

## 螢光抗補體法에 의한 *Mycobacterium scrofulaceum* 疎水性菌株의 型別同定

中央大學校醫科大學 微生物學教室

崔 哲 淳 · 金 容 在 · 梁 容 泰

=Abstract=

### A Rapid Serotyping of Hydrophobic Strains of *Mycobacterium scrofulaceum* by Fluorescent Anti-Complement Technique

Chul Soon Choi, Yong Jae Kim and Yong Tae Yang

Department of Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 151, Korea

In the ecology and epidemiologic studies on various serotypes of atypical mycobacteria(AM), Schaefer's bacterial agglutination test(BA) provided the basis of the serologic procedures. Recently, attempts have been made to modify and to simplify the Schaefer's BA such as a slide agglutination test(Engel & Beerwald, 1970), a "simplified" BA(Reznikov & Leggo, 1972), an agglutination inhibition test(Richards & Eacret, 1972) and "micromethod"(Thoen et al., 1975). The BA, however, was not widely applied as a routine laboratory test mainly because it requires much times and labors to perform and partly because it is not applicable to hydrophobic strains either often encountered in the isolation of AM in the clinical bacteriology or stock strains maintained in the laboratory.

On the contrary, fluorescent antibody technique with mycobacteria may have advantages over the BA because it is far more simpler in serologic procedures and is applicable to all strains of mycobacteria regardless of smooth or rough types of cultures. At the present, it is well known that the type-specific antigens are lacking on the surface of rough type of AM compared to that on smooth type of strain, but the antigenicity on the surface of the hydrophobic strains of AM which resulted from a series of sub-culture and the strain in the laboratory for 3 to 6 months has not been clarified.

In this study, an attempt to serotype the hydrophobic strains of *M. scrofulaceum* serotype 41, 42 and 43 by fluorescent anti-complement(FAC) technique was made. The FAC technique with mycobacteria was also described in detail.

In the summary, the complement fixing antibody titres of reference sera to smooth types of homologous serotype was highest, but the antibody titres of reference sera to hydrophobic strains of serotypes, 41, 42 and 43 gave two-to 8-folds lower than those to smooth type of strains. Although the sensitivity of type-specific antigens on the hydrophobic strains to reference sera was much lower, using the two units of reference sera determined by titration with hydrophobic strains, three serotypes, i. e., 41, 42

and 43 were specifically differentiated one another by FAC technique.

This result indicated that the hydrophobic strains which were maintained in the laboratory at least for 6 months still retain type-specific antigen detectable by FAC technique.

## I. 緒 論

결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*)에 의한 사람과 동물의 결핵(tuberculosis)과 非定型 mycobacteria에 의한 mycobacteria 感染症(mycobacterioses)의 감별진단은 분리된 mycobacteria의 세균학적 동정에 기초를 둔다. 요지음 임상적으로 결핵으로 진단되는 환자에서 분리되는 mycobacteria 중에서 비정형 mycobacteria의 분포가 높다는 것이 밝혀져<sup>1-4)</sup>, 치료 지침을 세우기 위하여 mycobacteria의 분리와 정확한 세균학적 동정이 절실히 요망된다.

오늘날 결핵균의 세균학적 동정은 생화학적 특성, 배양 특성 등 많은 성적을 전산처리하는 Adanson 分類法과 동물에 있어서의 病原性 등 고전적 분류법에 의존하기 때문에 최종적으로 동정하기까지는 많은 시간과 노력이 필요하지만, 비정형 mycobacteria의 동정은 다른 병원균의 혈청학적 동정에서와 같이 균체응집반응에 의하여 신속히 실시할 수 있게 되었다.<sup>5-11)</sup>

그러나 균체응집반응은 중형 특이항원이 있는 smooth ("S")형 세균의 분류동정에는 이용될 수 있지만 rough ("R")형 또는 균부유액제제가 불가능한 결핵균을 포함한 소위 疎水性: hydrophobic("H")균주의 혈청학적 분류동정에는 이용될 수 없는 단점을 갖고 있다.<sup>11)</sup>

이와는 반대로 최근에 세균의 동정에 많이 사용되는 형광 항체법을 "R" 또는 "H"특성으로 인하여 균체응집반응의 이용이 불가능한 결핵균을 포함한 비정형 mycobacteria의 혈청학적 동정법으로 응용코자 많은 연구가 시도되었다.<sup>12-17)</sup> 그러나 이것 역시 결핵균의 동정법으로서 민감성과 특이성이 낮기 때문에 보편화되지 않고 있으며, 단지 "S"형 비정형 mycobacteria의 동정만 가능한 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 또한 "S"형이 갖는 특이항원에 대한 기준항혈청(reference sera)을 이용한 "R" 또는 "H"형 세균체의 항원검출에 대한 민감성과 특이성에 대하여도 잘 모르고 있다.

그럼으로 이 연구에서는, 첫째 "H"형 mycobacteria의 특이항원성의 민감성을 조사하고, 둘째 기준항혈청의 최종항체값을 이용한 형광항체법에 의한 "H"형 비정형 mycobacteria의 型分類의 특이성을 조사하기 위한 목적으로, *M. scrofulaceum*의 3개 혈청형, 즉 serotype 41(scrofulaceum), 42(Lunning) 및 43(Gause)의 "S" 및 "H"형 균주간의 특이항원의 민감

성과 특이성을 형광항체법에 의하여 비교하고 성적을 보고한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 세균

*M. scrofulaceum*은 serotype 41(scrofulaceum), 42(Lunning) 및 43(Gause)으로서 Unit of Tuberculosis Research, Queensland Public Health의 Dr. M. Reznikov로부터 분양받았다(표 1참조).

Table 1. Serotypes and Strains of *Mycobacterium scrofulaceum*

Serotype	Strain*	Type strain for reference serum
41(Scrofulaceum)**	Bridge & P 29	Bridge
42(Lunning)	Lunning & La-Rue	Lunning
43(Gause)	Gause & Brooks	Gause

\* provided from Dr. M. Reznikov, The Tuberculosis Section, Laboratory of Pathology and Microbiology, Queensland Department of Health, Brisbane, Australia(originated from Dr. W. B. Schaffer, National Jewish Hospital and Research Center, Denver, Colo., USA).

\*\* ( ): Old type designation.

세균은 Löwenstein-Jensen egg 사면배지에 도말배양하여 5°C에 보존하면서 6개월 간격으로 계대하였다.

### 2. 型特異抗體

형특이항체는 특별히 지적된 것을 제외하고는 Schaffer<sup>5)</sup>의 방법에 따라 토끼에 면역시킨 고도면역혈청을 사용하였다. 즉 각혈청형의 표준균주(type strain)를 TB broth(10% 정상 우혈청 및 0.1% Tween 80함유)에 1주일간 배양한 다음 7H10한천경판에 선상도말한 다음 폴리리퀸렌백에 싸서 37°C에서 3주일간 배양하여 "smooth" 집락을 선정하였다. 이것을 TB broth에 1~2주일간 배양한 다음 5% phenol수용액을 배지의 1/10량으로 가한 다음 37°C에서 3일간 정치하여 살균시켰다. 균체는 0.5% phenol PBS(0.1M, pH 7.0)로 4°C 1,200×g에서 15분간 2회 원심체적하였다. 이것을 0.3% phenol PBS에 OD=0.3±0.05 (20mm, 525μm)로 조질하여 4°C에 보존하면서 면역용항원으로 사용하였다.

양성혈청은 이상의 항원을 토끼에 4일간격으로 이정맥 내에 0.5, 1.0, 2.0.....2.0ml를 6회에 걸쳐 번역하고 최종주사후 제 4일에 채취된 혈청의 응집항체값이 1 : 160 이상일 때 전체혈하여 혈청을 분리하였다.

### 3. 기니피복체

300~400g의 건강한 기니피(Hartley-Anyang系) 10수로부터 채혈하여 酸세척시험관에 개체별로 담아 실온에서 30분간 응고시킨 다음 1, 200×g에서 10분간 원침하여 혈청을 분리하였다. 혈청을 모두 혼합한 다음 1ml씩 분병하여 -40°C에 보존하면서 사용하였다.

### 4. 기니피 C3 globulin의 정제항원

기니피 C3 globulin은 Linscott 및 Cochrane<sup>18)</sup>의 방법에 따라 만들었다. 즉 신선한 기니피혈청을 자력각반기 위에서 저으면서 zymosan(12mg/ml)을 가한다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이것을 냉각된 Veronal 완충식염수(VBS: 0.1M, pH 7.4)로 5°C 1, 200×g에서 10분간 5회 원침세척하고 최종침전물 (zymosan-C3복합체)을 혈청실량이 되도록 VBS로 회석하여 4ml씩 분병한 다음 -40°C에서 48시간 잠압건조시킨 것을 C3 globulin 정제항원으로 사용하였다.

### 5. 기니피 C3 globulin에 대한 마우스 腹水抗體生産

zymosan-C3 복합체에 대한 마우스 腹水抗體의 생산은 전회의 보고<sup>19)</sup>에서와 같은 방법으로 1CR-1VR 마우스에 번역하여 만들었다.

### 6. 기니피 C3-globulin에 대한 마우스 腹水抗體의 정제

마우스 복수를 자력각반기에서 저으면서 동량의 2.25M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액(31.96g/100ml)을 서서히 가하여 37°C에서 10분간 각반하였다. 각반이 끝나면 이것을 5°C 1, 200×g에서 10분간 원침하여 상청액을 버리고 침전물을 복수량의 실량이 되도록 멸균증류수에 다시 용해한다음 2.25M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액으로 침전반응을 반복하였다. 최종침전물을 PBS(0.1M, pH 7.2)에 용해시켜 Visking tube에 옮겨 동일 PBS에 대하여 자력각반기로 저으면서 18시간 투석하였다. 이때 포화염화바륨액을 떨어뜨려 sulphate침전이 없을 때까지 투석을 계속하였다. 투석이 끝나면 500×g에서 10분간 원침하여 변성단백질과 응괴물을 제거시킨 다음 Lowry 들<sup>20)</sup>의 방법에 따라 단백질농도를 측정하고 PBS에 1g% 농도로 회석하였다.

### 7. FITC 原液吸收紙

FITC 원액흡수지는 Goldman 및 Carver<sup>21,22)</sup>의 방법에 따라 만들었다. 즉 FITC isomer I(Sigma Co.)을 acetone-dioxane(2 : 1) 혼합액에 20μg/ml의 농도로 용해시킨 다음 크로마토그래피박지(200mm<sup>2</sup>)에 1ml씩 흡수시켜 풍건한 것을 흑색병에 넣어 -5°C 데시케타에 보존하면서 사용하였다.

### 8. FITC 표식항체(conjugate)제조

기니피 C3(β<sub>1c</sub>, β<sub>1A</sub>) globulin에 대한 마우스 복수 globulin의 FITC 표식은 Goldwasser 및 Shepard<sup>23)</sup> 그리고 Cherry들<sup>24)</sup>의 방법에 의하였다. 즉 소형용기에 항체의 1/10량의 0.5M 탄산완충액(pH 9.5)을 미리 가하여 자력각반기로 서서히 저으면서 필요량의 FITC(25μg/g)가 되도록 원지를 절단하여 녹힌 다음 항체를 서서히 떨어뜨려 혼합시키고 실온에서 2시간 각반하여 복수 globulin의 염색을 실시하였다. 각반이 끝나면 500×g에서 10분간 원침하여 FITC흡수지와 이물질을 제거시키고 Killander들<sup>25)</sup>의 방법에 따라 Serhadex G-25 콜럼을 통하여 0.01M PBS(pH 7.2)로 용출하여 1차 FITC착색층을 채취하였다. 이것을 carbowax 4,000(Union carbide chemical Co.)으로 4°C에서 정제 globulin 실량이 되도록 농축시킨 다음 0.01% gelatin과 1 : 10,000배의 thiomersal을 가하여 4°C에 보존하면서 사용하였다.

### 9. 균체도말항원

Löwenstein-Jensen egg 사면배지에 1주일간 발육시킨 것을 실온에 6개월간 보존하여 소수성특성을 갖는 세균을 도말 항원으로 사용하였다. 즉 2ml의 멸균증류수에 위의 균체를 1 loop(2mm) 마서 부유시킨 다음 현미경용슬라이드글래스(0.8mm 두께) 위에 다이아몬드연필로 표시한 원형구획에 1 loop씩 도말하여 공기중에 건조시켜 가법제 화염고정한 다음 다시 0.02% gelatin과 0.01% Tween 80가 함유된 7% formalin 인산완충액(0.01M, pH 7.0)에 7분간 2차고정하여 사용하였다.

### 10. 도말표본의 염색

항원-항체-보체-항보체 반응은 전회보고<sup>17)</sup>와 같은 방법에 의하여 실시하였다. 즉, 도말표본 위에 형특이항체-보체혼합액을 Pasteur 피펫으로 1 drop씩 가하여 습상자에 넣어 37°C에서 45분간 반응시켰다. 이것을 PBS에 7분 PB에 5분간 각

각 세척한 다음 알지로 물기를 제거하고 conjugate(2 단위) 25 $\mu$ l을 가하여 위와 같은 방법으로 처리하였다. 최종세척후에 그리셀을원충액(glycerol:carbonate 완충액=1:5, pH 9.5)과 커버글라스로 덮어 경검하였다.

### 11. 경검 및 판독

형광현미경은 Leitz-Laborlux로서 HBQ 200W L2 Osram전구와 mirrohousing이 장치된 lamp housing 250을 사용하였다. 필터장치는 BG 12 1차 필터와 K490 2차필터를 사용하였으며 10배의 집안렌즈와 95배의 유

침대물렌즈를 통하여 경검하였다. 판독은 경검시야가 균등하게 형광발색을 보이는 것을 4+,  $\geq 75\%$ 를 3+,  $\geq 50\%$ 를 2+,  $\geq 25\%$ 를 1+ 그리고  $\leq 25\%$ 를  $\pm$ 로 표시하였다. 형광보체결합항체값은 3+ 이상의 형광발색을 보이는 최종혈청희석배수로 표시하였다.

## III. 結 果

### 1. 혈청형간의 형광보체결합항체값

*M. scrofulaceum* serotype 41(scrofulaceum), 42

Table 2. Fluorescent Anti-complement Fixing Antibody Titre of Type Antiserum to Homologous and Heterologous Serotypes.

Serotype	Antiserum Antigen	Reciprocal of Serum Dilution								
		4	8	16	32	64	128	256	512	control
41 (Bridge)*	41 Bridge	4**	4	4	4	3	3	2	$\pm$	$\pm$
	P 29	4	3	1	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	42 Lunning	2	$\pm$	$\pm$						$\pm$
	La-Rue	$\pm$	$\pm$							$\pm$
43 (Gause)*	43 Gause	2	$\pm$	$\pm$						$\pm$
	Brooks	2	2	$\pm$	$\pm$					$\pm$
	41 Bridge	3	1	$\pm$						$\pm$
	P 29	$\pm$	$\pm$							$\pm$
42 (Lunning)*	42 Lunning	3	3	3	3	3	2	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	La-Rue	3	3	1	$\pm$	$\pm$				$\pm$
	43 Gause	2	2	$\pm$						$\pm$
	Brooks	3	3	2	$\pm$					$\pm$
43 (Gause)*	41 Bridge	2	1	1	$\pm$					$\pm$
	P 29	1								$\pm$
	42 Lunning	3	2	2	$\pm$					$\pm$
	La-Rue	$\pm$	$\pm$							$\pm$
43 (Gause)*	43 Gause	4	4	4	3	2	1	$\pm$		$\pm$
	Brooks	4	4	4	4	3	2	$\pm$		$\pm$

\* Strains used for the production of reference sera.

\*\* Intensity of fluorescent anti-complement staining of the smear preparation; 4; 100% staining, 3; more than 75% staining, 2; 50% staining, 1; more than 25% staining,  $\pm$ ; less than 25% staining in the field of observation.

(Leunning) 및 43(Gause)의 "smooth" 집락형 세균의 1주일간격 3대 계대한 균체도말항원의 동형 및 이형항체에 대한 민감성과 특이성(교차반응)을 조사한 성적은 표 2와 같다.

즉, Serotype 41(scrofulaceum)에 대한 특이항체는 동형의 Bridge 및 P29에 대한 특이형광보체결합항체값은 각각 1:128 및 1:8이었으나 교차반응은 1:4 이하이었다. Serotype 42(Lunning)에 대한 항체는 동

형균주 Lunning 및 La-Rue에 1:64 및 1:8의 항체값을 보이고 교차반응은 1:4이하 이었다. Serotype 43(Gause)에 대한 항체도 동형균주 Gause 및 Brooks에 1:32 및 1:64의 높은 항체값을 보였으나 교차반응은 모두 1:4이하 이었다.

### 2. "Smooth" 및 "Rough" 균체간의 형특이항원의 민감성비교

7H10 한천평판에서 선정된 "S" 집락과 동집락을 L-

**Table 3. Fluorescent Anti-complement Fixing Antibody Titr of Type Antiserum to Smooth and Hydrophobic Strains Originated from Homologous Serotypes.**

Serotype	Strain	Colony* Type	Reciprocal of Serum Dilution					Control
			8	16	32	64	128	
41	Bridge	Smooth	4**	4	4	4	2	±
		Hydrophobic	4	3	1	1	±	±
42	Lunning	Smooth	4	3	3	3	2	±
		Hydrophobic	3	3	1	1	1	±
43	Gause	Smooth	4	4	4	3	2	±
		Hydrophobic	4	3	3	1	1	±

\* Smooth type: transferred three times on L-J egg slants at 7 days intervals after a smooth colony was picked up from culture on 7H10 agar medium.

\* Hydrophobic strain: stored at room temperature for 6 months and unstable for bacterial suspensions in saline and unsuitable for the agglutination test.

\*\* See footnote in table 2.

**Table 4. Sensitivity and Specificity of Fluorescent Anti-complement Staining Technique for Differentiation of Serotypes 41, 42 and 43 Using 2 units of Type Reference Sera**

Type Reference Serum	2 Units* of Antiserum (dilution)	Type 41		Type 42		Type 43	
		Bridge P 29	Lunning La-Rue	Gause Brooks			
41(Bridge)	1:8	4**	3	±	±	1	1
42(Lunning)	1:8	±	±	3	3	1	1
43(Gause)	1:16	±	±	1	±	4	4

\* 2 units of antiserum; mixed one volume of final dilution of serum given 4+ complement staining to one volume of guinea pig complement (2 units).

\*\* See footnote in table 2.

Jegg사면에 1주일간 배양한후 실온에 6개월간 보존하여 균등균부유액이 되지않는 소위 소수성세균간의 형특이항원의 민감성을 조사하기 위하여 3개 혈청형의 "S" 및 "H" 세균의 도말항원에 대한 동형의 "S" 균체에 대한 항체의 형광보체 결합항체값을 비교한 성적은 표 3과 같다.

즉 Bridge, Lunning 및 Gause의 3개 혈청형의 "S" 집락항원에 대한 항체값은 각각 1:128, 1:64 및 1:64이었는데 반하여 "H" 세균항원에 대한 항체값은 각각 1:16, 1:16 및 1:32로서 2-4 배의 차이로서 형특이항원성이 떨어졌다.

### 3. 최종항체값(2단위)을 이용한 형별특이성

Serotype 41, 42 및 43에 대한 기준항체의 동형의 "H" 균체에 대한 최종항체값(3+이상의 형광보체결합항체값을 보이는 최종희석배수)의 2단위 혈청을 이용한 형별분류의 특이성을 조사한 성적은 표 4와 같다.

즉, serotype 41(1:8), 42(1:8) 및 43(1:16)의 2단위 항체값을 이용한 동형 및 이형균주에 대한 형별 분류에서 동형반응은 3~4+의 반응을 보이는데 반하여 이형과의 교차반응은 ±~1+로서 판독시야가 불균등한 염색특성을 나타냄으로서 특이반응과 감별이 가능하였다.

## IV. 考 察

기준혈청(reference sera)을 이용한 응집반응에 의하여 親水性 비정형 mycobacteria의 "S" 집락균체가 갖는 중형특이항원의 검출로서 비정형 mycobacteria의 신속한 혈청학적동정이 가능하다는 것이 밝혀졌다.<sup>5-11)</sup>

그러나 균체응집반응에 의한 비정형 mycobacteria의 혈청학적분류 및 동정에 관한 슬기는 복잡하기 때문<sup>20)</sup>에 임상세균학에서는 실용화되지 못하고 단지 비정형 mycobacteria의 생태학적 전염병학적 연구 목적에만 사용되고 있다. 이러한 복잡성을 덜기 위하여 평

Fig. 1. Demonstration of type specific antigen on hydrophobic strains of *M. scrofulaceum* serotype 4I (I), 42(II) and 43(III) with homologous reference serum against smooth type bacteria by fluorescent anti-complement technique. Note the hydrophobic strain in cluster and the homologous reaction (I, II & III) showing even staining (4+), whereas cross reaction (W) showing partial staining ( $\pm$ ).

판응집반응법<sup>27)</sup>, 항원·항체의 사용량과 기준혈청의 수를 줄인 소위 “simplified” 검사법<sup>28)</sup>, 응집저지시험<sup>29)</sup>, 및 微量凝集反應<sup>29)</sup> 등의 改良法이 고안되었지만 親水性으로서 “S” 집락 또는 “D” 집락과 같이 균체표면에 중 및 형특이항원을 갖는 세균에만 이용될 수 있고 형특이항원이 결여된 “R” 집락형성세균 또는 균부유액 제조에 疎水性(hydrophobic; “H”) 특성을 갖는 세균의 혈청형동정은 불가능 하다.

이 연구에서는 疎水性 mycobacteria의 세균체표면에 있는 중 및 형특이항원의 민감성과 혈청형분류의 특이성을 조사하기 위하여 *M. scrofulaceum*의 “S” 집락에서 증식된 것을 실험실에 6개월 보존하여 “H” 상태로 만들어 형특이항원의 민감성을 조사하였다.

이 연구에서 기준항혈청 41, 42 및 43은 모두 동형 균주에 대하여 높은 민감성을 보이고 이형균주에 대하여 약간의 교차반응을 보였지만 특이성은 비교적 높았다. 그러나 기준항혈청 43을 제외하고 41 및 42는 동일균주와는 1:128 및 1:64의 높은 항체값을 보이는 반면 동형에 속하는 이균주와는 모두 1:8이하의 낮은 민감성을 보였다(표 2참조). 이러한 성적은 형특이 균체항원은 동형간에도 균주에 따라 양적차이가 크다는 것을 의미한다. 또한 흥미있는 관찰은 “S” 집락과 “H” 균체간에 항체값의 조사에서 후자의 경우 2-4배의 감소차이가 있어 “H” 균체에서 형특이항원성이 비록 유의적으로 감소되었지만 실험실에 6개월간 보존하여도 형특이항원성이 지속되었다는 사실이다.

이러한 성적은 “R” 집락의 세균을 혈청학적으로 분류동정하기 위하여는 기준항혈청의 항체값은 “R” 집락항원을 기준으로 측정하여야 한다는 것을 의미한다. 이 연구에서 “R” 집락을 기준으로하여 정한 항체값의 2 단위를 사용하여 실시한 형광항보체법에서 *M. scrofulaceum* serotype 41(scrofulaceum), 42(Bridge) 및 43(Gause)간에 형별특이성과 민감성이 증명되었다. 이러한 성적은 serotype 41 및 43은 *M. intracellulare* serotype 20(Arnold)과 교차반응을 보이지만 42 및 43형은 특이적이라는 다른 연구자<sup>11)</sup>의 성적과 일치한다. 그러나 이 연구에서 동형항원항체반응은 교차반응에 비하여 유의적인 민감성을 보였지만 교차반응이 응집반응에 비하여 다소 높다는 것은 형광항보체법이 균체응집반응에 비하여 민감한 반응이기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 성적으로 미루어 보아 흡수혈청을 이용한 응집반응의 번거로움을 피하고도 기준혈청의 종말항체값(2단위)을 이용한 형광항보체법은 “H”형 비정형 mycobacteria의 신속정확한 혈청학적동정법으로 적합

하다고 생각된다. 앞으로 환자의 객담 및 병변재료에 이용한 비정형 mycobacteria의 직접적인 혈청학적동정의 민감성과 특이성에 관한 연구가 계속되어야 할 것이다.

## V. 結 論

型特異抗體 또는 吸收抗血清을 이용한 균체응집반응과 기준항혈청의 종말항체값을 이용한 형광항체법은 비정형 mycobacteria의 혈청학적분류 및 동정의 기본이 된다. 균체응집반응은 형특이항원이 미약한 “R” 또는 “H”형세균의 혈청형조사에는 이용될 수 없는 반면 형광항체법은 형특이항원이 존속하는 한 모든 세균의 형별동정이 가능하다.

그러나 비정형 mycobacteria의 “S”형 균주가 “H”균주로 변할 때 형특이항원의 양질변화에 대하여는 잘 알려지지 않다.

그러므로 이 연구에서는 *M. scrofulaceum*의 serotype 41(scrofulaceum), 42(Lunning) 및 43(Gause)의 “S”균주가 “H”균주로 변할 때 “S”형 세균이 갖고 있는 형특이항원에 대한 기준항혈청(reference sera)에 대한 민감성과 특이성을 형광항보체법으로 조사하였다. 얻어진 성적을 종합하면 다음과 같다.

1. Serotype 41(scrofulaceum)에 대한 기준항혈청의 동형 “S”균주 Bridge 및 P 29에 대한 보체결합항체값은 1:128 및 1:8이었으며 교차반응항체값은 1:4 이하 이었다.
2. Serotype 42(Lunning)의 기준항혈청은 동형 “S”균주 Lunning 및 La-Rue에 대한 항체값은 1:64 및 1:8이었으며 교차반응항체값은 1:4 이었다.
3. Serotype 43(Gause)의 기준항혈청은 동형 “S”균주 Gause 및 Brooks에 대한 항체값은 1:32 및 1:64이었으나 교차반응항체값은 1:4 이었다.
4. Serotype 41, 42, 및 43기준항혈청의 “S” 및 “H”균주에 대한 보체결합항체값은 128/16, 64/16 및 64/32로서 “H”균주에서 2-8배의 감소를 보였다.
5. 기준항혈청의 2단위 종말항체값 41(1:8), 42(1:8) 및 43(1:16)을 이용한 형광항보체법에서 Serotype 41, 42 및 43의 “H”균주의 형별분류의 특이성이 인정되었다.

이상의 성적은 비정형 mycobacteria를 실험실에 6개월간 보존하여 “H”형으로 변할때도 비록 형별특이항원이 현저히 소실되지만 형별분류가 가능하다는 것을 의미한다.

## V. 참고 문헌

1. Trimble, A. and Runyon, E.H.: *The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease. J. Lab. Clin. Med.* **44**: 202, 1954.
2. Selkon, J.B.: *Atypical mycobacteria: A review. Tubercle(Lond.) Supp* : 70, 1969.
3. Rosenzweig, D.Y.: *Pulmonary mycobacterial infections due to Mycobacterium intracellulare-avium complex. Chest* **75**: 115, 1979
4. Wolinsky, E.: *Nontuberculous mycobacteria and associated disease. Am. Rev. Resp. Dis.* **119**: 107, 1979.
5. Schaefer, W.B.: *Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Resp. Dis.* **92**: 85, 1965.
6. Schaefer, W.B.: *Serologic identification of the atypical mycobacteria and its value in epidemiologic studies. Am. Rev. Resp. Dis.* **96**: 115, 1967.
7. Schaefer, W.B.: *Type-specificity of atypical mycobacteria in agglutination and antibody absorption tests. Am. Rev. Resp. Dis.* **96**: 1165, 1957.
8. Saito, H. and Kubica, G.P.: *Serologic studies of avian group III. Nonchromogen complex by agglutination test. Am. Rev. Resp. Dis.* **98**: 47, 1968.
9. Wolinsky, E. and Schaefer, W.B.: *Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 182, 1973.
10. Goslee, S., Rynerason, T. and Wolinsky, E.: *Additional serotypes of Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium gordonae, Mycobacterium marinum and Mycobacterium xenopi determined by agglutination. Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 136, 1976.
11. Schaefer, W.B.: *Serological identification of atypical mycobacteria, p. 323~343. In T. Bergan and J.R. Norris(ed.), Methods in Microbiology, vol. 13. Academic Press, London, 1979.*
12. Shepard, C.C. and Kirsh, D.: *Fluorescent antibody stainability and other consequences of the disruption of mycobacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**: 685, 1961.
13. Gilkerson, S.W. and Kanner, O.: *Improved technique for the detection of acid-fast bacilli by fluorescence. J. Bacteriol.* **86**: 890, 1963
14. Gillissen, G.: *Die fluoreszenz serologische von Mykobakterien. Zbl. Bak.(Orig.)* **188**: 81, 1963.
15. Jones, W.D. Jr., Saito, H. and Kubica, G.P.: *Fluorescent antibody techniques with mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis.* **92**: 255, 1965
16. Gilmour, N.J.L. and Gardiner, A.C.: *Detection of antibodies to Mycobacterium johnei by immunofluorescence. J. Comp. Path.* **78**: 107, 1968.
17. Choi, C.S., Royal, W.A. and Francis, J.: *The anti-complement fluorescent antibody technique for the identification of mycobacteria. Tubercle(Lond.)* **52**: 148, 1971.
18. Linscott, W.D. and Cochrane, L.G.: *Guinea-pig  $\beta$ 1c-globulin; Its relationship to the third component of complement and its alteration following interaction with immune complexes J. Immunol.* **93**: 965, 1964.
19. Choi, C.S., Kwon, H.J., and Yang, Y.T.: *Production of anti-species complement C3 ( $\beta$ 1c,  $\beta$ 1A) globulin in ascitic fluid of mice. Chung Ang J. Med.* **5**: 51, 1980.
20. Rowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.T.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.* **193**: 265, 1951.
21. Goldman, M. and Carver, R.K.: *Preserving fluorescein isocyanate for simplified preparation of fluorescent antibody. Science* **126**: 839, 1957.
22. Goldman, M. and Carver, R.K.: *Microfluorimetry of cells stained with fluorescent antibody. Exp. Cell. Res.* **23**: 265, 1961.
23. Goldwasser, R.A. and Shepard, C.C.: *Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedures. J. Immunol.* **80**: 122, 1958.



24. Cherry, W. B., Goldman, M. and Carski, T. R. : *Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable disease. U.S. Public Health. Serv. Publ. 729, 1960.*
25. Killander, J., Ponten, J. and Roden, L: *Rapid preparation of fluorescent antibodies using gel-filtration. Nature 192 : 182, 1961.*
26. Reznikov, M. and Leggo, J.H. : *Modification of Schaefer's procedure for serotyping of organisms of the Mycobacterium avium-M. intracellulare—M. scrofulaceum complex. Appl. Microbiol, 23 : 819. 2972.*
27. Engel, H. W. B. and Beerwald, L. G. : *A simplified agglutination test for serologic typing of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. 101 : 112, 1970.*
28. Richard, W,B, and Eacret. W.G. : *Mycobacterial agglutination inhibition test. Appl. Microbiol. 24 : 318, 1972.*
29. Thoen, C.O., Jarnagin, T.L. and Champion, N.L. : *Micromethod for serotyping strains of Mycobacterium avium. J. Clin. Microbiol. 1 : 469, 1975.*