

Human Immunodeficiency Virus(HIV) 抗體 檢査에서 ELISA 방법에 의한 非特異反應에 관한 研究

微生物部 病毒科

崔秉玄 · 朴贊九 · 具本寬 · 李東植 · 林鳳澤

Non-specific Reaction of Serological Tests for the Detection of Antibody to Human Immunodeficiency Virus by ELISA Method

Division of Virology

Byung Hyun Choi, Chan Koo Park, Bon Kwan Koo
Dong Sik Lee and Bong Tack Lim

= Abstract =

This survey was performed to acquire basic data for prevention and control of AIDS.

The sera of 268,444 collected from the 22 Health center in Seoul were tested to determine HIV Antibody titer by using ELISA method.

The results were as follows,

1. Specificity of ELISA method for the detection of antibody to HIV showed different according to using commercial and self-made reagent and condition of sera.
2. Different degrees of specificities were shown when Western blot was performed on 122 sera positive by ELISA test repeatedly; 59 sera (48.4%) of these partially positive sera by ELISA showed no band and 53 sera (43.4%) did not showed any glycoprotein bands of gp41, gp120 or gp160, whereas 10 sera (8.2%) showed glycoprotein band by Western blot method.

서 론

후천성 면역 결핍증(AIDS)은 1981년 5월 미국에서 처음 보고된 질환으로¹⁾ 뚜렷한 원인없이 면역결핍증이 심하게 나타나 중증의 기회감염이나 Kaposi 육종 등의 악성종양을 동반한 증후군으로 발견초기의 임상적 정의를 하였다²⁾. AIDS는 인형 면역 결핍 바이러스(HIV; Human Immunodeficiency Virus)의 감염을 통해 이

루어지며³⁾ HIV는 RNA 유전자를 함유하고 있고 특수 효소인 역전사효소(Reverse transcriptase)를 가지고 있어 RNA가 DNA로 전사되며 Lymphokine을 형성하여 helper T cell을 파괴하여 세포성 면역의 결손을 가져와 Interleukin-2와 γ -Interferon 등의 분비가 감소되고 Macrophage의 기능을 감소시킨다⁴⁾.

HIV에 감염된 후 감염자의 혈액내에 HIV에 대한 항체가 높은 농도로 존재함에 따라 혈청학적 검사가 가능하며 HIV 항체의 존재는 곧 HIV 감염 여부를 판단하는

지표가 된다^{5,6)}.

따라서 AIDS에 대한 혈액내의 항체를 측정하는 방법이 개발되어⁷⁾ 예방사업에 이용되고 있으며 우리나라에서는 87년 11월 후천성 면역 결핍증 예방법을 제정하여 조기검진을 통한 감염자의 색출과 보호관리를 실시하고 있다⁸⁾. 이에 따라 91년 1월부터 12월까지 서울지역 특수 업태부·접객부 등 유흥업소 종사자 및 위험에 노출된 대상에 대하여 서울시 22개 보건소를 통해 수집된 혈청 가검물을 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 이용하여 조사함으로써 이 질환의 감염현황을 파악하고 AIDS 예방대책의 기초 자료로 제공하고자 본 조사를 실시하였다.

조사대상 및 방법

1. 조사대상자

91년 1월부터 12월까지 서울 지역에 거주하는 접객업

소 종사자 및 보건증발급 대상자 중 22개 보건소를 통하여 의뢰된 혈청 267,444건(남성 113,221건, 여성 154,223건)을 검사 대상으로 하였으며 대상자의 연령별, 직업별 분포는 표 1, 2와 같았다.

표 1에서와 같이 21~25세 군이 전체의 33.7%로 가장 많았으며 20세 이하군 36~40세 군이 각각 9.8%, 9.6%로 가장 낮았다. 또한 직업별로는 표 2에서와 같이 위생업소 종사자가 44.2%로 가장 높았으며 유흥업소 종사자가 20.6%이었다.

2. 조사 방법

1) 효소 면역 분석법(ELISA method)

AIDS 혈청학적 검사방법중 일차 screening test로 ELISA method가 가장 보편화 되어 이 방법을 사용하였다. 즉 희석액으로 가검혈청을 희석한 후 H9 등의 세포주에서 배양하여 정제한 HIV 항원으로 coating시킨

Table 1. Distribution of age in the sera tested for HIV by ELISA method in 1991.

Age	Male		Female		Total	
	No. of sera	Percentage	No. of sera	Percentage	No. of sera	Percentage
below 20	12,810	11.3	13,325	8.6	26,135	9.8
21~25	35,269	31.2	54,979	35.6	90,248	33.7
26~30	13,714	12.1	18,326	11.9	32,040	12.0
31~35	20,921	18.5	26,832	17.4	47,753	17.8
36~40	9,845	8.7	15,758	10.3	25,603	9.6
over 40	20,662	18.2	25,003	16.2	45,665	17.1
Total	113,221	100	154,223	100	267,444	100

Table 2. Number of sera tested for HIV by occupation in 1991.

Occupation	Male		Female		Total	
	No. of sera	Percentage	No. of sera	Percentage	No. of sera	Percentage
Prostitute	—	—	979	0.6	979	0.6
Entertainment employee	12,959	11.4	42,188	27.4	55,147	20.6
Hotel employee	3,454	3.1	3,131	2.0	6,585	2.5
Tearoom employee	1,142	1.0	6,977	4.5	8,119	3.0
Hygiene establishment employee	53,963	47.7	64,212	41.6	118,175	44.2
Barber and beauty shop employee	6,231	5.5	14,933	9.7	21,164	7.9
Massageroom employee	388	0.3	1,706	1.2	2,094	0.8
Others	35,084	40.0	20,097	13.0	55,181	20.6
Total	113,221	100	154,223	100	267,444	100

microplate에 희석한 가검 혈청을 가하여 30분간 (37°C) 작용시킨 후 세척제로 수 회 세척한 후 효소를 표식한 Anti-Human IgG conjugate를 가한 후 일정시간 작용시켰다. 다시 수 회 세척 후 H₂O₂ 등의 기질과 Ortho-phenylene diamine(OPD) 등의 발색제를 가하고 실온에서 30분간 작용시킨 후 2M 황산을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 492 nm에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다.

ELISA 시약은 HIVIRO, AIDSDIA를 사용하였으며 구체적인 실험방법 및 판독기준은 각 제품의 시험기준에 따랐으며 검사장비는 서독 Behring Co.에서 구입한 ELISA Process-II를 사용하였다.

2) Western Blot Test

ELISA Test에 의해 양성 판독된 혈청을 대상으로 Western Blot Test를 하였으며 본 실험에 사용된 제품은 Dupont 회사 제품이었다⁹⁾. 즉 희석액으로 혈청을 1:100으로 희석하여 상온에서 16시간 이상 반응시킨 후 3회 세척하고 효소표식 Anti-Human IgG 항체를 넣어 1시간 반응시킨 후 Avidin conjugated horseradish peroxidase와 1시간 더 반응시킨 후 기질용액(4-chloro-1-naphotol, H₂O₂)으로 발색시킨 다음 나타내는 각 band를 육안으로 판독하였다.

결과 및 고찰

1. ELISA test의 비특이 반응

91년도 검사 의뢰된 혈청 267,444건중 HIVIRO와 AIDSDIA 시약을 사용하여 양성률을 조사한 바 결과는 표 3과 같았다. 표 3에서와 같이 제 1차 screening test에서 cut-off치 보다 높아 제 1차 양성으로 판정한 혈청

은 남성 113,221건중 292건으로 0.26%이었으며 여성은 154,223건중 400건으로 0.26%이었다.

연령별로는 26~30세 군이 남여 공히 0.47%로 비교적 높았으며 40세 이상군도 남여 각각 0.24%, 0.49%로 높게 나타났다.

또한 일차 screening test에서 양성 판정된 혈청 692건에 대해 2, 3차 반복 시험한 결과 122건만이 최종 ELISA 양성으로 판정되어 0.05%의 양성율을 나타냈다. ELISA 시험은 plate에 부착되는 Antigen을 제조한 cell line과 검체중의 어떤 물질이 비특이적으로 HIV 항원에 결합되어 위양성 반응을 나타나게 된다고 보고된 바¹⁰⁾ 있으며 이외에도 혈청의 보관상태, 시약의 제조 batch 및 시험자에 의한 비특이시험도 가능하다⁷⁾.

본 조사 성적에서도 일차 screening test에서 692건이 양성으로 나타났으나 반복 시험 및 다른 ELISA 시약을 사용하여 검사한 결과 122건만이 지속적 양성을 보였으며 570건이 비특이 반응을 나타낸 것으로 보아 제조 시약 및 혈청 상태 등에 따른 특이도에 큰 차이가 있는 것으로 생각된다.

따라서 ELISA 시험에서 일차 항체 양성으로 판정되면 반복 시험 및 다른 ELISA 시약을 사용하여 검사하는 것이 위양성을 줄일 수 있는 것으로 생각된다.

2. Western Blot test와의 비교

ELISA test에서 양성으로 판정된 혈청 122건에 대하여 Western Blot test에 의한 확인 시험한 바 결과는 표 4와 같았다.

표 4에서와 같이 Western Blot test에서 전혀 band를 형성하지 않은 혈청은 59건으로 48.4%였으며 단지 p17 band, p24 band의 각 단일 band를 나타낸 혈청은

Table 3. Positive rates of 1st and 2nd confirmative tests in ELISA method.

Age	Male			Female			Total		
	No. of sera	1st	2nd	No. of sera	1st	2nd	No. of sera	1st	2nd
below 20	12,810	37(0.29)	8(0.06)	13,325	27(0.20)	4(0.03)	26,135	64(0.24)	12(0.04)
21~25	35,269	87(0.25)	18(0.05)	54,979	75(0.14)	9(0.02)	90,248	162(0.18)	27(0.03)
26~30	13,714	65(0.47)	16(0.12)	18,326	84(0.46)	15(0.08)	32,040	149(0.47)	31(0.10)
31~35	20,921	38(0.18)	9(0.04)	26,832	69(0.26)	10(0.04)	47,753	107(0.22)	19(0.04)
36~40	9,845	16(0.16)	3(0.03)	15,758	23(0.15)	3(0.02)	25,603	39(0.15)	6(0.02)
over 40	20,662	49(0.24)	8(0.04)	25,003	122(0.49)	19(0.08)	45,665	171(0.37)	27(0.06)
Total	113,221	292(0.26)	62(0.05)	154,223	400(0.26)	60(0.04)	267,444	692(0.26)	122(0.05)

() : percentage

30건으로 24.6%였으며 초기에 나타나는 일부 band를 가지고 있으나 gp41, gp120, gp160 등의 glycoprotein band가 없는 혈청은 23건으로 18.8%이었다. 또한 gp41, gp120, gp160의 glycoprotein 등의 band를 나타낸 혈청은 10건으로 8.2%이었다.

Table 4. Comparison of Western Blot patterns on sera showing positive by ELISA method.

Western blot patterns	No. of sera (%)
No band	59(48.4)
p17 only	24(19.7)
p24 only	6(4.9)
p17+p24	5(4.1)
p24+p17+other band	5(4.1)
other band or combination of bands	11(9.0)
gp41, gp120, gp160	10(8.2)
Total	122(100.0)

일반적으로 HIV 감염 후 항원의 출현시기는 감염 2주 후부터 10주 사이이며 HIV 항체는 감염 후 3~8주 사이에 출현하고 IgG와 IgM 항체가 거의 동시에 나타나며 IgM 항체가 가장 먼저 소실되고 anti-gp41 항체는 계속적으로 항체가가 유지되나 ARC 또는 AIDS 증상이 나타날 때 항체가가 떨어진다. Anti-p24 항체는 보다 일찍 소실되고 이때에 HIV 항원의 양이 증가하게 된다. 따라서 일부 band 혈청 중 gp41, gp120, gp160 등의 glycoprotein 중 하나 이상이 있어야만 HIV와 특이 관계가 있으며 glycoprotein인 gp41, gp120, gp160 등의 band가 없는 일부 band만을 형성한 것을 비특이 반응으로 간주하고 있다⁷⁾. 본 조사 성적에서는 전혀 band가

없거나 glycoprotein band를 가지고 있지 않고 단지 core band만을 가지고 있는 혈청이 112건으로 ELISA 양성 혈청중 91.8%가 비특이 반응을 나타냈으며 gp41, gp120, gp160 등의 glycoprotein band를 가지고 있어 양성으로 판정된 혈청은 총 122건 중 10건으로 8.2%이었으며 남성 혈청 62건 중 9건, 여성 혈청 122건 중 1건이었다(표 5 참조). 이와 같은 비특이 반응의 원인으로 Major Histocompatibility Complex(MHC)에 의한 것으로 알려져 있으며¹¹⁾ 항원 정제시 오염된 HLA class I, II tubulin에 대한 항체에 기인하는 것으로 보고되고 있다¹²⁾. 또한 retrovirus에 의한 감염인 autoimmune disease와의 상호 작용에 의해서도 비특이적 반응이 나타나는 것으로 보고되고 있다¹³⁾.

이와 같이 HIV에 대한 비특이 양성 시험은 그 대상이 현혈자, 보건증 발급 대상자 등 다수 집단이며 일단 양성으로 판명시 본인과 가족 그리고 사회에 미치는 영향이 지대하고 1회라도 양성 반응시 반복 시험은 물론 같은 방법의 타시약 사용과 함께 Western Blot test 등 보다 특이한 시험이 요구되어 시간적, 물질적 손실이 크다. 따라서 HIV에 사용하는 여러 종류의 시약에 대한 정확한 평가가 요구되며 비특이 반응에 의한 위양성을 줄일 수 있는 여러 가지 시험방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

91년 1월부터 12월까지 서울시 22개 보건소를 통해 검사 의뢰된 혈청 가검물 268,444건에 대하여 ELISA method를 이용한 HIV 항체를 조사하고 양성혈청에 대하여 Western Blot test로 확인, 조사한 바 다음과 같은

Table 5. Distribution of Western Blot test on 22 sera positive by ELISA method.

Age	Male		Female		Total	
	No. of sera	Positive	No. of sera	Positive	No. of sera	Positive
below 20	8	9(25.0)	4	—	12	2(16.7)
21~25	18	1(5.6)	9	—	27	1(3.7)
26~30	16	4(25.0)	15	1(6.7)	31	5(16.1)
31~35	9	—	10	—	19	—
36~40	3	2(66.7)	3	—	6	2(33.2)
over 40	8	—	19	—	27	—
Total	62	9(14.5)	60	1(1.7)	122	10(8.2)

() : percentage

결과를 얻었다.

1. HIV 감염 여부를 탐지하기 위해 사용되는 ELISA 시험 방법은 제조 시약, 혈청 상태 등에 따라 특이도에 차이를 나타냈다.
2. ELISA 양성 혈청 122건 중 10건(8.2%)만이 Western Blot test에서 특이 반응을 나타냈으며 59건(48.4%)은 band가 검출되지 않았으며 53건(43.4%)은 비특이 반응을 나타냈다. 또한 glycoprotein인 gp41, gp120, gp160를 함유하여 AIDS 양성으로 판정된 혈청은 10건(8.2%)이었다.

참 고 문 헌

1. Gottlieb M.S., Schroff R., Schander H.M.: Pneumocystic carini pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men, Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N. Engl. J. Med., 305:1425 (1981).
2. Center for Disease Control: Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) United states. Morbid Mortal. Weekly Rep., 31:507 (1982).
3. Rosenberg S.A.: AIDS etiology diagnosis, treatment and preventing. J. B. rippincottco, 1 (1985).
4. CDC: Update on AIDS. HMWR, 31:507 (1982).
5. Bidwel V.A.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories, (1979).

6. 김태규, 이용수, 황응수, 서교일, 최정희, 신영오, 박성희: HIV 항체가의 임상 및 면역학적 의의. J. of Kor. Soc. of Virology, 19:101 (1989).
7. 신영오, 김성순, 백선영: 한국인 혈청에 대한 Human Immunodeficiency Virus(HIV) 항체 시험 방법의 평가. J. of Kor. Soc. of Virology, 19:59 (1989).
8. 보건사회부: 후천성 면역 결핍증 예방법. (1987).
9. Sarngadharan M.G., Popovic M., Bruch L.: Antibodies reactive with human T lymphotropic retrovirus in the serum of patients with AIDS. Science, 224:506 (1984).
10. Kuhn P., Holzberger G.: HLA-DR4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results. Lancet II, 1222 (1985).
11. Weiss S.H., Plann D.L., Murray C., Popovic M.: HLA-DR antibodies and THLV-III antibody ELISA testing. Lancet II, 157 (1985).
12. Janan Blomberg and Per Johan Klasse: Specificities and sensitivities of three systems for detection of antibody to Human Immunodeficiency Virus by Electrophoretic Immunoblotting. J. clin. Microbiology., 106 (1988).
13. Rucheton M., Grassland h., Fanton H., Ursule L., Ferrierpand G., larsen J.: Presence of circulating antibodies against gaggene MuMLV protein in patients with autoimmune connective tissue disorders. Virology, 114:468 (1985).

Table 2. Distribution of Western blot test on 35 sera positive by ELISA method

Total	Males		Females	
	No. of sera	Positive	No. of sera	Positive
1	1	0	1	0
2	2	0	2	0
3	3	0	3	0
4	4	0	4	0
5	5	0	5	0
6	6	0	6	0
7	7	0	7	0
8	8	0	8	0
9	9	0	9	0
10	10	0	10	0
11	11	0	11	0
12	12	0	12	0
13	13	0	13	0
14	14	0	14	0
15	15	0	15	0
16	16	0	16	0
17	17	0	17	0
18	18	0	18	0
19	19	0	19	0
20	20	0	20	0
21	21	0	21	0
22	22	0	22	0
23	23	0	23	0
24	24	0	24	0
25	25	0	25	0
26	26	0	26	0
27	27	0	27	0
28	28	0	28	0
29	29	0	29	0
30	30	0	30	0
31	31	0	31	0
32	32	0	32	0
33	33	0	33	0
34	34	0	34	0
35	35	0	35	0
Total	35	0	35	0