

## HIV 1형 RNA Viral Load 검출을 위한 두 가지 실시간 핵산증폭법의 비교

김수정<sup>1</sup> · 이은경<sup>1</sup> · 박윤희<sup>2</sup> · 김현숙<sup>1</sup>

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 관동대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>2</sup>

= Abstract =

### Comparison of Two Commercial Real-time Nucleic Acid Amplification Methods for Detecting the Viral Load of Human Immunodeficiency Virus Type 1

Sue Jung Kim<sup>1</sup>, Eunkyung Lee<sup>1</sup>, Younhee Park<sup>2</sup>, Hyon-Suk Kim<sup>1</sup>

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine<sup>1</sup>, Seoul,  
Kwandong University College of Medicine<sup>2</sup>, Goyang, Korea

**Background:** Detection of the viral load of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) RNA is important for clinical decision making and for determining the prognosis of HIV-infected patients. The aim of the study is to compare the performance of real-time RT-PCR (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1, CAP/CTM, Roche Diagnostics) and the Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NucliSens EasyQ HIV-1, NucliSens, BioMerieux) methods for testing Korean HIV-infected patients.

**Methods:** Among the specimens that were requested to undergo HIV-1 RNA viral load detection from 2005 to 2006, 153 specimens were selected based on the status of the specimens. The CAP/CTM and NucliSens tests were performed according to the manufacturer's instruction.

**Results:** HIV-1 RNA was detected by both tests in 93 specimens. Among the remainder, CAP/CTM detected HIV-1 RNA in 10 specimens, while the same specimens showed results lower than the detection limit with using the NucliSens. Though the results were appropriately correlated ( $r=0.85$ ,  $P<0.0001$ ), the mean differences between the two test results were  $-0.1321 \log_{10}$  IU/mL on the Bland-Altman test.

**Conclusion:** The methodologic difference or the presence of a HIV subtype may affect the agreement between the two tests. The standardization of methods and the establishment of a linear range for the individual laboratory results may be helpful to obtain accurate test results. (*Korean J Blood Transfus* 2008;19:216-221)

**Key words:** HIV, Viral load, RT-PCR, NASBA

접수일 : 2008년 12월 23일, 승인일 : 2008년 12월 25일

책임저자 : 김 현 숙 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실  
TEL: 02) 2228-2443 FAX: 02) 364-1583, E-mail: kimhs54@yuhs.ac

## 서론

1982년 수혈에 의한 Human Immunodeficiency Virus (HIV) 감염이 미국에서 처음 보고된 이후, 전파 위험이 있는 공여자를 제한하는 등 감염을 예방하려는 노력이 시작되었다.<sup>1,2)</sup> 이후 여러 가지 진단기법의 발달로 분자유전학적 방법으로 HIV를 검출하기에 이르렀다. 국내에서는 항체미형성기의 감염을 줄이기 위해 2005년 2월부터 헌혈혈액에 대해 핵산증폭검사를 시행하고 있다.<sup>3,4)</sup>

일단 HIV 감염이 진단된 환자의 경우, 병의 진행 정도를 확인하여 치료를 결정하고, 치료 반응을 확인하며, 예후를 파악하는 데에 정확한 HIV RNA 정량이 매우 중요하다.<sup>5)</sup> HIV 1형(HIV-1) RNA를 정량하는 여러 가지 방법들이 있으나 가장 널리 쓰이는 방법은 3가지로, 실시간 RT-PCR과 Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), branched DNA (bDNA) 방법이 상업적으로 개발되어 있다.<sup>6)</sup> 본 연구에서는 한국인 HIV 환자들을 대상으로 하여 real-time PCR법을 이용한 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 (CAP/CTM, Roche Diagnostics, Meylan, France) 시험과 NASBA법을 이용한 NucliSens EasyQ HIV-1 (NucliSens, BioMerieux, Lyon, France) 시험을 동일 검체에서 시행하여 그 결과를 비교하였다.

## 재료 및 방법

2005년부터 2006년까지 세브란스병원에 HIV-1 RNA 정량검사가 의뢰된 검체 중 검체 상태 등을 고려하여 153개를 선택하여 시험하였다. 동일한 환자에서의 중복검사는 제외하였다. 검체는 EDTA 튜브에 채취한 전혈을 이용하였고, 검체가 검사실에 도착하면 바로 혈장을 분리하였으며, 분리한 혈장은 시험할 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하

였다. 이때 혈장을 바로 분리하기 어려운 경우에는 냉장보관하였으며 6시간이 경과하지 않도록 하였다.

CAP/CTM 시험은 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 환자 혈장과 정도관리 물질을 각각 분주하여 COBAS Ampliprep (Roche Diagnostics)에서 핵산을 추출하였다. COBAS Ampliprep에서 얻은 핵산을 이용하여 COBAS TaqMan 48 (Roche Diagnostics)에서 검사를 시행하였다.

NucliSens 시험도 시약제조원의 지침에 따라 시행하였다. NucliSens lysis buffer (BioMerieux)를 환자의 혈장에 섞고, NucliSens Magnetic Extraction Reagents (BioMerieux)와 NucliSens mini MAG (BioMerieux)을 이용하여 핵산을 추출하고, 이를 튜브에 분주하고, 준비한 시발체 용액을 섞은 후, NucliSens EasyQ Incubator (BioMerieux)에서  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간,  $41^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 배양하였다. 튜브 뚜껑을 열고 준비한 효소 용액을 섞고,  $41^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 배양하였다. 원심분리한 후 다시 잘 섞고, 다시 원심분리하여 다시 NucliSens EasyQ Incubator에서  $41^{\circ}\text{C}$ 로 가온하였다. 튜브를  $41^{\circ}\text{C}$ 로 미리 가온한 NucliSens EasyQ Analyzer (BioMerieux)에 넣고 검사를 시행하였다.

모든 통계학적 분석은 log를 취한 결과값을 이용하였다. 두 검사 간의 상관성 분석을 위해 Pearson 검정을 하였고, 선형회귀분석을 시행하였다. 또한, 일치도를 확인하기 위해 Bland-Altman 검정을 시행하였다. 모든 통계학적 분석은 Analyse-it Standard Edition (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, United Kingdom)을 이용하였다.

## 결과

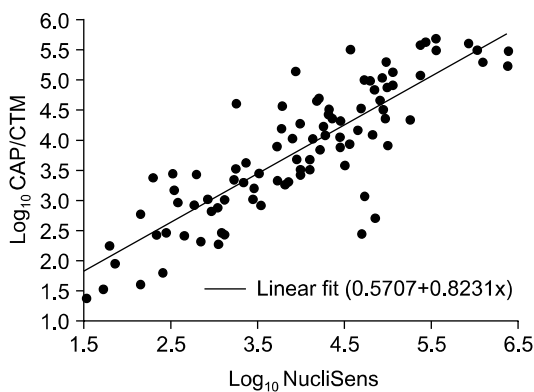
총 153 검체 중 93개의 검체가 두 시험에서 모두 HIV-1 RNA 양성결과를 보였다. 나머지 검체

중 10검체는 CAP/CTM 시험으로 HIV-1 RNA가 검출되었으나 NucliSens 시험으로는 검출한계 이하의 결과를 보였다(Table 1). 2개의 검체가 분석 가능한 선형범위(linear range) 이상의 결과를 보여 분석에서 제외하였다.

Pearson 검정 결과 상관계수  $r=0.85$  ( $P<0.0001$ ) 이었고, 산점도(scatter plot)를 Fig. 1에 나타내었다. 선형회귀분석 시 절편은 0.5707 (95% 신뢰구간 0.12~1.02), 기울기는 0.8231 (0.71~0.93)이었

**Table 1.** The results of COBAS AmpliPrep /COBAS TaqMan HIV-1 test and NucliSens EasyQ HIV-1 test

	COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1		Total
	No. positive	No. negative	
NucliSens	No. positive 93	0	93
EasyQ HIV-1	No. negative 10	50	60
Total	103	50	153



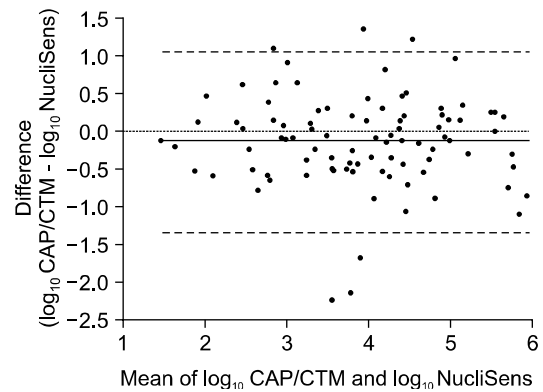
**Fig. 1.** Scatter plot of  $\log_{10}$  CAP/CTM vs.  $\log_{10}$  NucliSens with fitted regression line. Abbreviations: CAP/CTM, COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1; NucliSens, NucliSens EasyQ HIV-1.

다. Bland-Altman plot을 통해 두 결과 값의 차이가 전체 검사범위에 고루 분포되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 두 결과 값의 차이의 평균은  $-0.1321 \log_{10}$  IU/mL이었다.

## 고 찰

본 연구에서는 한국인 HIV 감염 환자들을 대상으로 두 가지 실시간 핵산 증폭법의 HIV-1 RNA viral load 검사 결과를 비교하였다. 실시간 RT-PCR과 NASBA 시험 결과에 대해 Pearson 상관 분석을 시행하였을 때, 상관계수가 0.85로 적절한 상관성을 보였으나, 선형회귀분석을 통해 얻은 기울기(0.8231)가 1보다 낮은 값을 보였으며, Bland-Altman 검정에서 두 결과값 차이의 평균값이  $-0.1321 \log_{10}$  IU/mL로 CAP/CTM이 NucliSens에 비해 전체적으로 낮은 값을 보였다.

HIV-1 RNA viral load를 측정하는 분자진단기법



**Fig. 2.** The Bland-Altman plot of  $\log_{10}$  CAP/CTM and  $\log_{10}$  NucliSens. The mean difference ( $-0.1302 \log_{10}$  IU/mL, solid line) and limits of agreement (mean $\pm$ 2 standard deviation,  $-1.3254$  to  $1.0613 \log_{10}$  IU/mL, dotted line) are displayed in the plot. Abbreviations: See Fig. 1.

들이 개발되고 있는데, 이 방법들의 상관성 및 일치도에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. 연구자와 연구대상, 검사 방법에 따라 높은 일치도를 보고한 연구도 있고,<sup>7)</sup> 일치도가 낮았다고 보고한 문헌도 있다.<sup>8)</sup> 본 연구에서 두 검사간의 일치도가 그다지 높지 않은 것은 방법상 원리가 다르다는 것이 가장 큰 원인일 것으로 생각되었다. 두 검사의 특징은 Table 2에 요약하였다. 두 검사 모두 HIV *gag* 부분에 대한 시발체를 사용하지만 RNA 추출 방법부터 다르고, 증폭 방법에 있어 큰 차이가 있다. 두 시험 결과의 차이는 특히 non-B 아형 검출시 두드러지는데, 현재 출시되고 있는 분자유전학적 검사들은 모두 HIV-1 B 아형을 검출하는 데에 최적화되어 있는 검사들이다. HIV-1 B 아형은 유럽과 미국에서 검출되는 HIV의 대부분을 차지하며,<sup>9,10)</sup> 국내에서도 B 아형이 주로 검출된다.<sup>11)</sup> 그러나 개발도상국에서는 non-B 아형

에 의한 감염이 많은 것으로 보고되고 있으며, 유럽과 미국에서도 non-B 감염이 증가추세에 있고, 국내에도 2001년 보고에 따르면 해외에서 감염된 환자에 의한 non-B 아형의 전파도 관찰되었다고 하였다.<sup>12)</sup> CAP/CTM의 경우, 제조사에서 자체적으로 시험한 결과 HIV-1의 모든 non-B 아형에 50 copies/mL 이하의 민감도를 보였고, NucliSens의 경우에도 M 아형의 A부터 J아형까지 모두 검출 가능하였다고 하였다. 그러나 HIV-1 non-B 아형이 검출되었던 환자로부터 의뢰된 검체를 대상으로 Versant HIV-1 RNA bDNA v3.0 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, USA), CAP/CTM와 NucliSens, 3가지 검사를 비교한 연구에서, 38.6%의 검체에서 세 검사 모두 HIV-1 RNA를 검출하였고, 나머지 검체 중 14.6%, 32.7%에서 각각 CAP/CTM과 NucliSens가 HIV-1 RNA를 검출해내었다.<sup>13)</sup> 두 검사 결과간 viral load 차이가 1 log 이상인 경우가

**Table 2.** Characteristics of the two methods of real-time nucleic acid amplification

	COBAS AmpliPrep /COBAS TaqMan HIV-1	NucliSens EasyQ HIV-1
Target region	<i>gag</i>	<i>gag</i>
Method	Real-time RT-PCR	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
Linear range	24.4~5,882,352.9 IU/mL (40~10,000,000 cp/mL)	50~3,000,000 IU/mL
Limit of detection	24.4 IU/mL	25 IU/mL
Specimen Required	EDTA plasma 1 mL	EDTA plasma 1~2 mL
Specimen handling	Whole blood (EDTA) can be stored at 2~25°C for 6 hours	Whole blood (EDTA) can be stored at room temperature for up to 24 hours
Specimen storage	EDTA plasma can be stored - up to 1 day at room temperature - up to 5 days at 2~8°C - for ≥5 days at -20 to -80°C	EDTA plasma specimens can be stored in NucliSens Lysis Buffer - up to 1 year at -70°C - for a maximum of 14 days at 2~8°C - for a maximum of 24 hours at room temperature (15~30°C)

5.4%, 0.5 log 이상인 경우가 29%였으며, 특히 G 아형과 재조합형인 CRF10\_CD형인 경우, 이러한 차이가 더욱 두드러졌다고 하였다. 본 연구에서 환자에서 검출된 HIV의 아형은 확인하지 못하였으나 non-B 아형이 포함되어 있었다면 두 검사결과가 더욱 차이를 보이도록 하였을 가능성이 있다. 아형 및 새로이 발견되는 재조합형과 변이들을 검출하기 위해서는 기존의 검사가 꾸준히 개선되어야 할 것이며 검사간의 방법적 차이를 극복하기 위해서는 검사간 표준화가 필요할 것으로 생각된다.

또한, 본 연구에서는 각 검사의 선형성을 평가하지 않고 제조사에서 제공한 선형 범위, 측정 가능 범위를 적용하였으나 실제로 검사실의 여러 가지 환경적 요인에 따라 선형 범위가 제조사가 제공한 범위와 다를 경우, 고농도나 저농도 검체에서 차이를 보일 수도 있다. 별도로 선형 범위를 평가하지 않은 것이 본 연구의 한계점이며, 고농도 및 저농도 검체에서 정확한 측정을 위해서는 선형 범위를 평가하고 정비하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

CAP/CTM 검사를 통해 NucliSens에서는 검출 한계 이하의 결과를 보였던 10개의 검체에서 HIV-1 RNA viral load를 검출할 수 있었다. 제조사에서 제공하는 검출한계는 CAP/CTM의 경우, 24.4 IU/mL, NucliSens의 경우 25 IU/mL로 큰 차이가 없으나 실제로는 CAP/CTM이 더 민감하게 HIV-1 RNA viral load를 검출할 수 있었다. 반면, 직접 실험을 통해 확인하지는 못하였지만, NucliSens의 경우, 검사 전까지 검체가 더 안정한 것이 장점이라고 하였다(Table 2).

CAP/CTM과 NucliSens는 HIV-1 RNA viral load 검출에 있어서 적절한 상관성을 보였으나 일치도는 높지 않았다. 이는 두 검사의 방법적 차이나 아형의 존재 등에 의한 것일 가능성이 있다. 따라

서 viral load 검사 방법들 간의 표준화가 필요할 것으로 생각되며, 각 검사실마다 선형 범위에 대한 평가를 시행하여 검출 한계를 정비하는 것이 고농도 및 저농도 검체의 정확한 측정에 도움이 될 수 있을 것이다.

## 요 약

**배경:** HIV RNA viral load 검출은 HIV 감염 환자의 치료 결정 및 예후에 매우 중요하다. 본 연구에서는 국내에서 사용되고 있는 실시간 핵산증폭법 두 가지, 즉 real-time PCR법을 이용한 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 (CAP/CTM, Roche Diagnostics) 시험과 Nucleic Acid Sequence Based Amplification법을 이용한 NucliSens EasyQ HIV-1 (NucliSens, BioMerieux) 시험 결과를 비교하였다.

**방법:** 2005년부터 2006년까지 세브란스 병원에 HIV-1 RNA viral load 검출이 의뢰된 검체 중 검체 상태 등을 고려하여 153 검체를 선택하여 제조사의 지침에 따라 CAP/CTM, NucliSens 검사를 시행하였다.

**결과:** 두 검사에서 HIV-1 RNA가 모두 검출된 검체는 93개이었고, 나머지 중 10검체는 CAP/CTM으로 검출되었으나 NucliSens로는 검출한계 이하의 결과를 보였다. 상관성 분석에서  $r=0.85$  ( $P<0.0001$ )로 적절한 상관성을 보였으나 Bland-Altman 분석에서 두 결과 값의 차이의 평균은  $-0.1321 \log_{10}$  IU/mL로 NucliSens가 높은 값을 보였다.

**결론:** 두 검사 결과는 그 방법적 차이나 아형의 존재 등에 의한 영향 때문에 차이를 보일 수 있다. 검사방법의 표준화 및 각 검사실 내 선형범위의 정비가 정확한 검사에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Centers for Disease Control (CDC). Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982;31:652-4
- Jaffe HW. The early days of the HIV-AIDS epidemic in the USA. *Nat Immunol* 2008;9:1201-3
- Seo DH, Hwang BG, Park YS, Oh YC, Kim SI. Performance of HCV and HIV-1 nucleic acid amplification test (NAT) in Korean blood donors. *Korean J Blood Transfus* 2000;11:91-7
- Han KS, Park MH, Kim SI. *Transfusion medicine*. 3rd ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher, 2006:330-4
- Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2000;283:381-90
- Peter JB, Sevall JS. Molecular-based methods for quantifying HIV viral load. *AIDS Patient Care STDs* 2004;18:75-9
- Anastassopoulou CG, Touloumi G, Katsoulidou A, Hatzitheodorou H, Pappa M, Paraskevis D, et al. Comparative evaluation of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 and 3.0 (bDNA) assays and the AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 test for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Virol Methods* 2001;91:67-74
- Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL. Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998;36:716-20
- Holguín A, Rodés B, Soriano V. Recombinant human immunodeficiency viruses type 1 circulating in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:505-11
- Alaeus A, Leitner T, Lidman K, Albert J. Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 1997;11:199-202
- Oh MD, Park SW, Kim U, Kim HB, Choe YJ, Kim E, et al. Determination of genetic subtypes of HIV type 1 isolated from Korean AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1229-33
- Lee JS, Nam JG, Kim SS, Kang C, Choi BS, Kim OJ, et al. Distribution of HIV-1 subtypes by transmission routes in Korea. *Korean J Infect Dis* 2001;33:311-8
- Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol* 2008;46:2918-23