

# Performance Evaluation of TaqMan Probe Method for BK Virus DNA Quantification by Real-time Polymerase Chain Reaction

Hee Young Chung, M.D.<sup>1</sup>, Yoo Li Kim, Ph.D.<sup>2</sup>, Kyung Ah Hwang, Ph.D.<sup>2</sup>, Byung Hoo Choi, M.T.<sup>1</sup>,  
Sook Ja Park, M.T.<sup>1</sup>, Heung Sup Sung, M.D.<sup>1</sup>, Mi-Na Kim, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center,

<sup>2</sup>BioSewoom Institutue Bioscience and Biotechnology, Seoul, Korea

**Background:** We evaluated the performance of a newly developed real-time polymerase chain reaction (PCR) method using TaqMan probe (TP) and internal control (IC) for quantitation of BK virus (BKV) DNA.

**Methods:** PCR primers and TP were targeted for the VP1 of BKV and 300 bp-region of VP1 was cloned to prepare a standard DNA. Threshold cycles (Ct) of IC was set at 33±3. The recovery rates, precision, linearity, and limit of detection (LOD) were measured using the standard DNA. To correlate TP with previous hybridization probe (HP) method, Ct of those were compared using 35 HP-positive and 15 HP-negative specimens, and the interpretation agreement was analyzed in 63 consecutive clinical specimens including 32 urines and 31 plasmas. Fifty-three specimens measured for IC were analyzed for positive rates and levels of BKV according to Ct of IC.

**Results:** The average recovery rate was 101.1% and intra-assay and inter-assay coefficient variations were 0.017~0.059 and 0.036, respectively, with the specimens of 3 log/mL, and 0.041~0.063 and 0.045, re-

spectively, with the specimens of 6 log/mL. LOD was 183 copies/mL and linearity range was 2.7 log- 12 log/mL. Ct of TP were correlated with those of HP with the function of  $y=0.8912x+0.3164$  ( $R^2=0.9062$ ). Among 63 clinical specimens, 16 were positive in TP and 12 were positive in HP with an agreement of 90.4%. Ct of IC were over 36 in 31 specimens (22 urines and 9 plasmas), of which BKV DNA was much higher in 7 (22.5%) BKV-positive specimens ( $5.9\pm 1.7$  log/mL) than in 4 (18.1%) BKV-positive specimens ( $3.9\pm 1.0$  log/mL) of 22 having Ct of IC  $\leq 36$ ;  $5.9\pm 1.7$  vs.  $3.9\pm 1.0$  log/mL.

**Conclusion:** TP warrants to be a reliable method for quantification of BKV. IC seemed to be essential to differentiate false-negative results or underestimation of BKV in clinical specimens, especially in urine. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:77-83)

**Key Words:** BK virus, Quantitation, Real-time Polymerase chain reaction, Internal control

## 서 론

BK 바이러스(BKV)는 1971년 신장이식 환자의 소변에서 처음 동정된 폴리오마 바이러스로서 5,300 bp의 이중나선 DNA를 가진, 비피막성 바이러스이다[1]. BKV 일차 감염은 2~5세에 주로 호흡기를 통해 일어나며 대개는 바이러스노 외에 특별한 증상이 없고, 신장, 뇌, B 림프구 등에 잠복하게 된다[1]. 임신부, 항암 치료를 받는 암 환자, 후천성 면역 결핍증 환자, 장기이식환자 등 면역 부전 시 바이러스가 재활성화되어 BKV에 의한 질병을 일으킬 수 있다[1]. 신장이식 환자에서 요세관간질성 신염을 특징으로 하는 BKV신증과 조혈모세포이식 환자의

출혈성방광염이 대표적이다[1]. 신이식 또는 골수이식 환자의 혈액이나 소변에서 BKV DNA 농도를 주기적으로 모니터링함으로써 BKV신증과 출혈성방광염의 발생을 조기진단하고, 치료 효과를 판정하는 데 사용된다[2,3]. BKV DNA 정량에는 실시간 증합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR) 검사가 주로 이용되며, 아직까지 진단용 검사로서 FDA 승인을 받은 제품은 없고[4] TaqMan probe, SybrGreen, hybridization probe 등을 이용하여 자가제조한 실시간 PCR 검사가 이루어지고 있다.

저자들은 hybridization probe (HP)법을 이용한 실시간 PCR법을 이용해 왔으나, 소변 검체에서 위음성이 의심되어서, 이를 감지할 수 있는 내부보정물질(internal control, IC)이 포함된 검사법이 필요하였다. IC를 포함한 TaqMan probe (TP)법에 의한 실시간 PCR법을 고안하였고, 진단용 검사로서 사용하기 위해 수행능을 평가하고자 하였다.

Received 6 August, 2007, Accepted 20 September, 2007

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, 388-1, Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

## 재료 및 방법

### 1. 검체

임상검체는 소변과 EDTA 혈액의 혈장을 이용하여 검사하였다. 혈장과 소변 200  $\mu$ L에서 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 핵산을 추출하여, 총 40  $\mu$ L의 DNA 용액을 얻었다. 이중 5  $\mu$ L를 PCR에 사용하여 희석배수는 40이었다.

### 2. 검사법

HP법에 사용하는 시약은 TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) 사에 BKV의 Large T 항원부위를 목표로 하여 주문제작한 소식자와 시발체를 사용하였다[5]. LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, India)를 사용하여 실시간 PCR을 실시하고, 45회차까지 결과를 모니터링하였다. TP법은 바이오세움(Seoul, Korea)사에 BKV VP-1 부위를 증폭하는 시발체와 TaqMan 소식자를 주문제작하여 사용하였다. Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하여 40회차까지 PCR을 실시하였다. BKV DNA 표준물질을 얻기 위해 HP법에서는 BKV Dunlop strain의 BKV 전체 게놈이 삽입된 pBKV (34-2) 플라스미드 DNA (ATCC 45025)를 *Escherichia coli*에 클로닝하여 사용하였다. DNA 농도를 측정할 후 바이러스 DNA copy수로 치환하여 계대희석하여 보정물질을 제작하였다. TP법에서는 BKV ATCC 45025의 VP-1 부위 300 bp를 pGEM/T 플라스미드에 클로닝하였다. 각각의 DNA 표준물질의 농도를 측정하기 위해, 클로닝한 플라스미드를 순수분리한 다음 비색광도계로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 목표 DNA의 농도를 copy/mL로 치환하여 사용하였다. TP법에서는 바이오세움사에서 제작한 IC를 핵산추출한 검체에 첨가하여 한 시험관에서 검사하였다. BKV DNA는 VIC 형광표지자를 IC는 FAM 형광표지자를 부착하여 별도의 형광채널에서 검출하고 내부대조물질의 역치값 (threshold cycle, Ct)의 범위가  $33 \pm 3$  cycle 이내에 드는 것을 확인하였다. 또한 매 반응마다 PCR의 오염을 확인하기 위해 증류수를 사용한 음성대조군에서 음성의 결과가 나오는지 확인하였다. DNA 표준물질을 계대희석하여 측정된 Ct값으로 보정곡선을 얻고 검체의 Ct값을 이 직선에 대입하여 검체의 BKV DNA를 copy/mL 또는 log/mL로 계산하였다. 바이오세움사는 PCR 시발체와 TP법의 소식자, IC, IC를 위한 시발체와 TP법 소식자의 염기서열을 공개하지 않았다.

### 3. BK 바이러스 DNA 표준물질의 회수율 평가

BKV DNA 표준물질을 500 copies/mL과  $10^3$  copies/mL부터  $10^{12}$  copies/mL까지는 10배수씩 증류수로 계대희석한 11개 농도를 포함하여 총 12개 농도에서 각 농도별 3회 반복 측정 후

예측치와 비교하였다.

### 4. 검출 한계 평가

BKV DNA 표준물질을 증류수로 희석하여  $10^4$  copies/mL,  $5 \times 10^3$  copies/mL,  $10^3$  copies/mL, 500 copies/mL, 350 copies/mL, 200 copies/mL, 100 copies/mL 농도의 희석액을 만들어 사용하였다. 각 농도당 150회 반복 검사를 실시하였다.

### 5. 특이도 평가

ACCURUN HCV RNA performance panels (Boston Biomedica Inc., MA, USA) 10개, ACCURUN HIV-1 RNA performance panels (Boston Biomedica Inc.) 8개, 그리고 ACCURUN HSV performance panels (Boston Biomedica Inc.) 2개 등 총 20개 양성혈청을 이용하여 동일조건에서 TP법을 시행하고 교차반응 여부를 확인하였다.

### 6. 정밀도 평가

$10^3$ ,  $10^6$  copies/mL 농도로 희석한 BKV DNA 표준물질을 사용하여 하루에 한번 일괄로 5회씩 반복측정하고, 6일 동안 6번의 일괄검사를 실시하여 일괄검사 내(intra-assay), 일괄검사 간(inter-assay) 정밀도를 평가하였다.

### 7. 직선성 평가

NCCLS EP-6에 따라 BKV DNA 표준물질을 검출한계 농도와 500 copies/mL와  $10^3$  copies/mL부터  $10^{12}$  copies/mL까지 농도 범위에서 10배수씩 연속 희석한 11개의 농도를 포함하여 총 12개 농도에 대해 8회씩 반복측정하여, 이상치를 제거하고 평균하여 직선성을 평가하였다.

### 8. Hybridization probe법과의 상관성 비교

HP법과의 상관성을 구하기 위해 HP법에서 양성인 35 검체와 음성인 15검체를 선택하여 TP법으로 검사를 실시한 후 두 검사의 Ct값을 선형회귀모델을 이용하여 검사 간 상관성을 평가하였다.

또한 2006년 12월부터 2007년 1월 사이에 BKV DNA 정량 검사가 의뢰된 63검체(혈장 31검체, 소변 32검체)를 이용하여 두 검사의 양성판독 결과를 비교하였다. 63검체 중 TP법에서 IC 값을 측정된 53검체에서 Ct 값이 36 이하인 그룹과 초과한 그룹으로 나누어 양성률과 양성검체에서 BKV DNA 농도를 비교하였다.

TP법과 HP법의 표준화를 위해 BKV DNA 전체 게놈을 희석하여  $1.75 \times 10^7$ /mL,  $1.75 \times 10^5$ /mL,  $1.75 \times 10^3$ /mL,  $1.75 \times 10^2$ /mL,  $1.75 \times 10^1$ /mL 농도의 다섯가지 표준물질을 제작하였다. HP법과 TP법으로 동시에 표준물질을 검사하여 예측치와 측정치를 선형회귀분석하였다.

9. 통계분석

최소 검출 농도는 probit 분석을 통하여 95% 신뢰수준에서 예측하였고, 분석에 이용한 통계소프트웨어는 StatsDirect (StatsDirect Ltd, Cheshire, UK)이었다. 직선성과 검사간 상관성을 평가하기 위해 선형회귀분석을 시행하였다. 통계소프트웨어는 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., IL, USA)를 이용하였다.

결 과

1. BK virus DNA 표준물질의 회수율 평가

10<sup>2.7</sup> copies/mL과 10<sup>3</sup> copies/mL부터 10<sup>12</sup> copies/mL까지의 농도에서 11개의 표준물질의 기대치에 대한 관측치의 평균 회수율은 101.1%이었다(Fig. 1).

2. 검출한계

BKV 표준물질 농도 10<sup>4</sup> copies/mL에서 350 copies/mL까지

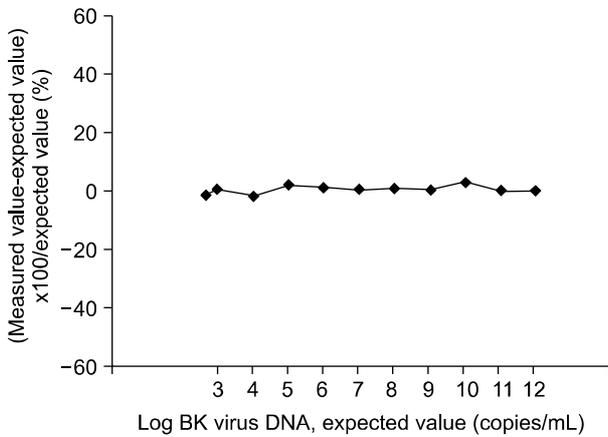


Fig. 1. Recovery rate of TaqMan probe method.

Table 1. Positive rates of 150 replicates of BK virus DNA specimens of seven concentrations for calculating the detection limit of TaqMan probe method

BK virus (copies/mL)	Replicates	Positive	%
10,000	150	150	100
5,000	150	150	100
1,000	150	150	100
500	150	150	100
350	150	150	100
200	150	140	93
100	150	120	80

양성률은 100%, 200 copies/mL의 양성률이 93%, 100 copies/mL의 양성률은 80%였다. 반복 측정된 자료를 이용한 probit 분석에서 95% 신뢰수준으로 결정되는 검출 한계는 183 copies/mL (95% confidence interval 158~232 copies/mL)이었다(Table 1).

3. 특이도

20개의 혈청 모두에서 BKV DNA가 증폭되지 않아 특이도는 100%였다.

4. 정밀도

10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> copies/mL 두 농도의 일괄검사 내 평균값은 1,093,829 ~ 1,438,000 copies/mL, 828~1,015 copies/mL의 분포를 보였고, CV는 각각 3.80~13.1%, 9.43~15.15%였으며, 일괄검사간 CV는 7.91%, 11.41%였다. 바이러스농도를 로그치환하면 일괄검사내 CV는 0.017~0.059과 0.041~0.063, 일괄검사 간 CV는 0.036과 0.045이었고, 두 농도의 Ct값에 대한 일괄검사내 CV는 0.18~0.59%, 0.69~0.99%이고 일괄검사 간 CV는 0.52%, 1.35%이었다.

5. 직선성

검출한계 농도를 제외하고 2.7 log~12 log/mL 범위에서 y=1.0101x-0.0298의 선형회귀 모델에 적합하였다(R<sup>2</sup>=0.9992). 따라서 본 검사는 500~10<sup>12</sup> copies/mL 범위에서 DNA 정량값을 보고할 수 있을 것으로 판단하였다(Fig. 2).

6. 검사법 비교

TP법과 HP법의 Ct값을 선형회귀분석하였을 때 y=0.8912x+

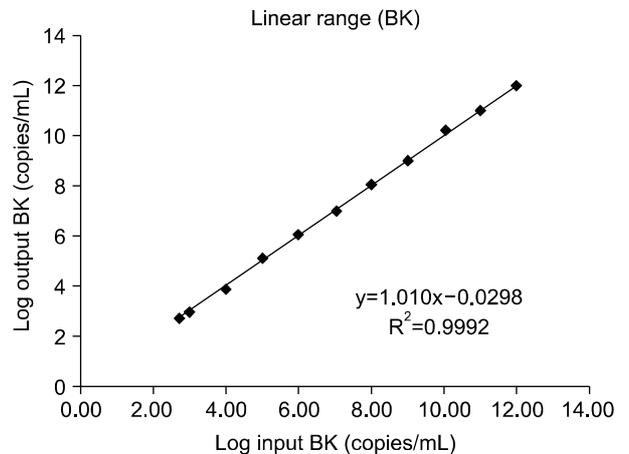
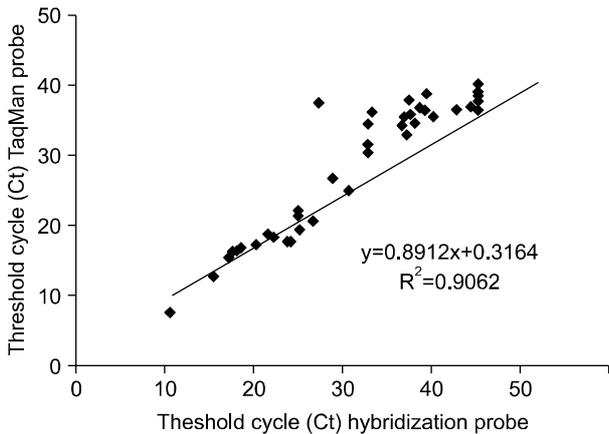


Fig. 2. Linear regression curve of TaqMan probe method. The straight line was determined by a linear regression of the estimated concentrations (input) with their measured concentrations (output) at the log<sub>10</sub> 12 nominal concentrations. Linearity was found from 500 to 10<sup>12</sup> copies/mL.



**Fig. 3.** Comparison of threshold cycles of TaqMan probe method with those of hybridization probe method in 35 positive specimens and 15 negative specimens.

**Table 2.** Comparison of TaqMan probe with hybridization probe for quantification of BK virus DNA in 63 clinical specimens

Specimens	Results of BKV detection		No.(%) of specimens
	Hybridization probe	TaqMan probe	
Plasma	Positive	Positive	5 (16.1%)
	Positive	Negative	1 (3.2%)
	Negative	Positive	4 (12.9%)
	Negative	Negative	21 (67.8%)
	Subtotal		31 (100.0%)
Urine	Positive	Positive	6 (18.7%)
	Positive	Negative	0 (0.0%)
	Negative	Positive	1 (3.1%)
	Negative	Negative	25 (78.2%)
	Subtotal		32 (100.0%)

0.3164 ( $R^2=0.9062$ )로 일차함수적 상관성을 보였다(Fig. 3). 63 개의 임상검체에서 HP법 양성인 12검체, TP법 양성인 16검체로 두 검사 간 판독 일치도는 90.4% ( $\kappa=0.726$ )이었다. 소변 검체 32개 중 HP법에서 6개, TP법에서 7개가 양성이었다, 혈장검체 31개 중 HP법에서 6개, TP법에서 9개가 양성이었다 (Table 2). TP법에서 BKV 양성률은 소변은 15.4% (4/26), 혈장은 29.6% (8/27)이었다(Table 3). TP법에서 IC 값을 측정할 53 검체 중 IC의 Ct값이 36 이상인 경우는 소변 26검체 중 22검체 (84.6%), 혈장 27검체 중 9검체(33.3%) 등 총 31검체(58.4%)로 소변에서 많았다. IC의 Ct값 36 이상으로 연장되었을 때 BKV 양성 검체는 소변 4검체, 혈장 3검체 등 총 7검체(22.5%)였고, 평균 농도는  $5.9 \pm 1.7 \log/mL$ 로,  $6 \log/mL$  이상이 4검체인데 비해, IC이 36 이하일 때 양성검체는 혈장 4검체(18.1%)로 평균

**Table 3.** Detection of BK virus DNA by TaqMan probe method according to Ct of internal control in 53 clinical specimens

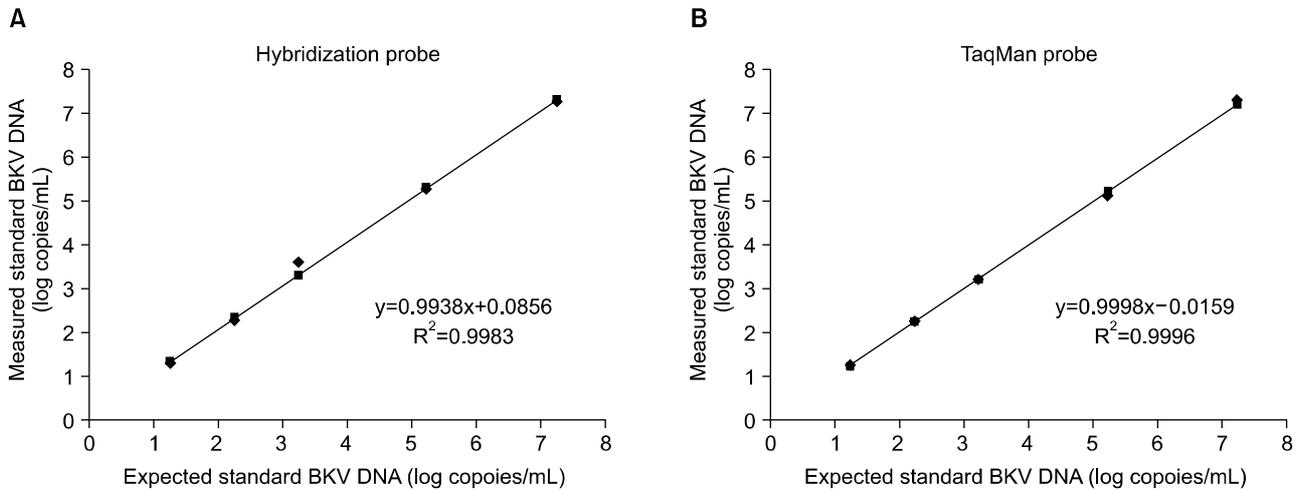
		Ct value		No. of specimen
		$\leq 36$	$> 36$	
Urine	Positive	0	4	4
	Negative	4	18	22
	Subtotal	4	22	26
Plasma	Positive	4	3	7
	Negative	14	6	20
	Subtotal	18	9	27

농도는  $3.9 \pm 1.0 \log/mL$ 이고, 모두  $6 \log/mL$  이하였다.

BKV DNA 전체 계층 표준물질을 HP법과 TP법에 동시에 검사하였을 때 측정치와 예측치의 선형회귀분석곡선은 각각  $y=0.9938x+0.0856$  ( $R^2=0.9983$ ),  $y=0.9998x-0.0159$  ( $R^2=0.9996$ )으로 서로 잘 일치하는 결과를 보였다(Fig. 4).

## 고찰

국내에서는 1990년대 말부터 BKV 감염을 진단하기 위해 BKV DNA에 대한 정성 PCR검사가 실시되었다[6,7], 골수이식 후 BKV에 의한 출혈성 방광염환자의 72.4%[6], 신장이식 후 BKV신증이 진단된 6명 중 5명에서 양성을 보였으나[7], 출혈성 방광염이 없는 골수이식환자의 31.6%[6], 118명의 신장이식 수여자 중 BKV 관련 신증이 의심되지 않았던 110명 중 22명 (20%)에서도 양성결과를 보여서[7] 두 가지 감염질환에서 정성 PCR 검사의 양성예측도가 진단용 검사로서는 낮음을 알 수 있다. 특이도가 더 높은 검사법이 요구됨에 따라 국내 여러 기관에서 BKV DNA 정량검사를 자체적으로 개발해서 사용 중이다. 하지만, Clinical Laboratory Standards Institutes는 MM6-A 지침에서 감염질환의 정량적 분자진단검사를 화학적 정량법에 준하는 엄격한 수행능 평가를 하도록 요구하고 있어서[8], 그 기준을 맞추는 것이 매우 까다로워졌다. 이 연구에서처럼 정량 검사를 새로이 시작할 때는 검출한계, 특이도, 정밀도, 직선성 평가하는데 적어도 수백 회의 반복검사가 필요하고, 일상적인 정도관리를 위해서도 두 농도 이상의 양성대조군의 정량값을 이용한 오차점검, 음성대조군에 의한 위양성 검출, 내부보정물질을 통한 위음성 검출 등이 이루어져야 한다. 하지만, 분자진단검사는 화학검사에 비해 검사건수가 비교할 수 없이 적기 때문에 검사실마다 이런 조건을 모두 만족시키는 것은 MM6에서도 인정하고 있듯이 비현실적인 경우가 많다. 따라서 검사실마다 자체적인 검사를 개발하는 것보다는 국내시약업체와 협력하여 수행능을 제대로 갖춘 검사를 개발하고, 여러 검사실에서



**Fig. 4.** Correlation of measured values to expected value of standard DNA of BKV whole genome in hybridization probe method and TaqMan probe method.

이를 이용하면 검사 시작 단계의 어려움을 해결할 수 있고, 검사의 질을 높일 수 있을 뿐 아니라, 검사실 간 표준화에도 기여할 것으로 생각된다.

본 연구에서 평가한 TP법은 실시간 PCR 원리를 사용하고 검출한계는 183 copies/mL로 이는 Si-Mohamed 등[9]과 McNees 등[10]이 보고한 100 copies/mL와 유사한 수치였다. 직선성은 2.7 log ~ 12 log/mL까지 10 log의 범위에서 유지되었다. 이는 7 log 범위에서 직선성을 유지했다는 이전 보고들에 비해 직선성 범위가 넓다[9-12]. 소변검체에서 BKV 농도는 면역억제 환자에서 BKV 재활성화로 소변에 최고 10<sup>13</sup> copies/day까지 검출되었다[13]는 보고가 있을 정도로 넓은 범위로 분포하기 때문에 한 번에 BKV 농도를 측정하려면 넓은 농도범위를 측정할 수 있는 검사가 필요하다. 또한 BKV 신증을 진단하는데 BKV DNA 농도의 cutoff 값으로 소변에서 10<sup>7</sup> copies/mL, 혈장에서 10<sup>4</sup> copies/mL 정도가 제안되고[14], 본 연구자들이 HP법을 사용할 때 cutoff 기준도 이와 유사하다[unpublished data]. 따라서 검출한계가 이들 수치를 신뢰성있게 정량할 정도로 충분히 민감하면서, 이들 cutoff 농도가 직선성 범위에 포함되어야 할 것이다. 이 연구에서 TP법은 소변과 혈장의 BKV DNA 정량에 적합한 검출한계, 직선성 범위를 가지고 있다고 생각되었다. 단, TP의 검출한계인 183 copies/mL에서 500 copies/mL까지는 직선성이 유지되지 않기 때문에 양성으로만 보고하고 DNA 정량값은 보고할 수 없을 것으로 판단하였다[8].

Human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, herpes simplex virus 등 바이러스와 교차 반응은 없었다. 그러나 BKV 같이 polyomavirus인 JC virus, SV40 virus 등과 교차 반응이 문제가 되는 바이러스나[10,15] 신장이식환자에서 신염의 주요원인인 사람 cytomegalovirus, 골수이식 후 비슷한 출혈성방광염을 일으키는 adenovirus 등 바이러스를 포함하여 특이도 검증

을 할 필요가 있다.

10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> copies/mL 두 가지 농도의 Ct값에 대한 일괄검사 내 CV는 0.18~0.59%, 0.69~0.99%이고 일괄검사 간 CV는 0.52%, 1.35%로서 이전 연구에서 BKV DNA 농도가 10~10<sup>6</sup> copies/mL 까지 10배 희석한 6개 농도의 Ct값의 일괄검사 내 CV는 0.6~1.7%, 일괄검사 간 CV는 1.1~2.3%[9]였다는 보고에 비교해보면 더 우수한 정밀도를 보인다. 이 연구에서 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> copies/mL에서 CV들이 15% 이내로 나오는 것은 바이러스 농도를 정량하는 검사에서 생물학적으로 의미있는 변화를 볼 때 10배수씩 차이가 나야 한다는 점에서 로그치환값을 사용하도록 권하는 것[8]에 비추어 보면 신뢰할 만한 정밀도이다. 바이러스 정량 중 가장 평가가 많이 되어 있는 검사 중 하나인 HIV RNA 정량검사에서 통상 0.5 log (±3배)의 일괄검사 내 변이계수를 인정하는데[8] 본 연구에서는 모두 0.1 log 이하였기 때문에 바이러스 정량검사에 적합한 우수한 정밀도를 보였다.

HP법과 Ct값 비교에서는 R<sup>2</sup>=0.9062로 우수한 상관성을 보였다. y=0.8912x+0.3164로 일차 방정식에 상관성을 보여 HP법의 Ct값보다 TP법의 Ct값이 더 작고 따라서 DNA 농도가 상대적으로 높게 측정됨을 알 수 있었다. 이는 63개 임상검체의 판독 결과를 비교했을 때 TP법에서 양성검체가 많은 것과 일치한다. 두 방법에서 사용한 DNA 표준물질이 달라서 측정된 값 간에 내재적인 차이가 있을 수 있다. 하지만 표준물질인 BKV DNA 전체 게놈을 사용하여 HP법과 TP법으로 측정된 값이 예측치와 잘 일치하고, 양 검사 간의 차이가 없어서 별다른 보정 없이도 서로 결과를 비교할 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 임상검체에서 두 방법 간에 측정값과 판독에 차이가 나는 것은 검체의 matrix 효과 때문으로 생각된다. 국제적으로 인정되는 BKV DNA의 표준물질이 없기 때문에 같은 검체에 대해 검사방법 간 또는 검사실 간 정량값이 차이가 나는 것을 보정할 수 있

는 방법이 없다. 즉 검사의 정확도를 보증할 수 없기 때문에 검사실간 결과를 비교할 수 없게 된다. BKV DNA 전체 계층은 국제적인 표준물질이나 국내에서 외부정도관리를 위해 검사실 간 비교를 할 수 있는 시료를 개발하는 데 사용될 수 있을 것이다.

TP법에 의한 BKV DNA 정량 검사에 IC로 해파리 DNA 50 copies를 첨가하여 IC 양성일 때만 결과를 인정하는 방법이 보고된 바 있는데[16], 본 연구에서는 IC의 양성여부 외에 정도관리범위를 설정하여 PCR 방해물질에 의해 Ct 값이 연장되는 것을 감시하고자 하였다. 총 63 임상검체 중 TP법의 IC의 Ct값이 36 이상인 검체가 총 31개(소변 22개, 혈장 9개)로 소변검체가 두 배 이상 많았고 BKV 양성률은 소변 15.4% (4/26), 혈장 29.6% (8/27)으로 통상적으로 소변이 혈장보다 양성률이 높은 것과 상반되는 결과를 보였다. IC 값이 연장되는 이유로는 목표하는 BKV DNA 농도가 매우 높을 때 IC과 목표 DNA가 경쟁하여 IC의 Ct 값이 연장되는 경우와 PCR 방해물질의 존재를 생각할 수 있다. IC가 36 이하일 때 양성인 4검체는 3.9±1.0 log/mL인데 비해 IC이 36 이상이면서 BKV 양성인 7검체 중 4검체는 6 log/mL 이상으로 월등히 농도가 높았기 때문에 이들에서는 BKV DNA 농도가 높아 경쟁에 의해 Ct 값이 연장되었을 가능성을 생각할 수 있다. 하지만 IC 36을 초과한 31검체 중 23검체가 BKV DNA 음성이었기 때문에 Ct 값이 연장된 경우 대부분 높은 농도의 목표 DNA 외의 PCR 방해물질이 작용했을 것으로 판단되었다. 특히 소변은 84.6% (22/26)에서 IC의 Ct 값이 연장되어 있어서 소변검체에 PCR 방해물질이 많음을 알 수 있고, 이는 소변이 혈장보다 BKV DNA 양성률이 낮은 이유가 PCR 방해물질에 의한 위음성때문일 가능성을 시사한다. 따라서 임상검체 특히 소변에서는 위음성을 감별하기 위해 BKV DNA 정량 PCR 검사법에 IC를 반드시 포함시킬 필요가 있다. 하지만 이 연구를 마치고 TP법을 정규검사로 적용하였을 때 결과를 검토해보니 IC이 36 이상이 소변 95검체 중 12검체 (12.6%), 혈장 95검체 중 6검체(6.3%)로 감소하면서, 소변과 혈장 양성률 또한 각각 31.6%, 20.0%로 소변검체의 양성률이 더 높아져서(unpublished data) 새로운 검사에 익숙해지기 전 연구를 수행함으로써 PCR 방해물질이 과도하게 영향을 주었을 가능성이 있다. IC을 포함시켜서 위음성 또는 농도가 낮게 측정되는 검사 오류를 인지한 경우 다음 단계로 PCR 방해물질을 제거하는 추후조치가 필요하다. 실시간 nested PCR로 Nipah virus를 검출한 한 연구에서는 53 소변검체 중 37검체가 IC 음성이어서 1:5로 희석 후 재검하였더니 이 중 22검체에서 IC이 양성으로 전환되었다고 보고했다[17]. 본 연구에서처럼 IC의 양성 여부 외에 Ct 값의 정도관리범위를 설정하여 정도관리에 이용하면 검사의 질을 더 높일 수 있을 것이다. IC이 음성일 때 또는 IC이 연장될 때 검체를 희석하거나 새로운 검체로 재검하는 등 PCR 방해작용을 극복할 방법에 대한 추가적 연구가 필요하다.

결론적으로 본 연구를 통하여 평가된 TP법은 회수율, 검출한계, 직선성, 특이도, 정밀도 등 수행능이 우수하였고, IC이 포함되어 있어서 위음성을 감시할 수 있었다. BK virus DNA 정량을 이용한 BK 바이러스 신증의 조기 진단이나 추적검사에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Hirsch HH and Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003;3:611-23.
- Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1176-80.
- Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang RH, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:1971-8.
- U.S. Department of health and human service. U.S. food and drug administration. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfTopic/consumer/index.cfm>[online] (Updated on July 2007).
- Herman J, Van Ranst M, Snoeck R, Beuselinck K, Lerut E, Van Damme-Lombaerts R. Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatr Transplant* 2004;8:485-92.
- Park MJ, Kang HJ, Shin DH, Lee KM, Lee DG, Choi JH, et al. Association of polyomaviruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:570-5.
- Lee WH, Kim BS, Jeong HJ, Kim YS, Kim HS. BK virus detection by polymerase chain reaction in renal transplant recipients and healthy donors. *Korean J Lab Med* 2003;23:263-7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quantitative molecular methods for infectious diseases. MM6-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
- Si-Mohamed A, Goff JL, Désiré N, Maylin S, Glotz D, Bélec L. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients. *J Virol Methods* 2006;131:21-7.
- McNees AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol* 2005;34:52-62.
- Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002;2:25-30.
- Sehban L, Kabamba-Mukadi B, Vandenbroucke AT, Bodéus M, Goubau P. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by LightCycler real-time PCR. *J Clin Virol* 2006;36:159-62.
- Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang RH, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:1971-8.
- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005;79:1277-86.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Basakova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed

- pediatric patients. J Clin Microbiol 2004;42:5189-98.
16. Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS, Ferrenberg J, Huang ML, Davis CL, et al. Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. J Infect Dis 2001;183:1669-72.
17. Wacharapluesadee S and Hemachudha T. Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. J Virol Methods 2007;141:97-101.

=국문초록=

## BK 바이러스 DNA 정량을 위한 TaqMan Probe법 실시간 중합효소연쇄반응법의 수행능 평가

<sup>1</sup>울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과, <sup>2</sup>바이오세움 생명공학연구소

정희영<sup>1</sup>, 김유리<sup>2</sup>, 황경아<sup>2</sup>, 최병후<sup>1</sup>, 박숙자<sup>1</sup>, 성홍섭<sup>1</sup>, 김미나<sup>1</sup>

**배경:** BK 바이러스(BKV) DNA 정량 중합효소연쇄반응법(PCR) 검사를 위해 저자들은 내부보정물질(internal control, IC)이 포함된 TaqMan probe (TP)법을 사용한 실시간 PCR을 고안하여 수행능을 평가하였다.

**방법:** PCR 시발체와 TP법은 BKV VP-1 부위를 목표로 하였고, VP-1 부위를 클로닝한 플라스미드 DNA를 표준물질로 사용하여 TP법의 회수율, 정밀도, 검출한계, 직선성이 유지되는 보고범위를 분석하였다. TP법에는 IC를 역치값(threshold cycle, Ct)이 33±3이 나오도록 포함되었다. 기존의 hybridization probe (HP)법 검사와 상관성을 구하기 위해 HP법 양성 35 검체와 음성 15검체를 선택하여 두 검사의 Ct값을 비교하였고, 63 임상검체(혈장 31검체, 소변 32검체)를 이용하여 두 검사의 판독 결과를 비교하였다. 63검체 중 IC 값을 측정한 53검체에서 IC의 Ct 값에 따른 양성률과 양성검체의 농도를 비교하였다.

**결과:** 회수율은 101.1%였으며, 3 log/mL 검체의 변이계수는 일괄검사 내 0.017~0.059, 일괄검사 간 0.036이었고 6 log/mL 검체의 변이계수는 각각 0.041~0.063, 0.045였다. 검출한계는 183 copies/mL, 보고범위는 2.7 log~12 log/mL이었다. TP법과 HP법의 Ct값을 선형회귀분석하였을 때  $y=0.8912x+0.3164$  ( $R^2=0.9964$ )로 일차함수적 상관성을 보였다. 63개의 임상검체에서 TP법 양성이 16검체, HP법 양성이 12검체로 두 검사간 판독 일치도는 90.4%였다. IC의 Ct 값이 36 이상은 소변 22개, 혈액 9개였다. IC의 Ct 값이 36 이상으로 연장되었을 때 양성은 7검체(22.5%)였고 이들의 평균농도는  $5.9\pm 1.7$  log/mL으로 IC의 Ct가 36 이하인 22개 중 BKV 양성인 4검체(18.1%)의 평균농도  $3.9\pm 1.0$  log/mL보다 높았다.

**결론:** TP법은 BKV 정량검사법으로 우수한 수행능을 보였다. 임상검체 특히 소변검체에서 PCR 방해물질이 존재하는 경우가 많아서 IC은 위음성과 농도가 저평가되는 경우를 판별하는 데 필수적이었다. [대한임상미생물학회지 2007; 10:77-83]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 풍납 2동 388-1  
서울아산병원 진단검사의학과  
Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884  
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr