

한우와 젖소에서 PCR을 이용한 혈액내 *Neospora caninum* 검출

이상은^{1,2} · 이정연^{1,*}

¹충남대학교 동물위과학연구소

²국립보건연구원 질병관리본부

(게재승인: 2008년 4월 3일)

Detection of *Neospora caninum* in the blood of Korean native cattle and dairy cows using PCR

Sang-Eun Lee^{1,2}, Jung-Youn Lee^{1,*}

¹Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Korea Centers for Disease Control and Prevention, Seoul 122-701, Korea

(Accepted: April 3, 2008)

Abstract : This study was performed to detect *Neospora caninum* in blood of 61 Korean native cattle and 50 dairy cows in Chungnam province. All of them were healthy and did not show any clinical signs. DNA was isolated from blood samples and a 328 bp fragment was amplified by PCR using primer pair Np21 and Np6. The PCR positive rate was 14.8% in Korean native cattle and 0% in dairy cows. Cows with 15.6% were a little higher than bulls with 12.5% in gender. The detection rate of over 3-year-old Korean native cattle was 28.6% in age. The results demonstrate that *N. caninum* DNA can be detected in blood by PCR. PCR analysis in blood may be useful to annually screening test for *N. caninum* infection in clinically healthy cattle.

Keywords : blood, Korean native cattle, *Neospora caninum*, PCR

서 론

개에서 최초로 확인되고 분리된 *Neospora(N.) caninum* 은 분류학상 Apicomplexa문 Coccidia아강, Sarcocystidea 과에 속하는 원충성 기생충으로서 개와 소에서 주로 신경증상과 유산을 일으키는 것으로 지금까지 염소, 양, 말, 사슴, 고양이 및 야생쥐 등에서 감염이 보고되었고 [8, 11-13, 15, 16, 20], 전 세계적인 발생분포를 나타내며, 항체 보유율은 국가와 지역에 따라 다양하게 나타난다 [10].

N. caninum 감염을 진단하기 위한 혈청학적 진단법으로는 효소결합면역진단법, 간접형광항체법 및 네오스포라응집반응 등이 확립되어 있으며 [1, 4, 10], 부가적으로 감염조직이나 혈액, 정액 및 우유 등에서 PCR 등을

이용한 *N. caninum*의 DNA를 검출하는 방법이 이용되고 있다 [10, 14, 15, 21, 25]. 최근에는 *N. caninum*의 병인론적인 연구가 다양하게 진행되고 있는데, O'Handley 등 [24]은 양에 대한 실험적 감염을 통해 혈액내 *N. caninum*을 분리해냈고, Okema 등 [26]은 유산된 소에서 시간이 갈수록 혈액내 *N. caninum* DNA 농도가 줄고, 임신한 소에서는 시간이 갈수록 혈액내 *N. caninum* DNA 농도가 증가한다고 보고한 바 있다. 그러나 국내에서는 무증상인 소의 혈액에서 PCR을 이용한 *N. caninum* 검출 screening 검사가 시도된 바가 없고, 향후 국내 네오스포라증의 병인론적 연구를 위한 기초자료로 이용하기 위해서 외관상 건강한 한우와 젖소를 무작위로 선정하여 PCR을 이용해 혈액에서의 *N. caninum*을 검출해 보고자 하였다.

*Corresponding author: Jung-Youn Lee

Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[Tel: +82-2-869-7582, Fax: +82-2-869-7583, E-mail: visionalive@hanmail.net]

Table 1. The detection rate of *Neospora caninum* using PCR in Korean native cattle and dairy cows in Chungnam province

	Korean native cattle			Dairy cow		
	NE*	NP†	PR‡ (%)	NE*	NP†	PR‡ (%)
Sex						
Cows	45	7	15.6	50	0	0
Bulls	16	2	12.5	-	-	-
Age						
< 3	40	3	7.5	36	-	0
> 3	21	6	28.6	14	-	0
Total	61	9	14.8	50	0	0

*NE: number of examined, †NP: number of positive, ‡PR: positive rate

재료 및 방법

샘플링, DNA 추출 및 PCR

금산과 공주 지역 한우목장의 한우 61두와 성환 지역 젖소목장의 젖소 50두를 무작위로 선정하여 경정맥에서 혈액을 채취한 후, DNA extraction kit(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 사용설명서의 지시대로 DNA를 추출하였다. 본 연구에 사용된 *N. caninum* 양성검체는 국립수의과학검역원에서 분양받은 약 3.125×10^2 개의 tachyzoites로서 DNA extraction kit(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 농도는 28.5 ng/1이었다(Qubit Fluorometer; Invitrogen Co., USA). 혈액내 *N. caninum* DNA를 확인하기 위한 primer로서 NP6 5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'와 NP21+ 5'-CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC-3'를 사용하였으며 [23, 25], PCR 조건은 94°C에서 1분간 DNA를 완전히 해리시킨 후, 94°C 1분, 63°C 1분, 74°C 3분을 40회 반복한 후 최종적으로 72°C 10분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 증폭여부를 검사하였다.

결 과

금산과 공주 지역 한우목장의 한우 61두와 성환 지역 젖소목장의 젖소 50두를 무작위로 선정하여 PCR을 이용한 혈액내 *N. caninum*을 검출한 결과는 다음과 같다.

PCR 양성을 보인 개체는 한우에서 성별로는 암소는 15.6%(7두/45두), 수소는 12.5%(2두/16두)를 나타내어 암소가 다소 높은 검출율을 보였고, 연령별로는 3세 이하에서 7.5%(3두/40두), 3세 이상에서 28.6%(6두/21두)를 나타내었다. 한우에서의 평균 검출율은 14.8%(9두/61두)였다. 한편 젖소에서는 50두 모두 음성을 나타내었다(Table 1).

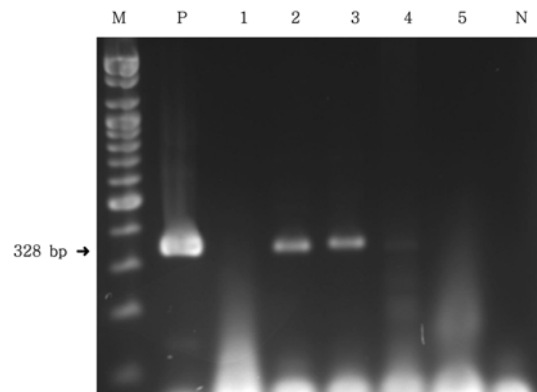


Fig. 1. Detection of *Neospora caninum* DNA in blood of Korean native cattle. The amplified 328 bp product was subjected to electrophoresis in 2% agarose gel. M: 100 bp maker; P: positive control; Lane 1: negative; Lanes 2-4: positive; Lane 5: negative; N: negative control.

고 찰

현재까지 네오스포라증은 대부분 소의 유사산이 나타날 경우에 해당 암소와 수소에 대해 간접형광항체법, 면역효소형광항체법 등의 혈청검사와 유·사산된 태아조직에 대한 병리조직학적 검사가 주로 활용되고 있다 [4, 10]. 국내에서도 주로 간접형광항체법을 실시하여 *N. caninum* 항체 양성률과 유사산태아 조직의 병리조직검사를 통해 종합적인 진단을 내리고 있다 [1-3, 5-7]. 그러나 Dubey [10]는 병변에 대한 면역조직화학염색법과 면역효소형광항체법이나 간접형광항체법 등의 혈청학적 진단법이 임신기간과 감염원에 대한 노출 정도, 감염기간 및 유산 등에 따라 민감성이 떨어지며, 특히 만성적인 감염 동물에서 더욱 불확실하다고하여 부가적으로 병변조직, 정액 및 혈청 등에서 PCR을 이용한 *N. caninum*

DNA를 검출해내어 실질적인 감염여부를 확인해야 한다고 보고하였다 [21, 27]. *N. caninum*을 PCR로 검출하기 위해서는 다양한 primer가 있지만 [25, 26, 30], 이중 NP6와 NP21+ primer는 *N. caninum*의 Nc5 단편을 증폭시키는 특이 primer로서 민감성이 높다고 보고된 바 있다 [17, 19, 30]. 이번 연구에서도 NP6와 NP21+ primer를 사용하여 328 bp의 특이 증폭산물이 관찰되어 혈액내 *N. caninum*이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

한편 이번 연구 결과와 직접적으로 비교할 수 없지만, 이번 연구에서 한우의 혈액내 *N. caninum* 검출율 14.8%(9/61)는 허 등 [6]이 보고한 충남지역 사육 한우의 항체 양성율 47.8%(11/23) 보다 낮았고, 황 등 [7]이 보고한 강원도내 한우의 항체 양성율 17.9%(145/868)와는 비슷하였으며, 김 등 [18]이 보고한 충남지역 한우 항체 양성율 8.9%(11/123) 보다는 높았다. 이러한 항체 양성율과 혈액에서의 *N. caninum* 검출율이 다양한 이유는 검사두수의 차이 뿐 만 아니라 조사 대상지역의 *N. caninum* 분포율, 한우 사육환경의 차이, 소의 성별 및 연령 등 개체에 따른 차이도 원인이 될 수 있을 것으로 사료된다. 성별로는 황 등 [7]이 암소(19.6%)가 수소(17.3%)보다 다소 높았다고 보고한 바와 같이, 이번 결과에서도 암소(15.6%)가 수소(12.5%)보다 다소 높게 나왔으며, 황 등 [7]은 그 원인을 암소의 나이가 평균 2세가 많았던 것과 연관성이 있다고 하였다. 이번 연구에서도 3세 이상에서 28.6%(6/21)의 양성율을 보인 것으로 보아 *N. caninum*은 연령이 높을수록 감염율이 높은 것으로 판단된다. 그러나 3세 이하 검사두수가 3세 이상 검사 두수보다 약 2배 많으므로 검사두수의 차이가 양성율에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 한편 대부분 *N. caninum* 항체 양성율이 젖소에서 높다고 보고되었으나 [6, 22, 28], 이번 연구에서는 젖소가 모두 음성을 보였는데, 이는 목장 주위에 개 등의 전파체가 없거나 *N. caninum* 감염관리 및 정기 건강검진 등 다른 목장과 차별화된 사육환경 때문일 것으로 사료된다. 따라서 앞으로 *N. caninum*에 대한 감염율을 조사할 때에는 반드시 사육환경에 대한 연구도 포함되어야 할 것으로 판단된다.

서론에서도 언급하였듯이, 최근에는 체내에서 *N. caninum*의 정량화에 대한 연구가 진행되고 있는 바, O'Handley 등 [24]과 Serrano-Martinez 등 [29]은 수소와 양에서 *N. caninum* oocysts의 실험적 감염 후 임상증상은 관찰되지 않았지만, 기간에 따라 혈액으로부터 *N. caninum*이 검출된다고 보고하였으며, Okeoma 등 [25]과 Ferre 등 [14]도 혈청검사 양성인 수소와 암소에서 모두 혈액내 *N. caninum*을 검출했다고 보고한 바 있다. 그러나 이번 연구에서는 혈청검사 및 유사산 여부 등의 병력을 배제하였기 때문에 직접 비교할 수는 없지만,

Okeoma 등 [25]이 혈액내 *N. caninum*의 검출은 뇌, 정액, 척수 등의 신체조직에서와 같이 실질적인 감염의 증거라고 보고한 바와 같이, 이번 연구 결과 *N. caninum* 양성 검체 9두 모두 임상증상은 관찰되지 않았고 외관상 건강하였지만, 실질적으로 *N. caninum*에 감염되었을 것으로 사료된다. 하지만 앞으로의 연구에서 많은 두수를 대상으로 개체별 유사산 등의 병력을 포함한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

이 질병에 대해서 아직까지 유효한 예방약이나 치료제가 개발되어 있지 않기 때문에 항체검사나 PCR 검사 양성반응을 나타낸 소는 신속히 격리 후 도태시키고, 이 원충을 전파시키는데 중요한 역할을 하는 개가 소와 접촉하는 것을 차단하며, 그 밖에 야생동물의 분비물로부터 사료나 물 등의 사육환경이 오염되지 않도록 해야 할 것이다 [4, 10]. 또한 이 질병의 지속적인 전파를 차단하기 위해 향후 백신 연구를 비롯한 소와 개 및 야생 동물에 대한 역학조사 및 상관성 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

금산 및 공주 지역 한우목장과 성환 지역 젖소목장에서 무작위로 채취한 61두의 한우와 50두의 젖소 혈액에서 *N. caninum*을 검출하기 위하여 NP21+과 NP6 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과는 다음과 같았다.

한우의 혈액에서 14.8%의 *N. caninum* 검출율을 나타내었으며, 젖소는 모두 음성을 나타내었다. 성별간에는 암소(15.6%)가 수소(12.5%)보다 다소 높은 검출율을 나타내었으며, 연령간에는 3세 이상의 한우에서 높은 검출율(28.6%)을 나타내었다.

이상의 결과로 보아, 혈액내 *N. caninum* DNA가 검출되므로서 실질적으로 *N. caninum*에 감염되었다고 판단되며, 향후 소의 *N. caninum* 감염여부를 정기적으로 스크리닝하는데 혈액을 이용한 PCR 검사법이 유용할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 강민수, 김재훈, 황우석, 남호우, 윤희정, 배종희, 김대용. *Neospora* 응집반응을 이용한 네오스포라증의 혈청학적 진단. 대한수의학회지 2003, **43**, 677-681.
2. 김대용, 황우석, 김재훈, 허권, 황의경, 이병천, 진영화, 이재진, 최상호. *Neospora*에 의한 소 유사산 발생. 대한수의학회지 1997, **37**, 607-612.
3. 김재훈, 황의경, 손현주, 진영화, 윤순식, 김대용. *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. 대한수의학회지 1998, **38**, 853-858.

4. 이재구, 김현철, 유명조. 최신수의기생충학. 제3판. pp. 567-574, 나눔의 집, 서울 2007.
5. 허권, 김재훈, 황우석, 황의경, 진영화, 이병천, 배지선, 강영배, 산근일량, 김대용. 간접형광항체법을 이용한 국내 젓소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청역학적 연구. 대한수의학회지 1998, **38**, 859-866.
6. 허인, 김영진, 김희, 허진희, 박일규, 강승원, 정우석. 소에서 *Neospora caninum*에 대한 항체가 조사, 한국가축위생학회지 2001, **24**, 9-14.
7. 황의경. 강원도 사육 한우에서 *Neospora caninum*에 대한 항체양성률 조사. 대한수의학회지 2003, **43**, 283-288.
8. Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA. Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. J Vet Diagn Invest 1992, **4**, 365-367.
9. Cho JH, Chung WS, Song KJ, Na BK, Kang SW, Song CY, Kim TS. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. Korean J Parasitol 2005, **43**, 19-25.
10. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 2003, **41**, 1-16.
11. Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J Parasitol 1990, **76**, 127-130.
12. Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am J Vet Res 1996, **57**, 329-336.
13. Dubey JP, Rigoulet J, Lagourette P, George C, Longeart L, LeNet JL. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). J Parasitol 1996, **82**, 338-339.
14. Ferre I, Aduriz G, del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. Theriogenology 2005, **63**, 1504-1518.
15. Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuglio A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. Vet Parasitol 2007, **148**, 346-349.
16. Jenkins MC, Parker C, Hill D, Pinckney RD, Dyer R, Dubey JP. *Neospora caninum* detected in feral rodents. Vet Parasitol 2007, **143**, 161-165.
17. Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl JMO, Trees A, Gottstein B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. Mol Cell Probes 1996, **10**, 289-297.
18. Kim JH, Lee JK, Hwang EK, Kim DY. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. J Vet Med Sci 2002, **64**, 941-943.
19. Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1999, **29**, 1583-1587.
20. Marsh AE, Barr BC, Madigan J, Lakritz J, Nordhausen R, Conrad PA. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J Am Vet Med Assoc 1996, **209**, 1907-1913.
21. McInnes LM, Ryan UM, O'Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. Vet Parasitol 2006, **142**, 207-213.
22. Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet Parasitol 2002, **107**, 303-316.
23. Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. J Clin Microbiol 1996, **34**, 2850-2852.
24. O'Handley R, Liddell S, Parker C, Jenkins MC, Dubey JP. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. J Parasitol 2002, **88**, 1120-1123.
25. Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie L. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. Vet Parasitol 2004, **122**, 307-315.
26. Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE. *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. Exp Parasitol 2005, **110**, 48-55.
27. Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. Vet Parasitol 2003, **117**, 301-308.
28. Osawa T, Wastling J, Acosta L, Ortellado C, Ibarra J, Innes E. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. Vet Parasitol 2002, **110**, 17-23.

29. **Serrano-Martínez E, Ferre I, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM.** Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 2007, **67**, 1175-1184.
30. **Yamaga M, Flechtner O, Gottstein B.** *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol* 1996, **82**, 272-279.