

실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 이용한 혈청 B형 간염 바이러스 DNA 검사

허 정¹ · 고원욱¹ · 김광하¹ · 강대환¹ · 송근암¹ · 조 몽¹ · 김형희^{2,3} · 이은엽²

부산대학교 의학전문대학원 내과학교실¹, 진단검사의학교실², 생명의료정보실³

HBV DNA Quantitation Using Real-time PCR

Jeong Heo, M.D.¹, Won Ook Go, M.D.¹, Gwang Ha Kim, M.D.¹, Dae Hwan Kang, M.D.¹, Geun Am Song, M.D.¹,
Mong Cho, M.D., Hyung Hoi Kim, M.D.^{2,3}, and Eeu Yup Lee, M.D.²

Departments of Internal Medicine¹ and Laboratory Medicine², Unit of Biomedical Informatics³, Pusan National University, School of Medicine, Busan, Korea

Background : Accurate measurement of the concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA in clinical samples is important for the appropriate treatment of patients and evaluation of their therapeutic responses. In addition, the concentration of HBV DNA in the serum of patients with chronic HBV infection has a very broad range. Real-time PCR is very sensitive and useful to detect HBV DNA in a wide range of concentrations. We designed new primers and probes for real-time PCR to detect HBV DNA.

Methods : Primers and probes specific for HBV were designed. EUROHEP HBV DNA standards (NIBSC, Hertfordshire, UK) with the HBV DNA concentration of 7.0×10^4 copies/mL was used to determine the calibration curve and efficacy for the real-time PCR assay. Sensitivity, dynamic range, and precision were evaluated. The correlation between the real-time PCR and Cobas Amplicor HBV Monitor™ assay in the measurement of serum HBV DNA concentrations in 52 patients with chronic HBV infection was evaluated.

Results : The sensitivity of the assay was approximately 6.08×10^2 copies/mL for HBV, and the quantitation was accurate and reproducible over a wide dynamic range from 6.1×10^2 to 6.5×10^9 copies/mL without any dilution of specimens. The assay showed low coefficients of variation of repeatability (3.7-24.9%) and reproducibility (7.8-24.7%). The results were found to correlate well with those obtained by Cobas Amplicor HBV Monitor™ kit.

Conclusions : We provide a new in-house method for the measurement of serum HBV DNA using real-time PCR, which enables us to detect HBV DNA rapidly, sensitively, and accurately. (*Korean J Lab Med* 2006;26:424-30)

Key Words : HBV DNA quantitation, Real time PCR, Cobas amplicor

서 론

B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV) 감염 환자를 평가하기 위한 검사법은 혈청학적 진단법에서 분자생물학적 진단법

으로 발전하고 있다. 바이러스의 증식능을 검출하는 검사는 HBeAg 검사, DNA polymerase 활성 측정법, 그리고 바이러스 농도 측정법(viral load test) 등이다. 자연적인 혹은 치료에 의한 HBeAg의 혈청 전환은 만성 B형 간염 바이러스 감염의 자연 경과에서 중요한 전환기가 되며 임상 병기를 판단하는데 필수적인 요소로서 인터페론 혹은 라미부딘 치료 후 효과 판정의 기준이 된다. 그러나 HBeAg 음성 만성 B형 간염(HBeAg negative Chronic Hepatitis B; HBeAg negative CHB)은 HBeAg은 음성이나 HBV가 활발하게 증식하면서 간 손상을 지속적으로 야기하여 간 경변증과 간암 발생위험이 증가한다[1, 2]. HBeAg 음성인 상태

접 수 : 2006년 3월 13일 접수번호 : KJLM1935
수정본접수 : 2006년 10월 31일
게재승인일 : 2006년 11월 12일
교 신 저 자 : 김 형 희
우 602-739 부산광역시 서구 아미동 1-10
부산대학교 의과대학 진단검사의학교실
전화 : 051-240-7414, Fax : 051-247-6560
E-mail : hhkim@pusan.ac.kr

는 HBeAg 음성 만성 B형 간염과 비활동성 HBsAg 보유 상태 (inactive HBsAg carrier; inactive carrier)가 포함되어 있는 이질적 요소로 구성되어 있다. 대부분의 HBeAg 음성 만성 B형 간염 환자는 간 효소치의 지속적인 상승이나 잦은 변동이 관찰될 수 있으나, 일부 환자는 일정기간 정상 간 기능을 보일 수 있어 비활동성(non-replication) 혹은 저활동성(low-replication) B형 간염 바이러스 보유자와 임상적으로 구분하기 어려운 경우가 많다[3]. 따라서 만성 B형 간염 환자에 대한 진단과 치료에 더 민감한 검사법의 필요성이 대두되었다.

혈청 HBV DNA의 직접적인 검출은 HBV 감염을 진단하고 항바이러스 제제 치료 반응평가에 가장 신뢰할 검사법이다. 나아가, 혈청 HBV DNA 정량 검사는 HBV 복제 수준에 대한 정보를 제공하고, 예후 평가나 항바이러스 제제에 대한 반응 지침으로 이용될 수 있다[4-9]. 최근 혈청 HBV DNA의 정량적 측정을 위한 표준화되고 상업화된 예민한 PCR 방법들이 개발되어 상호보완적으로 사용되고 있다[10].

PCR을 이용한 HBV DNA 정량법 중 Cobas Amplicor HBV Monitor testTM (Roche Diagnostics Systems, Meylan, France)는 높은 민감도를 가지고 있으나 검사법의 측정 가능 범위가 2.0×10^2 - 2.0×10^5 copies/mL로 좁아 정확한 정량이 가능한 직선 범위 내에서 측정하기 위해 검체 희석을 필요로 하는 단점이 있어 이를 극복하기 위해 측정 가능 범위가 넓은 실시간 정량적 중합 효소 연쇄 반응법(real-time PCR)들이 개발되었다.

본 연구에서 저자들이 고안한 real-time PCR법으로 우리나라 만성 HBV 감염 환자의 혈청 HBV DNA치를 측정하고, 기존 사용되고 있는 Cobas Amplicor HBV MonitorTM 검사법과 비교함으로써 그 적절성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

부산대학교병원에서 2005년 1월부터 6월까지 만성 B형 간염으

Table 1. Clinical and laboratory features of patients

Number of patients	52
Mean age (range), yr	43 (10-75)
Sex, male/female, n	34/18
Log ₁₀ [Serum HBV DNA], mean \pm S.D, copies/mL	6.0 \pm 1.0
HBeAg positive/negative, n (%)	33/19 (63.5/36.5%)
Chronic hepatitis/liver cirrhosis, n	27/25

Table 2. Primers of PCR amplification for standard plasmid

Primer	
P1-Eco, forward, 5'-GAGAGAATTCTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'	
P2-Pst, reverse, 5'-GAGACTGCAGAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'	

로 진단된 환자 중 HBV DNA가 Cobas Amplicor HBV Monitor testTM (Roche Diagnostics Systems)으로 10^3 copies/mL 이상인 52명의 혈청을 무작위로 추출하여 대상으로 하였고, 혈청은 측정하기 전까지 -70°C에서 보관되었다(Table 1).

2. Real-time PCR법에 의한 정량

1) HBV DNA standards의 준비

7.0×10^4 copies/mL 농도의 EUROHEP standard (NIBSC, Hertfordshire, UK)를 연속 희석(serial dilution)하여 real-time PCR을 이용한 HBV DNA 정량의 교정곡선(calibration curve)과 유효성(validation) 평가에 사용하였다.

2) Calibrators 제조를 위한 HBV DNA standard plasmid의 준비

환자 혈청에서 분리한 HBV의 전체 유전자를 시발체(primers) P1-Eco와 P2-Pst를 사용하여 PCR 증폭하였다(Table 2). 증폭된 결과물은 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI)에 클로닝하였으며 이렇게 만들어진 plasmid DNA는 plasmid mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)로 추출하였다. Standard plasmid는 공식인정 정량되어진 EUROHEP standard를 기준으로 HBV DNA를 정량한 다음, 5.0×10^9 , 5.0×10^7 , 5.0×10^5 , 5.0×10^3 copies/mL의 네 가지 HBV DNA 농도를 real-time PCR을 이용한 HBV DNA 정량측정을 위한 calibrators로 제조하였다.

3) 혈청으로부터 HBV DNA 추출

HBV 감염환자의 혈청 200 μ L를 QiAamp DNA blood kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 최종적으로 50 μ L 용리 완충액(elution buffer)으로 추출하여 QiAamp spin column (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)으로부터 real-time PCR의 주형(template)으로 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

4) Real-time PCR을 위한 oligonucleotide primers와 probe 제작

Real-time PCR을 위한 시발체와 탐촉자(probes)에 대한 제작은 TibMol사(Berlin, Germany)에 의뢰하여 제작하였다. 시발체는 잘 보존되는 HBV core 말단 영역(HBV Forward, HBV 508

Table 3. Primers and probes of real-time PCR for HBV DNA quantitation

Primer	
HBV Forward, 5'-GAC CAC CAA ATG CCC CTA T-3'	
HBV 508 Reverse, 5'-AAG CGC TGC GTG TAG TTT CT-3'	
Probe	
HBV FL, 5'-GAV GCA GGW CCC CTA GAA GAA GAA-fluorescein-3'	
HBV LC, 5'-LCRde-TCC CTC GCC TCG CAG ACG AAG TRC TS-phosphate-3'	

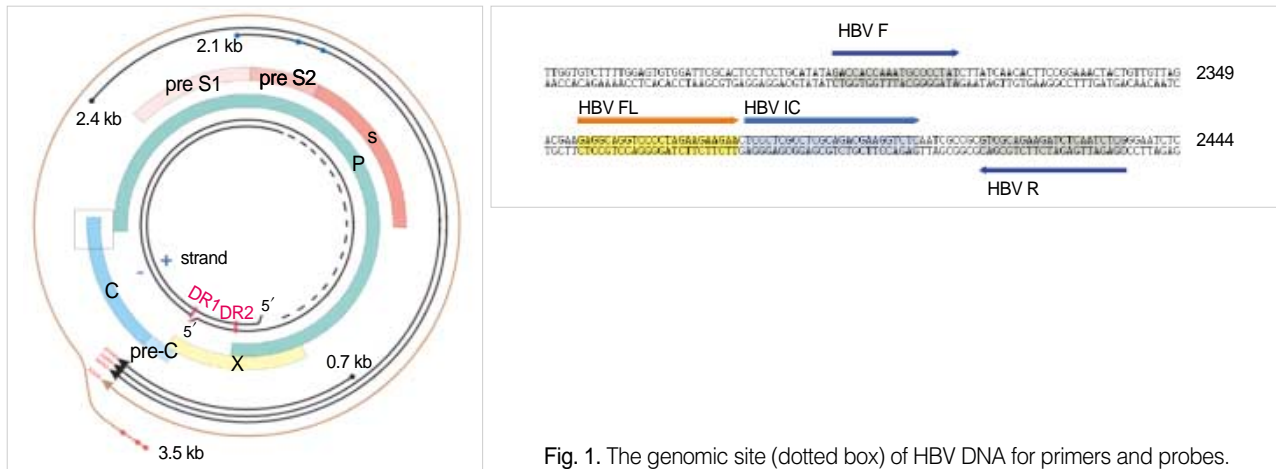


Fig. 1. The genomic site (dotted box) of HBV DNA for primers and probes.

Reverse)을 증폭하며 최종 산물은 약 500 bp의 크기를 가진다. 탐촉자는 PCR 산물에 직접적으로 결합하는 서열을 제작하여 donor fluorescein 탐촉자(HBV FL)와 acceptor LightCycler-Red 640 (LCRed) 탐촉자(HBV LC)를 합성하여 사용하였다(Table 3). 시발체 HBV Forward는 2,297-2,316 bp, 시발체 HBV 508 Reverse는 2,416-2,436 bp를 대상으로 하였고, 탐촉자 HBV FL은 2,355-2,379 bp, 탐촉자 HBV LC는 2,381-2,406 bp를 대상으로 하였다(Fig. 1).

5) Real-time PCR에 의한 HBV DNA 정량

Real-time PCR은 Roche Diagnostics LightCycler, version 1.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 사용하여 수행하였다. 30 μ L의 반응 혼합액은 주형 10 μ L, 10 \times LightCycler FastStart DNA 주 교잡(Master hybridization) 탐촉자(Roche Molecular Systems, California, USA) 3 μ L, HBV Forward 시발체 0.5 μ M, HBV Reverse 시발체 0.5 μ M, HBV FL donor 탐촉자 0.2 μ M, HBV LC acceptor 탐촉자 0.2 μ M와 MgCl₂ 4 mM을 포함하였다.

Real-time PCR의 반응 조건은 95°C에서 먼저 10분간 반응을 하여 FastStart Taq DNA polymerase를 활성화시켰으며 총 50 주기를 진행하는 동안 95°C에서 10초간 denaturation, 55°C에서 5초간 annealing, 72°C에서 17초간 extension을 하였다. 반응이 종결된 후 각각의 HBV DNA 시료는 Roche Diagnostics Light-Cycler 소프트웨어(3.5.3판)로 분석, 정량하였다.

3. Amplicor HBV Monitor™법에 의한 정량

첨부된 설명서에 따라 Cobas Amplicor HBV Monitor test™ (Roche Diagnostics Systems, Meylan, France)를 사용하여 제 조사의 사용 설명서에 따라 다음과 같이 혈청 HBV DNA를 정량 하였다[11, 12].

4. 정밀도 평가

5.0×10^8 copies/mL 농도의 HBV standard plasmid를 단계 희석하여 사용하였다. 각 농도 별로 매일 연속 5번 5일간 반복 측정하였다. 이 결과를 이용하여 검사 중 변이계수(within-run coefficient of variation), 일간변이계수(between-day coefficient of variation)를 구하여 평가하였다.

5. 특이도 평가

본원에 건강검진목적으로 내원한 건강한 성인 중 Architect HBsAg (Abbott Laboratories, IL, USA) 검사에서 음성인 50 검체를 이용하여 Real-time PCR를 시행하였다.

6. 직선성 평가

HBV standard plasmid를 순차적으로 10^2 copies/mL에서 10^{10} copies/mL 범위에서 10배수 연속 희석한 농도에 대해 각 농도마다 5회 반복 측정하여 직선성을 평가하였다.

7. 상관성비교

본원 내과에서 만성B형 간염으로 진단된 환자 중 다양한 범위의 농도를 가진 52명의 혈청을 이용하여 Cobas Amplicor HBV Monitor™ (Roche Diagnostics Systems)와 비교하였으며 Cobas Amplicor HBV Monitor™법에서는 2.0×10^5 copies/mL 이상 인 검체는 희석하여 정량하였다. 선형회귀모델을 이용하여 검사간 상관성을 평가하였다.

8. 통계 처리

Excel statistics package (Microsoft Corporation, New York,

USA)를 이용하여 정밀도 평가를 위해서는 변이계수를 구하였으며, 직선성 평가에서는 일반 선형모델로 회귀분석을 실시하였고 검사 간 상관성 분석은 선형회귀분석을 이용하였다. $P<0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Real-time PCR법에 의한 HBV DNA 검사의 정밀도 평가

Real-time PCR 검사의 검사 중 변이계수(within-run coefficient of variation)는 3.7-24.9% 범위이고 일간변이계수(between-day coefficient of variation)는 7.8-24.7%를 보였다(Table 4).

2. 특이도

Real-time PCR 검사로 HBsAg 음성인 혈청 전부에서 HBV DNA는 증폭되지 않아서 진단 특이도는 100%이었다.

Table 4. Precision of real-time PCR on serial dilution of standard plasmid (5.0×10^8 copies/mL)

Precision	Log ₁₀ dilution	Observed (copies/mL)		CV (%)
		Mean	SD	
Within-run	0	4.8×10^8	5.6×10^7	11.6
	-2	7.2×10^6	2.6×10^5	3.7
	-4	5.1×10^4	3.8×10^3	7.5
	-6	4.5×10^2	1.1×10^2	24.9
Between-day	0	4.7×10^8	3.7×10^7	7.8
	-2	5.9×10^6	1.1×10^5	18.6
	-4	5.5×10^4	7.4×10^3	13.6
	-6	5.4×10^2	1.3×10^2	24.7

Abbreviation: CV, Coefficient of variation.

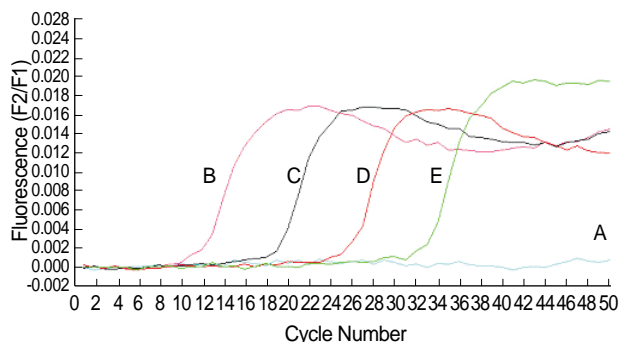


Fig. 2. Sigmoid fluorescence curves obtained with serial dilutions of standard plasmid. A, distilled water; B, 5.0×10^9 copies/mL; C, 5.0×10^7 copies/mL; D, 5.0×10^5 copies/mL; and E, 5.0×10^3 copies/mL.

3. Real-time PCR법에 의한 HBV DNA 검사의 직선성 평가

Real-time PCR의 측정 가능 범위를 확인하기 위해 EURO-HEP standard로 정량된 standard plasmid를 증류수를 사용하여 순차적으로 희석하였다. 각 검사마다 5회 반복하여 시행한 결과 전형적인 S자형 형광 곡선(sigmoid fluorescence curves) (Fig. 2)를 보여주었다.

EUROHEP standard의해 정량된 standard plasmid를 순차적으로 희석하여 확인된 측정 가능한 농도범위는 6.1×10^2 copies/mL에서 6.5×10^9 copies/mL 내에서 결정계수(R^2)가 0.9988으로 매우 우수한 직선성을 보였다(Fig. 3).

4. 혈청에서 HBV DNA 정량과 Cobas AmpliCor HBV Monitor™와의 연관성

대상 환자 모두에서 본 real time PCR법으로 HBV DNA가

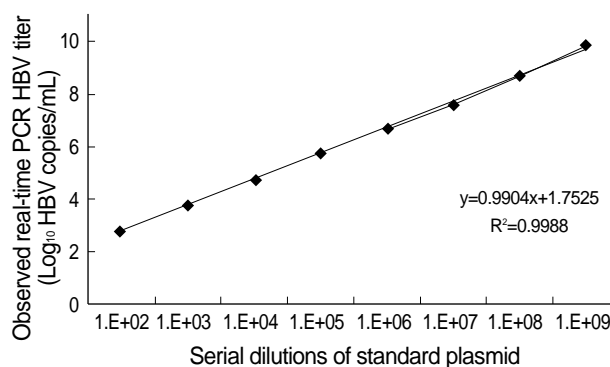


Fig. 3. The dilutional linearity of HBV DNA quantitation using real-time PCR. The standard curve was obtained with serial dilutions of standard plasmid (♦, mean of 5 experiments).

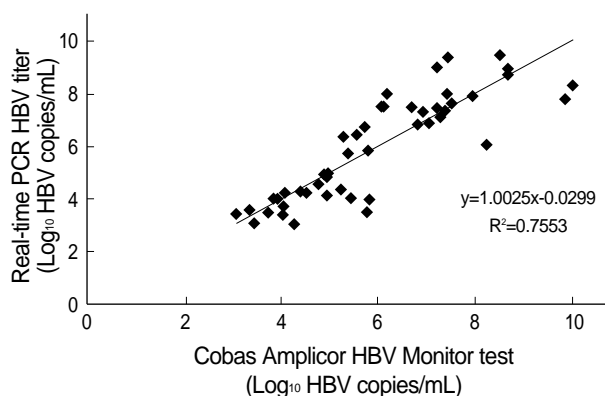


Fig. 4. Correlation between real-time PCR HBV DNA quantitation and the Cobas AmpliCor HBV Monitor™ test ($P<0.001$). Regression analysis of 52 sera of chronic hepatitis B patients analysed by both test methods. The real-time PCR HBV DNA quantitation test was duplicated. All specimens had titers above 1,000 copies/mL. Samples above 2.0×10^5 copies/mL in the the Cobas AmpliCor HBV Monitor™ test were diluted.

검출되었다. 모든 검체의 HBV DNA치는 10^3 copies/mL 이상이었으며, 두 검사법 간의 HBV DNA치는 기율기=1.0025, $R^2=0.7553$ 로 유의한 상관성이 있었고($P<0.001$), 두 검사치 차이의 평균과 표준편차는 각각 $0.69 \log_{10}$, $0.60 \log_{10}$ 이었다(Fig. 4).

고 찰

1980년대 초반에는 분자생물학적 진단법의 발전으로 HBV DNA 교잡법(hybridization)의 정성 한계가 10^6 - 10^7 copies/mL이었으나, 1980년대 후반부터는 PCR의 도입으로 HBV DNA 정성 한계가 10^2 - 10^3 copies/mL로 낮아졌다. 따라서 HBV DNA 검사법의 발전으로 HBV 감염의 병인, 자연사를 더 잘 이해할 수 있게 되었고 치료 반응에 대한 평가도 용이해졌다. 이전에는 HBV DNA 교잡법으로 혈청에서 HBV DNA가 검출되지 않는 환자는 비활동성 감염으로 간주되었다. 이런 환자는 다른 원인의 간 질환이 없다면, 치료를 요하지 않고 간 내 염증도 없는 것으로 여겨졌다. 급성 B형 간염에서 회복된 환자에서 교잡법으로는 HBV DNA가 검출되지 않지만 더 민감한 PCR 검사법에서는 10^3 copies/mL 이하의 낮은 HBV DNA치로 검출되었고[13, 14], 급성 감염 회복 후에도 HBV DNA는 수년간 지속된다[15]. HBeAg음성, anti-HBeAb양성인 만성 HBV 감염 환자 대부분이 PCR을 이용한 HBV DNA 검사에서 양성이다[13, 14]. 이런 임상 소견은 몇 가지 임상적으로 중요한 의문을 제기한다. 첫째, 어느 정도의 혈청 HBV DNA치가 진행성 간 질환과 관련이 있는가? 둘째, 어느 정도의 HBV DNA치가 치료 적응이 되는가? 셋째, 치료 중 지속적인 바이러스 억제, HBeAg 혈청전환과 간염 완치를 위해 어느 정도까지 혈청 HBV DNA치를 낮추어야 하는가? 이러한 의문들에 대한 답을 제시하고자 미국 국립보건원(National Institute of Health, NIH) 워크숍에서 임의로 혈청 HBV DNA 10^5 copies/mL를 비활동성 보유자와 만성 B형 간염을 구분하는 기준으로 제안하였다[16]. 이 HBV DNA치는 PCR을 이용하지 않는 상업적인 키트를 이용하는 HBV DNA 검사의 대략적인 검출 한계이다. PCR법이 개발되기 전인 1980년대와 1990년대 초반에 이루어진 연구에서 자연적으로 혹은 치료 후 HBeAg 혈청전환이 생긴 환자에서 정상 alanine aminotransferase (ALT)치, 간 조직 활성도 감소, 간 기능 부전 위험 감소와 생존 기간 증가를 보였고 당시의 교잡법으로는 HBV DNA가 검출되지 않았다. 만약 PCR법으로 검사되었다면 대부분의 이들 환자에서 양성 소견을 보였을 것이나 HBV DNA치가 낮아 치료의 대상이 되지는 않았을 것이다. 그러나 HBeAg양성 혹은 음성 만성 B형 간염과 비활동성 보유자의 기준점으로 혈청 HBV DNA 10^5 copies/mL는 확실하지 않다[17-19].

만성 B형 간염 환자에서 주기적인 HBV DNA 정량 검사는 감염 기전 연구, 진단, 치료 방향 결정, 치료 효과 판정과 항바이러스 제제 투여로 인한 내성 발생에 대한 체계적인 관리 지침을

제공하며, 이를 위해 폭 넓은 검출 범위를 요한다. PCR에 기초한 HBV DNA 정량법들은 항바이러스 치료 동안이나 비증식 HBsAg 보유자같은 낮은 수준의 HBV DNA 정량에 유리하나 측정 가능 범위는 한계가 있다. Cobas Amplicor HBV Monitor™법은 상한 직선 범위가 2.0×10^5 copies/mL로 대부분의 HBe항원 양성인 치료 전 만성 B형 간염 환자, 치료 중 내성 발현이 의심되는 검체는 희석해야 한다.

이러한 점들을 개선하고자 HBV 감염 환자의 혈청 HBV DNA치를 대상으로 저자들이 고안한 real-time PCR을 이용한 정량법의 타당성을 평가하고 기존 사용되고 있는 Cobas Amplicor HBV Monitor™ 검사법과 상관성을 평가하였다. 저자들이 고안한 real-time PCR을 이용한 HBV DNA 정량법은 6.1×10^2 copies/mL에서 6.5×10^9 copies/mL까지 직선성을 보이므로 허 등[18]이 보고한 우리나라의 만성 B형 간염 바이러스 보유자에서 항바이러스 약제 투여 전·후와 HBe항원의 유·무와 관계없이 정확한 정량이 가능하다. 다른 real-time PCR법에 의한 검사 범위와 유사하다[13, 20-24].

본 연구의 HBV DNA 검사치가 검출 범위 내에서 반복성과 재현성이 CV가 25% 이하로 PCR을 이용한 상업용 HBV DNA 정량 검사법들과 유사하였다[25].

이미 real-time PCR을 이용한 Cobas TaqMan™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) HBV DNA 정량법이 상용화되어 있으며 유효 검출 범위는 1.7×10^2 copies/mL에서 8.5×10^8 copies/mL이다. Cobas TaqMan™법은 Cobas Amplicor HBV Monitor™법에 비해 검사 범위가 넓어 검체 희석을 요하지 않으나 상대적으로 검사 비용이 고가인 것이 단점이다. 본 연구에서 고안된 시발체와 탐촉자를 사용한 real-time PCR에 기초한 HBV DNA 정량법은 Cobas Amplicor HBV Monitor™법에 비해서도 검사 비용이 저렴하며 검사 범위가 Cobas TaqMan™법과 거의 동일하다.

검출 범위의 하한은 6.1×10^2 copies/mL로 Cobas Amplicor HBV Monitor™법의 2.0×10^2 copies/mL와 Cobas TaqMan™법의 1.7×10^2 copies/mL에 비해 다소 높으나, 이는 저자가 사용한 Roche Diagnostics LightCycler, version 1.0의 모세관 크기가 30 μ L의 반응 혼합액만을 수용할 수밖에 없어 반응액을 제외하고 10 μ L의 분리된 혈청 검체만을 투입할 수 있는 데 비해 Cobas TaqMan™법은 모세관의 용적이 커서 100 μ L의 반응액 중 50 μ L의 분리된 혈청 검체를 측정하는 데 기인할 것으로 생각된다[24]. 개선된 LightCycler version 2.0은 모세관의 용적이 50 μ L로 증가되어 더 많은 분리된 혈청 검체를 투입할 경우 더 높은 민감도를 기대할 수 있다.

높은 HBV DNA치가 의심되는 검체인 경우 희석해야 하는 Cobas Amplicor HBV Monitor™법과의 비교에서도 유의한 상관성을 보였으며 두 검사법간의 측정된 범위에서 농도 차이가 $0.69 \log_{10}$ 로 상업적으로 사용 중인 다른 검사법에 비해 차이가 없었다[25]. 본 연구에 사용된 시발체와 탐촉자는 유전형에 관계없이 잘

보존되어 있는 core부위를 대상으로 하여 HBV의 유전형에 관계 없이 정확한 정량이 될 것으로 여겨지나 이를 검증하기 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각되고 Cobas TaqManTM법과 동일하게 혈청에서 HBV DNA 추출, 증폭 및 분석이 4시간 이내로 검사 시간이 짧아 다른 검사법에 비해 신속하였다. 결론적으로 real-time PCR을 이용한 HBV DNA 정량법은 신속하고 민감하게 넓은 검출 범위로 정량 측정이 가능한 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적 : 정확한 HBV DNA의 측정은 치료 대상 선정, 치료 반응 평가 등에 매우 중요하다. 중합 효소 연쇄 반응법(PCR)을 이용한 HBV DNA 정량법은 검사법의 직선성(linearity)을 나타내는 농도 범위가 좁은 반면, 실시간 정량적 중합 효소 연쇄 반응법(real-time PCR)은 검사 범위가 넓은 장점이 있다. 저자들은 real-time PCR로 HBV DNA 정량을 위한 새로운 시발체와 탐촉자를 고안하고, 혈청 HBV DNA치를 측정하여 검출 범위, 반복성 및 재현성을 평가하고 Cobas Amplicor HBV MonitorTM법과 비교하고자 하였다.

대상 및 방법 : HBV DNA에 특이적인 시발체와 탐촉자를 고안하여, 7.0×10^4 copies/mL 농도의 EUROHEP standard HBV DNA (NIBSC)를 real-time PCR 정량법의 교정 곡선(calibration curve)과 유효성 평가를 위해 연속 회석하여 사용하였고, 무작위로 추출한 만성 B형 간염 환자 52명의 혈청 HBV DNA치를 정량하였다. 정량 결과를 이용하여 검출 범위, 반복성을 평가하고 Cobas Amplicor HBV MonitorTM법에 의한 HBV DNA치와 상관성을 평가하였다.

결과 : 본 연구에서 고안한 real-time PCR을 이용한 HBV DNA 정량법의 검출 범위는 6.1×10^2 copies/mL부터 6.5×10^9 copies/mL까지였다. 반복성과 재현성은 CV (coefficient of variation)가 각각 3.7-24.9%, 7.8-24.7%였다. 회석하지 않은 본 검사법에 의한 정량 결과와 Cobas Amplicor HBV MonitorTM법에 의한 HBV DNA치 비교에서 상관계수 0.8691로 높은 상관성을 보였다.

결론 : 본 연구를 통해 개발한 HBV DNA Real-time PCR은 민감하게 넓은 검출 범위로 정확한 정량 측정이 가능하였고 현재 시판되는 상업키트와 비교하여 동등한 수준의 성능을 가진 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology* 1987;7:758-63.
2. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Purcell RH. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology* 1990;99:799-804.
3. Hadziyannis SJ and Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:617-24.
4. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002;122:1554-68.
5. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A, et al. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001;80:63-71.
6. Aspinall S, Steele AD, Peenze I, Mphahlele MJ. Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA: comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. *J Viral Hepat* 1995;2:107-11.
7. Barlet V, Cohard M, Thelu MA, Chaix MJ, Baccard C, Zarski JP, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum using chemiluminescence: comparison with radioactive solution hybridization assay. *J Virol Methods* 1994;49:141-51.
8. Krajden M, Minor J, Cork L, Comanor L. Multi-measurement method comparison of three commercial hepatitis B virus DNA quantification assays. *J Viral Hepat* 1998;5:415-22.
9. Chan HL, Leung NW, Lau TC, Wong ML, Sung JJ. Comparison of three different sensitive assays for hepatitis B virus DNA in monitoring of responses to antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:3205-8.
10. 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.
11. Ho SK, Chan TM, Cheng IK, Lai KN. Comparison of the second-generation digene hybrid capture assay with the branched-DNA assay for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1999;37:2461-5.
12. Niesters HG, Krajden M, Cork L, de Medina M, Hill M, Fries E, et al. A multicenter study evaluation of the digene hybrid capture II signal amplification technique for detection of hepatitis B virus DNA in serum samples and testing of EUROHEP standards. *J Clin Microbiol* 2000;38:2150-5.
13. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000;32:626-9.
14. Noborg U, Gusdal A, Horal P, Lindh M. Levels of viraemia in sub-

- jects with serological markers of past or chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Infect Dis* 2000;32:249-52.
15. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994;93:230-9.
 16. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-53.
 17. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham BN, Ollivier S, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol* 2002;36:543-6.
 18. Heo J, Baik TH, Kim HH, Kim GH, Kang DH, Song GA, et al. Serum hepatitis B virus (HBV) DNA levels at different stages of clinical course in patients with chronic HBV infection in an endemic area. *J Korean Med Sci* 2003;18:686-90.
 19. Oh SH, Kim HH, Heo J, Cho M, Chang CH, Lee EY, et al. Serum hepatitis B virus DNA quantitative analysis using polymerase chain reaction in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Korean J Lab Med* 2003;23:39-44. (오승환, 김형희, 허정, 조몽, 장철훈, 이은엽 등. 만성 B형 간염환자에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 바이러스 정량 측정. *대한진단검사의학회지* 2003;23:39-44.)
 20. Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:2899-903.
 21. Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus AD, Niesters HG. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol* 2000;38:2897-901.
 22. Weinberger KM, Wiedenmann E, Bohm S, Jilg W. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Virol Methods* 2000;85:75-82.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.