폐결핵환자 혈청내 결핵균 특이항체의 Immunoglobulin Class 별 분포*

서울대학교 의과대학 미생물학교실

차 창 용

대한결핵협회 결핵연구원 세균부

김 상 재

=Abstract=

Antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in the Immunoglobulin Classes in the Sera from the Patients with Pulmonary Tuberculosis

Chang-Yong Cha, M.D.

Dept. of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Sang Jae Kim, Ph.D.

Korean Institutes of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

In order to study the level of antibody binding to the extract antigen from *Mycobacterium tuberculosis* (TE antigen) in the IgG, IgA, IgM and IgE class in sera from patients with pulmonary tuberculosis, enzyme-linked immunosorbent assay was performed on 106 patients confirmed as active pulmonary tuberculosis and 30 normal healthy controls.

The results were obtained as follow:

- 1) The activity level (O.D. at 492nm) of IgG class to TE antigen at the serum dilution of 1:400 was 0.315 ± 0.245 in miliary tuberculosis; minimal, 0.228 ± 0.167 ; moderately advanced, 0.556 ± 0.616 ; far advanced, 1.116 ± 0.651 and 0.126 ± 0.084 in normal healthy controls.
- 2) The activity level (O.D. at 492nm) of IgA class to TE antigen at the serum dilution of 1:12.5 was 0.320 ± 0.231 in miliary tuberculosis; minimal, 0.606 ± 0.557 ; moderately advanced, 0.727 ± 0.589 ; far advanced, 1.002 ± 0.574 and 0.183 ± 0.123 in normal healthy controls.
- 3) No significant differences between tuberculous patients and normal healthy controls were observed in the activity levels of IgM and IgE classes to TE antigen at the serum dilution of 1:25.
- 4) Low degree of correlation ($r=0.475$) between IgG class and IgA class activity was observed in tuberculous patients.
- 5) For the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis, the specificity and the sensitivity in the assay of IgG class activity were 87% and 74%, respectively, whereas those in the assay of IgA class activity were 90% and 80%, respectively.

* 본 연구의 소요경비의 일부는 1982년도 서울대학교병원 특진연구비로 충당되었음.

I. 서 론

폐결핵환자에서 혈청단백성분의 변화를 전기영동법으로 측정한 결과, albumin의 감소와 globulin의 증가로 총혈청단백량은 정상진강인과 유의한 차이가 없으나 albumin과 globulin의 증감에 의한 A/G 비율은 폐결핵의 경증도의 지표가 될 수 있다고 보고되었다¹⁻⁶⁾. 특히 폐결핵환자 혈청 globulin 성분중 γ -globulin이 유의하게 증가되어 있는 것은^{2,4,5)} 항체생성에 의한 결과로 설명되고 있다. 이에 따라 면역확산법을 이용하여 폐결핵환자 혈청내 immunoglobulin (Ig) class의 농도를 측정한 결과^{2,7-9)} IgG 및 IgA가 모두 특이하게 증가되었다는 보고^{2,7,8)}도 있고, 또는 IgG 및 IgM이 특이하게 증가되었다는 보고⁹⁾도 있으나 모두 간접적으로 항결핵균항체의 immunoglobulin class의 변화를 관찰한 결과이다.

1948년 Middlebrook 및 Dubos¹⁰⁾가 혈구응집반응으로 폐결핵환자 혈청내 항결핵균항체를 검출하였다고 보고한 이래, 이 혈구응집반응은 결핵을 진단하기 위한 혈청학적 방법으로 주로 이용되어 왔다¹¹⁻¹²⁾.

그러나 연구자마다 제시한 결과가 다양한 것은 결핵균 자체가 지닌 항원성분의 복잡성^{17,18,21,22)}과 다른 균종과의 교차반응^{23,24)}에 의한 것으로 설명되고 있다. 따라서 보다 특이성이 높은 항원성분을 분리하거나^{17,18,21)}, 실험방법을 변형하여¹²⁾ 특이성 및 민감도를 높였으나 아직도 근본적인 단점을 개선하지 못한 실정이다. 즉, 항원성분에 특이하게 반응하는 Ig class가 구별되었으나^{15,16,25)}, 혈구응집반응자체로써는 Ig class를 구별하여 항체역가를 측정할 수 없기 때문에^{10,12-14)} 폐결핵환자에서 특이하게 나타나는 항체의 Ig class의 변화를 간접적으로 면역확산법이나 물리화학적 방법을 동원하여 Ig class의 농도를 측정할 수 밖에 없었다^{11,15,16)}.

그러나 최근에 개발된 효소결합면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)²⁶⁾은 이러한 문제를 쉽게 해결해 줄 수 있기 때문에 결핵의 혈청학적 진단을 위한 새로운 계기를 마련하게 되었다. 즉 ELISA는 nanogram 정도까지 측정할 수 있는 예민도와 더불어 신속성 및 재현성이 높을 뿐만 아니라 항체의 Ig class를 구별하여 측정할 수 있는 장점을 지니고 있다²⁶⁾. 이에 따라 최근에 우리나라에서도 aspergillo-sis²⁷⁾, 폐지스트마²⁸⁾, 간지스트마²⁹⁾ 및 장티푸스^{30,31)}의 혈청학적 진단에 그 가치가 인정되었으며, 결핵진단에도 김³²⁾ 및 심³³⁾이 그 유용성을 인정하였다. 1976

년에 Nassau 등³⁴⁾이 처음으로 결핵진단에 ELISA를 이용한 이래, Tandon 등³⁵⁾, Grange 등^{36,37)}, Daniel 등³⁸⁾, Zeiss 등³⁹⁾ 및 Benjamin 등⁴⁰⁾이 계속적으로 ELISA를 결핵진단에 응용함에 따라, 결핵균의 항원성분을 분석 및 분리할 수 있는 방법이 개발되어^{41,42)} 혈청학적 방법으로 결핵을 진단할 수 있는 확고한 가능성이 제시하기 시작하였다.

그러나 혈구응집반응을 비롯한 기존 혈청학적 진단법에 따라 측정된 항체역가는 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체의 전체역가에 상응하나, ELISA에서는 연구자마다 IgG, IgM 및 IgA를 선택하여 측정할 수 있다는 것이 장점도 될 수 있으나 단점도 될 수 있는 것이다. 왜냐하면 항체측정에 사용한 항원성분의 면역학적 성질^{15,16)}이나 항원에 대응하는 환자의 인종 및 성별에 따라^{2,3,7)} Ig class 반응이 다르기 때문이다. 따라서 결핵진단에 ELISA를 이용한 대부분의 연구자들^{32-36, 38-40)}은 IgG 항체만 측정하여 장티푸스^{31,32)}나 aspergillo-sis⁴³⁾에서 관찰된 바와 같이 IgM, IgA 및 IgE 항체의 생물학적 특성에 따른 진단적 의의를 찾지 못한 인상을 주고 있었다. 더구나 폐결핵환자에서 IgA 항체 및 IgM 항체의 증가는 진단적 의의를 내포함이 주장되어 왔으나^{2,7,8,9)} 최근에 ELISA를 이용하여 Grange 등³⁷⁾이 인도네시아 결핵환자에서 측정한 결과는 이와 상반되어서, 결핵진단에 있어서 Ig class별 변동의 진단적 의의에 대해선 아직도 논란의 여지가 많다.

이에 저자는 한국인 결핵환자의 혈청내 존재하는 항결핵균항체의 Ig class별 역가를 결핵균추출항원을 이용한 ELISA로 측정하여 한국인 결핵진단에 필요한 지표를 얻기 위하여 본 연구를 시도하였다.

II. 실험재료 및 방법

항원제조

Mycobacterium tuberculosis (H₃₇Rv strain)를 Sauton 배지에 대량 배양하여 phenol을 1%되게 첨가하여 균을 사멸시켰다. 이것을 phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0으로 3회 세척하고 PBS에 재부유시킨 다음 French-press로 15,000 psi에서 결핵균을 파쇄시켰다. 파쇄된 균성분을 4°C에서 10,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하였으며 이 항원성분은 수용성이었으며 "TE항원"이라 명명하고 본 실험에 사용하였다.

대상환자

1982년 11월부터 1983년 11월까지 서울대학교병원 전

염병 내과에 입원하였던 결핵환자중 객담검사상 양성인 활동성 결핵으로 판정된 106명의 환자를 대상으로 하였다. 이들 환자군은 1969년도 National Tuberculosis and Respiratory Diseases Association USA의 분류법에 따라 속립결핵(miliary tuberculosis, Mil-TBC) 5명, 경증결핵(minimal tuberculosis, Min-TBC) 10명, 중등증결핵(moderate tuberculosis, MA-TBC) 44명, 중증결핵(faradvanced tuberculosis) 47명으로 구분하여 각군을 비교하였다. 여기에 대해 정상대조군으로 결핵의 병력이 없는 건강한 서울의대 2학년 학생중 30명을 무작위하게 선택하여 결정하였다.

1) 혈청준비: 환자로 부터 채취한 혈액을 실온에서 응고시켜 4°C 냉장고에 보관 후, 실온에서 2000 r.p.m.(Beckman table-top centrifuge)로 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 이렇게 얻은 혈청을 -20°C 냉동고에 보관하였고 검사시 농도 0.1%의 bovine serum albumin(BSA)이 함유된 PBS-Tween 20용액에 희석하여 사용하였다.

2) 표준혈청의 준비: 본 실험의 실험치를 표준화하기 위하여 표준양성혈청과 표준음성혈청이 필요하였다.

IgG에 대한 표준양성혈청은 피부반응에서 40~48시간에 국소경결이 46 mm, 객담의 결핵균도발염색에 양성, 배양검사양성, 흉부 X선촬영 결과 중등증병변을 보이고 ELISA에서 높은 항체가를 보인 환자의 혈청을 사용하였다.

IgA 및 IgE에 대한 표준양성혈청은 흉부 X선 촬영 결과 중증결핵을 가진 환자중 IgG에 대한 항체가가 높은 환자의 혈청으로 정했다.

IgM에 대한 표준양성혈청은 80명의 환자혈청을 무작위로 선택하여 ELISA로 가장 항체가가 높은 환자의 혈청으로 정했다.

표준음성혈청은 피부반응에 음성이고 객담검사에 음성이며 건강하게 정상적인 생활을 영위하는 사람의 혈청으로 정하였으며 IgG에 대한 표준양성혈청과 표준음성혈청은 결핵연구원에서 분양받아 사용하였다.

효소결합면역분석법(ELISA)

제³¹⁾ 및 십³²⁾의 방법에 따라 시행하였다. 특히 십³²⁾ 등이 예비실험에서 결정한 TE항원의 최적부착농도를 그대로 본 실험에 적용하였다.

TE항원을 carbonate buffer(pH9.6)에 10 µg/ml로 희석하여, polystyrene 96-well EIA plate(Costar: Serocluster 96 well EIA plate, flat bottom, lot # 2171)에 각 well 당 100 µl씩 분주하고 4°C에 18시간

방치시켜 항원을 부착시켰다. 부착시킨 후 증류수로 2회 세척하고 bovine serum albumin(BSA)을 3%로 첨가한 PBS-Tween 20용액인 3% BSA-PBS-Tween 20을 각 well 당 150 µl씩 넣고 37°C에 2시간 방치하여 항원이 부착되지 않은 표면을 BSA로 차단시켰다. 차단시킨후 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척한 후에 즉시 또는 보관하였다가 실험에 사용하였다.

이렇게 항원을 부착시키는 과정이 끝난 ELISA plate에 희석된 혈청을 각 well에 100 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 항원-항체반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 후 PBS-Tween 20으로 세척한 후 희석된 peroxidase conjugated anti-human Ig을 100 µl씩 첨가하였다. 여기에서 예비실험을 통해서 각 Ig class에 대한 peroxidase conjugated anti-human Ig의 최적희석농도를 checkboard titration²⁶⁾에 의하여 결정하였다. 즉 peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG(Cappel Laboratories, lot # 14468)은 1:2000이었고, peroxidase conjugated goat anti-human IgA(Cappel Laboratories, lot # 14571), peroxidase conjugated goat anti-human IgM(Cappel Laboratories, lot # 18283), 및 peroxidase conjugated rabbit anti-human IgE(Cappel Laboratories, lot # 14788)의 경우는 모두 1:4000이었다. 이렇게 희석된 peroxidase conjugated anti-human Ig과 항원-항체반응을 상온에서 1시간 진행시킨후 PBS-Tween 20으로 5회 세척하고 기질용액을 첨가하였다. 이때 사용한 기질용액은 10 ml의 phosphate citrate buffer(pH 5.0)에 4 mg의 ortho-phenylenediamine과 20 µl의 30% H₂O₂를 섞은 용액이다. 이 기질용액을 well 당 100 µl씩 넣고 상온에서 25분 동안 반응시키고 2 N H₂SO₄용액을 50 µl씩 넣어 효소-기질반응을 정지시켰다. Multiscan(Titertek Model, Flow Laboratories)으로 각 well의 발색정도를 492 nm에서 흡광도(optical density O.D.)로 측정하였다. 각 실험치는 2개 well의 흡광도의 산술평균치며, ELISA를 실시하는 일별, plate 별 변이를 상쇄하기 위하여 아래식에 따라 수정하였다.

검체의 수정흡광도=검체의 흡광도

$$\times \frac{1}{\text{표준양성 혈청의 흡광도}}$$

III. 실험 성적

TE 항원에 대한 IgG 항체

TE항원에 대한 표준혈청의 역가를 검색하여 각 희

Fig. 1. Titration curve for IgG antibody activities to TE antigen in the reference sera.
— reference positive sera
..... reference negative sera

석배수에서 대한 O.D.를 Fig. 1에 표시하였다.

즉 표준양성혈청의 O.D.가 최대흡광도인 2.0이상이면서 표준음성혈청의 O.D.와 최대의 차이를 나타내는 혈청의 최대희석비는 1:200~1:400이었다. 따라서 IgG 항체를 측정하기 위해서 실험에 사용된 혈청은 모두 1:400으로 희석하여 TE 항원과 반응시켰다.

Fig. 2에서 보는 바와같이 결핵환자와 정상대조군의 혈청내 TE 항원에 대한 IgG 역가를 O.D.로 표시하였다. 즉 속립결핵환자에서 0.315 ± 0.245 , 경증결핵환자에서 0.228 ± 0.617 , 중등증결핵환자에서 0.556 ± 0.616 , 중증결핵환자에서 1.116 ± 0.651 에 달하고 임상소견 및 병변 증폭한 정도에 따라 IgG 항체는 유의하게 증가되는 경향이 있었다. 정상대조군에서 0.126 ± 0.084 이므로 결핵환자에서 유의하게 IgG 항체의 증가를 보였다.

TE 항원에 대한 IgA 항체

결핵환자의 혈청내 TE 항원에 대한 IgA 항체를 측정하기 위한 최적혈청희석비를 결정하기 위하여, Fig. 3에서 보는 바와같이 표준양성혈청과 표준음성혈청을 계단희석하여 항원-항체 반응후의 O.D.를 표시하였다. 표준양성혈청과 표준음성혈청간에 최대 O.D.치가 차이가 나는 희석비수는 1:12.5이었다. 따라서 IgA를 측정하기 위해 실험에 사용된 항체는 모두 1:12.5로 희석하여 TE 항원과 반응시켰다.

Fig. 4에서 보는 바와같이 결핵환자와 정상대조군의 혈청내 TE 항원에 대한 IgA의 역가를 O.D.로 표시하였다.

Fig. 2. Demonstration of IgG antibody activities to TE antigen in sera from patients with different clinical stages of tuberculosis.

MIL: Miliary tuberculosis
MIM: Minimal tuberculosis
MA: Moderately advanced tuberculosis
FM: Far advanced tuberculosis
N: Normal healthy control

즉 속립결핵환자에서 0.320 ± 0.231 , 경증결핵환자에서 0.606 ± 0.557 , 중등증결핵환자에서 0.727 ± 0.589 , 중증결핵환자에서 1.002 ± 0.574 이어서 결핵의 임상소견 및 병변이 증폭한 정도에 따라 IgA 항체는 유의하게 증가되는 경향이 있었다. 정상대조군에서 0.183 ± 0.123 이므로 결핵환자에서 보다 IgA의 역가가 낮았다.

TE 항원에 대한 IgM 항체

결핵환자의 혈청내 TE 항원에 대한 IgM 항체를 측정하기 위한 혈청의 최적희석비를 결정해야 하므로 Fig. 5에 표시된 바와 같이 표준혈청을 계단희석한 후 TE 항원과 반응시켰다. 이때에 나타난 O.D.는 표준양

Table 1. The Mean Activities in O.D. Value of IgG, IgA, IgM and IgE Antibody to TE Antigen in Sera from Patients with Different Clinical Stages of Tuberculosis and Normal Sera in ELISA

Clinical stage	No. of patient	IgG	IgA	IgM	IgE
MIL	5	0.315 ± 0.245	0.320 ± 0.231	0.567 ± 0.354	0
MIN	10	0.228 ± 0.167	0.606 ± 0.557	0.337 ± 0.162	0.012 ± 0.014
MA	44	0.556 ± 0.616	0.727 ± 0.589	0.382 ± 0.255	0.002 ± 0.005
FM	47	1.116 ± 0.651	1.002 ± 0.574	0.515 ± 0.439	0.004 ± 0.010
N	30	0.126 ± 0.084	0.183 ± 0.123	0.453 ± 0.214	0.011 ± 0.009

Reciprocal dilution of reference sera

Fig. 3. Titration curve for IgA antibody activities to TE antigen in the reference sera.

— reference positive sera
..... reference negative sera

성혈청과 표준음성혈청간에 별로 차이가 없었고, 대개 혈청의 희석비가 1 : 25에서 최대 O.D.의 차이를 보였다. 따라서 IgM 항체를 측정하기 위해서 모든 혈청은 1 : 25로 희석하여 TE 항원과 반응시켰다.

결핵환자와 정상대조군의 혈청내 TE 항원에 대한 IgA의 역가를 O.D.로 표시한 것이 Fig. 6에 나타나 있다. 즉 속립결핵환자에서 0.567 ± 0.354 , 경중결핵환자에서 0.337 ± 0.162 , 중등중결핵환자에서 0.382 ± 0.255 , 중중결핵환자에서 0.515 ± 0.439 로 결핵환자의 임상조건 및 병변과 전혀 관계없으며 더구나 정상대조군에서 0.453 ± 0.214 로 결핵환자의 IgM 항체 역가와 전혀 차이가 없었다.

TE 항원에 대한 IgE 항체

TE 항원에 대한 IgE 항체의 역가는 표준혈청에서 양성혈청과 음성혈청간에 전혀 차이가 없어서 모든 혈청

Fig. 4. Demonstration of IgA antibody activities to TE antigen in sera from patients with different clinical stages of tuberculosis.

MIL: Miliary tuberculosis
MIN: Minimal tuberculosis
MA: Moderately advanced tuberculosis
FA: Far advanced tuberculosis
N: Normal healthy control

을 1 : 25로 그대로 희석하여 TE 항원과 반응시켰다. Table 1에 나타나 있는 바와같이 결핵환자와 정상대조군에서도 모두 IgE 항체가 극소량 검출되었으나 결핵

Table 2. O.D. Value to Grade Activity Levels of IgG and IgA Antibody to TE Antigen in Sera from Patients with tuberculosis in ELISA

	—	±	+	++	+++
IgG	≤0.035*	≤0.210	≤0.810	≤1.410	>1.410
IgA	≤0.220*	≤0.310	≤0.910	≤1.510	>1.510

*O.D. value from reference negative sera

Reciprocal dilution of reference sera

Fig. 5. Titration curve for IgM antibody activities to TE antigen in the reference sera.

— reference positive sera
..... reference negative sera

환자와 대조군간에 전혀 역가의 차이가 없었다.

TE 항원에 대한 IgG 항체와 IgA 항체의 관계

폐결핵환자에서 임상소견 및 병변의 중독도에 평행하게 IgG 항체와 IgA 항체가 증가되어 있기 때문에 이들 항체가 서로 어떤 관계가 있는가를 살펴보았다. 각 환자의 혈청내 IgG 항체와 IgA 항체의 O.D.치를 Fig. 7에 표시하였던 바 IgG 항체와 IgA 항체간의 상관계수는 $r=0.475$ 로 상관관계는 낮았다.

그러나 TE에 대한 IgG 항체와 IgA 항체가 서로 상관도는 낮으나 상호보완적인 관계를 맺고 있는 경향을 나타냈기 때문에 Table 2에 표시한 바와같이 ELISA의 O.D.치에 따라 (-), (±), (+), (++) , (+++)로 등급을 정해서 Fig. 8에 표시하여 IgG 항체와 IgA 항체의 관계를 다른 각도로 분석하였다.

즉 IgG 인 경우에 표준음성혈청을 1:400으로 희석하였을 때 나타낸 O.D.치인 0.035 보다 낮은 경우를 (-)로, IgA에 대해선 표준음성혈청을 1:12.5로 희석하여 측정된 O.D.치인 0.220 이하인 경우를 (-)로

Fig. 6. Demonstration of IgM antibody Activities to TE antigen in Sera from Patients with different clinical stages of tuberculosis.

MIL: Miliary tuberculosis
MIN: Minimal tuberculosis
MA: Moderately advanced tuberculosis
FA: Far advanced tuberculosis
N: Normal healthy control

결정하였다. (±)은 IgG 및 IgA에 대한 정상대조군의 평균 O.D.치에 표준편차를 더한 O.D.치 이하인 경우로 정했다. 이 이상의 O.D.치인 경우를 모두 양성으로 정하고 Table 3에서와 같이 (+), (++) , (+++)로 O.D.치에

Table 3. Comparison in the Specificity and Sensitivity between IgG and IgA Antibody in the Diagnosis of Tuberculosis using IgG and IgA Activity to TE Antigen in Sera from Patients with Tuberculosis

	IgG		IgA	
	patient	normal	patient	normal
Positive	79	4	85	3
Negative	27	26	21	27
Specificity	87%		90%	
Sensitivity	74%		80%

Fig. 7. Correlation between IgG activities and IgA activities in ELISA against TE antigen in sera from patients with tuberculosis. closed circle: tuberculous patients open circle: normal healthy control

따라 3등급으로 표시하였다.

이렇게 구분한 O.D.치에 따라 해당되는 O.D.치를 나타내는 IgG 항체와 IgA 항체를 가진 환자를 구분하여 Fig. 8에 표시하였다. 즉 양성과 음성이 확실하게 구별되었고, 따라서 정상대조군과 환자가 항체역가에 따라 확실하게 구별되었다. 106명의 환자중에 IgG 항체가 (+)인 경우가 79명이었고 IgA에 대해선 85명이였다. IgG에 (±)이하에 해당되는 환자중에 IgA에서는 (+)로 나타난 경우가 15명이였다. 또한 IgA에서 (±)이하에 해당되는 환자중에 IgG에 (+)로 나타난 경우도 9명이였다.

30명의 정상대조군에서도 IgG에 (±)로 나타낸 사

Fig. 8. Comparison in the activity level in ELISA between IgG antibody and IgA antibody to TE antigen in sera from patients with tuberculosis and from normal healthy controls. closed circle: tuberculous patient open circle: normal healthy controls

람중에 17명이 IgA에 (-)로 나타났고, IgA에서 (±)로 나타낸 사람중 2명이 IgG에 (-)로 나타났다. 이와같은 결과는 IgG 항체와 IgA 항체는 서로 상관관계는 낮으나 폐결핵진단에 상호보완적인 관계를 보였다.

이에 따라 Table 2에 표시된 (-)와 (±)등급을 모두 음성으로 간주하고, 그이상을 양성으로 IgG 항체와 IgA 항체의 역가를 구분하였을 때 결핵진단에 대한 특이성(specificity)과 민감도(sensitivity)를 Table 3에 표시하였다. 즉 IgG 항체로 나타낸 결핵진단에 대한 특이성은 87%이었고 민감도는 74%이였다. 반면에 IgA 항체로 나타낸 결핵진단에 대한 특이성은 90%이었고 민감도는 80%이였다. 따라서는 본 실험의 결과에서는 결핵진단에 IgA 항체가 IgG 보다 특이성 및 민감도가 높았다.

VI. 고 찰

결핵의 혈청학적 진단의 조건으로는 1) 단순한 감염에 의한 항체보다는 활동성 결핵에 의한 항체의 생산을 검출할 수 있어야 하며, 2) BCG 접종에 의한 항체 생산과 감별할 수 있어야 하고, 3) 비전형성 항상균에 의한 항체와 감별할 수 있어야 하는데⁴⁴⁾, 결핵의 진단은 사용 항원의 종류와 항체측정법의 민감도에 따라 그 진단적 가치가 결정될 것이므로 그리 쉬운 일은 아니다. 그러나 이런 어려움에도 불구하고 혈청학적 진단

방법은 1) 집단검진에 사용하여 신원검색에 사용될 수 있고, 2) 질병의 경과를 관찰할 수 있게 되며, 3) X선검사가 크게 도움이 되지 않는 폐외결핵(extrapulmonary tuberculosis)의 진단에 도움이 되며, 4) 비전형성 항산균에 의한 감염과 구별할 수 있게 되므로 신뢰할 수 있는 측정법의 개발에 대한 연구의 필요성이 강조되어 왔다⁴⁴⁾.

이에 따라 결핵진단에 혈구응집반응^{10~21)}이 주된 측정법으로 최근까지 이용되어 왔으나, 면역학의 발달로 결핵에 대한 개념도 차츰 바뀌고⁴⁵⁾, 측정법도 새로이 개발되어 방사면역측정법⁴⁶⁾, 효소결합면역분석법^{26,34)}, 및 형광항체시험^{47,48,49)}등의 방법이 적용되었다. 이와같이 민감도와 재현성이 높은 항체측정법이 응용됨에 따라 항원성분에 대한 분석법이 발달되었고^{41,42)}, 따라서 결핵균의 특이항원을 분리 측정할 수 있는 방법이 개발됨에 따라 혈청학적인 진단법의 효용성이 검토되고 있다. 특히 방사면역측정법과 효소결합면역분석법이 주로 애용되고 있는데, 방사면역측정법은 동위원소를 사용함에 따르는 문제점이 있는데 반하여 효소결합면역측정법은 동위원소의 위험성이 없다는 장점으로 최근에 와서는 이 ELISA를 사용한 연구가 많이 진행되고 있다²⁶⁾.

여기에서 ELISA²⁶⁾은 소량의 검체에 존재하는 미량의 항체 또는 항원을 검출할 수 있는 장점을 갖고 더구나 Ig class를 구별할 수 있기 때문에 감염성 질환의 진단에 많이 이용되고 있다. Nassau 등³⁴⁾이 처음으로 결핵진단에 ELISA를 이용한 이래 많은 학자들^{32, 33, 35~40)}에 의하여 그 유용성이 검토되었는데 학자마다 사용한 항원성분이 다르기 때문에 제시한 결과가 다양하며, 특이성이 문제가 되고 있는데 이것은 결핵균 자체가 지닌 항원성분이 복잡하고^{17,18,21,22)}, 다른 균종과의 교차반응^{23,24)}이 있기 때문인 것으로 해석되고 있다.

이에 부응하여 결핵균에 특이한 항원성분을 순수분리하고 검정하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다^{17, 18, 21, 41, 42, 50, 51)}. 즉 결핵균 항원은 다당류성분, 단백질성분 및 인지질성분으로 대별되며^{42,51~53)} 이중에 다당류항원은 비특이적 반응을 보이고 anaphylaxis 반응을 유발하므로 실제 진단적 가치가 없는 것으로 생각되고 있다⁵²⁾. 인지질항원은 크게 glycerol 군과 inositol 군으로 나누어지며 결핵진단에 도움이 되는 것으로 보고되고 있다^{53~55)}. 단백질항원의 연구는 1932년 Seibert가 "OT"에서 purified tuberculo-protein을 추출하여 purified protein derivatives(PPD)로 명명함으로써 시작되어 현재까지 결핵진단의 표준항원으로 사용되어 왔

으나, PPD가 순수항원성분이 아니라는 것과 생산과정에서 열처리로 항원의 반응력이 많이 손상받는다라는 문제점이 제기되고 있다⁴²⁾. 이에 따라 Harboe 등⁵¹⁾은 *Mycobacterium bovis*, BCG strain(BCG)의 초음파추출물(ultrasonic extract)을 교차면역영동법(crossed immunoelectrophoresis)으로 분석하여 30가지의 항원을 분리하여, BCG를 열처리후 잔존항원, PPD 및 OT 항원과 비교함으로써 열처리과정에서 항원성분이 많이 손상받음을 보고하였다. 여기에 더 발전하여 Daniel 등^{42,50)}은 결핵균을 면역전기영동법으로 30가지의 항원을 순수분리하여 United States-Japanese reference nomenclature를 제정하고, 각 항원의 특이성을 검토한 결과 "antigen 5"가 인형결핵균과 우형결핵균에만 존재하는 항원임을 밝히고 결핵의 혈청학적 진단에 이 항원을 사용할 것을 주장하였다^{40,50)}. 본 연구에 사용된 TE 항원도 열처리과정을 거치지 않고 French press를 사용하여 인형결핵균에서 추출한 단백질항원으로 김 등³²⁾이 BCG에서 똑같은 방법으로 제조한 BE 항원의 우수성을 검토하여 제조과정의 공정성을 실증하였다. 이에 반하여 Grange 등³⁶⁾은 ELISA를 이용하여 PPD 항원과 타 항원과의 진단적 효과를 비교 검토한 바 오히려 PPD 항원의 우수한 특이성을 입증하여 열처리과정을 거치더라도 결핵균항원의 특이성이 그대로 유지됨을 주장하였고, 심등³³⁾의 보고에서 TE 항원과 PPD 항원간의 반응력과 특이성이 유사함을 입증하여 특이항원을 순수하게 분리해야 하는 필요성에 의문을 제기하였다.

결핵균항원에 대한 면역반응으로 IgG, IgM, IgA 및 IgE 항체가 모두 생산될 것이나, IgM은 초기에 생성되고^{57~59)} 비특이적 반응을 나타내어 항체측정에 간섭을 초래할 수 있으므로 진단적 가치를 의심하여^{11,20)} 주로 IgG 항체를 측정하는 경향을 보이고 있다^{20,32~36, 38~40)}.

그러나 결핵환자에서 혈청내 IgA가 상승되어 있다는 보고^{2,7~9)}에 따라 본 연구에서 측정한 TE 항원에 대한 IgA 항체는 IgG 항체보다 민감도 및 특이성이 높아서 Grange 등³⁷⁾의 보고와 달리 진단적 의의를 지니고 있었다. 이와같은 결과는 박등⁸⁾이 한국인의 결핵환자의 면역글로부린을 측정하여 IgA의 진단적 의의를 제시한 것과 일치하였다. 그러나 Alarcón-Segovia 등⁹⁾이 멕시코인 결핵환자에서 혈청내 IgG 및 IgM이 상승되었다고 주장하는 결과와는 상치되었다.

따라서 Ig class 별 항결핵균항체를 측정한 Grange 등³⁷⁾은 본 연구에서의와 같이 IgM은 전혀 변화가 없었

으나 IgA 항체와 IgG 항체가 상승되어 있는데, 이런 변화는 인도네시아의 정상대조군에 비해서 IgA 항체가 증가한 것이지 영국인 정상대조군과는 유의한 증가를 보이지 않아서 Faulkner 등²⁾이 주장한 인종간의 면역 반응의 차이로 생긴 결과로 해석되었기 때문에 본 연구에서 나타난 IgA 항체의 진단적 의의를 계속 추시해야 할 것이다. 또 한편으로 폐결핵은 결핵균이 호흡기를 통해서 침입증식하여 발생한 질환이므로 IgA 항체의 생산을 자극하여 나타낸 IgA 항체의 증가로도 해석할 수 있어서 폐외결핵환자에 대해서도 Ig class의 변동을 비교, 검토해야만 보다 특이성 있는 진단적 의의를 부여할 수 있을 것 같다.

본 연구에서 흉부 X선검사 결과와 항체역가(IgG 및 IgA)의 관계를 보면 경증결핵환자에서 낮은 역가를 보이고 중증결핵환자에서 높은 역가를 보여 비례관계를 나타내어서 이는 병변의 경중에 따라 항원의 농도가 증가하는 경향을 보인 것으로 해석되었다. 그러나 환자 각 개인을 비교할 때 항체역가의 증폭이 많으므로 각 개인의 경증도를 판정하는 데는 정확한 방법이라 할 수 없지만 이는 혈청내 항체의 생성은 혈청내 존재하는 항원량에 따라 좌우되며 혈중 항원량은 결핵의 경증과는 직접적인 관련이 없다는 것이 알려져 있어¹⁴⁾ 본 연구 결과와 일치하였다. 또한 결핵의 경증도는 흉부 X선검사로 판정하는 것이 정확하므로 이 문제는 큰 의의가 없는 것으로 생각되었다. 속립결핵환자에서 항체역가가 중증증환자나 중증환자보다 낮은 것은 숙주의 면역 반응의 저하에 기인된 것으로 사료되었다.

환자중 혈청내 항체역가가 낮은 군에서 정상대조군의 역가와 증폭되는 결과를 보이는데 이는 결핵환자의 상당수에서 항체를 생산하지 않는다는 보고⁶⁰⁾와 같은 결과로 해석되었다. 또한 본 연구에서 정상대조군의 항체의 역가가 높아서 환자군과 증폭되는 결과를 보였는데 이는 김등³²⁾이 사용한 피부반응검사의 음성인 정상군과는 달리 과거 BCG 접종한 경력이 있어서 이미 항체의 생산이 시작되었고, 또는 성년이 될 때까지 본인이 인식하지 못하게 결핵균에 노출되므로써 체내에 항체가 생성되었을 것으로 보여, 이는 결핵이환율이 높은 우리나라의 특수한 실정에 수반하여 나타날 수 있는 결과로, 중증환자의 역가와와는 증폭되지 않는 것으로 보아 마땅이 생길 수 있는 결과로 해석되었다. 외국의 보고에서는 결핵의 피부반응검사가 음성인 건강인을 정상대조군으로 사용하였으나³⁴⁻⁴⁰⁾ 결핵유병율이 2.5%인 우리나라의 실정으로는 결핵의 피부반응검사에 음성인 건강인이 적을 것이므로 본 연구에서와 같

이 과거에 결핵의 병력이 없고 흉부 X선검사에 병변이 없는 정상인을 대조군으로 취급하는 것이 더 현실적인 것으로 사료된다. 또한 Takahashi⁵⁶⁾가 흉부 X선상 결핵병변이 없으나 혈청내 항체역가가 높은 사람에서 결핵이 발생한 예를 보고하였듯이, 본 연구에서 정상대조군중 역가가 높은 사람에 대한 추적검사를 실시하여 계속 관찰하는 것도 의의가 있다 하겠다.

본 연구의 결과로 볼 때 우리나라에서 결핵의 혈청학적 진단법이 환자 개개인의 질병여부를 판정하는 것보다도 환자의 질병경과를 추적하여 항체역가를 측정하면서 치료에 따른 반응여부와 재발여부의 결정에 더 큰 의의가 있을 것으로 사료되며 외국의 보고^{60, 61)}에서도 이런 점을 시사하고 있다.

향후 이 방면의 연구과제로써는 통상적인 방법으로 진단하기 힘든 폐외결핵환자의 진단 및 경과관찰에 ELISA를 이용한 연구가 필요하며, 단일 항원에 대한 검사보다는 성상이 서로 다른 여러 항원에 대한 혈청검사를 실시하여 그 결과를 종합해서 단일 항원에 대한 결과를 비교해 볼 필요가 있을 것으로 사료되며, 결핵이환에 직접적으로 관련되는 항원의 분리, 더 나아가서 단세포군항체(monoclonal antibody)를 이용한 항원분석과 항원측정을 시도해 보는 것도 큰 의의가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

결핵균을 French press로 폐쇄 추출한 항원인 TE를 이용하여 폐결핵환자 혈청내 항결핵균항체의 Ig class의 역가를 효소결합면역분석법으로 측정하였던바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 혈청을 1:400으로 희석하여 TE 항원에 대하여 측정된 IgG 항체는 O.D.치(492 nm)로 속립결핵환자에서 0.315 ± 0.245 , 경증결핵에서 0.228 ± 0.167 , 중등증결핵에서 0.556 ± 0.616 , 중등증결핵에서 1.116 ± 0.651 이었고 정상대조군에서 0.126 ± 0.084 이었다.

2) 혈청을 1:12.5로 희석하여 TE 항원에 대하여 측정된 IgA 항체는 O.D.치로 속립결핵환자에서 0.320 ± 0.231 , 경증결핵에서 0.606 ± 0.557 , 중등증결핵에서 0.727 ± 0.589 , 중등증결핵에서 1.002 ± 0.574 이었고, 정상대조군에서 0.183 ± 0.123 이었다.

3) 혈청을 1:25로 희석하여 TE 항원에 대하여 측정된 IgM 항체와 IgE 항체의 역가는 폐결핵환자와 정상대조군사이에 차이가 없다.

4) 폐결핵환자에서 측정된 IgG 항체치와 IgA 항체치간의 상관관계는 낮으나($r=0.475$), 상호보완적 관계

를 맺고 있었다.

5) 폐결핵진단에 대한 항체의 특이성 및 민감도에서 IgG 항체는 각각 87% 및 74%이었고, IgA 항체는 각각 90% 및 80%이었다.

REFERENCES

- 1) 宋宣普, 崔龍天: 肺結核患者에 있어서 血清 γ -globulin의 測定成績. 결핵 및 호흡기질환, 10:35, 1961.
- 2) Eaulkner JB, Carpenter RL and Patnode RA: Serum Protein and Immunoglobulin levels in tuberculosis, Am. Clin. Path. 48:556, 1967.
- 3) 崔始東, 金義潤: 肺結核患者의 血清蛋白에 關한 觀察. 결핵 및 호흡기질환, 16:26, 1969.
- 4) 이원영: 폐결핵환자 혈청의 여지전기영동상에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환, 20:5, 1973.
- 5) 이원영, 김기호: 비활동성폐결핵환자 혈청 여지전기 영동상에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환, 23:1, 1976.
- 6) 오중근: 흉부질환환자 혈청의 단백질 전기영동상에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환, 26:9, 1979.
- 7) Bhatnagar R, Malaviya AN, Narayanan S, Rajgopalan, P, Kumar R, and Bharadwaj OP: Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. 115:207, 1977.
- 8) 박태수, 최응규, 변래원: 결핵환자의 면역글로불린량에 대한 연구. 결핵 및 호흡기질환, 24:92, 1977.
- 9) Alarcon-Segovia D and Eishbein E: Serum immunoglobulins in pulmonary tuberculosis, Chest 60:133, 1971.
- 10) Middlebrook G and Dubos RJ: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli, J. Exp. Med. 48:521, 1948.
- 11) Freedman SO, Dolovich J, Turcotte R and Sault F: Circulating IgG(7S) hemagglutinin in pulmonary tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. 94:896, 1960.
- 12) Turcotte R, Freedman SO, and Sehon AH: A new hemagglutination procedures for the diagnosis of active tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. 88:725, 1963.
- 13) Freedman SO, Turcotte R, and Sehon AH: a serological test for active tuberculosis, Clin. Res. 12:243, 1964.
- 14) Favez G, Jequier S and Vulliémot P: Demonstration and discrimination of distinct circulating antibodies during active tuberculosis in man, Am. Rev. Resp. Dis. 94:905, 1966.
- 15) Daniel TM and Baum GL: The immunoglobulin response to tuberculosis, I. Molecular characterization of hemagglutinating antibody to tuberculopolysaccharide in sera from patients with tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. 98:677, 1968.
- 16) Daniel TM and Baum GL: The immunoglobulin response to tuberculosis, II, Molecular characterization of hemagglutinating antibody to tuberculo protein in Serum from patients with tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. 99:249, 1969.
- 17) Reggiardo Z and Middlebrook G: Serologically active glycolipid family from *Mycobacterium Bovis* BCG, I. Extraction, Purification and immunologic studies, Am. J. Epidemiol. 100:469, 1975.
- 18) Reggiardo Z and Middlebrook G: Serologically active glycolipid families from *Mycobacterium bovis* BCG, II. Serological studies on human sera, Am. J. Epidemiol. 100:477, 1975.
- 19) Mitchison DA, Aber VR, Ahmad FJ, Allen BW and Devi S: Evaluation of a serological test for tuberculosis, Brit. M.J. i 1383, 1977.
- 20) Bradley GW, Nicholls AC, and Banfield L: Serological diagnosis of tuberculosis, evaluation of two years' experience, Scand. J. Resp. Dis. 60:176, 1979.
- 21) Reggiardo Z, Aber VR, Mitchison DA, and Devi S: Hemagglutination tests for tuberculosis with mycobacterial glycolipid antigens, Am. Rev. Resp. Dis. 124:21, 1981.
- 22) Daniel TM: Tuberculin antigens: the need for purification, Am. Rev. Resp. Dis. 113:717, 1976.
- 23) Minden P, McClatchy JK, Cooper R, Bardana EJ, Farr RS: Shared antigens between *Mycobacterium bovis*(BCG) and other bacterial

- species, Science. 176:57, 1972.
- 24) Minden P, McClatchy JK and Farr RS: Shared antigens between heterologous bacterial species, Inf. & Immun. 6:574, 1972.
 - 25) Uhr JW: The heterogeneity of the immune response, Science. 145:457, 1964.
 - 26) Voller A, Bidwell D and Bartlett A: Enzyme linked immunosorbent assay in Rose NR and Freedman, H (ed. ted), Manual of Clinical Immunology, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980, p. 359.
 - 27) Kim SJ: Demonstration of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* in aspergillosis by enzyme-linked immunoassay, Tuberculosis & Resp. Dis. 27:27, 1980.
 - 28) Cho SY, Hong ST, Rho YS, Choi S, and Han YC: Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis, Korean. J. Parasit. 19:151, 1981.
 - 29) Lee IK, Min DY, IM KI, Lee KT, and Soh CT: Study of enzyme-linked immunosorbent assay of *Clonorchis siensis* infection, Yonsei J. Med. Sci. 14:133, 1981.
 - 30) 李夏白, 朴鍾茂, 任敬一: 장티푸스診斷을 위한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 의 効用性에 關한 研究. 漢陽醫大學術誌, 3:88, 1983.
 - 31) 계기식, 김예흠, 최강원, 황응수, 국윤호, 이승훈
차창용: 장티푸스의 혈청학적 진단에 효소결합면역측정법의 적용실험. 大韓微生物學會誌, 18:73, 1983.
 - 32) 金尙材, 裴吉漢, 金成鎮: 酵素結合免疫分析法을 이용한 結核患者 血清內 抗結核菌抗體의 檢出, 結핵 및 호흡기질환 28:171, 1981.
 - 33) 심영수, 김종숙: 효소결합면역분석법을 이용한 결핵진단의 유용성에 관한 연구(in press).
 - 34) Nassau E, Parson ER, Johnson GD: The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Tubercle 57:67, 1976.
 - 35) Tandon A, Saxena RP and Saxend KC: Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen, Tubercle 61:87, 1980.
 - 36) Grange JM, Gibson J, and Batty A: The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis, Tubercle 61:153, 1980.
 - 37) Grange JM, Gibson J, and Nassau E: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A study of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease, Tubercle 61:145, 1980.
 - 38) Daniel TM, Oxtoby MJ, Enrique Pinto M and Edgar Moreno S: The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis, Am. Re. Resp. Dis. 123:556, 1981.
 - 39) Zeiss CR, Radin RC, Williams JE, and Levitz D: Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, J. Clin. Microb. 15:93, 1982.
 - 40) Benjamin RG and Daniel TM: Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, Am. Rev. Resp. Dis. 126:1013, 1982.
 - 41) Daniel TM and Anderson PA: The use of immunosorbent for the purification of mycobacterial antigen, J. Lab. Clin. Med. 90:354, 1977.
 - 42) Daniel TM and Janicki BW: Mycobacterial antigens: A Review of their isolation, chemistry and immunological properties, Microbiol. Rev. 42:84, 1978.
 - 43) Patterson R, Wang JLF, Roberts M and Zeiss R: Comparison of radioimmunoassay techniques in the detection of IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* antigen, J. Immunol. 120:66, 1978.
 - 44) Dienn BB: Problems in the serodiagnosis of tuberculosis, Ann. Intern. Med. 75:132, 1971.
 - 45) Lenzin L, and Rottoli P: The spectrum of human tuberculosis, Clin. Exp. Immunol. 27:230, 1977.
 - 46) Winters WD, and Cox RA: Serodiagnosis of

- tuberculosis by radioimmunoassay, Am. Rev. Resp. Dis. **124**:582, 1982.
- 47) Toussaint AJ, Fifer MS, Parlett RC, Affronti LF, Wright GL, Reich M, and Morse WC: a Soluble antigen fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection, Am. J. Clin. Path **52**:708, 1969.
 - 48) Affronti LF, Fife EH, and Grow L: Serodiagnostic test for tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. **107**:822, 1973.
 - 49) Majfouz O, Mahfouz C, Faser CEO, and Macdonald AB: An immunofluorescent test for detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, tubercle **61**:1, 1980.
 - 50) Janicki BW, Charparas SP, Daniel TM, Kubica GP, Wright GL and Yee GS: A reference for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, Am. Rev. Resp. Dis. **104**:602, 1971.
 - 51) Harboe M: Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis, Am. Rev. Resp. Dis. **124**:80, 1981.
 - 52) Yamamura Y, Anoue K, and Azumo I: Chemical and immunological studies on peptides and polysaccharides from tubercle bacilli, Ann. N. Y. Acad. Sci. **154**:88, 1968.
 - 53) Pangkorn MC: Structure of mycobacterial phosphatides, Ann. N.Y. Acad. Sci. **154**:133, 1968.
 - 54) Takahashi Y, and One K: Hemagglutination reaction by the phosphatide of the tubercle bacilli, Science **127**:1053, 1958.
 - 55) Takahashi Y.: Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatides and its clinical evaluation is a serodiagnostic test for tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis. **85**:708, 1962.
 - 56) Daniel TM and Anderson PA: The isolation by immunosorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5¹⁻⁴, Am. Rev. Resp. Dis. **117**:533, 1978.
 - 57) Daniel TM: Observations on the antibody response to single injections of PPD and Old tuberculin, Am. Rev. Resp. Dis. **90**:289, 1964.
 - 58) Daniel TM: Observations on the antibody response of rabbits to mycobacterial antigens, J. Immunol. **95**:100, 1965.
 - 59) O'connor JE and Snyder IS: Kinetics and immunoglobulin nature of antibody response to *Mycobacterium tuberculosis*, J. Bact. **94**:815, 1967.
 - 60) Kaplan MH and Chase MW: Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy, J. Inf. Dis. **142**:6, 1980.
 - 61) Favez G: Distinct circulating antibodies demonstrated in tuberculous patients, correlation between changes in the antibody content of the serum and clinical evolution, Ann. N.Y. Acad. Sci. **154**:128, 1968.