

## 톡소포자충의 총주에 따른 항원과 항체의 검출 시기 및 양상

이영하\*, 김계영, 강문수, 신대환

충남대학교 의과대학 기생충학교실

국문초록: 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 1개의 종(species)만이 있으나 숙주에서 발견되는 독력의 정도와 질병 양상에 따라 많은 총주(strain)로 분류되며, 따라서 감염 후 이들 사이의 면역학적 특성에 차이가 있을 것으로 예상된다. 본 연구는 톡소포자충의 강독주인 RH주 감염 마우스(마우스당  $1 \times 10^5$ 개의 tachyzoite를 복강내로 감염) 및 약독주인 Beverley주 감염 마우스(마우스당 10개의 씨스트를 복강내로 감염)의 혈액 및 조직(간, 뇌, 비장)을 일정 간격으로 채취하여 ELISA, Western blot, PCR 등을 이용하여 톡소포자충의 총주에 따른 항원, 항체의 검출 시기 및 양상을 알아보았다. 강독주를 감염시킨 마우스의 혈청내 순환항원 및 혈액내 총체(parasitemia)는 감염 2일부터 검출되었으며, 혈액, 간, 뇌 및 비장에서는 감염 3일부터 톡소포자충 특이 DNA band를 볼 수 있었다. 그러나 강독주 감염 마우스는 생존기간중 IgM 및 IgG 항체를 검출할 수 없었으며, 감염 혈청은 Western blot상 톡소포자충 항원대와 반응하는 공통 band도 없었다. 약독주 감염 마우스의 혈청내 순환 항원은 감염 10일부터 출현하기 시작하여 감염 35일까지 검출되었다. 톡소포자충의 특이 DNA는 혈액에서는 감염 15일~60일에, 비장은 감염 10일~30일에 검출되었으며, 간 및 뇌에서는 각각 감염 15일 및 20일부터 검출할 수 있었다. IgM 항체는 감염 10일부터 검출되기 시작하여 감염 60일까지 계속적으로 검출되었으며, 감염 15~25일 사이에 비교적 높은 항체가를 유지하였다. IgG 항체는 감염 15일부터 유의한 증가를 나타내기 시작하여 실험 기간동안 계속적으로 증가하였다. 또한 약독주 감염 마우스의 혈청은 감염 기간에 따라 특징적인 공통 항원 band를 볼 수 있었으며, 대부분의 감염 혈청은 27.5-kDa 및 32.5-kDa의 톡소포자충 항원대와 반응하였다. 이상의 성적으로 보아 톡소포자충의 강독주 감염 마우스는 생존기간중 항체는 검출할 수 없었으나 항원은 감염 2~3일부터 혈액 및 조직에서 검출되었으며, 약독주 감염 마우스는 감염 기간 및 조직에 따라 감염 10일부터 특이 항원 및 항체 반응을 나타내 이들 두 총주는 감염후 숙주에서 뚜렷한 면역학적 반응이 서로 차이가 있음을 알 수 있었다.

### 서론

톡소포자충증(toxoplasmosis)은 포유동물, 조류, 사람 등에 널리 만연되어 있다는 보고는 있으나 대부분 무증상으로 경과하여 임상 증상의 예는 비교적 적다. 미국의 경우 10~19세 연령군에서 5~30%, 50세 이상 연령군에서 10~67%의 톡소포자충에 대한 혈중 항체 양성반응을 나타내며(Kasper, 1994), 우리 나라에서도 전 인구의 1.9~7.2%에서 항체 양성반응을 나타낸다고 보고하였다(Choi,

1990). 최근에는 후천성 면역결핍증(AIDS), 장기 이식, 방사선 치료 등의 증가로 인하여 본증의 발병이 증가될 것으로 예상되므로 이에 대한 연구와 관심이 요구된다(McCabe and Remington, 1988).

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 감염 여부는 숙주에서 총체를 분리함으로써 확인할 수 있지만 급성기를 제외한 대부분의 경우 불가능하므로 methylene blue 색소시험, 형광항체법, Latex응집 반응, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등과 같은 면역형광학적 방법으로 항체를 증명하고 있다. 그러나 이러한 방법은 감염 초기에는 진단하기 곤란하고, 특이 반응을 제거하기 어렵다. 특히 후천성면역결핍증과 같이 면역학적으로 장애가 있는 환자에서는 항체를 증명하기 더욱 어렵다(Luft and Remington, 1988). 최근 분자생물학 분야의 급속한 발달로 각종 질병의 진단에 있어서 민

• 논문접수 1995년 8월 21일, 수정재접수 8월 31일  
• 이 논문은 1994년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구비에 의하여 연구되었음(연구과제번호 94-1400-08-01-3).

\* 별책 요청 저자

감도 및 특이도를 높일 뿐만 아니라 신속하게 할 수 있는 기법으로 PCR(polymerase chain reaction)이 도입되고 있다(Savva *et al.*, 1990). Grover *et al.* (1990)은 PCR법으로 선천성 독소포자충증의 출생 전 진단이 가능하다고 하였으며, Weiss *et al.* (1991) 및 Wastling *et al.*(1993)은 RH주를 감염시킨 마우스를 대상으로 PCR을 시행한 바 민감성과 특이성이 우수하다고 하였다.

독소포자충은 숙주의 면역계세포, 망상내피계세포 등에 침범하여 세포를 파괴하면서 분열 증식할 수 있으며, 숙주의 면역 상태에 따라 다양한 임상증상을 일으킨다. 건강한 사람은 재감염에 대한 영구 면역을 가지고 있지만, 선천성 독소포자충증이나 후천성 면역결핍증과 같이 면역 억제된 환자에 있어서는 심각한 증상을 일으킬 수 있다(Kasper, 1994). 지금까지 독소포자충 속(genus)에는 1개 종(species)만이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 마우스에 감염시켰을 때 발현되는 독력의 정도와 질병 양상의 특징에 따라 수 많은 충주(strain)로 분류된다(Ware and Kasper, 1987). Handman and Remington(1980)은 독소포자충의 충주에 따른 항체 반응을, Ware and Kasper(1987)는 Western blot으로 각 주(strain)의 항원을 분석하였다. 또한 동일 충주를 대상으로 Kasper and Ware(1985)은 충체의 발육 단계 등에 따른 항원성의 차이를, Grimwood and Smith(1990)는 충체의 투여량에 따른 병원성의 차이를 보고하였다.

이와같이 독소포자충은 충주의 종류에 따라 서로 다른 항원성을 가지고 있으므로, 본충 감염의 정확하고 신속한 진단 및 효과적 관리를 위해서는 독소포자충의 충주에 따른 면역학적 특성을 밝힐 필요가 있다. 본 연구는 독소포자충의 충주에 따른 면역학적 연구의 일환으로 독소포자충의 강독주 및 약독주를 마우스에 감염시킨 후 ELISA, Western blot, PCR 등을 이용하여 독소포자충의 충주에 따른 혈중 항원 및 항체의 검출 시기 및 조직내 충체의 출현 시기를 밝힘으로써 독소포자충증의 진단 및 관리에 유용한 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험동물: 생후 6~7주 된 17~20 g의 웅성 BALB/c 마우스를 한국화학연구소로부터 분양받아 동물사육실에서 통상적인 방법으로 사육하여 실험에 사용하였다.

독소포자충 충주: 독소포자충의 강독주인 RH주는 독소포자충 항원 제조와 마우스에 감염시켜 혈액내 항원 및 항체 검출, 조직(간, 뇌, 비장)내 충체 검출에 이용하였으며, 약독주인 Beverley주는 마우스에 감염시켜 혈액내 항원 및 항체 검출, 조직(간,

뇌, 비장)내 충체 검출에 이용하였다.

독소포자충 항원의 제조: 독소포자충 RH주의 tachyzoite를 마우스의 복강내에 감염시킨 3~4일 후 충체가 함유된 복강액을 얻어 700 × g로 원심하였다. 침사에 0.2% EDTA가 포함된 PBS(pH 7.2)를 가하여 만든 부유액을 cellulose powder (CF-11, Whatman)에 통과시킨 후 PBS로 원심세척 후 -70°C에 보관하였다. 냉동독소포자충을 녹인 후 homogenizer(Fisher, U.S.A.)와 sonicator(Ultrasonic Processor, U.S.A.)로 처리하고 4°C, 17,500 × g로 30분간 원심하여 그 상층액을 독소포자충 항원으로 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준단백으로 Bio-Rad assay kit(Bio-Rad, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

독소포자충 감염 토끼 혈청의 제조: New Zealand White 토끼 5마리에 독소포자충 RH주의 tachyzoite를 마리당 1,000개씩 피하로 감염시켰다. 감염 후 3일부터 모든 토끼에서 발열이 있었으며, 그중 3마리는 감염 4일, 6일에 독소포자충증으로 죽었고 나머지 2마리는 회복되었다. 회복된 토끼의 혈액을 감염 후 60일에 채취하여 immunofluorescence 및 immunodiffusion으로 독소포자충에 대한 항체 생산을 확인한 후 독소포자충 감염 토끼 혈청으로 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 준비: PCR에 이용할 2개의 primer는 Burg *et al.*(1988)이 개발한 독소포자충 30-kDa 항원의 염기서열 363-383 사이의 유전자와 결합하는 5'-TGT TTC CGA AGC CAG TGA GAC-3' 및 염기서열 1009~989 사이의 유전자와 결합하는 5'-CGT CCC GGA ACA GTA CTG ATT-3'을 (주)한국생공(대전광역시 유성구)에 의뢰하여 제조한 것을 사용하였다.

### 2. 실험 방법

독소포자충의 감염: 독소포자충의 강독주인 RH주는 마우스 당 1 × 10<sup>5</sup>개의 tachyzoite를 복강내로 감염시켰으며, 약독주인 Beverley주는 마우스당 10개의 씨스트를 복강내로 감염시켜 실험에 사용하였다. 대조군은 독소포자충을 감염시키지 않은 정상 BALB/c 마우스를 사용하였다.

실험 계획: 독소포자충의 약독주 및 강독주 감염 마우스에 있어서 혈중 항원 및 항체가를 측정하기 위하여 강독주 감염 마우스는 감염 후 매일, 약독주 감염 마우스는 감염 후 5~10일 간격으로 매회 5마리의 감염 마우스로부터 혈액 및 조직(간, 뇌, 비장)을 채취하였다.

채취한 혈액은 순환 항원 및 항체를 검출하기 위하여 혈장을 분리한 후 ELISA를 시행하였으며, 혈구 및 조직에서는 DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다. 또한 강독주 감염 마우스 혈액의 일부는 마우

스 복강에 주입하였으며(동물접종법), 약독주 감염 마우스의 뇌조직의 일부는 씨스트 검색에 사용하였다.

마우스 혈청내 순환 항원 검출: 총체를 감염시킨 마우스 혈액내 특소포자충의 순환 항원 검출은 Turunen(1983)의 방법을 기준으로 다음과 같이 실시하였다. Coating buffer인 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 rabbit anti-*Toxoplasma* antibody를 단백질 농도가 10 µg/ml 되게 희석한 다음 96-well microplate(Titertek, U.S.A.)의 각 well에 100 µl씩 분주 후 4°C로 하룻밤을 반응시켜 항체를 흡착시켰다. PBS/Tween 20으로 세척 후 마우스 혈청을 0.1% BSA/PBS/Tween 20으로 1:50배 희석하여 100 µl씩 분주한 다음 37°C에서 2시간 반응시켰다. Mouse anti-*Toxoplasma* antibody를 10 µg/ml 되게 희석하여 100 µl씩 분주한 다음 37°C에서 2시간 반응시킨 후 1:1,000배 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin을 100 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다. 기질인 o-phenylenediamine액을 150 µl씩 분주하여 30분간 발색 반응 후 8N 황산 50 µl씩을 분주하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 automatic ELISA reader(Behring ELISA Processor)를 이용하여 492 nm에서 측정하였다.

마우스 혈청내 IgM 및 IgG 변화: 마우스 혈액내 특소포자충에 대한 특이 항체 검출을 위한 ELISA는 Voller *et al.*(1976)의 방법에 따라 IgG 및 IgM 항체를 측정하였다. 즉, 특소포자충 항원을 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 단백질 농도가 10 µg/ml 되도록 희석하여 96-well microplate의 각 well에 100 µl씩 분주한 후 4°C로 하룻밤 반응시켰다. PBS/Tween 20으로 3회 세척 후 0.1% BSA/PBS/Tween 20으로 마우스 혈청을 IgG 측정용은 1:100배, IgM 측정용은 1:50배 희석시킨 다음 100 µl씩 분주 후 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS/Tween 20으로 3회 세척 후 0.1% BSA/PBS/Tween 20으로 1:1000 희석시킨 horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG와 IgM(Sigma, U.S.A.)을 각각 150 µl씩 분주하여 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS/Tween 20으로 3회, 증류수로 2회 세척 후 o-phenylenediamine 기질액 150 µl씩 분주하였으며 20분 후 8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 25 µl씩 넣어 반응을 정지시켰다. 흡광도는 automatic ELISA reader를 이용하여 492 nm에서 측정하였다.

Western blot을 이용한 특소포자충의 항원 반응대 조사: 특소포자충 항원을 Laemmli(1970)의 방법에 따라 전기영동을 실시한 후 Towbin *et al.*(1979)의 방법에 따라 nitrocellulose membrane에 전기적으로 전사시켰다. 즉, 전기영동시 분리 겔은 12%

polyacrylamide로, stacking 겔은 4% acrylamide로 만들었으며, 여기에 특소포자충 항원을 15 µl씩 분주하였다. 120 volt로 2시간 전기영동 후, 분자량의 결정은 표준분자량 단백질(GibcoBRL, lysozyme 14,300, β-lactoglobulin 18,400; carbonic anhydrase 29,000; ovalbumin 43,000; bovine serum albumin 68,000; phosphorylase 97,400; myosin(H-chain) 200,000)로 하였다. 전기영동이 끝난 후 겔의 일부를 잘라 Coomassie 염색하여 band를 확인한 후, 이 겔의 항원을 20% methanol이 함유된 0.025 M Tris/0.19 M glycine buffer(pH 8.3)를 사용하여 10 volt에서 16시간 nitrocellulose 종이로 전사시켰다. 전사 후 nitrocellulose 종이를 3% skim milk/PBS로 2시간 blocking한 다음 PBS로 세척하였다. Nitrocellulose 종이를 여러 strip으로 자른 후 각각의 마우스 혈청을 실온에서 4~6시간 반응시켰다. 세척 후 1% BSA/Tris buffered saline(150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5)으로 1:15,000 희석시킨 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 첨가하여 실온에서 3시간 반응시킨 다음 0.01 M PBS로 세척 후 기질 용액을 넣어 발색시켰다. 기질 용액은 10 ml의 alkaline phosphatase buffer(100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris, pH 7.5)에 nitroblue tetrazolium(Sigma)용액 66 µl와 bromochloroindolyl phosphate(Sigma)용액 33 µl를 첨가하여 만들었다. 기질반응 후에 20 mM EDTA/PBS를 사용하여 반응을 정지시켰다. 발색반응이 나타나 band는 표준 단백질과 비교하여 분자량을 결정하였다.

PCR을 이용한 마우스 조직내 항원 검출: 마우스의 혈액 및 조직(뇌, 간, 비장)으로부터 DNA의 검출은 Weiss *et al.*(1991)의 방법에 따라 실시하였다.

#### (1) 마우스 혈액으로부터 DNA 분리

마우스에서 채취한 혈액을 heparin 처리한 후 원심분리하여 buffy coat층만을 수집하였다. 수집한 백혈구를 10 mM Tris(pH 7.4), 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.4% SDS, 100 µg/ml proteinase K를 첨가한 후 50°C에서 2시간 가열한다. 그후 phenol/chloroform으로 단백질을 제거하고 ethanol 침전에 의하여 DNA를 분리하였다.

#### (2) 마우스 조직으로부터 DNA 추출

마우스 조직(간, 뇌, 비장) 100 mg을 150 mM NaCl, 200 mM sucrose, 10 mM EDTA, 300 mM Tris(pH 8.0)가 포함된 용액 2 ml에 넣은 후 homogenization한다. Homogenize한 용액에 10% SDS(최종 농도: 0.625%), proteinase K(100 µg/ml)를 첨가한 후 65°C에서 2시간 가열하였다. 8 M potassium acetate(최종 농도: 1.4 M)를 가하여 4°C에서 1시간 방치 후 원심분리하여 상층액만

을 취하였다. 그후 phenol/chloroform으로 단백질을 제거하고 ethanol 침전에 의하여 DNA를 분리하였다.

(3) PCR에 의한 DNA의 증폭

10 X polymerase buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 각각 250 μM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP를 가하고 1.0 μM의 한쌍의 primer에 증폭시킬 검체 DNA 1 μg, 2.5 units Taq DNA polymerase를 첨가한 뒤 총 100 μl 반응액에 mineral oil을 증충시켰다. 이 반응물을 95°C에서 5분간 가열한 후 UNO-Thermoblock(Boimetra, U.S.A.)을 이용하여 다음 3단계를 30주기 반복하여 DNA를 증폭시켰다. 각 cycle당 95°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing 그리고 74°C에서 3분간 extension하며, 마지막 주기에는 extension을 10분간 더 시켰다.

(4) 전기영동에 의한 PCR산물의 검색

PCR산물 20 μl를 취하여 10 X gel loading buffer(0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/50% glycerol)와 섞은 후 2% agarose gel 상에 전기영동하여 1 μg/ml ethidium bromide가 포함된 용액에 염색 후 이동한 DNA band의 위치를 자외선 투사기상에서 관찰하였다.

통계 처리: 실험 성적은 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 표시하였고 유의성 검정은 T-test를 이용하였으며, 유의수준은 p < 0.05로 하였다.

결 과

1. ELISA에 의한 혈청내 순환 항원의 검출

톡소포자충의 강독주인 RH주의 tachyzoite를 마우스당 1 × 10<sup>5</sup>개씩 복강내로 감염시킨 마우스의 평균 생존기간은 5.4 ± 0.9일 였으며, 감염 4일부터 마우스가 죽기 시작하여 7일까지 모두 죽었다. 정상 마우스의 혈청의 톡소포자충 항체에 대한 흡

광도 0.332 ± 0.050였다. 정상 마우스의 평균 흡광도에 표준편차를 3배 더한 흡광도, 즉 0.482 이상을 양성으로 판정시, 강독주 감염 마우스는 감염 2일 부터 혈청내 순환 항원이 검출되기 시작하였고 감염 3일부터는 모든 마우스에서 순환 항원이 검출되었다(Table 1, Fig. 1).

약독주 감염 마우스에서도 순환 항원이 검출되었으나 마우스에 따라 검출시기가 많은 차이를 보였다. 감염 5일부터 순환 항원이 검출되기 시작하여 감염 35일까지 검출되었으며, 특히 감염 15~25일 사이에는 0.756 ± 0.189~0.847 ± 0.155의 흡광도를 보여 순환 항원이 높게 검출되었다(Table 1, Fig. 2).

2. ELISA에 의한 혈청내 항체의 조사

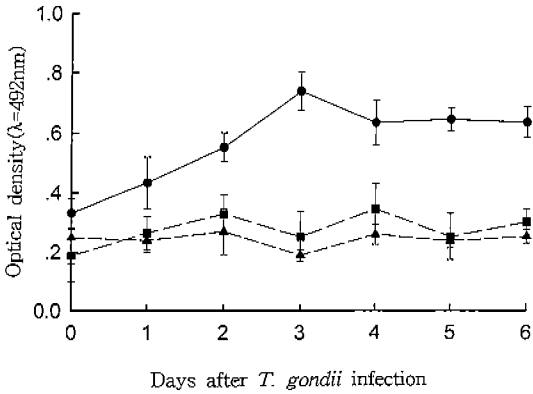
Immunoglobulin M 항체가: 정상 마우스의 혈청내 IgM 항체는 0.187 ± 0.089 였으며, 정상 마우스 혈청의 평균 흡광도에 표준편차를 3배 더한 흡광도 0.456 이상을 양성으로 판정하였다. 강독주 감염 마우스는 감염 4일에 1례에서 유의하게 증가된 IgM 항체를 나타냈을 뿐 그외의 감염 마우스에서는 검출되지 않았다(Table 1, Fig. 1). 약독주 감염 마우스는 감염 10일부터 IgM 항체가 검출되기 시작하여 전 실험 기간동안 계속 검출되었다. 감염 15~25일사이에는 흡광도 0.580 ± 0.249~0.720 ± 0.270으로 비교적 높은 항체를 나타냈으며, 특히 감염 60일에도 2례에서 양성반응을 나타냈다(Table 1, Fig. 2).

Immunoglobulin G 항체가: 정상 마우스의 혈청내 IgG 항체는 0.249 ± 0.090였으며, 표준편차를 3배하여 더한 흡광도 0.519 이상을 양성으로 판정하였다. 강독주 감염 마우스는 모든 마우스가 죽은 감염 6일까지 혈청내에서 IgG 항체가 전혀 검출되지 않았다(Table 1, Fig. 1). 약독주 감염마우스의 IgG 항체는 감염 15일부터 유의하게 증가하여 실험 기간동안 계속적으로 증가하였으며, 감염 60일에는 평균 1.890 ± 0.321의 흡광도를 나타냈다

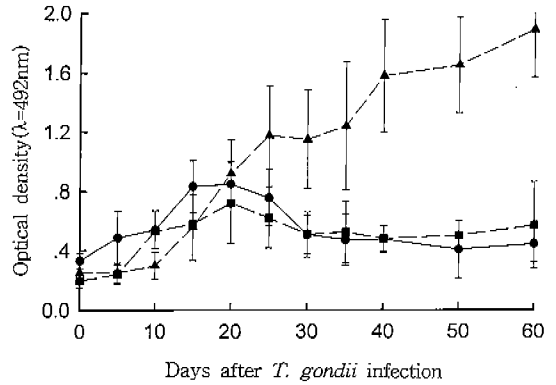
**Table 1.** Detection of circulating antigens and specific antibodies in the sera of mice infected with RH strain of *Toxoplasma gondii*

Days after infection	No. of sera	No. sera with antigen	No. of sera with		Positive mouse inoculation test
			IgM	IgG	
1	5	0	0	0	0
2	5	3	0	0	2
3	5	5	0	0	5
4	5	5	1	0	5
5	5	5	0	0	5
6	2*	2	0	0	2

\*Only two mice were alive.



**Fig. 1.** Detection of circulating antigens(●), specific IgM antibodies(■) and IgG antibodies(▲) in the sera of mice infected with RH strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Each point represents the mean ± S.D. of 5 mice, except day 6 post-infection.



**Fig. 2.** Detection of circulating antigens(●), specific IgM antibodies(■) and IgG antibodies(▲) in the sera of mice infected with Beverley strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Each point represents the mean ± S.D. of 5 mice, except day 6 post-infection.

(Table 1, Fig. 2).

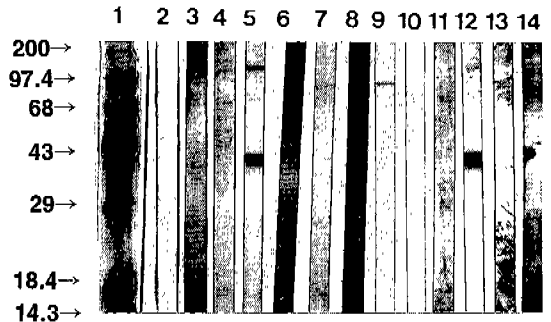
3. 동물접종검색 및 뇌조직내 씨스트 조사

강독주 감염 마우스는 동물접종검색법으로 혈액 내 독소포자충을 조사하였다. 강독주 감염 마우스 혈액을 heparin 처리한 다음, 가검 혈액당 3마리의 정상 마우스에 주입 후 3주 동안 관찰하였다. 감염 2일 혈액에서 처음으로 독소포자충 총체가 검출되기 시작하였으며, 감염 3일부터는 모든 감염 마우스 혈액에서 총체가 검출되었다(Table 1).

약독주 감염 마우스는 광학현미경으로 뇌조직내 씨스트를 조사한 결과, 감염 20일부터는 모든 약독주 감염 마우스의 뇌조직에서 씨스트를 검출할 수 있었다(Table 2).

4. Western blot을 이용한 독소포자충 항원 반응대의 조사

정상 마우스 혈청은 독소포자충 항원대와 반응하는 band를 전혀 볼 수 없었다(Fig. 3 and 4). 강독주 감염 마우스의 감염 1일, 3일, 5일 및 6일 혈청은 독소포자충 항원대와 반응하는 band를 볼 수 없었으나, 감염 2일 및 4일 혈청에서 36-kD, 149-kD의 항원대와 반응하는 band를 일부 감염 마우스에서 볼 수 있었다(Fig. 3). 약독주 감염 마우스의 감염 5일 혈청에서 27.5-kDa, 32.5-kDa의 band가 나타나기 시작하여 감염 10일 혈청에서 27.5-kDa, 32.5-kDa, 36-kDa, 83-kDa의 항원대와 반응하는 band를 일부 레에서 볼 수 있었다. 감염 15일 혈청부터는 32.5-kDa의 항원대와 반응하는 band를 모든 레에서 볼 수 있었으며, 감염 20-40일 혈청은 27.5-kDa, 32.5-kDa의 항원대와 모두 반응하였다. 분자량 27.5-kDa 및 32.5-kDa의



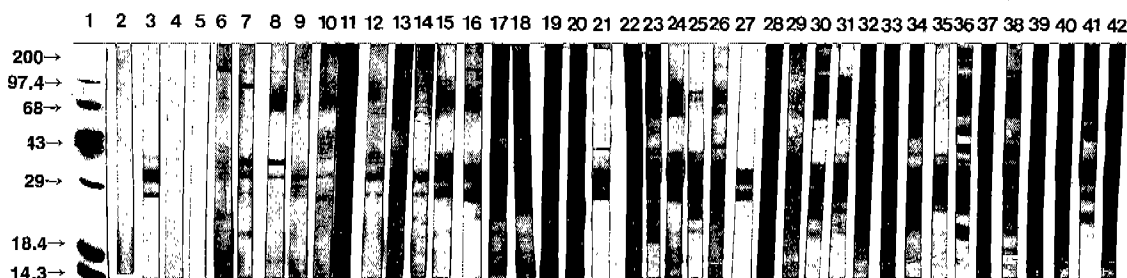
**Fig. 3.** Time course of the IgG immunoblot patterns of sera samples from mice infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*. Lane 1, molecular weight standard (kDa); 2, serum of normal mouse. Lanes 3-14 (days after infection): 3 and 4, 1; 5-7, 2; 8-10, 3; 11 and 12, 4; 13, 5; 14, 6.

band 외에, 감염 25일 혈청은 149-kDa, 감염 30일 혈청은 21-kDa, 23.7-kDa, 36-kDa, 감염 40일 혈청은 149-kDa의 독소포자충의 항원대와 band를 형성하였다. 감염 50일 혈청은 21-kDa, 23.7-kDa, 32.5-kDa, 36-kDa의 band를 모든 레에서 형성하였으며, 감염 60일 혈청은 가장 많은 band를 나타내 분자량 21-kDa, 25-kDa, 27.5-kDa, 32.5-kDa, 36-kDa, 149-kDa의 항원대와 거의 모든 레에서 band를 형성하였다(Fig. 4).

5. PCR을 이용한 혈액 및 조직내 총체 검출  
정상 마우스의 혈액 및 조직(간, 뇌 및 비장)에

**Table 2.** Detection of circulating antigens and specific antibodies in the sera of mice infected with Beverley strain of *Toxoplasma gondii*

Days after infection	No. of sera	No. sera with antigen	No. of sera with		Positive cyst in mouse brain
			IgM	IgG	
5	5	1	0	0	0
10	5	3	4	0	0
15	5	4	3	2	0
20	5	3	4	4	5
25	5	3	3	5	5
30	5	1	3	5	5
35	5	2	3	5	5
40	5	0	2	5	5
50	5	0	1	5	5
60	5	0	2	5	5



**Fig. 4.** Time course of the IgG immunoblot patterns of sera samples from mice infected with the Beverley strain of *Toxoplasma gondii*. Lane 1, molecular weight standard (kDa); 2, serum of normal mouse. Lanes 3-42 (days after infection): 3 and 4, 5; 5-7, 10; 8-12, 15; 13-16, 20; 17-21, 25; 22-26, 30; 27-31, 35; 32-35, 40; 36-39, 50; 40-42, 60.

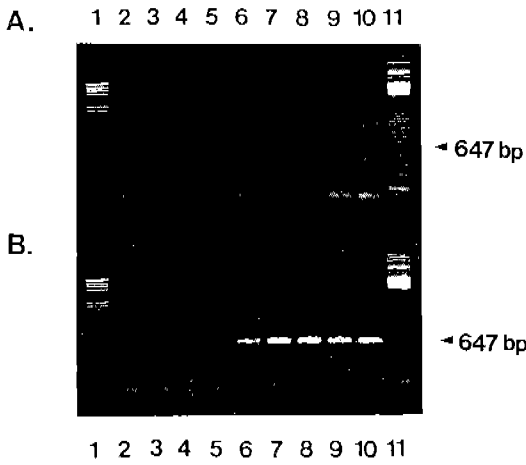
서는 톡소포자충의 특이 DNA band를 볼 수 없었다 (Fig. 5-8). 강독주 감염 마우스의 혈액 및 조직에서는 감염 3일부터 647-base pair의 특이 DNA band를 볼 수 있었다(Fig. 5 and 6).

약독주 감염 마우스의 혈액에서는 감염 15일, 20일, 25일, 40일, 60일에 특이 DNA band를 볼 수 있었다. 간에서는 감염 15일부터, 뇌에서는 감염 20일부터 특이 DNA band가 검출되기 시작하여 실험 기간 동안 모두 양성반응을 나타냈다. 그러나 비장에서는 감염 10일, 20일, 30일에만 특이 DNA band가 검출되었다(Fig. 7 and 8).

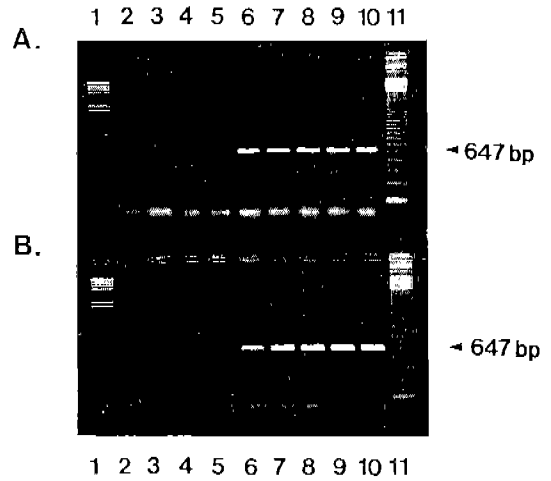
### 고 찰

톡소포자충증의 급성기에는 tachyzoite형이 증식하여 림프관과 혈류를 통하여 여러 조직과 장기에 전파되므로 분비물이나 배설물에서 항원 혹은 원충을 검출할 수 있으며(Huskinson *et al.*, 1989), 이 시기 진단법으로 동물점종검색법을 가장 신뢰할 수 있다. 이 진단법은 가검체료를 마우스에 접종하여

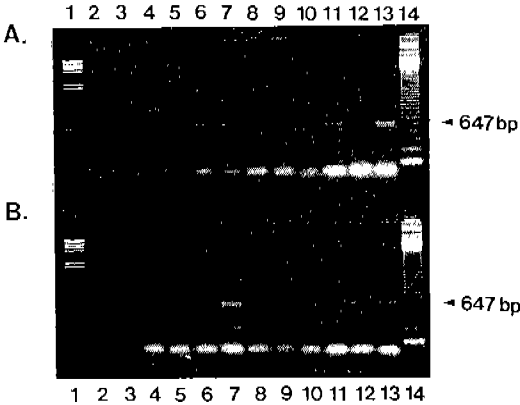
충체를 분리해 내는 방법으로, 마우스는 본충에 대하여 높은 감수성을 가질뿐만 아니라 자연 감염되는 예가 거의 없으므로 가장 유용하다. 본 실험에서 강독주인 RH주 감염 마우스의 혈액을 동물점종검색법으로 조사한 결과, 감염 2일 혈액에서 톡소포자충이 처음으로 분리되었으며 감염 3일부터는 모든 마우스 혈액에서 톡소포자충을 검출할 수 있어 ELISA에 의한 순환 항원 검출 성적, PCR에 의한 톡소포자충 DNA 검출 성적과 유사하였다. Derouin *et al.*(1987)은 톡소포자충 감염을 증명하는 방법으로 세포배양과 동물점종검색법이 유사한 감수성을 나타냈다고 하였으나, Hitt and Filice (1992)는 동물점종검색법이 62%, PCR이 37%, 세포배양법이 25%의 민감도를 나타내 급성기 진단 시 동물점종검색법이 가장 우수한 검사법이라고 하였다. 그러나 이와 같은 진단법은 동물사육시설 등을 필요로 하므로 임상검사에 이용하기 어려운 뿐만 아니라 충체가 검출되지 않았다고 톡소포자충 감염을 부정할 수는 없는 단점이 있다. 이를 보완한 진단법으로 ELISA를 이용하여 체액내 수용성 항원을



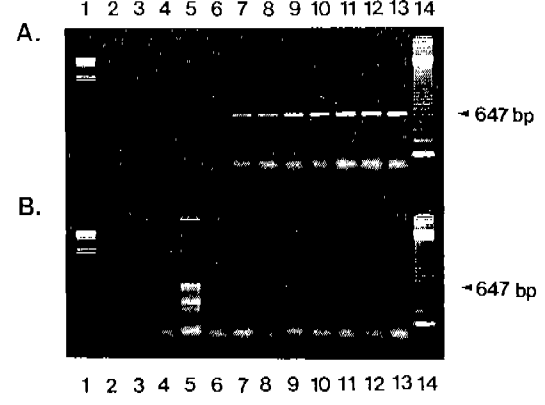
**Fig. 5.** Detection of *T. gondii* DNA from blood (panel A) and liver (panel B) in mice infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Lane 1,  $\lambda$ -Hind III marker; 2, negative control; 3, serum of normal mouse. Lanes 4-10 (days after infection): 4, 1; 5, 2; 6, 3; 7, 4; 8, 5; 9 and 10, 6. Lane 11, 123-bp marker ladder.



**Fig. 6.** Detection of *T. gondii* DNA from brain (panel A) and spleen (panel B) in mice infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Lane 1,  $\lambda$ -Hind III marker; 2, negative control; 3, serum of normal mouse. Lanes 4-10 (days after infection): 4, 1; 5, 2; 6, 3; 7, 4; 8, 5; 9 and 10, 6. Lane 11, 123-bp marker ladder.



**Fig. 7.** Detection of *T. gondii* DNA from blood (panel A) and liver (panel B) in mice infected with the Beverley strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Lane 1,  $\lambda$ -Hind III marker; 2, negative control; 3, serum of normal mouse. Lanes 4-13 (days after infection): 4, 5; 5, 10; 6, 15; 7, 20; 8, 25; 9, 30; 10, 35; 11, 40; 12, 50; 13, 60. Lane 14, 123-bp marker ladder.



**Fig. 8.** Detection of *T. gondii* DNA from brain (panel A) and spleen (panel B) in mice infected with the Beverley strain of *Toxoplasma gondii* during course of infection. Lane 1,  $\lambda$ -Hind III marker; 2, negative control; 3, serum of normal mouse. Lanes 4-13 (days after infection): 4, 5; 5, 10; 6, 15; 7, 20; 8, 25; 9, 30; 10, 35; 11, 40; 12, 50; 13, 60. Lane 14, 123-bp marker ladder.

검출하는 방법이 독소포자충증에 도입되어, Turunen(1983) 및 Ise *et al.*(1985)은 ELISA로 마우스와 토끼의 혈청에서 독소포자충의 순환 항원을 증명하였다. van Knapen *et al.*(1977)은 가토에서

ELISA로 검사시 감염 1일 부터, Ise *et al.*(1985)은 감염 4일부터, Acebes *et al.*(1994)은 감염 48시간 부터 검출되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 ELISA로 감염 2일~6일 사이 순환항원이 검출되어

동물접종검색법의 성적과 일치하였으며, 다른 여러 연구자들의 성적과 동일하였다. 지금까지 혈청내 순환 항원의 검출은 대부분 강독주 감염에 의한 성적이었으며, 약독주 감염에 의한 성적은 *Acebes et al.* (1994)의 보고 뿐이다. *Acebes et al.*(1994)은 Beverley주 감염시 감염 2일~28일 사이에 순환 항원이 검출되었으며, 감염 10일에 74%로 가장 높은 검출률을 보였다고 하였다. 이번 실험에서 약독주 감염 마우스의 순환 항원은 감염 15일~25일 사이에 가장 높게 검출되었으나 그 이후 감염 25일부터는 흡광도가 현저히 감소하였는데, 이는 IgG 항체가 충분히 증가하면 이것이 순환 항원과 면역복합체를 형성하여 순환 항원을 없애기 때문이라고 하였다 (*Candolfi et al.*, 1987).

현재 독소포자충증의 진단법으로 가장 흔히 이용되고 있는 방법은 숙주에서 특이 항체를 증명하는 것이다. 본충 감염 초기에는 항체가 별다른 방어적 역할을 하지 못하지만, 만성기에 있어서는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 면역혈청학적으로 급성 독소포자충증은 IgG 항체 및 IgM 항체를 동시에 검출함으로써 진단되며, IgG 항체는 감염 2~3주부터 나타나기 시작하여 6~8주에 최고치에 이른다고 하였다(*Cazabonne et al.*, 1994; *Kasper* 1994). 본 실험에서 강독주 감염 마우스는 실험 기간중 IgG 항체는 전혀 검출되지 않아 *Acebes et al.* (1994)의 보고와 일치하였다. 그러나 *Handman and Remington*(1980)이 강독주 감염시 IgG 항체는 감염 5일부터 검출되었다고한 보고와는 약간의 차이가 있었다. 약독주 감염 마우스의 IgM 항체는 10일부터 검출되기 시작하여 감염 15일~20일 사이에 가장 높은 흡광도를 유지하였으며, IgG 항체는 감염 15일부터 검출되기 시작하여 감염 60일까지 항체가 계속적으로 증가하였는데, 이는 감염 13일부터 IgG 및 IgM 항체가 검출되기 시작하였다는 *Cazabonne et al.*(1994)의 보고와 유사하였다.

본 실험에서 강독주 감염 마우스의 혈청은 실험 기간중 RH주의 초음파 추출 항원과 반응하는 공통 band를 확인할 수 없었는데, 이는 감염 기간이 충분치 않기 때문으로 생각된다. 일반적으로 RH주 감염 마우스는 감염 7일 혹은 감염 13일부터 특이 band가 나타나기 시작하였다고 하였다(*Chardes et al.*, 1990; *Cazabonne et al.*, 1994). 이번 실험에서 약독주 감염 마우스의 혈청과 반응하는 대표적 공통 항원으로 분자량 32.5-kDa, 27.5-kDa의 항원대였다. 이와같은 성적은 *Weiss et al.*(1987), *Makioka et al.*(1991), *Cazabonne et al.*(1994)의 성적과 유사하였다. *Makioka et al.*(1991)은 사람, 마우스, 토끼에서 공통적으로 높은 항체가를 나타낸 항원대가 27.5-kDa, 58.5-kDa였다고 보고하였다. 그러나 체액성 면역반응은 동일한 항원을 사용했을 경우에도 숙주의 종류, 항원의 투여 경로 및 투여량

등에 따라 다양한 면역 반응을 나타내므로 Western blot 성적의 단순 비교로만은 평가할 수 없는 단점이 있다.

최근에 PCR을 이용한 진단법은 독소포자충의 일부 DNA를 시험관내에서 연속적으로 증폭시킨 후 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출하는 방법으로 거의 100%의 특이도를 보여 주고 있다. 현재 많이 사용되고 있는 primer는 독소포자충 30-kDa 단백질에서 유래한 P30 gene(*Burg et al.*, 1988)과 B1 gene(*Burg et al.*, 1989)이 주로 사용되고 있다. 저자는 예비 실험에서 P30 gene이 B1 gene 보다 특이성이 더 우수하여 본 실험에서는 P30 gene을 실험에 사용하였다. 저자들과 유사한 견해를 *Wasting et al.*(1993)이 보고하였다. 즉, B1 gene을 이용하여 PCR을 시행시 P30 gene 보다 높은 감수성을 나타내 동물접종검색법과 유사한 총체 검출 성적을 보였으나, P30 gene을 이용할 경우 B1 gene 보다 위음성이 두배 정도 많다고 하였다. *Weiss et al.*(1991)은 RH주 감염 마우스의 조직에서는 감염 2일부터, 혈액에서는 감염 5일부터 독소포자충 DNA가 검출되었으며, Beverley주 감염 마우스의 조직에서는 감염 10일부터 검출되었다고 보고하여 저자들의 실험 성적과 유사하였다. PCR의 감수성을 떨어뜨리는 요인으로 heparin, heme 등이 보고되어 있으며(*Beutler et al.*, 1991), 이번 실험에서 강독주 및 약독주 감염 마우스 혈액의 특이 DNA band가 진하게 보이지 않았는데 이와 연관이 있는 것으로 생각된다. *Sumyuen et al.*(1995)은 약독주 감염 마우스를 대상으로 조직내 원충의 유무를 세포배양으로 조사한 결과, 비장은 감염 2일부터 검출되어 감염 7일에 가장 많은 총체가 검출되었고 감염 50일 이후에는 검출되지 않았으며, 간에서는 감염 7일~70일 사이에 검출되었다고 하였다. 저자들의 실험에서도 혈액보다 먼저 감염 10일에 비장에서 독소포자충 DNA가 확인되었는데, 이는 감염 초기에 원충이 먼저 림프계를 통하여 전파된 다음 전신 순환을 통하여 총체가 운반됨을 간접적으로 증명하였다(*Sumyuen et al.*, 1995). 또한 간에서는 감염 15일부터 DNA가 검출되기 시작하여 감염 60일까지 검출할 수 있었는데, 이는 간은 주로 정맥 혈류가 분포하기 때문에 혈액에서 DNA가 발견되는 시기와 일치한 것으로 생각된다.

이상의 성적으로 보아 Beverley 감염 마우스에 있어서 순환 항원, 독소포자충 특이 DNA 및 특이 항체의 검출 시기가 RH주 감염 마우스보다 늦었는데, 이는 bradyzoite가 씨스트에 싸여 있어 항원이 숙주에 노출되지 않기 때문으로 생각된다. 또한 독소포자충의 강독주 감염시에는 동물접종법, ELISA, PCR을 이용하여 항원이나 총체를 비교적 쉽게 증명할 수 있었다. 그러나 자연계 상태에서 독소포자충 감염의 대부분은 약독주에 의한 감염으로 숙주의 혈액



및 조직내 총체 수가 적고 총체의 잔류기간도 짧기 때문에 ELISA와 PCR을 함께 실시하여 항체와 항원을 모두 증명하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Acebes MV, Diez B, Garcia-Rodriguez JA, Viens P, Cisterna R (1994) Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 506-511.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W (1991) Interference of heparin with polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **19**: 6051.
- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **141**: 3584-3591.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **27**: 1787-1792.
- Canolfi E, Derouin F, Kien T (1987) Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol* **6**: 44-48.
- Cazabonne P, Bessieres MH, Seguela JP (1994) Kinetics study and characterisation of target excreted/secreted antigens of immunoglobulin G, M, A and E antibodies from mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* **80**: 58-63.
- Chardes T, Bourguin I, Mevelce M-N, Dubremetz J-F, Bout D (1990) Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun* **58**: 1240-1246.
- Choi WY (1990) Diagnosis and epidemiology of toxoplasmosis in Korea. *Korean J Parasitol* **28** (Suppl): 41-44.
- Derouin F, Mazon MC, Garin YJF (1987) Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* **25**: 1597-1600.
- Grover CM, Thuliez P, Remington JS, Boothroyd JC (1990) Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* **28**: 2297-2301.
- Grimwood J, Smith JE (1991) Kinetics of the growth and variation in infectivity of *Toxoplasma gondii* in mice. *Ann Trop Med Parasitol* **85**: 659-661.
- Handman E, Remington JS (1980) Antibody response to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect Immun* **29**: 215-220.
- Hitt JA, Filice GA (1992) Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol* **30**: 3181-3184.
- Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS (1989) *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol* **27**: 2031-2038.
- Ise Y, Iida T, Sato K, Suzuki T, Shimada K, Nishioka K (1985) Detection of circulating antigens in sera of rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **48**: 269-272.
- Kasper LH (1994) *Toxoplasma* infection and Toxoplasmosis 177: 903-908. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. E. Braunwald, Editor-in Chief. 13th edition. McGraw-Hill, New York, 1994.
- Kasper LH, Ware PL (1985) Recognition and characterization of stage specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J Clin Invest* **75**: 1570-1577.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 681-685.
- Luft BJ, Remington JS (1988) Toxoplasmic encephalitis. AIDS commentary. *J Infect Dis* **157**: 1-6.
- Makioka A, Suzuki Y, Kobayashi A (1991) Recognition of tachyzoite and bradyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* by infected hosts. *Infect Immun* **59**: 2763-2766.
- McCabe R, Remington JS (1988) Toxoplasmosis: The time has come. *New Engl J Med* **318**: 313-315.
- Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE (1990) Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* **32**: 25-31.
- Sumyuen MH, Garin YJF, Derouin F (1995) Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected with orally with cysts of an avirulent strain. *J Parasitol* **81**: 327-329.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet:

- Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 4350-4354.
- Turunen HJ (1983) Detection of soluble antigens of *Toxoplasma gondii* by a four-layer modification of an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* **17**: 768-773.
- van Knapen F, Panggabean SO (1977) Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **6**: 545-547.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladenkin B (1976) A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* **29**: 150-153.
- Ware PL, Kasper LH (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **55**: 778-783.
- Wastling JM, Nicoll S, Buxton D (1993) Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med Microbiol* **38**: 360-365.
- Weiss LM, Udem SA, Salgo M, Tanowitz HB, Wittner M (1991) Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **163**: 180-186.

**=Abstract=**

Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*

Young-Ha LEE\*, Kye-Young KIM, Moon-Soo KANG and Dae-Whan SHIN

Department of Parasitology, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-131, Korea

This study aims to assess the possible strain-dependent variations in detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies. The virulent RH strain or avirulent Beverley strain of *T. gondii* were injected into mice, intraperitoneally, and their antigens, antibodies and parasites were identified from the blood or tissues; liver, brain and spleen by ELISA, Western blot and PCR. In mice infected with RH strain, circulating antigens and parasitemia were first detected from 2 days after infection, and *Toxoplasma* DNA were found in the blood, liver, brain and spleen from 3 days after infection. It was impossible to detect specific IgM and IgG antibodies to *T. gondii*, and any specific band was not found by Western blot. In mice infected with Beverley strain, circulating antigens were detected between day 10 and day 35. The *Toxoplasma* DNA was found in the blood and liver from day 15 until day 60, and in the brain from day 20. But *Toxoplasma* DNA in the spleen were mainly detected between day 10 and day 30. The IgM antibodies were first appeared on day 10 post-infection, and were noted obviously increased between day 15 and 25. The IgG antibodies were first detected on day 15, and showed progressively increased titers. The antibody binding bands were specific according to infection period. Sera from mice infected with Beverley strain reacted mainly with the antigen of 27.5-kDa and 32.5-kDa. In conclusion, mice infected with RH strain revealed *Toxoplasma* antigens strongly, but not antibodies. However, mice infected with Beverley strain revealed both the *Toxoplasma* antigens and antibodies. The present results showed that immune responses are different between avirulent and virulent *T. gondii*.

**Key words:** *Toxoplasma gondii* (RH and Beverley strain), antigen, antibody, ELISA, PCR, Western blot, mouse

[Korean J. Parasitol. 33(3): 201-210, September 1995]

\*Corresponding author