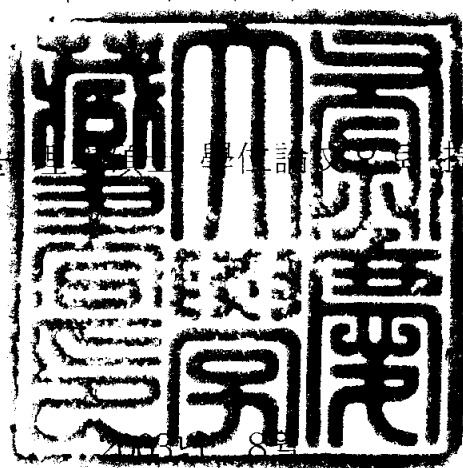


이학석사 학위논문

C형 간염 진단에 있어서 항체 검사 시약에 따른 결과차이 및 RT-PCR의 비교분석

지도교수 최 태 진

이 論文을 指導教授 崔 泰 進 先生 에게 提出함



부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

최 해 자

이 논문을 최해자의 이학석사
학위논문으로 인준함

2003년 6월

주 심 이학박사 이 원 재

위 원 이학박사 송 영 환

위 원 이학박사 최 태 진



목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 연구대상 및 방법	6
1. 연구대상	6
2. 연구방법	6
III. 연구결과	14
1. 두 시약간의 HCV 항체 검사 결과	14
2. HCV-RNA와 HCV 항체 검사결과의 상관성	17
3. HCV-RNA 양성이면서 두 항체 검사 모두 음성 예	19
4. HCV-RNA와 두 항체 검사 모두 음성이면서 ALT 수치가 기준치 이상인 예	21
IV. 고 찰	23
V. 요 약	28
VI. 인용문헌	30
VII. 감사의 글	34

List of Tables

Table 1. Oligonucleotide sequences for the PCR primer and probe	13
Table 2. Comparison of results between each two anti-HCV assay kits (n=100)	15
Table 3. Comparison of specimens showing discrepancy in two antibody detection	16
Table 4. Comparison of results between anti-HCV and HCV-RNA detection	18
Table 5. Five cases with negative HCV antibody and positive HCV-RNA results	20
Table 6. Fourteen cases with abnormal ALT, and negative both antibody test and RT-PCR	22

List of Figures

Figure 1. Schematic reaction sequences of COBAS CORE Enzyme Immunoassay	8
Figure 2. Schematic reaction sequences of Abbott AxSYM Microparticle Enzyme Immunoassay	10

Comparison of two antibody assay systems and RT-PCR for Hepatitis C virus diagnosis

Hae-Ja Choi

*Department of Industrial Microbiology, Graduate School of Industry,
Pukyong National University*

ABSTRACT

Hepatitis C virus(HCV) is one of the major causes of chronic, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Various techniques have so far been developed for the detection of HCV. Most hospitals use RT-PCR, that detects HCV RNA and serologic tests that detect HCV antibody by enzyme immunoassay(EIA) or micro particle enzyme immunoassay (MEIA). However, results of HCV antibody tests are supposed to be different depend on test kits because HCV antigen subtypes are variable. In this study, two HCV antibody assay systems were compared each other and RT-PCR method.

One hundred sera were randomly selected from those requested for HCV-RNA tests in a hospital. The number of specimens positive and negative in two test kits(EIA, MEIA) were 67 and 25, respectively with 92% of concordance rate. Most of the discrepant 8 samples showed low-titers, but there was no correlations between the titers

and discrepancy. The concordance rates between RT-PCR both of ELA and MEIA were 74%.

Five cases with Negative HCV Antibody and positive HCV-RNA showed Acute Hepatitis. Fourteen cases that are negative for HCV-RNA and HCV antibody, but have abnormal ALT shown to have inflammatory liver disease, inflammatory with unknown fever and other disease.

It is recommended that anti-HCV test is performed twice when a patient is clinically suspected of hepatitis C and both HCV-RNA, HCV antibody are negative.

I. 서론

1989년 Choo 등(1)에 의해 발견된 만성 간 질환의 또 다른 중요한 원인인 C형 간염바이러스(Hepatitis C virus; HCV)가 발견된 것은 비교적 최근의 일이지만, 이 바이러스가 존재함은 훨씬 이전부터 알려져 있었다. B형 간염바이러스가 발견된 후 수혈 시 B형 간염바이러스에 오염된 혈액은 사용하지 않게 되었음에도 불구하고 수혈 후 간염이 발생하는 것을 완전히 막을 수는 없었다. 따라서 A형이나 B형이 아닌 제3의 간염바이러스가 존재하리라는 것을 1974년 미국의 프린스 박사 등이 지적하였고, 이를 잠정적으로 non-A, non-B hepatitis(NANBH) 간염바이러스로 명명하였다(1). 이후, 10년 이상 세계적으로 이 간염바이러스를 발견하려고 갖은 노력을 기울였으나 성공하지 못하다가, 미국의 생명과학 회사인 카이론사(社)의 과학자들이 생명공학 기법을 사용하여 바이러스를 규명하는 데 성공하였고, 이를 C형 간염바이러스라고 명명하였다(1).

이 C형 간염바이러스는 약 9400bp의 single strand RNA genome을 가지고 있으며(2) Flaviviridae과의 flavivirus 및 pestivirus와 유사한 구조부위의 core(C) 단백질, envelope(E1) 단백질, E2/NS1 단백질과 비 구조부위(nonstructural region, NS)의 NS2, NS3, NS4 및 NS5 부위 단백질을 합성한다(3, 4). 이질성(heterogeneity)이 특징인 HCV는 계속되는 돌연변이를 통하여 숙주의 면역반응을 교묘히 빠져나감으로써 만성지속성감염을 일으키는 특징을 가지고 있다(5, 6). 이러한 C형 간염은 전세계적으로 1억 7천명(전세계인의 2-3%) 이상의 인구가 감염되어 있고, 국내에서는 전국민의 1% 정도가 양성으로 보고되고 있으나 더 많은 보균자가 있을 것으로 추정된다. 특히 감염자의 대부분이 만성으로 진행되고 이중 50% 이상

이 만성화하여 20%에서 만성 간염과 간경변으로 진행되므로(7) 이의 조기 진단과 치료는 B형 간염과 같이 중요한 의학적 문제가 아닐 수 없다. HCV 감염의 진단은 감염된 환자에서 HCV 항체가 존재하는 것이 밝혀져 항체에 특이한 면역혈청학적 검사가 개발되었고(8) 이 검사의 정착은 수혈 후 간염 발병율을 감소시켰다(9). 현재 C형 간염바이러스의 진단, 치료 및 경과 검사로 혈청 항체를 검출하는 방법인 C형 간염 항체검사와 PCR을 이용하는 C형 바이러스 RNA 검출법이 주로 사용된다. 그리고 간접적으로 ALT의 활성을 보거나 직접적으로 간 생검이 이용될 수 있으나 양자 모두 선별검사에는 적합한 방법이 될 수 없다. C형 간염 항체 검사 법으로는 최근 위 양성율을 크게 감소시킨 제3세대 HCV 항체 시약이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 cloning에 사용되는 세균의 단백질 성분에 대한 항체의 존재, 재조합 항원의 발현 및 HCV에 관계 있는 항원 결합부위에 대한 항체의 교차반응 등이나 제조회사에 따라 유전자 재조합 기술과 바이러스 항원의 아미노산 구조 등에 차이가 있어 동일 검체를 여러 가지 시약으로 동시에 검사하여도 시약에 따라 Anti-HCV의 검출율에 차이가 있고 아직도 위양성을 완전히 배제할 수 없는 실정이다(10, 11). Screening에서 양성을 나타내는 검체의 40-60%가 확인분석에서 음성을 나타내었으므로 이들 면역학적 분석의 판단이 어렵다는 사실이 최초 평가에 나타나 있다(12). 면역혈청학적 진단은 현재나 과거 HCV 감염의 노출에 대해 측정할 수는 있으나 C형 간염 바이러스를 직접 확인 할 수는 없다. 더구나 급성 HCV 감염 환자의 경우는 HCV에 대한 항체를 만들지 못하므로 면역혈청학적 방법으로 HCV 감염을 진단하는 것은 불가능하다. 반면, PCR에 의한 C형 간염 바이러스 검출은 현재 감염의 증거가 된다. PCR을 사용함으로써 면역학적 혈청변이(sero-conversion)에 앞서 C형 간

염 바이러스 혈증을 진단하고 항체반응이 양성인 만성 HCV 환자에서 바이러스 혈증의 변이를 측정하는 것이 가능해졌다. PCR은 HCV RNA를 직접 증폭하기 때문에 환자의 면역학적 상태와 독립적이며 PCR을 기초로 한 검사는 면역저하 환자에서 HCV RNA를 검출하는데 가치가 있다.

본 연구에서는 HCV RNA 정성검사 의뢰온 100건을 대상으로 2종류의 항체 검사 시약 Anti-HCV Ab EIA(Roshe COBAS CORE), Anti-HCV Ab MEIA(Abbott AxSYM)을 이용하여 HCV 항체의 정성검사를 한 후 시약에 따른 HCV 항체의 불일치율을 조사해 보고 이들 항체검사 결과와 혈청내 항원의 존재를 직접 증명할 수 있는 방법의 일종인 RT-PCR Hybridization법으로 HCV-RNA를 검사하여 이를 비교 분석함으로써 C형 간염 진행의 정도에 따라, 항체 검사 시약간의 불일치율을 찾아보고 간기능 검사의 척도인 ALT(Alanin aminotransaminase) 수치와도 비교하여 이를 연구 분석해 보고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

2002년 11월부터 2003년 3월17일까지 부산시내 소재 P 대학병원 내과에서 B형 간염 표면 항원(Hepatitis B surface antigen; HBsAg) 음성이면서 진단검사의학과로 의뢰된 HCV-RNA 정성검사 검체 100건을 대상으로 하였다. 대상자 100명 중 남자가 60명, 여자가 40명으로 나이는 16세에서 77세 사이였고 평균 연령은 49.8세였다. 이들 총 100건에 대하여 ALT (Alanin aminotransaminase) 수치 및 C형간염 항체의 존재 여부 (Anti-HCV)와 RT-PCR을 이용한 HCV-RNA의 존재 여부를 검사하였다.

2. 연구방법

1) ALT(Alanin aminotransaminase)

모든 검사대상에 사용된 혈청은 채혈 후 4시간 이내에 분리하여 ASAN 테크의 자동분석기용 ALT(Alanin aminotransaminase) 측정용 시약으로 생화학 자동분석기인 Hitachi 7600-110을 이용하여 제조사의 지시대로 분석하였다. 참고치는 40IU/L 이하이다.

2) Roche Cobas Core Anti-HCV II Enzyme ImmunoAssay

이 검사 시약의 원리는 Ag-Ab-Ab Sandwich 원리를 이용한 효소 면역법이다(Fig. 1). HCV항체 검사는 효소 면역 검사법(EIA)을 기초로, 상품화된 제 3세대 Anti-HCV EIA II(Roche COBAS CORE)를 이용하여 제조원의 방법과 원리에 따라 검사하였다. 2000rpm에서 5-10분 원심 분리한 혈청을 Eppendorf cup에 1.5ml 담은 뒤, sample rack에 장착하고 검사하였다. 혈청 내에 있는 HCV항체와 시약중의 HCV 재조합(recombinant) 항원과 streptavidin이 코팅된 polystyrene bead가 Ag-Ab complex를 형성하였다. 여기에 peroxidase가 부착된 Anti-HCV를 반응시켜 Ag-Ab-Ab complex를 형성 시킨 후 결합되지 않은 항원은 세척하여 제거 한 후에 기질 액으로 TMB(Tetramethyl Benzidine)를 반응시켜 발색 반응을 측정(492nm)한다. 정도관리 물질로 음성대조와 양성대조를 함께 검사하였다.

결과 해석은 진단시약제조회사의 방법과 원리에 따라 검사를 실시하여 Cut off치 이상일 때는 양성, 이하일 때는 음성으로 판정하였으며 COBAS CORE Anti-HCV Cut off는 0.365이다.

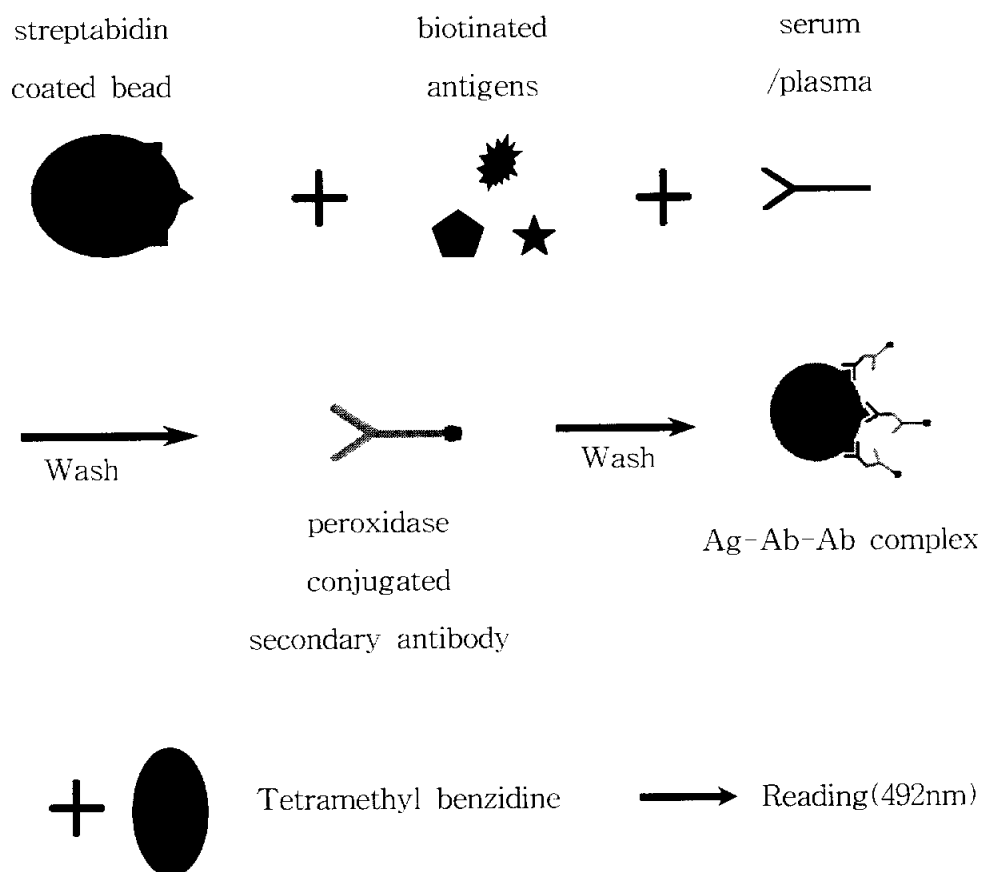
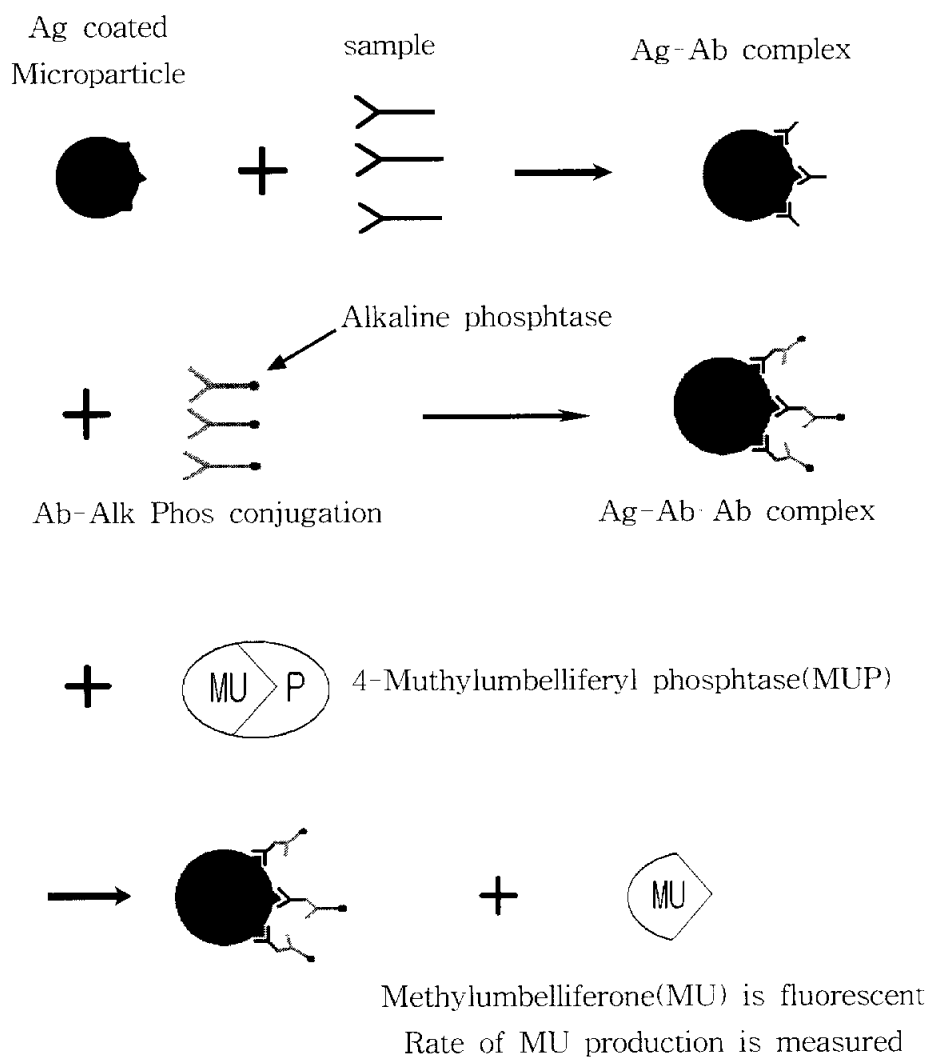


Fig 1. Schematic reaction sequences of COBAS CORE Enzyme Immunoassay.

3) Abbotte AxSYM HCV version 3.0 Microparticle Enzyme ImmunoAssay

이 검사 시약의 원리는 Ag-Ab-Ab Sandwich 원리를 이용한 미세입자효소면역법이다(Fig 2). AxSYM HCV 항체 검사는 효소면역법(MELA)을 기초로, 상품화된 제3세대 검사법인 AxSYM MELA 3.0 kit(Abbott, AxSYM)를 이용하여 제조원의 방법과 원리에 따라 검사하였다. 항응고제 필요 없이 2000rpm 에서 5-10분 원심 한 검체를 300ul 취하여 sample cup에 담은 후 segment caurousel에 장착한 후 검사하였다. 시약중의 HCV 재조합 항원이 미세입자(microparticle)에 입혀져 있어 검체내에 HCV 항체가 있는 경우 결합하여 Ag-Ab complex를 형성하였다. 여기에 Goat Anti-Human IgG Alkaline Phosphatase Conjugate를 분주하면 Ag-Ab-Ab complex에 결합하였다. 결합된 complex에 기질인 4-Methylyumbelliferylphosphate를 첨가하여 형광물질인 4-Methylyumbelliferon이 만들어졌다. 형광 물질의 형광을 측정하면 HCV 항체 농도와 비례한다. 제조사의 표준 물질(IndexCalibration)로 calibration하고 음성 정도 관리물질과 양성정도관리 물질을 동시에 측정하였다.

결과 해석은 진단시약제조회사의 방법과 원리에 따라 S/CO가 1.0 이상일 때 양성, 1.0 이하일 때는 음성으로 판정하였으며 S/CO는 $\text{sample rate/Cutoff Rate}$, $\text{Cutoff Rate} = \text{Index Calibrate mean} \times 0.12$ 와 같이 계산하였다.



**Fig 2. Schematic reaction sequences of Abbott AxSYM
Microparticle Enzyme Immunoassay.**

4) RT-PCR-Hybridization법

Amplicore Hepatitis C Virus 2.0 Test를 이용하여 제조회사의 설명서에 지시된 방법대로 검체 전처리, 역전사, PCR 증폭, 교잡반응 및 검출 반응의 순서로 실시하였다.

① HCV RNA 추출

냉동 보관된 혈청을 녹인 후 검체와 양성 및 음성대조를 포함한 수만큼 PCR tube를 준비한 후, 혈청 200 μ l에 400 μ l의 working lysis reagent를 넣고 3-5초간 vortex한 다음, 60℃에서 10분간 incubation 하였다. 가볍게 vortex한 후, 600 μ l의 100% isopropyl alcohol을 넣고 실온에서 2분간 방치한 다음 12,500-16,000 $\times$ G에서 15분간 centrifuge 하였다. 이후, 상층액을 완전히 제거하고 1ml의 70% ethanol을 넣고 3-5초간 vortex 하였다. 다시 12,500-16,000 $\times$ G에서 5분간 원심을 2회 반복하여 상층액을 완전히 제거하였다. 200 μ l의 specimen diluents(HCV DIL, v2.0)를 각 tube에 넣고 벽에 붙어 있는 pellet을 scraping 하여 재부유하였다.

② 역전사와 PCR 증폭

준비되어 있던 master mixer가 든 tube에 조제된 각 검체와 대조액 50ul을 튜브에 넣은 후 PCR을 실시하였다. 사용된 primer와 probe는 Table 1과 같다. PCR 프로그램은 50℃ 5분, 62℃ 30분을 실시 한 후 90℃ 10초, 58℃ 25초씩을 37회 실시한 후 91℃에 3시간을 넘기지 않았다. 곧바로 100ul의 denaturation solution을 가하고 실온 10분간 incubation하였다

③ Detection

농축 세척액을 증류수로 10배 희석하여 세척액을 조제하고 잘 섞은 후 HCV hybridization buffer 100ul를 각각의 well에 넣었다. 그리고 변성된

증폭산물 25ul를 각 well에 넣은 후 덮개를 덮고 37℃ 1시간 반응 시켰다. 이것을 5회 세척한 후 각 well에 Avidin-HRP conjugate 100ul를 넣고 37℃ 15분간 반응 시켰다. Substrate A 2ml와 substrate B 0.5ml를 섞어 만든 working substrate를 각 well에 100ul씩 넣은 후 450nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정하여 양성 여부를 판정하였다. 결과는 흡광도가 1.0이상이면 양성, 0.3 이하이면 음성판정, 0.3-1.0은 반복 검사 후 판정하고 positive control은 1.5이상, negative control은 0.25 이하이다.

Table 1. Oligonucleotide sequences for the PCR primers and probe.

Primers	Oligonucleotide sequence(5'-3')	Remarks
ky 80	GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT	Forwards primer (56 to 79)
ky 78	CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT	Reverse primer (299 to 276)
ky 88	GTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGT	Probe (251 to 275)

Ⅲ. 연구결과

1. 두 시약간의 HCV 항체 검사 결과

Cobas core, AxSYM에서의 HCV 항체 검사 결과를 살펴보면, 모두 양성으로 나온 경우가 67예(67%), 모두 음성으로 나온 경우는 25예(25%)로 92%의 일치율을 보였다. 불일치를 보인 8예(8%) 중 Cobas Core에만 양성인 경우는 2예, AxSYM에만 양성인 경우는 6예였다. AxSYM에서 양성인 경우가 6예로 많이 관찰되었다(Table 2).

불일치를 보인 사례 8예에서 한 종류의 항체 검사에서는 음성으로, 다른 종류의 항체 검사에서는 양성인 경우에 대부분의 양성인 낮은 역가를 나타내는 경우가 많았다. 그러나 한 검체가 한 시약에서는 음성으로 판명되고 다른 시약에서는 역가가 높은 양성으로 나온 경우도 1건이 관찰되었다(Table 3).

Table 2. Comparison of results between two anti-HCV assay kits(n=100).

Results		No. of cases
Cobas	AxSYM	(percentage)
P	P	67(67%)
P	N	2(2%)
N	P	6(6%)
N	N	25(25%)
Total		100(100%)

Table 3. Comparison of specimens showing discrepancy in two antibody detection methods.

No.	sex/age	Cobas	AxSYM	ALT
1	F/66	N(0.02)	P(2.59)	24
2	M/55	N(0.03)	P(1.60)	42
3	M/60	Grayzone*(0.376)	N(0.67)	34
4	F/67	N(0.266)	P(1.45)	25
5	F/67	P(0.987)	N(0.78)	24
6	M/62	N(0.022)	P(1.03)	28
7	M/56	N(0.088)	P(2.25)	42
8	M/29	N(0.226)	P(19.0)	21

* grayzone: specimens showed grayzone results twice were determined as positive.

2. HCV-RNA와 HCV 항체 검사결과의 상관성

1) HCV-RNA와 Cobas HCV 항체 검사결과 일치율

HCV-RNA와 Cobas HCV 항체 검사 모두 결과가 양성으로 나온 경우가 50예(50%), 모두 음성으로 나온 경우는 24예(24%)로 74%의 일치율을 보였다(Table 4).

2) HCV-RNA와 AxSYM HCV 항체 검사결과 일치율

HCV-RNA와 Abbott HCV 항체 검사 모두 결과가 양성으로 나온 경우가 52예(52%), 모두 음성으로 나온 경우는 22예(22%)로 74%의 일치율을 보였다(Table 4).

HCV-RNA와 비교된 2가지 HCV 항체 검사 중 HCV-RNA/Cobas에는 음성이나 HCV-RNA/AxSYM에 비교하였을 때 AxSYM에 저 역가인 2예는 ALT수치가 낮은 것으로 보아 antibody가 생성 중일 것으로 사료된다.

**Table 4. Comparison of results between anti-HCV(EIA)
and HCV-RNA detection.**

Test		Results(A/B)				Total(%)
A	B	P/P	P/N	N/P	N/N	
HCV-RNA	Cobas	50	7	19	24	100(100%)
HCV-RNA	AxSYM	52	5	21	22	100(100%)

3. HCV-RNA 양성이면서 두 항체 검사 모두 음성 예

HCV-RNA 결과 양성이면서 2가지 HCV 항체 검사에서 모두 음성인 경우가 5예로 그 중 3명은 ALT 수치가 100IU/L 이상으로 급성간염의 소견을 보이는 바 이는 Anti-HCV 검사 상 양성으로의 전환이 이루어지는 데는 감염 발생 후 최소한 2-4개월이 필요하므로 아직 양성으로의 전환이 이루어지지 않아서 음성으로 나타난 것으로 추측할 수 있다(Table 5).

Table 5. Five cases with negative HCV antibody and positive HCV-RNA results.

No.	sex/age	HCV-RNA	Cobas	AxSYM	ALT
1	M/53	intermediated*	N	N	165
2	M/50	P	N	N	15
3	F/40	intermediated*	N	N	32
4	F/39	P	N	N	133
5	M/20	intermediated*	N	N	211

* intermediated: specimens showed intermediated results twice were determined as positive.

4. HCV-RNA와 두 항체 검사 모두 음성인면서 ALT 수치가 기준치 이상인 예

HCV-RNA와 Cobas HCV 항체, AxSYM HCV 항체 검사에서 모두 음성이면서 ALT 수치가 40IU/L이상인 14명의 환자들의 병력을 조사하여 보았다. 이중 2명은 병명이 Toxic hepatitis였으며 1명은 Gall Bladder storn이며 3명은 Fatty Liver였다. 나머지 중에는 염증성 간 질환 이외 상세 불명의 염증, 그 밖의 질환을 갖고 있는 환자들과 원인이 밝혀지지 않은 환자도 있었다(Table 6).

Table 6. Fourteen cases with abnormal ALT, and negative both antibody test and RT-PCR.

No.	sex/age	RNA	Cobas		AxSYM		ALT
1	F/47	N	N	0.02	N	0.58	241
2	M/20	N	N	0.02	N	0.33	270
3	M/38	N	N	0.01	N	0.53	77
4	M/44	N	N	0.02	N	0.30	169
5	F/63	N	N	0.03	N	0.39	210
6	M/49	N	N	0.02	N	0.30	67
7	F/59	N	N	0.05	N	0.37	651
8	M/49	N	N	0.03	N	0.53	89
9	M/42	N	N	0.018	N	0.37	179
10	F/58	N	N	0.018	N	0.25	59
11	M/24	N	N	0.032	N	0.32	88
12	M/63	N	N	0.042	N	0.33	105
13	M/42	N	N	0.024	N	0.46	201
14	M/43	N	N	0.017	N	0.19	159

IV. 고 찰

바이러스에는 매우 많은 종류가 있으나 그 유전자를 만들고 있는 핵산에 따라 DNA 바이러스와 RNA 바이러스로 대변할 수 있다. 그 중 DNA로 만들어진 것은 DNA 그 자체가 안정되어 있기 때문에 유전자의 복사착오라고 볼 수 있는 유전자 변이의 확률이 비교적 적다. 이에 비해 RNA로 만들어진 유전자의 경우는 RNA 자체가 원래 불안정하기 때문에 복사착오가 생기기 쉽고 변이가 발생하기 쉽다. 간염 바이러스 중 B형 바이러스는 DNA 바이러스이고 C형 간염 바이러스는 RNA 바이러스다. 그 때문에 C형 간염바이러스는 바이러스 보유자가 되기 쉬운데 우리 몸의 면역기구(T임파구, B임파구)가 적으로 알고 공격을 가했을 때는 이미 바이러스는 모습을 바꾸어 공격의 대상이 되지 않도록 되어 있기 때문에 이 바이러스에 대한 백신을 만들기도 어렵다. 이러한 C형 간염은 예방 접종을 할 수도 없으며 감염자의 50%이상이 만성화하고 20%이상이 간경변으로 진행되므로(7) 이의 조기진단과 치료는 중요한 의학적 문제가 아닐 수 없다. Kim 등(13)에 의한 우리나라 만성간염, 간경변증, 간암 환자에서 C형 간염 바이러스에 대한 항체 빈도는 각각 27.3%, 19.6%, 17%에 이르러 우리나라에서도 HCV가 만성 간 질환의 원인으로서는 B형 간염 바이러스 다음으로 큰 비중을 차지하고 있음을 알 수 있다. 일본의 경우 지난 20년간 HBV에 의한 간암 발생은 일정하게 유지되고 있으나 HCV에 의한 간암 발생은 급격히 증가하는 추세로 각종 만성 간 질환의 가장 중요한 원인의 하나로 HCV가 대두되고 있다(14).

C형 간염 바이러스 감염의 검사 방법은 그 동안 많은 발전이 있어 왔으나, HCV는 환자의 혈중에 극히 미량으로 존재하기 때문에 아직도 HCV의 존재 여부를 확인할 수 있는 항원 검출법은 개발되어 있지 못한 실정

이다. 대신에 RT-PCR에 의한 HCV-RNA를 검출한다. 이 HCV-RNA의 검출은 곧 HCV바이러스 혈증을 의미하는 것이다. 최초의 검사법은 바이러스의 핵산이나 단백질을 직접 검출하는 것이 아니라 간접적으로 HCV의 구성성분에 대한 환자의 항체 존재 여부를 검사하는 ELISA (Enzymelinked immunosorbentassay)법이였다. 1989년부터 실용화된 제 1세대 진단 시약은 비구조 단백질 부위 중 NS3와 NS4 부위를 포함하는 C100-3 바이러스 항원 단백만을 이용한 것으로서 항체 검출율이 매우 낮다(8). 그 뒤 비 구조 단백 부분에 core 단백 항원이 추가된 제 2세대 진단 시약이 개발되었다. 그러나 초기 C형 간염 항체 검출물의 예민도는 향상되었지만 시약의 정제 과정 중 오염된 세균의 단백 성분으로 인한 비 특이적인 항체 검출에 따른 위 양성, C형 간염 바이러스의 항원 결합부위에 대한 항체 교차 반응 등의 이유로 인하여 위 양성율이 여전히 높았다(15). 그 후 HCV 항체 검사의 예민도와 특이도를 높이기 위한 노력들이 이어져 현재 비 구조 단백질 부위의 NS4 부분의 5-1-1 및 NS5 부위의 고감도 면역 우위 항원 부위를 추가하여 대부분의 HCV 항원을 포함시켜, 민감도와 특이도를 증가시킨 제 3세대 항체 검사법이 개발되어 이용되어지고 있다(16, 17). 오 등(18)은 anti HCV 항체 검출용 진단시약이 제 1세대에서 제 3세대로 바뀌면서 예민도와 특이도가 개선되었지만 EIA만으로 anti-HCV 항체 검사 결과를 통보하는 것은 임상적으로 문제시된다고 지적하였다. Anti-HCV 항체 검사는 널리 사용되고 있지만, 어디까지나 HCV 감염에 대한 숙주의 반응을 보는 지표에 지나지 않으므로 HCV 자체의 증감이나 치료에 대한 반응의 변동을 볼 수 없는 단점이 있다(19).

이상과 같은 이유로 HCV 감염의 조기 진단 및 확진용으로 특정 DNA 배열을 중합효소로 증폭하여 검출하는 방법으로 근간에 이루어진 분자생

물학적 실용기법이 높은 검사법으로 매우 유용하게 이용되고 있다(15). 수 시간 내에 검체내에 들어 있는 미량의 DNA를 수만 배로 증폭시킬 수 있는 PCR은 HCV와 같은 RNA 바이러스도 역전사(reverse transcription)의 과정으로 DNA를 형성시키면 증폭할 수 있다. RT-PCR에 의한 HCV-RNA의 검출은 곧 HCV 바이러스 혈증을 의미하는 것이다. 따라서 이 방법은 anti-HCV 검사 방법에 의한 결과가 음성으로 나오는 급성기의 C형 간염을 진단하는데, anti-HCV 양성 혈액이 실제 감염력을 갖고 있는지를 판별하는데, 또한 항 바이러스제를 투여 후 치료반응을 판정하는데 유용하게 쓰이고 있다(20). 그리고 간접적으로 ALT의 활성을 보거나 직접적으로 간 생검이 이용될 수 있으나 양자 모두 선별검사에는 적합한 방법이 될 수 없다.

본 연구에서는 100명을 대상으로 대다수의 병원에서 사용되는 두 가지 C형 간염 항체검사와 HCV-RNA검사 그리고 간 기능 검사의 지표인 ALT 결과를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

HCV 항체 검사에서 모두 양성으로 나온 경우는 67예(67%), 모두 음성으로 나온 경우는 25예(25%)로 92%의 일치율을 보였다. 불일치를 보인 8예에서 Abbotte AxSYM에서 양성인 경우가 6예로 Roche Cobas core의 2예 보다 많이 관찰되었다. 불일치를 보인 8예에서 한 종류의 항체검사에서는 음성으로, 다른 종류의 항체검사에서는 양성인 경우 대부분의 결과가 낮은 역가를 나타내었으나 한 검체가 한 시약에서는 음성으로 판명되고 다른 시약에서는 역가가 높은 양성으로 나오는 경우도 1건이 관찰되었다. 황 등(20)에 의하면 B형 간염 항체 정량 검사에 이용되는 4가지 종류의 시약간에 92.8%의 일치율을 보여 결과해석에 주의를 요하고 있다. 본 연구에서도 100건 중에 92건의 일치율을 보였는데 불일치를 보인 8예 중 1예를 제외하고는 대부분 낮은 역가를 보여 역가와와의 상관성은 찾을 수

없었다. HCV-RNA와 Roche HCV 항체 검사결과는 74%의 일치율을 보였으며 HCV-RNA와 Abbott HCV 항체도 74%의 일치율을 보였다. HCV-RNA와 비교한 2가지 HCV 항체 검사는 일치율은 같으나 Abbott AxSYM 과 비교한 양성율이 2% 높았다. Screening test에서 양성을 나타내는 검체의 40-60%가 보충 확인 분석에서 음성을 나타내어 이들 면역학적 분석이 어렵다고 평가에 나타나 있는데(12) 본 실험에서도 HCV-RNA/Cobas HCV antibody의 양성율이 50%, HCV-RNA/AxSYM HCV Antibody의 양성율이 52%로 나왔으므로 타 논문들과 크게 상이함은 없었다. HCV-RNA와 비교된 2가지 HCV antibody 검사 중 HCV-RNA/Cobas에는 음성이나 HCV-RNA/AxSYM에 비교하였을 때 AxSYM에 저 역가인 2예는 ALT 수치가 낮은 것으로 보아 antibody가 생성 중일 것으로 사료된다. 두 가지 anti-HCV 항체 검사 상 음성이나 HCV-RNA 검사 양성인 5예 중 3예의 ALT 수치는 100 이상으로 급성간염의 소견을 보이는바 이는 anti-HCV 검사 상 양성으로의 전환이 이루어지는데 간염 발생 후 최소한 2-4개월이 필요하므로 아직 양성 전환이 이루어지지 않아서 음성으로 나타난 것으로 추측할 수 있다(20). 또한 HCV-RNA와 Roche HCV 항체 검사, Abbott HCV 항체 검사에서 모두 음성이면서 ALT 수치가 40IU/L 이상인 14명은 최근 환자들의 병력지를 조사해본 결과 2명은 병명이 Toxic hepatitis였으며 1명은 Gall Bladder storn이며 3명은 Fatty Liver였다. 나머지 중에는 염증성 간 질환 및 상세 불명의 염증과 그 밖의 질환을 가지고 있는 환자와 원인이 밝혀지지 않은 환자도 있었다.

이상의 결과를 볼 때 C형 간염 항체검사는 사용하는 검사 시약의 종류에 따라 검사결과에 차이를 보일 수 있으며 특히 낮은 역가를 보이는 경우는 음성결과를 보일 수 있으므로 결과 해석에 주의가 필요할 것으로 생

각된다. 또한 HCV 항체 검사는 50-52%만이 보충 확인 분석에서 양성으로 판정되었으므로 항체검사만으로 C형 간염을 진단하는데 에도 많은 문제가 있으며 만성C형 간염환자에서는 드물지만 간헐적으로 HCV-RNA가 검출되지 않을 수 있으므로 임상적으로 HCV가 의심이 되는 환자는 anti-HCV 항체 검사를 시행하여 우선 감염 여부를 확인하고 만일 anti-HCV 항체 검사상 음성이라도 HCV-RNA를 시행하거나 일정한 시기를 두고 anti-HCV 항체 검사와 HCV-RNA를 반복 시행해야 될 것으로 사료된다.

V. 요 약

C형 간염검사는 현재까지 다양한 종류의 항체 검사 시약이 개발되어 사용되고 있어 대부분 그 결과들이 일치하는 것으로 알려져 있지만 검사시약마다 사용되는 항원의 종류, 검체에서의 아형의 분포 등의 차이가 있으므로 사용하는 시약에 따라 어느 정도 검사결과의 차이는 있을 것으로 예상된다.

이에 본 연구에서는 2종류의 검사 kit를 이용하여 Anti-HCV 결과를 비교해 보았고, Anti-HCV 검사법의 위 양성이나 항체 형성기간 동안의 진단, 또는 감염 후 회복되었는지, 현재바이러스 혈증이 있는지를 구분하기 위해 HCV-RNA를 RT-PCR-Hybridization법으로 검사하고 이들의 결과와 혈청 간 기능 검사의 척도인 ALT(Alanin Aminotransaminase)를 비교해 C형 간염 진행의 정도에 따라, 검사 장비에 따라 놓칠 수 있는 경우를 찾아보고 연구 분석해 보고자 하였다.

대상 및 방법으로는 2002년 11월부터 3월 17일 까지 부산시내 소재 P대학병원 내과에서 진단검사 의학과로 의뢰된 HCV-RNA 정성검사 검체 100건을 무작위로 선정하였다. HCV 항체 검사는 Anti-HCV Ab EIA KIT(Roshe, COBAS CORE)와 Anti-HCV Ab MEIA KIT(Abbott, AxSYM)을 이용하여 검사하였고 HCV RNA 검사는 RT-PCR-Hybridization (Roshe Amplicore Hepatitis C Virus 2.0 Test) 정성 검사법을 실시하였다.

그 결과 100명중 2가지 종류의 HCV 항체 검사에서 모두 양성으로 나온 경우는 67예(67%), 모두 음성으로 나온 경우는 25예(25%)로 92%의 일치율을 보였다. 불일치를 보인 것은 8예(8%)였다. HCV-RNA와 Roche HCV 항체 검사결과는 74%의 일치율을 보였으며 HCV-RNA와 Abbott

HCV 항체도 74%의 일치율을 보였다. HCV-RNA 결과 양성인면서 HCV 항체 음성인 5예 중 간기능 수치 100 이상인 3명은 급성간염의 소견을 보였다. 또한 HCV-RNA와 Roche HCV 항체 검사, Abbott HCV 항체 검사에서 모두 음성인면서 ALT 수치가 40IU/L 이상인 14명 중에는 염증성 간 질환 및 상세 불명의 염증과 그 밖의 질환을 가지고 있는 환자들과 원인이 밝혀지지 않은 환자도 있었다.

결론적으로 C형 간염은 검사 시약에 따라 질병진행의 정도에 따라 놓칠 수 있는 경우가 있으므로 임상적으로 HCV가 의심이 되는 환자는 anti-HCV 항체 검사를 시행하여 우선 감염 여부를 확인하고 만일 anti-HCV 항체 검사상 음성이더라도 HCV-RNA 검사를 시행하거나 일정한 시기를 두고 anti-HCV 항체 검사를 반복 시행해야 될 것으로 사료된다.

VI. 인용문헌

1. Choo Q.L., Kuo G, Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244(4902), p. 359-362.
2. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T and Shimotohno K. 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 87, p. 9524-9528.
3. Choo Q.L., Weiner A.J., Overby L.R., Kuo G and Houghton M. 1990. The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. Medical British Medical Bulletin 46(2), p. 423-441.
4. Miller R.H., Peucedell R.H. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. Proc Natl Acad Sci USA 87, p. 2057-2061.
5. Kurosaki M, Enomoto N, Marumo F, Sato C. 1993. Rapid sequence variation of the hypervariable of hepatitis C virus during the course chronic infection. Hepatology 18, p. 1293-1299.

6. Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C. 1993. The hypervariable region of HCV genome changes sequentially during the progression of acute HCV infection to chronic hepatitis. *J of Hepatology* 17, p. 415-422.
7. 변관수, 이창홍. 1992. C형 바이러스 감염의 최신지견. *가정의학회지*. 13: 300-309.
8. Kuo G, Choo Q.L., Alter H.J., Gitnick G.L., Readeker A.G., Purcell R.H., Miyamura T, Dienstag J.L., Alter M.J., Stevens C.E., Tegtmeier F, Boonino F, Columbo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Schuster J.R., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, p. 362-364.
9. Barrera J.M., Bruguera M, Ercilla M.G., Sanchez-Tapias J.M., Gil M.P., Gil M.P., Gil C, Costa J, Gelabert A, Rodes J, Castillo R. 1991. Incidence of Non-A, Non-B hepatitis after screening blood donors for antibodies to hepatitis C virus and surrogate markers. *Ann Intern Med* 115, p. 596-600.
10. 김대원, 지현숙. 1993. C형 감염항체 검출을 위한 효소면역측정법 진단시약의 비교평가. *대한 수혈학회지* 4, p. 223-22.

11. 오영철, 최범석, 배형준, 김기홍, 김상인. 1992. 각종 EIA 시약을 이용한 C형 간염 항체 검출에 관한 연구. 대한수혈학회지 3, p. 47-53.
12. 오홍범, 황유성, 조연정, 김두성, 김상인. 1997. 국내 헌혈자에서의 항 HCV 항체 면역 블롯 검사 경험. 대한수혈학회지 8(1), p. 1-7.
13. Kim C.Y., Lee H.S., Han C.J. 1993. Relative etiologic role of hepatitis B virus and hepatitis C virus in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma among age-specific groups in Korea: the possible presence of non-B, non-C agents. Seoul J Med 34, p. 27-33.
14. Nishioka K, Watanabe J, Furuta S, Tanaka E, Lino S, Suzuki H. 1991. A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan. Cancer 67, p. 429-433.
15. 최윤미, 홍승복, 우경남, 이도훈. 1996. 임상 검체에서 중합효소연쇄반응을 이용한 C형 간염 바이러스의 검출. 충북의대학술지 6(1), p. 21-29.
16. Vernelen K, Claeys H, Verhaert H, Volkaerts A, Vermeylen C. 1994. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. Lancet 343, p. 853-854.

17. Soffendini R, Rumi M, Lampertico P, Aroldi A, Taratino A, Ponticelli C and Colombo M. Increased detection of antibody to hepatitis C virus in renal transplant patients by third-generation assays. *Am J Kidney Dis* 28(3), p. 437-440.
18. 오영철, 최범열, 배형준, 김기홍, 김상인. 1992. 각종 EIA 시약을 이용한 C형 간염 항체 검출에 관한 연구. *대한수혈학회지* 3(1), p. 47-52.
19. 이선희. 1998. 한국인에 있어서 C형 간염 바이러스 RNA 양성자의 HCV 혈청형 분포. 부산대학교의학박사학위논문.
20. 유병연. 1996. 간기능 검사 이상 소견을 보이는 B형 간염 표식자 음성인 환자의 anti-HCV(RIA)와 HCV RNA(PCR) 검사 방법을 통한 C형 간염 유병율의 비교. *건국의과학학술지* 5, p. 39-47.
21. 황동희, 신보문. 2002. B형 간염 항체 정량 검사에 있어서 검사 시약에 따른 차이 비교. *대한진단검사의학회지* 22(6), p. 424-430.

VII. 감사의 글

여러 가지로 미흡한 논문이지만, 이 논문이 나오기까지 도와주신 모든 분들께 감사 드립니다. 바쁘신 중에도 많은 지도와 가르침을 주신 최태진 교수님께 먼저 감사 드립니다. 항상 웃는 얼굴로 도움을 주셨던 이원재 교수님께도 감사 드립니다. 그리고 여러 가지로 조언을 해주신 김영태 교수님, 영국 신사 같으신 송영한 교수님, 전형적인 학자의 모습이신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 이명숙 교수님께도 감사 드립니다. 자료수집 등 많은 도움을 준 오진희 선생과 조카길보, 동기생인 이규, 김지영, 김지선, 힘들고 어려울 때 격려해주고 도움을 준 것도 고맙고, 공부를 계속할 수 있게 도와주신 직장 동료, 선후배님들께도 고맙음을 표합니다. 그리고 저와 저희 가족을 위해 항상 기도하시며 뒷바라지 해 주신 어머니, 남편, 딸 은교, 귀염둥이 은수, 사랑하는 가족들이 가장 큰 힘이 되었습니다.

논문 마치며 감사의 글을 적는 지금도 생각해보니 제 주위에는 고마운 분들이 너무 많은 것 같습니다. 저와 제 가족을 위해 기도해 주신 모든 분께 감사 드립니다.

2003. 6