

## 간흡충증에 있어서 항체검출을 위한 Enzyme-linked Immunosorbent Assay와 Thin Layer Immunoassay의 비교

연세대학교 의과대학 기생충학교실

李用基 · 柳在淑 · 李根泰

한양대학교 의과대학 기생충학교실

任 敬 一

### 서 론

간흡충증 진단을 위하여 환자혈청에서 항체를 검출하는 여러가지 면역진단방법이 소개되고 있다. 피내반응(Sadun *et al.*, 1959), 간접형광항체법(任, 1974) 및 효소표식면역법(李등, 1981)등을 이용한 면역방법들이 실제 이용되고 있다. 간흡충 증체는 항원성이 매우 복잡하여 특이 항원을 찾아내어 이를 제조하기는 용이하지 않다. 어느 면역학적 진단방법이든간에 항원제조 방법에 따라 감수성, 특이성, 또는 재현성에 있어 그 결과가 다양할 것으로 생각된다.

최근 Elwing등(1976)에 의해 소개된 thin layer immunoassay(TIA)는 그 방법이 간단하고 특별한 실험기구나 특수한 시약이 필요 없고, 그 결과 판정도 간단하여 신속하게 얻을 수 있고 비용이 적게들어 대단히 집단검사에 사용될 수 있는 방법이라고 사료된다. Ismail등(1979)과 Nilsson등(1980a)은 주혈흡충증에서 면역진단방법으로서 TIA를 적용하였다. 또한 Nilsson등(1980b)은 TIA를 이용하여 이질아메바에 대한 항체를 검출하였다. 任(1983)은 간흡충증 환자를 대상으로 그 혈청에서 항체를 검출하기 위하여 TIA를 사용하였다.

본 연구는 TIA를 사용하여 간흡충증 환자의 혈청에서 항체를 정량적으로 검출하여 감수성과 특이성을 검토하고 효소표식면역법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의한 성적과 비교하고자 한다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 간흡충 성충

간흡충증 만연지역에 서식하는 담수어를 채집하여 인공위액(pepsin 0.3 g, 농염산 0.7ml, 생리식염수

100ml)를 가하고 36°C 수조에서 1~2시간 동안 방치하여 담수어 근육을 소화시켰다. 원심 침전하여 그 침사에서 간흡충 메타세르카리아를 확인하였다. 생리식염수로 2~3회 세척한 메타세르카리아를 건강한 가토에 경구적으로 위내로 주입시켜 감염시켰다. 주입 2개월후 가토의 간장을 적출하여 그 담도로부터 간흡충 성충을 분리하였다.

#### 2. 간흡충 항원

간흡충 성충을 냉동 건조시켜 李등(1981)의 방법으로 생리식염수 추출물을 제조한 후 4°C 증류수에서 48시간 투석하여 항원으로 사용하였다. 이 생리식염수 추출물 항원의 단백질 함량은 2.87mg/ml이었다.

#### 3. 간흡충증 환자 선정

간흡충 감염 여부를 확인하기 위하여 본문을 formalin-ether 원심 침전법으로 검사하였다. 이렇게 확인된 간흡충증 환자 60명, 건강대조군 24명, 아메바증 환자 20명, 폐흡충증 환자 16명과 특소플라스마증 환자 11명의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였으며 -70°C에 보관하였다가 사용하였다.

#### 4. 혈청내 Immunoglobulin G의 정량측정

혈청내 IgG의 정량적 측정은 Killingsworth등(1972)의 방법을 사용하였다. 즉 간흡충증 환자 혈청내 IgG는 LAS-R Human IgG Test (Hyland, U. S. A.)에 의하여 정량적으로 측정하였다.

#### 5. Thin layer immunoassay (TIA)

TIA 실시는 Elwing등(1976)의 방법에 준하였으며 agarose (BDH, England)를 사용하였다. Water vapour condensation on surface visualization technique에 의해 polystyrene 표면에 형성된 항원-항체 결합체를 정량적으로 측정하였다. 즉, 주위의 작은 물방울에 비하여 큰 물방울로 구별되어 표시되는 부분의 직경의 크기(mm)를 측정하여 정량적으로 표현하였다.

**6. 효소표식면역법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

효소표식면역법의 시행방법은 Voller등(1974)의 방법에 준하였다. Peroxidase conjugated IgG(Cappal Lab., U.S.A.)를 사용하였으며 ELISA 광량계(Dynateck Co., Swiss)로써 ELISA치를 측정하였다.

**7. 피내반응**

Veronal buffer로 추출한 간흡충 성충항원(이하 VBS 항원으로 표기)을 사용하여 간흡충 감염 환자를 대상으로 피내반응을 실시하여 구진 크기를 측정하였다.

**실험 성적**

**1. TIA에 의한 성적**

간흡충에 감염된 환자 60명에서 TIA에 의해 측정되는 혈청내 항체 분포를 보면 그 평균이 4.14mm였으며 가장 낮은 것은 3mm였다. 따라서 TIA에 의한 zone 직경 3mm 이상을 양성이라고 한다면 간흡충증 환자 60

**Table 1.** Results of TIA in 10 healthy control, 60 clonorchiasis, 10 amoebiasis and 16 paragonimiasis patients

	No. exam.	TIA	
		Positive*	Negative
Healthy control	10	3	7
Clonorchiasis	60	60	0
Amoebiasis	10	2	8
Paragonimiasis	16	9	7

Note: \*more than 3 mm in diameter

명 모두 양성이었으나, 건강대조군 10명 중 3명이, 아메바증 환자 10명 중 2명이, 폐흡충 증 환자 16명 중 9명이 양성이었다(Table 1). 간흡충 성충의 생리식염수 추출물 항원을 사용하여 TIA를 시행하였더니 감수성은 100%, 특이성은 61.1%였다.

**2. 효소표식면역법(ELISA)에 의한 성적**

간흡충증 환자 60명의 혈청에서 효소표식면역법에 의한 성적 분포를 보면 ELISA치가 0.8 이상을 양성이라 할 때 간흡충증 환자 60명중 53명이 양성이었고, 건강대조군 24명은 모두 음성이었으며, 아메바증 20명 중 15명이, 톡소플라스마증 11명 중 9명이 음성이었다(Tale 2).

따라서 간흡충 성충의 생리식염수 추출물을 항원으로 실시한 효소표식면역법의 감수성은 88.3%, 특이성은 87.3%였다.

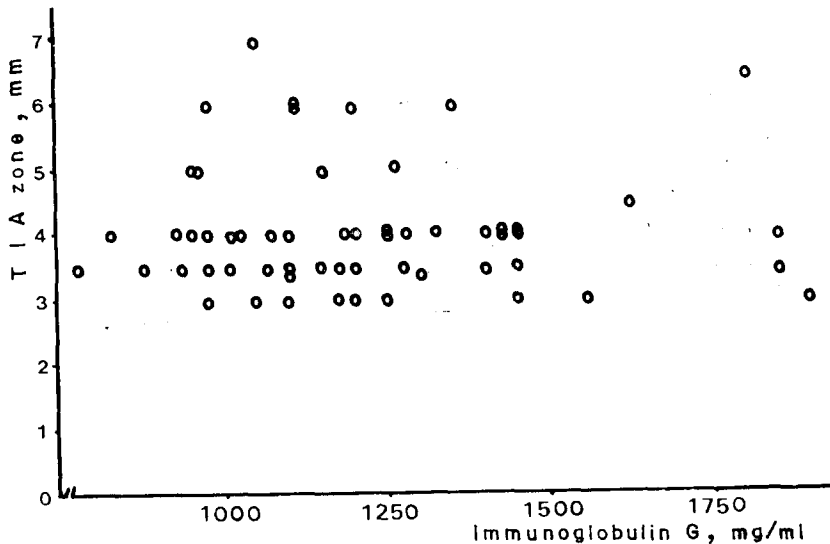
**3. 혈청내 IgG농도와 면역진단법 성적과의 관계**

TIA에 의한 간흡충에 대한 항체치와 혈청내 IgG농도와의 상관관계는 없음을 알 수 있었다(Fig. 1). 효

**Table 2.** Results of ELISA in 24 healthy control, 60 clonorchiasis, 20 amoebiasis and 11 toxoplasmosis patients

	No. exam.	ELISA	
		Positive*	Negative
Healthy control	24	0	24
Clonorchiasis	60	53	7
Amoebiasis	20	5	15
Toxoplasmosis	11	2	9

Note: \*more than 0.8 in optical density



**Fig. 1.** Relationship between Immunoglobulin G level and TIA zone diameter in sera from clonorchiasis patients.

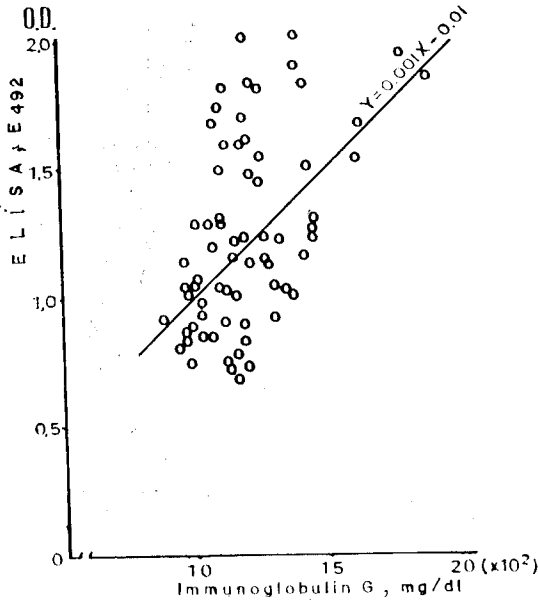


Fig. 2. Relationship between Immunoglobulin G level and ELISA value in sera from clonorchiasis patients.

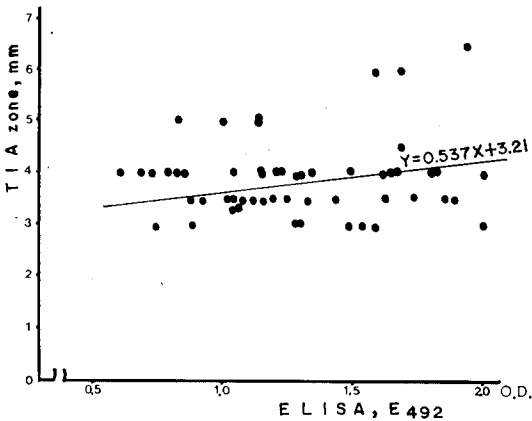


Fig. 3. Scatter diagram showing the relation between the extinction of ELISA and the zone diameter of TIA using clonorchiasis sera.

소표식면역법에 의한 항체치와 간흡충증 환자 혈청내 IgG농도와 상관관계를 보면 그 상관 계수는 0.69였고 회귀선의 방정식은  $Y=0.001X-0.01$ 이었다(Fig. 2).

4. 간흡충에 있어 면역진단방법들의 상관관계

간흡충증 환자 혈청에서 효소표식면역법에 의한 ELISA치의 분포와 TIA에 의한 zone의 분포는 서로 상관성이 없었다. 즉, 상관계수는 0.29, 회귀선 방정

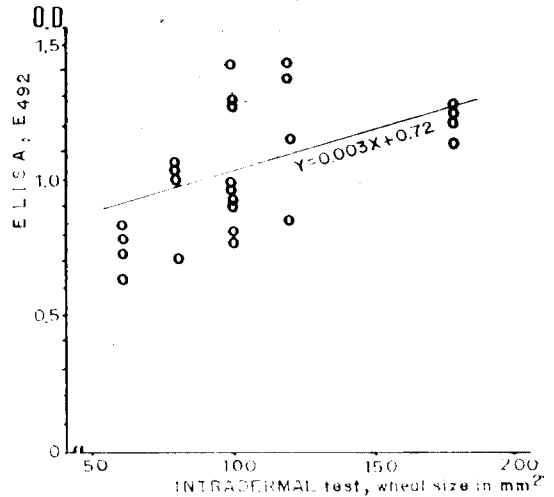


Fig. 4. The relationship between ELISA value and wheal size obtained with intradermal test in clonorchiasis patients.

식은  $Y=0.537X+3.21$ 이었다(Fig. 3). 또한 효소표식면역법에 의한 ELISA치와 VBS 항원을 사용한 피내반응에 의한 구진 크기와 상관관계를 보면 그 상관계수는 0.46이었고, 그 회귀선의 방정식은  $Y=0.003X+0.72$ 였다(Fig. 4).

고 찰

혈청에서 항체를 검출하기 위하여 TIA를 이용한 연구 보고로서 Ismail등(1979)은 주혈흡충증, Nilsson등(1980b)은 이질아메바 감염증 환자를 대상으로 조사하였다. 任(1983)은 간흡충증 환자 혈청에서 TIA를 이용하여 항체를 검출하였는데 이 항체 분포는 건강대조군이나 이질아메바 감염자에서의 항체와 비교할 때 차이가 유의하였으나, 폐흡충증 환자에서의 항체 분포와는 그 차이가 유의하지 않았다고 보고하였으며 간흡충증 진단에 있어 TIA의 이용 가능성이 있다고 하였다.

간흡충증에서 항체를 검출하는 면역학적 방법으로는 간접형광항체법(任, 1974), 피내반응(Sadun *et al.*, 1959), 면역확산법(Sun and Gibson, 1969), 보체결합반응(Sawada *et al.*, 1965)등이 보고되고 있다. 그러나 그 사용된 항원이 각각 다르고 진단적 가치에 있어 우수하지 못하여 실제 사용되지 못하고 있다. TIA는 그 방법이 간단하고 결과 판정이 용이하다는 장점이 있으나 많은 양의 항원이 소모된다. Voller등(1974)이 보고한 효소표식면역법(ELISA)에 의해 측정된 ELISA치와 TIA에 의한 성적을 비교하였으나 양자간에 상관성이 없었다. 또한 VBS항원을 사용한 피내반응 성적

과 비교하였더니, 상관계수는 0.46이었다. Nilsson 등 (1980b)은 아메바증에 있어 TIA에 의한 성적은 간접 혈구응집반응과 면역확산법에 의한 것과 잘 일치한다고 하였고, Ismail 등(1979)도 주혈흡충증에서 TIA와 ELISA는 그 성적이 서로 상관이 있다고 하였다. 본 실험에서 사용된 항원은 감염시킨 가토에서 채취한 성충의 생리식염수 추출물이었으나, 항원 제조방법을 달리 하였을 때 그 성적은 다를 것으로 추측된다. 따라서 항원 제조방법과 TIA 성적과의 상호 관련성은 앞으로 추구하여야 할 과제로 남아 있다.

본 성적에 의하면, 혈중 IgG 농도와 TIA에 의해 측정된 zone 크기는 상관성이 없었다. 그러나 Elwing 등 (1976)은 항체 농도와 TIA에 의한 zone 크기는 비례한다고 한다. 따라서 본 실험에서 TIA에 의해 검출되는 것이 IgG인지 IgM인지 확인되어야 하겠다. 또한 이 실험에서 ELISA에 의하여 검출된 IgG와 TIA에 의해 검출되는 항체들은 그 immunoglobulin class에 있어서 다르기 때문에 이 두 방법에 의한 항체 분포는 서로 상관성이 없는 결과를 가져올 수 있을 것으로 추측된다. 간흡충은 그 발육에 있어 여러 시기를 거치고 있어서 항원성이 매우 복잡하고 다양하다고 볼 수 있다. 그러므로 그 복잡한 항원성 때문에 폐흡충증과 교차 반응이 있을 것으로 생각된다. 간흡충증에 있어 성충 생리식염수 추출물을 항원으로 이용하여 실시한 TIA는 감수성이 좋으나 특이성이 효소표식면역법에 비해 좋지 않은 것으로 관찰되었으나 간흡충 항원을 정제한다면 TIA는 진단에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 요 약

간흡충증 환자 혈청에서 Thin layer immunoassay에 의하여 항체를 정량적으로 측정하여 감수성과 특이성을 알아보고, 효소표식면역법(ELISA)에 의한 성적과 비교하였다.

냉동 건조한 간흡충 성충의 생리식염수 추출물을 항원으로 사용하였고, TIA는 Elwing 등(1976)의 방법으로, 효소표식면역법은 Voller 등(1974)의 방법에 의해 실시하였다.

1. 간흡충증 환자 60명의 혈청에서 TIA zone 크기의 평균은 4.14mm였고, 3mm 이상을 양성으로 판정하였을 때 감수성은 100%, 특이성은 61.1%였다.
2. 효소표식면역법에 의하면 ELISA치 0.8 이상을 양성으로 판정하였을 때 감수성은 88.3%, 특이성은 87.3%였다.
3. 혈청내 IgG 농도는 TIA zone 크기와 상관이 없었으나 효소표식면역법에 의한 ELISA치와는 상관이 있어 그 계수는 0.69였다.
4. TIA zone 크기는 효소표식면역법에 의한 ELISA치와 그 분포에 있어 상관이 없었다.

### 참 고 문 헌

Elwing, H., Nilsson, L.A., and Cuchterlony, O. (1976). Visualization principles in Thin Layer Immunoassays (TIA) on plastic surfaces. *Int. Archs. Allergy & Appl. Immunol.*, 51:757-762.

任敬一(1974) 형광항체법을 이용한 간디스토마 감염의 면역진단에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 7: 194-205.

任敬一(1983) 肝吸蟲症에 있어 抗體 검출을 위한 Thin Layer Immunoassay. 기생충학잡지, 21(1):1-7.

Killingsworth, L.M. and Savory, J.(1979) Manual nephelometric methods for immunochemical determination of immunoglobulins Ig G, Ig A and Ig M in human serum. *Clin. Chem.*, 18:335-339.

Ismail, M., Draper, C., Cuchterlony, O., Nilsson, L. A. and Terry, R.(1979) A comparison between a new serological method, thin layer immunoassay (TIA), and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies in schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 1:251-258.

李重根, 閔得映, 任敬一, 李根泰, 蘇鎮璋(1981) 간흡충 감염 진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구. 연세의대논문집, 14:133-147.

Nilsson, L.A., Bjorck, L., Capron, A., Elwing, H. and Cuchterlony, O.(1980a) Application of thin layer immunossay (TIA) as a serodiagnostic tool in schistosomesiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 201-204.

Nilsson, L.A., Petchclai, B. and Elwing, H.(1980b) Application of thin layer immunoassay (TIA) for demonstration of antibodies against *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:524-529.

Sadun, E.H., Walton, B.C., Buck, AA. and Lee, B.K.(1959) The use of purified antigens in the diagnosis of *Clonorchis sinensis* by means of intradermal and complement fixation tests. *J. Parasit.*, 45:129-134.

Sawada, T., Takei, K., Williams, J.E. and Mcose, J.W. (1965). Isolation and purification of antigen from adult *Clonorchis sinensis* for complement fixation and precipitin tests. *Exp. Parasit.*, 17:340.

Sun, T. and Gibson, J.B.(1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18:241-252.

Voller, A., Bidwell, D.E., Huldtt, G., and Engvall, E.(1974) A microplate method of ELISA and its application to malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51:209.

=Abstract=

**Comparison of TIA with ELISA for circulating antibody detection  
in clonorchiasis**

Yong-Kie Lee, Jae-Sook Ryu, Keun-Tae Lee and Kyung-Il Im\*

*Department of Parasitology, College of Medicine, Yonsei University and*

*\*Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University*

A comparison was made of a new serological method, thin layer immunoassay (TIA), and an established method, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in the detection and quantification of antibodies in clonorchiasis.

Saline extract of lyophilized *Clonorchis sinensis* adult worm was used as antigen, and TIA by the method of Elwing *et al.* (1976) and ELISA by Voller *et al.* (1974) were performed. Using sera from known clonorchiasis cases, 100% of the sera tested were positive by TIA and 88.3% by ELISA. TIA produced false positive results in 14 out of 36 cases, which were 10 amoebiasis cases, 16 paragonimiasis cases and 10 healthy controls. ELISA, however, produced a small number of false positives, 7 out of 55 cases.

There was correlation between Immunoglobulin G level in sera and ELISA value (correlation coefficient, 0.69), whereas no correlation between Immunoglobulin G level and TIA result. The performance of TIA and ELISA was not correlated in the results using homologous antigen.