

만성 기침 환자에서 혈청 클라미디아 항체에 대한 ELISA와 microimmunofluorescence 검사의 비교

강원대학교 의과대학 내과학교실, 강원대학교병원 임상의학연구소
이희영, 김우진

Enzyme-linked Immunosorbent Assays for Antibodies against *Chlamydia Pneumoniae* Compared with Microimmunofluorescence Test with Patients with Chronic Cough

Hui Young Lee, M.D., Woo Jin Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kangwon National University and Clinical Research Institute, Kangwon National University Hospital

Background : *Chlamydia pneumoniae* is a clinically important pathogen, the diagnosis of such infection being based mainly on serology. Microimmunofluorescence (MIF) is the current standard diagnostic method, but is subjective and time-consuming, so the authors tested the serology of chronic cough patients using an ELISA method for the Chlamydial antibody, which is a more objective method, and compared the results with those of the standard method. **Method :** Thirty-five patients, who visited Kangwon National University Hospital between August 2003 and July 2004, were evaluated. A MIF and ELISA tests were used to determine *C. pneumoniae* antibody titers. Nasopharyngeal aspirates were examined by polymerase chain reaction (PCR). The Spearman rank correlation test was used for data analysis.

Results : Sensitivities of ELISA for IgG, IgA and IgM, as judged by MIF, were 84.0, 84.0 and 40.0% and the specificities were 60.0, 60.0 and 96.7%, respectively. Three patients were Chlamydia PCR positive.

Conclusion : ELISA can be a useful tool for studying the seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae*. However, further studies will be required prior to its clinical use. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 59: 47-52)

Key words : *Chlamydia pneumoniae*, Enzyme-Linked Immunosorbent assay

서 론

클라미디아 폐렴균은 지역사회 폐렴의 약 10%에서 원인균이며¹ 성인의 70%까지 혈청 양성 소견을 보여² 이전에 클라미디아 폐렴균에 감염되었거나 만성 감염으로 유지되는 경우가 많은 것으로 사료된다. 특히 최근 클라미디아 폐렴균에 대한 혈청 양성이 동맥경화와 관련된다는 보고가 있고³, 만성 호흡기 증상과 관련된다는 보고와⁴ 폐암의 위험요인이 된다는 보고도 있어⁵, 앞으로도 클라미디아 폐렴균의, 동맥경화와 폐

질환에 대한 역할에 대해 많은 임상적, 역학적 연구가 요구되고 있다.

클라미디아 폐렴의 진단에 있어, 클라미디아 폐렴균의 배양이 매우 어렵고, polymerase chain reaction (PCR)은 좀더 민감하지만 아직 진단적으로 인정받지는 못하고 있어, 현재까지 혈청 검사가 진단에 가장 중요하게 이용된다. 그중에서 microimmunofluorescence(MIF) 검사법이 표준으로 되어 있다⁶. 그러나, 이 검사는 시간이 많이 소요되며, 주관적이며 많은 경험이 요구된다는 단점이 있다.

특정 질환과 클라미디아 폐렴균과의 관계를 연구하기 위해 특정 질환에서의 혈청학적 유병률을 연구하게 되는데, 이 경우 많은 환자를 대상으로 하게 되고 이 경우 좀더 객관적이며 한번에 많은 수의 검사를 시행할 수 있는 Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)가 더 유리할 수 있다. 그러나, 클라미디아 폐렴의 진단에서는 MIF 이외에는 표준 진단으로 인정받지 못하고 있다⁶.

2004년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구하였음

Address for correspondence : **Woo Jin Kim, M.D.**
Department of Internal Medicine, Kangwon National University Hospital, 17-1 Hyoja-3 Dong, Chunchon-Si, Kangwon-Do, 200-947, Korea
Phone : +82-33-258-2377 Fax : +82-33-258-2455
E-mail : pulmo2@knuh.or.kr

Received : Jan. 26. 2005

Accepted : Jun. 28. 2005

MIF와 ELISA를 비교한 최근 연구는 정상인은 대상으로 하거나^{7,8}, 호흡기 감염이 있는 환자들을 대상으로⁹ 시행되었다. 클라미디아 혈청 검사의 경우, 호흡기 감염을 가진 환자이외에도 동맥경화, 만성 호흡기 질환과의 관련성을 알기위해 시행되는데, 이런 대상에서 MIF와 ELISA를 비교한 연구는 거의 없다. 만성 기침과 클라미디아 폐렴균과의 관계는 아직 논란이 있는 상태로, 만성 기침을 호소하는 환자들에서 두가지 검사법으로 검사를 진행하여 ELISA 검사법이 표준 검사법과 비교하여 정확도가 어떤지를 평가하기 위하여 연구를 진행하였다.

방 법

1. 혈 청

3주 이상 지속되는 만성기침을 주소로 2003년 8월부터 2004년 7월까지 강원대학교병원을 방문한 35명의 성인 환자에서 얻은 혈청으로 검사를 시행하였다. 흉부방사선 사진에서 이상소견이 발견된 환자는 제외하였다. 혈청은 검사에 사용하기까지 -70°C에서 보관하였다. 본 연구는 강원대학교병원 임상연구위원회의 승인을 얻었다.

2. ELISA

준비된 혈청을 클라미디아 폐렴균에 대한 IgG, IgA, IgM 항체에 대하여 Hitazyme Cpn kit(Hitachi chemical, Tokyo, Japan)을 이용하여 정량적으로 3회 측정하여 평균을 구하였다. 측정치가 IgG, IgA는 1.10 이상이면 양성으로, IgM은 1.60 이상이면 양성으로 판정하였다¹⁰.

3. MIF

순수 분리하여 0.03% 포르말린으로 고정한 *C. pneumoniae*(AR-39), *C. trachomatis*(L2), *C. psittaci*의 elementary body(EB)를 유리 슬라이드에 항원으로 올리고, 순차적으로 희석한 혈청을 1시간 동안 37°C에

서 반응시킨 후, PBS로 세척하고, 다시 FITC-conjugated anti-Ig G, A, M 으로 1시간 동안 반응하고, 세척한 후 형광현미경으로 200배 시야에서 관찰하였다. IgM 검사에는 비특이적 반응을 없애기 위해 RF absorbent(Dade Behringer, Marburg, Germany)를 처리하여 15분간 미리 반응시켰다.

정성적인 비교를 위해 Ig G, A, M 모두 1:16이상을 양성으로 판정하였다. 정량적인 비교를 위해서는 MIF 역가를 구하였다.

4. PCR

환자의 비인두에서 스왑으로 얻은 검체를 원심분리하여 원침에서 DNA를 추출하였고, Gaydos등¹¹에 의한 방법으로 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 primer CPN90 5' GGTCTCAACCCCATCCGTGTCCG 3', CPN91 5'TGCGGAAAGCTGTATTTCTACAGTT 3'을 첨가하여, denaturation은 94°C에서 15분, annealing 62°C에서 52°C로 touchdown 법으로 시행하였고, extension은 72°C에서 1분간 시행하였다.

5. 통 계

Spss(ver. 10.0)으로 ELISA ID 수치와 MIF의 역가에 대하여 비모수 상관계수 분석(Spearman)을 하였다.

결 과

1. 대상 환자

총환자수는 35명(남자13, 여자22) 평균나이는 50.0 ± 18.7 세이었고, 흡연력은 평균 3.2 ± 6.0 갑년이였다. 병력으로 고혈압이 5명, 당뇨가 2명, 결핵이 1명이였다.

2. IgG

ELISA로 양성인 환자가 24명, MIF로 양성인 환자가 33명이였다(Table 1). MIF 결과를 gold standard

Table 1. Results of *C. pneumoniae* serology by microimmunofluorescence and ELISA

Number	IgG		IgA		IgM	
	ELISA	MIF	ELISA	MIF	ELISA	MIF
1	0.73	1:64	1.72	1:32	1.01	<1:16
2	3.23	1:512	2.61	1:64	0.78	<1:16
3	1.96	1:128	2.85	1:64	0.63	<1:16
4	1.52	1:256	0.86	1:16	1.18	<1:16
5	0.49	1:16	0.70	<1:16	1.47	<1:16
6	0.81	1:32	0.82	<1:16	0.91	<1:16
7	3.15	1:64	1.02	<1:16	1.82	1:64
8	3.08	1:1024	1.78	1:32	1.55	<1:16
9	2.64	1:256	2.24	1:32	3.18	1:32
10	0.20	<1:16	2.88	<1:16	0.56	<1:16
11	1.42	1:64	0.48	1:32	0.77	1:16
12	1.74	1:256	1.09	1:32	0.43	<1:16
13	0.89	1:64	0.81	<1:16	0.87	<1:16
14	1.43	1:64	0.42	1:16	0.90	<1:16
15	3.43	1:512	1.25	1:32	1.00	<1:16
16	0.80	1:64	1.76	1:32	0.78	<1:16
17	3.04	1:512	1.47	1:64	0.64	<1:16
18	1.38	1:64	2.71	1:16	1.19	1:16
19	1.54	1:256	0.92	1:16	0.67	<1:16
20	1.04	1:32	1.27	1:16	0.59	<1:16
21	1.85	1:512	1.60	1:32	0.70	<1:16
22	0.74	1:64	0.67	<1:16	1.15	<1:16
23	0.84	1:32	1.04	<1:16	1.23	<1:16
24	1.38	1:64	2.46	1:32	0.87	1:16
25	0.02	1:16	0.09	<1:16	0.94	<1:16
26	1.13	1:32	0.67	<1:16	0.89	<1:16
27	1.31	1:64	1.93	1:16	0.55	<1:16
28	1.84	1:64	1.30	1:32	0.61	<1:16
29	2.02	1:256	3.59	1:32	0.60	<1:16
30	0.62	1:64	0.65	1:16	0.80	<1:16
31	2.56	1:256	1.85	1:32	0.69	<1:16
32	1.89	1:256	1.30	1:32	1.29	<1:16
33	2.10	1:256	0.98	1:16	0.97	<1:16
34	0.14	1:16	1.65	<1:16	1.62	<1:16
35	1.39	1:128	1.99	1:16	1.44	<1:16

로 하였을 때, ELISA 검사의 위양성은 없었고, 위음성이 9명 있어 74.3%의 일치율을 보였다. 민감도는 72.7%, 특이도는 100%이었다. 상관계수는 0.846($p < 0.05$)이었다.

3. IgA

ELISA로 양성인 환자가 25명, MIF로 양성인 환자가 25명이었다. 위양성이 4명, 위음성이 4명이었고 일치율은 77.1%이었다. 민감도는 84.0%, 특이도는 60.0%이었다. 상관계수는 0.433($p < 0.05$)이었다.

4. IgM

ELISA로 양성인 환자가 3명, MIF로 양성인 환자가 5명이었다. 위양성이 1명, 위음성이 3명이었다. 민감도는 40.0%, 특이도는 96.7%이었다. 일치율은 88.6%이었다. 상관계수는 0.300($p = 0.08$)이었다.

5. PCR

3명의 환자에서 PCR 양성 소견을 보였다(Fig. 1). 이들의 혈청은 IgG는 두명이 1:128에서, 한명이 1:256에서 양성되었고 IgA는 모두 1:16에서 양성되었고,

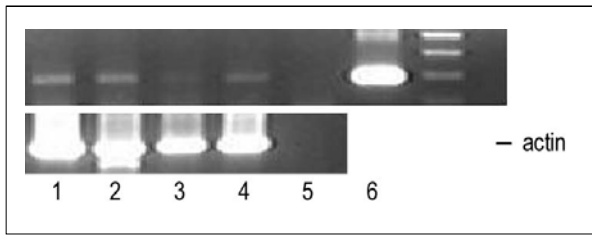


Figure 1. PCR for *C. pneumoniae* from nasopharyngeal swabs. Lane 1, 2 and 4 are positive samples for *C. pneumoniae*, lane 3 is negative sample and lanes 5 and 6 are negative and positive controls, respectively.

IgM 역가는 모두 음성이었다.

고 찰

본 연구에서는 ELISA로 시행한 만성기침환자의 클라미디아 폐렴균에 대한 항체가를 기존의 표준 검사인 MIF법과 비교하여 IgG는 민감도 84.0%, 특이도 60.0%, IgA는 민감도 84.0%, 특이도 60.0%, IgM은 민감도 40.0%, 특이도 96.7%의 결과를 보였다.

이전의 연구에서는 Numazaki 등이 소아를 대상으로 ELISA를 MIF와 비교한 연구에서 IgG는 90.4%의 민감도와 89.9%의 특이도를 보였고, IgA는 84.6%의 민감도와 86.7%의 특이도를 보였다⁷. 또한, 유럽에서 건강인을 대상으로 한 이전의 연구에서는 ELISA kit의 종류에 따라 58-100%의 민감도와 95-100%의 특이도를 보였다⁸. 같은 그룹에서 호흡기 감염환자를 대상으로 시행한 연구에서는 역시 ELISA의 종류에 따라 차이가 있지만 90%이상의 일치율을 보였다⁹. 본 연구는 만성 기침 환자들을 대상으로 한 연구였고, 이들을 대상으로 혈청역학적 연구를 ELISA로 시행할 때 참고가 될 수 있을 것이나, 정상 대조군이나 다른 대상균에 적용하는 경우는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

MIF법은 순수 분리하여 포르말린으로 고정된 EB를 슬라이드에 부착시켜 항원항체반응을 측정하는 것이고, ELISA는 일부 특이 항원을 이용한다는 점에서 방법상의 근본적인 차이가 있다. 본 연구에서 이용한 ELISA kit는 complex outer membrane complex를 항원으로 이용한 것으로 순수 분리한 클라미디아 폐렴균의 EB로부터 Sarkosyl buffer를 이용하여 제조하였

다^{10,12}. 유럽에서 제조한 ELISA kit는 전체 항원 또는 recombinant lipopolysaccharide(LPS) 등을 항원으로 이용하였고, LPS의 경우에는 민감도, 특이도가 떨어진다는 결과를 보였다⁹.

본 연구에서 IgG의 위음성은 1:16(+에서 2예, 1:32(+에서 2예, 1:64(+에서 5예였다. 1:128이상의 높은 역가에서 위음성을 보인 예는 없었다. 이전의 연구에서도 대부분 낮은 역가에서만 불일치를 보이고 있다.

IgM의 경우는 위양성이 문제가 되는 경우가 많다. MIF의 경우 RF absorbent를 처리하여 IgG와 IgG 면역 복합체와 반응하는 IgM을 제거하고, ELISA kit 역시 비슷한 원리로 비특이적인 항체를 제거하는 단계를 거친다. 본 연구의 결과에서 IgM에 대한 ELISA의 민감도가 낮게 나왔다고 해석 할 수도 있지만, 대상 환자들이 흉부방사선 상 정상인 만성 기침 환자임을 감안하면 일부 환자의 MIF가 위양성일 가능성이 높음을 시사한다. 또한, 상관관계가 통계적으로 의미없는 수치로 나온 것이 비특이적 항체를 제거하는 방법의 차이가 영향을 주었을 가능성이 있다.

본 연구는 만성 기침 환자를 대상으로 항체역가를 비교하였다. 혈청학적 기준으로 이들 환자들의 25%가 급성 감염, 54%가 만성 감염으로 판단된다. 혈청학적 양성의 빈도는 지역에 따른 차이를 보이고 있다. 이전의 연구에서 만성기침을 대상으로 클라미디아 혈청검사를 하여 일본에서는 6.5%가 급성 감염이라는 보고가 있었고, 미국의 응급실에서 시행한 연구에서는 20%가 급성 감염이었다. 유럽에서는 4%가 급성감염이고, 46%가 만성감염이었다는 보고가 있다¹³⁻¹⁵.

본 연구에서는 3명(8.6%)의 환자에서 PCR 양성을 보였다. 이들의 항체가는 IgG가 1:256, 1:64에서 양성이고 IgM은 모두 1:16미만이었다. 회복기의 혈청검사가 없다는 한계가 있으나, PCR 양성으로 나온 환자에서 혈청학적으로 급성 감염의 증거는 없었다. 이전 보고에서 일본에서의 만성 기침환자에서는 5.5%가 PCR 양성이었다¹⁴, 유럽의 연구에서는 1.5%가 PCR 양성이었다¹⁵. 클라미디아 폐렴의 진단에서 PCR은 아직 표준화된 방법이 정립되지는 않았다. 외국의 가이드라인에 따르면 4가지가 비교적 신뢰성 있는 방법으로 평가되고 있고⁶, 본 연구에서도 이 중의 한 방법을 이용

하였다. PCR을 이용한 폐렴 원인균의 진단은 아직은 정확도가 떨어지고, 임상에서의 이용은 제한되고 있다¹. 또한, 클라미디아 폐렴균은 이전의 감염이 있었던 환자에서도 검출 될 수 있다는 연구보고도 있어¹⁶, 해석상의 주의를 요한다.

결론적으로, 항원성의 차이가 있을 수 있음에도 불구하고 MIF법과 ELISA 법은 혈청 IgG와 IgA 양성이 비교적 일치하였다. 좀더 객관적인 ELISA 검사로 많은 환자들을 대상으로 하는 혈청역학적 연구에서는 좀더 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 임상적인 폐렴의 진단에 이용되기 위해서는 IgM의 결과가 좀더 나아져야 할 것이고, 항체역가의 4배 증가를 ELISA의 수치 변화에 적용할 수 있을지는 좀더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

클라미디아 폐렴균은 임상적으로 중요한 균으로 혈청검사가 진단에 중요하다. 현재 이용되는 micro-immunofluorescence법은 주관적이고 시간이 많이 소요되므로 좀더 객관적으로 진단할 수 있는 ELISA법을 이용하여 만성 기침을 주소로 내원한 환자들의 혈청을 대상으로 검사하고 표준방법과 결과를 비교하였다.

방 법 :

2003년 8월부터 2004년 7월까지 강원대학교병원을 방문한 35명의 성인 환자에서 얻은 혈청을 ELISA법과 microimmunofluorescence법으로 시행하였다. 비인두 스왑에서 PCR을 시행하였다. 두 방법의 비교는 비모수 상관계수 분석(Spearman)을 하였다.

결 과 :

ELISA 검사결과 IgG는 민감도 84.0%, 특이도 60.0%, IgA는 민감도 84.0%, 특이도 60.0%, IgM은 민감도 40.0%, 특이도 96.7%의 결과를 보였다. PCR은 3명의 환자에서 양성이었다.

결 론 :

ELISA법이 많은 환자들을 대상으로 하는 역학적 연구에서는 좀더 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 임상적으로 적용되기 위해서는 좀더 연구가

필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. File TM. *Community-acquired pneumonia*. *Lancet* 2003;362:1991-2001.
2. File TM, Tan JS, Plouffe JF. *The role of atypical pathogens: Mycoplasma pneumonia, Chlamydia pneumoniae and Legionella pneumophila in respiratory infection*. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12:569-92.
3. Saikku P, Leinonen M, Mattila KJ, Ekman MR, Niemans MS, Makela PH, et al. *Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction*. *Lancet* 1988;2:983-6.
4. Falck G, Gnarpe J, Hansson LO, Svardsudd K, Gnarpe H. *Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to Chlamydia pneumoniae*. *Chest* 2002;122:1587-93.
5. Kocazeybek B. *Chronic Chlamydia pneumoniae infection in lung cancer, a risk factor: a case-control study*. *J Med Microbiol* 2003;52:721-6.
6. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. *Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the centers for disease control and prevention and the laboratory centre for disease control*. *Clin Infect Dis* 2001;33:492-503.
7. Numazaki K, Ikebe T, Chiba S. *Detection of serum antibodies against by Chlamydia pneumoniae ELISA*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;14:179-83.
8. Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T. *Comparison of eleven commercial tests for Chlamydia pneumoniae-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1603-9.
9. Hermann C, Gueinzius K, Oehme A, von Aulock S, Straube E, Hartung T. *Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against Chlamydia pneumoniae to a microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections*. *J Clin Microbiol* 2004;42:2476-9.
10. Kishimoto T, Matsushima T, Morikawa T, Kawagoe K. *Assay of specific anti-Chlamydia pneumoniae antibodies by ELISA method: 3. setting of serological criteria*. *Kansenshogaku Zasshi* 1999;73:457-66.
11. Gaydos CA, Quinn TC, Eiden JJ. *Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA amplification of the 16S rRNA gene*. *J Clin Microbiol* 1992;30:796-800.
12. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. *Purification*

- and partial characterization of the major outer membrane of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1981; 31:1161-76.
13. Wright SW, Edwards KM, decker MD, Grayston JT, Wang S. Prevalence of positive serology for acute *Chlamydia pneumonia* infection in emergency department patients with persistent cough. *Acad Emerg Med* 1997;4:179-83.
 14. Birkebaek NH, Jensen JS, Seefeldt T, Degn J, Hunniche B, Andersen PL, et al. *Chlamydia pneumonia* infection in adults with chronic cough compared with healthy blood donors. *Eur Respir J* 2000;16:108-11.
 15. Miyashita N, Fukano H, Yoshida K, Niki Y, Matsu-shima T. *Chlamydia pneumonia* infection in adult patients with persistent cough. *J Med Microbiol* 2003; 52:265-9.
 16. Menendez R, Cordoba J, Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-hontagas JL, Slavert M, et al. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1868-73.
-