

Chlamydia trachomatis 진단에 유용한 단세포균 항체 생산에 관한 연구*

한양대학교 의과대학 임상병리학교실
서울대학교 의과대학 미생물학교실¹
고신대학교 의과대학 미생물학교실²

최태열 · 김신규 · 김춘원 · 김기홍(作故) · 황응수¹ · 차창룡¹ · 김광혁²

=Abstract =

Production of Monoclonal Antibody to *Chlamydia Trachomatis*

Tae-Yeal Choi, Think You Kim, Choon Won Kim, Ki-Hong Kim, Eung-Soo Hwang,¹
Chang-Yong Cha¹ and Kwang-Hyuk Kim²

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Hanyang University
Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University¹
Department of Microbiology, College of Medicine, Kosin University²

Chlamydia trachomatis has now shown that this interesting intracellular parasite is a cause of non-gonococcal urethritis, infantile pneumonia, pelvic inflammatory disease and epididymitis, in addition to lymphogranuloma venerum and inclusion conjunctivitis.

There are several diagnostic methods for *C. trachomatis*, but the method using monoclonal antibody is the most sensitive and specific. The hybride cell were prepared by fusion of myeloma cell(P₃X₆₃ Ag₈ · V₈₅₃) of mouse and lymphocyte of mouse(BALB/c) that were immunized with formalin killed *C. trachomatis* serotype D.

The cell mixtures after fusion were dispensed into 640 wells of the 96 well culture plates and continuously cultured in HAT medium for 2 weeks. The supernatants of culture media in 83(13%) wells were reacted with *C. trachomatis*, which were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in 96 well microplate. The clones that secreted antibody to *C. trachomatis* were cloned by limiting dilution. Only six monoclonal secreted antibody to *C. trachomatis*. The antibody titer of ascitic fluid that collected from same BALB/c mice bearing hybridoma cells was above 1:100,000.

These monoclonal antibodies that were IgG reacted with elementary and reticulate bodies of all serotypes(Ba, D, E, F, G, H, J and LGV type-I) using ELISA and indirect immunofluorescence stain, but there were no cross reaction with other bacteria(coagulase negative *Staphylococcus*, *Proteus* and *E. coli*).

We concluded these six monoclonal secreted the same monoclonal antibody to *C. trachomatis*.

The sensitivity and specificity of the monoclonal antibody compared with Microtrak(confirmatory test of *C. trachomatis*, Syva) was 100%, respectively.

Key Words: Monoclonal antibody, *Chlamydia trachomatis*.

서 론

* 본 연구의 실험경비는 1986년도 삼미문화재단 연구비에 의하여 이루어졌음.

Chlamydia trachomatis (이하 *C. trachomatis* 라 함)는 살아 있는 세포에서만 기생할 수 있는 성격을 띄고 있으며, DNA와 RNA를 공유하고 세포막을 갖고 있는 작은(0.3 μ ~1 μ) 세균이다. *C. trachomatis*는 감염력이 있는 기본체(elementary body

0.3 μ)가 세포내에 감염되어 일정시간 후에는(12~48hrs), 중간체(intermediate body 0.5~1.0 μ) 및 망상체(reticulate body 1.0 μ)로 변하며, 세포질내에서 glycogen을 함유한 봉입체(inclusion body)를 형성한다³⁴. *C. trachomatis*의 혈청형 A, B, Ba 및 C는 눈에 트라코마를 일으키고, 혈청형 D, E, F, G, H, I, J 및 K는 눈에 봉입체성 결막염^{3, 28}, 비임균성 뇨도염⁴ 및 자궁경관염¹⁹ 등을 일으킨다. 그밖에 LGV I, II 및 III은 lymphogranuloma venenum(LGV)의 주원인이 된다. 특히 비임균성 뇨도염에서는 40~50%까지가 *C. trachomatis*에 의한 것으로 보고되고 있으나^{6, 10, 36}, 원인균 발견이 다른 일반세균 동정보다 어렵고 시간이 많이 소요되기 때문에 일부 몇몇 기관을 제외하고는 정확한 검사를 시행치 못하고 있는 실정이다. 검사방법으로는 직접검경법, 세균분리법 및 혈청학적방법 등 여러 방법이 있다^{1, 9}. 직접검경법으로는 iodine, Giemsa²⁵ 및 Immunofluorescence(IF)²⁹ 염색방법등이 있으며, 세균검출 방법으로는 배양세포(McCoy cell, Hella cell)나⁴ 난황막 및 마우스에 접종방법이 있다. 그외에 혈청학적인 방법으로는 Micro-immunofluorescence(Micro-IF)^{31, 33} 및 보체결합법등이 있다. 현재 상용화되어 널리 사용되고 있는 방법으로는 단세포균 항체를 이용한 면역형광현미경법이 있어 예민성 및 특이성면에서도 다른 검사방법보다 높으며, 간편하게 사용될 수 있으나, 시약이 고가라는 문제점이 있다²⁴. 그 다음 효소면역 분석법이 있으나 일시에 많은 검체를 처리하여야 하는 단점이 있다. 이외에 균자체를 세포에 감염시켜 배양한 후 염색하여 보

는 세포배양법이 있으나, 많은 장비와 숙련된 기술을 필요로 하는 불편이 있다^{15, 17, 27}. 뿐만 아니라 우리 실정에서는 모든 고가의 시약을 전부 외국에서 수입해야 하는 어려운 문제점을 갖고 있다. 본 연구진은 이러한 문제점을 해결하기 위하여 *C. trachomatis*를 가장 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 단세포균 항체생산에 착수하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바입니다.

재료 및 방법

1. *Chlamydia trachomatis* 표준균주

실험에 사용한 *C. trachomatis* 표준균주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입한 것으로 혈청형의 종류는 A/HAR-13, B/HAR-36, Ba/Apache-2, D/UW-3/Cx, E/Bour, F/IC-cal-3, G/UW-57/Cx, H/UW-43/Cx, I/UW-12/UR, J/UW-36/Cx, K/UW-31/Cx, LGV Type I/440, 및 LGV Type III/404였다(Table 1 참조).

2. 환원 제조

12mm 직경의 원형 cover glass에 McCoy 세포를 단층으로 배양하여 *C. trachomatis* (표준균주)를 감염시킨후 400배 시야에서 봉입체 수가 40~60개가 되게 계속 증폭세대 배양하였다. 20개 vial에 들어 있는 봉입체를 전부 모아 75cm² tissue culture flask(Corning[®] 25115)의 단층세포에 재감염시켜 전체세포의 80% 이상이 감염되게 하였다. Flask에 유리구슬을 넣어 세포를 파괴시킨후 sonificator(ul-

Table 1. The list of serotypes of *Chlamydia trachomatis*

Stains of <i>C. trachomatis</i>	Name of strains	Sources	Remark
A	HAR-13	Conjunctiva	Missed
B	HAR-36	Conjunctiva	
Ba	Apache-2	Eye	
C	-	-	Missed
D	D/UW-3/Cx	Cervix	
E	E/Bour	Trachoma	
F	F/IC-Cal-3	Eye	
G	G/UW-57/Cx	Cervix	
H	H/UW-43/Cx	Cervix	
I	I/UW-12/UR	Urethra	Missed
J	J/UW-36/Cx	Cervix	
K	K/UW-31/Cx	Cervix	Missed
LGV-type I	LGV type I/440	Lymph node	
LGV-type II	LGV type II/	Lymph node	Missed
LGV-type III	LGV type III/404	Lymph node	Missed

trasonic 태화초음파)에서 20 초간 처리하여 기본체 및 망상체(elementary body, rericulate body)를 봉입체로부터 유리시켰다. 세포 찌거기는 $500 \times g$ 로 20분 원심침전시킨 후 상청액을 $30,000 \times g$, $4^\circ C$ (Sigma 20,000, USA)에서 1시간 동안 *C. trachomatis*의 기본체와 망상체를 원침시켰다. 원침된 잔사를 PBS (0.02% formalin pH7.2)에 현탁시켜 면역용 항원 및 혈청형 검사용 항원으로 사용하였다^{11, 13, 14, 23, 31}.

3. 전자현미경

면역 및 ELISA에 사용된 항원의 동질성을 검사하기 위하여 분리된 항원을 $30,000G$, $4^\circ C$ 에서 한번 더 고속원심분리하여 침사를 1.5% glutaraldehyde와 1% O_3O_4 에 고정하였다, 고정된 검체를 Epon 812에 포매 하였으며, 절편은 urahyl acetate와 lead citrate)로 염색하여 전자현미경(Hitach H-600)으로 관찰을 하였다¹³.

4. 면역 조작

추출한 D항원을 10마리의 Balb/c mice(10주 female)의 복강내에 5×10^8 개 봉입체를 1주 간격으로 3회 주사하였으며, 마지막으로 꼬리정맥에 동일항원 10^8 개 봉입체를 주사후 3일만에 실험에 사용하였다. 도살 24시간 전에 BALB/c mice의 안구를 heparinized 된 모세관으로 찢러 혈액을 채취하여 혈청을 분리 phosphate buffer salin으로 희석하여 효소결합 면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay ELISA)로 혈청형 D 및 다른 혈청형의 항원에 대한 항체가를 측정하였다.

5. 면역된 림프구의 준비

도살직후 BALB/c의 비장을 무균적으로 적출하여 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Flow 10-331-20)에 넣고 뾰족한 핀셋으로 잘게 찢어 림프구를 유출시켰다. 부유액을 실온에서 15분간 정지시켜 찌거기를 가라앉힌 후 Tris-NH₄Cl 용액(Tris 20.6gm/l, NH₄Cl 8.3gm/l) 5ml에 부유시켜 적혈구를 파괴하였다. 침사된 세포성분을 DMEM에 3회 세척하여 생존율과 세포수를 계산한 후 융합에 사용하였다.

6. 골수종세포

융합에 사용된 골수종 세포주는 $P_1X_{63}Ag_8 \cdot V_{653}$ 으로 자체면역 그로브린을 생성못하며, HGPRT(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase)가 결여된 세포주로 8-azaguanine($20 \mu g/ml$)에 내성을 나타낸다. 융합전에 신선하게 배양하여 DMEM

으로 3회 세척하여 융합 사용하였다.

7. 세포융합

3×10^7 개의 $P_1X_{63}Ag_8 \cdot V_{653}$ 과 1.5×10^6 cells 비장 림프구를 섞어 DMEM으로 3회 세척한 후 융합에 사용하였다. 세포융합조작은 Köhler 등³²의 방법을 수정한 차등³¹의 방법을 이용하였다. 비장의 림프구와 $P_1X_{63}Ag_8 \cdot V_{653}$ 세포를 물기를 없앤후에 50%(W/V) polyethylene glycol(PEG 10000, Sigma P-3515) 용액을 4초에 한방울씩 1ml를 $37^\circ C$ 항온수조에서 떨구어 융합을 실시하였다. 계속하여 1ml의 DMEM을 3초에 한방울씩 첨가하여 PEG 용액을 희석하였으며, 곧바로 15ml의 DMEM을 1초에 한방울씩 떨구어 세포를 완전 희석 부유시켰다. 융합이 끝난 직후 실온에서 부유액을 $400 \times g$ 로 5분간 원심 분리하여 상청액을 제거한 후 DMEM(DMEM 100ml에 20% PBS, NCTC 1ml, VCN 0.4ml, GM 0.12ml) 30ml에 부유시켰다. 50μ 씩 96well microplate(Limbro 76-003-05) 6장에 분주하여 $37^\circ C$ CO₂ incubator(5~10% CO₂, 100% H₂O)에서 세포 배양을 실시하였다. 동시에 융합에 사용하였던 골수종세포와 BALB/c mice의 비장 림프구를 Control로 동일한 조건에서 배양하였다.

8. 융합세포의 선택

융합에 성공한 세포만 선택적으로 성장할 수 있게끔 HAT medium(hypoxanthine 1.37mg/dl, aminopterin 0.0176mg/dl, thymidine 0.76mg/dl, 20% FBS, NCTC-135 1.37mg/dl, VCN포함)을 50μ 씩 융합후 제 1, 3, 7일에 각 well에 첨가하였으며, 배양 9일째는 50μ 씩의 상청액을 제거하고 새로운 HAT medium을 첨가하였다. 배양 11일째는 융합된 세포들이 균을 이루어 1mm 직경 이상된 well만 골라 배양상청액으로 항체 존재여부를 ELISA를 실시하여 검색하였다. 그중 항체가가 높은 세포군을 25well plate(Limbro; 76-033-05)로 옮겨 융합된 세포를 증식시켰다.

9. 단세포 배양(Cloning)

24well plate에서 증식된 림프잡종세포(hybridoma cell)중 항체생성이 높은 세포군 10개를 임의로 무한대희석법에 따라 희석하여 96well microplate 각 well에 세포가 0.5, 1, 1.5, 2개씩 분주되게끔 계산하여 HT(hypoxanthin, thymidine)배지 100μ 와 함께 각각 분주하였다. 10개의 세포군을 각기 4종류의 방법으로 cloning하여 40개의 96well plate에 분주하여 흔들리지 않게 5% CO₂ 배양기에서 일

주일가량 배양후 각 well에 정확히 1개의 clone 이 자란곳에만 HT medium 을 100 μ l 씩 조심스럽게 첨가하였다. 단 세포군이 형성된 well의 세포는 24 well에 옮겨 계속 증폭시켰으며, 상청액으로 *C. trachomatis*의 각 혈청형에 대하여 ELISA를 실시하였다.

10. 효소결합 면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

단세포군 세포에서 분비하는 항체의 역가와 종류를 알기 위하여 ELISA를 실시하였다. 96well plate (Flow, 76-003-05)에 50 μ l의 poly-L-Lysine (Sigma P-3513, 1mg/100ml PBS)을 넣어 실온에서 1시간이상 방치후 *C. trachomatis* 항원(Ba, D, E, F, G, H, J, LG-V type I)을 control well 2줄을 제외하고 각 well에 넣고 3,000rpm(Beckman, TJ-6 Centrifuge)에서 1시간 원심시켰다. 여기에 0.5% glutaraldehyde를 50 μ l 분주하여 고정하였으며, 세정후 100mM glycine이 첨가된 0.1% bovine serum albumin을 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에 냉장보관하여 1개월내에 사용하였다. ELISA 검사는 이미 표준항원들이 Coating된 plate에 배양 상청액, 혈청, 복수액 및 정제된 항체를 희석하여 50 μ l씩 분주하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨후 PBS-Tween 20으로 3회 세척과정을 거쳐 2차항체 peroxidase conjugated antimouse immune globuline (DAKO, P-260)을 1:1,000으로 희석 50 μ l씩 분주하였다. Plate를 다시 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 3번 세척하였다. 그후 기질용액(phosphate citrate buffer 10ml, O-phenylenediamine 4mg, 30% H₂O 20 μ l)을 50 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨후 2M H₂SO₄를 50 μ l씩 분주하여 반응을 정지시켰다. 곧바로 automatic ELISA reader(Titertek Multiskan[®] MC, Flow)에서 492nm의 filter를 사용 흡광도를 측정하였다.

11. 시험관을 이용한 ELISA 검사

Plate를 이용한 ELISA 검사와 동일하나 시험관을 carbonate buffer(Sodium carbonate 293mg, Sodium carbonate 159mg, 증류수 100ml) 사용 단일세포군 항체를 coating시켰으며, 1차 항체대신 표준항원 및 검체를 반응시켰다(그 후의 조작은 10번에 있는 microtitration plate에서 시행한 방법과 동일함).

12. 간접면역형광(Indirect immunofluorescence) 염색법

CDC Manual²³⁾을 변형한 방법으로 McCoy cell로 단층을 만들어 표준항원 및 검체를 접종 감염시켜 48시간 후에 acetone에 McCoy세포를 고정하였다. 고정후 단세포군항체(배양액 및 희석된 복수액)을 40 μ l씩 분주하여 전세포를 덮게한 후 37 $^{\circ}$ C 습윤상자에서 45분간 반응시켰다. PBS와 증류수로 각기 3번씩 세척한 후 Evan blue(0.005% Sigma, E₀₁₃₃)가 첨가된 FITC Conjugated rabbit antimouse immune globulin(DAKO F-261)을 1:20으로 희석하여 30 μ l씩 cover glass를 덮어 37 $^{\circ}$ C 습윤상자에서 다시 반응시킨후 PBS-TW로 세척한 후 glycerol에 mounting하여 Nikon 형광현미경(Blue primary filter, 460nm의 secondary filter)을 사용 100, 400 및 1,000배에서 관찰하였다.

13. 생체내 고농도 항체생성

동종의 BALB/c 마우스복강내에 pristan(2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, Cat# T-2 280-2, Aldrich chemical co.)을 0.5ml씩 주사하고 일주일후에 신선하게 배양된 단세포군 세포를 DMEM에 세척하여 세포수를 1 \times 10⁷/ml개로 조정하여 복강내에 0.2ml씩 주사하였다. 세포를 주사후 복수가 고여 배가 팽팽하여 질 때(약 2주) 복수액을 채취하여 냉동보존하였다.

14. 단세포군 항체의 IgG Subclass 결정

단세포군에서 분비하는 IgG immunoglobuline의 아형을 결정하기 위하여 ELISA 방법을 사용하였으며, 사용된 antimouse immunoglobuline은 anti-mouse IgG₁(Sigma M-8144), anti-mouse IgG_{2a}(Sigma M-8269), anti-mouse IgG_{2b}(Sigma M-8394) 및 anti-mouse IgG₃(Sigma M-8519)였다. 우선 borate buffer(pH 8.0)에 복수액과 배양액을 희석하여 96 well plate에 부착시킨 후 각 anti-mouse immunoglobuline을 희석하여 반응시켰으며, peroxidase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobuline (Sigma A-5278)로 2차 반응시킨 후 기질용액을 첨가 반응시켜 automatic ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

실험성적

1. 항원의 순수성

BALB/c 마우스에 사용한 면역용 "D"항원 및 ELISA 검사를 하기 위하여 사용된 각 혈청형 항원의 순수성을 판정하기 위하여 각 항원들을 전자현미경으로 관찰한 결과 전 항원들이 기본체

Fig. 1. Electron microscop of thin section of purified *C. trachomatis*, serotype D that is mixed with elementary and reticulate bodies. The preparation consists of electron-dense EE and larger particle with a more diffuse matrix are RB.

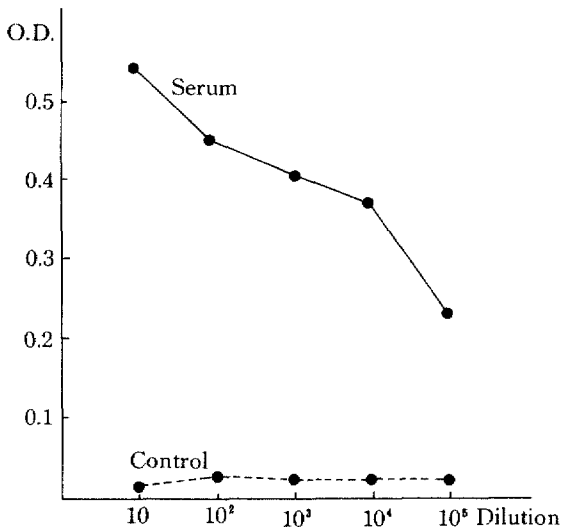


Fig. 2. Antibody titers of serum in the immunized balb/c mice(Titertek Multiskan MS, 492nm filter).

(elementary body 0.3μ), 중간체(intermediate body $0.5\sim 1\mu$) 및 망상체(reticulate body 1μ)로 혼합 구성되어 있었다(Fig. 1 참조).

2. 면역된 Balb/c 마우스 혈청의 항체가

*C. trachomatis*의 혈청형 "D"로 이미 coating된 96 well microplate를 사용하여 면역된 BALB/c의 혈청을 반응시켜 ELISA로 항체를 측정하였다. 5마리의 항체를 automatic ELISA reader로 측정하여 흡광도의 평균이 0.200이상인 것을 양성으로 판정하였다. 육안적으로 음성대조군은 흡광도가 0.016 ± 0.026 으로 아무 색조를 띄지 않았으나, 10만배 희석한 혈청에서는 항체의 흡광도가

Fig. 3. Cluster of hybridoma cells and degenerated cells in HAT medium(10 days after fusion).

0.288 ± 0.025 로 황적색의 뚜렷한 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 2 참조).

3. 융합빈도 및 항체생산율

적출된 비장의 림프구(및 형질세포) 1.5×10^6 개와 $P_3X_{83}Ag_8\cdot V_{853}$ 세포 3×10^7 개를 PEG를 사용하여 융합한 후 1×10^6 개의 세포가 96well microplate의 각 well에 들어가게끔 HAT 배지와 함께 50μ 씩 640 well에 분주하였으며, 대조군으로 융합에 사용하였던 림프구(및 형질세포)와 $P_3X_{83}Ag_8\cdot V_{853}$ 를 각기 96well에 동일한 방법으로 분주하였다. 1주 배양후에는 융합이 안된 림프구(및 형질세포)와 $P_3X_{83}Ag_8\cdot V_{853}$ 세포들은 거무튀튀하게 수축되어 괴사되었으며, 반면 융합된 림프잡종세포(hybridoma cell)는 융합전의 세포들보다 크고 광택이 나며, 계속 증식되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3 참조). 배양 12일째에 림프잡종 세포군의 직경이 1mm 이상되는 244well(38%)의 *C. trachomatis*에 대한 항체 생성유무를 검색하기 위하여 ELISA 검사를 실시하였다. 혈청형 "D"로 coating된 96well plate로 검사하여 흡광도가 0.200이상인 well은 83well(13%)이었다. 이 중 흡광도가 1.0이상인 것이 2well, 0.5~1.0이 17well, 나머지는 0.3~0.5의 흡광도를 나타내었다(Table 2 참조). *C. trachomatis*에 대한 항체를 분비하는 83well에서 임의로 20well을 선택 *C. trachomatis*의 각 혈청형(Ba, D, E, F, G, H, J, 및 LGV-type I)과 일반세균(Coagulase 음성 포도상구균, 대장균 및 변형균)과의 반응을 96well plate를 이용하여 ELISA를 실시하였다. 각 배양상청액은 일반세균과는 전혀 반응치 않았으며, Ba항원에서는 3, E에서는 4, G에서는 5, J에서는 1, LGV type I에서는 2개의 배양액이 약하게 양성으로 나타났으나, 대다수의 배양상청액은 강하게 양성반응을 나타내어 각 상청액간에 특정한 반응양

상은 관찰할 수 없었다(Table 3 참조).

4. 단세포배양 및 단세포균항체 분비양상

Table 2. Frequency of hybrids secreting antibodies to *C. trachomatis* in HAT medium after cell hybridization

Total wells to dispensed after fusion	640
Wells with growing hybride in HAT medium	244(38%)
*Wells with hybrid secreting antibodies in the medium	83(13%)

*Determined by ELISA(O.D. of positive is above than 0.200, at 429nm).

*C. trachomatis*에 반응하는 항체를 분비하는 83 well에서 각 혈청형에 대한 특정한 유형을 발견할 수 없어 고역가순으로 10well을 선정 무한대희석법으로 각 well에 세포가 0.5, 1, 1.5, 2개씩 각기 분주되게끔 4 가지 방법으로 96well microplate 40장에 HT 배지를 사용하여 100 μ l씩 분주하였다. 일주일후에 완전한 단세포균을 형성한 well은 6개였으며, 전부 한 well에 세포가 1개씩 들어가게 계산한 plate였다(Fig. 4). 6개의 단세포균은 전부 "D" 항원에 반응하는 항체를 분비하였으며, *C. trachomatis*의 각 혈청형에 대한 특이한 유형은 찾아 볼 수 없었다. 단지 Ba에서 1, G에서 3 및 J 항원에서 2개씩 각기 반응이 약하게 관찰됐을 뿐이

Table 3. Reactivity between the supernatant antibodies and each serotype of *C. trachomatis* by ELISA

Serotype	No																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ba		+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+
D		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E		±	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G		±	±	+	+	+	+	+	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
H		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J		+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LGV-I		+	+	+	+	±	+	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*CNS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ec		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pro		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*CNS; coagulase negative *Staphylococcus*, Ec; *Escherichia coli.*, Pro; *Proteus milabilis*, B; blank +; positive, ±; weakly positive, -; negative

Table 4. Reactivity between the 6 monoclonal antibodies and each serotype of *C. trachomatis* by ELISA

Serotype	No						
		*MoAb 1	MoAb 2	MoAb 3	MoAb 4	MoAb 5	MoAb 6
Ba		+	+	±	+	+	+
D		+	+	+	+	+	+
E		+	+	+	+	+	+
F		+	+	+	+	+	+
G		+	±	±	±	+	+
H		+	+	+	+	+	+
J		+	+	+	±	±	+
LGV-I		+	+	+	+	+	+
CNS		-	-	-	-	-	-
Ec		-	-	-	-	-	-
Pro		-	-	-	-	-	-

*MoAb; monoclonal antibody.

Fig. 4. Monoclonal in HT medium(10 days after oning).

Table 5. Reactivity between the 6 monoclonal antibodies and each serotype of *C. trachomatis* with indirect immunofluorescence staining

MoAb Serotype	1	2	3	4	5	6
Ba	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+
J	+	+	+	+	+	+
LGV-I	+	+	+	+	+	+
CNS	-	-	-	-	-	-
Ec	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-

다. 또한 Coagulase 음성 포도구균, 대장균 및 변형균과의 교차반응은 전혀 없었다(Table 4 참조).

5. 간접면역형광법을 이용한 검사 결과

McCoy 세포에 *C. trachomatis*의 각 serotype 을 감염시킨후 본 연구진에 의하여 개발된 6개의 단세포균 항체를 이용 간접면역형광염색을 한 결과 각 혈청형에서 전부 양성으로 나타났으며, 일반세균으로 감염시켜 오염된 McCoy 세포는 전혀 형광을 띄지 않았다(Table 5 참조). 실지 100명의 비임균성 환자의 검체를 McCoy 세포에 접종후 배양하여 40 시간 후에 상품화된 Microtrak(*C. trachomatis* culture confirmation test, Syva) 과 본 연구진에 의하여 개발된 단세포균 항체를 이용, 면역형광 염색하였으며, 60시간후에 Iodine 염색을 하여 비교 관찰하였다. Iodine 염색은 6명(6%)의 양성율을 나타내었고, 상품화된 Microtrak[®] 과 본 연구실의 단세포

Fig. 5. Heavily infected McCoy cells showing bright yellow inclusion bodies and elementary bodies, indirect immunofluorescence staining and Evan blue counter staining.

Table 6. Results of test of patient samples using iodine, DIF and IIF staining to *C. trachomatis*, the McCoy cells culture

Methods Groups	Iodine	DIF	IIF	Total
I	-	-	-	93
II	-	+	+	1
III	+	+	+	6

Table 7. Results of individual positive cases using iodine, DIF and IIF staining(Each score means average inclusion numbers per high power field, 400 \times).

Patient no.	Method	Iodine	DIF	IIF
1		0	1	2
2		1이하	1	3
3		1	2	4
4		10	30	Many
5		20	Many	"
6		20	"	"
7		*Many	"	"

*Many: above than 30 inclusion bodies.

포균 항체를 이용한 검사에서는 7명(7%)이 양성 반응을 나타내었다(Table 6 참조).

양성으로 판정된 7례는 판정시 McCoy 세포내 봉입체의 양적인면 뿐만 아니라 질적인 면에서도 단세포균 항체를 이용한 면역형광염색이 월등히 우수하였다. 상품화된 Microtrak[®] 과 본 연구실의 단세포균 항체를 이용한 검사결과는 양쪽 공히 예민도 및 특이도에서 동일하였으며, 판정시 용이도에서도 차이가 없었다(Fig. 5, Table 7 참조).

Fig. 6. Enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibody coated test tube, serially dilution of *C. trachomatis* antigen.

Table 8. Results of ELISA to *C. trachomatis* using test tube coated with monoclonal antibody

Inclusion bodies No./HPF*	O.D.
1	0.289
2	0.395
4	0.724

*HPF; high power field.

6. 시험관을 이용한 ELISA 검사 결과

단세포균 항체를 시험관에 coating 시킨 후 표준균주를 희석하여 ELISA 검사를 실시한 결과, 육안적 관정이 가능한 희석배수는 McCoy 세포내 봉입체수가 고배율 시야에서 1개까지 관찰된 시험관까지 황색의 색조를 나타내었다(Table 8, Fig. 6참조).

7. 생체내 고농도 단세포균 항체

Balb/C mouse의 복강내에서 채취된 복수액을 희석하여 96well microplate에서 ELISA 검사(Fig. 7 참조) 및 McCoy 세포를 이용한 IIF 염색 결과는 10^8 배 희석액에서도 양성으로 나타났다.

8. 단세포균 항체의 IgG subclass 결정

상품화된 각각의 anti-mouse immunoglobulin 들을 96well plate에 coating 시켜 6개의 단세포균 항체를 반응시켜 ELISA 실시한 결과 전부 IgG₁으로 나타났다(Table 9 참조).

9. 단세포균세포의 영속성

본 연구진에 의하여 개발된 단세포균 세포는 일부 액체질소 tank에 보관하였으며, 일부는 계속 D-MEM(10% FCS)에서 계대배양 되어지고 있으며(현재 May, 1987: 9개월), 아직까지 10개월 동안

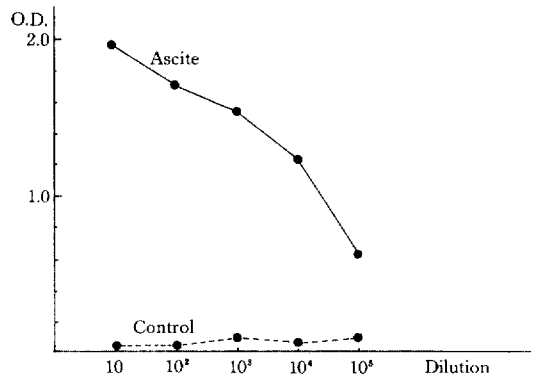


Fig. 7. Antibody titers of ascite in the BALB/c mice(Titertek Multiskan, 492nm filter).

Table 9. Immunoglobulin subclass of monoclonal antibodies

Anti-MoAb	Anti-IgG 1	Anti-IgG 2a	Anti-IgG 2b	Anti-IgG 3
MoAb 1	+	-	-	-
MoAb 2	+	-	-	-
MoAb 3	+	-	-	-
MoAb 4	+	-	-	-
MoAb 5	+	-	-	-
MoAb 6	+	-	-	-

항체를 계속 분비하고 있음을 관찰하였다.

고찰

현재 단세포균 항체를 이용한 진단시약이 계속 개발되고 사용되는 이유는 종전에 사용하던 어느 항체보다 예민도와 특이도가 좋을 뿐만 아니라 동일항체를 무한정 얻을 수 있기 때문이다. 뿐만 아니라 종전에는 검출이 어려웠던 항원에 대해서도 단세포균 항체를 만들 수 있기 때문이다. 단세포균 항체의 개발은 처음 köhler와 Milstein(1975)²¹⁾이 마우스에 면양적혈구를 주사하여 면역한 후에, 면역된 비장 림프구와 마우스의 P₃X₆₃Ag₈ 세포를 융합하여 면양적혈구와 특이하게 반응하는 항체를 분비할 수 있는 영원불멸의 림프잡종세포(hybridoma cell)을 개발한데서부터 시작된다. 그후 임상에 필요한 단세포균항체는 계속 개발되어 왔으며, 국내에서도 이미 차(1984)²²⁾이 급성림프성 백혈병 진단에 사용되는 단세포균항체 개발에 성공하였고, Kim 등(1984)²³⁾의 α -fetoprotein에 대한 단세포균 항체 개발등이 있었다. 단세포균 항체를 얻기 위하여서는 어떤 물질(항원)을 면역한 후 그 물질에 대한 항체를 분비할 수 있는 세포(비장의 림프구 또

는 형질세포)와 영원불멸의 증식을 할 수 있는 골수종세포가 융합(fusion)되어야 하며, 융합이 이루어진 후에도 계속 두세포의 특성을 갖는 유전자의 손실없이 분열증식하여 면역항원에 대한 특이 항체를 계속 분비하여야 한다.

Chlamydia trachomatis (이하 *C. trachomatis* 라 함)에 대한 단세포균 항체는 이미 Stephen 등(1984)¹⁰⁾ Caldwell 등(1984)¹¹⁾이 genus-specific한 것을 개발하여 *C. trachomatis*의 항원분리 및 serotype 결정에 사용하였다.

항원분리는 Wang¹²⁾ 등의 방법을 약간 수정하여 Hela 세포대신에 McCoy 세포에 *C. trachomatis*를 감염시켜 기본체와 망상체가 동시에 존재할 수 있는 접종후 62시간에 균체를 수집하였다. BALB/c 마우스에 접종한 항원의 순도를 알아보기 위하여 접종항원을 전자현미경으로 관찰하여 본 결과 기본체(elementary body), 중간체(intermediate body) 및 망상체(reticulate body)가 균등하게 관찰되었다. 그러나 Hatch 등¹³⁾ Caldwell 등¹⁴⁾은 순수 기본체를 얻기 위하여 균접종후 21, 48시간에 균체를 회수한 후, renografin 비중액으로 기본체를 순수정제하여 면역항원으로 사용하였다.

면역은 우선 적절한 동물(mouse/rat)에 정제된 항원을 주사하여야 하는데 단세포균 항체생산은 종래의 항체생산과 달리 접종항원을 고도의 기술로 정제하지 않아도 되는 이유는 나중에 항체를 생산하는 림프잡종세포(hybridoma cell)를 Cloning하여 원하는 항체를 분비하는 세포군을 분리할 수 있기 때문이다. 면역항원은 가용성항원(soluble antigen)과 세포(intact cell)로 구별되나, 본 연구의 항원은 불활성화시킨 세균(intact cell)이므로 회석하여 직접 복강 및 미정맥에 주사하였으나, 가용성의 항원인 경우는 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 주사(피하, 복강내 및 근육)하여야 한다^{15, 16)}.

마지막 면역을 시킨후 마우스안구의 retrobulbar plexus에서 혈액을 채취하여 *C. trachomatis*에 대한 항체 생성유무를 효소결합 면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)로 판정한 후 면역이 잘 이루어진 마우스의 비장만 평균적으로 적출해야 한다. 면역이 잘된 비장은 정상 비장보다 3~5배 커져 있었으며, 분리되는 림프구(또는 형질세포)도 한마리에서 1×10^8 정도 얻을 수 있었다. 융합(fusion)의 종류는 사용되는 림프구(형질세포)와 골수종 세포의 모체에 따라 mouse-mouse, rat-rat, human-human, mouse-rat 및 mouse-human 등이 있으나, mouse-mouse(BALB/c mouse, mouse myeloma)가 가장 일찍 시도되었고, 많이 쓰이고 있다¹⁷⁾.

Fusion에 사용되는 mouse의 골수종세포(myeloma cell)는 $P_3-X_{63}-Ag_8$, $P_3-NS_{1}-Ag-1$, $P_3-X_{43}-Ag_8 \cdot V_{80}$, $Sp_{2,1}-Ag_{14}$ 및 Fo 등이 있으나, 일반적으로 자체 면역글로블린을 생성하는 성질을 상실하였거나, 없는 경우가 많다(간혹 자체 면역글로블린을 생성하는 세포도 있음). 뿐만 아니라 HGPRT(hypoxanthine phosphoribosyl transferase)가 결핍되어 있다¹⁸⁾. 사용된 골수종세포는 $P_3X_{63}Ag_8 \cdot V_{80}$ 였으며, 이는 $P_3X_{63}Ag_8$ 의 변이세포로 자체 면역글로블린을 생성 못하고, HGPRT가 없는 8-azaguanine($20 \mu\text{g}/\text{ml}$)에서 내성을 나타내는 세포주(cell line)이었다. 융합은 비장의 림프구(형질세포)와 골수종 세포를 5~10:1의 비율로 섞어서 융합을 실시해야 좋은 결과를 얻을 수 있기에 본 연구에서도 BALB/c의 림프구(형질세포)를 1.5×10^6 개, 골수종세포 3×10^6 개를 융합하였다. 융합촉진제로는 초기에는 sendai 바이러스(HVJ)가 사용된 적이 있었으나¹⁹⁾, 현재는 polyethylene glycol(PEG)를 주로 사용한다. 이는 고농도의 PEG를 융합에 사용하므로써, 첫째 두세포의 넓은 부위가 서로 접하게 되며, 둘째 heterokaryon을 형성, 결국 핵이 융합된 hybrid cell이 된다고 생각하고 있다²⁰⁾.

융합은 융합세포 2×10^6 개 중에서 1개 정도로 적은 수만이 융합되므로 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)배지에서 선택적으로 배양되어야 한다²¹⁾. HAT배지내에서 HGPRT가 결핍된 골수종세포는 핵산을 생산하는 주 및 부경로가 전부 막혀 곧 사멸되며, 비장의 림프구(또는 형질세포)는 골수종 세포와 같이 계속 분열증식할 수 있는 성질이 없으므로 부경로를 이용하여 핵산을 생산한다 하여도 수일내에 사멸된다. 그러나 융합이 이루어진 세포는 HGPRT를 갖고 있는 림프구의 항체를 생산할 수 있는 유전자와 영원불멸의 증식을 할 수 있는 골수종 세포의 유전자를 함께 지니게 되므로 HAT배지 내에서 계속 분열증식되는 것이다²⁰⁾.

본 연구에서 융합된 세포를 직접 전부 계산할 수는 없으나, 융합된 세포가 증식하여 직경이 1mm 이상된 세포군을 형성한 것을 계산한 결과 차등²²⁾의 78%보다는 낮았으나, 38%의 융합된 세포군을 발견할 수 있었다. 그러나 융합이 이루어진 세포군의 배양액으로 *C. trachomatis*의 혈청형 D에 대한 항체생산 유무를 ELISA로 검사한 결과 13%의 세포군에서 항체를 분비하는 것으로 보아 차등²²⁾의 항체생산물과 비슷함을 알 수 있었다. 단세포배양(cell cloning)에는 무한대 회석법에 의한 limiting dilution법, 반고형배지를 이용하여 림프잡종세포(hy-

bridoma cell)를 회석하는 법, Fluorescence-activated cell sorter를 이용한 cloning 방법이 있으나⁸⁾, 본 연구에서는 무한대 회석법을 이용하여 각 림프 잡종세포(hybridoma cell)가 96well plate에 각기 0.5, 1, 1.5, 2개씩 들어가게 분주하였으나, 각 well에 1개의 세포를 주입한 plate에서 제일 많이 단세포군이 형성되었다.

Cloning 하기 전의 림프잡종세포(hybridoma cell) 및 Cloning 후의 단세포군(monoclonal)의 배양액으로 *C. trachomatis*의 각 혈청형과의 반응여부를 알아보기 위하여 ELISA 검사를 하였으나, 특정한 유형이 없이 전 serotype이 전부 양성반응을 보였으며, McCoy cell에 각 혈청형의 *C. trachomatis*를 감염시킨후 IIF(indirect immunofluorescence) 염색을 한 결과에서도 각 혈청형에 관계없이 기본체와 망상체에서 전부 양성반응을 나타내었다. 뿐만 아니라 monodone 6개의 배양액을 갖고 immunoglobulin G 아형(subclass)를 검사한 결과 전부 IgG₁으로 나타나 6개의 단세포군이 동일 면역 글로블린을 분비하여 *C. trachomatis*의 genus-specific한 항원에 반응하는 동일한 단세포군 항체로 판단된다. 뿐만 아니라 본 연구에서 생산된 단세포군 항체를 기존의 상품화된 Microtrak(Syva, chlamydia trachomatis culture confirmation test, U.S.A.)과 비교 관찰에서 예민도 및 특이도에서 뒤지지 않고 있으며, 배경염색 및 양성형광의 밝기도 좋아 초심자도 쉽게 이용할 수 있으리라 생각된다. 단세포군의 세포를 동종의 BALB/c 복강내 주사하여 *C. trachomatis*에 대한 고농도의 항체를 얻었으나, 앞으로 복수액에서 항체를 정제하여 효소(peroxidase) 및 형광물질(FITC, fluorescein isothiocyanate)를 결합시켜 직접면역 형광법 및 test tube를 이용한 ELISA 검사를 개발, 임상에 더욱 손쉽게 이용할 수 있게끔 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 western blotting 등²¹⁾을 이용, 본 연구에서 생산된 단세포군 항체가 *C. trachomatis*와 반응하는 정확한 항원의 위치 및 특성이 앞으로 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

*Chlamydia trachomatis*는 비임균성 뇨도염 뿐만 아니라 트라코마 및 자궁내막염등의 중요 원인균중의 하나이다. 검출방법이 여러 가지가 있으나, 전부 장단점이 있으며, 최근 단세포군 항체를 이용한 균체 발견이 제일 정확하고 간편한 방법으로 인정받고 있는 실정이다. 그러나, 고가의 시약을 수입

에만 의존해야하므로 일반병원에서는 균체 검출에 많은 문제점을 갖고 있어, 본 연구진은 이러한 고가의 단세포군 항체를 국내에서 생성코져 본 연구를 실시한 결과 좋은 결과를 얻었기에 보고하는 바입니다.

면역은 ATCC에서 분양받은 *C. trachomatis* (D/UW-12/UR)를 BALB/c 마우스(10주, female)의 복강내에 1주일 간격으로 3번, 꼬리정맥에 1번 주사하였다. 면역된 Balb/c의 비장을 적출하여 림프구(1.5×10^8)를 분리한 후 골수종세포(myeloma cell, P₃X₆₃Ag₈·V₆₅₃, 1.5×10^8)와 50%(W/V) PEG를 이용하여 융합을 실시하였다. 융합시킨 세포를 1×10^6 씩 96well plate에 각각 분주하여 HAT medium에서 12일간 배양하였다. 분주된 640well에서 융합된 것으로 계산하여 244well(38%)에서만 효소결합 면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay ELISA)을 사용 *C. trachomatis*에 대한 항체생성 여부를 검사하였다. 244well의 배양액중 83well(전체의 13%)에서 모든 serotype(Ba, C, D, E, F, G, H, J, LGV-I)에서 전부 양성반응을 나타내었다. Serotype D에 대한 항체가 제일 높은 10개의 세포군을 선정, 무한대 회석법으로 cloning을 실시한 결과 배양 10일후 완전한 단세포군을 형성한 것은 3960well(96well plate 40장)중 6well(0.15%)뿐이었다. 이 여섯개의 단세포군 배양액으로 *C. trachomatis*의 각 serotype에 대한 ELISA 및 간접면역형광법(IIF, indirect immunofluorescence) 염색을 한 결과 모든 혈청형에서 양성으로 나타났다. 타균과의 교차반응을 관찰하기 위하여 대장균, 변형균, 및 coagulase 음성 포도상구균을 사용 ELISA 및 IIF 검사를 한 결과 전부 음성결과를 나타내었다. 이 여섯개의 단세포군 항체를 ELISA 방법을 사용하여 immunoglobulin G의 아형(subclass)를 검사한 결과 전부 IgG₁으로 판명되었다. 상기 사실로 미루어 보아 여섯개의 단세포군은 전부 동일한 항체를 분비하는 것으로 추정되었으며, *C. trachomatis*의 genus-specific한 항체를 분비하는 것으로 판단되었다.

본 연구진에 의하여 개발된 단세포군 항체를 직접 100명의 환자 검체를 세포배양후 IIF 검사한 결과, 상품화된 Micro Trak(Syva, chlamydia trachomatis culture confirmation test)과 비교할 때 전혀 양적으로나 질적으로 손색이 없음을 관찰하였다(양성율; 각기 7%)뿐만 아니라 생성된 단세포군 항체를 시험관 내벽에 coating시킨후 표준균주를 반응시켜 ELISA 검사를 한 결과 육안적으로도 양성, 음성을 판정할 수 있어 앞으로 직접 환자검체를 이용하는 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다

다.

본 연구를 성공하게끔 이끌어 주신 고 김기홍 교수님께 감사 이 논문을 바칩니다.

참 고 문 헌

- 1) 김성진, 이무상 : *Chlamydia trachomatis* 감염의 진단방법별 효용성 비교. 대한비뇨기과학회지, **26**:211, 1985.
- 2) 김재식 : Monoclonal antibody의 이론. 대한임상병리학회지, **6**:499, 1986.
- 3) 김재호, 김기봉 : *Chlamydia*성 결막염과 조직배양. 최신의학, **27**:979, 1984.
- 4) 금동극, 최영식, 최태열 : 세포배양법을 이용한 *Chlamydia trachomatis* 봉입체 검출에 관한 고찰. 대한임상병리학회지, **6**:429, 1986.
- 5) 박명희 : Production of Monoclonal Antibody 대한임상병리학회지, **6**:505, 1986.
- 6) 이진무, 권성원, 이무상 : 한국에서의 *Chlamydia trachomatis* 감염 현황에 관한 연구. 대한의학협회지, **29**:417, 1986.
- 7) 정규봉, 금동극, 최태열 : 비임균성 요도염환자에서 Chlamydiazyme 을 이용한 *Chlamydia trachomatis*의 검출에 관한 연구. 한양의대학술지, **6**:221, 1986.
- 8) 차창룡, 황응수, 조명제 : 급성백혈병 세포항원에 반응하는 단세포군 항체를 분비하는 림프잡종 세포종(Hybridoma) 생산에 관한 연구. 대한의학협회지, **27**:253, 1984.
- 9) 최태열, 강신재, 김영환 : *Chlamydia trachomatis*의 진단검사 방법에 관한 연구(96 well microplate 를 이용하여), 한양의대학술지, **7**:571, 1987.
- 10) 최태열, 김춘원, 김중환 : 비임균성 노도염 환자에서 *Chlamydia trachomatis* 검출방법에 관한 연구(3가지 방법 비교). 대한미생물학회지, **21**:393, 1986.
- 11) Bird BR, Forrester FT: Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. CDC, Atlanta, 1981.
- 12) Cardwell HD and Hitchcock PJ: Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: Location of the epitope on Chlamydial lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*. **44**:306, 1984.
- 13) Cardwell HD, John K, Schachter J: Purification and partial characterization of the major outer Membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, **31**:1161, 1981.
- 14) Caldwell HD and Schachter J: Antigenic Analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia Spp*. *Infection and Immunity*, **35**:1024, 1982.
- 15) Cardwell HD, Schachachter J: Immunoassay for detecting *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *J. Clin Micro*, **18**:539, 1983.
- 16) Elisabeth R: The treatment of pelvic inflammatory disease. *Am J. Obstet. Gynecol*, **138**:1042, 1980.
- 17) Evana RT and Robinson DT: Comparison of various McCoy cell treatment procedures used for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J. of Clinical Microbiology*, **10**:198, 1979.
- 18) Hatch TP, Allan I and Pearce JH: Structural and Polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia Spp.*: *Jour of Bacteriology*, **157**:13, 1984.
- 19) Burrell JG: Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications. CRC press, Boca Raton, p. 19, 1982.
- 20) Kenett RH, McKean TJ: Monoclonal antibodies. Hybridomas: A new dimension in biological analysis. Plenum press, New York and London, 1980.
- 21) Kenji O, Tadashi K, Kohei SN: Immunozy-matic detection of three kinds of 43,000 molecular weight antigens by monoclonal antibodies in the insoluble fraction of toxoplasma gondii. *Infection and Immunology*, **43**:1057, 1984.
- 22) Kim Seung-Won, Bum-Suk Tchai, Hong-Ke-un Chung: Production of monoclonal antibody to human Alpha-fetoprotein. *Korean J. Biochem*, **16**:41, 1984.
- 23) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**:495, 1975.
- 24) Lipkin2 ES, Moncada JV, Shafer MA et al: Comparison of monoclonal antibody staining and culture in diagnosing cervical Chlamydial Infection. *J. of Clin Micro*, **23**:114, 1986.

- 25) Munday PE, Johnson AP, Thomas BJ and Robinson DT: A comparison of the sensitivity of immunofluorescence and Giemsa for staining *Chlamydia trachomatis* inclusion in cycloheximide-treated McCoy cells. *J. Clin Path*, **33**:177, 1980.
- 26) Reeve P, Owen J, Oriel JD: Laboratory procedures for the isolation of *C. trachomatis* from the human genital tract. *J. Clin Path*, **28**:910, 1975.
- 27) Ripa KT, Mardh PA: Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide treated McCoy cells. *J. of Clin Microbiology*, **6**: 328, 1977.
- 28) Rowe DS, Aicardi EZ, Dawson CD: Purulent ocular discharge in neonatis: Significance of *Chlamydia trachomatis*. *Pediatric*, **63**: 628, 1979.
- 29) Stamm WE, Tam M, Koester M: Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusion in McCoy cell culture with Fluorescein conjugated monoclonal antibody. *J. of Clin Micro*, **17**: 666, 1983.
- 30) Stephens RS, Tam MR, Kuo CC: Monoclonal antibodies to *C. trachomatis*: Antibody specificities and antigen characterization *J. of Immunology*, **128**:1083, 1982.
- 31) Wang SP, Kuo CC and Grayston JT: Formalinized *Chlamydia trachomatis* organisms as antigen in the Micro-Immunofluorescence test. *J. of Clinical microbiology*, **10**:259, 1979.
- 32) Wilbert J, Newhall V et al: Serovar determination of *Chlamydia trachomatis* isolates by using type-specific monoclonal antibodies. *J. Clin Microbiol*, **23**:333, 1986.
- 33) Wilbert JN, Perttiterho, Charles EW: Serovar determination of *Chlamydia trachomatis* isolate by using type specific Monoclonal antibodies. *J. of Clin Micro*, **23**:333, 1986.
- 34) Willcox JR, Fisk PG, Barrow J: The need for a Chlamydial culture service. *British J. of Venereal Disease*, **55**:281, 1979.