

## 돼지편충의 45kDa 항원단백질에 대한 단클론항체 생산

이종경 · 김종태<sup>1</sup> · 서훈수<sup>2</sup> · 박종열<sup>3</sup> · 윤희정<sup>4\*</sup>

제스

<sup>1</sup>늘푸른동물병원

<sup>2</sup>한국화이자동물약품(주)

<sup>3</sup>바이엘코리아(주)

<sup>4</sup>서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2004년 9월 15일)

## Production of monoclonal antibody to 45 kDa somatic protein of *Trichuris suis*

Jong-Kyung Lee, Jong Tae Kim<sup>1</sup>, Hunsu Seo<sup>2</sup>, Jong-Yeol Park<sup>3</sup> and Hee-Jeong Youn<sup>4\*</sup>

J.E.S., Seoul 153-811, Korea

<sup>1</sup>Evergreen Animal Hospital, Seoul 151-887, Korea

<sup>2</sup>Pfizer Animal Health Korea Ltd., Seoul 143-210, Korea

<sup>3</sup>Bayer Korea Ltd, Korea

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: September 15, 2004)

**Abstract :** *Trichuris suis* does not excrete eggs during larval stage as well as in particular adult stage. It is impossible to diagnose by use of fecal examination method in those periods. Therefore, serological diagnostic method can be very useful for those stages. In order to produce monoclonal antibody, specific somatic and secretory-excretory (SE) antigens of *T. suis* were identified and analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Monoclonal antibody-producing hybridoma cells were cloned, which were made of popliteal lymph node of BALB/c mice immunized with a 45 kDa somatic antigen of *T. suis*. Five clones (1B9, 2C4, 2C5, 2D7 and 2D8) showing strong responses to *T. suis* antigens were selected and the isotype identified. All monoclonal antibodies were IgG1 isotype and the light chains were  $\kappa$  chain. Established monoclonal antibodies reacted specifically to somatic and SE antigens of *T. suis* and did not cross-reacted to antigens of *Ascaris suum*, *Trichuris vulpis*, or *Trichinella spiralis*. The sensitivity of somatic and SE antigens against these monoclonal antibodies were significant ( $p < 0.01$ ) associated with those of positive and negative sera.

**Key words :** *Trichuris suis*, somatic, secretory-excretory antigens, monoclonal antibody, western blot, antigen-capture sandwich ELISA

### 서 론

돼지편충(*Trichuris suis*)은 세계적으로 널리 분포하며 주로 돼지의 맹장과 결장에 기생하는 연충으로서 [9], 분류학적으로 동물계(Kingdom: Animalia), 선형동물문(Phylum: Nematelminths), 선충강(Class: Nematoda), 쌍

기충아강(Subclass: Adenophorea [Aphasmidia]), 에노프리드목(Order: Enoplida), 편충과(Family: Trichuridae), 편충속(Genus: *Trichuris*)에 속한다 [3].

돼지편충의 감염율은 유럽, 미국 등지에서 돼지 선충류 중에서 50-70% 정도로 높고 사료효율에서도 약 33%의 경제적 손실을 초래하는 원인이 된다 [19, 21]. 돼지

\*Corresponding author: Hee-Jeong Youn  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
[Tel: +82-2-880-1267, Fax: +82-2-888-0659, E-mail: younhj@snu.ac.kr]

편충은 육성·비육돈의 50-70% 중에서 발견되고 있으며, 전형적으로 21일 설사를 일으킴으로써 비감염돈에 비해 출하일령이 약 5일간 지연되고 그로 인하여 두 당 생산 원가가 3달러 증가하며 특히 최근에는 양돈장이 기업화되는 추세에서 나타나는 그 경제적 피해가 전 세계적으로 연간 20억 달러에 이르고 있다 [21].

우리나라의 경우, 전국의 기업 양돈장에서의 편충 감염율은 4.1%로 보고되었다 [1]. 그러나 이 감염율은 총란 검사법으로 시행한 결과들이기 때문에 총란을 배출하지 않는 미성숙 단계의 감염을 감안한다면 실제 감염율은 이보다 훨씬 높을 것으로 사료된다. 그 추정을 가능케 하는 일례로서 수원 근교의 톱밥 발효 돈사에서 돼지편충 감염율을 8 일 동안 조사한 보고서에 의하면 6.7% 였으나 자돈사에서 검출되지 않았던 돼지편충 총란이 자돈사 바로 다음으로 이동하는 육성돈사에서는 20% 나 검출되었고 급성 돼지편충증으로 다수의 폐사가 발생하였다고 보고하였고, 돼지편충이 병원성이 강한 기생충으로서 새롭게 알려지고 있다고 보고하였다 [4]. 또한 환경 공해 문제로 인하여 톱밥 발효 돈사가 등장하면서 급성 돼지편충 감염이 크게 문제되어 왔기 때문에 발효 톱밥 돈사를 우리나라보다 일찍 시작한 일본의 경우 돼지편충증으로 인한 폐사돈이 많이 발생하였다고 보고하였다 [31].

편충증의 진단법으로는, 편리하고 경제적인 이유 때문에 현재까지 널리 사용되고 있는 총란 검사 방법이 있으나, 이 방법은 총란이 배출되지 않는 시기의 진단이 불가능하며 경미한 감염에 의해 나타나는 편충 감염증을 진단하거나 감별 진단을 하는 데는 많은 어려움이 있다. 이런 경우에는 혈청학적, 면역학적 방법을 이용한 진단법이 매우 유용하다 [21]. 현재 돼지편충 뿐만 아니라 포상조충(*Taenia hydatigena*), *Neospora caninum*, 선모충(*Thichinella spiralis*) 등의 기생충 감염증에 대하여 면역학적 진단 방법을 이용한 연구가 다양하게 보고되고 있으며, 이러한 연구에 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)의 방법이 이용되고 있다 [5, 11, 12, 23].

본 연구에서는 미성숙 단계를 포함한 모든 단계의 편충 감염증에 대하여 기존의 분변 검사법이나 혈청학적 진단법보다 더 정확하고 유용한 새로운 진단법을 개발하고자 이러한 최신의 연구 기법들을 이용하였다. 즉, 돼지편충의 체항원으로 면역된 마우스의 슬와림프절의 세포들을 마우스 골수종세포와 융합시켜서 돼지편충 단백 분해체를 생산하였고 ELISA와 Western blotting으로 그 특성을 조사하였으며, 다른 유사 선충류와의 교차반응(cross-reaction) 여부를 Western blotting으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

서울대학교 실험동물사육장에서 분양받은 4주령의 BALB/c mouse 6마리와 농림부 국립수의과학검역원에서 분양 받은 4~6주령의 ICR mouse 12 마리를 사용하였다.

### 체항원 및 분비·배설항원 준비

#### (1) 돼지편충과 돼지회충의 항원

경기도 이천 도축장에서 도축된 돼지의 대장을 절개하여 돼지편충(*T. suis*)과 돼지회충(*Ascaris suum*)의 성충을 회수하여 Greenspon 등 [18]의 방법에 따라 항원을 제조하였다. 여기에서 얻은 돼지편충 성충 약 400마리와 돼지회충 성충 5마리는 체항원(somatic antigens)을 만드는데 이용하였고 돼지편충 성충 약 600마리와 돼지회충 성충 25마리는 분비·배설항원(SE antigens)을 얻는데 사용하였다. Hill 등(1994)의 방법에 의하여 제조하였다 [20]. 이렇게 만든 항원은 항원 분석에 사용하였다. 그리고 마우스 면역을 위한 돼지편충의 항원 제조는 Pupo 등(1999)의 방법에 의하여 생산하여 마우스에 접종시키는데 사용하였다 [26]. 각 기생충의 분비·배설항원은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific)에서 penicillin (10,000 units/ml), streptomycin(25 µg/ml)과 amphotericin B 및 Fungizone 0.85%(Gibco)가 첨가된 RPMI1640으로 배양하면서 24시간 간격으로 배지를 회수하였다. 14 kDa 이하 분자량을 갖는 물질을 투과시키는 반투막을 이용하여 회수한 배지를 4°C, 3차 증류수에서 12시간마다 증류수를 바꾸어 주며 48시간 동안 투석시켰다.

이러한 방법으로 14 kDa 크기 이하의 분자량을 갖는 물질을 제거하고 동결건조기(lyophilizer, 삼원냉열 엔지니어링)를 이용하여 농축한 후 항원으로 사용하였다.

#### (2) 개편충과 선모충의 항원

개편충의 항원은 경기도 광명시에 있는 농장에서 도축견의 대장을 절개하여 개편충의 성충을 회수한 후 상기의 방법에 따라 항원을 제조하였고, 선모충의 항원은 서울대학교 수의과대학 기생충학 교실에서 계대하고 있는 선모충으로부터 제조한 항원을 사용하였다.

#### (3) 돼지분변내의 항원단백질 분리

돼지편충을 인공적으로 감염시킨 14마리의 감염돈과 14마리의 무감염돈의 분변을 수거하였다. 돼지편충의 감염기 자충을 함유한 총란을 첫 번째에는 마리 당 500개, 그리고 1주일 간격으로 100개씩 경구로 감염시킨 후 분변검사를 통하여 EPG 208-3569(1163+963)개의 총란

이 관찰된 14개의 분변샘플만을 양성 대조군으로 사용하였다. 총란을 감염시키지 않은 대조군 9마리 중 총란 검사결과 총란이 확인되지 않은 분변샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 이 분변들을 100 ml의 ELISA용 도포 완충액(coating buffer; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g, 증류수 1 liter, pH 9.6)과 10:1로 섞어 덩어리를 풀어 현탁액을 만들고 이를 5,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 수거하여 coproantigen으로 사용하였다. Lowry protein assay [17]를 이용하여 단백질 농도를 측정하였고 항원 농도가 1 µg/ml이 되도록 ELISA용 도포 완충액으로 희석하였다. ELISA microplate(Nunc)의 각 well에 100 µl 씩 분주한 후 ELISA를 실시하였다.

#### 항원 정량

Lowry protein assay [17]를 이용하여 돼지편충 체항원의 단백질 농도를 측정하였으며 SDS-PAGE하여 잘라낸 gel상의 밴드 내에 들어 있는 단백질의 농도는 다음과 같이 측정하였다. 즉, bovine serum albumin(BSA)을 1 mg/ml의 농도로 희석한 것과 위에서 만든 돼지편충의 체항원을 SDS-PAGE하여 BSA를 standard로 하여 image analysis를 이용하여 band상의 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 농도가 1.00 mg/ml가 되도록 멸균된 3차 증류수로 희석하여 이중 0.2 ml(단백질 농도 200 µg)를 취하여 마우스 면역과 간접면역형광항체법을 시행하기 위한 항원으로 사용하였다.

#### 항원 분석

##### (1) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

12% acrylamide gel(증류수 3.33 ml, 4× stock 2.5 ml, acrylamide 4.17 ml, 10% APS 50 µl, TEMED 5 µl)을 만든 후 dual gel caster에 loading한 뒤 4°C의 냉장고에서 overnight 시켰다. Separating gel이 굳은 후, Pupo 등 [26]의 방법에 의하여 위에서 얻은 각 항원 10 µl를 전기영동하여 특이적인 밴드를 확인하였다. 이 때 분자량 marker로 prestained marker(Sigma)를 사용하였다.

##### (2) Western blotting

각 항원 10 µl를 2× sample buffer와 섞어 8분간 중탕 처리한 뒤 Pupo 등 [26]의 방법에 의하여 단클론항체를 TBS로 3회 세척한 후 BCIP/NPT를 phosphatase substrate (KPL)로 발색시켜 밴드를 확인하였다.

#### 단클론항체 생산

##### (1) 마우스 면역

정제된 돼지편충의 체항원과 complete Freund's

adjuvant(Gibco)를 동량으로 섞어 0.1 ml 씩 2마리의 5주령 BALB/c 마우스의 양쪽 후지의 발바닥에 1 ml 주사기를 이용하여 1차 접종하였고, 2주 후에 incomplete Freund's adjuvant(Gibco)를 섞은 체항원을 2차 접종하여 면역시켰다. 다시 2주 후에 체항원 0.1 ml를 꼬리정맥에 주사하였다. 또한 정제된 돼지편충 체항원을 SDS-PAGE하여 45 kDa 크기에 해당하는 10개의 band(protein)의 양이 150 µg)를 수거하여 돼지편충과 돼지회충의 항원에서의와 같은 방법으로 잘게 부수어 2마리의 5주령 BALB/c 마우스의 양쪽 후지의 발바닥에 1 ml 주사기를 이용하여 0.1 ml 씩 1차 접종하였고, 2주 후에 동일한 방법으로 만든 항원을 2차 접종하여 면역시켰다. 다시 2주 후에 동일한 방법으로 만든 항원을 3차 접종하였다. 마지막 접종 3일 후에 보정기로 마우스를 보정한 후 적외선램프로 가열하여 꼬리정맥이 도출되도록 한 뒤 26-gauge 주사바늘과 1 ml 주사기를 이용하여 마우스 꼬리정맥에서 혈액을 채취하였다. 그 혈액들에 대해 간접면역형광항체 반응법을 실시하였으며 그 결과가 양성인 마우스의 슬와림프절(popliteal lymph node)을 채취하여 융합에 사용하였다.

간접면역형광항체 반응법을 위해서는 100% methanol로 세척한 MTS(multi-spot microscope slide)에 위에서 준비한 체항원을 10 µl/well의 양으로 smear한 후 공기 중에서 건조하여 acetone으로 10분간 고정한 후 -30°C에서 보관하여 사용하였다. 또 항원을 도말하여 고정시킨 후 보관 중이던 MTS slide를 PBS(pH 7.4)로 10분간 3회 세척하였다. 융합 10-15일 후 융합세포가 충분히 자란 well의 배양액을 채취하여 37°C, humidified atmosphere incubator에서 45분간 반응시키고 PBS로 10분간 3회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Jakson immunoresearch)를 사용하였으며 PBS를 이용해 1:160으로 희석하여 37°C, humidified atmosphere incubator에서 45분간 반응시킨 후 PBS로 10분간 3회 세척하였다. 이렇게 준비된 slide는 mounting medium(0.5 M carbonate buffer: glycerol(1:9))으로 mounting하였고 형광현미경으로 형광 유무를 관찰하였다.

##### (2) 골수종세포(myeloma cell) 및 feeder cell 배양:

###### Myeloma cell

단클론항체 생산 융합세포 작성에 사용한 골수종 세포는 P3-X63Ag14로 세포 융합 2주전에 액체 질소 탱크에서 꺼내어 Salah 등 [29]와 채 [7]의 방법에 따라 배양하였으며, 융합 이틀 전부터 8-azaguanin으로 처리하여 돌연변이 세포를 제거하였다. 세포수가 4×10<sup>6</sup>개가 되도록 희석하여 이를 세포 융합에 사용하였다.

### (3) Feeder cell

융합세포 작성과 클로닝(cloning)때 사용한 feeder cell 은 4-8주령의 ICR 마우스의 복강 탐식세포로써, 마우스를 희생하여 70% ethanol로 마우스의 체표를 소독한 후 무균적으로 복부의 피부를 제거해 복막이 드러나도록 한 뒤 18 gauge 주사바늘을 이용하여 HAT supplement(0.1 mM hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine; Sigma)와 10% 혈청이 첨가된 차가운 DMEM(HAT DMEM) 10 ml를 복강 내로 주입하였다. 복부를 부드럽게 세척하고 주입한 복강액을 다시 회수하여 멸균된 증류수로 30초간 혈구를 용해시킨 후 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하여 융합 및 클로닝 하루 전에 96-well microplate에 100  $\mu$ /well씩 분주하여 배양하였다.

### (4) 세포 융합

마지막 접종 4일 후 마우스를 희생시켜 후지의 피부를 제거하고 후지 안쪽 근육내의 슬와림프절을 무균적으로 채취하였고 혈청이 첨가되지 않은 차가운 DMEM에 옮겨 놓고 26-gauge 주사바늘을 이용하여 림프절을 세절한 후 림프구를 부유시켰다. 부유액은 50 ml centrifuge tube로 옮겨 1-2분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였고 이를 혈청이 첨가되지 않은 차가운 DMEM으로 1,200 rpm에서 5분간 3번 원심한 뒤 세척하였다. 침전된 림프구를 부유시켜 cell의 개수를 확인한 후 위와 동일한 방법으로 준비한 골수중세포와 5:1( $2 \times 10^7$ 개(림프구): $4 \times 10^6$ 개(골수중세포)) 정도의 비율로 혼합하여 세포융합을 실시하였다 [7, 26].

### (5) 융합세포의 클로닝 및 복수 생산

융합세포의 특이항체 생산 여부를 예비적으로 검사하기 위하여 위와 같이 간접면역형광항체 반응법을 실시하였으며, Western blotting을 실시하였다. 간접면역형광항체 반응법과 Western blotting 검사 결과, 양성인 세포주는 Salah 등 [26]과 채 [7]의 방법에 따라 Western blotting으로 항체 생산을 확인하였고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 사용하였다.

### (6) 단클론항체의 부분 정제 및 isotyping

마우스의 복강을 통하여 얻어 복수를 Salah 등 [26]과 채 [7]의 방법에 따라 발색하여 관찰하였다.

### (7) 교차 반응 검사

다른 유사 항원과의 교차 반응 시험은 위와 같이 Western blot을 이용하여 실시하였다. 사용한 항원은 개 편충, 돼지회충 및 선모충의 체항원과 분비·배설항원이었다.

### 단클론항체 특성 검정

#### (1) 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

위의 방법으로 준비한 돼지편충의 체항원과 분비·배설항원을 Björkman 등 [10]과 채 [7]의 방법에 따라 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1차 항체로는 45 kDa에 해당하는 단클론항체, 돼지편충을 인공감염시켜 얻은 14마리의 돼지혈청과 돼지편충이 감염되지 않은 14마리의 돼지혈청을 사용하였으며, 각각을 PBS-Tween 20으로 200배 희석하여 사용하였다. 측정된 각 항원의 OD 값은 x-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

#### (2) Indirect competitive ELISA

돼지편충에 대한 단클론항체를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석한 후, 돼지편충의 체항원을 흡착시킨 96-well polystyrene ELISA microplate에 위에서 준비한 돼지편충의 체항원을 1, 10, 100, 1000 및 10000 ng/ml로 희석한 희석액과 함께 넣어 주었다. Alkaline phosphate-conjugated goat anti-mouse IgG를 PBS-Tween 20으로 5,000배 희석하여 각 well에 100  $\mu\text{l}$  씩 첨가한 후,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시켰다. 기질( $p$ -nitrophenyl phosphate(PNPP), diethanolamine 1 ml,  $\text{MgCl}_2$  0.006 g, 증류수 9 ml) 액을 넣어 주고 발색시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 단클론항체의 특성

#### (1) SDS-PAGE에 의한 돼지편충의 단백질 분석

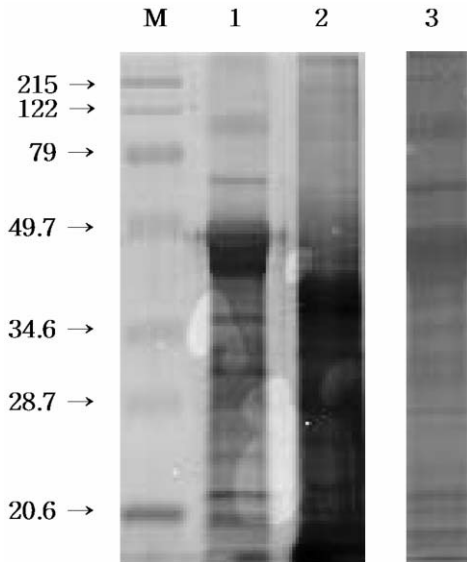
각 항원을 전기영동한 후 silver stain과 Coomassie blue로 염색하여 단백질 분획을 확인하였다. 돼지편충의 체 단백질 및 분비·배설단백질은 20~280 kDa 사이에서 분획을 확인되었으며, 주요 단백질의 크기는 체단백질의 경우 215, 103, 69, 45, 38, 32, 25, 22 및 20 kDa이었고, 분비·배설단백질의 경우 38, 33 및 20 kDa 이었다(Fig. 1).

#### (2) 단클론항체의 생산 및 isotyping

SDS-PAGE에서 45 kDa 밴드에 포함되어 있는 단백질량은 15  $\mu\text{g}$  이었다. 돼지편충의 단클론항체를 생산하기 위하여 체항원을 면역시킨 마우스의 슬와림프절세포를 융합시킨 결과 192 wells 중 총 58 wells의 안정한 hybridoma를 얻을 수 있었다. 간접면역형광항체 반응법으로 단클론항체 생산 유무를 검사한 결과 이들 중 23 wells에 있는 집중세포가 돼지편충 체항원에 특이적으로

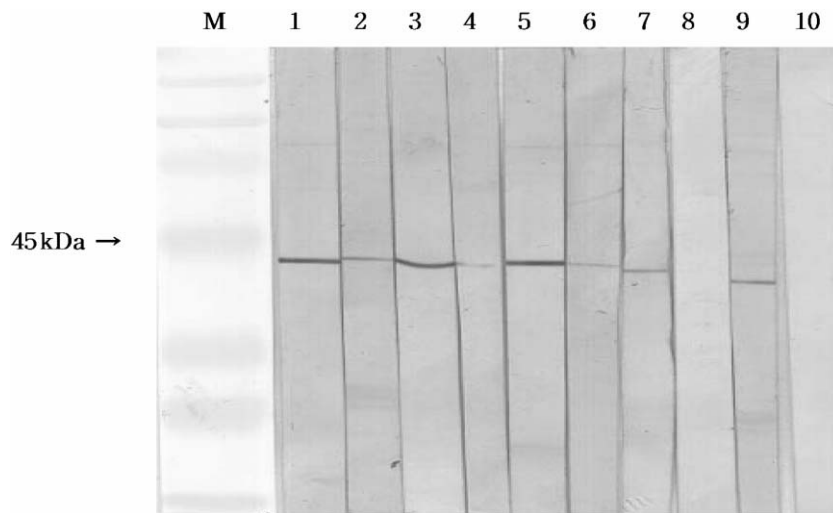
반응하는 단클론항체를 생산하였다. SDS-PAGE하여 45 kDa 크기에 해당하는 band를 이용하여 면역시킨 마우스

의 슬와림프절세포를 융합시킨 결과 192 wells 중 총 148 wells의 안정한 잡종세포를 얻었다. 간접면역형광항체 반응법과 Western blotting으로 단클론항체 생산 유무를 검사한 결과 이들 중 114 wells에서 돼지편충에 대해 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다. 양성 wells 중 간접면역형광항체 반응법과 Western blotting 결과 반응성이 좋은 clone 5 개(1B9, 2C4, 2C5, 2D7, 2D8)를 선택하여 2차 클로닝하였다. 이 5개 중 Western blotting 결과 밴드가 강하게 나타나는 2C4 clone 유래 단클론항체를 항체의 특이성 검사 및 antigen-capture ELISA를 위한 biotinylated antibody로 사용하였고 그 다음으로 밴드가 강하게 나타난 1B9 clone과 2D8 clone 유래 단클론항체를 antigen-capture ELISA를 위한 coating antibody로 사용하였다(Fig. 2). 돼지편충 45 kDa에 해당하는 항원을 면역시킨 마우스의 슬와림프절세포와 마우스 골수종 세포를 융합시켜 얻은 단클론항체 중 반응성이 좋은 5개(1B9, 2C4, 2C5, 2D7, 2D8)를 isotyping 한 결과 모두 IgG1 subgroup 이었으며 light chain은 모두  $\kappa$ -chain 이었다.

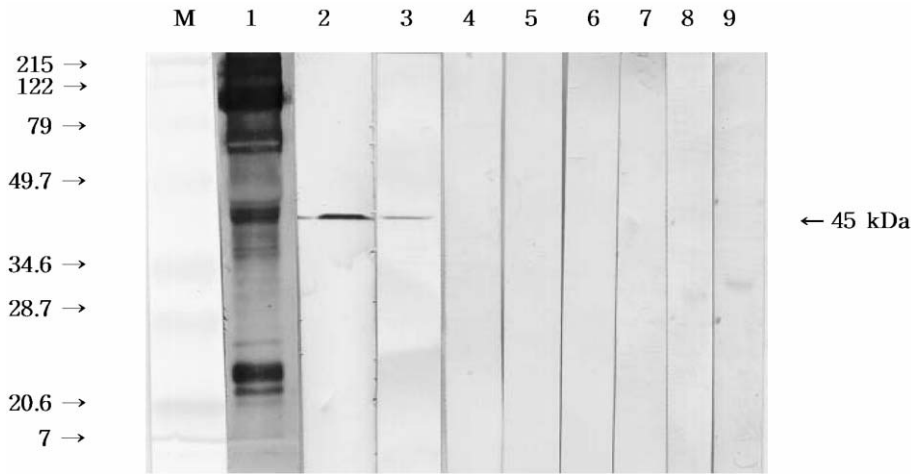


**Fig. 1.** Electrophoretic analysis of somatic and secretory-excretory proteins of *T. suis*. Lane M: molecular weight marker, Lane 1: somatic proteins, Lane 2: secretory-excretory proteins. Lane 1 and 2 were stained by silver staining. Lane 3: somatic proteins stained with Coomassie blue. Arrow indicated the band on the molecular weight markers.

(3) 단클론항체와 다른 유사 항원과 교차 반응 검사  
2C4 clone 유래 단클론항체를 이용한 돼지편충(*T. suis*), 돼지회충(*A. suum*), 개편충(*T. vulpis*) 및 선모충(*T. spiralis*)의 체항원, 분비·배설항원에 대한 Western blotting 결과 돼지편충의 체항원과 분비·배설항원에 대하여 45 kDa 크기에 해당하는 특이적인 밴드를 확인할 수 있었



**Fig. 2.** Immunoblotting of the somatic proteins and SE proteins of *T. suis* reacting to monoclonal antibodies against the 45 kDa antigen. Lane M, molecular weight marker. Lane 1, 3, 5, 7, 9 are somatic proteins of *T. suis* reacted with monoclonal antibodies 2C4, 1B9, 2D8, 2C5, 2D7, respectively. Lane 2, 4, 6, 8, 10 are SE proteins of *T. suis* reacted with 2C4, 1B9, 2D8, 2C5, 2D7, respectively. Arrow indicates the molecular weight marker.



**Fig. 3.** Immunoblotting of the somatic and SE antigens of *T. suis* and other parasite antigens for reacted with 2C4 monoclonal antibody. Lane M, molecular weight marker. Lane 1, *T. suis* somatic antigens reacted with antiserum raised in mouse. Lane 2, *T. suis* somatic antigen reacted with 2C4. Lane 3, *T. suis* SE antigen reacted with 2C4. Lane 4, *Ascaris suum* somatic antigen reacted with 2C4. Lane 5, *A. suum* SE antigen reacted with 2C4. Lane 6, *Trichuris vulpis* somatic antigen reacted with 2C4. Lane 7, *T. vulpis* SE antigen reacted with 2C4. Lane 8, *Trichinella spiralis* somatic antigen reacted with 2C4. Lane 9, *T. spiralis* SE antigen reacted with 2C4. Arrows on the left side indicate the molecular weight markers and the arrow on the right side indicates 45 kDa molecular weight marker.

으나 다른 기생충의 체항원과 분비·배설항원의 경우 밴드를 확인할 수 없었다(Fig. 3).

(4) 단클론항체의 특이성

본 실험에서 생산한 돼지편충 항원 45 kDa에 반응하는 monoclonal antibody와 돼지편충의 체항원 및 분비·

배설항원에 대한 반응정도를 확인하기 위하여 2C4 monoclonal antibody와 돼지편충의 양성 및 음성혈청으로 효소면역측정법(ELISA)을 수행하였다. 각 항원이 2C4 monoclonal antibody와 반응하는 OD means±SD 값은 돼지편충 성충의 체항원 OD값이 0.378±0.017이었고, 돼지편충 성충의 분비·배설항원 OD값이 0.273±

**Table 1.** Comparison of observance values for *Trichuris suis* somatic and secretory-excretory antigens to 2C4 monoclonal antibody and to mouse negative sera by ELISA

No of Examination	<i>Trichuris suis</i> adult antigens			
	Somatic Ag		SE Ag	
	2C4 Mab positive serum	Mouse negative serum	2C4 Mab positive serum	Mouse negative serum
1	0.358*	0.081	0.256	0.102
2	0.351	0.098	0.277	0.088
3	0.367	0.096	0.278	0.085
4	0.372	0.108	0.265	0.083
5	0.391	0.080	0.280	0.128
6	0.379	0.071	0.273	0.104
7	0.380	0.065	0.277	0.083
8	0.399	0.127	0.269	0.076
9	0.383	0.111	0.275	0.112
10	0.401	0.112	0.280	0.079
ODmean±SD	0.378±0.017**	0.095±0.020	0.273±0.008	0.094±0.017

\*OD values at 405 nm

\*\*P<0.01

0.008 이었다(Table 1). 그리고 각 항원이 양성혈청과 반응하는 OD means±SD 값은 돼지편충 성충의 체항원 OD값이 0.293±0.086이었고, 돼지편충 성충의 분비·배설항원 OD값이 0.231±0.027이었다. 각 항원이 음성혈청과 반응하는 OD means±SD 값은 돼지편충 성충의 체항원 OD값이 0.095±0.020이었고, 돼지편충 성충의

분비·배설항원 OD값은 0.094±0.017이었다(Table 2). 양성 OD값은 cut-off value(negative OD means+3SD)의 OD 값 이상의 값으로 판정하였다. 돼지편충의 체항원과 분비·배설항원이 2C4 monoclonal antibody와 반응하는 OD 값은 음성혈청의 OD값과 비교하여 볼 때 고도로 유의성이(P<0.01) 있음을 확인하였으며, 또한 양성혈청의 OD

**Table 2.** Comparison of OD values for somatic and secretory-excretory antigens to positive and negative sera by ELISA

No of Examination	<i>Trichuris suis</i> adult antigens			
	Somatic Ag		SE Ag	
	Positive serum	Negative serum	Positive serum	Negative serum
1	0.323*	0.081	0.233	0.102
2	0.342	0.098	0.256	0.098
3	0.289	0.096	0.212	0.065
4	0.209	0.108	0.222	0.073
5	0.221	0.080	0.259	0.128
6	0.223	0.081	0.215	0.104
7	0.412	0.067	0.198	0.083
8	0.422	0.127	0.199	0.076
9	0.224	0.111	0.186	0.100
10	0.341	0.112	0.265	0.079
11	0.175	0.097	0.236	0.099
12	0.189	0.054	0.239	0.097
13	0.334	0.119	0.276	0.118
14	0.398	0.093	0.238	0.088
ODmean±SD	0.293±0.086**	0.095±0.020	0.231±0.027	0.094±0.017

\*OD values at 405 nm

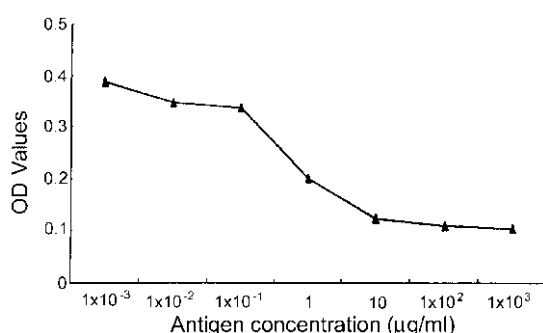
\*\*P<0.01

**Table 3.** Comparison of observance values of coproantigens *Trichuris suis* infected and noninfected pigs to 2C4 clone, positive serum and negative serum by ELISA

Fecal no.	Infected pigs			Noninfected pigs			
	Abs	Positive serum	Monoclonal antibody	Negative serum	Abs	Positive serum	Monoclonal antibody
1		0.389*	0.426	0.091	1	0.102	0.099
2		0.403	0.412	0.141	2	0.098	0.143
3		0.512	0.345	0.101	3	0.109	0.092
4		0.356	0.219	0.108	4	0.078	0.101
5		0.203	0.392	0.097	5	0.097	0.179
6		0.281	0.391	0.081	6	0.102	0.098
7		0.229	0.551	0.081	7	0.111	0.121
8		0.561	0.499	0.099	8	0.096	0.219
9		0.406	0.561	0.093	9	0.083	0.089
10		0.390	0.402	0.078	10	0.127	0.079
11		0.382	0.509	0.076	11	0.123	0.128
12		0.408	0.598	0.049	12	0.093	0.203
13		0.401	0.398	0.065	13	0.133	0.168
14		0.198	0.222	0.121	14	0.088	0.093
OD mean±SD		0.366±0.107**	0.423±0.115	0.092±0.023	OD mean±SD	0.103±0.016	0.129±0.046

\*OD values at 405 nm

\*\*P<0.01



**Fig. 4.** Standard curves determined by indirect competitive ELISA for somatic antigens of *T. suis* using 45 kDa monoclonal antibody. The titer microplate was coated with somatic antigens of *T. suis* (100 µg/ml) and somatic antigens of *T. suis* was competed with monoclonal antibody (10 µg/ml).

값보다도 높게 나타난 것을 확인하였다.

#### (5) 분변항원에 대한 효소면역측정법(ELISA)

본 실험에서 생산한 45 kDa에 해당하는 단클론항체와 돼지편충의 분변내에서 분리한 분변항원에 대한 반응도를 확인하기 위하여 2C4 clone 단클론항체, 돼지편충의 양성 및 음성혈청으로 효소면역측정법(ELISA)을 수행하였다. 돼지편충 감염돈의 분변 시료가 2C4 clone 단클론항체와 반응하는 OD means±SD값은 0.423±0.115이었고, 양성혈청과 반응하는 OD means±SD값은 0.366±0.107이었으며, 음성혈청과 반응하는 OD means±SD값은 0.092±0.023이었다. 돼지편충 무감염돈의 분변시료가 양성혈청 및 2C4 clone 단클론항체와 반응하는 OD means±SD 값은 각각 0.103±0.016 및 0.129±0.046로써 분변항원과 음성혈청을 반응시킨 값과 유사하였다. 돼지편충의 분변항원이 2C4 clone 단클론항체와 반응하는 OD값을 음성혈청의 OD값과 비교하여 볼 때 고도로 유의성이(P<0.01) 있음을 확인하였으며, 또한 양성혈청의 OD 값 보다도 높게 나타난 것을 확인하였다(Table 3).

#### (6) 단클론항체의 항원검출능

항체의 농도를 10 µg/ml 되게 하여 이 단클론항체의 역할을 indirect competitive ELISA법으로 측정하였던 바 항원의 양이 100 ng/ml 까지 검출할 수 있었다(Fig. 4).

## 고 찰

충란 검사에 의한 기생충 감염의 진단은 편리하고 경제적이지만 충란이 배출되지 않는 시기의 진단 및 경미

한 감염에 의해 나타나는 편충 감염증을 진단하는 데는 어려움이 많기 때문에 현재 기생충의 혈청학적 진단에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이러한 연구는 기생충감염 진단시 분변내 충란 검출에 의한 진단의 단점을 보완할 수 있다 [21]. 즉, 감염 후라도 미성숙 단계에서는 충란 검출이 불가능하였으나, 이러한 혈청학적 방법의 활용은 충란을 검출할 수 없는 시기의 감염을 진단하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다 [10]. 그러므로 편충증의 진단은 혈청학적이거나 면역학적 방법으로 검출율을 높일 수 있다. 미생물학적으로 단클론항체는 고도의 동질성과 특이성이 있으므로 질병의 진단이나 이를 이용한 항원 분석 또는 분리 등에 널리 적용되고 있다 [2, 7, 25, 29].

본 실험에서는 돼지편충의 체항원과 분비·배설항원을 이용하여 편충증 진단에 이용할 수 있는 적합한 단클론항체를 생산하였고 ELISA와 Western blot으로 그 민감도와 특이성을 분석하였다. 그 중 반응이 좋은 단클론항체를 선택한 후 그 항체를 사용한 antigen-capture sandwich ELISA 기법을 이용하여 돼지혈청 및 돼지분변내의 항원 검출을 통한 돼지편충증의 면역학적 진단에 대한 적용성을 검사하였다.

Hill 등 [21]은 돼지편충의 성충을 이용하여 20 kDa 분획에서 나타난 분비·배설항원의 특성을 확인하였으며, 또한 마우스 편충의 성충을 이용한 분비·배설항원의 분획을 85~105 kDa에서 확인하였다고 보고하였고, 지 등 [6]은 돼지편충의 성충 및 제 3기 자충의 체항원과 분비·배설항원의 유사한 분획을 확인하기 위하여 전기영동시킨 후 silver stain을 실시한 결과, 20~80 kDa에서 분획을 확인하였으며 각 분획은 80, 45, 32, 28, 20 kDa에서 확인하였다고 보고하였다. 본 실험에서 확인된 20 kDa와 45 kDa에 해당하는 분획은 Hill 등 [21]과 지 등 [6]이 보고한 분획과 모두 일치하였으며 돼지편충의 성충을 배양하여 회수한 배양액에서 column chromatography를 이용하여 20 kDa secretory-excretory (SE) glycoprotein을 분리하였으며 돼지편충 성충을 *in vitro*에서 배양하여 분리한 zinc metalloprotease가 45 kDa 크기의 항원으로 면역 염색방법에 의해 돼지편충의 stichosome에 위치하고 있다는 것을 확인한 Hill 등 [21]의 보고와 일치하였다. Hill 등 [21]은 또한 돼지편충의 성충을 이용한 분비·배설항원의 분획을 85~105 kDa에서 확인하였다고 보고하였는데 이것은 본 실험에서 확인된 103 kDa 분획과 유사하였다. 본 실험에서 확인된 항원의 분획은 Hill 등 [21]과 지 등 [6]의 분획보다 많이 나타났는데 이것은 체항원과 분비·배설항원 분리시 cation exchange high-pressure liquid chromatography column의 단계를 실시하지 않았기 때문인 것으로 사료



된다.

돼지편충 및 유사 선충류들의 항원의 분획에 대한 연구가 많이 보고 되어 있는데 Lillywhite 등 [22]은 사람 편충 성충의 분비·배설항원의 주요 분획이 52~54 kDa, 35~45 kDa와 17 kDa 이었으며 체항원의 분획은 숙주의 기생충에 대한 면역학적 반응과 면역병리학적 반응 및 숙주 방어 기전 변화를 끌어내는 역할을 한다고 보고하였다. 또한 쥐편충의 분비·배설항원의 주요 분획이 43 kDa 이었다고 보고하였는데 본 실험에서 확인된 돼지편충의 45 kDa의 분획과는 일치하지 않았다.

Fetterer 등 [15, 16]은 돼지편충이 분비하는 phenol oxidase를 이용한 일련의 연구에서 돼지편충의 제조 조직 분석 결과 44 kDa와 53 kDa의 분획을 확인하였다고 보고하였고, Drake 등 [13]은 편충은 조직 기생충으로서 감염성 있는 제 1기 유충이 숙주의 장 점막에 침투하여 발육한 후, 성충의 전체부에 식도로 연결되는 stichocyte를 갖게 되는데 이것이 분비하는 항원들은 면역원성이 높고 감수성이 있는 숙주에서 방어 면역을 유발한다고 보고하였다. 따라서 이러한 분자들 또는 분비물들의 기능이 기생충의 생존에 필수적인 대사 과정에 관여할 것으로 추정되며 쥐편충의 배설·분비 물질은 105 kDa와 85 kDa의 주요 peptidase를 가지고 있다고 보고하였다.

Else 등 [14]은 complete Freund's adjuvant를 섞은 쥐편충의 분비·배설항원으로 접종한 NIH mice에서 접종 후 반응을 조사한 결과 쥐편충의 분비·배설항원을 포함한 crude antigen은 면역원성이 매우 높게 나타났으며 105~110 kDa, 90~95 kDa, 80~85 kDa의 주요 분획들을 확인하였다고 보고하였다. Chan과 Ko [11]는 중국에서 홍콩으로 수입된 2,000두의 돼지에서 SDS-PAGE와 indirect ELISA 방법으로 선모충 항원에 대한 특이성을 조사한 결과 28 kDa~55 kDa에 해당하는 분획을 확인하였다고 보고하였는데 이러한 결과들은 모두 본 실험에서 작성된 45 kDa의 돼지편충의 분획과는 일치하지 않았다.

Needham 등 [24]은 기생충의 분비·배설항원에 대한 초기 항체 반응은 영양 단백질이나 감염 정도에 관계없이 시간 의존적이며 가장 뚜렷하게 IgG1 group들이므로 나타났다고 보고하였고, 또한 편충의 antibody isotype을 조사한 바 IgG1 group과 IgG2 group 수준이 전반적인 감염 농도와 가장 중요한 관계가 있으며, 이것은 편충 감염이 강하고 다양한 체액 면역 반응을 일으킨다는 Lillywhite 등 [22]의 보고를 확인한 것이라고 보고하였는데, 이러한 결과들은 본 실험에서 얻은 단클론항체의 isotyping 결과가 IgG1 group으로 나타난 것과 유사한 결과로 사료된다.

Roach 등 [27, 28]은 서로 다른 편충간의 교차반응이

나타난 것은 stichocyte 항원을 공유하기 때문이며 전방에 있는 stichocyte의 입자들이 더 강하게 반응한다고 보고하였다. Urban 등 [30]은 돼지회충 감염에 의한 면역은 숙주의 일령보다 감염과 관련이 있으며, 장내에서 회충을 제거하여도 면역은 영향을 받지 않는다고 보고하였다. Homan 등 [23]은 선모충의 진단을 위한 항원 확인 실험에서 분비·배설항원과 다른 stichocyte 유래 항원들이 crude extract보다 면역진단학적으로 훨씬 우수하다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다고 보고하였고 선모충 근육 유충의 분비·배설항원을 분석한 결과 92, 53, 48 kDa에 해당하는 분획을 확인하였다고 보고하였다.

Hill 등 [21]의 연구에 의하면 돼지편충 성충의 분비·배설항원은 돼지회충, 선모충, 개편충, 특소포자충 (*Toxoplasma gondii*), 개회충 (*Toxocara canis*), 개구충 (*Ancylostoma caninum*), 분선충 (*Strongyloides stercoralis*), 돼지장결절충 (*Oesophagostomum dentatum*) 등의 선충류 감염에 의해 형성된 항체와 반응하지 않으므로 혈청학적 방법의 진단 항원으로 이용할 수 있다고 보고하였다. Hong [8]은 단클론항체 이용 돼지회충 분비·배설항원 및 체항원 특이성 분석에서 29 kDa의 분자량에 대한 항체가 돼지편충의 체항원 및 분비·배설항원과의 교차반응을 확인하고자 Western blot을 하였으나 교차반응은 일어나지 않았다고 보고하였다.

본 실험에서 얻은 단클론항체를 이용하여 돼지편충, 돼지회충, 개편충 및 선모충의 체항원과 분비·배설항원에 대한 Western blot을 실시한 결과 돼지편충에서는 45 kDa 크기에 해당하는 특이적인 밴드를 확인할 수 있었으나 다른 기생충의 체항원과 분비·배설항원에서는 밴드를 확인할 수 없었다.

이러한 결과로 볼 때 돼지편충 감염에 의해 미성숙 단계나 총란 미배출시기의 편충증은 돼지편충의 45 kDa에 해당하는 monoclonal antibody를 이용하여 효소면역측정법(ELISA)을 실시함으로써 진단에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 작성한 45 kDa에 해당하는 단클론항체와 돼지편충에 감염된 돼지의 분변내에서 분리한 항원성 단백질에 대한 반응 정도를 확인하기 위하여 효소면역측정법(ELISA)을 수행한 결과 돼지편충 감염돈의 분변 시료가 양성 혈청이나 음성 혈청 OD값보다 높게 나타난 것을 확인하였다. 이 결과는 항원을 분리하여 돼지편충의 양성 및 음성 혈청으로 효소면역측정법을 수행하여 양성 혈청과 반응하는 돼지편충 성충 체항원의 OD값(음성 혈청과 반응하는 OD값)을  $0.30 \pm 0.120 (0.09 \pm 0.006)$ 으로, 그리고 성충의 분비·배설항원의 OD값을  $0.24 \pm 0.031 (0.11 \pm 0.00)$ 로 보고한 지 등 [6]의 결과보다도 더 높게 나타난 것이다.

Björkman 등 [10]은 간접면역형광항체법(IFAT)과 indirect ELISA를 이용하여 혈청과 우유내 *Neospora caninum*의 항체를 신속히 구명할 수 있었다고 보고하였으며, Chan과 Ko [11]는 IgG-ELISA를 이용하여 선모충 항원의 특이성을 보고하였으며, Deplazes 등 [12]은 antigen-capture andwich ELISA를 이용하여 개의 포상조충(*Taenia hydatigena*)의 분변항원을 높은 특이수준에서 확인하였음을 보고하였다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 본 실험에서 얻은 단클론항체를 이용하여 antigen-capture sandwich ELISA법으로 면역학적 진단을 한다면 전세계적으로 양돈장에 많은 경제적 피해를 입히고 있는 돼지편충의 모든 감염단계에 대한 진단이 가능함으로써 양돈장에서보다 근본적이고 확실한 구충계획을 세울 수 있게 되어 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 사료된다.

## 결 론

편충은 미성숙 단계와 성충의 어떤 시기에서는 충란을 배출하지 않기 때문에 일반적인 분변검사법으로는 감염증 진단이 불가능하므로 면역학적 진단법이 필요하다. 돼지편충의 체항원을 면역시킨 BALB/c마우스의 슬 와립프질세포와 마우스 골수중세포를 융합하여 융합 잡종세포를 만들었고 단계회석법과 ELISA를 이용하여 클로닝함으로써 45 kDa의 단클론항체를 생산하였다. Western blot으로 민감도를 조사해 본 결과 돼지편충의 체항원 및 분비·배설항원과 특이적으로 반응하였으나 돼지회충, 개편충 및 선모충의 항원과의 교차반응은 나타나지 않았다. 충란 양성인 돼지에서 분변 항원 검출율과 혈청 내 항원 검출율을 비교해 본 결과 분변 항원 검출율이 혈청 내 검출율보다 더 높게 나타났다.

## 참고문헌

1. 강영배, 위성환, 김상희, 장환, 최상호. 최근 기업화 양돈장의 돼지 내부기생충 감염실태 변화양상 조사. 한국수의공중보건학회지. 1989, **13**, 15-19.
2. 권창희. Psedorabies Virus 단클론항체를 이용한 개량 효소면역확산법 개발 및 gP50과 gP63 유전자 클로닝에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사 학위 논문. 서울, pp. 43, 1991.
3. 이재구. 최신 수의 기생충학. pp. 266-268, 대한교과서주식회사, 서울, 1987.
4. 장두환, 노재욱, 강두원. 말효톱밥 돈사에 대한 돼지 내부기생충 조사. 대한수의학회지. 1991, **31**, 509-513.
5. 지차호, 박승준. 시험관내에서 돼지회충(*Ascaris suum*) 합자충란(L<sub>2</sub>)의 인공배양. 대한수의학회지. 1998, **38**, 107-117.
6. 지차호, 이철순, 박승준. 혈청학적 진단을 위한 돼지 편충의 체항원, 배설/분비항원의 분리 및 비교. 대한수의학회지. 1999, **39**, 159-168.
7. 채창수. Sulfamethazine에 대한 단클론항체의 생산과 이를 이용한 ELISA의 개발. 서울대학교 대학원 석사 학위 논문. 서울. pp. 6-10, 1996.
8. 홍영선. 단클론항체 이용 돼지 회충 분비 항원 및 체항원 특이성 분석. 서울대학교 대학원 박사 학위 논문. 서울, pp. 43-44, 1999.
9. Beer, R. J. S. Studies on the biology of the life-cycle of *Trichuris suis* Schrank, 1788. Parasitology. 1973, **67**, 253-262.
10. Björkman, C(amilla), Joakim, O., Holmdahl, M. and Uggla, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospira caninum* in serum and milk of cattle. Vet. Parasitol. 1997, **68**, 251-260.
11. Chan, S. W. and Ko, R. C. Specificity of affinity-purified *Trichinella spiralis* antigens. Vet. Parasitol. 1992, **41**, 109-120.
12. Deplazes, P., Gottstein, B., Stügelin, Y. and Eckert, J. Detection of *Taenia hydatigena* Copro-Antigens by ELISA in Dogs. Vet. Parasitol. 1990, **36**, 91-103.
13. Drake, L. J., Bianco, A. E., Bundy, D. A. P. and Ashall, F. Characterization of peptidases of adult *Trichuris muris*. Parasitol. 1994, **109**, 623-630.
14. Else, K. J., Wakelin, D., Wassom, D. L. and Hauda, K. M. MHC-restricted antibody responses to *Trichuris muris* secretory-excretory (SE) antigen. Parasite Immunol. 1990, **12**, 509-527.
15. Fetterer, R. H. and Hill, D. E. Localization of phenol oxidase in female *Trichuris suis*. J. Parasitol. 1994, **80**, 952-959.
16. Fetterer, R. H. and Hill, D. E. The occurrence of phenol oxidase activity in female *Trichuris suis*. J. Parasitol. 1993, **79**, 155-159.
17. Fields, H. A., Bruguera, P., de la Torre, N., Puig, J. and Anderson, L. J. Purity, antigenicity and immunogenicity of the hepatitis B surface antigen purified by five different methods. J. Virol. Methods. 1988, **22**, 283-294.
18. Greenspon, L. W., White, J., Shields, R. S., Funer, A. and Gold, W. M. Purification of *Ascaris suum* antigen: Its allergenic activity in vitro and in vivo. J Allergy Clin. Immunol. 1986, **77**, 443-51.
19. Hill, D. E. Protective Antigens from culture Fluids of the Adult Swine Whipworm, *Trichuris suis*. Research Investment Report (National Pork Producers Council). 1996.

20. Hill, D. E., Fetterer, R. H., Romanowski, R. D. and Urban, J. F. Jr. The effect of immunization of pigs with *Ascaris suum* cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, **42**, 161-169.
21. Hill, D. E., Romanowski, R. D. and Urban, J. F. Jr. A *Trichuris* specific diagnostic antigen from culture fluids of *Trichuris suis* adult worms. *Vet. Parasitol.* 1997, **68**, 91-102.
22. Lillywhite, J. E., Cooper, E. S., Needham, C. S., Venugopal, S., Bundy, D. A. P. and Bianco, A. E. Identification and characterization of excreted/secreted products of *Trichuris trichiura*. *Parasite Immunol.* 1995, **17**, 47-54.
23. Homan, W. L., Derksen, A. C. and van Knapen, F. Identification of diagnostic antigens from *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 1992, **78**, 112-119.
24. Needham, C. S., Bundy, D. A. P., Lillywhite, J. E., Didier, J. M., Simmons, I. and Bianco, A. E. The relationship between *Trichuris trichiura* transmission intensity and the age-profiles of parasite-specific antibody isotypes in two endemic communities. *Parasitology.* 1992, **105**, 273-283.
25. Prichard, R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 1997, **71**, 155-175.
26. Pupo, E., Aguila, A., Santana, H., Nunez, JF., Castellanos-Serra, L. and Hardy, E. Mice immunization with gel electrophoresis micropurified bacterial lipopolysaccharides. *Electrophoresis.* 1999, **20**, 458-461.
27. Roach, T. I. A., Else, K. J., Wakelin, D., McLaren, D. J. and Grecis, R. K. *Trichuris muris*: antigen recognition and transfer of immunity in mice by IgA monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* 1991, **13**, 1-12.
28. Roach, T. I. A., Wakelin, D., Else, K. J. and Bundy, D. A. P. Antigenic cross-reactivity between the human whipworm, *Trichuris trichiura*, and the mouse trichuroids *Trichuris muris* and *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* 1988, **10**, 279-291.
29. Salah, F., Demerdash, Z., Shaker, Z., El Bassiouny, A., El Attar, G., Iamail, S., Badir, N., Saad El Din, A. and Mansour, M. A monoclonal antibody against *Schistosoma haematobium* soluble egg antigen: efficacy for diagnosis and monitoring of cure of *S. haematobium* infection. *Parasitol. Res.* 2000, **86**, 74-80.
30. Urban, J. F., Alizadeh, H. and Romanowski, R. D. *Ascaris suum* : Development of intestinal immunity to infective second stage larvae in swine. *Exp. Parasitol.* 1988, **66**, 66-77.
31. 平詔 亨, 池田逸夫. 豚の内部寄生蟲病と對策. 畜産の研究. 1990, **44**, 601-608.