

Original Article **항 바이러스 치료중인 B형 간염환자에서 HBeAg 및 HBV DNA 검출에 관한 분석**

서울아산병원 핵의학과

천준홍 · 채홍주 · 박미선 · 임수연 · 유선희 · 이선호

Analysis of HBeAg and HBV DNA Detection in Hepatitis B Patients Treated with Antiviral Therapy

Jun Hong Cheon, Hong Ju Chae, Mi Sun Park, Soo Yeon Lim, Seon Hee Yoo and Sun Ho Lee

Department of Nuclear Medicine, Asan medical Center, Seoul Korea

Purpose Hepatitis B virus (hepatitis B virus, HBV) infection is a worldwide major public health problem and it is known as a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and liver cancer. And serologic tests of hepatitis B virus is essential for diagnosing and treating these diseases. In addition, with the development of molecular diagnostics, the detection of HBV DNA in serum diagnoses HBV infection and is recognized as an important indicator for the antiviral agent treatment response assessment. We performed HBeAg assay using Immunoradiometric assay (IRMA) and Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) in hepatitis B patients treated with antiviral agents. The detection rate of HBV DNA in serum was measured and compared by RT-PCR (Real Time - Polymerase Chain Reaction) method

Materials and Methods HBeAg serum examination and HBV DNA quantification test were conducted on 270 hepatitis B patients undergoing anti-virus treatment after diagnosis of hepatitis B virus infection. Two serologic tests (IRMA, CMIA) with different detection principles were applied for the HBeAg serum test. Serum HBV DNA was quantitatively measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using the Abbott m2000 System.

Results The detection rate of HBeAg was 24.1% (65/270) for IRMA and 82.2% (222/270) for CMIA. Detection rate of serum HBV DNA by real-time RT-PCR is 29.3% (79/270). The measured amount of serum HBV DNA concentration is $4.8 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^8$ IU/mL (mean \pm SD). The minimum value is 16 IU/mL, the maximum value is 1.0×10^9 IU/mL, and the reference value for quantitative detection limit is 15 IU/mL. The detection rates and concentrations of HBV DNA by group according to the results of HBeAg serological (IRMA, CMIA) tests were as follows.

- 1) Group I (IRMA negative, CMIA positive, N = 169), HBV DNA detection rate of 17.7% (30/169), $6.8 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^6$ IU/mL
- 2) Group II (IRMA positive, CMIA positive, N = 53), HBV DNA detection rate 62.3% (33/53), $1.1 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$ IU/mL
- 3) Group III (IRMA negative, CMIA negative, N = 36), HBV DNA detection rate 36.1% (13/36), $3.0 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^6$ IU/mL
- 4) Group IV (IRMA positive, CMIA negative, N = 12), HBV DNA detection rate 25% (3/12), $1.3 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$ IU/mL

Conclusion HBeAg detection rate according to the serological test showed a large difference. This difference is considered for a number of reasons such as characteristics of the Ab used for assay kit and epitope, HBV of genotype. Detection rate and the concentration of the group-specific HBV DNA classified serologic results confirmed the high detection rate and the concentration in Group II (IRMA-positive, CMIA positive, N = 53).

Key Words HBV (hepatitis B virus), IRMA, CMIA, HBV DNA

• Received: February 28, 2019 Accepted: March 2, 2019

• Corresponding author: **Jun Hong Cheon**

• Department of Nuclear Medicine, Asan medical Center, 88,

Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea

Tel: +82-2-3010-4563, Fax: +82-2-3010-4588

E-mail: jhcheon@amc.seoul.kr

서 론

B형 간염바이러스 (Hepatitis B virus, HBV)는 주로 간세포에서 복제되는 약 3200 base pairs의 부분적으로 이중 가닥인 DNA 바이러스로 B형 간염 e항원(hepatitis B e antigen, HBeAg), B형 간염 핵심항원(hepatitis B core antigen, HBcAg), HBV 중합 효소(HBV- Polymerase), B형 간염 표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg), PreS1, PreS2 및 HBx와 같은 7개의 단백질을 암호화하는 4 개의 오픈 리딩 프레임 가지고 있습니다¹⁾(Fig. 1, 2). HBV 감염은 전 세계적으로 중요한 공중 보건 문제이며 만성 B형간염, 간경변, 간암의 주요 원인으로 알려져 있으며,²⁾ 이러한 질환의 진단 및 치료에 B형 간염바이러스의 혈청학적 검사는 필수적이다. 또한, 혈청 내 HBV DNA를 증폭하여 검출하는 분자유전학적 기법은 혈청학적 B형 간염 표지자 검사들과 더불어 B형 간염의 진단에 사용된다. HBV DNA 정량검사의 경우 만성 B형 간염 환자의 치료반응을 추적관찰하기 위하여 필수적이며, B형 간염 보균자와 만성 B형 간염 환자의 구분, B형 간염바이러스의 전염성에 대한 평가, 항바이러스제 치료여부 결정, 치료 전 HBV DNA 기저치 농도 평가, 치료 종료나 약제 변경에 대한 결정, 간이식 후 예후 추적관찰 등의 목적으로도 사용되고 있다.³⁾ 저자들은 항바이러스 치료중인 B형 간염 환자를 대상으로 면역방사계수법(IRMA; Immunoradiometric assay)과 화학발광 미세입자 면역분석법(CMIA; Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)을 이용하여 혈청 내 HBeAg 검출을 시행하였고, 또한 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR; Realtime-Polymerase Chain Reaction)법을 이용하여 측정된 혈청 내 HBV DNA 검출율을 비교 분석 하였다.

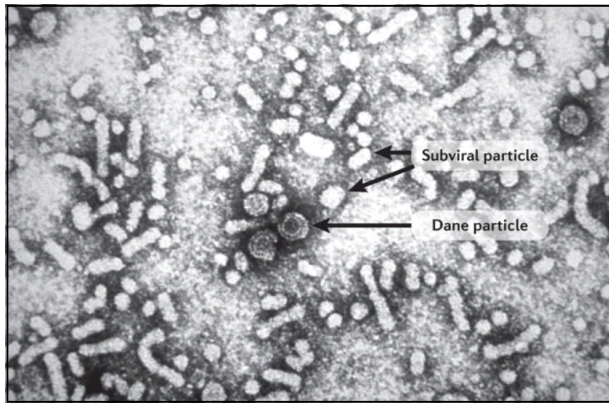


Fig. 1. Electron micrograph of hepatitis B virus.

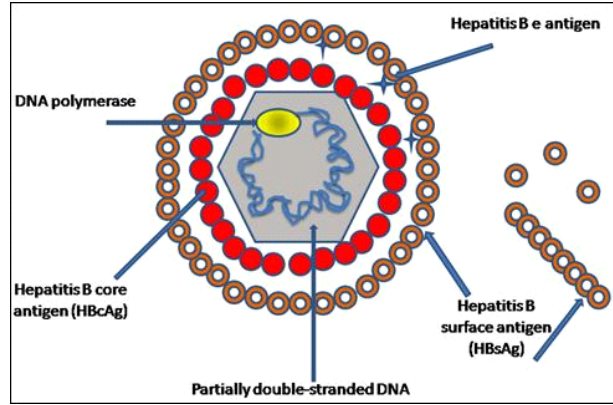


Fig. 2. The Structure of hepatitis B virus.

대상 및 방법

1. 대상

2017년 9월부터 2017년 12월까지 서울아산병원에서 항바이러스 치료중인 B형 간염 환자 270명을 대상으로 검출원리가 다른 혈청학적 검사법을 이용하여 혈청 내 HBeAg 을 검출 하였다. 또한 동시에 분자유전학적 검사법인 실시간 중합효소 연쇄반응법을 사용하여 혈청 내 HBV DNA의 검출율과 농도를 비교 분석 하였다.

2. HBeAg 혈청학적 검사

혈청 내 HBeAg 측정은 B형 간염 바이러스성 감염의 진행 상황을 모니터링 하기위해 사용된다. HBeAg는 HBsAg의 발현 후, B형 간염 감염의 초기에 검출 될 수 있다. 또한 HBeAg은 HBV DNA 복제 정도와 관련 있으며 HBeAg 양성이면 전염력도 높다고 볼 수 있다. 급성 B형 간염에서는 HBsAg 혈청 전환 이전에 HBeAg 혈청 전환이 일어나 B형간염 e항체(anti-HBe)가 생성되나 만성 B형 간염의 경우 수년에서 수십 년 동안 HBeAg 혈청 전환이 일어나지 않는 경우도 있다. 일반적으로 HBeAg이 혈청에서 사라지고 anti-HBe가 나타나면 HBV DNA가 감소하고 심한 간기능 이상도 호전되어 비증식기로 이행한다.³⁾ 이러한 특성을 가진 혈청내 HBeAg의 검출율을 비교하기 위해, 면역방사계수법의 BNIBT HBeAg IRMA Kit(Beijing North Institute of Biotechnology, Beijing, China)와 화학발광 미세입자 면역분석법의 ARCHITECT HBeAg kit(Abbott laboratories, IL, USA)를 이용하여 혈청내 HBeAg을 검출하였다.

3. 혈청 HBV DNA 정량

혈청 HBV DNA 정량 분석은 실시간 증합효소 연쇄반응법을 통해 얻어졌고 상업적인 장치(Abbott m2000 System®, Abbott Molecular inc, IL, USA)와 Reagent(Abbott RealTime HBV Amplification Reagent)가 이용 되었다. Real-Time PCR 방법은 증폭과 검출이 단일 튜브에서 발생하는 원리이기에 신속한 검사가 가능하고 오염률이 낮다는 특성이 있으며, HBV DNA 정량에 있어서 예민도와 검사범위가 우수한 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ Abbott m2000 System은 DNA 추출과 증폭이 각각 수행되는 두 개의 기기로 구성되어 있다. Abbott m2000sp를 이용하여 혈청 200 μ L에서 HBV DNA를 추출한 후, 이 HBV DNA에 50 μ L 반응혼합물(master mix)을 혼합하고 반응 Plate에 옮긴 후 Abbott m2000rt로 증폭과정을 시행하였고 검출민감도는 15 IU/mL 이었다. 현재 HBV DNA 정량검사는 항바이러스 치료 환자의 추적검사, HBV 감염 간이식환자의 추적검사용, 급 만성 B형 간염환자의 진단용으로 사용되고 있다.

4. 자료처리 및 분석

혈청 내 HBe Ag의 검출율과 HBV DNA의 정량 분석 데이터에 대한 모든 통계학적 처리는 SPSS for windows 18.0 (IBM SPSS® IBM inc, Armonk, NY, USA) 프로그램을 사용하였고, 유의수준 0.05 미만 ($p < 0.05$)을 통계학적으로 의미 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. HBeAg 검출율

검출원리가 다른 혈청학적 검사법을 사용하여 얻어진 HBeAg 검출율은 면역방사계수법의 경우 24.1% (65/270) 결과를 보였고, 반면 화학발광 미세입자 면역 분석법에서는 82.2% (222/270)의 높은 검출율의 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

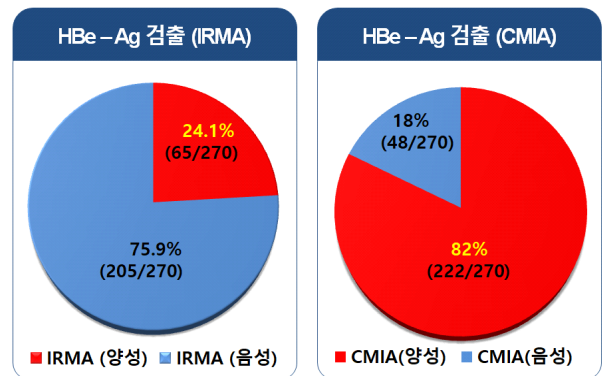


Fig. 3. Comparison of results between each 2 HBeAg assay kit (n=270).

2. 혈청학적 검사결과 일치율

혈청학적 검사방법(IRMA, CMIA)에 따른 HBeAg 검사결과의 일치율은 33% (89/270) 결과를 보였다(Table 1).

Table 1. Comparison of HBeAg results between IRMA and CMIA (n=270)

Assay Kit		Test results (A/B)				Concordance Number(%)
A	B	+/+	+/-	-/+	-/-	
IRMA	CMIA	53(19.6%)	12(4.4%)	169(62.6%)	36(13.3%)	89(33%)

Table 2. Detection rate of serum HBV DNA levels using Abbott m2000 System (n=270)

System	Abbott m2000
Reagent	Abbott Real Time HBV Amplification Reagent
HBV DNA detection rate	79/270 (29.3%)
Mean ± SD	4.8×10 ⁷ IU/mL ± 1.9×10 ⁸ IU/mL
Max	1.0×10 ⁹ IU/mL
Min	1.6×10 ¹ IU/mL
Detection limit	15 IU/mL

3. RT-PCR을 이용한 HBV DNA 검출율과 농도

실시간 중합효소 연쇄반응법을 이용한 혈청 내 HBV DNA의 검출율은 29.3% (79/270)의 결과를 보였고, 혈청 내 HBV DNA 농도는 16 IU/mL ~ 1.0×10⁹ IU/mL의 분포를 나타냈다. 검출된 혈청 내 HBV DNA 평균농도는 4.8×10⁷ IU/mL 이었으며, 검출한계는 <15 IU/mL 이다(Table 2).

4. 혈청학적 검사법 결과에 따른 그룹별 HBV DNA 검출율과 농도

혈청학적 검사법(IRMA, CMIA)에 의해 검출된 HBeAg 결과에 따라 분류된 HBV DNA의 검출율과 농도(Mean ± SD)는 다음과 같다(Table 3, 4). 면역방사계수법으로 HBeAg 검출결과가 양성일때 HBV DNA 검출율은 55.4%, 그리고 음성일때 HBV DNA 검출율은 20.9% 이었으며 혈청 내 HBV DNA농도는 각각 1.1×10⁸ IU/mL, 5.7×10⁵ IU/mL의 결과를 나타냈다. 이에 반해 화학발광 미세입자 면역 분석법의 경우 HBeAg 검출결과가 양성일때 HBV DNA 검출율은 28.4%, 음성일때 33.3%의 결과를 나타냈으며 혈청 내 HBV DNA농도는 6.0×10⁷ IU/mL, 2.4×10⁵ IU/mL 이었다(Table 3). 면역방사계수법과 화학발광 미세입자 면역 분석법에서 동일하게 HBeAg 검출결과가 양성인 경우 HBV DNA 검출율은 62.3%의 높은 결과를 보였으며, 1.1×10⁸ IU/mL의 혈청내 HBV DNA농도를 나타냈다(Table 4).

고찰 및 결론

HBV(hepatitis B virus)는 전 세계적으로 많은 인구가 감염되어 있으며, 국내 감염율은 HBV 백신에 의하여 현저히 감소하였지만, 간경변증과 간암의 가장 흔한 원인이다.^{2,5,6} HBsAg, HBeAg 및 HBV DNA는 B형 간염에 대한 viral marker로 이용되고 있으며, 이러한 viral marker는 HBV 감염으로 인해 야기되는 질병의 결과 예측 및 치료 효능에 유용함이 입증되었습니다. 현재까지는 혈청 HBV DNA의 정량 분석이 유일하게 혈청중의 돌아다니는 바이러스 정량을 반영하고 간내 바이러스 생산의 활동도를 반영하는 지표로 활용되고 있다.⁷ HBV DNA의 중요성은 대규모 인구집단의 B형간염보유자의 관찰연구에서 잘 나타나 있는데, HBV DNA의 농도가 높을수록 (특히, HBV DNA > 10,000 copies/ml 또는 > 2,000 IU/mL) 간경변증으로 진행이나 간세포암의 발생이 흔하였다.^{8,9}이 결과는 현재 미국, 유럽 및 아시아-태평양만성B형간염 치료 가이드라인에 포함되어 HBV DNA > 10,000 copies/ml 또는 > 2,000 IU/mL 이면 항바이러스 치료를 권고하고 있으며¹⁰, 현재 초기치료 약제로는 테노포비어, 엔테카비어, 페그인터페론 알파 중 하나의 사용을 권장한다. B형 간염의 진단과 치료에 중요한 지표로 사용되고 있는 HBeAg, HBV DNA의 검출 결과를 비교 분석한 결과 혈청학적 검사법(IRMA, CMIA)에 의한 HBeAg 검사결과의 일치율은 33%의 결과를 보였으나, 면역방사계수법을 사용한 HBeAg 검출율과 실시간 중합효소 연쇄반응법에 의한 HBV DNA의 검출율

Table 3. Serum HBV DNA levels IRMA and CMIA

Group	HBV DNA (IU/mL)		Detection rate	t-TEST P-value
	Mean	SD		
IRMA + n=65	1.1×10 ⁸	2.7×10 ⁸	55.4% (36/65)	0.026
IRMA - n=205	5.7×10 ⁵	1.7×10 ⁶	20.9% (43/205)	
CMIA + n=222	6.0×10 ⁷	2.1×10 ⁸	28.4% (63/222)	0.026
CMIA - n=48	2.4×10 ⁵	9.7×10 ⁵	33.3% (16/48)	

Table 4. Serum HBV DNA levels according to the concordance of IRMA and CMIA

Group	HBV DNA (IU/mL)		Detection rate
	Mean	SD	
I IRMA - CMIA + n=169	6.8×10 ⁵	1.9×10 ⁶	17.7% (30/169)
II IRMA + CMIA + n=53	1.1×10 ⁸	2.8×10 ⁸	62.3% (33/53)
III IRMA - CMIA - n=36	3.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	36.1% (13/36)
IV IRMA + CMIA - n=12	1.3×10 ³	1.1×10 ³	25% (3/12)

이 화학발광 미세입자 면역 분석법의 경우 보다는 높은 결과를 보였다. 그리고 두가지 혈청학적 검사법(IRMA, CMIA)에서 HBeAg이 검출된 그룹(Group II IRMA 양성, CMIA 양성, n=53)에서 혈청내 HBV DNA 높은 검출율과 농도를 확인할 수 있었다. 검출원리가 다른 혈청학적 검사법에 따른 HBeAg 검출률은 많은 차이를 보였으며, 이러한 차이는 검사kit에 사용된 Ab의 특성과 epitope, HBV의 genotype등 다양한 원인으로 생각되며 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

[목적] B형 간염바이러스(hepatitis B virus, HBV)감염은 전세계적으로 중요한 공중 보건 문제이며 만성간염, 간 경변, 간암의 주요 원인으로 알려져 있으며, 이러한 질환의 진단 및 치료에 B형 간염바이러스의 혈청학적 검사는 필수적이다. 항 바이러스 치료중인 B형 간염 환자를 대상으로 면역방사계수 측정법(IRMA; Immunoradiometric assay)과 화학발광 미세입자 면역분석법(CMIA; Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)을 이용하여 HBe-Ag 검사를 시행하였고, 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR; Realtime-Polymerase Chain Reaction)법을 이용하여 혈청 내 HBV DNA 검출율을 비교 분석 하였다.

[대상 및 방법] 항 바이러스 치료가 시행중인 B형 간염 환자 270명을 대상으로 HBeAg 혈청 검사와 HBV DNA 정량 검사를 실시하였다. HBeAg 혈청 검사는 검출 원리가 다른 두가지 혈청학적 검사법(IRMA, CMIA)을 적용 하였고, 혈청 내 HBV DNA는 Abbott m2000 System을 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR; Realtime-Polymerase Chain Reaction)법으로 정량 측정 하였다.

[결과] HBeAg 검출율은 면역방사계수법(IRMA)의 경우 24.1% (65/205), 화학발광 미세입자 면역 분석법(CMIA)에서는 82.2% (222/48)의 결과를 보였다. 혈청학적 검사방법(IRMA, CMIA)에 따른 HBeAg 검사결과의 일치율은 33% (89/270)이다. 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 혈청 내 HBV DNA의 검출율은 29.3% (79/191)를 보였고, 혈청 내 HBV-DNA 농도는 16 IU/mL ~ 1.0×10^9 IU/mL 이며 검출한계는 <15 IU/mL 이다. 면역방사계수법(IRMA)으로 HBeAg 검출결과가 양성일때 55.4%, 그리고 음성일때 20.9%의 HBV DNA 검출율과 1.1×10^8 IU/mL, 5.7×10^5 IU/mL의 혈청내 HBV DNA 농도를 나타냈다. 이에 반해 화학발광 미세입

자 면역 분석법(CMIA)의 경우 HBeAg 검출결과가 양성일때 HBV DNA 검출율은 28.4%, 음성일때 33.3%의 결과를 나타냈으며 혈청 내 HBV DNA 농도는 6.0×10^7 IU/mL, 2.4×10^5 IU/mL 이었다. 면역방사계수법과 화학발광 미세입자 면역 분석법에서 동일하게 HBeAg 검출 결과가 양성인 경우 HBV DNA 검출율은 62.3%의 결과를 보였으며, 혈청 내 HBV DNA 농도는 1.1×10^8 IU/mL 이다.

[결론] 혈청학적 검사법에 따른 HBeAg 검출율은 많은 차이를 보였다. 이러한 차이는 검사kit에 사용된 Ab의 특성과 epitope, HBV의 genotype등 여러 가지 원인으로 생각된다. 혈청학적 검사 결과로 분류 된 그룹별 HBV DNA의 검출율과 농도를 비교한 결과, Group II (IRMA 양성, CMIA 양성, N=53)에서 높은 검출율과 농도를 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Yim HJ. Hepatitis B virus genetic diversity and mutant. *Korean J Hepatol* 2008;14:446-464.
2. Byun KS. Recent epidemiologic changes of acute and chronic hepatitis in Korea. *J Korean Med Assoc* 2005;48:423-427.
3. Jang ES. Diagnostic Tests for Viral Hepatitis. *Korean J Med* 2013;85:267-271.
4. Hazakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assesment. *J Hepatol* 2006;44:S71-6.
5. Seeger C, Mason Ws. Hepatitis B virus biology. *Microbiol MolBiol Rev* 2000;64:51-68.
6. Korean Association for the Study of Liver. KASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *Clin Mol Hapatol* 2016;22:18-75.
7. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 2018; 67:1560-1599.
8. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.
9. Iloeje UH, yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-686.
10. European Association for The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines; management of chronic hepatitis B. *J hepatol* 2009;50:227-242.