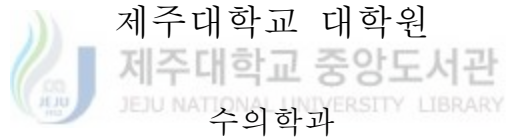


석사학위논문

개 심장사상충증 신속진단법 개발



이 주 율

2003年 6月

개 심장사상충증 신속진단법 개발

지도교수 임윤규

이 주 율

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2003년 6월

이주율의 수의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____(인)

위 원 _____(인)

위 원 _____(인)

제주대학교 대학원

2003년 6월

초 록

개 심장사상충증 신속진단법 개발

(지도교수 : 임윤규)

이 주 율

제주대학교 대학원

수의학과

개의 심장사상충증(dirofilariasis)을 진단하기 위한 면역학적 진단법을 개발하였다. 이를 위하여, 증체항원(somatic antigen)과 분비항원(excretory/secretory antigen)을 준비하여 BALB/c 마우스에 접종하였다. 면역된 BALB/c 마우스의 비장세포를 취하여 골수암 세포(SP/2)와 융합시켜 단클론항체를 분비하는 잡종세포주를 개발하였다.

개발된 3종의 IgM type 및 1종의 IgG type 단클론항체는 심장사상충 감염 혈청 중의 14 및 19kDa의 단백질과 특이적인 결합 반응을 보였다.

선정된 단클론항체의 조합으로 개발한 ELISA와 Immunochromatography assay법으로 표준혈청 61건을 검사하였을 때 민감도와 특이도는 2가지 방법 공히 각각 100%로 나타났다.

주요어 : Canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, Monoclonal antibody, ELISA, colloidal gold, Immunochromatography

목 차

I. 서	론.....	1
II. 재료 및 방법.....		4
III. 결	과.....	27
IV. 고	찰.....	39
 제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY		
V. 결	론.....	41
VI. 참 고 문 헌.....		42
	영문초록.....	46

I. 서 론

개 심장사상충증(Canine heartworm disease: dirofilariasis)의 원 인체는 *Dirofilaria immitis*로서, 개 뿐 아니라 고양이, 여우, 바다표범, 곰 및 오랑우탄에게도 기생하는 선충류이다.

개 심장사상충은 남부유럽지역, 인도 및 중국 등 동남아시아, 한국과 일본 등 극동지역, 호주, 북미, 남미 및 중미 지역 등 거의 전세계의 모든 국가에서 발병하고 있다(Wang, 1997). 국내의 개 중 약 10%~20%가 심장사상충에 감염되어 있다고 하였다(이, 1996; 서, 2001).

심장사상충 성충의 수컷은 12~16cm 정도이고, 암컷은 그 보다 긴 25~30cm정도이다. 형태는 유백색의 소면모양을 띄고 있는데, 전단은 둔원이며 4쌍의 작은 유두가 있다. 꼬리에는 작은 측익이 있고 보통 5쌍의 난형 유두를 가진다. 그 중 1쌍은 총배설강 후유두이며 2쌍의 손가락 모양의 유두는 말단부근에 위치한다(Harris 등, 2002).

심장사상충의 Life cycle을 완성시키기 위한 중간숙주는 *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* 및 *Myzorrhynchus* 속의 모기이다. 그러므로 하절기에 전파가 일어난다. 감염된 개의 혈액 중에 존재하는 L1 stage의 감염자충(microfilaria)은 흡혈시 모기의 말피기관으로 이행하여 성숙한 후 타액선으로 옮겨간다. 그 후 모기의 주둥이 부위에 모여 있다가 흡혈시 타액과 함께 포유류 숙주로 전달된다. 온대 지방에서는 약 15~17일에 제 3기유충 (L3, infective stage)까지 성숙한다(Frank 등, 1996).

개의 경우, 감염 후 85~120일에 우심장과 폐동맥 부위에서 발육형이 관찰된다. 성충이 microfilaria를 혈액에 배출하기까지는 약 6개월이 소요된다. 성충은 약 5년까지 생존하며 microfilaria를 배출한다(Haddock 등, 1987).

심장사상충에 감염되면 초기 6개월 동안은 뚜렷한 증상이 나타나지 않지만, 이 후 가벼운 기침, 운동 시 쉽게 피로, 호흡곤란, 체중감소, 식욕부진, 탈모, 빈혈, 혈뇨, 복수, 황달, 객혈 및 급사 등을 일으킨다. 특히 경주용 개나 사냥개 및 군견 등과 같이 폐활량을 많이 필요로 하는 개의 경우에 초기에도 심각하게 작용한다. 또한 감염증상이 심해지면 심장판막의 기능장애, 진행성 동맥내막염 유발, 우심장의 확장 비대, 간 충혈, 간 경화, 흉수, 복수, 만성기침 및 호흡촉박 등의 증상을 보인다(Mendis 등, 1983). 사람에서는 폐에 기생하여 결절을 형성하고 폐종양으로 오진되기도 하며(Narine 등, 1999; Lee 등, 2000) 또한 간에서도 사상충증을 보인다(Kim 등, 2002).

심장사상충 감염을 예방하기 위해서는 모기에 물리지 않도록 해야하나 사실 불가능하므로 위생적인 관리와 정기적인 검사, 예방약으로써 경구투여제와 피부도포제를 투약해야 한다. 그 외에도 사료첨가제 등을 이용하여 예방하기도 한다(Atkins 등, 1999).

심장사상충 감염의 치료법으로는 성충구제제(selamectin)를 2회 주사후 매달 한번씩 유충구제제(selamectin)를 경구투여해서 재감염을 방지하는 방법(Clemence 등, 2001)이 소개되어 있으나, 치료제를 투약하는 경우에도 성충의 사망체에 의한 혈전이 야기되는 등의 문제점이 있기 때문에, 조기진단에 이은 조기치료를 실시하여 타동물에의 전파를 방지하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

심장사상충의 유충인 *microfilaria*의 진단에는 혈액도말법, hematocrit capillary tube test, Knott's tests 및 filer test 등의 현미경적인 진단법이 소개되어있다. 심장사상충의 성충의 진단에 이용되는 방법은 종전에는 피내 점종법이 이용되어왔으나 간접형광항체법(IFA), 면역확산법, 용해성 항원형광항체법, 혈구응집반응 및 효소면역흡착법(ELISA) 등의 면역학적 진단법이 소개되어 있다(Matsumura 등, 1988b).

ELISA는 개 심장사상충 진단을 위해 가장 일반적으로 사용되어 왔던 실험적인 방법으로서 적은 수의 심장 사상충의 감염 시에도 매우 민감하기 때문에 진단에 용이한 방법으로 알려져 왔으나 (Matsumura 등, 1986; Matsumura 등 1988a) 장관 내의 선충류나 다른 사상충(*Dirofilaria repens*)의 혼합 감염 시에 교차반응에 의한 오인이 있을 수 있다(Cleator 등, 1987).

현재 임상에서는 수분 이내에 결과를 판정할 수 있는 신속진단법으로서 immuno-chromatography rapid test kit 즉 Wittness[®] (AGEN, Australia)나 Idexx[®] (Idexx, USA)나 ICT[®] (ICT, USA)등의 외국 제품이 대부분 사용되고 있다(Courtney와 Zeng, 2001).

본 실험은 개 심장사상충 감염 진단법을 개발하기 위하여 수행하였다. 이를 위하여 개 심장사상충을 수집하여 체항원 (somatic antigen) 과 분비항원 (excretory/secretory antigen)을 준비하여, 전기영동, Western blot 및 ELISA 등의 방법으로 항원적 특성을 조사하고(Fujita와 Tsukidate, 1984; Sato 등, 1994), 동물에 면역 접종하여, 진단에 이용될 수 있는 단클론항체를 개발하여 신속한 면역학적 진단방법을 제시하고자 실시하였다(Hammer P 등 1995, Sato K 등, 1996). 또한 개발된 진단법을 응용한 심장사상충 신속진단 키트의 상품화를 목표로 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 항원(Antigen)

1.1 기생충체수집

개 심장사상충 감염견으로부터 충체적출을 위한 외과적수술시 수집한 성충을 37℃의 생리식염수에 4회 세척한 후 Culture Flask에 20마리씩 넣고 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, with gentamycin 320mg/500ml)으로 배양(37.5℃ 5% CO₂)하였다. 배지의 교환은 8~12시간 간격으로 7일간 실시하였으며 교환시 회수된 배지는 분비항원 준비에 공여하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Cultivation of *dirofilaria immitis* in culture flask.

1.2 심장사상충의 항원 준비

1) 분비항원(Excretory/secretory antigen)

성충의 배양배지를 원심 분리 (600×g 5min, room temperature)를 하고 상층액을 동결 건조 (IIShin Lab, PVTFD10A, Korea)시켰다. 증류수 40 ml에 용해하고 4℃에서 100 mM Phosphate buffer (pH 7.3)에 3시간 간격으로 3회 투석액을 교환한 후 생리 식염수액에 6시간 간격으로 2회 교환하였다(Fig. 2).

2) 체항원(Somatic antigen)

분비항원을 얻기 위하여 배양이 끝난 성충은 유발에 넣은 후 액체질소 소량을 가하여 파쇄하였다. 이후 20 mM phosphate buffer saline(pH 7.0)을 소량씩 가하며 분쇄하였다.

충분히 분쇄된 총체 교반액을 Sonicator (BRANSON sonifer 450, USA)로 25초간 5회 초음파처리(Duty cycle 30%, power 45%)하였다. 각 초음파 처리시 1분의 간격을 두어 항원에의 가열을 방지하였다. 이 후 고속 원심분리 (16,000×g 10min, 4℃, KONTRON Centrikon T-324, Italy)하고 70℃ 보관하여 면역원 및 분석항원으로 사용하였다. 단백질농도 측정은 Bradford법 (Biorad protein assay kit, USA)을 이용하였다(Fig. 2).

3) 자충항원(microfilaria antigen)

분비항원을 얻기 위하여 회수한 배양액을 원심분리 (600×g 5min, room temperature)하여 얻은 침전을 생리식염수로 3회 세척

하고 유발에 분쇄하여 체항원의 준비와 동일한 방법으로 자충항원을 준비하였다(Fig. 2).

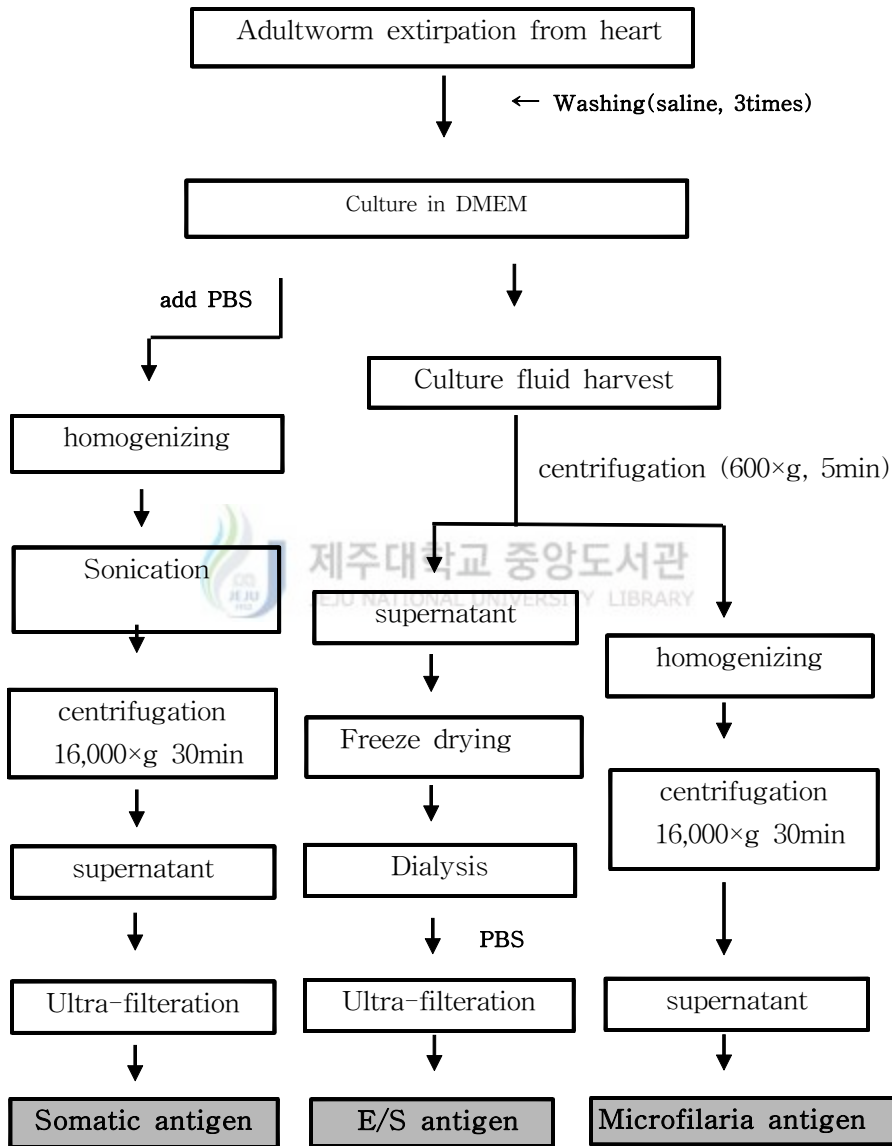


Fig. 2. Diagram of various antigens preparation of *Dirofilaria immitis*

2. 단클론 항체의 생산

2.1 배지 및 시약 준비

단클론항체 개발을 위해 사용된 배지의 조성을 아래 Table 1과 같이 제조하여 준비하였다.

Table 1. Compositions of reagent for hybridoma cloning.

Medium	Contents	Quantity
Culture medium	DMEM(GIBCO BRL NO12100-046)	500ml
	FBS	100ml
	7.5 %Sodium bicarbonate	14.5ml
	gentamycin (1000 units)	2ml
	10% L-glucose	5ml
	antibiotic micotic	5ml
Washing Medium	DMEM	500ml
	1M HEPES	5ml
HAT medium	DMEM	100ml
	100×HAT	1ml
HT medium	DMEM	100ml
	100×HT	1ml
Cloning Medium	DMEM	100ml
	conditioning Medium	100ml
Freezing Medium	DMSO(dimetyl sulfoxide)	5ml
	culture medium	50ml

면역시킨 항원에 대한 면역성 여부와 monoclonal antibody의 제작을 위한 fusion 후 hybridoma의 선별에 사용하기 위해 Table 2와 같이 시약을 제조하였다.

Table 2. Composition of reagents for ELISA.

Solution	Contents	Quantity
Coating buffer (carbonate-bicarbonate pH 9.6)	NaCO ₃	1.59g
	NaHCO ₃	2.93g
	DW	adjust to 1 ℓ
Phosphate- buffered saline pH 7.2 (PBS)	NaCl	8g
	KH ₂ PO ₄	0.2g
	Na ₂ HPO ₄	1.15g
	KCl	0.2g
	DW	adjust to 1 ℓ
Blocking buffer (PBS with 0.1% BSA)	PBS	100ml
	BSA	0.1g
Washing buffer PBS-T	PBS	100ml
	Tween 20	50μℓ
Sample dilution buffer	PBS-T	100ml
	BSA	0.1g
	10% NaN ₃	500μℓ
Conjugate dilution buffer	PBS-T	100ml
	BSA	0.1g
Chromogen buffer for ABTS pH 5.0	0.1M Citric acid	24.3ml
	0.2M Phosphate	25.7ml
	DW	50ml
	H ₂ O ₂ (30%)	4μℓ

2.2 단클론항체 제조와 생산

1) BALB/c mouse의 면역

Female 6주령의 BALB/c mouse 각 2두씩 체항원과 분비항원을 단백질량 150 μg 씩 접종하였다. 항원은 마우스 1두당 항원 100 μl 와 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) 100 μl 를 유착시킨 후 복강내로 접종하였다. 추가접종은 Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA)를 이용하여 초회 면역시와 같은 양을 유착시켜 2주 후에 2차, 4주 후에 3차, 8주 때는 동량의 항원만을 3일간 매일 접종하였다(Fig. 3).



Fig. 3. Immunization schedule for the cloning of hybridoma.

BALB/c mouse, female, 6 w.o. Dose: 150 μg /head.

2) Fusion

세포융합에 사용될 SP/2 myeloma 세포 주를 미리 culture medium에 배양하며 왕성한 분열이 지속되는 상태를 유지하였다. 면역된 BALB/c mouse는 마지막 면역접종후 24시간에 살처분하고 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다.

먼저, 심장을 통하여 전 채혈한 후, 경추탈구법으로 안락사 시키

고 70% ethanol을 분주하였다. 이 후 멸균된 가위와 forceps으로 비장을 적출하고 미리 준비한 70% ethanol에 침적한 후 즉시 washing medium에 2회씩 침적시켜 ethanol을 제거하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 37°C로 미리 가온시켜 사용하였다.

비장세포의 분리를 위하여 50 ml conical tube에 화염멸균 시킨 stainless steel 그물(400목)을 놓고 spleen을 얹어 놓고 1 ml의 주사기로 비장 내에 washing medium을 주입시켜 부풀린 후 주사바늘과 pincet으로 비장을 파열시켰다. 비장세포가 conical tube 내로 유입되도록 소량의 washing medium을 점적하였다. 이 후 멸균된 피펫으로 6~7회 정도 흡입 및 배출을 반복하면서 비장의 세포가 단일세포로 분리 되도록 한 후 washing medium을 50 ml되게 채워주었다.

분리된 spleen cell들은 원심분리하여 세척하였으며, SP/2 cell은 spleen cell의 2회 세척 시에 50 ml conical tube에 옮겨서 원심분리(600×g 5min, room temperature)하였다. 원심분리 후 침전된 세포량(packed cell volume)이 동일하게(SP/2 : Spleen cell = 1 : 5~6) 되도록 SP/2 cell의량을 조절하고 섞은 후 3회째 원심분리를 실시하였다. 이 후 washing medium으로 3회간 더 원심분리(600×g 5min, room temperature)하여 세척하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 흡입 제거하고 세포융합을 실시하였다(Table 1).

세포융합시 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 cell이 tube바닥에 골고루 퍼지게 한 후에 polyethylene glycol-1500 (PEG 1500)를 가하여 융합이 이루어지도록 하였다.

즉, 총 1 ml의 50% PEG 1500을 1분에 걸쳐 점적하면서 가볍게 흔들어 혼합하였다. 30초간 정치시켜 충분한 융합이 일어나도록 한 후 washing medium 1 ml를 1분에 걸쳐 점적한 후 30초간 정치하고, 다시 washing medium 2 ml를 1분에 걸쳐 점적하고 30초 동안

정치하였다. 이 후, washing medium 8 ml를 1분에 걸쳐 점적하고 30초간 정치 한 후 washing medium 10 ml를 30초에 걸쳐 점적하는 과정을 통하여 융합에 사용된 PEG를 서서히 희석하였다.

세포융합이 완료되고 wasing medium로 3회 원심분리 (600×g 5min, room temperature)후 세척한 침전에 culture medium 25 ml를 가하고 96 well tissue culture plate (Corning, USA)에 well당 25 μ l가 되게 분주하였다. 6시간 및 16시간 후 HAT medium을 well당 25 μ l씩 추가하였다. 약 5일간 HAT medium을 100 μ l씩 가하며 세포융합이 되지 않은 SP/2 세포를 사멸시켰다. 이후에 3일간 HT medium를 공급하여 융합된 hybridoma의 증식을 관찰하였다(Table 1).



3. Hybridoma clone의 선별

3.1 선별 ELISA

특이 항체를 분비하는 hybridoma clone을 선별하기 위하여 세포가 증식하여 well바닥의 1/3 정도 채워졌을 때 배양 상층액을 100 μ l씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 항원을 coating buffer로 희석하고, 96 well ELISA plate (Nunc, polysorb, USA)에 100 μ l씩 분주하여 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 자동 plate 세척기로 항원액을 흡입한 후 blocking buffer 200 μ l를 각 well에 분주하고 4°C에 2시간 정치한 후 PBS로 3회 세척하여 ELISA plate를 준비하였다.

준비된 plate에 세포배양 상층액 50 μ l와 sample buffer 50 μ l를 가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 양성 control은 cell fusion전에 채혈 보관 중인 혈청 10 μ l를 sample buffer 100 μ l에 희석하였으며 음성 control은 sample buffer 100 μ l를 사용하였다. 반응 완료 후 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse horseradish IgG와 goat anti-mouse IgM (μ -chain specific) HRP접합체를 conjugate buffer에 희석하여 well당 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하였다. 발색제로는 ABTS용액을 사용하였으며 30분간 발색시킨 후 405 nm와 reference 492 nm에서 Reading하여 그 OD 값을 측정하였다(Table 2).

특이항체를 생산하는 hybridoma는 24 well plate (Corning, USA)에 옮겨 배양하고 well당 cell이 2개가 들어가게 희석하여 분주한 후 위와 같은 선별 과정을 수행하였다.

3.2 선택된 Hybridoma의 동결

세포 분열이 활발히 진행되는 단계를 현미경 검경시 세포분열에 의하여 수 개 세포의 덩어리가 확인되는 시점으로 이때 배지의 색조는 주홍색을 띤다. flask의 바닥에 부착된 세포는 flask를 가볍게 두들겨 탈락시키고 flask를 세로로 세워 30분간 37℃에서 방치 후 원심분리 (600×g 5min, room temperature)한 다음 세포에 Freezing media를 가하고 부유 시켰다. 이를 1.8 ml 냉동 보관용 vials에 1.5 ml씩 분주하고 보온박스에 넣어 -70℃에서 24시간 보관하여 서서히 온도를 강하시켰다. 24시간 이후에 액체질소(-170℃)가 채워진 용기에 보관하였다(Table 1).

3.3 복수 생산

특이항체를 분비하는 hybridoma clone은 BALB/c 마우스에 접종하여 고농도의 단클론항체를 생산하기 위하여 pristane (2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane, Sigma, USA)으로 일주일전 감각시킨 후 BALB/C mouse (8주령, female)의 복강 내로 약 10^7 cell개씩 접종하고 생성되는 복수를 채취하여 단클론항체를 정제하였다.

4. Rabbit α -CHW antiserum

심장사상충의 polyclonal antibody를 얻기 위하여 CHW 체항원 300 μ g을 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) 200 μ l와 혼합하여 New Zealand white rabbit 2두 (8주령, female)의 피하에 면역접종하였다. 추가접종은 2주 간격으로 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)와 항원을 동량으로 혼합하여 피하접종하였다. 제5차 접종을 실시한 후 ELISA로 항체 역가를 측정하는 다음 심장을 통한 전 채혈을 실시하였다(Fig. 4).



Fig. 4. Immunization schedule for raising polyclonal Rabbit anti-CHW.

5. 항체 분석

5.1 SDS-PAGE

1) SDS-PAGE 관련 시약 제조

SDS-polyacrylamide gel을 제조하기 위한 시약과 SDS-PAGE를 위해 Table 3과 같이 준비하였다.

Table 3. Compositions of reagents for SDS-PAGE.

Medium	Contents	Quantity
40% Acrylamide stock	acrylamide	38.67g
	bis-acrylamide	1.33g
in 100ml DDW		
Lower gel buffer (4×LGB)	1.5M Tris	90.855g
	0.4% SDS	10ml of 20% SDS
	pH 8.8 adjust with HCl	total 500ml
Upper gel buffer (4×UGB)	0.5M Tris	30.77g
	0.4% SDS	10ml of 20% SDS
	pH 6.8 adjust with HCl	total 500ml
10% APS	ammonium persulfate	100mg/ml
4× loading dye	100% glycerol	5ml
	4× UGB	4.4ml
	0.5% bromophenol blue	0.4ml
Loading Buffer	4× loading dye	350 μ l
	20% SDS	126 μ l
	2% MESH	14 μ l
	total	490 μ l
Coomassie gel staining solution	Coomassie blue	1g
	methanol	450ml
	acetic acid	100ml
	DDW	450ml
Coomassie gel destaining solution	methanol	100ml
	acetic acid	100ml
	DDW	800ml

2) SDS-PAGE Gel 제조

Table 4. Solutions for preparing gel for SDS-PAGE

	12.5% Separating	15% Separating	4% stacking
40% acrylamide	9.35ml	9.38ml	500 μ l
4×LGB	6.25ml	6.25ml	
4×UGB			1.25ml
DDW	9.07ml	9.04ml	3.18ml
10% APS	300 μ l	300 μ l	60 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	3 μ l

Separating gel은 Table 4와 같이 조제하여 gel plate에 분주하기 직전에 10% APS와 TEMED를 섞어 사용하였다. Plate와 glass plate 사이에 액 중에 기포가 생기지 않도록 분주하고 well의 끝에서 1 cm 정도의 stacking gel을 위한 공간을 남겨두고 증류수를 채워 gel이 수평이 되도록 하였다.

Separating gel이 굳은 후 증류수를 버리고 stacking gel을 Table 4와 같은 조성으로 하되 분주 전 10% APS와 TEMED를 섞은 후 plate 상단까지 분주하고 well을 기포가 생기지 않도록 주의하며 comb을 삽입하였다. Gel이 굳어지도록 30~35분 정치한 후 comb을 조심스럽게 뽑아 well내를 증류수로 3회 세척하고 gel caster를 떼어 내었다. Gel 밖에 묻어 있는 acrylamide를 완전히 제거하고 gel running tank에 장착한 후 upper tank와 lower tank에 Running buffer를 채웠다.

3) 전기 영동 sample

단백량이 라인마다 20 μ g이 되게 희석한 후 항원과 4×sample buffer 1:3 정도의 비율이 되게 하여 3분간 100℃에서 끓인 후 전기 영동하였다. 이를 원심 분리하여 뚜껑에 증발된 수증기를 모으고

sample를 준비하였다.

준비된 gel에 첫 번째 well는 Standard Marker (Biorad, USA)를 5 μ l, 각 sample은 각각 6 μ l씩 loading하고 나머지 well에는 순차적으로 sample를 loading 하였다.

4) 전기영동

전기영동의 조건은 다음과 같다. 즉, 100 mA/gel로 영동장치에 전원을 50 V로 조정하고 bromophenol blue dye가 stacking gel을 벗어 날 때까지 30분간 영동하였다. 이 후, 100 V로 승압시켜 1시간 가량 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시했다.

5) 염색



전기영동이 끝난 gel은 증류수로 세척하고 Coomassie gel staining solution액으로 2시간 가량 염색하였다. 탈색은 Coomassie gel destaining solution으로 세척한 후 destaining solution으로 4시간 하였다.

5.2 Western blotting

1) Western blotting 관련 시약제조

단클론항체의 항원에 대한 western blotting 분석을 위해 Table 5과 같이 시약을 제조하여 사용하였다

Table 5. Compositions of reagents for Western blot.

Medium	Contents	Quantity
5% Douglas Gel Buffer	0.25M Glycine	288g
	1.92M Tris	60.6g
		Fill to 1 ℓ
Running Buffer	5× DGB	200ml
	20% SDS	5ml
		Fill to 1 ℓ
Transfer Buffer	5× DGB	100ml
	MeOH	200ml
		Fill to 1 ℓ
Lysis Buffer	20% SDS	1.25ml
	mercaptol	1ml
	4× UGB	2.5ml
	DDW	250 μ l
Tris buffed saline (TBS)	5M NaCl	30ml
	2M Tris	5ml
	DDW	Fill to 1 ℓ
Blocking solution	BSA	3g
	tris buffed saline	100ml
Washing buffer	tween 20	50 μ l
	tris buffed saline	100ml
TBS-T (0.2% BSA)	BSA	0.2g
	tris buffed saline	100ml
Diaminobenzidine (DAB)	DAB	10mg
	DDW	47.5ml
	1M Tris	2.5ml
	H ₂ O ₂ (30%)	7.5 μ l

2) Western blot

생산된 단클론항체가 반응하는 epitope를 확인하기 위하여 blotting을 실시하였다. 15% polyacrylamide gel로 PAGE를 실시한 후 gel을 transfer buffer내에서 100V 350mA에서 2시간 전기 영동 하여 Nitrocellulose paper (NC paper, schleicher & schuell, Germany)에 전사하였다.

전기영동이 끝난 NC paper를 gel에서 분리하여 blocking buffer로 4℃에서 하룻밤 침적한 후 MAbs (hybridoma cell 배양상층 액)과 4시간 반응시켰다.

Washing buffer로 5분간 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma, USA)와 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 washing buffer로 3회 세척한 후 DAB로 5분간 발색시켰다. 적당히 발색이 진행되었을 때 증류수에 침적시켜 반응을 정지시켰다.

6. 항체 정제

6.1 Canine heartworm affinity gel 제조

1) Affinity gel buffer 제조

Affinity gel에 사용된 buffer는 Table 6과 같은 조성을 제조하여 준비하였다.

Table 6. Solution for coupling proteins with CNBr-activated agarose gel.

Buffer	NOTES
Gel washing buffer	1mM HCl (200ml/g)
Coupling buffer	NaHCO ₃ (0.1M, pH8.3) containing NaCl (0.5M)
Blocking buffer	0.2M Glycine (pH 8.0)
Washing buffer	acetate buffer (0.1M, pH 4.0) containing NaCl (0.5M)

2) Affinity gel 제조

CNBr activated agarose gel에 CHW somatic Ag를 결합시켜, affinity gel을 준비하였다. 즉, Cyanogen bromide activated agarose (Sigma, USA) 2 g을 Gel washing buffer 7 ml에 용해시킨 후 sintered glass filter를 이용하여 gel washing buffer를 400 ml 흘려 세척하였다. 세척한 gel을 Coupling buffer 5 ml에 부유시킨 후 CHW somatic antigen (9 mg/ml) 4 ml을 가하고 실온에서 2시간 동

안 반응시켰다. 이후 blocking buffer를 첨가하고 냉장고에서 하룻밤 정치시켰다. 제조한 gel은 packing한 후 Coupling buffer와 washing buffer를 50 ml 정도씩 순차를 바꿔가며 5회 실시하였다. 준비된 gel에 20 mM Phosphate buffer saline (pH 7.2, with 0.2% BSA)을 100 ml 가량 흘려주어 준비하였다(Fig. 5).

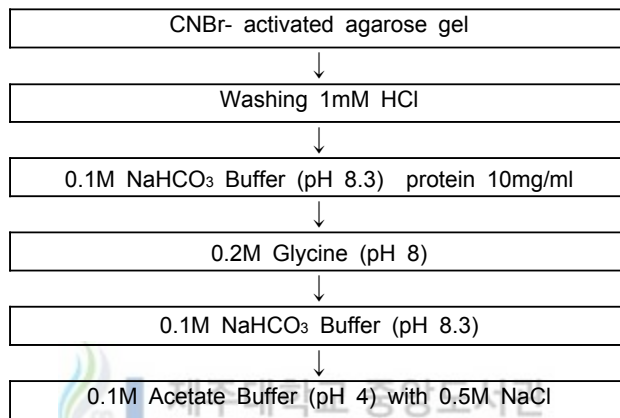


Fig. 5. Flow chart of product canine heartworm antigen agarose gel.

6.2 Affinity chromatography

Affinity chromatography에 사용되는 buffer들은 autoclave를 통하여 gas를 제거하였다. 정제의 전 과정을 실온에서 실시하였다.

Affinity chromatography법으로 정제할 복수는 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 미리 ×5배 희석한 후 1분당 1 ml의 유속으로 Column에 가하여 주며 affinity gel에 결합된 CHW Ag와 반응되도록 하였다. 반응하지 않은 여타의 물질을 세척하기 위하여 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)을 충분히 가하였다. 3M NaSCN을 가하며 실시하였다. 단백질 측정된 분획은 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)에서 4°C overnight 시켜 투석하되 4시간 간격으로 3회 교

환해 주었다.

Affinity gel은 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 충분히 washing한 후 냉장상태에 보관하였다.



7. ELISA

7.1 HRP labeled conjugate 제조

Two-step glutaraldehyde법을 실시하였다(Wilson과 Nakane, 1978). 즉 Horseradish Peroxidase (Sigma, USA) 10 mg을 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 ml에 glutaraldehyde (Sigma, USA)를 1.25%되게 섞은 후 실온에서 18시간 방치하였다. 이를 PD10 column(Pharmacia, Sweden)에 gel filtration을 거쳐 Glutaraldehyde를 제거하고 5 mg/ml을 항체를 섞은 후 Sodiumcarbonate-bicarbonate buffer를 가하여 pH를 9.5까지 올려주었다. 활성화시킨enzyme labeled HRP에 0.2 M lysine을 넣어 masking을 한 후 투석하여 준비하였다(Fig. 6).

7.2 MAb coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원을 coating buffer로 희석하고, 이를 ELISA plate (Nunc, polysorb, USA)에 100 μ l씩 분주하여 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 이를 PBS로 세척한 후 blocking buffer를 well당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 한시간 정치하여 준비하였다.

7.3 Antibody pair 결정

준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 양성혈청과 음성혈청을 PBS에 희석하여 well당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다.

이 후 Enzyme-labeled 항체를 Conjugate buffer에 희석하고 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 3

회 세척하였다. 발색제로는 ABTS용액을 사용하였으며 30분간 발색시킨 후 405 nm와 reference 492 nm에서 Reading하여 그 OD 값을 측정하였다. P/N ratio(양성 시료의 OD값/ 음성 시료의 OD값)가 큰 pair를 ELISA 및 Immunochromatography를 위한 Ab pair로 선정하였다.

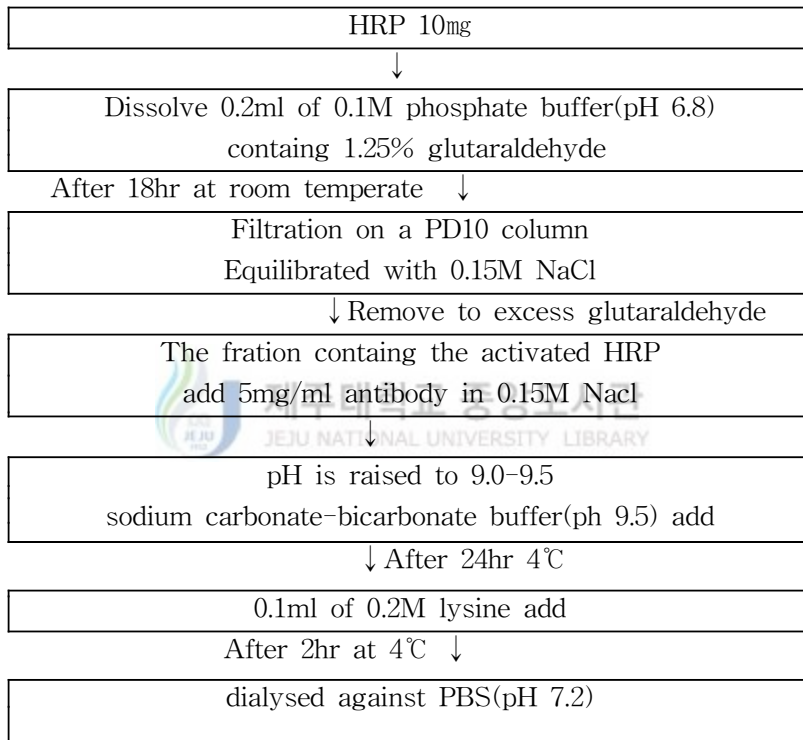


Fig. 6. Flow chart of HRP labeled with MAbs.

8. Immunochromatography법 개발

8.1 Colloidal gold접합체 제조

1) 20nm Colloidal gold (100 ml)의 제조

3차증류수 89 ml를 hot plate magnetic stirrer를 사용하여 60도로 가열하고, 1% gold chloride, 1 ml을 가하여 0.01%되게 하였다. 그 후에 1% sodium citrate 4 ml에 물 6 ml을 섞고, 가열된 gold chloride의 중앙에 즉시 가였다. 용액이 적색을 띠기까지 약 50분 놔두었다가 15분간 끓인 후 식혀 사용하였다. 사용된 모든 용액은 주사용수[®](중외제약, korea)를 사용하여 조제하였다.

2) 40nm Colloidal gold (100 ml)의 제조

만들어진 20 nm gold 25 ml에 물 153 ml을 가한 다음 끓였다. 1% Sodium citrate 2 ml을 가하여 0.01%가 되게 하였다. 1% gold chloride (Sigma G-4022, USA) 2 ml을 물 18 ml과 섞은 후 1 ml/min정도로 점적하였다. 이후 온도를 유지하며 20분간 끓인 후 실온에 방치하여 사용하였다.

3) Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위한 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD₅₁₄ 값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1 mg/ml이 되게 하였다. plain gold의 산도는 0.1% NaOH로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다.

접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 10 ml에 antibody를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA (10 μ l of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후 이를 원심분리 (10,000 \times g, 30min, 4 $^{\circ}$ C, KONTRON Centrikon T-324, Italy)시켜 맑은 상층액을 건어내고 gold 접합액에 재 부유하였다.

gold 전용희석액으로 적당히 (1% T-20, 1% BSA, 2-3% sucrose, in 100 mM PB) 희석하여 사용하였다.

8.2 Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP 003, USA)을 5 mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체를 10 mg/ml을 2.0 μ l씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 Immunochromatography를 실시하였다.

96 well microplate에 개의 혈청 20 μ l와 OD 10의 gold conjugate 10 μ l를 가하고 gold 접합액 30 μ l를 추가하여 준비된 NC membrane의 strip을 각 well에 삽입하고 10분간 정치시켜 NC membrane와 상의 항체와 gold conjugate가 혈청 중의 항원을 매개로 결합하여 적색의 dot 형성의 유무를 관찰하였다. back flow에 의한 위양성반응을 배제하기 위하여 결과의 판정은 전개 후 10분 이내에 실시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 항원의 정제

수집한 114마리의 성충과 분비한 항원을 이용하여 면역에 필요한 항원을 준비한 내용은 아래 Table 7와 같다.

체항원의 경우 1.45 mg/ml의 10 ml정도를 얻었으며 분비항원은 4 L정도 항원의 동결건조를 마친 후 희석하여 원심분리를 거친 다음 pellet은 0.5 ml(3.41 mg/ml)정도였으며 상층액은 2 ml(0.94 mg/ml)로 얻었다. 자충항원은 0.3 ml(0.55 mg/ml)을 얻었다.

Table 7. Antigens yield from 114 canine heartworm.

Antigen	mg/ml	Quan.(ml)
Somatic Antigen	1.45	10
E/S antigen	0.94	2
Filaria antigen	0.55	0.3

2. SDS- PAGE

체항원, 분비항원 및 자충항원의 비교분석을 위하여 각 항원을 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동은 12.5% SDS-PAGE gel을 사용하였고 전기영동이 완료된 gel을 CBB staining solution에서 체항원은 14, 19, 20, 22, 24, 29, 33, 36, 45, 66kDa 등에서 다양한 분획을 보였다. 분비항원은 14, 15, 16, 19, 20, 24, 36, 43, 50, 55, 66kDa 등에서 분획이 확인되었다. 자충항원은 14kDa에서 보였으며 66kDa 이상의 분획은 보이지 않았다. 체항원, 분비항원 및 자충항원 등 세 가지의 항원에서 14kDa에서 공통된 분획이 확인되었다(Fig. 7).

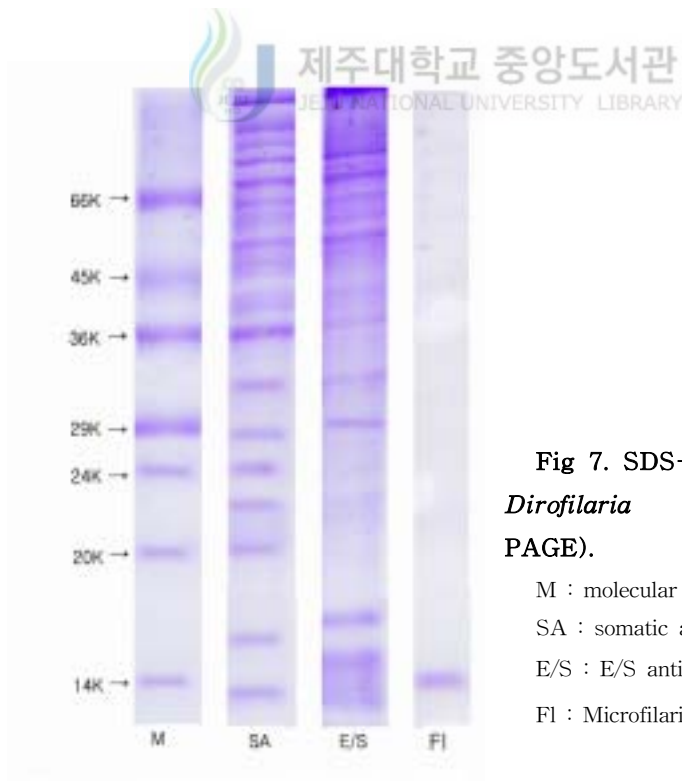


Fig 7. SDS-PAGE analysis of *Dirofilaria immitis*. (12.5% PAGE).

M : molecular size marker

SA : somatic antigen

E/S : E/S antigen

Fl : Microfilaria

3. Western-blot

Rabbit α -CHW antiserum를 체항원에 immuno-blotting을 실시한 결과 14, 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 다양한 반응을 나타내었다. 또한 개 심장사상충 감염혈청과 비감염혈청을 western-blot한 결과 감염혈청에서 14, 19kDa에서 반응성을 보였으며 비감염혈청의 경우에는 반응성이 나타나지 않았다(Fig. 8).



Fig 8. Immunoblots of somatic antigen and E/S antigen using rabbit α -CHW antiserum.(15% PAGE).

M: molecular size marker

E/S: excretory/secertory antigen

SA : somatic antigen

(+) : positive serum

(-) : negative serum

단클론항체를 체항원에 immuno-blotting을 실시한 결과 Fig 9. 와 같이 CHW01, 09, 10등은 같은 양상을 보이며 14, 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 다양한 반응을 나타내었다. CHW04는 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 반응성을 나타내었다. CHW07, 14, 24은 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 다양한 반응을 나타내었다.

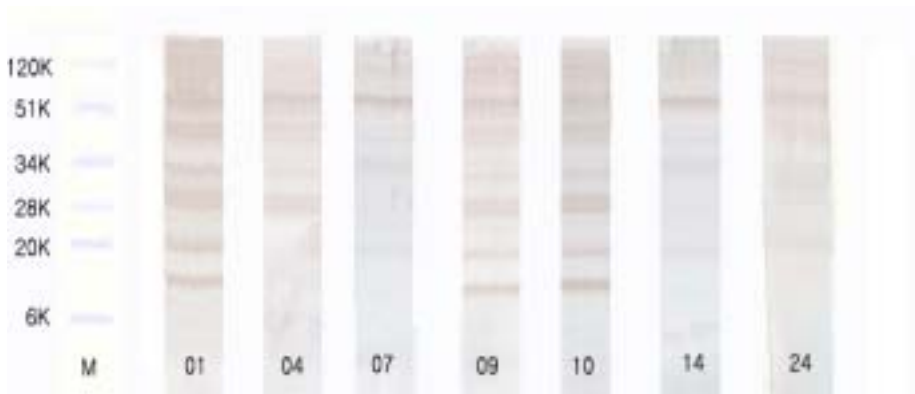


Fig 9. Immunoblots of somatic antigen using monoclonal antibody(15% SDS PAGE).

M : molecular size marker

01~24: CHW monoclonal antibody



Fig 10. Immunoblots of positive serum and monoclonal antibody. (15% PAGE).

M : molecular size marker

01~24: CHW monoclonal antibody

단클론항체를 감염혈청을 immuno-blotting을 실시한 결과 Fig 10. 과 같이 CHW01, 09, 10, 24는 14, 19kDa에서 반응성을 보였으며, CHW04, 07, 14는 14kDa에서 반응성을 보였다.

4. 단클론 항체의 특성

CHW에 대한 MAbs를 분리하는 hybridoma(CHW01, 04, 07, 09, 10, 11, 14, 24, 107, 1011)를 각출하였다.

각 단클론 항체의 반응 특성을 파악하기 위해 ELISA를 실시한 결과 CHW01, 04, 07, 09, 10, 11 및 14는 M type(μ -chain)에 반응을 보였으며 CHW24, 107, 1011은 G type(ν -chain)에 반응을 나타내었다.

CHW04, 09, 11 및 14 등은 protein A에서도 반응성을 나타내었다. 특히적으로 CHW14는 M Type임에도 protein G에서 반응성을 나타내었다(Table 8).

Table 8. Characterization of clone to canine heartworm by specificity ELISA test.

Clone NO.	ν -chain	μ -chain	α -chain	Prot-G	Prot-A	Ig Type
CHW01	+++	++	-	-	-	M type
CHW04	+++	++	-	-	+	M type
CHW07	-	+	-	-	-	M type
CHW09	+++	+	-	-	+	M type
CHW10	+++	+	-	-	-	M type
CHW11	+++	++	-	-	+	M type
CHW14	+	++	-	+	+	M type
CHW24	++	-	-	+	-	G type
CHW107	++	-	-	-	-	G type
CHW1011	++	-	-	-	-	G type

* ELISA test reading wavelength 405/492nm

+ : OD 0.5-1.5 , ++ : OD 1.5-2.5, +++ : OD 2.5 ± : OD 0.3-0.5

ν -chain : goat-anti mouse Ig G, μ -chain : goat-anti mouse Ig M

α -chain : goat-anti mouse Ig A, Prot-G : Protein G, Prot-A: Protein A

5. ELISA법 개발

5.1 Enzyme-labeled HRP Conjugate

HRP가 표지된 항체의 역가를 조사하기 위하여 Somatic antigen가 흡착된 plate에 ELISA를 실시하였다. 또한 conjugate는 100, 1,000, 10,000, 100,000로 계단희석을 실시하였다.

CHW01, 10는 약 1,000배 희석에서 CHW14는 약 10,000배 희석에서까지 검출한계(end point)를 나타내었다(Fig. 11).

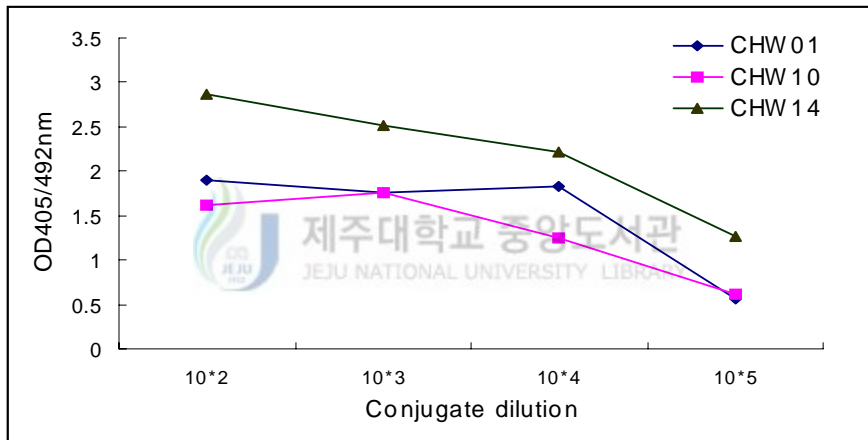


Fig. 11. Titer of HRP labeled monoclonal anti-CHWs by ELISA. (OD405/492nm)

Sandwich ELISA법을 이용하여 immuno-chromatography에 적용될 적

정향체 pair를 결정하기 위해서 정제된 CHW01, 10 및 14가 흡착된 plate를 준비하였으며, 또한 HRP-Conjugate labeling된 CHW01, 10 및 14를 사용하되 각각 양성혈청 7종과 음성혈청 6종을 sample로 ELISA를 실시하여 각각의 평균값을 P/N ratio로 산출하였다.

그 결과 CHW01 coating - CHW10 HRP, CHW10 coating - CHW01 HRP, CHW14 coating - CHW 10 HRP 등의 Pair에서 높은 P/N ratio를 나타내었다(Table 9).

Table 9. Pairing of monoclonal anti-CHWs for ELISA

P/N ratio : Positive serum / Negative serum OD ratio.

HRP-conjugate \ Coating	CHW01	CHW10	CHW14
	CHW01	12.33	10.06
CHW10	63.87	40.39	13.31
CHW14	3.05	2.80	0.69

5.2 ELISA의 민감도와 특이도

P/N ratio의 높은 Coating CHW01 - CHW10 HRP, Coating CHW10 - CHW01 HRP, Coating CHW14 - CHW 10 HRP pair를 선정하여 제주대학교 동물병원에서 제공받은 표준 양성혈청 39개와 음성혈청 22개를 이용하여 ELISA의 민감도와 특이도를 조사하였다.

CHW01 - CHW10 HRP pair의 경우 Table 10과 같이 sensitivity와 specificity가 각각 100%, 100%를 나타내었다.

Table 10. CHW ELISA sensitivity and specificity.

(Coating CHW01 and CHW10 HRP)

		Standard Serum	
		Positive	Negative
ELISA	Positive	39	0
	Negative	0	22

Sensitivity= $39 / (39+0) \times 100 = 100\%$, Specificity= $22 / (0+22) \times 100 = 100\%$

CHW10 - CHW01 HRP pair는 Table 11과 같이 sensitivity와 specificity가 각각 100%, 100%를 나타내었다.

Table 11. CHW ELISA sensitivity and specificity.

(Coating CHW10 and CHW01 HRP)

		Standard Serum	
		Positive	Negative
ELISA	Positive	39	0
	Negative	0	22

Sensitivity= $39 / (39+0) \times 100 = 100\%$, Specificity= $22 / (0+22) \times 100 = 100\%$

CHW14 coating - CHW 10 HRP pair는 Table 12와 같이 sensitivity가 94.8%를 보였고 specificity는 77.2%를 나타내었다.

Table 12. CHW ELISA sensitivity and specificity.

(Coating CHW14 and CHW10 HRP)

		Standard Serum	
		Positive	Negative
ELISA	Positive	37	5
	Negative	2	17

Sensitivity= $37 / (37+2) \times 100 = 94.8\%$, Specificity= $17 / (17+5) \times 100 = 77.2\%$

6. Immunochromatography의 개발

6.1 Colloidal gold 제조

40 nm 구경의 colloidal gold는 먼저 20 nm의 gold를 만든 후, 추가적인 seeding을 통하여 만드는 방법이 직접적인 citric acid의 환원에 의한 제조법에 비하여 유효한 것으로 판단되었다. Fig 15.는 전자현미경으로 검경한 40 nm의 colloidal gold로서, 구형이 균일하게 약 40 nm의 입자로 구성되어 있는 것으로 확인되었으며, 이를 gold - antibody 접합체의 합성에 사용하였다.

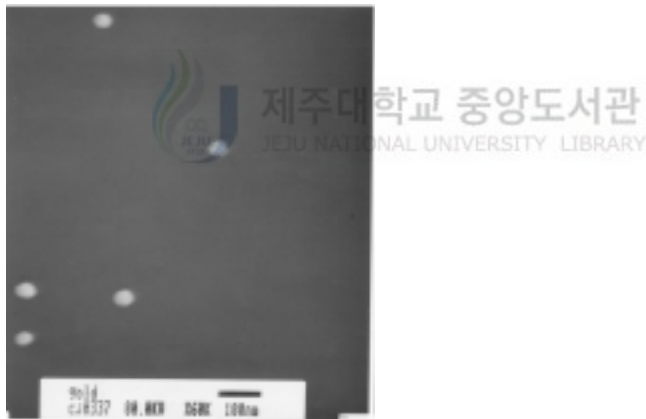


Fig. 14. Electron microscopy (EM) to 40nm colloidal gold.

6.2 Immunochromatography의 개발

선정된 CHW 단클론항체를 gold접합체로 만든 후 gold-Ab와 표준양성혈청, 접합액의 조건을 조정한 후 Table 15와 같이 특이항체로 coating한 NC membrane (Whatman, USA)에 반응성을 확인하였다. 그 결과 Gole-Ab는 CHW01을 선정하고 CHW10를 coating에 선정하였다.

Table 15. Select to gold-Ab and Antibody coating pair for Immuno-chromatography.

gold-Ab Antibody	CHW01	CHW04	CHW07	CHW09	CHW10	CHW14	CHW24
CHW01		+	+		++	++	++
CHW04							
CHW07							
CHW09	++	±	±		±	±	±
CHW10	++			±		±	±
CHW14	++				±		±
CHW24							

6.3 Immunochromatography의 민감도와 특이도

제주대학교 동물병원에서 제공받은 표준 양성혈청 39개와 음성혈청 22개를 이용하여 Immunochromatography의 민감도와 특이도를 조사하였다. ELISA와 Immunochromatography의 결과가 양호한 Coating - CHW10 gold-Ab - CHW01 pair는 Table 16과 같이 sensitivity와 specificity를 결과 각각 100%, 100%를 보였다.

Table 14. Sensitivity and specificity of Immunochromatography using CHW10 coated NC membrane and CHW01 gold conjugate pair.

		Standard Serum	
		Positive	Negative
Immuno- chromatography	Positive	39	0
	Negative	0	22

Sensitivity= $39 / (39+0) \times 100 = 100\%$, Specificity= $22 / (0+22) \times 100 = 100\%$

IV. 고찰

본 실험은 개 심장사상충의 항원성을 조사하고 더 나아가 진단 키트 시장의 거의 전량을 수입에 의존하고 있는 실정에서 국내에서 진단 키트를 개발하여 사용하기 위해 실시되었다.

이와 지(2000)의 보고에 의하면 주요 분획이 14.5kDa에서 45kDa 이하에서 나타났었고 본 연구에서는 종합적으로 체항원과 분비항원에서 14, 19, 20, 22, 24, 29, 33, 36, 45, 66kDa등에 걸친 다양한 분획이 확인되었다. 또한 자충항원에서는 14kDa에서 분획이 확인되었다. 체항원, 분비항원, 자충항원등의 공통항원은 14kDa에서만 나타났다.

이들 체항원, 분비항원은 면역에 사용되었지만 자충항원의 경우는 항원의 양이 적어서 실험을 항체를 생산하지 못했다.

단클론항체를 CHW 감염혈청의 Immuno-blotting에서는 CHW01, 09, 10, 24는 14, 19kDa에서 특이 반응성을 나타냈으며, CHW04, 07, 14는 14kDa에선 반응성을 나타냈다. Rabbit α -CHW antiserum에선 감염혈청에서 14, 19kDa에서 반응성을 보였지만 비감염혈청의 경우에는 반응성을 나타내지 않았다.

또한 체항원을 이용하여 Immuno-blotting을 한 결과 14, 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 다양한 반응을 나타내었다. 단클론항체 CHW01, 09, 10등은 14, 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 반응을 나타내었고, CHW04는 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 반응성을 나타내었으며 CHW07, 14, 24는 19, 29, 30, 33 45, 66kDa등에서 다양한 반응을 나타내어 각 특이항체의 반응부위가 다름을 확인할 수 있었다.

단클론항체의 각각의 특성을 파악한 결과 CHW01, 04, 07, 09, 10, 11및 14 등은 M type (μ -chain specific)에 반응을 보였으며 CHW24, 107 및 1011 등은 G type (ν -chain specific)에 반응성을

나타내었다. A Type(α -chain)의 경우는 모든 항체에서 반응성을 보이지 않았다.

CHW04, 09, 11 및 14 등은 protein A에서도 반응성을 나타냈다. 특이적으로 CHW24는 M Type임에도 protein G에서 반응성을 나타내었다. CHW107과 1011은 protein G, A등에 반응을 나타내지 않았음을 보아 Fc receptor가 손상되었음이 사료된다.

ELISA와 immuno-chromatography의 민감도와 특이도를 조사하였다. ELISA의 경우 CHW01 - CHW10 HRP pair와 CHW10 - CHW01 HRP pair에선 sensitivity와 specificity가 각각 100%, 100%를 나타내었다. 반면 CHW14 coating - CHW10 HRP pair는 sensitivity가 94.8%를 보였고 specificity는 77.2%를 나타내었다. Western-blot결과와 같이 19kDa에서만 반응성을 나타냄을 보아 다른 CHW04, CHW07, CHW14는 위양성반응이나 위음성반응을 일으킬 수 있을 거라 추측된다.

Immuno-chromatography에서는 Coating - CHW10 gold-Ab - CHW01 pair는 sensitivity와 specificity를 결과 모두 100%를 나타내어 임상적으로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구는 개 심장사상충의 항원을 정제하여 마우스에 면역시켜 비장세포와 myeloma cell의 세포융합을 통해 단클론항체를 생산하는 hybridoma를 획득하여 개 심장사상충의 진단에 필요한 항체를 생산 및 제조하여 신속 진단키트 제작에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

개 심장사상충증에 대한 신속진단법에 적용할 단클론항체를 개발하고 그 특성을 찾아낸 후 ELISA와 Immunochromatography를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 6개의 IgM type 및 3종의 IgG type Canine heartworm(CHW)의 단클론을 얻을수 있었다.

2. Western-blot을 한 결과 CHW 감염 혈청중의 14 및 19kDa의 CHW 특이 항원과 결합 반응을 보였다.

3. 최적의 Pair인 CHW01과 CHW10 clone을 조합한 sandwich ELISA로 표준혈청 61건을 검사하였을 때 민감도와 특이도 모두 100%로 나타났다.

4. Immunochromatography법으로 개발된 신속진단법에서도 민감도와 특이도는 모두 100%로 나타났다.

VI. 참고문헌

Atkins, CE, Atwell R, Genchi C, Hago M, Holmes RA, Knight DH, Lukof DK, McCall, JW, Venco L., Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of heartworm(*Dirofilaria immitis*) infections in cats., Am. Heart. Soc., 26(3): 1-9, 1999

Cleator M, Delves CJ, Howells RE, Rees HH., Identity and tissue localization of free and conjugated ecdysteroids in adults of *Dirofilaria immitis* and *Ascaris suum*., Mol. Biochem. Parasitol., 25(1): 93-105, 1987

Clemence RG, Sarasola P, Genchi C, Smith DG, Shanks DJ, Jernigan AD, Rowan TG., Efficacy of selamectin in the prevention of adult heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs in northern Italy., Vet. Parasitol., 91(3-4): 251-258, 2001

Courtney CH, Zeng Q., Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens., Vet. Parasitol., 96(4): 317-322, 2001

Frank GR, Grieve RB., Purification and characterization of three larval excretory-secretory proteins of *Dirofilaria immitis*., Mol. Biochem. Parasitol., 75(2): 221-229, 1996

Fujita K, Tsukidate S., A highly purified allergen from excretory and secretory products of *Dirofilaria immitis*., Int. J. Parasitol., 14(6): 547-550, 1984

Haddock KC., Canine heartworm disease: a review and pilot study., Soc. Sci. Med., 24(3): 225-246, 1987

Hammer P, Heeschen W., Antibody-capture immunoassay for the detection of enrofloxacin in raw milk. in proceeding of IDF/FIL on

residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk., kiel Genmany., 28-31: 260-261, 1995

Harris MT, Fuhrman JA., Structure and expression of chitin synthase in the parasitic nematode *Dirofilaria immitis*., Mol. Biochem. Parasitol., 122(2): 231-234, 2002

Kim MK, Kim CH, Yeom BW, Park SH, Choi SY, Choi JS., The first human case of hepatic dirofilariasis. J. Korean Med. Sci., 17(5): 686-690, 2002

Lee KJ, Park GM, Yong TS., The first korean case of human pulmonary dirofilariasis., Yonsei Med. J., 41: 285-288, 2000

Mendis AH, Rose ME, Rees HH, Goodwin TW., Ecdysteroids in adults of the nematode, *Dirofilaria immitis*., Mol. Biochem. Parasitol., 9(3): 209-226, 1983



Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K, Inoue T., The enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies against *Dirofilaria immitis* in dogs., Vet. Parasitol., 21(3): 165-171, 1986

Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K, Inoue T, Matsuda H., A rapid microassay for dirofilarial antibodies by using antigen-coated nitrocellulose paper., Vet. Parasitol., 27(3-4): 337-344, 1988a

Matsumura K, Wakatsuki S, Endo R, Tanaka K, Inoue T, Matsuda H., A rapid detection of circulating antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs by a dot enzyme-linked immunosorbent assay., FEMS Microbiol Immunol., 1(3), 145-149, 1988b

Narine K, Brennan B, Gilfillan I, Hodge A., Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man., Eur J Cardiothorac Surg., 16(4), 475-477, 1999

Sato K, Aoki T, Nakano M., *Dirofilaria immitis* : a large-scale purification method and partial characteristics of a superoxide dismutase from adult worms., *Exp. Parasitol.*, 78(2): 210-216, 1994

Sato K, Ichiyama S, Iinuma Y, Nada T, Shimokata K, Nakashima N., Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and dainascreen ausab, *J. Clin. Microbiol.*, 34(6): 1420-1422, 1996

Wang LC., Canine filarial infections in north Taiwan., *Acta Trop.*, 68(1): 115-120, 1997

Wilson MB, Nakane PK., Recent development in the periodate method of conjugating horseadish peroxidase(HRPO) to antibodies., *North. holland. biomedical.*, 1978

Yamagata GR, Gershwin LG, Wong MM., Immunoglobulin E recognition of *Dirofilaria immitis* antigens is more specific than immunoglobulin G., *Vet. Parasitol.*, 44(3-4): 223-245, 1992

김상기, 신성기, 권중기., 진도개에 감염된 심장사상충증의 초음파 진단에 관한 연구., *大韓獸醫學會誌.*, 40(4), 2000

서영우, 김종택, 신성식., 수도권 일대 집단 번식농장 사육견에서의 개심장 사상충 감염실태., *大韓獸醫學會誌.*, 41(1), 2001

이정치., Modified Knott's test와 Antigen test를 이용한 개의 심장사상충 (*Dirofilaria immitis*) 감염실태 조사., *全南大學校.*, 1996

이재구., 아세톤 집중법에 의한 전주지방 축견의 견사상충 감염률 조사., *대한수의사회지.*, 6: 42-44, 1966

이재구., *최신수의기생충학.*, 2nd,: 244-249, 1999

이철순, 지차호., 개 심장사상충 (*Dirofilaria immitis*) 진단을 위한 항원성
조사 및 단크론항체 생산., 大韓獸醫學會誌., 40(1), 2000



Rapid diagnostic method for canine heartworm disease

Ju-Yul Lee

Department of Veterinary Medicine, Graduate school
Cheju National University
Jeju Korea

(Advised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Abstract

Immunochromatography against *Dirofilaria immitis* antigen was developed for the rapid diagnosis of Canine heartworm infection. Somatic antigen and excretory/secretory antigen were prepared from the adult worms to immunize BALB/c mice. Spleen cells from immunized BALB/c mice were fused with SP/2 myeloma cells to develop hybridoma clones secreting specific monoclonal antibodies against heart worm antigens.

Developed of 3 of IgM type and 1 of IgG type monoclonal antibodies combined with 14 and 19 kDa CHW specific antigen of Canine heartworm(CHW) infection positive serum.

When perform sandwich ELISA using monoclonal antibodies pair CHW01 and CHW10 clones with 61 reference serum, sensitivity and specificity were 100%.

Sensitivity and specificity of rapid diagnostic method developed by Immunochromatography method were 100% respectively.

key word : canine heartworm, (*Dirofilaria immitis*) , monoclonal antibody, ELISA, colloidal gold