



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주도내 고양이 혈액에서 독소포자충의
감염률 및 유전자형 조사



濟州大學校 大學院

獸醫學科

金 炤 延

2010年 12月

제주도내 고양이 혈액에서 독소포자충의
감염률 및 유전자형 조사

指導教授 尹永玟

金 炤 延

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.

2010年 12月

金炤延의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 이 경삼 (印)

委 員 우 들춘 (印)

委 員 윤 영민 (印)

濟州大學校 大學院

2010年 12月

초 록

제주도내 고양이 혈액에서 톡소포자충의 감염률 및 유전자형 조사

김 소 연
(지도교수 : 윤 영 민)

제주대학교 대학원
수의학과

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)는 세포내에 기생하는 원충으로 사람을 포함한 대부분의 포유동물이 중간숙주로 작용하며 고양이과 동물은 유일한 종숙주로 톡소포자충증의 전파에 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 제주도내 고양이 혈액에서의 톡소포자충 감염률과 유전자형을 조사하고 수의임상에서 톡소포자충증 진단에 사용하고 있는 상업용 IgG ELISA kit와 ImmunoComb[®] kit의 시행 결과를 비교하였으며, 실시간 PCR법을 확립하여 톡소포자충증의 진단을 보다 신속히 하였다.

실험에 사용된 시료는 제주도내 야생고양이 66마리와 집고양이 11마리의 혈액에서 추출한 gDNA와 혈청이며 gDNA를 이용하여 톡소포자충 *SAG2* 유전자의 PCR과 PCR-RFLP를 시행하였고 혈청을 이용하여 ELISA와 ImmunoComb[®] kit을 실시하였다.

실험 결과, 총 77개의 시료 중 14개의 시료(20%)가 톡소포자충 양성이었으며 그 중 길고양이에서 11개체(17%), 집고양이에서 3개체(27%)가 나타났다. *SAG2* 유전자 PCR-RFLP 결과 모든 양성 시료의 유전자형이 가장 침해도가 높은 제 1형으로

나타났다. 항체가 검출 결과, 70개의 혈청시료를 대상으로 사람의 2차 항체를 사용한 상업용 ELISA kit에서 모든 시료가 음성으로 나타났다. 반면, 고양이의 2차 항체를 사용한 ImmunoComb[®]kit의 경우 PCR 결과 양성시료 14개 중 12개, PCR 음성 시료 10개 중 5개에서 양성을 나타냄으로써 고양이의 톡소포자충증 진단에는 고양이의 2차 항체를 사용한 ImmunoComb[®]kit를 사용하는 것이 적합할 것이다. 또한 초고속 실시간 PCR의 반복 실험을 통한 결과, 일반 PCR에 비해 적은 시간에 동일한 결과를 얻어낼 수 있었으며 실제 임상에서 톡소포자충증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

주요어: *Toxoplasma gondii*, Cat, *SAG2*, PCR, PCR-RFLP, realtime PCR

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및	방법	4
III. 결	과	12
IV. 고	찰	17
V. 결	론	20
VI. 참 고	문헌	21
영 문	초 록	27

I. 서 론

톡소포자충(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*)은 전 세계에 널리 퍼져있는 원충으로 인수공통전염병인 톡소포자충증(Toxoplasmosis)의 원인체이며, 들쥐와 사 람을 포함한 대부분의 포유동물이 중간숙주가 된다(1, 14). 고양이, 호랑이와 표범 등의 고양이과 동물은 톡소포자충의 유일한 종숙주로서 톡소포자충증의 전파에 중 요한 역할을 한다(14, 32, 42, 43).

톡소포자충의 생활사는 중간숙주와 종숙주 간의 차이가 있다. 종숙주의 분변을 통해서 외부환경으로 나온 난포낭(Oocyst)은 감염성이 있는 형태로 바뀌어 중간숙 주의 체내로 유입되며, 체내에서 bradyzoite의 형태로 근육 내에 잠복하여 만성 톡소포자충증을 유발한다(10). 종숙주의 경우, 체내로 유입된 난포낭과 중간숙주의 포식과정에서 유입된 bradyzoite가 tachyzoite로 변환되어 혈액과 뇌척수액 등으로 이동하여 급성 톡소포자충증을 일으킨다. 이 tachyzoite는 종숙주의 장세포에 서 유성생식을 하며 sporozoite로 변환되어 다시 난포낭의 형태로 배설되는 콕시 디움(Coccidium)의 생활사를 가진다(4, 6-8).

톡소포자충의 감염경로는 크게 세 가지로 구분할 수 있다(14). 첫째는 종숙주의 분변으로부터 나온 난포낭으로 오염된 음식이나 물을 섭취한 경우(11, 35, 47), 둘째는 bradyzoite가 잠복해있는 중간숙주의 근육을 덜 익힌 채로 섭취한 경우(9), 마지막으로 숙주의 임신기에 태반을 통해 감염되는 경우이다(9, 17).

톡소포자충에 감염된 종숙주는 안과 질환을 포함한 다양한 전신적인 급성 임상 증상을 보이지만(8, 29), 중간숙주의 경우 대부분의 건강한 개체에서는 무증상을 보이며, 면역력이 저하된 동물에서는 만성 톡소포자충증이 발생할 수 있다(14). 사 람에서는 후천성면역결핍증(AIDS) 환자와 암환자 등 면역결핍환자에서 톡소포자충 의 감염으로 인한 사망 사례가 있으며(22, 33, 40), 중간숙주가 임신기에 감염될 경우 태반 감염과 함께 임신 초기 유산을 일으킬 수 있다(24, 36, 40).

톡소포자충은 tachyzoite 표면 단백질에 따라 3가지 형태로 분류할 수 있다. 국 내에서 가장 많이 보고된 RH strain과 한국에서 처음으로 보고된 KI-1 strain을

포함한 제 1형은 독력(virulence)이 가장 높다(21, 39). 제 2형에는 PLK와 Beverly strain 등이, 제 3형에는 VEG와 CTG strain 등이 포함되며 이 두 가지 형태는 독력이 없다고 알려져 있다(21). 독소포자충 형태를 구분하는 방법으로 제한효소단편길이다형성(Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 검사가 있으며, 이에 사용되는 표지 유전자로는 *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*와 *c29-2* 등이 있다(39, 44, 46). 이 중 *SAG2*는 독소포자충의 형태를 구분하는데 적합한 유전자로써 tachyzoite 표면 단백질의 두 가지 다른 형태의 RFLP로 확인할 수 있으며 제 1형과 3형은 같은 단백형을, 제 2형은 다른 단백형을 나타낸다(41).

독소포자충 감염의 진단법은 중숙주의 분변에서 난포낭(Oocyst)이나 tachyzoite의 검출(14), 독소포자충의 특이적 IgG와 IgM 항체의 검출(13), tachyzoite의 특정 항원을 검출하는 방법 등이 있다. 항체 검출법으로 라텍스응집반응시험(Latex Agglutination Test, LAT), 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 간접형광항체시험(Indirect fluorescence antibody test, IFAT) 등이 있고(14, 16) 항원의 직접적인 검출에는 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)이 널리 활용되고 있다(14, 34).

독소포자충 감염률의 조사 연구로는 브라질 임신여성의 혈청 항체가 검사에서 32.2%(45), 미국 우드척(woodchuck)의 혈청에서 14.3%(31), 독일 면양의 혈청에서 27.8%(38) 감염 등이 있으며, 전 세계적으로 독소포자충의 감염률과 그 유전형을 조사하는 연구가 진행되어 왔다. 국내에서도 서울과 경기도 지역 고양이 혈액 PCR 검사에서 독소포자충 감염률이 각각 30.2%(30), 13.2%(25)로 보고되었고, 제주도에서는 1989년 76개체 고양이 혈청 중 29개체(38.2%)가 항체 양성률을 보였으며(18), 성인 혈청 연구에서 감염률이 12.9%(48)로 보고된 바 있다. 그러나 아직까지 제주도내 고양이 혈액에서 독소포자충의 항원 검출 및 유전형을 조사한 보고는 없다.

본 연구에서는 제주도내 고양이 혈액에서의 독소포자충 감염률과 그 유전자형을 조사하였다. 그리고 현재 수의 임상에서 독소포자충 감염 진단에 사용하고 있는 상

업용 톡소포자충 IgG ELISA kit와 고양이 특이적 IgG 검출을 위한 ImmunoComb[®] kit를 통한 항체가 검사 및 PCR을 통한 직접 항원 검출을 실시하여 그 결과를 비교하였다. 또한 인수공통전염병인 톡소포자충증의 진단을 보다 간단하고 신속하게 진단하기 위한 실시간 PCR법을 확립하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 시료

실험에 사용한 고양이는 제주도 지역 TNR (Trap, Neuter, Return) 프로그램에 의거하여 제주대학교 부설 동물병원에 내원한 길 고양이 66마리와 진료로 내원한 집 고양이 11마리, 총 77마리를 대상으로 하였다. 혈액은 경정맥을 통하여 3ml 채혈하였으며, 이 중 0.5ml은 DNA 추출을 위해 EDTA-3K로 항응고 처리된 튜브에, 나머지 2.5ml은 혈청 또는 혈장 분리를 위해서 각각 Plain 튜브와 Sodium heparin으로 항응고 처리된 튜브에 분주하였다. 혈청 및 혈청분리는 3000rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 e-tube에 0.5ml씩 분주하여 검사에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

2. DNA 추출

Genomic DNA (gDNA)는 EDTA-3K 처리한 0.5ml의 전혈로부터 G-DexIIb™ extraction (Intron, Korea) 상업용 키트를 사용하여 추출하였으며, 최종 농도는 100ng/ μl (Nanoveu, USA)가 되도록 조정하였다.

3. 양성 대조군

톡소포자충 양성 대조군은 톡소포자충 RH strain으로 대한민국 질병관리본부에서 분양받아 사용하였다.

4. 중합효소연쇄반응 (PCR)

톡소포자충의 항원(DNA) 검출을 위해 PCR (Peltier Thermal Cycler US PTC-200DNA Engine, BIO-RAD)을 실시하였으며, PCR 산물은 1.5% 아가로스젤에 전기 영동하여 확인하였다. 증폭부위는 *T. gondii* repeated region으로 전기 영동 시 533bp 위치에 하나의 밴드가 나타나도록 primer set (Table 1) 및 PCR 조건(Table 2)을 설정하였다.

Table 1. The sequences of *T. gondii* PCR primers and fragment sizes of the investigated genes

Primer set	Sequence (5'→3')	Amplification size (bp)
TOX04	GGGGAATTCTGTCGCTAAGCCATCGGAAGG	533
TOX05	GGGGAATTCGTTCCGTTGATTCGTCTGATGGTG	

Table 2. PCR condition at *T. gondii* repeated region

TOX04–TOX05 Amplification			
38 Cycles	Initial denaturation	94°C	5min
	Denaturation	94°C	45sec
	Annealing	58°C	30sec
	Extension	72°C	30sec
	Final extension	72°C	7min

5. 효소면역측정법 (ELISA)

항체 검출을 위해 용혈과 황달이 있는 혈청을 제외한 70개의 혈청 시료를 대상으로 DRG® *T. gondii* anti-human IgG ELISA kit (DRG, German)를 사용하였으며, OD값은 Sunrise (TECAN, Austria) 장비를 이용하여 450nm에서 측정하였다.

6. *T. gondii* anti-cat IgG 검출

톡소포자충 항체 검출을 위한 ELISA kit 시행 결과와 항원 검출 결과(PCR)와의 비교를 위해서, PCR 시행 결과를 바탕으로 한 톡소포자충 양성시료 14개와 음성시료 10개를 대상으로 *T. gondii* anti-cat IgG 검출 kit인 ImmunoComb® (Biogal, USA)을 사용하여 톡소포자충 항체를 측정하였다.



Fig. 1 ImmunoComb® kit including plastic card (A), on which purified *Toxoplasma gondii* and *Chlamydomphila* antigens are attached. a: Positive reference b: *Chlamydomphila* positive c: *T. gondii* positive

7. 유전자형 분석

1) PCR

톡소포자충의 유전자형을 보기 위해서 *SAG2* 유전자의 5'와 3' 부위에 각각의 primer sets를 합성하여 PCR을 실시하였다. 제 3형을 분류하기 위해서 5' 부위에 특이 primer sets을 이용하여 PCR하였으며, 제 2형을 분류하기 위해서 3'부위에 특이 primer sets을 이용하여 PCR하였고 PCR 산물은 5'과 3' 부위에 각각 330bp와 326bp 크기가 되도록 하였다. PCR에 사용된 primer sets (Table 3)과 PCR 조건(Table 4, Table 5)은 아래와 같다.

Table 3. Primer sets for Primary PCR of *SAG2*

Primer sets	Sequence (5'→3')	Amplification size(bp)
SAG2F4	GACCTAGAACAGGAACAC	330
SAG2R4	GCATCAACAGTCTTCGTTGC	
SAG2F3	TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC	326
SAG2R3	TCAAAGCGTGCATTATCGC	

Table 4. Condition for primary PCR at *SAG2* 5'

SAG2F4–SAG2R4 Amplification			
40 Cycles	Initial denaturation	94°C	5min
	Denaturation	94°C	45sec
	Annealing	58°C	30sec
	Extension	72°C	30sec
	Final extension	72°C	7min

Table 5. Condition for primary PCR at *SAG2* 3'

SAG2F3–SAG2R3 Amplification			
	Initial denaturation	94°C	5min
	Denaturation	94°C	45sec
40 Cycles	Annealing	59°C	30sec
	Extension	72°C	30sec
	Final extension	72°C	7min

2) Nested PCR

Primary PCR-product를 증류수로 10배 희석한 것을 주형으로 하여 nested PCR하였으며, PCR 산물은 5'과 3' 부위에 각각 241bp와 221bp 크기가 되도록 하였다. 이에 사용된 primer sets (Table 6)과 PCR 조건(Table 7)은 아래와 같다.

Table 6. Primer sets of nested PCR

Primer sets	Sequence (5'→3')	Amplification size(bp)
SAG2F	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC	241
SAG2R2	GCAAGAGCGAACTTGAACAC	
SAG2F2	ATTCTCATGCCTCCGCTTC	221
SAG2R	AACGTTTCACGAAGGCACAC	

Table 7. Condition for nested PCR at *SAG2*

SAG2F–SAG2R2/SAG2F2–SAG2R Amplification			
	Initial denaturation	94°C	5min
	Denaturation	94°C	45sec
40 Cycles	Annealing	58°C	30sec
	Extension	72°C	30sec
	Final extension	72°C	7min

3) PCR–RFLP

Nested PCR 결과에서 양성으로 확인된 시료 모두를 1.5% 아가로스젤에 8μl 전기 영동한 후 MEGA–Bead gel extraction kit (Intron, Korea)를 사용하여 gel elution과정을 거쳐 PCR–RFLP를 실시하였다. 5'부위에 사용한 제한효소는 *Sau3AI*이고 3'부위에 제한효소는 *HhaI*였다. Gel elution된 PCR 산물 8μl, 제한효소 1μl, 완충액 1μl, 총 10μl의 혼합물을 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 4% 아가로스젤에 전기 영동한 후 결과를 확인하였다. RFLP 실시 결과 5' 부위에서 절단된 형태를 가질 경우 제 3형으로, 3' 부위에서 절단된 경우 제 2형으로 분류하였고, 이 두 가지 효소 모두에서 절단되지 않은 형태를 제 1형으로 분류하였다.

8. 초고속 실시간 PCR (Ultra rapid realtime PCR, URRT–PCR)

초고속 PCR은 TMC–1000 system (Samsung, Korea)을 이용하여 실시하였다. TMC–1000은 SYBR Green을 포함한 PCR 혼합물(DNA 100ng, Forward primer 10pmol, Reverse primer 10pmol, dNTP 25mM, Taq 20U, 10X PCR Buffer

1X, 10X SYBR Green 0.5X)을 마이크로 칩(Fig. 2a)에 6 μ l 주입한 후 플랫폼에 장착하고 PCR하면 유전자가 증폭됨에 따라 전면 패널(Fig. 2b)에 실시간으로 증폭 정도가 나타나게 된다. PCR과정 중 denaturation, annealing, extension에 걸리는 시간이 각각 5초였다. 초고속 실시간 PCR에 사용된 primer sets은 SAG2F-SAG2R2이며 PCR 조건(Table 8)은 아래와 같다.

Table 8. realtime PCR condition using SAG2F-SAG2R2 primer set

SAG2F-SAG2R2 Amplification			
40 Cycles	Initial denaturation	94 °C	30sec
	Denaturation	94 °C	5sec
	Annealing	58 °C	5sec
	Extension	72 °C	5sec
	Final extension	72 °C	3min

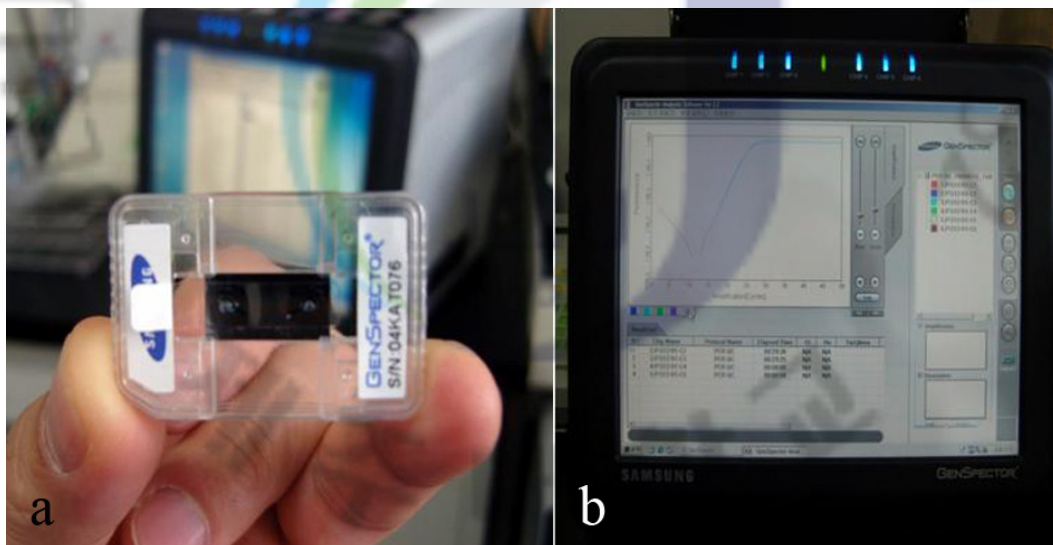


Fig. 2 A realtime micro-scale chip-based PCR system, GenSPECTOR TMC-1000 (Samsung, Korea). a: Micro PCR chip with plastic housing b: The software embedded in computing unit which produces the amplification curve during reaction.

9. 클로닝(Cloning)과 염기서열분석

특소포자충 항원 양성 시료와 그 유전자형 분석을 실시한 결과를 확인하기 위하여 클로닝과 염기서열분석을 실시하였다. *Toxoplasma gondii* 533bp repeated region의 PCR 산물과 SAG2 5'부위 PCR 산물을 2% 아가로스젤에 전기 영동 한 후 MEGA-Bead[®] gel extraction kit (Intron, Korea)를 사용하여 gel elution하고 이것을 pCR[®]2.1-TOPO[®] vector (Invitrogen, USA) (Fig. 3)에 클로닝 하였다. PCR 산물이 삽입된 vector를 *E. Coli* (DH-5 α)에 transformation하고, 삽입이 확인된 *E. Coli*에 대해서는 ampicillin 함유 LB broth에 배양(37 $^{\circ}$ C, overnight)하였다. 배양된 *E. Coli*를 원심분리하고 pellet을 QIAGEN[®] Plasmid mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 plasmid를 추출하고, 염기서열분석을 의뢰하였다 (Solgent, Korea).

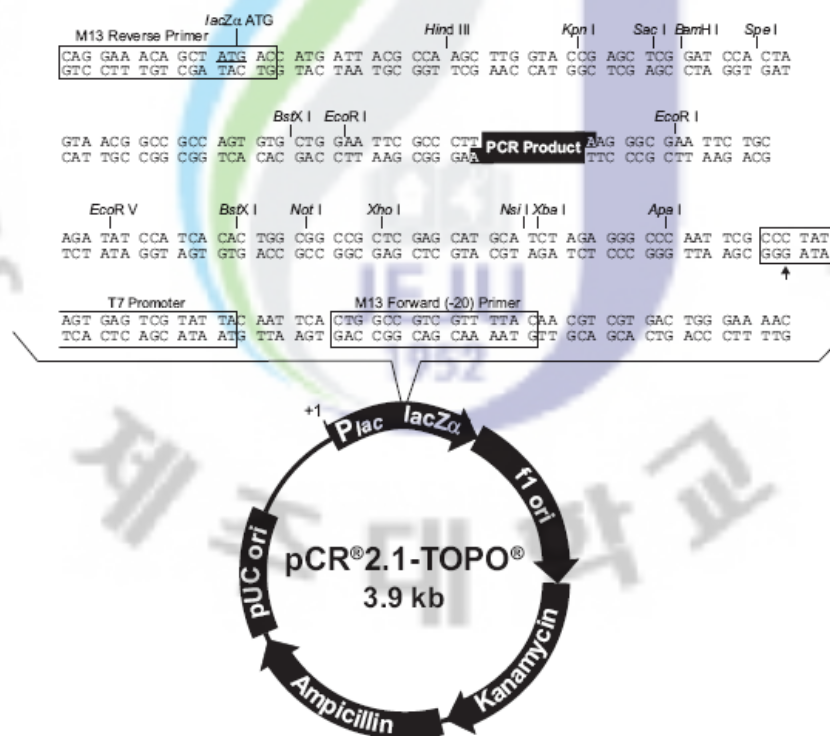


Fig. 3 Genetic map of pCR[®]2.1-TOPO[®] vector (Invitrogen, USA) with total vector size of 3.9kb.

III. 결 과

1. 중합효소연쇄반응 (PCR)

T. gondii repeated region을 증폭한 PCR 결과에서 533bp의 위치에 하나의 밴드를 나타낸 양성 시료는 총 14개체(20%)였으며, 그 중 길 고양이 11개체(17%), 집 고양이가 3개체(27%)였다(Fig. 4).

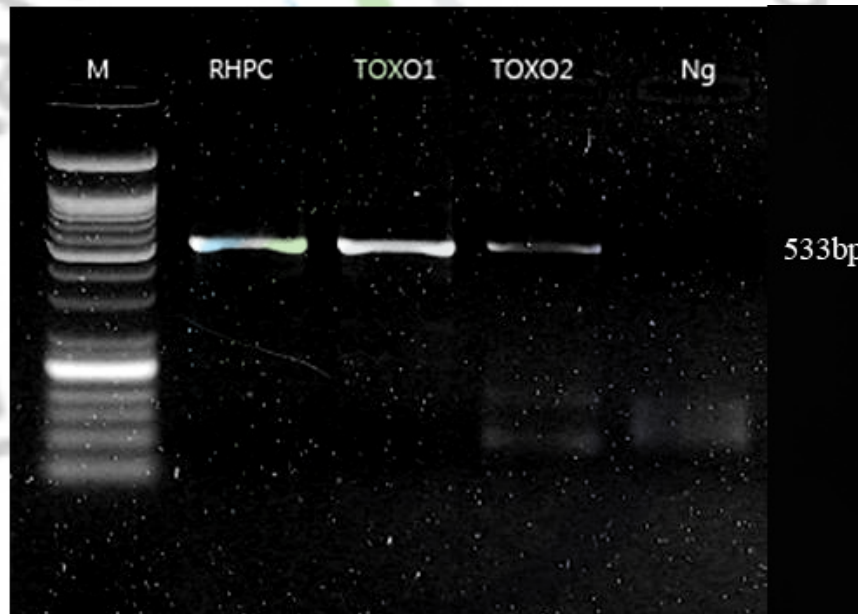


Fig. 4 Electrophoresis pattern of *T. gondii* repeated region after PCR amplification M: 25/100bp ladder, RHPC: *Toxoplasma gondii* RH strain positive control, Toxo1~2: *Toxoplasma gondii* positive sample Ng: Negative control

2. 유전자형 분석

PCR 검사에서 톡소포자충 양성인 시료 14개를 대상으로 *SAG2* 유전자의 5'와 3' 부위의 primary PCR과 nested PCR을 시행한 결과에서 5' 부위에는 각각 330bp와 241bp의 위치에, 3' 부위에는 각각 326bp와 221bp의 위치에 하나의 밴드를 확인하였다. (Fig. 5)

5'와 3' 부위의 nested PCR 산물을 gel elution한 후 PCR-RFLP를 시행한 결과, 14개체 모두가 톡소포자충 RH strain과 같은 제 1형이었다(Fig. 6, Fig. 7).

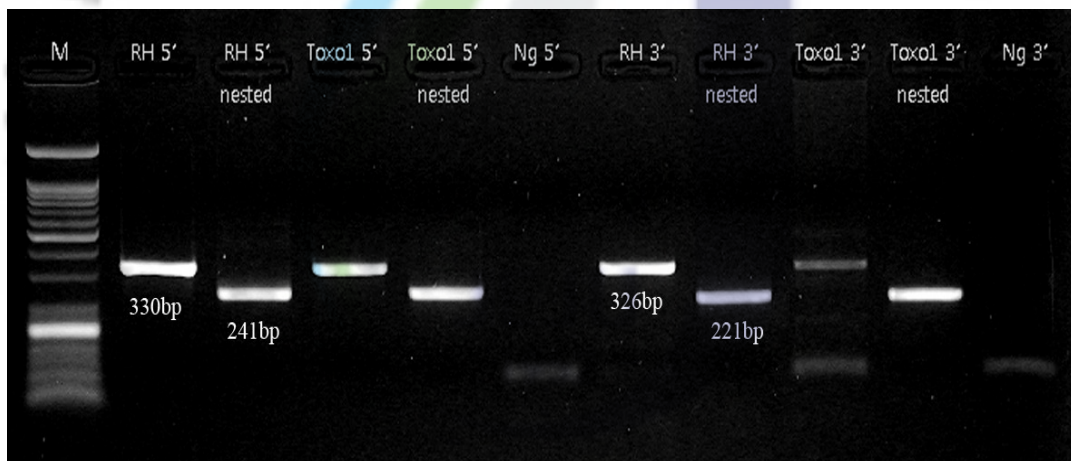


Fig. 5 Electrophoresis patterns of *SAG2* gene after PCR amplification M: 25/100bp ladder, RH5'/3': *T. gondii* RH strain positive control primary PCR at 5'/3', RH5'/3'nested: *T. gondii* RH strain positive control nested PCR at 5'/3', Toxo1: *Toxoplasma gondii* positive sample

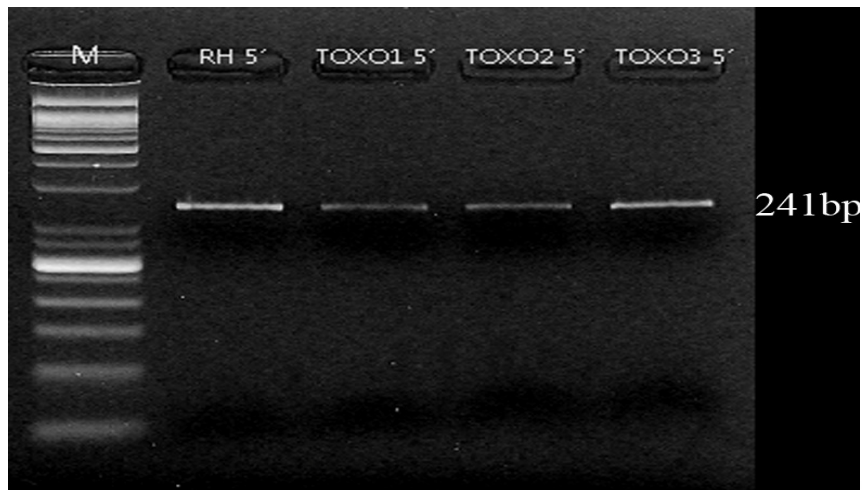


Fig. 6 PCR-RFLP patterns of *SAG2* gene at 5' by *Sau3AI* M: 25/100bp ladder, RH 5': *T. gondii* RH strain positive control nested PCR-RFLP by *Sau3AI*, Toxo1~3: *T. gondii* positive sample nested PCR using *Sau3AI*

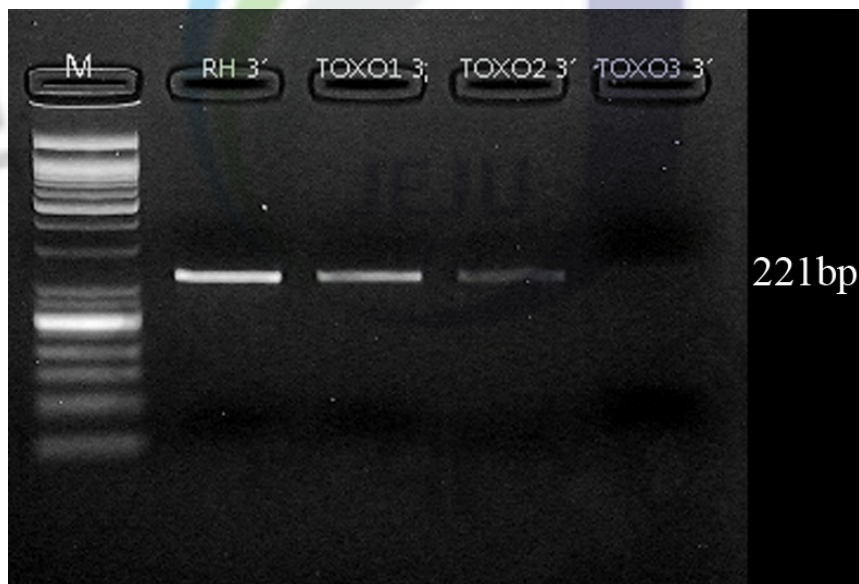


Fig. 7 PCR-RFLP patterns of *SAG2* gene at 5' by *HhaI* M: 25/100bp ladder, RH 3': *T. gondii* RH strain positive control nested PCR-RFLP by *HhaI*, Toxo1~3: *T. gondii* positive sample nested PCR using *HhaI*

3. 클로닝과 염기서열 분석

PCR실험 결과에서 533bp 위치에 증폭된 산물과 *SAG2* 5' 부위 primary PCR (330bp) 산물의 염기서열 분석 결과, 533bp PCR 산물의 염기서열은 GeneBank에 등록되어있는 *T. gondii* repeated region (Accession no.AF146527.1)과 100% 일치하였으며, *SAG2* 5' primary PCR산물의 염기서열 분석결과 *T. gondii* isolate RH surface antigen P22 유전자의 5' UTR과 partial cds (GenBank Accession no. AY941252.1)와 100% 일치하였다.

4. ELISA

70개체 혈청 시료에 대해서 *T. gondii* anti-human IgG ELISA kit (DRG, German)로 항체를 검사한 결과 70개체 모두가 양성 판단의 최소 흡광도 값 (50IU/ml)에 미치지 못해서 모두 음성으로 확인되었다.

6. 초고속 실시간 PCR

초고속 실시간 PCR (Ultra rapid realtime PCR, URRT-PCR)에서 *T. gondii* *SAG2* 5' 부위를 증폭한 결과는 PCR 시작 24분 후에 얻을 수 있었고 유전자의 증폭여부를 판단해주는 형광값이 35사이클 전후에서 크게 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 8a). URRT-PCR 산물을 2% 아가로스젤에 전기 영동하여 일반 PCR과 동일한 위치인 241bp 크기를 확인하였다(Fig. 8).

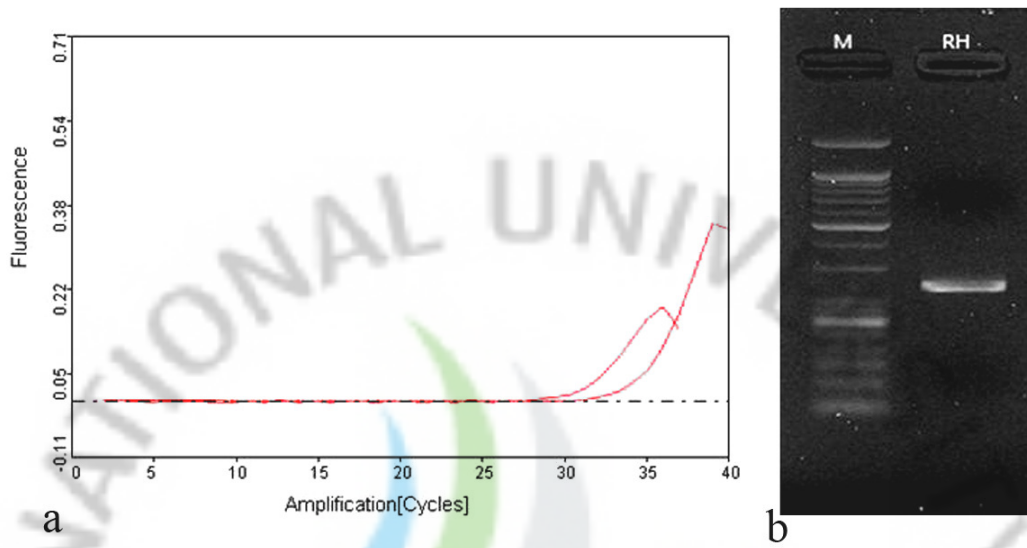


Fig. 8 Results of real-time PCR a: The Realtime PCR amplification curve, b: Electrophoresis pattern of real-time PCR product

IV. 고 찰

톡소포자충의 감염 진단에 사용되는 방법에는 중간숙주와 종숙주의 체내에서 톡소포자충의 tachyzoite 또는 종숙주의 분변 내 난포낭(Oocyst)을 확인하는 방법(14), 톡소포자충 특이적 IgG와 IgM 항체가 측정(13) 및 PCR을 통한 직접 항원 검출법(34) 등이 있다. 이러한 방법 중 고양이 분변에서 난포낭을 확인하는 방법은 톡소포자충증 감염을 진단하는 가장 정확한 방법이지만, 실제 혈액이나 뇌척수액 등에서 항체나 항원이 검출된 고양이 분변에서 직접 난포낭을 확인한 보고는 없다(28). 고양이 분변 내 난포낭을 확인하기 위한 실험에서 0.9%(3/326) 감염률을 보고한 바 있다(7).

톡소포자충의 tachyzoite 항원 검출을 위한 PCR법은 *B1*, *P80*, *18S* rRNA Genes, *T. gondii* repeated gene 등 다양한 유전자가 사용되고 있으며, 톡소포자충의 감염여부를 판단하는데 활용되는 빠르고 민감한 방법이다(19, 23). 항원 검출을 위한 검체로는 뇌척수액(6), 안방수(23), 혈액(25) 및 분변 등으로 다양하다. 톡소포자충증에 감염된 개체에서 tachyzoite의 표면 단백질에 따라 3가지 유전형을 PCR-RFLP 방법으로 구분할 수 있으며, 이에 사용되는 다양한 유전자가 보고되었다(20). 국내에서도 PCR-RFLP를 이용한 연구 보고가 있으며(39), 2008년 경기도 지역 고양이에서 톡소포자충 양성 시료를 대상으로 한 실험 결과 시료 모두가 가장 독력이 높은 제 1형으로 분류된 바 있다(26).

본 실험에서는 *T. gondii* repeated gene (529bp)을 증폭하여 항원을 검출하였으며 그 결과 20%(총 77개체 중 14개체)의 시료에서 양성을 나타내었다. 일반적으로 PCR법이 톡소포자충 진단에 추천되고 있으며, 대부분의 연구에서 *T. gondii* *B1* 유전자를 사용해 왔다(4). 본 실험에서는 *B1* 유전자 증폭시에 한 개 이상의 비특이적 밴드가 확인되어 항원을 확인하는데 다소 문제가 있었기에 *B1* 유전자가 아닌 *T. gondii* repeated region (529bp)을 포함한 부위를 증폭하도록 primer를 새롭게 디자인하였다. 본 실험에 사용된 양성시료에 대한 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 *T. gondii* repeated region (GenBank Accession no.AF146527.1)

과 100% 일치함을 확인하였으며, 독소포자충 양성 검체를 대상으로 *SAG2* 유전자의 PCR 산물(330bp)을 염기서열 분석한 결과 *T. gondii*의 RH surface antigen P22 부위(GenBank Accession no. AY941252.1)와 100% 일치함을 확인하였다. 이를 토대로, 독소포자충 항원의 검출을 위한 PCR 검사에 있어 *B1*부위가 아닌 *T. gondii* repeat region (529bp)과 *SAG2* 부위를 증폭했을 때 단일 밴드를 확인함으로써 진단에 유용한 지표가 됨을 확인하였다.

PCR 양성 14개체 중 11개체는 길 고양이, 3개체는 집 고양이에서 확인되었으며, PCR-RFLP 시행 결과 14개체 모두가 제 1형으로 분류되었다. 독소포자충 제 1형은 국내에서 가장 많이 보고된 RH strain과 국내에서 최초로 보고된 KI-1 strain(39)이 포함되어 있으며 그 독력이 가장 높은 것으로 알려져 있다(21). 이는 사람과 접촉하고 있는 집 고양이에서 확인되었다는 점과 가장 독력이 높은 제 1형이라는 점에서 공중보건학적으로 중요한 의의가 있다고 할 수 있다.

독소포자충의 특이적 IgG와 IgM 항체를 검출하는 방법인 ELISA, IFAT와 MAT 방법 중에서 MAT 방법보다 ELISA와 IFAT방법으로 검사하는 것이 감염률(73.3%), 민감도(94.3%) 및 특이도(83.3%)가 높게 나타났다(16). 이러한 결과를 바탕으로 사람을 포함하여 면양 등의 다양한 동물을 대상으로 독소포자충의 IgG와 IgM 항체를 검출하는 상업용 kit가 개발되어(2, 3, 15, 27) 인의와 수의 분야에 사용되고 있다. 그러나 종숙주인 고양이의 체액 내 독소포자충 IgG와 IgM을 검출하는 상업용 ELISA kit는 생산 및 원활한 공급이 되지 않아 국내 수의 임상에 적용하기에 많은 어려움이 있다. 과거 국내 고양이의 체액 중 독소포자충의 항체 검출 관련 연구에서는 상업용 ELISA kit가 아닌 manual 방식의 ELISA 방법으로 검사(25, 30)하였다. 이런 경우 적합한 실험 조건이 갖추어질 경우에만 진단이 가능하기 때문에 실제 수의 임상에서 적용하기에는 무리가 있다. 본 실험에서는 국내에서 손쉽게 구할 수 있는 사람 2차 항체(anti-human IgG) 처리된 독소포자충 IgG ELISA 상업용 kit를 사용하여 고양이에서의 독소포자충 감염률을 보았으며 그 결과 70개체 모두가 양성 기준 흡광도 값에 못 미치는 음성을 나타내었다. 또한 PCR 결과 양성인 시료 14개체와 음성인 시료 10개체를 대상으로 고양이 2차 항체

(anti-feline IgG)를 사용한 ImmunoComb[®] kit로 검사한 결과, 기존 anti-human IgG ELISA kit 결과와 달리 PCR 양성 시료 14개체 중 12개체(86%)에서, PCR 음성 시료 10개체 중 5개체(50%)에서 양성을 나타내었다. 따라서 고양이에서의 톡소포자충 감염을 진단하는데 있어서 고양이의 2차 항체를 사용한 ImmunoComb[®] kit가 적합할 것으로 판단된다. 또한 ImmunoComb[®] kit는 별도의 장비나 기구 없이 검사에 걸리는 시간이 35분 정도인 것에 비해 ELISA kit은 별도의 장비가 필요하고 검사에 3시간 정도가 소요되는 점을 고려해볼 때 실제 임상에서 톡소포자충증의 진단에 유용할 것으로 생각한다.

PCR 검사와 항체가 검사 결과 간의 다소 차이가 발생한 이유는 두 방법 간에 검출하고자 하는 표적(항원, 항체)에 차이가 있어서 이다. 그 예로써, 톡소포자충 감염 후 21일째 혈액 내에서 항체가 검출되는 반면에 항원의 검출은 감염 후 14일 전후에 나타난다고 보고된 바 있다(5). 또한 중숙주인 고양이가 난포낭, 감염성 난포낭, bradyzoite 등 어떤 형태의 톡소포자충에 감염되었는지에 따라 항원과 항체의 검출 시기에 차이가 있다고 하였다(9). 본 실험 결과 PCR 양성 개체의 혈청 중 항체가 검출되지 않은 2개의 시료가 감염초기 채혈된 것일 가능성과, 이 2마리의 고양이가 모두 동일한 어미에서 태어난 새끼 고양이였다는 점에서 태반감염의 가능성도 고려해 볼 수 있을 것이다. 그리고 PCR 결과 음성 개체에서 ImmunoComb[®] kit 양성 결과가 나타난 5개체의 경우 톡소포자충 감염 후 항원이 혈중에 존재하지 않고 항체만 존재한 것으로 볼 수 있다.

이상의 실험 결과에서, 고양이 톡소포자충증의 진단에는 임상증상을 포함하여 항체와 항원의 검출을 병행하는 것이 필요하다. 그리고 확인된 모든 톡소포자충이 독력이 강한 형태로 임신초기 여성에게 감염되지 않도록 공중보건학적 관리가 필요하다. 또한 본 실험에서 초고속 실시간 PCR법을 통해서 신속하고 정확한 진단을 할 수 있는 방법을 확립함으로써 실제 임상에서 톡소포자충증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 결 론

제주도내 고양이 혈액에서의 톡소포자충 감염률과 그 유전자형을 조사하고, 톡소포자충 감염의 진단법 중 항체가 측정과 PCR을 통한 직접 항원 검출 결과를 비교한 결과는 아래와 같다.

PCR 검사에서 20%(14마리/70마리)가 톡소포자충 감염으로 확인되었으며, 이 중 11개체(17%)는 길 고양이, 3개체(27%)는 집 고양이였다. 그리고 양성 14개체 모두 nested PCR-RFLP 검사에서 톡소포자충 제 1형으로 확인되었다.

PCR 양성 14개체와 음성 10개체, 총 24개체를 대상으로 *T. gondii* IgG ELISA kit와 ImmunoCom[®] kit로 검사한 결과, *T. gondii* IgG ELISA kit 검사에서 모든 시료가 음성을 나타낸 반면에 ImmunoCom[®] kit 검사에서는 70%의 양성률을 나타내었다.

톡소포자충 초고속 실시간 PCR 검사법을 확립하였으며, 실제 수의 임상에서 진단에 유용하게 적용할 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과로 고양이 톡소포자충증의 진단에는 임상증상을 포함하여 항체와 항원의 검출을 병행하는 것이 필요하며, 확인된 모든 톡소포자충이 독력이 강한 형태로 공중보건학적 관심과 관리가 필요하다. 또한 초고속 실시간 PCR법을 통해서 신속하고 정확한 진단을 내릴 수 있는 방법을 확립됨으로써 실제 임상에서 톡소포자충증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

VII. 참고 문헌

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* 1980;74:745-746.
2. Barberi A, Gistri A, Cappelletti F, Giordano I. Diagnostic value of IgG avidity in *Toxoplasma* infection: comparison of 3 commercial kits. *J Infect Dis* 2001;184:944-946.
3. Bobic B, Klun I, Vujanic M, Nikolic A, Ivovic V, Zivkovic T, Djurkovic-Djakovic O. Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. *J Med Microbiol* 2009;58:358-364.
4. Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:269-271.
5. Burney DP, Lappin MR, Spilker M, McReynolds L. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia in experimentally inoculated cats. *J Parasitol* 1999;85:947-951.
6. Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, Antinori A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol* 1996;45:472-476.
7. Dabritz HA, Miller MA, Atwill ER, Gardner IA, Leutenegger CM, Melli AC, Conrad PA. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J Am Vet Med Assoc* 2007;231:1676-1684.
8. Davidson MG, English RV. Feline ocular toxoplasmosis. *Vet Ophthalmol* 1998;1:71-80.

9. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998;28:1019–1024.
10. Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology* 1997;115:15–20.
11. Dubey JP BC. Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Raton* 1988:220.
12. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 1970;132:636–662.
13. Fakahany AF, Abdel-Maboud AI, el-Garhy MF, Eraky MA. Comparative study between elisa IgG, IgM and PCR in diagnosing and studying toxoplasmosis in Qualyobia Governorate, *Egypt. J Egypt Soc Parasitol* 2002;32:475–486.
14. Sherdering GR. Toxoplasmosis and other systemic protozoal infection. In: Saunders Manual of small animal practice, 3rd ed, Ohio. 1996; 219–225.
15. Galanti LM, Dell'Omo J, Wanet B, Guarin JL, Jamart J, Garrino MG, Masson PL, Cambiaso CL. Particle counting assay for anti-toxoplasma IgG antibodies. Comparison with four automated commercial enzyme-linked immunoassays. *J Immunol Methods* 1997;207:195–201.
16. Garcia JL, Navarro IT, Vidotto O, Gennari SM, Machado RZ, da Luz Pereira AB, Sinhorini IL. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp Parasitol* 2006;113:100–105.
17. Grigg ME, Boothroyd JC. 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* 2001;39:398–400.

18. H.J K. On the distribution of Toxoplasma antibodies in Cheju-Do. Distribution of Toxoplasma antibodies in swine, cats and butchers. *Korean J Vet Res* 1989;29:10.
19. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000;30:69-75.
20. Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of Toxoplasma gondii strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:1411-1414.
21. Howe DK, Sibley LD. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995;172:1561-1566.
22. Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1993;17 Suppl 2:423-435.
23. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of T. gondii in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:634-644.
24. Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol Today* 1998;14:150-156.
25. Kim HY, Kim YA, Kang S, Lee HS, Rhie HG, Ahn HJ, Nam HW, Lee SE. Prevalence of Toxoplasma gondii in stray cats of Gyeonggi-do, Korea. *Korean J Parasitol* 2008;46:199-201.
26. Kim HY, Kim YA, Lee HS, Rhie HG, Cho SH, Yu JR, Lee SE. Genotype of Toxoplasma gondii from blood of stray cats in Gyeonggi-do, Korea. *Korean J Parasitol* 2009;47:413-415.
27. Klun I, Djurkovic-Djakovic O, Thulliez P. Comparison of a

- commercial ELISA with the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally exposed sheep. *Zoonoses Public Health* 2007;54:165–168.
28. Knaus BU, Fehler K. *Toxoplasma gondii* infections and oocyst shedding in domestic cats and the significance of this for the epidemiology and epizootiology of toxoplasmosis. *Angew Parasitol* 1989;30:155–160.
 29. Lappin MR, Greene CE, Winston S, Toll SL, Epstein ME. Clinical feline toxoplasmosis. Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. *J Vet Intern Med* 1989;3:139–143.
 30. Lee SE, Kim JY, Kim YA, Cho SH, Ahn HJ, Woo HM, Lee WJ, Nam HW. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in stray and household cats in regions of Seoul, Korea. *Korean J Parasitol* 2010;48:267–270.
 31. Lehrer EW, Fredebaugh SL, Schooley RL, Mateus–Pinilla NE. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in woodchucks across an urban–rural gradient. *J Wildl Dis* 2010;46:977–980.
 32. Lukesova D, Literak I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 1998;74(1):1–7.
 33. Mastroianni A, Coronado O, Scarani P, Manfredi R, Chiodo F. Anergic disseminated toxoplasmosis in a patient with AIDS. Case report. *Minerva Med* 1997;88:101–104.
 34. Meganathan P, Singh S, Ling LY, Singh J, Subrayan V, Nissapatorn V. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by PCR following microwave treatment of serum and whole blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010;41:265–273.
 35. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965–1976.
 36. Ndir I, Gaye A, Faye B, Gaye O, Ndir O. Seroprevalence of

- toxoplasmosis among women having spontaneous abortion and pregnant women following in a center of health up-town in Dakar. *Dakar Med* 2004;49:5-9.
37. Nissapatorn V. Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009;40:1158-1178.
38. Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol* 2010;139:193-201.
39. Quan JH, Kim TY, Choi IU, Lee YH. Genotyping of a Korean isolate of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP and microsatellite analysis. *Korean J Parasitol* 2008;46:105-8.
40. Romero Cabello R, Buitron Garcia R, Amancio Chasin O, Tay Zavala J, Sanchez Vega JT. Toxoplasmosis and threatened abortion. *Ginecol Obstet Mex* 1998;66:495-8.
41. Sabaj V, Galindo M, Silva D, Sandoval L, Rodriguez JC. Analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 gene (SAG2). Relevance of genotype I in clinical toxoplasmosis. *Mol Biol Rep* 2010;37:2927-2933.
42. Silva JC, Ogassawara S, Adania CH, Ferreira F, Gennari SM, Dubey JP, Ferreira-Neto JS. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol* 2001;102:217-224.
43. Silva JC, Ogassawara S, Marvulo MF, Ferreira-Neto JS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from Brazilian zoos. *J Zoo Wildl Med* 2001;32:349-351.
44. Sreekumar C, Hill DE, Miska KB, Vianna MC, Yan L, Myers RL, Dubey JP. Genotyping and detection of multiple infections of

- Toxoplasma gondii using Pyrosequencing. *Int J Parasitol* 2005;35:991-999.
45. Sroka J, Wojcik-Fatla A, Szymanska J, Dutkiewicz J, Zajac V, Zwolinski J. The occurrence of Toxoplasma gondii infection in people and animals from rural environment of Lublin region - estimate of potential role of water as a source of infection. *Ann Agric Environ Med* 2010;17:125-132.
46. Sundar N, Cole RA, Thomas NJ, Majumdar D, Dubey JP, Su C. Genetic diversity among sea otter isolates of Toxoplasma gondii. *Vet Parasitol* 2008;151:125-132.
47. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Inglard JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM. Evaluation of a strategy for Toxoplasma gondii oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4035-4039.
48. Yang HJ, Jin KN, Park YK, Hong SC, Bae JM, Lee SH, Choi HS, Hwang HS, Chung YB, Lee NS, Nam HW. Seroprevalence of toxoplasmosis in the residents of Cheju island, Korea. *Korean J Parasitol* 2000;38:91-93.

Abstract

Prevalence and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Blood of Cat Population in Jeju Island

Soyeon Kim

(Supervised by Prof. Youngmin Yun)

Department of Veterinary Internal medicine, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju, Korea.

Toxoplasma gondii is a widespread protozoan parasite that may cause serious diseases in various mammalian hosts including humans and small ruminants. It has been well-known that cats play an important role in the spread of toxoplasmosis, and they act as the definitive host of this parasite.

This study is designed to investigate prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii*, which is detected in blood of cats of Jeju island. In this process, both antibody-detecting and antigen-detecting methods, which are widely used for diagnosis of Toxoplasmosis, were evaluated, and their detection rates were compared. The antibody-detection methods include a commercial kit involving *Toxoplasma gondii* IgG ELISA and ImmunoComb[®] kit detecting feline specific IgG, while PCR was used as the antigen detection method in this study. Furthermore, ultra rapid real-time PCR method has been adopted to diagnose *T. gondii* more promptly.

Blood samples were collected from 66 stray cats and 11 house-kept cats. Genomic DNA was extracted for detection of *T. gondii* by PCR method. Meanwhile, serum samples were also collected for ELISA kit and ImmunoComb[®] kit. Based on PCR results, the positive samples were used

for demonstration of PCR-RFLP patterns of *SAG2* gene. On the other hand, ultra rapid real-time PCR method was used to provide a prompt diagnosis of toxoplasmosis.

In total, 14 of the 77 blood samples (20%) were positive in which 11(17%) were from stray cats and 3(27%) were from house-kept cats in PCR method, respectively. Meanwhile, 70 serum samples showed negative results in ELISA kit. On the other hand, ImmunoComb[®] tests were performed on both 14 positive and 10 negative samples from PCR methods, and 12 out of 14 positive and 5 out of 10 negative samples in PCR were demonstrate das positive. PCR-RFLP revealed that all samples belong to Type I clonal lineage. In addition, the results obtained using ultra rapid real-time PCR method well correlated with those from conventional PCR method, and it is also much less time-consuming.

In this study, it was possible to know the prevalence of *T. gondii* in the cat population of Jeju island. Meanwhile, all positive samples were belong to Type I clonal lineage which is the most virulent type. As toxoplasmosis is one of the major zoonotic diseases and it poses a threat on public health, the prevalence rate needs to be continuously monitored. In addition, it can be suggested that the mmunoComb[®] kit is superior to the commercial ELISA kit in diagnosis of feline toxoplasmosis, as the former uses the feline secondary antibody in contrast to the latter using the human secondary antibody.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Cat, *SAG2*, PCR-RFLP, realtime PCR

감사의 글

수의사의 꿈과 밝은 미래를 꿈꾸며 제주에 발을 들인지 햇수로 벌써 9년이 되었습니다. 9년이라는 시간동안 언젠가는 달력만 바라보며 더디게 가는 시간을 원망한 적도 있었고, 언젠가는 무섭게 지나가는 시간이 아까워 방에 가두어 두고 조금씩 꺼내 쓰고 싶을 적도 있었습니다. 모든 일들이 계획대로 되는 것만도 아니고 뜻하지 않은 곳에서 기쁨과 행복이 찾아오기도 한다는 인생의 가르침을 조금이나마 배우게 되었습니다. 이제는 제주의 품을 떠나 조금 더 넓은 세상으로 나가 무사히 학사, 석사를 마치는데 도움주신 모든 분들께 보답하는 새로운 시작을 하고자 합니다.

먼저 이 모든 것이 가능하게 해주신 우리 엄마, 아빠! 낳아주셔서 감사하고 키워주셔서 감사하고 무엇보다도 제 뜻에 OK사인을 해주신 것. 너무 감사합니다. 그 동안 받은 무한한 사랑과 지원, 이제는 오래오래 갚으며 살겠습니다. 언제나 자랑스럽고 든든한 나의 영원한 친구 미경씨~ 어디서나 돌보고이고 당당한 언니로 있어줘서 고마워. 그리고 책임감과 독립심을 키우는데 일조한 내 동생들 진선마님, 희동, 나무, 콩쥐, 팔쥐, 마이클 고맙고 사랑해~

윤영민 교수님. 어렵게 걸어온 대학생활을 변화시켜 이렇게 무사히 마무리 할 수 있게 해주셔서 감사합니다. 짧은 시간이었지만 교수님께 많은걸 배우고, 느꼈습니다. 늘 부끄럽지 않고 자랑스러운 교수님의 학생이 되고 싶었습니다. 교수님의 가르침 가슴에 새기고 사회에 보탬이 되는 사람으로 열심히 살겠습니다. 슈퍼맨같이 모든 일을 해내시는 교수님. 이제는 건강 챙기시며 원하시는 바 모두 이루시길 바랄게요.

항상 환한 웃음 잃지 않으시는 대동물의 아버지, 내과실의 아버지, 이경갑 교수님. 소동물에만 그칠 수 있었던 저에게 소와의 교감을 만들어주셔서 감사드립니다. 이제는 약주 조금 줄이시고 항상 건강하세요. 입학 후 지금까지 늘 저의 멘토가 되어주신 신태균 교수님. 부족한 모습도 많이 보여드렸지만 항상 저를 기억하고 사랑해주신 것 마음으로 느꼈습니다. 학교 생활동안 저의 고민 해결, 진로 결정에 좋은 방향으로 이끌어 주신 것 감사합니다. 꼭 좋은 모습으로 보답하겠습니다. 그리고 2년간의 동물병원 생활에서 가장 가슴에 남는 똥순이와 똥순이 어머니님. 덕분에 많은걸 느끼고 배워갑니다. 감사합니다.

내과실 식구들. 성질 급하고 불같은 대학원생 옆에서 고생이 많았습니다.

부족함 많고 까칠한 저를 참아주고 다독여주고 계속 이 길을 갈 수 있게 이끌어 준 송정환 선생님. 말로 표현할 수 없는 고마움, 마음으로 전할게요. 그동안 울고 웃으며 만든 추억 간직하며 앞으로의 학교 생활에서도 인생의 선배로 많은 가르침 주세요~ 세상에서 가장 아름다운 가족과 함께 앞으로도 좋은 일만 가득하길 바래요. 쌤 주변에서 도움이 되는 귀인으로 남고 싶습니다. ^_^

4학년들. 평생 동안 소중하게 간직할 보물이 되어주어서 고마워요. 국시합격 기원합니다. 부장님.

이제는 오빠라고 부르기엔 너무 멀리 온 것 같아서 평생 성부장님으로 부를랍니다. 그래도 늘 듬직하고 자랑스러운 저의 오라버니예요~ 태균아, 같은 실험실에 있으면서 늘 너에게 도움이 되는 버팀목이 되어주어야겠다고 생각했었는데 오히려 도움 받은 것이 더 많은 것 같아서 참 고맙고 미안해. 앞으로의 학교생활 누구보다도 멋지게 해낼 수 있을 꺼라 확신해~ 대굴대굴 대근아~누가 뭐래도 니가 있는 내과실이 가장 웃음꽃이 활짝 피고 즐거워~ 초심 잃지 않고 계획대로 잘 마무리되었으면 좋겠어~ 우리 실험실의 왕고 김윤기씨, 너의 섬세함과 예리함, 눈웃음과 주황색 색연필, 라텍스는 앞으로의 내 생활 곳곳에서 웃음을 줄 것 같다. 지금 모습 늘 간직하길 바래. 내과실의 하나밖에 없는(ㅋㅋ) 여동생 혜원양, 믿어주고 의지해줘서 고맙고 똑똑하고 착하고 무엇보다도 노력하는 모습이 참 예뻐! 내 맘알지? 강승훈이~휴학하면서 익숙하지 않은 실험실 생활에 잘 따라와 줘서 고맙고 대견하다. 넌 영원한 내과실 한가족이야~^^ 동기 없이 홀로 한 학년 역할 수행하느라 고생이 많은 라원아~ 힘들지만 많은 걸 얻었을 거라 생각해. 이제 내과실 대장이니까 선배후배 잘 챙기고 지금처럼 잘 웃고 잘 지내줬으면 좋겠어~ 동휘야, 이제는 송아지랑도 강아지랑도 친한 레알 수의학도가 되었으니 더욱 분발해서 최고의 수의사가 되길 바래~ 내과실의 신데렐라 영신아, 실험실 굿은일 도맡아 하느라 고생이 많다. 이제 실험실의 주역이 되어 발바닥 땀나게 뛰고 졸업 전에 예쁜 여친과 함께 유리구두 신고 나타나거라~ㅋ 내과실의 사감선생님 지원아~성실함과 부지런함은 어떤 것 보다 강력한 무기가 될 수 있다는 걸 널 보며 느낀다. 이제.. 글씨 연습만 하면돼~ㅋ 언니가 펜글씨 교본 보내 줄게. 뭐든 잘하는 사슴 같은 지연아~ 내과실의 안방마님이 되었구나. 더 많은 시간을 함께했으면 좋았을 텐데 아쉬움이 남는다. 그래도 앞으로의 날이 더 기니까..하고 싶은 것 다하면서 자랑스러운 내 후배 수의사가 되길 바래^-^

8년이 넘는 시간 동안 함께 존재한다는 것만으로 힘이 되는 내 동기들 감사합니다. 특히 물심양면 도움이 컸던 병리실 재훈이, 독성실 동건이 고맙다. 너희는 큰 사람이 될꺼야~! 그리고 추운 겨울 군대에서 땀흘리고 있는 성준이, 조금만 더 참고 힘내~! 정 많고 꿈 많고 배울점 많은 내 가족 같은 동생 지혜야. 높이높이 올라가서 나중에 맛있는거 많이 사줘! 충청도에서 고생하고 있는 전라디안 우리 정욱이, 요즘 옷은 잘 사입고 다니는지 모르겠다. 우리 추억들 간직하며 모두 건강하게 잘살자^^ 그리고 10년 지기 친구 경미, 제주에서 부모님 역할하며 나 거뒀먹이느라 고생이 많았고 대학원 오라고 얘기 해줘서 고마워^^ 미국에서 열공중인 보람오빠, 야스요언니, 늘 인생의 조연자가 되어줘서 고마워요. 미국에서 얼마 전에 득녀 하신 정효훈 선생님, 덕분에 대학원생활 시작을 잘할 수 있어서 이 날이 온 것 같습니다. 감사합니다. 또한 이 논문이 가능하게 해주신 질병관리본부 말라리아.기생충과 이상은 선생님께 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 김정수씨~ 늘 나를 믿어주고 함께 해줘서 고맙고 서귀포와 제주시를 옆 동네 가듯 달려줘서 고마워. 뭐든 잘먹어주고 내 이야기 잘 들어주고 항상 날 보고 웃어줘서 고마워. 그리고 무엇보다도 날 위해 제주행 비행기를 타줘서 고마워^^ 덕분에 행복합니다. 감사합니다.

힘이 되어주시는 모든 분들 기대에 어긋나지 않는 정직하고 참 좋은 수의사가 되겠습니다.