

## 肝蛭症의 酵素免疫學的 診斷

全北大學校 獸醫寄生蟲學教室

李 宰 求 · 白 秉 杰 · 李 相 福

### 緒 論

反芻獸의 膽管에 寄生하는 肝蛭(*Fasciola* sp.)은 우리에게 막대한 經濟的 損失을 가져온다. 즉, 소가 이 寄生蟲에 感染됨으로써 食肉 및 牛乳의 損失은 물론 繁殖障害까지 일으킨다.

韓牛의 肝蛭 感染率은 地域이나 報告者에 따라 다름지만 河村(1915)의 最初 報告以來 지금까지의 報告들을 綜合, 分析 檢討하면 全國的인 感染率은 30%가 훨씬 넘으며(李 등, 1973), 經濟的인 損失은 무려 150 億圓 以上으로 推定되고 있다.

지금까지는 肝蛭症 診斷方法으로서 蟲卵檢査와 皮內反應을 實用的으로 適用하여 왔으나, 모두 理想的인 方法으로서 好評을 받고 있는 것은 아니다.

前者에 있어서 肝蛭이 寄生하고 있어도 蟲卵이 陰性인 경우가 있다. 즉, 幼若蟲은 產卵을 하지 않으며, 蟲體가 老衰하면 產卵數가 적으며, 膽管內壁의 肥厚, 狹窄, 膽石形成 등으로 因하여 蟲卵의 排泄이 困難하며, 소는 大量的 糞을 排出하기 때문에 小數의 肝蛭이 寄生하면 蟲卵 檢出이 困難하다.

免疫學的 診斷方法으로서 널리 實用化되고 있는 皮內反應도 偽陽性, 偽陰性이 있고 다른 寄生蟲과의 交叉反應, 驅蟲 後 8~9個月에도 陽性反應을 나타내므로 現症과 既往歷을 區別하는데 어려움이 있다.

近來에 이르러 特異性이나 感受性, 再現性이 우수하며, 簡單, 低廉, 迅速하게 適用할 수 있으며, 驅蟲 與否를 判定할 수 있는 方法으로 酵素免疫診斷法(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)이 寄生蟲 感染症을 診斷하는데 널리 이용되고 있지만 우리나라에 있어서는 肺吸蟲(Cho *et al.*, 1981), 肝吸蟲(梁 등, 1983; 1984; 李 등, 1981) 그리고 스파르가눔症(Kim *et al.*, 1984) 등에 대한 몇 例의 報告 밖에는 없다. 더구나 家畜의 寄生蟲症診斷에 대한 調查研究은 전혀 試圖된 바 없다.

그러므로, 著者 등은 畜牛의 肝蛭症을 ELISA로 集團檢診하여 그 感度 및 特異性을 調查하였기에 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 1. 抗原 調製

소의 膽管으로부터 採集한 肝蛭을 0.9%生理食鹽水로 3회 洗滌하여, 蟲體 1g을 얼음속의 乳鉢에 넣은 다음 다시 2ml의 生理食鹽水를 넣어 2時間 粉碎하였다. 이에 20ml의 生理食鹽水를 다시 넣어 震盪하여 4°C냉장고에 24時間 放置한 다음 4°C에서 10,000g으로 30分間 遠心分離하여 얻은 上清液을 抗原原液으로 使用하였으며, Lowry *et al.* (1951) method에 의하여 蛋白質을 定量하였던 바 0.8mg/ml이었다.

#### 2. 皮內反應 陰性血清의 反應上限值

家畜衛生研究所에서 製造한 肝蛭症 診斷用 抗原 0.2 ml을 소위 尾根部에 注射한 後 15分에 丘疹의 直徑이 10mm以下인 소로부터 血液을 採取하여 얻은 血清을 -20°C에 保管, ELISA로 吸光度를 測定하여 이의 平均+2×SD를 陰性反應基準의 上限 값으로 定하였다(以下 標準吸光度라고 稱함).

#### 3. 抗原의 感度

肝蛭蟲體로 調製한 抗原의 感度を 알기 위하여 全州 屠畜場에서 屠殺되고 있는 소의 總輸膽管으로부터 蟲體가 確認된 例의 血清을 ELISA로 吸光度를 測定한 다음 陰性反應 基準값보다 높게 나타난 例를 陽性으로 判定하여 抗原의 感度を 調査하였다.

#### 4. 野外에서의 肝蛭 感染率 調査

1984年 6월부터 11月 사이에 걸쳐 全州 屠畜場에서 屠殺되고 있는 소와 全羅北道 種畜場에서 飼育하고 있는 소 272마리로부터 採血한 다음 血清을 分離하여 -20°C에 保管, ELISA로 肝蛭 感染率을 調査하였다.

#### 5. ELISA 施術方法

Voller *et al.* (1976b)과 McLaren *et al.* (1978)의 方法을 약간 수정하여 施術하였다. 즉, 塗布緩衝液(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 2.93g, 증류수 1,000ml; pH 9.6)에 抗原原液을 1/200로 稀釋하여 EIA microtitration plate(Limbro社)의 각 구멍에 200μl의 抗原(蛋白質 4μg/ml)을 넣어 室溫에서 1晝夜 放置하여 抗原을 벽에 附着시켰다. 이를 Saline/Twee20液(NaCl 45g, Tween 20 2.5ml, 증류수 5,000ml)으로 洗滌하였으며, PBS(磷酸緩衝液; NaCl 170g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25.6g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·

2H<sub>2</sub>O 3.12g, 증류수 20,000ml; pH 7.6)을 PBS/Tween 20액(PBS 900ml, Tween20 0.45ml)으로 만들어, 試驗血清을 1/100으로 稀釋, 각 구멍에 200 $\mu$ l씩 넣고 이를 다시 36°C에서 2時間 放置한 다음 다시 Saline/Tween 20액으로 3回 洗滌하여 PBS/Tween20액으로 1/2,000로 稀釋된 peroxidase conjugated antiovine IgG rabbit (Cappel Lab. Co.) 200 $\mu$ l씩 넣어 37°C에 2時間 정치하여 3回 洗滌한 다음 基質溶液(原液; orthophenylendiamine 100mg, methanol 10ml, 使用液; 原液 1ml, 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05ml, 증류수 99ml) 200 $\mu$ l씩 넣고 30分後 20 $\mu$ l의 8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液을 넣어 反應을 停止시키고 492nm 波長에서 Gilford 260 spectrophotometer로 吸光度를 測定하였다.

抗原의 適正 稀釋倍率을 결정하기 위하여 抗原原液을 50, 100, 200, 300, 400, 500 그리고 600배로 稀釋한 다음 陽性血清과 皮內反應 陰性血清 各 3個씩을 100배로 稀釋, ELISA를 施行하여 吸光度를 測定하였다. 한편, 血清의 稀釋倍率을 결정하고자 抗原原液을 200:1로 稀釋한 後 陽性 및 陰性血清 3個씩을 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 및 400배로 稀釋하여 ELISA를 施行한 後 抗原과 血清間의 稀釋 段階別 陽 및 陰性間의 差異를 檢定하였다.

Table 1. Subjected cases tested by ELISA

Groups	Description	No. of cases
I	Negative cases of intradermal test for <i>Fasciola</i> sp.	27
II	Positive cases of intradermal test for <i>Fasciola</i> sp.	49
III	Cases of the presence of the adult flukes in the bile ducts	58
IV	Cases of hyperplastic cholangitis	33
V	Field survey cases for fascioliasis	272
Total		439

## 結 果

### 1. 抗原 및 血清의 稀釋 倍率

ELISA로 肝蛭의 免疫學的 診斷을 하는데 있어서 適正 抗原 및 血清의 稀釋倍率을 결정하고자 陽性 및 陰性血清 各 3個를 對象으로 ELISA를 施行하였다. 즉, 陽性血清과 陰性血清에 대한 抗原의 稀釋 倍率에 따른 吸光度의 變化는 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 陽性血清의 平均 ELISA값을 回歸直線化하면  $\log Y = -0.181 - 0.00127X$ , 陰性血清은  $\log Y = -0.578 - 0.000879X$  이었다. 이들 2개의 回歸直線을 比較하면, 陽性血清의 吸光度가 陰性血清의 것보다 有意하게 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 또한, 抗原의 各 稀釋段階에 있어서 陽性血清은 50배부터 200배까지는 有意的인 差異가 認定되

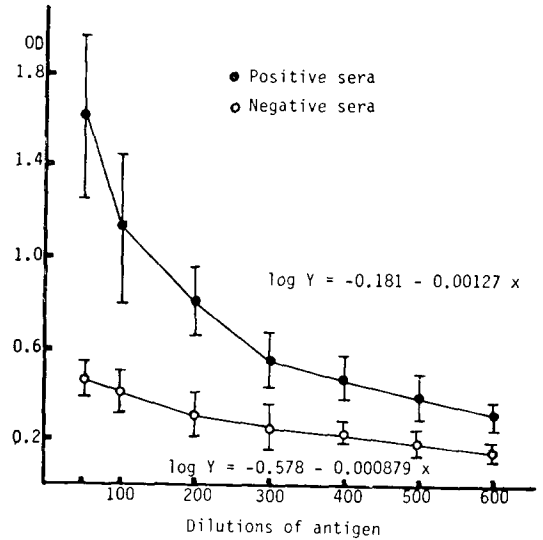


Fig. 1. Optimal dilution of antigen.

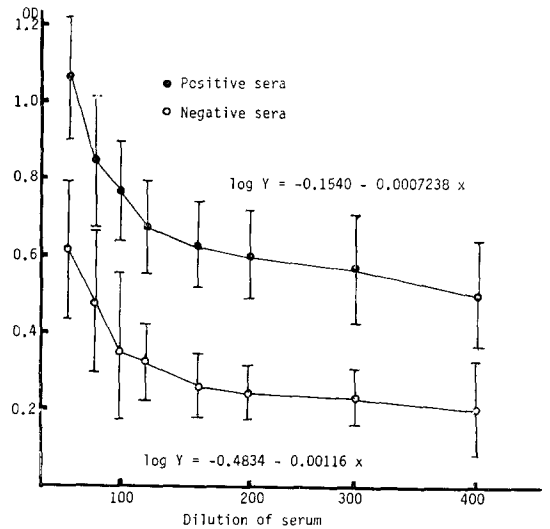


Fig. 2. Optimal dilution of serum.

었을뿐 300倍以上에서는 差異를 認定할 수 없었다. 그러나 陰性血清에 있어서는 抗原의 全稀釋段階에서 有意的 差異를 認定할 수 없었다.

肝蛭 感染 血清의 感度 決定에 사용하였던 標準吸光度인 0.7을 Y軸으로한 稀釋倍率 X軸의 截片값은 陽性血清 例에서는 250배이였으나 陰性血清 例에서는 Y軸 값이 0.7以下에서 截片되므로서 X軸값을 求할 수 없었다.

또한, 血清의 適正稀釋倍率을 결정하기 위하여 ELISA를 施行한 결과는 Fig. 2.와 같다. 즉, 陽性血清에 있어서 平均吸光度를 回歸直線化하면  $\log Y = -0.1540 - 0.0007238X$ , 陰性血清은  $\log Y = -0.4834 - 0.00116X$

로서 현저한 差異를 보였다( $p < 0.05$ ). 陽性血清과 陰性血清의 稀釋段階別 差異는 25 및 50倍 稀釋에서 認定되었을 뿐 그 以上 稀釋倍率에서는 有意의인 差異를 認定할 수 없었다( $p > 0.05$ ). 그러나, 標準吸光度 0.7을 Y軸으로한 X軸 截片값은 陽性血清에서는 100倍이었으며 陰性血清에서는 Y軸이 0.7以下이므로 X軸에서 適正 稀釋倍率을 결정할 수 없었다.

2. 皮內反應 陰性血清의 反應上限值

皮內反應 檢査에서 陰性으로 判定된 27頭 血清의 ELISA값은 平均  $0.447 \pm 0.144$ 이었으며 그 範圍는 0.7 ~ 0.15이었다. 陰性血清의 正規分布上 95% (平均 +  $2 \times SD$ )에 해당하는 吸光度 範圍( $0.447 + 2 \times 0.144$ )를 벗어난 例는 없었으므로 抗原의 肝蛭 陰性判定을 위한 特異性은 100%인 셈이다.

그러므로, 肝蛭症의 疫學的 調查를 위하여 實際의으로 應用하는데 있어서 ELISA값의 陽性 下限值를 0.7로 하였다.

3. 抗原의 蟲體陽性血清에 대한 感度

蟲體가 總輸膽管에서 確認된 58頭 血清의 ELISA값은 平均  $0.846 \pm 0.224$ 이었으며, 이는 皮內反應 陰性血清의 ELISA값  $0.447 \pm 0.144$ 보다 高度의 有意의인 差異( $t = 8.303, p < 0.001$ )를 나타내었다. 58頭의 蟲體陽性 例증에서 標準吸光度 0.7보다 높은 값 즉, 陽性判定 血清數는 44個로서, 抗原의 感度는 75%이었다.

4. 抗原의 皮內反應 陽性血清에 대한 感度

皮內反應 檢査에서 陽性으로 判定된 49頭의 ELISA값의 平均은  $0.695 \pm 0.156$ 으로서 皮內反應 陰性血清의 ELISA값과는 高度의 有意의인 差異( $t = 6.719, p < 0.001$ )를 나타내었으며, 標準吸光度 0.7보다 높은 例는 23頭로서 抗原의 感度는 46.93%이었다.

5. 抗原의 膽管肥厚例에 대한 感度

剖檢에서 33頭의 膽管 肥厚例의 血清에 대한 ELISA값의 平均은  $0.744 \pm 0.245$ 이었으며 皮內反應 陰性血清의 ELISA값보다 高度의 有意의인 差異( $t = 5.538, p < 0.001$ )를 나타냈으며 皮內反應 陽性血清과 蟲體 陽性血清사이에 있어서의 ELISA값과는 有意의인 差異를 認定할 수 없었다( $p > 0.05$ ). 抗原의 膽管 肥厚例의 血清에 대한 感度는 33頭중 20頭가 標準吸光度 0.7보다 높아, 60%의 感度를 나타내었다.

6. 野外에서의 肝蛭 感染度 調查

全羅北道內에서 飼育 또는 屠殺되고 있는 272頭의 소의 血清을 蒐集하여 ELISA를 통한 肝蛭 感染率을 調查한 結果는 Fig. 3에 表示한 바와 같다. 標準吸光度 0.7을 넘는 例는 118頭로서 43.38%이었으며, 吸光度別 分布는  $>1.3$  1.47%,  $>1.0$  9.13%,  $7.9 \sim 7.0$  및  $6.9 \sim 6.0$  各各 18.75%,  $<0.29$  1.47%이었다.

考 察

疾病 診斷에 있어서 光學 및 電子顯微鏡으로 細胞內 抗原을 索出하는데 免疫診斷法이 이용된 以來(Voller et al., 1976b), 體液內에서 水溶性 抗原과 抗體의 測定을 위한 放射免疫診斷法의 變法으로 酵素免疫診斷法이 開發되어 寄生蟲 疾患 診斷에도 적용되고 있다(李 등, 1981; Voller et al., 1976a; Ruitenbergh et al., 1977; 陳 등, 1983; 梁 등, 1984; Cho et al., 1981; Kim et al., 1984).

오늘날 寄生蟲에 대한 ELISA가 널리 이용되고 있지만 이의 陽性率은 調查者에 따라 약간의 差異가 있다. 즉, Long et al. (1981)은 單촌住血吸蟲 感染患者에 대하여 gel filtration, 加藤氏 厚層塗抹法, 放射免疫診斷法 및 酵素免疫診斷法을 比較 檢討하였던 바 陽性率은 各各 44.4%, 85%, 78% 그리고 68%이었다고 報告하였으나 Ito et al. (1983)은 은코세르카症 診斷에 있어서 ELISA와 間接血球凝集反應(IHA)을 比較하였던 바 ELISA가 IHA보다 感度가 높았으며 蛔蟲, 鞭蟲 및 鉤蟲 등과의 交叉反應은 거의 없었다고 한다.

우리나라에서는 소의 肝蛭症 診斷에 ELISA를 이용한 調查研究가 지금까지 전혀 없어, 著者 등은 Cho et al. (1981)의 方法에 準하여 肝蛭 蟲體를 粉碎하여 抗原을 製造하여 Voller et al. (1976b)과 McLaren et al. (1978)의 ELISA法에 準하여 약간 變形하여 施行하였다. 肝蛭 陰性血清을 얻고자 농촌진흥청 가축위생연구소에서 製造한 皮內反應 診斷液을 이용하여 27例의 陰性血清을 索出, LCISA를 遂行한 바 그 값은  $0.447 \pm 0.144$ 이었으며 正規分布上 95%에 해당(平均 +  $2 \times SD$ )하는 0.735를 벗어난 例는 전혀 없었다. 그러므로, 肝蛭 陽性血清의 標準吸光度를 便宜上 0.7로 결정함은 妥當할 것으로 생각되어 0.7보다 높으면 陽性, 낮으면 陰性으로 判定하였다.

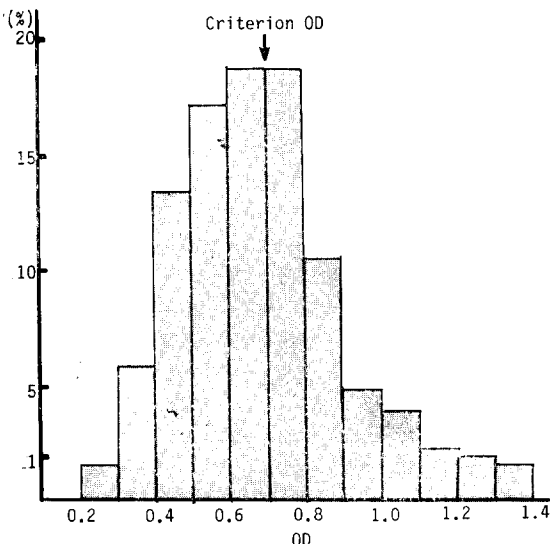


Fig. 3. Distribution of absorbance values from the 272 heads in field survey.

소의 膽管으로부터 肝蛭의 存在가 認定된 58例 血清의 ELISA값은  $0.846 \pm 0.224$ 이었으며, 이중에서 0.7보다 높은 예는 44頭로서 75%의 感度を 나타내었다. ELISA에 의한 各種 寄生蟲 診斷에 있어서 感度は 그 種類에 따라 差異가 있어 肝吸蟲 87%(李 등, 1981), 肺吸蟲 86%(Cho *et al.*, 1981) 그리고 *Onchocerca* 91.6%(Ito *et al.*, 1983)와 68%(Long *et al.*, 1981) 등의 調査報告가 있다. 本 調査例에 있어서는 그 感도가 75%로서 李 등(1981), Cho *et al.* (1981)의 것보다 낮은데 이는 아마도 抗原성이 낮거나 또는 抗原과 血清의 稀釋倍率의 異常이 아닌가 생각된다. 그리고, 抗原성은 血清의 冷凍方法과 保存期間에 영향을 받는다. 즉, 肝蛭 陽性 血清을 100:1로 稀釋한 다음 抗原을 50~600倍 稀釋, ELISA를 遂行하면, 50~200倍의 各 稀釋段階別로 有意的 差異를 보여주었으며 ( $p < 0.05$ ), 그 이상의 倍率에서는 有意的인 差異가 없었다. 그러므로, 낮은 稀釋倍率在 抗原성을 높이는데 效果의이라는 것을 알 수 있다. 그러나, 陰性血清에 있어서는 抗原의 各 稀釋段階에서 有意的인 差異를 認定할 수 없었다 ( $p > 0.05$ ). 또한, 血清의 稀釋倍率, 保存溫度와 保存期間 등도 ELISA값에 영향을 미친다. 즉, 抗原을 200:1로 稀釋한 다음 陽性 및 陰性血清을 25~400倍 稀釋, ELISA를 遂行하면 兩血清 모두 25倍와 50倍 稀釋段階에서 有意的인 差異를 가져왔으나 ( $p < 0.05$ ) 그 이상의 倍率에서는 有意성을 認定할 수 없었다. 물론 陽性 및 陰性血清의 ELISA값도 抗原 및 血清의 稀釋倍率에 따라 有意的인 差異를 認定할 수 있었다 ( $p < 0.01$ ). Voller *et al.* (1976a)은 ELISA를 시행하는데 있어서 *Toxoplasma* 및 *Babesia*는 200:1, 온코세르카症은 2,000:1로 血清을 稀釋하고 있다. 그러나, 抗原의 感度を 높이기 위해서는 寄生蟲別로 適正稀釋倍率을 決定, ELISA를 遂行할 必要가 있다고 생각된다.

血清을 比較의 低溫에서 오랫동안 冷凍保存하면 抗原성이 低下된다. 즉, 梁 등(1983)에 의하면 138명의 肝吸蟲 患者 血清을 1개월간 保管하면 83%, 6개월以上 3年 以內 保管시킨 224명의 患者 血清에서는 66%의 陽性率을 나타낸다고 하며 이는 血清의 保管溫度는 抗原, 抗體의 特異的 反應에 直接的인 影響을 미치고 있음을 證明한 셈이다. 또한, Moorhouse *et al.* (1981)에 의하면  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서 血清蛋白은 잘 冷凍되지 않으므로  $-40 \sim -60^{\circ}\text{C}$ 에서 變質될 수 있으며, 可能한 限 血清은 液體窒素( $-196^{\circ}\text{C}$ ), 氣化狀態( $-100^{\circ}\text{C}$ ) 또는 超冷凍器( $-90^{\circ}\text{C}$ )에 保管할 것을 권장하고 있다. 그러나, 本 例에 있어서는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 1~6개월간 保管, 使用함으로써 陽性率이 현저히 低下되지 않았나 생각된다.

抗原의 特異성을 높이기 위한 方法으로서 많은 學者들은 抗原을 精製, 使用하고 있다. 즉, Yogore *et al.* (1980)은 日本住血吸蟲卵을, Oldham(1983)은 肝蛭을 粉碎하여 Sephadex G 200으로, Hillyer *et al.* (1979)

은 Sephadex G 200과 Sephacryl S 200 등으로 各 크로마토그래피하여 特異抗原을 分離, 使用하였는가 하면, Cho *et al.* (1981)과 本例에서는 蟲體를 다만 粉碎한 原液을 그대로 使用하였다. 그리고, 梁 등(1983)은 肝吸蟲을 粉末抗原(50mg)으로 調製하여, 증류수로 稀釋한(1/80,000) 것과 綠十字社에서 製造한 肝吸蟲 皮內反應用 抗原(1/10,000)을 8倍로 稀釋하여 이의 特異성을 肝吸蟲 患者 16名의 血清으로 ELISA값을 比較하였던 바 粉末抗原은  $1.347 \pm 0.728$ , 皮內反應用 抗原은  $2.332 \pm 0.420$ 이었으며, 이의 陽性率은 62.5%와 100%이라고 報告하였다. 이 結果로 미루어 보아 抗原의 純粹分離가 寄生蟲症 診斷에 가장 큰 要因이 된다고 생각된다. Rotmans *et al.* (1981)은 單촌住血吸蟲에 있어서 蟲體를 粉碎하여 얻은 抗原과 蟲體의 分泌 또는 排泄物中에  $MW > 20,000$ 인 物質을 抗原으로하여 比較檢討하였던 바 分泌 및 排泄 物質중에는 anodic polysaccharide가 特異성을 높이므로, 抗原 選擇과 抗體 檢出과는 밀접한 關係가 있다. 또한, Rotmans 및 Delwel (1983)은 polystyrene microtitration plate에 0.1% N-ethyl-N-(3-dimethylamine propyl)-carbodiimide를 塗布하던 抗原抗體反應을 上昇시킨다고 하였다. Oldham (1983)은 肝蛭을 人工感染시킨 소 4頭의 血清을 對象으로 ELISA값을 調査한 바 個體에 따라 吸光度의 差異가 현저하게 나타나고 있어 소의 個體에 따라 抗體 形成量이 다르다는 것을 밝힌 바 있다.

抗原의 量 또한 報告者에 따라 差異가 있다. 즉, Cho *et al.* (1981)은 肺吸蟲으로부터 얻은  $5.3 \mu\text{g/ml}$ 의 蛋白質을 抗原으로 使用하였으며, Malaria  $2.5 \mu\text{g/ml}$  (Long *et al.* 1981), 肝蛭  $10 \mu\text{g/ml}$  (Hillyer *et al.*, 1983), *Aspergillus fumigatus*  $3 \mu\text{g/ml}$  (Richardon *et al.*, 1983) 그리고 日本住血吸蟲에 있어서 Yogore *et al.* (1981)은 蛋白質量을 1, 3, 5 그리고  $10 \mu\text{g/ml}$ 을 이용한 바 各段階에 있어서 큰 差異를 認定할 수 없어, 便宜上  $5 \mu\text{g/ml}$ 를 抗原量으로 결정하였으나 稀釋倍率在 낮으면 낮을수록 感도가 높게 나타난다고 한다. 本 例에 있어서  $4 \mu\text{g/ml}$ 은 適正量이었다고 생각되나 特異성을 높이기 위해서는 이의 精製 分離가 必要하겠다.

抗原과 血清의 適正稀釋倍率 檢定에서 血清을 100:1로 稀釋한 後 抗原을 50~600倍 稀釋, 肝蛭 陽性 및 陰性血清의 ELISA값을 回歸直線化하여 比較한 바 陽性血清에서는  $\log Y = -0.181 - 0.00127X$ , 陰性血清에서는  $\log Y = -0.578 - 0.000879X$ 로서 陽性血清의 ELISA값이 有意的으로 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 그리고, 血清稀釋倍率을 결정하는데 있어서 抗原을 200:1로 稀釋, ELISA를 遂行하면, 陽性血清의 各 稀釋段階는  $\log Y = -0.1540 - 0.0007238X$ , 陰性血清에서는  $\log Y = -0.4834 - 0.00116X$ 로서 역시 陽性血清에서 有意的으로 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 이들 回歸直線을 이용하여 陽性血清에 대한 ELISA를 遂行할 때 抗原 및 血清의 稀釋倍率을 결정하는데 있어서 Y軸을 吸光

도 0.7에 해당되는 X軸의 截片값에서 나타난 바와 같이 血清 100:1과 抗原 200:1稀釋倍率は 適正한 稀釋倍率이었다. 더욱이 陰性血清에 있어서 標準吸光度 0.7값에 해당되는 X軸에서의 截片값을 求할 수 없었던 점을 勘案한다면 肝蛭症 索出에 이용 가능성이 높다고 생각된다. 최근에 이르러 血清의 量은 ELISA값에 큰 영향을 미치지 않는다고 한다. 즉, Ito *et al.* (1983)에 의하면 血清과 濾紙에 血液을 數滴 묻힌 後 PBS/Tween 20에 稀釋한 것을 比較하였던 바 反應의 差異가 없었다고 한다( $r=0.97$ ).

소의 肝蛭症을 診斷하기 위한 抗原의 感度를 測定하기 위하여 皮內反應 陽性 및 陰性血清例, 膽管이 肥厚된 例 그리고 蟲體가 觀察된 例들의 血清을 대상으로 ELISA값을 調査한 바는 다음과 같다. 즉, 皮內反應 陰性血清 0.447±0.144, 陽性血清 0.695±0.156로서 陽性血清에서 有意인 差異로 높게 나타났으나( $p<0.01$ ). 陽性判定에 사용하였던 標準吸光度 0.7을 벗어난 例는 46.93%에 이르렀으며, 膽管이 肥厚된 例에 있어서는 0.744±0.245로서 皮內反應 陰性血清에서 보다도 有意의( $p<0.001$ )로 높았으며, 이의 標準吸光도를 벗어난 例는 60%에 불과하다. 이와같이, 肝蛭에 의한 增殖性 膽管炎이 認定되었음에도 불구하고 ELISA값이 낮았던 것은 아마도 驅蟲에 따른 抗體의 消失이라고 생각된다. 일찌기, Hillyer *et al.* (1979)은 肝蛭을 驅蟲하면 2주째부터 抗體量이 減少된다고 하였다.

한편, 皮內反應 陰性血清의 ELISA값의 正規分布上 95%에 해당하는 標準吸光度 0.7을 基準으로 하여 全羅北道 地域內의 소 272頭를 對象으로 ELISA값을 調査한 바 陽性率은 43.38%이었으나, 吸光度 分布에서 나타난 바와 같이 많은 例가 標準吸光度 前後에 걸쳐서 分布하고 있는 것을 勘案한다면 抗原의 純粹分離를 통한 特異抗原의 調製가 절대적으로 必要하며 더욱 나아가서는 血清의 保管方法도 역시 改善되어야 할 것이다.

### 結 論

우리나라 소에 있어서 重要 寄生蟲病의 하나인 肝蛭症의 診斷을 위한 免疫學的 診斷方法으로 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 遂行하였다. 肝蛭로부터 抽出한 水溶性 抗原에 대한 適正稀釋倍率, 特異性 그리고 感度를 檢討하고 全羅北道內 272頭 소의 肝蛭 感染率을 調査한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 抗原의 適正稀釋倍率을 결정하기 위하여 血清을 100:1로 稀釋한 後 抗原(0.8mg/ml)을 50~600倍로 稀釋, ELISA를 遂行한 吸光도를 回歸直線化하면 肝蛭 感染 陽性血清에서는  $\log Y = -0.181 - 0.00127X$ 이었으며, 陰性血清은  $\log Y = -0.578 - 0.000879X$ 로서 陽性血清의 吸光度가 높았다( $p<0.05$ ).

2. 血清의 適正稀釋倍率을 결정하기 위하여 抗原을 200:1로 稀釋(4 $\mu$ g/ml)한 後 血清을 25~400倍로 稀釋,

ELISA를 遂行한 吸光도를 回歸直線化하면 陽性血清에서는  $\log Y = -0.1540 - 0.0007238X$ , 陰性血清에서는  $\log Y = -0.4834 - 0.00116X$ 로서 陽性血清이 陰性血清보다 높았다( $p<0.05$ ).

3. 皮內反應 陰性血清 27例의 吸光度는 平均 0.447±0.144이었다. 95%正規分布時의 信賴限界(平均+2×標準偏差) 吸光度는 0.735이었으며, 이를 벗어난 例는 한 例도 없어 特異性은 100%이었다. 그러므로, 便宜上 0.7를 陽性判定 標準吸光度로 定하였다.

4. 標準吸光度에 따른 抗原(蛋白質量 0.8mg/ml)과 血清의 適正稀釋倍率은 抗原에서는 250倍, 血清에서는 100倍이었다.

5. 58例의 蟲體保有 血清의 吸光度는 平均 0.846±0.224이었으며, 標準吸光度 보다 높은 값을 나타낸 例는 75%(44例)이었으며, 그리고 33例의 膽管에서 增殖性炎이 觀察된 例에 있어서는 60%(20例)이었다.

6. 全羅北道內의 소 272頭에 대한 肝蛭感染率은 43.4%이었다.

### 參 考 文 獻

Cho, S.Y., Hong, S.T., Rho, Y.H., Choi, S. and Han, Y.C. (1981) Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis. *Korean J. Parasit.*, 19(2):151-156.

Hillyer, G.V. and Santiagode, W.N. (1979) Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica*. II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. *J. Parasitol.*, 65(5):680-684.

Ito, M., Lujan, T.A., Fukumoto, S. and Kamiya, M. (1983) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a diagnostic tool for Guatemalan onchocerciasis using a bovine filaria (*Onchocera gutturosa*) antigen and blood samples collected on filter paper. *Jpn. J. Vet. Res.*, 31:141-150.

陳成元, 李駿商, 林漢鍾(1983) 肝吸蟲 및 肺吸蟲症에 있어서 免疫動物 血清을 利用한 ELISA법과 Cuchterlony법의 比較研究. 高醫大論集, 20(1):191-199.

河村 了(1915) 南鮮家畜內寄生蟲種類調査表. 第3次牛疫血清製造所年報, 142-151.

Kim, H., Kim, S.I. and Cho, S.Y. (1984) Serological diagnosis of human sparganosis by means of micro-ELISA. *Korean J. Parasit.*, 22(2):222-228.

Long, E.G., McLaren, M., Gaddard, M.J., Bartholomew, R.K., Peters, P. and Goodgame, R. (1981) Comparison of ELISA, radioimmunoassay and stool examination for *Schistosoma mansoni* infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 75(3): 365-371.

李重根, 閔得映, 任敬一, 李根泰, 蘇鎮璋(1981) 간흡

- 충 감염 진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구. 연세의대 논문집, 14(1):133-147.
- McLaren, M., Draper, C.C., Roberts, J.M., Minter, G.E., Lighthart, G.S., Teesdale, C.H., Amin, M.A., Omer, A.H.S., Barlett, A. and Voller, A. (1978) Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 72(3):243-253.
- Moorhouse, P.D. and Hugh-Jones, M.E. (1981) Serum banks. *The Vet. Bull.*, 51(5):277-287.
- Oldham, G. (1983) Antibodies to *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. *Vet. Parasit.*, 13:151-158.
- 李宰求, 林秉武, 韓斗錫(1973) 全北地方 韓牛의 肝蛭 感染率 및 肝蛭症의 病理學的 所見에 關한 調査 研究. 全北大學校 農大論文集, 4:37-51.
- Richardson, M.D., Turner, A., Warnock, D.W. and Llewellyn, P.A. (1983) Computer assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. *J. Immunol. Meth.*, 56:201-207.
- Rotmans, J.P. and Delwel, H.R. (1983) Cross-linking of *Schistosoma mansoni* antigens and their covalent binding on the surface of polystyrene microtitration trays for use in the ELISA. *J. Immunol. Meth.*, 57:87-98.
- Rotmans, J.P., Van der Voor, M.J., Looze, M., Mooij, G.W. and Deelder, A.M. (1981) *Schistosoma mansoni*: use of antigens from excretions and secretions in immunodiagnosis. *Exper. Parasit.*, 52:319-330.
- Ruitenbergh, E.J. and Van Knapen, F. (1977) The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. *J. Infec. Dis.*, 136:267-273.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladehin, O. (1976a) A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Path.*, 29:150-153.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976b) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. World Health Organiz.*, 53:55-65.
- 梁正成, 李駿商, 林漢鍾(1983) 肝吸蟲症 診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 關한 研究. 高醫大論集, 20(1):201-209.
- 梁元容, 李駿商, 林漢鍊(1984) 肝吸蟲 感染 家兔에 있어서 感染強度, 經過 및 治療에 따른 ELISA 抗體價의 變動에 關한 實驗的 研究. 高醫大論集, 21(3):81-88.
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Blas, B.L. (1981) Shistosomiasis japonica in Barrio san Antonio, Bases, Samar, in the Phippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30(6):1252-1262.

## =Abstract=

**Application of Micro-ELISA in Serodiagnosis of Fascioliasis in Cattle**

Jae Ku Rhee, Byeong Kirl Baek and Sang Bork Lee

*Department of Veterinary Parasitology, Jeonbug National University, Jeonju 520, Korea*

Fascioliasis in cattle is one of the most common and very serious trematode diseases in Korea. In the present study, the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied in the diagnosis of fascioliasis using antigen of *Fasciola hepatica*, peroxidase of conjugate anti-cattle Ig G and orthophenylenediamine as a substrate by micro-method technique of Voller *et al.* (1976b) and MacLaren (1978) with a slight modification.

Results obtained from the present study are as follows:

1. In assay for optimal dilution of stock antigen, the antigen (protein contents; 0.8mg/ml) was diluted from 1/50 to 1/600 with carbonate buffer (pH 9.6), and then absorbance values were measured with 1/100 diluted sera. The regression equations between the OD values of ELISA and dilution of antigen were  $\log Y = -0.181 - 0.00127X$  in infected sera, and  $\log Y = -0.578 - 0.000879X$  in normal sera. The significantly higher ( $p < 0.05$ ) OD value was observed in the former.

2. In assay for optimal dilution of sera, the sera were diluted from 1/25 to 1/400 with in PBS/Tween 20 (pH 7.4), and absorbance values were measured with 1/200 diluted antigen. The regression equation between the OD values of ELISA and dilution of sera were  $\log Y = -0.1540 - 0.0007238X$  in infected sera and  $\log Y = -0.4834 - 0.00116X$  in normal sera. The former was higher than the latter ( $p < 0.05$ ).

3. In the 27 cases of negative intradermal test, OD values of the ELISA are  $0.447 \pm 0.144$ , the 95% confidence interval (Mean + 2 × SD) of the values was 0.735, and there was no case over the values. Therefore, the sensitivity of the antigen to diagnose fascioliasis was 100% in the negative case. The OD value 0.7 which is designed as a criterion (detection level of positive one) is useful for the performance of the ELISA in fascioliasis.

4. According to the OD value of criterion in the regression equations, the optimal dilutions of stock antigen and serum were 1/250 and 1/100, respectively.

5. In the 58 cases of fascioliasis from which the adult could be found in the bile ducts, the OD value was  $0.846 \pm 0.224$ . The 75% (44 cattle) among them had higher value with compared to the criterion, and the 60% (20 cattle) of the cases of proliferative cholangitis of 33 cattle which had been infected previously with *Fasciola* sp. is higher than the criterion.

6. Prevalence of fascioliasis was 43.4% in the application of the ELISA to 272 cattle which were reared in Jeonbug district.