

핵산증폭시험을 이용한 혈장분획물질에서 HCV RNA 검출

홍승희

한국보건복지인력개발원

HCV는 HIV 등과 함께 수혈이나 혈장분획물질을 통하여 감염되는 주요 바이러스이다. 주로 혈액이나 혈장에서 HCV에 대한 항체를 검출함으로써 HCV의 감염을 방지하고 있다. 그러나 바이러스에 감염되었으나 항체가 생성되기 이전이나 항체의 양이 적은 경우에는 HCV의 검출이 어렵다. 따라서 핵산증폭시험(nucleic acid amplification tests, NAT)을 이용한 HCV 유전자를 검출하려는 시도들이 진행되고 있다. 이 연구의 목적은 혈장분획물질에서 HCV RNA를 검출할 수 있는 핵산증폭시험 방법을 개발하는 것이다. 5종류의 PCR primer를 선별하여 실험에 이용하였다. 혈장분획물질의 HCV RNA 추출에는 컬럼 방법을 이용하는 것이 유용한 것으로 나타났다. 핵산증폭시험의 절합 온도는 48°C가 가장 적절한 것으로 나타났다. 또한 2차 PCR의 경우, 1차 PCR 산물 1 µl과 30 pmol의 primer를 사용하였을 때 높은 민감도와 특이성을 보이는 것을 알 수 있었다. 혈장분획물질에 HCV를 주입하여 핵산증폭시험을 수행한 결과, 100 IU/ml까지 검출할 수 있었다. 한편 근육주사용항체(IMIG)의 경우 핵산증폭시험을 통한 검출한계는 100 IU/ml로 COBAS amplicor HCV2.0의 500 IU/ml 이상의 검출한계보다 민감도가 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과들로 보아 본 실험에 이용된 핵산증폭시험이 혈장분획물질에서 HCV RNA를 검출하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Key words □ Hepatitis C virus, Nucleic acid Amplification Tests (NAT), plasma-derived products

Hepatitis C virus (HCV)는 단일가닥으로 구성된 약 9.4 kb의 positive-strand RNA 유전자로 이루어져 있으며, pestivirus, flavivirus와 구조적으로 연관성이 있는 것으로 알려졌다(15). HCV 유전자가 밝혀짐에 따라 HCV 검출에 유전자를 이용하는 방법들이 개발되고 있다(5). 하지만 혈액 및 혈장에서 바이러스를 검출하려는 시도에도 불구하고, 혈액을 통하여 HCV 감염 사례들이 보고되고 있으며 혈장분획물질을 통한 HCV의 감염에 대한 가능성이 여전히 남아있다. 1990년대까지는 제조과정에서의 바이러스의 불활성화 기술에 중점을 두어 다양한 가열법이나 계면활성제를 이용한 불활성화 방법이 개발되어 혈장분획물질에 의한 HIV 등의 감염의 가능성이 낮아졌다. 그러나 그 후에도 비교적 안전하다고 생각되었던 면역글로블린에서 HCV 감염이 발생하여 제조과정에서의 바이러스 불활성화 뿐만 아니라 혈장에서의 바이러스 감염을 예방할 필요성이 인식되었다(2, 3, 8).

혈액을 통한 HCV의 감염을 방지하기 위하여 수혈한 혈액에 HCV 항체검사를 도입함으로써 감염의 가능성은 상당히 감소하였다. 그러나 바이러스가 인체에 감염되면 항체가 생성되기까지는 일정기간(window period)이 필요하다. 이 기간은 바이러스에 따라 다르지만, HCV는 평균 82일로 상당히 길며 이 기간의 혈중 바이러스 양은 10^7 genome equivalents per ml (gEq/ml)까지

올라가는 경우도 있다(10). 또한 항체가 생성되었다고 하더라도 그 양이 작아 항체실험에서 검출될 수 있는 수준 이하라면 혈액에 감염되어 있는 HCV를 기존의 항체검출 방법으로 완벽하게 검출하는데 한계가 있다(1). 그러므로 핵산증폭시험(nucleic acid amplification tests, NAT)이 혈액에서 HCV RNA를 검출할 수 있는 새로운 방법으로 시도되고 있으며, 항체생성 이전 기간에 있는 혈액에서도 HCV를 검출함으로써 감염에 대한 위험을 상당히 감소시킬 수 있을 것으로 예상하고 있다(10). 핵산증폭시험이 고감도인 점을 이용하여 혈장을 pool로 만들어 검사를 수행하는 것이 가능하게 되었으며 일부에서는 이 방법을 도입함으로써 혈장분획물질의 안전성이 매우 높아지고 있다.

핵산증폭시험은 효소중합연쇄효소 반응(PCR), transcription-mediated amplification (TMA), branched DNA (bDNA) 신호 증폭법 등이 사용되고 있다. 그 중에서도 주로 많이 이용되고 있는 방법은 역전사 효소 PCR을 이용한 핵산증폭방법으로서, 이 방법을 이용한 HCV RNA 검출에 대한 연구들이 발표되고 있다(6, 7, 9, 12, 13). 하지만 기존에 발표된 연구들에 의하면 HCV RNA 검출의 민감도와 특이도가 연구자들 간의 서로 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다. 또한 한국인의 HCV genotype은 1b가 주로 많은 것으로 보고되었다(11). 그러므로 본 연구에서는 한국인의 HCV genotype에 적용 가능하면서, RNA 검출에 영향을 미치는 여러 조건들의 검증을 통한 혈장분획물질에서 최적의 민감도와 특이도를 보이는 HCV RNA를 검출할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-3156-1164, Fax: 82-2-3156-1189
E-mail: shhong@khrdi.or.kr

재료 및 방법

표준 혈장 및 혈장분획물질

HCV RNA를 검출하기 위한 핵산증폭시험에 이용한 HCV RNA는 NIBSC (National Institute for Biological Standard and Control, England)로부터 분양 받은 HCV RNA WHO 국제표준품(96/790), 50,000 IU/ml을 사용하였다. 각 바이알을 0.5 ml의 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 100,000 IU/ml의 농도로 이용하였다. 핵산증폭시험의 검출한계를 측정하기 위한 실험에는 HCV RNA 표준품을 HCV RNA가 음성인 사람의 혈장에 주입하거나 희석하여 이용하였다.

실험에 이용한 혈장분획물질은 albumin, IVIG (intravenous immunoglobulin), IMIG (intramuscular immunoglobulin), coagulation factor VIII, coagulation factor IX, antithrombin III으로서 녹십자 (Korea) 제품을 사용하였다. 냉동진공동결된 물질을 DEPC가 처리된 증류수에 녹여 4°C 보관하였다. 다만 albumin은 실온에서 보관하였다.

HCV RNA 추출

혈장분획물질로부터 HCV RNA 추출에는 주로 멤브레인 필터 법인 QIAamp Viral RNA Isolation Kit (QIAGEN)을 사용하였다. 우선 140 µl 또는 280 µl의 검체를 lysis buffer 560 µl 또는 1,120 µl와 함께 넣어 잘 섞은 후 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 560 µl 또는 1,120 µl의 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리하여 여과된 여액은 버리고 새 튜브에 column을 옮겼다. AW1과 AW2 buffer를 이용하여 세척한 후, Spin column을 새로운 tube에 옮긴 후 70 µl 혹은 140 µl의 AVE buffer를 넣은 후 실온에서 1분 동안 반응시킨 후 원심분리하여 얻은 HCV RNA 용액을 핵산 증폭에 이용하였다. 그 외에 최적의 HCV RNA 추출 조건을 확립하기 위하여 Accuprep Viral RNA Extraction Kit (Bioneer), Viral RNA premate (Bioneer), Ultraspec-II RNA Isolation System (Biotext) 등을 사용하여 RNA를 추출하였다. HCV RNA 추출은 각각의 키트에서 제시하는 방법에 따라 수행하였다.

cDNA 합성 및 polymerase chain reaction (PCR)

cDNA 합성 및 first PCR, nested PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer Co., USA)을 사용하여, RNA PCR kit Ver. 2.1. (TaKaRa Shuzo Co., Ltd. Japan)을 이용하여 실시하였다. cDNA 합성은 AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하였으며, 42°C, 50°C, 58°C의 조건 중에서 최적 역전사 효소반응 온도를 결정하였다. HCV RNA 10 µl를 포함하여 총 반응 부피는 20 µl를 이용하였다.

핵산증폭시험은 outer primers와 inner primers를 이용한 두 단계를 통한 핵산 증폭 방법인 nested PCR을 이용하였다. 온도 조건은 1차 PCR, nested PCR 모두 pre-denaturation은 95°C 3분, denaturation은 95°C 30초로 하였고, primer가 template에 결합하는 온도는 각각 42°C, 48°C, 52°C, 55°C를 사용하여 30회 반복

하여 증폭하였다. Nested PCR 시 가장 높은 감도를 나타내는 적절한 primer 양과 1차 PCR 산물의 농도를 결정하기 위하여, 10 pmol, 30 pmol, 50 pmol의 primer와 1 µl, 5 µl, 10 µl의 1차 PCR 산물을 이용하였다. PCR의 산물은 2% agarose gel (Sigma chemical Co., USA)에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

COBAS amplicor HCV 2.0을 이용한 HCV RNA 검출

RNA의 추출은 amplicor HCV specimen preparation kit, v2.0 (Roche Diagnostic Systems, USA)을 이용하였다. 처리된 검체는 working master mix가 담긴 tube에 넣은 후 COBAS amplicor™ analyzer (Roche Diagnostic Systems, USA)에 장착하였다. 증폭과 검출은 자동적으로 수행되며, A₆₆₀에서 측정하여 결과를 판정하였다. 마지막 단계에서 증폭된 biotinylated amplicons을 변형시켜 반응하면 HCV 특이물질(probe)이 부착된 자석에 잡히게 된다. 다음에는 amplicons을 avidine-horseradish peroxidase conjugate와 반응시키고, 여기에 tetramethylbenzidine 기질과 반응시키면 청색으로 발색되며 OD 660 nm에서 측정하였다.

결 과

HCV RNA 추출 방법 선별

본 실험에서는 RNA 추출방법이 HCV RNA 검출 감도에 미치는 영향을 확인하여 민감도와 특이도가 높은 방법을 선별하고자 하였다. 실험에 사용한 RNA 추출 방법은 컬럼을 이용하는 방법과 guanidine salts lysis 방법이다. 이들을 이용하여 실험한 결과, QIAGEN 회사의 RNA 추출 키트가 가장 효율적인 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그림에서 볼 수 있듯이 QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN)의 경우는 100 IU/ml의 감도를 보이고 있으며 Accuprep viral RNA extraction kit (Bioneer, Korea)의 경우는 500 IU/ml의 감도를 보이고 있다. 반면에 나머지 두 종류

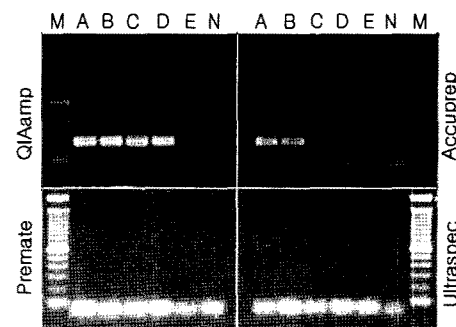


Fig. 1. Comparison of RNA isolation efficiency for HCV RNA detection. Four different RNA extraction kits were used to HCV RNA isolation. RT-PCR and nested PCR were performed with primer 4. PCR products were detected in size 218 bp. The highest detection sensitivity was shown by using QIAGEN viral RNA isolation kit. M, 1 kb plus ladder; A, 1000 IU/ml; B, 500 IU/ml; C, 200 IU/ml; D, 100 IU/ml; E, 20 IU/ml; N, HCV negative human plasma.

Table 1. Nucleotide sequences of candidate primers from the 5'-terminal region of the HCV

Sets	Outer/inner	Nucleotide ^a	Polarity	Sequences (5'-3')	References
1	outer.	62-79	+	AGCGTCTAGCCATGGCGT	Hsiang <i>et al.</i> (1992)
		309-325	-	GCACGGTCTACGAGACCT	
	inner	131-147	+	GTGGTCTGCGGAACCGG	
		287-304	-	GGGCACTCGCAAGCACCC	
2	outer	6-26	+	GGCGACTCCACCATAGATC	Fanson <i>et al.</i> (2000)
		309-329	-	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	
	inner	33-53	+	CTGTGAGGAAGTACTGTCTTC	
269-289		-	CCCTATCAGGCAGTACCACAA		
3	outer	7-25	+	GCGACTCCACCATAGAT	Sayah <i>et al.</i> (1994)
		310-329	-	GGTGCACGGTCTACGAGACC	
	inner	15-31	+	CCACCATAGATCACTCC	
		276-296	-	GCAAGCACCCCTATCAGGCAGT	
4	outer	71-90	+	CCATGGCGTTAGTATGAGTG	Petrik <i>et al.</i> (1997)
		309-329	-	TGCACGGTCTACGAGACCT	
	inner	87-106	+	AGTGTGTGTCAGCCTCCAGG	
		287-304	-	CACTCGCAAGCACCCCTATC	
5	outer	18-37	+	CCATAGATCACTCCCCTGTG	Heermann <i>et al.</i> (1996)
		284-303	-	GGCACTCGCAAGCACCTAT	
	inner	45-64	+	ACTACTGTCTTCACGCAGAAAGC	
242-260		-	GCGACCCAACACTACTCGGC		

^aPosition of 5' end, numbered according to HCV- 1b (accession number D50485)

의 키트는 1,000 IU/ml의 농도에서도 RNA가 검출되지 않았다. Ultraspec의 경우, 가장 낮은 감도를 보이고 있는데, 그 이유는 아마도 바이러스 RNA처럼 적은 양의 RNA 분리 방법으로는 적절하지 않은 것으로 생각된다. 나머지 Accuprep이나 Premate kit는 각각 chaotropic salt (guanidine salts and urea)와 guanidinium salt를 이용하여 RNA를 분리하는 것인데, 이 키트들도 HCV RNA 분리에는 별로 효율적이지 못한 것임을 알 수 있었다. 또한 이 실험을 통하여 RNA 추출 방법에 따라 RT-PCR을 이용한 HCV RNA 검출의 민감도와 특이도가 영향을 받는다는 것을 확인할 수 있었다.

Primer의 선별

기존에 발표된 여러 자료들을 바탕으로 HCV genotype에서 가장 많이 분포하는 것으로 있는 알려진 5'-untranslated region에서 5개의 후보 primer set를 선별하였다(Table 1). Primer 선별에 이용한 표준 유전자는 HCV-1b (accession number D50485)를 이용하였다. 적은 양의 RNA를 검출해야 하는 한계를 극복하기 위하여 PCR을 nested PCR로 수행하고자 하였으며, 그에 맞추어 외부 PCR primers와 유전자 안쪽 부분에 외부 PCR primers와 겹치거나, 또는 겹치지 않도록 내부 PCR primers를 설계하였다.

HCV RNA 검출을 위한 PCR의 최적화

HCV RNA 검출을 위한 PCR 반응은 2단계 반응인 nested PCR을 수행하였다. 우선 각 primer의 적절한 결합(annealing) 온도를 결정하고자 하였다. 앞의 방법으로 추출한 RNA를 이용하여 여러 온도에서 PCR을 수행한 결과, primer 4의 경우, 결합 온도 48°C에서 250 IU/ml까지 검출할 수 있었으며, primer 5의 경우, 결합 온도 48°C와 52°C에서 역시 250 IU/ml까지 검출할 수 있었다(Table 2). 반면에, primer 2와 3은 HCV 유전자 상에서 primer의 위치가 HCV RNA의 5-UTR 부분의 끝에 위치하고 있으며 다른 primer들에 비하여 민감도가 낮아 1,250 IU/ml의 검출 한계를 보이고 있다. 결국, primer 4와 5는 비슷한 감도를 보였으나, primer 5의 경우에는 HCV 유전자상의 primer 위치가 primer 4에 비해 5' 끝에 위치하고 있어 여러 저해인자에 의해 외부 정방향(outer sense) primer의 결합력이 떨어질 가능성이 있으므로, primer 4를 가장 적당한 primer로 선택하였으며, 이때의 결합 온도는 48°C로 결정하였다.

최적의 민감도와 특이도를 보이는 nested PCR을 조건을 확립하기 위하여 primer의 농도와 1차 PCR 산물의 농도를 결정하고자 하였다. 10 pmol, 30 pmol, 50 pmol의 primer 농도와 1 µl, 5 µl, 10 µl의 1차 PCR 산물을 실험에 이용하였다. 실험 결과,

Table 2. Comparison of annealing temperature of each primers

Primer set	Anneal. Temp.	Sensitivity at RT-PCR (IU/ml)			
		42°C	48°C	52°C	55°C
Primer 1	NT	500	500	500	500
Primer 2	1,250	1,250	1,250	1,250	NT
Primer 3	2,500	2,500	2,500	2,500	NT
Primer 4	NT	250	500	250	250
Primer 5	NT	250	250	500	500

NT, Not tested

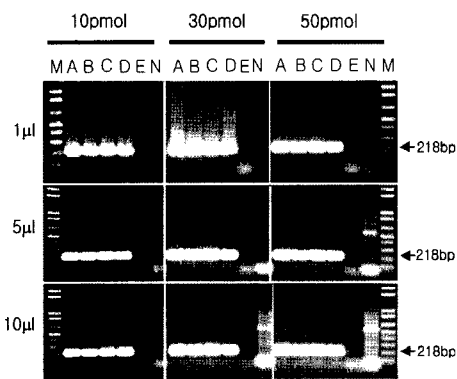


Fig. 2. Optimization of primers and 1st PCR product concentrations for nested PCR. Nested PCR was carried out various concentrations of inner primers and 1st PCR products. Primers concentrations were used to 10 pmol, 30 pmol, and 50 pmol and PCR product was applied to 1 µl, 5 µl, and 10 µl. PCR products were separated on 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide. The row shows primer concentrations and the column also shows 1st PCR products amount. M, 1 kb plus ladder; A, 1000 IU/ml; B, 500 IU/ml; C, 200 IU/ml; D, 100 IU/ml; E, 20 IU/ml; N, HCV negative human plasma.

primer 농도가 10 pmol 보다는 30 pmol 이나 50 pmol일 때 밴드가 더 진한 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 1차 PCR 산물의 양역시 1 µl 보다는 5 µl 이나 10 µl 에서 더 진한 밴드를 관찰 할 수 있었다. 그러나, primer 농도와 1차 PCR product의 양이 많은 경우에는 비록 민감도는 더 나올 수 있지만, 오히려 비특이적 밴드들이 나타날 가능성 많을 것으로 추측된다. 그러므로 HCV RNA 검출을 위한 nested PCR의 최적의 primer 농도는 30 pmol로 결정하였으며 1차 PCR 산물의 양은 1 µl를 이용하기로 하였다.

위의 결과들을 토대로 최적의 조건을 갖춘 핵산증폭시험의 특이도를 검증하기 위하여 100개의 사람의 혈장 검체를 이용하여 nested PCR을 수행한 결과, 모두 음성으로 확인되었다(자료 미제시). 이러한 결과는 우리가 HCV RNA를 검출하기 위하여 개발한 핵산증폭시험이 HCV RNA를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.

혈장분획물질에서 HCV RNA의 검출

실제로 혈장분획물질에서 HCV RNA 검출의 민감도와 특이도

Table 3. Comparison with NAT and COBAS amplicor HCV 2.0 for detection of spiked HCV RNA

	NAT (IU/ml)				COBAS amplicor HCV 2.0 (IU/ml)			
	500	250	100	50	500	250	100	50
Albumin	+	+	+	-	+	+	+	-
IMIG ^a	+	+	+	-	-	-	-	-
IVIG ^b	+	+	+	-	+	+	+	-
Factor VIII	+	+	+	-	+	+	+	+
Factor IX	+	+	+	-	+	+	+	+
Antithrombin III	+	+	+	-	+	+	+	+

^a Intramuscular immunoglobulin

^b Intravenous immunoglobulin

를 확인하기 위하여 HCV를 여러종류의 혈장분획물질들에 주입하여 핵산증폭시험을 수행하였다. 실험에 이용한 혈장분획물질에는 알부민(albumin), 근육주사용항체(IMIG), 정맥주사용항체(IVIG), 혈액응고 팩터 VIII, 혈액응고 팩터 IX, 그리고 안티트롬빈 III이다. 또한 핵산증폭시험의 효율성을 비교하기 위하여 본 실험에서 조건을 잡은 핵산증폭시험과 HCV RNA 검출에 가장 많이 사용되고 있는 COBAS amplicor HCV 2.0 (Roche)을 비교하여 실험하였다. 그 결과, 핵산증폭시험의 경우 혈장분획물질에서 100 IU/ml 농도까지 HCV RNA를 검출할 수 있었으며, COBAS amplicor HCV 2.0의 경우는 혈장분획물질에 따라 서로 다른 민감도를 보이고 있다(Table 3). 즉 혈액응고 팩터와 안티트롬빈 III의 경우는 50 IU/ml의 가장 높은 민감도를 보이고 있다. 알부민과 정맥주사용항체에서는 100 IU/ml까지 검출이 가능하며 이것은 핵산증폭시험의 결과와 동일한 민감도를 보이고 있다. 반면에 근육주사용항체의 경우에는 핵산증폭시험에서는 100 IU/ml까지 검출되었으나, COBAS amplicor HCV 2.0에서는 전혀 검출되지 않았다. 아마도 이러한 현상은 항체 단백질이 16.5%로 상당히 많은 양이 들어 있는 근육주사용항체의 특징 때문으로 생각된다. 그러므로 항체의 양을 다양한 농도로 희석한 후, HCV를 주입하여 COBAS amplicor HCV 2.0을 통하여 검출한 결과, 항체의 양이 적을 수록 HCV RNA 검출의 민감도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Table 4). 즉 항체의 양이 2.5%로 들어있는

Table 4. Detection of spiked HCV RNA using COBAS amplicor HCV 2.0 in diluted concentration of immunoglobulin

Concentration (%)	HCV (IU/ml)			
	500	250	100	50
16.5	-	-	-	-
10	+	+	+	-
5	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+

경우는 50 IU/ml까지 검출이 가능하지만 16.5%로 들어 있는 경우는 500 IU/ml에서도 검출이 불가능하였다. 이러한 결과로서 알 수 있는 것은 핵산증폭시험이 COBAS amplicor HCV 2.0에 비하여 민감도가 낮지 않으며, 근육주사용항체의 경우에는 COBAS amplicor HCV 2.0에 비하여 매우 높은 민감도를 보이고 있어 향후 혈장분획물질에서 HCV RNA검출에 유용한 방법으로 쓰일 수 있다는 것을 보여준다.

고 찰

현재 다양한 방법들이 HCV RNA 검출에 사용되고 있으며, 그 중에서도 주로 핵산증폭시험이 이용되고 있다. 그러나 민감도와 특이도가 높은 핵산증폭시험을 확립하기 위해서는 다양한 조건들을 고려하여야 한다. 첫 번째는 추출하고자 하는 시료에서 HCV RNA의 추출과 관련되어 있다. 추출된 RNA의 양과 질에 따라 그 다음 역전사와 PCR에 영향을 주게 된다. 특히 바이러스 유래 RNA는 시료에 소량으로 존재하는 특성으로 인하여 더욱 민감도가 높은 방법을 사용하여야 한다. 본 실험에서도 RNA를 추출하는 여러 가지 방법들을 비교하여 실험하였고, 그 결과가 가장 민감도가 높은 방법을 선별하였다. 다음으로는 primer의 선별에 달려 있다. HCV의 경우 가장 높은 민감도와 특이도를 보이는 primer의 위치는 5'-UTR 지역으로 알려져 있다. 왜냐하면 이 위치가 HCV 바이러스들 간에 가장 많이 일치하는 부분 (conserved region)으로 시료에 존재하는 HCV RNA 검출시에 놓치는 HCV 바이러스가 없도록 하기 위하여 주로 사용된다(4). 본 실험에서도 5'-UTR 부분에 있는 5종류의 primer 중 여러 조건을 통한 실험 결과 가장 적절하다고 보여지는 primer를 선별하였다. 그러므로 적절한 핵산증폭시험의 조건을 확립하기 위한 변수들로서, 역전사효소반응의 최적온도와 primer의 농도, 결합 온도, MgCl₂ 농도, 1차 PCR 산물의 양 등 다양한 조건들을 비교하여 실험하였으며 그 결과 HCV RNA 검출에 최적화된 핵산증폭시험을 확립하였다.

핵산증폭시험을 이용한 HCV RNA를 검출하고자 하는 많은 연구들이 진행되어 오고 있으며 기존에 여러 연구의 결과들이 보고되었다(6, 7, 9, 12, 13). 하지만 연구들간의 HCV RNA 검출의 민감도와 특이도의 차이를 보이고 있다. 또한 최대의 민감도와 특이도를 보이는 방법을 개발함으로써 혈액 내에 있는 한 개의 HCV genome까지 검출하는 것이 여러 연구자들의 목표라 할 수 있다. 본 연구의 목표 중 하나는 한국인에게 주로 분포하고 있는 HCV genotype을 최대한으로 검출할 수 있는 방법의 확립이다. 이전의 연구결과에 의하면 한국인이 가장 많이 가지고 있는 HCV genotype은 1 b로서 약 70% 이상의 분포를 보이고 있는 것으로 나타났다(11). 그러므로 본 연구에서 이용한 여러 유전정보 및 프라이머들은 HCV genotype 1 b를 reference로 이용하였다. 비록 이 연구에서는 한국인의 혈청을 이용한 실험까지 진행하지 못하였지만, 향후 한국인의 HCV RNA를 검출하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

혈색소(heme), 항응고제제(EDTA, heparin), 높은 농도의 백혈

구 유전자, 또는 알려지지 않은 혈액 내에 존재하는 다양한 억제제(inhibitor)들이 핵산증폭의 효율을 감소시키는 것으로 알려졌다(16). 이러한 억제제들은 세포 용해, 핵산 분해, DNA 중합효소의 불활성화 등의 기작으로 핵산증폭을 방해하는 것으로 생각된다. 혈장에도 이런 억제제들이 포함되어 있으므로 분리과정에서 제거하여야 하며, 만약 그렇지 못할 경우 핵산증폭시험의 위음성(false-negative)을 얻을 가능성이 있다. 혈장분획물질 역시 혈장으로부터 크로마토그래피 등 여러 방법들을 이용하여 생성된 물질로서 핵산증폭의 억제제를 제거할 필요성이 있다. 또한 혈장분획물질에 첨가되는 안정제, 보존제 및 고농도의 단백질도 핵산증폭의 억제제로 작용할 수 있다. 본 실험에서도 높은 농도의 항체가 COBAS amplicor HCV 2.0을 사용한 HCV RNA 검출에 억제제로 작용하여 항체를 희석하였을 경우에만 높은 민감도를 보이며 검출 할 수 있다는 결과를 얻었다.

혈장분획물질에 HCV의 오염을 방지하기 위해서는 우선 혈장에서의 스크리닝이 중요하며 제조과정에서도 바이러스 검출을 통한 바이러스 오염을 차단해야 한다. 그럼에도 불구하고, 혈장분획물질을 통한 감염사고가 일어날 수 있는 가능성을 완전히 배제할 수 없기 때문에 혈장분획물질의 오염 여부를 검사하여야 한다. 그러나, 기존에 주로 이용되고 있는 COBAS amplicor HCV 2.0으로는 완제품에 대한 시험을 보증 할 수 없으며, 일반적으로 항체의 농도가 높을수록 PCR에서 위음성이 나타난다고 보고하고 있다(14). 따라서 본 실험에서는 COBAS amplicor HCV 2.0과 핵산증폭시험을 비교하여 실험하였다. 결과에서도 알 수 있듯이 COBAS amplicor HCV 2.0의 경우는 일부 혈장분획물질에서는 핵산증폭시험보다 더 높은 민감도를 보이고 있지만, 근육주사용항체의 경우에는 검출 한계가 매우 낮아 검출이 매우 어려운 것을 알 수 있었다. 반면에 본 연구에서 확립한 핵산증폭시험의 경우는 혈장분획물질의 종류와 상관없이 100 IU/ml의 상당히 높은 민감도를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이, 많은 양의 항체 단백질로 인하여 COBAS amplicor HCV 2.0로는 검출이 어려운 근육주사용항체에서도 100 IU/ml의 민감도를 보이고 있으며 이는 핵산증폭시험 방법이 기존에 주로 사용되고 있는 HCV RNA 검출 방법들과 함께 HCV RNA 검출에 매우 적절한 방법으로 개발되었다는 것을 확인할 수 있다.

참고문헌

1. Bukh, J., R.H. Purcell, and R.H. Miller. 1992. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 187-191.
2. Chandra, S., J.E. Cavanaugh, C.M. Lin, C. Pierre-Jerome, N. Yerram, R. Week, E. Ianigan, and F. Feldamn. 1999. Virus reduction in the preparation of intravenous immune globulin: in vitro experiments. *Transfusion* 39, 249-257.
3. Christopher, J., N.K. Healiy, J.D. Sabharwal, D. Fiona, Y. Pen-Lee, A.F. Kenneth, W.G. Roger, P.S. Chapman, and H. Chapel. 1996. Outbreak of acute hepatitis C following the use of anti-hepatitis C virus-screened intravenous immunoglobulin therapy. *Gastroenter-*

- ology 110, 1120-1126.
4. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
 5. Echevarria, J.M., P. Len, C.J. Domingo, J.A. Lopez, C. Elola, M. Madurga, F. Salmern, P.L. Yap, J. Daub, and P. Simmonds. 1996. Laboratory diagnosis and molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis C virus infection among recipients of human intravenous immunoglobulin in Spain. *Transfusion* 36, 725-730.
 6. Fanson, B.G., P. Osmack, and A.M. Bisceglie. 2000. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J. Virol. Meth.* 89, 23-27.
 7. Heermann, K.H., H. Seitz, and R. Thomssen. 1996. Capture and RT-PCR of hepatitis C virus RNA with safety primers. *J. Virol. Meth.* 59, 33-43.
 8. Houghton, M., K. Richman, J. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, L. Overby, A. Weiner, D. Bradley, G. Kuo, and Q.L. Choo. 1991. Hepatitis C virus (HCV): A relative of the pestiviruses and flaviviruses, p. 328-333. In F.B. Hollinger, S.N. Lemon, and H. Margolis (eds.), *Viral Hepatitis and Liver Disease*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
 9. Hsiang, J.L., S. Naiyi, M. Masashi, and F.B. Hollinger. 1992. Polymerase chain reaction assay for Hepatitis C virus RNA using a single tube for reverse transcription and serial rounds of amplification with nested primer pairs. *J. Med. Virol.* 38, 220-225.
 10. James, L.G. and D. Elizabeth. 2000. Blood screening by nucleic acid amplification technology : Current issues, future challenges. *Mol. Diagn.* 5, 11-22.
 11. Lee, D.S., Y.C. Sung, and Y.S. Whang. 1996. Distribution of HCV genotypes among blood donors, patients with chronic liver disease, hepatocellular carcinoma, and patients on maintenance hemodialysis in Korea. *J. Med. Virol.* 49, 55-60.
 12. Petrik, J., G.J. Pearson, and J.P. Allain. 1997. High throughput PCR detection of HCV based on semiautomated multisample RNA capture. *J. Virol. Meth.* 64, 147-159.
 13. Sayah, N., M. Freddie, and B. Robin. 1994. Simultaneous amplification and detection of specific Hepatitis B virus and Hepatitis C virus genomic sequences in serum samples. *J. Med. Virol.* 42, 212-216.
 14. Waleed, A.A., J.J. Leif, and R. Peter. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 345-350.
 15. Widell, A., Y.Y. Zhang, B. Anderson-Gre, and L. Hammarstrm. 1997. At least three hepatitis C virus strains implicated in Swedish and Danish patients with intravenous immunoglobulin-associated hepatitis C. *Transfusion* 37, 313-320.
 16. Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.

(Received October 8, 2008/Accepted November 6, 2008)

ABSTRACT : A Nucleic Acid Amplification Tests for Reliable HCV RNA Detection Method for Plasma-Derived Products

Seung-Hee Hong (Korea Human Resource Development Institute for Health and Welfare, Seoul 122-701, Republic of Korea)

HCV is transmitted via various plasma derived products. Current methods to detect hepatitis C virus (HCV) are based on its antibody detection in the donated blood and plasma. Viral contamination can potentially escape such detection during the window period of infection, when no antibody is present or the level of antibody is too low to detect. It is trying to application of nucleic acid amplification tests (NAT) for the direct detection of HCV. The objective of this study was to develop a reliable NAT for the HCV RNA detection from plasma-derived products. The most useful primers was selected for NAT among 5 sets of primers. We have also found that QIAamp viral RNA isolation kit was the most efficient for HCV RNA isolation. The highest sensitivity and specificity was appeared in 48°C annealing temperature and 30 pmol of primers. With a spiking of HCV to albumin, immunoglobulins and coagulation factors, NAT can detect up to 100 IU/ml. Meanwhile, COBAS amplicor HCV 2.0 afforded a lower sensitivity in high concentrated intramuscular immunoglobulins to below 500 IU/ml. Our results suggested that NAT appears to be a highly sensitive and specific method for HCV RNA detection in plasma-derived products.