

Original article

B형 간염 표면 항체 역가 검사의 시약 간 비교분석

정세희, 이영지, 이선호
서울아산병원 핵의학과

Comparative Analysis between Reagents for Hepatitis B Surface Antibody Titer Test

Se-Hee Jeong, Yung-Ji Lee, Sun-Ho Lee

Department of Nuclear Medicine, Seoul Asan Medical Center, Seoul, Korea

Corresponding Author : Sun-Ho Lee, Department of Nuclear Medicine, Seoul Asan Medical Center, 88, Olympic-ro 43-GIL, SONGPA-GU, SEOUL 05505, Republic of Korea, Tel : +82-2-3010-4587, E-mail : T200944@amc.seoul.kr

ABSTRACT

Purpose: It is important for liver transplant patients to maintain a certain level of hepatitis B antibodies to prevent recurrence of hepatitis B after liver transplant surgery. The liver transplant and hepatobiliary surgery department at our hospital uses hepatitis B surface antibody titer testing as an important indicator in monitoring liver transplant patients. Recently, our hospital switched to reagents from company B due to an unstable supply of reagents and consumables from company A. Therefore, we evaluated the differences and correlation between those two reagents. **Materials and Methods:** A reagent comparison experiment between Company A and Company B was conducted on 69 samples of the hepatitis B surface antibody test requested in April 2022. Company A's reagent is a two-step test using beads, and Company B's reagent is a one-step test using a tube. For comparative experiments, samples diluted 10 times with stock solution and physiological saline were used, and the correlation between these reagents was analyzed by dilution factor. **Results:** The correlation graph between the two reagents shows the gradual upward gradient, and the result of B's reagent tended to be 5 times lower than A's reagent. The correlation between the 10-fold dilution of B's reagent, which is multiplied by 5, and the 10-fold dilution of A's reagent was compared for a similar value of A's reagent. Consequently, that was $y = 1.1426x - 145.44$, $R^2 = 0.9828$, which means a good correlation with an increased gradient. Furthermore, the B took 90 minutes to react, though the A took more than 120 minutes to test. **Conclusion:** Overall, B's reagent showed a lower value approximately 5 times rather than A's reagent, and there is the most valuable correlation between the 10-fold dilution of A's reagent and the 10-fold dilution of B's reagent multiplied by 5. If the 5-fold corrected value is referred to when reporting results using B's reagent, antibody trend analysis will be possible, similar to the result of the previous reagent. Also, it leads to an improvement in the laboratory's work efficiency significantly by the shorter test time.

Key Words: Hepatitis B Surface Antibody Test, Correlation, Reagent Comparison

서론

B형 간염 표면 항체(hepatitis B surface antibody; HBsAb)는 간염을 일으키는 B형 간염 바이러스를 제거하기 위해 B형 간염 표면 항원(hepatitis B surface antigen; HBsAg)에 대한 면역반응으로 형성된 항체이다. B형 간염 바이러스의 감염 경로는 태아의 수직감염, 수혈, 재사용한 의료기구 및 성접촉 등이 있으며, 감염 시 간세포 파괴 및 염증이 발생된다. B형 간염 바이러스 감염에 의해 B형 간염 표면 항원에 노출된 후 6주에서 수개월 이내에 항원이 완전히 소실된 회복기에 B형 간염 항체가 출현하게 되며 이는 면역성의 획득을 의미한다.

B형 간염 표면 항체 역가 검사(titer test)란 B형 간염 항체 보유 여부를 확인하고 B형 간염 항체 수치를 정량화하는 검사이다. 간이식 수술을 받은 환자에게는 간염 재발의 방지를 위해 주기적으로 고단위 B형 간염 항체인 헤파빅이 투여된다. 이 과정에서 B형 간염 표면 항체 역가 검사는 헤파빅 투여 후 항체의 농도가 기준치 이상으로 유지되는지를 정량적으로 확인하는 중요한 역할을 한다. 특히, B형 간염 표면 항체 역가 검사는 치료의 방향을 결정하며 간이식 환자의 간염 재발을 막아 이식 성공률을 높이는데 기여한다. 따라서 정확하고 신뢰성 있는 결과 보고가 필수적이다.

그러나 기존에 사용중인 A사의 시약 및 소모품 공급의 불안정으로 대체 시약인 B사 시약으로 변경이 필요하였다. 이에 본 연구에서는 B형 간염 표면 항체 역가 검사에서 A 시약과 B 시약을 분석하여 기존 시약과 대체 시약 간의 상관성 평가를 통해 대체시약의 신뢰성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 검사대상

본 연구는 2022년 4월 본원에 B형 간염 표면 항체 역가 검사가 의뢰된 혈청 검체 중 69개를 대상으로 진행 하였다. 검체는 음성(negative) 결과를 제외한 혈청 검체 중 무작위로 선정하여 A 시약과 B 시약을 이용해 두 시약 간의 상관성을 비교 분석하였다.

2. 검사방법

A 시약의 경우 검사 전용 플레이트(plate)에 B형 간염 표면 항원이 코팅된 구슬(bead)을 넣고 표준액과 검체를 각각 200 μ L씩 넣은 후 40°C에서 80분간 교반식 건식배양기(shaking air incubator)에서 반응시켰다. 반응 완료 후 증류수를 사용하여 세척을 실시하고 아이오딘-125가 표지 된 B형 간염 표면 항원 (125 I-HBsAg)을 200 μ L 분주한 뒤 다시 40°C에서 80분간 반응시켰다. 마찬가지로 증류수를 사용하여 세척을 실시하고 구슬을 전용 시험관에 옮겨 감마선 계측기를 이용하여 1분간 계측하였다.

B 시약의 경우 각각 표준액 및 검체를 50 μ L씩 B형 간염 표면 항원이 코팅된 시험관에 넣은 다음 125 I-HBsAg을 150 μ L 분주하여 잘 혼합한 후 실온(18~25°C)에서 90분간 반응시켰다. 반응 종료 후에는 증류수로 세척한 뒤 감마선 계측기를 이용하여 1분간 계측하였다.

A 시약 검사 시 Microlab AT plus 2 (HAMILTON, Switzerland)을 사용하여 검체와 시약을 분주하였고 B시약 검사 시 Freedom EVO 150 (Tecan, Switzerland)을 사용하였다. 감마선 계측기(gamma counter)는 DREAM GAMMA-10 (SHINJIN MEDICS, Korea)를 사용하여 두 시약의 방사능을 측정하였다.

3. 평가방법

1) 상관성 비교 방법

A 시약과 B 시약 간의 상관성을 평가하기 위해 생리식염수를 이용하여 10배 희석한 검체와 희석하지 않은 원액 검체를 사용하여

결과값을 비교하였다. 검체의 희석은 환자의 혈청 50 μ L를 생리식염수 450 μ L와 혼합하여 진행하였다. 상관성 분석을 위한 결과 그래프에서 X축을 기존 A시약 결과로 설정하고 Y축을 B 시약의 결과로 설정하였다.

희석배수별 상관성 비교를 위해 6가지의 희석배수 조건을 설정하였다. 첫번째는 원액을 검체를 사용하여 A시약과 B 시약 간의 결과값 비교, 두번째는 10배 희석한 검체를 사용하여 A시약과 B 시약 간의 결과값 비교, 세번째는 10배 희석한 검체를 사용하여 평가한 A 시약의 결과값과 원액을 사용하여 평가한 B 시약의 결과값 비교, 네번째는 원액을 사용하여 평가한 A 시약의 결과값과 원액을 사용하여 평가한 B 시약의 결과값에 5배수를 보정한 결과값 간의 비교, 다섯번째는 10배 희석한 검체를 사용한 A 시약의 결과값과 원액을 사용하여 평가한 B 시약의 결과값에 5배수를 보정한 값의 비교, 여섯번째는 10배 희석한 검체를 사용한 A 시약의 결과값과 10배 희석한 검체를 사용한 B 시약의 결과값에 5배수를 보정한 결과값 간의 비교로 설정하였다(Table 1). 6가지 조건에 대한 결과값 비교를 위해 상관 계수(correlation coefficient)와 회귀 분석(regression analysis)을 실시하였다.

Table 1. The method of comparing the correlation between concentration values of reagent A and reagent B

Reagent	A	B
1	1	1
2	10	10
3	10	1
4	1	1 and correction(X5)
5	10	1 and correction(X5)
6	10	10 and correction(X5)

2) 비율 비교 분석 방법

두 시약 간 결과값의 차이를 정량적으로 비교하기 위해 상관성 비교 방법에서 설정한 6가지 희석 배수 조건을 적용하여 B 시약 결과값/A 시약 결과값 형태로 비율을 산출하였다. 이후 각 희석 배수에 따른 전체 비율 평균(mean ratio) 및 표준편차(standard deviation, SD)를 계산하여 비율의 변동성을 평가하고 두 시약 간의 차이를 비교하였다. 따라서 비율 값이 1에 근접할수록 A 시약과 B 시약 간의 결과값 차이가 미미함을 나타내며 비율 값이 0.20인 경우 A 시약에 비해 B 시약의 결과값이 5배 낮다는 사실을 명확히 확인할 수 있다.

3) 정도관리 물질을 이용한 비교 방법

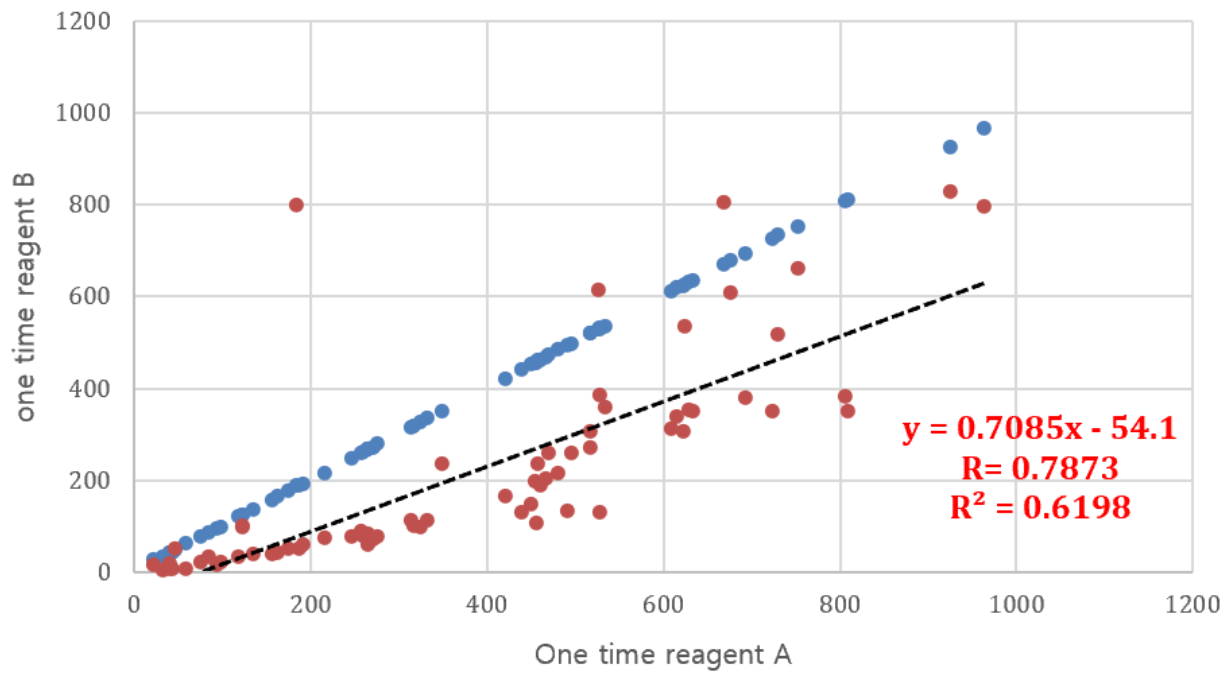
대체 시약으로 선정된 B사 시약의 유용성 평가를 위해 내부정도관리 결과를 비교하여 분석하였다. 본원의 B형 간염 표면 항체 역가 검사 시 내부정도관리를 위해 환자 검체를 사용하여 저농도 및 고농도로 제조한 혼합혈청(pooled serum)을 정도관리 물질로 사용하고 있다. A 시약과 B 시약의 정도관리 물질 결과값으로 평균(mean), 표준편차(standard deviation, SD) 그리고 변동계수(coefficient of variation, CV)를 산출하여 두 시약을 비교 분석 하였다. 또한 비교의 정확성을 위해 동일한 로트(lot)의 시약을 선정하여 평가하였다.

결과

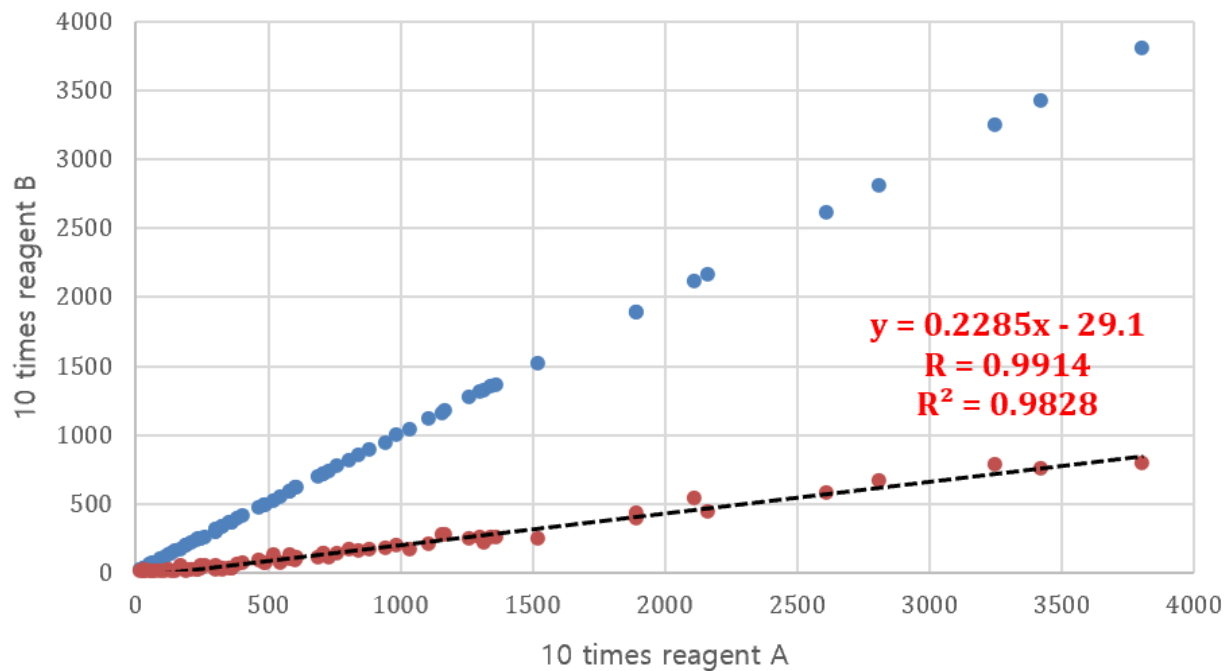
1. 상관성 비교 결과

6가지 희석 배수 설정에 대한 상관성 비교 결과는 다음과 같다. 첫 번째 A와 B 시약 간 1배 결과에 대한 상관 분석의 회귀식 및 상관계수는 $y=0.7085x-54.1$, $R=0.7873$ 이고, 두 번째 A와 B 시약 간 10배 희석한 결과는 $y=0.2285x-29.1$, $R=0.9914$ 이며, 세 번째 A 시약의 10배 희석한 결과와 B 시약의 1배 결과는 $y=0.252x+12.4$, $R=0.9826$ 로 산출되었다(Fig. 1.).

(A) The one time correlation between reagent A and reagent B



(B) The 10 times correlation between reagent A and reagent B



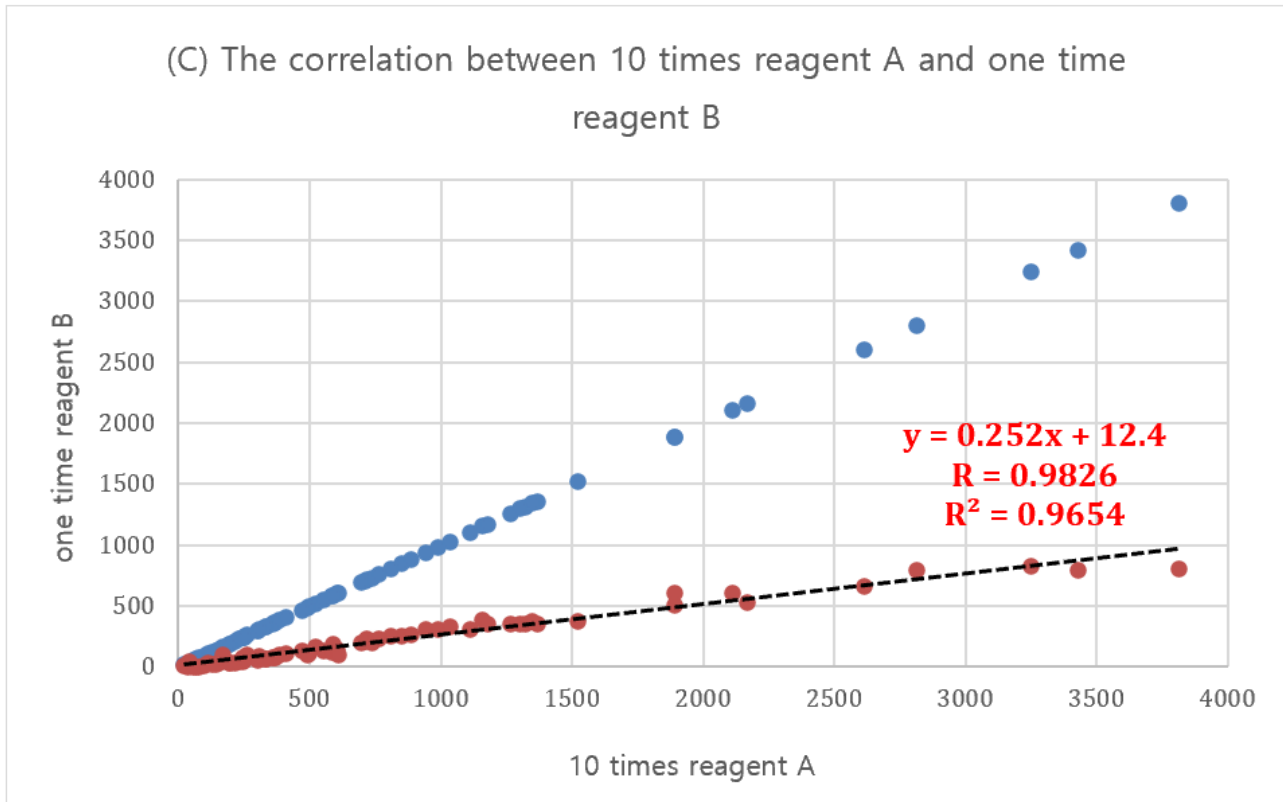
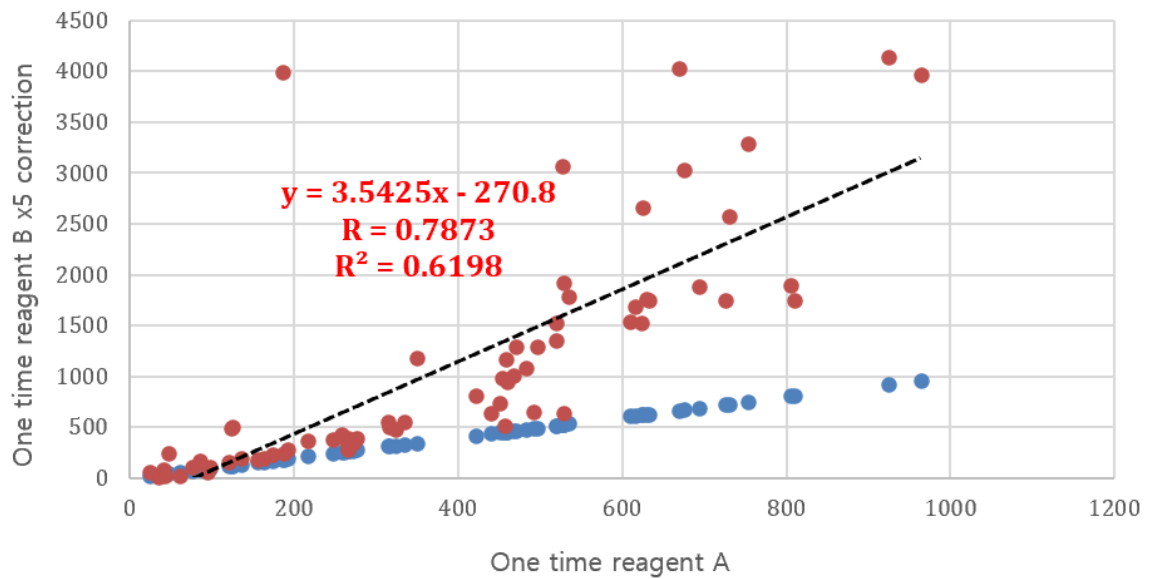


Fig. 1. The graphs(A~C) above show the correlation between reagent A and reagent B.

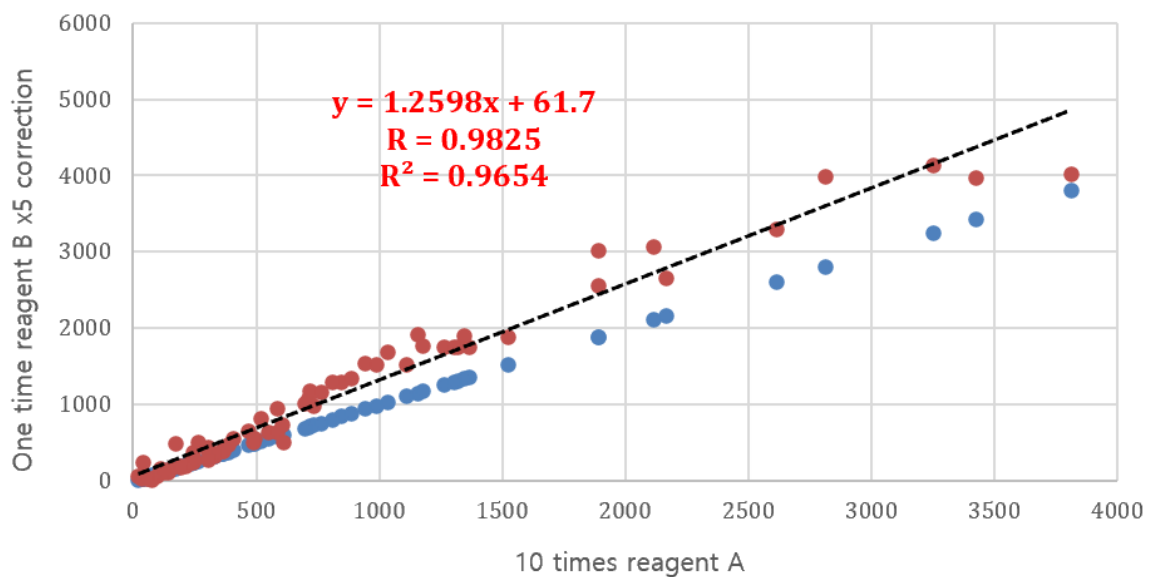
상관 계수로 비교하였을 때 세 번째 A 시약의 10배 희석한 결과와 B 시약의 1배 결과의 상관계수가 0.9914로 가장 우수하나 회귀식의 기울기는 0.2285로 B 시약의 결과가 약 5배 낮게 측정됨을 확인하였다. 본 결과를 토대로 B 시약의 결과에 5배수를 보정한 결과 값을 적용하여 네 번째에서 여섯 번째의 비교를 실시하였다. 네 번째 A 시약의 1배 결과와 B 시약의 1배 결과에 5배수를 보정한 결과 값 간 회귀식 및 상관계수는 $y=3.5425x-270.8$, $R=0.7873$ 이고, 다섯 번째 A 시약의 10배 희석한 결과와 B 시약의 1배 결과에 5배수를 보정한 결과는 $y=1.2598x+61.7$, $R=0.9825$ 이며, 여섯 번째 A 시약의 10배 희석한 결과와 B 시약의 10배 희석한 결과에 5배수를 보정한 결과는 $y=1.1426x-145.4$, $R=0.9914$ 를 나타내었다(Fig. 2).

본 연구 결과는 A 시약의 10배 희석 결과와 B 시약 10배 희석 결과에 5배수 보정한 결과가 가장 높은 수준의 상관관계를 나타냈다.

(D) The corrective correlation between one time reagent A and one time reagent B x5



(E) The corrective correlation between 10 times reagent A and one time reagent B x5



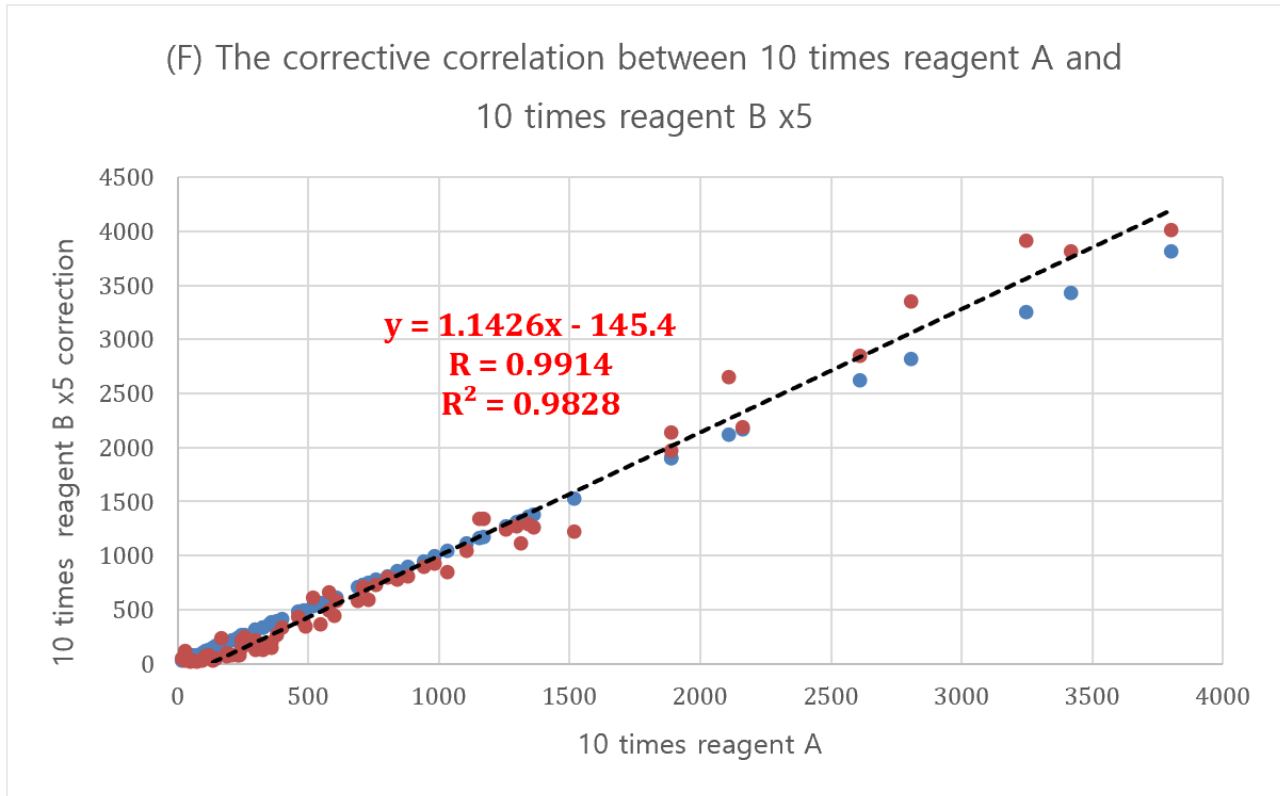


Fig. 2. The graphs(D~F) above show the correlation between reagent A and reagent B multiplied by 5.

2. 비율 분석 비교 결과

A 시약과 B 시약 간의 결과 차이를 평가하기 위해 비율 분석을 실시하였으며 6가지 희석 배수 설정에 따라 결과를 산출하였다. 각 희석 배수에 따른 결과는 다음과 같다.

첫 번째 각 1배 희석에서 A 시약과 B 시약의 비율 평균은 0.51, 표준편차는 0.52로 나타났다. 두 번째 두 시약 간 10배 희석의 비율 평균은 0.16, 표준편차는 0.08이며, 세 번째 A 시약 10배와 B 시약 1배의 비율 평균은 0.28, 표준편차는 0.16이다. 네 번째 A 시약 1배와 B 시약 1배에 5배수를 보정한 결과의 비율 평균은 2.56, 표준편차는 2.61로 나타났다. 다섯 번째 A 시약 10배와 B 시약 1배에 5배수를 보정한 결과의 비율 평균은 1.38, 표준편차는 0.78이며, 마지막으로 A 시약 10배와 B 시약 10배 결과에 5배수 보정한 결과의 비율 평균은 0.81, 표준편차는 0.40으로 확인되었다(Table 2).

결과적으로 두 시약 간 10배 희석 비교에서 비율평균은 0.16으로 산출되었으며 기대값인 0.20에 가장 근접하였다. 또한 A 시약 10배와 B 시약 10배 결과에 5배 보정한 비율평균의 값이 0.81로 기대값인 1에 가장 가까운 값을 나타내어 두 시약간 결과가 가장 유사하다는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 2. The comparison of the ratio between reagent A and reagent B

Dilution factor and Correction factor	Reagent B	1	10	1	1 (X5)	1 (X5)	10 (X5)
	Reagent A	1	10	10	1	10	10
Mean ratio *		0.51	0.16	0.28	2.56	1.38	0.81
SD ratio		0.52	0.08	0.16	2.61	0.78	0.40

* The ratio was calculated as Reagent B/Reagent A

3. 정도관리 물질 비교 결과

정도관리 물질을 이용한 비교 결과 A 시약으로 실시한 저농도 정도관리 물질의 평균값은 73.6이며 고농도 정도관리 물질의 평균값은 387로 나타났다. 이때 표준편차는 각각 3.4와 16.9로 나타나고 변동계수는 4.6%와 4.3%로 산출되었다. B 시약을 이용한 검사에서는 저농도 정도관리 물질의 평균값이 12.4, 고농도 정도관리 물질의 평균값은 71.2로 나타났고 표준편차는 각각 2.4와 6.6, 변동계수는 19.3%와 9.3%로 산출되었다.

종합적으로 A 시약과 B 시약의 저농도 및 고농도 정도관리 물질의 평균값을 비교한 결과 B 시약은 저농도에서 5.93배, 고농도에서 5.46배 낮은 측정값을 보였다(Fig. 3).

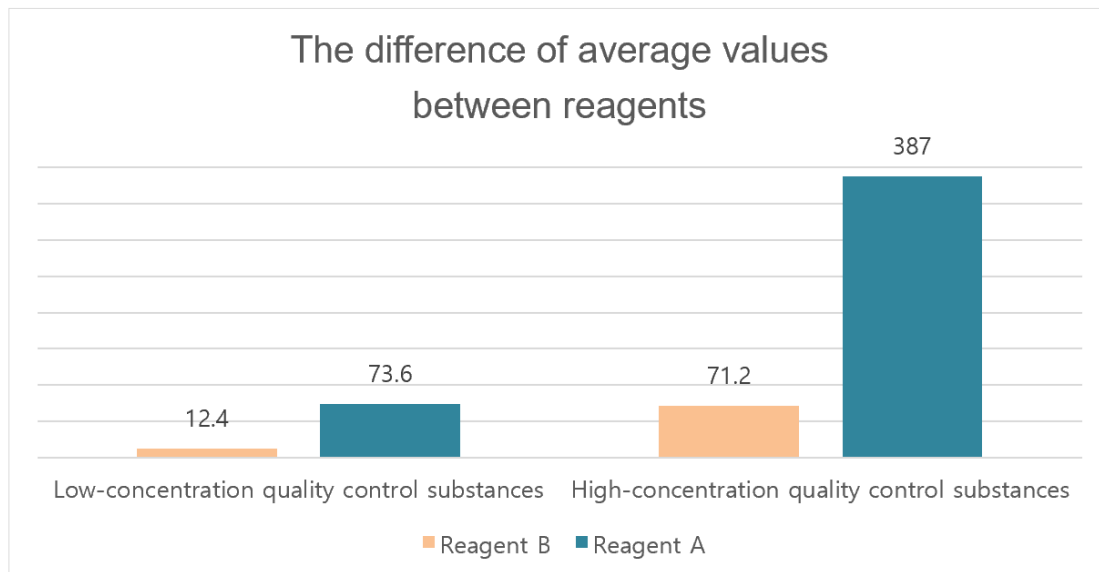


Fig. 3. The graph shows the mean difference between reagent A and reagent B.

고찰

본 연구에서는 B형 간염 표면 항체 역가 검사를 위한 기존 시약의 공급 불안정성으로 대체 시약의 필요성이 대두됨에 따라 기존 시약과 대체 시약 간의 상관성을 평가하고자 하였다. 이와 관련하여 A 시약과 B 시약 간에는 여러 가지 뚜렷한 차이가 존재한다. 첫째, A 시약은 구슬을 이용한 검사이고 B 시약은 시험관을 이용한 검사다. A 시약은 B형 간염 표면 항원을 구슬에 피복시킨 후 혈청 내 존재하는 B형 간염 표면 항체와 면역반응으로 항원-항체 복합체를 형성한다. B 시약의 경우 시험관에 B형 간염 표면 항원을 피복시키고 혈청의 B형 간염 표면 항체와 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하는 원리를 이용한다. 둘째, A 시약은 두 단계 검사법(two step test)이고 B 시약은 한 단계 검사법(one step test)이다. 셋째, 검사 소요 시간에 있어서 A 시약은 약 160분이 소요되는 반면 B 시약은 90분 가량 소요된다. 넷째, 반응 조건에 차이가 있다. A 시약은 40°C 건식배양기에서 교반하여 항원-항체-표지항원 결합을 실

시하고, B 시약은 실온에서 교반하여 항원-항체-표지항원 결합을 진행한다(Table 3).

Table 3. The differences in the characteristics of reagent A and B

Reagent A	Reagent B
Using Bead	Using Tube
Two steps	One step
160 min. required	90 min. required
40°C Shaking Air Incubator	Room temperature shaker

본 연구를 통해 두 시약 간의 차이를 분석하여 B 시약이 A 시약보다 평균적으로 약 5배 낮은 결과가 나타남을 확인했다. A 시약의 10배 희석한 결과값과 B 시약을 10배 희석한 결과에 5배수 보정한 값이 가장 좋은 상관성 결과라는 것을 발견했다. 또한 비율 분석을 통해 시약 간 10배 희석 시 B 시약이 5배 낮음을 나타내는 0.20에 가까웠고 A 시약 10배 결과와 B 시약 10배 결과에 5배수 보정을 적용한 결과는 1에 가장 근접하여 두 시약 간의 유사성을 추가로 확인할 수 있었다. 따라서 B 시약을 이용하여 10배 희석한 결과에 5배수 보정한 값을 참고한다면 이전 시약의 결과 값과 유사한 항체 추이 분석이 가능할 것으로 사료된다.

다만, 본 연구의 한계점으로는 갑작스러운 시약의 수급 불안정성에 의해 기존에 사용하던 시약의 부족으로 시약 간 비교 실험에서 충분한 검체 수를 설정하지 못하여 세밀한 상관성 비교가 어려웠다는 점이다. 또한 실험에 사용할 수 있는 대체 시약이 B 시약으로 한정되어 있어 기존에 사용하던 시약 간의 비교가 제한적이었다는 점도 고려해야 한다.

결론

B형 간염 표면 항체 역가 검사는 환자의 혈액 내 B형 간염 바이러스에 대한 항체 형성 정도를 평가하는 중요한 진단 검사로 본원에서는 헤파빅 투약 후 항체 역가가 500 IU 이상으로 유지되도록 권장하고 있다. 이는 간이식 수술을 받은 환자의 상태를 모니터링하고 적절한 치료 결정을 내리는데 필수적인 기준이 된다. 따라서 보고된 이전 결과의 경향성과 일치하는 것이 중요하다. 대체 시약인 B 시약과의 차이를 확인하고 보정함으로써 A 시약과 유사한 결과를 보고할 수 있다. 또한 B 시약을 통해 기존의 검사 소요 시간보다 약 70분 단축시킬 수 있는 장점이 있으며 검사실의 업무 효율성을 크게 향상시킬 것으로 기대된다. 이러한 시간 단축은 의료진이 신속하게 진단을 내리고 환자에게 즉각적인 치료를 제공하는데 기여할 것이다. 결과적으로 B형 간염 표면 항체 역가 검사의 신뢰성과 효율성을 유지하며 환자 관리의 질 향상에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.

REFERENCES

- Jo JW, Park YH, Kim SJ, Choi SH, Lee SK, Lee JH, et al. Orthotopic liver transplantation in HBs-antigen positive patients. Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg. 1998;2(2):82-5. Retrieved from <https://www.ahbps.org/journal/view.html?spage=81&volume=2&number=2>
- Lee JJ, Lee JY, Oh JM, Lee BK, Son IJ, Shin WK. Liver transplantation for patients with hepatitis B: prevention of hepatitis B recurrence by combination of hepatitis B immunoglobulin and lamivudine. J. Kor. Soc. Health-Syst. Pharm. 2002;19(4):433-9. Retrieved from <https://www.jkshp.or.kr/journal/view.html?uid=888&vmd=Full>