

거대세포바이러스와 엡스타인바바이러스 DNA 정량검사를 위한 핵산 추출

Nucleic Acid Extraction for the Quantification of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus

성흥섭¹ · 황상현² · 고영진¹ · 김미나¹

Heungsup Sung, M.D.¹, Sang-Hyun Hwang, M.D.², Young-Jin Koh, M.D.¹, Mi-Na Kim, M.D.¹

울산의대 서울아산병원 진단검사의학교실¹, 국립암센터 진단검사의학교과²

Department of Laboratory Medicine¹, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Center for Diagnostic Oncology and Hematologic Malignancy Branch, Division of Translational & Clinical Research II, National Cancer Center, Goyang, Korea

Background: Availability of an international standard will improve the standardization of quantitative PCR (qPCR) for cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV); however, nucleic acid extraction methods may affect qPCR results. This study was designed to determine whether routine measurement of DNA concentration and purity is required in qPCR for CMV and EBV. In addition, the performance of the automated QIASymphony DSP DNA Mini kit (Qiagen, USA) and the manual QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) in extracting DNA from whole blood samples was compared.

Methods: The concentration and purity of 300 extracted DNA samples were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). A total of 72 and 54 whole blood samples were tested by artus CMV and EBV qPCR (Qiagen), respectively.

Results: No correlation was found between DNA concentration and EBV DNA load or between DNA purity and the PCR inhibition measured by ΔCq (the difference between internal control Cq of the sample and that of the negative control). Quantification of CMV and EBV DNA using the two extraction methods showed highly similar results ($\rho = 0.946$ and 0.887 , respectively). Of the 29 specimens that yielded CMV DNA by both methods, however, 8 specimens (27.6%) yielded higher CMV DNA loads with QIASymphony.

Conclusions: Routine measurement of DNA concentration and purity is not necessary for qPCR of CMV and EBV. The automated QIASymphony outperformed the manual QIAamp Blood Mini kit in extracting CMV and EBV DNA from whole blood samples.

Key Words: Nucleic acid extraction, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, MIQE guideline

서 론

거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV)와 엡스타인바바이러스(Epstein-Barr virus, EBV)는 면역억제 환자에서 재활성화되어 각각 조직침습성질환과 림프세포증식질환을 일으킬 수 있다[1, 2].

Corresponding author: Heungsup Sung

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, 88 Olympic-ro 43-gil, Seoul 05505, Korea
Tel: +82-2-3010-4499, Fax: +82-2-478-0884, E-mail: sung@amc.seoul.kr

Received: April 28, 2015

Revision received: December 14, 2015

Accepted: January 25, 2016

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2016, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

최근 CMV와 EBV에 대한 예방적 또는 선제적 항바이러스제 치료가 증가하면서, 모니터링 검사로서 CMV, EBV DNA 정량을 위한 실시간 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 검사법이 보편화되었다[3, 4]. CMV, EBV qPCR 검사는 Conformité Européenne (CE) 또는 미국 식품의약품안전처(U.S. Food and Drug Administration, FDA) 승인을 얻은 검사법들이 이용 가능하다[5-7]. 또한 CMV qPCR 검사 키트들은 2010년 WHO가 제작하여 시판하는 국제 표준물질(NIBSC code: 09/162)을 기준으로 보정(calibration)되었기 때문에, “IU/mL” 또는 “log₁₀ copies/mL” 단위로 보고 가능하다[8]. EBV qPCR 검사도 2011년부터 WHO 표준물질(NIBSC code: 09/260)의 이용이 가능해졌다[9].

이와 같이 CMV, EBV qPCR 검사법들의 표준화는 많이 이루어졌지만, qPCR 검사를 위한 핵산 추출법에 대해서는 표준화된 가이드라인이 없는 실정이다[10]. College of American Pathologists (CAP)는 qPCR의 경우 내부대조물질(internal control)을 핵산 추출

의 전 과정을 평가할 수 있도록 검체에 첨가한 후, 내부대조물질의 증폭이 정해진 범위 내의 결과를 보이는지 평가하도록 한다(CAP checklist. MIC.64025). Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)는 내부대조물질 사용에 대한 지침을 제시하고 있다[11, 12]. 2009년에 발표된 Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) 지침은 qPCR 논문의 저자, 심사자, 편집자 등이 논문을 작성 또는 평가할 때 핵산 추출에 관한 점검표를 제시하고 있다[13]. 이 지침에서 DNA를 추출할 경우에는 검사 과정과 기기, 추출 키트의 이름, 추가로 사용한 시약의 자세한 정보, RNase를 사용하였을 경우 처리 방법, RNA 오염의 정도, 핵산의 양, 핵산의 순도, 핵산 추출의 수율, 핵산의 전기영동 양상, 억제제 검사[희석에 따른 Cq (quantification cycle)값의 변화, 내부대조 물질의 첨가 등을 점검할 것을 권고하고 있다. 그러나 임상 검사실에서 일상적인 CMV, EBV qPCR 검사에서 위의 모든 사항들을 점검해야 되는지는 알려진 바가 없다[14].

임상 검사실에서 CMV, EBV qPCR 검사법을 도입할 때 각각의 검사법에 적합한 핵산 추출법을 선택해야 하며, 검사실의 규모가 작거나 검체 수가 적은 경우 수기법에 의한 핵산추출법을 많이 사용한다. 이번 연구에서는 CMV, EBV qPCR 검사를 위한 핵산 추출에서 MIQE 지침에서 제시되었던 핵산의 양적, 질적 평가가 일상적으로 필요한지 여부와 함께, 수기법과 자동화된 핵산추출법을 비교하여 임상 검사실에서 적합한 핵산 추출법을 도입할 때 고려해야 할 사항을 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

DNA 정량과 순도 측정은 QIAamp DNA Blood Mini 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 수기 추출한 후 EBV qPCR을 시행한 300개 전혈 DNA를 대상으로 하였다. 수기 핵산추출과 자동화된 핵산추출의 비교는 CMV qPCR이 의뢰된 72개의 전혈과 EBV qPCR이 의뢰된 54개의 전혈을 대상으로 하였다.

이번 연구에 사용된 검체들은 모두 임상치의 처방에 따라 검사가 수행된 잔여 검체로, 익명화된 이후 사용되었다. 이번 연구는 임상연구심의위원회에서 “심의면제” 확인을 받은 후 시행되었다.

2. 방법

1) 핵산의 정량 및 순도 측정

300개의 핵산 추출물은 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 260 nm에서 핵산의 농도를, 280 nm에서 단백질의 농도를 측정하고, 추출된 핵산의 순도는 A260/A280비를 측정하여 평가하였다. 검체에 첨가

한 내부대조물질의 Cq값에서 동일한 qPCR 배치에서 사용한 음성 대조검체(negative control)에 첨가한 내부대조물질의 Cq값을 뺀 ΔCq 값을 구하여, DNA 순도가 PCR 억제 정도를 반영할 수 있을지를 살펴보았다.

2) 전혈에서 핵산 추출

QIAamp DNA Blood Mini 키트를 이용하여 제조사의 지침에 따라 핵산을 수기로 추출하였으며, 전혈 200 μ L에서 40 μ L의 용출액으로 추출하였다. 자동화 핵산 추출은 QIASymphony SP (Qiagen) 장비에서 QIASymphony DSP DNA Mini 키트(Qiagen)를 이용하여 전혈 300 μ L에서 60 μ L의 용출액으로 추출하였다.

3) CMV, EBV qPCR

QIAamp DNA Blood Mini 키트로 추출한 DNA는 artus CMV LC PCR 키트(Qiagen)와 artus EBV LC PCR 키트(Qiagen)로 측정하였다. qPCR은 추출된 DNA 10 μ L를 사용하여 전체 25 μ L PCR 반응액으로 실시하였으며, Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, German) qPCR 장비에서 증폭 및 정량하였다. QIASymphony DSP DNA Mini 키트로 추출한 핵산은 QIASymphony AS (Qiagen) 장비에서 artus CMV QS-RGQ 키트(Qiagen)와 artus EBV QS-RGQ (Qiagen)로 PCR 혼합물을 만들었다. 반응액은 추출된 20 μ L의 DNA와 30 μ L의 PCR 시약을 혼합하여 총 50 μ L였으며, Rotor-Gene Q (Qiagen) 장비에서 증폭 및 정량하였다. 검사 과정은 제조사의 지침을 준수하여 시행하였다. 서로 다른 핵산 추출 방법의 qPCR 측정값 차이가 0.5 \log_{10} copies/mL 미만일 경우 두 추출 키트의 성능이 동일하다고 가정하여 분석하였다[12, 15].

4) 통계학적 방법

평균 및 표준 편차 등의 기술적 통계로 표현하였다. 핵산 추출의 수기법과 자동화기기 방법의 상호 연관성은 회귀분석과 Spearman 상관분석 방법을 이용하였다. 3군(group) 평균의 비교는 일원배치 분산분석을 시행한 후 Bonferroni 교정을 시행하였다. $P < 0.05$ 를 의미 있게 해석하였으며 통계 프로그램은 MedCalc statistical software version 15 (MedCalc Software, Ostend, Belgium)과 SPSS version 21.0 (IBM, New York, NY, USA)를 사용하였다.

결 과

1. 핵산의 정량 및 순도와 EBV qPCR값 비교

QIAamp DNA Blood Mini 키트로 추출된 300개의 전혈 DNA 중, EBV 정량값이 음성이었던 164개 검체의 DNA 농도는 39.1 ± 31.7 μ g/mL, 3 \log_{10} copies/mL 미만 80검체의 DNA 농도는 $48.4 \pm$

Table 1. Effects of DNA concentration on determination of EBV DNA load and DNA purity

| | EBV DNA | | |
|-------------------------------|---------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | Negative (N=164) | < 3 log ₁₀ copies/mL (N=80) | ≥ 3 log ₁₀ copies/mL (N=56) |
| DNA concentration (μg/mL)* | 39.1 ± 31.7 | 48.4 ± 26.0 | 47.7 ± 22.4 |
| A260/A280 | 1.93 ± 0.28 | 1.92 ± 0.13 | 1.98 ± 0.21 |
| Internal control Cq (ΔCq) | -0.14 ± 0.82 | -0.14 ± 0.66 | 0.08 ± 0.87 |

*P=0.198 by One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction.
Abbreviation: ΔCq, internal control Cq of sample - internal control Cq of negative control sample.

Table 2. Comparison of ΔCq and DNA purity of EBV determined by qPCR

| | A260/A280 ratio | | | P value* |
|-----|-----------------------|------------------------------|------------------------|----------|
| | Ratio < 1.7 (N=25) | 1.7 ≤ ratio ≤ 1.9 (N=114) | Ratio > 1.9 (N=161) | |
| ΔCq | 0.01 ± 1.13 | -0.07 ± 0.79 | -0.15 ± 0.74 | 0.52 |

*By One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction.
Abbreviation: ΔCq, internal control Cq of sample - internal control Cq of negative control.

26.0 μg/mL, 3 log₁₀ copies/mL 이상 56검체의 DNA 농도는 47.7 ± 22.4 μg/mL이었다(Table 1). EBV DNA 음성인 검체들의 DNA 농도는 3 log₁₀ copies/mL 미만 검체들의 DNA 농도보다 유의하게 낮았지만(P=0.024), 음성인 검체들과 3 log₁₀ copies/mL 이상 검체들의 DNA 농도는 차이를 보이지 않았으며, 3군의 평균을 일원배치 분산분석으로 비교하였을 때 차이가 없었다(P=0.198).

EBV qPCR값이 음성이었던 164개 검체의 DNA 순도는 1.93 ± 0.28, 3 log₁₀ copies/mL 미만 80검체의 DNA 순도는 1.92 ± 0.13, 3 log₁₀ copies/mL 이상 56검체의 DNA 순도는 1.98 ± 0.21로 차이가 없었다(Table 1). A260/A280비가 1.7-1.9 범위인 검체와 A260/A280비가 1.7 미만 또는 1.9 초과인 검체 사이에 내부대조물질의 ΔCq 차이가 없었다(P=0.52) (Table 2). A260/A280비가 1.7-1.9 범위인 114검체의 ΔCq는 -0.07 ± 0.79였으며, A260/A280비가 1.7 미만인 25검체의 ΔCq는 0.01 ± 1.13, 1.9 초과인 161검체의 ΔCq는 -0.15 ± 0.74였다. 또한 순수한 DNA라 할 수 있는 A260/A280비 1.8 정도의 검체에서 ΔCq 분포가 다양하였으며, DNA 순도와 키트 내 내부대조물질의 ΔCq 사이에는 특별한 차이가 없었다(Table 2, Fig. 1).

ΔCq가 +1 이상은 23검체(7.7%)였으며, 이 검체들의 A260/A280비는 1.87 ± 0.22, EBV 정량값 음성은 12검체(52.2%)였다. ΔCq가 +2 이상은 5검체(1.7%)였으며, 이 검체들의 A260/A280비는 1.71 ± 0.22로 5검체 모두 EBV 정량값이 음성이었다.

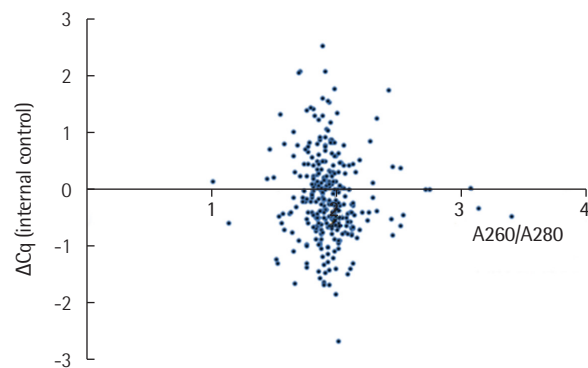


Fig. 1. Distribution of ΔCq (the difference between internal control Cq of sample and that of negative control) in terms of DNA purity.

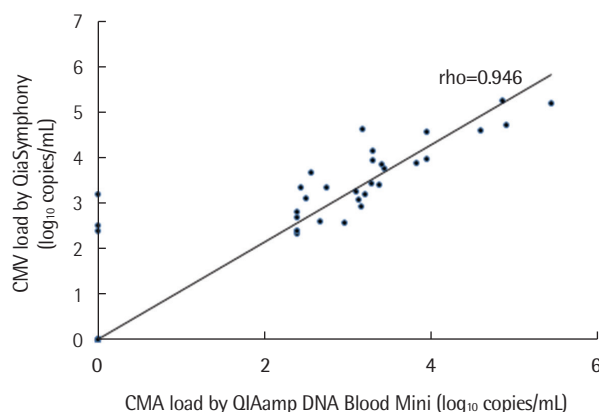


Fig. 2. Correlation between copy number of CMV DNA in whole blood after manual extraction by QIAamp DNA Blood Mini kit and automated extraction by QIASymphony DNA Mini kit (Qiagen). Spearman's coefficient of rank correlation (rho)=0.946 [95% confidence interval (CI), 0.916-0.966, P<0.0001].

2. QIAamp DNA Blood Mini 키트와 QIASymphony DSP DNA Mini 키트 추출법에 따른 CMV qPCR값 비교

CMV qPCR을 시행한 72검체 중 QIAamp DNA Blood Mini 키트와 QIASymphony DSP DNA Mini 키트 추출법 둘 다 양성인 검체는 29검체(40.3%)였으며, 이 중 8검체(8/29, 27.6%)에서 0.5 log₁₀ copies/mL 이상 CMV qPCR값의 차이를 보였다. 8검체 모두 QIASymphony DSP DNA Mini 키트에서 추출한 DNA의 CMV qPCR값이 높게 측정되었다(range, 0.61-1.45 log₁₀ copies/mL). 두 추출법 모두에서 qPCR값이 음성이었던 검체는 40개(55.6%)였다. 3검체는 QIAamp DNA Blood Mini 키트에서 추출한 DNA에서는 음성이었지만, QIASymphony DSP DNA Mini 키트에서 추출한 DNA에서는 양성이었으며, 정량값은 2.4 log₁₀, 2.5 log₁₀, 3.2 log₁₀ copies/mL로 낮았다. 두 추출법으로 얻은 DNA에서 측정된 CMV qPCR값의 상관관계는 Spearman 상관관계수(rho)는 0.946 [95% confidence interval (CI), 0.916-0.966, P<0.0001]이었다(Fig. 2).

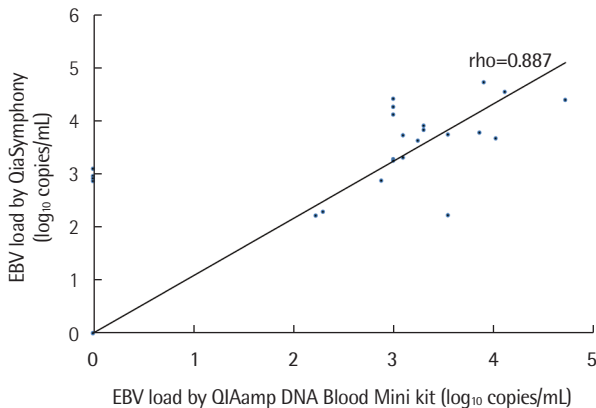


Fig. 3. Correlation between copy number of EBV DNA in whole blood after manual extraction by QIAamp DNA Blood Mini kit and automated extraction by QIASymphony DNA Mini kit (Qiagen). Spearman's coefficient of rank correlation (ρ)=0.887 (95% CI, 0.812-0.933, $P<0.0001$).

3. QIAamp DNA Blood Mini 키트와 QIASymphony DSP DNA Mini 키트 추출법에 따른 EBV qPCR값 비교

EBV qPCR을 시행한 54검체 중 QIAamp DNA Blood Mini 키트와 QIASymphony DSP DNA Mini 키트 추출법 둘 다 양성인 검체는 21검체(38.9%)였으며, 이 중 8검체(8/21, 38.1%)에서 0.5 log₁₀ copies/mL 이상 EBV qPCR 차이를 보였다. 7검체는 QIASymphony에서 추출한 DNA가 높았으며(range, 0.53-1.42 log₁₀ copies/mL), 1검체는 QIAamp DNA Blood Mini 키트에서 추출한 DNA가 높았다(1.32 log₁₀ copies/mL). 둘 다 음성인 검체는 29검체(53.7%)였다. 4검체는 QIAamp DNA Blood Mini 키트에서 추출한 DNA에서는 음성이었지만, QIASymphony에서 추출한 DNA에서는 양성이었으며, 각각의 정량값은 2.9 log₁₀, 2.9 log₁₀, 3.0 log₁₀, 3.1 log₁₀ copies/mL로 낮았다. 두 추출법으로 얻은 DNA에서 측정된 CMV qPCR값의 Spearman 상관계수(ρ)는 0.887 (95% CI, 0.812-0.933, $P<0.0001$)이었다(Fig. 3).

고 찰

검체로부터 핵산을 추출하는 과정은 qPCR 검사의 출발점이지만[16], 바이러스 정량 검사를 위한 핵산 추출 후 일상적으로 어떤 요소를 점검해야 되는지에 대한 지침은 부족하다. 이번 EBV qPCR 연구에서 추출된 DNA의 농도와 바이러스 DNA 정량값 사이에 특별한 관련이 없었다. 따라서 qPCR을 위해 핵산을 추출한 후 일상적인 핵산 정량은 불필요할 것으로 판단하였다. 또한 EBV DNA 정량값과 A260/280로 측정된 DNA 순도 사이에도 관련이 없었으며, DNA 순도와 내부대조물질의 Δ Cq값 사이에도 특별한 차이가 없었다. 이는 A260/A280 측정으로는 억제물질의 존재를 의미 있게 확

인할 수 없음을 시사한다. DNA 바이러스 병원체의 qPCR 검사를 처음 개설할 때와 정도관리 과정에서 주기적인 측정은 필요하겠으나, 일상적인 검사 과정에서 매번 RNA 오염, 핵산의 양, 핵산의 순도 등을 측정할 필요는 없을 것으로 판단하였다[13]. 병원체 검출과 qPCR 과정에서는 내부대조물질을 첨가하고, 내부 대조물질의 Cq값이 허용값 내에 드는지 여부가 중요하다[11, 12]. 내부대조물질의 Cq값이 허용값을 초과할 때 추출된 핵산을 희석한 후 내부대조물질 Cq값의 변화, 표적 DNA의 Cq값과 정량값의 변화를 평가함으로써 PCR 억제제의 존재 유무를 가장 정확하게 평가하고 해결할 수 있다[13, 17].

검체로부터 핵산을 추출하는 과정의 자동화는 수기법과 비교하여 업무 흐름을 개선할 뿐 아니라, 추출의 여러 단계에서 검체 간 오염을 방지할 수 있고, 작업자의 감염원에 대한 노출을 최소화할 수 있다는 장점이 있다[16, 18, 19]. 그러나 검체의 종류, 검체의 특성, 검사실의 규모와 환경, 검체 수 등에 따라 수기법에 의한 핵산 추출이 반드시 필요한 경우가 있다. 따라서 수기법에 의한 핵산 추출과 자동화 기기에 의한 핵산 추출을 비교하여 두 방법의 차이를 결과 보고서에 포함하여 임상인들이 결과를 해석하는 데 도움이 되도록 하여야 한다[14]. DNA 바이러스의 핵산 추출 방법에 대한 비교는 CMV나 BK 바이러스에 대하여 많은 평가가 이루어졌다[15, 20-22]. CMV qPCR을 위한 핵산 추출법을 비교 평가한 연구들을 살펴보면 핵산 추출법뿐만 아니라 qPCR 방법까지 달라서 핵산 추출법의 차이만 비교할 수 있는 경우는 드물었다[20-22]. 동일한 Abbott CMV PCR 키트(Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL, USA)를 사용하여 세 가지 자동화 핵산추출법을 비교한 연구에서, BioRobot EZ1 추출 플랫폼에 EZ1 Virus 2.0 키트(Qiagen)를 사용하였을 때가 m24SP 기기(Abbott Diagnostics)에서 mSample preparation system DNA 키트(Abbott Diagnostics)나 COBAS AmpliPrep system (Roche Diagnostics)에서 High Pure viral nucleic acid 키트(Roche Diagnostics)를 사용하였을 때보다 CMV 정량값이 높았다[22]. 검사실에서 자체 제작한 qPCR 검사로 수기법인 QIAamp DNA Blood Mini 키트(Qiagen)와 자동화기기인 MagNA Pure LC (Roche Molecular Biochemicals) 추출법을 비교한 연구에서, 두 추출법 간 qPCR 측정값의 상관성은 높았으나(ρ =0.863), 수기법 음성/자동화기기 양성인 검체가 두 검체(2.3%) 있었다고 보고하였다[23]. 이번 연구에서는 동일한 표적 유전자를 검출하는 artus 시약을 사용하여 핵산 추출의 영향을 관찰하였으며, 0.5 log₁₀ 이상 차이가 있는 CMV 8검체와 EBV 8검체 중 1검체를 제외하고 15검체에서 QIASymphony DSP DNA Mini 키트에서 추출한 경우 DNA 정량값이 높았다. QIAamp DNA Blood Mini 키트의 경우 200 μ L의 전혈에서 40 μ L의 핵산을 추출하고 그중 10 μ L를 qPCR에 사용하여 전혈 50 μ L로부터 얻은 핵산을 qPCR에 사용하였던 데 비해,

QIASymphony DSP DNA Mini 키트의 경우 300 μ L의 전혈에서 60 μ L의 핵산을 추출하고 그중 20 μ L를 qPCR에 사용하여 전혈 100 μ L로부터 얻은 핵산을 qPCR에 사용하였던 점을 고려할 때 QIAamp DNA Blood Mini 키트 음성/QIASymphony DSP DNA Mini 양성인 검체가 많은 것은 사용한 핵산의 용량이 영향을 주었을 가능성도 있다. 비록 WHO 표준물질을 이용하여 두 핵산 추출법을 비교하지 않아 두 방법 사이의 정확한 회수율을 알 수 없지만, DNA 추출 방법에 따른 차이점과 한계를 보고서 양식에 추가하는 것이 바람직할 것으로 판단하였다[8, 9].

이번 연구의 한계점으로는 추출된 DNA의 완전성(integrity)을 평가하지 않았다는 점이다. 일반적으로 추출된 DNA의 질을 평가하는 데는 농도, 순도, 완전성의 세 가지 질 지표를 사용한다. 완전성은 한천 겔에 전기영동하여 DNA 조각의 번짐(smearing) 정도로 분해 정도를 보거나 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 평가할 수 있다. CMV와 EBV qPCR을 위한 대부분의 상업화된 키트는 200 bp 미만을 증폭하기 때문에 DNA 완전성의 영향을 덜 받을 가능성이 높지만[24, 25], 향후 DNA 완전성과 바이러스 DNA 정량값 간의 연관성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 두 번째 한계점은 이번 연구에서 사용된 두 가지 추출법 모두 흡착크로마토그래피법(adsorption chromatography)의 원리를 이용한 핵산 추출법이었다는 점이다. 전통적인 핵산 추출법인 페놀/클로로포름법 또는 높은 순도의 핵산을 얻을 수 있는 음이온교환크로마토그래피법(anion-exchange chromatography)과 자동화기기에서 추출한 핵산의 정량값 비교 연구가 추가로 필요할 것이다. 마지막으로 이 연구에서는 DNA 바이러스 중 CMV와 EBV만을 평가하였으며, 검사실에서 DNA qPCR을 시행하고 있는 BK 바이러스, 파르보바이러스 B19 등에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로 CMV와 EBV qPCR을 위해 추출된 핵산의 양과 질을 바이러스 정량을 평가하는 일상적인 지표로 사용할 수 없을 것으로 판단되었다. 전혈에서 CMV와 EBV DNA를 추출할 때 자동화 기기인 QIASymphony법의 정량값이 수기법인 QIAamp DNA Blood Mini 키트보다 유의하게 높았다.

요 약

배경: 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV)와 엡스타인바바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 국제 표준물질이 이용 가능해짐으로써, CMV와 EBV 정량 PCR (qPCR)의 표준화는 향상되었지만, 핵산 추출 방법 또한 qPCR 결과에 영향을 줄 수 있다. 이 연구에서는 바이러스 qPCR 전에 DNA 농도와 순도 측정이 일상적으로 필요한지를 살펴보고자 하며, 수기법인 QIAamp DNA Blood Mini 키트

(Qiagen, USA)와 자동화법인 QIASymphony DSP DNA Mini 키트 (Qiagen)를 비교하여 핵산 추출법을 도입할 때 고려해야 할 사항을 살펴보고자 하였다.

방법: DNA 정량과 순도는 QIAamp DNA Blood Mini 키트로 수기 추출한 후 EBV qPCR을 시행한 300개 전혈 DNA를 대상으로 하였으며, NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)에서 측정하였다. 수기 핵산추출과 자동화된 핵산추출의 비교는 CMV qPCR이 의뢰된 72개의 전혈과 EBV qPCR이 의뢰된 54개의 전혈을 대상으로 하였다. CMV와 EBV DNA는 artus CMV 및 Artus EBV PCR로 정량하였다.

결과: DNA 농도와 EBV DNA 정량값 사이에는 일관된 상관성이 없었으며, DNA 순도와 ΔCq (내부대조물질의 Cq 값에서 동일한 qPCR 배치에서 사용한 음성 대조검체에 첨가한 내부대조물질의 Cq 값을 뺀 값) 사이에는 상관성이 없었다. 수기 핵산추출과 자동화된 핵산추출 후 CMV와 EBV qPCR값은 두 방법 간에 높은 상관관계가 있었다(CMV, $\rho=0.946$; EBV, $\rho=0.887$). 두 방법 모두에서 CMV DNA가 양성되었던 29검체 중 8검체(27.6%)는 QIASymphony에서 추출한 핵산 정량값이 유의하게 높았다.

결론: 검사실에서 CMV와 EBV qPCR 전에 일상적으로 DNA 농도와 순도를 측정할 필요는 없을 것으로 판단되었다. 전혈에서 CMV와 EBV DNA를 추출할 때 자동화 기기인 QIASymphony법의 정량값이 수기법인 QIAamp DNA Blood Mini 키트보다 유의하게 높았다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 해당 회사와 이해관계가 없음.

감사의 글

이 연구는 2012년 진단검사의학재단 질 향상 연구사업의 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1. Razonable RR and Emery VC. Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 2004;11:77-86.
2. Cherikh WS, Kauffman HM, McBride MA, Maghirang J, Swinnen LJ, Hanto DW. Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation. *Transplantation* 2003;76:1289-93.
3. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus in-

- fection in transplant recipients. *J Clin Virol* 2008;41:237-41.
4. Gärtner B and Preiksaitis JK. EBV viral load detection in clinical virology. *J Clin Virol* 2010;48:82-90.
 5. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. In: Versalovic J, et al. eds. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press, 2011: 1558-74.
 6. Gärtner BC. Epstein-Barr virus. In: Versalovic J, et al. eds. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press, 2011:1575-84.
 7. U.S. Food and Drug Administration. Nucleic acid based tests. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm330711.htm> (Updated on Jan 2015).
 8. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD, and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.
 9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD, and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus (EBV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2011; WHO/BS/11.2172.
 10. Demeke T and Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:1977-90.
 11. Clinical and Laboratory Standard Institute. *Molecular diagnostic methods for infectious diseases*. Approved guideline. 2nd ed. MM03-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2006.
 12. Clinical and Laboratory Standard Institute. *Quantitative molecular methods for infectious diseases*. Approved guideline. MM6-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2003.
 13. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-22.
 14. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012;54:1793-7.
 15. Kim S, Park SJ, Namgoong S, Sung H, Kim MN. Comparative evaluation of two automated systems for nucleic acid extraction of BK virus: NucliSens easyMAG versus BioRobot MDx. *J Virol Methods* 2009;162: 208-12.
 16. Lee KS, Park DS, Yoon KH, Lee YJ, Cho JH. Evaluation of ExiPrep16 automated system for the extraction of nucleic acids from nasopharyngeal swabs for the detection of respiratory viruses. *Lab Med Online* 2013;3:227-33.
 17. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* 2008;1:70.
 18. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Schmid KW, Brockmeyer NH, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal* 2007;21: 244-8.
 19. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
 20. Costa C, Mantovani S, Balloco C, Sidoti F, Fop F, Cavallo R. Comparison of two nucleic acid extraction and testing systems for HCMV-DNA detection and quantitation on whole blood specimens from transplant patients. *J Virol Methods* 2013;193:579-82.
 21. Pillet S, Bourlet T, Pozzetto B. Comparative evaluation of the QIAasympy RGQ system with the easyMAG/R-gene combination for the quantitation of cytomegalovirus DNA load in whole blood. *Virol J* 2012;9:231.
 22. Bravo D, Clari MÁ, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, José Remigia M, et al. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma Cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2011;49: 2899-904.
 23. Gouarin S, Vabret A, Gault E, Petitjean J, Regeasse A, Hurault de Ligny B, et al. Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2004; 29:194-201.
 24. Vincent E, Gu Z, Morgenstern M, Gibson C, Pan J, Hayden RT. Detection of cytomegalovirus in whole blood using three different real-time PCR chemistries. *J Mol Diagn* 2009;11:54-9.
 25. Forman M, Wilson A, Valsamakis A. Cytomegalovirus DNA quantification using an automated platform for nucleic acid extraction and real-time PCR assay setup. *J Clin Microbiol* 2011;49:2703-5.