

닭 크립토스포리디움의 형태계측을 위한 전자현미경적 연구

박남용 · 김영섭 · 정치영 · 조경오 · 박영석 · 이봉주 · 박형선

전남대학교 수의과대학
(1999년 4월 24일 접수)

Morphometrical analysis of chicken *Cryptosporidium* on electron microscopy

Nam-yong Park, Young-seop Kim, Chi-young Chung, Kyoung-oh Cho,
Young-seok Park, Bong-joo Lee, Hyung-seon Park

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Apr 24, 1999)

Abstract : Morphometrical analysis of chicken *Cryptosporidium baileyi* in various stages of life cycle in the bursa of Fabricius were carried out by electron microscope to establish a differential point for identification of *C baileyi*. By avidin-biotin complex method, protozoans of the bursa of Fabricius were identified *Cryptosporidium* spp. The size and area on each developmental stages of *C baileyi*, as measured by Morphomat 10 attached to electron microscope were as follows. Trophozoites' size with range of $3.21 \pm 0.70 \times 2.49 \pm 0.59 \mu\text{m}$, area with range of $118.82 \pm 41.92 \mu\text{m}^2$; meronts' size $3.99 \pm 1.07 \times 2.96 \pm 0.52 \mu\text{m}$, area $210.11 \pm 57.11 \mu\text{m}^2$; merozoites' size $1.98 \pm 0.43 \times 0.60 \pm 0.18 \mu\text{m}$, area $24.10 \pm 5.97 \mu\text{m}^2$; microgametes' size $1.36 \pm 0.83 \times 0.50 \pm 0.23 \mu\text{m}$, area $20.23 \pm 6.73 \mu\text{m}^2$; macrogametes' size $4.57 \pm 0.65 \times 4.02 \pm 0.55 \mu\text{m}$, area $258.37 \pm 51.83 \mu\text{m}^2$; oocytes' size $4.39 \pm 0.56 \times 3.44 \pm 0.50 \mu\text{m}$, area $187.21 \pm 62.68 \mu\text{m}^2$.

In conclusion, the size and area on each developmental stages of *Cryptosporidium baileyi* is different from that of other *Cryptosporidia* spp. It suggests, with considering tissue tropism and life cycle, morphometrical analysis can be quite a good way to identify *C baileyi*.

Key words : *cryptosporidium baileyi*, chicken, electron microscopy, morphometrical analysis.

서 론

Cryptosporidium 은 Apicomplexa 문, Eimeriana 아목, Cryp-

tosporidium 속으로 분류되는 원충으로 Tyzzer가 마우스 위선에서 처음 발견하여 이를 *Cryptosporidium muris* 라는 새로운 원충으로 보고¹한 후 그 형태와 수평감염실험을 통해 현재까지 20여종으로 분류되고 있으며 사람과

동물에 감염성이 있는 것은 6가지이다².

*C parvum*은 사람과 포유류에 높은 이환률과 치사율을 나타내고³⁻⁵ *C muris*는 설치류에서 관찰되며² *C baileyi*와 *C meliagridis*는 조류⁶⁻⁹ *C serperitis*는 양서류²에서 *C nasorum*은 어류²에서 확인되었다.

사람에서는 1976년 3살된 여아에서 발생한 급성 장염에서 직장 생검을 통해 크립토스포리디움증이 최초 보고된 후 인수공통전염병으로 중요하게 취급되고 있다¹⁰⁻¹². 또한 최근에는 후천성 면역결핍증 환자에서 크립토스포리디움증이 치명적인 설사를 유발한다는 보고²가 있어 그 중요성이 더욱 강조되고 있다.

조류에서는 Tyzzer¹³가 닭의 맹장 상피세포에 감염된 것을 처음 보고한 이래 Fletcher *et al*⁷은 F낭에서의 기생을 확인하였고 Current *et al*¹⁴은 닭의 F낭에서 분리한 크립토스포리디움을 *C baileyi*라고 명명하였다. 조류에서 감염성을 갖는 두가지 종류중 *C baileyi*는 F낭과 총배설강 그리고 호흡기 상피에 감염을 일으키고 *C meliagridis*는 소장엔 증식하는 것으로 알려져 있다^{15,16}. 그리고 설사를 일으키거나 면역을 억압하는 병원체와의 복합감염시 더 심한 증상을 나타낸다^{17,18}.

국내에서는 모 등¹⁹에 의해 닭의 크립토스포리디움증이 최초로 보고된 이래 여러 보고자에 의해 각종 동물을 대상으로 이 원충의 감염실태를 조사한 바 *C parvum*²⁰, *C muris*²¹, *C baileyi*²² 등이 보고되었다. 위 등²²은 국내 마우스로부터 분리한 크립토스포리디움의 마우스 실험 접종과 *C parvum*의 송아지로의 감염실험²³ 및 염색법 비교실험^{22,24}을 보고하였다. 또한 모 등²⁵에 의해 국내 육계에서의 호흡기형 크립토스포리디움증이 보고되었다.

본 연구는 크립토스포리디움증을 수반한 닭의 F낭을 대상으로 면역조직화학적 특이성이 뛰어난 Avidin-biotin complex 염색법을 통해 크립토스포리디움을 확인하여 이 원충의 다양한 발육단계별 초기세구조를 관찰하고 투과전자현미경의 Morphomat 10을 이용해서 크기와 면적을 측정하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 1991년 3월부터 1992년 12월까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 가검물중 크립토스포리디움증으로 진단된 3개 양계장의 8마리 닭의 F낭을 이용하였다. 실험에 사용된 닭은 21일령부터 49일령까지

였으며 크립토스포리디움증의 단독감염 보다는 다른 질병과 복합감염된 닭으로 그 현황은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Status of cryptosporidiosis and complicated infection with other disease

Farms	Chicken age (days)	No. of chicken	Complicated infection
A	30	3	cryptosporidiosis + ND + coccidiosis
B	49	2	cryptosporidiosis + necrotic enteritis
C	21	3	cryptosporidiosis + ND

광학현미경 관찰 : 10% 중성포르말린에 고정된 F낭을 일반적인 방법으로 파라핀에 포매한 후 약 4 μ m 두께로 절편을 만든 다음 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

간접면역과산화효소법 : 4 μ m 두께로 자른 F낭 조직절편을 자일렌과 histoclear가 1:3으로 혼합된 dewaxing agent (Biomed Co)와 각급 알콜을 거쳐 증류수에서 함유한 후 periodic acid가 혼합된 endoblocking agent(Biomed Co)를 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리하여 조직내의 내인성 peroxidase를 억제시켰으며 주성분이 tris buffer인 1X automation buffer(Biomed Co)로 10회 세척하였다. 또한 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해 10배 희석한 정상 송아지 혈청(Sigma Co)을 40 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였고 1차 항체로 100배 희석한 rabbit anti-cryptosporidium 고도면역혈청을 40 $^{\circ}$ C에서 50분간 반응시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. 2차 항체는 biotin conjugated anti-rabbit IgG(Biomed Co)를 100배 희석하여 40 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. 다음으로 50배 희석한 avidin-peroxidase labeled(Sigma Co)를 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척한 다음 chromogen으로는 3-amino-9-ethylcarbazole(Biomed Co)을 10분씩 2번 40 $^{\circ}$ C에서 염색한 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. 대조염색으로 헤마톡실린액으로 30초간 염색한 다음 1X automation buffer로 10회 세척하고 크리스탈마운트로 봉입한 후 검경하였다.

전자현미경 관찰 : 투과전자현미경 관찰을 위해 10% 중성포르말린에 고정된 F낭을 1mm³ 크기로 세절하여 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.4)에서 12시간 세척한 후 1%

osmium tetroxide(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)에 후고정하였다. 고정된 조직은 각급 에탄올과 propylene oxide 제열을 거쳐 탈수하여 epon에 포매한 다음 ultramicrotome (LKB-V)으로 1 μ m 두께의 박절편을 만들었다. 박절편은 methylene blue-basic fuchsin 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰한 다음 40-60nm 두께로 초박절하였다. 초박절편은 copper grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 실시하여 가속전압 50kV 하에서 투과전자현미경(Carl Zeiss109)으로 관찰하였다. 또한 형태학적 측정용 위해 Morphomat 10(Carl Zeiss)을 이용하여 각 발육단계의 장축 및 단축의 길이와 면적을 측정하였다.

주사전자현미경 관찰을 위해 10% 중성포름알데히드 고정된 F낭을 2.5% glutaraldehyde(cacodylate buffer, pH 7.2)에서 12시간 방치한 후 아세톤 series로 탈수시키고 건조시킨 다음 금이온으로 막을 입힌 후 Jeol JAC-1100 주사전자현미경으로 25kV 10mA 상태에서 관찰하였다.

결 과

광학현미경 소견 : F낭에는 다발성의 피사병변이 관찰되었고 여포의 림프구계 세포의 고갈, 낭포 형성, 추벽상피의 증식소견을 보였다(Fig 1). 또한 F낭 추벽상피세포 표면에 다수의 원충이 관찰되었다(Fig 2). 대부분은 상피 표면에 부착되어 있으나 일부는 상피표면 근처에 유리되어 있었다.

간접면역과산화효소법 : 광학현미경에서 관찰된 F낭의 상피세포에 부착되어 있는 원충을 동정하기 위해 avidin-biotin complex 법을 수행한 결과 갈색의 강한 양성 반응을 보여 *Cryptosporidium* spp.로 확인되었으며(Fig 3) 1차 항체를 제거한 음성대조군에서는 어떠한 양성반응도 관찰되지 않았다.

투과전자현미경 소견 :

발육기별 미세구조 : 이 원충의 발육기(developmental stage)는 F낭 추벽의 상피세포표면에 부착된 상태로 관찰되며(Fig 4), 내성발육(endogenous development)은 숙주의 미세용모 유래의 기생충 산생포막(parasitophorous vacuolar membrane)으로 둘러싸여 있는 기생충 산생포(parasitophorous vacuole)속에서 일어나는데 이 기생충 산생포막은 미세용모 유래의 숙주막으로 둘러싸여 있다.

영양형(trophozoite)은 난원형 또는 구형을 띠고 있으며 F낭의 표면상피세포의 얇은 전자치밀질대에 부착되어

있으며 이 부위에는 미세용모가 소실되었다(Fig 5). 메론트(meront) 및 메로조이트(merozoite)는 생활사중 흔히 관찰되는 것으로 8개의 메로조이트가 한 기생충 산생포속에 형성되어 성숙메론트를 구성하고 있다(Fig 6).

생식모체(microgamete)는 수생식체(microgamete)를 형성하는 것으로서 다른 발육기와 쉽게 구별할 수 있으며 기생충 산생포속에 큰 잔체를 형성하기도 한다. 암생식체(macrogamete)는 이중막으로 되어 있는 박막으로 완전히 둘러싸여 있으며 기생충 산생포 안에 가득 차 있다. 세포질의 주변부에서 여러 전자밀도를 보여주는 물질을 포함하고 있는 벽형성체(wall-forming body) 및 조면형질내세망을 볼 수 있으며 완전히 성숙된 암생식체의 모양은 등글다(Fig 7).

오오시스트(oocyst)는 기생충 산생포 속에 들어 있고 이중막으로 되어 있는 명확한 오오시스트벽에 의해 쉽게 알 수 있다. 이 오오시스트벽은 다른 발육기의 박막보다 전자밀도가 낮으며 두껍다. 아밀로펙틴체 및 조면형질내세망을 지니고 있는 잔체를 볼 수 있다(Fig 8). 기생충 산생포 속에서 포자생식이 이루어져 4개의 스포로조이트(sporozoite)가 형성되는데 이중막으로 된 박막으로 둘러싸인 스포로조이트의 세포질 속에는 하나의 핵, 많은 수의 microneme, 작은 아밀로펙틴체, 공포, 리보솜, 전자치밀체(electron dense body) 등이 분포한다. 성숙한 스포로조이트는 바나나 모양으로 관찰되었다(Fig 8).

형태학적 측정 : 투과전자현미경의 형태계측장치인 Morphomat 10을 이용하여 각 발육단계의 장축과 단축의 길이 및 면적을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Size and area by developmental stage of *C. baileyi* using a Morphomat 10 in electron microscope

Developmental stage	size(μ m) (Length \pm SD \times width \pm SD)	Area(μ m ²) (Square measue SD)
Trophozoite	3.21 \pm 0.70 \times 2.49 \pm 0.59	118.82 \pm 41.92
Meront	3.99 \pm 1.07 \times 2.96 \pm 0.52	210.11 \pm 57.11
Merozoite	1.98 \pm 0.43 \times 0.60 \pm 0.18	24.10 \pm 5.97
Microgamete	1.36 \pm 0.83 \times 0.50 \pm 0.23	20.23 \pm 6.73
Macrogamete	4.57 \pm 0.65 \times 4.02 \pm 0.55	258.37 \pm 51.83
Oocyte	4.39 \pm 0.56 \times 3.44 \pm 0.50	187.21 \pm 62.68

주사전자현미경 소견 : 저배율상에서 감염된 F낭의 상

피세포를 밀집해서 채우고 있는 크립토스포리디움을 관찰할 수 있었고(Fig 9) 보다 근접해 보면 메론트내에 바나나 모양의 메로조이트를 볼 수 있으며 또한 내용물이 빠져나가 비어있는 막만이 관찰되기도 하였다(Fig 10).

고 찰

본 연구는 닭의 F낭에 감염된 크립토스포리디움을 발육단계별로 영양형, 메론트, 메로조이트, 수생식체, 암생식체 그리고 오오시스트를 대상으로 하여 각각 그 크기 및 면적을 측정하였다.

크립토스포리디움 종류 중에서 일반적으로 조류에 감염성이 있는 속으로서 닭에서 *C baileyi*, 칠면조에서 *C meleagridis*가 있으며 주로 F낭과 호흡기에 기생하지만 드물게 회장, 맹장 및 결장에 기생하는 경우도 보고되어 있다^{7,8}.

조류에 기생하는 크립토스포리디움의 여러 발육기의 미세구조에 대한 연구^{8,12,16}가 체계적으로 진행되었으나 그 크기를 측정함에 있어서 *C muris*를 제외하고는 그 차이를 거의 인정할 수 없다고 하였다²⁶. 그러므로 투과전자현미경의 Morphomat 10을 이용하여 보다 정밀한 형태를 관찰하고 그 면적을 측정함으로써 각 발육단계별 크기와 넓이를 비교하여 종을 분류하는 기준으로 삼고자 했다.

본 실험으로 밝혀진 크립토스포리디움의 여러 발육단계의 미세구조는 사람을 포함한 다른 포유동물의 것들과 그 크기만을 기준으로 했을 때 *C baileyi*와 유사한 결과를 보였다. 그러나 조류에서 발견되는 *C meleagridis*의 여러 발육기의 미세구조도 *C baileyi*와 비슷하기 때문에

이들의 감별이 필요하다. 이 경우 그 크기만으로는 감별하는데 어려움이 있으므로 기생부위, 숙주특이성 등을 고려하여 구분할 수 있다.

본 연구에서 닭의 F낭에서 관찰된 크립토스포리디움을 전자현미경으로 관찰하고 형태계측장치를 이용하여 그 크기와 면적을 측정한 결과 면적은 수행된 연구의 보고를 접하기 힘들어 비교할 수는 없었지만 그 크기에 있어서 *C baileyi*의 여러 발육단계의 크기와 비교할 때 Itakura *et al*²⁷의 결과와 큰 차이점을 발견할 수 없었으며 *C muris*와 *C parvum*과 같은 다른 크립토스포리디움 종들과 비교했을 때 그 크기 차이가 다소 인정되었다. 따라서 기생부위 및 숙주특이성과 함께 전자현미경상의 형태계측을 통해 각 발육단계의 크기와 면적을 고려한다면 *C baileyi*를 더 정확하게 동정할 수 있음을 확인하였다.

결 론

면역조직화학적염색을 통해 *Cryptosporidium spp.* 감염으로 확인된 3개 양계장 8마리 닭의 F낭에 분포한 *C baileyi*의 미세구조 및 형태를 측정하였다. 또한 각 발육단계의 크기와 면적을 측정하여 다른 *Cryptosporidia* 종들과 비교해본 결과 *C muris*, *C parvum* 등과의 크기 차이가 다소 인정되었다. 따라서 기생부위 및 숙주특이성과 함께 전자현미경상의 형태계측을 통해 각 발육단계의 크기와 면적을 고려한다면 *C baileyi*를 더 정확하게 동정할 수 있음을 확인하였다.

Legend for figures

- Fig 1. Hyperplastic response of the bursal epithelium in a 30 day-old broiler with the presence of numerous cryptosporidia on the luminal surface. H & E, × 200.
- Fig 2. Vacuolar degeneration of follicle in the bursa of Fabricius. H & E, × 200.
- Fig 3. Positive reaction on the luminal surface of bursa of Fabricius. Avidin-biotin complex method, × 500.
- Fig 4. Follicular epithelial surface with various stages of the protozoan. Uranyl acetate and lead citrate. × 3,000.
- Fig 5. Trophozoite attached to bursal epithelium. Uranyl acetate and lead citrate. × 12,000.
- Fig 6. Cryptosporidial schizont with five merozoite. Uranyl acetate and lead citrate. × 12,000.
- Fig 7. Macrogametocyte with polysaccharide granules. × 12,000.
- Fig 8. Oocyst with sporozoites and residual body. × 12,000.
- Fig 9. Scanning electron micrograph showing a dense lawn of parasites over the luminal surface of the bursal epithelium. × 1,000.

Fig 10. High power scanning electron micrograph of Fig 9. Merozoite-containing schizonts and empty capsule can be seen. × 5,400.

참 고 문 헌

1. Tyzzer EE. A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 5:12-13, 1912.
2. Webster KA. Molecular methods for detection and classification of *Cryptosporidium*. *Parasitol Today*, 9:263-266, 1993.
3. Kennedy GA, Kreitner GL, Straffuss AC. Cryptosporidiosis in three pigs. *J Am Vet Med Assoc*, 170:348-350, 1977.
4. Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol*, 8:479-484, 1971.
5. Tzipori S, Larson J, Smith M, et al. Diarrhea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infection. *Vet Rec*, 111:35-36, 1982.
6. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1990.
7. Fletcher OJ, Munnel JF, Page RK. Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius of chickens. *Avian Dis*, 19: 630-639, 1975.
8. Lindsay DS, Blagburn BL, Hoerr FJ. Experimentally induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Am J Vet Res*, 48:104-108, 1987.
9. Hoerr FJ, Current WL, Haynes TB. Fatal cryptosporidiosis in quail. *Avian Dis*, 30:421-425, 1986.
10. Bogaerts J, Lepage P, Rouvroy D, et al. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Central Africa. *J Clin Microbiol*, 20(5):874-876, 1984.
11. Smith HV, Rose JB. Water borne Cryptosporidiosis. *Parasitol Today*, 6:8-12, 1990.
12. Dhillon AS, Thacker HL, Dietzel AV, et al. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. *Avian Dis*, 25:747-751, 1981.
13. Tyzzer EE. Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am J Hyg*, 10:269, 1929.
14. Current WL. Disease of Poultry, 9th ed., pp.797-804. Iowa State Univ Press, USA, 1991.
15. Current WL, Reese NC. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool*, 33:98-198, 1986.
16. Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool*, 33(2):289-296, 1986
17. Guy JS, Levy MG, Ley DH, et al. Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Dis*, 32:381-390, 1988.
18. Levy MG, Ley DH, Barnes HJ, et al. Experimental Cryptosporidiosis and infectious bursal disease virus in infection of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis*, 32:803-811, 1988.
19. 모인필, 윤희정, 최상호 등. 닭의 크립토스포리디움 증 발생에 보고. 대한수의학회지, 28(1):175-177, 1988.
20. 채종일, 신손문, 윤종구 등. 면역억제에 의한 마우스의 *Cryptosporidium* 발현실험. 기생충학잡지, 28(1): 31-37, 1990.
21. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토스포리디움의 분리 및 동정 II. 마우스로부터 *Cryptosporidium muris*의 분리. 기생충학잡지, 29(2):149-159, 1991.
22. 위성환, 강영배, 주후돈 등. 국내 마우스로부터 분리된 *Cryptosporidium*의 실험용 마우스로의 감염실험. 농사시험연구논문집(가축위생편), 34(1):43-48, 1992.
23. 위성환, 이정길, 주후돈 등. 국내 마우스로부터 분리한 *C. parvum*의 송아지로의 감염시험. 기생충학잡지, 30(4):259, 1992.
24. 노재욱, 강두원, 장두환 등. 크립토스포리디움증의 실험실적 진단법. 대한수의학회지, 31(4):501-507, 1991.
25. 오명호, 은길수, 김홍집 등. 국내 육계의 호흡기형 크립토스포리디움증에 대한 역학적 조사연구. 대한수의학회지, 33(4):693-699, 1993.
26. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토스포리디움의 분리 및 동정 III. 닭으로부터 *cryptosporidium baileyi*의 분리. 기생충학잡지, 29(4):315-324, 1991.
27. Itakura C, Nakamura H, Umemura T, et al. Ultrastructure of *Cryptosporidium* life cycle in chicken host cells. *Avian Pathol*, 14:237-249, 1985.

28. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토 스폐리디움의 분리 및 동정 I. 각종 동물의 크립토

스포리디움 감염상황. 기생충학잡지, 29(2):139-148, 1991.