

개 심장사상충(*Dirofilaria immitis*) 진단을 위한 항원성 조사 및 단클론항체 생산

이 철 순 · 지 차 호

충북대학교 수의과대학
(1999년 12월 22일 접수)

Studies on antigenicity and production of monoclonal antibody for diagnosis of canine heartworm(*Dirofilaria immitis*)

Cheol-soon Lee, Cha-ho Jee

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

(Received Dec 22, 1999)

Abstract : In order to diagnose canine heartworm infection by antigen capture ELISA, the crude somatic(S), partial somatic(below 45kDa) and excretory/secretory(E/S) antigen of adult heartworm were identified and the antigenicity was examined by silver stain, immunoblot and ELISA. Then, production of monoclonal antibody to specific antigen carried out in this experiment. The bands to S antigen and E/S antigen were recognized between 10 and 200kDa and common bands were recognized strongly 14, 18, 28, 43kDa by silver stain. By western blot analysis, fractions to S antigen were recognized 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 43, 50, 55kDa, etc. and only a 14kDa to E/S antigen in positive sera which were positive in modified Knott's test and necropsy. In ELISA, the positive sera reacted to antigens(SA, SA₄₃, E/S) were significantly different from negative sera by Student's *t*-test($p < 0.05$). Four hybridoma cell lines(14, 16, 17, 32kDa) that produce specific monoclonal antibodies for these antigens were obtained by immunizing BALB/c mice with a partially purified somatic antigen (below 45kDa) preparation, by fusing spleen cells with SP2/O cell myeloma cells, and by screening cell culture supernatants for antibody.

In these results, it was confirmed that partial somatic antigen(below 45kDa) or E/S antigen can be used for serologic diagnosis of heartworm infection and monoclonal antibody reacting with specific antigen(14kDa) can be used for antigen capture ELISA in prepatent period of canine heartworm infection.

Key words : canine heartworm(*Dirofilaria immitis*), somatic, excretory and secretory antigen, monoclonal antibody, antigen capture ELISA.

서론

일반적으로 모기에 의해 전파되는 개 심장사상충(*Canine heartworm, Dirofilaria immitis*)은 주로 개에서 심혈관계의 기능 이상을 야기하는 중요한 기생충으로 전세계적인 임상문제로서 인식되고 있으며 여러 진단법의 개발, 효과적인 방지책 그리고 수의 전문가와 축주 사이의 증가된 인식에도 불구하고 심장사상충의 발생은 계속해서 보고되고 있으며 질병의 진단은 여전히 복잡하고 어렵다.

개 심장사상충증의 진단은 전통적으로 순환 혈액중의 미세사상충 존재유무에 기초를 두고 있으며 미세사상충의 탐지를 위한 기술에는 혈액도말법, hematocrit capillary tube test, Knott's tests 그리고 filter tests가 있다. 그러나 이러한 미세사상충을 직접 확인하는 방법은 개 피부사상충(*Dipetalonema reconditum*)과 감별하여야 하는 번거로움이 있으며 개업 수의사들이 진단에 이용하는 미세사상충 검사법에서 개 피부사상충과의 감별을 하고 있지 않으며 벼룩(fleas)이나 이(lice)에 의해 매개되는 개 피부사상충의 감염도 적지 않다고 보고하고 있다^{2,12}. 또한 개 심장사상충의 미세사상충은 은폐감염(occult infection)과 정기 출현성(periodicity)^{14,15}으로 심장사상충에 감염된 많은 개들은 혈중에 순환 미세사상충을 가지지 않으므로 현재에는 면역학적 진단법으로 심장사상충 성충의 존재를 진단하는 방법이 추천되고 있다. 심장사상충에 감염된 개에서 첫 번째 면역학적 방법은 피내침종법(intradermal skin test)¹⁷이었으며 그 이후 혈구응집반응(hemagglutination test)^{22,25}, 면역확산법(immunodiffusion test)⁴, 혈액 및 뇨 침전법(blood & urine precipitin)²⁶, 용해성 항원형광항체법(soluble-antigen fluorescent antibody), 간접형광항체법(indirect immuno fluorescent assay, IFA)¹⁴ 그리고 효소면역흡착법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 등¹⁰이 계속적으로 개발되었다. 이 중 간접형광항체법과 효소면역흡착법이 최근에 개 심장사상충 진단을 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이며 간접형광항체법은 미세사상충의 순환항원에 대한 항체를 검출하는 방법으로 Wong *et al*²⁴은 면역매개에 의한 은폐감염시에는 85-90%의 양성 진단율을 보이지만 감염초기와 혈액 내에 미세사상충에 대한 항체가 나타나기 전에는 음성으로 나타나고 은폐감염의 다른 원인에서는 진단할 수 없다고 알려져 있다¹⁴. 효소면역흡착법은 항체검출을 기

초로 감염초기에 진단할 수 있고 적은 수의 심장사상충 감염시에도 매우 민감하지만 장관내 기생충 혹은 다른 사상충과 혼합감염된 개에서 교차반응이 일어나기 때문에 실제적인 진단법으로 사용하는 것은 문제점이 있다^{9,21}. 이러한 문제점의 해결방법으로 개 심장사상충 성충의 순환항원을 탐지하기 위해 단클론항체(monoclonal antibody)²³를 이용한 실험들이 연구되었으며 개 심장사상충의 진단에서 새로운 방법으로 추천되고 있다^{23,27}. Thilsted *et al*²¹은 4가지 혈청학적 진단법(항체탐지(AB)-ELISA, 항원탐지(AG)-ELISA, 미세사상충-간접형광항체법(MF-IFA), 항체-간접형광항체법(AB-IFA))을 비교한 결과, 부검에 의한 감염확인 과 가장 일치하고 특이성이 높은 진단법은 항원탐지 효소면역흡착법(Antigen capture ELISA)이라고 보고하였다.

본 실험은 이러한 연구들을 바탕으로 국내에서도 문제가 되는 개 심장사상충의 체항원(somatic antigen)과 배설/분비항원(excretory/secretory antigen)에 대해 전기영동(electrophoresis), silver stain, immunoblotting, ELISA를 실시하여 항원성을 확인하고 진단에 사용할 수 있는 항원을 선별하여 개 심장사상충에 대한 특이 단클론항체를 생산함으로써 좀더 특이성과 민감성이 높은 진단법 개발을 위한 기초자료로 이용하기 위해 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

기생충 및 혈청준비: 천안근교 전장원에서 도축한 개의 심장에서 개 심장사상충 성충을 수집하였으며 혈청은 성충을 수집한 개와 충북대학교 수의학대학 조직학 실험실의 비글견(beagle dog)의 경정맥에서 혈액 10ml을 채취하여 2ml은 modified Knott's method를 실시하여 부검과 함께 감염여부를 확인하였고 8ml은 원심분리하여 혈청으로 준비하였다.

항원제조: 체항원은 수집한 성충을 생리식염수에 세척한 후 glinding 하고 15,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수거하였으며 배설/분비항원은 37°C, 5% CO₂ 항생제가 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium에서 성충을 배양하면서 12시간 간격으로 3일간 배지를 교환 회수하여 15,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수거하고 동결건조기를 이용하여 농축하였다. 준비한 항원은 이물질과 배지성분을 제거하기 위해 4°C, 0.01M 인산완충액(PBSS)에서 하룻밤 동안 투석막을 이

용하여 투석하였다. 또한 45kDa 이하의 체항원을 준비하기 위해 체항원을 전기영동후 겔상의 45kDa 이하 분획만을 잘라내어 투석막에 넣고 Tris-glycine buffer가 포함된 horizontal electrophoresis 장치에서 10mA, 4시간동안 작동하고 4℃, 50mM PBSS에서 하룻밤동안 투석하여 준비하였다.

항원성의 비교분석: 준비한 각 항원은 전기영동후 silver stain, Western blot, ELISA를 실시하여 항원성을 조사 확인하여 진단에 사용할 수 있는 특이항원을 조사하였다.

1) 전기영동 및 silver stain: 전기영동에 사용한 겔은 12.5% PAGE 겔로서 Ready gel cell(Bio-Rad)에서 Black-shear³의 방법에 준하여 전기영동을 실시하였으며 그후 silver stain은 Merrill *et al*¹¹의 방법에 준하여 실시하였다.

2) Western blot: 전기영동한 겔을 transfer buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 20% methanol(v/v), pH 8.3)에서 15분간 천천히 흔들며 겔을 준비하고 PVDF transfer membrane과 thick filter paper 2장을 transfer buffer에 담가두었다가 Western blot은 Gershoni *et al*⁸의 방법에 준하여 실시하였다. Trans-blot semi-dry electrophoretic transfer cell(Bio-Rad)에 filter paper-membrane-gel-filter paper 순으로 공기방울이 생기지 않도록 배열한 후 전원장치를 13V로 20분간 겔의 항원을 transfer시켰다. 그후 membrane을 5% non-fat dry milk/PBS-T₂₀(0.05% Tween²⁰ in PBSS, pH 7.4)에 담가 1시간 정도 천천히 흔들며 blocking한 후 PBS-T₂₀으로 15분간 3회 교환하며 씻어주었다. 개 심장사상충의 양성혈청과 음성혈청을 PBS-T₂₀으로 1:100으로 각각 희석하고 membrane에 첨가하여 1시간동안 반응시킨 후 10분동안 2번 PBS-T₂₀을 교환하며 membrane을 씻어주었다. Alkaline phosphate conjugated anti-dog IgG (Sigma)를 PBS-T₂₀에 1:3,000으로 희석한 용액에 membrane을 담가 1시간동안 반응시킨 후 30분동안 3회 PBS-T₂₀을 교환하며 씻어주었다. 가질로써 tris buffer(0.1M Tris, 0.5mM MgCl₂, pH 9.5) 12ml에 BCIP/NBT color development solution(Bio-Rad)을 각각 120μ씩 혼합하여 membrane과 반응시킨 후 분획이 나타나면 증류수로 씻어 반응을 멈춰 결과를 관찰하였다.

3) 효소면역흡착법(ELISA): 효소면역흡착법은 Tamashiro *et al*¹⁹의 방법에 준하여 실시하였으며 준비된 항원(SA, SA₄₅와 E/S)을 도포완충액(carbonate buffer; sodium carbonate 0.159g, sodium bicarbonate 0.293g, sodium azide 0.04g, D.W. 100ml, pH 9.6)으로 각각 1μg/ml로 희석하여

96-well plate의 각 well마다 100μ씩 첨가한 후 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후 4℃에서 하룻밤동안 방치하였다. 항원을 제거하고 PBS-T₂₀으로 5회 세척후 1% bovine serum albumin 100μ씩을 각 well마다 첨가한 후 37℃에서 2시간 이상 반응시킨 후 PBS-T₂₀으로 5회 씻어주었다. PBS-T₂₀으로 양성혈청을 1:100으로 희석하여 각 well마다 100μ씩 첨가한 후 37℃에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T₂₀으로 5회 씻어주었다. 그후 Alkaline phosphate conjugated anti-dog IgG(Sigma)를 PBS-T₂₀과 1:5,000으로 희석하여 100μ씩 첨가한 후 37℃에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T₂₀으로 5회 세척하였다. 가질로 p-nitrophenyl phosphate 10mg을 0.5mM MgCl₂가 포함된 10mM diethanolamine (pH 9.5) 10ml에 녹인 후 각 well에 50μ씩 첨가한 후 실온에서 35분간 암시야에서 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 405nm의 파장에서 결과를 판독하였다. 측정된 각 항원의 흡광도(Optical Density, OD)값은 Student's *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

단클론항체의 생산: 면역시 교차반응을 줄이기 위하여 45kDa 이하의 체항원을 6주령의 BALB/c 마우스에 Freund's complete adjuvant와 동량으로 섞어 복강내로 0.5ml씩 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 마지막 접종 2주후에 항원과 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 섞은 후 0.5ml씩 복강주사하였다. 3차 접종후 마우스의 비정맥으로부터 채혈하여 심장사상충에 대한 혈청역가를 ELISA로 검사하여 충분한 항체가를 나타내는 마우스를 대상으로 융합(fusion)전 마지막으로 체항원 0.5ml 정맥주사하였다. 정맥주사후 3일째 되는 날 마우스의 비장을 무균적으로 적출한 비장세포와 배양한 SP2/O myeloma cell을 1:5로 혼합하여 1회 원심분리후 PEG를 넣어 세포를 융합하였다. 이 세포들은 hydroxanthine-aminopterin-thymidine(HAT) 배지로 부유시킨 다음 96-well plate에 well마다 200μ씩 분주하고 5% CO₂, 37℃의 배양기에서 5일간 배양하고 2일 간격으로 배지를 교환해주었다. 세포융합후 10일후 colony가 1/3 이상 형성된 well의 배양상층액을 채취하고 성충의 항원을 이용한 ELISA에서 양성인 well만을 limiting dilution 법으로 cloning을 실시하고 Western blot 하여 하나의 특이 단클론항체만을 생산하는 hybridoma를 획득하였다. 심장사상충이 항체생산 hybridoma는 pristane(2,6,10,14-tetra-methyl-pentadecane)으로 미리 감작시킨 마우스 복강내로 1ml씩 접종하여 복수(腹水)를 생산하였다.

결 과

혈청 및 항원제조 : 본 실험에 사용한 혈청은 modified Knott's method와 부검에 의하여 확인된 양성혈청과 음성혈청 각각 5개이었다. 양성혈청은 부검에 의해 성충이 존재한 혈액(2개)과 modified Knott's method에 의해 미세사상충이 존재하는 혈액(3개)이며 음성혈청은 부검과 modified Knott's method에서 성충이나 미세사상충이 없는 혈액 5개이었다.

항원성의 비교분석 : 준비한 각 항원의 항원성을 비교하기 위한 결과는 다음과 같았다.

1) Silver stain : 체항원과 배설/분비항원은 12.5% PAGE gel을 이용하여 전기영동한 후 silver stain에 의해 항원을 확인하였다. 개 심장사상충 성충의 체항원과 배설/분비항원은 10~200kDa에 걸쳐 넓게 분포하였으며 체항원과 배설/분비항원의 주요 공통분획은 14, 18, 28, 43 kDa 분획이 관찰되었다(Fig 1).

Fig 1. Silver stain of *Dirofilaria immitis* and other parasite antigens (12.5% PAGE).

M: Molecular weight marker, 1: Somatic antigen of *D immitis*, 2: Partial somatic antigen of *D immitis*, 3: Excretory/secretory antigen of *D immitis*, 4: Somatic antigen of *Trichuris vulpis*.

2) Western blot : 개 심장사상충에 감염된 개의 양성혈청에 대해 개 심장사상충 체항원은 14, 16, 18, 20,

24, 28, 32, 43, 50, 55kDa 등에서, 배설/분비항원에서는 14kDa의 분획만이 관찰되었으며 두 항원 모두에서 14 kDa의 공통분획이 존재함을 확인하였다. 그러나 개 편충(*T vulpis*)에 대해서는 이러한 공통분획을 관찰할 수 없었으며 17kDa에서 교차반응을 확인하였다(Fig 2).

Fig 2. Western blot of *Dirofilaria immitis* and other parasite antigens (12.5% PAGE).

A: positive serum, B: negative serum.

M: Molecular weight marker, 1: Somatic antigen of *D immitis*, 2: Partial somatic antigen of *D immitis*, 3: Excretory/secretory antigen of *D immitis*, 4: Somatic antigen of *Trichuris vulpis*.

Table 1. Comparison of OD values[†] to somatic(S) and excretory/secretory(E/S) antigen by indirect ELISA

	<i>Dirofilaria immitis</i>			<i>T. vulpis</i>
	S Ag	S Ag(<45kDa)	E/S Ag	
Positive 1	0.988	0.690	0.673	1.043
2	0.808	0.523	0.393	0.339
3	0.835	0.342	0.464	0.703
4	0.768	0.309	0.531	0.796
5	0.716	0.361	0.461	0.362
OD mean±SD	0.823**±0.10	0.445*±0.16	0.504*±0.11	0.648±0.30
Negative 1	0.310	0.191	0.301	0.291
2	0.539	0.287	0.411	0.664
3	0.349	0.196	0.193	0.438
4	0.672	0.198	0.493	0.903
5	0.328	0.220	0.234	0.289
OD mean±SD	0.440±0.16	0.218±0.04	0.326±0.12	0.517±0.27
<i>t</i> -test	p<0.002	p<0.017	p<0.041	p<0.482

[†] OD values at 405nm after 35 min.

*: p<0.05, **: p<0.01.

3) 효소면역흡착법 : 체항원, 45kDa 이하의 체항원 그리고 배설/분비항원에 대해 양성혈청과 반응하는 흡광도(OD means±SD) 값은 0.823±0.10, 0.445±0.16, 0.504±0.11이었고, 음성혈청은 0.440±0.16, 0.218±0.04, 0.326±0.12이었다. 또한 개 편충(*Trichuris vulpis*) 체항원에 대해 반응한 양성혈청(음성혈청)의 흡광도(OD means±SD)는 0.648±0.30(0.517±0.27)이었다(Table 1). 양성혈청과 음성혈청에 의해 반응한 각 항원의 흡광도는 Student's *t*-test를 이용하여 비교한 결과 체항원이 고도의 유의성(p<0.01)이 있었고 45kDa 이하의 체항원, 배설/분비항원도 유의성(p<0.05)이 있었지만 개 편충의 체항원에 대해서는 유의성이 없었다.

단크론항체 생산 : 단크론항체 생산을 위해 세포융합 후 ELISA와 immunoblotting의 결과 심장사상충에 대해 특이적으로 반응하는 단크론항체는 모두 4개를 생산하였으며 체항원에 대해서는 14, 16, 17, 32kDa에서 반응함을 확인하였으며(Fig 3) 이 중 14kDa에 대한 단크론항체만이 배설/분비항원에서도 반응함을 확인하였다(Fig 4).

Fig 3. Immunoblots of somatic antigen using monoclonal and polyclonal antibodies.

M : Molecular weight marker, 1-4 : Monoclonal antibodies, P1-P5 : Positive polyclonal antibodies, N1-N5 : Negative polyclonal antibodies.

하지만 배설/분비항원에 대한 immunoblotting 결과에서

Fig 4. Immunoblots of excretory/secretory antigen using monoclonal and polyclonal antibodies.

M : Molecular weight marker, 1-4 : Monoclonal antibodies, P 1~P5 : Positive polyclonal antibodies, N1~N5 : Negative polyclonal antibodies.

보는 것과 같이 14kDa 항원에 대해 단클론항체와 양성 혈청에서는 반응하였지만 음성혈청에서는 반응하지 않음을 확인하였다.

고 찰

개 심장사상충(*canine heartworm, Dirofilaria immitis*)의 진단은 지금까지 임상증상, 방사선 검사 그리고 말초혈액에서 직접 미세사상충(*microfilaria*)을 확인하는 modified Knott's method나 filter test 등에 의존되어왔다. 그러나 현재 미국 심장사상충학회에서 보고된 것에 따르면 개에서 효과적인 혈청학적 진단법으로 항원탐지 효소면역흡착법(AG-ELISA)이 제시되고 있다.

본 실험은 개 심장사상충에 대한 항원성을 조사하고 그에 따른 단클론항체를 생산하여 진단법 이용 가능성에 대한 확인을 최종 목적으로 하였다. Silver stain 결과, 각 항원은 10~200kDa의 범위에서 전체적으로 고르게 분포함을 확인하였으며 체항원과 배설/분비항원의 주요 공통분획은 14, 18, 28, 43kDa에서 반응함을 확인하였다. Immunoblotting의 결과에서는 체항원이 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 43, 50, 55kDa 등에서 반응하며 배설/분비항원에서는 단지 14kDa에서만 반응함을 확인하였다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 체항원과 배설/분비항원이 공통으로 반응하는 분획은 단지 14 kDa 뿐이었고 체항원의 다른 항원들은 다세포로 이루어진 심장사상충체에 대한

항체반응을 유도함을 확인할 수 있었다. Tamashiro *et al*²⁰이 보고한 연구에서는 Coomassie blue stain을 실시하여 성충의 주요 분획은 96, 70, 57, 38, 34, 14.5kDa이며 미세사상충의 주요 분획은 68, 52, 45, 32kDa 그리고 배설/분비항원의 주요 분획은 14.5kDa에서 나타남을 보고하고 있는데 본 실험에서는 교차반응이 적을 것으로 추정된 45kDa 이하의 항원을 확인하기 위해 12.5% SDS-PAGE gel을 사용하였기 때문에 60kDa 이상의 분획을 정확히 확인하기 어려웠으며 silver stain(2~10ng band)과 Coomassie blue stain(0.1~1µg/band)의 민감도 차이도 항원분획의 확인에서 고려되어야 할 것으로 사료된다. 다른 사상충과의 교차반응을 보이는 항원으로는 심장사상충의 43kDa 분획이 사람의 림프성 사상충증(*lymphatic filariases*)의 원인체인 *Wuchereria bancrofti* 와 *Brugia malayi* 에서 반응함이 보고되었으며⁶ 사람에서 심장사상충은 22~28kDa의 배설/분비항원이 특이적이며 18kDa의 배설/분비항원이 교차반응을 보임이 보고되었다^{1,6}. 또한 Prieto *et al*¹³이 고양이에서 심장사상충 감염에 대한 immunoblotting 결과 체항원에 대해서는 19~30kDa 사이에서 적어도 4개의 분획과 약 40kDa에서 하나의 분획이 확인되었고 배설/분비항원에서는 22kDa, 25kDa에서 각각 하나의 분획씩 확인되었으며 배설/분비항원이 진단에 이용하기에 적당하다고 보고하고 있다.

효소면역흡착법(ELISA)을 실시한 결과, 개 심장사상충 각 항원(SA, SA₄₅, E/S)은 음성혈청에 대한 양성혈청의 OD값에서 유의성(p<0.05) 있게 반응함을 확인하였으며 개 편충(*Trichuris vulpis*) 체항원에 대해서는 유의성이 없음을 확인하였다. 그러나 Tamashiro *et al*²⁰의 연구에서 일반적으로 교차반응을 보이는 항원은 분자량이 아주 크다는 보고와 Fuller *et al*⁷의 연구에서 30kDa 이하의 항원이 개 심장사상충에 더욱 특이적이라는 보고에서와 같이 전체 체항원이 다른 항원(SA₄₅, E/S)보다 유의성이 있음은 교차반응 때문인 것으로 사료되며 전체 체항원보다는 45kDa 이하의 체항원이나 특이적인 배설/분비항원이 진단에 사용될 수 있다는 것을 확인하였다. 본 실험에서 실시한 항체 탐지 효소면역흡착법(AB-ELISA)의 경우 교차반응과 항체 지속성이 문제시되고 있는데 위 결과에서와 같이 분자량이 적은 45kDa 이하의 항원을 사용한다면 교차반응의 문제를 해결할 수 있으며 Scholten *et al*¹⁸의 미세사상충이 말초혈액이 출현한 후에 감소하기 시작하며 미세사상충이 만연될 기보다 은폐감염

의 개에서 의미적으로 높게 나타난다는 보고와 같은 항체 변화에 관한 연구가 항체의 지속성 문제를 해결할 수 있을 것이다.

따라서 본 실험에서는 교차반응이 높은 전체 체항원 보다는 45kDa 이하의 체항원이나 배설/분비항원에 대한 단크론항체를 생산함으로써 개 심장사상충 진단에 있어 특이성을 높일 수 있을 것으로 사료되어 번역시 45kDa 이하의 체항원만을 번역에 사용하였다. 단크론항체 생산을 위해 세포융합후 ELISA와 immunoblotting의 결과, 심장사상충에 대해 특이적으로 반응하는 단크론항체는 모두 4개를 생산하였다. 이들은 체항원에 대해서는 14, 16, 17, 32kDa에서 반응함을 확인하였으며 이중 14kDa에 대한 단크론항체만이 배설/분비항원에서 동일하게 반응함을 확인하였다. 배설/분비항원에 대한 immunoblotting 결과에서 보는 것과 같이 14kDa 항원에 대한 단크론항체와 양성혈청 1개를 제외한 양성혈청에서 반응함을 확인하였다. 14kDa 항원에 대해서는 Fuller *et al.*⁷⁾이 감염초기에 숙주 면역반응에 의해 인지되고 감염후 8개월 후에는 탐지할 수 없으며 이 항원에 대한 단크론항체는 미세사상충, 자충 그리고 성충 모두에서 탐지할 수 있다고 보고하고 있다. 본 실험에서 반응하지 않은 1개의 양성혈청은 감염후 8개월이 지난 개의 혈청으로 추정되며 14kDa 항원에 대한 단크론항체는 단지 감염초기 진단에서 사용할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하여 보면 본 실험에서는 전체 체항원보다는 45kDa 이하의 체항원이나 배설/분비항원이 개 심장사상충 감염진단에 있어 다른 사상충류와의 교차반응을 줄일 수 있으며 체항원과 배설/분비항원에 대해 공통으로 반응하는 14kDa 항원에 대한 단크론항체를 이용한 진단법의 개발은 심장사상충 감염초기의 진단에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

개 심장사상충의 항원성을 확인하기 위하여 체항원과 배설/분비항원을 전기영동후 silver stain, Western blot, ELISA를 실시하여 비교 분석하였으며 이러한 결과로 45kDa 이하의 체항원만을 BALB/c mouse에 면역하여 4개의 특이 단크론항체를 생산하는 hybridomas를 생산하고 그 특성을 조사하였으며 그 결과는 다음과 같았다.

1. 심장사상충의 체항원과 배설/분비항원은 silver stain

결과 10~200kDa에 걸쳐 넓게 분포함을 확인하였으며 체항원과 배설/분비항원의 주요 공통항원은 14, 18, 28, 43 kDa이었다.

Western blot 결과 체항원에 대해서는 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 43, 50, 55kDa 등에서 반응하였고 배설/분비항원에 대해서는 단지 14kDa에서만 반응함을 확인하였다.

2. 효소면역흡착법(ELISA)을 실시한 결과 개 심장사상충 각 항원(SA, SA₄₅, E/S)은 음성혈청에 대한 양성혈청의 흡광도(OD값)에서 유의성($p < 0.05$) 있게 반응함을 확인하였으며 개 편충(*Trichuris vulpis*) 체항원에 대해서는 유의성이 없음을 확인하였다.

3. 본 실험에서 단크론항체 생산은 심장사상충 항원에 대해 특이적으로 반응하는 4개의 hybridomas를 생산하였으며 이들은 체항원에 대해서 14, 16, 17, 32kDa에서 반응하였으며 배설/분비항원에 대해서는 단지 14kDa에서만 반응함을 확인하였다.

이러한 결과를 종합하면 본 실험에서는 전체 체항원 보다는 45kDa 이하의 체항원이나 배설/분비항원을 이용하면 심장사상충 감염진단에 있어 다른 사상충류와의 교차반응을 줄일 수 있으며 본 실험에서 제작한 단크론항체는 체항원과 배설/분비항원에서 공통으로 반응하는 14kDa 항원에 대한 단크론항체만이 심장사상충 감염초기 진단에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Akao N, Kondo K, Fujita K. Immunoblot analysis of *Dirofilaria immitis* recognized by infected humans. *An Trop Med Parasitol*, 85:455-460, 1991.
2. Aranda C, Panyella O, Eritja R, *et al.* Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona(Spain). *Vet Parasitol*. 77:267-275, 1998.
3. Blackshear PJ. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Meth Enzymol*, 104 237-255. 1984.
4. Desowitz RS, Una SR. The detection of antibodies in human and animal filariases by counterimmunoelectrophoresis with *Dirofilaria immitis* antigens. *J Helminth*, 50:53-57, 1976.
5. Ellsworth JH, Johnson AH. Precipitin test and soluble antigen fluorescent antibody technique for detecting *Dirofilaria immitis* in dogs. *Am J Vet Res*, 34:689-

- 692, 1973.
6. Freedman DO, Nutman TB, Ottesen EA. Protective immunity in Bancroftian filariasis: selective recognition of a 43-kD larval stage antigen by infection-free individuals in an endemic area. *J Clin Invest*, 83:14-22, 1989.
 7. Fuller SA, Wong MM, Hurrell JGR. Immunochemical studies on the antigens of *Dirofilaria immitis*. *Vet Immunol Immunopath*, 17:345-356, 1987.
 8. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: principles and application. *Anal Biochem*, 131:1-15, 1983.
 9. Grieve RB, Glickman LT, Batek AK, et al. Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: Examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. *Am J Vet Res*, 47:329-332, 1986.
 10. Grieve RB, Mika-Johnson M, Jacobson RH, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Am J Vet Res*, 42:66-69, 1981.
 11. Merrill CR, Goldman D, Vankeuren ML. Gel protein stains: silver stain. *Meth Enzymol*, 104:441-446, 1984.
 12. Pratt SE, Corwin RM, Robert M, et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infections in Missouri Dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 179:592-593, 1981.
 13. Prieto C, Venco L, Simon F, et al. Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infection. *Vet Parasitol*, 70:209-217, 1997.
 14. Rawlings CA. Heartworm disease in dogs and cats. *WB Saunders Co*, 209-237, 1986.
 15. Rhee JK, Yang SS, Kim HC. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. *Kor Jour Parasitol*, 36:235-239, 1998.
 16. Santamaria B, Cordero M, Muro A, et al. Evaluation of *Dirofilaria immitis* excretory/secretory products for seroepidemiological studies on human dirofilariasis. *Parasite*, 2:269-273, 1995.
 17. Sawada T, Takei T, Katamine D. Immunologic studies on filariasis. III. Isolation and purification of antigen for intradermal skin test. *Jpn J Exp Med*, 35:125-132, 1965.
 18. Scholtens RG, Patton S. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for occult dirofilariasis in a population of naturally exposed dogs. *Am J Vet Res*, 44:861-864, 1983.
 19. Tamashiro WK, Ibrahim MS, Moraga DA, et al. *Dirofilaria immitis*: studies on anti-microfilarial immunity in Lewis rats. *Am J Trop Med Hyg*, 40:368-376, 1989.
 20. Tamashiro WK, Powers KG, Levy DA, et al. Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of infection with *Dirofilaria immitis*. *Am J Trop Med Hyg*, 34:292-301, 1985.
 21. Thilsted JP, Whorton J, Hibbs CM, et al. Comparison of four serotests for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Am J Vet Res*, 48:837-841, 1987.
 22. Wang LC. Comparison of a whole-blood agglutination test and an ELISA for the detection of the antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Am J Trop Med Parasitol*, 90:73-77, 1998.
 23. Weil GJ, Malane MS, Powers KG, et al. Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of *Dirofilaria immitis*-infected dogs. *J Immunol*, 134:1185-1191, 1985.
 24. Wong MM, Suter PF. Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariasis. *Am J Vet Res*, 40:414-420, 1979.
 25. Yamanouchi S. Immunologic studies on filariasis. I. The relationship between intradermal reaction and hemagglutination. *Kurume Med J*, 19:105-112, 1972.
 26. Yamanouchi S. Immunologic studies on filariasis. III. Antigenic substance in the urine of dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Kurume Med J*, 19:117-121, 1972.
 27. 이정치, 이채용, 신성식 등. 국내 독일셰퍼드(German shepherd)종의 개 심장사상충 감염실태. *기생충학잡지*, 34:225-231, 1996.