

중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기 진단에 관한 연구

서명득 · 신기욱

(경상대학교 수의과대학)

Use of Polymerase Chain Reaction(PCR) for Detection of *Toxoplasma gondii* in Diagnosis of Acute Acquired Swine Toxoplasmosis

Suh, Myung-Deuk · Shin, Gee-Wook

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

적 요

돼지의 급성 톡소플라즈마병(Tp병)의 신속, 정확한 진단법을 개발코저 도살돼지와 인공감염돼지의 혈액과 각 장기를 재료로 하여 Tp B1 gene을 target로 한 PCR방법에 의한 이 병의 조기 진단법으로서의 이용 가능성을 검토하고 그 결과를 다음과 같이 요약한다.

Tp B1 gene을 target으로 하는 primer T-1과 T-2를 사용하여 인공감염 돼지의 혈액과 폐조직에 대한 PCR에서는 501bp의 총체 특이DNA가 검출되었으나 대조군인 *Neospora caninum*에서는 검출되지 않아 primer의 특이성이 인정되었으며, 도살돼지의 인공조작 혈액에 대한 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*, Tp)의 회석 단계별 총체 특이DNA 검출은 혈액 1ml당 100개까지였고, 인공조작 각종 장기에 대한 Tp의 회석 단계별 총체 특이DNA 검출 한계치는 각 장기 5g당 102개까지 가능하였다.

도살돼지 및 인공감염돼지의 각종 장기로부터 총체 특이DNA의 추출방법은 조직의 동결→융해→마쇄 순서의 과정을 반복한 전처리 과정에서 얻은 재료를 PCR을 이용한 진단기법에 사용하는 것이 효과적이었다.

인공감염 돼지의 혈액으로부터 총체 특이DNA는 Tp 감염후 108시간째와 120시간 째에 검출되었으며 검출시기는 Tp의 혈중 출현(parasitaemia)의 지속기간과 상관관계가 있었으며, 각종 장기로부터 총체 특이DNA 검출은 폐에서만 가능하였다.

그리고 인공감염돼지의 Tp감염 혈액으로부터 총체 검출적중율은 PCR에서는 25~33.3%이었고 MI에서는 75~100%이었다. 따라서, PCR진단기법은 돼지의 급성Tp병의 조기진단에 이용될 수 있을 것으로 평가되었다.

I. 서론

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*, Tp)은 *Toxoplasma*속의 단일 종으로 고양이의 장관 구포자충(intestinal coccidian)의 하나이고, 면양과 돼지에서는 유산 또는 사산을 일으키며^{3, 9, 10} 사람에서는 임신 중에 감염되었을 때에는 유산 또는 선천적인 장애를 초래할 수

있어 이 원충에 의한 톡소플라즈마병(toxoplasmosis, Tp병)은 공중 위생상 중요한 질병으로 알려져 있다^{4, 10, 25} 모든 고양이과(felids)의 동물은 종숙주가 되며 특히 사사하는 고양이는 가장 중요한 종숙주의 하나이고 이를 제외한 온혈동물과 조류 등은 중간숙주 역할을 함으로서 이 원충의 숙주범위는 대단히 광범위하다^{9, 26, 41}

식육으로 제공되는 동물 중 특히 돼지에 대한 Tp

감염율은 다른 동물에 비하여 훨씬 높은 것으로 알려져 있으며^{1, 11, 12, 21, 31, 33, 43}) 사람에서는 Tp에 감염된 돼지고기를 날 것으로 섭취한 사람에서의 급성 Tp병의 발생 예도 보고되고 있다.⁶⁾

이와 같이 동물과 사람에 큰 피해를 주는 Tp병의 신속하고 정확한 진단을 위한 여러 학자들의 연구 결과 혈청학적 진단법으로는 색소시험법(Dye test, DT)³²⁾, 간접적혈구응집반응(Indirect haemagglutination test, IHA)³⁵⁾, 간접형광항체법(Indirect fluorescent antibody test, IFAT)^{17, 20)}, Latex응집반응(Latex agglutination test, LAT)^{28, 36)} 및 효소표지 면역검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^{30, 37, 44, 45)} 등이 알려져 있으나 이러한 혈청학적 진단법은 어디까지나 역학적인 추정 진단에 도움이 될 뿐 현증 확인에는 한계가 있다.

동물접종법^{22, 34)}으로서 마우스의 맹목계대(blind passage)에 의한 원충 분리시험이 이용되고 있으나 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 그래서 이러한 여러 가지 단점을 보완하여 Tp에 대한 새로운 진단기법으로서 분자생물학적 방법의 하나인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 각종 동물의 Tp병 진단 기법개발에 많은 학자들이 연구를 수행해 오고 있다.^{5, 18, 19, 34, 40, 42)}

최근에 와서 Burg 등⁵⁾이 Tp의 B1 gene을 이용한 생체 진단기법으로서 PCR의 이용가능성을 보고한 이후 면양,^{18, 19, 42)} 소,¹⁸⁾ 말⁴⁰⁾ 그리고 고양이 등^{7, 38, 39)}의 Tp감염 진단에 PCR기법이 흔히 이용되고 있으나 돼지의 Tp감염병에 대한 PCR기법 이용에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않다.

따라서 저자들은 국내에서 돼지 Tp감염병의 신속 정확한 진단법으로서 PCR의 이용 가능성과 효과를 검토하고 이에 의한 돼지 Tp감염병의 진단기법을 확립코져 이 연구를 수행하였던 바 약간의 성적을 얻었기에 그 결과를 이에 보고한다.

II. 재료 및 방법

공시원충주

Toxoplasma gondii(Tp) : 수의과학검역원으로부터

분양받아 경상대학교 수의과대학 수의기생충학 교실에서 BALB/c 마우스에 연속 계대하면서 보존해 온 RH주를 사용하였다.

Neospora caninum : 수의과학검역원에서 보존하고 있는 *Neospora caninum*의 genomic DNA를 분양 받아 -20°C 냉동고에 보존하면서 음성대조로 사용하였다.

공시동물 및 인공감염

마우스: 경상대학교 부설유전공학연구소 실험동물 사용장에서 생산 관리된 생후 4주령으로 체중 20~25g 이상된 ICR마우스를 시험에 사용하였다.

돼지 : LAT검사서 Tp음성으로 판정된 생후 40일령의 자돈 4두를 김해 소재 K양돈장으로 부터 구입하여 일반 백신과 구충제를 투여한 후 시험에 사용하였다.

인공감염은 2두씩 정맥접종군(A)과 경구감염군(B)으로 나누어 A군은 마우스 복강으로부터 채취한 복강액 중 Tp가 2×10^6 개가 함유되도록 멸균 PBS로 조정하여 각각 귀정맥(ear vein)으로 접종하여 감염시켰으며 B군은 2×10^6 개의 Tp를 마우스 복강내에 접종한 후 만 4일째 폐사 직전의 감염 마우스를 돼지 두당 1마리씩 경구적으로 섭취케 하여 감염시켰다.

도살돼지로부터 재료 채취

진주시 소재 도살장에서 도살되는 돼지로부터 혈액 및 각 장기를 임의로 채취하여 총체 특이DNA 검출을 위한 인공조작 재료로 사용하였다.

인공감염 돼지로부터 재료 채취

돼지에 Tp를 인공감염 시킨 후 12시간 간격으로 혈액은 EDTA(7.5% vacutainer, U.K)가 들은 채혈병에 채취하여 PCR의 민감성 조사와 마우스 접종법에 의한 원충 분리시험에 각각 사용하였다. 장기 채취는 Tp를 접종한 후 1주째와 4주째에 각 접종군별로 1두씩 도살한 후 각 장기를 채취하여 총체 특이DNA 검출 재료로 사용하였다.

인공감염 돼지에 대한 체온 및 임상조사

Tp접종 후 나타나는 임상증상은 12시간 간격으로 체온(rectal temperature, RT) 측정과 동시에 조사하여 기록하였다.

PCR의 수행

Primer

Primer는 Stiles 등⁴⁰⁾이 고안한 B1 gene.으로써 염기서열은 T-1은 5'-GGAAGTCATCCGTTTCATGAG-3'(21bp)이고, T-2는 5'-CAGACGAATCACGGAAC TG-3'(20bp)인 것을 사용하였다.

도살돼지의 인공조작 재료로부터 총체 특이 DNA추출

혈액으로부터 총체 특이DNA추출

Tp감염 마우스 복강으로부터 복강액을 채취하여 PBS(pH7.2)로 1,500rpm에서 5분간씩 3회 원심 세척한 후 순수한 Tp부유액을 만든 다음 도살돈의 혈액 3ml중에 세척한 Tp가 10⁶개가 함유되도록 조정된 다음 이것을 원액으로 하여 10⁻¹개 까지 10배 단계 희석하고, 각 희석 단계별 혈액은 총체 특이DNA추출 재료로 사용하였으며 추출과정은 인공감염 돼지의 혈액으로부터 총체 특이DNA추출과 같은 방법으로 수행하였다.

장기로부터 총체 특이DNA 추출

도살돼지로부터 채취한 뇌, 폐, 심장, 간, 비장, 횡격막의 각 장기로부터 5g씩을 취하여 유발에 넣고 여기에 혈액 조작과정에서와 같은 방법으로 Tp를 10⁵개부터 10¹개까지 10배 단계 희석한 후 각 단계별 희석액 5ml씩을 21G의 주사침이 부착된 주사기로 이미 준비된 각 5g씩의 조직내로 강제 주입시켜 -70°C 냉동고에서 30분간 동결한 다음 60°C 항온수조에서 10분간 용해하고 유발내에서 조직을 마쇄하였다.

이와 같은 동결→용해→마쇄과정을 2회 반복한 다음 그 재료를 DNA추출 전처리 재료로 사용하였으며 DNA추출과정은 인공감염 돼지의 장기 처리과정에서와 같은 방법으로 수행하였다.

인공감염 돼지의 재료로부터 총체 특이DNA추출

감염 혈액으로부터 총체 특이DNA 추출

혈액으로부터 DNA의 추출은 Wastling 등의²⁸⁾ 방법을 준용하여 수행하였다.

장기로부터 총체 특이DNA추출

감염 후 각 군별로 1주째와 4주째에 도살한 돼지로부터 뇌, 폐, 심장, 간, 비장, 횡격막을 채취한 다음 Tp 총체 특이DNA추출 시험은 다음과 같이 수행하였다. 즉 각 장기별로 5g씩을 채취하여 각각의 유발에 넣어 멸균 된 가위로 세절한 다음 여기에 멸균 증류수 또는 PBS(pH7.2) 5ml씩을 분주한 후 도살돈의 조직 전처리 과정에서와 같은 방법으로 처리한 후 3,000rpm에서 15분간 원심하여 상층액을 취하여 계측하였고 여기에 1/10용량의 3M Sodium acetate와 2.5배의 absolute ethanol 을 가한 후 -70°C 냉동고에서 30분간 정치하여 DNA를 침전 시켰다. 침전된 DNA는 70% cold ethanol로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 100μl TE buffer(pH 8.0)에 재부유시켜 -20°C 냉동고에 보존하면서 PCR 시험에 사용하였다.

PCR mixture

추출한 template DNA 10μl를 PCR tube에 취하고 10× 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 PCR분석을 위한 시료로 사용하였다.

PCR 과정

PCR분석기기는 PTC-100(MJ research, inc.)을 사용하였으며 시료의 증폭과정은 서와 주³³⁾의 방법에 따라 수행하였다.

마우스 접종에 의한 원충분리 및 확인 시험

인공감염 돼지로부터 Tp 접종후 12시간 간격으로 채혈하여 혈액 3ml에 histopaque 1077(sigma)를 동량 첨가하여 1,300rpm에서 30분간 원심한 후 buffy coat

충 만을 수거한 다음 마우스 복강내에 접종하여 원충분리를 시도하였으며 마우스에서의 접종은 3대까지 맹목계대(blind passage)하였고 매 계대 때의 만 4 일째에 마우스 복강액을 채취하여 광학현미경으로 원충을 확인하여 분리여부를 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 도살돼지의 인공조작 재료로부터 총체 특이 DNA 검출

가. 혈액으로부터 총체 특이DNA검출

도살돼지의 혈액에 대한 Tp의 희석 단계별 총체 특이DNA 검출 한계치는 Fig 1에서와 같이 혈액 1ml 당 Tp 10⁹개까지 이었다.

PCR을 이용한 Tp병의 진단법은 Tp의 일부 DNA를 시험관내에서 연쇄적으로 증폭 시킨 후 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출해 내는 방법으로 거의 100%의 특이성을 나타내며,^{5, 40, 42)} 이 방법에 사용되는 primer는 주로 30kDa 단백질 유래의 P30과 총체 genome 내의 B1 gene으로 알려져 있다.^{5, 42)} Burg 등⁵⁾은 이 primer로써 Tp genome내의 B1 gene을 총체 특이DNA검출기법인 PCR에 이용하였던 바 그 특이성과 민감성이 높다고 하였으며 이 기법은 Tp 감염

병의 진단에 매우 유용하게 이용될 것이라고 하였다.

Stiles 등은³⁹⁾ 혈중 총체 특이DNA를 검출코져 Tp tachyzoites를 Tp비감염 개 또는 고양이 혈액으로 각각 인공 혼합한 후 10배 단계 희석하여 PCR를 수행한 시험에서 이들 혈액 1ml중에 Tp tachyzoite가 10²개가 함유되었을 때 Tp총체 특이 DNA band를 확인 할 수 있었다고 보고하였으며 서와 주³⁸⁾ 고양이 혈액으로 Tp tachyzoite를 10배 단계 희석한 실험에서 10¹개/ml 까지 DNA band를 검출할 수 있었다고 보고하였다.

저자들이 돼지 혈액으로 인공조작하여 혈액 1ml당 Tp tachyzoite의 검출 한계치를 조사한 성적(Fig 1)에서는 10⁹개/ml 까지 501bp의 총체 특이DNA band를 검출 할 수 있었는데 이는 Stiles 등의³⁹⁾ 성적과는 희석배수에서 두 단계(100배)의 차이가 있었으나 서와 주³⁸⁾ 성적과는 한 단계(10배) 차이로 비슷하였다.

이와 같은 결과는 Stiles 등은³⁹⁾ 혈액 처리과정에서 항응고제로서 heparin을 사용하였으며 또한 전혈을 사용하여 PCR용 template DNA를 분리하였으나 서와 주³⁸⁾ 그리고 저자들은 혈액 처리과정에서 항응고제로서 EDTA를 사용하였지만 histopaque를 이용한 농도구배 원심분리로 buffy coat만을 분리하여 PCR에 사용함으로써 Taq polymerase의 활성에 영향을 미

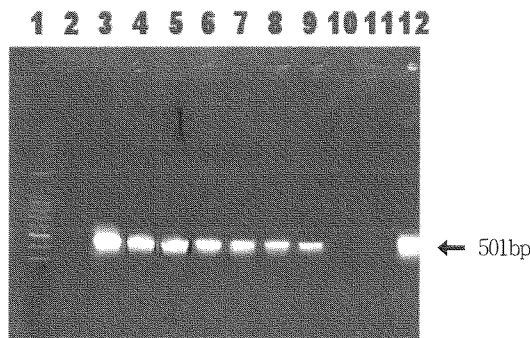


Fig. 1. Limit of detection for Tp specific-DNA in the blood of slaughtered pig by PCR .

- | | |
|---|---|
| Lane 1: 100bp DNA ladder | Lane 2: Neospora caninum |
| Lane 3~10 : tenfold serial dilution of Tp tachyzoites | |
| Lane 3 : 10 ⁶ | Lane 4 : 10 ⁵ |
| Lane 5 : 10 ⁴ | Lane 6 : 10 ³ |
| Lane 7 : 10 ² | Lane 8 : 10 ¹ |
| Lane 9 : 10 ⁰ | Lane 10 : 10 ⁻¹ |
| Lane 11: normal pig leukocytes | Lane 12: positive control(Tp tachyzoites) |

칠 것으로 생각되는 항응고제(EDTA, heparin)²⁾와 혈액중의 heme을²³⁾ 충분히 제거한 데에 기인된 것으로 생각된다.

나. 도살돼지의 각 장기로부터 특이DNA검출

동결, 용해, 마쇄 과정에 의한 도살 돼지의 각 장기로부터 Tp의 희석단계별 총체 특이 DNA검출 한계치를 조사한 성적은 Table 1에서와 같이 각 장기에서는 5g당 10²개까지 이었다.

Michelle 등은²⁹⁾ 식용의 훈연 돼지고기를 마쇄하여 Tp tachyzoite의 단계별 희석액과의 혼합재료에 대한 총체 특이DNA검출 한계치를 조사한 성적에서 10²개/g까지 가능하다고 보고 하였으나 저자들의 성적(Table 1)에서는 각 장기 20개/g로서 Michelle 등의²⁹⁾ 성적과는 큰 차이가 있었다.

이와 같은 결과는 저자들과 Michelle 등이²⁹⁾ 사용한 검사재료의 차이라고도 할 수 있으나 특히 재료의 처리과정에서 저자들이 사용한 각 장기 조직의 동결→용해→마쇄법이 총체 DNA를 추출해내는 데

훨씬 유리한 것으로 생각되며, Michelle 등은²⁹⁾ PCR에 P30을 primer로 사용하였으나 저자들은 Tp genomic B1 gene을 사용하였는 바, 이와 같이 각 연구자가 사용한 primer에 따라 PCR의 민감성과 특이성에도 차이가 있을 수 있다고 생각된다.

2. 인공감염 돼지의 각 재료로부터 총체 특이 DNA 검출

가. 혈중 총체 특이DNA 검출

감염 후 경과 시간별 혈중 총체 특이DNA의 검출 상황을 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 A군에서는 108시간째와 120시간째에, B군에서는 120시간째에 총체 특이DNA가 검출되었다.

Darek 등은⁷⁾ Tp mozart strain(tissue cysts)을 종숙 주인 고양이에 경구 감염시킨 시험에서 감염 후 14일째부터 유행 중 총체 특이DNA가 검출되기 시작하여 182일째까지도 산발적인 PCR 양성반응을 보였다고 하였으며, 서와 주는³⁸⁾ Tp RH strain에 감염된 마우

Table 1. Detection of Tp⁻ specific DNA in artificially injected with tenfold serial dilutions of Tp tachyzoites into normal organs collected from slaughtered pig

Organs	Dilution of Tp tachyzoites						
	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
lung	-	-	-	+	+	+	+
liver	-	-	-	+	+	+	+
heart	-	-	-	+	+	+	+
spleen	-	-	-	+	+	+	+
brain	-	-	-	+	+	+	+
diaphragm	-	-	-	+	+	+	+

Table 2. The responses of Tp specific DNA detection according to time-course in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites by PCR.

Group	Pig No.	Hours after infection										
		0	36	48	60	72	84	96	108	120	132	148
A	P-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	P-2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B	P-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	P-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

A : iv B : oral

스를 경구적으로 감염시킨 고양이에서 감염 5일째부터 유혈증 총체 특이DNA가 검출되기 시작하여 64일째까지, Esteban과 Innes¹⁸⁾ S48 strain(oocyst)을 경구감염시킨 면양에서 감염 후 2일째부터 9일째 사이에 산발적으로, Sedlak 등은³⁴⁾ Tp K7 strain의 oocyst를 경구 감염시킨 토끼에서 감염 후 7일째와 12일째 사이에 혈중 총체 특이DNA를 검출 할 수 있었다고 보고 하였다.

저자들은 이 실험(Table 2)에서 A군은 감염 후 4.5일(108시간)째와 5일(120시간)째, B군은 5일(120시간)째에서만 유혈 증 총체 특이DNA가 검출되었을 뿐 그 이후에는 검출되지 않았다. 이와 같이 각 연구자에^{7, 18, 34)} 따른 성적의 차이는 사용한 Tp strain간의 병원성의 강약 및 유무, 사용 원충주의 발육기, 감염 방법 및 공시 숙주 등의 차이에서 온 결과라고 생각 된다.

나. 각 장기로부터 총체 특이DNA 검출

Tp 감염후 7일째에 각 군별의 장기로부터 채취한 폐, 심장, 비장, 간, 뇌조직 에서 총체 특이DNA를 검출한 성적은 Table 3에서와 같이 각 군별의 폐조직에서만 검출되었다.

Sedlak 등은³⁴⁾ 급성 Tp병에 감염된 토끼의 각종 장기로부터 Tp 총체 특이DNA 검출을 시도하였으나 폐 이외의 다른 장기에서는 특이DNA를 검출 할 수 없었다고하였는데, 이는 저자들의 인공감염 돼지에 대한 성적(Table 3)과 일치하였다. 이와 같은 결과는 Tp감염에 의한 발열증상, 폐에서의 염증반응, DNA검출 성적 등을 종합하여 판단컨대 Tp는 parasitamia가

출현하는 급성기의 체내이행 중 다른 장기에서보다 일시적으로 많은 총체가 폐에 선택적으로 침입하여 폐조직내에 집충현상이 이루어진 데에 기인된 것으로 추정된다.

3. 감염돼지의 혈액에 대한 PCR와 MI법에 의한 총체 검출

감염돼지에서 PCR에 의한 혈중 총체 특이DNA 검출과 혈액의 마우스 접종에 의한 원충분리를 비교한 성적은 Table 4에서와 같이 A군의 P-1과 P-2는 108시간째와 120시간째에서만 PCR양성이었고, MI에서 P-1은 72, 96, 108, 120, 132시간째까지, P-2는 84시간째 이후 12시간 간격으로 132시간째까지 채혈한 혈액의 마우스접종에서 모두 원충이 분리되었다.

B군에서는 P-3와 P-4는 각각 120시간째에서만 PCR양성이었고, MI에서 P-3은 96, 120, 132시간째까지, P-4에서는 96시간째 부터 이후 12시간 간격으로 132시간째까지 채혈한 혈액의 마우스 접종에서 원충이 분리되었다.

Hitt와 Filice²²⁾ 진단방법별 Tp진단 적중을 조사에서 MI에서는 62%, PCR은 37%, 세포배양법에서는 25%였다고 하였으며, Sedlak 등은³⁴⁾ Tp 감염 토끼 혈액에 대한 PCR와 MI에 의한 진단 적중률 조사에서 전자에서는 79%, 후자에서는 100%였다고 하였고, 서와 주³⁸⁾ 고양이 혈액에 대한 PCR에서 10¹까지의 총체 특이DNA가 검출되었으나 MI에서는 10¹개에서도 원충이 분리되었다고 보고하였다.

저자들의 성적(Table 4)에서는 Tp감염 후 72시간

Table 3. Detection of Tp specific-DNA in organs of pigs slaughtered on day 7 post-inoculation of Tp tachyzoites by PCR

Group	Pig No.	organs				
		lung	heart	spleen	liver	brain
A	P-1	+	-	-	-	-
	P-2	+	-	-	-	-
B	P-3	+	-	-	-	-
	P-4	+	-	-	-	-

A : iv B : oral

째부터 132시간째까지 6회의 채혈에서 A군의 PCR 적중률은 33.3%(2회)였으며 B군은 4회의 채혈에서 25%(1회)로써 Hitt와 Filice의²²⁾ 성적(37%)보다는 약간 낮았고, Sedlak 등의³⁴⁾ 성적(79%)보다는 현저히 낮았다. 그러나 MI에서는 A군은 6회의 채혈에서 83.3%(5회)였고 B군은 4회의 채혈에서 75%(3회)와 100%(4회)의 적중율을 보임으로써 Sedlak 등의³⁴⁾ 성적(100%)과는 거의 일치 하였으나 Hitt와 Filice의²²⁾ 성적(62%)보다는 높았다.

이와 같이 PCR와 MI법에 의한 원충 검출 적중율에 현저한 차이가 있었던 것은 Tp 감염에 의한 급성기의 유행중에 나타나는 tachyzoite에서는 DNA의 추출이 용이하여 PCR의 적중률을 높일 수 있으나 급성기 이후에 나타나는 tachyzoite는 백혈구에 탐식되어 parasitophorous vacuole (PV)을^{13, 15)} 형성한 intracellular form이 되는 데 이것은 유행 중에 출현하더라도 산에 저항성이^{8, 15, 16)} 커서 cell lysis buffer에 의한 DNA의 추출이 불가능하여 PCR의 적중률을 낮게한 데에 기인된 것으로 생각된다.

그러나 intracellular form이 마우스의 복강내에 접종되었을 때에는 tachyzoite stage로 증식되므로 MI에 의한 진단 적중률은 PCR에서 보다 훨씬 높게 나타날 수 있지만 이 법에 의한 Tp의 분리는 마우스에 2~3대에 걸친 맹목계대(blind passage)를 수행해야 하기 때문에 많은 시간과 비용이 소요된다는 것이 단

점으로 지적되고 있다. 하지만 PCR법의 진단 적중율은 MI법보다 낮다고 하더라도 급성기의 신속하고 정확한 진단기법으로서의 이용 효과는 큰 것으로 생각된다.

IV. 결론

돼지의 급성 Tp병의 신속, 정확한 진단법을 개발코져 도살돼지와 인공감염돼지의 혈액과 각 장기를 재료로 하여 Tp B1 gene을 target로 한 PCR를 수행하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tp B1 gene을 target으로 하는 primer T-1과 T-2를 사용하여 인공감염 돼지의 혈액과 폐조직에 대한 PCR에서는 501bp의 총체 특이DNA가 검출되었으나 대조군인 *Neospora caninum*에서는 검출되지 않아 primer의 특이성이 인정되었다.

2. 도살돼지의 인공조직 혈액에 대한 Tp의 희석 단계별 총체 특이DNA검출 한계치는 혈액 1ml당 10⁶개 까지 이었다.

3. 도살돼지의 인공조직 각종 장기에 대한 Tp의 희석 단계별 총체 특이DNA 검출 한계치는 각 장기 5g 당 10²개 까지 이었다.

4. 도살돼지 및 인공감염돼지의 각종 장기로부터 총체 특이DNA의 추출방법은 조직의 동결, 용해, 마

Table 4. Comparison between isolation of Tp parasite by MI and detection of Tp specific DNA by PCR in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites

Group	Pig No.	Detection of infection	Hours after infection													
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	
A	P-1	MI*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
	P-2	MI	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
B	P-3	MI	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	P-4	MI	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

* : mouse inoculation

쇄 순서의 과정을 반복한 전처리 과정에서 얻은 재료를 PCR에 사용하는 것이 효과적이었다.

5. 인공감염 돼지의 혈액으로부터 총체 특이DNA는 Tp 감염후 108시간째와 120시간째에 검출되었으며 검출시기는 parasitaemia의 지속기간과 상관관계가 있었다.

6. 인공감염 돼지의 각종 장기로부터 총체 특이 DNA 검출은 폐에서만 가능하였다.

7. Tp감염 혈액으로부터 총체 검출 적중율은 PCR에서는 25~33.3%이었고 MI에서는 75~100%이었다.

참고 문헌

1. Assadi-Rad AM, New JC, Sharon P.(1995), Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management system in Tennessee, *Vet Parasitol*, 57 (4) : 289~297.
2. Beutler E, Gilbert T, Kuhl W.(1988), Interference of heparin with polymerase chain reaction, *J Immunol*, 146 : 3584~3591.
3. Beverley JKA.(1976), Toxoplasmosis in animals, *Vet Rec*, 99 : 123 127.
4. Buffolan W, Gibert RE, Aolland FJ, et al. (1996), Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women, *Epidemiol infect*, 308 : 349~351.
5. Burg JL, Grover CM, Pouletty D, Boothroyd JC. (1989), Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 27 : 1787~1792.
6. Choi WY, Nam HW, Kwak NH, et al.(1997), Food-borne outbreak of human toxoplasmosis, *J Infec Disease*, 175 : 1280~1282.
7. Darek PB, Matthew JC, Steven WD, et al.(1998), Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally inoculated cats, *Vet Parasitol*, 79 : 181~186.
8. Dominique S.(1996), Molecular genetic structure in *Toxoplasma gondii* closes in on a successful invader, *FEBS Letters*, 389 : 80~83.
9. Dubey JP.(1994), Toxoplasmosis, *J Am Vet Med Assoc*, 205(11) : 1593~1598.
10. _____, Beattie CP(1988), Toxoplasmosis of animals and man, CRC Press Inc, Boca Raton Flo : 1~200.
11. _____, Leighty JC, Beal VC.(1991), National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs, *J Parasitol*, 77 : 517~521.
12. _____, Katula AW, Sharar A. et al.(1990), Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cystes in pork, *J Parasitol*, 76 : 1201~1204.
13. _____, (1998), Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, *Inter J Parasitol* 28 : 1019~1024
14. _____, (1994), Zoonosis update toxoplasmosis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*(205) : 1593~1598.
15. _____, Andrews CD, Thullize P, et al. (1997), Long-term humoral antibody response by various serologic test in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*, *Vet Parasitol*, 68 : 41~50
16. _____, Lindsay DS, Speer CA. (1998), Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst, *Clin Microbiol Rev*, 11(2) : 267~299.
17. Duram TM, Colvin HM. (1978), Premarket evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagent, *J Clin Microbiol*, 7(3) : 255~260.
18. Esteban-Redondo I, Innes EA. (1998), Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts, *Inter J Parasitol*, 28 : 1459~1466.

19. _____, Maley SW, Nicoll S, *et al.* (1999), Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection, *Vet Parasitol*, 86 : 155~171.
20. Fletcher S. (1965), Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*, *J Clin Path*, 18 : 193~200.
21. Gamble HR, Brady RC, Dubey JP. (1999), Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the England states, *Vet Parasitol*, 82 : 129~136.
22. Hitt JA, Filice GA. (1992), Detection of *Toxoplasma gondii* parasitaemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation, *J Clin Microbiol*, 30 : 3181~3184.
23. Huguchi R. (1989), Simple and rapid preparation of samples for PCR. In principles and applications for DNA amplification(Erich H.A, editors), Stocktom Press, 31~38.
24. Jungersen G, Jensen L, Riber U, *et al.* (1999), Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs, *Inter J Parasitol*, 29 : 1307~1319.
25. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, *et al.* (1996), Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy, Results of a prospective case-control study in Norway, *Am J Epidemiol*, 144 : 405~412.
26. 이재구(1999), 최신수의기생충학(완전개정), 대한교과서주식회사, 537~541.
27. Lind P, Haugegaard J, Wingstrand A, Henriksen SA. (1997), The time course of the specific antibody response by various ELISA in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, *Vet Parasitol*, 71 : 1~15.
28. Markioka A, Kobayashi A. (1989), Evaluation of a commercial kitt toxoplasma direct agglutination test, *Jpn J Parasitol*, 38(4) : 179 183.
29. Michelle RW, Juile DJ, Richard EH. (1998), Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meat, *Inter J Food Microbiol*, 45 : 211~215.
30. Naot Y, Reminton JS. (1981), An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis, *J Infect Dis*, 142 : 73 78.
31. 노인순, 한정희, 김재훈, 안병우(1997), 자돈의 톡소플라즈마병, 대한수의학회지 37(4) : 817~823.
32. Sabin FB, Feldman HA. (1948), Dye as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite (toxoplasma), *Science*, 108 : 660~663.
33. Scuaraz-Aranda F, Galisteo JAJ, and Hiramoto RM. (2000), The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru, *Vet Parasitol*, 91 : 23 32.
34. Sedlak K, Literak I, Faldyna M, *et al.* (2000), Fatal toxoplasmosis in brown hares(*Lepus europaeus*) : possible reasons of their high susceptibility to the infection, *Vet. Parasitol*, 93 : 13~28.
35. 서명득, 장두환(1972), 돼지 Toxoplasmosis 의 간접적혈구응집반응과 피내반응에 관한 연구, 대한수의학회지, 12(1) : 51~58.
36. _____, 주후돈, 데이비드 마스(1995), Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단용 kit 개발에 관한 연구, 대한수의학회지, 35 : 538~539.
37. _____, 장동화, 주후돈(1989), ELISA를 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기진단에 관한 연구, 대한수의학회지, 29 : 567~575.
38. _____, 주보현(1999), 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 고양이 혈액내에서의 *Toxoplasma gondii* 검출에 관한 연구, 대한수의학회지, 39(6) : 1151~1160.
39. Stiles JE, Prade R, Green C.(1995), Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological

- samples by use of the polymerase chain reaction, *Am J Vet Res* 57 : 264~269.
40. Turner CB, Savva D.(1991), Detection of *T. gondii* in equine eyes, *Vet Rec*, 129 : 128~130.
 41. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, *et als*, (1987), *Veterinary Parasitology*, Longman Scientific & Technical, 227~231.
 42. Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. (1993), Comparison of two gene amplification method for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep, *J Med Microbiol*, 38 : 360~365.
 43. Weigel RM, Dubey JP, Siegel SM.(1994), The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Illinois swine(1992), *J Am Vet Med Assoc*.
 44. Wielecrod MF, Van GH, Duermerer WIH. (1983), Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin in antibodies, *J Clin Microbiol*, 17 : 981~987.
 45. Wingstrand A, Lind P, Hangegard J. (1997), Clinical observation, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected *Toxoplasma gondii*, *Vet Parasitol*, 72 : 129~140.