

Comparison of Rapid Antigen Test and Real-Time Reverse Transcriptase PCR for Diagnosing Novel Swine Influenza A (H1N1)

Aerin Kwon, Jae-Seok Kim, Han-Sung Kim, Wonkeun Song,
Ji-Young Park, Hyoun Chan Cho, Kyu Man Lee

Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Novel swine influenza (H1N1) was first identified in Mexico in April 2009. Because of its high infectivity and worldwide distribution, a rapid and efficient screening test is necessary. Here we evaluated the usefulness of a rapid antigen test currently in use, compared to real-time RT-PCR (rRT-PCR) as a screening test for detection of novel swine influenza (H1N1).

Methods: A total of 1,228 patients who visited Hallym University Kangdong Sacred Heart Hospital with influenza-like illness between 14 August 2009 and 30 September 2009, and were tested by both rapid antigen and rRT-PCR tests, were enrolled in this study.

Results: Sensitivity, specificity, predictive value of a positive test, and predictive value of a negative test for the rapid antigen test were 30.5%, 99.2%, 86.4% and 90.1%, respectively. Fifty-one (4.2%) patients were positive for both rapid antigen test and rRT-PCR, and 1,053 (85.7%) were negative for both rap-

id antigen test and rRT-PCR. A total of 124 (10.1%) patients showed a discrepancy between the two tests. Among them, 116 (9.4%) were only positive for rRT-PCR and 8 (0.7%) were only positive for the rapid antigen test. The latter 8 patients all showed negative H1/M2 results in rRT-PCR. There were significant differences in detection rates of the rapid antigen test between different H1 Ct (threshold cycle) interval groups and for different age groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Although the rapid antigen test is easy to perform and provides fast results, its limits as a screening test for detection of novel swine influenza (H1N1) due to its low sensitivity compared to rRT-PCR need to be considered in practical situations. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:109-113)

Key Words: Novel swine influenza, H1N1, Rapid antigen test, Real-time PCR, Sensitivity

서 론

인플루엔자 바이러스는 *Orthomyxoviridae*과에 속하는 단일 가닥 RNA 바이러스로 6개 종이 있으며 그 중 A, B형이 주로 겨울철에 사람에게 호흡기 감염을 일으킨다[1,2]. 인플루엔자 바이러스 지질막에 위치한 hemagglutinin (HA), neuramidase (NA)와 M2 단백질은 바이러스 복제에 중요한 역할을 하며 인플루엔자 검사의 표적이 된다[3,4]. A형 인플루엔자 바이러스는 HA와 NA의 아미노산 구조에 지속적인 점돌연변이 즉, 소변이 (antigenic drift)가 일어나 매우 높은 유전적 다양성을 보이는 특징이 있다[3,5]. 이들 단백질에 큰 항원변이가 일어나 기존에

존재하던 아형과 면역학적으로 완전히 다른, 새로운 HA나 NA의 아형을 지닌 인플루엔자 바이러스 변종이 발생하여(대변이, antigenic shift) 인구집단을 감염시키면 대유행이 일어나게 된다[5].

2009년 4월 멕시코에서 새로운 인플루엔자 A 바이러스가 분리되어 신종인플루엔자(novel swine influenza A, H1N1)로 명명되었다. 신종인플루엔자는 빠른 전파속도와 높은 전염성을 보여 2009년 6월 WHO는 대유행을 선포하였다[6-8].

신종인플루엔자의 전파를 감소시키고 환자에게 적절한 항바이러스제를 사용하기 위해 신속한 선별검사가 필요하다[7,8]. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR, rRT-PCR) 검사는 정확한 반면 고가이고 대부분의 1차 의료기관에서 시행하기 어렵다. 반면 계절인플루엔자 검사에 쓰이는 신속항원검사는 검사방법이 간단하고 20분 이내에 검사결과가 나오며 판독이 쉽다[8,9]. 따라서 이 연구는 신종인플루엔자 진단을 위해 현재 사용하고 있는 신속항원검사와 rRT-PCR 검사를 비교하여 선별검사로써 신속항원검사의 유용성을 평가해보고자 하였다.

Received 7 January, 2010, Revised 6 July, 2010

Accepted 20 July, 2010

Correspondence: Jae-Seok Kim, Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Kangdong Sacred Heart Hospital, 445 Gil-dong, Gangdong-gu, Seoul 134-701, Korea. (Tel) 82-2-2224-2327, (Fax) 82-2-2224-2214, (E-mail) jaeseok@hallym.or.kr

대상 및 방법

1. 대상

2009년 8월 14일부터 9월 30일까지 한림대학교 강동성심병원에 내원한 신종인플루엔자 의심환자 중 선별검사인 신속항원검사와 확진검사인 rRT-PCR 검사를 모두 실시한 총 1,228명의 환자를 대상으로 하였다.

2. 신속항원검사

본 연구에서 사용된 신속항원검사(SD BIOLINE Influenza Ag, Yongin, Korea)는 면역크로마토그래피방식을 이용하여 인플루엔자 A, B 각각에 특이적인 핵단백항원을 검출하며 계절인플루엔자와 신종인플루엔자가 구별되지 않는다[10]. 동봉된 멸균면봉으로 비인두도말을 채취한 후 제조사의 지시대로 검사를 시행하였다. 인플루엔자 A 반응선과 대조선 모두에 발색 반응이 관찰되면 인플루엔자 A형 양성으로 판독하였다.

3. rRT-PCR

Flocked Swabs (Copan, Brescia, Italy)로 비인두도말을 채취한 후 Universal Transport Medium (Copan)에 넣어 즉시 검사실로 접수하고 RNA 추출 전까지 4°C에 보관하였다. QIAamp RNA Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)와 QIAcube (QIAGEN) 기기를 이용하여 RNA를 추출하였다. 계절인플루엔자와 신종인플루엔자에 공통적인 M2 유전자 및 신종인플루엔자에 특이적인 H1 유전자를 사용하여 두 바이러스를 동시에 감별진단 가능한 one step rRT-PCR 키트인 Real-time Ready Influenza A/H1N1 Detection Set (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)시약을 이용하였다. 이 시약은 FDA에서 emergency use only로 허가되었다. M2 및 H1 유전자 검출을 위해 각각 다른 튜브에서 다른 시발체-탐색자 혼합물을 사용하였다. RNA 5 uL, 시발체-탐색자 혼합물 3 uL, 완충액 4 uL, 효소 혼합액 0.4 uL, 증류수 7.6 uL로 구성된 PCR 반응액으로 LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics)과 LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) 기기에서 PCR 반응을 실시하였다. 매 실험

마다 키트에 포함되어 있는 양성대조물과 음성대조물을 포함하여 검사하였다. PCR 반응은 58°C에서 8분, 95°C에서 30초 반응 후 95°C에서 1초, 60°C에서 20초, 72°C에서 1초 반응을 총 45회 반복하고 최종적으로 40°C에서 30초간 두었다. 모든 검사결과의 증폭곡선을 눈으로 직접 확인하였고, 판정이 불확실한 경우 원검체로 RNA 추출과정부터 재검 또는 3차 재검을 실시하였다.

4. 통계

통계분석은 Excel version 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 이용하여 실시하였다. rRT-PCR 검사에서 양성결과를 보였던 환자군 중 Ct (threshold cycle)값 및 연령대별로 나눈 군 간의 신속항원검사 양성률 비교를 위해 chi-square test를 실시하였고, 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

총 1,228명(남자 601명, 여자 627명)이 이번 연구에 포함되었다. 평균연령은 20.4세(1개월~97세)였다. rRT-PCR 검사를 확진검사로 하여 신속항원검사의 검사능을 평가하였다. 신속항원검사의 민감도, 특이도, 양성검사 예측률(predictive value of a positive test), 음성검사 예측률(predictive value of a negative test) 및 검사효율성은 각각 30.5%, 99.2%, 86.4%, 90.1%, 89.9%였다. 신속항원검사 및 rRT-PCR 검사결과는 Table 1과 같다. 총 1,104명(89.9%)에서 신속항원검사와 rRT-PCR 검사결과가 일치하였고 나머지 124명(10.1%)은 두 검사결과가 불일치하였다. 신속항원검사에서만 양성반응을 보였던 환자 8명 모두 rRT-PCR 검사에서 H1/M2 음성이었다. rRT-PCR 검사의 H1 Ct값과 환자의 연령대에 따라 신속항원검사의 양성률이 통계

Table 1. Comparison of rapid antigen test and real-time RT-PCR for detection of novel swine influenza A (H1N1)

Real-time RT-PCR	Rapid antigen test*		
	Positive	Negative	Total
Positive	51 (4.2%)	116 (9.4%)	167 (13.6%)
Negative	8 (0.7%)	1,053 (85.7%)	1,061 (86.4%)
Total	59 (4.8%)	1,169 (95.2%)	1,228 (100.0%)

*No. (%) of patients.

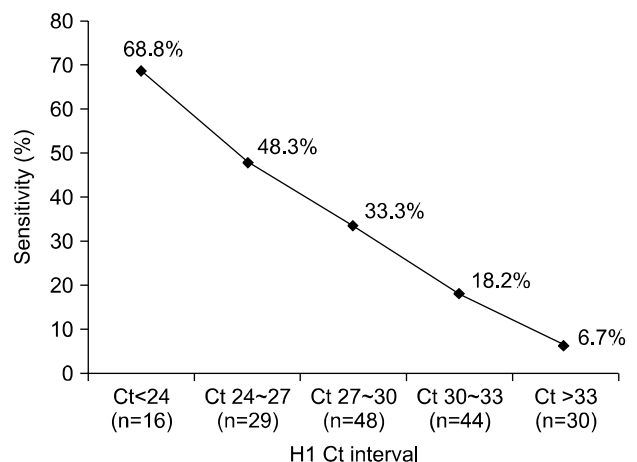


Fig. 1. Comparison of rapid antigen test sensitivity between different H1 Ct* interval groups among novel swine influenza A (H1N1) patients confirmed by real-time RT-PCR. *Ct, threshold cycle.

Table 2. Comparison of rapid antigen test results between different age groups among novel swine influenza A (H1N1) patients confirmed by real-time RT-PCR

Age (year)	Rapid antigen test*		Total
	Positive	Negative	
<13	20 (44.4%)	25 (55.6%)	45
13~29	29 (26.9%)	79 (73.1%)	108
≥30	2 (14.3%)	12 (85.7%)	14
Total	51 (30.5%)	116 (69.5%)	167

*No. (%) of patients.

적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$) (Fig. 1, Table 2).

고 찰

인플루엔자 바이러스는 흔히 겨울철에 발열, 기침, 콧물 등을 증상으로 하는 급성 호흡기 질환을 일으키며, 특히 A형의 경우 지속적인 소변이와 대변이를 통해 유전자가 변화되어 효과적인 백신개발이 어렵고 대유행이 발생하기도 한다[1,5,11]. 2009년에 전세계적으로 범유행하고 있는 신종인플루엔자에 감염된 대부분의 환자는 가벼운 감기증상만 보이지만 입원치료가 필요한 경우도 있고 일부는 중환자실치료를 받기도 한다[4]. 특히 면역력이 약한 영유아, 노인, 만성질환자, 임신부와 같은 고위험군에서 높은 사망률을 보인다[1,4,12].

인플루엔자의 신속한 진단은 조기치료를 가능케 하여 임상증상의 호전을 기대할 수 있고 바이러스의 전파, 입원치료기간, 불필요한 검사, 항바이러스제와 항생제의 남용, 합병증 및 사망률을 감소시킬 수 있다[3,8,13,14]. 인플루엔자 바이러스의 진단방법에는 신속항원검사, 바이러스 배양검사, rRT-PCR 검사, 다중 PCR 검사, 직접항원검사 등이 있다[9]. 고식적인 바이러스 배양검사는 여전히 표준법으로 여겨지고 있으나 배양기간이 2~14일로 길고 검사자의 숙련도를 요구하며 별도의 실험실이 필요하다[13,14]. 또 다른 확진검사인 rRT-PCR 검사는 민감도와 특이도가 높고 실시간으로 증폭상태를 확인 가능하며 반정량적으로 바이러스 농도를 예측할 수 있는 장점이 있다. 하지만 대부분의 1차 의료기관에서 실행하기 어렵고 검사자의 숙련도가 역시 요구되며, 결과판정이 애매한 경우가 있어 전문가의 판정이 필요하다[8,9,15]. 이에 비해 환자의 침상 또는 외래 진료실에서 간편하게 검사하여 20분 이내에 결과를 바로 알 수 있고 검사방법 및 판정이 매우 간단한 많은 종류의 인플루엔자 현장검사 키트가 개발되어 널리 사용되고 있다[16]. 그러나 신속항원검사는 특이도가 높은 반면 바이러스 배양검사와 rRT-PCR 검사에 비해 민감도가 떨어지는 단점이 있다[9,13,17].

계절인플루엔자 진단을 위한 여러 신속항원검사의 유용성을

평가한 논문들에서 신속항원검사의 민감도는 47~91%로 다양하게 보고되었다[9,11,13,14]. 이번 연구에 사용되었던 신속항원검사의 민감도 역시 55~88%로 비슷하게 보고되었다[18,19]. 신속항원검사의 민감도는 신종인플루엔자 진단을 위해 사용되었을 때 이보다 더 낮게 조사되었는데, rRT-PCR과 비교하여 Directigen EZ Flu A+B (Beckton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), QuickVue Influenza A+B (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA)와 BinaxNOW Influenza A&B (Inverness Medical, Waltham, MA, USA)의 민감도는 Vasoo 등[8]의 연구에서 각각 46.7%, 53.3%, 38.3%였고 CDC[15]의 연구에서 각각 49%, 69%, 40%였다. 이번 연구에 사용되었던 신속항원검사는 이보다 더 낮은 30.5%의 민감도를 보였다.

신속항원검사의 민감도는 사용한 키트의 종류, 인플루엔자 바이러스의 아형, 검체의 종류, 검체운송 및 보관시간, 검체채취시기, 환자의 연령, 검사자의 숙련도 등에 따라 다양하게 보고되고 있다[3,8,10,11,13-15,17,18]. 사용한 키트의 종류와 인플루엔자 바이러스의 아형을 제외한 나머지 요소는 모두 검체 내 바이러스 농도와 연관된 것들로서 바이러스 농도가 신속항원검사의 민감도에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이 연구에서도 다른 문헌에서 보고된 바와 마찬가지로[8,15] 검체의 바이러스 농도가 높을수록 신속항원검사의 양성률이 유의하게 높았다.

비인두흡인액이 비인두도말검체보다 바이러스양을 더 많이 포함하고 있어 신속항원검사에 더 좋은 검체이나[3,20] 검체채취의 용이성으로 인해 이 연구에서는 모두 비인두도말검체를 사용하였다.

바이러스의 증식 및 분비는 증상발현 48시간째 최고조에 이르고 그 이후에는 급감하기 때문에 검체를 채취하는 시점은 증상이 발현되는 시점으로부터 3일 이내가 좋다[3]. 소아는 성인보다 더 오랜 기간 바이러스를 분비하고 바이러스 농도의 감소시기가 더 길어 증상 발현 5일 이후에 검체를 채취해도 유용하다[3,15,21,22].

일반적으로 소아에서 성인보다 신속항원검사의 민감도가 더 우수한 것으로 알려져 있는데[13-15], 이번 연구에서도 13세 미만에서 신속항원검사의 민감도가 44.4%로 가장 높았다(Table 2). 소아의 경우 면역체계가 불완전하여 바이러스 증식이 활발히 일어나 분비량도 증가하고[10], 성인은 연령이 증가할수록 여러 인플루엔자 바이러스 아형에 대한 감염에 노출되기 때문에 다양한 돌연변이에 대한 면역력이 축적되어 약하지만 어느 정도 보호작용을 해서 바이러스 증식이 억제될 가능성이 있다[22].

따라서 증상 발현 2~3일 이내에 방문한 소아환자에서 숙련된 검사자에 의해 검사를 실시하면 민감도가 더 높아질 것으로 생각되나 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

신속항원검사에서만 양성반응을 보였던 환자 8명은 모두 발열, 기침, 콧물, 가래 등 급성 호흡기질환증상을 보였으나 rRT-PCR 검사에서 H1/M2 음성이었고 동일한 검체로 재검을 실시해도 결과는 같았다. 검체 내에 과다한 점액질 또는 혈액이 포함된 경우나 사용된 검체의 종류에 따라 신속항원검사에서 위양성이 나올 수 있다는 보고가 있었다[23]. 염기서열분석과 같은 다른 확진 방법을 통해 두 검사 간의 불일치 원인을 분석해야 할 것으로 생각된다.

이 연구에서 사용한 신속항원검사는 검사방법과 판정이 간단하고 빠른 시간 내에 검사결과를 알 수 있으며 특이도가 높은 장점이 있으나 민감도와 음성예측도가 낮아 신종인플루엔자의 조기진단을 위한 검사로는 한계가 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Kim SH, Huh JH, Bae SY, Kim JS, Yoon SY, Lim CS, et al. Epidemiology of respiratory viral infection in 2004-2006. *Korean J Lab Med* 2006;26:351-7.
- Lee WG, Lee HK, Kim HJ, Chung JK, Lee EH, Moon HR. Evaluation of a rapid antigen test for detection of influenza virus. *Korean J Clin Microbiol* 2004;7:119-23.
- Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis* 2006;194(Suppl 2):S98-110.
- Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* 2009;45:169-73.
- Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 2009;45:174-8.
- World Health Organization. WHO web sites on disease outbreak news. Pandemic (H1N1) 2009 - update 71. http://www.who.int/csr/don/2009_10_23/en [Online] (last visited on 17 October 2009).
- Panning M, Eickmann M, Landt O, Monazahian M, Olschlager S, Baumgarte S, et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2009;14:pii: 19329.
- Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009;49:1090-3.
- Rahman M, Vandermause MF, Kieke BA, Belongia EA. Performance of Binax NOW Flu A and B and direct fluorescent assay in comparison with a composite of viral culture or reverse transcription polymerase chain reaction for detection of influenza infection during the 2006 to 2007 season. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:162-6.
- Song SH and Kim EC. Rapid diagnosis of respiratory virus infection. *J Lab Med Qual Assur* 2007;29:207-10.
- Kim JS, Choi HJ, Ahn YM, Hwang YO. Clinical usefulness of rapid antigen test on the diagnosis of influenza. *Korean J Pediatr* 2005;48:1348-53.
- Chan KH, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origin influenza virus (H1N1). *J Clin Virol* 2009;45:205-7.
- Cheng CK, Cowling BJ, Chan KH, Fang VJ, Seto WH, Yung R, et al. Factors affecting QuickVue Influenza A+B rapid test performance in the community setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:35-41.
- Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *J Clin Microbiol* 2003;41:3487-93.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:826-9.
- Kang JO, Kim EC, Lee KM, Lee NY, Lee CK. Surveillance for respiratory virus testing situation in Korea and epidemiology for the respiratory viruses detected in 5 university hospitals: report from virus study group. *Korean J Clin Microbiol* 2007;10:102-8.
- Chan KH, Lam SY, Puthavathana P, Nguyen TD, Long HT, Pang CM, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1. *J Clin Virol* 2007;38:169-71.
- Yoo Y, Sohn JW, Park DW, Kim JY, Shin HK, Lee Y, et al. Clinical evaluation of the SD Bioline influenza virus antigen test for rapid detection of influenza viruses A and B in children and adults during the influenza season. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1050-2.
- Mai LQ, Hien PT, Hang NL, Oh JS, Ha GW, Kwon JA, et al. Evaluation of two lateral-flow chromatographic membrane immunoassays for rapid detection of influenza virus in limited respiratory specimens. *J Lab Med Qual Assur* 2005;27:243-9.
- Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup A, Ozinskas A, Gill J, et al. Evaluation of the directigen FluA+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:1675-80.
- World Health Organization. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf (last visited on July 2005).
- Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol* 2002;40:2051-6.
- Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009;45:191-5.

=국문초록=

신종인플루엔자 검사에 사용되는 신속항원검사와 실시간 역전사 중합효소연쇄반응검사의 비교

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실

권애린, 김재석, 김한성, 송원근, 박지영, 조현찬, 이규만

배경: 2009년 4월 멕시코에서 새로운 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스가 분리되어 신종인플루엔자로 명명되었다. 신종인플루엔자는 전파속도가 빠르고 감염성이 높아 빠른 진단을 위해 신속한 선별검사가 필요하다. 이 연구는 신종인플루엔자 진단을 위해 현재 사용하고 있는 신속항원검사와 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR, rRT-PCR) 검사를 비교하여 선별검사로서 신속항원검사의 유용성을 평가해보고자 하였다.

방법: 2009년 8월 14일부터 2009년 9월 30일까지 한림대학교 강동성심병원에 내원한 신종인플루엔자 의심환자 중, 선별검사인 신속항원검사와 확진검사인 rRT-PCR 검사를 모두 실시한 총 1,228명의 환자를 대상으로 하였다.

결과: 신속항원검사의 민감도, 특이도, 양성검사 예측률(predictive value of a positive test), 음성검사 예측률(predictive value of a negative test)은 각각 30.5%, 99.2%, 86.4%, 90.1%였다. 신속항원검사와 rRT-PCR 검사에 모두 양성인 환자는 51명(4.2%)이었고 모두 음성인 환자는 1,053명(85.7%)이었다. 총 124명(10.1%)이 두 검사 간의 결과 불일치를 보였다. rRT-PCR 검사에서 양성을 보였으나 신속항원검사에서 음성을 보인 환자는 116명(9.4%)이었으며, 8명(0.7%)은 신속항원검사에서만 양성반응을 보였다. 신속항원검사에서만 양성반응을 보였던 환자 8명 모두 rRT-PCR 검사에서 H1/M2 음성이었다. rRT-PCR 검사의 H1 Ct 값(threshold cycle) 및 환자의 연령대에 따라 신속항원검사의 양성률에 차이를 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다($P < 0.05$).

결론: 신속항원검사는 검사방법이 간편하고 빠른 시간 내에 검사결과를 알 수 있는 장점이 있지만 rRT-PCR 검사에 비해 민감도가 낮으므로, 신종인플루엔자의 선별검사로는 한계가 있을 것으로 생각된다. [대한임상미생물학회지 2010; 13:109-113]

교신저자 : 김재석, 134-701, 서울시 강동구 길동 445
한림대학교 의과대학 강동성심병원 진단검사의학과
Tel: 02-2224-2327, Fax: 02-2224-2214
E-mail: jaeseok@hallym.or.kr