

# ELISA method와 Particle Agglutination Method에 의한 HIV 抗體 非特異反應에 대한 調查研究

微生物部 病毒科

朴魯雲 · 申眞浩 · 金益洙 · 元云載 · 高明順

## Comparison of Non-Specific Reaction of Human Immunodeficiency Virus Antibodies by ELISA and Particle Agglutination Method

*Division of Virology*

Noh Woon Park, Jin Ho Shin, Ik Soo Kim

Woon Jae Won and Myung Soon Ko

### = Abstract =

The comparison test for non-specific reaction was performed in the reagents which were used for HIV antibody screening test of AIDS.

Fourteen thousands and twenty four samples of human serum were collected from Health center and tested for HIV antibody titer by using both of ELISA and Particle Agglutination (PA) methods.

1. The false-positive rate is higher in ELISA method than in PA method.
2. All the HIV positive sera tested by PA method were observed to contain some protein bands by Western blot method.

### 서 론

후천성 면역 결핍증(Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)은 1981년 미국에서 처음 보고되어<sup>1)</sup> 1982년에 명명된 질환으로<sup>2)</sup> 발열, 발한, 피로감, 체중 감소, 임파절종창 등의 전신증상으로 시작하여 기능부전을 주로한 세포성 면역부전에 따른 기회감염과 Kaposi 肉種과 같은 악성종양을 주 증상으로하는 합병증에 의해 사망에 이르게 되는 질병이다. 이 질병의 원인으로 1983년에 프랑스에서 Montagnier<sup>3)</sup> 등에 의해

AIDS 전구증상 환자로부터 retrovirus가 분리되고 이어 1984년 미국 NIH의 Gallo와 California大 Levy는 각기 AIDS 환자로부터 retrovirus를 분리했으며 그 후의 연구에 의해 이들 세 virus의 유전자 구조가 밝혀져<sup>4,5)</sup> 1986년에 virus 분류 국제위원회에서 새로 HIV (Human Immunodeficiency Virus)라는 통일명칭이 제창되어 사용되고 있으며<sup>6,15)</sup> 현재 HIV는 HIV-I과 HIV-II로 분류되고 있으며<sup>7)</sup> 중앙원성 virus이므로 복제된 virus 유전자가 감염세포의 유전자에 결합되어 감염이 지속적으로 유지된다<sup>12,13)</sup>.

HIV감염으로부터 AIDS발증까지의 임상적 잠복기간

은 11~14개월 내지 2~4년이 주류이며 감염후 3주~2, 3개월 사이에 항체 양성으로 되지만 잠복중에는 AIDS 증상이 나타나지 않는다<sup>6)</sup>. 항체양성반응은 일반 virus 질환의 경우 항체양성이 그 virus 질환에 대한 면역학적 방어기전의 형성을 의미하나 HIV항체 양성의 경우는 항체가 virus를 제어하지 못하는 특성이 있으나 혈액중에 HIV항체 유무를 검사함으로써 HIV감염자 진단이 가능하며 이로써 감염경로 차단이 가능하게 된다<sup>7,8)</sup>. 이 HIV항체 검사방법으로는 ELISA법, Particle Agglutination, Western Blot, IFA Method 등 여러가지 방법이 개발되어 있으나 현재 우리나라에서 Screen test로 사용하고 있는 간접 효소면역법은 여러가지 비특이적 반응이 많아<sup>2)</sup> 위양성률이 높아져서 실험의 신뢰성에 의문을 제기하게 하며<sup>9)</sup> 이 반응에 대한 2차 Screen으로 사용가능한 시약중 Particle Agglutination Method를 이용하여<sup>10)</sup> 비특이 반응의 정도와 그 반응을 줄일 수 있는 방법을 찾아내기 위하여 본 실험을 실시하였기 보고함니다.

## 조사대상 및 방법

### 1. 조사대상

1991년 12월중 시내 22개구 보건소에서 의뢰받은 HIV항체검사를 위한 가검혈청중 본 연구원에서 사용중인 HIV항체 Screen Test용 ELISA시약(AIDSIA와 HIVIRO)과 입자응집반응 시약(SERODIA-HIV)을 사용하여 시험을 실시하였다.

### 2. 조사방법

#### 1) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method

AIDS 혈청학적 검사방법중 일차 Screening Test로 ELISA Method가 보편적으로 사용되고 있다. 가검혈청을 희석액에 희석한 후 H9-Cell Line 등에서 배양하여 정제한 HIV항원으로 코팅시킨 Microplate에 일정량을 가하여 37°C에서 30분간 작용시킨 후 세척액으로 수 회 세척하고 효소를 표식한 Anti-Human IgG Conjugate를 가하고 일정시간 작용시키고 다시 수 회 세척후 기질(Abstrate)을 가하여 30분간 실온에서 발색시키고 반응정지액을 첨가하여 효소반응을 정지시킨후 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다. ELISA 시약은 AIDSIA(동아제약), HIVIRO(녹십자사)를 사용하였

으며 실험기준 및 판정은 각 제품의 시험기준에 따랐고 ELISA processor-II(Behring)를 사용하여 시험하였다.

#### 2) Particle Agglutination (P.A.) Method

Human Immunodeficiency Virus(HIV)를 배양하여 자당밀도구배법에 의해 얻은 비중 1.16의 바이러스 분획을 계면활성제로 처리하여 불활성화시킨 항원을 인공젤라틴입자에 흡착시켜 감각인자로 만들고 이 입자가 혈청내에 HIV항체존재시 감각인자간에 항체에 의한 격자가 형성되어 육안으로 관찰가능한 응집상을 나타내는지의 여부로 항체 유무를 판정하는 시험법으로 그림 1에 서와 같이 Microplate에 혈청희석용액을 Dropper를 이용하여 제 1 well에 75  $\mu$ l. 제 2 및 제 3 well에 25  $\mu$ l씩 가하고 피검혈청 25  $\mu$ l를 제 1 well에 가하여 잘 섞은 후 그 25  $\mu$ l를 취하여 제 2 well에 옮겨 교반한 후 다시 25  $\mu$ l를 제 3 well에 다시 옮겨 교반 후 25  $\mu$ l를 버린다.

Dropper로 제 2 well에 미감작 입자, 제 3 well에 감각 입자를 25  $\mu$ l씩 떨어뜨린 후 tray mixer 위에서 내용물을 잘 혼합하여 뚜껑을 덮고 실온(15~25°C)에 수평으로 2시간 방치한 후 판정한다.

P.A시약은 SERODIA-HIV (Fujirebio)를 사용하였고 판정은 제품의 시험기준에 따랐다.

Well No.	1	2	3
Serum dilution sol ( $\mu$ l)	75	25	25
Serum ( $\mu$ l)	25	25	25
Dilution ratio	1 : 4	1 : 8	1 : 16
Unsensitized particle suspension ( $\mu$ l)		25	
Sensitized particle suspension ( $\mu$ l)			25
Final dilution ratio		1 : 16	1 : 32

mixed, cover plate, incubate 2 hrs at room temperature

interpretation

Fig. 1. Systematic scheme of work by particle agglutination.

#### 3) Western Blot (W.B) Method

W.B시험은 ELISA와 P.A시험에서 양성으로 판독된 혈청을 대상으로 실시하였으며 시약은 HIV-1 Western Blot Kit (Du Pont.)을 다음의 시험방법에 따라 시행하

었다<sup>9)</sup>. 즉 희석액으로 가검혈청을 100배 희석하여 실온에서 2시간 이상 진탕하면서 반응시킨 후 3~4회 세척하고 효소표시 Anti-Human IgG항체를 넣어 1시간 반응시키고 Avidin Conjugated Horseradish Peroxidase로 다시 1시간 더 반응시킨 후 4-chloro-1-naphtol과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 된 기질용액으로 발색시킨 다음 나타나는 각 band를 시험기준에 따라 육안으로 판독하였다.

### 결과 및 고찰

서울 시내 22개 보건소로부터 HIV항체 검사를 의뢰받은 14,024건의 혈청중 Screen test인 AIDSIA와 HIVIRO를 이용한 ELISA method 양성 반응을 나타낸 29건의 혈청과 Particle Agglutination test 결과는 표 1과 같았으며 이는 ELISA method가 microwell에 부착되는 Antigen을 제조한 Cell line과 검체중의 어느 물질이 특이적으로 결합되어 비특이 반응이 나타나게 되어<sup>2,11)</sup> 재시험을 필요로 하는데 본 시험에서 사용한 ELISA 시약은 극히 높은 민감도로 인하여<sup>4)</sup> 재시험을 실시하는 관계로 시간적, 물질적 손실이 크다<sup>7)</sup>.

HIV항체 검사용 ELISA의 microplate에 부착되는 인면역글로부린이 비특이적인 요인에 의해 양성 반응을 나타낼 수 있고 바이러스가 배양된 세포의 성분을 함유하고 있으므로 이러한 세포 성분에 대한 항체는 위양성을 초래할 수 있다<sup>11)</sup>.

표 1의 결과는 이러한 위양성을 줄이기 위해 3차례의 반복시험 결과이며 ELISA 양성률은 0.20%이었다. P.A 시험법으로 동일 혈청을 시험한 결과 양성률이 0.06%를 나타내어 ELISA법 보다 높은 특이도를 나타냈다.

**Table 1.** Comparison of positive reaction for HIV antibodies by ELISA and PA method.

Sex	No. of sera tested	ELISA		P.A	
		No. of positive (%)	No. of positive (%)	No. of positive (%)	No. of positive (%)
Male	5,816	21 (0.36)	6 (0.10)		
Female	8,208	8 (0.10)	2 (0.02)		
Total	14,024	29 (0.20)	8 (0.06)		

ELISA와 PA시험 결과 양성반응을 나타낸 혈청에 대하여 HIV 확인시험 방법의 일종인 Western Blot test

의 결과는 표 2와 같았다<sup>9)</sup>. ELISA 양성혈청 29건 중 전혀 band를 형성하지 않은 혈청이 13건으로 44.8%였고 p17 band 등 단일 band가 나타난 혈청이 9건으로 31.0%이었으며 p24+p17 등 combination band를 나타낸 혈청이 4건으로 13.8%이었다. glycoprotein 항체인 gp41과 gp41+120/160 band를 나타낸 혈청은 3건으로 10.4%이었으며 이 중 2건은 HIV항체 양성으로 판명되었다. 또한 P.A 양성혈청 8건 중 band가 검출되지 않은 혈청은 없었으며 단일 band 2건, 복합 band 3건으로 62.5%를 나타내었고 gp band 성적은 ELISA 양성혈청과 일치하는 결과를 나타냈다.

이는 현재 WHO panel에서 판정에 사용하는 gp band의 중요성으로 미루어 보아 타당한 결과를 나타냈다고 사료된다<sup>15)</sup>. 낮은 감도의 시약사용으로 인한 위음성과 항체 미형성 시기에 항체탐지의 문제점 등이 HIV항체검사의 어려운 점이며 이런 관점에서 국내에서 검색용시약의 특이도를 높이는 것이 바람직하다고 생각된다.

**Table 2.** Distribution of Western blot bands in positive sera tested by ELISA and PA method.

Test type	ELISA method		PA method	
	No. of sera	Percentage	No. of sera	Percentage
Glycoprotein band				
gp41 only	1	(3.5%)	1	(12.5%)
gp41+120/160	2	(6.9%)	2	(25.0%)
Combination band				
p17+24, p17+31, p17+55, p31+55, p17+24+31, p17+24+55	4	(13.8%)	3	(37.5%)
Single band				
p17, p24, p55	9	(31.0%)	2	(25.0%)
No band	13	(44.8%)	—	—
Total	29	100.0%	8	100.0%

### 결론

1991년 의뢰받은 14,024건의 혈청을 HIV항체 검사용으로 사용한 시약들의 비특이 반응에 대하여 비교시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HIV항체 시험에서 ELISA Method는 P.A.

Method에 비해 위양성율이 높았다.

2. P.A. Method에 의한 양성혈청은 Western blot test 결과 band가 전부 검출되었다.

### 참 고 문 헌

1. 한중수, 김석례, 이연수, 김익수, 한규문, 조남준, 임봉택 : ELISA method를 이용한 AIDS 항체 검사에 비특이적 반응에 관한 연구(II). 서울특별시 보건환경연구원보, 25:30 (1989).
2. 유병태, 한중수, 김동일, 윤중섭, 임봉택 : ELISA Method를 이용한 AIDS항체 검사에서 특이반응에 관한 연구(1). 서울특별시보건환경연구원보, 24:15 (1988).
3. 조남준, 배청호, 한중수, 구분관, 박찬구, 신진호, 윤희자, 임봉택 : ELISA Method를 이용한 AIDS 항체 검사에서 비특이 반응에 관한 조사(3). 서울특별시보건환경연구원보, 26:23 (1990).
4. 이평우, 윤철호, 이호왕 : 한국인의 후천성 면역 결핍증 발병 위험 집단에서의 Human Immunodeficiency Virus(HIV)에 관한 혈청학적 연구. 대한바이러스학회지, 18:1 21 (1988).
5. 윤철호, 이평우, 이호왕 : Human Immunodeficiency Virus(HIV)에 대한 MT-2 세포와 CCRF-CEM 세포의 감수성 비교. 대한바이러스학회지, 18:1 (1988).
6. 김태국, 이중수, 황웅수, 서교일, 최정희, 신영오, 박성희 : HIV항체가의 임상 및 면역학적 의의. 한국바이러스학회지, 19:2 101 (1989).
7. 신영오, 김성순, 백선영 : 한국인 혈청에 대한

Human Immunodeficiency Virus(HIV) 항체 시험 방법의 평가. 한국바이러스학회지, 19:1. 59 (1989).

8. 용근호, 신영오, 이용수, 김태숙, 백선영, 기미경, 김성순, 정경순, 조영걸, 양애순, 최병희, 이승욱 : 국내 후천성 면역 결핍증의 혈청학 및 역학적 연구(1985~1990). 국립보건원보 제27권 1호 139 (1990).
9. 北村敬, 南谷幹夫 : AIDSの臨床. 醫學書院, 東京 (1987).
10. Constantine, N.T., Callahan, J.D., Watts, D.M.: HIV testing and quality control-A guide for laboratory personnelaidstech. Durham. USA. 10 (1991).
11. Tsutomu Yoshida, Susumu Kobayashi, Toshio Matsui and Naoki Yamamoto: Gelatin particle agglutination assay for antibody to AIDS virus. 醫學のあゆみ, 138:3 213 (1986).
12. Ratner, L.: Complete nucleotide sequence of AIDS virus, HTLV-III. Nature, 313:227 (1985).
13. Sanchez-Pescador, R: Nucleotide Sequence and Expression of an AIDS-Associated Retrovirus (ARV-2. Science. 227:484 (1985).
14. Frideman-Kein AE, Laubenstein L, Marmor M. Kaposi sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men—New York and California, MMWR., 30:250 (1981).
15. Bernard N, Fields David M. Knipe: Fields Virology second Edition. Raven press, New York, 1529 (1990).