

## 형광 영상 기반 CD4 신속 검사법 개발을 위한 항원-항체 반응 조건 정량화

김수빈\* · 김종경†

### Quantitation of Antigen-Antibody Reaction Condition for Development of Fluorescence Image-based CD4 Rapid Test

Subin Kim and Jung Kyung Kim

**Abstract.** CD4+ T-cell count determines the effectiveness for antiretroviral therapy (ART) in patients with human immunodeficiency virus (HIV). Although ART slows the progression of HIV to AIDS, rapid counting of CD4+ T lymphocytes with a drop of patient's blood sample is urgently needed to ensure timely ART treatment in rural areas. Recently point-of-care CD4 testing devices have been developed by using non-flow based imaging cytometer incorporated with a sample cartridge where CD4+ T cells are reacted with fluorescently tagged specific antibodies. Here we conducted an experimental study using a conventional fluorescence microscope-based imaging system to quantitate the interaction of CD4 antibodies with CD4+ T cells at different reaction conditions. We demonstrated that a fast and affordable point-of-care CD4 test is feasible with a far less amount of antibodies and a shorter incubation time compared with a conventional sample preparation protocol for flow cytometry. We also proposed a general method to evaluate and compare the detection limit across different CD4 counting platforms by using fluorescently labelled microbeads for intensity calibration.

**Key Words :** CD4+ T lymphocyte(CD4 양성 T 림프구), Fluorescence(형광), Antigen-Antibody Reaction(항원-항체 반응), Point-of-Care Test(현장검사), Calibration Bead(보정입자), MESF(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome)

#### 1. 서 론

2010년 말 통계조사에 따르면 전 세계적으로 3,400만 명이 AIDS(acquired immunodeficiency syndrome) 질환을 유발하는 바이러스인 HIV(human immunodeficiency virus)에 감염되었고 이 중에서 68%는 아프리카 사하라 사막 남쪽에 거주하고 있다<sup>(1)</sup>. 다행스럽게도 ART(antiretroviral therapy; 항레트로바이러스 치료법)<sup>(2)</sup>라고 하는 약물 치료법이 보급되기 시작하여 지난 10년 동안 HIV/AIDS 환자의 사망률이 상당히 감소하였다. ART는 면역 기능을 담당하는 CD4 림프구가 많이 감소되지 않았을 때 바이러스 감염을 줄이고 AIDS로 진행되는 빈도를 낮추는데, 감염 환자 중에서 37%만 이 치료 프로그램을 필요로 한다<sup>(3,4)</sup>. HIV/AIDS를 진단하는 표준 검사법 중의 하나인 CD4 검사법은 혈액 1  $\mu$ L당 CD4 림프구의 개수

를 측정하여 HIV를 가진 환자를 대상으로 ART 치료의 유효성을 평가하는데 사용된다. 정상인의 혈액은 CD4 림프구의 농도가 500~1200 개/ $\mu$ L 범위를 가지나 AIDS 환자는 200개/ $\mu$ L을 넘지 않는다. 2009년 이후 세계보건기구는 CD4 검사 결과가 350개/ $\mu$ L 미만인 환자는 증상과 상관없이 ART를 시작하도록 권고하고 있다.

ART 시행 시기를 결정하고 치료 경과를 판단하는 데 활용되는 CD4 검사법은 중앙검사실에 있는 고가의 유세포분석기(flow cytometer)라는 대형 장비에 의존하는데 HIV 감염률이 높은 아프리카 사하라 사막 남쪽과 같은 지역에서는 중앙검사실까지 혈액을 운송하고 빠른 시간 내에 검사결과를 전달하는데 필요한 사회기반시설이 부족하다<sup>(5)</sup>. 원격지에서 채취한 감염자 혈액의 운송 시간을 포함하여 우편으로 검사 결과를 전달하는 시간이 최소 2일에서

† 책임저자, 국민대학교 기계공학과

E-mail: jkkim@kookmin.ac.kr

\* 국민대학교 기계공학과

최대 2주 정도가 소요되고, 지방에 거주하는 환자가 멀리 떨어진 병원을 직접 방문하여 진단을 받는 경우에도 혈액 검사 결과가 나오기 전에 집으로 돌아가서 결과를 기다릴 수 밖에 없는 실정이다.

현재 가장 대표적인 CD4 림프구 농도 측정법인 유세포 분석법(flow cytometry)은 사용 절차가 복잡하고 고가의 대형 장비를 사용하므로 자원이 부족하고 낙후된 지역에서는 활용하기 힘들다. 그러므로 현장검사기기가 개발되면 환자는 진단 결과를 즉시 통보받고 신속한 처방을 통해 적절한 시기에 치료를 받을 수 있게 된다<sup>6)</sup>. 최근에는 유세포 분석기를 소형화해서 휴대가 가능하며 1회 검사에 소모되는 시약 비용을 절감하고 최소한의 훈련만으로 조작할 수 있는 대체기기가 개발되고 있다<sup>46,7)</sup>. CD4 검사를 위한 현장진단기기는 휴대 가능하며 가격이 저렴하고 사용하기 쉬워 환자가 중앙검사실까지 가지 않아도 치료 경과를 지속적으로 확인 가능하다는 장점이 있다. 결과적으로 사회 기반시설이 부족한 지역에서도 빠른 피드백을 얻을 수 있어 ART 프로그램의 문제인 비용을 크게 절감시킬 수 있다. 현재 CD4 현장검사기기로 유체 흐름을 이용하는 유세포분석기와 달리 시료챔버와 형광 염색된 세포의 영상 분석에 기반한 CD4 세포분석기가 개발되고 있다<sup>68)</sup>. 본 연구진은 선행연구를 통해 스마트폰 카메라와 자체 개발한 영상 획득 및 분석 애플리케이션을 이용한 세포분석기를 개발하여 시료챔버 내 혈구의 개수와 형상 측정 기능을 구현하고 형광검출 성능을 평가하였다<sup>9)</sup>.

본 논문에서는 HIV/AIDS 환자를 현장에서 신속하게 진단하고 치료 경과를 지속적으로 모니터링할 수 있는 CD4 검사기기 개발을 목표로, 시료챔버에 주입한 혈액 한 방울 정도의 미량 시료 내 CD4 림프구를 형광 표지하기 위한 항원-항체 반응 조건을 정량적으로 평가하였다. 또한 형광 강도 보정입자를 이용하여 개발된 검사기기의 검출 한계를 파악하고 CD4 림프구의 형광 표지 최적 조건을 도출하는 방법을 제시하였다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1 카메라 노출시간의 영향

혈액에 각각 다른 방사 파장을 갖는 형광 표지가 부착된 항체 CD4-PE(ab18282, abcam;  $\lambda_{ex}$  = 488 nm,  $\lambda_{em}$  = 575 nm)와 CD3-PE/Cy5(ab95510, abcam;  $\lambda_{ex}$  = 496 nm,  $\lambda_{em}$  = 670 nm)을 넣어 백혈구의 일종인 CD4 림프구와 형광 표지가 붙은 항체를 결합시켰다. 이를 위해 혈액 8  $\mu$ L에 전체 시료량의 10%인 각 항체를 1  $\mu$ L씩 총 2

$\mu$ L 넣고 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 혈액과 항체를 반응시킨 후, 1  $\mu$ L를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 형광현미경(IX51, Olympus)에서 10배 대물렌즈(0.3NA), PE와 Cy5 형광 검출을 위한 광학 필터조합(525AF45, 560DRLP, 595AF60 or 695AF55, Omega Optical) 및 냉각 CCD 카메라(Sensicam, Cooke)를 통해 관찰하였다. 이때 CD4 림프구의 형광 영상을 최적의 조건에서 획득하고자 계조치 범위를 0-255로 고정하고 카메라 노출시간( $\Delta t_{exp}$ )을 50, 100, 150 ms로 조절하여 CD3-PE/Cy5 항체와 CD4-PE 항체가 모두 부착된 림프구의 영상을 얻은 후 분석 프로그램(ImageJ, <http://imagej.nih.gov/ij/>)을 이용하여 노출시간이 CD4 림프구의 형광 강도에 미치는 영향을 분석하였다. 한 개의 영상에서 형광 표지된 CD4 림프구(N=4)의 테두리를 설정한 후 계조치의 평균값을 구하고 배경 또한 2개 영역을 설정하여 계조치의 평균값을 구했다. CD4 림프구의 평균 계조치를 배경의 평균 계조치로 나눈 신호대잡음비(signal-to-noise ratio; SNR)를 구하여 노출시간에 따른 SNR의 변화를 살펴보았다.

### 2.2 항체 농도의 영향

형광 염색된 CD4 림프구를 배경으로부터 구별하는데 필요한 항체량을 알아보고자 전체 시료 양을 기준으로 항체 농도( $C_{Ab}$ )를 1, 2, 3.3, 5, 10, 20%으로 변화시켜 실온에서 혈액과 15분씩 반응시켰다. 반응이 끝난 시료를 1  $\mu$ L씩 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 형광 표지된 CD4 림프구(N=5)를 형광현미경으로 관찰하였다. 카메라 노출시간을 100 ms로 고정된 상태에서 형광 영상을 획득하고 앞서 설명한 절차에 따라 영상을 분석하여 항체 농도에 따른 SNR의 변화를 살펴보았다.

### 2.3 혼합반응 시 반응시간의 영향

혼합효과가 있는 경우 반응시간( $\Delta t_{rc}$ )이 혈액과 항체 결합에 미치는 영향을 확인하고자 항체 농도가 3.3%와 10%인 두 가지 시료에 대해 반응시간에 따른 SNR의 변화를 살펴보았다. 혈액에 항체를 3.3% 및 10% 농도만큼 희석하여 반응 용기 내에서 일정하게 섞고 실온에서  $\Delta t_{rc}$  = 5, 15, 30, 60분 반응시킨 시료를 1  $\mu$ L씩 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 형광현미경으로 관찰하였다. 혼합효과뿐만 아니라 일정한 공간 내에서의 확산반응을 살펴보려고 같은 조건으로 준비한 시료 10  $\mu$ L를 높이가 0.1 mm인 플라스틱 시료챔버(C-Chip, INCYTO)에 주입

한 후 실온에서  $\Delta t_{inc} = 5, 15, 30, 60, 90, 120$ 분 반응시켜 형광 표지된 CD4 림프구(N=5)를 형광현미경으로 관찰하고 분석하였다.

### 2.4 확산반응 시 반응시간의 영향

확산효과가 지배적일 때 반응시간이 혈액과 항체 결합에 미치는 영향을 확인하고자 혈액에 전체 시료양의 3.3% 및 10% 농도에 해당하는 항체를 넣고 혼합효과를 배제한 조건에서 바로 시료챔버에 10  $\mu$ L를 주입하여 실온에서  $\Delta t_{inc} = 5, 15, 30, 60, 90, 120$ 분 동안 반응시켜 형광 표지된 CD4 림프구(N=5)를 형광현미경으로 관찰하였다.

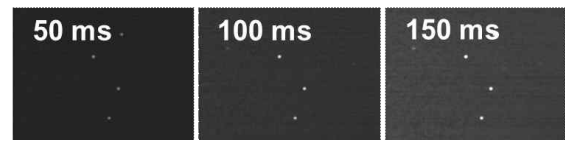
### 2.5 보정입자를 이용한 형광 강도 정량화

형광 영상의 계조치를 형광 강도로 변환시키기 위하여 MESF(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome)값을 이미 알고 있는 형광 강도 보정입자 시료(Quantum™ MESF Kits, Bangs Laboratories)를 사용하였다. 시료를 슬라이드와 시료챔버에 각각 주입하고 형광현미경에서 획득한 영상의 계조치를 측정하였다. 보정입자는 평균 지름이 7.65  $\mu$ m이고 1번부터 4번까지 4단계의 형광 강도(1988, 16694, 67310, 291866 MESF)를 가지는 형광입자 분산액으로 구성되어 있다. 각 단계의 시료를 1  $\mu$ L씩 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 관찰하였다. 시료챔버에는 2번과 3번 시약을 1  $\mu$ L씩 주입하여 영상을 획득하였다. 이렇게 얻어진 보정입자 영상을 분석하여 SNR을 구하고 형광 표지된 CD4 림프구(N=5)의 SNR과 비교하였다.

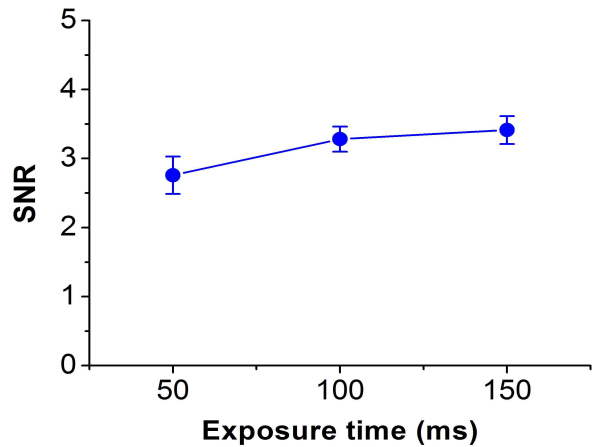
## 3. 결과 및 토의

### 3.1. 카메라 노출시간의 영향

Fig 1(a)에 나타난 카메라 노출시간에 따른 형광 영상을 보면 노출시간이 길어질수록 형광 강도가 높아지는 것을 육안으로도 확인 가능하다. Fig 1(b)에서 볼 수 있듯이,  $\Delta t_{exp} = 50, 100, 150$  ms일 때 각각 SNR = 2.76, 3.28, 3.41을 얻었다. 그러나  $\Delta t_{exp} = 150$  ms일 때 영상에 포함된 모든 CD4 림프구의 계조치가 최대값인 255로 측정되었다.  $\Delta t_{exp} = 100$  ms일 때 CD4 림프구의 형광 강도가 최대 계조치를 넘지 않는 범위 내에 있으므로 형광 강도를 정량화하는데 가장 적절한 카메라 노출시간으로 보인다. 따라서 항체 농도 또는 반응시간이 CD4 림프구의 형광 강도에 미치는 영향을 살펴보는 후속 실험에서는  $\Delta t_{exp} = 100$  ms로 설정하였다.



(a)

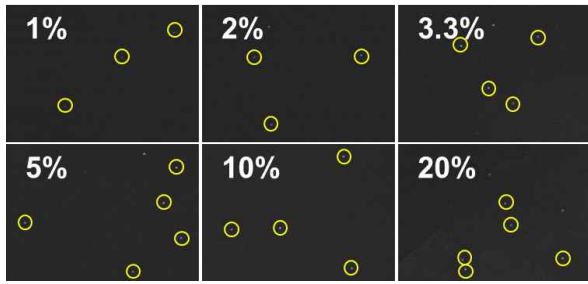


(b)

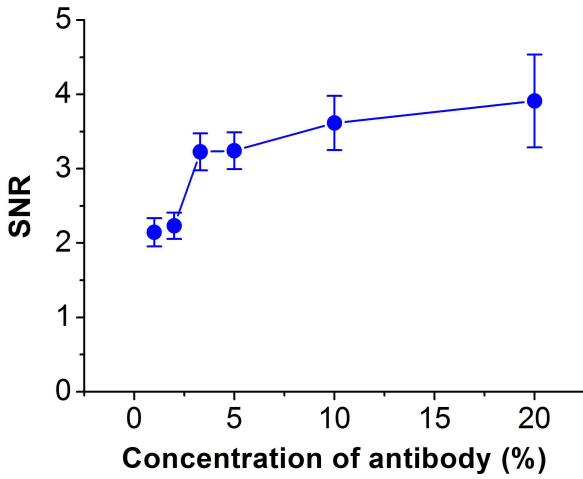
Fig. 1. (a) Fluorescence images of CD4+ lymphocytes labeled with anti-CD4 antibody phycoerythrin (PE) (N=4) and (b) SNR values at different exposure times ( $\Delta t_{exp} = 50, 100$  and  $150$  ms) in slideglass-coverslip. ( $p < 0.05$ )

### 3.2 항체 농도의 영향

Fig 2(a)는  $\Delta t_{inc} = 15$ 분 조건에서 항체 농도에 따른 형광 영상을 나타내며 항체 농도가 높아질수록 형광 표지된 림프구를 더욱 뚜렷하게 확인할 수 있다. Fig 2(b)에서 볼 수 있듯이  $C_{Ab}$ 가 1%에서 20%까지 증가할 때 SNR이 2.14에서 3.91까지 증가하였다. 이는  $C_{Ab}$ 가 높을수록 동일한 반응시간 동안 CD4 림프구에 형광 표지된 항체들이 더 많이 결합하여 형광 강도가 증가한다는 것을 의미한다. 항체 농도 1%와 2%, 3.3%와 5%, 10%와 20%의 SNR이 비슷한 값을 가지며 SNR은  $C_{Ab}$ 와 선형적인 관계를 갖지 않고 증가율이 점차 감소하는 양상을 보인다.  $C_{Ab} = 3.3\%$ 이면 SNR=3.0이 되므로 현미경에서 형광 표지된 CD4 림프구를 충분히 관찰할 수 있고 적절한 영상처리를 통해 배경으로부터 분리해서 자동 계수할 수 있다. 만약 개발된 CD4 현장검사기에서도 동일한 결과가 얻어진다면 일반적인 CD4 검사법에서 사용하는  $C_{Ab} = 10\%$  보다 낮은 항체 농도를 사용해서 CD4 림프구를 검출 가능하고 결과적으로 고가의 항체 비용을 절감할 수 있다는 것을 의미한다.



(a)



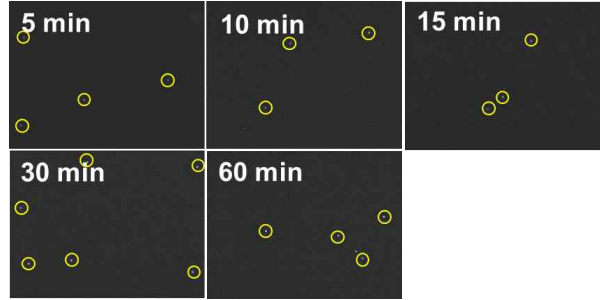
(b)

Fig. 2. (a) Fluorescence images of CD4+ lymphocytes labeled with anti-CD4 antibody phycoerythrin (PE) ( $N = 5$ ) and (b) SNR values at different antibody concentrations ( $C_{Ab} = 1, 2, 3.3, 5, 10$  and  $20\%$ ) in slideglass-coverslip. ( $p < 0.05$ )

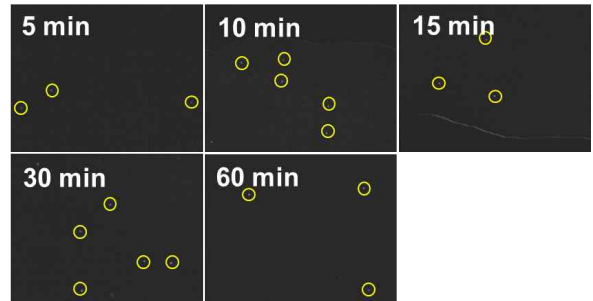
3.3 혼합반응 시 반응시간의 영향

$C_{Ab} = 3.3\%$ ,  $10\%$ 인 시료에 혼합효과를 준 후 반응시간에 따른 형광 영상을 나타낸 Fig 3(a)와 Fig 3(b)를 보면  $\Delta t_{inc}$  증가에 따라 CD4 림프구의 형광 강도가 증가하나 증가율은 점차 감소함을 확인할 수 있다. Fig 3(c)의 그래프를 보면  $\Delta t_{inc}$ 가 5분에서 60분까지 증가함에 따라  $C_{Ab} = 3.3\%$ ,  $10\%$ 인 시료의 SNR이 각각 2.07에서 2.97까지, 1.88에서 3.52까지 증가했다. 그러나  $\Delta t_{inc} \leq 15$ 분일 때 SNR은  $C_{Ab} = 3.3\%$ 에서  $C_{Ab} = 10\%$ 인 경우 보다 높게 나타났다. 앞서 나타낸 Fig 2(b)를 보면  $\Delta t_{inc} = 15$ 분에서 SNR은  $C_{Ab} = 10\%$ 인 시료가  $C_{Ab} = 3.3\%$ 인 시료보다 높게 나왔다. 예상과 달리  $\Delta t_{inc} \leq 15$ 분에서 SNR이 역전된 것은 두 혈액 시료가 동일인으로부터 얻어지지 않았고 반응을 촉진하는 혼합 과정에서 혼합실험기(vortex)를 이용했기 때문에 발생한 오차에 기인했을 것으로 추정된다. 이러한 오차와 상관없이 CD4 검사 프로토콜에서 권장하는

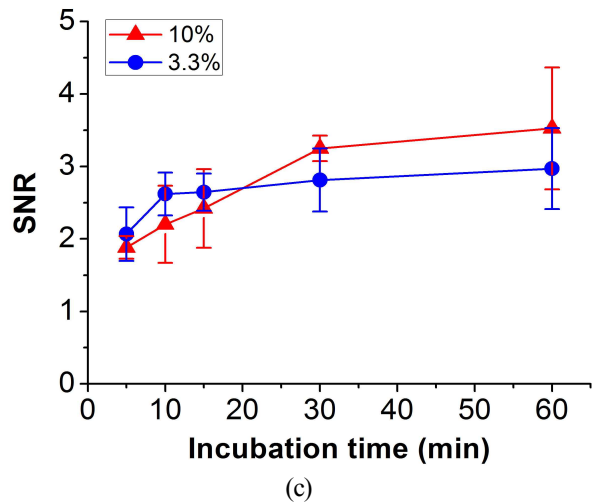
$\Delta t_{inc} = 15$ 분보다 짧게 반응시켜도 SNR  $\approx 2$ 를 얻게 되므로 CD4 림프구를 검출할 수 있다. 한편 혼합에 의한 오차를 제거하고자 혼합효과를 가하지 않고 확산이 지배하는 반응조건을 조성하여 시료챔버 내에서 반응시간에 따른 CD4 림프구의 형광 강도를 분석하였다.



(a)



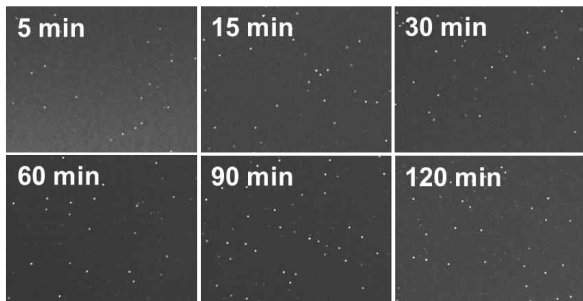
(b)



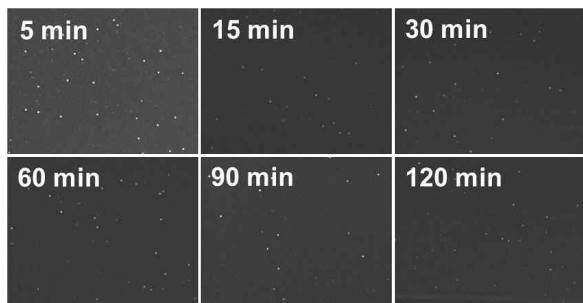
(c)

Fig. 3. Fluorescence images of CD4+ lymphocytes labeled with (a)  $C_{Ab} = 3.3\%$  ( $p < 0.05$ ) and (b)  $C_{Ab} = 10\%$  anti-CD4 antibody phycoerythrin (PE) ( $N = 5$ ,  $p < 0.05$ ) and (c) SNR values at different incubation times ( $\Delta t_{inc} = 5, 10, 15, 30$  and  $60$  min) in slideglass-coverslip with mixing effect.

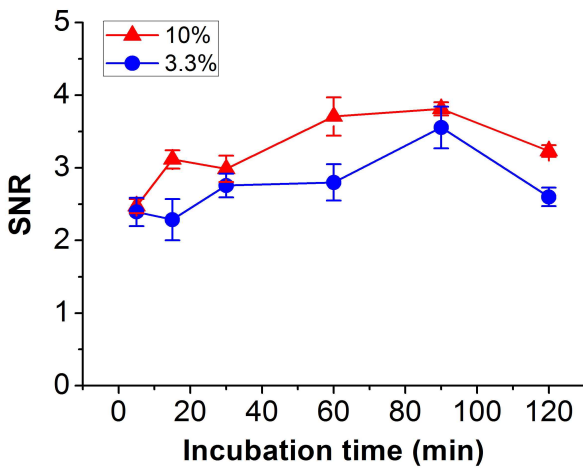
3.4 확산반응 시 반응시간의 영향



(a)



(b)

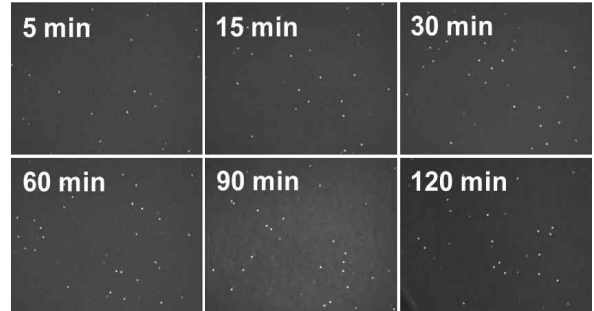


(c)

Fig. 4. Fluorescence images of CD4+ lymphocytes labeled with (a)  $C_{Ab} = 3.3\%$  ( $p < 0.05$ ) and (b)  $C_{Ab} = 10\%$  anti-CD4 antibody phycoerythrin (PE) ( $N = 5$ ,  $p < 0.05$ ) and (c) SNR values at different incubation times ( $\Delta t_{inc} = 5, 10, 15, 30$  and  $60$  min) in plastic microchamber with diffusion effect.

혼합효과를 배제하고 높이가 0.1 mm인 플라스틱 시료 챔버에서 확산효과 및 반응시간이 형광 영상에 미치는 영

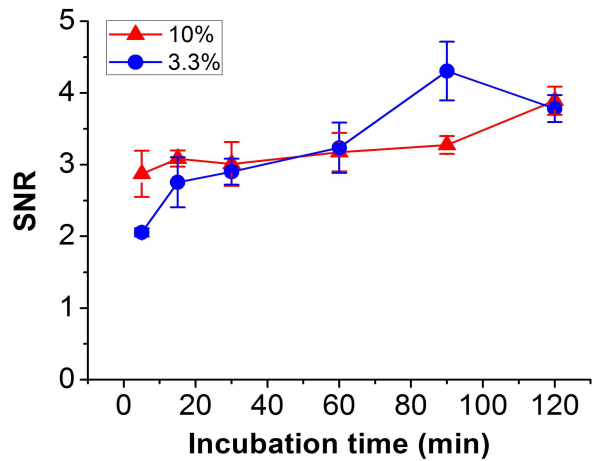
향을 살펴보고 Fig 4에 결과를 나타내었다. Fig 4(a) 및 Fig 4(b)를 슬라이드에서 얻은 형광 영상 Fig 3(a) 및 Fig 3(b)와 비교해보면 시료챔버에서 더 많은 CD4 림프구가 관찰되었다. 이는 슬라이드-커버글라스와 시료챔버에 주입된 시료량의 차이에 기인한다고 볼 수 있다. Fig 4(c)에서



(a)



(b)

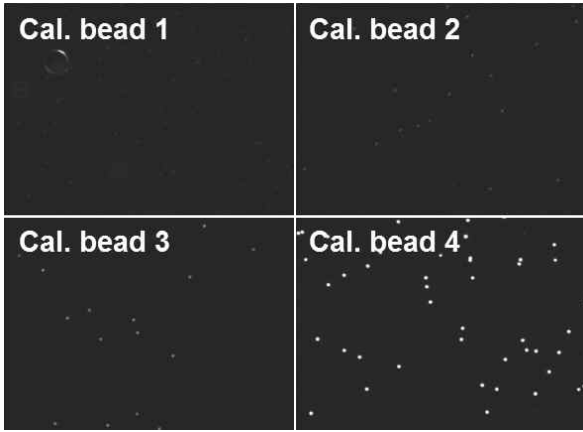


(c)

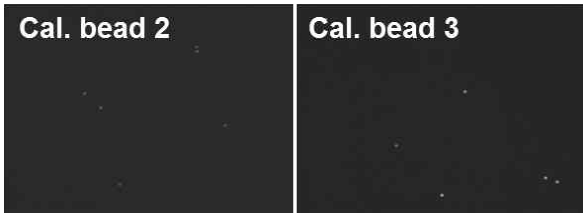
Fig. 5. Fluorescence images of CD4+ lymphocytes labeled with (a)  $C_{Ab} = 3.3\%$  ( $p < 0.05$ ) and (b)  $C_{Ab} = 10\%$  anti-CD4 antibody phycoerythrin (PE) ( $N = 5$ ,  $p < 0.05$ ) and (c) SNR values at different incubation times ( $\Delta t_{inc} = 5, 10, 15, 30$  and  $60$  min) in plastic microchamber with mixing effect.



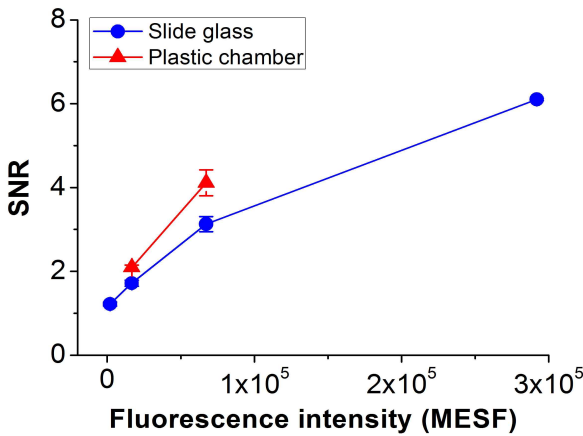
볼 수 있듯이 혼합효과를 배제하고 확산에 의한 반응을 유도한 결과 혼합효과가 반영되었던 Fig 3(c)의 SNR 경향과는 다르게  $C_{Ab} = 3.3\%$ 인 시료가  $C_{Ab} = 10\%$ 인 시료보다 반응시간에 상관없이 SNR이 낮았다.  $\Delta t_{inc} \leq 90$ 분 범위에서는 SNR이 대체적으로 증가하는 경향을 보였으나  $\Delta t_{inc} > 90$ 분에서는 SNR이 감소했다.



(a)



(b)



(c)

Fig. 6. Fluorescence images of intensity-calibration beads ( $N=5$ ) contained in (a) slideglass-coverslip ( $p < 0.05$ ) and in (b) plastic microchamber. ( $p < 0.05$ ) (c) SNR values for calibration beads in slideglass-coverslip and plastic microchamber.

$\Delta t_{inc} = 120$ 분일 때 SNR 계산에 사용되는 CD4 림프구 및 배경의 계조치 변화를 살펴보면 항체 농도가 다른 두 시료에서 SNR 감소의 원인이 다를 수 있다.  $C_{Ab} = 10\%$ 인 경우 배경 계조치가 급격히 높아져서 SNR이 감소하였고  $C_{Ab} = 3.3\%$ 인 경우에는 CD4 림프구의 계조치가 대폭 감소하여 SNR이 감소하였다. 배경의 계조치가 증가한 원인으로는 CD4 림프구와 결합하지 못한 형광 항체의 침전 현상을 고려할 수 있다. CD4 림프구의 계조치 감소 원인으로는 세포와 반응한 항체의 항원과의 결합력이 약해져서 발생하는 해리 현상 또는 영상 획득을 위해 반복적으로 광원을 조사하는 경우에 발생하는 광표백 현상 등을 생각해볼 수 있다.

Fig 5는 시료챔버에 시료를 주입하기 전에 혼합실험기로 혼합효과를 주고 반응시간에 따른 형광 영상을 분석한 결과이다. Fig 5(c)를 보면  $C_{Ab} = 10\%$ 인 시료에서는 반응시간에 따라 SNR이 대체적으로 완만하게 증가했다. Fig 4에서 살펴본 확산효과와 비교해보면 초기 반응시간 5분에서 혼합효과를 주었을 때 SNR이 조금 더 높았다. 이는 혼합효과에 의해 반응 초기에는 CD4 림프구와 항체가 보다 더 활발하게 반응하는 것을 의미하며, 이후에는 확산 반응이 지배적인 시료가 조금 더 빠른 시간에 최대 형광 강도에 도달했다.  $C_{Ab} = 3.3\%$ 인 시료에서는 혼합효과를 주었을 때 반응 초기에는 SNR이 높지 않았으나  $\Delta t_{inc}$ 이 증감함에 따라  $C_{Ab} = 10\%$ 인 시료보다 SNR이 급격히 증가했다. 그리고 확산효과를 주었을 때와 마찬가지로  $\Delta t_{inc} > 90$ 분에서 SNR이 낮아졌으며 혼합효과를 주었을 때 더 높은 SNR을 가졌다. 이상의 결과로부터 시료챔버에서 확산효과와 혼합효과를 비교해보면  $C_{Ab} = 10\%$ 인 시료에서는 확산에 의해 짧은 반응시간으로도 높은 SNR을 얻을 수 있었으며,  $C_{Ab} = 3.3\%$ 인 시료에서는 혼합효과를 통해 높은 SNR을 얻을 수 있었다.

### 3.5 보정입자를 이용한 형광 강도 정량화

슬라이드와 시료챔버에서 관찰한 형광 강도 보정입자의 형광 영상을 각각 Fig 6(a)와 Fig 6(b)에 나타내었다. 슬라이드에서 1번 보정입자는 육안으로 검출하기 힘들 정도로 형광 강도가 약하며 4번 보정입자는 대부분의 계조치가 최대값 255에 도달할 정도로 매우 강한 형광을 방출한다. 정량적인 상호 비교를 위해 앞서 수행한 실험에서 설정한 카메라 영상획득 조건을 그대로 적용할 경우 4번 보정입자의 계조치가 포화되므로, 보정입자의 형광 강도(MESF)와 SNR의 관계를 나타낸 Fig 6(c)를 보면 슬라이드에서 측정된 SNR은 형광 강도와 선형적인 관계를 갖지 않는다.

시료챔버에서 관찰한 1번 및 4번 보정입자는 SNR이 너무 낮거나(SNR = 1.22) 너무 높아서(SNR = 6.10) 형광 표지된 CD4 림프구의 SNR과 비교 대상으로 고려하지 않았다. 슬라이드에서 2번 보정입자의 경우 SNR = 1.72, 3번은 SNR = 3.13로 측정되었으며 시료챔버에서는 2번 SNR = 2.09, 3번 SNR = 4.11로 슬라이드에 비해 1.8~2배 높게 측정되었다. 이는 유리 재질인 슬라이드와 플라스틱 재질인 시료챔버 바닥면에서 반사되는 형광 강도가 다르므로 발생하는 차이라고 추정된다.

이와 같이 형광 강도 보정입자를 이용하면 CD4 검사기의 성능에 따른 검출 한계를 파악할 수 있고 CD4 림프구의 형광 표지 최적 조건을 도출할 수 있다. 동일한 규격의 카메라를 사용하더라도 광학부의 구조 및 부품에 따라 광원의 시료 조사량이 변화할 수 있는데 정량화 작업에 영향을 줄 수 있는 이러한 오차를 보정할 수 있는 방법이 Grünwald 등<sup>(10)</sup>에 의해 제시된 바 있다.

#### 4. 결 론

본 논문에서는 HIV/AIDS의 현장 신속 진단법으로 최근에 활용되기 시작한 형광 영상 기반 CD4 검사법의 시료 전처리 단계에서 CD4 림프구를 형광 표지하기 위한 항원-항체 반응 조건을 정량적으로 평가하였다. 이를 위해 항체 농도, 반응시간, 시료챔버 등의 다양한 조건에 따라 변하는 형광 영상의 SNR을 측정해본 결과, 일반적인 CD4 검사 프로토콜에서 권장하는 항체 농도( $C_{Ab} = 10\%$ )보다 더 낮은 항체 농도( $C_{Ab} \leq 3.3\%$ )에서도 형광 표지된 CD4 림프구의 검출이 가능함을 확인하였다. 또한 시료챔버에서  $C_{Ab} = 3.3\%$ 의 낮은 항체 농도를 갖는 시료는 혼합효과를 주어 짧은 반응시간( $\Delta t_{inc} \leq 10$ 분)으로  $C_{Ab} = 10\%$ 의 항체 농도를 갖는 시료와 비슷한 수준의 형광 강도 검출이 가능했다. 카메라 노출시간, 항체농도, 혼합 및 확산 반응 시 반응시간의 영향과 형광 강도 정량화에서 각 데이터간의 차이를 분산분석(ANOVA test)을 통해 분석해본 결과 p값이 유의수준인 0.05 보다 작으므로 통계적 유의성이 존재한다는 것을 확인했다. 본 논문에서 제시한 항원-항체 반응 조건의 정량적 평가 방법은 CD4 현장검사기 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 본 논문에서 제시한 방법에 따라 도출된 결과는 연구에 사용된 특정 형광현미경 및 카메라에 의존하지만, 형광 강도 보정입자를 사용하여 서로 다른 검사기기의 검출한계 등의 성능을 상호 비교할 수 있다.

#### 후 기

이 논문은 교육부의 재원으로 한국연구재단(NRF)의 지원(NRF-2013R1A1A2059539, NRF-2012S1A2A1A01029148)을 받아 수행된 연구결과임.

#### Reference

- 1) Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2011, World AIDS Day Report 2011.
- 2) Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., Hakim, J. G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J. H., Godbole, S. V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B. R., Mayer, K. H., Hoffman, I. F., Eshleman, S. H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L.A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaldo, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T. E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M. and Fleming, T. R., 2011, "Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy" N. Engl. J. Med., Vol. 365, pp.493-505.
- 3) Boyle, D. S., Hawkins, K. R., Steele, M. S., Singhal, M. and Cheng, X., 2012, "Emerging Technologies for Point-of-Care CD4 T-lymphocyte Counting", Trends in Biotechnology, Vol. 30, No. 1, pp.45-54.
- 4) Wade, D., Diaw, P. A., Daneau, G., Camara, M., Dieye, T. N., Mboup, S., Kestens, L., 2013, "CD4 T-Cell Enumeration in a Field Setting: Evaluation of CyFlow Counter Using the CD4 Easy Count Kit-Dry and Pima CD4 Systems", PLoS One., Vol. 8, pp.e75484.
- 5) Beck, M., Brockhuis, S., van der Velde, N., Breukers, C., Greve, J. and Terstappen, L. W., 2012, "On-chip Sample Preparation by Controlled Release of Antibodies for Simple CD4 Counting", Lab. Chip., Vol. 12, pp.167-73.
- 6) Glynn, M. T., Kinahan, D. J. and Ducreé, J., 2013, "CD4 Counting Technologies for HIV Therapy Monitoring in Resource-poor Settings-State-of-the-art and Emerging Microtechnologies", Lab. Chip., Vol. 13, pp.2731-48.

- 7) Bae, S. Y., Park, H. C., Oh, J. S., Yoon, S. Y., Park, D. W., Choi, I. K., Kim, H. J., Oh, J. H., Hur, D. S., Chung, C., Chang, J. K., Robinson, J. P. and Lim, C. S., 2009, "Absolute CD4+ Cell Count Using a Plastic Microchip and a Microscopic Cell Counter", *Cytometry B Clin Cytom.*, Vol. 76, pp.345-53.
- 8) Ymeti, A., Li, X., Lunter, B., Breukers, C., Tibbe, A. G., Terstappen, L. W. and Greve, J., 2007, "A Single Platform Image Cytometer for Resource-Poor Settings to Monitor Disease Progression in HIV Infection", *Cytometry A.*, Vol. 71, pp.132-42.
- 9) Park, C., Cho, M.-O., Lee, D. and Kim, J. K., 2012, "Analysis of Blood Cell Images Using Smartphone-based Mobile SmartScope", *J. Kor. Soc. Vis.*, Vol. 10, No. 2, pp.25-31.
- 10) Grünwald, D., Shenoy, S. M., Burke, S. and Singer R. H., 2008, "Calibrating Excitation Light Fluxes for Quantitative Light Microscopy in Cell Biology," *Nat. Protoc.*, Vol. 3, No. 11, pp.1809-1814.