

RIA, Recombinant Immunoblot Assay 및 Nested RT-PCR에 의한 C형 간염바이러스 검출

단국대학교 미생물학과, 단국대학교 의과대학 임상병리학교실¹

김재수 · 김종완¹ · 이연태

=Abstract=

Detection of Hepatitis C Virus by RIA, Recombinant Immunoblot Assay and Nested RT-PCR

Jae-soo Kim, Jong-Wan Kim¹ and Yun-Tai Lee

*Department of Microbiology, Department of Clinical Pathology, College of Medicine¹,
Dankook University, Chonan, Korea*

Hepatitis C virus (HCV) is one of the important human pathogen that can cause acute and chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Recently, the third generation radiation immuno assay (RIA) method has been developed as a very sensitive test to detect anti-HCV antibody. However, false positive is the problem with RIA test. To solve this the RIA results were compared to those of 5-antigen recombinant immunoblot assay (5-RIBA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Among 12,767 serum samples tested from clinic visitors, total 275 (2.2%) samples were antibody positive by RIA.

RIBA was performed with 148 RIA positives cases but among them was shown eighty five was antibody positive and sixty three (42.6%) was negative result. However, nested RT-PCR test was shown also carried out with 43 positive, 6 intermediates and 25 negatives of RIBA. As a result of the nested RT-PCR results, HCV antigen were detected in RIBA positive, 33.3% (2/6) RIBA intermediate and 12% (3/25).

Clinical syndrome of all 148 patients as a with chronic active hepatitis (46.0%), cirrhosis (18.9%), hepatocellular carcinoma (8.1%) and others (27.0%) and they were positive in reaction by RIA test. But RIBA positive patients with 34.9% of chronic active hepatitis, 18.6% of cirrhosis, 4.6% of hepatocellular carcinoma and 41.9% of others were detected to be positive case by nested RT-PCR.

Key Words: Hepatitis C virus, 5-antigen recombinant immunoblot assay, RT-PCR

서 론

Hepatitis C virus (HCV)는 크기가 80 nm 이하의

작은 바이러스로서 1989년 Choo 등 (13)에 의해 그 genome의 구조가 밝혀졌는데 (Figure 1) 유전자의 길이는 약 10 kb 정도이고, 약 3,010~3,033개의 아미노산으로 이루어진 large polyprotein을 cod-

접수 : 2000년 6월 30일, 논문게재확정 : 2000년 8월 1일

*; Corresponding author: 이연태, 330-714, 충남 천안시 안서동 산 29번지, 단국대학교 기초과학부 미생물학과
Tel: 041) 550-3456, e-mail: lyt@anseo.dankook.ac.kr

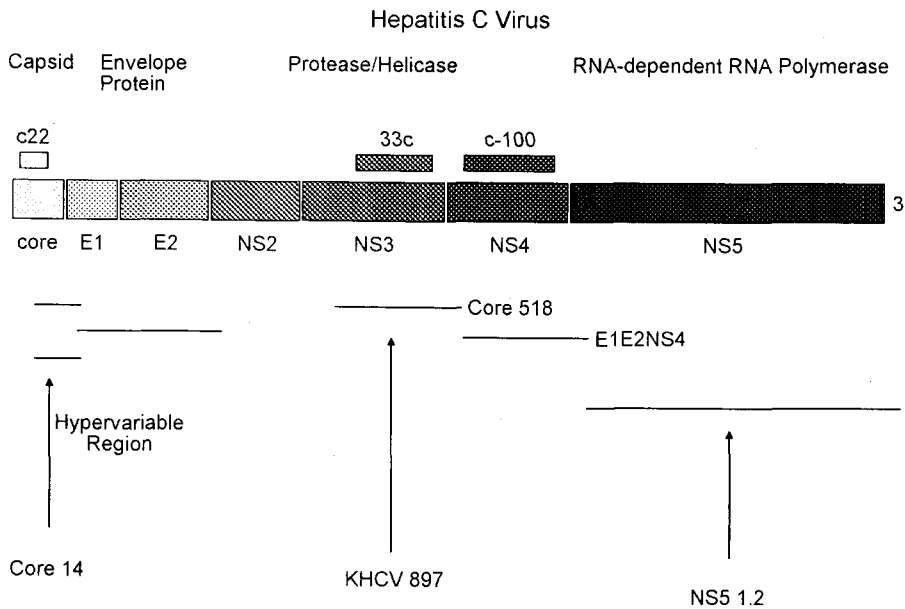


Figure 1. Molecular structure of hepatitis C viral genome.

ing하는 하나의 positive-stranded RNA genome을 지니고 있다. HCV의 genomic sequence 및 polyprotein을 기존의 다른 virus들과 비교해본 결과 flavivirus 및 pestivirus에 가까운 유사성을 나타내어 최근에는 flaviviridae의 새로운 genus로 분류하고 있으며, 다양한 변이형이 존재하고 지역에 따라서 주요 변이형 HCV의 분포양상이 다른 것으로 알려져 있다 (6,25,26).

HCV는 수혈 후 간염의 80~90%를 차지하는 non-A, non-B형 간염으로 주로 수혈에 의해 감염되는 것으로 알려져 있다. HCV는 산발성 간염의 50%를 차지하며 HBV 보다 임상경과가 완만하게 진행되지만 만성간염으로의 이행은 6~10% 정도인 B형 간염에 비해 50% 정도라는 보고 (2,10,17)가 있으나 이후 혈액이나 간세포의 HCV RNA를 증폭하여 검사를 한 보고에서는 80~90%가 만성으로 진행된다는 보고도 있다 (8). 만성 C형 간염은 B형 간염처럼 스스로 바이러스 증식이 정지되고 간기능이 좋아지는 경과로 넘어가는 경우가 극히 드물고 (2% 이하) 결국 간경변 및 간암으로 발전하게 되는데 말기의 간질환이나 간암으로 진행시 개인적인 차이는 있지만 20~30년안에 간경변으로 진행된다고 알려져 있는, 간세포암의 중요한 원인 인자이다 (18,22,27,28). 감염의 위험성은 장기이식 수혜자와 AIDS 환자에서 증가하고, 특

히 신장이식 환자의 20%에서 HCV에 감염되고 있다 (16,20,21). 모든 면역 억제된 그룹에서 anti-HCV 항체는 검출이 안되므로 진단은 HCV RNA에 대한 검사를 필요로 한다.

1989년 Choo 등 (13)에 의해 처음 소개된 유전자 재조합 방법으로 cloning된 c100-3 (NS3와 NS4일부) 이후로 HCV genome의 core, NS2, NS3, NS4 및 NS5 부위로부터 유전자 재조합법 (7)이나 또는 단백질합성법에 의해 얻어진 여러 단백질항원들이 anti-HCV 항체검출에 이용되어 HCV의 진단에 이용되고 있다. HCV의 비구조 단백질인 c100-3을 이용한 제1세대 효소면역측정법 (Enzyme immunoassay, EIA) (7) 및 방사선 동위원소법 (Radiation immuno assay, RIA)은 예민도가 낮고, cloning에 사용하는 세균의 단백질성분에 대한 항체의 존재나 재조합 항원의 발현, HCV에 관계 있는 항원결합 부위에 대한 항체의 교차반응 등으로 인한 위양성 (False positive)이 많다. 그후 c100-3에 core와 비구조 단백질인 NS3/NS4의 항원으로 조합하여 제조한 제2세대 검사시약이 개발되었으며 (4), 최근에는 core 부위와 NS5 부위가 추가되어 대부분의 HCV 항원들이 포함된 제3세대 EIA 및 RIA 검사시약이 개발되었다. 이와 같은 노력에도 불구하고 anti-HCV 항체검사만으로는 급성기의 HCV 감염을 진단하기 어렵고, 급성감염 후 만성간염으로

이행하지 않고 항체발현까지 평균 22주의 소위 'window period'가 존재하여 급성기의 진단의 어려운 점이 있으며, 회복기에도 지속적으로 항체 양성을 보이므로 과거의 감염과 현재의 활동성 감염을 구분할 수도 없다. 일부 지속적인 바이러스 증식이 동반된 감염상태를 확인하기 위하여 4-antigen recombinant immunoblot assay (4-RIBA)가 이용되고 있기는 하지만 (23,31) 역시 RT-PCR을 이용하여 혈청내 HCV의 RNA를 검출한다면 HCV의 초기진단을 가능케 하며, 이전의 간염과 현재의 활동성 간염 상태를 구분해 줄 수 있을 뿐만 아니라, 치료 후 추적 관찰에 있어서 필수적인 검사법으로 알려지고 있다 (24). 항체분석의 결과는 현재의 급성, 만성감염 그리고 과거에 감염되었으나 현재는 완치된 경우 등의 차별성에 대한 근거를 제공할 수 없으나 HCV-PCR은 이러한 차이의 결과 해석이 가능하다 (24). anti-HCV 양성이면 HCV-RNA가 혈중에 존재할 가능성이 높음을 시사하는 소견으로 사료되는 반면, anti-HCV가 음성 이면서 HCV-RNA가 검출되는 환자들도 20% 정도 발견되기 (1) 때문에 anti-HCV 검사만으로 HCV 감염을 확진할 수는 없다. 그러므로 환자의 감염상태를 평가하는데 있어 anti-HCV 검사뿐만 아니라 RT-PCR법을 추가 검사함으로써 HCV RNA 존재 여부를 확인하는 것이 필수적이다. 따라서 RT-PCR법에 의한 C형 간질환의 진단은 임상적으로 중요한 보조검사법이 되며, 특히 anti-HCV 양성인 환자에게 HCV RNA의 존재여부나 항체가 형성되지 않은 환자에게도 진단이 가능하며, 인터페론 치료시 용량과 치료기간을 예측하는데 유용하고 (16,21) 출산시 신생아 감염을 추적하는데도 유용하게 사용될 수 있다 (1).

이에 본 연구에서는 RIA법을 이용한 제3세대 HCV antibody immunoradiometric assay (IRMA)와 5-RIBA 방법을 이용한 항체검사를 nested RT-PCR을 이용한 방법과 비교하여 각 실험방법들간의 연관성을 비교하는 한편 또한 각 질환별 임상 진행양상을 조사 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1997년 1월부터 1999년 8월까지 천안지역 대학 병원에 내원한 총 12,767명을 제3세대 RIA법을 이용하여 HCV 항체검사서 양성으로 나타난

275명의 시료를 대상으로 실시하였다. 시료는 환자로 부터 분리된 혈청을 수집하여, -70℃에 냉동 보관 하였다가 사용할 때 신속하게 용해시켜서 측정하였다.

2. 5-RIBA를 이용한 항체의 검출

제3세대 RIA법을 이용하여 항체 양성을 나타낸 검체를 5-RIBA ((주)LG화학)법으로 core 14 (핵 항원 단백질), core 518 (핵 항원과 NS3 항원의 융합 단백질), E1E2NS4 (E1과 E2 막 항원과 NS4 항원의 융합 단백질), KHCV 897 (NS3 항원 단백질) 그리고 NS5 1.2 (NS5 항원 단백질)이 strip에 부동화 되어 있어 유전자 각 부위의 항원에 대한 특정 항체를 따로 볼 수 있는 5-RIBA의 LG hcd confirm을 사용하여 제조회사에서 제시한 방법대로 시행하였다.

3. nested RT-PCR에 의한 항원의 검출

1) RNA 추출

100 µl의 혈청에 lysis buffer 400 µl를 첨가하여 조심하여 잘 mix한 후 4℃에서 10분간 방치하였다. Chloroform용액 325 µl를 첨가하여 mix 후 4℃에서 15분간 반응시킨 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 200 µl 취해 새로운 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣고 1시간 동안 RNA를 침전시킨다.

2) cDNA합성

Isopropanol에 침전시킨 RNA는 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻고 DEPC treated 70% ethanol로 2회 세척하였다. 56℃ heat block에서 pellet을 5분간 건조 후 30 µl의 RNA hydration solution을 넣고 vortexing 하여 잘 녹여준 후, Primer (HCV1/HCV2; Table 1)와 MMLV, Taq DNA polymerase, 완충액 (Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), dNTP, RNase inhibitor 등이 동결건조되어 있는 1차 PCR tube (HCV detection kit이용, Bioneer)에 추출된 RNA 10 µl를 넣고 잘 섞어준 후 Thermocycler에 넣어 57℃에서 10분간 pre-denaturation, 42℃에서 60분간 cDNA 합성, 94℃에서 5분간 RNase inactivation 시킨 후, 다음과 같은 조건으로 35회 1차 PCR을 시행하였다. Denaturation은 94℃에서 45초, annealing은 62℃에서 45초, extension은 72℃에서 1분간 시행하였다.

3) nested PCR

2차 PCR은 Primer (HCV3/HCV4; Table 1)와 Taq

Table 1. Primers used in amplifying HCV 5' UTR region

Primer	Nucleotide position	Sequences (5'-3')	Size of product
HCV1	24-45	ACTCCACCATAGATCACTCCCC	283 bp
HCV2	306-285	AAGCACCTATCAGGCAGTACC	
HCV3	84-105	CATGGCGTTFAGTATGAGTGTCCG	216 bp
HCV4	299-278	CTATCAGGCAGTACCACAAGGC	

Table 2. Prevalence of HCV antibody by clinical visitors by radiation immuo assay method

	No. of case	Percent
Negative	12,492	97.8
Positive	275	2.2
Total	12,767	100

Table 3. Sexual distribution of positive case of radiation immuo assay method (N=275)

Sex	No. of case	Percent
Male	167	60.7
Female	108	39.3

Table 4. Age distribution of positive cases by HCV antibody radiation immuo assay test

Age	No. of positive	Percent
20-29	12	4.4
30-39	51	18.5
40-49	61	22.2
50-59	71	25.8
60-69	63	22.9
70-	17	6.2
Total	275	100

DNA polymerase 등이 동결건조 되어 들어 있는 2차 PCR tube (HCV detection kit이용, Bioneer)에 1차 PCR 반응액 2 µl와 증류수 14 µl를 가하여 94℃에서 5분간 RNase inactivation 시킨 후, denaturation은 94℃에서 45초, annealing은 62℃에서 45초, extension은 72℃에서 1분으로 30 cycle 시행했다. 증폭된 cDNA는 2% agarose gel상에서 0.5× TBE buffer로 전기영동시킨 다음 ethidium bromide 로 염색시킨 후 자외선을 조사한 후 관찰하였다.

결 과

1. RIA, RIBA 및 PCR 방법의 비교

제3세대 HCV RIA 검사를 의뢰했던 총 12,767명의 사람에서 275명이 anti-HCV antibody 양성자였다 (Table 2). 성별로는 남자가 167 (60.7%)명, 여자가 108 (39.3%)명으로 남자에게서 많은 양성율을 나타내었다 (Table 3). 연령별 분포는 40대 이후 연령이 증가할수록 양성율도 증가함을 알 수 있었다 (Table 4). Anti-HCV 항체 양성인 148시료

M 1 2 3 4 5 6 P

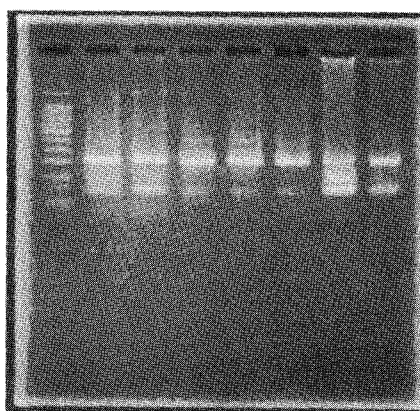


Figure 2. Products of nested RT-PCR M; 100 bp DNA ladder marker, Lane 1-6; patient samples, P; positive control.

를 5-RIBA 방법으로 검사를 한 결과 85 (57.4%)시료에서 양성을 보였고, 63 (42.6%)시료에서 음성 (indeterminate포함)을 나타냈다. 이중 5-RIBA에서 양성을 나타낸 43시료와 음성 (indeterminate포함)으로 나타난 31시료를 가지고 nested RT-PCR법을

Table 5. Comparison of HCV-RNA positivity according to anti-HCV reaction pattern in LG HCD** confirm test

Immunoblot assay					HCV RNA*			
NS5 ^a	897 ^b	EEN ^c	C518 ^d	C14 ^e	Interpretation	P	N	% Positivity
+	+	+	+	+	P	10	1	90.9
+	+	+	-	+	P	1	0	100
+	+	-	+	+	P	4	0	100
+	-	+	+	+	P	2	2	50
-	+	+	+	+	P	4	1	80
+	-	-	+	+	P	1	1	50
-	+	-	+	+	P	10	2	83.3
-	-	+	+	+	P	1	0	100
-	+	+	-	-	P	1	0	100
-	-	-	+	+	P	1	1	50
-	+	-	-	-	I	1	0	100
-	-	-	+	-	I	1	1	50
-	-	-	-	+	I	0	3	0
-	-	-	-	-	N	3	22	12

Abbreviation: a; NS5 1.2, b; NS3, c; E1E2NS4, d; core 518, e; core 14, *; Nested RT-PCR, **; Recombinant immunoblot assay, P; Positive, I; Indeterminate, N; Negative

시행하였다 (Table 5, Figure 2).

RT-PCR 결과 5-RIBA에서 양성으로 나타난 43예 중 35 (81.4%)예가 양성으로 나타났으며, indeterminate로 나타났던 6예에서 2 (33.3%)예가 양성으로 나타났고, 음성으로 나타났던 25예 중 3 (12%)예가 양성으로 나타났다.

Immunoblot assay (5-RIBA)방법에서 NS5, KSCV-897, E1E2NS4, core 518, core 14 항원이 표지된 strip으로 각각의 항체를 조사한 결과 5개의 항원 모두에서 양성을 나타낸 것은 11시료였으며, 이 중에서 PCR 결과 10 (90.9%)시료가 양성으로 나타났다. 4개의 항원에서 양성을 나타낸 14시료에서는 11 (78.6%)시료가 PCR 양성으로 나타났으며, 3개의 항원에서 양성을 나타냈던 15시료에서는 12 (80.0%)시료에서 양성을 나타냈다. 또한 2개의 항원에 양성을 나타낸 3시료에서는 2 (66.7%)시료에서 양성을 나타냈다. 하나의 항원에만 반응을 보여 indeterminate로 나타난 6시료 중에서는 2 (33.3%)시료만 PCR 양성으로 나타났고, 항원에 반응을 보이지 않은 25시료에서는 3 (12.0%)시료에서만 PCR 양성을 나타냈다.

하나의 항원에서만 양성반응을 나타낸 항원은 3예에서 core 14, 1예에서 NS3 부위의 항원인 897이었으며, 나머지 2예는 core 518이었다. 이중 core 518 항원에 양성을 보인 1예에서 HCV RNA가 검출되었고, 나머지 1예는 897 항원에 양성을 나타낸 예이다. 5-RIBA 양성 중에서 NS5 1.2 항원에 양성을 보인 22예 중에서 HCV RNA 양성은 18예였으며, NS3 부위의 항원인 897은 35예 중에서 30예가 양성이었으며, E1E2NS4에 양성을 보인 23예 중 19예가 양성이었으며, core 518에 양성을 보인 43예 중에는 33예가 양성이고, 마지막 core 14에 양성을 보인 46예 중에는 34예가 HCV RNA 양성이었다.

2. 질환별 분포

질환별로는 RIA법에서 양성인 나온 148시료에서 간암 (hepatocellular carcinoma)이 12 (8.1%), 간경화 (liver cirrhosis)가 28 (18.9%), 만성간염 (chronic hepatitis)이 68 (46.0%), 기타가 40 (27.0%)이었다. 그중에서 RIBA 방법에서 양성인 나온 85시료에서는 간암이 9 (10.6%), 간경화가 15 (17.6%), 만성

Table 6. Prevalence of anti-HCV antibody IRMA test in 148 patients according to clinical diagnosis

Diagnosis	RIBA positive	RIBA negative	Total (%)
Hepatocellular Ca	9 (75.0)	3 (25.0)	12 (8.1)
Liver cirrhosis	15 (53.6)	13 (46.4)	28 (18.9)
Chronic hepatitis	43 (63.2)	25 (36.8)	68 (45.9)
Others	18 (45.0)	22 (55.0)	40 (27.1)
Total	85 (57.4)	63 (42.6)	148 (100.0)

Table 7. Prevalence of HCV RT-PCR in 74 patients according to clinical diagnosis

Diagnosis	PCR positive	PCR negative	Total (%)
Hepatocellular Ca	2 (50.0)	2 (50.0)	4 (5.4)
Liver cirrhosis	8 (47.1)	9 (52.9)	17 (23.0)
Chronic hepatitis	15 (57.7)	11 (42.3)	26 (35.1)
Others	18 (66.7)	9 (33.3)	27 (36.5)
Total	43 (58.1)	31 (41.9)	74 (100.0)

간염이 43 (50.6%), 기타가 18 (21.2%) 시료였으며, 음성이 나온 63 시료에서는 간염이 3 (4.8%), 간경화가 13 (20.6%), 만성간염이 25 (39.7%), 기타가 22 (34.9%) 시료로 나타났다 (Table 6). 또한 RIA 양성 중에서 74 시료를 대상으로 nested RT-PCR을 시행하여 HCV RNA 양성으로 나타난 43 시료 중에 간염이 2 (4.6%), 간경화가 8 (18.6%), 만성간염이 15 (34.9%), 기타가 18 (41.9%) 시료였으며, HCV RNA 음성인 31 시료 중에는 간염이 2 (6.5%), 간경화가 9 (29.0%), 만성간염이 11 (35.5%), 기타가 9 (29.0%)이었다 (Table 7).

고 찰

C형 간염바이러스는 비 경구적인 감염경로인 혈액 및 혈액산물을 통하여 전파되는 것으로 알려져 있으며, 주로 수혈을 받는 사람, 혈우병 환자, 마약 사용자, 혈액 및 혈액산물을 취급하는 의료종사자들이 위험군으로 분류되고 있다. 그러나 C형 간염 환자의 약 40%는 혈액이외의 원인불명의 감염경로를 통하여 감염되는 것으로 알려져 있다 (12). 최근 C형 간염 환자인 산모로부터 수직 감염의 예와 성적접촉에 의한 감염의 예가 보고된 바 있으나 (12) 아직도 C형 간염바이러스의 전

파경로는 확실하게 확립되어 있지 않으며, 연령이 증가할수록 높은 감염률을 나타내고 있다 (5).

본 연구에서 HCV RNA 양성으로 판명된 43명의 환자를 대상으로 환자의 상태를 조사한 결과 만성간염 (chronic hepatitis)이 15 (34.9%)명, 간경화 (liver cirrhosis)가 8 (18.6%)명, 간세포암 (hepatocellular carcinoma)이 2 (4.7%)명 그리고 기타가 18 (41.8%)명으로 나타나 C형 간염바이러스가 간세포암의 주요인중 하나로 나타났다.

HCV는 RNA 바이러스로 혈중 바이러스의 양이 적고, 바이러스에 대한 면역반응이 미약하여 혈청학적 진단에 매우 어려움이 있어서 새로운 진단 기법이 요구되는 실정이다. 이에 의한 간염을 진단하기 위한 검사법으로서 제1세대 시약은 효모균에서 유전자 재조합으로 HCV 유전자의 NS3 일부와 NS4 대부분에서 coding되어 발현시킨 c100-3 항원 단백질 (13) 한가지만을 이용한 방법으로 항원결합부위에 대한 항체의 교차반응 등으로 인한 위양성이 많아 HCV 간염진단에 문제점이 많았다 (4). 이를 개선하고자 c100-3에 추가로 구조단백인 NS3/NS4의 항원으로 조합하여 제조된 제2세대 항 HCV 항체검사시약이 개발되었고, 최근에는 core 부위와 NS5 부위가 추가되어 대부분의 HCV 항원이 포함된 제3세대 EIA 및 RIA 검사시약이 개발

되었다. 또한 HCV 단백질에 대한 반응 유무를 확인하기 위해 개발된 확인검사법 (Recombinant immunoblot assay, RIBA)이 국내외 회사에서 만들어지고 있다 (3).

Van der Poel 등 (31)은 125명의 효소면역측정법 양성인 헌혈자를 대상으로 한 연구에서 11명 (8.8%)에서 역전사 중합효소연쇄반응 양성이었다고 보고했다. 또한 Hsu 등은 EIA법에서 anti-HCV 항체를 가진 60명을 immunoblot assay법으로 검사했을 때 7명이 양성이었다고 이 중 6명 (24%)이 RT-PCR반응 양성이었다고 보고했다. 이들 두 연구의 성적은 본 연구의 RIA법 양성자 중 5-RIBA법으로 검사했을 때 RIBA법 57.4%와는 많은 차이가 있었으며, nested RT-PCR 양성률 50%와도 차이가 많았다. 이는 앞의 두 연구가 건강한 헌혈자를 대상으로 한 연구이고 본 연구는 간염을 의심하는 환자를 대상으로 한 때문이라 판단된다. 또한 RIBA법과 RT-PCR 양성률은 81.4%로 대체로 높게 나타났다.

RIBA법에서의 anti-HCV 양성인 43예 중 35예 (81.4%)에서 RT-PCR에 의해 HCV RNA를 검출할 수 있었고 anti-HCV 음성 25예 중 3예 (12%)에서 HCV RNA가 검출되었다. Anti-HCV 양성이나 HCV RNA가 검출되지 않은 경우가 8예 (18.6%)로 이러한 PCR 위음성의 원인에 대해 고찰해 보면 다음과 같다.

첫째, anti-HCV는 바이러스 자체나 그 항원을 검출하는 것이 아니고 항체를 탐지하는 방법이므로 현재 체내에서 증식이 일어나고 있는지 아니면 단순한 과거 감염의 흔적에 불과한지 감별할 수 없다는 점을 들 수 있다 (9).

둘째, Shawar 등 (29)과 Clarridge 등 (15)에 의하면 PCR 위음성의 원인으로 검체내에 포함되어 있는 바이러스 자체의 수가 적거나 혹은 PCR의 억제제가 존재하는 점을 고려할 수 있는데, heparin, hemoglobin, phenol 및 SDS 등이 검체내에 존재하여 PCR 검사에 억제제로 작용하고 DNA 중합효소 자체가 PCR에 억제작용을 갖고 있어 낮은 증폭율을 보인다고 알려지고 있다. 또한 적절한 primer의 선택 및 검체의 장기간 보관과 -70℃ 보관시 잦은 해동도 HCV RNA의 검출율을 떨어뜨린다.

본 연구결과 anti-HCV 음성이나 HCV RNA가 검출되는 경우가 3예 (12%)로 PCR 위양성인 원인을 살펴보면 첫째는 Inchauspe 등 (19)과 Christano

등 (14)이 anti-HCV 음성이면서 HCV RNA 양성인 예를 보고하면서 초기감염에서 항체형성 전까지 HCV RNA는 증식이 일어나지만 anti-HCV가 미처 생기지 못한 경우이다. 또 다른 인자로서 Christano 등 (19)은 PCR 산물의 carryover나 타 검체로부터의 오염의 가능성과 바이러스가 혈액내 존재하는 동안 항체가 소실된 경우 등의 가능성들도 고려되어야 한다고 주장하였다. 본 연구에서는 이러한 carryover나 오염의 가능성을 배제하고자 피펫을 분리하고, tip과 시험관 등은 멸균하여 사용하였으며, RNA는 RNA prep kit를 사용하였는데, 본 연구의 성적에서 특별한 carryover나 오염현상을 관찰할 수 없었다.

결론적으로 만성 간질환 환자에서 HCV 검출을 위한 혈청표지자와 PCR 결과는 반듯이 일치하는 것이 아니며 HCV의 모든 혈청표지자에 음성인 경우라도 상당수에서 HCV 감염과 연관될 수 있다고 생각되었고, 간세포암의 중요 요인 중 하나인 HCV의 정확한 진단을 위하여 RIA, RIBA, PCR법을 비교 추적한 결과 PCR법이 매우 우수한 결과를 보였으므로 앞으로 HCV 진단시 PCR을 이용해야 할 것이라 생각되며, HCV 백신이 빠른 시간안에 개발되었으면 한다.

참 고 문 헌

- 1) 기승정, 신종희, 서순팔, 양동욱: 만성 간질환 환자에서 B형 및 C형 간염바이러스 검사에 대한 효소면역법과 중합효소연쇄반응법의 비교. 대한임상병리학회지 16: 965-978, 1996.
- 2) 김경희, 문영명, 정미령, 한과협, 전재윤, 이관식: 한국인 non-A, non-B, 간질환에서 C형 간염바이러스 항체검출에 관한 연구. 대한내과학회지 39: 148-156, 1990.
- 3) 김대원, 권석운, 지현숙, 김인수: C형 간염 항체검출을 위한 제3세대 효소면역측정법과 확인검사의 평가. 대한수혈학회지 5: 115-126, 1994.
- 4) 김미숙, 김대원, 김재식, 김신규, 박명희, 조한수: 면역혈청검사 신병도조사 결과보고 (1994). 정도관리와 임상병리 17: 33-50, 1995.
- 5) 김종규, 성연문, 송경은, 이원길, 김재식: C형 바이러스성 간염 진단에 있어서 효소면역측정법과 역전사 중합효소연쇄반응 간의 성적비교 및 연령별 분포. 대한임상병리학회지 15:

- 139-145, 1995.
- 6) 김현성, 최준호, 이효석: 한국내 C형 간염바이러스의 유전적 다양성. *대한바이러스학회지* **26**: 31-44, 1996.
 - 7) 박준상, 이범용, 정수일, 민미경: Hepatitis C Virus E2 외피항원에 대한 단일클론항체의 특성연구. *대한바이러스학회지* **27**: 9-17, 1997.
 - 8) 변관수, 서동진: 한국인 급성 및 만성 간질환에서 C형 간염바이러스 항체발현상. *대한내과학회지* **40**: 484-492, 1991.
 - 9) 이효석, 윤정환, 김 응, 김정룡: 중합효소연쇄 반응을 이용한 혈청 B형 간염바이러스 DNA 검출 및 혈청 anti-HCV 검출에 의한 규명. *대한내과학회지* **42**: 8-15, 1992.
 - 10) 정규원, 선희식, 정환국, 신호균, 박충기, 유재영: 한국인 수혈 후 감염과 만성 간질환 환자에서의 C형 간염바이러스 감염동태. *대한내과학회지* **38**: 750-753, 1990.
 - 11) Alter MJ: Review of serologic testing for hepatitis C virus infection and risk of posttransfusion hepatitis C. *Arch Pathol Lab Med* **118**: 342-345, 1994.
 - 12) Baek LJ, Suh DJ, Kim YS, Kim GY, Chu YK, Lee HW: Detection and characterization of hepatitis C virus from Korean non-A, non-B hepatitis patient's sera using PCR and the mode of intrafamilial transmission. *J Kor Soc Microbiol* **30**: 441-449, 1995.
 - 13) 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.
 - 14) Christiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM: Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic NANB hepatitis-detection by PCR using multiple primer sets. *Hepatology* **14**: 51-55, 1991.
 - 15) Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, Pliakaytis BB: Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* **31**: 2049-2059, 1993.
 - 16) Drobacheff C, Derancourt C, Van Landuyt H, Devred D, de Wazieres B, Cribier B: Porphyria cutanea tarda associated with human immunodeficiency virus infection. *Eur J Dermatol* **8(7)**: 492-496, 1998.
 - 17) Esteban JI, Gonzales A, Hernacles JM, Vidalomiu L, Sanchez C, Vidal X, Esteban R, Guardia J: Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis. *N Engl J Med* **323**: 1107-1112, 1990.
 - 18) Halim AB, Garry RF, Dash S, Gerber MA: Effect of schistosomiasis and hepatitis on liver disease. *Am J Trop Med Hyg* **60(6)**: 915-920, 1999.
 - 19) Inchauspe G, Abe K, Zebedee S, Nassof M, Prince AM: Use of conserved sequences from hepatitis C virus for the detection of viral RNA in infected sera by PCR. *Hepatology* **14**: 595-600, 1991.
 - 20) Izopet J, Payen JL, Alric L, Sandres K, Charlet JP, Vinel JP, Duffaut M, Pascal JP: Baseline level and early suppression of serum HCV RNA for predicting sustained complete response to alpha-interferon therapy. *J Med Virol* **54(2)**: 86-91, 1998.
 - 21) Khanna A, Poduri CD, Murugan P, Kumar S, Sugunan VS, Shenoy KT, Das MR: Analysis of human immune response to potential hepatitis C viral epitopes. *Acta Virol* **42(3)**: 141-145, 1998.
 - 22) Komatsu F, Takasaki K: Determination of serum hepatitis C virus core protein using a novel approach for quantitative evaluation of HCV viraemia in anti-HCV positive patients. *Liver* **19(5)**: 375-380, 1999.
 - 23) Martin P, Fabrizi F, Dixit V, Quan S, Brezina M, Sra K: Automated RIBA hepatitis C virus strip immunoblot assay for reproducible HCV diagnosis. *J Clin Microbiol* **36**: 387-390, 1998.
 - 24) Papaevangelou V, Pollack H, Rochford G, Kokka R, Hou Z, Chernoff D: Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants of HIV and HCV-coinfected women. *J Infect Dis* **178(4)**: 1047-1052, 1998.

- 25) **Park YS, Lee KO, Oh MJ, Chai YG:** Distribution of genotypes in 5' untranslated region of hepatitis C virus in Korea. *J Med Microbiol* **47**: 643-647, 1998.
- 26) **Pier LC, Joe K, Sra K, Quan S, Bonino F, Massaro AL, Alan P, et al:** Hepatitis C virus heteroduplex tracking assay for genotype determination reveals diverging genotype 2 isolates in Italian hemodialysis patients. *J Clin Microbiol* **36**: 227-233, 1998.
- 27) **Reuter D, Polywka S, Iske L, Feucht HH, Laufs R:** Close correlation between hepatitis C virus serology and polymerase chain reaction in chronically infected patients. *Infection* **20**(6): 320-323, 1992.
- 28) **Roy KM, Bagg J, McCarron B:** The effect of saliva specimen collection, handling and storage protocols on hepatitis C virus (HCV) RNA detection by PCR. *Oral Dis* **5**(2): 123-127, 1999.
- 29) **Shawar RM, El-Zaatari FAK, Nataraj A, Clarridge JE:** Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol* **31**: 61-65, 1993.
- 30) **Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J:** Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* **65**: 1105-1113, 1991.
- 31) **Van der Poel CL, Cuyper HTN, Reesink HW:** Confirmation of hepatitis C virus infection by new 4-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* **337**: 317-319, 1991.