

Evaluation of a Quantitative RealArt HBV LC PCR Assay for Hepatitis B Virus by Real-time PCR

Ji-Hyun Cho^{1,2,3}, Hye-Soo Lee⁴, Key-Earn Lee^{1,2}, Do-Sim Park^{1,2,3}, Young-Jin Lee^{1,2,3}, Hyung-Bae Moon^{2,3,5}, Chang-Soo Choi^{2,3,6}, Eun-Young Cho^{2,3,6}, Haak-Cheoul Kim^{2,3,6}

Departments of ¹Laboratory Medicine, ⁵Pathology and ⁶Internal Medicine, ²Institute of Wonkwang Medical Science, ³Wonkwang Clinical Medicine Research Center, Wonkwang University College of Medicine, Iksan; ⁴Department of Laboratory Medicine, Chonbuk National University College of Medicine, Jeonju, Korea

Background: As oral antiviral treatment for chronic hepatitis B increases, quantitation of viral load has become an essential test for HBV management, and assays using real-time PCR principles have been introduced recently.

Methods: We analysed the analytical performance (precision, linear range, and sensitivity) of RealArt HBV LC PCR Reagents (Artus GmbH, Hamburg, Germany), its correlation with COBAS AMPLICOR HBV MONITOR Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and distribution of viral load in the patients' sera according to antiviral treatment and presence of HBeAg.

Results: Variation of intra-assay and inter-assay were 39.7% and 78.1% at 10^3 copies/mL of viral load,

18.1% and 73.2% at 10^4 copies/mL, and below 10% and below 15% between $10^5 \sim 10^9$ copies/mL. Linear range was with $5 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^9$ copies/mL. Correlation with Amplicor was $y = 0.9211x + 0.607$ ($R^2 = 0.7801$, $P < 0.001$) and the median concentration in the patients without any treatment was 6.3×10^7 copies/mL (HBeAg positive) and 3.1×10^3 copies/mL (HBeAg negative).

Conclusion: RealArt reagent using principles of real-time PCR, would be an appropriate laboratory method for HBV management. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:25-31)

Key Words: Hepatitis B virus, HBV DNA assay, Real-time PCR

서 론

HBV (hepatitis B virus)는 전세계 4억 인구가 감염되어 있으며, 국내 감염률은 B형 간염 바이러스(HBV) 백신에 의하여 현저히 감소하였지만, 아직도 5~7%로 추정되며, 간경변증과 간암의 가장 흔한 원인이다[1,2].

최근 HBV 치료에 인터페론 외에 라미부딘과 같은 경구용 제제 사용이 증가됨에 따라, 혈중 HBV 정량은 환자의 진단뿐만 아니라, 치료의 경과 추적과 성패, 내성 바이러스의 출현 및 재발의 예측에 필수적인 방법이 되었다[3,4]. 아직까지 국내에서는 치료대상을 ALT 2배 이상 증가와 10^5 copies/mL 이상을 권장하고 있으나, HBeAg 음성 만성간염에서는 10^4 copies/mL가 치료기준으로 제시되고 있으며, 200 copies/mL 이하에서도 환자의 8.3%에서 내성 변이종이 검출되며, 바이러스의 내성(viral breakthrough) 판단에 바이러스의 절대 농도(10^5 copies/mL)와

함께 최저 농도에서 1.0 log 이상의 농도 변화를 제시하고 있어, 50 IU/mL 농도까지도 검출하며 광범위한 직선구간을 나타내는 방법이 추천되고 있다[3-5].

HBV정량은 신호증폭(signal amplification)과 핵산증폭(target amplification) 방법으로 구분되는데, 검출원리와 각 방법에 따라 검출한계(detection limit)와 직선구간(linear range)에 차이가 있다[3,6]. 초기 신호증폭 방법은 10^5 copies/mL 이하를 검출하지 못하였으나, 방법의 개선 및 최근 real time PCR 원리를 도입함으로써, 점차 검출한계가 10^2 copies/mL 수준으로, 직선구간이 10^9 copies/mL 이상에까지 확장되고 있고, 핵산추출에 자동화 방법이 도입되고 있다[6-12]. Real-time PCR 방법은 증폭과 검출이 단일 튜브에서 발생하는 원리이기에 신속한 검사가 가능하고 오염률이 낮다는 특성이 있으며, HBV 정량에 있어서는 예민도와 검사범위가 기존의 정량법 중에서는 가장 우수한 것으로 보고되고 있다[6].

이에, real-time PCR 방법(RealArt HBV LC PCR Reagents; Artus GmbH, Hamburg, Germany)을 이용한 HBV 정량법의 성능(정확도, 예민도, 직선구간 및 재현성)과 COBAS AMPLICOR HBV MONITOR Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Ger-

Received 1 September, 2006, Accepted 10 November, 2006

Correspondence: Haak-Cheoul Kim, Department of Internal Medicine, Wonkwang University Hospital, 344-2, Shinyoung-dong, Iksan 570-711, Korea. (Tel) 82-63-850-1069, (Fax) 82-63-855-2055, (E-mail) kimpb@wonkwang.ac.kr

many) 방법 간의 비교 및 HBeAg과 항바이러스제 치료와 관련된 혈청 내 HBV DNA 농도의 분포를 조사하였다.

대상 및 방법

1. HBV DNA 정량

RealArt 시약을 제품 설명서에 따라, LightCycler (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)를 사용하여 측정하였다. 혈청 200 μ L에서 High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics)를 사용하여 50 μ L 용액에 추출하였다. RealArt 시약은 WHO standard에 calibration된 5가지 농도($10^1 \sim 10^5$ IU/L)의 표준물질(copies/mL로의 conversion factor 7)과 PCR 과정에서의 억제제를 확인하기 위하여 internal control이 포함되어 있으며, 최종 증폭산물은 134 bp이다. 증폭 조건은 95°C 20초 방치 후에, 95°C 1초- 55°C 15초- 72°C 15초를 60회 반복 후, melting curve 분석 과정 [95°C 1초- 50°C 15초- 95°C 0초(ramp rate $20^\circ\text{C}/\text{초}$) - 40°C 30분]을 추가하여 특이도를 확인하였다. 한편, Amplicor 방법은 혈청 100 μ L를 사용하였다.

2. RealArt 시약의 검사성능 분석

1) 정확도(accuracy): Amplicor에 의하여 농도가 측정된 고농도(2.5×10^9 copies/mL) 환자 혈청을 10배수 계대희석한 10검체를 각각 3회 측정하고 그 평균값을 기대치와 비교하였다.

2) 재현성(precision): 초기 검사법 평가기간에 검사내(intra-assay) 변이를 조사하기 위하여 7가지 농도의 혈청 검체를 각각 5회씩 검사하였으며, 검사간(inter-assay) 변이는 7가지 농도의 혈청 검체를 서로 다른 날짜에 5회 측정하였다. 한편, 실제 환자 검체에서 HBV DNA 정량검사를 실시한 2년 동안 표준곡선 제작에 사용된 5가지 표준물질의 threshold cycle (Ct) 값과, 자가 제작한 정도관리 물질(10^4 , 10^5 , 10^6 copies/mL)의 Ct 값과 농도의 변이계수 및 범위를 조사하였다.

3) 직선구간(linear range): Amplicor법에 의하여 측정된 고농도(2.3×10^9 copies/mL) HBV DNA 검체를 10^3 copies/mL 수준

까지 10배수 계대 희석하고 반복 측정(10^9 , 10^8 및 10^7 copies/mL 12회, 10^6 과 10^5 copies/mL 14회, 10^4 copies/mL 18회, 10^3 copies/mL 22회)하였다. 한편, RealArt법에 의하여 $10^3 \sim 10^5$ copies/mL 범위의 혈청에서 추출된 37 DNA 검체와, 고농도 HBV DNA 검체를 10^9 copies/mL에서 10^1 copies/mL까지 계대 희석한 9검체에 대하여 nested PCR 방법(HBV PrimerMix kit, 제노텍, 대전)으로 검사하였다.

3. 임상적 유용성

1) HBV 정량에 있어서 RealArt법과 Amplicor법의 상관성:

Amplicor법으로 정량된 환자 혈청 85검체(10^7 copies/mL 10검체, 10^6 copies/mL 10검체, 10^5 copies/mL 15검체, 10^4 copies/mL 10검체, 10^3 copies/mL 10검체, 10^2 copies/mL 10검체, 10^1 copies/mL 10검체 및 HBV가 검출되지 않은 10검체)를 냉장 보관하여 2일 이내에 RealArt법에 의하여 측정하였다. 동시에 이때 추출된 DNA를 이용하여 Amplicor 방법에 의하여 10^4 copies/mL 미만이었다던 40검체는 nested PCR 방법으로 분석하

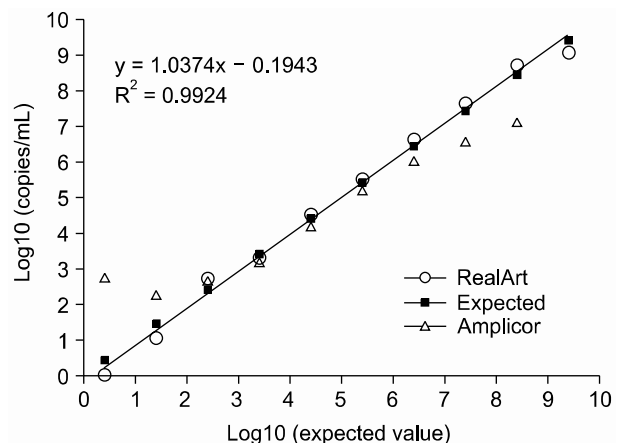


Fig. 1. Expected and assayed values of HBV concentration of 10 ten-fold dilution series of a high-titered serum (2.5×10^9 copies/mL) samples analyzed by RealArt and Amplicor methods.

Table 1. Results of intra-assay testing during pre-clinical period

Control (N=5)	Threshold cycle (no. of cycles)			Concentration of HBV (copies/mL)			
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Range
C3	35.09	1.47	4.20	3.8×10^3	2.8×10^3	73.24	$1.1 \sim 6.4 \times 10^3$
C4	31.33	0.21	0.66	1.3×10^4	2.4×10^3	18.07	$1.0 \sim 1.5 \times 10^4$
C5	28.11	0.10	0.37	2.0×10^5	1.7×10^4	8.40	$1.9 \sim 2.2 \times 10^5$
C6	24.68	0.05	0.21	2.5×10^6	8.1×10^4	3.21	$2.4 \sim 2.6 \times 10^6$
C7	21.14	0.02	0.10	2.5×10^7	3.8×10^5	1.51	$2.4 \sim 2.5 \times 10^7$
C8	17.64	0.02	0.10	2.3×10^8	2.8×10^6	1.22	$2.3 \sim 2.4 \times 10^8$
C9	14.09	0.02	0.16	2.2×10^9	2.8×10^7	1.27	$2.2 \sim 2.3 \times 10^9$

Table 2. Results of inter-assay testing during pre-clinical period

Control (N=5)	Threshold cycle (no. of cycles)			Concentration of HBV (copies/mL)			
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Range
C3	35.49	1.27	3.57	3.6×10^3	2.8×10^3	78.14	$7.0 \times 10^2 \sim 9.8 \times 10^3$
C4	31.55	0.35	1.11	1.9×10^4	7.7×10^3	39.66	$1.0 \sim 3.8 \times 10^4$
C5	28.30	0.26	0.93	2.0×10^5	3.0×10^4	14.80	$1.4 \sim 2.5 \times 10^5$
C6	24.79	0.09	0.37	2.2×10^6	3.2×10^5	14.42	$1.8 \sim 2.6 \times 10^6$
C7	21.19	0.04	0.21	2.3×10^7	2.5×10^6	10.87	$1.9 \sim 2.5 \times 10^7$
C8	17.67	0.05	0.27	2.2×10^8	1.9×10^7	8.58	$1.9 \sim 2.5 \times 10^8$
C9	14.05	0.35	2.48	2.3×10^9	3.3×10^8	14.36	$1.9 \sim 2.8 \times 10^9$

Table 3. Results of clinical performance during a 2-year period

Standards (N=114)				Controls						
Conc. (copies/mL)	Threshold cycle (no. of cycles)			Concentration (copies/mL)				Threshold cycle (no. of cycles)		
	Mean	CV	Range	Level	No.	CV	Range	Mean	CV	Range
7×10^3	29.57	2.61	26.54~30.97	I* 3.2×10^4	111	63.0	$2.0 \times 10^3 \sim 8.4 \times 10^4$	30.94	3.88	28.85~35.26
7×10^4	26.32	2.38	24.94~28.96	4.5×10^4	24	40.2	$9.6 \times 10^3 \sim 7.3 \times 10^4$	30.60	2.58	29.20~32.56
7×10^5	22.79	2.04	21.84~23.75	1.8×10^4	5	89.8	$7.4 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^4$	33.16	4.83	31.37~35.02
7×10^6	19.33	2.34	18.48~20.12	3.4×10^4	26	61.9	$4.7 \times 10^3 \sim 7.0 \times 10^4$	31.25	2.03	29.95~32.62
7×10^7	15.84	2.40	14.81~16.57	3.0×10^4	33	77.0	$2.0 \times 10^3 \sim 8.4 \times 10^4$	30.77	5.39	28.85~35.26
				2.3×10^4	23	39.6	$8.0 \times 10^3 \sim 4.0 \times 10^4$	30.73	1.41	30.06~31.87
				II 2.9×10^5	20	40.8	$1.1 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^5$	27.75	3.31	26.19~29.56
				III 3.2×10^6	55	20.0	$1.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^6$	24.20	1.89	23.38~25.05

*Summary of results of 5 home-made controls used during the study period.

였다.

2) **혈청 내 HBV DNA 농도 분포:** 2004년 3월부터 2006년 2월까지 HBV DNA 정량검사가 의뢰된 965환자 1,805검체에 대하여 전산자료를 조사하여, 항바이러스제(Lamivudine, Adefovir, Clevudine)의 사용과 HBeAg 존재에 따라 A군(264검체: 치료-, HBeAg+), B군(547검체: 치료-, HBeAg-), C군(565검체: 치료+, HBeAg+), D군(429검체: 치료+, HBeAg-)으로 분류하고 HBV DNA 농도를 percentile로 도시하였다.

결 과

1. RealArt 시약의 검사 성능

1) **정확도(accuracy):** 10배수 계대 희석한 환자혈청($2.5 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^0$ copies/mL)에 대하여, RealArt법은 기대치와 $y=1.0374x-0.1943$ ($R^2=0.9924$, $P<0.001$)의 관계를 나타내었다. 단, 10^9 copies/mL 이상과 10^2 copies/mL 이하 범위에서는 기대치보다 낮게 측정되는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

2) **재현성(precision):** HBV 농도 $10^3 \sim 10^9$ copies/mL 범위의 7개 희석혈청에 대한 RealArt법의 검사 내 및 검사 간 Ct 값 변이는 모두 CV 5% 이하였으며, $10^5 \sim 10^9$ copies/mL 범위에서 농도변화도 각각 10%와 15% 이하였다. 10^4 , 10^3 copies/mL 농도에서 검사 내 변이는 각각 18.1%와 73.2%였으며, 검사 간 변이는 39.7%와 78.1%였다(Table 1, 2).

실제 환자검체의 HBV 정량검사 때마다 표준곡선 작성에 사용된 5가지 표준물질의 Ct 값 변이는 3% 이하로 매우 낮았다. 자가 제작한 정도관리 물질의 10^4 , 10^5 , 10^6 copies/mL 수준에서 CV 값과 변화범위는 각각 63.0% ($2.0 \times 10^3 \sim 8.4 \times 10^4$), 40.8% ($1.1 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^5$) 및 20.0% ($1.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^6$)였다(Table 3).

3) **직선구간(linear range):** 고농도 HBV DNA 검체(2.3×10^9 copies/mL)를 10^3 copies/mL 수준까지 10배수 희석한 검체의 기대치에 대하여 $y=1.0054x-0.0554$ ($R^2=0.9883$, $P<0.001$)의 관계였다. 기대치 2.3×10^3 copies/mL의 22검체 측정값은 1개 ($<1.0 \times 10^2$ copies/mL)를 제외하고는 $2.0 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$ copies/

mL 내로 분포하였으며, 농도가 높을수록 분포범위가 좁아지는 경향이었다(Fig. 2).

계대 희석된 DNA 검체에서, 1차 PCR 결과 10^4 copies/mL까지 희미한 밴드를 관찰할 수 있었으며, 2차 PCR에서는 10^2 copies/mL까지 뚜렷한 밴드를 관찰할 수 있었다. 한편, RealArt 법에 의하여 $10^3 \sim 10^5$ copies/mL 범위를 나타내었던 혈청에서 추출된 37 DNA 검체에서 nested PCR 방법은 21검체(56.8%)에서 양성결과를 나타내었다(Fig. 3).

2. 임상적 유용성

1) RealArt법과 Amplicor법 및 nested PCR법에 의한 HBV 정량 비교: Amplicor법과 RealArt법 사이에는 $y=0.9211x+0.607$ ($R^2=0.7801$, $P<0.001$)의 좋은 상관성을 나타내었다. Amplicor법에 비하여 10^6 copies/mL 이상에서는 RealArt 값이 상대적으로 높아지는 경향이었으며, 10^2 copies/mL 이하

에서는 1.0 log 범위를 벗어나는 경우가 증가하였다(Fig. 4). 한편, Amplicor법에 의하여 $10^0 \sim 10^4$ copies/mL 범위의 30검체에서 음성결과를 나타낸 것은 RealArt법 2개, nested PCR법 11개였으며, 음성 10검체 중 9개가 $7 \sim 1,260$ copies/mL 범위를 나타낸 반면, nested PCR에서는 1개만이 양성결과를 나타내었다.

2) HBeAg과 항바이러스제 치료와 관련된 혈청 내 HBV DNA 농도 분포: A군(치료-, HBeAg+), B군(치료-, HBeAg-), C군(치료+, HBeAg+), D군(치료+, HBeAg-)에서 중앙값 및 범위는 각각 6.3×10^7 (not detectable- 1.5×10^{10}), 3.1×10^3 (not detectable- 6.6×10^9), 2.9×10^5 (not detectable- 6.7×10^9), 3.6×10^3 (not detectable- 7.6×10^8) copies/mL이었으며, 10^5 copies/mL 미만을 나타내는 경우는 A군 9.0% (미검출 1.1% 포함), B군 83.4% (미검출 18.1% 포함), C군 43.7% (미검출 6.7% 포함), D군 78.8% (미검출 19.8% 포함)를 차지하였다(Fig. 5).

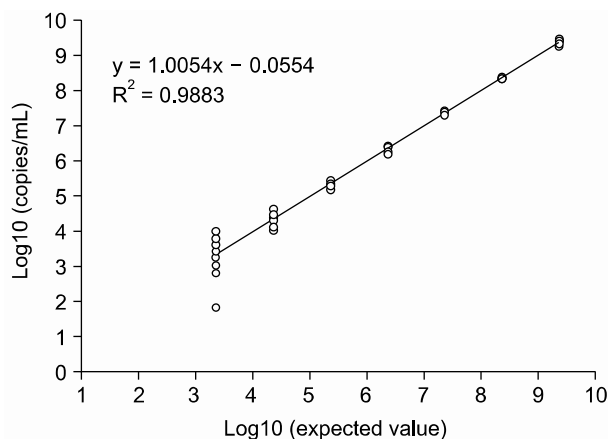


Fig. 2. Linear range. The straight line (log-log regression) was determined by a linear regression of the log10 calculated concentrations with the log10 nominal concentrations of ten-fold dilution series of a high-titer HBV DNA (2.3×10^9 copies/mL) samples analyzed by RealArt test.

고 찰

근래에 HBV에 대한 경구용 치료제가 널리 사용됨에 따라, HBV의 정량검사는 HBV 관리에 필수적인 방법이 되었다[3,4]. HBV는 혈청농도가 10^{10} copies/mL 이상에 이를 수 있으며, 라미부딘 치료 후 200 copies/mL 이하에서도 환자의 8.3%에서 내성 변이종이 검출되고, 1.0 log 이상 농도가 증가한 경우를 내성 출현(viral breakthrough)으로 정의함에 따라, $10^2 \sim 10^{10}$ copies/mL 범위의 직선구간과 예민도를 갖춘 검사방법이 이상적이다[1,3,5]. 일반적으로, 신호증폭 원리를 사용하는 HBV 정량방법은 고농도까지 직선성이 유지되지만, 10^5 copies/mL 미만에서 예민도가 감소되는 점이 보완되고 있다[6]. 한편, 핵산증폭 원리를 이용하는 Amplicor법은 $200 \sim 10^5$ copies/mL 범위의 낮은 농도에서도 예민하고 직선성이 유지되지만, 10^6 copies/mL 이상에서는 희석검체를 사용하여야 정량이 가능한데, 2~3개월 간격으로 반복 검사하여야 하므로 매우 비효율적이다[8,10]. 최

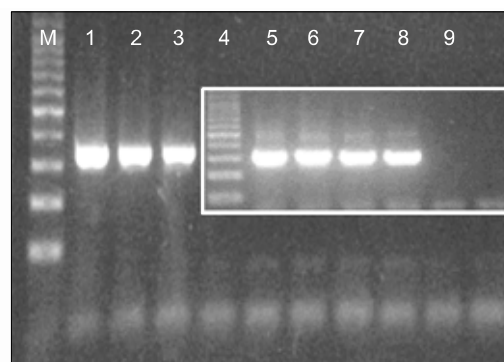
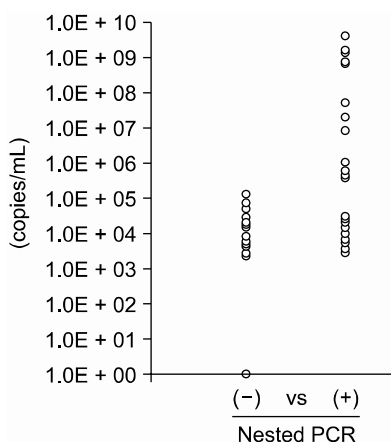


Fig. 3. Comparison of sensitivity of RealArt and nested PCR, using 37 patients' sera and 9 ten-fold dilution series of a high-titer HBV DNA (2.3×10^9 copies/mL) samples. Left: 16 negative sera, 21 positive sera. Right: M, 100 bp size marker; from lane 1 to lane 9, levels from 10^9 to 10^1 copies/mL; N, negative control; insert reveals amplicon of secondary PCR.

근에 사용되고 있는 real-time PCR 원리를 이용한 방법들은 $10^2 \sim 10^9$ copies/mL 구간에 이르는 예민도와 직선성을 나타내어, 기존의 정량법 중에서는 가장 우수하다[8,12]. Lindh 등은 HBeAg (+) 환자의 86%가 10^7 copies/mL, HBeAg (-) 환자는 평균 $10^{4.5}$ copies/mL이라고 보고하였는데, 본 연구에서 치료력 없는 HBeAg (+) 환자에서 평균 4.6×10^8 copies/mL (중앙값 6.3×10^7 , 범위: not detectable- 1.5×10^{10})이고, 치료 중 HBeAg (-) 환자는 7.1×10^6 copies/mL (중앙값 3.6×10^3 , 범위: not detectable - 7.6×10^8)이었음에 미루어 real-time PCR법을 이용한 HBV 정량검사가 HBV 관리에 효율적이며, 아울러 경제적인 것으로 생각되었다[13].

Stelzl 등과 Hui 등은 RealArt 시약의 직선구간이 $5.4 \times 10^1 \sim 3.6 \times 10^9$ copies/mL이었으며, $10^1 \sim 10^4$ copies/mL 범위 검체에서 RealArt법은 82.5%를 검출하여, real-time PCR 원리를 이용하는 Molecular Beacon 방법의 43.9%보다 예민함을 보고하였다[8,11]. 계대희석한 고농도 핵산검체를 측정본 연구에서, 2.3×10^3 copies/mL 검체 22개에서 1개만이 560 copies/mL이었

고, 21개가 $2.0 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$ copies/mL 범위에 분포하였으며, 2.3×10^9 copies/mL까지 농도가 증가할수록 측정치가 밀집되는 결과를 나타내어, RealArt법의 직선성은 최소한 $5.0 \times 10^3 \sim 10^9$ copies/mL 구간에서는 유지될 것으로 추정되었고, 그 이상의 고농도로도 연장될 것으로 생각되었다. 본 연구에서 nested PCR법의 예민도는 2.3×10^2 copies/mL이었는데, RealArt법으로 $10^3 \sim 10^5$ copies/mL 범위를 나타낸 37 DNA 검체에서 nested PCR 방법은 21검체(56.8%)에서만 양성하였고, Amplicor법에 $10^0 \sim 10^4$ copies/mL 범위의 30 혈청에서, RealArt법 2개, nested PCR법은 11개에서 음성인 반면, Amplicor법에 음성 혈청 10개 중 RealArt법에 9개가 $7 \sim 1,260$ copies/mL 범위였으며, nested PCR법에서는 1개만이 양성되었음에 미루어, RealArt법의 예민도가 높음을 관찰할 수 있었다. 하지만, Amplicor법에 의하여 음성이었던 혈청이 모두 HBV 정량검사가 의뢰된 환자검체였다 할지라도, RealArt법에 의한 위양성의 가능성이 존재하므로 판독에 유의하여야 할 것으로 생각되었다. 역으로, 본 연구에서 RealArt 방법의 직선성을 조사하는 과정에서 기대치 2.3×10^2 copies/mL 농도에서는 HBV가 검출되지 않는 경우가 상당수 발생하였던 점에 미루어 10^2 copies/mL 농도에서의 해석에 주의하여야 할 것으로 생각되었다.

한편, RealArt법은 Amplicor법과는 $y=0.9211x+0.607$ ($R^2=0.7801$)의 좋은 상관성을 나타내었다. 특기할 점은, DNA 검체에서는 10^9 copies/mL까지 농도가 증가할수록 측정치가 밀집되고 직선성이 좋아지는 경향이었는데, 혈청에서는 2.5×10^6 copies/mL 이상에서 기대치보다 다소 높은 쪽에 분포되었으나, 2.5×10^9 copies/mL에서는 오히려 낮게 측정되어, 혈청에서 DNA를 추출하는 방법에 의한 영향일 것으로 생각되었다. Read는 핵산의 추출방법에 따라 HBV 정량에서 최소 24% 차이를 관찰하였으며, 5가지 추출방법 중에서 본 연구에서 사용한 high pure viral nucleic acid (HPVA) 방법이 추출률이 상대적으로 100%에 근접함을 보고하였다[14]. 최근에는 핵산 추출과정에 의한 변동과 작업량을 최소화하기 위하여 자동화가

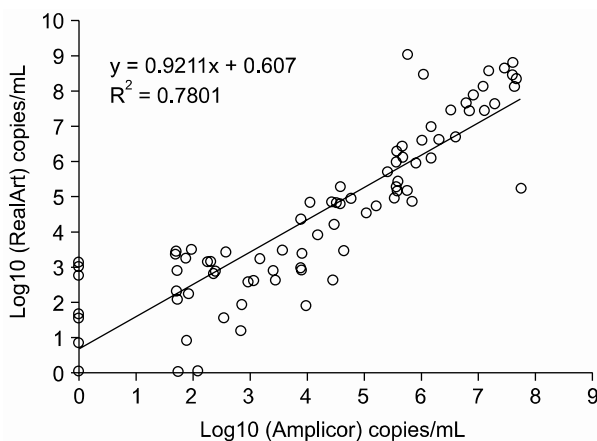
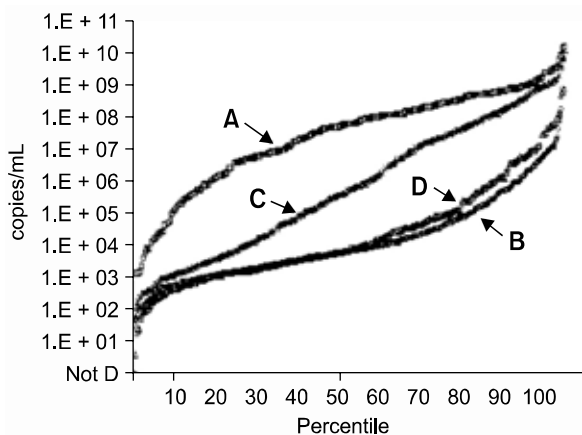


Fig. 4. Correlation between viral load measurements for HBV DNA (N=80) by RealArt and Amplicor methods.



Percentage			
A	B	C	D
0.8	0.0	0.0	0.0
8.0	0.2	3.4	0.0
36.0	0.5	13.3	1.2
21.2	1.8	15.6	4.0
16.3	5.5	10.1	7.2
8.7	8.6	14.0	8.9
4.5	16.5	12.9	15.6
3.4	35.5	17.2	30.3
0.0	12.6	6.4	11.0
0.0	0.7	0.5	1.9
0.0	0.0	0.0	0.2
1.1	18.1	6.7	19.8

Fig. 5. Distribution of HBV concentration according to status of HBeAg and antiviral treatment (group A, HBeAg [+] and no treatment, 264 samples; group B, HBeAg [-] and no treatment, 547 samples; group C, HBeAg [+] and treatment, 565 samples; and group D, HBeAg [-] and treatment, 429 samples).

시도되고 있다[8,12].

본 연구의 초기 실험물질에 의한 검사 간 및 검사 내 Ct 값의 CV는 $10^3 \sim 10^9$ copies/mL 수준에서 모두 5% 미만의 높은 재현성을 나타내었다. 또한, 농도값의 CV는 $10^5 \sim 10^9$ copies/mL 수준에서 15% 미만, 10^4 copies/mL에서는 39.7%로써 다른 HBV 정량법과 유사하거나 좋은 성적이었으나, 10^3 copies/mL 수준에서 검사 간 CV값은 78.1%로 높게 관찰되어, 검사 시약 및 원리의 차이보다는 핵산추출 방법과 기술적인 요인에 의한 영향이 클 것으로 생각되었다[7-12]. 즉, Stelzl 등이 자동 핵산 추출과정을 거친 $10^3 \sim 10^9$ copies/mL 농도의 검체에서 RealArt법을 사용하였을 때, 검사 간 CV값은 농도와 관계없이 16~73% 범위 및 10^4 과 10^3 copies/mL 수준에서 각각 45%, 38%였는데 비하여, 수작업으로 핵산을 추출한 본 연구에서는 $10^5 \sim 10^9$ copies/mL 농도에서 15% 미만 및 각각 39.7%와 78.1%였다[8].

한편, 실제 환자검체를 측정한 2년 동안의 정도관리물질의 CV 값은 10^6 , 10^5 , 10^4 copies/mL 수준에서 각각 20.0%, 40.8%, 63.0%로써, 농도가 낮을수록 CV값이 증가되었는데, 정도관리물질의 제조 과정에서의 영향과 피펫팅 과정에 주의하여야 할 것으로 생각되었다. 즉, 연구기간 동안 5번 정도관리 물질이 교체된 10^4 copies/mL 물질은 제조 물질에 따라 39.6~89.8% 범위의 차이가 관찰되어 제조 및 보관 과정에서의 영향으로 생각되었다. 또한, 정도관리 물질과 표준물질의 CV 변화가 저농도일수록 증가되는 현상은 피펫팅 과정의 영향일 것으로 판단되었으며, 10^3 copies/mL 수준에서는 검사간 변이폭이 1 log 이상이므로 내성의 판정에 주의하여야 할 것으로 생각되었다.

이상의 결과로, HBV 정량에 real-time PCR 원리를 이용한 RealArt 시약은 재현성, 예민도, 직선구간 및 타 검사와의 높은 상관성을 나타내고 있어, HBV 감염 진단과 치료경과의 추적 및 재발 판정에 적절할 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참 고 문 헌

1. Seeger C and Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64:51-68.
2. Byun KS. Recent epidemiologic changes of acute and chronic hepatitis in Korea. J Korean Med Assoc 2005;48:423-7.
3. Kim YS. Monitoring patients with chronic HBV infection during antiviral therapy. Korean J Hepatol 2005;11:9-12.
4. Osborn MK and Lok AS. Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. J Antimicrob Chemother 2006;57:1030-4.
5. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. Hepatology 2001;34:785-91.
6. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. J Hepatol 2006;44:S71-6.
7. Niesters HG, Park DS, Lee YJ, Cho JH, Lappalainen M, Chae JS. Hepatitis B virus DNA assay using the TaqMan PCR system. Korean J Lab Med 2002;22:325-30.
8. Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by automated sample preparation and real-time PCR. J Clin Microbiol 2004;42:2445-9.
9. 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.
10. Sum SS, Wong DK, Yuen JC, Lai CL, Yuen MF. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. J Med Virol 2005;77:486-90.
11. Hui CK, Bowden S, Zhang HY, Wong A, Lewin S, Rousseau F, et al. Comparison of real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy. J Clin Microbiol 2006;44:2983-7.
12. Hochberger S, Althof D, Gallegos de Schrott R, Nachbaur N, Rock H, Leying H. Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. J Clin Virol 2006;35:373-80.
13. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. J Viral Hepat 2000;7:258-67.
14. Read SJ. Recovery efficiencies on nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler PCR. Mol Pathol 2001;54:86-90.

=국문초록=

B형 간염 바이러스 실시간 정량법(RealArt HBV LC PCR)의 평가

원광대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ⁵병리학교실, ⁶내과학교실, ²원광의과학연구소,
³원광임상의학연구센터, ⁴전북대학교 의과대학 진단검사의학교실

조지현^{1,2,3}, 이해수⁴, 이기은^{1,2}, 박도심^{1,2,3}, 이영진^{1,2,3}, 문형배^{2,3,5}, 최창수^{2,3,6}, 조은영^{2,3,6}, 김학철^{2,3,6}

배경: 경구용 B형 간염 바이러스 치료제가 널리 사용됨에 따라 혈중 HBV 정량은 환자의 진단과 치료에 필수적이며, 최근 real-time PCR법은 $10^2 \sim 10^9$ copies/mL 구간에 이르는 직선성과 예민도를 나타내어 사용이 증가되고 있다.

방법: RealArt HBV LC PCR Reagents (Artus GmbH, Hamburg, Germany)의 성능(재현성, 직선구간 및 예민도) 및 COBAS AMPLICOR HBV MONITOR Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)와의 상관성, HBeAg과 항바이러스제 치료와 관련된 환자 혈청 내 HBV DNA 농도의 분포를 조사하였다.

결과: RealArt법은 농도에 따라 검사 내 및 검사 간 변이가 10^4 copies/mL에서 각각 18.1%, 73.2%, 10^3 copies/mL에서 39.7%, 78.1% 및 $10^5 \sim 10^9$ copies/mL에서 <10%, <15%였으며, 직선구간 $5 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^9$ copies/mL, Amplicor법과 상관관계 $y=0.9211x+0.607$ ($R^2=0.7801$, $P<0.001$)이었으며, 치료력이 없는 검체에서 중앙값 농도는 HBeAg (+) 검체 6.3×10^7 copies/mL 및 HBeAg (-) 검체 3.1×10^3 copies/mL였다.

결론: Real-time PCR 원리를 이용한 RealArt HBV 정량 방법은 직선구간, 예민도 및 재현성에서 B형 간염의 관리에 적절할 것으로 생각한다. [대한임상미생물학회지 2007;10:25-31]

교신저자 : 김학철, 570-711, 전북 익산시 신용동 344-2
 원광대학교병원 내과
 Tel: 063-850-1069, Fax: 063-855-2055
 E-mail: kimpb@wonkwang.ac.kr