

## Rapid Molecular Diagnosis using Real-time Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) for Detection of Influenza A Virus Subtypes

Jaewon Lim<sup>1</sup>, In Soo Lee<sup>2</sup>, Yoonjung Cho<sup>1</sup>, Hyunwoo Jin<sup>1</sup>, Yeonim Choi<sup>1</sup>,  
Hyeyoung Lee<sup>1,†</sup> and Tae Ue Kim<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University,  
Wonju, Kangwon-do 220-710, Korea

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Hyejeon Colleague, Hongseong, Chungcheongnam-do 350-702, Korea

Influenza A virus of the *Orthomyxoviridae* family is a contagious respiratory pathogen that continues to evolve and burden in the human public health. It is able to spread efficiently from human to human and have the potential to cause pandemics with significant morbidity and mortality. It has been estimated that every year about 500 million people are infected with this virus, causing about approximately 0.25 to 0.5 million people deaths worldwide. Influenza A viruses are classified into different subtypes by antigenicity based on their hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. The sudden emergence of influenza A virus subtypes and access for epidemiological analysis of this subtypes demanded a rapid development of specific diagnostic tools. Also, rapid identification of the subtypes can help to determine the antiviral treatment, because the different subtypes have a different antiviral drug resistance patterns. In this study, our aim is to detect influenza A virus subtypes by using real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) which has high sensitivity and specificity through molecular beacon. Real-time NASBA is a method that able to shorten the time compare to other molecular diagnostic tools and is performed by isothermal condition. We selected major pandemic influenza A virus subtypes, H3N2 and H5N1. Three influenza A virus gene fragments such as HA, NA and matrix protein (M) gene were targeted. M gene is distinguished influenza A virus from other influenza virus. We designed specific primers and molecular beacons for HA, NA and M gene, respectively. In brief, the results showed that the specificity of the real-time NASBA was higher than reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, time to positivity (TTP) of this method was shorter than real-time PCR. This study suggests that the rapid detection of neo-appearance pandemic influenza A virus using real-time NASBA has the potential to determine the subtypes.

**Key Words:** Influenza A virus, Real-time NASBA, RT-PCR

### 서 론

인플루엔자 A 바이러스 (Influenza A virus)는 *Orthomyxoviridae*에 속하는 바이러스로써, 수세기 동안 국내를 포함하여 세계 여러 지역에서 호흡기 질환의 주요한 병원체 중의 하나이며 여러 차례 대유행을 일으켜 왔다 (Hwang

et al., 2004; Schulze et al., 2010). 이 바이러스에 감염되면 건강한 성인의 경우 경미한 상기도 감염증을 유발하지만, 만성질환자, 유아, 노약자, 입원 환자 등 고위험 군에서는 급성 호흡기 질환을 유발시키며 생명의 위협을 초래하기도 한다 (Kim et al., 1995). 또한 인체간 감염 전파 속도가 매우 빨라 매년 전 세계적으로 계절독감을 일으키며, 대유행으로 확산이 되는 경우 밀집된 인구집단에서 높은 발병률과 사망률을 나타내기도 한다 (Arias et al., 2009; Pabbaraju et al., 2009). 매년 전 세계적으로 5억 명 정도가 인플루엔자 A 바이러스에 감염이 되고 있으며, 감염된 인구 중 약 25~50만 명 정도가 본 바이러스에 의해 야기된 호흡기 관련 질환으로 사망하고 있다 (Arias et al., 2009).

인플루엔자 A 바이러스는 8개의 RNA 절편을 유전체

\*접수일: 2011년 9월 6일 / 수정일: 2011년 10월 26일  
채택일: 2011년 11월 8일

†Corresponding author: Tae Ue Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea.

Tel: 82-33-760-2424, e-mail: kimtu@yonsei.ac.kr

†Corresponding author: Hyeyoung Lee, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea.

Tel: 82-33-760-2740, e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

로 가지고 있으며, 그 중에서 당단백질인 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)가 가지는 항원성에 의하여 여러 가지 아형 (subtypes)으로 분류된다. HA 당단백질의 항원형은 총 16가지 아형 (H1-H16)을 가지며 NA 당단백질은 총 9가지 아형 (N1-N9)을 지닌다. 이 두 가지 표면 당단백질은 숙주의 면역방어와도 밀접한 연관성을 가지며 당단백질의 항원형이 어떻게 달라지는가에 따라 바이러스에 대한 숙주의 감수성과 면역반응이 다르게 나타나게 된다 (Kim et al., 2005; Arias et al., 2009; Saxena et al., 2010). 또한 표면 HA, NA 당단백질의 유전자가 항원 대변이 (antigenic shift)나 항원 소변이 (antigenic drift)에 의하여 변화하게 되면 인체에 감염성을 나타내는 기존의 바이러스 항원형과 다른 아형의 바이러스가 출현할 수 있고, 이로 인해 치명적이고 광범위한 대유행이 야기될 수도 있다 (Wiely and Skehel, 1987; Hwang et al., 2004). 대표적인 예로 2009년 유행했던 변종 H1N1 바이러스를 들 수 있는데, 세계 보건 기구 (World Health Organization, WHO)에 따르면 2009년 4월부터 2009년 10월까지 변종 H1N1 바이러스에 의해 318,925건의 감염이 보고되었으며, 그 중 최소한 3,917명이 사망하였다 (Saxena et al., 2010).

인플루엔자 A 바이러스 감염에 의하여 야기되는 호흡기 질환을 효과적으로 치료하기 위해선 바이러스의 제거를 위한 항바이러스 약제의 투여가 필요하지만, 바이러스의 아형에 따라 항바이러스 약제에 대한 감수성이 다르게 나타나므로 인플루엔자 A 바이러스의 아형을 분류하는 것은 매우 중요하다 (Kamps et al., 2006; Chidlow et al., 2010; schulze et al., 2010). 또한 매년 인플루엔자 A 바이러스의 유행을 예측하기 위한 역학적 통계 분석과 이를 바탕으로 한 예방 및 백신 개발에 있어서도 바이러스 아형을 분류하는 것은 매우 중요하다 할 수 있다 (Kamps et al., 2006).

현재까지 일반적인 인플루엔자 A 바이러스 검사 방법으로는 바이러스 배양, 혈청학적 검사, 직접 항원 검출법 등이 있으며, 최근 분자진단학적 기술을 이용한 진단 방법이 개발이 되어 적용되거나 개발 중에 있다 (Park et al., 2001; Kamps et al., 2006). 세포 배양을 통한 바이러스의 분리동정 방법은 유행하는 바이러스의 정확한 아형 분석과 유행 가능한 바이러스 후보의 확보 및 백신 제조를 위해 반드시 필요한 방법이지만, 바이러스 분리에 적어도 일주일 이상 소요된다는 점과 더불어 고가의 비용으로 인해 신속한 분리동정 방법으로는 적합하지 못하다. 혈청학적 진단이나 직접 항원 검출법은 신속하게 아형에 대

한 동정은 가능하나 그 민감도와 특이도에 있어서 매우 낮다는 단점이 존재한다 (Kim et al., 1995; Park et al., 2001). 이러한 고전적 진단법의 단점을 극복하기 위하여 분자진단학적 방법을 이용한 아형 분석이 대두되고 있으며, 이러한 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 또는 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (real-time RT-PCR)과 같은 인플루엔자 A 바이러스 아형 분석 방법이 행해지고 있다 (Pabbaraju et al., 2009; Schulze et al., 2010). 하지만 RT-PCR이나 real-time RT-PCR의 경우 인플루엔자 A 바이러스의 유전체인 RNA를 이용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하는 과정이 필요하고 이 과정에서 오염이 발생할 수 있으며, 또한 시간을 추가적으로 소모하게 된다 (Zhao et al., 2010).

최근에 이용되고 있는 분자진단학적 분석 방법인 real-time nucleic acid sequence based amplification (real-time NASBA)는 목표가 되는 RNA를 이용하여 dsDNA를 합성하고 다시 RNA를 증폭한 뒤, 증폭된 RNA와 상보적인 염기서열을 가진 molecular beacon이 결합을 하게 되고, 결합 후 발생하는 형광 신호를 실시간으로 분석하는 방법이다 (Molden et al., 2007; Loens et al., 2008). 또한 real-time NASBA는 cDNA를 따로 합성하는 과정을 거치지 않기 때문에 RT-PCR이나 real-time RT-PCR에 비해 오염에 대한 위험도가 적으며, 증폭과정 또한 전사과정을 응용하여서 매우 빠르게 RNA를 증폭하게 되어 분석 시간이 비교적 짧다는 장점이 있다 (Ge et al., 2010; Moore et al., 2010).

우리는 본 연구에서 앞으로 유행할 가능성이 있는 인플루엔자 A 바이러스의 아형을 선별하고 각각의 아형 유전자 정보를 수집하였다. 그리고 real-time NASBA를 이용하여 신속 정확하게 인플루엔자 A 바이러스 아형을 진단할 수 있는 분자진단학적 방법을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 인플루엔자 A 바이러스 아형 선별 및 유전자 염기서열 수집 및 비교

현재까지 대유행한 인플루엔자 A 바이러스 아형으로는 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1이 있다 (Kamps et al., 2006). 우리는 그 중 H3N2 및 H5N1을 선별하여 아형의 유전자 염기서열을 수집하였다. Matrix protein (M) gene은 다른 호흡기 질환 관련 바이러스로부터 인플루엔자 A 바이러스

를 감별하기 위해 분석을 하였고, HA gene과 NA gene은 각각의 아형을 구분하기 위해 분석을 하였다. M gene에 대해서는 H1N1, H2N2, H3N2 그리고 H5N1 등 총 4개 아형의 유전자 염기서열 700개를 수집하여 비교 분석하였다. H3N2 아형의 HA gene은 214개의 유전자 염기서열을 수집하였고, NA gene은 196개, 그리고 H5N1 아형의 HA gene 68개, NA gene 68개를 수집한 뒤 각각 비교 분석하였다. 모든 유전자 염기서열은 미국의 National Institutes of Health (NIH)의 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 수집하였다. 수집한 유전자 염기서열은 multi-alignment program (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)을 통하여 비교 분석하였다.

#### 인플루엔자 A 바이러스 아형 표준 유전자 제작

본 연구에 사용할 아형 표준 유전자를 제작하기 위하여 아형 표준 균주를 선정하였다. M gene에 대해서는 모든 아형이 공통적으로 포함하고 있는 부위의 유전자 염기서열을 바탕으로 하였으며, 염기서열은 A/Korea/01/2009 (H1N1) strain을 기준으로 하였다. H3N2 아형은 A/Thailand/CU23/2006 (H3N2) strain을 표준 균주로 선정하고 H5N1 아형은 A/Indonesia/CDC739/2006 (H5N1) strain

을 표준 균주로 선정하였다. 특이도 확인을 위해 A/Korea/01/2009 (H1N1) 및 A/Japan/305/1957 (H2N2) strain의 HA/NA gene을 대조균으로 선정하였다. 그리고 각 표준 유전자 합성을 Bioneer (Daejeon, Korea) 사에 의뢰하여 제작하였다.

#### Real-time NASBA 용 primer 및 molecular beacon 디자인

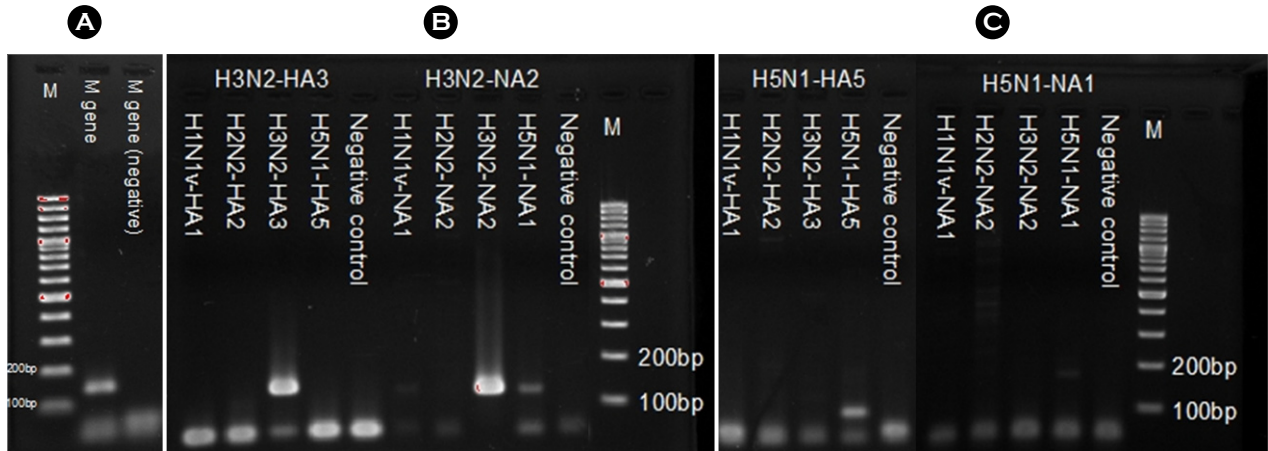
분석한 유전자 염기서열을 바탕으로 M gene과 각 아형의 HA 및 NA gene에 특이적인 primer 및 molecular beacon을 디자인 하였다 (Table 1). 모든 forward primer에는 RNA를 증폭할 수 있도록 T7 RNA polymerase promoter sequence를 부착하였다. 또한 모든 molecular beacon에는 stem-loop 구조를 이루도록 하기 위해 양 끝에 5'-CGA TCG-3'를 부착하였고 5' 끝에 6-carboxy fluorescein fluorophore를 포함하고 3'에 Dabcyl quencher를 부착하도록 디자인 하였다.

#### PCR

각각의 표준 유전자에 대하여 디자인한 primer의 증폭여부를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. 각각의 표준 유전자 template를 0.2 nM 농도가 되도록 한 다음,

**Table 1.** Sequences of oligonucleotide primers and molecular beacons

Target gene	Primer & beacon	Sequence (5'-3')
M	Forward primer	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G AGA AGG AAC ACA GAT CTT GAG GCT CTC ATG</u>
	Reverse primer	GCT GCA GTC CTC GCT CAC TG
	Molecular beacon	<u>FAM-CGA TCG AAG GGG GAG CAT GAT ATG AAT GGT CGA TCG-DABCYL</u>
H3N2 HA3	Forward primer	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G AGA AGG CAA AAT GTA AAC AGG ATC ACA TAT GG</u>
	Reverse primer	ATT GCG CCA AAT ATG CCT CTA G
	Molecular beacon	<u>FAM-CGA TCG TTC GCA TCC CTG TTG CCA ATT TCA CGA TCG-DABCYL</u>
H3N2 NA2	Forward primer	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G AGA AGG AAA TTG CAG ATA AAT AGG CAA GTC A</u>
	Reverse primer	CCT TAT CAA CTC CAC ATA AAA GCA
	Molecular beacon	<u>FAM-CGA TCG GCA GCT TTT GCC TTC AAC AGA CGA TCG-DABCYL</u>
H5N1 HA5	Forward primer	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G AGA AGG GAA TCC ACT CAA AAG GCA ATA GA</u>
	Reverse primer	CAA GAA GAT GGA AGA CGG GTT
	Molecular beacon	<u>FAM-CGA TCG AGC CTC AAA CTG AGT GTT CAT CGA TCG-DABCYL</u>
H5N1 NA1	Forward primer	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G AGA AGG TAG CAA TAA CTG ATT GGT CAG GAT A</u>
	Reverse primer	CAA TTT GGA CTA GTG GAA GCA GCA
	Molecular beacon	<u>FAM-CGA TCG TCA ACC CAG AAA CAA GGT CTT ATG CA CGA TCG-DABCYL</u>



**Fig. 1. PCR results of each influenza A virus subtypes reference genes.** Each of subtype reference genes (M/HA/NA) was amplified with specific primer to confirm specificity. PCR using (A) M gene primer, (B) H3N2 HA3 gene and H3N2 NA2 gene primer and (C) H5N1 HA5 gene and H5N1 NA1 gene primer.

표준 유전자 template 10  $\mu$ l, 10 $\times$  *Taq* polymerase buffer (Cosmo Genetech, Seoul, Korea) 2  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP (Cosmo Genetech, Seoul, Korea) 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ M forward/reverse primer 2  $\mu$ l, 2.5 U/ $\mu$ l *Taq* polymerase (Cosmo Genetech, Seoul, Korea) 0.2  $\mu$ l을 섞은 후 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 증류수를 분주하였다. 그리고 난 후 thermocycler (Applied Biosystems, California, USA) 장비를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 41 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초씩 35 cycles를 시행한 후 최종 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 처리하였다. PCR 합성물은 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide (EtBr)가 포함된 1.8% agarose gel (w/v)에 전기영동을 하여 확인을 하였으며, 100 bp DNA ladder marker (Bioneer, Daejeon, Korea)와 비교하였다.

#### Real-time NASBA

각 표준 유전자에 대해 디자인한 molecular beacon이 primer에 의해 형성된 transcript를 검출할 수 있는지 확인하기 위하여 real-time NASBA를 시행하였다. 동시에 각각의 molecular beacon에 대한 특이도 성능을 분석하고 final signal과 time to positivity (TTP)를 측정하였다. Real-time NASBA는 NucliSENS basic kit (v2; bioMérieux Korea, Seoul, Korea)를 이용하였고 protocol은 bioMérieux사에서 제공한 지침에 따랐다. 0.2 nM 표준 유전자 template 2.5  $\mu$ l, 20  $\mu$ M forward/reverse primer, 10  $\mu$ M molecular beacon, NASBA enzyme mixture (T7 RNA polymerase, AMV-RT, RNase H)를 섞은 후 최종 부피가 10  $\mu$ l가 되도록 DEPC-treated water를 분주하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 5분, 41 $^{\circ}$ C에

서 5분 처리한 후 NucliSENS EasyQ analyzer (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)장비에서 150분 동안 41 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응 후 NucliSENS EasyQ Director software (version 2; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 결과를 분석하였다.

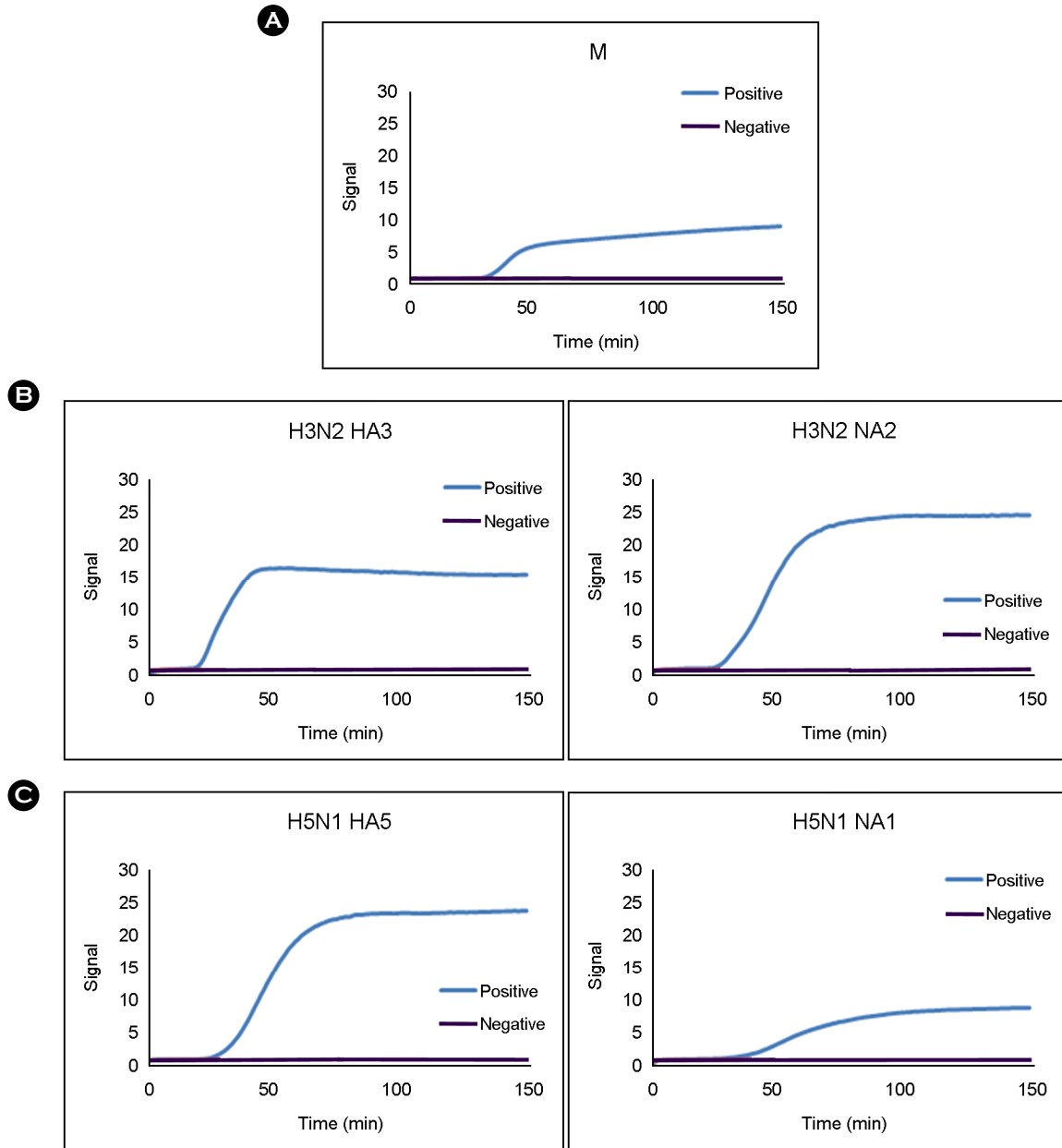
## 결 과

#### 표준 유전자 증폭여부 확인 및 특이도 관찰

디자인한 각 아형의 표준 유전자에 대한 증폭여부와 특이도를 확인하기 위하여 PCR을 수행한 결과 각각의 primer에 대상이 되는 표준 유전자를 증폭하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). M gene에서 141 bp, H3N2에서 각각 142 bp의 HA3 gene, 140 bp의 NA2 gene, H5N1에서 각각 149 bp의 HA5 gene, 167 bp의 NA1 gene에 대한 amplicon을 형성하는 것을 확인할 수 있었고 (Fig. 1-B), H3N2 HA3 gene을 제외한 나머지 primer에서 각 표적 표준 유전자를 특이적으로 증폭하는 것을 확인할 수 있었다. 다른 primer에 비해 H5N1 HA5 gene과 NA1 gene에 대한 primer (Fig. 1-C)는 증폭량이 상대적으로 적은 것을 볼 수 있었다.

#### Real-time NASBA의 조건 확립 및 성능 평가

각 표준 유전자에 대한 real-time NASBA를 실행한 결과 디자인한 각각의 molecular beacon에 의하여 양성 signal이 나오는 것을 확인할 수 있었고, cut-off line을 2로 설정한 것이 적합했음을 보여주고 있다 (Fig. 2). Cut-off



**Fig. 2. Real-time NASBA of Influenza A virus subtypes H3N2 and H5N1.** Real-time NASBA was performed for each gene targets using positive (target template) and negative controls. It was confirmed that optimal cut-off line signal value was 2. Furthermore, the signals of each genes rise up from 21 to 41 minutes. Real-time NASBA was performed by (A) H1N1 M gene template, (B) H3N2 HA3/NA2 gene templates and (C) H5N1 HA5/NA1 gene templates.

line은 양성 표준 유전자와 음성 대조군을 이용하여 실험한 결과 음성 대조군에서는 final signal이 2 미만으로 나오는 것을 확인하고 임의로 설정하였다 (data not shown). 또한 최종 signal과 time to positivity (TTP)를 비교한 결과 60분 이내에 표준 유전자에 대한 양성 판정이 가능함을 알 수 있었다 (Table 2). TTP값의 경우 H5N1 HA5에서는 분석을 시작한지 28분만에 양성 값을 나타냈으며, 가장

늦은 경우인 H5N1 NA1에서도 41분 경과 후 양성 값을 보였다. 또한 양성 final signal 값은 음성 대조군과 비교 시 확연하게 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있다.

#### Real-time NASBA의 특이도 확인

각각의 molecular beacon의 표준 유전자에 대한 특이도를 확인하기 위한 real-time NASBA를 진행한 결과 H3N2

와 H5N1의 HA/NA gene에 대한 molecular beacon의 특이도가 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). H3N2의 NA2 gene 특이 molecular beacon의 경우 H2N2 NA2 gene에 대한 교차반응 없이 특이도가 확보되는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 3-A), H5N1 NA1 gene 특이 molecular beacon의 경우에도 마찬가지로 H1N1 NA1 gene에 대한 교차반응이 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-B). 특히

H3N2 NA2의 경우 primer에 의해 다른 아형의 NA gene이 증폭되었으나 (Fig. 1-B), real-time NASBA의 경우에는 molecular beacon이 가지는 특이도에 의하여 다른 아형에서 양성 signal이 나타나지 않았다 (Fig. 3-B).

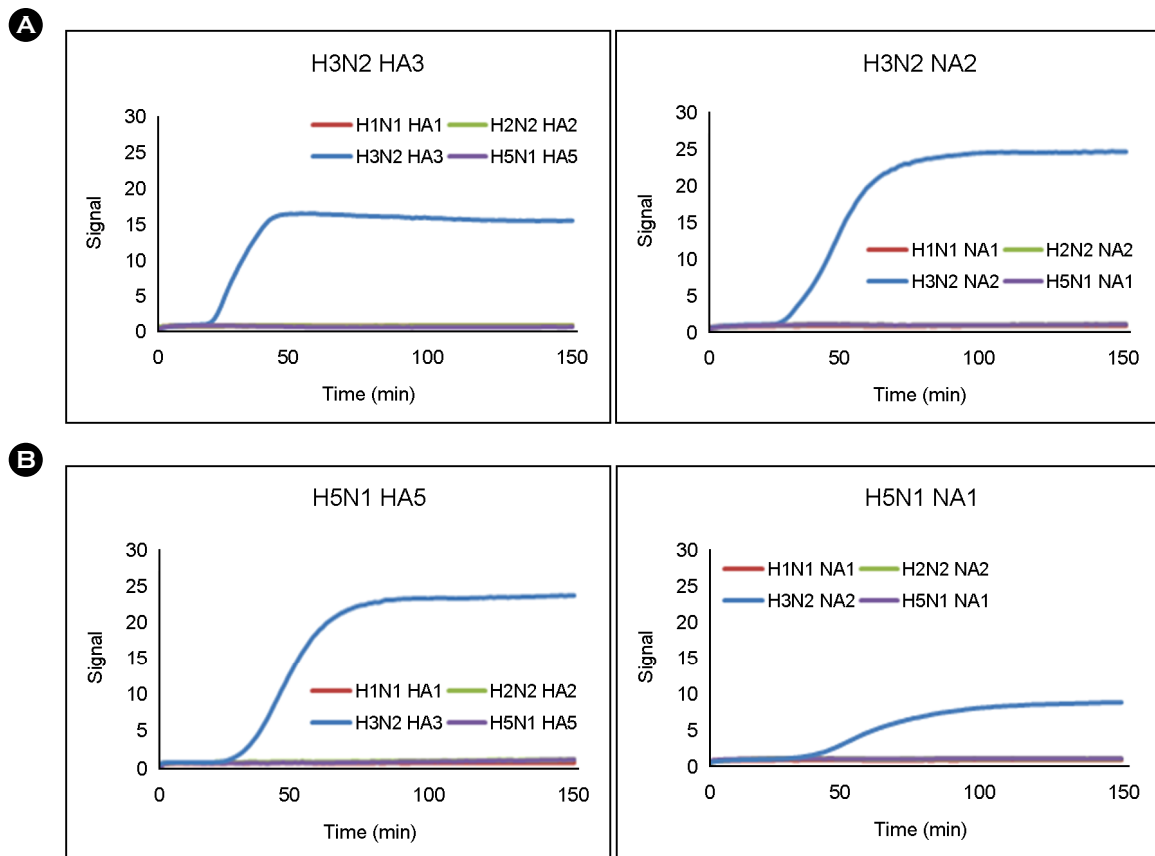
## 고 찰

인플루엔자 A 바이러스는 20세기 이후 1918년 스페인 독감을 시작으로 3~4차례 대유행을 야기하고 동시에 계절 독감을 유발하면서 매년 25~50만 명이 사망하고 있으며, 특히 대유행이 있는 시기에는 그 상황에 따른 차이가 있으나 적게는 수 만에서 많게는 수백 만 명을 사망에 이르게 하고 있다. 대유행의 시기 또한 반복적인 주기를 가지고 일어나고 있으며, 현재까지 알려진 바에 의하면 대유행과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있는 인플루엔자 A 바이러스의 아형은 H1N1, H2N2 그리고 H3N2가 있다 (Kamps et al., 2006). 하지만 2009년에는 기존의 계절형

**Table 2.** The time to positivity (TTP) and final signal value of real-time NASBA

Target	TTP (min)	Final signal
M	35	9.062
H3N2 HA3	21	15.526
H3N2 NA2	28	24.496
H5N1 HA5	28	23.763
H5N1 NA1	41	8.843

Signal value >2 was positive in this study.



**Fig. 3.** The specificities of Influenza A virus subtypes in real-time NASBA. Each of subtype HA/NA gene specific molecular beacon was used to confirm specificity. Real-time NASBA using (A) H3N2 HA3/NA2 gene specific molecular beacon and (B) H5N1 HA5/NA1 gene specific molecular beacon.

H1N1과는 다른 전염성과 병원성을 지닌 돼지로부터 유래된 H1N1에 의한 대유행이 나타난 바 있으며 (Schulze et al., 2010), 2006년에는 조류에서 유래한 것으로 알려진 새로운 형태의 H5N1에 의해 동아시아에서 많은 사망자를 유발하였다 (Kamps et al., 2006). 두 가지 경우 모두 인플루엔자 A 바이러스가 가지는 특징 중 하나인 대변이에 의해서 유발된 것으로 알려져 있으며, 2009년에 대유행을 야기한 H1N1의 경우에는 NA gene의 대변이에 의해서 나타난 것으로 추측되고 있다 (Chidlow et al., 2010).

이러한 높은 병원성과 빠른 전염 속도를 가진 인플루엔자 A 바이러스의 아형에 대비하기 위해선 보다 신속하고 정확한 진단법을 통한 빠른 치료와 환자의 집중적인 관리가 필요하다. Real-time RT-PCR과 같은 분자진단학적 방법은 이러한 인플루엔자 A 바이러스의 아형을 신속 정확하게 진단할 수 있는 방법으로 여겨지고 있으며, 본 연구에서 real-time NASBA를 이용한 아형 감별 또한 유용하다는 것을 보여주고 있다. 신속도 측면에서 TTP 값을 분석해 본 결과, 분석 시작 후 28분에서 늦어도 41분에 양성 signal이 나타나는 것으로 나타나, 기존의 방법에 비해 신속한 진단법으로 판단이 된다. 본 결과를 토대로, real-time NASBA를 인플루엔자 A 바이러스의 아형 진단에 이용할 경우 1시간 이내에 진단이 가능 할 것이라 생각한다. 또한 cDNA를 만드는 과정을 따로 진행하지 않으므로 일반적으로 4시간 정도 소모되는 real-time RT-PCR에 비해 진단의 신속도는 더 빠를 것이라 여겨진다. 특이도 면에서도 일부 PCR 결과에서 목적이 되는 아형의 유전자와는 다른 아형의 유전자가 증폭이 되었음에도 불구하고 molecular beacon이 가지는 특이도를 이용하여 정확도를 높일 수 있는 장점을 보여주었다. 또한 molecular beacon과 증폭된 target template 사이에 높은 친화도가 있는 경우, primer에 의한 증폭량이 상대적으로 적더라도 충분히 감별이 가능한 final signal이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험 결과를 바탕으로 인플루엔자 A 바이러스의 다른 아형의 감별에도 real-time RT-PCR과 더불어 real-time NASBA 또한 매우 유용한 방법이 될 것이라 생각된다. 또한 인플루엔자 A 바이러스가 아닌 다른 RNA 유전체를 가진 바이러스의 진단에도 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 마지막으로 임상 검체를 이용한 임상적 적용에 대한 평가를 통하여 real-time NASBA를 이용한 진단의 유용성에 대한 평가가 더 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

## Acknowledgement

본 연구는 지식경제부 중소기업청의 2010년 산학연공동기술개발지원사업 연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

## REFERENCES

- Arias CF, Escalera-Zamudio M, Rio MD, Cobian-Guemes AG, Isa P, Lopez S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *J Arcmed*. 2009. 40: 643-654.
- Chidlow GR, Harnett GB, Williams SH, Tempone SS, Speers DJ, Hurt AC, Deng YM, Smith DW. The detection of Oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2010. 169: 47-51.
- Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, Wu B, Wang H, Shi Z. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods*. 2010. 163: 495-497.
- Hwang YO, Seo BT, Choi BH. Analysis of isolation and subtyping of influenza virus in Seoul, during 1999-2003. *J Bacteriol Virol*. 2004. 34: 67-74.
- Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza report 2006. 2006. pp.18-22, 26-28, 87-91, 127-132, 150-155. Flying Publisher. Paris, France
- Kim JS, Park KY, Lee MG, Kim YS, Ahn JB, Yoon HJ. Rapid and type-specific detection of human influenza viruses using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Korean Soc Microbiol*. 1995. 30: 233-243.
- Kim YY, Lee JY, Hwang JH, Kim KA, Jang SW, Park MS, Kim WJ, Cho HW, Lee HH, Kang C. Characterization of hemagglutinin and neuraminidase genes and Oseltamivir resistance of influenza viruses isolated Korea. *J Bacteriol Virol*. 2005. 35: 149-155.
- Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, Ieven M. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2008. 46: 185-191.
- Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsten F. PreTect™ HPV-Proofer: Real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods*. 2007. 142: 204-212.
- Moore C, Telles JN, Corden S, Gao RB, Vernet G, Aarle PV, Shu YL. Development and validation a commercial real-time

- NASBA assay for the rapid confirmation of influenza A H5N1 virus in clinical samples. *J Virol Methods*. 2010. 170: 173-176.
- Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, Appleyard GD, Chui L, Pang XL, Yanow SK, Fonseca K, Lee BE, Fox JD, Preiksaitis JK. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J Clin Microbiol*. 2009. 47: 3454-3460.
- Park YH, Woo YD, Kim SK, Bae HJ, Park SW. Simultaneous detection and identification of human respiratory syncytial virus, influenza virus A (H3N2, H1N1) and B by one-tube multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Bacteriol Virol*. 2001. 31: 269-274.
- Saxena SK, Mishra N, Saxena R, Swamy MLA, Sahgal P, Saxena S, Tiwari S, Mathur A, Nair MP. Structural and antigenic variance between novel influenza A/H1N1/2009 and influenza A/H1N1/2008 viruses. *J Infect Dev Ctries*. 2010. 4: 1-6.
- Schulze M, Nitsche A, Schweiger B, Biere B. Diagnostic approach for the differentiation of the pandemic influenza A(H1N1)v virus from recent human influenza viruses by real-time PCR. *PLoS ONE*. 2010. 5: e9966.
- Wiely DC, Skehel TT. Functional balance between hemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Ann Rev Biochem*. 1987. 56: 365-394.
- Zhao J, Tang S, Storhoff J, Marla S, Bao YP, Wang X, Wong EY, Ragupathy W, Ye Z, Hewlett IK. Multiplexed, rapid detection of H5N1 using PCR-free nanoparticle-based genomic microarray assay. *BMC Biotechnology*. 2010. 10: 74-82.
-