

파라핀 블록 PCR을 이용한 소 네오스포라 감염증의 진단법 확립

이중근 · 김재훈* · 김진현 · 이병천 · 황우석 · 윤희정 · 남호우** · 진영화* · 김대용

서울대학교 수의과대학, 농생명공학부

*국립수의과학검역원

**카톨릭의과대학 기생충학교실

(2001년 8월 23일 게재승인)

Establishment of diagnostic method for bovine neosporosis by PCR using paraffin block

Jung-keun Lee, Jae-Hoon Kim*, Jin-Hyun Kim, Byung-chun Lee, Woo-suk Hwang, Hee-jeong Youn, Hoo-woo Nam**, Young-wha Jean*, Dae-Yong Kim

College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

*National Veterinary Research Institute and Quarantine Service

**Department of Parasitology, College of Medicine, Catholic University

(Accepted by August 23, 2001)

Abstract : *Neospora caninum* infections have been associated with neonatal paresis as well as abortion around the world. Bovine abortion induced by *N. caninum* was first reported in 1997 in Korea. Diagnosis of *N. caninum* infection is usually based on histopathology and immunohistochemical detection of organism. However, often the tissues having lesion suggestive of *N. caninum* infection were negative on immunohistochemistry. Here, we describe establishment of PCR-based diagnostic strategy for *N. caninum* infection using DNA extracted from paraffin blocks containing the lesion. PCR was able to amplify *N. caninum*-specific bands from the paraffin blocks containing at least moderate degree of inflammation. Compared to paraffin-blocks, DNA extracted from fresh tissues were less sensitive than that of paraffin blocks. This PCR-based method can be practically applicable for rapid diagnosis of bovine *N. caninum* infection with high specificity and sensitivity. Based on this method, 17% of bovine abortion surveyed during a designated period was associated with *N. caninum* infection.

Key words : bovine, *Neospora caninum*, PCR, diagnosis, abortion

서 론

*Neospora caninum*은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 아강, Sarcocystidae과에 속하는 원충으로서, 소와 개 등에서 유산과 신경 증상 등을 일으키는 것으로 알려져 있다^{1,2}. 현재까지 보고된 것에 의하면 neosporosis는 한국을 포함한 미국, 일본, 뉴질랜드 등 거의 전세계적인 발생분포를 보이고 있다^{1,4}. 한국에서는 1997년 임신 6개월령의 젖소 유산 태아에서 *N. caninum* 감염을 최초로 보고한 바 있으며, 이후 원충감염으로 인한 동일한 소의 반복유산을 증명하기도 하였다⁴. *N. caninum*에 감염된 유

산태아나 선천적으로 감염된 송아지의 특징적인 소견은 병리조직학적으로 볼 때 심근, 골격근에 다발성으로 비화농성 염증을 일으키며, 뇌에서도 다발성으로 비화농성으로 괴사를 동반한 뇌막뇌염을 일으키고 드물게는 간과 신장에 염증을 유발시킨다^{1,2}.

현재 소 *N. caninum* 감염증의 진단방법으로는 유산태아 조직에 대한 병리조직학적 검사와 병변부위에서 원충을 확인하는 면역조직화학염색법이 가장 보편적으로 사용되고 있다^{2,5,6}. 또한 어미 젖소에 대한 혈청검사는 간접형광항체법 (indirect fluorescent antibody test : IFAT) 과 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), DAT

본 연구는 농림부 기획과제(399002-3) 및 두뇌한국 21 사업에 의해서 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Address reprints requests to Dr. Dae-yong Kim, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea (E-mail: daeyong@plaza.snu.ac.kr)

(direct agglutination test) 등의 방법이 사용되고 있다⁷⁻¹⁰. 모체혈청을 이용한 검사법은 *N caninum*에 의한 유산을 확인하는데 있어서는 감수성이 높지 않은 단점이 있다. 즉, 어미 소가 유산될 시기의 항체가 높으면 혈청학적으로 양성을 나타내지만, 유산 당시 모체 혈청가가 높지 않은 개체도 있기 때문이다¹¹. 또한 ELISA와 IFAT를 이용하여 동일한 모체의 혈청검사를 실시하여 간혹 양성-음성의 상반된 결과를 얻는 경우도 있어서, 진단상에 다소의 문제점이 있다¹². 현재 모체 혈청을 이용한 항체 검사법은 일반적으로 목장 단위로 실시하며, 혈청검사 시 *N caninum*의 확진율이 50~65%에 미치고 있다고 보고되고 있다¹³. 한편 면역조직화학염색을 이용한 진단법은 유산태아내의 조직에 존재하는 원충의 수가 적을 시 진단이 어렵고, 따라서 진단법으로서 감수성에 역시 한계가 있다¹⁴.

따라서 최근에 혈청학적인 검사와 면역조직화학염색의 단점을 극복하기 위해서 *N caninum*의 감염으로 의심되는 조직을 이용한 PCR 진단법이 보고된 바 있다¹⁵. 이 진단법은 포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직으로부터 DNA를 추출하여 *N caninum*의 감염여부를 검사하는 방법으로 빠르고 정확하게 진단을 할 수 있는 장점이 있다¹⁵.

본 연구에서는 PCR 법에 근거한 진단법을 확립하여 국내 소에서의 *N caninum* 감염에 의한 유산율을 조사하는 한편 면역조직화학염색과 진단법으로서의 이용가치를 비교하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

1999년 6월부터 2000년 6월까지 서울대학교 수의과대학 병리학 교실에 의뢰된 소 유산태아 144두를 대상으로 연구를 수행하였다.

병리해부 및 조직학적 검사

유산태아는 일반적인 부검술식에 의하여 외관검사를 실시한 다음, 개복하여 흉강 및 복강 장기를 세밀하게 관찰하였다. 뇌를 포함한 주요 실질장기를 적출하여 10% 완충포르말린에 24시간 고정하였다. 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 3~4 µm 두께로 조직 절편을 제작하여 탈파라핀 한 후 hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직학적 검사

병변이 관찰된 조직을 4 µm 두께로 박절한 후 탈 파라핀 시키고 3% H₂O₂가 함유된 무수 메탄올에서 5분간

처리하고, 0.1% pronase로 37°C에서 10분간 처리한 후, 0.1% gelatin에 희석한 5% 정상 토끼 혈청으로 37°C 습상에서 20분간 반응시켰다. 일차 항체는 1:3,000으로 희석한 *N caninum* 고도면역혈청 (VMRD, Inc., Pullman, USA)을 37°C에서 30분간 처리한 다음 차가운 10% Triton-X 함유 PBS buffer로 수세하였다. 이차 항체는 biotinylated anti-goat IgG (Vector Lab. Inc., Burlingame, USA)를 1:200으로 희석하여 37°C 습상에서 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex 용액에 20분간 적용시키고, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Vector Lab. Inc., Burlingame, USA)로 발색시켰다. 핵 대조 염색으로 Harrison's hematoxylin 염색을 하여 광학현미경으로 검경하였다.

양성대조군으로는 실험적으로 *N caninum* 국내 분리주인 KBA-2를 감염시킨 마우스 뇌조직의 파라핀 블록을 이용하였다.

PCR 검사

의뢰된 144개체 중 병리조직학적으로 뇌와 심근에서 경도에서 심한 정도의 병변이 확인된 34 개체 (Table 1)의 파라핀 블록을 대상으로 PCR을 실시하였다. 또한 같은 개체의 신선한 조직이 있을 경우 이를 대상으로도 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 primer는 *N caninum*에 특이적인 Np4 (5'CCTCCCAATGCGA-ACGAAA3')과 Np7 (5'GGGTGAACCGAGG GAGTTG3')를 사용하였다¹⁵. PCR 혼합액의 조성은 50 µl에 150 ng의 target DNA, 2 mM MgCl₂, 10X reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 0.1% Triton X-100), 1 ml 당 1 mg의 gelatin, PCR primer를 각 10 pmol, 각각의 dNTP를 200 µM, 2 unit Taq polymerase (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였다¹⁵. PCR은 Perkin-Elmer Thermocycler 9600 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 이용하여 수행하였으며, 반응 조건은 94°C에서 2분간 pre-denaturation 하였으며, 95°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 60초간 extension 하는 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 2분간 extension 하도록 하였다. 증폭 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하여 자외선광으로 DNA

Table 1. Summary of bovine aborted fetuses studied

Year	No. of cases	Degree of microscopic lesions		
		mild	moderate	severe
1999	95	14	5	8
2000	49	3	2	2
Total	144	17	7	10

중폭 산물을 확인하였다. 양성 대조군으로는 실험적으로 *N. caninum* 국내 분리주인 KBA-2를 감염시킨 마우스 뇌조직의 파라핀 블록을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 어떠한 병변도 확인되지 않은 정상소의 뇌조직을 이용하였다.

미생물학적 검사

폐장, 간장, 4위액, 신장, 비장을 대상으로 통상적인 방법에 준해서 세균 분리 및 동정을 실시하였고, 또한 PCR과 FA 법 등을 이용하여 IBR, BVD, Akabane 및 Aino 바이러스 등의 감염여부를 조사하였다.

결 과

미생물 검사

세균 검사 시 *N. caninum* 감염으로 의심된 34개체에서 유산과 직접적으로 관련된 어떠한 원인체도 분리되지 않았다. 또한 34개체 모두 IBR, BVD, Akabane 및 Aino 바이러스에 음성이었다.

병리조직학적 소견

육안검사 시 병리조직학적으로 *N. caninum* 감염이 의심되었던 34 예 중 2두에서 심장 및 골격근에서 직경 2에서 4 mm 정도의 한계 명료한 유백색조의 결절을 관찰할 수 있었다. 병리조직학적 검사 결과 총 144 두 중 34 예에서 *N. caninum*의 감염 시 특징적으로 동반되는 병변이 관찰되었다 (Table 1). 즉 뇌의 실질에는 간혹 괴사를 동반한 림프구, 형질세포, 및 대식구로 구성된 비화농성 소견을 관찰할 수 있었으며 (Fig 1), 혈관주변 및 뇌막에서도 림프구와 형질세포의 침윤을 관찰할 수 있었다 (Fig 2). 심장에서는 심근과 심외막에 림프구, 형질세포, 대식구로 구성된 국소적 또는 다발 병소성의 병변이 관찰되었고 심한 경우에는 심근세포의 괴사 및 단열도 동반되었다 (Fig. 3). 병변의 정도는 개체에 따라서 뇌와 마찬가지로 다양하였다. 한편 골격근에서도 심근과 비슷한 변화를 관찰할 수 있었다. 간혹 일부의 개체에서는 한계 명료한 괴사성 비화농성 염증소가 간 및 폐장에서도 관찰되었다 (Fig. 4).

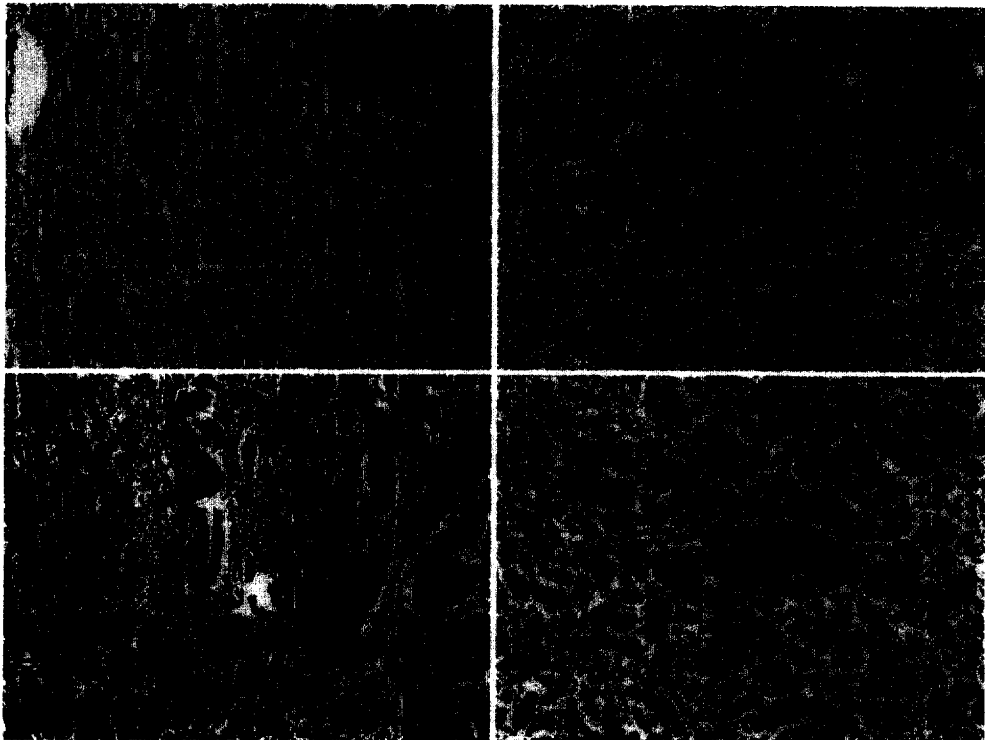


Fig 1. Brain, aborted bovine fetus. Note necrosis and mixed mononuclear cell infiltration in the neuropil. H&E, X200.
Fig 2. Brain, aborted bovine fetus. Note perivascular infiltration of lymphocytes and plasma cells. H&E, X200.
Fig 3. Heart, aborted bovine fetus. Note severe infiltration of mixed mononuclear cells and myocardial necrosis. H&E, X200.
Fig 4. Liver, aborted bovine fetus. Note mixed mononuclear cell infiltration in the periportal area. H&E, X200.

Table 2. Summary of histopathology, immunohistochemistry, and PCR

Group	Histopathology	IHC	PCR	
			Fresh tissue	Paraffin block
1*	17	0/17 (0%)**	0/17 (0%)	7/17 (41%)
2	7	2/7 (29%)	2/6 (33%)	7/7 (100%)
3	10	4/10 (40%)	3/6 (50%)	10/10 (100%)

*Group 1:+ ; group 2:++ ; group 3:+++

**Positive percentage

**Fig 5.** PCR detection of *N. caninum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from aborted bovine fetuses. Lane 1, DNA molecular ladder (100 bp); lane 2, positive control (KBA-2 infected mouse brain); lane 3, negative control (normal bovine brain); lane 4, case #10 (+); lane 5, case #15 (+); lane 6, case #20 (++) ; lane 7, case #24 (++) ; lane 8, case #28 (+++) ; lane 9, case #34 (+++) ; lane 10, positive control (*N. caninum* DNA only); lane 11, paraffin only, negative control.

면역조직화학적 소견

면역조직화학 염색 결과 병리조직학적 검사 시 병변이 미약한 경우에는 뇌, 골격근, 심근의 염색 시 모든 개체에서 tachyzoite 항원을 검출할 수 없었다. 하지만 병리조직학적 검사 시 중등도의 병변 (++)을 나타낸 7개체 중 2개체에서 비화농성 염증이 있는 골격근과 심근 혹은 뇌에서 tachyzoite를 관찰할 수 있었고, 조직학적 소견 시 병변이 심한 (+++) 10개체의 조직에서는 4개체에서 tachyzoite를 관찰할 수 있었다 (Table 2).

PCR 결과

신선한 조직을 이용한 PCR 검사 결과 조직학적으로 병변이 있는 34개체 중에서 병변이 미약한 개체에서는 양성밴드가 확인되지 않았으나, 중등도의 병변에서는 2개체에서 양성밴드가 확인되었고, 병변이 심한 개체에서는 PCR을 실시한 6개체 중 3개체에서 양성 반응을 나타내었다 (Table 2).

파라핀 포매 조직을 이용하여 PCR을 실시한 결과 병변이 미약한 17개체 중 7개체에서 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig 5). 한편 조직학적으로 중등도 병변을 가진 7개체와 심한 병변을 보인 개체 10 개체 모두에서 밴드를 확인할 수 있었다 (Table 2).

고 찰

현재 실시하고 있는 neosporosis에 의한 소 유산 진단 방법은 병리조직학적 검사 또는 면역조직화학 검사 방법을 사용하고 있지만 그 감수성과 특이성은 한계성이 있다⁸. 병리조직학적 검사에서 병변이 관찰된다고 하더라도 면역조직화학 검사 시 병변내에 tachyzoite가 소수 존재하는 경우는 항원을 확인하는 것이 어렵기 때문에 진단상에 어려움이 있다. 하지만 병리조직학적 검사를 통하여 병변의 유무를 확인한 후, 동일한 파라핀 포매 조직을 이용하여 PCR을 수행하면 적은 양의 tachyzoite 항원이 존재하더라도 검출이 가능하다¹⁵.

현재 사용되는 모체 혈청을 이용한 혈청검사법은 혈청의 역가에 의해서 검사 결과에 영향을 많이 받으며, 결과가 'false negative'로 진단되기도 한다¹². 실제로 검사한 결과 혈청 검사 당시 중등도 이상의 역가를 가진 경우는 회석배율에서 문제가 되지 않지만, 역가가 낮은 경우는 회석배율이 높은 경우 'false negative' 결과를 나타낼 수 있다⁹. 유산 당시 유산 태아 내에는 일반적으로 병변이 존재하지만 모체의 경우는 역가가 높지 않게 나타날 수 있다^{2,11,16}.

N. caninum 감염에 의한 소 유산증을 정확하게 진단하기 위해서는 보다 확실한 진단방법이 필요하며, 그러한 목적으로 본 연구에서는 우리나라에서도 상당히 문제되고 있는 소 neosporosis의 정확한 진단을 위해서 PCR을 이용한 진단법을 확립하였다. 결과에서 확인된 바와 같이 PCR 방법이 면역조직화학 염색에 비해서 상당히 민감도 및 특이성이 높다는 것을 알 수 있었다. 면역 염색 시 중등도 및 심한 정도에서는 각각 28%와 40%의 진단율을 보였으나, PCR의 경우 중등도 이상의 17 예 모두에서 양성 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 신선한 조직을 이용한 PCR 법은 파라핀 블록을 이용한 PCR 법에 비해서 상대적으로 민감도가 많이 떨어졌다. 이는 신선한 조직을 이용한 경우 파라핀 블록과는 달리 무작위로 조직을 채취하기 때문에 병변의 존재 유무를 모르는 상태에서 PCR을 실시하기 때문인 것으로 판단된다.

하지만 경도의 병변을 나타낸 17 예 중 7 예에서만 PCR 밴드를 확인할 수 있어서 PCR 법 역시 진단상에 있어서 어느 정도의 한계성이 있다고 하겠다. Baszler 등

에 의하면 조직 20 mg 당 최소 20에서 40개 정도의 tachyzoite가 있어야만 PCR 수행 시 양성 결과를 확실하게 얻을 수 있다고 하였다¹⁵. 따라서 경도의 17 예 중 밴드가 확인되지 않은 10 예는 원충의 수가 충분하지 않은 상태에서 아마도 조직의 사후변화가 겹쳐서 음성 반응을 보였으리라 사료된다.

소에서 *N caninum*에 의한 유산은 세계적인 발생 분포를 보이며 나라마다 유산율에 있어서는 차이가 있으나 미국이나 뉴질랜드의 경우에는 약 20~25% 정도의 유산율이 보고되어 경제적으로도 큰 손실을 주는 것으로 알려져 있다¹². 본 연구에서 확립된 PCR 법을 이용하여 144두의 소 유산태아를 대상으로 조사한 결과 약 17%가 *N caninum*에 의한 유산임이 확인되었다. 결론적으로 우리 나라에서도 *N caninum*이 소의 유산에 있어서 중요한 원인체로 작용한다는 것을 다시 한번 확인하였으며 본 연구에서 확립된 진단법은 국내에서 소의 neosporosis를 연구하는데 있어서 폭넓게 활용될 수 있으리라 기대된다.

결 론

PCR 법을 이용한 소 *N caninum* 감염증에 대한 진단법을 확립하고자 1999년 6월부터 2000년 6월까지 의뢰된 144두의 소 유산태아를 대상으로 연구를 수행한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 총 144두 중 34 예에서 경도에서 심한 정도의 *N caninum* 감염으로 의심되는 병리조직학적 변화가 뇌, 심근, 골격근에서 관찰되었으며 간혹 간장 및 신장에서도 관찰할 수 있었다.
2. 면역조직화학염색 시 항원의 검출율은 염증성 변화가 경도, 중증도, 및 심한 경우 각각 0%, 29%와 40% 였다.
3. 신선한 조직을 이용한 PCR의 경우에는 경도, 중증도 및 염증이 심한 경우 각각 0%, 33%와 50% 였다.
4. 파라핀 블록을 대상으로 PCR을 수행한 결과 경도의 염증성 변화를 보이는 조직에서는 41%의 검출율을 확인하였으나 중증도에서 심한 정도의 염증성 변화를 보이는 조직에서는 100%의 검출율을 보였다.
5. 이상의 결과를 종합해 볼 때 파라핀 조직을 이용한 PCR 법은 소 *N caninum*의 진단법으로서 높은 민감도와 정확도를 보여 앞으로 본 질병의 확진법으로서 이용가치가 높다고 하겠다.
6. PCR 법을 이용하여 조사한 결과 17%가 *N caninum*에 의한 유산으로 판명되었다.

참고문헌

1. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67:1-59, 1996.
2. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci*, 60-61:417-431, 2000.
3. 김대용, 황우석, 김재훈 등. *Neospora*에 의한 소 유산 발생. *대한수의학회지*, 37:607-612, 1997.
4. 김재훈, 황의경, 손현주 등. *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. *대한수의학회지*, 38:853-858, 1998.
5. Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, et al. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol*, 28:110-116, 1991.
6. Cole RA, Lindsay DS, Dubey JP, et al. Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody. *J Vet Diagn Invest*, 5:579-584, 1993.
7. Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, et al. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec*, 137:611-613, 1995.
8. Atkinson R, Harper PA, Reichel MP, et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol Today*, 16:110-114, 2000.
9. Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, et al. Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 141:59-68, 1999.
10. Bjorkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*, 29:1497-1507, 1999.
11. Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest*, 5:572-578, 1993.
12. Schares G, Conraths FJ, Reichel MP. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int J Parasitol*, 29:1659-1667, 1999.
13. Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol*, 83:545-547, 1997.
14. Sundermann CA, Estridge BH, Branton MS, et al. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. *J Parasitol*, 83:440-443, 1997.
15. Baszler TV, Gay LJ, Long MT, et al. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol*, 37:4059-4064, 1999.
16. 허 권, 김재훈, 황우석 등. 간접형광항체법을 이용한 국내 젖소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청역학적 연구. *대한수의학회지*, 38:859-866, 1998.