

Evaluation of the Real-Q HCV Quantification Kit

Young-Sook Cho¹, Young-Hoon Kim¹, Kyung-Hee Lee¹, Hye-Sun Jang¹,
Kyung-Ah Hwang¹, Yoo-Li Kim², Hyun-Young Chi¹

¹Samkwang Medical Laboratories, ²Biosewoom Institute of Bioscience & Biotechnology, Seoul, Korea

Background: Hepatitis C virus (HCV) RNA quantification is necessary for predicting the therapeutic response and assessing treatment results in patients with chronic HCV infection. Recently, real-time PCR technology for HCV RNA quantification displayed good linearity within the dynamic range. Thus, it is gradually replacing branched-DNA (bDNA) and PCR-hybridization assays. In this study, we evaluated the performance of the Real-Q™ HCV quantification kit (biosewoom. Inc., Seoul, Korea) developed in Korea.

Methods: We evaluated the HCV quantification kit for detection limit, specificity, linearity, accuracy, and recovery rate of HCV RNA standard material. The results were analyzed for a correlation with those of Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0.

Results: The HCV quantification kit showed a high recovery rate of HCV RNA standard material of various concentrations and amplification of HCV RNA

equally in all genotypes. Hepatitis B virus and human immunodeficiency virus showed no cross-reactivity with HCV. Within-run and between-run coefficients of variation (CV) were 9.52~15.84% and 9.40~17.53%, respectively. Between-day coefficients of variation were 11.62~18.04%, and detection limit was 44 IU/mL. It showed a good correlation with Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 ($R^2=0.8954$).

Conclusion: The Real-Q HCV quantification kit showed a good specificity, sensitivity, linearity, and accuracy; therefore, we propose that it is fully adequate for monitoring antiviral therapy in patients with chronic HCV infection. (*Korean J Clin Microbiol* 2009;12:72-77)

Key Words: Real-time PCR, HCV RNA Quantitation, Cobas amplicor, Hepatitis C virus

서 론

C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 *flaviviridae* family에 속하는 RNA 바이러스로서 만성 간질환을 일으키는 중요한 원인이다. C형 간염의 특징은 감염자의 60~80%가 만성화되며 만성 감염자의 20% 이상이 간경변이나 간암으로 발전할 수 있다. 세계적으로 HCV의 감염률은 1~3% 정도이며 우리나라의 경우 약 1.5% 정도 되는 것으로 보고되었다[1-3].

HCV의 진단은 효소면역분석법이나 방사선면역측정법에 의한 항체 검사와 혈청 중의 바이러스 RNA를 RT-PCR이나 branched DNA법 등으로 검출하는 방법이 있다[4,5]. 혈액 내 HCV의 정량은 임상적 경과나 항바이러스 치료 후 예후 판정에 중요한 역할을 한다. 하지만 HCV는 혈액 내 매우 미미한 농도로 존재하는 경우가 많아 일반적인 효소면역법이나 방사선면역측정에 의한 정량은 불가능하기 때문에 분자생물학적 검사가 주

로 이용된다. 대표적인 검사방법으로, 혈청내의 HCV RNA의 5' untranslated region (5' UTR)과 중심부 유전자(core region)에 목표 표지자를 부착시킨 후, 고정을 위한 표지자와 증폭용 표지자를 이용하여 HCV RNA를 정량하는 방법인 branched DNA (bDNA) 법과, RNA 표준물질과 혈청 내 RNA transcript의 5' UTR을 함께 증폭시킨 후 발색반응으로 혈청 내의 HCV RNA 양을 측정하는 RT-PCR hybridization 법이 있다[5-7]. 전자는 VERSANT HCV RNA 3.0 (Bayer Corporation, Tarrytown, N.Y.), Quantiplex™ HCV RNA 2.0 Assay (Chiron Diagnostics, USA)가 대표적이고, 후자는 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA)이 대표적이다. 그런데 bDNA 법은 일반적으로 고농도의 바이러스에 대해서는 비교적 정확한 정량이 가능하지만, 민감도가 낮은 단점이 있고, RT-PCR hybridization 법은 높은 민감도를 가지고 있어 저농도(600~500,000 IU/mL)의 HCV RNA 정량은 가능하지만, 고농도에서는 직선성이 유지되지 않는 단점이 있어, 직선 범위 내에서 측정하기 위해 검체 희석을 필요로 하는 단점이 있다[4].

최근 보다 정확하고 측정가능 범위가 넓은 방법으로 실시간 정량적 역전사-중합효소연쇄반응(Real-Time RT-PCR)이 개발되어 임상에서 응용되고 있다. Real-Time RT-PCR은 기존의

Received 6 February, 2009, Revised 6 May 2009

Accepted 1 June, 2009

Correspondence: Hyun-Young Chi, Samkwang Medical Laboratories, 9-60, Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul 137-887, Korea. (Tel) 82-2-3497-5133, (Fax) 82-2-3497-5229, (E-mail) chumgang@smlab.co.kr

PCR 방법과 달리 PCR 증폭산물을 형광을 통해 검출하는 방법이다. 크게 intercalating 법(SYBR Green I)과 형광표식 탐식자(TaqMan probe, cycling probe)를 이용하는 2가지 방법이 있다. Intercalating 법은 double strand DNA를 모두 검출하기 때문에 유전자별로 탐식자를 준비할 필요가 없어 저렴한 비용으로 반응계를 구축할 수 있다는 장점이 있는 반면 검출 특이성은 그다지 높지 않다. 형광표식 탐식자를 이용하는 방법은 비용은 많이 들지만 검출 특이성이 높다는 장점이 있다[8-14].

본 연구에서는 국내에서 개발된 HCV RNA Real-Time RT-PCR 시약의 검사특성과 기존 사용되고 있는 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 검사법과 비교함으로써 그 적절성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 혈청으로부터 HCV RNA 추출

실시간 정량적 역전사-중합효소연쇄반응을 위한 HCV RNA는 혈청 200 μ L로부터 자동화 핵산 추출 기기인 Chemagic Magnetic separation module I (Chemagen, Baesweiler, Germany) 과 Chemagic Viral DNA/RNA kit special (Chemagen, Baesweiler, Germany)를 이용하여 장비 및 시약 제조사 지침에 따라 추출한 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

2. HCV RNA 농도측정

1) RT-PCR hybridization 정량검사법(Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0): RT-PCR hybridization 검사법을 이용한 HCV RNA의 농도 측정은 중합효소연쇄반응 후 보합반응을 이용하는 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 (Roche Diagnostics System, Basel, Switzerland)을 이용하여 제조사 지침에 따라 검사하였다.

2) 실시간 정량적 역전사-중합효소연쇄반응법(Real-Q HCV Quantification kit): 본 연구에서는 Corbett RG-6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia)을 이용하여 Real-Q HCV Quantification kit (BioSewoom Inc., Seoul, Korea)를 평가하였고 HCV RNA 정량 방법을 간략히 소개하면 다음과 같다.

혈청 200 μ L서 최종 150 μ L로 HCV RNA를 추출하였고, SuperScript[®] III RTS First-Strand cDNA Synthesis kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 9 μ L의 합성한 HCV cDNA를 kit 내 21 μ L의 반응혼합물(master mix)에 분주하고 Corbett RG-6000를 이용하여 uracil DNA glycosylase 반응 50 $^{\circ}\text{C}$ 2분, pre-denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 10분 이후 denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초, annealing 58 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, extension 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초의 반응을 45회 반복하였다. 이때 kit 내 포함된 HCV 표준물질도 동일한 방법으로 같이 반응하였다. 반응 후 HCV 표준물질의 농도에 대한 threshold cycle (Ct) 값으

로 표준 직선을 얻고 이 직선에 대비하여 검체의 HCV RNA를 IU/mL의 단위로 정량하였다. 표준 직선에서 계산된 HCV RNA 농도에 총 추출된 RNA 부피(μ L)를 곱하고 추출에 사용한 혈청의 양(0.2 mL)으로 나누어 검체 1 mL 내 존재하는 HCV RNA를 계산하였다[HCV RNA 농도(IU/mL) = 계산된 HCV RNA 농도 \times 추출된 RNA 양(150 μ L) \div 혈청 양 (0.2 mL)]. 또한 매 반응마다 PCR의 오염을 확인하기 위해 증류수를 사용한 음성대조군에서 음성의 결과가 나오는지 확인하며, 저농도 및 고농도 정도관리 물질을 동시 검사하여 지정된 범위 내에 드는지를 확인하였다. 내부 정도관리 기준에 부적합한 경우는 동시 검사하였던 모든 검체에 대해 재검하였다.

3. Real-Q HCV Quantification kit의 평가

1) 검출한계 평가: Real-Q HCV Quantification kit의 검출한계를 결정하기 위하여 ACCURUN 305 HCV RNA positive control (BBI Diagnostics, MA, USA)을 HCV 음성혈장으로 희석하여 250 IU/mL, 125 IU/mL, 95 IU/mL, 62.5 IU/mL, 31.25 IU/mL, 15.625 IU/mL 농도의 희석액을 만들어 사용하였다. 각 농도당 100회 반복 검사를 실시하였으며 결과는 probit analysis program (StatsDirect statistical software, UK)을 이용하여 분석하였다.

2) HCV genotype 검출 평가: ACCURUN Hepatitis C Virus RNA Genotype Performance Panel, PHW 201 (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 4h, 5a, 6a 유전자형, BBI Diagnostics, MA, USA)을 이용하여 각 아형의 HCV RNA 증폭 여부를 확인하였다.

3) 특이도 평가: ACCURUN HBV DNA Genotype Performance Panels, PHD 201 (A, B, C, D, E, F 유전자형), ACCURUN HIV-1 RNA performance panels (A, B, C, D, E, F, G, H 유전자형), ACCURUN CMV positive control, ACCURUN Human Papilloma virus positive control, ACCURUN West Nile virus positive control, ACCURUN Parvovirus positive control를 이용하여 동일조건에서 RT-PCR을 시행하고 교차반응 여부를 확인하였다. 또한 Epstein-Barr virus, BK virus, HSV type 1과 type 2 환자 검체와 동일한 검사를 진행하여 교차반응 여부를 확인하였다.

4) 정밀도 평가: 1.2×10^6 , 1.2×10^3 IU/mL 농도의 HCV 표준 DNA를 사용하여 5일간 하루에 2시간 이상의 간격으로 2회씩을 시행하였고, 매번 실시할 때마다 5회 측정하였다. 이 결과를 이용하여 within-run, between-run, between-day의 정밀도를 평가하였다.

5) 직선성 평가: Clinical and Laboratory Standards Institute 가이드라인의 평가프로토콜(CLSI EP-6)에 따라 HCV 표준물질을 검출한계 농도 및 1×10^2 IU/mL에서 1×10^{10} IU/mL까지 10 배수로 연속 희석한 농도에 대해(총 10개 농도) 각 농도마다 8 회씩 반복 측정하여 직선성을 평가하였다.

6) HCV RNA 표준물질의 회수율 평가: HCV viral RNA assay validation kit (AcroMetrix corporation, CA, USA)를 사용하여 kit의 회수율을 평가하였다. 음성혈장을 포함하여 kit 내 50 IU/mL의 농도부터 5×10^6 IU/mL의 농도까지 10배 농도차이를 나타내는 7개의 표준물질로부터 RNA를 추출한 후 Real-Q HCV Quantification kit를 이용하여 정량값을 측정 후 비교하였다.

7) 상관성 비교: CLSI EP-9에 따라 다양한 범위의 농도를 가지는 52개의 검체를 이용하여 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 (Roche Diagnostics Corp.)과 비교하였으며, 각 검체별로 두 번씩 반복 측정 후 평균값을 사용하였다. 선형회귀모델을 이용하여 검사간 상관성을 평가하였다.

결 과

1. 검출한계 평가

검출한계를 평가하기 위해 ACCURUN 305 HCV RNA positive control (BBI Diagnostics, MA, USA)을 HCV 음성혈장으로 희석하여 분석한 결과를 이용하여 propit 분석을 한 결과 95%의 신뢰수준으로 검출할 수 있는 HCV RNA의 양은 44 IU/mL (confidence interval: 37~58 IU/mL)이었다(Table 1).

2. HCV genotype 검출 평가

ACCURUN Hepatitis C Virus RNA Genotype Performance Panel, PHW 201 (1a, 1b, 2a, 2b 3a, 3b, 4, 4h, 5a, 6a 유전자형, BBI Diagnostics, MA, USA)을 이용하여 모든 아형의 HCV RNA가 증폭되는 것을 확인하였다.

3. 특이도 평가

ACCURUN HBV DNA Genotype Performance Panels (A, B, C, D, E, F 유전자형), ACCURUN HIV-1 RNA performance panels (A, B, C, D, E, F, G, H 유전자형), ACCURUN CMV positive control, ACCURUN Human Papilloma virus positive control, ACCURUN West Nile virus positive control, ACCURUN Parvovirus positive control에서 HCV RNA가 증폭하지 않았고

EBV, BK virus, HSV type 1과 type 2 환자 검체에서 HCV RNA가 증폭되지 않아 특이도는 100%였다.

4. 정밀도 평가

검사 중 변이계수(within-run coefficient of variation)는 9.52~15.84%, 검사간 변이계수(between-run coefficient of variation)는 9.40~17.53% 범위이고 일간변이계수(between-day coefficient of variation)는 11.62~18.04%를 보였다. 정밀도 평가 결과는 Table 2에 나타내었다.

5. 직선성 평가

Second WHO International Standard for HCV RNA (96/798)에 의해 calibration된 standard plasmid를 순차적으로 희석하여 확인된 측정 가능한 농도범위는 4.4×10^1 IU/mL에서 1×10^{10} IU/mL 내에서 결정계수(R^2)가 0.9992로 우수한 직선성을 보였다(Fig. 1).

6. HCV RNA 표준물질의 회수율 평가

음성혈장과 50 IU/mL의 농도부터 5×10^6 IU/mL의 농도까지 10배 농도차이를 나타내는 7개의 표준물질로부터 추출된 RNA에 대한 키트의 회수율을 평가한 결과 기울기=0.9923, $R^2=0.9943$ 로 다양한 농도의 HCV에 대하여 높은 회수율을 나타내었다(Fig. 2).

7. 상관성 비교

Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0에서 600 IU/mL 이하의 결과를 보였던 4개 검체는 Real-Q HCV Quantification kit에서 $0 \sim 2.9 \times 10^2$ IU/mL의 결과를 보였고 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0에서 500,000 IU/mL 이상의 결과를 보였던 11개 검체는 Real-Q HCV Quantification kit에서 $2.1 \times 10^5 \sim 8.7 \times 10^7$ IU/mL의 다양한 결과를 보였다. 두 검사법을 비교한 결과, Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0의 검출범위인 600~500,000 IU/mL에서는 기울기=0.959, $R^2=0.8954$ 의 상관성을 보였다(Fig. 3).

Table 1. The detection limit of Real-Q HCV Quantification kit

| Input HCV (IU/mL) | Result | | |
|-------------------|------------|-------------------|-----|
| | Replicates | Positive reaction | % |
| 250 | 100 | 100 | 100 |
| 125 | 100 | 100 | 100 |
| 95 | 100 | 100 | 100 |
| 62.5 | 100 | 98 | 98 |
| 31.25 | 100 | 85 | 85 |
| 15.625 | 100 | 58 | 58 |

Table 2. Precision of HCV real-time PCR on standard plasmids, 1.2×10^6 IU/mL and 1.2×10^3 IU/mL

| Precision | Input HCV plasmid (IU/mL) | Observed (IU/mL) | | |
|-------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | | Mean | SD | CV (%) |
| Within-run | 1.2×10^6 | 1.32×10^6 | 1.26×10^5 | 9.52 |
| | 1.2×10^3 | 1.54×10^3 | 2.44×10^2 | 15.84 |
| Between-run | 1.2×10^6 | 1.47×10^6 | 1.38×10^5 | 9.40 |
| | 1.2×10^3 | 1.44×10^3 | 2.53×10^2 | 17.53 |
| Between-day | 1.2×10^6 | 1.47×10^6 | 1.71×10^5 | 11.62 |
| | 1.2×10^3 | 1.50×10^3 | 2.70×10^2 | 18.04 |

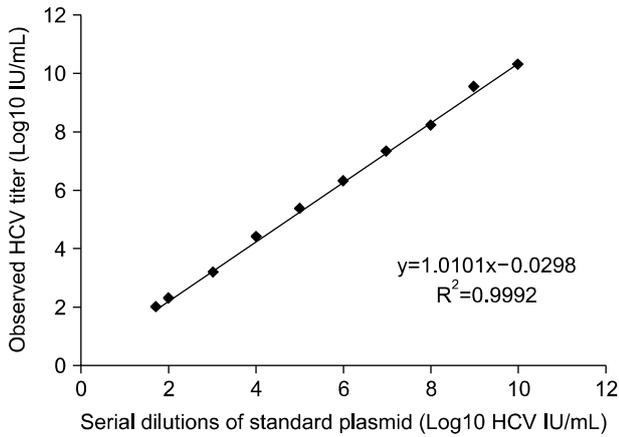


Fig. 1. Linearity range of the Real-Q HCV Quantification kit. The straight line was determined by a linear regression of the log 10 estimated concentrations with the log 10 nominal concentrations. Linearity was found from 44 to 1×10^{10} IU/mL.

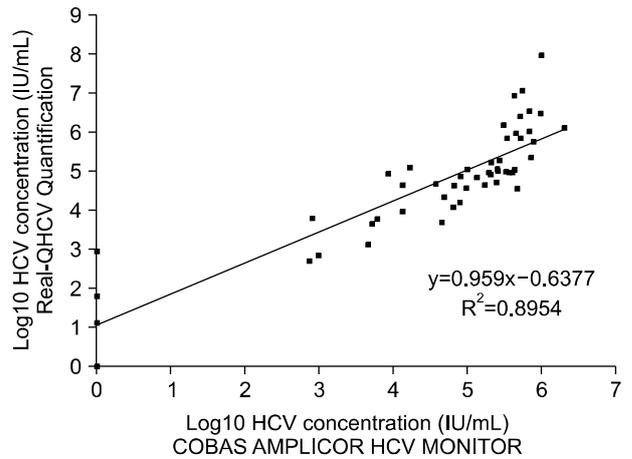


Fig. 3. Comparison of HCV RNA concentrations observed in the Real-Q HCV Quantification kit and COBAS AMPLICOR HCV MONITOR 2.0.

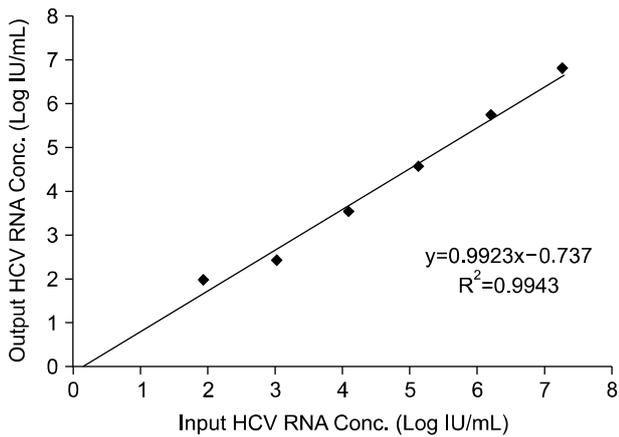


Fig. 2. Quantitative correlation of HCV RNA between HCV viral RNA assay validation kit (AcroMetrix Corporation) and observed concentration by Real-Q HCV Quantification kit.

고 찰

HCV RNA의 정량은 바이러스의 복제 정도를 알 수 있으며 진행된 간경변이나 간암에서 간세포의 파괴가 진행되어 간기능 검사상 정상을 보이는 환자에서도 유용하다고 보고되고 있고[10,11], 인터페론과 리바비린과 같은 항바이러스 약제를 투여한 치료 후 지속적인 반응(sustained virological response, SVR)을 예측하는 데 있어 HCV RNA의 정확한 정량 및 바이러스 양의 지수 감소(log decline)는 임상적으로 매우 유용하다는 보고들이 있는 바 저농도에서 고농도까지 정확한 HCV RNA 정량이 가능한 새로운 검사방법이 필요하게 되었다[15].

국내에서 HCV RNA 정량을 위해 널리 이용되는 검사법에는

HCV RNA를 직접 증폭하는 원리를 이용한 Amplicor HCV Monitor 2.0과 HCV RNA에 부착된 형광 시그널을 증폭하는 bDNA test 원리를 적용하는 Versant HCV RNA 3.0, Quantiplex HCV RNA 2.0이 있다[4,5,7].

Amplicor HCV Monitor 2.0은 측정범위가 600~500,000 IU/mL의 측정범위를 가지고 있어 낮은 농도의 HCV RNA 검사에 효율적이고, Quantiplex HCV RNA 2.0은 31,746~19,047,619 IU/mL, Versant HCV RNA 3.0은 615~7,692,310 IU/mL이기 때문에, Quantiplex HCV RNA 2.0은 높은 농도의 검사에, Versant HCV RNA 3.0은 비교적 낮은 농도에서부터 높은 농도의 HCV RNA 검사에 효율적이지만, 이들보다 낮은 농도에서는 정량이 불가능하고 높은 농도에서도 검체를 희석하여 재검을 실시해야 정확한 측정이 가능하다[4].

Real-time Quantitative PCR은 중합효소연쇄반응 시발체와 형광물질이 부착된 탐식자를 이용하여 실시하고 탐식자에 부착된 형광 물질의 발광 현상을 이용하여 융합 유전자의 정확한 양을 측정하는 검사 방법이다. 중합효소연쇄반응이 일어나는 동안 증폭되는 DNA의 양이 직선성을 보이는 초기 단계에서 측정되고, 증폭된 DNA를 측정할 때 특이성이 높은 탐식자를 이용하여 정량하게 되므로 기존에 알려진 어떤 검사방법보다도 정확한 결과를 빨리 얻을 수 있다[12-14].

또한 실시간으로 탐식자의 분리에 의하여 생기는 형광의 양이 기본 값 이상의 일정한 기준 값에 도달하는 증폭주기인 Ct (threshold cycle)값을 측정하고 표준곡선을 사용한 정량으로 8~10 log 이상의 광범위한 영역의 측정 범위를 제공한다. 매 증폭 주기마다 유전자의 양의 측정이 이루어지기 때문에 유전자 증폭 전 과정을 모니터링하여 정확한 증폭양상을 관찰할 수 있으며, 증폭이 끝난 후에 추가적인 과정이 필요 없기 때문에 오

염을 최소화할 수 있다[12,13].

본 연구에서 평가한 Real-Q HCV Quantification kit는 Real-time PCR 원리를 사용하고 분석 민감도는 44 IU/mL로 이는 Konnick 등[16]의 보고(71.3 IU/mL)보다는 우수한 결과이며, Abbott RealTime HCV Test (30 IU/mL)와는 비슷한 수준이었다. 직선성은 Cobas TaqMan HCV Test ($30 \sim 2 \times 10^8$ IU/mL) 및 Abbott RealTime HCV Test ($12 \sim 1 \times 10^8$ copies/mL IU/mL)와 대등하였다.

HIV, HBV, CMV, HPV, EBV, BKV, HSV, Parvovirus, West Nile Virus 등 주요 바이러스와 교차 반응은 없었고 HCV의 모든 아형에서 HCV RNA 검출이 확인되었다.

1.2×10^3 , 1.2×10^6 IU/mL 두 가지 농도에서의 정밀도는 within-run CV가 9.52~15.84%, between-run CV가 9.40~17.53%, between-day CV가 11.62~18.04%였다. Michelin 등[17]의 연구와 비교해 보면, 본 검사와 유사한 HCV RNA 농도를 보이는 구간에서 Abbott RealTime HCV Test의 정밀도는 inter-assay CV가 15~32%, intra-assay CV가 5~8%로 유사한 정밀도 결과를 확인하였다.

Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0과 비교에서는 $R^2=0.8954$ 로 우수한 상관성을 보였다. 하지만 본 연구에서 사용한 Amplicor HBV MONITOR test는 검출 한계가 600~500,000 IU/mL로 그보다 낮은 농도 또는 높은 농도에서의 상관성은 확인하지 못하였다. 본 검사법과 유사한 TaqMan probe 방법을 이용한 real-time PT-PCR인 Cobas TaqMan HCV Test와 Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0의 상관성 비교에서 R^2 은 0.818의 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있고[16], Sarrazin 등의 보고에 의하면[18] HCV 아형별로 R^2 은 0.87~0.97의 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다. Abbott RealTime HCV Test와의 상관성 비교 연구에서는 $R^2=0.8886$ 의 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다[19]. Cobas Amplicor HCV Monitor와의 우수한 상관성, $44 \sim 1 \times 10^{10}$ IU/mL 범위에서의 우수한 직선성, $50 \sim 5 \times 10^6$ IU/mL 범위의 표준 RNA에 대한 정확한 회수율을 고려할 때 본 연구에서 사용한 Real-Q HCV Quantification kit 또한 600 IU/mL 이하 및 500,000 IU/mL 이상에서도 높은 상관성을 보일 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 평가된 Real-Q HCV Quantification kit는 검출한계, 직선성, 특이도, 정밀도 등에서 좋은 성능을 보여, HCV RNA 정량을 이용한 만성 C형 간염 치료의 추적관찰에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Martró E, González V, Buckton AJ, Saludes V, Fernández G, Matas L, et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis c virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *J Clin Microbiol* 2008;46:192-7.
- Oh HB, Hwang YS, Kim DS, Kim SI, Lee SY, Han KS. Study on the seroincidence of hepatitis C virus infection among blood donors in Korea. *Korean J Blood Transfus* 1997;8:33-41.
- Lee HJ, Cho YK, Kim HU, Choi EK, Hyun S, Kang D, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Jeju Island. *Korean J Hepatol* 2008;14:28-35.
- Germer JJ, Heimgartner PJ, Ilstrup DM, Harmsen WS, Jenkins GD, Patel R. Comparative evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0, QUANTIPLEX HCV RNA 2.0, and COBAS AMPLICOR HCV MONITOR version 2.0 Assays for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol* 2002;40:495-500.
- Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayati C, Kolberg J, Collins M, et al. Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1996;34:901-7.
- Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by QUANTIPLEX HCV RNA assay versions 1 and 2, Roche Monitor assay, and an in-house limiting dilution method. *J Clin Microbiol* 1999;35:187-92.
- Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol* 2000;38:4171-9.
- Mellor J, Hawkins A, Simmonds A. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:2525-32.
- Fang JW, Albrecht JK, Jacobs S, Lau JY. Quantification of serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology* 1999;29:997-8.
- Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000;32:654-9.
- Kim YA, Kim HS, Cho DH, Han KH. Quantification of serum hepatitis C virus in patients with chronic C viral liver disease. *Korean J Clin Pathol* 1998;18:603-7.
- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002;8:257-60.
- Valasek MA and Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005;29:151-9.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
- Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J, Anderson F, Krajden M, Gordon S, et al. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005;12:465-72.
- Konnick EQ, Williams SM, Ashwood ER, Hillyard DR. Evaluation of the COBAS Hepatitis C Virus (HCV) TaqMan analyte-specific reagent assay and comparison to the Cobas Amplicor HCV Monitor V2.0 and Versant HCV bDNA 3.0 assays. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2133-40.
- Michelin BD, Muller Z, Stelzl E, Marth E, Kessler HH. Evaluation of the Abbott RealTime HCV assay for quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Virol* 2007;38:96-100.
- Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmman D, Babel R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin*

1. Martró E, González V, Buckton AJ, Saludes V, Fernández G, Matas L, et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis c virus

Microbiol 2006;44:729-37.

19. Wolff D, Gerritzen A. Comparison of the Roche COBAS Amplicor Monitor, Roche COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan and Abbott

RealTime Test assays for quantification of hepatitis C virus and HIV RNA. Clin Chem Lab Med 2007;45:917-22.

=국문초록=

실시간 정량적 역전사-중합효소연쇄반응을 이용한 HCV 정량검사 시약(Real-Q HCV Quantification Kit)의 평가

¹의료법인 삼광의료재단, ²(주)바이오세움 생명과학연구소

조영숙¹, 김영훈¹, 이경희¹, 장혜선¹, 황경아¹, 김유리², 지현영¹

배경: 정확한 Hepatitis C Virus (HCV) RNA의 정량은 치료반응 예측과 치료결과 평가에 매우 중요한 지표로 활용된다. 최근 HCV RNA 정량에 사용되고 있는 실시간 정량적 역전사-중합효소연쇄반응(real-time PT-PCR)은 측정 범위가 넓고 결과값의 직선성이 좋아 기존에 사용되던 branched DNA법과 PCR-hybridization법을 대체하고 있다. 본 연구에서는 국내에서 개발된 Real-Q HCV Quantification kit의 성능을 평가하였다.

방법: Real-Q HCV Quantification kit의 성능평가를 위해 kit의 검출한계, 분석특이도, 정밀도, 직선성 범위, HCV RNA 표준물질의 회수율을 평가하였고, Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0과의 상관성을 분석하였다.

결과: 다양한 농도의 HCV RNA 표준물질에 대하여 높은 회수율을 나타내었고, 모든 유전자형에서 동일하게 증폭되는 것을 확인하였다. Hepatitis B virus와 Human Immunodeficiency virus 양성 검체와 교차반응이 없음을 확인하였고, 검사 중 변이계수는 9.52~15.84%, 검사간 변이계수는 9.40~17.53% 범위이고 일간변이계수(between-day coefficient of variation)는 11.62~18.04%를 보였으며, 검출한계는 44 IU/mL이었다. Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0과도 좋은 상관성을 보였다.

결론: 본 연구를 통하여 평가된 Real-Q HCV Quantification kit는 특이도, 민감도, 직선성, 정밀도에서 우수한 성능을 보여, HCV RNA 정량을 이용한 만성 C형 간염 치료의 추적관찰에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. [대한임상미생물학회지 2009;12:72-77]

교신저자 : 지현영, 137-887, 서울시 서초구 양재동 9-60
의료법인 삼광의료재단
Tel: 02-3497-5133, Fax: 02-3497-5229
E-mail: chumgang@smlab.co.kr