

## Original article

# CA 19-9 결과보고 개선을 위한 One step 방식과 Two step 방식의 비교에 관한 연구

안재석, 김지나, 박광서, 주은빛, 윤상혁, 김윤철  
국립암센터 핵의학과

## A Study on the Comparison of One Step Method and Two Step Method to Improve Reporting of CA 19-9 Results

Jae-Seok An, Ji-Na Kim, Kwang-Seo Park, Eun-Bit Joo, Sang-Hyuk Yoon, Yoon-Cheol Kim

Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center, Goyang-si, Korea

**Corresponding Author** : Jae-Seok An, Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Republic of Korea, Tel: +82-31-920-0173, Fax: +82-31-920-0179, E-mail: [anjaedol@ncc.re.kr](mailto:anjaedol@ncc.re.kr)

### ABSTRACT

**Purpose:** CA 19-9 is the most widely used tumor marker for the diagnosis of digestive system tumor, especially pancreatic and biliary tract cancer. This study was conducted to improve the result value near reference range by comparing the reagents of CA 19-9 one step method and two step method. In addition, it was intended to establish a standard for selecting reagents. **Material and Methods:** 120 patients who visited the National Cancer Center in 2023 were selected as subjects for this study. The reagents used in the study were CA 19-9 IRMA kits (Shinjin, Korea) and three types of reagents were compared. Two step method reagent that is currently being used (A), one step method reagent (B) and two step method reagent improved by request (C) were compared and regression analysis was performed on their data. And we also performed recovery test, linearity test and hook effect test for each reagent. **Result:** There were 46 cases of reagent B in which the concentration value was lower than the result measured in reagent A that was previously used, and 77 cases of reagent C. As a result of regression analysis of reagents A, B, and C, the coefficients of determination of reagents A and B, reagents A and C, and reagents B and C were 0.653, 0.577, and 0.875. In the recovery rate test and the linearity test, the results of all reagents were good, and in the hook effect test, reagent B showed a hook effect at a low value. **Conclusion:** The improved reagent C appears to have been improved based on the concentration value of reagent B, which the manufacturer judged to be more stable at low concentrations. The hook effect in reagent B can be a fatal reason for disqualification when selecting reagents in general patient samples which high-concentration samples appear frequently. The first improved reagent C will be able to be used once it is confirmed that it has more stability for various concentration values.

**Key Words:** CA 19-9, One Step, Two Step

## 서론

CA 19-9(Carbohydrate antigen 19-9)는 소화기계 종양, 특히 췌장암과 담도암 진단에 가장 널리 사용되고 있는 종양표지자이다[1]. 본 원 핵의학과에서는 종양의 진단 및 항암치료의 예후를 추적하는데 사용하고 있으며 암 예방 차원의 개인건강검진 항목으로도 많이 사

Received April 03, 2024

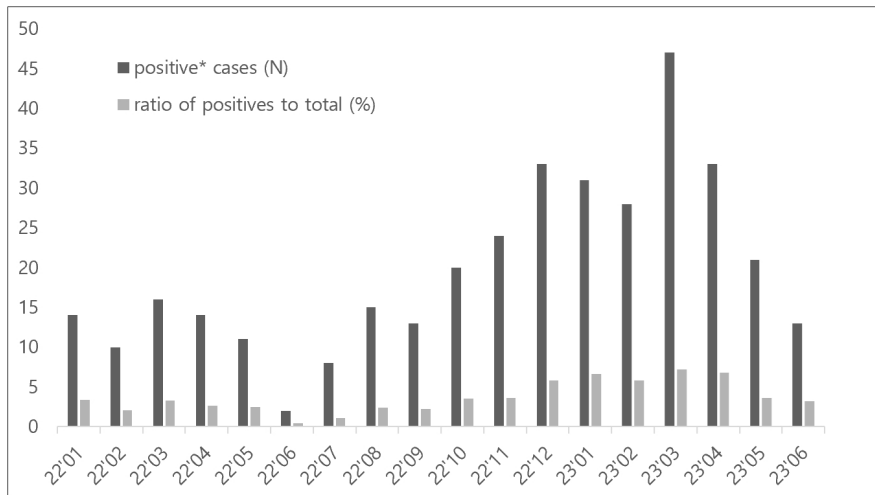
Revised April 23, 2024

Accepted May 02, 2024

Copyright © 2024 The Korean Society of Nuclear Medicine Technology.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

용하고 있다. 그런데 최근 들어서 검사 결과값의 이상 소견을 문의하는 전화가 급격하게 늘어났다. 검사건수의 비중이 높은 간담도 췌장암센터와 건강검진센터 두 곳에서 주로 문의가 있었으며 대부분 2022년 12월부터 2023년 4월까지 검사된 결과값이 참고범위 (0–37) U/mL 보다 다소 높다고 하는 내용이였다. 일반 환자는 단순비교가 어려웠으나 건강검진센터 환자의 통계 결과는 명확하게 이상결과 빈도수가 높음을 보여주고 있었다. 해당 기간 건강검진센터의 CA19-9 양성 건수의 비율은 다른 기간의 평균에 비하여 두 배 이상 높았다(Fig. 1). 우리는 문제의 심각성을 인지하고 원인 파악을 시도하였으나 본원 실험실 및 제조사측 모두 결과값이 높게 나오는 것에 대한 특별한 이유를 찾지 못하였다. 이러한 현상이 단지 일시적 현상이었던 것인지 아니면 시약의 지속적인 품질저하 때문인지에 대한 원인을 찾으려 하였고 동시에 시약 개선의 필요성을 느껴 제조사에 1차 시약 개선을 요청하였다. 그리고 얼마 후 기존 시약을 바탕으로 개선된 시약의 평가용 제품이 본원에 도착하였다. 그래서, 본 연구는 이러한 배경을 바탕으로 시약 비교실험을 진행하기로 결정하였고 아무런 이유 없이 정상범위를 벗어나는 값에 대한 원인을 찾고자 하였다. 더불어 그 결과를 바탕으로 CA 19-9 진단 시약 선정에 대한 새로운 기준을 마련하고자 하였다.



**Fig. 1.** This chart shows that the number of CA 19-9 positive cases in health care center from December 2022 to April 2023 is higher than the overall average. \*The cut-off for positivity of serum CA 19-9 was 37 U/mL.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

2023년 8월부터 9월까지 본원에 내원한 외래 및 입원환자 중 CA 19-9 검사를 시행한 120명을 대상으로 하였다.

### 2. 사용 시약 및 장비

연구에 사용된 시약은 모두 신진메디스사에서 제조한 CA19-9 IRMA (Shinjin, Korea) 시약을 이용하여 진행하였다. 기존에 사용하고 있는 two step 시약(시약A), one step 시약(시약B), 그리고 본원 요청에 의해서 개선된 two step 시약(시약C)의 결과값들을 이용하여 데이터 분석을 시행하였다. 시약 A, B, C의 실험에 필요한 검체량은 각각 50  $\mu$ L, 25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L였으며, 시약 A와 C는 반응시간이 각 30분씩 two step 방식으로 진행되었고, 시약 B의 반응시간은 총 45분의 one step 방식으로 진행되었다(Table 1). 실험에 사용된 분주기는 Freedom evo(Tecan, Switzerland)를 사용하였고, 감마카운터는 Dream Gamma10(Shinjin, Korea)를 이용하여 측정하였다.

**Table 1.** Comparison of assay procedure

	A (two-step)	B (one-step)	C (Improved two-step)
Calibrator, Control, Sample	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Diluent	50 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L
1 <sup>st</sup> Incubation	30 min.	-	30 min.
1 <sup>st</sup> Washing	D.W 3mL twice	-	D.W 3mL twice
Tracer	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Buffer	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
2 <sup>nd</sup> Incubation	30 min.	45 min.	30 min.
2 <sup>nd</sup> Washing	D.W 3mL twice	D.W 3mL twice	D.W 3mL twice

### 3. 비교실험 및 분석방법

#### 1) 상관성 비교

세 종류 시약에 대한 상관성을 비교하기 위하여 회귀분석을 시행하였다. 분석 대상은 본원 결과 보고 기준에 맞춰 검체 희석이 필요하지 않은 (0-120) U/mL 범위내의 검체 94건을 사용하였다. 통계에 사용된 프로그램은 STATA17을 사용하였고 회귀식과 결정계수( $R^2$ )를 구하여 비교하였다. 결정계수는 1에 가까울수록 상관관계가 좋다고 판단하였다.

#### 2) 회수율 시험

저, 중, 고농도의 검체에 각 시약의 1번, 2번, 3번 표준액을 1:1로 섞은 후 농도를 계산하였다. 회수율은 다음의 식으로 구하였고 90~110%를 유효 범위로 정하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{측정값}}{\text{기대값}} \times 100$$

#### 3) 직선성 시험

표준물질의 최고 농도와 근접한 수치의 검체를 선정해서 계단 희석을 하여 결과값이 희석배율을 잘 반영하여 직선성을 나타내는 지 각 시약 별로 비교하였다. 희석은 시약 내 동봉된 희석액을 사용하였고 1배, 2배, 4배, 8배, 16배, 32배, 64배, 128배, 256배까지 계단 희석을 하였다.

#### 4) 고농도 후크 효과 확인시험

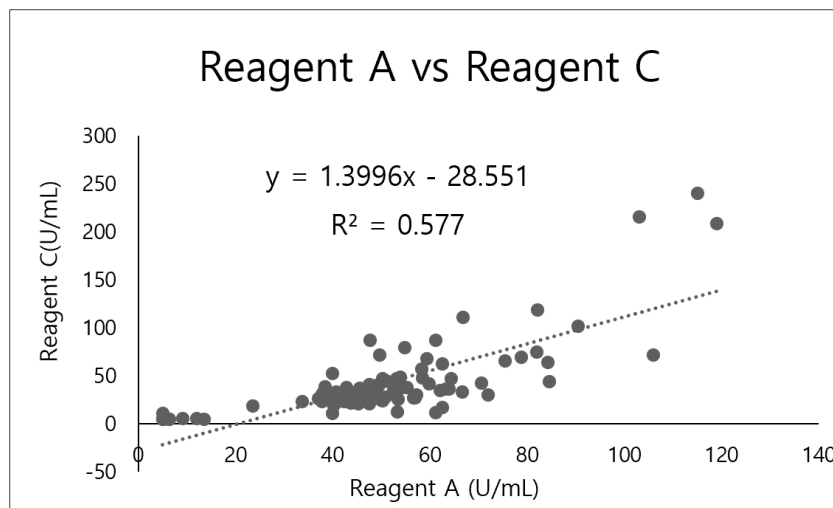
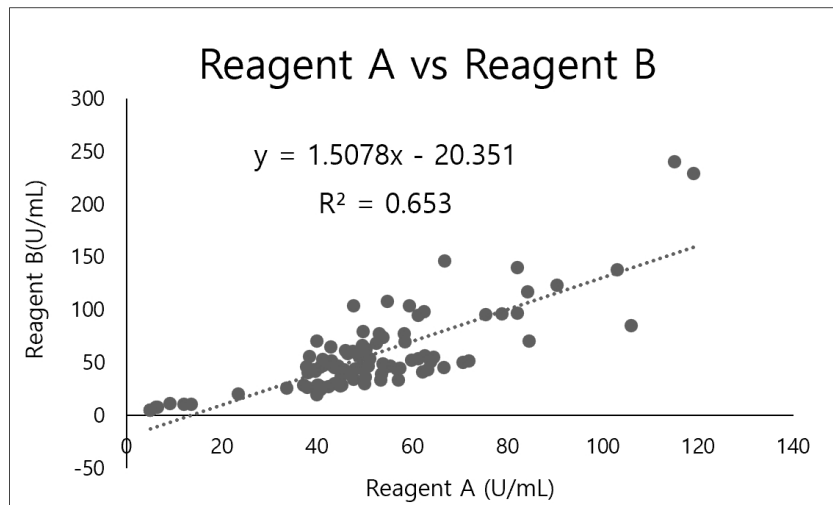
고농도의 검체 24개를 선정하여 희석시험을 진행하였고 후크 효과가 나타나는지 테스트하였다. 10배에서 1000배까지 계단 희석을 하였고 결과값을 각각 비교 분석하였다.

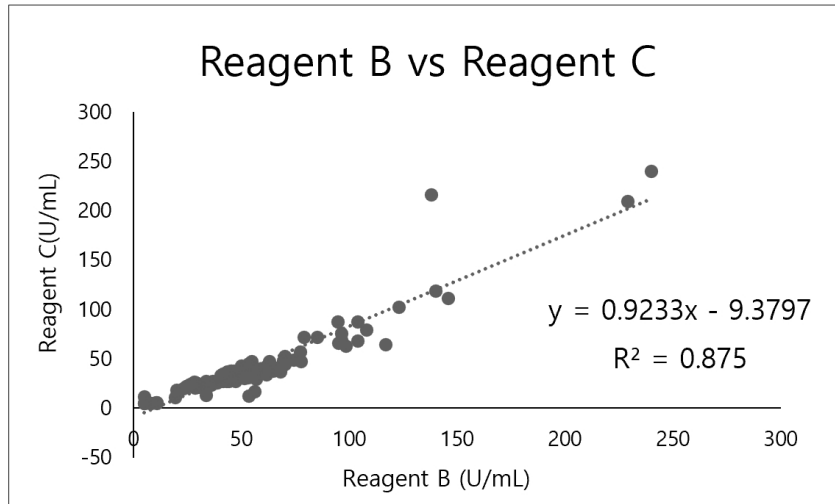
#### 5) 결과값과 소화기계 종양 진단과의 일치도 비교

CA19-9의 결과값이 소화기계 종양 진단여부와 얼마나 일치하는지 간접적으로 확인해 보기 위하여 소화기계 악성종양 진단 여부와 비교 분석을 진행하였다. 참고범위 37 U/mL을 넘은 환자 중 소화기계 악성종양 진단을 받지 않은 경우의 건수와 진단을 받은 적이 있으나 참고범위 이하의 결과가 나온 경우의 건수를 시약 별로 분석하였다. 비교 대상은 시약A 결과값 기준으로 양성 보고가 된 110명과 음성보고가 된 10명을 확인하였다.

## 결과

기존에 사용하던 시약A에서 측정된 값보다 농도가 낮아진 경우는 시약B에서는 46건, 시약C에서는 77건이었다. 세 종류의 시약에 대한 회귀분석결과 결정계수( $R^2$ )는 시약A와 시약B 사이에서 0.653, 시약A와 시약C 사이에서는 0.577, 시약B와 시약C 사이에서는 0.875로 나타났다(Fig. 2). 회수율 시험에서는 유효범위  $100 \pm 10(\%)$ 의 범위를 벗어난 경우는 시약 A, B, C에서 5건, 1건, 5건이 있었다(Table 2). 직선성 시험은 모든 시약에서 5 U/mL에서 150 U/mL까지는 양호한 직선성을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 24개의 고농도 검체를 이용하여 후크 효과시험을 진행했을 때 시약A와 C에서는 모두 문제없이 결과보고가 가능하였으나 시약B에서는 2개의 검체에서 1배 결과값이 145 U/mL, 95.8 U/mL 값을 보이고 10배에서 100배까지  $>240$  U/mL, 1000배에서 34.8 U/mL, 95.4 U/mL으로 측정됨으로써 전형적인 후크 효과를 확인할 수 있었다(Table 3). 시약A에서 참고범위를 벗어나는 결과를 보였던 검체 110건 중 시약B에서 18건, 시약C에서 47건이 참고범위 안으로 들어오는 결과값을 보였다. 소화기계 종양 진단 여부를 확인한 결과, 참고범위를 벗어난 시약A 110건, 시약B 91건, 시약C 63건의 검체 중 진단 결과와 일치하지 않는 위양성이라고 생각되어지는 경우는 시약A, B C에서 24건(21.8%), 13건(14.3%), 4건(6.3%)이었으며, 참고범위 안의 결과값을 보인 시약A 10건, 시약B 29건, 시약C 57건의 검체 중 위음성이라고 생각되어지는 경우는 시약A, B, C에서 0건(0%), 8건(27.6%), 27건(47.4%)이었다(Table 4).



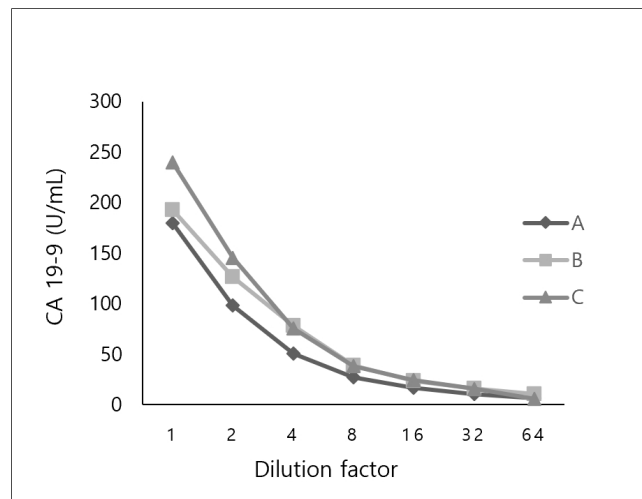


**Fig. 2.** These graphs show the correlation between each reagent.

**Table 2.** The result of recovery rate

Samples	Reagent A			Reagent B			Reagent C			
	Expected value (U/mL)	Measured value (U/mL)	Recovery rate (%)	Expected value (U/mL)	Measured value (U/mL)	Recovery rate (%)	Expected value (U/mL)	Measured value (U/mL)	Recovery rate (%)	
Low	1	18.7	19.8	105.9	16.2	17.1	105.6	15.1	18.4	121.9
	2	27.4	25.8	94.2	23.6	21.5	91.1	19.2	19.1	99.5
	3	41	54.8	133.7	51.7	49.9	96.5	43.7	40.9	93.6
Mid.	1	26.2	25.6	97.7	23.7	22.1	93.2	22.6	20.4	90.3
	2	34.9	31.1	89.1	31.1	31.4	101.0	26.7	22.5	84.3
	3	48.6	55.5	114.2	59.2	62.4	105.4	51.2	46.3	90.4
High	1	41.2	34.8	84.5	38.7	36.8	95.1	37.6	31.4	83.5
	2	49.9	44.1	88.4	46.1	45.7	99.1	51.2	41.2	80.5
	3	63.6	61.5	96.7	74.2	62.5	84.2	66.2	50.8	76.7

The concentrations of calibrators 1, 2, and 3 used in the recovery test were 15, 30, and 60(U/mL).



**Fig. 3.** This is the linearity test result of each reagent.

**Table 3.** The results of hook effect test

Sample number	Real value (U/mL)	Dilution factor	Reagent A	Reagent B	Reagent C
			Results (U/mL)	Results (U/mL)	Results (U/mL)
23	27900	1	>240	145	>240
		10	>240	>240	>240
		100	>240	>240	>240
		1000	27.9	34.8	31.5
24	47500	1	>240	95.8	>240
		10	>240	>240	>240
		100	>240	>240	>240
		1000	47.5	95.4	110

**Table 4.** Comparison of results accuracy

Cases	Reagent A	Reagent B	Reagent C
Reversed cases from positive* to negative**	0	18	47
Number of cases with not a history of malignant tumor diagnosis in positive samples	24(21.8%)	13(14.3%)	4(6.3%)
Number of cases with a history of malignant tumor diagnosis in negative samples	0(0%)	8(27.6%)	27(47.4%)

Values are presented with numbers of subjects.

\*CA 19-9 result is higher than 37 U/mL: Positive

\*\*CA 19-9 result is lower than 37 U/mL: Negative

## 고찰 및 결론

시약의 비교실험 결과 각 시약 간의 상관성은 시약A와 B, 시약A와 C보다는 시약B와 C의 상관성이 좋았다. 이것은 제조사에서 시약C를 제조 시에 시약B와 같은 원료물질을 사용하였기 때문이라 판단된다. 회수율 시험은 시약 A, B에서 양호한 결과값이 나온 것에 반하여 시약C의 회수율은 다소 낮게 나온 측면이 있었다. 이러한 결과는 시약C의 표준물질이 아직 완전치 않음을 간접적으로 보여주는 것이며 이것은 시약C의 측정값이 전반적으로 낮게 나오는 것과 연관이 있다고 생각해 볼 수 있다. 검사시약을 교체하게 되면 기존 시약과 새로운 시약의 결과값이 어느 정도 차이가 나는지 상관성을 확인하는 것이 가장 우선순위이다[2]. 아무리 품질이 좋은 시약이더라도 기존 시약과의 일관성이 어느 정도 재현되지 않는다면 채택하기 부담스럽기 때문이다. 그런 관점에서 볼 때 본 연구의 결과는 많은 아쉬움이 들게 한다. 먼저 시약A에 비해 시약 B, C에서 참고범위를 벗어나는 경우는 확실히 감소하였다(Table 4). 물론 본 실험의 목적이 참고범위를 살짝 벗어나는 위양성이라고 생각되는 값들을 줄이고자 하는 데서 시작된 것을 생각하면 의미 있는 결과일 수도 있다. 하지만 개선된 시약C에서 전체적으로 농도값이 낮아지면서 위음성이라고 생각되는 값들이 증가한 것도 확인할 수 있었다. 그것은 제조사에서 시약의 1차 개선 시 임상 데이터를 고려하지 못한 채 단순히 표준물질의 농도 값을 낮게 설정하였기 때문에 음성의 비율이 전체적으로 늘어난 것이 아닌가 생각해볼 수 있다. 기존 시약인 시약A 대비 시약C의 결과값은 총 94건 중 77건(81.9%)이 낮게 측정되었고, 전체 결과값의 평균 역시 16% 낮았다. 이러한 결과들로 미루어 보아 개선된 시약C는 시약A와의 측정 결과값에 대한 차이가 있다고 볼 수 있으며 아직 완성형 단계에 미치지 못하였다고 판단된다. 또한, one step 방식을 사용하는 시약B는 고농도에서 후크 효과가 발생하는 것을 확인하였기 때문에 고농도 값이 많은 본원에서 사용하기에는 불가능하다고 판단된다. 비교실험 결과 시약B와 시약C를 본원에서 구입하여 사용하는 데는 무리가 있어 보인다. 아직 시약 개발이 완전하게 끝난 것이 아니기 때문에 본 연구를 바탕으로 시약의 개선이 지속적으로 진행된다면 본원 외래 및 입원 환자의 진단용으로 사용이 가능할 것이다. 시약B는 상대적으로 사용이 편리하고 검사결과 보고 시간도 빠르다는 장점이 있기 때문에 상대적으로 고농도 값의 검체가 적은 건강검진 센터 전용으로는 선택적으로 사용이 가능할 것이라 사료된다.

## REFERENCES

- Myung SJ, Choi SM, Kim EO, Choi HS, Lee SK, Kim MH et al. The Diagnostic Value of CA19-9 in Pancreaticobiliary Diseases. *Korean J Gastroenterol.* 1995;27(3): 345-53.
- Oh HB, Ahn HY, Lee KJ, Hwang SH, Choi SE, Lee HJ. *Clinical Evaluation of Diagnostic Drugs.* 1st. Seoul: Korea Medical Book; 2007. p. 229-70
- Katzman BM, Ness KM, Algeciras-Schimmich A. Evaluation of the CLSI EP26-A protocol for detection of reagent lot-to-lot differences. *Clin Biochem.* 2017;50(13-14):768-77.
- Cho YY, Chun S, Lee SY, Chung JH, Park HD, Kim SW. Performance Evaluation of the Serum Thyroglobulin Assays with Immunochemiluminometric Assay and Immunoradiometric Assay for Differentiated Thyroid Cancer. *Ann Lab Med.* 2016;36(5):413-9.
- Chu Q, Takalkar A, Shi R, Shkouh-Amiri H. Accuracy of Multi-detector Computed Tomography, Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-CT, and CA 19-9 Levels in Detecting Recurrent Pancreatic Adenocarcinoma. *JOP.* 2013;14(4):466-8.
- Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The Clinical Utility of Serum CA 19-9 in the Diagnosis, Prognosis and Management of Pancreatic Adenocarcinoma: An Evidence Based Appraisal. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(2):105-19.