

비임균성 노도염 환자에서 *Chlamydia trachomatis* 검출방법에 관한 연구

(배양법, 효소면역법 및 직접면역형광법의 비교 관찰)

한양대학교 의과대학 임상병리학 및 피부과학교실¹

최태열 · 김춘원 · 김중환¹

= Abstract =

A Comparison of the Sensitivities of Culture, Chlamydiazyme and Direct Immunofluorescence Staining for *Chlamydia trachomatis* in Non-gonococcal Urethritis

Tae-Yeal Choi, Choon-Won Kim and Jung-Hwan Kim¹

Department of Clinical Pathology and Dermatology¹, Medical College, Hanyang University, Seoul, Korea

Chlamydia trachomatis is one of the most common cause in non-gonococcal urethritis. There are several diagnostic methods for *Chlamydia trachomatis*; culture method using McCoy cell, enzyme immunoassay and direct immunofluorescence staining etc. We have studied a sensitivities of culture, chlamydiazyme and direct immunofluorescence staining(DIF). 85 male patients previously conformed to non-gonococcal urethritis have been selected in this study. Three samples were concurrently collected in the same patient. First sample was used to inoculation in McCoy cell, 2'nd sample was used to Chlamydiazyme test and 3'rd sample was used to direct immunofluorescence staining method.

The results are following.

1. All culture, Chlamydiazyme and DIF positive cases are 15/85(17.7%).
2. Culture and Chlamydiazyme positive but DIF negative cases absent.
3. Culture and DIF positive, but Chlamydiazyme negative cases are 2/85(2.4%).
4. Chlamydiazyme and DIF positive, but culture negative cases are 9/85(10.6%).
5. Culture positive, but Chlamydiazyme and DIF negative cases are 6/85(7.1%).
6. Chlamydiazyme positive, but culture and DIF negative cases are 7/85(8.2%).
7. DIF positive, but culture and Chlamydiazyme negative cases are 3/85(3.5%).
8. All culture, Chlamydiazyme and DIF negative cases are 43/85(50.1%).

In summarized, any one positive cases of culture, Chlamydiazyme and DIF are 42/85(49.9%).

Key Words: *Chlamydia trachomatis*, non-gonococcal urethritis.

서 론

최근 *Chlamydia trachomatis* (이하 *C. trachomatis*)는 비임균성 노도염의 가장 많은 원인으로 밝혀지고 있어, 성병치료 및 관리에 중요한 문제점으로 대두되고 있다^{1, 4-7, 12}.

그러나 *C. trachomatis*가 한국의 경우 뒤늦게 소개되고 정확한 통계가 없었던 것은 *Chlamydia* 의

생활사가 일반다른 세균과 달라 규명이 다른 일반 세균동정방법보다 어렵고 시간이 많이 소요되었기 때문이다. 국내에서도 일부 몇기관에서 발표된 것이 있으나 검출방법이 편중되어 있거나, 기초실험에 국한되어 있어, 본 연구진은 현재 *C. trachomatis*의 임상진단에 많이 사용되고 있는 McCoy 세포를 이용한 배양법, 효소면역법(Chlamydiaenzyme Abbott Lab.) 및 단일항체를 이용한 직접면역형광법(Microtrak, syva Lab.)을 사용하여 동일검체에서 *C.*

Fig. 1. Infected McCoy cells, Iodine-stained (10×40).

*trachomatis*를 검출하였기에 비교 관찰하여 보고하는 바입니다.

재료 및 방법

1. 연구대상

서울 중구보건소 성병진료실을 방문한 남자 노도염환자들만 선정하여 검사하였다. 검사전날 노분비물을 Gram 염색, 임균배양(Thayer-Martin medium 사용), 및 소변검사를 하여 임균성에 의한 노도염이 아님을 확인한 후 소변잔사 검사중 백혈구수가 고배율(10×40)상에 5개 이상인 전형적인 비임균성 환자 85명에서 *C. trachomatis*에 대한 검사를 실시하였다.

2. 연구방법

1) 검체채취

검사당일 소변을 2시간이상 참고 성병진료실을 내방하여 먼저 노도입구를 깨끗이 닦아낸 후 면봉을 노도입구로부터 2~3cm 삽입하여 2~3번 회전시켜 내벽의 분비물 및 상피세포를 동일한 방법으로 연속 3번씩 채취하였다.

2) 배양방법

제일 먼저 채취된 면봉(日本綿奉)을 수송배지(2SP; 0.2M sucrose-0.02M phosphate)에 넣어 4°C 냉장고에 보관후 당일 저녁 이미 만들어진 McCoy cell monolayer에 접종시켰다(35°C에서 3,000rpm으로 1시간 원심). 접종된 McCoy cell은 37°C CO₂배양기에서 48~72시간 배양한 후, 고정액(Alcohol/Formalin)에 고정하여 Jones' Iodine으로 염색하였다. 양성판정은 McCoy cell내 1개이상의 봉입체가 정확히 발견된 것을 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

3) 효소면역 측정법

두번째로 채취된 면봉(Abbott Lab.)을 수송배지

Fig. 2. Heavily infected urethral smear, stained by direct IF(Nikon, 10×100).

(Abbott Lab.)에 넣어 4°C에 보관후 5일마다 검체를 chlamydiazyme (Abbott Lab, Enzyme Immuno Assay)을 이용하여 검사하였다.

4) 직접면역형광법

마지막으로 채취된 면봉(Syva Lab.)을 검체 채취 kit내에 들어있는 유리슬라이드(8mm 직경원형)에 도말후 acetone으로 고정하여 -20°C에 보관하였다. 보관되었던 유리슬라이드는 5일에 한번씩 microtrak™(Syva Lab.)을 사용하여 염색후 형광현미경(Nikon; blue filter, 및 540nm filter 사용)으로 판독하였다. 판정은 bright apple-green fluorescence를 내는 pinpoint size의 elementary body가 5개 이상 관찰된 경우만 양성으로 하였다¹⁰⁾(Fig. 2).

성 적

C. trachomatis 배양법, 효소면역법(Enzyme Immuno-Assay, EIA) 및 직접면역형광법(Direct Immuno-Fluorescein, DIF) 3가지중 한가지 방법이라도 양성인 예는 42/85(49%), 3가지 방법 전부 음성인 예는 43/85(51%)였다. 배양법으로 양성인 예는 23/85(27%), chlamydiazyme법은 31/85(37%) 및 DIF법은 29/85(34%)였다. *C. trachomatis*배양법, Chlamydiazyme, DIF법에 모두 양성인 예는 15/85(18%), 배양법과 chlamydiazyme법에 양성이며 DIF법에 음성인 예는 0/85(0%), 배양법 및 DIF에 양성 chlamydiazyme법에 음성인 2/85(2.4%)는 예는 9/85(11%), 배양법, chlamydiazyme법, 및 DIF법에서 각기 양성이나 다른 방법에는 음성인 예도 각기 6/85(7%), 7/85(8%), 및 3/85(40%)였다.

본 연구결과에서 2가지 방법은 양성, 나머지 한가지 방법이 음성인 경우 음성인 방법의 결과를 위음성으로 할 때, 배양법, chlamydiazyme, 및 DIF

Table 1. The results of positive rates in *McCoy* culture*, *Chlamydiazyme*(EIA)**, and *Direct Immunofluorescein*(DIF)*** methods for detection of *Clamidia trachomatis*

Culture*	Clamydiazyme**	DIF***	Total(%)
+	+	+	15(17.65%)
+	+	-	0(0.00%)
+	-	+	2(2.35%)
-	+	+	9(10.59%)
+	-	-	6(7.06%)
-	+	-	7(8.24%)
-	-	+	3(3.53%)
-	-	-	43(50.59%)
23(27%)	31(37%)	29(34%)	85(100.00%)

Table 2. Comparison of results between culture and chlamydiazyme

Culture Chlamydiazyme	Positive	Negative	Total
Positive	15	16	31
Negative	8	46	54
Total	23	62	85

Chlamydiazyme : Sensitivity 15/23 : 65%
Specificity 46/62 : 74%

의 위음성율은 자기 9(11%), 2(2.4%) 및 0(0%)이다. 반대로 두가지 방법이 음성인데 다른 한가지 방법이 양성인 경우를 위양성이라 할 때 배양법은 6(7%), chlamydiazyme은 7(8%) 및 DIF법은 3(4%)에가 위양성이었다(Table 1 및 Fig. 1, 2).

그러나 여러 가지 방법중 배양법을 절대적인 방법으로 생각할 때 배양법에 대한 chlamydiazyme 법의 sensitivity 및 specificity는 자기 15/23(65%), 및 46/62(74%)이며 DIF법은 17/23(74%) 및 50/62(81%)였다(Table 3, 4).

고 찰

현재 *Chlamydia*로 알려진 병원체는 1950대 초반부터 바이러스가 아니라 세균임이 규명되었으며 또 한 psittacosis, trachoma, inclusion conjunctivitis, lymphogranuloma venerum(LGV)을 일으키는 원인 병원체임이 밝혀졌다¹⁾. *Chlamydia*는 genus이며 *C. psittaci*와 *C. trachomatis*라는 두가지 species가 있어 자기 틀린 질환을 일으킨다. *C. psittaci*는 주로 동물에 병을 일으켜 psittacosis(ornithosis), meningopneumonitis 및 feline pneumonitis의 원인병원체이며, *C. trachomatis*는 주로 사람에서 병원성을

Table 3. Comparison of results between culture and direct immunofluorescence(AIF) staining

DIF \ Culture	Positive	Negative	Total
Positive	17	12	29
Negative	6	50	56
Total	23	62	85

DIF : Sensitivity-17/23 : 74%
Specificity-50/62 : 81%

나타내어 trachoma, inclusion conjunctivitis, lymphogranuloma venerum의 원인이 된다²⁾.

*Chlamydia*의 항원과 immunotype은 group antigen이 공통으로 있어 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 측정할 수 있으며 specific antigen으로는 species-specific antigen이 자기 세포막에 존재하나 열에 약해 대개가 추출도중에 파괴되고 만다. 이외에 type specific antigen이 있어 *C. trachomatis*의 immunotype이 15가지로 구분된다. Immunotype A, B, B_a 및 C는 trachoma를 일으키고, C, D, E, F, G, H, I, J, K는 inclusion conjunctivitis 및 비임균성 눈도염을 일으키고, L₁, L₂, L₃는 lymphogranuloma venerum (LGV)의 원인이 된다. 각각의 Immunotype은 서로 cross reaction을 일으킬 수 있어(B, B_a), (E, D), (L₁, L₂), (C, J), (K, L₃)등이 교차반응을 일으킨다^{10-12, 14, 15)}. 외국의 경우 D/E type이 많으나, 김 등³⁾은 G/F형이 28/76명(37%)으로 제일 많았다.

현재 nonspecific urethritis(NSU)는 nongonococcal urethritis(NGU)와 혼동되어 사용되고 있으나 일반적으로 눈도염증상이 있으며 임균은 발견되지 않으며 소변침사 검사시 고배율(10×40배) 현미경하에 백혈구가 5개 이상인 경우를 NGU로 판단한다¹³⁾. 본 연구에서도 기술된 것과 같이 검사대상을 선정하여 전날 눈도분비물을 Gram염색, 임균배양(Thayer-Martin media 사용) 및 소변검사를 실시하여 임균이 없음을 확인하고, 소변침사 검사에서도 대부분 환자가 백혈구가 20개이상 되었었다. 가능한 한 항생제투여를 하지 않은 환자를 선정하려 하였으나 몇몇 환자는 tetracycline 및 ampicillin 등을 이미 자가복용한 환자들이 있었으나 소수의 경우라 통계적으로 분류하지는 않았다. 뿐만아니라 *C. trachomatis*는 살아있는 세포내에서만 기생하는데, 이는 본병원체의 Energy대사과정중 일부 효소를 기생체로부터 공급받아야 하기 때문이다. 그러므로 검체채취시 가능하면 눈도나 자궁경부 깊숙이 면봉을 넣어 상피세포와 함께 채취되어야 한다⁴⁾. 외국 남자의 경우 면봉을 눈도입구에서 3~4cm 삽입하기

를 권하나 본 연구에서는 2~3cm으로 감축시켰는데 이는 방광염의 유발을 막기 위함이었다. 검체를 채취한 후에도 보관상태에 따라 검출율이 틀릴 수 있기 때문에⁷⁾ 본 연구에서도 배양검사는 가능한 한 당일 McCoy cell에 접종하였으며, chlamydiazyme 법 및 직접면역형광법 (direct immunofluorescein, DIF)은 검체를 5일까지 각기 4°C 및 -20°C에 보관하였다가 일시에 검사하였다.

McCoy cell culture 및 접종은 CDC manual⁸⁾에 따랐으나 배양 48시간에 1회 염색으로 72시간 배양 및 secondary passage를 하지 못하여 배양법이 다른 방법보다 검출율이 낮지 않았나 사료된다. 배양법이 secondary passage까지 실시하면 다른 방법보다 검출율이 높아 새로운 검사와의 비교시 표준이 되는 방법으로 사용되고 있으나 세포배양을 할 수 있는 시설과 숙련된 기술이 필요하며, 타 방법에 비하여 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 배양법에서 주의할 점은 검체접종시 3,000rpm 이상의 원심분리를 1시간이상 실시하여야 하며 McCoy cell의 monolayer에 균을 접종후 cycloheximide 처리하는 과정을 잊어서는 안된다^{9, 10, 11)}.

Chlamydiazyme 법은 효소면역법을 이용한 것으로 검체중 항원을 추출, 반응시켜 cutoff value 이상인 것을 양성으로 판정한다. Chlamydiazyme 법은 배양법과 달리 균체의 생존여부와 관계없이 항원만 많이 있으면 양성으로 판정되며, 주로 노도에서 채취된 검체에서 많이 사용된다. 자궁경부의 검체에서도 측정가능하나 위양성이 많아 확인검사로 는 부적합하리라 생각된다^{12, 13)}.

직접면역형광법은 술식이 간단하고, 신속하나, 형광현미경이 필요하고 소모품 값이 상당히 비싸서 한국 실정에는 보편화되기가 어려우리라고 생각된다³⁾.

상기 방법 이외에 검체를 직접 슬라이드에 도말하여 iodine 및 Giema 염색을 하여 관찰하는 경우도 있으나 검출율이 매우 낮아 현재는 별로 사용되지 않고 있다¹⁴⁾.

또한 환자의 혈청에서 항체를 보체결합방법, 간접면역형광방법 등으로²⁾ 역가를 측정하는 방법이 있으나, 검사방법의 번잡성 및 표준항원보유등의 문제점이 내포되어 있어, 역학적인 조사등에 이용되고 있을뿐 임상에는 적용하기 힘든 실정이다.

상기 비교된 3가지 방법을 모두 정확한 검사라 생각할 때 한가지 방법이라도 양성이면 *C. trachomatis*에 감염되었다고 가정할 때, 한국에서도 NGU의 원인중 *C. trachomatis*가 차지하는 율은 49%로 외국의 40~60% 검출율과 대동소이하다고 생각된다^{15, 20)}.

결 론

비임균성 노도염의 원인중 *Chlamydia trachomatis*가 차지하는 비율이 최근들어 높게 보고되고 있으며 많은 검사방법들이 임상에 소개되고 있다. 이에 저자들은 현재 임상에서 많이 사용되고 있는 세포배양법(McCoy cell culture), 효소면역법(chlamydiazyme, Abbott Lab.), 직접면역형광법(Microtrak, Syva Co.)을 사용 *C. trachomatis*의 검출율을 비교 관찰하였다.

검사대상은 비임균성 노도염으로 판정된 남자 85명을 선정하였으며, 첫번째 채취된 검체는 세포배양법에, 두번째 채취된 검체는 chlamydiazyme 법에 마지막 채취된 검체는 직접면역형광법에 사용하였다. 세포배양법에서 양성인 예는 23/85 (27%), chlamydiazyme 법에서는 31/85 (37%), 직접면역형광법에서는 29/85 (34%)였다. 세포배양법을 표준방법으로 할 때 chlamydiazyme의 sensitivity 및 specificity는 65%, 74%였으며, 직접면역형광법은 각기 74%, 81%였다. 그러나 상기 세가지 방법중 한가지 방법이라도 양성이면 *C. trachomatis*에 의한 노도염으로 판단할 경우, *C. trachomatis*에 의한 비임균성 노도염은 42/85 (49%)로 절반을 차지하고 있다.

참 고 문 헌

- 1) 김성진, 이무상, 이진무: 비임균성노도염과 진립선염에서 *Chlamydia trachomatis*의 분리 및 항생제효과에 관한 연구. 대한비뇨기과학회지, 25(6): 746, 1984.
- 2) 김성진, 이무상: 간접면역형광법을 이용한 비노생식기계 *Chlamydia trachomatis* 감염의 혈청학적 진단과 면역형분류. 대한비뇨기과학회지, 26(2): 102, 1985.
- 3) 김성진, 이무상: *C. trachomatis* 감염의 진단방법별 효용성비교. 대한비뇨기과학회지, 26(3): 211, 1985.
- 4) 김성진: 항생제의 *Chlamydia trachomatis*에 대한 항균력측정. 대한비뇨기과학회지, 26(5): 501, 1985.
- 5) 이진무, 권성원, 이무상, 김성진: 한국인에서의 *Chlamydia trachomatis* 감염현황에 관한 연구. 대한의학협회지, 29(4): 417, 1986.
- 6) 정규봉, 금동규, 최태열, 김춘원: 비임균성 노

- 도염 환자에서 Chlamydiazyme 을 이용한 *Chlamydia trachomatis* 의 검출에 관한 연구. 한양대학술지, 6(1): 221, 1986.
- 7) 홍석일, 박명희, 이상은: 비임균성 노도염 환자에서 배양법과 직접도말면역현광 염색법을 이용한 *Chlamydia trachomatis* 의 검출. 대한임상병리학회지, 4(1): 101, 1984.
 - 8) Bird BR and Forrester FT: Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *CD-C, Atlanta*, 1981.
 - 9) Cadwell HD et al: Immunoassay for detecting *C. trachomatis* Major outer membrane protein. *J. Clin. Microbiol.* 18(3): 539, 1983.
 - 10) Caldwell HD et al: Monoclonal Ab against a genus-specific antigen of Chlamydia species: Location of the epitope on Chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 44(2): 306, 1984.
 - 11) Johnson AP, Osborn MF and Rowntree S et al: A study of inactivation of *Chlamydia trachomatis* by normal human serum. *Br. J. Vener. Dis.* 59: 369, 1983.
 - 12) Hatch TP et al: Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp. *J. Bacteriol.* 157(1): 13, 1984.
 - 13) Mandell GL, Douglas RG and Bonett JE: Principles and practice of infectious diseases. New York. 2nd p722-724, 1985.
 - 14) Newhall VWJ et al: Serovar determination of *C. trachomatis* isolates by using type-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Micro.* 23(2): 333, 1986.
 - 15) Rujjs G et al: Rapid detection with monoclonal antibodies of *Chlamydia trachomatis* in urethral smears and urine sediments(letter): *Lancet.* I: 8383, 1984.
 - 16) Saikku P and Paavonen J, et al: Solid-phase enzyme immunoassay for Chlamydia antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 17: 22, 1983.
 - 17) Stamm WE, Tam M and Koester M: Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 17(4): 666, 1983.
 - 18) Stephens RS et al: Sensitivity of Immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 16(1): 4, 1982.
 - 19) Stephens RS and Tam MR et al: Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: Antibody specificities and antigen Characterization. *J. Immunol.* 128: 1083, 1982.
 - 20) Thomsons BJ et al: Sensitivity of detecting *C. trachomatis* elementary bodies in smears by use of a fluorescein labelled monoclonal antibody: Comparison with conventional Chlamydial isolation. *J. Clin. path.* 37: 812, 1984.