

肝蛭症의 酵素免疫學的 診斷을 위한 抗原分劃

全北大學校 獸醫寄生蟲學教室

李宰求·白秉杰·李存華

緒 論

소의 肝蛭症은 우리나라에서 主要寄生蟲症의 하나이며, 養畜家에게 막대한 經濟的 損失을 주고 있다. 이에 의한 損失을 減少시켜 養畜家의 經濟狀態를 潤澤하게 하기 위해서는 그 豫防對策의 樹立과 實踐이 시급히 要請되는 바이다.

肝蛭症은 蟲卵檢査, 寒天二重擴散法, 逆免疫電氣泳動法 그리고 酵素免疫診斷法(ELISA) 등으로 診斷할 수 있으며, 그 중에서 가장 簡便한 方法으로서는 糞便檢査를 통한 蟲卵 檢出方法인데 이는 感染後 8週에야 비로소 可能하다(De Leon *et al.*, 1981). 그리고, 蟲卵 排泄 1個月前에야 비로소 急性臨床症狀이 나타나 早期 診斷이 不可能하므로, 最近에 이르러 酵素免疫學的 診斷方法이 널리 利用되고 있다(Voller *et al.*, 1976a).

우리나라에서 李 등(1985)은 소의 肝蛭症을 ELISA로 診斷하기 위한 抗原과 抗血清의 適正稀釋倍率을 確立시키고 抗原의 感度(75%)를 求한 바 있는데, 著者 등은 抗原의 感度を 向上시키기 위하여 從來의 ELISA에 使用하던 肝蛭 粗抗原을 分劃하여 보다 더 敏感하고 特異的인 抗原을 索出하고 그 特性을 把握하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

粗抗原 調製: 소의 膽管으로 부터 肝蛭 成蟲 20g을 採集, 0.9% 生理食鹽水로 3回 洗滌, 均質器로 粉碎한 다음 100ml의 磷酸緩衝液을 넣어 李 등(1985)의 方法에 準하여 水溶性 抗原(以下 粗抗原이라 稱함)을 얻었다.

粗抗原의 分劃: 5ml의 粗抗原(蛋白質量 20mg/ml)을 세파덱스 G-100으로 充填시킨 컬럼(2.0×95cm)에 넣고 20ml/hr의 流速으로 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.6)을 使用하여 이를 溶離시켜 100個의 試驗管에 3.5ml씩 分注한 다음 280nm 波長으로 吸光度를 測定하여 吸光度의 피이크에 따라 溶離液을 7個로 나누었다(以下 分劃抗原이라 稱함). 그리고, blue dextran (MW>150,000), hemoglobin (MW 66,400), cytochrome C (MW 12,400), tryptophan (MW<5,000) 등을 標準

蛋白質로 使用하여 $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ (V_e : elution volume, V_0 : void volume, V_t : total volume)의 公式으로 分劃抗原의 分子量을 求하였다. 分劃抗原을 다시 4°C에서 24時間 visking tube로 透析하여 ELISA에, 冷凍乾燥시켜 -70°C에 保管하여 寒天二重擴散法에 使用하였다. 粗抗原과 分劃抗原의 蛋白質量은 Lowry *et al.* (1951)의 方法에 準하여 定量하였다.

肝蛭陽性 및 陰性血清: 1985年 4~6月사이에 全州屠畜場에서 屠殺되고 있는 소의 膽管에서 肝蛭 成蟲이 確認된 24例의 血清(以下 肝蛭 陽性血清이라 稱함)과 肝蛭 診斷用 抗原(家畜衛生研究所 生理食鹽水 抽出液製; 以不 診斷用抗原이라 稱함)에 의한 皮內反應檢査에서 陰性으로 나타난 소의 血清(以下 肝蛭 陰性血清이라 稱함)을 使用하였다.

肝蛭人工感作 家兎血清: 2마리의 家兎(體重 약 2kg)에 粗抗原(蛋白質量 30mg/ml) 0.5ml와 同量의 Freund complete adjuvant를 混合하여 1週에 1回씩 3회에 걸쳐 腋窩部에 皮下注射한 後 2週제에 血清을 얻었다(以下 肝蛭感作血清이라 稱함). 한편, 抗原注入後 2日間에 걸쳐 gentamycin (2.5mg/kg)을 하루 2回씩 筋肉注射하였다.

肝吸蟲感染 家兎血清: 肝吸蟲의 被囊幼蟲 150個씩을 2마리의 家兎(體重 약 2kg)에 經口投與한 다음 35週에 採血하여 血清을 分離하였다(以下 肝吸蟲 陽性血清이라 稱함).

以上的 모든 血清은 -70°C에 保管, 使用하였다.

寒天二重擴散法: Agarose를 veronal 緩衝液(barbital 1.4g, barbital sodium 5.0g, NaCl 1.0g, 증류수 1l: pH 8.2)으로 1%가 되도록 稀釋한 다음 85~90°C에서 重濃溶解시켜 玻璃板위에 2mm 두께의 寒天板을 만들어 4°C 냉장고에 1晝夜 放置한 後 試驗에 使用하였다.

粗抗原과 여러가지 血清을 反應시켜 沈降帶를 觀察하기 위하여, 1個의 內孔(直徑 8mm)에 80μl의 粗抗原(蛋白質量 20mg/ml)과 內孔으로부터 4mm 떨어진 8個의 外孔(直徑 6mm)에는 소의 肝蛭陽性血清(1, 2番) 및 陰性血清(3, 4番) 家兎의 肝吸蟲陽性血清(5番) 및 陰性血清(6番) 그리고 肝蛭感作血清(7, 8番)을 各各 50 μl씩 넣었다.

한편, 粗抗原과 分劃抗原에 대한 肝蛭感作血清의 沈降反應을 觀察하기 위하여 內孔에 80μl의 肝蛭感作血

清, 外孔에 50 μ l의 粗抗原 1個와 分劃抗原(蛋白質量 20mg/ml) 7個를 各各 넣었다.

이와 같이 抗原과 血清을 넣은 寒天板을 保濕室에 넣어 室溫에서 12時間, 4°C에서 48時間 放置하였다. 그 다음 veronal 緩衝液/生理食鹽水(1/20) 混合溶液으로 1日 1回씩 3日間 洗滌, 乾燥시킨 後 amido black 10B 溶液(amido black 10B 0.5g, 메탄올 50ml, 冰醋酸 10ml, 증류수 40ml)으로 3~5分間 染色하여 5% 水醋酸과 증류수로써 脫色, 沈降帶를 觀察하였다.

ELISA 方法: Voller *et al.*(1976a)과 Ruiteng 및 Van Knapen(1985)의 方法을 약간 修訂한 李 등(1985)의 方法에 準하여 抗原의 特異性 및 感度를 求하였으며 이 때 使用한 抗原蛋白質量은 5 μ g/ml이었다.

粗抗原 및 分劃抗原의 皮內反應: 肝蛭感染 牛 40頭를 5頭씩 8群으로 나누어 各 소의 尾根部에 診斷用 抗原 0.2ml와 그 2cm 後方에 粗抗原 또는 分劃抗原 0.2ml (蛋白質量 100 μ g/ml)씩을 皮內注入한 後 15分에 丘疹의 直徑을 測定比較하였다.

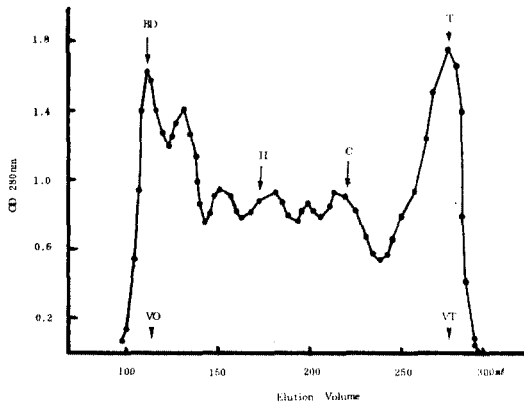


Fig. 1. Fractionation of *Fasciola hepatica* extract into 7 fractions by sephadex G-100 gel chromatography. Arrows indicate elution points of blue dextran (BD), hemoglobin (H), cytochrome C (C) and tryptophan (T). Vo: void volume, Vt: total bed volume

結 果

抗原의 分劃: 肝蛭의 粗抗原을 세파덱스 G-100으로 컬럼크로마토그래피하여 Fig. 1에 表示한 바와 같이 7個의 피이크로 分劃하였는데 그 중에서 第1, 2, 7分劃의 吸光度가 높았다. 이들 7個 分劃을 透析하여 얻은 蛋白質量과 分子量은 Table 1에 表示한 바와 같다. 즉, 第1, 5, 7分劃의 分子量은 各各 >150,000, 26,000, <5,000이었으며, 蛋白質量은 ml當 1.3mg, 1.2mg 그리고 0.4mg으로 各各 다르다.

寒天二重擴散法: 粗抗原을 肝蛭 自然感染牛血清, 家兔의 肝吸蟲 感染血清, 家兔의 肝蛭 感作血清에 反應시켰던 바 家兔의 肝蛭 感作血清에서만 6個以上の 沈降帶가 나타났을 뿐 그밖의 血清에서는 沈降帶가 전혀 觀察되지 않았다(Fig. 2). 한편, 粗抗原과 分劃抗原을 肝蛭 感作血清에 反應시켰던 바 Fig. 3에서 보는 바와 같이 沈降帶數는 粗抗原 >6個, 第1分劃抗原 >3個, 第2와 3分劃抗原 2個, 第4, 5, 6分劃抗原 1個이었다.

肝蛭 陰性血清의 特異性: 소의 肝蛭 陰性血清 16例였으나 第7分劃抗原에서는 沈降帶를 전혀 觀察할 수

Table 1. Molecular weights and protein concentrations of *Fasciola hepatica* antigens fractionated by Sephadex G 100 gel chromatography

No. of fractions	Molecular weight (K dalton)	Protein con. (mg/ml)
I	150	1.3
II	126	1.5
III	90	1.1
IV	46	1.0
V	26	1.2
VI	16	1.5
VII	5	0.4

Table 2. ELISA results by fractionated antigens against positive and negative sera of bovine fascioliasis

No. of fractions	Negative sera (16 cases)			Positive sera (24 cases)		Ratio of mean of positive sera to that of negative
	Mean \pm SD	Mean+2SD	Specificity of antigen(%)	Mean \pm SD	Sensitivity of antigen(%)	
Crude antigen	0.37 \pm 0.14	0.65	100	1.84 \pm 0.35	100	4.97
I	0.78 \pm 0.28	1.34	93.7	2.09 \pm 0.25	100	2.67
II	0.64 \pm 0.22	1.08	93.7	1.64 \pm 0.26	100	2.56
III	0.34 \pm 0.16	0.66	100	1.52 \pm 0.31	100	4.47
IV	0.37 \pm 0.15	0.67	100	1.86 \pm 0.16	100	5.02
V	0.23 \pm 0.09	0.42	100	1.94 \pm 0.19	100	8.43
VI	0.42 \pm 0.10	0.62	100	1.09 \pm 0.29	87.5	2.59
VII	0.93 \pm 0.31	1.55	100	0.96 \pm 0.18	0	1.03

Fig. 2. Precipitation test of crude antigen of *Fasciola hepatica* against bovine positive sera naturally infected with *F. hepatica* (1, 2), bovine negative sera (3, 4), rabbit positive serum with *Clonorchis sinensis* (5), rabbit negative serum (6) and sera of immunized rabbits by crude antigen of *F. hepatica* (7, 8).

에 대한 粗抗原 및 各 分割抗原의 ELISA 값은 Table 2에 表示한 바와 같이 比較의 第 1, 7 分割抗原의 反應 값이 높았다. 各 抗原의 特異性 즉, 抗原과 肝絛 陰性 血清의 反應值에서 標準吸光度(正規分布上 95% 信賴 區間: 平均 ELISA值 + 2SD)를 벗어난 것은 第 1, 2 分割抗原의 16例중 各各 1例씩으로 93.7%이었으며 다 른 抗原에서는 모두 100%의 抗原特異성을 보였다.

肝絛 陽性血清의 感度: 소의 肝絛 陽性血清 24例에 대한 各 分割抗原의 ELISA 값은 Table 2에 表示한 바 와 같이 第 1 分割抗原 2.09 ± 0.25 , 第 5 分割抗原 1.94 ± 0.19 로서 비교적 높았으며 第 5 分割抗原의 陽性血清 ELISA 값은 陰性血清보다 8.43배 높아 여러 抗原중에서 가장 큰 差異를 보여 주고 있었다. 한편, 陽性血清 에 대한 粗抗原 및 各 分割抗原의 感度 즉, 標準吸光度보다 낮은 反應值을 갖는 例는 第 6, 7 分割抗原의 各 24例중 3例(87.5%), 24例(0%)이었으며 그밖의 抗原은 모두 標準吸光度보다 높아 100%의 感度を 나타 내었다.

抗原의 皮內反應: 診斷用抗原에서 陽性으로 判定된 소 40頭에 대하여 粗抗原 및 各 分割抗原을 反應시켜 丘疹의 크기를 觀察한 結果는 Table 3에서 보는 바와 같이 診斷用 抗原 40例의 丘疹 平均크기는 2.46 ± 0.15 cm 이었으며 各群의 5例에 대한 丘疹 平均크기는 分割 順序에 따라 그 값이 점점 작아졌다.

考 察

肝絛症의 簡便한 診斷方法은 糞便으로부터 蟲卵을 檢 出하는 것 인데 이는 다른 寄生蟲卵과의 區別이 困難

Fig. 3. Precipitation test of serum from immunized rabbit by crude antigen of *F. hepatica* against crude antigen (C) and fractionated antigens (1 to 7).

Table 3. Comparison of wheal sizes by the antigen of VRI* with fractionated antigens for bovine fascioliasis

Antigens	Wheal sizes(cm)
VRI antigen(40 cases)	2.46 ± 0.15
Crude antigen(5 cases)	2.40 ± 0.17
Fractionated antigens(5 cases)	
I	2.87 ± 0.17
II	2.73 ± 0.05
III	2.47 ± 0.09
IV	2.22 ± 0.04
V	2.22 ± 0.13
VI	1.90 ± 0.08
VII	1.70 ± 0.16

Remark; VRI*: Veterinary Research Institute, Korea

하다. 最近에 이르러, 寄生蟲사이의 交叉反應에 의한 偽陽性 및 偽陰性反應이 적다고 알려진 ELISA가 寄生 蟲의 免疫學的 診斷方法으로 紹介된 이래(Voller *et al.*, 1976 a, b, c) 많은 寄生蟲症 診斷에 이 方法이 應 用되고 있는 實情이다.

ELISA用 抗原은 주로 生理食鹽水(崔 등, 1979; Cho *et al.*, 1981)와 磷酸緩衝液(Oldham, 1983; Hillyer *et al.*, 1979)을 使用하여 蟲體로 부터 抽出하고 있으 며, 抗原성을 向上시키기 위하여 肝絛體表에서 特異抗 原을 分離하거나(Bennet *et al.*, 1982; Hillyer, 1980), 成蟲을 1% nonidet P-40 (Hillyer, 1980)이나 sodium dodecyl sulphate(Hillyer *et al.*, 1979, 1980)와 같은 洗淨劑 등을 生理食鹽水 또는 磷酸緩衝液에 添加하고 있다.

또한 Oldham(1983)은 肝絛 粗抗原을 세파덱스 G-

200, Hillyer *et al.* (1979)은 세파덱스 G-250과 G-50 그리고 Hillyer *et al.* (1981)은 Sephacryl S-200 등으로 분劃, 精製한 바 있으며, 崔 등(1979)은 肝蛭 抽出物을 세파덱스 G-200으로 분劃한 抗原을 家兔에게 感作시켜 血清을 얻은 다음 肺 및 肝吸蟲 그리고 雙口吸蟲의 抗原과 反應시켜 特異沈降帶形成 與否를 觀察한 바 있다.

本 實驗에서는 粗抗原으로 부터 보다 敏感하고 特異한 抗原을 얻고자 세파덱스 G-100으로 粗抗原을 分劃하여 얻은 抗原들과 肝蛭 陰性 및 陽性血清을 反應시켜 OD값을 測定함과 더불어 寒天二重擴散法으로 形成된 沈降帶의 特性을 觀察하였다.

즉, 粗抗原 및 各 分劃抗原을 소의 肝蛭 陰性 및 陽性血清에 反應시켜 ELISA를 遂行한 바 第5分劃抗原의 陰性血清 ELISA값은 0.23 ± 0.09 로서 다른 抗原들에 비해 가장 낮았으나, 陽性血清과의 差異는 가장 컸다(Table 2). 陽性血清의 ELISA값에 있어서는 各 分劃抗原중에서 分子量이 가장 큰 ($>150,000$) 第1分劃抗原이 2.09 ± 0.05 로서 OD값 또한 가장 컸으며, 이는 Oldham(1983)이 肝蛭 粗抗原을 세파덱스 G-200으로 分劃한 7個의 抗原을 肝蛭 人工感染 初期의 송아지에서 分離한 血清과 反應시켜서 얻은 ELISA값 중에서 第1分劃抗原이 가장 컸던 것과 같다. 그러나, 本 實驗에 있어서 陰性血清과 第1分劃抗原을 反應시켜 얻은 ELISA값은 무려 0.78 ± 0.28 이며 特異性 또한 다른 抗原에 있어서는 100%이었는데 比하여 93.7%밖에 되지 않아 非特異的인 抗原이라고 할 수 있다. 한편, 第7分劃抗原은 가장 非特異的인 抗原으로서 ELISA값은 陰性血清 0.93 ± 0.31 , 陽性血清 0.96 ± 0.18 로서 陰性 및 陽性血清과의 ELISA값의 有意的인 差異가 거의 없으며 그 感度 역시 0%이었다.

소의 肝蛭 感染血清과 粗抗原을 寒天二重擴散法으로 反應시켰던 바 沈降帶를 전혀 觀察할 수 없었으나 Doyle (1973)은 송아지에 肝蛭 被囊幼蟲 500~750個를 人工感染시켜 얻은 血清과 粗抗原을 反應시켜 沈降帶를 觀察하였다. 또한 Hillyer *et al.* (1985)은 肝蛭 被囊幼蟲 1,200個를 송아지에 人工感染시킨 後 經時的으로 沈降帶를 確認한 바 感染 2~21週 사이에 1~3個의 沈降帶가 나타났으나 蟲體數를 보다 적게 感染시킨 例에서는 沈降帶를 觀察할 수 없으므로 소의 肝蛭 感染血清에서의 沈降帶 形成은 肝蛭의 感染 蟲體數와 밀접한 關係가 있다고 하였다. 그러므로, 本 實驗에서 소의 肝蛭 感染血清이 沈降帶를 전혀 形成하지 못한 것은 아마도 蟲體數가 적었기 때문이라고 생각된다. 또한, 肝吸蟲의 被囊幼蟲 150個를 家兔에게 經口投與하여 35週 後에 얻은 血清과 粗抗原을 反應시켰던 바 沈降帶를 전혀 觀察할 수 없었는데 이는 家兔의 肝吸蟲 感染血清과 肝蛭粗抗原사이에는 交叉反應이 成立될 수 없음을 뜻한다. 그러나, 家兔에게 肝蛭 粗抗原을 感作시켜 얻은 血清과 粗抗原을 비롯한 分劃抗原들을 沈降反應시켰던

바 粗抗原에 있어서는 6個以上, 各 分劃抗原에 있어서는 分劃順序에 따라 沈降帶數가 점점 減少되었는데 이는 抗原이 점점 純粹하게 分離된다는 것을 뜻한다.

이와 같이 粗抗原을 세파덱스 G-100으로 分劃한 各 抗原 중에서 陰性和 陽性血清사이의 ELISA값이 가장 큰 差異를 보였고 寒天二重擴散法에서 沈降帶가 현저히 減少되었던 第5分劃抗原이 肝蛭症의 免疫學的 診斷에 有效하게 使用할 수 있는 特異抗原이라고 생각할 수 있다. 그 이유는 첫째, 第5分劃抗原의 陰性血清에 대한 ELISA값이 0.23 ± 0.09 로서 7個의 分劃抗原중 가장 낮았으며, 陽性血清 ELISA값에 있어서도 1.94 ± 0.19 로서 第1分劃抗原을 除外한 다른 分劃抗原보다도 比較的 높은 CD값을 보였으며, 둘째, 抗原의 特異性和 感度を Cho *et al.* (1981)과 李 등(1985)의 方法에 의하여 算出하였을 때 第5分劃抗原에서 100%의 特異性和 感度(Table 2)가 나타났으며, 셋째, 寒天二重擴散法에서 第5分劃抗原의 沈降帶數가 1個 뿐이었는데도 不拮하고 陽性血清의 ELISA 값이 陰性血清의 것에 比하여 8.43倍로서 顯著한 差異가 있었으며, 넷째 第5分劃抗原의 分子量이 26,000으로서 De Weil *et al.* (1984)이 肝蛭의 種特異抗原性物質을 分離, 이의 分子量을 14,000~43,000으로 報告한 것과 類似하였다. 또한, Oldham(1983)은 세파덱스 G-200으로 肝蛭 粗抗原을 分劃하고 肝蛭 被囊幼蟲을 송아지에 人工感染시킨 後 經時的으로 ELISA를 遂行, 觀察하였던 바 第5分劃抗原이 感染 第6週 後부터 持續的으로 反應值가 上昇하여 重復感染 또는 慢性感染 例의 診斷에 使用할 수 있다는 有效한 抗原임을 暗示하였는데 이의 分子量 역시 30,000이었다. 그러므로, 第5分劃抗原은 다른 分劃抗原보다 우리나라에서와 같이 肝蛭의 重復感染 또는 慢性感染 例가 흔한 地域에서의 診斷目的으로 應用性이 높게 評價되는 特異抗原이라 생각할 수 있다.

한편, 肝蛭症의 또 다른 診斷方法으로 迅速, 簡便하고 感度が 높은 皮內反應法이 널리 應用되고 있는 實情이다. 本 實驗에 있어서 診斷用 抗原에 의하여 陽性으로 判定된 40頭의 소를 5頭씩 8群으로 나누어 粗抗原 및 7個의 分劃抗原을 皮內에 注入, 丘疹의 크기를 測定, 比較하였던 바 診斷用 抗原에서의 丘疹크기는 2.46 ± 0.15 cm이었으며, 分劃抗原중에서는 第1分劃抗原에 대한 丘疹 크기가 가장 크게 나타났었다. 이는 다른 分劃抗原보다 分子量이 가장 크고, 沈降反應에서 沈降帶數가 가장 많아서 純粹分離가 되지 않은 狀態이므로 그러한 結果가 나타났다고 생각된다. 따라서 抗原의 分子量과 沈降帶數가 적어지는 分劃順序에 따라 皮內反應의 丘疹 크기도 작아지는 傾向을 보였다.

結 論

肝蛭症을 酵素免疫學的인 方法으로 診斷하기 위하여 肝蛭 粗抗原을 세파덱스 겔 컬럼크로마토그래피하여 7

個의 分割抗原을 얻어 ELISA, 寒天二重擴散法 그리고 皮內反應을 實施한 바 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. 抗原의 特異性(標準吸光度 ; 陰性血清의 平均 ELISA值의 95% 信賴區間)은 第1과 2分割抗原은 93.7%이었으나 그밖에 다른 抗原들은 모두 100%이었다.

2. 分割抗原의 感度(標準吸光度보다 높은 陽性血清의 ELISA 反應值)는 第6과 7分割抗原은 各各 87.5%와 0%이었으나, 다른 分割抗原들은 모두 100%이었다.

3. 分割抗原중에서 肝蛭 陽性血清과 陰性血清사이에 가장 顯著한 ELISA값의 差異가 나타난 것은 分子量 26,000의 第5分割抗原으로서 陽性血清의 ELISA값은 陰性血清의 것보다 8.43倍이었다.

4. 寒天二重擴散法에서 소의 肝蛭 感染血清과 粗抗原을 反應시킨 바 沈降帶는 전혀 觀察되지 않았으나 家兔의 肝蛭 感作血清과 粗抗原 및 各 分割抗原을 反應시킨 沈降帶數는 粗抗原 6個以上, 第5分割抗原 1個이었다.

5. 肝蛭 感染 소에 대한 皮內反應에 있어서 第1, 2, 3分割抗原은 診斷用 抗原의 丘疹크기인 >2.46cm보다 컸으며, 그밖의 分割抗原은 診斷用抗原의 陽性判定 丘疹크기인 >1.5cm보다 컸었다.

以上の 結果로 미루어 보아 第5分割抗原은 肝蛭症의 免疫學的 診斷에 有效하게 使用할 수 있는 特異抗原이라고 생각된다.

參 考 文 獻

Bennett, C. E., Joshua, G.W.P. and Hughes, D.L. (1982) Demonstration of juvenile-specific antigen of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, 68(5):791-795.
 崔源永, 李玉蘭(1979) 肝蛭(*Fasciola hepatica*)의 免疫電氣泳動法. *기생충학잡지*, 17(1):73-80.
 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.
 De Weil, N.S., Hillyer, G.V. and Pacheco, E.(1984) Isolation of *Fasciola hepatica* genus-specific antigens. *Inter. J. Parasit.*, 14(2):197-206.
 Doyle, J.J. (1973) The precipitin response induced in calves by a single experimental infection with

Fasciola hepatica. *Res. Vet. Sci.*, 15:119-120.
 De Leon, D. and Quinones R. (1981) The prepatent and patent periods of *Fasciola hepatica* in cattle in Puerto Rico. *J. Parasit.*, 67(5):734-735.
 Hillyer, G.V. and De Weil, N.S. (1979) Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infection with *Fasciola hepatica* II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbit. *J. Parasit.*, :680-684.
 Hillyer, G.V. (1980) Isolation of *Fasciola hepatica* tegument antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 12(5):695-699.
 Hillyer, G.V. and De Weil, N.S.(1981) Serodiagnosis of experimental fascioliasis by immunoprecipitation tests. *Inter. J. Parasit.*, 11:71-78.
 Hillyer, G.V., Sanchez, Z. and De Leon, D. (1985) Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by enzyme immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. *J. Parasit.*, 71(4):449-454.
 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Lewisfarr, A. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 Oldham, G. (1983) Antibodies to *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. *Vet. Parasit.*, 13:151-158.
 李宰求, 白秉杰, 李相福(1985) 肝蛭症의 酵素免疫學的 診斷. *기생충학잡지*, 23(1):95-101.
 Ruitenber, E.J. and Van Knapen, F. (1977) The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. *J. Infect. Dis.*, 136: 267-272.
 Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976a) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. World Health Organ.*, 53:55-65.
 Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E. (1976b) Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70(2):98-106.
 Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976c) A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Path.*, 29:150-153.

==Abstract==

Fractionation of Antigen for ELISA of Bovine Fascioliasis

Jae Ku Rhee, Byeong Kirl Baek and John Hwa Lee

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

In order to obtain the most specific and sensitive antigen from crude antigens of *Fasciola hepatica* for the immunodiagnosis of bovine fascioliasis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), phosphate buffered saline extract of *F. hepatica* was prepared. The crude extract was fractionated into 7 antigens using sephadex G-100 column chromatography. Seven fractionated antigens were applied to ELISA, precipitation test and intradermal test, respectively. Results obtained are as follows:

1. The specificity(95% confidence interval in negative sera of bovine fascioliasis; Mean+2×SD of absorbance) of the first(MW>150,000) and the second antigens(MW 120,000) were 93.7%, but those of others including crude antigen showed 100%.

2. The sensitivity(positive sera of bovine fascioliasis having higher values with compared to the criterion) of the first, the sixth (MW 16,000) and the seventh antigen (MW<5,000) were 91.6%, 87.5% and 0%, respectively, but those of others showed all 100%.

3. The absorbance by ELISA using the fifth antigen (MW 26,000) was 8.43-folds higher in the positive sera than that in the negative sera. This could be used as one of the most specific antigens for the immunodiagnosis of bovine fascioliasis.

4. In Ouchterlony test, precipitin lines were not found in the sera naturally infected with *F. hepatica*, but some were found in the sera of rabbits immunized with the crude antigens. The numbers of precipitin lines in the sera of rabbits were different in the different fractionated antigens. They were 6 in the crude, 2 in the second and the third antigens, 1 in the fourth, the fifth and the sixth antigens and absent in the seventh antigen, respectively.

5. The wheal size for bovine infected with *F. hepatica* was 2.46 ± 0.15 cm in the intradermal test antigen(saline extract of *F. hepatica*) supplied by the Veterinary Research Institute, Rural Development Administration, Korea. The wheal size of the first, the second and the third antigens were larger than that of intradermal test antigen, whereas those of the fourth, the fifth, the sixth and the seventh antigens showed smaller than that of the intradermal test antigen.

The results suggest that the fifth antigen may be specific antigen for the immunodiagnosis of bovine fascioliasis.