

효소면역측정법을 위한 장티푸스 균체항원의 부착방법[†]

서울대학교 의과대학 미생물학교실 · 암연구소 및 내과학교실*

김윤원 · 황응수 · 국윤호 · 최강원* · 김익상 · 차창용 · 이승훈

= Abstract =

Methods for Coating the Killed Whole Cell Antigens of *Salmonella typhi* in Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Youn-Won Kim, Eung-Soo Hwang, Yoon-Hoh Kook, Kang-Won Choi, Ik-Sang Kim
Chang-Yong Cha and Seung-Hoon Lee

Department of Microbiology, Cancer Research Institute and Department of Internal Medicine*
College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

The advantages of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are its sensitivity and simplicity in detecting IgG, IgM and IgA antibody. To apply ELISA to diagnosis of typhoid fever, antigen such as lipopolysaccharide of *Salmonella typhi* or killed whole cell must be coated on solid phase. It is easy to coat lipopolysaccharide on ELISA plate but troublesome to purify it. As it is easy to obtain the killed whole cells, the development of the appropriate method by which those antigens of *S. typhi* are optimally coated on solid phase is needed.

To establish the appropriate method, carbonate buffer, methanol or poly-L-lysine was applied as binding substance on polystyrene or polyvinylchloride plate as solid phase when the killed whole cell antigens of *S. typhi* varied as follows: 10^8 , 10^7 , 10^6 and 10^5 cell/ml.

The criteria of the optimal method were determined as follows: 1. The optical density of positive sera is above 1.0 (0.6 in IgM) at 1:10 serum dilution and is 0.3 (0.2 in IgM) higher than that of negative sera: 2. The O.D. of sera is flat or lowering according to serum dilution: 3. It must be that the O.D. of negative sera is lower than 0.2 at the point of serum dilution where the O.D. of positive sera is higher than 1.0 (0.5 in IgM). The results obtained were summarized as follows:

1. The methods which fitted the above criteria were to use poly-L-lysine as binding substance, polyvinylchloride plate as solid phase and 10^7 cell/ml as antigen concentration of *S. typhi* (poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^7) and poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^6 in detecting IgG antibody, methanol/polystyrene/ 10^8 , poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^6 and poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^6 in IgM and carbonate buffer/polystyrene/ 10^8 , carbonate buffer/polystyrene/ 10^8 , methanol/polystyrene/ 10^8 , methanol/polyvinylchloride/ 10^8 , methanol/polyvinylchloride/ 10^8 , poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 and poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 in IgA.
2. The coating method using poly-L-lysine, polyvinylchloride plate and 10^8 cell/ml was best to assay IgG, IgM and IgA antibody all in one. By this method, to assay the each immunoglobulin class with an appropriate fixed serum dilution, 1:320 dilution was best.

서론

장티푸스의 진단은 원인균인 *Salmonella typhi* 가
[†]본 연구의 경비일부는 1984년도 서울대학교병원 특진연구비로 충당되었음.

환자의 혈액, 대변 또는 소변에서 분리되어야 장티푸스로 확진되나¹⁾ 환자혈청내의 항체역가의 변동을 측정하는 혈청학적 검사도 진단적 의의가 높다
5, 27, 28, 30).

특히 환자검체에서 원인균을 분리동정하는 과정

이 2~3일 정도 소요되므로, 고열을 호소하는 환자 즉이나 의사측으로 볼때, 상당히 지루한 시간이며 적절한 치료대책을 신속하게 강구하는데 적합하지 않기 때문에 초기에 진단을 결정할 수 있는 민감한 혈청학적 검사가 임상에게 선호되고 있다⁵⁾.

더구나 우리나라에서는 근래에 와서 항생제의 남용으로 전형적인 임상증세 및 병리조건을 나타내는 환자는 드물고 대부분이 비전형적인 경과를 취하는데다 *S. typhi*가 환자검체에서 분리되지 않는 경우에 혈청학적 검사에 의존하여 환자를 진단하고 치료해야 하는 임상예가 상당수에 달하고 있음을 많이 보고하고 있다^{2, 6, 9, 10)}. 이에 따라 장티푸스의 혈청학적 진단의 중요성이 가증되었고, 의존도가 높아지고 있으나 대부분의 병원검사실에서는 튜브응집반응인 Widal검사가 주로 이용되고 있다^{5, 28, 30)}. Widal 검사는 간편하고 24시간 이내에 결과를 알 수 있으나 특이성과 민감도가 많은 인자³⁰⁾에 의하여 심하게 변해서 신뢰도가 낮은 검사법으로 취급되고 있다. 그 이유로는 원인균인 *S. typhi*가 분리되어 장티푸스로 확진된 환자에서도 응집항체가 검출되지 않는 경우도 있고^{7, 9, 27, 30)} *S. typhi* 이외의 *Salmonella* 균과 교차반응의 결과가 속출하기 때문이다^{16, 17, 18, 30)}. 더구나 Widal검사는 혈청내 IgM 항체와 *S. typhi* 균체항원과의 응집 반응결과이므로 IgG 항체와의 반응은 무시된 결과로 나타나는 단점을 지니고 있다¹⁾. 민감도와 특이성을 높이기 위하여 적혈구에 lipopolysaccharide(LPS)를 부착시켜 항체를 측정하는 혈구응집반응^{6, 10)}도 역시 IgM 항체와 주로 반응하는 것이다.

장티푸스환자에서 *S. typhi*가 체내에 들어와서 잠복기를 거쳐 고열을 호소하면서 병원을 찾게 되는 것은 균의 침입부터 따져 경과시간이 약 3~4주쯤 되는데^{2, 10)}, 이때 쯤에는 혈청내의 항체량이 증가되어 있고 immunoglobulin class 간의 양적 변동^{3, 4, 24)}도 있겠으나 응집반응으로는 이러한 변화를 측정할 수 없다. 또한 장티푸스는 *S. typhi*에 의한 감염이므로 lipopolysaccharide 이외의 성분에도 항체 생성 반응^{4, 17)}이 일어날 것을 고려한다면, IgM, IgG 및 IgA 항체를 구별하여 측정하는 것은 장티푸스의 진단 및 예후판정에 큰 의의가 있는 것으로 보고되어 있다^{3, 4, 11, 24)}.

혈청내의 IgM, IgG 및 IgA 항체를 구별하여 측정하려면 최근에 개발된 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^{11, 20, 25, 32)}을 이용하므로써 쉽게 특이항체를 측정할 수 있다. ELISA는 특이성이나 민감도가 높고, 항원이 부착된 ELISA plate를 미리 준비하고 있다면 측정시간이 5시

간 이내이므로 신속하게 결과를 알 수 있다. Carlson 등^{14, 15)}이 처음으로 *S. typhi* LPS 항원을 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6)에 용해하여 polystyrene ELISA plate에 부착시켜서 ELISA로 LPS에 대한 IgG 및 IgM 항체의 측정을 시도하여 민감도 및 특이성이 탁월함을 보고한 이래로 Bruins 등¹⁸⁾은 *Salmonella minesotta*의 LPS를 0.1% triethylamine에 용해시킨뒤 polystyrene plate에 부착시켰으며 Beasley 등¹¹⁾은 *S. typhi* cell envelope fraction을 carbonate buffer(pH 9.6)를 사용하여 solid phase에 부착시켜서 ELISA를 행하여 유사한 결과를 얻었다. Granfos 등^{20, 21)}은 *Yersinia enterocolitica*의 LPS항원과 균체항원(killed whole cell antigen)을 0.1 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.5)을 이용하여 solid phase에 부착시켜, 두 항원에 대해 측정된 항체의 특이성이나 민감도에 차이가 없음을 보고하였다. Rote 등²⁹⁾은 결합 완충액(binding buffer)으로 0.1 M carbonate buffer(pH 9.6)를 사용하여 Group B Streptococci의 수용성 항원성분과 균체항원을 solid phase에 부착시켜 ELISA로 항체를 측정하여 세균의 항원성분에 따라, 해당되는 특이항체를 측정할 수 있음을 시사하는 결과를 보였다. 계 등¹⁾은 0.05 M carbonate buffer(pH 9.6)를 결합완충액으로 *S. typhi*의 균체항원과 LPS를 각각 solid phase에 부착시켜 ELISA로 측정된 항체의 특이성과 민감도에서 차이가 없음을 보고하였다.

Whole bacteria cell을 그대로 solid phase에 부착시킨 ELISA를 이용하는 것은 LPS를 비롯한 항원성분을 정제하는 번거로움을 피할 수 있고 균체항원은 만들기가 간편하고 쉬워서 기술적으로 훨씬 단순해지는 장점을 지니고 있다.

그러나 LPS는 결합완충액(binding buffer)으로 0.05 M carbonate buffer(pH 9.6)를 이용하여 solid phase에 붙이는 것이 일반적인 방법^{1, 11, 14, 18, 29)}으로 확립되어 있으나 whole cell에 대해서는 일반적인 방법이 확립되어 있지 않아 연구자에 따라 다양하게 시행해 왔다^{1, 20, 21, 29)}.

이에 따라 저자는 *S. typhi*의 whole cell이 solid phase에 부착되는 조건을 수립하기 위하여, killed whole cell을 다양한 방법으로 부착하여 장티푸스로 확진된 환자의 immunoglobulin class의 역할을 ELISA로 측정하므로써, 부착방법에 따른 역할을 비교 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균종 및 항원의 제자

서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 제대 보균자인 *Salmonella typhi* O901W를 nutrient broth에 18시간 동안 다량 배양하여 항원제작에 사용하였다.

균체항원을 얻기 위하여 배양된 균액이 들어있는 Erlenmeyer flask를 끓는 물에 2시간 동안 넣어두었다. 이렇게 한 균액을 5°C에서 1,400×g(Sorvall® RC 2-B centrifuge)로 30분간 원심침전했다. 상층액을 버리고 PBS(pH 7.2)로 위와 같이 3회 원심침전하여 세척한 뒤 0.3% formalinized saline으로 균을 재부유시켰다. 부유액균이 완전히 사멸되었음을 확인하고 항원 부착시험에는 Nephelometry에 의하여 혼탁도를 비교함으로써 균량을 측정하였다. 1ml에 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵ cell로 균량을 측정하여 각각을 항원 부착용 균체항원으로 사용하였다.

2. 환자의 혈청

제등¹¹⁾이 보관하고 있는 혈청으로서, 서울대학병원에서 입원한 환자중에서 장티푸스로 세균학적 진단이 확인되고 Widal test에서 O항원에 대한 역가가 1:160이상 나왔으며 IgG, IgM의 역가가 높은 3명의 환자혈청을 합쳐서 환자혈청으로 사용하였다. 대조군으로는 서울대학교 의과대학생중에서 장티푸스의 증상을 경험한 적이 없으며 Widal test에서 O항원에 대한 역가가 1:40이하인 3명의 혈청을 합쳐서 대조혈청으로 삼았다.

3. 항원부착용 ELISA Plate

ELISA용으로 특수하게 제작된 96 well을 가진 polystyrene plate(Costar®, flat bottom, hard plate)와 polyvinylchloride plate(Titertek®, flat bottom, soft plate)의 두 종류를 사용하여 ELISA plate와 항원의 부착정도를 파악하였다.

4. 항원부착의 방법

(1) Carbonate Buffer를 결합완충용액으로 사용

Voller등의¹²⁾ 방법을 변형하여 LPS를 붙이는 일반적인 방법과 같이 0.05 M carbonate buffer(pH 9.6)와 polystyrene plate를 사용하였다.

균체항원의 각 균량(10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵ cell/ml)을 carbonate buffer에 희석하여 polystyrene plate의 well에 50μl씩 분주하고 4°C에서 하루밤 방치하였다. PBS-Tween 20(Tween 20 50μl in pH7.2 PBS 100 ml)으로 3회 세척하고 3% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS-Tween 20으로 37°C에서 1시간동안 반응시켜 nonspecific background를 제거하였다.

3회 세척하고 환자혈청을 1:10에서 1:5120까지 2배 계단희석하여 각 well에 50μl씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척하고 peroxidase conjugated antihuman IgG, IgM 및 IgA goat sera(Cappel Lab.)를 1:4000으로 희석(IgG는 1:3000으로도 희석)하여 각 well에 50μl씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응 후 5회 세척하였다. 여기에 peroxidase에 대한 기질용액(O-phenylenediamine 4 mg과 20μl의 30% H₂O₂를 10ml phosphate citrate buffer에다가 섞음)을 well당 50μl씩 분주하여 30분 동안 실온에 반응시키고 2 M H₂SO₄를 각 well에 50μl씩 첨가하여 발색반응을 정지시켰다. ELISA reader(Titertek®)를 이용하여 반응정도를 492nm에서 흡광도(optical density)로 측정하였다.

(2) Methanol 고정법

Briles 등¹³⁾의 방법을 변형하였고 polystyrene plate와 polyvinylchloride plate를 사용하였다.

균체항원의 각 균량을 증류수에 희석하여 각 plate의 well에 50μl씩 분주하고 56°C dry oven에 말린 후 고순도의 methanol(Merck®)을 각 well에 50μl씩 분주하여 실온에서 10분간 고정하였다. PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 3% BSA-PBS-Tween 20으로 blocking하고 그 다음은 carbonate buffer사용시와 같은 방법으로 하였다.

(3) Poly-L-lysine 사용

Kenet¹⁴⁾의 방법을 변형하여 시행하였다.

Polyvinylchloride plate를 사용하며 각 well에 50μl poly-L-lysine(1 mg in PBS 100 ml)을 분주하고 실온에서 1시간 방치한 후 제거하였다. PBS(pH 7.2)에 희석된 각 균량의 균체항원을 각 well에 50μl씩 분주하고 2000×g(Beckman® TJ-6 centrifuge)로 10분간 원심침전하였다. PBS에 녹인 0.5% glutaraldehyde를 각 well에 50μl씩 분주하고 15분간 실온에서 반응시켰다. PBS로 2회 세척하고 100mM glycine(in 0.1% BSA-RPMI 1640 solution)을 각 well에 100μl씩 분주하고 실온에서 30분간 방치하여 glutaraldehyde를 blocking하였다. PBS로 2회 세척하고 3% BSA-PBS-Tween 20으로 blocking하며 그 다음은 carbonate buffer사용시와 같은 방법으로 하였다.

성 적

1. Carbonate Buffer-Polystyrene Plate

(1) Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:4000)-Fig. 1.: 균체항원으로 whole cell이 10⁷/ml 이상일 경우에는 1:80부터 1:5120까지 환자혈청이 대조혈청에 비해 흡광도(O.D.)차이가 2 배이상 나

타나며 1:40이하에서는 대조혈청에서 비특이성 반응이 강하게 나타났다. 10^8 cell/ml일때는 환자혈청과 대조혈청에서 큰 O.D. 차이가 나타나지 않으며 균체항원의 균량이 적어질수록 동일혈청, 동일희석배수에서 O.D.가 낮아졌다.

(2) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:3000)-Fig. 2.**: 전체적인 양상이 peroxidase conjugated antihuman IgG를 1:4000으로 희석한 것과 비슷하나 환자혈청의 O.D.가 높게 나타났다.

(3) **Peroxidase conjugated antihuman IgM(1:4000)-Fig. 3.**: O.D.가 모두 1.0이하이었다. 균체항원이 10^8 cell/ml일때는 1:40부터 1:5120 이상까지 환자혈청이 대조군보다 2배이상의 O.D. 차이를 보이나 그 이외에서는 큰 차이가 없었다. 대조혈청에서는 균체항원의 균량과 상관없이 동일혈청희석배수에서는 비슷한 O.D.를 보였다.

(4) **Peroxidase conjugated antihuman IgA(1:4000)-Fig. 4.**: 균체항원이 10^7 cell/ml 이상일 경우는 1:10부터 1:5120까지 환자혈청이 대조군보다 2배이상의 O.D. 차이를 보이나 10^8 cell/ml에서는 큰 차이가 없었다. 동일혈청, 동일희석배수에서는 균체항원 균량이 적어질수록 O.D.도 낮아졌다. 특히 10^8 , 10^9 cell/ml에서 유의한 반응이 나타났다.

2. Methanol-Polystyrene Plate

(1) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:4000)-Fig. 5.**: Fig. 1. 과 유사하였다.

(2) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:3000)-Fig. 6.**: Fig. 5. 와 전체적으로 비슷하나, 혈청의 낮은 희석배수에서는 Fig. 5. 보다 O.D. 가 높게 나타났다.

(3) **Peroxidase conjugated antihuman IgM(1:4000)-Fig. 7.**: Fig. 3. 과 유사하나 10^8 cell/ml에서는 환자혈청과 대조혈청의 O.D. 차이가 크게 나타났다.

(4) **Peroxidase conjugated antihuman IgA(1:4000)-Fig. 8.**: 모든 균체항원 균량에서 환자혈청이 대조군보다 2배이상의 O.D. 차이를 모든 혈청희석배수에서 보였다. 특히 10^8 , 10^9 cell/ml에서 유의한 반응이 나타남을 알수 있었다.

3. Methanol-Polyvinylchloride Plate

(1) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:4000)-Fig. 9.**: 모든 O.D.가 0.9이하이며 혈청의 낮은 희석배수에서는 비특이성 반응이 강했다.

(2) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:3000)-Fig. 10.**: 환자혈청에서 Fig. 9.보다 훨씬 높은 O.D.를 보이며, 모든 균체항원 균량에서 1:40이

상의 희석배수에서는 환자혈청이 대조군보다 2배이상의 O.D. 차이를 나타냈다. 10^8 , 10^9 cell/ml에서 1:80이하의 혈청희석배수에서는 비특이성 반응이 나타났다.

(3) **Peroxidase conjugated antihuman IgM(1:4000)-Fig. 11.**: O.D.가 모두 1.0이하이었다. 10^8 cell/ml인 경우는 1:20부터 1:320까지 환자혈청이 대조군보다 2배이상의 O.D. 차이를 보이나 그 이외에서는 큰 차이가 없었다.

(4) **Peroxidase conjugated antihuman IgA(1:4000)-Fig. 12.**: Fig. 8. 과 비슷한 양상을 보이며 10^8 , 10^9 cell/ml에서 유의한 반응이 나타났다.

4. Poly-L-lysine-Polyvinylchloride Plate

(1) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:4000)-Fig. 13.**: 모든 O.D.가 1.5이하이며 환자혈청의 낮은 희석배수에서 비특이성 반응이 강하게 나타났다.

(2) **Peroxidase conjugated antihuman IgG(1:3000)-Fig. 14.**: Fig. 13.에 비해 월등히 O.D.가 높게 나타나고 있으며, 10^8 cell/ml에서만 비특이적 반응이 약하게 나타나고 있었다. 특히 10^7 , 10^8 cell/ml에서 유의한 반응이 나타남을 알수 있었다.

(3) **Peroxidase conjugated antihuman IgM(1:4000)-Fig. 15.**: 다른 방법에 의한 IgM측정에서 보다 높은 O.D.를 보이고, 균체항원이 10^7 cell/ml이상에서 혈청희석배수 1:80부터 1:2560까지 환자혈청이 대조군보다 O.D.가 2배이상 높았다. 대조혈청에서 균체항원의 균량에 따른 O.D.의 차이는 없었다. 10^8 , 10^9 cell/ml에서 특히 유의한 반응이 나타났다.

(4) **Peroxidase conjugated antihuman IgA(1:4000)-Fig. 16.**: 다른 방법에 의한 IgA 측정에서 보다 높은 O.D.를 보이고, 모든 균체항원 균량과 모든 희석배수에서 환자혈청이 대조혈청보다 2배이상의 O.D.를 보였다. 10^8 , 10^9 cell/ml에서 특히 유의한 반응이 나타났다.

5. 적합한 방법의 조건 및 그 예

저자는 적합한 방법의 조건으로 첫째 최저희석배수인 1:10에서 환자혈청 O.D.가 1.0(IgM은 0.6) 이상이고 대조혈청보다 0.3(IgM은 0.2)이상 높아야 하며, 둘째 희석이 증가함에 따라 O.D.가 같거나 낮아져야 하고, 셋째 환자혈청 O.D.가 1.0(IgM은 0.5)이상인 희석배수에서 대조혈청 O.D.가 0.2이하인 점이 있어야 된다고 사료되었다.

위의 세 조건을 모두 만족시키는 방법을 찾아 보았다.

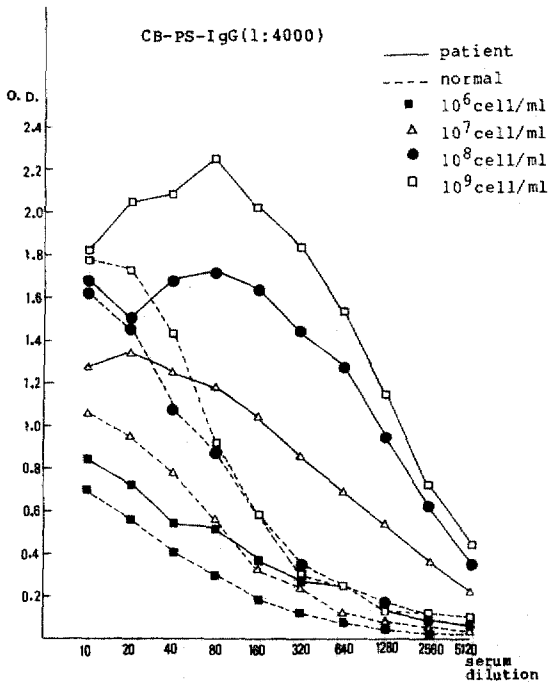


Fig. 1. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene ELISA plate with carbonate buffer to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera(1:4000).

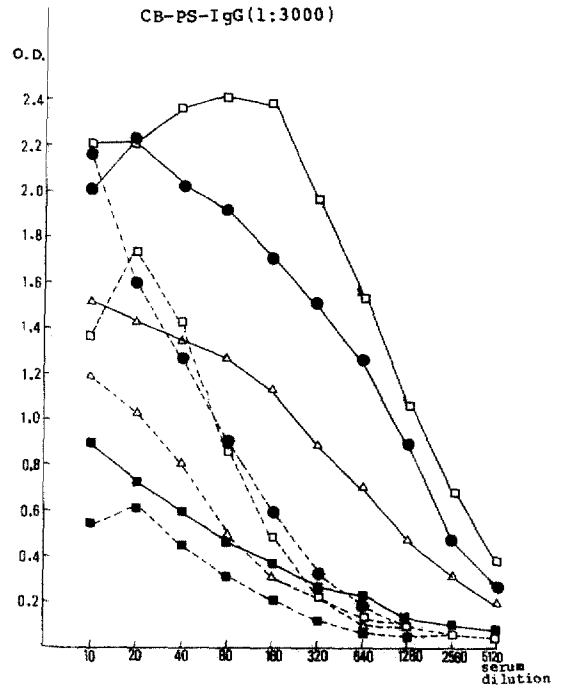


Fig. 2. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene ELISA plate with carbonate buffer to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:3000).

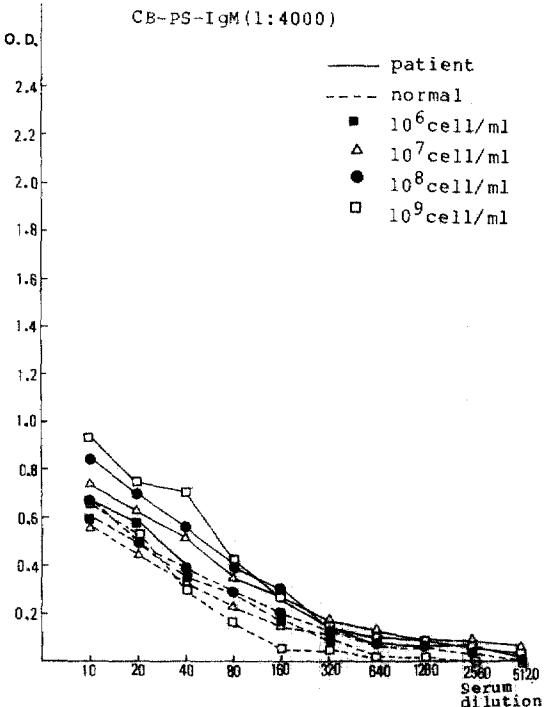


Fig. 3. Reactivity of IgM against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene ELISA plate with carbonate buffer to use peroxidase conjugated antihuman IgM goat sera (1:4000).

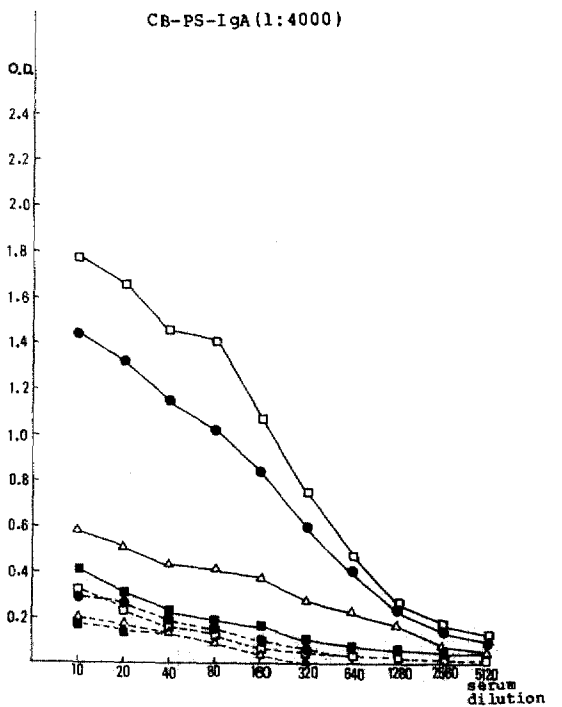


Fig. 4. Reactivity of IgA against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene ELISA plate with carbonate buffer to use peroxidase conjugated antihuman IgA goat sera (1:4000).

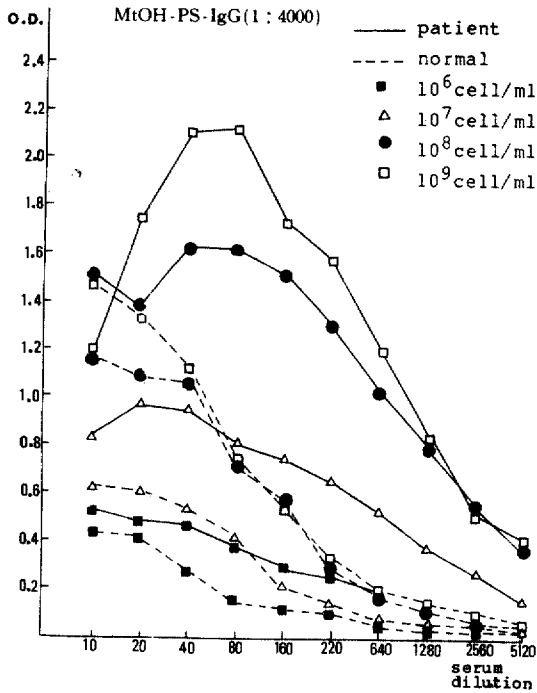


Fig. 5. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:4000).

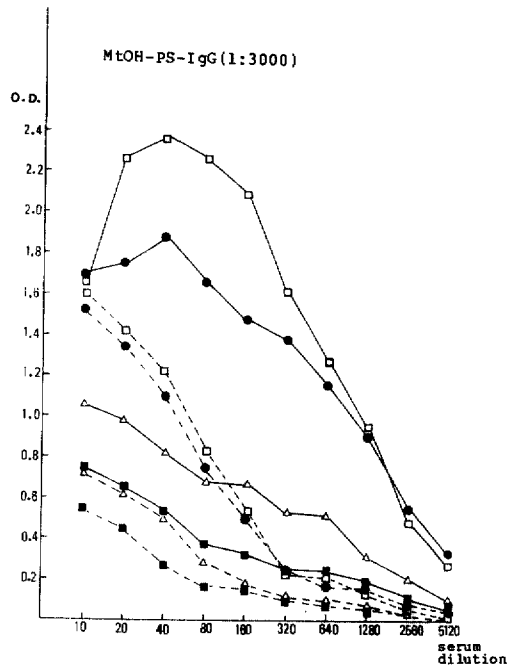


Fig. 6. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:3000).

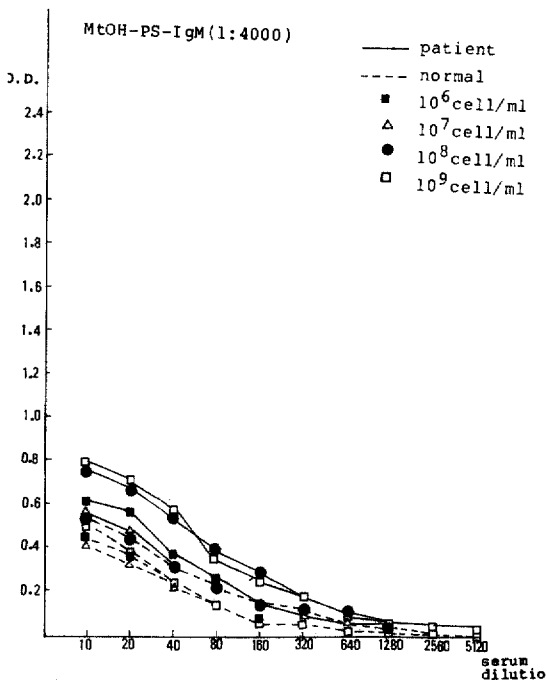


Fig. 7. Reactivity of IgM against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgM goat sera (1:4000).

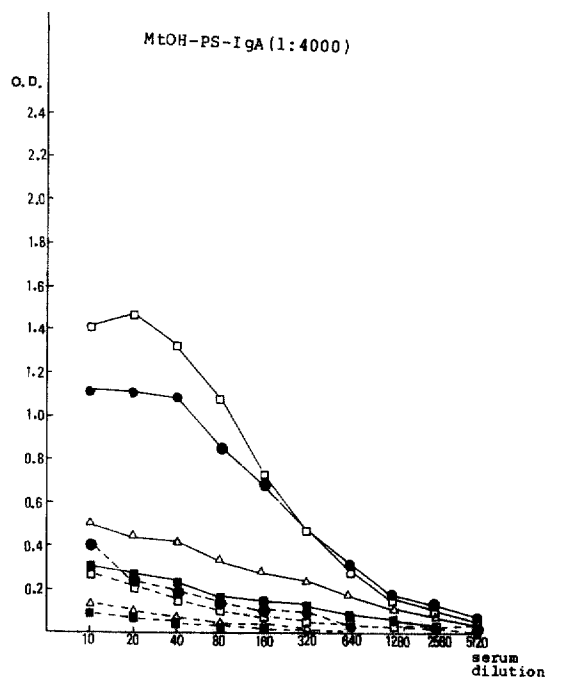


Fig. 8. Reactivity of IgA against killed whole cell of *S. typhi* coated on polystyrene plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgA goat sera (1:4000).

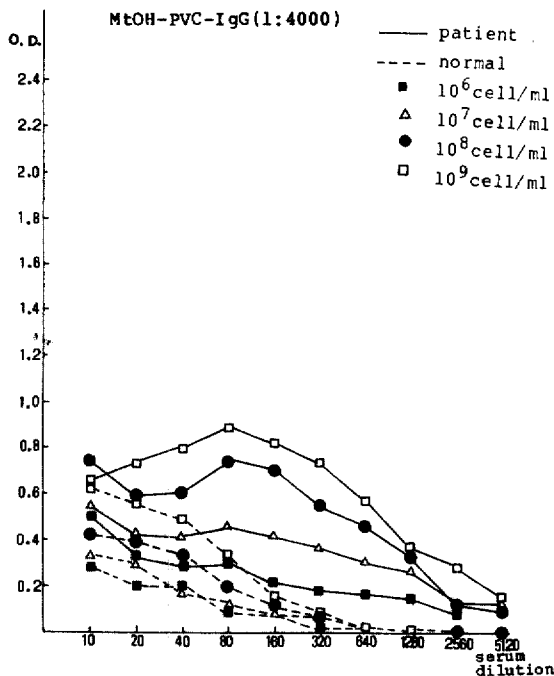


Fig. 9. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:4000).

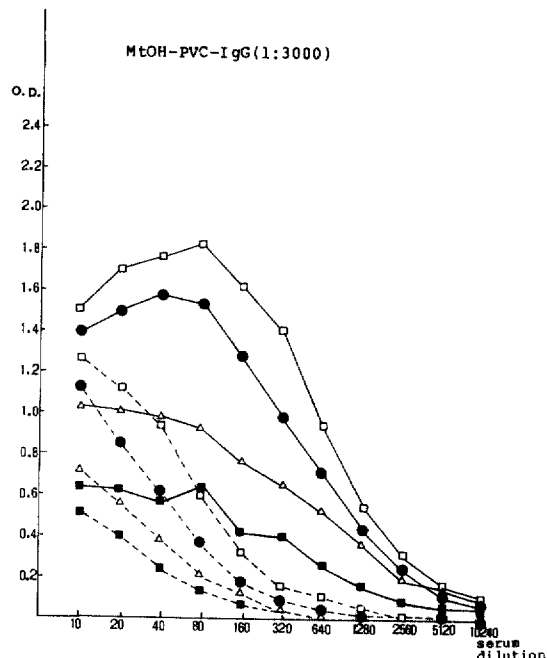


Fig. 10. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:3000).

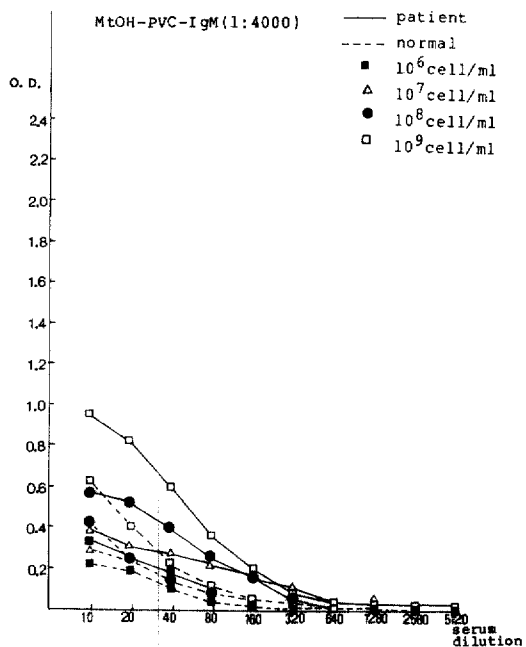


Fig. 11. Reactivity of IgM against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgM goat sera (1:4000).

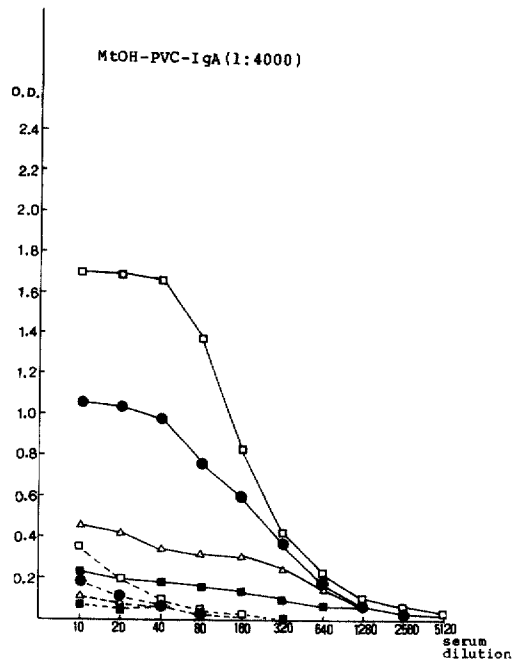


Fig. 12. Reactivity of IgA against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by methanol to use peroxidase conjugated antihuman IgA goat sera (1:4000).

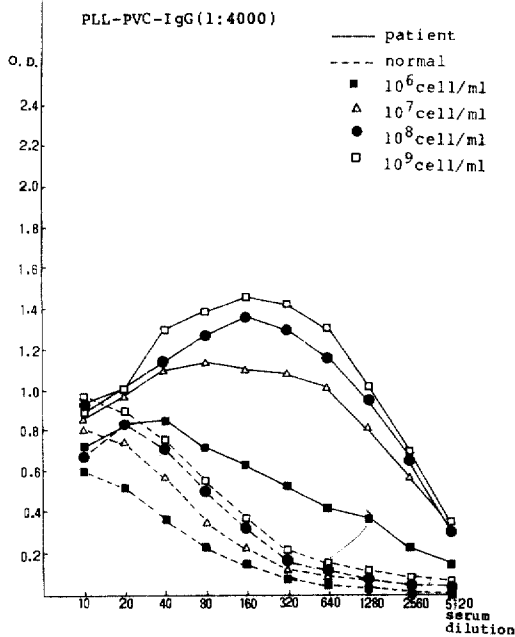


Fig. 13. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by poly-L-lysine to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:4000).

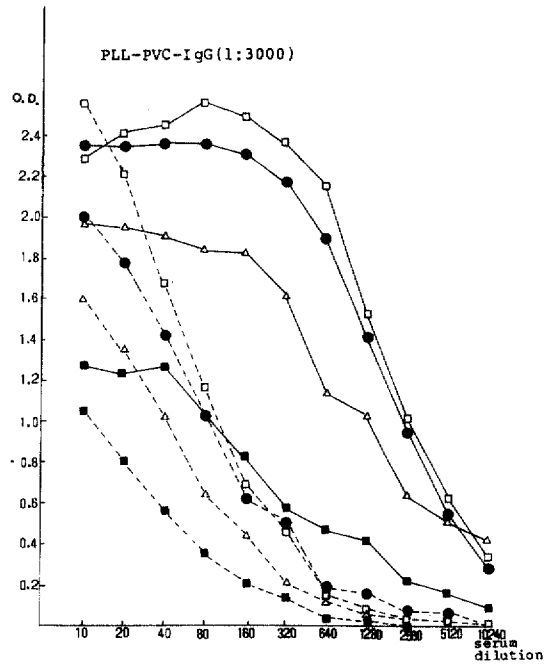


Fig. 14. Reactivity of IgG against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by poly-L-lysine to use peroxidase conjugated antihuman IgG goat sera (1:3000).

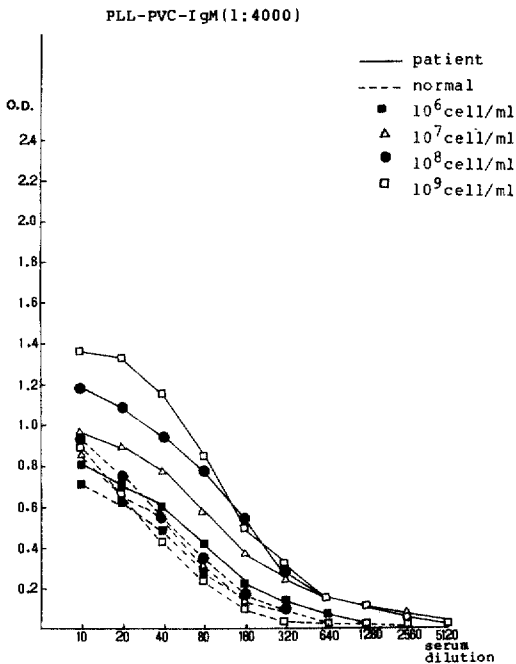


Fig. 15. Reactivity of IgM against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by poly-L-lysine to use peroxidase conjugated antihuman IgM goat sera (1:4000).

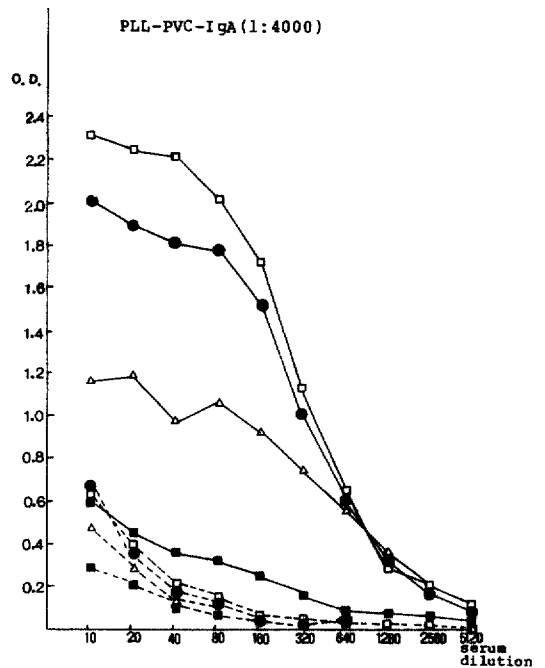


Fig. 16. Reactivity of IgA against killed whole cell of *S. typhi* coated on polyvinylchloride plate by poly-L-lysine to use peroxidase conjugated antihuman IgA goat sera (1:4000).

IgG에서는 poly-L-lysine으로 polyvinylchloride plate에 균체항원 10^7 cell/ml을 부착하여 peroxidase conjugated antihuman IgG를 1:3000으로 희석한 것으로 반응시킨 방법(PLL-PVC- 10^7 , 1:3000)이나 균체항원을 10^8 cell/ml을 사용한 것(PLL-PVC- 10^8 , 1:3000)이었다.

IgM에서는 methanol fixation(MtOH)-polystyrene plate(PS)- 10^8 , PLLPVC- 10^8 그리고 PLLPVC- 10^9 이었다.

IgA에서는 carbonate buffer(CB)-PS- 10^8 , CB-PS- 10^{10} , MtOH-PS- 10^8 , MtOH-PVC- 10^8 , MtOH-PVC- 10^8 , PLLPVC- 10^8 및 PLLPVC- 10^9 이었다.

Table 1.에서는 위의 세 조건을 만족하는 방법을 비교하기 위해 1:10희석에서의 환자혈청 O.D. 와

대조혈청과의 O.D.비, 그리고 세번째 조건을 만족시키는 희석배수, 그 희석배수에서 환자혈청과 대조혈청의 O.D.의 비를 나타냈다.

Table 1.에서 IgG, IgM 및 IgA를 동시에 만족하는 것은 PLLPVC- 10^8 (IgG antisera는 1:3000으로 희석한 것)의 방법이었다. 이 방법을 통해 screening하거나 routine check하는데 가장 적합한 혈청희석배수는 IgG에서 1:640, IgM에서 1:160, 그리고 IgA에서는 1:160과 1:320이었다. 그러나 immunoglobulin class에 따라 혈청희석배수를 다르게 한다면 field에서 실행하는데 불편하고 서로 비교하기에 어려운 점이 있으므로, 각 class에 모두 사용할 수 있는 하나의 희석배수를 찾아 보았다. 1:160으로 하면 IgM과 IgA는 만족하나 IgG에서 환자혈

Table 1. Methods for coating the whole cells of *S. typhi*

	Method	POD at 1:10	P/N at 1:10	point dilution rate	P/N at point	P/N at other point
IgG	PLL-PVC- 10^7 (1:3000)	1.97	1.2	1:320	8.0	
				1:640	9.5	
				1:1280	17.2	
IgM	PLL-PVC- 10^8 (1:3000)	2.34	1.2	1:640	11.8	2.16/0.50=4.3
				1:1280	9.5	at 1:320
				1:160	3.3	0.38/0.08=4.8
IgA	PLL-PVC- 10^9	1.36	1.6	1:160	6.3	
				CB-PS- 10^8	1.44	4.8
	CB-PS- 10^9	1.77	5.4	1:40	9.1	
				1:80	10.9	
				1:160	15.3	
	MtOH-PS- 10^8	1.11	2.8	1:40	6.4	
				MtOH-PVC- 10^8	1.06	5.3
	MtOH-PVC- 10^9	1.70	4.7	1:20	11.7	
				1:20	8.5	
				1:40	16.7	
				1:80	27.6	
				1:160	25.3	
	PLL-PVC- 10^8	2.01	3.1	1:40	10.6	
				1:80	13.7	
				1:160	25.3	
1:320				25.5		
1:80				11.9		
PLL-PVC- 10^9	2.32	3.7	1:80	11.9		
			1:160	24.6		
			1:320	22.6		

*POD at 1:10 : O.D. of patient sera at 1:10 dilution
P/N : O.D. ratio of patient sera & control
Point : point satisfying condition 3

청 O.D.는 2.31, 대조는 0.62이며 그비는 3.7이므로 대조혈청 O.D.가 너무 높게 나타났다. 1:320으로하면 IgA는 만족하고 IgM은 환자혈청 O.D./대조 O.D.가 0.38/0.08=4.8로 환자혈청의 O.D.가 1:160보다 낮아도 대조혈청의 O.D.가 아주 낮으므로 사용할 수 있다고 사료되며 IgG에서는 2.16/0.50=4.3이므로 1:160보다 대조 O.D.는 낮고 O.D.비는 높으므로 사용될 수 있다고 사료된다(Table 1. 참조).

그러므로 하나의 회석배수로 세가지 Immunoglobulin class 각각을 측정하는 데는 PLL-PVC-10⁸ (IgG antisera는 1:3000회석) 방법으로 혈청회석은 1:320으로 하는 것이 가장 좋은 방법이라고 사료된다.

그러나 poly-L-lysine을 사용하여 다량의 plate에 항원을 부착하는 데는 많은 노력이 필요하므로 이것이 단점일 수 있다. 다량의 plate에 균체항원을 적은 노력으로 간단하게 부착할 수 있는 방법은 methanol고정법인데, peroxidase conjugated antihuman sera를 모두 1:4000으로 회석해서 사용하면 이 방법중에서 가장 적합한 것은 MtOH-PS-10⁸이라고 추정된다. 이 방법은 poly-L-lysine을 사용하는 것에 비해 비특이성 반응이 심하고 IgM 측정에는 환자혈청과 대조혈청의 O.D. 차이가 적은 것이 결점이라고 할 수 있다.

고 찰

효소면역측정법은 소량의 검체에 존재하는 미량의 항체 또는 항원을 검출할 수 있는 장점이 있고 더구나 immunoglobulin class를 구별할 수 있기 때문에 감염성질환의 진단이 많이 이용되고 있다^{11, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 32}.

ELISA를 이용하는데 중요한 점은 측정하려는 항체에 합당한 항원성분이 결정되어야 하며 이것을 ELISA plate에 붙여야 한다. carbonate buffer를 사용하여 *S. typhi*의 LPS를 부착하는 방법^{1, 11, 14, 15, 29}은 보편화되어 있으나 LPS를 정제하는 데는 많은 노력과 시간이 필요하다. 이런 결점을 해결하려면 LPS와 ELISA에서 특이성과 민감도의 차이가 없는 *S. typhi*의 균체항원(killed whole cell antigen)을 solid phase에 부착하면 된다고 생각하였다. 그러나 균체항원을 부착하는 방법이 확립되어 있지 않아 적합한 방법을 확립하는 것이 필요하다.

본 실험에서는 *S. typhi*의 사균을 부착시키기 위해 균체항원의 균량과 ELISA plate의 종류 및 부착 방법을 다르게 하고 peroxidase conjugated antihuman IgG, IgM 및 IgA를 사용하여 가장 적합한 방

법을 찾으려 하였다.

이상적인 방법은 부착방법이 쉽고, 높은 부착률을 보이며, 항원으로서의 성질에 변화가 일어나지 않고, 비특이성 반응이 나타나지 않는 것이다.

적합한 방법을 선택하는데 있어 조건을 정하는 기준은 다양할 수 있다.

대중을 screening하거나 환자의 routine check를 위해서는 어떤 특정 혈청회석배수에서 정상과 비정상을 시사해 줄 수 있다면 매우 간단하므로 좋은 방법이라 사료되어 세계 조건을 정하였다. Voller, Alister³¹에 의하면 일정한 회석배수에서 환자혈청과 대조혈청의 O.D.비교는 역가와 직접적으로 연관이 있고 그 자체로 양성과 음성을 구분할 수 있다고 하였다.

본 실험에서 poly-L-lysine을 사용하는 것이 가장 적합한 방법으로 판단되었는데 poly-L-lysine은 배양된 동물세포를 ELISA plate에 붙이는 방법으로 최근 많이 사용되어 왔다.

Voller 등^{31, 32}에 의하면 일정한 회석배수에서 환자혈청과 대조혈청 사이에 유의한 O.D. 차이가 나타난다면 진단으로 사용할 수 있으므로, PLL-PVC-10⁸ 방법으로 혈청은 1:320으로 회석하는 것이 가장 적합하다는 본 실험의 결과가 장티푸스의 혈청학적 검사에 응용될 수 있기를 기대한다.

Mass screening이나 routine check에는 위의 방법보다 민감성은 떨어진다고 추정되나 간단한 MtOH-PS-10⁸을 사용할 수도 있을 것이다.

다양한 균체항원 부착방법에서 얻어진 각 immunoglobulin class의 특징을 관찰하면 IgG는 일반적으로 O.D.는 높으나 혈청의 낮은 회석배수에서 비특이성 반응이 심하고, IgM은 환자혈청의 O.D.가 낮으며, IgA에서는 환자혈청의 O.D.는 높고 대조군은 낮았다.

*S. typhi*의 LPS를 추출하는 번거로움 없이 killed whole cell을 그대로 solid phase에 붙이므로 장티푸스에 대한 ELISA가 간편한 방법으로 본 실험에서 확립되었고, 이것은 장티푸스의 조기 진단, 예후 및 치료에 쉽게 이용될 수 있을 것이다.

결 론

*Salmonella typhi*의 균체항원(killed whole cell antigen)을 ELISA plate에 부착시키는데 있어 적합한 방법을 찾기 위해 여러가지 방법을 시도하였다. binding substance로 carbonate buffer, methanol 혹은 poly-L-lysine을 사용하였고 solid phase로는 polystyrene 혹은 polyvinylchloride ELISA plate를 사용하였

으며 균체항원은 10^8 , 10^7 , 10^6 혹은 10^5 cell/ml을 사용하였다.

적합한 방법의 조건은 첫째 혈청희석 1:10에서 환자혈청흡광도가 1.0(IgM은 0.6)이상이고 대조혈청보다 0.3(IgM은 0.2)이상 높아야 하고, 둘째 희석이 증가함에 따라 흡광도가 같거나 낮아져야 하며, 셋째 환자혈청흡광도가 1.0(IgM은 0.5)이상인 희석배수에서 대조혈청흡광도가 0.2이하인 점이 있는 것으로 정하였다.

위의 방법과 조건에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 위의 조건에 맞는 방법을 열거하면 IgG 항체 검사에서는 poly-L-lysine을 binding substance로 polyvinylchloride plate에 균체항원 10^7 cell/ml을 부착시키는 방법(poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^7) 과 poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 이고 IgM 항체 검사에서는 methanol/polystyrene/ 10^8 , poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 과 poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 이며 IgA에서는 carbonate buffer/polystyrene/ 10^8 , carbonate buffer/polystyrene/ 10^8 , methanol/polystyrene/ 10^8 , methanol/polyvinylchloride/ 10^8 , methanol/polyvinylchloride/ 10^8 , poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 과 poly-L-lysine/polyvinylchloride/ 10^8 이었다.

2) IgG, IgM 및 IgA 항체를 동일방법으로 측정하는 때는 poly-L-lysine, polyvinylchloride plate와 10^8 cell/ml을 사용하는 것이 가장 좋은 방법이었다. 이 방법에 의해서 각각의 immunoglobulin class 측정용 하나의 적합한 혈청희석배수로 한다면 1:320의 희석배수가 가장 적절하였다.

참 고 문 헌

- 1) 계기식 · 김예흠 · 최강원 · 황응수 · 국윤호 · 이승훈 · 차창용 : 장티푸스의 혈청학적 진단에 효소결합면역측정법(ELISA)의 적용실험, 대한미생물학회지 18 : 73, 1983.
- 2) 김은상 · 최호섭 · 이성동 · 이상계 · 김만재 : 장「티푸스」 288례에 대한 관찰, 대한내과학회잡지 18 : 605, 1975.
- 3) 노병호 · 김노경 : 장티푸스환자 혈청내의 Immune Globulin에 관한 연구, 대한내과학회지 16 : 73, 1973.
- 4) 박상곤 · 한동섭 · 전도기 : 장티푸스환자혈청의 immunoglobulin에 관한 연구, 중양의학 25 : 17, 1973.
- 5) 박승함 · 박기영 : Salmonellosis에 대한 Laboratory Diagnosis, 한국의과학 3 : 499, 1971.

- 6) 윤길자 · 양애림 · 전종휘 : 내과병동에서 본 유행열질환의 현황—속칭불명열에 대한 검토, 감염 7 : 63, 1975.
- 7) 이일웅 · 이태숙 · 서보상 : 살모넬라 감염증으로 인한 장천공성 장막염의 임상 및 혈액상에 대한 관찰, 충남의대잡지 2 : 535, 1975.
- 8) 이현학 : 장티푸스 진단에서의 혈구응집반응, 중합의학 8 : 1017, 1963.
- 9) 이호용 · 박규언 · 고영식 · 이해선 · 변기수 : 장티푸스 561례에 대한 임상적 관찰, 대한내과학회잡지 21 : 547, 1978.
- 10) 정재혁 · 정구현 · 정희영 : 사의 「장 typhus」 환자에 관한 임상적 관찰, 대한내과학회잡지 17 : 418, 1974.
- 11) Beasley WJ, Joseph SW and Weiss E : Improved serodiagnosis of Salmonella enteric fevers by Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microb.* 13 : 106, 1981.
- 12) Briles DE, Clafin LJ, Schroer K, Forman C, Basta P, Lehmyer J and Benjamin WH, Jr.: The use of hybridoma antibodies to examine antibody-mediated antimicrobial activities, 285, in *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridoma*, edited by Turk JL, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1981.
- 13) Bruins SC, Ingwer I, Zeckel ML and White AC : Parameters affecting the Enzyme-linked Immunosorbent assays of immunoglobulin G antibody to a rough mutant of *Samonella minnesota*. *Inf. Immun.* 21 : 721, 1978.
- 14) Carlsson HE, Lindberg AA and Hammarstrom S : Titration of antibodies to Salmonella O antigens by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Inf. Immun.* 6 : 703, 1972.
- 15) Carlsson HE, Linderg AA, Hammarstrom S and Ljungren A : Quantitation of Salmonella O antibodies in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* 48 : 485, 1975.
- 16) Devillier AB, Deupfree RH, Dickinson C and Beeler MF : Comparative study of typhoid O antigens. *Am. J. Clin. Path.* 44 410, 1963.
- 17) Espersen F, Hertz JB, Hoiby N and Mogensen HH : Quantative immunoelectrophoretic analysis of *Salmonella typhi* antigens and of corresponding antibodies in human sera. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 88 : 237, 1980.

- 18) Espersen F, Hoiby N and Hertz JB : Cross-reactions between *Salmonella typhi* and 24 other bacterial species. *Acta Path. Microb. Scan. Sect. B* 88 : 243, 1980.
- 19) Freter R : Agglutinin titration(Widal) for the diagnosis of enteric fever and other enterobacterial infections, 460, in *Manual of Clinical Immunology*, second edition, edited by Rose NR & Friedman H, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.
- 20) Granfors K : 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.
- 21) Granfors K, ViLjanen MK and Toivanen A : 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.
- 22) Gripenberg M, Nissinen A, Vaisanen E and Linder E : Demonstration of antibodies against *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microb.* 10 : 279, 1979.
- 23) Kennett RH : Enzyme-linked antibody assay with cells attached to polyvinylchloride plates, 376, in *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A new dimension in biological analyses*, edited by Kennett RH, McKearn TJ and Bechtol K B, Plenum Press, New York and London, 1980.
- 24) Kenny K and Herzberg M : Early antibody response in mice to either infection or immunization with *Salmonella typhimurium*. *J. Bact.* 93 : 773, 1967.
- 25) Keren DF : Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies to *Shigella flexneri* antigens, *Inf. Immun.* 24 : 441, 1979.
- 26) Lamb VL, Jones LM, Schurig GG and Berman DT : Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Inf. Immun.* 26 : 240, 1979.
- 27) Levine MM, Grados O, Gilman RH, Woodward WE, Solis-plaza R and Waldman W : Diagnostic value of the Widal test in area endemic for typhoid fever. *Am. J. Trop. Med.* 27 : 795, 1978.
- 28) Reynolds DW, Carpenter RL and Simmon WH : Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever, *JAMA* 214 : 2192, 1970.
- 29) Rote NS, Taylor NL, Shigeoka AN, Scott JR and Hill HR : Enzyme-linked immunosorbent assay for Group B streptococcal antibodies, *Inf. Immun.* 27 : 118, 1980.
- 30) Schreoder SA : *Interpretation of serological tests for typhoid fever*, *JAMA*, 206 : 839, 1968.
- 31) Voller A : Heterogeneous enzyme immunoassay and their application, 181, in *Enzyme-immunoassay*, edited Maggio ET, CRC Press, 1980.
- 32) Voller A, Bidwell D and Bartellet A : Enzyme-linked immunosorbent assay, 359, in *Manual of Clinical Immunology*, second edition, edited by Rose NR and Friedman H, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.