

新生 송아지에 있어서 Theileria sergenti의 感染에 관한 研究

이우종, 이성식, 이재구, 백병걸*
京畿道 家畜衛生試驗所 西部支所, 全北大學校 獸醫科大學*

Study on Infection of Theileria Sergenti in Neonatal Calves

Woo-Jong Lee, Sung-Sik Lee, Jae-Gu Lee, Byung-Girl Baek*

Western Branch of Kyunggi Veterinary Service Laboratory,
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University*

Abstract

The rate of 58 neonatal calves in infection of Theileria sergenti was investigated in random samples on the farms located in Kyunggi, Chonbuk districts of Korea.

1. The criteria used in verifying infection with T. sergenti included the detection of parasites by giemsa stain and acridine orange stain in the blood smear slides.

2. Further evidence of current or previous exposure to T. sergenti was based on demonstration of T. sergenti specific antibody and antigen by the western immunoblot and the directed immunofluorescent antibody test in the peripheral blood of the calves.

3. The prevalence rates were 35%, 50% in Kyunggi, Chonbuk provinces respectively and the overall prevalence in all the farms was 43.2% by means of acridine orange stain.

4. The parasites that were observed in the peripheral blood of calves was shown surely by the western immunoblot to the characteristic 34KD antigen among the proteins of T. sergenti (Korean isolate).

5. And the antigen of the neonatal calves reacted at the very highest titer(1 : 2, 560)

6. These data highlight the significances of T. sergenti in the neonatal calf disease in Korea.

Key words : Theileria sergenti, Giemsa stain, Acridine orange stain, Western immunoblot, Neonatal calf.

서 론

Theileriosis는 적혈구내에 기생하는 원충성 질병으로서 경제적 손실을 초래하는 중요한 질병의 하나이다.

이 질병은 숙주의 비임상적 증세로 경과하면서 숙주의 체력약화나 Stress 및 면역능력의 저하 등 어떤 자극이 가해지면 심한 임상증상이 발현하여 생명을 위협하는 무서운 질병 중 하나이다.

Theileria 속 원충의 생활사를 비롯한 역학적 특성은 Neitz¹⁾ 등에 의하여 규명된 바 있다.

그러나, 생활사 중에서 태반을 통한 수직감염에 대하여 언급하고 있는 보고 예는 전혀 접할 수 없는 실정이지만, 사람에 기생하는 Plasmodium spp에 있어서 태반 감염 예는 보고²⁾되어 있다.

그러나 소에 기생하는 T. sergenti의 태반감염 가능성 여부에 대한 규명이 이 질병을 이해하는데 있어서 중요한 일부분일 것이다.

저자 등은 소에 있어서 Theileriosis의 예방에 관한 연구를 수행하기 위하여 형태학적 연구³⁾, 항원성 분석⁴⁾, 면역성 시험⁵⁾, 그리고 최근에는 합성 peptid의 항원성 면역원성 등에 대한 일련의 연구를 수행하던 과정에서 출생 직후 신생송아지의 적혈구 내에서 Piroplasma가 관찰되어 1개월 미만의 신생 송아지를 대상으로 T. sergenti의 감염 확인을 위해 Giemsa염색법, Acridine orange염색법, Western blot방법, 그리고 간접 형광 항체법 등으로 Theileriosis의 태반을 통한 가능성에 대한 역학조사를 수행하였다.

이같은 연구는 앞으로 우리나라 소에 있어서 유행하고 있는 Theileriosis를 예방하기 위한 대책 수립에 필요한 지식을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험동물 : 경기도(52두), 전라북도(6두)지역에서 분만 사육되고 있는 30일령 이하의 신생송아지 58두를 대상으로 하여 1992년 1월과 10월 사이에 출생한 신생 송아지로부터 채혈, 적혈구내 총체 감염여부, 항체를 측정하였다.

총체의 관찰 : 적혈구내 총체의 확인을 위하여 도말 혈액 표본을 제조하여 Giemsa염색법과 Acridine orange(0.1%) 염색법을 이용⁶⁾하여 감염율을 광학 현미경과 형광 현미경으로 각각 관찰하였다.

간접형광항체검사(Indirect Fluorescent Antibody Test) : 신생송아지로부터 분리한 혈청의 항체를 측정하기 위하여 보관중인 T. sergenti검진용 IFA 슬라이드를 완전히 건조한 후에 가검 혈청을 단계별로 희석

하여 반응시킨다음 FITC conjugated rabbit anti-bovine IgG(H&L) (Cappel Co., 1 : 40)로 반응시켜 신생 송아지의 혈청내 항체를 측정하였다.

양성 판정은 표준 음성혈청과의 반응정보보다 강하게 반응하는 정도를 양성으로 판정하는 기준으로 하였다.

SDS-PAGE와 Western Blot :

SDS-PAGE : 전라북도에서 분리한 균주로부터 생산, 사용하였던 항원을 SDS-PAGE(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)에 사용하였다.

Theileria sergenti merozoite 항원을 白등의 방법에 준하여 PAGE에 Comb를 넣지 않고 전기 영동한 후 Tsang등의 방법으로 이를 Nitrocellulose membrane (Midwest Science Co.)에 이동시켜 약 4mm 넓이로 strip을 절단한 다음 특이 항원과의 반응대를 확인하고자 Western Blot을 수행하였다.

Western Blot : SDS-PAGE한 겔을 Nitrocellulose에 전기 영동시킨 후 절단하여 strip을 만들어 tray 내에서 58두 신생 송아지의 혈청(1 : 100)과 반응시켜서 Affinity purified phosphatase anti-bovine IgG Conjugated(KPL Co.)를 PBS로 1 : 1000으로 희석하여 반응시킨 후에 기질액(BCIP, NBT, Tris buffer pH 9.5., KPL Co.)으로 발색, 항원, 항체 반응을 각각 관찰⁴⁾하였다.

결 과

신생송아지의 Theileria sergenti 감염율 : 신생 송아지 58두에 있어서의 총 감염율은 Giemsa염색법과 Acridine orange 염색법에 있어서 32.8%, 43.1%로서 Acridine Orange 염색 방법이 다소 높게 관찰되었다.

Acridine orange 염색 방법에 의한 주령별 감염율은 일령과는 관계 없이 35.7%~52.4% 범위의 감염율을 나타내었으며 신생송아지 58두 중 25두가 감염되어 43.1%의 감염율을 나타내었다.(표1)

즉, 출생후 1일이내에 채혈한 송아지와 4주령의 송아지의 Acridine Orange염색 방법으로 염색한 결과 양성 반응율은 40%와 52.4%로서 차이를 보였다.

한편, Giemsa염색 방법에서의 58두에 대한 감염율은

Talbe 1. The prevalence rate of Theileria sergenti of neonatal calves by several diagnosis methods.

Age	Number of head	Positive rate (%)		Negative *
		Giemsa stain	Acridine orange	
< 1 week	10	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)
2 week	13	4 (30.7%)	5 (38.5%)	4 (30.7%)
3 week	14	4 (28.6%)	5 (35.7%)	5 (35.8%)
4 week	21	8 (38.0%)	11 (52.4%)	2 (9.5%)
Total	58	19 (32.8%)	25 (43.1%)	14 (24.1%)

* Observed RBC by means of acridine orange stain.

32.8%로서 Acridine orange 염색 방법 보다 낮게 관찰되었다.

이들의 적혈구내 기생율은 거의 모든 예에서 약 0.01%수준 미만으로 관찰되었다.

지열별 감염율 조사 : 지역별 감염율은 경기도와 전라북도 지역의 신생 송아지에 있어서 40%와 50%의 감염율을 나타내었다.

Talbe 2. Comparison prevalence rate of Theileria sergenti according to various districts by means of acridine orange stain.

District Calf	District		Total
	Kyunggi Do	Chollabuk Do	
Number of Cattle	52	6	58
Positive No.	22	3	25
Prevalence rate	40 %	50 %	43.1 %

간접형광 항체검사(Indirect Fluorescent Antibody test : 신생 송아지 58두 혈청의 T. sergenti에 대한

Talbe 3. Distribution of IFA titer against T. sergenti in neonatal calves.

IFA	Negative						Total	
	1 : 20	1 : 40*	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640		>1 : 2,560
No. of calves	29	7	5	5	5	6	1	58
	50%	12.1%	8.6%	8.6%	8.6%	10.3%	1.7%	100%

* : The sera might be negative against Theileria sergenti.

IFA 역가는 다양하게 측정되었다.(표3)

즉 IFA역가는 1 : 40이하의 음성 반응의 예와 1 : 40 이상에서 부터 1 : 2560 이상에 이르는 양성 반응의 예를 나타내는 폭넓은 범위의 항체 역가를 나타내었다.

표준 음성혈청(1 : 40이하)과 표준 양성혈청(1 : 40이상)에서의 반응 정도를 기준으로하여 음성으로 판정된 송아지는 36두(약 62.1%)였으며 1 : 80이상의 양성 반응을 나타내는 예는 22두(37.9%)로 관찰되었다.

SDS-PAGE와 Western blot의 소견 : Theileria sergenti merozoite 항원으로 SDS-PAGE를 실시한 후 Western blot하여 신생 송아지 58두의 혈청을 각각 반응시켰던 바 총체가 확인된 예의 혈청에서는 항원, 항체가 반응을 하였으나 그렇지 못한 경우에는 항원항체 반응을 관찰할 수 없었다.(Photo 4).

즉, 신생 송아지 58두에 대한 Western Blot 소견은 다양하여 특이 및 비특이반응을 강하게 나타낸 예(Photo 4A, B), 전형적인 T. sergenti와만 반응을 나타내는 예(Photo 4C), 그리고 전혀 반응을 나타내지 않은 예(Photo 4D) 등으로 구분되었다.

이같은 반응의 특색은 IFA에서 항체가 높았던 예에서의 *T. sergenti* merozoite 항원에 대한 신생 송아지 혈청은 특징적인 반응은 Photo 4의 A, B strip들에서 보는 바와같이 34KD이상의 크기 항원에서 강한 특이 및 비특이 반응으로 항원 항체 반응대를 구분할 수 있었으나 *T. sergenti* merozoite 항원과의 반응만을 나타내는 예에서는 29KD, 34KD 등의 물질이 강하게 반응하였으며(Photo 4C) *T. sergenti* merozoite 항원에 대하여 거의 모든 반응 반응을 나타내지 않은 예도 있었다.(Photo 4 D)

고 찰

우리나라에서 사육되고 있는 소에 있어서 주혈 기생충 병에 대한 경제적 손실을 최소화하기 위하여 양축농가는 치료와 예방에 대한 관심이 지대할 뿐만 아니라 많은 경비를 지출하고 있는 실정이다.

우리나라에서의 *Theileria sergenti*에 대한 연구는 감염실태⁷⁾, 임상적소견⁸⁾, 형태학적 분류, 면역학적 예방대책⁹⁾, 중간숙주¹⁰⁾, 치료대책¹¹⁾, 항원의 특색 및 면역원성 그리고 전자 현미경적 구조 등에 관한 연구가 이루어진 바 있다.

그렇지만 신생 송아지에 있어서 원인 불명의 빈혈 및 폐사등에 의한 피해를 경험하고 있음에도 불구하고 *Theileriosis*와 관련된 연구 보고는 접할 수 없었다.

그 이유는 *Theileria sergenti*의 태반 감염에 대한 확실한 근거나 보고가 없었기 때문이라 사료된다..

저자 등은 야외 목장에서 예방접종 실험을 수행중 신생 송아지의 적혈구내에서 충체가 Giemsa염색으로 관찰됨으로서 이를 좀더 명확하게 규명하기 위하여 경기도와 전라북도 지역에서 1992년 1월부터 10월 사이에 출생한 신생 송아지를 대상으로 혈액 및 혈청을 수집하고 광학 현미경 및 형광 현미경을이용하여 형태학적 관찰은 물론 IFA 및 Western blot방법을 이용한 혈청 면역학적 연구에 근거하여 감염율과 항원항체반응 정도를 관찰하였다.

그 결과 Giemsa 및 Acridine orange 염색 방법에서 전형적인 *Theileria sergenti*가 관찰되었고 IFA검사방

법에 의한 항체역가를 나타내었으며 또한 Western blot 소견에서도 마찬가지로 *Theileria sergenti*의 항원 단백질인 34KD의 특징적으로 반응하고 있는 신생 송아지가 약 40% 나타남으로서 신생송아지의 적혈구 내에서 *Theileria sergenti* 감염을 확인하기에 이르렀다.

물론 보다 정확한 동정 확인을 위하여는 *T. sergenti*의 특이 DNA를 이용한 Southern blot와 34KD에 해당되는 단크론성 항체를 생산하여 immunoblot를 함으로서 특이성과 감도를 한층 높여 확인하는 연구방법이 뒤따라야 할 것이다.

주혈 기생충 중 사람에게 있어서 *Plasmodium spp*의 태반감염에 대한 연구는 여러학자들에 의하여 이루어진 바 있다.

Walter등은 아프리카의 말라리아 유행 지역내 임신부 741명을 임의로 선정하여 분만과정중에 태반을 채취하여 Hematoxylin-eosin 염색을 하여 관찰하였던 바 33%(741명중 247명)에서 감염 상태를 입증할 수 있었다.

그들은 충체를 내용모 간극에서의 관찰과 더불어 많은 수의 대식 세포의 출현, 말라리아 유래성 색소 침착, 섬유소성 침착, 합포체성 영양세포의 손상, 영양막의 비후 등을 보고하였다.

더불어 모체에서의 방어면역 능력은 유행지역 내에서의 임신부에서 감염율이 비유행 지역의 감염율보다 낮게 나타내는 면역능력의 차이가 보고¹²⁾된 바 있다.

*Toxoplasma gondii*의 경우 태반감염에 대한 산발적인 뇌염 병변을 태아에서 확인 보고되었으며 양에서는 불임과 사산으로 나타나는 예가 보고되어 있다.

이와 같이 태반감염은 태아가 아직 모든 병체에 대한 면역체계가 확립되기 전이기 때문에 면역관용(Immunotolerance) 또는 비특이 면역 반응(nonresponsiveness of immunity)상태에서 쉽게 감염이 이루어질 수 있으나 생후 2~3개월까지 면역기전이 성립되지 않은 상태로 남아있게 되는 예¹³⁾가 있다.

소에 있어서 *Anaplasma marginale*의 자궁내 감염과 수직감염에 대한 연구는 일찌기 이루어진 바 있다.¹⁴⁾

소에 있어서 *Anaplasmosis*에 대한 임신시기에 관련된 충체의 태반감염은 임신말기에 인공감염시 발병되지

않았지만 임신 3개월 이내에서는 감염되는 것으로 보고된 바 있다.¹⁵⁾

본 예와 같이 1개월 미만의 신생 송아지 적혈구 내에서 관찰되는 *T. sergenti*의 감염이 이루어진 시기는 출생전에 태반을 통한 감염이었을 가능성이 높다.

그 이유는 소에 인공감염 시켰을 경우 이 총체의 출현 시기 및 임상적 증상에 관한 보고를 들 수 있다.

즉, 1개월령에서부터 12개월령의 송아지에서 *T. sergenti*균주를 감염시킨 후 적혈구내 기생총체의 출현과 항체형성을 IFA와 ELISA를 이용하여 관찰하였던바 모든 연령층에서 2개월 또는 3개월후에 최고치에 달하였으며 기생율은 3개월째에 7.6%로서 최고의 기생율을 나타내었다.¹⁶⁾

이처럼 소에서의 총체의 출현이 분만후에 나타난 것이 아니라는 점은 중등의 보고예를 보면 확실히 태반을 통한 총체일 것으로 사료된다.

즉, *T. sergenti*감염혈액 1ml를 피하접종시 31일 후에 처음으로 순환혈액에서 총체를 관찰하였으며 100-150ml를 정맥으로 접종시 5-10일에 순환혈액내에서 피하접종시 13-14일에서야 비로소 처음으로 관찰된다는 사실을 보고 하였다.

IFA역가에 있어서도 1:2560 이상으로 강한 반응을 나타내는 예가 있었는데 이 항체는 단순히 초유를 통한 Immunoglobulin만은 아니라고 추측되며 아마 태반감염에 의한 태아 자체에서의 항체가 형성된 것으로 판단되어 진다.

이를 뒷받침하는 또다른 이유는 만약 IFA와 Western Blot조건에서 보았던 바와 같이 신생 송아지의 반응이 약하게 나던지 소멸되어야 초유로부터 이행된 항체라고 사료되는 바이다.

결국 소에 있어서 *T. sergenti*의 태반 감염은 *Anaplasma marginale*의 경우에서처럼 Immunoglobulin을 형성할 수 있는 면역기전이 활동하는 것으로 사료된다.

*Anaplasma marginale*의 경우에는 임신 141일후부터 침입한 균체에 대하여 항체를 형성할 수 있으며 만약 면역형성이 부족하면 태아에 치명적 손상을 줄 수 있고 만성 잠복상태를 유지한다.

소에 있어서는 임신중 태반 내에서의 체액성 면역과

세포성 면역이 비교적 잘 형성되므로 임신 초기에 세균이나 Virus감염 숙주에서의 여러가지 면역 방어능력이 나타난다는 사실과 부합된다.

그리고, 이에 대한 경제적 손실은 말라리아가 태아에 감염되었을 경우처럼 모체의 면역능력이 불안전하면 유산, 발육부진, 지속적 감염 그리고 면역관용등을 경험하게 될 것이다.¹⁷⁾

태아에 있어서 어떤 감염성 질환에 대한 항체형성은 그 질병의 혈청학적 진단에 유익하게 사용될 수 있는 바 본 예에 있어서의 신생 송아지 혈청내 항체를 Western blot이나 IFA 방법으로 검진함은 *T. sergenti*의 면역학적으로 진단함에 있어서 의미있는 방법이라 사료된다.

결론적으로 신생 송아지의 적혈구 내에서 관찰되는 *T. sergenti* 감염경로는 태반을 통한 수직감염에 의하여 이루어졌을 것으로 사료되며 앞으로 모체태자 및 태반을 중심으로 하여 그들의 신생 송아지를 함께 조사하는 실험모형으로 면역학적 방법과 신생 송아지로부터의 총체성 DNA검출과 같은 분자생물학적 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

신생 송아지의 *Theileria sergenti* 감염경로 규명을 위한 연구의 일환으로 경기도, 전라북도 지역에서 분만된 1개월 미만의 송아지 58두를 대상으로 *Theileria sergenti*의 감염율을 조사하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈액 도말 표본에서의 적혈구내 감염율은 Acridine orange 염색 방법에서 43.1%의 양성 반응을 나타내었으며 경기도, 전라북도 지역의 송아지에서 *Theileria sergenti*의 감염은 총 58두중 25두(43.1%)의 감염을 보였다.

2. 간접 형광 항체 검사(IFA)에서 양성율은 37.9%였으며 이중 1:2,560(1.7%) 희석 배율에서도 반응을 나타내는 예가 있었다.

3. *Theileria sergenti* merozoite 항원으로 SDS-PAGE한 후에 신생 송아지 혈청을 Western blot하였던 바 *Theileria sergenti*의 특징적 항원물질인

34KD 단백질이 관찰된 예와 그렇지 못한 예가 있었다. 이상의 결과로 *Theileria sergenti*는 태반을 통한 수직 감염의 가능성이 이루어지고 있음을 예측할 수 있는 일련의 결과를 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Nietz WO, Jansen BC, 1956. Discussion the classification of the theileridae ondersteport. J Vet Res. 27 : 7-15.
2. Gilles HM, Lawson JB, Sibelas M. 1969. Malaria anemia and pregnancy. Ann Trop Med Parasitol. 63 : 245-263.
3. 백병걸, 김병수, 이호일. 1990. 한우에 있어서 *Theileria sergenti* merozoite의 미세구조. 대한수의학회지. 30(2) : 465-471.
4. 백병걸, 김병수, 이재구. 1990. 한우에 있어서 *Theileria sergenti*의 항원성에 관한 연구. 대한수의학회지. 30(2) : 223-229.
5. Baek BK, Choi IH, Kim BS, et al. 1992. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite enriched *Theileria sergenti* immunogens. Kor J Parasitol. 30 : 133-140.
6. 백병걸, 최인혁, 박강희 등. 1993. 재래산양과 호주산 산양에서의 Anaplasmosis 발생보고. 대한수의학회지. 33(2) : 289-293.
7. 이주목, 김명철. 1987. 젓소의 파이로플라즈마증의 효과적인 집단검색과 치료 방법에 관한 연구. 대한수의학회지. 27(2) : 321-330.
8. 김성하, 최희인, 이창우. 1984. 인공 감염에 의한 송아지의 *Theileria*병 예방에 관한 임상적 관찰. 서울대학교수의대논문집. 9 : 83-91.
9. 서명득, 장두환, 1982. 도입우의 진드기 매개 주혈원충 감염과 *Theileria sergenti*의 치료·예방에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 6 : 33-57.
10. 강영배, 장환. 1989. 비장 적출 송아지에 있어서의 *Haemaphysalis longicornis* 진드기를 통한 *Theileria sergenti* 감염증 인공유발 시험, 농사시험연구 논문. 31 : 48-53.
11. 강영배, 김상희, 장환 등. 1988. *Theileria sergenti* 아의주에 대한 성장조사. 接種 脾牛에 있어서의 혈액학적 소견 및 pamaquine처리효과. 농사시험연구 논문집. 30(2) : 17-21.
12. Covell G. 1950. Congenital malaria. Trop Dis med Bull. 47 : 1147-1152.
13. Banks K. 1982. Host defence in the newborn animal. J Am Vet Med Asso. 181 : 1053-1056.
14. Norton Jh, Parker RJ. 1983. Neonatal anaplasmosis in a calf. Aust Vet J. 60 : 348-351.
15. Fowler D, Swift BL. 1981. Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. Theriogenology. 4 : 59-67.
16. Asaoka H, Onuma M, Kawamoto S. et al. 1991. Activation of bovine peripheral blood macrophages in *Theileria sergenti* infected calves. Res Vet Sci 50 : 23-28.
17. Osbern BI, Maclachlan NJ, Terrell TG. 1982. Ontogeny of the immune system. J Am Vet Med Ass. 181 : 1049-1152.

Legend for figures

- Photo 1. Observation of *T. sergenti* with giemsa stain in RBC of one-day-old calf.
- Photo 2. Observation of *T. sergenti* with acridine orange stain in RBC of one-day-old calf.
- Photo 3. Observation of *T. sergenti* with indirected immunofluorescent antibody test in RBC of one-day-old calf.
- Photo 4. Sera of neonatal calves were immunoreacted against *T. sergenti* merozoite antigen by means of western immunoblot.

