

포도구균의 A단백질을 이용한 효소면역법으로 살모넬라 O항원 검출

국군서울지구병원 · 가톨릭대학 의학부 미생물학교실¹

유문간 · 김금룡¹ · 이종기

=Abstract=

An Improved Method for Detection of *Salmonella Typhi* O Antigen with Staphylococcal Protein A Using Enzyme Immunoassay

Mun-Gan Rhyu, Gum-Ryong Kim¹ and Choong-Ki Lee

ROK Armed Forces, Seoul District Armed Forces General Hospital and Department of Microbiology, Catholic Medical College¹, Seoul, Korea

Coagglutination method is widely used for the diagnosis of *Salmonella* infection. This test, however, has a disadvantage of false positive reaction due to the coagglutination of staphylococci with non-specific immune complexes or anti-staphylococci antibody in serum.

Salmonella O antigen was detected by enzyme immunoassay with protein A-bearing *Staphylococcus aureus* as in the solid phase. Horse radish peroxidase was labeled to IgG specific against *Salmonella* O antigen. This enzyme immunoassay was much more sensitive than conventional coagglutination method without false positive agglutination.

To improve the sensitivity for detection of *Salmonella* O antigen in samples, we tried to determine the optimal concentration of normal IgG that inhibits non-specific binding of horse radish peroxidase labeled IgG to staphylococci, and to establish the optimal condition of reaction between antigen-antibody complex and staphylococci.

Non-specific binding of horse radish peroxidase labeled specific IgG to staphylococci was almost blocked when the enzyme labeled IgG was 500-fold diluted with phosphate buffered saline containing 2mg/ml of normal IgG.

When staphylococci coated with antibody to *Salmonella* O antigen were mixed with antigen-antibody complex and then incubated for 1 hour at room temperature, the minimal detectable concentration of *Salmonella* O antigen was 1ng/ml. The sensitivity of enzyme immunoassay was 100-fold greater than a conventional coagglutination method.

This enzyme immunoassay could be expected as an improved method for detection of other infectious agents.

Key Words : Staphylococcal protein A, Enzyme immunoassay, *Salmonella* O antigen, Coagglutination.

서 론

장티푸스는 선진국에서 감소하는 추세에 있는

수인성 전염병이지만 개발도상국에서는 불명열의 주요원인이 되고있다¹⁾. 더구나 항생제의 남용으로 특징적인 임상증상을 나타내는 증례가 매우 드물어 정확한 진단과 치료에 어려움이 많

* 본 연구는 1987년도 가톨릭 중앙의료원 연구보조비로 이루어졌음.

으며¹⁶⁾, 타질환과의 감별진단을 하기위하여 균분리 및 균체 항원을 이용한 혈청학적 검사법이 많이 이용되고 있다¹⁷⁾.

따라서 균 또는 그 항원을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법으로 효소면역법, Latex응집법, counter immunoelectrophoresis, coagglutination법 등이 개발되었다^{2,4,19)}.

특히 coagglutination법은 황색포도구균의 세포벽에 공유결합상태로 존재하는 protein A를 이용하여 신속하고 경제적으로 살모넬라항원을 찾아낼수 있으므로 살모넬라 감염을 진단하는데 사용하고 있다^{5,16,18)}. 포도구균의 protein A는 IgG가 항원과 결합된 상태에서는 안정되고 신속하게 IgG의 Fc부위와 비면역학적으로 반응하기 때문에⁹⁾, 항원-항체반응이 포도구균의 응집반응으로 나타나므로 특이한 면역반응만을 육안적으로 관찰할 수 있다⁹⁾.

그러나 혈청내에 미리 존재하는 비특이적 항원-항체 복합체 및 포도구균 자체에 대한 항체 등으로 발생하는 위양성 결과를 검증하는 과정을 거쳐야하고 장내세균 사이의 교차반응이 문제가 되었다^{5,15)}.

이에 저자들은 포도구균의 protein A를 고정상으로 이용하는 효소면역법으로 Salmonellosis 진단에 많이 이용되고 있는 통상적인 coagglutination법에서 문제가 되는 위양성 반응을 가능한 감소시키고 *Salmonella* O항원의 검출능을 높이기 위하여 이에 필요한 효소면역법의 적절한 반응조건을 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 포도구균의 배양 및 처리

황색포도구균 Cowan 1(ATCC-12598) 균주를 Kessler⁹⁾ 및 Movitz¹¹⁾ 등의 방법으로 배양 및 처리 하였다. 즉 액체배지 1ℓ에서 16시간 교반배양된 포도구균을 3,000×g로 20분 원심침전하여 상청을 제거하고 0.1% sodium azide가 함유된 0.01M 인산완충 식염액(pH 7.5, phosphate buffered saline, 이하 PBS로 약기)으로 2회 세척한 후 동일한 PBS 100ml에 부유시켰다.

여기에 formalin을 최종농도가 1.5%되도록 한 방울씩 가하면서 1.5시간 교반한 다음 급속가열(80°C, 5분), 급속냉각하여 균을 사멸시키고 PBS로 세척한 후 10%(v/v)로 재부유시켰다. 이렇게 처리한 포도구균을 PBS로 10%부유액으

로 만들고 이 부유액 1ml에 항혈청 0.1ml을 혼합하여 4°C에 보관하였다가 사용전 실온에서 항체로 1시간 반응시켜 전처리 하였다.

2. 표준항원 및 정상토끼 IgG

*Salmonella typhi*의 O항원 및 정상토끼 IgG는 Sigma제품을 구입하여 사용하였다.

3. 살모넬라 O항원에 대한 항체생산 및 효소표지

Salmonella typhi O항원을 William과 Chase²⁰⁾의 방법에 따라 준비한 다음, 균수를 10⁹/ml로 조정된 부유액 0.5, 1.0, 2.0, 3.0ml을 토끼에 1주간격으로 4회에 걸쳐 정맥주사하고 최종 주사후 6일째 채혈하여 항혈청을 얻었다.

이때 응집반응을 실시하여 측정된 항체가 1:640이상인 혈청을 모아 포화 황산암모니아로 염색시켜 면역글로블린을 분리하여 IgG항체로 사용하였다. IgM항체는 전기한 *Salmonella typhi*의 표준항원 100μg을 1회 정맥주사후 채혈하여 Plaut와 Tomasi¹⁴⁾의 방법으로 분리하였다.

IgG 및 IgM항체는 Nakane와 Kawaoi¹²⁾의 periodate법으로 horse radish peroxidase(이하 HRP로 약기)를 표지시켜 500배로 희석하여 사용하였다. 이때 사용된 희석용 PBS에는 1%우혈청 알부민을 첨가하였다.

4. 효소면역법 조건

포도구균을 고정상으로하여 시행한 효소면역법의 조건은 다음과 같다. 희석용 PBS (0.01M, pH 7.5)로 1%우혈청 알부민과 0.05% NaN₃을 첨가하였고, 세척용 PBS (0.01M, pH 7.5)로는 0.05% Tween-20을 첨가하였고, 효소 표지항체로는 500배로 희석한 HRP-IgG와 HRP-IgM을 사용하였다. pH 5.0, 0.15M phosphate-citrate buffer에 0.04% orthophenylene diamine(이하 OPD로 약기)과 0.04% H₂O₂를 첨가하여 기질로 사용하였다.

효소표지항체와 포도구균의 비특이적 결합을 억제하기 위해 희석용 PBS에는 정상토끼 IgG를 10mg~0.01mg/ml이 되도록 첨가하였다. 즉 항혈청으로 전처리한 0.1%(v/v)포도구균 부유액 10μl와, 정상토끼 IgG가 추가된 희석용 PBS로 500배 희석된 HRP-IgG 100μl를 혼합하여 실온에서 1시간 반응시키고 세척용 PBS로 3회 세척하였다. 여기에 200μl의 OPD를 가하고 20분후 2.5

M 황산용액 50 μ l를 첨가한 다음 파장 488nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Coagglutination법 및 효소면역법에 의한 O항원 검출

Coagglutination법은 항혈청으로 전처치한 포도구균과 O항원의 농도가 10^{-1} ~ 10^{-7} mg/ml인 표준용액을 사용하여 Christensen들³⁾의 방법에 따라 시행하였고 응집반응이 2분 이내에 나타나면 양성으로 판정하였다.

황색포도구균을 이용한 효소면역법은 batch wise법으로 시행하였다. O항원의 농도가 10^{-1} ~ 10^{-7} mg/ml인 표준용액 100 μ l와 O항원에 대한 항체인 HRP-Ig G 또는 HRP-Ig M 100 μ l를 혼합하여 실온에서 2시간 반응시켰다.

이 항원-항체 반응액과 항혈청으로 전처치한 0.1% 포도구균 100 μ l의 원심침전물을 혼합하여 실온에서 2분 또는 1시간 반응시킨 후 세척용 PBS로 3회 세척한다음 원심침전 시켰다.

여기에 OPD 200 μ l를 가하고 30분 반응시킨 후 2.5M 황산용액 50 μ l로 효소에 의한 발색반응을 정지시킨 다음 원심침전시켜 상청 200 μ l를 회수하여 파장 488nm에서 흡광도를 측정하였다.

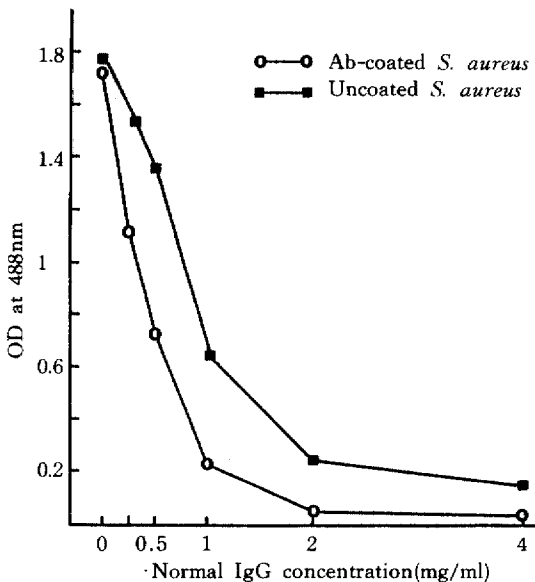


Fig. 1. Inhibition curves of enzyme labeled IgG from binding to protein A on *S. aureus*. 100 microliters of Ab-coated or uncoated *S. aureus*, 0.1% (v/v), was mixed with 100 microliters of enzyme labeled IgG which was 500-fold diluted with PBS containing normal IgG at various concentration.

이때 흡광도가 0.2이상인 경우를 양성반응으로 판정하였다.

성 적

1. 과량의 정상 IgG에 의한 효소표지항체의 비특이적 반응억제

포도구균은 살모넬라 O항원에 대한 항혈청으로 전처치하고 효소표지항체는 10mg~0.1mg/ml의 정상 IgG를 첨가한 PBS로 500배 희석하여 포도구균과 효소표지항체와의 비특이적 반응양상을 측정된 결과 Fig. 1과 같다. 즉 포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응은 정상 IgG 농도가 증가함에 따라 감소하여 2mg/ml에서는 완전히 차단되었다. 또한 포도구균을 항혈청으로 전처치하지 않은 경우는 4mg/ml의 IgG농도에서 비특이적 반응의 차단이 완전하지 않았다.

따라서 고정상으로써 이용하는 포도구균은 항혈청으로 전처치하고 효소표지항체는 정상 IgG가 2mg/ml이 되도록 추가한 PBS로 희석하여

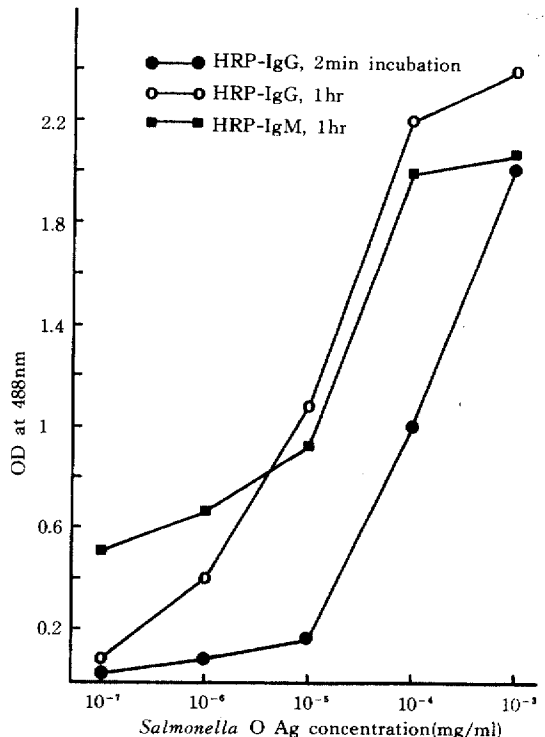


Fig. 2. Binding curves of Ag-Ab complex to protein A on *S. aureus* at various concentration of O Ag. HRP-IgG or HRP-IgM were 500-fold diluted with PBS containing 2mg/ml of normal IgG.

포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응을 차단시켰다.

2. 포도구균의 효소 면역법에 의한 O항원의 검출

Salmonella typhi O항원의 표준용액과 HRP-IgG 항체를 반응시키고 여기에 항혈청으로 전처치한 포도구균을 혼합하여 1시간 또는 2분동안 반응시킨 후 batch wise법으로 시행한 효소면역법으로 검출할 수 있는 항원량을 측정하였다 (Fig. 2).

항원-항체 복합체와 포도구균을 1시간 반응시키면 10^{-6} mg/ml의 O항원 농도로부터 양성반응을 보였으나 2분 반응시키면 10^{-4} mg/ml의 항원 농도에서 음성반응을 보였다. 또한 IgM은 protein A와 반응하지 않기 때문에 효소표지항체로서 HRP-IgM을 사용하였으나 10^{-7} mg/ml의 O항원농도에서도 흡광도가 0.5 이상을 보여 비특이적 반응이 높은 것으로 나타났다.

따라서 효소표지항체로서 HRP-IgG를 사용하면 포도구균과 항원-항체 복합체와의 반응을 1시간 이상 충분히 일으켜 미량의 O항원까지 검출할 수 있으며 HRP-IgM을 사용하면 비특이적 반응이 높기 때문에 의의가 없었다.

3. 포도구균을 사용하여 O항원을 검출하는 효소면역법 및 coagglutination법의 비교

Salmonella typhi O항원을 항체와 반응시킨 후 항혈청으로 전처치한 포도구균과 혼합하고 batch wise법으로 항원과 반응안된 HRP-IgG를 제거하여 효소면역법을 시행하였으며 결과는 파장 488nm에서 측정된 흡광도가 1.0 이상은 + + +, 1.0~0.5는 + +, 0.5~0.2는 +, 0.2이하는 음성으로 하였다.

또한 coagglutination법의 결과는 항혈청으로 전처치한 포도구균과 O항원의 응집반응이 나타나는 시간이 30초 이내는 + + +, 30초~1분 + +, 1분~2분은 +, 2분이상은 음성으로 각각 하였다 (Table 1). 즉 포도구균을 사용하는 효소면

역법 및 coagglutination법으로 양성반응을 보이는 항원농도를 비교한 결과 효소면역법으로는 O항원농도가 10^{-6} mg/ml에서부터 양성반응을 보였고 coagglutination법으로는 10^{-4} mg/ml에서부터 양성반응을 보였다.

따라서 과량의 정상 IgG로 포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응을 차단하면서 포도구균과 항원-항체 복합체와 1시간이상 충분히 반응시키면 2분이내에 일어나는 coagglutination법으로 검출할 수 없는 미량의 항원까지 검출할 수 있었다.

고 찰

황색포도구균을 항혈청과 혼합반응시키면 세포벽에 공유결합된 protein A에 IgG의 Fc부위가 결합하기 때문에 포도구균을 간편한 면역흡착제로 이용할 수 있다. 따라서 항혈청으로 전처치한 포도구균을 항원과 반응시키면 항원-항체반응이 포도구균의 응집반응으로 나타난다³⁾.

소위 이런 coagglutination법은 콜레라균, 연쇄구균, 뇌막염균등의 세균항원 및 간염바이러스, 헤르페스바이러스등의 바이러스항원을 검출하는데도 응용되고 있다^{3,8,10,13,15)}.

현재 살모넬라 감염증은 항생제남용으로 인해 실험실 진단의 신뢰성이 낮아짐에 따라 항원을 신속하게 검출하기 위해 coagglutination법이 이용되고 있으나^{4,7,17)}, coagglutination법은 가검물에 존재하는 비특이적 항원-항체 복합체 및 포도구균 자체에 대한 항체등으로 인한 위양성반응과 장내세균들 사이의 공유항원에 의한 교차반응을 검증하여 감별해야 한다. 즉 장내세균의 공유항원에 의한 교차반응은 공통항원으로 흡수시키고⁵⁾ 가검물내의 자연항체에 의한 위양성 반응은 포도구균으로 흡수시키는 과정을 거쳐야한다¹⁵⁾.

따라서 본 실험에서는 포도구균을 고정상으로 써 이용하는 효소면역법으로 종래의 위양성 반응문제를 해결하고 보다 미량의 항원을 검출할

Table 1. Comparison of results obtained by staphylococcal protein A using enzyme immunoassay and coagglutination at various concentrations of *Salmonella* O Ag

Tests	Concentrations of <i>Salmonella</i> O Ag(mg/ml)				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Enzyme immunoassay	+++	+++	++	+	-
Coagglutination	++	+	-	-	-

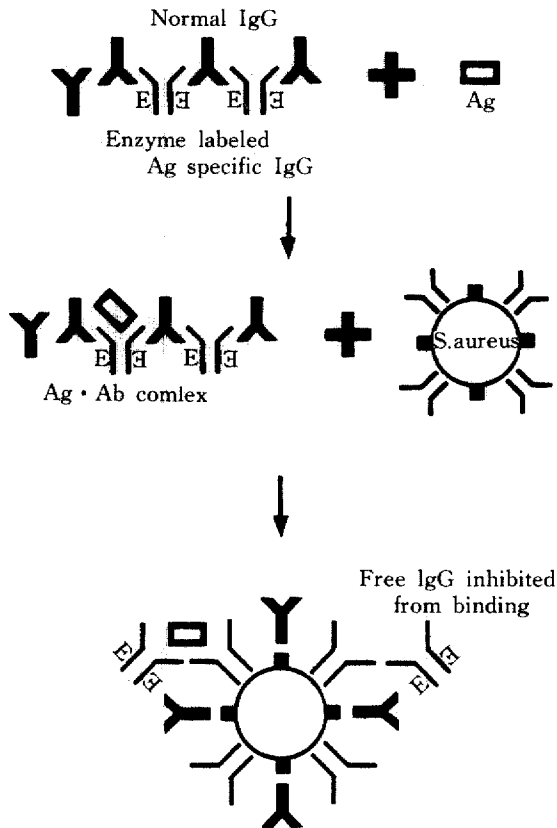


Fig. 3. Diagram shows the principle of *S. aureus* enzyme immunoassay. Enzyme labeled IgG molecules that formed Ag-Ab complex strongly bind to protein A but enzyme labeled free IgG molecules do not bind due to excessive normal IgG.

수 있는 살모넬라 O항원 진단법을 모색하고자 하였다.

효소면역법의 고정상으로써 포도구균을 이용할 때 효소표지항체와 포도구균의 비특이적 반응이 나타난다. 그림 1과 같이 특이적인 항원이 없어도 protein A와 IgG가 비면역학적으로 결합하여 포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응이 일어난다. 그러나 효소표지항체를 희석할 때 사용하는 PBS에 정상 IgG농도를 증가시키기에 따라 비특이적 반응은 감소하였다. 특히 포도구균을 항혈청으로 전처치하면 더욱 효과적이어서 PBS내의 정상 IgG농도가 2mg/ml일때 비특이적 반응이 완전 차단되었다.

즉 과량의 정상 IgG하에서 항원과 반응안된 효소표지 IgG는 정상 IgG와 경쟁하게 되므로 포도구균과의 비특이적 결합이 차단되는것 같다

(Fig. 3).

그러나 항원과 반응한 효소표지 IgG가 포도구균과 결합할 때 미리 protein A와 결합되어 있던 IgG를 해리시키면서 protein A와 결합하는지 또는 항원을 중간으로하여 protein A와 결합되어 있던 IgG와 결합하는지 규명해야 할 것이다.

Goding⁶⁾은 protein A와 IgG의 결합은 수초내에 일어나는 신속한 반응이라 했으며 coagglutination법에서도 2분 이내 일어나는 응집반응만을 양성으로 판정한다⁹⁾. 그러나 본 실험에서는 과량의 정상 IgG로 포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응을 차단할 수 있었으므로 포도구균과 항체를 1시간 반응시켰다.

포도구균과 항원-항체 복합체를 2분간 반응시키면 10⁴mg/ml의 항원농도에서 양성반응을 나타냈으며(Fig. 2) coagglutination법에서도 10⁴mg/ml의 항원농도에서 양성판정을 보인다면 포도구균과 항원-항체 복합체를 1시간 반응시키면 100배의 미량의 항원농도에서도 양성반응을 보였다(Table 1).

즉 항원이 미량일때는 2분간의 반응으로는 미흡한 것으로 나타났다.

이상의 실험성적을 종합하면, 효소표지항체를 희석시킬 때 사용하는 PBS에 정상IgG를 추가하고 포도구균을 항혈청으로 전처치하면 포도구균과 효소표지항체의 비특이적 반응이 과량의 정상 IgG에 의해 차단되었으며 포도구균과 항원-항체 복합체를 1시간 반응시키면 미량의 항원도 검출할 수 있었다.

결 론

살모넬라 O항원을 검색하는데에 포도구균의 protein A를 이용한 coagglutination법이 많이 이용되고 있으나 혈청내에 미리 존재하는 비특이적 면역 복합체 및 포도구균 항원에 대한 항체등으로 위양성 반응율이 비교적 높아 살모넬라 진단에 어려움이 많다.

따라서 포도구균을 고정상으로써 이용하는 효소면역법으로 종래의 위양성반응을 가능한 감소시키면서 진단의 민감성을 높이고자 *Salmonella typhi* O항원에 특이한 horse radish peroxidase로 표지된 IgG항체와 포도구균 protein A의 비특이적 반응을 차단하는 정상 IgG농도 및 포도구균과 항원-항체 복합체와의 적절한 반응조

진을 측정한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. *Salmonella typhi* O항원에 특이적인 IgG 항체에 horse radish peroxidase를 표지하고 이를 정상 IgG농도가 2mg/ml이상되게 조정된 인산완충액으로 500배 희석하여 protein A와 반응시켰을때 표지항체와 protein A와의 반응이 차단되었다.

2. 포도구균을 항혈청으로 전처치하면 효소표지항체와 포도구균과의 비특이적 반응이 더욱 효과적으로 차단되었다.

3. 포도구균과 항원-항체 복합체를 1시간 반응시키면 2분 반응시킨 경우보다 미량의 항원 즉 10^{-6} mg/ml까지 검출되었다.

4. 이상의 조건에서 시행한 효소면역법으로 종래의 coagglutination법보다 100배 미량의 O항원을 검출할 수 있었다.

그러므로 포도구균을 이용하는 효소면역법은 위양성반응을 감소시키고 미량의 항원까지 검출하는 세균 및 바이러스 항원 검사법으로의 응용이 기대된다.

REFERENCES

- 1) Anderson KE, Joseph SW, Nasution R, Butler T, Van Peenen PFD, Irving GS, Saroso JS and Watten RH : Febrile illness resulting in hospital admission : a bacteriological study in Jakarta, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25 : 116, 1976.
- 2) Carlsson HE, Lindberg AA and Hammarström S : Titration of antibodies *Salmonella* O-antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 6 : 703, 1972.
- 3) Christensen P, Kahlmeter G, Jonsson S and Kronvall G : New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein-A containing staphylococci. *Infect. Immun.* 7 : 881, 1973.
- 4) Edwards EA and Hilderbrand RL : Method for identifying *Salmonella* and *Shigella* directly for the primary isolation plate by coagglutination of protein A-containing staphylococci sensitized with specific antibody. *J. Clin. Microbiol.* 3 : 339, 1976.
- 5) Ekwall E, Norberg T, Svenson SB and Lindberg AA : Specific identification of *Salmonella* serogroup E antigen O3 by immunofluorescence and coagglutination with antiserum elicited by a synthetic trisaccharide-bovine serum albumin glycoconjugate. *J. Clin. Microbiol.* 19 : 699, 1984.
- 6) Goding JW : Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods.* 20 : 241, 1978.
- 7) Ingall D and Sherman JD : Chloramphenicol. *Pediatr. Clin. North. Am.* 15 : 57, 1968.
- 8) Jesudason MV, Thangavelu CP and Lalitha MK : Rapid screening of fecal samples for *Vibrio cholerae* by a coagglutination technique. *J. Clin. Microbiol.* 19 : 712, 1984.
- 9) Kessler SW : Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent : Parameters of the interaction of antigen-antibody complexes with protein A. *J. Immunol.* 115 : 1617, 1975.
- 10) Mogensen SC and Dishon T : Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical specimens by the use *Staphylococcus aureus* rich in protein A. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 91 : 83, 1983.
- 11) Movitz J : Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* 68 : 291, 1976.
- 12) Nakane PK and Kawaoi A : Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22 : 1084, 1984.
- 13) Olcén P, Danielsson D and Kjellander J : The use of protein A-containing staphylococci sensitized with anti-meningococcal antibodies for grouping *Neisseria meningitidis* and demonstration of meningococcal antigen in cerebrospinal fluid. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 83 : 387,

- 1975.
- 14) Plaut AG and Tomasi TB : Immunoglobulin M : Pentameric Fc μ fragments released by trypsin at higher temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **65** : 318, 1970.
 - 15) Rajagopalan MS and John TJ : Passive bacterial agglutination—A new sensitive technique for the detection of hepatitis B surface antigen. *Indian J. Med. Res.* **78** : 509, 1983.
 - 16) Rockhill RC, Rumans LW, Lesmana M and Dennis DT : Detection of *Salmonella typhi* D, Vi and d antigens, by slide coagglutination, in urine from patients with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* **11** : 213, 1980.
 - 17) Rubin RH and Weinstein L : *Salmonellosis : microbiologic, pathologic and clinical features.* *Stratton Intercontinental Medical Book Corp., New York.* p. 43-94, 1977.
 - 18) Sanborn WR, Lesmana M and Edwards EA : Enrichment culture coagglutination test for rapid, low-cost diagnosis of salmonellosis. *J. Clin. Microbiol.* **12** : 151, 1980.
 - 19) Thirumoorthi MC and Dajani AS : Comparison of staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* **9** : 28, 1979.
 - 20) Williams CA and Chase MW : *Methods in Immunology and Immunochemistry.* *Academic Press, New York, Chapters* Vol. 1. B. 2 and 1. B. 5. 1967.