

## 장티푸스의 혈청학적 진단을 위한 Vi-수동혈구응집법, SD<sup>®</sup> Kit 및 Widal 시험에 대한 효용성 평가

김성훈<sup>1</sup> · 김석호<sup>2</sup> · 이덕용<sup>1</sup> · 이에스더<sup>1</sup> · 박미선<sup>1</sup> · 이복권<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립보건연구원 장내세균과, <sup>2</sup>경북대학교 의과대학 미생물학교실

## Evaluation of Vi-Passive Hemagglutination, SD<sup>®</sup> Kit, and Widal Test for Serological Diagnosis of Typhoid Fever

Sung Hun Kim<sup>1</sup>, Shukho Kim<sup>2</sup>, Deog Yong Lee<sup>1</sup>, Esther Lee<sup>1</sup>, Mi Sun Park<sup>1</sup>,  
and Bok-Kwon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Disease, National Institute of Health,  
Seoul 122-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Republic of Korea

(Received February 11, 2010/Accepted March 23, 2010)

In this study, we evaluated Vi-passive hemagglutination (Vi-PHA), SD *Salmonella* Typhi IgG/IgM (SD<sup>®</sup> kit) and Widal test for the rapid laboratory diagnosis of typhoid fever patients. A total of 36 serum samples from febrile patients in Korea from 2005 to 2006 were used. Among 36 patients, 27 were fever patients without typhoid, 9 were typhoid fever. Vi-PHA showed 8 positive results out of 9 typhoid fever patients (sensitivity 88.9%) and 1 positive and 26 negative results out of 27 febrile patients without typhoid (specificity 96.3%). The sensitivity and the specificity of SD<sup>®</sup> kit were 100% and 92.6%, respectively. However, the sensitivity and the specificity of Widal O & H tests were 88.9%, 100%, and 77.8%, 70.4%, respectively. Consequently, Widal H and SD<sup>®</sup> kit showed higher sensitivity and Vi-PHA showed higher specificity. To efficient diagnosis, Vi-PHA may be sufficient diagnosis method in acute cases and SD<sup>®</sup> kit and Widal test may be sufficient in sporadic area and high risk group.

**Keywords:** serological diagnosis, SD<sup>®</sup> kit, typhoid fever, Vi-PHA, Widal test

장티푸스는 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (이하 *S. Typhi*) 균의 감염에 의해 유발되는 질병이다. 장티푸스의 주요 증상은 고열, 상대적인 서맥, 두통, 오한, 설사 후 변비, 홍반, 간비장종대 등의 다양한 형태로 나타나기 때문에 초기 진단 시 어려움이 있다(8). 또한 비 장티푸스성 살모넬라와는 다르게 사람만이 유일한 병원소로 알려져 있다. 장티푸스는 임상적으로 유사한 질병이 많고, 세균학적으로 진단되지 않는 경우가 많아 그 정확한 발생률은 알 수가 없지만, 법정전염병신고 자료를 토대로 우리나라의 장티푸스 발생 현황을 보면 10만명당 10명 이상의 높은 이환율을 보이다가 1970년대 말이 되어서야 10만명당 1명 이하로 줄었다(16). 1990년 이후에는 장티푸스가 10만명당 평균 0.74명으로 감소되고 비 장티푸스성 살모넬라증이 대부분을 차지하게 되어 선진국형으로 변화되고 있는 상황이지만(16), 전염병 웹통계시스템

(<http://stat.cdc.go.kr>)을 통한 확인 결과 2002년 이후에도 여전히 장티푸스환자가 매년 200명 이상 지속적으로 발생하고 있어 이에 대한 조기 감별 진단이 여전히 중요하다. 미신고 사례를 감안할 때 현재의 장티푸스 발생률은 10만명당 1명 이상으로 추정된다.

현재 국내 대부분의 병원에서는 열성질환으로 내원한 환자에 대하여 기본적으로 Widal O & H 시험을 실시하고 있고, 균체항원(O)에 대한 역가와 편모항원(H)에 대한 역가가 높은 환자를 대상으로 배양검사를 실시하여 장티푸스 균이 검출되면 장티푸스 환자로 신고하고 있으며, 장티푸스 균이 검출되지 않았지만 임상적인 증상이 일치한 경우 의사환자, 임상적인 증상 없이 균이 검출되면 병원체 보유자(보균자)로 보건소에 신고하고 있다(2007 법정전염병 진단. 신고 기준). 장티푸스의 확인진단은 배양검사를 통한 균 분리가 가장 중요하나 시간적인 소모와 잦은 항생제의 사용으로 인하여 균양성율의 감소가 나타나고 있으며(14), 혈청형확인을 위한 O (Group D; 9.12[Vi])

\* For correspondence. E-mail: bokrates@hanmail.net; Tel: +82-2-380-2981; Fax: +82-2-352-4767

**Table 1.** Results of serological tests. Vi-PHA, SD<sup>®</sup> kit, and Widal test on typhoid patients and non-typhoid febrile patients

Patients (N)	Vi-PHA (%)		SD <sup>®</sup> kit (%)		Widal test (%)			
	Positive	Negative	Positive	Negative	Widal O (≥160)		Widal H (≥160)	
					Positive	Negative	Positive	Negative
Typhoid patients (9)	8 (88.9)	1 (11.1)	9 (100)	0 (0)	8 (88.9)	1 (11.1)	9 (100)	0 (0)
Non-typhoid febrile patients (27)	1 (3.7)	26 (96.3)	2 (7.4)	25 (92.6)	6 (22.2)	21 (77.8)	8 (29.6)	19 (70.4)

& H (single factor d) 항원의 확인까지는 3일에서 5일의 시간이 소요되기 때문에 감염 초기에 효과적으로 사용할 수 있는 항체 진단법이 필요하다.

현재 국내에서 사용되고 있는 항체 진단법인 Widal 시험법은 O & H 항체역가를 제품의 기준인 1:160 이상으로 할 경우 양성률은 37.3%로 낮게 나타나며, H 항체 역가를 1:320 이상으로 할 경우 69.7%로 다소 높은 양성률을 나타내는 것으로 보고되었다(7). 과거 1980년대의 진단 기준에 비하여 유의수준이 높아졌으나 우리나라에서는 아직 진단적 유의성이 낮은 것으로 보고되고 있다(11). 한편 1987년 국내에서 보고된 자료에 따르면 장티푸스 균의 항체 진단 시 Vi 항원에 대한 항체 진단이 효율적이며, 감염 초기에도 Vi에 대한 항체 검출이 가능함이 확인되었다(6). Vi 항원을 이용한 항체 진단법에는 Vi-수동 혈구응집법(Vi-Passive hemagglutination assay, Vi-PHA) (5), 간접면역형광항체법(indirect fluorescent antibody test, IFAT) (3), 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (4) 등이 있으며, 장티푸스균의 *rfbE*, *rfbS*, *fliC* 등의 유전자를 검사하는 중합효소연쇄반응법(Polymerase chain reaction, PCR) (9)이 소개되고 있다. 저자들은 배양검사의 보조검사법으로써 장티푸스 환자 및 보균자의 효율적인 혈청학적인 실험실 진단을 위해 Widal O & H 검사, Vi-PHA 그리고 SD<sup>®</sup> kit 시험에 대한 비교를 통하여 각 시험법에 대한 효용성에 대해 고찰해 보고자 하였다.

2005년부터 2006년까지 서울지역 6개 3차 의료기관과 서울, 경기지역 보건소를 통하여 장티푸스 의심환자의 혈액검체를 수집하여 시험을 수행하였다. 전체 36건의 혈액 검체를 수집하였으며, 검체는 내원시 채혈된 혈액을 수집하였다. 장티푸스 확진환자는 9명이었고, 비장티푸스성 열성환자는 27명이었다. 환자력이 확인된 28명에 대한 조사결과 남성은 12명(42.9%), 여성은 16명(57.1%)으로 여성이 더 많았으며, 연령대는 8세부터 78세로 확인되었다. 20세에서 30세 사이가 7명(25%)으로 가장 많았다. Vi-PHA 시험을 위한 캡슐항원(Vi)은 국제 백신 연구소(International vaccine institute; IVI)에서 분양 받아 사용하였으며, 양 혈액은 식품의약품안전청의 실험동물자원과로부터 분양 받아 사용하였다. 실험은 Csizmas (2)와 Takeshi et al. (15)의 방법에 따라 수행하였다. 양의 적혈구(Sheep red blood cell; SRBC)를 formalin 용액으로 고정하고 0.5% tannic acid 용액으로 감작한 후 Vi 항원(10 µg/ml)이 들어있는 buffer B (pH 6.4) 용액과 혼합하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 1% fatal bovine serum이 들어있는 PBS로 4°C에서 2일간 정치 후 시험에 사용하였다. 항체 진단 시험은 PBS 25 µl가 들어있는 96 well round bottom plates (Corning Coaster, USA)에 25 µl

의 혈청을 순차적으로 희석한 후 25 µl의 Vi 항원 감작혈구를 떨어뜨리고 상온에서 2시간 반응한 후 응집 결과를 확인 하였다. 양성한계점은 희석배수 1:32 이상으로 설정하였다. SD<sup>®</sup> kit 시험은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 혈청처리 후 15분에서 30분 동안 kit의 색 변화를 관찰하여 IgM 또는 IgG 두 개의 검사선 중 하나 이상에서 발색 반응이 나타난 경우 양성으로 판정하였다. Widal O & H 시험은 *Salmonella* Typhi-O Group D Somatic antigen과 *Salmonella* Typhi-H Flagellar antigen (Remel Inc., USA)을 이용하여 속성 슬라이드 글래스 법으로 수행하였다. 제조사 매뉴얼에 따른 진단기준인 O 항체 역가 1:160 이상 또는 H 항체 역가 1:1160 이상을 양성으로 판정하였다. 세가지 시험법에 대한 민감도와 특이도에 대한 통계학적인 분석은 Fisher's exact를 이용하였다. 유의수준은  $P$  value<0.05의 값으로 판단하였다.

장티푸스 확진환자에서 분리된 혈청 9건에 대한 Vi-PHA 시험결과 8건에서 1:32 이상에서 응집이 확인되었으며, 1건은 음성으로 확인되었다. SD<sup>®</sup> kit과 Widal 검사에서는 9건 모두 양성으로 확인되었다. 장티푸스 의심환자혈청 27건에 대한 Vi-PHA 시험에서는 1건의 양성을 제외한 26건에서 모두 1:16 이하로 확인되었으며, 미응집은 11건에서 나타났다. SD<sup>®</sup> kit에서는 2건의 위양성이 관찰되었고, Widal O 검사에서는 6건(22.2%)에서 1:160 이상의 위양성이 확인되고, Widal H는 8건(29.6%)에서 위양성이 확인되었다(Table 1). 민감도(sensitivity; 양성환자에 대한 검사법의 양성률)와 특이도(specificity; 음성환자에 대한 검사법의 음성률)는 비장티푸스성 열성질환 환자의 혈청을 정상균으로 설정하여 확인하였다. Vi-PHA는 환자 혈청 9건 중 양성 8건으로 민감도 88.9% ( $P<0.001$ ; Fisher's exact test), 비 장티푸스성 열성환자 27건 중 1건이 양성을 보여 특이도 96.3%로 나타났다. SD<sup>®</sup> kit는 9건 중 양성 9건으로 민감도 100% ( $P<0.001$ ), 열성환자 27건 중 2건이 양성을 보여 특이도 92.6%로 나타났다. Widal (O & H) 시험은 확진환자 혈청 9건 중 Widal O는 8건에서 1:160 이상으로 나타나 민감도 88.9% ( $P=0.001$ ), 열성환자 27건 중 양성 6건으로 특이도 77.8%로 나타났다. Widal H는 확진환자 모두 1:160 이상으로 나타나 민감도 100% ( $P<0.001$ ), 열성환자 27건 중 양성 8건으로 특이도 70.4%로 확인되었다(Table 2).

본 연구에서는 장티푸스 환자 혈청 그리고 비 장티푸스성 열성환자 혈청을 대상으로 현재 병원에서 사용되고 있는 Widal O & H 시험과 Vi 항원에 대한 항체를 확인하는 Vi-PHA, SD<sup>®</sup> kit을 사용하여 실험실적 진단의 효율성을 확인하여 보았다. 결과에 나타난 것처럼 Vi-PHA, SD<sup>®</sup> kit, Widal H 검사법은 모두 높은 민감도를 나타내었다. 기존 문헌들의 보고와는

**Table 2.** Sensitivity and specificity of Vi-PHA, SD<sup>®</sup> kit and Widal O & H test to serological diagnosis of typhoid fever

Comparison (No.)	Vi-PHA (%)	SD <sup>®</sup> kit (%)	Widal O (%)	Widal H (%)
Sensitivity (9)	88.9 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	88.9 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Specificity (27)	96.3	92.6	77.8	70.4

<sup>a</sup> Sensitivity is significantly different from patients with typhoid fever & carrier ( $P \leq 0.001$ ; Fisher's exact test)

다르게 Widal O & H 시험의 민감도가 높게 나타났으며(7), 검체 수집 대상지역이 장티푸스 발생이 많은 서울 경기지역으로 장티푸스 유행 지역에서는 Widal 시험의 민감도가 높게 나타난다는 보고자료와 일치한다(10). 반면 특이도는 Vi-PHA가 가장 높게 나타났으며, Widal O & H 시험의 특이도는 77.8%, 70.4%로 다소 낮은 것으로 확인되었다. Widal 시험의 O와 H의 항체역가를 공통으로 적용했을 때 특이도는 63%로 더 낮게 나타났으며, H 항체역가를 1:320 이상으로 적용하면 특이도를 81.5%로 높일 수 있다. 최근 2007년 방글라데시에서 실시한 시험결과에 따르면, 243명의 환자를 대상으로 한 시험에서 Widal 시험은 민감도 81.8%, 특이도 69.2%로 나타나 Widal 시험이 민감도는 높고, 특이도는 낮은 것으로 보고되었다(13). 결과적으로 세가지 시험법의 민감도는 SD<sup>®</sup> kit와 Widal H가 가장 높은 것으로 확인되었고, 특이도는 Vi-PHA가 가장 높은 것으로 확인되었다.

Vi-PHA 시험법은 처음 준비 과정이 다소 번거롭지만 제조 후 보관이 용이하며, 장시간 사용할 수 있다. 또한 과거 보균자의 진단을 위하여 많이 사용되었고, 특별한 장비 없이 간편하고, 쉽게 사용할 수 있기 때문에 각 지역의 시험기관이나 보건소에서 실시하는 기왕력자(과거 장티푸스 병력이 있는 사람)에 대한 보균검사에 유용하게 사용할 수 있으며(1), 면역크로마토그래피법인 SD<sup>®</sup> kit 역시 Vi 항원에 대한 항체를 확인하는 상품화된 진단 디바이스로 간편하고 신속하게 결과를 얻을 수 있어 앞으로 병·의원 등에서 *S. Typhi* 감염증의 신속한 진단이 요구되는 상황에서 배양검사와 함께 보조적으로 사용할 수 있는 검사법이다(13). Vi 항원은 2,500개 이상의 살모넬라 혈청형 중 *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Paratyphi C* 혈청형에서만 존재하는 것으로 알려져 있으며, *S. Dublin*, *S. Paratyphi C*는 국내 인체감염 사례를 찾아볼 수 없다. 또한, 항체 검사 시 장티푸스균이 속한 O 항원 그룹 D (factor 9, 12) 혈청형(*S. Enteritidis*, *S. Panama* 등)과의 비특이적인 교차반응을 최소화할 수 있는 장점이 있다. Vi 항원의 발현은 *OmpR*, *EnvZ* 유전자에 의하여 조절되고 있으며, 실험실 분리 배양 시 Vi 항원이 소실되거나 다시 나타나는(V-W 변이) 이유는 배양조건이나 삼투압의 변화에 의한 것으로 알려져 있다(12).

결론적으로, 세가지 혈청검사법을 이용한 장티푸스 환자 및 보균자에 대한 현실적인 혈청학적 진단 기준은 Widal 시험의 진단 수준을 O 항체 역가 보다는 H 항체 역가에 진단수준을 맞추고, Vi 항체를 확인하기 위하여 Vi-PHA 또는 SD<sup>®</sup> kit를 보조적으로 사용하는 것이 가장 효과적일 것으로 생각된다. 장티푸스 유행지역에서는 특이도가 높은 Vi-PHA로 검사를 수행하고, 장티푸스 비 유행지역과 고위험군에 대하여는 민감도가 높은 Widal H와 SD<sup>®</sup> kit를 적용하는 것이 진단의 유의수준을

높일 수 있을 것으로 판단된다.

## 적요

본 연구는 장티푸스 환자에 대한 혈청학적 시험법인 Vi-PHA, SD<sup>®</sup> kit, Widal 시험(O & H)에 대하여 평가를 위해 수행하였다. 2005년부터 2006년까지 수집된 36건의 혈청검체를 대상으로 하였으며, 9건은 배양검사를 통하여 장티푸스균이 검출된 확진환자의(Typhoid fever) 검체이며, 27건은 비장티푸스성 열성환자의(Non-typhoid fever) 검체이다. 시험결과 Vi-PHA는 환자 혈청 9건 중 양성 8건으로 민감도 88.9% ( $P < 0.001$ ; Fisher's exact test), 비장티푸스성 열성환자 27건 중 1건이 양성을 보여 특이도 96.3%로 나타났다. SD<sup>®</sup> kit는 민감도 100% ( $P < 0.001$ ), 특이도 92.6%로 나타났다. Widal (O & H) 시험의 민감도는 각각 88.9% ( $P = 0.001$ ), 100% ( $P < 0.001$ ), 특이도는 77.8%, 70.4%로 나타났다. 민감도는 SD<sup>®</sup> kit와 Widal H 검사법이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 특이도는 Vi-PHA가 가장 높게 나타났다. 장티푸스의 효과적인 혈청학적 진단을 위하여 급성 또는 유행지역에서는 특이도가 높은 Vi-PHA로 검사를 수행하고, 장티푸스 비 유행지역과 고위험군에 대하여는 민감도가 높은 Widal H와 SD<sup>®</sup> kit를 적용하는 것이 진단의 유의수준을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 말

본 연구는 질병관리본부 토착화·질환퇴치사업의 시험연구비를 이용하여 수행한 연구결과이며 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

- Bao, X., J. Qiu, N. Yang, L. Mei, and X. Chen. 1992. Study and preparation of Vi-PHA reagent and its application for detection of *Salmonella typhi* carriers. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.* 32, 289-295.
- Csizmas, L. 1960. Preparation of formalized erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 157-160.
- Doshi, N. and A.G. Taylor. 1984. Comparison of the Vi indirect fluorescent antibody test with the Widal agglutination method in the serodiagnosis of typhoid fever. *J. Clin. Pathol.* 37, 805-808.
- Hwang, S.C., J.M. Kim, E. Kim, C.S. Hong, J.H. Kim, and O.H. Kwon. 1987. A study of the usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using LPS antigen in the early diagnosis of typhoid fever. *Korean J. Infect. Dis.* 19, 107-116.
- Kang, G., G. Sridharan, M.V. Jesudason, and T.J. John. 1992. Evaluation of modified passive haemagglutination assay for Vi antibody estimation in *Salmonella typhi* infections. *J. Clin. Pathol.* 45, 740-741.

6. Kim, J.M., E. Kim, and C.S. Hong. 1987. Vi-indirect Fluorescent-antibody test (Vi-IFAT) in the diagnosis of typhoid fever. *Korean J. Intern. Med.* 33, 753-761.
7. Kim, S.E., S.K. Kim, I.K. Park, J.O. Kang, and T.Y. Choi. 1999. Is the Widal test still useful?. *Korean J. Lab. Med.* 19, 215-221.
8. Lee, C.K., S. Lee, J.K. Choi, and S.T. Lee. 2001. Usefulness of Widal test in the diagnosis of typhoid fever. *Korean J. Infect. Dis.* 33, 206-209.
9. Moon, J.Y., Y.B. Kim, and C.L. Chang. 2007. Genomic characteristics and identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A using multiplex PCR. *Korean J. Clin. Microbiol.* 10, 6-13.
10. Pang, T. and S.D. Puthuchery. 1983. Significance and value of the Widal test in the diagnosis of typhoid fever in an endemic area. *J. Clin. Pathol.* 36, 471-475.
11. Park, M.H. and H.J. Kwon. 1985. Reassessment of the Widal test in the diagnosis of typhoid fever. *J. Clin. Pathol. Qual. Control.* 7, 79-86.
12. Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan, and S. Chatfield. 1994. Characterization of defined ompR mutants of *Salmonella typhi*: ompR is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect. Immun.* 62, 3984-3993.
13. Rahman, M., A.K. Siddique, F.C. Tam, S. Sharmin, H. Rashid, A. Iqbal, S. Ahmed, G.B. Nair, C.L. Chaignat, and P.L. Lim. 2007. Rapid detection of early typhoid fever in endemic community children by the TUBEX O9-antibody test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58, 275-281.
14. Robertson, R.P., M.F. Wahab, and F.O. Rassch. 1968. Evaluation of chloramphenicol and ampicillin in *Salmonella enteric fever*. *N. Engl. J. Med.* 278, 171-176.
15. Takeshi, K. and J.Y. Homma. 1978. Passive hemagglutination reaction using formalinized sheep erythrocytes treated with tannic acid and coated with exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Exp. Med. Dec.* 48, 497-501.
16. Yoo, S., H. Pai, J.H. Byeon, S. Kim, and B.K. Lee. 2004. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Typhi infections in Korea for recent 9 years: Trends of antimicrobial resistance. *J. Korean Med. Sci.* 19, 15-20.