

무균성 뇌막염과 뇌염으로 입원한 성인 환자 뇌척수액에서 중합효소 연쇄반응에 의한 HSV, VZV, HHV-6의 검출

이화여자대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학연구소 분자생물학부
박혜경 · 우소연 · 김현진 · 정영해

=Abstract=

Detection of Herpes Simplex Virus, Varicella-Zoster Virus and Human Herpes Virus-6 by PCR in Cerebrospinal Fluid from Hospitalized Adult Patients with Aseptic Meningitis or Encephalitis

Hae-Kyung Park, So-Youn Woo, Hyun-Jin Kim and Young-Hae Chong

*Department of Microbiology, College of Medicine, and Division of Molecular Biology,
Medical Research Center, Ewha Womans University, 911-1, Mok-6-Dong,
Yangcheon Ku, Seoul 158-056, Korea*

Herpes simplex virus, Varicella zoster virus and Human herpes virus-6 caused central nervous system infections and latent infections but there is no data of the 3 viruses being tested from the same cerebrospinal fluid samples with aseptic meningitis or encephalitis in adults patients. These viruses produced similar neurologic symptoms but difficulties existed in differentiating of etiologic agents and therefore the viruses needed to be detected in the early state.

Herpes simplex virus encephalitis (HSVE) in adults, if not treated promptly was fatal. If treated with antiviral drugs in the early phase of encephalitis, neurologic sequales decreased by 65%. Recently, a PCR method for detection of HSVE with CSF was developed. VZV primary and secondary infections caused neurologic symptoms of encephalitis or meningitis. The second frequency of adult encephalitis that caused VZV were reported. HHV-6 caused CNS latent infection that was studied with normal adults brains.

But there is no data of HSV, VZV and HHV-6 for aseptic meningitis and encephalitis of Korean adults through etiologic study.

We cultured CSFs on HEp-2 cells and simultaneously tested for HSV PCR, VZV nested PCR and HHV-6 PCR with 8 specific primers.

The PCR results of CSF from meningitis Korean adults were 13/19 (68.4%) for HSV, 10/19 (52.6%) for VZV and 12/19 (63.2%) for HHV-6. 7/19 (36.8%) cases were triple infected HSV PCR, VZV PCR and HHV-6 PCR positive; 3/19 (15.8%) cases were dual infected HSV PCR and HHV-6 PCR positive; 1/19 (0.5%) cases was VZV PCR positive. Strong viral DNA amplification of CSF means a causative virus may be present in aseptic meningitis or encephalitis patients and may cause clinical neurologic symptoms. HSV and HHV-6 viruses detection rate were higher than VZV by PCR with CSFs.

Key Words: HSV PCR, VZV nested PCR, HHV-6 PCR aseptic meningitis, CSF

접수: 2000년 10월 16일, 논문게재확정: 2000년 12월 12일

*; 책임저자: 박혜경, 158-056, 서울시 양천구 목6동 911-1, 이화여자대학교 의과대학 미생물학교실
전화: (02) 650-5737, FAX: (02) 653-8891

서 론

사람에 질병을 일으키는 헤르페스바이러스과 (Herpesviridae)에 속하는 단순포진바이러스 1형 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1), 단순포진바이러스 2형 (Herpes simplex virus type 2, HSV-2), 수두 대상포진바이러스 (Varicella-Zoster virus, VZV), 사람 헤르페스바이러스 6 (Human herpes virus 6, HHV-6)는 중추신경계통 (central nervous system, CNS)에 감염을 일으키며 이들 바이러스들은 또한 잠복감염 (latent infection)을 나타낸다.

이들 바이러스의 CNS 감염에 의해 나타나는 임상증세는 바이러스 종류에 따라 특이적으로 구별되지 않기 때문에, 원인 바이러스를 규명하기 위해서는 세포배양과 혈청학적 검사가 필수적이다. 또한 이들 바이러스에 의한 뇌막염 또는 뇌염의 증세를 나타내어 입원한 성인 환자에서 정확한 원인체의 진단이 필요하다. 바이러스 종류에 따른 특이 치료제인 acyclovir, gancyclovir, foscarnet 등의 선택이 절실히 요구되기에 이에 관한 연구가 필요하다 (14).

단순포진바이러스 뇌염 (herpes simplex virus encephalitis, HSVE)는 질환이 진행되어 뇌괴사 (cerebral necrosis)와 부종 (edema) 등이 나타나므로, Whitley와 Gnann (27)은 acyclovir로 치료하면 환자의 65%에서 신경학적 결함이 나타나지 않았으며 단지 약한 장애만이 남는다고 약제효과를 보고하였다. 또 Guffond 등 (13)은 HSVE는 치료하지 않으면 70%의 사망률을 나타낸다고 하였다. 우리나라에서도 현재 acyclovir 등의 항바이러스제를 사용하고 있으나 이에 대한 치료효과의 보고는 아직 없다. Whitley와 Lakeman (28)은 HSVE의 발병빈도는 미국의 경우 매년 인구 100만 명당 1~4명이라는 보고가 있으나 이에 대한 우리나라의 연구 보고는 거의 없는 실정이다.

최근에 Lakeman 등 (15)은 뇌염 환자에서 뇌생검을 시행하여 HSVE로 확진된 54예에서 다시 이들 검체를 가지고 PCR 방법을 응용하여 53예에서 HSV DNA를 검출하였다. PCR의 예민도는 98% (53/54)이었다. 이 연구는 비침습적인 방법으로 뇌척수액 (Cerebrospinal fluid, CSF) 검체를 이용한 PCR 방법이 예민도가 높기 때문에, HSVE의 진단에서 침습적인 뇌생검 대신 PCR 방법으로 대처할 수 있음을 증명해 주었다. 그 후 Cinque 등 (7)

과 Mitchell 등 (19)이 HSVE 진단을 위한 PCR법을 이용한 연구를 계속 발전시켜, 현재 HSVE 진단에 도움을 주게 되었다. 그러나 우리나라에서는 아직 성인 뇌막염 환자에서 PCR로 HSVE를 확인한 보고는 없었다.

수두 대상포진바이러스는 사람에서 신경학적 질환을 일으키며 다른 바이러스성 뇌막염과 비슷한 증세를 나타낸다 (4). VZV의 초도감염과 재발은 신경학적 감염과 질환을 일으킨다. VZV 감염에 동반되는 신경학적 증세는 비정상적 면역반응으로 인한 결과로 일어나는 가장 흔한 증세는 소뇌의 ataxia이다. 또한 신경조직에서 바이러스 증식을 나타내는 직접적인 효과인 활성화 (reactivation)에 의해서도 VZV는 질환을 일으킨다. VZV는 혈행을 통해서 또는 이 바이러스가 잠복상태로 있던 sensory ganglia로부터 직접 전파되어 신경계통에 도달하는 경로를 취하게 된다. 피부에 발진이 없는 대상포진 환자에서도 급성 뇌염, 무균성 뇌막염, 수막염은 가장 흔한 질환으로 나타난다고 보고 (17)되어 있다. 대상포진바이러스 뇌염 (VZV encephalitis, VZVE)의 초기 진단은 CSF 검체에서 PCR 방법으로 바이러스의 특이 sequence의 검출이 가능하다고 Puchhammer-Stockle 등 (22)이 처음으로 보고하였다. VZVE는 HSVE와는 다르게 주로 연령이 많은 노인층이나 면역억제 상태인 사람에서 호발하며, 정상의 소아와 젊은이에게서는 드물다고 보고 되어 있다. 다른 나라의 경우 성인 바이러스성 뇌막염 환자 중에서 33%가 VZV에 의한다고 보고 되어있는 발생빈도가 높은 바이러스이나, 우리나라에는 아직 이에 대한 보고가 없었다. Cacas 등 (5)은 면역학적으로 정상인 뇌염 환자의 CSF에서 HSV와 VZV의 이중 증폭 (double amplification)을 검출하여서 이중 바이러스 감염으로 보고하였다.

사람 헤르페스바이러스 6 (Human herpes virus-6, HHV-6)는 소아의 rosella의 원인체로 1988년 Yamanishi 등 (29)이 처음으로 동정한 바이러스이다. HHV-6는 역학적 연구에서 사람이 1~3세에 이르면 거의가 바이러스 항체를 보유하게 되는 흔히 존재하는 바이러스인데 우리나라에서는 뇌막염 환자에서 이에 대한 연구가 없었다. 영아기에 이 감염은 대부분 자연적으로 치유되나 rosella 환자의 몇몇 경우는 바이러스가 열성 발작을 일으키며 meningoencephalitis, encephalopathy를 일으킨다는 Asano 등 (3)의 보고가 있다. 성인

에서도 HHV-6가 발견되었는데 Luppi 등 (16)은 신경학적으로 정상인 성인의 뇌에서도 사후 부검 검체를 사용하여 PCR 방법으로 HHV-6 DNA를 검출하여 잠복감염의 가능성에 대한 연구를 보고하였다. HHV-6의 감염 후 특히 면역기능이 저하된 환자들에서는 폐렴 (9), 뇌염 (10) 등이 발병하며 골수이식 실패 (11)가 흔하다는 보고들도 있다. 그러므로 본 연구에서는 성인 뇌막염 환자에서 HHV-6에 의한 CNS 감염에 대한 연구를 하고자 하였다.

우리나라의 바이러스성 뇌막염 또는 뇌염의 증세를 나타내어 입원한 성인 환자에서 원인 바이러스를 규명하고자 시도한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 성인에서 뇌막염과 뇌염을 일으키는 DNA 바이러스 중 발생빈도가 크다고 외국에서 많이 보고된 단순포진바이러스 (4,5,7,28), 수두 대상포진바이러스 (5)와 사람 헤르페스바이러스 6 (3)를 택하여, 뇌막염 또는 뇌염의 증세로 입원한 성인 환자의 CSF에서 이 3가지 바이러스의 발생빈도를 연구하고자 하였다. 본 연구는 우리나라의 성인에서 바이러스성 뇌막염과 뇌염을 일으키는 HSV, VZV, HHV-6 중 흔한 바이러스의 종류와 동시에 환자의 연령과 성별을 분석하여 바이러스 질환의 진단과 역학적 가치가 크다고 생각되었다. 바이러스성 뇌막염과 뇌염 증세로 입원한 성인 환자의 CSF를 가지고 분자생물학적 진단 방법인 polymerase chain reaction (PCR)으로 HSV, VZV, HHV-6 DNA를 검출하여 이중 (double) 또는 삼중 (triple) 감염의 빈도를 측정하고자 한다. 이전의 각기 다른 primer를 사용하여 동시에 3가지 바이러스 검출을 위한 이러한 연구는 거의 없었으며, 또한 성인 환자에서의 바이러스에 의한 뇌막염과 뇌염에서 HHV-6를 검출하고자 하였던 연구는 국내외에 없었다.

재료 및 방법

1. 검체 수집

이화여자대학교 의과대학 목동병원 신경내과에 1999년 1월부터 10월 사이에 무균성 뇌막염과 뇌염으로 진단받고 입원하였던 성인 환자를 대상으로 하였다. 환자의 뇌척수액을 무균적으로 채취, 소분하여 -20℃에 보관 후 실험에 사용하였다.

2. 뇌척수액에서 monoclonal 항체를 이용한 효소면역측정법으로 3가지 바이러스 항원 검출

1) 뇌척수액 검체에서 Herpes simplex virus 항원 검출

입원한 성인 뇌막염 또는 뇌염 환자의 뇌척수액을 1:50으로 carbonate buffer로 희석하여 EIA 평판에 coating 하였다. 4℃에서 16시간 방치한 후 PBS-tween 용액으로 3회 세척하였다. Herpes simplex virus monoclonal 항체 1:5000 (Chemicon MAB 821, USA)으로 37℃에서 2시간 방치한 후 PBS-tween 용액으로 3회 세척하였다. Goat antimouse IgG peroxidase conjugate 1:1000을 첨가하여 37℃ 2시간 방치 후 세척하였다. Substrate로 orthophenylene diamine (OPD)를 넣어 빛을 차단한 상태로 30분간 정치하였다. 2N H₂SO₄를 넣어서 발색을 차단하고 490 nm spectrophotometer에서 판독하여 negative mean OD ± 3SD로 OD 0.2 이상을 양성으로 판독하였다.

2) 뇌척수액 검체에서 Varicella-Zoster virus 항원 검출

1)의 방법과 동일하며 VZV monoclonal 항체 1:200 (Chemicon MAB8614, USA)를 사용하였다.

3) 뇌척수액 검체에서 Human herpes-6 virus 항원 검출

1)의 방법과 동일하며 HHV-6 monoclonal 항체 1:150 (Chemicon MAB8532, USA)를 사용하였다.

3. 뇌척수액 검체를 HEp-2 cell에 배양

CSF 검체를 HEp-2 세포에 filter로 여과하여 접종한 후 37℃에서 1시간 방치 후 CSF를 버리고 PBS로 세척하고 RPMI1640을 첨가하여 배양하였다. 1주일간 5% CO₂ incubator에서 배양하여 CPE를 확인 후 세포를 수거하여 PBS로 1회 세척 후 cell pellet에서 DNA를 추출하였다. 동시에 교실에 보관중인 HSV, VZV, HHV-6를 같은 조건으로 배양하여 immunofluorescent stain으로 확인 후 양성대조로 사용하였다.

4. 뇌척수액 검체에서 중합효소 연쇄반응 (PCR)에 의한 Herpes simplex virus (HSV)의 검출

환자의 CSF를 HEp-2 cell에 배양하여 CPE를 나타낼 때 수거하여 DNA를 Qiagen kit (Germany)로 추출하였다. Cohen 등 (8) 방법을 변형하여 10X PCR buffer, MgCl₂, primer KS 30, primer KS 31을

각각 12.5 pmole, sample DNA, dNTP 200 μM, *Taq* 2 μ를 얼음 위에서 혼합하였다. Thermocycler에서 96℃ 2분, 96℃ 1분, 55℃ 1분 15초로 37 cycle 후 72℃ 3분 연장하여 4℃에 정치하였다. Ethidium bromide가 함유한 3.3% NuSieve agar에 12 μl의 PCR 산물을 전기영동하여 UV lamp 아래에서 polaroid film으로 찍어 390 bp의 PCR 산물을 확인하였다.

5. 뇌척수액 검체에서 종합효소 연쇄반응 (PCR)에 의한 Varicella Zoster virus (VZV)의 검출

환자의 CSF를 HEp-2 cell에 배양하여 CPE를 나타낼 때 수거하여 DNA를 Qiagen kit로 추출하였다. 박과 서 (1)의 방법을 변형하여 10X PCR buffer, MgCl₂, primer 1, primer 2, primer 3, primer 4를 사용하여 nested PCR을 시행하였다. sample DNA, dNTP 200 μM, *Taq* 1.7 μ를 사용하였다. Thermocycler에서 94℃ 1분, 90℃ 30초, 62℃ 1분, 72℃ 3분으로 35 cycle 후 72℃ 3분 연장하여 4℃에서 정치하였다. Ethidium bromide가 함유된 2.9% NuSieve agar에 10 μl PCR 산물을 전기영동하여 UV lamp 아래에서 polaroid film으로 찍어 447 bp를 확인하였다.

6. 뇌척수액 검체에서 종합효소 연쇄반응 (PCR)에 의한 Human Herpes Virus 6 (HHV-6)의 검출

환자의 CSF를 HEp-2 cell에 배양하여 CPE를 나타낼 때 수거하여 DNA를 Qiagen kit로 추출하였다. Gopal 등 (12)의 방법을 변형하여 10X PCR buffer, MgCl₂, primer H6-6, primer H6-7을 사용하여 sample DNA, dNTP 200 μM, *Taq* 2 μ를 사용하였다. Thermocycler에서 94℃ 1분, 94℃ 15초, 55℃ 15초, 72℃ 30초로 35 cycle 후 72℃ 3분 연장하여 4℃에서 정치하였다. Ethidium bromide가 든 3.3% NuSieve agar에 25 μl PCR 산물을 전기영동하여 UV lamp 아래에서 polaroid film으로 찍어 223 bp를 확인하였다.

결과 및 고찰

1999년 1월부터 10월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 신경과에 입원한 19명의 무균성 뇌막염과 뇌염의 증세로 입원한 성인 환자의 뇌척수액을 HSV, VZV, HHV-6의 DNA를 PCR 또는 Nested PCR 방법으로 검출하였다.

Table 1에서와 같이 19명의 성별은 M:F=12:7이었다. 연령은 13~67세 (평균 32.5세)이었다. Herpes simplex virus가 PCR 방법으로 검출된 예는 13/19 (68.4%)이었다. 이중 C10, C12, C13의 경우는 강한 390 bp의 band를 나타내었다 (Figure 1).

Varicella Zoster virus가 Nested PCR 방법으로 검출된 예는 10/19 (52.6%)이었다. 이중 C1, C6, C7, C9의 경우 강한 447 bp의 band를 나타내었다 (Figure 2).

Human herpes virus-6가 PCR 방법으로 검출된 예는 12/19 (63.2%)이었다. 이중 C6, C10, C12의 예에서는 강한 223 bp의 band를 나타내었다 (Figure 3).

무균성 뇌막염, 뇌염 환자의 CSF에서 PCR 방법으로 검출시 HSV, HHV-6의 감염이 VZV 보다 빈도가 큰 것 같다. HSV, VZV, HHV-6 virus가 동시에 검출된 예는 7/19에 (36.8%)이었다. HSV와 HHV-6가 동시에 검출된 예는 3/19에 (15.8%)이었고, VZV가 검출된 예는 1/19에 (0.5%)이었다. HHV-6가 단독으로 검출된 예는 2/19에 (10.5%)이었다.

이중감염을 나타낸 C4, C12, C17은 입원일수가 각각 10일, 15일 28일이었고 삼중감염을 나타낸 C1, C7은 입원일수가 35일, 24일이었다 (Table 1).

PCR band가 강한 경우는 표준균주 또는 다른 검체들보다 강한 경우를 말하며 정량을 못하였다. HSV, HHV-6의 경우 표준균주 보다 강한 PCR band는 CSF에서 발견되지 않았다. VZV의 경우는 nested PCR 방법을 사용하였기에 표준균주만큼 강하게 나타내었다. HHV-6 PCR 방법이 가장 약한 PCR band를 나타내었다.

단순헤르페스바이러스 뇌염 (Herpes simplex virus encephalitis, HSVE)은 중추신경계통에 증세를 나타내는 가장 흔한 바이러스 질환으로 치료하지 않으면 치명적이라고 1977년 Whitley 등 (25)이 처음으로 보고하였다. 1986년 Whitley 등 (26)은 효과적인 항바이러스 약제인 acyclovir를 HSVE의 질병 초기에 사용시 가장 효과적이라고 밝혔다. 그러므로 HSVE의 진단은 초기에 빠른 확인이 필요하다. 원인체인 HSV에는 2가지 type의 바이러스가 있는데 특히 HSV type 1은 성인에게 HSVE를 일으킨다는 Nahmias 등 (21)의 연구가 있고, HSV type 2는 주로 신생아 HSVE를 일으킨다는 Sullivan-Bolyai 등 (24)의 보고가 있었다.

HSVE의 진단에 이용되는 여러 방법을 살펴보면 serum과 CSF를 사용한 혈청학적 진단 방법은

Table 1. Detection results of HSV, VZV, and HHV-6 DNA from CSF hospitalized meningitis and encephalitis adults patients by monoclonal Ab EIA, PCR and nested PCR

CSF No.	Patients name	Sex	Age (Year)	Clinical Diagnosis	Duration of Hospitalization (days)	Results							
						OD of HSV EIA	HSV PCR	OD of VZV EIA	VZV nested PCR	OD of HHV-6 EIA	HHV-6 PCR	Dual infection	Triple infection
C1	KJY	M	41	Herpes encephalitis	35	0.043	+	0.260	++ ^d	0.082	+ ^b		+
C2	CHT	M	38	Aseptic meningitis	6	0.036	+	0.122	+ ^e	0.047	+		+
C4	JAS	M	34	Viral meningitis	10	0.215	+	0.275	- ^f	0.191	-	++	
C5	PSA	F	33	Viral meningitis	.	0.228	+	0.317	-	0.188	++		
C6	SJH	M	16	Headache, coma	7	0.130	+	0.269	++	0.230	++ ^c		+
C7	JJA	M	67	TB meningitis	24	0.293	+	0.411	++	0.313	+		+
C8	KMJ	F	14	Viral meningitis	.	0.239	- ^a	0.368	-	0.243	+		
C9	HASS	M	-	Meningitis	.	0.075	+ ^b	0.102	++	0.209	+		+
C10	CTI	M	13	Viral meningitis	.	0.302	++ ^c	0.449	+	0.241	++		+
C11	KJN	F	29	Viral meningitis	.	0.175	-	0.217	-	0.177	+		
C12	KMS	F	34	Viral meningitis	15	0.103	++	0.186	-	0.112	++		+
C13	PKC	M	17	Viral meningitis	.	0.374	++	0.609	-	0.412	- ^{a'}		
C14	PHS	F	30	Normal	0	0.077	-	0.102	-	0.084	-		
C15	KCH	F	39	Viral meningitis	.	0.161	+		-	0.137	-		
C16	-	F	19	Normal	0	0.134	-	0.240	+	0.146	-		
C17	LKJ	M	52	Viral meningitis	28	1.061	+	1.319	+	1.129	-		+
C24	CSJ	M	43	Viral meningitis	8	0.258	-	0.337	+	0.233	-		
C25	PNS	M	37	Viral meningitis	10	0.232	-	0.162	-	0.135	-		
C30	KKH	M	29	Viral meningitis	.	0.135	+	0.235	+	0.146	+		+

a and a', HSV and HHV-6 PCR negative; b and b', HSV and HHV-6 PCR positive; c and c', HSV and HHV-6 PCR strong positive; d, VZV nested PCR strong positive; e, VZV nested PCR positive; f, nested VZV PCR negative.

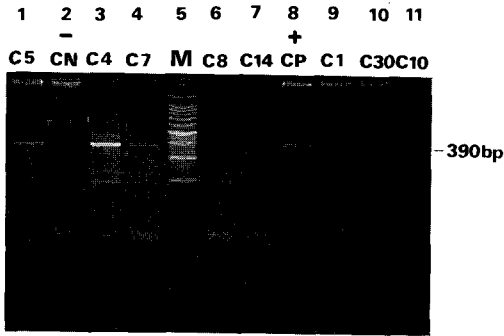


Figure 1. PCR product of HSV (390 bp) with CSF from hospitalized aseptic meningitis and encephalitis adults patients on 3.3% NuSieve agarose gel. Lane 1, C5 HSV PCR positive; lane 2, -CN HSV PCR negative control; lane 8, +CP HSV PCR positive control; lane 6, C8; lane 7, C14 were HSV PCR negative.

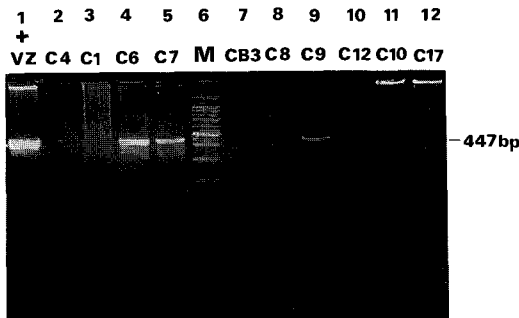


Figure 2. Nested PCR product of VZV (447 bp) with CSF from hospitalized aseptic meningitis and encephalitis adults patients on 2.9% NuSieve agarose gel. Lane 1, VZV PCR positive control; lane 4, C6; lane 5, C7; lane 9, C9; lane 11, C10 positive were VZV PCR positive; lanes 2, 3, 7, 8, and 10 were VZV PCR negative.

질환 초기에 치료의 결정에 도움이 되지 않는다고 하였다. Anderson 등 (2)의 HSVE 환자에서 뇌조직 생검을 하여 바이러스의 배양과 면역형광항체법으로 진단하는 것에 대한 연구에 논란이 있었으나, 이러한 뇌조직 생검법이 확진에는 가치가 있다고 생각되었다. 그 후 Merthens 등 (18)은 HSVE 3명의 환자 CSF에서 분자생물학적 방법인 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 방법을 이용하여 증폭된 HSV DNA를 검출하여 처음으로 HSVE의 빠른 진단의 가능성을 제시하였다.

VZVE의 진단을 PCR 방법이 개발되기 전에는

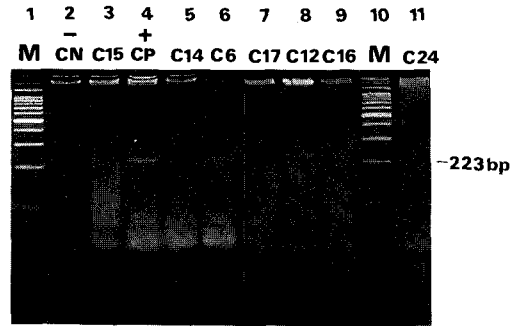


Figure 3. PCR product of HHV-6 (223 bp) with CSF from hospitalized aseptic meningitis and encephalitis patients on 3.3% NuSieve agarose gel. Lane 1, Molecular marker 100 bp; lane 2, -CN HHV-6 PCR negative control; lane 4, +CP HHV-6 PCR positive control; lane 6, C6 positive; lane 3, 5, 7, 9, and 11 were HHV-6 PCR negative.

손쉽게 CSF에서 검출되는 특이 VZV IgG 항체의 측정으로 VZVE를 진단하였다. 그러나 VZVE 진단에서 Mayo와 Boos (17)는 CSF로부터 바이러스의 동정과 혈청에서의 항체검사는 진단에 적합하지 못하다고 하였으며, 이는 VZV의 잠복감염이 있기 때문으로 해석하였다. VZV에 의한 무균성 뇌막염 환자의 뇌척수액의 임상병리 검사실 소견은 중등도 내지 약한 림프구 pleocytosis를 보이며 단백질이 증가하고 glucose의 농도는 정상을 나타낸다는 보고가 있다.

본 연구에서는 뇌막염으로 입원한 성인의 CSF 검체를 HEp-2 cell에 배양 후 DNA를 추출하여 HSV, VZV, HHV-6 8개의 primer를 사용하여 각각에 대한 PCR을 시행하였다. 이 방법은 시간이 걸리고 번거롭다는 점도 있으나 바이러스 검출의 예민도가 증가되며 또한 이러한 연구 시도는 국내외에 없었다. 따라서 본 연구에서는 바이러스성 뇌막염 또는 뇌염의 증세를 나타내어 입원한 성인 환자의 치료 개시 전의 CSF 검체를 HEp-2 세포에 배양 후 PCR 방법으로 HSV, VZV, HHV-6 각각의 DNA를 검출하였다. 사용한 primer가 다르며 specific하여 각각을 다른 시기에 시행했으므로 교차오염은 방지할 수 있었다.

특히 최근에 외국의 큰 병원에서는 CNS 감염에 대한 검사에서 분자생물학적 진단 방법인 multiplex PCR법을 CSF 검체에 사용하고 있다. Multiplex PCR은 사람 헤르페스과에 속하는 HSV, VZV, CMV, EBV, HHV-6를 동시에 검사할 수 있는 방법으로 Cacas 등 (6), Minjolle 등 (20), Read와 Kurtz

(23)의 연구 보고들이 있으며, 검사 비용을 절약하고 시간을 단축하는 효과가 있다.

본 연구는 19예의 CSF 검체를 HEp-2 cell에 배양하여 5일 후 수거하여 DNA를 추출하여 HSV PCR와 HHV-6 PCR 또는 VZV nested PCR을 시행하였다. CSF 검체를 배양하여 PCR을 시행했기에 양성률이 높았다고 생각된다. CSF에서 VZV의 DNA 검출의 band가 nested PCR 방법을 사용하여 더욱 선명하였다. 그러나 본 연구에서 HSV (3예), VZV (4예), HHV-6 (4예)의 강한 PCR band를 나타낸 예에서는 이 바이러스가 뇌막염, 뇌염의 원인체로 생각되었다 (Table 1).

무균성 뇌막염과 뇌염 환자의 뇌척수액에서 HSV와 VZV 두 바이러스 DNA가 PCR nested PCR 방법으로 검출된 이중감염은 3/19예 (15.8%)이었다 (Table 1). 무균성 뇌막염과 뇌염 환자의 뇌척수액에서 3종류의 바이러스 DNA가 검출된 경우 3중감염은 7/19예 (36.8%)이었다 (Table 1). 그러나 성인 뇌막염 환자에서 HSV, VZV, HHV-6가 같은 CSF에서 PCR nested PCR 방법으로 검출한 보고는 국내외에 없기에 비교 검토는 어렵다.

무균성 뇌막염, 뇌염으로 입원한 성인 환자의 CSF에서 HSV가 PCR 방법으로 13/19예 (68.4%)로 높게 검출되었으며 이는 외국의 보고와 같이 뇌막염의 원인체로써 HSV가 큰 빈도를 나타내는 것을 우리나라에서 처음으로 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 1999년 KISTEP 연구비 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- 1) 박혜경, 서주영: 한국에서 분리한 Varicella-Zoster virus 야생주 및 백신주의 항원구조 및 유전자 제한효소 절편양상. 대한미생물학회지 **32**: 265-274, 1997.
- 2) Anderson NE, Willouby EW, Synek BJ, Croxon MC, Glasgow GL: Brain biopsy in the management of focal encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* **54**: 1001-1003, 1991.
- 3) Asano Y, Yoshikawa T, Kajita Y, Ogura R, Suga S, Yazaki T, Nakashima T, Yamada A, Kurata T: Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpes viurs-6 infection. *Arch Dis child* **67**: 1484-1485, 1992.

- 4) Barnes DW, Whitley RJ: CNS disease associated with varicella-zoster and herpes simplex virus infection. *Neurol clinics* **4**: 265-283, 1986.
- 5) Cacas I, Tenorio A, de Ory F, Lozano A, Echevarria JM: Detection of both Herpes simplex and Varicella-Zoster viruses in cerebrospinal fluid from patients with encephalitis. *J Med Virol* **50**: 82-92, 1996.
- 6) Cacas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A: Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for enterovirus and herpes viruses in a prospective study. *J Med Virol* **57**: 145-151, 1999.
- 7) Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, Van Loon AM: The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **61**: 339-345, 1996.
- 8) Cohen BA, Rowley AH, Long CM: Herpes-simplex type 2 in a patient with Mollaret's meningitis: demonstration by polymerase chain reaction. *Ann neurol* **35**: 112-116, 1994.
- 9) Cones RW, Hackman RC, Huang ML, Bowden RA, Myers JD, Metcalf MZJ, Ashley R, Cprey L: Human herpes virus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Eng J Med* **329**: 156-161, 1993.
- 10) Drobyski WR, Dunne WM, Bud EM: Human herpes virus (HHV-6) infection in allogenic bone marrow transplant recipients: evidance of a marrow suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* **167**: 735-739, 1993.
- 11) Drobyski WR, Konx KK, Majewski A, Carrigan DR: Fatal encephalitis due to variant B human herpes virus-6 infection in bone marrow transplant. *N Engl J Med* **330**: 1356-1360, 1994.
- 12) Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, Tedder RS, Honess RW: Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositive. *Lancet* **i** 1958-1959, 1990.
- 13) Guffond T, Dewilde A, Lobert PE, Lefebvre DC, Hober K, Wattre P: Significance and clin-

- ical relevance of the detection of herpes simplex virus DNA by the polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with resumed encephalitis. *Clin Infect Dis* **18**: 744-749, 1994.
- 14) Jones CA, Isaccs D: Human herpes virus-6 infections. *Arch Dis Child* **74**: 98-100, 1996.
 - 15) Lakeman FD, Whitley RJ, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group: Diagnosis of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* **171**: 857-863, 1995.
 - 16) Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Marasca R, Torelli G: Human herpes virus 6 infection in normal brain tissue. *J Infect Dis* **169**: 943-944, 1994.
 - 17) Mayo DR, Boos J: Varicella-zoster associated neurological disease without skin lesions. *Arch Neurology* **46**: 313-315, 1989.
 - 18) Merthens G, Ieven M, Ursi D, Pattyn SR, Martin JJ, Parizel PM: Detection of herpes simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with encephalitis using the polymerase chain reaction. *J neurol science* **118**: 213-216, 1993.
 - 19) Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Toal DR, Rys PN, Berbari EF, Osmon DR, Persing PN: Laboratory diagnosis of central nervous system infection with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* **35**: 2873-2877, 1997.
 - 20) Minjolle S, Michelet C, Julsselin I, Joannes M, Cartier F, Coliman R: Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol* **37**: 950-953, 1999.
 - 21) Nahmias AJ, Whitley RJ, Vistine AN, Takei Y, Alford CA Jr: Herpes simplex encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis* **145**: 829-836, 1982.
 - 22) Puchhammer-Stockle E, Popov-Kraupp T, Heinz HX, Mandl CW, Kunz C: Detection of Varicella-Zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid from patients suffering from neurological complications associated with chickenpox or herpes zoster. *J Clin Microbiol* **29**: 1513-1516, 1991.
 - 23) Read SJ, Kurtz JB: Laboratory Diagnosis of Common Viral Infections of the Central Nervous System by Using a Single Multiple PCR Screening Assay. *J Clin Microbiol* **37**: 1352-1355, 1999.
 - 24) Sullivan-Bolyai J, Hull HF, Wilson C, Corey L: Neonatal herpes simplex virus infection in King County Washington: increasing incidence and epidemiological correlates. *J Am Med Assoc* **250**: 3059-3062, 1983.
 - 25) Whitley RJ, Soong SJ, Dolin R, Galasso R, Chien LT, Alford CA, Collaborative Study group: Adenine arabinoside therapy for of biopsy proved herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* **297**: 289-294, 1977.
 - 26) Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, Schooley RT, Luby JP, Aoki FY, Hanley D, Nahmias AJ, Soong SJ, NIAD Collaborative Antiviral Study Group: Vidarabin versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* **314**: 144-149, 1986.
 - 27) Whitley RJ, Gnann JW Jr: The epidemiology and clinical manifestation of herpes simplex virus infections. pp 69-105, Eds. Roizmann B, whiteley RJ, and Lopez C, *The Human Herpes viruses*. New York, Raven Press Ltd, 1993.
 - 28) Whitley RJ, Lakeman F: Herpes simplex virus infection of the central nervous system: therapeutic and diagnostic consideration. *Clin Infect Dis* **20**: 414-420, 1995.
 - 29) Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kono T, Asano Y, Kurato T: Identification of human herpes virus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet i*: 1065-1067, 1988.