ORIGINAL ARTICLE

pISSN 2384-1079 · eISSN 2384-1087
Pediatr Infect Vaccine 2016;23:194-201
DOI: https://doi.org/10.14776/piv.2016.23.3.194

PIV PEDIATRIC INFECTION & VACCINE

소아에서 폐렴구균 집락률 측정을 위해 비인두 흡인물의 총 RNA를 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응법

김영광[1] · 이경훈[1] · 윤기욱[2] · 이미경[3] · 임인석[1]
중앙대학교병원 소아청소년과[1], 서울대학교 어린이병원 소아청소년과[2], 중앙대학교병원 진단검사의학과[3]

Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Using Total RNA Extracted from Nasopharyngeal Aspirates for Detection of Pneumococcal Carriage in Children

Young Kwang Kim[1], Kyoung Hoon Lee[1], Ki Wook Yun[2], Mi Kyung Lee[3], In Seok Lim[1]
[1]Department of Pediatrics, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, [2]Department of Pediatrics, Seoul National University Children's Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, [3]Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Monitoring pneumococcal carriage rates is important. We developed and evaluated the accuracy of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) protocol for the detection of *Streptococcus pneumoniae*.
Methods: In October 2014, 157 nasopharyngeal aspirates were collected from patients aged <18 years admitted to Chung-Ang University Hospital. We developed and evaluated a real-time PCR method for detecting *S. pneumoniae* by comparing culture findings with the results of the real-time PCR using genomic DNA (gDNA). Of 157 samples, 20 specimens were analyzed in order to compare the results of cultures, real-time PCR, and real-time RT-PCR.
Results: The concordance rate between culture findings and the results of real-time PCR was 0.922 (P<0.01, Fisher exact test). The 133 culture-negative samples were confirmed to be negative for *S. pneumoniae* using real-time PCR. Of the remaining 24 culture-positive samples, 21 were identified as *S. pneumonia*-positive using real-time PCR. The results of real-time RT-PCR and real-time PCR from 20 specimens were consistent with culture findings for all *S. pneumoniae*-positive samples except one. Culture and real-time RT-PCR required 26.5 and 4.5 hours to perform, respectively.
Conclusions: This study established a real-time RT-PCR method for the detection of pneumococcal carriage in the nasopharynx. Real-time RT-PCR is an accurate, convenient, and time-saving method; therefore, it may be useful for collecting epidemiologic data regarding pneumococcal carriage in children.

Key Words: Streptococcus pneumoniae; Nasopharynx; RNA; Real-time polymerase chain reaction

접수: 2016년 6월 11일
수정: 2016년 8월 7일
승인: 2016년 9월 21일

책임저자: 윤기욱
서울대학교 어린이병원 소아청소년과
Tel: 02)2072-4909, Fax: 02)743-3455
E-mail: pedwilly@snu.ac.kr

서론

호흡기 감염을 일으키는 여러 세균들은 대부분 증상을 일으키지 않고 비인두(nasopharynx)에서 상주(colonization)할 수 있으며, 간혹 주위 조직을 침범하여 중이염이나 폐렴을 유발할 수 있고, 드물게는 패혈증 및 수막염과

같은 침습성 감염을 일으킬 수 있다. 특히 면역력이 저하된 소아에서는 피부와 점막의 방어벽이 약해서 상재균이 병원균으로 작용할 가능성이 더 높아지며, 폐렴 및 패혈증 등을 유발할 수 있다[1-3].

감염성 질환들의 역학 변화를 감시하고 예측하는데 있어서 주요 세균들에 대한 보균율 연구는 중요한 역할을 하는데, 폐렴구균의 경우 지역 사회의 주요 보균 혈청형들이 침습성 및 비침습성 감염에서도 비슷하게 발견된다[4]. 또한, 보균율 분석은 해당 세균의 역학을 감시할 수 있는 기능 외에도 감염 질환의 발병 기전을 유추하는 데에도 중요한 자료를 제공한다[5]. 그런데, 현재 보균율 측정에 있어 표준 방법으로 쓰이는 배양법은 민감도가 낮을 뿐 아니라 균을 검출하기까지 비교적 많은 시간이 소요되며, 상대적으로 배양이 어려운 세균들이 과소 평가되는 측면이 있다. 또한 최근의 항생제 사용 여부에 따라 결과에 큰 영향을 받으며, 중복된 집락균을 효과적으로 검출해내기 어려운 단점이 있다[6]. 이러한 약점들을 극복하기 위해 분자생물학적 방법론을 이용한 새로운 검사법들이 지속적으로 개발되고 있다. 그 중에서도 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)은 민감도가 높고 신속한 진단이 가능하여 최근 다양한 분야에서 많이 사용되고 있다[7]. 이로 인해 세균 관련 역학 연구의 새로운 패러다임이 형성되고 있으며, 관련 자료들이 지속해서 생성되고 있다.

한편, 수년 전부터 국내 병원들에서는 하부 호흡기 감염으로 입원하는 소아에서 원인 바이러스를 검출하기 위해 PCR 검사를 흔히 사용하고 있다. PCR 검사법은 주로 비인두 흡인물을 검체로 사용하며, 대부분의 호흡기 바이러스들이 RNA 바이러스이므로 비인두 흡인물로부터 RNA를 추출하고, 다시 complementary DNA (cDNA)로 역전사(reverse transcription, RT)한 후 PCR을 시행하게 된다. 이 과정에서 추출된 RNA 중 일부만이 RT-PCR의 직접 검체로 사용되므로, 대부분의 호흡기 질환 입원 환자들에서 비인두 흡인물의 RNA가 남게 되는데, 여기에는 바이러스 및 인체 세포는 물론, 집락균의 RNA도 포함된다. 이에 본 연구에서는 호흡기 바이러스 검사를 위해 추출된 RNA로부터 폐렴구균을 확인할 수 있는 real-time RT-PCR법을 구축하고, 보균율 측정의 정확성 및 이점을 확인하고자 하였다.

방법

1. 대상

본 연구는 Korea Collection for Type Culture (KCTC) 미생물자원센터로부터 구매한 폐렴구균 표준 균주를 이용하여 우선적으로 real-time PCR법을 구축한 후, 2014년 9월 말부터 10월까지 중앙대학교병원에 입원하여 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사를 시행 받은 157명의 18세 이하의 소아 환자들로부터 채취한 비인두 흡인물과 그로부터 추출한 RNA 및 genomic DNA (gDNA)를 통해, 각각 고전적인 배양법과 real-time PCR법을 이용, 폐렴구균의 집락률을 측정하고 이를 비교 분석하고자 하였다.

본 연구는 중앙대학교병원 연구윤리위원회(Institutional Review Board, IRB; C2013089-1049)의 승인을 받았다.

2. 비인두 흡인물 채취

폐렴구균 집락 확인을 위한 비인두 흡인물은 중앙대학교병원에 호흡기 증상을 주소로 입원하는 환아들에게 통상적으로 시행되는 검사인 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사를 시행할 때 채취되며, 이들 중 본 연구 참여에 동의한 환아들에서 채취된 비인두 흡인물만을 대상으로 하였다. 비인두 흡인물은 5 mL 용량의 주사기와 연결시킨 5 Fr 크기의 멸균 위장관 영양 카테터(Hankook Medical, Seoul, Korea)를 환아의 후방 비인두에 부드럽게 삽입한 후, 멸균된 생리식염수 3–5 mL를 환아의 비강 내로 주입하고, 이 세척액을 주사기를 부드럽게 뒤로 당겨 흡입하여 채취한다. 최종적으로 생리식염수에 섞인 2–3 mL의 검체를 얻은 후, 실온에서 다른 어떤 배지의 첨가 없이 6시간 이내에 실험실로 운송하였다.

3. 폐렴구균의 배양 및 분리 동정

검체를 채취한 지 12시간 이내에 1 loop (10 μL)를 혈액한천배지(blood agar plate [BAP])에 펴 바른 후 37℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 BAP에 배양된 균주를 용혈 소견 및 옵토친(optochin) 디스크 감수성 검사를 통해 폐렴구균으로 동정하였다.

4. 비인두 흡인물로부터 genomic DNA 및 complementary DNA 수집

Real-time PCR법을 구축하고 그 정확도를 평가하기 위하여, 157개의 검체 모두에 대하여 비인두 흡인물 1.2 mL를 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨 13,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리한 후, 침전물을 포함한 300 μL 검체로부터 DNA Extraction Kit (Intron, Seoul, Korea)를 사용하여 gDNA를 분리한 후 분석을 위해 필요시까지 −80℃에서 냉동 보관하였다. 또한 RNA를 이용한 real-time RT-PCR법을 평가하기 위하여, 20명의 환자의 검체에 대하여

입원 시 시행한 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사 후 남은 RNA를 진단검사의학과로부터 제공받아 cDNA로 전환 후 연구에 활용하였다. 이 20개의 검체는 선택 오차를 피하기 위하여 연구 기간 중 가장 초반인 9월 29일부터 10월 2일까지에 해당하는 경우로 선정하였다. 보관된 RNA에서 역전사 반응으로 cDNA를 얻었다. 주형 RNA와 primer, RT buffer 4 μL, RNase inhibitor 20 units, reverse transcriptase 200 units를 혼합한 후 dH_2O (distilled H_2O)로 총 양이 20 μL가 되도록 혼합하여 가볍게 섞었다. 이 혼합물을 50℃에서 60분 동안 반응시켰다.

5. Real-time PCR법의 구축

폐렴구균의 검출을 위한 목표 유전자는 *cpsA*를 이용하였으며, primer는 cpsA_F (5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC-3'), cpsA_R (5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3')을 사용하였고, probe는 TaqMan probe (6FAM-AAT GTT ACG CAA CTG ACG AG-MGBNFQ)를 이용하였다. Real-time PCR 장비는 CFX96 (BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하였다. 양성 대조로는 폐렴구균의 표준 균주인 ATCC49619와 KCTC5414를 사용하였고, 음성 대조로는 폐렴구균과 가장 유사한 세균 중 하나로 알려져 있는 *Streptococcus pseudopneumoniae*의 표준 균주인 KCTC5765를 사용하였다. PCR 반응액은 3 μL의 DNA에 4 μL의 5×PB ACE PM, 3 μL의 8-MOP (8-methoxypsoralen) solution, 10 μL의 2 multiplex master mix로 총 20 μL가 되도록 한 후, 각 세균들에 대하여 가장 정확한 검출률을 보이는 적정 증폭 조건을 실험을 통해 결정하였다. 표준 균주를 이용하여 standard curves를 그리고, cycle threshold (CT) 값을 측정하여 정량적 분석에 활용하였다.

6. 통계 분석

모든 통계적 분석은 SPSS version 19.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하여 Fisher exact test를 시행하였다. 임상 척도 간의 비교는 Cohen κ법을 이용하여 전체 검체를 대상으로 시행한 고전적인 배양법과 real-time PCR 검사법 간의 일치율을 구하였다. 통계학적 유의 수준은 P 값이 0.05 미만인 경우로 정의하였다.

결과

1. 인구학적 특성 및 배양률

본 연구에 참여한 소아는 총 157명으로, 남자가 89명, 여자가 68명이었다. 연령은 1개월부터 14년 10개월까지 분포하였으며, 중앙값은 22개월이었다. 이 중 고전적 배양법을 통해 폐렴구균이 검출된 소아는 24명으로, 총 대상자의 15.3%에 해당하였다. 5세 이하의 소아는 총 110명이었고, 이들 중 배양에서 폐렴구균이 검출된 소아는 21명(19.1%)이었으며, 이는 전체 폐렴구균 배양 건수 중 87.5%에 해당하였다.

대상 환자들의 진단은 폐렴이 가장 많았고(n=55, 35.0%), 다음으로 모세기관지염(n=24, 15.3%), 기관지염(n=16, 10.2%) 등의 순이었다. 호흡기 바이러스 RT-PCR을 통해 호흡기 바이러스가 검출된 대상자는 107명(68.2%)이었으며, rhinovirus가 가장 많았고(n=39, 24.8%), respiratory syncytial virus (n=27, 17.2%), adenovirus (n=13, 8.3%) 순이었다.

2. Real-time PCR법의 구축 및 적용

먼저 폐렴구균의 표준 균주인 ATCC49619로부터 추출한 gDNA를 이용하여 real-time PCR법을 위한 primer 및 probe의 적정 농도 및 반응 온도를 정하고, gDNA의 농도에 따른 CT값을 구하여 standard curve를 그렸다(Fig. 1). 다음으로 폐렴구균의 표준 균주인 ATCC49619와 KCTC 5412를 양성대조로, *S. pseudopneumoniae*의 표준 균주인 KCTC5765와 *Escherichia coli* 임상 균주를 음성대조로 사용하여 폐렴구균의 검출을 위한 real-time PCR법의 cut-off CT값을 35로 결정하였다. 이후 연구 대상 검체의 gDNA를 이용하여 real-time PCR 검사를 시행하였고, 증폭 곡선을 얻은 후 CT값을 구하였다(Fig. 2). gDNA를 이용한 real-time PCR의 결과와 배양법의 결과를 비교하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 총 157개 검체 중 배양에서 음성으로 나온 133개의 검체는 모두 real-time PCR에서도 음성으로 확인되었다. 그러나 배양에서 양성으로 나온 24개 검체 중 21개는 real-time PCR에서 양성, 나머지 3개는 음성이었다. 이 3개 검체의 gDNA 농도는 평균 1.7 ng/μL로, 양성 검체의 평균 농도 15.9 ng/μL에 비하여 크게 낮았다. 검사 간 일치율(κ)은 0.922 (P<0.01, Fisher exact test)로 매우 높았다(Table 1).

3. 배양, real-time PCR, real-time RT-PCR 검사법 간 비교

20개의 검체에 대하여 RNA를 이용하여 real-time RT-

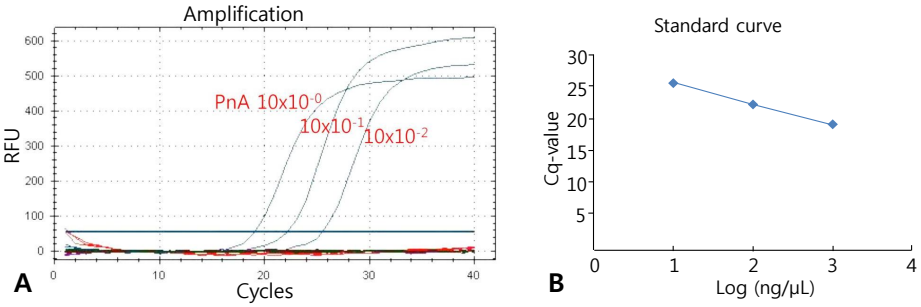

Fig. 1. (A) Amplification curves and (B) standard curve of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for *Streptococcus pneumoniae*. Abbreviations: PnA, *Streptococcus pneumoniae* (ATCC49619); RFU, relative fluorescence unit; Cq, quantification cycle.

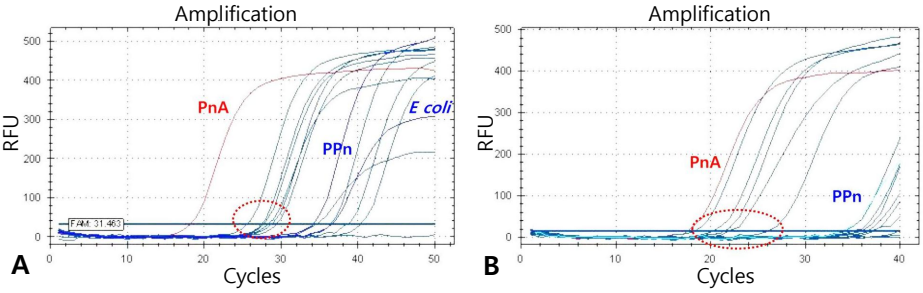

Fig. 2. Amplification curves of real-time reverse transcription polymerase chain reaction using (A) complementary DNA and (B) genomic DNA. Abbreviations: RFU, relative fluorescence units; PnA, *Streptococcus pneumoniae* (ATCC49619); PPn, *Streptococcus pseudopneumoniae* (KCTC5765); *E. coli*, *Escherichia coli*.

Table 1. Number of Detected Pneumococcus and Mean Concentration of gDNA (n=157)

Real-time PCR	Culture				κ	*P*-value
	Growth		No growth			
	No.	gDNA (ng/μL)	No.	gDNA (ng/μL)		
Positive	21	15.9	0	NA	0.922	<0.01†
Negative	3	1.7*	133	16.1		

*2.4 ng/μL (sample 1), 2.1 (sample 2), and 0.6 (sample 3).
†Fisher exact test.
Abbreviations: gDNA, genomic DNA; PCR, polymerase chain reaction; NA, not available.

PCR을 시행하였고, 그 검사 결과를 배양법과 gDNA를 통한 real-time PCR법과 비교하였다. Real-time RT-PCR법의 검출 결과는 배양검사 결과와 정확히 일치하였으나, gDNA를 이용한 real-time PCR 결과에서는 1건의 배양 양성에서 음성 결과를 보였다(Table 2). 이 검체에서 추출한 gDNA의 농도는 0.6 ng/μL, RNA에서 얻은 cDNA의 농도는 333.1 ng/μL로, cDNA의 농도가 gDNA의 농도보다 500배 가량 높았다. Real-time PCR에서 양성 검체들의 평균 CT값은 gDNA와 cDNA에서 각각 33.5, 25.6이었다.

Table 2. Results of Conventional Culture Method and Real-Time PCR with gDNA or cDNA for Detecting *Streptococcus pneumoniae* Carriage Isolates (n=20)

Variable	Culture	
	Growth	No growth
Real-time PCR (gDNA)		
Positive	4	0
Negative	1	15
Real-time RT-PCR (cDNA)		
Positive	5	0
Negative	0	15

Abbreviations: PCR, polymerase chain reaction; gDNA, genomic DNA; cDNA, complementary DNA.

4. 배양법과 real-time RT-PCR의 검사 소요 시간

비인두 흡인물 검체 20개 수량을 기준으로, 먼저 배양법은 검체 20개를 BAP에 펴 바르는데 1시간, 배지를 배양하는데 24시간, 여기서 배양된 균주의 집락 형태와 용혈 소

견을 확인하고 옵토친 디스크 감수성 검사를 시행하는데 1시간, 마지막으로 폐렴구균을 확인하는데 30분이 소요되어 총 26.5시간이 소요되었다. Real-time RT-PCR 검사법은 20개의 비인두 흡인물 검체의 원심 분리 및 RNA를 추출하는데 2시간 30분, 이 RNA를 cDNA로 역전사 하는데 1시간, 그리고 real-time PCR 장비로 검사를 시행하고 결과를 확인하기까지 1시간이 소요되어 총 4.5시간이 소요되었다.

고찰

본 연구에서는 통상적인 호흡기 입원 환자 진료 시 비인두 흡인물로부터 추출되는 RNA를 이용하여 폐렴구균을 확인할 수 있는 real-time RT-PCR법을 구축하고, 이것을 기존의 배양법과 gDNA를 이용한 real-time PCR과 비교하여 보균율 측정에 있어서의 정확성 및 편의성을 확인하고자 하였다. 총 157개 검체의 gDNA를 이용한 real-time PCR 검사는 기존의 배양법과 검사 간 일치율이 0.922로 매우 높았다. 20개의 검체에 대해 시행한 real-time RT-PCR 검사 결과는 기존 배양법과 결과가 일치했고, 반면에 배양 및 real-time RT-PCR에서 양성으로 검출된 1건의 검체가 gDNA를 이용한 real-time PCR 검사에서는 음성으로 나타났다. 검사 간 불일치의 가장 주된 이유는 추출된 gDNA의 낮은 농도였다. 비인두 흡인물 검체 20개 수량을 기준으로, 배양법은 폐렴구균을 확인하기까지 총 26.5시간, real-time RT-PCR 검사법은 총 4.5시간이 소요되었다.

비인두는 빈번한 호흡기 바이러스 감염의 발생 장소이며, 동시에 여러 종류의 세균이 집락을 형성하는 곳이다. 폐렴구균은 대표적인 비인두 상재균으로, 일반적으로 소아는 출생한 지 수년 내 비인두에 폐렴구균을 보유하게 된다. 특히 6개월부터 5세 사이 연령의 소아들은 90% 이상에서 폐렴구균을 보유한 적이 있는 것으로 알려져 있다[3]. 폐렴구균의 보균율은 2세 경에 최고로 올라간 후 점진적으로 감소하며, 일반적으로 성인은 5%–10%, 소아에서는 25%–50%의 보균율이 알려져 있다[8,9]. 본 연구에서도 5세 이하 소아의 19.1%에서 폐렴구균이 배양되었고, 반면에 6세 이상의 소아에서는 6.4%에서만 폐렴구균이 배양되었다.

최근 국내에서 PCR 검사를 이용하여 세균의 비인두 보균율을 확인한 연구들을 살펴보면, Shin 등[10]은 건강한 33명의 소아를 대상으로 보균율 검사를 시행하였는데, 전체 90.9% (30/33)의 PCR 양성률을 보였다. 검출된 30명의 소아들에서 폐렴구균, 인플루엔자균, 클라미디아, 그리고 백일해균이 검출되었고, 이 중에서 폐렴구균은 13명(39.4%)에서 검출되었다. Jung 등[11]이 폐렴 환자와 정상인을 대상으로 진행한 연구에서는, 폐렴구균이 환자군에서는 52.0% (52/100), 정상인에서는 53.5% (53/99)에서 PCR 양성 결과를 얻었다. 두 연구 모두 PCR 검사가 균 배양검사에 비해 시간이 짧게 소요되고, 배양 검사보다 민감도가 높으며, 적은 양의 검체로도 검출이 가능한 장점이 있었다[10-13].

기존에 있던 PCR 검사를 통한 폐렴구균 보균율은 연구에 따라 결과가 다양한데, 이는 연구 대상의 인구학적 특성이나 진단 기준, 검사 방법, 검체 종류 등에 따라 결과가 큰 영향을 받기 때문이라 생각된다. 그중 하나로 PCR 검사에 사용되는 표적 유전자에 따른 특이도의 차이를 생각해 볼 수 있다. 기존에 *ply* 유전자를 표지자로 이용한 Brugger 등[14]의 연구에서는, PCR 결과가 양성인 경우의 29% 정도가 폐렴구균 외의 다른 병원균에 동반 감염되어 있었다. 이 같은 문제를 Carvalho Mda 등[15]의 연구에서 *lytA* 표지자를 사용해서 검사의 특이도를 향상시켰다는 보고가 있으나, 최근 Simoes 등[16]의 연구에서는 *lytA* 표지자 기반의 real-time PCR 검사에서 폐렴구균의 식별에 오류가 발생할 수 있음을 보고하였다. 본 연구는 *cpsA*를 표적 유전자로 한 primer와 TaqMan probe를 이용하여 폐렴구균 검출을 위한 real-time PCR 검사를 시행하였는데, *cpsA* primer는 폐렴구균에 매우 특이적이어서 특히 다른 유사 연쇄구균들과의 구별에 유용하다고 알려져 있다[17].

본 연구에서는 음성 대조로 *S. pseudopneumoniae* 균주를 사용했는데, 이 균주는 폐렴구균과 16S rRNA 유전자 서열이 단 5 bp만 다를 뿐, 99.7%의 유전적 유사성을 보여준다. 또한 폐렴구균은 viridans 그룹의 연쇄구균들과도 99%의 16S rRNA 유전자 서열 유사성을 공유하며, 이런 균주들 사이에서는 유전자 전이가 쉽게 일어나기 때문에, 폐렴구균을 더 정확하게 분별해내는 것이 임상적으로 중요하다. Keith 등[18]의 연구에서는 *S. pseudopneumoniae* 균주는 폐렴구균과 달리 피막을 갖고 있지 않기 때문에, 본 연구에서 사용한 *cpsA*처럼 피막(capsule)을 보유한 균주에서 특이적으로 발견되는 primer가 두 균을 분별하는데 있어 유용하다고 밝혔다. 그러나 *cpsA*를 이용한 방법으로는 비피막형 폐렴구균을 검출하지 못할 가능성이 높다[19]. 그럼에도 불구하고, 대부분의 주요한 임상 질환을 일으키는 균주들은 피막형이므로, 그 임상적 유용성에 대한 영향은 미미할 것이라고 생각된다.

본 연구에서 검체를 채취하는 방법으로는 비인두 흡인물 채취법을 사용하였다. 이미 기존 연구를 통해 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사 시행 시 비인두 흡인물 검체가 비인두 면봉 채취법으로 얻은 검체에 비해 민감도가 약 10%–20% 정도 높은 것으로 보고되었다[20,21]. 현재 World Health Organization에서는 폐렴구균의 역학 연구에 사용하는 검체 채취 방법으로 비인두 면봉 채취법을 권고하고 있지만, 비인두 흡인물 채취법 또한 유효한 채취법으로 제시하고 있으며, 오히려 폐렴구균 검출의 민감도에 있어서 비인두 흡인물 채취법이 면봉 채취법과 동등하거나, 오히려 더 뛰어날 수 있다고 보고하고 있다[22]. 다만 흡인물 채취가 면봉 채취법보다 피실험자가 불편함을 가질 수도 있다는 단점이 있고, 콧물 증상이 없는 경우 유효한 검체 채취가 어려울 수 있으므로, 지역 사회의 보균율 측정 역학 연구에는 면봉 채취법이 선호되리라 사료된다. 본 연구와 같이 감염 증상이 있는 입원 환자를 대상으로 하는 경우에는 비인두 흡인물 채취가 그리 어렵지 않고 신속하게 채취가 가능하며, 호흡기 바이러스 RT-PCR과 같이 다른 검사를 위해 이미 시행되기 때문에, 비인두 흡인물 채취법으로 폐렴구균 검출을 손쉽고 정확하게 할 수 있다고 생각된다.

본 연구에서는 먼저 비인두 흡인물에서 자체적으로 추출한 gDNA를 이용하여 real-time PCR 검사법이 기존의 배양법과 높은 일치율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 배양에서 양성으로 나온 24개 검체 중 3개는 gDNA를 이용한 real-time PCR 검사에서 음성이었는데, 이 3개 검체의 gDNA 농도는 평균 1.7 ng/μL로, 양성 검체의 평균 gDNA 농도 15.9 ng/μL에 비하여 크게 낮았다. 일반적으로 PCR 검사는 민감도가 우수하여 결과가 음성인 경우 감염을 배제할 수 있다고 생각되지만, 본 연구와 같이 검체에서 추출된 gDNA의 농도가 낮은 경우에는 위음성을 보일 수 있음을 고려하여 결과를 해석해야 한다. 또한, 민감도만의 측면에서 볼 때, 폐렴구균과 같이 배양 조건이 까다롭지 않고 비교적 잘 배양되는 세균에서는, 세균 배양법에 비하여 real-time PCR 검사의 민감도가 상대적으로 크게 높지 않을 수 있다.

전체 대상 검체로 real-time PCR법의 정확성을 평가한 후, 20개의 비인두 흡인물에서 추출된 RNA를 이용해 real-time RT-PCR 검사를 시행하였고, 이를 gDNA를 이용한 real-time PCR, 그리고 배양법과 비교하여 그 정확성을 평가하였다. Real-time RT-PCR의 폐렴구균 검출 결과는 모두 배양 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 반면 gDNA를 이용한 real-time PCR 결과에서는 1건의 배양 및 real-time RT-PCR 양성에서 음성 결과를 보여주었다. 이 검체에서 추출한 gDNA의 농도는 0.6 ng/μL, RNA로부터 얻은 cDNA의 농도는 333.1 ng/μL로 cDNA의 농도가 500배 가량 높았다. 이 결과 또한 추출된 gDNA의 농도가 낮았기 때문에 real-time PCR 음성이 나왔을 것으로 사료되며, RNA를 이용한 real-time RT-PCR이 직접 gDNA를 추출한 real-time PCR보다 민감도를 더 높일 수 있겠다.

비인두 흡인물 검체 20개 수량을 기준으로 배양법과 real-time RT-PCR의 검사 시행 및 결과 확인까지 걸리는 시간을 비교하였을 때, 배양법은 총 26.5시간이 소요되었고, real-time RT-PCR 검사법은 총 4.5시간이 소요되었다. Real-time RT-PCR법은 고전적인 배양법에서 균주를 배양하는데 걸리는 시간을 줄여, 역학 연구에 있어 연구자가 소요하는 시간을 단축시킬 수 있다. 이에 더하여 임상에서 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사를 시행하고 남은 여분의 RNA 또는 cDNA를 통해서, 검체를 모으는데 필요한 시간과 노력을 크게 단축시킬 수 있다.

이 연구를 통하여 비인두 집락 세균의 검출법으로서 real-time RT-PCR법을 확립하였고, 폐렴구균 보균율의 측정에 있어 배양법만큼 real-time RT-PCR법이 정확하다는 것을 알 수 있었다. 또한, 관련 역학 연구에서 연구자가 실제로 소요하는 시간과 노력을 줄일 수 있는 좋은 방법이라고 사료된다. 이는 폐렴구균의 보균율 역학 자료의 신속한 구축과 정확한 보균 분포를 제시함으로써 향후 임상 지침을 결정하고 백신을 개발하는 데 있어 근거 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2013년 한국소아감염병학회 한국노바티스 학술상 지원을 받아 수행되었다.

References

1. Dahlblom V, Soderstrom M. Bacterial interactions in the nasopharynx: effects of host factors in children attending day-care centers. J Infect Public Health 2012;5:133-9.
2. Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of Streptococcus pneumoniae in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis 1980;142:923-33.

3. Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in Finnish children younger than 2 years old. J Infect Dis 2001;184:451-9.
4. Levy PY, Ollivier M, Drancourt M, Raoult D, Argenson JN. Relation between nasal carriage of Staphylococcus aureus and surgical site infection in orthopedic surgery: the role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis. Orthop Traumatol Surg Res 2013;99:645-51.
5. Kim SM, Hur JK, Lee KY, Shin YK, Park SE, Ma SH, et al. Epidemiological study of pneumococcal nasal carriage and serotypes among Korean children. Korean J Pediatr 2004;47:611-6.
6. Paule SM, Pasquariello AC, Hacek DM, Fisher AG, Thomson RB Jr, Kaul KL, et al. Direct detection of Staphylococcus aureus from adult and neonate nasal swab specimens using real-time polymerase chain reaction. J Mol Diagn 2004;6:191-6.
7. Chan YR, Morris A. Molecular diagnostic methods in pneumonia. Curr Opin Infect Dis 2007;20:157-64.
8. Wood JB, Peters TR. Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus). In: Kliegman R, Behrman RE, Nelson WE, editors. Nelson textbook of pediatrics. 20th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016:1322-7.
9. Feigin RD, Cherry JD. Pneumococcal infections. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, Steinbach WJ, Hotez PJ, editors. Feigin & Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2013:1198-246.
10. Shin JH, Han HY, Kim SY. Detection of nasopharyngeal carriages in children by multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Korean J Pediatr 2009;52:1358-63.
11. Jung CL, Lee MA, Chung WS. Clinical evaluation of the multiplex PCR assay for the detection of bacterial pathogens in respiratory specimens from patients with pneumonia. Korean J Clin Microbiol 2010;13:40-6.
12. Al-Marzooq F, Imad MA, How SH, Kuan YC. Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia. Trop Biomed 2011;28:545-56.
13. Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. Clin Infect Dis 2011;52 Suppl 4:S326-30.
14. Brugger SD, Hathaway LJ, Muhlemann K. Detection of Streptococcus pneumoniae strain cocolonization in the nasopharynx. J Clin Microbiol 2009;47:1750-6.
15. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting lytA, ply, and psaA genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol 2007;45:2460-6.
16. Simoes AS, Tavares DA, Rolo D, Ardanuy C, Goossens H, Henriques-Normark B, et al. lytA-based identification methods can misidentify Streptococcus pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis 2016;85:141-8.
17. Park HK, Lee SJ, Yoon JW, Shin JW, Shin HS, Kook JK, et al. Identification of the cpsA gene as a specific marker for the discrimination of Streptococcus pneumoniae from viridans group streptococci. J Med Microbiol 2010;59(Pt 10):1146-52.
18. Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR. Characteristics of Streptococcus pseudopneumoniae isolated from purulent sputum samples. J Clin Microbiol 2006;44:923-7.
19. Kurola P, Erkkila L, Kaijalainen T, Palmu AA, Hausdorff WP, Poolman J, et al. Presence of capsular locus genes in immunochemically identified encapsulated and unencapsulated Streptococcus pneumoniae sputum isolates obtained from elderly patients with acute lower respiratory tract infection. J Med Microbiol 2010;59(Pt 10):1140-5.
20. Stensballe LG, Trautner S, Kofoed PE, Nante E, Hedegaard K, Jensen IP, et al. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of respiratory syncytial virus in different settings in a developing country. Trop Med Int Health 2002;7:317-21.
21. Ohrmalm L, Wong M, Rotzen-Ostlund M, Norbeck O, Broliden K, Tolfvenstam T. Flocked nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for detection of respiratory tract viruses in immunocompromised adults: a matched comparative study. BMC Infect Dis 2010;10:340.
22. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, Antonio M, Hare KM, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of Streptococcus pneumoniae: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. Vaccine 2013;32:165-79.

PIV PEDIATRIC INFECTION & VACCINE

PEDIATRIC INFECTION & VACCINE PIV

요약

목적: 폐렴구균은 주요 비인두 상재균으로, 주위 조직을 침범하여 침습성 감염을 일으킬 수 있어 보균율에 대한 감시가 중요하다. 본 연구에서는 임상에서 비인두 흡인물로부터 추출하고 남은 RNA를 이용하여 폐렴구균을 확인할 수 있는 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time reverse transcription polymerase chain reaction [RT-PCR])법을 구축하고, 보균율 측정에 있어서의 정확성과 이점을 확인하고자 하였다.

방법: 2014년 9월부터 10월까지 중앙대학교병원에 입원하여 호흡기 바이러스 RT-PCR 검사를 시행받은 18세 이하의 소아들로부터 비인두 흡인물을 채취하였다. 먼저 배양법과 genomic DNA (gDNA)를 이용한 real-time PCR을 시행하여 폐렴구균 검출률의 정확성을 확인하였다. 이 중 처음 20개의 검체를 이용하여, 고전적인 배양법과 gDNA를 이용한 real-time PCR, 그리고 RNA를 이용한 real-time RT-PCR법을 시행하고 이를 비교 분석하였다.

결과: 총 157개의 검체에서 시행한 real-time PCR 검사는 기존의 배양검사와 일치율이 0.922 ($P<0.01$, Fisher exact test)로 매우 높았다. 배양검사에서 음성인 133개의 검체는 real-time PCR에서도 모두 음성을 보였다. 24개의 배양 양성 검체 중 21개의 검체는 real-time PCR에서도 양성이었지만, 나머지 검체는 음성 결과를 보였다. 20개의 검체에서 시행한 real-time RT-PCR 검사는 1개 검체를 제외하고 배양법 및 real-time PCR과 결과가 일치하였다. 한편, 배양법을 시행하고 결과를 확인하기까지는 총 26.5시간, real-time RT-PCR 검사에는 총 4.5시간이 소요되었다.

결론: 본 연구는 비인두 집락균 확인을 위한 real-time RT-PCR법의 확립과, 폐렴구균 보균율 측정에 있어서의 real-time RT-PCR 검사의 정확성 및 편의성을 보여주었다. Real-time RT-PCR 검사법은 주요 세균들의 보균율 연구에 있어서 시간과 노력을 줄일 수 있는 좋은 방법이며, 폐렴구균의 역학자료 수집에 큰 도움이 될 것으로 기대한다.