

개 바베시아병에 관한 연구

I. *Babesia gibsoni*의 시험관내 분리와 항원성상에 관한 연구

이 호 권 · 서 명 득

경상대학교 수의과대학
(1996년 2월 6일 접수)

Studies on canine babesiosis in Korea

I. *In vitro* isolation and antigenic properties of *Babesia gibsoni*

Ho-kweon Lee, Myung-deuk Suh

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Feb 6, 1996)

Abstract : The present study was conducted to isolate *Babesia gibsoni* by culture method of the microaerophilous stationary phase(MASP) and analyse the antigenic properties of the parasite by SDS-PAGE and immunoblot. The results obtained were summarized as follows.

The protozoan parasite *Babesia gibsoni* multiplied in canine erythrocytes in RPMI 1640 medium(pH7.0) containing 20-40% normal canine serum under the MASP condition of 5% CO₂ and 95% air at 37°C incubator. The levels of parasitaemia in the erythrocytes were shown more higher by exchanging the medium at 24 hours interval.

Under the above condition of MASP, the percentage of parasitized erythrocytes(PPE) after incubation for 8 days increased about 14 times more than that in the initiation of the 1% infected canine erythrocyte culture.

The parasites were purely isolated from the MASP culture of red blood cells collected from dogs infected with *Babesia gibsoni* naturally or artificially. Among the total of 36 canine(Pit-bullterier) blood samples the parasites were isolated from 17 cases(47.2%) in the MASP culture while the parasites were detected from 20 cases(56%) and 12 cases(33.3%), respectively, by indirect fluorescent antibody(IFA) test and direct light microscopy(DLM). On the other hand, *Babesia gibsoni* was isolated by MASP culture from 15 cases(75%) and 11 cases(92%) of positive cases of IFA and DLM, respectively.

In the analysis of the erythrocytic merozoite(AEOM) antigen derived from infected dog approximately 11 antigenic bands in molecular weight of 130, 120, 97.4, 92, 80, 52, 50,

42, 36, 30 and 29 KDa were observed on SDS-PAGE. Antigenic bands in the endoerythrocytic merozoite(CEOM) antigen derived from infected erythrocyte (sediment) in MASP culture were much similar to those of AEOM bands. In the exoerythrocytic merozoite(CEEM) antigen derived from supernatant of the infected erythrocyte culture approximately 20 antigenic bands were observed and the molecular weight of the major bands among these were 140, 120, 114, 105, 96, 93, 92, 80, 60, 52, 50, 38, 36, 30, 24, 18.5 and 16 KDa.

In the protein patterns of AEOM and CEOM antigen by immunoblot 15 bands were observed and these patterns were much similar between each other. The molecular weight of the major bands in the both antigens were 130, 120, 80, 60, 52, 50, 42, 30, 29, 18.5 and 16 KDa. Approximately 21 bands were observed in CEEM antigen and the molecular weight of the major bands were 140, 120, 96, 92, 85, 80, 76, 60, 52, 50, 37, 30, 24, 16 and 15 KDa.

The specific antigenic bands in the artificially infected dogs were firstly observed at 3 weeks after inoculation of infected blood and these antigenic bands were maintained up to 18 months after inoculation. In the immunoblot of the sera of the splenectomized dogs the specific antigenic bands with the molecular weight of 93 KDa and 52 KDa, respectively, were observed weakly comparing to those of non-splenectomized dog. In immunoblot of the sera collected from the naturally infected dogs the antigenic bands were observed as same as those of artificially infected dogs while antigenic band of 29 KDa in some individual dog showed strongly.

In comparison of immunoblot of the sera collected from dogs non-treated and treated with diminazene aceturate(7mg/Kg, IM) after artificial infection no differences of antigenic bands were observed. In analysis of antigenic bands by digoxigenin glycan/protein double labeling, antigenic bands in the molecular weight of 106, 60 58, 36, 30 and 29 KDa were determined as glycoproteins.

Key words : *Babesia gibsoni*, MASP culture, SDS-PAGE, Immunoblot.

서 론

개 바베시아병은 진드기에 의하여 매개되는 주혈 원충성 질병으로서¹⁻⁸ 원인체는 현재까지 *Babesia canis*, *B gibsoni*, *B vogeli* 및 *B felis*의 4종이 보고 되어있다⁹. 그중 대형종인 *B canis*와 소형종인 *B gibsoni*가 전 세계적으로 널리 분포하고 있는 것으로 알려져 있다²⁻¹¹. 그러나 우리나라에서는 이들중 *B gibsoni* 만이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다⁵⁻¹⁴.

*B gibsoni*는 Patton⁷이 수렵견에서 최초로 보고하였으며 그후 Shirlaw 등⁶에 의하여 임상증상과 병리학적소견 등이

보고된 바 있다.

이 원충의 merozoite는 적혈구에 기생하며 적혈구내에서 무성생식을 통하여 증식한다¹⁵⁻¹⁸. 감염은 주로 개 진드기에 의하여 이루어지지만 기계적 감염도 가능하다³⁻⁸. 이 원충에 감염되면 빈혈 및 황달을 나타내며 심급성의 경우 혈색소뇨를 동반하면서 폐사하기도 한다^{1-10,16}.

국내에서는 손¹³이 경주지역의 수렵견(Retriever, Pointer)에서 최초로 발견 보고한 바 있으며 서⁵와 이 등⁹도 이 병의 발생을 보고한 바 있다.

*B gibsoni*의 진단법으로는 혈액도말 검사법, 동물 접촉법, 겔 침강법(AGP), 간접 적혈구 응집반응법(IHA) 및 간접 형광항체법(IFA) 등이 널리 이용되고 있다^{4,8,10,19,20-24}.

그러나 원충을 직접 증명할 수 있는 혈액도말 검사법은 초기 급성 감염기를 제외하고는 진단이 어렵다는 단점이 있으며* 동물 접종법은 가장 확실한 방법이지만 비용과 시간이 많이 소요된다는 단점이 있고^{4,23}, 항체진단법은 많이 활용되고 있으나 현충을 진단하는 데에는 어려움이 있다²⁰⁻²³. 한편 진단용 항원생산에서는 숙주동물을 이용해야 하므로 비용이 많이 들고 항원 분리시 숙주 동물의 항체 혼입으로 인한 비특이 반응이 일어날 수 있어 순수한 항원을 생산하는 데에는 고도의 기술을 요한다²¹⁻²⁷.

이와같은 단점을 보완하기 위하여 최근에 와서는 원충의 시험관내 배양법 확립에 대한 요구가 높아지고 있는 실정이다^{18,20,27-29}.

Erp 등⁷은 *Babesia* spp.의 시험관내 증식법으로 spinner suspension 배양법을 보고하였으나 원충의 증식성이 낮아 널리 활용되지 못하였고, Levy 등³¹은 *B. bovis*의 배양에 microaerophilous stationary phase(MASP) 배양법을 고안하여 원충배양에 이용하였던 바, 증식성이 크게 향상되었다고 보고하였다. 그후 여러 연구자들에 의하여 *B. canis*, *B. divergens*, *B. bigemina* 및 *B. caballi* 등의 MASP 배양법이 보고되었다^{20,21,29,32}.

*B. gibsoni*의 배양은 Murase 등¹⁶에 의하여 시험관내 증식성과 형태학적 변화에 관하여 보고한 바 있고 Onishi 등¹⁸은 시험관내 배양의 최적조건과 배양유래 원충의 병원성의 변화에 대하여 보고한 바 있다.

특히 시험관내 배양법은 숙주동물을 사용하지 않고 혈액재료로부터 원충을 직접 분리할 수 있는 방법으로 Holm 등²⁰은 *B. caballi*에 감염된 말에서 잠복감염의 확인에 이 방법을 적용한 바 있고, mixed population 상태의 바베시아로부터 순수한 단일 population을 cloning할 경우에도 이 방법이 응용되고 있으며³³, James 등²¹은 시험관내 배양법을 이용하여 *B. canis*의 배양유래 항원의 특성과 면역원성 규명에 대한 연구를 수행한 바 있다.

그러나 우리나라에서는 채 등¹²에 의하여 *B. gibsoni* 항원의 특성이나 면역원성에 대한 연구가 일부 이루어진 바 있으나 그들은 숙주의 체내에서 증식시킨 감염적혈구를 이용하여 연구를 수행하였을 뿐 배양유래 원충에 대한 항원성이나 특성에 대한 연구는 수행하지 않았다.

따라서 저자 등은 국내의 투견에서 개임후 흔히 빈혈과 식욕부진 등의 임상증상을 일으키면서 발병하는 *B. gibsoni* 감염개로부터 이 원충의 순수분리법을 확립하고 분리된 원충항원의 특성을 조사코져 MASP 배양법을 실험

실내에서 수행하고 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

원충주 : 경남지역에서 투견인 pit bullterrier로부터 분리한 *B. gibsoni*를 가장 적출한 잡종개와 비장적출하지 않은 잡종개에 연속계대하면서 실험에 사용하였다.

실험동물 : 실험동물은 혈액도말표본에서 음성이고 간접형광항체법(IFA)에서 항체 음성인 6~10개월된 10~15kg의 건강한 개로서 일반 전염병 백신접종과 구충시킨 후 펠렛사료를 자유급식하면서 실험에 사용하였다.

개의 인공감염 : *B. gibsoni*의 인공감염은 비장을 적출한 후 2~4주 째에 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 개의 감염된 적혈구를 피하 또는 정맥내로 접종하였으며 비장을 적출하지 않은 개도 같은 수준의 원충을 피하 또는 정맥내로 접종하여 감염시켰다.

치료는 인공감염시킨 개에서 PPE(percent of parasitized erythrocytes)가 최고치에 도달하는 시기에 diminazene aceturate(7mg/Kg, IM)로 치료하였다.

감염여부 및 PPE 수준은 혈액도말표본을 Giemsa 염색하여 광학현미경하에서 조사하였으며 항체생성 유무는 IFA로 조사하였다.

직접 현미경검사법(DLM) 및 간접 형광항체법(IFA) :

직접 현미경검사법(direct light microscopy, DLM)은 혈액을 슬라이드에 박층 도말하고 무수메탄올로 고정한 후 PBS(pH 7.2)로 20배 희석한 Giemsa 염색액(Fluka)으로 염색하여 수세한 다음 1000배로 광학현미경하에서 관찰하였다. 간접 형광항체법(IFA)은 Anderson 등¹⁹과 Yamane 등²⁴의 방법에 준하여 실시하였다.

***B. gibsoni*의 동정 :** *B. gibsoni*의 동정은 Farwell 등²과 Mimori 등¹⁵의 형태학적 동정법에 따라 수행하였다.

Microaerophilous stationary phase (MASP) 배양 : MASP배양에는 Gibco사 제품인 RPMI 1640, medium 199 (M 199), minimum essential medium (MEM) 및 α -MEM을 사용하여 이들 배지에 첨가제로 penicillin G 100IU/ml, streptomycin 100 μ g/ml 및 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid(HEPES, Gibco)가 25mM이 함유되도록 한 것을 불완전 배지(이하 A배지라 함)로 그리고 이들 각 A배지에 원충의 증식을 증진시킬 목적으로 *Babesia* 항체음성의 개혈청(normal canine serum, NCS)이 20~40% 함유되도록 첨가한 것을 완전배지(이하 B배지라 함)로 하였다.

배양은 Levy와 Ristic³¹의 방법에 준하여 감염개의 정맥으로부터 항응고제(5IU/ml, heparin sodium(중의계약))가 들어 있는 채혈병에 채혈한 후 NCS가 함유되지 않은 A배지로 450g에서 3회 원심 세척하여 백혈구를 제거한 후 침전된 적혈구를 배양에 사용하였다. 최종적으로 침전된 적혈구는 B배지로 혈구 용적비(PCV)가 10% 되도록 부유시키고 96 well 또는 24 well의 조직배양용 plate(Nunc)에 분주하여 배양하였다. 배양조건은 96 well plate에서는 200 μ l를 그리고 24 well plate에서는 1.2ml씩의 감염적혈구 부유액을 분주하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하면서 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양하였다. 가스 조건을 고려하여 plate내 배양액의 높이는 6.2mm정도 되게 하였으며 배지액은 24시간 마다 교환하였다.

배양 4일째 부터는 정상적인 개의 적혈구가 2.5% 함유되도록 제조한 B배지를 사용하여 배양하였고 PPE는 24시간 간격으로 배양혈구를 도말표본하여 Giemsa 염색한 후 광학현미경하에서 혈구 1000개당 원충 감염율을 계산하여 산출하였다.

아외개(투견)로부터 *B gibsoni*의 시험관내 분리 : 경남지역에서 사육되고 있는 36두의 투견(Pit bullterrier)으로부터 혈액과 혈청을 무균적으로 채집하여 DLM과 IFA로 원충의 감염유무를 확인하였고 동시에 MASP 배양을 실시하여 원충의 증식성과 분리율을 조사하고 순수분리를 시도하였다.

Merozoite의 분리 및 항원생산 : SDS-PAGE와 immunoblot에 사용할 merozoite의 분리 및 항원생산은 다음과 같이 수행하였다.

인공감염개에서 endoerythrocytic merozoite(AEOM)의 분리 및 항원생산 : 인공감염개로부터 채취한 감염혈액을 Figueroa 등³²의 방법을 수정한 glycerol osmotic shock 방법으로 혈액을 Hanks' balanced salt solution(HBSS, Sigma)으로 3회 원심세척 후 침전 적혈구에 7% anhydrous glycerol이 함유된 HBSS를 5배 용량으로 첨가하고 실온에서 20분동안 감각한 뒤 450g에서 10분간 원심한 후 상층액을 제거하였다. 침전된 적혈구에 다시 5배 용량의 HBSS를 첨가하여 enhanced glycerol osmotic shock방법으로 용혈시킨 후 용혈되지 않은 적혈구와 백혈구를 제거하기 위하여 450g에서 10분간 그리고 820g에서 10분간씩 2회 원심하여 상층액을 회수한 다음 8500g에서 20분간 원심(Type 16 rotor, Beckman)한 후 상층액을 버리고 침전물은 PBS(pH 7.2)로 3회 원심세척한 후 PBS로 부유

시켜 AEOM 항원으로 사용하였다.

배양유래 endoerythrocytic merozoite(CEOM)의 분리 및 항원생산 : MASP법으로 plate에서 배양한 혈구부유액을 450 \times G에서 10분간 원심한 후 침전된 혈구만을 채취하여 AEOM 분리에서와 같은 방법으로 실시하여 CEOM 항원으로 사용하였다.

배양유래 exoerythrocytic merozoite(CEEM)의 분리 및 항원생산 : James 등³의 방법에 따라 CO₂ incubator에서 배양중인 plate를 CO₂가 결핍되도록 하기위해 vacuum desiccator에 넣은 다음, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24시간 배양한 후 혈구부유액을 conical tube에 옮겨 450g에서 10분간 원심한 다음 다시 상층액을 다른 tube에 옮겨 820g에서 10분간씩 2회 원심한 후 상층액을 회수하여 8500g에서 20분간 원심한 후 상층액을 버리고 침전물은 PBS(pH 7.2)로 3회 원심세척한 후 PBS로 부유시켜 CEEM 항원으로 사용하였다.

SDS-PAGE : Sambrook 등³⁴의 방법에 따라 discontinuous buffer system을 이용하여 6~15% separating gel, 5% stacking gel의 상태로 사용하여 전기영동을 실시하였다.

각 항원은 2 \times SDS/sample buffer(200mM Tris HCl, pH 6.8, 10% β -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue)로 100 $^{\circ}$ C에서 2분간 처리하여 사용하였다. 전기영동은 15 $^{\circ}$ C에서 20mA로 12시간 실시하고 gel은 30% methanol과 10% acetic acid가 함유된 고정액에서 1시간 고정된 후 Coomassie brilliant blue G(Sigma)로 염색하였으며 분자량은 standard marker(MW-SDS-200, Sigma)를 표준으로 하여 측정하였다.

Immunoblot : SDS-PAGE를 실시한 후 electrotransfer (TE 52X, Hoeffer)를 사용하여 4 $^{\circ}$ C, 1.0A에서 electrotransfer buffer로 2시간동안 nitrocellulose paper(millipore, 이하 NCP라 함)에 이적시켰다. 이적된 NCP는 3% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 함유된 0.05% Tween-10mM Tris buffered saline(TTBS, pH 7.5)에 침적시켜 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 서서히 진탕하면서 blocking하였다.

여기에 혈청은 TTBS로 1/200로 희석하여 0.2ml/cm²이 되도록 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감각시킨 후 TTBS로 3회 진탕 세척하였다. 그런 다음 conjugate(horse radish peroxidase labelled rabbit anti-dog IgG, KPL)를 TTBS-3% BSA로 1/5000로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 다음 TTBS로 3회 진탕 세척하였다.

발색기질은 sodium acetate buffer [pH 5.2, 0.022% 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC)와 0.03% H₂O₂함유]를 사용하여 15~30분간 감작시켜 항원대가 나타난 후 증류수로 세척하여 반응을 중지시켰다.

분자량은 prestained standard marker(Gibco BRL)를 사용하여 측정하였으며 merozoite 항원의 SDS-PAGE 분석 중 glycoprotein(gp)의 존재 유무는 digoxigenin glycan/

protien double labeling kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 조사하였다.

결 과

MASP 배양법에 의한 배지별 *B gibsoni*의 증식성 : RPMI 1640외 3종의 배지를 MASP법에 사용하여 *B gib-*

Table 1. Percent of parasitized erythrocytes of *B. gibsoni* in red blood cell cultured with different media by MASP

Medium	Days after incubation												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
RPMI 1640	*1.1	2.3	3.1	5.6	4.8	7.6	9.3	14.2	8.5	9.1	12.7	10.7	10.7
M199-HBSS	1.0	3.0	3.2	2.7	3.5	3.2	4.0	3.8	2.6	3.1	4.5	3.2	4.5
MEM-EBSS	1.1	2.4	3.7	5.4	2.5	4.0	3.4	4.3	7.2	6.0	7.7	5.8	9.2
α -MEM	1.0	2.5	3.1	4.8	4.6	5.4	5.0	11.4	7.1	4.7	7.6	8.9	12.5

HBSS : Hank's balanced salt solution, EBSS ; Earle's balanced salt solution

* : Percent of parasitized erythrocytes(PPE)

Table 2. Antibody titers in sera and detection of *B gibsoni* in red blood cells collected from dogs

Dog No.	Antibody titers by IFA	Parasites		Dog No.	Antibody titers by IFA	Parasites	
		DLM	MASP			DLM	MASP
1	2048	-	+	19	-	-	-
2	512	+	+	20	1024	+	+
3	128	+	+	21	1024	+	+
4	1024	+	+	22	-	-	-
5	2048	+	-	23	2048	-	+
6	-	-	+	24	2048	-	-
7	512	-	-	25	1024	+	+
8	1024	+	+	26	-	-	-
9	-	-	-	27	512	+	+
10	2048	+	+	28	2048	-	-
11	-	-	-	29	-	-	-
12	-	-	-	30	1024	-	+
13	-	-	-	31	-	-	-
14	1024	-	+	32	1024	-	-
15	2048	+	+	33	-	-	-
16	512	+	+	34	-	-	-
17	-	-	-	35	-	-	-
18	-	-	+	36	-	-	-

※ IFA test indicated that titer < 64 was negative, titer ≥ 64 was positive

+ : parasite detected, - : parasite not detected

soni의 적혈구내 증식성을 조사한 성적은 Table 1에서와 같이 RPMI 1640에서는 배양후 8일째에 PPE는 14.2%로 peak를 나타내었고 그후 부터는 약간 감소하였으나 13일째까지도 8.5~10.7%의 비교적 높은 PPE를 유지하였다. M199와 MEM에서는 증식성이 아주 불량하였으며, α -MEM에서는 배양 8일째에 PPE가 11.4%를 나타낸후 급격히 하강하는 경향을 보였다.

아외개로 부터 *B gibsoni*의 시험관내 분리 : 야외개(투견) 36두에서 채취한 혈액과 혈청에 대하여 IFA, DLM 및 MASP 배양법에 의한 *B gibsoni*의 감염여부를 비교 조사한 성적은 Table 2에서와 같이 36두중 IFA에서는 20두(56%), DLM에서는 12두(33.3%) 그리고 MASP 배양법에서는 17두(47.2%)가 양성이었다. IFA의 양성인 20두중 15두(75%)에서 그리고 DLM의 양성인 12두중 11두(92%)에서 MASP 배양법으로 원충을 분리할 수 있었다.

SDS-PAGE에서 merozoite 항원의 분획상 : 인공감염 개의 적혈구에서 분리한 AEOM 항원과 시험관내에서 분리한 CEOM 항원 및 CEEM 항원을 SDS-PAGE하여 그 분획상을 비교한 바 Fig 1에서와 같이 AEOM 항원(Lane 2)에서는 130, 120, 97.4, 92, 80, 52, 50, 42, 36, 30 및 29 KDa 등 11개의 항원분획이 관찰되었다. CEOM 항원(Lane 4)은 AEOM 항원과 거의 유사한 분획을 나타내었으나 AEOM에서 관찰되지 않았던 140 KDa 분획이 관찰되었다. 한편 CEEM 항원(Lane 3)은 약 20개의 분획이 관찰되어 CEOM 항원보다 많은 분획 즉, 140, 120, 114, 105, 96, 93, 92, 80, 60, 52, 50, 38, 36, 30, 24, 18.5 및 16 KDa 등이 관찰되었다.

Immunoblot에서 merozoite 항원의 분획상 : 인공감염시킨 개에서 감염후 9주째에 혈청을 채취하여 IFA에서 2048배의 항체가를 나타내는 혈청으로 immunoblot한 결과 merozoite 항원의 분획상은 Fig 2에서와 같이 AEOM 항원(Lane 2~4)과 CEOM 항원(Lane 10~12)에서는 유사한 분획상을 나타내어 약 15개의 분획이 관찰되었는데 이들중 130, 120, 80, 60, 52, 50, 42, 30, 29, 18.5 및 16 KDa 항원대가 뚜렷이 관찰되었다. CEEM 항원(Lane 7~9)에서는 약 21개의 분획이 관찰되었는데 이들중 140, 120, 96, 92, 85, 80, 76, 60, 52, 50, 37, 30, 24, 16 및 15 KDa 등이 주요 항원대였다. 그리고 각 항원의 분획에 사용한 항원양(20~40 μ l)에 따른 분획상의 차이는 없었다.

비장적출한 개와 적출하지 않은 개에 *B gibsoni*를 인공감염시킨 후 채취한 개의 혈청을 immunoblot한 결과는

Fig 3에서와 같이 감염 1주째에는 항원대가 형성되지 않았으나 3주째(Lane 2와 6)부터는 관찰되기 시작하여 16주째(Lane 4와 8)까지 비장의 유무에 관계없이 항원대가 형성되었다. 그리고 비장적출한 개의 혈청에서는 감염후 18개월째(Lane 11)까지의 항원대가 관찰 될 수 있었으나 특히 93 KDa과 52 KDa의 항원대에서는 반응상이 약하게 관찰되었다.

야외 개로부터 채취한 혈청중 IFA양성을 나타낸 5두의 혈청을 선택하여 immunoblot한 결과는 Fig 4에서와 같이 인공감염개에서 얻은 혈청의 반응상과 동일한 항원대를 관찰할 수 있었으나 개체에 따라 29 KDa의 분획이 강하게 반응하는 것도 있었다. 그러나 diminazene aceturate (7mg/kg, IM)을 투여하여 치료한 감염개의 혈청의 반응상(Fig 5)은 치료하지 않은 개 혈청의 반응상과 큰 차이가 없었다.

*B gibsoni*의 merozoite항원에서 glycoprotein의 존재여부를 조사한 결과는 Fig 6에서와 같이 105, 60 58, 36, 30 및 29 KDa의 항원대는 sugar group을 함유하고 있는 glycoprotein이었으며 gp105는 CEOM항원에서만 관찰되었고 gp29는 소실되어 관찰되지 않았다.

고 찰

Levy와 Ristic³¹에 의하여 *B bovis*의 MASP 배양이 보고된후 바베시아의 시험관내 배양기술은 크게 발전되어 원충의 시험관내 직접분리와 항원생산에도 이용할 수 있게 되었다.

이 연구에서는 MASP 배양법을 이용하여 *B gibsoni*를 시험관내에서 직접 분리할 수 있는가를 검토하고 immunoblot를 이용하여 배양유래 원충항원의 항체반응성과 특성을 규명하여 이 항원을 진단에 이용할 수 있는지를 조사하였다.

바베시아의 MASP 배양에서는 여러가지 배지가 사용되고 있으나 이 연구에서는 RPMI 1640, M199, MEM 및 α -MEM을 이용한 *B gibsoni*의 배양시험 결과 RPMI 1640에서 배양 8일째에 PPE가 14.2%에 도달하여 가장 높은 증식성을 나타내었다. 이는 RPMI 1640에서 배양 7일째에 PPE가 최고 9.5%에 도달하였다고 보고한 Onishi 등¹⁸의 연구결과와 비슷하였다.

Murase 등¹⁶은 α -MEM의 MASP 배양법에서 *B gibsoni*의 지속적인 배양을 실시한 바 배양 8일과 9일째에 PPE

가 최고 4.0%에 도달하였다고 보고하였으나 저자 등의 성적에서는 α -MEM에서 배양 8일제에 11.4%의 PPE를 나타내어서 그들의 성적과는 차이가 있었다.

한편 Thomford 등³⁵은 MASP 배양법으로 사막에 서식하는 bighorn sheep과 mule deer에서 최초로 *Babesia* spp.를 분리하여 이 배양법의 이용 가능성을 증명한 바 있고 Rodriguez 등³⁸은 MASP 배양법에 의한 *B. bovis*의 cloning으로 보균동물로부터 직접 *B. bovis*를 분리하여 일반적으로 사용되고 있는 감수성 동물의 접종법보다 시간과 비용을 절약할 수 있다고 하였다. 또한 Holman 등²⁰은 실험적으로 *B. caballi*에 감염된 말의 보균상태를 검색하기 위해서 혈청학적 검사와 MASP 배양을 실시하여 총 10두중 CF에서 3두, IFA에서 7두 그리고 MASP 배양에서 4두가 양성으로 판정되어 MASP 배양도 *B. caballi*의 진단법으로 유용하다고 하였다. 저자 등의 실험에서는 경남지역의 투견에서 채취한 혈액과 혈청으로 IFA와 DLM으로 *B. gibsoni* 감염여부를 검사하고 동시에 MASP 배양법을 실시한 결과 IFA의 양성에서는 75% 그리고 DLM의 양성에서는 92%의 원충분리율을 보임으로서 RPMI 1640을 이용한 MASP 배양법은 숙주의 감염혈액으로 부터 *B. gibsoni*를 직접 분리하는데 매우 효과적인 진단법으로 사용할 수 있다고 생각된다. 그리고 IFA에서 음성인 개체가 MASP 배양에서 양성으로, IFA에서 양성인 개체가 MASP 배양에서 음성인 경우도 관찰되었는데, 전자는 항체가 생성되기 전인 개체일 것으로 생각되며 후자는 이미 원충이 순환혈액에서 사라진 경우라고 생각되어진다. 또한 DLM에서 음성인 개체가 배양에서 양성으로 나타나는 경우도 있었는데 이는 DLM 검사의 단점이라고 할 수 있다.

이 실험에서 CEEM 항원의 주요한 분획은 140, 120, 114, 105, 96, 93, 92, 80, 52, 50, 38, 36, 30, 24, 18.5 및 16 KDa 등이었는데 이는 Adachi 등²⁶이 *B. gibsoni*의 SDS-PAGE에서 보고한 항원의 분획상과 거의 비슷하다고 생각된다. 그리고 AEOM 항원과 CEOM 항원의 SDS-PAGE에서의 분획상은 거의 비슷하였으나 CEOM 항원에서 관찰된 140 KDa는 AEOM 항원에서는 관찰되지 않았으며 CEEM 항원과 AEOM 항원의 SDS-PAGE에서의 분획상 비교에서 약간의 차이가 관찰되었는데 CEEM 항원에서는 97.4 KDa이 관찰되지 않았고 AEOM 항원에서는 114, 96, 60 및 38 KDa이 관찰되지 않았다. 이들 항원에서 관찰되지 않은 분획에 대하여는 앞으로 더 검토되어야 할 것으로 생각된다.

채 등¹²은 숙주동물에서 분리한 *B. gibsoni* 항원에 대한 immunoblot을 실시하여 20, 46, 54, 61.5, 84 및 100 KDa에서 각각 1개씩의 분획이 형성되어 총 7개의 분획을 확인할 수 있었다고 보고하였다. 저자 등의 실험에서는 AEOM 항원에서 130, 120, 80, 60, 52, 50, 42, 30, 29, 18.5 및 16 KDa 등 약 15개의 분획이 관찰되었는데 이는 SDS-PAGE시 채 등¹²은 10% monogel을 사용하였으나 저자 등의 실험에서는 6-15% linear gradient gel을 사용하였기 때문에 더욱 많은 분획을 관찰할 수 있었다고 생각된다. Adachi 등²⁵은 anti-erythrocyte membrane 항체를 밝히기 위해 정상 적혈구 항원에 대하여 immunoblot한 결과 90, 65, 61, 63, 55, 50, 48, 46, 42, 33 및 30 KDa 분획이 관찰되었다고 보고한 바 있다. 이들 분획중 저자 등의 실험에서 나타난 분획과 일치하는 것도 관찰하였으나 항원 대조군에서 반응부위가 관찰되지 않는 것으로 보아 다른 종류의 단백질로 생각된다.

그리고 배양유래 항원의 단백질에서는 약간의 변이를 관찰할 수 있었는데 그 이유는 명확히 알 수 없으나 Riddles 등³⁶은 바베시아를 장기간 배양하면 병원성이 약화된다고 하였다.

Exoerythrocytic merozoite와 endoerythrocytic merozoite 항원의 비교에서 37, 24 및 15 KDa는 exoerythrocytic merozoite 항원에서만 그리고 42 KDa과 29 KDa는 endoerythrocytic merozoite 항원에서만 관찰된다. *B. gibsoni*의 exoerythrocytic merozoite는 erythrocyte를 침입할 때 surface coat를 탈피하여 적혈구 내로 감염되는 것으로 보고되었으며^{36,37}, *B. bovis*는 MASP 배양에서 배지 상층액중에 다량의 분비항원이 유출된다고 보고되어^{36,38}있는 바와 같이 저자 등의 실험에서 exoerythrocytic merozoite에서만 관찰되었던 항원물질은 surface coat protein의 일부분일 것으로 추측된다.

한편 비장적출된 인공감염 개의 혈청에서는 특히 93 KDa과 52 KDa의 항원대가 반응상이 약하였는데 이는 비장이 면역작용에 크게 영향을 미친다는 이론과 관계가 있는 것으로 생각되며³⁶ diminazene aceturate로 치료한 감염개에서 채취한 혈청의 반응상은 치료하지 않은 개의 혈청반응상과 큰 차이가 없는 것으로 보아 diminazene aceturate는 면역작용에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

B. gibsoni merozoite의 SDS-PAGE분획중 105, 60, 58, 36, 30 및 29 KDa분획은 sodium metaperoxidate oxidation에서 sugar group이 존재하고 있는 것으로 밝혀진

바 이들 분획은 glycoprotein으로 생각된다. 특히 gp29는 CEEM에서만 관찰되었고, gp105는 CEOM에서만 관찰되었다. 이들 glycoprotein의 sugar group에 대한 정밀한 분석은 앞으로 더 연구되어야 할 과제라고 생각된다.

이상에서와 같이 RPMI 1640을 이용한 MASP 배양은 *B gibsoni*를 감염혈액으로부터 직접 분리할 수 있어 진단법으로 유용하며, MASP 배양유래 항원의 항원성은 숙주 유래 항원과 비교하여 큰 차이가 없는 점으로 미루어보아 *B gibsoni* 감염혈액을 MASP법으로 실험실에서 대량배양하여 진단용 항원으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 개 바베시아병의 진단법 개발에도 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

MASP 배양법을 이용하여 *B gibsoni*를 시험관 내에서 직접분리 할 수 있는지의 가능성을 검토하고 아울러 배양 유래 항원의 항체반응성을 immunoblot로 확인하여 배양 유래 원충 항원의 특성을 규명함과 동시에 이 항원을 진단에 이용할 수 있는지를 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MASP 배양법에서 *B gibsoni*는 RPMI 1640배지에서 가장 좋은 증식성을 나타내었다.
2. 야외 개에서 채취한 36두의 혈액과 혈청을 IFA와 DLM으로 감염여부를 조사하고 MASP 배양으로 *B gibsoni* 분리를 시도한 결과 IFA의 양성인 20두중 15두(75%)에서 그리고 DLM의 양성인 12두중 11두(92%)에서 원충이 분리되었고 MASP 배양법은 *B gibsoni*를 감염혈액으로 원충을 직접분리하는데 이용될 수 있는 좋은 방법이었다.

3. 인공감염 개에서 분리한 AEOM 항원과 시험관내에서 분리한 CEOM 항원 및 CEEM 항원을 SDS-PAGE에서 분획상을 비교한 바 AEOM 항원에서는 약 11개의 항원분획이 관찰되었으며 130, 120, 97.4, 92, 80, 52, 50, 42, 36, 30 및 29 KDa 등이 중요한 분획이었고, CEOM 항원은 AEOM 항원과 거의 유사한 분획을 나타내었다. CEEM 항원은 약 20개의 분획이 관찰되어 CEOM 항원보다 많은 분획이 관찰되었으며 주요한 분획은 140, 120, 114, 105, 96, 93, 92, 80, 60, 52, 50, 38, 36, 30, 24, 18.5 및 16 KDa 등 이었다.

4. Immunoblot에서 항원 단백질 분획상은 AEOM과 CEOM 항원에서는 15개의 유사한 분획상을 나타내었고 중요한 항원대는 130, 120, 80, 60, 52, 50, 42, 30, 29, 18.5 및 16 KDa 등 이었다. CEEM 항원에서는 약 21개의 분획이 관찰되었고 140, 120, 96, 92, 85, 80, 76, 60, 52, 50, 37, 30, 24, 16 및 15 KDa 등이 주요 항원대였다.

5. 인공감염개에서는 감염 3주째부터 혈청에서 특이 항원대가 관찰되기 시작하였고 18개월째까지 항원대가 출현하였다. 비장적출한 인공감염개의 혈청에서는 특히 93 KDa과 52 KDa의 항원대가 반응상이 약하였다.

6. 야외감염개의 혈청 반응상은 인공감염개와 같은 항원대를 나타내었으며 개체에 따라서는 26 KDa의 분획이 강하게 반응하는 것도 있었다.

7. 비장적출하지 않은 개에 인공감염시킨 후 diminazene aceturate(7mg/kg, IM)를 투여하여 치료한 개의 혈청반응상은 치료하지 않은 것과 큰 차이가 없었다.

8. *B gibsoni*의 항원물질중 105, 60-58, 36, 30 및 29 KDa의 항원은 glycoprotein 성분이었다.

Legends for figures

Fig 1. SDS-PAGE patterns in merozoite antigen of *B gibsoni* derived from animal and MASP culture.

- Lane 1 : Molecular weight marker(MW-SDS-200, Sigma)
- Lane 2 : AEOM antigen derived from animal
- Lane 3 : CEEM antigen derived from culture
- Lane 4 : CEOM antigen derived from culture
- Lane 5 : Normal dog RBC as control

Fig 2. Immunoblot analysis of merozoite antigen of *B gibsoni* derived from animal and MASP culture.

- Lane 1 : Molecular weight marker(MW-SDS-200, Sigma)
- Lane 2 : AEOM antigen derived from animal ; 20 μ l
- Lane 3 : AEOM antigen derived from animal ; 30 μ l

- Lane 4 : AEOM antigen derived from animal ; 40µl
- Lane 5 : Normal dog RBC treated with glycerol as control
- Lane 6 : Normal dog RBC as control
- Lane 7 : CEEM antigen derived from culture ; 20µl
- Lane 8 : CEEM antigen derived from culture ; 30µl
- Lane 9 : CEEM antigen derived from culture ; 40µl
- Lane 10 : CEOM antigen derived from culture ; 20µl
- Lane 11 : CEOM antigen derived from culture ; 30µl
- Lane 12 : CEOM antigen derived from culture ; 40µl

Fig 3. Immunoblot analysis of CEEM antigen by serum from experimentally infected dog.

- Lane 1, 2, 3, 4 : serum from splenectomized dog 1, 3, 9, 16 weeks after inoculation, respectively
- Lane 5, 6, 7, 8 : serum from intact dog 1, 3, 9, 16 weeks after inoculation, respectively
- Lane 9 : serum splenectomized dog 5 months after inoculation
- Lane 10 : serum splenectomized dog 9 months after inoculation
- Lane 11 : serum splenectomized dog 18 months after inoculation

Fig 4. Immunoblot analysis of CEEM and CEOM antigens by serum from field dog serum.

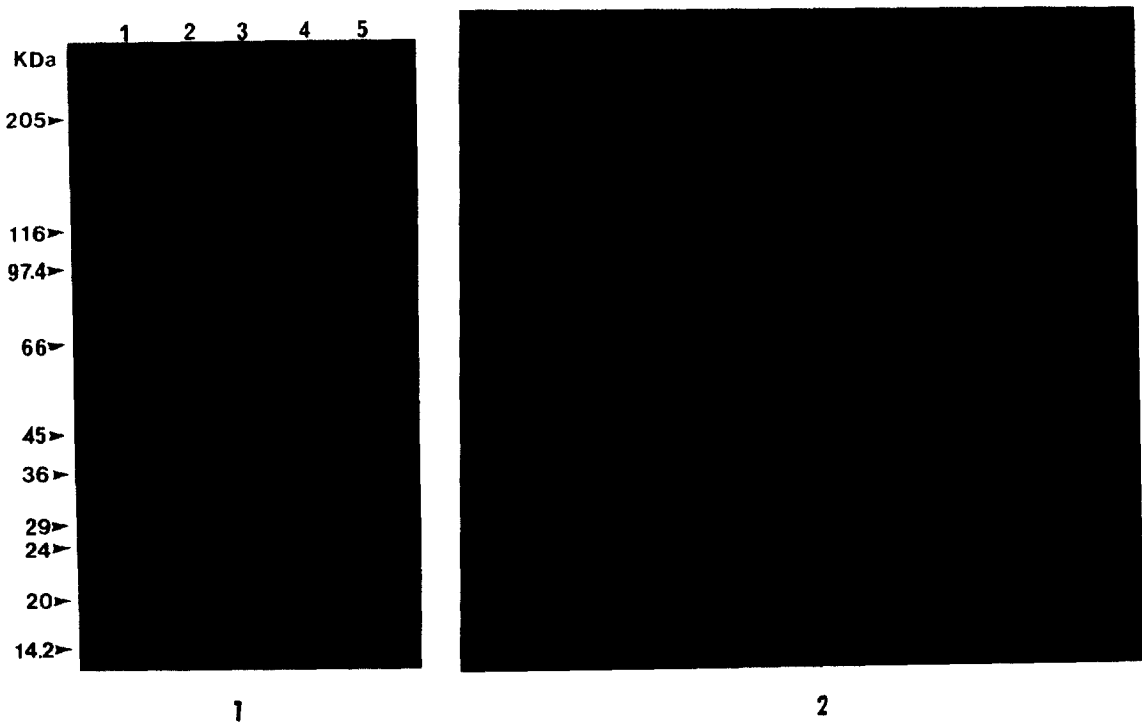
- Lane 1, 2, 3, 4, 5 : CEEM antigen
- Lane 6, 7, 8, 9, 10 : CEOM antigen

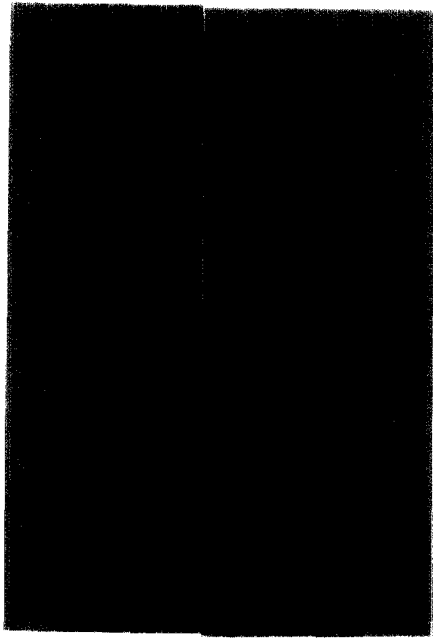
Fig 5. Immunoblot analysis of CEEM antigen by serum from dog treated with diminazene aceturate.

- Lane 1 : serum 5 week after inoculation
- Lane 2 : serum 7 week after inoculation
- Lane 3 : serum 14 week after inoculation

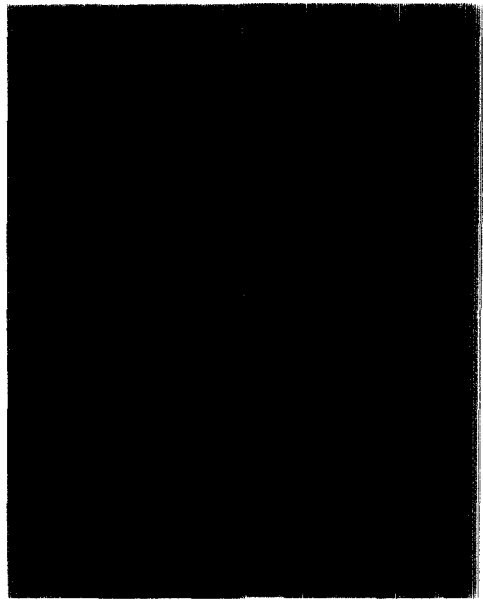
Fig 6. Identification of glycan from merozoite antigens of *B gibsoni* by sodium metaperoxidate oxidation.

- Lane 1 : Molecular weight marker(MW-SDS-200, Sigma)
- Lane 2 : AEOM antigen derived from animal
- Lane 3 : CEEM antigen derived from culture
- Lane 4 : CEOM antigen derived from culture

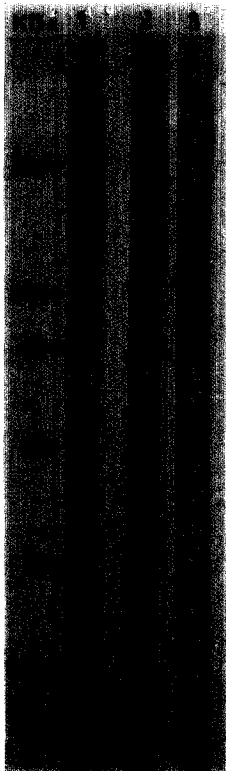




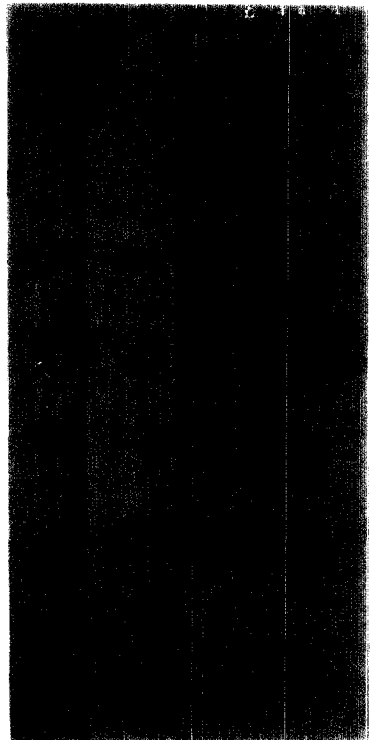
3



4



5



6

참 고 문 헌

1. Conrad P, Thomford J, Yamane I, et al. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 199 : 601-605, 1991.
2. Farwell GE, Grand I, Cobb CC. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 180 : 507-511, 1982.
3. Irwin PJ, Hutchinson GW. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 68 : 204-209, 1991.
4. Klinefelter MR. Cause, diagnosis, and treatment of canine piroplasmiasis. *Veterinary Medicine/small animal clinician*, 1505-1508, 1982.
5. 서동일. 개의 바베시아병 1예. *대한수의학회지*, 13 : 167-168, 1977.
6. Shirlaw JF, MRCVS. On the relationship between 'Lahore canine fever' and 'tick fever' of dogs due to *P. gibsoni* infection, with observations on their pathology and haemocytology. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 8 : 293-316, 1938.
7. Symons TH, Patton WS. Report on an outbreak of canine piroplasmiasis due to *Piroplasma gibsoni* (Patton) among the hounds of the madras hunt, together with some observations on the treatment of the disease with salvarsan. *Ann Trop Med Parasit*, 6 : 361-370, 1912.
8. Yamane I, Conrad PA, Gardner I. *Babesia gibsoni* infections in dogs. *J Protozool Res*, 3 : 111-125, 1993.
9. 이학호, 김태중, 이원창. *Babesia gibsoni*가 감염된 개에 관한 연구. *대한수의사회지*, 20 : 161-168, 1984.
10. Boulos AM, Ronald WM, Ibrahim SB. Some observations on experimentally induced infection of dogs with *Babesia gibsoni*. *Am J Vet Res*, 36 : 293-296, 1975.
11. Sanders DA. Observations on canine babesiasis (piroplasmiasis). *J Am Vet Med Assoc*, 43 : 27-38, 1937.
12. 채준석, 인동길, 이주목 등. 개의 *Babesia gibsoni* 감염 예방에 관한 연구. *한국임상수의학회지*, 7 : 21-32, 1990.
13. 손제영. 한국에서 발생한 canine babesiasis에 관한 연구. *경북대학논문집*, 6 : 169-175, 1962.
14. 윤창모, 이주목, 채준석 등. *Babesia gibsoni* 항원접종과 *Theileria sergenti*를 비특이 항원으로 접종한 개의 면역효과에 관한 연구. *대한수의학회지*, 33 : 101-108, 1993.
15. Mimori T, Kono I, Sakamoto T, et al. Morphological studies of multiplication of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. *Jap J Vet Sci*, 44 : 699-701, 1982.
16. Murase T, Hashimoto T, Ueda T, et al. Multiplication of *B gibsoni* in *in vitro* culture and its hemolysis of infected erythrocytes. *J Vet Med Sci*, 53 : 759-760, 1991.
17. Namikawa KF, Sunaga F, Kanno Y. Morphology of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. *Jap J Vet Sci*, 50 : 936-938, 1988.
18. Onishi T, Morita M, Anda T. *In vitro* cultivation and infectivity of *Babesia gibsoni*. *Jpn J Parasitol*, 42 : 340-344, 1993.
19. Anderson JF, Magnarelli LA, Sulzer AJ. Canine babesiasis : indirect fluorescent antibody test for a North american isolate of *Babesia gibsoni*. *Am J Vet Res*, 41 : 2102-2105, 1980.
20. Holman PJ, Wayne MF, Lucious C, et al. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 : 698-701, 1993.
21. James MA, Kakoma I, Holland C, et al. Antigenic and immunogenic studies on cell culture-derived *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 10 : 29-40, 1982.
22. Popovic NA, Ristic M. Diagnosis of canine babesiasis by a gel precipitation test. *Am J Vet Res*, 31 : 2201-2204, 1970.
23. Ristic M, Lykins JD, Smith AR. *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* : soluble and corpuscular antigen isolated from blood of dogs. *Experimental Parasitology*

- tology*, 30 : 385-392, 1971.
24. Yamane I, Thomford JW, Gardner IA, et al. Evaluation of indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am J Vet Res*, 54 : 1579-1584, 1993.
 25. Adachi K, Yoshimoto A, Hasegawa T, et al. Anti-erythrocyte membrane antibodies detected in sera of dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci*, 54 : 1081-1084, 1992.
 26. Adachi K, Watanabe T, Yamane SI, et al. Isolation of *Babesia gibsoni* piroplasm from infected erythrocytes of dogs. *J Vet Med Sci*, 55 : 487-490, 1993.
 27. Wright IG. Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. *CRC Press*, 61-98, 1987.
 28. Holman PJ, Waldrup KA, Wagner GG. *In vitro* Cultivation of *Babesia* isolated from a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Parasitol* 74 : 111-115, 1988.
 29. Valentin A, Precigout E, L'Hostis M, et al. Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protectin. *Infection and Immunity*, 61 : 734-741, 1993.
 30. Erp EE, Gravely SM, Smith RD, et al. Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. *Am J Trop Med Hyg*, 27 : 1061-1064, 1978.
 31. Levy MG, Ristic M. *Babesia bovis* : Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science*, 207: 1218-1220, 1980.
 32. Figueroa JV, Buening GN, Kinden DA. Purification of the erythrocytic stages of *Babesia bigemina* from cultures. *Parasitol Res*, 76 : 675-680, 1990.
 33. Rodriguez SD, Buening GM, Green TJ, et al. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infection and Immunity*, 42 : 15-18, 1983.
 34. Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3 : 18.47-18.75, 1989.
 35. Thomford JW, Conrad PA, Boyce WM, et al. Isolation and *in vitro* cultivation of *Babesia* parasites from free-ranging desert bighorn sheep (*Ovis Canadensis Nelsoni*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. *J Parasitol*, 79 : 77-84, 1993.
 36. Riddles PW, Wright IG. Control of intraerythrocytic parasites, chapter 9, animal parasite control utilizing biotechnology. *CRC press*, 221-240, 1992.
 37. Goff WL, Davis WC, Palmer GH, et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 56 : 2363-2368, 1988.
 38. James MA, Levy MG, Ristic M. Isolations and partial characterization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens. *Infection and Immunity*, 31 : 358-361, 1981.
-