

장기 이식 환자에서 거대세포바이러스 감염 진단을 위한 중합효소 연쇄 반응법과 항원혈증 검사의 비교

이용화, 남명현, 이장호, 이남용

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 임상병리과학교실

Comparison of Polymerase Chain Reaction Method and CMV Antigenemia Assay for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Transplanted Patients

Yong-Wha Lee, M.D., Myung-Hyun Nam, M.D., Jang Ho Lee, M.T. and Nam Yong Lee, M.D.

Department of Clinical Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine,
Seoul, Korea

Background : Early detection and treatment of cytomegalovirus (CMV) infection is very important because CMV infection is a major cause of morbidity and mortality after organ transplantation. CMV antigenemia assay has been reported to be very sensitive and specific for detection of CMV infection among many laboratory methods. However, there is no single method correlated well with the infection state up to now. We compared the results of SHARP Signal System Assay (Digene, USA) using PCR and hybridization with those of CMV antigenemia assay (Clonab CMV-kit; Biotest AG, Germany) to evaluate their clinical usefulness.

Methods : We performed SHARP Signal Assay on whole blood samples of 125 from 56 transplanted patients submitted for CMV antigenemia at Samsung Medical Center. We compared the results with those of CMV antigenemia and evaluated the correlation with CMV disease state.

Results : Fifty six patients were classified as three groups; 43 patients with no evidence of CMV infection, four patients with CMV infection and 9 patients with CMV disease. Twenty four cases (19.2%) showed discrepant results between the two methods. Of the 22 cases showing positive only by SHARP Signal Assay, two cases were proved to be CMV disease, 12 cases were on antiviral treatment and remaining cases had no evidence of infection. Two cases showing positive only by CMV antigenemia were confirmed to be CMV disease. For CMV disease, the sensitivity of SHARP Signal Assay and CMV antigenemia were 85.7% and 90.5%, respectively and the specificity of them were 73.1% and 93.3%, respectively.

Conclusions : CMV antigenemia is thought to be useful for early diagnosis and follow-up of antiviral treatment as a quantitative and highly specific method, and SHARP Signal Assay can be used as a complementary method because it correlates well with disease state.

(Korean J Clin Microbiol 1999;2:177-181)

Key Words : CMV Antigenemia, SHARP Signal Assay, PCR

원 본 접 수 : 1999년 8월 6일

접수번호 : CM 99-2-4

서 론

수정본접수 : 1999년 9월 6일

교 신 저 자 : 이 남 용

(135-710) 서울시 강남구 일원동 50

삼성서울병원 임상병리과

전화 : 02-3410-2706 FAX : 02-3410-2719

거대세포바이러스(Cytomegalovirus, CMV) 감염증은
장기이식 환자 등과 같이 면역기능이 저하되어 있는
경우 치명적인 감염 증상을 유발하여 이식 실패뿐만이

아니라 사망에 이르게 할 수 있는 주요 원인중 하나로 알려져 있다. 물론 CMV 감염증과 상관없이 항바이러스 제제의 예방적 투여에 의해서 CMV 감염증에 의한 사망률을 감소시킬 수는 있으나 약제의 독성 및 부작용도 고려되어야 하기 때문에[1], 결국 CMV 질환 발생의 위험이 있어 항바이러스 제제의 투여 대상이 될 수 있는 환자를 조기 발견하는 것이 치료 성적 및 예후를 결정하는 데에 있어서 가장 중요한 요소라 할 수 있다[2].

CMV 감염의 진단을 위한 방법으로서 혈청학적 항체 검사법, 바이러스 배양법, 항원혈증 검사법 및 중합효소 연쇄 반응법 등이 현재까지 널리 이용되고 있다. 이중 CMV 항원혈증 검사법이 검사시간이 비교적 짧고 민감도와 특이도가 모두 높아 조기 진단 및 치료 효과를 판정할 수 있는 임상적 유용성이 큰 방법으로 알려져 있으나[3-5], 검사방법에 따라 결과의 차이를 보이는 것으로 알려져 있어 현재까지 CMV 감염증과 높은 상관성을 갖는 단일 진단 검사법은 없는 실정이다. 이에 저자들은 장기 이식환자를 대상으로 중합효소연쇄반응과 보합법을 원리로 한 검사법인 SHARP Signal System Assay와 항원혈증 검사법을 시행하여 CMV 질환의 조기 진단 및 추적 검사법으로서의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

대상

1999년 1월부터 3월까지 삼성서울병원 임상병리과에 CMV 항원혈증 검사가 의뢰된 56명의 환자로부터 채취된 125개의 전혈 검체를 대상으로 하였다. 남자가 31명, 여자가 25명이었고 평균연령은 40.2세이었다. 이들은 골수 이식 혹은 고형 장기 이식후 CMV 감염 여부를 판정하기 위해 검사가 의뢰된 환자들이었다. 이중 한 환자로부터 연속적으로 검사가 가능했던 경우는 101예로서 32명의 환자로부터 약 1주 간격으로 검사하였다. CMV 감염(배양검사 혹은 항원 검사에서 양성으로 나오거나 감염을 시사하는 항체 검사 결과가 관찰된 경우)이 있으면서 2일 이상 지속되는 발열, 백혈구 감소증, 혈소판감소증, 간효소치 상승, 장염, 폐렴증, 망막염, 신염 혹은 관절통 등과 같은 전신 증상 중 2가지 이상의 소견이 관찰되는 경우에 CMV 질환이 있는 것으로 판정하였다[6,7].

2. 방법

1) SHARP Signal™ System Assay (SHARP Signal Assay; Digene, USA)

(1) DNA 추출

DNA의 추출은 Dr. GenTLE kit (Takara Shuzo Co., Ltd.

Japan)를 이용하였다. EDTA 검체 200μL에 lysis 용액 1 mL를 가한후 오염된 적혈구를 용혈시키고 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 1.3 mL의 nucleic lysis 용액을 가한후 1 mL의 단백질을 침전 용액을 분주하고 원심분리하여 단백질을 제거하였다. DNA를 침전시키기 위하여 이소프로필 알코올 500μL를 첨가하고 혼합하여 흰색의 침전물이 형성되면 12,000g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 1mL의 70% 에탄올을 분주하여 세척후 DNA rehydration 용액을 분주하여 실험 전까지 -20℃ 이하에서 보관하였다.

(2) 중합효소 연쇄 반응

PCR에 이용된 primer는 CMV의 Major immediately (MIE) 유전자에 특이적인 1쌍의 염기배열을 선택하였고, 각각의 염기서열은 Table 1과 같다. 0.5 mL PCR용 시험관에 10× PCR buffer 20.3 μL, dATP, dTTP, dGTP와 dCTP 각각 500 μM, primer 각각 50 pmol, 0.05-0.5 μg/μL 농도의 DNA 5 μL, Taq DNA 중합효소 2.5 U와 증류수를 가하여 100 μL의 최종 반응액을 만들었다. PCR 반응은 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, USA) thermal cycler를 이용하여 94℃에서 15분간 DNA를 변성한 후 denaturation, annealing 및 extension시키는 과정을 94℃ 1분, 55℃ 2분, 72℃ 3분으로 40회 시행한 다음 72℃ 7분간 1회 시행하였다.

(3) 보합 및 결과판정

증폭된 산물 5μL에 DNA 변성시약 25μL를 분주하여 잘 섞은 후 RNA 소식자 25μL를 PCR 산물내의 target DNA와 보합 결합시켰다. 모든 반응액을 streptavidin이 부착된 microwell plates에 옮긴 후 alkaline phosphatase가 부착된 항체 100μL를 보합체와 반응시킨후 실온에서 30분간 반응시킨 다음 5회 세척하였다. 여기에 PNPP 기질 100μL를 첨가한 후 37℃에서 1시간 반응시킨 후 발색정도를 405nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도가 음성 대조는 0.05이하, 양성 대조는 0.4이상이면 검사는 제대로 시행된 것으로 간주하였고, 흡광도가 0.1이상일 때 양성으로 판독하였다.

2) CMV Antigenemia Assay (Clonab CMV-kit; Biotest AG, Germany)

CMV 항원혈증 검사는 Clonab CMV:APAAP-Kit를 사용하여 CMV의 lower matrix phosphoprotein인 pp65에 대한 단클론 항체를 반응시켜 면역염색을 시행하였다.

EDTA 혈액 3mL에 5% dextran 1mL를 섞어 백혈구 층을 분리하고 남아 있는 적혈구를 용혈시켰다. PBS로 부유하여 백혈구 수가 $1 \times 10^6/L$ 가 되도록 백혈구 수를 맞춘 다음 cytopsin을 시행하여 한 slide당 백혈구수가 200,000이 되도록 백혈구 부유액을 슬라이드에 고정시켰고 각 검체당 2장의 슬라이드를 만들었다. 건조된

Table 1. Primer sequences for the Major immediate-early genomic region of CMV

Primer	Sequences (5' to 3')	Position
	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	
	Biotin-CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	

Table 2. Comparison of SHARP Signal Assay and pp65 antigenemia for 125 specimens from 56 transplanted patients

SHARP Signal Assay	pp65 Antigenemia		
	Positive	Negative	Total
Positive	24	22	46
Negative	2	77	79
	26		

슬라이드를 Acetone-methanol 용액으로 고정후 CMV-pp65 항원에 대한 단클론성 항체(Clonab CMV monoclonal Ab), Bridging antibody (Rabbit anti-mouse antibody), alkaline phosphatase와 anti-alkaline phosphatase의 복합체를 차례로 반응시킨 후 기질 발색 시약으로 염색하였다. Hematoxylin으로 대조 염색하고 광학 현미경으로 관찰하여 40만 개의 백혈구중 핵이 적색으로 염색된 백혈구가 1개이상 있을 경우 양성으로 판정하였다.

결 과

56명의 조사 대상 환자들은 CMV 감염을 증명할 수 없었던 군(43명), 임상 증상없이 CMV 감염만이 있었던 군(4명)과 CMV 질환군(9명)으로 분류되었다. 총 125예 중 SHARP Signal Assay는 46예(36.8%)에서, CMV 항원혈증 검사는 26예(20.8%)에서 양성을 보여 SHARP Signal Assay에서 더 높은 양성율을 나타내었으며 24예(19.2%)에서 두 검사법간 불일치를 보였다(Table 2). 두 검사법간 불일치를 보인 예중 SHARP Signal Assay에서만 양성으로 검출된 22예는 CMV 질환이 있었던 2예, 감염 진단 후 치료 중이었던 12예, 현재 CMV 감염을 의심할 수 없었던 8예이었다. CMV 질환이 있었던 2예는 각각 PCR과 소변 배양 검사에서 양성소견을 나타내었으며 혈소판 감소증 및 간 효소치상승 등의 소견을 보였다(Fig. 1). CMV 항원혈증 검사에서만 양성이었던 2예는 이후의 추적 검사에서

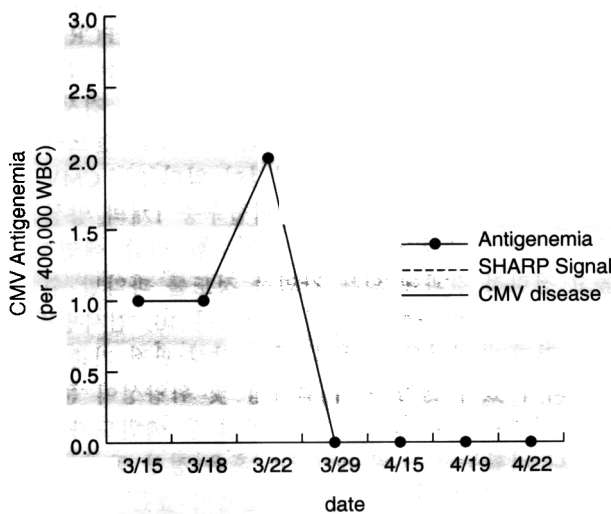


Fig. 1. Follow-up result of SHARP Signal Assay and pp65 antigenemia in one patient with CMV disease.

SHARP Signal Assay 검사도 음성에서 양성으로 전환되었고 CMV 항원혈증 검사에서도 지속적으로 양성소견을 보였으며 CMV 감염증상을 보여 CMV 질환이 있는 것으로 간주하였다. 항원혈증 검사와 SHARP Signal Assay에서 모두 음성을 보였던 예 중 1예는 소변 배양 검사와 PCR에서 양성 소견을 보였으며 고열 및 간 효소치상승 등 CMV 감염 증상 소견을 보여 CMV 질환이 있는 것으로 간주하였다.

CMV 질환에 대한 SHARP Signal Assay와 CMV 항원혈증 검사의 예민도는 85.7%와 90.5%이었고 특이도는 73.1%와 93.3%이었다(Table 3).

고 찰

장기이식 환자에서 CMV 감염증은 이식 실패뿐만 아니라 사망까지 이르게 할 수 있는 주된 원인중의 하나로 잘 알려져 있다. 따라서 CMV 감염증을 조기에

Table 3. Correlation of SHARP Signal Assay and pp65 antigenemia with CMV disease state

Test	Result	Disease state		
		No infection	CMV infection	CMV disease
SHARP Signal Assay	Negative	76	0	3
	Positive	20	8	18
pp65 Antigenemia	Negative	96	1	2
	Positive	0	7	19

신속하게 진단할 수 있는 예민도가 높은 검사법이 다양하게 개발되어 왔으며 현재는 CMV 감염증의 조기 진단후 치료에 대한 반응을 평가할 수 있으며 각 장기의 CMV 질환을 예측할 수 있는 viral load에 대한 정량 방법의 개발에 관심이 모아지고 있다[8].

CMV 감염을 진단하기 위한 방법으로 혈청학적 항체 검사, 바이러스 배양, 항원혈증 검사 및 PCR 등이 이용되고 있다. 혈청학적 방법은 검사 방법은 간편하나 위양성 및 위음성의 빈도가 높아 진단적 검사로서는 불충분하고 바이러스 배양법은 특이도는 높으나 민감도가 낮고 검사시간이 긴 단점이 있다[9]. CMV 항원혈증 검사법은 400,000개의 백혈구중 1개의 양성 세포가 존재할 경우에도 검출이 가능할 만큼 예민도가 높고 정량적 결과에 의해 감염증 정도를 파악할 수 있는 장점이 있어 많이 이용되고 있으나[10] 검사방법에 따라 결과가 차이를 보일 수 있고 양성 판정 기준이 표준화되어 있지 않아 역시 위음성 및 위양성이 문제가 될 수 있다. PCR은 여러 검사 방법 중 예민도가 가장 높으나 비활동성 잠복 바이러스 혹은 정상 공여자에서도 양성 소견을 보이는 등 위양성률이 높은 점이 문제가 되어 왔고[11] 이러한 문제는 정량 PCR 방법을 이용하여 부분적으로 해결할 수 있는 것으로 보고되었다[5].

본 연구에서는 PCR 후 PCR 산물에 보합을 하여 특이도를 높인 방법인 Digene SHARP Signal System Assay를 시행하여 그 결과를 CMV 항원혈증 검사와 비교하였다. CMV 항원혈증 검사의 예민도와 특이도가 SHARP Signal Assay보다 높았는데, 이는 실제로 감염 증상이 있는 CMV 질환군에서 CMV 항원혈증 검사의 검출율이 더욱 높았음을 제시하며, 이러한 결과는 Boivin등의 결과[12]와 차이가 있는 반면, pp 65 양성 세포수가 적은 검체에서는 CMV 항원혈증 검사가 hybrid capture assay에 비해 예민도가 높았다는 다른 보고자의 결과와는 일치하였다[8,13].

19.2%에서 두 검사법간 불일치를 보였는데 SHARP Signal Assay에서만 양성으로 검출된 예 중 8예는 임상적으로 CMV 감염을 시사하는 소견이 없었고 추적 검사도 시행되지 않아 위양성으로 생각되었다. CMV 감염 치료후 증상이 회복된 환자인 경우에도 PCR 검사법과 마찬가지로[14] 지속적으로 SHARP Signal Assay에서도 양성을 보여 CMV 항원혈증 검사 결과와 불일치를 보였는데 이는 CMV 감염증이 발병하기 전이나 항바이러스 제제 치료후의 바이러스의 양이 CMV 항원혈증 검사로 검출이 불가능할 정도로 적은 것에 기인할 것으로 생각되었다. 그러나 CMV 항원혈증 검사의 반정량적 결과는 질환의 추적 검사에서 임상 양상과 더욱 높은 상관성을 보였으므로 치료 효과의 판정에 유용할 것으로 생각되었다. SHARP Signal Assay 검사도 표준 검체의 적정 회석을 통한 정량 검사로 시행

한다면 정량값에 따른 CMV 질환의 경중도 평가 및 추적 검사에서 치료 효과 판정을 위한 방법으로 유용할 것이라 생각되었다. 검사비용 및 검사실 사정을 고려하여 한가지 검사법을 선택해야 할 경우 검사시간이 짧고 민감도와 특이도가 높으며 정량화가 가능한 CMV 항원혈증 검사의 우선 시행이 권장될 수 있겠다.

결론적으로 SHARP Signal Assay는 CMV 항원혈증 검사와 비교하여 높은 일치율을 보였으며 CMV 감염과도 높은 상관성을 보였다. 그러나 치료 반응과 상관없이 추적검사에서 계속 검출된 경우 및 CMV 질환이 있음에도 불구하고 검출이 안된 경우도 있었으므로 CMV 감염 진단 및 경과 관찰을 위해서 CMV 항원혈증 검사와 상호 보완적으로 이용될 수 있는 검사법이라 생각된다. 반면 CMV 항원혈증 검사는 정량화가 가능하였고 질환 특이도가 높았으므로 추적 검사 및 약제의 효과를 판정하는 검사로서 효과적일 것으로 생각되었다.

요 약

배 경 : 거대세포바이러스(CMV) 감염증은 장기이식 환자에서 주된 사망 원인중 하나로서 조기 진단 및 치료가 매우 중요하다. CMV 감염증의 진단 및 치료 효과를 판정하기 위한 검사중 CMV 항원혈증 검사법이 민감도와 특이도가 모두 높아 많이 이용되고 있으나 검사방법에 따라 결과의 차이를 보이는 것으로 알려져 있어 현재까지 CMV 감염증의 정확한 진단 검사법은 없는 실정이다. 저자들은 중합효소연쇄반응과 보합법을 원리로 한 검사법인 SHARP Signal™ System Assay를 항원혈증 검사법(Clonab CMV-kit; Biotest AG, Germany)과 비교하여 유용성을 평가해 보고자 하였다.

방법 : 삼성서울병원 임상병리과에 CMV 항원혈증 검사가 의뢰된 56명의 환자로부터 채취된 125개의 전혈 검체를 대상으로 하였다. 전혈로부터 분리된 DNA에 대하여 SHARP Signal Assay를 시행하여 항원혈증 검사 결과와 비교하였고, 추적검사와 임상 양상 등을 통해 CMV 감염증 여부를 조사한 후 질환과의 상관성을 알아보았다.

결 과 : 56명의 조사 대상 환자들은 CMV 감염을 증명할 수 없었던 군(43명), 임상 증상없이 CMV 감염만이 있었던 군(4명)과 CMV 질환군(9명)으로 분류되었다. 총 125예 중 24예(19.2%)에서 두 검사법간 불일치를 보였다. SHARP Signal Assay에서만 양성으로 검출된 22예는 CMV 질환이 있었던 2예, 감염 진단 후 치료 중이었던 12예, 현재 CMV 감염을 의심할 수 없었던 8예이었다. CMV 항원혈증 검사에서만 양성이었던 2예는 모두 CMV 질환이 있었다. CMV 질환에 대한 SHARP Signal Assay와 CMV 항원혈증 검사의 예민도는 85.7%와 90.5%이었고 특이도는 73.1%와 93.3%

이었다.

결론 : CMV 항원혈증 검사는 정량화가 가능하였고 질환 특이도가 높았으므로 조기 진단 및 치료의 효과를 판정하는 검사로서 효과적일 것으로 생각된다. 또한 SHARP Signal Assay는 CMV 감염과도 높은 상관성을 보였으므로 CMV 항원혈증 검사와 상호 보완적으로 이용될 수 있는 검사법이라 생각된다.

참 고 문 헌

- Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. *Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplant. N Engl J Med* 1991;325:1601-7.
- Bowden RA. *Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. Hematol Oncol Clin N Am* 1995;9:155-65.
- 신혜정, 김현경, 김현숙. 거대세포바이러스 감염증의 조기진단을 위한 PCR 및 early antigen 면역염색법의 유용성. 대한임상병리학회지 1998;18:452-7.
- Eckart P, Brouard J, Legoff C, Freymuth F, Duhamel JF, Ryckelynck JP, et al. *Virological diagnosis of cytomegalovirus in renal transplantation: Comparison of three diagnostic methods: DNA in plasma by PCR, pp65 leukocytic antigenemia and viremia. Transplant Proc* 1996;28:1806-7.
- Boeckh M, Boivin G. *Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev* 1998;11:533-54.
- Tong CYW, Cuevas L, Williams H, Bakran A. *Use of laboratory assays to predict cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. J Clin Microbiol* 1998;36:2681-5.
- Van der Bji, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH. *Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. J Clin Microbiol* 1988;26:2531-5.
- Mazzulli T, Wood S, Chua R, Walmsley S. *Evaluation of the Digene Hybrid Capture System for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol* 1996;34:2959-62.
- Myers JB, Amsterdam D. *The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. Immunol Inv* 1997;26:383-94.
- Koskinen PK, Nieminen MS, Mattila SP, Hayry PJ, Lautenschlager IT. *The correlation between symptomatic CMV infection and CMV antigenemia in heart allograft recipients. Transplantation* 1993;55:547-51.
- Peiris JSM, Taylor CE, Main J, Graham K, Madley CR. *Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) disease in renal allograft recipients: the role semiquantitative polymerase chain reaction (PCR). Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1198-205.
- Boivin G, Handfield J, Murray G, Toma E, Lalonde R, Lazar JG, et al. *Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects with and without CMV disease by using PCR and the SHARP Signal Detection System. J Clin Microbiol* 1997;35:525-6.
- Lazzarotto T, Camposi B, Dalmonte P, Galli S, Spezzacatena P, Guglielmi P, et al. *A quantitative test (HCMV-Hybrid Capture (TM)) to detect human cytomegalovirus DNA in the blood of immunocompromised patients compared with antigenemia and polymerase chain reaction. Microbiologica* 1996;19:193-201.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, et al. *Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. J Infect Dis* 1991;164:488-98.