

## 세포배양에서 *Cryptosporidium parvum*의 발육

김보숙 · 주후돈\* · 위성환\* · 김태중\*\*

서울대공원, 가축위생연구소 기생충학\*, 건국대학교\*\*  
(1994년 12월 23일 접수)

### Development of *Cryptosporidium parvum* in cell culture

Bo-sook Kim, Hoo-don Joo\*, Sung-hwan Wee\*, Tae-jong Kim\*\*

Seoul Grand Park, Department of Parasitology, Veterinary Research Institute of RDA\*  
Department of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University\*\*

(Received Dec 23, 1994)

**Abstract** : The purpose of this study was to establish a method for *in vitro* culture of *C parvum* isolated in Korea by determination of suitable cell model to complete development of this parasite. The result obtained were summarized as follows:

1. To determine the most suitable cell line, six types of cell line were examined by microscopy. All cell lines were infected with *C parvum* and showed the highest infection score in HmLu cells.

2. The staining methods including DMSO-modified acid-fast(A-F) stain, hematoxylin-eosin(H & E) stain and immunofluorescence antibody(IFA) stain were applied to examine the infection of *C parvum* in cell culture. These staining methods were possible to examine the infection of *C parvum* in cell culture. The most sensitive one was IFA staining technique.

3. Developmental stages of *C parvum* in HmLu cell were observed. After the initial 8 hour incubation period, some trophozoites were observed. The meronts and gametes were appeared at 24-48 hour post inoculation(PI), and oocysts were observed firstly at 48-72 hour PI.

4. In H & E stain, the parasite appeared as basophilic within parasitophorous vacuole membrane(PVM) and lying in cytoplasm at near the nucleus of the host cells. It was able to distinguish the type I, type II meronts and gametes.

5. In DMSO-modified acid-fast stain, specific stained parasites were appeared firstly after 48 hour PI. The parasites were showed with different degrees of staining bright red color within PVM.

6. The endogenous stages of parasites in HmLu cell recovered at 48, 96, 120 and 144 hour after inoculation were reacted with rabbit immunized serum in immunofluorescence antibody and avidin-biotin complex peroxidase staining technique.

**Key words** : *C parvum*, cell culture, development stages

## 서 론

*Cryptosporidium*(Phylum: Apicomplexa; Suborder: Eimeriorina)은 사람과 여러 동물의 상피세포에 기생하는 2-6 $\mu$ m 크기의 원충이다<sup>1,7,24</sup>. 이 원충은 면역이 결핍되었거나 억압된 개체에서 심한 설사를 유발하는데 특히 AIDS 환자에서 만성적인 설사로 생명을 위협을 초래하는 병원체로 알려져 인수공통원충으로 매우 중요하게 취급되고 있다<sup>1,7,10,12,13,29</sup>.

*C parvum*은 다른 coccidia 원충과는 달리 숙주세포의 표면, 세포내 그리고 세포외에서 발육이 가능한 것으로 알려져 있어 시험관내에서 이들의 생물학적 특성을 밝히려는 많은 연구가 진행되고 있다<sup>13,15,16,17</sup>. Current와 Long<sup>2</sup>은 사람과 소에서 유래된 *Cryptosporidium*을 계태아의 요막에 감염시켜 chorioallantoic membrane의 endoderm cell에서 완전한 생활환이 이루어짐을 보고하였다. Current et al<sup>8</sup>은 Human fetal lung(HFL) cell, Primary chicken kidney(PCK) cell과 Porcine kidney(PK) cell에서 배양이 가능함을 보고하였다. 그 밖에도 여러 연구자들에 의하여 Human enterocyte HT 29 cell<sup>11</sup>, Mardin-Darby canine kidney(MDCK) cell<sup>15,16,20</sup>, Caco-2 carcinoma cell line<sup>6</sup>, Human foreskin cell line<sup>25</sup>, Chick embryo<sup>14,21</sup> 그리고 Human endometrial carcinoma cell line et al<sup>18</sup>에서 세포배양이 시도된 바 있다. 또한, Marshall et al<sup>16</sup>과 Upton et al<sup>32</sup>은 *Cryptosporidium*에 대한 효과적인 약제 선발을 위해서 시험관내 배양을 이용한 것이다.

국내에서는 *Cryptosporidium*의 분리, 발현, 염색법 및 감염실험 등이 이루어진 바는 있으나 시험관내 배양에 관하여 시도되었던 바는 없다<sup>26-34</sup>. *Cryptosporidium*의 *in vitro* model은 *in vivo* model에 비하여 비용이 저렴하고 *in vivo*에서 관찰하기 어려운 발육 단계를 쉽게 확인할 수 있어 원충의 생물학적 특성의 규명과 면역학적 연구를 비롯하여 유효약제의 선발 등에 그 필요성이 증가되고 있는 실정이다<sup>16,17,24</sup>.

따라서 본 연구는 국내에서 분리된 *C parvum*의 완전한 생활환을 이루는데 가장 적합한 세포 모델을 선정하고 *C parvum* 국내 분리주에 대한 각 발육 단계별 면역학적 특성과 약제 시험등의 기초자료로 활용될 수 있도록 시험관내 배양기법을 확립하기 위해서 실시하였다.

## 재료 및 방법

원충주 : 국내 BALB/c 마우스에서 분리하여 송아지에 계대되고 있는 *C parvum* 국내 분리주(VRI-CN91)를 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양받아 사용하였다<sup>28,29,30</sup>.

사용된 세포주 : 사용된 세포주는 농촌진흥청 가축위생연구소에서 계대중인 Black goat kidney(BGK), Baby hamster kidney(BHK), Hamster lung(HmLu), Mardin-Darby bovine kidney(MDBK), MDCK, PK-15 cell line을 분양받아 실험에 사용하였다.

배지는 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 100IU/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25 $\mu$ g/ml amphotericin-B가 함유된  $\alpha$ -Minimum Essential Medium( $\alpha$ -MEM, Gibco) 완전배지를 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 배양기에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하면서 1주일에 2-3회 계대하였다.

배양용기는 목적에 따라 15-50ml 배양 플라스크, 96 well plate 그리고 chamber slide(Nunc) 등을 이용하였다. 배양용기에 분주한 세포의 수는 1 $\times$ 10<sup>3</sup>-1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml로 하였고, 세포가 배양용기 바닥에서 완전히 단층을 형성하면 trypsin-versene(0.25% trypsin과 1mM EDTA 혼합액, Gibco)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에 5분간 두어 세포가 바닥에서 박리되면 완전배지로 원심, 세척하여 다시 계대배양하였다.

*C parvum*의 순수 분리 : 송아지 분변으로부터 oocyst를 순수 분리하기 위하여 위 et al<sup>30</sup>의 방법에 따라 ether extraction과 discontinuous sucrose gradients를 병용하여 사용하였다. 분리된 oocyst는 혈구계산판에서 수를 계산하고 남아있는 오염물질을 살멸시키기 위해 Current et al<sup>8</sup>의 방법에 따 0.1% glucose, 5,000IU/ml Penicillin, 5mg/ml Streptomycin, 20 $\mu$ g/ml Amphotericin-B(Gibco)가 함유된 PBS에 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3시간 동안 잠작하였다.

*C parvum*의 세포감염 : Oocyst로 부터 sporozoite를 얻기 위하여 Current et al<sup>8</sup>의 방법에 따라 0.75% sodium taurocholate와 0.25% trypsin이 함유된 인공갈낭액을 이용하여 탈낭시킨 후 원심, 세척하여 2% FBS가 함유된 유지용 배지에 부유시켜 감염에 사용하였다. 그리고 인산완충액(PBS, pH 7.2)으로 1,500 $\times$ g에서 10분간씩 3회 원심, 세척한 후 2.5% Potassium dichromate에 부유시켜 4 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 세포감염은 세포가 96 well plate나 chamber slide에 완전히 단층을 형성했을 때 sporozoite가 함유된 유지용 배지를 첨가하여 12시간 이상 배양하므로써 시행하였다.

감염된 세포의 관찰 : Sporozoite를 세포에 감염시킨 후 12시간째 부터 7일째까지 도립현미경(Nikon, IMT-2)으로 원충의 발육 상황을 정기적으로 관찰하였다. 또한 일자별 원충의 발육 상황에 대한 염색소전을 관찰하기 위하여 sporozoite를 접종한 후 24시간 간격으로 chamber slide를 꺼내 PBS로 3회 가볍게 세척하고 methanol로 5분간 고정한 후 공기건조하여 DMSO-modified acid-fast stain<sup>6</sup>과 Hematoxylin and eosin(H & E) stain을 실시하였다.

Immunocytochemistry : Sporozoite의 세포 감염 후 시간대 별로 면역 혈청에 대한 반응을 확인하기 위하여 immunofluorescence antibody(IFA) stain과 avidin-biotin complex(ABC) peroxidase stain을 실시하였다. 감염 후 48, 96, 120 그리고 144시간째에 96 well plate와 chamber slide를 꺼낸 후 PBS로 3회 가볍게 세척하고 methanol에서 약 5분간 고정한 후 -20℃에 보관하면서 사용하였다. 면역 혈청은 *C parvum*의 oocyst로 면역시킨 토끼 혈청을 가축위생연구소에서 분양받아 사용하였다.

1) IFA stain : Bjorneby et al<sup>3</sup>과 Rusnak et al<sup>22</sup>의 방법을 수정하여 1:100-1:200으로 희석된 가토면역혈청과 1:150로 희석된 FITC conjugated goat anti-rabbit IgG(Cappel)를 차례로 반응시킨 후 형광현미경(SH-250, Carl Zeiss)으로 관찰하였다.

2) ABC peroxidase stain : Bullock<sup>5</sup>의 방법을 수정하여 Fig 1과 같은 순서로 실시하였다. 이때 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector)는 1µg/ml의 농도로 반응시켰으며 avidin-biotinylated peroxidase는 반응 30분전에 pre-mixing하여 사용하였다. 기질과 대조염색은 enhanced diaminobenzidine(DAB) kit(KPL)를 사용하였고 원충액은 0.1M Tris Buffered Saline(TBS, pH 7.5)을 사용하였다.

Chamber slide prefixed with methanol  
 ↓ 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol(10min)  
 Blocking endogenous peroxidase activity  
 ↓  
 Washing with TBS  
 ↓ TBS supplemented with 10% normal goat serum and 0.1% saponin as blocking buffer (30min)  
 Washing with TBS  
 ↓ rabbit immune serum diluted with blocking

buffer(30min)  
 Washing with TBS  
 ↓ biotinylated goat anti-rabbit IgG diluted with blocking buffer(30min)  
 Washing with TBS  
 ↓ Avidin-biotinylated peroxidase(30min)  
 Washing with TBS  
 ↓ DAB-2.5% nickel ammonium sulfate(10min)  
 Washing with TBS  
 ↓  
 Counterstain with green contrast(2-3min)  
 ↓  
 Washing and destaining with isopropanol  
 ↓  
 Mount with balsam and examined

Fig 1. Procedure of immunocytochemical method in avidin-biotin complex peroxidase stain

## 결 과

세포주별 감염율 비교 : *C parvum*의 세포 배양에 가장 적합한 세포주를 선택하기 위하여 6종의 세포주의 감염 정도를 비교한 결과 모든 세포주에 *C parvum*이 감염됨을 확인하였고 그 중 HmLu cell이 가장 높은 infection score를 나타내었다. 세포감염에 사용된 *C parvum*의 oocyst와 cell의 비율은 1:1 또는 10:1로 조정하였던바, 접종량에 따른 차이는 보이지 않았다(Table 1). 따라서 이후의 시험은 HmLu cell을 사용하였으며 oocyst대 cell의 비(ratio)를 1:1 또는 2:1로 하였다.

Table 1. Infection scores of *C parvum* in various cell line measured by microscopy

Cell line	Oocysts/Cell ratio	
	1:1	10:1
BHK	1+*	2+
BGK	1+	1+
HmLu	3+	3+
MDBK	1+	1+
MDCK	1+	1+
PK	1+	1+

\*Infection score : 1+ : ≤5/field, 2+ : 6-10/field  
 3+ : >10/field(×200)

염색법에 따른 infection score의 비교 : *C parvum*의 세포배양시 감염유무를 판단할 수 있는 효과적인 염색법을 DMSO-modified acid-fast stain, H & E stain 그리고 IFA stain을 비교하였던 바 IFA stain이 가장 민감하였다(Fig 2).

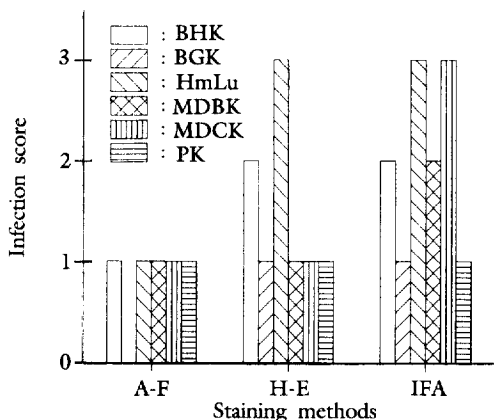


Fig 2. The infection scores of *C parvum* in various cells at different staining methods.

(A-F: DMSO modified acid-fast stain, H & E: hematoxylin-eosin stain and IFA: immunofluorescence assay)

*C parvum*의 HmLu cell에서의 발육 상황 : 세포 감염 후 시간대 별로 *C parvum*의 발육 단계를 관찰한 결과, 감염 8시간 이후 부터 세포내에 trophozoite가 형성되어 있음을 관찰할 수 있었고 세포내로 침입하지 않은 sporozoite도 관찰되었다. Inverted microscopy에서는 세포내에 감염된 원충을 확인할 수는 있었으나 발육 단계가 구분되지는 않았다. Oocyst는 48-72시간 부터 관찰할 수 있었고, 96시간 이후 부터는 세포에서 나와 배지에 떠돌아 다니는 oocyst도 관찰할 수 있었다(Fig 3).

H & E stain에서는 원충이 세포질내에 호염기성으로 염색되어 있었으며, 대체로 세포핵 가까운 곳에 감염되어 있었다. 감염 24-48시간 후 부터 세포질에 parasitophorous vacuole membrane(PVM)을 형성한 6-8개의 merozoite를 가진 type I이나 4개의 merozoite를 가진 type II meront를 관찰할 수 있었다(Fig 4).

Gamete는 48시간 이후부터 관찰할 수 있었으나 성별의 구분은 명확치 않았다(Fig 4).

DMSO-modified acid-fast stain하여 관찰한 결과 Table 2에서와 같이 48시간 이후 부터 특이적으로 염

색되었으며, 염색되지 않은 원충도 동시에 관찰되었고 그 비율은 시간이 지날수록 증가하였다. 염색양상은 PVM내에 붉게 염색되었으며, 부분적으로만 염색되어 나타났다(Fig 5).

Table 2. The variation of DMSO-modified acid-fast staining pattern of *C parvum* endogenous stages in HmLu cells at different times

Time after inoculation (hours)	DMSO-modified acid-fast stain positive	Observed endogenous stages	Ratio
8	-	1	0
24	-	6	0
48	5*	19	0.26
72	6	19	0.32
96	6	9	0.67
120	4	5	0.80
144	2	2	1.00

\* Numbers of parasites per field

HmLu Cell에서 *C parvum*의 발육 단계별 항체 반응성 : 가토면역혈청을 이용하여 IFA stain과 ABC peroxidase stain을 실시한 결과는 Table 3에서와 같이 성숙 meront가 출현하는 감염후 48시간, 모든 발육 단계가 공존하는 96-120시간 그리고 주로 oocyst가 존재하는 144시간 모두 면역 혈청과 반응하였다. 반응양상은 세포질이 원충이 특이형광(Fig 6)이나 DAB(Fig 7)로 염색되어 관찰되었다.

Table 3. Serological reactivity of *C parvum* in HmLu cells at the different time after inoculation using immunofluorescence antibody and ABC peroxidase stain

Methods	Time after inoculation			
	48	96	120	144
IFA*	+	+	+	+
ABC**	+	+	+	+

\* IFA : Immunofluorescence antibody stain

\*\* ABC : Avidin-biotin complex peroxidase stain

\*\*\* Sero positive : reacted with immunized rabbit serum

## 고 찰

사람이나 동물에서 분리한 *Cryptosporidium*은 숙주 특이성이 낮고, 기생부위 또한 장관 뿐만 아니라 기관, 자궁 등에도 실험적 감염이 이루어져 다양한 종류의 세포에서 배양이 가능할 것으로 시사되어 왔다<sup>1,4,10</sup>.

본 연구에서는 BGK, BHK, MDBK, MDCK, PK 그리고 HmLu cell에서 세포배양을 시도한 결과 모든 세포에 감염되어 완전한 발육이 이루어져 숙주특이성이 낮음을 시사하고 있었다. 그 중 HmLu cell에서 가장 많은 원충이 감염됨을 확인할 수 있었는데 이는 Current et al<sup>8</sup>이 HFL, PCK 그리고 PK cell중 HFL이 가장 많은 감염이 이루어졌다는 결과와 비교해 볼 때 lung 유래 cell에서 많은 원충이 감염된다는 결과가 유사하였다.

본 연구에서는 원충의 세포 감염 여부를 Inverted microscopy로 관찰하고, DMSO-modified acid-fast stain, H & E stain 그리고 IFA stain으로 확인하였는데, 감염유무를 판단할 수 있는 효과적인 염색법으로는 IFA stain이 가장 좋았다. 그러나 IFA stain이나 DMSO-modified acid-fast stain에서는 발육 단계의 구분은 어려웠고, H & E stain에서는 원충의 PVM이나 merozoite, refractile body 등을 관찰할 수 있었다.

Current et al<sup>8</sup>은 Nomarski interference contrast (NIC) microscopy로 모든 발육단계를 구분할 수 있다고 하였으나, 본 실험에서는 Inverted microscopy에서 각 단계를 구분할 수 없었으며, 감염여부만 판단 가능하여 차이가 있었는데 이는 현미경의 phase contrast방식의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. Flanigan et al<sup>11</sup>은 DMSO-modified acid-fast, Papanicolaou, Giemsa 그리고 H & E stain을 비교한 결과에서 H & E fast에서 만 전형적인 trophozoite를 구분할 수 있다고 보고하여 본 실험의 성과와 일치하였다. 그 밖에도 Rasmussen et al<sup>18</sup>은 Giemsa stain에서 명확한 발육단계는 구분할 수 없다고 하였고, Rosales et al<sup>18</sup>은 Giemsa과 Alcian blue의 혼합염색에서 모든 발육단계를 구분한 바 있다.

*C parvum*의 HmLu cell에서 발육 상황을 관찰한 결과, 감염 8시간 후부터 세포내 trophozoite가 관찰되었고, H & E stain 소견에서 24-48시간 후에는 PVM내에서 완전히 발육된 Type I, II meront를 관찰할 수 있었다. 원충은 세포질의 핵 가까운 곳에서 주로 관찰되었고, 호염기성으로 염색되었다. Gamete는 H & E나 DMSO-modified acid-fast stain으로 구분이 힘들었으나

대체로 48시간 이후 부터 관찰되었으며 oocyst는 48-72시간 부터 관찰되었다. Current et al<sup>8</sup>은 HFL cell에서 감염 후 4시간 부터 trophozoite, 12시간 부터 144시간 까지 Type I, II meront, 48-144시간 까지 gamete가 관찰된 결과는 본 실험 성과와 대체로 일치하였다. 그러나 oocyst의 출현시기는 약간의 차이를 보이고 있다. 즉, Current et al<sup>8</sup>은 HFL cell에서 72시간 이후 부터 oocyst를 확인한 반면 Rosales et al<sup>18</sup>은 MDCK cell에서 24시가 이후 부터 oocyst가 명확히 관찰된다고 보고하였다. 본 실험에서는 HmLu cell에서 48시간 이후 부터 oocyst가 관찰되었는데 이는 사용한 세포주에 따라 원충 발육에 차이가 있어 oocyst의 출현 시기가 다를 수 있을 것으로 생각된다.

DMSO-modified acid-fast stain의 변화에서는 48시간 이후 부터 특히 염색을 관찰할 수 있었는데 DMSO-modified acid-fast stain이 대개 감염동물의 분변내 oocyst를 증명하는데 사용되는 염색법임을 감안할 때 oocyst의 출현시기와 관계됨을 시사하는 것으로 부분적으로 염색이 되는 경우도 oocyst의 성숙여부와 관계가 있는 것으로 판단되었다. 따라서 앞으로 이에 대한 심도 깊은 연구가 계속된다면 *Cryptosporidium*의 발육상을 정확히 관찰하기 어려운 현미경에서도 meront단계와 oocyst단계를 명확하게 구분할 수 있는 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

HmLu cell에서 *C parvum*의 발육 단계별로 oocyst로 면역시킨 토끼 혈청에 대한 반응을 형광항체법과 면역 조직화학적 방법으로 조사한 결과 48, 96, 120 그리고 144시간째에 모두 양성반응을 나타내어 대부분의 발육단계에 면역 혈청이 반응하는 것으로 생각되었다. 이는 최근에 여러 연구자들이 발육단계별 항원분석에서 oocyst wall, sporozoite 그리고 merozoite 사이에 공통항원대를 가지고 있다는 결과<sup>3</sup>를 뒷받침하는 것이라 생각된다. 이러한 면역 혈청학적 방법은 다른 염색법에 비하여 민감도가 높아 세포 감염 여부를 판단하거나 이 원충의 면역학적 특성을 연구하는데 쉽게 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 국내에서 분리된 *C parvum*도 여러 세포에서 발육이 이루어짐을 확인할 수 있었는데 세포배양에서의 여러 발육 단계들은 항체반응성도 우수하여 단클론성 항체의 특성규명, 시험관내 항체 중화시험 등에 응용될 수 있을 것으로 생각되며 나아가서 유효약제의 스크린에도 유효하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다. 그러나 실험의 제반조건에 따른 재현성변화나 배양유래 원충의 병원성 등은 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결 론

국내에서 분리한 *C parvum*의 완전한 생활환을 이루는데 적합한 세포 모델을 선정하고 시험관내 배양기법을 확립하기 위하여 본 연구를 수행한 바 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. *C parvum*의 세포배양에 가장 적합한 세포주를 선택하기 위하여 6종의 세포주(BGK, BHK, HmLu, MDBK, MDCK, PK)의 감염정도를 비교한 결과 모든 세포주에 *C parvum*이 감염됨을 확인하였다. 그 중 HmLu cell이 가장 높은 infection score를 나타내어 *C parvum*을 세포배양하기에 가장 적합한 세포로 판단하였다.

2. *C parvum*의 세포배양시 감염 유무를 판단할 수 있는 효과적인 염색법을 조사한 결과 DMSO-modified acid-fast stain, hematoxylin-eosin stain과 immunofluorescence antibody stain 중 immunofluorescence

antibody stain이 가장 민감하였다.

3. 세포에 감염시킨 후 시간대 별로 발육 단계를 관찰한 결과 감염 8시간에 trophozoite가 관찰되었고, 24-48시간째 부터 meront가, gamete는 48시간 이후 부터 확인할 수 있었으며, oocyst는 48-72시간 부터 관찰할 수 있었다.

4. H & E 염색에서는 원충이 대체로 세포핵 가까운 곳에 호염기성으로 염색되어 있었으며, 세포질에 parasitophorous vacuole membrane(PVM)과 type I, type II meront 그리고 gamete를 관찰할 수 있었다. 그리고 DMSO-modified acid-fast stain에서는 48시간 이후 부터 PVM내에 붉게 염색된 원충을 관찰할 수 있었다.

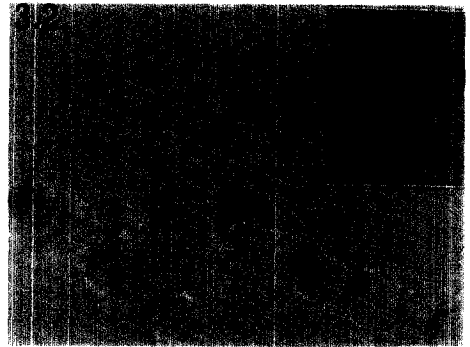
6. *C parvum*의 oocyst로 면역시킨 토끼혈청을 이용하여 immunofluorescence antibody와 avidin-biotin complex peroxidase stain으로 시간대 별로 항체 반응성을 확인하였던 바 48-144시간 까지 모두 반응하였다.

## Legends for figures

- Fig 3. Light microscopic appearances of HmLu cells infected with *C parvum* sporozoites. Trophozoite visible (arrowhead,  $\times 400$ )(3.1). HmLu cell infected with more than parasite(arrow and mature oocyst outside of the cell(arrowhead)(3.2).
- Fig 4. Representative developmental stages of *C parvum* in HmLu cells H & E stained( $\times 1000$ ). Trophozoites within parasitophorous vacuole membrane(PVM) at 8 hour after infection(4.1). Type I(arrowhead) and type II(arrow) meront with merozoites(4.2). Mature type II meront with merozoites(4.3). Consider as gamete with refractile body and granular cytoplasm(4.4). Immature oocyst(4.5) and oocyst undergoing sporogony within PVM of host cell(4.6).
- Fig 5. DMSO-modified acid-fast staining patterns of HmLu cells infected with *C parvum* at the different time after infection( $\times 1000$ ). Meronts with central refractile body(rb) were not stained(5.1). Oocysts undergoing sporogony within PVM of the host cell(5.2). Oocysts partially stained and other endogenous stages not stained(5.3). Typically stained mature oocysts and not stained other stags of parasite(5.4).
- Fig 6. Immunofluorescence antibody stained stages of *C parvum* developing in HmLu cells at 48 hour after infection. Parasites were stained green with fluorescein at  $\times 250$ .
- Fig 7. ABC peroxidase stained stages of *C parvum* developing in HmLu cells at 72 hour after infection. Parasite were stained dark brown with DAB-Ni( $\times 1000$ ).



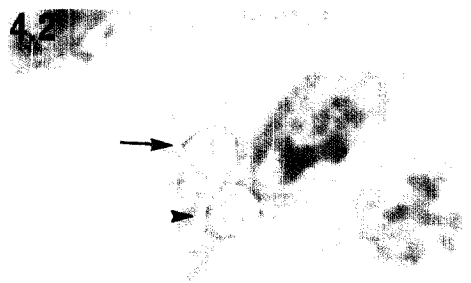
4.1



4.2

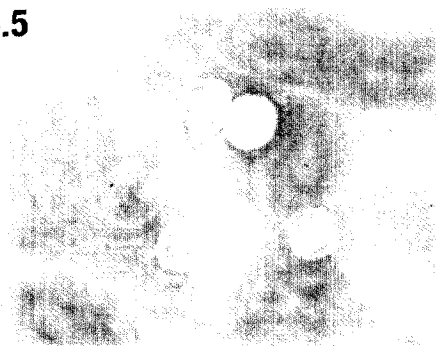


4.3

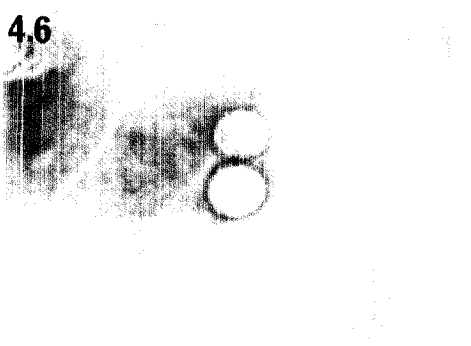


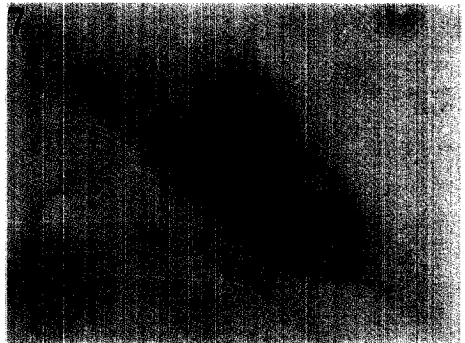
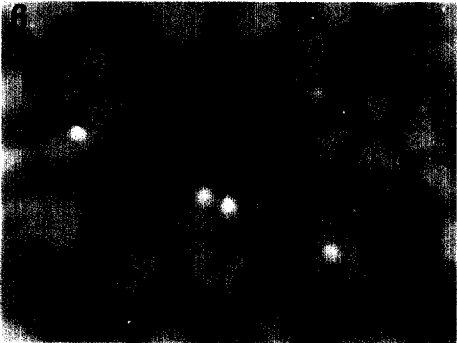
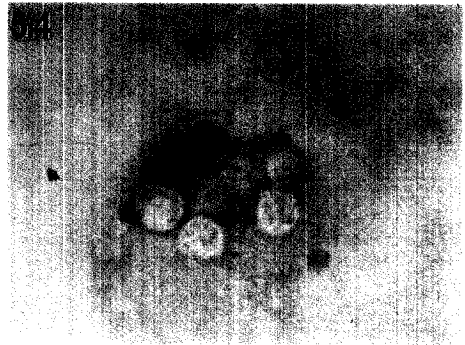
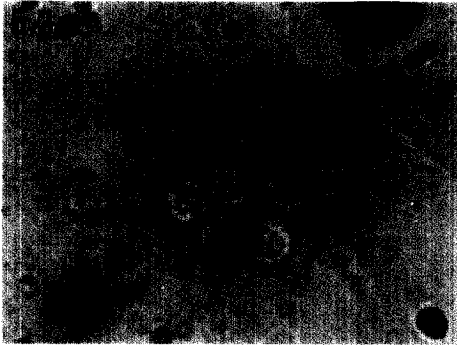
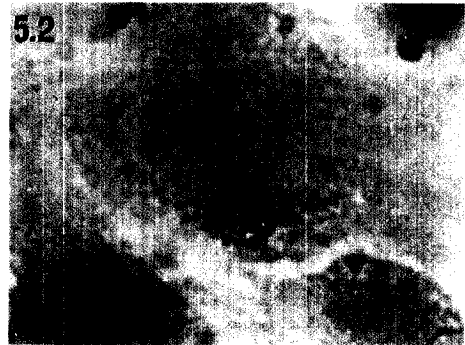
4.4

4.5



4.6





### 참 고 문 헌

1. Angus KW. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *J Royal Soci Med* 1983; 76: 62-70.
2. Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *J parasitol* 1987; 73(2): 314-319.
3. Bjorneby JM, Riggs MW, Perryman LE. *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. *J Immunol* 1990; 145(1): 298-304.
4. Boufassa-Ouzrout S, Chermette R, Meissonnier E. Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man. *Off Int Epi* 1986; Technical series. No 5.
5. Bullock CR, Petrusz P. Techniques in im-



- munocytochemistry. 2: 85-102.
6. Buraud M, Forget E, Bizet J, et al. L. Sexual stage development of cryptosporidia in the Caco-2 cell line. *Infect Immun* 1991; 59(12): 4610-4613.
  7. Current WL. Cryptosporidiosis. *JAVMA* 1985; 187(12): 1334-1338.
  8. Current WL, Haynes TB. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 1984; 224: 604-605.
  9. Current WL, Long PL. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J Infect Dis* 1983; 148: 1108-1113.
  10. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Cryptosporiosis of man and animals. CRC press Boca Raton Florida 1990.
  11. Flanigan TP, Aji T, Marshall R, et al. A sexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infect Immun* 1991; 234-239.
  12. Goodgame RW, Genta RM, Cliton White A, et al. Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *J Infect Dis* 1993; 167: 704-709.
  13. Heyworth MF. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Infect Dis* 1992; 166: 465-472.
  14. Lindsay DS, Sundermann CA, Blagburn BL. Cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos and pathogenicity of chicken embryo-passed oocyst. *J parasitol* 1988; 74(2): 288-293.
  15. Lumb R, Smith K, O' Donoghue PJ, et al. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol Res* 1988; 74: 531-536.
  16. Marshall RJ, Flanigan TP. Paromomycin inhibits *Cryptosporidium* infection of a human enterocyte cell line. *J Infect Dis* 1992; 165: 772-774.
  17. Peterson C. Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Today* 1993; 9(3): 87-91.
  18. Rasmussen KR, Larsen NC, Healey MC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infect Immun* 1993; 61(4): 1482-1485.
  19. Rosales MJ, Cifuentes J, Mascaro C. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Exp Parasitol* 1993; 76: 209-212.
  20. Rosales MJ, Mascaro C, Osuna A. Ultrastructural study of *Cryptosporidium* development in Mardin-Darby canine kidney cells. *Vet Parasitol* 1993; 45: 267-273.
  21. Rosales MJ, Mascaro C, Osuna A. New findings during *Cryptosporidium parvum* development in the chick embryo. *J Infect Dis* 1992; 165: 789-790.
  22. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 1135-1136.
  23. Upton SJ, Current WL. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa; Cryptosporidiae) infecting mammals. *J Parasitol* 1985; 71(5): 625-629.
  24. Upton SJ, Tilley ME, Marchin GI, et al. Efficacy of a pentaiodide resin disinfectant on *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocysts in vitro. *J Parasitol* 1988; 74(4): 719-721.
  25. Wagner ED, Das MP. *Cryptosporidium* in cell culture. *Jpn J Parasitol* 1986; 35(3): 253-255.
  26. 노재욱, 강두원 등. 크립토스포리디움종의 실험실적 진단법. 대한수의학회지 1991; 31(4): 501-507.
  27. 모인필, 윤희정, 최상호 등. 닭의 cryptosporidiosis 발생에 보고. 대한수의학회지 1988; 28(1): 175-177.
  28. 위성환, 강영배, 주후돈 등. 국내 마우스로부터 분리된 *Cryptosporidium*의 실험용 마우스로의 감염실험. 농시논문집(가축위생편) 1992; 34(1): 43-48.
  29. 위성환, 이정길, 주후돈 등. 국내 마우스에서 분리된 *C. parvum*의 송아지로의 감염실험. 기생충학잡지 1992; 30(4): 259-262.
  30. 위성환, 이정길, 김보숙 등. 분변에 함유된 *Cryptosporidium parvum* 오오시스트의 순수분리-Ether extraction과 discontinuous sucrose gradients의 병용. 기생충학잡지 1994; 32(1): 7-12.
  31. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토스포리디움의 분리 및 동정. I. 각종 동물의 크

- 립토스포리디움 감염상황. 기생충학잡지 1991; 29(2): 139-148.
32. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토스포리디움의 분리 및 동정. II. 마우스로부터의 *Cryptosporidium muris*의 분리. 기생충학잡지 1991; 29: 149-159.
33. 이재구, 서영석, 박배근. 한국산 동물로부터 크립토스포리디움의 분리 및 동정. III. 닭으로부터의 *Cryptosporidium baileyi*의 분리. 기생충학잡지 1991; 29(4): 315-324.
34. 채종일, 신손문, 윤종구 등. 면역 억제에 의한 마우스의 *Cryptosporidium* 발현실험. 기생충학잡지 1990; 28(1): 31-37.
-