

Ultra-sensitive HBsAg IRMA 키트의 민감도 및 변이형 검출능 평가

서울대학교병원 핵의학과
하동혁 · 민경선 · 노경운 · 김현주

The Assessment of Ultrasensitive HBsAg kit's Sensitivity level and Performance in Detection of Mutant Forms

Dong Hyuk Ha, Kyung Sun Min, Gyeong Woon Noh and Hyun Ju Kim
Department of Nuclear medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Purpose: The DNA-type virus HBV, discovered by D. Dane and others in 1976, is approximately 42nm big and known as the main cause of liver-related diseases around the world. HBsAg has 4 kinds of subtypes including adw, adr, ayw and ayr and besides common antigen factor a, there are d, y, r, w. From the methods of serologically testing HBV, IRMA, EIA and CLIA were developed for testing HBsAg and are being used in examining the surface antigen of HBV. In this study, among the methods for testing HBV, the recently developed RIAKEY Ultrasensitive HBsAg IRMA kit's sensitivity level and performance in detection of mutant forms were measured and compared with CLIA. **Materials and methods:** Two certified reference materials, which are WHO 1st International Standard 1985(80/549) and WHO 2nd International Standard 2003(00/588. subtype adw2, genotypeA), were used in the examination and the sensitivity level was measured by diluting these materials from 0.08 IU/ml to 0.005 IU/ml. The materials for examining the detection of mutant forms included 9 kinds of subtype 'ad' and one kind of subtype 'ay' purchased from DSI company. Also, with the use of positive and negative samples, they was compared with CLIA. **Result:** Ultrasensitive HBsAg kit based on IRMA method showed the detection of up to 0.01 IU/ml not only for WHO 1st International Standard 1985(80/549) but also for WHO 2nd International Standard 2003(00/588. subtype adw2, genotypeA) and the sensitivity level was measured as 0.01 IU/ml by WHO standard. In testing the performance for detection of mutant forms, the 9 kinds of subtype 'ad' and one kind of subtype 'ay' mutant materials were detected, demonstrating the capacity of detecting various types of mutant forms. **Conclusions:** With the clinical importance of sensitivity level and performance in detection of mutant forms increasing in the field of HBsAg diagnosis, the examination of IRMA's effectiveness using RIA method in the aspects of the sensitivity level and performance in detection of mutant forms was carried out and its result is as follows. The sensitivity level was measured as 0.01 IU/ml by WHO standard and it was possible to measure various types of mutant forms with high sensitivity. Thus it is suggested that more speedy and accurate reports could be produced from a nuclear medicine laboratory for clinical practitioners requiring results of various situations. (*Korean J Nucl Med Technol* 2011;15(1):121-125)

Key Words: WHO , Ultra-sensitive, HBsAg, Mutant form

서 론

B형간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV)에 의한 감염은 한국 및 세계 각국의 주요한 보건 문제로 대략 3억 5천만 명의 세계 인구가 HBV에 감염되어 있다. HBV의 보균자는 만성 B형간염, 간경화, 간암으로 진행할 위험성이 높다. 우리나라와 같이 B형간염이 만연되어 있는 지역에서는 B형간염 바

- Received: . Accepted:
- Corresponding author: **Dong Hyuk Ha**
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital 28
Yeongeon-dong, Seoul, 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2537, Fax: +82-2-745-7690
E-mail: nclasshyuk@naver.com

이러스의 유전자 및 조절요소 에서 변이가 다양하게 일어나고 있다. B형간염 바이러스는 숙주인 인간과 진화를 같이 해왔다. 이에 따라 B형 간염 바이러스에 감염된 환자의 민족 또는 인종에 따라, 그리고 발견된 지역에 따라 바이러스 유전자 서열에 차이를 보이고 있다. 한 환자의 체내에서도 장기간의 증식과정에서 면역압력을 피하여 유전자의 구조나 서열을 변환하게 된다.¹⁻⁵⁾ 이러한 바이러스의 유전자 변이는 B형 간염바이러스의 혈청학적 검사를 통한 진단과 치료를 어렵게 한다. 이 바이러스들은 특정 세포에서 면역 검출을 피하기 위한 여러 가지 기작들을 변화시켜 왔는데, 이는 돌연변이로서 숙주 면역반응 붕괴 등을 일으키고 있다. 면역원성의 주요 부위인 'a' 결정기 (a determinant) 라 부르며, 이는 HBsAg 의 염기서열 중 124 ~ 147번 아미노산에 위치하며 대부분의 B형간염 바이러스 분리 주에 공통적으로 나타나므로 세부 분류 시 큰 역할을 하기 어려워 다른 항원 결정기를 기준으로 아형을 나누게 되었다. 이들이 바로 d/w와 r/w 결정기이며 이들 결정기는 HBsAg 에서 두 군데 의 전혀 다른 위치에 있는 아미노산인 122번과 160번의 종류에 따라 나누어진다. 즉, 122번 아미노산이 arginine이면 아형은 y 이며 lysine이면 아형은 d가 예측된다. 이러한 기준에 따라 최초 4종의 아형이 보고되었다. 현재 혈청형의 아형은 10종이 있으며 최근 국내의 한 보고에서는 adr 92.3%, adw 5.7%, ayr 0.5%의 빈도로 혈청형이 관찰됨 이 보고되었다.⁶⁻⁹⁾ 이러한 아형이 점차 증가함에 따라 아형을 측정 할 수 있는 키트의 개발이 요구되고 있다. 기존에 사용 중인 검사법으로 측정하기 어려웠던 B형간염 바이러스 subtype을 최근 개발된 4세대 RIAKEY Ultra sensitive HBsAg IRMA 키트로 측정하여 민감도 및 변이형 검출능을 발광면역측정법과 비교 분석하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 B형간염 검사의 표준물질은 National Institute for Biological Standards and Control Assuring the Quality of Biological Medicines(NIBSC)에서 구입한 WHO 1st International Standard 1985(80/549) 표준물질과 WHO 2nd International Standard 2003 (00/588) HBsAg Subtype adw2 (Genotype A) 를 사용 하였으며, 변이형 검출에는 DSI 사의 Subtype ad 9종, Subtype ay 변이시료 1종의 시료를 이용하여 측정하였다.

Table 1. WHO 1st International Standard 1985(80/549)

PANEL	CPM	Mean	Index
WHO 0.08	1,935	1,789	4.8
	1,689		
	1,743		
WHO 0.04	983	1,324	3.55
	1,965		
	1,024		
WHO 0.02	588	544	1.46
	549		
	495		
WHO 0.01	375	424	1.14
	403		
	495		
WHO 0.005	249	301	0.81
	355		
	300		

2. 실험 방법

1) 민감도 측정

WHO 1st International Standard 1985(80/549), WHO 2nd International Standard 2003 (00/588) 표준물질 2개를 이용하여 농도별 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 IU/ml 까지 계단희석을 시행하였다.

2) 변이형 검출

DSI사의 Subtype ad 9종, Subtype ay 변이시료 1종을 이용하여 RIAKEY, BNIBT, RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg, ROCHE 키트를 이용하여 시행하였다.

3) 상관계수 측정

변이형 검출에 사용된 변이시료 10종에 대한 IRMA법의 RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg와 CLIA법의 CENTAUR 장비를 이용한 상관계수를 비교하였다.

결 과

1. 민감도

WHO 1st International Standard 1985(80/549) 표준물질의 농도별 측정 시 WHO 0.01 PANEL 에서 Index 1.0 이상의 결과 값을 얻었으며, 그 결과 민감도는 0.01 IU/ml로 측정되었다. HBsAg 검사에서 CLIA 법은 민감도가 ARCHITECT 0.05, Bayer Advia Centaur 0.06 IU/ml 로 RIAKEY Ultra HBsAg 키트가 민감도측면에서 우수함을 알 수 있었다 (Table 1).

Table 2. WHO 2nd International Standard 2003 (00/588)

PANEL	CPM	Mean	Index
WHO 0.08	186,9	206,1	5.53
	247,9		
WHO 0.04	183,5	103,8	2.79
	111,1		
WHO 0.02	973	732	1.96
	103,1		
WHO 0.01	709	495	1.33
	722		
WHO 0.005	765	263	0.71
	686		
WHO 0.01	418	495	1.33
	381		
WHO 0.005	244	263	0.71
	291		
	254		

희석검사에서 5 PANEL 농도 값(0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005)에서 Index값이 1.0이상이 양성이다. 0.01값에서 1이상의 결과 값을 얻을 수 있었으며 그 결과 민감도는 0.01 IU/ml로 알 수 있었다(Table 2).

2. 변이형 검출

RIAKEY Ultra sensitive HBsAg IRMA 키트에서는 adw2 9종과 ayw1 1종의 변이형 형태에 따라 모두 Index 1.0 이상으로 검출 할 수 있음을 확인하였다(Tabel 3, Fig. 1).

3. RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg과 CLIA법의 CENTAUR 장비를 이용한 상관계수 비교

RIAKEY Ultra sensitive HBsAg과 CLIA법의 Centaur 장비의 검사결과를 비교하여 키트의 성능을 평가하였다. 30가지의 아형의 표준물질을 사용하여 비교한 결과 RIAKEY

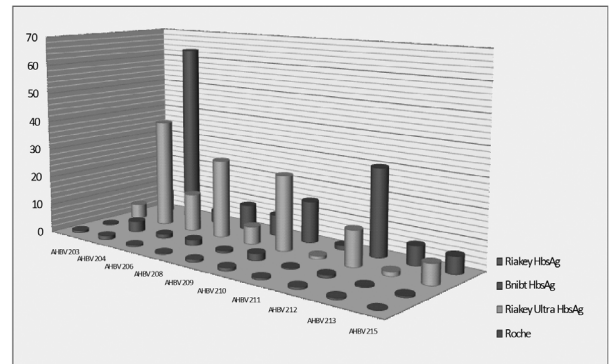


Fig. 1. Detection of subtype.

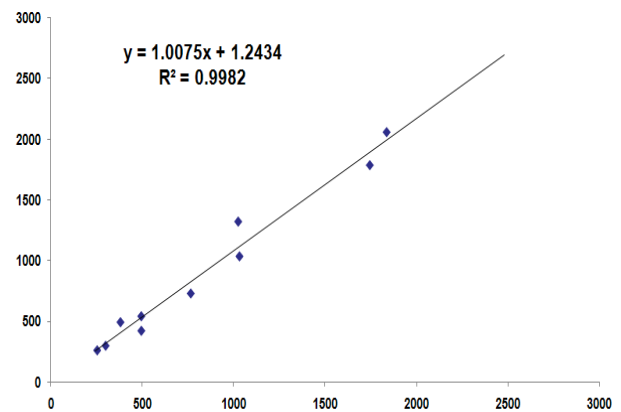


Fig. 2. Comparison of coefficient of variation

Ultra sensitive HBsAg와 CLIA의 결과가 $Y=1.0075 X + 1.2434$, $R^2=0.9982$ 이었다(Table 4, Fig. 2).

고 찰

HBsAg 검사는 HBV 감염을 진단하고 추적하는데 유용하되 민감한 측정 시스템이 필수적이다. 국내에서는 일반 건강

Table 3. Detection of subtypes

PANAL	SUBTYPE	Mutant form	RIAKEY Ultra Index	ROCHE Index	RIAKEY Index	BNIBT Index
AHBV203	adw2	G145R	5.1	7.5	0.9	0.4
AHBV204	adw2	Q129R	37.8	63.4	1.4	3.7
AHBV206	adw2	Q129H	13.1	4.3	0.7	1.5
AHBV208	adw2	T126N	27.2	8.7	0.5	2.0
AHBV209	adw2	T143K	6.1	7.4	1.0	0.8
AHBV210	adw2	P142S	25.8	14.5	1.1	2.5
AHBV211	adw2	K141E	1.2	1.6	0.7	0.5
AHBV212	adw2	M133L	12.3	30	0.8	1.1
AHBV213	adw2	M133H	1.6	6.7	0.6	0.5
AHBV215	ayw1	G145R	7.0	6.0	0.1	0.6

Table 4. Comparison of coefficient of variation

Sample	Ultra HBsAg	CENTAUR
S18	2.64	3.02
S16	6.14	6.25
S10	23.24	22.54
S2	24.61	26.95
S4	25.85	29.85
S6	27.47	30.65
S15	49.00	50.25
S7	75.98	75.21
S1	85.92	87.55
S11	136.6	132.5
S26	148.23	142.23
S19	158.8	165.2
S5	237.98	241.21
S25	296.73	301.55
S27	312.60	325.50
S29	346.36	332.21
S17	353.59	350.12
S24	368.77	405.21
S14	405.16	425.35
S22	475.3	479.25
S8	482.15	492.22
S9	485.99	490.11
S13	517.1	520.25
S21	539.95	530.55
S12	551.59	550.50
S28	564.26	570.35
S30	575.26	580.22
S23	591.41	581.55
S20	601.14	612.22
S30	621.37	635.95

검진이나 수술 등의 침습적 처치 전에 필수적 검사로 포함되어 있으므로 검사의 정확성과 신속성이 요구된다. 현재 행하고 있는 CLIA 검사법 등은 HBsAg 을 매우 민감하게 측정할 수 있다고 알려져 있으며 그 성능을 인정받아 많은 검사실에서 사용되고 있다.⁷⁾ 그러나 최근 연구에서 9종의 HBsAg 의 중화항체 결합부위인 'a' 결정기에 변이가 있을 경우 많은 시약이 HBsAg 변이형 검출을 하지 못하고 위 음성 결과를 보임을 보고 하였고, 이 연구에서 AxSYM 과 Centaur에서 변이형을 검출한 경우 그 지수 값이 매우 낮을 수 있음을 밝힌 바 있다.⁶⁾ 그리고, 경계 범위의 결과에 대한 임상적 해석이 분명하지 않아 재검이나 추가 검사를 실시해야 하고, 이러한 환자들이 다른 기관에서 반복 검사를 하였을 때 서로 다른 결과를 보여 혼란을 초래하는 경우도 적지 않았다. 그럼에도 불구하고 HBV 보균율이 높은 국내 현실에서 가장 비중 있는 검사 중 하나인 HBsAg 검사에 대해 보편적인 측정 방법들을 비교 평가한 보고는 드물다.⁸⁻¹⁰⁾ 이에 본 저자들은 표준

물질을 이용하여 국내 검사실에 시행 하고 있는 CLIA법과 RIA법 검사에 대한 민감도, 변이형 측정, 상관계수를 비교 평가하여 측정값의 분포 및 결과 일치 율 을 알아보고자 하였다. 현재 전국 RIA 간염검사의 건수가 점차 줄어들고 있는 추세에 있다. 그 이유 중 하나는 자동화장비를 이용한 CLIA 법의 간염검사로의 전환이 되고 있다. CLIA 법은 2000년대에 나온 4세대 검사법으로 아형 및 여러 변이형을 측정 할 수 있는 데에 반하여 RIA를 통한 검사는 1980년대에 나온 3세대 검사법으로 변이형을 효과적으로 측정할 수가 없었다. 이번 연구를 통하여 핵의학과의 간염검사가 최근에 출시된 4세대 키트인 RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg 키트로의 전환이 이루어진다면 간염바이러스의 변이형을 효과적으로 측정 할 수 있다고 판단된다.

결 론

RIAKEY 에서 새로 개발되어진 IRMA법의 Ultra Sensitive HBsAg 키트의 성능은 위의 실험결과 정밀도, 민감도, 직선성 모두 우수하였으며, 현재 진단검사의학과의 CLIA법의 측정결과 값이 $y=1.0075x+1.2434$, 상관계수 $R^2=0.9982$ 으로 상이하지 않다는 것을 알 수 있었다. 그 결과 새로운 키트를 대체하여 사용할 수 있다고 판단된다. 본원의 경우 간염 검사의 건수가 진단검사의학과의 검사에 비해 상대적으로 줄어들고 있는 상황이며 그 결과 정확하고 신속한 검사결과 보고가 요구되어 지고 있다. 4세대인 IRMA법의 Ultra Sensitive HBsAg 키트가 시판이 되게 되면 아형을 정확히 측정할 수 있고 신속히 진단할 수 있을 것으로 여겨진다.

요 약

배경 : B형간염표면항원(HBsAg)은 B형간염의 진단에 있어 가장 중요한 혈청학적 지표 중 하나이다. HBsAg 검사에 대한 임상검사의 수요에 맞추어 자동화 장비 및 검사법이 계속 개발되어 왔다. 본 연구는 국내에 보급된 RIAKEY, BNIBT, RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg, ROCHE 키트의 민감도 및 변이형 검출능과 CLIA법의 CENTAUR 장비와 RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg의 상관계수를 알아보고자 하였다.

방법 : WHO 1st International Standard 1985(80/549), WHO 2nd International Standard 2003 (00/588) 표준물질 2개를 이용하여 농도별 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 IU/ml 까지

계단희석을 시행하였으며, Subtype ad 9종, Subtype ay 변이 시료 1종을 이용하여 RIAKEY, BNIBT, RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg, ROCHE 키트를 이용하여 시행하였다. 그리고, 아형 검출에 사용된 변이시료 10종에 대한 IRMA법의 RIAKEY Ultra Sensitive HBsAg와 CLIA법의 CENTAUR 장비를 이용한 상관계수를 비교하였다.

결과 : 표준물질의 농도별 측정 시 WHO 0.01 PANEL 에서 Index 1.0 이상의 결과 값을 얻었으며, 그 결과 민감도는 0.01 IU/ml로 측정되었다. RIAKEY Ultra sensitive HBsAg 키트가 민감도측면에서 우수함을 알 수 있었다. RIAKEY Ultra sensitive HBsAg IRMA 키트에서는 adw2 9종과 ayw1 1종의 변이형 형태에 따라 모두 Index 1.0 이상으로 혈청중의 HBsAg을 100% 측정할수 있었다. RIAKEY Ultra sensitive HBsAg와 CLIA의 결과가 $Y=1.0075 X + 1.2434$, $R^2=0.9982$ 으로 우수한 상관성을 보였다.

결론 : 4세대인 IRMA법의 Ultra Sensitive HBsAg 키트로 혈청중의 HBsAg과 여러 가지 아형을 신속하고 정확히 측정하여 질병을 진단 할 수 있을 것으로 여겨진다.

REFERENCES

- Hepatology Anna S. F. Lok1, Brian J. McMahon2. Volume 45, Issue 2, pages 507-539, February 2007.
- Grötzinger T, Will H. Sensitive method for identification of minor hepatitis B mutant viruses. Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/Munich, Germany. 1992 Mar;187(1):383-7.
- 박중원, 윤정환, 황유진, 이효석, 김정룡. B형 간염바이러스 표면항원과 항체가 동시에 발현된 만성 간염 환자에서 표면항원 'a'결정기 유전자의 변이. 대한소화기학회지 1997; 29: 182-91.
- Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM, Lok AS. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology 1998; 27: 213-22.
- 차영주, 채석래. B형간염 표면항원 양성 환자에서 표면항체 동시 양성빈도 및 임상적 의의. 대한임상병리학회지 2000; 20: 204-9.
- 유수진, 오혜진, 신보문. B형간염표면항원 측정을 위한 세 가지 자동화 면역측정법의 비교. 대한진단검사의학회지 2006; 26:282-6
- Moerman B, Moons V, Sommer H, Schmitt Y, Stetter M. Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. Clin Lab 2004;50:159-62.
- Taylor P, Pickard G, Gammie A, Atkins M. Comparison of the ADVIA Centaur and Abbott AxSYM immunoassay systems for a routine diagnostic virology laboratory. J Clin Virol 2004;30: S11-5.
- Chen D, Kaplan L, Liu Q. Evaluation of two chemiluminescent immunoassays of ADVIA Centaur for hepatitis B serology markers. Clin Chim Acta 2005;355:41-5.
- Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of two new automated assays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. J Clin Microbiol 2003;41:135-43.