

A Comparative Study of the Diagnostic Performance of the GENEDIA Avellino Corneal Dystrophy Mutation Detection Kit and Screening Master Mix and a Direct Sequencing Method to Detect Mutations in the *TGFBI* Gene

Nae Yu, In Sik Hwang,
Kyung Ran Hong, Mee
Suk Ahn, Seo-Jin Park,
and Jong Rak Choi

Department of Laboratory
Medicine, Yonsei University
College of Medicine, Seoul,
Korea

Corresponding author:

Seo-Jin Park

Department of Laboratory
Medicine, Yonsei University
College of Medicine, 50 Yonsei-
ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752,
Korea

Tel: +82-2-2228-2450

Fax: +82-2-364-1583

E-mail: SJPARK11@yuhs.ac

Background: Mutations in the gene encoding transforming growth factor-beta induced (*TGFBI*) are associated with corneal dystrophies. We evaluated the diagnostic performance of the GENEDIA Avellino corneal dystrophy (ACD) mutation detection kit and GENEDIA corneal dystrophy screening master mix (Green Cross Medical Science Co., Korea) by comparing it with an in-house sequencing method.

Methods: The study group consisted of 40 patients with Avellino corneal dystrophy (ACD) and 40 patients suspected to suffer from ACD; 40 healthy individuals were used as the control. All samples used for this study were previously obtained. All results obtained using the kit were evaluated for sensitivity, specificity, and detection limit.

Results: The sensitivity of the GENEDIA ACD kit was 100.0% with a positive mean \pm 2SD Ct (cycle threshold) value of 25.87 \pm 1.24 and an excellent coefficient of variation value of 0.02 in ACD group. All normal control samples were negative, indicating a specificity of 100% for the GENEDIA kit. The detection limit was set at a DNA concentration of >0.2 ng/ μ L. Direct sequencing results obtained using the GENEDIA master mix and the in-house method agreed for all 20 ACD samples. Additional R555W mutation detected in four ACD-suspected samples were suggestive of the diagnosis of granular corneal dystrophy type I.

Conclusions: The GENEDIA ACD detection kit and master mix showed acceptable results, demonstrating high sensitivity and specificity, and may be considered for clinical application. Furthermore, the GENEDIA master mix was useful for the detection of mutations in exons 4 and 12 of the *TGFBI* gene.

(J Lab Med Qual Assur 2013;35:115-21)

Key Words: Avellino corneal dystrophy, *TGFBI*, Real-time polymerase chain reaction, Sequencing analysis

pISSN: 1225-097X

eISSN: 2288-7261

Received July 23, 2013, Revision received December 2, 2013, Accepted December 2, 2013

서론

과립성 각막이상증(granular corneal dystrophy, GCD)은 각막 층 사이에 침착물이 축적되는 질환으로 과거에는 세극등 소견이나, 침착된 모양, 각막 침범의 깊이, 조직병리학적 소견 등을 이용해 4가지 질환으로 세부 분류되었다.

유전자진단기법이 발달함에 따라 염색체 5q31에 위치한 transforming growth factor beta-induced (*TGFBI*) 유전자의 돌연변이가 각막이상증을 일으키는 원인으로 밝혀졌고, exon 4와 12의 Arg124와 Arg555가 돌연변이의 hotspot으로 알려졌다. 또한 Arg124Leu 돌연변이는 더 안 좋은 예후를 보이는 등, 돌연변이 종류에 따른 예후와의 상

관성도 보고되어 있다[1-3]. 그러나 임상적인 소견만으로는 여러 가지 각막이상증의 다른 유형들과 구별하기 쉽지 않고 가족들 사이에서도 그 증상이 다양하게 나타나, 현재는 유전자 검사를 통해 GCD 종류가 구분되고 있어[1,4,5] 유전자검사의 중요성은 더욱 커지고 있다.

아벨리노 각막이상증(Avellino corneal dystrophy, ACD; granular corneal dystrophy type II)은 이탈리아 아벨리노 지방출신의 가족에서 처음 보고된 각막기질 이상증으로[6], 상염색체 우성으로 유전된다. 특히 레이저를 이용한 근시교정술(*laser in situ keratomileusis*, LASIK)을 받은 환자에서 각막이상증이 급격히 악화되어 주목을 받게 되었다[7-9]. 국내 ACD의 유병률은 만 명당 11.5명으로 알려져 있다[10]. 이를 진단하기 위해서 중합효소연쇄반응-단일염기다형성, DNA chip, 직접염기서열분석법 등의 많은 방법이 사용되었고, 현재는 직접 염기서열분석법이 진단에 주로 사용되고 있다[4,10,11].

본 연구에서는 real-time PCR을 이용하는 GENEDIA ACD mutation detection kit (GENEDIA ACD kit), 그리고 exon 4와 12를 직접염기서열분석법으로 시행할 수 있도록 개발된 GENEDIA corneal dystrophy screening master mix (GENEDIA master mix)에 대해 저자들의 검사실에서 제작하여 실제 이용하고 있는 직접 염기서열분석법과 비교하여 그 진단성능을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2011년 12월에서 2013년 6월까지 연세대학교 세브란스병원 진단검사의학과에 ACD검사가 의뢰된 검체 중에서 ACD heterozygote로 진단을 받은 환자 검체(ACD군) 40개, 가족력이 있거나 세극등 검사소견에서 ACD가 의심되었지만, exon 4에 대한 자가제조 직접 염기서열분석법 결과가 음성으로 나타난 검체(suspicious ACD군) 40개를 대상으로 하였다. 또한 특이도를 평가하기 위해 각막이상증의 증상이 없는 건강한 40명을 음성 대조군으로 선정하여 검사를 추가로 시행하였다. 양성 및 음성인 환자의 임상기록지를 후향적으로 검토하여 진단명, 나이, 성별, 가족력, 증세의 심한 정도, LASIK 시행 여부와 시행부터 ACD 진단까지의 기간을 조사하였다.

2. 방법

ACD군 40명과 suspicious ACD군 40명의 DNA를 제조

사의 지시에 따라 GENEDIA ACD mutation detection kit (Green Cross Medical Science Co., Yongin, Korea)을 이용하여 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 장비로 real-time PCR을 실시하였다. 모든 검체는 EDTA tube에 채혈된 말초혈액으로, QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 DNA를 추출하였다. GENEDIA corneal dystrophy screening master mix를 이용한 PCR은 S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였고 ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.) 장비와 염기서열분석 소프트웨어인 Sequencher (ver. 5.1; Gene Codes Co., Ann Arbor, MI, USA)로 exon 4와 12의 돌연변이 유무를 분석하였다. 기준이 된 원내 검사는 연세대학교 세브란스병원에서 *TGFBI* 유전자 exon 4와 exon 12에 대한 primer를 제작해 사용하였으며(*TGFBI* gene exon 4 F: 5'-AGA GAA GGG AGG GTG TGG TT-3', R: 5'-CTC GGG GAA GTA AGG CAG TT-3', exon 12 F 5'-GTG GCC TGG ACT CTA CTA TCC-3', R: 5'-TTT AGT CCC GCC CAC TCT TT-3'), 위와 동일한 염기분석장비 및 소프트웨어를 사용하였다.

GENEDIA ACD kit를 이용한 real-time PCR검사는 제조사의 지침에 따라 internal positive control (IPC) cycle threshold (Ct) 값 33 이하로 유효한 결과임을 확인하고, Avellino allele Ct 값이 40 미만이며, Ct 값 차이(Ct Avellino allele-Ct IPC, Δ Ct)가 8 이하이면 양성으로 판정하였다. Δ Ct 값이 8 초과이면 Avellino allele Ct 값에 관계없이 음성으로 판정하였다. 모든 검사는 2회씩 실시하였다. 제조사의 지침에서 제시한 최소검출한계를 확인하기 위해 40명 양성 환자에서 무작위로 4명의 DNA 검체를 선택하여 1:10부터 1:10,000까지 10배씩 희석하여 돌연변이 검출키트를 검사하고 측정가능범위를 확인하였다. 직접 염기서열 분석법결과에서는 염기서열을 확인하여 exon 4에서 124번째 codon에서 CGC 염기가 CAC로 바뀐 경우 Arg124His (c.371G>A: R124H) 돌연변이로, exon 12에서 555번째 codon에서 CGG 염기가 TGG로 바뀐 경우 Arg555Trp (c.1663C>T: R555W) 돌연변이로 판정하였다.

결과

1. 대상군의 특성 및 GENEDIA Avellino corneal dystrophy mutation detection kit의 분석성능 평가

ACD군 40명과 suspicious ACD군 40명, 정상대조군 40

명의 나이는 각각 평균 41.4세(19–74세), 29.8세(19–62세), 45.8세(25–81세)였으며 남녀 비율은 유의한 차이를 보이지 않았다. ACD군에서는 가족구성원 중에 이미 ACD로 진단을 받은 사람이 25명(62.5%)으로, suspicious ACD군에서의 10명(25%)에 비해 매우 높은 비율을 보였다. ACD군에서는 10명(25%)이 과거에 TGFBI 유전자 돌연변이 유무를 확인하지 않고 LASIK을 시행 받았으며 10명 모두에서 각막이상증이 매우 심한 소견을 보였다. 각막이상증이 매우 심한 경우는 전체 40명에서 13명(32.5%), 중등도인 경우는 14명(35%)를 차지하였다(Table 1). 검사를 하게 된 계기는 가족이 ACD로 진단을 받아서 다른 안과질환 치료 중 ACD가 의심되어 LASIK을 준비하다가 순으로 나타났다.

ACD군 40명 모두가 GENEDIA ACD kit를 이용한 real-time PCR검사결과에서 평균 Avellino allele Ct 값 25.87 (± 1.24), 평균 Δ Ct 값 6.93 (± 0.96)로 양성결과를 보였

다. 기준이 된 직접 염기서열분석법결과와 100% 일치하여 민감도는 100%였고, 변이계수도 2%로 매우 우수하였다. Suspicious ACD군도 기준방법과 100% 동일한 결과를 보였고, 평균 Avellino allele Ct 값 38.36 (± 1.74), 평균 Δ Ct 값 17.96 (± 1.68), Ct 값의 변이계수 5%로 나타났다.

특이도를 평가하기 위해 정상 대조군도 동일하게 검사를 진행하였다. 그 결과 평균 Avellino allele Ct 값 37.14 (± 2.74), 평균 Δ Ct 값 18.11 (± 2.08)로 모두 음성결과를 보여 특이도는 100%였고, Ct 값의 변이계수는 4%였다. Δ Ct 값은 정상대조군, ACD군, ACD 검체를 1:10으로 희석한 군에서 다소 높은 변이계수(6–7%)를 나타내었다. 검체의 DNA 농도가 낮을 경우를 고려하여 증류수로 검체를 희석하여 1:10 희석한 군을 추가하였다. 이에 저자들은 추가적으로 Ct_{sample/IPC} (Avellino allele Ct/IPC Ct) 값을 계산하여 변이계수를 확인하였고, 이는 0.02–0.04로 우수한 결과를 보였다(Table 2). 또한 제조사의 판정기준대로 Δ Ct 값

Table 1. Baseline characteristics of study subjects

Characteristic	ACD	Suspicious ACD	Normal control
Total patients	40	40	40
Male/female	14/26	11/29	12/28
Age (yr)*	41.4 (19–74)	29.8 (19–62)	45.8 (25–81)
Family history of ACD	25	10	0
LASIK history	10	5	
Time to exacerbation after surgery (yr)*	7.9 (0.8–13)		
ACD grade	Mi: 4, Mo: 14, S: 9, VS: 13	S: 1, VS: 4	

Abbreviations: ACD, Avellino corneal dystrophy; LASIK, laser *in situ* keratomileusis; Mi, mild; Mo, moderate; S, severe; VS, very severe.

*Value is expressed as mean (range).

Table 2. The mean, SD, and CV of Δ Ct and Ct_{sample/IPC} in ACD patients and normal controls

Value	Δ Ct			Ct _{sample/IPC}		
	NC (n=40)	ACD (n=40)	1:10 ACD (n=40)	NC (n=40)	ACD (n=40)	1:10 ACD (n=40)
Mean (range)	18.11 (16.44–23.63)	6.93 (5.84–7.84)	5.63 (4.64–6.49)	1.96 (1.8–2.33)	1.37 (1.29–1.43)	1.24 (1.20–1.29)
SD	1.04	0.50	0.40	0.09	0.03	0.02
%CV	-6%	7%	7%	4%	2%	2%

Results showing Avellino allele Ct < 40, Δ Ct < 8, and the IPC Ct < 33 are considered positive.

Abbreviations: SD, standard deviation; CV, coefficient of variation; Ct, cycle threshold; Δ Ct, Ct of Avellino allele-Ct of IPC; IPC, internal positive control; ACD, Avellino corneal dystrophy; NC, normal control.

과 IPC Ct 값을 이용해 양성을 판정할 수 있지만(Fig. 1A), Ct_{sample}/IPC 결과에서 ratio 값의 차이가 1.5 이하인 경우, 제조사의 판정기준결과와 일치하여 이를 이용한다면 판정에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다(Fig. 1B).

정밀도를 확인하기 위하여 평균과 2배의 표준편차 값(SD)을 산정하였고, 정상대조군, ACD군에서 모든 검체를 2회씩 반복 검사하였을 때, 평균±2SD 범위 안에 있는 결과를 보여 우수한 정밀도를 확인할 수 있었다.

제조사에서 제시한 최소검출한계는 2 ng/μL로 제시되어 있어 최소검출한계를 확인하기 위해 무작위로 고른 4개의 ACD 양성 DNA 검체를 증류수를 이용하여 10배씩 5단계 희석하고 각각 검사를 2회씩 시행하였다(총 40회). 측정 Avellino allele Ct 값의 범위는 26.5-43.8였으며 ΔCt 값은 1.9-9.5이었다. DNA 농도가 0.16 ng/μL 이상인 경우 모두 원래 검체와 일치하는 양성결과를 보여 제조사에서 최소검출한계로 제시한 2 ng/μL 이상인 경우 검사의 재현성이 우수한 것으로 생각되며, 검체의 DNA 농도가 0.2 ng/μL 이상인 경우에도 신뢰성 있는 검사결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 DNA 농도가 0.02 ng/μL 이하가 되는 10,000배 희석한 경우에는 결과의 Avellino allele Ct 값이 40 이상으로 증가되거나 아예 보고되지 않는 경우가 있었다(Table 3).

2. GENEDIA corneal dystrophy screening master mix의 분석성능 평가

ACD군과 suspicious ACD군에서 각각 20명을 선정하여 GENEDIA master mix를 이용한 직접 염기서열분석법을 시행하였다. GENEDIA master mix에는 *TGFBI* 유전자의 exon 12에 대한 forward 및 reverse primer도 포함되어 있어 이에 대한 염기서열분석도 추가적으로 확인할 수 있었다. 20명의 ACD군에서 기준 검사결과와 동일하게 R124H 양성결과를 보였으며(Fig. 2A), 나머지 20명의 suspicious ACD군에서는 4명에서 exon 12의 R555W 돌연변이가 발견되어 GCD type I으로 진단할 수 있었다(Table 1, Fig. 2B). GCD type I를 진단받은 4명의 환자들은 임상적으로 가족력이 있었던 경우가 2명이었고, 3명은 심한 각막혼탁소견을 보였다. GCD type I를 진단받은 4명의 환자들에 대해 추가적으로 exon 12에 대한 기준검사(in-house sequencing)를 시행하였으며 동일한 R555W 돌연변이가 관찰되었다. 그 외 GCD를 일으키는 다른 종류의 돌연변이 검출이 가능한지 평가하기 위해, R124C 돌연변이 양성 환자 4명, R555W 돌연변이 양성 환자 1명 및 R124H homozygote를 보인 환자 1명의 검체를 추가하여 GENEDIA master mix를 이용해 직접 염기서열분석법을 시행하였다. 6명 모두 기준 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

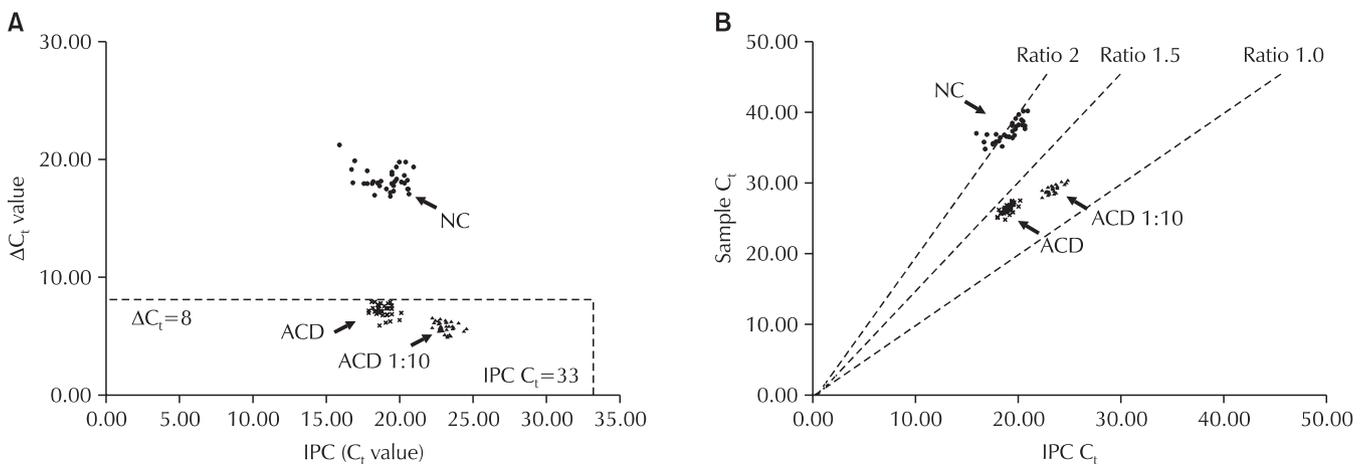


Fig. 1. Results of Ct values obtained using real-time PCR ACD detection kit. (A) Results showing Avellino allele $Ct < 40$, $\Delta Ct < 8$, and the IPC $Ct < 33$ are considered positive. (B) Ratio indicates sample $Ct/IPC Ct$. The slope of the graph demonstrates that all positive results had a ratio below 1.5. Abbreviations: ACD, Avellino corneal dystrophy; ACD 1:10, ACD sample 1:10 dilution; IPC, internal positive control; NC, normal control; Ct, cycle threshold; ΔCt , Ct of Avellino allele-Ct of the internal positive control.

Table 3. Ct results of serial dilution in four ACD patients

Values*	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4	
	Ct	ΔCt	Ct	ΔCt	Ct	ΔCt	Ct	ΔCt
Original sample	26.7	7.1	27.6	7.5	26.5	6.3	26.6	6.7
1:10 (15.8–20.0)	29.0	6.0	30.1	6.0	29.9	6.3	29.5	6.2
1:100 (1.6–2.0)	33.1	4.9	33.7	5.9	33.3	5.3	32.9	5.3
1:1000 (0.16–0.20)	37.3	6.2	36.7	5.8	36.0	4.5	35.9	5.0
1:10000 (<0.02)	39.6	5.6	38.2	1.9	ND [†]	ND [†]	43.8 [†]	9.5 [†]

Results showing Avellino allele Ct<40, ΔCt<8, and the internal positive control Ct<33 are considered positive.

Abbreviations: ACD, Avellino corneal dystrophy; Ct, cycle threshold; ΔCt, Ct of Avellino allele-Ct of internal positive control; ND, not detectable.

*Serial dilution of ACD patient samples (range of DNA concentration in ng/μL). [†]Avellino allele was not detected.

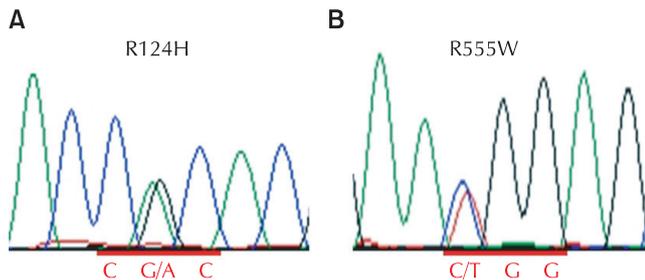


Fig. 2. Results of direct sequencing using GENEDIA master mix. (A) The second nucleotide G of codon 124 was substituted with A, resulting in the arginine-to-histidine amino acid change (R124H). (B) The first nucleotide C of codon 555 was substituted with T, resulting in the arginine-to-tryptophan amino acid change (R555W).

고찰

ACD 환자에서 LASIK 후 각막혼탁이 증가되는 최초의 증례가 발표된 이래 ACD 환자에서 LASIK은 금기시됐다 [12,13]. 라식수술 시 각막조직을 절제하는 것이 TGF-β를 포함하는 cytokine의 형성을 증가시켜서 결과적으로 각막편 사이에 서서히 hyaline의 축적을 유도하고 각막혼탁을 악화시켜 시력 및 대비감도의 저하를 초래하는 것이 그 기전으로 밝혀져 있다[9]. 본 연구에서도 LASIK 후 ACD 증세가 악화된 경우가 10명(25%)에서 확인되었다. 따라서 LASIK을 앞두고 있거나 ACD 가족력이 있는 경우 유전자 검사가 필수적이며, 외래에서 검사를 시행하고 빠르게 확인할 수 있는 검사가 이상적으로 생각된다.

본 연구에서 저자들은 새로 개발된 GENEDIA ACD kit와

GENEDIA master mix의 진단 성능을 평가하고 그 결과를 기준에 사용한 exon 4에 대한 자가제조 직접 염기서열분석법결과와 비교하였다. 그 결과 민감도는 100%로 매우 우수한 결과를 보였다. 대조군을 정상인을 대상으로 시행한 한계점이 있으나 특이도 100%로 매우 우수한 결과를 보였다. 또한 제조사에서 제시한 최소측정한계 범위(2 ng/μL)에서 안정적으로 검사결과가 재현되었고, 제한적인 방법으로 최소검출한계를 평가하여 보다 낮은 2×10^{-1} ng/μL 농도의 DNA 검체까지 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

구강세포 검체는 혈액 검체에 비해 DNA 농도가 매우 적으며, 검사방법에 따라 DNA 농도가 10 ng/μL 이하까지 다양하게 보고되어 있다[14,15]. GENEDIA ACD kit는 구강세포 검체도 이용 가능하도록 고안되어 있는데 본 연구에서는 구강세포 채취 검체를 얻을 수 없어 이를 이용한 평가를 시행할 수 없었다. 그러나 이를 보완하기 위해 DNA 검체를 10,000배까지 희석하여 검사한 다음 그 결과를 제시하였고 0.02 ng/μL까지 안정적인 결과를 보였다.

본 GENEDIA ACD kit의 제한점으로 homozygote와 heterozygote를 구분할 수 없다는 점을 들 수 있다. 그러나 ACD homozygote 환자의 경우 증상의 발현시기가 매우 이르고, 중증도가 심하다고 알려져 있기 때문에[10,16] 임상 소견이나 가족력 등으로 homozygote가 의심될 경우를 선별하여 GENEDIA master mix를 이용한 직접 염기서열분석법으로 확인하는 방법을 추가하는 것이 이런 제한점을 보완할 수 있을 것으로 생각되었다.

현재 ACD 진단을 위해서는 주로 직접 염기서열분석법을 사용하고 있는데 이는 고가의 자동화된 sequencer 장비와

분석프로그램이 요구되므로 소규모의 검사실에서 검사를 진행하기에는 어려움이 있을 수 있다. 그러나 본 연구에서 평가된 GENEDIA ACD kit는 real-time PCR 장비를 사용하므로 소규모 검사실에서도 빠르게 검사결과를 확인할 수 있고 Ct 값을 이용해 쉽게 판정할 수 있는 장점이 있다. 국내 및 해외에서 GCD 원인 돌연변이 빈도는 ACD를 일으키는 R124H가 90% 이상이며, 그 외에 R555W, R124C 등이 10% 이하로 보고된다[1,17,18]. 따라서 ACD가 의심될 경우 먼저 real-time PCR을 이용한 GENEDIA ACD kit로 양성 여부를 확인하고, 음성결과임에도 ACD가 강하게 의심된다면, GENEDIA master mix를 이용해 직접 염기서열분석법을 추가로 시행해 R555W 등의 GCD를 일으킬 수 있는 다른 돌연변이 유무를 확인하는 순서로 검사를 진행하는 것이 유용한 검사 알고리즘으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 평가한 GENEDIA ACD kit는 직접 염기서열분석법을 시행하기 어려운 검사실에서도 real-time PCR로 빠르게 결과를 판정할 수 있으며, 민감도 및 특이도 100% 결과를 나타내어 사용하기에 충분히 우수하였다. 같이 평가한 GENEDIA master mix는 대부분의 환자가 진단되는 TGFBI 유전자의 exon 4의 돌연변이뿐만 아니라 exon 12의 hotspot까지 확인할 수 있어 exon 4에 대한 sequencing 결과만으로는 진단할 수 없었던 환자들까지 확인할 수 있는 장점이 있었다. 또한 본 저자들이 제시한 Ct_{sample/IPC} 값 또한 신뢰성 있는 결과판정에 도움이 될 것으로 생각되었다.

REFERENCES

1. Kocak-Altintas AG, Kocak-Midillioglu I, Akarsu AN, Duman S. BIGH3 gene analysis in the differential diagnosis of corneal dystrophies. *Cornea* 2001;20:64-8.
2. Poulaki V, Colby K. Genetics of anterior and stromal corneal dystrophies. *Semin Ophthalmol* 2008;23:9-17.
3. Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies. *Hum Mutat* 2006;27:615-25.
4. Yoo SY, Kim TI, Lee SY, Kim EK, Keum KC, Yoo NC, et al. Development of a DNA chip for the diagnosis of the most common corneal dystrophies caused by mutations in the betaigh3 gene. *Br J Ophthalmol* 2007;91:722-7.
5. Han KE, Choi SI, Chung WS, Jung SH, Katsanis N, Kim TI, et al. Extremely varied phenotypes in granular corneal dystrophy type 2 heterozygotes. *Mol Vis* 2012;18:1755-62.
6. Holland EJ, Daya SM, Stone EM, Folberg R, Dobler AA, Cameron JD, et al. Avellino corneal dystrophy: clinical manifestations and natural history. *Ophthalmology* 1992;99:1564-8.
7. Banning CS, Kim WC, Randleman JB, Kim EK, Stulting RD. Exacerbation of Avellino corneal dystrophy after LASIK in North America. *Cornea* 2006;25:482-4.
8. Lee JH, Stulting RD, Lee DH, Lee CS, Kim WC, Kim EK. Exacerbation of granular corneal dystrophy type II (Avellino corneal dystrophy) after LASEK. *J Refract Surg* 2008;24:39-45.
9. Yi JH, Ha BJ, Kim SW, Kim TI, Kim EK. The number of cases, cause and treatment of Avellino corneal dystrophy exacerbated after LASIK. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:1415-24.
10. Lee JH, Cristol SM, Kim WC, Chung ES, Tchah H, Kim MS, et al. Prevalence of granular corneal dystrophy type 2 (Avellino corneal dystrophy) in the Korean population. *Ophthalmic Epidemiol* 2010;17:160-5.
11. Cho KJ, Mok JW, Na KS, Rho CR, Byun YS, Hwang HS, et al. TGFBI gene mutations in a Korean population with corneal dystrophy. *Mol Vis* 2012;18:2012-21.
12. Jun RM, Tchah H, Kim TI, Stulting RD, Jung SE, Seo KY, et al. Avellino corneal dystrophy after LASIK. *Ophthalmology* 2004;111:463-8.
13. Wan XH, Lee HC, Stulting RD, Kim T, Jung SE, Kim MJ, et al. Exacerbation of Avellino corneal dystrophy after laser in situ keratomileusis. *Cornea* 2002;21:223-6.
14. Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2072-6.
15. Lehmann AS, Haas DM, McCormick CL, Skaar TC, Renbarger JL. Collection of human genomic DNA from neonates: a comparison between umbilical cord blood and buccal swabs. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:362.e1-6.
16. Moon JW, Kim SW, Kim TI, Cristol SM, Chung ES, Kim EK. Homozygous granular corneal dystrophy type II (Avellino corneal dystrophy): natural history and progression after treatment. *Cornea* 2007;26:1095-100.
17. Yoshida S, Kumano Y, Yoshida A, Hisatomi T, Matsui H, Nishida T, et al. An analysis of BIGH3 mutations in patients

with corneal dystrophies in the Kyushu district of Japan. Jpn J Ophthalmol 2002;46:469-71.
18. Cung le X, Ha NT, Chau HM, Thanh TK, Fujiki K,

Murakami A, et al. Mutation analysis of the TGFBI gene in Vietnamese with granular and Avellino corneal dystrophy. Jpn J Ophthalmol 2004;48:12-6.

자가제조 직접 염기서열분석법과 비교를 통한 GENEDIA Avellino Corneal Dystrophy Mutation Detection Kit와 Screening Master Mix의 진단성능 평가

유내 • 황인식 • 홍경란 • 안미숙 • 박서진 • 최종락
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

배경: Transforming growth factor beta-induced (*TGFBI*) 유전자의 돌연변이는 각막이상증과 연관되어 있음이 알려져 있다. 본 연구에서는 GENEDIA Avellino corneal dystrophy (ACD) mutation detection kit와 GENEDIA corneal dystrophy screening master mix (Green Cross Medical Science Co., Korea)를 저자들의 검사실에서 제작하여 실제 이용하고 있는 직접 염기서열분석법과 비교하여 그 진단성능을 평가하고자 하였다.

방법: 2011년 12월에서 2013년 6월까지 연세대학교 세브란스병원 진단검사의학과에 ACD로 검사가 의뢰된 혈액검체 중에서 ACD군, ACD 의심군, 정상대조군 각각 40개의 검체를 대상으로 민감도, 특이도, 최소검출한계를 평가하였다.

결과: ACD군 40검체 모두 GENEDIA kit를 이용한 검사결과에서 평균 Ct (cycle threshold) 값 25.87 (± 1.24)으로 양성결과를 보여 민감도 100% 소견을 보였고, 변이계수도 0.02로 매우 우수하였다. 정상대조군은 모두 음성결과를 보여 특이도는 100%로 확인되었다. 최소검출한계는 검체의 DNA 농도가 0.2 ng/ μ L 이상인 경우였다. GENEDIA master mix를 사용한 결과도 기준 결과와 100% 일치하였으며, 20명의 ACD 의심군 중 4명에서 R555W 돌연변이가 발견되어 새롭게 과립성 각막이상증 type I으로 진단할 수 있었다.

결론: 본 연구에서 평가하였던 GENEDIA ACD 검출키트와 master mix의 민감도와 특이도는 임상검사에서 사용하기에 충분히 우수하였다. 또한 GENEDIA master mix는 대부분의 환자가 진단되는 *TGFBI* 유전자의 exon 4와 exon 12의 돌연변이를 확인할 수 있었다.

(J Lab Med Qual Assur 2013;35:115-21)

교신저자: 박서진
우)120-752 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02)2228-2450 Fax: 02)364-1583 E-mail: SJPARK11@yuhs.ac

