

면역방사계수측정법의 민감도 향상을 위한 변법의 평가

권원현 · 강미지 · 김나경 · 박지솔 · 김정인 · 이경재

분당서울대학교병원 핵의학과

Evaluation of Variation Method to Improve the Sensitivity of Immunoradiometric Assay

Won-Hyun Kwon, Mi-Ji Kang, Ji-Sol Park, Jung-In Kim and Kyung-Jae Lee

Department of Nuclear Medicine, Bun-Dang Seoul National University hospital, Seongnam-si 13620, Republic of Korea

Abstract

Purpose The concentration of PSA (Prostate Specific Antigen) after radical prostatectomy in prostate cancer patients is a predictor of biochemical recurrence, and the AUA (American Urological Association) is defined as biochemical recurrence when the concentration of PSA is measured at 0.2 ng/mL or more, and when the concentration is measured at 0.2 ng/mL or more at the retest. This standard is also applied our hospital. In this laboratory, the PSA reagent using IRMA (Immunoradiometric Assay) is used, and the sensitivity at a very low value was not as good as the reagent used in the department of laboratory medicine. This study aims to increase the reliability of the results by improving the precision and sensitivity of very low values.

Materials and Methods As a reagent for the study, PSA reagent using IRMA was used. As a method to improve the precision and sensitivity of very low values, a variation method on the serum volume(25 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL) was studied, and variation usefulness evaluation was conducted. The evaluation items were compared the results of precision, analytical sensitivity, recovery rate, dilution test, high-dose hook effect test, parallel test and very low concentration values(n = 20).

Results The validation results were displayed in the order of 25 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL. As the serum volume increased, it was confirmed that CV (Coefficient of Variation)(%) improved. Analytical sensitivity(ng/mL) was 0.038, 0.041, 0.017, 0.015 and recovery rate(%) was 101±3, 101±3, 99±2, 97±4. very low concentration values(ng/mL) between each volume(n=20) were 0.135±0.068, 0.076±0.050, 0.048±0.034, 0.046±0.034. and high dose hook effect appeared as the serum volume increased.

Conclusion Through the variation usefulness evaluation, it was confirmed that as the serum volume increased, the precision and sensitivity improved at very low concentration values. However, it is necessary to pay special attention to the occurrence of high-dose hook effect as the serum volume increases. In the case of tests that requires very low concentration values, it is thought that the reliability of the result will be increased if the variation method is properly used after the variation usefulness evaluation.

Key Words Immunoradiometric Assay(IRMA), Sensitivity, High-Dose Hook Effect

서론

핵의학 검체검사의 측정원리는 크게 항체에 대한 비표지항원과 표지항원 사이에 일어나는 경쟁반응을 응용한 방사면역 측정법(Radioimmuno Assay, RIA)과 다량의 표지항체로 항원을 모두 결합시킨 후 표지항체 분포를 조사하는 비경쟁

반응을 응용한 면역방사계수 측정법(Immunoradiometric Assay, IRMA)으로 나뉜다[1]. 특히 IRMA은 동일물질에 대해서 RIA보다 예민도가 우수하고 측정범위가 더 넓어서 기존 RIA에서 IRMA로 대체되고 있다.

본원에서는 비뇨의학과에서 전립선암 환자들이 근치적 전립선절제술 후의 생화학적 재발의 예측인자로 prostate specific antigen (PSA)의 농도를 중요시 하고 있다. 미국 비뇨기과학회(American Urological Association, AUA)는 PSA의 농도가 0.2 ng/mL이상으로 측정이 되고, 재검사를 한 농도가 0.2 ng/mL보다 큰 경우를 생화학적 재발로 정의 하고 있고, 본원 비뇨의학과 역시 그 기준을 적용하고

- Corresponding Author : **Won-Hyun Kwon**
- Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 82, Gumi-ro 173beon-gil, Budang-Gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
Tel: +82-31-787-2951, Fax: +82-31-787-4018
E-mail: hyun2no1@naver.com

있다. 하지만 현재 사용하고 있는 PSA시약이 민감도의 재현성이 떨어져 비노기과로부터 PSA의 결과값이 높게 관찰되는 측면이 있어 재발 유무 판정이 어렵다고 지속적으로 컴플레인이 발생하였고, 핵의학과 진단검사의학과 양쪽으로 검사를 진행하는 경우도 빈번하게 생겼다(Table 1, 2).

본 검사실에서 사용하는 PSA는 IRMA를 이용한 시약이고, IRMA의 특성을 이용하여 아주 낮은 농도값에서 민감도와 재현성을 높이기 위해서 표준용액들 간의 count per minute (CPM)값의 차이를 벌릴 수 있는 방법을 연구하고, 그 변법을 유효성 평가를 통하여 적합성을 판단한 후에 검사실에 적용할 수 있게 하는 것이다. 즉 아주 낮은 농도값의 정밀도와 민감도를 향상시켜 결과의 신뢰도를 높이고자 변법에 대한 연구를 진행하게 되었다.

실험재료 및 방법

1. 검사 방법

현재 본원 비뇨의학과에서 컴플레인 받은 문제를 해결하고자 시작한 연구이기에, 검사실에서 사용한 시약은 hPSA [I-125] IRMA KIT(ISOTOPE, Hungary)를 사용하였고 감마카운터는 Dream Gamma-10(신진메딕스, Korea)를 사용하여 측정하였다.

2. 분석 방법

검체 볼륨을 4그룹(25 μ L[원법], 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L)으로 나누어 연구를 진행하였고, 각 볼륨 별 결과값을 가

지고 정밀도, 분석적 민감도, 회수율, 고용량 후크효과 검사, 희석검사, 평행성검사 순으로 유효성 평가를 진행하였고, 추가적으로 원법, 변법, 진단검사의학과와의 PSA 농도값들의 상관관계를 비교하였다(Fig. 1).

Table 1. Comparison of results of nuclear medicine and laboratory medicine

(unit : ng/mL)		
No.	NM	LM
1	0.125	0.018
2	0.223	0.116
3	0.146	0.081
4	0.103	0.026
5	0.180	0.022
6	0.224	0.109
7	0.343	0.062
8	0.118	0.022
9	0.204	0.100
10	0.236	0.130

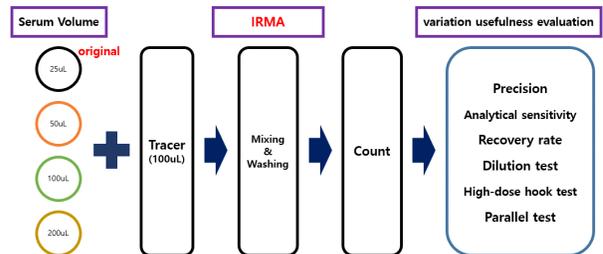


Fig. 1. This figure shows inspection methods and the evaluation items.

Table 2. Intra-assay precision(5times) - Bkg. Subtraction

		(result unit : ng/mL)				
STD	times	1	2	3	4	5
		CPM				
0.000		224	203	240	214	229
0.100		524	535	549	469	484
0.500		700	759	723	699	714
2.000		2354	2277	2300	2344	2339
8.000		8696	8761	8759	8860	8812
25.000		24498	24550	24916	24623	24343
100.000		87730	87270	87272	87612	86814
CPM		543	579	572	585	586
Result		0.122	0.144	0.128	0.245	0.221

(농도 단위 : ng/ml)

25uL				50uL				100uL				200uL			
STD	농도	CPM	B/T(%)	STD	농도	CPM	B/T(%)	STD	농도	CPM	B/T(%)	STD	농도	CPM	B/T(%)
1	0	200	0.07	1	0	159	0.05	1	0	88	0.03	1	0	58	0.02
2	0.1	502	0.17	2	0.1	671	0.23	2	0.1	969	0.33	2	0.1	1733	0.60
3	0.5	1397	0.48	3	0.5	2414	0.83	3	0.5	3317	1.14	3	0.5	5750	1.98
4	2.0	3627	1.25	4	2.0	6806	2.34	4	2.0	11606	4.00	4	2.0	20139	6.93
5	8.0	13353	4.60	5	8.0	24872	8.56	5	8.0	41734	14.37	5	8.0	69501	23.93
6	25.0	40808	14.05	6	25.0	72042	24.81	6	25.0	113323	39.02	6	25.0	168000	57.85
7	100.0	139166	47.92	7	100.0	213661	73.57	7	100.0	253845	87.40	7	100.0	264204	90.97

Fig. 2. This figure is the results of cpm and B/T(%) of the standard materials for each volume.

결 과

1. 표준용액의 CPM과 B/T (Bound/Total)(%)(Total CPM : 290431)

검체 볼륨이 커질수록 표준 용액간의 CPM 차이와 B/T(%)가 커지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. 정밀도 평가

각 볼륨별로 측정 내 정밀도 20회, 측정간 정밀도 10회를

측정하였고, coefficient of variation (CV)(%)값은 검체 볼륨이 커질수록 좋아지는 경향이 있다(Fig. 3).

3. 분석적 민감도

각 볼륨 별로 표준용액(0 ng/mL)을 20회 분주하여 구하였고, 검체 볼륨이 커질수록 분석적 민감도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

● Intra-Assay(CV(%) : 5~10) - 20회 측정

(Mean값 단위 : ng/ml)

25uL				50uL				100uL				200uL			
No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)
1	0.058	0.012	21.30	1	0.036	0.005	12.57	1	0.025	0.003	10.27	1	0.012	0.001	10.35
2	0.086	0.013	15.08	2	0.061	0.006	9.57	2	0.047	0.003	6.82	2	0.045	0.002	4.56
3	0.209	0.024	11.43	3	0.129	0.015	11.84	3	0.098	0.006	6.59	3	0.209	0.004	4.19
4	0.343	0.026	7.46	4	0.281	0.015	5.47	4	0.248	0.010	3.97	4	0.343	0.008	3.20

● Inter-Assay(CV(%) : 10~15) - 10회 측정

25uL				50uL				100uL				200uL			
No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)	No.	Mean	SD	CV(%)
1	0.046	0.016	35.09	1	0.058	0.012	13.42	1	0.058	0.002	11.15	1	0.011	0.001	12.35
2	0.076	0.017	22.42	2	0.086	0.013	11.42	2	0.086	0.005	9.16	2	0.044	0.002	5.43
3	0.143	0.027	18.88	3	0.209	0.024	7.86	3	0.209	0.008	7.39	3	0.098	0.005	5.03
4	0.307	0.026	8.53	4	0.343	0.026	8.29	4	0.343	0.017	7.39	4	0.229	0.011	5.01

Fig. 3. This figure is the results of the precision(intra-assay, inter-assay) for each volume.

● Analytical sensitivity (n=20)

25uL			50uL			100uL			200uL		
	농도	CPM									
STD 1	0	264	STD 1	0	166	STD 1	0	112	STD 1	0	80
STD 2	0.1	568	STD 2	0.1	701	STD 2	0.1	1073	STD 2	0.1	1667
STD 3	0.5	1162	STD 3	0.5	1874	STD 3	0.5	3251	STD 3	0.5	5348
STD 4	2.0	3724	STD 4	2.0	6600	STD 4	2.0	11799	STD 4	2.0	19578
STD 5	8.0	13295	STD 5	8.0	23905	STD 5	8.0	42328	STD 5	8.0	69861
STD 6	25.0	39511	STD 6	25.0	69410	STD 6	25.0	117235	STD 6	25.0	173162
STD 7	100.0	139209	STD 7	100.0	210599	STD 7	100.0	267139	STD 7	100.0	278850
Mean		292.25	Mean		262.30	Mean		201.50	Mean		169.80
SD		43.17	SD		62.04	SD		35.27	SD		58.09
2SD		86.33	2SD		124.08	2SD		70.53	2SD		116.18
3SD		129.50	3SD		186.13	3SD		105.80	3SD		174.27
M+3SD		421.75	M+3SD		448.43	M+3SD		307.30	M+3SD		344.07
M+2SD		378.58	M+2SD		386.38	M+2SD		272.03	M+2SD		285.98
sensitivity		0.038	sensitivity		0.041	sensitivity		0.017	sensitivity		0.011

Fig. 4. This figure is the results of the analytical sensitivity for each volume.

4. 회수율

모든 검체 볼륨에서 회수율이 90-110% 사이에 들어가 우수하게 나왔다(Fig 5).

5. 고용량 후크효과검사

연구에 사용된 시약의 표준액의 최대값은 100 μ L이며, 원법인 25 μ L에서는 후크효과가 없었지만, 희석한 정량값이 8,000 ng/mL 정도에서부터는 볼륨이 50 μ L에서도 후

● 각 Volume별 회수율 (90~110%)

25ul					50ul					100ul					200ul				
pool Serum (PS) (ng/ml)	STD 첨가량 (ng/ml)	기대값(ng/ml)		회수율(%)	pool Serum (PS) (ng/ml)	STD 첨가량 (ng/ml)	기대값(ng/ml)		회수율(%)	pool Serum (PS) (ng/ml)	STD 첨가량 (ng/ml)	기대값(ng/ml)		회수율(%)	pool Serum (PS) (ng/ml)	STD 첨가량 (ng/ml)	기대값(ng/ml)		회수율(%)
		(PS+STD첨가량)/2	측정값(ng/ml)				(PS+STD첨가량)/2	측정값(ng/ml)				(PS+STD첨가량)/2	측정값(ng/ml)				(PS+STD첨가량)/2	측정값(ng/ml)	
0.795	0.100	0.448	0.469	104.80	0.828	0.100	0.464	0.492	106.03	0.709	0.100	0.405	0.406	100.37	0.752	0.100	0.426	0.394	92.49
	0.500	0.648	0.686	105.95		0.500	0.664	0.671	101.05		0.500	0.605	0.559	92.47		0.500	0.626	0.588	93.93
	2.000	1.398	1.379	98.68		2.000	1.414	1.310	92.64		2.000	1.355	1.325	97.82		2.000	1.376	1.329	96.58
	8.000	4.398	4.217	95.90		8.000	4.414	4.433	100.43		8.000	4.355	4.221	96.93		8.000	4.376	4.281	97.83
	25.000	12.898	12.982	100.66		25.000	12.914	12.990	100.59		25.000	12.855	12.829	99.80		25.000	12.876	13.292	103.23
3.629	0.100	1.865	1.957	104.96	3.566	0.100	1.833	1.815	99.02	3.429	0.100	1.765	1.732	98.16	3.483	0.100	1.792	1.681	93.83
	0.500	2.065	2.135	103.41		0.500	2.033	1.971	96.95		0.500	1.965	1.869	95.14		0.500	1.992	1.852	93.00
	2.000	2.815	2.947	104.71		2.000	2.783	2.810	100.97		2.000	2.715	2.712	99.91		2.000	2.742	2.643	96.41
	8.000	5.815	5.720	98.37		8.000	5.783	5.861	101.35		8.000	5.715	5.569	97.45		8.000	5.742	5.637	98.18
	25.000	14.315	14.514	101.39		25.000	14.283	14.535	101.76		25.000	14.215	14.474	101.83		25.000	14.242	15.045	105.64
14.542	0.100	7.321	7.432	101.52	14.463	0.100	7.282	7.395	101.56	14.039	0.100	7.070	7.045	99.65	14.634	0.100	7.367	6.899	93.65
	0.500	7.521	7.437	98.88		0.500	7.482	7.690	102.79		0.500	7.270	7.267	99.97		0.500	7.567	7.128	94.20
	2.000	8.271	7.885	95.33		2.000	8.232	8.621	104.73		2.000	8.020	8.050	100.38		2.000	8.317	7.743	93.10
	8.000	11.271	11.196	99.33		8.000	11.232	11.420	101.68		8.000	11.020	10.968	99.53		8.000	11.317	11.113	98.20
	25.000	19.771	19.511	98.68		25.000	19.732	19.272	97.67		25.000	19.520	19.306	98.91		25.000	19.817	20.079	101.32

Fig. 5. This figure is the results of the recovery rate for each volume.

● 고용량 Hook검사(n=6)

(측정값 단위 : ng/ml)

Sample	Volume 희석배수	25ul		50ul		100ul		200ul	
		측정값	결과값	측정값	결과값	측정값	결과값	측정값	결과값
1	*1	>80		>80		>80		>80	
	*10	10.210	102.100	10.655	106.550	11.230	112.300	12.387	123.870
2	*1	>80		>80		>80		>80	
	*10	60.179	601.790	64.335	643.350	76.070	760.700	>80	
	*100	5.626	562.600	5.802	580.200	6.026	602.600	6.635	663.500
3	*1	>80		>80		>80		>80	
	*10	>80		>80		>80		>80	
	*100	8.673	867.300	8.872	887.200	9.210	921.000	10.571	1057.100
4	*1	>80		>80		>80		24.553	24.553
	*10	>80		>80		>80		>80	
	*100	22.643	2264.300	23.265	2326.500	25.045	2504.500	32.159	3215.900
5	*1	>80		>80		39.770	39.770	13.438	13.438
	*10	>80		>80		>80		>80	
	*100	55.750	5575.000	60.776	6077.600	73.025	7302.500	>80	
	*1000	4.472	4472.000	4.615	4615.000	4.899	4899.000	5.421	5421.000
6	*1	>80		69.635	69.635	20.191	20.191	6.684	6.684
	*10	>80		>80		>80		>80	
	*100	>80		>80		>80		>80	
	*1000	8.211	8211.000	8.913	8913.000	8.998	8998.000	10.562	10562.000

Fig. 6. This figure is the results of high-dose hook effect test for each volume.

크효과가 생겼고, 100 μL에서는 원액의 값이 20.191 ng/mL, 200 μL에서는 원액의 값이 6.684 ng/mL가 나오는 것을 확인 할 수 있었다. 검체 볼륨이 커질수록 고용량 검체의 항원이 과잉되어 후크효과가 심하게 발생하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

6. 낮은 값에서의 각 볼륨 별 민감도

검체 볼륨을 25 μL로 한 검사에서 0.2 ng/mL이상의 값들이 다른 Volume에서는 0.2 ng/mL이하로 나오는 것을 알 수 있었다(Fig. 7).

7. 검체 볼륨 100 μL 변법의 희석시험

각 볼륨 별로 표준용액의 B/T, 정밀도, 분석적 민감도, 회수율, 고용량 후크효과 검사 그리고 낮은 값에서의 민감도 검사들을 통해서 본 검사실에서는 검체 볼륨 100 μL의 변법을 사용하기로 결정하였고, 희석 직선성검사결과는 좋았다(Fig. 8).

● 100ul 변법의 희석시험(직선성)

No.	희석배수	농도값(ng/ml)	
		검체1	검체2
1	1배	122.062	101.076
2	2배	61.031	50.538
3	4배	25.471	20.932
4	8배	12.994	10.601
5	16배	6.382	5.265
6	32배	3.046	2.631
7	64배	1.503	1.281
8	128배	0.756	0.685
9	256배	0.360	0.356
10	512배	0.189	0.184
11	1024배	0.108	0.095

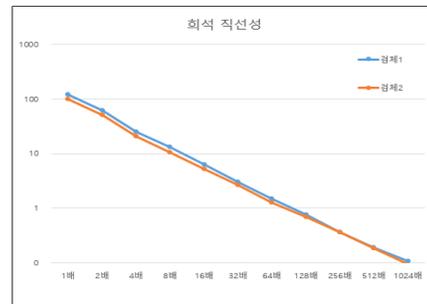


Fig. 8. This figure is the results of the dilution test for 100 uL variation method.

● Volume별 Low값 민감도

(측정값 단위 : ng/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
25ul	0.032	0.029	0.079	0.081	0.059	0.121	0.073	0.067	0.084	0.152	0.234	0.252	0.134	0.201	0.185	0.158	0.198	0.171	0.199	0.181
50ul	0.014	0.024	0.018	0.024	0.051	0.027	0.038	0.036	0.040	0.088	0.143	0.126	0.044	0.083	0.107	0.133	0.116	0.122	0.166	0.129
100ul	0.011	0.006	0.011	0.006	0.016	0.021	0.026	0.022	0.019	0.059	0.105	0.074	0.033	0.064	0.064	0.085	0.072	0.077	0.099	0.083
200ul	0.007	0.005	0.008	0.007	0.014	0.014	0.025	0.025	0.017	0.065	0.095	0.067	0.034	0.056	0.064	0.083	0.081	0.076	0.100	0.085

Fig. 7. This figure is the results of very low concentration values for each volume.

8. 검체 볼륨 100 μL 변법의 평행성 검사

100 μL 변법의 평행성 검사는 기울기가 1에 가까워 우수하게 나왔다(Fig. 9).

● 100ul 변법의 평행성검사

(단위 : ng/ml)

No.	희석배수	기대값	관찰값
1	1배	74.416	74.416
2	2배	37.208	34.295
3	4배	18.604	16.154
4	8배	9.302	7.857
5	16배	4.651	3.967
6	32배	2.325	1.973
7	64배	1.162	0.962
8	128배	0.581	0.434
9	256배	0.290	0.203
10	512배	0.145	0.092
11	1024배	0.070	0.001

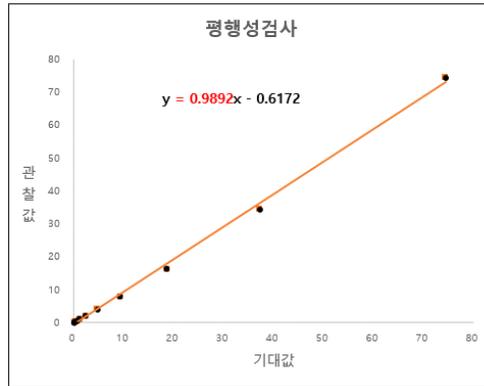


Fig. 9. This figure is the results of the parallel test for 100 uL variation method.

9. 원법(25 μL), 변법(100 μL) 그리고

진단검사의학과의 상관관계 비교(n=18)

진단검사의학과와의 상관관계가 원법(25 μL)보다 변법(100 μL)이 더 좋게 나오는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

고 찰

본 연구를 통해서 검체 볼륨이 커질수록 표준용액의 B/T, 정밀도, 분석적 민감도, 회수율, 낮은 값에서의 민감도 검사의 결과가 우수하다는 것을 알 수 있었지만, 고용량 후크효과가 심해지는 것을 알 수 있었다. 검사실에서는 이러한 결과를 가지고 후크효과현상을 감수하고, 본원 비뇨의학과 의 컴플레인을 해결할 수 있는 방안을 모색하기로 했다.

● 25ul VS 100ul VS 진단검사의학과 (n=18)

(측정값 단위 : ng/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
25ul	0.296	0.684	0.546	0.391	0.439	0.546	0.783	0.571	0.590	0.736	0.743	1.146	1.717	2.249	2.452	2.662	3.228	3.785
100ul	0.043	0.392	0.391	0.302	0.320	0.374	0.472	0.471	0.384	0.532	0.582	0.924	1.364	1.875	2.095	2.416	2.915	3.587
진검	0.026	0.388	0.396	0.418	0.505	0.525	0.565	0.570	0.607	0.640	0.702	0.983	1.590	2.000	2.070	2.240	2.830	3.310



Fig. 10. This figure is the results of the correlation between the original method (25 uL), the variation method (100 uL), and diagnostic laboratory medicine.

연구결과를 가지고 여러 차례 회의를 통하여 검체 볼륨을 100 μ L를 사용하는 변법을 사용하기로 결정하였다. 특히 검체 볼륨이 커질수록 고용량 후크효과현상이 생기는 것에 대한 각별한 주의가 필요하다고 판단하였고 현재 연구하면서 나온 PSA의 고농도값은 8,000 ng/mL정도이고 볼륨 100 μ L의 원액 검사수치는 20.191 ng/mL가 나왔지만, 더 높은 수치의 고농도값이 나올 수 있다고 판단하여 PSA의 농도값이 10 ng/mL이상이면 검체를 희석하여 재검사를 하기로 하였다.

결 론

변법 유효성 평가를 통해서 검체 볼륨이 커질수록 아주 낮은 값에서 정밀도와 민감도가 향상된다는 것을 확인하였고, 반대로 고용량 후크효과현상이 심해진다는 것도 알 수 있었다. 이러한 연구결과를 토대로 IRMA를 이용한 검사에서, 특징적으로 아주 낮은 값을 요구하는 검사의 경우 검체 볼륨의 변화를 주는 변법을 각 검사실에서 적절하게 사용하면, 그 결과값의 신뢰도를 높여줄 것으로 사료된다.

REFERENCE

1. 김정인, 권원현, 이경재. IRMA 검사법 중 알고리즘 변경에 따른 장비 간 결과값 비교분석. 핵의학기술. 2019; 25(2):43-4