大韓獸醫學會誌(2003) 第43卷 第4號
Korea J Vet Res(2003) 43(4) : 677~681

*Neospora*응집반응을 이용한 네오스포라증의 혈청학적 진단

강민수 · 김재훈[1] · 황우석 · 남호우[2] · 윤희정 · 배종희[1] · 김대용*

서울대학교 수의과대학, [1]제주대학교 수의학과,
[2]카톨릭대학교 의과대학

(게재승인: 2003년 11월 18일)

Establishment of *Neospora* agglutination test for serologic diagnosis of neosporosis

Min-Soo Kang, Jae-Hoon Kim[1], Woo-Suk Hwang, Ho-Woo Nam[2], Hee-Jeong Youn, Jong-Hee Bae[1], and Dae-Yong Kim*

College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[1]Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
[2]Department of Parasitology and Catholic Institute of Parasitic Diseases, College of Medicine, Catholic University, Seoul 137-701, Korea

(Accepted: November 18, 2003)

Abstract : Currently, both the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) have been used to detect *Neospora caninum* antibodies. Several factors such as the buffers, the conjugate, the pattern of fluorescence, and the cross reactivity with other apicomplexan protozoan, may result in poorly correlated data. The present study was undertaken to develop and evaluate the *Neospora* agglutination test (NAT) for the detection and quantification of IgG antibodies to *N. caninum* from various animal species. Compared to the ELISA method, the NAT with a cutoff value of 1:512 gave a high index of coincidence (kappa=0.807) and no cross reactivity to *Toxoplasma gondii* antiserum. Hence, this NAT method, which did not require a species-specific secondary antibody and expensive tools, would be easily available for the detection of antibodies to *N. caninum* of various animal species.

Key words : *Neospora caninum*, *Neospora* agglutination test (NAT), serology, Korean dairy cattle, dog

서 론

*Neospora caninum*은 분류학상 Apicomplexa문 Coccidia아강, Sarcocystidea과에 속하는 원충성 기생충으로서 소에서 유산 또는 기형 송아지를 발생시키는 neosporosis의 원인체이다 [11]. 본 원충은 뇌척수염 및 근염을 나타낸 개에서 최초로 확인되어 알려지기 시작하였으며 [8] 이 외에도 염소 [7], 양 [12], 말 [16], 사슴[14] 등에서 자연발생 예가 확인되었다. 또한 고양이, 마우스, 돼지, 원숭이 등에서 실험감염 예가 보고되었다 [11]. *N. caninum*의 감염은 수직감염과 수평감염이 모두 이루어진다. 일부 숙주 동물에서 태반을 통한 감염이 증명되었으며, 소에서는 수직감염이 본 질병의 주된 감염경로로 알려져 있다 [11]. 개는 원충에 감염 또는 오염된 조직을 섭취함으로써 감염되며, 분변을 통하여 원충의 oocyst를 배설한다. 최근 개의 분변을 통하여 외계에 저항성을 갖는 oocyst가 배출되고 다시 재감염에 성공함으로써 개가 종숙주임이 밝혀졌다 [17].

소에서 네오스포라증은 거의 전 세계적인 발생분포를 나타내고 있다. 항체 보유율은 국가와 지역에 따라 다양

이 연구는 농림기술개발과제(399002-3) 및 Brain Korea 21의 지원하에 수행되었음

*Corresponding author: Dae-Yong Kim
Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: 82-2-880-1249, Fax: 82-2-879-2736, E-mail: daeyong@plaza.snu.ac.kr]

하게 나타나며, 일부 젖소목장에서는 80% 이상의 높은 항체 양성율을 나타내기도 한다 [11]. 임상증상은 주로 2개월령 이하의 송아지에서 나타나며, 주로 체중감소, 기립불능, 보행장해 등을 나타낸다 [11]. 성우에서는 거의 임상증상을 나타내지 않으며, 특히 선천적으로 감염되어 있으나 임상증상을 나타내지 않는 송아지의 경우 만성적인 감염으로 이행되기 때문에 본 질병에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다 [11].

국내에서는 임신 6개월령 젖소 유산태아에서 *N. caninum* 감염을 최초로 보고한 바 있으며, 동일한 어미 젖소에서 본 원충감염으로 인한 반복유산이 증명되기도 하였다 [1, 2]. 또한 간접형광항체 기법을 이용하여 전국적으로 젖소 목장에 대한 항체검사를 실시한 결과 약 20%에 달하는 높은 항체 양성율을 나타내고 있으며, 144두의 소 유산태아에 대하여 병리조직학적 검사와 PCR을 수행하여 16.7%의 유산 예가 네오스포라 감염에 의한 유산임이 밝혀졌다 [4, 5].

네오스포라증에 대한 혈청학적 진단법으로는 원충 tachyzoites를 이용한 간접형광항체법(IFA)(indirect fluorescent antibody test: IFA) [9, 13]과 원충의 다양한 항원 성분을 이용한 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) [6, 19]에 의한 검사 방법이 확립되어 있다. 그러나 소와 개를 제외한 실험동물 또는 야생동물에서는 두 가지 혈청학적 진단법의 활용에 제약이 따르는 실정이다. 따라서 본 연구는 톡소플라즈마증의 혈청학적 진단법으로 자주 활용되는 직접응집반응을 [10] 다소 변형시켜 동물의 종에 관계없이 적용할 수 있는 *Neospora* agglutination test (NAT) [18, 20]를 개발하고자 하였다. 또한 본 실험에서는 기존에 확립된 ELISA 기법과 NAT의 결과를 비교, 분석하여 여러 동물에서 특이성과 민감도가 높은 진단법으로 활용가능 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

NAT 항원의 준비

NAT의 항원으로는 *N. caninum* 국내 분리주 KBA-2를 사용하였으며, 원충은 Kim 등 [15]의 방법에 준하여 원숭이 신장 단층 세포인 Vero cell (CRL6318, ATCC, MD)에서 유지 계대하였다.

Vero cell의 약 80%가 감염되었을 때 cell scraper로 원충 tachyzoites를 수확하고 26게이지 바늘을 통과시켜 vero cell을 깨뜨린 다음 용액을 5 μm 필터로 통과시켜 세포 붕괴물을 제거하였다. 이 현탁액을 1,500×g에서 10분간 원심한 후 상층액을 제거하고 pellet을 인산완충액으로 세척한 다음 다시 원심을 하여 원충의 tachyzoites만을 분리하였다 [15]. 원충 pellet에 포르말린을 인산완충액으로 희석한 6% formaldehyde 용액을 가하여 부유시킨 다음 4°C에 하룻밤 지난 다음 1,500×g에서 10분간 원심을 걸어 포르말린을 제거한 뒤 다시 멸균 인산완충액으로 세척 및 원심을 3회 반복하여 고정된 원충만 분리하였다. 원충 pellet에 알카리성 완충액 (NaCl 7.02 g, H_3BO_3 3.09 g, 1N NaOH 24 m*l*, horse serum [HS] albumin [fraction V] 4 g, eosin Y 50 mg, 0.1% sodium azide, 멸균 증류수로 1 *l* 제작, pH 7.8)을 가하여 부유시킨 후 최종 원충 tachyzoites의 수가 4×10^4/μ*l*가 되도록 희석하여 4°C에서 보관한다.

혈청의 준비

혈청시료는 최근 2001~2002년 사이에 의뢰되었던 시료 중 Bae 등 [6]의 ELISA 기법으로 검사하여 양성으로 판명된 31개 혈청과 음성으로 판명된 43개 혈청 등 총 74개 혈청 시료를 무작위로 선정하였다. 모든 혈청을 PBS로 8배 희석하여 검사 시료를 준비하였다. 대조군으로 소와 개의 양성대조, 음성대조 혈청 및 Toxoplasma 양성 혈청(VMRD, USA)은 따로 준비하여 실험에 이용하였다.

NAT 검사 방법 및 판독

NAT 기법과 기존에 확립된 ELISA 기법으로 소 혈청 74점에 대하여 혈청검사를 동시에 실시하여 NAT 기법의 유용성을 검증하였다.

혈청에 대한 ELISA 검사는 Bae 등 [6]의 방법에 준하여 실시하였으며, ELISA 판독기 (Dynatech Lab. Inc. Chantilly, VA, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. NAT 검사를 위하여 V-bottom 96well microtiter plate에 검사할 혈청을 25 μ*l* 씩 분주한 후 2진 희석하였다. 각각의 well에 0.2M 2-mercaptoethanol을 25 μ*l* 씩 분주하고, 준비된 원충 항원을 50 μ*l* 씩 분주하여 잘 섞어준 뒤 37°C, 5% CO_2 배양기에서 하룻밤 정치시킨 후 판독하였다. 각각의 마이크로 플레이트에서 2 구멍은 양성 및 음성 대조로 활용하였다.

NAT에 대한 결과 판독은 각 well의 전반에 걸쳐 미만성으로 퍼진 확장된 불투명한 물질이 관찰될 경우 양성으로 판정하였으며, 중심부 또는 바닥에 불연속적인 물질이나 점으로 보이면 음성으로 판정하였다.

결 과

양성과 음성 개 및 소 혈청 그리고 Toxoplasma 양성 혈청을 이용하여 NAT의 cutoff 치를 결정하였다. 본 실험에서 응집 반응의 양성과 음성의 특이성과 민감도를

Table 1. Comparison of IgG antibody to *N. caninum* obtained using the enzyme linked immunosorbent assay and the Neospora agglutination test at the cutoff value of 1:512

Groups		The results of ELISA		Total
		+	−	
The results of NAT	+	28 (a)	4 (b)	32 (p1)
	−	3 (c)	39 (d)	42 (q1)
Total		31 (p_2)	43 (q_2)	74

Kappa value $K=2(ad-bc)/(p_1q_2+p_2q_1)=0.807$

Table 2. Comparison of IgG antibody to *N. caninum* obtained using the ELISA and the NAT at the cutoff values of 1:256 and 1:1024

Groups		The results of ELISA at the cutoff value of 1:256		The results of ELISA at the cutoff value of 1:1,024	
		+	−	+	−
The results of NAT	+	30	15	16	2
	−	1	28	15	41

가장 잘 나타내고 있는 1:512 희석배율을 cutoff 역가로 판단하여 결과를 도출하였다.

본 실험실에서 이미 확립된 ELISA 기법과 새롭게 개발하고자 하는 NAT 기법을 이용하여 소 혈청 74점에 대하여 각 기법의 혈청검사 결과를 비교 분석하였다. 두 가지 혈청검사 방법으로 양성 또는 음성으로 일치하는 결과를 나타낸 경우와 그렇지 못한 경우를 비교하였다. NAT 기법으로 cutoff 값이 1:512일 때 ELISA에서 양성인 31개 소 혈청 중 NAT에서도 양성인 개체는 28개로 나타났으며, ELISA 음성 혈청 43개 중 NAT 음성인 개체는 39개로 나타나 매우 높은 일치율을 보여주고 있었다(Table 1). 각 검사법의 판정일치도를 분석하기 위하여 kappa 치를 이용하여 두 가지 혈청검사 결과를 비교 분석하였다. NAT cutoff 값 1:512의 경우에는 0.807의 kappa 치를 나타내어 cutoff 값 1:256 및 1:1024일 경우의 0.582 및 0.499에 비하여 높은 수준으로 확인되었다(Table 2).

고 찰

현재까지 neosporosis의 진단을 위해서는 유·사산이 발생한 젖소목장의 어미소에 대한 혈청검사와 유산된 태아조직에 대한 병리조직학적 검사가 반드시 필요하다. 혈청검사의 방법으로는 ELISA와 IFA가 가장 많이 쓰이고 있으며, 이 중 neospora항체 양성율 검사 및 혈청 역학 검사를 위해서는 IFA 기법이 보편적으로 사용되고 있는 실정이다 [5, 11].

그러나 IFA의 경우 검사하고자 하는 숙주 동물의 항체에 대하여 형광이 부착된 2차 항체가 반드시 필요하다. 또한 IFA 마이크로 플레이트 제조 시 사용된 항원의 상태, 항원의 고정 방법에 따라 판독이 달라질 수 있고, tachyzoite에서 발현하는 형광을 판단할 수 있는 숙련이 필요로 한다. ELISA 기법의 경우 대량의 혈청 검사에 용이하다는 장점은 있으나, 항원으로 사용된 부위 및 conjugate의 성상과 질에 따라 결과가 달라질 수 있다. 또한 두 가지 방법 모두 conjugate의 반응 시간과 농도를 설정하기 위한 기초 실험 단계가 있어야만 한다. 게다가 neospora와 유사한 apicomplexa 문에 속하는 *Sarcocystis cruzi*를 인공감염 시킨 동물의 혈청에서 IFA 및 ELISA 공히 비특이 반응이 관찰되는 문제점이 제시되었다 [13]. 따라서 여러 가지 동물의 자연 감염 또는 인공감염의 검사에 폭 넓게 활용할 수 있고 손쉽게 적용 가능한 혈청검사 기법이 절실한 상황이다.

원충성 질병에 있어서 응집 반응은 기본적으로 포르말린으로 불활화된 원충이 원충 특이 면역 글로불린을 응집하는 원리를 이용한 방법이다. Desmonts와 Remington [10]은 *Toxoplasma gondii* 항체를 검출하기 위한 변형된 직접 응집 검사법을 개발하였으며, 이 방법은 민감도와 특이성을 증진시키기 위하여 다소 변형되고 반응을 좀 더 쉽게 확인하기 위하여 다양한 염색약이 활용되면서 여러 나라에서 킷트로 개발되어 시판하고 있고 이를 통하여 모든 종의 동물에서 연구 목적으로 또는 사람의 감염을 확인하는 검사법으로 폭 넓게 사용되고 있다.

본 연구에서는 국내 분리 *N. caninum* 원충주 KBA-2를 이용하여 *T. gondii* 응집반응을 다소 변형시킨 NAT 기법을 확립하였다. 특히 apicomplxa 문에 속하는 다른 원충과의 교차반응 여부를 검사한 결과, 국내에서 사람과 동물에 많이 발생하고 있는 톡소플라즈마 감염증과 교차반응이 매우 적음을 확인할 수 있었다. 이는 여러 원충을 토끼, 랫드 및 면양에 실험감염 후 NAT를 실시하여 상당히 낮은 교차반응이 나타남을 증명한 Romand 등[20]의 결과와 유사하였다. 두 가지 실험 방법에 따른 판정일치도 분석에 통상적으로 사용되는 kappa 값에 대한 해석은 0.75 이상이면 일치도 매우 좋음, 0.45 이상 0.75 미만이면 일치도 좋음, 0.45 미만이면 일치도 낮음으로 판정한다 [3]. 본 실험에서 NAT 기법 cutoff value 1:512에서 kappa 값은 0.807로 나타나 매우 좋은 일치도를 보여주고 있었다. 본 연구를 통하여 확립된 NAT 기법은

알칼리 완충액에 함유된 2-mercaptoethanol이 IgM 항체를 파괴하기 때문에 IgG 항체만을 검출할 수 있다. 일반적으로 *T. gondii* 또는 *N. caninum*에 감염되면 첫 2주 중에 IgG가 혈중에 나타나기 때문에 NAT 기법이 네오스포라증의 혈청학적 진단효율에 큰 영향을 미치는 않는 것으로 사료된다. NAT 검사 결과와 ELISA 결과를 비교하였을 때 매우 높은 일치도를 보여 주었으며, 동시에 유의성 있는 cutoff 치를 정할 수 있었다. 다른 연구자들의 cutoff 값 (1:40~1:160)에 비하여 본 실험에서는 비교적 높은 1:512로 나타난 바, 이는 U자형 96 구멍 마이크로 플레이트를 쓰지 않고 적은 양의 항체에도 응집반응을 관찰할 수 있는 V자형 96 구멍 마이크로 플레이트를 사용하였기 때문으로 판단된다. NAT 검사를 수행함에 있어 한 가지 단점으로는 다량의 혈청 시료를 검사하기 위해서는 많은 양의 항원을 확보해야 한다는 점이다. 이는 본 실험과 같이 세포배양을 통하여 항원을 확보하는 대신에 *T. gondii*의 경우처럼 마우스의 복강내 원충을 접종하여 항원을 수거함으로써 극복되어 질 수 있으리라 사료된다.

NAT 기법은 특별한 이차항체 또는 conjugate가 필요치 않고, 형광현미경이나 ELISA 판독기와 같은 고가의 장비를 요구하지도 않으며, 혈청 진단의 표준화에 소요되는 시간도 절약되는 장점을 가지고 있다. 따라서 종숙주 또는 중간숙주의 역할이 가능한 야생 육식 및 초식동물에 대한 혈청 검사 뿐만 아니라, *N. caninum*의 실험동물 모델 개발 등 다양한 실험 목적에 맞게 응용될 수 있는 효과적인 혈청검사 방법으로 사료된다.

결 론

NAT 기법을 이용하여 *N. caninum*에 자연 감염된 소의 혈청으로 혈중 IgG를 검색하는 기법을 확립하였다. 기존에 확립된 ELISA와 비교하여 볼 때 NAT 기법으로 cutoff 값이 1:512일 때 매우 높은 판정일치도를 나타내었으며, *T. gondii* 양성 혈청과는 교차반응을 나타내지 않았다. 따라서 본 혈청검사 기법은 여러 동물의 *N. caninum* IgG를 검출함에 있어 특이적이며 다른 혈청검사에 비해 저렴하고 실험방법과 결과판독이 용이할 뿐만 아니라 적은 실험 장비로 여러 종의 야생동물 등을 검사할 수 있는 효과적인 방법이라 사료된다.

참고문헌

1. **김대용, 황우석, 김재훈, 허권, 황의경, 이병천, 진영화, 이재진, 최상호.** *Neospora*에 의한 소 유산 발생. 대한수의학회지. 1997, **37**, 607-612.
2. **김재훈, 황의경, 손현주, 진영화, 윤순식, 김대용.** *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. 대한수의학회지. 1998, **38**, 853-858.
3. **안윤옥, 유근영, 박병주.** 실용의학통계론. pp. 143-146, 서울대학교 출판부. 서울. 1996.
4. **이중근, 김재훈, 김진현, 이병천, 황우석, 윤희정, 남호우, 진영화, 김대용.** 파라핀 블록 PCR을 이용한 소 네오스포라 감염증의 진단법 확립. 대한수의학회지. 2001, **41**, 381-385.
5. **허권, 김재훈, 황우석, 황의경, 진영화, 이병천, 배지선, 강영배, Yamane, I., 김대용.** 간접형광항체법을 이용한 국내 젖소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청학적 연구. 대한수의학회지. 1998, **38**, 859-866.
6. **Bae, J. S., Kim, D. Y., Hwang, W. S., Kim, J. H., Lee, N. S. and Nam, H. W.** Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. Korean J. Parasitol. 2000, **38**, 245-249.
7. **Barr, B. C., Anderson, M. L., Woods, L. W., Dubey, J. P. and Conrad, P. A.** *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. J. Vet. Diagn. Invest. 1992, **4**, 365-367.
8. **Bjerkas, I., Mohn, S. F. and Presthus, J.** Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 1984, **70**, 271-274.
9. **Conrad, P. A., Sverlow, K. W., Anderson, M. L., Rowe, J. D., BonDurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A. A., Dubey, J. P., Duhamel, G. and Barr, B.** Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. J. Vet. Diagn. Invest. 1993, **5**, 572-578.
10. **Desmonts, G. and Remington, J. S.** Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. 1980, **11**, 562-568.
11. **Dubey, J. P.** Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet. Parasitol. 1999, **84**, 349-367.
12. **Dubey, J. P., Hartley, W. J., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.** Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J. Parasitol. 1990, **76**, 127-130.
13. **Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gay, J. M., Baszler, T. V., Blagburn, B. L. and Thulliez, P.** Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am. J. Vet. Res. 1996, **57**, 329-336.
14. **Dubey, J. P., Rigoulet, J., Lagourette, P., George, C., Longeart, L. and LeNet, J. L.** Fatal transplacental

neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). J. Parasitol. 1996, **82**, 338-339.

15. **Kim, J. H., Sohn, H. J., Hwang, W. S., Hwang, E. K., Jean, Y. H., Yamane, I. and Kim, D. Y.** *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. Vet. Parasitol. 2000, **90**, 147-154.
16. **Marsh, A. E., Barr, B. C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R. and Conrad, P. A.** Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1996, **209**, 1907-1913.
17. **McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A. and McGuire, A. M.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 1998, **28**, 1473-1478.
18. **Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A., Loomis, E. F., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Marsh, A., Cray, C. and Barr, B. C.** A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998, **5**, 467-473.
19. **Paré, J., Hietala, S. K. and Thurmond, M. C.** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1995, **7**, 352-359.
20. **Romand, S., Thulliez, P. and Dubey, J. P.** Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol. Res. 1998, **84**, 50-53.