

# Real-time PCR을 이용한 Epstein-Barr Virus DNA 검사 평가

## Evaluation of Real-time PCR Kits for Epstein-Barr Virus DNA Assays

하지혜<sup>1</sup> · 박용정<sup>2</sup> · 심정은<sup>1</sup> · 김현숙<sup>1</sup>

Jihye Ha, M.D.<sup>1</sup>, Yongjung Park, M.D.<sup>2</sup>, Jungeun Shim, M.T.<sup>1</sup>, Hyon-Suk Kim, M.D.<sup>1</sup>

연세대학교 의과대학부속 세브란스병원 진단검사의학과<sup>1</sup>, 국민건강보험공단 일산병원 진단검사의학과<sup>2</sup>

Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine<sup>2</sup>, National Health Insurance Corporation, Ilsan Hospital, Goyang, Korea

**Background:** Epstein-Barr virus (EBV) is known to be the causative agent of infectious mononucleosis and EBV-related malignancies. In this study, we compared the results of three real-time PCR kits for EBV DNA assays.

**Methods:** A total of 300 whole blood samples submitted for quantitative EBV PCR between January 2013 and September 2014 at Severance Hospital were included. The samples were tested by using the Artus EBV RG PCR Kit (Qiagen, Germany), AccuPower EBV Quantitative PCR Kit (Bioneer, Korea), and Real-Q EBV Kit (BioSewoom, Korea). Samples with discordant results between the three kits were confirmed by direct sequencing.

**Results:** The result concordance rate and kappa coefficient (K) were 86.3% and 0.69 for Artus–AccuPower, 93.3% and 0.85 for Artus–Real-Q, and 92.3% and 0.83 for AccuPower–Real-Q, respectively. The correlations between the three kits were found to be significant, with a correlation coefficient of  $r=0.854$  for Artus–AccuPower,  $-0.802$  for Artus–Real-Q, and  $-0.977$  for AccuPower–Real-Q, respectively ( $P<0.0001$ ). If the real-time PCR concordant results of 258 samples and the direct sequencing results of 42 real-time PCR discordant samples were assumed to be true, the sensitivity/specificity values were 0.921/0.976 for Artus, 0.902/0.965 for AccuPower, and 0.967/1.000 for Real-Q.

**Conclusions:** The three real-time PCR kits showed excellent sensitivities and specificities. All these kits would be acceptable for clinical and therapeutic management of EBV. However, some discordant results between the kits indicate the need for caution in clinical diagnosis and staging. Further implementation of standardized methodology would be needed for EBV DNA assays.

**Key Words:** Epstein-Barr virus (EBV), EBV DNA, Real-time PCR

## 서론

Epstein-Barr virus (EBV)는 1960년대 Burkitt's lymphoma의 세포배양에서 처음 발견되었으며 전염성단구증의 원인균으로 잘 알려져 있다[1]. 또한 많은 연구를 통해 각종 림프세포증식성 질환과 비인두암, 위암 및 자가면역성 질환과도 밀접한 관련이 있음이 밝

혀졌다[2-4]. EBV 진단 방법으로 혈청학적 항체검사법, 바이러스 배양법, DNA를 검출하는 중합-효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 등이 있다. 이 중에 바이러스 배양법은 확진 검사이지만 수작업으로 검사를 시행하여 표준화가 어려워, 주로 혈청학적 검사법과 바이러스 DNA를 검출하는 방법이 널리 사용되고 있다[5]. 혈중 바이러스 DNA 검출을 위한 분자생물학적 검사방법은 EBV 연관 질환을 진단하고 추적 관찰하는 데 도움을 준다. 특히 이식환자에서 EBV DNA의 혈중 농도 상승은 이식 후 림프세포증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disease, PTL)과 연관된 것으로 알려져 있어 혈중 바이러스 DNA 검출은 빠른 치료를 가능하게 한다[6]. 또한 후천성면역결핍증 환자에서 뇌척수액에 대한 EBV PCR로 중추신경계 림프종을 높은 민감도 및 특이도로 진단할 수 있다고 보고된 바 있다[7]. 한편, 비인두암 환자에서도 혈중 EBV DNA 측정검사는 예후 판정과 치료 후 재발을 추적관찰하는 데 유용한 종양표지자로서의 역할을 한다[8, 9].

현재는 기존의 고식적인 PCR법을 거쳐서 민감도와 특이도가 개

**Corresponding author:** Hyon-Suk Kim

Department of Laboratory Medicine, Severance Hospital, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

Tel: +82-2-2228-2443, Fax: +82-2-364-1583, E-mail: kimhs54@yuhs.ac

Received: February 17, 2015

Revision received: June 4, 2015

Accepted: June 9, 2015

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2016, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

선된 다양한 real-time PCR을 통한 EBV DNA의 측정이 가능하다 [10-12]. 하지만 EBV DNA 측정방법 간의 표준화가 아직 이루어지지 않아서, Hayden 등[13]은 EBV DNA 정량검사의 검사실 간 편차를 보고한 바 있다. 따라서 현재 사용 가능한 상품화된 시약 간의 EBV DNA값에 대한 평가가 필요한 시점이다. 본 연구에서는 국내에서 개발된 EBV real-time PCR 시약 두 가지를 기준에 사용되고 있는 시약과 비교함으로써 현재 상품화된 제품 간의 차이가 있는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상

2013년 1월부터 2014년 9월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원 진단검사의학과에 EBV PCR 정량검사가 의뢰되어 현재 사용 중인 Artus EBV RG PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 검사하였던 검체 중 검체 양이 충분한 음성 100개와 양성 200개의 전혈 검체를 무작위로 선택하였다.

### 2. 방법

#### 1) EBV PCR

모든 전혈 검체는 자동화된 핵산추출 장비인 QiaCube (Qiagen)에 장착하여 동일한 방법으로 핵산을 추출하였다. Real-time PCR 방법을 사용하는 EBV DNA 정량검사 2종과 정성검사 1종 검사를 비교하였으며 정량검사는 Artus EBV RG PCR Kit (Qiagen)와 AccuPower EBV Quantitative PCR Kit (Bioneer, Daejeon, Korea), 정성검사는 Real-Q EBV Kit (BioSewoom, Seoul, Korea)이었다.

Artus EBV RG PCR Kit는 Rotor-Gene Q (Qiagen), AccuPower EBV Quantitative PCR Kit는 Exicycler 96 (Bioneer) 그리고 Real-Q EBV Kit는 CFX 96 (Bio-Rad, Hercules, USA) 장비를 이용하여 제조사 지침대로 real-time PCR을 실시하였으며 각각의 시약의 특징과 사용된 장비는 Table 1에 요약하였다.

#### 2) EBV DNA sequencing

3종의 검사 결과를 비교하여 불일치 검체에 대해서 sequencing으로 결과를 확인하였다. Sequencing은 Wizard MagneSil Sequencing Reaction Clean-Up System (Promega, Madison, USA)으로 DNA를 정제하였고, 시발체(F: 5'-AGT CGT CTC CCC TTT GGA AT-3', R: 5'-ATC GTC AAA GCT GCA CAC AG-3')로 EBV의 EBNA-1 유전자를 증폭하였다. ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) 장비를 이용하여 sequencing을 하였다.

#### 3) 통계분석

모든 통계분석에는 Analyse-it Method Validation Edition version 3.90.3 software (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK)를 사용하였다. 세 가지 시약의 결과가 일치하는 경우 그 결과값을 기준으로 하였고, 하나라도 불일치한 경우에는 sequencing 결과를 기준으로 각 장비의 민감도와 특이도를 측정하였으며 신뢰구간은 95%로 하였다. 정성결과와의 비교를 위하여 일치도와 kappa 계수를 산출하였고, 각 검사방법에 대한 정량 값 또는 threshold cycle (Ct)값을 비교하기 위하여 Spearman 상관성 시험을 통하여 상관계수(r)를 산출하였다. 모든 통계분석에서 P 값이 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. EBV PCR의 검사 결과

Artus, AccuPower, Real-Q를 사용한 비교 대상 300건의 검체에서 EBV PCR의 정성검사 결과가 Table 2와 같은 분포를 보였다. 세 가지 검사의 결과를 양성 및 음성 여부로 일치도를 판정하였을 때 완전히 일치한 경우는 258건, 불일치를 보인 경우는 총 42건으로 86.0%의 일치율을 보였다.

Table 1. Characteristics of the EBV PCR kits evaluated in this study

Real-time PCR kit	Artus	AccuPower	Real-Q
Amplification method	Real-time PCR	Real-time PCR	Real-time PCR
Instrument	Rotor-Gene Q	Exicycler 96	CFX 96
Target sequence	EBNA-1	Gp220	EBNA-1
Probe technology	Hydrolysis	Hydrolysis	Hydrolysis
Type of result	Quantitative	Quantitative	Qualitative
LOD	510 copies/mL	265.6 copies/mL	110 copies/mL
Measurement range (copies/mL)	2.5×10 <sup>4</sup> -2.5×10 <sup>7</sup>	4×10 <sup>2</sup> -4×10 <sup>11</sup>	125-5×10 <sup>11</sup>
No. of PCR cycles	45 cycles	45 cycles	45 cycles
Assay time	1 hr 40 min	1 hr 40 min	2 hr

Abbreviation: LOD, limit of detection.

Table 2. Results of the EBV PCR kits

Qualitative results			N	Sequencing results	Quantitative results*		
Artus	AccuPower	Real-Q			Artus (log <sub>10</sub> Copies/mL)	AccuPower (log <sub>10</sub> Copies/mL)	Real-Q (Ct)
Positive	Positive	Positive	178		4.41 (3.88-5.87)	4.51 (3.91-5.48)	31.50 (28.94-33.45)
Negative	Negative	Negative	80		-	-	-
Positive	Negative	Positive	16	Positive: 16	3.31 (3.20-3.58)	-	37.13 (36.37-37.93)
Negative	Positive	Positive	13	Positive: 13	-	3.84 (3.24-4.36)	34.44 (33.95-35.73)
Negative	Positive	Negative	6	Positive: 4, Negative: 2	-	2.79 (2.74-2.85)	-
Positive	Negative	Negative	6	Positive: 3, Negative: 3	3.26 (3.12-3.59)	-	-
Negative	Negative	Positive	1	Positive: 1	-	-	33.60
			300		4.33 (3.68-5.46)	4.41 (3.79-5.38)	32.14 (29.20-34.16)

\*Values are presented as median (1st to 3rd quartiles).

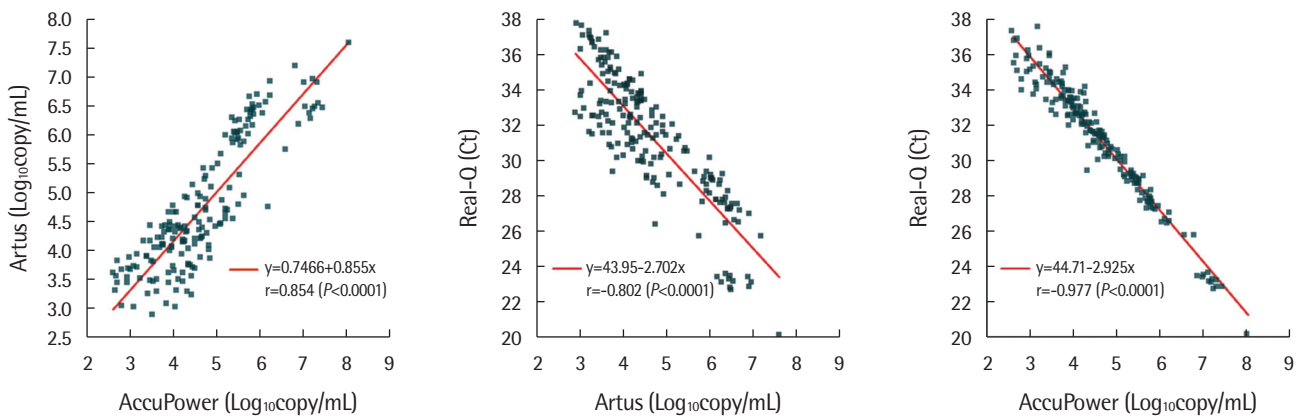


Fig. 1. Correlation of EBV DNA loads or Ct values between EBV PCR kits in 178 positive samples.

### 2. EBV PCR 검사 시약의 진단 성능

세 종류의 검사에서 결과가 일치한 경우에는 그 결과를 기준으로, 세 가지 중 한 가지 이상에서 불일치한 결과를 보였을 경우에는 EBV sequencing 결과를 기준으로 하여 각각 검사방법의 결과를 비교하여 민감도와 특이도를 구하였다. 각각 Artus는 0.921 (95% 신뢰구간, 0.877-0.950), 0.976 (95% 신뢰구간, 0.9180-0.994), AccuPower는 0.902 (95% 신뢰구간, 0.855-0.935), 0.965 (95% 신뢰구간, 0.901-0.988), Real-Q는 0.967 (95% 신뢰구간, 0.934-0.984), 1.000 (95% 신뢰구간, 0.957-1.000)의 민감도와 특이도를 보였다.

### 3. EBV PCR 검사 결과의 일치도 및 상관성

각 시약의 검사 결과는 Artus와 AccuPower 간에는 86.3% (95% 신뢰구간, 82.0-89.8)에서 일치하였고 kappa 계수는 0.69 (95% 신뢰구간, 0.61-0.78,  $P=0.044$ )였다. Artus와 Real-Q, AccuPower와 Real-Q는 각각 93.3% (95% 신뢰구간, 89.9-95.6), 92.3% (95% 신뢰구간, 88.8-94.8)의 일치율을 보였고 kappa 계수는 각각 0.85 (95% 신뢰구간, 0.79-0.91,  $P=0.033$ ), 0.83 (95% 신뢰구간, 0.76-0.89,

$P=0.035$ )이었다. 세 가지 검사가 양성되었던 178검체를 대상으로 정량 값 및 Ct 값의 상관성을 비교한 결과 상관계수( $r$ )는 Artus와 AccuPower 0.854 (95% 신뢰구간, 0.807-0.890,  $P<0.0001$ ), Artus와 Real-Q -0.802 (95% 신뢰구간, -0.850--0.741,  $P<0.0001$ ), 그리고 AccuPower와 Real-Q은 -0.977 (95% 신뢰구간, -0.983--0.939,  $P<0.0001$ )이었다(Fig 1).

## 고 찰

EBV 연관 질환에서 EBV PCR의 유용성에 관한 많은 연구가 이루어져 왔고 이로 인해 EBV PCR의 역할이 점차 확대되고 있다. 특히 PTLD의 경우 EBV PCR 검사가 유용하다고 할 수 있는데, 여러 연구에서 EBV의 viral load가 PTLD를 예측할 수 있다고 보고하였다[6, 14]. PTLD의 치료법으로 항 CD20 단일클론항체와 같은 효과적인 치료가 개발되어 PTLD의 빠른 진단을 위한 EBV viral load 측정의 중요성이 커지고 있다. 국제 백혈병 학회에서는 PTLD의 위험도가 높은 골수이식 환자에게 최소 3개월 동안 1주일에 한번

EBV virus load 측정할 것을 권고한 바 있다[15]. 그 외에도 여러 EBV 연관 림프종, 비인두암 환자에서의 EBV PCR의 사용이 점차 증가하는 추세이다.

Real-time PCR은 EBV virus load를 측정하는 데 쉽고 믿을 수 있는 방법으로 많이 이용되고 있다. 기존의 고식적인 PCR에 비해 빠르고 PCR 후 수기 작업을 통한 분석과정이 필요 없어 close tube 시스템이 가능해 다른 검체로 인한 교차 오염 위험이 적다. 그러나 현재 EBV real-time PCR은 검사실 간의 검체 종류, 핵산 추출, 시발체나 탐침자의 디자인, 표준물질 그리고 보고 단위 등의 표준화가 이루어지지 못해 대단위 연구나 국가 간 비교가 어려운 실정이다.

본 연구에서는 EBV real-time PCR 시약 세 가지를 비교하였다. 불일치를 보인 경우는 총 300건 중 42건으로 14%에서 불일치를 보였다. 음성 및 양성 일치 여부를 기준으로 시약 간 일치도를 판정하였을 때 정량 시약인 Artus와 AccuPower 간의 일치도보다 정성 시약인 Real-Q와 두 종류의 정량 시약 간의 일치도가 93.3%, 92.3%로 높았다. 정량 값 및 Ct 값 간의 상관성은 AccuPower와 Real-Q가 0.977의 상관 계수로 가장 높았다. 그러나 일치율과 상관성이 높은 시약 간에도 한 시약은 음성이나 비교 시약은 양성을 나타낸 경우 양성 결과의 정량 값이나 Ct 값의 중위수가 3.31 log<sub>10</sub> copies/mL, 3.84 log<sub>10</sub> copies/mL, 34.44(Ct), 37.13(CD)로 EBV DNA 양이 낮지 않았다. 이는 상용화된 EBV real-time PCR을 비교한 다른 논문에서도 한 시약은 음성을 보이지만 다른 시약은 높은 정량 값을 보이는 경우가 많았다는 보고와 일치하는 소견이다[16]. 한 시약에서 높은 정량 값을 보임에도 다른 시약에서는 음성을 나타내는 불일치의 이유 중 하나로 PCR 증폭 대상 유전자나 시발체의 염기서열이 시약마다 다른 점을 생각해 볼 수 있다. EBV 유전자 안에 여러 개의 반복이 있을 수 있는 유전자를 대상으로 하는 검사법과 한 개만 존재하는 유전자를 대상으로 하는 검사법의 결과가 다를 수 있다고 알려져 있다[17]. 본 연구에서 사용된 시약의 증폭대상 유전자인 EBNA-1과 gp220는 single copy gene이므로 반복의 차이는 없을 것으로 생각되나 증폭대상 유전자의 시발체 결합부위에 유전자 변이가 있는 EBV인 경우 높은 농도로 존재해도 음성으로 나올 가능성이 있기 때문에 증폭대상 유전자의 차이를 불일치한 결과를 보이는 원인 중 하나로 고려해볼 수 있다. 그 외에 시발체 설계의 차이로 인한 검체와 표준물질의 PCR 효율 차이, 시발체의 안정성과 특이성, 그리고 PCR 생성물의 크기 차이 등이 본 연구에서 보인 결과 간의 불일치를 설명할 수 있다[18]. 앞으로 WHO 등 기관 주도로 EBV 표준물질의 개발을 통하여 EBV PCR 검사의 국제적 표준을 잘 구현함으로써 EBV viral load 측정을 표준화시켜 현재의 결과 해석의 어려움을 줄여야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구에서 평가하였던 Artus, AccuPower, Real-Q는 비교적 높은 일치율과 상관성을 보였고 sequencing 결과와

비교하여 산출한 민감도와 특이도가 높아 임상 검사실에서 사용하기에 충분히 우수하였다. 하지만, 각 시약들을 사용한 검사 결과 간에 불일치를 보이는 경우가 있으므로 혈청학적 검사 등 보완할 수 있는 다른 검사와 같이 시행하고 한 번의 검사 보다는 추적 검사를 하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** Epstein-Barr virus (EBV)는 전염성 단구증, 악성종양의 원인으로 밝혀져 있다. 현재 국내에서 시행되는 EBV 검사 시약 중 real-time PCR을 이용한 3종류의 시약을 비교하여 보았다.

**방법:** 2013년 1월부터 2014년 9월까지 연세대의 세브란스병원에 EBV PCR 검사가 의뢰된 검체 중 검체량이 충분한 300검체를 임의로 선택하였다. Artus EBV RG PCR Kit (Qiagen, Germany), AccuPower EBV Quantitative PCR Kit (Bioneer, Korea), 그리고 Real-Q EBV Kit (BioSewoom, Korea)를 비교하였다.

**결과:** 세 가지 시약으로 검사한 결과 정성 검사 기준으로 각 검사들의 일치율과 Kappa 계수는 86.3%, 0.69 (Artus-AccuPower), 93.3%, 0.85 (Artus-Real-Q) 그리고 92.3%, 0.83 (AccuPower-Real-Q)이었다. 세 시약 결과 간의 상관성은 유의하였는데, 상관계수 r=0.854 (Artus-AccuPower), -0.802 (Artus-Real-Q), 그리고 -0.977 (AccuPower-Real-Q)이었다. 하나라도 결과가 불일치한 42검체는 sequencing 결과를 참으로 가정하여 민감도와 특이도를 구하였을 때 0.921/0.976 (Artus), 0.902/0.965 (AccuPower), 그리고 0.967/1.000 (Real-Q)이었다.

**결론:** 세 가지 real-time PCR을 이용한 EBV 검사는 모두 민감도와 특이도가 우수하였다. 임상 검사실에서는 각자의 조건에 따라 선택하면 좋을 것이다. 그렇지만 임상적 진단과 추적 검사 시 동일한 시약을 사용하는 것이 필요하며, 앞으로 표준화된 검사 방법이 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;1:702-3.
2. Young LS and Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003;22:5108-21.
3. Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, Brenner MK, Krance RA, Heslop HE. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 1995;89:98-103.
4. James JA, Neas BR, Moser KL, Hall T, Bruner GR, Sestak AL, et al. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Ep-

- stein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 2001;44:1122-6.
5. Chung JL and Kim HS. Clinical usefulness of EBV-specific antibody panel test and PCR genotyping in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:320-9.
  6. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001; 3:79-87.
  7. Cinque P, Brytting M, Wahren B, Linde A, Castagna A, Lazzarin A, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342:398-401.
  8. Lo YM, Chan AT, Chan LY, Leung SF, Lam CW, Huang DP, et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res* 2000;60: 6878-81.
  9. Chan AT, Lo YM, Zee B, Chan LY, Ma BB, Leung SF, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1614-9.
  10. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132-6.
  11. Brengel-Pesce K, Morand P, Schmuck A, Bourgeat MJ, Buisson M, Barguès G, et al. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol* 2002;66:360-9.
  12. Patel S, Zuckerman M, Smith M. Real-time quantitative PCR of Epstein-Barr virus BZLF1 DNA using the LightCycler. *J Virol Methods* 2003;109: 227-33.
  13. Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, Bankowski MJ, Belzer SW, Carr J, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2008;46: 157-63.
  14. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, Volin L, Haario H, Ruutu T, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007;45:1305-9.
  15. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:757-70.
  16. Ruiz G, Peña P, de Ory F, Echevarría JE. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA. *J Clin Microbiol* 2005;43:2053-7.
  17. Le QT, Jones CD, Yau TK, Shirazi HA, Wong PH, Thomas EN, et al. A comparison study of different PCR assays in measuring circulating plasma Epstein-Barr virus DNA levels in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5700-7.
  18. Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn* 2001;3:55-61.