

실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 이용한 Real-Q HBV Quantification Kit의 성능평가

황상현¹ · 차충환² · 김유리³ · 권오중³ · 오흥범²

부산대학교병원 진단검사의학과¹, 울산의대 서울아산병원 진단검사의학과², ㈜바이오세움 생명공학연구소³

Performance Evaluation of Real-Q HBV Quantification Kit for HBV DNA by Real-Time PCR

Sang-Hyun Hwang, M.D.¹, Choong-Hwan Cha, M.D.², Yoo-Li Kim, Ph.D.³, Oh-Joong Kwon, Ph.D.³, and Heung-Bum Oh, M.D.²

Department of Laboratory Medicine, Pusan National University Hospital¹, Busan; Asan Medical Center and University of Ulsan College of Medicine², Seoul; BioSewoom Institute of Bioscience & Biotechnology³, Seoul, Korea

Background : Hepatitis B virus (HBV) DNA quantification is important for the management of HBV infection and identification of the development of resistance. The susceptibility to contamination and more variable reproducibility of results with the conventional HBV DNA quantification method have raised the need of a more simple and accurate method for HBV DNA quantification. Real-time quantitative PCR assays recently introduced in the laboratory can meet these needs. In this study, we evaluated the performance of the Real-Q HBV Quantification kit developed in Korea.

Methods : We evaluated the recovery of DNA extraction, the interference of internal control, an analytical sensitivity, specificity, and reproducibility, a clinical specificity, and a reportable range of the Real-Q HBV Quantification kit. The quantification result was also compared to that obtained by the Digene Hybrid-Capture II.

Results : The mean percent recovery was 108.6% and there was no interference with the internal control on DNA extraction. None of HIV, hepatitis C virus, or cytomegalovirus showed a cross-reactivity with HBV. This assay detected HBV DNA in a linear range from 10^2 to 10^{10} copies/mL, with the detection limit of 56 copies/mL. The assay exhibited a low within-run CV (coefficient of variation) (8.7-11.9%), between-run CV (10.5-14.7%), and between-day CV (13.2-21.4%). No HBV DNA was detected in any of 100 samples without HBV, resulting in a clinical specificity of 100%. The levels of HBV DNA showed a good correlation with those determined with Digene Hybrid-Capture II ($R^2=0.9827$).

Conclusions : The Real-Q HBV Quantification kit showed a good analytical sensitivity, specificity, and high reliability with a broad reportable range. This assay should be clinically useful in managing patients with HBV infection. (*Korean J Lab Med* 2006;26:442-8)

Key Words : Real-time polymerase chain reaction, Hepatitis B virus, Evaluation, TaqMan

서론

접 수 : 2006년 5월 24일 접수번호 : KJLM1951
수정본접수 : 2006년 7월 24일
게재승인일 : 2006년 8월 11일
교신저자 : 오 흥 범
우 138-736 서울시 송파구 풍납동 388-1
서울아산병원 진단검사의학과
전화 : 02-3010-4505, Fax : 02-478-0884
E-mail : hboh@amc.seoul.kr

기존의 B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV) DNA 정량 검사방법은 전통적인 중합효소연쇄반응(PCR) 방법을 이용하여 핵산을 증폭한 후 최종산물을 희석하여 정량 값을 구하는 방식과 증폭 없이 핵산에 탐식자를 부착시켜 증폭된 신호를 토대로 정량 값을 구하는 것이었다. 전자에는 Amplicor HBV Monitor

(Roche Molecular System, Pleasanton, CA)가 대표적이며[1, 2], 후자에는 branched-DNA (bDNA) 기술을 근본으로 하는 Quantiplex HBV DNA (Bayer Diagnostics, Emeryville, CA)[3, 4]와 hybrid-capture 기술로 불리는 Digene Hybrid-Capture (Murex Diagnostics, Dartford, UK)가 대표적이다[5]. 그런데 Amplicor HBV Monitor의 경우는 저농도(300-200,000 copies/mL)의 HBV DNA 정량은 가능하나 고농도에서는 직선성이 유지되지 않는 단점이 있으며, 이에 반해 bDNA와 hybrid capture 방법은 개발 시기에 따라 다르지만 일반적으로 고농도 바이러스 혈중(>10⁵ copies/mL)에 대해서 정확한 정량이 가능하고 저농도의 바이러스는 검출하지 못하는 한계가 있었다[6]. 과거에는 10⁵ copies/mL 이하인 경우 비활동성 보유자(inactive carrier)로 간주되어 임상적 관심이 낮았으나, 약물치료로 10⁵ copies/mL 이하로 떨어진 이후에도 다시 재발하는 사례들이 있어 10⁵ copies/mL 이하에서도 정확한 정량 값을 알고자 하는 필요가 발생하였다. 따라서 보통은 약물치료 추적검사를 bDNA 혹은 hybrid capture 방법으로 하다가 10⁵ copies/mL 이하로 떨어진 경우에는 Amplicor HBV Monitor를 이용하여 다시 검사하였다. 이러한 이중 검사체계의 단점들을 보완하면서 보다 간편하고 정확한 HBV DNA 정량 기법의 필요성이 제기되었는데 최근 검사실에 보급되고 있는 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR, RQ-PCR)은 이런 요구에 부응할 수 있는 기법이다[7-9].

RQ-PCR은 기존의 PCR과는 달리 증폭산물을 형광으로 정량 검출하는 것으로 주로 TaqMan probe 원리를 이용한다[10]. 이는 기존의 PCR과 유사하나 형광염료가 부착된 탐식자와 형광공명에너지 전이현상(fluorescence resonance energy transfer, FRET)을 이용한다는 점이 다르다[11, 12]. 즉, 탐식자 내 보고 색소(reporter dye; FAM, VIC, TET, HEX)의 형광발현을 억제하고 있는 억제색소(quencher dye; TAMRA)를 핵산증폭과정에서 DNA polymerase에 의하여 제거함으로써, 증폭주기마다 증폭산물에 비례하여 증가하는 형광의 강도를 실시간으로 확인한다[13-15].

본 연구에서는 국내에서 개발된 HBV DNA RQ-PCR 시약에 대해 검사실 사용에 앞서 검사키트의 성능평가 경험을 소개하고자 한다. 성능평가 항목은 검출 한계, 분석특이도, 진단특이도, 정밀도, 직선성 범위, 상관성 등이었다.

재료 및 방법

1. 성능평가 대상 키트

본 연구에서는 ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, CA, USA) 기기를 이용하여 Real-Q HBV quantification kit (BioSewoom Inc., Seoul, Korea)를 평가하였는데, HBV DNA 정량 방법을 간략히 소개하면 다음과 같다. QIAamp MinElute

virus spin kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 혈청 200 μ L에서 최종 30 μ L로 HBV DNA를 추출하였다. 이때 내부 대조(internal control, IC) DNA를 첨가하여 추출함으로써 핵산 추출 및 증폭 과정상의 오류가 없음을 확인할 수 있도록 하였다. 5 μ L의 추출한 HBV DNA 및 Real-Q HBV quantification kit내 HBV standard DNA를 20 μ L의 반응혼합물(master mix)에 분주하고 ABI PRISM 7000 SDS를 이용하여 50°C 2분, 95°C 10분 이후 95°C 20초/58°C 30초/72°C 30초를 45회 반복하였다.

반응 후 HBV standard DNA의 농도에 대한 threshold cycle (Ct) 값으로 standard 직선을 얻고 이 직선에 대비하여 검체의 HBV DNA를 copies/ μ L의 단위로 정량하였다. Standard 직선에서 계산된 HBV DNA 농도(copies/ μ L)에 총 추출된 DNA 부피(μ L)를 곱하고 추출에 사용한 혈청의 양(0.2 mL)으로 나누어 주어 검체 1 mL 내 존재하는 HBV DNA를 계산하였다.

검사 시 사용하는 HBV standard DNA의 성상은 다음과 같다. HBsAg의 일부를 PCR로 증폭한 후 pGEM T-Easy Vector System (Promega, Madison, USA)의 사용법에 따라 vector내에 삽입하였다. 삽입된 DNA를 ECOS101 (Yeastern Biotech., Taiwan) 세포에 도입하고 배양한 후 플라스미드 DNA를 추출하였다. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)을 사용하여 플라스미드 DNA의 농도를 정량한 후 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)의 WHO HBV 국제 표준품(97/746)을 이용하여 보정하였다.

HBV DNA에는 VIC 염색제를, 내부대조물질에는 FAM 염색제를 부착하여 별도의 형광채널에서 검출하고 내부대조물질의 Ct 범위가 33 \pm 3 cycle 이내에 드는 것을 확인하였다. 또한 매 반응마다 PCR의 오염을 확인하기 위해 증류수를 사용한 음성대조군에서 음성의 결과가 나오는지 확인하며, 저농도 및 고농도 정도관리 물질을 동시 검사하여 지정된 범위 내에 드는 것을 확인하였다. 내부 정도관리 기준에 부적합한 경우는 동시 검사하였던 모든 검체에 대해 재검하였다.

2. HBV DNA 표준물질의 회수율 평가

HBV viral DNA assay validation kit (AcroMetrix Corporation, CA, USA)를 사용하여 키트의 회수율을 평가하였다. 음성혈장을 포함하여 키트 내 200 IU/mL의 농도부터 2.0 \times 10⁷ IU/mL의 농도까지 10배 농도차이를 나타내는 6개의 표준물질로부터 DNA를 추출한 후 Real-Q HBV Quantification kit를 이용하여 정량 값을 측정 후 비교하였다.

3. 검출 한계 평가

검출 한계를 결정하기 위하여 ACCURUN 325 HBV DNA 양성대조검체(BBI Diagnostics, MA, USA)를 HBV 음성혈장으로 희석하여 225 copies/mL, 112.5 copies/mL, 84 copies/mL,

56 copies/mL, 28 copies/mL 농도의 희석액을 만들어 사용하였다. 각 농도 당 50번 반복 검사를 실시하였다.

4. 특이도 평가

Architect HBsAg (Abbott Laboratories, IL, USA) 검사에서 음성인 100검체와 ACCURUN HCV RNA performance panels (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 4h, 5a, 6a 유전자형), ACCURUN HIV-1 RNA performance panels (A, B, C, D, E, F, G, H 유전자형) 그리고 ACCURUN CMV positive control 검체 19개를 이용하여 동일조건에서 RQ-PCR을 시행하고 교차반응 여부를 확인하였다.

5. 정밀도 평가

1×10^6 , 1×10^3 copies/mL 농도의 HBV standard DNA를 사용하여 NCCLS EP-5에 따라 20일간 하루에 2시간 이상의 간격으로 2회씩을 시행하였고, 매번 실시할 때마다 두 번 반복 측정하였다. 이 결과를 이용하여 검사차레내(within-run), 검사차레간(between-run), 검사일간(between-day) 정밀도를 평가하였다.

6. 직선성 평가

NCCLS EP-6에 따라 HBV standard DNA를 검출 한계 농도 및 10^1 copies/mL에서 10^{10} copies/mL 범위에서 10배수로 연속 희석한 농도에 대해(총 11개 농도) 각 농도마다 8회씩 반복 측정하여 직선성을 평가하였다.

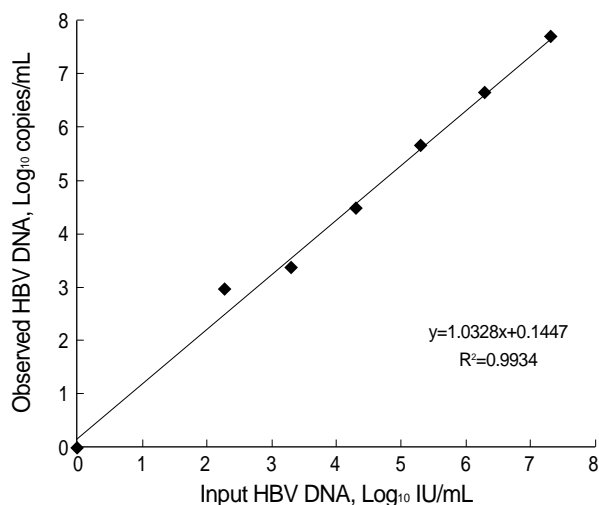


Fig. 1. Quantitative correlation between reference from HBV viral DNA assay validation kit (AcroMetrix corporation) and observed value by Real-Q HBV Quantification kit (BioSewoom Inc.).

7. 상관성 비교

NCCLS EP-9에 따라 다양한 범위의 농도를 가지는 40개의 검체를 이용하여 Digene Hybrid-Capture II (Murex Diagnostics, Dartfold, UK)와 비교하였으며, 각 농도별로 두 번씩 반복 측정 후 평균값을 사용하였다. 선형회귀모델을 이용하여 검사 간 상관성을 평가하였다.

8. 내부 대조물질(internal control)의 PCR 반응 간섭여부 평가

IC의 PCR 반응 간섭여부를 확인하기 위하여 핵산 추출 시, 한 검체당 2 μ L의 IC를 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우에 대해 동일한 과정을 거쳐 RQ-PCR을 시행하였다. 정상적인 핵산 추출 시 IC의 Ct 범위가 33 ± 3 cycle이고 각 검체에서 이 범위 안에 들어가는지 조사하였다.

9. 통계분석

최소 검출 농도는 probit 분석을 통하여 95% 신뢰수준에서 예측하였고, 분석에 이용한 통계소프트웨어는 StatsDirect (StatsDirect Ltd., Cheshire, UK)이었다. 직선성을 평가하기 위해 다항 회귀분석을 시행하였고, t-test로 검정하였다. 검사간 상관성 분석은 선형회귀분석을 이용하였다. $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 통계소프트웨어는 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하였다.

결 과

1. HBV DNA 표준물질의 회수율 평가

음성혈청을 포함한 200 IU/mL의 농도부터 2.0×10^7 IU/mL의 농도까지 6개의 표준물질에 대한 평가 결과는 Fig. 1과 같았다. 6개의 표준물질의 기대치에 대한 관측치의 평균 회수율은 108.6%이었고, 기울기=1.0328, $R^2=0.9934$ 로 Real-Q HBV Quantification kit는 다양한 농도의 HBV에 대하여 우수한 회수율을 나타내었다(Fig. 1).

Table 1. Detection limit of Real-Q HBV Quantification kit

Input HBV (copies/mL)	Result		
	Replicates	Positive reaction	%
225	50	50	100
112.5	50	50	100
84	50	49	98
56	50	48	96
28	50	39	88

2. 검출 한계

검출 한계를 검증하기 위해 시행한 검사에서 Real-Q HBV Quantification kit는 56 copies/mL (confidence interval 41-84 copies/mL)의 HBV DNA를 96%의 양성률로 검출할 수 있었던 반면, 28 copies/mL의 경우는 88%의 양성률로 검출되었다(Table 1). 따라서, 검출 한계는 56 copies/mL으로 정하였다. 반복 측정된 자료를 이용한 Probit 분석에서 95% 신뢰수준으로 결정되는 검출 한계의 HBV 정량값은 51 copies/mL이었다.

Table 2. Analytical specificity of Real-Q HBV Quantification kit

	HBV (VIC)	Internal control (FAM)
Cytomegalovirus	-	+
Hepatitis C virus 1a	-	+
Hepatitis C virus 1b	-	+
Hepatitis C virus 2a	-	+
Hepatitis C virus 2b	-	+
Hepatitis C virus 3a	-	+
Hepatitis C virus 3b	-	+
Hepatitis C virus 4	-	+
Hepatitis C virus 4h	-	+
Hepatitis C virus 5a	-	+
Hepatitis C virus 6a	-	+
HIV A	-	+
HIV B	-	+
HIV C	-	+
HIV D	-	+
HIV E	-	+
HIV F	-	+
HIV G	-	+
HIV H	-	+

VIC and FAM are the reporter dyes.

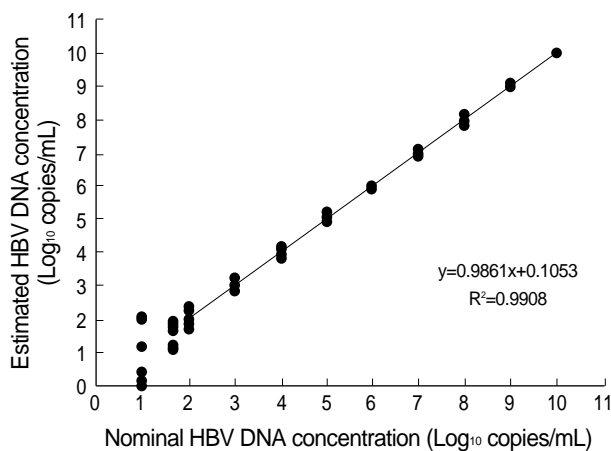


Fig. 2. Linearity range of Real-Q HBV Quantification kit (BioSewoom Inc.). The straight line was determined by a linear regression of the log 10 estimated concentrations with the log 11 nominal concentrations. Linearity was found from 10^2 to 10^{10} copies/mL.

3. 특이도

HBsAg 음성 혈청 100 검체와 ACCURUN HCV RNA performance panels (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 4h, 5a, 6a 유전자형), ACCURUN HIV-1 RNA performance panels (A, B, C, D, E, F, G, H 유전자형) 그리고 ACCURUN CMV positive control에서 HBV DNA가 증폭되지 않아 진단 특이도는 100%이었다(Table 2).

4. 정밀도

1×10^6 , 1×10^3 copies/mL 두 농도에 대해 검사차례내 정밀도는 각각 8.7%, 11.9%이었으며 검사차례간 CV의 경우는 각각

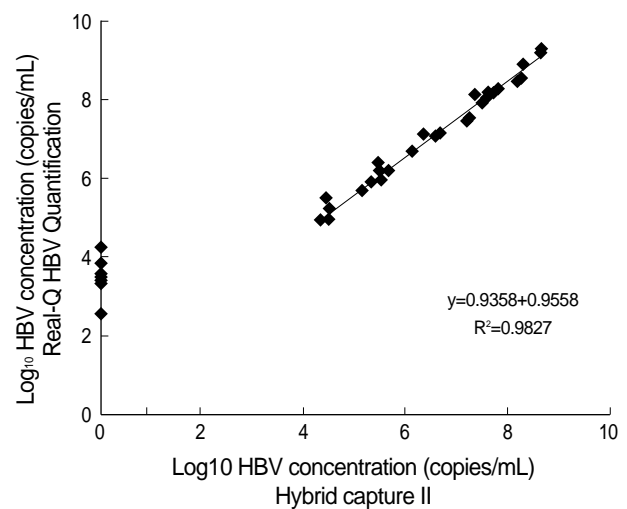


Fig. 3. Quantitative comparison of Real-Q HBV Quantification kit (BioSewoom Inc.) with Digene Hybrid-Capture II (Murex Diagnostics).

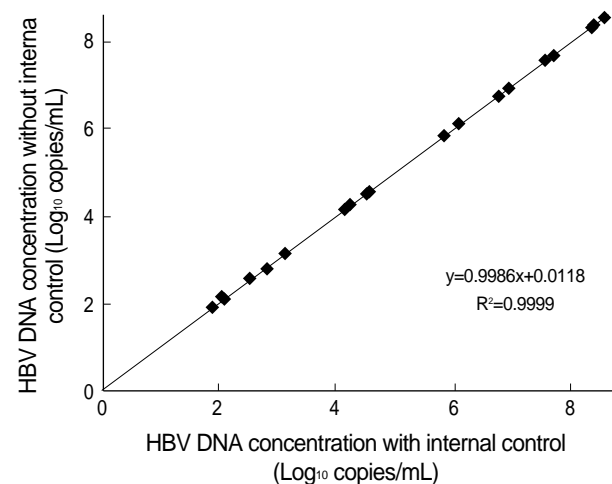


Fig. 4. The comparison of HBV concentrations measured with and without internal control.

10.5%, 14.7%이었고, 검사일간 CV의 경우는 각각 13.2%, 21.4%이었다.

5. 직선성

Real-Q HBV Quantification kit의 직선성은 10^1 - 10^{10} copies/mL 범위의 경우 10^1 copies/mL은 검출 한계 이하, 검출 한계에 해당하는 56 - 10^{10} copies/mL 범위의 경우 선형회귀 모델($y=a+b_1X$)에서 $b_1=0.9132$ ($P=0.1832$), 비선형회귀 모델($y=a+b_1X+b_2X^2$)에서는 $b_2=1.1263$ ($P<0.0001$)로 직선성이 유지되지 않음을 확인하였다. 10^2 - 10^{10} copies/mL 범위에서는 선형회귀 모델에 적합하였다($b_1=0.9861$, $P<0.0001$, adjusted $R^2=0.9908$). 따라서, 본 검사는 10^2 - 10^{10} copies/mL 범위에서 직선성이 유지됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

6. 검사법 비교

Digene Hybrid-Capture II에서 10^5 copies/mL 이하의 결과를 보였던 12개 검체는 Real-Q HBV Quantification kit에서 0 - $15,862$ copies/mL의 다양한 결과를 보였다. 10^5 copies/mL 이상의 결과를 보였던 28개 검체에서는 기울기= 0.9358 , $R^2=0.9827$ 의 좋은 상관성을 나타내었다(Fig. 3).

7. 내부대조물질(IC)의 PCR 반응 간섭 여부

IC을 사용하는 경우와 사용하지 않는 경우 결과 값에 차이가 없이 기울기= 0.9986 , $R^2=0.9999$ 의 좋은 상관성을 나타내었다(Fig. 4). 또한 검사기간 동안 내부대조물질의 Ct 범위가 모두 33 ± 3 cycle에 들어가는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

HBV는 만성간질환의 주요한 원인이며, 간경변증, 간암 등의 합병증을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 세계보건기구의 2000년 통계에 의하면, 전 세계적으로 20억 정도의 인구가 HBV에 감염되어 있고 그 중 3억 5천만 명 이상이 만성간염을 가지고 있는 것으로 보고되었다[16]. 만성 B형 간염의 치료는 interferon- γ 의 주 3회 주사나 라미부딘(lamivudine) 일일 경구 단독 투여 요법이 흔히 시행되고 있다. 만성 B형 간염 환자들에서 혈청 내 HBV의 정량적인 측정은 환자의 예후를 예측하고 치료의 반응을 평가하여 치료의 시작과 종료를 결정하는 데 있어서 매우 중요한 판단의 근거가 된다. 또한, lamivudine의 내성은 치료 1년 이후 14-32%에서 나타나며, 치료 2년이 지나면 38-56%에서 나타난다. 따라서 lamivudine 내성 HBV의 조기 발견을 위해 더 민감한 HBV 정량검사와 lamivudine 내성 검사 등이 필요하다.

국내에서 HBV DNA 정량을 위해 널리 이용되는 검사법에는 Amplicor HBV Monitor test, bDNA test 그리고 Hybrid-Capture test 등이 있다[17]. HBV DNA를 직접 증폭하는 Amplicor HBV Monitor는 낮은 농도의 HBV DNA 검사에 효율적이고, HBV DNA에 부착된 형광 시그널을 증폭하는 bDNA와 Hybrid-Capture는 높은 농도의 검사에 효율적이다[6]. 과거에는 HBV DNA 농도가 10^5 copies/mL 이하인 경우 비활동성 보유자(inactive carrier)로 간주되어 임상적으로 관심이 낮았으나, Amplicor HBV Monitor 방법으로 HBV를 정량적으로 측정하여 200 copies/mL 이하인 경우는 재발률이 37%, 1,000 copies/mL 이상인 경우는 73%에서 재발한다는 보고가 있어[18], 10^5 copies/mL 이상뿐만 아니라, 그 이하에서도 정확한 정량이 가능한 새로운 검사 기법이 필요하게 되었다.

RQ-PCR의 가장 큰 장점은 8에서 10 log의 넓은 측정 범위를 가지고 있다는 점이다. 또한 실시간으로 형광 신호를 관찰하기 때문에 증폭 후 전기영동을 하는 과정이 필요 없어 검사보고 시간이 빠르고 검사 시 발생할 수 있는 carryover 위험성을 최소화할 수 있다[19]. 현재 검사실에서 많이 사용되고 있는 RQ-PCR 기기의 종류로는 ABI Prism 7000/7300/7500/7900HT SDS (Applied BioSystems)와 LightCycler (Roche Molecular Systems, Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Science, NSW, Australia), COBAS TaqMan 48 analyzer (Roche Molecular Systems) 등이 있다[20]. 또한 RQ-PCR의 반응 신호 검출 형식에 따라 크게 이중가닥 DNA에 끼어들어가는 방식과 탐식자에 형광을 부착시키는 방식으로 나눌 수 있는데 전자에는 SYBR Green I 형광염료가 쓰이고, 후자에는 TaqMan, Hybridization, Molecular Beacon 방법 등이 있다[15, 20, 21]. SYBR Green I 형광염료를 사용하는 경우는 상대적으로 저렴한 비용으로 신속히 선별검사를 시행할 수 있는 장점이 있으나, 탐식자를 이용하는 방식보다 특이도가 낮다는 단점이 있다[8]. 따라서 바이러스 정량과 같이 정확한 결과를 필요로 하는 경우는 탐식자를 이용하는 것이 보편적이다.

RQ-PCR에 있어 가장 중요한 데이터는 역치 증폭주기(threshold cycle) 즉, Ct 값이다. Ct는 PCR 과정에서 증폭산물이 현저히 증가하기 시작하는 지점의 PCR cycle 수를 의미한다. 즉 분리된 '보고자염색(reporter dye)'에 의하여 생기는 형광의 양이 일정한 기준 값에 도달하는 증폭주기인 것이다. 원래 검체에 HBV DNA 양이 많으면 일찍 Ct 값에 도달하고 검체에 HBV DNA 양이 적으면 늦은 cycle에서 Ct에 도달하게 되므로 표준물질의 Ct 값을 알고 있으면 검체의 Ct 값을 통하여 원래 검체의 HBV DNA를 정량할 수 있게 된다[15, 22, 23].

본 연구에서 평가한 Real-Q HBV Quantification kit는 RQ-PCR 원리를 사용하고 검출 한계는 56 copies/mL로 이는 Ho 등[24]의 보고(250 copies/mL)보다는 우수한 결과이며, Roche COBAS TaqMan HBV Test (34 copies/mL)와는 비슷한 수준이었다[25]. 직선성은 COBAS TaqMan HBV Test (170 to at least 8.5×10^8 copies/mL)와 대등하였다[25]. HIV, HCV,

CMV 등 주요 바이러스와 교차 반응은 없었으며, 임상 검체를 대상으로 한 진단특이도 또한 100%로 우수한 성능을 보였다.

1×10^6 , 1×10^3 copies/mL 두 가지 농도에서의 정밀도는 검사 차례내 정밀도가 8.7-11.9%, 검사차례간 정밀도가 10.5-14.7%, 검사일간 정밀도가 13.2-21.4%였다. Weiss 등[25]의 연구와 비교해 보면, 본 검사와 유사한 HBV DNA 농도를 보이는 구간에서 COBAS TaqMan HBV Test의 정밀도는 검사차례내 정밀도가 7.9-11.6%, 검사차례간 정밀도가 13.0-18.6%으로 차이가 거의 없었으며, Zanella 등[26]의 연구에서는 검사차례내 정밀도가 19.3-35.8%, 검사차례간 정밀도가 9.3-33.9%로 본 검사의 정밀도는 HBV DNA가 낮은 농도에서도 우수한 것으로 판단되었다.

Digene Hybrid-Capture II와 비교에서는 $R^2=0.98$ 로 우수한 상관성을 보였다. 하지만 본 연구에서 사용한 Digene Hybrid-Capture 방법은 검출 한계가 10^5 copy/mL 이상으로 그보다 낮은 농도에서 타 검사법과의 상관성은 확인하지 못하였다. 본 검사법과 유사한 Taqman probe 방법을 이용한 real-time PCR인 COBAS TaqMan HBV Test와 Amplicor HBV MONITOR test의 상관성 비교 연구에서는 $R^2=0.9575$ 의 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다[27]. Digene Hybrid-Capture II와의 우수한 상관성, 10^2 - 10^{10} copies/mL 범위에서의 우수한 직선성, 2.0×10^2 - 2.0×10^7 copies/mL 범위의 표준 DNA에 대한 정확한 회수율을 고려할 때 본 연구에서 사용한 Real-Q HBV Quantification kit 또한 10^5 copy/mL 이하에서도 우수한 상관성을 보일 것으로 사료된다. 특히 Real-Q HBV Quantification kit은 IC를 검체와 혼합하여 DNA를 추출하기 때문에 추출과정에서의 오류를 검출할 수 있도록 고안되었다. Real-Q HBV Quantification kit에서 사용하는 IC는 목표(target) 유전자 증폭에 있어 간섭인자가 되지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 IC의 Ct를 점검함으로 증폭과정의 적절성을 확인할 수 있었는데 이는 본 연구키트의 장점이라 여겨진다.

결론적으로 본 연구를 통하여 평가된 Real-Q HBV Quantification kit (BioSewoom)는 검출 한계, 직선성, 특이도, 정밀도 등의 성능에 있어 유사 제품에 비해 손색이 없다고 판단되는 바, HBV DNA 정량을 이용한 만성 B형 간염 치료의 추적관찰에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

배경 : Hepatitis B virus (HBV) DNA 정량검사는 항바이러스제제의 사용, 치료효과 추적, 내성 HBV의 조기 진단 등 HBV 감염의 치료를 위해 필요하다. 최근 검사실에 보급되고 있는 real-time quantitative PCR은 기존의 HBV DNA 검사법의 단점들을 보완하면서 보다 간편하고 정확한 HBV DNA 정량 기법이다. 본 연구에서는 최근 국내에서 개발된 Real-Q HBV Quantification kit의 성능을 평가하였다.

방법 : Real-Q HBV Quantification kit의 회수율, 검출 한계, 분석특이도 및 진단특이도, 정밀도, 직선성 범위, 그리고 Digene Hybrid-Capture II와 상관성과 internal control (IC)의 간섭영향을 분석하였다.

결과 : 평균 %회수율은 108.6%이었으며, 동일 검체에서 IC과의 경쟁 때문에 target 유전자의 증폭이 억제되지 않음을 확인하였다. Hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV), Cytomegalovirus (CMV) 19개의 양성 검체와 교차반응은 없었으며, 본 검사의 재현성은 검사차례내 변이계수 8.7-11.9%, 검사차례간 변이계수 10.5-14.7%, 검사일간 변이계수 13.2-21.4%를 보였다. 검출 한계는 56 copies/mL이었으며, 보고범위는 10^2 - 1×10^{10} copies/mL이었다. HBV 음성 100검체를 이용하여 분석한 진단특이도는 100%이었고, Digene Hybrid-Capture II와 우수한 상관관계를 보였다($R^2=0.9827$).

결론 : 본 연구를 통하여 평가된 Real-Q HBV Quantification kit는 우수한 검출 한계, 특이도, 높은 신뢰성을 보였으며, 기존의 HBV DNA 정량 검사법보다 넓은 범위의 HBV DNA를 측정할 수 있어, HBV 감염의 치료와 내성 HBV 조기 진단에 매우 유용할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Gerken G, Gomes J, Lampertico P, Colombo M, Rothaar T, Trippier M, et al. Clinical evaluation and applications of the Amplicor HBV Monitor test, a quantitative HBV DNA PCR assay. J Virol Methods 1998;74:155-65.
- Kessler HH, Pierer K, Santner BI, Vellimedu SK, Stelzl E, Lackner H, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA with a new PCR assay. Clin Chem Lab Med 1998;36:601-4.
- Urdea MS, Horn T, Fultz TJ, Anderson M, Running JA, Hamren S, et al. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. Nucleic Acids Symp Ser 1991; 24:197-200.
- Hendricks DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. Am J Clin Pathol 1995;104:537-46.
- Pawlotsky JM, Bastie A, Lonjon I, Remire J, Darthuy F, Soussy CJ, et al. What technique should be used for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples? J Virol Methods 1997;65: 245-53.
- Pawlotsky JM, Bastie A, Hezode C, Lonjon I, Darthuy F, Remire J, et al. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. J Virol Methods 2000;85:11-21.

7. Kohmoto M, Enomoto M, Yano Y, Otani S, Minamitani S, Tamori A, et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA by real-time quantitative polymerase chain reaction (TaqMan PCR) during lamivudine treatment: comparison with three other assays. *Hepatol Res* 2003;26:125-33.
8. Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, Saunders NA. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods* 2001;93:105-13.
9. Paraskevis D, Haida C, Tassopoulos N, Raptopoulou M, Tsantoulas D, Papachristou H, et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. *J Virol Methods* 2002;103:201-12.
10. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190-212.
11. Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* 1992;211:353-88.
12. Selvin PR. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* 1995;246:300-34.
13. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7276-80.
14. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3761-6.
15. Valasek MA and Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005;29:151-9.
16. WHO. Hepatitis B. Fact Sheet No. 204. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (Revised on October 2000).
17. Kim SH, Kim JW, Park S, Cho EH, Kim EJ, Park SS, et al. Annual report on external quality assessment in diagnostic genetics in Korea (2004). *J Lab Med Qual Assur* 2005;27:141-65. (김선희, 김종원, 박수연, 조은혜, 김은지, 박성섭 등. 진단유전학검사 신빙도조사 결과보고(2004). 임상검사와 정도관리 2005;27:141-65.)
18. Lee HC, Suh DJ, Ryu SH, Kim H, Shin JW, Lim YS, et al. Quantitative polymerase chain reaction assay for serum hepatitis B virus DNA as a predictive factor for post-treatment relapse after lamivudine induced hepatitis B e antigen loss or seroconversion. *Gut* 2003;52:1779-83.
19. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002;8:257-60.
20. Bell AS and Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002;18:337-42.
21. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002;30:503-12.
22. Kuhne BS and Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 2002;33:1078-84.
23. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
24. Ho SK, Yam WC, Leung ET, Wong LP, Leung JK, Lai KN, et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes. *J Med Microbiol* 2003;52:397-402.
25. Weiss J, Wu H, Farrenkopf B, Schultz T, Song G, Shah S, et al. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. *J Clin Virol* 2004;30:86-93.
26. Zanella I, Rossini A, Domenighini D, Albertini A, Cariani E. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-time amplification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:22-6.
27. Hochberger S, Althof D, Gallegos de Schrott R, Nachbaur N, Rock H, Leying H. Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol* 2006;35:373-80.