

肺吸蟲 皮內反應 陽性者에 對한 Agar-gel Diffusion, Counterimmunoelectrophoresis 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay의 比較

順天鄉大學 醫學部 寄生蟲學教室

李 玉 蘭

가톨릭大學 醫學部 寄生蟲學教室 및 가톨릭 寄生蟲病研究所

崔 源 永

緒 論

肺吸蟲症은 蟲卵을 發見하면 確診이 가능하나 실제로 肺吸蟲感染者의 一部에서만 蟲卵이 관찰된다. 反面에 肺吸蟲感染時에 抗原-抗體反應이 比較的 잘 일어나기 때문에 免疫血清學的 診斷方法이 많이 利用되어왔다. 일찌기 Ando(1921)는 補體結合反應을, 布上(1930)는 皮內反應을 試圖한 바 있었고 그 外에 寒天二重擴散反應(以下 AGD, Phillipson and Fadzean, 1962)과 免疫電氣泳動反應(以下 IEP, Kruidenier and Katch, 1959), 間接螢光抗體反應(崔 등, 1975)과 Counterimmunoelectrophoresis(以下 CIEP, Xiaosu *et al.*, 1980) 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(以下 ELISA, Yokogawa *et al.*, 1983)등의 方法이 利用되어 왔다.

筆者들은 가톨릭寄生蟲病研究所에 의뢰해온 臨床的으로 肺吸蟲症이 의심되고 皮內反應도 陽性이나 肺吸蟲卵이 發見되지 않은 患者에 對하여 1964년부터 1974년까지 補體結合反應(以下 CFT)을 실시한 바 있고 1972년 이후부터는 AGD반응을 CFT와 併行 實施하여왔다. 이에 對한 結果(윤과 최, 1973)와 다른 研究者들(Seed *et al.*, 1966; 金 등, 1969; 李 등, 1970)의 報告에서 CFT와 AGD의 두가지 反應이 感受性이나 特異性에서 매우 近似함을 근거로 하여 1975년 이후로는 AGD만을 施行하여 왔다. 後者는 CFT에 비하여 手技가 간단할 뿐 아니라 抗原-抗體의 結合을 肉眼的으로 관찰할 수 있는 長點이 있으나 抗原-抗體의 沈降帶가 肉眼的으로 확인되려면 高濃度の 抗原과 抗體가 必要하기 때문에 感受性이 弱하다는 說이 있다. 그러나 筆者들(崔 및 李, 1981)은 2마리의 肺吸蟲 蟲體를 가지고 있던 고양이의 血清에서도 AGD 반응에서 沈降帶를 발견한 바 있어서 이것으로 보아 肺吸蟲 感染의 경우 AGD반응의 感受성은 높다고 생각된다. 그러나 最近에 各種寄生蟲疾患에 대한 免疫血清學的 診斷法으로 새로

이 登場한 CIEP(Krupp, 1974; Despommier *et al.*, 1974; Hillyer and Capron, 1976; Xiaosu *et al.*, 1980; Craft and Nelson, 1982)와 ELISA(Yang and Kennedy, 1979; Speiser, 1980; Cho *et al.*, 1981; Yogore *et al.*, 1981; Long *et al.*, 1982; Nakao *et al.*, 1982; Yokogawa *et al.*, 1983)가 각광을 받고 있다. 筆者들은 이제까지 使用하여 왔던 AGD反應과 CIEP 및 ELISA 반응과의 感受性과 特異性을 相互 比較檢討할 目的으로 本 實驗을 企圖하였다.

材料 및 方法

A. 材 料

1. 肺吸蟲 抗原

강원도 양양에서 採集한 참가재(*Cambaroides similis*)에서 肺吸蟲(*Paragonimus westermani*) 被囊幼蟲을 分離하여 개(犬)에 먹인 후 4~5個月後에 肺에서 成蟲을 적출하였다. 生蟲을 生理食鹽水와 증류수로 數回 세척한 후 凍結-磨碎-融解方法(辻守康, 1975)으로 homogenate를 만들어 2,000rpm 15分間 원심하여 上清液을 증류수로 24時間 透析한 후 10,000rpm으로 1時間 再 원심한 上清液을 粗抗原原液(蛋白質도, 7.56mg/ml: PA)으로 하였다.

2. 抗血清

가톨릭醫大부속寄生蟲病研究所에 肺吸蟲症에 대한 免疫反應검사를 의뢰해온 肺吸蟲 皮內反應 陽性者 血清으로 1979년 1월~1982년 1월에 AGD 反應을 실시하고 -20°C 에 보존된 血清들이다. 總 155例의 AGD반응결과는 陽性 52例, 陰性 103例이었으며 이들 血清들에 대해 1982년 2월~6월에 Counterimmunoelectrophoresis와 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 反應을 실시하였다.

3. 對照血清

i. 肝吸蟲(*Clonorchis sinensis*) 感染者 血清 10例

- ii. 痢疾아메바(*Entamoeba histolytica*) 感染者 血清 10例
- iii. 톡소플라스마(*Toxoplasma gondii*) 螢光抗體反應 陽性者 血清 8例

B. 方法

1. Ouchterlony反應(Agar-gel Diffusion : AGD)

Ouchterlony(1958)방법으로 slide에 1% 寒天을 1~2 mm두께로 입히고 6mm직경의 구멍을 만들어 抗原과 血清을 약 50 μ l씩 넣는다. 이것을 moist chamber에 넣어 4~6°C 冷所에서 48~72時間 방치한 후 室溫에서 生理食鹽水로 24時間 세척하여 濾過紙로 덮어 말린 후 Amido Black 10B로 染色하여 沈降帶의 有無로 陽-陰性を 판정한다. 사용한 抗原은 肺吸蟲粗抗原原液(PA)이었고 檢査형질은 血清原液을 사용하였다.

2. Counterimmunoelectrophoresis(CIEP)

Barbital buffer (pH 8.6)로 1%로 희석한 寒天을 AGD에서와 같은 방법으로 slide에 입히고 서로 대칭되게 직사각형의 구멍을 10mm간격으로 만든다. 電氣泳動 vessel에 넣고 陰極쪽에 抗原을, 반대편에 血清을 넣어 barbital buffer (pH 8.6)로 5 Volt/cm로 50分~1時間 通電시킨 후 生理食鹽水로 洗滌한다. 세척후 염색 과정과 沈降帶의 有無에 대한 判定은 AGD에서와 같다. 사용된 抗原과 檢査형질은 AGD반응에서와 같은 粗抗原原液(PA)과 血清原液을 사용하였다.

3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Voller *et al.* (1976)의 間接方法을 기준으로 conjugate는 peroxidase labelled human anti IgG를 역가 측정의 위해 10,000배로 희석하여 사용하였다. 肺吸蟲抗原은 역가 측정에 의해 粗抗原(PA)을 40,000배로 희석하여 사용하였고 가검 血清도 측정에 의해 100배~200배를 적정농도로 판정하여 各各 100배와 200배로 희석한 血清을 사용하였다.

- i. 肺吸蟲粗抗原(PA)을 carbonate buffer(pH 9.6)로 40,000배로 희석하여 polystyrene plate wells에 200 μ l씩 分注한 후 4°C에서 overnight한다.
- ii. PBS-Tween液으로 plate를 3回 세척하고 희석한 血清 200 μ l씩 各 well에 넣고 moist chamber內에서 室溫으로 2時間 배양한다.
- iii. PBS-Tween液으로 plate를 3回 세척하고 substrate 200 μ l씩 넣어 30分間 室溫에 방치한 후 2.5M-H₂SO₄ Sol. 50 μ l씩 넣어 반응을 멈춘다.
- iv. 各各의 plate well의 optical density (OD)를 microtiter spectrophotometer로 파장 492nm에서 측정하여 100배, 200배 희석형질에 대해 各各 OD 0.6, 0.4이상을 陽性으로, 그 미만을 各各 陰性으로 판정하였다(Table 3, Fig. 4).

成 績

1. Agar-Gel Diffusion反應(AGD)

被檢血清 155例 중 沈降帶 形成의 有無에 따른 定性反應의 結果는 52例에서 1~3個(드물게 4~6)의 沈降帶形成을 관찰하였다(Fig. 2). Table 1의 No. 3*, No. 14* 및 No. 30*은 同一人의 血清으로서 No. 3은 治療前, No. 14와 No. 30은 bitin 投藥後 各各 4個月 및 7個月後의 것으로서 bitin 投與후 沈降帶가 陰轉하지 않은 例이다. 155例 중 103例에서는 沈降帶가 形成되지 않았다(Table 2, Fig. 1). 被檢血清중 No. 9** (Table 1)와 No. 55** (Table 2)도 同一人의 血清으로 前者는 治療前으로 沈降帶 形成이 관찰되었고 後者는 bitin 投與後 6個月後의 血清으로서 沈降帶가 陰轉하였다. Table 1의 No. 5 및 No. 17은 各各 略痰檢査에서, 그리고 No. 43은 胸膜液에서 肺吸蟲卵이 발견된 例로서 이때의 AGD反應 染色強度는 매우 強하였다. 對照血清인 肝吸蟲感染 血清 10例, 아메바感染 血清 10例, *Toxoplasma*의 間接螢光抗體反應 陽性血清 8例에 對한 AGD反應은 全例에서 陰性이었다.

2. Counterimmunoelectrophoresis (CIEP)

AGD反應 陽性血清 52例가운데 CIEP 陽性은 51例로서 兩者의 陽性反應의 一致率은 98%이었다. 이때의 沈降帶數는 1~7個이었다(Table 1). 한편 AGD反應 陰性血清 103例는 CIEP反應에서도 全例가 陰性으로서 100%의 一致率을 나타내었다(Table 2). 따라서 全例에 대한 兩反應의 一致率은 155例중 154例로서 99.4%이었다. 이들 被檢血清중 長期間 保管되었던 血清(最高 4年) 가운데에는 CIEP의 沈降帶의 染色強度가 AGD反應의 그것보다 낮은 경우가 있었으나(Fig. 3), AGD검사후 數個月이 경과되지 않은 경우의 AGD陽性血清 중에는 CIEP반응에서 染色反應이 強하거나 또는 沈降帶數가 많은 것들이 있었다(Table 1 및 Fig. 4). 對照群의 血清(28例)은 全例에서 CIEP反應이 陰性이었다.

3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

AGD反應 陽性血清 52例 중 血清稀釋 倍數 100倍 血清에서는 50例(96%)가, 200倍 血清에서는 49例(94%)에서 ELISA陽性으로 判定되었다(Table 1 및 Fig. 1). AGD反應 陰性血清 103例 중에서는 100배 및 200배 희석血清에서 各各 100例(97%) 및 102例(99%)가 ELISA 陰性으로 判定되었다(Table 2 및 Fig. 1). 따라서 被檢血清 155例 全部에 對한 AGD反應과 ELISA 反應의 一致率은 100배 희석형질 및 200배 희석형질에서 各各 96.8% 및 97.4%이었다. Optical density의 本포는 Table 3에서와 같다.

한편 CIEP反應과는 희석血清 100배, 200배에서 陽性反應은 各各 98.0% 및 96.1%의 一致率을, 그리고 陰性反應에서는 各各 97%와 99%의 一致率을 나타내

Table 1. Results of CIEP and ELISA reaction in 52 sera of AGD positive persons

Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA		Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA	
			Precip. band (No.)	OD in 100× and 200× sera	Precip. band (No.)	OD in 100× and 200× sera							
1	P. M. J.	17 f	+(2)	1.47	0.79	27	S. J. B.	29m	+(4)	2<	1.76		
2	H. S. M.	51m	+(2)	1.24	0.68	28	L. J. J.	21m	—	0.35	0.20		
*3	K. J. J.	34 f	+(2)	1.88	1.07	29	K. S. R.	—	+(2)	1.30	0.70		
4	J. Y. W.	18m	+(3)	1.64	1.22	*30	K. J. J.	35 f	+(2)	1.02	0.55		
*5	K. C. M.	16m	+(3)	2<	1.50	31	Y. Y. S.	—m	+(2)	2<	2<		
6	K. M. J.	32 f	+(1)	0.42	0.40	32	K. S. D.	32 f	+(3)	1.60	1.10		
7	K. C. K.	41m	+(1)	0.67	0.38	33	S. I. M.	62m	+(3)	0.88	0.56		
8	B. H. K.	23m	+(1)	0.90	0.45	34	P. O. H.	56—	+(3)	2<	1.33		
**9	K. K. S.	36m	+(2)	1.87	1.20	35	P. N. S.	63m	+(2)	1.60	0.88		
10	C. B. Y.	53m	+(2)	2<	1.52	36	L. K. S.	40 f	+(4)	2<	1.46		
11	S. J. S.	21m	+(1)	1.20	0.45	37	K. B. H.	24 f	+(4)	1.64	1.22		
12	K. K. H.	49 f	+(1)	1.18	0.77	38	N. J. H.	31 f	+(2)	1.08	0.69		
13	K. K. R.	38 f	+(3)	1.34	0.84	39	W. S. Y.	37 f	+(2)	1.68	1.15		
*14	K. J. J.	35 f	+(3)	1.22	0.69	40	L. H. J.	18 f	+(4)	2<	2<		
15	K. K. H.	30 f	+(2)	1.59	1.00	41	L. W. S.	34 f	+(3)	1.90	1.33		
16	K. Y. D.	29m	+(3)	2<	1.28	42	H. I. M.	43m	+(4)	2<	1.14		
*17	K. Y. A.	23 f	+(5)	2<	2<	*43	H. K. N.	31 f	+(5)	2<	1.73		
18	L. M. S.	20 f	+(4)	2<	1.72	44	J. Y. S.	10m	+(3)	0.82	0.35		
19	L. S. Y.	26 f	+(1)	1.72	1.04	45	K. S. S.	22m	+(4)	1.02	0.69		
20	L. S. H.	24 f	+(2)	0.99	0.66	46	M. J. Y.	52m	+(5)	2<	1.93		
21	B. S. H.	— f	+(4)	1.28	0.92	47	J. Y. S.	31 f	+(6)	1.46	0.87		
22	K. K. B.	27m	+(1)	1.09	0.66	48	P. J. A.	24 f	+(7)	1.16	0.79		
23	H. E. S.	32 f	+(1)	0.97	0.51	49	L. M. W.	51 f	+(6)	1.24	0.62		
24	Y. K. J.	30 f	+(2)	1.20	0.73	50	Y. H. S.	62m	+(5)	1.07	0.68		
25	K. Y. H.	50m	+(2)	1.22	0.70	51	J. E. D.	50m	+(4)	0.73	0.59		
26	K. H. H.	40 f	+(3)	2<	1.50	52	A. S. Y.	44m	+(2)	2<	1.64		

Table 2. Results of CIEP and ELISA reactions in 103 sera of AGD negative persons

Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA		Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA	
			Precip. band	OD in 100× and 200× sera	Precip. band	OD in 100× and 200× sera							
1	B. B. Y.	51m	—	0.65	0.35	13	O. M. O.	40 f	—	0.43	0.23		
2	Y. S. K.	26m	—	0.13	0.10	14	K. J. W.	39m	—	0.23	0.21		
3	K. C. M.	23m	—	0.22	0.11	15	K. J. S.	23m	—	0.14	0.14		
4	S. S. H.	27m	—	0.15	0.10	16	K. E. R.	40 f	—	0.41	0.24		
5	K. B. K.	66 f	—	0.15	0.09	17	L. B. H.	55m	—	0.10	0.07		
6	C. W. S.	25m	—	0.47	0.22	18	H. T. S.	20 f	—	0.15	0.09		
7	H. J.	54m	—	0.35	0.15	19	Y. W. H.	34m	—	0.07	0.05		
8	L. J. M.	43 f	—	0.28	0.17	20	L. B. B.	57 f	—	0.19	0.16		
9	J. W. D.	39m	—	0.19	0.15	21	L. S. E.	44 f	—	0.20	0.13		
10	A. S. G.	43m	—	0.16	0.11	22	J. E. D.	79m	—	0.23	0.17		
11	S. S. J.	47m	—	0.12	0.09	23	C. S. H.	—m	—	0.15	0.11		
12	W. I. C.	47m	—	0.29	0.15	24	L. B. C.	—m	—	0.18	0.11		

Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA	
			Precip. band	—	OD in 100×	and 200× sera
25	H. S. W.	31m	—	—	0.16	0.12
26	K. Y. H.	79 f	—	—	0.17	0.12
27	N. Y. H.	26 f	—	—	0.21	0.16
28	S. Y. H.	23 f	—	—	0.29	0.23
29	L. S.	52m	—	—	0.16	0.11
30	J. S. D.	68 f	—	—	0.21	0.16
31	K. G. S.	26m	—	—	0.18	0.15
32	K. J. M.	65 f	—	—	0.24	0.18
33	H. M. K.	60m	—	—	0.39	0.31
34	J. E. S.	26 f	—	—	0.37	0.18
35	Y. S. K.	41m	—	—	0.12	0.08
36	H. S. M.	45m	—	—	0.17	0.13
37	B. S. E.	22m	—	—	0.17	0.12
38	K. H. T.	56m	—	—	0.14	0.11
39	K. H. J.	26m	—	—	0.49	0.39
40	Y. B. S.	48 f	—	—	0.12	0.06
41	K. B. M.	69m	—	—	0.46	0.22
42	H. S. S.	50 f	—	—	0.45	0.25
43	P. S. H.	27m	—	—	0.28	0.16
44	O. J. K.	47 f	—	—	0.10	0.07
45	A. K. S.	43m	—	—	0.10	0.06
46	L. S. H.	85m	—	—	0.20	0.11
47	J. Y. S.	25m	—	—	0.21	0.11
48	P. S. C.	38m	—	—	0.20	0.08
49	C. J. K.	30m	—	—	0.29	0.14
50	H. M. B.	69m	—	—	0.07	0.05
51	J. T. S.	34m	—	—	0.15	0.10
52	Y. H. N.	70 f	—	—	0.13	0.09
53	Y. D. E.	—	—	—	0.26	0.18
54	M. J. K.	53m	—	—	0.13	0.08
**55	K. K. S.	37m	—	—	0.47	0.28
56	K. N. K.	22m	—	—	0.22	0.16
57	P. S. G.	52m	—	—	0.16	0.10
58	J. M. H.	39m	—	—	0.26	0.16
59	Y. D. N.	45m	—	—	0.14	0.13
60	P. M. D.	65m	—	—	0.49	0.30
61	L. Y. H.	40m	—	—	0.39	0.27
62	K. M. H.	22 f	—	—	0.11	0.07
63	O. J. M.	— f	—	—	0.17	0.12
64	K. C. S.	31m	—	—	0.11	0.07
65	P. K. S.	27 f	—	—	0.18	0.12
66	P. D. H.	27m	—	—	0.09	0.06
67	K. D. H.	48m	—	—	0.15	0.09
68	K. A. J.	24 f	—	—	0.19	0.12
69	Y. J. C.	46m	—	—	0.12	0.08

Serial No.	Name	Age & Sex	CIEP		ELISA	
			Precip. band	—	OD in 100×	and 200× sera
70	P. T. J.	47m	—	—	0.11	0.10
71	L. H. W.	—	—	—	0.12	0.09
72	J. A. J.	37 f	—	—	0.20	0.17
73	K. B. K.	59m	—	—	0.36	0.24
74	L. K. B.	58m	—	—	0.15	0.10
75	S. S. H.	37m	—	—	0.15	0.11
76	J. C. G.	37m	—	—	0.20	0.10
77	K. Y. H.	22m	—	—	0.10	0.08
78	S. D. S.	49 f	—	—	0.13	0.09
79	L. G. J.	41 f	—	—	0.27	0.17
80	Y. G. D.	38m	—	—	0.15	0.08
81	L. S. H.	36 f	—	—	0.15	0.10
82	J. J. R.	17m	—	—	0.14	0.09
83	K. S. H.	32 f	—	—	0.23	0.14
84	N. G. D.	58m	—	—	0.16	0.12
85	J. W. N.	—	—	—	0.16	0.10
86	K. C. W.	36m	—	—	0.38	0.23
87	J. H. Y.	63m	—	—	0.39	0.28
88	J. H. J.	31m	—	—	0.20	0.09
89	B. Y. Y.	25 f	—	—	0.25	0.17
90	K. S. K.	35m	—	—	0.25	0.17
91	M. E. B.	46 f	—	—	0.58	0.35
92	H. G. S.	50m	—	—	0.63	0.42
93	B. D. D.	23m	—	—	0.21	0.17
94	L. H. O.	20 f	—	—	0.18	0.14
95	Y. I. J.	54m	—	—	0.30	0.10
96	H. M. H.	40 f	—	—	0.63	0.40
97	A. K. D.	37m	—	—	0.26	0.16
98	O. K. I.	—m	—	—	0.13	0.09
99	K. Y. R.	44 f	—	—	0.45	0.29
100	L. T. H.	30m	—	—	0.30	0.24
101	B. D. S.	48m	—	—	0.39	0.30
102	J. B. J.	53m	—	—	0.17	0.12
103	C. Y. B.	20 f	—	—	0.25	0.19

었다. 따라서 全例에 대한 CIEP와 ELISA의 一致率은 98%이었다. 蟲卵이 검출된 No. 5, No. 17 및 No. 43(Table 1-e)은 100배 희석혈청에서 各各 OD 2이상 (>2)이었고 200배 희석혈청에서는 各各 OD가 1.5, >2, 및 1.73으로 높은 optical density를 나타내었다. 또한 No. 3, No. 14 및 No. 30(Table 1)의 血清은 同一人血清으로 No. 3은 投藥前이고 No. 14와 No. 30은 投藥하고 4個月 및 7個月後의 血清인 바 OD의 값이 100배 희석혈청에서는 各各 1.88, 1.22 및 1.02였고 200배 희석혈청에서는 各各 1.07, 0.69 및 0.55로서 점차 저하된 것이 관찰되었다(Table 1). 以上の AGD陽

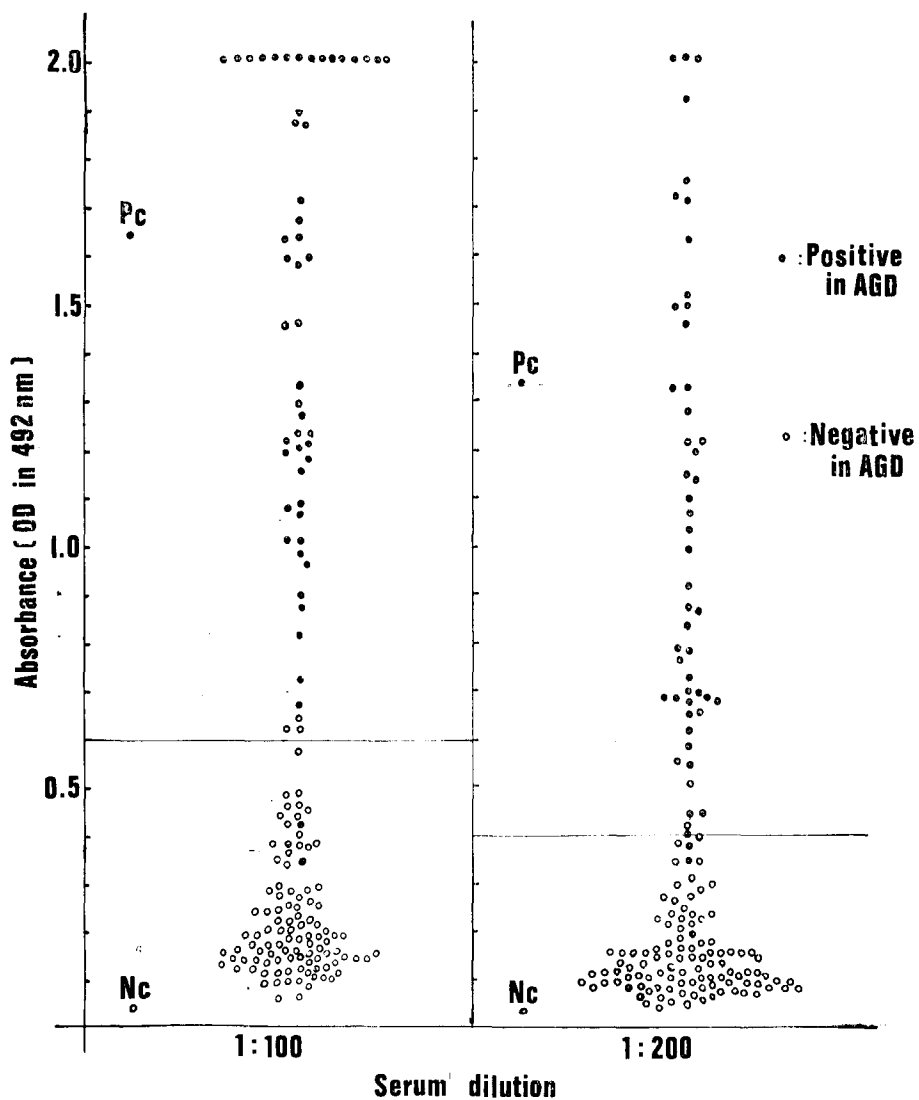


Fig. 1. OD-distribution in ELISA test of 155 sera for *Paragonimus* skin test positive persons.

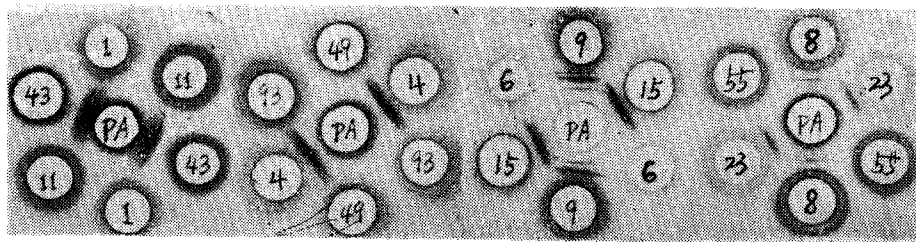


Fig. 2. Precipitin bands in AGD test.

Center wells: *Paragonimus* antigen, Outer wells: No. of sera,

Table 1: No. 4, 6, 8, 15, 23, 43, Table 2: No. 1, 11, 49, 55, 93

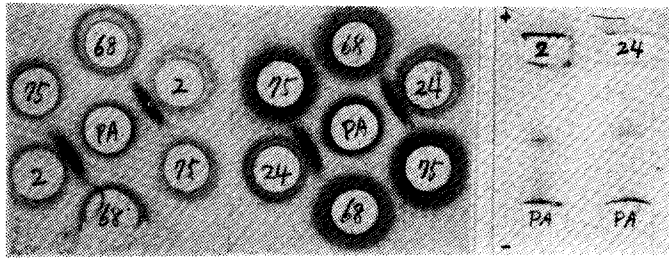


Fig. 3. Precipitin bands in AGD and CIEP.

Center wells: *Paragonimus* antigen, Outer wells: No. of sera, Table 1: No. 2, 24, Table 2: No. 68, 75

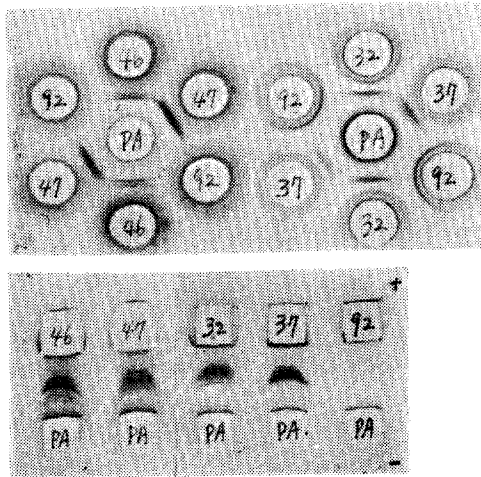


Fig. 4. Precipitin bands in AGD and CIEP.

Center wells: *Paragonimus* antigen,
Outer wells: No. of sera,
Table 1: No. 32, 37, 46, 47,
Table 2: No. 92

性 및 陰性的 血清에 對한 ELISA反應의 OD 分布樣相은 Table 3에서와 같다. 對照群의 血清 卽 肝吸蟲症, 아메바症 및 *Toxoplasma*症에서는 ELISA反應에서 100 배 희석배수 程度에서 全例가 OD 0.5 以下이었다(Fig. 5).

考 察

肺吸蟲症에 對한 間接診斷方法인 免疫學的 診斷法은 일찌기 補體結合反應(Ando, 1921)으로 시도되어 현재 까지 多樣한 免疫診斷方法이 적용되고 있고 또한 이들 方法에 의한 感受性과 特異性에 對한 견해의 差異도 많이 보고되어 왔다.

近來에 各種 寄生蟲 疾患을 診斷하는데 있어서 CIEP 反應이 예민한 감수성과 反應의 빠른진행으로 結果를 신속히 알 수 있다는 點 등으로 寄生蟲感染 抗體檢出 方法에 이용되고 있으며(Krupp, 1974; Hillyer, 1975;

Table 3. OD-distribution in different serum dilution of ELISA reaction in positives and negatives by AGD reaction

OD at 492nm	Positive sera by AGD		Negative sera by AGD	
	Serum dilution		Serum dilution	
	No. in 1:100	No. in 1:200	No. in 1:100	No. in 1:200
>2	15	3		
1.81~2.0	3	1		
1.61~1.8	4	4		
1.41~1.6	5	4		
1.21~1.4	7	5		
1.01~1.2	9	6		
0.81~1.0	5	5		
0.61~0.8	2	14	3	
0.41~0.6	1	6	10	1
0.21~0.4	1	3	32	21
~0.2		1	58	81
Total	52	52	103	103

Scapin and Tendler, 1975; Hillyer and Allain, 1979; Xiaosu *et al.*, 1980; Hillyer and Weil, 1981; Craft and Nelson, 1982), 특히 신속한 반응 외에 投藥後 治療효과 확인에 우수하다는 點이 보고되었다(Hillyer and Allain, 1979; Hillyer and Weil, 1981). 또한 抗原의 濃度로 보아 AGD 반응보다 10~30배 정도 감수성이 높다고 보고된 例들도 있다(Despommier *et al.*, 1974; Hillyer, 1975; Xiaosu *et al.*, 1980). 本 實驗에서는 AGD 반응과 CIEP 反應에서 蛋白濃度가 共히 7.56mg/ml의 抗原을 사용하였으므로 抗原濃度에 의한 感受性의 差異를 證明하기는 어려웠으나 同一抗原에서 CIEP 反應은 AGD반응에서보다 沈降帶數와 染色強度가 강하게 나타난 경우들(Fig. 3)로 보아 CIEP반응의 감수성이 보다 높다고 본다. 本 實驗의 抗原으로는 陽-陰性 判定의 一致率은 99.4%로 두 반응의 특이성 차이는 없었다.

最近 가장 감수성이 예민하다고 알려진 ELISA 反應

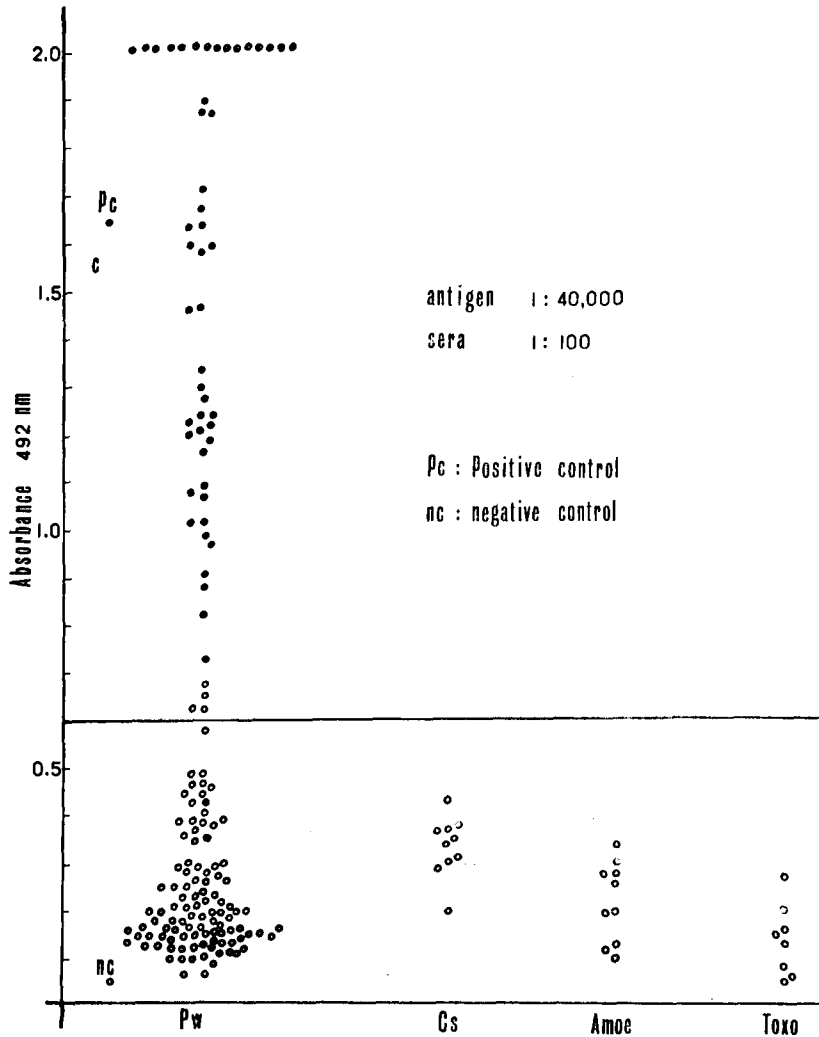


Fig. 5. Comparison of ELISA reaction for sera of clonorchiasis, amoebiasis, toxoplasmosis and *Paragonimus* skin test positive with *Paragonimus* antigen.

올 본 實驗의 다른 두 반응 즉 AGD, CIEP 反應과 비교 해볼 때 각각 97%, 98%의 一致率로서 特異性的의 差異는 볼 수 없었다. 그러나 ELISA反應에서는 抗原은 前 2者의 40,000倍 희석된 항원을 사용하였고, 그리고 抗血清은 100~200倍 희석혈청에서 反應이 가능하였던 點으로 보아서 ELISA反應이 前 2者의 反應에 比하여 매우 高度의 感受性을 가진 反應이라고 할 수 있겠다. Yang과 Kennedy(1979)는 아메바증에 대한 ELISA반응에서 정상인에 대한 음성반응율이 96.4%, 그리고 아메바 감염이 아닌 各種寄生蟲, 細菌감염자에 대하여는 96.6%의 陰性反應率을 나타내어서 感受性뿐 아니라 特異性도 높다고 하였다. 그 외에 ELISA反應 즉 絲狀蟲症과 狹粒條蟲症(Speiser, 1980), *Toxoplasma*症(Naot and Reming-

ton, 1980), 日本住血吸蟲症(松田 등, 1981; Yogore et al., 1981; Long et al., 1982; Nakao et al., 1982) 및 肺吸蟲症(Yokogawa et al., 1983)들은 感受性이 매우 높다고 보고되었다. 그러나 이 ELISA反應은 감수성이 예민한 한편 他寄生蟲症과 交叉反應이 있음도 보고되었다. (Speiser, 1980; Yogore et al., 1981; 松田 등, 1981). Speiser(1980)는 사상충과 포충증 진단에서 ELISA와 다른 면역진단반응, 즉 Indirect fluorescent antibody test(IFAT), Indirect hemagglutination test (IHA), CIEP 반응들과 비교하여 ELISA반응은 감수성은 가장 높았으나 특이성은 가장 낮았다고 하였다. 그리하여 많은 血清檢査를 하기 위한 screening 方法으로 ELISA反應은 가장 편리한 수단이 될 수 있으

나 특이진단을 하기 위해서는 다른 방법과 병행하는 것이 좋다고 보고하였다. 本實驗에서 血清희석 100배 및 200배에서 陽-陰性反應이 交叉되는 OD값과 근사한 OD값을 가진 경우 稀釋희석에 따라 陽-陰性反應관계가 불안정하며 本實驗에서 血清희석농도에 따라 陽-陰性이 바뀐 소수의 경우가 이러한 예가 되겠다. 松田 등(1981)은 日本住血吸蟲症에 대한 ELISA 반응실험에서 다른 種의 住血吸蟲, 肝蛭, 肺吸蟲등과 交叉反應이 있으나 被檢血清을 500배로 희석하였던 바 交叉反應이 減少하였다고 하였다. 또한 Yokogawa 등(1983)의 肺吸蟲症에 대한 ELISA反應은 CFT나 AGD反應과 밀접한 상관관계가 있다고 하였으며 ELISA反應이 肺吸蟲症의 免疫診斷法에 有用하다고 하였다.

일반적으로 抗原-抗血清의 濃度에 따른 感受性의 예민성은 ELISA, CIEP 및 AGD反應의 順位라고 보고 있으나 本實驗에서는 CIEP와 AGD反應 사이의 희석 濃度에 따른 감수성의 差異는 檢討하지 않았다. AGD 반응이나 CIEP 반응에 비해 항원이나 稀釋의 농도로 보아 극히 소량으로 반응이 가능한 ELISA 반응은 감수성에 있어서는 가장 우수하나 粗抗原을 사용했을 경우 特異性은 불안한 것 같다. 各各의 반응방법에 따라 적정농도의 抗原-抗血清을 사용한다면 감수성의 差異는 극히 경미해질 것으로 생각된다. 따라서 本實驗에서의 세가지 反應, 즉 AGD, CIEP, ELISA反應을 비교해볼 때 세반응중 가장 少量의 抗原으로 多數의 試檢자를 檢査할 수 있는 ELISA反應은 抗原을 高度로 정제했을 경우에 가장 적합한 방법이라고 보며 高濃度의 抗原을 要하는 AGD反應의 경우 粗抗原 사용으로도 他寄生蟲症과의 交叉反應이 적어서(崔 및 李, 1981) 特異性이 높다고 본다. CIEP反應은 AGD反應과는 침전반응으로는 근본적으로 同一한 방법이지만 전기영동장치 등의 설비가 필요하다. 반면 AGD보다 反應속도가 빠르다는 利點이 있다. Levine 등(1980)은 肝蛭감염 마우스와 家兎에서 ELISA와 CIEP反應을 비교한 바 ELISA는 감염후보다 早期에 抗體檢出이 가능하고 CIEP는 投藥後 藥劑 효과관정에 더 유용한 방법이라 보고한 바 있다.

本實驗에서 AGD, CIEP, ELISA反應은 유사한 反應관계를 나타내었고 各各의 方法을 사용함에 있어 長短點을 갖고 있어 어느 方法이 가장 좋은 方法이라고 말할 수는 없으나 抗原을 정제했을 경우 少量의 抗原이 소요되는 ELISA反應을 이용하는 것이 다당하리라 본다.

要 約

임상적으로 肺吸蟲症이 疑心되나 蟲卵檢出이 안되었던 155例(3例는 蟲卵發見)의 皮內反應 陽性例에 對하여 Agar-gel Diffusion(AGD)反應, Counterimmunoelectrophoresis(CIEP)반응 및 Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay(ELISA)를 實施하여 이들사이의 相關關係를 檢토했다. AGD 반응과 CIEP反應은 肺吸蟲粗抗原原液(蛋白濃度: 7.56mg/ml)과 血清原液을 사용하였고 ELISA反應에서는 上記 粗抗原의 40,000배 희석항원을, 그리고 血清은 100배 및 200배 희석稀釋을 사용하였다.

1. AGD反應과 CIEP사이의 陽性反應의 一致率은 98%이었고 陰性反應의 一致率은 100%이었다. 沈降帶는 AGD反應에서 1~3個가 흔히 관찰되었고 CIEP反應에서는 1~7個가 관찰되었으며 染色強度도 後者에서 일부의 試檢稀釋에서 強하게 나타났다.

2. AGD反應과 ELISA反應은 陽性反應에서는 100배 희석血清에서 96%, 그리고 200배 희석稀釋에서 94%의 一致率을 나타내었고, 陰性反應에서는 100배 희석血清 및 200배 희석血清에서 各各 97%와 99%의 一致率을 나타내었다.

3. CIEP와 ELISA反應은 陽性反應에서 100배 희석稀釋에서는 98%, 200배 희석稀釋에서는 96%의 一致率을 나타내었고 陰性反應에서는 100배 희석稀釋에서 97%, 200배 희석稀釋에서 99%의 一致率을 나타내었다.

4. 對照血清인 肝吸蟲感染血清, 아메바感染血清 및 *Toxoplasma* 螢光抗體反應 陽性血清에 對한 AGD反應, CIEP 및 ELISA反應은 全例에서 陰性이었다.

以上的 結果로 볼 때 反應에 사용된 抗原-抗血清의 濃度로 보아서는 ELISA反應의 感受性이 월등히 높았다. 같은 濃度의 抗原과 血清을 사용한 AGD와 CIEP反應에서는 CIEP에서 침강반응의 염색강도가 보다 強하게 나타난 것으로 보아 세가지 반응의 감수성의 높은 順位는 ELISA, CIEP, AGD라고 보여진다. 그러나 本實驗에서 AGD와 CIEP反應에서 ELISA보다 높은 농도의 抗原과 抗血清을 사용하였을 때 감수성의 差異는 거의 볼 수 없는 유사한 상관관계의 反應을 나타내었다. 즉 반응방법에 따라 적절한 농도의 항원과 항稀釋을 사용한다면 감수성의 차이는 없다고 본다.

세가지 反應의 유효성으로 볼 때 가장 手技가 간편한 AGD反應은 粗抗原을 사용할 때 용이하게 사용할 수 있는 방법이라 생각되며 CIEP는 AGD보다 전기영동장치가 필요한 번거로움이 있으나 보다 早期에 反應結果를 알 수 있다. 가장 감수성이 예민한 ELISA反應은 抗原을 精製하여 少量의 抗原으로 多數의 集團檢査를 할 수 있는 가장 바람직한 방법이라 생각된다.

(本實驗을 수행함에 있어 ELISA反應을 檢査해 주신 연세대의 기생충학교실의 장재경 선생님께 감사드립니다)

參 考 文 獻

Ando, A. (1921) Complement fixation test in man and dogs infected with *Paragonimus westermani*. *Jap. J. Microbiol. Soc.*, 15: 391-404.

- Cho, S.Y., Hong, S.T., Rho, Y.H., Choi, S. and Han, Y.C. (1981) Application of Micro-ELISA in serodiagnosis of Human paragonimiasis. *Korean J. Parasit.*, 19(2):151-156.
- 崔源永·李元求·李玉蘭(1975) 間接螢光抗體法에 의한肺디스토마症의 診斷法 研究. *기생충학잡지*, 13(2):152-158.
- 崔源永·李玉蘭(1981) 實驗的 肺吸蟲症의 寒天沈降反應. *기생충학잡지*, 19(2):101-108.
- Craft, J.C. and Nelson, J.D. (1982) Diagnosis of Giardiasis by Counterimmunoelectrophoresis of Feces. *J. Infect. Dis.*, 145(4):499-504.
- Despommier, D., Muller, M., Jenks, B. and Fruitstone, M. (1974) Immunodiagnosis of human Trichinosis using counter-electrophoresis and agar gel diffusion techniques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(1):41-44.
- 布上正則(1930) 肺디스토마病における 皮膚反應に就て. *熊本醫會誌*, 6:513-514.
- Hillyer, G.V. (1975) Use of Counter-electrophoresis to Detect Infections of *Fasciola hepatica*. *J. Parasit.*, 63(3):557-559.
- Hillyer, G.V. and Capron, A. (1976) Immunodiagnosis of human fascioliasis by counter-electrophoresis. *J. Parasit.*, 62(6):1,011-1,013.
- Hillyer, G.V. and Allain, D. (1979) Use of Immunologic Techniques to Detect Chemotherapeutic Success in infections with *Fasciola hepatica*. III. Comparison of Counter-electrophoresis and Indirect Hemagglutination in Infected Rabbits. *J. Parasit.*, 65(6):960-963.
- Hillyer, G.V. and Weil, N.S. (1981) Serodiagnosis of experimental fascioliasis by immunoprecipitation tests. *Intern. J. Parasit.*, 11:71-78.
- 金東燦·李溫永·成雨永(1969) 肺 및 肝디스토마 診斷用 抗原의 檢定法 改良研究. 1. 肺디스토마 診斷用 抗原의 力價 및 同定을 위한 免疫反應試驗. *國立保健研究院報*, 6:291-308.
- Kruidenier, F.J. and Katch, A.K. (1959) Electrophoretic studies of the sera of white rats and cats following infection with *Paragonimus kellicotti*, Ward, 1908. *J. Parasit.*, 45(Suppl):17.
- Krupp, I.M. (1974) Comparison of Counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(1):27-30.
- 李溫永·橫川宗雄·辻守康(1970) 數種의 血清學的 術式에 의한 肺吸蟲感染 血清의 抗體測定에 관한 研究. *國立保健研究院報*, 7:307-321.
- Levine, D.M., Hillyer, G.V. and Flores, S.I. (1980) Comparison of counter-electrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay, and Kato fecal examination for the diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22(4):602-608.
- Long, G.W., Yogore, M.G., Lewert, R.M., Blas, B.L. and Pelly, R.P. (1982) Efficacy of purified *Schistosoma japonicum* egg antigens for ELISA serodiagnosis of human schistosomiasis japonica: Specificity and sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31(5):1,006-1,014.
- 松田 肇·中尾 稔·田中 寛·永田 傳, Ncsenas, J.S., Blas, B.L., Portillo, C.P. and Santos, A.T. (1981) 벨로オキシダーゼ 標識抗體, 5-アミノサリチル酸 基質を用いた日本住血吸蟲症の ELISA 反應の研究. *寄生蟲學雜誌*, 30(4):363-372.
- Nakao, M., Matsuda, H. and Tanaka, H. (1982) Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of circulating antigen in *Schistosoma japonicum* infections. *Jap. J. Parasit.*, 31(4):289-294.
- Naot, Y. and Remington, J.S. (1980) An Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Ig M antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 142(5):757-766.
- Ouchterlony, O. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5:1-78.
- Phillipson, R.F. and Fadzean, J.A.M. (1962) *Clo-norchis*, *Opisthorchis* and *Paragonimus* gel diffusion studies. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 56:13.
- Scapin, M. and Tendler, M. (1975) Immunoelectrophoresis as a Rapid Method for Detecting Soluble Antigenic Fraction of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 63(3):561-562.
- Seed, J.R., Sogandares-Bernal, F. and Mills, R.R. (1966) Studies on American paragonimiasis. II. Serological observations of infected cats. *J. Parasit.*, 52(2):358-362.
- Speiser, F. (1980) Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of filariasis and echinococcosis. *Tropenmed. Parasit.*, 31(4):459-466.
- 辻 守康(1975) 數種 寄生蠕蟲類の 感作血清による免疫電氣泳動像の 比較研究. *寄生蟲學雜誌*, 24(4):227-236.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976) A microplate enzyme immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J.*

- Clin. Path.*, 29:150-153.
- Xiaosu, H., Ruiyuan, F., Anqi, H., Fangqing, L., Heping Y. and Guangzhao, T. (1980) Immunodiagnosis of paragonimiasis by counterimmunoelectrophoresis and agar-gel diffusion. *Chinese Med. J.*, 93(8):557-561.
- Yang, J. and Kennedy, M.T. (1979) Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serodiagnosis of Amebiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 10(6):778-785.
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Blas, B.L. (1981) Schistosomiasis japonica in barrio San Antonio, Basey, Samar, in the Philippines. V. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) compared with quantitative stool examination and the circumoval precipitin(COP) test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30(6):1252-1262.
- Yokogawa, M., Kojima, S., Kobayashi, M., Hata, H., Ito, J., Tsuji, M., Miranda, H., Ibanez, N., Fernandez, E. and Guerra, A. (1983) Peruvian paragonimiasis: Diagnostic value of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). *Jap. J. Parasit.*, 32(4):317-322.
- 윤백현·최원영(1973) 페니스토마의 혈청학적 연구. 가톨릭大學醫學部論文集, 25:163-176.

=Abstract=

**Comparison of Agar-gel Diffusion Test, Counterimmunoelectrophoresis
and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the sera of
skin test positives for paragonimiasis**

Ok-Ran Lee

*Department of Parasitology, College of Medicine, Soonchunhyang
University, Choong-Nam, Korea*

Won-Young Choi

*Department of Parasitology, Catholic Medical College & Catholic
Institute of Parasitic Diseases, Seoul, Korea*

Agar-gel Diffusion test (AGD), Counterimmunoelectrophoresis (CIEP) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) were examined with the sera of skin test positives for paragonimiasis.

The crude antigen (*Paragonimus* whole worm extracts: protein concentration, 7.56mg/ml) and human sera were used in AGD and CIEP. And in ELISA test, diluted antigen with 1:40,000 of crude antigen and diluted sera with 1:100, 1:200 were used in the test.

The positive identical ratio between AGD and CIEP reactions is 98% and negative identical ratio is 100%. One or three precipitin bands are observed in AGD. One to seven precipitin bands are also revealed in CIEP. Especially, deeply stained bands are observed in CIEP than those of AGD.

The positive identical ratios between AGD and ELISA tests are 96% in 1:100 diluted sera, and 94% in 1:200 diluted sera. But the negative identical ratios between AGD and ELISA tests are 97% and 99% respectively in 1:100 and 1:200 diluted sera.

The positive identical ratios between CIEP and ELISA tests are 98% and 96% respectively in 1:100 and 1:200 diluted sera, but also 97% and 99% in 1:100 and 1:200.

Control sera, such as clonorchiasis, amoebiasis and toxoplasmosis, revealed all negatives with *Paragonimus* antigen in AGD, CIEP and ELISA tests.

By above results, ELISA was most sensitive, next CIEP and AGD. But AGD test appears to be more useful when used to crude antigen without cross reaction with other parasitic infections. CIEP test is basically equal in terms of precipitin reaction, but CIEP is able to be detected more sensitively and rapidly though less simple in handiwork than AGD.

Consequently, three methods for immunological tests of paragonimiasis have good correlations with one another. Also, each of these has both merits and demerits in immunological test for paragonimiasis. But the ELISA test was proved to be the most sensitive and convenient tool for mass screening test, especially in case of using purified antigen.