

ELISA검사에 의한 기생충 감염의 진단

최태열, 안명희, 하서은, 최한규, 류재숙

한양대학교 의과대학 기생충학교실, 임상병리학교실*

Diagnosis of Parasitic Infection by ELISA test

Tai Yeal Choi*, Myoung-Hee Ahn, Seo Eun Ha, Han Kyu Choi, and Jae-Sook Ryu

Departments of Parasitology and Clinical Pathology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: ELISA test is commonly used for diagnosis of parasite infection. This experiment was performed for detecting positive sera against *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*, cysticercus, sparganum, *Aisakis* larvae, *Toxoplasma gondii* and *Trichomonas vaginalis* in patient's sera with ELISA and Western blot analysis.

Methods: Two hundred sera were collected from clinical laboratory of Hanyang University Hospital(Seoul, Kuri). Antigens of parasites were prepared from rabbit (*C. sinensis*), dog (*P. westermani*), hog (cysticercus, from Yonsei University), patient (sparganum), mackerel (*Anisakis* larvae), mouse (*T. gondii*), cultivation in Trypticase-Yeast extract-Maltose medium (*T. vaginalis*). ELISA and Western blot was conducted with several parasite antigens and patient's sera.

Results: Positive antibody titers of *P. westermani*, *Anisakis*, *C. sinensis* were observed 12.7%, 11.0%, and 7.0% of patient's sera, respectively. Nineteen sera among 200 patients showed cross reactions with other parasites. On Western blot, there were several antigenic bands with patient's sera, i.e., 3/5 sera of *C. sinensis*, 2/2 sera of *P. westermani*, 1/4 sera of sparganum, and 0/4 sera of cysticercus.

Coclusions: ELISA is a convenient method for detecting parasite infections. But purification of antigens is necessary and Western blot analysis may reduce the false positive reactions of infection.

(Korean J Clin Microbiol 2002;5(1):52-58)

Key words: *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*, cysticercus, spargenium, *Anisakis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, ELISA, Western blot

서 론

우리나라는 기생충 질환이 과거에 비해 크게 감소하였으나 매개체나 음식 또는 물을 통한 감염은 지속적인 편이다. 최근에 우리나라에서 토착성 말라리아의 재유행이 있었고, 전세계적으로도 과거보다 많은 인구

의 이동으로 기생충 질환의 재유행이나 새로운 기생충의 출현이 보다 중요해졌다. 또 항암제나 스테로이드를 장기간 투여한 환자에서 기회감염을 일으키는 기생충에 의해 심하면 환자가 사망하기도 한다. 기생충성은 총란, 유충 또는 성충을 확인함으로써 진단할 수 있지만 경우에 따라서 혈청학적 또는 분자생물학적 검사를 이용하기도 한다. 기생충 감염의 혈청학적 진단은 항원의 복잡성, 다른 기생충과의 교차반응 및 기생충이 제거된 후에도 장기간 환자 혈청내 항체의 유지 등 단점이 있고 항원을 준비하려면 기생충의 실험실내 배양 또는 동물을 감염시켜 충체를 구해야 하는 어려움이 있다. 그러나 이용 방법이 간편하고 민감도나 특이도가 대체로 높아 역학조사나 기생충 감염이 의심되

* 이 논문은 1999년 한양대학교 교내연구비에 의하여 연구 되었음.

접수번호 : CM 5-01-11

교신저자 : 안명희

(133-791)서울시 성동구 행당동 17

한양대학교 의과대학 기생충학교실

Tel : (02) 2290-0682, 8264 Fax : (02) 2281-6519

E-mail : mhahn@hanyang.ac.kr

나 충체를 찾지 못할 경우 또는 조직을 침범하는 기생충에서 혈청학적 진단 방법이 효과적으로 사용될 수 있다. 또 조항원(crude antigen)은 다른 기생충과의 교차반응이 크므로 단일크론 항체나 항원의 부분 정제 또는 recombinant antigen을 제조하여 이용하기도 한다. 저자들은 참붕어등 민물생선 또는 개나 가재의 생식, 돼지고기의 생식, 뱀등 야생동물의 생식, 오징어등 해산어류의 생식으로 감염될 수 있는 간흡충, 폐흡충, 유구낭충, sparganum, 고래회충유충과 독소포자충과 질편모충등 원충을 진단하기 위해 한양대학 병원에 내원한 환자의 혈청으로 ELISA법에 의한 혈청학적 검사를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 기생충 항원제조

간흡충, 폐흡충, 유구낭충, 스파르가눔, 고래회충유충은 다음 방법으로 기생충을 얻었다. 간흡충은 낙동강에서 잡은 참붕어에서 피낭유충을 분리하여 토끼에게 경구 투여하여 감염시켰고감염 4주후에 부검하여 얻은 충체를 얻었다. 폐흡충은 전남 보길도에서 잡은 가재에서 피낭유충을 분리하여 개에 경구 감염

시키고 12주후에 폐에서 충체를 얻었다. 유구낭충은 감염돼지의 근육에서 유구낭충을 분리하여 항원으로 이용하였다. 스파르가눔은 환자에서 분리한 충체를 -20℃에 냉동시킨후 마쇄하여 항원을 분리하였다. 고래회충유충은 시장에서 구입한 고등어 내장에서 분리한 유충을 사용하였다. 독소포자충(RH)은 마우스 복강내에 계대 배양하여 얻었다. 질편모충은 환자로부터 분리한 원충을 TYM(Trypticase-Yeast extract-Maltose)배지에서 배양한 후 박테리아를 제거하여 계대 배양하였다. 각 기생충을 생리식염수로 몇차례 세척하고 -70℃에 냉동시킨후 사발에서 마쇄하였다. PBS에 녹인 마쇄액을 10,000 g에서 60분동안 원심분리후 상청액을 dialysis시키고 단백질을 측정하여 항원으로 사용하였다.

2. 환자혈청

한양대학병원(서울 및 구리)에 내원한 환자 200명에서 채혈한 혈청을 검사하였다. 환자혈청중 류마치스 항원 양성인 경우는 제외하였다. 대조군으로 건강한 남녀 54명의 혈청과 중학생 100명의 혈청을 사용하였다.

3. ELISA

각 기생충 항원을 carbonate-bicarbonate buffer로 5 µg

Table 1. Test conditions of different parasites for ELISA and Western blot

Parasite	Serum dilution	Peroxidase-conjugated anti-human IgG
<i>C. sinensis</i>		
EA*	1:200	1:10,000
WB†	1:800	1:4,000
<i>P. westermani</i>		
EA	1:100	1:10,000
WB	1:200	1:3,000
<i>Cysticercus</i>		
EA	1:200	1:10,000
WB	1:800	1:4,000
<i>Sparganum</i>		
EA	1:200	1:10,000
WB	1:400	1:4,000
<i>Anisakis larvae</i>		
EA	1:800	1:10,000
WB	1:800	1:4,000
<i>T. gondii</i>		
EA	1:200	1:10,000
<i>T. vaginalis</i>		
EA	1:200	1:10,000

*ELISA test; †Western blot.

Table 2 ELISA tests with parasitic antigens on patient' s sera at Hanyang University Hospital in Seoul and Kuri, Kyungi-do

Parasite	No of tested sera	ELISA* cut-off	No. of positive sera		
			total	Seoul	Kuri
<i>C. sinensis</i>					
E-1	199	0.32	26	10	16
E-2	199	0.36	14	5	9
<i>P. westermani</i>					
E-1	204	0.29	39	4	35
E-2	204	0.31	26	2	24
<i>Cysticercus</i>					
E-1	200	0.38	9	4	5
E-2	200	0.39	7	4	3
<i>Sparganum</i>					
E-1	200	0.60	15	12	3
E-2	200	0.61	14	11	3
<i>Anisakis larva</i>					
E-1	200	0.42	25	18	7
E-2	200	0.45	22	16	6
<i>T. gondii</i>					
E-1	200	0.67	9	8	1
E-2	200	0.68	9	8	1
<i>T. vaginalis</i>					
E-1	200	0.59	14	8	6
E-2	200	0.59	14	8	6

*Cut-off value: mean + 3SD of 52 normal human sera

Table 3 Cross-reaction of patient' s sera with other parasite antigens by ELISA at Hanyang University Hospital in Seoul and Kuri, Kyungi-do

	No. of positive sera	No. of cross-reaction		No. of sera with cross reaction				
		positive titer	negative titer	CS [†]	PW [§]	<i>Cysticercus</i>	<i>Sparganum</i>	<i>Anisakis</i>
<i>C. sinensis</i>	26 (199)*	15 (19) [†]	-	-	15	7	7	6
<i>P. weatermani</i>	39 (204)	12	4	15	-	6	4	4
<i>Cysticercus</i>	9 (200)	7	7	7	6	-	3	4
<i>Sparganum</i>	15 (200)	6	5	7	4	3	-	5
<i>Anisakis larva</i>	25 (200)	6	2	6	4	4	5	-

*No. of tested sera; [†]No. of cross-reacted sera ; [†]*C. sinensis*; [§]*P. westermani*

/mL로 희석하여 96 well plate에 well당 100 μ L씩 첨가하고 4℃에서 하룻밤 재운다음 washing buffer로 3번 세척하고 건조시켰다. 환자혈청을 희석하여 각 well에 100 μ L씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킨 후 buffer로 3회 세척하고 건조하였다. 적정 희석된 peroxidase-conjugated anti-human IgG (Cappel, North Carolina, USA), 100 μ L를 넣고

37℃에서 1시간 반응시킨다. 기질액은 phosphate citrate buffer에 o-phenylene diamine, H₂O₂를 녹여 50 μ L씩 첨가하여 25℃에서 30분간 반응시킨 후 2.5M H₂SO₄를 50 μ L씩 첨가하여 반응을 정지시키고 492 nm에서 ELISA reader를 이용하여 항체가를 측정하였다. 정상대조군의 mean + 3SD의 값을 cut off value로 정하였다(Table 1).

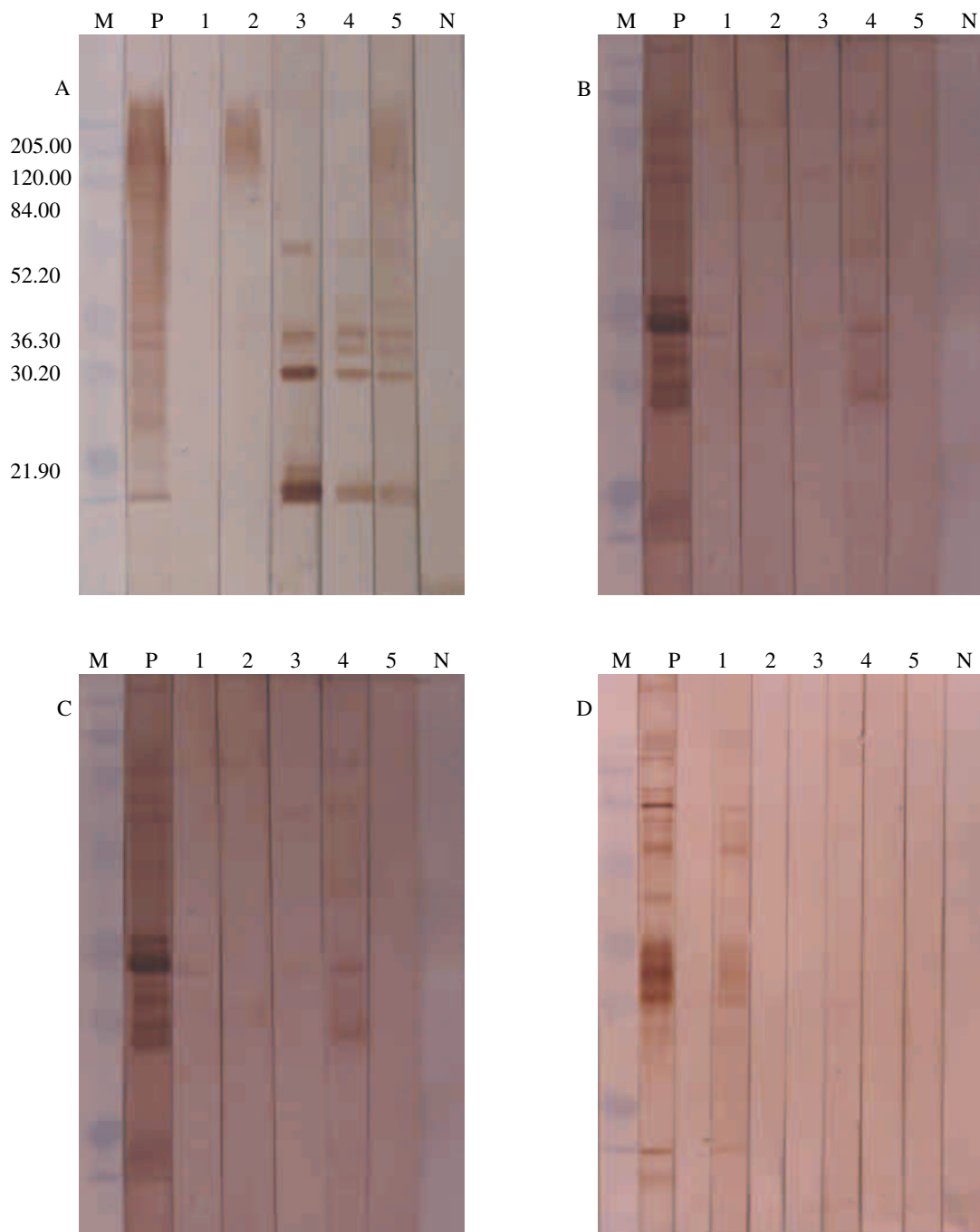


Fig. 1. Western blot analysis was performed with sera of patient and antigens of *Clonorchis sinensis* (A), *Paragonimus westermani* (B), *Cysticercus* (C), and *Sparganum* (D). M; marker, P; positive serum, N; negative serum, 1-7; patient' s sera.

4. Western Blot

12% agarose gel에 각 기생충 항원을 lane당 10 g/mL씩 넣고 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Amersham, UK)에 전이시키고 blocking buffer에서 37℃에 1시간 방치하였다. 환자혈청은 기생충에 따라 1:200,

1:400, 1:800으로 희석하여 반응시켰으며, peroxidase conjugated anti-human IgG (Cappel, PA, USA)를 1:3,000 또는 1:4,000으로 희석하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. Diaminobenzidine (DAB, Sigma, USA)로 발색하고 H₂O₂로 반응을 정지시킨후 densitometer에서 단백질 분자량을 측정하였다.

결 과

1. 기생충에 대한 IgG 항체검사와 교차반응

한양대학병원에 내원한 환자의 혈청으로 간흡충, 폐흡충, 유구낭충, 스파르가눔, 고래회충유충, 독소포자충, 질편모충에 대한 ELISA를 시행하였을 때 폐흡충, 고래회충유충, 간흡충의 양성율이 각각 12.7%(26/204명), 11%(22/200명), 7.0%(14/99명)로 높았다(Table 2). 간흡충과 폐흡충 양쪽 다 양성인 경우가 15명으로 두 기생충은 서로 교차반응이 잘 일어남을 알 수 있었다. 간흡충에 양성인 환자 혈청에서 폐흡충에서 15명, 유구낭충에서 7명, 스파르가눔에서 7명, 고래회충유충에서 6명이 동시에 양성으로 나타났다(Table 3). 또 검사자 200명중 19명에서 2종 이상의 기생충에 양성반응을 보였으며 5 기생충에 양성인 경우가 3명, 4 기생충에 양성인 경우가 6명, 3 기생충에 양성인 경우가 5명, 2 기생충에 양성인 경우가 5명이었다. 교차반응을 보인 환자 19명중 간흡충이 15명, 폐흡충이 16명, 유구낭충이 14명, 스파르가눔이 11명, 고래회충유충이 11명으로 나타났다. 원충에서는 질편모충에 양성인 경우가 7%(14/200명), 독소포자충에 양성인 경우가 4.5%(9/200명)이었다.

2. Western blot

각 기생충에 대해 항체가가 양성인 환자의 혈청으로 Western blot을 시행하였다. 간흡충은 검사한 5명중 3명에서, 폐흡충은 2명중 2명에서 스파르가눔은 4명중 1명에서 항원성 단백질 밴드를 보였고 유구낭충은 4명에서 모두 음성으로 나타났다(Fig. 1).

고 찰

기생충감염 진단이 현미경에서 기생충을 확인하는 방법 외에 면역학적 또는 분자생물학적 기법이 최근 진단에 활용되고 있다. 특히 ELISA나 IFA등 혈청학적 진단은 간편하고 편리하므로 기생충을 포함한 여러 분야에 널리 이용되고 있다. 간흡충과 폐흡충은 환자 진단시 성충의 조항원으로 피내반응검사를 많이 이용하고 있으며, 조항원이나 단일크론항체로 ELISA나 IFA방법도 개발되어 있다. 간흡충과 폐흡충은 과거에 우리나라에 만연지역을 형성하고 있었고, 유구낭충이나 스파르가눔이 인체에 감염된 경우 충체가 조직으로 이동하므로 혈청학적 진단이 중요하다. 고래회충유충의 경우 위나 장이외의 조직으로 이동한 경우 진단이 어려우며 혈청학적 진단이 도움이

된다. 독소포자충의 인체 감염은 혈청학적 방법이 진단에 유용하게 쓰이며 질편모충 환자의 진단은 wet smear를 현미경으로 관찰하는 것이 좋으나 혈청학적 방법도 함께 이용되고 있다. 그외에도 개회충, 분선충, 포충증, 주혈흡충, 회선사상충, 람블편모충, 와포자충, 리슈만 편모충, 사가스 질병, 말라리아등의 진단에 혈청학적 방법이 이용되고 있다.

간흡충 만연지역에서 대변에서 충란이 확인된 환자 84명의 혈청으로 ELISA를 시행하였을 때 항체가는 1.22 ± 0.35 (건강인 0.52 ± 0.16)으로 높았다[1]. 간흡충증 환자에서 ELISA로 측정된 항체가는 그 값이 낮은 것에서 높은 것까지 고루 분포되어 있었다[2]. 간흡충의 항원 단백질을 Western blot으로 관찰하였을 때 43kDa, 34kDa, 28-25kDa이 중요하다[3]. 또 간흡충의 분비배설 항원인 7kDa 단백질은 간흡충 진단의 지표로 중요하며, 과거 감염인 경우는 양성으로 나타나지 않는다[4]. Yong 등[5, 6]은 간흡충과 폐흡충에서 단클론항체를 이용한 ELISA inhibition test는 민감도는 일반 ELISA와 같으나 특이도가 높아지므로 간흡충 또는 폐흡충 환자 진단에 유용하다고 하였다. 폐흡충 만연지역에서 피내반응 양성자 239명중 ELISA에 의한 IgG 항체양성자는 40명으로 16.7%이었고 대변에서 충란이 검출되지 않으나 피내반응검사가 양성인 경우 ELISA를 시행할 수 있다[7]. 폐흡충의 조항원으로 시행한 ELISA는 역학조사뿐 아니라 약제 치료 후 그 효과 판정에도 유용하다[8]. 유구낭충증을 의심하는 환자 68명중 ELISA와 Western blot에 모두 양성을 보인 경우는 27명이었다[9]. Yang 등[10]은 유구낭충의 낭액에서 분리한 10kDa의 항원단백질은 217명의 환자에서 84.6%의 양성율을 보였고 다른 기생충과 교차반응은 조항원에 비해 크게 감소하였다고 한다. 무구조충의 두부에서 분리, 정제한 항원 25.5kDa, 28kDa, 87.5kDa, 12.5kDa의 단백질은 환자 진단에 유용하였고 스파르가눔이나 폐흡충과 교차반응이 없었다[11]. *Spirometra erinacei*를 정제한 36kDa, 31kDa항원은 민감도와 특이도가 각각 96.4%, 96.9%로 좋아졌고 유극악구충, 광동주혈선충, 선모충 환자의 혈청과 교차반응을 일으키지 않았다[12]. Im 등[13]은 임신부 618명의 혈청으로 독소포자충에 대한 항체를 관찰하였을 때 ELISA로는 7.0%, IFA검사에서는 6.6%의 양성률을 보였다. 또 임신부 899명의 혈청으로 ELISA 및 LAT (Indirect latex agglutination test)를 시행하였을 때 각각 4.3%와 0.8%의 양성률을 관찰하였다[14]. 급성 또는 만성 독소포자충증 환자 혈청에서 Western blot을 시행하였을 때 p38 항원이 급성과 만성 감염을 구별하는데 좋았다[15]. 질편모충증 환자 15명의 혈청으로 Western blot을 시행하였을 때 10,000 Da과 60,000 Da이 중요한 항원 단백질이었다[16]. 자궁경부암 환자에서 질편모충에 대한 항체를 조사하기위해 ELISA와 Western blot을 시행하였을 때 41.3%에서 항체가가 양성이었고 92kDa, 115kDa 항원이 중요하였다[17]. 류 등[18]은 질편모충증 환자 80명

의 혈청으로 ELISA 검사를 시행하였을 때 95.0%의 양성률을 보여 집단검사에 ELISA 검사가 유용하다고 하였다. 전국적으로 6,704명에서 기생충 항원에 대한 ELISA를 시행하였을 때 간흡충 3.6%, 폐흡충 1.7%, 유구낭충 4.5%, 스파르가눔 2.6%, 고래회충유충 8.1%, 개회충 5.6%의 양성률을 나타내었다[19].

이 실험에서는 간흡충, 폐흡충, 고래회충 유충의 항체가 높았고 간흡충과 폐흡충간에는 교차반응이 뚜렷하였다. 또 질편모충 양성 혈청이 독소포자충 양성인 경우보다 많았다. 이 실험에서는 병원에 내원한 환자의 혈청으로 ELISA를 시행하였으므로 기생충에 대한 항체가 다소 높게 나타났고 교차반응을 보인 경우도 19명이 있었다. 기생충 감염환자 진단에서 ELISA법을 이용한 항체가 측정은 역학적 조사에는 비교적 편리하게 사용될 수 있다. 그러나 기생충간의 교차반응을 낮추기 위해 기생충 항원의 정제가 필수적이다. 또 항체가 높은 환자에서는 Western blot을 시행하는 것이 위양성을 찾아내는 좋은 방법이라고 생각된다.

요 약

배 경: 한양대학 병원(서울, 구리)에 내원한 환자의 혈청으로 ELISA법을 이용하여 간흡충, 폐흡충, 유구낭충, 스파르가눔, 고래회충유충, 독소포자충, 질편모충에 대한 항체가를 측정하고, 각 기생충에서 항체가 양성으로 나온 혈청으로 Western blot을 시행하여 기생충 항원과 반응하는지 관찰하였다.

방 법: 환자혈청은 한양대학병원에 내원한 환자에서 얻었으며 류마치스 환자의 혈청은 제외하였다. 간흡충은 참붕어에서 분리한 피난유충을 토끼에 감염시켜 성충을 얻었으며, 폐흡충은 가재에서 분리한 피난유충을 개에 감염시켰다. 유구낭충은 감염된 돼지에서, 스파르가눔은 환자에서 분리한 충체에서, 고래회충유충은 시장에서 구입한 고등어의 내장에서 분리한 유충으로 각각 항원을 준비하였다. 독소포자충은 마우스 복강내에서 계대하였고 질편모충은 TYM배지에서 배양하여 얻었다. ELISA와 Western blot은 일반적인 방법대로 시행하였다.

결 과: 환자 200명에서 얻은 혈청으로 시행한 ELISA에서 폐흡충, 고래회충 유충, 간흡충의 양성율이 각각 12.7%, 11%, 7.0%로 높았다. 환자 200명의 혈청에서 19명이 다른 기생충과 교차반응을 나타내었다. Western blot에서 간흡충은 5명중 3명에서 폐흡충은 2명중 2명에서 스파르가눔은 4명중 1명에서 항원성 단백질을 관찰하였고 유구낭충은 4명 모두 음성으로 나타났다.

결 론: 기생충 감염 환자에서 ELISA는 역학적 조사에 이용할 수 있으며 보다 나은 결과를 얻기 위해 항원의 정제가 필요하다. 또 항체가 높은 환자의 혈청은 Western blot을 시행하면 위양성을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. 이준근, 민득영, 임경일, 이근태, 소진탁. 간흡충 감염 진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구 연세의대 논문집 1981;14:133-45.
2. Soh CT, Min DY, Ryu JS, Yong TS. Study on the reproducibility of ELISA technique for the diagnosis of clonorchiasis and paragonimiasis. Yonsei Rep Trop Med 1985;16:1-10.
3. Hong ST, Kho WG, Lee MJ, Lee JS, Lee SH. Immunoblot patterns of clonorchiasis. Korean J Parasitol 1997;35: 87-93.
4. Kim SI. A Clonorchis sinensis-specific antigen that detects active human clonorchiasis. Korean J Parasitol 1998;36:37-45.
5. Yong TS, Im KI, Chung PR. Analysis of Clonorchis sinensis antigens and diagnosis of clonorchiasis using monoclonal antibodies. Korean J Parasitol 1991;29:293-310.
6. Yong TS, Seo JH, Yeo IS. Serodiagnosis of human paragonimiasis by ELISA-inhibition test using monoclonal antibodies. Korea J Parasitol 1993;31:141-7.
7. 조승열, 이동근, 강신영, 김석일, 면역효소진단법을 이용한 폐흡충증 유행의 역학조사. 기생충학잡지 1983;21:246-56.
8. Imai JI. Evaluation of ELISA for the diagnosis of Paragonimiasis westermani. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1987;81:3-6.
9. Sloan L, Schneider S, Rosenblatt J. Evaluation of Enzyme-linked Immuno assay for serological diagnosis of cysticercosis. J Clin Microbiol 1995;33:3124-8.
10. Yang HJ, Chung JY, Yun DH, Kong Y, Ito A Ma L et al. Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of Taenia solium metacestodes. Parasite Immunol 1998; 20:483-8.
11. Yong TS, Yes IS, Seo JH, Chang JK, Lee JS Kim TS et al. Serodiagnosis of cysticercosis by ELISA-inhibition test using monoclonal antibodies. Korean J Parasitol 1993;31:149-56.
12. Morakote N, Kong Y. Antigen specificity of 36 and 31 kDa proteins of Spirometra erinacei plerocercoid in tissue invading nematodiasis. Korean J Parasitol 1993;31:169-71.
13. Im KI, Yong TS, Shin HJ, Lee DH. Anti-Toxoplasma antibody titers in pregnant women Yonsei Rep Trop Med 1991;22:15-20.
14. Ryu JS, Min DY, Ahn MH, Choi HG, Cho SC, Shin YJ

- et al. *Toxoplasma* antibody titer by ELISA and indirect latex agglutination test in pregnant women. *Korean J Parasitol* 1996;34:233-8.
15. Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. *Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: Determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. Clin Diag Lab Immunol* 2000;7:384-9.
 16. Garber GE, Proctor EM, Bowie WR. *Immunogenic proteins of Trichomonas vaginalis as demonstrated by the immunoblot technique. Inf Immun* 1986;51:250-3.
 17. Yap EM, Ho TH, Chan YC, Thong TW NG GC, HO LC et al. *Serum antibodies to Trichomonas vaginalis in invasive cervical cancer patients. Genitourin Med* 1995; 71:402-4.
 18. 류재숙, 윤경, 하서은, 민득영, 안명희. 질편모충의 혈청 IgG 항체 측정을 위한 세 가지항원의 비교. *대한임상미생물학회지* 2000;3:62-68.
 19. 임한중, 이준상, 주경환, 정명숙. 우리나라의 주요 기생충질환에 대한 혈청학적 조사. *한국농촌의학회지* 1991;16:48-60.