

혈청학적 진단을 위한 돼지 편충의 체항원, 배설/분비항원의 분리 및 비교

지차호 · 이철순 · 박승준

충북대학교 수의과대학
(1999년 1월 15일 접수)

Isolation and comparison of somatic and excretory-secretory antigens for serological diagnosis in *Trichuris suis*

Cha-ho Jee, Chul-soon Lee, Seung-jun Park

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

(Received Jan 15, 1999)

Abstract : Swine whipworm(*Trichuris suis*) is cosmopolitan nematode which can cause serious pathology in immature stage(larva2~larva5) of infected pigs, such as anorexia, diarrhea, anemia, and death in heavy infections. In this larval stages, it is very difficult to diagnose the infection of whipworm and to differentiate from other common swine gastrointestinal disorders such as 21 day scours which are associated with TGE virus, rota virus, *coccidium*, and the stress of weaning.

In this experiment, the isolated antigens of *Trichuris* spp. were carried out to examine the structure and specificity of antigens and to select the reasonable antigens which would be used in serological diagnosis by electrophoresis, Western blotting, ELISA. The results of this experiment were as follows ;

1. The common fractions of each *Trichuris suis* antigen were identified 28,32,45, 80kDa by SDS-PAGE with silver stain and four major fractions could be detected in positive swine sera by Western blot analysis.

2. The OD(optical density) values of somatic and excretory-secretory antigens which were reacted against positive(negative) sera from pigs infected with *Trichuris suis* by ELISA reader were ; 1) OD values(mean \pm SD) of adult somatic antigen against positive(negative) sera were $0.30 \pm 0.12(0.09 \pm 0.006)$ and third-stage larva of somatic antigen were $0.28 \pm 0.038(0.10 \pm 0.005)$. And OD values of excretory-secretory antigens of adult and third-stage larva were $0.24 \pm 0.031(0.11 \pm 0.005)$ and $0.08 \pm 0.013(0.10 \pm 0.003)$, respectively. 2) OD values of adult somatic, larval

본 연구는 1998년도 과학재단 핵심전문연구(981-0612-060-1) 지원으로 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Cha-ho Jee, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheonju 360-763, Republic of Korea.

somatic antigen and adult excretory-secretory antigen response to positive sera were significantly ($p < 0.01$) associated with negative swine sera. And the Cut-off OD values(minimum positive value) were determined to be mean negative value plus 3 SD that would minimized the risk of false positives.

3. The OD values of somatic antigens of *T suis* and *T vulpis* against swine positive(negative) sera were $0.30 \pm 0.120(0.09 \pm 0.006)$ and $0.25 \pm 0.141(0.09 \pm 0.003)$. These data mean that the somatic antigens of *T suis* and *T vulpis* were able to diagnose *T vulpis* infection in dogs as well as *T suis* infection in pigs.

These results suggest that somatic antigen of third-stage larva and excretory-secretory antigen of adult *T suis* could be used the diagnostic antigen by serological test(ELISA) in immature *Trichuris* spp. infection.

Key words : immature trichuriasis, serological diagnosis(ELISA), *Trichuris suis*, excretory-secretory antigen, somatic antigen.

서 론

편충증(trichuriasis)은 돼지, 개, 염소, 양 등의 숙주에서 빈혈, 혈변 및 체중감소를 나타내며 중감염시 폐사의 원인이 되는 중요한 기생충성 질병으로서^{13,26} 성충의 형태는 앞부분은 길고 가는데 뒷부분은 대단히 두껍기 때문에 일반적으로 鞭蟲(whip-worm)이라고 알려져 있다¹. 돼지 편충의 감염율은 유럽, 미국 등지에서 돼지 선충류 중에서 50~70% 정도로 높고 사료효율에서도 약 33%의 경제적 손실을 초래하는 원인이 된다^{15,16}.

편충의 생활사^{1,2}는 미성숙단계(immature stage; 제2~제5기 자충)와 성충단계(adult stage)로서 적당한 조건(28℃, 4주)에서 발육한 합자충란(제1기 자충)을 숙주가 섭취함으로써 감염이 이루어진다. 제2기 자충은 감염 16일에서 21일 사이에 발육하여 소장 점막표면에 존재하며, 제3기 자충은 감염 32일까지 발육한 자충으로 맹장 및 결장 점막내부에 기생하므로 숙주에게 설사를 유발한다. 제4기 자충은 형태학적으로 암·수를 구별할 수 있고 충체의 모든 기관이 형성되는 시기이며 감염 37일까지 제4기 자충으로 발육한다. 제5기 자충은 감염 37일후 자충의 인후두(oesophagus)로 장점막을 뚫고 들어가서 영양분을 섭취하면서 점막의 손상을 유발한다. 편충증(trichuriasis)의 잠복기(prepatent period)는 감염 47일 이후이며, 미성

숙단계(immature stage)에서는 충란을 배출하지 않으므로 충란검사에 의한 진단은 불가능하다.

편충감염에 의해 나타나는 임상증상은 설사, 빈혈, 출혈을 동반한 대장염이며 심한 경우 폐사를 일으킬 수 있다^{11,12}. 편충에 감염된 돼지는 돼지적리와 유사한 점막괴사, 출혈 등의 부검소견이 나타나며 점막 출혈성 설사를 일으킨다. 돼지의 21일령 설사증(21 days scours diarrhea)¹⁶은 편충의 미성숙단계(제2기 자충~제3기 자충)에서 발생하는 설사증으로 자돈설사증을 유발하는 바이러스성 설사증(TGE virus, rota virus), *Coccidium*에 의한 설사증 및 이유 스트레스에 의한 설사증과 감별진단하여야 한다²⁷.

현재 포상조충(*Taenia hydatigena*)⁸, *Neospora canium*⁶, 선모충(*Trichinella spiralis*)^{7,18} 등의 기생충에서 혈청학적 방법을 이용한 연구가 보고되고 있으며 또한 개 심장사상충(*Dirofilaria immitis*) 감염의 진단은 효소면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay)의 방법이 이용되고 있다.

기생충의 인공배양^{29,30}은 1980년대부터 발전하기 시작하였으며 국내에서도 지 등³¹에 의해 돼지 회충(*Ascaris suum*)의 배양이 수행되었다. 이러한 기생충의 인공배양은 구충제 효능시험^{23,32} 및 기생충의 진단방법^{6,7}을 발전시킬 수 있는 토대를 마련하였으며 자충이나 성충을 배양한 배지에서 추출한 배설/분비항원을 이용한 백신개발⁵ 및 면역학적 연구^{4,22,25}에 응용되고 있다. 그러나 편

충(*Trichuris* spp.)의 실험실(*in vitro*) 배양은 항원을 분리하는 수준에서 이루어지고 있다¹⁶. 최근 전기영동과 Western blotting 등의 방법으로 편충의 항원에 관한 연구가 사람 편충(*T. trichiura*)^{3,20,21}, 마우스 편충(*T. muris*)^{9,10} 및 돼지 편충(*T. suis*)^{11,12,16}에서 보고되었다. 편충에 자연감염된 돼지와 인공적으로 편충을 경구감염(10,000개/두)시킨 돼지 혈청에서 항원-항체반응의 OD값은 감염 21~63일까지 대조군에 비하여 유의한 수준으로 나타난다고 보고하였다¹⁶. 그러나 이러한 편충항원에 관한 연구는 성충의 배설/분비항원의 특성에 관한 연구이며 자충(larva)항원의 특성에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험은 돼지 편충 성충의 체항원 및 배설/분비항원(E/S Ag)과 자충의 체항원 및 배설/분비항원을 전기영동, Western blotting 및 효소면역흡착법을 실시하여 항원성을 비교 조사함으로써 성충 및 자충항원을 진단항원으로 사용할 가능성을 타진하기 위하여 실험을 실시하였다. 또한 돼지 편충과 개 편충의 체항원을 전기영동, Western blotting 및 효소면역흡착법에 의해 공통항원을 찾고 진단시 항원을 상호적으로 이용할 수 있는 가능성을 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

편충(*Trichuris* spp.)의 분리 및 항원제조 : 돼지 편충을 인공감염시킨 돼지에서 부검에 의하여 성충을 회수하여 RPMI1640 배지에서 배양하면서 회수한 편충란을 28℃, 4주간 배양한 함자충란(제1기 자충)을 카테터를 이용하여 체중 kg당 제1기 자충(감염자충) 1,500개를 35일령 돼지에 경구적으로 인공감염시켜 4주후 부검하여 맹장과 결장으로부터 제3기 자충을 회수하였고 성충은 8주에 부검하여 회수하였다. 개 편충(*T. vulpis*)의 성충은 충북대학교 동물병원에 내원한 자연감염된 환축으로부터 회수하였다.

항원제조 : 돼지 편충(*T. suis*)성충 및 제3기 자충과 개 편충(*T. vulpis*) 성충의 체항원(somatic antigen) 제조는 각각 PBS로 세척한 후 동결건조용 유리관에 넣어 냉동시킨 후 -80℃에서 동결건조하였다. 건조된 성충은 분쇄시킨 후 PBS로 희석하여 0.2µm 필터로 여과하여 체항원으로 사용하였다.

돼지 편충 성충 및 제3기 자충의 배설/분비항원(excretory-secretory antigen)은 37℃, CO₂ 배양기에서 RPMI1640 배

지에 배양하면서 12~24시간마다 회수한 배지를 Amicon concentration unit(10kDa cut-off, SIGMA)를 사용하여 500g, 30분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 0.2µm 필터로 여과하였고 여과된 용액은 동결건조하였으며 건조후 PBS로 희석하여 배설/분비항원으로 사용하였다.

분리된 각 항원은 Lowry 법에 의해 항원농도를 측정하여 실험에 사용하였다.

혈청의 분리 : 본 실험에 사용한 혈청은 인공감염에 의해 감염유무를 육안으로 확인한 후 형광항체법을 실시하여 음성혈청과 양성혈청으로 분리하였다. 양성혈청은 돼지에 감염충란(제1기 자충)을 35일령 돼지에 인공적으로 경구감염(1,500개/kg)시키고 8주 후에 부검하여 감염유무를 확인하였다. 편충(*T. suis*)에 감염된 돼지로부터 혈액을 회수한 후 원심분리(3,000rpm, 5분)하여 혈청을 분리하였다. 음성혈청은 편충에 감염되지 않은 35일령 돼지에 이보멕(ivermectin, MSD)을 투여한 다음 8주후 부검하여 편충의 감염유무를 확인하였으며 편충(*T. suis*)이 감염되지 않은 돼지의 혈액을 회수한 후 원심분리(3,000rpm, 5분)하여 혈청을 분리하였다.

Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE : 본 실험에서 전기영동에 사용한 gel은 10% resolving gel을 사용하였으며 silver stain에 의해 각 항원의 분해를 비교하였다.

전기영동을 하기 위한 장치로 READY GEL CELL(BIO-RAD)를 준비하고 전기영동을 수행한 후 silver stain을 실시하였다.

Western blotting : Western blotting에 사용할 thick filter paper와 nitrocellulose membrane은 transfer buffer 용액(pH 8.1~8.3, 15.6mM Tris Base, 120mM Glycine)에 담근 후 냉장보관하여 사용하였으며 전기영동한 gel은 염을 제거하기 위하여 transfer buffer에 15분간 방치시킨 후 Trans-Blot(BIO-RAD) 13 volt에서 20분간 transfer하였다. 항원이 transfer된 membrane은 분리하여 heat-sealable plastic bag으로 옮긴 후 5% non fat dry milk/Tris buffer solution(TBS)을 넣고 2시간동안 membrane을 Blocking시켰다. Blocking 후 0.5% BSA/TBS로 3회 세척한 다음 1차 항체(양성혈청)를 1:200배 0.5% BSA/TBS로 희석하여 1시간동안 천천히 반응시켰다.

2차 항체(Alkaline phosphate conjugated : goat anti-swine IgG(H+L), KPL INC)는 0.5% BSA/TBS로 1:2,000배 희석하여 membrane과 1시간 반응시켰다. Membrane은 0.5

% BSA/TBS로 30분간 3회 세척하였으며 Alkaline phosphate buffer로 5분간 세척한 후 nitro blue tetrazolium chloride(NBT) /5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP)(SIGMA) 100 μ l와 Alkaline phosphate buffer 12ml을 혼합하여 membrane을 담근 후 반응이 나타날 때까지 천천히 교반한 후 20mM EDTA/TBS 용액으로 반응을 멈추고 결과를 관찰하였다.

효소면역흡착법(Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) : 돼지 편충(*T suis*) 성충 및 제3기 자충, 개 편충(*T vulpis*) 성충의 체항원과 배설/분비항원을 도포완충액(coating buffer, pH 9.6)으로 1 μ g/ml 되도록 희석한 다음 각 well에 100 μ l씩 분주하였다. 항원이 분주된 plate는 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시킨 후 세척액(washing buffer ; 0.05 % Tween 20 in PBS)으로 5분씩 3회 세척하였다. 그후 Blocking buffer(2% BSA in PBS)를 100 μ l씩 분주한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 배양한 후 세척액으로 5분씩 3회 세척하였다.

1차 항체(양성, 음성혈청)는 PBS-Tween 20으로 1:200으로 희석하여 사용하였으며 희석된 혈청은 각 well에 100 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 다음 세척액으로 3회 연속 세척하였다. 2차 항체(Alkaline phosphate conjugated : goat anti-swine IgG(H+L), KPL INC)는 PBS-Tween 20으로 1:5,000 희석하여 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 1시간 후에 세척액으로 4회 연속 세척하며 기질(*p*-nitrophenyl phosphate (PNPP))을 각 well에 50 μ l씩 첨가하고 45분 후 stop solution (2M EDTA)을 50 μ l씩 각 well에 분주한 다음 ELISA reader (405nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

측정한 각 항원의 OD값은 student's test를 이용하여 통계학적 유의성을 분석하였다.

돼지 편충(*T suis*)과 개 편충(*T vulpis*) 성충 체항원의 비교 : 돼지, 개 편충의 성충을 회수하여 제조한 돼지, 개의 체항원(somatic antigen)은 돼지로부터 채혈한 양성, 음성 혈청과 반응시켰다. 각 체항원은 전기영동 후 silver stain 하였으며 Western blotting으로 양성혈청과 체항원을 반응시켰다. 또한 체항원과 양성, 음성혈청을 이용하여 효소면역흡착법을 실시하여 돼지와 개 편충의 체항원의 OD값을 비교하였다.

결 과

SDS-PAGE와 silver stain : 항원은 전기영동(SDS-PAGE)한 후 silver stain에 의해 분획을 확인하였다. 돼지 편충 성충의 체항원, 배설/분비항원 및 제3기 자충의 체항원, 배설/분비항원은 20~80kDa 사이에서 분획을 확인하였으며 항원의 공통분획은 28, 32, 45, 80kDa으로 모든 항원에서 확인하였다(Fig 1).

Fig 1. Analysis of *Trichuris suis* antigens by SDS-PAGE with silver staining.

Lane 1 : somatic antigen of adult *T suis*, Lane 2 : excretory-secretory antigen of adult *T suis*, Lane 3 : somatic antigen of *L3 T suis*, Lane 4 : excretory-secretory antigen of *L3 T suis*.

Fig 2. Western blot analysis of *Trichuris suis* antigens in swine sera.

Lane 1 : somatic antigen of adult *T suis*, Lane 2 : excretory-secretory antigen of adult *T suis*, Lane 3 : somatic antigen of *L3 T suis*, Lane 4 : excretory-secretory antigen of *L3 T suis*.

Western blotting : Western blotting에 의해 항원성 있는 분

획을 확인한 결과 돼지 편충의 성충 체항원, 배설/분비항원, 제3기 자충의 체항원에서 반응하는 4개의 공통분획을 확인하였다(Fig 2).

효소 면역 흡착법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) : 각 항원이 양성혈청과 반응하는 OD값(음성혈청과 반응하는 OD값)은 돼지 편충 성충의 체항원 OD값(OD means±SD)은 $0.30 \pm 0.12(0.09 \pm 0.006)$ 이었고, 제3기 자충의 체항원 OD값(OD means±SD)은 $0.28 \pm 0.038(0.10 \pm 0.005)$ 이었다. 그리고 성충의 배설/분비항원 OD값은 $0.24 \pm 0.031(0.11 \pm 0.005)$ 이었으며, 제3기 자충의 배설/분비항원 OD값은 $0.08 \pm 0.013(0.10 \pm 0.003)$ 이었다(Table 1, Fig 3). 또한 cut-off value(negative OD means + 3SD)의 OD값 이상의 값을 양성 OD값으로 판정하였다. 음성혈청의 OD값과 양성혈청에 의해 반응한 각 항원의 OD값을 비교한 결과 제3기 자충의 배설/분비항원의 OD값을 제외한 모든 항원의 OD값에서 고도의 유의성($p <$

0.01)이 있음을 확인하였다(Table 1).

돼지 편충(*T suis*)과 개 편충(*T vulpis*) 체항원의 비교 : 돼지 편충(*T suis*)과 개 편충(*T vulpis*) 성충에서 분리

Table 1. Comparison of OD values somatic and excretory-secretory antigens by ELISA

Sera	Antigens			
	<i>T suis</i> adult somatic Ag	<i>T suis</i> adult E/S Ag	<i>T suis</i> L ₃ somatic Ag	<i>T suis</i> L ₃ E/S Ag
Positive				
1	0.321*	0.256	0.290	0.083
2	0.328	0.270	0.277	0.100
3	0.240	0.238	0.232	0.092
4	0.234	0.236	0.242	0.087
5	0.472	0.261	0.350	0.055
6	0.467	0.258	0.317	0.084
7	0.146	0.225	0.277	0.081
8	0.163	0.172	0.281	0.080
OD mean±SD	$0.30 \pm 0.120^{**}$	$0.24 \pm 0.031^{**}$	$0.28 \pm 0.038^{**}$	0.08 ± 0.013
Negative				
9	0.101	0.116	0.108	0.097
10	0.092	0.107	0.099	0.099
11	0.091	0.108	0.106	0.102
OD mean±SD	0.09 ± 0.006	0.11 ± 0.005	0.10 ± 0.005	0.10 ± 0.003

*OD values at 405nm, **p < 0.01.

Fig 3. The mean OD values of *T suis* antigens by ELISA(**p < 0.01). Pos: positive sera(1: somatic antigen of adult *T suis*, 2: excretory-secretory antigen of adult *T suis*, 3: somatic antigen of L₃ *T suis*, 4: excretory-secretory antigen of L₃ *T suis*), Neg: negative sera(5: somatic antigen of adult *T suis*, 6: excretory-secretory antigen of adult *T suis*, 7: somatic antigen of L₃ *T suis*, 8: excretory-secretory antigen of L₃ *T suis*).

Fig 4. Analysis of *Trichuris suis*(Ts) and *Trichuris vulpis*(Tv) antigens by SDS-PAGE with silva staining.

한 체항원을 전기영동한 결과, 돼지 편충(*T suis*)의 체항

원은 80, 45, 32, 28, 20kDa에서 각 분획을 확인하였으며, 개 편충(*T vulpis*) 체항원의 분획은 80, 45, 32kDa에서 확인하였다(Fig 4). 공통분획은 80, 45, 32kDa으로 3분획이 확인되었다. 또한 Western blotting에 의해 양성혈청과 반응하는 항원은 3개의 분획에서 반응하는 것을 확인하였다(Fig 5).

효소면역흡착법(ELISA)에 의한 돼지 편충(*T suis*)과 개 편충(*T vulpis*)의 성충 체항원은 돼지 양성혈청과 음성혈청에 반응하였으며 돼지 편충 체항원의 양성(음성) OD 값은 $0.30 \pm 0.120 (0.09 \pm 0.006)$, 개 편충 체항원의 양성(음

Fig 5. Western blot analysis of *Trichuris suis*(Ts) and *Trichuris vulpis*(Tv) antigens in swine sera.

Tabel 2. Comparison of OD values somatic antigens in adult of *T suis* and *T vulpis* by ELISA

Sera	Antigens	<i>T suis</i> adult somatic Ag	<i>T suis</i> adult E/S Ag
Positive			
1		0.321*	0.243
2		0.328	0.234
3		0.240	0.203
4		0.234	0.182
5		0.472	0.476
6		0.467	0.465
7		0.146	0.117
8		0.163	0.116
OD mean±SD		$0.30 \pm 0.120^{**}$	$0.25 \pm 0.141^{**}$
Negative			
9		0.101	0.094
10		0.092	0.094
11		0.091	0.100
OD mean±SD		0.09 ± 0.006	0.09 ± 0.003

*OD values at 405nm, **p < 0.01.

Fig 6. OD value(405nm) of somatic antigens in adult of *T suis* and *T vulpis* by ELISA reader(**p < 0.01).

(Ps: *T suis* positive, Ns: *T suis* negative, Pv: *T vulpis* positive, Nv: *T vulpis* negative).

Tabel 3. Comparison of *Trichuris suis* antigens by SDS-PAGE with silver stain, Western blotting and ELISA in swine sera

	SDS-PAGE with silver stain	Western blotting	ELISA*
<i>T suis</i> adult Ag	Pos	Pos	+++
<i>T suis</i> adult E/S Ag	Pos	Pos	+
<i>T suis</i> L ₃ Ag	Pos	Pos	++
<i>T suis</i> L ₃ E/S Ag	Pos	Pos	-

*OD values(-: < 0.20, +:) 0.20, ++:) 0.25, +++: 0.30)

Pos: positive reaction, Neg: negative reaction.

성) OD값은 $0.25 \pm 0.141(0.09 \pm 0.003)$ 이었다(Table 2, Fig 6). 이러한 결과로 돼지, 개 편충의 체항원은 진단시 항원을 상호적으로 이용하여 진단할 수 있는 가능성을 확인하였다.

각 항원을 전기영동, Western blotting, 형광항체법, 효소면역흡착법에 의하여 측정값을 비교 분석한 결과, 편충증 진단에 가장 적합한 항원은 편충성충의 배설/분비항원 및 제3기 자충의 체항원으로 확인할 수 있었다(Table 3).

고 찰

최근 기생충증을 진단하는데 혈청학적 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이러한 연구는 기생충 감염진단시 분변내 충란검출에 의한 진단의 단점을 보완할 수 있다. 즉, 감염후 자충단계에서는 충란검출이 불가능하나 이러한 혈청학적 진단방법의 활용은 충란을 검출할 수 없는 시기의 기생충 감염증을 진단하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다. 편충증(trichuriasis)도 충란을 배출하지 않는 미성숙단계의 진단은 충란검사에 의해 실시할 수 없기에 혈청학적 방법에 의해 진단해야 한다. 따라서 본 실험은 미성숙편충증 진단에 사용할 수 있는 항원을 분리하여 항원의 구조와 특성을 비교 분석하고 혈청학적 진단에 적합한 항원을 찾기 위하여 실시하였다.

돼지 편충(*T suis*)의 성충(adult) 및 제3기 자충(larva 3)과 개편충(*T vulpis*)의 체항원과 배설/분비항원의 구조는 전기영동 및 Western blotting을 실시하여 확인하였고 분리정제한 각 항원은 혈청(양성, 음성)과 반응정도를 확인하기 위하여 효소면역흡착법(ELISA)을 실시하여 항원을 비교 분석하였다.

Hill *et al*^{16,17}은 돼지 편충(*T suis*)의 성충을 이용하여 20kDa 분획에서 나타난 배설/분비항원의 특성을 확인하였으며 또한 마우스 편충의 성충을 이용한 배설/분비항원의 분획을 85~105kDa⁹에서 확인하였다고 보고하였다.

본 실험에서는 체항원(somatic antigen) 및 배설/분비항원(excretory-secretory antigen)을 이용하여 각 항원간에 유사한 분획을 확인하기 위하여 전기영동후 silver stain을 실시한 결과 10~80kDa에서 분획을 확인하였으며, 각 분획은 10, 28, 32, 45, 80kDa에서 확인하였다. 10~20kDa의 분획은 Hill *et al*¹⁷에 의해 분리한 성충의 배설/분비항원과 유사한 분획으로 사료되며, 45kDa에서 나타난 분획

은 편충이 분비하는 zink metalloprotease¹⁴와 유사한 항원으로 추측된다. 또한 80kDa 이상의 항원은 peptidase⁹와 유사한 항원으로 추측된다. 본 실험에서는 항원의 분획이 Hill *et al*^{14,16}의 분획보다 많이 나타난 것은 체항원과 배설/분비항원에서 polyclonal 항원의 분획을 비교하였으므로 더 많은 분획을 확인할 수 있었다.

실험에 사용한 혈청은 인공적으로 돼지에 경구감염시킨 후 부검하여 감염유무를 확인한 후 간접형광항체법을 실시하여 음성혈청과 양성혈청을 확인하였으며 확인된 음성혈청은 효소면역흡착법에 대조군으로 선정하여 실험에 사용하였다. 양성혈청과 반응하는 항원의 분획을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시한 결과 성충의 체항원과 배설/분비항원 및 제3기 자충의 체항원에서 반응하는 4개의 유사분획을 확인하였다. 이러한 결과는 각 항원의 분획중 항원성을 갖는 분획을 이용하여 혈청학적 진단에 활용할 수 있다. 또한 체항원과 배설/분비항원의 반응정도를 확인하기 위하여 효소면역흡착법을 실시하였으며 각 항원은 OD(optical density)값을 비교하여 반응정도를 확인하였다(Table 1).

분리한 각 항원이 음성혈청과 반응한 돼지 편충 체항원의 음성 OD값(OD means \pm SD)은 성충 0.09 ± 0.006 , 제3기 자충 0.10 ± 0.005 이었으며, 배설/분비항원의 음성 OD값은 성충 0.11 ± 0.005 , 제3기 자충 0.10 ± 0.003 으로 나타났다.

분리한 각 항원이 양성혈청과 반응한 돼지 편충 체항원의 양성 OD값은 성충 0.30 ± 0.120 , 제3기 자충 0.28 ± 0.038 이었으며, 배설/분비항원의 양성 OD값은 성충 0.24 ± 0.031 , 제3기 자충 0.08 ± 0.013 이었다. 편충 감염증의 음성, 양성을 측정한 OD값으로 판정할 때 의양성(false positive)을 최소화 하기 위하여 최소 양성 OD값(cut-off value = negative OD means + 3SD)을 설정하였다. 음성혈청의 OD값과 양성혈청의 OD값을 비교한 결과 제3기 자충의 배설/분비항원의 양성 OD값을 제외한 모든 항원의 OD값에서 고도의 유의성($p < 0.01$)이 있음을 확인하였다(Table 1). 측정된 성충의 체항원 OD값이 다른 항원에 비하여 OD값과 편차가 높게 나타난 것은 자충의 항원에 비해 충체를 구성하는 항원성이 없는 단백질 등의 다른 물질에 의해 나타나는 반응으로 사료된다. 또한 제3기 자충의 배설/분비항원이 Western blotting과 효소면역흡착법에서 반응하지 않은 것은 제3기 자충의 배설/분비항원이 성충이 분비하는 배설/분비항원보다 항원성이 적

어서 반응하지 않는 것으로 추정된다.

Roach *et al*²⁴은 사람 편충과 마우스 편충의 관련성을 연구하였으며 Hill *et al*¹⁷의 연구에 의하면 돼지 편충과 개 편충 항원은 서로 유사한 항원성 분획이 있어 상호 교차진단이 가능하다고 보고하였다. 그러므로 본 실험에서는 돼지, 개의 항원이 편충에 감염된 돼지 혈청과 반응하는지 알아보기 위하여 전기영동, Western blotting 및 효소면역흡착법을 실시하여 각 항원의 특성을 비교 분석하였다. 돼지 편충(*T suis*)과 개 편충(*T vulpis*) 항원의 공통분획(20~80kDa)이 나타나며 Western blotting에 의해 양성혈청과 반응하는 항원은 3개의 분획에서 반응하는 것을 확인하였다. 효소면역흡착법을 실시한 결과 돼지 체항원 0.30±0.120, 개 체항원 0.25±0.141의 양성 OD값을 확인하였다(Table 2).

또한 Hill *et al*¹⁷의 연구에 의하면 성충의 항원은 돼지 회충(*Ascaris suum*), 선모충(*Trichinella spiralis*), 돼지 장결절충(*Oesophagostomum dentatum*) 등의 편충류가 아닌 선충류 감염에 의해 형성된 항체와 반응하지 않으므로 편충류(*Trichuris spp.*)의 진단항원으로 이용할 수 있다고 보고하였다.

그러므로 편충증 진단에 유용하게 이용할 수 있는 항원은 Table 3에서와 같이 성충의 배설/분비항원과 제3기 자충의 체항원이 적합한 것으로 확인되었다. 그러나 미성숙 편충증의 혈청학적 진단에는 제3기 자충의 체항원이 더 유용하다고 사료된다. 그 이유는 미성숙단계(제2기 자충~제5기 자충)의 편충감염증을 진단하는 시기는 미성숙단계의 항원에 의한 항체가 형성되었기 때문이며 또한 성충의 배설/분비항원의 분리, 제조 및 항원량에 있어서 제3기 자충의 체항원이 더 편리하기 때문이다.

본 실험은 돼지 편충의 체항원과 배설/분비항원을 분리하여 진단항원으로 사용하기 위함이었다고 각 항원의 분획에 나타난 항원의 항원성 및 면역성 등의 특성을 밝히지 못하였다. 앞으로 각 항원분획의 특성을 밝힘으로써 편충 뿐만 아니라 선충류의 진단 및 백신연구에 이용할 수 있으므로 각 분획의 항원성 및 면역성을 밝히는 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 또한 돼지 편충에 감염되어 나타나는 면역성에 관한 연구는 마우스 편충(*T muris*)¹⁹과 사람 편충(*T trichiura*)²¹에 관한 연구가 수행되었으나 돼지 편충의 면역성에 관한 연구는 미흡한 실정이므로 앞으로 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

본 실험은 전기영동, Western blot, 효소면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay)을 이용하여 편충의 체항원(somatic antigens) 및 배설/분비항원(excretory-secretory antigens)의 특성을 조사하고 미성숙단계의 편충증에 적합한 진단항원을 찾기 위하여 실험한 결과는 아래와 같았다.

분리한 편충의 각 항원을 전기영동 및 silver stain한 결과 각 항원의 분획은 20~80kDa 사이에서 확인되었으며 Western blot에 의해 각 항원과 반응시킨 결과 양성혈청과 반응하는 항원의 분획은 돼지 편충 성충의 체항원 및 배설/분비항원, 제3기 자충의 체항원에서 공통적으로 4개의 분획이 반응하였다.

효소면역흡착법(ELISA)을 실시하여 각 항원이 양성혈청과 반응하는 OD값(음성혈청과 반응하는 OD값)은 돼지 편충 성충의 체항원 OD값(OD means±SD)은 0.30±0.12(0.09±0.006)이었고, 제3기 자충의 체항원 OD값은 0.28±0.038(0.10±0.005)이었다. 그리고 성충의 배설/분비항원 OD값은 0.24±0.031(0.11±0.005)이었으며, 제3기 자충의 배설/분비항원 OD값은 0.08±0.013(0.10±0.003)이었다. 최소 양성 OD값(cut-off value)은 음성 평균 OD값(negative OD means)에 3배의 표준편차값(SD)을 더하여 그 이상의 OD값을 양성으로 판정하였다. 음성혈청의 OD값과 양성혈청에 의해 반응한 각 항원의 OD값을 비교한 결과 제3기 자충의 배설/분비항원의 OD값을 제외한 모든 항원의 OD값에서 고도의 유의성(p<0.01)이 있음을 확인하였다.

돼지 편충에 감염된 양성혈청에 돼지 편충 체항원과 개 편충 체항원을 반응시킨 효소면역흡착법을 실시한 결과 각각 0.30±0.120, 0.25±0.141의 유사한 양성 OD값을 확인하였다.

이상의 결과로 성충의 배설/분비항원과 제3기 자충의 체항원은 미성숙 편충감염증의 혈청학적 진단에 사용할 수 있는 적합한 항원이며 또한 돼지, 개 편충의 체항원은 편충증 진단시 항원을 상호적으로 이용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Beer RJS. Morphological descriptions of the egg and larval stages of *Trichuris suis* Schrank, 1788. *Parasitol*, Dec. 67:263-278, 1973.
2. Beer RJS. Studies on the biology of the life-cycle of *Trichuris suis* Schrank, 1788. *Parasitol*, 67:253-262, 1973.
3. Beer RJS. The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. *Res Vet Sci*, 20:47-54, 1976.
4. Bellaby T, Robinson K, Wakelin D, et al. Isolates of *Trichuris muris* vary in their ability to elicit protective immune responses to infection in mice. *Parasitol*, 111: 353-357, 1995.
5. Bundy DAP, Lillywhite JE, Didier JM, et al. Age-dependency of infection status and serum antibody levels in human whipworm (*Trichuris trichiura*) infection. *Parasite Immunol*, 13:629-638, 1991.
6. Camilla B, Joakim O, Holmdahl M, et al. An indirect enzyme-linked immuno-assay(ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospira caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol*, 68:251-260, 1997.
7. Chan SW, Ko RC. Specificity of affinity-purified *Trichinella spiralis* antigens. *Vet Parasitol*, 41:109-120, 1992.
8. Deplazes P, Gottstein B, Stingelin Y, et al. Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens by ELISA in dogs. *Vet Parasitol*, 36:91-103, 1989.
9. Drake LJ, Bianco AE, Bundy DAP, et al. Characterization of peptidases of adult *Trichuris muris*. *Parasitol*, 109:623-630, 1994.
10. Else KJ, Richard K. Antibody-independent effector mechanisms in resistance to the intestinal nematode parasite *Trichuris muris*. *Infect Immunol*, 64:2950-2954, 1996.
11. Fetterer RH, Hill DE. The occurrence of phenol oxidase activity in female *Trichuris suis*. *J Parasitol*, 79:155-159, 1993.
12. Fetterer RH, Hill DE. Localization of phenol oxidase in female *Trichuris suis*. *J Parasitol*, 80:952-959, 1994.
13. Hale OM, Stewart TB. Influence of an experimental infection of *Trichuris suis* on performance of pigs. *J Anim Sci*, 49:1000-1005, 1979.
14. Hill DE, Gamble HR, Roads ML, et al. *Trichuris suis* : A Zinc M thallopeptase from culture Fluids of Adult Parasites. *Exp Parasitol*, 77:170-178, 1993.
15. Hill DE. Protective Antigens from culture Fluids of the Adult Swine Whipworm, *Trichuris suis*. *Research Investment Report(National Pork Producers council)*, 1996.
16. Hill DE, Romanowski RD, Urban JF. A *Trichuris* specific diagnostic antigen from culture fluids of *Trichuris suis* adult worms. *Vet Parasitol*, 68:91-102, 1997.
17. Hill DE, Sakanari JA. *Trichuris suis* : thiol protease activity from adult worms. *Exp Parasitol*, 85:55-62, 1997.
18. Homan WL, Anja CG, Derksen FK. Identification of diagnostic antigens from *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res*, 78:112-119, 1992.
19. Koyama K, Hidekazu Tamauchi, Yoichi Ito. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunol*. 17:161-165, 1995.
20. Lillywhite JE, Coper ES, Needham CS, et al. Identification and characterization of excreted/secreted products of *Trichuris trichiura*. *Parasite Immunol*, 17:47-54, 1995.
21. Needham CS, Lillywhite JE, Didier JM, et al. Age-dependency of serum isotype responses and antigen recognition in human whipworm (*Trichuris trichiura*) infection. *Parasite Immunol*, 15:683-692, 1993.
22. Prichard Roger Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*, 71:155-175, 1997.
23. Richards DT, Harris S, Lewis JW. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Vet Parasitol*, 59:39-51, 1995.
24. Roach TIA, Wakelin D, Else KJ, Bundy DAP Antigenic cross-reactivity between the human whipworm, *Trichuris trichiura*, and the mouse trichuroids *Trichuris muris* and *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol*, 10: 279-291, 1988.
25. Roach TIA, Else KJ, Wakelin D, McLaren DJ, Grecis RK. *Trichuris muris* : antigen recognition and transfer

- of immunity in mice by IgA monoclonal antibodies. *Parasite Immunol* . 13:1-12, 1991.
26. Roepstorff A, Murrell KD. Transmission dynamics of helminth parasites of pigs on continuous pasture : *Ascaris suum* and *Trichuris suis* . *Int J Parasitol* 27:563-572, 1997.
 27. Rutter JM, Beer RJS. Synergism between *Trichuris suis* and the microbial flora of the large intestine causing dysentery in pigs. *Infect Immunol* , 11:395-404, 1975.
 28. Singh S, Samantaray JC, Sigh N, Das GB, Verma LC. *Trichuris vulpis* infection in an Indian tribal population. *J Parasitol* , 79:457-458, 1993.
 29. Urban JF, Douvres FW. *In vitro* development of *Ascaris suum* from third- to fourth-stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture system. *J Parasitol* , 67:800-806, 1981.
 30. Urban JF, Alizadeh H, Romanowski RD. *Ascaris suum* : Development of intestinal immunity to infective second stage larvae in swine. *Exp Parasitol* , 66:66-77, 1988.
 31. 지차호, 박승준. 시험관내에서 돼지 회충(*Ascaris suum*) 합자충란(L₂)의 인공배양. *대한수의학회지*, 38:107-117, 1998.
 32. 지차호, 박승준. 시험관내에서 인공배양한 제3기 자충 및 성충을 이용한 구충효능 선발시험. *대한수의학회지*, 38:589-594, 1998.
-