

거대세포바이러스 정량 검출을 위한 Biosewoom™ Real-Q Cytomegalovirus Quantification kit 평가

허운보¹ · 원동일¹ · 김유리² · 김명희³ · 오흥범³ · 서장수¹

경북대학교병원 진단검사의학과¹, ㈜바이오세움 생명공학연구소², 울산의대 서울아산병원 진단검사의학과³

Evaluation of Biosewoom™ Real-Q Cytomegalovirus Quantification kit for Cytomegalovirus Viral Load Measure

Woon Bo Heo, M.D.¹, Dong Il Won, M.D.¹, Yoo Li Kim, Ph.D.², Myeong Hee Kim, M.D.³, Heung Bum Oh, M.D.³,
and Jang Soo Suh, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine¹, Kyung Pook National University Hospital, Daegu; Biosewoom Institute of Bioscience & Biotechnology², Seoul; Department of Laboratory Medicine³, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background : Rapid and accurate laboratory tests are essential to detect cytomegalovirus (CMV) infections in solid organs and haematopoietic stem cell transplant recipients. We assessed the real-time quantitative PCR (RQ-PCR) technology for its usefulness in detecting CMV DNA.

Methods : We evaluated the analytical performance of CMV RQ-PCR using Real-Q Cytomegalovirus Quantification kit (BioSewoom Inc., Korea). To evaluate its clinical utility, we also compared it to pp65 antigenemia test, an immunostaining method, on 343 samples of total 84 patients, including 63 transplant recipients.

Results : The detection limit of RQ-PCR was 63 copies/mL and none of hepatitis B virus, hepatitis C virus, or human immunodeficiency virus showed a cross-reactivity with CMV. Total coefficient of variation (CV) was 10.4-19.5%. It detected CMV DNA in a linear range from 1×10^2 to 5×10^{11} copies/mL ($P < 10^{-13}$, $R^2 = 0.9994$). The qualitative positive rates of pp65 antigenemia test and RQ-PCR were 4.7%, 16.3%, respectively and concordance rate between the two tests was 84.8% ($\kappa = 0.221$, $P < 10^{-6}$). In comparison of quantitative results, the correlation between two tests was significant ($r = 0.45$, $P < 10^{-17}$). In comparison among three groups by pp65 antigen level, CMV DNA level obtained with RQ-PCR increased significantly ($P < 10^{-3}$ and $P < 10^{-7}$, respectively).

Conclusions : The RQ-PCR is easier to perform than the immunostaining method, has good analytical performance and reflects the blood level of viral DNA well. It may be a new method substituting the pp65 antigenemia test. Further studies determining RQ-PCR value starting pre-emptive therapy will be required. (*Korean J Lab Med* 2007;27:298-304)

Key Words : RQ-PCR, pp65 antigenemia test, CMV DNA

접 수 : 2007년 5월 2일 접수번호 : KJLM2037
수정본접수 : 2007년 6월 20일
게재승인일 : 2007년 6월 25일
교신저자 : 서 장 수
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕2가 50
경북대학교병원 진단검사의학과
전화 : 053-420-5293, Fax : 053-426-3367
E-mail : suhjs@knu.ac.kr

*이 논문은 2006년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. ROA-2003-000-10306-0).

서 론

거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 감염은 선행적 치료(pre-emptive therapy)나 조기 진단법의 발전에도 불구하고 고형장기 이식환자나 조혈모세포 이식환자의 이환율과 사망률의 중요한 원인이다[1]. 따라서 CMV 감염을 조기에 진단하고 항바

이러스 치료의 효과를 지속적으로 추적하기 위해서는 신속하고 정확한 검사가 필수적이며, 여러 가지 검사방법 중에서도 백혈구 내에서 CMV pp65 저밀도단백을 검출하는 pp65 항원검사가 지금까지 CMV 감염의 표준검사법으로 널리 시행되어 왔다[2]. 그러나 pp65 항원검사는 전 과정이 수작업으로 이루어지고 즉각적인 검체 처리를 요구하는 점, 판독의 주관성, 낮은 민감도 등의 문제점 외에도 검사실 간 방법상의 표준화가 이루어져 있지 않아 민감도와 특이도의 차이가 크고, 특히 이식 후나 항암치료 등으로 호중구감소증을 보이는 환자에서는 검사를 시행하기 어려운 한계점을 가지고 있다[3, 4]. 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 CMV-DNA 정성검사가 pp65 항원검사보다 더 민감하다고 밝혀져 있으나, 잠복감염과 현증감염을 감별해내지 못하고 특이도나 양성예측도가 낮아서 임상적 의의는 적다[5, 6]. 반면에 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative PCR, RQ-PCR)과 같은 기법을 이용하여 바이러스 양을 측정하는 것이 CMV 감염의 임상 경과와도 잘 일치하며, 민감도, 특이도가 높은 뿐만 아니라 정확하고 신속한 검사가 가능하여, pp65 항원검사를 대체할 수 있는 새로운 검사법으로 주목 받고 있다[7].

이에 저자들은 국내에서 개발된 CMV RQ-PCR 키트의 분석 성능을 평가하고, 임상 검체에서 면역염색법인 pp65 항원검사와 비교하여 임상적 적용을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

분석 성능 평가는 CMV 표준 플라스미드 DNA를 CMV 음성

Table 1. Classification of the patients in this study

Underlying disease	No	No of CMV infection		
		I	II	III
Transplant recipients	63	16		1
Peripheral blood stem cell	49	12		1
Bone marrow	7			
Kidney	6	3		
Liver	1	1		
HIV infection	3	1	1	
Hepatitis	4			
Gastroenteritis	2		1	
Pneumonia/Pneumonitis	4			
Pericarditis	1		1	
Chronic renal failure	2			
Leukemia/Lymphoma	2			
Aplastic anemia	1			
Systemic lupus erythematosus	1			
Total	83	17	3	1

I, Asymptomatic infection; II, End organ disease; III, CMV syndrome.
Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; HIV, human immunodeficiency virus.

혈장으로 희석하여 사용하였다. 임상적 평가를 위하여, 2006년 7월부터 2007년 1월까지 본과에 CMV pp65 항원검사가 의뢰된 63명의 이식 수혜자를 포함한 총 84명(남 52명, 여 32명, 연령 0-70세, 평균연령 38세)의 343검체를 대상으로 하였다(Table 1). 이식 후 환자는 주 단위로 추적 검사하였고, 평균 추적검사 횟수는 5회이었다. 검체는 EDTA 용기에 채취하여 즉시 검사에 사용하였다. 무증상 CMV 감염은 증상 없이 pp65 항원이나 CMV DNA가 검출된 경우로 대상군 중 17명이었다. 이 중 ganciclovir로 선행적 치료를 받은 환자는 7명, 치료를 받지 않은 환자는 10명이었다. 조직학적 검사상 CMV 감염에 의한 위염, 망막염, 심장막염이 확진된 CMV 말단 장기 질환 환자는 3명, 발열과 호중구감소증, 혈소판감소증을 보이면서 ganciclovir 치료에 반응하여 CMV 바이러스 증후군의 기준을 만족한 환자는 1명이었다(Table 1).

2. 방법

1) RQ-PCR법에 의한 CMV DNA 정량

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 500 μ L의 전혈로부터 DNA를 추출하였다. 이때 내부대조(internal control, IC) DNA를 첨가하여 추출함으로써 핵산 추출 및 증폭 과정상의 오류가 없음을 확인할 수 있도록 하였다. RQ-PCR은 CMV 유전체 내 glycoprotein B (gB)의 64 bp 크기의 생성물을 증폭하도록 고안된 Real-Q Cytomegalovirus Quantification kit (Biosewoom Inc., Seoul, Korea)를 사용하였다. 5 μ L의 추출한 CMV-DNA 및 kit 내 CMV 표준 DNA를 20 μ L의 반응혼합물(master mix)에 분주하고 ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 50°C 2분, 95°C 10분 이후 95°C 20초/58°C 30초/72°C 30초를 45회 반복하였다.

CMV DNA에는 VIC 염색제를, 내부대조물질에는 FAM 염색제를 부착하여 별도의 형광 채널에서 검출하고 내부대조물질의 threshold cycle (Ct) 범위가 33 \pm 3 cycle 이내에 드는 것을 확인하였다. 또한 매 반응마다 PCR의 오염을 확인하기 위해 증류수를 사용한 음성대조군에서 음성의 결과가 나오는지 확인하였다.

반응 후 CMV 표준 DNA의 농도에 대한 Ct 값으로 표준 직선을 얻고 이 직선에 대비하여 검체의 CMV DNA를 copies/ μ L의 단위로 정량하였다. 표준 직선에서 계산된 CMV DNA 농도(copies/ μ L)에 총 추출된 DNA 부피(μ L)를 곱하고 추출에 사용한 검체의 양(500 μ L)으로 나누어 주어 검체 1 mL 내 존재하는 CMV DNA를 계산하였다.

2) pp65 항원검사

EDTA 혈액 3 mL에 pentastarch (Pentastarch 10%®; 제일약품, 용인, 한국) 1 mL를 섞어 백혈구를 분리하고, 검체마다 세포 수를 일정하게 맞춘 후 세포원침하여 각 슬라이드에 200,000개의 백혈구가 부착되도록 하였다. 슬라이드를 1% paraformaldehyde 용액으로 4°C 10분간 고정 후 인산완충액으로 세척하고, metha-

nal로 -20°C 10분간 고정 후 실온에서 건조시켰다. 면역염색과정은 Clonab CMV alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) kit (Biotest, Dreieich, Germany)를 사용하여 시행하였다. 슬라이드에 CMV pp65 항원에 대한 단클론항체 (Clonab CMV, Biotest, Dreieich, Germany) 50 µL를 첨가한 후 습윤상자에서 37°C 15분간 염색하고 인산완충액으로 두 번 세척하였다. 이차항체 50 µL 첨가 후 다시 37°C 15분간 염색, 인산완충액으로 세척 후 APAAP complex 50 µL를 첨가하고 37°C 15분간 항온하였다. 세척 후 50 µL의 substrate chromogen과 반응시키고 Mayer's haematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 대조 염색하여 광학현미경으로 판독하였다. 결과는 200,000개의 백혈구(peripheral blood leukocytes, PBLs)당 양성 세포 수를 보고하였다.

3) RQ-PCR의 분석 성능 평가

민감도 평가를 위해 10,000, 5,000, 1,000, 500, 100, 75, 50 copies/mL 농도의 CMV 표준플라스미드 DNA를 사용하였다. 각 농도당 150번 반복 검사를 하였다.

특이도 평가를 위해서는 CMV pp65 항원검사에서 음성이면서 Absolute CMV PCR kit (Biosewom Inc.)로 시행한 CMV 정성 PCR에서 음성인 20검체와 ACCURUN 325 HBV DNA 양성 대조 검체(BBI Diagnostics, MA, USA), 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)을 이용하여 동일 조건에서 RQ-PCR을 시행하고 교차반응 여부를 확인하였다.

정밀도(coefficient of variation, CV) 평가를 위해서는 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 copies/mL 농도의 CMV 표준 플라스미드 DNA를 사용하여 각 농도마다 5일간 하루에 2시간 이상의 간격으로 2회씩 시행하였고, 매번 실시할 때마다 5회 반복 측정하여 총 50회를 검사하였다. 이 결과로 검사차레 내(within-run), 검사차레 간(between-run), 검사일 간(between-day) CV를 평가하였다. 또 DNA 정량 값 뿐만 아니라 Ct 값에 대해서도 변이 정도를 분석하였다.

직선성은 CMV 표준 플라스미드 DNA를 1×10^2 copies/mL 부터 1×10^{11} 범위에서 10배수로 연속 희석한 농도 및 5×10^{11} copies/mL 농도에 대해(총11개 농도) 각 농도마다 8회씩 반복 측정하여 직선성을 평가하였다.

4) CMV 감염의 임상 분류

CMV 감염은 2002년 Ljungman 등[8]의 정의에 따라 임상증상이나 장기 기능의 손상이 없이 어느 검체에서든지 바이러스나 항원, 핵산이 검출되는 경우로 하였다. CMV 말단 장기 질환은 임상증상 없이 직접적인 조직 생검이나 내시경 등의 검사를 통해 조직학적으로 침습적인 CMV 질환이 증명된 경우, CMV 바이러스 증후군은 2일 이상 지속되는 38°C 이상의 발열, 호중구감소증

($<4 \times 10^9/L$) 혹은 혈소판감소증($<150 \times 10^9/L$)을 동반한 CMV 감염 상태로 정의하였다.

5) 통계처리

SPSS (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 두 검사의 정량적 상관성은상관분석을 시행하였고, pp65 항원검사 결과에 따라 세 군의 RQ-PCR 결과 비교 시 분산분석과 사후검정으로 Scheffe's test를 하였다. RQ-PCR의 분석 성능 평가에서 최소 검출 농도는 Probit 분석을 통하여 95% 신뢰수준에서 예측하였고 직선성은 선형회귀분석으로 평가하였다. $P < 0.05$ 이면 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. RQ-PCR의 분석 성능 평가

1) 민감도

100 copies/mL 이상의 농도에서는 모두 100%의 양성률을 보였으며, 75 copies/mL 농도에서 150회의 반복검사 중 145회에서 양성률이 검출되어 97%, 50 copies/mL의 경우는 87% (130/150)의 양성률로 검출되었다(Table 2). 반복 측정한 자료를 이용한 Probit 분석에서 95% 신뢰수준으로 결정되는 검출 한계의 정량 값은 63 copies/mL (95% 신뢰구간 58-75 copies/mL)이었다.

2) 특이도

CMV pp65 항원 음성이면서 CMV 정성 PCR 음성인 20검체와 ACCURUN 325 HBV DNA 양성 대조 검체, 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)에서 CMV DNA가 증폭되지 않아 진단 특이도는 100%이었다(Table 3).

3) 정밀도(CV)

1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 copies/mL 농도에

Table 2. Analytical sensitivity of Real-Q CMV Quantification kit

Input CMV (copies/mL)	Result		
	Replicates	Positive reaction	%
10,000	150	150	100
5,000	150	150	100
1,000	150	150	100
500	150	150	100
100	150	150	100
75	150	145	97
50	150	130	87

Abbreviation: CMV, cytomegalovirus.

Table 3. Analytical specificity of Real-Q CMV Quantification kit

	CMV (VIC)*	Internal control (FAM)*
Hepatitis B virus	-	+
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.

Abbreviations: See Table 1.

Table 4. Comparison between pp65 antigenemia and CMV DNA obtained with RQ-PCR among 343 samples

	pp65 antigenemia*		Total
	Positive	Negative	
CMV DNA*			
Positive	10 (2.9%)	46 (13.4%)	56 (16.3%)
Negative	6 (1.7%)	281 (81.9%)	287 (83.7%)
Total	16 (4.7%)	327 (95.3%)	343 (100%)

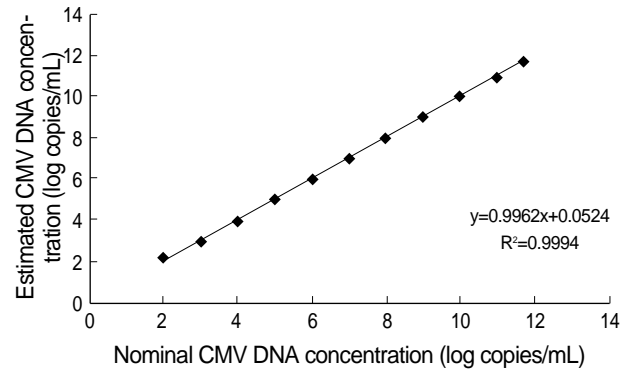
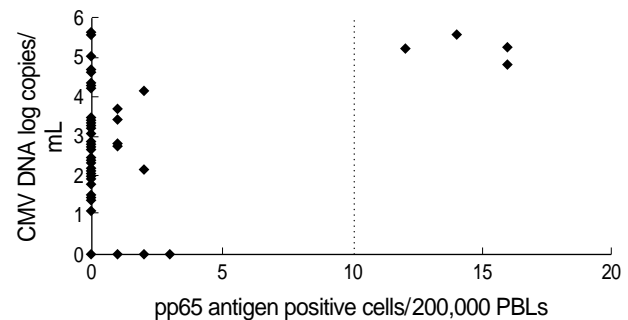
*Concordance rate 84.8%, Kappa coefficient 0.221 ($P < 10^{-6}$).

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; RQ-PCR, real-time quantitative PCR.

대해 DNA 정량 값의 검사차레 내 CV는 각각 8.6%, 8.9%, 7.1%, 13.0%, 13.9%, 검사차레 간 CV는 10.0%, 6.1%, 9.4%, 9.6%, 14.3%, 검사일 간 CV는 각각 9.9%, 4.8%, 9.4%, 6.6%, 13.2%이었다. 총 CV는 각각 12.8%, 10.4%, 11.6%, 16.5%, 19.5%이었다. Ct 값의 검사차레 내 CV는 각각 0.7%, 0.6%, 0.4%, 0.7%, 0.7%, 검사차레 간 CV는 2.6%, 1.9%, 2.0%, 2.1%, 1.6%, 검사일 간 CV는 1.3%, 1.2%, 1.3%, 1.1%, 0.7%이었다. 총 CV는 각각 2.5%, 2.0%, 2.0%, 2.1%, 1.7%이었다.

4) 직선성

1×10^2 copies/mL부터 5×10^{11} copies/mL의 농도 범위에서 구한 선형회귀 모델($y = a + bx$)에서 $b = 0.9962$ ($P < 10^{-13}$), $R^2 = 0.9994$ 로 이 농도 범위에서 직선성이 우수하였다(Fig. 1).

**Fig. 1.** Linearity range of Real-Q CMV Quantification kit.**Fig. 2.** Quantitative comparison of pp65 antigen values and CMV DNA levels obtained by RQ-PCR ($r = 0.45$, $P < 10^{-17}$).**Table 5.** CMV DNA levels according to the pp65 antigen levels

Patient group (pp65 antigen positive cells/ 200,000 PBLs, N)	CMV DNA levels* (Log ₁₀ copies/mL)
0 (N=327)	0.38 ± 1.03
1-10 (N=12)	$1.59^{\dagger} \pm 1.73$
11-20 (N=4)	$5.23^{\ddagger} \pm 0.31$

*Mean \pm SD. † Scheffe's test, $P < 10^{-3}$, and $P < 10^{-7}$, respectively, compared with the group above.

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; PBLs, peripheral blood leukocytes.

2. pp65 항원검사와 비교를 통한 RQ-PCR의 임상적 적용 평가

1) 전체 환자 검체에서의 비교

두 검사의 양성, 음성 판정의 비교에서 343검체 중 pp65 항원 검사와 RQ-PCR의 양성률은 각각 4.7%, 16.3%이었고, 최고치는 각각 16개/200,000 PBLs, 5.63 log₁₀ copies/mL (424,281 copies/mL)이었다. 두 검사의 일치율은 84.8%이었다(Table 4).

두 검사의 정량 결과 비교에서, 두 검사 수치의 상관성이 유의하였다($r = 0.45$, $P < 10^{-17}$, Fig. 2). pp65 항원검사를 기준으로 세 군(0개, 1-10개, 11-20개/200,000 PBLs)으로 나누었을 때, CMV DNA 수준은 각각 0.38, 1.59, 5.23 log₁₀ copies/mL로 세 군별 증가가 유의하였다(Scheffe 검정, $P < 0.05$, Table 5). 따라서,

Table 6. pp65 antigenemia and CMV DNA levels according to the clinical status of CMV infection

	pp65 antigen (positive cells/ 200,000 PBLs)	CMV DNA levels (Log ₁₀ copies/mL)
Asymptomatic CMV infection (N=17)	1.5±3.9*	2.72±1.54*
CMV end-organ disease (N=3)	0, 0, 0	0, 0, 5.06
CMV viral syndrome (N=1)	16	5.20

*Mean±SD.

Abbreviations: See Table 5.

RQ-PCR 검사는 혈중 CMV 수준을 비교적 잘 반영하는 것으로 볼 수 있었다.

2) 환자 임상 분류에 따른 비교(Table 6)

두 검사 중 하나라도 양성으로 정의한 무증상의 감염 환자 17명에서, pp65 항원은 $1.5 \pm 3.9/200,000$ PBLs로 비교적 낮았지만, CMV DNA는 $2.72 \pm 1.54 \log_{10}$ copies/mL로 비교적 다양한 범위를 보였다. 이들 중 선행적 치료를 한 군과 하지 않은 군의 CMV DNA 수준은 각각 2.77 ± 1.73 , $2.67 \pm 1.49 \log_{10}$ copies/mL로 차이가 없었다(Mann-Whitney test: $P=0.74$).

CMV 말단 장기 질환 환자 3명에서, 모두 pp65 항원검사 음성이고, 한 명만 RQ-PCR 양성($5.06 \log_{10}$ copies/mL)이었다. CMV 바이러스 증후군 환자 1명은 pp65 항원 양성세포가 16개/200,000 PBLs, CMV DNA가 $5.20 \log_{10}$ copies/mL이었다.

고 찰

CMV는 가장 흔한 기회감염 병원체로 건강인에서는 아무 증상이 없는 잠복감염의 형태를 보이지만 면역억제 상태의 숙주에서는 원발 감염이나 이차감염 모두 심각한 질병을 야기시킨다[9, 10]. 이차감염은 CMV 양성혈청반응을 보이는 환자에서 잠재된 바이러스의 재활성화나 바이러스의 재감염에 의해 발생하며, 장기이식이나 HIV 감염, 항암치료 등의 면역억제 상태가 바이러스가 재활성화될 수 있는 조건이 된다[11]. 골수이식 환자에서 CMV 폐렴은 이식 후에 생명을 위협하는 가장 흔한 감염이며[12], 후천성면역결핍증(AIDS) 환자에서 CMV는 가장 흔한 바이러스 병원체로서 적극적인 항바이러스 치료에도 불구하고 이들에서의 CMV 망막염은 생명을 위협하는 가장 흔한 감염으로 알려져 있다[13, 14]. CMV 감염과 심각한 질환으로의 진행을 막기 위해 선행적인 항바이러스 치료가 널리 이용되고 있으며 선행적 치료가 효과를 거두기 위해서는 CMV 감염을 조기에 진단할 수 있는 정확한 검사가 뒷받침되어야 한다.

정량적 PCR은 바이러스 감염을 진단하고 추적하는 유용한 검사 방법으로 임상적으로 널리 이용되고 있으며, CMV 감염에서

도 정량적 PCR 검사를 이용해서 바이러스 양과 CMV 질환의 상관성을 규명하고 항바이러스 치료 효과를 평가 및 추적하려는 시도가 있어 왔다[15, 16]. 정량적 PCR은 PCR 반응이 완료된 시점에서 측정하는 end-point PCR과 반응의 각 주기마다 실시간 분석이 가능한 RQ-PCR 기법이 있다. End-point PCR은 증폭된 DNA 검출을 위해서 PCR 후단계를 반드시 필요하여 오염의 기회가 증가하고 시간과 노동력이 많이 드는 한계점이 있으며 정량 범위도 비교적 좁다. 또 최종 증폭산물을 측정함으로써 얻을 수 있는 정량결과를 기대하기 힘든 반면 RQ-PCR은 PCR 반응의 초기, 즉 증폭 산물이 정확하게 2배로 증가하는 대수증식기(exponential phase)에서 분석이 이루어지므로 정확한 결과를 얻을 수 있고 정량 범위도 넓다. 또 실시간 분석으로 결과를 빨리 얻을 수 있으며 검사를 수행하기가 용이한 장점이 있다[10, 17, 18].

이 연구에서 RQ-PCR의 분석 성능 평가에서, 95% 신뢰수준으로 결정되는 검출한계는 63 copies/mL이었고, 검사차례 내, 검사차례 간 및 검사일 간 정밀도도 우수하였다. 1×10^2 copies/mL부터 5×10^{11} copies/mL의 농도 범위에서의 직선성 평가에서도 우수한 결과를 보였다.

두 검사의 양성, 음성 판정의 비교에서, RQ-PCR은 16.3%, pp65 항원검사는 4.7%의 양성률을 보였고, 두 검사의 일치율은 84.8%이었다. 정량 결과 비교에서, 두 검사 수치의 상관성이 유의하였다($r=0.45$). pp65 항원검사를 기준으로 세 군으로 나누었을 때 양성세포수가 증가함에 따라 CMV DNA 양도 유의하게 증가하여 RQ-PCR도 혈중 CMV 수준을 비교적 잘 반영하는 것으로 생각되어 pp65 항원검사를 대체할 수 있는 새로운 검사로 생각되었다.

무증상의 CMV 감염 환자 17명에서, 선행적 치료를 한 군과 하지 않은 군의 CMV DNA 수준은 차이가 없어서 RQ-PCR의 위양성 가능성이 의심되었으나, 본 연구 대상군의 CMV 치료 시작 방침이 pp65 항원검사 양성이었기 때문에 정확한 해석은 할 수 없었다. 무증상의 CMV 감염 환자에서 실제로 CMV 질환이 발병할 것인지를 예측하고 선행적 치료시점을 결정하기 위해 CMV DNA 양으로 적정 경계 값(optimal cutoff)을 정하기 위한 연구들이 보고되고 있는데[19, 20] 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

이 연구에서 pp65 항원검사만 양성 1.7%, RQ-PCR에서만 양성인 경우가 13.4%로 불일치를 보였는데 원인으로는 먼저 방법상의 민감도의 차이로 CMV DNA가 pp65 항원보다 더 빠른 시기에 검출되는 점, 두 검사가 대상으로 하는 검출부위가 서로 다른 점, 검사수행 과정에서의 기술적 오류에 의한 위양성 등을 생각할 수 있다[21]. CMV는 인간을 감염시키는 가장 큰 바이러스로 CMV 유전체는 230-235 kbp의 선형의 두 가닥 DNA로 구성되어 있고, 230개의 겹치지 않는 open reading frame을 포함한다[11, 22]. CMV 유전체에는 세 군데의 잘 보존된 영역(highly conserved region)이 알려져 있는데, IE1 혹은 major immediate-early (MIE) 유전자 영역, DNA 중합효소 유전자 영역, gB 유전자

영역이다. MIE 유전자는 MIE 단백질 ppUL123을, DNA 중합효소 유전자는 DNA 증식에 관여하는 UL54를 합성하며 주요 외피 단백질 gB (gpUL55)는 세포간 전파에 관여한다[23]. 이 연구에서는 gB 유전자 영역을 증폭하는 시발체와 소식자로 RQ-PCR을 시행하였으며 면역염색법이 대상으로 하는 pp65 항원은 CMV 증식 주기, 즉 immediate-early phase (IE), early phase (E), late phase (L)의 세 단계 중 L phase에서 합성되는 단백질이다[21]. 이 연구에서 1주 간격으로 시행한 5회의 검사 중 4회에서 pp65 항원만 양성, CMV DNA는 음성(나머지 1회는 둘 다 음성)의 결과를 보인 환자가 1명 있었는데, 급성 림프구성 백혈병으로 말초혈액 조혈모세포 이식을 받은 환자였다. CMV DNA가 음성이면서 pp65 항원만 양성인 경우는 염색과정에서의 위양성 가능성과 항바이러스 치료에 의해 바이러스의 DNA가 차단되었을 가능성 등을 생각해 볼 수 있다. 그러나 이 환자의 경우는 반복 검사에서도 같은 결과를 보여 검사수행 과정상의 문제는 아닌 것으로 생각되었고, ganciclovir는 바이러스의 DNA 중합효소를 길항하는 약제이므로 후자의 가능성도 배제할 수 있다. 또 MIE 유전자 영역을 증폭하는 시발체로 시행한 PCR에서도 CMV DNA가 검출되지 않아서 각 검사의 검출 부위가 다르기 때문일 가능성이 가장 높은 것으로 생각되었다.

결론적으로 RQ-PCR에 의한 CMV DNA 정량은 pp65 항원 검사보다 검사를 수행하기가 쉽고 분석 성능도 우수하며 혈중 바이러스 수준을 잘 반영하여 pp65 항원검사를 대체할 수 있는 새로운 검사법이 될 수 있을 것으로 생각된다. 또 무증상의 CMV 감염 환자에서 실제로 CMV 질환이 발병할 것인지를 예측하고 선행적 치료시점을 결정하기 위해 RQ-PCR로 얻은 CMV DNA 결과로 선행적 치료시점을 결정하는 연구가 앞으로 있어야 할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 이식 수혜자에서 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 감염에 대한 신속하고 정확한 검사가 필수적이다. 저자들은 최근 개발된 실시간 정량 PCR (RQ-PCR) 방법에 의한 CMV 검사를 평가해 보고자 하였다.

방법 : Real-Q Cytomegalovirus Quantification kit (Biose-woom Inc., Korea)를 사용한 CMV RQ-PCR의 분석 성능을 평가하였고, 임상적 적용을 평가하기 위하여 이식 수혜자 63명을 포함한 총 84명의 343검체를 대상으로 면역염색법인 pp65 항원 검사와 비교하였다.

결과 : RQ-PCR의 검출 한계는 63 copies/mL 이었고, hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) 양성 검체와 교차반응은 없었다. 정밀도는 총변이계수 10.4-19.5%이었으며, CMV DNA $1 \times 10^2 - 5 \times 10^{11}$ copies/mL의 범위에서 직선성이 유지되었다($P < 10^{-13}$, $R^2 =$

0.9994). 환자 검체에서, 정성 판정의 양성률은 pp65 항원검사 4.7%, RQ-PCR 16.3%이었고, 두 검사의 일치율은 84.8% ($\kappa = 0.221$, $P < 10^{-6}$)이었다. 정량 결과 비교에서, 두 검사 수치 간 상관성이 유의하였고($r = 0.45$, $P < 10^{-17}$), pp65 항원 수준에 따라 분류한 세 군에서도 RQ-PCR 수치의 증가가 유의하였다(각각 $P < 10^{-3}$, $P < 10^{-7}$).

결론 : RQ-PCR은 면역염색법보다 검사 과정이 간편하고 분석 성능도 우수하며 혈중 바이러스 수준을 잘 반영하여 pp65 항원검사를 대체할 수 있는 새로운 검사법이 될 수 있을 것으로 생각된다. CMV 선행적 치료 시작을 위한 RQ-PCR 결과 값에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Paya CV. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of solid-organ transplants. Clin Infect Dis 2001;32:596-603.
2. Boeckh M and Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998;11:533-54.
3. Camargo LF, Uip DE, Simpson AA, Caballero O, Stolf NA, Vilas-Boas LS, et al. Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation. Transplantation 2001;71:412-7.
4. Guiver M, Fox AJ, Mutton K, Mogulkoc N, Egan J. Evaluation of CMV viral load using TaqMan CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. Transplantation 2001;71:1609-15.
5. Monte PD, Lazzarotto T, Ripalti A, Landini MP. Human cytomegalovirus infection: a complex diagnostic problem in which molecular biology has induced a rapid evolution. Intervirology 1996;39:193-203.
6. Delgado R, Lumberras C, Alba C, Pedraza MA, Otero JR, Gomez R, et al. Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. J Clin Microbiol 1992;30:1876-8.
7. Schaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR. J Clin Microbiol 2000;38:4006-9.
8. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. Clin Infect Dis 2002;34:1094-7.
9. Patel R, Snyderman DR, Rubin RH, Ho M, Pescovitz M, Martin M, et al. Cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplant recipients. Transplantation 1996;61:1279-89.

10. Kearns AM, Guiver M, James V, King J. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus. *J Virol Methods* 2001;95:121-31.
11. Mandell GL, Bennett JE, et al. eds. Principles and practices of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005;1786-7.
12. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 1986;153:478-88.
13. Masur H, Whitcup SM, Cartwright C, Polis M, Nussenblatt R. Advances in the management of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *Ann Intern Med* 1996;125:126-36.
14. Nokta MA, Holland F, De Gruttola V, Emery VC, Jacobson MA, Griffiths P, et al. Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction profiles in individuals with advanced human immunodeficiency virus infection: relationship to CMV disease. *J Infect Dis* 2002;185:1717-22.
15. 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.
16. Sia IG, Wilson JA, Espy MJ, Paya CV, Smith TF. Evaluation of the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38:600-6.
17. Alice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Marchiaro G, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol* 2006;78:915-22.
18. Piiparinen H and Lautenschlager I. Quantitative TaqMan assay for the detection and monitoring of cytomegalovirus infection in organ transplant patients. *Methods Mol Biol* 2006;335:147-56.
19. Martin-Davila P, Fortun J, Gutierrez C, Marti-Belda P, Candelas A, Honrubia A, et al. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. *J Clin Virol* 2005;33:138-44.
20. Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, San Juan R, Maldonado S, Prieto C, et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc* 2005;37:4094-6.
21. Fan J, Ma WH, Yang MF, Xue H, Gao HN, Li LJ. Real-time fluorescent quantitative PCR assay for measuring cytomegalovirus DNA load in patients after haematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J* 2006;119:871-4.
22. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996;70:78-83.
23. Zwegyberg Wirgart B, Brytting M, Linde A, Wahren B, Grillner L. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. *J Clin Microbiol* 1998;36:3662-9.