

Latex 응집반응 및 polymerase chain reaction을 이용한 돼지톡소플라즈마병 감염실태 조사

심항섭*, 최경묵, 전오숙, 이수진, 우종태, 노기완

경기도축산위생연구소
(접수 2008. 2. 28. 게재승인 2008. 3. 13)

Investigation of swine toxoplasmosis by Latex agglutination and polymerase chain reaction(PCR)

Hang-Sub Shim*, Gyeong-Muk Choi, Oh-Sook Jeon, Su-Jin Lee,
Jong-Tae Woo, Ki-Woan Ro

Gyeonggi Veterinary Service, Geumgokdong, Gwanseongu, Suwon, 441-460, Korea
(Received 7 February 2008, accepted in revised form 13 March 2008)

Abstract

Between March and October 2007, a total of 516 blood samples from pigs in the Gyeonggi province were examined for seroprevalence against toxoplasmosis by latex agglutination test (LAT) and the detection of antigenic particles among seropositive samples by PCR. In the LAT, 118 (22.8%) were positive, and the unadjusted percentage of seroprevalence rates of breeding and fattening pigs were significant difference. Positive rate (14.1%) in the breeding pigs was much lower than that (27.8%) of the fattening pigs ($p < 0.001$, Pearson's Chi-square test). The antibody detection rate of sows was lower than fattening pigs, i.e., 15.8% (25/158) and 26% (93/358), respectively ($P = 0.011$, Pearson's Chi-square test). Among 118 seropositive samples by LAT, 68 (57.6%) were positive in PCR for the detection of the toxoplasma specific-DNA. There was a statistical difference in the positive PCR reaction between the raising pigs (63/93 67.7%) and sows (5/25, 20%) ($P < 0.01$).

Key words: Toxoplasmosis, Latex agglutination, PCR.

*Corresponding author

Phone : +82-31-299-5482 Fax : +82-31-294-6773

E-mail address: shimhsub@gg.go.kr

서 론

톡소플라스마병은 포유류 및 조류를 포함한 대부분의 온혈동물에서 나타나는 인수공통전염병으로서, 돼지에 대한 감염률은 다른 동물에 비하여 훨씬 높은 것으로 알려져 있으며 성돈에서는 무증상 감염을 일으키지만 어린 돼지에서는 설사 등의 소화기 및 호흡기증상과 신경증상을 보이며, 특히 임신된 돼지에서 유산을 일으키는 것이 특징이다^{1,2)}.

톡소플라스마병의 원인체인 *Toxoplasma gondii* 는 미국 오하이오주 소재 농장 돼지에서 1952년 최초 보고된³⁾ 이후 전 세계적으로 매우 흔하게 관찰되는 질병으로 알려져 있다. 국내에서는 1964년 문이 처음으로 돼지에서 톡소플라스마 원충을 분리한⁴⁾ 이후 Latex 응집반응법, ELISA법 등 다양한 검사법이 개발되어 항체검사를 통한 혈청학적 진단과 더불어 체내 원충의 존재를 확인하는 분자생물학적 방법의 하나인 중합효소연쇄반응(PCR)이 개발되어 있다⁵⁻⁷⁾. 경남, 전남 및 제주 등 일부지역에서 톡소플라스마병에 대한 실태조사가 이루어졌으나⁸⁻¹⁰⁾ 전국적인 조사나 연구는 매우 미진한 실정이다. 톡소플라스마병이 사람과 동물 모두에서 질병을 일으키는 병원체로서의 중요성과 특히 육류의 공급원으로 돼지고기를 많이 소비하는 우리나라로서는 톡소플라스마 원충이 돼지에 미치는 영향과 피해에 대한 지속적인 조사와 연구가 필요한 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 우리나라의 양돈 밀집지역인 경기지역에 대한 톡소플라스마병 항체 분포조사를 실시하고 PCR을 이용한 톡소플라스마 특이항원에 대한 감염상태를 조사하여 돼지 톡소플라스마병의 예방대책에 대한 기초자료를 제공하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 혈액

경기지역 33개 돼지농장에서 516두의 혈액시료를 2007년 3월부터 10월까지 수집하였다. 10ml를 채혈하여 EDTA(7.5% Vacutainer, UK)가 들어있는 채혈병에 혈액 3ml을 분주하여 DNA 추출재료로 사용하였으며, 나머지 혈액에서 혈청을 분리한 다음 -25℃ 냉장보관하면서 혈청검사 재료로 사용하였다.

Latex 응집반응

Latex 응집반응항원 (국립수의과학검역원 제조)을 이용하여 사용하였으며 다음과 같이 실시하였다.

U형 마이크로플레이트의 각 웰에 완충액(0.2M 2-amino-2-methyl-1 propanol solution, pH 8.0)을 이용하여 가검혈청 25 μ l을 1:16, 1:32, 1:64배로 희석하고 톡소플라스마 latex 항원을 25 μ l씩 분주한 후 실온에서 12~15시간 반응시켜 1:32배 이상에서 응집반응이 나타나는 것을 양성으로 판정하였다.

혈액으로부터 DNA 추출

혈액에서 DNA 추출은 시험관에 histopaque 3ml을 넣고 그 위에 동량의 혈액을 혼합되지 않도록 주입한 다음 1,300rpm에서 30분간 원심하여 buffy coat 층을 피펫으로 수집한 후 PBS로 3회 세척한 후 시판되는 DNA 추출킷(Qiazen)를 이용하여 DNA를 추출하였다

Primer

Primer는 Stiles 등¹¹⁾이 고안한 B1 gene으로 염기서열은 T-1은 5'-GGAACATGCAT-CCGTTTCATGAG-3'(21bp)이고 T-2 (5'-CA-GACGAATCACGGAAGT-3'(20bp)를 사용하였다

PCR 검사

추출한 DNA와 primer를 상온화된 PCR

premix(Bioneer)를 사용하여 PCR기기(PTC-200, MJ research)에 반응시켰으며 시료의 증폭과정은 먼저 94℃에서 4분간 가열하여 변성을 유도하고 94℃에서 1분간의 denaturation, 52℃에서 1분간 annealing 그리고 72℃에서 1분간 extension의 3단계로 총 35회 반복하였으며, 72℃에서 8분간 더 extension을 실시하였다. 증폭산물을 확인하기 위하여 PCR product 10 μ l를 1.2% agarose gel에 전기영동하여 product size 501bp를 확인하였다 (Fig 1).

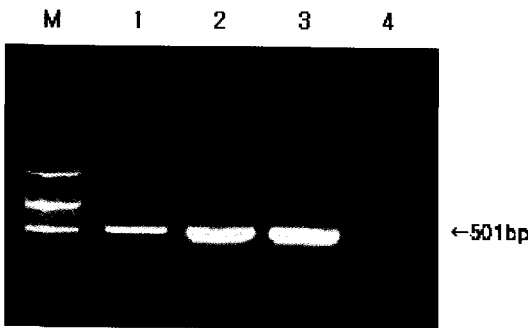


Fig 1. Detection for toxoplasma specific-DNA from the blood of pig by PCR. M : 100 bp marker, Lane 1-3 : positive, Lane 4 : negative

결 과

항체분포

Latex 응집반응법으로 조사한 경기지역의 돼지톡소플라즈마 항체보유 검사결과 516두 중 118두(22.9%)에서 항체양성을 나타냈으며, 종돈장에서는 185두 중 26두(14.1%)에서 양성으로 일반농장에서는 331두 중 92두(27.8%)가 양성으로 나타나 종돈장이 일반농장보다 항체양성율이 낮았다(Table 1).

또한 모돈과 비육돈에 대한 항체보유 비교결과 모돈에서는 158두 중 25두가 양성으로 판정되어 양성율이 15.8%이었으나, 비육돈에서는 358두 중 93두(30%)가 양성으로 나타나 모돈 보다 비육돈의 항체양성율이 높은 것으로 조사되었다(Table 2).

Table 1. Comparison of sero-positive rate in the pigs between from breeding and fattening farms by LA test

Farm group	No of		Positive rate
	Examined	Positive	
Breeding	185	26	14.1
Fattening	331	92	27.8
Total	516	118	22.9

Table 2. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in sera from sows and fattening pigs by LA test

Group	No of	
	Examined	Positive(%)
Sow	158	25 (15.8)
Fattening pig	358	93 (26.0)
Total	516	118 (22.9)

PCR 검사 결과

Latex 응집반응 양성개체에 대한 백혈구 중 *Toxoplasma* 특이 DNA PCR 검사 결과 톡소플라즈마 항체양성 118두 중 68두에서 양성으로 조사되었다(Table 3).

Table 3. Comparison of the latex agglutination and PCR

Positive sera determined by Latex agglutination		PCR	
		No of positive(%)	No of negative(%)
Sow	25	5(20)	20(80)
Fattening pig	93	63(67.7)	30(32.3)
Total	118	68(57.6)	50(42.3)

고 찰

톡소플라즈마병은 원충이 종숙주인 감염된 고양이의 장벽 상피에서 oocyst를 형성하여 분변으로 배출하며, 배출된 oocyst가 중간숙주인 포유류, 조류 등의 동물 체내에 침입하여 분열소체 및 cyst를 형성하여 주로 중추신경

계나 근육 내에서 장기간 생존하는 것으로 알려져 있다. 돼지에서 감염경로는 주로 경구와 태반감염으로 이루어진다. 즉, 감염된 고양이 분변으로 오염된 사료나 음수를 통하여 또는 감염된 폐사돈이나 병든 돼지에 대한 카니발리즘 및 털균사키지 않은 육식성 사료 등을 통하여 경구감염 되거나 태반을 통하여 태아에 감염되는 것으로 알려져 있다. 돼지에서 임상증상은 대부분의 동물에서와 마찬가지로 임상증상 발현이 드물지만 신생자돈과 3주령 이하의 자돈에서 피해를 입혀 경제적 손실을 초래할 수 있는 것으로 보고되어 있다^{1,12)}.

이러한 톡소플라즈마병에 대한 국내의 돼지의 감염률 조사는 김 등이 제주에서 21.3%, 서 등이 전남에서 57.7% 그리고 이 등 경남에서 17%인 것으로 보고한 바 있으며⁸⁻¹⁰⁾, 본 실험에서 경기지역의 항체보유실태가 22.9%인 것으로 나타나 전남지역보다는 낮고 제주나 경남에 비하여 약간 높은 것으로 나타났다.

또한 종돈장에 대한 항체 양성율은 이 등이 경남지역에서 6개 종돈장에서 194두 검사하여 91두(46.9%)인 것으로 조사 보고되었으나¹⁰⁾, 경기지역에서는 9개 종돈장 185두 검사 결과 14.1%인 것으로 나타나 종돈장의 항체 양성율이 크게 낮은 것으로 나타났으나 일반 농장의 경우 항체 양성율이 27%로 타 지역에 비해 약간 높게 나타났다.

또한 본 실험에서 모돈과 비육돈에서 항체 양성율 비교 결과 모돈에서 15.8%이고 비육돈에서 26.8%인 것으로 나타나 농가에서 환경위생관리 및 방역관리에 따라 항체 양성율에 차이가 있는 것으로 사료된다. 이러한 위생관리를 위한 주요사항으로 Kijlstra 등¹³⁾은 고양이와 설치류 등에 대한 차단을 효과적으로 하는 무창돈사 등 현대식 양돈시설에는 톡소플라즈마병 감염율을 낮출 수 있다고 지적한 바와 같이 농장에서 톡소플라즈마 원충이 돼지에 감염하는 것을 막기 위해서는 농장주변의 야생고양이 왕래를 차단하여 감염 고양이의 분변이 사료나 음용수에 오염되는 것을 막아야 하며, 폐사한 동물은 즉시 제거하고 분만 후 태반을 돼지나 다른 동물이

섭식하지 않도록 하여야 할 것으로 판단된다.

톡소플라즈마 감염개체의 효과적인 진단을 위해 체내 조직에서 톡소플라즈마 원충을 검사하는 방법은 동물집중법 및 PCR 기법 등을 많은 학자들이 연구하고 있다. 톡소플라즈마의 B1 gene 을 이용한 PCR기법을 통하여 혈액 1ml 당 10-100까지의 분열소체를 검출할 수 있는 것으로 보고되었으며, 이 방법을 통하여 고양이의 경우 감염 후 14일부터 182일까지 혈액 중 총체를 확인할 수 있고, 돼지의 경우 감염 후 4.5일~5일부터 혈액 중 총체의 DNA가 검출될 수 있으며 10일 이후부터 혈중항체가 출현함과 동시에 혈액 중에 DNA 검출이 소실되는 것으로 보고되었다^{7,11,14)}. PCR 기법을 통하여 초기 감염 및 발증기에 대한 구별이 가능한 것으로 판단되어 본 실험에서 Latex 항체 양성개체에 대한 총체 특이 DNA 검사결과 비육돈에서 63두(67.7%), 모돈에서 5두(20%)가 양성반응으로 확인되어 비육돈에서는 parasitemia 등으로 톡소플라즈마 총체가 순환 감염되고 있으며, 모돈에서는 비교적 만성감염상태를 유지하는 것으로 추정된다.

본 실험 결과 돼지 톡소플라즈마병이 국내에 폭넓게 분포하고 있는 것으로 조사 되었다. 이러한 톡소플라즈마병에 대한 근절 및 피해 예방을 위하여 역학조사 및 예방백신 개발 등 보다 광범위한 연구가 필요한 것으로 생각되며, 또한 톡소플라즈마병이 인수공통전염병임을 감안하여 인체에 미치는 영향과 예방 대책에 대한 효과적인 대처방안이 수립되어져야 할 것이라고 생각된다.

결 론

경기지역 돼지 총 516두를 대상으로여 Latex 응집반응 및 PCR 검사로 톡소플라즈마병에 대한 항체분포 및 톡소플라즈마 항원 보유상황 조사 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. Latex 응집반응에서 총 516두 중 118두

(22.9%)가 항체양성을 나타냈으며, 종돈장에서는 185두 중 26두(14.1%), 일반농장에서는 331두 중 92두(27.8%)가 항체양성을 나타내 종돈장이 일반농장보다 양성비율이 낮은 것으로 조사되었다. 항체양성을 연령별로 구분한 결과 모돈에서는 158두 중 25두(15.8%)가 항체 양성을 나타냈으며, 비육돈에서는 358두 중 93두(30%)가 양성으로 모돈 보다 비육돈에 항체 양성율이 높은 것으로 조사되었다. Latex 응집반응 양성 돼지 대한 혈액 중 *Toxoplasma* PCR 검사 결과 118두 중 68두(58%)에서 양성으로 조사되었다.

참고문헌

1. Soulsby E.J.L. 1962, *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. 7 eds. Balliere Tindal. London : 670-682.
2. Dubey J.P., Leighty J.C., Beal V.C., et al. 1991. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. *J Parasitol* 77 : 517-521.
3. Farrell R.L., Docton F.L., Chamberlain D.M., et al. 1952. Toxoplasmosis. I. *Toxoplasma* isolated from swine. *Am J Vet Res* 47 : 181-185.
4. 문재봉. 1965. Toxoplasmosis에 관한 연구
1. 돈으로부터 *Toxoplasma* 분리. 가축위생 연구소보 8 : 143-160.
5. 서명득, 장동화, 주후돈. 1989. ELISA를 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 조기 진단에 관한 연구. *대한수의학회지* 29(4) : 567-575.
6. 서명득, 주후돈, 데이빗마스. 1995. Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마 병 진단용 kit 개발에 관한 연구. *대한수의학회지* 35(3) : 583-593.
7. 서명득, 신기옥. 2001. Polymerase chain reaction 을 이용한 실험적 감염 돼지의 혈액과 조직으로부터 *Toxoplasma gondii* 검출. *대한수의학회지* 41(1) : 89-98.
8. 김승호, 김영주. 1989. 제주도에 있어서 *Toxoplasma* 항체분포에 관한 연구. 1. 돼지, 고양이 및 식육취급자에 있어서의 *Toxoplasma* 항체분포에 대하여. *대한수의학회지* 29 : 333-342.
9. 이병훈, 황보원, 변유성 등. 1992. 경남 중부지역에서의 Latex 응집반응을 이용한 돼지 톡소플라즈마병의 항체분포조사. *한가위지* 15(2) : 174-183.
10. 서두석. 1979. 전남지역의 돈 *Toxoplasma* 감염조사 연구. *대한수의사회지* 15(8) : 447-450.
11. Levine N.D. 1985. *Veterinary Protozoology*. 5 ed. Iowa. Iowa State University Press, Ames : 248-255.
12. Kijlstra A, Eissen O.A., Cornelissen J, et al. 2004. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3165-3169.
13. 서명득, 주보현. 1999. 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 고양이 혈액내에서의 *Toxoplasma gondii* 검출에 관한 연구. *대한수의학회지* 39(6) : 1151-1160.
14. Stiles J.E., Prade R., Green C. 1995. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 57 : 264-269.