

## Original Article RIA 검사별 희석실험을 통한 결과의 상한치 검증

서울아산병원

이근의 · 최진주 · 이영지 · 유선희 · 이선호

### Verification of the upper limit of results through dilution tests for RIA test

Geun Ui LEE<sup>1</sup>, Jin Ju CHOI, Young Ji LEE, Seon Hee YOO and Sun Ho LEE

Department of Nuclear Medicine, Asan medical Center, Seoul Korea

**Purpose** In the meantime, there have been not many samples that require dilution, and it has been difficult for the examiner to set an appropriate dilution multiple for RIA test item and report the results. Accordingly, it was judged that it was necessary to set the maximum dilution multiple for each test and to verify the upper limit of the clinical reportable range. Therefore, in this study, the maximum dilution multiple for each RIA test was set and the upper limit of the clinical reportable range was verified accordingly

**Materials and Methods** Among all RIA tests conducted at Asan Medical Center, the study treated on 30 types of tests which also conduct the dilution test. Data from March to July 2021 were collected and analyzed. The study was conducted on samples subjected to serial dilutions such as X2, X4 or X10, X10<sup>2</sup>, X10<sup>3</sup>, X10<sup>4</sup>, X10<sup>5</sup>.

**Results** Among a total of 30 test types, 18 test types have more than 5 N values in the tolerance range of 80~120%. As a result of the verification of maximum dilution multiples, the test set to 10<sup>4</sup> is  $\alpha$ -fetoprotein and thyroglobulin, and the test set to 10<sup>3</sup> is CA-125, CEA, and  $\beta$ -hCG, and the test set to 10<sup>2</sup> is Free PSA, PSA, CA15-3, SCC, Ferritin, PTH, Cortisol, and Calcitonin. Tests set to 10 include three categories:  $\beta$ 2-Microglobulin, C-peptide, and Testosterone.

**Conclusion** It is expected that it will contribute to improving the quality of nuclear medicine blood tests as the results of dilution experiments can be reported quickly and accurately through the verification of the clinical reportable range.

**Key Words** Clinical reportable range, Upper limit verification, Maximum dilution multiple(ratio)

## 서 론

검사실 내의 모든 정량 검사는 정확도와 정밀도 선형성(linearity)등을 고려하여 측정가능범위(analytical measurement range, AMR) 및 임상보고가능범위(clinical reportable range, CRR)가 설정되어 있다. 측정가능범위란 검증을 통해 얻은

타당성 있는 결과 범위로 검사실의 모든 정량검사에서는 측정가능범위를 명시하고 있다. 뿐만 아니라 측정가능범위를 초과하는 검체에 대해서도 임상적 의사결정을 하기 위해서 희석을 통해 보고할 수 있는 임상보고가능범위가 설정되어 있어야 한다. 임상보고가능범위는 검체가 측정가능범위를 벗어날 때 희석이나 농축 등의 전처리를 통해 정량적 검사결과값을 도출하는데, 이때 보고될 수 있는 분석수치의 범위를 임상보고가능범위라 한다.<sup>1)</sup> 임상보고가능범위는 각 검사실에서 적용하고 있는 희석방법과 희석액 종류 및 결과 보고 방법에 따라 설정된 보고범위가 검사실마다 다를 수 있다. 따라서 검사실에서 설정한 측정가능범위를 초과하는 핵의학 검체검사들은 임상보고가능범위를 설정하고 이에 맞는

• Received: April 15, 2022 Accepted: May 6, 2022  
• Corresponding author: **Geun Ui Lee**  
• Department of Nuclear Medicine, Seoul Asan medical Center, Seoul Korea 388-1 Pung nap 2-dong Song pa gu, Seoul 138-736, Korea  
Tel: +82-8108-0384  
E-mail: rms0384@gmail.com

희석방법과 보고방법이 정의되고 문서화되어야 한다.<sup>1)</sup> 통상적인 핵의학 검체검사는 희석하여 진행해야하는 검사항목의 수가 많지 않아 임상보고가능범위의 설정 시 보편적인 기준을 마련하거나 상한치 검증을 실시하는 것이 어려웠다. 또한 핵의학과에서 시행하는 검체검사 종목별로 사용하는 키트의 제조사가 동일하지 않고, 검사키트마다 희석방법 및 희석액의 종류도 다르기 때문에 검사자가 적절한 희석배수를 정하여 희석실험결과를 보고하는데 어려움이 있다. 이에 본 연구에서는 그동안 측정된 희석 검사 결과의 자료에 근거하여 핵의학 검체검사 종목별 최대 희석배수의 설정 및 임상보고가능범위의 상한치 검증을 실시하고, 데이터의 수집과 분석을 통해 임상보고가능범위를 실증적 방식으로 검토하고자 하였다. 그리고 키트 별로 희석배수를 표준화함으로써 보다 정확한 검사 결과를 도출하는데 도움이 되고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 대상

2021년 3월 01부터 7월 31일까지 서울아산병원 핵의학과에서 시행하는 72건의 핵의학 검체검사 중 희석을 시행하는 30종의 검사종목을 대상으로 연구를 진행하였다. 통상적으로 희석을 진행하지 않는 RIA 검사항목은 본 연구에서 제외하였다.

### 2. 검사방법

본 연구에서는 각 검사의 매뉴얼에 명시된 방법에 따라 3 단계로 나누어 실험을 진행하였다. 첫 단계는 검체의 전처리 과정으로, 본 실험에서는 측정가능범위를 벗어나는 검체를

희석 검사의 대상으로 판단하고 이에 해당되는 검체들을 적절한 희석액으로 계단 희석하였다. 희석배수는 결과의 비교가 서로 간 용이하도록 검사종목에 따라 2배수 혹은 10배수의 일관된 방향으로의 계단식 희석을 진행하여 비교 분석하였다(Fig. 1). 두번째 단계로 검체를 희석하는 희석액을 선정하였다. 희석 시 사용되는 검체의 희석액 및 희석방법 그리고 최종결과 계산식 등은 검사종목에 따라 상이할 수 있다. 일반적으로 희석액의 종류는 증류수, 키트 내 0 Standard, buffer 등을 사용하는데, 본 연구에서는 검사 항목별 희석액 비교실험을 통해 본원에서 설정한 희석액을 사용하였다(Table. 1). 마지막으로 희석실험결과에 대한 계산 및 최종결과 보고 단계이다. 희석 검체의 측정값에 해당 희석배수를 곱한 값을 최종 희석 결과값으로 설정하였으며, 희석 배수에 따른 측정값들이 비례하는 선형성을 보이며 동시에 측정가능범위 내에 속할 경우 그 중 가장 낮은 배수의 희석결과를 최종 결과로 설정하였다. 다만, 최종결과 계산식은 희석방법, 희석물질, 희석과정에 사용되는 기타 물질 등에 따라 오차범위를 줄이고자 조금씩 상이하게 실시하였다.

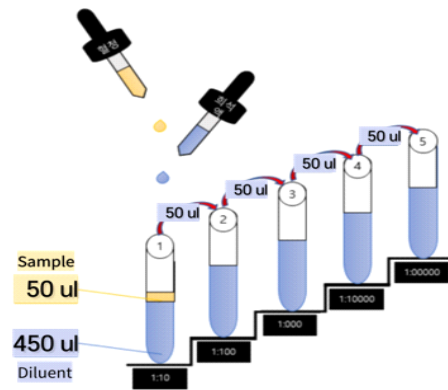


Fig. 1. Describes how to perform serial dilution.

Table 1. Types of dilutions used in the RIA diluent experiment

Diluent	검사종목
KIT 내BUFFER	AFP ( $\alpha$ -fetoprotein), CA 15-3, CA19-9, SHBG (Sex Hormone Binding Globulin)
KIT 내0 Standard	F-PSA (Free Prostate Specific Antigen), Cortisol, FSH (Follicle Stimulation Hormone), renin activity, PTH (Parathyroid Hormone), Insulin, Calcitonin, LH (luteinizing hormone), E2 (estradiol)
KIT 내 전용 Diluent	PSA (Prostate Specific Antigen), CA-125, CA72-4, CEA (Carcinoembryonic Antigen), ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone), C-Peptide, $\beta$ -hCG, Aldosterone
Saline	SCC (Squamous Cell Cancer Antigen), ADD (Anti-DNA Antibody), Testosterone, HGH (Human Growth Hormone)
PBS (C-peptide kit 내)	Ferritin, $\beta$ 2-Microglobulin, TG (Thyroglobulin), Prolactin, GAD-Ab (glutamic acid decarboxylase antibodies)

### 3. 백분율 허용범위의 설정

검체를 희석할 때 검체 원액을 일정한 비율로 계단식으로 희석할 경우 계통오차 및 과실 오차가 발생할 확률이 높아진다. 또한 고농도 검체는 일부 immunoradiometric assay (IRMA)에서 심한 Hook effect를 나타내어 검증과정에서 검사결과에 대한 신뢰도를 떨어트릴 수 있다. 따라서 상한치 검증에 필수적인 신뢰할 만한 표본을 수집하기 위해 백분율 허용범위 구간을 설정하였다. 따라서 본 연구에서는 분석 절차의 범위 설정에 있어 다양한 참고문헌에서 공통으로 제시하는 백분율 허용범위 80~120%를 신뢰구간으로 결정하였다. 이를 근거로 확보한 표본들을 N값으로 지칭한다.

### 4. 분석방법

총 3차례에 걸쳐 30종목의 검체검사 항목에 대해 계단 희석을 시행한 후 획득한 실험 결과를 기댓값, 실측값, 계산값 및 허용오차 백분율로 결과를 도출하였으며, 각 항목의 정의는 Table. 2와 같다. 본 실험에서는 임상보고 가능한 범위의 상한치 검증에 필요한 최소 표본수를 5개 이상으로 설정하였고, 최소 표본수를 만족할 경우 희석실험을 실시하여 검사 항목별 최대희석배수를 설정하였다

**Table 2.** Components of data collection of dilution results

요소	설명
기대값	검사결과 보고값/희석배수
실측값	실제 측정장비에서 계측된 값
계산값	실측값 X 희석배수
백분율	실측값/기대값 X100 (선형성의 유효성 평가)

## 결과

30종목의 검체검사 중 검증에 필요한 최소 표본수 (N≥5)를 만족한 검사는 19종목이었으며, 종양검사와 기타 검사 항목에서 가장 많은 수인 표본크기가 모집되었다. 12가지 종양검사 중에서 표본수를 만족하여 상한치 검증 및 최대 희석배수의 설정이 가능한 검사항목은 9개이었다(Table. 3). 이 항목들 중 AFP는 최대 10,000배 희석하였으며, β 2-Microglobulin은 최대 10배까지 희석하였다. CA19-9, CA72-4, ADD는 표본수를 만족하지 못하여 분석에서 제외하였다.

**Table 3.** Establishment and verification of the upper limit according to the maximum dilution multiples in Tumor part

종양 종목	시험범위 (임상보고가능범위)	최대희석 배수(배)	N값 (개수)
AFP	0.36~7,000,000 ng/mL	10,000	10
CA-125	1.1~500,000 U/mL	1,000	15
CEA	0.30~190,000 ng/mL	1,000	10
β -HCG	0.23~1,000,000 mIU/ml	1,000	10
Free PSA	0.02~1,000 ng/mL	100	9
PSA	0.04~9,000 ng/mL	100	10
CA15-3	0.20~20,000 U/mL	100	10
SCC	0.03~14,500 ng/mL	100	10
β2-Microglobulin	0.06-250 μ g/mL	10	10
CA19-9	1.5~2,000,000 U/mL	10,000	불만족
CA72-4	0.80~70,000 U/mL	1,000	(N<5)
ADD	2.5~9,000 IU/mL	100	:분석제외

16가지 호르몬검사 중에서 표본수를 만족하여 상한치 검증 및 최대 희석배수의 설정이 가능한 검사항목은 8개이었다(Table. 4). 이 중 가장 희석을 많이 할 수 있는 항목은 TG로 최대 10,000배까지 희석하였고, 희석을 적게 해야 하는 검사는 FSH와 renin activity로 각각 최대 4배와 2배 희석하였다. ACTH, SHBG, insulin, prolactin, HGH, GAD-Ab, LH, E2 검사는 표본수를 만족하지 못하여 임상보고가능범위 설정에서 제외하였다.

**Table 4.** Establishment and verification of the upper limit according to the maximum dilution multiples in Hormone part

호르몬 종목	시험범위 (임상보고가능범위)	최대희석 배수(배)	N값 (개수)
TG	0.08~2,300,000 ng/mL	10,000	10
PTH	3.0~150,000 pg/mL	100	6
Calcitonin	1.5~100,000 pg/mL	100	9
Cortisol	0.09~7,000 μ g/dL	100	10
Testosterone	0.03~120 ng/mL	10	8
FSH	0.10~528 mIU/mL	4	5
Aldosterone	1.5~21,600 ng/dL	100	11
renin activity	0.20~60 ng/mL/hr	2	10
ACTH	3.0~183,000 pg/mL	100	
SHBG	0.10~2,500 nmol/L	10	
Insulin	0.60~1,300 uIU/mL	10	
Prolactin	0.35~14,200 ng/mL	100	불만족
HGH	0.04~50 ng/mL	1	(N<5)
GAD-Ab	0.10~100 U/mL	1	:분석제외
LH	0.20~189 mIU/mL	1	
E2	4.0~4638 pg/mL	4	

다음으로 임상보고 가능범위의 상한치 검증 및 최대희석 배수의 설정이 이루어진 기타항목으로 ferritin과 C-peptide

가 있었으며, 최대희석배수는 각각 100배와 10배 였다 (Table. 5).

**Table 5.** Establishment and verification of the upper limit according to the maximum dilution multiples in the other part

기타 종목	시험범위 (임상보고가능범위)	최대희석 배수(배)	N값 (개수)
Ferritin	0.39~100,000 ng/mL	100	14
C-peptide	0.10-170 ng/mL	10	15

## 결론 및 고찰

본 연구에서는 희석 후 시행하고있는 핵의학 검체검사 30종목 중 총 19종목이 검증에 필요한 최소 표본수를 충족하여 각 검사종목에 대한 임상보고가능범위 상한치를 검증하였고, 임상적 진단에 도움을 줄 수 있는 최대희석배수를 설정하였다. 본 연구에서 설정한 분석 절차의 범위는 분석 방법이 적절한 수준의 정밀도, 정확도 및 선형성을 갖고 있음이 입증된 시료 및 분석물의 상한 및 하한치 농도 사이의 간격을 의미한다.<sup>2)</sup> 결과범위에 대한 선형성은 시료의 농도 범위가 예상 농도 범위의 80~120% 안에 드는 최소 5~6개의 표준농도(값)를 바탕으로 입증할 수 있다.<sup>3)</sup> 이를 근거로 표본 N값이 최소 5개 이상인 검사종목의 상한치를 검증하고 최대희석배수를 설정하였다.

검사종목 중 insulin 검사는 기존 방법에서 10배수 희석을 진행하였으나, 임상적으로 2배수 희석검체가 많아 최대희석배수의 하향 조정을 검토하였다. 호르몬 종목 중 aldosterone 검사는 본 연구기간 중 표본수가 4개로 분석대상에서 제외되었으나, 추후 검체를 추가 수집하여 최종적으로 100배에서 최대희석배수를 설정하고 상한치 검증을 완료하였다. 그 외의 검체검사 종목들도 추후 추가 연구를 통해 조건을 충족하는 표본을 수집한다면 상한치 검증 및 최대희석배수의 설정이 가능할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 검사종목별로 희석을 많이 하는 종목과 적게 하는 종목을 나누어 비교해볼 수 있었다. 또한 각 검사종목의 특성에 따라 최대희석배수를 표준화함으로써 불필요한 희석을 최소화하고 희석 배수 간 오차범위를 줄일 수 있는데 도움을 주고자 하였다. 임상보고 가능범위는 본래 재검사에 따른 검사 소요시간의 절감과 재검사에 수반되는 비용을 고려한 경제성에 기반한 임상적 의의를 지니고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 본 연구의 실증적 방안에서의 임상보고가능범위 검증은 이러한 경제적 측면의 효율을 극대화하는 데 도움이 될 것으로 사료된다. 더불어 본원 핵의학과에서 시행하는 희석 실험의 정확성을 높

이는 데 기여하고자 하였다. 반면 표본수가 부족하여 검증 및 희석배수의 설정이 어려웠던 나머지 11종목도 지속적인 연구를 통해 검체 수를 추가하여 분석한다면 보다 정확한 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요약

핵의학과 검체검사에서 시행되는 모든 정량 검사는 정확도와 정밀도를 고려하여 측정가능범위 및 임상보고 가능범위가 설정되어 있다. 측정가능범위를 벗어난 검체는 희석 실험을 시행하여 최종 검사 결과를 보고해야 한다. 그동안 희석을 진행하는 검체의 수가 많지 않았고, 검사 종목별 희석액이 시약마다 달라 검사자가 실험 종목마다 적절한 희석배수를 정하여 결과를 보고하는 데 어려움이 있었다. 이에 따라 RIA 검사별 최대 희석배수의 설정 및 임상보고가능범위의 상한치 검증이 필요하다고 판단되었다. 본 연구에서는 KOLAS를 바탕으로 설정된 임상보고 가능범위의 상한치를 검증하였고 그에 따른 각 종목의 최대희석배수를 설정하였다.

서울아산병원에서 시행하고 있는 모든 RIA 검사 중 희석하는 30종의 검사종목을 대상으로 연구를 진행하였다. 2021년 3월부터 7월까지 총 4개월간의 자료를 종목별로 취합하여 분석하였다. 각 검체는 검사 항목별 Kit 내 기재된 희석방법에 따라 D.W, Kit 내 전용 Diluent 혹은 0 Standard로 희석하였으며 2배, 4배 및  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  등의 계단희석을 진행한 검체를 대상으로 하였다. 실험 결과의 유효성을 확인할 수 있는 지표로 실측값을 기댓값으로 나눈 백분율을 사용하였다. 본 연구에서는 백분율 허용범위를 80~120%로 설정하였으며 이를 만족한 실험 결과를 연구의 표본이 되는 N값으로 설정하였다.

총 30종의 검사항목 중 백분율 허용범위에 속하는 N값의 수가 5개 이상인 종목은 19종목이었다. 희석배수의 검증 결과  $10^4$ 로 설정된 검사는  $\alpha$ -fetoprotein, Thyroglobulin으로 2종목이며,  $10^3$ 로 설정된 검사는 CA-125, CEA,  $\beta$ -hCG로 3종목,  $10^2$ 로 설정된 검사는 Free PSA, PSA, CA15-3, SCC, Ferritin, PTH, Cortisol, Calcitonin, Aldosterone 으로 9종목이다.  $10$ 으로 설정된 검사는  $\beta 2$ -Microglobulin, C-peptide, Testosterone 3종목이 있다. 남은 2종목인 Renin Activity와 Follicle Stimulation Hormone은 각각 2배, 4배로 설정하였다. 그 외 특이사항이 있는 항목은 11종목으로 허용범위를 벗어난 결과가 섞여 있어 표본이 부족하거나 희석검체 수가 부족하여 값을 설정하기 어려웠다. 이러한 종목들은 기존 자료를

토대로 희석배수를 설정하였고, 추후 자료를 수집하여 허용 범위 내에 속하는 N값의 수가 충족된다면 희석배수를 재설정할 계획이다.

본 연구를 통해 임상보고 가능범위를 실증적 방식으로 검토하고, RIA 검사별 적절한 희석배수를 표준화함으로써 핵의학 검사의 경제성을 높이고, 연구를 통해 검증된 임상보고 가능범위 내에서 더욱 정확한 희석검사결과를 도출하는 데 도움이 되고자 하였다. 이를 통해 핵의학 혈액검사의 전반적인 질 향상을 기대해 볼 수 있으리라 사료된다.

### Reference

1. Sang-Wu Chang, Sang-Gon Lee, Ho-Seong Choi, Eun-Young Song, Yong-Won Park and In-Ae Lee. An Empirical Study of the Clinically Reportable Range in Clinical Chemistry. *Korean J Clin Lab Sci.* 2007;39:32-36
2. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR ACTIVE CONSTITUENT, AGRICULTURAL AND VETERINARY CHEMICAL PRODUCTS. APVMA. October 2004;4-5
3. Canary Wharf. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. European Medicines Agency (EMA).1995;2-6
4. J. Mark Green. A Practical Guide to Analytical Method Validation. American Chemical Society. 1996;305:305-309
5. BioPharm International. Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods. Analytical Best Practices. 2016:4-6