

Practical Aspects of Cytomegalovirus DNA Quantitative PCR

Jeonghyun Chang¹, Sang-Hyun Hwang^{1,2}, Mi-Na Kim¹, Heungsung Sung¹

¹Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul,

²Department of Laboratory Medicine, Center for Diagnostic Oncology, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea

Human cytomegalovirus (CMV) is a clinically important pathogen that causes significant morbidity and mortality in immunocompromised patients and is typically monitored using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). International standards and certified reference materials were recently developed by the WHO, providing the opportunity to standardize viral load reporting. Clinical microbiologists who conduct quantitative CMV DNA testing should be aware of technical issues that can affect the analytical and clinical performance of the method used. These include specimen type, limits of detection and quantification, linear range, reproducibility, and wide variability in viral load values among different assays. Specimen types for testing include whole blood, plasma, serum, and peripheral blood leukocytes. The tests that use whole blood and peripheral blood leukocytes have higher sensitivities. Adsorption chromatography methods are widely used for nucleic acid extraction, and efficiencies can differ between man-

ual and automatic processes. The most common method for quantitative CMV DNA testing is real-time PCR. All CMV testing methods require quality control at the pre-analytic, analytic, and post-analytic stages. In transplant patients, specific quantitative results and monitoring of any changes at follow-up are important. Five to seven days is an adequate follow-up interval in this regard, and drug-resistant CMV should be suspected if there is no response to therapy. One specimen type should be chosen for follow-up quantitative CMV DNA testing, optimized according to WHO standards. Further studies are needed to better standardize CMV testing approaches and to determine the appropriate clinical cut-off level. (**Ann Clin Microbiol** 2017;20:21-26)

Key Words: Cytomegalovirus, Preemptive therapy, Quantification, Real-time polymerase chain reaction, Standardization

INTRODUCTION

인간거대세포바이러스(human cytomegalovirus, CMV)는 면역이 저하된 환자에서 심각한 감염을 일으킬 수 있다. CMV 감염은 무증상 감염과 증상이 있는 감염으로 나눌 수 있다. 증상이 있는 감염에는 발열, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증 등으로 나타나는 CMV 증후군과 폐렴, 간염, 소화기계 감염, 망막염 등으로 나타나는 조직 침습성 질환이 있다. 이식 후에 발생하는 CMV 감염은 감염에 의한 직접적인 질환뿐 아니라 면역제어 (immunomodulation) 등의 간접적인 효과에 의한 기회 감염이나 조직 거부반응과도 관련이 있다[1,2].

장기 이식의 예후에 직간접적인 영향을 주는 CMV 감염을 예방하기 위한 전략 중 하나인 선제치료(preemptive therapy)를

위해서는 바이러스 혈증을 적절하게 감시할 수 있는 검사 방법이 필요하다. 이러한 목적으로 CMV 항원혈증 검사와 CMV DNA 정량검사가 주로 이용된다. 두 검사는 CMV 질환의 위험성을 평가하고 치료에 대한 반응을 추적 관찰하는데 도움을 준다[3]. CMV 항원혈증 검사는 검사자의 숙련도가 요구되고, 검사 시간이 길며, 판독자의 주관에 개입될 수 있다. 우리나라에서는 CMV DNA 정량검사에 비해 환자가 부담하는 비용이 적기 때문에 아직까지 많이 사용되고 있다. CMV DNA 정량검사는 CMV 항원혈증 검사와 비교할 때 검사 시간이 짧으며, 검사 방법이 어렵지 않고, 2010년부터 WHO 정량 표준물질의 사용이 가능하기 때문에 표준화가 가능하다는 장점이 있다. CMV DNA 정량검사는 선제 치료의 시점을 결정하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, CMV 질환의 진단과 치료에 대한 반응을 추적 관

Received 26 January, 2017, Revised 7 April, 2017, Accepted 8 April, 2017

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

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© 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.

찰하는 데에도 사용된다(Fig. 1).

이 종설에서는 CMV DNA 정량검사를 위한 WHO 표준물질, 정도관리, 결과 해석 등에 대해 살펴보기로 한다.

TECHNICAL AND CLINICAL ASPECTS OF QUANTITATIVE CMV DNA TESTING

1. CMV DNA 정량검사를 위한 WHO 표준물질

2008년 미국, 캐나다, 유럽의 33개 검사실을 대상으로 실시한 CMV DNA 외부정도관리 결과가 보고되었다[4]. 17개 검사실은 상용화된 키트를 사용하였으며 18개 검사실은 검사실에서 자체 개발한 검사법(laboratory-developed tests, LDTs)을 사용하였다. 10개의 양성 검체에서 검사실간 정량값의 차이는 검체에 따라 2-4.3 log₁₀ copies/mL에 달했다. 이 연구에서는 향후 검사실간 차이를 줄이기 위해 국제 표준물질(international standards)이 반드시 필요하다는 점을 강조하였다.

핵산증폭 검사를 위한 CMV 표준물질인 NIBSC cod 09/162는 2010년 WHO에서 처음으로 만들었다. 표준물질은 CMV Merlin 주(strain) 바이러스 입자를 Tris-HCl과 사람 알부민을 포함한 완충액에 녹인 후 동결건조하여 1 mL씩 소분하여 만들었다[5]. NIBSC code 09/162의 농도는 5×10⁶ International Unit (IU)/mL로 맞추어져 있으며 전세계 32개의 검사실에서 평가되

었는데, 표준물질 사용 시 검사실 간 일치율이 높아 2차 표준물질을 위한 calibration 용으로 사용하는 것이 적절하다고 판단하였다[6]. WHO standard의 단위(IU/mL)는 적절한 conversion factor를 사용하여 copies/mL로 변환할 수 있다. CMV DNA 정량검사를 하는 검사실에서는 임상에 결과를 보고할 때 WHO 표준물질을 이용하여 calibration한 키트를 사용한 검사로 conversion factor를 이용하여 copies/mL과 IU/mL로 모두 해석할 수 있다고 알려주는 것이 도움이 될 수 있다.

비록 WHO 표준물질이 도입되더라도 검사실에서는 다음과 같은 요인들이 CMV DNA 정량 결과에 영향을 줄 수 있음을 고려해야 한다. (1) 사용하는 검체, (2) 핵산 추출 방법, (3) 각각의 검사실에서 사용하는 검사법의 시발체와 소식자 및 이에 따른 증폭 반응의 효율성, (4) 검사법에서 사용하는 기기의 종류 등이 있다[7]. 미국 FDA 승인 제품을 사용하는 것이 위 요인들로 인한 변이를 줄일 수 있는 하나의 방법이 될 수 있다.

2. 검체

선제치료를 위한 CMV DNA 정량검사는 주로 전혈 또는 혈장을 이용하며, 혈청이나 백혈구 분획을 이용하기도 한다[8]. 일반적으로 전혈과 백혈구 분획은 혈장이나 혈청보다 CMV DNA 검출 민감도가 높다(Table 1) [9-11]. 2011년 Lisboa 등 [10]은 CMV 질환으로 항바이러스제 치료를 받은 219명의 환

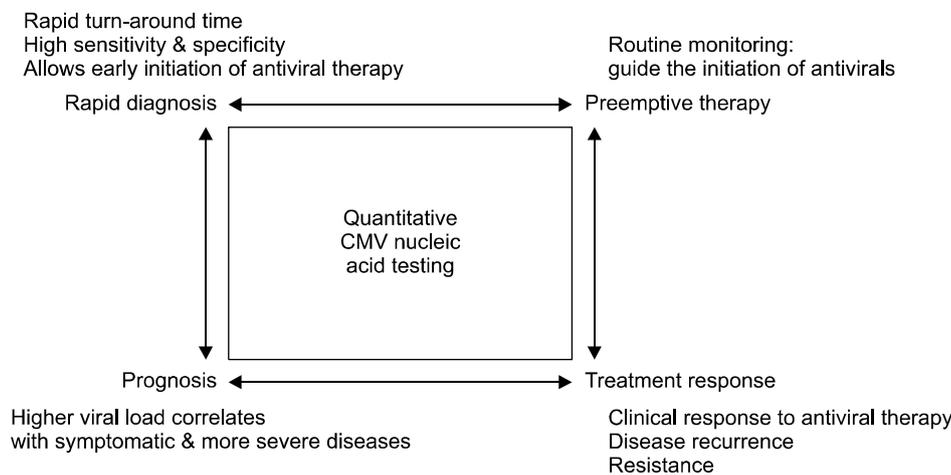


Fig. 1. Clinical utility of quantitative CMV DNA testing.

Table 1. Advantages and disadvantages of various specimen types which can guide preemptive therapy, diagnosis of CMV disease, and treatment monitoring

Specimen	Advantages	Disadvantages
Whole blood	- High sensitivity: detects lower level of viral replication - Easy to process	- May detect latent virus - Low specificity
Plasma or serum	- Indicates active viral replication - High specificity	- Requiring pretest preparation - Less sensitive for monitoring CMV disease
Buffy coat	- Higher sensitivity than plasma or serum	- May detect latent virus - Requiring pretest preparation

자들을 대상으로 전혈과 혈장의 CMV DNA 정량 결과를 보고 하였다. 전혈에서는 70.3%의 환자에서 CMV DNA가 양성인데 비해, 혈장에서는 52.1%의 환자에서만 CMV DNA 양성이었다. 또한 CMV DNA 농도가 전혈에서 혈장보다 약 1 log₁₀ (10 배) 정도 높게 측정되었다[10]. 그러나 항바이러스제 치료 직후 전혈 CMV DNA 양성인면서 혈장 CMV DNA 음성군과 전혈과 혈장 모두 음성이었던 군의 6개월간의 추적 관찰에서 혈장의 CMV DNA가 양성되는 비율은 유사하였다(23.1% vs. 23.6%). 고형장기 이식 환자에서는 CMV 바이러스 혈증이 일시적으로 생겼다가 치료 없이도 없어지는 경우가 많기 때문에 전혈을 검체로 사용할 경우 불필요한 항바이러스제 사용의 우려가 있다[3]. 혈장 또는 혈청에서 검출되는 CMV는 감염된 백혈구가 깨지면서(lysis) 유리되거나 감염된 장기의 실질 또는 혈관내피세포에서 방출되는 것으로 알려져 있다. 이처럼 전혈이나 백혈구 분획보다는 혈장 또는 혈청에서 검출되는 CMV DNA가 활동성 감염에 더 특이적이며[3], CMV 질환과의 연관성이 높다는 보고도 있다[12].

각 검사실은 환자군의 특성을 고려하여 검체를 선택해야 한다. CMV 질환의 위험성이 높은 환자군의 경우 민감도를 우선으로 검체를 선택해야 하며, 상대적으로 CMV 질환의 위험성이 낮은 환자군의 경우에는 특이도를 우선으로 검체를 선택해야 할 것으로 생각한다[8].

3. 핵산 추출 방법

일선 검사실에서 사용하는 핵산 추출 방법은 대부분 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography) 원리를 이용한다. 추출 키트에 실리카 막(membrane)을 두거나, 또는 실리카를 자석 비드에 코팅하여 흡착이 가능하게 한다. 낮은 pH, 높은 이온 강도, chaotropic 염(chaotropic salts)을 포함한 추출 용액 환경에서 음성 극성의 핵산은 실리카 표면에 흡착하게 되고, 흡착된 핵산은 세척 후 높은 pH와 낮은 이온 강도의 용출액(elution buffer)으로 용출하게 된다. 핵산 추출의 원리는 동일하지만 주로 실리카 막을 사용하는 수기법과 실리카가 코팅된 자석 비드를 사용하는 자동화법의 핵산 추출 효율은 차이가 있을 수 있다[13]. 전혈에서 CMV DNA를 추출할 때 자동화 기기인 QIASymphony (Qiagen, Valencia, CA, USA)법의 정량값이 수기법인 QIAamp DNA Blood Mini 키트(Qiagen)의 정량값보다 유의하게 높았다는 보고가 있다[13].

핵산 추출의 효율을 비교한 기존의 보고들 중 일부는 핵산 추출 후 사용한 정량 PCR법이 서로 달랐다[14,15]. Bravo 등 [16]은 서로 다른 세가지 방법으로 핵산을 추출한 후 동일한 정량 PCR법으로 핵산 추출법의 효율을 비교하였다. 이 연구에서는 세 가지 레벨의 CMV DNA load 별로 효율을 비교하였는데, 세 레벨 모두에서 BioRobot EZ-1 기기에 EZ1 Virus 2.0 키트 (Qiagen)로 핵산을 추출할 때 COBAS AmpliPrep 기기에 High

Pure viral nucleic acid 키트(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)로 추출하거나 m24 SP 기기에 mSample preparation system DNA 키트(Abbott Diagnostics, IL, USA)로 추출할 때보다 viral load가 높게 나타나 CMV DNA 추출 효율이 높았다고 한다.

핵산 추출 방법마다 검체량에 차이가 있을 수 있다. 이론적으로 0.2 mL의 전혈에서 핵산을 추출하는 것보다 0.5 mL의 전혈에서 핵산을 추출할 때 민감도가 높을 수 있다. 따라서 각 검사실에서는 핵산 추출을 위해 사용하는 검체의 양과 핵산 추출법을 임상과의 공유할 필요가 있다[13].

4. CMV DNA 정량 PCR법

CMV DNA 정량 PCR 검사는 Conformité Européenne (CE) 또는 미국 식품의약품안전처(U.S. Food and Drug Administration, FDA) 승인을 얻은 검사법이 이용 가능하다[17,18]. 현재까지 FDA 승인을 받은 CMV DNA 정량검사는 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV Test (Roche Molecular Systems)와 Artus CMV RGQ MDx (Qiagen, Valencia, CA, USA) 등이다[18]. 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 CMV DNA 정량검사는 직선성 구간이 넓고, 검출 한계와 정량 한계값이 낮으며, 증폭 산물에 의한 오염 위험성이 낮기 때문에 임상 검사실에서 가장 널리 사용되고 있다. 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용하는 상품화된 키트들의 특징에 대해서 Table 2에 정리하였다[17].

5. CMV DNA 정량검사의 정도관리

다른 진단검사와 마찬가지로 분석 전(검체 채취, 운송, 검체 처리), 분석(검사), 분석 후(보고, 결과의 해석) 전 과정에 대한 정도관리가 필요하다.

CMV DNA 정량검사를 외부 기관에 의뢰하는 경우나 일괄 검사(batch test)를 위해 검체를 보관할 경우 검체 안정성에 대한 평가가 필요하다[7]. 검체의 냉장 보관은 72시간을 초과해서는 안 된다[19]. 혈장을 이용할 경우 DNA가 분해되지 않게 빠른 시간 안에 전혈로부터 분리해야 한다. 일단 분리된 혈장의 CMV DNA는 4°C에서 14일간 안정하다[20].

검사법에 대해서는 검출 한계(limit of detection, LoD)와 정량 한계(limit of quantification, LoQ), 검사의 직선성 구간, 검사실 내에서 검사의 재현성, 정확도 등에 대한 평가가 있어야 한다[21]. LoD는 낮은 쪽의 LoQ와 동일하거나 그보다 낮을 수 있다. LoD가 낮은 쪽의 LoQ보다 낮을 때 LoD와 LoQ 사이의 결과값은 “CMV DNA가 검출되었지만 정량 하한값보다 낮아 정확한 정량값을 알 수 없음”과 같은 해설과 함께 보고하도록 한다. 낮은 CMV DNA 혈증(<100-500 copies/mL)의 임상적 의미는 아직까지 잘 알려져 있지 않다[7]. 특히 전혈을 검체로 사용할 경우에는 백혈구에 잠복한 바이러스에 의해 낮은 농도의 DNA 혈증을 보일 수 있다. 지금까지의 보고들을 종합하면

Table 2. Commercial real-time PCR assays for quantitative detection of CMV

Manufacturer	Assay name	Target	Positive controls	Calibrated against WHO International standard	Availability	Recommended or validated extraction system
Roche	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV Test	Non-drug target region of <i>UL54</i> gene	High and low positive controls	Yes	U.S. FDA licensed	Incorporated
Abbott	Abbott REALTIME CMV	Not specified	Two level controls	Yes	CE-marked	<i>m2000sp</i> (plasma and whole blood); <i>m24sp</i> (plasma)
Altona	RealStar CMV PCR kits	Proprietary	None	Yes	CE-marked	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)
bioMerieux	Argene CMV R-gene	<i>UL83</i> pp65 gene	Sensitivity control	Yes	CE-marked	NucliSENS easyMAG
Cepheid	Affigene CMV Trender	Proprietary	Not specified	Not yet	CE-marked	Affigene DNA extraction
ELITech	Alert Q-CMV Real Time Complete	<i>UL123</i> MIE gene	Not specified	Not specified	CE-marked	EXTRAcell & EXTRAgen
Focus	Simplexa CMV	<i>UL83</i> gene	High and low positive controls	Yes	CE-marked	Roche MagNA Pure LC extraction or bioMerieux easyMAG extraction
Qiagen	Artus and EASY artus CMV PCR	<i>UL123</i> MIE gene	None	Yes	CE-marked	EZ1 DSP Virus System
BioSewoom	CMV Quantification Kit	<i>UL55</i> glycoprotein B gene	High and low positive controls	Yes	Korean FDA licensed	Roche MagNA Pure LC extraction system
Bioneer	AccuPower CMV Quantitative PCR kit	Envelope glycoprotein gene*	None	Not specified	Korean FDA licensed	ExiPrep 16 Dx nucleic acid extraction system

*Not further specified.

CMV DNA 정량 검사는 LoD 또는 낮은 쪽의 LoQ가 250-500 IU/mL 정도이며, 직선성 구간은 6 log₁₀ 이상인 것이 요구된다[7].

CMV DNA 정량검사를 시행할 때 적어도 두 가지 농도의 정도관리 물질을 이용한다. 이상적으로 환자 검체와 동일한 기질 (matrix)에 CMV 바이러스 입자를 혼합해야 하지만 이를 검사실에서 사용하기는 어려우며, WHO 표준물질을 희석하거나 서로 다른 lot의 표준물질을 사용할 수 있다. 낮은 농도의 정도관리 물질의 농도는 LoQ와 LoQ+1 log₁₀ copies/mL 사이의 농도여야 한다[22]. 검사실 자체개발검사의 경우 처음 검사 시작할 때 40번 반복 검사한 후 평균과 표준편차를 구하고 시약의 lot가 바뀔 때 10번 반복 검사하여 평균을 재설정한다. 정도관리 결과는 Levey-Jennings control chart 등 시각적으로 표시하도록 한다[22]. 식약처 인증을 받은 검사 키트를 인증 범위 내에서 사용하는 경우에는 제조사의 지침을 따르도록 한다.

6. CMV DNA 정량검사의 결과 해석

바이러스 정량 검사에서 의미 있는 변화는 HIV-1 검사에서 사용되는 0.5 log₁₀ copies/mL 기준을 많이 사용한다. FDA 승인을 위한 HIV-1 RNA 정량 검사의 변이가 0.1-0.2 log₁₀ copies/mL 이어야 하고, 치료받지 않은 HIV-1 만성 감염 환자에서의 생물학적 변이가 0.3 log₁₀ copies/mL 이내이기 때문이다[23]. 그러

나 CMV 감염 환자에서 생물학적 변이의 정도는 알려져 있지 않기 때문에 다음과 같은 기준으로 CMV DNA의 의미 있는 변화를 평가할 수 있다. CMV 바이러스 부하가 (1) 3 log₁₀ copies/mL 미만일 경우 5배 이상(0.7 log₁₀ 이상), (2) 3 log₁₀ copies/mL 이상일 경우 3배 이상(0.5 log₁₀ 이상)일 경우 의미 있는 변화라고 할 수 있다[7]. 결과 보고 시 copies/mL 또는 IU/mL를 바로 사용할 경우 변화량을 과대 해석할 수 있기 때문에 log₁₀ copies/mL 또는 log₁₀ IU/mL로 보고하도록 한다[7].

이식 환자에서 4 log₁₀ copies/mL 미만인 경우 한 번 측정으로 얻은 특정한 정량값과 함께 추적 관찰에서 CMV DNA 농도의 변화 정도도 중요하다[24]. 4 log₁₀ copies/mL 이상의 높은 CMV DNA 농도는 한 번으로도 의미가 있으며, 공여자자와 수여자자의 CMV 감염상태(serostatus)가 다르거나 T 세포 감소(T cell depletion) 조혈모세포이식 환자 등에서는 그 보다 낮은 농도의 바이러스 혈증도 의미가 있다[7].

치료를 받지 않은 환자에서 CMV DNA 농도가 짧은 기간에 급격히 증가할 수 있으므로, 치료 시작 2-3일 전에 CMV DNA 농도를 측정하였다더라도 치료 시작 전 초기 CMV DNA 정량 검사를 다시 시행하도록 한다. 일단 치료를 시작하게 되면 혈장에서 CMV DNA의 반감기는 3-8일 정도이기 때문에 CMV DNA 추적 관찰을 위한 검체 간격은 5-7일이 적당하다[25]. 치

료 시작 후 CMV DNA가 일시적으로 상승할 수 있기 때문에 5-7일 이전에 추적 관찰할 경우 치료 실패로 잘못 판단할 수 있다. 혈장이나 전혈에서 CMV DNA가 지속되는 것은 CMV 질환의 재발과 연관성이 있으므로[10,25,26], CMV DNA가 검출되지 않을 때까지 치료하는 것이 요구된다[26,27].

2주 이상의 적절한 치료에도 CMV DNA 농도가 감소하지 않거나, CMV DNA 농도가 감소하다가 정체를 보이거나, 처음에는 감소하였다가 다시 CMV DNA 농도가 증가하는 경우 약제 내성 CMV의 출현을 의심해야 한다[27,28]. 이 환자들에게서 CMV *UL97* 유전자(phosphotransferase gene)과 CMV *UL54* 유전자(DNA polymerase gene)의 염기서열분석을 실시하도록 한다[29-31].

CONCLUSION

선제치료를 위한 CMV DNA 정량검사를 위해서 임상 검사실에서는 하나의 검체(전혈 또는 혈장)를 선택하여 추적 관찰하도록 한다. WHO 표준물질에 맞추어진(calibrated) 정량 PCR법을 사용하는 것이 CMV DNA 정량 검사 표준화를 위한 첫걸음이 될 것이다. 최근 FDA 승인된 CMV DNA 정량 검사법이 소개되었으며 이들 검사들은 WHO 표준물질로 맞추어져 IU/mL로 보고가 가능하다.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Health-Guard Research Center, funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP) of Korea as a Global Frontier Project (Grant Number H-GUARD_ERND2-5).

REFERENCES

- Kim T, Sung H, Park KT, Kim SC, Kim SH, Choi SH, et al. Clinical usefulness of human cytomegalovirus antigenemia assay after kidney transplantation. *Infect Chemother* 2009;41:72-7.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007;357:2601-14.
- Razonable RR and Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:703-27.
- Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK; American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice; Canadian Society of Transplantation. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009;9:258-68.
- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004;85:1301-12.
- Fryer JF, Heath AB, Minor PD; Collaborative Study Group. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals* 2016;44:242-51.
- Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012;54:1793-7.
- Dioverti MV and Razonable RR. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28:317-22.
- Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J Clin Virol* 2006;36:72-5.
- Lisboa LF, Asberg A, Kumar D, Pang X, Hartmann A, Preiksaitis JK, et al. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation* 2011;91:231-6.
- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002;73:968-73.
- Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Alexander GJ. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. *J Clin Pathol* 1998;51:914-21.
- Sung H, Hwang SH, Koh YJ, Kim MN. Nucleic acid extraction for the quantification of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *Lab Med Online* 2016;6:165-70.
- Costa C, Mantovani S, Balocco 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.
- Pillet S, Bourlet T, Pozzetto B. Comparative evaluation of the QIASymphony RGQ system with the easyMAG/R-gene combination for the quantitation of cytomegalovirus DNA load in whole blood. *Virol J* 2012;9:231.
- 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.
- Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Carroll KC, Jorgensen JH, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed, Washington, DC; ASM Press, 2015:1718-37.
- U.S. Food and Drug Administration. Nucleic acid based tests. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm330711/> [Online] (last visited on 4 August 2016).
- Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Sternhell KE, Garlock K, Singer GG, et al. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:2224-8.
- Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM. Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated whole blood and plasma samples. *J Clin Virol* 2011;52:222-4.
- Oh HB, ed. *Performance Evaluation and Approval for In Vitro Diagnostic Device*. 2nd ed, Seoul; Korea Medical Book Publishing Company, 2015:223-318.
- Grys TE. Developing a quality system for quantitative laboratory-developed tests. *Clin Microbiol Newsl* 2011;33:179-85.

23. CLSI. Quantitative molecular methods for infectious diseases; approved guideline. CLSI document MM06-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
24. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000;355:2032-6.
25. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis* 2002; 186:829-33.
26. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013;96:333-60.
27. Humar A, Snyderman D; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9 Suppl 4:S78-86.
28. Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:2122-7.
29. Sung H, An D, Lee SO, Choi SH, Kim SH, Chi HS, et al. Detection of a UL97 gene mutation conferring ganciclovir resistance in human cytomegalovirus: prevalence of the D605E polymorphism in Korean immunocompromised patients. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42:429-34.
30. Jeong TD, Sung H, Choi SH, Lee SO, Yoon HK, Kim MN, et al. Cytomegalovirus ventriculoencephalitis with compartmentalization of antiviral-resistant cytomegalovirus in a T cell-depleted haploidentical peripheral blood stem cell transplant recipient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74:307-10.
31. Lurain NS and Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:689-712.

=국문초록=

인간거대세포바이러스 DNA 정량 중합효소연쇄반응 검사의 실제

¹울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학교실, ²국립암센터 진단검사의학과

장정현¹, 황상현^{1,2}, 김미나¹, 성홍섭¹

인간거대세포바이러스(human cytomegalovirus, CMV)는 면역이 저하된 환자에서 심각한 감염을 일으킬 수 있다. 장기 이식 수혜자에서 CMV 감염의 선제치료를 위해 일반적으로 CMV DNA 정량검사를 실시한다. 2006년 WHO에서 핵산증폭 검사를 위한 CMV 표준물질을 만들었지만, CMV DNA 정량 결과에는 검체, 핵산 추출법, 시발체와 소식자 및 증폭 반응의 효율성, 그리고 기기의 종류 등이 영향을 줄 수 있음을 고려해야 한다. CMV 정량검사의 검체는 주로 전혈 또는 혈장, 그리고 혈청이나 백혈구 분획을 이용하는데, 검체를 선택할 때 전혈과 백혈구 분획이 혈장이나 혈청보다 CMV DNA 검출 민감도가 높다는 점을 고려해야 한다. 임상 검사실에서 주로 사용되는 핵산 추출 방법은 대부분 흡착 크로마토그래피법의 원리를 이용한다. 그러나 핵산 추출 효율은 수기법과 자동화법에서 다를 수 있으며 추출 키트마다 차이가 있을 수 있다. 가장 널리 사용되는 CMV DNA 정량 PCR 검사는 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 것으로 이는 직선성 구간이 넓고, 검출 한계와 정량 한계값이 낮으며, 증폭 산물에 의한 오염 위험성이 낮다. 다른 진단검사와 마찬가지로 CMV DNA 정량 PCR 검사도 분석 전, 분석, 분석 후 전 과정에 대한 정도관리가 필요하다. 추적 관찰 간격은 5-7일이 적당하며 적절한 치료에도 반응이 없는 경우 약제 내성 CMV의 출현을 의심해야 한다. 선제치료를 위한 CMV 정량검사서 하나의 검체를 선택하여 추적 관찰하며, WHO 표준물질에 맞춘 정량 PCR법을 사용하도록 한다. 향후 표준화된 검사법과 임상적으로 의미 있는 CMV DNA 농도에 대한 연구가 필요하다. [Ann Clin Microbiol 2017;20:21-26]

교신저자 : 성홍섭, 05505, 서울시 송파구 올림픽로 43길 88
 울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학교실
 Tel: 02-3010-4499, Fax: 02-478-0884
 E-mail: sung@amc.seoul.kr