

# 사람유두종바이러스의 검출과 유전자형 분석을 위한 HPV28 Detection 검사와 HPV DNA Chip 검사의 비교 평가

## Comparative Evaluation of the HPV28 Detection and HPV DNA Chip Test for Detecting and Genotyping Human Papillomaviruses

신은심 · 배효진 · 송완근 · 정선경 · 황유성

Eunsim Shin, Ph.D., Heojin Bae, M.T., Wan-Keun Song, M.S., Sun-Kyung Jung, M.D., Yoo-Sung Hwang, M.D.

네오딘의학연구소 분자진단검사센터

Molecular Diagnostics Testing Center, Neodin Medical Institute, Seoul, Korea

**Background:** The HPV28 Detection test (Seegene) is a real-time polymerase chain reaction assay that is designed for testing a total of 28 human papillomavirus (HPV) genotypes and estimating the approximate HPV viral load. The aim of this study was to evaluate the clinical applicability of the HPV28 Detection test with regard to the prevalence of HPV infection and distribution of HPV genotypes by using the HPV28 Detection and HPV DNA Chip tests (Biomedlab).

**Methods:** HPV DNA Chip and HPV28 Detection tests were performed for 500 cervical swab specimens. HPV genotype results were confirmed by sequencing analysis of the specimens that showed discordant results in the 2 test methods.

**Results:** The positive rate of HPV detection determined by using HPV28 Detection and HPV DNA Chip tests were 43.8% and 40.6%, respectively. The sequencing results in 64 discordant specimens that showed single HPV infection in the 2 test methods were in complete agreement with the test results obtained with the HPV28 Detection test. The genotyping results of the HPV28 Detection test were 100% concordant in repeated experiments with HPV-infected specimens that have 12 different HPV genotypes, i.e., types 16, 31, 33, 39, 42, 51, 52, 53, 58, 66, 68, and 70. The HPV28 Detection test was 100-fold more sensitive than the HPV DNA Chip test with serially diluted HPV DNAs.

**Conclusions:** The HPV28 Detection test can be applied in the clinical field as an HPV genotyping test can accurately identify various HPV genotypes with high specificity and low detection limit.

**Key Words:** HPV Genotyping, Human Papillomavirus, HPV DNA Chip, Real-Time PCR

## 서론

사람유두종바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)의 감염은

**Corresponding author:** Yoo-Sung Hwang

Molecular Diagnostics Testing Center, Neodin Medical Institute,

320 Cheonho-daero, Seongdong-gu, Seoul 133-847, Korea

Tel: +82-2-2244-6500, Fax: +82-2-2212-4383, E-mail: hwangys@neodin.com

Received: May 29, 2013

Revision received: July 11, 2013

Accepted: July 12, 2013

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

© 2013, 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.

자궁경부암의 가장 중요한 위험인자이며, 자궁경부암의 약 90-100%에서 HPV의 감염이 보고되고 있다[1]. 특히, 고위험군(High-risk types) HPV는 대부분의 자궁경부암에서 검출되고, 자궁경부 편평상피내병변(Squamous intraepithelial lesions, SIL)의 중증도에 따라 고위험군 HPV의 양성률이 증가하고 있으며[2], HPV 바이러스의 양이 많을수록 자궁경부암으로 진행되는 위험도가 증가하는 것으로 보고되고 있다[3]. HPV의 검출, 유전자형의 확인과 HPV viral load의 증감여부는 임상에 유용하게 적용할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 또한, 최근 고위험군 HPV 유전자형 중에서 특이 HPV 유전자형에 효과적인 백신(Cervarix, Gardasil)의 개발로 HPV의 감염여부를 확인과 유전자형의 분석 등[4], 고위험군 HPV를 진단하는 분자진단검사의 임상적 중요성이 더욱 높아지고 있다. 이러한 HPV 유전자형의 동정은 자궁경부암의 발병 가능성이

높거나 불분명한 세포학적 이상소견을 보이는 여성을 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다. HPV 감염 정도를 상대적으로 정량화한 HPV viral load 또한, 원추절제술 등 환자의 치료 후 추적관찰이 가능하여[5], HPV 양성 환자 혹은 치료를 받은 환자에서 추적검사로 적용함으로써 임상적 활용이 높다고 할 수 있다.

HPV 유전자형 검사는 HPV 감염에 의한 증후나 질환의 원인과 진행을 이해하는데 도움을 줄 뿐 아니라, 자궁경부암의 예방을 위한 무증상의 여성을 대상으로 하는 건강검진 검사로 적용하기도 한다. 그러나, 검사의 민감도, 특이도, 분석 결과와 임상적 연관성, 지속적인 모니터링의 가능성, 검사의 편리성과 분석 결과의 객관적 해석 등 다양한 측면이 고려되어야 한다. 실시간 중합효소연쇄반응법(Real-Time PCR, RT-PCR)은 여러 병원체 또는 여러 유전자형을 한번에 분석할 수 있는 분자진단검사방법으로, 다양한 HPV 유전자형을 한번에 확인할 수 있는 효과적이며 유용한 방법이라고 할 수 있다. 이번 연구에서는 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용하여 HPV 유전자형의 분석과 대략적인 HPV viral load를 동시에 분석할 수 있는 HPV28 Detection (Seegene, Seoul, Korea)과, 중합효소연쇄반응과 DNA hybridization 방법을 이용하여 HPV 유전자형을 분석하는 HPV DNA Chip (Biomedlab, Seoul, Korea)을 이용하여, HPV의 양성률과 유전자형의 분포를 분석하고, 염기서열분석법과의 일치율을 평가하여, 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 HPV28 Detection의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

이번 연구는 네오딘의학연구소 의학연구윤리심의위원회의 승인을 받은 후(ND-IRB-2013-01), 2013년 1월부터 2월까지 HPV 유전자형 검사가 의뢰된 검체 중, HPV DNA Chip 검사 후의 잔여 검체가 있는 500명의 자궁경부 세포 검체를 대상으로 하였으며, 500명 중 연령 정보가 제공되지 않은 132명(26.4%)를 제외한 총 368명(73.6%) 연구군의 평균 연령과 표준편차는  $37.9 \pm 11.4$ 세이며, 연령 구성은 20세 미만은 2명(0.5%), 20-29세 114명(31.0%), 30-39세 108명(29.3%), 40-49세 77명(20.9%), 50-59세 45명(12.2%), 60-69세 16명(4.3%), 70-79세 4명(1.1%), 80세 이상은 2명(0.5%)으로 구성되었다.

### 2. HPV28 Detection을 이용한 HPV 유전자형 분석

HPV28 Detection은 19종의 고위험군 HPV (type 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82)와 9종의 저위험군 HPV (type 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70)을 분석할 수 있으며, HPV DNA Chip 검사가 완료된 후, 잔여 검체가 있는 500명의

자궁경부세포 검체를 대상으로 하였다. HPV DNA의 추출은 MICROLAB사의 STARlet 자동화 추출 시스템(Hamilton, Reno, NV, USA)을 이용하여 MICROLAB사의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. HPV DNA 추출 후, HPV28 Detection에서 제공하는 방법에 따라, PCR 반응액은 DNA 5  $\mu$ L, 4 $\times$ HPV28 TOM 5  $\mu$ L, RNase-free Water 5  $\mu$ L 및 Anyplex PCR Mastermix 5  $\mu$ L로 총 20  $\mu$ L되게 하였다. PCR 수행은 CFX96 real-time PCR 장비(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 50°C에서 4분간 오염방지를 위한 Uracil-DNA glycosylase (UDG) system의 활성화를 하고, 95°C에서 15분간 초기 변성 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 30초의 조건에서 50회 반복 수행하였고, cyclic-catcher melting temperature analysis (Cyclic-CMTA)를 PCR cycle 30, 40, 50회 이후에 측정하였다. CMTA는 55°C에서 반응혼합액을 냉각시키고, 55°C에서 30초, 55°C부터 85°C (5초/0.5°C)까지 연속적인 형광 측정을 수행하였다. Cyclic-CMTA 결과는 PCR cycle 30회에서 측정했을 때 검출이 되면 “+++”, 40회에서 검출이 되면 “++”, 50회에서 검출이 되면 “+”로 결과를 나타낸다. HPV 유전자형 판정은 SeegeneViewer (Seegene)를 이용하였다.

### 3. HPV DNA Chip을 이용한 HPV 유전자형 분석

HPV DNA Chip은 oligonucleotide microarray 방법으로, 18종의 고위험군 HPV (type 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73)와 14종의 저위험군 HPV (type 6, 11, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 62)를 분석할 수 있다. HPV DNA의 추출은 자궁 경부 세포 검체 200  $\mu$ L로부터 Chemagic Viral DNA/RNA kit special (PerkinElmer Chemagen, Baeseiler, Germany)과 자동화 핵산 추출 시스템 Chemagic Magnetic separation module I (PerkinElmer Chemagne)을 이용하여 장비 및 시약 제조사의 핵산 추출 방법에 따라 수행하였다. HPV DNA Chip (Biomedlab)의 시약 제조사에서 제공하는 방법에 따라, 중합효소연쇄반응으로 증폭된 산물을, HPV 유전자형별 특이 올리고가 부착된 유리슬라이드에 반응시킨 후, 스캐너 장비(GenePix Personal 4100A, Axon Instruments, CA, USA)를 이용하여 교잡결합 유무를 분석하여, HPV 유전자형을 확인하였다.

### 4. HPV28 Detection의 평가

#### 1) HPV 유전자형 비교 평가

두 가지 방법으로 HPV 유전자형을 분석한 후, 복합감염을 가지는 검체를 제외하고, 두 가지 방법의 결과가 일치하지 않는 108예의 검체 중에서, 잔여 핵산의 양이 부족하여 추가 확인 분석이 불가능한 검체 등을 제외한 64예의 검체에 대하여 염기서열분석법을 수행하였다. HPV DNA는 E6/E7 유전자형 특이 프라이머와

PGMY11/GP6+ (M2) 프라이머를 이용하여 증폭하였으며, 증폭된 산물은 DNA purification kit (MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit, iNtRON, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하였다. 정제된 산물은 5 pmol의 PGM11/GP6+ (M2) 프라이머와 E6/E7 유전자형 특이 프라이머를 이용하여 Big-Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여, 제조사의 방법에 따라 염기서열분석을 시행하였다. 염기서열분석 결과는 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하여 HPV 유전자형을 결정하였다.

## 2) 반복 분석에 따른 정밀도 평가

단일 HPV 유전자형으로 분석된 검체 중, 서로 다른 HPV 유전자형으로 분석된 21예의 불일치 검체 중, 잔여 핵산의 양이 부족하여 추가 확인 분석이 불가능한 검체를 제외한 18예의 검체와 서로 동일한 HPV 유전자형으로 분석된 37예의 검체 중, 16형, 18형, 52형과 58형의 4예의 검체에 대하여, 각각의 분석 방법을 2일간 하루에 1회씩을 수행하여, 최종 3회 수행한 실험 결과를 이용하여 정밀도로 평가하였다.

## 3) 최소 검출 한계의 평가

자궁경부암 백신의 접종을 위해 HPV 유전자형의 확인이 필요한 16형과 18형 그리고, HPV28 Detection에서 가장 높은 빈도로 검출된 52형과 HPV DNA Chip에서 16형 다음으로 많이 검출된 58형에 대하여 최소 검출 한계를 평가하였다. HPV 유전자형 16형, 18형, 52형과 58형으로 분석된 4예의 검체에 대하여, 10배씩 5단계로 계단 희석하여 각 유전자형마다 총 6 단계의 농도를 가진 검체를 준비한 뒤, 각각의 분석 방법을 3일간 하루에 1회씩을 시행하여, 최종 3회 수행한 실험 결과를 이용하여 HPV28 Detection과 HPV DNA Chip의 최소 검출한계를 평가하였다.

## 5. 통계분석

연구 결과의 통계학적 분석은 SPSS 9.1의 McNema's test 분석을 이용하여 두 가지 검사방법에서 확인된 HPV의 양성률 및 고위험군 HPV와 저위험군 HPV의 유병률을 유의 수준  $P < 0.0001$ 을 기준으로 유의성 검증을 하였다.

## 결 과

### 1. HPV 양성률과 유전자형의 분포

전체 500명에 대한 HPV28 Detection과 HPV DNA Chip의 HPV

**Table 1.** Positive rate and prevalence of HPV genotypes with the HPV28 Detection and HPV DNA Chip genotyping tests for 500 cervical specimens

	HPV28 Detection	HPV DNA Chip	P value
HPV Positive	219 (43.8%)	203 (40.6%)	0.0004
Multiple HPV genotype infections	92 (18.4%)	18 (3.6%)	<0.0001
Single HPV genotype infection	127 (25.4%)	121 (24.2%)	<0.0001
High Risk in single HPV genotype infection	107 (84.3%)	86 (71.1%)	<0.0001
Low Risk in single HPV genotype infection	20 (15.7%)	35 (28.9%)	<0.0001
Other type in HPV infections	NA	64 (12.8%)	NA2

Abbreviations: HPV, human papillomavirus; NA, not available.

양성률은 각각 43.8% (219명/500명)와 40.6% (203명/500명)이었고, 두 가지 이상의 HPV 유전자형을 가지는 복합 HPV 유전자형의 양성률은 각각 18.4% (92명/500명)와 3.6% (18명/500명)이었다. 또한, 단일 HPV 유전자형의 양성률은 각각 25.4% (127명/500명)와 24.2% (121명/500명)이었으며, 고위험군 HPV와 저위험군 HPV의 양성률을 살펴보면, HPV28 Detection은 84.3% (107명/127명)와 15.7% (20명/127명)이었으며, HPV DNA Chip은 각각 71.1% (86명/121명)와 28.9% (35명/121명)이었다. HPV 양성률과 복합 HPV 유전자형, 고위험군 및 저위험군 HPV 양성률은 HPV DNA Chip 방법에 비해 HPV28 Detection 방법에서 유의하게 나타났다( $P < 0.001$ ). 한편, HPV DNA Chip의 경우, HPV 양성으로 분석되었으나 유전자형이 분류되지 않아 HPV other 결과로 분류된 예는 12.8% (64명/500명)이었다(Table 1).

또한, HPV 유전자형의 분포는 HPV28 Detection의 경우, 52형(7.0%), 53형(6.2%), 70형(4.8%)의 순서이었으며, HPV DNA Chip은 16형(3.2%), 58형(2.2%), 61형(2.0%)의 순서이었다(Fig. 1).

HPV 유전자형 분석 결과에서 54.4% (272명/500명)가 일치하였고, 이 중 84.6% (230명/272명)은 HPV 음성이었으며, 13.6% (37명/272명)는 단일 HPV 유전자형으로 나타났다. 이 중 16형의 일치율이 16.6%로 가장 높게 나타났고, 그 외 유전자형은 유사한 빈도를 보였다. 또한, 1.8% (5명/272명)는 복합 HPV 유전자형으로, 6형과 33형, 16형과 61형, 51형과 56형, 39형과 51형, 58형과 61형을 가지는 것으로 분석되었다.

또한, 45.6% (228명/500명)의 분석 결과가 불일치하였으며, 서로 다른 유전자형으로 분석된 단일 HPV 유전자형 불일치 검체는 9.2% (21명/228명), 복합 HPV 유전자형의 불일치 결과는 43.4% (99명/228명), HPV28 Detection에서 단일 HPV 유전자형이 확인되었으나 HPV DNA Chip에서 HPV 음성인 경우는 20.2% (46명/228명), HPV DNA Chip에서 other 결과인 경우는 19.7% (45명/228명)이었고, HPV28 Detection에서 HPV 음성이나 HPV DNA Chip에서 단일 HPV 유전자형이 확인된 경우는 75% (17명/228명)이었다.

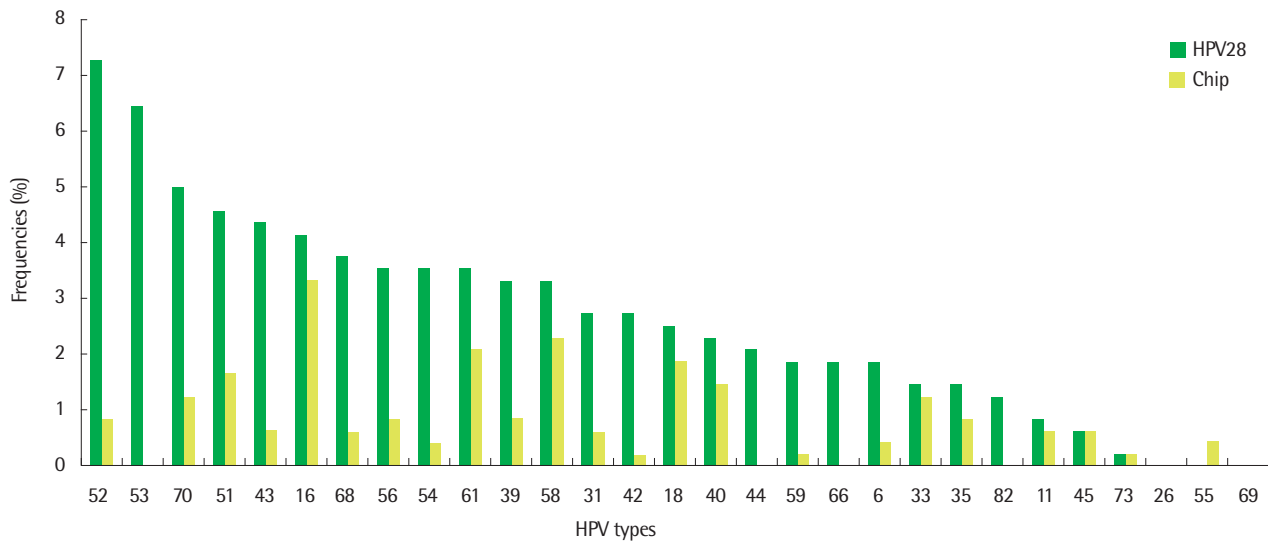


Fig. 1. Frequencies of human papillomavirus genotypes with the HPV28 Detection and HPV DNA Chip tests for 500 cervical specimens.

## 2. HPV 유전자형의 비교 평가

염기서열분석법을 시행하여 HPV 유전자형을 확인한 64예 중, HPV28 Detection에서 HPV 단일 유전자형 양성이나 HPV DNA Chip에서 HPV 음성인 검체는 46.9% (30명/64명)이었으며, other type인 검체는 26.6% (17명/64명)이었다. 이에 대한 염기서열분석 결과, HPV28 Detection의 HPV 유전자형과 100% 일치하였으며, HPV DNA Chip에서 HPV 음성이었던 HPV 유전자형은 52형과 53형이 각각 23.3% (7명/30명), 31형과 39형이 각각 10.0% (3명/30명), 그리고, 42형과 61형이 각각 6.7% (2명/30명)이었으며, 그 외 6형, 51형, 54형, 68형, 70형, 82형이 각각 1예씩 분포하였다. 또한, HPV DNA Chip에서 HPV other type으로 분석되었던 17예의 HPV 유전자형은 70형이 3예, 42형, 53형, 66형, 68형이 각각 2예, 그리고, 33형, 44형, 51형, 52형, 58형, 59형이 각각 1예씩 분포하였다. 한편, HPV28 Detection에서 HPV 음성이나 HPV DNA Chip에서 HPV 단일 유전자형 양성인 검체는 26.6% (17명/64명)이었으며, 염기서열분석 결과, 29.4% (5명/17명)는 HPV 음성이었으며, 52.9% (9명/17명)는 55형, 62형, 74형, 81형, 90형 등 HPV28 Detection으로 검출되지 않는 HPV 유전자형으로 분석되었으며, 17.6% (3명/17명)는 HPV DNA Chip으로 분석된 HPV 유전자형과 불일치하는 유전자형으로 분석되었다.

## 3. 반복 분석 결과에 따른 정밀도 평가

서로 다른 HPV 단일 유전자형으로 분석된 검체 18예에 대하여 두 가지 HPV 유전자형 분석 방법을 각각 3회 반복 분석한 결과, HPV28 Detection의 경우, 모두 동일한 HPV 유전자형의 결과를 얻어, 100%의 일치율을 보였으며, Cyclic-CMTA에 따른 viral load에 대한 분석 결과값도 동일한 범위로 검출되었다. 반면, HPV DNA

Table 2. Agreement of the HPV28 Detection tests by repeat measurement of samples with discordant HPV genotyping results between the HPV28 Detection and HPV DNA Chip tests

HPV28 Detection			HPV DNA Chip		
1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
16	16	16	11 (w)*	16	16
16	16	16	33	Other†	16
31	31	31	55	Other†	55 (w)*
33	33	33	16	Other†	Other†
39	39	39	40 (w)*	Negative	Negative
42	42	42	6 (w)*	Negative	Negative
51	51	51	39 (w)*	Other†	Other†
52	52	52	73	Negative	Negative
52	52	52	6 (w)*	Negative	Negative
52	52	52	51 (w)*	Negative	Other†
53	53	53	6 (w)*	Negative	Other†
53	53	53	16	Negative	Negative
53	53	53	16 (w)*	Negative	Negative
58	58	58	18 (w)*	Other†	Negative
66	66	66	11 (w)*	Negative	Negative
68	68	68	16	68	68
68	68	68	11 (w)*	Other†	Other†
70	70	70	39	Negative	Other†

\*(w), Type-specific signal intensity was weaker than the signal intensity of the positive control; †Other, The HPV genotype was not identified although the test for HPV infection was positive.

Abbreviation: HPV, human papillomavirus.

Chip의 경우, 1회 실험에서 11형, 33형, 55형으로 분석되었던 검체 3예의 경우, 2회와 3회의 반복 분석 결과에서 각각 16형과 16형, other type과 16형, other type과 55형으로 분석되는 등, 분석한 18예의 모든 검체에서 동일한 결과를 얻지 못하여, 재현성과 일치율을 확인할 수 없었다(Table 2).



**Table 3.** Determination of the limit of detection (LOD) for the HPV genotypes 16, 18, 52 and 58

HPV types	Dilution fold	HPV28 Detection			HPV DNA Chip		
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
16	Original	16 (++++)	16 (++++)	16 (++++)	16	16	16
	10 <sup>-1</sup>	16 (++)	16 (++)	16 (++)	16	16	16
	10 <sup>-2</sup>	16 (++)	16 (++)	16 (++)	Neg	16	16
	10 <sup>-3</sup>	16 (++)	16 (++)	16 (++)	16	16	16
	10 <sup>-4</sup>	16 (++)	16 (+)	16 (+)	16	16	16
	10 <sup>-5</sup>	Neg	16 (+)	16 (+)	Other*	Other*	Other*
18	Original	18 (++++)	18 (++++)	18 (++++)	18	18	18
	10 <sup>-1</sup>	18 (++++)	18 (++)	18 (++)	18	18	18
	10 <sup>-2</sup>	18 (++)	18 (++)	18 (++)	Other*	Other*	Other*
	10 <sup>-3</sup>	18 (++)	18 (++)	18 (++)	Other*	Other*	Other*
	10 <sup>-4</sup>	18 (+)	18 (+)	18 (+)	Neg	Other*	Other*
	10 <sup>-5</sup>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
52	Original	52 (++++)	52 (++++)	52 (++++)	52	52	52
	10 <sup>-1</sup>	52 (++++)	52 (++++)	52 (++++)	52	52	52
	10 <sup>-2</sup>	52 (++)	52 (++)	52 (++)	52	Other*	52
	10 <sup>-3</sup>	52 (++)	52 (++)	52 (++)	Other*	Other*	Other*
	10 <sup>-4</sup>	52 (++)	52 (++)	52 (+)	Other*	Other*	Neg
	10 <sup>-5</sup>	52 (+)	Neg	Neg	Neg	Other*	Neg
58	Original	58 (++++)	58 (++++)	58 (++++)	58	58	58
	10 <sup>-1</sup>	58 (++++)	58 (++++)	58 (++++)	58	58	58
	10 <sup>-2</sup>	58 (++)	58 (++)	58 (++)	58	58	58
	10 <sup>-3</sup>	58 (++)	58 (++)	58 (++)	Other*	Other*	Other*
	10 <sup>-4</sup>	58 (++)	58 (++)	58 (+)	Neg	Neg	Other*
	10 <sup>-5</sup>	58 (+)	58 (+)	Neg	Neg	Neg	Other*

\*Other: The HPV genotype was not identified although the test for HPV infection was positive.

Abbreviations: HPV, human papillomavirus; Neg, Negative.

#### 4. 최소 검출한계의 평가

HPV28 Detection의 최소 검출한계는, 16형, 18형, 52형과 58형 모두 10<sup>-4</sup>배 희석 단계까지 유전자형이 분석되었으며, 10<sup>-5</sup>배 희석 단계에서는 16형과 58형은 3번 반복 분석 중, 1번의 음성 결과와 2번의 동일한 유전자형 결과로 분석되었고, 52형은 2번의 음성 결과와 1번의 동일한 유전자형 결과로 분석되었으며, 18형은 3번 모두 음성으로 분석되어, 10<sup>-5</sup>배 희석 단계에서는 18형은 검출되지 않았다. 한편, HPV DNA Chip의 최소 검출한계는, 16형은 10<sup>-4</sup>배 희석 단계까지, 18형은 10<sup>-4</sup>배 희석 단계까지, 52형과 58형은 10<sup>-2</sup>배 희석 단계까지 분석되었으나, 16형과 52형의 경우 10<sup>-3</sup>배 희석 단계에서, 3번 반복 분석 중 각각 1번의 음성 결과가 분석되었다(Table 3).

## 고 찰

자궁경부암은 전세계 여성암 발생빈도에서 2위를 차지하며 전체 여성암 중 10-25%를 차지하고 있다. 한국에서는 유방암, 위암과 대장암 다음으로 많이 발생하며 매년 약 5,000명 이상의 신규 환

자가 발생하는 것으로 보고되고 있다[6]. HPV는 자궁경부암을 일으키는 가장 중요한 원인으로 보고되고 있으며, 자궁경부암은 장기간의 전암단계를 거쳐 암으로 발전하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 전암단계의 시기에 적절한 선별검사를 통해 진단되어야 하고, 그에 따른 치료를 한다면 자궁경부암으로 인한 사망률을 낮출 수 있다[7].

자궁경부 세포진검사(Papanicolaou test, PAP test)는 편리성과 저비용 등의 장점으로 널리 시행되어왔고, 그 이후로 자궁경부암의 발생률과 사망률이 크게 감소하였다. 그러나, 최근 몇 년 사이에 6-55%에 달하는 높은 위음성률로, 검사 방법의 민감도와 재현성이 떨어진다는 점이 제기되고 있고, 병변이 없는 경우 앞으로 발생할 위험성을 알 수 없는 문제점을 갖고 있다[8-12]. 이러한 세포검사의 위음성률을 낮추기 위해 HPV 검사의 보조적인 방법들이 개발되어 왔으며, 그 중 HPV DNA 검사방법은 HPV 감염 여부를 확인하는 방법으로 각광받고 있는 검사이다. 현재까지 많은 연구들을 통해 HPV 감염이 자궁경부암의 직접적인 발암 원인으로 규명되었으며, HPV 감염의 검출 및 같은 유전자형의 지속 감염 여부에 대해 모니터링을 하는 것은 자궁경부암을 예방하는 검사로서 HPV 유전자형 검사가 이용되는 것은 매우 당연하다고 볼 수 있다. 또한, 같은 고위험군 HPV 유전자형의 지속적인 감염은 대체로 중증의 이형성증 및 자궁경부암으로 발전하기 위한 위험도가 증가된다고 보고되고 있다[13]. 따라서, 질병에 대한 예후 관측과 모니터링을 위한 정확한 HPV 유전자형을 식별하는 것은 진단의 유효성 측면에서 세포검사 결과와 차별화된 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다[14].

HPV 유전자형들은 각각 암을 유발하는 능력에 따라 고위험군과 저위험군으로 분류되며, 특히 고위험군은 자궁경부암과 전암병변의 발병에 필수적인 요소로 보고되었다[15, 16]. 고위험군 중에서 HPV 16형은 전세계적으로 가장 높은 감염률을 보이고, 그 다음의 빈도순위는 HPV 18형으로 알려져 있으나, 아시아에서는 HPV 58형이 보다 많이 보고되는 등 지역에 따라 다른 유전자형의 분포를 보이고 있으며 한국에서는 HPV 16형 다음으로 HPV 58형과 HPV 52형이 보고되었다[17-20]. 또한 유럽과 아프리카에서 침윤성 자궁경부암 중 가장 높은 빈도를 보이는 유전자형은 HPV 16형, 18형, 45형, 31형, 33형으로 알려져 있고, 아시아에서는 HPV 16형, 18형, 58형, 52형으로 보고 되고 있다[21, 22]. 이번 연구에서는 HPV 52형, 53형, 70형, 51형, 43형, 16형의 순서로 빈도를 보였고, 이는 몇몇 연구결과들과 비슷한 양상을 나타내었다[23-25]. 반면, 다른 연구결과들과의 HPV 유전자형 빈도의 분포가 다른 이유는 지역별 그리고 연구대상 및 연구방법에 따라 차이가 나타나는 것으로 생각되며, 특히, 이번 연구 결과에서 HPV28 Detection에서만 검출된 HPV 유전자형인 53형, 44형, 66형, 82형의 경우(Fig. 1), HPV DNA

Chip에서 HPV28 Detection과 다른 유전자형으로 검출되거나 HPV 음성 또는 other type으로 분석되었으며, HPV 음성 또는 other type으로 분석된 검체 중 Cyclic-CMTA의 값이 “+”이상인 검체에 대해 염기서열분석법으로 HPV 유전자형을 확인한 결과, HPV28 Detection의 유전자형과 일치함을 확인하여, 분석 방법에 따라 유전자형의 분포가 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

HPV hybrid capture 2 (Qiagen, Silver Spring, MD, USA) 검사는 자궁경부에서 채취된 검체를 이용하여 간단히 검사할 수 있으며, 적절한 민감도와 특이도를 갖고 있어 선별검사로써 유용성이 수 년 간 입증되었고, 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration, FDA)에서 공인되었다. 그러나 감염된 HPV 유전자형을 구분할 수 없고, HPV hybrid capture 2 검사에서 검출 가능한 유전자형 이외에 다른 유전자형도 검출하는 특이도 부분의 문제가 제기되고 있다. 이러한 단점을 해결해줄 수 있는 HPV DNA chip 검사는 각각의 유전자형과 자궁경부암 발생의 연관성에 대한 정보를 제공할 수 있어 최근 HPV 유전자형 분석에 많이 이용되고 있다. 그러나 common primer를 사용하는 HPV DNA chip 검사법은 검출 가능한 HPV 유전자형에 따라 PCR 증폭률이 동등하지 않고[26], PCR 증폭 산물을 다시 chip 위에 교잡반응을 시키는 단계가 있는 등 숙련된 검사자를 필요로 하며, 또한 PCR 증폭산물을 직접 다름으로써 이에 따른 오염으로 인한 위양성 결과를 초래할 수 있는 단점을 가지고 있다. 이번 연구 결과에서도 두 실험방법에 대한 반복분석에 따른 정밀도 평가 실험결과에서 HPV28 Detection은 3 반복 모두 동일한 결과를 보이는 반면, HPV DNA chip 검사는 3 반복 실험에서 동일한 결과를 얻지 못하였다(Table 2). 또한, HPV DNA chip의 other type의 결과는 PCR 증폭은 확인되었으나 chip 결과 음성인 경우로, 이러한 other type에 대한 염기서열분석 결과, 모두 HPV28 Detection의 유전자형과 일치하는 결과를 보였다. 이는 HPV DNA chip의 이분화(증폭 후 교잡)된 검사과정에서의 오류로 볼 수 있다. 게다가 HPV DNA chip과 HPV28 Detection의 양성률은 각각 40.6%, 43.8%로 두 검사 간의 큰 차이는 없었으나, HPV DNA chip에서의 중복감염률은 3.6%, HPV28 Detection에서는 18.4%로 나타났다(Table 1). 이는 common primer를 사용하는 HPV DNA chip과 type specific primer를 사용하는 HPV28 Detection의 차이로 볼 수 있다. 이상적인 HPV 진단을 위해서는 HPV 유전자형들에 대한 특이적인 primer를 사용해야 하고, PCR 산물의 오염으로 인한 위양성 결과를 피하기 위해 한 번의 반응으로 결과를 도출해야 하는 것이 효과적이며, HPV28 Detection은 이러한 조건에 가장 근접한 방법이라고 볼 수 있다.

HPV 감염 후 약 90% 이상에서 자정작용으로 인해 자연소실이 된다고 알려져 있으나, 2년 이상 감염이 지속되면 중증 자궁경부이형성증(High Grade Squamous Intraepithelial lesions, HSIL)의 발

병 가능성이 HPV 음성인 경우에 비해 300배 이상 높은 것으로 추정되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 세포형태학적 변화는 감염된 HPV가 일정량 이상이 되어야 일어나고 세포 변화의 정도는 바이러스의 양을 반영한다고 알려져 있다[27, 28]. 이런 측면에서, HPV DNA chip 검사의 단점은 감염된 바이러스의 정량적 정보를 얻을 수 없는 반면, HPV28 Detection은 바이러스의 양에 대한 대략적인 정보(+++, ++, +)를 알 수 있는 장점을 가지고 있다.

최근, 미국과 유럽에서 고위험군 HPV 중에서 HPV 16, 18, 31, 45 유전자형에 대하여 자궁경부암 백신이 개발되었고, HPV 16형, 18형의 예방을 목적으로 하는 자궁경부암 백신이 상용화되었다[29, 30]. 자궁경부암 백신의 상용화에 따라 HPV의 유전자형 빈도 분포에 대한 지속적인 연구가 필요하며, 특히, 한국인 HPV 유전자형의 분포는 대륙별로 서로 다른 결과를 보이는 여러 보고들과 차이가 있어[17-20], 한국인에 적합한 자궁경부암 백신 개발이 이루어지기 위해서는 정확한 HPV 유전자형 분석 검사방법을 통한 국내 HPV 유전자형 분포에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

따라서, 이번 연구 결과로 HPV28 Detection을 이용한 한국 여성의 HPV 감염률과 유전자형 분포도에 대한 정보를 제공하여 향후 자궁경부암의 진단 및 치료에 도움이 될 것으로 생각하며, HPV28 Detection은 HPV DNA의 검출과 유전자형 분석에 우수한 검사 방법으로, HPV viral load에 대한 대략적인 정보를 제공할 수 있어 임상적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** HPV28 Detection (Seegene, Korea)은 실시간 중합효소연쇄 반응법으로, 28종류의 HPV 유전자형의 분석과 함께 대략적인 HPV viral load를 분석할 수 있다. 이번 연구는 HPV28 Detection과 HPV DNA Chip을 동시에 수행하여, HPV 양성률과 유전자형의 분포를 분석하여, HPV28 Detection 검사가 임상적으로 유용하게 적용될 수 있는지 비교 평가하고자 하였다.

**방법:** 자궁경부 세포 검체 500예에서 HPV DNA Chip과 HPV28 Detection을 수행하였으며, 두 검사 방법의 결과가 일치하지 않는 경우, 염기서열분석법으로 HPV 유전자형을 확인하였다.

**결과:** HPV의 양성률은 HPV28 Detection과 HPV DNA Chip을 이용한 경우, 각각 43.8%와 40.6%로 분석되었다. 두 검사 방법의 HPV 유전자형 분석 결과, HPV 단일 유전자형의 불일치가 있는 64예의 검체에 대하여 염기서열분석법을 수행하여 HPV28 Detection의 유전자형과 100% 일치함을 확인하였다. 반복 분석 결과에 따른 12종류의 HPV 유전자형인 16, 31, 33, 39, 42, 51, 52, 53, 58, 66, 68, 70에 대한 HPV28 Detection의 일치율은 100%였으며, 계단

희석 방법으로 확인된 최소 검출 한계는 HPV28 Detection이 HPV DNA Chip보다 100배 이상 높았다.

**결론:** HPV28 Detection은 HPV의 검출과 유전자형의 분석에 특이적이며 최소 검출한계가 높아, 다양한 HPV 유전자형을 정확하게 구분할 수 있어 임상적으로 유용하게 적용될 수 있는 HPV 유전자형 검사로 확인되었다.

## REFERENCES

1. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
2. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:41-7.
3. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 2003;201:1-6.
4. Kim MK, No JH, Song YS. Human papilloma vaccine. *J Korean Med Assoc* 2009;52:1180-6.
5. Kim YT, Lee JM, Hur SY, Cho CH, Kim YT, Kim SC, et al. Clearance of human papillomavirus infection after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2010;126:1903-9.
6. Lee MY, Cho CH, Kwon SH, Song DK, Chung SW, Kang HO, et al. Annual report of gynecologic cancer registry program in Korean for 2002 (Jan. 1st, 2002-Dec. 31st, 2002). *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47(S6): 1029-70.
7. Schiffman M and Adrianza ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol* 2000;44: 726-42.
8. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 1989;261:737-43.
9. Miller AB, Nazeer S, Fonn S, Brandup-Lukanow A, Rehman R, Cronje H, et al. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. *Int J Cancer* 2000;86:440-7.
10. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J cancer* 2004; 108:329-33.
11. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities; a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132:810-9.
12. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995;141:680-6.
13. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
14. Lee EH, Lee KB, Kim EO, Ji SI, Shin SK, Lee HS, et al. Clinical effectiveness of restriction fragment mass polymorphism assay for human papillomavirus genotyping. *J Lab Med Qual Assur* 2008;30:291-9.
15. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
16. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:303-15.
17. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
18. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:2153-6.
19. An HJ, Cho NH, Lee SY, Kim IH, Lee C, Kim SJ, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer* 2003;97:1672-80.
20. Cho NH, An HJ, Jeong JK, Kang S, Kim JW, Kim YT, et al. Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA chip in Korean women: comparison with cytologic diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188: 56-62.
21. Hong SR, Kim IS, Kim DW, Kim MJ, Kim AR, Kim YO, et al. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in Korean women: a multicenter study. *Korean J Pathol* 2009;43: 342-50.
22. Bae JH, Lee SJ, Kim CJ, Hur SY, Park YG, Lee WC, et al. Human papillomavirus (HPV) type distribution in Korean women: a meta-analysis. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:788-94.
23. Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, Roh JW, Ju YH, Oh JK, et al. Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis* 2004;190:468-76.

24. Oh JK, Franceschi S, Kim BK, Kim JY, Ju YH, Hong EK, et al. Prevalence of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis infection among women attending cervical cancer screening in the Republic of Korea. *Eur J Cancer Prev* 2009;18:56-61.
25. Kim YJ, Kwon MJ, Woo HY, Paik SY. Prevalence of Human Papilloma-virus Infection and Genotype Distribution Determined by the Cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis in Korean medical checkup population. *J Microbiol* 2013(in press).
26. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 2004; 122:87-93.
27. Yitalo N, Sørensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Pontén J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2174-80.
28. Elfgrén K, Kalantari M, Moberger B, Hagmar B, Dillner J. A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:561-7.
29. Kahng JM and Lee HJ. Clinical efficacy of HPV DNA chip test in the era of HPV vaccination: 1,211 cases, a single institution study. *Korean J Lab Med* 2008;28:70-8.
30. Hung CF, Monie A, Alvarez RD, Wu TC. DNA vaccines for cervical cancer; from bench to bedside. *Exp Mol Med* 2007;39:679-89.