

개의 *Babesia gibsoni* 感染豫防에 관한 研究

I. 抗原의 Sonication 및 Formalin 처리에 의한 豫防接種

蔡俊錫 · 印東喆 · 李周默 · 尹昌模*

全北大學校 獸醫科大學 · 裡里農林高等學校*

서 론

Ristic²²⁾에 의하면 개에 대한 *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*)의 感染은 1910년에 印度에서 처음 報告되었다고 한다. 그후 이집트¹⁵⁾, 美國³⁾, 東南아시아¹⁰⁾, 日本³⁵⁾등 지에서 계속하여 報告되고 있으며 우리나라에서도 진드기 棲息地域에서 많은 發生이 報告^{26,37,38,40,41)}되고 있다. 住血原蟲인 *B. gibsoni*는 진드기에 의해서 媒介되는 것으로 알려져 있으며 *Babesia* spp. 中 小型原蟲으로서 赤血球內에서 1개 또는 2개 이상의 여러가지 形態^{7,9,16,14)}로 寄生하면서 宿主에 多様な 臨床症狀이 나타나는 것으로 報告되고 있다^{1,2,5,8,11,12,14,27,28,29,36)}.

개의 住血原蟲性疾病에 대한 免疫學的 研究는 Ristic²³⁾이 보고한 感染赤血球로 부터의 抗原 製造, Popovic²¹⁾의 抗原-抗體 反應을 이용한 Gel precipitation test에 의한 *B. canis*의 診斷方法 그리고 Anderson⁴⁾이 보고한 間接螢光抗體法 (Indirect fluorescent antibody test: IFA test)에 의한 *B. gibsoni* 診斷方法 등 다양한 研究가 이루어지고 있다. 또한 Tamura³¹⁾은 *B. gibsoni*에 대한 免疫抑制劑 投與의 影響에 關한 研究를, Tamura³²⁾는 實驗感染犬에서의 臨床所見과 免疫學的인 關係를 報告하였으며 Tamura³³⁾은 *B. gibsoni*에 感染된 개에서 間接螢光抗體法에 의한 抗體價 測定方法을 보고 하였다.

이와같이 原蟲性疾病的 免疫學的 研究는 매우 多様^{6,13,17,19,20,24,25,30)}하게 이루어지고 있으나 *B.*

*gibsoni*에 대한 vaccine 接種 效果에 관한 實驗研究는 아직 그 報告를 찾아 볼 수가 없었다.

따라서 著者는 感染犬으로 부터 回收한 抗原으로 vaccine을 製造하여 이를 實驗犬에 接種한 후 *B. gibsoni*를 人工感染시켜서 vaccine의 效果를 調査하기 위하여 本 研究을 수행하였다.

재료 및 방법

Babesia 原蟲: *B. gibsoni*는 全北 鎭安地方에서 자연감염된 개로 부터 채취하여 사용하였다. 이 원충은 광학현미경으로 검사한 결과 *B. gibsoni*로 판명되었으며 실험실에서 사육하는 잡종견에 접종하여 계대하였고 계대된 원충은 脾臟摘出犬에 人工感染시켜서 증식된 原蟲을 실험에 사용하였다.

實驗動物: 실험동물은 생후 5개월에서 1년생인 체중 6kg~15kg의 雜種犬으로서 임상검사 및 혈액검사상 건강하다고 판단되는 15두를 사용하였다. 실험동물은 모두 실험실시 1개월전에 内部寄生蟲의 구충제를 2회 투여하였으며 canine distemper, canine parvovirus, infectious canine hepatitis 그리고 leptospirosis에 대한 예방접종을 실시하였다.

실험동물은 5두씩 3群으로 나누어서 이를 實驗群에 2群, 對照群에 1群을 배정하였다.

이 외에 原蟲增殖用으로 건강한 개 2두를 脾臟摘出하여 사용하였다

原蟲增殖과 Vaccine 製造: 5개월령의 건강한 개를 脾臟摘出하여 수술부위가 완전히 치료된후 (4주) 감염율이 1%인 혈액(*B. gibsoni*감염적혈구: 10^9 개)을 상완정맥에 접종하였다. 접종후 5일간 dexamethasone 0.1mg/kg을 피하주사하고 stress(심한 운동)를 가하여 원충을 증식시켰다. 접종 28일 후에 全血를 채혈하였고 이때의 感染率은 21.8%였다.

이 혈액(*B. gibsoni*감염적혈구: 2×10^{10} 개)을 脾臟摘出した 6개월령의 다른 개에 재접종하여 원충을 증식시켜서 다음과 같이 vaccine을 제조하였다. 즉, B군에 사용한 vaccine은 감염적혈구를 sonication하여 soluble antigen을 만들어서 1두당 단백질이 1.5mg/ml되도록 하였다. C군에 사용한 vaccine은 *Babesia gibsoni*원충을 0.2% formalin으로 고정시켜서 1두당 원충수가 10^8 /ml되도록 하였다. B군과 C군에 사용한 항원은 모두 Freund's complete adjuvant(FCA)와 동량으로 혼합하여 사용하였다.

豫防接種 實驗: 實驗群(2群)과 對照群(1群)중 Table 1에 표시된 바와 같이 A군은 대조군으로서 무처리군이며 실험군인 B군과 C군에 대해서는 다음과 같이 1차 접종을 실시 하였다.

즉, B군과 C군은 각기 그 항원을 동량의 FCA를 혼합한 vaccine을 2ml씩 피하로 1차 예방접종을 실시하였다.

제2차 예방접종(booster)은 1차 예방접종을한 2주 후에 실시하였으며 B군과 C군은 1차 예방접종과 동일한 방법으로 실시하였다.

Challenge는 제2차 예방접종 3주 후에 실시하였으며 *B. gibsoni*원충수는 10^8 /kg이 되도록 하여 정맥주사 하였다. 항체가를 측정하기 위하여 IFA test를 실시하였으며 그 혈청은 1주간격으로 채취하였다

抗原-抗體反應 檢査: *B. gibsoni*원충이 감염된 적혈구를 soluble antigen으로 만들어 감염혈청과 반응시켰을 경우에 나타나는 특이 항원-항체반응을 확인하기 위한 Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques(EITB)는 Western blot 방법에 의하여 다음과 같이 실시 하였다.

抗原製造: 常法에 의해서 얻어진 감염 적혈구를 超音波磨碎機(ultrasonicator)로 20 kilocycle에서 마쇄하여 soluble antigen을 만들었다.

대조항원으로는 *B. gibsoni*에 감염되지 않은 개의 정상적혈구를 상기한 바와 동일한 방법으로 처리하였다. 이들 항원은 -20°C 이하에서 냉동보관하였다.

血清: EITB에 사용한 양성혈청은 脾臟摘出犬에 *B. gibsoni*를 인공감염시킨후 70일(감염율: 48%)째에 채취한 것을 사용하였으며 대조로는 건강한 개의 정상혈청을 사용하였다.

電氣泳動: Western blot에 사용하기 위한 전기영동은 sodium dodecyl sulfatopolyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)법에 의해서 실시 하였다.

Western blot: Sonication하여 얻은 항원과 감염혈청을 반응시켜서 나타나는 특이항원을 찾기 위하여 Tsang등³⁴⁾의 방법에 의한 Western blot

Table 1. Experimental Desing of Vaccination and Challenge

Weeks	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A ¹ (5 heads)	None	-	None	-	-	Ch	-	-	-	-
B ² (5 heads)	PV	-	SV	-	-	Ch	-	-	-	-
C ³ (5 heads)	PV	-	SV	-	-	Ch	-	-	-	-

1: Control

2: 1.5mg protein/ml + 1ml FCA*/head(S.C.)(* : Freund's complete adjuvant)

3: 10^8 PE**/ml + 1ml FCA/head(S.C.)(** : parasited erythrocyte)

PV : Primary vaccination

SV : Secondary vaccination

Ch : Challenge with *Babesia gibsoni*(10^8 PE/kg B.W., I.V.)

을 실시하였다. 즉, sonication한 항원을 전기영동하여 분리된 band들을 nitro-cellulose membrane에 옮긴 후 이들 band에 감염혈청과 비감염혈청을 각각 반응시켜서 이중 감염혈청에서만 나타나는 특이 band를 찾도록 하였다.

抗體價 檢査: 실험 全期間동안 각군의 抗體價를 측정하기 위하여 일반적으로 널리 이용하고 있는 間接螢光抗體法³⁷⁾에 준하여 실시하였다.

抗原製作은 감염적혈구를 약 4°C의 PBS(pH7.2)로 3회 세척하고 PBS 3용량에 침전 적혈구 1용량을 가하여 25%의 赤血球 浮游液을 만들었다. 이를 무형광 slide glass에 박충도말하여 건조시킨후 약 4°C의 acetone으로 10분간 고정하고 이 slide를 -20°C에 보관하였다.

被檢 및 對照血清은 56°C에서 30분간 비동화시켰으며 대조혈청은 PBS로 1:40으로 희석하고 실험견의 혈청도 1:40부터 5배 희석배율로 증가시켰다. 형광표식항체 (Fluorescein, conjugated IgG, Fraction Goat Anti-Dog IgG; CAPPEL)는 PBS와 1:400으로 희석하여 사용하였다.

一般血液檢査와 感染率 調查: 혈액검사로서 對照群과 각 實驗群은 일주일에 1회씩 赤血球容積(PCV), 血色素(Hb) 및 赤血球數(RBC)와 白血球數(WBC) 그리고 白血球鑑別計算을 실시하였다.

감염을 조사는 혈액도말표본을 Giemsa 染色하여 적혈구 1,000개당 감염적혈구수를 계산하였다.

결 과

抗原-抗體反應을 보기위한 Western blot을 실시한 결과는 Fig. 1에 표시된 바와 같다. 감염적혈구를 sonication하여 얻은 항원에 감염혈청을 반응시킨 lane(A)에서는 20, 46, 54, 56, 61.5, 84, 100kd에서 각기 1개씩의 band가 형성되어 총 7개의 band를 확인 할 수 있었으며 대조항원에 감염혈청을 반응시킨 lane(B)에서는 20, 46, 56, 61.5, 84kd에서 각기 1개씩의 band가 형성되어 총 5개의 band를 확인 할 수 있었다. 그리고 감염 적혈구를 sonication하여 얻은 항원에 정상

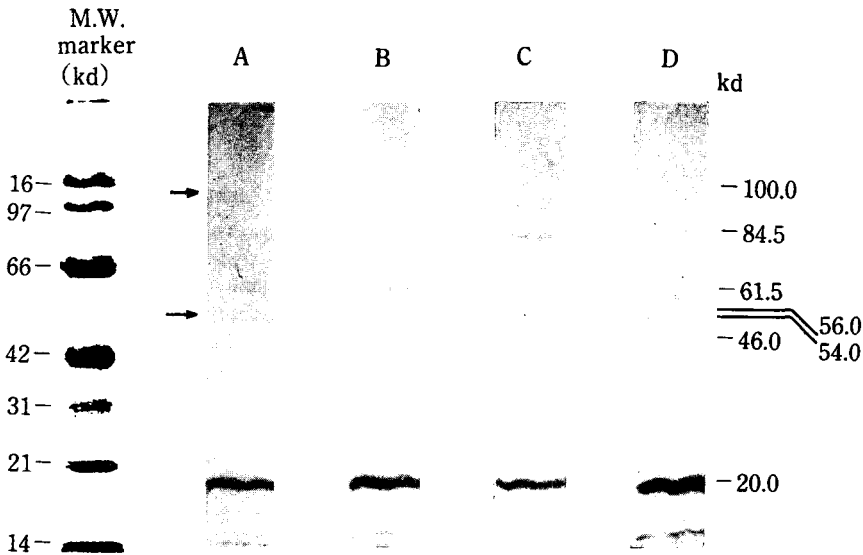


Fig. 1. Enzyme-linked immunoelectrotransfer(EITB) from experimental dogs infected with *Babesia gibsoni*,

- A : Positive serum was added to *Babesia gibsoni* antigen
- B : Positive serum was added to normal RBC
- C : Negative serum was added to *Babesia gibsoni* antigen
- D : Negative serum was added to normal RBC

Table 2. Antibody Titer in Serum after Vaccinations and Challenge in Dogs

Weeks	Group A	Group B	Group C
0 ←	40	40	40
1	40	200	200
2 ← ¹⁾	40	200	200
3	40	1,000	200
4	40	200	200
5 ← ²⁾	40	200	200
6	200	200	1,000
7	1,000	1,000	5,000
8	5,000	1,000	1,000
9	1,000	5,000	5,000

← : PV, ¹⁾ : SV, ²⁾ : Ch

혈청을 반응시킨 lane(C)에서는 20, 56, 61.5 81 kd에서 각기 1개씩 총 4개의 band를 확인하였고 대조항원에 정상혈청을 반응시킨 lane(D)에서도 역시 20, 56, 61.5 84kd에서 각기 1개씩의 band가 형성되어 총 4개의 band를 확인 할 수 있었다.

IFA test에 의한 실험군과 대조군의 血中抗體

價를 비교한바 Table 2에 표시된 바와 같은 결과를 얻었다.

血中の 原蟲出現率은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 실험군과 대조군이 모두 challenge한후 15일을 전후해서 원충출현율이 증가하였으며 이때 원충의 출현율은 대조군이 $55.0 \pm 5.4\%$ 로서 예방접종을 한 B군의 $26.0 \pm 16.4\%$ 와 C군의 $15.6 \pm 7.8\%$ 에 비하여 높은 출현율을 나타내고 있다.

2차에 걸친 vaccine접종과 challenge후의 대조군과 실험군간의 평균 PCV값(Table 3), 혈색소(Table 4) 및 적혈구수(Table 5)의 검사에서는 challenge후 각군 모두 감소하는 경향을 나타내었다.

Fig. 3에서와 같이 總白血球數는 실험군과 대조군사이에 유의성있는 차이가 없었으며 challenge후에 3군이 모두 감소하는 경향을 나타내었다.

Lymphocyte(Fig. 4)는 두번째의 vaccine접종과 challenge후에 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, 대조군은 실험전 $2,219 \pm 802/\mu\text{l}$ ($16.1 \pm 4.2\%$)에서 최종관찰치 $3,374 \pm 1,724/\mu\text{l}$ ($23.8 \pm 6.0\%$)로 증가하였으며 B군은 실험전 $2,876 \pm 1,304/\mu\text{l}$ (16.9 ± 6.0

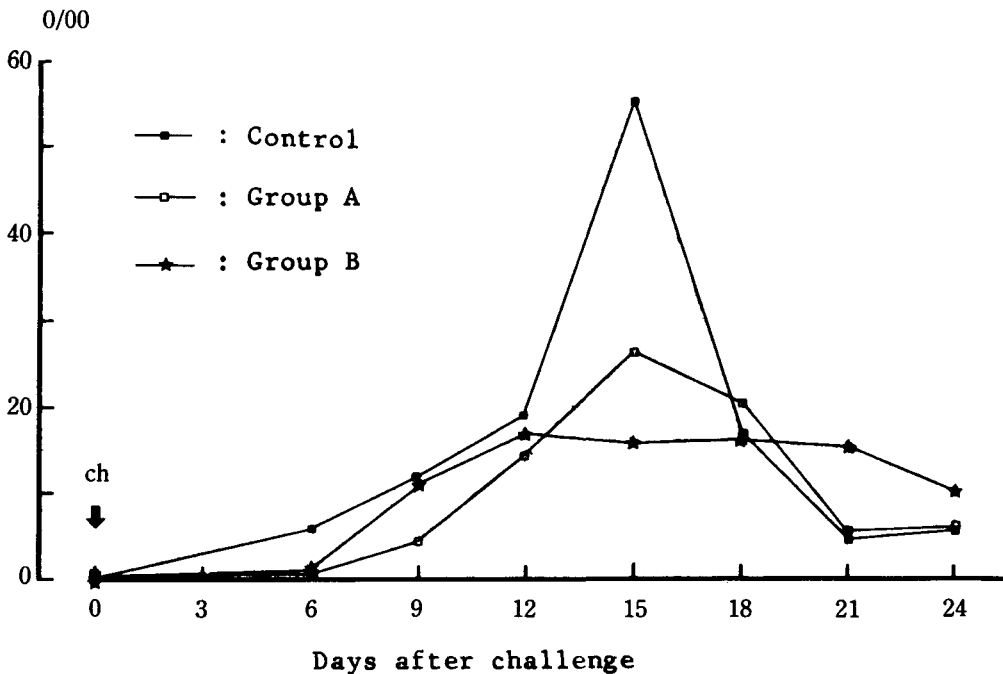


Fig. 2. Appearance of *Babesia gibsoni* in the peripheral blood after challenge.

Table 3. Changes of Packed Cell Volume after Vaccinations and Challenge

Weeks	PCV value[Mean±SD(%)]			F-value
	Group A	Group B	Group C	
0 ←	37.9±7.4	34.4±4.6	29.2±4.4	2.99<3.88 = F _{0.05}
1	32.8±8.3	34.5±9.6	30.7±2.5	0.32 ∕
2 ← ¹⁾	34.9±9.8	36.9±6.4	35.5±2.6	0.11 ∕
3	38.2±6.4	33.9±4.4	35.8±2.8	1.00 ∕
4	35.9±8.3	34.9±5.8	32.1±4.1	0.51 ∕
5 ← ²⁾	41.4±7.9	36.4±4.0	34.0±5.0	2.02 ∕
6	25.9±5.9	32.1±3.4	26.4±3.5	2.50<3.90 = F _{0.05}
7	19.8±6.2	27.5±4.3	23.9±1.9	3.31 ∕
8	14.9±5.4	19.5±1.9	19.6±3.7	2.03 ∕
9	21.2±3.7	20.4±2.4	25.6±2.7	3.83 ∕

12 ← : PV, ¹⁾ : SV, ²⁾ : Ch

Table 4. Changes of Hemoglobin after Vaccinations and Challenge

Weeks	Hemoglobin value [Mean±SD(mg/dl)]			F-value
	Group A	Group Ba	Group C	
0 ←	12.8±2.1	13.0±2.3	11.6±3.1	0.44<3.88 = F _{0.05}
1	12.5±2.5	10.4±1.3	9.8±1.8	2.39 ∕
2 ← ¹⁾	13.0±3.7	14.1±3.0	12.0±2.4	0.54 ∕
3	13.3±2.4	12.3±2.2	11.3±1.7	1.00 ∕
4	13.0±2.7	12.5±2.5	11.1±2.6	0.65 ∕
5 ← ²⁾	13.2±2.0	13.4±2.3	12.6±1.9	0.17 ∕
6	9.3±1.1	10.8±1.0	9.1±1.7	1.96<3.90 = F _{0.05}
7	6.7±2.1	8.5±0.9	8.1±1.3	1.60 ∕
8	5.8±1.8	7.1±1.1	6.9±1.3	1.04 ∕
9	8.3±2.5	9.2±1.5	8.4±1.7	0.27 ∕

← : PV, ¹⁾ : SV, ²⁾ : Ch

Table 5. Changes of Red Blood Cell after Vaccinations and Challenge

Weeks	RBC value[Mean±SD(×10 ⁴ /μl)]			F-value
	Group A	Group B	Group C	
0 ←	636.4±119.3	602.8±119.1	570.0±146.8	0.33
1	556.6±133.8	553.6±137.0	555.4± 80.2	0.00
2 ← ¹⁾	575.8±136.8	594.2± 83.7	636.6± 74.4	0.47
3	617.2±129.7	620.6± 96.2	619.6± 80.4	0.00
4	576.2±122.0	618.6±126.4	600.4±134.2	0.14
5 ← ²⁾	620.6± 68.9	621.2± 99.6	610.2± 81.9	0.01
6	423.2± 70.0	566.5± 89.2	455.4± 74.5	4.09*
7	358.8±121.1	424.3± 40.9	455.0± 91.9	1.40
8	310.8±115.4	338.0± 72.5	351.8± 97.5	0.22
9	392.4±141.6	369.0± 30.0	409.2± 74.4	0.19

*>3.88 = F_{0.05}

← : PV, ¹⁾ : SV, ²⁾ : Ch

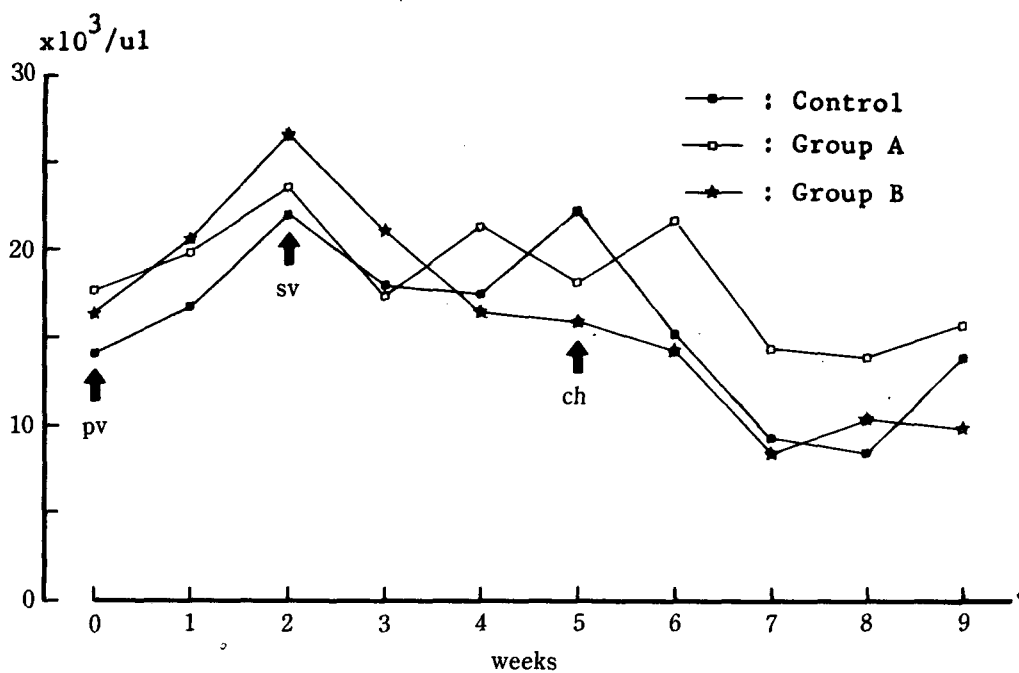


Fig. 3. Changes of total white blood cell after vaccinations and challenge.

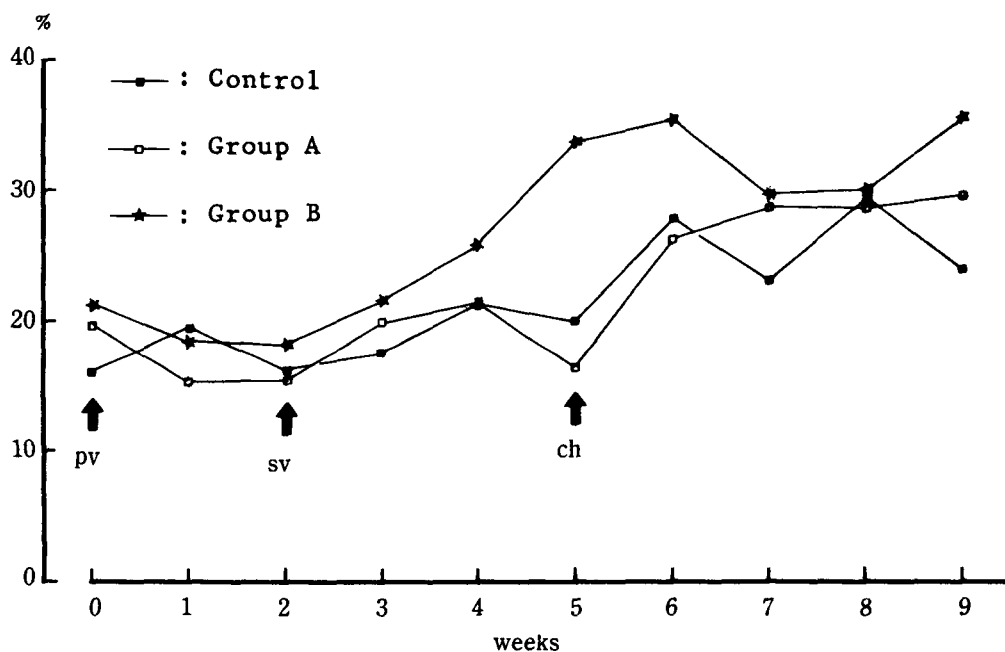


Fig. 4. Changes of lymphocyte after vaccinations and challenge.

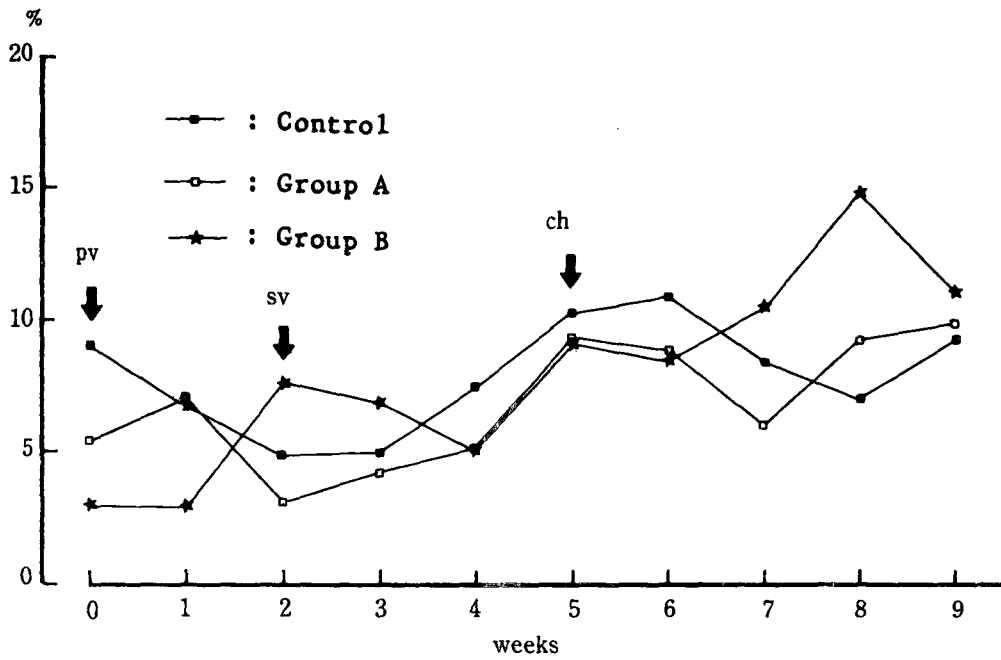


Fig. 5. Changes of monocyte after vaccinations and challenge.

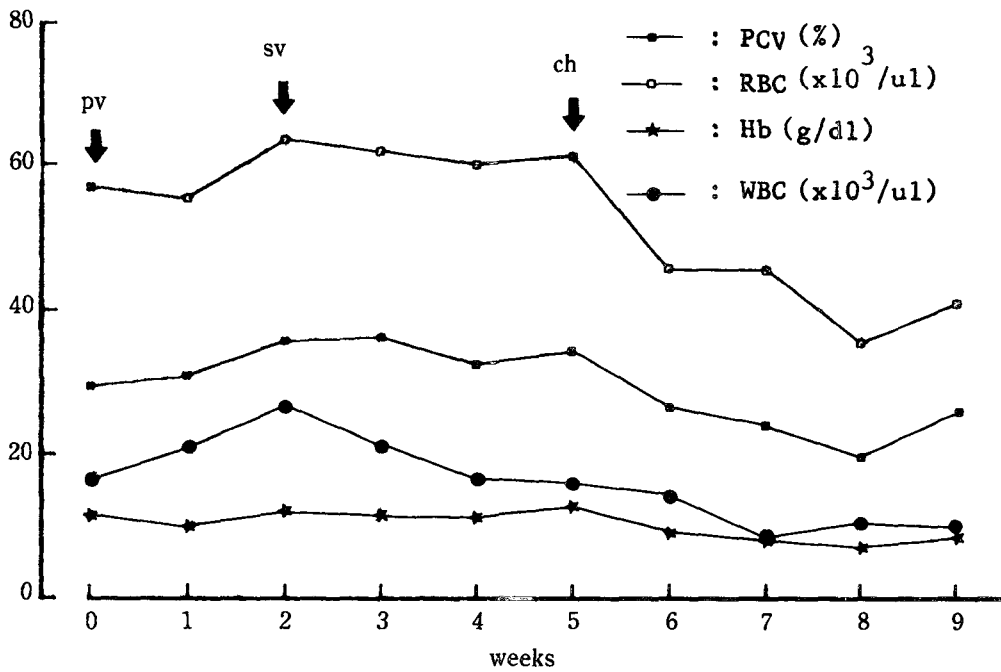


Fig. 6. Blood pictures after vaccinations and challenge in group.

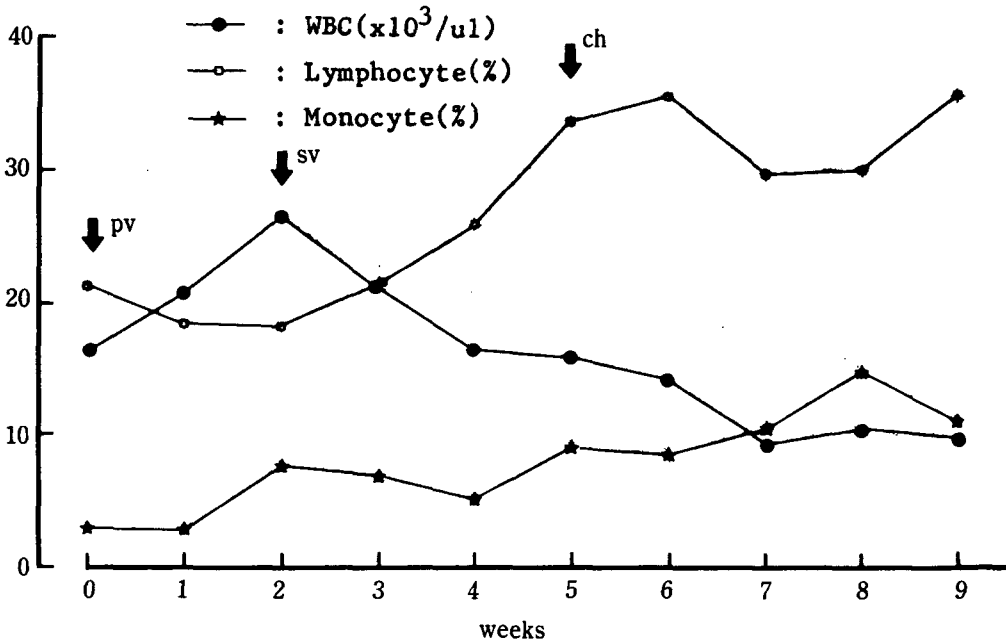


Fig. 7. Changes of white blood cell after vaccinations and challenge in group C.

%)던 것이 $3,842 \pm 2,839/\mu\text{l}$ ($29.5 \pm 4.7\%$)로 증가하였고, C군은 $3,182 \pm 935/\mu\text{l}$ ($21.2\% \pm 7.3\%$)에서 $3,477 \pm 866/\mu\text{l}$ ($35.4 \pm 6.2\%$)로 증가하였다.

Monocyte도 Fig. 5에 나타난 바와 같이 B군과 C군에서 2차접종후 부터 challenge후 까지 lymphocy와 비슷한 증가 경향을 나타내었다.

고 찰

Fig. 1에서와 같이 Western blot에 나타난 7개의 band중 20kd, 56kd, 61.5kd 및 84kd의 4가지 band는 A lane에서 부터 D lane까지 모든 lane에서 나타나는 공통적인 band임을 알 수 있으며, A lane의 54kd과 100kd의 band만이 다른 lane에서 찾아 볼 수 없었다. 따라서 이들 두 band는 항원과 감염혈청의 반응에 의해서 나타나는 특이 band이며 이들 물질이 *B. gibsoni*의 특이항원성 물질로 생각된다.

Anderson등⁴⁾에 의하면 *B. gibsoni*에 감염된 개에서 IFA test를 실시할 결과 25일 후에 항체가 1:256까지 상승하였으며 그후 실험을 끝마친 24주후까지는 항체가 1:4,096까지 상승 유지되었다고 보고하고 있다. 본 실험에서는 예

방접종을 실시한 4주(28일) 후의 IFA test 항체가 1:200으로서 Anderson 등이 보고한 값보다 약간 낮기는 하였으나 어느정도 비슷한 결과를 나타내고 있었다. 또한 본 실험에서 예방접종 후에 *B. gibsoni*를 감염시킨 결과 4주 후에는 최고치인 1:5,000까지 항체가 상승함을 관찰할 수 있었는데 이는 Anderson 등의 1:4,096과 역시 비슷한 값을 나타내었다 하겠다.

오늘날 몇종류의 주혈원충이 가지고 있는 가장 어려운 문제의 하나는 vaccine을 실시함에도 불구하고 parasitemia를 억제할 수 없다는 점이다. 본 실험에서도 예방접종군에 대한 challenge의 결과 역시 parasitemia를 억제할 수 없었다. 이러한 문제점의 해결과 앞에서의 vaccine 접종후의 항체를 더 높이기 위해서는 예방접종방법에 관한 철저한 연구가 시행됨은 물론 주혈원충의 전반적인 문제에 관한 연구가 훨씬 더 진척되어야 해결될 것으로 생각된다. 다만 본 실험에서도 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 예방접종군(B군:26%, C군:15.6%)에서는 대조군(A군:55.0%)에 비해서 적혈구의 *B. gibsoni*감염율은 낮게 나타났다.

PCV, RBC, Hb 등은 예방접종과 challenge 과

정중에서 감소경향을 나타냈으며 대조군과 실험군간에는 통계적으로 유의성 있는 차이를 인정할 수가 없었다. PCV의 경우 최저치는 parasitemia가 최고치에 이른 1주후(challenge후 3주)에 최저치에 달 하였는바 이때의 대조군의 평균 PCV치는 $14.9 \pm 5.4\%$ 이었으나 B군은 $19.5 \pm 1.9\%$ 그리고 C군은 $19.6 \pm 3.7\%$ 로서 대조군과 vaccine 접종군 사이에는 약간의 차이를 찾아볼 수 있었다. 그러나 이 차이는 통계적으로 유의성 있는 것은 아니었다.

일반적으로 PCV, RBC, Hb., WBC 등이 모두 challenge 후에 비슷한 감소경향(Fig. 6, 7 참조)을 나타내고 있는 반면 lymphocyte, monocyte 등은 오히려 challenge 후에 증가 경향(Fig. 7 참조)을 나타내고 있다. 이러한 challenge 후의 증가 경향은 IFA test에서도 마찬가지로여서 challenge 2~3주 후 부터 증가 경향을 보이고 있다. lymphocyte나 monocyte가 면역과 관계가 깊은 세포임을 감안할 때 IFA test에 의한 항체가 상승과 lymphocyte 및 monocyte의 증가 현상이 일치함은 매우 흥미있는 일로서 vaccine 접종의 성공 가능성을 예시해주는 것이라 하겠다.

총백혈구는 challenge 2~3주 후에 제일 낮은 값을 나타내고 있는바 이는 채 등⁹⁾이 보고한 *Babesia gibsoni* 감염시의 백혈구 변화상과 똑같은 양상을 나타내고 있다. 그러나 Theileriosis에서는 원충출현수가 최고에 이른 시기에 WBC도 급격한 상승현상을 나타낸 양상^{40,43)}과는 매우 대조적인 현상이라 하겠다.

결 론

*B. gibsoni*에 대한 감염예방 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 즉, 건강한 개(犬) 15두를 5두씩 3군으로 나누어 1군(group A)은 대조군으로 그리고 나머지 2군은 실험군[항원을 sonication하여 접종한 군(group B)과 항원을 0.2% formaline처리하여 접종한 군(group C)]으로 하여 *B. gibsoni* 감염에 대한 효과를 조사한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Sonication한 항원에 감염혈청을 반응시킨 Western blot에서는 A lane의 54kd과 100kd 부

위에서 각기 1개씩 총 2개의 특이한 band가 나타남을 알 수 있었다.

2. IFA test에서는 1차 예방접종 후에 B군과 C군에서 혈중 항체가가 대조군에 비해 5배 정도 높았으며 2차 예방접종 후에도 이러한 항체가에는 변화가 없었다. 그러나 challenge 후에는 대조군이나 B군 및 C군이 다같이 항체가가 증가하였으나 challenge후 4주까지 1:5,000이상을 넘지 않았다.

3. Challenge 후의 원충수가 최고치에 달하는 시기는 A, B, C군 모두에서 15일을 전후한 시기(12~18일)이었다. 이 경우 대조군인 A군에서는 원충 출현율이 $55.0 \pm 5.4\%$ 에 달하였으나 B군은 $26.0 \pm 16.4\%$, C군은 $15.6 \pm 7.8\%$ 이었다.

4. 실험군과 대조군 모두에서 challenge 후에는 PCV, Hb, RBC가 모두 감소하였다.

5. 실험군과 대조군 모두에서 challenge 후에 총백혈구수가 감소하는 경향을 나타냈다.

6. Lymphocyte와 monocyte는 총백혈구수가 감소하는 시기(challenge 후)에 오히려 증가하는 경향을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Abdullahi, S.U. and Sannusi, A.: Canine babesiosis. In: Kirk RW, ed. Current veterinary therapy IX. Small animal practice. Philadelphia: WB Saunders Co.(1986): 1096~1098.
2. Amstutz, H.E., Archibald, J. and Armour, J. et al.: The merck veterinary manual. 6th. ed. Merck & Co., Inc. RAHWAY, N.J., U.S.A.(1986): 1564~1567.
3. Anderson, J.F. and Magnarelli, L.A.: Canine Babesia new to North America. Science(1979): 204: 1431~1432.
4. Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. and Sulzer, A.J.: Canine Babesiosis: Indirect fluorescent Antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res.(1980): 41: 2102~2105.
5. Botros, B.A.M., Moch, R.W. and Barsoum, I.S.: Some observations on experimentally induced

- infection of dogs with *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res.(1975) : 36 : 293~296.
6. Burrige, M.J. : Application of the indirect fluorescent antibody test in experimental East Coast Fever(Theileria parva infection of Cattle). Res. Vet. Sci.(1971) : 12 : 338~341.
 7. Farwell, G.E., Legrand, E.K. and Cobb, C.C. : Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infection in dogs. J.A.V.M.A.1982 : (180) : 507~511.
 8. Fowler, J.L., Ruff, M.D. and Fernau, R.C. *et al.* : *Babesia gibsoni* : Chemotherapy in dogs. Am. J. Vet. Res(1972) : 33 : 1109~1114.
 9. Fower, J.L., Ruff, M.D. and Hornof, W.J. : Modification of field's stain for examination of growth forms of *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res.(1970) : 31 : 1079~1083.
 10. Groves, M.G. and Yap, L.F. : *Babesia gibsoni* in a dog. J.A.V.M.A.(1968) : 153 : 689~614.
 11. Jain, N.C. : Schalm's veterinary hematology. 3th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia,(1986) : 599~601.
 12. Klinefelter, M.R. : Cause, diagnosis, and treatment of canine piroplasmiasis. Veterinary Medicine/Small Animal Clinician(1982) : 1505~1508.
 13. Kuttler, K.L. and Johnson, L.W. : Immunization of cattle with a *Babesia bigemina* antigen in Freund's complete adjuvant. Am. J. Vet. Res. (1980) : 41 : 536~538.
 14. Levine, N.D. : Veterinary protozoology. 1st. ed. Iowa Stte University Press. Ames,(1985) : 306~307.
 15. Maronpot, R.R. and Guindy, E. : Preliminary study of *Babesia gibsoni* Patton in wild carnivores and domesticated dogs in Egypt. Am. J. Vet. Res.(1970) : 31 : 797.
 16. Mimori, T., Kono, I. and Sakamoto, *et al.* : Morphological studies of multiplication of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. Jpn. J. Vet. Sci. (1982) : 44 : 699~701.
 17. Morishige, T., Takahashi, K. and Abe, S. *et al.* : Detection of circulating immune complex in dogs infected with *Babesia gibsoni*. J Coll Dairying(1988) : 12 : 443~452.
 18. Namikawa, K., Sunaga, F. and Kanno, Y. : Morphology of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. Jpn. J. Vet. Sci.(1988) : 50 : 936~938.
 19. Ohgitani, T., Okabe, T. and Sasake, N. : Antigenic Properties of *Theileria sergenti* in ELISA serodiagnosis Jpn.J.Vet.Sci.(1987) : 49 : 531~534.
 20. Onodera, T., Tsuda, T. and Shimizu, S. *et al.* : Biochemical characterization of *Theileria sergenti* lysate antigen on the adjuvant effect in mice. Jpn. J. Vet. Sci.(1988) : 50 : 814~816.
 21. Popovic, N.A. and Ristic, M. : Diagnosis of Canine Babesiosis by a Gel Precipitation Test. Am. J. Vet. Res.(1970) : 31 : 2201~2204.
 22. Purnell, R.E. : Babesiosis in various hosts. Babesiosis. Academic Press.(1981) : 25~63.
 23. Ristic, M., Lykins, J.D. and Smith, A.R. *et al.* : *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* : Soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs. Exp Parasitol(1971) : 30 : 385~392.
 24. Sakurai, H., Takahashi, H. and Sato, M. *et al.* : Immunity in neonates of mice chronically infected with *Babesia rodhaini*. Jpn.J.Vet.Sci.(1987) : 49 : 77~84.
 25. Sang-Seop Han, Saeki, H. : Prophylactic efficacy of a killed vaccine against *Babesia Rodhaini* Infection in mice. The bulletin of the Nippon veterinary and zootechnical college.(1985) : 34 : 72~75.
 26. Scott, M.V.,Fowler, J.L. and Ruff, M.D. : *Babesia gibsoni* infection of a dog in Korea J.A.V.M.A. (1971) : 159 : 1122~1123.
 27. Soulsby, E.J.L. : Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th. Bailliere Tindal, London,(1982) : 723~728.
 28. Sunaga, F., Namikawa, K. and Kanno, Y. : Analysis of thermic circadian rhythm and degree of parasitemia in dogs infected with *Babesia gibsoni*. Jpn. J. Vet. Sci.(1988) : 50 : 925~929.
 29. Sunaga, F., Namikawa, K. and Kanno, Y. : The thermic circadian rhythm of dogs infected with

- Babesia gibsoni*. Jpn. J. Vet. Sci.(1988) : 50 : 279~281.
30. Takahashi, K., Sonoda, M. and Kurosawa, T. : Immunopotentiating effect of levamisole in dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. J Coll Dairying(1981) : 9 : 123~134.
 31. Tamura, T., Takahashi, K. and Sonoda, M. *et al.* : Effect of some Immunosuppressive treatments in dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. J. Coll Dairying(1979) : 8 : 89~98.
 32. Tamura, T. : Clinical and immunological studies on dogs infected with *Babesia gibsoni*. J. Coll Dairying(1977) : 7 : 141.
 33. Tamura, T., Takahashi, K. and Sonoda, M. *et al.* : The indiret fluorescent antibody test as a method for detecting antibody in dogs infected with *Babesia gibsoni*. J. Coll Dairying(1980) : 8 : 249~256.
 34. Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Ray Simons, A. : Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques(EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Meth in enzymol(1983) : 92 : 377~391.
 35. Yonamine, H., Ichiki, H. and Hamakawa, M. *et al.* : Studies on canine babesiosis in Okinawa Island. Jpn. J. Vet. Sci.(1984) : 46 : 511~518.
 36. 南 哲郎, 藤永 徹 : 獸醫住血微生物病. 近代出版.(1986) : 6 : 66~68.
 37. 南 哲郎, 藤永 徹 : 獸醫住血微生物病. 近代出版.(1986) : 6 : 269~272.
 38. 孫濟英 : 韓國에서 發生한 Canine babesiosis에 관한 研究. 第三報 自然發生患犬의 臨床觀察 및 患犬發生地域 飼育犬에 對한 調査. 大韓獸醫學會誌(1964) : 4 : 7~9.
 39. 申相泰, 崔熙仁, 成在基 등 : 사냥개에서의 *Babesia gibsoni* 感染. 韓國臨床獸醫學會誌(1987) : 4 : 61~67.
 40. 李周默, 金明鐵 : 鬚소의 파이로프라스마症의 효과적인 집단검색과 치료방법에 관한 연구. 大韓獸醫學會誌(1987) : 20 : 321~330.
 41. 李學豪, 金泰鍾, 李元暢 : *Babesia gibsoni*가 感染된 개에 關해 研究. 大韓獸醫師會誌(1984) : 20 : 161~168.
 42. 채준석, 인동철, 한재철 등 : Canine Babesia spp. 感染病例. 韓國臨床獸醫學會誌(1989) : 6 : 21~27.
 43. 韓正熙, 李周默 : Theileria 感染牛 血液의 臨床血液學的 調査. 全北大學校 農大論文集(1984) : 15 : 91~96

Studies on the Prophylaxis against *Babesia gibsoni* Infection in Dogs

I. Vaccinations with the Sonicated and the Formalin-treated Antigen

Joon-Seok Chae, D.V.M., M.S. Dong-Cheol Ihn, D.V.M.,

Joo-Muk Lee, D.V.M., Ph.D. and Chang-Mo Yoon, D.V.M.*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
Iri Agricultural and Forestry High School*

Abstract

To examine the effects of vaccination against *Babesia gibsoni* infection in dogs, 15 normal mixed-breed dogs (5 month to 1 year old) divided into 3 groups with 5 dogs in a group. One of them was selected as control group (group A) and others were selected as experimental groups (group B and C).

The group B was vaccinated with sonicated antigens and the group C was vaccinated with 0.2% of formalin treated antigens.

The results obtained in the examination were summarized as follows :

1. In the western blot, the lane A revealed specific two bands on the regions of 54kd and 100kd, respectively.

2. After the first vaccination, the antibody titers of group B and C were higher 5 times (1 : 200) than those of control group (1 : 40). After the second vaccination, the antibody titers of group B and C have not changed. When challenged with the protozoa (*Babesia gibsoni*), the antibody titers (1 : 5,000) were elevated in all groups. But these were not exceeded over 1 : 5,000 for 4 weeks.

3. After challenge, the peak time of increased numbers of the protozoa was the 15th day (12-18 days) in all groups. During these days, the rate of parasitized erythrocytes in control group was $55.0 \pm 5.4\%$. But those of group B and group C were $26.0 \pm 6.4\%$, and $15.6 \pm 7.8\%$, respectively.

4. After challenge, all of the values of PCV, Hb, RBC were shown to decrease in all of the control and experimental groups.

5. The total leukocytes counts are shown a tendency of reduction in all groups after challenge.

6. In all groups, there were increase in lymphocytes and monocytes after challenge.