

컴퓨터 상 분석을 이용한 HBsAg-screening용 Rapid Immunochromatographic Assay Kit의 정량적 측정법

신형순·허태련*
인하대학교 생물공학과

(접수 : 2000. 4. 20., 게재승인 : 2000. 6. 21.)

Quantitative Method of Rapid Immunochromatographic Assay Kit for HBsAg-screening using Computer Image Analysis

Hyeong-soon Shin and Tae-ryeon Heo†

Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2000. 4. 20., Accepted : 2000. 6. 21.)

One of recent topics in the case of hepatitis B virus(HBV) is the value of hepatitis B surface antigen(HBsAg) concentration as a prognostic marker. We developed quantitative method of rapid immunochromatographic assay(ICA) kit for HBsAg using computer image analysis(CIA) for the purpose of home diagnosis. Quantitative ICA using CIA demonstrated integrated optical density(OD) values proportional to log of reference HBsAg concentrations in the range of 2~200 ng/mL, and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) demonstrated the same in the range of 0.1~100 ng/mL, however, the test results with sample sera showed the same concentrations on both kits. Furthermore, repeated tests with the same samples revealed that this quantitative ICA using CIA would be reproducible and coefficient of variation(CV) of the results was 1.38~6.30%.

Key Words : HBsAg, Immunochromatographic assay, Quantitative method and Computer imaging analysis

서론

B형간염은 B형간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)가 그 원인균인데(1) 감염 여부는 혈청 중에 HBV의 표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg)의 유무로 판정한다(2). HBsAg는 다시 4 종류의 subtype, 즉 adr, ayr, adw, ayw 등으로 나뉘는데(3) B형간염의 진단은 주로 공통항원인 'a'에 대한 검사로 이루어진다(4). 1980년도 초반에, 진단에만 그치지 않고 HBsAg의 혈청 중 농도에 따라 감염의 예후를 판정하려는 연구가 활발히 진행되었으나 실험자에 따라 상반된 결과를 발표하였는데 Frosner 등(5)은 300여명의 혈청을 조사하여 급성간염의 경우에는 첫 양성 판정 후 20일 이내에 HBsAg의 혈청 중 농도가 반감한다고 하였고 Nisevich 등(6)은 31명의 환자를 조사하였으나 감염과 HBsAg 농도 사이에는 어떤 상관관계를 확인할 수 없었다고 발표하였다.

1990년도에 들어 HBsAg 농도 외에도 pre-S1 Ag과 pre-S2 Ag의 역가를 측정하여 좋은 상관관계를 확인하였고(7) Nikiforov(8)는 말초혈액의 HBsAg과 Anti-HBs 농도가 예후(prognosis)판정의 지표로 사용될 수 있다고 하였다.

면역크로마토그래피 측정법(Immunochromatographic assay: ICA)은 그 신속·간편함 때문에 신속시험(rapid test)이라고도 불리는데(9), 절차가 간단하고 결과가 신속하게 나타나기 때문에 각종 체액을 이용한 검사에 많이 이용되고 있다. 그 원리는 검체 중에 들어 있는 항원이 금입자(gold particle)에 결합된 표식항체(tracer antibody)와 반응한 다음 모세관현상에 의해 니트로셀룰로스(nitrocellulose, NC)막의 미세구멍(micropore)을 통하여 이동하는 도중에 미세구멍의 내부 표면에 고정되어 있는 포획항체(capture antibody)와 결합하여 발색띠를 형성함으로써 양성·음성을 육안으로 판별하는 것이다. 따라서 그동안은 정성용으로만 사용되었으나 Amerongen 등(10)에 의하여 computer image analysis (CIA) 기법을 ICA kit 판독에 응용하면서 정량적인 사용이 가능하게 되었다.

필자 등은 면역크로마토그래피 측정법을 이용한 HBsAg의 진단 kit를 개발하였으며(11), 이를 정량적인 용도로 사용 가능할지를 확인하기 위하여 assay strip 판독에 CIA기법을 도입하여 HBsAg에 대한 정량적 진단을 시도하였다.

†Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Institute of Industrial Biotechnology Inha University, Incheon 402-751, Korea

TeI : 032-860-7511, Fax : 032-875-0827

E-mail : theo@inha.ac.kr

재료 및 방법

혈청 샘플 수집

고대 의대 구로병원을 내원한 환자들로부터 채혈하여 효소면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, Enzygnost HBsAg, Behringer Mannheim, 독일)에 의하여 결과가 양성으로 판정된 혈청을 수집하였다.

HBsAg 진단용 ICA kit의 제조

Pore size 0.8 μm 의 NC막(S&S사, 독일)에 Bioject dispenser (BIODOT사, 미국)로 1 mg/mL의 goat anti-HBs(Jackson Lab사, 미국) 용액을 분사하여 선을 긋고 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온기에서 하룻밤 동안 정치시켜 항체를 막에 고정시켰다. 대조선에는 goat anti-mouse IgG(Jackson Lab사, 미국)를 사용하였다.

금입자·항체 결합체를 완충액에 현탁한 후 glass fiber filter (Whatman, 독일)에 적시고 37 $^{\circ}\text{C}$ oven에서 3시간 건조시켰다. 이어서 Backing plate에 고정된 NC막, conjugate pad 및 아래와 위쪽에 흡습여지를 lamination module(BIODOT사, 미국)을 사용하여 붙이고 절단기를 사용하여 0.6 mm의 폭으로 절단하여 assay strip을 제조하였다.

ELISA kit를 이용한 정량시험

General Biologicals(대만)의 SURASE B-96을 이용하여 HBsAg 표준용액을 사용법대로 시험하여 HBsAg 농도의 log값에 대한 optical density(OD)값의 표준곡선을, 그리고 검체의 HBsAg 농도를 계산하였다. 검체는 표준곡선내의 비례 범위내에 포함되도록 0.01% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 포함된 phosphate-buffered saline(PBS)으로 200배 희석하였으며 HBsAg 표준용액은 독일의 Paul-Urlhich Institute로부터 구입한 것인데 이것을 0.01% BSA가 포함된 PBS로 2배 연속 희석하여 각기 다른 농도의 HBsAg 표준용액을 준비하였다.

컴퓨터 상 분석(CIA)기법을 이용한 정량시험

Image analysis system을 이용한 ICA의 정량법을 개발하기 위하여 색깔의 농도를 정량화하는데 컴퓨터 상 분석의 이용 가능성을 알아 보았다. 위의 HBsAg 표준용액을 160 μL 씩 assay strip에 가하고 별도의 assay strip에 검체를 가하여 반응시켰다. 반응을 완료시킨 뒤 건조된 strip을 video camera로 촬영하고 image analysis system (ImageMaster VDS; Pharmacia)을 이용하여 양성선(test line)의 integrated optical density(IOD)를 구한 후 HBsAg 농도의 로그값에 대한 표준곡선을, 그리고 검체의 HBsAg 농도를 계산하였다.

CIA를 이용한 정량법의 재현성

CIA를 이용한 정량법이 반복적으로 동일한 결과를 나타내는 가 확인하기 위하여 3개의 검체를 100배 희석하여 5회 반복 시험하고 평균, 표준편차 및 변이상수(coefficient of variation, CV)를 구하여 CIA 기법을 이용한 정량법의 재현성을 검토하였다.

결과 및 고찰

ELISA kit를 이용한 정량시험

General Biologicals(대만)의 SURASE B-96을 이용하여 표준용

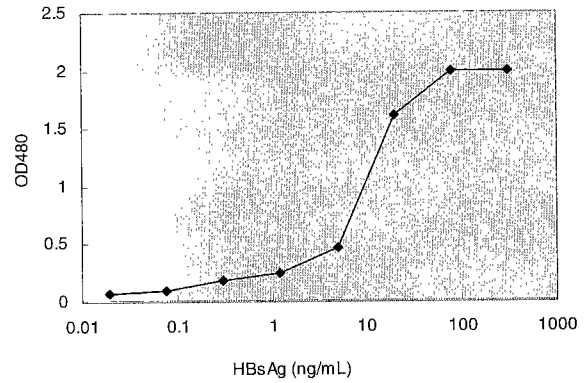


Figure 1. Standard curve of ELISA for HBsAg obtained by spectrophotometer.

액을 시험하고 HBsAg 농도의 log값에 대한 OD값의 표준곡선을 그렸고(Figure 1) 여기에 3개의 혈청 검체의 OD값을 대입하여 HBsAg 농도를 구하였을 때 각각 9,000, 7,000, 4,000 ng/mL으로 나타났다.

컴퓨터 상 분석(CIA)을 이용한 정량시험

Assay strip에 2배 연속 희석된 HBsAg 표준용액을 가하여 반응시킨 결과 Figure 2와 같은 양성선이 나타났다. 육안으로 관찰하였을 때에도 HBsAg 농도가 높을수록 선의 색깔이 짙었으며 농도가 낮을수록 색깔이 옅어지다가 2 ng/mL에서는 희미한 흔적만을 나타내었다. 이 양성선의 IOD값을 image analysis system을 이용하여 구하고, 이 값과 HBsAg 농도의 로그값을 이용하여 표준곡선을 작성한 결과는 Figure 3와 같다. 그래프에서 보듯이 2 ng/mL에서 250 ng/mL의 HBsAg 농도 범위 내에서 그 농도가 증가함에 따라 IOD값도 증가함을 나타내었다. 또한 고대 의대 구로병원에서 수집한 3개의 혈청 검체는 IOD값이 각각 146, 125, 80이었는데 이 값을 표준곡선에 적용하여 농도를 추정하면 각각 9,000, 7,000, 4,000 ng/mL이었다. B형간염 항원농도를 병세의 예후(prognosis)를 판정하는 지표로 사용할 수 있을 만큼 간염을 정량적으로 진단하는 것은 대단히 중요하다(12). 특히 기계의 도움없이도 시험이 가능한 ICA kit를 시험이 끝난 후 CIA 기법으로 IOD값을 측정하여 간염항원농도를 정량화 한다면 computer가 있는 장소라면 어느 곳에서나 정량적 자가진단이 가능하다고 할 수 있고 만성간염환자는 집에서 손쉽게 간염의

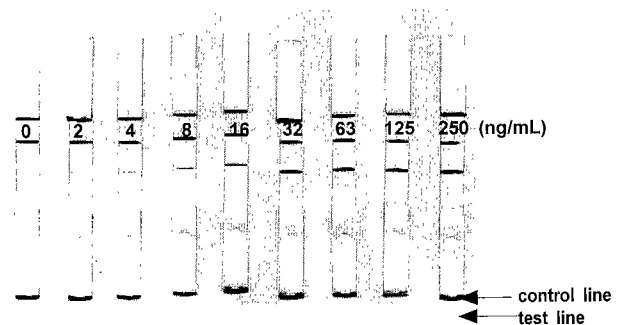


Figure 2. Results of immunochromatographic assay for the detection of HBsAg. Goat anti-mouse IgG and goat anti-HBs were immobilized on the control line and the test line, respectively.

Table 1. 반복 시험에 의한 CIA를 이용한 정량법의 재현성

시료 / 차수	1/1	1/2	1/3	2/1	2/2	2/3	3/1	3/2	3/3
IOD	1.815	1.954	1.923	1.412	1.443	1.394	0.795	0.895	0.931
	1.792	1.879	1.876	1.3997	1.479	1.452	0.839	0.942	0.957
	1.862	1.834	1.916	1.387	1.365	1.436	0.725	0.952	0.912
	1.847	1.954	1.877	1.422	1.381	1.413	0.842	0.915	0.953
	1.826	1.825	1.854	1.436	1.366	1.414	0.764	0.971	0.971
평균	1.8284	1.8892	1.8892	1.4108	1.4068	1.4218	0.7930	0.9350	0.9448
표준편차	0.0273	0.0625	0.0292	0.0195	0.0519	0.0225	0.05	0.0301	0.0233
변이계수(%)	1.49	3.31	1.55	1.38	3.66	1.58	6.30	3.22	2.47

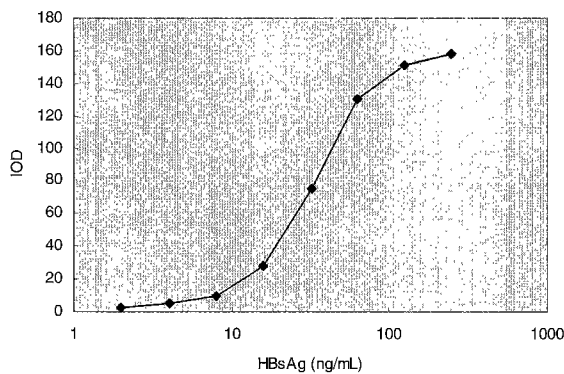


Figure 3. Standard curve of ICA for HBsAg obtained by computer image analysis.

진행 정도를 파악할 수 있다. Birnbaum(13) 등은 latex 입자를 이용한 ICA kit로 항원을 분석할 때 검체에 포함되어 있는 항체량의 log값에 비례하여 양성선의 색깔이 진하게 나타난다고 하였는데 본 연구에서도 Figure 1과 같이 항원농도가 높을수록 진하게 나타났으며 이것을 그래프로 그렸을 때 Birnbaum의 결과와 마찬가지로 농도의 log값에 비례하는 그래프를 구할 수 있었다. 또한 이때의 검출한계도 Laitinen 등(14)이 progesterone의 경우 5 ng/mL이라고 보고한 것과 비슷한 2 ng/mL이었다. ELISA kit를 이용한 정량시험과 CIA기법을 이용한 정량시험을 비교하였을 때 ELISA kit는 0.1~100 ng/mL의 농도 범위 내에서 항원농도의 log값에 비례하는 OD값을 나타내었고(Figure 1) ICA kit는 2~200 ng/mL 범위 내에서 항원농도의 log값에 비례하는 IOD값을 나타내어(Figure 3) 두 방법이 유사한 그래프 모양을 보였으나 ELISA kit의 검출한계가 ICA kit보다 10배 가량 높기 때문에 ELISA kit가 더 낮은 농도에서도 비례하는 모양을 나타내었다(Figure 1). 또한 각각 검체 번호에 따라 ELISA kit와 ICA kit의 결과가 동일하게 9,000, 7,000, 4,000 ng/mL의 항원농도를 나타내었는데 Frosner 등(5)에 의하면 이 농도는 건강한 보균자들이 나타내는 혈중 HBsAg 농도라고 한다.

CIA를 이용한 정량법의 재현성

3개의 검체를 5회 반복 시험하여 얻어진 IOD값의 평균, 표준편차 및 변이상수(coefficient of variation)를 구하였는데 Table 1에서 보듯이 CV값이 1.38~6.30% 이내였다. Amerongen 등(15)은 CIA기법을 이용한 정량법의 재현성을 hCG kit로 시험하여

항원농도에 따라 약간씩 다르지만 CV가 약 1.03~5.28% 이내였다고 보고하였는데 본 연구에서도 이와 비슷하여 1.38~6.30% 이내의 CV값을 얻을 수 있었다(Table 1). 따라서 CIA기법을 이용한 HBsAg-ICA kit 정량시험은 기존의 방법들보다 간편하고 신속할 뿐만 아니라 재현성있게 B형간염에 대한 자가진단이 가능하도록 해 주는 새로운 정량적 측정법이다.

요 약

B형간염 바이러스 연구에 관한 최근의 주제는 혈중 B형간염 표면항원농도(HBsAg)를 예후 판정의 지표로 활용하는 것이다. 본 연구에서는 B형간염에 대한 자가진단을 목적으로 하여 컴퓨터 상 분석 기법을 사용하는 HBsAg에 대한 정량적 면역크로마토그래피 측정법을 개발하였다. 본 방법을 사용하였을 때 측정된 integrated optical density(OD)는 2~200 ng/mL의 범위 내에서 표준 HBsAg 농도의 log값에 비례하여 증가하였는데, ELISA 측정법은 0.1~100 ng/mL의 범위 내에서 표준 HBsAg 농도의 log값에 비례하여 증가하였다. 3개의 혈청 검체를 가지고 두 가지의 측정법으로 각각 시험하여 표준곡선에 대입하였을 때 동일한 농도를 나타내었는데 그 값이 각각 9,000, 7,000, 4,000 ng/mL이었다. 또한 컴퓨터 상 분석 기법을 사용하는 HBsAg에 대한 정량적 면역크로마토그래피 측정법으로 동일 검체를 5회 반복 시험하였을 때 측정된 IOD값이 재현성이 있었으며, 변이계수가 1.38~6.30% 이내였다.

REFERENCES

- Nordenfelt, E. (1975), Some epidemiological and clinical aspects of hepatitis B antigen and its subtypes, *Scand. J. Infect. Dis.*, **7**, 147-152.
- Luengrojankul, P., H. Ohnuma, K. Tachibana, S. Usuda, H. Okamoto, T. Tanaka, F. Tsuda, A. Machida and M. Mayumi (1990), Common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen particles: susceptibility to reduction and/or alkylation evaluated with monoclonal antibodies, *Jpn. J. Exp. Med.*, **60**, 253-261.
- Swenson, P. D., J. T. Riess and L. E. Krueger (1991), Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies, *J. Virol. Methods*, **33**, 27-38.
- Petrilli, F. L., P. Crovari, and S. De Flora (1975), Quanti-

- tative detection and typing of HBsAg and anti-HBs by radioimmunoassay techniques., *Dev. Biol. Stand.*, **30**, 103-110.
5. Frosner, G. G., H. Schomerus, K. H. Wiedmann, R. Zachoval, B. Bayerl, U. Backer, G. A. Gathof and U. Sugg (1982), Diagnostic significance of quantitative determination of hepatitis B surface antigen in acute and chronic hepatitis B infection, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **1**, 52-58.
 6. Nisevich, N. I., I. I. Zubikova, G. V. Chaplygina, A. A. Romaniukha, V. A. Konev (1989), Significance of quantitative indicators of HBsAg in the pathogenesis and outcome of a malignant form of viral hepatitis B in children, *Pediatrics*, **7**, 14-20.
 7. Zoulim, F., L. Mimms, M. Floreani, C. Pichoud, I. Chemin, A. Kay, L. Vitvitski and C. Trepo (1992), New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection, *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1111-1119.
 8. Nikiforov, N. D., B. I. Sanin, G. S. Nikiforova, E. S. Saiapina, L. V. Novikova, I. A. Il'inskii and A. F. Popov (1996), Profiles of serological markers of HBV-infection in acute hepatitis B, *Klin. Med.(Mosk)*, **74**, 16-18.
 9. Cole, R. A., H. M. Lu, Y. Z. Shi, J. Wang, De-Hua T. and A. T. Zhou (1996), Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis on patients with pulmonary tuberculosis in China, *Tuber. Lung Dis.*, **77**, 363-368.
 10. van Amerongen, A., J. H. Wichers, L. B. Berendsen, A. J. Timmermans, G. D. Keizer, A. W. van Doorn, A. Bantjes and W. M. van Gelder (1993), Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analysis of results, *J. Biotechnol.*, **30**, 185-195.
 11. Shin, H. S., Y. B. Kim, J. W. Shin, C. K. Kim, W. S. Lee, H. K. Kim, and K. S. Shin (1997), The evaluation of immunochromatographic assay kit for rapid detection of hepatitis B surface Antigen, *J. Virol.*, **27**, 137-141.
 12. Grob, P. J. and H. I. Joller-Jemelka (1995), Progress in hepatitis diagnosis, *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, **84**, 547-554.
 13. Birnbaum, S., C. Uden, C. G. Magnusson and S. Nilsson (1992), Latex-based thin-layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes, *Anal. Biochem.*, **206**, 168-171.
 14. Laitinen, M. P., M. Vuento (1996), Immunochromatographic assay for quantitation of milk progesterone, *Acta. Chem. Scand.* **50**, 141-145.
 15. van Amerongen, A., D. van Loon, L. B. Berendsen and J. H. Wichers (1994), Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay, *Clin. Chim. Acta.*, **229**, 67-75.