

면역혈청학적 흡충류 검사법의 특이도 및 민감도 비교

고신대학 의학부 기생충학교실
옥 미 선

Comparative Study on the Specificity and the Sensitivity of Immunoserologic Tests for Trematodes

Mee-Sun Ock

*Department of Parasitology
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

=Abstract=

To study the specificity and the sensitivity of immunodiagnostic tests for 3 closely related species of trematodes, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*, *Fasciola hepatica* were used as antigens. Antisera of 13 clonorchiasis patients, 5 paragonimiasis patients, 1 fascioliasis patients, and 11 normal adults human sera were applied.

Clonorchis antigen and antibody reaction in double-diffusion was weak, and only 23% among patients was positive. But paragonimiasis antisera-antigen reaction was very clear and 4 of 5 was positive. Clonorchiasis antisera-antisera was 100% positive in micro-ELISA, but clonorchis antigen, paragonimus antigen, fasciola antigen-fascioliasis antisera reaction was also 100% positive.

In dot-ELISA, clonorchis antigen-antisera was 11 patients positive among 13 patients, but reaction of clonorchis antigen-paragonimus antisera was also 3 positive among 5 patients. Paragonimus antigen-clonorchis antibody never reacted, but 1 of 5 normal human sera reacted with clonorchis and paragonimus antigen. And fasciola antigen made cross-reaction with paragonimiasis patient sera and 10 of 13 clonorchiasis patient sera.

In this experiments, although there was no cross-reactivity in double-diffusion, sensitivity was low. Micro and Dot-ELISA had high sensitivity, but specificity was low. And it was considered that the app-

repiate mixture of 3 kinds of test will produce the good results.

Key Words : Trematodes, Specificity, sensitivity, Immunodiagnosis

서 론

흡충류의 감염여부를 밝히는 검사법에는 분변에서의 충란검사법을 비롯하여 여러가지 면역학적인 방법들이 아울러 사용되어져 왔다^{9,10,11}), 그러나 이러한 면역혈청학적 진단법은 민감도(sensitivity)^{5,6,7}) 및 비특이항원으로 인한 다른 기생충과의 교차반응⁸)에 있어서 큰 차이를 보이므로 이러한 차이를 검사방법별로 알아보기 위하여 밀접하게 연관된 3종의 흡충류, 간흡충(*Clonorchis sinensis*), 폐흡충(*Paragonimus westermani*), 및 간질(*Fasciola hepatica*)을 항원으로 micro-ELISA, double-diffusion, dot-ELISA를 시행한 후 비교 검토하였다.

재료 및 방법

항혈청 : 대변검사에서 충란이 검출된 감흡충증환자 13명의 항혈청과 1명의 간질증환자, 폐흡충증환자 5명 및 정상인 11명의 혈청을 실험에 사용하였다.

항원 : 3종의 흡충류는 김 과 양⁴)의 방법을 참고하여 충체를 homogenizer로 균질화시킨 다음 0.01m PBS(pH 7.2)용액에서 원심분리(15,00rpm/15min./4℃)하여 조항원으로 사용하였다. 조항원의 단백질을 Bradford⁴)의 방법에 따라 BioRad Protein Assay Reagent(Richmond, California)를 사용하여 정량하였다.

Double-Diffusion : Sun과 Gibson¹)의 방법을 참고하여 0.01% agarose로 slide glass 위에 gel 층을 만들고 well punch로 직경 3.0 mm의 well을 만들어 항원과 항체를 채우고

습기가 충분한 상자속에 넣어 실온에서 48시간 두었다가 생리식염수로 48시간 세척한 다음 Amido Black으로 30분간 염색하여 관찰하였다.

Micro-ELISA : 3종 흡충류의 조항원(1μg/ml)을 polystyrene plate(Falcon)에 coating하기 위하여 4℃에서 하룻밤 지난 후 PBS-0.05% Tween 20로 3번 세척후 20% FCS-PBS로 1시간 blocking하고 다시 3번 세척하였다. 항혈청을 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1,1000로 희석하여 37℃, 1시간 배양한 후 3번 세척하고, 1 : 500으로 희석한 Anti-Human Peroxidase conjugated Rabbit Immunoglobulin G(Serotec.)로 37℃, 1시간 배양후 다시 세척하였으며 기질[3,3'-diaminobenzidine(Sigma) + H₂O₂]로 30분 처리하여 발색시켜 관찰하였다.

Dot-ELISA : 1cm² 크기로 나눈 Nitrocellulose paper(Schleicher & Schuell)위에 조항원(3μg/ml)을 2ul/cm²씩 떨어뜨린뒤 실온에서 30분간 둔 다음 PBS-1% BSA-0.05% Tween 20로 처리하여 5분간 말린다. 1 : 500으로 희석한 항혈청 2ul를 가한 후 습기가 충분한 상자속에 30분간 두었다가 washing buffer로 서너번 씻어 1 : 500으로 희석한 Anti-Human Peroxidase conjugated Rabbit Immunoglobulin G (Serotec)를 실온에서 30분 처리하고 다시 세척하여 기질(dimethoxybenzidine-0.01% H₂O₂)을 첨가하면 15분이내에 발색하였다.

결과 및 고찰

Double-Diffusion : 감흡충항원과 항혈청을

Table 1. Cross-reactivity of Clonorchiasis, Paragonimiasis, and fascioliasis by ELISA

antigen\antibody	clonorchis	fasciola	
clonorchis	7/13(54%)	3/5(60%)	1/1(100%)
paragonismus	1/13(8%)	5/5(100%)	1/1(100%)
fasciola	2/13(15%)	4/5(80%)	1/1(100%)

사용한 결과 13명의 환자 중 3명(23%)에 서만 양성으로 확인되었고, 폐흡충항원 및 간질증항원을 간흡충항혈청으로 반응시킨 경우에는 전혀 양성반응을 볼 수 없었다. 또 폐흡충 항혈청과 항원의 반응에서는 5명중 4명에서 강한 밴드를 나타내었고, 폐흡충 항 원과 간흡충항혈청의 경우에는 전혀 반응을 볼 수 없었다. 또 간질항원과 다른 항혈청과 의 교차반응도 찾아볼 수 없었다. double-di- fusion의 결과에서는 높은 특이도는 인정되 나 타 실험법에 비하여 민감도는 떨어지는 것으로 나타났다.

Micro-ELISA

Micro-ELISA를 실시하기 위하여 3종의 흡 충류항원을 각 well당 1ug/ml로 coating하였 고 항혈청은 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1,000의 희석배수로 실험하여 표1과 같은 결과를 얻 었다.

11명의 정상인 혈액의 경우 (1 : 500 희 석), 평균흡광도(mean absorbance)는 간흡 충항원에서는 0.22, 폐흡충항원에서는 0.11, 간질항원에서는 0.26이었고 표준편차(S. D.)는 각각 0.12, 0.18, 0.10으로써, cut-off 지점은 평균 +3xS. D.로 계산하여 0.59, 0. 35, 0.57로 결정하였다.

간흡충 항혈청은 간흡충 항원으로 반응시 킨 결과 54% 양성율을 보였는데, 이는 dou- ble-diffusion의 결과보다도 2배 이상 높은것 으로 나타났다. 그러나 간흡충항원으로 폐흡 충환자의 혈청을 반응시키면 60%의 위양성 율을 보여 민감도는 인정되나 특이성에 문 제가 있음을 나타내고 있다. 그러나 김 등²⁾ 이 Indirect hemagglutination test로 시행한

결과에서는 위양성율이 18.2%로 보고되어 본실험에서와 큰 차이를 보였다. 이러한 차 는 항원의 분리과정과 실험방법의 차에서 비롯되는 것으로 생각되었다. 간질증환자의 혈청은 간흡충 및 폐흡충 항원 모두에서 양 성으로 나타났으며, 폐흡충증환자의 혈청도 간질항원에 대하여 높은 양성반응을 나타내 었다. 그러나 간질증 항혈청에 관한 결과는 보다 많은 수의 항혈청을 마련하여 재시도 하여야 할 것으로 생각되었다. 이번 실험의 결과에서는 micro-ELISA 검사법을 흡충류 검사에 이용하기 위해서는 보다 정제된 항 원을 사용하는 것이 필요할 것으로 생각되 나 김 등¹¹⁾은 단클론항체로 정제된 항원을 사 용하였을 경우에는 특이도는 증가하나 민감 도는 오히려 떨어지는 것으로 보고한 바가 있고 용 등¹²⁾은 단클론항체를 이용한 ELISA-inhibition test에서 민감도와 특이도 모두를 향상시켰다고 보고하고 있어 차이를 보이고 있다.

dot-ELISA

각 흡충의 항원을 0.1ug/ml/cm² 사용한 후 3종의 흡충에 대한 항혈청과 정상혈청을 1 : 500으로 희석하여 dot-ELISA를 시도하였 다. 간흡충항원과 한흡충항혈청의 반응에서 는 13명중 11명에서 양성반응(+)을 나타내 었으나 폐흡충항혈청에 대해서도 5명중 3명 에서 양성반응(+)을 볼 수 있었고, 특히 3 명중 1명의 항혈청과는 간흡충 항혈청에서 보다 더욱 강한 양성반응(++)을 나타내었 다. 폐흡충 항원은 간흡충항혈청과는 전혀 교차반응을 나타내지 않았으나 간질항원은 13명중 10명에서 위양성으로 반응하였다.

Table 2. Comparision of Sensitivity among 3 kinds of Immunodiagnostic test

tests			
Ag-Ab	Double-Diffusion	Micro-ELISA	Dot-ELISA
C.s Ag*—C.s Ab	3/3(23%)	7/13(54%)	8/13(62%)
P.w Ag—P.w Ab	4/5(80%)	3/ 5(60%)	5/ 5(100%)
#			
F.h Ag@—F.h Ab	ND	1/ 1(100%)	1/ 1(100%)

Table 3. Comparision of Sensitivity among 3 kinds of Trematodes and Antisera.

tests			
reaction	Double-Diffusion	Micro-ELISA	Dot-ELISA
C.s Ag—P.w Ab	0/ 5(0%)	3/ 5(60%)	3/ 5(60%)
C.s Ag—F.h Ab	N.D.	1/ 1(100%)	0/ 1(0%)
P.w Ag—C.s Ab	0/13(0%)	1/13(8%)	0/13(0%)
P.w Ag—F.h Ab	N.D.	1/ 1(100%)	0/ 1(0%)
F.h Ag—C.s Ab	0/13(0%)	2/13(15%)	10/13(77%)
F.h Ag—P.w Ab	0/ 5(0%)	4/ 5(80%)	5/5(100%)
C.s Ag—N. Ab			1/ 5(20%)
P.w Ag—N. Ab			1/ 5(20%)
F.h Ag—N. Ab			1/ 5(0%)

또 정상인 5명중 1명은 항원과 폐흡충 항원에 대하여 각각 위양성반응을 나타내었다.

실험에 사용한 3종류의 실험법과 각 흡충류의 항원-항체반응의 민감도를 비교해 보면 (표2) 간흡충과 폐흡충에서는 dot-ELISA 검사법이 민감도가 가장 높은 것으로 나타났으나 정상인중에서 5명중 1명이 위양성반응을 나타내었다.

3종류의 실험방법을 이용하여 흡충류 상호간의 교차반응 즉, 특이도를 비교하면 표3에 나타난 바와 같이 Double-Diffusion에서는 교차반응은 전혀 찾아볼 수 없었고, micro-ELISA에서는 간흡충 항원을 사용한 경우에는 다른 종류의 항혈청에 대하여 높은 교차반응을 보였으나 폐흡충항원을 사용하여 간흡충을 진단한 경우에는 8%로 낮게 나타났다. 이상의 실험결과로 볼 때 3종의 실험법 모두 특이도와 민감도에 한계를 가

지므로 세가지 방법을 필요에 따라 적절히 혼용하면 좋은 결과를 얻었을 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

Double-Diffusion, Micro-ELISA, Dot-ELISA 등의 방법으로 3종의 흡충류, 간흡충, 폐흡충, 간질을 진단한 결과 특이도는 Double-Diffusion에서 높은 것으로 나타났으나 민감도는 떨어졌고, Micro와 Dot-ELISA는 민감도는 높았으나 특이도가 낮은 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microg-

- ram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal Biochem 72 : 248, 1976
2. Kim TS, Joo KH, and Rim HJ : Evaluation of indirect hemagglutination test with adults worm antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis. Korea Univ Med J 24 : 197, 1987
3. Kim TS, Kang SY, Cho SY, Hwang ES, and Cha CY : Purification of cystic fluid antigen of *Taenia slium* metacystodes by affinity chromatography using monoclonal antibody and its antigenic characterization. Korea J Parasit 24 : 145, 1986
4. Kim CH, Yang J : Immunological characterization of antigen from cysticercus and sparganum, and their application to the development of immunodiagnostic system. 2. Immunological characterization of crude antigenic components from sparganum. Korea J Zool 32 : 429, 1989
5. Kwon KH, Lee JS, and Rim HJ : The use of IFAT in the diagnosis of human clonorchiasis. Korea Univ Med J 21 : 495, 1984
6. Lee OR, Ahn WS : Studies on the immunodiagnosis of rabbit clonorchiasis 1. ELISA by whole worm extract crude antigen. J Soonchunhyang Coll 10 : 409, 1987
7. Sadun EH, Walton BC, Buck AA, and Lee BK : The use of purified antigen in the diagnosis of clonorchiasis sinensis by means of intradermal and complement fixation test. J Parasit 45 : 129, 1959
8. Schantz MP, Shanks D, and Wilson M : serologic cross reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am J Trop Med Hyg 29 : 609, 1980
9. Sirisinha S, Sahassananda D, Bunnag D, and Rim HJ : Immunological analysis of *Ppisthorchis* and *Clonorchis* antigens. J Helminthol 64 : 133, 1990
10. Sun T, Gibson JB : Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. An analysis by gel diffusion technique. Am J Trop Med Hyg 18 : 241, 1969.
11. Yang JS, Lee JS, and Rim HJ : The use of ELISA in the diagnosis of human clonorchiasis. Korea Univ Med J 20 : 201, 1983.
12. Youn TS, Im KI, and Chung PR : Analysis of *Clonorchis sinensis* antigens and diagnosis of clonorchiasis using monoclonal antibodies. Korea J Parasit 29 : 293, 1991