였는 바 이러한 경우에 PCR 재료로써 혈액 뿐만 아니라 각 조직 또는 장기에서도 충체 특이 DNA를 검출하여 신속·정확한 진단을 기할 수 있는 PCR 기법이 조속히 개발되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

고양이의 급성 톡소플라즈마증의 신속·정확한 진단

법을 개발하고자 *Toxoplasma gondii* 인공감염 고양이와 가정에서 사육한 고양이를 대상으로 하여 톡소포자충 B1 gene을 target로 한 PCR을 수행하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 톡소포자충 B1 gene을 target로 하는 primer T-1과 T-2를 사용하여 고양이 혈액중 톡소포자충에 대한 PCR에서는 501bp의 총체 특이 DNA가 검출되었으나 대조군인 *Neospora caninum* 과 normal cat leukocyte에서는 검출되지 않아 primer의 특이성이 인정되었다.

2. PCR에 의한 인공감염 고양이의 혈액중에서 총체 특이 DNA는 감염 6일째부터 64일째까지 검출할 수 있었다.

3. PCR에 의한 총체 특이 DNA 검출은 혈액 1ml당 tachyzoite 10개까지 가능하였으며 MI법에서는 혈액 1ml당 1개 까지도 3대의 blind passage에 의해 톡소포자충을 분리할 수 있었다.

4. 고양이의 혈액으로부터 PCR에 의한 총체 특이 DNA 검출과 혈액재료의 MI법에 의한 톡소포자충분리 시험에서는 56두중 3두가 양성으로 두 검사결과가 일치하였다.

5. 인공감염 고양이의 혈액중 항체가는 LAT에서는 감염후 3주째부터 15주째까지 양성반응을 보였으며 감염후 8주째에 1:1.024로 최대 항체가를 나타내었다. IFAT에서는 감염후 2주째부터 양성반응을 나타내어 18주째까지 양성반응이 유지되었고 최대 항체가는 6주째에 1:1.024 이었다.

6. 56두의 고양이에 대한 톡소포자충 항체양성율은 LAT에서는 15두(26.7%)이었고 IFAT에서는 19두(33.9%)이었다.

7. PCR 법은 동물의 톡소포자충의 감염 확인진단에는 항체증명에 의한 감염추정 진단법으로 이용되고 있는 혈청학적 진단법(LAT, IFAT) 보다는 효과적인 방법으로 생각되며 실험실 진단법으로는 두 가지 방법을 병용할 경우 더 큰 진단효과가 있을 것으로 평가되었다.

참 고 문 헌

- Dubey JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, 205 (11):1593-1598, 1994.
- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animal and man. CRC Press Inc, Boca Raton, Flo:1-200, 1988.
- Accebes MVB, Diez B, Cisterna R. *Toxoplasma gondii*, Un reto para los noventa. *Enfer Infec Microbiol Clin*, 11:347-351, 1983.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract*, 16:12-45, 1986.
- Sabin FB, Feldman HA. Dye as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite(toxoplasma). *Science*, 108:660-663, 1948.
- Duram TM, Colvin HM. Premarket evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagent. *J Clin Microbiol*, 7(3):255-260, 1978.
- Fletcher S. Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Path*, 18: 193-200, 1965.
- 서명득, 주후돈, 데이비드 마스. Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단용 kit 개발에 관한 연구. 대한수의학회지, 35:538-539, 1995.
- Lappin MR, Greene CE, Prestwood AK, et al. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in the cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *Am J Vet Res*, 50:1580-1585, 1989.
- Chavkin MJ, Lappin MR, Powell CC. Seroepidemiologic and clinical observation of 93 case of uveitis in cats. *Prog Vet Compar Ophthalmol*, 2:29-36, 1992.
- Lappin MR, Greene CE, Prestwood AK, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. *Am J Vet Res*, 50:1586-1590, 1989.
- Kasper LH, Bradley HS, Pfefferkeron ER. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 132(1): 443-449, 1984.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty D, et al. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27:1787-1792, 1989.
- Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med*

- Microbiol*, 38:360-365, 1993.
15. Turner CB, Savva D. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes. *Vet Rec*, 129:128-130, 1991.
 16. Stiles JE, Prade R, Green C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*, 57: 264-269, 1995.
 17. Dubey JP. Diagnosis of feline toxoplasmosis. *Feline Pract*, 3:14-17, 1973.
 18. Huskinson J, Stepick-biek PN, Araujo FG, et al. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol*, 27:2031-2038, 1989.
 19. Derouin F, Mazeron MC, Garin YJF. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*, 125:1957-1600, 1987.
 20. Beutler E, Gilbert T, Kuhl W. Interference of heparin with polymerase chain reaction. *J Immunol*, 141:3584-3591, 1988.
 21. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In principles and applications for DNA amplification, 4th ed, Stockton Press, New York:31-38, 1989.
 22. Frenkel JK. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *J Am Vet Med Assoc*, 196(2):233-240, 1990.
 23. 서명득, 장동화, 주후돈. ELISA를 이용한 돼지톡소 플라즈마병의 조기진단에 관한 연구. 대한수의학회지, 29(4):567-575, 1989.
 24. Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. *Am J Vet Res*, 45(9):1719-1725, 1984.
 25. Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol*, 20:3181-3184, 1992.
 26. Teutsh SM, Juranek DD, Sulzer A. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N Eng J Med*, 300:695-699, 1979.
 27. Childs JE, Rooney JA, Cooper JL, et al. Epidemiologic observations on infection with *Rochalimaea* species among cats living in Baltimore. *J Am Vet Med Assoc*, 204(11):1775-1778, 1994.
 28. 김승호, 김영주. 제주도에 있어서 *Toxoplasma* 항체 분포에 관한 연구: 1. 돼지, 고양이 및 식육섭취자에 있어서의 *Toxoplasma* 항체분포에 대하여. 대한수의학회지, 29(3):333-343, 1989.
 29. Dubey JP. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: A survey of domiciled and stray cats. *J Am Vet Med Assoc*, 162(10):873-877, 1973.
 30. Davidson MG, Rottman JB, English RV. Feline immunodeficiency virus predisposes cats to acute generalized toxoplasmosis. *Am J Pathol*, 143:1486-1497, 1993.
 31. Schalm OW. Finding in feline bone marrow. *Feline Pract*, 8:18-25, 1978.