

환자의 조기진단에 도움이 된다[7-9].

실시간-중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 유전자의 증폭산물에 결합된 형광물질로부터 방출되는 형광량을 실시간으로 측정한다. Hybridization probe는 형광이 표지된 한 쌍의 소식자(probe)를 대상유전자에 특이적으로 결합시킨 후, FRET (fluorescence resonance energy transfer) 반응에 의해 방출되는 형광을 측정하는 방식이다. 또한 hydrolysis probe는 소식자의 양 끝에 한 쌍의 형광을 표지하여 대상유전자에 특이적으로 결합시킨 후, 가수분해에 의해 방출되는 형광을 측정하는 방식이다.

본 연구에서는 장바이러스 검출을 위해 고안된 다음의 여러 방법들을 비교, 분석하였다: 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR: reverse transcription PCR), 바이러스 배양, 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응(real-time nested RT-PCR). 이를 통해 장바이러스를 검출함에 있어서 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응의 유용성을 검증하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 리보핵산 추출

무균수막염이 의심되는 50명의 환자들을 대상으로 요추를 천자하여 멸균된 용기에 뇌척수액을 채취한 후, 2-3개로 분주하여 -70°C 냉동고에 보관하였다가 리보핵산 추출에 이용하였다. 리보핵산 추출에는 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하였다. 1.5 mL 튜브에 AVL 완충액 560 μ L, 뇌척수액 140 μ L를 넣고 실온에 10분 동안 방치하였다. 100% 에탄올 560 μ L를 넣고 혼합한 후 QIA spin column에 넣고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 500 μ L의 AVW1 및 AVW2 완충액으로 세척한 후 AVE 완충액 60 μ L로 리보핵산을 추출하였다.

2. 장바이러스 검출을 위해 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 역전사중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응을 시행하기 전에 장바이러스 리보핵산으로부터 상보적인 디옥시리보핵산을 합성하는 역전사반응을 시행하였으며 그 반응액(20 μ L)은 다음과 같았다: 10 \times RT buffer 2 μ L, dNTP 8 μ L (각 1 mM), 임의의 시발체(random primer) 1 μ L (50 pmol), 10 단위의 리보핵산분해효소 억제제(ribonuclease inhibitor), 7 단위의 AMV 역전사 효소(avian myeloblastosis virus reverse transcriptase), 추출된 리보핵산 2 μ L. 25°C에서 10분, 41°C에서 60분간 역전사반응을 시행한 후에 4°C에서 10분간 디옥시리보핵산의 안정화 반응을 시행하였다. 역전사반응은 PTC-200 thermal cycler (MJ Research Inc., Waltham,

MA, USA)를 이용하였다. 매 반응마다 바이러스 배양법에서 양성반응을 나타낸 검체로부터 추출한 장바이러스 리보핵산을 양성대조로 사용하였다.

세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 사용된 시발체 및 반응조건 등은 Table 1에 정리하였다[10, 11]. 반응액(25 μ L)은 다음과 같으며, 각 반응에 사용된 시발체의 종류만 다를 뿐 나머지 구성은 모두 동일하였다: 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L (각 0.05 mM), 시발체 각 1 μ L (10 pmol), 0.625 단위의 Taq 중합효소(TaKaRa, Shiga, Japan), 역전사된 디옥시리보핵산 1.5 μ L, 증폭된 산물은 ethidium bromide (0.5 μ g/mL)가 포함된 3% 아가로오스 겔(agarose gel)에서 100 V, 20분 동안 전기영동하여 확인하였다(Fig. 1).

3. 장바이러스 검출을 위한 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응

역전사반응을 따로 시행하지 않고, 주형으로 리보핵산을 반응액에 직접 첨가하여 한 번의 과정만으로 역전사중합효소연쇄반응을 시행하였다. 매 반응마다 배양법에서 양성반응을 나타낸 검체로부터 추출한 장바이러스 리보핵산을 양성대조로 추가하였다. 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응에는 시발체 EV3-F (5'-CCC CTG AAT GCG GCT AAT CC-3'), 시발체 EV3-R (5'-CAA TTG TCA CCA TAA GCA GCC A-3') 및 소식자 EV3-P (6-FAM-5'-CAC GGA CAC CCA AAG TAG TCG GTT CC-3'-TAMRA)를 사용하였다(Bioneer, Daejeon, Korea) [11]. 반응액의 조성(20 μ L)은 다음과 같았다: 2.7 \times LightCycler

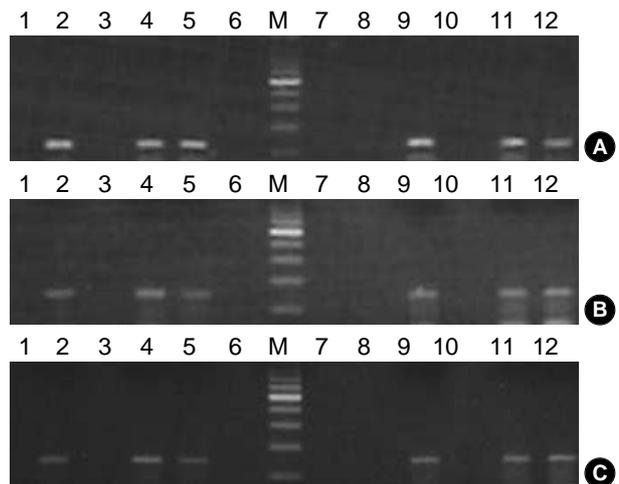


Fig. 1. Detection of enterovirus by RT-PCR methods for 3 different targets using CSF specimens. (A) The amplified products of first method using EV1-F and EV1-R primers are 114 bp. (B) The amplified products of second method using EV2-F and EV2-R primers are 154 bp. (C) The amplified products of third method using EV3-F and EV3-R primers are 149 bp. Lane 1, negative control; lane 2, positive control; lane M, 100 bp DNA size marker; lane 3-12, specimens.

RNA Master HybProbe (Roche, Penzberg, Germany) 7.5 μ L, 5.5 mM Mn²⁺, 0.4 μ M 각 시발체, 0.2 μ M 소식자, 추출된 리보핵산 4 μ L. 61°C에서 20분간의 역전사반응 후 95°C에서 2분간 초기변성을 시행하였다. 증폭반응(총 60회)을 위해 95°C에서 5초 동안 변성을 시행하였고, 70°C에서 62°C까지 한 회당 0.2°C만큼 내려가도록 설정하여(step size: 0.2°C/cycle) 10초 동안 결합반응을 시행한 다음, 72°C에서 10초 동안 연장반응을 거쳐 40°C에서 30초 동안 증폭산물을 안정화시켰다. 증폭반응은 LightCycler 2.0 (Roche, Penzberg, Germany)을 이용하여 시행하였으며, 증폭신호의 검출을 위해서 측정파장 530 nm, 분석파장 530/705 nm로 설정하여 결합반응에서의 형광신호를 단발적으로 측정하였다(single fluorescence measurement).

이차 실시간-중합효소연쇄반응에는 일차 실시간-역전사중합효소연쇄반응 증폭산물을 증류수로 50배 희석해서 주형 핵산으로 첨가하였으며 소식자는 일차 반응과 동일하게 사용하였다. 시발체로는 Cox-F (5'-GTA ACG GGC AAC TCT GCA GC-3'), Pol-F (5'-CGT AAC GCG CAA GTC TGT GG-3') 및 Ent-R (5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3')을 사용하였다(Bioneer, Daejeon, Korea)[11]. 반응액의 조성(20 μ L)은 다음과 같았다: 10×LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche, Penzberg, Germany) 2 μ L, 4 mM MgCl₂, 0.2 μ M Cox-F 시발체, 0.2 μ M Pol-F 시발체, 0.4 μ M Ent-R 시발체, 0.2 μ M 소식자, 주형 핵산 2 μ L. 95°C에서 10분 동안 초기변성을 시행하였고, 30회의 증폭반응(95°C 5초, 65°C 10초, 72°C 10초)을 시행한 후, 40°C에서 30초 동안 증폭산물을 안정화시켰다. 형광측정파장과 분석파장은 일차 반응과 동일하게 적용하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used to detect enterovirus and reaction conditions

Methods	PCR*
1 Primers	EV1-F: 5'-ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT TCC-3' EV1-R: 5'-TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C-3'
Conditions	95°C 45 sec-58°C 45 sec-72°C 45 sec (35 cycles)
Product size	114 bp
2 Primers	EV2-F: 5'-CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T-3' EV2-R: 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'
Conditions	90°C 45 sec-46°C 45 sec-72°C 45 sec (37 cycles)
Product size	154 bp
3 Primers	EV3-F: 5'-CCC CTG AAT GCG GCT AAT CC-3' EV3-R: 5'-CAA TTG TCA CCA TAA GCA GCC A-3'
Conditions	95°C 45 sec-64.5°C 45 sec-72°C 45 sec (35 cycles)
Product size	149 bp

*Reverse transcription PCR.

4. 장바이러스 배양

총 44명의 환자로부터 채취한 뇌척수액에 대해 바이러스 배양이 시행되었다. 숙주세포로는 RD 세포(human embryonal rhabdomyosarcoma cell)와 MRC-5 세포(human embryonal lung fibroblast cell)를 사용하였으며, 접종한 다음 날부터 7일 동안 세포의 변형 유무를 관찰하였다.

결 과

1. 장바이러스 검출을 위해 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 역전사중합효소연쇄반응

시발체 EV1을 이용한 역전사중합효소연쇄반응에서는 26.0% (13/50)에서 장바이러스가 검출되었다. 시발체 EV2을 이용한 반응에서는 40.0% (20/50), 시발체 EV3를 이용한 반응에서는 46.0% (23/50)에서 장바이러스가 검출되었다(Table 2).

2. 장바이러스 검출을 위한 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응

실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응을 실시한 결과 86.0% (43/50)에서 장바이러스가 검출되었다(Table 2). 실시간-중합효소연쇄반응에서 음성 소견을 보였던 7예(14%)는 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응에서도 모두 음성이었으며, 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응에서 모두 양성인 13예(26%)는 실시간-중합효소연쇄반응에서도 모두 양성 소견을 보였다.

3. 장바이러스 배양

총 44명의 환자로부터 채취한 뇌척수액을 RD 세포 및 MRC-5 세포에 배양한 결과, 3예에서 양성 소견(6.8%)을 보였다.

Table 2. Comparison between the results of real-time PCR and PCRs for 3 different targets

Real-time PCR [§]	PCR 1*		PCR 2 [†]		PCR 3 [‡]	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Negative (14.0%)	7	0	7	0	7	0
Positive (86.0%)	30	13	23	20	20	23

*First RT-PCR method using EV1-F and EV1-R primers; [†]Second RT-PCR method using EV2-F and EV2-R primers; [‡]Third RT-PCR method using EV3-F and EV3-R primers; [§]Real-time nested RT-PCR.

고 찰

최근 국내에서 장바이러스에 의한 무균수막염의 유행을 경험한 바 있다[12-16]. 1997년에 유행한 무균수막염은 그 전에 유행했던 것과는 다른 양상을 띠어, 소아 환자와 함께 많은 성인 환자가 발생하였으며 echovirus type 30, 6, 4와 coxsackievirus type B5, A24 등 한 종류가 아닌 여러 종류의 장바이러스 혈청형이 동시에 분리되었다[16]. 원인균이 밝혀지지 않은 무균수막염의 80-92%가 장바이러스에 의해 발병하며[17], 수막염 외에도 호흡기질환, 위장관질환, 심근염, 뇌염 등 다양한 임상양상이 나타날 수 있으므로 조기에 장바이러스를 검출하는 것이 중요하다.

장바이러스를 검출할 수 있는 방법 중 실시간-중합효소연쇄반응은 기존의 중합효소연쇄반응이나 바이러스 배양에 비해 빠른 시간 내에 장바이러스를 검출할 수 있다는 장점이 있다. 또한 적은 개체수의 장바이러스도 검출할 수 있는 높은 민감도를 갖는다[18, 19]. 기존의 중합효소연쇄반응은 핵산추출에서 전기영동하기까지 약 4시간이 소요되고, 바이러스 배양은 결과를 얻기까지 일주일의 시간이 소요되는 반면, 실시간-이중-중합효소연쇄반응은 검사 결과를 얻기까지 약 2시간이 소요되었다.

본 연구에서는 장바이러스 검출에 있어서 실시간-중합효소연쇄반응의 유용성을 평가하기 위하여, 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응 및 바이러스 배양의 결과와 비교하였다. 실시간-중합효소연쇄반응에서 음성인 모든 증례는 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응에서도 모두 음성이었으며, 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응에서 모두 양성 소견을 보였던 증례들은 실시간-중합효소연쇄반응에서도 양성 소견을 보였다. 배양법에서 양성 소견을 보였던 세 증례는 실시간-중합효소연쇄반응에서도 모두 양성이었다. 한편 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응의 장바이러스 검출률은 각각 26.0%, 40.0%, 46.0%로 50.0% 이하였던 반면에 실시간-중합효소연쇄반응은 86.0%의 검출률을 보여(Table 2), 실시간-중합효소연쇄반응의 높은 민감도를 확인할 수 있었다.

실시간-중합효소연쇄반응 결과의 판독에 있어서 crossing point (Cp) 값이 산출되고 동시에 완만한 증폭곡선을 보이는 경우 양성으로 하였으며, Cp 값이 산출되지 않거나 산출되더라도 완만한 증폭곡선을 형성하지 않은 경우에는 음성으로 판독하였다. 즉 결과를 판독할 때는 해당 검체의 Cp 값과 증폭곡선을 동시에 살펴봐야 하는 주의가 필요하다. 실제로 검사실에서 실시간-이중-중합효소연쇄반응을 시행할 때는, 검사 과정 중 발생할 수 있는 증폭산물의 오염을 방지하기 위하여 일차 반응 결과 Cp 값이 산출되고 완만한 증폭곡선을 형성하여 양성으로 판독이 가능한 경우에는 이차 반응을 시행하지 않는 것도 고려해 볼 수 있을 것이다.

세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응은 아가로오스 겔에 전기영동하여 결과를 판독하므로, 약양성의 경우 양성 또는 음성에 대한 객관적인 판독이 어려운 점이 있으며,

이런 문제점은 특히 증폭산물의 크기가 작은 경우에 심각하다. 반면에 실시간-중합효소연쇄반응은 증폭곡선과 Cp 값을 객관적인 지표로 삼아 판독하므로 결과 판독에 있어서 주관적인 판단을 배제할 수 있다.

최근 들어 국내에서도 실시간-중합효소연쇄반응법의 유용성이 보고되고 있다[20, 21]. 저자들은 장바이러스 검출에 실시간-중합효소연쇄반응을 이용함으로써 기존의 방법들에 비해 검출률을 높일 수 있으며 빠른 시간 내에 검출할 수 있고 객관적인 판독이 가능함을 확인하였다. 실시간-중합효소연쇄반응을 통한 장바이러스의 검출은 무균수막염과 세균성 수막염과의 신속하고 정확한 감별 진단에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 장바이러스(enterovirus)는 무균수막염, 호흡기질환, 피부병변, 심근염, 뇌염 등의 다양한 증상을 유발할 수 있다. 감염의 진단은 항체검사와 숙주세포를 이용한 배양법 및 중합효소연쇄반응에 의존해 왔으나 낮은 민감도가 문제가 되어 왔다. 이러한 단점을 보완하기 위해 저자들은 실시간-중합효소연쇄반응의 장점을 이용한 장바이러스 검출법의 유용성을 평가하였다.

방법 : 무균수막염이 의심되어 뇌척수액 검체를 채취한 50명을 대상으로 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 역전사중합효소연쇄반응과 실시간-이중-역전사중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이 중 44명의 환자에 대해 바이러스 배양검사를 시행하였다.

결과 : 세 종류의 각기 다른 표적을 대상으로 시행한 중합효소연쇄반응의 결과 각각 26.0%, 40.0%, 46.0%의 장바이러스 검출률을 보였으며 바이러스 배양법의 양성률은 6.8%였다. 실시간-중합효소연쇄반응의 장바이러스 검출률은 86.0%였다.

결론 : 장바이러스 검출에 있어서 실시간-중합효소연쇄반응법은 기존의 방법들에 비해 검출률을 높일 수 있으며 빠른 시간 내에 검출할 수 있어, 무균수막염과 세균성 수막염의 신속하고 정확한 감별 진단에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

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: 2590-92.
2. Cherry JD, ed. *Pediatric infectious disease*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992:1705-53.
3. White DO and Fenner FJ. *Picornaviridae*. In: Fenner FJ, ed. *Medical virology*. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1994:381-406.
4. Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin

- JF. Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 1993;168:888-92.
5. Modlin JF. Update on enterovirus infections in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1996;12:155-80.
 6. Hughes PJ, North C, Minor PD, Stanway G. The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J Gen Virol* 1989;70:2943-52.
 7. Hyypia T, Auvinen P, Maaronen M. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol* 1989;70:3261-8.
 8. Rothbart HA. Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr* 1990;117:85-9.
 9. Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA. Enteroviral meningitis in infancy: potential role for polymerase chain reaction in patient management. *Pediatrics* 1994;94:157-62.
 10. Lee KM, Park SY, Kang HJ, Lee EH. Relation of sampling time to the detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid from the patients with aseptic meningitis. *Korean J Pediatr Infect Dis* 1996;3:163-7. (이규만, 박순영, 강희정, 이은희. 무균성 수막염 환자의 뇌척수액 채취시기와 장바이러스 RNA 검출과의 관계. *소아감염* 1996;3:163-7.)
 11. Watkins-Riedel T, Woegerbauer M, Hollemann D, Hufnagl P. Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the Light-Cycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:99-105.
 12. Oh SH, Lee MS, Kang JH, Kim CW, Park JY, Son YM, et al. Report of nationwide epidemiology of aseptic meningitis outbreak in 1993 in Korea. *J Korean Pediatr Soc* 1996;39:42-52. (오성희, 이무송, 강진한, 김창휘, 박종영, 손영모 등. 1993년 전국적으로 유행한 무균성 뇌막염의 역학조사. *소아과* 1996;39:42-52.)
 13. Kim HK, Kang HJ, Lee KM. Echovirus type 9 infection in an epidemic of aseptic meningitis in 1993. *Korean J Clin Path* 1994;14:185-92. (김혜경, 강희정, 이규만. 1993년에 유행한 무균성 수막염 환자에서 확인된 제 9형 에코바이러스 감염. *대한임상병리학회지* 1994;14:185-92.)
 14. Cho JY, Kim HJ, Jeong GY, Bang JK, Lee DP. Epidemic aseptic meningitis in 1993. *J Korean Pediatr Soc* 1995;38:901-6. (조지연, 김향주, 정귀영, 방진건, 이두봉. 1993년에 유행한 무균성 뇌막염. *소아과* 1995;38:901-6.)
 15. Kwon OS, Park SY, Lee KL, Kim WY, Jeong WJ, Ma SH. Epidemics of aseptic meningitis in kyongsangnamdo from May to August, 1996. *Korean J Pediatr Infect Dis* 1997;4:97-105. (권오수, 박선영, 이경림, 김원엽, 정원조, 마상혁. 96년 상반기에 경상남도 중부지방에서 유행한 무균성 뇌막염의 임상적 고찰. *소아감염* 1997;4:97-105.)
 16. Park SY, Kwon OS, Kim WY, Jeong WJ, Ma SH, Lee KM. Epidemics of aseptic meningitis in kyongsangnamdo from March to October, 1997. *Korean J Pediatr Infect Dis* 1998;5:104-14. (박선영, 권오수, 김원엽, 정원조, 마상혁, 이규만. 1997년 경상남도 중부지방에서 유행한 무균성 뇌막염의 임상적 고찰. *소아감염* 1998;5:104-14.)
 17. Peigue-Lafeuille H, Croquez N, Laurichesse H, Clavelou P, Aumaitre O, Schmidt J, et al. Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol* 2002;67:47-53.
 18. 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.
 19. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-8.
 20. Lee NY, Park HY, Lee YH, Seo JS. Clinical significance of HER2/neu gene quantification and MAGE assay in primary breast cancer. *Korean J Lab Med* 2004;24:432-8. (이난영, 박호용, 이영하, 서장수. 유방암에서 HER2/neu 유전자 정량과 MAGE 검사의 임상적 의의. *대한진단검사의학회지* 2004;24:432-8.)
 21. Seong MW, Kim JY, Ko HS, Hwang JM, Park SS. Mitochondrial DNA content and the MTND4 gene expression in leber's hereditary optic neuropathy. *Korean J Lab Med* 2004;24:439-45. (성문우, 김지연, 고현수, 황정민, 박성섭. Leber씨 유전성시신경병증에서 사립체 DNA 양과 MTND4 발현양상. *대한진단검사의학회지* 2004;24:439-45.)