

개회충에 감염된 생쥐에 있어서 시기별 단백분해효소 활성의 변동

계명대학교 의과대학 기생충학교실¹⁾, 고려대학교 의과대학 기생충학교실²⁾
주종윤¹⁾, 정명숙²⁾, 주경환²⁾

The dynamics of proteinase activity at different stages of toxocariasis in mice

Chong-Yoon Joo¹⁾, Myung-Sook Chung²⁾, Kyoung-Hwan Joo²⁾

Department of Parasitology¹⁾, Keimyung University School of Medicine, Taegu, 700-712,
Department of Parasitology²⁾, Korea University School of Medicine, Seoul, 136-705, Korea

= ABSTRACT =

Toxocariasis is a parasitic zoonosis caused by infestation of humans with larvae of *Toxocara canis*, the common roundworm in dogs. Two syndromes have been identified : visceral larva migrans and ocular toxocariasis. In this study we were characterized proteinase activity in crude extracts from liver, lung, kidney and heart of mice infected with *Toxocara canis* and the dynamics of their changes in different stages of disease. The optimal pH was 5.5. In liver of mice infected with *Toxocara canis*, the maximum activity of proteinase was observed in 5 day post infection. In lung, the activity reached its maximum on 5th day in A group (infected with 100 embryonated eggs), and on 5th week in B group (infected with 500 embryonated eggs). In kidney, the maximum activity was shown at 6th week in A group, and in B group was shown at 10th day. In early infection, the activity reached its maximum in heart of mice infected with *Toxocara canis*. As we could see, the dynamics of the changes of proteinase activity in mice is similar in the case of the disease with other biochemical and immunological indices observed in toxocariasis.

KEY WORDS : *Toxocara canis*, proteinase, activity, dynamics, mice

본 연구는 1997년도 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어 졌음.

I. 서 론

Toxocariasis(개회충증)은 개회충의 유충 *Toxocara canis* larva를 병원체로 하며, 개회충의 感染卵이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 증상으로 진단 및 치료가 곤란한 질환이다 (Seo, 1978).

전세계적으로 약 2백만 마리의 애완견 중에서 많은 개들이 개회충(*Toxocara canis*)에 감염되어 있으며(Glickman 과 Schantz 1981), 우리나라 농촌에서 키우는 개의 대부분이 개회충에 감염되어 있다고 알려져 있다. 인체에 나타나는 개회충증(toxocariasis)은 개회충 유충의 移行에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 移行은 visceral larva migrans(VLM)와 ocular toxocariasis의 원인이 된다. VLM(Beaver, 1969)은 발열, 호산구증다증(Beaver들 1952), 간비대증및 호흡장애등(Gillespie 1987; Glickman 과 Schantz 1981; Taylor등 1988)의 증상을 나타내며, ocular toxocariasis는 눈염증을 일으켜 망막에 손상을 주거나, 시각장애를 일으킨다(Gillespie 1987; Glickman 과 Schantz 1981; Pollard등 1979). 그러나 정확히 진단하기가 매우 어렵다.

기생충 단백질 분해효소는 숙주의 조직 침입시, 숙주 면역 반응으로부터의 회피기전으로, 또는 혈액응고 반응에 대한 방어에 이용되고 있는데(McKerrow, 1989) 개심장사상충(Wesley등, 1987), 스파르가눔(Kong등, 1994)에서 IgG를 분해하는 cystein 단백질 분해효소가 발견되었으며 람블편모충(Brian 과 Jonathan 1993), 이질아메바 (David, 1989)와 같은 원충류에서 IgA 를 분해하는 단백질 분해효소가 있음을 보고하였다. 조직에 기생하는 원충류들은 조직을 뚫을 수 있는 단백질 분해 효소를 이용하여 감염시 피부를 침투, fibrinogen을 소화하여 영양분을 획득하면서 기생하는 것으로 알려져 있다. 이들 조직 기생성 원충류에 대하여 최근에 이 기생충들에 존재하는 활성 효소에 대한 조사가 진행되고 있으며, 조직침범에 의해 감염되는 기생충종 흡충류의 주혈흡충 (Chappell 과 Dresden, 1986 ; Zerdad등, 1988 ; Chappell등, 1990 ; Rege등, 1992 ; Yoshino등, 1993) 및 폐흡충 (Song 과 Dresden 1990)의 단백질 분해 효소에 대한 연구가

있으며, 간질에 대하여도 연구된 바 있다(Simpkin 등, 1980 ; Dalton 과 Hefferman, 1989 ; Rege등, 1989). 선충류에 관한 연구가 보고 되었다 (Knox 와 Kennedy 1988 ; Robertson등, 1989 ; Sakanari 와 McKerrow, 1990 ; Morris 와 Sakanari 1994 ; Young등, 1995 ; 임등 1997). 그러나 개회충의 단백질 분해효소에 대한 연구는 미미하다.

이 연구에서는 우리나라 농·어촌지역에서 문제가 될 것으로 생각되는 개회충에 대하여 개회충에 감염된 생쥐의 각 장기에서 시기별로 단백질 분해효소의 활성을 측정하여 변화되는 양상을 알아 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 개회충의 실험적 감염

개회충(*Toxocara canis*)에 감염된 개에서 성충을 수집한 후 수정란을 분리하여 생리식염수로 세척하여 0.2% formalin/saline에서 자충포장란이 될 때까지 배양하였다.

자충포장란 100개(A 군), 500개(B 군)씩을 각각 100마리의 생쥐에 경구감염시켰다.

2. 각 장기의 적출 및 효소시료 조제

감염 후 1주 부터 10 주까지 1 주일 간격으로 생쥐 5마리에서 각각 간, 신장, 심장 및 폐장을 적출하였다. 대조군으로 감염되지 않은 생쥐에서도 각 장기를 적출하였다.

각 장기와 0.1 M 인산완충액 (pH 7.2) 의 비를 1:4로 하여 4℃에서 마쇄한 다음 60 분간 20,000 g에서 원심분리하였다. 상층액을 채취하여 효소 시료로 사용 하였으며, 활성을 측정할 때까지 -60℃에서 보관하였다.

3. 효소활성도 측정

단백분해 효소의 활성도는 McKerrow 등 (1985)에 의해 측정하였다.

각 장기에서 분리 추출한 단백질 분해 효소의 활성도는 기질로 azocasein 을 사용하여 37℃, pH 8

위 3.5-8.5에서 측정하여 최적 pH를 측정하였다.

완충액 50 μ l 에 1% (w/v) azocasein 100 μ l 를 첨가하고 측정하고자 하는 효소 50 μ l 를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation 하였다. Trichloroacetic acid 200 μ l 가하고 실온에서 10 분간 방치한 후 10,000g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었으며, 상층액에 0.5 N NaOH 2.4ml 를 첨가하여 420nm 에서 흡광도를 측정하였다.

흡광도 변화로써 단백질 분해효소의 활성을 관찰하였다.

III. 실험성적

1. 완충용액의 최적 pH

장기에서 추출한 효소 활성의 최적 pH를 조사하였다. 활성은 완충용액의 pH 의 변화에 따라 변화되었으며 최적 pH는 5.5 이었다 (Fig. 1).

2. 각 장기에서의 활성도 변화

100개 감염시킨 생쥐 간에서 추출한 단백질분해효소의 활성 변화는 감염 후 5일 제 가장 높았으며, 점차 감소하다가 6주 제 약간 증가하였으며

다시 감소하기 시작하였다. 500개 감염시킨 생쥐 간에서의 활성 변화도 감염 후 5일 제 가장 높았으며, 그 후로는 거의 일정하였으나 5주 제 약간 높은 활성을 나타내었다 (Table 1).

100개 감염시킨 생쥐 균의 폐에서 추출한 단백질분해효소의 활성은 감염 후 5일 제 가장 높았으나 시기별로 거의 비슷한 활성을 나타내었으며, 500개 감염시킨 균에서는 시기별로 거의 비슷한 양상을 보이다가 5주 제에서 가장 높았다 (Table 2).

신장에서 활성 변화는 100개 균에서 감염 후 거의 일정하게 변화하다가 5주부터 증가하기 시작하여 6주 제가 가장 높았으며 그후는 감소하였다. 500개 균에서는 감염 초기인 10일, 5일에서 높은 활성을 나타내었으나, 감염 후 10주 제까지 비슷한 활성을 나타내었다 (Table 3).

심장에서 활성도 변화도 감염 초기에서 높은 활성을 나타내었으며, 그후는 활성이 감소하였으며, 10주 제까지 비슷한 활성을 나타내었다 (Table 4).

대조군에서는 단백질분해효소의 활성변화가 거의 없었다.

한편 추출한 단백질분해효소 활성은 감염강도에 대해서 변화가 거의 없었다.

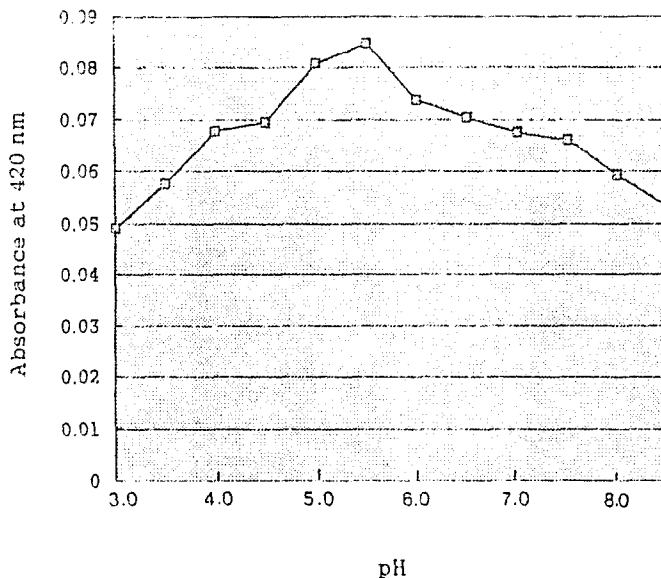


Fig. 1. The optimal pH for proteolytic enzyme activity in mice kidney infected with *T. canis*.

Table 1 The chronological changes of absorbance at 420 nm as proteinase activity in mice liver infected with *T. canis* measured with azocasein as substrate at pH 5.5

Days	A group*	B group**	non-infected
5 d	0.0465 ± 0.0009	0.0464 ± 0.0019	0.0227 ± 0.0011
10 d	0.0338 ± 0.0018	0.0391 ± 0.0009	0.0218 ± 0.0014
15 d	0.0325 ± 0.0031	0.0347 ± 0.0014	0.0211 ± 0.0011
3 w	0.0354 ± 0.0031	0.0358 ± 0.0021	0.0226 ± 0.0015
4 w	0.0327 ± 0.0011	0.0357 ± 0.0011	0.0208 ± 0.0012
5 w	0.0357 ± 0.0023	0.0416 ± 0.0016	0.0204 ± 0.0009
6 w	0.0381 ± 0.0008	0.0348 ± 0.0041	0.0228 ± 0.0014
7 w	0.0369 ± 0.0007	0.0352 ± 0.0008	0.0192 ± 0.0008
8 w	0.0366 ± 0.0027	0.0359 ± 0.0016	0.0218 ± 0.0012
9 w	0.0373 ± 0.0038	0.0346 ± 0.0027	0.0211 ± 0.0013
10 w	0.0363 ± 0.0024	0.0344 ± 0.0021	0.0192 ± 0.0011

* Infected with 100 embryonated eggs

** Infected with 500 embryonated eggs

Table 2 The chronological changes of absorbance at 420 nm as proteinase activity in mice lung infected with *T. canis* measured with azocasein as substrate at pH 5.5

Days	A group*	B group**	non-infected
5 d	0.0749 ± 0.0029	0.0513 ± 0.0017	0.0390 ± 0.0024
10 d	0.0543 ± 0.0028	0.0531 ± 0.0009	0.0351 ± 0.0021
15 d	0.0556 ± 0.0026	0.0511 ± 0.0007	0.0407 ± 0.0029
3 w	0.0551 ± 0.0017	0.0585 ± 0.0015	0.0409 ± 0.0025
4 w	0.0488 ± 0.0017	0.0541 ± 0.0008	0.0415 ± 0.0017
5 w	0.0567 ± 0.0031	0.0635 ± 0.0046	0.0397 ± 0.0019
6 w	0.0581 ± 0.0028	0.0515 ± 0.0011	0.0391 ± 0.0024
7 w	0.0521 ± 0.0017	0.0496 ± 0.0018	0.0349 ± 0.0021
8 w	0.0517 ± 0.0019	0.0507 ± 0.0026	0.0411 ± 0.0021
9 w	0.0306 ± 0.0024	0.0524 ± 0.0017	0.0397 ± 0.0021
10 w	0.0548 ± 0.0021	0.0491 ± 0.0011	0.0389 ± 0.0023

* Infected with 100 embryonated eggs

** Infected with 500 embryonated eggs

Table 3 The chronological changes of absorbance at 420 nm as proteinase activity in mice kidney infected with *T. canis* measured with azocasein as substrate at pH 5.5

Days	A group*	B group**	non-infected
5 d	0.0557±0.0019	0.0587±0.0019	0.0254±0.0021
10 d	0.0505±0.0018	0.0632±0.0002	0.0241±0.0014
15 d	0.0515±0.0024	0.0561±0.0014	0.0216±0.0021
3 w	0.0510±0.0021	0.0526±0.0041	0.0222±0.0017
4 w	0.0512±0.0021	0.0473±0.0007	0.0270±0.0022
5 w	0.0658±0.0043	0.0539±0.0016	0.0262±0.0019
6 w	0.0795±0.0018	0.0464±0.0021	0.0268±0.0014
7 w	0.0510±0.0027	0.0448±0.0018	0.0263±0.0018
8 w	0.0486±0.0017	0.0459±0.0016	0.0241±0.0022
9 w	0.0491±0.0028	0.0464±0.0027	0.0216±0.0018
10 w	0.0475±0.0034	0.0469±0.0021	0.0222±0.0021

* Infected with 100 embryonated eggs

** Infected with 500 embryonated eggs

Table 4 The chronological changes of absorbance at 420 nm as proteinase activity in mice heart infected with *T. canis* measured with azocasein as substrate at pH 5.5

Days	A group*	B group**	non-infected
5 d	0.0611±0.0031	0.0464±0.0007	0.0284±0.0009
10 d	0.0561±0.0018	0.0488±0.0004	0.0286±0.0006
15 d	0.0471±0.0011	0.0459±0.0006	0.0299±0.0007
3 w	0.0514±0.0018	0.0477±0.0011	0.0298±0.0024
4 w	0.0427±0.0021	0.0439±0.0005	0.0293±0.0012
5 w	0.0476±0.0023	0.0406±0.0013	0.0295±0.0009
6 w	0.0433±0.0018	0.0394±0.0011	0.0302±0.0004
7 w	0.0354±0.0007	0.0355±0.0018	0.0281±0.0005
8 w	0.0389±0.0013	0.0405±0.0006	0.0286±0.0009
9 w	0.0381±0.0008	0.0364±0.0007	0.0299±0.0011
10 w	0.0416±0.0014	0.0401±0.0011	0.0298±0.0025

* Infected with 100 embryonated eggs

** Infected with 500 embryonated eggs

IV. 고 찰

조직에 기생하는 유훁류들은 조직을 뚫을 수 있는 단백분해 효소를 이용하여 감염시 피부를 침투, fibrinogen을 소화하여 영양분을 획득하면서 기생하는 것으로 알려져 있다. 이들 조직 기생성 유훁류에 대하여 최근에 이 기생충들에 존재하는 활성 효소에 대한 조사가 진행되고 있으며, 조직 침범에 의해 감염되는 기생충종 흡충류의 주혈흡충 (Chappell 과 Dresden, 1986 ; Zerda 등, 1988 ; Chappell 등, 1990 ; Rege 등, 1992 ; Yoshino 등, 1993) 및 폐흡충 (Song 과 Dresden 1990)의 단백분해 효소에 대한 연구가 있으며, 간질에 대하여도 연구된 바 있다 (Simpkin 등, 1980 ; Dalton 과 Hefferman, 1989 ; Rege 등, 1989). 또한 선충류에 관한 연구가 보고 되었다 (Knox 와 Kennedy 1988; Robertson 등, 1989; Sakanari 와 McK errow, 1990 ; Morris 와 Sakanari 1994 ; Young 등, 1995 ; 임 등 1997).

Robertson 등 (1989)은 개회충 분비물에서 단백질 분해효소에 관하여 연구한 바 최적 pH는 9라고 하였으며, 그 다음으로 pH 5와 7에서 활성을 나타내었다고 하였다. 임 등 (1997)은 조직기생 선충류 유충에서 분리한 단백질 분해효소에 관하여 검토하였는데 개회충의 단백질 분해효소의 최적 pH는 5.5였다고 하였다. 이 결과들은 본 연구와 유사하였다.

Hadas 등 (1994)은 선모충에 감염된 생쥐의 근육에서 시기별로 단백질 분해효소의 활성을 측정하여 최적 pH는 5.5와 7.5임을 보고하였으며, 단백질 분해효소의 최고 활성을 나타내는 시기는 감염 후 5주-6주였다고 하였다. 한편 감염 후 6주부터는 점차 감소하기 시작하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 신장에서 추출한 단백질 분해효소가 감염 후 6주 째에 100개 감염군에서 최고의 활성을 나타내었다.

단백 분해 효소에 관한 연구는 많이 있었으나, 감염 시기별 감염부위에서의 단백질 분해 효소에 대한 연구는 거의 없었다.

본 연구에서는 개회충에 감염된 생쥐의 각 장기에서 단백질 분해 효소의 활성을 검토하고자 하였

다. 그 결과 100개 및 500 감염시킨 생쥐 간에서의 활성 변화는 감염 후 5일 째 가장 높았으며, 그 후로는 거의 일정하였다. 100개 감염 시킨 생쥐 군의 폐에서 추출한 단백질 분해효소의 활성은 감염 후 5일 째 가장 높았으며, 500개 감염시킨 군에서는 5주 째에서 가장 높았다. 신장에서의 활성 변화는 100개 군에서는 감염 후 6주 째가 가장 높았으며, 5주, 5일째의 순이었다. 500개 군에서는 감염 초기인 10일, 5일에서 높은 활성을 나타내었으며, 감염 후 10주 째까지 비슷한 활성을 나타내었다. 심장에서의 활성도 변화도 감염 초기에서 높은 활성을 나타내었으며, 10주 째까지 비슷한 활성을 나타내었다. 대조군에서는 변화가 거의 없었다.

단백분해효소의 활성은 개회충 유충이 각 장기로 이행하는 정도에 따라 변할 것이라 생각한다. Carter (1992)는 방사성 동위원소(^{35}S)를 이용하여 방사능의 활성으로 시기별로 각 장기에서 개회충 유충이 검출되는 정도를 연구하였는데 간에서는 감염 후 4일에 최고치에 도달하였고 점차 감소하기 시작하였으며, 뇌에서는 점차 증가한다고 하였다. Bardon 등 (1994)은 감염 후 63일 이 지난 후 개회충 유충의 분포를 알아보았는데 뇌에서 가장 많이 발견되었으며 그다음으로 간, 폐의 순이었다. 시기가 오래될수록 뇌에서 많이 발견되는 것을 볼 수 있으나 본 실험에서는 뇌에서의 단백질 분해 효소의 활성도는 측정하지 않았다. 차후에 해 보아야 할 것 같다. Epe 등 (1994)은 숙주간에 있어서 차이를 보았는데 BALB에서는 감염 후 12일에 간에서 가장 많이 발견되었으며, C3H에서는 감염 후 8일에 간에서 가장 많이 발견되었다. 폐에서는 각 숙주마다 시기별 차이는 거의 없었으나 DBA, C3H 및 NMR1 생쥐에서 감염 후 4일에서 많이 발견되었다. 이 결과는 본 실험의 결과와 상당히 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 한편 감염 강도에 따른 유충의 분포를 Havasiova-Reiterova 등 (1995)이 관찰한 바 간에서는 감염 강도에 무관하였으며, 뇌 및 근육에서는 감염 강도가 클수록 많은 수의 유충이 관찰되었다. Parsons 와 Grieve (1990)도 감염 강도의 영향을 C57BL/6J 생쥐의 간에서 관찰하였는데 25개 미만군에서는 감염 후 7, 14 및 21일에 유충을 관

찰할 수 없었으며, 75 - 250 개 군에서는 거의 같은 수의 유충을 발견할 수 있었다. 본 실험에서도 감염강도에 따른 변화 즉 100개 감염군과 500개 감염군에서 단백분해효소 활성의 변화가 거의 없었다.

Crandall 과 Crandall (1972), Kagan 과 Norman (1970)은 선모충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 시기에 대하여 10일 전후라고 하였으나 박병연 등 (1995)은 ELISA법을 이용하여 IgG 가 유의성 있게 증가하는 것은 감염 후 6일 부터였다고 하였다. 최규홍등 (1994)은 토끼에 대한 고래회충의 실험적 감염 후 IgM이 유의성 있게 증가하는 것은 5일에서 7일 사이에 처음 감지되며, 약 20일간 지속된다고 하였으며, IgG는 IgM 보다 2일 정도 늦게 양성으로 판별된다고 하였다. Yang등 (1991)은 역시 고래회충의 실험적 감염 후 IgM의 변화를 ELISA로 관찰한 바 감염 6일 째부터 양성으로 되어 감염 19일 까지 지속된다고 한 바 있다. Tsuji (1989)에 의하면 ELISA를 이용하여 고래회충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 최초의 시기가 10일에서 20일 사이라고 하였다. 주종윤등(1998)은 성충항원을 이용하여 토끼 개회충증 진단에 이용한 바 감염 후 10, 14일 이후부터 양성범위에 들기 시작하였다고 하였다. 본 연구에서 단백분해효소의 활성이 최고치를 나타내는 시기는 5일 및 10일째로 나타난 결과와 상관성이 있는 것 같다.

이상에서 각 장기에서의 단백분해효소 활성은 유충의 이행과 깊은 관계가 있으며, 단백분해효소가 항원으로서도 작용하므로 항체 형성과도 깊은 관계가 있음을 알 수 있었다.

V. 요약 및 결론

개회충증은 개회충의 感染卵이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 증상으로 인체에 나타나는 개회충증은 개회충 유충의 이행에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 이행은 visceral larva migrans(VLM)와 ocular toxocarasis의 원인이 된다. 이 연구에서는 개회충에 감염된 생쥐의 각 장기에서 시기별로 단백 분해효소의 활성을 측정하여 개회충이

분비하는 단백분해효소에 대하여 알아 보고자 하였다. 개회충 총란을 100개 및 500개 감염 시킨 생쥐 군의 각 장기(간, 폐, 신장, 심장)에서 시기별로 단백분해효소의 활성을 측정 한 결과는 다음과 같다. 단백분해효소의 최적 pH는 5.5이었다. 100개 및 500개 감염시킨 생쥐 간에서의 활성 변화는 감염 후 5일 때 가장 높았으며, 그 후로는 거의 일정하였다.

100개 감염시킨 생쥐 폐에서 추출한 단백분해효소의 활성은 감염 후 5일 때 가장 높았으며, 500개 감염시킨 군에서는 5주 째에서 가장 높았다. 신장에서의 활성 변화는 100개 군에서는 감염 후 6주 째가 가장 높았으며, 5주, 5일째의 순이었다. 500개 군에서는 감염 초기인 10일, 5일 후에서 높은 활성을 나타내었으며, 감염 후 10주 째까지 비슷한 활성을 나타내었다. 심장에서의 활성도 변화도 감염 초기에서 높은 활성을 나타내었으며, 10주 째까지 비슷한 활성을 나타내었다.

한편 추출한 단백분해효소 활성은 감염강도에 대해서 변화가 거의 없었다.

이상에서 각 장기에서의 단백분해효소 활성은 유충의 이행과 깊은 관계가 있으며, 단백분해효소가 항원으로서도 작용하므로 항체 형성과도 깊은 관계가 있음을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. 임한중, 주경환, 최성아, 이혜정, 주종윤, 정명숙, 조직기생 선충류 유충에서 분리한 단백분해 효소의 특성 및 항원성 검토, 한국농촌의학 회지 1997 ; 22(1) : 61-74.
2. 주종윤, 김문규, 정명숙, 개회충 성충항원을 이용한 실험적 토끼 개회충증 혈청항체의 측정, 계명대의논문집 1998 ; 17 : 202-212.
3. 최규홍, 정명숙, 주경환, 임한중, Gel 여과한 아나사키스 유충항원의 Immunoblot 분석, 고 의대의논문집 1994 ; 31(3) :365-376.
4. 탁병연, 정명숙, 주경환, 김수진, Immunoblot 와 면역황금 표지법을 이용한 선모충 특이항 원 분석, 고의대의논문집 1995 ; 32(1) :55-70.
5. Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT and Rockey JH. *Analysis of Toxocara canis*

- larval excretory-secretory antigens: physico-chemical characterization and antibody recognition. *J Parasitol* 1987 ; 73 : 593-600.
6. Beaver PC. The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969 ; 55 : 529-539.
 7. Beaver PC, Synder CH, Carrera GM, Dent JH and Lafferly JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics* 1952 ; 9 : 7-10.
 8. Brain LK, Jonathan IR. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J infect Dis* 1993 ; 168 : 1319-1322.
 9. Carter KC. The use of ³⁵S-labelled *Toxocara canis* to determine larval numbers in tissues. *J Helminthol* 1992 ; 66 : 279-287.
 10. Crandall RB and Crandall CA. *Trichinella spiralis* : Immunologic response to infection in mice. *Exp Parasitol* 1972 ; 31 : 378-386.
 11. David MP. Characterization of thiol proteases in *Giardia lamblia*. *J. Infect Dis* 1989 ; 160 : 1076-1080.
 12. Epe C, Sabel T, Schnieder T and Stoye M. The behavior and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains. *Parasitol Res* 1994;80:691-695
 13. Gillespie SH. Human toxocariasis. A review. *J. Appl.Bact* 1987 ; 63: 473-479.
 14. Hadas D, Kerda M, Boczon K and Wansurska-Nowak E. Biochemical investigations of the dynamics of proteinase activity at different stages of trichinellosis in mice. *Polskie Towarzystwo Parazytologiczne* 1994 ; 40(4) : 329-335.
 15. Kagan IC and Norman C. The serology of trichinosis in : *Trichinosis in man and animals* (SE Gould, ed) Illinois Charles C Thomas Springfield 1979 ; p 222.
 16. Knox DP and Kennedy MW. Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum* and their inhibition by antibody. *Mol Biochem Parasitol* 1988 ; 28 : 207-216
 17. Kong Y, Chung YB, Cho SY, Karf SY. Cleavage of immunoglobulinG excretorysecretory cathepsin S-like protease of *Spirometra mansoni* plerocercoid. *Parasitol* 1994 ; 109 :611-621.
 18. Maizels RM, de Savigny DH and Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Imm* 1984 ; 6:23-37.
 19. Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD and Smith HV. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secrete epitopes of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987 ; 139:207-214.
 20. McKerrow JH, Jones P, Sage H and Piano-Heisse H. Proteinase from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement membrane molecules. *Biochem J* 1985 ; 231 : 47-51.
 21. McKerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989 ; 68 : 111-115.
 22. Meghji M and Maizels RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory(ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* 1986 ; 18:155-170.
 23. Morris SR and Sakanari JA. Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor for the tissue penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J Bio Chem* 1994 ; 269 (44) : 27650-27656.
 24. Pollard ZF, Jarret WH, Hagler WS, Allain DS and Schantz PM. ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis. *Ophthal* 1979 ; 86:743-752.
 25. Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z and Malzeis RM. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol* 1988 ; 74 :236-241.
 26. Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH and Maizels RM. *Toxocara canis* : Proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in

- vitro. *Exp Parasitol* 1989 ; 69 : 30-36.
27. Sakanari JA and McKerrow JH. *Identification of the secreted neutral proteases from Anisakis simplex*. *J Parasitol* 1990 ; 76(5) : 625-630.
 28. Seo BS : *Clinical Parasitology*. Seoul, Il Cho Kuk. 1978 : 172-173.
 29. Tsuji M. *Serological and immunological studies*. In Ishikawa H (ed) *Gastric anisakiasis in Japan* Tokyo Springer Verlag 1989:1
 30. Wesley K, Tamashiro, Mangala R, Alan LS. *Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes*. *J Parasitol* 1987 ; 73 : 149-154.
 31. Yang HJ, Cho YJ and Paik YH. *Changes of IgM and IgG antibody levels in experimental rabbit anisakiasis as observed by ELISA and SDS-PAGE immunoblot*. *Korean J Parasitol* 1991 ; 29 : 389-396.
 32. Young CJ, McKeand JB and Knox DP. *Proteases released in vitro by the parasitic stages of *Trichostrongylus circumcincta*, an ovine abomasal nematode*. *Parasitology* 1995 ; 110 : 465-471.