

Digene Hybrid Capture™ assay와 자가제조 PCR법을 이용한 HBV DNA 측정법의 비교

김영식, 이광길, 박수연, 이희주, 서진태

경희대학교 의과대학 임상병리학교실

Comparison of the Digene Hybrid Capture™ Assay and in-house PCR for the Detection of HBV DNA

YS Kim, KK Lee, SY Park, HJ Lee, and JT Suh

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

Background : Among many serologic and molecular methods, direct detection of HBV DNA in serum appears to be the most reliable method for monitoring HBV infection and assessing the response to anti-viral treatment. Generally, polymerase chain reaction (PCR) with high sensitivity and hybridization analysis with quantification are available for detecting the presence of HBV DNA in serum. In this study, we compared Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay with in-house PCR assay.

Methods : We performed in-house nested PCR in 44 patients with negative results and 16 patients with weakly positive results (≤ 17 pg/mL) by Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay.

Results : Of the 44 negative patients of Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay, 26 (59.1%) were positive and 18 (40.9%) were negative for PCR. Of the 16 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay weak positive patients, all (100%) were positive for PCR.

Conclusions : Although the hybridization method is less sensitive than the PCR, it is considered to be a standard procedure and quantitative method. So, if combined with PCR, the hybridization method will be useful for monitoring HBV infection and assessing the response to anti-viral treatment. (*Korean J Clin Microbiol* 2000;3:132-136)

Key words : Hybridization method, in-house polymerase chain reaction, HBV DNA

서 론

전세계적으로 3억 5천만명 이상이 B형 간염 바이러스에 감염되어 있는 것으로 추정되고 있으며, 수혈후 간염 발생 원인의 약 10%를 차지한다[1,2]. HBV에 의해 감염된 간세포에서는 대개 지속적으로 HBsAg과 HBeAg이 생성되며, HBeAg은 바이러스의 급격한 복제를 나타내는 것으로 여겨지고 있다[3,4]. HBsAg과

HBeAg은 B형 간염 진단에 매우 유용하지만, 이들 항원의 유무가 HBV 감염의 유무를 전적으로 나타내지는 못한다[5-9]. 이는 HBeAg을 생성하지 못하는 precore mutant HBV나 치료에 의해 HBs antigenicity가 없어졌는데도 HBV가 체내에 계속 존재하는 경우도 있기 때문이다[10-12]. 따라서 B형 간염 진단에는 혈청학적 검사보다는 혈청내에서 HBV DNA를 직접 검출하는 것이 HBV의 증식상태를 잘 반영하는 것으로 여겨지고 있으며, 특히 HBV DNA 정량검사는 B형 간염의 치료와 예후에 도움을 주고 있다[1,13]. 현재까지 HBV DNA를 검출하는 방법은 크게 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, 이하 PCR이라 함)과 보합결합법 (hybridization)이 있다. PCR은 매우 민감하지만 HBV DNA를 정량적으로 검출할 수 없고, 보합결합법은 HBV

접수번호 : CM 3-2-9

교신저자 : 김영식

(130-702) 서울 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 의과대학 임상병리학교실
Tel : (02) 958-8672 Fax : (02) 958-8609
E-mail : yeongsic@yahoo.co.kr

Table 1. Synthetic oligonucleotide sequences used for amplification of HBV-DNA

	Oligonucleotide sequences	Map position
KHBV1	5' -TCCYACTGTTCAAGCCTCCAAGC-3'	
KHBV2	5' -TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCC-3'	
KHBV3	5' -TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCC-3'	
KHBV4	5' -CTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCC-3'	

DNA를 정량할 수 있지만 미량의 DNA는 검출할 수 없는 단점이 있다. 본 연구에서는 보합결합법의 원리를 이용한 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay가 의뢰되었던 검체중 HBV DNA가 음성인 환자와 낮은 농도로 검출되었던 환자의 검체를 대상으로 자가제조 PCR을 시행하여 비교분석하였다.

재료 및 방법

2000년 1월 한달 동안 경희의료원 임상병리과에 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay가 의뢰된 환자 중 HBV DNA 음성인 44명과 양성이지만 HBV DNA 농도가 17 pg/mL 이하인 16명을 대상으로 PCR을 시행하여 결과를 비교하였다. 연구에 사용된 검체는 -70℃에 보관하였다가 사용하였다.

2. 방법

1) Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay

Hybridization tube에 검체 50μL, proteolytic solution 25μL, 희석액 25μL를 넣고 1,100 rpm으로 30초 동안 혼합시키고 65℃ 온수조에서 20분 동안 반응시켰다. 반응된 검체에 NaOH가 함유된 denaturation reagent 50μL를 첨가한 후 1,100 rpm으로 30초 동안 혼합시키고 65℃ 온수조에서 30분 동안 반응시켜 변성시켰다. HBV RNA probe 50μL를 첨가 후 1,100 rpm으로 3분 정도 흔들어주고 65℃ 온수조에서 1시간 동안 교잡반응시켰다. 시험관의 내용물을 capture tube로 옮기고, capture tube를 1,100 rpm으로 1시간 동안 혼합시킨 후 시험관내 용액은 버렸다. Capture tube에 anti-RNA:DNA-alkaline phosphatase conjugate를 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 5회 세척하였다. 그 후 발색소 LumiPhos® 530을 넣고 실온 암소에서 30분 동안 반응시킨 후 LEADER50으로 측정하였다. 음성 대조 검체 1개와 양성 대조 검체 3가지를 측정하여 참고치로 설정하고, HBV DNA가 3 pg/mL 이하는 음성, 4 pg/mL 이상은 양성으로 판정하였다.

2) 자가제조 nested PCR

검체 50 μL와 동량의 0.2 N NaOH를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.14 N HCl 50 μL로 중화한 후 12,000

g에서 10분간 원심분리 후 상층을 검사에 이용하였다. Nested PCR을 위하여 core 영역에 위치하는 두 쌍의 시발체를 이용하였으며, sequence는 Table 1과 같다. 첫 번째 PCR은 PCR용 튜브에 원심분리 상층액 2μL, 100 μM dNTP, 10 pM 시발체 1과 2, 0.5 U Taq polymerase (Bioneer, Cheongwon, Korea) 2μL, 10×buffer, 3.0μM MgCl₂을 넣고 8-MOP (Methyloxypsoralen) 용액으로 반응부피가 20μL가 되도록 맞추었다. 음성 대조군으로는 음성 환자 혈청을 사용하였다. GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, CA, USA)를 이용하여 5분간 94℃에서 predenaturation한 후 94℃ 5초, 60℃ 10초, 72℃ 15초 과정을 30번 반복하였고 5분간 72℃에서 post extension하였다. 두 번째 PCR은 1.5μM MgCl₂와 시발체 3,4를 넣는 것 이외에는 첫 번째와 동일하게 시행하였다. 증폭 PCR 산물 분석은 증폭 산물 6μL를 1.5% agarose gel에서 molecular marker (123 bp DNA ladder, Bioneer, Korea)와 같이 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transluminator로 관찰하였다. 519 bp의 band가 보이면 양성으로 판정하였다.

3) HBV 혈청학적 표지자 검사

상품화된 Kit Ausria II (Dianabot, Tokyo, Japan)을 이용하여 방사면역법으로 측정하였다.

결 과

1. HBV PCR의 민감도

준비한 표준물질을 10 pg/mL 농도에서 10배 연속희석하여 nested PCR을 시행해서 감도를 측정한 결과 0.1 pg/μL까지 측정이 가능하였다.

2. HBV 보합결합법과 PCR의 결과

Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에서 음성인 44명 중 HBV DNA PCR 양성인 26명(59.1%)이고 음성은 18명(40.9%)이었다. Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에서 양성이지만 HBV DNA 농도가 17 pg/mL 이하인 16명은 모두 PCR 양성을 보였다(Table 2).

3. 혈청학적 표지자에 따른 PCR과 보합결합법의 비교

검사 분석 대상자 60명 중 간염 혈청학적 표지자 검

Table 2. Comparison of HBV PCR results with DNA hybridization results(n=60)

DNA hybridization	+	PCR		Total
		+	-	
		16(100.0%)	0(0%)	16(100.0%)
		26(59.1%)	18(40.9%)	44(100.0%)

Table 3. Comparison of serologic marker results with results of HBV PCR and DNA hybridization (n=42)

HBsAg	HBeAg	PCR		DNA hybridization		Total
		+	-	+	-	
+	+	11(78.6%)	3(21.4%)	1(7.1%)	13(92.9%)	14(100.0%)
+	-	19(67.8%)	9(32.2%)	2(7.7%)	26(92.3%)	28(100.0%)
Total		30	12	3	39	42

사 결과를 알 수 있었던 경우는 42명이었고, 이들 모두는 HBsAg 양성이었으며 이 중 HBeAg 양성은 14명이었고 음성은 28명이었다 (Table 3). HBsAg 양성 42명에 대한 PCR 검사 결과는 양성 30명(71.4%)과 음성 12명(28.6%)으로 나타났으나 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay 결과는 양성 3명(7.1%)과 음성 39명(92.9%)으로 나타났다. HBeAg 양성 14명에 대한 PCR 검사 결과는 양성 11명(78.6%)과 음성 3명(21.4%)이었으며 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay 결과는 양성 1명(7.1%)과 음성 13명(92.9%)이었다. HBeAg 음성 28명에 대한 PCR 검사 결과는 양성 19명(67.8%)과 음성 9명(32.2%)으로 나타났으나 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay 결과는 양성 2명(7.7%)과 음성 26명(92.3%)으로 나타났다.

고찰

B형 간염의 진단에는 혈청학적 방법과 분자생물학적 방법들이 있다. 그러나 혈청학적 방법으로는 HBsAg이나 다른 혈청학적 표지자가 음성이라고해서 환자 혈청내에 HBV DNA가 없다거나 감염력이 없다고 할 수는 없으며 임상경과 및 치료효과를 판정하기 어려운 경우가 많다[5,8,14,15]. PCR이나 보합결합법에 의한 HBV DNA 검사는 환자의 감염 상태를 직접적으로 알 수 있어 질환의 치료와 예후에 많이 활용되고 있다 [1,13,16].

1988년 액체보합결합법을 이용한 HBV DNA 정량 검사가 시행된 이후로 보합결합법에 기초한 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay와 Quantiplex bDNA Assay, Amplicor HBV Monitor, crosslinking hybridization assay 등이 개발되어 이용되고 있지만 검사법의 표준화 미비로 인해 민감도나 특이도, 재현성 등에서 서로 다른 결과를 보여주고 있다 [17-19]. Kao 등은 crosslinking hybridization assay가 bDNA assay보다 민감도가 높고 검사 시간이 짧다고 보고하였고[20], Butterworth

등은 bDNA assay가 액체보합결합법이나 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay보다 민감도가 높다고 보고하였다[17,19]. 그러나 HBV DNA 보합결합법이 B형 간염의 감염을 정확히 진단할 정도로 민감도가 높지는 않다 [21].

PCR 검사는 HBV DNA 0.00001 pg까지도 검출하며, 민감도가 bDNA assay보다 10,000배 정도 높은 것으로 여겨지지만 정량검사에 제한이 있다[19,22]. 본 연구에서도 PCR의 민감도가 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay보다 높은 것으로 나타났다. 즉, Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에서 음성인 44명 중 26명(59.1%)은 HBV DNA 중합효소연쇄반응 양성으로 나타났으며, Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에서 양성이면서 HBV DNA 농도가 17 pg/mL 이하인 16명에서는 모두 PCR 양성을 보였다. 물론 위의 결과는 대상 환자를 Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay 결과가 음성이거나 17 pg/mL 이하의 낮은 농도를 보인 환자로 국한시켰기 때문에 보다 예민한 방법인 PCR에서 양성율이 더욱 높았을 것으로 사료되었다.

혈청 HBeAg은 바이러스 체내 복제 활성화에 대한 평가로 많이 사용되고 있으며, 본 연구에서 PCR의 경우, HBeAg 양성인 환자에서 HBV DNA 양성율은 78.6%, HBeAg 음성인 환자에서 양성율은 67.8%로 나타나 HBeAg 음성인 경우에도 감염력을 측정할 수 있는 유용한 검사로 생각되었다. PCR 검사는 HBV DNA를 검출하는데 노동력이 많이 필요하고 오염 문제가 많으며 검사방법이 표준화되어 있지 않기는 하나 매우 예민한 방법으로 낮은 농도의 HBV DNA가 존재하는 경우에는 매우 유용한 검사법으로 사료되었으며, 보합결합법은 정량적인 결과를 얻을 수 있고 검사방법이 표준화되어 있어 중합효소연쇄반응법과 같이 이용할 경우 B형 간염의 진단과 치료효과를 판단하는데 도움이 될 것으로 사료되었다.

요 약

배 경 : 혈청학적 표지자는 B형 간염 진단에 매우 유용하지만 이들 항원의 유무가 HBV 감염의 유무를 전적으로 나타내지는 못한다. 따라서 혈청내에서 직접 HBV DNA를 검출하여 B형 간염의 진단과 치료, 예후 판정에 이용하고 있다. 대표적인 HBV DNA 검출 방법으로는 민감도가 높은 PCR과 정량검사가 가능한 보합결합법이 있으며, 본 연구에서는 보합결합법에 의해 HBV DNA가 낮거나 음성으로 나온 검체에 대해 두 방법을 비교분석하고자 하였다.

방 법 : Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에 의한 HBV DNA 검사결과가 음성인 44명과 17 pg/mL 이하의 낮은 농도를 보인 16명을 대상으로 자가제조 nested PCR를 시행하였다.

결 과 : Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay 결과 음성인 44명 중 HBV DNA PCR 결과가 양성인 26명 (59.1%)이고 음성은 18명 (40.9%)이었다. Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay에서 17 pg/mL 이하의 낮은 농도를 보인 16명은 모두 PCR 양성을 보였다.

결 론 : 보합결합법은 PCR 검사에 비해 민감도는 낮으나 정량적인 결과를 얻을 수 있고 검사방법이 표준화되어 있어 이 두가지 방법을 이용할 경우 B형 간염의 진단과 치료효과를 판단하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Lee WM. *Hepatitis B virus infection*. *N Engl J Med* 1997;337:1733-45.
2. Reesink HW, van der Poel CL. *Blood transfusion and hepatitis: still a threat?* *Hamatol Bluttransfus* 1989;58:1-6.
3. Hindman SH, Gravelle CR, Murphy BL, Bradley DW, Budge WR, Maynard JE. *e-Antigen, Dane particles and serum DNA polymerase activity in a HBs Ag carrier*. *Ann Intern Med* 1976;85:458-60.
4. Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. *e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B to their infants*. *N Engl J Med* 1976;294:746-9.
5. Brechot C, Degos F, Lugassy C, Theirs V, Zafrani S, Franco D, et al. *Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen*. *N Engl J Med* 1985;312:270-6.
6. Nalpas B, Berthelot P, Thiers V, Duhamel G, Courouge AM, Tiollais P, et al. *Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers: a study of 146 chronic alcoholics*. *J Hepatol* 1985;1:89-97.
7. Schafritz DA, Lieberman HM, Isselbacher KJ, Wands JR. *Monoclonal immunoassays for hepatitis B surface antigen: demonstration of hepatitis B virus DNA or related sequences in serum and viral epitopes in immune complexes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5675-9.
8. Scotto J, Hadscoel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C. *Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers*. *Hepatology* 1983;3:279-84.
9. Gitlin N. *Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment*. *Clin Chem* 1997;43:1500-6.
10. Carman WF, Thomas HC. *Genetic variation in hepatitis B virus*. *Gastroenterology* 1992;102:711-9.
11. Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Lioriot MA, Giostra E, Boyer N, Thiers V, et al. *Persistence of hepatitis B virus DNA demonstrated by polymerase chain reaction in serum and liver after loss of HBsAg induced by antiviral therapy*. *Ann Intern Med* 1990;112:227-8.
12. Adachi H, Kaneko S, Matsushita E, Inagaki Y, Unoura M, Kobayashi K. *Clearance of HBsAg in seven patients with chronic hepatitis B*. *Hepatology* 1992;16:1334-7.
13. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. *The treatment of chronic viral hepatitis*. *N Engl J Med* 1997;336:347-56.
14. Sun CF, Pao CC, Wu SY, Liaw YF. *Screening for hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1848-52.
15. Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, et al. *Purcell. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:312-6.
16. Ranki M, Shatzl HM, Zachoval R, Uusi-Oukari M, Lehtovaara P. *Quantification of hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative activity in response to treatment and in recurrent infection*. *Hepatology* 1995;21:1492-9.
17. Butterworth LA, Prior SL, Buda PJ, Faoagli JL, Cooksley WGE. *Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA*. *J Hepatol* 1996;24:686-91.
18. Janssen HLA, Schoenmaker-Weber YAM, Kruijning H, Schalm SW, Heijtkink RA. *Quantitative assessment of hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B: comparison of two solution hybridization assays*. *J Med Virol* 1993;40:307-12.

19. Zaaijer HL, Ter-Borg F, Cuypers HTM, Hermus MCAH, Lelie PN. *Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol* 1994;32:2088-91.
20. Kao JH, Wood M, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. *Comparison of two methods for quantification of hepatitis B viral DNA. J of Gastroenterology and Hepatology* 1999;14:423-6.
21. Prince AM, Stephan W, Brotman B. *B-propiolactone/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives. Rev Infect Dis* 1983;5:92-07.
22. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. *Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J Clin Microbiol* 1989;27:1930-3.