

중합효소 연쇄반응에 의한 수포액, 혈액과 관절액에서 단순포진 바이러스 1, 2와 대상포진 바이러스의 검출과 감별

이화여자대학교 의과대학 미생물학교실 의과학연구소 분자생물학부

박혜경 · 우소연 · 김현진 · 이정화*

=Abstract=

Detection and Differentiation of Herpes Simplex Virus 1 and 2, and Varicella-Zoster Virus in Vesicle Fluid, Joint Fluid and Serum using PCR Method

Hae-Kyung Park, So-Youn Woo, Hyun-Jin Kim and Chung-Hwa Lee*

Department of Microbiology, Division of Molecular Biology, Ewha Medical Center
and College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 158-056, Korea

The viruses of Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1), Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) and Varicella-Zoster virus (VZV) which belong to the alpha herpes subfamily are important human pathogens. When eruptions were not fully developed from these viral infections, clinical diagnosis was not always easy and required virological confirmation test. The above viruses were reactivated in individuals who were compromised in immune competence for one reason or another. Polymerase chain reaction (PCR) enables rapid and sensitive detection of HSV and VZV DNAs. Its sensitivity was largely influenced by choice of primers.

Authors conducted a study to detect of those three viruses in human specimens including vesicle fluid and joint fluid and serum using PCR methods. Primers used for this study were the general primer pair GPHV-RU which was known to amplify within the genes enjoying the highest degree of homology between UL15 of HSV and UL42 of VZV. PCR with primers hybridized pair GPHV-RU amplifies a 396 bp with HSV-1 and HSV-2 standard strain DNA and 405 bp with VZV standard strain DNA. Restriction enzyme cleavage with *HpaII* and *DdeI* were used to detect and distinguish DNAs of HSV-1 and HSV-2 and VZV.

The purpose of this study was a rapid and easy detection of VZV and HSV-1 or HSV-2 from various clinical specimens (vesicle fluid, serum and joint fluid) by PCR method.

Used methods were: HSV PCR with primer 1, 2 and *HpaII* RE digestion; VZV nested PCR; HSV PCR with primer A, B and *BssHII* RE digestion.

1) In 33 cases (33/42, 78.6%) VZV was detected single or mixed infection from 42 clinical specimens which included vesicle fluid (5), serum form respiratory infected children (10), serum from immune suppressed adult cancer patients (7) and joint fluid from arthritis patients (20).

2) In 20 cases (20/42, 47.6%) HSV was detected singly or mixed infection and 19 of those

접수 : 2000년 6월 29일, 게재결정 : 2000년 9월 9일

책임저자: 박혜경

*: 이화여자대학교 의과대학 2학년 학생

1997년도 연경재단 연구지원에 의한 것임, 본 논문은 1998년 10월 대한미생물학회에서 발표하였음.

cases were HSV-2 and 1 case was HSV-1.

3) In 19 cases (19/42, 45.2%) VZV was singly detected which included serum from respiratory infected children (6 cases), joint fluid from arthritis patients (9 cases), vesicle fluid (2 cases) and serum form immunosuppressed cancer patients (2 cases).

4) HSV was singly detected in 6 cases (6/42, 14.3%) which included joint fluid from arthritis patients (5 cases) and serum form respiratory infected children (1 cases).

5) 14 cases of VZV and HSV mixed infection (14/42, 33.3%) were detected. They included vesicle fluid (3 cases), serum form immunosuppressed cancer patients (4 cases), serum from respiratory infected children (2 cases) and joint fluid from arthritis patients (5 cases).

6) HSV-1 and HSV-2 detection and typing by HSV PCR with primer A, B and BssHII RE digestion method was more sensitive and the results were easier to detect than on other method.

Key Words: Herpes simplex virus 1 and 2, Varicella-Zoster virus, PCR, *HpaII*, *DdeI*, *BssHII*

서 론

단순포진 바이러스 1 (Herpes simplex virus; HSV-1), 단순포진 바이러스 2 (Herpes simplex virus; HSV-2)와 대상포진 바이러스 (Varicella-Zoster virus; VZV)는 사람에서 중요하며 흔한 병인체로써 herpes virus의 alpha (α) subfamily에 속한다. HSV-1은 흔히 구순염을 일으키며 초도감염 이후 잠복 감염 상태로 있다가 스트레스와 같은 외부자극에 의해 같은 위치에 재발이 흔하며 때로 뇌염 등을 일으키는 병인체이다^{13,16}. HSV-2는 주로 성 접촉에 의하여 전염되며 생식기관에 수포병변을 일으키는데 성인 여자의 월경전에 재발이 흔하며 그 외에 성인의 뇌염 등을 일으키는 것으로 알려졌다¹⁹. HSV 감염은 면역억제 상태에 있는 AIDS 환자나 이식환자에서 높은 빈도로 치명적인 감염을 일으키기 때문에 임상적으로 그 중요성이 증가되고 있으며¹⁸ 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 최근에 Gilden 등 (1992)¹²과 Cascas 등 (1996)⁹은 사람 alpha herpes virus는 신경조직에 잠복감염을 일으킬 수 있고 재발이 흔하다고 발표하였다.

HSV-1, HSV-2는 임상적 증세나 감염의 경로, 그 예후가 각각 다르기 때문에 감별을 하는 것이 정확한 진단과 치료를 위하여 필요하지만 지금까지는 임상에서 각 바이러스의 감별 진단을 위해서 많은 시간과 경비가 소요되므로 정확한 감별을 시행하지 않았다. 그러나 최근 herpes virus의 감염에 대한 새로운 항바이러스제제의 계속되는 개발로 인해 치료에 효과적인 예민한 약제의 선

택이 필요하게 되었다¹¹. 그러므로 HSV-1, HSV-2, VZV의 감별을 위해서는 빠르고 예민한 진단 방법이 더욱 필요하게 되었다¹².

VZV는 일차감염으로 영아, 소아에서 흔한 감염성 질환인 수두를 일으키며, 잠복 상태로 있다가 성인에서 재발감염에 의해 신경절을 따라 나타나는 대상포진을 일으키는 바이러스임을 Ozaki 등 (1994)²¹이 밝힌 바 있다. Antonelli 등 (1991)⁶은 1년간 1000명의 환자를 대상으로 한 연구에서 저용량의 methotrexate를 사용한 류마티드관절염 환자에서 (14.5예), 일반인 인구군 (1.3~4.8예)에서 VZV에 의한 관절염이 나타날 수 있다고 보고하였다. 그러나 우리나라의 관절염환자에서 이와 같은 VZV의 감염 빈도에 대한 연구는 없으며 단지 저자들의 미발표 연구가 있을 뿐이다.

이러한 수포병변의 진단에서 VZV 감염과 그 양상이 비슷한 HSV 감염과, 비정형적인 VZV 감염, 그리고 면역억제환자에서의 수포병변이 존재하는 경우는 바이러스의 감별, 확인이 필요하다고 Penneys 등(1991)²²이 보고하였다. 이러한 HSV-1, HSV-2와 VZV의 감별 진단은 바이러스의 배양, Tzank 도말법과 면역형광항체법의 병용, 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 의한 바이러스의 동정에 의해서 가능하다고 하였다¹⁷.

PCR의 방법 중 nested PCR인 경우는 HSV⁷, VZV²¹, herpes virus 6¹⁴의 검출에서 특이성과 예민도가 증가한다는 보고들이 있다. 그러나 HSV-1, HSV-2, VZV를 nested PCR로 감별하고자 하면 12개의 primer가 필요하며 시간과 경비가 많이 소요된다. 이러한 단점을 보완하고자 최근에 밝혀진

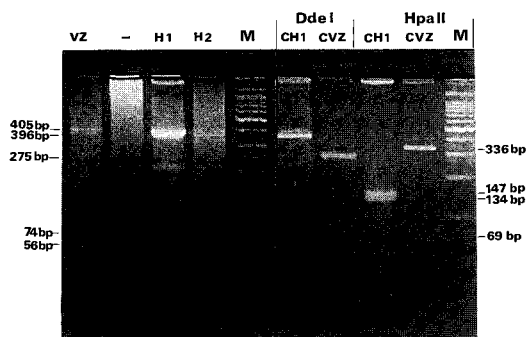


Figure 1. PCR products of standard virus strain VZV, negative control, HSV-1, HSV-2, and restriction enzyme (RE) digestion patterns on 3.57% NuSieve agarose. Lane 6, 396 bp was not digested with *DdeI* (HSV-1); lane 7, 275 bp, 74 bp, 56 bp digested with *DdeI* (VZV); lane 8, 147 bp, 134 bp digested with *HpaII* (HSV-1); land 9, 336 bp, 69 bp digested with *HpaII* (VZV). M, molecular marker 100 bp ladder.

HSV와 VZV의 유전자에서 가장 큰 빈도의 동일성 (homogeneity)을 나타내는 것은 HSV의 UL15 유전자와 VZV UL42 유전자라는 결과¹⁶⁾를 이용하여 본 연구에서는 Baron 등 (1996)⁸⁾이 고안한 GP HS-Ru primer를 사용하였는데, 이는 HSV UL 15 유전자와 VZV UL42 유전자가 hybridize 된다는 근거를 두고 있다.

우리나라에서 임상검체에서 HSV와 VZV의 연구는 많지 않다. 저자들의 HSV의 검출에 대한 연구로 환자의 혈청을 이용한 HSV의 보체결합 방법¹⁾, Enzyme Immunoassay (EIA)²⁾, immunoblot 등³⁾을 이용한 연구가 있다. 특히 HSV-1, HSV-2의 감별 시험을 시행하여 보고한 경우는 저자들⁴⁾의 논문 뿐이며, VZV의 세포배양과 혈청학적 진단 방법인 EIA, PCR에 의한 연구는 저자들의 보고⁵⁾가 유일하다. 이에 수포액, 관절액과 혈청검체들에서 HSV-1, HSV-2, VZV의 감별을 PCR로 시도한 예는 국내외에 없기에 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 검 체

1998년 1월부터 1998년 12월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 피부과에 내원한 피부에 수포가 생기는 임상증세를 보인 단순포진 환자와 대상포진 환자 5명의 수포액과 목동병원 내과에 입원한 면역억제 상태인 암환자의 혈청 7개

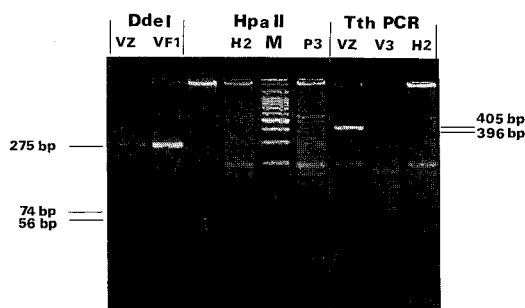


Figure 2. PCR products by amplification with *Tth* polymerase and RE digestion patterns of standard strain and clinical samples on 3.57% NuSieve agarose. Lane 1, 275 bp, 74 bp, 56 bp digested with *DdeI* (VZV); lane 2, vesicle fluid #1 PCR product digested with *DdeI* (VZV); lane 7, 405 bp VZV PCR product; lane 9, 396 bp HSV-2 PCR product.

와 1998년 12월부터 1999년 12월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 소아과에 폐렴으로 입원한 소아의 혈청 10개를 소분하여 -70℃에 보관하여 사용하였다. 또한 관절염으로 1998년 1월부터 1998년 12월까지 고려대학교 의과대학 구로병원 정형외과에 내원한 관절염환자 20명의 관절액을 무균적으로 채취하여 소분하여 -70℃에 보관하여 사용하였다.

2. 바이러스의 조직배양

HSV-1 (McIntyre), HSV-2 (strain G), VZV (Ellen, ATCC VR-588) 균주를 RPMI 1640 배지에 키운 Vero cell에 배양하여 이들을 양성대조군으로 하였다. 검체인 vesicle fluid (5 검체), joint fluid (20 검체), serum (17 검체) 각각을 Vero cell에 배양하여 세포병변을 확인하였다. 수포액, 관절액, 혈청 검체를 Vero cell 또는 HEp-2 세포에 filter로 여과하여 집중한 후 RPMI 1640을 첨가하여 배양한다. 1주일간 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하고 CPE를 확인한 후 세포를 수거하여 PBS로 1회 세척 후 cell pellet에서 DNA를 추출하였다.

3. Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 HSV-1, HSV-2와 VZV 검출

① DNA

수포액, 관절액, 혈청의 검체를 Vero cell에 배양하여 CPE 확인 후 사용하였고, 동시에 대조 표준 바이러스를 Vero cell 또는 HEp-2 cell에 배양하여 양성대조군으로 하여 DNA를 추출하였다 (Qiagen,

박혜경 등: PCR에 의한 HSV 1, 2와 VZV의 검출과 감별

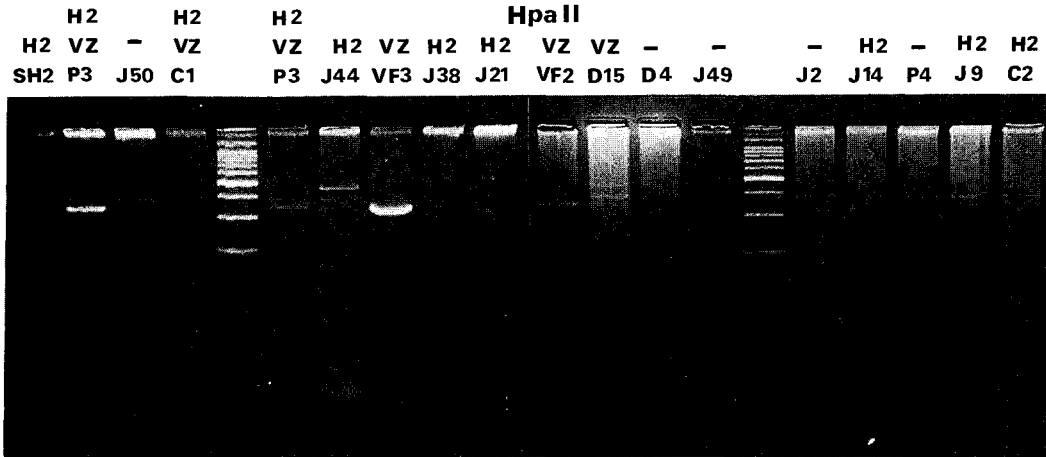


Figure 3. PCR products of 405 bp or 396 bp from clinical samples and digested with *HpaII* on 3.57% NuSieve agarose. S, standard HSV-2 strain; P, serum from adult cancer patients; J, joint fluids from arthritis patients; VF, vesicle fluids from VZV patients; D, serum from respiratory infected children; C, CSF from HSV meningitis patients.

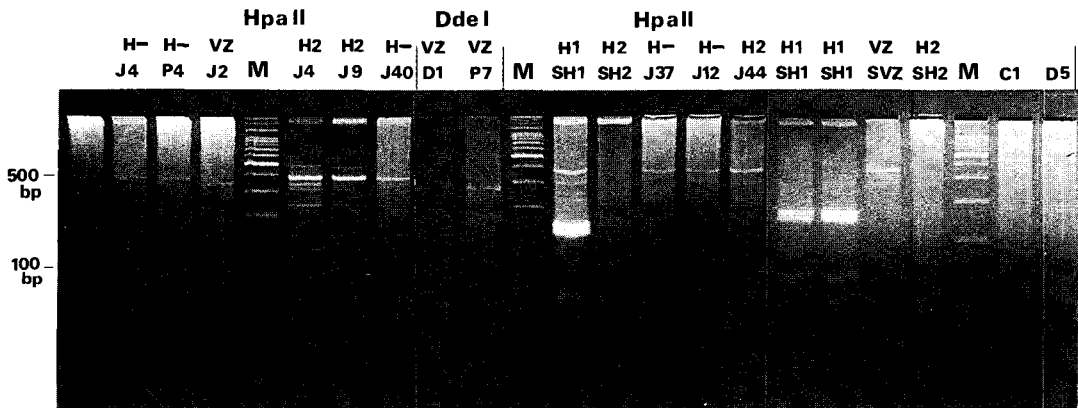


Figure 4. PCR products of 405 bp or 396 bp from clinical samples digested with *HpaII* or *DdeI* on 3.57% NuSieve agarose. SH1, standard HSV-1; SH2, standard HSV-2.

Germany).

② Primer

Baron 등 (1996)⁹⁾이 고안한 primer를 사용하였다.

primer 1 (sense)

5'-TCC TGG CTG CTA TTT CCC TC-3'

primer 2 (antisense)

5'-TGG CCG ATT CCT TCT TGC AGG A-3'

③ DNA amplification

a. Taq DNA polymerase (Takara, Japan)

PCR 방법은 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, template DNA, 20 pmol primer 1과 20 pmol primer 2를 첨가 후 Taq polymerase를 사

용하여 50 μl volume으로 하였다. 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분을 35 cycle간 반복하였다.

b. Tth DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany)

PCR 방법은 10X PCR buffer, 200 μM dNTP, template DNA, 10 pmol의 primer 1과 10 pmol의 primer 2를 첨가한 후 99℃ 5분 처리 후 80℃에서 0.5 U Tth DNA polymerase를 사용하여 50 μl volume으로 하였다. 94℃ 1분, 59℃ 1분, 72℃ 1분을 35 cycle 반복 후 72℃에서 10분 연장하고 4℃에 보관하였다 (Fig. 2).

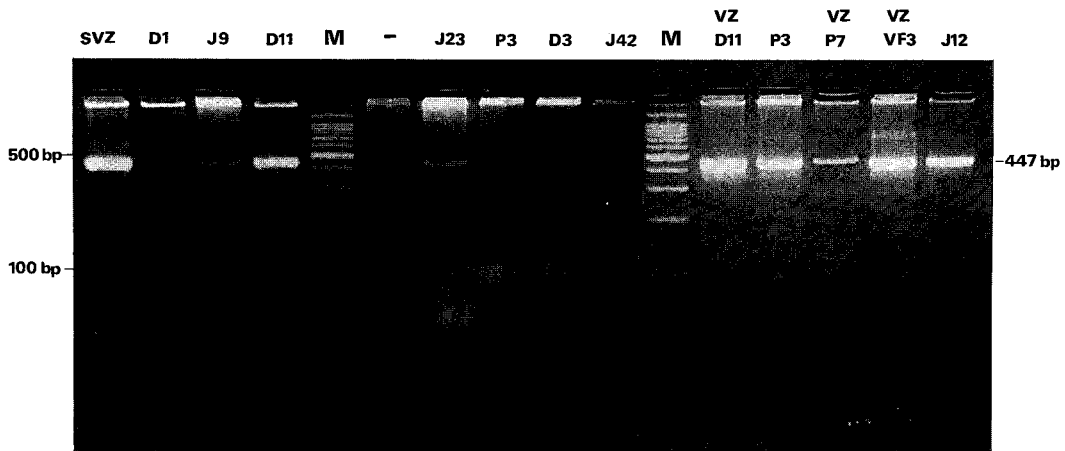


Figure 5. Nested PCR products of VZV 447 bp from clinical samples on 3.57% NuSieve agarose. Lane 1, standard VZ strain; lane 6, negative control.

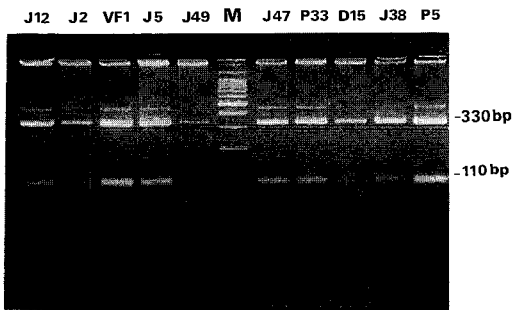


Figure 6. Nested PCR products of VZV 447 bp from clinical samples were digested with *HpaII* and cleaved to 330 bp, 110 bp on 3.57% Nusieve agarose.

④ Agarose gel electrophoresis

증폭된 20 μ l의 PCR 산물을 ethidium bromide가 포함된 3.57% NuSieve agarose에서 4 V/cm으로 70 분간 전기영동하였다. HSV-1, HSV-2는 396 bp, VZV는 405 bp를 나타내었다 (Fig. 1).

4. *DdeI*, *HpaII* 제한효소에 의한 HSV-1, HSV-2 와 VZV의 감별

PCR 산물 10 μ l를 *DdeI* 10 U, *HpaII* 10 U (Boehringer Mannheim, Germany)로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 작용시켰다. 이를 3.57% NuSieve agarose에 전기영동하여 band를 확인하였다.

① 405 bp VZV PCR 산물의 VZV의 *DdeI* 제한효소 처리

PCR 산물이 HSV-1과 HSV-2의 경우는 *DdeI*에

의해 처리되지 않고 그대로 396 bp를 나타내었다. PCR 산물이 VZV인 경우는 *DdeI*에 의해서 405 bp가 275 bp, 74 bp, 56 bp로 처리되었다.

② 396 bp HSV-1, HSV-2의 PCR 산물과 405 bp VZV PCR 산물의 *HpaII* 제한효소 처리

PCR 산물이 HSV-1인 경우 *HpaII*에 의해 147 bp, 134 bp로 처리되었고, HSV-2인 경우에는 *HpaII*에 의해 170 bp, 110 bp로 처리되었다. PCR 산물이 VZV인 경우는 *HpaII*에 의해 405 bp가 336 bp, 69 bp로 처리되었다 (Fig. 1, 2, 3, 4).

5. Nested 중합효소 연쇄반응 (nested PCR)에 의한 Varicella Zoster (VZV)의 검출

① 환자의 수포액, 관절액, 혈청을 Vero cell 또는 HEP-2 cell에 배양하여 CPE를 나타낼 때 수거하여 DNA를 Qiagen kit로 추출하였다.

② 박과 서⁹⁾의 방법을 변형하여 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, primer 1, primer 2를 사용하여 PCR을 시행하였다. sample DNA, dNPT 200 μ M, Taq 1.7 U를 사용하였다.

③ Thermocycler에서 94 $^{\circ}$ C 1분, 90 $^{\circ}$ C 30초, 62 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 3분으로 35 cycle 후 72 $^{\circ}$ C 3분 연장하여 4 $^{\circ}$ C에서 정치하였다.

④ 1st PCR product 2 μ l를 primer 3, primer 4를 사용하고 ②와 ③과 같은 조건으로 nested PCR을 시행하였다.

⑤ Ethidium bromide가 함유된 2.9% NuSieve agarose에 10 μ l PCR 산물을 전기영동하여 UV

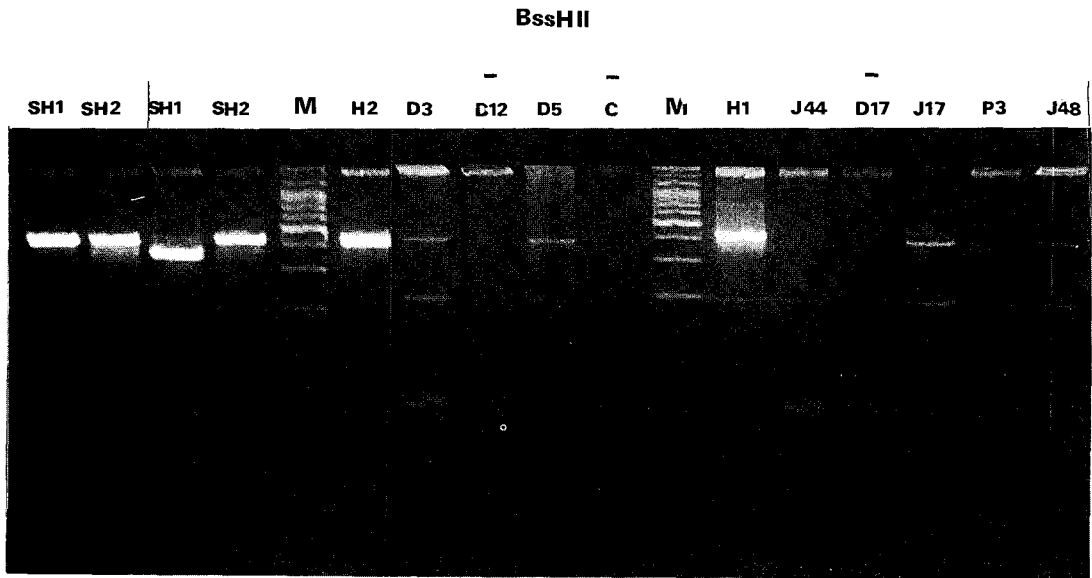


Figure 7. 390 bp PCR products with primer A and B of standard virus strain HSV-1, HSV-2 and *BssHII* digestion patterns on 3.57% NuSieve agarose. Lane 1, 390 bp PCR product of HSV-1; lane 2, 390 bp PCR product of HSV-2; lane 3, 390 bp was digested with *BssHII* cleaved to 360 bp, 30 bp (HSV-1); lane 4, 6, 390 bp not digested (HSV-2); lane 7, 9, 13, 15, 16, 17, HSV positive; lane 8, 14, HSV negative; lane 10, HSV negative control.

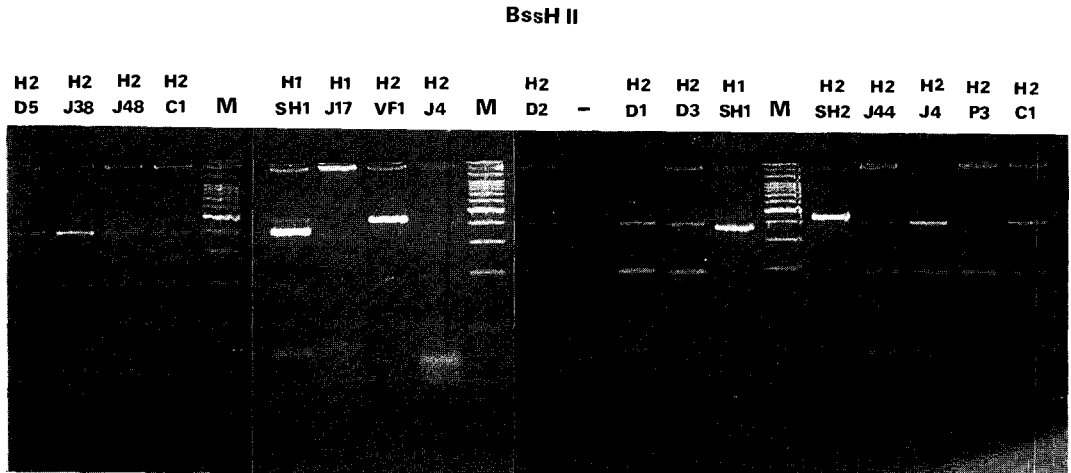


Figure 8. 390 bp of HSV-1 and HSV-2 PCR products from vesicle fluids (VF) joint fluids (J) and serum samples (P, D) and digested with *BssHII* on 3.57% Nusieve agarose. SH1, standard strain of HSV-1; SH2, standard strain of HSV-2; P, serum from adult cancer patients; D, serum from respiratory infected children; C, CSF from HSV meningitis patients. Lane 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 13, 14, 18, 19, 20, 21, HSV-2; lane 7, HSV-1.

lamp 아래에서 polaroid film으로 찍어 447 bp를 확인하였다 (Fig. 5).

primer 1 (VZV, 115953, sense)

5'-CCGTATATGAGCCTTACTACCATTC-3'

primer 2 (VZV 116605, antisense)

5'-GAGTTCATCAAACAGTGTGCTCGTG-3'

primer 3 (VZV 116052, sense)

5'-TATGGCCACGTAATGATTATGATGG-3'

primer 4 (VZV 116474, antisense)

5'-CCACGTCTTGAAAGCATGTTGTATG-3'

6. *HpaII* 제한효소 처리에 의한 VZV의 확인

Nested VZV PCR 산물인 447 bp를 다시 *HpaII* 제한효소로 처리 (37°C 2시간)하여 330 bp와 110 bp를 나타냄을 3.57% Nusieve agarose에서 관찰하였다 (Fig. 6).

7. KS 30, KS 31 primer를 사용한 중합효소 연쇄반응 (PCR)에 의한 Herpes simplex virus (HSV)의 검출

① 환자의 수포액, 관절액, 혈청 등을 Vero cell 또는 HEp-2 cell에 배양하여 CPE를 나타낼 때 수거하여 DNA를 Qiagen kit로 추출하였다.

② Cohen 등 (1994)¹⁰⁾ 방법을 변형하여 10X PCR buffer, MgCl₂, primer KS 30, primer KS 31을 12.5 pmole, sample DNA, dNTP 200 μM, Taq 2 U를 얼음 위에서 혼합하였다.

Primer A (KS 30, sense) 5'-TTC AAG GCC ACC ATG TAC TAC AAA GAC GT-3'

Primer B (KS 31, antisense) 5'-GCC GTA AAA CGG GGA CAT GTA CAC AAA GT-3'

③ Thermocycler에서 96°C 2분, 96°C 1분, 57°C 1분 15초로 37 cycle 후 72°C 3분 연장하여 4°C에서 정치하였다.

④ Ethidium bromide가 함유된 3.3% NuSieve agarose에 12 μl PCR 산물을 전기영동하여 UV lamp 아래에서 polaroid film으로 찍어 390 bp를 확인하였다 (Fig. 7).

8. HSV의 *Bss*HIII에 의한 type 결정

HSV PCR 산물 20 μl를 *Bss*HIII (Takara) 0.5 μl로 처리하여 50°C에서 5시간 작용시켜 3.57% NuSieve agarose에 전기영동하여 band를 확인하였다.

① 390 bp의 PCR 산물이 HSV-1인 경우는 *Bss*HIII에 의해서 처리되지 않았다.

② HSV-2인 경우 390 bp가 *Bss*HIII에 의해서 360 bp와 30 bp로 처리되었다 (Fig. 8).

결 과

1) 3종류의 PCR 방법을 이용한 4가지의 임상 검체들에서 VZV, HSV-1, HSV-2의 단독검출

① 수포액

수포액 5예 중 2예 (2/5, 40%)에서 VZV가 단독 검출되었다.

② 면역억제된 암환자의 혈청

혈청 7예 중 2예 (2/7, 28.6%)에서 VZV가 단독 검출되었고 VZV와 HSV가 전혀 발견되지 않은 경우가 1예이었다.

③ 호흡기질환의 소아환자의 혈청

혈청 10예 중 6예 (6/10, 60%)에서 VZV가 단독 검출되었다. HSV-2가 단독 발견된 경우가 1예 이었고, VZV와 HSV-1 또는 HSV-2가 발견되지 않은 경우가 1예 이었다.

④ 관절염환자의 관절액

관절액 20예 중 9예 (9/20, 45%)에서 VZV가 단독 검출되었다. HSV가 단독검출된 예는 5예 (5/20, 25%) 이었고 이중 HSV-2가 4예, HSV-1이 1예 이었다. VZV와 HSV가 분리되지 않은 경우가 1예 이었다 (Table 1).

2) 3종류의 방법을 이용한 4가지 임상검체들에서 VZV와 HSV-1 또는 HSV의 동시 검출

① 수포액

수포액 5예에서 VZV가 nested PCR로 검출되었고, PCR 방법으로 HSV가 동시에 검출된 예가 3예 (3/5, 60%) 이었다.

② 면역억제된 암환자의 혈청

혈청 7예 중에서 6예에서 VZV가 nested PCR로 검출되었고, HSV가 동시에 PCR 방법으로 검출된 예는 4예 (4/7, 57.1%) 이었으며 모두 HSV-2가 검출되었다.

③ 호흡기감염 소아의 혈청

혈청 10예 중 8예에서 VZV가 nested PCR로 검출되었고 HSV가 동시에 검출된 예는 2예 (2/10, 20%) 이었고, 모두 HSV-2가 검출되었다.

④ 관절염환자의 관절액

관절액 20예에서 VZV가 nested PCR 방법과 primer A, B를 사용한 HSV PCR과 시행 후 *Bss*HIII 제한효소 처리 방법으로 5예 (5/20, 25%)에서 HSV-2가 동시 검출되었다 (Table 1).

3) 임상검체에서 VZV와 HSV-1, HSV-2의 검출 빈도와 typing에 따른 PCR 방법의 비교

① Primer 1, 2를 사용한 HSV PCR 시행 후 *HpaII*의 제한효소를 처리하여 VZV, HSV-1, HSV-2 감별 방법은 VZV의 경우에 선명하여 특이적이고 판독이 용이하였다. 그러나 HSV-1과 HSV-2의 감별은 어려웠다.

② 임상검체들에서 VZV 검출에 있어 nested

박혜경 등: PCR에 의한 HSV 1, 2와 VZV의 검출과 감별

Table 1. Detection results of VZV, HSV-1 and HSV-2 detection from vesicle fluids, serum and joint fluids by nested PCR method and two PCR methods combined with restriction enzyme digestion

Specimen	Sex	Age (year)	Nested VZV PCR	Primer 1, 2 PCR <i>HpaII</i> cut	Primer A, B PCR <i>BssHII</i> cut
VF1	.	.	NVZ +	VZ	HSV-2
VF2	.	.	NVZ +	VZ	H -
VF3	.	.	NVZ +	VZ	HSV-2
VF4	.	.	NVZ +	NT	HSV-2
VF5	.	.	NVZ +	VZ	H -
P1	F	75	NVZ +	VZ	HSV-2
P2	.	.	NVZ +	VZ	HSV-2
P3	M	51	NVZ +	VZ	HSV-2
P4	M	67	NVZ -	-	H -
P5	F	.	NVZ +	VZ	H -
P6	M	29	NVZ +	VZ	H -
P7	M	68	NVZ +	VZ	HSV-2
D3	F	.	NVZ +	VZ	HSV-2
D11	F	6/12	NVZ +	VZ	HSV-2
D17	M	6/12	NVZ +	NT	H -
D18	F	3/12	NVZ +	VZ	H -
D15	F	.	NVZ +	VZ	H -
D12	M	2	NVZ -	-	H -
D5	M	3/12	NVZ -	H	HSV-2
D6	M	3/12	NVZ +	VZ	H -
D1	.	.	NVZ +	VZ	H -
D4	M	1	NVZ +	VZ	H -
J24	M	43	NVZ -	H	HSV-2
J4	M	40	NVZ -	H	HSV-2
J17	M	39	NVZ -	H	HSV-1
J42	M	44	NVZ -	-	H -
J47	F	48	NVZ +	NT	H -
▽ J23	M	27	NVZ +	H	HSV-2
▽ J9	F	37	NVZ +	HSV-2	HSV-2
▽ J46	M	25	NVZ +	VZ	H -
J21	F	42	NVZ -	HSV-2	HSV-2
▽ J48	M	11	NVZ +	VZ	HSV-2
▽ J38	F	43	NVZ +	HSV-2	HSV-2
J5	F	.	NVZ +	VZ	H -
▽ J16	M	28	NVZ +	VZ	H -
J2	M	44	NVZ +	H	H -
J40	M	25	NVZ +	VZ	H -
▽ J37	F	31	NVZ +	VZ	H -
▽ J14	M	22	NVZ +	-	HSV-2
▽ J44	M	42	NVZ -	HSV-2	HSV-2
J49	M	.	NVZ +	-	H -
▽ J12	M	23	NVZ +	VZ	H -

+ PCR positive. - PCR negative. . unknown. NT not tested. VF vesicle fluids from VZV adults. J joint fluids. P serum from adult cancer patients. D serum from respiratory infected children.

PCR 방법은 아주 예민한 방법으로, 양성률은 수포액 (5/5, 100%), 면역억제환자의 혈청 (6/7, 85.7%), 호흡기질환의 소아 혈청 (8/10, 80%), 관절염환자의 관절액 (14/20, 70%) 이었다.

③ HSV-1가 HSV-2를 임상검체에서 검출하고 typing 하는데에는 primer A, B를 사용한 BssHII 제한효소로 처리하는 방법이 ①의 방법보다 예민하고 판독이 용이하였다 (Table 1).

고 찰

HSV의 빠른 검출과 혈청학적 typing은 임상검체를 세포가 들어있는 용기에 넣어 원심침전 후 세포배양을 하여 바이러스를 분리하거나, 단클론항체를 사용하였는데 이 방법들은 정확하고 예민하다고 알려져 있다. Lin 등 (1989)¹⁵⁾에 의하면 세포배양의 경우는 감염성의 바이러스 입자가 요구된다고 하였고, Pouletty 등 (1987)²³⁾은 단클론항체를 가지고 HSV 항원을 검출하는 방법은 수 시간 이내에 할 수 있으며 감염성의 바이러스 입자는 필요하지 않다고 하였다.

최근 PCR 방법은 소량의 바이러스 DNA 검출에 이점이 있어 가피와 같은 오래된 상처에서나, 불완전하게 보존된 적은 양에서 또는 포르말린으로 고정된 조직의 절편에서도 HSV의 진단이 가능하다고 Nahass 등 (1995)¹⁸⁾이 보고하였으며 그 외에도 HSV와 VZV의 감염의 진단에서 다양한 primer를 이용한 PCR에 의한 많은 연구가 있다^{24,25)}. 이러한 PCR 방법으로 HSV와 VZV를 검출할 때의 예민도와 난이도는 다양한 primer set의 존재와 자연적으로 바이러스에게 나타나는 유전적인 다양성이 결과에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있다.

VZV의 진단에서 PCR 방법을 이용한 Ozaki 등 (1991)²⁰⁾의 연구에서는 수두환자의 인후도말에서 26.2% (11/42)에서 양성을 나타내었고, 수두감염의 잠복기 후에 임상증세가 나타나는 예에서는 89.7% (35/39)에서 양성을 나타내어 PCR의 이용이 VZV의 진단에 적합함을 밝혔다.

본 연구에서는 수포액, 관절액, 혈청 등의 임상검체를 HEp-2 cell에 배양한 후 DNA를 추출하여 primer 1, 2를 이용한 PCR을 시행하면 HSV와 VZV의 396 bp, 405 bp의 band가 가까이 있어 판독이 난이한 경우도 있었으나, HpaII 제한효소의 처리는 두 바이러스의 감별에 도움을 주었다. 본

연구에서 특히 임상검체에서 VZV 결과가 불분명한 경우에는, 이 검체를 nested VZV PCR을 시행하면 PCR band가 뚜렷하고 HpaII 제한효소로 처리하여 330, 110 bp로 분획이 뚜렷하게 관찰되어 예민하고 정확한 진단이 가능하였다.

수포가 형성되는 피부과 질환에서 HSV-1, HSV-2 중 어느 type인지를 알고자 할 때는 세포배양하여 type 특이항체를 이용하여 증화항체 반응으로 감별하는데는 많은 시간과 비용이 소요된다. 또한 정형외과에 내원하는 관절염환자의 관절액에서 VZV의 동정은 세포배양하여 항혈청을 이용한 면역형광항체 반응으로 확인하는데에는 시간과 비용이 소요된다. 본 연구에서는 수포액, 관절액과 혈청검체에서 직접 DNA를 추출하여 PCR 방법으로 증폭한 HSV-1, HSV-2, VZV의 PCR 산물을 DdeI, HpaII의 두가지 제한효소로 처리하여 나누어지는 분절의 크기 차이로 감별이 가능한 방법을 응용한 것이다. 그러나 검체에 DNA의 양이 적을 경우는 판독이 어려웠다.

본 연구와 같이 관절액에서 HSV-1, HSV-2, VZV를 PCR 방법으로 검출한 연구는 국내외에 없으며, 또한 2세 미만의 호흡기질환의 소아 혈청검체에서 PCR 방법으로 HSV-2가 30% (3/10)에 검출된 최초의 보고이다. 그리고 대상성 포진의 성인환자의 수포액에서 VZV의 PCR band가 강하게 나타나 진단이 용이하였다.

임상검체인 수포액, 관절액과 혈청에서 직접 DNA를 분리하여 분자생물학적 방법을 이용하면 3가지 바이러스 동정과 감별이 12시간 이내에 이루어지므로, 피부과에 내원한 수포를 가진 환자의 진단과, 정형외과에 내원한 환자의 관절염이 VZV에 의한 경우라면 관절액에서 빠른 시간에 예민하고 정확한 진단이 가능하다. 이를 응용하여 치료에 적합한 항바이러스제를 선택하여 치료의 시기를 단축할 수 있어 임상적 가치가 크지만 양성률이 떨어진다.

본 연구에서와 같이 임상검체를 Vero cell에 배양하여 증폭된 DNA를 추출 후, PCR을 시행하고 제한효소로 처리 후, 전기영동하여 분획을 검사하는 것이 시간은 소요되나 (3~7일) 훨씬 정확하고 예민하다고 생각되었다. 임상검체 중 특히 성인 VZV의 환자의 수포액, 면역억제된 암환자의 혈청과 관절염환자의 관절액에서 VZV와 HSV-2의 혼합감염이, VZV nested PCR과 primer A, B를 사용하여 HSV PCR 시행 후에 BssHII 제한효소

처리시에 높게 검출되었다 (3/5예 (60%), 4/7예 (57.1%), 5/20예 (25.0%), Table 1).

결 론

1998년 1월부터 1998년 12월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 피부과, 내과, 소아과에 내원 또는 입원한 환자에서 채취한 검체들 수포액 (5예), 면역억제된 성인 암환자의 혈청 (7예), 호흡기감염의 소아 혈청 (10예)과, 같은 기간 동안 고려대학교 의과대학 구로병원 정형외과에 내원한 환자의 관절액 (20예)를 사용하여 VZV, HSV-1, HSV-2를 감별 검출하고자 하였다. 사용한 방법은 primer 1, 2를 사용한 HSV PCR을 시행 후 *HpaII* 제한효소 처리를 처리하는 방법과, VZV nested PCR 방법, 그리고 primer A, B를 사용한 HSV PCR 후 *BssHIII* 제한효소 처리하는 방법을 사용하였다.

1) VZV는 단독 또는 혼합감염의 형태로 임상검체인 수포액 (5예), 호흡기감염의 소아 혈청 (10예), 면역억제된 성인 암환자 혈청 (7예)과 관절액 (20예)의 합계 42예에서 nested VZV PCR 방법으로 33예 (78.6%)로 가장 많이 검출되었다.

2) HSV는 임상검체에서 단독 또는 혼합감염의 형태로 20/42예 (47.6%)에서 검출되었고 이중 HSV-2 (19예), HSV-1 (1예) 이었다.

3) VZV가 단독으로 검출된 예는 19/42예 (45.2%) 이었다. 호흡기질환의 소아 혈청 (6예), 관절염환자의 관절액 (9예), 수포액 (2예)와 면역억제된 성인 암환자의 혈청 (2예) 이었다.

4) HSV가 단독으로 검출된 예는 6/42예 (14.3%)이며 관절염환자의 관절액 (5예)과 호흡기질환의 소아 혈청 (1예) 이었다.

5) VZV와 HSV가 혼합감염을 일으킨 경우는 14/42예 (33.3%) 이었다. 수포액 (3예), 면역억제된 암환자의 혈청 (4예), 호흡기질환의 소아 혈청 (2예), 관절염환자의 관절액 (5예) 이었다.

6) HSV-1과 HSV-2의 검출과 typing 하는데에는 primer A, B를 사용한 HSV PCR을 시행 후 *BssHIII* 제한효소 처리하는 방법이 예민하고 판독이 용이하였다.

참 고 문 헌

1) 박혜경: 보체결합반응과 간접면역형광법을

사용한 herpes simplex virus 감염의 혈청역학적 조사. *이화의대지* **4**: 159-165, 1981.

- 2) 박혜경: 효소면역법에 의한 영아와 소아의 herpes simplex virus type 1과 varicella-zoster virus의 IgG, IgM, IgA 항체에 관한 연구. *대한미생물학회지* **24**: 619-629, 1989.
- 3) 박혜경: 특이 IgG 결합 활성과 immunoblotting에 의한 소아와 임신부의 varicella-zoster virus 감염의 항체반응. *대한미생물학회지* **26**: 579-584, 1991.
- 4) 박혜경, 서주영: Immunoblotting을 이용한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 특이 혈청항체의 감별. *대한미생물학회지* **29**: 647-654, 1994.
- 5) 박혜경, 서주영: 한국에서 분리한 varicella-zoster virus 야생주 및 백신주의 항원구조 및 유전자 제한효소 절편양상. *대한미생물학회지* **32**: 265-274, 1997.
- 6) Antonelli MS, Moreland LW, Brich JE: Herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with weekly, low-dose methotrexate. *Am J Med* **90**: 295-298, 1991.
- 7) Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgreen M: Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* **337**: 189-192, 1991.
- 8) Baron JM, Rubhen A, Grußendorf-Conen EI: Evaluation of a new general primer pair for rapid detection and differentiation of HSV-1, HSV-2 and VZV by polymerase chain reaction. *J Med Virol* **49**: 279-282, 1996.
- 9) Casas I, Tenorio A, Ory F, de 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.
- 10) Cohen BA, Rowley AH, Long CM: Herpes Simplex Type 2 in a Patient with Mollaret's Meningitis: Demonstration by Polymerase Chain Reaction. *An Neurol* **35**: 112-116, 1994.
- 11) De Clercq E, Descamps J, Verhelst G, Walker RT, Jones AS, Torrence PF, Shugar D: Comparative efficacy of anti-herpes against different strains of herpes simplex. *J Infect Dis* **141**: 563-

- 574, 1980.
- 12) Gliden DH, Dueland AN, Devlin ME, Mahalingan R, Cohro R: Varicella-zoster reactivation without rash. *J Inf Dis* **166**: 30-34, 1992.
 - 13) Kimura H, Shibata M, Kuzushima K, Nishikawa K, Nishiyama Y, Morishima T: Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol* **179**: 177-184, 1990.
 - 14) Kondo K, Nagafuji H, Hara A, Tomori C, Yamanishi K: Association of human herpes virus 6 infection of central nervous system with recurrence of febrile convulsion. *J Infect Dis* **167**: 1197-1200, 1993.
 - 15) Lin SY: Modification of shell bial centrifugation method for detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol* **27**: 1896-1897, 1989.
 - 16) Mcgeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P: The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **69**: 1531-1574, 1988.
 - 17) Nahass GT, Goldstein BA, Zhu WY: Comparison of Tzanck smear, viral culture and DNA diagnostic methods in detection of herpes simplex and varicella-zoster infection. *JAMA* **268**: 2541-2544, 1992.
 - 18) Nahass GT, Mandel MM, Cook S, Fan W, Leonardi CL: Detection of herpes simplex and varicella zoster infection from cutaneous lesions in different clinical stages with the polymerase chain reaction. *J Am Acad Dermatol* **32**: 730-733, 1995.
 - 19) Nahmias AJ, Keyserling H, Lee FK: Herpes simplex virus 1 and 2 In: Evans AS (Ed): *Viral infection of humans: epidemiology and control*, 3rd ed. Plenum Publishing Co., New York, pp 393-417, 1989.
 - 20) Ozaki T, Masuda S, Asano Y, Kondo K, Nama-zue J, Yamanishi K: Investigation of varicella-zoster virus DNA by the polymerase chain reaction in healthy children with varicella vaccination. *J Med Virol* **42**: 47-51, 1991.
 - 21) Ozaki T, Kajita Y, Asano Y, Aono T, Yamanishi K: Detection of varicella-zoster virus DNA in blood of children with varicella. *J Med Virol* **44**: 263-265, 1994.
 - 22) Penneys NS, Goldstein B, Nahass GT, Leonardi CL, Zhu WY: Herpes simplex virus DNA in occult lesions: demonstration by the polymerase chain reaction. *J Am Acad Dermatol* **24**: 689-692, 1991.
 - 23) Pouletty P, Chomel J, Thouvenot D, Catalan F, Rahillon V, Kadouche J: Detection of herpes simplex virus in direct specimens by immunofluorescence assay using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* **25**: 958-959, 1987.
 - 24) Shimizu C, Shimizu H, Mitsuda T, Tsukuda M, Ichikawa S, Yokota S: One step determination of herpes simplex type 1 and type 2 by polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes* **8**: 193-198, 1994.
 - 25) Tenorio A, Echevarria JE, Casas I, Echevarria JM, Tabares E: Detection and typing human herpes viruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **44**: 261-269, 1993.