<원 저>

국내 젖소에서 *Theileria buffeli* 주요 표면 단백질 유전자의 다양성 분석

유도현¹ · 이영화¹ · 채준석² · 박진호^{1,*}

¹전북대학교 수의과대학, ²서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2011년 6월 1일)

The polymorphism of *Theileria buffeli* major surface protein associate with their clinical signs in holstein in Korea

Do-Hyeon Yu¹, Ying-Hua Li¹, Joon-Seok Chae², Jin-Ho Park^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine & Biosafety Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: June 01, 2011)

Abstract : *Theileria (T.) buffeli* (formerly *T. sergenti*/*T. orientalis*) is the major hemo-protozoan distributed in the Far East Asian countries such as Korea, China and Japan. It is responsible for the clinical symptoms of anorexia, ateliosis, anemia, fever and icterus. It also causes abortion and sudden death under severe cases, resulting in economic losses for many livestock farms. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of the major surface protein (Msp) gene in *T. buffeli* in Holstein in Korea, and we characterized the association of the diversification of the Msp gene and its relationship with the pathogenicity of *Theileria*. For this, complete blood counts and *Theileria* PCR sequence analysis were performed from 57 Holstein in Jeju Island. A total of 26 PCR positive Holstein (16 anemic and 10 non-anemic) were then randomly selected based on 18s rRNA sequence typing of the *Theileria* Msp gene. The DNA sequence of the *T. buffeli* Msp gene in Holstein showed 99.0%, 99.2%, 99.9%, 99.5%, 98.7%, 98.4% and 98.4% homology with *T. sergenti*, *Theileria* spp., *T. sergenti*, *Theileria* spp., *Theileria* spp., *Theileria* spp. and *Theileria* spp., respectively. The result showed a genetic variation of 57.7% (type I), 3.8% (type II), 15.4% (type III), 7.7% (type IV), 13.5% (type V) and 1.9% (type VI). Type I is the most frequent type in both anemic and non-anemic Holstein while type II was found in only non-anemic Holstein. This results of our study help confirm the diversity of Msp gene types and demonstrate that the gene type distribution of Msp genes varies among *Theileria*-infected Holstein in Jeju Island.

Keywords : anemia, Antigenic diversity, Korean indigenous cattle, Major surface protein gene, *Theileria buffeli* (*sergenti*/*orientalis*)

서 론

소의 진드기 매개성 질병의 병원체인 *Theileria*(*T.*) *buffeli*는 소의 적혈구에 기생하는 주혈원충으로서, 지역에 따라 서로 다른 병원체가 분포되어있다 [8]. *Theileria* 중에서도 병원성이 강한 *T. parva*나 *T. annulata*는 아프

리카, 남유럽, 남아시아에 분포하고 있으며, *T. buffeli*(*T. sergenti*/*T. orientalis*)는 주로 한국, 중국, 일본 등의 극동 아시아 지역과 호주에 분포하고 있는 것으로 보고되어 있다 [6, 21, 31].

진드기(tick)가 서식하는 지역에서의 가축의 방목 사육은 Theileriosis로 인한 피해가 매우 심각하며 이런 현

*Corresponding author

Tel: +82-63-270-2557, Fax: +82-63-270-3780

E-mail: jpark@jbnu.ac.kr

상은 전국적으로 확산되어있다 [4]. 일본과 한국에서 *Theileria*는 소와 같은 반추동물에 빈혈, 식욕부진, 발열, 황달 등의 임상증상을 보이게 하고, 스트레스나 다른 합병증이 있을 경우 유산, 발육부진, 그리고 심하게 감염되면 폐사에 이르게 하여 양축농가에 많은 경제적 손실을 끼치고 있다 [3, 21, 29].

*Theileria*의 감염을 진단, 동정 혹은 gene의 다형성을 분석하기 위하여 일본 터키 등 국가에서는 *Theileria* major surface protein(MSP) gene중 32-, 33-, 34-kDa gene을 증폭하여 비교 하는 PCR 기법을 사용하고 있는데 [1, 12, 13, 16, 34], 이는 *Theileria*의 MSP가 major target antigen으로서 숙주의 면역 system에 의하여 인지되기 때문이다 [13, 20]. MSP의 33 kDa는 *T. sergenti*내에서 많은 부위를 차지하는 단백질로서 가장 면역원성이 높은 부위로 알려져 있다. 그리고 Shirakata 등 [26]은 *Theileria*의 MSP가 원충의 표면에 산재되어 있음을 증명하여 보고하였다 [13, 28]. 또한, Kawazu 등 [12]은 MSP의 33 kDa와 34 kDa도 면역 우월부위의 단백질임을 보고하였다.

병원성이 비교적 낮은 *Theileria* spp.는 MSP gene의 allele에 근거하여 적어도 5개의 타입 즉, Ikeda type(*T. sergenti*), Chitose type(*T. sergenti*), Buffeli(*T. buffeli*) type1, Buffeli type2, Thai type(*Theileria* spp.)으로 분류한 연구 결과도 보고되어 있다 [7, 13, 17, 18, 20]. 한편, 한국, 일본, 중국, 대만, 호주, 그리고 유럽의 일부 국가들에서 MSP allele gene의 유전자형이 혼합감염 되어있다는 연구결과도 보고되어 있다 [7, 11, 13, 18, 24, 27, 32]. 일본에서 non-pathogenic *Theileria* MSP gene type은 type I, C, B1, B2가 보고되어 있고, 중국, 대만, 호주에서는 type C, B1이 보고되었다 [17, 18, 32].

한국의 gene type은 모든 isolate에서 type I를 포함하고 있고, type I와 type C의 혼합감염이라는 보고가 있다 [11]. 전북의 산간지역에 분포하고 있는 *T. sergenti*의 경우 Ikeda, Chitose, 그리고 Buffeli Type 등 세 가지 type의 혼합감염이었고, 또 일부 Korean isolate에서는 type B1과 type B2가 검출되기도 하였다 [15].

소 theileriosis의 주요 임상증상은 적혈구 파괴에 의한 빈혈이지만, 준 임상적인 감염인 경우에는 진단하기가 쉽지 않다 [27]. 또한 *Theileria*에 감염이 되어도 심한 빈혈이 유발되는 소가 있는 반면, 빈혈이 유발되지 않은 즉 혈액수치가 정상범위로 유지되는 소도 존재한다 [15]. 지금까지 국내외 소 *Theileria* MSP gene과 관련한 연구에서는 *Theileria* MSP의 항원성과 빈혈과의 상관관계에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 젖소에서 *Theileria*의 병원성에 관여하고 있는 MSP의 다양한 항원성을 분석하였고, 빈혈과의 상관성에 관한 비교 분석을 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 동물 및 혈액학적 검사

방목 위주로 사육되고 있는 제주도 젖소 57두의 경정맥(jugular vein)에서 혈액(blood)을 채취하여 EDTA 처리를 한 후 실험실로 이동하여 혈액검사(CBC) 및 DNA 추출하는데 사용하였다. 젖소는 2~7년령의 암소로부터 혈액을 채취하였으며 18두(7월), 20두(9월), 19두(11월)로 총 57두였다. 채혈된 혈액으로부터 적혈구 용적을 측정하여(hemavet 950; Drew Science, USA) 그 결과들을 anemic group과 non-anemic group으로 나누었다(기준: 총 적혈구 용적 30%).

Theileria 병원체 진단 및 염기 서열 분석

Theileria 감염여부는 *Theileria* 18S rRNA gene을 중합효소연쇄반응으로 증폭 한 후 sequencing하여 확인하였다. Genomic DNA는 혈액으로부터 GENE ALL Blood Total DNA Purification kit(General bio system, Korea)을 이용하여 추출하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 위해 사용되었다.

18S rRNA gene 증폭을 위한 중합효소연쇄반응의 혼합액은 2× Green GoTaq Reaction Buffer(pH 8.5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 그리고 3 mM MgCl₂, Green GoTaq(Promega, USA))와, 각각의 primer {THF(5'-AAA CTG CGA ATG GCT CAT-3')와 THR(5'-ACA TCC TTG GCA AAT GCT-3')}, 그리고 300~400 ng의 genomic DNA 1 μL를 각각 혼합한 후, nuclease free water를 첨가하여 최종 혼합물의 양이 20 μL가 되도록 하여 증폭 시켰다. 증폭 조건은 95°C, 3 min denaturation 및 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min 30 sec의 기본 증폭 반응(35 cycle), 그리고 72°C에서 7 min의 post-extension 반응으로 진행하였다. 이 모든 과정은 PTC-200 Thermal cycler(MJ Research, USA)장비를 통해 실행하였다. 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 120 V로 40분간 전기영동한 후, ethidium bromide (0.5 μg/mL; Sigma, USA)로 염색하여 UV trans-illuminator(Gel-Doc 2000; Bio-Rad, USA)를 통해 증폭된 유전자를 관찰하였다.

양성으로 확인된 18S rRNA gene PCR products는 total volume 100 μL가 되도록 하여 GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit(GE Healthcare, UK)를 사용하여 PCR DNA 방법으로 정제하여(purification) 최종 40 μL의 산물을 얻었다. 이 방법으로 얻은 증폭산물은 direct sequencing에 사용하여 유전자 염기서열을 확인, GenBank database의 유사 *Theileria* 18S rRNA gene(Table 1)들과 비교하였다.

Table 1. 18S rRNA gene sequences of *Theileria* (*T.*) spp. in GenBank

Name	Origin	GenBank accession number
<i>T. sergenti</i>	USA	AY661514
<i>T. sergenti</i>	Japan	AB016074
<i>T. buffeli</i>	USA	AY661512
<i>T. buffeli</i>	Netherlands	AF236094
<i>T. buffeli</i>	South Africa	TB18SRRN
<i>Theileria</i> spp.	USA	TSU97047
<i>Theileria</i> spp.	China	DQ104610

Theileria MSP gene을 target으로 하는 nested PCR 증폭 및 염기서열 분석

Theileria 18S rRNA 진단 검사에서 양성을 보인 sample 중 anemic 그룹에 속한 젓소 16두와 non-anemic 그룹에 속한 젓소 10두를 무작위로 선택하여 *Theileria* MSP gene으로 유전자를 증폭하여 sequence 분석에 사용하였다. Primer는 첫 번째 증폭 primer 한 쌍 {MSP P³² gene인 Ts-U(5'-CAC GCT ATG TTG TCC AAG AG-3'), Ts-R(5'-TGT GAG ACT CAA TGC GCC TA-3')} [30]과 nested PCR primer 한 쌍 {MSP P³³, P³⁴(F: 5'-TAT GTT GTC CAA GAG ATC GT-3', R: 5'-TGA GAC TCA GTG CGC CTA GA) [12]}으로 구성되었고, 반응조건은 35 cycle의 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min으로 후 72°C에서 4분 post-extension으로 구성하였다.

증폭 산물의 확인은 위의 방법과 마찬가지로 실행되었다. 증폭 과정 및 증폭 산물의 과정, 그리고 산물의 정제 과정은 위와 동일하게 실행하였다. 보다 정확한 염기서열 확인을 위해 정제된 증폭 산물은 gene cloning and nucleotide sequencing과정을 거쳤는데, 정제 산물을 pGEM-T vector와 함께 DH5 competent cell에 삽입하여 ampicillin(100 mg/mL), X-gal(2%), IPTG(20 mg/mL)이 첨가된 LB plate에서 37°C, overnight 평판 배양하였다. 이후, cloning양성으로 판정되는 white colony만을 선택하여 LB broth에서 증균 시킨 후 plasmid DNA만을 순수하게 추출하였다(Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA). Transformation 여부는 *EcoR*-I(BeamsBio, Korea) enzyme digestion(37°C, 1 h)을 통해 확인하였다. MSP gene은 한 sample당 두 개의 colony를 선택하여 sequencing을 실시하였다.

증폭된 MSP gene DNA의 염기들은 SP6와 T7 primer를 이용해 sequencing(Genotech, Korea)을 수행하였고, Data Collection software(ver. 2.1; ABI Prism, USA), Sequence analysis software(ver. 2.1.1; ABI Prism, USA), 그리고 Chromas software(ver. 2.3; Technelysium,

Table 2. MSP gene sequences of *T. buffeli*-like parasites

Name	Origin	GenBank accession number
<i>T. sergenti</i>	Japan (Ikeda)	D11046
<i>T. sergenti</i>	Japan (Aomori)	D50304
<i>T. sergenti</i>	Japan (Chitose)	D12689
<i>T. sergenti</i>	Japan (Fukushima)	AB016280
<i>Theileria</i> spp.	Japan (Okinawa)	AB218442
<i>Theileria</i> spp.	Japan (Okushiri)	D87205
<i>Theileria</i> spp.	China (Macheng)	EU584238
<i>T. sergenti</i>	China	DQ078264
<i>Theileria</i> spp.	Thailand	AB081329
<i>T. buffeli</i>	Australia (Warwic)	D11047
<i>T. orientalis</i>	England (Essex)	AB008369
<i>Theileria</i> spp.	Jeju	D87198
<i>Theileria</i> spp.	USA	AB010702
<i>T. annulata</i>	Netherland	AF214834

Australia)를 이용하여 수집, 분석하였다. 또한 Biotechnology Information(NCBI, USA), BLAST network service(NCBI, USA)를 통하여 유사한 염기서열의 존재 여부를 조사 및 확보하였다(Table 2).

아미노산 전사 및 항원성 분석

DNA sequence로부터 전사되는 아미노산 염기서열의 분석은 Sequence Manipulation Suite(JavaScript program)를 이용하여 수행하였고, antigenicity analysis는 DNASTAR software package(DNASTAR, USA)를 이용하여 수행하였다. 항원성 분석을 통하여 sample들을 일정한 type으로 나눈 후 각 type과의 유사 sequence들을 수집하였다. 수집된 자료를 토대로 본 실험에서 증폭된 MSP gene의 DNA sequence와 GenBank database에서 얻은 유사 strain sequence들과의 차이를 비교 분석하였다. Multiple sequence alignment 및 sequence identity 계산은 Multalin software(INRA, France)와 ALIGN(GenStream, France)을 이용하였다. 최종적으로 위에서 분석된 자료를 토대로 하여 MSP gene sequence data와 CBC data와 비교 분석을 실시하였다.

결 과

혈액 검사 결과

젓소의 적혈구 용적 수치를 토대로 빈혈 그룹과 정상 그룹으로 나누어 본 결과, 7월에 채혈한 혈액(18두)은 모두 빈혈 그룹으로 나타났고, 평균 적혈구 용적(packed cell volume, PCV)이 21.14.3%이었다. 그러나 빈혈 그룹의 평균 PCV는 9월에 28.62.3%(n = 13), 11월에 29.71.7%

Table 3. The mean Packed Cell Volumes data of Holstein in Jeju island

Months	No. of anemic sample / No. of non-anemic samples	Anemic group	Non-anemic group
July	18 / 0	21.14.3%	0
September	13 / 7	28.62.3%	33.92.1%
November	8 / 11	29.71.7%	36.52.5%
Total	39 / 18	25.44.3%	35.52.1%

Table 4. Detection of *Theileria* 18S rRNA gene by PCR from cattle in Jeju island

Months	No. of PCR positive / No. of tested samples (%)
July	18 / 18 (100)
September	19 / 20 (95)
November	19 / 19 (100)
Total	56 / 57 (98)

(n=8)이었다. 정상 그룹(7두)의 평균 PCV는 9월, 11월에 각각 33.92.1%(n=7), 36.52.5%(n=11)이었다(Table 3).

PCR 양성 검출율 결과

7월에 채혈한 총 18두의 젓소에서 모두 *Theileria* PCR 양성반응을 보였고 9월에는 20두 중 1두가 양성반응을 보였으며 11월에는 19두 전부 양성반응을 보여 총 57두 중, 56두가 양성으로 98%의 감염율을 나타냈다(Table 4). 증폭된 젓소의 양성 sample 중 1개의 sample을 무작위로 선택하여 유전자 분석(sequencing)을 실시, 유사 염기 서열들과 비교하여 본 결과, 증폭 산물은 *Theileria* 18S rRNA gene의 부분 산물임을 확인할 수 있었다.

아미노산 전사 및 항원성에 따른 type 분류

PCR진단에 의한 *Theileria* 양성 젓소 중, 무작위로 26두를 선택하여 *Theileria* MSP gene 유전자로 증폭시킨 후, 총 52개의 MSP gene sequence를 얻었다(cloning시 1마리당 2개의 colony를 선택하여 반복 실험하였음). 그 결과 본 실험에서 증폭된 젓소 DNA sequence는 예상 amino acid sequence와 95% 이상의 유사성을 나타냈다.

젓소의 MSP gene sequence는 517~571 bp 부분의 variation이 가장 심하였고, 또한 전사된 아미노산 서열을 계산하여 GenBank database에서 수집한 strain의 상응 부분을 비교, 분석할 수 있었다(Fig. 1). 최종적으로 이렇게 분석된 antigenicity 그래프의 다양성을 토대로 MSP gene sequence 52개를 6개의 type(I~VI)으로 분류하였다(Fig. 2). 이 중, type IV의 경우 sequence homology

	173	190
D11046	NFKVKKVMFEEKDVGDSN	
DQ078264	*****	
HC 25-1	*****	
AB218442	A*****K*****AN	
HC 1-1	A*****K*****AN	
D87205	A*****K*****AN	
HC 24-2	A*****K*****AN	
HC 19-2	T*****K*****AN	
AB016280	****T**K*****E****K	
HC 16-2	****T**K*****E****K	
AB081329	****S**K*****V**K*ES	
HC 2-1	****S**K*****V**K*ES	
EU584237	A*****S*K****LV****PK	
HC 14-1	A*****S*K****LV****PK	

Fig. 1. Comparison of the partial amino acid sequences from translated DNA sequence of Holstein in Jeju and translated MSP genes of *Theileria* parasites sequence from the GenBank database. Ikeda, Japan (D11046); China (DQ078264); Okinawa, Japan (AB218442); Okushiri, Japan (D87205); Fukushima, Japan (AB016280); Thailand (AB081329); Macheng, China (EU584237); HC: 1-1, 2-1, 14-1, 16-2, 19-2, 24-2, 25-1-*Theileria* isolate from Holstein cattle in Jeju.

에 근거하여 2개의 아-타입으로 분류되었다.

총 52개의 colony중 anemic group에 속하는 colony는 32개이고, non-anemic group은 20개였다. Type에 따른 염기 서열분석 결과, type I, type II, type III, type IV-1, type IV-2, type V 그리고 type VI이 각각 Macheng, China(99.5%, EU584237), China(99.0%, DQ078264), Thailand(99.2%, AB081329; Thai type), Okinawa, Japan (98.7%, AB218442), Okushiri, Japan(98.4%, D87205), Fukushima, Japan(99.9%, AB016280), 그리고 Okushiri, Japan(98.4%, D87205)과 높은 유사성을 나타내었다. 그 밖에 Australia Warwick의 *T. buffeli*(D11047, B1 type)와 96.7%, England Essex의 *T. orientalis*(AB008369, B2 type)와 type I이 96.7%, Japan의 Ikeda strain인 *T. sergenti*(D11046, I type)와 type II가 99.0%, Aomori의 *T. sergenti*(D50304)와 type III가 99.2%, Japan의 Chitose strain의 *T. sergenti*(D12689, C type), Korea Jeju *Theileria* spp. (D87198)와 type 99.9%, 98.8%의 homology를 나타내었다.

본 실험에서 증폭된 sequence들과 USA East Texas의 *Theileria* spp.(AB010702)와는 72.3~75.5%의 homology를, Netherland의 *T. annulata*(AF214834)와는 60.3~62.3%의 낮은 homology를 나타내었다(Fig. 3).

Fig. 2. Antigenicity analysis for Holstein cattle. The results of MSP gene sequence, translated amino acid sequence and antigenicity analysis were sorted into 6 types. A: Type I, similar to *Theileria* spp. (China; EU584237) with 99.5% homology; B: Type II, similar to *T. sergenti* (China; DQ078264) with 99.0% homology; C: similar to *Theileria* spp. (Thailand; AB081329) with 99.2% homology; D: IV-1, similar to *Theileria* spp. (Japan; AB218442) with 98.7% homology; E: IV-2, similar to *Theileria* spp. (Japan; D87205) with 98.4% homology; F: type V, similar to *T. sergenti* (Japan; AB016280) with 99.9% homology; G: type VI, similar to *Theileria* spp. (Japan; D87205) with 98.4% homology.

Table 5. The number of sample according to the type in seasonal change in Holstein

Months	Type I	Type II	Type III	Type IV	Type V	Type VI	Total
July	10	0	2	3	1	0	16
September	10	0	3	0	5	0	18
November	10	2	3	1	1	1	18
Total	30	2	8	4	7	1	52

MSP gene의 다양성과 항원성에 관한 비교

월별 분포 결과, 빈혈군이 제일 많은 7월에는 type I

이 10, type III이 2, type IV가 3, 그리고 type V가 1로 나타났고 9월에는 type I이 10, type III이 3, type V가 5

Fig 3. Phylogenetic tree based on *Theileria* MSP gene sequences. the sorted MSP gene sequences of Holstein cattle I-type, II-type, III-type, IV_1-type, IV_2-type, V-type and VI-type were similar to that of *Theileria* spp. GenBank accession numbers of the MSP sequences are: *T. annulata* (AF214834), *T. parva* (Z48740), Ikeda, Japan (D11046), China (DQ078264), Thailand (AB081329), Fukushima, Japan (AB016280), Okushiri, Japan (D87205), Macheng, China (EU584237), Warwick, Australia (D11047), Essex, England (AB008369), and Okinawa, Japan (AB218442).

Table 6. The number of sample according to the type in anemic and non-anemic group in Holstein (%)

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Type V	Type VI	Total
Anemic	20 (62.5)	0 (0.0)	4 (12.5)	3 (9.4)	4 (12.5)	1 (3.1)	32
Non-Anemic	10 (50.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	3 (15.0)	0 (0.0)	20
Total	30 (57.7)	2 (3.8)	8 (15.4)	4 (7.7)	7 (13.5)	1 (1.9)	52

를 나타냈으며 11월에는 type 별로 각각 10, 2, 3, 1, 1, 1을 나타내었다(Table 5). 결국, type I~VI이 각각 20(62.5%), 0(0.0%), 4(12.5%), 3(3.1%), 4(12.5%), 1(3.1%)로 나타났고 non-anemic 그룹에서는 type I~VI이 각각 10(50.0%), 2(10.0%), 4(20.0%), 1(5.0%), 3(15.0%), 0(0.0%)을 차지하였다(Table 6).

고 찰

한국의 전체적인 지형으로부터 볼 때 산이 많고 고온 다습한 기후 특징으로 인해 진드기가 많이 서식하고 있고 이에 따른 소에서의 진드기 매개성 질병도 많은 것으로 알려져 있다. 이중 *T. sergenti*의 경우 전 지역에 걸쳐 대부분의 소에 감염되어 있다 [9, 10]. 따라서 *T. sergenti*

에 대한 진단 및 연구는 한국에서 많이 진행되어있는 편으로 광학 및 전자현미경적 관찰법 [3], *T. sergenti*충체 특이 DNA probe를 이용한 Southern blot hybridization [4] *T. sergenti* DNA단편을 특이적으로 증폭하여 진단하는 중합효소연쇄반응 [5] 등으로 연구를 실시한 전례가 있다. 이러한 방법 중에서 PCR 기법을 이용한 진단방법이 hybridization 방법에 의한 진단보다는 경제성 및 특이성 면에서 더욱 효과적이며 빠른 시간 내에 진단할 수 있는 방법으로 판단되어, 본 실험에서도 *Theileria*에 대한 검출은 PCR 방법을 이용하였다.

월별 분포를 보면 7, 9, 11월에 채혈한 sample에서 98%의 검출율을 나타내었는데, 이는 100%의 감염율을 나타낸 Lee 등 [19]의 결과와 비슷한 양상을 보인다. 특히, 본 연구진의 예비 연구 결과, 5월에 수집된 sample

에서는 55%의 양성 감염율을 나타내었는데, 아마도 진단기 활동이 활발해지는 7월에서 11월에는 감염율이 높은 것으로 사료된다.

Non-pathogenic *Theileria*는 한국, 일본, 러시아, 중국 등 극동지역 나라와 호주에 분포되어있으며 [6, 21, 31], 이에 관한 연구가 활발히 전개되고 관심을 가지는 지역도 일본, 한국, 중국 등 분포 국가들이다 [12, 15, 28, 33]. 특히 일본의 경우, *Theileria* 18S gene과 더불어 *Theileria* MSP에 관한 비교 실험을 하여 immunodominant piroplasma surface protein 인 P^{32/34}의 allelic form을 구별하였다 [11, 13, 23, 34]. Onuma 등 [22]은 일본에는 Ikeda type(I), Chitoshi type(C), Buffeli type(B1, B2)이 존재한다고 서술하였는데 non-pathogenic *Theileria*가 분포되어 있는 국가들은 이 분류 방법을 많이 따르고 있다. 예를 들어 Taiwan isolate에서 MSP gene PCR test를 실시하였는데 C type, B1 type만 검출되고 I type은 없었고 [32] Australian cattle의 경우 B1과 C type이 검출되었으며 [17], Turkey에서는 두 개의 allelic MPSP type(B와 C type)을 발견하였다고 보고되었다 [2]. 이밖에 Italian cattle에서 처음으로 C type과 *T. buffeli/orientalis*의 혼합감염 보고가 있었다 [25].

한국의 경우에는 Kakuda 등 [11]이 모든 sample에서 I type이 검출되었고 I type을 동반한 C type, B1, B2 type이 있다고 보고하였는데, 최근 Ko 등 [15]의 연구에 따르면 한국 제주도 Black cattle에서는 I type보다는 C type이 더 우세를 차지하고, B type에서는 B1 type이 많은 검출을 보였고 나머지는 B1+B2 type인 경향을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서도 보면 젓소에서는 B1 type(57.7%)이 가장 많이 검출되었고 Thai type(15.4%)이 뒤를 이었으며 C type, B2, I type순으로 검출되었다. 이는 모든 sample에서 I type이 검출되었다는 Kakuda 등 [11]의 보고와도 다르고 C type이 가장 우세를 점하였다는 Ko 등 [15]의 보고와도 차이가 있다. 다만 모든 sample에서 I type이 검출되지 않은 점과 B type에서 B1 type이 많이 검출된 점에서 Ko 등 [15]의 결과와 일치하다. Kakuda 등 [11]의 경우 Sample 채취한 지역이 김포, 강릉, 안문도, 제주도(소량 수집) 등으로 모든 Sample을 제주도에서 수집한 본 실험과는 약간의 지역차이가 있을 수 있고, Ko 등 [15]과는 Jeju Black cattle과 종간의 차이, 그리고 PCV수치의 차이 때문에 약간의 차별화된 결과가 있을 수 있다고 본다.

이번 실험에서 총 52개의 sequence를 얻었는데 이들을 I, C, B, Thai type으로 분류하는데 이들 type과 유사하지 않은 sequence가 있는 등 제한적인 면이 있어서 위 방법과는 다른 방법으로 전체 sequence를 분류하였다. amino acid를 토대로 antigenicity 분석을 실시하였고 이

antigenicity에 근거하여 이번 실험에서 얻은 sequence들을 I-VI개 type으로 나누어 비교 분석하였다. I, C, B, Thai type 외의 분류는 Kim 등 [14]과, Zakimi 등 [34]의 sequence 분석을 통한 분류 등이 있는데 본 실험에서처럼 antigenicity 분석을 토대로 한 분류방법은 처음 시도되었다.

Kim 등 [14]의 sequence의 type 1과 본 실험에서 증폭된 sequence의 type V, 9.3~99.7%의 높은 homology를 나타내었다. 그리고 Kim 등 [14]의 type 4(D87205, Okushiri, Japan)와 본 실험에서의 type IV-2의 sequence들이 높은 homology(젓소: 85.6~99.6%)를 나타내었다. 그 외 type 5(D87198, Jeju, Korea) 등은 80%대의 낮은 homology를 나타내었다.

Zakimi 등 [34]이 분류한 type 1, 2, 3, 4, 7은 본 실험에서 각각 type V, II, I, IV, III와 90% 이상의 유사도를 나타내었으나, type 5와 type 6은 각각 80%, 70%의 유사도를 나타내었다. 즉 일본에서는 검출된 MSP gene type 5와 type 6는 제주도 젓소에서는 검출되지 않았다. 이 점에 대해서는 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

이번 실험에서 MSP gene을 증폭하기 위하여 선택된 18S gene 양성인 젓소를 각각 anemic group과 non-anemic group으로 나누어 비교를 하였다. Anemic group인 경우 평균 PCV 수치가 $23.3 \pm 5.7\%$, non-anemic group인 경우 평균 PCV 수치가 $37.5 \pm 1.6\%$ 였다(결과에 나타내지 않았음). non-anemic group에서 PCV 수치가 normal range에 있음에도 불구하고 모든 sample에서 양성 반응이 나타났다. Ko 등 [15]의 연구에서도 같은 결과가 나타났는데 이로써 준 임상적인 감염이 존재한다는 것을 알 수 있다 [27].

*T. sergenti/buffeli/orientalis*사이의 병원성 상호관계는 정확히 밝혀지지 않았지만, type I는 type C와 B보다 병원성이 강하다고 하는 연구가 있었다. 또한 한국에서는 Ikeda stock은 Fukushima stock 보다 병원성이 강하고 모든 *Theileria* isolates가 type I이었을 때 소에서 심한 임상증상을 나타내었다는 보고가 있다 [11]. 본 연구에서 결과 젓소의 경우에는 B1 type과 유사성을 가지고 있는 type I이 가장 많았고(30 of 52) 다음으로 Chitose type과 유사한 type V(7 of 52)이 많은 것으로 나타났다.

이를 세분화하여 anemic 과 non-anemic으로 비교하여 보았을 때 anemic group에서 type I이 가장 많이 검출되었고(20 of 32) type II의 경우 0건을 기록하였으며 Thai type과 유사한 type III와 type V의 경우 각각 4건씩 나타났다.

월별 분석의 경우 유의성 있는 결과를 얻지 못하였는데 이는 병원체의 검출 및 sequence에 대한 분석만 이루어졌고 정량적인 연구 등을 진행하지 못한 것, 그리고

월별로 채취한 sample 수의 불일치 등과 연관이 있을 것으로 생각된다.

한 sample 당 두 개의 colony를 선택하여 sequence 분석을 실시하였는데 같은 sample에서 얻은 두 개의 sequence는 서로 같은 type에 속하여 있을 때도 있고 그렇지 않을 때도 있었다. 이로부터 하나의 개체에 다양한 종류의 MSP genotype이 존재함을 알 수 있다. 즉 기생충(parasite)의 mixed population은 다양한 종류의 MSP genotype의 조합(combination)을 지니고 있다고 볼 수 있을 것이다 [16, 22, 25].

결 론

T. buffeli(*T. sergenti*/*T. orientalis*)는 한국, 중국, 일본 등의 극동아시아 지역에 분포하고 있는 주혈원충으로서 소에게 식육 저하, 발육 부진, 빈혈, 발열, 그리고 황달 등의 많은 임상증상을 나타내며, 중증에서는 유산, 및 폐사에 이르게 하여 양축농가에 많은 경제적 손실을 끼치고 있는 병원체이다. 본 연구는 국내 Holstein 젖소에 감염되어 있는 타일레리아의 주요항원단백질(major surface protein) 유전자의 다양성을 분석해 보고자 수행되었다. 나아가 MSP 유전자의 다양성과 타일레리아의 병원성과의 관계도 분석하였다. 이를 위하여 총 57마리의 젖소 우 혈액을 공시재료로 사용하여 혈액검사와 18S rRNA를 표적으로 하는 PCR을 수행하였다. 그 후, 타일레리아 18S rRNA에 양성인 26마리(빈혈군: 16, 정상군: 10)를 무작위로 선발하여 MSP유전자의 염기 서열을 반복하여 분석하였다. 총 52개의 염기서열 결과는 다변성 부위에 따라 크게 type I에서 type VI까지 6가지 형태로 나눌 수 있었는데, 이는 유전자은행(GenBank)에 등록되어 있는 다음의 유전자형과 98.4% 이상 일치하였다[*T. sergenti*(China; DQ078264), *Theileria* spp.(Thailand; AB081329), *T. sergenti*(Fukushima strain, Japan; AB016280), *Theileria* spp.(China; EU584237), *Theileria* spp.(Okinawa strain, Japan; AB218442) *Theileria* spp.(Okushiri strain, Japan; D87205), *Theileria* spp.(Okushiri strain, Japan; D87205)]. 그 분포로는 type I이 30건(57.7%), type II가 2건(3.8%), type III가 8건(15.4%), type IV가 4건(7.7%), type V가 7건(13.5%), 그리고 type VI가 1건(1.9%)을 차지하였다. 그리고 아미노산 서열을 토대로 한 항원성 분석과 sample의 PCV 수치와의 관계를 비교 분석한 결과, 빈혈군과 비-빈혈군 모두에서 type I이 우세하게 나타났다. 이상의 연구에서부터 한국의 젖소에 감염된 *Theileria*는 그 MSP gene의 type이 다양하게 존재하고 있음을 확인할 수 있다.

참고문헌

1. Aktas M, Altay K, Dumanli N. PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. Vet Parasitol 2006, **140**, 259-263.
2. Aktas M, Altay K, Dumanli N. A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. Vet Parasitol 2006, **138**, 179-185.
3. Baek BK, Kim BS, Lee HI. Fine structure of *Theileria sergenti* merozoite in Korean native cattle. Korean J Vet Res 1990, **30**, 465-471.
4. Chae JS, Lee JM, Kwon OD, Park JH, Chae KS. Rapid detection of *Theileria sergenti* by the polymerase chain reaction in Korean cattle. Korean J Vet Res 1996, **36**, 195-207.
5. Choi EJ, Kang SW, Kweon CH, Jeong WS, Yoon YD, Song HJ. Rapid detection of *Theileria sergenti* by polymerase chain reaction. Korean J Parasitol 1997, **35**, 111-117.
6. Fujisaki K, Kawazu S, Kamio T. The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. Parasitol Today 1994, **10**, 31-33.
7. Inoue M, Van Nguyen D, Meas S, Ohashi K, Sen S, Sugimoto C, Onuma M. Survey of *Theileria* parasite infection in cattle in Cambodia and Vietnam using piroplasm surface protein gene-specific polymerase chain reaction. J Vet Med Sci 2001, **63**, 1155-1157.
8. Irvin AD. Characterization of species and strains of *Theileria*. Adv Parasitol 1987, **26**, 145-197.
9. Jeon Y. Hematological survey on hematozoa of cattle in Korea. Korean J Vet Res 1970, **10**, 2081-2087.
10. Jeon Y. A survey on babesiosis and theileriasis in Korean cattle. Korean J Vet Res 1978, **18**, 23-26.
11. Kakuda T, Shiki M, Kubota S, Sugimoto C, Brown WC, Kosum C, Nopporn S, Onuma M. Phylogeny of benign *Theileria* species from cattle in Thailand, China and the U.S.A. based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes. Int J Parasitol 1998, **28**, 1261-1267.
12. Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K. Molecular cloning and immunological analysis of immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. J Vet Med Sci 1992, **54**, 305-311.
13. Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K. Antigenic differences between Japanese *Theileria*

- sergenti* and other benign *Theileria* species of cattle from Australia (*T. buffeli*) and Britain (*T. orientalis*). Parasitol Res 1992, **78**, 130-135.
14. Kim SJ, Tsuji M, Kubota S, Wei Q, Lee JM, Ishihara C, Onuma M. Sequence analysis of the major piroplasm surface protein gene of benign bovine *Theileria* parasites in East Asia. Int J Parasitol 1998, **28**, 1219-1227.
 15. Ko MS, Lee KK, Hwang KK, Kim BS, Choi GC, Yun YM. Antigenic diversity of *Theileria* major piroplasm surface protein gene in Jeju black cattle. J Vet Sci 2008, **9**, 155-160.
 16. Kubota S, Sugimoto C, Onuma M. A genetic analysis of mixed population in *Theileria sergenti* stocks and isolates using allele-specific polymerase chain reaction. J Vet Med Sci 1995, **57**, 279-282.
 17. Kubota S, Sugimoto C, Onuma M. Population dynamics of *Theileria sergenti* in persistently infected cattle and vector ticks analysed by a polymerase chain reaction. Parasitology 1996, **112** (Pt 5), 437-442.
 18. Kubota S, Sugimoto C, Kakuda T, Onuma M. Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. Int J Parasitol 1996, **26**, 741-747.
 19. Lee JM, Kim MC. Studies for the Effective Diagnosis and Treatment of Bovine Piroplasmosis. Korean J Vet Res 1987, **27**, 321-330.
 20. Matsuba T, Kubota H, Tanaka M, Hattori M, Murata M, Sugimoto C, Onuma M. Analysis of mixed parasite populations of *Theileria sergenti* using cDNA probes encoding a major piroplasm surface protein. Parasitology 1993, **107** (Pt 4), 369-377.
 21. Minami T, Fujinaga T, Furuya K, Ishihara T. Clinico-hematologic and serological comparison of Japanese and Russian strains of *Theileria sergenti*. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 1980, **20**, 44-52.
 22. Onuma M, Kakuda T, Sugimoto C. *Theileria* parasite infection in East Asia and control of the disease. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1998, **21**, 165-177.
 23. Sako Y, Sugimoto C, Onuma M. Expression of a major piroplasm surface protein of *Theileria sergenti* in sporozoite stage. J Vet Med Sci 1999, **61**, 275-277.
 24. Sarataphan N, Nilwarangkoon S, Tananyutthawongese C, Kakuda T, Onuma M, Chansiri K. Genetic diversity of major piroplasm surface protein genes and their allelic variants of *Theileria* parasites in Thai cattle. J Vet Med Sci 1999, **61**, 991-994.
 25. Savini G, Onuma M, Scaramozzino P, Kakuda T, Semproni G, Langella V. First report of *Theileria sergenti* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in Italy. Ann N Y Acad Sci 1998, **849**, 404-407.
 26. Shirakata S, Onuma M, Kirisawa R, Takahashi K, Kawakami Y. Localization of surface antigens on *Theileria sergenti* merozoite by monoclonal antibodies. Nippon Juigaku Zasshi 1989, **51**, 831-833.
 27. Stockham SL, Kjemtrup AM, Conrad PA, Schmidt DA, Scott MA, Robinson TW, Tyler JW, Johnson GC, Carson CA, Cuddihee P. Theileriosis in a Missouri beef herd caused by *Theileria buffeli*: case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis, and experimental transmission. Vet Pathol 2000, **37**, 11-21.
 28. Sugimoto C, Kawazu S, Kamio T, Fujisaki K. Protein analysis of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasms by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Parasitology 1991, **102** (Pt 3), 341-346.
 29. Takahashi K, Yamashita S, Isayama Y, Shimizu Y. Serological response to the indirect fluorescent antibody test of cattle infected with *Theileria sergenti*. Br Vet J 1976, **132**, 112-117.
 30. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, Hiramatsu K, Baek BK, Sugimoto C, Onuma M. Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. J Clin Microbiol 1993, **31**, 2565-2569.
 31. Uilenberg G, Perié NM, Spanjer AA, Franssen FF. *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle: demonstration of the schizont stage. Res Vet Sci 1985, **38**, 352-360.
 32. Wang CT, Kubota S, Kakuda T, Kuo CC, Hsu TL, Onuma M. Survey of *Theileria* parasite infection in cattle in Taiwan. J Vet Med Sci 1998, **60**, 253-255.
 33. Yin H, Luo J, Schnittger L, Lu B, Beyer D, Ma M, Guan G, Bai Q, Lu C, Ahmed J. Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitol Res 2004, **92**, 36-42.
 34. Zakimi S, Kim JY, Oshiro M, Hayashida K, Fujisaki K, Sugimoto C. Genetic diversity of benign *Theileria* parasites of cattle in the Okinawa Prefecture. J Vet Med Sci 2006, **68**, 1335-1338.