

보존액이 *Toxoplasma gondii*의 생존성에 미치는 영향

진주은, 정경태, 이우원, 양 주, 이강록, 김근규

부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소

Effects of several suspending media on behavior of *Toxoplasma gondii*

Joo-Eun Jin, Kyung-Tae Chung, Woo-Won Lee, Ju Yang,
Gang-Rog Lee, Geun-Kyu Kim

*Division of Veterinary Service Laboratory,
Pusan Metropolitan City Institute of Health and Environment*

Abstract

A preservation test of *Toxoplasma gondii* tachyzoites for considerable time was tried to obtain simple and economical methods using various suspending media at 4°C rather than serial passage of the parasite in mice.

The preservation period was a term that the tachyzoites were detected from the peritoneal fluid of mice after inoculation of 2×10^5 organisms preserved according to the lapse of time. The numbers of tachyzoite per 1mm^3 of the peritoneal fluid with 2ml of the saline solution taken in 4 days after inoculation were presented as percentage in proportion to the control. The numbers of tachyzoite per 1mm^3 of the peritoneal fluid of the control were consisted of the average number of the tachyzoites of 10 mice inoculated with 2×10^5 organisms by serial mouse passage.

The tachyzoites could be preserved for 26 days in the suspending medium of saline solution at 4°C, Ringer's solution for 18 days, Hank's solution for 28 days, and egg-glycerine solution for 50 days.

Key words : *Toxoplasma gondii* tachyzoites, Preservation medium

서 론

*Toxoplasma gondii*는 Isospora속에 속하는 일종의 콕시듐으로 알려져 있으며, 인체와 동물에 공통적으로 감염되어 각종의 질병을 일으킬 수 있는 원충이다^{7,11,13,16,22}. 일반적으로 건강한 사람이 *T. gondii*에 감염되면 불현성 혹은 가벼운 임파선증 등의 증상이 나타날 수 있으나, 선천성 감염 혹은 면역억제 환자에 감염되면 충체는 중추신경계와 중요장기에 침입하여 치명적인 질병을 일으킬 수 있다^{16,18,25}. 동물에서는 주로 어린 동물이 감수성이 높고, 종종 폐사의 원인이 되기도 한다^{12,16}. 그러나 성숙의 톡소플라즈마증은 일반적으로 불현성 감염이 보통이나, 인체 *T. gondii*의 감염원이 되기 때문에 공중위생학적인 면에서 중요시된다^{3,10,11,13,24}.

인체 및 동물의 톡소플라즈마증에 관하여 현재까지 많은 연구가 이루어져 왔다^{3,19,20,23,24}. 이러한 연구를 위해서는 실험실 내에서 충체를 항상 보존할 필요성이 있으며, 특히 Sabin-Feldman 색소시험을 위해서는 생존 충체가 필요하다. *T. gondii*를 보존하기 위해서 일반적으로 마우스 복강에 계대 접종하고 있으나, 이것은 시간과 경제적인 면에서 부담이 될 뿐 아니라, 취급자의 감염 및 장기간의 계대로 충체의 병원성에 변화가 일어나는 결점도 있다^{19,21}. 세포 배양에 의한 *T. gondii*의 증식과 계대를 실시하는 경우도 있으나, 그 과정이 간단하지 않다⁶. 냉동보존에 의해서 충체를 장기간 보존한 실험이 다수 보고되어 있으나^{4-9,15,17,21} 냉장보존에 관한 연구는 소수에 불과하다^{12,14,21}.

Chandler와 Weiman⁷이 처음으로 glycerol이 15% 함유된 마우스의 *T. gondii* 부유 복수를 dry ice를 사용한 -70°C에서 184일간 보존한 바 있다. Samantaray 등²¹은 부유액으로서 10% glycerine 생리식염수와 10% DMSO생리식염수를 각각 사용하여 -70°C에서 충체를 보존한 결과 전자에서는 210일까지, 그리고 후자에서는 140일까지 보존이 가능하였다고 하였다. Sabin과 Olitzky²⁰는 *T. gondii*에 감염된 마우스 뇌조직을 Tyrode액에 넣어서 냉장고에서 14일간 보존한 바 있고, Wolf등(1940)은 *T. gondii*에

감염된 태아의 뇌와 척수조직을 생리식염수에 넣어 7°C 냉장고에서 11시간 보존이 가능하였다고 하였다. Manwell과 Drobeck¹⁹는 충체에 감염된 마우스의 뇌조직을 skim milk(Difco)에 넣어서 냉장고에서 18일간 보존할 수 있었다고 하였다. 또 Jacobs 등¹²은 *T. gondii*에 감염된 마우스 뇌조직을 neopeptone broth에 넣어서 5°C 냉장고에서 17일까지 보존이 가능하였다고 하였다.

이 실험의 목적은 *Toxoplasma*에 관한 여러 가지 실험을 위해서 tachyzoite가 필요하여 충체를 mouse에 계대하여 왔으나, 이는 시간적 그리고 경제적인 부담이 되었으므로 수종의 충체 부유액을 사용하여, 보다 경제적이고 간편한 단기간의 냉장보존에 관해서 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

마우스 : ICR계 마우스(5~8주령)를 대한실험동물센터에서 구입하여 사용하였다.

Toxoplasma gondii : 경북대학교 기생충학실에서 동결보존된 tachyzoite를 마우스 복강에 접종한 상태에서 분양받아 사용하였다.

충체 보존액 : 생리식염수, Ringer액, Hank's balanced solution, 그리고 난황 glycerine액⁴⁾을 사용하였다. 난황 glycerine액의 조성은 난황 1, 3% 구연산 나트륨액 6, 그리고 glycerine 1의 비율이며, 신선한 계란을 소독 건조한 후, 무균적으로 난황을 채취하고, 여기에 구연산 나트륨액을 가하여 진탕한 후 glycerine을 첨가하였다. 이것을 멸균 가제를 통해서 여과하고, 56°C 30분간 간헐멸균을 3일간 실시한 후 4°C 냉장고에 보관하였다. 사용할 때는 생리 식염수 충체부유액 1에 난황 glycerine액 3을 가하고 여기에 penicillin(PC) 100 μ l/ml, streptomycin(SM) 100 μ l/ml를 첨가한 후 4°C 냉장고에 보존하였다.

실험방법

충체접종 및 계대 : *Toxoplasma tachyzoite* 2×10^5 마리가 부유된 생리식염수 0.5~1ml를 마우스 복강에 4일마다 접종 계대하면서 충체를 냉장 보존시험에 사용하였다. 접종된 마우스로부터 충체를 채취하기 위해서 복부 피부를 박피하고 정중선 중앙 복벽을 직경 약 0.5cm 크기로 무균 상태에서 절개하였다. 주사기를 사용하여 절개구로 2ml의 생리식염수를 복강내 주입과 흡입을 3회 반복하면서 복강장기를 세척한 후 가능한 충체부유액을 모두 채취하였다. 혈구 계산판을 사용하여 충체부유액의 1mm³내의 충체수를 계산하고 이를 충체 보존기간 시험성적 대조구로 하였다.

충체 보존 : 충체를 접종한 mouse복강으로부터 채취한 생리식염수 충체 부유액을 먼저 최저 속도로 원심분리하여 염증세포를 제거하고, 2000rpm으로 5분간 원심 침전한 후 상층액을 버리고, 침전물에 각각의 보존액 10ml를 가하고, 여기에 PC 100µg/ml와 SM 100µg/ml를 첨가하여 4℃ 냉장고에 보관하였다. 각 보존액으로 보존된 충체의 냉장고 보존기간을 측정하기 위하여, 보존액 내의 충체를 생리식염수로 세척한 후 다시 생리식염수에 부유하고, 2×10^5 마리의 충체가 함유된 부유액 0.5~1ml를 각각 3마리의 mouse에 2일 간격으로 계속 접종하여, 접종 4일째 충체를 상기와 같은 방법으로 회수하여 복수1mm³내의 충체수를 계산하고, 충체가 검출되지 않을 때까지 계속하였다.

보존기간평가 : 각 보존액에 의한 충체의 냉장고 보존기간에 대한 평가는 먼저 냉장고에 보존하지 않고 정상적으로 계대하여 채취한 mouse 10마리의 생리식염수 충체 부유액 각 1mm³내의 평균한 충체수를 100으로 하고, 각각의 보존액으로 냉장고에 보존한 충체를 mouse에 접종하여 얻은 충체수를 대비하여 백분율로 표시하였다.

결 과

보존액에 따른 톡소플라즈마 원충수의 변화

*Toxoplasma tachyzoite*를 각종의 보존액을

사용하여 4℃ 냉장고 내에서 보존 실험을 실시하고, 보존기간의 판정은 보존한 충체를 마우스 복강에 2×10^5 마리의 충체를 접종한 후 충체가 검출되는 기간을 계산하였으며, 정상적으로 계대 접종하여 채취한 마우스 복강 세척액 1mm³내의 평균 충체수 24,450을 100으로하고, 이에 대비하여 보존 후에 접종하여 얻은 1mm³내의 충체수를 백분율로 표시하였다.

생리식염수 : 생리식염수에서 2일 보존 후 마우스에 접종하여 채취한 복수 1mm³내의 충체수는 평균 23,350마리로 95.5%이었으며, 4일 보존하였을 때는 82.3%, 6일 보존에서는 54.1%로 크게 감소하였다. 8일 이후부터는 시간의 경과에 따라 점진적으로 감소하였으며, 26일간 보존한 충체수는 122마리로서 0.5%를 나타내면서 더 이상 검출되지 않았다(Fig 1).

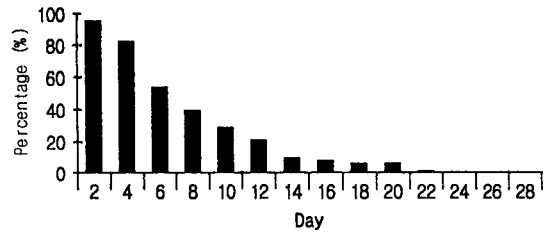


Fig 1. Preservation of *Toxoplasma tachyzoites* in saline solution

Ringer액 : 타 보존액에 비하여 Ringer액에 보존하였을 때 보존기간이 짧았다. 2일 보존하였을 때 충체수는 19,144마리로서 78.3%, 4일 보존에서는 77.5%, 6일 보존에서는 32.3%로 크게 감소하였으며, 18일 보존에서는 98마리로서 0.4%를 나타내었고 그 이후에는 검출이 되지 않았다(Fig 2).

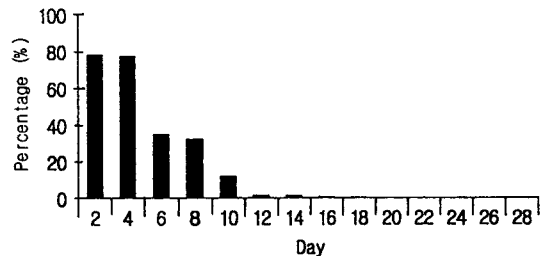


Fig 2. Preservation of *Toxoplasma tachyzoites* in Ringer solution

Hank액 : 2일 보존에서는 22,567마리의 총체가 검출되어 92.3%를 나타내었으며, 4일과 6일 보존에서는 각각 78.3%, 77.5%, 8일 보존에서는 43.0%로 크게 감소하였으며 그리고 최장 보존 기간은 28일이며 이때 총체는 73마리이며 검출율은 0.3%이었다(Fig 3).

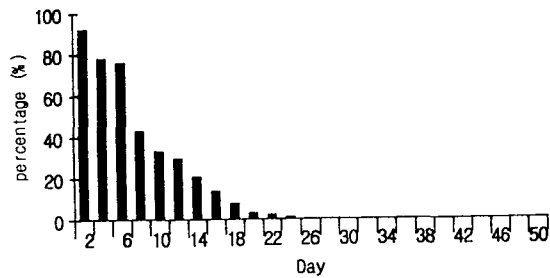


Fig 3. Preservation of *Toxoplasma tachyzoites* in Hank's solution

난황glycerine액 : 보존 기간은 50일로서 가장 장기간의 보존효과가 나타났으며, 보존 초기에는 타 보존액보다 총체 회수율이 다소 떨어졌다. 2일간 보존에서는 21,956마리가 회수되어 89.8%를 나타내었으며, 이후에는 점진적으로 총체 회수율이 감소하여 50일 보존에서는 0.3%의 총체 회수율을 나타내었고, 그후에는 총체가 검출되지 않았다(Fig 4).

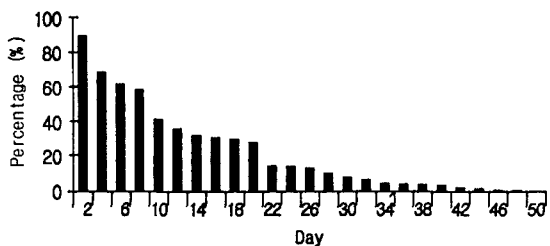


Fig 4. Preservation of *Toxoplasma tachyzoites* in yolk glycerine solution

고 찰

*Toxoplasma tachyzoite*를 보다 경제적이고 간편하게 보존할 수 있는 방법을 찾기 위하여 몇 종류의 부유액 즉 생리식염수, Ringer액, Hank액, 그리고 난황 glycerine액⁴⁾을 각각 사

용하여 4°C에서 냉장보존 실험을 실시하였다. 각 부유액을 사용한 실험에서 냉장 보존기간은 난황glycerine액에서 50일간으로 가장 장기간 보존할 수 있었으며, Hank액에서 28일, 생리식염수에서 26일, Ringer액에서 18일간 보존할 수 있었다.

총체를 냉장고에서 보존할 때 총체부유액에 항생제가 중요하였으며, penicillin과 streptomycin을 첨가하지 않았을 때는 보존 기간이 거의 반으로 감소하였다. 잡균에 의해서 총체는 냉장상태에서도 수명이 단축된 것으로 추측된다.

총체의 보존 기간의 평가는 일정기간 냉장 보존한 총체 2×10^5 마리를 0.5~1ml의 생리식염수에 다시 부유하여 2일 간격으로 마우스에 접종하여 접종된 마우스에서 총체가 확인되지 않을 때까지 계속하였으며, 총체가 확인될 때까지의 기간을 보존 기간으로 하였다. 총체 보존 시간의 경과에 따라서 마우스복강으로부터 총체의 회수율은 현저히 감소하였다. 시간의 경과에 따른 총체 회수율의 표시는, 보존하지 않고 정상적으로 계대접종한 10마리의 각 마우스 복수 1mm³내의 평균 총체수 24,450을 100으로 하고, 보존후의 총체를 3마리의 마우스에 접종하여 채취한 각 1mm³복수내의 평균 총체수를 백분율로 표시하였다. 보존기간의 평가는 보존후에 총체를 마우스의 폐사시간을 표시한 보고가^{7,9,12)} 있으나 이 실험에서는 총체 접종 후 마우스는 대부분 5일째 폐사되었기 때문에 모두 4일째 총체를 채취하여 복수 1mm³내의 총체수로써 평가하였다. 각 부유액을 사용하여 냉장 보존 하였을 때 보존 후기에 다수의 총체가 변성되어 비정상적인 형태를 나타내었기 때문에 마우스에 접종 실험을 할 때는 총체가 형태적으로 정상적이며 충실한 것만을 계산하여 접종하였다.

石井進 등(1979)은 *Toxoplasma tachyzoite*를 난황 glycerine액에 부유하여 4°C 냉장고에서 보존한 결과 6주간의 감염력을 나타내었다고 하였으며, 완서 냉각법에 의해서 -80°C 이하에서 보존한 결과 상당히 장기간 보존이 가능하였고, 그리고 액체질소를 이용하여 -196°C에서 보존한 결과 약 4년이 경과하여도 감염력을 나타내었

었다고 하였으나, 이번 실험에서는 상기의 보존액을 사용하여 4°C에서 보존한 결과 7주간 충체를 보존할 수 있었다. 4°C에서 보존하였을 때 石井進 등(1979)의 성적과의 차이는 실험에 사용한 충체의 생물학적 특성의 차이에서 나타날 것으로 추측된다.

충체를 장기간 보존하기 위해서는 일반적으로 액체질소를 이용하여 초저온 냉동 보존을 하고 있다. 냉동 보존에서 중요한 것은 온도를 점진적으로 낮추어야 하며 이때 충체의 냉동보호제로서 glycerine 혹은 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하고 있다^{5,8,9,17,23} 전과 장(1993)은 TC-M, 송아지혈청 그리고 DMSO를 사용하여 생리식염수 충체부유액을 저속냉각법(-30°C에서 3시간, -60°C에서 1시간)으로 동결한 후 -196°C의 액체질소에 보존한 결과 5년이상 보존이 가능하였다고 하였다.

결 론

*Toxoplasma tachyzoite*를 보다 경제적이고, 간편하게 보존하기 위해서 각종의 보존액을 사용하여 4°C냉장고에서 보존 실험을 실시하였다. 보존 기간은 보존한 충체를 마우스복강에 2×10^5 마리를 보존 시간에 따라 2일 간격으로 계속 접종한 후 각각 충체가 검출되는 최장의 기간이며, 2×10^5 마리의 충체를 마우스에 정상적으로 계대 접종한 후 10수의 마우스 복강 세척액 1mm³의 평균 충체수 24,450을 100으로 하고, 이에 대비하여 보존 후에 접종하여 얻은 1mm³의 충체수를 백분율로 표시하였다.

*Toxoplasma tachyzoite*를 생리식염수에 부유하여 4°C 냉장고에 보존하였을 때 26일간 보존이 가능하였고, Ringer액에서는 18일간, Hank액에서는 28일간, 난황 glycerine액에서는 50일간 보존이 가능하였다.

참고문헌

1. 문무홍. 1991. 도축돈에서 *Toxoplasma*의 분리와 분리주에 대한 병원성 시험. 한국수의공중보건학회지 15 : 111~125.
2. 문제봉. 1965. *Toxoplasma*에 관한 연구. 제 1모돈으로부터 *Toxoplasma* 분리. 가축위생연구소보 8 : 143~171.
3. 임한중, 이성균, 이원재 등. 1972. 한국산돈의 *Toxoplasma* 감염에 대하여. 최신의학 15 : 69~73.
4. 石井進 外 8人. 1979. 獸醫臨床 寄生蟲學. 獸醫臨床 寄生蟲學 編集委員編 : 671~671.
5. 전 영, 장 환. 1993. 톡소플라즈마 원충(RH주)의 5년간 동결보존실험. 대한수의학회지 33 : 285~287.
6. Bollinger RO, Musallam N, Stulberg CS. 1974. Freeze preservation of tissue culture propagated *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 60 : 68~369.
7. Chandler AH, Weiman D. 1956. Prolonged storage of *Toxoplasma* at -70°C. Am J Clin Pathol 26 : 323~326.
8. Diamond LS. 1964. Freeze-preservation of protozoa. Cryobiology 1 : 95~102.
9. Eyles DE, Coleman N, Cavanaugh DJ. 1956. Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing. J Parasitol 42 : 408~413.
10. Dienst RB, Verma MP. 1965. Isolation of *Toxoplasma* from salivary glands and saliva of pigs with asymptomatic infection. Am J Trop Med Hyg 14 : 558~560.
11. Dubey JP, Murrell KD, Fayer R. 1984. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. Am J Vet Res 45 : 1941~1943.
12. Jacobs L, Jones FE, Melton ML. 1952. The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media. J parasitol 38 : 293~297.
13. Jacobs L, Remington JS, Melton ML. 1960. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. J Parasitol 46 : 23~28.
14. Jeffery GM. 1962. Survival of trophozoites of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum* in glycerolized whole blood

- at low temperatures. *J Parasitol* 48 : 601~606.
15. Kwantes W, Fleck DG, Payne RA. 1967. Isolation and preservation to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Pathol* 20 : 286~289.
 16. Levine ND. 1967. *Veterinary protozoology*. Iowa State University Press, Iowa : 248~254.
 17. Mackie MJ. 1972. Two years studies on Eyles' glycerol preservation technique for *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 58 : 846~847.
 18. Manwell RD, Coulston F, Binckley EC, et al. 1945. Mammalian and avian *Toxoplasma*. *J Inf Dis* 76 : 1~14.
 19. Manwell RD, Drobeck HP. 1951. Mammalian toxoplasmosis in birds. *Exp Parasitol* 1 : 83~93.
 20. Sabin AB, Olitzky PK. 1937. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* 85 : 336~338.
 21. Samantaray JC, Mithal S, Mohapatra LM. 1980. Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing. *Indiana J Med Res* 72 : 637~640.
 22. Smith R. 1973. Method for storing *Toxoplasma gondii* (Rh strain) in liquid nitrogen. *Appl Microbio* 26 : 1011~1012.
 23. Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD, et al. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine : Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. *Am J Vet Res* 45 : 1719~1725.
 24. Wolf A, Cowen D, Paige BH. 1940. Toxoplasmic encephalomyelitis IV. Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J Exp Med* 71 : 187~214.