

세가지 효소면역측정 시약을 이용한 C형 간염 바이러스 항체 검사의 비교

영남대학교 의과대학 임상병리학과교실

조희순 · 문진영 · 이채훈 · 김경동

서 론

Choo 등(1989)에 의해 C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, 이하 HCV)의 유전자구조가 밝혀진 이후 혈청학적 검사법이 개발되면서 그 예민도 및 특이도를 높이기 위한 노력이 계속되고 있다. 현재 국내에서 C형 간염의 진단 및 헌혈자 선별검사용으로 주로 이용되는 검사법은 혈청내 항체를 검출하는 효소면역법(Enzyme immunoassay, 이하 EIA)으로 국내 대부분의 병원에서 2세대 및 3세대 진단 시약을 사용하고 있다(김신규 등, 1997). 2세대 시약은 비구조항원인 c100-3만을 함유한 1세대 시약의 주요 문제점이던 위양성과 위음성을 감소시키고자 구조 항원인 core항원과 NS3, NS4 비구조항원을 추가한 것인데, 2세대 시약 역시 위양성이 높은 것으로 보고되어 왔다(김대원과 지현숙, 1993; Leon 등, 1993). 최근에는 특이도를 더욱 향상시키기 위해 core항원과 NS3, NS4 부위의 빠진 항원을 보완하고 새로 NS5의 항원을 추가한 3세대 시약이 주로 사용된다.

국내에서도 1995년 이후로 많은 임상 검사실들이 3세대 EIA를 이용한 C형 간염 항체(이하 anti-HCV)검사를 시행하고 있으며 최근 수종의 시약

들이 국산으로 개발되어 있다. 각 검사방법이 보다 높은 예민도와 특이도를 가지고, 보다 간편하거나 자동화된 검사법들로 바뀌어 가는 추세이며, 보다 경제적이고 안정적인 시약공급이 가능한 검사법을 이용하게 되었다. 대한임상검사정도관리협회에서 실시하는 면역혈청검사 신빙도조사에서 해마다 C형 간염 항체검사 결과가 상이함에 따른 논란이 발생하고 있으며, 검사원리에 관계없이 제조회사간의 품질에 차이도 있음이 보고된 바 있다(김신규 등, 1997).

이에 저자들은 환자와 헌혈자의 검체를 대상으로 국내에서 개발된 3세대 효소면역측정 시약인 LG HCD 3.0(LG화학, 한국, 이하 LG)과 기존에 영남대학병원에서 사용하고 있는 Axsym® HCV version 3.0(Abbott, Germany, 이하 Axsym)과 Cobas® Core anti-HCV EIA(Roche, Australia, 이하 Cobas)를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 대상

세 가지 3세대 효소면역측정 시약의 일치율을 알아 보기위해서 영남대학교 의과대학 부속병원

* 이 논문은 1998년도 적십자 혈액원 연구비의 일부지원으로 이루어 졌음.

에 anti-HCV 검사가 의뢰되어 양성결과를 보였던 검체 50개와 1997년 헌혈자 중 82검체를 무작위로 선출하여 총 132개의 혈청을 검사시까지 -70℃에 보관하였다가 시료로 사용하였다. 또한 역전사 효소-중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR)에서 양성이고 anti-HCV 양성인 검체 5개를 각각 RT-PCR 음성이며 anti-HCV 음성인 검체로 1:5부터 1:320까지 2배수 연속희석한 검체를 대상으로 하여 각 검사시약의 민감도를 조사하였다.

2. 방법

1) 효소면역측정법

비교를 위해 사용한 시약은 모두 3세대 효소면역측정시약으로 유전자 제조법에 의해 제조되었으며, 각각의 항원구성은 다음과 같다.

LG HCD 3.0(LG화학, 한국)

: Core518(Core/NS3), E1E2NS4(E1E2/NS4), NS5
Axsym® HCV version 3.0(Abbott, Germany)

: HCr43(Core/NS3), c200(NS3/NS4), c100-3(NS3/NS4), NS5

Cobas® Core anti-HCV EIA(Roche, Australia)

: Core, NS3, NS4, NS5

LG 키트는 96 well microplate를 사용하는 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)이며, Axsym은 microparticle Enzyme Immunoassay(MEIA)이고, Cobas는 polystyrene bead를 사용하는 bead법이다. 모든 검사는 제조회사에서 지시된 방법에 따라 실시되었고, 결과판정은 검체의 흡광도가 판정기준치보다 낮으면 음성으로, 판정기준치 이상이면 양성으로 판정하였다. 각사의 제품마다 판정기준치가 다르므로 검체의 흡광도/판정기준치(signal/cutoff ratio, 이하 S/C로 약함)를 계산하여 비교하였다.

양성과 음성의 분별능력을 보기 위하여 양성검

체와 음성검체에 대한 3종 EIA 검사결과의 흡광도를 S/C비로 비교하였는데, 이때 양성검체는 3종 EIA에서 모두 양성을 보인 50 검체를, 음성검체는 모두 음성을 보인 74 검체를 대상으로 분석하였다.

2) 면역블로팅검사

세 가지 효소면역측정 시약에서 불일치를 보인 8검체를 대상으로 면역블로팅 진단시약인 LG HCD Confirm을 사용하여 확인검사를 시행하였다. LG HCD Confirm은 nitrocellulose strip에 유전자 재조합으로 제조한 5개의 상이한 항원 즉, core 14(핵항원단백), core518(핵항원과 NS3 항원의 융합단백), E1E2NS4(E1과 E2 막단백과 NS4 항원의 융합단백), KHCV897(NS3 항원 단백질), NS5 1.2(NS5 항원 단백질)을 따로따로 부동화시킨 것으로 제조회사에서 제시한 방법대로 검사를 시행하였으며, 각각의 밴드를 대조밴드와 비교하여 (-)에서 (4+)까지 점수를 매긴 후 밴드의 양상에 따라 결과를 판독하였다.

결 과

1. 세 가지 EIA 시약의 검사결과 일치율

132 검체를 세 가지 EIA 시약으로 anti-HCV 검사를 실시한 결과 모두 양성으로 일치된 결과를 보인 것은 56 검체였고, 모두 음성으로 판정된 검체는 74 검체로 일치율은 93.9%(124/132)이었다. 각각 두 시약간의 검사결과 일치율은 95.5-96.2%로 유사한 일치율을 보였다(표 1).

2. 세 가지 EIA 시약에 의한 검사결과의 흡광도 비교

양성과 음성의 분별능력을 보기 위하여 양성검체와 음성검체에 대한 3종 EIA 검사결과의 흡광도를 S/C비로 비교하였다(표 2). Cobas에서는 모든

Table 1. Comparison results between 3 EIA reagents(n=132)

EIA reagent		Test results(order: A,B)				Number	Concordance(%)
A	B	+,+	+,-	-,+	-,-		
LG*	Axsym [†]	50	3	2	77	127	96.2%
LG	Cobas [‡]	51	2	4	75	126	95.5%
Axsym	Cobas	51	1	4	76	127	96.2%

* LG HCD 3.0(LG Chemical Ltd, Korea)
[†] Axsym[®] HCV version 3.0(Abbott, Germany)
[‡] Cobas[®] Core anti-HCV EIA(Roche, Australia)

Table 2. Distribution of S/C ratio of negative and positive samples

S/C	anti-HCV negative samples(n=74)			anti-HCV positive samples(n=50)				
	0.0-0.49	0.5-0.79	0.8-0.99	1.0-1.99	2.0-2.99	3.0-3.99	4.0-4.99	≥5.0
LG	64	9	1	9	4	7	5	25
Axsym	63	11	0	0	0	1	0	49
Cobas	74	0	0	0	0	0	0	50

* S/C : Signal/Cutoff ratio

Table 3. Immunoblotting results of discordant samples

EIA results(S/C)			LG HCD confirm					Interpretation
LG	Axsym	Cobas	NS5 1.2*	KHCV897	E1E2NS4	Core518	Core14	
N(0.91)	P(93.8)	P(> 11)	3+	3+	3+	3+	3+	P [†]
P(1.73)	N(0.21)	N(0.36)	-	-	1+	1+	-	I [†]
N(0.06)	P(3.67)	N(0.02)	-	-	-	-	-	N [‡]
N(0.09)	N(0.30)	P(2.44)	-	-	-	-	-	N
N(0.19)	N(0.30)	P(1.92)	-	-	-	-	-	N
N(0.69)	N(0.30)	P(1.33)	-	-	-	-	-	N
P(1.23)	N(0.33)	P(1.12)	-	-	-	-	-	N
P(1.82)	N(0.59)	N(0.37)	-	-	-	-	-	N

* NS5 1.2; NS5 protein, KHCV897; NS3 protein, E1E2NS4; envelop/NS4 fusion protein, Core518; core/NS3 fusion protein, Core14; core protein

[†] P ; positive

[†] I ; indeterminate

[‡] N ; negative

음성검체의 S/C가 0.49이하였고 모든 양성검체는 5이상이었다. LG와 Axsym은 S/C가 0.8에서 1사이를, Cobas는 0.9에서 1.1사이를 재검을 필요로 하는 Gray Zone으로 보고있는데, LG에서는 음성검체중 한 검체에서 S/C가 0.88로 0.8에서 1사이값을 보였다. LG는 양성검체의 50%만이 5이상으로 다른 시약에 비해 S/C치가 비교적 낮게 나타났다.

3. 세 가지 EIA 시약에서 불일치를 보인 검체에서의 면역블로팅 검사 결과

세 가지 EIA 검사에서 불일치를 보인 8검체의 면역블로팅 검사 결과를 표 3에 요약하였다. LG에서만 음성을 보인 한 검체에서 양성 결과를 보였으며, LG에서만 양성을 보인 한 검체에서는 보류(indeterminate)결과를 보였다. Axsym에서만 양성을 보인 1례, Cobas에서만 양성을 보인 3례, LG에서만 양성을 보인 1례 그리고 LG와 Axsym에서 양성을 보인 1례에서는 음성으로 나타났다.

4. 민감도 비교

Cobas는 전 검체에서 1:320까지 양성을 보였으며, Axsym은 한 검체에서 1:320에서 음성을 보였다. LG는 한 검체에서 1:160부터, 두 검체에서 1:320에서 음성결과를 보였다.

고 찰

C형 간염 바이러스(HCV)는 1989년 Choo 등에 의해 그 구조가 밝혀졌는데 약 9,400개 정도의 핵산으로 구성된 RNA 바이러스로, HCV 유전자는 핵항원(core) 단백질부분과 막항원(envelope) 당단백부분을 포함하는 구조단백질부분과 flavivirus의 NS2-NS5에 상응하는 4개의 비구조 단백질 부분으로 이루어져 있다. 현재까지의 보고에 의하면 수

혈후 간염의 80-95%가 비-A, 비-B 간염 바이러스에 의해 발생되며, 수혈로 인한 비-A, 비-B간염의 75-90%가 HCV에 의한 것으로 알려져 있다 (Esteban 등, 1990).

HCV 감염의 진단은 크게 anti-HCV 항체검사와 HCV RNA를 직접 검출하는 RT-PCR 검사로 나눌 수 있다. RT-PCR은 HCV를 증폭시켜 직접 검출하므로 특이도와 예민도가 높기는 하나, 혈중바이러스 농도가 낮고 변이가 심한 HCV의 특성상 100%의 진단적 특이도와 민감도를 보인다고 생각하기는 어려우며, 간헐적으로 바이러스혈증을 보이거나 조직내에만 HCV RNA가 존재하는 경우에는 위음성 결과를 보일 수 있다. 또 무엇보다도 기술 및 시간적 요인, 그리고 고가의 시약과 장비가 든다는 제한점이 있어 헌혈혈액의 대량 선별검사나 통상 진단검사로 사용되기는 어렵다(Cha 등, 1991).

HCV는 RNA 바이러스이므로 replicase의 오류가 잦고 DNA 복제시 돌연변이가 일어날 가능성이 높기 때문에 HCV 지놈(genome) 자체가 유동성을 가지는 것으로 알려져 있다. HCV에 감염된 환자 자신의 체내에서조차도 HCV 지놈은 동일하지 않고 유사종으로 존재한다고 한다. 이때 돌연변이가 일어나기 전에 생성된 anti-HCV는 돌연변이 후의 HCV에 대한 중화 효과가 상실되며 따라서 anti-HCV와 HCV RNA가 대부분 동시에 존재하며 이것이 anti-HCV를 HCV 감염의 선별검사로 사용하는 이론적 근거이다(Takamizawa 등, 1991). 그러므로 EIA를 이용한 anti-HCV 검사는 공혈자의 선별검사와 간질환 환자의 감별진단에 사용되는 검사로 여겨진다.

침팬지의 혈장에서 혈액전파성 비-A, 비-B 간염 바이러스의 항원을 분리하여 유전자 재조합방식을 이용, 대량복제하는데 성공하여 이를 HCV로 명명한 이후(Choo 등, 1989), 유전자 재조합법을

이용한 바이러스 항원에 대한 항체진단법이 개발되어 비-A, 비-B형 간염의 진단에 이용되게 되었다(Kuo 등, 1989). NS3 부위의 비구조 항원인 C100-3항원을 이용한 1세대 EIA는 민감도가 낮고 cloning에 사용하는 세균의 단백질성에 대한 항체의 존재나 재조합 항원의 발현 등으로 인하여 위양성이 많고, 감염후 항 c100-3 항체 양성으로의 전환이 매우 늦어 심지어는 감염후 1년이 지나야 양성으로 전환된다는 보고도 있어(Alter 등, 1989) HCV 간염 진단에 이용하는데는 문제점이 많았다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 구조 항원인 core 항원과 NS3/NS4 비구조 항원을 복합하여 사용한 2세대 EIA 역시 위양성이 높은 것으로 보고되었다(Leon 등, 1993). 현재 시판되고 있는 3세대 EIA 시약은 core와 NS3, NS4 부위의 빠진 항원을 보완하였고 새로 NS5의 항원을 추가하여 대부분의 HCV 항원들이 포함되어 예민도와 특이도가 크게 향상되었음이 국내외에서 보고되고 있다(김현숙 등, 1994; 김대원 등, 1994; Uyttendaele 등, 1993).

그러나 대한임상검사정도관리협회에서 실시하는 면역혈청검사 신빙도조사에서 해마다 anti-HCV 검사 결과가 검사실간에 차이가 있으며, 검사원리에 관계없이 제조회사간의 품질이 차이가 남을 보고한 경우도 있었다(김신규 등, 1997). 그러므로 새로 시약을 개발하거나, 새로운 시약을 도입하고자 할 때 기존 시약들과의 일치도를 알아보는 것이 바람직하고 또 필수적인 과정으로 여겨진다(박규은 등, 1996). 본 연구 결과 Cobas가 모든 음성검체의 S/C가 0.49 이하, 모든 양성검체의 S/C가 5 이상으로 가장 분별력이 좋았으며, 희석한 검체에서 모두 1:320까지 양성을 보여 가장 민감도가 높은 것으로 보였으나, 불일치를 보인 8례 중 4례에서 위양성을 보여, 분별력과 민감도가 좋은 반면 약간 높은 위양성률을 보였다. LG는 희

석 검체에서 1례를 제외하고는 1:160까지 양성을 보였으며, AxSYM, Cobas와 96.2%, 95.5%로 우수한 일치율을 보여 선별검사로 사용하기에는 무리가 없을 것으로 생각되었다. 그러나 다른 두 검사에 비해 비교적 분별력이 낮아, 양성 50%에서 S/C가 5 이하의 값을 보였으며, 음성을 보인 검체 1례에서 제조사가 재검이 요구되는 'Gray zone'으로 제시하는 0.8과 1.0 사이값인 0.88을 나타냈다.

검사 결과가 일치하지 않는 경우의 해석에 어려움이 있는데, RT-PCR을 기준으로 할 때 RT-PCR 역시 전술한 제한점들이 있고, 면역반응이 개개인마다 차이가 있어서 HCV-RNA는 존재하면서 anti-HCV는 음성인 seronegative window 시기에는 결과가 다를 수 있으며, anti-HCV 양성인 검체에서 HCV RNA가 검출되지 않을 수도 있다(Takamizawa 등, 1991; 이창훈 등, 1997). 현재까지 anti-HCV 검사에 대해 표준이 될 만한 검사는 없으나 선별검사에 양성일 경우 재조합 면역블로팅 검사(Recombinant immunoblotting assay, 이하 RIBA)가 사용되고 있는데, PCR의 바이러스혈증 상태 또는 HCV의 감염성여부와 높은 상관관계를 보인다고 알려져 있어 현재까지는 anti-HCV 양성 결과의 확인 검사로 인정되고 있다(Cuthbert, 1994; Bresters 등, 1993). 본 연구에 사용한 LG HCD Confirm은 현재까지 기준 검사로 생각되던 Ortho사의 RIBA II와 비교하여 판정상 양성과 음성의 구별이 분명하고 보류(indeterminate)가 가장 적어서 해석이 편리하며, PCR과의 연관성도 높았으며, 예민도, 특이도 및 양성예측도가 각각 99.2%, 76.4%, 90.5%로 우수한 것으로 보고되고 있어(김현숙 등, 1994; 김대원 등, 1994) 확인 검사로 사용되고 있다. 본 연구에서 세 가지 EIA 시약에서 불일치를 보인 검체의 면역블로팅 검사 결과 위양성을 보인 검체의 S/C는 1에서 4 사이이고, 위양성을 보인 1례에서는 0.91로 나타나 S/C가 0.8에서

4 사이인 경우 면역블로팅검사로 확인할 필요가 있다고 본다. 그러므로 검사실마다 검체의 양성율과 사용 목적을 고려하여 anti-HCV 키트시약을 선정하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

3세대 EIA를 이용한 anti-HCV 검사는 2세대 EIA에 비해 예민도와 특이도가 향상되었으나, 여전히 제조회사간에 서로 상이한 결과를 보이는 경우가 많았다. 저자들은 국산 3세대 anti-HCV 검사 시약인 LG HCD 3.0과 기존 영남대학교 의과대학 부속병원에서 사용하고 있는 Axsym HCV version 3.0, Cobas Core anti-HCV EIA와 비교하였다. Cobas 키트가 분별력과 민감도는 높았으나 상대적으로 위양성률이 높은 경향을 보였다. LG 키트는 희석 검체에서 1례를 제외하고는 1:160까지 양성을 보였으며, 다른 두 종의 anti-HCV 키트와 우수한 일치율을 보였으나, 다른 두 키트에 비해 비교적 분별력이 낮아 양성률의 50%에서 S/C가 5이하의 값을 보였다. 위양성을 보인 검체의 S/C는 1에서 4사이이고, 위음성을 보인 1례에서는 0.91로 나타나 S/C가 0.8에서 4사이인 경우 면역블로팅검사로 확인할 필요가 있다고 생각되므로 검체의 양성율과 사용목적을 고려하여 시약을 선정하여야 할 것이다.

참 고 문 헌

김대원, 지현숙: C형 간염 항체 검출을 위한 효소 면역측정법 진단시약의 비교 평가. 대한수혈학회지 4: 75-81, 1993.
김대원, 권석운, 지현숙, 김인수: C형 간염 항체

검출을 위한 제3세대 효소면역측정법과 확인 검사의 평가. 대한수혈학회지 5: 115-126, 1994.
김신규, 김덕연, 김병철, 김재룡, 김현숙, 박명희, 박애자 등: 면역혈청검사 신빙도 조사 결과보고 (1997). 임상병리와 정도관리 20: 63-109, 1998.
김현숙, 정석훈, 권오현, 홍석현, 예병일, 한광협, 박상진: 제3세대 효소면역법 C형 간염 진단용 국산시약 HCD 3.0과 RIBA 및 HCV-RNA 결과. 임상병리와 정도관리 16: 307-316, 1994.
박규은, 김현숙, 권오현: C형 간염 항체 검출용 제3세대 효소면역측정법 동아 HCV 3.0의 평가. 임상병리와 정도관리 18: 385-392, 1996.
이창훈, 박덕우, 이미경, 윤갑준: C형 바이러스 검출을 위한 중합효소연쇄반응의 임상적 응용. 임상병리와 정도관리 19: 197-208, 1997.
Alter HJ, Purcel RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 321: 1494-1500, 1989.
Bresters D, Zaaier HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Exel-Oehlers PJ, Drimmelen AA, et al.: Recombinant immunoblotting assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. Transfusion 34: 130-134, 1993.
Cha TA, Kolberg J, Irvine B: Use of a signature nucleotide sequence of hepatitis C virus for detection of viral RNA in human serum and plasma. J Clin Microbiol 29: 2528-2534, 1991.
Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. Science 244: 359-

- 362, 1989.
- Cuthbert JA: Hepatitis C: Progress and problem. Clin Microbiol Rev 7: 505-532, 1994.
- Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, Viladomiu L, Sauchez C, Lopez Talavera JC, Lucea D, et al.: Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. N Engl J Med 323: 1107-1112, 1990.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, et al.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. Science 244: 362-364, 1989.
- Leon P, Lopez JA, Domingo C, Echevarria JM: Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. Transfusion 33: 268-270, 1993.
- Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, et al.: Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. J virol 65: 1105-1113, 1991.
- Uyttendaele S, Claeys H, mertens W, Verhaert H, Vermynen C: Evaluation of third generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. Vox Sang 66: 122-129, 1994.

— Abstract —

Comparison of Three Third-Generation Anti-HCV Enzyme Immunoassay Tests

Hee Soon Cho, Jin Young Moon, Chae Hoon Lee, Kyung Dong Kim

*Department of Clinical Pathology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

The aim of this study was to evaluate domestic enzyme immunoassay(EIA) kit 'LG HCD 3.0'(LG) for the detection of antibody to hepatitis C virus(anti-HCV) in comparison with Axsym HCV version 3.0(Axsym), Cobas Core anti-HCV EIA(Cobas). Cobas kit shows better clear distinction between positive and negative by signal/cutoff ratio(S/C), but it also reveal relatively high false positive rate. The concordance rate of test results between LG and Axsym was 96.2%, between LG and Cobas was 95.5%, and total agreement between three EIA kit was 93.9%. LG were relative poor distinction between positive and negative results, but it could be applied clinically as a screening tool for hepatitis C in general population. The S/C of one false negative result by LG was 0.91, and false positive were less than 4.0, therefore we concluded it is necessary to confirm by immunoblotting assay when S/C were between 0.8 and 4.0.

Key Words: Hepatitis C virus, Anti-HCV, Third-generation enzyme immunoassay