

## Polymerase chain reaction을 이용한 실험적 감염 돼지의 혈액과 조직으로부터 *Toxoplasma gondii* 검출

서명득 · 신기욱

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소  
(2001년 2월 5일 게재승인)

### Detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected porcine blood and tissues by polymerase chain reaction

Myung-deuk Suh, Gee-wook Shin

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
(Accepted by February 5, 2001)

**Abstract :** This study was conducted to detect the toxoplasma specific-DNA in circulating blood and organs collected from slaughtered pigs at slaughtering house and experimentally infected pigs with *Toxoplasma gondii* tachyzoites by polymerase chain reaction(PCR), and also PCR was applied to diagnose for acute phase of swine toxoplasmosis as a newly developed diagnostic test. The sensitivity of oligonucleotide primer, T-1 & T-2, designed from toxoplasma B1 gene amplification method was compared with Tp parasite detection by mouse inoculation(MI). On the other hand, latex agglutination test(LAT) was conducted to detect the serum antibodies comparing with the detection of toxoplasma by PCR and MI. The results obtained were summarized as follows. PCR was able to determine at the lowest level of  $10^0$  / ml *T. gondii* in blood samples which were blended with a serial diluted *T. gondii* *in vitro*. On the other hand,  $10^2$  / 5 g of *T. gondii* could detect from a variety of tissues including lung, diaphragm, liver, heart, spleen and brain *in vitro*. The primer was proved to specifically determine *T. gondii* in blood and tissues *in vitro* but it did not detect *Neospora caninum* used as a negative control. DNA of *T. gondii* was effectively extracted by freezing, thawing and grinding twice both tissues mixed with *T. gondii* *in vitro* and in experimentally infected pig's tissues. PCR detected specific DNA in the blood of experimentally infected pigs at 108 hrs and 120 hrs post-infection, it was the same time that the pigs showed fever and parasitaemia. In case of tissue, specific DNA was, however, detected only lung from experimentally infected pigs. Even though the duration of acute phase was from 3 to 7 days post-infection, but the latex agglutination test (LAT) results appeared from 8 days post-infection. A comparison of sensitivity in determining *T. gondii* in blood samples between PCR and MI, PCR positive rate ranged from 25 to 33.3%, but that of MI covered from 75 to 100%.

**Key words :** *Toxoplasma gondii*, polymerase chain reaction, porcine, B1 gene, LAT

## 서 론

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*, Tp)은 *Toxoplasma* 속의 단일 종으로 고양이의 장관 구포자충(intestinal coccidian)의 하나이고, 면양과 돼지에서는 유산 또는 사산을 일으키며<sup>1-3</sup> 사람에서는 임신 중에 감염 되었을 때

에는 유산 또는 선천적인 장애를 초래할 수 있어 이 원충에 의한 톡소포자충증(toxoplasmosis, Tp 증)은 공중 위생상 중요한 질병으로 알려져 있다<sup>3-5</sup>.

모든 고양이과(felids)의 동물은 종숙주가 되며 특히 사사하는 고양이는 가장 중요한 종숙주의 하나이고 이를 제외한 온혈동물과 조류 등은 중간숙주 역

할을 함으로서 이 원충의 숙주범위는 대단히 광범위하다<sup>3,6,7</sup>.

이 원충의 생활사는 종숙주인 고양이와 장관 특히 공장과 회장에서 무성생식과 유성생식의 장관 발육기(intestinal stage)를 가지며 고양이에서의 감염은 주로 Tp에 감염된 동물의 육을 섭취하거나 또는 감염된 설치류 등을 포식하였을 때 가장 흔히 일어나며 중간숙주에서의 감염은 주로 종숙주에서 배설된 성숙한 oocyst를 섭취하거나 다른 감염된 중간숙주의 근육을 섭취하였을 때 주로 이루어지며 이들 중간숙주 체내에서는 tachyzoites와 bradyzoites 기를 포함한 장외형 발육기(extra-intestinal stage)를 가진다<sup>7</sup>.

식육으로 제공되는 동물 중 특히 돼지에 대한 Tp 감염율은 다른 동물에 비하여 훨씬 높은 것으로 알려져 있으며<sup>8-13</sup>, 사람에서는 Tp에 감염된 돼지고기를 날 것으로 섭취한 사람에서의 급성 Tp 증의 발생 예도 보고되고 있다<sup>14</sup>.

이와 같이 동물과 사람에 큰 피해를 주는 Tp 증의 신속하고 정확한 진단을 위한 여러 학자들의 연구 결과 혈청학적 진단법으로는 색소시험법(Dye test, DT)<sup>15</sup>, 간접적혈구응집반응(Indirect haemagglutination test, IHA)<sup>16</sup>, 간접형광항체법(Indirect fluorescent antibody test, IFAT)<sup>17,18</sup>, Latex 응집반응(Latex agglutination test, LAT)<sup>19,20</sup> 및 효소표지 면역검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>21-24</sup> 등이 알려져 있으나 이러한 혈청학적 진단법은 어디까지나 역학적인 추정 진단에 도움이 될 뿐 현증 확인에는 한계가 있다.

동물접종법<sup>25,26</sup>으로서 마우스의 맹목계대(blind passage)에 의한 원충 분리 시험이 이용되고 있으나 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 그래서 이러한 여러 가지 단점을 보완하여 Tp에 대한 새로운 진단기법으로서 분자생물학적 방법의 하나인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 각종 동물의 Tp 증 진단 기법 개발에 많은 학자들이 연구를 수행해 오고 있다<sup>26-31</sup>.

최근에 와서 Burg *et al*<sup>27</sup>이 Tp의 B1 gene을 이용한 생체 진단기법으로서 PCR의 이용가능성을 보고한 이후 면양<sup>28-30</sup>, 소<sup>29</sup>, 말<sup>31</sup> 그리고 고양이<sup>32-34</sup> 등의 Tp 감염 진단에 PCR 기법이 흔히 이용되고 있으나 돼지의 Tp 감염증에 대한 PCR 기법 이용에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않다.

따라서 저자들은 국내에서 돼지 Tp 감염증의 신속·정확한 진단법으로서 PCR의 이용가능성과 효과를 검토하고 이에 의한 돼지 Tp 감염증의 진단기법을 확립코져 이 연구를 수행하였던 바 약간의 성적을 얻었기에 그 결과를 이에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 공시원충주

*Toxoplasma gondii*(Tp)를 수의과학검역원으로 부터 분양 받아 경상대학교 수의과대학 수의기생충학 교실에서 BALB/c 마우스에 연속 계대하면서 보존해 온 RH주를 사용하였다.

### 공시동물 및 인공감염

경상대학교 부설유전공학연구소 실험동물사육장에서 생산·관리된 생후 4주령으로 체중 20~25g 이상된 ICR 마우스를 시험에 사용하였으며 돼지는 LAT 검사에서 Tp 음성으로 판정된 생후 40일령의 자돈 4두를 김해 소재 K 양돈장으로 부터 구입하여 일반 백신과 구충제를 투여한 후 시험에 사용하였다. 인공감염은 2두씩 정맥 접종군(A)과 경구감염군(B)으로 나누어 A 군은 마우스 복강으로부터 채취한 복강액 중 Tp가  $2 \times 10^6$ 개가 함유되도록 멸균 PBS로 조정하여 각각 귀정맥(ear vein)으로 접종하여 감염시켰으며 B 군은  $2 \times 10^6$ 개의 Tp를 마우스 복강내에 접종한 후 만 4일째 폐사 직전의 감염 마우스를 돼지 두당 1마리씩 경구적으로 섭취케 하여 감염시켰다.

### 도살돈으로부터 재료 채취

진주시 소재 도살장에서 도살되는 돼지로부터 혈액 및 각 장기를 임의로 채취하여 총체 특이 DNA 검출을 위한 인공조작 재료로 사용하였다.

### 인공감염돼지로부터 재료 채취

돼지에 Tp를 인공감염 시킨 후 12시간 간격으로 혈액은 EDTA(7.5% vacutainer, U.K)가 들은 채혈병에 채취하여 PCR의 민감성 조사와 마우스 접종법에 의한 원충 분리시험에 각각 사용하였고 분리된 혈청은 -20°C 냉동고에 보존하면서 LAT에 사용하였다. 장기 채취는 Tp를 접종한 후 1주째와 4주째에 각 접종군별로 1두씩 도살한 후 각 장기를 채취하여 총체 특이 DNA 검출 재료로 사용하였다.

### 인공감염돼지에 대한 체온 및 임상조사

Tp 접종 후 나타나는 임상증상은 12시간 간격으로 체온(rectal temperature, RT) 측정과 동시에 조사하여 기록하였다.

### PCR의 수행

Primer는 Stiles 등<sup>31</sup>이 고안한 B1 gene으로써 염기서열은 T-1은 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'(21bp)

이고, T-2는 5'-CAGACGAATCACGGAACGTG-3'(20bp)인 것을 시험에 사용하였다.

#### 도살돈의 인공조작 재료로부터 총체 특이 DNA 추출

**혈액으로부터 총체 특이 DNA 추출 :** Tp 감염 마우스 복강으로부터 복강액을 채취하여 PBS(pH7.2)로 1,500 rpm에서 5분간씩 3회 원심 세척한 후 순수한 Tp 부유액을 만든 다음 도살돈의 혈액 3 ml 중에 세척한 Tp가 10<sup>6</sup>개가 함유되도록 조정한 다음 이것을 원액으로 하여 10<sup>7</sup>개 까지 10배 단계 희석하고, 각 희석 단계별 혈액은 총체 특이 DNA 추출 재료로 사용하였으며 추출 과정은 인공감염 돼지의 혈액으로부터 총체 특이 DNA 추출과 같은 방법으로 수행하였다.

**장기로 부터 총체 특이 DNA 추출 :** 도살돈으로부터 채취한 뇌, 폐, 심장, 간, 비장 그리고 횡격막의 각 장기로부터 5g 씩을 취하여 유발에 넣고 여기에 혈액 조작 과정에서와 같은 방법으로 Tp를 10<sup>5</sup>개부터 10<sup>7</sup>개까지 10배 단계 희석한 후 각 단계별 희석액 5 ml 씩을 21G의 주사침이 부착된 주사기로 이미 준비된 각 5g 씩의 조직내로 강제 주입시켜 -70°C 냉동고에서 30분간 동결한 다음 60°C 항온수조에서 10분간 용해하고 유발내에서 조직을 마쇄하였다. 이와 같은 동결→용해→마쇄 과정을 2회 반복한 다음 그 재료를 DNA 추출 전처리 재료로 사용하였으며 DNA 추출과정은 인공감염 돼지의 장기 처리과정에서와 같은 방법으로 수행하였다.

#### 인공감염 돼지의 재료로부터 총체 특이 DNA 추출

**감염 혈액으로부터 총체 특이 DNA 추출 :** 혈액으로부터 DNA의 추출은 Wastling *et al*<sup>28</sup>의 방법을 준용하여 다음과 같이 수행하였다. 즉 시험관에 histopaque 1077 (sigma) 3 ml을 넣고 그 위에 동량의 혈액을 혼합되지 않도록 올린 다음 1,300 rpm에서 30분간 원심하여 buffy coat 층만을 pasteur 모세 시험관으로 수집한 후 다른 시험관에 옮겨 PBS(pH 7.2)로 3회 세척한 다음 상층액을 버리고 proteinase K(amresco)가 100 mg/ml 농도로 첨가된 400 µl의 K buffer[10 mM Tris(pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% SDS]를 가한 후 50°C에서 2시간 동안 반응시키고 94°C에서 10분간 proteinase K를 불활화 시켰다. 여기에 동량의 phenol/chloroform을 첨가하여 vortex하고 15,000 rpm에서 5분간 원심한 후 상층액을 분리하였으며 이와 같은 과정을 2회 반복하였다. 최종 수거된 상층액에 1/10 용량의 3M Sodium acetate와 2.5배의 absolute ethanol을 가한 후 -70°C 냉동고에서 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% cold ethanol로 세척하고 공기중에서 건조시킨 후 50 µl TE buffer(pH 8.0)에

재부유시켜 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 양성 대조군도 위와 동일한 방법으로 DNA를 추출하여 PCR에 사용하였다.

**장기로 부터 총체 특이 DNA 추출 :** 감염 후 각 군별로 1주째와 4주째에 도살한 돼지로부터 뇌, 폐, 심장, 간, 비장, 횡격막을 채취한 다음 Tp 총체 특이 DNA 추출 시험은 다음과 같이 수행하였다. 즉 각 장기별로 5g 씩을 채취하여 각각의 유발에 넣어 멸균된 가위로 세절한 다음 여기에 멸균 증류수 또는 PBS (pH7.2) 5 ml 씩을 분주한 후 도살돈의 조직 전처리 과정에서의와 같은 방법으로 처리한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심하여 상층액을 취하여 계측하였고 여기에 1/10 용량의 3M Sodium acetate와 2.5배의 absolute ethanol을 가한 후 -70°C 냉동고에서 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% cold ethanol로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 100 µl TE buffer(pH 8.0)에 재부유시켜 -20°C 냉동고에 보존하면서 PCR 시험에 사용하였다.

#### PCR mixture

추출한 template DNA 10 µl를 PCR tube에 취하고 10 × PCR buffer[100 mM Tris(pH 9.0), 500 mM KCl, 1% Triton X-100], 0.1 µM의 primer T-1과 T-2, 2.5 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 250 µM의 dNTP(takara) 그리고 1.0U의 *Taq* polymerase(takara)를 가한 후 총량이 50 µl가 되도록 3차 증류수를 가하여 PCR 분석을 위한 시료로 사용하였다.

#### PCR

PCR 분석기기는 PTC-100(MJ research, inc.)을 사용하였으며 시료의 증폭과정은 먼저 94°C에서 4분간 가열하여 변성을 유도하고 94°C에서 1분간의 denaturation, 52°C에서 1분간의 annealing 그리고 72°C에서 1분간의 extension의 3단계로 총 35회 반복하였으며 72°C에서 8분간 더 extension을 실시하였다. 증폭 산물을 확인하기 위하여 PCR product 10 µl를 6 × gel loading dye(promega)에 혼합하였고 Ethidium bromide를 0.5 µg/ml 농도로 첨가한 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 UV transilluminator 상에서 자외선을 조사하여 증폭 산물을 확인하였다.

#### LAT

LAT에 사용된 진단액은 수의과학검역원에서 분양 받았으며 반응술식 및 판정기준은 서 등<sup>20</sup>의 방법을 준용하였다.

**마우스 접종에 의한 원충분리 및 확인 시험 :** 인공감염 돼지로부터 Tp 접종후 12시간 간격으로 채혈하여 혈액 3 ml에 histopaque 1077(sigma)를 동량 첨가하여

1,300 rpm에서 30분간 원심한 후 buffy coat 층만을 수거한 다음 마우스 복강내에 접종하여 원충분리를 시도하였으며 마우스에서의 접종은 3대까지 맹목계대(blind passage)하였고 매 계대 때의 만 4일째에 마우스 복강액을 채취하여 광학현미경으로 원충을 확인하여 분리여부를 판정하였다.

**결 과**

**도살돈의 인공조작 재료로부터 총체 특이 DNA 검출**

**혈액으로부터 총체 특이 DNA 검출 :** 도살돈의 혈액에 대한 Tp의 회석 단계별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 Fig 1에서와 같이 혈액 1 ml 당 Tp 10<sup>6</sup>개 까지 이었다.

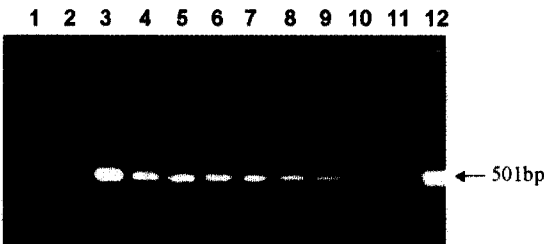
**폐로부터 총체 특이 DNA 검출 :** 도살돈의 폐조직에 대한 Tp의 회석단계별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 Fig 2에서와 같이 폐재료 5 g 당 Tp 10<sup>2</sup>개 까지 이었다.

**횡격막으로부터 총체 특이 DNA 검출 :** 도살돈의 횡격막 조직에 대한 Tp의 회석단계별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 Fig 3에서와 같이 횡격막 조직 5 g 당 Tp 10<sup>2</sup>개 까지 이었다.

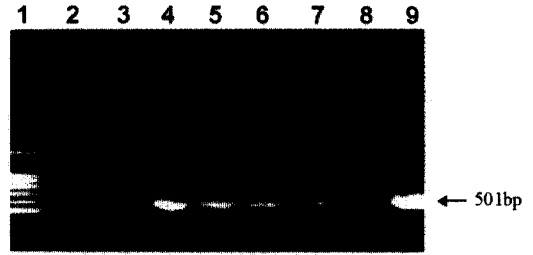
**기타 각 장기로부터 총체 특이 DNA 검출 :** 동결, 유행해, 마쇄 과정에 의한 각 장기 별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 Table 1에서와 같이 각 장기 5 g 당 Tp 10<sup>2</sup>개 까지 이었다.

**인공감염돼지의 재료로부터 총체 특이 DNA 검출**

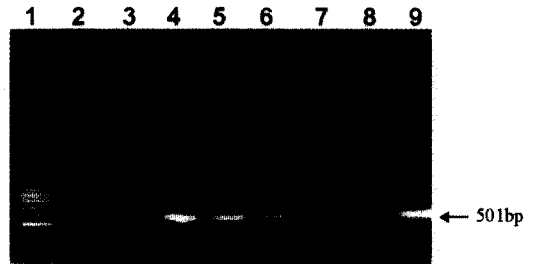
**감염 후 경과 시간별 혈중 총체 특이 DNA 검출 :** 감염 후 경과 시간별 혈중 총체 특이 DNA의 검출상황을



**Fig 1.** Limit of detection for Tp specific-DNA in the blood of slaughtered pig by PCR.  
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: *Neospora caninum*  
Lane 3~10: tenfold serial dilution of Tp tachyzoites  
Lane 3: 10<sup>6</sup>, Lane 4: 10<sup>5</sup>, Lane 5: 10<sup>4</sup>, Lane 6: 10<sup>3</sup>  
Lane 7: 10<sup>2</sup>, Lane 8: 10<sup>1</sup>, Lane 9: 10<sup>0</sup>, Lane 10: 10<sup>-1</sup>  
Lane 11: normal pig leukocytes  
Lane 12: positive control (Tp tachyzoites)



**Fig 2.** Limit of detection for Tp specific-DNA in the lung of slaughtered pig by PCR.  
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: *Neospora caninum*  
Lane 3: control(lung tissue of normal pig)  
Lane 4~8: tenfold serial dilution of Tp tachyzoites  
Lane 4: 10<sup>5</sup>, Lane 5: 10<sup>4</sup>, Lane 6: 10<sup>3</sup>, Lane 7: 10<sup>2</sup>  
Lane 8: 10<sup>1</sup>, Lane 9: positive control(Tp tachyzoites)



**Fig 3.** Limit of detection for Tp specific-DNA in the diaphragm of slaughtered pig by PCR.  
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: *Neospora caninum*  
Lane 3: control(diaphragm of normal pig)  
Lane 4~8: tenfold serial dilution of Tp tachyzoites  
Lane 4: 10<sup>5</sup>, Lane 5: 10<sup>4</sup>, Lane 6: 10<sup>3</sup>, Lane 7: 10<sup>2</sup>  
Lane 8: 10<sup>1</sup>, Lane 9: positive control(Tp tachyzoites)

**Table 1.** Detection of Tp- specific DNA in artificially injected with tenfold serial dilutions of Tp tachyzoites into normal organs collected from slaughtered pig

Organs	Dilution of Tp tachyzoites						
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
Liver	-	-	-	+	+	+	+
Heart	-	-	-	+	+	+	+
Spleen	-	-	-	+	+	+	+
Brain	-	-	-	+	+	+	+

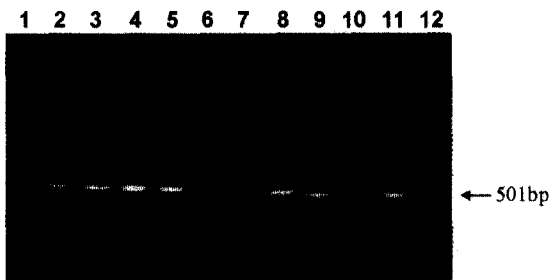
조사한 성적은 Table 2와 Fig 4에서와 같이 A 군에서는 108시간째와 120시간째에, B 군에서는 120시간째에 총체 특이 DNA가 검출되었다.

**체온(RT)과 혈중 총체 특이 DNA 검출과의 상관관계:** A 군과 B 군의 RT와 혈중 총체 특이 DNA 검출

**Table 2.** The responses of Tp specific DNA detection according to time-course in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites by PCR

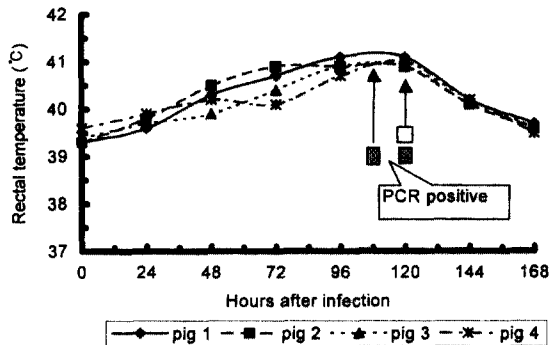
Group	Pig No.	Hours after infection													
		0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	148	
A	P-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	P-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
B	P-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	P-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

A : iv, B : oral



**Fig 4.** Detection of Tp specific-DNA according to time-course post-inoculation in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites by PCR.

Lane 1 and 12: 100 bp DNA ladder  
 Lane 2~5: A(iv), Lane 6~9: B(oral)  
 Lane 2 and 3: 108 hrs post-inoculation  
 Lane 6 and 7: 108 hrs post-inoculation  
 Lane 4 and 5: 120 hrs post-inoculation  
 Lane 8 and 9: 120 hrs post-inoculation  
 Lane 10: negative control(*Neospora caninum*)  
 Lane 11: positive control(Tp tachyzoites)

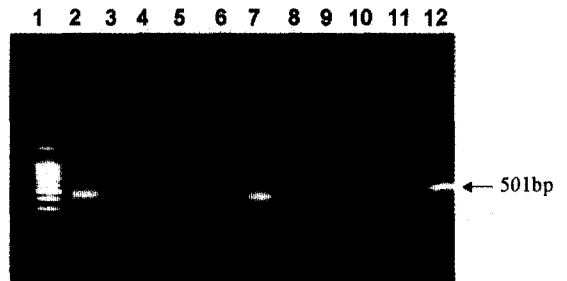


**Fig 5.** Relationship between rectal temperature and detection of Tp specific DNA in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites.  
 PCR : ■ - A(iv) □ - B(oral)

과의 상관관계를 조사한 성적은 Fig 5에서와 같이 A 군의 돼지에서는 접종 후 108시간째에 각각 41.1°C와 40.9°C, 120시간째는 41.1°C와 40.9°C로 2회의 극기에 총체 특이 DNA가 검출되었고, B 군에서는 120시간째 각각 40.9°C와 41.0°C의 극기일 때 1회에서만 총체 특이 DNA가 검출되었다.

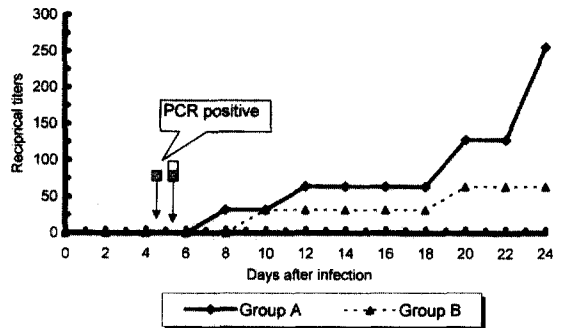
**각 장기로 부터 총체 특이 DNA 검출 :** Tp 감염후 7 일째에 각 군별 1두씩 도살하여 채취한 폐, 심장, 비장, 간 및 뇌조직으로부터 총체 특이 DNA를 검출한 성적은 Fig 6에서와 같이 각 군의 폐조직에서만 검출되었다.

**혈중 원충 출현과 LAT 항체 소장 :** Tp 감염돼지에 대한 혈중 총체 특이 DNA 검출과 항체 소장과의 관계를 조사한 성적은 Fig 7에서와 같이 A군에서는 4.5일(108시간)째와 5일(120시간)째에, B 군에서는 5일(120시



**Fig 6.** Detection of Tp specific-DNA in organs of pigs slaughtered on day 7 post-inoculation of Tp tachyzoites by PCR.

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2~6: A(iv)  
 Lane 7~11: B(oral), Lane 2: A-lung, Lane 3: A- heart  
 Lane 7: B-lung, Lane 8: B-heart, Lane 4: A- spleen  
 Lane 5: A- liver, Lane 9: B- spleen, Lane 10: B-liver  
 Lane 6: A- brain, Lane 11: B- brain  
 Lane 12: positive control(Tp tachyzoites)



**Fig 7.** Relationship between LA antibody and detection of Tp specific DNA in the blood of pigs artificially infected with Tp tachyzoites.  
 PCR : ■ - A(iv) □ - B (oral)

**Table 3.** Comparison between isolation of *Tp* parasite by MI and detection of *Tp* specific DNA by PCR in the blood of pigs artificially infected with *Tp* tachyzoites

Group	Fig No.	Detection of infection	Hours after infection													
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	
A	P-1	MI*	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	P-2	MI	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
B	P-3	MI	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	P-4	MI	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

\*mouse inoculation

간)체에 각각 혈중 총체 특이 DNA가 검출되었다.

LAT 항체기는 24일까지의 조사에서 A 군에서는 감염 후 8일째에 1:32, 12일째와 16일째에는 1:64, 20일째에는 1:128, 24일째에는 1:256 이었으며, B 군에서는 12일째와 16일째에 1:32, 20일째와 24일째에는 1:64를 나타내었다.

**감염돼지의 혈액에 대한 PCR와 MI 법에 의한 총체 검출 :** 감염돼지에서 PCR에 의한 혈중 총체 특이 DNA 검출과 혈액의 마우스 접종에 의한 원충분리를 비교한 성적은 Table 3에서와 같이 A 군의 P-1과 P-2는 108시간째와 120시간째에서만 PCR 양성이었으나 MI에서는 72시간째, 96시간, 108시간, 120시간 및 132시간째까지, P-2는 84시간째 이후 12시간 간격으로 132시간째까지 채혈한 혈액에서 모두 원충이 분리되었다.

B 군에서는 P-3와 P-4는 각각 120시간째에서만 PCR 양성하였고 P-3은 96시간째, 120시간 및 132시간째까지, P-4에서는 96시간째 부터 이후 12시간 간격으로 132시간째까지 채혈한 혈액에서 각각 원충이 분리되었다.

## 고 찰

PCR을 이용한 *Tp* 감염증의 진단법은 *Tp*의 일부 DNA를 시험관내에서 연쇄적으로 증폭시킨 후 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출해 내는 방법으로 거의 100%의 특이성을 나타내며<sup>27,28,31</sup>, 이 방법에 사용되는 primer는 주로 30 kDa 단백질 유래의 P30과 총체 genome 내의 B1 gene으로 알려져 있다<sup>27,28</sup>. Burg *et al*<sup>27</sup>은 이 primer로써 *Tp* genome 내의 B1 gene을 총체 특이 DNA 검출기법인 PCR에 이용하였던 바 그 특이성과 민감성이 높다고 하였으며 이 기법은 *Tp* 감염증의 진단에 매우 유용하게 이용될 것이라고 하였다.

Stiles *et al*<sup>32</sup>은 혈중 총체 특이 DNA를 검출코져 *Tp* tachyzoites를 *Tp* 비감염 개 또는 고양이의 혈액으로 각각 인공 혼합한 후 10배 단계 희석하여 PCR를 수행한 시험에서 이들 혈액 1 ml 중에 *Tp* tachyzoite가 10<sup>2</sup>개가 함유되었을 때 *Tp* 총체 특이 DNA band를 확인할 수 있었다고 보고하였으며 서와 주<sup>33</sup>는 고양이 혈액으로 *Tp* tachyzoite를 10배 단계 희석한 시험에서 10<sup>1</sup>/ml개 까지 DNA band를 검출할 수 있었다고 보고하였다.

저자들이 돼지 혈액으로 인공조작하여 혈액 1 ml 당 *Tp* tachyzoite의 검출 한계치를 조사한 성적(Fig 1)에서는 10<sup>6</sup>/ml개 까지 501 bp의 총체 특이 DNA band를 검출할 수 있었던 바 이는 Stiles *et al*<sup>32</sup>의 성적과는 희석 배수에서 두 단계(100배)의 차이가 있었으나 서와 주<sup>33</sup>의 성적과는 한 단계(10배) 차이로 비슷하였다.

이와 같은 결과는 Stiles *et al*<sup>31</sup>은 혈액 처리과정에서 항응고제로서 heparin을 사용하였으며 또한 전혈을 사용하여 PCR 용 template DNA를 분리하였으나 서와 주<sup>33</sup> 그리고 저자들은 혈액 처리과정에서 항응고제로서 EDTA를 사용하였지만 histopaque를 이용한 농도구배 원심분리로 buffy coat 만을 분리하여 PCR에 사용함으로써 *Taq* polymerase의 활성에 영향을 미칠 것으로 생각되는 항응고제(EDTA, heparin)<sup>35</sup>와 혈액중의 heme<sup>36</sup>을 충분히 제거한데에 기인된 것으로 생각된다.

Michelle *et al*<sup>37</sup>은 식용의 훈연 돈육을 마쇄하여 *Tp* tachyzoite의 단계별 희석액과의 혼합재료에 대한 총체 특이 DNA 검출 한계치를 조사한 성적에서 10<sup>2</sup>/g개 까지 가능하다고 보고하였으나 저자들의 성적(Fig 2, 3, Table 1)에서는 각 장기 20g개로서 Michelle *et al*<sup>37</sup>의 성적과는 큰 차이가 있었다.

이와 같은 결과는 저자들과 Michelle *et al*<sup>37</sup>이 사용한 검사재료의 차이라고도 할 수 있으나 특히 재료의 처리

과정에서 저자들이 사용한 각 장기 조직의 동결→융해→파쇄법이 총체 DNA를 추출해 내는데 훨씬 유리한 것으로 생각되며, Michelle *et al*<sup>37</sup>은 PCR에 P30을 primer로 사용하였으나 저자들은 Tp genomic B1 gene을 사용하였는 바, 이와 같이 각 연구자가 사용한 primer에 따라 PCR의 민감성과 특이성에도 차이가 있을 수 있다고 생각된다.

Wastling *et al*<sup>28</sup>은 PCR의 primer로서 B1 gene 유래 primer와 P30 유래 primer에 대한 민감성과 특이성 조사에서 B1 gene은 P30에 비하여 민감성이 높을 뿐만 아니라 반응상의 위음성(false negative)을 50% 정도 감소시킬 수 있는 장점을 가지며 마우스접종법(MI)과 비슷한 진단 효과를 가져올 수 있다고 하였다.

Darek *et al*<sup>34</sup>은 Tp mozart strain(tissue cysts)을 종숙주인 고양이에게 경구 감염시킨 시험에서 감염 후 14일째부터 유행 증 총체 특이 DNA가 검출되기 시작하여 182일째 까지도 산발적인 PCR 양성반응을 보였다고 하였으며, 서와 주<sup>33</sup>는 Tp RH strain에 감염된 마우스를 경구적으로 감염시킨 고양이에서 감염 5일째부터 유행 증 총체 특이 DNA가 검출되기 시작하여 64일째까지, Esteban과 Innes<sup>29</sup> S48 strain(oocyst)을 경구감염시킨 면양에서 감염 후 2일째부터 9일째 사이에 산발적으로, Sedlak *et al*<sup>26</sup>은 Tp K7 strain의 oocyst를 경구 감염시킨 토끼에서 감염 후 7일째와 12일째 사이에 혈중 총체 특이 DNA를 검출할 수 있었다고 보고하였다.

저자들은 이 실험(Table 2, Fig 4)에서 A 군은 감염 후 4.5일(108시간)째와 5일(120시간)째, B 군은 5일(120시간)째에서만 유행 증 총체 특이 DNA가 검출되었을 뿐 그 이후에는 검출되지 않았다. 이와 같이 각 연구자<sup>26,29,34</sup>에 따른 성적의 차이는 사용한 Tp strain 간의 병원성의 강약 및 유무, 사용 원충주의 발육기, 감염방법 및 공시 숙주 등의 차이에서 온 결과라고 생각된다.

Tp RH strain의 마우스에 대한 병원성은 아주 큰 것으로 알려져 있고 육성돈 이상의 큰 돼지에서는 대체로 병원성이 가벼운 것으로 알려져<sup>38,39</sup> 있으나 자돈의 경우에는 인공접종 후 4~5일째에 임상증상의 일환으로서 체온은 대체로 40~41°C까지의 고열을 나타내며 집단으로 발생하는 경우도 흔한 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>.

Jungersen *et al*<sup>38</sup>은 Tp SSI 119 strain을 정맥으로 인공감염시킨 돼지에서 감염 후 4일째에 41.1°C까지의 체온상승이 있었다고 하였으며, Wingstrand *et al*<sup>22</sup>은 이 원충주의 oocyst를 경구적으로 감염시킨 돼지에서 감염 후 4~5일째에 41.5°C 이상의 고열이 있었다고 하였다. Esteban *et al*<sup>30</sup>은 Tp S48 strain의 oocyst를 경구적으로 감염시킨 면양에서 감염 후 4일째에 41.5°C까지의 체온상승이 있었고 같은 방법으로 감염시킨 소에서는 4~6

일째까지 발열증상이 지속되었으며 5일째의 40.2°C가 가장 높은 체온이었다고 하였다.

저자들의 성적(Fig 5)에서 A 군은 감염 후 2일째부터 체온이 상승하기 시작하여 3~4일째에 41°C, B 군은 5일째에 41°C까지의 체온상승을 보였는 바, 이와 같은 결과는 앞의 여러 학자들<sup>22,30,39</sup>이 보고한 성적과 거의 일치하였으며 한편 Tp 감염에 의한 발열극기는 대체로 숙주, 원충주 그리고 감염방법 등의 차이에 관계없이 감염 후 4~5일째에 나타나는 것으로 사료된다.

Esteban *et al*<sup>30</sup>은 Tp S48 strain의 oocyst를 경구감염시킨 소와 면양에서 발열증상과 혈중 총체 특이 DNA 검출과의 상관관계를 조사한 성적에서 Tp oocyst 10<sup>3</sup>개를 경구감염시킨 소에서는 감염 후 5일째부터 9일째까지 가벼운 체온(40.5°C) 상승기가 있었으나 이 때에는 혈중 총체 특이 DNA가 검출되지 않았으며, oocyst 10<sup>5</sup>개를 감염시켰을 때에는 감염 후 3일째부터 체온이 상승하기 시작하여 5일째와 8일째까지는 40.5°C에 가까운 체온을 유지하였고 감염 후 2일째와 5일째에는 혈중 총체 특이 DNA를 검출할 수 있었다고 하였다. 그리고 면양에서는 oocyst 10<sup>3</sup>개를 경구 감염시켰을 때 감염 후 4일째부터 체온이 상승하기 시작하여 5일째에는 40.9°C, 6일째와 7일째에는 41~41.5°C, 9일째까지 40°C 이상의 발열증상이 지속되었고 총체 특이 DNA는 감염 후 7일째와 8일째에서 검출되었지만, oocyst 10<sup>5</sup>개를 감염시켰을 때에는 감염 후 2일째부터 8일째까지 40~41.5°C까지의 높은 체온이 지속되었으나 혈중 총체 특이 DNA는 2일, 6일 및 7일째에 간헐적으로 검출되었다고 보고하였다.

저자들의 성적(Fig 5)을 이들의 성적과 비교해 보면 유행 증의 총체 특이 DNA 검출시기는 약간씩의 차이는 있으나 대체로 비슷하였으며 Tp 감염에 의한 유행 증의 parasitaemia는 숙주의 종류나 총체의 감염형태 및 감염방법에 관계없이 대체로 체온이 40°C 이상의 발열 증상을 보이는 급성기에 나타나며 이 시기에서만 총체 특이 DNA가 검출되며 감염숙주에서의 발열증상은 parasitaemia의 출현과 총체 특이 DNA의 검출과는 밀접한 관계가 있다고 생각된다.

돼지에서 Tp 증의 중요한 임상증상은 발열, 식욕감퇴, 쇠약 등이고 임상해부학적 소견으로서서는 폐의 심한 염증으로 알려져 있다<sup>6,42</sup>. 저자들의 실험(Fig 5)에서도 발열, 식욕감퇴, 쇠약 및 폐염 등의 소견들이 관찰됨으로서 기존의 보고 성적들<sup>6,42</sup>과도 일치하였다.

Sedlak *et al*<sup>26</sup>은 급성 Tp 증에 감염된 토끼의 각종 장기로부터 Tp 총체 특이 DNA 검출을 시도하였으나 폐 이외의 다른 장기에서는 특이 DNA를 검출할 수 없었다고 하였는데, 이는 저자들의 인공감염 돼지에 대한 성

적(Fig 6)과 일치하였다. 이와 같은 결과는 Tp 감염에 의한 발열증상, 폐에서의 염증반응, DNA 검출 성적 등을 종합하여 판단한 대 Tp는 parasitaemia가 출현하는 급성기의 체내 이행 중 다른 장기에서 보다 일시적으로 많은 총체가 폐에 선택적으로 침입하여 폐조직 내에 집중 현상이 이루어진 데에 기인된 것으로 추정된다.

Jungersen *et al*<sup>38</sup>은 Tp SSI-119 strain의 tachyzoite 접종수에 따른 인공감염 돼지에서 ELISA 법에 의한 항체 조사 결과 tachyzoite 10<sup>6</sup>개를 감염시킨 군에서는 감염 후 10일째부터, 10<sup>4</sup>개 감염군에서는 14일째부터 항체가 출현하였다고 하였다. Lind *et al*<sup>39</sup>도 이 strain의 tachyzoite 10<sup>4</sup>개와 10<sup>3</sup>개를 각각 경구적으로 인공 감염시킨 돼지에서 ELISA 법으로 항체를 조사한 성적에서 10<sup>4</sup>개 감염군이 10<sup>3</sup>개 감염군 보다 먼저 항체가 출현하였다고 하였으며, SSI-119 strain의 tissue cyst의 경구 감염군과 RH strain tachyzoites 10<sup>6</sup>개의 정맥 감염군과의 비교에서는 모두가 감염 후 9일째부터 항체가 출현하기 시작하였으나 cyst 감염군이 tachyzoite 감염군 보다 훨씬 짧은 기간내에 급속한 항체가의 상승을 보였다고 하였고, Dubey *et al*<sup>41</sup>은 4종의 strain을 돼지에 각각 감염시켰던 바, 2종의 strain에서는 감염 후 2주째에, 다른 2종에서는 4주째에 LAT 양성반응을 보였다고 하였다.

저자들의 시험(Fig 7)에서도 감염 8일 이후부터 LAT 양성반응을 보임으로써 이는 앞의 여러 학자들<sup>38,40,42</sup>의 성적과도 대체로 일치하였다. 이러한 결과들을 종합해 보면 Tp 감염에 의한 혈중 항체는 항체조사에 이용되는 혈청학적 진단법, 숙주의 종류, Tp의 감염형(발육기), 감염방법 등에 관계없이 대체로 감염 후 8~10일 이후부터 출현하는 것으로 생각된다.

Sedlak *et al*<sup>26</sup>은 Tp K7 strain의 oocyst를 경구 감염시킨 토끼에서 LAT에 의한 혈중 항체가와 PCR에 의한 혈중 총체 특이 DNA 검출과의 관계를 조사하였던 바 전자는 감염 후 12일째부터 출현하였고 후자는 7일째와 12일째에 각각 검출되었다고 하였으며, Esteban<sup>29</sup>은 Tp M3 strain의 oocyst를 경구 감염시킨 면양에서 혈청학적 방법(IFAT, ELISA)에 의한 항체는 감염 후 10일째부터 출현하였고, DNA는 2일째부터 10일째 사이에 산발적으로 검출되었다고 하였다.

저자들의 성적(Fig 7)에서 LAT에 의한 항체는 8일~10일째부터 출현하였는 바 이는 Sedlak *et al*<sup>26</sup>과 Esteban *et al*<sup>29</sup>의 성적과 대체로 일치하였고 DNA는 4일째와 5일째에 검출되었는 바 이는 Sedlak *et al*<sup>26</sup>의 성적과는 검출 시기에서 상당한 차이가 있었으나 Esteban *et al*<sup>28</sup>의 4, 6일째 검출 성적과는 일치하였다.

이러한 여러 연구자들<sup>26,28</sup>의 성적으로 보아 대체로 감염숙주에서의 Tp 증의 급성기는 감염 후 parasitaemia가

출현하기 시작하는 3일째부터 10일째 까지로 추정되며 parasitaemia가 지속되는 기간에는 혈중 총체 특이 DNA가 검출될 수 있으나 10일째 이후부터는 혈중 항체가 출현함과 동시에 parasitaemia는 점차 소실되므로 이후의 유행 중 DNA 검출은 불가능할 것으로 사료된다.

Hitt와 Filice<sup>25</sup>는 진단방법별 Tp 진단 적중률 조사에서 MI에서는 62%, PCR은 37%, 세포배양법에서는 25%였다고 하였으며, Sedlak *et al*<sup>26</sup>은 Tp 감염 토끼 혈액에 대한 PCR와 MI에 의한 진단 적중률 조사에서 전자에서는 79%, 후자에서는 100%였다고 하였고, 서와 주<sup>33</sup>는 고양이 혈액에 대한 PCR에서 10<sup>1</sup>개까지의 총체 특이 DNA가 검출되었으나 MI에서는 10<sup>1</sup>개에서도 원충이 분리되었다고 보고하였다.

저자들의 성적(Table 3)에서는 Tp 감염 후 72시간째부터 132시간째 까지 6회의 채혈에서 A 군의 PCR 적중률은 33.3%(2회)였으며 B 군은 4회의 채혈에서 25%(1회)로써 Hitt와 Filice<sup>25</sup>의 성적(37%)보다는 약간 낮았고, Sedlak *et al*<sup>26</sup>의 성적(79%)보다는 현저히 낮았다. 그러나 MI에서는 A 군은 6회의 채혈에서 83.3%(5회)였고 B 군은 4회의 채혈에서 75%(3회)와 100%(4회)의 적중률을 보임으로써 Sedlak<sup>26</sup>의 성적(100%)과는 거의 일치하였으나 Hitt와 Filice<sup>25</sup>의 성적(62%) 보다는 높았다.

이와 같이 PCR와 MI 법에 의한 원충 검출 적중률에 현저한 차이가 있었는데 이에 대하여는 추후 더 연구·검토되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

돼지의 급성 Tp 증의 신속, 정확한 진단법을 개발코저 도살돈과 인공감염돼지의 혈액과 각 장기를 재료로 하여 Tp B1 gene을 target로 한 PCR를 수행하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tp B1 gene을 target으로 하는 primer T-1과 T-2를 사용하여 인공감염돼지의 혈액과 폐조직에 대한 PCR에서는 501 bp의 총체 특이 DNA가 검출되었으나 대조군인 *Neospora caninum*에서는 검출되지 않아 primer의 특이성이 인정되었다.
2. 도살돈의 인공조작 혈액에 대한 Tp의 회석 단계별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 혈액 1 ml 당 10<sup>4</sup>개까지이었다.
3. 도살돈의 인공조작 각종 장기에 대한 Tp의 회석 단계별 총체 특이 DNA 검출 한계치는 각 장기 5 g 당 10<sup>2</sup>개까지이었다.
4. 도살돈 및 인공감염돼지의 각종 장기로부터 총체 특이 DNA의 추출방법은 조직의 동결, 용해, 마쇄 순서의 과정을 반복한 전처리 과정에서 얻은 재료를 PCR에



사용하는 것이 효과적이었다.

5. 인공감염돼지의 혈액으로부터 총체 특이 DNA는 Tp 감염 후 108시간째와 120시간째에 검출되었으며 검출시기는 발열증상 및 parasitaemia의 지속기간과 상관관계가 있었다.

6. 인공감염돼지의 각종 장기로부터 총체 특이 DNA 검출은 폐에서만 가능하였다.

7. Tp 감염에 의한 급성기는 감염 후 3일째부터 7일째까지 이었고 LA 항체는 8일 이후부터 출현하기 시작하였다.

8. Tp 감염 혈액으로부터 총체 검출 적중율은 PCR에 서는 25~33.3% 이었고 MI에서는 75~100% 이었다.

## 사 사

이 연구를 수행하는데 실험동물(돼지)과 사료를 지원해 주신 부경양돈농협의 신용승 선생께 심심한 감사의 말씀드립니다. 그리고 실험동물 알선과 실험 수행에 많은 조언을 해 주신 경상대학교 수의과대학 정태성 교수님께도 심심한 감사의 말씀 올립니다.

## 참고문헌

- Dubey JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, 205(11):1593-1598, 1994.
- Beverley JKA. Toxoplasmosis in animals. *Vet Rec*, 99:123-127, 1976.
- Dubey JP. and Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc. Boca Raton Flo:1-200, 1988.
- Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case - control study in Norway. *Am J Epidemiol*, 144:405-412, 1996.
- Buffolan W, Gibert RE, Aolland FJ, et al. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women. *Epidemiol infect*, 308:349-351, 1996.
- 이재구. 최신수의기생충학(완전개정). 대한교과서주식회사, 537-541, 1999.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, et al. Veterinary Parasitology. Longman Scientific & Technical, 227-231, 1992.
- Gamble HR, Brady RC, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the England states *Vet Parasitol*, 82:129-136, 1999.
- Scuarez-Aranda F, Galisteo Jr AJ, Hiramoto RM. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Vet Parasitol*, 91:23-32, 2000.
- Dubey JP, Leighty JC, Beal VC. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. *J Parasitol*, 77:517-521, 1991.
- Weigel RM, Dubey JP, Siegel SM. The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Illinois swine (1992). *J Am Vet Med Assoc*, 1994; in Press.
- Assadi-Rad AM, New John C, Sharon P. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management system in Tennessee. *Vet Parasitol*, 57(4):289-297, 1995.
- Dubey JP, Katula AW, Sharar A, Andrews CD, et al. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cystes in pork. *J Parasitol*, 76:1201-1204, 1990.
- Won-Young Choi, Ho-Woo Nam, No-Hoon Kwak, et al. Food-borne outbreak of human toxoplasmosis. *J Infect Disease*, 175:1280-1282, 1997.
- Sabin FB, Feldman HA. Dye as microchemical indicators of new immunity phenomenon on affecting a protozoan parasite(toxoplasma). *Science*, 108:660-663, 1948.
- 서명득, 장두환. 돼지 Toxoplasmosis 의 간접적혈구응집반응과 피내반응에 관한 연구. 대한수의학회지, 12(1):51-58, 1972.
- Duram TM, Colvin HM. Premarket evaluation of commercial toxoplasmosis indirect fluorescent-antibody reagent. *J Clin Microbiol*, 7(3):255-260, 1978.
- Fletcher S. Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Path* 18:193-200, 1965.
- Markioka A, Kobayashi A. Evaluation of a commercial kitt toxoplasma direct agglutination test. *Jpn J Parasitol*, 38(4):179-183, 1989.
- 서명득, 주후돈, 데이비드 마스. Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단용 kit 개발에 관한 연구. 대한수의학회지, 35:538-539, 1995.
- Naot Y, Reminton JS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Ig M antibodies to *Toxoplasma gondii* use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis*, 142:73-78, 1981.
- Wingstrand A, Lind P, Hangegard J. Clinical observation, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 72:129-140, 1997.
- Wielecrd MF, Van Graijthuijesu H, Duermerer WIH. Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin in antibodies. *J Clin Microbiol*, 17:981-987, 1983.
- 서명득, 장동화, 주후돈. ELISA를 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기진단에 관한 연구. 대한수의학회지, 29:567-575, 1989.
- Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitaemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol*, 30:3181-3184, 1992.
- Sedlak K, Literak I, Faldyna M, et al. Fatal toxoplasmosis in brown hares(*Lepus europaeus*) : possible reasons of their high susceptibility to the infection. *Vet Parasitol*, 93:13-28, 2000.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty D, et al. Direct and

- sensitive detection of pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27:1787-1792, 1989.
28. Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. Comparison of two gene amplification method for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med Microbiol*, 38:360-365, 1993.
  29. Esteban-Redondo I, Innes EA. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Inter J Parasitol*, 28:1459-1466, 1998.
  30. Esteban-Redondo I, Maley SW, Nicoll S, et al. Detection of *T gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet Parasitol*, 86:155-171, 1999.
  31. Turner CB, Savva D. Detection of *T gondii* in equine eyes. *Vet Rec*, 129:128-130, 1991.
  32. Stiles JE, Prade R, Green C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*, 57:264-269, 1995.
  33. 서명득, 후보현. 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 고양이 혈액내에서의 *Toxoplasma gondii* 검출에 관한 연구. *대한수의학회지*, 39(6):1151-1160, 1999.
  34. Darek PB, Matthew JC, Steven WD, et al. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally - inoculated cats. *Vet Parasitol*, 79:181-186, 1998.
  35. Beutler E, Gilbert T, Kuhl W. Interference of heparin with polymerase chain reaction. *J Immunol*, 146:3584-3591, 1988.
  36. Huguchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In principles and applications for DNA amplification (Erlich H.A. editors). Stockton Press, 31-38, 1989.
  37. Michelle RW, Juile DJ, Richard EH. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meat. *Inter J Food Microbiol*, 45:211-215, 1998.
  38. Jungersen G, Jensen L, Riber U, Haugegaard PHM, et al. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Inter J Parasitol*, 29:1307-1319, 1999.
  39. Lind P, Haugegaard J, Wingstrand A. et al. The time course of the specific antibody response by various ELISA in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 71:1-15, 1997.
  40. 노인순, 한정희, 김재훈, et al. 자돈의 특소플라즈마병. *대한수의학회지*, 37(4):817-823, 1997.
  41. Dubey JP, Andrews CD, Thullize P, et al. Long-term humoral antibody response by various serologic test in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 68:41-50, 1997.