

장내 바이러스 검출을 위한 Realtime-Nucleic acid sequence based amplification(NASBA)의 적용

나영란[†] · 조현철 · 이영숙 · 빈재훈 · 최홍식

역학조사과

Application of a Realtime-Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) Assay for the Detection of Enterovirus RNA

Young-Ran Na[†], Hyeon-Cheol Joe, Young-Sook Lee, Jae-Hun Bin and Hong-Sik Cheigh

Epidemiology Division

Abstract

Rapid detection of enterovirus infections is important in the management of aseptic meningitis. The aim of this study was to examine the relative efficiency of the realtime-NASBA comparing to performance with an established reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) protocol and viral culture for the detection of enterovirus RNA in clinical samples from aseptic meningitis. In addition, specificity was tested with clinical isolates positive for viruses with clinical importance in aseptic meningitis. Of the 292 samples, 142 were determined to be positive by realtime-NASBA, 101 were found to be positive by viral culture, and 86 were found to be positive by RT-PCR. The 147 samples were negative by all methods, 46 samples were positive by all methods. The 4 samples were positive by realtime-NASBA only. The analysis of clinical samples positive for Herpes simplex virus (HSV)-1, HSV-2, adenovirus, mumps and rhinovirus were all negative by realtime-NASBA and viral culture. One rhinovirus sample was, however, strongly positive in RT-PCR. The realtime-NASBA procedure can be completed within 5 hour versus 9 hour for the RT-PCR versus 3-14 days for the viral culture. In this study, the realtime-NASBA assay showed to be a standardized, rapid, specific, sensitive procedure for the detection of enterovirus RNA.

Key Words: enterovirus, realtime-NASBA

서론

Human enteroviruses는 family Picornaviridae에 속하며, polioviruses (3 types), coxsackieviruses A (23 serotypes), coxsackieviruses B (6 serotypes), echoviruses (28 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 (Helen 등¹⁾. VP1-VP3은 비리온의 표면에 노출되어 있으며 이중 VP1은 중화반응에서 항원의 위치와 연관되어 혈청형을 결정하는데 중요한 region이 된다.

Enterovirus 감염을 진단하는데 세포배양은 가장 널리 쓰

이는 방법이지만 바이러스가 세포에서 자라기까지 많은 시간이 필요하며 세포배양 기술을 실험실에서 표준화시키는데 어려움이 있다 (Grandien 등²⁾. 그리고 coxsackieviruses A에 속하는 enterovirus의 혈청형들은 세포배양에서 대개 잘 자라지 않는 것으로 알려져 있다 (Hsiung³⁾, Landry 등⁴⁾. 반대로 분자생물학적 방법은 실험소요시간이 비교적 짧고 세포배양에서 자라지 않는 subgroup까지 검출할 수 있는 장점을 가진다. 그래서 Enterovirus의 RNA를 검출하기 위하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 법을 기초로 하는 여러 방법들이 제시되어 왔다 (Glimaker 등⁵⁾, Rotbart⁶⁾, Zoll 등⁷⁾. 유전자 구조상 매우 변이가 커 넓은 스펙트럼을 가진 enterovirus의 subtype들을 공통적으로 검출하기 위하여 높은 보존성을 가진 5'-NCR을 target으로 하는 RT-PCR법이 소개되었다 (Lai 등⁸⁾). 이 방법은 enterovirus 감염증을 진단하는데 매우 유용하지만 여러 단계를 거치므로 교차오염의 가능성이 있어 실험 control이 어렵고, 별도의 전기영동이 필요한 단점이 있다.

[†] Corresponding author. E-Mail: na9502@busan.go.kr
Phone: 051-757-6936, Fax: 051-757-2879

Nucleic acid sequence based amplification (NASBA; bioMérieux, Boxtel, The Netherlands)은 RNA를 표적으로 하며 avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, RNase H, T7 RNA polymerase 등의 효소가 일정한 온도에서 동시에 반응하는 하는 원리를 이용하여 고안되었다 (Compton⁹). Realtime-NASBA는 enterovirus에 특이적인 molecular beacon probe를 사용하여 별도의 전기영동 없이 증폭되는 과정을 실시간으로 볼 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 높은 수준의 민감도를 가지고 다양한 serotypes의 enterovirus를 검출하기 위하여 5'-NCR region을 target으로 한 primer와 molecular beacon (Fox 등¹⁰), NucleiSens Amplification kit (bioMérieux, Geneva, Switzerland)를 사용하여 realtime-NASBA 실험을 수행하였다.

이 실험의 목적은 realtime-NASBA가 enterovirus 감염 증 진단에 사용될 가능성을 확인하기 위해 무균성수막염으로 의심되는 환자의 뇌척수액, 대변, 인후도찰물을 NucleiSens Amplification kit를 사용한 realtime-NASBA와 현재 enterovirus를 검출하는데 사용되는 2 step RT-PCR과 세포배양법을 수행하여 각 실험법의 민감도, 편리성, 신속성을 비교하였다. 아울러 무균성수막염에서 enterovirus와 감별 진단해야 하는 중요한 바이러스들과 enterovirus와 유전적으로 유사한 rhinovirus를 각각의 방법들에 대해 실험하여 실험의 정확성과 특이도를 비교하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 세포배양

부산지역 4개 병원 소아과에 2005년 4월부터 9월까지 무균성수막염 및 폐혈증으로 의심되는 환자의 대변 197건, 뇌척수액 69건, 인후도찰물 26건, 총 292건의 검체를 사용하였다. 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 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다. 각각의 검체는 4°C에서 운반하였고 -70°C를 유지하여 보관하였다. 검체는 154건의 남자와 138건의 여자였고, 36건의 검체는 10세 이상인 검체였고, 256건은 10세 미만이었다. 일반적으로 enterovirus의 분리에 가장 적절한 세포는 일차배양 원숭이 신장세포 (Primary monkey kidney cell)이지만 매년 이 세포를 획득하기가 현실적으로 어려우므로 세계보건기구 (WHO; World Health Organization)가 추천하는 세포 중 RD (human rhabdomyosarcoma) 세포주를 사용하였다.

RNA 분리

대변 상층액과 뇌척수액, 인후도찰물의 RNA 분리는 NucleiSens Lysis Buffer와 NucleiSens Isolation

Reagent를 사용하여 제조사 (bioMérieux, Geneva, Switzerland)의 프로토콜에 따라 수행하였다. 검체 200 μ L와 900 μ L의 lysis buffer를 사용하였고 25 μ L를 elution 하였다. 이 RNA 추출물을 realtime-NASBA와 RT-PCR에 사용하였다.

Realtime-NASBA를 사용한 enterovirus 증폭과 검출

Realtime-NASBA를 사용한 enterovirus RNA 검출을 위하여 190 nucleotides의 specific primers와 molecular beacon probe (Fox 등¹⁰, Table 1.)는 Eurogentec (Seraing, Belgium)에 의뢰하여 합성 및 HPLC 정제하였고, NucleiSens Amplification kit를 사용하여 수행하였다 (bioMérieux, Geneva, Switzerland). 10 μ L master mix (0.2 μ M primer 1, 0.2 μ M primer 2, 0.2 μ M molecular beacon probe, 90 mM KCl)에 5 μ L template RNA를 첨가한 후 template RNA의 predenaturation과 master mix에 primer가 용해되게 하기 위해 65°C 5분, 41°C 5분간 반응하였다. 그리고 이 mixture에 5 μ L의 enzyme mix (T7 RNA polymerase, AMV reverse transcriptase and RNase H)를 첨가하여 NucleiSens EasyQ analyzer에서 41°C에서 150분간 반응하면서 증폭 및 검출을 수행하였다. 데이터는 NucleiSens EasyQ analyzer 제조사의 NucleiSens EasyQ director software를 이용하여 분석하였다. 20건의 enterovirus 음성검체를 이용하여 4회의 realtime-NASBA 실험을 수행하여 나온 결과 값을 제조사의 방법에 따라 계산하여 threshold fluorescence level을 결정하였고 이에 따라 검체의 양성 음성을 판정하였다.

유전자 검출시험

Enterovirus의 유전자 검출을 위하여 보존성이 높은 것으로 알려진 5'-NCR region을 target으로 하는 2 step RT-PCR을 수행하였으며 (Zoll 등⁷), 바이러스 유전자형 확인을 하기 위해 바이러스 capsid 중 VP1 region을 target으로 하는 2 step RT-PCR을 수행하였다 (Oberste 등^{11,12}). 각각의 2 step RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다. RT 반응은 reverse primer와 MMLV reverse transcriptase (RTase) (Promega, USA)를 사용하였다. RT 반응액은 5 μ L nucleic acid elute, 3 μ L 5 \times buffer, 3 μ L dNTP, 1 μ L reverse primer, 0.5 μ L MMLV RTase를 포함하여 총 15 μ L가 되게 멸균증류수를 첨가하였다. RT 수행은 20°C 10분, 42°C 90분으로 실시하였다. PCR 반응액의 조성은 RT product 1 μ L에 2.5 μ L 10 \times buffer, 3 μ L dNTP, 0.5 μ L forward primer, 0.5 μ L reverse primer, 0.5 μ L Taq DNA polymerase (TAKARA, Japan)를 혼합하였고 멸균증류수를 첨가하여 총 25 μ L로 조정하였다. PCR 수행은 95°C 5분간 predenaturation한 후 95°C/30초, 56°C/30초, 그리고

Table 1. Primers sequences used in the amplification of enterovirus RNA

	primer	sequence (5'-3')	references
5'-NCR* NASBA	Primer 1	F-AATTSTAATACGACTCACTATAGGGCACCCGGATGG CCAATCCA	Fox 등 ¹⁰⁾
	Primer 2	F-GATGCAAGGTCGCATATGAGGGTG TGAAGAGCCTA TTGAG	
	Molecular beacon	F-CCATGCG TCCTCCGGCCCTGAATGCGCGCATGG 5'- Fluorescent dye : FAM, 3'- Quencher : DABSYL	
5'-NCR RT-PCR	ENTF	F-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Zoll 등 ⁷⁾
	ENTR	R-ATTGTACCATAAGCAGCCA	
VP1** RT-PCR	292	F-MIGCIGYIGARACNGG	Oberste 등 ¹²⁾
	222	R-CICCIGGIGGIAYRWACAT	

NCR* : Noncoding region, VP** : Virus protein.

72°C 30초 씩 3단계로 35 cycles 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 실험의 특이도를 알아보기 위하여 무균성수막염에서 enterovirus와 감별진단이 필요한 임상검체들과 유전적으로 enterovirus와 유사한 rhinovirus 검체를 real time NASBA와 2 step RT-PCR, 그리고 세포배양법으로 실험하였다. 각각의 바이러스는 특이적인 primer를 이용한 PCR로 양성인 것들을 사용하였다. 3건의 단순포진바이러스 1형과 3건의 단순포진바이러스 2형, 3건의 adenovirus, 2건의 유행성이하선염바이러스를 실험에 사용하였고 광주보건환경 연구원에서 분양받은 10건의 rhinovirus를 각각의 실험에 사용하였다.

증폭된 VP 1 RT-PCR 산물의 Sequencing

Enterovirus의 유전자형을 확인하기 위하여 증폭된 산물의 염기서열을 결정하여 기존에 보고된 바이러스와 비교하여 sequence homology가 가장 높은 형을 결정하였다. 세포배양 결과 세포변성효과를 보이는 세포배양액의 상층액과 검체에 대한 5'-NCR 2 step RT-PCR 결과 양성을 보이는 검체에 대하여 유전자형 확인을 위하여 VP1 RT-PCR을 수행하여 그 증폭산물을 Solgent 사 (Solgent co., Ltd, Korea, Daejeon)에 의뢰하여 sequencing하여 분석하였다. ABI PRISMTM Bigdye™ terminator cycle sequence ready reaction kit V3.1 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여 Sequencing 반응을 하였고, Millipore - Montage dye removal kit로 Sequencing 산물을 정제하였으며 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (50cm capillary, Perkin Elmer, USA)로 Sequencing 산물을 running 하여 염기서열을 결정하였다. NCBI BLAST search program을 사용하여 기존의 바이러스와 sequence homology를 비교하

여 염기서열결과를 분석하였다. 기존 혈청형의 염기서열과 75%이상의 상동성을 보이는 경우를 기준으로 바이러스의 유전형질을 결정하였다.

결 과

Realtime-NASBA, 2 step RT-PCR, 세포배양 결과 비교

197건의 대변, 69건의 뇌척수액, 그리고 26건의 인후도찰물 총 292건의 검체를 대상으로 실험하였다. 검체를 RD 세포주에 처리, 배양하여 검체에 따라 3-5일에서 늦으면 일주일 후에 장내바이러스에 의한 전형적인 세포변성효과인 세포의 원형화, 세포질의 수축 그리고 세포의 파괴 등의 현상이 유발됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 그리고 NucleiSens Isolation Reagent와 NucleiSens Lysis Buffer를 사용하여 RNA를 분리하여 enterovirus realtime-NASBA를 수행하여 enterovirus 2 step RT-PCR 시험하여 436 bp 산물을 확인하였다 (Fig. 1). 42건의 대변과 1건의 뇌척수액, 3건의 인후도찰물, 총 46건에서 모든 실험에서 양성으로 나타났고, 대변 94건, 뇌척수액 45건, 인후도찰물 8건, 총 147건의 검체는 3가지 실험 모두에서 음성이었다. 양성검체는 realtime-NASBA 145건, 세포배양 101건, 2 step RT-PCR 86건순으로 나타났다. 각각의 실험에 대한 양성결과는 Table 2에 나타내었다. 세포배양과 2 step RT-PCR을 결과를 비교하여 보면 세포배양 시험에서만 양성인 검체는 대변 42건, 뇌척수액 1건, 인후도찰물 3건, 총 46건이었고, 2 step RT-PCR에서만 양성인 경우는 대변 26건, 뇌척수액 4건, 인후도찰물 10건, 총 40건이었다 (Table 3). 모든 2 step RT-PCR 양성검체와 세포배양 양성검체는 realtime-NASBA에서도 양성으로 나타났고 2건의 대변, 2건의 뇌척수액 총 4건의 검체에서는 realtime-NASBA에서만 양성으로 나타났다.

특이도 검사

3건의 단순포진바이러스 1형과 3건의 단순포진바이러스 2

Table 2. Positive results of cell culture, realtime NASBA, and 2 step RT-PCR

	total	Stool	CSF	Throat
cell culture positive	101 (69.7%)	75	18	8
NASBA positive	145 (100%)	103	24	18
2 step RT-PCR positive	86 (59.3%)	68	5	13

Table 3. Comparison of enterovirus viral culture and enterovirus 2step RT-PCR

		viral culture		Total
		Positive	Negative	
2 step RT-PCR	Positive	46 (42 stool; 1 CSF; 3 throat)	40 (26 stool; 4 CSF; 10 throat)	86
	Negative	55 (33 stool; 17 CSF; 5 throat)	151 (96 stool; 47 CSF; 8 throat)	206
Total		101	191	292

형, 3건의 아데노바이러스, 2건의 유행성이하선염바이러스는 세포배양, realtime-NASBA, 2 step RT-PCR 시험에서 모두 음성으로 나타났다. 10건의 rhinovirus 모두에서 세포배양과 realtime-NASBA 실험결과 음성으로 나타났지만 2 step RT-PCR 시험에서는 1건의 rhinovirus가 강한 양성으로 나타났다.

양성환자 특성

46건의 검체에서 모든 실험에 대해 양성 결과를 보였고, 이들 모두는 10세 미만 환자의 검체에서 검출되었다. 각각의 실험중 하나 또는 그 이상 양성인검체는 모두 145건였다. 143(145)건 검체는 10세 미만의 환자에서 검출된 것이었고,

2(145)검체는 10세 이상에서 검출되었다. 한 검체도 18세 이상에서 검출된 것은 없었다. 검체별로는 대변이 양성건수와 검체건수 (103건/197건)가 모두 많았고, 뇌척수액 (24건/69건), 인후도찰물(18건/26건) 순으로 나타났다. 뇌척수액에 대한 2 step RT-PCR 시험에서 양성건수가 적었으며 인후도찰물에 대한 실험에서는 세포배양에서 양성건수가 적었다. 월별로는 6-8월에 분리된 검체건수가 많았고 (Fig. 3), 양성 환자의 성별비는 남 70 : 여 71로 유의한 차이점을 나타내지 않았다.

세포배양과 realtime-NASBA, 2 step RT-PCR 시험의 실험수행의 편리성, 소요시간 비교

세포배양에서 enterovirus가 자라는데 보통 3일에서 5일,

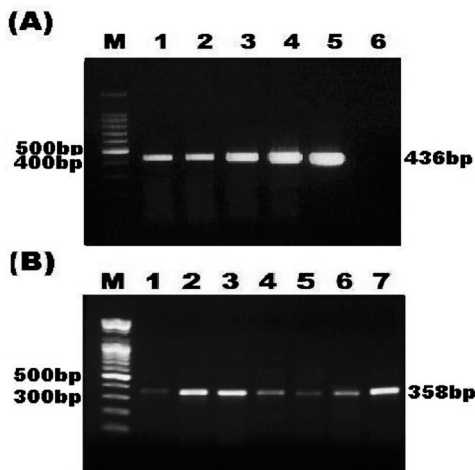


Fig. 1. RT-PCR amplified products obtained by amplification of clinical isolates of enterovirus. (A) RT-PCR product was used to amplify a 5'-NCR region. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 2-5: Positive of 5'-NCR 2 step RT-PCR, Lane 6: Negative Control. (B) RT-PCR product was used to amplify a VP1 region. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1-7: Positive of 5'-NCR 2 step RT-PCR. Each final products were resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis, respectively.

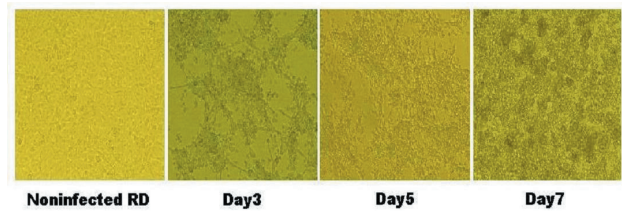


Fig. 2. Morphological changes in RD cells infected with enterovirus.

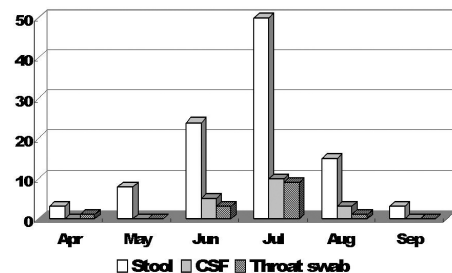


Fig. 3. Monthly distribution of enteroviruses isolated in Busan, 2005.

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

Virus	Genotype	Number
Coxsackie virus A	4	1
Coxsackie virus B	1	2
	2	1
	3	24
	5	53
Echovirus	9	13
	18	45
	30	1
Enteroviruses	Untypable	2

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 세포변성효과를 확인하기 위하여 숙련된 인력이 필요하다. Raltime-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

세포배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR 수행결과 양성인 검체 141건 (세포배양과 5'-NCR 2 step RT-PCR 둘다 양성 41건, 세포배양 양성 113건, 5'-NCR 2 step RT-PCR 양성 29건)에 대하여 VP-1 RT-PCR을 수행하여 검체 모두에서 358 bp의 증폭산물이 확인되어 (Fig. 1) sequencing 분석을 수행하였다. 그 결과 coxsackie virus A4형 1건, B1형 2건, B2형 1건, B3 24건, B5 53건, echovirus 9형 13건, 18형 45건, 30형 1건, untypable enterovirus 2건으로 분석되었다 (Table 4). 그 중 세포배양에서는 음성이고 2 step RT-PCR에서만 양성을 보이는 검체 40건은 coxsackie virus A4형 1건, B3 2건, B5 4건, echovirus 9형 3건, 18형 27건, 30형 1건, untypable enterovirus 2건으로 나타났다.

고 찰

Enteroviruses는 무균성뇌막염의 가장 중요한 원인 바이러스이며, 가벼운 비특이적 열에서부터 일반적인 상기도감염증, 심한 심근염, 뇌염, 마비성척수염(paralytic poliomyelitis) 등의 매우 광범위한 질환의 원인이 되는 바이러스이며 (Gorgievskie-Hrisoho 등⁴³), 구강항문 루트로 전파되어 혈관을 통해 목적장기로 이동한다 (Landry 등¹³). Enteroviruses는 보통 높은 유행율과 낮은 치명율을 특징으

로 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.

NASBA (Nucleic acid sequence based amplification ; bioMerieux, Boxtel, The Netherlands)는 avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, RNase H, T7 RNA polymerase 등의 효소가 일정한 온도에서 동시에 반응하는 하는 원리를 사용하여 RNA를 검출하기 위하여 고안되었고 (Compton⁹). 이후로 특이적인 molecular beacon probe를 사용하여 별도의 전기영동 없이 증폭되는 과정을 실시간으로 볼 수 있다는 장점을 가진 realtime-NASBA로 발전되었다. realtime-NASBA는 *Escherichia coli*, *Mycoplama pneumoniae*, rabies, hepatitis A virus 등을 진단하는데 다양하게 시도되고 있다 (Min 등¹⁹, Loens 등¹⁸, Wacharapluesadee 등¹⁷, Jean 등¹⁸). 이전의 발표들에서 realtime-NASBA는 무균성뇌막염 환자의 뇌척수액에서 enterovirus RNA 검출을 위한 효과적인 방법이며 2 step RT-PCR이나 3 step RT-PCR과의 비교에서는 민감도에서는 비슷한 결과를 보였지만 RT-PCR이 상대적으로 교차오염 가능성이 많다고 하였다 (Capaul 등¹⁹, Heim 등²⁰) 또한 realtime NASBA가 세포배양보다 민감도가 높다는 실험 결과도 있다 (Landry 등⁴, Ginocchio 등²¹). 본 연구에서는 realtime-NASBA가 무균성뇌막염이 의심되는 환자의 인후도찰물, 대변, 뇌척수액 등의 다양한 검체에서 enterovirus의 진단에 사용될 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 현재 enterovirus 진단에 많이 사용되는 2 step RT-PCR 시험, 세포배양 시험을 비교 실험하여, 각 시험의 민감도와 특이도, 실험수행 시 편리성, 시험소요 시간, 교차오염의 가능성 등을 확인하였다.

본 연구에서는 197건의 대변, 69건의 뇌척수액, 그리고 26건의 인후도찰물을 포함하여 총 292건 임상검체를 대상으로 realtime-NASBA, 2 step RT-PCR 시험, 세포배양 시험을 수행하였다. 이 결과 realtime-NASBA에서 145건, 세포배양에서 101건, 2 step RT-PCR에서 86건이 양성으로 나타나

realtime-NASBA가 가장 민감도가 높은 시험법임을 알 수 있다. 모든 2 step RT-PCR 양성검체와 세포배양 양성검체는 realtime-NASBA에서도 양성으로 나타났고, 46건의 검체에서 모든 실험에서 양성으로 나타났다.

세포배양과 2 step RT-PCR 시험결과를 비교하면 2 step RT-PCR에서 양성이고 세포배양에서는 음성인 검체는 40건이었다. 이에 유전자형 확인을 위하여 VP1 region을 target으로 하는 RT-PCR 산물로 염기서열을 분석하였다. 그 결과 세포배양에서는 잘 자라지 않는 특성을 가진 바이러스인 coxsackie virus A4형 1건으로 분석되었고 coxsackie virus B3 2건, B5 4건, echovirus 9형 3건, 18형 27건, 30형 1건, untypable enterovirus 2건 등은 검체의 취급과정 중에 바이러스의 vitality가 떨어져, 바이러스의 활력과 관계없이 RNA는 증폭되는 특성이 있는 2 step RT-PCR 시험에서는 양성 결과가 나왔지만 세포배양에서는 자라지 않은 것으로 사료되어진다. 그리고 세포배양은 양성이고 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 realtime-NASBA 시험은 민감도가 특이도가 높은 시험법으로 현재 enterovirus 검출법으로 많이 수행되는 세포배양과 2 step RT-PCR을 대체할 가능성이 있다고 보여진다.

특이도 검사를 위하여 enterovirus 외에 뇌수막염의 원인이 되는 바이러스로 3건의 단순포진바이러스 1형과 3건의 단순포진바이러스 2형, 3건의 아데노바이러스, 2건의 유행성이하선염바이러스와 그리고 10건의 rhinovirus를 대상으로 realtime-NASBA, 2 step RT-PCR 시험, 세포배양 시험을 각각 수행하였다. 실험에 사용된 모든 바이러스는 세포배양, realtime-NASBA 시험에서 모두 음성으로 나타났다. 2 step RT-PCR 시험에서는 rhinovirus를 제외한 다른 바이러스에서는 모두 음성으로 나타났고, 흥미로운 결과로 2 step RT-PCR 시험에서는 10건 중 1건의 rhinovirus가 강한 양성 밴드가 관찰되어 위양성 반응을 보이는 것으로 나타나 이 다른 두 시험보다 특이도가 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 알려진 바와 같이 enterovirus는 rhinovirus와 유전적으로 매우 유사하며 다른 바이러스들 간에 교차반응이 많다는 것을 시사하며 (Lai 등⁸⁾, 9건의 rhinovirus에 대해 2 step RT-PCR과 realtime NASBA를 수행한 결과 realtime NASBA에서는 모두 음성이었지만 2 step RT-PCR에서는 3건에서 양성을 나타낸 발표결과 (Capal 등⁹⁾)와 유사한 결과를 보인다. 그러므로 무균성수막염을 보이는 환자의 인후도찰물 검체에서 enterovirus의 2 step RT-PCR은 rhinovirus와의 감별시

험이 필요할 것으로 생각되며, rhinovirus의 검출이 거의 보고된바 없는 뇌척수액 검체를 대상으로 시험할 때에도 검체의 수집과 전처리, RT-PCR 과정에서 인후도찰물과 같은 다른 종류의 검체로부터 rhinovirus가 오염되는 것에 충분한 주의를 기울여야 할 것이다.

각각의 실험 중 하나 또는 그 이상 양성인검체는 모두 145건이었고, 이 중 143건의 검체는 10세 미만의 환자에서 검출되었고, 2건의 검체는 10세 이상에서 검출되었다. 한 검체도 18세 이상에서 검출된 것은 없었다. 이 3가지 실험법은 대변, 뇌척수액, 호흡기가검물 등의 다양한 검체에 적용가능 한 것으로 나타났으나 뇌척수액에 대한 2 step RT-PCR 시험에서 양성 건수가 적었으며 인후도찰물에 대한 실험에서는 세포배양에서 양성건수가 적었다.

또한 이 연구의 목적은 realtime-NASBA과 이전부터 enterovirus 검출의 표준(Gold standard)으로 사용되어 왔던 세포배양과 2 step RT-PCR 시험 간에 사용자의 편리성과 소요시간을 비교하는 것이다. 세포배양에서 바이러스가 자라려면 보통 3일에서 5일, 길게는 7일이 걸리며 음성판정에는 14일이상이 걸린다. 그리고 실험이 없을 때에도 세포주를 항상 최적의 상태로 유지하기 위한 시간이 별도로 소요되므로 enterovirus를 신속하게 검출하는 데는 한계가 있다. 그리고 세포배양을 위해 BSL 2-3등급으로 별도의 구역화 된 실험실과 세포의 유지와 세포변성효과를 확인하기 위하여 숙련된 인력이 필요하여 일선 소아과에서 무균성수막염의 진단에 임상적으로 적용할 수는 없었다. 2 step RT-PCR은 cDNA를 합성(RT)하는 과정과 PCR로 증폭하는 과정의 2단계가 필요하며 별도의 전기영동이 필요하므로 오염을 방지하기 위하여 별도로 3개에서 4개의 구역이 필요하며 9시간의 수행시간이 필요하므로 하루 만에 실험결과를 볼 수 없다. 그러나 realtime-NASBA는 molecular beacon probe와 NucleiSens EasyQ analyzer 제조사의 NucleiSens EasyQ director software를 사용하여 증폭과 검출이 실시간으로 확인되어 5시간이 필요하므로 하루 만에 결과를 볼 수 있다. 이로써 NucleiSens EasyQ를 이용한 enterovirus realtime-NASBA가 다른 실험에 비해 사용자의 편리성과 수행 시간이 짧음을 확인되었다.

그리고 단계별로 튜브를 열고 다른 튜브로 산물들을 옮겨 실험하는 2 step RT-PCR이나 여러 검체를 세포에 접종하는데 있어 검체간 오염의 가능성이 있어 신중한 주의를 요하는 세포배양에 비해 realtime-NASBA는 하나의 튜브에서 증폭과 검출이 동시에 일어나므로 교차오염을 줄일 수 있는 장점을 가진다. 그래서 realtime-NASBA는 세포배양이나 2 step RT-PCR에 비해 구역화 된 별도의 실험공간이 필요치 않으며 검출에 복잡한 여러가지 장비가 필요하지 않아 간단한 시설과 장비, 시약으로도 충분히 운영가능하다. 그러므로 일선 병원과 소규모 실험실에서 무균성수막염을 신속하게 진단하는 데 쉽게 적용할 수 있어, 결과적으로 부적절한 항생제의 사용을 막

을 수 있고 입원시간을 단축하는데 기여할 것으로 예상된다.

결 론

본 연구에서는 realtime-NASBA가 무균성뇌막염이 의심되는 환자의 검체에서 enterovirus의 진단에 사용될 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 현재 enterovirus 진단에 많이 사용되는 2 step RT-PCR 시험, 세포배양 시험을 비교 실험하여, 각 시험의 민감도와 특이도, 사용자 편리성, 시험소요 시간, 교차오염의 가능성 등을 확인하였다. 비교시험 결과 realtime-NASBA에서 145건, 세포배양에서 101건, 2 step RT-PCR에서 86건이 양성으로 나타나 realtime-NASBA가 가장 민감도가 높은 시험법임을 알 수 있다. Enterovirus 외의 바이러스에 대한 비교실험결과 realtime-NASBA와 세포배양에서는 양성이 없었으나 2 step RT-PCR에서 10건의 rhinovirus 중 1건에서 양성이 발견되어 다른 실험법에 비해 2 step RT-PCR의 특이도가 떨어지는 것으로 나타났다. Realtime-NASBA는 한 튜브에서 증폭과 검출이 동시에 일어나 5시간 만에 결과를 볼 수 있으므로 세포배양 (5-14일) 및 2 step RT-PCR (9시간)에 비하여 신속하며 교차오염의 가능성을 줄일 수 있다. 그리고 시험법이 간단하므로 실험의 표준화에 용이하며 간단한 시설과 장비, 시약으로도 충분히 운영가능하므로 앞으로 일선병원이나 실험실에서 enterovirus를 검출하는데 쉽게 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Hellen CUT, Wimmer E : Enterovirus structure and assembly. In Human enterovirus infection. Rotbart HA(Ed), ASM press, Washington DC, pp155-174(1995)
- Grandien M, Forsgren M, Ehrnst A. : Enteroviruses. Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial Infection. Lennette EH, Lennette ET, Editors. 7th Ed. American Public Health Association, Washington DC, pp279-97(1995)
- Hsiung GD : Picornaviridae. 4th ed. Hsiung's diagnostic virology, New Haven, Yale University press, P119(1994)
- Landry ML, Garner R, Ferguson D. "Rapid enterovirus RNA detection in clinical specimens by using nucleic acid sequence based amplification", J Clin Microbiol, 41, 346-50(2003)
- Glimarker M, Johansson B, Olcen P, Ehrnst A, Forsgren M. "Detection of enterovirus RNA by polymeric chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis", Scan J Infect Dis, 25, 547-57(1993)
- Rotbart HA. "Enzymatic RNA amplification of enteroviruses", J Clin Microbiol, 28:438-42(1990)
- Zoll GJ, Melcher WJ, Kopecka H, Jambros G, Vanderpoel HJA, Galama JMD. "General primer mediated polymeric chain reaction for detection of enteroviruses : application for diagnostic routine and persistent infections", J Clin Microbiol, 30, 160(1992)
- Lai KKY, Cook L, Wendt S, Conrey L, Jerome KR. "Evaluation of realtime PCR versus PCR with liquid phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid", J Clin Microbiol, 41, 3133-41(2003)
- Compton J. "Nucleic acid sequence based amplification", nature, 7 march 350(6313), 91(1991)
- Fox JD, Han S, Samuelson A, Zhang Y, Neale ML, Westmoreland D. "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, 117-20(2002)
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. "Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification", J Virol, 73, 1941-1948(1999)
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. "Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1", J Clin Microbiol, 37, 1288-1293(1999)
- Landry ML, Garner R, Ferguson D. "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, 5006-10(2003)
- Gorgioevski-Hrisoho M, Schmacher JD, Vilimonovic N, Germann D, Matter L. "Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland", J Clin Microbiol, 36, 2408-12(1998)
- Min J, Baeumer AJ. "Highly Sensitive and Specific Detection of Viable *Escherichia coli* in Drinking Water", Anal Biochem, 303(2), 186-93(2002)
- Loens K, Ursi D, Ieven M, van Aarle P, Sillekens P,

- Oudshoorn P, Goossens H. "Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Spiked Clinical Samples by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification", *J Clin Microbiol*, 40(4), 1339-45(2002)
17. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. "Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies", *J Clin Microbiol*, 358, 892-893(2001)
18. Jean J, Blais B, Darveau A, Fliss I. "Detection of Hepatitis A Virus by the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Technique and Comparison with Reverse Transcription-PCR", *Appl Environ Microbiol*, 67(12), 5593-5600(2001)
19. Capaul SE, Gorgioevski-Hrisoho M. "Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ enterovirus assay", *J Clin Virol*, 32, 236-40(2005)
20. Heim A, Schumann J. "Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples", *J Virological Methods*, 103, 101-7(2002)
21. Ginocchion C, Zhang F, Malhotra A, Manji R, Sillekens P, Helma F, Overdyk M, Peeters M. "Development Technical performance and clinical evaluation of a NucliSens Basic kit application for detection of Enterovirus RNA cerebrospinal fluid", *J Clin Microbiol, J Clin Virol*, 2616-23(2005)