

신증후출혈열 환자의 혈청학적 및 분자생물학적 진단 검사법 비교

아산생명과학연구소, 서울보건대학 임상병리과*

우영대† · 문희주* · 배형준*

국문초록: 우리 나라에서 발생하고 있는 급성 출혈성 질환인 신증후출혈열의 원인 바이러스는 Family *Bunyaviridae*의 Genus *Hantavirus*에 속하는 한탄과 서울바이러스에 의하여 발생되고 있다. 본 연구에서는 신증후출혈열로 의뢰된 환자에서 한탄바이러스에 대한 항체를 간접면역형광항체법 (indirect immunofluorescent antibody technique, IFAT), 면역효소측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (IgG, IgM), 고비중입자응집반응 (high density composite particle agglutination, HDPA) 및 플라크감소중화시험 (plaque reduction neutralization test, PRNT) 등으로 비교 측정하였고, 신증후출혈열 환자로 확진된 15명의 한탄바이러스 혈청형을 PRNT와 혈청형 특이 역전사 효소 중합효소연쇄반응 (nested reverse transcriptase polymerase chain reaction, nested RT-PCR)으로 확인하였다. 신증후출혈열로 의뢰된 환자에서의 한탄바이러스에 대한 IFAT, ELISA (IgG, IgM), HDPA 그리고 PRNT 비교에서 형광항체, ELISA IgG, 응집항체 및 중화항체는 8명 모두 높게 나타났으며, ELISA IgM은 5명에서는 현저히 높은 항체를 보유하고 있었다. 신증후출혈열 환자 15명에서는 높은 형광항체와 중화항체 역가를 나타내었고, 15명 중 12명은 한탄바이러스, 2명은 서울바이러스에 대한 높은 중화항체를 갖고 있었으며, 1명은 두 바이러스에 대하여 동일한 항체 역가를 나타내었으며, 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR에서는 15명 중 3명과 1명만이 한탄바이러스와 서울바이러스 primer에 대해 RNA가 검출되었다.

서 론

신증후출혈열 (haemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)은 해마다 전세계적으로 수 십만 명의 환자가 발생하여 이 중 약 3~7%가 사망하는 질환으로 한국에서는 매년 수백 명의 환자가 민간인과 군인들에게서 발생하고 있는 급성 출혈성 질환이다¹³⁾.

신증후출혈열의 병원체인 한탄바이러스가 Lee와 Lee¹⁴⁾에 의하여 1976년 등줄쥐의 폐장조직에서 처음 발견된 이후 한탄바이러스와 신증후출혈열의 역학적 관계, 한탄바이러스의 생물학적, 분자생물학적 연구가 진전되었으며, 이 질병은 한국에서는 제2종 법정전염병으로 지정되어 국가에서

관리하고 있으나 아직까지 효과적인 치료약이나 치료법은 개발되지 못한 상태이다¹¹⁾. 1989년에는 병원에 입원한 중증의 신증후출혈열 환자 혈액으로부터 분리한 한탄바이러스 ROK 84~105주를 suckling mouse 뇌 내에서 다량으로 증식시킨 다음 바이러스를 순수하게 분리 정제한 후 0.05% 포르말린으로 불활화 시킨 예방백신 (ELISA; 10,240 units/ml)이 개발되었다¹²⁾.

신증후출혈열을 일으키는 원인 바이러스들은 혈청학, 전자현미경^{17,28)} 및 분자생물학 연구²⁰⁾에 의해 *Bunyaviridae* 科의 RNA 바이러스로 확인되었고, 현재는 새로이 확립된 *Hantavirus* 屬으로 분류되었으며, 러시아에서는 이 질병을 출혈성 신우신장염²⁴⁾, 중국에서는 songo열⁶⁾, 일본에서는 유행성출혈열⁹⁾, 스칸디나비아에서는 nephropathia epidemica¹⁹⁾, 동구라파제국에서는 epidemic nephritis 또는 epidemic haemorrhagic fever⁶⁾, 그리고 한국에서는 한국형출혈열²³⁾로 그간 불려졌으나 1984년

* 논문 접수 : 2000년 6월 5일

수정재접수 : 2000년 6월 30일

† 별책 요청 저자: 우영대

WHO 회의²⁹⁾에서 신증후출혈열 (HFRS)로 통일하였다.

신증후출혈열 감염시 발증하는 임상증상과 징후는 매우 다양하며, 주요 증상으로는 발열, 쇠약, 단백뇨, 출혈, 쇼크 및 신부전 등이 있고, 잠복기는 평균 2~3주이나 4일부터 42일까지 다양하다³⁾. 신증후출혈열 환자의 임상경과는 병태생리학적 양상에 따라 발열기 (3~7일), 저혈압기 (2일), 췌노기 (3~7일), 이노기 (수일-수주) 및 회복기 (2~3개월) 등의 5기로 나눈다¹⁰⁾. 신증후출혈열의 혈청학적 진단 법으로는 간접면역형광항체법 (indirect immunofluorescent antibody technique, IFAT)¹³⁾ 이 가장 널리 이용되고 있으며, 그 외에 면역효소측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)⁷⁾, 플라크감소 중화시험 (plaque reduction neutralization test, PRNT)⁴⁾, 혈구응집저지반응 (hemagglutination inhibition, HI)²¹⁾, 면역접착 적혈구응집반응 (immune adherence hemagglutination, IAHA)²⁵⁾ 및 western blot analysis¹⁶⁾ 등이 있다. 또한 면역활성물질에 부착력이 뛰어난 고비중입자 (high density composite particle, HDP)¹⁸⁾를 한탄바이러스 항원에 부착하여 신속하게 응집반응 (high density composite particle agglutination, HDP)을 시행하는 검사법이 개발되었다²⁶⁾. 그 외에도 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통한 시험관내에서의 DNA 증폭으로 항원 양이 매우 적어도 정확하게 검출할 수 있게 되었다²⁷⁾.

본 연구에서는 원인불명열 (fever unknown origin, FUO)로 내원한 환자에서 채혈하여 분리한 혈청을 한탄바이러스에 대한 IFAT, ELISA (IgG, IgM), HDP 그리고 PRNT 등의 검사를 시행하여 결과를 비교하였으며, 신증후출혈열로 확진된 환자에서는 PRNT와 혈청형 특이 역전사 효소 중합효소연쇄반응 (nested reverse transcriptase polymerase chain reaction, nested RT-PCR)을 이용하여 한탄바이러스 혈청형을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 혈 청

서울중앙병원에 입원하여 신증후출혈열로 의심되어 검사 의뢰된 8명과 신증후출혈열 환자로 확진된 15명의 혈청을 사용하였다. 채혈된 혈액은 원심분리 (400 xg, 10 min)하여 혈청을 사용 전까지 -80℃에 보관하였다.

2. 간접면역형광항체법 (IFAT)

IFAT로 한탄바이러스의 항체를 검사하기 위해 한탄과 서울바이러스 감염 Vero E6 (African green monkey kidney, ATCC-CRL 1586) 세포를 12~18시간 배양한 spot slide를 냉각 아세톤으로 10분 간 고정된 후 공기 중에서 건조시킨 다음 1차 반응은 각 well에 환자 혈청을 20 μl씩 가한 후 moist chamber에 넣어 36.5℃에서 30분 간 반응시켰다. 반응시킨 slide를 냉각된 인산완충식염수 (PBS; 0.01 M, pH 7.2)로 3회 세척하고, 증류수로 1회 씻은 다음 실온에서 건조시켰다. 2차 반응은 FITC goat anti-human IgG (KPL, USA)를 8~16 unit로 적정하여 20 μl씩 가한 후 1차 반응과 동일한 방법으로 반응시킨 후 세척과 건조하여 mounting media를 가하고 유리덮개를 덮어 형광현미경 (Zeiss, Germany)으로 특이 형광반응을 관찰 (×400) 하였다.

3. 효소면역측정법 (ELISA)

1) ELISA IgG

신증후출혈열 환자의 혈액에서 분리한 한탄바이러스 (ROK 84/105주) 항원을 인산완충식염수 (PBS; 0.01 M, pH 7.2)로 1:1000으로 희석하여 100 μl을 96-well polyvinyl U plate (Dynatech LAB, USA)의 각 well에 넣어 도포한 후 4℃에서 12~24시간 동안 놓아 두었다. 그 후 0.1% Tween 20을 첨가한 인산완충식염수로 3회 세척한 후 환자 혈청을 5% skim milk로 1:100부터 계단 희석하여 상기 well에 100 μl씩 분주하고 36.5℃에서 45~60분 간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척하여 1:1000으로 희석된 peroxidase-conjugated anti-human IgG (KPL, USA)을 100 μl씩 분주하여 반응시킨 후 세척하였고 기질용액 (KPL, USA) 100 μl을 가하여 36.5℃에서 30분간 반응한 후 ELISA 광량계 (MCC/340, Finland)로 405 nm 광파장에서 O.D. 값을 측정하였다.

2) ELISA IgM

한탄바이러스 ROK 84/105주를 suckling ICR mouse의 뇌에 접종하여 마비가 발생하는 6~8일 경에 뇌를 무균적으로 조작하여 일본뇌염 바이러스 백신의 제조법³⁰⁾에 따라 바이러스를 정제 불활화한 후 항원으로 사용하여 IgM-sandwich법⁷⁾으로 시행하였다. 인산완충식염수 (PBS; 0.01 M, pH 7.2)로 1:500으로 희석된 goat anti-human IgM

(Tago, USA) 100 μ l을 96-well polyvinyl U plate (Dynatech LAB, USA)의 각 well에 넣어 도포한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12~24시간 동안 방치하고 0.1% Tween 20을 첨가한 인산완충식염수로 3회 세척한 후 환자 혈청을 5% skim milk로 1:100부터 계단 희석하여 상기 well에 100 μ l씩 분주하고 36.5 $^{\circ}$ C에서 45~60분 간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척한 후 8~16 unit의 항원을 각 well에 100 μ l씩 분주하여 상기와 동일한 방법으로 반응시킨 후 세척하고 1:1000으로 희석된 hamster anti-Hantaan serum을 각 well에 100 μ l씩 분주하여 반응시킨 후 세척하였다. 1:1000으로 희석된 peroxidase-conjugated anti-hamster IgG (KPL, USA)을 100 μ l씩 분주하여 반응시킨 후 세척하였고 기질용액 (KPL, USA) 100 μ l을 가하여 36.5 $^{\circ}$ C에서 30분 간 반응한 후 ELISA 광광계 (MCC/340, Finland)로 405 nm 광파장에서 O.D. 값을 측정하였다.

4. 고비중입자응집반응 (HDP)

신증후출혈열의 원인 바이러스인 한탄바이러스의 항원을 불용성 담체입자 (HDP)에 감작시킨 항원과 검체내에서 존재하는 한탄바이러스 항체와의 항원-항체반응에 의한 응집현상을 관찰함으로써 검체내의 한탄바이러스에 대한 항체유무를 판정하는 진단시약인 한타디아 (HantadiaTM, (株) 녹십자, Korea)를 사용하여 제조회사에서 설명한 방법에 따라 실시하였다.

V형 96-well microplate (A&T Co, Tokyo)에 검사대상 혈청을 1:20으로 희석하여 처음 두 well에서 각각 25 μ l씩 분주하고 3번째 well부터 최종 well까지 계단 희석을 하였다. 한탄바이러스 항원으로 감작시키지 않은 대조 HDP액 25 μ l씩을 처음 well에 각각 분주하고 한탄바이러스 항원감작 HDP액을 2번째 well부터 최종 well까지 25 μ l씩 분주한 후 microplate를 microplate mixer를 사용하여 약 10초 간 교반한 후 60분 간 실온에 정치한 후 결과를 판독하였다.

5. 플라크감소중화시험 (PRNT)

중화항체의 존재와 그 역가를 측정하기 위하여 PRNT를 실시하였고, 환자 혈청의 최초희석배수는 1:10이었으며 다음 2배 계단 희석하여 최종 플라크감소 중화시험을 실시하였다. 희석된 검체 100 μ l에 200 plaque forming unit (PFU)의 한탄과 서울바이러스를 각각 동량 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C 냉장고

에서 16시간 환자 혈청을 이용하여 중화시킨 다음, 미리 준비한 6-well plate (LinbroTM, USA)에서 단층 배양한 Vero E6 세포에 시료를 100 μ l씩을 접종하여 36.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 60분 간 흡착시켰다.

혼합액을 흡착 후 1차 한천 중첩배지를 2 ml 첨가하여 굳힌 다음 36.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 7일 간 배양하고, 5% neutral red를 함유한 2차 한천 중첩배지를 1 ml 첨가한 후 2~3일에 걸쳐 나타나는 한탄바이러스의 플라크의 수를 계산하여 중화항체가를 결정하였다. 중화항체가는 바이러스 플라크를 50% 이상 감소시키는 혈청 희석배수의 역수로써 표시하였다.

6. 중합효소연쇄반응 (PCR)

바이러스 핵산을 추출하기 위하여 바이러스 원액 (HTNV: ROK 84-105, SEOV: HR 80-39) 150 μ l에 TRizol (GibcoBRL) 1 ml를 첨가하고 vortex로 잘 섞은 다음, 얼음에 5분 간 정치시킨 후 chloroform 200 μ l을 첨가한 후 잘 혼합시킨 뒤 원심분리 (10000 xg, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)하여 상층액을 분리하고, 여기에 isopropanol을 1 volume 첨가한 후 RNA 침전을 위하여 -80 $^{\circ}$ C에서 한 시간 이상 정치시킨 뒤 원심분리 (10000 xg, 4 $^{\circ}$ C, 20 min)하고, 침전된 RNA pellet을 75% ethanol로 세척한 후 vacuum dryer로 건조시킨 다음 10 μ l의 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-treated H₂O에 재현탁하여 사용하였다.

본 연구에서 nested RT-PCR에 사용한 2쌍의 primer들의 oligonucleotide sequence는 Table 1과 같다. 역전사과정에 사용한 primer와 1차 PCR에 사용한 MOF103과 MOR204 primer들은 한타바이러스屬의 3분절 유전자중 G1 당단백질의 유전정보를 가지는 M분절에서 유래되었으며¹⁾, 현재까지 발표된 한타바이러스屬에 속하는 바이러스들의 염기서열 중 보존이 가장 잘 되어 있어 모든 한타바이러스에서 상보성이 가장 높은 부위에서 선택하였고, nested RT-PCR에 사용한 한 쌍의 내부 혈청형-특이 primer들은 각종 한타바이러스의 nucleotide sequence 중 1차 PCR에 의하여 증폭된 상보 DNA내에서 각 혈청형이 보존이 잘 되어 있는 부위에서 선택하여 합성하였다³⁾.

DEPC-treated H₂O에 용해되어 있는 2가지 바이러스의 RNA 10 μ l에 1 μ l (1 pmole)의 primer MOF103 (Table 1)을 0.2 ml thin wall microtube에 첨가하여, 10분 간 70 $^{\circ}$ C에서 가열하여 불활화시

Table 1. Nucleotide sequences of *Hantavirus* genus-reactive and serotype specific primers

	Name	Nucleotide position	Primer sequence	Sense Products (bps)
Genus-specific	MOF103	1190-1212	5'>GGACCAGGTGCAGCTTGTGAAGC<3'	+ 490 bp
	MOR204	1661-1680	5'>ACCTCACAAACCATTGAACC<3'	-
HTNV	HTNG1F	1343-1362	5'>TGCAACGGGCAGAGGAAAGT<3'	+ 285 bp
	HTNG1R	1604-1625	5'>GTA CTGATTTTAGCCTATTCTC<3'	-
SEOV	SEOG1F	1343-1362	5'>TGTAATGGTCAGAAAAAGAC<3'	+ 289 bp
	SEOG1R	1607-1629	5'>CGTAGAATGGCTTTGAATCGGTT<3'	-

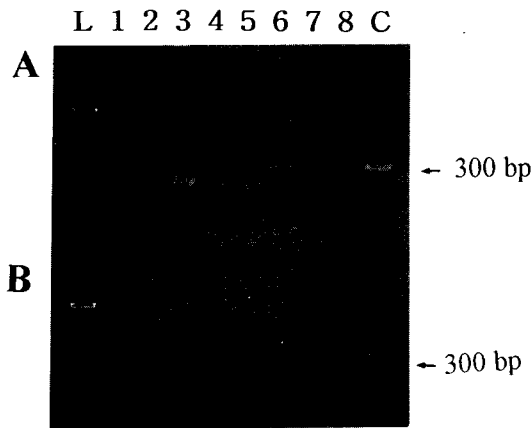


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of nested RT-PCR products. Nested RT-PCR products were obtained from the sera of patients with HFRS by using HTN (A) and SEO (B) serotype-specific primers. Lane L: 100 bp DNA ladder size marker, Lane C: Positive control, Lane 1 to 8: HFRS patients sera.

킨 다음 40℃로 식혀 바이러스의 RNA와 primer를 annealing시킨 다음 RNase inhibitor, 5× reverse transcriptase buffer, 2 mM dNTPs mixture, 0.1 M DTT, 10 unit MMLV reverse transcriptase, cDNA synthesis buffer를 첨가한 후 Gene cycler™ (Bio-Rad, Japan)를 이용하여 40℃에서 90분 간 그리고 95℃에서 5분 간 가열하여 총 20 µl의 한타바이러스 cDNA를 합성하였고 연속적으로 PCR을 실시하였다.

RT-PCR은 10 µl의 cDNA에 총 40 µl의 RT-PCR mixture를 첨가하여 실시하였다. RT-PCR은 Gene cycler™를 이용하여 30회의 thermal cycling step으로 증폭시켰다. Melting step은 94℃에서 30초, an-

nealing step은 50℃에서 30초, 그리고 extention step은 72℃에서 180초로 30 cycles를 반응시켰다²⁷⁾.

7. 혈청형 특이 역전사 효소 중합효소연쇄반응 (nested RT-PCR)

1차 증폭된 DNA를 혈청형 특이 primer를 이용하여 nested RT-PCR을 하였다. Hantaan virus primer (HTN G1F, HTN G1R) 및 Seoul virus primer (SEO G1F, SEO G1R)를 혈청형 특이 primer를 포함하는 nested RT-PCR mixture 48 µl을 1차 PCR 2 µl와 첨가하여 Gene cycler™를 이용하여 30회의 thermal cycling step으로 증폭시켰다. Melting step은 94℃에서 30초, annealing step은 50℃에서 30초, 그리고 extention step은 72℃에서 180초로 30 cycles를 반응시켰다.

8. 전기영동

Ethidium bromide를 포함하는 TAE buffer를 이용한 1.2% agarose gel에서 10× loading buffer 1 µl와 증폭된 DNA 9 µl을 30분 간 100 volt에서 전기영동하여, UV transilluminator (Model SL-20 DNA Image Visualizer, USA)를 이용하여 Polaroid 사진을 찍었고, DNA size marker로는 100 bp DNA size ladder (GibcoBRL)를 사용하였다 (Fig. 1, 2).

결 과

1. 신증후출혈열의 혈청학적 검사 성적 비교

신증후출혈열로 의심되어 검사 의뢰된 8명과 음성대조로 정상인 1명의 한타바이러스에 대한 IFAT, ELISA (IgG, IgM), HDPa 그리고 PRNT로 한타바이러스에 대한 항체 역가는 Table 2와 같

다. IFAT와 HDPA의 형광항체가와 응집항체가는 각각 1,024~32,324 그리고 1,280~40,960이었고, IFAT보다 감수성이 높은 ELISA IgG 및 재감염에 대한 면역성을 갖는 중화항체는 각각 800~51,200 그리고 40~2,560 사이로 8명 모두 높게 나타났으며, 발병초기 IgG 항체가 나타나기 전 또는 동시에 생성되었다가 조속히 소멸되는 ELISA IgM 은 IgM double sandwich법으로 각각 <100~51,200

사이로 1명에서는 음성으로 나타났고 2명을 제외한 5명에서는 현저히 높은 항체를 보유하고 있었다.

2. 신증후출혈열 환자에서 형광항체가와 중화항체의 비교

신증후출혈열로 확진된 15명의 환자혈청에 대한 한탄바이러스 (HTNV84-105)와 서울바이러스 (SEOV80-39)에 대한 형광항체와 중화항체의 역가는 Table 3과 같다. IFAT에 의한 신증후출혈열 환자의 한탄바이러스와 서울 바이러스에 대한 형광항체는 대부분 동일하였으며 4명의 환자 혈청에서 서울바이러스보다 한탄바이러스에 대한 형광항체가 2배 높았고 1명의 환자 혈청에서는 비교적 역가가 낮았지만 한탄바이러스 형광항체가 4배 높게 나타났다. PRNT에 의한 중화항체의 역가는 15명 중에서 12명은 한탄바이러스에 대해 중화항체가 높게 나타났고, 2명은 서울바이러스에 대해 중화항체가 높게 나타내어 뚜렷한 차이를 나타내어 혈청형 분석을 용이하게 하였으며 1명은 한탄바이러스와 서울바이러스에 대해 같은 역가를 나타내었다.

3. 중화항체와 nested RT-PCR에 의한 혈청형 분석

PRNT로 중화항체 역가와 nested RT-PCR로 신증후출혈열 환자의 혈청형을 비교한 결과는 Table 3

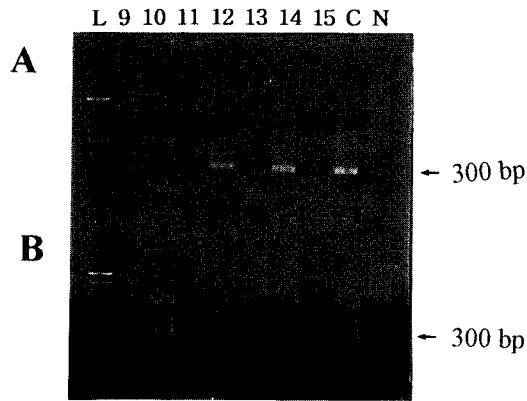


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of nested RT-PCR products. Nested RT-PCR products were obtained from the sera of patients with HFRS by using HTN (A) and SEO (B) serotype-specific primers. Lane L: 100 bp DNA ladder size marker, Lane C: Positive control, Lane N: Negative control, Lane 9 to 15: HFRS patients sera.

Table 2. Comparison of serological diagnostic tests from doubtful HFRS patients against Hantaan virus by IFAT, ELISA, HDPA and PRNT

Code no.	Patient no.	Antibody titers against Hantaan virus by				
		IFAT	ELISA IgG	ELISA IgM	HDPA	PRNT
1	KHF99-05	2,048	12,800	<100	5,120	1,280
2	KHF99-16	16,384	25,600	12,800	10,240	40
3	KHF99-27	4,096	6,400	12,800	10,240	160
4	KHF99-32	1,024	800	200	1,280	2,560
5	KHF99-52	8,192	3,200	100	10,240	40
6	KHF99-66	4,096	12,800	51,200	10,240	160
7	KHF99-80	2,048	3,200	51,200	5,120	640
8	KHF99-82	32,324	51,200	51,200	40,960	80
9	KHF99-30*	<32	<100	<100	<40	<10

*Negative control serum

Table 3. Comparison of IFAT, PRNT and nested RT-PCR test in differentiating virus serotype from the sera of patients with haemorrhagic fever with renal syndrome

Code no.	Patient no.	IFAT		PRNT		nested RT-PCR	
		HTNV	SEOV	HTNV	SEOV	HTNV	SEOV
1	KHF94-30	4,096	4,096	1,280	20	-	-*
2	KHF94-71	8,192	8,192	5,120	10	-	-
3	KHF94-108	4,096	2,048	5,120	20	-	-
4	KHF95-56	2,048	2,048	1,280	20	-	-
5	KHF95-219	256	256	80	1,280	-	-
6	KHF95-225	8,192	8,192	320	20	+	-
7	KHF96-39	256	256	1,280	10	-	-
8	KHF96-74	2,048	8,192	640	1,280	-	-
9	KHF96-129	2,048	2,048	1,280	10	-	-
10	KHF97-18	8,192	8,192	160	160	-	+
11	KHF97-176	16,384	8,192	10,240	10	-	-
12	KHF97-204	8,192	2,048	10,240	10	+	-
13	KHF98-4	4,096	2,048	5,120	160	-	-
14	KHF98-8	8,192	8,192	10,240	40	+	-
15	KHF98-127	128	32	2,560	160	-	-

*+: Hantaviral RNA detected from a patient's serum
 * -: Hantaviral RNA not detected from a patient's serum

및 Fig. 1, 2와 같다. PRNT에 의한 중화항체 역가로 15명의 환자 중 12명은 한탄바이러스 그리고 2명은 서울바이러스 혈청형으로 분석할 수 있었고, 1명은 한탄바이러스와 서울바이러스에 대한 중화항체가 동일하게 나타났으며, nested RT-PCR로 신증후출혈열 환자의 혈청형을 비교한 결과는 15명 중 3명은 한탄바이러스 그리고 1명은 서울바이러스 RNA가 검출되었으며, 11명의 신증후출혈열 환자 혈청에서는 한탄바이러스 RNA가 검출되지 않아 확인되지 않았다.

고 찰

전형적이고 심한 임상증상을 나타내는 신증후출혈열 환자는 임상진단이 용이하나 혈청학적 진단법이 확립되기 이전의 신증후출혈열의 진단은 유사한 증상을 나타내는 다른 질병이나 전형적인 증상과는 다소 다른 혹은 보다 경미한 증상에 대해서는 오진하는 경우가 많았던 것이 사실이다.

그리하여 환자의 조기진단 및 적절한 치료를 위하여 정확하고 신속한 혈청학적 진단이 요구된다.

혈청학적 진단은 항원-항체간의 특이적인 결합으로, 원인항원의 자극을 받아 생성된 혈청내 항체를 검사하여 질병을 검사하는 것으로서, 특정항원을 사용하여 항체를 검출하는 것은 특이성이 매우 높고 민감도 또한 매우 높아서 미량의 항체까지도 검출할 수 있고, 분자생물학적 방법으로는 1 PFU의 바이러스를 확인할 수 있는 민감도와 다른 혈청형에 속하는 바이러스들에는 반응을 하지 않는 특이성을 갖고 있다.

신증후출혈열 환자에서 발병직후부터 간접면역형광항체, ELISA 항체 및 중화항체가 나타나며 발병 2주~3주경에 최고치에 달한다. 가장 간단한 혈청학적 진단법은 1주일 간격으로 2회 채취한 혈청에서 항체증가를 IFAT나 ELISA로 증명하는 것이다. 또한 발병 초기 혈청과 회복기 혈청을 모두 채취할 수 없는 경우에는 초기 혈청 하나만으로도 한탄바이러스에 대한 IgM 항체를 측정하

여 추정진단을 내릴 수 있다. 또한 별도의 장비나 시약이 필요 없으며 반응시간이 짧고 판독이 용이하여 일반 임상 검사실에서도 쉽게 사용할 수 있는 HDP가 이용되고 있으며²⁵⁾, 혈청형 특이 primer를 사용하는 nested RT-PCR은 기존의 IFAT으로는 검출할 수 없었던 바이러스 항원을 한타바이러스 혈청형에 따라 검출할 수 있다³⁾.

신증후출혈열로 의심되어 검사 의뢰된 8명의 혈청을 대상으로 한타바이러스에 대한 IFAT, ELISA (IgG, IgM), HDP 그리고 PRNT를 수행한 결과 한타바이러스에 대한 항체 역가는 각각 1,024~32,324, 800~51,200, 1,280~40,960 그리고 40~2,560 사이로 8명 모두 현저히 높게 나타났으며, 발병 초기 IgG 항체가 나타나기 전 또는 동시에 생성되었다가 조속히 소멸되는 ELISA IgM은 각각 <100~51,200 사이로 그 중 5명에서는 높은 항체를 보유하고 있어 현증 환자로 보여진다.

IFAT와 HDP는 일치율 (% agreement)이 98.3%이며²²⁾, 현재 신증후출혈열 임상진단에 유용하게 이용되고 있으나 IFAT는 조직배양 시설과 형광현미경 등 특별한 시설이 필요하고, 비특이적인 반응이 나타나 검사자의 숙련이 요구되고 있으며, 이에 반해서 HDP는 특별한 시설이 필요 없고, 조작이 간단하여 1시간 내에 결과를 알 수 있는 조기진단 시스템으로 사료된다. ELISA는 시약과 장비가 필요하나 간단하고 민감도가 높아 IgG 및 IgM을 동시에 비교 조사하여 환자의 신속한 진료에 도움을 줄 수 있으나 검사법 표준화를 위하여 다량의 항원 확보가 불가피하다. PRNT는 민감도가 대단히 높고 혈청형을 구별할 수 있으나 검사시일이 2주일 이상 걸리며 고도의 조직배양 기술을 요하기 때문에 쉽게 이용될 수 없는 것이 큰 단점으로 지적된다.

우리 나라에서 발생하는 신증후출혈열 환자의 대부분은 등줄쥐와 집쥐 또는 곰취가 숙주인 한타바이러스와 서울바이러스에 의해 발병을 하고 있다. 서울중앙병원에서 신증후출혈열 환자로 확진된 15명의 혈청으로 IFAT과 PRNT 그리고 nested RT-PCR로 분석, 비교한 결과 대부분 한타바이러스와 서울바이러스에 대해 높은 형광항체를 나타내었으며 또한 동일하거나 2배의 많은 교차 반응을 보였고, 중화항체가에서는 한타바이러스와 서울바이러스에 대해서 뚜렷한 혈청형을 구분할 수 있어 15명 중 12명은 한타바이러스에 대해 서울바이러스보다 높은 중화항체를 보였고,

2명만이 서울바이러스에 대해 높은 중화항체를 보였으며, 또한 1명은 한타바이러스와 서울바이러스에 대한 중화항체가 동일하였다.

nested RT-PCR에서는 15명 중 3명과 1명만이 각각 한타바이러스와 서울바이러스 primer에 의해 RNA가 검출되었으나 나머지 11명은 RNA가 검출되지 않았으며, 이는 대부분의 검사 혈청이 발병 후 1주일 이상 경과한 시점에 의뢰된다는 점에서 발병 초기에 혈액 중에 나타나는 바이러스 혈증(viremia)이 지났음을 시사하며, 우리 나라의 신증후출혈열 환자는 대부분 야생 등줄쥐가 전파하는 한타바이러스에 의한 것으로 사료된다.

따라서 신증후출혈열의 신속한 진단과 연구 목적에 따라 혈청학적 및 분자생물학적 특징을 고려하여 가장 바람직한 방법을 선택하는 것도 중요한 사안이라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Antic D, Lim BU and Kang CY (1991): Molecular characterization of the M genomic segment of the Seoul 80-39 virus: nucleotide and amino acid sequence comparisons with other *Hantaviruses* reveal the evolutionary pathway. *Virus Res*, **19**: 47-58.
- 2) Byrne BC, Li J, Sninsky J and Poiesz BJ (1988): Detection of HIV1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, **16**: 4165.
- 3) Chu YK and Lee HW (1997): Discrimination of *Hantaviruses* from the tissues of infected hamsters to 5 different serotype *Hantaviruses* by nested RT-PCR using *Hantavirus* serotype specific primers. *J Korean Soc Virol*, **27**: 49-57.
- 4) Chu YK, Rossi C, LeDuc JW, Lee HW, Schmaljohn CS and Dalrymple JM (1994): Serological relationships among viruses in the *Hantavirus* Genus, Family *Bunyaviridae*. *Virology*, **198**: 196-204.
- 5) Earle DP (1954): Symposium on epidemic haemorrhagic fever. *Am J Med*, **16**: 617-709.
- 6) Gaon J, Karlovac M, Gresikova M, Hlaca D, Rukavania J, Kuezevic V, Saratlic-Savic D and Vampotic A (1968): Epidemiological features of haemorrhagic fever. *Folia Med Fac Med Univ Sarav*, **3**: 24.

- 7) Goldgaber D, Gibbs Jr.CJ, Gajdusek DC and Svedmyr A (1985): Definition of three sero types of *Hantaviruses* by a double sandwich ELISA with biotin avidin amplification system. *J Gen Virol*, **66**: 1733-1740.
- 8) Ishii S, Ando K, Watanabe N, Murakami R, Nagayama T and Ishikawa T (1942): Studies on Songo fever. *Jap Army Med J*, **335**: 1755.
- 9) Kasahara S, Kitano M, Kikuchi H, Sakyuama M, Kanazawa K, Nezu N, Yoshimura M and Kudo T (1944): Studies on pathogen of epidemic haemorrhagic fever. *J Jap Pathol*, **34**: 3.
- 10) Lee HW (1982): Haemorrhagic fever with renal syndrome, history, Hantaan virus and epidemiologic features. *Scan J Infect Dis Supple*, **36**: 82-85.
- 11) Lee HW (1986): Global distribution and molecular biological characteristics of *Hantavirus*. *J Kor Soc Virol*, **16**: 1-5.
- 12) Lee HW and Ahn CN (1988): Development of vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome. *J Kor Soc Virol*, **18**: 143-148.
- 13) Lee HW and Dalrymple JM (1989): Manual of haemorrhagic fever with renal syndrome. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (HFRS). Institute for viral disease: 13-17.
- 14) Lee HW and Lee PW (1976): Korean haemorrhagic fever I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Internal Med*, **19**: 371-383.
- 15) Lee HW, Lee PW and Johnson KM (1978): Isolation of the etiologic agent of Korean haemorrhagic fever. *J Infect Dis*, **137**: 298-308.
- 16) Lee PW and Lee HW (1989): Use of Western blotting for detection of *antiHantavirus* antibody and differential diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome. *J Kor Soc Virol*, **19**: 91-99.
- 17) McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL and Kiley MP (1984): Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the *Bunyaviridae*. *Lancet*, **i**: 765-768.
- 18) Mitani K (1989): 新素材を用いた免疫學的凝集反應. *化學と生物*, **27**: 216-217.
- 19) Myhrman G (1951): Nephropathia epidemica, a new infectious disease in Northern Scandinavia. *Acta Med Scand*, **140**: 52.
- 20) Schmaljohn CS and Dalrymple JM (1983): Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of *Bunyaviridae*. *Virology*, **131**: 482-491.
- 21) Seong IW, Song KJ, Park DW and Lee HW (1986): Serologic differential diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan and Seoul viruses by hemagglutination inhibition test. *J Kor Soc Virol*, **16**: 121-129.
- 22) Song KJ, Baek LJ and Lee HW (1991): Comparative study of serologic diagnostic tests against Hantaan virus. *J Kor Soc Virol*, **21**: 87-103.
- 23) Smadel JE (1951): Epidemic haemorrhagic fever. *Am J Publ Hlth*, **43**: 1327-1330.
- 24) Smorodintsev AA, Aunaevkii MI, Kakhreidze KA, Neustroev VD and Churilov AU (1944): Etiology and clinics of haemorrhagic nephrosonephritis. *Moscow Medgiz*, 26.
- 25) Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, Shiga S, Akao Y, Komatsu T and Kitamura T (1984): An immune adherence assay for discrimination between etiologic agents of haemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*, **149**: 67-73.
- 26) Tomiyama T and Lee HW (1990): Rapid serodiagnosis of *Hantavirus* infections using high density particle agglutination. *Arch Virol*, (**suppl 1**): 29-33.
- 27) White BA (1993): PCR protocol, current methods and application, *Methods in molecular biology*, Humana press, Totowa, New Jersey.
- 28) White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW, Brand OM and Lee HW (1982): Hantaan virus, aetiologic agent of Korean haemorrhagic fever, has *Bunyaviridae* like morphology. *Lancet*, **i**: 768-771.
- 29) WHO Report (1982): Report of the working group on haemorrhagic fever with renal syndrome. *Tokyo WHO/WPR/RPD/WG*, **82**: 16.
- 30) Yanagizawa G (1976): Preparation of Japanese encephalitis vaccine, pp. 80-85. 2nd Ed., National Institute of Preventive Medicine and Hygiene, Tokyo.

=Abstract=

**Comparative Diagnostic Studies on Serologic and Molecular Biological Tests
Against Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome**

Young-Dae Woo[†], Hi-Joo Moon* and Hyung-Joon Bae*

Department of Virology, Asan Institute for Life Science, Seoul 138-736, Korea

*Department of Medical Technology, Seoul Health College, Sungnam, 461-713, Korea**

The etiologic agents of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Korea are Hantaan and Seoul virus in the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*. Antibody titers of sera from HFRS patients against Hantaan virus were measured by immunofluorescent antibody technique (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), high density composite particle agglutination (HDPa) and plaque reduction neutralization test (PRNT). PRNT and nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested RT-PCR) was used for serotypic differentiation of *Hantaviruses* against Hantaan and Seoul virus. Eight doubtful HFRS patients showed higher fluorescent, IgG ELISA, agglutination and neutralizing antibody titer by IFAT, ELISA IgG, HDPa and PRNT, respectively. Five out of them showed high IgM antibody titer by IgM capture ELISA against Hantaan virus, remarkably. Fifteen HFRS patients showed higher fluorescent antibody titer by IFAT. In PRNT, 12 out of them showed high neutralizing antibody titer against HTNV, 2 against SEOV and 1 against both viruses. In nested RT-PCR using serotype specific-primer, 3 out of them showed positive against HTNV and 1 against SEOV.

Key Words: HFRS, IFAT, ELISA, HDPa, PRNT, nested RT-PCR

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(2): 141-149, June, 2000]

[†] Corresponding author