

臟器塗抹法과 組織標本法에 의한 *Babesia bigemina*와 *Babesia argentina*의 形態學的鑑別에 관한 研究

서 명 득

H. M. D. Hoyte

농촌진흥청 가축위생연구소

호주 Queensland 대학교 기생충학교실

緒 論

바베시아病은 바베시아 原虫으로 인한 動物들의 疾病이며 진드기에 의해 媒介되는 疾病으로 世界 各地에서 發生되며 이에 의한 經濟的損失은 畜產業에 莫大한 支障을 招來하고 있다¹¹⁻¹³.

Babesia 屬(Starcovici, 1893)은 脊椎動物의 赤血球에 感染하며 Ixodid tick 에 의해 傳播된다^{5,14}.

Babes(1888)에 의해 東部 유럽에서 처음으로 病原體가 發見되었고 Smith 및 Kilborne(1893)은 *Babesia bigemina*가 美國에서 Texas-fever의 原因體임을 究明함으로써 이것들이 傳染病의 하나임을 再確認하였던 것이다¹¹.

Levine⁶은 現在 各種動物에 感染되는 *Babesia* 屬은 71種類로 分類하고 그 중에서 6種類가 소에게 感染된다고 發表하였다. 이 原虫들이 自然宿主에 感染되었을 때에는 熱發, 貧血, 血色素尿, 腦症狀 등을 나타내고 斃死도 일으킨다^{11,12}.

그래서 最近 20年間に 이들 原虫에 의한 진드기熱에 대해 폭넓은 研究가 遂行되어 왔고, 그 結果 새로운 識見과 技術이 發表되었다¹³.

호주에 있어서 진드기熱은 大體로 3가지 原因體 *Babesia argentina*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*에 의해 發生되며 이 順으로 그 重要性이 認定되고 있다. 뿐만 아니라 이들에 대한 診斷方法이나 免疫方法 등에 對해서는 世界 어느 나라보다도 잘 開發되어 있다^{12,13}.

Callow 및 McGavin¹¹과 Rogers¹⁵는 *B. argentina*에 感染된 소의 各臟器 및 腦의 直接塗抹法과 組織標本法으로 原虫이 腦의 毛細血管內에 集中的으로 packing된 所見을 보인다고 하였고, Hoyte⁹는 *B. argentina*와 *B. bigemina*는 大腦皮質과 毛細管末稍

血液의 塗抹法으로 두 原虫의 鑑別診斷이 容易함을 報告한 바 있고, Lee⁷도 腦塗抹法으로 *B. argentina*의 鑑別이 容易함을 報告하였다.

Mahoney 및 Saal¹⁰은 *B. argentina*와 *B. bigemina*의 鑑別은 厚層血液塗抹法으로 손쉽게 할 수 있음을 報告하였으며, Callow 및 Johnston⁸도 임상적으로 正常的인 保有宿主의 腦塗抹法으로 *B. argentina*와 *B. bigemina*의 鑑別이 可能하다는 것을 報告하였다.

Mahoney¹⁰는 補體結合反應에 의한 바베시아의 診斷法을, Ludford¹⁶는 螢光抗體法에 의한 診斷法을 各各 確立하였다.

Wright^{17,18}는 *B. argentina*가 感染된 大腦皮質內의 原虫의 電子顯微鏡의 觀察과 腎臟毛細血管內의 感染赤血球에 對한 똑같은 觀察을 通해서 末梢毛細血管內에서의 *B. argentina*의 集虫現象을 밝혔다. 그리고 Goodger 및 Mahoney¹⁹는 急速平板凝集反應法을 應用하여서 *B. argentina*가 感染된 소를 集團의으로 診斷하는 方法을 報告하였다.

著者들은 *Babesia* 感染牛의 各臟器(肺臟, 肝臟, 腎臟, 心臟, 淋巴節, 腦)로부터 組織의 塗抹法과 組織標本法에 의한 *B. bigemina*와 *B. argentina*의 檢出如否를 調査比較코자 이 試驗을 實施하였다.

材料 및 方法

實驗動物: 供試動物은 바베시아의 發生이 전혀 없는 地域에서 分娩飼育된 5~6月齡의 어린송아지(Herford 잡종)와 진드기(*Boophilus microplus*)이며 송아지는 진드기의 感染이 없도록 隔離된 畜舍에서 飼育하였으며 本試驗에 供試되기 10日前에 2日間隔으로 血液을 檢査하여 原虫의 感染이 없음을 確認하였고 內部寄生 虫도 完全히 驅除한 後에 試驗에 使用하였다.

試驗群은 4頭를 脾臟剔出하였고 剔出 10日後에 2群

으로 나누어 2頭는 *B. argentina* 試驗에 다른 2頭는 *B. bigemina* 感染試驗에 各各 使用하였다.

原虫株: 이 試驗에 供試된 原虫株는 모두가 CSIRO Long Pocket Laboratories 의 Animal Health Division 에서 分讓받았다. *B. bigemina* 株는 Long Pocket Laboratories 에서 數年間 소에 繼代되어 온 것으로서 0.5% 感染血液 4 ml 적을 頸靜脈으로 接種하였다. *B. argentina* 株도 Long Pocket Laboratories 에서 1965 年 以後부터 계속 保存繼代되어 오던 것으로서 1% 感染血液 4 ml 적을 頸靜脈에 各各 接種하였다.

血液塗抹 및 原虫檢査: 原虫接種後의 發熱症狀은 每日 午前 8~9時 사이에 檢溫하였고 血液은 動物이 斃死되기 前까지 每日 꼬리 末端部의 毛細血管으로부터 採血하였으며 斃死後에는 各臟器를 直接塗抹하여 固定, 染色한 後에 鏡檢하였다.

腦의 塗抹標本과 原虫檢査: 斃死한 直後에 곧 腦全部를 剔出하여 塗抹標本을 만들었고, 그 後에는 材料를 5°C 冷藏庫에 保存하여 두고 必要에 따라서 每日 標本을 만들어 鏡檢하였다.

組織標本製作 및 原虫檢査: 腦와 各臟器의 材料를 잘게 잘라서 10% 中性 포르말린으로 1週日間 固定한 後 Short 및 Cooper¹⁰⁾의 方法을 改良한 다음과 같은 過程을 거쳐서 鏡檢하였다.

Process of Section Preparations

- Fix in neutral buffered formalin
- Embed in paraffin wax and cut this section
- Remove wax with toluene
- Remove toluene with alcohol
- Bring down to distilled water
- Stain for 1 hour or longer in Giema stain, 10 ml; acetone, 10 ml; methanol, 10 ml; buffered distilled water, 100ml (pH 7.2 to 7.4)
- Differentiate in 95% ethyl alcohol
- Apply absolute alcohol
- Apply toluene
- Apply several fresh changes of toluene until section becomes clear
- Mount in permount

結 果

脾臟剔出牛에 있어서 原虫出現과 臨床觀察: *B. bigemina* 와 *B. argentina* 를 接種한 脾臟剔出牛에서

Table 1. Clinical Signs and Parasitaemia of Splenectomized Calf Inoculated with *B. bigemina* and *B. argentina*

Group	Cattle No.	Day of Infection															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>B. bigemina</i>	1	T(°C)	38.7	39.2	38.9	40.1	40.5	40.1	40.2	40.2	38.7	36.9					
		P	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	T(°C)	38.8	39.4	39.9	40.1	40.2	40.1	40.5	39.8	37.1						
P	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>B. argentina</i>	3	T(°C)	38.8	38.7	38.6	39.5	39.8	38.3	38.9	39.5	39.0	39.4	39.8	40.7	40.9	41.6	41.4
		P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	T(°C)	38.5	38.4	38.7	38.5	38.7	38.6	39.9	40.2	40.5	41.0	41.5	37.2			
P	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Parasitaemia(P):
 — : Negative
 + : 0~1% of red blood cells
 ++ : 2~5% of red blood cells
 +++ : 10% of red blood cells

Nervous signs(N):
 + : Acute nervous signs present
 — : Acute nervous signs absent

Table 2. Detection of *B. bigemina* and *B. argentina* by Smear Method and Tissue Section from Organ's of Splenectomized Calf after Death

Organ	Protozoa		Protozoa	
	Smear	Section	Smear	Section
Brain	+	—	卍	卍
Kidney	++	—	卍	卍
Liver	++	—	++	++
Lung	+	—	+	+
Heart	+	—	++	++
Lymphnode	+	—	+	+

Table 3. Detection of *Babesia argentina* from Brain Kept at 5°C Refrigerator during 9 Days

Days after Keeping	Detection of Protozoa	Remark
1	卍	
2	卍	
3	卍	
4	卍	Autolysis
5	卍	Initiated Putrefaction
6	卍	Putrefaction
7	++	Putrefaction
8	+	Severe Putrefaction
9	+	Severe Putrefaction

觀察된 臨床症狀과 血液을 接種한 後 每日 調査한 赤血球內 原虫出現所見은 다음과 같다(第 1表).

臟器의 塗抹法과 組織標本法에 의한 原虫檢出成績 : *B. bigemina* 및 *B. argentina*에 感染되어 斃死한 直後에 肺臟, 肝臟, 腎臟, 心臟, 淋巴節과 腦의 塗抹法 및 組織標本法에 의한 原虫檢出成績은 다음과 같았다(第 2表).

*B. bigemina*의 感染牛에서는 腦와 臟器의 塗抹法으로 原虫이 檢出되지만 組織標本法에 依해서는 檢出되지 않았다. 그러나 *B. argentina*의 경우에는 두 가지 方法으로 原虫이 檢出되었다(사진 2~10 참조).

특히 腦와 腎臟에서는 어느 方法을 利用하는지 毛細血管內에 많은 數의 原虫이 集虫되어 있는 것이 特異한 所見이었다(그림 6~8 참조). 그리고 心筋組織標本에서도 原虫의 集虫現象(사진 9)을 볼 수 있었으나 그

밖의 肺臟, 肝臟, 淋巴節 등에서는 極小數의 原虫만이 檢出되었다.

腦組織의 保存에 따른 原虫檢出成績 : *B. argentina*를 接種하여 斃死한 犢牛의 腦材料를 剔出하여 5°C 冷藏庫에 保存하고서 每日 塗抹法에 依하여 原虫檢出 如何를 調査한 바 1~9日間 腦의 皮質毛細血管內에 集虫되어 있는 原虫이 계속하여 檢出되는 것을 確認하였다(第 3表).

考 察

Mahoney 및 Saal¹⁹⁾은 厚層血液塗抹法을 利用하여 *B. bigemina*와 *B. argentina*의 鑑別診斷을 發見하였고 現在까지도 그들은 集團放牧牛의 라베시아 感染 調査에 이 方法을 利用하고 있으며, Callow 및 McGavin¹⁷⁾과 Callow 및 Johnston²⁰⁾은 腦塗抹法을 利用하여 *B. bigemina*와 *B. argentina*를 鑑別診斷코자 大小腦의 皮質과 연수의 組織塗抹法을 利用한 바 *B. argentina*는 이들 腦組織의 毛細血管에서 쉽게 原虫이 發見되고 특히 大腦皮質에 多數의 感染赤血球가 集虫되어 있으나 *B. bigemina*는 그렇지 않으므로 이 兩者의 鑑別에 큰 도움이 된다고 하였고 또한 cerebral babesiosis에 있어서는 심한 神經症狀을 觀察할 수 있다고 하였다.

이 試驗에서도 血液塗抹法, 組織塗抹法 및 組織標本法을 利用하여 *B. bigemina*와 *B. argentina*의 檢出 如何를 比較하였던 바 Mahoney 및 Saal¹⁹⁾, Callow 및 McGavin¹⁷⁾ 그리고 Callow 및 Johnston²⁰⁾의 成績과 一致하는 結果를 얻었다.

특히 腦와 腎臟에서는 *B. argentina*의 檢出이 容易하였으나 心臟筋肉의 組織標本에서도 多數의 原虫이 集虫되어 있는 現象을 發見할 수 있었는데 이것은 지금까지의 다른 成績에서 찾아볼 수 없었던 하나의 좋은 發見이라고 생각된다.

그리고 腎臟과 腦의 毛細血管內에 *B. argentina* 感染赤血球가 蓄積되는 現象은 3가지 面에서 考察될 수 있다고 생각된다.

첫째는 *B. argentina*가 赤血球에 感染되면 赤血球의 表面이 거칠어져서 末稍血管에서 血栓을 잘 일으킬 수 있다는 點, 둘째는 腎臟과 腦의 解剖學的 位置로서 다른 장기에 比해서 末稍血管이 더 많이 分布되어 있다는 點, 셋째는 感染赤血球로부터 原虫의 代謝作用의 副産物로 產生되는 카리크라인(kallikrein)이 血中에 增加됨으로써 야기되는 血壓의 低下 등으로 생각할 수 있다¹⁷⁻²¹⁾.

B. argentina 感染腦를 5°C 冷蔵庫에 保存하면서 原虫檢出如否를 調査한 바 約 9日間 塗抹法으로 原虫을 檢出할 수 있었는데 이러한 成績으로 보아서 Babesia 病으로 斃死한 소로부터 *B. argentina* 를 證明코자 할 때에는 다른 臟器보다도 腦와 더불어 腎臟을 于先하여 檢査함으로써 診斷에 큰 도움이 되리라고 믿는다.

以上에서 論한 바와 같이 今後 國內에서 *B. bigemina* 와 *B. argentina* 의 檢索을 試圖코자 할 때에는 腦의 塗抹法이나 組織標本法을 利用하면 兩 原虫의 特性과 形態를 鑑別하는데 쉬운 方法이 될 것으로 思料된다.

結 論

脾臟剔出한 5~6月齡의 犏牛에 *B. bigemina* 와 *B. argentina* 를 各各 接種하여 血液과 組織塗抹法, 그리고 組織標本法에 依한 이 두 原虫의 檢出方法을 比較하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. *B. argentina* 는 血液塗抹法, 組織塗抹法 및 組織標本法에 의해 原虫의 檢出이 容易하였으나, 特히 腦와 腎臟의 塗抹法이나 組織標本法에 의한 原虫의 證明이 더욱 容易하였고 이들 組織의 毛細血管內에는 *B. argentina* 感染赤血球의 蓄積現象을 볼 수 있었으나

B. bigemina 의 경우에는 이런 所見을 觀察할 수 없었다.

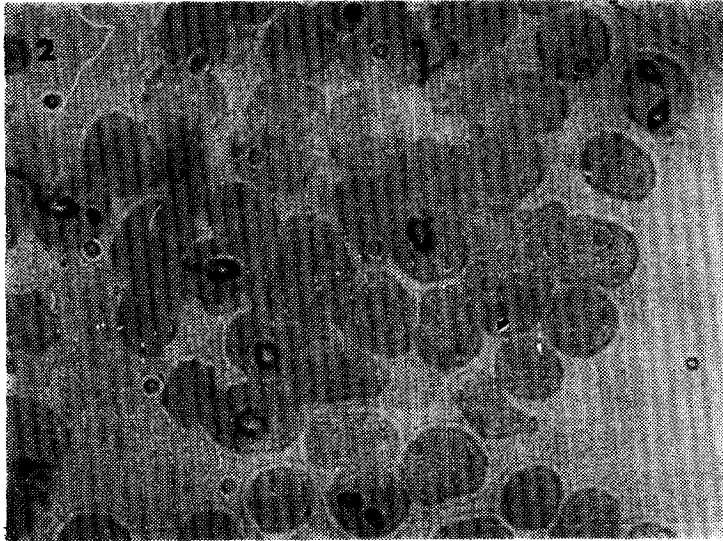
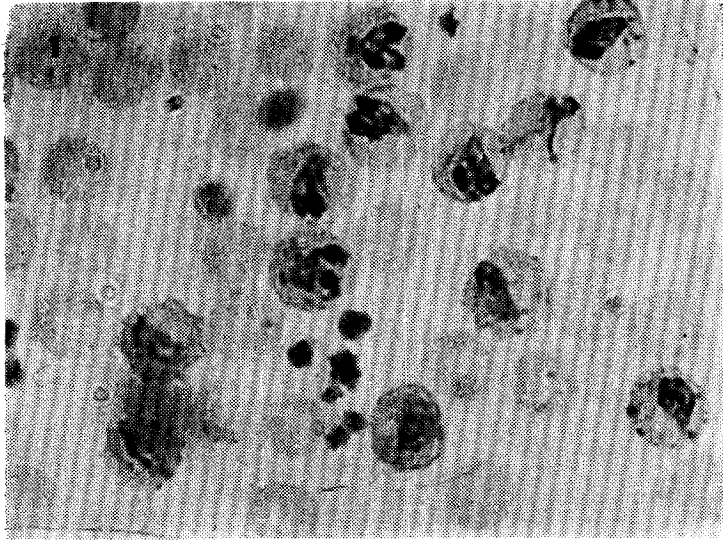
2. *B. argentina* 感染腦를 5°C 冷蔵庫에 保存했을 때는 塗抹法에 依하여 腦皮質의 毛細血管內에서 9日間 原虫을 檢出할 수 있는 點으로 보아서 野外에서 類似 바베시아 病으로 斃死한 소의 境遇 이 方法을 應用하면 *B. bigemina* 와 *B. argentina* 의 鑑別 診斷이 可能한 것이다.

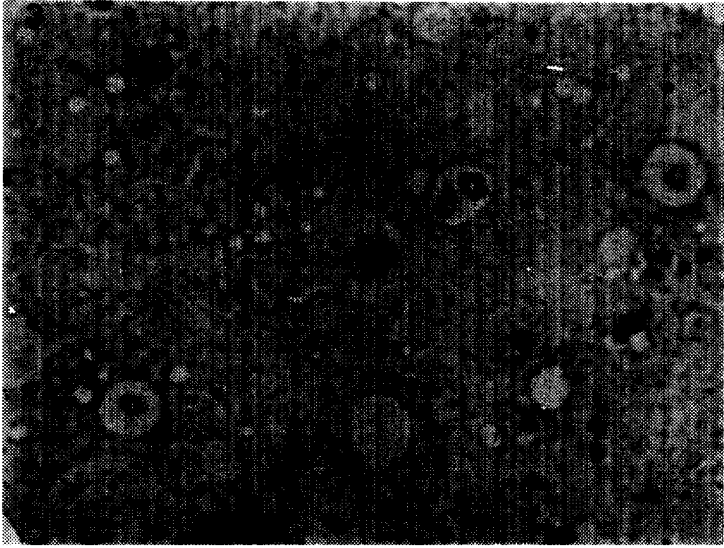
3. 國內 소의 바베시아病 檢索에 腦의 塗抹法이나 組織標本法을 應用하면 *B. bigemina* 와 *B. argentina* 의 區別에 充分한 診斷的 價値가 있을 것이다.

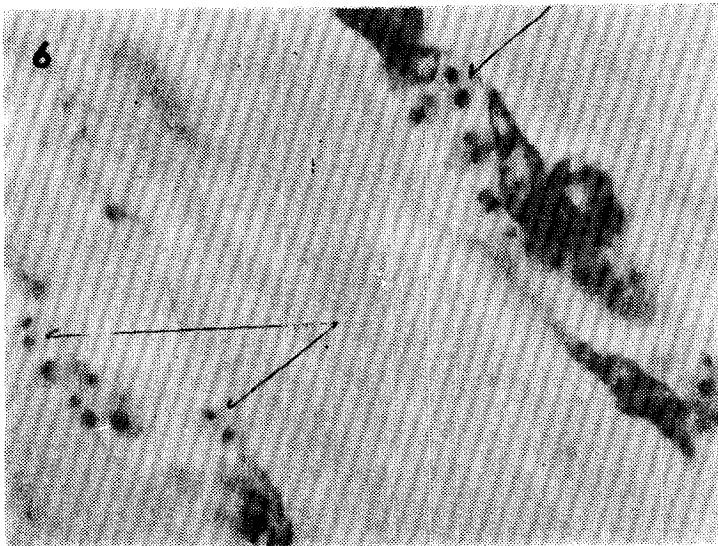
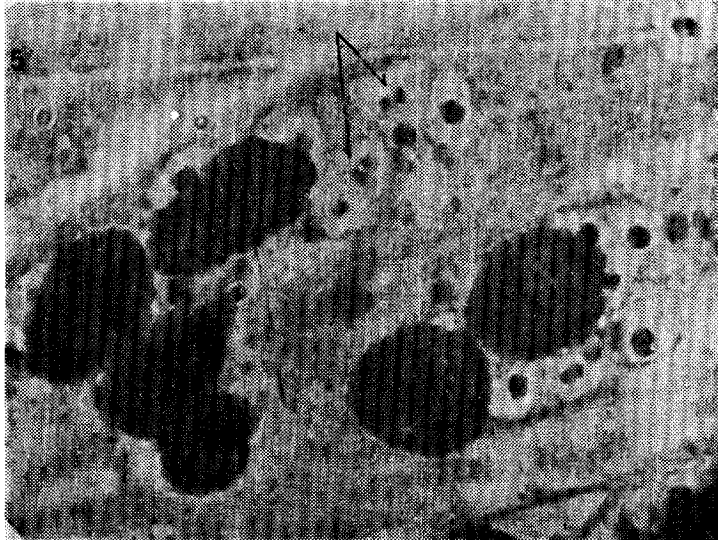
Acknowledgements: This report was financed by the Australian Development Assistance Agency (ADAA). I wish to thank the Authority for their support. I am deeply indebted to Mr. Ralph Leutton, the technician of the Department of Parasitology of the University of Queensland, for his technical cooperation. I do also wish to thank all the staff of this Department for their cooperation and kindness.

Legends for Figures

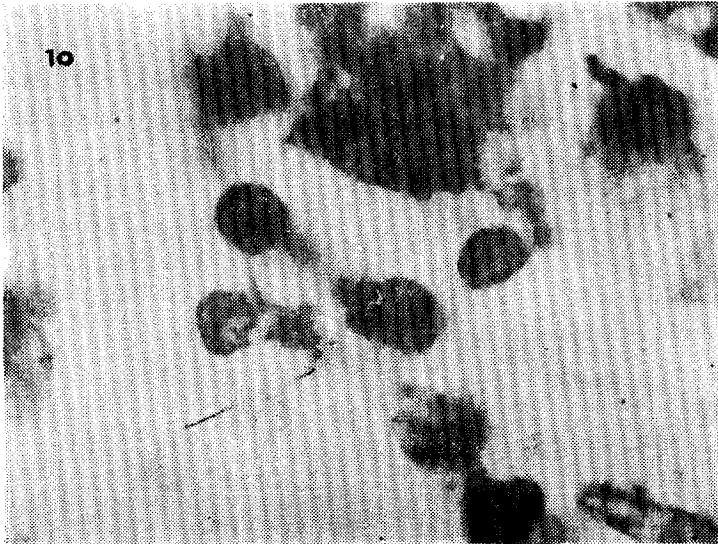
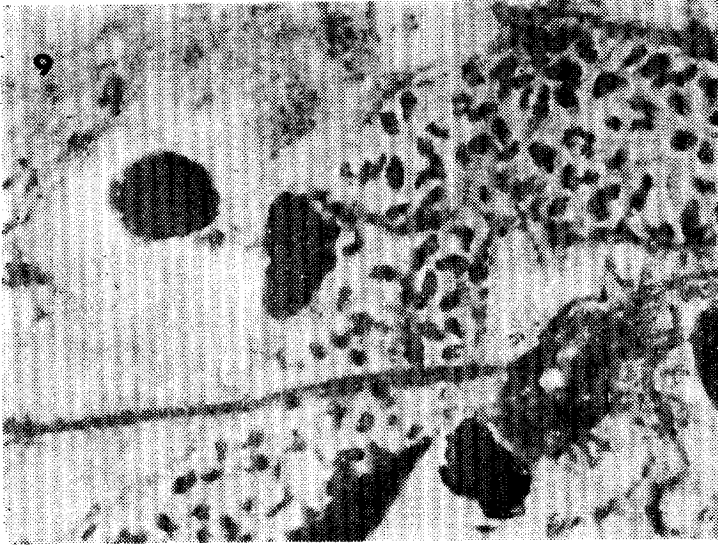
- Fig. 1. *B. bigemina* in cow blood smear. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 2. *B. argentina* in cow blood smear (single or paired form). Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 3. *B. argentina* in liver smear. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 4. *B. argentina* in kidney smear. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 5. *B. argentina* in brain smear kept at 5°C refrigerator during 9 days. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 6. *B. argentina* in fresh brain smear. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 7. *B. argentina* in cerebral cortex section. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 8. *B. argentina* in kidney cortex section. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 9. *B. argentina* in heart muscle section. Giemsa stain, ×1,000.
- Fig. 10. *B. argentina* in lymphnode section. Giemsa stain, ×1,000.











參考文獻

1. Callow, L.L. and McGavin, M.D.: Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. Aust. Vet. J. (1963) 39 : 15.
2. Callow, L.L. and Johnston, L.A.Y.: Babesia spp. in the brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique. Aust. Vet. J. (1963) 39 : 25.
3. Gooder, B.V. and Mahoney, D.F.: A rapid slide agglutination test for the herd diagnosis of *Babesia argentina* infection. Aust. Vet. J. (1974) 50 : 250.
4. Hoyte, H.M.D.: Differential diagnosis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in cattle using thin blood smears and brain smears. Aust. Vet. J. (1971) 47 : 248.
5. Hoyte, H.M.D.: The tick-fever parasites of cattle. Proc. R. Soc. Qd. (1976) 87 : 5.
6. Levine, N.D.: Taxonomy of the piroplasms. Trans. Amer. Micros. Soc. (1971) 90(1) : 2.
7. Leeflang, P.: Diagnosis of *Babesia argentina* infections in cattle using brain smears. Aust. Vet. J. (1972) 48 : 72.
8. Ludford, C.G.: Fluorescent antibody staining of four Babesia species. Exp. Parasitol. (1969) 24 (3) : 327.
9. Mahoney, D.F. and Saal, J.R.: Bovine babesiosis: Thick blood films for the detection of parasitaemia. Aust. Vet. J. (1961) 37(2) : 44.
10. Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: Diagnosis of infection by a complement fixation test. Aust. Vet. J. (1962) 38(2) : 48.
11. Mahoney, D.F.: In "Immunity to Animal Parasites" (E.J.L. Soulsby) Academic Press Inc., New York and London (1972) pp. 301-341.
12. Mahoney, D.F.: Babesiosis of cattle. A.M.R.C. Review (1973) No. 12 : p. 1-12.
13. Mahoney, D.F. et al.: Tick-fevers of cattle. Australian Veterinary Association Queensland Division. Technical Report Series No. 1 (1974).
14. Neitz, W.O.: Piroplasms of Domestic Animals. Annals New York Academy of Sciences (1956) p. 56.
15. Rogers, R.J.: Observations on the pathology of *Babesia argentina* infections in cattle. Aust. Vet. J. (1971) 47 : 242.
16. Short, H.E. and Cooper, W.: Staining of microscopical sections containing protozoal parasites by modification of McNamara's method. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1947) 41(3) : 427.
17. Wright, I.G.: An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia argentina* infection. Int. J. Parasit. (1972) 2 : 209.
18. Wright, I.G.: Ultrastructural changes in *Babesia argentina* infected erythrocytes in kidney capillaries. J. Parasit. (1973) 59(4) : 735.
19. Wright, I.G.: Plasma kallikrein levels in acute *Babesia argentina* infections in splenectomized and intact calves. Z. Parasitenk. (1973) 41(4) : 269.
20. Wright, I.G. and Mahoney D.F.: The activation of kallikrein in acute *Babesia argentina* infections of splenectomized calves. Z. Parasitenk. (1974) 43(4) : 271.
21. Wright, I.G. and Kerr J.D.: Effect of trasylol on packed cell volume and plasma kallikrein activation in acute *Babesia argentina* infection of splenectomized calves. Z. Parasitenk. (1975) 46(3) : 189.

Studies on Morphological Differentiation of *Babesia bigemina* and *Babesia argentina* Infections Using Smears and Tissue Sections of Organs of Splenectomized Calves

M.D. Suh, D.V.M., M.S.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

H.M.D. Hoyte, B.Sc., Ph.D.

Department of Parasitology, University of Queensland, Australia

Abstract

The smears and tissue sections of organs (liver, lung, kidney, heart, lymph-node, brain) were carried out to compare the detection of parasites in the splenectomized calves artificially infected with *B. bigemina* and *B. argentina*, respectively.

The results obtained from this experiment were abstracted as follows:

1. In the calves infected with *B. argentina* the parasites were easily detected by the blood smears and tissue smears but, particularly, the detection of parasites in the kidneys and brain by tissue smears and tissue sections was greater useful.

In this experiment, the packing of the parasite-infected red blood cells was found in the capillary vessels of the organs.

2. When the fresh infected-brain was kept at 5°C refrigerator, *Babesia argentina* could be detected during 9 days from the brain smears.

According to this results, we could do differentiate the parasites from the brain of the dead animal by the doubtful babesiosis in the field.

3. If we use the brain smears and brain sections in order to survey or detect *Babesia* infections of cattle in Korea, these methods could be worthwhile for the differential diagnosis of *B. argentina* and *B. bigemina*.