

行政院衛生署科技研究計劃書
期末報告

年度:八十五年

計劃名稱:台灣犬心絲蟲症之研究

計劃編號:DOH 85-TD-022

執行機關:國立陽明大學寄生蟲研究所

主持人:陳正成

填報日期:八十五年七月十五日

一、中文摘要

人類肺臟犬心絲蟲症 (human pulmonary dirofilariasis) 為寄生於犬之犬心絲蟲 (*Dirofilaria immitis*) 所引起。患者之肺臟腫塊大多被人體吸收或鈣化不會威脅人類生命。但其所引起之肺臟病變,大多被放射診斷誤診為腫瘤,因此患者常遭受非必要之開胸手術處置。目前人類肺臟犬心絲蟲症並無專一性診斷方法,在此實驗中我們建立人類肺臟犬心絲蟲症之酵素連結免疫吸附檢測系統,利用犬心絲蟲第五期幼蟲之粗抗原及 DNA 重組之融合蛋白質 (D 34-A fusion protein) 為抗原,進行人類肺臟犬心絲蟲症之血清診斷,並用於高、低危險群血清篩選。篩選結果顯示,南投縣信義鄉之高危險群居民在 1994 年採集 359 個血清、

1996 年採集 339 個血清與 1995 年在台東縣成功鎮之低危險群居民 248 個血清樣本中，對犬心絲蟲粗抗原呈陽性反應之血清陽性率分別為 2.5 % ， 2.1 % 與 0.4 % ； 以 DNA 重組合成之融合蛋白質當抗原測試相同之血清樣本，抗犬心絲蟲融合蛋白質抗原呈陽性反應之血清陽性率分別為 2.0 % ， 0.9 % 與 0 % 。

關鍵字 : 犬心絲蟲，類肺臟犬心絲蟲症，粗抗原，融合蛋白質，酵素連結免疫吸附檢測，血清流行病學

二、英文摘要

Human pulmonary dirofilariasis is a zoonosis caused by the dog heartworm *Dirofilaria immitis*. Human pulmonary dirofilariasis is usually presented as a spherical, subpleural, pulmonary embolization with granulomatous reaction, that is almost always a self-limited process posing no significant threat to human health. Nevertheless this lesion is usually mistaken radiological for a primary or metastatic lung tumor, necessitating thoracotomy with excisional lung biopsy for diagnosis. There is no specific method available presently for the differential diagnosis of human dirofilariasis. In this study, we established two ELISA systems using *D. immitis* L5 somatic antigen and recombinant DNA - derived *D. immitis* fusion protein, respectively, for the diagnosis of human dirofilariasis. Data are also presented on serological surveys using these two ELISA systems in human populations associated with high and low prevalence of canine dirofilariasis. Three hundreds and fifty nine and 339 human sera were collected from an area with high prevalence of canine dirofilariasis in 1994 and 1996, respectively. In addition, 248 human sera were collected from another area with low canine dirofilariasis prevalence in 1995. The human seropositive rates detected by ELISA using somatic antigen were 2.5 % and 2.1 % in the high canine dirofilariasis prevalence area in 1994 and 1996, respectively, while it was 0.4 % in the low prevalence area. The human

seropositive rates detected by ELISA using fusion protein were 2.0 % and 0.9 % in high canine dirofilariasis area in 1994 and 1996, respectively, while it was 0 % in low prevalence area.

Key Words: *Dirofilaria immitis* , Human pulmonary dirofilariasis , somatic antigen , fusion protein , Enzyme-linked immuno assay , seroepidemiological survey.

三、緒 論

1. 犬心絲蟲：

犬心絲蟲為常見於狗、貓、狐等食肉目動物之右心室及肺動脈的寄生蟲；蟲體細長，白色，雌蟲可長達 25 - 30 cm，尾部呈直線狀末端鈍圓，肛門開口於腹側，陰門則位於身體腹側前端，距離食道約 2.7 mm 處，卵胎生幼蟲一般稱為微絲蟲 (microfilaria)；雄蟲則長 12 - 16 cm，尾端捲曲數圈且有細小側翼，具有 4 - 6 對卵形乳突及 2 根交尾刺 (Ichiro and Yukiharu, 1988; Yong et al.,1992)。

犬心絲蟲之生活史可分為在蚊子體內時期及在犬隻體內時期兩部份 (Ichiro and Yukiharu, 1988; Yong et al.,1992)：

(1) 蚊子體內時期共計有四個階段

a.微絲蟲期 當蚊子吸入含有微絲蟲之血液後，24 小時內微絲蟲停留在胃內，經 24 - 36 小時移行到馬氏管並開始發育。

b.第一期幼蟲期 (first stage larvae) 進入馬氏管細胞內發育之微絲蟲，3 - 4 天變成粗短之前香腸型 (pre - sausage) 長約 220 - 240 μm ，直徑 20 μm ；再經 4 - 5 天發育為具完整腸道的香腸型 (sausage) 長約 500 μm ，直徑 25 μm ，此為第一期幼蟲。

c.第二期幼蟲期 (second stage larvae) 第一期幼蟲在感染後 6 - 7 天由細胞進入馬氏管管腔，經 2 - 3 天蛻皮成為第二期幼蟲。

d.第三期幼蟲期 (third stage larvae) 經過一段時間生長，第二期幼蟲蛻皮成為具感染性之第三期幼蟲，穿出馬氏管進入體腔，此時約為進入蚊子體內後 10 - 20 天，第三期幼蟲移行經由腹部到胸部而進入頭部到達口唇。

(2)犬隻體內時期共計有三個階段

a.第四期幼蟲期 (fourth stage larvae) 犬隻感染是蚊子吸血時，下唇內

之第三期幼蟲由下唇進入犬隻皮膚，或經由下顎穿刺的孔洞、毛囊進入而感染，第三期幼蟲在皮下組織及肌肉層停留，在進入後的 9 - 12 天蛻皮成為第四期幼蟲，此時幼蟲可達 25mm。

b. 第五期幼蟲期 (fifth stage larvae) 第四期幼蟲繼續發育，在進入犬隻體內第 60 - 70 天蛻皮，之後進入右心室。

c. 成蟲期 (adult worm) 發育到成熟約須 120 天，成蟲成熟、交配、胎生微絲蟲，微絲蟲出現在血中約在犬隻感染後 190 天左右，而生殖期則長達 2 - 5 年。

2. 犬心絲蟲病之流行病學：

犬心絲蟲在熱帶、亞熱帶及某些溫帶地區均有廣泛分佈，美國南部及東南部、地中海沿岸之歐洲及非洲國家、日本、中國大陸、東南亞地區、澳洲、太平洋及加勒比海地區均有高度流行。(Ciferri, 1982; Muro et al., 1990; Yong et al., 1992)。

在臺灣地區，1935 年日本人 Miyamoto 氏等利用解剖及血液檢查 70 隻犬，其中 68 隻台灣犬均屬陰性，惟兩隻進口犬 (中國大陸及日本各一隻) 感染犬心絲蟲 (引述自 Hsieh and Chung, 1956)；1956 年謝與莊氏在高雄縣檢查 75 隻犬，發現 4 隻 (臺灣犬 3 隻，進口犬 1 隻) 感染犬心絲蟲 (Hsieh and Chung, 1956)；1957 年黃氏等在臺北市解剖 290 隻犬，發現犬心絲蟲成蟲陽性率為 4.5 % (Huang et al., 1957)；1982 年陳氏等利用抽血及膜濾法檢查 440 隻犬，微絲蟲陽性率為 5.2 % (臺灣犬兩隻，其餘 21 隻為由美國及日本之進口犬) (Chen et al., 1982)；1986 年至 1988 年間吳氏等以解剖檢查 306 隻犬，發現成蟲陽性率為 24.8 % (Wu et al., 1988)，1992 年流浪犬之成蟲陽性率則上昇為 42 % (Wu et al., 1992)，1994 年之流浪犬之成蟲陽性率為 52.4 %，家犬之微絲蟲陽性率為 26 %，而臺北市之流浪犬成蟲陽性率更高達為 60.8 % (Wu et al., Unpublished observation)，因此臺灣地區已成為犬心絲蟲高度流行區。(附表一)

3. 對犬之致病性：

許多狗被犬心絲蟲寄生後並無臨床症狀出現，但當其大量寄生時，蟲體可以引起機械性循環障礙，蟲體阻礙心瓣膜功能，由於蟲體寄生在右心室及肺動脈前端，因此導致右側心臟顯著擴大和肥大，產生鬱血、肝硬化和腹水；當心室肥大

時開始出現臨床症狀，包括肺、腎和肝的水腫及門脈擴張，常引起咳嗽與缺乏體力等慢性症狀。(Ichiro and Yukiharu,1988 ; Yong et al.,1992)。

4. 人類肺臟犬心絲蟲症：

由於人類並非犬心絲蟲之正常宿主，此蟲在感染人後大多死於蚊蟲叮咬處附近的皮膚，亦有少數被血流沖至肺臟，引起肺臟肉芽腫梗塞，稱為人類肺臟犬心絲蟲症 (human pulmonary dirofilariasis)，主要病癥為胸痛、咳嗽、咳血與肺臟有直徑 1.0 - 3.7 cm 之鐮幣狀病灶。而其所引起之肺臟病變，大多被放射診斷誤診為腫瘤，因此患者常常遭受非必要開胸手術處置 (Ronald and Piggott , 1971 ; Dayal and Neafie, 1975 ; Hiroyuki et al., 1980 ; Takeuchi et al., 1981 ; Ciferri, 1982 ; Hawkins et al., 1985 ; Kochar et al., 1985 ; Ro et al., 1989 ; Bradham et al., 1990 ; Asimacopoulos et al., 1992 ; Chiang et al., 1992 ; Nicholson et al., 1992 ; Jarratt, 1995)。使患者蒙受非必要之侵犯性診斷或治療，造成醫療資源浪費。

5. 人類肺臟犬心絲蟲症的傳播：

一般認為犬心絲蟲症流行有四個主要因素，包括：(1)犬隻族群大小。(2)犬隻犬心絲蟲症之流行。(3)傳播媒介族群密度。(4)人類暴露於感染性蚊蟲叮咬的程度(Ciferri , 1982)。

犬心絲蟲為蚊子所傳播，已知有多種家蚊、斑蚊和瘧蚊皆可為病媒，而在台灣地區調查之結果顯示，主要病媒蚊為熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*)，其犬心絲蟲自然感染率在 1993 年為 3.8 %，而 1995 年則上升到 4.6 % (Wu et al., 1993 ; 1995)。熱帶家蚊為台灣地區居家最常見的蚊子，因此人類肺臟犬心絲蟲症患者可能會在台灣急遽增加。

6. 人類肺臟犬心絲蟲症之一般診斷方法：

臨床上人體肺臟犬心絲蟲症並無專一性診斷方法，胸部放射診斷顯示為一鐮幣狀病灶，惟其形狀不易與肺腫瘤區別，(Takeuchi et al., 1981 ; Ciferri, 1982 ; Hawkins et al., 1985 ; Ro et al., 1989 ; Bradham et al., 1990 ; Chiang et al., 1992 ; Nicholson et al., 1992 ; Jarratt, 1995)。而經胸壁細針抽取術 (transthoracic needle aspiration)

則不易直接採到蟲體，在文獻上已知近二百個確定病例中僅有二例是由此方法直接證實 (Hawkins et al., 1985 ; Roussel et al., 1990)。至於血清學檢查一般皆使用成蟲蟲體抗原 (somatic antigen) ，其專一性不高，極易與感染人體之其他蠕蟲發生交叉反應 (Haimilton et al., 1983 ; Sun and Sugane, 1992 ; Villanueva and Rodriguez - Perez, 1993)。直到 1991 年 Sun et al. 從雌性犬心絲蟲成蟲的 cDNA library 分離出選株，利用西方墨點法 (Western blotting) 與感染人類肺臟犬心絲蟲症患者血清作用，篩選得一個高抗原性的 cD 34 蛋白質 (Sun et al., 1991)，並經其在 1992 年以酵素連結免疫吸附法檢測證實此 cD 34 蛋白質之專一性，此 cD 34 蛋白質與許多被蠕蟲感染之人類血清都沒有交叉反應，例如：羅阿絲蟲 (Loa Loa)、蟠尾絲蟲 (Onchocerca volvulus)、班氏絲蟲 (Wuchereria bancrofti)、安尼線蟲 (Anisakis simplex)、犬蛔蟲 (Toxocara canis)、豬囊尾幼蟲 (Cysticercus cellulosae)、日本血吸蟲 (Schistosoma japonicum)、中華肝吸蟲 (Clonorchis sinensis) 和衛氏肺吸蟲 (Paragonimus westermani) 等；且和肺結核 肺癌的病人血清也沒有交叉反應 (Sun and Sugane, 1992)。

7. 研究動機：

近年來台灣地區犬隻之犬心絲蟲感染率較過去高出許多，且有急遽上升趨勢；台灣地處於熱帶及亞熱帶地區，溫度高，濕度大，頗適於蚊蟲孳生及繁殖，同時，台灣養犬風氣日盛，又疏於犬隻之管制，不僅犬隻之犬心絲蟲感染率日遽增高，人體感染病例也可能會快速增加，然而目前在臨床上人類肺臟犬心絲蟲症並無專一性診斷方法。

8. 研究目的：

希望建立高特異性人類肺臟犬心絲蟲症之酵素連結免疫吸附檢測系統，以供人類肺臟犬心絲蟲症的血清診斷。

四、材料與方法

1.人類血清：

(1) 人類肺臟犬心絲蟲症患者血清由台北榮民總醫院提供，另於 1994 及 1996 年至南投縣信義鄉採集當地居民血清 359 及 339 個樣本，此地區家犬之犬心絲蟲微絲蟲陽性率在 1993 年為 36.2 % (Wu et al., 1993)，在 1995 年為 37.5 % (Wu et al., 1995)。此外另由高雄醫學院提供之台東成功鎮居民血清樣本 248 個，此地家犬之犬心絲蟲微絲蟲陽性率為 5 % (Wu et al., Unpublished observation)。

(2) 其他寄生蟲感染之人類血清包括：人類肺臟犬心絲蟲症、肺癌和肺結核患者血清由台北榮民總醫院所提供；犬蛔蟲、亞洲條蟲 (*Taenia saginata asiatica*) 和痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 患者血清由台北醫學院所提供；廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 和中華肝吸蟲患者血清由高雄醫學院所提供。

2.犬心絲蟲：

所採用之第五期犬心絲蟲幼蟲 (L5 stage larvae) 由陽明大學吳金正老師所提供。取自台北地區流浪犬，心臟解剖後所得之蟲體，將蟲體以預冷的磷酸緩衝溶液 (phosphate - buffer saline ， PBS ， pH 7.3) 沖洗數次，儲存於 - 70 備用。

3. 犬心絲蟲之粗抗原製備：

犬心絲蟲之粗抗原係依 Tamashiro et al. (1985)、 Akao et al. (1991) 及 Villanueva and Rodriguez-Perez (1993) 之方法稍加以修改進行製備，取第五期幼

蟲先以 PBS (10mM , pH7.3) 沖洗 4 次 , 切成小片斷放入液態氮 (liquid nitrogen) 內急速冷凍 , 以研砵及杵研成微細粉末 , 溶解於含有 1 % Triton x-100 (Merck) 及 1mM phenylmethyl sulfluroride (PMSF , Merck) 之 PBS 中 , 於 4 靜置 1 小時 , 以 15,000xg 離心 (2K15 , Sigma) 20 分鐘 , 取上清液於 4 以蒸餾水透析 (6-8,000 MC , Spectra) 一晚 , 再經 15,000xg 離心 30 分鐘 , 取上清液測其蛋白質濃度 (Protein Assay , Bio-Rad) , 並加以分裝置於 - 70 備用。

4. 犬心絲蟲 cD34 融合蛋白 (fusion protein) 之製備 :

根據 Sun et al. (1991) 所發表的犬心絲蟲 cD34 cDNA 序列及蛋白質特性 , 設計二個 Primers , 此二者之序列 (TAC AAC AAG CAC AAG AGG CT and GTT GGT GAT AGT GAT TTT GGC) 涵蓋了 cD34 蛋白質大部份抗原性區域 , 且其 5' 端含有限制酵素之裂解序列 , 以利用於 subcloning 工作。 (Kellerman and Ferenci, 1982 ; Guan et al., 1988; Maina et al., 1988)

利用上述兩個 flanking primers 和第五期幼蟲之 genomic DNA template 用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction , PCR) 放大 , 得到預期之大約 500 bp 之 犬心絲蟲 cD34 部份 DNA fragment , 將此部份純化。

純化後之 DNA fragment 連接到 p MAL - C2 (New England Biolabs , U.S.A.) 質體內再送到 E. coli TB1 中生長 , 以含有 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - {symbol 98 \f "Symbol" \s 12|b} - D - galactoside (X - gal , New England Biolabs , USA) 與 isopropylthio - {symbol 98 \f "Symbol" \s 12|b} - D - galactoside (IPTG , New England Biolabs , U.S.A.) 之培養基進行篩選 , 並抽取其質體 DNA 做定序分析以確定其為 cD34 之正確 reading frame。

大量培養生產含有一段 cD34 蛋白質之 E. coli TB1 , 並在生長對數期加入 0.3 mM IPTG 誘導其表現含有 cD 34 之蛋白質 (Poole et al., 1992)。於 37 作用 2 小時後以 4000 xg 分離細胞 , 將細胞置入 - 20 一晚 , 以冰水解凍之細胞在 4 下進行超音波震盪 (Soniprep 150 , MSE) , 以每作用十五秒休息十五秒方式共作用八個循環打破細胞 , 再以 9000 xg 分離細胞碎片取上清液 , 其內含有 cD 34 之蛋白質 , 由於此段 overexpress 之融合蛋白質前端含有一小段 maltose binding protein (MBP) , 因此利用 amylose affinity chromatography 予以 one - step 快速純化 (Kellerman and Ferenci, 1982 ; Hugues and Duplay, 1988)。

純化後之融合蛋白質再以 protease factor Xa (New England Biolabs , U.S.A.)處理後將 MBP 切除，再經 hydroxyapatite chromatography 與 amylose affinity chromatography (New England Biolabs , U.S.A.) 後即能得到完全純化之犬心絲蟲 cD34 融合蛋白質。(Kellerman and Ferenci, 1982 ;Guan et al., 1988; Hugues and Duplay, 1988; Maina et al.,1988)。

5. 西方點墨法 (Western blotting):

將抗原加入等量 sample buffer (0.152g Tris-base , 2 ml Glycerol , 0.2g sodium dodecyl sulfate (SDS) , 0.2 ml 2-mercaptoethanol , 0.0001g Bromophenol blue , 4 ml H₂O) 於煮沸熱水中作用 5 分鐘，注入 10 % SDS polyacrylamide gel 槽中，以 50 V 電壓使抗原分子由聚集膠體 (stacking gel) 進行到分離膠體 (running gel) 再改以 100 V 電壓直到 bromophenol blue 移動到離底部 0.5 公分，關機後膠片與預先以 methanol 處理過之 membrane (Immobilon - p , Millipore) 泡入 transfer buffer (0.192 M Glycine, 0.025 M Tris, 0.0013 M SDS , 10-20 % MeOH) , 將浸過 transfer buffer 之濾紙、膠片、 membrane 與濾紙依序置入 Semi - Dry Blotting System (C.B.S.) 以 0.8 A / cm² 電流通電一小時進行轉漬。取出 membrane 切下的一部份進行蛋白質染色 (coomassie blue stain) , 另一部份進行抗體免疫吸附分析，先以 blocking buffer (PBST - milk) 浸潤一小時，以 PBST 沖洗四次，加入稀釋之感染犬心絲蟲之犬血清於 37 作用一小時，以 PBST 沖洗四次，加入 1 : 5000 稀釋之 alkaline phosphatase - conjugated goat anti - dog IgG (Calbiochem) 於 37 作用一小時，以 PBST 沖洗四次，加入受質溶液 (Nitro Blue Terazolium / 5 - Bromo - 4 - Chloro - 3 - Indolyl Phosphate , Sigma) 直到呈色，以自來水沖洗終止呈色反應。以測試融合蛋白質之抗原性。

6. 酵素連結免疫吸附檢測法 (Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay - ELISA):

(1) 粗抗原之酵素連結免疫吸附檢測法之建立:

酵素連結免疫吸附檢測法採用 Muro et al. (1992) 之方法，以碳酸緩衝溶液(carbonate buffer , pH 9.6) 稀釋不同濃度之犬心絲蟲第五期幼蟲粗抗原在 4 下處理 ELISA plates (96-wells ELISA Plates , Corning) 一晚，再以含有 0.05 % Tween - 20 (Merck) 之 PBS (PBST) 洗 plate 4 次，並以 200ul

之 PBST - bovine serum albumin (2 %) (BSA , Boserol Organon Teknika , PBST-BSA , pH 7.3) 於 37 °C 下阻斷 (blocking) 1 小時,再以 PBST 沖洗 4 次。加入 100 μl 以 PBS - BSA 稀釋之不同倍數受檢人類血清 , 置於 37 °C 作用 1 小時,再以 PBST 沖洗 4 次。加入 100 μl 之稀釋 (1 : 1000) peroxidase-conjugated anti - human IgG (Eappel , Organon Teknika) 於 37 °C 作用 1 小時,再以 PBST 沖洗 4 次,並以 2, 2'-azino - di -[3 -hyllbenzthiazoline - 6 - sulfonic acid](ABTS) 呈色劑和 hydrogen peroxide solution (H₂O₂) (Peroxidase Substrate Kit , Bio - Rad) 為受質。5 分鐘後以 1 % SDS 終止反應 , 置於 Titertek Multiscan Colorimeter (Flow , USA) 以波長 405 nm 判讀。

(2) D 34-A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附檢測法之建立 :

以碳酸緩衝溶液稀釋之不同濃度犬心絲蟲 D 34-A 融合蛋白質在 4 °C 下處理 micro ELISA plate 一晚,再以 PBST 洗 ELISA plate 4 次,並以 200 ul 之 PBST - BSA 於 37 °C 下 blocking 1 小時,再以 PBST 沖洗 4 次。加入 100 μl 以 PBS - BSA 稀釋不同倍數之受檢人類血清,於 37 °C 作用 1 小時,以 PBST 沖洗 4 次。加入 100 μl 稀釋 (1 : 1000) 之 peroxidase-conjugated anti-human IgG (Eappel, Organon Teknika) 於 37 °C 作用 1 小時,再以 PBST 沖洗 4 次。並以 ABTS 和 H₂O₂ 為呈色劑與受質。5 分鐘後以 1 % SDS 終止反應,置於 Titertek Multiscan Colorimeter 以波長 405 nm 判讀。

7. 以酵素連結免疫吸附檢測法進行交叉試驗:

以前述所建立之犬心絲蟲粗抗原與 D 34-A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附檢測法分別與其他寄生蟲的抗血清進行交叉試驗。

五、研究結果

1. 高低危險群居民之血清採集：

根據 Wu et al. (1993;1995) 之調查研究報告顯示，南投縣信義鄉家犬之犬心絲蟲微絲蟲陽性率在 1993 年和 1995 年分別為 36.2 % 和 37.5 %；而該鄉犬心絲蟲中間宿主之調查結果顯示熱帶家蚊為其自然病媒，熱帶家蚊其犬心絲蟲自然感染率在 1993 年和 1995 年分別為 3.8 % 和 4.6 %，人和家畜皆為熱帶家蚊之吸血對象，因此該鄉有家犬感染之居民皆可被認為是感染犬心絲蟲之高危險群。此外在台東縣成功鎮，其家犬之犬心絲蟲微絲蟲陽性率為 5 % (Wu et al., Unpublished observation) 因此該地居民被認為是感染犬心絲蟲之相對低危險群。

1994 年至南投縣信義鄉採集高危險群居民血清樣本 359 個，其中女性 218 位，男性 141 位，年齡分佈為：10 歲以下 97 位，11 - 30 歲 81 位，31 - 50 歲 85 位，50 歲以上 96 位。

在 1996 年間再至南投縣信義鄉地區取 339 個受檢血清樣本，其中女性 177 位，男性 162 位，年齡分佈為：10 歲以下 5 位，11 - 30 歲 94 位，31 - 50 歲 103 位，50 歲以上 137 位。

台東縣成功鎮地區 248 個受檢血清樣本中，其中女性 142 位，男性 106 位，年齡分佈為：10 歲以下 7 位，11 - 30 歲 36 位，31 - 50 歲 73 位，50 歲以上 132 位 (表 1)。

2. 犬心絲蟲之粗抗原酵素連結免疫吸附檢測法之建立：

犬心絲蟲之粗抗原酵素連結免疫吸附檢測法中，最適宜使用濃度之測定是將欲測物質之濃度 2 倍系列稀釋，而檢測法中其餘物質濃度皆維持不變狀況下測定，結果發現在本檢測法中，犬心絲蟲之粗抗原最適宜濃度為 1.6×10^{-9} g protein / ml (圖 1)，而最適宜之人類血清稀釋倍數為 1:128 (圖 2)。

3. 高、低危險群居民血清之抗犬心絲蟲粗抗原抗體檢測:

以 1994 年 359 個高危險群地區之血清樣本進行檢測，將臨界值 (cut off value) 定為平均吸光值加 3 個標準偏差 (standard deviation) (Lobos et al., 1991 ; Muro et al., 1992 ; Villanue and Rodrigue-Perez, 1993) 以電腦 Microsoft Excel Version 5.0 程式計算繪製圖表，其血清陽性吸光度為 0.83 (圖 3)，血清樣本中有 9 個對犬心絲蟲粗抗原呈陽性反應，血清陽性率為 2.5 %，其中女性 6 位，男性 3 位，平均年齡為 60 歲。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 0.98。

1996 年 339 個高危險群地區之血清樣本進行檢測，臨界值為 0.79 (圖 4)，血清樣本中有 7 個對犬心絲蟲粗抗原呈陽性反應，血清陽性率為 2.1 %，其中女性 5 位，男性 2 位，平均年齡為 58 歲。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 0.96。

1995 年 248 個低危險群地區之血清樣本進行檢測，臨界值為 0.70 (圖 5)，血清樣本中有 1 個對犬心絲蟲粗抗原呈陽性反應，血清陽性率為 0.4 %，女性，年齡為 38 歲。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 0.95。

4. 犬心絲蟲 D 34 - A 融合蛋白質之製備：

根據 Sun et al. (1991) 所發表之犬心絲蟲 cD34 cDNA 序列 (附圖 1) 合成 Primer - 1 (TAC AAC AAG CAC AAG AGG CTA) 與 Primer - 2 (GTT GGT GAT AGT GAT TTT GGC) 和第五期幼蟲之 genomic DNA 模板進行 PCR 反應，得到一個約 1.6 kb 之 DNA fragment (圖 6)。

此 1.6 kb 之 DNA 片段經核酸定序比對後，發現此確為犬心絲蟲 cD34 cDNA fragment，但此段 1.6 kb DNA 片段含有 intron (圖 7)，因此於 E. coli TB1 中生長不能表現蛋白質特性。

為了去除此段 intron 干擾，利用前述之 cD34 cDNA 序列，另外合成一段 DNA 序列 Primer - 3 (GAT GAT CAT TCT GAG ATG GTT)；利用 Primer - 3 與 Primer - 2 兩個 flanking primers 與第五期幼蟲 genomic DNA 模板進行 PCR 反應，得到去除 intron 部份，其 PCR 產物約 326 bp 片段 (圖 8)。

將放大之 326 bp DNA fragment 純化後，連接到 pMAL - c2 質體內並 transform 到 E. coli TB1 生長，得到六個 clones，分別抽取其質體進行 DNA 定

序分析，經定序分析比對，確定其確實為 cD34 cDNA 之正確 reading frame (圖 9)。

在四個含 insert 之正確 reading frame 的 clones 中，取其中一個 clone 命名為 D 34 - A，大量培養 D 34 - A 細胞並以 IPTG 誘導其表現含有 D 34-A 之蛋白質 (Poole et al.,1992)，以超音波震盪器使細胞破裂釋出融合蛋白質，由於此 overexpress 之融合蛋白質前端含有一小段 mal E 所 encode 的 maltose binding protein (MBP)，所以得到分子量約 64 kD (圖 10)。

為確定所製備之融合蛋白質之抗原性，利用西方墨點法與感染犬心絲蟲之犬隻血清抗體作用進行檢測 (圖 11)，確定由 E. coli TB1 所表現之融合蛋白質 (64 kD) 確實是具有抗原性。

由於此融合蛋白質前端含有一段 MBP，可用 amylose affinity chromatography 予以純化，純化後之融合蛋白質以 protease factor Xa 將 MBP 切除，並利用西方墨點法與感染犬心絲蟲之犬隻血清抗體作用進行檢測 (圖 12)，確定純化後之融合蛋白質仍具有抗原性且 MBP 並不影響融合蛋白質之抗原性，因此不再進行分離 MBP 之純化工作。

5. D 34 - A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附檢測法建立：

犬心絲蟲 D 34 - A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附檢測法中，最適宜使用濃度之測定是將欲測物質濃度作 2 倍系列稀釋，而檢測法中其餘物質濃度皆維持不變之狀況下測定；在本檢測法中，由於此 overexpress 的融合蛋白質前端含有一小段 MBP protein，所以利用以 carbonate buffer 稀釋 (1: 10000) 之抗 MBP 多株抗體當底層藉以吸附融合蛋白質，而犬心絲蟲之 D 34 - A 融合蛋白質最好之檢測濃度為 10^{-10} g protein / ml (圖 13)，而最適宜之人類血清稀釋倍數為 1: 1000 (圖 14)。

6. 高、低危險群居民血清之抗犬心絲蟲融合蛋白抗體檢測：

以 1994 年高危險群地區 359 個血清樣本進行檢測，臨界值定為 1.01 (圖 15)，血清樣本中有 7 個對犬心絲蟲融合蛋白抗原呈抗體陽性反應，血清陽性率為 2.0%，其中女性 5 位，男性 2 位，平均年齡為 60 歲。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 1.12。與粗抗原檢測系統比較 (表

2), 以二個檢測系統分析皆呈陽性的有兩個, 一位男性, 一位女性, 平均年齡為 47 歲。

以 1996 年高危險群地區 339 個血清樣本進行檢測, 臨界值定為 0.91 (圖 16), 血清樣本中有 3 個對犬心絲蟲融合蛋白抗原呈抗體陽性反應, 血清陽性率為 0.9%, 其中女性 2 位, 男性 1 位, 平均年齡為 53 歲。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 1.00。與粗抗原檢測系統比較 (表 3), 以二個檢測系統分析皆呈陽性的有兩個, 一位男性, 一位女性, 平均年齡為 33 歲。

以 1995 年低危險群地區 248 個血清樣本進行檢測, 臨界值定為 0.73 (圖 17), 血清樣本中未發現對犬心絲蟲融合蛋白抗原呈抗體陽性反應之血清。而台北榮總發現之人類肺臟犬心絲蟲症患者血清吸光度為 0.98。與粗抗原檢測系統比較 (表 4), 並未發現以二個檢測系統分析皆呈陽性之血清檢體。

7. 以酵素連結免疫吸附檢測法進行交叉試驗:

以前述所建立之犬心絲蟲粗抗原與 D 34-A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附檢測法分別與其他寄生蟲感染之血清及本實驗中篩得之抗體陽性反應, 吸光值較高者同時進行交叉試驗 (圖 18)。實驗中加入由 1994 年以用兩種系統檢測皆呈陽性反應的兩個血清及在二系統中呈血清陽性反應, 分別取兩個吸光值最高之血清進行比較; 在粗抗原檢測系統中, 實驗結果顯示, 與感染痢疾阿米巴和犬蛔蟲之血清有較明顯之交叉反應, 而以融合蛋白質檢測則與感染其他寄生蟲如犬蛔蟲、亞洲條蟲、痢疾阿米巴、廣東住血線蟲及中華肝吸蟲感染血清並無明顯交叉反應, 且與肺癌和肺結核患者血清亦無交叉反應。

六、討論:

臨床上人類犬心絲蟲症並無專一性診斷方法，胸部放射診斷顯示此蟲在肺部為一錢幣狀病灶（pulmonary coin lesion），惟其形狀不易與肺腫瘤區別，（Ciferri, 1982； Hawkins et al., 1985； Ro et al., 1989； Bradham et al., 1990； Nicholson et al., 1992； Jarratt, 1995）。而經胸壁細針抽取術則不易直接取得蟲體，在文獻上已知近二百個人類犬心絲蟲症之確定病例中僅有二例藉此法直接證實（Hawkins et al., 1985； Roussel et al., 1990）。

目前最常被使用於診斷人類犬心絲蟲症的方法，為利用成蟲蟲體抗原來檢測患者血清中特異性抗體，唯其專一性不高且極易與感染人體之其他蠕蟲抗原發生交叉反應（Hamilton et al., 1983； Yazdanbakhsh, 1990； Sun and Sugane, 1992； Villanueva and Rodriguez - Perez, 1993）。為了得到較高特異性的抗原，DNA 重組技術已被廣泛應用於絲蟲或其他寄生蟲感染之抗體偵測，如 Lucius et al. (1988； 1992) 用於蟠尾絲蟲之特異性抗原（Ov33）重組與抗原蛋白質合成、Lobos et al. (1991) 用於蟠尾絲蟲特異性抗原重組與蛋白質合成、Raghavan et al. (1992) 與 Dissanayake et al. (1992) 用於班氏絲蟲之 muscle-associated 抗原（WbN1）重組與合成、Bradley et al. (1993) 與 Katharine et al. (1994) 用於蟠尾絲蟲抗原（Ov MBP/10, Ov MBP/11, Ov MBP/29）重組與合成、Zarlenga et al. (1994) 用於肥頭帶條蟲（*Taenia crassiceps*）之囊尾幼蟲（cysticercosis）抗原（TcA2-MBP）重組與合成、Sun et al. (1994) 用於旋毛蟲（*Trichinella spiralis*）之幼蟲特異性抗原重組與合成。其中 Lucius et al. (1988) 之重組 Ov33 蛋白質用於檢測已感染蟠尾絲蟲症之患者血清，專一性可達 96%；Lobos et al. (1990) 重組之蟠尾絲蟲特異性抗原用於檢測已感染蟠尾絲蟲症患者血清，專一性可達 98%（Yazdanbakhsh, 1990）；Bradley et al. (1993) 混合數個重組融合蛋白質用於檢測已感染蟠尾絲蟲症血清，其專一性可達 100%。

DNA 重組技術運用在犬心絲蟲方面，始於 1991 年 Sun et al. 由雌性犬心絲蟲成蟲的 cDNA library 分離出選株，利用西方墨點法與感染犬心絲蟲患者血清作用，篩選得一個高抗原性 cD 34 蛋白質，以此 cD 34 DNA 序列合成一融合蛋白質，並於 1992 年以酵素連結免疫吸附法檢測與許多蠕蟲感染之人類血清例如：羅阿絲蟲、蟠尾絲蟲、班氏絲蟲、安尼線蟲、犬蛔蟲、豬囊尾幼蟲、日本血吸蟲、中華肝吸蟲和衛氏肺吸蟲之病人血清都沒有交叉反應，甚至和肺結核、肺癌病人血清也沒有交叉反應（Sun et al., 1991），證實此 cD 34 蛋白質之專一性。

本實驗則根據 1991 年 Sun et al.將此 cD 34 蛋白質片段之 cDNA 序列進行 DNA 重組，合成 D 34 - A 融合蛋白質，實驗中以粗抗原和 D 34 - A 融合蛋白質之酵素連結免疫吸附系統與其他寄生蟲進行交叉反應，藉以比較融合蛋白質之專一性；實驗結果顯示，粗抗原酵素連結免疫吸附系統與感染痢疾阿米巴和犬蛔蟲患者血清有較明顯之交叉反應；而 D 34 - A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附系統則與實驗中其他寄生蟲感染血清如：犬蛔蟲、亞洲條蟲、痢疾阿米巴、廣東住血線蟲和中華肝吸蟲均無明顯交叉反應，且未與肺癌和肺結核患者血清產生交叉反應。此與 1992 年 Sun and Sugane 對含 cD 34 序列之融合蛋白質與其他寄生蟲感染血清無交叉反應結果相似，故 D 34 - A 融合蛋白質酵素連結免疫吸附系統其專一性較粗抗原酵素連結免疫吸附系統高。

以犬心絲蟲粗抗原進行酵素連結免疫吸附檢測，在高危險群區 1994 年與 1996 年之血清陽性率分別為 2.5 % 與 2.1 %，兩者之血清陽性率並無太大差異，此結果比利用粗抗原檢測西班牙地區居民之血清陽性率 5 % (Muro et al., 1990) 與 5.8 % (Simon et al., 1991) 低，與波多黎各地區的 2.66 % 相近 (Villanueva and Rodriguez - Perez, 1993) ；實驗中此高危險群區二年間之家犬微絲蟲陽性率分別為 36.2 % (Wu et al., 1993) 和 37.5 % (Wu et al., 1995) 與西班牙地區的犬微絲蟲陽性率 35.6 % 與 33.3 % 相近，比波多黎各地區的犬微絲蟲陽性率 20.4 % 高，而在 1994 年及 1996 年血清陽性者之平均年齡約在 58 歲與西班牙地區及波多黎各地區相近。在粗抗原酵素連結免疫吸附系統中，其臨界值以平均值加上三個標準偏差計算，在 1994 年及 1996 年其臨界值分別為 0.83 及 0.79，亦與西班牙地區之臨界值 0.8 (Muro et al. , 1990) 及波多黎各地區之臨界值 0.857 (Villanueva and Rodriguez - Perez, 1993) 相似。

以犬心絲蟲之 D 34-A 融合蛋白質進行酵素連結免疫吸附檢測，高危險群區居民於 1994 年與 1996 年之血清陽性率為 2.0 % 及 0.9 %，比同一時期的抗犬心絲蟲粗抗原之抗體陽性率低。

應用粗抗原和融合蛋白質酵素連結免疫吸附法進行檢測，發現高危險群居民在 1994 年 16 個陽性血清中，能用此兩種方法檢測皆呈陽性反應者有兩個；在 1996 年 10 個陽性血清中，以兩種方法檢測皆呈陽性反應者亦有兩個；在低危險群居民中，未發現同時以兩種方法檢測均呈陽性者；以粗抗原系統檢測結果呈血清陽性反應，而融合蛋白質系統篩選結果呈血清陰性者在 1994 年有 7 個，在 1996 年有 5 個，推測所導致原因可能是系統中粗抗原與其他寄生蟲抗原間之交叉反應 (Hamilton et al., 1983 ; Yazdanbakhsh, 1990 ; Sun and Sugane, 1992 ; Villanueva and Rodriguez - Perez, 1993)。本實驗中顯示粗抗原酵素吸附檢測系統中粗抗原與感染犬蛔蟲及痢疾阿米巴患者血清有交叉反應； Sun et al. (1992) 的結果也證實粗抗原與其他寄生蟲如羅阿絲蟲、蟠尾絲蟲、班氏絲蟲、

安尼線蟲、犬蛔蟲、日本血吸蟲患者感染血清有交叉反應。

以融合蛋白質系統檢測呈陽性反應，而其抗原系統篩選結果為陰性者在 1994 年有 5 個，在 1996 年有 1 個，因為本研究及 Sun et al. (1992) 的結果皆證實融合蛋白質酵素吸附檢測系統與犬心絲蟲以外之其他種類寄生蟲無交叉反應，而粗抗原與犬心絲蟲有交叉反應，除此外其它原因尚有待進一步探討。不過仔細分析這六個案例之吸光值，其中四個融合蛋白質系統檢測陽性血清，其吸光值皆僅比臨界值高 0.07 (表 1 及表 2)。這些血清是否為確為融合蛋白質系統檢測之抗體陽性血清尚無法肯定，有待進一步證實。

目前，本實驗中以酵素連結免疫吸附法檢測所得之血清陽性患者尚以胸部 X 光和心臟超音波進行追蹤偵測中，期望藉以佐證 D 34 - A 融合蛋白質和粗抗原酵素連結免疫吸附系統日後用於診斷人類肺臟犬心絲蟲症之可行性。

而台東縣成功鎮之低危險群居民中，僅以粗抗原酵素連結免疫吸附系統檢測出一個樣本呈血清陽性反應，血清陽性率為 0.04 %，由於當地之家犬感染犬心絲蟲之陽性率相當低 (5 %) (Wu et al., Unpublished observation)，因此居民被犬心絲蟲感染之機率也可能相對降低。

另一方面，本實驗根據 Sun et al. (1991) 所發表的犬心絲蟲 cD 34 cDNA 序列合成 D 34-A 融合蛋白質前端含有一小段的 MBP，以 factor Xa 作用分離 MBP，並經西方墨點法在實驗中証實此段 MBP 與 dirofilariasis 血清無反應，而所合成之融合蛋白質在去除 MBP 後仍具抗原性。此與 Maina et al. (1988)、Raghavan et al. (1992)、Crowley et al. (1993) 和 Suerbaum et al. (1994) 等人以 MBP 及 Mal E protein 利用西方墨點法與感染犬心絲蟲、蟠尾絲蟲及班氏絲蟲之患者抗血清作用均無反應之結果相同，另一方面 Bradley et al. (1993) 和 Katharine et al. (1994) 亦利用酵素連結免疫吸附檢測法證實 MBP 與一般人體血清作用，其 anti - MBP O.D. 平均值 (+ 標準偏差) 相當低，分別為 $0.096 + 0.087$ 及 $0.086 + 0.061$ ，因此他們建議不需進行 Xa digest MBP 和進一步的純化步驟。

本實驗所建立之融合蛋白質抗體檢測系統，其價值在於臨床上之應用而非全面性之篩檢，因至醫院就診之患者可能多為出現胸痛，咳嗽或咳血等病癥，其所引起之肺臟病變，大多被放射診斷誤診為腫瘤，因此患者常常遭受非必要開胸手術處置。而犬心絲蟲所引起之肺臟腫塊最後大多被人體吸收或鈣化，不致於有生命危險，此時可藉由放射診斷後以融合蛋白質抗體檢測系統進行輔助診斷，避免患者遭受非必要之開胸手術處置，而蒙受非必要之風險，同時亦可避免醫療資源的浪費。

七、引用文獻

Akao, N., K. Kondo, and K. Fujita. 1991. Immunoblot analysis of *Dirofilariasis immitis* recognized by infected humans. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 85:455-460.

Asimacopoulos, P. J., A. Katras, and B. Christie. 1992. Pulmonary dirofilariasis. *Chest*. 102:857-855.

Bradham, P. R., P. R. Locklair, and A. Grimball. 1990. Bilateral pulmonary nodules caused by *Dirofilaria immitis*. *Annals of Thoracic surgery* .50: 312- 313.

Bradley, J. E., K. R. Trenholme, A. J. Gillespie, R. Guderian, V. Titanji, Y. Hong, and L. McCreynolds. 1993. A sensitive serodiagnostic test for Onchocerciasis using a cocktail of recombinant antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 48:198-204.

Chen, Y.C., W.C. Yang, and H. H. Lin. 1982. Epidemiological study on dog heartworm infection in the imported dogs in Taipei County. *Journal of Animal Medicine* .20: 62-67.

Chiang, H., S.H. Tsay, Y.C. Lee, and L.S. Wang. 1992. Human pulmonary dirofilariasis - a case report. The 8th Annual Meeting of

the Chinese Society of Parasitology, Program and Abstract, 8.

Ciferri, F. 1982. Human pulmonary dirofilariasis in the United States: A critical review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 31: 302- 308.

Crowley, P.J., L.J. Brady, D.A. Piacentini, and A. S. Bleiweis. 1993. Identification of a salivary agglutinin binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*. 4:1547-1552.

Dayal, Y., and R. C. Neafie. 1975. Human pulmonary dirofilariasis : A case report and review of the literature. *American Review of Respiratory Disease*. 112:437-443

Dissanayake, S., M. Xu., and W.F. Piessens. 1992. A cloned antigen for serological diagnosis of *Wuchereria bancrofti* microfilaremia with daytime blood samples. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 56:269-278.

Guan, C., P. Li, P. D. Riggs, and H. Inouye. 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose - binding protein. *Gene*. 67:21-30.

Hamilton, R. G., A. L. Scott, R. D ntonio, D. A. Levy, and N. F. Adkinson. 1983. *Dirofilaria immitis* : performance and standardization of specific antibody immunoassays for filariasis. *Expirmental Parasitology* . 56:298-313.

Hawkins, A.G., J.. Hsiu, R.M. Smith III.F.P. Stitik, M.A. Siddiky, and O.E. Edwards. 1985. Pulmonary dirofilariasis diagnosed by fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytologica* . 29: 19-22.

Hiroyuki, Y., N. Akao, K. Kondo, and Y. Ohnishi, 1980. Human dirofilariasis in Japan case report and review of literature. *International Journal of Zoonoses*.7: 107-114.

Hsieh, H.C., and C.H. Chung. 1956. A note on the periodic appearance of microfilaria of *Dirofilaria immitis* Leidy in the peripheral blood of an indigenous dog in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*. 55:20-22.

Huang, W. H., J. K. Chiu, and C.T. Kao. 1957. A survey of the endoparasite fauna of stray dogs in Northern Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*. 56:614.

Hugues, B., and P. Duplay. 1988. Production in *Escherichia coli* and one - step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose . *Journal of Biochemistry*. 171:541-549.

Ichiro, M., and T. Yukiharu. 1988. *Parastic Zoonoses*. Kyushu University Press. Fukuoka.

Jarratt, M. 1995. Solitary pulmonary nodule in a 62 - year - old man. *Chest*. 107:271-273

Katharine, R. T., T.I. M. Tree, A. J. Gillespie , R. Guderian, R. M. Maizels, and J. E. Bradley. 1994. Heterogeneity of IgG antibody responses to cloned *Onchocerca volvulus* antigens in microfilaridemia positive individuals from Esmeraldas Province, Ecuador. *Parasite Immunology*. 16:201-209.

Kellerman , O.K., and T. Ferenci . 1982. Maltose binding protein from *Escherichia coli*. *Method in Enzymology*. 90: 459- 463.

Kochar, A.S. 1985. Human pulmonary dirofilariasis report of three cases and brief review of the literature. *American Journal of Clinical Pathology*. 84:19-23.

Lobos, E., N. Weiss, M. Karam, H.R. Taylor, E.A. Ottesen, and T.B. Nutman. 1991. An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen : a specific and early marker of infection . *Science*. 251:1603-1605.

- Lucius, R., N. Erondu, A. Kern, and J. E. Donelson. 1988. Molecular cloning of an immunodominant antigen of *Onchocerca volvulus*. *Journal of Experimental Medicine*. 168:1199-1204.
- Lucius, R., A. Kern, F. Seeber, T. Pogonka, J. Willenbacher, H. R. Taylor, M. Pinder, H.W. Ghalib, H. Schulz - Key, and P. Soboslay. 1992. Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov 33). *Tropical Medicine and Parasitology*. 43:139-145.
- Maina, C. V., P. D. Riggs, A.G. Grande III, B.E. Slatko, L.S. Moran, J. A. Tagliamonte, L. A. McReynolds, and C. Guan. 1988. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose binding protein. *Gene*. 74:365-373.
- Muro, A. A., M. S. Cordero, J. M. Martin, and F. M. Simon. 1990. Seroepidemiological studies on human pulmonary dirofilariasis in Spain. *Tropical and Medicine Parasitology*. 42: 371-374.
- Muro, A. A., M. S. Cordero, and F. Simon. 1992. Differential recognition of *Dirofilaria immitis* antigens by human IgG and IgM positive sera preliminary data based on EITB analysis. *Tropical Medicine and Parasitology*. 43:130-131.
- Nicholson, C. P., M.S. Allen, V.F. Trastek, H.D. Tazelaar, and P.C. Pairolero. 1992. *Dirofilaria immitis*: A rare, increasing causes of pulmonary nodules. *Mayo Clinical Proceeding*. 67:646-650.
- Poole, C. B., A.G. Grande III, G. V. Maina, R. E. Jenkins, M. Selkirk, and L. A. Mc Reynolds. 1992. Cloning of a cuticular antigen that contains multiple tandem repeats from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 89:5986-5990.
- Raghavan, N., C. V. Maina, P. C. Fitzgerald, R. S. Tuan, B.E. Slatko, E. A. Ottesen, and T. B. Nutman. 1992. Characterization of a

muscle - associated antigen from *Wuchereria bancrofti*.
Experimental Parasitology. 75:379-389.

Ronald, C.N., and J. Piggott. 1971. Human pulmonary dirofilariasis.
Archives of Pathology. 92:342-349.

Roussel, F., A. Delaville, H. Campos, M. Benozio, and P. Brasseur. 1990. Fine needle aspiration of retroperitoneal human dirofilariasis with a pseudotumoral presentation. *Acta Cytologica*. 34:533-535.

Ro. J. Y., P.J. Tsakalakis, V. A. White, M.A. Luna, E.G. Chang - Tung, L. Green, L. Cribbett, and A.G. Ayala. 1989. Pulmonary dirofilariasis: the great imitator of primary or metastatic lung tumor. A clinicopathologic analysis of seven cases and a review of the literature. *Human Pathology*. 20: 69-76.

Simon, F., A. Muro, M. Cordero, and J. Martin. 1991. A seroepidemiologic survey of human dirofilariasis in Western Spain. *Tropical Medicine and Parasitology*. 42:106-109.

Suerbaum, S., J. M. Thiberge, A. Kansau, R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1994. *Helicobacter pylori* hsp A - hsp B heat shock gene cluster : nucleotide sequence , expression , putative function and immunogenicity. *Molecular Microbiology*. 14:959-974.

Sun, S., T. Matsuura, and K. Sugane. 1992. Stage - specific expression of developmentally regulated gene in *Dirofilaria immitis*. *Journal of Helminthology*. 66: 62-67.

Sun, S., and K. Sugane. 1992. Immunodiagnosis of human dirofilariasis by enzyme - linked immunosorbent assay using recombinant DNA - derived fusion protein. *Journal of Helminthology*. 66:220 -226.

Sun, S., T. Matsuura, and K. Sugane. 1991. Molecular cloning of the cDNA encoding an immunodominant antigen of *Dirofilaria immitis* . *Journal of Helminthology*. 65: 149 -158.

Sun, S., W. Xia, N. He, and K. Sugane. 1994. An antigenic recombinant fusion protein from *Trichinella spiralis* induces a protective response in BALB / c mice. *Journal of Helminthology*. 68:89

-91.

Takeuchi, T., K. Asami, S. Kobayashi, M. Masuda, M. Tanabe, S. Miura, M. Asakawa, and T. Murai. 1981. *Dirofilaria immitis* infection in man : Report of a case of the infection in heart and inferior vena cava from Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 30:966-969.

Tamashiro, W.K., K.G. Powers, D.A. Levy, and A.L. Scott. 1985. Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of infection with *Dirofilaria immitis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 34: 292-301.

Villanueva, E. J., and J. Rodriguez - Perez. 1993. Immunodiagnosis of human dirofilariasis in Puerto Rico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 8:536-541.

Wu, C.C., C.C. Chen, P.C. Fan, and I.H. Wu. 1993. Recent status of *Dirofilaria immitis* infection in dogs and mosquitoes in northern Taiwan. The 8th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology Program and Abstract.33.

Wu, C.C., C.C. Chen, and P.C. Fan, 1995. Important vectors of *Dirofilaria immitis* in Taiwan. The 10th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology Program and Abstract. A- 4.

Wu, C. C., P. C. Fan, and C. C. Chen, 1994. Current status of *Dirofilaria immitis* infection in dogs and mosquitoes in Taipei City. The 9th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology Program and Abstract. A-7.

Wu, C. C., P. C. Fan., and C. Y. Lin. 1988. *Dirofilaria immitis* infection among stray dogs in Taipei City, Taiwan. *Chinese Journal of Parasitology*. 1:144 - 151.

Wu, C. C., P. C. Fan and C. Y. Lin. 1988 . Susceptibility of nine species of Taiwan mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. Proceeding Sino-Japanese Symposium on Parasitic Zoonosis . 169-173.

Yazdanbakhsh, M. 1990. Molecular biological approaches towards immunodiagnosis of filariasis. *Parasitology Today*. 6:207-208.

Yong, W. K. 1992. Animal parasite control utilizing biotechnology. CRC Press. Florida.

Zarlenga, D. S. , M..L. Rhoads, and F.M. Al - Yaman. 1994. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* .67:215-223.

{page }

{page |29}

