pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 199~205 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.199

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유통식육에서의 톡소포자충 검출을 위한 유전자검사법 개발

윤한성 · 서수환 · 곽효선 · 주인선*
식품의약품안전처 미생물과

Real-time PCR assay for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Retail Meats: Proof-of-concept Study

Han Seong Yun, Soo Hwan Suh, Hyo-Sun Kwak, and In-Sun Joo*
Food Microbiology Division, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
(Received February 20, 2017/Revised March 4, 2017/Accepted April 24, 2017)

ABSTRACT - Although many PCR-based assays have been developed, the majority of rapid detection of *Toxoplasma gondii* in animal and their meat product has been dependent on immunogenic assays. Thus, there is still a need for more reliable PCR based detection method for *T. gondii* in retail meats. Recently, a 529-bp repeat element that exists in 200-300 copies per genome of *T. gondii* genome had been spotlighted for its usefulness as potential detection targers. In this study, the 529-bp repeat element was selected for real-time PCR to detect three types of *T. gondii* (type I, II and III). A primer pair targeting 82-bp of the 529-bp element detected all three types of *T. gondii* and showed high level of specificity against 14 different food-borne pathogens as well as 3 protozoan parasites such as *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* and *Entamoeba histolytica*. Application of the new real-time PCR assay in meat samples showed improved detection sensitivity compared to the B1-gene targeted method suggesting potential new target for *Toxoplasma gondii* screening in retail meats.

Key words : *Toxoplasma gondii*, Real-time PCR, Retail meat

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 인수공통전염병인 톡소포자충증(Toxoplasmosis)의 원인이며, 핵이 있는 모든 세포에 침범할 수 있는 원충으로서 전 세계적으로 널리 퍼져있다. 들쥐와 사람을 포함한 대부분의 포유동물의 중간숙주가 되며[1,28], 고양이과 동물인 고양이, 호랑이와 표범 등이 톡소포자충의 유일한 종숙주로서 톡사포자충증의 전파에 중요한 역할을 한다. 사람에게 감염되었을 때는 유산까지 일으키고 때로는 중추신경계까지 영향을 줄 수 있다[21,28,32]. 톡소포자충은 형태학적으로 다른 3가지 감염단계(infection stag)를 가지게 되는데, 감염 급성기에 빠르게 분열하는 단계인 tachyzoite, 만성감염 시 동물 조직에서 cyst를 형성하고 휴면기(dormant) 상태인 bradyzoite, 그리고 oocysts로서 고양이 배설물에서 발견되는 sporozoites 형태로 생활사를 이룬다[3].

톡소포자충은 tachyzoite 표면 단백질에 따라 3가지 형태로 분류할 수 있다. 국내에서 가장 많이 보고된 RH strain과 한국에서 처음 보고된 KI-1 strain이 포함된 제 1형은 독력(virulence)이 가장 높으며, 제 2형에는 ME49, PTG, Beverly strain 등이, 제 3형에는 VEG와 CTG strain 등이 포함되며 이 두 가지 형태는 독력이 약하거나 없다고 알려져 있다[9,12].

인체감염의 경로는 *Toxoplasma* cycsts를 포함하는 가축의 근육이 제대로 조리되지 않은 채 섭취되는 경우[8], 배설물에 오염된 손으로 요리한 음식재료에서의 oocyst 섭취[7,23,34] 장기이식 및 수혈, 임산부에 의한 태아전파(transplacental transmission) 및 tachyzoites의 감염 등이 있다[7,10]. 톡소포자충은 숙주 내에 감염 후 숙주의 면역반응을 회피하고자 근육이나 뇌에 침입해서 tissue cyst를 형성하여 장기간 숙주 내에 기생한다. 이 기간 동안 숙주를 공격하지 않고 머물고 있다가 숙주의 면역력이 떨어질 때 tissue cyst를 터트리고 나와서 숙주를 공격해 사망에 이르게도 한다[13,22,26].

톡소포자충의 감염현황은 국가 및 지역에 따라 5~85%의 다양한 범위의 유병율을 나타내고 있다. 유럽, 미국, 한국 인구의 각각 38% (2004), 10.8% (2004) 및 4% (1990)

*Correspondence to: In-Sun Joo, Food Microbiology Division, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong 2-ro, Osong, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4302, Fax: 82-43-719-4300
E-mail: jis901@korea.kr

라는 높은 감염률이 보고되었다[33]. 주로 고양이를 사육하는 곳, 위생상태가 불량한 곳, 기후가 고온다습한 곳일수록 톡소포자충의 유병이 높다고 알려져 있다[8,24].

본 연구에서는 비교적 새로운 유전자인 529-bp repeat region을 이용하여 식육 내 원충 감염을 확인할 수 있는 실시간 유전자 검출법을 개발하여 식품에 적용할 수 있는 방법을 개발하여 국내 유통 중인 식육에서 인수공통감염원충의 하나인 톡소포자충의 감염 여부를 확인하고자 한다.

Materials and Methods

사용균주

본연구에 사용된 톡소포자충은 Type 1 strain인 RH (ATCC 50147)과 KI-1 (Korean isolate, KCDC), Type 2인 ME49 (ATCC 50611)과 PTG (ATCC 50941), Type 3인 STRL (ATCC 50955) 총 5종이 사용 되었고, 특이도 확인 시험에 사용한 균주는 식품에서 주로 분리되는 식중독 세균 14종 및 원충 3종이 사용 되었다(Table 1).

DNA 추출 및 샘플 전처리

DNA 추출은 NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux, France) 장비를 이용하여 매뉴얼에 따라 진행 하였으며, 추출한 DNA를 이용하여 conventional PCR 및 real-time PCR 실험에 사용 하였다. 식육샘플은 조직 25 g을 블랜더로 파쇄한 후 1 g을 취하여 균주와 동일한 방법으로 DNA 추출하였으며, 추출된 template DNA를 real-time PCR로 증폭하여 결과를 확인하였다.

Table 1. Bacteria and Protozoan parasites used for specificity test

Name	Strain no.
Toxoplasma gondii Type 1(RH)	ATCC 50174
Toxoplasma gondii Type 1(KI-1)	Korean isolate
Toxoplasma gondii Type 2(ME49)	ATCC 50611
Toxoplasma gondii Type 2(PTG)	ATCC 50941
Toxoplasma gondii Type 3(STRL)	ATCC 50955
Bacillus cereus	ATCC 21366
Campylobacter coli	ATCC 33559
Campylobacter jejuni	ATCC 33250
Listeria monocytogenes	ATCC 10145
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 11607
Salmonella enteritidis	ATCC 13076
Staphylococcus aureus	ATCC 13565
Yersinia enterocolitica	KCCM 41657
Escherichia coli	NCCP 11090
Salmonella enteritidis	ATCC 13076
Salmonella typhimurium	ATCC 13311
Shigella sonnei	ATCC 9290
Shigella flexneri	KCTC 2517
Shigellaboydii	KCTC 22528
Cryptosporidium parvum	Waterborne P102M
Giardia lamblia	ATCC 30957
Entomoeba histolytica	Korean isolate

T. gondii 검출용 프라이머 및 프로브 설계

*T. gondii*의 유전자 증폭을 위한 타겟 유전자 부위는 529 repeat region으로 선정하였고 NCBI (National Center for Biotechnology Information) database에 등록된 시퀀스 정보들을 수집하였으며(Table 2), 수집한 유전자염기서열의 alignment를 위해 Clustal W 소프트웨어(http://www.clustal.org)를 사용하였다(Larkin et al., 2007). Table 2의 시퀀스

Table 2. Reference sequences of *T. gondii* 528-bp repeat region

Accession No.	Description
AF146527	*Toxoplasma gondii* repeat region
EF195646	*Toxoplasma gondii* repeat region, partial sequence
FJ656209	*Toxoplasma gondii* strain RH repetitive DNA sequence
AF487550	*Toxoplasma gondii* strain RH repeat region, partial sequence
KC607824	*Toxoplasmagondii* microsatellite sequence; and hypothetical protein gene, complete cds
DQ779192	*Toxoplasma gondii* strain SH repetitive DNA sequence
EF648168	*Toxoplasma gondii* repetitive DNA sequence
DQ779189	*Toxoplasma gondii* strain PYS repetitive DNA sequence
DQ779196	*Toxoplasma gondii* strain ZS1 repetitive DNA sequence
DQ779191	*Toxoplasmagondii* strain RH repetitive DNA sequence
DQ779190	*Toxoplasma gondii* strain QHO repetitive DNA sequence
DQ779193	*Toxoplasmagondii* strain CN repetitive DNA sequence
DQ779188	*Toxoplasma gondii* strain NT repetitive DNA sequence
DQ779194	*Toxoplasma gondii* strain ZCS repetitive DNA sequence
DQ779187	*Toxoplasma gondii* strain GYS repetitive DNA sequence
EF648169	*Toxoplasma gondii* repetitive DNA sequence
DQ779195	*Toxoplasma gondii* strain ZS repetitive DNA sequence
KF872166	*Toxoplasmagondii* repetitive DNA sequence

들을 alignment 하여 최소 mismatches를 가지는 부위에 프라이머 및 TaqMan probe를 설계하였다. TaqMan probe는 Tm (Melting temperature) 값이 프라이머 보다 8~10°C 높게 하였으며 probe의 5' 말단에는 염기서열 중 구아니딘(guanidine, G)이 오지 않게 하였다. 프로브 서열 5' 말단의 형광 물질(Reporter dye)은 6-FAM을 표지하였고, 3' 말단의 형광 제어 물질은 Black Hole Quencher 1 (BHQ-1)를 이용하였으며, 이를 바탕으로 forward primer (ATG AGC TCG CCT GTG CTT G)와 reverse primer (TAA GCT GGA GGA GCG GCA) 그리고 probe (FAM-AGC CAC AGA AGG GAC AGA AGT CGA AGG-BHQ1)를 설계하였다.

Real-time PCR을 이용한 검출한계 및 적정곡선 확인

설계된 프라이머 세트의 증폭이 잘 이루어지는지 확인하기 위해 먼저 real-time PCR을 이용하여 설계된 프라이머, 프로브의 검출한계(lower limit of detection) 및 적정곡선을 확인하였다. 먼저 NCBI를 통해 확인한 유전자 증폭 부위를 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning한 뒤 plasmid를 제작하였고, 이로부터 얻은 plasmid DNA를 10^6~10^0 copies/μl로 10배씩 단계적으로 희석 후 주형 DNA로 사용하여 real-time PCR 진행 하였다. 반응액은 10 pmol/μl로 희석한 forward 및 reverse primer 각 1 μl, 4 pmol/μl로 희석한 TaqMan probe 1 μl, PowerAmp™ Real-time PCR Master Mix (Kogenebiotech, Korea) 10 μl 혼합액에 nuclease-free water 2 μl, 단계적으로 희석한 plasmid DNA를 5 μl 첨가하여 최종 볼륨을 20 μl로 맞추었다. Thermal cycle 조건은 95°C 10분을 반응시켜 Taq polymerase를 활성화시킨 후 95°C 15초, 60°C 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.이때 사용한 real-time PCR 장비는 AB7500 Fast Real-time PCR system (Life technologies, USA)이다.

Conventional PCR을 이용한 증폭산물 확인

Real-time PCR로 증폭곡선 확인 후 conventional PCR을 추가로 진행 하였다. 이를 위한 conventional PCR 반응액과 반응 조건은 real-time PCR과 동일하게 진행 하였으며, 이때 사용한 Thermocycler는 GeneAmp PCR system 9700 (Life technologies, USA)이다. PCR 수행 후 2% agarose (Sigma Co., USA) gel을 이용하여 100 V 전압으로 30분 전기영동하고, PCR 증폭 산물을 확인하였다.

프라이머 세트와 프로브의 민감도 및 특이도 확인

톡소포자충의 타입별 검출한계를 확인하기 위해 Table 1에 나타낸 Type 1, 2, 3의 톡소포자충 genomic DNA를 추출하여 real-time PCR을 실시하였고, 반응액 조성과 thermal cycle 조건은 앞선 방법과 동일하게 진행하였다. 또한 검출한계를 다른 real-time PCR 증폭법과 비교하였고, OIE terrestrial Manual (2008)에서 발표된 B1 gene을 타겟으로 하는 forward primer (TCC CCT CTG CTG GCG AAA AGT)와 reverse primer (AGC GTT CGT GGT CAA CTA TCG ATT G) 그리고 probe (FAM-TCT GTG CAA CTT TGG TGT ATT CGC AG-TAMRA)를 사용하여 민감도를 비교 하였으며, 실험 조건은 앞선 방법과 동일하였다[20]. 특이도 확인은 식중독을 유발하는 세균 14종에서 순수 배양하여 얻은 DNA와 톡소포자충 이 외의 원충 3종의 DNA (Table 1)를 50 ng을 반응액에 첨가하여 real-time PCR 반응을 수행하였으며, 반응액 조성과 thermal cycle 조건은 앞선 방법과 동일하게 진행 하였다.

식육검체에 적용한 Real-time PCR 증폭곡선 확인

설계된 프라이머 세트와 TaqMan 프로브를 식육검체에 적용 했을 때 방해받는 요소 없이 유전자 증폭이 원활히 되는지 확인해 보기 위해 음성판정 받은 식육 검체로부터 얻은 DNA 샘플에 *T. gondii* type 1, type2, type3 DNA (10 pg/μl)를 넣어 실시간 증폭곡선을 확인하였으며, 반응액 조성과 thermal cycle 조건은 앞선 방법과 동일하게 진행 하였다.

Result

Real-time PCR을 이용한 검출한계 및 적정곡선 확인

최적화된 real-time PCR 반응의 검출한계 확인을 위해서 유전자 증폭 부위를 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning한 뒤 plasmid를 제작하였고, 이로부터 얻은 plasmid DNA를 10^6~10^0 copies/μl로 10배씩 단계적으로 희석하였다. 이를 반응액 당 5 μl 첨가하여 3반복 테스트한 결과 10 copies까지 3회 모두 검출되었고 10^0 copies는 3반복 중 1회가 검출되었다(Table 3). 3회 모두 양성의 검출을 보이는 10 copies까지 DNA의 copy 수를 x 축, 이때의 Ct value를 y 축으로 한 표준곡선(standard curve)를 작성하였을 때, 증폭효율이 98.4%로 계산되었으며

Table 3. Real-time qPCR targeted *T. gondii* 529 repeat gene (cloned vector)

Copies	Ct values	Detected/run
10^6	18.52 / 18.56 / 18.49	3/3
10^5	21.84 / 21.92 / 21.88	3/3
10^4	24.85 / 25.12 / 25.08	3/3
10^3	28.62 / 28.69 / 28.64	3/3
10^2	32.24 / 32.26 / 32.28	3/3
10^1	35.12 / 35.14 / 35.17	3/3
10^0	38.45 / - / -	1/3

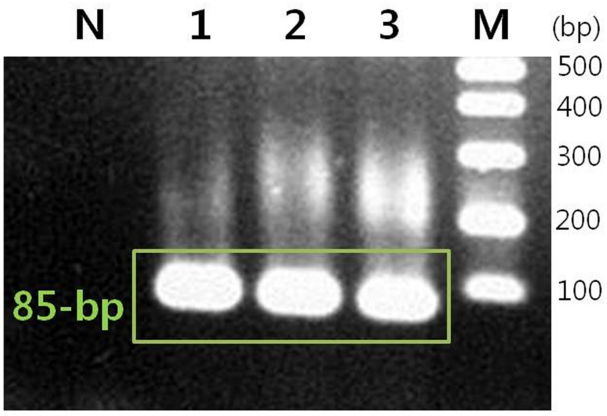

Fig. 1. PCR product confirmation using primers designed for 529 repeat region (Lane N: No template control (NTC), Lane 1: *T. gondii* type 1, Lane 2: *T. gondii* type 2, Lane 3: *T. gondii* type 3, Lane M: 1kb DNA size marker).

이때 R^2 값은 0.999로 나타나 DNA 희석배수의 직선성을 확인 할 수 있었다.

Conventional PCR을 이용한 설계된 프라이머의 증폭산물 확인

Conventional PCR 결과 Fig. 1과 같이 톡소포자충 type 1, type 2 및 type 3 DNA를 주형(template)로 사용하였을 때, 85 bp에서 뚜렷한 band가 생성되었음을 확인하였다. 톡소포자충의 529-bp repeat region의 경우 200~300 copy의 반복 서열을 가지는 특성이 있기 때문에 일부의 비타겟 유전자로 생각되어지는 밴드가 250~50 bp 부근에서 관찰되었다.

프라이머 세트와 프로브의 민감도 및 특이도 확인

본 연구에서 개발한 프로브, 프라이머 세트와 기존에 사용된 B1 gene을 타겟으로 하는 프라이머 세트와 타입별 검출한계를 비교한 결과, 타입 1(RH & KI-1)과 타입 3(STRL)에서는 같은 민감도를 보였으나, 타입 2 톡소포자충(ME49 & PTG)에서는 더 낮은 검출한계를 보여 민감도가 더 좋은것으로 확인되었다(Table 4).

또한 설계된 프라이머의 반응 특이도를 알아보기 위해 식품에서 주로 분리되는 식중독 세균 14종 및 원충 3종에

Table 4. Mean Ct values of triplicated real-time qPCR of *T. gondii* strains

	RH (type 1)		KI-1 (type 1, Korean isolate)		ME49 (type 2)		PTG (type 2)		STRL (type 3)	
Conc. (ng/μl)	529 repeat	B1	529 repeat	B1	529 repeat	B1	529 repeat	B1	529 repeat	B1
1	19.61	22.04	20.94	25.38	14.55	21.53	19.51	23.70	22.53	28.49
1.E-01	23.30	25.61	24.73	29.12	18.74	25.15	22.90	28.22	26.36	31.16
1.E-02	26.94	29.29	28.57	32.82	23.18	28.67	26.51	32.15	30.17	34.34
1.E-03	30.61	32.85	31.83	37.12	26.79	32.03	30.54	36.97	33.67	39.26
1.E-04	34.54	36.33	**35.25**	-	31.24	36.95	**33.42**	-	37.84	39.68
1.E-05	37.92	39.98	-	-	35.67	39.08	**37.09**	-	-	-
1.E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

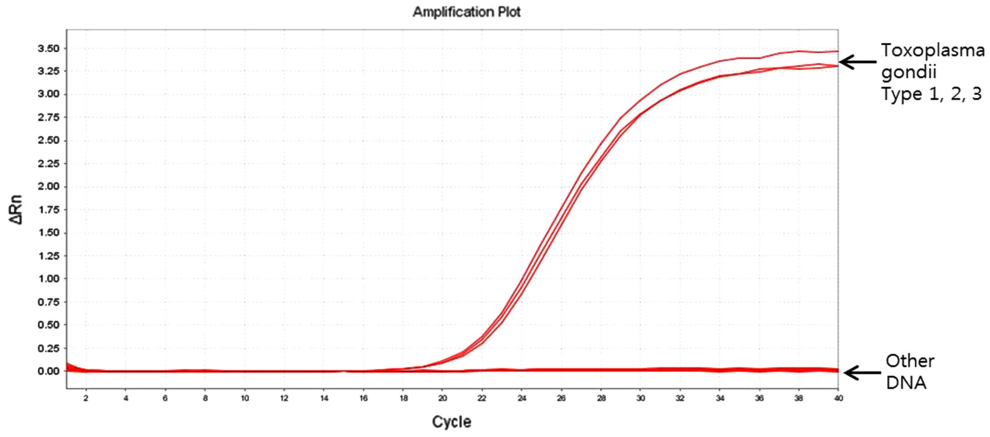

Fig. 2. A schematic flow diagram of 529 targeted real-time qPCR results: 3 *T. gondii* strains had strong amplification signals while other microorganisms showed no amplification.

대해 특이도를 비교한 결과, 검출 목표 시료인 *T. gondii*의 DNA에서만 증폭곡선이 확인되었으며, 나머지 DNA 시료에서는 모두 증폭 반응이 일어나지 않은 것을 확인하였다(Fig. 2).

식육검체에 적용한 Real-time PCR 증폭곡선 확인

식육검체에 적용하였을 때 설계된 프라이머 세트와 TaqMan 프로브가 방해 받는 요소 없이 유전자 증폭이 원활히 되는지 확인해 보았으며, 식육에서 뽑은 DNA샘플에 *T. gondii* type 1, type 2, type 3 DNA를 넣어 실시간 증폭곡선을 확인한 결과, *T. gondii* type 1, type 2 및 type 3의 genomic DNA가 모두 동일한 패턴의 곡선을 보인 양성으로 나타났다. 이는 식육에서 추출한 DNA 샘플에 real-time PCR의 증폭에 방해가 되는 정도의 증폭방해물질(inhibitor)가 존재하지 않는다는 것을 의미한다.

Results and Discussion

현재까지 톡소포자충의 유전학적 검출법에 관한 논문은 다양하게 발표가 되어있다. Burg 등(1989)은 conventional PCR법을 이용한 톡소포자충의 검출법을 개발하였으며, 35-fold repetitive B1-gene을 타겟으로 검출을 실시하였을 때, 검출 한계가 10 parasites로 나타났다고 보고하였다. 또한, Lin 등(2000)은 같은 B1-gene을 목적 유전자로하는 실시간 유전자증폭법(real-time PCR)을 개발하였으며, Buchbinder 등(2003)은 톡소포자충의 P30 gene과 B1 gene을 목적 유전자로 하는 PCR 검출법을 개발하여 그 결과를 비교하였다. 두 목적 유전자 모두 10 tachyzoite까지의 검출한계를 보여주었다. 이와 비슷하게 Jones 등(2000)은 P30, B1, 그리고 18S rRNA gene을 목적유전자로 하는 PCR 검출법을 개발하고 이를 비교하였다. 이 발표에서는 B1 gene이 다수의 인체 조직을 대상으로 가장 높은 민감도를 보여주었다.

Homan 등(2000)이 연구한 자료에 의하면 529 repeat region은 톡소포자충 한 개체에 200~300 copies가 존재한다고 알려져 있어, 톡소포자충의 검출 민감도를 높이는데 큰 기대를 받고 있는 유전자 부위라고 하였으며, B1 gene 과 529 bp repeat region을 타겟으로 하는 각각의 프라이머 세트를 이용하여 conventional PCR 실험한 결과 529 bp repeat region이 B1 gene 보다 약 2 log 낮은 민감도를 보였다.

본 연구에서는 이 유전자를 활용하여 검출민감도를 최대한으로 높였고, 또한 200~300 bp의 유전자가 각기 다른 부위에 포함되어 있어 프라이머와 프로브를 잘못 디자인하면 특이도에 영향을 받을 수 있기 때문에 NCBI로부터 얻은 유전정보를 alignment하여 최소한의 mismatch를 가지는 부위를 골라냈으며, TaqMan probe는 Tm (Melting temperature) 값을 프라이머 보다 8~10°C 높게 설정하여 사용하였다. 비특이적 반응에 의한 위양성을 최소화할 수 있게 프라이머 및 프루브를 수동으로 제작하여 실시간유전자 증폭법에 적용하였다.

톡소포자충은 국내에서는 큰 이슈가 되지는 않지만, 유럽 및 북미에서는 건강에 큰 위협을 주는 요소중의 하나로 관리되어지고 있다. Dubey 등(1998)은 톡소포자충의 인체 감염은 전 세계적으로 흔하게 발생하는데 미국과 영국의 경우 인구의 16%~40%, 중앙아메리카, 남아메리카, 유럽의 경우 50%~80%의 감염 현황을 보고 하였다. 국내의 경우 Shin(2007)이 1.9%~7.2%의 감염률을 보고 하였고, Song 등(2005)은 임산부의 혈청과 양수를 조사하여 0.88%의 항체 양성율을 보고 하였다. Kim 등(2015)은 우리나라 감염율이 외국에 비해 낮게 나타나는 이유를 가정에서 고양이를 키우는 비율이 비교적 적고, 돼지고기를 생식하는 경우가 거의 없기 때문인 것으로 보고하였으며, Cheong 등(1994)은 인체 감염 비율을 일반인에 비해 축산업 및 식육을 취급하는 업자와 같이 톡소포자충과의 접촉 기회가 많은 사람들이 다소 높은 항체 보유율을 나타낸다고 하였다.

Jones와 Dubey는(2012) 1960년부터 2012년까지 발표된 미국의 톡소포자충 관련 논문을 정리하여 발표 하였고, 돼지 0.3%~92.7%, 양 4%~77.9%, 염소 25.8%, 소 0%, 닭 0%, 사슴 17%~28.7%, 흑곰 35.7%~70%의 양성율을 나타냈다. 또한 Racka 등(2015), Bartova 등(2006)이 발표한 자료의 경우 체코의 wild bore(야생 멧돼지)의 혈청학적 양성율이 30~40%대로 나타났다. 국내의 경우 Kim 등(2015)이 조사한 자료에 의하면 국내 소의 톡소포자충의 항체 보유율은 4.6%에서 20.7%로 보고 되었으며, 돼지의 경우 16.8%에서 22.9%로 보고 되었다.

Kim 등(2010)이 국내 축사 돼지를 모니터링 한 결과, 38.3% 정도의 항체 양성률이 나와 톡소포자충에 대한 노출이 적지는 않다는 것을 확인할 수 있었으나, 돼지 300마리 혈액과 도축장에 출하되는 돼지 근육 200건에 대하여 conventional PCR 실시한 결과 모든 시료에서 음성으로 판정 되어, ELISA 실험 결과가 현재의 감염을 대변해 주지 않는다고 판단된다. Cazabonne 등(1994)은 IgG 항체가 2~3주부터 나타나기 시작해 6~8주에 최고치에 이른다고 하였으며, Lee 등(1995)은 쥐에 톡소포자충 약독주(Beverley)를 감염시켜 혈청내 항체를 조사한 결과, 감염마우스의 IgG 항체가는 감염 15일부터 눈에 띄게 증가하였으며, 실험 최대 기간인 60일까지 꾸준히 증가 하는 것으로 나타났다. Seo 등(2009)이 발표한 자료에 의하면 실제 체내에 존재하는 충체수와 항체 양성률 간 차이가 나는 이유는 충체가 사멸된 후에도 일정기간 동안 항체를 보유 하고 있어 양성반응이 나타날 수도 있기 때문이라고 하였다. 다시 말해, 현재의 감염상태를 확인해야 하는 감염실태조사나 식중독 원인조사 등에서는 ELISA법 보다 실시간유전자증폭법 등의 유전자 기반의 검출법이 적합하다고 판단된다.

본 연구에서는 529 repeat region 부위에 프라이머 및 프로브를 설계하였으며, 실험한 결과 검출 한계는 10 copies까지 모두(3/3) 검출되었고, 85 bp에서 뚜렷한 band가 생성되어 유전자 증폭이 잘 이루어 졌다. 그리고 B1 gene과 비교 하였을 때 민감도가 더 좋은 것으로 나타났으며, 특이도 확인 시험에서는 *T. gondii*의 DNA에서만 증폭곡선이 확인되었다. 식육검체에 적용하였을 때 증폭방해물질(inhibitor)이 존재하지 않는다는 것도 확인 하였다. 본 연구에서 개발된 유전자 검출법은 국내 유통 중인 식육에서 톡소포자충 감염여부를 확인하는 모니터링에 활용될 예정이다.

Acknowledgement

본 논문은 식품의약품안전평가원 연구사업(과제번호: 15161 축산물 642)으로 수행 되었습니다. 톡소포자충 검출 개발을 위한 프라이머 디자인은 (주)코젠바이오텍의 도움을 받았으며, 원충 및 원충 유전자는 질병관리본부 말라리아 기생충과와 연세대학교 기생충학교실에서 제공 받아 사용 하였습니다.

국문요약

인수공통 감염증의 하나인 톡소포자충의 검출을 위해서는 대부분은 ELISA 법이 사용 되고 있으나, 충체가 사멸된 후에도 양성반응이 나타나는 등 사용에 제한이 있다. 반면 유전자 검출법은 현재 감염상태를 확인 할 수 있기 때문에 식중독 원인조사 등에 적합하다고 판단되어 이를 활용하여 본 연구를 진행하였다. 톡소포자충의 유전정보를 통해 529 repeat region의 염기서열을 얻고, 프라이머 및 TaqMan 프로브를 설계하여 real-time PCR을 이용한 검출법을 개발하였다. 검출한계(lower limit of detection) 및 적정곡선을 확인한 결과 10 genomic DNA copy가 검출한계로 확인되었고, 정량을 위한 곡선은 10^1~10^6 DNA copies까지 0.999의 R^2값을 나타내었다. 개발된 검출법의 증폭효율을 비교하기 위해 B1 gene 타겟 프라이머 세트와 타입별 검출한계를 비교한 결과, type 1, 2, 3 톡소포자충에서 같거나 더 나은 검출한계를 보였다. 또한 식품에서 주로 분리되는 식중독 세균 14종 및 원충 3종에 대해 특이도를 비교한 결과, 모두 음성으로 나타났다. 개발된 검출법을 식육검체에 적용하였을 때 type 1, 2, 3에서 모두 원활한 검출결과를 보여 증폭방해물질이 존재하지 않은 것으로 확인되었다. 본 연구를 통해 개발된 유전자검출법은 국내 유통 중인 식육에서 인수 공통감염 원충의 하나인 톡소포자충의 감염 여부를 확인하는 사전적 모니터링의 방법으로 활용될 예정이다.

References

1. Al-Karmi T., Behbehani K.: Epidemiology of toxoplasmosis in Kuwait. II. *Toxoplasma gondii* in the desert rodent, Meriones crassus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **74**, 745-746 (1980).
2. Bartova E., Sedlak K., Literak I.: Prevalence of *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Vet Parasitol*, **142**, 150-153 (2006).
3. Buchbinder S., Blatz R., Rodloff A.C.: Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Infect Dis*, **45**, 269-271 (2003).
4. Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P., Boothroyd J.C.: Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol*, 1787-1792 (1989).
5. Cazabonne P., Bessieres M.H., Seguela J.P.: Kinetics study and characterization of target excreted/secreted antigens of immunoglobulin G, M, A and E antibodies from mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasittol Res*, **80**, 58-63 (1994).
6. Cheong K.S., An S.C., Kim J.O., Kim N.S., Chang K.H.: A studies on toxoplasmosis antibody from slaughtered pigs and cattle. *Korean J Vet Serv*, **17**, 32-36 (1994).
7. Dubey J.P.: Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **28**, 1019-1024 (1998).
8. Dubey J.P. and Beattie C.P.: Toxoplasmosis of animal and Man. CRC press Inc, Florida, 1-213 (1998).
9. Dubey J.P., Hill D.E., Jones J.L., Hightower A.W., Kirkland E., Roberts J.M., Marcet P.L., Lehmann T., Vianna M.C.B., Miska K., Sreekumar C., Kwok O.C.H., Shen S.K., Gamble H.R.: Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J. Parasitol*, **91**, 1082-1093 (2005).
10. Grigg M.E.and Boothroyd J.C.: Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J Clin Microbiol*, **39**, 398-400 (2001).
11. Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J., Verschueren H.: Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *J Parasitol*, **30**, 69-75 (2000).
12. Howe D.K. and Sibley L.D.: *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human diseases. *J Infect Dis*, **172**, 1561-1566 (1995).
13. Israelski D.M. and Remington J.S.: Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis*, **47**, 413-415 (1993).
14. Jones C.D., Okbravi N., Adamson P., Tasker S., Ligbtman S.: Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18S rDNA Genes of *T. gondii* in Aqueous Humor. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **416**, 34-644 (2000).
15. Jones J.L. and Dubey J.P.: Foodborne Toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*, **55**, 845-851 (2012).
16. Kim E.G., Park H.J., Son G.B., Jung M.H.: Prevalence of *Toxoplama gondii* infection from domestic pig in Gyeongnam province. *Korean J Vet Serv*, **33**, 345-351 (2010).

17. Kim N.H., Kim H.R., Park H.S., Kim Y.S., Lee JH.: Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Toxoplasma gondii* in cattle in Seoul, Korea. *Korean J Vet Serv*, **38**, 233-239 (2015).
18. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins DG.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948 (2007).
19. Lee Y.H., Kim K.Y., Kang M.S., Shin D.W.: Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol*, **33**, 201-210 (1995).
20. Lin M.H., Chen T.C., Kuo T.T., Tseng C.C., Tseng C.P.: Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol*, **38**, 4121-4125 (2000).
21. Lukesova D. and Literak I.: Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol*, **74**, 1-7 (1998).
22. Mastroianni A., Coronado O., Scarani P., Manfredi R., Chiodo F.: Anergic disseminated toxoplasmosis in a patient with AIDS. *Minerva Med,* **88**, 101-104 (1997).
23. Montoya J.G. and Liesenfeld O.: Toxoplasmosis. Lancet **363**,1965-1976 (2004).
24. Neva F.A. and Brown H.W.: Basic & Clinical Parasitology, 6th ed. Norwalk: Appliton & Lange. 46-56 (1994).
25. Racka K., Bartova E., Budikova M., Vodrazka P.: Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (Sus scrofa) in several districts of the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med*, **14**, 71-73 (2007).
26. Romero C.R., Buitron G.R., Amancio C.O., Tay Z.J., Sanchez V.J.T.: Toxoplasmosis and threatened abortion. *Ginecol Obstet Mex*, **66**, 495-498 (1998).
27. Seo M.G., Jang Y.S., Lee E.M., Park N.C., Kwak D.M.: Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and pigs reared in eastern areas of Gyeongbuk province. *Korean J. Vet Serv*, **32**, 131-137 (2009).
28. Sherdering G.R.. Toxoplasmosis and other sysemic protozoal infection. In: Saunders Manual of small animal practice, 3rd ed, Ohio, 219-225 (1996).
29. Shin S.S.: Pathgenicity and prevention of swine toxoplasmosis. *Kor J Vet Publ Hlth*, **21**, 173-181 (2007).
30. Song K.J., Shin J.C., Shin H.J., Nam H.W.: Seroprevalence of toxoplasmosis in Korean pregnant women. *Korean J parasitol*, **43**, 69-71 (2005).
31. Silva J.C., Ogassawara S., Adania C.H., Ferreia F., Gennari S.M., Dubey J.P., Ferreira-Neto J.S.: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol*, **102**, 217-224 (2001).
32. Silva J.C., Ogassawara S., Marvulo M.F., Ferreira-Neto J.S., Dubey J.P.: *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from Brazilian zoos. *J Zoo Wildl Med*, **32**, 349-351 (2001).
33. Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M.: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, **31**, 217-20 (2001).
34. Villena I., Aubert D., Gomis P., Ferte H., Inglard J.C., Denis B.H., Dondon J.M., Pisano E., Ortis N., Pinon J.M.: Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 4035-4039 (2004).