

Detection of Enterovirus using Real-Time Nucleic Acid Sequence-based Amplification

Sun Hee Jun¹, Kee Hyung Sung¹, Sang Hoon Song^{1,2}, Kyoung Un Park^{1,2}, Hong Bin Kim³,
Junghan Song^{1,2}, Eun Hwa Choi⁴, Sung Sup Park², Eui Chong Kim²

¹Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam,

²Department of Laboratory Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul,

Departments of ³Internal Medicine and ⁴Pediatrics, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Background: Enteroviruses are the most frequent etiologic agents of aseptic meningitis and are estimated to be the cause of 70% to 90% of viral meningitis cases. Enterovirus diagnosis can be difficult because clinical features vary according to patient immunity and age. The purpose of this study was to evaluate the performance of the real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay compared to that of the real-time nested RT-PCR assay for enterovirus detection.

Methods: This study was performed on 96 patients suspected of aseptic meningitis based on clinical features. RNA was extracted using NucliSENS EasyMAG and real-time NASBA assay was performed using NucliSENS EasyQ Enterovirus and NucliSENS EasyQ Basic 2. We also executed in-house real-time nested RT-PCR assay for RNA extracted via QIAamp Viral RNA Mini.

Results: The positive rate of real-time NASBA assay

was 45.8% for enterovirus detection. The positive rate of first real-time reverse transcription PCR was 22.9% and the second real-time PCR was 57.3%. The concordant rate of the real-time NASBA assay and first real-time reverse transcription PCR was 75.0%. The concordant rate of the real-time NASBA assay and second real-time PCR was 86.5%.

Conclusion: The detection of enteroviruses using the real-time NASBA assay is less prone to cross-contamination and is simple, without the need for reverse transcription. We conclude that the NASBA assay is an effective method for the rapid diagnosis of aseptic meningitis. (Korean J Clin Microbiol 2010;13: 53-58)

Key Words: Enterovirus, Real-time PCR, Nucleic acid sequence-based amplification, Aseptic meningitis

서 론

장바이러스는 단일가닥의 RNA 바이러스로 *Picornaviridae*에 속하며 직경 18~30 nm 크기이며 외피가 없다. 사람에게 감염되는 장바이러스에는 poliovirus, echovirus, coxsackievirus, 기타 장바이러스가 있다. Poliovirus는 3개의 혈청형으로, echovirus는 34개의 혈청형으로 나눈다. A군 coxsackievirus는 23개의 혈청형, B군 coxsackievirus는 6개의 혈청형을 포함한다. 1969년부터 새로이 발견되는 혈청형에는 번호를 부여하기로 함에 따라 기타 장바이러스에는 68, 69, 70, 71형 등이 있다[1]. 캡시드 단백을 구성하는 구조단백이 서로 다르므로 염기순서분석으로도 혈청형을 알아낼 수 있다[2].

장바이러스는 무균수막염의 가장 흔한 원인 바이러스이지만, 임상증상이 환자의 면역상태나 연령에 따라 매우 다양하게 나타나서 세균이나 진균에 의한 감염과의 구별이 용이하지 않다. 감염의 진단에는 바이러스 배양법이 고전적으로 사용되고 있지만, 세포 병변효과를 관찰하기까지 2일에서 7일 정도가 소요되고 음성결과를 확인하기까지 10일에서 14일 정도가 소요된다[3]. 또한 coxsackievirus A군 등 일부 바이러스의 경우 숙주 세포가 감수성을 나타내지 않는다는 단점이 있다[4]. 이와 대조적으로 분자진단법은 대부분의 혈청형을 검출할 수 있고, 개체 수가 적은 경우에도 비교적 빠른 시간 내에 바이러스를 검출할 수 있으므로, 환자의 조기 진단에 도움이 된다[5-7].

장바이러스의 5' NCR (5' noncoding region)을 대상으로 한 역전사중합효소 연쇄반응이 보편화된 이후, 최근에는 유전자의 증폭산물에 결합된 형광물질로부터 방출되는 형광량을 실시간으로 검출하는 실시간-중합효소연쇄반응을 이용한 연구들이 보고되고 있다[8-11].

염기순서기반증폭(nucleic acid sequence-based amplification,

Received 19 July, 2009, Revised 23 November, 2009

Accepted 25 March, 2010

Correspondence: Kyoung Un Park, Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 300, Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam 463-707, Korea. (Tel) 82-31-787-7692, (Fax) 82-31-787-4015, (E-mail) m91w95pf@snu.ac.kr

NASBA)은 역전사효소(avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, AMV-RT), RNase H, T7 RNA중합효소의 세 가지 효소를 이용하여 일정한 온도(41°C)에서 RNA의 증폭산물을 얻는다 [12]. 실시간으로 증폭산물을 검출하기 위해서는 장바이러스의 5' NCR을 대상으로 한 소식자(molecular beacon)를 이용할 수 있다 [13]. 일반적으로 실시간-염기순서기반증폭에는 효소혼합물 키트로서 NucliSENS EasyQ Basic 1 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)과 NucliSENS EasyQ Basic 2 (bioMérieux) 중 하나가 사용된다. 그러나, 기존 장바이러스 검출용 효소혼합물 키트인 NucliSENS EasyQ Basic 1은 일부 유효하지 않은 결과로 인해 양성 또는 음성 결과를 최종적으로 확정하는데 어려움이 있었다[3].

본 연구에서는 장바이러스 검출에 있어서 실시간-염기순서기반증폭의 유용성을 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응과의 비교를 통해 검증하고자 하였다. 이에 앞서 일반적으로 실시간-염기순서기반증폭에 사용되는 두 종류의 효소혼합물 키트를 비교하여 장바이러스 검출에 적절한 키트를 선정하였다.

재료 및 방법

우선 실시간-염기순서기반증폭에 기본적으로 필요한 효소혼합물(역전사효소, RNase H, T7 RNA중합효소) 키트인 NucliSENS EasyQ Basic 1과 NucliSENS EasyQ Basic 2 (bioMérieux) 중

장바이러스 검출에 보다 적절한 키트를 선정하기 위해서 4월에 무균수막염이 의심되어 장바이러스 검출이 의뢰된 84 검체를 대상으로 두 가지 실시간-염기순서기반증폭의 비교분석을 진행하였다. 그 후 6월에 무균수막염이 의심되어 장바이러스 검출이 의뢰된 별도의 96 검체를 대상으로 실시간-염기순서기반증폭과 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응의 장바이러스 검출능 비교를 진행하였다. 각 검사의 매 반응마다 바이러스 배양법에서 양성을 나타낸 검체로부터 추출한 장바이러스 RNA를 양성대조로 사용하였으며, 각 비교검사는 동일한 RNA로 동시에 진행되었다.

실시간-염기순서기반증폭을 위한 RNA 추출은 NucliSENS EasyMAG (bioMérieux)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 내부대조용 RNA를 검체에 추가하였으며, 200 µL의 검체를 사용하여 최종 25 µL의 추출산물을 얻었다. NucliSENS EasyQ Basic과 NucliSENS EasyQ Enterovirus (bioMérieux)를 사용하여 반응혼합물을 만들었다. NucliSENS EasyQ Basic 키트에 포함되어 있는 증류수(NASBA water) 14 µL와 16 µL KCl을 혼합한 후 24 µL를 취해서 64 µL의 시약구(reagent sphere)와 혼합하고, 다시 NucliSENS EasyQ Enterovirus 키트에 포함된 시발체 및 소식자 8 µL를 혼합하여 그 중 10 µL를 취한 후, 추출산물 5 µL를 첨가하여 NucliSENS EasyQ Incubator (bioMérieux)를 이용하여 65°C에서 2분, 41°C에서 2

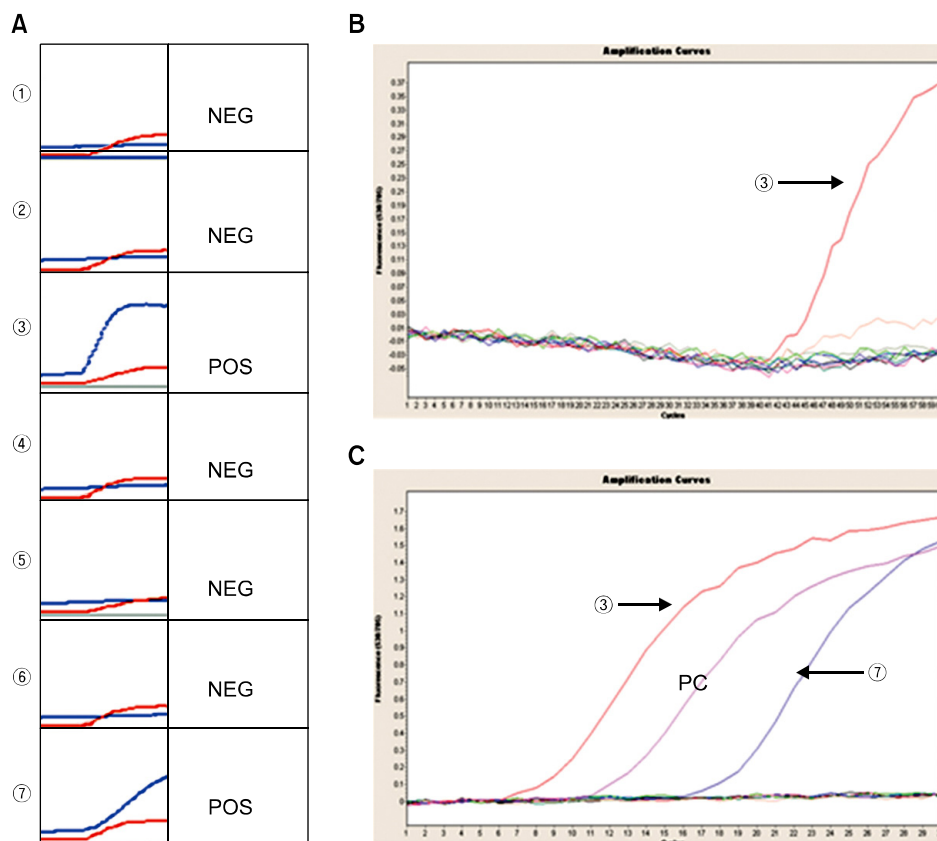


Fig. 1. Detection of enterovirus by nucleic acid sequence-based amplification and real-time nested reverse transcription PCR. (A) Nucleic acid sequence-based amplification. ①~② and ④~⑥, samples with a internal control signal (red) and no enterovirus signal (blue); ③ and ⑦, samples with a internal control signal and a strong enterovirus signal. (B) The first real-time reverse transcription PCR. ③, positive for enterovirus. (C) The nested real-time PCR. ③ and ⑦, positive for enterovirus; PC, positive control.

분간 반응시켰다. 초기변성 후 5 μ L의 효소혼합물을 첨가하여 NucliSENS EasyQ Analyzer (bioMérieux)를 이용하여 41°C에서 150분간 증폭을 수행하였다.

장바이러스의 RNA를 대상으로 하는 소식자에 부착된 6-FAM (6-carboxyfluorescein)과 내부대조용 RNA를 대상으로 하는 소식자에 부착된 6-ROX (6-carboxy-X-rhodamine)의 형광을 NucliSENS EasyQ Analyzer를 통해 실시간으로 확인하였다. NucliSENS EasyQ Director Software (bioMérieux)를 이용하여 두 가지 형광신호를 분석하여 각 검체별로 검사의 결과가 유효한지 여부 및 양성 여부를 결정하였다(Fig. 1).

실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응은 자체 방법으로서 이전에 저자들의 검사실에서 보고한 방법 그대로 시행하였다[14]. RNA의 추출에는 QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하였고 140 μ L의 검체를 사용하여 최종 60 μ L의 추출산물을 얻었다. 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응은 LightCycler RNA Master HybProbe (Roche, Penzberg, Germany)를 이용하여 시행하였고, 총 60회의 증폭반응을 LightCycler 2.0 (Roche)을 통해 시행하였으며, 증폭신호의 검출을 위해서 측정파장 530 nm, 분석파장 530/705 nm로 설정하여 결합반응에서의 형광신호를 단발적으로 측정하였다. 이차 실시간-중합효소연쇄반응은 일차 증폭산물을 증류수로 50배 희석하여 주형핵산으로 사용하였고[11], 소식자는 일차 반응과 동일하였으며, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche)를 사용하였다. 총 30회의 증폭반응에는 LightCycler 2.0을 사용하였으며, 형광측정파장과 분석파장은 일차 반응과 동일하게 적용하였다.

바이러스 배양법에서 양성으로 확인된 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) 세 검체와 Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) 두 검체, Varicella zoster virus (VZV) 한 검체, Cytomegalovirus (CMV) 세 검체를 대상으로 실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출을 진행하여 그 특이도를 확인하였다.

결 과

84 검체(뇌척수액 71 검체, 대변 11 검체, 혈청 2 검체)에서

Table 1. Comparison of results of enterovirus detection by real-time nucleic acid sequence-based amplification between NucliSENS EasyQ Basic 1 and NucliSENS EasyQ Basic 2

NucliSENS EasyQ Basic 2	NucliSENS EasyQ Basic 1			Total
	Positive	Negative	Invalid	
Positive	5	2		7
Negative		67	8	75
Invalid		1	1	2
Total	5	70	9	84

추출한 동일한 RNA로 NucliSENS EasyQ Basic 1과 NucliSENS EasyQ Basic 2를 각각 사용하여 실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출을 동시에 시행한 결과, NucliSENS EasyQ Basic 1을 사용한 검사에서는 양성이 5 검체, 음성이 70 검체, 유효하지 않은 결과가 9 검체로 나타났다. NucliSENS EasyQ Basic 2를 이용한 검사에서는 양성이 7 검체, 음성이 75 검체, 유효하지 않은 결과는 2 검체로 나타났다 (Table 1).

상기 84 검체와는 별도의 시점에 임상에서 의뢰된 96 검체(뇌척수액 85 검체, 대변 9 검체, 혈청 2 검체)를 대상으로 실시간-염기순서기반증폭과 실시간-이중-역전사중합효소 연쇄반응을 동시에 시행하였다. 실시간-염기순서기반증폭에 의한 장바이러스의 양성률은 45.8%였고, 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응에 의한 양성률은 22.9%, 이차 실시간-중합효소연쇄반응의 양성률은 57.3%였다. 일차 실시간-역전사중합효소 연쇄반응의 결과와 실시간-염기순서기반증폭과의 일치율은 75.0%였으며, 이차 실시간-중합효소연쇄반응의 결과와 실시간-염기순서기반증폭과의 일치율은 86.5%였다(Table 2). HSV-1, HSV-2, VZV 및 CMV 양성 검체들로 실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출을 시행하였을 때, 모두 음성결과를 보였다.

고 찰

무균수막염이란 세균 또는 진균에 의한 감염이 원인이 아니라 바이러스 감염 또는 기타의 원인으로 인한 수막염을 말한다. 특히 여름철에 발생하는 무균수막염은 장바이러스 감염일 가능성이 매우 높다[15]. 경구로 전파되며 임상 증상은 환자의 연령이나 면역능에 따라 매우 다양하게 나타난다[16]. 발열을 호소하면서 구토, 식욕감퇴, 발진 또는 감기 증세를 보이고 신생아에서는 간괴사, 심근염, 괴사성 장염 등으로 진행할 수 있다. 무균수막염의 원인이 세균 등에 의한 감염이 아닌 장 바이러스에 의한 발병이라는 것을 조기에 진단한다면 불필요한 항생제 사용이나 다른 진단검사 등을 줄이고 입원 기간도 단축시

Table 2. Comparison of results between real-time nested reverse transcription PCR and real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of enterovirus

NASBA	First real-time RT-PCR		Nested real-time PCR		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	21	23	43	1	44
Negative	1	51	12	40	52
Total	22	74	55	41	96

Abbreviations: NASBA, nucleic acid sequence-based amplification; RT, reverse transcription.

킬 수 있다. 장바이러스를 검출할 수 있는 방법 중 바이러스배양은 2일에서 14일 정도 걸리고 발병 후 일주일이 지나면 바이러스가 쉽게 배양되지 않는 단점이 있다. 이에 비해 분자진단법은 개체수가 적은 경우에도 빠른 시간 내에 바이러스를 검출할 수 있다[17,18].

본 연구에서는 장바이러스 검출에 대한 실시간-염기순서기반증폭의 유용성을 평가하고자 기존의 분자진단법 중 가장 장바이러스 검출능력이 뛰어난 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응과 비교하였다. 이를 위해 먼저 실시간-염기순서기반증폭에 필요한 효소혼합물을 포함하는 NucliSENS EasyQ Basic 1과 NucliSENS EasyQ Basic 2를 비교하여 장바이러스 검출에 적절한 키트를 선정하였다. 제조회사에 따르면 두 키트는 당(sorbitol)의 농도와 키트의 보관온도에 차이가 있으며, 장바이러스 검출에는 NucliSENS EasyQ Basic 1을 사용할 것을 권장하고 있다. 그러나, 저자들의 검사실에서 NucliSENS EasyQ Basic 1을 이용하여 장바이러스 검출을 시도한 경험에 따르면, NucliSENS EasyQ Basic 1의 경우 10.7%에서 유효하지 않은 결과를 보였으며, 이 검체들에 대해 같은 키트로 다시 재검을 했을 경우에 음성 또는 여전히 유효하지 않은 결과를 보였다. 이 검체들은 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응에 의해 최종적으로 음성으로 확인되었다. 유효하지 않은 결과는 장바이러스 RNA의 소식자에 부착된 6-FAM과 내부대조 RNA의 소식자에 부착된 6-ROX의 형광이 기준치에 이르지 못하여 결과를 신뢰할 수 없는 경우를 의미한다. 이 경우 유효한 결과를 얻기 위해서 같은 방법으로 재검을 하거나 심지어 또 다른 방법에 의해 검사를 재시행해야 하며, 이는 보고시간의 지체와 불필요한 검사의 반복으로 인해 검사실 및 임상에 문제가 되었다. 따라서 본 연구에서는 효소혼합물로 NucliSENS EasyQ Basic 2를 최종적으로 선택하였다. NucliSENS EasyQ Basic 2의 경우 효소혼합물을 선택하기 위한 연구에서는 2.4%에서 유효하지 않은 결과를 보였으며, 실제로 96 검체에 대해 검사를 시행한 연구에서는 모두 유효한 결과를 보였다.

본 연구에서 84 검체와 96 검체를 대상으로 한 각각의 실시간-염기순서기반증폭에 의한 장바이러스 양성률이 차이를 보였다. 이는 여름철에 집중적으로 확산되는 장바이러스의 특성을 고려할 때, 각 군의 검체 채취시기가 상이함에 따른 결과로 해석된다. 84 검체의 경우 검출률을 보기 위함이 아니라 음성 검체와 유효하지 않은 결과의 구분을 목적으로 한 연구였으므로 오히려 양성률이 낮은 계절의 검체를 대상으로 연구가 진행되었으며, 96 검체의 경우 검사간의 검출률의 차이를 목적으로 하였으므로 양성검체를 보다 많이 포함할 수 있는 시점을 택하여 연구가 진행되었다.

실시간-염기순서기반증폭과 이차 실시간-중합효소연쇄반응에서 동시에 양성을 보인 43 검체의 평균 교차점(crossing point)값이 9.3이었던데 반해 이차 실시간-중합효소연쇄반응에

서만 양성을 보인 검체들의 평균 교차점값은 14.0이었다. 즉 이들 검체는 이차적인 실시간-중합효소연쇄반응을 통해서만 검출이 가능할 정도로 장바이러스 농도가 상대적으로 더 낮았던 것을 알 수 있다. 하지만 현재 가장 민감하다고 알려진 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응의 경우, 다양한 농도의 장바이러스에 대한 검출률을 높이기 위하여 일차 증폭과정 후에 증폭산물을 희석한 후에 다시 이차 증폭반응을 수행해야 하며[11], 이는 증폭산물을 실험실에 노출시킴으로 인한 오염의 위험을 증가시킬 수 있기 때문에, 한번의 반응만으로 일차적인 실시간-역전사중합효소연쇄반응보다 두 배 정도의 검출률($P=0.0008$, Pearson's chi-square)을 보이는 실시간-염기순서기반증폭이 현실적인 대안으로 판단된다. 또한 실시간-염기순서기반증폭에 의한 장바이러스의 검출은 내부대조를 검체에 추가하여 RNA의 추출부터 증폭 및 검출에 이르는 전 과정에 대해 정도관리가 가능하며, 역전사 없이 단일 온도에서 RNA의 증폭이 이루어진다. 즉 중합효소연쇄반응에 의한 장바이러스 검출에 필수적인 역전사 과정이 필요없다. 한편, 본 연구에 사용된 실시간-염기순서증폭은 분석 프로그램의 특성상 음성, 양성, 또는 유효하지 않은 경우로만 결과분석이 가능하여, 실시간-중합효소연쇄반응의 교차점에 해당하는 지표를 파악할 수 없다는 단점을 가지고 있다.

실시간-역전사중합효소연쇄반응을 이용한 연구에서 19.3%의 장바이러스 검출률이 보고되었고[19], 고전적인 염기순서기반증폭과 역전사중합효소연쇄반응을 비교한 기존의 보고에서는 염기순서기반증폭은 47.6% (39/82)에서 양성을, 역전사중합효소연쇄반응은 45.1% (37/82)에서 양성을 보였다[3]. 고전적인 염기순서기반증폭과 장바이러스 배양을 비교한 연구에서는 염기순서기반증폭은 25.6% (44/172), 배양은 22.7% (39/172)에서 양성을 보였다[16]. 상기 두 보고는 모두 유효하지 못한 결과를 일부 포함한 연구들이다. 실시간-염기순서기반증폭과 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응을 직접 비교한 경우 및 유효하지 못한 결과를 배제한 보고로는 저자들의 연구가 처음인 것으로 파악된다. 하지만 장바이러스의 특성상 다양한 검체 및 다양한 시점에 따른 양성률의 차이를 반드시 고려해야하므로, 각 보고 사이의 검출률을 직접 비교하기보다는 각 보고 내에서의 검사법 간의 비교 결과에 의미를 두어야 할 것이다.

실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출은 증폭산물 오염의 가능성이 없고 역전사 과정이 없어 검사과정이 단순함으로, 임상검체를 대상으로 하는 검사실에서 장바이러스를 검출하는데 유용하다. RNA 추출부터 바이러스 검출까지 4시간 정도가 소요되므로 무균수막염과 세균성 수막염의 신속한 감별에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 추후 실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출의 한계 및 정밀도 등에 대한 추가적인 연구가 진행될 것이다.

참 고 문 헌

1. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2590-2.
2. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999;37:1288-93.
3. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Comparison of the NucliSens Basic kit (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:5006-10.
4. Hsiung GD. *Picornaviridae*. In: Hsiung GD, Fong CKY and Landry ML, eds. *Hsiung's Diagnostic Virology*. 4th ed, New Haven; Yale University Press, 1994:119-140.
5. Hyypiä T, Auvinen P, Maaronen M. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol* 1989;70:3261-8.
6. Rotbart HA. Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr* 1990;117:85-9.
7. Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA. Enteroviral meningitis in infancy: potential role for polymerase chain reaction in patient management. *Pediatrics* 1994;94:157-62.
8. Pozo F, Casas I, Tenorio A, Trallero G, Echevarria JM. Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1741-5.
9. Rotbart HA. Reproducibility of AMPLICOR enterovirus PCR test results. *J Clin Microbiol* 1997;35:3301-2.
10. Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:3666-70.
11. Watkins-Riedel T, Woegerbauer M, Hollemann D, Hufnagl P. Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:99-105.
12. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991;350:91-2.
13. Wang H, Li J, Liu H, Liu Q, Mei Q, Wang Y, et al. Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of molecular beacons on an agarose film. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e61.
14. Heo SR, Jin SK, Chang HE, Park KU, Song JH, Kim EC. Detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by real-time nested reverse transcription polymerase chain reaction. *Korean J Lab Med* 2006;26:9-13.
15. Peigue-Lafeuille H, Croquez N, Laurichesse H, Clavelou P, Aumaître O, Schmidt J, et al. Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol* 2002;67:47-53.
16. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Rapid enterovirus RNA detection in clinical specimens by using nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2003;41:346-50.
17. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-60.
18. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 134-8.
19. Hymas WC, Aldous WK, Taggart EW, Stevenson JB, Hillyard DR. Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clin Chem* 2008;54:406-13.

=국문초록=

실시간-염기순서기반증폭(Real-Time Nucleic Acid Sequence-based Amplification)을 통한 장바이러스 검출

¹분당서울대학교병원 진단검사의학과, ²서울대학교 의과대학 검사의학교실,
³분당서울대학교병원 내과, ⁴분당서울대학교병원 소아청소년과

전선희¹, 성기형¹, 송상훈^{1,2}, 박경운^{1,2}, 김홍빈³, 송정환^{1,2}, 최은화⁴, 박성섭², 김의종²

배경: 장바이러스는 무균수막염의 가장 흔한 원인으로 바이러스에 의한 수막염 중 70%에서 90%를 차지한다. 임상 증상은 환자의 연령이나 면역능에 따라 매우 다양하게 나타나 진단에 어려움이 있다. 본 연구에서는 장바이러스 검출에 있어서 실시간-염기순서기반증폭(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)의 유용성을 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응과의 비교를 통해 검증하고자 하였다.

방법: 임상에서 무균수막염이 의심되어 장바이러스 검출을 의뢰한 96검체를 대상으로 NucliSENS EasyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)으로 RNA를 추출한 후 NucliSENS EasyQ Basic 2 (bioMérieux)와 NucliSens EasyQ Enterovirus (bioMérieux)를 사용하여 실시간-염기순서기반증폭을 시행하였다. 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응은 RNA를 QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)로 추출한 후 검사실 자체의 방법에 의해 시행하였다.

결과: 실시간-염기순서기반증폭에 의한 장바이러스 양성률은 45.8% (44/96)였다. 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응에 의한 양성률은 22.9% (22/96)였으며 이차 실시간-중합효소연쇄반응의 양성률은 57.3% (55/96)였다. 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응의 결과와 실시간-염기순서기반증폭과의 일치율은 75.0% (72/96)였으며, 이차 실시간-중합효소연쇄반응의 결과와 실시간-염기순서기반증폭과의 일치율은 86.5% (83/96)였다.

결론: 실시간-염기순서기반증폭을 통한 장바이러스 검출은 증폭산물 오염의 가능성이 없으며 역전사 과정이 없어 검사 과정이 단순함으로 임상검체를 대상으로 하는 검사실에서 무균수막염의 신속한 감별에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. [대한임상미생물학회지 2010;13:53-58]

교신저자 : 박경운, 463-707, 경기도 성남시 분당구 구미동 300

분당서울대학교병원 진단검사의학과

Tel: 031-787-7692, Fax: 031-787-4015

E-mail: m91w95pf@snu.ac.kr