

寄生蟲疾患의 免疫血清學的 診斷에 관한 研究*

高麗大學校醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶風土病研究所

林漢鍾 · 李駿商 · 朱炆煥 · 嚴基善** · 鄭明淑

緒 論

우리나라의 寄生蟲疾患은 지난 10여년 동안의 집중적인 관리와 우수한 치료제의 출현으로 현격히 減少되었으며, 특히 회충 등 線蟲類寄生蟲의 感染率은 팔목할 만큼 현저하게 감소되었다. 그러나 아직 까지도 감염자가 많거나 진단 및 치료의 난점, 또는 감염에 따른 육체적인 손상의 정도등을 감안하여 관리에 보다 많은 신경을 써야 할 기생충질환등이 많이 남아있다. 예를들어 肝吸蟲은 우리나라에서 아직 100만명 이상이 감염되어 있고 감염원에 계속 노출되어 있는 상태이며, 肺吸蟲症은 감염원 및 감염원에 대한 노출기회는 크게 감소하였으나 異所寄生(ectopic paragonimiasis)의 경우 심한 증상이 일어남에도 불구하고 치료 및 진단이 곤란하고, 유, 무구조충 및 낭미충증 역시 진단의 어려움과 더불어 전신발작등 신경증상을 야기시킨다. 그 밖에도 스파가눔증, 아나사키스증등이 감염에는 많이 보고되어 있지 않아도 문제가 될 수 있으며 *Capillaria hepatica*의 불현성감염도 현재 전혀 알려진 바 없으나 관심의 초점이 될 수 있는 기생충질환의 예로 들 수 있다.

이들 질환은 肝吸蟲의 경우를 제외하고는 대부분 진단상의 어려움이 있어서 흔히 기생충질환 진단에 사용되는 大便檢査만으로는 感染與否를 확인하기 어렵다는 공통점이 있다. 최근에 이르러 국내에서는 이들 기생충질환에 대하여 혈청학적 진단법인 ELISA법으로 진단해 보고자 하는 노력이 활발히

전개되고 있다. 결과 간 및 폐흡충증의 진단에 있어서는 그간 많은 진전이 있었으며 낭미충증등 여러 가지 기생충질환에 대한 혈청학적 진단도 최근에 이르러 활발하게 연구되고 있다. 그러나 간 및 폐흡충증의 진단에 있어서는 상호간 또는 기타 흡충류 질환 사이에 일어나는 교차반응이 항상 문제가 되고 있으며(李들 1983¹⁾; 梁들 1983²⁾; 陣들 1983³⁾ 및 李들 1981⁴⁾) 이들 검사의 교차반응은 결국 검사의 특이도를 낮추어 위양성반응을 일으키거나 민감도를 떨어뜨려 위음성반응을 유도하는 결과가 되고 있다. 이와 같은 현상은 비단 肝, 肺吸蟲에만 국한되는 것이 아니며 낭미충증의 혈청학적 진단에 있어서도 역시 마찬가지 양상을 보이고 있다. 가령 유구낭미충을 조항원으로 하여 낭미충증 진단에 사용할 경우 유구낭미충 자체가 매우 복잡한 항원체계를 갖고 있는 관계로 공통항원의 존재에 따라 교차반응이 일어나며 특히 *Echinococcus*종과의 교차반응이 해외에서는 문제가 되고 있다(Schantz들, 1980⁵⁾). 우리나라에서 최근 발표된 성적들을 참조해 보아도 무구조충, 스파가눔, 폐흡충, 광절열두조충, 간질(*F. hepatica*) 등과의 교차반응이 보고된 바 있다(Cho들 1986⁶⁾; 강들 1987⁷⁾).

따라서 이러한 문제에 근본적으로 접근해 들어가기 위해 저자들은 이미 오래전 부터 기생충질환은 물론 다른 여러 분야의 질환의 진단목적으로 사용되어 왔던 난주위침강반응, 간접혈구응집반응, 보체결합반응, 간접형광항체법은 물론 근래에 널리 이용되고 있는 ELISA와 western blot법 등을 이용하여 기생충질환 진단목적의 혈청학적 진단법을 좀더 개발시켜 나가 보고자 하였다.

* 이 논문은 1986년도 문교부 자유과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

** 충북대학교 의과대학 기생충학교실

實驗材料 및 方法

1. 대상 기생충질환

우리나라에서 문제가 되고 있는 몇가지 윤충류 감염증을 대상으로 하였다. 흙충류중에서는 간흡충, 조충류에 있어서는 낭미충에 대하여, 그리고 선충류에 있어서는 *Capillaria hepatica*를 연구대상 기생충으로 선정하였다.

2. 항원의 제조

기생충항원은 실시하는 검사법에 따라 항원제조 방법이 다르다. 그러나 대체적으로 인산완충액 추출조항원을 사용하였고, 일부검사에 있어서는 총란을 사용하거나 충체절편조직 또는 그 밖의 추출방법을 사용하였다. 간흡충항원 제조에 쓰인 방법을 중심으로 하여 기록하고자 한다.

1) 간흡충항원

a) 간접혈구응집반응용 항원

경남 김해산 참붕어(*Pseudorasbora parva*)의 근육에서 피낭유충을 분리시켜 흰쥐에 감염시킨 다음 5주후 부검하여 성충을 수집하고 추출항원을 얻어 실험에 사용하였다. 200mg의 동결건조된 간흡충과 10ml의 무수에테르를 조직교반기에 넣고 주위를 얼음주머니로 싸 다음 10~15분간 완전히 마쇄하였다. 교반기에 다시 5ml의 에테르를 더 넣어 씻은 후 원심침전관으로 옮겨 850g 30분간 원심분리한 후 상층액을 항원으로 사용하였다.

b) 간접형광항체반응용 항원

간흡충의 성충체를 절단하여 항원부착슬라이드를 만든 후 Wilson들(1974)*의 방법을 약간 수정하여 제작하였다. 즉 수집된 간흡충의 성충을 증류수에 3회 세척하여 여과지로 수분을 흡수시킨 후 냉동시킨 O.C.T. Tissue-tek II embedding medium block에 부착하여 -40°C에 보관하였다가 -30°C에서 cryo-cut를 사용하여 15um의 두께로 절단하였다. 주로 간흡충의 인두와 복흡반의 사이에서 얻어진 절편을 pot-slide에 부착하여 반응에 사용할 때까지 -40°C에 보관하였다.

c) ELISA용 항원

녹십자제조 피내반응 항원을 사용하였다. 단 wes-

tern blot의 경우에 있어서는 별도의 항원을 만들어 사용하였다. 즉 동결건조된 충체 1gm을 0.05mM PMSF와 phosphate buffer 10ml 당 SBTI 0.002gm이 함유된 phosphate buffer 20ml에 녹여 teflon coating된 glass homogenizer에 넣어 마쇄하였다. 마쇄된액을 10,000rpm에서 60분간 원심분리하고 상층액을 얻어 항원으로 사용하였다.

2. 낭미충항원

a) 간접형광항체반응용 항원

뇌낭미충에 감염된 사람의 제 4 뇌실로부터 외과적 수술에 의해 적출한 낭미충의 낭벽조직을 항원으로 사용하였다. 낭벽을 3×5mm의 크기로 절단한 다음 4°C의 PBS(pH 7.2)로 여러차례 세척하고 Tissue-tek II embedding medium에 포매하여 블록상태로 -40°C에 보관하였다가 cryo-cut microtome을 사용하여 -20°C에서 10um의 두께로 절단하였다. 낭벽항원의 절편은 알코올로 닦은 spot slide에 부착하여 실험에 사용할 때까지 -40°C에 보관하였다.

b) ELISA 및 western blot용 항원

낭미충에 자연감염된 제주도산 돼지의 근육으로부터 도살후 떼어낸 낭미충을 PBS로 잘 세척한 다음 26호의 주사바늘을 사용하여 낭액을 뽑아내 그대로 사용하였다. 사용하기전에 0.45um의 filter membrane으로 여과하여 사용하였다.

3. *Capillaria hepatica* 항원

a) ELISA용 항원

*C. hepatica*의 자충포장란 2000개를 감염시킨 후 6주된 흰쥐에서 분리한 총란을 5주간 배양하여 얻은 자충포장란 0.2ml(packed volume)를 증류수로 3회 세척하여 2ml의 carbonate coating buffer(pH 9.6)에 옮겨 담은 후 2시간 동안 마쇄하였다. 여기에 같은량의 carbonate coating buffer를 넣고 4°C에서 24시간 추출되도록 방치하였다. 추출액을 4°C의 냉동원심기로 48,000g에서 30분간 원심시켜 상층액을 얻어 visking tube에 넣고 24시간 투석한 후 단백질 함량이 1.25ug/ml(Lowry method)로 되도록 희석한 수용성 총란항원을 사용하였다.

b) 난주위침강반응용 항원

*C. hepatica*총란을 5주간 배양하여 동결건조시킨 총란을 사용하였다.

c) 간접형광항체반응용 항원

자충포장란 1000개를 경구감염시켜 5주간 경과된 마우스에서 충란이 집적된 부분을 적출한 즉시 가로세로 각각 3mm의 크기로 절단한 후 PBS에 수회 세척하였다. 이를 OCT Tissue-Tek II embedding medium에 포매하여 -20°C 에서 cryo-cut microtome으로 6~8 μm 으로 절단한 후 spot slide에 부착하여 항원으로 사용하였다.

3. 검사방법

1) 간접혈구응집반응법

Kagan(1970)⁹⁾이 변형시킨 IHA에 관한 Boyden technique(1951)¹⁰⁾을 그대로 사용하되 실험실 조건에 맞추어 약간 변형시켰다.

2) 난주위침강반응

金들(1982)¹¹⁾의 방법에 따라 PBS(pH 7.2)에 16배로 희석한 시험혈청을 concave slide에 떨어뜨리고 37°C 에서 충란과 반응시켰다. 이때 충란은 40ul PBS당 50~100개가 되도록 하였다. 반응이 끝난 충란을 PBS에 3회 세척하고 0.01% Evans blue용액에 16배로 희석한 goat anti-rat immunoglobulin conjugated with fluorescein isothiocyanate(Cappel lab.) 내에서 37°C 6시간 반응시킨 후 다시 세척하여 형광현미경(AO Microstar : 광원 HBO_{50w} L2 ; exciter filter, Schott BG-12 ; barrier filter, Schott OG-1 : dark field condenser)으로 관찰하여 점막전 주위에 초록색의 특이한 형광이 나타날 때 양성반응으로 판정하였다.

3) 간접형광항체반응법

Wilson들(1974)⁸⁾ 및 權들(1984)¹²⁾의 방법에 따랐다. 항원부착 슬라이드를 실온에서 건조시킨 후 -20°C 의 acetone에 10분간 처리한 다음 실온에서 30분이상 완전히 건조시켰다. 희석된 혈청을 각 항원에 10ul씩 micropipette으로 떨어뜨리고 moisture chamber에 넣어 항온기 내에서 30분간 반응시킨 후 PBS(pH 7.2)에 슬라이드를 넣어 60~70rpm rotator로 20분간 세척하고 항원이 완전히 건조되기 전에 형광표지항체 10ul를 떨어뜨리고 다시 항온기내에서 30분간 반응시켰다. 같은 방법으로 세척한 다음 buffered glycerine(pH 9.0)을 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 24×50mm 커버글래스를 덮고 형광을 관찰하였

다. 형광의 관찰 및 형광표지항체는 난주위침강반응에 기재한 바와 같다.

4) ELISA

Voller들(1979)¹³⁾과 McLaren들(1978)¹⁴⁾의 방법을 약간 수정하였다. 통상의 방법을 사용하되 conjugate는 peroxidase system을 사용하였고, 488nm의 ELISA광량계(micro ELISA reader, Dynatech lab)로 흡수광량을 측정하였다. Conjugate의 용량, 반응시간, 항원의 농도, 차단치등은 각각의 시험에 따라 기준이 일정하지 않으므로 실험성적에서 간략히 기재하였다.

실험에 사용된 용액은 다음과 같다.

① 도포완충액 : pH 9.6(Na_2CO_3 1.59gm, NaHCO_3 2.93gm, NaN_3 0.2gm, 증류수 1,000ml)

② 인산완충액 : pH 7.4(NaCl 8.0gm, KH_2PO_4 0.2 gm, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9gm, KCl 0.2gm, Tween 20 0.5ml, 증류수 999.5ml)

③ 기질용액 : (0.1M acetic acid 24.3ml, 0.2M phosphate 25.7ml, orthophenylene diamine, OPD 20mg, 30% H_2O_2 20ul)

5) SDS-PAGE 및 EITB

Tsang(1983)¹⁵⁾에 기재된 바와 같은 방법으로 실시하였다. Gel은 Pharmacia Fine Chemicals의 160×200×0.8mm의 vertical system을 사용하였으며, 완충액은 Neville(1971)¹⁶⁾들이 변형시킨 Jovin들(1971)¹⁷⁾의 J4179 system을 사용하였다. 항원재료는 SDS의 최종농도를 pH 8.0의 urea를 넣은 용액으로 희석하여 2.5%가 되게 한 다음 여기에 항원재료를 0.2ug/ul가 되게 하여 사용하였다.

재료는 3~20% linear gradient gel과 3% stacking gel을 이용하여 stacking gel에서는 10mA, resolving gel에서는 20mA로 하여 영동하였다. Sample application의량은 10ul, 염색은 Merril들(1981)¹⁸⁾의 silver stain법으로 하였다.

역시 Tsang(1983)¹⁵⁾의 방법에 따라 SDS-PAGE로 분해된 단백분획을 nitrocellulose paper에 blot시켰다. Blot는 250Vdc constant(Current 0.5~2.0A)로 1시간 동안 실시하였다. NC paper는 0.5cm간격으로 잘라서 slotted incubation tray에 넣고 PBS-0.3% Tween 20액으로 1 : 200희석한 여러가지 혈청을 넣어 rotary shaker에서 overnight시켰다. 항원대와 부

착한 항체는 ELISA법으로 확인하였으며 과정중 conjugate는 ELISA에서와 마찬가지로 하였다. Chromogenic substrate는 3,3'-diaminobenzidine(Sigma)로 발색시켰다.

檢 査 成 績

1. 간흡충증에 있어서의 혈청학적 검사

1) 간접혈구응집반응

100예의 간흡충 감염자 혈청을 간접혈구응집반응로 조사한 결과는 Table 1과 같다. 즉 100명의 감염자중 양성 기준의 삼은 역가 1:16이상인 사람이 모두 84명이었고 정상 대조 58명중 1:16이상은 1명 1:8이하가 57명(98.3%)으로 나타났다. 양성자의 경우에 있어서 역가는 주로 1:32~1:256에 분포하고 있었으며, 모두 16명이 음성으로 처리되었다. 대변검사상 음성이었던 사람중 1예가 1:64의 양성 반응을 보였다. 이와 같이 1:16이상을 양성으로

했을 때 간접혈구응집반응의 민감도 및 특이도는 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 민감도는 경감염(EPG 1~999) 55예중 44예에서 양성으로 나와 80.0%, 중등도 감염(1,000~9,999) 31예중 27예가 양성으로 87.1%, 중감염(10,000~29,999) 4예는 모두 양성 있었고, 중중감염(30,000EPG 이상) 10예중 9예가 양성이어서 90.0%를 나타내었다. 따라서 100명중 민감도는 84.0%에 이르고 있었다.

반면 음성자 58명중 양성은 단 1예이어서 특이도는 98.3%이었다. 이를 ELISA와 비교하면 역시 Table 2와 같은 바 경감염 55예중 47예가 양성(85.5%)이었고, 중등도감염 31예중 29예(93.6%), 중감염은 4예 모두에서, 중중감염은 10예 모두에서 양성인 등 100예중 90%의 민감도를 나타내고 역시 98.3%의 특이도를 나타내어 ELISA법이 약간 우수한 결과를 나타내었다.

교차반응을 보기위하여 동시에 실시한 총 51예의 기타 기생충 감염자 혈청에 대한 검사 결과 폐흡충

Table 1. Indirect hemagglutination antibody titers in clonorchiasis patients sera according to the degree of infection.

Degree of infection*	No. Exam	Titer of IHA**										
		Negative				Positive						
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Light	55	4	3	4	4	15	7	7	5	4	1	1
Moderate	31	1	1	2	2	7	3	4	6	3	1	1
Heavy	4	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
Very heavy	10	1	0	0	0	0	0	2	2	0	2	3
Total	100	6	4	6	7	23	10	13	13	8	4	6
Control	58	39	14	4	0	0	1	0	0	0	0	0

* : Light infection : EPG 1~999, Moderrate : EPG 1000~9999, Heavy : EPG 10,000~29,999 Very heavy : EPG 3000~

** : Positive tieter is 1 : 16

Table 2. Sensitivity and speibicity of IHA and ELISA in the diagnosis of clonorchiasis

Degree of infection	No. Exam.	IHA		ELISA	
		No. Posit.	(%)	No. Posit.	(%)
Light	55	44	80.0	47	85.5
Moderate	31	27	87.1	29	93.6
Heavy	4	4	100.0	4	100.0
Very Heavy	10	9	90.0	10	100.0
Total	100	84	84.0	90	90.0
Control	58	57*	(98.3)**	57*	(98.3)**

*No. of negative** specificity

Table 3. Cross reactivity of IHA by *Clonorchis sinensis* adult worm crude antigen

Serum Ab. of	No. Exam.	No. Posit.	Per cent
<i>P. westermani</i>	11	2*	18.2%
<i>Taenia sp.</i>	6	0	0
<i>D. latum</i>	4	0	0
<i>Cysticercus</i>	10	0	0
<i>S. mansoni</i>	9	0	0
<i>H. nana</i>	4	0	0
<i>H. heterophyes</i>	1	0	0
Filariasis	6	0	0
Total	51	2	3.9%

*These two *Paragonimus* cases revealed positive reaction in the ELISA

감염자 11명중 2예가 양성반응을 나타내었다.

반면 *Taenia*조충, 광절열두조충, 낭미충, 만손주혈흡충, 왜소조충, 이형흡충, 사상충등의 감염자에 있어서는 양성반응을 보인 예가 없었다(Table 3).

2) 간접형광항체반응

간흡충감염자의 혈청을 1:8에서 1:1024까지 PBS로 희석시키고 환자의 혈청을 가하지 않은 PBS를 대조로 하여 항원부착 슬라이드에 반응시킨 후 fluorescein isothiocyanate와 다시 반응시킨 결과

특이한 초록색의 형광이 나타나는 양성반응을 보였다. 항체가별 분포와 교차반응은 Table 4에서 보는 바와 같다. 즉 1:16이 제일 많아 40예이었고 1:32가 15예, 1:64가 7예등이었다. 기타 기생충감염자 16명중 1:16 이상되는 예는 한 사람도 없었으나 정상인 9명중 1명에서 1:16의 양성반응을 나타내었다. 이를 감염강도에 따라 나누어 보면 Table 5와 같다. 즉 간흡충 감염자 117예중 양성반응을 나타낸 사람은 72명으로 61.5%의 양성률을 나타내었다. 그중 경감염군은 28.1%, 중등도감염군은 68.9%, 중감염군은 77.8%, 중중감염군은 84.6%의 양성률을 나타내었다. 일반적으로 EPG가 높을 수록 IFAT의 희석배율도 높게 나타났으며, 경감염군과 다른 군들과는 양성률에 있어서 많은 차이를 나타내었다.

3) ELISA

간흡충감염자 138예에 대하여 ELISA를 실시하여 얻은 ELISA치의 분포는 Table 6과 같다. ELISA치는 평균 1.674 ± 0.601 이었으며, 정상인 9명의 혈청은 평균 0.108 ± 0.081 을 나타내었다. 138명의 혈청중 양성기준으로 삼은 1.000이상의 OD값을 나타낸 예는 115명으로 83.3%이었다. 조충증환자 37명중 2명의 혈청에서 양성반응이 나타났다.

Table 4. Indirect immuno-fluorescent antibody titers on tissue sections of adult *C. sinensis*

Serum Ab.	No. Exam.	Dilution of sera						
		<1/16	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
<i>C. sinensis</i>	117	45	40	15	7	5	4	1
<i>H. nana</i>	4	4	—	—	—	—	—	—
<i>P. westermani</i>	4	4	—	—	—	—	—	—
<i>C. cellulosae</i>	4	4	—	—	—	—	—	—
<i>T. gondii</i>	4	4	—	—	—	—	—	—
Non-infected human	9	8	1	—	—	—	—	—

Table 5. Distribution of the indirect immuno-fluorescent antibody titers against 117 *C. sinensis* infected sera by degree of infection

Degree of infection	No. of case	Dilution of sera							% of positive
		<1/16	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
Light infection	32	23	6	2	1	—	—	—	28.1
Moderate infection	45	14	22	7	—	1	1	—	68.9
Heavy infection	27	6	9	5	3	2	2	—	77.8
Very heavy infection	13	2	3	1	3	2	1	1	84.6
Total	117	45	40	15	7	5	4	1	61.5

Table 6. Range of O.D. values of ELISA in clonorchiasis and other group

Group	No. of case	OD (Mean ± SD)	Range	OD values			
				<0.5	0.5~1.0	1.0~1.5	1.5<
clonorchiasis	138	1.674±0.601	0.085-2.232	9	14	16	99
paragonimiasis	1	0.206		1	0	0	0
taeniasis	37	0.236±0.442	0.000-2.056	33	2	0	2
non-infected human sera	9	0.108±0.081	0.005-0.261	9	0	0	0

4) Western blot

간흡충의 urea soluble antigen을 SDS-PAGE한 결과 14K로부터 69K의 relative molecular weight 사이에 산재한 항원대를 나타내고 있는데 그 중 14~22K사이에 있는 한 개의 band와 25~35K사이의 여러 개의 작은 band, 그리고 48~69K사이에 수개의 주요항원대가 있었다. 이를 nitrocellulose paper로 transfer한 다음 ELISA를 실시한 결과 59K의 band와 21K의 또 다른 항원대가 다른 혈청과는 반응하지 않아서 종특이성의 반응이 있는 것으로 추정되었다. 그 밖의 대부분의 band들은 대부분 폐흡충 혈청과 반응하며 주혈흡충 감염혈청과도 교차반응을 보이고 있었다(Fig. 1, 2).

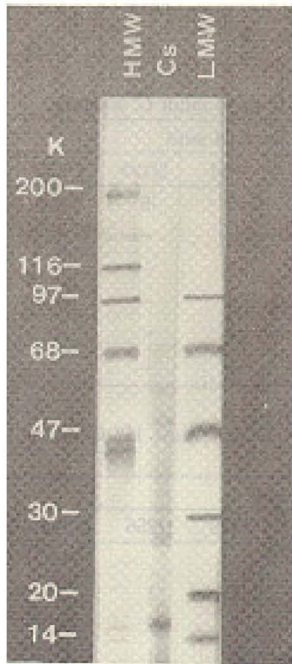


Fig. 1. SDS-PAGE of *C. sinensis* antigen(2ug/lane).

5) 치료후의 역가변동

a) 혈청 및 뇨의 ELISA치 변동

투약후 IgG항체의 ELISA에 의한 흡광도의 변화는 Table 7과 같다. 즉 투약전 혈청의 흡광도는 1.122±0.551이었으나 9개월후에는 급격히 감소하여 0.572±0.434이었고 그 이후로는 서서히 감소하여 18개월에는 0.464±0.188이었다. 반면에 대조군에서는 투약전, 9

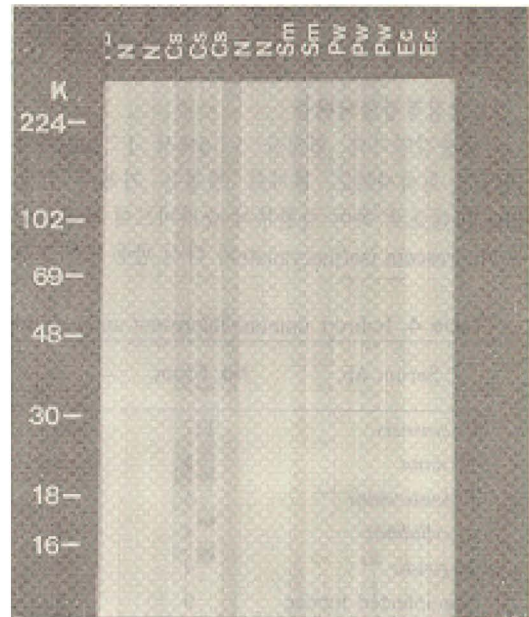


Fig. 2. EITB from *C. sinensis* crude saline extract antigen.

For the EITB the nitrocellulose strips containing .2ug/lane of antigen protein were incubated with various sera.

- N : negative control
- Cs : clonorchiasis
- Sm : schistosomiasis
- Pw : paragonimiasis
- Ec : echinococcosis
- PB : PBS

Table 7. Changes of mean absorbance values(488nm) of serum & urine by ELISA after praziquantel administration in clonochiasis

Group	Pre-Treatment (mean± S.D.)	Post-treatment(mean± S.D.)	
		9 month	18 month
Serum 22	1.122± 0.551	0.572± 0.434	0.464± 0.188
Control 13	0.291± 0.163	0.301± 0.115	0.286± 0.134
Urine 22	0.484± 0.467		0.261± 0.376
Control 13	0.232± 0.098		0.252± 0.101

*pre-treatment mean EPG of study group ; 2,831 EPG (range 100~13800)

Table 8. Negative conversion rate of IHA in clonorchiasis at 18 months after praziquantel treatment

	No. Exam	Range of titer before Tx.	Negative conversion after Tx.(%)	Range of titer after Tx.
Light	10	8 ~ 512	8(80.0)	2~16
Moderate	8	16 ~ 128	5(62.5)	8~32
Heavy	2	64, 2048	2(100)	2.2
Very heavy	5	512~2048	5(100)	2~ 4
Total	25	1.8 ~2048	20(80.0)	1 : 2~32

Table 9. Intensity of fluorescent reaction at different locations of cyst wall antigen in cysticercosis and pseudopositive cases for cysticercosis IFAT.

Location	Cysticercosis	Pseudopositives*
Tegument	+++**	+
Nuclear layer	+-	-
Fibrous layer	--	--
Internal surface	++++	+

* : Pseudopositive cases for cysticercosis by IFAT

** : Intensity of fluorescent reaction from -to +++++ at 16 fold dilution of sera

개월 및 18개월에 있어 별다른 변동을 보이지 않았다. 한편 뇨를 이용하여 ELISA를 실시한 바 대조군의 경우 투약전 및 투약 18개월후 검사에 있어서 별다른 변화가 없으나 감염군의 경우 치료전 0.484±0.467로부터 치료후 0.261±0.367로 약 1/2수준으로 감소하였다.

b) 간접혈구응집반응 역가의 변동

치료후 원격추적 및 간접혈구응집반응 검사가 가능하였던 25예의 치료 18개월 후 역가변동은 Tabel 8에 기재한 것과 같은 바 경감염자 10예중 8예(80.0%), 중등도감염자의 62.5%(5/8)가 음전되었으며, 중감염 및 중중감염자는 7예 모두 음전되었다. 따라서 이 조사의 25명중 20(80.0%)명이 치료후 18

개월에 음전된것이 확인되었다.

2. 낭미충증의 혈청학적 검사

1) 간접형광항체반응

낭미충 낭벽의 구조는 표피, nuclear layer, fibrous layer 및 내막(internal surface)으로 이루어져 있으며, 이들 각 부분은 항원항체반응의 강도에 서로 차이가 있었다. Table 9는 혈청희석배율 16에서의 낭미충증과 타 기생충감염증에 의한 위양성 경우에 의한 각 부위 반응의 강도이다. 낭미충증 혈청의 경우에 있어서 가장 반응이 강하여 뚜렷한 형광을 나타내었던 부위는 내막이었고, 표피, nuclear layer의 순이었으며, fibrous layer에서는 반응을 보이지 않았다. Nuclear layer는 전반적으로 넓게 분포된 부분에서 항원성을 나타내었다. 또한 낭미충에 대한 위양성반응을 나타낸 혈청에는 유, 무구조충증, 광절열두조충증, 간흡충증이 포함되어 있었으며, 이들은 표피와 내막에 미약한 형광을 나타내었다. Fibrous layer에서는 Evans blue에 붉게 대조염색됨으로써 음성으로 항원성을 나타내지 않았다.

이와 같은 방법을 이용하여 낭미충증 감염자의 혈청 24예에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다. 즉 혈청희석배율 1:16을 양성기준으로 할 때에 95.8%(23/24)의 감수성을 나타내었다. 낭미충증환자의

Table 10. IFA titers and mean(log₂) in various parasitoses and non-infected cases

Parasite	No. Exam.	IFA titers									Mean $\frac{1}{4}(\log_2)$
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
Cysticercosis	24			1	6	3	5	5	3	1	6.67
<i>Taenia solium</i>	5			3	2						3.49
<i>Taenia saginata</i>	15	1	10	2	2						2.58
<i>Diphyllobothrium latum</i>	17	4	7	4	2						2.56
<i>Hymenolepis nana</i>	12	5	7								1.66
Sparganum	1		1								2.00
<i>Clonorchis sinensis</i>	36	14	14	7	1						2.11
<i>Paragonimus westermani</i>	11	6	5								1.54
Non-infected control	65	41	16	8							1.69

Table 11. The sensitivity and cross reactivity of *cysticercus cellulosae* antigen as determined by ELISA

Infected Parasite	No. evaluated	No. of positives using	
		Vesicular fluid Ag	Parenchymal Ag
Cysticercus	40	36(90.0)	30(75.0)
<i>Taenia species</i>	14	3(21.4)	2(14.3)
<i>D. latum</i>	7	2(28.6)	2(28.6)
<i>P. westermani</i>	9	1(11.1)	3(33.3)
<i>C. sinensis</i>	16	0	0
Sparganum	1	0	1
Non-infected case	20	0	0

혈청역가의 평균은 6.67(log₂)로서 다른 기생충증에서의 1.00~3.49(log₂), 또는 정상인의 혈청역가의 평균 1.69(log₂)보다 훨씬 높았다. 1.00~3.49(log₂), 또는 정상인의 혈청역가의 평균 1.69(log₂)보다 훨씬 높았다. 유구조충 5예중 2예(40.0%), 무구조충은 15예중 2예(13.3%), 광절열두조충은 17예중 2예(11.8%)에서 교차반응을 나타내었다.

또한 각 기생충증의 혈청역가의 평균은 왜소조충증의 1.66(log₂)에서부터 유구조충증 3.49(log₂)까지 분포하였다. 간흡충은 36예중 1예(2.8%)에서 교차반응을 나타내었으며, 흡충류 기생충의 혈청역가의 평균은 요꼬가와 흡충증의 1.00(log₂)에서부터 간흡충증의 2.11(log₂)까지 분포하였다. 또한 호산구증가증을 보인 8예에서는 혈청역가 2에서 3예, 4에서 4예 및 8에서 1예를 보임으로써 평균혈청역가 1.91(log₂)을 나타내었다(Table 10).

2) ELISA

ELISA법으로 낭미충양성자 40명의 혈청에 대해

검사한 성적을 보면 Table 11과 같다. 차단치는 낭액항원을 사용할 경우 OD치가 0.39, 낭미충항원을 사용할 경우는 0.42이었다. 검사결과 양성자 40명중 ELISA양성인 예는 36명이어서 90.0%의 민감도를 나타내었으며, 낭미충항원의 경우는 30명만이 양성 이어서 75.0%의 민감도를 나타내었다. 본 검사에 있어서의 ELISA법의 특이도는 검사대상으로 한 20명의 정상인 혈청중 단 1예도 양성반응자가 나타나지 않아 두 방법 모두 100%의 특이도를 나타내고 있었다. 그러나 교차반응을 보면 낭액항원을 이용할 경우 ELISA에 있어서 유, 무구조충 14예중 3예, 광절열두조충 7예중 2예, 폐흡충 9예중 1예에서 양성반응을 나타내었으며, 낭미충항원의 경우 유, 무구조충 14예중 2예, 광절열두조충 7예중 2예, 폐흡충 9예중 3예, 스파가눔 1예에서 양성반응이 일어나고 있었다. 간흡충의 경우는 16예를 조사하여 교차반응이 확인된 예는 없었다.

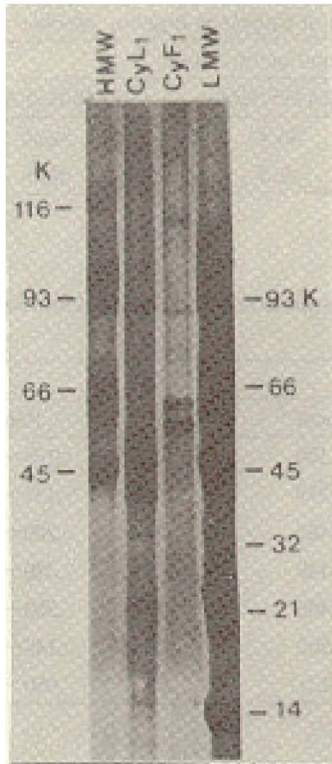


Fig. 3. SDS-PAGE of CyF₁ & CyL₁(2ug/lane)
 CyF₁ : Cystic fluid antigen
 CyL₁ : *Cysticercus cellulosae* antigen

3) western blot

낭액항원은 SDS-PAGE상 106, 91, 63, 21kd의 주요항원대를 포함하는 여러개의 band로 구성되어 있었다(Fig. 3). 이 중 116~200kd 사이에서 나오는 band는 비특이적이며 106kd의 band는 대조혈청과도 반응하였다. 낭미충감염자 혈청은 106kd, 91kd, 63kd 및 21kd의 band와 반응하였다. 이 중 91, 63, 21kd의 band는 낭미충 감염자 혈청에 특이하게 반응하였으나, 모든 낭미충감염혈청에 반응하는 것은 63kd band이었다(Fig. 4).

3. *Capillaria hepatica*의 혈청학적 검사

1) 난주위침강반응

난주위침강반응(COP)후 형광을 염색한 결과 양성혈청에서는 초록색의 특이한 형광이 점막전(mucoïd plug)주위에만 나타났고, 난각의 다른 부위에서는 나타나지 않았다. 또한 대조군혈청에서는 간호충란의 점막전에 침강물을 형성한 것이 발견되었으

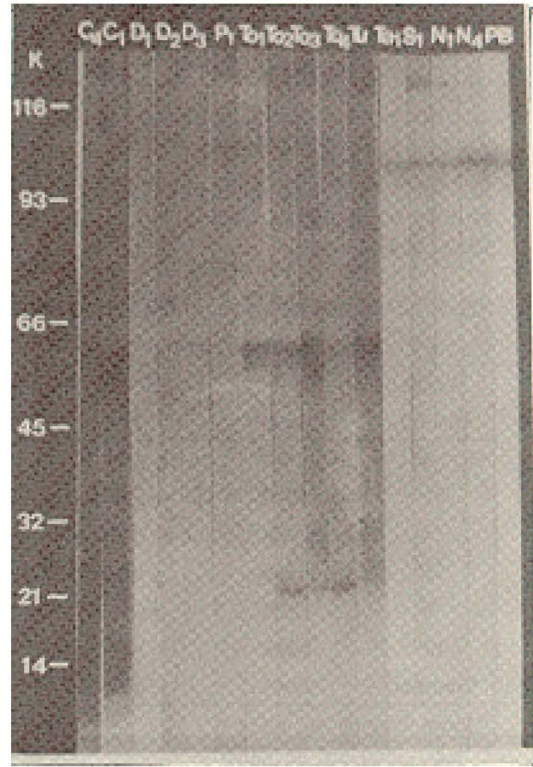


Fig. 4. EITB of CyF₁(cystic fluid antigen)
 For the EITB the nitrocellulose strips containing 2ug/lane of antigen protein were incubated with various sera.
 C : *Cysticercus* D : *D. latum*
 P : *P. westermanni* :
 Ta : *Taenia saginata*
 To : *Taenia solium*
 Tu : *Taenia* species
 S : sparganosis
 N : negative control
 PB : PBS

나, 전례에서 형광에 염색이 되지 않았다. 40마리에서 얻은 피검혈청중 34마리에서 양성을 나타내어 85.0% (34/40)의 감수성을 보였으며, 각혈청은 총란중 24~61%에서 양성반응을 일으켰다. 16배 혹은 그 이상에서 특이한 형광을 보이는 경우를 양성으로 판정하였으며, 양성반응이 일어나는 최대희석배율을 항체가로 하였다. 양성일 경우의 반응부위는 간조직 내에서 종단 또는 횡단으로 절단된 충란의 내막부분이었으며, 난각의 외막 및 pillar, laminated 및 non-laminated layer, 점막전은 orange-red의 비특이형광을 보였으며, 충란의 외부 및 충체내부의 구성물질은

Table 12. Sensitivity of different immunoassay in the diagnosis of *Capillaria hepatica* infection

	Test and antigen used		
	COP(EGGS)	IFAT(ScEA*)	ELISA(SEA**)
No. positive/total positive	34/40	33/40	34/40
Sensitivity of test(%)	85.0	82.5	85.0

*ScEA : sectioned egg antigen

**SEA : soluble egg antigen

Table 13. Means and ranges of IFAT titers and ELISA absorbance values in sera from 5 *C. hepatica* infected rats and 30 normal rats

Weeks Post-inf.	IFAT			ELISA		
	Mean*	S.D.	Range	Mean**	S.D.***	Range
0	2.848	± .678	4~8	.179	± .019	.165~.215
1	2.848	± .678	4~8	.219	± .069	.127~.301
3	8.138	± 6.970	128~512	.492	± .211	.260~.868
5	8.138	± 6.970	128~512	.449	± .091	.329~.611
9	4.138	± 2.963	8~32	.405	± .127	.253~.567
13	2.848	± .678	4~8	.205	± .049	.147~.295
Controls	2.848	± .678	4~8	.131	± .059	.050~.230

*Mean titer in log₂ units

**absorbance value

***S.D. : standard deviation

미약한 비특이형광반응을 보였다.

대조군혈청으로 반응시켰을 때에는 전례에서 총란의 내막에 형광이 나타나지 않았으며 난각은 역시 orange-red로 염색되어 있었고 총체의 외피 및 내부구성물질은 비특이형광을 보였다. 흰쥐 40마리에서 얻은 피검혈청중 33마리에서 양성을 나타내어 항체가 가장 16에서 최고 1,024까지 분포하였으며, 감수성은 82.5% (33/40)이었다(Table 12).

2) ELISA

ELISA는 3000배로 희석한 시험혈청을 사용하였으며 OD치 0.25이상을 양성으로 하였다. 흰쥐 40마리에서 얻은 혈청중 34마리에서 양성반응을 나타내어 85% (34/40)의 감수성을 보였으며, 양성혈청의 OD치는 최저 0.253에서 0.883까지 분포하였고, 대조혈청에서는 전례에서 0.25미만이였다(Table 12).

4) 감염경과에 따른 항체가 변동

C. hepatica 자충포장란 2,000개씩을 감염시킨 5마리의 흰쥐에서 0, 1, 3, 5, 9, 13주에 채혈하여 항체의 변동을 관찰하였다. 감염 각 주에 따른 5마리의 혈청의 항체가의 범위는 Table 13과 같다. 간

접형광항체반응에 의한 시험에서는 감염전의 혈청에서 항체가 4~8로 모두 음성을 나타내었고, 감염후 3, 5주에 급격한 항체가의 상승을 보여 128~512를 나타내었으며, 9주에 하강하여 8~32주, 13주에는 4~8로 다시 음성으로 전환되었다. 이를 평균치로 보면 감염후 3주 및 5주에 가장 높은 항체가를 보여 8.138(log₂ unit)이었고, 9주에는 4.138이였으며, 감염전 및 대조혈청 30마리에서는 항체가 4~8(2.848)로 음성이였다(Table 12). ELISA에 의한 성적도 이와 유사하여 감염전의 혈청에서는 평균 0.179로 음성을 나타내었으나 감염후 3주에 급격히 상승하여 0.492였으며 차츰 하강하여 5주 및 9주에 0.449 및 0.405였으나 아직도 양성을 나타내었고 13주에는 0.205로 다시 음성으로 전환되었다. 또한 대조혈청에서는 0.050~0.230의 범위내에 분포하여 음성을 나타내었다.

考 察

윤충류 감염의 진단은 총란, 성충 또는 성충의 일부를 검사실적으로 증명하여 진단하는 것이 대부분

이다. 그러나 때로는 유충을 확인하여 진단하지 않으면 안되는 경우도 없지 않다. 어떤 경우에 있어서는 증상이나 환자의 과거력등을 참조하면 진단에 도움이 되기도 한다(Rim 1981)¹⁹⁾. 그러나 치료하기 전에는 어떤 경우를 막론하고 확실한 실험실적 진단의 절차가 선행되어야 한다. 그러나 많은 수의 윤충류 감염에 있어서 실제적으로 앞서 열거한 방법들에 의한 진단이 불가능하거나 발견의 가능성이 떨어지는 경우가 많다. 예를 들면 요충의 경우는 대변검사로 진단이 매우 부정확하므로 항문주위도말법에 의존하나 요충의 생활사에서의 특징상 감염상태에서 비감염상태로 전환되는 충체가 남긴 충란을 발견하는 것이므로 (Faust들 1970²⁰⁾; Akagi 1973²¹⁾충체의 감염량이 적은 경우 진단이 매우 힘들며, 간흡충의 경우에 있어서도 가장 기본적인 진단법은 대변내에서 특징적 충란을 발견해 내는 일이지만 실제적으로 경감염의 경우나 감염 말기, 또는 간담도 폐쇄의 경우 진단상 음성으로 처리될 가능성은 많다. 또한 유, 부구조충감염의 경우 대변검사에 의한 진단은 거의 불가능하며 충체편절을 확인하여 진단하는 방법이 최상의 방법이나 이 또한 발견율은 그다지 높지 못하다. 더욱 중요한 것은 장관계에 기생하지 않는 기생충종의 진단상 단점으로서 낭미충증, 스팔가눔증, 간 카필라리아증, 선모충증, 폐흡충의 이소기생등은 생검에 의한 진단법 이외에는 마땅한 방법이 없다. 따라서 이런 경우들에 있어서 면역학적으로 진단을 실시해야 할 필요성이 있다고 여지진다. 그러나 기생충의 면역반응은 실험실내의 animal model에서는 잘 일어나는 것이 확인되고 있으나 실제적인 진단 목적, 또는 면역의 목적으로 사용하기에는 숙주-기생충상호관계, 또는 기생충-기생충간의 교차반응, 검사방법의 민감도의 부족등으로 곤란한 점이 많다. 또한 혈청학적인 진단법은 체내 특이항체가 구충, 또는 치료후 오랜 기간동안 소멸되지 않고 남아 있는 관계로 감염경력이 있다거나 불현성감염이 있었던 경우에도 역시 양성반응이 나타날 수 있다는 근본적인 결함을 지니고 있다.

본 연구에서는 이러한 단점등을 우선 인정하면서, 지금까지 개발된 여러가지 면역학적 진단방법들을 우리나라에서 현재 문제가 되고 있거나 문제가 될 수 있는 몇몇 기생충질환에 적용시켜 보았다.

간흡충종의 진단에 있어서 가장 확실한 방법은

역시 대변검사이다. 그러나 앞서 열거한 몇몇 이유들에 의해, 그리고 향후 간흡충의 면역에 관한 연구에 대비한 기초적인 지식의 획득이라는 대의에 따라 면역학적 연구의 필요성은 충분히 인정되고 있는 터이다. 지금까지 가장 일반적으로 사용되고 있는 면역학적 진단법은 피내반응이다. 그러나 이 방법은 치료후 장기간 음성화되지 않는다는 단점과 더불어 林들(1973)²²⁾의 보고에 따르면 경감염일 경우 위음성인 예가 비교적 많다는 지적이 있었다. 본 연구에 있어서는 IHA, IFAT 및 ELISA등을 간흡충 진단에 적용시켜 보았고 Western blot으로 특이반응대를 확인하여 보았다. 간흡충의 진단목적으로 IHA를 처음 사용한 것은 Pacheco들(1960)²³⁾이 처음으로 실험동물 및 3예의 인체감염예에 적용하여 진단목적으로의 사용가능성을 시사한 바 있으며, 현재 아메바증, 낭미충증, 포충증, 사상충증, 분선충증의 진단에 ELISA와 병행하여 사용되고 있다(CDC, 1985)²⁴⁾. 이 법은 microtitration method로서 조작이 비교적 간단하고 많은 수의 혈청을 일시에 처리할 수 있는 장점은 물론 최소한의 실험장비로 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있는 등 여러가지 장점이 있어 다른 질환에도 널리 이용되고 있는 검사법이다. 본 연구에서 나온 이 법의 민감도 및 특이도를 볼 때 경감염군에 있어서는 민감도가 80.0%에 머물러 다소 문제점이 없지 않으나 중등도 감염에 있어서는 87.1%, 중감염 이상에서는 14예중 13예가 양성인으로서 추후 기술될 ELISA등과 더불어 간흡충증의 혈청학적 진단에 충분히 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 한편 형광항체반응법을 이용하여 기생충감염으로 인한 면역현상을 이해하고 이를 근거로 진단에 적용하려는 시도는 여러가지가 있는바 윤충류의 성충 표피에서 형광항체법 양성인 항원성물질에 관한 보고가 있다. 즉 Sadun(1963)²⁵⁾은 선모충에서 Taffs 및 Voller(1963)²⁶⁾은 회충에서, Sato들(1960)²⁷⁾은 일본 주혈흡충에서, Thorpe(1965)²⁸⁾은 간질에서, Sun 및 Gibson(1969)²⁹⁾은 간흡충에서, Ambrois-Thomas 및 Kien Truong(1970)³⁰⁾은 사상충의 표피에서 형광이 나타난다고 하였다. Sun 및 Gibson(1969)²⁹⁾은 면역확산법에 의하여, Sun(1969)³¹⁾은 난주위침강반응법에 의하여 간흡충의 충란은 항원성이 없다고 하였다. 이들은 또 피낭유충에는 약한 항원성이 있다고 하였으며, 간흡충의 피낭유충이

숙주에 감염되어 탈낭하면 항원성을 발휘하기 시작하여 성충으로 발육하는 과정중에도 계속해서 항체 생성에 참여할 것으로 생각한다고 하였다. 본 실험에서 관찰된 충란은 충란 속에 함께 있는 충란이어서인지 또는 난각의 투과성이 없어서인지 확실하지 않으나 비특이성형광이 나타났으며, 충란표면에서 항원항체반응을 관찰할 수 없었다. Sadun 및 Gore (1967)³²⁾, Cancio(1965)³³⁾들은 주혈흡충의 감염 정도와 항체가 사이에는 상관성이 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 경감염군에서는 항체양성률이 28.1%에 불과하나 중등도 감염군 이상에서는 68.9~84.6%의 양성률을 얻어 감염강도가 높으면 높을 수록 양성률이 높을 뿐 아니라 IFAT의 희석배율도 높게 나타났다. 그러나 중등도 감염군 이상에서는 강도에 따른 양성률에 있어서 큰 차이를 발견할 수 없었다. 이는李들(1981)⁴⁾, 姜(1982)³⁴⁾이 EPG의 강도에 따른 ELISA의 OD치에 어떠한 차이를 관찰할 수 없었다는 보고와는 다소 차이가 있다. 과거 우리나라에서 최초로 사용되었던 형광항체법은(任 1974³⁵⁾; Cho 및 Soh, 1974)³⁶⁾ Camargo들(1965)³⁷⁾ 및 Hoshino들(1970)³⁸⁾이 주혈흡충증에 형광항체법을 사용하기 위하여 고안한 성충입자항원(worm particle antigen)의 제조법을 인용한 것이나 본 실험은 Couder(1967)³⁹⁾과 Wilson들(1974)⁸⁾이 주혈흡충에서, Ambrois-Thomas 및 Kien Truong(1974)³⁰⁾들이 사상충증에서 형광항체법을 사용하기 위하여 고안한 성충체를 절단하여 항원부착슬라이드를 만들어 간흡충증 환자의 혈청과 반응시킨 것이다. 이 방법은 그들의 지적대로 슬라이드상에 항원을 부착하기 쉽고 더우기 많은 검사를 하는데, 항원의 양이 소량되고 반응의 강도 및 반응의 위치를 알 수 있을 뿐만 아니라, 양성 및 음성반응의 색구별 자체도 용이하였다. Cho 및 Soh(1974)³⁶⁾는 교차반응을 인정하였으며, 본 실험에서도 교차반응은 마찬가지로 인정되었다.

Micro-ELISA법에는 효소표지항원에 대한 시험항원과 이미 알고 있는 항원의 경쟁작용을 이용한 항원검출법, 미리 부착된 항체 및 시험혈청에 대한 일정량의 효소표지항원의 반응에 의해 가수분해를 이용한 이중항체검사법, 효소표지항체에 의해 가수분해를 이용한 간접항체검출법, 시험혈청과 표지항체 반응을 통한 저지법등이 소개되어 있으나, 본 실험에 쓰인 방법은 polystyrene에 미리 부착시킨 간흡충항

원과 시험혈청을 반응시키고 효소표지항체를 반응시켜 가수분해에 의한 색상의 변화를 ELISA광량계를 이용하여 흡수광량을 관찰함으로써 혈청 내 항체를 산출하는 방법이다.李들(1981)⁴⁾은 간흡충성충의 수용성항원(단백질함량 2.87mg/ml)을 사용하여 84명의 간흡충증 환자에 대한 ELISA법을 시행하여 87%의 양성률을 얻었다고 보고하였는 바 본 연구의 83.3%, 또는 90.0%등과 비슷한 성적을 나타내어 민감도는 대체로 80~90% 정도인 것을 시사하였다. ELISA법은 미량의 혈청이 필요하며 필요에 따라서 filter paper법을(韓들, 1986)⁴⁰⁾ 사용할 수도 있으며, 감수성 및 재현성이 높아 진단검사도 가능하다(Ruitenber그들, 1977)⁴¹⁾.

간흡충을 치료한 후 혈청 또는 요의 항체가의 변동을 관찰한 문헌은 별로 없다. 그 중 간흡충에 대하여는 Chen들(1982)⁴²⁾이 간흡충을 praziquantel로 치료하고 6개월까지 혈청내에 존재하는 항체가를 관찰하고 Soh들(1985)⁴³⁾은 1년까지李들(1986)⁴⁴⁾은 6개월까지 관찰하였다. Chen들(1982)⁴²⁾은 100명의 간흡충증 환자에 대하여 관찰한 결과 투약적 0.7463에서 3개월후 0.4339 6개월후 0.3360이었으며, 투약후 대변내 충란배출이 음전된 56예의 ELISA음성률은 3개월후 30.4% (17/56), 6개월후 51.8(29/56)이었다. 본 실험에서 완치되어 9개월이 지난후에는 투약전에 비하여 1/2로 흡포도가 감소한 결과와 비교할 때 유사한 결과로 사료된다. 또한 Soh들(1985)⁴³⁾은 감염 및 치료후의 진단을 위한 역학적 조사방법으로서의 ELISA의 효용성을 알아보고자 관찰한 결과 치료전 0.63±0.25로부터 치료 1년후 0.33±0.16으로 감소하여 질병의 경과나 치유판정에 이용될 수 있을 것으로 본다고 하였다. 한편 인체에 감염된 간흡충 이외에도 실험적으로 치료한 후 항체가의 변동을 관찰한 보고도 있는 바 梁들(1984)⁴⁵⁾은 간흡충 감염 토끼에서 치료 6개월후 혈청내 특이 IgG가 ELISA로 관찰하여 감염전과 비슷한 수준으로 감소하였다고 하였다. 본 실험에서 감염후 18개월에 ELISA에 있어서 22예중 13예가 음전되어 59.1%의 음전율을 보였다. 반면 간접혈구응집반응의 경우 간흡충 감염자가 양성반응을 보이는 민감도는 83% 정도로서 ELISA의 83.3%~93.0%(韓들, 1986)⁴⁰⁾보다는 못하지만 적어도 특이도에 관한 한은 별다른 차이가 없었으며, 치료후 18개월의 음전률은 80%(20/25)에 이르러 ELISA보

다 치유판정에는 보다 도움이 될 것으로 생각되었다. 따라서 ELISA나 IHA를 한번만 실시하여 치료판정에 사용하는 데에는 무리가 있으나 투약전의 항체가와 비교할 수 있다면 유용하다고 생각된다. 뇨 역시 혈청과 마찬가지로 보조적인 치료판정에 이용될 수 있다고 본다.

유구낭미충증의 혈청학적 진단에 있어서 Konovalova(1973)는 낭미충항원을 이용하여 30예의 확진된 낭미충증 환자의 80%를 간접형광항체반응 양성으로 진단하였고, 300예의 건강인중 4예에서 위양성반응을 보인다고 하였다. Rydzewski들(1975)⁴⁶⁾은 무구조항원으로 28예의 낭미충증 환자중 89.2%를 양성으로, 8예의 건강인 모두를 음성으로 진단하였다. 또한 Gonzalez-Barranco(1978)⁴⁷⁾은 35예의 낭미충증 환자중 94%를 양성으로, 364예의 낭미충증이 의심되는 환자중 49%를 양성으로, 100예의 건강인중 2예를 위양성으로 보고하였다. 따라서 보고자에 따라 80~94%의 감수성을 나타내었다. 반면에 수용성 단백항원을 이용한 다른 진단방법에 관한 연구는 항원의 제조법 및 항원으로 사용한 충체의 부위에 따라 매우 다양한 성적을 보여주며 또한 검사 대상자 수도 일정하지 않으나 대략 7~100%의 감수성을 보여주며 최근에 사용되는 ELISA는 60~90%의 감수성을 보여주고 있다(Flisser et al 1986)⁴⁸⁾. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 부합된다.

이러한 검사방법들에 주로 사용되는 항원은 돼지의 유구낭미충으로서, 낭액을 제거한 후 남은 두절 및 낭벽에서 추출한 B항원이 좋다고 하는 의견과(Flisser들, 1980⁴⁹⁾; Guerra들, 1982⁵⁰⁾; Espinoza들 1982⁵¹⁾; Yakoleff-Greenhouse들 1982⁵²⁾; Williams 및 Sandeman 1982)⁵³⁾ 낭액항원이 좋다고 하는 의견이 있다(Choi들 1986⁵⁴⁾; 朱들 1987⁵⁵⁾; Larralde들 1986⁵⁶⁾). 본 실험에서는 낭액항원의 표피와 내막에 강한 형광반응을 나타냄으로써 항원성을 보여주었고, nuclear layer에도 넓은 범위에 걸쳐서 비교적 강한 항원성을 나타내며 fibrous layer는 항원성을 보여주지 않았다. 이러한 결과는 낭벽에서 특히 nuclear layer에서 항원을 생성하여 낭의 내부로 분비함으로써 낭액항원을 형성하는 것으로 추측할 수 있다. 이러한 항원성을 나타내는 부분중 뚜렷한 형광을 나타낼 때 양성반응으로 판독하여 얻은 본 실험에서의 감수성은 95.8%이었으며, 1예에서 위음성

반응을 나타내었다.

유구낭미충항원과 유구낭미충증 이외의 기생충증 환자 혈청간에 생기는 교차반응에 대하여는 많은 보고가 있다. 예를들면 포충증(Rydzewski들 1975⁴⁶⁾; Schantz 들 1980⁵⁵⁾; Diwan들 1982⁵⁷⁾), Sparganum증(Kim들 1984⁵⁸⁾; Cho들, 1986)⁶¹⁾, Taenia증(Proctor들 1966⁵⁹⁾; Mahajan들 1974⁶⁰⁾; Cho들 1986)⁶¹⁾, 주혈흡충증(Diwan들 1982)⁵⁷⁾, 간, 폐흡충증, 간질충(Cho들 1986)⁶¹⁾, 광동추혈선충증(Diwan 1982)⁵⁷⁾을 들 수 있다.

최근에 낭미충증의 면역진단에 많이 이용되는 ELISA는 민감도와 재현성에 있어서 탁월한 장점들을 지니고 있으나 앞서 열거한 것과 같은 많은 기생충 질환감염자의 혈청과 교차반응 또는 비특이성반응(non-specific reaction)에 따라 민감도 및 특이도에 영향을 받고 있다. 본 연구에서는 EITB를 이용하여 낭미충증의 진단에 우수한 효과가 있다고 알려진 낭액항원에 있어서 각종의 낭미충증 양성반응을 일으키는 혈청들이 어떤 항원 band와 반응하는지를 알아보았다. EITB는 Towbin들(1979)⁶¹⁾이 처음 개발하고 Tsang들(1983)¹⁵⁾에 의하여 처음 기생충질환에 사용되기 시작하였다. 낭미충에 관하여 western blot를 적용하여 얻은 결과들을 보면 저자에 따라서 서로 상이한 결과를 보이고 있음을 알 수 있다. 즉 Grogil(1985)⁶²⁾은 분자량 64Kd, 53, 32~30kd의 항원대가 낭미충감염자의 혈청내 항체와 민감하게 반응한다고 하였고, Larralde들(1986)⁵⁶⁾은 246, 149, 103, 65, 47, 40kd의 항원대와 10~17Kd사이의 광범위하고 흐린 반응대가 있음을 지적하고 이 중 103kd의 분자량을 갖는 항원대가 낭미충감염자 혈청내 항체와 가장 강하게 반응한다고 하였으며, Gottstein들(1986)⁶³⁾은 26Kd 및 8Kd의 분자량을 갖는 항원대가 특이하게 낭미충감염혈청과 반응한다고 하였다. 본 연구에서는 91, 63, 43 및 14Kd의 항원대가 특이하게 반응한다고 하였다. 이러한 연구결과의 차이점의 원인이 무엇인지는 분명하지 않으나 우선 생각할 수 있는 것은 사용한 항원제조법의 차이들을 들 수 있으며 다음으로는 항원으로 이용한 낭미충의 batch에 따른 차이를 들 수 있고, 이의 분해과정중 완충액이나 사용하는 detergent등 시약의 차이 및 방법상의 차이점 또는 SDS-PAGE과정중 각 slot내에 들어가는 항원의 단백질함량, 그리고 사용하는 혈

정의 purity, 교차반응을 보기위해 사용하는 다른 기생충감염증 혈청등의 선택에 따라 결과가 달라지는 것으로 생각된다. 여하튼 western blot는 ELISA 보다 탁월한 특이도를 나타냄을 확인하였고, 민감도 면에 있어서도 다소간의 장점이 있음이 확인되었으므로 검사법 자체가 까다롭지 않고 시간적으로 단축이 가능하므로 진단목적으로의 이용이 가능하다고 하겠다. 본 법의 한계는 이미 지적된 바와 같이 각 실험실내에서의 표준화된 검사법에 의해서만 재현이 가능할 것이라는 점에 있다. 검사의 정확도를 높일 수 있는 제반 조건에 대한 연구가 앞으로 더 진행되어야 할 것으로 생각한다. Lee(1987)⁶⁴⁾에 의하면 *Capillaria hepatica* 감염의 주증상은 간장의 종대이다.

특히 median lobe에 충체 및 충란에 의한 백색반점이 많이 분포하며 간장의 종대가 두드러지는 시기는 감염후 3주부터 라고 하였다. 이 시기에는 자성충체내에서 충란이 많이 발견되며 충란의 형태는 이 때에 갖추어지기 시작한다.

본 증의 진단에 있어서 간접형광항체반응을 사용한 예는 많지 않으나 Kim(1985)⁶⁵⁾은 충란절편항원, 또는 동결건조항원을 이용하여 좋은 결과를 얻었다고 하였다. 또한 난주위 침강반응과 간접형광항체반응을 동시에 사용하여 연구하였던 예는 주혈흡충증의 경우(Yogore들, 1976⁶⁶⁾; De Sala들 1962⁶⁷⁾가 있었으며, 이들은 면역글로부린의 존재여부를 알기 위한 연구에 중요한 방법이라고 생각된다.

난주위 침강반응 때는 점막전이 중요한 역할을 하는 것으로 보이며 Monne 및 Honig(1954)⁶⁸⁾는 *Trichuris*와 *Capillaria*의 충란의 점막전은 polysaccharide를 함유하며 충란의 다른 부분에서는 이와 같은 성분이 발견되지 않는다고 하였다. 이러한 물질들은 모두 항원으로서 작용할 수 있는 성분들이며 *C. hepatica*에 대한 항체를 유발하는 중요한 역할을 할 것으로 믿어진다. *C. hepatica*충란의 점막전 내부에는 전자밀도가 높은 과립이 발견되며(Inatomi 1960⁶⁹⁾; Mariano, 1967⁷⁰⁾; Grigonis 및 Solomon 1976⁷¹⁾에 대한 기능은 밝혀져 있지 않으나 점막전의 형성에 관계되리라는 추측은 가능하다.

Capillaria hepatica 감염증에 있어서의 면역혈청학적 특징의 하나는 항체의 지속기간이 매우 짧다는 것이다(Lämmler 1974⁷²⁾; Zahner들, 1976⁷³⁾; Solomon들, 1974⁷⁴⁾; Raybourne들, 1974⁷⁵⁾; Zahner들,

1981⁷⁶⁾; Kim들, 1985⁶⁵⁾; Lee들, 1985⁷⁷⁾; Raybourne 및 Solomon 1975⁷⁸⁾. 즉 Solomon들(1974)⁷⁴⁾은 마우스에 충란(2000개)을 실험적으로 경구감염시키고 IHA로 검사한 결과 3주후부터 5주후까지 항체가 양성되었고, 10주후에 이르러 음전된다고 하였다. 또한 Raybourne들(1974)⁷⁵⁾은 마우스에 충란(5,000)을 정맥에 주사하여 면역시키고 IHA로 검사한 결과 3주후부터 항체가 상승하여 8주후에 음전된다고 하였다.

Zahner들(1981)⁷⁶⁾도 항체가의 소실이 충란생산의 정지와 일치한다고 하였으며, Solomon들(1974)⁷⁴⁾도 항체가의 소실시기가 충란의 생성과 밀접한 관계가 있다고 하였다. 그리고 주혈흡충증의 경우에서도 혈중항체가 많이 나타나는 시기는 충체가 성숙하여 충란이 조직내에 집적되는 때와 일치한다고 하였다(Naimark들 1957⁷⁹⁾; Smithers 1960⁸⁰⁾; Sadun들 1985⁸¹⁾). 따라서 *C. hepatica* 감염증은 3~7주에 진단이 실험적으로 가능함을 인정하고 있다. *C. hepatica*가 human source에서 얼마나 양성으로 나올 수 있는지의 여부는 아직 밝혀진 바 없으며 이에 관한 논의는 추후에 더 상세히 진행되어야 할 듯하다.

要 約

우리나라에서 문제가 되고 있는 몇몇 기생충질환을 대상으로 각종의 혈청학적 진단법을 적용시켜 진단적 가치 및 의의에 대하여 검토하였다. 연구대상 기생충은 간흡충, 낭미충, *Capillaria hepatica*이었으며, 주로 간접형광항체반응, ELISA, western blot등의 기법을 적용시켜 보았다. 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 간흡충증에 있어서 ELISA는 83.3%의 민감도를 나타낸 반면 폐흡충 및 초충과의 교차반응이 인정되었다. ELISA는 간접혈구응집반응, 간접형광항체반응에 비해 우수한 성적을 보이고 있었다. 앞서 기술한 교차반응을 구별하고 항원-항체반응의 특이 항원대를 알아보기 위해 실시한 western blot의 결과 59Kd band와 21K의 band는 간흡충감염자 혈청 이외에는 반응하지 않아 종특이성이 있는 것으로 판단되었다. Praziquantel로 치료한 다음 18개월 후에 혈청 및 뇨를 이용하여 ELISA로 검사한 결과 OD치는 치료전의 약 1/2수준으로 감소하였고, 음전률은 60

%에 이르렀다. 간접혈구응집반응을 이용할 경우 치료 18개월 후 80%가 음전되었다.

2) 낭미충증 진단에 있어서 간접형광항체반응은 95.8% (23/24) 민감도를 나타내었으며 내막에서 가장 강한 반응을 나타내었다. ELISA 역시 90.0% (36/40)의 높은 민감도를 나타내었으나 두 방법 모두에서 다른 기생충감염자 혈청과의 교차반응이 인정되었다. Western blot에서 볼때 91, 63, 21Kd의 band가 종특이한 것으로 나타났으며, 이중 63Kd의 항원대가 일관성 있게 낭미충 감염 혈청과 반응하였다.

3) *Capillaria hepatica* 충란을 이용한 난주위침강 반응 및 간접형광항체법에서 85.0%의 민감도를 나타내었으며, 초록색의 특이한 형광이 점막전주위 및 충란절단면의 내막에서 관찰되었다. 수용성충란항원을 이용한 ELISA에 있어서도 85.0%의 민감도를 나타내었다. 항체가 감염후 3~5주부터 급격히 상승하기 시작하여 9주부터 점차 감소되어 감염후 13주에는 음성으로 전환되었다.

參 考 文 獻

- 1)李玉蘭·崔源永: 肺吸虫皮内反應陽性者에 對한 Agar-gel Diffusion, Counterimmunoelectrophoresis 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay의 比較. 기생충학잡지 21 : 270, 1983
- 2)梁正成·李駿商·林漢鍾: 肝吸虫症 診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 관한 研究. 고려대학교 의과대학 논문집 20 : 201, 1983
- 3)陣成元·李駿商·林漢鍾: 肝吸虫 및 肺吸虫症에 있어서 免疫動物血清을 利用한 ELISA법과 Ouchterlony법의 比較研究. 고려대학교 의과대학 논문집 20 : 191, 1983
- 4)李重根·閔得暎·任敬一·李根泰·蘇鎮탁: 간흡충 감염 진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구. 연세의대논문집 14 : 133, 1981
- 5)Schantz PM, Shanks D and Wilson M : Serologic cross reactions with echinococcosis and cysticercosis. Am J Trop Med Hyg 29 : 609, 1980
- 6)Cho SY, Kim SI, Kang SY, Choi DY, Suk JS, Choi KS, Ha YS, Chung CS and Myung H : Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using paired samples of serum and cerebro-

- pinal fluid. Korean J Parasit 24 : 25, 1986
- 7)강옥중·엄기선·임한중: 간접형광 항체반응에 의한 인체낭미충증의 혈청학적 진단에 관한 연구. 高醫大論集, 24 : 85, 1987
- 8)Wilson M, Sulzer AJ and Walls KW : Modified antigens in the indirect immunofluorescence test for schistosomiasis. Am J Trop Med Hyg 23 : 1072, 1974
- 9)Kagan IG and Norman L : Serodiagnosis of parasitic disease 453-486 in J R Blair EH Lenette and JP Truant eds Manual of Clinical microbiology. Washington DC 1970
- 10)Boyden SV : The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J Exper Med 93 : 107, 1951
- 11)金正俊·李駿商·林漢鍾: 肝카필라리아症 (Hepatic capillariasis)에 있어서 卵周圍沈降反應에 관한 實驗的 研究. 高醫大論集 19 : 81, 1982
- 12)權貴香·李駿商·林漢鍾: 肝吸虫症 診斷에 있어서 間接 接螢抗體反應(IFAT)의 應用에 관한 研究. 高醫大論集 21 : 91, 1984
- 13)Voller A, Bidwell DE, Bartlett A : The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). A guide with abstract of microplate applications. Dynatech Europe(ed), 1979
- 14)McLaren M, Draper CC, Roberts JM Minter Goedbloed E, Lig GS, Teesdale CH, Amin MA, Omer AHS, Bartlett A, Voller A : Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) test for schistosoma mansoni infections. Ann Trop Med & Parasit 72 : 243, 1978
- 15)Tsang VCW, Peralta JM, Simons AR : Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods Enzymol 92 : 377, 1983
- 16)Neville DM : Molecular weight determination of proteindodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in discontinuous buffer system. J Biol Chem 246 : 6328, 1971
- 17)Jovin TK, Dante ML and Chrumbach A : Multiphasic buffer systems output. Fedral scientific and technical informations. US Department Comme-

- rice PB 196085-196091, 1971 Springfield VA USA
- 18) Merrill CR, Goldman D, Sedman SA and Ebert MH : *Science* 211 : 1437, 1981
 - 19) Rim HJ : *Helminthic infections : Diagnosis and treatment in Korea. Medical progress* Aug : 30, 1981
 - 20) Faust EC, Russel PF and Jung RC : *Craig and Faust's Clinical Parasitology 8th ed Lea & Febiger Philadelphia* 330-335, 1970
 - 21) Akagi K : Enterobius vermicularis and enterobiasis. *Progress of Medical Parasitology in Japan* 5 : 229-279, 1973
 - 22) 林漢鍾 · 李聖均 · 徐丙錫 : 肝디스토마의 疫學 및 臨床에 관한 研究. *最新醫學* 16(1) : 81, 1973
 - 23) Pacheco G, Wykoff DE and Jung RC : *Trial of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of infection with Clonorchis sinensis. Am J Trop Med Hyg* 9 : 367, 1960
 - 24) Centers For Disease Control : *Laboratory methods in medical parasitology* 1985, US. Department of Health and Human Services
 - 25) Sadun EH : *Seminar on Immunity to Parasitic Helminths. VII Fluorescent Antibody Technique for Helminths Infections. Exp Parasit* 13 : 72, 1963
 - 26) Taffs LF and Voller A : *In vitro fluorescent antibody studies on Ascaris lumbricoides and Ascaris suum. Trans Roy Soc Trop med Hyg* 57 : 353, 1963
 - 27) Sato S, Imamura S and Yoneyama K : *Fluorescent antibody studies of Schistosoma japonicum infections. Gumma J Med Sci* 13 : 199, 1964
 - 28) Thorpe E : *An immunochemical study with Fasciola hepatica. Parasitology* 55 : 209, 1965
 - 29) Sun T and Gibson JB : *The sites of antigen formation in different development stage of Clonorchis sinensis. Jap J Med Science and Biology* 22 : 263, 1969
 - 30) Ambroise-Thomas P and Kien Truong T : *Application of the indirect fluorescent antibody test on sections of adult filariae to the serodiagnosis, epidemiology and post-therapeutic surveillance of human filariasis. Annals of Trop Med & Parasit* 64 : 435, 1974
 - 31) Sun T : *The non-antigenicity of intact ova of clonorchis sinensis. J Med Microbiol* 2 : 358, 1969
 - 32) Sadun EH and Gore RW : *Relative sensitivity and specificity of soluble antigen (metabolic and somatic) and whole cercariae in fluorescent antibody tests for schistosomiasis in humans and rabbits. Exp Parasit* 20 : 131, 1967
 - 33) Cancio MR, de Sal a, Rodriquez-Molina, R odriquez-Molina R and Toro-Goyco E : *In Vitro Quantitation of the Circum-Oval Precipitin Test in Infections with Schistosoma mansoni. Exp Parasit* 16 : 64, 1965
 - 34) 姜麟周 : 肝吸虫症에 있어서 filter paper血清에 의한 ELISA법의 效用. 高麗大學校 大學院 碩士學位請求論文, 1982
 - 35) 任敬一 : 형광항체법을 이용한 간디스토마 감염의 면역진단에 관한 실험적 연구. 연세의대 논문집 7 : 194, 1974
 - 36) Cho KM and Soh CT : *Evaluation of the indirect antibody test with adult worm antigen for the immunodiagnosis of clonorchiasis. Yonsei Reports on Trop Med* 5 : 45, 1974
 - 37) Camargo ME, Hoshino S and Caetano da Silva L : *A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of Schistosoma mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 7 : 327, 1965
 - 38) Hoshino S, Camargo ME and Caetanoda Silva L : *A comparison between the hemagglutination test with formalin treated erythrocytes and the immunofluorescence test with worm particles for schistosomiasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12 : 136, 1970
 - 39) Coudert J, Gartin JP, Ambroise-Thomas P and Pothier MA : *Premiers resultats a propos du diagnostic serologique de la bilharziose par immunofluorescence sur coupes la congelation de Schistosoma mansoin. Ann Parasit* 42 : 483, 1967
 - 40) 韓柱煥 · 嚴基善 · 林漢鍾 : 肝吸虫症에 있어서 血清 및 濾着紙吸著血液을 이용한 酵素免疫測定法(ELISA)에 관한 比較研究. 高醫大論集 23 : 13, 1986
 - 41) Ruitenberg EJ and ven Knapen F : *The enzyme-*

- linked immunosorbent assay and its application to parasitic disease. *J Infect Dis* 136(Suppl) : 267, 1977
- 42) Chen YT et al : *The kinetics of ELISA in the evaluation of cure in clonorchiasis. Chin J Int Med* 21 : 308, 1982(English abstract)
- 43) Soh CT, Min DY, Ryu JS and Yong TS : *Study on the reproducibility of ELISA technique for the diagnosis of clonorchiasis and paragonimiasis. Yonsei Rep Trop Med* 16 : 1, 1985
- 44) 李權海·嚴基善·朴漢鍾：肝吸虫症에 있어서 praziquantel 投與前後의 抗體價變動에 관한 研究. 高醫大論集, 23 : 13, 1986
- 45) 梁元容·李駿商·林漢鍾：肝吸虫 感染家兔에 있어서 感染強度, 經過 및 治療에 따른 ELISA 抗體價의 變動에 관한 實驗的 研究. 高醫大論集 21 : 81, 1984
- 46) Rydzewski AK, Chischolm ES and Kagan IG : *Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody and agar gel precipitation tests. J Parasit* 6 : 154, 1975
- 47) Gonzalez-Barranco D, Sandoval-Island ME and Trujillo-Valdes, VM : *Indirect immunofluorescence reaction in cysticercosis. Archivos de Investigacion Medica* 9 : 51, 1978
- 48) Flisser A and Larralde C : *Cysticercosis In : Immunodiagnosis of parasitic diseases Vol I Helminthic diseases Kenneth W Walls, Peter M Schantz (ed) Academic Press. 1986*
- 49) Flisser A, Woodhouse E and Larralde C : *Human cysticercosis : Antigens, antibodies and non-responders. Clin Exp Immunol* 39 : 27, 1980
- 50) Guerra G, Flisser A, Canedo L and Lacleste JP : *Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of Taenia solium In : Cysticercosis : Present state of knowledge and perspectives. A Flisser, K Willms JP Lacleste, C Larralde C Ridaura and F Beltran (eds). Academic Press p437, 1982*
- 51) Espinoza B, Flisser A, Plancarte A and Larralde C : *Immunodiagnosis of human cysticercosis : ELISA and immunoelectrophoresis. In : Present state of Knowledge and perspectives. A Flisser K Willms JP Lacleste C Larralde C Ridaura and F Beltran(eds). Academic Press. p163, 1982*
- 52) Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A and Larralde C : *Analysis of antigenic variation in cysticerci of Taenia solium. J Parasitol* 68 : 39, 1982
- 53) Williams JF and Sandeman RM : *Antigens of Taeniid Cestodes. In : Cysticercosis : Present state of knowledge and perspectives. A Flisser K Willms JP Lacleste C Larralde C Ridaura and F Beltran(eds). Academic Press p525, 1983*
- 54) Choi BK, Kim SI, Kang SY and Cho SY : *Evaluation of antigens from different parts of Cysticercus cellulosae in serological diagnosis of human cysticercosis. Chung-Ang J Med* 11 : 135, 1986
- 55) 朱昞煥·姜星鎬·李駿商·林漢鍾：有鉤囊尾虫症 診斷에 있어서 特異抗原帶의 증명에 관한 研究. 高醫大論集 24(3) : 139, 1987
- 56) Larralde C, Lacleste JP, Owen CS, Madrazo I, Sandoval M, Boualil R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Diaz ML, Govezensky T, Montoya RM and Goodsaid F : *Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid : ELIAS and Hemagglutination tests. Am J Trop Med Hyg.* 35(5) : 965, 1986
- 57) Diwan AR, Cocker-Vann M, Brown P, Subianto DB and Gajdusek DC : *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of Taenia solium. Am J Trop Med Hyg* 31(2) : 364, 1982
- 58) Kim H, Kim SI and Cho SY : *Serological diagnosis of human sparganosis by means of micro ELISA. Korean J Parasit* 22 : 222, 1984
- 59) Proctor EM, Powell SJ and Elsdon-Dew R : *The serological diagnosis of cysticercosis. Ann Trop Med Parasit* 60 : 146, 1966
- 60) Mahajan RC, Chitkara NL and Chopra JS : *Evaluation of Cysticercus and adult worm antigens in serodiagnosis of cysticercosis. Int J Med Res* 62 : 1310, 1974
- 61) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Nat'l Acad Sci USA* 76 : 4350,

1979

- 62) Grogl M, Estrada JJ, MacDonald G and Kuhn RE : *Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis*. *J Parasit* 71(4) : 433, 1985
- 63) Gottstein B, Tsang VCW, Schantz PM : *Demonstration of species specific and cross reactive components of Taenia solium metacestodes antigens*. *Am J Trop Med Hyg* 35(2) : 308, 1986
- 64) 李淑環 · 嚴基善 · 林漢鍾 : *Capillaria hepatica* 感染 마우스에 있어서 間接螢光抗體反應을 이용한 IgG, IgM 및 IgA의 變動에 관한 研究. *고 의대논집* 24(3) : 97, 1987
- 65) 金東彦 · 嚴基善 · 林鍾漢 : *Capillaria hepatica* 感染百鼠에 있어서 虫卵切片抗原에 대한 間接螢光抗體反應에 관한 研究. *高醫大論集* 22 : 173, 1985
- 66) Yogore MG, Ozcel MA and Lewert RM : *Study of the circumoval precipitate in schistosomiasis japonica by immunofluorescent technic*. *Am J Trop Med Hyg* 25 : 353, 1976
- 67) De Sala AR, Menendez-Corrada R and Rodriguez Molina R : *Detection of circumoval precipitins by the fluorescent antibody technic*. *Proc Soc Exp Biol Med* 111 : 212, 1962
- 68) Monne L and Honig G : *On the properties of the egg envelopes of the parasitic nematodes Trichuris and Capillaria* *Ark Zool* 6 : 559, 1954
- 69) Inatomi S : *Submicroscopic structure of the egg-shell of helminth III a study on Capillaria*. *Acta Mediciniae Okayama* 14 : 261, 1960
- 70) Mariano M : *Histochemical investigation on egg shell polysaccharides in Capillaria hepatica (Bancroft 1918, Capillaridae Triehroidea)*. *Acta histochem* 26 : 144, 1967
- 71) Grigonis CJ Jr and Solomon GB : *Capillaria hepatica : fine structure of egg shell*. *Exp Parasitol* 40 : 286, 1976
- 72) Lämmler G, Zahner H, Vollerthun R and Rudolph R : *Egg production and host reaction in Capillaria hepatica infection of Mastomys natalensis*. *In Parasitic zoonoses. Clinical and experimental studies*. E.J.L Soulsby(ed). *New York San Francisco London Academic Press* 327pp 1974
- 73) Zahner H, Bruckmann G, Schmidt H, Lämmler G and Geyer G : *Capillaria hepatica infections of Mastomys natalensis : on the development, egg production and host reaction*. *Z Parasitenkd* 49 : 41, 1976
- 74) Solomon GB, Raybourne RB and Soulsby E.J.L : *Serological studies on rodents infested with Capillaria hepatica*. *J parasitol* 60 : 732, 1974
- 75) Raybourne RB, Solomon GB and Soulsby E.J.L : *Capillaria hepatica : Granuloma formation to eggs II peripheral immunological responses*. *Exp Parasitol* 36 : 244, 1974
- 76) Zahner H, Lämmler G and Geyer E : *X-ray sensitivity of embryonated Capillaria hepatica eggs and serum-GLDH activities and antibody titers in Mastomys natalensis infected with untreated or irradiated eggs* : *Z Parasitenkd* 65 : 107, 1981
- 77) 鄭然郁 · 嚴基善 · 朴漢鍾 : *Capillaria hepatica* 感染白鼠에 있어서 虫卵抗原을 이용한 免疫診斷에 관한 比較研究. *高醫大論集* 22 : 43, 1985
- 78) Raybourne RB and Solomon GB : *Capillaria hepatica : Granulomaformation to eggs III. Antiimmunoglobulin augmentation reagin activity in mice*. *Exp Parasitol* 38 : 37, 1975
- 79) Naimark DH, Oliver-Gonzalez J, Chafee EF and Anderson RI : *Studies on schistosomiasis mansoni in primates I Initial occurrence of serologic antibodies correlated with egg recovery*. *J Parasitol* 43 : Suppl 26, 1957
- 80) Smithers SR : *Gel diffusion studies-on Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 54 : 8, 1960
- 81) Sadun EH, Schoenbechler MJ and Bentz M : *Multiple antibody response in Schistosoma mansoni infections : Antigenic constituents in eggs, cercariae and adults(excretions and secretions) determined by flocculation reactions, cross absorption and double diffusion studies*. *Am J Trop Med Hyg* 14 : 977, 1965

= Abstract =

Studies on the Seroimmunodiagnosis of
Parasitic Diseases

Han-Jong Rim, Joon-Sang Lee,
Kyoung-Hwan Joo, Kee-Seon Eom and
Myung-Sook Chung

*Department of Parasitology and Institute for Tropical En-
demic Diseases, College of Medicine, Korea University,
110-702, Seoul, Korea*

In many of the helminthic infections, diagnosis is accomplished by the demonstration of the eggs or, occasionally the adult worms or their parts. Diagnosis can be made by the identification of larval stage obtained from stool or surgically extracted materials too. However some kinds of parasitic disease can not be diagnosed by above mentioned procedure alone. Brain cysticercosis, ectopic paragonimiasis, *Capillaria hepatica* infection in liver is a good example. In such a case, immunologic method would be helpful for the decision of physician.

In this paper, immunologic tools such as indirect hemagglutination test, indirect fluorescent antibody test, circumoval precipitation test, ELISA, western blot were applied for the diagnosis of *Clonorchis sinensis*, Cysticercosis and *C. hepatica* infection and their efficacy was evaluated.

The results obtained were as follows :

1) In the diagnosis of clonorchiasis, ELISA revealed sensitivity of 83.3%, but cross reaction against

antibody of *Paragonimus westermani* and *Taenia* species were observed. For the identification of cross reaction and species specific band of Ag-Ab reaction, western blot was applied. 59Kd relative molecular weight and 21Kd band were identified as a *Clonorchis sinensis* specific band.

OD values of ELISA performed with sera of 18 months after praziquantel treatment decreased to half level compared to that of before treatment. Negative conversion rate of ELISA after 18 months of treatment was 60%.

2) In the diagnosis of cysticercosis, IFAT disclosed 95.8% (23/24) of sensitivity and reaction was most strongly occurred in inner membrane. ELISA revealed 90.0% (36/40) of sensitivity, but cross reaction was observed in both technique. In western blot, 91, 63 and 21Kd Mw bands were identified as a strongly positive band. Among them 63Kd band showed positive reaction against almost all sera of cysticercosis patient.

3) Circumoval precipitation, ELISA, IFAT, showed 85.0% of sensitivity in the diagnosis of *C. hepatica* infection in rat.

The antigenic localities were inner membrane of sectioned egg antigen on the precipitates around the mucoid plugs which were induced by circumoval precipitation reaction. Sera from rats infected with 2000 eggs were collected periodically to observe the changing patterns of antibody titers by IFAT and ELISA, which showed that high titers were detected at weeks 3 and 5, then gradually declined through weeks 9 until to negatively converted at weeks 13.