

## 분변에 함유된 *Cryptosporidium parvum* 오오시스트의 순수분리 —Ether extraction과 discontinuous sucrose gradients의 병용

위성환<sup>1)\*</sup>, 이정길<sup>2)</sup>, 김보숙<sup>1)</sup>, 주후돈<sup>1)</sup>, 강승원<sup>1)</sup>

농촌진흥청 가축위생연구소<sup>1)</sup> 및 전남대학교 수의과대학<sup>2)</sup>

국문초록: *Cryptosporidium*의 오오시스트를 분변에서 분리해 내는 방법은 많이 알려져 있으나 그러한 방법은 주로 설사변에 함유된 원충을 분리하는 데 적용되었다. 이 실험에서는 송아지와 마우스를 *C. parvum*으로 감염시키고, 그 분변으로부터 원충을 순수 분리하기 위해 ether extraction (EE)법과 discontinuous sucrose gradients(DSG)법을 병용하여 실시하였다. 먼저 EE법으로 분변 내의 지질이나 지방성분과 함께 큰 이물질을 제거한 후 동망체를 사용하여 분변내의 이물질을 다시 한번 제거하였다. 동망체에 걸러진 분변 부유액을 2.5% potassium dichromate 현탁액으로 만들어 DSG법으로 원심한 결과 비중 1.103과 1.064의 sucrose gradient 경계부위에 흰 밴드가 관찰되었다. 흰 밴드 부위에서 이물질이 제거된 오오시스트를 회수할 수 있었는데, 송아지와 마우스 분변을 EE법으로 전처리한 부유액에 ml 당 오오시스트의 수가 많을수록 원충의 회수율은 높았다. 송아지 분변에서 회수된 원충의 회수율은 EE법으로 처리된 부유액 내에  $3.8 \times 10^7$ /ml개의 오오시스트가 함유되었을 때 81.6%였으며, 마우스 분변에서 회수된 원충의 회수율은 EE법으로 처리된 부유액내에  $3.2 \times 10^6$ /ml 개의 오오시스트가 함유되었을 때 51.6%이었다. 따라서 50% 정도의 원충을 회수하기 위해서는 EE법으로 전처리한 분변 부유액의 ml당 오오시스트의 수가  $2 \times 10^6$ 개 이상 되어야 할 것으로 나타났다. 또한 이 방법은 송아지의 설사분변은 물론 정상적인 분변이나 마우스 분변에 함유된 오오시스트를 순수 분리하는데 효과적이었다.

### 서 론

*Cryptosporidium*을 실험실내에서 유지하기 위하여 계태아 배양(Rosales *et al.*, 1992)이나 세포배양(Wagner and Prabhy Das, 1986; Buraud *et al.*, 1991; Flanigan *et al.*, 1991)이 시도되었으나 오오시스트로 완전하게 발육되는 수가 매우 적어서 다량의 원충을 얻기가 어려웠다. 그래서 자연감염된 동물이나 실험적으로 감염시킨 동물의 분변으로 배출되는 오오시스트를 채취하여 실험에 사용하고 있다. 그런데 분변중에 다른 이물질들과 섞여 있는 상태의 오오시스트는 cryptosporidiosis의 혈청학적 진단기법이나 원충의 항원 분석에 사용할 수 없다. 이러한 목적으로 사용되는 원충은 다른 물질 즉 세균을 포함한 모든 이물질이 제거된 상태이어야 한

다(Ungar and Nash, 1986; Mead *et al.*, 1988a & 1988b; Tilley *et al.*, 1991; Nina *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1992; Uhl *et al.*, 1992).

분변에서 이 원충을 분리하는 방법으로는 sodium chloride나 sucrose 등을 이용한 부유법(Lazo *et al.*, 1986; Robert *et al.*, 1990; Ungar, 1990)과 ether extraction법(Riggs and Perryman, 1987), sucrose, percoll, cesium chloride 등의 비중을 이용한 방법(Arrowood and Sterling, 1987; Luft *et al.*, 1987; Dubey *et al.*, 1990)이 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 주로 송아지의 설사변에 함유된 원충을 순수 분리하는데 적용되고 있다. 저자들은 이미 보고된 방법들인 ether extraction법(Riggs and Perryman, 1987)과 discontinuous sucrose gradients법(Arrowood and Sterling, 1987)을 병용하여 설사변뿐 아니라 정상변에서도 오오시스트를 순수 분리할 수 있었기에 그 결과를 보고한다.

• 논문접수 1994년 1월 20일, 수정재접수 1994년 2월 21일

\* 별책 요청 저자

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

Sheather's sugar 부유법과 DMSO-modified acid-fast 염색법(Bronsdon, 1984)으로 검사하여 *C. parvum*에 감염되어 있지 않은 7일령의 젓소 송아지 1두와 가축위생연구소 specific pathogen free (SPF) 실험동물사에서 생산되는 20일령(8-10 g)의 ICR계 마우스 50마리를 사용하였다.

### 2. 실험동물의 감염 및 분변의 처리

실험동물의 감염에 사용된 *C. parvum*은 우리나라에서 사육되는 BALB/c 마우스에서 분리하여 SPF 마우스(ICR)에 계대종인 VRI-CN91이었다(위성환 외, 1992a & 1992b). 송아지에는  $7 \times 10^6$ 개의 오오시스트를 경구 투여하고, 그 후 6-10일 사이에 배출된 송아지 분변을 동량의 2.5% potassium dichromate에 부유시켜 4°C에 보관하였다. 마우스에는 마리당  $2 \times 10^5$ 개의 오오시스트를 경구 투여하고, 투여 후 5-15일 사이에 배출된 분변을 수거하여 동량의 2.5% potassium dichromate에 부유시켜 4°C에 보관하였다.

### 3. 원충의 순수 분리

가. 제1단계, Ether extraction(EE)법: 송아지와 마우스 분변을 ether extraction법(Riggs and Perryman, 1987)으로 전처리하였다. 그 방법을 요약하면 2.5% potassium dichromate에 보관되어 있는 분변을 잘 흔들어 그중 5 ml을 10배 용량의 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)에 부유시켜 3회 원심 세척(1500 × g, 10분)하였다. 침전물을 5배 용량의 1% sodium bicarbonate 용액에 부유시키고 7.5 ml의 diethylether와 혼합하여 30초 이상 힘차게 흔든 다음 원심(1500 × g, 10분)하였다. 침전물을 PBS에 3회 원심 세척(1500 × g, 10분)한 후 동망체(80 mesh부터 250 mesh, 61 μm porosity)를 이용하여 단계적으로 큰 이물질들을 제거하였다. 최종적으로 걸러진 부유액을 PBS에 1회 원심 세척(1500 × g, 10분)하고 2.5% potassium dichromate에 부유시킨 다음 혈구계산판으로 단위용적(ml)당 오오시스트의 수를 계산하였다.

나. 제2단계, Discontinuous sucrose gradients(DSG)법: Discontinuous sucrose gradients법(Arrowood and Sterling, 1987)을 위한 용액은 다음과 같이 만들었다.

- A용액: 500 g의 sucrose를 320 ml의 증류수에 용해
- B용액: 1% Tween 80이 함유된 0.025 M PBS

○ C용액: 위 A용액 1에 B용액 2를 혼합, 비중 1.103

○ D용액: 위 A용액 1에 B용액 4를 혼합, 비중 1.064

50 ml의 polypropylene 원심튜브에 10 ml의 C용액을 분주하고 그 윗면에 D용액 10 ml을 추가한 다음 제 1단계에서 전처리된 오오시스트의 부유액 5 ml를 가장 윗면에 올려 30분간 원심(1500 × g)하였다. DSG법으로 원심한 후 C와 D용액의 경계면에서 흰 밴드가 관찰되었는데, 밴드부위에서 대부분의 오오시스트가 회수되었다(1차 회수). 1차 회수하였을 때 원심 튜브 바닥에 가라 앉은 침전물을 5 ml의 2.5% potassium dichromate에 부유시켜 1차 회수때와 동일한 방법으로 원심한 후 C와 D의 경계면에서 오오시스트를 재차 회수하였다(2차 회수). 회수된 오오시스트는 멸균된 PBS로 3회 원심 세척(1500 × g, 10분)하였다.

다. 항생제 및 항진균제 처리: 멸균된 PBS로 원심 세척한 오오시스트는 세균과 곰팡이의 증식을 억제하기 위하여 0.1% glucose(weight to volume), penicillin(5,000 IU/ml), streptomycin(5 mg/ml), amphotericin-B(20 μg/ml)가 첨가된 PBS에 부유시켜 실온에 3시간 감작시켰다(Current and Haynes, 1984). 그 후 멸균된 PBS로 3회 원심 세척(1500 × g, 10분)하였으며, 오오시스트의 멸균유무를 확인하기 위하여 10% fetal bovine serum(Gibco)이 함유된 α-minimum essential medium(α-MEM, Gibco) 배지에서 Mardin-Darby bovine kidney(MDBK) cell를 배양하면서 항생제 및 항진균제가 처리된 오오시스트를 접종하여 세균과 곰팡이의 증식을 관찰하였다. PBS로 원심 세척한 오오시스트는 혈구 계산판으로 ml당 오오시스트의 수를 계산하였다.

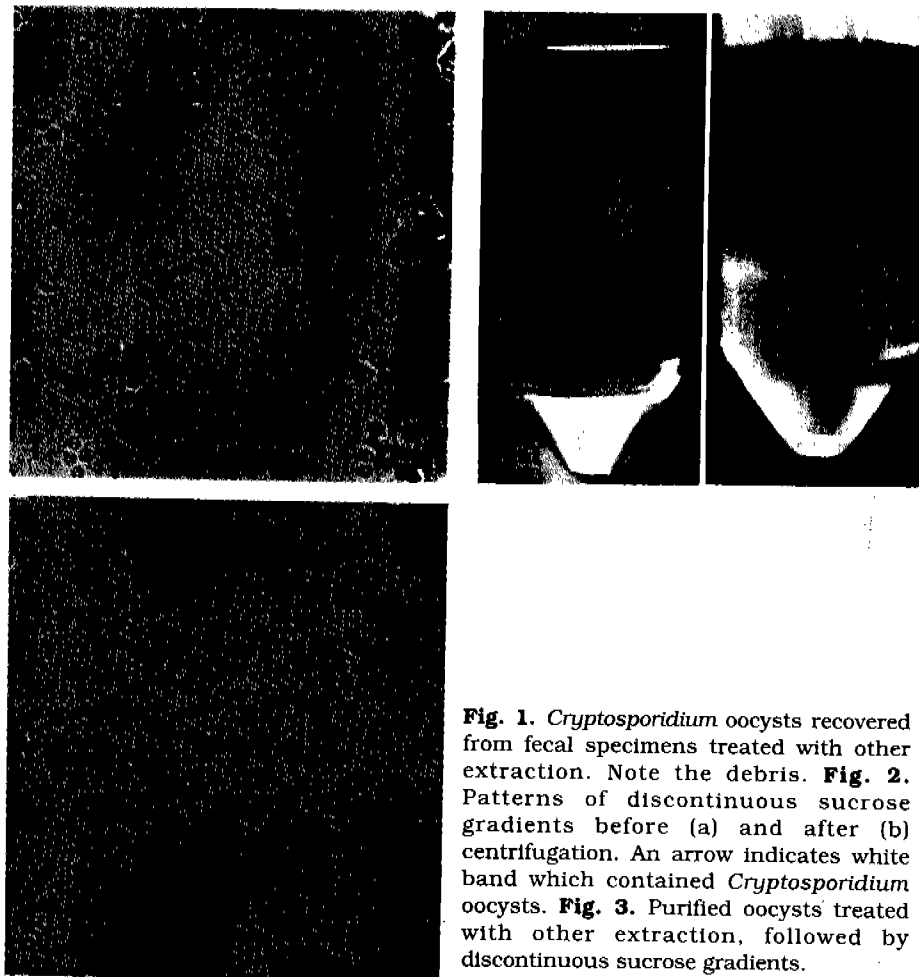
### 4. 원충의 회수율

EE법으로 전처리한 용액에 함유된 오오시스트의 수를 기준으로 하여 DSG법으로 회수된 오오시스트의 수를 계산하여 회수율을 구하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{제2단계에서 순수분리된 오오시스트의 수/ml}}{\text{제1단계로 처리한 용액내 오오시스트의 수/ml}} \times 100$$

## 결 과

EE법으로 분변을 전 처리한 후 동망체로 걸러낸 부유액에는 큰 이물질들은 거의 제거되고 없었으나 작은 이물질들은 남아 있었다(Fig. 1). EE법으로 처리한 후 2.5% potassium dichromate에 함유된



**Fig. 1.** *Cryptosporidium* oocysts recovered from fecal specimens treated with other extraction. Note the debris. **Fig. 2.** Patterns of discontinuous sucrose gradients before (a) and after (b) centrifugation. An arrow indicates white band which contained *Cryptosporidium* oocysts. **Fig. 3.** Purified oocysts treated with other extraction, followed by discontinuous sucrose gradients.

오오시스트를 순수분리하기 위해 DSG법으로 원심 분리한 바 C와 D용액의 경계면에서 흰 밴드가 관찰되었고 그 밴드에서 이물질이 제거된 오오시스트를 회수할 수 있었다(Fig. 2 and Fig. 3). 이때 튜브에 가라앉은 침전물에도 많은 수의 오오시스트가 이물질과 섞여 있었다. 이 침전물을 다시 DSG법으로 처리하였던 바 오오시스트에서 이물질은 제거되었으나 2차 회수된 오오시스트의 수는 1차보다 적었다. 또한  $\alpha$ -MEM 배지에서 MDBK cell를 배양하면서 항생제 및 항진균제가 처리된 오오시스트를 접종하여 세균과 곰팡이의 오염유무를 관찰한 바 접종 후 10일째 까지도 세균증식이나 곰팡이의 증식을 관찰할 수 없었다.

DSG법을 2차례 실시하여 회수한 오오시스트의 회수율은 EE법으로 전처리한 부유액내의 오오시스트의 수가 많을수록 높았다(Table 1 and Table 2). 송아지 분변의 오오시스트 회수율은 EE법으로 처리된 부유액내에  $3.8 \times 10^7$ /ml개의 오오시스트가 함유되었을 때 81.6%였으며(Table 1), 마우스 분

변의 오오시스트 회수율은 EE법으로 처리된 부유액내에  $3.2 \times 10^6$ /ml개의 오오시스트가 함유되었을 때 51.6%였다(Table 2). 송아지와 마우스의 분변을 각각 EE법으로 전처리한 부유액내에 존재하는 오오시스트 수가 같은 경우 순수 분리된 오오시스트의 회수율도 비슷하였다.

### 고 찰

본 실험에서는 *C. parvum*의 오오시스트가 함유된 송아지 설사변 뿐만 아니라 송아지 및 마우스의 정상변으로부터도 오오시스트를 순수 분리하기 위하여 이미 보고된 방법인 ether extraction 법(Riggs and Perryman, 1987)과 discontinuous sucrose gradients 법(Arrowood and Sterling, 1987)을 병용하여 사용하였다. 분변에서 이 원충의 오오시스트 분리를 위해 사용되는 방법은 부유법(Lazo et al., 1986; Robert et al., 1990; Ungar, 1990)과 ether extraction법(Riggs and Perryman, 1987), 그리고

**Table 1.** Recovery rates by discontinuous sucrose gradients (DSG) centrifugation of oocysts from a calf fecal materials previously treated with ether extraction (EE)

No. of oocysts in the fecal materials treated by EE ( $\times 10^6$ )	Recovery rates by DSG (%)		
	1st	2nd	Total
0.1	7.4	0	7.4
0.5	19.0	0.1	19.1
3.0	38.1	0.5	38.6
16.5	47.6	2.1	49.7
35.0	40.9	10.0	50.9
112.0	45.4	29.7	75.1
192.0	60.6	21.0	81.6

1st, recovered from primary DSG.

2nd, recovered from secondary DSG from the sediment of the primary DSG.

**Table 2.** Recovery rates by discontinuous sucrose gradients (DSG) centrifugation of oocysts from mice fecal materials previously treated with ether extraction (EE)

No. of oocysts in the fecal materials treated by EE ( $\times 10^6$ )	Recovery rates by DSG (%)		
	1st	2nd	Total
0.1	6.9	0	6.9
0.5	17.2	0.1	17.3
3.1	40.3	0.6	40.9
16.0	49.1	2.5	51.6

1st, recovered from primary DSG.

2nd, recovered from secondary DSG from the sediment of the primary DSG.

비중을 이용한 방법(Arrowood and Sterling, 1987; Luft *et al.*, 1987; Dubey *et al.*, 1990) 등이 사용되고 있다. 본 실험에서 설사변에 함유된 오오시스트를 분리할 때는 이미 보고된 방법중의 한가지만으로도 오오시스트를 회수할 수 있었다(미발표자료). 그러나 송아지의 분변이 정상적인 형태에 가까워지거나 마우스의 분변처럼 딱딱할 경우, 이러한 방법으로는 많은 어려움이 있었다. 80 mesh부터 250 mesh까지의 동망을 사용하여 단계적으로 걸러진 부유물로 순수 분리를 시도하였던 바 회수된 오오시스트에는 불순물이 많이 함유되어 있거나 오오시스트의 회수율이 높지 않았다. 그래서 본 실험에서

는 분변을 제1단계로 EE법(Riggs and Perryman, 1987)으로 전처리한 후 제2단계로 DSG법(Arrowood and Sterling, 1987)을 적용하여 오오시스트를 순수 분리하였다. Ethyl acetate(Ungar, 1990)나 ether(Smith *et al.*, 1989; Dubey *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1990) 등을 사용하면 분변에 함유된 지질이나 지방성분을 제거할 수 있을 뿐만 아니라 분변 찌꺼기도 어느정도 제거할 수 있다는 점을 착안하여 DSG법으로 오오시스트를 순수 분리하기 전에 ether로 분변을 전처리하였다. EE법과 DSG법을 병용한 오오시스트의 순수 분리는 아직 보고된 바 없으며, 송아지의 정상분변으로 배출되는 오오시스트나 실험동물의 분변으로 배출되는 오오시스트를 순수 분리할 수 있어서 앞으로 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

DSG법으로 원심 분리한 결과 비중 1.103과 1.064의 sucrose gradients 경계면이 흰색의 밴드 형태로 관찰되었는데, 그 부위에서 순수 분리된 오오시스트가 회수되었다. 본 실험 결과에서 나타난 흰색의 밴드는 EE법으로 전처리한 부유액에  $3.2 \times 10^6$ /ml개 이상의 오오시스트가 함유되어 있을 때 관찰되었으며,  $6 \times 10^5$ /ml개 이하의 오오시스트가 포함된 부유액에서는 밴드가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 DSG법으로 원심한 후 흰 밴드가 확인된다면 EE법으로 전처리한 부유액에 적어도  $10^7$ 개 이상의 오오시스트( $2 \times 10^6$ /ml)가 함유되어 있음을 나타내는 것이다.

송아지 분변에서 회수된 오오시스트의 회수율은 EE법으로 처리된 부유액내에  $3.8 \times 10^7$ /ml개의 오오시스트가 함유되었을 때 81.6%였으며, 마우스 분변에서 회수된 오오시스트의 회수율은 EE법으로 처리된 부유액내에  $3.2 \times 10^6$ /ml개의 오오시스트가 함유되었을 때 51.6%였다. 마우스의 경우, 분변으로 배출되는 오오시스트의 수가 적었기 때문에 ml당 오오시스트의 수를  $3.2 \times 10^6$ ( $1.6 \times 10^7/5$  ml)개 까지만 확보할 수 있었다. 송아지와 마우스의 분변을 각각 EE법으로 전처리 하였을 때 부유액내에 ml당 오오시스트의 수가 거의 같은 경우에는 순수 분리된 오오시스트의 회수율도 비슷하였다. 또한 EE법으로 전처리한 부유액내의 ml 당 오오시스트 수가 증가할수록 순수 분리된 오오시스트의 회수율도 높아졌다. 이런 결과들로 보아 마우스 분변에 더 많은 오오시스트가 함유되어 있다면 마우스 분변에서의 오오시스트 회수율도 더 높아질 것으로 생각된다. 한편 분변을 전처리하여 오오시스트가  $1 \times 10^5$ 개 함유된 용액을 사용하여 순수 분리했을 경우는 10% 이하의 낮은 회수율을 보였으며, 그 이하의 오오시스트를 함유하는 경우에는 거의 오오시스트가 회수되지 않았다. 순수 분리된 오오시스트의 회수율이 50% 이상이 되어야 효과적으로 사용할 수 있는 방법으로 본다면, 50% 정도의 오오시스트

을 회수하기 위해서는 EE법으로 전처리한 분변 부유액내의 오오시스트 수는  $10^7$ 개( $2 \times 10^6$ 개/ml) 이상이 되어야 할 것으로 생각되며, 이것은 DSG법을 적용한 후 흰 밴드가 나타났을 때의 오오시스트의 숫자이었다.

분변에서 순수하게 분리된 오오시스트에는 세균이나 다른 불순물이 포함되지 않아야 한다. 따라서 약간의 세균이 포함되어 있거나 세균의 오염방지를 위해 phenol(Arrowood and Sterling, 1987)이나 sodium hypochlorite(Riggs and Perryman, 1987; Riggs *et al.*, 1989) 그리고 항생제 및 항진균제를 혼합하여 사용(Current and Haynes, 1984)하고 있다. 본 실험에서는 Current and Haynes(1984)의 방법에 따라 남아 있는 오염물질을 살멸하기 위해 항생제 및 항진균제가 혼합된 PBS에 순수 분리된 오오시스트를 감작시킨 후 멸균된 PBS로 세척하여  $\alpha$ -MEM 배지에서 MDBK cell를 배양하면서 항생제 및 항진균제가 처리된 오오시스트를 접종한 바 접종 후 10일째 까지도 세균증식이나 곰팡이의 증식을 관찰할 수 없었다. 그러나 유전자분석 등에 사용되는 오오시스트나 sporozoites의 순수 분리를 위해서는 Percoll을 이용한 continuous gradients나 컬럼을 사용하는 것이 더욱 유용할 것으로 생각된다(Arrowood and Sterling, 1987; Riggs and Perryman, 1987).

#### 참고문헌

- 위성환, 강영배, 주후돈, 외 (1992a) 국내 마우스로부터 분리된 *Cryptosporidium*의 실험용 마우스로의 감염실험. 농사시험연구논문집(가축위생편) **34**: 43-48.
- 위성환, 이정길, 주후돈, 강영배 (1992b) 국내 마우스에서 분리된 *Cryptosporidium parvum*의 송아지로의 감염시험. 기생충학잡지 **30**: 259-262.
- Arrowood MJ, Sterling CR (1987) Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *J Parasitol* **73**: 314-319.
- Bronsdon MA (1984) Rapid dimethyl sulfoxide (DMSO)-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J Clin Microbiol* **19**: 952-953.
- Buraud M, Forget E, Favennec L, Bizet J, Gobert J, Deluol, A. (1991) Sexual stage development of cryptosporidia in the Caco-2 cell line. *Infect Immun* **59**: 4610-4613.
- Current WL, Haynes TB (1984) Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* **224**: 603-605.
- Dubey JP, Speer CA, Fayer R (1990) Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Flanigan TP, Aji T, Marshall R, Soave R, Alkawa M, Kaetzel C (1991) Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infect Immun* **59**: 234-239.
- Lazo A, Barriga OO, Redman DR, Bech-Nielsen S (1986) Identification by transfer blot of antigens reactive in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in rabbits immunized and a calf infected with *Cryptosporidium* sp. *Vet Parasitol* **21**: 151-163.
- Luft BJ, Payne D, Woodmansee D, Kim CW (1987) Characterization of the *Cryptosporidium* antigens from sporulated oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* **55**: 2436-2441.
- Mead JR, Arrowood MJ, Current WL, Sterling CR (1988a) Field inversion gel electrophoretic separation of *Cryptosporidium* spp. chromosome-sized DNA. *J Parasitol* **74**: 366-369.
- Mead JR, Arrowood MJ, Sterling CR (1988b) Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *J Parasitol* **74**: 135-149.
- Nina JMS, McDonald V, Dyson DA, *et al.* (1992) Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. *Infect Immun* **60**: 1509-1513.
- Petersen C, Gut J, Leech JH, Nelson RG (1992) Identification and initial characterization of five *Cryptosporidium parvum* sporozoite antigen genes. *Infect Immun* **60**: 2343-2348.
- Riggs MW, McGuire TC, Mason PH, Perryman LE (1989) Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *J Immunol* **143**: 1340-1345.
- Riggs MW, Perryman LE (1987) Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun* **55**: 2081-2087.
- Robert B, Ginter A, Antoine H, Collard A, Coppe P (1990) Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* **37**: 1-8.
- Rosales MJ, Mascaró C, Osuna A (1992) New findings during *Cryptosporidium parvum* development in the chick embryo. *J Infect Dis* **165**: 789-790.
- Smith HV, McDiarmid D, Smith AL, Hinson AR, Gilmour RA (1989) An analysis of staining

- methods for detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water-related samples. *Parasitology* **99**: 323-327.
- Tilley M, Upton SJ, Fayer R, et al. (1991) Identification of a 15-Kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* **59**: 1002-1007.
- Uhl EW, O'Connor RM, Perryman LE, Riggs MW (1992) Neutralization-sensitive epitopes are conserved among geographically diverse isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* **60**: 1703-1706.
- Ungar BLP (1990) Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J Clin Microbiol* **28**: 2491-2495.
- Ungar BLP, Nash T (1986) Quantification of specific antibody response to *Cryptosporidium* antigens by laser densitometry. *Infect Immun* **53**: 124-128.
- Wagner ED, Prabhy Das MR (1986) *Cryptosporidium* in cell culture. *Jpn J Parasitol* **35**: 253-255.

**=Abstract=**

Isolation of *Cryptosporidium parvum* oocysts from fecal samples - The combination of ether extraction and discontinuous sucrose gradients

Sung-Hwan Wee<sup>1\*</sup>, Chung-Gil Lee<sup>2)</sup>, Bo-Suk Kim<sup>1)</sup>, Hoo-Don Joo<sup>1)</sup> and Seong-Won Kang<sup>1)</sup>

Veterinary Research Institute<sup>1)</sup>, RDA, Anyang 430-016, and College of Veterinary Medicine<sup>2)</sup>  
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

A calf and 50 mice were infected with *Cryptosporidium parvum*, and their fecal materials were collected and treated with ether extraction (EE), followed by discontinuous sucrose gradients (DSG) method. EE method was to remove some of fat or lipid from feces. Sediments were washed by centrifugation ( $1,500 \times g$  for 10 min., 3 times) in phosphate-buffered saline and then these washed sediments were sieved sequentially through stainless steel screens with a final mesh of 250 ( $61 \mu m$  porosity) to remove other debris. After sieving, the materials were suspended in 2.5% potassium dichromate solution. Oocysts were counted by using a hemocytometer and the recovery rate of pure oocysts was calculated on the basis of the count. Following centrifugation ( $1,500 \times g$  for 30 min.) by DSG method, most oocysts were recovered at the interface between a gravity of 1.103 and 1.064. The recovery rates of pure oocysts from the fecal suspension of the calf ( $3.8 \times 10^7/ml$ ) and the mouse ( $3.2 \times 10^6/ml$ ) treated with EE method were 81.6% and 51.6%, respectively. It is suggested that the recovery rate was dependent on the number of oocysts in each suspension treated with EE method. To get the 50% recovery rate, there must be more than  $2 \times 10^6$  oocysts per ml of the fecal suspension treated with EE method. By the combination of the two methods it was possible to isolate *C. parvum* oocysts from normal feces of the calf and mouse as well as from diarrheic feces.

**Key words:** *Cryptosporidium parvum*, isolation, ether extraction, discontinuous sucrose gradients

[Korean J. Parasit., 32(1): 7-12, March 1994]

\* Corresponding author