

장티푸스의 혈청학적 진단에 효소결합면역측정법 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)의 적용 실험*

서울대학교 의과대학 외과학교실

계 기 식 · 김 예 흠

내과학교실

최 강 원

미생물학교실

황응수 · 국윤호 · 이승훈 · 차창용

= Abstract =

Application of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay to the Serodiagnosis of Typhoid Fever

Ki-Shik Kye and Yae Hum Kim

Department of Surgery

Kang Won Choi

Department of Internal Medicine

Eung Soo Hwang, Yoon Ho Kook, Seung Hoon Lee, and Chang Yong Cha

*Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University
Seoul, Korea*

The advantages of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are its sensitivity and its simplicity in detecting IgM and IgG antibodies. For applying the ELISA to the diagnosis of typhoid fever, first of all, experiments were performed to determine which concentration of killed whole cell antigens and lipopolysaccharide (LPS) antigens of *S. typhi* (0.901 w) were optimally coated to the wells of the polystyrene and polyvinylchloride microplate, using the hyperimmune sera from rabbits against *S. typhi*. By using both kinds of antigens of *S. typhi* adsorbed to the ELISA microplate, the changing patterns of IgG and IgM antibodies in the sera from rabbits responding to the killed whole cell antigens of *S. typhi* (0901 w) during the prolonged immunization were serially traced by the ELISA. At the same time, the level of antibodies against *S. typhi* in sera from patients with typhoid fever and from normal healthy persons were measured by the ELISA employing the killed whole cell antigens and LPS antigens as the coating antigens.

The results obtained were summarized as follow:

1. The optimal concentration of the killed whole cell antigens, which were more easily adsorbed to the polystyrene plate than the polyvinylchloride plate, was 10^8 cells/ml of carbonate buffer (pH.

* 본 연구의 소요경비의 일부는 1982년도 서울대학병원 특진연구비로 충당되었음.

- 9.6) on the wells of the polystyrene plate when treated at 37°C for 4 hours. On the other hand, the optimal concentration of lipopolysaccharide antigens, which were adsorbed only to the polyvinylchloride plate, was 100 µg/ml of carbonate buffer (pH. 9.6) on the wells of the polyvinylchloride plate when treated at 37°C for 4 hours.
2. IgM antibody response were dominating in rabbits responding to the killed whole cell antigens of *S. typhi* (0.901 w), and were more specific to the LPS antigens than to the killed whole cell antigens in the ELISA. Good correlations were made between the IgM titers by the ELISA and the agglutinating titers of sera from the immunized rabbits.
 3. Both IgG and IgM agglutination titers by the ELISA in sera from most of patients with typhoid fever were above 1 : 320, but those in sera from most of normal, healthy persons were below 1 : 80.
 4. There were close correlations between the antibody titers by the ELISA and the agglutinating titers to the killed whole cell antigens in the tested human sera, IgM titers being more correlated with the agglutinating titers than IgG titers. But a little correlations were made between the antibody titers by the ELISA and the agglutinating titers to the LPS antigens.
 5. IgM titers in the tested human sera were similar to IgG titers detected by the ELISA employing the killed whole cells antigens and the LPS antigens.
 6. Good correlations were made between the antibody titers demonstrated by the ELISA performed on the killed whole cell antigens and the LPS antigens as the different, coating antigens on the ELISA microplates.

서 론

장티푸스는 *Salmonella typhi*의 감염에 의한 지속적인 고열을 주증상으로 나타내는 장관성유열질환 (enteric fever disease)^{1), 2)}으로 적절히 치료되지 못하면 장출혈³⁾을 비롯하여, 감염된 회장천공으로 복막염^{4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)}에 까지 이르러 외과적 처치를 받아야 하는 중독한 경과를 거치기 때문에 외과분야에서 중요한 응급질환 중에 하나이다. 장티푸스환자가 적절하게 치료를 받아 외과적 합병증에까지 이르지 않기 위해서는 신속히 진단이 결정되어야 한다.

장티푸스의 진단은 원인균인 *Salmonella typhi*가 환자의 혈액, 대변 또는 소변에서 분리되어야 장티푸스로 확진되나^{1), 2)} 환자혈청내의 항체여가의 변동울 측정하는 혈청학적 검사도 진단적 의의가 높다^{3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)}. 특히 환자 검체에서 원인균이 분리 동정되는 과정이 2~3일 정도 소요되므로, 고열을 호소하는 환자측이나 의사측에서 볼 때, 상당히 지루한 시간이며, 적절한 치료 대책을 신속하게 강구하기에 적합하지 않기 때문에 신속하게 진단을 결정할 수 있는 민감한 혈청학적 검사가 임상가에게 선호되고 있다.

더구나 근래에 와서 장티푸스의 전형적인 임상증상 및 병리소견을 나타내는 환자는 드물고 대부분이 비전형적인 경과를 취하는데다^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)}, *S. typhi*도 환자

검체에서 분리되지 않는 경우에 혈청학적 검사에 의존하여 환자를 진단하고 치료해야하는 임상예가 상당수에 달하고 있음이 많이 보고되고 있다^{3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)}. 이에 따라 장티푸스의 혈청학적 진단의 중요성이 가중되었고, 의존도가 높아지고 있으나 대부분의 병원검사실에서는 튜브응집반응인 Widal 검사^{6), 7), 8), 9), 10), 11), 12)}가 주로 이용되고 있다. Widal 검사는 간편하고 24시간 이내에 결과를 알 수 있으나 특이성과 민감도가 많은 인자^{3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10)}에 의하여 심하게 변해서 신뢰도가 낮은 검사법으로 취급되고 있다. 그 이유로는 원인균인 *S. typhi*가 분리되어 장티푸스로 확진된 환자에서도 응집항체가 검출되지 않는 경우도 있고^{2), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), 12), 13), 14), 15), 16), 17), 18), 19), 20), 21)}, *S. typhi* 이외의 *Salmonella* 균과 교차반응의 결과가 속출하기 때문이다^{2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), 12), 13), 14), 15), 16), 17), 18), 19), 20), 21)}. 더구나 Widal 검사는 응집반응이므로 혈청내 IgM 항체와 *S. typhi* 균체항원과의 반응의 결과이므로, IgG 항체와의 반응은 무시된 결과로 나타나는 단점을 지니고 있다²⁶⁾. 민감도와 특이성을 높이기 위하여 적혈구에 lipopolysaccharide (LPS)을 부착시켜 항체를 측정하는 혈구응집반응^{15), 27)}도 역시 IgM 항체를 대표하는 것이다²⁶⁾.

장티푸스에서 *S. typhi*가 체내에 들어와서 잠복기를 거쳐 고열을 호소하면서 병인을 찾게 되는 것은 균의 침입때부터 따져 경과시간이 약 3~4주 즈 되는 때^{3), 14), 20)}. 이때 쯤에는 혈청내의 항체량도 증가되어 있을 뿐만 아니라, immunoglobulin class 간의 양적 변동^{5), 21)}

실험재료 및 방법

1) 균종 및 항원의 제작

서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대 보관중인 *Salmonella typhi*(0.901 w)를 brain heart infusion agar가 들어 있는 roux bottle에 대량 배양하여 항원 제작에 사용하였다.

균체항원을 얻기 위하여 agar 상의 세균을 phosphate buffered saline (pH 7.3, PBS)으로 세척한 후 3,000 rpm(I.E.C. Centrifuge)에서 30분간 원심침전하여 2회 PBS로 세척하였다. PBS에 다시 부유시켜 100°C에서 2시간 처리하여 killed whole cell 항원인 균체항원을 얻었고 항원 부착시에는 Nephelometry에 의하여 혼탁도를 비교함으로써 균량을 측정하였다.

한편으로 이렇게 얻은 균체항원을 냉동건조 시킨 후 Hot-phenol water 방법을 사용하여 LPS를 추출하였다.

2) 토끼면역조작 및 혈청채취

항체생산의 양상을 관찰하기 위하여 3kg 정도 크기의 5마리의 토끼를 *S. typhi*의 균체항원으로 1주일 간격으로 3회에 걸쳐 연속적으로 귀정맥에 주사하였고, 96일째 및 129일째 재차면역하였다. 이때 사용한 항원량은 nephelometry로 측정된 혼탁도로 결정하여 약 10^8 cell/ml 피계 멸균된 PBS(pH 7.3)으로 희석하여 5회에 걸쳐 0.5 ml, 1 ml, 1 ml, 2 ml, 2 ml씩을 각각 귀정맥에 주사하였다.

5마리의 토끼로 부터 면역 전에 혈청을 채취하여 면역전혈청(preimmune serum)으로 보관하였고, 그 후에는 면역직전에 혈청을 얻었고 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 96일, 105일, 114일, 120일, 129일 및 136일째에 각각 혈청을 얻어서 면역혈청(immune serum)으로 보관하였다. 모든 혈청을 분주하여 -20°C에 보관하였다.

3) 환자의 혈청

서울대학교병원에 입원한 환자중에서 장티푸스로 세균학적 진단이 확인된 26명의 혈액을 10 ml씩 채취하였다.

2,000 rpm(I.E.C. centrifuge)에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여, 1 ml씩 소분하여 -20°C에 보관하였다.

대조군의 혈청으로 무작위로 선택한 서울의대생으로부터 역시 혈액 10 ml씩을 채취하여 혈청을 얻어

^{34,35}이 있었으나, 응집반응으로는 이러한 변화를 측정할 수 없다. 또한 장티푸스는 *S. typhi*에 의한 자연감염이므로 lipopolysaccharide 이외의 항원성분에도 항체생성반응^{3,26,28,36}이 일어날 것으로 고려한다면, IgG 및 IgM 항체를 구별하여 측정하는 것은 장티푸스의 진단 및 에후관정에 큰 의의가 있는 것으로 보고되고 있다.^{5,22,26,34,36}

혈청내의 IgM 및 IgG 항체를 구별하여 측정하려면 최근에 개발된 효소결합면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)⁴³을 이용하므로써 쉽게 특이항체를 측정할 수 있다. ELISA는 특이성이나 민감도도 높고 측정시간도 최대한도로 짧아서 5시간 정도 소요되므로 신속하게 결과를 알 수 있으나 이에 앞서 항원성분이 solid phase인 plastic surface에 부착되어야만 한다.⁴³

Carlsson 등^{24,25}이 처음으로 *S. typhi* LPS 항원을 polystyrene에 부착시켜 ELISA로 LPS에 대한 IgG 및 IgM 항체의 측정을 시도하여 민감도 및 특이성이 탁월함을 보고한 이래로 *S. minnesota* LPS³⁷, *S. typhi* CE 항원²²을 solid phase에 부착하여 ELISA를 시도하여 유사한 결과를 얻었다. Granfors 등^{31,32}은 *Yersinia enterocolitica*의 LPS 항원과 whole bacteria cell 항원을 solid phase에 부착시켜 측정된 항체의 특이성이나 민감도에 차이가 없음을 보고하였고, Rote 등³⁹도 Group B Streptococci의 수용성 항원성분과 whole bacteria 세포 항원을 solid phase에 부착시켜 ELISA로 항체를 측정하여 세균의 항원성분을 구별하여 해당되는 특이항체를 측정할 수 있음을 시사하는 결과를 보였다.

더구나 whole bacteria를 그대로 solid phase에 부착시켜 ELISA를 이용하는 것은 LPS를 비롯한 항원성분을 정제하는 번거로움을 피할 수 있어서 기술적으로 훨씬 단순해지는 장점을 지니고 있다.

이에 따라 저자는 *S. typhi*의 균체항원으로 면역된 토끼혈청을 이용하여 균체항원과 LPS가 solid phase에 부착되는 조건 및 항원 농도를 결정하여 수립된 ELISA를 이용하여 토끼가 *S. typhi*의 균체항원의 자극에 변하는 항체의 immunoglobulin class의 역가를 추적하였고, 또한 장티푸스로 확진된 환자의 혈청내 항체의 immunoglobulin class의 역가를 측정하여 응집역가와 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

-20°C에 소분하여 보관하였다.

4) 튜브응집반응

항원은 균체항원(0901 W) 혼탁도로 측정하여 10⁸ cell/ml 되게 PBS로 희석하여 사용하였다.

응집반응하기 직전에 혈청을 56°C에서 30분간 처리하여 보체를 비동화시켜 사용하였다. 혈청은 1:10으로 부터 시작하여 2배 계단희석법으로 희석하였고, 항원은 0.25 ml씩을 희석된 혈청 0.25 ml을 잘 섞은 후 50°C 항온수조에서 2시간 반응시킨 후 다시 4°C에서 18시간 방치하였다가 쥬전 유무를 판독하였다.

5) 효소결합면역측정법

(1) 항원부착용 ELISA plate

ELISA 용으로 특수하게 제작된 96개 well을 가진 polystyrene plate(Flow Lab. Inc, flat bottom, Lot No. 76381016, Hard plate)와 Polyvinylchloride plate(Dynatech Lab. round bottom, Lot No. B 24 M 116 soft plate)의 두 종류를 사용하여 ELISA plate의 성격과 항원의 특성간의 관계에 따라 다시 선택하기로 했다.

(2) 항원부착

항원을 부착시키기 위해서는 Granfors^{31,32} 및 Voller⁴¹의 방법을 변형하여 carbonate buffer(pH 9.6)에 항원을 희석하여 100 μl씩 ELISA plate의 각 well에 분주하였다. 여기에서 사용한 항원인 균체항원은 부유되는 세포이고 LPS는 수용성이므로 두 종류의 항원의 부착 정도를 점검하였다.

carbonate buffer(pH 9.6)에 처리된 항원을 microwell 내에서 37°C에서 4시간 부착시키고 난 후 PBS(pH 7.3)으로 3회 세척하였다. 항원이 부착되지 않은 microwell 내의 표면에 혈청이 부착하므로써 유발되는 non-specific background 반응을 제거하기 위하여 3% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 PBS-Tween 20-NaN₃를 각 microwell에 150 μl씩을 분주하고 37°C에서 2시간 반응시켰다.

반응이 끝난 후 1% BSA-PBS-Tween 20-NaN₃로 3회 세척하고 4°C에 보관하다가 실험에 사용하였다.

(3) 효소결합면역측정법의 시험과정

토끼혈청 및 환자혈청을 1% BSA-PBS-Tween 20-NaN₃로 1:10부터 희석을 시작하여 2배계단 희석하고 각각의 희석혈청 100 μl씩 각각 항원부착 microwell에 분주한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다.

반응이 끝난 후 1% BSA-PBS-Tween 20-NaN₃로 3회 세척하고 여기에 peroxidase conjugated immuno-

Table 1. Determination of the optimal concentration of different antigens to be coated on the surface of the two different kinds of ELISA plates.

Killed whole cell antigen

plate	Ig. class	Ag. conc. cell/ml in well							
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	
*Hard	Ig G 1)	++	+++	+	+	+	+	+	
	Ig M 2)	++	+++	+	-	-	-	-	
**Soft	Ig G	++	+++	++	±	±	-	-	
	Ig M	+	++	±	-	-	-	-	

Lipopolysaccharide

plate	Ig. class	Ag. conc. μgm/ml in well						
		100	50	25	10	5	2.5	1.25
*Hard	Ig G	-	-	-	-	-	-	-
	Ig M	-	-	-	-	-	-	-
**Soft	Ig G	+++	++	++	+	±	-	-
	Ig M	+	+	+	+	±	±	-

* Hard: polystyrene plate

** Soft: polyvinylchloride plate

Degree of color appeared in the final peroxidase-substrate reaction was divided as follows by the eyes;

(+++): strong

(++) : intermediate

(+) : weak

(±) : suspicious

(-) : absolutely none

1) Ig G: immunoglobulin class in the immune serum specific to Salmonella antigen, detected by peroxidase conjugated anti-rabbit IgG.

2) Ig M: immunoglobulin class in the immune serum specific to Salmonella antigen, detected by peroxidase conjugated anti-rabbit IgM.

globulin(1:500) 100 μl씩을 분주하였다.

여기에서 토끼혈청에 대한 실험에서는 peroxidase conjugated anti-rabbit IgG(Cappel Lab. Lot No. 15014)와 IgM(Cappel Lab. Lot No. 15009)을 사용하였고 환자혈청에서는 peroxidase conjugated anti-human IgG(Cappel Lab. Lot No. 14468) 및 IgM(Cappel Lab. Lot No. 18283)을 사용하였다.

Peroxidase anti-immunoglobulin으로 처리한 ELISA plate를 상온에서 1시간 방치한 후 1% BSA-PBS-Tween 20-NaN₃로 5회 세척하였다.

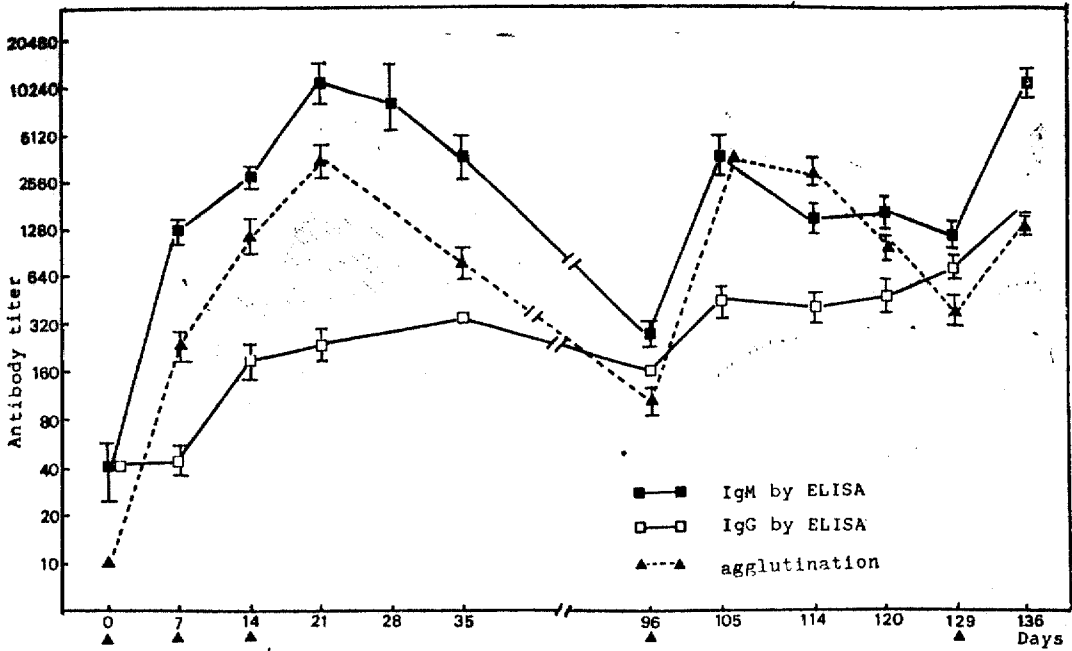


Fig. 1. Sequential antibody response of rabbits to multiple I.V. injection of killed whole cell antigens of *S. typhi* (0901 W strain) measured by agglutination and ELISA against the killed whole cell antigens from the homologous strains.

여기에 peroxidase에 대한 기질용액(O-phenylenediamine 8mg과 4 μ l의 30% H_2O_2 를 20 ml phosphate citrate buffer에다가 섞음) 발색반응의 여부를 목측으로 관찰하였다. 이 때에 효소-기질반응에 2N- H_2SO_4 용액 50 μ l씩을 첨가하여 반응을 정지시키고 갈색으로 나타나면 발색반응양성으로 하고 발색반응이 나타나는 혈청의 최고 희석배수를 항체가로 결정하였다.

성 적

1) ELISA plate

ELISA용 plate는 polyvinylchloride와 polystyrene의 두 종류를 사용하였다. 항원의 종류에 따라 부착이 안 되는 경우가 있어서 carbonate buffer(pH 9.6)을 사용하여 ELISA의 개개의 microwell에 균체항원과 LPS를 부착시키고 토끼면역혈청을 1:10으로 희석하여 최적부착항원농도 및 해당되는 ELISA plate의 종류를 결정하였다.

(1) 균체항원

균체항원을 10^8 cell/ml부터 10^5 cell/ml로 carbonate buffer로 희석한 결과에는 polyvinylchloride plate에서 10^8 cell/ml에서 가장 강한 발색반응을 보였고, 항원량을 10^6 cell/ml로 증가하자 오히려 발색반응이 감소

하였다. 반면에 polyvinylchloride plate에서는 IgG를 측정하는 경우 $10^7 \sim 10^8$ cell/ml에 가장 강한 반응을 보였다. IgG의 경우에는 10^8 cell/ml의 농도에서 가장 강한 반응을 나타내어서 항원의 최적농도는 10^8 cell/ml으로 정하였다. 여기에서 균체항원은 polystyrene plate나 polyvinylchloride plate에 carbonate buffer에 의하여 비교적 쉽게 부착됨을 알게 되었다(Table 참조).

(2) Lipopolysaccharide(LPS) 항원

carbonate buffer에 100μ g/ml~ 1.25μ g/ml까지 단계적으로 희석하여 각기 희석된 LPS 100μ l씩을 polyvinylchloride plate와 polystyrene plate에 부착과정을 끝내고 토끼혈청과의 반응여부를 끝내고 항원의 부착여부로 결정하였다. polystyrene plate에는 발색반응이 없어서 LPS가 부착되지 않은 것으로 판단하였고, polyvinylchloride plate에는 LPS 100μ g/ml를 최적부착농도로 결정했다. 따라서 LPS는 polyvinylchloride plate에 100μ g/mg로 부착하면 최적반응을 볼 수 있었다. (Table 1 참조)

2) 토끼의 *S. typhi*에 대한 면역반응

ELISA 방법의 수행상의 기본적인 조건을 확립하기 위해서 항원과 항체의 특이성이 알려져 있는 것이 절대적이므로 *S. typhi* 균체항원을 5마리의 토끼에 정맥

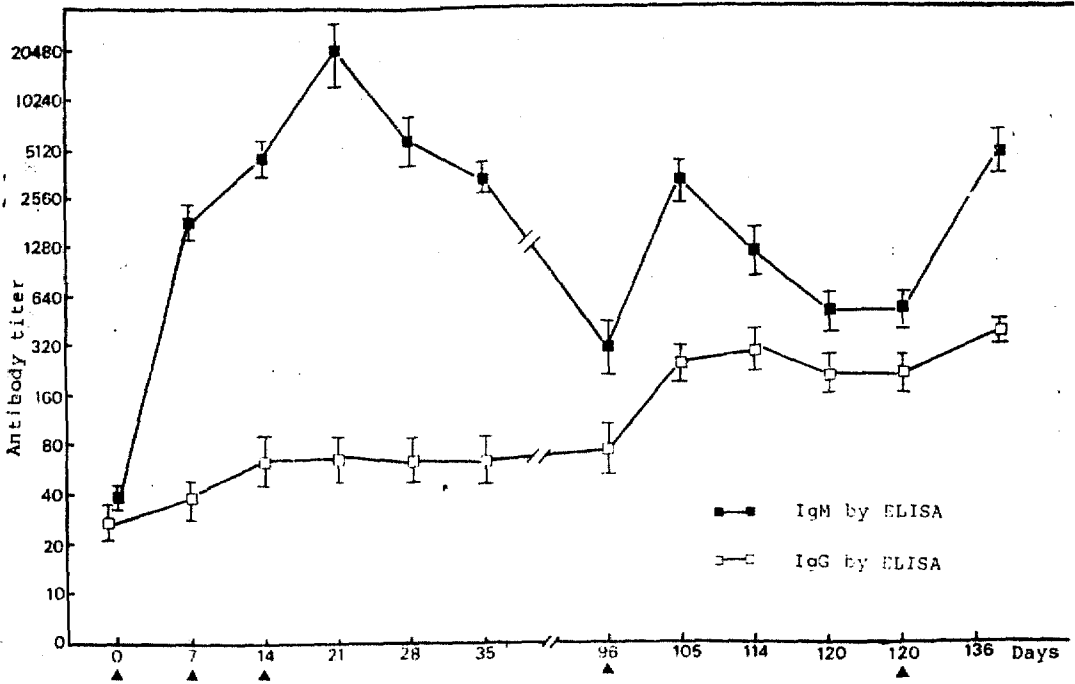


Fig. 2. Sequential antibody response of rabbits to multiple I.V. injection of killed whole cell antigens of *S. typhi* (0901 W) measured by ELISA against lipopolysaccharide from the homologous strain.

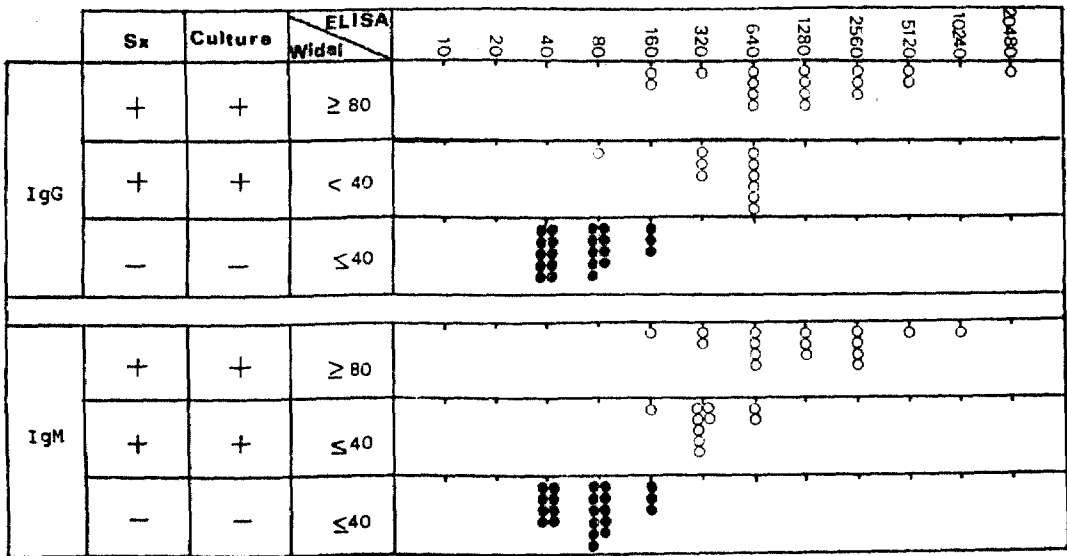


Fig. 3. Distribution of IgG and IgM antibodies in ELISA against the killed whole cell antigens from *S. typhi*(0901 W strain) for the bacteriologically confirmed patients as typhoid fever. open circle; patients with typhoid fever closed circle; healthy medical students

주사하여 면역시켰다. 즉 *S. typhi*의 균체 항원을 일주 간격으로 3회 주사하고 96일째 및 129일째 재면역하면서 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 96일, 105일, 114일, 120일, 136일째 각각 얻은 혈청내의 항체의 변화

를 응집반응과 ELISA로 측정하여 균체항원에 대한 양상을 Fig. 1에 표시했고, LPS에 대한 양상을 Fig. 2에 표시하였다.

Fig. 1에 표시되어 있는 바와 같이 응집함체역가는

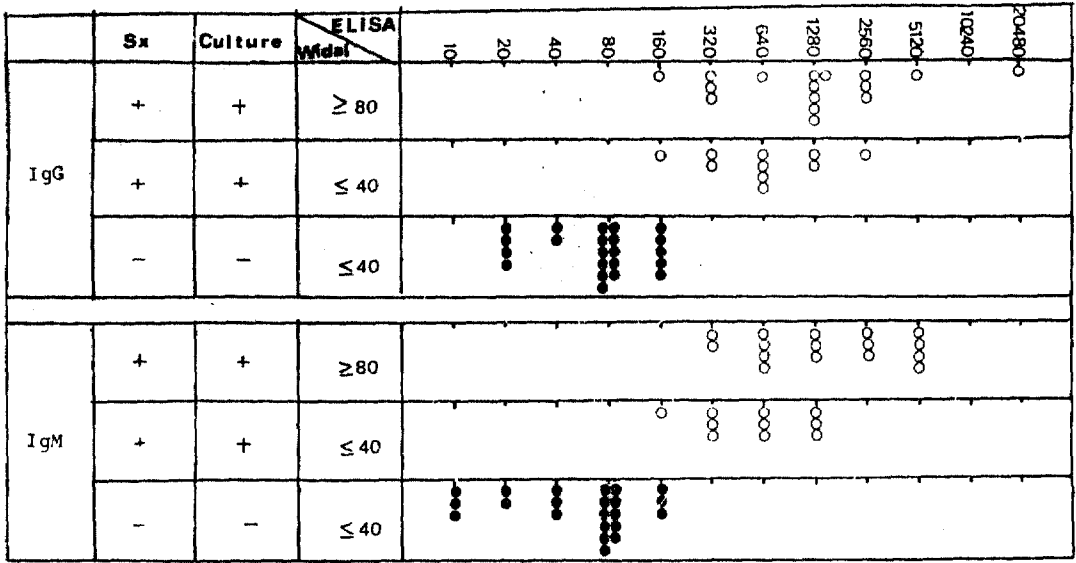


Fig. 4. Distribution of IgG and IgM antibodies in ELISA against lipopolysaccharide from *S. typhi* (0901 W strains) for the bacteriologically confirmed as typhoid fever.
 open circle; patients with typhoid fever
 closed circle; healthy medical students

1:160 정도의 역가로 상승하여 항원자극에 따라 2주일에는 1:1,280 정도의 역가를, 3주일 후에는 1:2,560 정도의 역가에 이르다가 항원자극이 없어지니 급속히 항체역가가 감소하여 96일째는 1:80 정도까지 감소하였다. 96일째에 항원으로 자극하니 105일째에는 다시 1:2,560에 달하였고 다시 급속히 감소하여 1:320으로 감소하였다. 다시 129일째에 항원으로 자극하니 급속히 상승하는 양상을 보여 1:1,280 정도에 달하였다.

ELISA에 의한 IgM 항체역가의 변화는 응집역가와 아주 유사한 양상을 보였으나 항체역가가 2~4배 높은 수준을 유지했다. 반면에 IgG 항체는 서서히 증가하여 35일째에 약 1:320 정도에 달하였고 항원자극에 관계 없는 변화를 보여 주었다. 그러나 96일째 재차 항원자극에 약간의 역가의 상승을 보였으나 그 수준을 그대로 유지하려는 인상을 주고 있었다.

응집항체역가와 IgG 항체역가는 항원자극에 민감한 변화를 나타냈으나 IgM 항체는 둔한 변화를 나타내었다.

Fig. 2에는 LPS에 대한 항체역가의 변화를 표시하였다. IgM 항체역가의 변화와 유사한 양상을 보였으나 IgG 항체는 역시 항원자극에 둔한 반응을 보이며 일정한 항체의 역가를 나타내었다.

또기에서 *S. typhi*에 대한 면역반응은 IgM 항체가 주된 반응으로 항원자극에 민감한 반응을 보였고 응집

항체와 유사한 양상을 나타냈다. 그러나 IgG는 서서히 지속적으로 약간씩 증가하는 양상이며 역가가 감소하지는 않았다.

3) 장티푸스환자의 혈청내 Anti-*S. typhi* 항체의 측정

서울대학교 병원에 입원하여 *S. typhi*가 분리되어 세균학적으로 확진된 장티푸스환자 26명의 혈액을 채취하여 얻은 혈청내의 Anti-*S. typhi* 항체의 역가를 튜브응집반응과 ELISA로 측정하였다.

현증이 없는 대조군으로 서울대학교 의과대학 학생 22명을 무작위로 선택하여 채혈하여 얻은 혈청내의 Anti-*S. typhi* 항체역가를 측정하여 비교하였다. 대조군의 학생은 장티푸스를 앓은 경험도 없고 예방주사를 접종받은 경험이 없는 학생 중에서 선택하였다.

(1) ELISA로 측정된 IgG 항체 및 IgM 항체의 분포

환자혈청 및 대조군 혈청에 대해서 튜브응집 반응을 실시하여 얻은 결과, 대조군은 대부분 1:40 이하였고 환자의 경우에도 1:40 이하이기 때문에 Fig. 3 및 Fig. 4에서와 같이 3군으로 나누고 ELISA에 의하여 측정된 역가에 따라 분포를 표시하였다.

Fig. 3에서는 군체항원에 대한 IgG 및 IgM 항체의 분포이다. 즉 제 1군(16명)은 현증이 있는 응집항체역가가 1:80 이상인 장티푸스환자들의 ELISA 항체역가

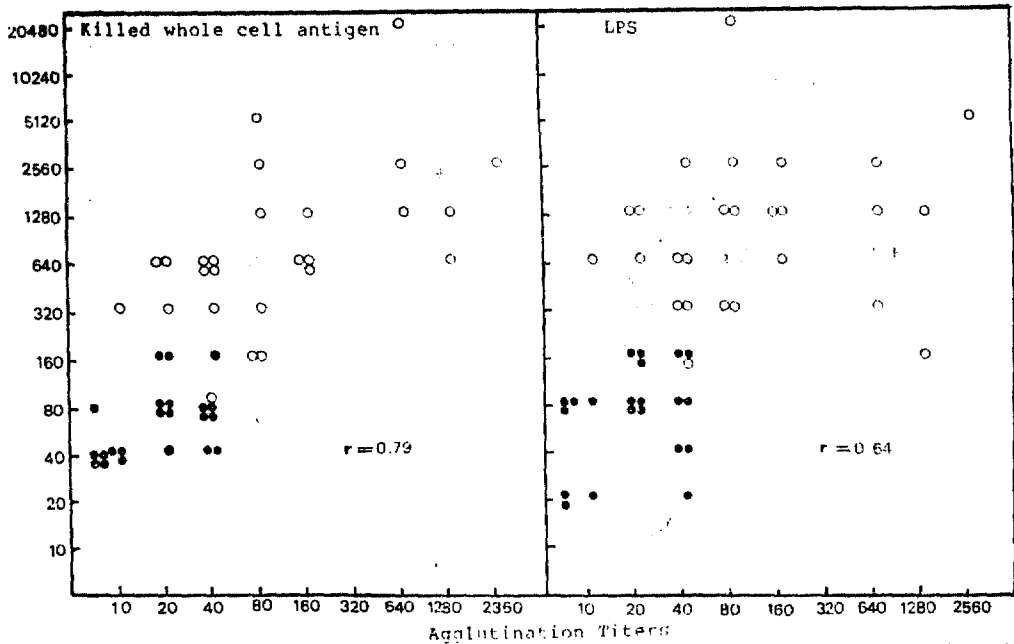


Fig. 5. Comparison between agglutination titers and IgG titers in ELISA against the killed whole cell antigens and lipopoly-saccharide from *S. typhi*(0901 W) strain.
 open circle; patients with typhoid fever
 closed circle; healthy medical students

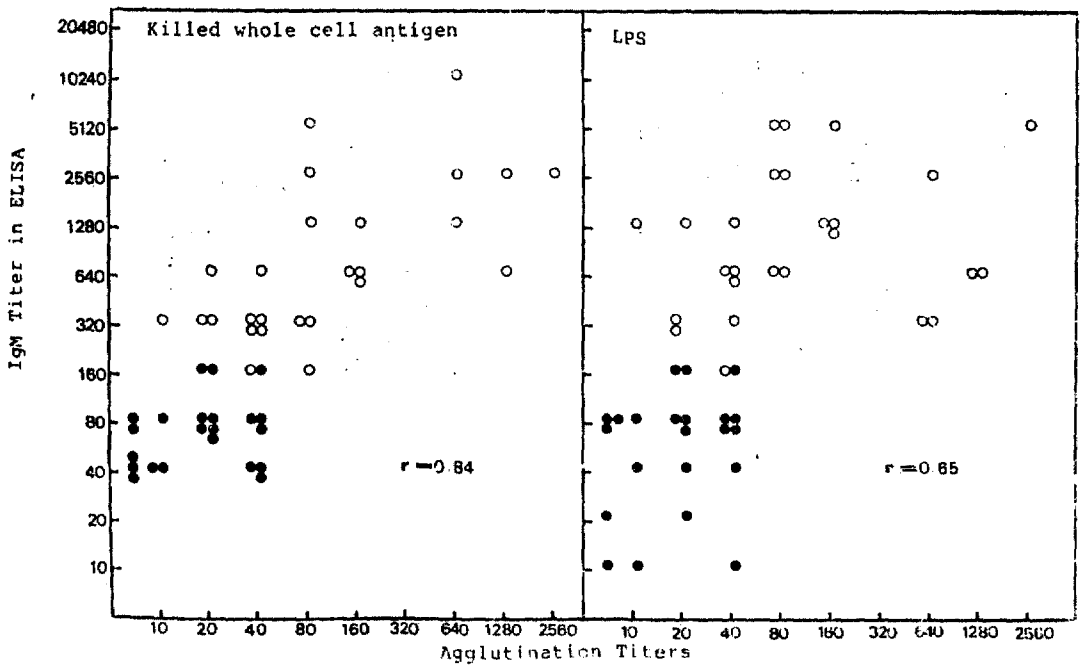


Fig. 6. Comparison between agglutination titers and IgM titers in ELISA against the killed whole cell antigens and lipopolysaccharide from *S. typhi* (0901 W strain).
 open circle; patients with typhoid fever
 closed circle; healthy medical students

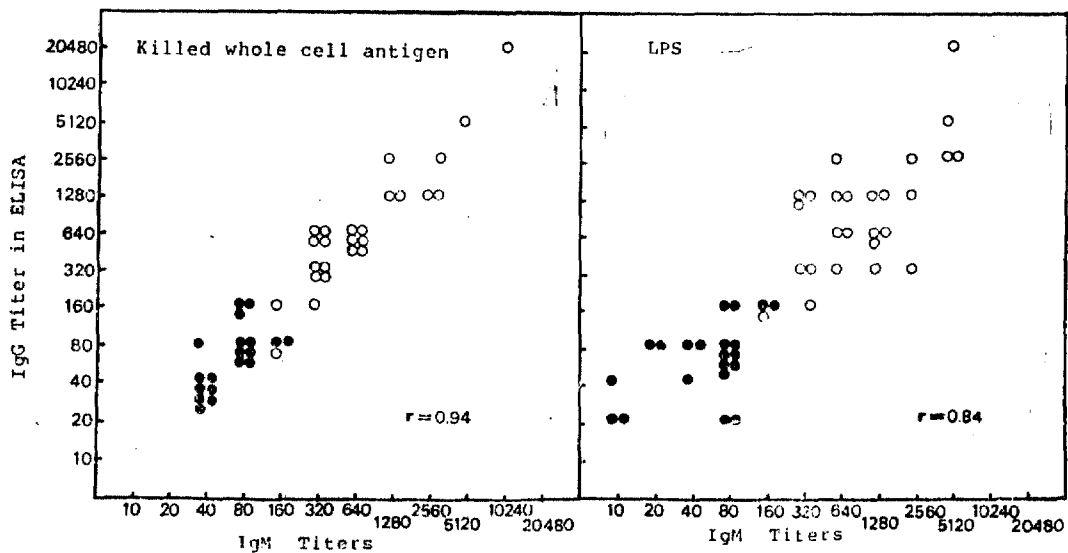


Fig. 7. Correlation between IgG antibody titers and IgM antibody titers in ELISA against the killed whole cell antigens and lipopolysaccharide in patients with typhoid fever.
 open circle; patients with typhoid fever
 closed circle; healthy medical students

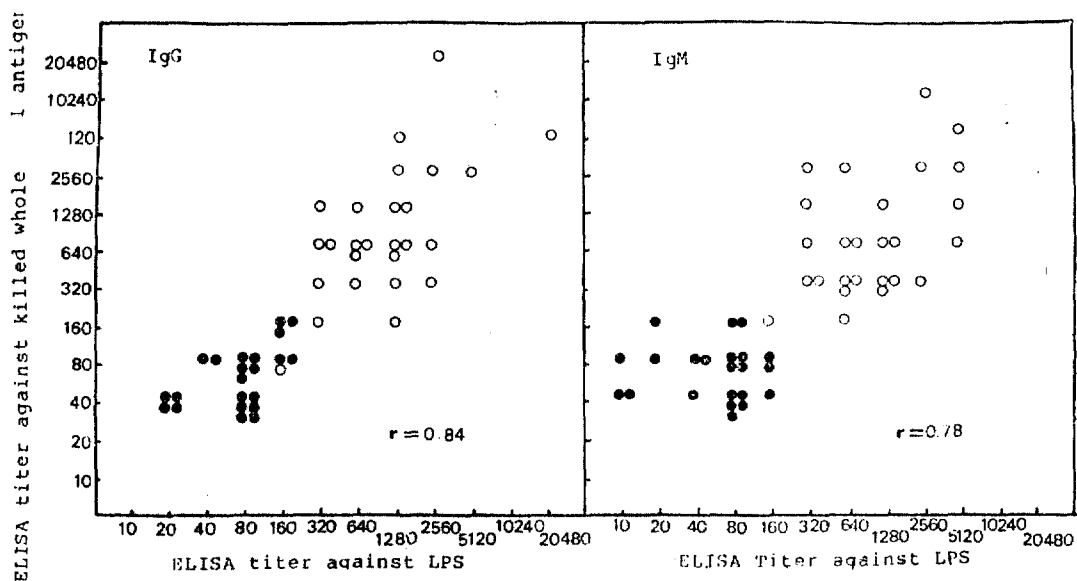


Fig. 8. Correlation between the killed whole cell antigens in polystyrene and lipopolysaccharide in polyvinylchloride plate used in ELISA detecting IgG and IgM to *S. typhi* in patients with typhoid fever
 open circle; patients with typhoid fever
 closed circle; healthy medical students

로 IgG는 주로 1:320 이상이나 2명이 1:160이었다. IgM에 대해서도 유사한 양상을 보였다. 제 2군(10명)은 현종이 있고 응집항체가 1:40 이하인 장티푸스환자로 IgG 역가는 대부분 1:320~1:640이었고 IgM 항체역가도 대부분 1:320이었다. 반면에 대조군(22명)은 대부분이 IgG 및 IgM 항체역가가 1:40~1:80 사이에 분포하였고 3명이 1:160이었다.

Fig. 4에는 LPS에 대한 ELISA에 의한 IgG 및 IgM 항체역가의 분포를 표시하였다. 제 1군(16명)은 IgG 항체역가는 1명을 제외하고 대부분 1:320 이상이고 IgM 항체역가도 모두 1:320 이상이었다. 반면에 대조군(22명)은 대부분이 1:80 이하에 분포하고 있었다.

따라서 장티푸스환자 26명 중 2명이 1:160이었고 대부분(24명)의 IgG 및 IgM 항체역가는 1:320 이상이었으며 대조군(22명) 중 3~5명이 1:160인 것을 제외하고는 대부분이 1:80 이하였다.

(2) ELISA 항체역가와 응집항체역가의 비교

장티푸스환자와 대조군의 응집항체에 대해서 ELISA에 의한 IgG 항체역가를 균체항원에 대한 ELISA IgG 항체역가는 응집항체와 밀접한 관계($r=0.79$)를 맺고 있었으나 LPS에 대해서는 상관관계가 낮았다($r=0.64$).

장티푸스환자 및 대조군에서 Fig. 6에 도시하였다. 즉 응집항체역가는 균체항원에 대한 IgM 항체와 밀접한 상관관계($r=0.84$)를 갖고 있었으나 LPS에 대한 IgM 항체역가와와는 상관관계가 낮았다($r=0.65$).

균체항원에 대해서 측정된 IgG 및 IgM 항체는 응집항체역가와 밀접한 상관관계를 맺고 있으나 LPS에 대한 IgG 및 IgM 항체역가는 응집항체역가와와는 오히려 상관관계가 낮았다.

(3) IgG 항체와 IgM 항체와의 상호관계

장티푸스군에 의한 감염의 결과로 인체가 생산하는 항체의 immunoglobulin class가 특이하다면 특이한 항체의 Ig class의 측정은 매우 진단적 가치를 부여할 것이다.

본 실험에서 *S. typhi*의 균체항원에 대한 토기의 면역반응은 IgM이 주된 반응인 점을 감안하여 IgG와 IgM 항체간의 상호관계를 비교하였다.

Fig. 7에 표시된 바와 같이 *S. typhi*의 균체항원에 대한 IgG 및 IgM이 평행하게 증가하는 양상을 보였다.

또한 *S. typhi*의 LPS에 대한 환자 혈청내 IgG 및 IgM 항체역가도 밀접한 상관관계를 갖고 있다($r=0.84$).

즉 IgM 항체와 IgG 항체의 증가가 병행함을 시사하

고 있었다.

(4) 항체측정에 있어서 균체항원 ELISA와 LPS ELISA 간의 상호 관계

균체항원과 여기에서 다시 정제하여 얻은 LPS 항원에 대한 항체의 반응양상을 비교검토하려는 것이다.

*S. typhi*를 열 처리하여 얻은 균체항원과 이것을 다시 정제하여 얻은 LPS 항원에 대한 항체의 반응양상을 비교검토한 것이다.

즉 균체항원은 세포벽내 다른 항원성분과 더불어 LPS가 함유되어 있고, LPS는 수용성성분이고 Table 1에 나타난 바와 같이 ELISA plate에 부착양상에도 차이가 있으므로 사용하는 항원성분에 따라 ELISA plate의 종류도 달라짐이 본 실험을 통해서 밝혀졌다.

균체항원에 의하여 측정된 IgG 항체역가와 LPS로 측정된 혈청내 IgG 항체역가는 밀접한 상관관계를 맺고 있고($r=0.84$) 또한 IgM 항체에 대해서도 역시 밀접한 상관관계를 맺고 있었다($r=0.78$).

따라서 어떤 형태의 항원을 사용하여도 IgG 항체나 IgM 항체를 검출하는데 차이가 없음을 시사하는 것이고 항체의 반응성도 유사함을 제시하는 결과이었다.

고 안

효소결합면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay)⁴³⁾은 소량의 정제에 존재하는 미량의 항체 또는 항원을 검출할 수 있는 장점을 갖고 더구나 immunoglobulin class를 구별할 수 있기 때문에 감염성질환의 진단에 많이 이용되고 있다^{22,25,31,32,33,35,39,42,43).}

ELISA를 이용하는데 중요한 점은 측정하려는 항체에 합당한 항원성분이 결정되어야 하며^{32,39)} 특히 특이성을 높이기 위해서는 정제된 항원을 사용하는 것이 바람직하다. 본 실험에서 균체항원과 정제된 LPS를 나누어 사용하였고 이에 따라 항원을 부착시킬 ELISA plate의 종류를 항원성질에 따라 구별해야 함을 알게 되었다. 일반적으로 ELISA plate는 polyvinylchloride plate와 polystyrene plate로 구별되어 시판되고 있는데 항원성분의 특성에 따라 항원이 부착되는 양상이 있으므로⁴³⁾ 이와 같은 예비실험의 과정을 통해서 결정되어야 한다.

Carlsson^{24,25)} 등은 *S. typhi*의 LPS 항원을, Beasley²²⁾ 등은 *S. typhi* CE 항원을 carbonate buffer(pH 9.6)에 의하여 solid phase에 부착시켰으나 본 실험에서는 Granfors^{31,32)}의 방법을 변형하여 균체포인 균체항원을 직접 solid phase인 polystyrene plate에 carbonate

buffer에 37°C에서 4시간 처리하여 부착시켰기 때문에 보다 쉽게 항원을 제조하여 ELISA에 이용할 수 있음을 입증한 것이다.

본 실험에서 응집항체를 비교할 때 장티푸스환자 10명은 대조군과 전혀 구별될 수 없는 응집항체가를 지녔으나 ELISA로 항체역가가 확실하게 구별될 수 있어서 ELISA의 민감도를 재확인하게 되어서 Beasley²²⁾가 주장하는 것과 유사한 결론을 내릴 수 있었다.

본 실험에서 *S. typhi* 균체항원을 면역조작으로 나타난 토끼의 면역반응은 IgM이 주된 반응이어서 Altemeir et al.²¹⁾가 인체에서 얻은 결과와 유사한 양상이었으나, 본 실험에서는 장티푸스환자의 혈청내에는 *S. typhi*에 대한 IgG 및 IgM 항체가 밀접한 상관관계를 맺고 증가되어 있어서 Beasley²²⁾의 결과와 유사하였다. 따라서 면역조작에서는 항원자체가 균체항원이므로 주로 lipopolysaccharide가 주된 항원이고 면역혈청의 역가를 측정시에도 homologous 항원을 사용함으로써 나타나는 결과로 해석되었다. 그러나 장티푸스는 virulent *S. typhi*에 의한 자연감염으로 *S. typhi*가 지닌 각종 항원성분에 대한 반응이기 때문에^{28,29)} IgG 반응도 강하게 나타냄을 본 실험 뿐만 아니라 朴⁵⁾ 및 Beasley²²⁾의 결과에서도 시사된 바 있다. 따라서 장티푸스의 혈청학적 진단에는 IgG와 IgM 모두를 측정해야 함을 시사하는 것으로 사료되었다.

균체항원을 이용한 ELISA에 의한 항체역가나 LPS를 이용한 ELISA의 항체역가는 대체적으로 밀접한 상관관계를 맺고 있어서 Granfors²²⁾가 *Yersinia enterocolitica*에 대해서, Rote²⁹⁾가 Group B. *Streptococci*에 내린 결론과 일치하였다. 이렇게 되면 민감도가 높은 ELISA를 장티푸스의 혈청학적 진단에 이용하기 훨씬 수월해지는 계기가 되는 것이다.

본 실험을 기초에 두고 앞으로 장티푸스의 질병 경과에 따르는 항체역가의 변화를 ELISA로 측정하므로써 장티푸스 초기 진단의 지침이 수립되고 예후 및 치료대책이 쉽게 수립되어 신속하고 적절한 치료로 합병증에 이르지 않도록 해야 할 것이다.

결 론

효소결합면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay)을 장티푸스의 혈청학적 진단에 적용하기 위하여 항원으로는 *S. typhi*(0901)의 균체항원과 LPS를 solid phase인 플라스틱표면에 부착시켜 토끼면역혈청으로 ELISA를 수립하고 균체항원의 자극으로 토끼에 나타난 면역 반응시의 immunoglobulin class의 변동

을 추적하였고, 동시에 장티푸스로 확진된 환자의 혈청내의 항체역가를 ELISA로 측정하여 응집항체역가와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. typhi*의 균체항원과 LPS를 carbonate buffer (pH 9.6)로 37°C에서 4시간 처리하였을 때, 균체항원은 polystyrene plate에 LPS는 polyvinylchloride plate에 쉽게 부착되었으며 각각의 최적부착농도는 10⁶cell/ml 및 100 µg/ml이었다.

2. 토끼의 *S. typhi*에 대한 항체반응은 주로 IgM 반응이었고, LPS에 대해서 보다 특이한 반응을 보였으며 응집항체와 유사한 반응양상을 나타냈다.

3. 장티푸스환자에서 *S. typhi*에 대한 IgG 및 IgM 항체역가는 대부분이 1:320이었으나 건강한 대조군에서는 대부분이 1:80 이하였다.

4. 장티푸스환자 및 대조군에서 측정된 ELISA 항체역가와 응집항체역가는 균체항원을 사용하였을 때 밀접한 상관관계가 있었고, IgM 항체가 IgG 항체보다 상관관계가 높았다. 항원을 사용했을 때는 ELISA 항체역가와 응집항체역가간의 상관관계는 낮았다.

5. 장티푸스환자에서 *S. typhi*에 대한 IgG 항체와 IgM 항체역가는 유사한 역가 수준을 보였다.

6. 균체항원으로 측정된 장티푸스환자의 항체역가는 LPS로 측정하였을 때와 차이가 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 金邊浩 : 釜山城方에 있어서 Salmonellosis에 의한 廻腸穿孔性腹膜炎의 臨床的 考察, 大韓外科學會誌 12: 669, 1970.
- 2) 金鎮福, 吳承根 : 장티푸스에 의한 廻腸穿孔活潑, 大韓外科學會誌 16: 345, 1974.
- 3) 金銀常, 崔浩燮, 李晟東, 李相桂, 金萬在 : 「티푸스」 288例에 對한 觀察, 대한내과학회잡지 18: 605, 1975.
- 4) 朴福音, 朴聖鎬, 金澄賢, 李泰石, 曹永喆, 都血金 : 腸티푸스 456例에 對한 臨床的 觀察, 대한내과학회잡지 20: 284, 1977.
- 5) 朴相坤, 韓東燮, 全燕基 : 腸티푸스患者血清의 immunoglobulin에 關한 研究, 中央醫學 25: 177, 1973.
- 6) 朴승합, 박기영 : Salmonellosis에 대한 Laboratory Diagnosis, 한국외과학 3: 499, 1971.
- 7) 徐武昌, 鄭然郁, 姜錫鳳, 朴東錫 : Salmonellosis에 의한 廻腸穿孔性腹膜炎의 外科的 觀察, 大韓外科學會誌 15: 13, 1973.

- 8) 申根洙, 文瑛植, 李載均: Salmonellosis에 의한穿孔性腹膜炎의 外科的 觀察, 大韓外科學會誌 10: 885, 1968.
- 9) 신강연, 리종오, 김계영, 김화세, 최낙상, 이재곤: 장티푸스 280예에 대한 임상적 고찰, 大韓內科學會雜誌 12: 45, 1969.
- 10) 尹吉子, 楊愛琳, 全鍾暉: 內科病棟에서 본 有熱疾患의 現況—俗稱不明熱에 對한 檢討 감염 7: 63, 1975.
- 11) 李一雄, 李泰淑, 徐輔祥: 살모넬라 感染症으로 인한 腸穿孔性 腸膜炎의 臨床 및 血液像에 對한 觀察, 충남의대잡지 2: 535, 1975.
- 12) 李載汶, 金東必: 腸「티푸스」 「파라티푸스」 및 그 類似疾患에 對한 臨床的 考察, 大韓內科學會雜誌 3(2): 77, 1959.
- 13) 李鍾承: 韓國의 腸티푸스—微生物學的 考察—綜合醫學 9: 374, 1964.
- 14) 李昌連, 林熙哲, 李邦憲, 李東厚, 朴奩南, 李正熙, 朴陞哲, 金鍾高: 腸티푸스患者 257例에 對한 臨床的 觀察, 대한내과학회잡지 20: 291, 1977.
- 15) 李憲鶴: 腸티푸스 診斷에서의 血球凝集反應, 綜合醫學, 8: 1017, 1963.
- 16) 李享浩, 朴眞享, 朴東浩, 申永基, 劉邦鉉: Typhoid fever의 腸出血群과 非出血群의 臨床的 比較 觀察, 대한내과학회잡지 14: 105, 1971.
- 17) 李浩鎔, 朴奎彥, 高榮植, 李海宜, 卞基洙: 腸티푸스 561例에 對한 臨床的 觀察, 대한내과학회잡지 21: 547, 1978.
- 18) 全鍾暉: 現時的 腸티푸스는 臨床像이나 經過에 變貌가 있는가? 綜合醫學 9: 861, 1964.
- 19) 鄭在奎: Chloromycetin에 typhoid 抗體形成에 미치는 影響, 大邱醫學雜誌 79: 1957.
- 20) 鄭在赫, 鄭九鉉, 鄭喜泳: 似疑「腸 typhus」患者에 對한 臨床的 觀察, 대한내과학회잡지 17: 418, 1974.
- 21) Altemeir W.A. III., J.A. Bellanti and E.L. Buescher: The IgM response of children to Salmonella typhosa vaccine, I. measurement of anti-typhoid concentration and their proportion of total serum IgM globulins. J. Immunol. 103: 917, 1969.
- 22) Beasley, W.J., S.W. Joseph and E. Weiss: Improved serodiagnosis of Salmonella enteric fevers by Enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microb., 13: 106, 1981.
- 23) Bruins, S.C., I. Ingwer, M.L. Zeckel and A.C. White: Parameters affecting the Enzyme-linked Immunosorbent assays of immunoglobulin G antibody to a rough mutant of Salmonella minnesota. Inf. Immunity, 21: 721, 1978.
- 24) Carlsson, H.E., A.A. Lindberg and S. Hammarstrom: Titration of antibodies to Salmonella O antigens by Enzyme-linked immunosorbent assay. Inf. Imm. 6: 703, 1972.
- 25) Carlsson, H.E., A.A. Linderg, S. Hammarstrom, and A. Ljungren: Quantitation of Salmonella O antibodies in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Int. Archs Allergy appl. Immun. 48: 485, 1975.
- 26) Chau, P.Y. and M.H Ng: Differential agglutination of particulate Vi and O antigens by the IgM and IgG class antibodies. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 56: 39, 1978.
- 27) Devillier, A.B., R.H. Deupfree, C. Dickinson and M.F. Beeler: Comparative study of typhoid O-antigens. Am. J. Clin. Path. 44: 410, 1963.
- 28) Espersen, F., J.B. Hertz, N. Hoiby and H.H. Mogensen: Quantative immunoelectrophoretic analysis of Salmonella typhi antigens and of corresponding antibodies in human sera. Acta path. microbiol. Scand. Sect. B., 88: 237, 1980.
- 29) Espersen, F., N. Hoiby and J.B. Hertz: Cross-reactions between Salmonella typhi and 24 other bacterial species. Acta Path. Microb. Scan. Sect. B., 88: 243, 1980.
- 30) Gardner, A.D.: An international experiment on the Widal reaction. J. Hyg. 37: 124, 1937.
- 31) Granfors, A: Measurement of Immunoglobulin M. IgG and IgA antibodies against Yersinia enterocolitica, by enzyme-linked immunosorbent assay: Persistence of serum antibodies during disease, J. Clin. Microb. 9: 336, 1979.
- 32) Granfors, K., M.K. ViLjanen, and A. Toivanen: Measurement of immunoglobulin M, immunoglobulin G, and immunoglobulin A antibodies against Yersinia enterocolitica by enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of lipopolysaccharide and whole bacterium as antigen. J.

- Clin. Microb.* 14 : 6, 1981.
- 33) Gripenberg, M., A. Nissinen, E. Vaisanen, and E. Linder: *Demonstration of antibodies against Yersinia enterocolitica lipopolysaccharide in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay.* *J. Clin. Microb.* 10 : 279, 1979.
- 34) Kenny, K. and M. Herzberg: *Early antibody response in mice to either infection or immunization with Salmonella typhimurium.* *J. Bact.*, 93 : 773, 1967.
- 35) Kern, D.F.: *enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies to Shigella flexneri antigens.*, *Inf. Immun.*, 24 : 441, 1979.
- 36) Levine. M.M., O. Grados, R.H. Gilman, W.E. Woodward, R. Solis-plaza and W. Waldman: *Diagnostic value of the Widal test in area endemic for typhoid fever.* *Am. J. Trop. Med.* 27 : 795, 1978.
- 37) Freter, R.: *Agglutinin titration (Widal) for the diagnosis of enteric fever and other enterobacterial infections, in Manual of Clinical Immunology edited N.R. Rose & H. Friedman American Society for Microbiol., Washington, D.C. 1976.*
- 38) Pike, R.M., M.L. Schulze, and C.H. Chandler: *Agglutinating and precipitating capacity of rabbit anti-salmonella typhosa rG and rM antibodies during prolonged immunization.* *J. Bact.*, 92 : 880, 1966.
- 39) Rote, N.S., N.L. Taylor, A.N. Shigeoka, J.R. Scott and H.R. Hill: *Enzyme-linked immunosorbent assay for Group B streptococcal antibodies.* *Inf. & Immun.*, 27 : 118, 1980.
- 40) Schreoder, S.A.: *Interpretation of serological tests for typhoid fever.* *J.A.M.A.*, 06 : 839, 1968.
- 41) Springer, G.F. and R.E. Horton: *Blood group isoantibody stimulating in man by feeding blood group-active bacteria.* *J. Clin. Invest.* 48 : 1280, 1969.
- 42) Svenungsson, B., H. Jorbeck, and A.A. Lindberg: *Diagnosis of Salmonella infection: Specificity of indirect immunofluorescence for rapid identification of Salmonella enteritidis and usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay.* *J. Inf. Dis.*, 140 : 927, 1979.
- 43) Voller, A., D. Bidwell and A. Bartellett: *Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infections, 506, in manual of clinical immunology, edited N.R. Rose and H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1976.*
- 44) O'Neill, G.J. & J.P. Toold: *Extraction of nucleic acid free lipopolysaccharide from gram-negative bacteria,* *Nature* 190 : 344, 1961.