

엔테로바이러스 검출을 위한 real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), reverse transcription-PCR (RT-PCR) 및 바이러스 배양법의 비교

나영란 · 조현철 · 이영숙 · 빈재훈 · 최흥식 · 민상기*

부산광역시보건환경연구원

Received February 13, 2008 / Accepted March 21, 2008

Comparison of the Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) Assay, Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) and Virus Isolation for the Detection of Enterovirus RNA. Young-Ran Na, Hyeon-Cheol Joe, Young-Suk Lee, Jae-Hun Bin, Hong-Sik Cheigh and Sang-Kee Min*. *Division of Epidemiology, Busan Institute of Health and Environment, Busan 613-104, Korea* - Rapid detection of enterovirus (EVs) is important in the management of aseptic meningitis. We examined the relative efficiency and specificity of the real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) comparing with the established reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and viral culture method which were used for the detection of enterovirus RNA in clinical specimens. Of the total 292 samples, 145 were found to be positive to enterovirus RNA by real-time NASBA, 101 were positive by viral culture, and 86 were positive by RT-PCR. 147 samples and 46 samples were determined to be negative and positive by all methods respectively, but 4 samples were positive only by real-time NASBA. To compare the specificity of each method, various clinical samples which were diagnosed for herpes simplex virus (HSV)-1, HSV-2, adenovirus, mumps, and rhinovirus were applied. Except one rhinovirus sample which was false positive to enterovirus RNA by RT-PCR, the other different samples were negative to all three methods. The real-time NASBA procedure can be completed within 5 hours in contrast with 9 hours for the RT-PCR and 3-14 days for the viral culture. From this study, it was suggested that the real-time NASBA assay could be a standardized, rapid, specific, and sensitive procedure for the detection of enterovirus RNA.

Key words : Enterovirus, real-time NASBA, RT-PCR, viral culture

서 론

Enteroviruses (EVs)는 *Picornaviridae* 과에 속하는 바이러스로 polioviruses (3 types), coxsackieviruses A (23 serotypes), coxsackieviruses B (6 serotypes), echoviruses (34 serotypes), enteroviruses (4 serotypes) 등 약 70종의 혈청형으로 분류된다. 게놈은 약 7,400 염기로 단일가닥 RNA이고 5'-noncoding region (NCR), 한 개의 open reading frame 및 3'-NCR로 구성되어 있다. Open reading frame은 약 2,100개의 아미노산으로 구성되는 다단백질의 생성에 필요한 정보를 가지고 있는 것으로 알려져 있고, 다단백질은 번역 후 과정을 통하여 4개의 구조단백질(VP1-VP4)과 7개의 비구조 단백질로 나누어지는 것으로 알려져 있다[8]. VP1-VP3은 비리온의 표면에 노출되어 있으며 이중 VP1은 중화반응에서 항원의 위치와 연관되어 혈청형을 결정하는데 중요한 부위이다.

Enterovirus 감염을 진단하는데 세포배양은 가장 널리 쓰이는 방법이지만 바이러스가 세포에서 자라기까지 많은 시간이 필요하며 세포배양 기술을 실험실에서 표준화시키는데 어려

움이 있다[7]. 그리고 coxsackieviruses A에 속하는 혈청형들은 세포배양에서 대개 잘 자라지 않는 것으로 알려져 있다 [10,13]. 반대로 분자생물학적 방법은 실험 소요시간이 비교적 짧고 세포배양에서 자라지 않는 혈청형까지 검출할 수 있는 장점을 가진다. 그래서 enterovirus의 RNA를 검출하기 위하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 법을 기초로 하는 여러 방법들이 제시되어 왔다[5,19,21]. 유전자 구조상 매우 변이가 커 넓은 스펙트럼을 가진 enterovirus의 subtype들을 공통적으로 검출하기 위하여 높은 보존성을 가진 5'-NCR을 표적으로 하는 RT-PCR법이 소개되었다[12]. 이 방법은 enterovirus 감염증을 진단하는데 매우 유용하지만 여러 단계를 거치므로 교차오염의 가능성이 있으며 별도의 전기영동이 필요한 단점이 있다.

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 은 RNA를 표적으로하며 avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, RNase H, T7 RNA polymerase등의 효소가 일정한 온도에서 동시에 반응하는 하는 원리를 이용하여 처음 고안되었으며[2], real-time NASBA는 enterovirus에 특이적인 molecular beacon probe를 사용하여 별도의 전기영동 없이 실시간으로 증폭되는 과정을 볼 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 무균성수막염으로 의심되는 환자의 뇌척수액, 대

*Corresponding author

Tel : +82-51-757-7502, Fax : +82-51-757-2879

E-mail : girin@bs21.net

변, 인후도찰물 검체를 대상으로 다양한 serotypes의 enterovirus를 검출하기 위하여 5'-NCR region을 target으로 한 primer와 molecular beacon [3]을 제작, NucleiSens Amplification kit (bioMerieux, Boxtel, The Netherlands)를 사용하여 real-time NASBA 시험을 실시하고, 현재 enterovirus를 검출하는데 사용되는 2 step RT-PCR과 바이러스 배양시험을 동시에 수행하여 각 실험법의 검출율, 편리성, 신속성을 비교 분석하였다. 아울러 무균성수막염 환자에서 enterovirus와 감별 진단이 필요한 다른 원인바이러스와 enterovirus와 유전적으로 유사한 rhinovirus를 사용하여 각 실험법의 정확성과 특이도를 비교하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 세포배양

2005년 4월부터 9월까지 부산지역 4개 병원 소아과 내원 무균성수막염 의심 환자의 대변 197건, 뇌척수액 69건, 인후도찰물 26건 등 총 292건의 검체를 공시재료로 사용하였다. 검체의 연령별 구분은 10세 미만인 256건, 10세 이상이 36건이며, 성별 구분으로는 남자 154건, 여자 138건이었다. 인후도찰물은 VTM (virus transport medium)을 사용하여 채취하였고 뇌척수액은 별도의 전처리 없이 사용하였다. 대변은 PBS/chloroform을 사용하여 10% 부유액으로 만든 다음 5분 동안 강하게 진탕하고 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다. 각각의 검체는 4°C에서 운반하였고 -70°C를 유지하여 보관하였다. 일반적으로 enterovirus의 분리에 가장 적절한 세포는 일차배양 원숭이 신장세포(primary monkey kidney cell)이지만 때때로 이 세포를 획득하기가 현실적으로 어려우므로 세계보건기구(WHO)가 추천하는 세포 중 RD (human rhabdomyosarcoma) 세포주를 사용하였다.

RNA 분리

대변상층액, 뇌척수액, 인후도찰물의 RNA 추출은 NucleiSens

Lysis Buffer와 NucleiSens Isolation Reagent를 사용하여 제조사(bioMerieux, Boxtel)의 프로토콜에 따라 수행하였다. 검체 200 µl와 900 µl의 lysis buffer를 사용하였고 25 µl를 elution하였다. 이 RNA 추출물을 real-time NASBA와 RT-PCR에 사용하였다.

Real-time NASBA 시험

Real-time NASBA를 이용한 enterovirus RNA 검출을 위하여 190 nucleotides의 specific primers와 molecular beacon probe [3]는 Eurogentec (Seraing, Belgium)에 의뢰하여 합성 및 HPLC 정제하였고, NucleiSens Amplification kit (bioMerieux, Boxtel)를 사용하여 수행하였다(Table 1). 10 µl master mix (0.2 µM primer 1, 0.2 µM primer 2, 0.2 µM molecular beacon probe, 90 mM KCl)에 5 µl template RNA를 첨가한 후 template RNA의 predenaturation과 master mix에 primer가 용해되게 하기 위해 65°C 5분, 41°C 5분간 반응하였다. 그리고 이 mixture에 5 µl의 enzyme mix (T7 RNA polymerase, AMV reverse transcriptase and RNase H)를 첨가하여 NucleiSens EasyQ analyzer (bioMerieux, Boxtel, The Netherlands)에서 41°C에서 150분간 반응하면서 증폭 및 검출을 수행하였다. 데이터는 NucleiSens EasyQ analyzer 제조사의 NucleiSens EasyQ director software (version 1.2.1.0)를 이용하여 분석하였다. 20건의 enterovirus 음성검체를 이용하여 4회의 real-time NASBA 실험을 수행하여 나온 결과 값을 제조사의 방법에 따라 계산하여 threshold fluorescence level을 결정하였다.

RT-PCR 시험

Enterovirus의 유전자 검출을 위하여는 보존성이 높은 것으로 알려진 5'-NCR region을 target으로 2 step RT-PCR을 수행하였으며[21], 바이러스 유전자형 확인을 하기 위하여는 바이러스 capsid 중 VP1 region을 target으로 2 step RT-PCR을 수행하였다[17,18]. 각각의 2 step RT-PCR에서 사용된 primer

Table 1. Primer and probe sequences for detection of enterovirus RNA

Methods	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	References
5'-NCR ^{a)} NASBA	primer 1	F-AATTSTAATACGACTCACTATAGGGCACCGGATGGCCAATCCA	[3]
	primer 2	F-GATGCAAGGTTCGCATATGAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAG	
	molecular beacon	F-CCATGCGTCTCCGGCCCTGAATGCGCGCATGG 5'- Fluorescent dye: FAM, 3'-Quencher: DABSYL	
5'-NCR RT-PCR	ENTF	F-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	[21]
	ENTR	R-ATTGTCACCATAAGCAGCCA	
VP1 ^{b)} RT-PCR	292	F-MIGCIGYIGARACNGG	[17]
	222	R-CICCGIGGGIAYRWACAT	

^{a)} NCR: noncoding region, ^{b)} VP: virus protein.

는 Table 1에 제시하였다. RT 반응은 reverse primer와 MMLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용하였다. RT 반응액은 5 µl nucleic acid elute, 3 µl 5× buffer, 3 µl dNTP, 1 µl reverse primer, 0.5 µl MMLV reverse transcriptase를 포함하여 총 15 µl가 되게 멸균증류수를 첨가하였다. Reverse transcription 반응은 20°C 10분, 42°C 90분으로 실시하였다. PCR 반응액의 조성은 cDNA 1 µl에 2.5 µl 10× buffer, 3 µl dNTP, 0.5 µl forward primer, 0.5 µl reverse primer, 0.5 µl Taq DNA polymerase (Takara, Japan)를 혼합하였고 멸균증류수를 첨가하여 총 25 µl로 조정하였다. PCR 수행은 95°C 5분간 pre-denaturation한 후 95°C/30초, 56°C/30초, 그리고 72°C/30초씩 3단계로 35cycles 수행한 후 마지막으로 72°C 3분간 extension을 실시하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동하여 5'-NCR region 436 bp, VP-1 region 358 bp의 band 유무를 확인하였다.

특이도 시험

각 시험법의 특이도를 알아보기 위하여 무균성수막염에서 enterovirus와 감별진단이 필요한 임상검체들과 유전적으로 enterovirus와 유사한 rhinovirus 검체를 real-time NASBA와 2 step RT-PCR, 그리고 바이러스 배양법으로 실험하였다. 각각의 바이러스는 특이적인 primer를 이용한 PCR로 양성인 확인된 것들을 사용하였다. 3건의 herpes simplex virus type 1 (HSV-1)과 3건의 HSV-2, 3건의 adenovirus, 2건의 mumps virus를 실험에 사용하였고 광주보건환경연구원에서 분양받은 10건의 rhinovirus를 각각의 실험에 사용하였다.

염기서열 분석

바이러스 배양 결과 세포변성효과를 보이는 배양 상층액과 5'-NCR 2 step RT-PCR 결과 양성을 보이는 검체에 대하여 유전자형 확인을 위하여 VP1 2 step RT-PCR을 수행하고 그 증폭산물은 솔젠트사(SolGent Co., Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. BigDye™ terminator V3.1 cycle sequencing kit (Perkin Elmer, USA)을 사용하여 sequencing 반응을 하였고, Millipore-Montage dye removal kit로 sequenc-

ing 산물을 정제하였으며 ABI 3730XL capillary DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)로 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI BLAST search program을 사용하여 기존의 보고된 바이러스와 sequence homology를 비교하여 기존 혈청형의 염기서열과 75% 이상의 상동성을 보이는 경우를 기준으로 바이러스의 유전자형을 결정하였다.

결 과

Real-time NASBA, 5'-NCR 2 step RT-PCR, 바이러스배양 시험결과 비교

대변 197건, 뇌척수액 69건, 인후도찰물 26건 등 총 292건의 검체를 대상으로 real-time NASBA, 바이러스배양, 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험을 각각 실시하였다. 검체를 RD 세포주에 배양하여 검체에 따라 3-5일에서 늦으면 일주일 후에 장내바이러스에 의한 전형적인 세포변성효과(CPE)인 세포의 원형화, 세포질의 수축, 세포의 파괴 등의 현상이 유발됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 NucleiSens Isolation Reagent와 NucleiSens Lysis Buffer를 사용하여 RNA를 분리하여 enterovirus real-time NASBA를 수행하고, 동시에 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험하여 436 bp 산물을 확인하였다(Fig. 2). 대변 42건과 뇌척수액 1건, 인후도찰물 3건 등 총 46건에서 3가지 시험법 모두 양성으로 나타났고, 대변 94건, 뇌척수액 45건, 인후도찰물 8건 등 총 147건의 검체는 3가지 시험법 모두에서 음성이었다. 양성검체는 real-time NASBA 145건, 세포배양 101건, 2 step RT-PCR 86건순으로 나타났다(Table 2). 바이러스 배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR의 결과를 비교하여 보면 두 가지 시험 모두에 양성인 검체는 대변 42건, 뇌척수액 1건, 인후도찰물 3건 등 총 46건이었고, 바이러스 배양 시험에서만 양성인 경우는 대변 33건, 뇌척수액 17건, 인후도찰물 5건 등 총 55건이었으며, 5'-NCR 2 step RT-PCR에서만 양성인 경우는 대변 26건, 뇌척수액 4건, 인후도찰물 10건 등 총 40건이었다(Table 3). 모든 5'-NCR 2 step RT-PCR 양성검체와 세포배양 양성검체는 real-time NASBA에서도 양성으로 나타났고 2건의 대변, 2건의 뇌척수액 등 총 4건의 검체에서는 real-time NASBA에

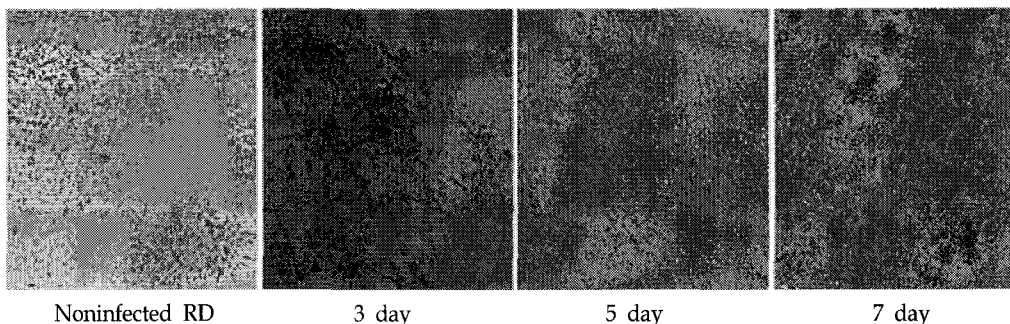


Fig. 1. Morphological changes in RD cells infected with enteroviruses.

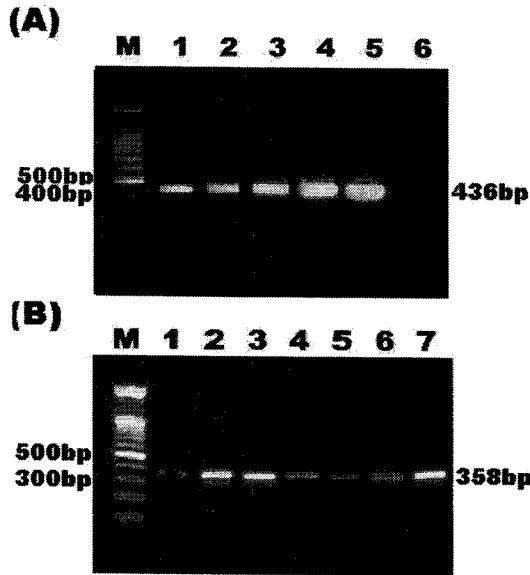


Fig. 2. Electrophoresis of the RT-PCR products with each target region. (A) 5'-NCR region amplification. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 2-5: Positive of 5'-NCR 2 step RT-PCR, Lane 6: Negative Control. (B) VP1 region amplification. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1-7: Positive of VP1 2 step RT-PCR. Each final products were resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis, respectively.

Table 2. Comparison with real-time NASBA, viral culture and 5'-NCR 2 step RT-PCR for detection of EV-positive samples

Detection methods	No. (%) of EV positive samples			
	Total (n=292)	Stool (n=197)	CSF ^{a)} (n=69)	TS ^{b)} (n=26)
Real-time NASBA	145 (49.7)	103	24	18
Viral culture	101 (34.6)	75	18	8
5'-NCR 2 step RT-PCR	86 (29.5)	68	5	13

^{a)}CSF: cerebrospinal fluid, ^{b)}TS: throat swab

Table 3. Comparison of viral culture and 5'-NCR 2 step RT-PCR for detection of EV in different samples

	Viral culture		Total
	No. of positives	No. of negatives	
2 step RT-PCR	46 (42 Stool; 1 CSF ^{a)} ; 3 TS ^{b)})	40 (26 Stool; 4 CSF; 10 TS)	86
	55 (33 Stool; 17 CSF; 5 TS)	151 (96 Stool; 47 CSF; 8 TS)	206
Total	101	191	292

^{a)}CSF: cerebrospinal fluid, ^{b)}TS: throat swab

서만 양성으로 나타났다.

특이도 검사

시험에 사용한 단순포진바이러스 1형(HSV-1), 2형(HSV-2), adenovirus 각 3건과 mumps virus 2건은 real-time NASBA, 바이러스 배양, 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험 모두에서 음성으로 나타났다. rhinovirus의 경우, 10건 모두에서 바이러스 배양과 real-time NASBA 시험 결과 음성으로 일치하였지만, 2 step RT-PCR 시험에서는 1건의 rhinovirus가 위양성 반응을 나타내었다.

양성 검체 특성

46건의 검체에서 3가지 시험법 모두에서 양성 결과를 보였고 이들은 모두 10세 미만 환자의 검체에서 검출되었다. 각각의 시험법 중 하나 또는 그 이상 양성으로 검출된 검체는 모두 145건이었으며 그 중 10세 미만 환자에서 143건이 검출되었고, 10세 이상에서 2건 검출되었으며 18세 이상에서는 1건도 검출되지 않았다. 검체별 양성율은 대변이 52.3%(103/197건), 뇌척수액 34.8%(24/69건), 인후도찰물 69.2%(18/26건)으로 각각 나타났다. 또 뇌척수액의 경우 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험에서 상대적으로 낮은 양성율 7.2%(5/69)을 보였으며, 인후도찰물은 바이러스 배양에서 양성율이 30.7%(8/26)으로 낮게 나타났다. 월별로는 6-8월에 분리된 검체건수가 많았고, 양성 환자의 성별비는 남 70 : 여 71로 유의한 차이점을 나타내지 않았다.

Real-time NASBA, 5'-NCR 2 step RT-PCR, 바이러스 배양시험의 편리성 및 소요시간 비교

세포배양에서 enterovirus가 자라는데 보통 3일에서 5일, 길게는 7일이 걸리며 14일 이상 세포병변효과가 관찰되지 않으면 음성으로 판정하게 된다. 그리고 세포배양 실험을 위해서는 실험이 없을 때에도 세포주를 항상 최적의 상태로 유지하기 위한 시간이 별도로 소요되며, 세포의 유지와 세포변성 효과를 확인하기 위하여 숙련된 인력이 필요하다. Real-time NASBA는 molecular beacon probe와 NucleiSens EasyQ를 사용하여 하나의 튜브에서 증폭과 검출이 동시에 일어나므로 복잡한 단계가 필요 없고 소요시간도 5시간이면 충분하다. 2 step RT-PCR은 RT와 PCR의 2단계가 필요하며 증폭산물을 확인하기 위한 별도의 전기영동과정이 필요하므로 총 9시간이 걸려 결과적으로 하루 만에 실험결과를 확인할 수는 없었다.

바이러스 유전자형 분석결과

바이러스 배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험결과 양성인 검체 141건(바이러스 배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR 모두 양성 46건, 바이러스 배양만 양성 55건, 5'-NCR 2 step RT-PCR만 양성 40건)에 대하여 VP-1 RT-PCR을 수행하여 검체 모두에서

Table 4. Genotype analysis of enteroviruses isolated from Busan, Korea in 2005

Serogroup	Genotype	No. (%) of isolation (n=141)
Coxsackievirus A	CA4	1 (0.7)
Coxsackievirus B	CB1	2 (1.4)
	CB2	1 (0.7)
	CB3	24 (17.0)
	CB5	53 (37.6)
Echovirus	E9	13 (9.2)
	E18	44 (31.2)
	E30	1 (0.7)
Enteroviruses	Untypable	2 (1.4)

358 bp의 증폭산물이 확인되어(Fig. 1) sequencing 분석을 수행하였다. 그 결과 coxsackievirus CA4형 1건, CB1형 2건, CB2형 1건, CB3 24건(17.0%), CB5 53건(37.6%), echovirus E9형 13건(9.2%), E18형 44건(31.2%), E30형 1건, untypable enterovirus 2건으로 분석되었다(Table 4). 그 중 세포배양에서는 음성이고 2 step RT-PCR에서만 양성을 보이는 검체 40건은 coxsackievirus CA4형 1건, CB3 2건, CB5 4건, echovirus E9형 3건, E18형 27건, E30형 1건, untypable enterovirus 2건으로 나타났다.

고 찰

Enteroviruses는 무균성수막염의 가장 중요한 원인 바이러스이며, 가벼운 비특이적 열에서부터 일반적인 상기도 감염증, 심한 심근염, 뇌염, 마비성척수염(paralytic poliomyelitis) 등의 매우 광범위한 질환의 원인이 되는 바이러스이며[6], 구강 항문 루트로 전파되어 혈관을 통해 목적장기로 이동한다[14]. Enteroviruses는 보통 높은 유행률과 낮은 치명률을 특징으로 하는 self-limited disease의 원인이 된다. Enteroviruses 감염증을 다른 세균감염과 신속하게 구별하여 진단하는 것은 다른 진단 검사의 불필요, 입원기간의 단축과 항생제 남용을 예방할 수 있어 중요하다.

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)는 avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, RNase H, T7 RNA polymerase등의 효소가 일정한 온도에서 동시에 반응하는 하는 원리를 사용하여 RNA를 검출하기 위하여 고안되었고[2], 이후로 특이적인 molecular beacon probe를 사용하여 별도의 전기영동 없이 증폭되는 과정을 실시간으로 볼 수 있다는 장점을 가진 real-time NASBA로 발전되었다. 현재 real-time NASBA는 *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae*, rabies, Hepatitis A virus등을 진단하는데 다양하게 시도되고 있다[11,15,16,20]. 한편, enterovirus의 경우 무균성수막염 환자의 뇌척수액에서 RNA 검출을 위하여 real-time NASBA시

험법을 적용한 결과 RT-PCR 시험법과 비슷한 민감도를 나타낸다는 보고와[1,9] 바이러스 배양법보다 민감도가 높다는 보고 등이 알려져 있다[4,13].

본 연구에서는 무균성수막염이 의심되는 환자의 뇌척수액의 대변, 인후도찰물 등의 다양한 검체에서 real-time NASBA 시험법을 적용하고 현재 enterovirus 진단에 많이 사용되는 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험 및 세포배양 시험을 비교 실험하여 각 시험의 검출율, 특이도, 실험수행 시 편리성, 시험 소요 시간, 교차오염 가능성 등을 확인하였다. 본 연구에서는 대변 197건, 뇌척수액 69건, 인후도찰물 26건을 포함하여 총 292건 임상검체를 대상으로 시험하였으며 그 결과 real-time NASBA에서 145건, 세포배양에서 101건, 5'-NCR 2 step RT-PCR에서 86건이 양성으로 나타나 real-time NASBA가 가장 민감도가 높은 시험법임을 알 수 있었다. 모든 5'-NCR 2 step RT-PCR 양성검체와 세포배양 양성검체는 real-time NASBA에서도 양성으로 나타났고 46건의 검체에서는 모든 실험에서 양성으로 나타났다.

세포배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험결과를 비교하면 2 step RT-PCR에서 양성이고 세포배양에서는 음성인 검체는 40건이었다(Table 3). 이에 유전자형 확인을 위하여 VP1 region을 target으로 하는 RT-PCR 산물로 염기서열을 분석하였다. 그 결과 세포배양에서는 잘 자라지 않는 특성을 가진 coxsackievirus CA4형 1건과 CB3 2건, CB5 4건, echovirus E9형 3건, E18형 27건, E30형 1건, untypable enterovirus 2건으로 각각 나타났다. 이는 검체의 취급과정 중에 바이러스의 vitality가 떨어져 세포배양에서는 자라지 않으나 2 step RT-PCR 시험은 바이러스의 활력과 관계없이 RNA가 증폭되는 특성의 차이로 사료되어진다. 반면, 세포배양은 양성이고 5'-NCR 2 step RT-PCR은 음성인 검체는 55건이었다. 이는 검체 자체에 활력을 가지는 바이러스가 2 step RT-PCR에서는 검출한계를 벗어난 매우 적은 숫자로 존재하거나 검체의 취급, 운반, 보관 중에 RNA가 소실된 것으로 추측된다. 이는 세포배양과 2 step RT-PCR 단독으로는 enterovirus를 검출하는데 한계가 있으며 두 실험을 상호 보완적으로 수행해야 함을 의미하며 아울러 검체 채취 및 보관, 운송 등의 과정에서 최적의 조건을 유지하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 그에 비해 real-time NASBA 시험은 민감도와 특이도가 높게 나타나 두 시험법을 대체할 가능성이 있다고 사료된다. Real-time NASBA 시험의 특이도 검사를 위하여 enterovirus 외에 뇌수막염의 원인이 되는 바이러스 즉, 단순포진바이러스 1형 3건, 단순포진바이러스 2형 3건, 아데노바이러스 3건, 유행성이하선염바이러스 2건 그리고 rhinovirus 10건을 대상으로 real-time NASBA, 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험, 세포배양 시험을 각각 수행하였다. 실험에 사용된 모든 바이러스는 세포배양, real-time NASBA 시험에서 모두 음성으로 나타났다. 흥미로운 결과로 5'-NCR 2 step RT-PCR 시험에서 10건의 rhinovirus중 1건에서 강한 양성 밴

다가 관찰되어 위양성 반응을 보여 다른 두 시험보다 특이도가 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 enterovirus는 rhinovirus와 유전적으로 매우 유사하며 다른 바이러스들 간에 교차반응이 많다는 보고[12]와 9건의 rhinovirus에 대해 2 step RT-PCR과 real-time NASBA를 수행한 결과 real-time NASBA에서는 모두 음성이었지만 2 step RT-PCR에서 3건의 rhinovirus가 위양성 반응을 보였다는 보고[1]와 유사한 결과를 보인다. 그러므로 무균성수막염 의심환자의 인후도찰물 검체에서 enterovirus 검출을 위한 2 step RT-PCR 시험 시 rhinovirus와의 감별시험이 필요할 것으로 사료된다.

또한 본 연구는 real-time NASBA와 enterovirus 검출의 표준시험법(Gold standard)으로 사용되어 왔던 세포배양과 2 step RT-PCR 시험 간의 사용자 편리성과 소요시간을 비교 고찰하였다. 세포배양에서 바이러스가 자라려면 보통 3일에서 5일, 길게는 7일이 걸리며 음성판정에는 14일 이상이 걸린다. 그리고 실험이 없을 때에도 세포주를 항상 최적의 상태로 유지하기 위한 시간이 별도로 소요되므로 enterovirus를 신속하게 검출하는 데는 한계가 있다. 그리고 세포배양을 위해 BSL (BioSafety Level) 2-3등급으로 별도의 구역화 된 실험실과 세포의 유지 및 CPE (Cytopathic Effect)를 확인을 위한 숙련된 인력이 필요하여 임상에서 무균성수막염 진단에 적용하기에는 어려움이 있다. 2 step RT-PCR은 cDNA를 합성하는 과정과 PCR로 증폭하는 과정 및 전기영동장치가 필요하므로 오염 방지를 위하여 별도로 3~4개의 실험구역이 필요하며 9시간 정도의 수행시간이 필요하다. 그러나 real-time NASBA는 molecular beacon probe와 NucleiSens EasyQ analyzer 제조사의 NucleiSens EasyQ director software를 사용하여 증폭과 검출이 실시간으로 확인됨으로 5시간 정도면 결과를 볼 수 있다. 이로써 NucleiSens EasyQ를 이용한 enterovirus real-time NASBA가 다른 실험에 비해 사용자의 편리성과 수행 시간이 짧음을 확인할 수 있었다. 그리고 단계별로 튜브를 열고 다른 튜브로 산물들을 옮겨 실험하는 2 step RT-PCR이나 여러 검체를 세포에 접종할 시 검체 간의 오염가능성이 있어 신중한 주의를 요하는 세포배양법에 비해 real-time NASBA는 하나의 튜브에서 증폭과 검출이 동시에 일어나므로 교차오염을 줄일 수 있다는 장점을 가진다. 또한 real-time NASBA는 세포배양이나 2 step RT-PCR에 비해 구역화 된 별도의 실험공간이 필요치 않으며 비교적 간단한 시설과 장비, 시약으로도 충분히 운영가능하다. 그러므로 일선 병원과 소규모 실험실에서 무균성수막염을 신속하게 진단하는데 쉽게 적용할 수 있어, 결과적으로 부적절한 항생제의 사용을 막을 수 있고 입원 시간을 단축하는데 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 무균성수막염 의심환자의 다양한 검체로부터

enterovirus의 진단을 위하여 real-time NASBA, 2 step RT-PCR 시험과 세포배양 시험을 각각 실시하여 각 시험법의 검출율, 특이도, 사용자 편리성, 시험소요 시간, 교차오염의 가능성 등을 비교 검토하였다. 비교시험 결과 전체 292건의 검체로부터 real-time NASBA에서 145건, 세포배양에서 101건, 2 step RT-PCR에서 86건이 양성으로 나타나 real-time NASBA가 가장 검출율이 높은 시험법임을 알 수 있었다. Enterovirus 외의 무균성수막염 원인바이러스에 대한 특이도 비교 시험결과 2 step RT-PCR 시험에서 rhinovirus 10건 중 1건이 위양성 반응을 나타내어 다른 시험법에 비해 특이도가 떨어지는 것으로 나타났다. Real-time NASBA는 하나의 튜브에서 증폭과 검출이 동시에 일어나 다른 시험과 비교하여 교차오염의 가능성이 낮으며 또한 시험 소요시간이 5시간 정도로 세포배양(5-14일 소요) 및 2 step RT-PCR(9시간소요)에 비하여 신속하게 진단할 수 있어 일선병원이나 실험실에서 enterovirus를 검출을 위하여 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Capaul, S. E. and M. H. Gorgioevski. 2005. Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ enterovirus assay. *J. Clin. Virol.* **32**, 236-240.
2. Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence based amplification. *Nature* **350**, 91.
3. Fox, J. D., S. Han, A. Samuelson, Y. Zhang, M. L. Neale and D. Westmoreland. 2002. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) for diagnosis of enterovirus infections using the NucliSens Basic kit. *J. Clinical Virol.* **24**, 117-120.
4. Ginocchion, C., F. Zhang, A. Malhotra, R. Manji, P. Sillekens, F. Helma, M. Overdyk and M. Peeters. 2005. Development technical performance and clinical evaluation of a nucli sens basic kit application for detection of enterovirus RNA cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2616-2623.
5. Glimarker, M., B. Johansson, P. Olcen, A. Ehrnst and M. Forsgren. 1993. Detection of enterovirus RNA by polymeric chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scan. J. Infect. Dis.* **25**, 547-557.
6. Gorgioevski-Hrisoho, M., J. D. Schmacher, N. Vilimonovic, D. Germann and L. Matter. 1998. Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2408-2412.
7. Grandien, M., M. Forsgren and A. Ehrnst. 1995. Enteroviruses diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection. pp. 279-297, In Lennette E. H. and E. T. Lennette, 7th eds. *American Public Health Association*, Washington DC.
8. Hellen, C. U. and E. Wimmer. 1995. Enterovirus structure and assembly. pp. 155-174, *Human enterovirus infection*, ASM press, Washington DC.
9. Heim, A. and J. Schumann. 2002. Development and evalu-

- ation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. *J. Virological Methods* **103**, 101-107.
10. Hsiung, G. D. 1994. *Picornaviridae*. pp. 119, 4th eds. Hsiung's diagnostic virology, New Haven, Yale University press.
 11. Jean, J., B. Blais, A. Darveau and I. Fliss. 2001. Detection of hepatitis a virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5593-5600.
 12. Lai, K. K. Y., L. Cook, S. Wendt, L. Conrey and K. R. Jerome. 2003. Evaluation of realtime PCR versus PCR with liquid phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3133-3141.
 13. Landry, M. L., R. Garner and D. Ferguson. 2003. Comparison of the NucliSens basic kit (nucleic acid sequence based amplification) and Argene Biosoft enterovirus consensus reverse transcription PCR assay for rapid enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5006-5010.
 14. Landry, M. L., R. Garner and D. Ferguson. 2003. Rapid enterovirus RNA detection in clinical specimens by using nucleic acid sequence based amplification. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 346-350.
 15. Loens, K., D. Ursi, M. Ieven, A. P. Van, P. Sillekens, P. Oudshoorn and H. Goossens. 2002. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in spiked clinical samples by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1339-1345.
 16. Min, J. and A. J. Baeumer. 2002. Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Anal. Biochem.* **303**, 186-193.
 17. Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick and A. Pallansch. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* **73**, 1941-1948.
 18. Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, M. R. Flemister, B. A. Brown and M. A. Pallansch. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1288-1293.
 19. Rotbart, H. A. 1990. Enzymatic RNA amplification of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 438-442.
 20. Wacharapluesadee, S. and T. L. Hemachudha. 2001. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* **358**, 892-893.
 21. Zoll, G. J., W. J. Melcher, H. Kopecka, G. Jambros and H. J. Vanderpoel. 1992. General primer mediated polymeric chain reaction for detection of enteroviruses; application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 160.