대한진단검사의학회지 제28권 제2호 2008
Korean J Lab Med 2008;28:109-17
DOI 10.3343/kjlm.2008.28.2.109

Rhinovirus, Human Metapneumovirus, Coronavirus 검출을 위한 Seeplex™ RV Detection 키트의 평가

성흥섭 · 박숙자 · 우영대 · 최병후 · 김미나

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과

Evaluation of Seeplex™ RV Detection Kit for Detecting Rhinovirus, Human Metapneumovirus, and Coronavirus

Heungsup Sung, M.D., Sook Ja Park, M.T., Young Dae Woo, Ph.D., Byung Hoo Choi, M.T., and Mi-Na Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background : Direct antigen test (DAT) and culture are primary tests to diagnose infections by respiratory viruses, but are mainly available for the traditional viral pathogens such as respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus, parainfluenza virus (PIV), and adenovirus in clinical laboratories. The objective of this study was to evaluate a multiplex reverse transcriptase-PCR method using Seeplex™ RV Detection kit (Seegene, Korea) for the detection of rhinovirus, coronavirus, and human metapneumovirus (hMPV).

Methods : From January to May 2007, nasopharyngeal aspirates (NPAs) from pediatric patients negative for culture and DAT of traditional viral pathogens were tested with Seeplex™. All the amplicons were directly sequenced and homology of the sequences was searched in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Patients' medical records were reviewed for clinical and demographic features.

Results : Forty-seven (26.4%) of 178 NPAs were positive: 18 rhinovirus, 15 hMPV, 4 RSV A, 3 coronavirus OC43, 3 influenza virus A, 2 adenovirus, 1 coronavirus NL63, and 1 RSV B. Based on maximum identity, each of the sequences indicating rhinovirus, hMPV, and coronavirus OC43 matched to the corresponding viruses with homology of 94-98%, 96-99%, and 98-100%, respectively. Seeplex™-positive patients were 0-11 yr old with a male:female ratio of 1.5:1. Clinical diagnoses included 9 pneumonia, 6 bronchiolitis, 2 cold, 1 asthma exacerbation for rhinovirus; 10 pneumonia, 4 bronchiolitis, and 1 clinical sepsis for hPMV; and 1 pneumonia, 2 croup, and 1 cold for coronavirus.

Conclusions : Multiplex reverse transcriptase-PCR method using Seeplex™ RV Detection kit is a reliable test to detect rhinovirus, hMPV, and coronavirus. It may improve the diagnostic sensitivity for RSV, influenza virus, PIV, and adenovirus. *(Korean J Lab Med 2008;28:109-17)*

Key Words : *Culture, Direct Antigen Test, Multiplex PCR, Respiratory Virus*

접 수 : 2008년 1월 2일 **접수번호 :** KJLM2102
수정본접수 : 2008년 2월 21일
게재승인일 : 2008년 2월 21일
교 신 저 자 : 김 미 나
우 138-736 서울시 송파구 풍납2동 388-1
서울아산병원 진단검사의학과
전화 : 02-3010-4499, Fax : 02-478-0884
E-mail : mnkim@amc.seoul.kr

*본 논문은 2007년도 아산생명과학연구소 연구비 지원(2007-443)에 의한 것임.

서 론

급성 호흡기 감염은 모든 연령층에서 가장 흔한 질병이며, 특히 소아가 입원하게 되는 주요한 원인 중 하나이다[1, 2]. 소아에서 급성 하기도 감염의 80% 정도는 바이러스가 원인이다[3]. 바

이러스성 호흡기 감염은 세균성 감염과의 감별이 필요하고, 원인 바이러스가 다르더라도 유사한 증상과 징후를 보여 임상적으로는 원인 바이러스를 구분하기 어렵기 때문에 검사실적 진단이 필요하다[4]. 호흡기 감염의 원인 바이러스를 신속하게 검출하면 위급한 환자에서 적절한 항바이러스제 치료를 할 수 있을 뿐 아니라 불필요한 항균제 사용과 입원기간을 줄일 수 있으며, 감염 환자를 적절하게 격리하여 병원 내 전파를 막을 수 있다[5]. 유행기에 따라 분리 빈도에 차이가 있으나 respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus, parainfluenza virus (PIV), adenovirus 등이 높은 빈도로 분리된다[6-8]. 최근에는 기존에 감기의 원인으로 알려졌던 바이러스가 심각한 호흡기 감염을 일으킬 수 있음이 밝혀지거나, 호흡기 감염을 일으키는 새로운 바이러스들이 알려지고 있다[9, 10]. Human metapneumovirus (hMPV)는 2001년 처음으로 발견된 호흡기 바이러스로 소아에서 급성 하기도 감염의 원인 중 5-15%를 차지한다고 보고되었으며[9], 주로 상기도 감염의 원인인 human rhinovirus (HRV)와 coronavirus (CoV)도 천식의 급성 악화와 급성 하기도 감염을 일으킬 수 있다[11, 12]. 따라서 급성 호흡기 감염 증상을 보이는 소아에서 감별해야 할 바이러스의 종류가 많아졌다.

호흡기 바이러스 검출에는 직접항원검사와 배양검사가 전통적인 방법이다[3, 13]. 하지만 일부 바이러스 검출에는 직접항원검사의 민감도가 낮을 수 있으며, 배양이 안 되거나 시간이 많이 걸리는 바이러스도 있다[13]. 핵산증폭법은 바이러스를 더 신속하고 민감하게 검출할 수 있어 전통적인 방법의 단점을 보완할 수 있다[14]. 최근에는 hMPV처럼 이제까지 검출하지 않았던 새로운 바이러스를 검출할 때 직접항원검사법이나 배양검사법보다 핵산 증폭법을 먼저 적용하여 신속하게 바이러스 감염 유무를 진단하고 있다[9]. 특히 호흡기 감염 바이러스는 감별 진단을 위해 여러 가지 바이러스를 동시에 검출할 필요가 있기 때문에 다중역전사 중합효소연쇄반응(multiplex reverse transcriptase-PCR, multiplex RT-PCR) 검사법이 유용하다[6, 15, 16]. 국내에서는 dual priming oligonucleotide (DPO)를 이용하여 RSV A, RSV B, influenza virus A, influenza virus B, PIV 1, PIV 2, PIV 3, adenovirus, HRV, hMPV, CoV OC43, CoV 229E/NL43 등 13종의 호흡기 바이러스를 동시에 multiplex RT-PCR하기 위한 Seeplex™ RV Detection 키트(Seegene, Seoul, Korea)가 개발되었다[17].

본 연구에서는 RSV, influenza virus, PIV, adenovirus 직접항원검사와 배양검사가 모두 음성이었던 환자를 대상으로 Seeplex™ RV Detection 키트의 진단적 유용성을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 검체

2007년 1월부터 5월까지 호흡기 증상으로 RSV, influenza virus, PIV, adenovirus 직접항원검사와 배양검사가 동시에 의뢰된 환자 중 두 검사 모두 음성이었던 소아 환자를 대상으로 하였으며 전자의무기록을 조회하여 환자의 임상정보를 얻었다. 직접항원검사와 배양검사에서 사용한 비인두흡인액을 4°C에서 보관하였다가 7일 이내에 사용하였다. 직접항원검사와 배양검사에는 동정용 항체로 D3 DFA (Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH, USA)를 사용하였다. 바이러스 배양을 위해 2007년 1-2월에는 Madin-Darby canine kidney (MDCK), LLC-MK2, HEp-2 세포주를, 2007년 3월부터는 R-Mix Too 세포주(Diagnostic Hybrids Inc.)를 사용하였다.

2. Multiplex RT-PCR

Viral Gene-Spin, Viral DNA/RNA Extraction 키트(Intron, Seoul, Korea)를 사용하여 비인두흡인액 300 μL에서 30 μL의 RNA를 추출하였다. 각 검체에서 핵산을 추출하기 전 키트 내 내부대조물질 5 μL를 첨가하였다. 추출한 RNA 8 μL를 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 키트(Fermentas, Ontario, Canada)로 cDNA를 합성하여 최종 부피가 20 μL가 되게 맞추었다. Seeplex™ RV Detection 키트 내의 adenovirus, hMPV, CoV 229E/NL63, PIV 1형, 2형, 3형 검출을 위한 A 세트와 influenza virus A형과 B형, RSV A형과 B형, HRV, CoV OC43 검출을 위한 B 세트 각각에 대한 PCR 반응액을 제조하였다. PCR 반응액은 3 μL의 cDNA, 4 μL의 5× RV Primer, 3 μL의 8-methoxypsoralen (8-MOP), 10 μL의 2× Multiplex Master Mix로 총 20 μL가 되도록 하였다. PCR은 94°C 에서 15분 반응 후, 94°C 30초, 60°C 1.5분, 72°C 1.5분의 반응을 40회 반복하였고, 최종적인 연장 반응을 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 반응 산물은 ethidium bromide가 0.5 μL/mL 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하여 내부대조물질의 증폭산물이 있을 때 핵산 추출과 증폭과정이 적절하였다고 판단하였고, 각 증폭산물의 밴드 크기는 키트에 포함된 marker DNA와 비교하여 판독하였다.

3. 염기서열분석과 계통발생학적 분석

PCR 산물은 GENCLEAN II 키트(Q-BIO gene, Carlsbad,

CA, USA)로 정제한 후 Seeplex™ RV Detection 키트에 포함된 해당 바이러스의 시발체로 BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)에서 직접 염기서열분석하였다. 각 염기서열은 NCBI의 Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)로 GenBank에 등재된 바이러스 유전자 염기서열과 비교하여 상호 일치도를 구하였다. 바이러스 유전자의 염기서열 일치도가 높은 바이러스와 같은 과(family) 또는 속(genus)에 포함된 바이러스 유전자를 GenBank에서 찾아 ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)에서 염기서열을 정렬하고, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 3, http://www.megasoftware.net/) 프로그램에서 Neighbour-Joining 방법으로 계통발생학적으로 분석하였다[18]. 이때 계통발생학적 나무 그림은 TreeView 프로그램(http: //taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html)에서 얻었다. 계통발생학적 분석에 사용된 바이러스 염기서열의 GenBank accession number는 다음과 같다: DQ473498 (HRV), EF456706 (poliovirus 1), EU262658 (coxsackievirus A16), X05690 (coxsackievirus B4), DQ-452074 (enterovirus 71), X92886 (echovirus 9); DQ023127 (hMPV), AF187152 (avian pneumovirus (APV C), D00850 (APV A), Y14292 (APV B), D11128 (pneumonia virus of mice), NC001989 (bovine RSV), NC001781 (human RSV); AY903460 (CoV OC43), DQ415914 (CoV HKU), NC005831 (CoV NL63), NC002645 (CoV 229E), NC004718 (SARS CoV).

결 과

1. 대상 환자들의 특성

5개월 동안 323명의 환자에서 477검체가 의뢰되었으며, RSV, influenza virus, PIV, adenovirus 직접항원검사와 배양검사 결과 각각 47명(14.6%)에서 49검체(10.3%), 54명(16.7%)에서 57검체(11.9%)가 양성이었다. 분리된 바이러스는 RSV 26검체(5.5%), influenza virus A 16검체(3.4%), influenza virus B 7검체(1.5%), PIV 7검체(1.5%), adenovirus 5검체(1.0%)였다. 266명(82.4%)의 417검체(87.4%)는 두 가지 검사 모두 음성이었으며, 추적관찰 검체를 제외한 후 검사 가능한 178검체를 대상으로 multiplex RT-PCR을 시행하였다. 남자가 108명(60.7%), 여자가 70명(39.3%)이었으며, 나이는 0.8±3.2세, 연령 분포는 생후 4일부터 15세까지였다. 외래 환자가 1명(0.6%), 응급실에서 치료받은 후 퇴원한 환자가 23명(12.9%), 호흡기 증상으로 입원한 환자가 86명(48.3%), 입원 중 호흡기 증상이 발생한 환자가 68명(38.2%)이었다.

2. Multiplex RT-PCR 결과

직접항원검사와 배양검사에서 모두 음성이었던 178검체 중 47검체(26.4%)가 multiplex RT-PCR 양성이었으며, 모두 1가지 종류의 바이러스만 검출되었다. HRV는 18검체(10.1%), hMPV는 15검체(8.4%), CoV OC43은 3검체(1.7%), CoV 229E/NL63은 1검체가 검출되었다(Table 1). 직접항원검사 및 배양검사에서 음성이었는데, multiplex RT-PCR에서 양성인 경우는 RSV A형 4검체(2.2%), influenza virus A형 3검체(1.7%), adenovirus 2검체(1.1%), RSV B형 1검체(0.6%)였다(Table 1). RSV A가 검출된 환자 두 명은 각각 8일과 4개월 전에 RSV가 배양된

Table 1. Clinical diagnoses of 47 patients positive for rhinovirus, human metapneumovirus, coronavirus, and other viruses by multiplex reverse transcriptase PCR

Respiratory viruses	Total	N of patients					
		Pneumonia	Bronchiolitis	Croup	Asthma exacerbation	Clinical sepsis	Common cold
HRV	18	9	6	0	1	0	2
hMPV	15	10	4	0	0	1	0
CoV OC43	3	1	0	1	0	0	1
CoV NL63	1	0	0	1	0	0	0
Others*	10	3	5	0	0	2	0
Total	47	23	15	2	1	3	3

*Others included traditional viral pathogens such as respiratory syncytial virus, influenza virus, parainfluenza virus, and adenovirus.
Abbreviations: HRV, rhinovirus; hMPV, human metapneumovirus; CoV, coronavirus.

Table 2. Similarities between the sequences of the respiratory viral isolates in this study and the archival sequences from the GenBank

Viruses	Target gene	Size of target gene (bp)	N of isolates	Sequence identity (%) based on maximum identity	Compared strains (GenBank accession no.)
Rhinovirus	5' untranslated region	337	18	94-98	DQ316274, -277, -297 DQ473498, -3508 EF186077 AF542443 AF108161, -173 EF077279
hMPV	Fusion protein	469	15	96-99	AY304362 EF081369 DQ023127, -131 AY622381 AY530094
Coronavirus OC43	Membrane glycoprotein	231	3	99-100	AY903459, -460
Coronavirus 229E/NL63	Spike protein	375	1	98	AY567487
RSV A	Fusion protein	273	4	98-100	AF512538 DQ885231 AY114149
RSV B	Fusion glycoprotein	391	1	98	AY526565
Influenza A	Segment 7 matrix protein	351	3	98	EF620022
Adenovirus	E2B DNA polymerase	534	2	99	AY339865

Abbreviations: hMPV, human metapneumovirus; RSV, respiratory syncytial virus.

적이 있었다. 핵산 추출, 역전사, Seeplex™ RV Detection 키트를 이용한 multiplex RT-PCR법의 전체 검사시간(turnaround time)과 수기 시간(hands-on time)은 각각 8시간과 90분이었다.

3. 염기서열분석과 계통발생학적 분석 결과

RT-PCR에 양성이었던 47검체의 증폭산물 모두의 염기서열을 GenBank에서 비교 검색했을 때 각각의 증폭산물의 크기로 동정된 바이러스 종과 높은 일치도를 보였다(Table 2). hMPV로 동정된 3명의 환자 검체에서 얻은 염기서열을 제외하고는 각각의 바이러스 분리주 사이의 염기서열이 100% 일치하는 경우는 없었다.

HRV 양성 검체들은 표적 유전자인 5' untranslated region 유전자 337 bp 부위의 염기서열이 GenBank에 등록된 HRV 염기서열과 94-98% 일치하였고(Table 2), 다음으로 높은 일치도를 보인 poliovirus의 염기서열과 62%의 일치도를 보였다. HRV로 동정되었던 환자 검체에서 얻은 염기서열과 GeneBank에 등록된 HRV 염기서열, HRV와 염기서열 일치도가 높은 Enterovirus의 염기서열과 계통발생학적 분석결과 HRV와 군집을 이루었다(Fig. 1A). hMPV 양성 검체들은 표적 유전자인 fusion protein 유전자 469 bp 부위의 염기서열이 GenBank에 등록된 hMPV 염기서열과 96-99% 일치하였고(Table 2), 다음으로 APV C형의 염기서열과 73%의 일치도를 보였다. hMPV로 동정되었던 환자 검체에서 얻은 염기서열과 GenBank에 등록된 hMPV 염기서열, hMPV와 염기서열 일치도가 높은 Pneumovirinae의 염기서열과 계통발생학적 분석 결과 hMPV와 군집을 이루었다(Fig. 1B). CoV OC43 양성 검체들은 membrane glycoprotein 유전자 231 bp 부위의 염기서열이 GenBank에 등록된 CoV OC43 염기서열과 99-100% 일치하였고(Table 2), 다음으로 CoV HKU의 염기서열과 66%의 일치도를 보였다. GenBank에 등록된 CoV OC43, CoV 229E, CoV NL63, CoV HKU, SARS CoV 염기서열과 RT-PCR에서 CoV OC43 양성이었던 환자에서 얻은 염기서열을 계통발생학적으로 분석한 결과 CoV OC43과 군집을 이루었다(Fig. 1C). CoV 229E/NL63 양성인 1검체는 spike protein 유전자 375 bp 부위의 염기서열이 GenBank에 등록된 CoV NL63 염기서열과 98% 일치하였고(Table 2), 다음으로 CoV 229E와 67%의 일치도를 보였으며, GenBank에 등록된 CoV OC43, CoV 229E, CoV NL63, CoV HKU, SARS CoV 염기서열과 계통발생학적 분석 결과 CoV NL63과 군집을 이루었다(Fig. 1D).

RSV A형, RSV B형, influenza virus, adenovirus 양성이었던 검체에서 얻은 염기서열과 GenBank에 등록된 염기서열

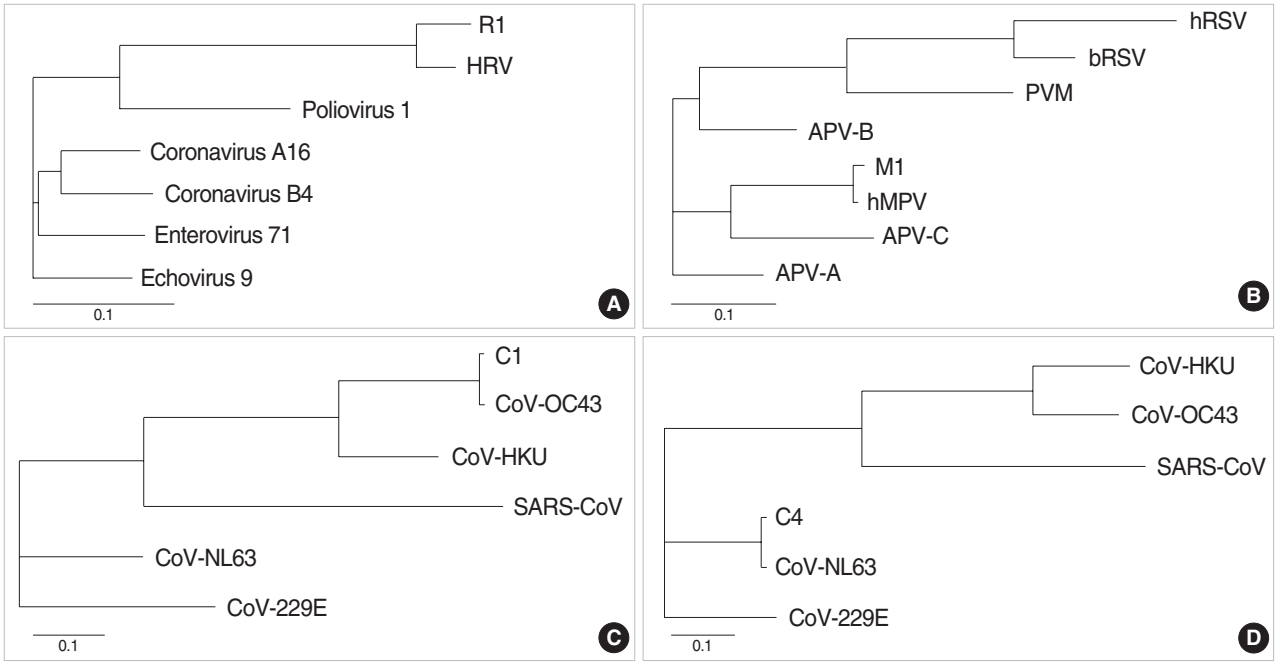

Fig. 1. Phylogenetic analysis using Neighbour-Joining method showed a close relationship between the isolates of this study (A. Human rhinovirus [HRV] R1, B. Human metapneumovirus [hMPV] M1, C. Coronavirus [CoV] OC43 C1, D. CoV NL63 C4) and archival strains of corresponding viruses. Distances are presented as a number of substitutions per site (a scale of '0.1' means 0.1 nucleotide substitution per site).
Abbreviations: hRSV, human respiratory syncytial virus; bRSV, bovine respiratory syncytial virus; PVM, pneumonia virus of mice; APV, avian pneumovirus; SARS, severe acute respiratory syndrome.

사이의 일치도는 각각 98-100%, 98%, 98%, 99%였다(Table 2).

4. Multiplex RT-PCR 양성 환자들의 임상적 특성

HRV 양성 18명 중 남자는 8명(44.4%), 여자는 10명(55.6%)이었으며 나이의 중앙값은 1.4세(2개월-11세)였다. 11명(61.1%)은 기저질환을 가지고 있었으며, 9명(50.0%)은 폐렴, 6명(33.3%)은 급성 세기관지염, 2명(11.1%)은 상기도 감염, 1명(5.6%)은 천식의 급성악화로 진단받았다. 9명의 폐렴 환자 중 4명은 원인이 밝혀졌으며, 세균성 폐렴이 3명, 거대세포바이러스 폐렴이 1명이었다(Table 1).

hMPV 양성 환자 15명 중 남자는 11명(73.3%), 여자는 4명(22.2%)이었으며 나이의 중앙값은 1.4세(4개월-7세)였다. 9명(60.0%)은 기저질환을 가지고 있었으며, 10명(66.7%)은 폐렴, 4명은 급성 세기관지염, 1명(6.7%)은 임상적 패혈증으로 진단받았다(Table 1). hMPV가 검출된 환자 중 세균성 폐렴이 증명된 환자는 없었다.

CoV OC43 양성 환자 3명은 모두 남아로 나이 범위는 4개월에서 6개월이었으며, 각각 폐렴, 크룹, 상기도 감염으로 진단받았다. CoV NL63 양성 환자는 3세 여아로 크룹으로 진단받았다(Table 1). CoV가 검출된 환자 중 세균성 폐렴이 증명된 환자는 없었다.

RSV A형 또는 B형이 분리된 5명은 모두 2세 미만이었으며, 4명은 급성 세기관지염, 1명은 폐렴으로 진단받았다. Influenza virus가 분리된 3명 중 2명은 임상적 패혈증으로, 1명은 폐렴으로 진단받았다. Adenovirus가 분리된 2명 중 1명은 폐렴, 나머지 1명은 급성 세기관지염으로 진단받았다(Table 1).

고 찰

RT-PCR에서 증폭된 산물을 염기서열 분석한 결과 기존에 GenBank에 등록된 바이러스 염기서열과 94-100%의 높은 일치도를 보였고, 계통발생학적으로 해당 바이러스와 뚜렷한 군집을 보여서 Seegene RV Detection 키트의 판독 결과와 모두 일치하였다. 이들 바이러스가 분리된 47명의 환자들은 임상적으로 호흡기 증상을 가지고 있었고, hMPV와 CoV 양성인 환자들에서는 세균성 원인이 증명된 경우가 없어서 이들 바이러스가 현 감염의 원인일 것으로 추정할 수 있었다. RT-PCR 방법으로

원인 바이러스가 검출될 경우 증폭산물의 교잡반응이나 염기서열 분석을 통해 교차 오염의 가능성을 배제해야 한다[19]. hMPV 양성이었던 3검체는 증폭산물의 염기서열이 서로 100% 일치하여 교차 오염에 의한 위양성 가능성을 배제할 필요가 있었지만, 3검체 모두 임상적으로 하기도 감염이 의심되었던 환자에서 채취되었고 hMPV에 대한 직접항원검사와 배양검사도 양성이어서 hMPV 감염으로 판단하였던 증례들이다(미발표 자료). 따라서 HRV, hMPV, coronavirus 감염에 대한 Seeplex™ RV Detection 검사법의 진단 특이도는 100%였다. Multiplex RT-PCR의 특이도는 배양이 가능한 호흡기 바이러스에 대해서는 직접항원검사와 배양검사를 기준으로 평가되며, 배양이 불가능한 호흡기 바이러스에 대해서는 새로운 시발체로 단일 RT-PCR을 시행하거나 염기서열분석을 통해 평가된다[16, 20]. 기존의 보고에서 multiplex RT-PCR의 특이도는 배양검사와 직접항원검사를 기준으로 96-99%, 단일 RT-PCR을 기준으로 96-100%, 염기서열분석을 기준으로 94%로 보고되어 RT-PCR의 특이도는 매우 우수하였다[16, 20]. Seeplex™ RV Detection 키트가 다중중합효소연쇄반응법인데도 불구하고 민감도와 특이도를 유지할 수 있는 이유는 시발체가 18-25 bp의 5' 부위, 5개의 deoxyinosine으로 구성된 'linker' 부위, 6-12 bp의 3' 부위 등 세 부분으로 구성되어 있어서, 상대적으로 긴 5' 부위는 바이러스 유전자와의 결합을 촉진하며, 짧은 3' 부위는 바이러스 특이 증폭반응이 일어날 수 있게 하는 DPO 기법을 이용하여 제작하였기 때문이다[17, 21]. 이 제품에 대한 다른 평가에서도 검출한계값이 10 copies/mL로 기존의 multiplex RT-PCR 검사법들의 검출한계값인 50-250 copies/mL에 비해 더 우수한 민감도를 보였다[16, 19, 21]. HRV와 CoV 진단에는 배양법이 용이하지 않고, hMPV 진단에는 RT-PCR이 '표준법'이기 때문에[22-24] 이들 바이러스를 동시에 민감하고 특이하게 검출하는 Seeplex™ RV Detection 키트는 호흡기 바이러스 진단에 믿을만한 검사법이라고 판단하였다.

RSV, influenza virus, PIV, adenovirus 등의 직접항원검사와 배양검사 음성인 환자 중 20.8%에서 multiplex RT-PCR법에 의해 HRV, hMPV, CoV가 검출되었음을 미루어 볼 때 HRV, hMPV, CoV가 소아 호흡기 질환의 중요한 원인 바이러스임을 알 수 있었다. 본 연구에서 이들 바이러스가 모두 단독으로 분리되었는데, RSV, influenza virus, PIV, adenovirus에 대한 직접항원검사와 배양검사 음성이었던 검체만을 대상으로 하였기 때문으로 판단되며, 중복감염을 보고했던 기존 연구들[10, 21, 25]에 비추어 볼 때 RSV, influenza virus, PIV, adenovirus 양성 검체에서 중복감염이 있었을 가능성을 배제할 수 없다. RSV와 influenza virus의 상대적 빈도가 다른 국내 연구에 비해 낮았던 것은 검체 수집 기간이 이들 2가지 바이러스의 최고 유행기인 11월과 12월이 제외된 것이 가장 큰 원인일 것으로 추정하였다. HRV는 상기도 감염의 주요 원인이지만, 소아 특히, 신생아 및 면역억제 환자에서 심한 하기도 감염을 일으킬 수 있다고 알려져 있다[26, 27]. 본 연구에서도 HRV 양성 환자 18명 중 11명(61.1%)이 기저질환을 가지고 있어서 하기도 감염의 빈도가 높았을 것이다. hMPV 양성이었던 환자 중 90% 이상이 하기도 감염이었는데, 이는 병원의 특성상 증상이 심한 환자들이 내원하였기 때문일 수 있다. 하지만 이전의 국내 보고에서 하기도 감염 소아 환자의 4.7-15.7%에서 hMPV가 분리되어[10, 28, 29], hMPV는 소아 하기도 감염의 주요 원인일 것으로 판단하였다. CoV 감염 환자는 2.2%를 차지하여 하기도 감염 소아의 1.6%, 급성 호흡기 감염 소아의 1.7-5.0%에서 분리되었다는 국내 보고와 유사하다[10, 25, 30]. CoV의 빈도가 높지는 않지만 크룹과 세기관지염을 유발하므로 이들 감염이 있는 환자에서는 CoV 검출이 필요하다. CoV 감염에 대한 기존의 국내 보고에서는 NL63에 의한 것이 많은데 비해 본 연구에서는 4명 중 3명이 OC43임을 규명함으로써 RT-PCR 검사가 호흡기 바이러스 감염의 역학적 분석에도 도움이 됨을 알 수 있었다[10, 25, 30]. 이상의 결과를 볼 때 통상적인 배양검사와 직접항원검사로 진단되지 않고 있는 HRV, hMPV, CoV 등이 소아 호흡기 감염의 중요한 원인임을 알 수 있었다. 그러므로, 이들 바이러스를 신속 정확하게 검출할 수 있는 multiplex RT-PCR 검사법이 유용할 것으로 판단하였다.

RSV, influenza virus, PIV, adenovirus에 대한 직접항원검사와 배양검사에서 모두 음성이었던 10검체(5.6%)에서 RT-PCR로 RSV, influenza virus, adenovirus 등이 검출되어, RT-PCR이 항원검사나 배양검사에 비해 민감도가 더 높을 것으로 추정되었다. RSV가 RT-PCR법으로 검출된 5검체 중 1검체는 RSV가 배양된 지 8일 후 채취한 검체인데 배양검사가 음성이었던 이유는 바이러스 역가가 낮거나, 호흡기 상피세포가 충분하지 못했거나, 검체 운송 과정 중 바이러스가 죽었기 때문일 가능성이 있다[3]. 직접항원검사와 배양검사는 검체의 종류, 검체의 채취 시간, 검체의 질, 운송 조건, 동정에 사용하는 시약, 이용되는 세포주 등에 따라 민감도에 차이가 있다[20]. RT-PCR의 경우에도 검체의 종류, 검체의 채취 시간 등에 영향을 받지만, 직접항원검사나 배양검사보다는 검체 영향이 덜하기 때문에 민감도가 더 높을 수 있다[31]. 이전 보고에서 4가지 바이러스에 대한 직접항원검사와 배양검사, multiplex RT-PCR법의 양성률이 각각 28.4%, 36.2%, 44.9%로 RT-PCR의 민감도가

가장 높았고[10], MultiCode-PLx법을 평가했을 때 배양법보다 influenza virus A를 더 많이 검출하거나 전체적인 민감도가 높았다는 보고가 있다[20, 32]. 특히 RT-PCR은 바이러스 배출 기간이 짧고 배출량이 적은 성인이나 증상이 시작된 후 3일이 지난 소아에서 원인 바이러스 검출에 도움이 될 수 있다[33]. 2007년 국내 임상검사실을 대상으로 한 설문조사에서 호흡기 바이러스 검사를 실시하는 31개 기관 중 호흡기 바이러스 직접항원검사를 실시하는 기관이 58.1%로 가장 많았고, RT-PCR과 배양검사를 실시하는 기관이 각각 41.9%로 RT-PCR의 이용률이 배양검사와 비슷함을 알 수 있다[7]. 그러나 RT-PCR은 검사 소요시간이 항원검사보다 길고 시발체 부위에 염기서열 변이가 있을 때에는 위음성일 수 있으며, 새로운 호흡기 바이러스를 검출할 수는 없으므로 직접항원검사나 배양검사를 완전히 대체할 수는 없다[31].

임상검사실에서 통상 검사로의 도입 여부를 결정할 때 검사 소요시간과 수기 시간이 중요한 요소가 된다. Seeplex™ RV Detection 키트는 전체 검사 소요시간과 수기 시간이 각각 8시간과 90분 정도로 NGEN respiratory virus analyte-specific assay (Nanogen, San Diego, CA, USA), ResPlex II assay (Genaco Biomedical Products, Inc., Huntsville, AL, USA), MultiCode-PLx respiratory virus panel (EraGen Biosciences, Madison, WI, USA), ID-Tag respiratory viral panel (Tm Bioscience Corp., Toronto, Canada) 등 다른 상품화된 multiplex RT-PCR 검사법들이 전체 검사 소요시간은 4-9시간, 수기 시간은 50-70분 정도인 것에 비해 긴 편이다[4, 16, 20, 32]. 이는 PCR 증폭산물을 검출하는데 전통적인 전기영동법을 사용하기 때문으로 검사실로서는 전기영동장치 외의 별도의 검출 장비가 필요하지 않다는 점이 장점이 될 수 있지만, 다중 시발체 수가 증폭산물 밴드를 육안으로 감별할 수 있을 정도로 제한된다는 점과 전체 검사소요시간과 수기 시간이 길어지고 전기영동 밴드를 주관적으로 해석할 위험이 있다는 점들은 단점이 될 수 있다. 따라서 향후 증폭산물을 검출하는 방법의 개선이 필요할 것이다. 현재까지 개발된 호흡기 바이러스 검출을 위한 상품화된 RT-PCR 검사법 중 체외진단시약으로 미국식품의약국의 승인을 받은 제품은 없고, 국내에서는 multiplex RT-PCR법을 진단검사에 적용하기 위한 기준을 검토하는 단계이므로 향후 진단 시약의 개발 또는 개선과 함께 이 검사법들의 진단적 유효성과 장단점 비교가 체계적으로 이루어질 필요가 있다.

결론적으로 Seeplex™ RV Detection 키트는 HRV, hMPV, CoV 검출을 위한 신뢰할 만한 검사법이었고, RSV, influenza virus, adenovirus 검출의 민감도도 높일 수 있었다. 소아 환자에서 HRV, hMPV, CoV 등이 호흡기 감염의 중요한 원인균으로 기존의 호흡기 바이러스와 함께 이들 바이러스까지 검출할 수 있는 Seeplex™ RV Detection 키트가 호흡기 감염 진단에 유용할 것으로 판단하였다.

요 약

배경 : 임상 검사실에서 호흡기 바이러스검사에 직접항원검사와 배양검사를 일차적으로 이용하지만, respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus, parainfluenza virus (PIV), adenovirus 등에만 국한되어 있다. 본 연구에서는 위의 전통적인 호흡기 바이러스뿐만 아니라 rhinovirus, coronavirus, human metapneumovirus (hMPV)의 검출을 위해 Seeplex™ RV Detection 키트(Seegene, Seoul, Korea)를 사용한 다중역전사 중합효소연쇄반응(multiplex reverse transcriptase-PCR, multiplex RT-PCR) 검사법의 진단적 유용성을 평가하였다.

방법 : 2007년 1월부터 5월까지 RSV, influenza virus, PIV, adenovirus에 대한 직접항원검사와 배양검사가 음성이었던 178개의 비인두흡인액을 Seeplex™ RV Detection 키트로 검사하였다. Seeplex™ RV Detection 키트에서 양성인 증폭산물을 직접 염기서열 분석하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI) 데이터베이스에서 가장 유사한 염기서열을 검색하였다. 환자의 임상정보는 전자의무기록에서 조회하였다.

결과 : 47검체(26.4%)가 양성이었으며, rhinovirus 18검체, hMPV 15검체, RSV A형 4검체, coronavirus OC43 3검체, influenza virus A형 3검체, adenovirus 2검체, coronavirus NL63 1검체, RSV B형 1검체 순이었다. Rhinovirus, hMPV, coronavirus OC43의 염기서열은 기존 보고된 바이러스주와 각각 94-98%, 96-99%, 98-100% 일치하였다. Seeplex™ RV Detection 키트를 사용하여 multiplex RT-PCR법으로 양성이었던 환자들의 나이는 0-11세였으며, 남녀비는 1.5:1이었다. Rhinovirus 양성이었던 환자는 폐렴 9명, 세기관지염 6명, 상기도염 2명, 천식의 급성 악화 1명이었으며, hMPV 양성이었던 환자는 폐렴 10명, 세기관지염 4명, 임상적 패혈증 1명이었고, coronavirus 양성이었던 환자는 폐렴 1명, 크룹 2명, 상기도염 1명이었다.

결론 : Seeplex™ RV Detection 키트를 사용한 multiplex RT-PCR법은 rhinovirus, hMPV, coronavirus 검출을 위한 신뢰할 만한 검사법이었으며, RSV, influenza virus, PIV,

adenovirus 등에 의한 호흡기 감염의 진단에 있어서 배양검사, 직접 항원검사보다 민감도를 높일 수 있을 것으로 판단하였다.

감사의 글

이 연구를 위해 Seeplex™ RV Detection 키트를 제공해 주고, 염기서열 분석을 지원해 준 (주)씨젠에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chretien J, Holland W, Macklem P, Murray J, Woolcock A. Acute respiratory infections in children. A global public-health problem. N Engl J Med 1984;310:982-4.
2. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. Am J Med 2002;112(S):S4-12.
3. Forbes BA, Sahm DF, et al. eds. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007:798-813.
4. Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, et al. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2007;45:2105-9.
5. Henrickson KJ. Cost-effective use of rapid diagnostic techniques in the treatment and prevention of viral respiratory infections. Pediatr Ann 2005;34:24-31.
6. Denny FW and Clyde WA Jr. Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children. J Pediatr 1986;108:635-46.
7. Kang JO, Kim EC, Lee KM, Lee NY, Lee CK. Surveillance for respiratory virus testing situation in Korea and epidemiology for the respiratory viruses detected in 5 university hospitals. Korean J Clin Microbiol 2007;10:102-8. (강정옥, 김의종, 이규만, 이남용, 이창규. 국내 의료기관의 호흡기 바이러스 검사현황 및 5개 대학병원에서 검출된 호흡기 바이러스 역학. 대한임상미생물학회지 2007;10:102-8.)
8. Kim SH, Huh JH, Bae SY, Kim JS, Yoon SY, Lim CS, et al. Epidemiology of respiratory viral infection in 2004-2006. Korean J Lab Med 2006;26:351-7. (김선형, 허지훈, 배숙영, 김장수, 윤수영, 임채승 등. 2004-2006년의 호흡기 바이러스 감염의 역학. 대한진단검사의학회지 2006;26:351-7.)
9. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. N Engl J Med 2004;350:443-50.
10. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. Clin Infect Dis 2006;43:585-92.
11. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1285-9.
12. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. Nat Med 2004;10:368-73.
13. Forbes BA, Sahm DF, et al. eds. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007:718-76.
14. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 2006;19:165-256.
15. Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 2007;45:3631-40.
16. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. J Clin Microbiol 2007;45:2965-70.
17. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. Nucleic Acids Res 2007;35:e40.
18. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004;5:150-63.
19. Tang YW and Crowe JE Jr. Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2007:1361-77.
20. Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 2007;45:2626-34.
21. Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid identification of 12 respiratory viruses with a multiplex PCR assay. Korean J Lab Med 2007;27(S):S526-7.
22. Landry ML. Rhinoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manu-

al of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2007;1405-13.

23. Mahony JB. Coronaviruses. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2007:1414-23.
24. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. Pediatr Infect Dis J 2004;23(S):S25-32.
25. Yoo SJ, Kuak EY, Shin BM. Detection of 12 respiratory viruses with two-set multiplex reverse transcriptase-PCR assay using a dual priming oligonucleotide system. Korean J Lab Med 2007;27:420-7. (유수진, 곽은영, 신보문. Dual priming oligonucleotide system을 이용한 다중 역전사 PCR 키트를 통한 12가지 호흡기 바이러스의 검출. 대한진단검사의학회지 2007;27:420-7.)
26. Krilov L, Pierik L, Keller E, Mahan K, Watson D, Hirsch M, et al. The association of rhinoviruses with lower respiratory tract disease in hospitalized patients. J Med Virol 1986;19:345-52.
27. McMillan JA, Weiner LB, Higgins AM, Macknight K. Rhinovirus infection associated with serious illness among pediatric patients. Pediatr Infect Dis J 1993;12:321-5.
28. Kim YK and Lee HJ. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections in korean infants and young children. Pediatr Infect Dis J 2005;24:1111-2.
29. Yeom HH, Park JS, Jeong DJ, Kim CJ, Kim YB, Lee DH, et al. Human metapneumovirus infection in Korean children. Korean J Pediatr 2006;49:401-9. (염희현, 박준수, 정동준, 김창진, 김용배, 이대훈 등. 소아에서 human metapneumovirus 감염. 대한소아과학회지 2006;49:401-9.)
30. Han TH, Chung JY, Kim SW, Hwang ES. Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004-2006. J Clin Virol 2007;38:27-31.
31. Leland DS and Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev 2007;20:49-78.
32. Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, et al. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. J Clin Microbiol 2007;45:2779-86.
33. Falsey AR, Formica MA, Treanor JJ, Walsh EE. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. J Clin Microbiol 2003;41:4160-5.