

## Hepatitis B Surface Antigen을 신속히 검출하기 위한 Immunochromatographic Assay kit의 성능 평가

주식회사 종근당 종합연구소, <sup>1</sup>고려대학교 의과대학 병리학과,  
<sup>2</sup>충남대학교 수의과대학 수의학과

신형순\* · 김영봉 · 신정우 · 김창규 · 이왕식 · 김한겸<sup>1</sup> · 신광순<sup>2</sup>

=Abstract=

### The Evaluation of Immunochromatographic Assay kit for Rapid Detection of Hepatitis B Surface Antigen

Hyeong-Soon Shin, Young-Bong Kim, Jung-Woo Shin, Chang-Kyu Kim,  
Wang-Sik Lee, Han-Kyeom Kim<sup>1</sup> and Kwang-soon Shin<sup>2</sup>

Chong Kun Dang Research Institute, <sup>1</sup>Department of Pathology, Medical College, Korea University, Seoul 136-705, <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764

We evaluated Immunochromatographic assay kit to screen HBsAg in human serum.

When the reference HBsAg was applied to ICA, HA and EIA kits, the limit of detection for HBsAg were found out to be 4, 2 and 0.25 ng/ml respectively. But ICA kit required 5 minutes to read the result whereas HA and EIA kit more than one hour. The sensitivity was 97% (29 of 30 samples) and the specificity 100% (45 samples) compared with conventional EIA. The ICA kit needs no instrument or machine to perform the test contrary to the conventional methods.

Therefore, this rapid and sensitive ICA kit can be used for HBsAg-screening, especially in the emergency room and in the scene of the accident.

**Key Words:** HBsAg, Immunochromatographic assay, limit of detection, sensitivity, specificity

## 서 론

현재 Hepatitis B virus (HBV)에 의한 B형 간염의 스크리닝에 널리 사용되고 있는 진단법으로는 역수동혈구응집법 (reversed passive haemagglutination, RPHA) [1]과 방사면역측정법 (radio immunoassay, RIA) [2], 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA) [3] 등이 있다. 혈구응집법은 주로 양의 적혈구를 이용하는데, 사용하기 편하도록 포르말린등으로 고정시킨 후 정제된 anti-HBs를 감작시켜 검체 혈청중의 hepatitis

\* Corresponding author

B surface antigen (HBsAg)과 응집되는 것을 관찰하는 방법이다. 효소면역측정법은 HBsAg가 가지고 있는 여러 가지 에피토프 중 한 에피토프에 대한 anti-HBs를 matrix에 고정시키고 HBsAg를 반응시킨 후 반응에 참여하지 않은 나머지의 HBsAg를 세척해 내고 다시 다른 에피토프를 인식하는 항체에 horse radish peroxidase (HRP)를 결합시킨 conjugate를 반응시키고 발색제를 가해 변색되는 정도로 HBsAg를 확인하는 것이다. 방사면역측정법은 위의 방법중에서 HRP 대신에 방사성동위원소를 결합시켜 사용하는 것이다. 또한 matrix에 고정되는 capture antibody, 표식자가 붙어 있는 tracer antibody가 항원을 양쪽에서

싸고 결합하기 때문에 sandwich법이라고 부른다. 혈구응집법은 결과의 판독에 특별한 기계를 이용하지 않고 간편하게 육안으로 결과를 알 수 있다는 장점이 있으나 감도가 덜 예민하다는 단점이 있다 [4]. 방사면역측정법과 효소면역측정법은 가장 정확하고 예민하지만 여러 가지 기계를 이용해야 하기 때문에 복잡하고 비용이 많이 들며 검사시간이 오래 걸리는 등의 단점이 있다. 이런 기존의 검사방법들은 이러한 단점에도 불구하고 이들을 대체할 만한 적당한 방법이 없었기에 그대로 사용되어 왔다.

금입자를 면역학적 진단에 사용한 것은 원래 전자현미경의 관찰을 돕게 하기 위해서였다 [5]. 그 후 금입자와 nitrocellulose (NC) 막을 면역학적인 진단법에 응용하면서 immuno chromatographic assay (ICA) 법으로 발전하여 [6] 현재와 같이 cassette나 stick 등의 형태로 다양하게 발전하였다. ICA의 원리는 검체의 혈청중에 들어 있는 항원이 금입자에 결합된 tracer antibody와 반응한 후 모세관현상에 의해서 NC 막 위를 이동하는 도중에 막에 고정되어 있는 capture antibody와 결합하여 발색띠를 형성함으로써 양성·음성을 육안으로 판별하는 것이다. 이 방법은 희석이나 세척 등의 조작이 필요 없이 단순하게 혈청을 몇 방울만 떨어 뜨리면 판독이 가능하므로 전문가가 아닌 사람도 쉽게 사용할 수 있고 도구나 기계 없이 사용할 수 있으며 실험 결과도 기존의 방법들과는 달리 counter나 reader를 사용하지 않고 육안으로 판정할 수 있다. 반응시간도 다른 방법들 보다 대단히 빨라 시험을 시작한지 5분이면 판독이 가능하다. 이러한 장점으로 해서 이 ICA kit는 임상실험실 뿐만 아니라 [7] 응급실이나 사고현장에서, 현혈시, 수혈 직전 등에서 이용하기에 편리하다.

본 연구에서는 자체 개발한 ICA-HBsAg kit를 HBsAg의 스크리닝에 이용하고자 [8] 이 ICA kit의 검출한계, 민감도, 특이도 등과 같은 성능에 대하여 논하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 검체 혈청 수집

고대 의대 구로병원을 내원한 환자들로부터 채혈하여 ELSIA방법 (Enzygnost HBsAg, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 으로 결과

가 판정된 총 75개의 혈청 (양성 30개와 음성 45개)을 수집하였다.

### 2. ICA-HBsAg kit

본 연구소에서 제작된 cassette형의 진단 kit이다 (Fig. 1). Cassette에는 크게 두 부분으로 나뉘는 strip이 장착되어 있다. 하단부의 유리섬유에는 25nm의 금입자를 단세포균 anti-HBs가 둘러싸고 있는 금입자·anti-HBs의 conjugate가 건조상태로 포함되어 있는데 일단 cassette의 검체용 well에 검체 혈청을 가하면 혈청중의 HBsAg와 이 conjugate가 결합하게 되어 금입자·anti-HBs-HBsAg의 결합체가 형성되면서 모세관 현상에 의해 두 번째 부분인 NC 막을 따라 상단부로 이동하게 된다. 이 막에는 두 가지의 항체 (capture antibody)가 선의 형태로 고정되어 있어 이동하는 결합체와 반응하여 이동이 정지되므로 색깔이 있는 선이 나타나게 된다 (금입자·anti·HBs·HBsAg·anti-HBs). 두 가지의 항체 중 아래 부분의 다세포균 anti-HBs는 HBsAg와 특이적으로 반응하여 양성 검체에서만 선으로 나타나지만 윗부분의 anti-mouse Ig는 모든 이동해 온 conjugate와 반응할 수 있으므로 대조선으로 사용된다.

### 3. ELISA

Genedia HBsAg ELISA 3.0 (녹십자, 서울) 을 사용하였다. 위의 ICA-HBsAg kit와 마찬가지로 sandwich 형의 진단 방법이다. 96-well microplate에는 capture 항체로 마우스 단세포균 anti-HBs가 결합되어 있어 있는데 검체 혈청과 면양 anti-HBs·과산화효소 결합체를 함께 가하면 capture 항체가 혈청의 HBsAg와 반응하게 되고 이 결합체 (anti-HBs·HBsAg)는 다시 접합체와 반응하여 anti-HBs·HBsAg·anti-HBs·HRP의 결합체를 형성하게 된다. 여기에 OPD용액을 가하여 발색시킨 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하여 양성 및 음성 대조와 비교하여 양성 및 음성을 판별한다.

### 4. RPHA

Hepa S-ag Test (RPHA, 녹십자, 서울) 를 사용하였다. 검체를 알맞게 희석하여 anti-HBs 감작양 적혈구 부유액과 25 μl 씩 섞고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 양성 및 음성대조와 비교하여 양성 및 음성을 판별한다.

## 5. 반응 소요시간 결정

Kit의 well에 검체 혈청 160  $\mu$ l를 가하고 전체적인 반응이 끝난 후 양성이나 음성으로 판정되는 시간을 측정하였다.

## 6. Kit의 성능시험

표준 HBsAg를 2배 희석방법으로 단계적으로 희석하여 각각의 농도별로 RPHA (Hepa S-ag Test), ELISA (Genedia HBsAg ELISA 3.0) 및 ICA kit (종근당, 서울)에 가하여 검출한계를 구하고, 수집된 혈청을 ICA kit로 재실험하여 kit의 민감도와 특이도 [9]를 구하였다.

## 결과 및 성적

### 1. 반응 소요시간 결정

Kit의 well에 검체 혈청 160  $\mu$ l를 가하고 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10분마다 전개속도 및 양성선, 대조선의 발색 양상을 관찰하였다 (Fig. 1). 전개 후 1분 경과하자 양성선이 나타나기 시작하여 시간이 경과함에 따라 색이 짙어 졌으며 3분이 경과하자 대조선이 나타났으나 붉은 색 입자가 이동하는 것으로 보아 반응이 완결되지 않았음을 알 수 있었고 이 현상은 약 5분 경과 후까지 계속 되었다. 그 후에도 색깔이 계속 짙어져 반응이 계속 되고 있음을 볼 수 있었다. 그러나 전체적으로 양성 반응은 1분내에 시작되어 5분 정도면 확인

할 수 있었다.

### 2. Kit의 성능시험

#### (1) 검출한계

검출한계는 한 검색체계가 표적으로 하는 반응물과 어느 정도 희석되었을 때까지 반응성을 나타내는가를 나타내는 척도로서 보통  $\mu$ g/ml 혹은 ng/ml 등으로 표현한다. 이 ICA kit의 검출한계를 다른 검색체계와 비교하기 위하여 ELISA kit (Genedia HBsAg ELISA 3.0, 녹십자) 와 RPHA kit (Hepa S-ag Test, 녹십자) 을 병행하여 실험하였다. 먼저 HBsAg 표준용액 (1  $\mu$ g/ml) 을 0.1% BSA-PBS용액을 사용하여 2배 희석방법으로 최종적으로 약 16,000배까지 희석하고 각각의 희석액을 각 검색체계의 사용방법에 따라 실험을 실시하였을 때 ICA, ELISA, RPHA 들의 검출한계는 각각 4, 0.25, 2 ng/ml임을 확인할 수 있었다. 이때의 실험조건을 비교하면 표 1과 같았다.

#### (2) Assay 결과

고대 의대 구로병원에서 ELSIA방법 (Enzygnost HBsAg, Boehringer Mannheim) 으로 실험한 결과 총 75 개의 혈청 중 30개는 양성, 45개는 음성으로 판명되었으나 ICA kit로 실험했을 때에는 29개가 양성이고 46개가 음성이었다. ELISA와 ICA kit로 실험한 결과를 비교하면 표 2와 같다.

#### (3) 민감도

민감도는 한 검색체계의 위음성 반응을 나타내는 척도로서 다음 식으로 표시된다.

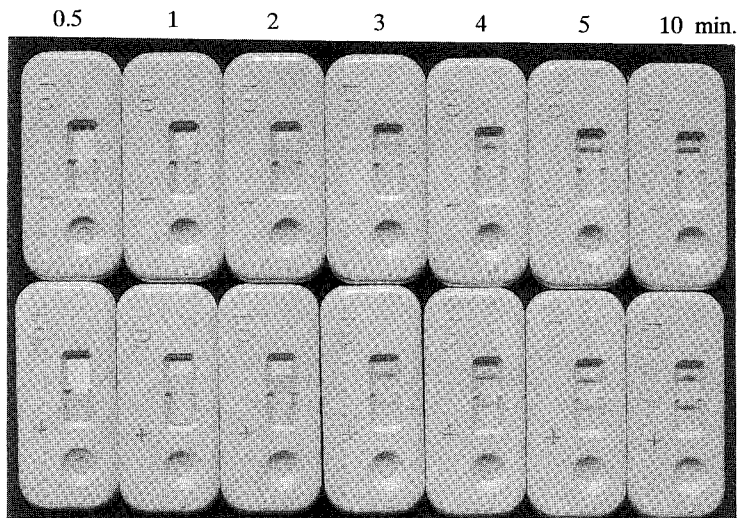


Figure 1. The reaction and colour development of HBsAg-ICA kit as time goes by.

**Table 1.** Comparison of reaction condition of each assay system: ICA, ELISA, RPHA

	ICA	ELISA	RPHA
Dilution	No	No	1/32
Controls	No	positive, negative	positive, negative
Incubation (°C)	R/T	37	37
Washing	No	5 times	no
Time required (min)	5	120	60
Reading	naked eye	spectrophotometer	naked eye

$$\text{민 감 도} = \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \times 100$$

고대 의대 구로병원에서 수집한 검체 혈청 (총 75개; 양성 30, 음성 45) 중 양성 검체 하나가 ICA kit에서는 음성으로 나타났다. 따라서 이 ICA kit의 민감도는 Boehringer Mannheim의 Enzygnost HBsAg를 기준으로 할 때 97%였다.

#### (4) 특이도

특이도는 한 검색체계의 위양성 반응을 나타내는 척도로서 다음 식으로 표시된다.

$$\text{특이도} = \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False negative}} \times 100$$

고대 의대 구로병원에서 수집한 45개의 음성 검체가 모두 음성으로 나타났으므로 이 ICA kit의 특이도는 100%였다.

## 고 찰

HBsAg를 스크리닝하는데 있어서 ICA kit의 성능을 확인하기 위하여 ELISA 및 RPHA kit와 병행하여 실험하였을 때 성능면에서는 다소 떨어지지만 ICA kit만의 고유한 장점으로 인하여 대단히 유용한 방법임을 확인할 수 있었다.

ICA kit의 검출한계는 4 ng/ml로 RPHA kit (2 ng/ml)와는 비슷하지만 ELISA kit (0.25 ng/ml)와는 10배 이상 차이가 났다. 이 검출한계는 반응시간과 관계가 있는 것으로 판단된다. ICA kit가 불과 5분인 반면 RPHA와 ELISA kit는 각각 60분, 90분으로 10배 이상 반응시간이 길었다. ICA kit에서는 반응시간을 더 늘릴 경우 검출한계가 2배~4배 정도까지는 개선되었지만 (~1 ng/ml) 그 이상 더

**Table 2.** The result of assay performed with ELISA and ICA kit

EIA kit	ICA kit		
	+	-	Total
+	29	1	30
-	0	45	45
Total	29	46	75

+: positive detection, -: negative detection.

개선되지는 않았다. 이것은 시간이 지남에 따라 NC 막 위의 수분이 평형화되어 모세관 현상이 약화됨에 따라 이동능력을 상실함으로써 반응이 중지되고, 다른 kit와는 달리 표면적이 넓으므로 수분이 쉽게 증발되어 시간이 지남에 따라 오히려 반응이 떨어지는 효과 때문인 것으로 짐작된다.

조작의 편리성은 ICA kit가 대단히 우수하다 (Table 1). RPHA에서는 피펫이나 그밖의 도구를 이용하여 32배 희석단계가 필요하지만 ELISA와 ICA에서는 희석할 필요가 없다. 항원·항체 반응은 ELISA와 RPHA가 37°C 배양기를 이용하지만 ICA는 실온에서 실시하므로 배양기도 필요 없다. ELISA는 washer 등의 방법으로 세척단계를 거쳐야 하지만 RPHA와 ICA에서는 세척단계가 없다. ICA는 strip에 대조선이 함께 있으므로 실험에 대조군을 사용할 필요가 없지만 RPHA와 ELISA는 반드시 양성대조액과 음성대조액을 함께 사용하여야 한다. 결과를 판정하기 위해서 ELISA에서는 비선광도계를 이용하여 흡광도를 측정 후 판정기준값을 계산하여 양성·음성을 가리지만 RPHA와 ICA에서는 그냥 육안으로 판정한다.

민감도에 있어서는 ELISA kit로 양성임을 확인한 30개 검체중 하나가 위음성으로 판정되어 97%의 민감도를 나타내었다. 그러나 검체 혈청이 부족한 관계로 더 이상 시험할 수 없었기 때문에 어떤 원인으로 ICA의 결과와 ELISA의 결과 사이에 불일치되는 것이 발생하였는지 확인할 수 없었다. 반면에 특이도는 ELISA kit로 양성임을 확인한 45개 검체 모두가 ICA의 결과와 일치하여 100%의 특이도를 나타내었다.

ICA kit의 장점을 보면 무엇보다 먼저 결과를 신속하게 확인할 수 있다는 것이다. 기존의 방법들이 한시간 이상을 필요로 하는 반면 ICA kit는

5분이면 검체의 음성·양성 여부가 판명된다. 이러한 신속성은 주로 병원의 임상병리과 실험실에서 수행되어 오던 B형 간염 검사가 응급실이나 수혈 및 현혈시 현장에서 즉시 수행할 수 있게 해 준다. 또한 아무 기계나 기구없이 시험하고 판독할 수 있다는 점은 출혈사고 현장에서 비전문가에 의해서도 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 경제적인 면에서도 기계나 기구를 구입치 않아도 되며 RPHA와 ELISA kit처럼 양성대조와 음성대조를 사용하지 않으므로 소모가 적어서 경제적인 스크리닝 방법이다.

## 결 론

1. HBsAg-스크리닝 시에 ICA kit를 이용하면 5분 이내에 HBsAg의 유무를 확인할 수 있다.
2. 이 ICA kit의 HBsAg에 대한 검출한계는 4 ng/ml이지만 시간이 경과함에 따라 개선되어 약 1 ng/ml까지도 확인할 수 있다.
3. ELISA와 같이 약 90분간 반응시켜도 증발과 평형화 효과 때문에 더 이상 개선되지 않는다.
4. Enzygnost HBsAg (Boehringer Mannheim)를 기준으로 할 때 ICA kit의 민감도와 특이도는 각각 97%, 100% 였다.
5. ICA kit는 HBsAg를 스크리닝하는 데 있어서 신속하고 경제적이며 성능도 우수한 방법이다.

## 참 고 문 헌

1. Withers MJ, McCahill GV, Griffiths PD, Heath RB, Pattison Jr, Dane DS: A comparative study of passive haemagglutination methods for the detection of hepatitis B surface antigen in routine hospital practice. *J Clin Pathol* 29: 732-735, 1976.
2. Petrilli FL, Crovari P, De Flora S: Quantitative detection and typing of HBsAg and anti-HBs by radioimmunoassay techniques. *Dev Biol Stand* 30: 103-110, 1975.
3. Haas J: Rapid detection of HBsAg and Anti-HBs By enzyme-immunoassay. *J Virol Methods* 2: 63-69, 1980.
4. Hendry RM, Herzog LW and Herrman JE: Comparison of enzyme immunoassay with radioimmunoassay for the detection of hepatitis B surface antigen. *J Med Microbiol* 16: 11-116, 1983.
5. Geoghegan WD and Ackerman GA: Absorption of horse radish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscope level; A new method, theory and application. *J Histochem Cytochem* 25: 1187-1200, 1977.
6. Handley DA, Arbeeney CM, Witte LD and Chien S: Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes. *Proc Natl Acad Sci* 78: 368-371, 1981.
7. Kumiko S, Satoshi I, Yoshitsugu I, Toshi N, Kaoru S and Nobuo N: Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab. *J Clin Microbiol* 34: 1420-1422, 1996.
8. de Verdier KK, Espandiari J: Evaluation of an one-step test for rapid, in practice detection of rotavirus in farm animals. *Vet Rec* 138: 393-395, 1996.
9. Warren SB, Tomas BN, Steven RC: Designing a New Study: III. Diagnostic Tests. P. 87-89. In Stephen BH, Steven RC, Designing Clinical Research: An epidemiologic approach. Williams and Wilkins, Baltimore, 1980.