

□ 원 저 □

다양한 특이결핵항원을 이용한 결핵항체 검사(ELISA)의 진단적 유용성

국립마산결핵병원 임상연구소, 연세대학교 의과대학 미생물교실*

김대연, 최인환, 박승규, 조상래*, 송선대

= Abstract =

Diagnostic Significance of the Serologic Test Using Multiple Antigens of Mycobacterium Tuberculosis by ELISA

Dae Yun Kim, M.D., In Hwan Chol, M.D., Seung Kyu Park, M.D.,
Shang Rae Cho, Ph.D.*, Sun Dae Song, M.D.

Clinical Institute, National Masan Tuberculosis Hospital, Masan, Department of Microbiology,
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Diagnosis by smear and/or cultures of the Mycobacterium tuberculosis from body fluid or biopsy specimen is "Gold standard". However the sensitivity of the direct microscopy is relatively low and culture of mycobacteria is time consuming. Despite an explosion in the techniques of rapid identification of mycobacteria by molecular genetic means, it is laborious and expensive and then rapid, inexpensive serodiagnosis is interested in diagnosis of tuberculosis. But sensitivity and specificity of known serologic antigen is not full sufficient level and then new antigen develop and combination cocktails of new developed antigens by ELISA are needed.

Method : To compare the efficacy of different mycobacterial specific antigen and to assess the applicability of the combination of several different antigens in the diagnosis of tuberculosis, five ELISA tests derived 14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa were evaluated in 57 active pulmonary patient and 24 inactive post-therapy follow up patient and 48 normal control.

Results : The optical densities of ELISA test with 14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa were significantly higher in active tuberculosis cases than in normal control($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.027$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)

Address for correspondence :

Dae Yun Kim, M.D.

National Masan Tuberculosis Hospital

486 Kapodong, Hapogu, Masan, 631-320, Korea

Phone : 0551-249-3777 Fax : 0551-242-1135 E-mail : cskdymd@unitel.co.kr

and those with 16KDa, 38KDa were significant higher in active tuberculosis cases than in inactive post-therapy follow up cases($P<0.01$, $P<0.001$) and those of 14KDa, 16KDa, 23KDa, 38KDa were significant higher in inactive post-therapy follow up cases than in normal control($P<0.008$, $P<0.01$, $P<0.006$, $P<0.001$). The sensitivity of 14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa in active pulmonary patient cases was 42.1%, 43.9%, 15.8%, 28.0%, 70.2%, respectively and the specificity of 14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa in active pulmonary patient cases was 95.8%, 95.8%, 91.7%, 89.6%, 93.8%, respectively. The sensitivity and specificity of combination 38KDa with 16KDa was 87% and 93.7%.

Conclusion : The sensitivity and specificity of new antigens for serodiagnosis of the tuberculosis still remains limited at around 70%, which makes its a poor diagnostic tool for disease confirmation. A combination of cocktail antigens provided by cut-off value adjustment for serodiagnosis of tuberculosis some improved diagnostic yield than single antigen serologic test. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 757-767)

Key words : Serodiagnosis, Pulmonary tuberculosis, Combination antigens.

서 론

결핵은 오래 전부터 인류를 괴롭혀온 감염성 질환이며 현재도 전 세계를 통틀어 16억 인구가 감염된 상태로 있으며 매년 1000만 명의 새로운 결핵환자가 발생하고 그 중 300만 명의 환자가 결핵으로 인해 사망하는 것으로 보고되고 있다¹. 특히 결핵은 아시아 아프리카의 저개발국가에서 높은 유병률을 보이고 있으며, 서구사회에서도 유병률이 감소하다가 80년대 중반 이후 HIV감염과 연관되어 유병률이 다시 증가하는 추세를 보이고 있으며 특히 다제내성균주의 출현이 결핵치료에 있어서 막대한 의료비의 증가와 높은 사망률 등으로 새로운 문제로 대두되고 있는 실정이다. 우리나라에도 1995년 전국 결핵 실태조사에서 엑스선상 폐결핵 유병률은 1.03%로 꾸준히 감소 추세에 있으나 항암 약물치료 및 면역억제제의 사용과 당뇨병 및 인구고령화와 만성노인질환의 증가에 따라 결핵 유병률의 감소 추세가 둔해진 것으로 보고되고 있다². 제 7차 전국 결핵 실태 중간보고에 의하면 총 내성률 9.9%, 초회 내성률 5.8%, 획득 내성률 25.0%로 내성균 전염의 우려가 높다고 하겠다³. 결핵의 진단은 임상적 검체에서 결핵균을 발견하는 것이 가장 정확한 방법이며 통상적인 검사로 이용되어 왔으나 객담도말 검사의

경우 민감도가 낮고 특히 검사자의 숙련도 및 검사투여 시간이 중요한 변수로 작용하고 있으며 배양검사의 경우 4주 이상의 기간이 소요되어 조기진단과 조기치료의 시기를 놓치는 경우를 종종 보게된다. 특히 소아결핵의 경우 검체를 얻기 힘들고 결핵성 뇌막염이나 척추결핵의 경우 임상 검체에서 결핵균의 발견은 폐결핵에 비해 아주 낮기 때문에 새로운 진단법의 개발이 필요함을 절실히 느끼고 있다. 이를 위해 최근의 여러 새로운 검사법이 개발되었는데, BACTEC system, 중합효소연쇄반응(PCR) 및 Gen probe, Chromatography of mycolitic acid, Serologic test등이 대표적인 검사법이다. BACTEC system⁵의 경우 10-14일내 결핵균을 배양하고 결핵균 외에 비결핵성 항산균 등의 생화학적인 동정이 가능한 장점이 있으나 설치와 유지의 비용이 많이 들고 방사선 동위원소의 사용 등으로 아직 외국과 국내에서 널리 사용은 어려운 실정이다. 중합효소연쇄반응(PCR)등의 유전학적 진단방법은 최근 높은 감수성과 특이도로 활발한 연구가 진행되고 있으나 실험실 또는 검사실내 공기의 DNA오염으로 인한 위양성율이 큰 문제로 대두되고 있으며 검사의 방법 또한 어려운 단점을 가지고 있다⁴. 1972년 Engvall과 Perlmann등이 결핵의 진단에 사용하여 높은 감수성과 특이도를 가지면서도 간단하고

검사비용이 저렴한 ELISA 법을 보고하였다⁶.

많은 항원들이 감수성과 특이도를 높이기 위해 사용되었는데, Complex Antigens of tuberculosis⁷, BCG socinate⁸, PPD Ag^{9,10}, Ag 5와 Mycobacterium glycolipids¹¹ 등을 들 수 있고 이것들의 감수성은 26%-95%이고 특이도는 74%-100% 등으로 각각 다양하였고¹², 현재로는 38KDa와 30KDa, Antigen 60등이 가장 감수성과 특이도가 높아 일부 상업화된 ELISA kit가 개발되어져 있다. 그러나 이들 항원들이 기존의 항산성균 직접도말법이나 결핵균 배양법을 대체하여 사용할 수 없는데 주 요인은 감수성이 떨어지는 단점이 있고 이의 가장 큰 이유로 각 항원에 대한 환자의 항체생성이 다양하게 나타나고 있으며 이의 정확한 기전은 환자의 면역반응이 다른 것인지 균 특이상태에 따른 것인지 잘 모르고 있는 실정이다. 그러므로 이 연구는 국립 마산 결핵병원에서 입원 및 퇴원환자를 대상으로 다양한 결핵항원의 항체를 측정하고 각 항원의 민감도 및 특이도를 측정하며 면역반응의 다양성에 따라 조합하여 민감도를 올리려는 시도를 하려한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1997년 9월부터 1997년 12월까지 국립마산결핵병원에 입원 후 치료중인 환자를 대상으로 한 활동성 폐결핵 환자군 57명과 결핵치료를 마친 환자로 본원 외래에서 경과관찰을 시행하는 비 활동성 폐결핵군 24명과 마산지역의 한 병원에서 건강검진을 통해 폐결핵이 없음을 확인한 정상군 48명을 대상으로 하였다. 활동성 폐결핵 환자군은 이 군에 속해있는 환자군은 다음 중 적어도 한가지에 속해있는 환자로 (1) 양성인 항산균 도말 환자 (2) 양성 배양 환자 (3) 조직학적으로 결핵으로 증명된 환자 (4) 흉부 단순촬영 상 결핵이 의심이 되고 결핵 치료 후 상당한 치료효과가 인정된다고 생각한 환자이다.

2. 연구방법

1) 환자에 대한 조사

환자들의 임상기록을 토대로 성별 및 연령을 기록하고 입원당시의 항산균 도말 상태는 (-); 전 시야에 균이 없을 때 (+); 전 시야에 3-9개의 균이 있을 때 (+); 전 시야에 10개 이상의 균이 있을 때 (+++); 매 시야에 1개 또는 그 이상의 항산균이 있을 때로 표기하였다. WHO가 추천한 치료의 우선 순위에 따라 카테고리 I - IV 분류하였고(Table 1)¹³ 치료약제는 일차약제로 조합된 경우와 이차약제 및 일차약제와 이차약제가 혼합된 경우는 다같이 이차약제로 분류하고 아이나(INH) 단독요법인 경우 등 3가지로 나누었다. 단순 흉부 촬영의 경우 미국 흉부 학회에서 1969년 제정한 진단 및 분류에서 병변에 따른 분류로 경증, 중등증, 중증으로 나누어 기술하고¹⁴ 그 외에도 치료 횟수, 동반 질환, 합병증, 내성결과를 참조로 하였다.

2) 결핵균 항체 검사

14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa의 항원을 2ug/ml의 농도로 CPB coating buffer에 희석하여 96-well ELISA plate(Costar corporation)에 16-18시간 4℃ overnight coating을 시킨 후 PBST-NGS로 coating 되지 않은 부위를 37℃에서 blocking 1시간 후 serum 100μl을 PBST-NGS solution에 1:300으로 희석하여 100μl을 96-well plate에 정치시킨 후 PBST로 각 well을 세척하고 PBST-NGS 1:20000으로 희석한 100μl의 affinity-purified peroxidase conjugated anti-human IgG (Calbiochem, San Diego, CA, U. S. A)를 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 각 well을 세척한 후 H₂O₂-phenylenediamine substrate를 첨가하고 상온에서 15분간 반응시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 결과의 판정 및 분석

결핵균 항체 검사의 판정 기준치는 마산지역의 한 병

Table 1. WHO category classification

TB treatment category	TB patients
I	New smear-positive PTB; new smear-negative PTB with extensive parenchymal involvement; new cases of severe forms of extra-pulmonary TB.
II	Sputum smear-positive: relapse; treatment failure; treatment after interruption.
III	New smear-negative PTB (other than in Category I); new less severe forms of extra-pulmonary TB.
IV	Chronic case(still sputum-positive after supervised re-treatment)

원에서 건강 검진시 폐질환이 없는 정상군의 혈청에서 측정된 흡광도의 평균값에 표준 편차의 2배를 더한 값으로 정하고, 이 값 이상인 경우 양성, 미만인 경우를 검사 음성으로 하였다. 이러한 방법으로 14KDa, 16KDa, 19KDa, 23KDa, 38KDa항원에 대한 항체값의 판정기준은 각각 0.239, 0.231, 0.442, 0.464, 0.336으로 하였다. 민감도, 특이도, 양성예측율 및 음성예측율을 구하였다.

4) 통계분석

통계분석은 SPSS/PC+ 통계 패키지를 이용하여 흡광도가 활동성 폐결핵군과 치료 종결한 비활동성 폐결핵군과 정상군을 비교 분석하였고 p값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 분석하였다.

결 과

1. 활동성 폐결핵 환자군의 성격

대상환자는 57명으로 남자 56명, 여자 1명이며 연령은 평균 43.56 ± 11.61 세이고 40대가 20명으로 가장

많고 전체적으로 고른 분포를 보이며, 카테고리별 분류에서 I 16, II 34, III 0, IV 6, 미확정 1명으로 카테고리 II가 많고, 가래 객담검사에서 (-) 13, (+) 23, (++) 3, (+++) 7명으로 (+)환자가 상대적으로 많으며, 흉부 X-선상 경증 2, 중등증 13, 중증 42명으로 대체로 본원에 입원한 환자는 중증환자가 많은 것으로 생각이 되며, 치료횟수는 평균 2.58 ± 1.46 으로 다른 기관에 비해 대체로 많은 치료횟수를 가지고 있다고 보이며, 치료약으로 일차약 38, 이차약 16명, 아이나 단독 2명, 미확정 1명으로 일차약제 투여 환자가 많았다. 동반 질환으로 당뇨 10, B형 간염 3, 간 경화증 1명 등이었고 합병증으로 결핵성 늑막염이 14예가 있었다.

2. 대상군별 각 항원에 대한 흡광도 비교분석 (Table 2)

1) 14KDa항원에 대한 항체값의 분석(Fig. 1)

활동성 폐결핵군은 비활동성 치료종결군에 비해 유의하게 높지 않았고($P < 0.065$), 정상군에 비하여는 유의하게 높았으며($P < 0.001$), 비활동성 치료종결군도

Table 2. The optical densities of various antigens optical density(mean \pm SD)

Group	No.	14KDa	16KDa	19KDa	23KDa	38KDa
A	57	0.75 ± 1.20	0.70 ± 1.13	0.35 ± 0.67	0.38 ± 0.42	1.64 ± 1.30
B	24	0.39 ± 0.54	0.30 ± 0.43	0.18 ± 0.16	0.34 ± 0.26	0.42 ± 0.38
C	48	0.06 ± 0.09	0.05 ± 0.09	0.15 ± 0.15	0.18 ± 0.18	0.11 ± 0.10

A : active pulmonary TB, B : inactive pulmonary TB, C : healthy control

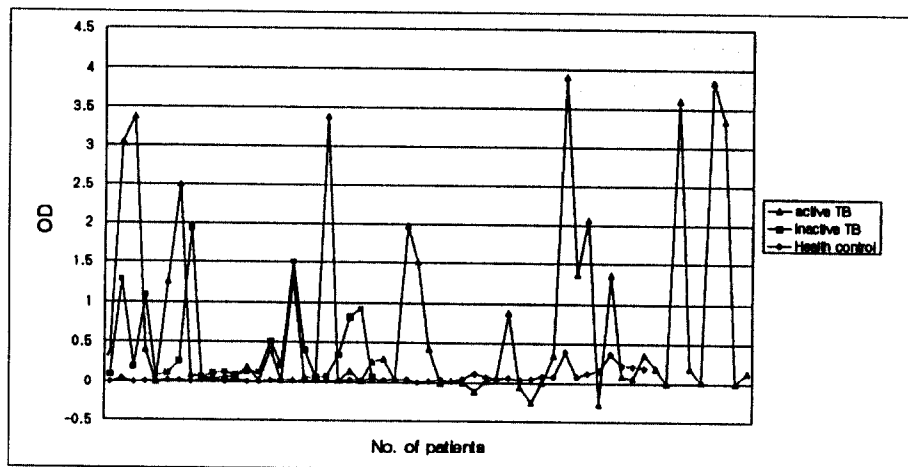


Fig. 1. The antigen 14KDa in the different groups.

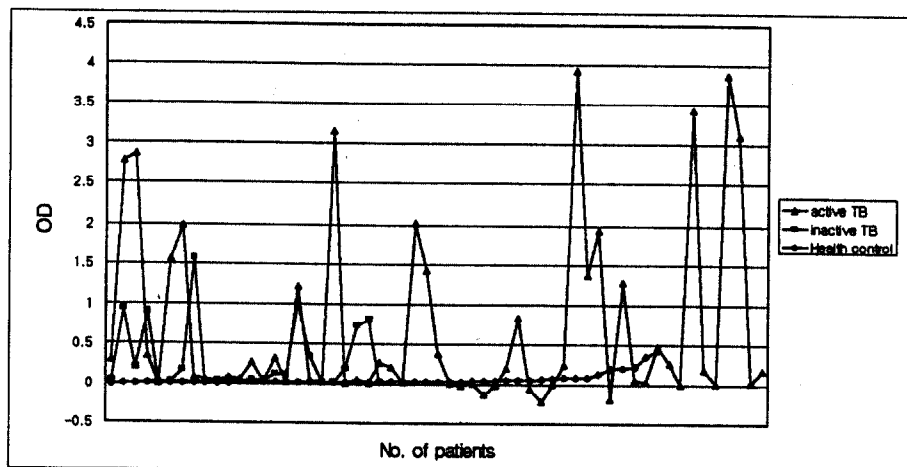


Fig. 2. The antigen 16KDa value in the different groups.

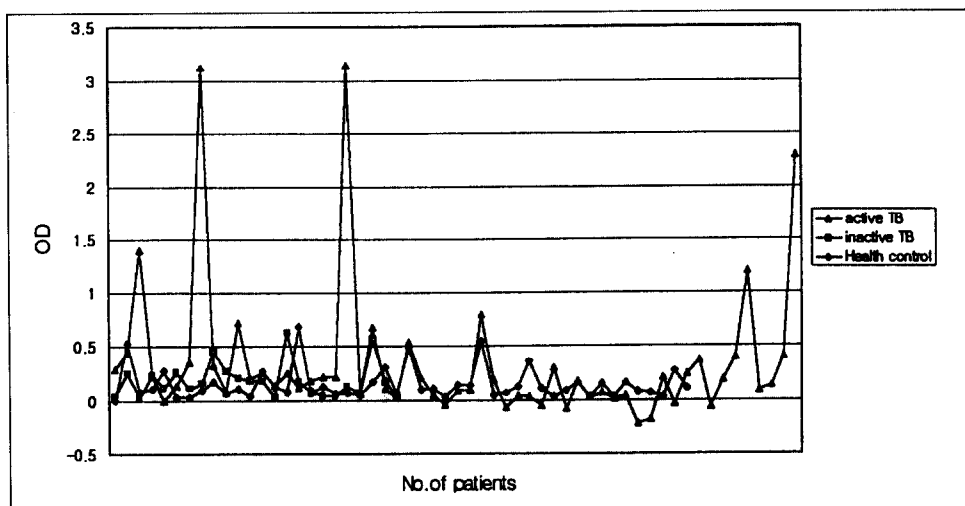


Fig. 3. The antigen 19KDa value in the different groups.

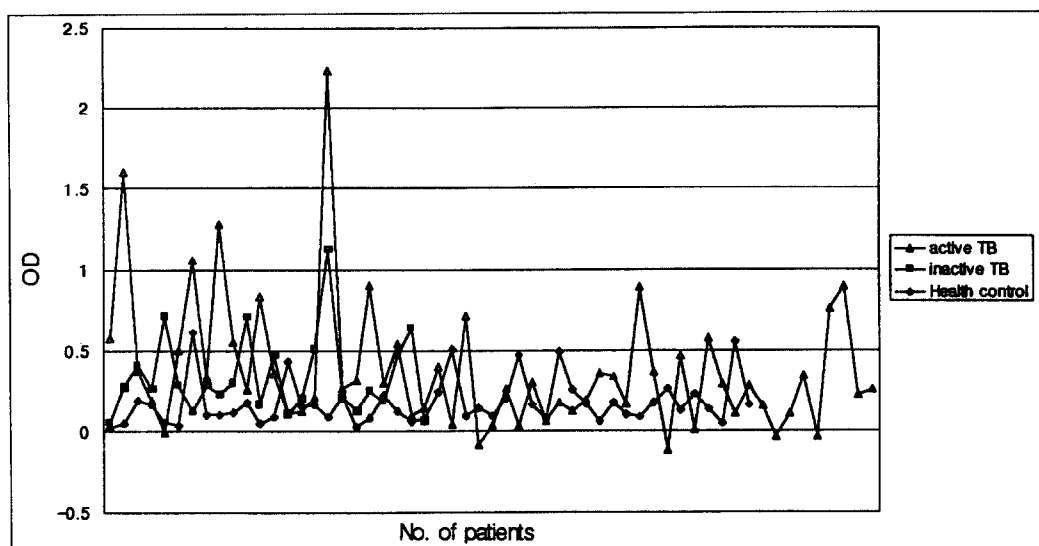


Fig. 4. The antigen 23KDa value in the different groups.

정상군에 비해 유의하게 높았다($P < 0.008$).

상군에 비해 유의하게 높았다($P < 0.01$).

2) 16KDa항원에 대한 항체값의 분석(Fig. 2)

활동성 폐질환군은 비활동성 치료종결군에 비해 유의하게 높았고($P < 0.025$), 정상군에 비하여는 유의하게 높았으며($P < 0.001$), 비활동성 치료종결군도 정

3) 19KDa항원에 대한 항체값의 분석(Fig. 3)

활동성 폐질환군은 비활동성 치료종결군에 비해 유의하게 높지 않았고($P < 0.08$), 정상군에 비하여는 유의하게 높았으며($P < 0.027$), 비활동성 치료종결군도

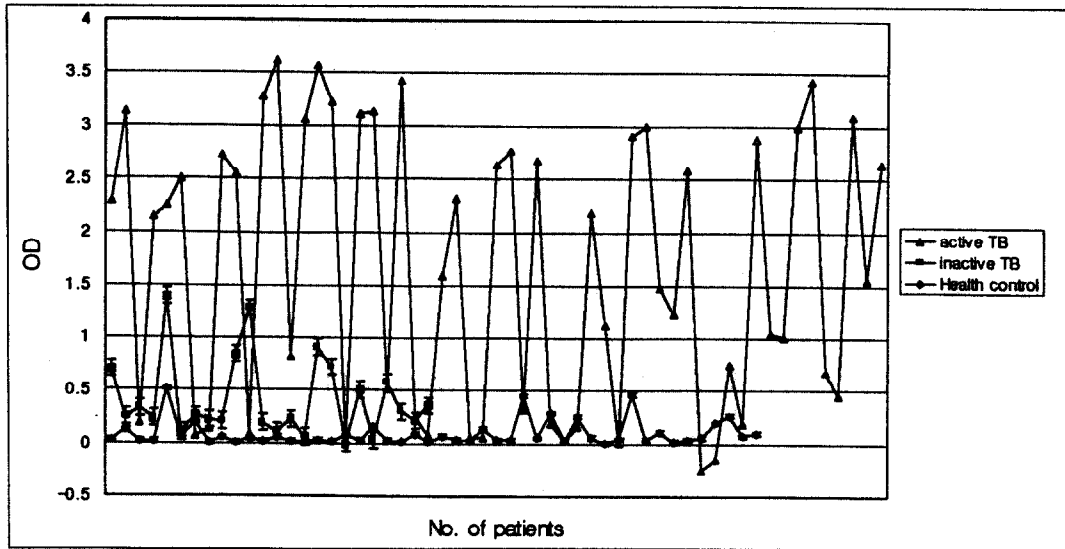


Fig. 5. The antigen 38KDa value in the different groups.

Table 3. The validity of various antigens between active TB patient and healthy control.

Antigens	A	B	C	D
14KDa	42.1	95.8	92.3	58.2
16KDa	43.9	95.8	92.6	59.0
19KDa	15.8	91.7	62.2	47.8
23KDa	28.0	89.6	76.2	51.2
38KDa	70.2	93.8	93.0	76.6

A : sensitivity(%), B : specificity(%), C : positive predictive value(%),
D : negative predictive value(%)

정상군에 비해 유의하게 높지 않았다($P < 0.32$).

4) 23KDa항원에 대한 항체값의 분석(Fig. 4)

활동성 폐질환군은 비활동성 치료종결군에 비해 유의하게 높지 않았고($P < 0.66$), 정상군에 비하여는 유의하게 높았으며($P < 0.001$), 비활동성 치료종결군도 정상군에 비해 유의하게 높았다($P < 0.006$).

5) 38KDa항원에 대한 항체값의 분석(Fig. 5)

활동성 폐질환군은 비활동성 치료종결군에 비해 유의하게 높았고($P < 0.001$), 정상군에 비하여는 유의하

게 높았으며($P < 0.001$), 비활동성 치료종결군도 정상군에 비해 유의하게 높았다($P < 0.001$).

3. 각 항원에 대한 항체검사의 평가(Table 3)

각 항원에 대한 항체검사의 평가는 앞에서 전술한 민감도, 특이도, 양성예측도 및 음성 예측도로 나타내었고 Table 3에서 잘 나타내어 주고 있는 데 38KDa의 경우 민감도가 70%대로 약간 낮은 결과를 보이고 있으나 특이도가 우수한 것으로 나타났고 14KDa와 16KDa의 경우 민감도가 50% 이하이며 특이도가 높

아 단독으로 사용하기는 어려울 것으로 생각되고 38KDa와 combined cocktail로 사용할 수 있으리라 생각되며 19KDa와 23KDa는 민감도가 너무 떨어지는 단점이 있어 항원에 대한 연구가 있어야 되고 이 이후 combined cocktail로 사용가능 하리라 생각이 된다.

4. 16KDa와 38KDa의 combined cocktail의 효과

38KDa의 민감도를 높이면서 특이도를 떨어뜨리지 않기 위해 16KDa의 cut off value를 기존의 mean \pm 2SD에서 mean \pm 3SD로 상향조정했을 때 활동성 폐결핵 환자 57명중 46명이 양성으로 나와 민감도 87%, 특이도 93.8%, 양성 예측도 93.9%, 음성 예측도 80.4%로 검사의 질이 향상되었다.

고 찰

19세기말 Koch가 결핵균을 발견하고 염색과 배양법을 개발하여 결핵을 진단할 수 있게 되었고 100년 이상 "gold standard" 사용하고 있지만 염색의 낮은 민감도와 배양의 시간이 많이 소요된다는 점 때문에 새로운 진단법의 개발의 필요성이 증대되어 왔다. 최근 유전공학의 폭발적이라 할 수 있을 정도로 발달과 함께 표준결핵균주의 전 염기서열이 밝혀지고¹⁶ 이에 따라 내성결핵에 대한 유전학적 염기서열을 밝혀내고 내성균주의 진단에 사용할 수 있는 kit개발이 연구과정에 있으나 임상적용에는 다소 시간이 필요하리라 생각 된다.

100여 년 간 꾸준한 연구가 있는 결과 1972년 ELISA법이 개발되고 Nassau등⁷이 ELISA방법을 이용하여 결핵진단에 57%의 민감도와 98%의 특이도를 보고하였고 이 후 ELISA법을 기본으로 하는 여러 혈청검사법과 결핵균에 특이한 정제 항원 및 단클론성 항체들이 개발됨에 따라 민감도와 특이도가 향상되어 기존의 결핵진단법을 보완하기 위해 혈청학적 검사에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다¹⁰. 특히 혈청

학적 검사는 객담 항산균 음성 결핵이나 폐외 결핵같이 통상적인 방법으로 진단에 실패했거나 어려운 경우를 진단하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대되고 있으며 그 외 투약중인 환자의 순응도를 감시, 예방적 화학요법이 필요한 경우의 진단 및 새로운 백신의 효과판정에 혈청학적 검사가 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다¹⁷.

ELISA를 이용한 혈청학적 항체검출 방법에 있어서 항원의 역할이 주요한데 균 특이 항원이 의미하는 면역반응을 유발해야 하고 교차반응이 적어야 민감도 및 특이도를 높일 수 있다. 현재까지 연구결과를 살펴보면 38KDa은 1978년 Daniel과 Anderson¹⁸이 Antigen5로 첫 발표를 하였고 Cleveland 연구에서 IgG항체가 치료 첫 3개월까지 상승하고 12-16개월 정도 지난 후 떨어지는 것으로 되어있고 Anderson과 Hansen¹⁹은 유전자 재조합에 의한 r38KDa를 사용으로 더 나은 결과를 보고하였다. 30KDa은 쉽게 제조가 가능하고 보관에 있어서 역가를 안정적으로 유지 할 수 있는 장점이 있으나 결핵균이외의 항산균에 비 특이적으로 반응이 많은 단점을 가지고 있고 14KDa 및 16KDa은 Verbon²²등에 의해 개발되었고 저 분자량의 heat-shock proteins의 alpha crystalline family에 속하는 것으로 결핵균에 특이한 B-cell epitopes를 가지고 있는 것으로 보고하였다²⁰. 그의 결핵균의 세포막 성분인 glycolipid complex인 Lipoarabinomannan, 23KDa, 배양내의 분비 항원들, 우형결핵균(M. bovis)과 같은 정제되지 않은 형태의 여러 항원들, 정제단백유도체(PPD)와 그의 반정제 형태인 A60 antigen등이 여러 연구자에 의해 연구를 진행하고 있다. 그러나 어느 특정한 균특이 항원이 단독으로 활동성 결핵의 면역반응을 유도하여 항체형성을 유발한다는 증거가 많지 않고²¹, HIV감염환자에서는 항체형성이 적어 혈청학적 검사의 민감도가 매우 낮고²², 일부 HLA-DR8의 표현형인 경우 38KDa 항원에 대한 항체형성 능력이 현저히 감소해 있는 것으로 알려져 있는²³ 등 환자의 면역상태에 따라 항체 생성 능력이 다르므로^{20, 21, 24} 단독 항원에 대한 검사보다

는 몇 가지 균특이 항원을 조합하여 사용하면 민감도를 높일 가능성도 있다.

14KDa 항원에 대한 항체 검사는 활동성 폐결핵과 정상균과의 구별은 용이하나 비활동성 치료종결균과의 구별은 불리하게 보이지만 유의수준이 borderline에 있고, 16KDa는 평균과 표준편차가 14KDa와 비슷하며 한 환자 내에서도 항체가의 증감과 민감도 및 특이도가 비슷하였으나, 14KDa 항원에 비해 활동성 폐결핵균과 치료종결균의 비교에서는 유리한 측면을 보였으며 연구 대상을 늘려 좀 더 자세한 분석이 필요 하리라 사료된다.

19KDa 항원에 대한 항체 검사는 활동성 폐결핵과 정상균과의 구별은 용이하나 비활동성 치료종결균과의 구별은 불리하게 보이지만 비활동성 폐결핵과 정상균을 구별할 수 없어 폐결핵의 진단에 있어 단일 항원으로서의 가치보다는 combinational cocktail을 만들 때 사용 가치를 부여할 수 있겠다.

38KDa 항원에 대한 항체 검사는 활동성 폐결핵과 정상균과의 구별은 용이하고 비활동성 치료종결균과의 구별 또한 유의하게 가능한 것으로 보이며 기존의 연구와 같은 결과를 보이고 있다¹⁵.

여러 항원을 조합하여 한 항원에서 양성으로 나오면 검사 양성으로 판정을 하게 되면 민감도는 올라가지만 특이도가 떨어지는 결과가 생기고 위양성율이 높아지게 되는 데 이로 인해 환자에게 수개월의 일차약제 또는 수년간의 이차약제를 투여한다는 것은 경제적으로나 물질적으로 너무나 많은 손실이 있으므로 결핵진단에 있어서 특이도는 다른 감염성 질환에 비해 무엇보다도 중요하다고 하겠다. 그러므로 특이도를 그대로 유지하면서 민감도를 향상시키기 위해 기준치(cut-off value)의 조정이 필요하다고 생각이 되고^{11,15} 본 연구도 이와 같은 배경에서 여러 항원들을 유전자 재조합의 방법으로 생산을 하고 같은 연구대상으로 각각 항원의 민감도, 특이도 등을 조사를 하여 combined cocktail의 가능성을 알아보고 실제 combined cocktail을 시행할 때 결과도 알아보고자 하였으며 더 나아가 다음 연구로 항원의 항체반응의 다양성을 환자의

면역상태에 따라 어떤 다양성(variety)을 가지고 있는지를 알아보는 것이다.

본 연구에서 38KDa 항원에 가장 민감도 70% 및 특이도 93.8%로 다른 항원에 비해 높았고 이를 근간으로 하는 조합을 해야할 것으로 생각이 되었으나 23KDa 및 19KDa는 민감도가 크게 떨어지는 모습을 보였다. 본원의 흉부 촬영상이나 도말 상태 등에서 보는 것처럼 중증환자가 많이 포함되어 있는 점을 감안할 때 23KDa나 19KDa의 결과는 조합을 하기에는 미흡한 점이 있지 않나 생각이 된다. 14KDa와 16KDa는 민감도가 42%-43.9%로 23KDa나 19KDa보다는 우수하여 우선 조합대상에 포함될 수 있으나 14KDa의 평균과 표준편차가 16KDa의 평균 및 표준편차가 유사하고 각각의 환자에서도 같은 증감과 같은 양성을 보이는 바 14KDa와 16KDa중 16KDa를 대표로 사용할 수 있겠다. 16KDa의 기준치를 $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 보다 높은 $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ 로 했을 때 38KDa와 16KDa를 조합하면 민감도는 87%로 상향조정되고 특이도는 93.8%로 38KDa와 같은 양상을 보이고 있다.

본 연구에서 각각 항원별로 활동성 환자군과 비활동성 치료종결균 및 정상균으로 나누어 항체 측정가를 분석하였는데 38KDa 항원의 경우 세 그룹의 구별이 뚜렷하였고 통계학적인 의의가 있어 비활동성 치료종결균의 재발가능성을 판정하는 데 유용하게 사용될 가능성을 내포하고 있고 여기에 대한 연구가 더 진행되어야 하리라 생각된다.

ELISA를 이용한 결핵의 혈청학적 진단법은 30년간의 연구 중 단점으로 생각되는 몇 가지 점을 보면 첫째 도말 양성환자 및 중증환자에서 높을 항체가를 보이는 반면 소수 배균자와 균음성환자에서는 정상인 보다는 높지만 통계학적 유의수준의 민감도와 특이도를 얻기 힘들다는 점, 둘째 자연 치유되었거나 치료에 의해 종결된 경우에도 항체가가 오랫동안 남아 활동성을 가리기 어렵다는 점, 셋째 우리 나라에서와 같이 개발도상국인 나라에서는 결핵감염이 많고 비결핵성 항산균과의 접촉이 많은 편이어서 정상균의 항체가가

높이 나타나는 점이다. 그럼에도 불구하고 ELISA를 이용한 결핵항원의 항체측정법은 계속 연구되어 지고 있고 특히 단클론성 항원이 유전공학의 발달에 따라 항원제조가 다량으로 순도가 높게 제조 가능하게 됨으로서 다양한 항원에 대한 실험이 이루어지고 있고 본 연구도 그 연장선상에 있다고 보아야 하겠다. 100여년 이상 "gold standard"인 도말과 배양을 대체할 만한 검사는 아직까지 없으며 이를 대체해서 사용할 수 있는 혈청학적인 검사방법이 나올 수 있는 가능성은 열려져 있다. 이를 위해 꾸준한 특이항원의 개발과 연구 및 임상실험이 이루어져 나아가야 할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. World Health Organization : World health statistics annual, WHO, Geneva. 11;1989.
2. 보건복지부 보건사업지침. 보건복지부, 117; 1996.
3. 홍영표. 제7차 전국 결핵실태 중간보고. 결핵 및 호흡기 질환 43;1996.
4. Kyallenius G, Hoffner SE, Miyorner H, Svenson SB Novel approaches to the diagnosis of mycobacterial infections [editorial] Eur Respir J 1994; 7:1921-4.
5. 김상재. 결핵의 진단. 결핵 및 호흡기질환 1998;45:675-686.
6. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol 1972; 109:129-35.
7. Nassau E, Parson ER, Johnson GD. The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate and enzyme-linked immunosorbent assay. Tubercle 1976;57:67-70.
8. Grange JM, Gibson J, Batty A, Kardito T. The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis. Tubercle 1980;61:153-6.
9. Tandon A, Saxena RP, Saxena KC, Jamil Z, Gupta AK. Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen. Tubercle 1980;61:87-9.
10. Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS, Levitz D, Metzger E, Radin R, Phair JP. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1984;130:845-8.
11. Chan SL, Reggiardo Z, Daniel TM, Girling DJ, Mitchison DA. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. Results in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis ranging in extent of disease from minimal to extensive. Am Rev Respir Dis 1990;142:385-9.
12. William NR, Stuart MG, Barry RB. Immunodiagnosis of tuberculosis. Tuberculosis. Boston : Little Brown company;1996.p223.
13. World Health Organization. Treatment of tuberculosis, Guidelines for national programed, WHO, Geneva. 3, 1993.
14. American Thoracic Society : Diagnosis standards and classification of tuberculosis, 1969(12th) edition, New York, National tuberculosis and respiratory disease association, 1996.
15. Chiang IH, Suo J, Bai KJ, Lin TP, Luh KT, Yu CJ, Yang PC. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. Am J Respir Crit Care Med 1997;156: 906-11.
16. Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeyer K, Pascopella L,

- Balasubramanian V, Heym B, Bergh S, Bloom BR, Jacobs WR Jr, Cole ST. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3132-7.
17. Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995;20:676s-688s.
18. Daniel TM, Anderson PA. The isolation by immunosorbent affinity chromatography and physicochemical characterization and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:533-9.
19. Anderson AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989;57:2481-8.
20. Verbon A, Hartskeerl RA, Moreno C, Kolk AH. Characterization of B cell epitopes on the 16K antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 1992;89:395-401.
21. Bassey EO, Catty D, Kumararatne DS, Raykundalia C. Candidate antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1996;77:136-45.
22. Verbon A, Weverling GJ, Kujiper S, Speelman P, Jansen HM, Kolk AH. Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:378-84.
23. Lee BY, Hefta SA, Brennan PJ. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1992;60:2066-74.
24. Daniel TM, De Murillo GL, Sawyer JA, Griffin AM, Pinto E, Debanne SM, Espinosa P, Cespedes F. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:662-5.
-