

소의 태이레리아병 치료시 *Theileria sergenti*의 32kDa Polypeptide 검출의 유용성

김 병 수

서해대학 임상병리과
(제재승인 : 2002년 9월 1일)

Usefulness of 32kDa Polypeptide Detection of *Theileria sergenti* in Monitoring Treatment Progress of Bovine Theileriosis

Byeong-Soo Kim

Department of Clinical Pathology, Sohae College, Kunsan, 573-717, Republic of Korea.

(Accepted : September 1, 2002)

Abstracts : Bovine piroplasmosis caused by *Theileria sergenti* is a major cause of economic loss in livestock industry. Five cattle infected with *Theileria sergenti* showing severe and fatal anemia, confirmed by indirect immunofluorescent assay(IFA), were used in this study. Four cattle were treated with diminazene aceturate and one was not treated as the control. The therapeutic effect of diminazene aceturate against *Theileria sergenti* infection was monitored by detecting the 32kDa polypeptide specific for *Theileria sergenti* by the western blotting with both polyclonal and monoclonal antibodies. The 32kDa polypeptide detected at the beginning of diminazene aceturate treatment was not detectable after the treatment. It is postulated that the detection of the 32kDa polypeptide specific for *Theileria sergenti* may be a good tool for the diagnosis and monitoring the treatment progress of *Theileria sergenti* infection.

Key words : *Theileria sergenti*, 32kDa polypeptide, diminazene aceturate, western blot, cattle

서 론

국내에서 타이레리아병은 소의 유산과 빈혈 및 증체를 감소 등으로 인해 양축 농가에 많은 경제적 손실을 초래하는 대표적인 진드기매개 원충성질병으로 잘 알려져 있다^{1,2,3}. *Theileria spp*는 온대지역에서부터 아열대 지역에 이르기까지 광범위하게 분포되어 있으며 한국과 일본 등의 동아시아 지역에는 *T. sergenti*, 호주에는 *T. buffeli*가 기타 지역에는 *T. orientalis*가 각각 분포하고 있다^{4,5}. 한편 병원성이 강한 *T. parva*는 아프리카지역에 제한적으로 분포하는 대표적인 종인 반면, *T. annulata*는 서유럽지역에서부터 남아시아지역에 이르기까지 광범위하게 분포하고 있다. *T. sergenti*, *T. buffeli*, *T. orientalis*를 분류하는데 있어 생화학 및 혈청학적 특이성과 매개 진드기의 종류에 의한 분류⁴와 형태학적·비교실험^{5,6,7} 등

이 있으나 연구자마다의 각기 다른 의견들이 있다.

최근에는 계통분류학이 발달함에 따라서 유전자 분석을 통한 분류가 이루어지고 있으며⁸, 국내에서는 *T. sergenti* 항원의 특성 및 면역원성⁹, 특이 항원의 polypeptide 구조 규명과 면역원성 시험^{10,11,12} 그리고 DNA probe을 이용한 진단¹³등의 연구가 이루어진 바 있다. 그러나 국내에 분포한 타이레리아 종에 대한 유전적 다형성에 대한 규명은 아직 이루어진 바 없고, Onuma(1998)등¹⁴에 의해 일본, 한국, 중국, 대만 등 동아시아지역에 분포한 *T. sergenti*의 MPSp(major piroplasm surface protein)gene에 대한 다형현상을 PFLPs 법으로 분석한 바 32kDa와 34kDa 단백질에 대한 유전적 변이(allelic variants)가 있음을 보고하였다.

백 등(2002)¹⁵은 전북지역 한우에서 발병한 타이레리아병을 치료하기 위하여 Diminazene aceturate을 투여한

후 *T. sergenti* type 분포와 이들의 소멸관계를 확인하고자 *T. sergenti*의 세포막단백질 중 32kDa와 33kDa의 생산에 관여하는 rRNA의 핵산물질을 이용 Allelic specific PCR방법으로 분석하였던 바, *T. sergenti*의 Buffeli type, Chitose type 그리고 Ikeda type이 동시에 검출되었고, 구충제 투여 후에는 Buffeli type과 Chitose type은 일정기간(7월) 출현하지 않았으나, Ikeda type은 전 시험기간에 걸쳐서 지속적으로 관찰되었으며, Chitose type은 치료 직후 소멸되어 그 이듬해까지 관찰되지 않음을 보고한 바 있다. 본 연구는 이 같이 치료후 각 type별 소멸 현상이 각기 다른 이유가 숙주의 면역반응과 어떠한 상관성이 있는지를 비교 분석하고자 국내에서 분리하여 보관 중인 표준 *T. sergenti* 항원 및 치료 전·후의 항원과 양성혈청 및 단 클론항체를 이용하여 western blot 실시하였다 바 32kDa 물질이 변화를 확인할 수 있었다. 이 물질은 향후 본 질병의 치료에 대한 효과 판정이나 약제 내성 관련 연구에 중요한 역할을 할 수 있음과 타이레리아 감염시 체액성 면역반응에 주된 역할을 하고 있는 것으로 판단되었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시험 동물

송아지 2두가 극심한 빈혈로 폐사된 전북산간 지역의 한우 목장에서 사육하고 있는 소 중에서 적혈구내 기생율이 30~60%이며, 다양 형태의 원충이 관찰된 송아지 5두를 선발하여 본 실험에 사용하였다.

2. Diminazene aceturate의 투여

2mg/체중 kg(Berenil, Hoechst)용량을 4두에 정맥 주사하였으며, 1두는 치료를 하지 않고 계속 방목하면서 대조 동물로 사용하였다.

3. 채혈과 적혈구 수집

3~4 개월령의 송아지 5 마리를 2000년 6월부터 2001년 5월까지 경정맥에서 채혈하여 Hematocrit로 빈혈소견을 관찰하였고, 혈청분리는 치료 전·후 매월 채혈하여 각기 1ml씩을 취하여 혼합, -70°C에 보관 사용하였다. 한편, 적혈구로부터 충체를 추출하기 위하여 매월 1회 씩 혜파린을 항응고제로 20 mL를 채혈하여 Baek 등(1990)⁹의 방법에 준하여 *T. sergenti* 세포막성 물질을 항원으로 준비하였고, 1989년 국내 소에서 분리한 원충 주를 비장적출 한우에 인공 감염시켜 항원으로 제조한 뒤 전북대 수의과대학에서 냉동보관(-70°C)중인 *T. sergenti* 표준항원을 각각 사용하였다.

4. Indirect Immunofluorescent Assay(IFIA)

치료 전·후의 혈청내의 항체 역가를 측정하기 위하여 40% 이상의 감염적혈구를 Tris buffer(pH 7.4)로 세척하고 슬라이드 글라스에 도말, -20°C에서 5분간 고정한 뒤 -70°C에 보관하여 IFA용 항원으로 사용하였다. 검사 혈청은 2 단계 계열 회석하여 습윤상자 하에서 30분간 실온에 반응시킨 뒤 Tris buffer(pH 7.4)로 3회 이상 세척하고 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-bovine IgG(KPL co.)를 1:2,000으로 회석하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 형광현미경(Olympus, BXFLA)으로 항원 항체의 반응 강도를 확인하였다.

5. SDS-PAGE와 Western blot

Diminazene aceturate을 투여한 후 적혈구내 *T. sergenti* type 별 출현 pattern을 관찰하고자, 치료 전(5두)과 치료 후(4 두)의 적혈구를 배 등의 방법⁹으로 준비하여 원심 침전물 0.5mL 량씩을 취하여 *T. sergenti* 세포막성 항원을 추출하였다. 항원 추출물은 Bradford(1976)법¹⁶으로 단백질 함량을 균일하게 조정하여 Laemmli 방법¹⁷으로 준비한 mini gel system(Bio-Rad co.)하에서 월별로 추출한 MPSP을 각 lane당 15μg씩 loading하여 전기영동을 수행하였다. Western blot은 일반적인 방법에 따라 실시하였고, 면역반응을 위해 IFA 항체 역가가 ≥1:2,560인 표준 양성혈청과 매월 분리한 혈청을 각각 1:200, 2차 항체는 phosphatase conjugated anti-bovine IgG(KPL co.)를 1:2,000으로 각기 회석하여 사용하였다. 매월 채혈한 적혈구내 충체의 세포막 항원성의 변화를 확인하고자 상기 방법에 의해 항원을 준비하여 SDS-PAGE한 후, *T. sergenti*의 세포막성 물질 중 32kDa와 33kDa에 해당하는 단 클론 항체를 Shirakata 등¹⁸(일본 북해도 수의과대학)으로부터 분양받아 이를 1:100으로 회석하여 사용하였고, phosphatase conjugated anti-mouse IgG(KPL co.)를 1:2,000으로 회석하여 2차 항체로서 사용하여 western blot를 실시하였다.

결 과

1. 적혈구내 기생충 감염율

2000년 6월부터 2001년 5월까지 매월 채혈한 혈액을 Giemsa 염색하여 적혈구내 기생율을 조사 하였던 바 Fig 1에서 보는 바와 같이 치료 전인 6월에는 평균 60% 이었으나, 치료 후인 7월에는 적혈구내 Dot 모양의 충체만이 드물게 검출되었으며, 기생율은 약 1% 이었다. 그리고 9월 이후부터 기생율은 약간 증가하였지만 전 시험 기간에 걸쳐 15% 수준을 일정하게 유지하여 부분적인

치료효과를 인정할 수 있었다. 그러나 대조 송아지에서 2000년 12월까지 약 30~40%의 기생율을 나타내었으나 2001년 1월 이후에는 점차적으로 감소되기는 하였으나, 20% 수준을 유지하고 있었다.

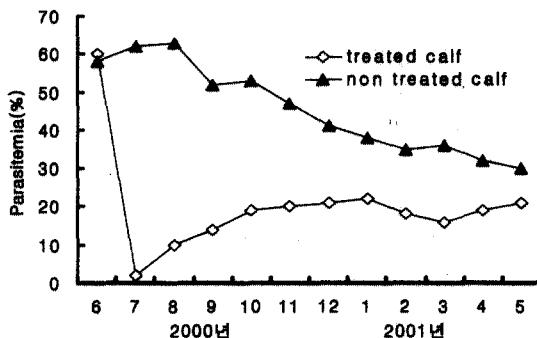


Fig. 1. Comparison of the prevalence rate of *T. sergenti* in red blood cell between treated calves with Diminazene aceturate and control calf.

2. IFA 항체 역가

치료 전·후에 채혈하여 분리한 혈청의 IFA 항체 역가를 측정하였던 바, Table 1과 같이 치료 전(6월)에는 ≥ 1:2,560이었으며, 점차적으로 감소되어 이듬해 3월에는 ≥ 1:160의 항체 가를 보여 표준 IFA 항원에 대한 강한 형광항체 반응을 나타내고 있어, 본 실험을 위해 매월 채혈한 항원이 *T. sergenti*인 것으로 확인하였고, 이를 근거로 western blot 반응 1차 항체로 사용하였다.

3. Western blot 결과

1) 치료 전·후의 혈청과의 면역 반응: 치료 전·후의 적혈구내 충체성 항원을 추출하여 SDS-PAGE하였던 바, 16, 23, 32, 33, 36, 38, 45, 49~116kDa의 물질들이 관찰되었으며, 치료 전(6월)의 항원과 치료 전 혈청과의 면역 반응에서는 Fig. 2(B)에서 보는 바와 같이 32kDa에서 특이하게 반응되었던 반면, 33kDa는 치료 직후(7월)에 오히려 강한 반응대를 나타내었고, 이는 다음 해인 3월까지도 그 반응을 계속 보였으나 강도는 매우 미약하였다. 반면, 치료 후 혈청과의 반응에서는 Fig. 2(C)에 나타난 바와 같이 6월 항원에서는 *T. sergenti* 주요 반응물질인 32kDa, 33kDa 등의 반응대가 미약하게 반응된 반면, 치료 후인 7월 항원과의 반응에서는 33kDa가 강한 반응을 보임으로써 이는 감염 후 치료에 따른 *T. sergenti*의 phase variation 현상이 나타난 결과로 해석되었다. 한편 전체적인 반응에서 치료 전의 감염 양성 혈청과의 immunoblot 반응 결과(Fig. 2(B))는 치료 후인 3월 혈청

(Fig. 2(C))에 비해 전체적인 반응 정도가 강하였고 32kDa에서 분명한 차이가 인정되었다.

2) 단 클론 항체에 대한 반응: 치료 전후의 적혈구 항원(6월, 7월 및 다음해 3월)을 SDS-PAGE 한 후, *T. sergenti* 주요 반응물질인 32kDa, 33kDa에 대한 단 클론 항체와 반응시 Fig. 2(B)에 나타난 바와 같이 6월 항원에서는 *T. sergenti* 주요 반응물질인 32kDa 물질에서 반응이 나타난 반면, 치료 후인 7월 항원과의 반응에서는 아주 미약한 반응을 보였고, 3월 항원에 대해서는 그 특이 반응대가 관찰되지 않았다. 한편 치료 전·후의 polyclonal 혈청과의 면역반응 때와는 달리 33kDa가 표준 *T. sergenti* 항원에서만 반응되었을 뿐 6월, 7월 및 3월 항원에서는 나타나지 않았다.

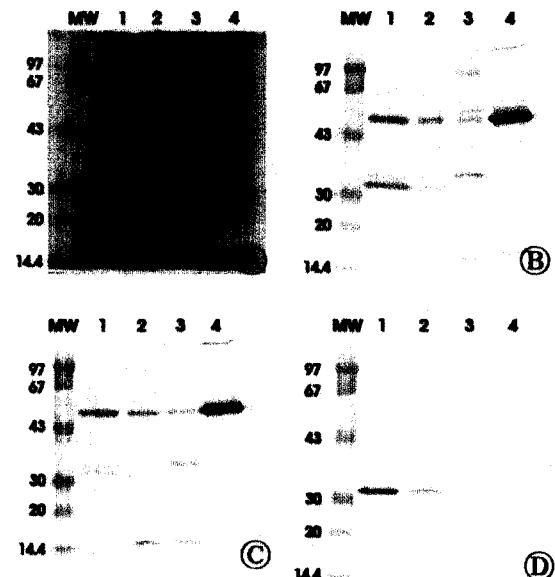


Fig. 2. SDS-PAGE(A) of *T. sergenti* antigen(1), crude lysate antigen of Jun(2), July(3) 2000 years and March(4) 2001 in field infected cattle products were stained with Comassie brilliant blue R-250. MW: molecular weight marker scale in kDa. Western blot analysis products were probed with polyclonal antiserum before Diminazene aceturate treatment(B), with anti-serum after Diminazene aceturate treatment(C) and with MoAb C9(Tp32)(D)

고 찰

우리나라의 소에서는 *T. sergenti*, *Babesia ovata* 그리고 *Anaplasma centrale* 등과 같은 주혈기생충 들이 단독 또

Table 1. The chronological reciprocal antibody titer by means of IFA in calves infected with *T. sergenti*

Month	2000		2001		
	June	July	October	January	March
Reciprocal antibody titer	≥ 1:2,560	≥ 1:1,024	≥ 1:640	≥ 1:160	≥ 1:160

는 혼합 감염되어¹, 유산, 체중·비유량 감소 등을 초래하여 양축 농가에 막대한 경제적 손실을 끼치는 중요한 질병으로 알려지고 있다^{2,3,4}. 이의 발병예방과 치료를 위하여 진드기 구제¹⁹, 항 원총성 치료제^{1,20,21} 그리고 체액성 면역형성 방법^{10,12}등이 연구되어지고 있으나, 현재 항 원총제를 이용한 치료가 보편적으로 이루어지고 있는 실정이다.

현재 타이레리아병의 원인체로는 12종이 있으며, 이의 분류는 형태학적, 지리학적, 매개 진드기 종류 등에 여러 가지에 근거하여 분류되고 있다. 최근에는 계통분류학이 발달함에 따라서 유전자 분석을 통한 분류가 이루어지고 있는 실정이다^{4, 22,23,24}. 국내에서는 *T. sergenti* 항원의 특성 및 면역원성^{3,9}, 특이 항원 polypeptide 구조 규명과 면역원성 시험^{10,11,12} 그리고 DNA probe을 이용한 진단¹³ 등에 관한 연구가 이루어진 바 있다. 한편 일본에서는 *T. sergenti*의 진단 분류에 단 클론 항체를 만들어 면역학적 연구를 수행한 바 있으며^{18,25}, *T. sergenti* 세포막성 32kDa와 33 kDa의 단백질을 생산하는 rRNA의 PCR primer sequence 결정, 제작하여 종의 계통 분류에 활용한 바도 있다^{4,14,24}. Mastuba 등^{23,24}은 *T. sergenti*의 감염시기 및 개체 동물별로 유전자의 변이에 의한 다소 차이가 있으며, 이를 충체의 혼합감염에 기인됨을 genomic DNA fragment(pTs)와 cDNA probe를 이용한 RFLPs로 분석한 바 있다. 이러한 차이는 *T. sergenti*의 진드기를 매개 곤충의 세포 내·외 발육 단계와 종숙주내에서의 무성 및 유성 증식²⁶, 다양한 형태의 생활사, 감염 적혈구의 적혈구막성 ganglioside와 총 지방결합, sialic acid 량의 변화와 같은 생화학적 특성²⁷과 숙주의 빈혈 유발과 merozoites의 적혈구내 침입에 작용하는 물질, 그리고 지속적인 감염에 따른 항원성 상승 등과 같은 특성들이 *T. sergenti*의 동정과 직·간접적으로 관계가 있을 것이다.

일본에 분포하고 있는 *Theileria* spp를 분류함에 있어서 유럽지역과 호주지역의 *T. buffeli* 과 *T. orientalis*의 충체내 veil 물질과 생화학적 성상을 상호비교 분석하였던 바 각기 서로 다른 차이가 인정되었으며²⁶, 충체의 유전자형을 분석에서도 다양한 종의 *T. sergenti*가 분포하고 있음을 보고한 바 있다^{27,28}. 일본에서는 여러 지역에서 얻은 충체별로 계놈상의 차이와 *T. sergenti*의 계놈 DNA 구조를 pUC-18에 삽입하여 얻은 probe를 ³²P 또는

비동위원소 물질을 이용하여 적혈구내 *T. sergenti*의 검출²⁸과 p32cDNA clone probe를 이용한 southern blot과 PCR에 의해 지역별 유전자 다양 현상이 있음을 관찰 보고한 바 있다^{23,24}. 국내에서는 *T. sergenti*의 계놈 DNA 구조를 동정하기 위한 연구는 이루어진 바 있지만^{13,29}, genomic diversity와 지역별 차이점을 구체적으로 밝히지 못하고 있는 실정이다.

우리나라와 일본에 분포하고 있는 *T. sergenti*의 세포벽 단백질을 형성하는 p33kDa 막성물질 생산에 관여하는 rRNA primer를 이용한 PCR은 기존의 Giemsa stain을 이용한 형태학적 특성을 기술하는 것 보다 특이성이 월등히 우수하여 진단에 활용될 수 있으며, 유전자에 대한 핵산과 아미노산 구조은 99.4%과 98.9%의 일치함이 보고된 바도 있다^{27,28}.

본 연구에서 치료 전 충체의 모습은 여러 가지 형태가 관찰되었지만 치료 후에는 dot 모양의 충체만이 관찰되고 있었고, 이는 Diminazene aceturate에 저항하는 형으로 판단되었으며 영양이 풍부한 미성숙 적혈구내에서는 주로 대형의 충체가, 분열 능력이 활발한 경우에는 소형(小型)이 관찰되고 있어 충체의 형태는 여러 가지 요인에 의하여 다양 형태가 출현함을 고려할 때 *T. sergenti*의 세포질막 물질 형성에 관여하는 rRNA type를 분석하는 일은 의미 있는 일이라 판단된다.

저자 등¹⁵은 방목하고 있는 송아지에서 타이레리아 감염을 확인한 뒤 Diminazene aceturate를 투여하고 매월 채혈하여 그 치료효과를 관찰하였던 바 적혈구내 기생율의 급격한 하락과 적혈구 수와 용적수치의 상승으로 치료 전에 비해 빈혈소견이 개선되었음을 확인하였고, rRNA primer로부터 얻은 핵산 물질을 상호 교차하여 Allele-specific PCR을 이용하여 유전자형을 분석하였던 바 임실군의 산간지역에 분포하고 있는 *T. sergenti*의 형은 Kakuda 등²⁷이 보고한 바 있는 Ikeda, Chitose, 그리고 Buffeli 형이 모두 검출되었으며, Universal Primer를 이용한 PCR에서도 모두 반응하는 특색을 나타내고 있었다. 이들 3가지 Type은 Diminazene aceturate를 투여 시 Ikeda 형을 제외하고 모든 type이 혈액에서 사라졌다가 다시 출현하는 특색을 나타내었는데 이는 여러 형이 혼합 감염되어 있기 때문으로 판단하였다. 한편, 치료 후 Chitose 형이 그 다음 해 2월까지 관찰되지 않음은 Chitose 형 감

염에 따른 면역항체가 Chitose형의 재 감염에 따른 체내 발육을 억제시킨 것으로 추정되었다. Chitose type과 Buffeli type 유전자는 함께 소멸되었다가 Buffeli type은 재출현하고 있었지만 Chitose type(825bp)의 PCR에서는 이의 증폭을 관찰할 수 없는 것으로 미루어 보아, Chitose type의 발육이나 재감염을 억제시킬 수 있는 면역항체 또는 IFN- γ 과 IL12 등의 작용에 따른 CD4+ 활성화에 의해 충체의 발육이 억제되었을 것이다.

더욱이 치료 전후의 적혈구로부터 추출한 충체막성 항원물질에 대한 *T. sergenti* 감염 양성혈청을 이용한 면역반응에서 32kDa, 33kDa 등의 반응대가 동일하게 출현하고 있었으나, 치료 후의 항원에서는 이를 반응대 물질 중에 32kDa 반응대가 관찰되지 않고 있어 이는 백 등¹⁵의 7월 이후 Allelic PCR에서 Chitose type의 primer에서 유전자가 증폭되고 있지 않았던 결과와 일치하였고, 다음해 3월의 적혈구내 충체성 항원과 반응에서는 반응이 되지 않았으나 DNA를 이용한 Allelic PCR에서는 출현하는 것으로 보아 이들 원충은 치료 후 현저히 감소되어 원충의 검출이 충분하지 않았기 때문이라고 사료되며, PCR에서의 DNA 증폭은 동절기를 지나서 소수의 진드기가 *T. sergenti*를 감염시킨 초기에 검출된 DNA 때문이라고 사료되었다. 또한 Chitose type이 출현하지 않음을 보건데 이는 앞에서 추론했던 바와 같이 감염 기생충에 대한 동형 항체(homologous antibody)에 의한 체액성 항체반응 때문으로 판단되며, 매월 적혈구로부터 추출한 항원에 대한 단 클론항체 면역반응에서도 6월의 항원에서는 32kDa에서 면역 반응대가 명확하게 확인되었지만 치료한 후에는 그 반응대가 미약하였다. 이 역시 allelic PCR에서 소량의 충체성 DNA를 증폭시킬 수 있었기 때문에 올 수 있는 차이점이라고 생각되며 western blot은 일부 예민한 방법으로 사용될 수는 있지만 적혈구내 충체성 항원을 검출하는데는 다소 난이 할 것으로 판단된다. 즉, 소의 적혈구내 기생율을 확인하는데 western blot을 사용하는 것은 그 민감도가 떨어지는 것으로 나타나고 있어 우리나라 소에서의 타이레리아에 의한 경제적 피해를 막기 위한 조기 진단 방법으로 allelic PCR의 활용이 바람직한 일이라 사료되었다. 한편, 치료 전과 후의 항원에 대한 western blot 결과 32kDa 물질에서 의미 있는 변화가 나타나고 있어 항후 이에 대한 정량적인 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

결 론

소 테이레이아 병으로 많은 피해를 당하고 있는 한우 목장의 4~5개월령 송아지 5두를 대상으로 매월 혈액

을 채취하여 적혈구 내의 원충감염율과 빈혈소견 등의 임상증상을 확인하고 본 실험에 사용하였다. 우선 indirect immunofluorescent assay(IF)을 수행 *T. sergenti* 감염에 대한 항체변화 추이를 확인한 뒤 Diminazene acetarate 치료 경과 별로 *T. sergenti*의 merozoite 표면항원성 물질인 32kDa polypeptide에 대한 변화를 관찰하였다. 즉, P32/33 MoAb와 polyclonal 항체를 이용한 western blot법으로 Diminazene acetarate 치료에 따른 효과를 조사하였던 바 표준 *T. sergenti* 항원을 SDS-PAGE 한 후 매월 채혈한 혈청과 표준양성 혈청과의 Western blot 반응에서 치료전의 혈청에서는 32kDa, 33kDa가 관찰되었으나 치료 후에는 32kDa가 나타나지 않았다. 한편, P32/33 MoAb를 이용하여 치료 전·후의 충체 항원의 변이를 Western blot으로 확인하였던 바, 치료 전 항원에서는 32kDa 물질만이 특이면역 반응을 나타내었고, 치료 후에는 *T. sergenti* 특이 항원성 반응물질이 확인되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 보아 Diminazene acetarate 치료 시 32kDa polypeptide가 Diminazene acetarate의 치료 전과 후에 각각 변화가 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 향후 본 질병의 치료 경과에 따른 효과 판정이나 약제 내성 관련 연구에 중요한 역할을 할 수 있음과 체액성 면역반응에 주체임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 서명득, 김배정, 이병도. 소의 파이로플라즈마병에 관한 연구. 농시보고, 13: 81, 1972.
2. 손재영, 유동열, 김교준. 경북지방에 수입된 Canada 산 유우의 *Piroplasma* 감염피해에 관한 조사보고 (II). 대한수의학회지, 12:59-66, 1972
3. 서명득, 장두환. 도입우의 진드기매개 주혈원충 감염상과 의 치료예방에 관한 연구. 한국수의공중보건 학회지, 6:33-57, 1982.
4. Fujisaki K, Kawazu S, Kamio T. The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. Parasitol Today, 10:31-33, 1994.
5. Uilenberg G, Perié NM, Spanjer AAM, et al. *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle: demonstration of the schizont stage. Res Vet Sci, 38:352-357, 1985.
6. 백병걸, 김병수, 이호일. 한우에 감염된 *Theileria sergenti* merozoite의 미세구조. 대한수의학회지, 30: 465-471, 1990.
7. 한태우. 우리나라 축우의 소위 piroplasma 병에 관한 연구. III. 소위 소형 piroplasma 원충의 전자현미경학

- 적 관찰. 가축위생연구소보, 14:103-107, 1971.
8. Onuma M, Kakuda T, Sugimoto C. *Theileria* parasite infection in east Asia and control of the disease. *Comparat Immunol, Microbiol & Infect Dis*, 21:165-177, 1998.
 9. 백병걸, 김병수, 이재구. 한우에 있어서 *Theileria sergenti*의 항원성에 관한 연구. 대한수의학회지, 30: 223-229, 1990.
 10. 백병걸, 정재명, 김병수. *Theileria sergenti* merozoite로부터 합성한 polypeptide vaccine의 예방효과. 대한수의학회지, 36:453-461, 1996.
 11. Baek BK, Kim BS, Rhim BM, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. III. Characterization of immunodominant peptides. *Kor J Parasitol*, 32:111-116 1994.
 12. Baek BK, Choi IH, Kim BS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. I. Protection against homologous stabilate challenge. *Kor J Parasitol*, 30: 133-140, 1992.
 13. 김명철, 이주목, 권오덕 등. *Theileria sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초 연구. 대한수의학회지, 33:479-486, 1993.
 14. Misao Onuma, Tsutomu Kakuda, Chihiro Sugimoto. *Theileria* parasite infection in East Asia and control of the disease. *Comp. Immuno. Microbiol. Infect. Dis*, 21: 165-177, 1998.
 15. 백병걸, 이영준, 김병수. Diminazene aceturate의 *Theileria sergenti* types에 대한 구충효과. 대한수의학회지, 42(2):261-268, 2002.
 16. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72:248-254, 1976.
 17. Laemmli, UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
 18. Shirakata S, Onuma M, Kirisawa R, et al. Localization of surface antigens on *Theileria sergenti* merozoite by monoclonal antibodies. *Jpn J Vet Sci*, 51:831-933, 1989.
 19. 강영배, 장항. 비장적출 송아지에 있어서 *Heamaphysalis longicornis* 진드기를 통한 *Theileria sergenti*감염증 인공 유발 시험. 농시보고, 31:48-53, 1989.
 20. 강영배, 김상희, 장항 등. *Theileria sergenti* 아외주에 대한 성상 조사: 접종 전 비우에 있어서의 혈액학적 소견 및 primaquine 처리 효과. 농시보고, 30:17-21, 1988.
 21. Purnell RE, Rae MC, Deuk SM. Efficacy of imidocarb dipropionate and primaquine phosphate in the prevention of tick-borne disease in imported Hereford heifers in South Korea. *Trop Anim Health Prod*, 13:123-127, 1981.
 22. Kubota S, Sgimoto C, Kakuda T, et al. Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. *Int J Parasitol*, 26:741-747, 1996.
 23. Mastuba T., Sugimotos C., Onoe S, et al. Changes in hybridization patterns of population of *Theileria sergenti* during infection. *Vet Parasitol*, 47:215-223, 1993.
 24. Mastuba T, Kuboto H, Tanaka M, et al. Analysis of a mixed parasite population by using cDNA probes encoding a major piroplasm surface protein of *Theileria sergenti*. *Parasitology*, 107:369-377, 1993.
 25. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. Monoclonal antibodies against intraerythrocytic merozoites(pioplasma) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci*, 49:697-702, 1987.
 26. Sugimoto C, Kawazu S, Kamio T, et al. Protein analysis of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasms by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology*, 102:341-346, 1991.
 27. Kakuda T, Kubota S, Sugimoto C, et al. Analysis of immunodominant piroplasm surface protein genes of benign *Theileria* parasites distributed in China and Korea by allele-specific polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 60:237-239, 1998.
 28. Kajiwara N, Kirisawa R, Onuma M, et al. Specific DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *Nippon Juigaku Zasshi*, 52:1199-1204, 1990.
 29. Kang SW, Choi EI, Kweon CH. Cloning and sequencing of p33 on a Korean isolate of *Theileria sergenti*. *Kor J Parasitol*, 35:105-110, 1997.