

HBsAg 돌연변이 위험군을 대상으로 한 국내 주요 면역검사법의 변이 검출능 평가 및 임상적 의의

Performance Evaluation of Immunoassay Detection of HBsAg Mutants and Their Clinical Significance in the High Risk Groups

최정인¹ · 임지훈¹ · 정윤성¹ · 이선호¹ · 박재선¹ · 박능화² · 신정우² · 나양원³ · 남창우³ · 차영주⁴ · 김성률¹

Jung-In Choi, M.D.¹, Ji-Hun Lim, M.D.¹, Joseph Jeong, M.D.¹, Seon-Ho Lee, M.D.¹, Jae-Sun Park, M.D.¹, Neung Hwa Park, M.D.², Jung Woo Shin, M.D.², Yang Won Nah, M.D.³, Chang Woo Nam, M.D.³, Young Joo Cha, M.D.⁴, Sung-Ryul Kim, M.D.¹

울산대학교병원 진단검사의학과¹ · 내과² · 외과³, 중앙대학교 의과대학 진단검사의학과 교실⁴

Departments of Laboratory Medicine¹, Internal Medicine², and General Surgery³, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine, Ulsan; Department of Laboratory Medicine⁴, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: False negative results have been reported in the immunodetection of hepatitis B virus (HBV) because of the existence of the various mutants of the virus, causing most suppliers to try to develop superior reagents by using highly sensitive and specific monoclonal or polyclonal antibodies. In this study, we evaluated the effectiveness of 3 newly developed reagents by major manufacturers by adopting automated methods with increased sensitivity and specificity in the detection and discrimination of native and recombinant mutant antigens.

Methods: We analyzed samples confirmed positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg), high-risk samples from chronic hepatitis patients treated with antiviral agents, and samples from patients who had undergone liver transplantation and were treated with high-dose hepatitis B immunoglobulin (HBIG) by using reagents and systems newly developed by Abbott Laboratories (USA), Roche Diagnostics (Germany), and Siemens Healthcare Diagnostics (USA). Recombinant sample panels from these manufacturers with low and high concentrations were also analyzed for comparing the 3 reagents.

Results: There were no discrepant results among the various selected patient groups; however, for the recombinant mutant panels, all of the 3 reagents showed highly positive detection rates for their corresponding mutant panels, but showed relatively discrepant mutant detection rates when cross-tested with the other mutant panels. Detection rates of the HBsAg mutant panels were higher at a higher concentration of the mutant samples, but were lower for the same mutant receptor sites at a lower concentration.

Conclusions: The 3 major detection methods seem to recognize the major native mutants commonly encountered in clinical practice. However, in the case of recombinant mutants, we believe that our data are not to be interpreted as a reference standard for any reagent, because the results can only be validated for the reagents' corresponding mutant panels; such results tend to be mutually exclusive, and the enough concentration of mutants was required to be adjusted for a comparative analysis.

Key Words: HBV, HBsAg, Hepatitis B virus, Hepatitis B Surface Antigen, Mutants, Recombinant mutants, Immunoassay, Chemiluminescence immunoassay, Microparticle enzyme immunoassay, Electrochemiluminescence immunoassay

Corresponding author: Sung-Ryul Kim M.D.

Department of Laboratory Medicine, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine, 877 Bangeojinsunhwan-doro, Dong-gu, Ulsan 682-714, Korea

Tel: +82-52-250-7271, FAX: +82-52-250-8269, E-mail: srkimuuh@hitel.net

Received: May 8, 2012

Revision received: June 12, 2012

Accepted: July 4, 2012

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

© 2013, 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/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

B형 간염 백신 및 치료 방법의 많은 발전에도 불구하고 아직까지 전 세계적으로 약 18억명의 인구가 B형간염바이러스(hepatitis B virus, HBV)에 감염되어 있으며, 이 중 300만명 이상이 간경변증이나 간암 등의 만성간질환으로 전환되고 있다[1]. 국내에서도 HBV는 국민보건에 큰 위협이 되는 질병 중 하나로 2009년 10세 이상을 대상으로 조사한 B형간염표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg) 양성률은 3.2%로 알려져 있다[2].

HBsAg은 HBV 감염 후 첫 번째로 나타나는 표지자로서, 감염 후 4-10주 후면 혈청에서 측정되며 임상 증상이 발현하기 2-8주 전에

측정 가능하므로 B형간염의 임상진단을 빨리 내리는데 도움을 줄 수 있다[3]. 또한 헌혈 전이나 장기 기증 전에 HBV의 존재를 파악하는 선별검사로써도 이용되고 있다[4, 5]. 이렇듯 HBsAg검사는 HBV 존재 여부를 확인하는 유용한 검사로서 널리 사용되어 왔으나 종종 위음성결과들이 보고되어 왔으며[6-8], 최근에는 검출 민감도와 특이도가 향상된 검사법들이 개발되어 소개되고 있다.

위음성을 보이는 원인으로는 HBsAg 농도가 검사법의 검출한계보다 낮은 경우[6], HBsAg유전자에 변이가 발생하여 기존의 항체와 반응하지 않는 경우[7, 8] 등이 있다. 그리고 유전자변이가 발생하는 경우에는 만성간염보균 상태가 장기간 지속되는 경우[9], HBV백신사업이 장기간 지속되는 경우[10], 항바이러스제 투여가 장기화되는 경우[11], 고농도의 B형간염면역글로불린(Hepatitis B immunoglobulin, HBIG)을 장기간 투여하는 경우[12] 등이 있다. 이들 유전자변형은 HBsAg의 major hydrophilic region (MHR)에 주로 발생하며 특히 'a' 결정기('a' determinant)에 변이를 동반하여 위음성을 초래하는 경우가 많다. 따라서 HBsAg검사 시 유전자돌연변이에 의한 'a' 결정기 변이를 검출하여야 할 필요성이 증가되고 있다.

HBsAg검사방법으로는 효소결합면역검사법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 효소면역측정법(enzyme immunoassay, EIA), 미세입자효소면역검사법(microparticle enzyme immunoassay, MEIA), 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA) 등이 주로 사용되어 왔다. 최근에는 민감도와 특이도가 높고 HBV유전자변이도 측정 가능한 화학발광미세입자면역검사법(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA), 전기화학발광면역검사법(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA), 화학발광면역측정법(chemiluminescence immunoassay, CLIA)과 같은 자동화된 고감도검사법이 개발되어 사용되고 있다[13]. 그러나 HBsAg와 반응하는 포획항체의 종류와 HBV유전자 항원결정부위(epitope)의 종류가 제조사마다 다르므로 검사에 사용되는 시약에 따라 검사 결과의 차이를 보일 수 있다.

HBV는 S유전자의 다양한 변이 양상에 따라 아형이 분류되며 그 중 아시아 지역에서는 B형과 C형이 널리 분포되고 있다. 국내에서는 일본이나 대만과는 달리 거의 C2형이며[14], 이는 젊은 나이에 합병증이 자주 발생하며 특히 간경변이 빨리 진행되어 간암이 흔히 발생한다[15]. 이렇듯 우리나라는 HBV유전자형이 외국과 다르고, 이에 따른 분자진단학 차이로 이전에 발표된 주요 외국의 연구 결과[16]를 국내 환자에 동일하게 적용하기가 어렵다.

이에 저자들은 HBV의 돌연변이가 발생할 위험이 높은 환자군과 임의로 조작한 다양한 유전자재조합검체들을 대상으로 국내에서 널리 이용되고 있는 주요 3개 공급사의 최신 개발 시약들의 HBsAg 검출능을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

연구에 사용된 검체는 혈청검체은행 검체, 일반 환자군 검체, 각 제조사에서 제공한 돌연변이조작 검체로 분류하였다. 혈청검체은행 검체는 인체유래 고위험군바이러스 혈청검체은행(<http://knrrb.knrrc.or.kr>)으로부터 분양받은 검체 100개(HSB20111214)를 사용하였다. 일반 환자군 검체로는 울산대학교병원 소화기내과에서 약제치료를 받고 있는 만성간염 환자에서 얻은 검체(이하, 약제치료군) 50개 및 간이식 후 고농도의 HBIG를 투여 중인 환자에서 얻은 검체(이하, 간이식군) 41개를 사용하였다. 돌연변이조작 검체패널(recombinant sample panel, 이하 재조합군)은 각 제조사에서 제공한 것으로 Abbott사(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)는 상대적으로 낮은 농도(lower)와 상대적으로 높은 농도(higher)의 양성대조군 검체 2종과 낮은 농도와 높은 농도로 조작한 돌연변이 검체 18종을 포함한 40검체, Roche사(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)는 13검체 그리고 Siemens사(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA)는 28검체로 총 81검체가 제공되었다. Abbott사 패널은 표면항원의 아미노산 1번에서 226번까지 인코딩하는 야생형 S유전자에서 특정 부위의 아미노산만 변형을 가한 것이었고, Roche사와 Siemens사 패널은 정보를 확인할 수 없었다.

2. 장비와 시약

검사에 사용된 장비는 Architecti 2000sr analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA; 이하 Architect), Modular analytics E170 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; 이하 E170) 그리고 ADVIA Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA; 이하 Centaur XP)를 사용하였다.

검사시약은 Abbott의 경우 정성검사 시약으로 Architect HBsAg Qualitative II (Abbott Laboratories, Delkenheim, Germany, 이하 Architect HBsAg Qual II)와 정량검사 시약으로 Architect HBsAg (Abbott Laboratories, Delkenheim, Germany, 이하 Architect HBsAg Quant)를 사용하였다. Roche의 경우 정성검사 시약으로 Elecsys HBsAg II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)와 정량검사 시약으로 Elecsys HBsAg Quant (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였다. Siemens의 경우 정성검사 시약으로 ADVIA Centaur HBsAg (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA)를 사용하였고, 정량검사 시약은 발매되지 않았다.

HBsAg 정성검사의 경우 Architect는 지수값(signal/cutoff value, S/CO)으로 결과를 판정하며 이 값이 1.0 S/CO 이상인 경우 양성(reactive), 1.0 S/CO 미만이면 음성(non-reactive)으로 판정한다.

E170은 지수값(cutoff index value, COI)이 1.0 COI 이상이면 양성, 0.9 이상 1.0 COI 미만이면 경계성(borderline), 0.9 COI 미만이면 음성으로 판정한다. Centaur XP는 지수값(index value)이 1.0 index 이상이면 양성, 1.0 index 미만이면 음성으로 판정한다.

HBsAg 정량검사의 경우 Architect은 측정범위가 0.00-250 IU/mL이고 250 IU/mL 이상이면 검체를 희석하여 측정한 후 희석 배수로서 보정한다. 이때 0.05 IU/mL 이상이면 양성으로 판정한다. E170은 측정범위가 0.01-130 IU/mL이고 농도를 측정하기 전에 장비에서 모든 검체를 400배 자동 희석하여 측정한 후 희석배수로서 보정한다. 이때 0.05 IU/mL 이상이면 양성으로 판정한다.

3. 검사방법

연구대상 검체를 이용하여 같은 날 같은 시각 Abbott, Roche 및 Siemens 각각의 전용검사 장비 및 시약을 이용하여 제조사의 지침에 따라 검사를 실시하였다. 모든 장비는 각 회사의 장비관리부에서 사전 점검하였다.

4. 통계분석

HBsAg 정성 및 정량 검사 결과에 대하여 양성률과 음성률 상호 비교에 카이스퀘어 테스트를 실시하였으며, HBsAg 정량검사의 농도 결과값 비교에는 상관계수(correlation coefficient, r)를 사용하였고, 값이 <0.05 IU/mL인 경우 0.05 IU/mL로 >250 IU/mL인 경우는 250 IU/mL로 처리하였다. 통계프로그램은 MedCalc (Version 12.2.1, Mariakerke, Belgium)를 사용하였으며, P 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 혈청검체은행 검체

정성검사의 경우 총 100검체에서 Architect, E170, Centaur XP 세 장비에서 100검체 모두 양성을 보여 세 시약 간의 양성률은 차이가 없었다(Table 1). 정량검사의 경우 역시 총 100검체에서 Architect과 E170 두 장비에서 100검체 모두 양성을 보여 두 시약 간의

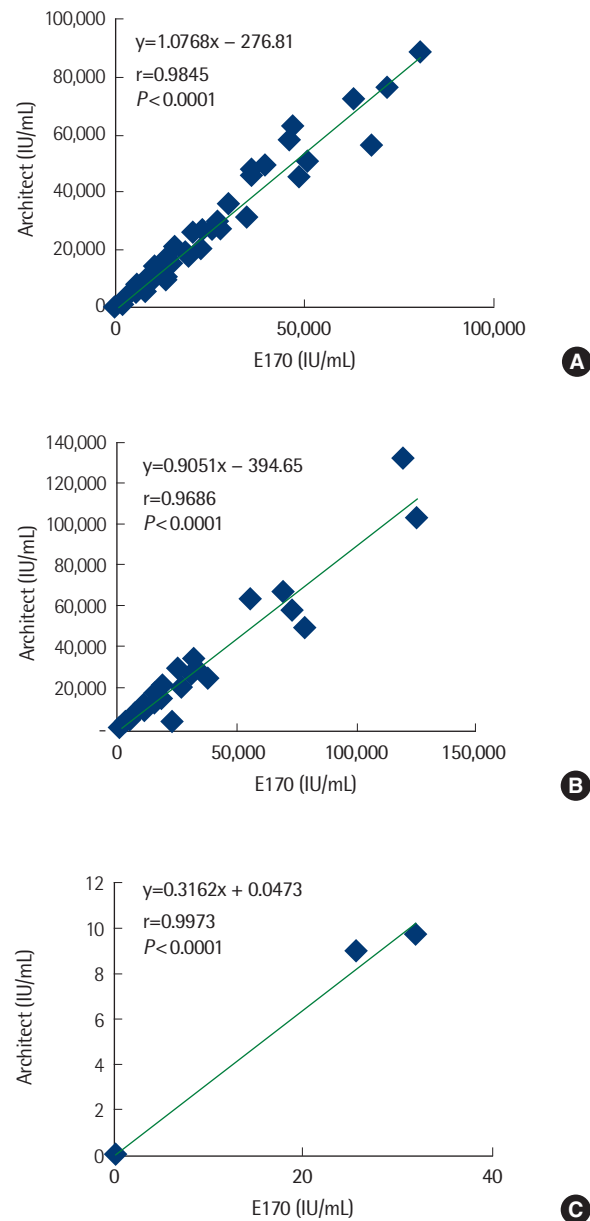


Fig. 1. Correlation of quantitative results between E170 and Architect in Human Serum Bank samples (A), chronic hepatitis B patients with antiviral agents (B) and liver transplanted patient (C).

Table 1. Comparison of the HBsAg detection rates obtained using 6 different panels

N	Positive detection rates (%)				
	Qualitative			Quantitative	
	Architect (%)	E170 (%)	Centaur XP (%)	Architect (%)	E170 (%)
Serum bank panel	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
HBV with antiviral agents panel	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)
Liver transplantation panel	41 (2 (4.8))	2* (5.0)	2 [†] (5.1)	2 (4.8)	2 (4.8)
Recombinant mutants panel	81 (72 [†] (91.1))	46 [†] (58.2)	70 (86.4)	54 [†] (68.4)	36 [§] (48.6)
Total	272 (204 (75.5))	186 [¶] (69.1)	220 (81.4)	192 (71.1)	185 ^{**} (69.8)

Some samples were not tested owing to insufficient sample volume: *40 samples tested; [†]39 tested; [‡]79 tested; [§]74 tested; ^{||}270 tested; [¶]269 tested; ^{**}265 tested.

양성률의 차이가 없었고 정량검사 농도값의 상관계수는 0.9845이었다($P<0.0001$) (Fig. 1).

2. 억제치료군

정성검사의 경우 치료를 받고 있는 만성간염 환자 총 50검체에서 Architect, E170, Centaur XP 세 장비에서 50검체 모두 양성을 보여 세 시약간의 양성률은 차이가 없었다(Table 1). 정량검사의 경우 총 50검체에서 Architect과 E170 두 장비에서 50검체 모두 양성을 보여 두 시약 간의 양성률의 차이가 없었고 정량검사 농도값의 상관계수는 0.9686이었다($P<0.0001$) (Fig. 1).

3. 간이식군

총 41검체 중 2검체는 검체량 부족으로 39검체에서만 동시 검사 결과를 얻었다(Table 1). 정성검사의 경우 Architect, E170, Centaur XP 세 장비에서 모두 2검체에서 양성, 37검체에서 음성(2/39, 양성률 5.1%)을 보여 세 시약간의 양성률은 차이가 없었다. 정량검사의 경우 Architect과 E170 두 장비에서 모두 2검체에서 양성, 37검체에서 음성(2/39, 양성률 5.1%)을 보여 두 시약 간의 양성률은 차이가 없었고(Table 1) 정량검사 농도값의 상관계수는 0.9973이었다($P<0.0001$) (Fig. 1).

Table 2. Comparison of the HBsAg detection rates obtained using 3 recombinant panels

	N	Positive detection rates (%)				
		Qualitative			Quantitative	
		Architect (%)	E170 (%)	Centaur XP (%)	Architect (%)	E170 (%)
Abbott (low concentration)	20	19 (95)	9 (45)	14 (70)	9 (45)	6 (30)
Abbott (high concentration)	20	20 (100)	14 (70)	16 (80)	18 (90)	14 (70)
Roche	13	13 (100)	13 (100)	12 (92.3)	13 (100)	13 (100)
Siemens	28	20* (76.9)	10* (38.4)	28 (100)	14* (53.8)	3 [†] (14.3)
Total	81	72 [‡] (91.1)	46 [‡] (58.2)	70 (86.4)	54 [‡] (68.4)	36 [§] (48.6)

Some samples were not tested owing to insufficient sample volume: *26 samples tested; [†]21 tested; [‡]79 tested; [§]74 tested.

Table 3. Results of immunodetection by using Architect, E170, and Centaur XP for the recombinant mutant panels supplied by Abbott

Recombinant mutation	Lower concentration					Higher concentration				
	Qualitative			Quantitative		Qualitative			Quantitative	
	Architect (S/CO)	E170 (COI)	Centaur XP (Index)	Architect (IU/mL)	E170 (IU/mL)	Architect (S/CO)	E170 (COI)	Centaur XP (Index)	Architect (IU/mL)	E170 (IU/mL)
A1 (Positive control)	1.50	1.15	1.33	0.05	< 0.05	4.56	1.73	3.92	0.13	0.082
A2 (C137W)	1.83	2.18	0.27	0.10	0.106	5.41	6.03	0.30	0.17	0.377
A3 (C138W)	1.57	1.50	2.26	0.11	0.055	5.00	3.64	7.52	0.30	0.154
A4 (C147S)	1.69	2.04	2.71	0.05	0.088	4.78	6.21	10.00	0.13	0.295
A5 (C124R)	1.27	0.57	17.57	0.03	< 0.05	3.72	0.46	64.63	0.12	< 0.05
A6 (I22DT)	1.05	0.52	9.22	0.02	< 0.05	2.79	0.52	34.12	0.06	< 0.05
A7 (T123N/C124R)	1.02	0.58	12.79	0.04	< 0.05	2.75	0.45	49.03	0.11	< 0.05
A8 (P120S/T125M/P127Y/S143L)	1.68	0.46	1.36	0.12	< 0.05	5.08	0.53	4.42	0.34	< 0.05
A9 (C121Y/K122L/T123N/G130E/M133I/ D144G/G145R)	0.71	0.40	0.20	0.04	<0.05	1.67	0.52	0.25	0.13	< 0.05
A10 (Positive control)	1.76	1.03	1.21	0.05	<0.05	4.99	1.84	3.52	0.12	0.097
A11 (Q129H)	1.81	1.53	1.30	0.04	< 0.05	5.11	1.92	4.29	0.13	0.102
A12 (M133L)	1.75	0.93	1.19	0.04	< 0.05	5.12	1.82	3.78	0.13	0.089
A13 (D144A)	1.71	0.83	0.58	0.03	< 0.05	5.15	1.89	1.43	0.07	0.082
A14 (G145R)	1.69	0.82	0.38	0.08	< 0.05	4.82	1.93	0.91	0.23	0.069
A15 (P142L/G145R)	1.58	0.84	0.38	0.09	0.05	4.47	1.43	0.77	0.25	0.066
A16 (P142S/G145R)	1.56	0.74	0.48	0.08	< 0.05	4.67	1.36	1.18	0.22	0.061
A17 (T123A)	1.55	1.91	4.64	0.00	0.098	4.47	5.20	15.99	0.03	0.321
A18 (I22NT)	1.02	0.55	19.69	0.04	< 0.05	2.73	0.79	76.72	0.08	< 0.05
A19 (I22RA)	1.23	1.13	8.10	0.03	< 0.05	3.45	2.81	29.3	0.10	0.128
A20 (T123N)	1.33	2.29	1.93	0.00	0.093	3.99	4.59	6.65	0.03	0.278

The values in bold indicate negative results.

4. 재조합검체군

1) Abbott에서 제공한 재조합 검체(Table 2, 3)

정성검사의 경우, 상대적으로 낮은 농도(lower) 20검체 중 Architect HBsAg Qual II 시약으로는 19검체에서 양성, 1검체에서 음성(19/20, 양성률 95%), Elecsys HBsAg II 시약으로는 9검체에서 양성, 11검체에서 음성(9/20, 양성률 45%), ADVIA Centaur HBsAg 시약으로는 14검체에서 양성, 6검체에서 음성(14/20, 양성률 70%)을 보여, 양성률은 Architect, Centaur XP, E170의 순으로 높았다. 세 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P=0.0026$). 상대적으로 높은 농도(higher) 20검체의 경우 Architect HBsAg Qual II 시약으로는 20검체 모두에서 양성(20/20, 양성률 100%), Elecsys HBsAg II 시약으로는 14검체에서 양성, 6검체에서 음성(14/20, 양성률 70%), ADVIA Centaur HBsAg 시약으로는 16검체에서 양성, 4검체에서 음성(16/20, 양성률 80%)을 보여, 양성률은 Architect, Centaur XP, E170 순으로 높았다. 세 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P=0.0347$).

낮은 농도와 높은 농도 간의 양성률은 Architect 5%, E170 25%, Centaur XP 10%의 차이로 높은 농도에서 양성률이 높게 나타났다.

정량검사의 경우, 낮은 농도 20검체 중 Architect HBsAg Quant 시약으로는 9검체에서 양성, 11검체에서 음성(9/20, 양성률 45%), Elecsys HBsAg Quant 시약으로는 6검체에서 양성, 14검체에서 음성(6/20, 양성률 30%)을 보였고 두 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.5136$). 높은 농도 20검체의 경우 Architect HBsAg Quant 시약으로는 18검체에서 양성, 2검체에서 음성(18/20, 양성률 90%), Elecsys HBsAg Quant 시약으로는 14검체에서 양성, 6검체에서 음성(14/20, 양성률 70%)을 보였고 두 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.2357$).

낮은 농도와 높은 농도 간의 양성률은 Architect 45% ($P=0.0069$), E170 40% ($P=0.0269$)의 차이로 높은 농도에서 양성률이 높게 나타났다.

낮은 농도 검체를 대상으로 정성검사와 정량검사의 결과를 비교해보면 Architect은 정성(19/20, 양성률 95%)과 정량검사(9/20, 양성률 45%) 간의 양성률은 유의한 차이가 있었고($P=0.0019$), E170은 정성(9/20, 양성률 45%)과 정량검사(6/20, 양성률 30%) 간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.5136$). 높은 농도 검체를 대상으로 정성검사와 정량검사의 결과를 비교해 보면 Architect은 정성과 정량검사 간의 양성률은 유의한 차이가 없었고($P=0.4682$), E170도 정성과 정량검사 간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.7301$).

2) Roche에서 제공한 재조합 검체(Table 2, 4)

정성검사의 경우, 13검체 중 Architect HBsAg Qual II 시약으로

Table 4. Results of immunodetection by using Architect, E170, and Centaur XP for the recombinant mutant panels supplied by Roche

Recombinant mutation	Qualitative			Quantitative	
	Architect (S/CO)	E170 (COI)	Centaur XP (Index)	Architect (IU/mL)	E170 (IU/mL)
R1 (F8L/R24K/N40R/G43R/L94S/M103I/113A114/M133T/P142L/D144G)	13.61	3.45	7.39	0.25	0.183
R2 (I110L/S113T/T114S/T126I/N131T/F134Y/T143S/G145R)	7.01	3.17	17.25	0.36	0.167
R3 (S132Y/P142S/G145R)	12.22	8.01	64.48	0.91	0.475
R4 (Q129P/F134R/P142L/D144E/G145K/S171F/L175S)	4.64	3.95	55.19	0.29	0.222
R5 (R122I)	20.30	11.06	142.86	1.10	0.699
R6 (R122T)	14.46	9.86	64.13	0.58	0.495
R7 (C124R)	59.95	140.6	651.11	0.63	6.860
R8 (E122I)	4.08	2.14	24.89	0.31	0.079
R9 (T123N)	1.56	13.69	0.68	0.82	0.605
R10 (G145K)	69.05	3.79	>1,000	12.46	0.155
R11 (I22RA123)	1.14	1.72	31.07	0.07	0.071
R12 (P142L/G145R)	5.69	1.78	62.36	0.58	0.070
R13 (D144G)	9.56	4.21	19.83	0.21	0.251

The value in bold indicates negative results.

는 13검체에서 양성(13/13, 양성률 100%), Elecsys HBsAg II 시약으로는 13검체에서 양성(13/13, 양성률 100%), ADVIA Centaur HBsAg 시약으로는 12검체에서 양성, 1검체에서 음성(12/13, 양성률 92.3%)을 보였고 세 시약 간 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.3583$).

정량검사의 경우, 13검체 중 Architect HBsAg Quant 시약과 Elecsys HBsAg Quant 시약 모두 13검체에서 양성(13/13, 양성률 100%)을 보여 두 시약 간의 양성률은 차이가 없었고 정량검사 농도 값도 유의한 차이가 없었다($P=0.5533$).

정성검사와 정량검사의 결과를 비교해 보면 Architect과 E170은 정성 및 정량검사 간의 양성률은 모두 100%로 차이가 없었다.

3) Siemens에서 제공한 재조합 검체(Table 2, 5)

정성검사의 경우, Architect HBsAg Qual II 시약으로는 26검체 중 20검체에서 양성, 6검체에서 음성(20/26, 양성률 76.9%), Elecsys HBsAg II 시약으로는 26검체 중 10검체에서 양성, 16검체에서 음성(10/26, 양성률 38.5%), ADVIA Centaur HBsAg 시약으로는 28검체 중 28검체에서 양성(28/28, 양성률 100%)을 보여, 양성률은 Centaur, Architect, E170순으로 높았다. 세 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P<0.0001$).

정량검사의 경우, Architect HBsAg Quant 시약으로는 26검체 중 14검체에서 양성, 12검체에서 음성(14/26, 양성률 53.8%), Elecsys

Table 5. Results of immunodetection by using Architect, E170, and Centaur XP for the recombinant mutant panels supplied by Siemens

Recombinant Mutation	Qualitative			Quantitative	
	Architect (S/CO)	E170 (COI)	Centaur XP (Index)	Architect (IU/mL)	E170 (IU/mL)
S1 (T123N)	0.74	0.74	1.81	0.02	<0.05
S2 (F134H)	1.31	1.17	2.39	0.04	<0.05
S3 (F134N)	1.60	1.26	3.14	0.05	<0.05
S4 (T123N/G145R)	1.58	0.93	1.74	0.08	<0.05
S5 (T123N/G145R)	1.12	0.74	1.33	0.08	<0.05
S6 (I22RA123)	0.34	0.92	2.67	0.02	<0.05
S7 (C124R)	0.34	0.67	3.83	0.01	ND
S8 (M133I/F134H/D144V)	4.92	1.92	3.44	0.10	0.097
S9 (S143L)	1.57	0.97	1.84	0.04	<0.05
S10 (M133L)	1.80	1.06	2.32	0.05	<0.05
S11 (I22RG123)	0.33	0.62	2.24	0.01	<0.05
S12 (K122I)	1.44	1.22	3.12	0.06	<0.05
S13 (K141W)	6.51	7.81	1.93	0.21	0.383
S14 (F161H)	1.28	1.35	3.60	0.03	<0.05
S15 (K122T)	0.77	0.85	2.03	0.03	<0.05
S16 (T143M)	3.35	1.78	3.30	0.11	ND
S17 (T131N)	1.54	0.97	1.69	0.05	ND
S18 (T126S)	1.33	0.93	1.83	0.03	<0.05
S19 (K122N/G145R)	1.07	0.62	2.07	0.05	ND
S20 (K122N/G145R)	2.03	0.71	3.91	0.11	<0.05
S21 (Q129H)	1.27	0.97	1.66	0.04	<0.05
S22 (T143L)	2.91	1.45	2.79	0.07	0.062
S23 (G145R)	2.01	0.98	1.71	0.08	ND
S24 (D144A)	2.10	0.85	1.43	0.03	<0.05
S25 (G130D)	1.85	1.07	2.20	0.09	<0.05
S26 (I23RGT124)	0.35	0.48	2.87	0.02	<0.05
S27 (T126S/Q129H/M133L)	ND	ND	3.08	ND	ND
S28 (Native G143R 9051/0426)	ND	ND	2.95	ND	ND

The values in bold indicate negative results; ND, not tested owing to insufficient sample volume.

HBsAg Quant 시약으로는 21검체 중 3검체에서 양성, 18검체에서 음성(3/21, 양성률 14.3%)을 보였고 두 시약 간 양성률은 유의한 차이가 있었다($P=0.0123$).

정성검사와 정량검사의 결과를 비교해 보면 Architect은 정성 및 정량검사 간의 양성률은 유의한 차이가 없었고($P=0.1466$), E170도 정성 및 정량검사간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.1296$).

4) 3사에서 제공한 모든 재조합 검체에 관한 정성검사 및

정량검사의 양성률(Table 1, 2)

정성검사의 경우 총 81검체 중 검체 부족으로 79검체에서만 동시검사 결과를 얻었다. 그 중 Architect HBsAg Qual II 시약으로는 72검체에서 양성, 7검체에서 음성(72/79, 양성률 91.1%), Elecsys HBsAg II 시약으로는 46검체에서 양성, 33검체에서 음성(46/79, 양

성률 58.2%), ADVIA Centaur HBsAg 시약으로는 68검체에서 양성, 11검체에서 음성(68/79, 양성률 86.0%)을 보여, 양성률은 Architect, Centaur, E170의 순으로 높았다. 세 시약의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P<0.0001$). Abbott 낮은 농도 검체를 제외한 3사의 재조합 검체를 대상으로 시행한 결과 양성률은 Centaur (56/61, 91.8%), Architect (53/59, 89.8%), E170 (37/59, 62.7%)의 순이었고 세 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P<0.0001$).

정량검사의 경우 총 81검체 중 검체 부족으로 74검체에서만 동시검사 결과를 얻었다. 그 중 Architect HBsAg Quant 시약으로는 50검체에서 양성, 24검체에서 음성(50/74, 양성률 67.5%), Elecsys HBsAg Quant 시약으로는 36검체에서 양성, 38검체에서 음성(36/74, 48.6%)을 보였고 두 시약 간의 양성률은 유의한 차이가 있었다($P<0.0209$).

정성검사와 정량검사를 비교해 보면 Architect은 정성(72/79, 양성률 91.1%) 및 정량검사(50/74, 양성률 67.5%) 간의 양성률에는 유의한 차이가 있었고($P=0.0008$), E170는 정성(46/79, 양성률 58.2%) 및 정량검사(36/74, 양성률 48.6%) 간의 양성률에 유의한 차이가 없었다($P=0.3053$).

재조합검체패널 별로 양성률을 살펴보면, Abbott 제공 재조합검체의 경우 양성률은 Architect 97.5%, Centaur 75%, E170 57.5% 순이었고, Roche 제공 재조합검체의 경우 양성률은 E170 100%, Architect 100%, Centaur 92.3% 순이었으며, Siemens 제공 재조합검체의 경우 양성률은 Centaur 100%, Architect 76.9%, E170 38.4% 순으로 나타나 자사의 제품으로 검사할 경우 양성률이 가장 높았고 타사의 경우는 낮았다(Table 1).

고 찰

B형간염의 진단에 있어 표면항원의 존재를 정확히 검사하는 것은 환자의 진단 뿐만 아니라, 증상이 없는 보균자들을 선별하여 감염을 막는 데에도 중요하다. 국내에서의 보균자 진단은 표면항원 양성 정도에만 의존하고 있는 경우가 많아 국내에서 이용되는 시약들의 표면항원검사 시약 민감도를 평가할 필요가 있다.

B형간염이 만연되어 있는 지역에서는 HBV유전자의 변이가 다양하게 일어나는데[17], 그 종류로는 만성 B형간염 환자에서 바이러스 증식이 장기간 지속되면 발생하는 표피단백의 preS변이[9], B형간염백신을 접종 받거나 간이식 후 HBIG를 투여 받은 환자에서 발생하는 표면항원의 백신도피변이[10, 12], 장기간 항바이러스제 투여 후에 발생하는 중합효소유전자의 약제내성변이[11] 등이 있다. 현재 이러한 변이의 정확한 유병률은 알기 어려우나 국내와 같이 HBV백신이 전국민 예방접종으로 시행되고 있는 경우 백신도피변이의 빈도가 증가하였을 것으로 추정할 수 있다. 실제 타이완에

서는 1984년 예방접종사업이 시작될 때 13세 이하 소아에서의 만성 B형간염의 유병률은 8.6%였고 MHR변이 동반율은 7.8%였으나, 1999년에는 B형간염의 유병률은 0.96%로 떨어진 반면 MHR의 변이 동반율은 23.1%로 증가하였다는 연구 결과가 있다[18]. 우리나라도 항체보유자의 증가에 따라 만성 B형간염의 유병률은 감소하고 있으나[19], 'a' 결정기 변이는 21.4%로 타이완에서의 연구와 비슷하게 나타났다[20].

백신도파변이는 주로 'a' 결정기 아미노산 서열 124-147번 사이에서 발생하고, 특히 아미노산서열 145번에서 glycine이 arginine으로 치환되는 G145R 변이와[21] 144번의 aspartate가 alanine으로 치환된 D144A 변이가 가장 흔하게 발생한다[22]. 따라서 'a' 결정기와 반응하는 단클론항체에 의한 기존의 HBsAg검사법은 이러한 백신도파변이에 의한 감염 시 위음성 결과를 보일 수 있다.

본 연구에서는 이러한 점을 보완하여 민감도를 높이고 돌연변이 검출율을 개선시킨 최근 발매 시약을 사용하여 검사를 시행하였다. Architect HBsAg Qual II의 경우 CMIA를 원리로 하고 포획항체로 2개의 단클론항체, 결합항체로 단클론 및 다클론항체 조합을 사용하는데 포획항체로 1개의 단클론항체, 결합항체로 1개의 다클론항체를 쓰던 Architect HBsAg Qualitative에 비해 분석 민감도 및 G145R, D144A 검출능이 개선되었으며 T123A 검출능이 추가되었다. Elecsys HBsAg II의 경우 ECLIA를 원리로 하고 포획항체로 2개의 단클론항체, 결합항체로 다클론항체를 사용하는데 포획항체로 1개의 단클론항체, 결합항체로 1개의 단클론항체를 쓰던 Elecsys HBsAg에 비해 분석 민감도가 0.1 IU/mL에서 0.025 IU/mL로 개선되었다. ADVIA Centaur HBsAg의 경우에는 CLIA를 원리로 하고 포획항체로 3개의 단클론항체, 결합항체로 2개의 단클론항체를 사용하고 분석 민감도가 0.021 IU/mL에서 0.018 U/mL로 향상되었다.

이와 같이 각 사 시약의 성능이 이전에 비해 많이 개선되었기 때문에 본 연구에서 혈청검체은행 검체군, 약제치료군 및 간이식군의 정성검사 양성률은 3사 간의 유의한 차이가 나지 않았다($P=0.4903$). 이에 검체의 종류를 다양하게 하고 검체 수를 늘려서 연구를 시행하면 의의 발견이 가능할 것으로 생각되어 재조합 검체군을 추가하여 보완 검사를 시행해 보았다. 그 결과 3사는 자사가 제공한 재조합검체들에서 가장 높은 양성률을 보이고 타사 제품에서는 결과값이 낮아 차이를 보였다($P<0.0001$). 이렇듯 같은 위치의 돌연변이지만 재조합검체를 제공한 회사 별로 검출 결과의 차이가 나는 이유는 재조합항원의 경우 제조사에 따라 자연 상태의 HBsAg와 구조적으로 차이가 있을 것이고, 또한 각각의 검사 시약에 포함되어 있는 항체들의 항원결정부위(epitope)도 다르기 때문일 것으로 추정된다. 따라서 검사성능 평가 시 재조합검체를 이용하는 것은 적절치 않으며 가능하면 많은 수의 환자 검체 혹은

야생형 돌연변이 검체를 확보하는 것이 중요할 것으로 판단된다.

한편 Abbott 재조합 검체 중 낮은 농도 검체를 대상으로 하여 정성검사와 정량검사의 양성률을 비교해 보면, Architect HBsAg Qual II 양성률(95%)은 Architect HBsAg Quant 양성률(45%)보다 현저히 높았다($P=0.0019$). 이러한 결과는 정성검사의 경우 낮은 농도 검체를 검출하는데 초점을 두고 있는데 반해, 정량검사는 치료 효과를 추적 검사하는데 초점을 두고 있으므로 농도가 높은 검체에 민감하고 저농도 검체에 대해서는 위음성을 초래할 수 있기 때문으로 추정된다. 결국 정량검사를 정성검사로 대체하기는 곤란하며, HBsAg 선별검사 시에는 정량검사보다 정성검사가 더 정확한 결과를 도출할 수 있을 것으로 기대된다.

또한 Abbott재조합 검체를 낮은 농도(lower) 검체와 높은 농도(higher) 검체로 구분하여 각 사의 양성률을 비교해 보면 Architect는 낮은 농도 검체에서 95%, 높은 농도 검체에서 100%, E170은 낮은 농도 검체에서 45%, 높은 농도 검체에서 70%, Centaur XP는 낮은 농도 검체에서 70%, 높은 농도 검체에서 80%로 낮은 농도 검체보다 높은 농도 검체에서 양성률이 증가하는 경향이 있었다. 이때 정성검사에서는 검출이 되나 정량검사에서는 검출이 되지 않는 검체는 낮은 농도 20검체 중 Architect는 10검체, E170은 4검체가 있었고, 높은 농도 20검체 중 Architect는 2검체, E170은 없었다. 따라서 일반 검체에서도 농도가 낮을 때보다 어느 정도 농도가 유지될 때 적절한 검사 결과를 얻을 수 있을 것으로 예측할 수 있다.

E170의 경우 재조합 검체군에서 정성 및 정량검사 간의 양성률은 유의한 차이가 없었다($P=0.3053$). 이는 재조합 검체군만을 대상으로 했을 때는 Abbott재조합 검체의 수가 가장 많고 Roche 재조합 검체의 수가 가장 적어서 E170의 정성 및 정량검사 양성률이 다른 2사보다 낮게 나왔으므로 이 수치를 비교하는 것은 적절치 않은 것으로 판단된다.

각 사에서 제공한 재조합검체의 정성 결과를 보면 대부분 10.0 S/CO 미만의 약양성 검체이므로 돌연변이를 검출하지 못하였다기보다 농도가 낮아서 검출되지 않았을 가능성도 생각할 수 있다. 특히 각 사별로 정성검사 값이 다소 상이한 성향은 보이지만 Centaur HBsAg에서 얻은 정성검사 값이 가장 높게 나왔다(Table 3-5). 이는 포획항체로 2개의 단클론항체를 사용하는 다른 시약과 달리 Centaur HBsAg는 3개의 단클론항체를 사용하기 때문으로 추정된다. 또한 본 연구자들이 다른 주제로 연구한 내용에 의하면 돌연변이와 무관하게 일반 환자의 검체에서도 낮은 농도의 양성검체에서는 각 사 간 정량검사의 불일치 소견이 관찰되었다.

HBsAg 변이를 검출하지 못하면 HBV 진단을 놓칠 수 있으나, 본 연구 결과 국내에서 널리 사용되는 위의 세 장비와 시약의 경우 돌연변이 발생이 높은 환자군을 대상으로 했을 때 검출능의 차이를 보이지 않았다. 앞으로 HBsAg변이의 유병률과 이에 대한 면역검

사법의 검출능에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

배경: B형간염바이러스(HBV) 감염 진단에는 B형간염표면항원(HBsAg)의 존재를 정확하게 검출하는 것이 중요하다. 그러나 간염 백신, 간염치료제, 간이식 후 면역글로블린 사용 등으로 인하여 HBsAg의 돌연변이종들이 점차 다양하게 증가하고 위음성 결과를 초래한다는 보고들이 잇따르고 있다. 최근 주요 공급사들에서 이러한 돌연변이들을 더욱 잘 검출할 수 있도록 장비와 시약을 개발하여 소개하고 있으므로, 본 저자들은 돌연변이를 초래할 수 있는 환자군들과 인위적으로 다양하게 제조한 유전자재조합 검체들을 대상으로 주요 자동화 면역장비와 시약들을 이용하여 돌연변이군들에 대한 HBsAg 검출능을 조사하고자 하였다.

방법: Architect2000sr analyzer (Abbott Laboratories, USA), Modular analytics E170 system (Roche Diagnostics, Germany) 그리고 ADVIA Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA)를 사용하여 혈청검체은행에서 양성으로 확인된 검체, 항바이러스제 치료를 받고 있는 만성B형간염 환자와 간이식 후 추적 관찰 중인 환자의 검체 그리고 각 장비 회사가 제공한 재조합변이항원 검체들에 대한 HBsAg 정성검사와 정량검사 검출능을 비교해 보았다.

결과: 혈청은행에서 양성으로 확인된 검체, 항바이러스제 치료를 받고 있는 만성B형 간염 환자들과 간이식 후 추적 관찰 중인 환자들의 검체들에서 3시간 불일치 결과를 보이는 검체는 없었다. 반면 같은 제조사에서 제공한 재조합 검체들에서 변이항원 검출률이 높았지만 다른 제조사에서 제공한 재조합 검체들에서는 검출률이 상대적으로 훨씬 더 낮았으며, 장비 별로도 불일치한 결과를 보였다. 또한 동일한 돌연변이종이라도 저농도 검체와 고농도 검체의 양성률을 비교해 보면 고농도 검체에서 양성률이 높았으며, 장비 별로도 불일치한 결과를 보였다.

결론: HBsAg 변이를 검출하지 못하면 HBV 진단을 놓칠 수 있다. 국내에서 널리 사용되는 위의 세 장비의 경우 돌연변이 발생이 높은 환자군을 대상으로 했을 때는 검출능의 차이를 보이지 않았으나 각 회사별로 제공한 자사 재조합 검체들을 대상으로 했을 때는 양성률이 서로 상이하였다. 그러므로 재조합 검체들을 중심으로 제품을 평가하면 안된다. 또한 변이종들에서 농도가 낮은 검체에서 검출률이 낮으므로 위음성의 가능성을 염두에 두어야 한다. 그러므로 낮은 농도의 변이종을 보다 잘 검출할 수 있는 제품의 개발이 필요하다. 본 연구에 다양한 환자 검체들을 추가하여 HBsAg 변이의 면역검사법의 검출능에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 애보트, 지멘스의 연구비 지원과 애보트, 로슈, 지멘스의 학술, 기술 및 재조합검체 제공 지원을 받아 수행되었습니다. 인체유래 고위험군바이러스 혈청검체를 분양해 주신 중앙대학교 혈청검체은행에 감사드립니다.

참고문헌

1. World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 (Revised October 2000). WHO Web site. 2000. <http://who.int/inffs/en/fact204.html>.
2. Korea Health Statistics 2009 :Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANESIV-3).
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-29.
4. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2: 553-62.
5. Leads from the MMWR. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus: prenatal screening of all pregnant women for hepatitis B surface antigen. *Jama* 1988;260:165, 9-70.
6. Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5:75-91.
7. Gerlich WH. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-a consensus report of an expert meeting. *Intervirology* 2004;47:310-3.
8. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J Med Virol* 1999;59:19-24.
9. Gerner PR, Friedt M, Oettinger R, Lausch E, Wirth S. The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology* 1998;245:163-72.
10. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-91.
11. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007;46:254-65.
12. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM, Lok AS. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were

- reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998;27:213-22.
13. Moerman B, Moons V, Sommer H, Schmitt Y, Stetter M. Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin Lab* 2004;50:159-62.
14. Kim H, Jee YM, Song BC, Shin JW, Yang SH, Mun HS, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) genotypes and serotypes in patients with chronic HBV infection in Korea. *Intervirology* 2007;50:52-7.
15. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003;37:19-26.
16. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005;32:102-12.
17. Park JW, Yoon JH, Hwang YJ, Lee HS, Kim CY. Mutations at the Gene Encoding the 'a' Determinant of HBsAg in Chronic Hepatitis B Patients with Concurrent HBsAg and Anti-HBs Positivity. *Korean J Gastroenterol* 1997;29:10.
18. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut* 2004;53:1499-503.
19. Park NH, Chung WH, Lee HS. Impacts of Vaccination on Hepatitis B Viral Infections in Korea over a 25-Year Period. *Intervirology* 2010;53:20-8.
20. Lee SS, Chang JY, Seo JK. Mutations in Hepatitis B Virus Precore, Core Promoter, and "a" Determinant in Children with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;14:279-85.
21. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condeay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-44.
22. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.