

역전사중합효소 연쇄반응-효소면역측정법을 활용한 장내바이러스 감염 진단

박귀성¹ · 이강범² · 백경아¹ · 정은혜¹ · 박성민^{1,3} · 조영채³ · 송재형⁴ · 안광숙⁵ · 천두성⁶

충청남도 보건환경연구원¹, 중앙대학교 생활과학대학 식품영양학과², 충남대학교 의과대학 예방의학교실³, 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과⁴, 대전대학교 생명과학과⁵, 질병관리본부 간염 폴리오바이러스과⁶

Application of a Diagnostic Method Using Reverse Transcription-PCR ELISA for the Diagnosis of Enteroviral Infections

Kwisung Park, Ph.D.¹, Kangbum Lee², Kyungah Baek, Ph.D.¹, Eunhye Jung¹, Seongmin Park^{1,3}, Youngchae Cho, Ph.D.³, Jaehyoung Song⁴, Gwangsook Ahn, Ph.D.⁵, and Doo-Sung Cheon, Ph.D.⁶

Chungcheongnam-do Health & Environment Research Institute¹, Daejeon; Department of Food and Nutrition², College of Human Ecology, Chung-Ang University, Anseong; Department of Preventive Medicine and Public Health³, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon; Department of Herbal Resources⁴, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan; Department of Life Science⁵, Daejeon University, Daejeon; Division of Enteric and Hepatitis Viruses⁶, Korea Center for Disease Control and Prevention, Seoul, Korea

Background : Enteroviruses are known as major pathogen for aseptic meningitis. Although rapid diagnosis for enteroviruses is very essential to exclude bacterial infections in patients with meningitis, classical diagnostic method based on virus isolation is not practicable for timely treatment of patients due to its laborious and time-consuming procedure. Recently molecular methodologies as alternatives are routinely used for rapid and sensitive diagnosis for enteroviruses infections.

Methods : Reverse transcription (RT)-PCR ELISA kit for targeting 5'non-coding region (NCR) with highly conserved genetic identity among all genotypes of enteroviruses was introduced in this investigation. RT-PCR ELISA was evaluated about sensitivity and specificity through virus isolation using clinical specimens from patients suspected of enteroviral infections and enteroviral isolates comparing with conventional RT-PCR identifying them.

Results : The detection limit of the RT-PCR ELISA was up to 10-100 folds higher than virus isolation using cell culture and conventional RT-PCR. On comparison between above two methods, the detection rate of RT-PCR ELISA for clinical specimens from patients with aseptic meningitis was 7% higher than that of conventional RT-PCR targeting 5'NCR ($P=0.016$).

Conclusions : Our results suggest that RT-PCR ELISA developed in this study could be an alternative diagnostic method for the detection of enteroviral genome with high sensitivity and specificity. (Korean J Lab Med 2009;29:594-600)

Key Words : Enterovirus, Aseptic meningitis, Conventional RT-PCR, RT PCR-ELISA

Received : April 16, 2009

Manuscript No : KJLM09-053

Revision received : September 9, 2009

Accepted : September 9, 2009

Corresponding author : Doo-Sung Cheon, Ph.D.

Division of Enteric and Hepatitis Viruses, Korea Center for
Disease Control and Prevention, 194 Tongil-ro, Eunpyeong-gu,
Seoul 122-701, Korea
Tel : +82-2-380-1493, Fax : +82-2-380-1495
E-mail : cheonds@korea.kr

*본 연구는 질병관리본부 건강증진사업인 "폴리오바이러스 및 장내바이러스 국제연구" 사업비로 수행된 결과입니다.

서론

장바이러스(Enterovirus)는 27-30 nm 크기의 외피를 갖지 않는 바이러스로서 정이십면체의 형태를 가지며, 현재까지 약 68여 종 이상의 혈청형이 알려져 있다. 분류학적으로 Picornaviridae과의 Enterovirus속에 속하며, 여기에는 3가지 polio-

virus (PV: 1-3)와 23가지 coxsackievirus A군(CVA: 1-22, 24), 6가지 coxsackievirus B군(CVB: 1-6), 그리고 28가지의 echovirus군(ECV: 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33) 및 기타 enterovirus (EV: 68-73) 등으로 구성되어 있다[1-3].

장바이러스는 분변-구강경로를 통하여 사람에게 전파되며, 소화기를 통해 감염된 후 인후두 부위나 소장의 림프절에서 일차적으로 증식한 후 신체의 각 장기로 이동한다[4]. 감기와 같은 가벼운 증상으로부터 심각한 마비까지 매우 다양한 임상적 질환을 유발하는데, 무균성 수막염, 결막염, 포진성 구협염, 수족 구병, 고환염, 심근염, 뇌염, Guillian-Barre syndrome, 횡단성 척수염, 당뇨병 등을 나타낸다[5, 6].

장바이러스의 검출은 세포배양을 통한 바이러스 분리 및 중화 항체시험법, 유전자 진단 및 형광 항체법 등이 있다. 특히 세포배양을 통하여 바이러스를 증식시키고 특이적인 중화항체를 이용하여 중화시험을 실시함으로써 혈청형까지 동정이 가능하며 중화시험법은 현재까지 장바이러스 진단의 표준방법으로 알려져 있다[7, 8]. 그러나 이 방법은 장바이러스를 동정할 때까지 많은 시간이 필요하고 세포배양과 중화시험에 있어 상당한 기술과 비용이 요구된다. 이러한 문제점의 해결 대안으로 개발된 것이 reverse transcription (RT)-PCR법이다[9, 10]. 국내에서도 1993년부터 장바이러스 유전자의 5' non-coding region (NCR)을 특이적으로 인식하는 시발체를 이용하여 RT-PCR을 수행함으로써, 세포배양법보다 용이하게 장바이러스를 확인할 수 있게 되었다[11]. 그러나 RT-PCR을 이용하여 장바이러스를 진단할 경우 진단법의 민감도나 특이도는 증가하지만, 실험 중 발생할 수 있는 오염, 시발체의 비특이적 결합에 의한 위양성, 이미지 장비의 해상도의 한계, 그리고 돌연변이 유발제인 ethidium bromide의 사용 등은 단점이라고 할 수 있다[12].

본 연구에서는 RT-PCR에 비해 높은 특이도와 민감도를 보이고, 위의 단점들을 보완할 수 있는 RT-PCR ELISA 키트를 제작하여 이것의 임상적 의의를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1) 표준 바이러스주와 분리된 바이러스

본 연구에서는 PV2, CVA9, CVB1, ECV9를 대상으로 하였는데, PV2, CVA9는 국내의 분리주를 이용하였고, CVB1 [13]과 ECV9 [14]은 American Type Culture Collection주를 사용하였다. Vero와 Hep2 세포를 24칸 배양판에 2×10^4 cell/well

로 단층배양 후, 밀도가 약 70% 정도 되었을 때 바이러스를 접종하였다. 5% CO₂ 배양기에서 3-5일간 배양한 후, 냉동과 해동을 2-3회 반복하였다.

2) 임상 검체

2005년 6월에서 8월 사이에 충남지역 병원에 내원 또는 입원한 생후 1개월에서 14세까지의 환자를 대상으로 입원 전 혹은 입원 기간 중 무균성 수막염 증상을 보인 경우, 즉 발열, 두통, 구토, 복통 등을 나타내며 뇌척수액 검사에서 백혈구 수가 5개 이상인 환자의 대변 검체 100건을 사용하여 검출률 비교에 사용하였다. 또한 설사 환자의 대변 검체 중 로타바이러스 양성을 보인 50건을 음성 검체로 이용하였다.

2. 방법

1) RNA 추출

RNA 추출은 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 Chomczynski 방법으로 수행하였다[15]. 바이러스 배양액 200 μ L에 TRIzol 용액 600 μ L를 더하여 상온에서 10분간 방치 후 클로로폼(chloroform, Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) 200 μ L와 혼합하여 상온에서 15분간 방치하였다. 4°C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리(Micro High Speed Centrifuge, Hanil, Incheon, Korea) 후 상층을 분리하고, 여기에 700 μ L의 이소프로판올(Isopropanol, Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)을 추가하여 -20°C에서 2시간 방치하고, 4°C에서 14,000 rpm 30분간 원심분리 후 차가운 70% 에탄올로 세척하여 상온에서 건조시켰다. RNA 침전물은 diethylpyrocarbonate (DEPC, Bioneer, Daejeon, Korea)가 포함된 증류수 10 μ L에 녹여 cDNA 합성을 위한 RNA 주형으로 사용하였다.

2) cDNA 합성

추출된 RNA를 주형으로 10 mM dNTP (Bioneer, Daejeon, Korea) 4 μ L, 5배 RTase 완충용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 4 μ L, MMLV RNA Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 200 U, oligo-dT₍₁₅₎ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 1 μ L, RNA 5 μ L에 증류수 20 μ L로 적정한 후 20°C에서 10분, 37°C에서 90분, 95°C에서 5분간 반응하였다.

3) RT-PCR

10 mM의 dNTP 4 μ L, 10× Taq DNA polymerase buffer

Table 1. Specific primer and probe sequences of the 5'NCR of enterovirus for RT-PCR and RT-PCR ELISA

Primer	Sequence	Position
Ent-F	5'-AAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	161-181
Ent-R	5'-Biotin-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	569-577
Probe	5'-Phosphate-TTTTTTTTTTCCGGCCCCCT GAATGCGGCTAATCC-3'	454-477

Abbreviations: 5'NCR, 5'non-coding region; RT-PCR, reverse transcription-PCR; F, forward; R, reverse.

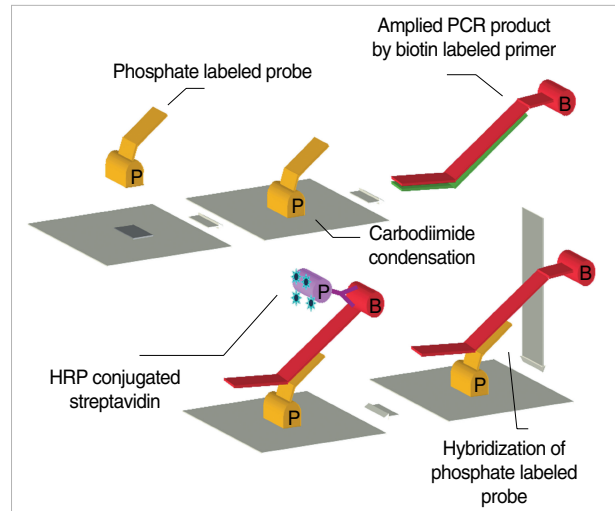
(Bioneer, Daejeon, Korea) 5 μ L, 10 pM의 시발체를 각 1 μ L씩 첨가하고(Table 1), *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea) 2 U, cDNA 10 μ L를 더하여 증류수 50 μ L로 적정한 후 94°C에서 3분 동안 먼저 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 45초의 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 7분 동안 연장하였다. PCR 산물은 PCR ELISA에 사용하였다.

4) PCR ELISA Kit의 제작 및 조건 설정

장바이러스의 특이적인 소식자를 제작하여 각 칸에 코팅하여 준비한 후, 역방향 시발체 말단에 비오틴을 결합시켰다. RT-PCR 산물을 각 칸에 넣어 변성시켜 단일가닥 DNA를 만들고, 각 칸에 부착된 소식자와 결합시켰다. 비오틴에 친화도를 갖는 아비딘에 과산화효소(peroxidase)를 부착시키고, 그 후 기질을 처리하여 발색한 후, ELISA 판독기를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Fig. 1).

NucleoLink strip (Nunc, Roskilde, Denmark)에 소식자를 부착하기 위하여 5'말단 인산기 사이에 carbodiimide 반응을 유도하여 공유결합을 시도하였다. pH 7.0의 10 mM 1-methylimidazole (Sigma-aldrich, St. Louise, MO, USA), 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC, Sigma-aldrich, St. Louise, MO, USA)에 3차 증류수로 10 mL를 맞추어 공유결합 용액을 만들고, 여기에 소식자(100 pmol/ μ L) 50 μ L를 추가한 후, NucleoLink strip의 각 칸에 50 μ L씩 분주하였다. 그 후 증발되지 않는 상태로 50°C에서 24시간 동안 반응하였다. 0.4 M의 NaOH (Sigma-aldrich, St. Louise, MO, USA) 세척액에 Tween 20 (Sigma-aldrich, St. Louise, MO, USA)을 0.25% 되도록 첨가하고, 소식자가 코팅된 NucleoLink strip을 3번 세척하였다. 0.4 M의 NaOH 용액을 다시 넣어 50°C에서 담근 후, 3회에 걸쳐 세척하였다. 마지막으로 증류수에 5분 동안 담근 후 3번 세척하였다. 코팅이 끝난 NucleoLink strip은 4°C에서 보관하였다.

PCR ELISA에 대한 조건은 5' 말단에 비오틴이 결합된 PCR

**Fig. 1.** The schematic design of PCR ELISA reaction applied in this study.

Abbreviations: HRP, horseradish peroxidase; Yellow P, phosphate; B, biotin; Purple P, horseradish peroxidase.

산물 5 μ L와 교잡완충용액(Hybridization Buffer for PCR/DIG ELISA, Roche, Indianapolis, IN, USA) 45 μ L를 각 칸에 로딩하였다. PCR 산물은 95°C에서 2분 30초 동안 변성시키고, 이어서 60°C에 90분 동안 교잡반응을 유도하였다. 그 후 1배 SSC 완충용액(Bioneer, Daejeon, Korea)에 Tween 20을 0.1% 되도록 섞고, 이것을 이용하여 각 칸을 5회 세척하였다. PCR 산물의 발색을 위하여, 아비딘이 결합된 과산화효소(Streptavidin-POD conjugate, Roche, Indianapolis, IN, USA)를 PBS에 1,000:1로 희석하고, 각 칸에 50 μ L씩 분주하였다. 상온에서 한 시간 동안 반응 후, ELISA 세척액으로 5회 세척하였다. 마지막으로 과산화효소의 기질로써 tetramethylbenzidine (TMB, Supplementary Reagents for Enzygnost/TMB, Behring, Newark, DE, USA)를 처리하여 30분간 발색시킨 후, 정지 용액으로 반응을 정지시켰다. 그 결과는 ELISA 판독기(EL808, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이들의 경계치는 기질로 사용된 TMB의 흡광도는 450 nm에서 측정되었고, 음성과 양성을 결정하기 위한 경계치는 각각의 흡광도에 의해 계산되었다. 음성의 경계치를 설정하기 위해 모든 음성시료들의 흡광도에 대한 평균값과 표준편차(SD)를 구하였다. 음성시료의 평균값에 4배의 표준편차를 더하여 진단 경계치로 사용하였다[16].

5) RT-PCR ELISA 시스템의 민감도 측정

Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀)을 이용하여 바

이러스 역가를 계산하고, 그에 따른 세포병변과 RT-PCR, 그리고 RT-PCR ELISA의 민감도를 비교하였다. 바이러스에 의한 세포병변과 10배 연속희석에 의하여 10^{-1} – 10^{-8} 까지 희석된 바이러스에 대한 RT-PCR과 RT-PCR ELISA의 결과를 비교하였다.

TCID₅₀ 측정을 위해 세포를 96 well microtiter plate (Nunc)에 각각 100 μ L (1×10^5 세포)씩 분주하여 배양하였고, 바이러스는 10배 연속희석에 의하여 10^{-1} – 10^{-8} 까지 희석한 후, 칸에 세포와 동량인 100 μ L씩 분주하였다. 이것을 37°C, 5% CO₂ 항온 배양기에서 3–5일간 배양하면서 세포병변을 관찰하여 바이러스 역가를 계산하였다.

그 후 10^{-1} – 10^{-8} 까지 희석된 각 바이러스 배양액을 150 μ L씩 취한 후, 같은 조건으로 RNA를 추출하여, 동일한 조건으로 RT-PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% 아가로오즈겔에서 확인하였다.

6) 통계처리

검출률에 대한 통계처리는 SPSS version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였고, 각 군의 비교는 crosstab (McNemar) test로 분석하였다. *P*값은 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. PCR ELISA법의 경계치 설정

음성 임상시료 50건에 대하여 흡광도를 측정하였고, 이를 이용하여 경계치로 0.4를 결정하였다. 동일한 RT-PCR 산물을 RT-PCR ELISA 시스템에 양을 다르게 적용시켰을 때, 0.987/1 μ L, 1.217/3 μ L, 1.807/5 μ L, 2.204/10 μ L의 결과를 보였다 (Fig. 2). 또한 여러 가지의 음성 시료에 적용시켰을 때, 0.163–0.223의 흡광도를 나타내었다.

2. RT-PCR ELISA의 민감도 시험

선택된 4가지 바이러스를 대상으로 제작된 RT-PCR ELISA 시스템의 민감도를 측정하였다. PV2의 경우에는 바이러스 역가가 $10^{6.75}$ /mL일 때, 세포 병변효과는 10^{-7} 까지 관찰되었고, RT-PCR과 RT-PCR ELISA에서는 10^{-8} 까지 양성을 확인할 수 있었다. CVA9의 경우에는 바이러스 역가가 $10^{5.50}$ /mL일 때, 세포 병변효과는 10^{-5} , RT-PCR은 10^{-6} 까지 양성이 확인되었다. 그러나 RT-PCR ELISA의 결과에서는 10^{-7} 까지 양성을 확인할

PCR-ELISA	Optical density	Samples
A	0.987	1 μ L of positive sample
B	1.217	3 μ L of positive sample
C	1.807	5 μ L of positive sample
D	2.204	10 μ L of positive sample
E	0.163	5 μ L of negative sample
F	0.223	10 μ L of negative sample
G	0.130	5 μ L of different virus sample
H	0.174	5 μ L of distilled water

Fig. 2. The results from PCR ELISA using amplified PCR product for enteroviruses.

수 있었다. CVB1의 경우, 바이러스의 역가가 $10^{6.25}$ /mL일 때, 세포병변효과는 10^{-5} , RT-PCR과 RT-PCR ELISA 결과에서 10^{-6} 까지 확인되었다. ECV9의 경우, 바이러스의 역가가 $10^{5.10}$ /mL일 때, 세포병변효과는 10^{-5} , RT-PCR과 RT-PCR ELISA에서 10^{-6} 까지 양성이 확인되었다(Fig. 3).

3. 임상 시료의 적용

50건의 로타바이러스 양성을 보인 설사 검체를 대상으로 장 바이러스에 특이적인 RT-PCR과 RT-PCR ELISA를 수행한 결과, 50건 모두가 이 두 방법에서 음성을 나타내었다. 그리고 무균성 수막염 환자 100명의 대변 검체를 대상으로 RT-PCR과 RT-PCR ELISA를 비교한 결과, RT-PCR에서 44건에서 양성을 보였고, RT-PCR ELISA에서 51건의 양성률을 보이며 RT-PCR에서 보다 7% 높은 검출률을 나타내었는데, 이때 *P*값은 0.016으로 통계적으로 유의하였다.

고 찰

장바이러스의 진단법은 세포배양을 통한 바이러스 분리 및 중화 항체법과 RT-PCR법이 있다. 세포배양법은 3일 이내의 배양에서 42%, 7일 이내의 배양에서 85%가 양성 결과를 보인 다[17]. 그러나 바이러스를 동정하는데, 약 2–3주의 시간이 필요하고 세포배양과 중화시험을 수행하는데 상당한 수준의 기술이 요구된다. 또한 CVA의 경우에는 몇몇 혈청형을 제외하고 감수성을 갖는 세포가 없어 바이러스 분리가 불가능하다[18]. 이러한 문제들의 대안으로 개발된 것이 RT-PCR법이다. 이 방법

Enterovirus		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	TCID ₅₀
Poliovirus 2	Cytopathic effect	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	↓	
	RT-PCR									10 ^{6.75}
	RT-PCR ELISA OD (A ₄₅₀)	0.614	0.809	0.889	0.849	0.727	0.638	1.463	1.307	
Coxsackievirus A9	Cytopathic effect	+++	+++	+++	+++	++	↓			
	RT-PCR									10 ^{5.50}
	RT-PCR ELISA OD (A ₄₅₀)	0.904	0.635	0.763	0.828	1.008	1.124	0.462	0.360	
Coxsackievirus B1	Cytopathic effect	+++	+++	+++	+++	++	↓			
	RT-PCR									10 ^{6.25}
	RT-PCR ELISA OD (A ₄₅₀)	3.205	2.009	1.261	1.916	1.007	1.022	0.297	0.382	
Echovirus 9	Cytopathic effect	+++	+++	+++	+++	+	↓			
	RT-PCR									10 ^{5.10}
	RT-PCR ELISA OD (A ₄₅₀)	0.950	1.043	1.076	1.829	1.315	1.910	0.274	0.325	

Fig. 3. The comparative results of sensitivity for various assays for the detection of enteroviruses. ↓, Detection limit; +, Relative low; ++, Moderate; +++, High.

Abbreviations: TCID₅₀, Tissue Culture Infections Dose 50; RT-PCR, reverse transcription-PCR; OD, optical density.

은 세포배양을 통해 분리하기 어려운 CVA를 검출할 수 있고, 바이러스 역가가 낮은 시료에서도 효과적으로 진단할 수 있다. 그러나 이 방법은 민감도나 특이도는 증가하지만, 실험 중 발생할 수 있는 오염과 전기영동상의 오류 등이 발생할 수 있다[12]. 본 연구에서는 RT-PCR법보다 민감도가 높고, 추가된 소식자로 인하여 특이도가 높으며[19], 위의 단점들을 보완할 수 있는 RT-PCR ELISA 진단시스템을 장바이러스 RT-PCR 산물의 검출에 적용하였다. 소식자는 장바이러스에 특이적이면서 여러 장바이러스에 공통적인 부분을 이용하여 제작하였고, 소식자 앞쪽에 티민을 10개 정도 추가하여 교잡반응을 더 용이하도록 하였다.

장바이러스 RT-PCR ELISA의 민감도 비교를 위해, PV2,

CVA9, CVB1, 그리고 ECV9을 사용하였다. PV2의 경우에는 TCID₅₀이 10^{6.75}/mL일 때, 세포병변효과는 10⁻⁷, RT-PCR과 RT-PCR ELISA의 경우 10⁻⁸까지 양성을 판단할 수 있었다. 그러나 결과판독에 있어 RT-PCR은 10⁻⁸에서 상대적으로 약한 결과를 나타냈지만, RT-PCR ELISA 결과에서는 10⁻⁸까지 강한 양성 결과를 보였다. TCID₅₀이 10^{5.50}/mL인 CVA9 경우에는 세포병변효과는 10⁻⁵까지 확인되었고, RT-PCR은 10⁻⁶ 그리고 RT-PCR ELISA의 결과에서는 10⁻⁷에서는 약한 양성결과가 확인되었다. 결과적으로 CVA9에 있어서, RT-PCR ELISA는 세포병변보다는 100배, RT-PCR보다 10배 민감도가 높았다. CVB1의 경우에는 TCID₅₀이 10^{6.25}/mL일 때, 세포병변효과는 10⁻⁵, RT-PCR과 RT-PCR ELISA은 10⁻⁶까지 양성 결과를 보였다. 그러

나 10^{-6} 에서 상대적으로 RT-PCR ELISA 결과가 더 강하게 나타났다. 마지막으로 ECV9의 경우에는 TCID₅₀이 $10^{5.10}$ /mL일 때, 세포병변효과는 10^{-5} , RT-PCR과 RT-PCR ELISA 결과는 10^{-6} 으로 동일한 민감도를 확인할 수 있었지만, 양성판단에 있어 RT-PCR ELISA 방법이 더 확실한 결과를 보였다. 전체적으로 세포병변효과에 대한 민감도 보다는 CVA9를 제외하고 RT-PCR이나 RT-PCR ELISA 방법에서 10배 정도 높았고, RT-PCR과 RT-PCR ELISA의 비교에서는 RT-PCR ELISA방법이 10배 정도 높거나 마지막 배수의 양성판단이 더 용이하였다. 그러나 바이러스 역가에 따른 흡광도의 차이는 보이지 않아, 이를 정량적으로 이용하는 것은 어려울 것이라 생각된다.

음성 대변 검체 50건을 대상으로 RT-PCR과 RT-PCR ELISA를 이용하여 검사를 수행한 결과 모든 검체에서 두 방법 모두 음성 결과를 나타내었다. 또한 장바이러스 감염이 의심되는 무균성 수막염 환자로부터 100건의 임상 시료를 대상으로 RT-PCR과 RT-PCR ELISA의 결과를 비교했을 때, RT-PCR ELISA에서 7% 정도의 상대적으로 높은 검출률을 보였고 이것은 통계적($P=0.016$)으로 유의하였다.

결과적으로 RT-PCR ELISA는 RT-PCR보다 높은 민감도와 검출률을 보였으며, 특히 RT-PCR의 주관적 판단을 배제할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 세포배양법에서 놓칠 수 있는 CVA를 검출하는 데 효과적이라 할 수 있다. 일반적으로 임상 환자에서 바로 채취된 분변 시료에서 10^5 – 10^{11} /g의 장바이러스가 배출된다[20]. 그러므로 신선한 임상 시료에 직접 적용한다면 본 실험에서 보다 더 높은 민감도를 보일 것이라 예상되고 세포배양에 필요한 경제적인 비용과 노력을 현저하게 감소될 것으로 사료된다.

요 약

배경 : 장바이러스(enterovirus)는 무균성 수막염의 주요 병원체이다. 무균성 수막염이 의심되는 경우, 장바이러스에 대한 정확한 진단이 필수적이지만 기존의 세포배양을 통한 바이러스의 분리법은 많은 시간과 노력이 필요하다. 그러므로 최근에는 장바이러스 진단을 위하여 신속하고 민감한 분자생물학적 방법이 사용되고 있다.

방법 : 장바이러스의 유전자 중 잘 보존된 부분인 5'non-coding region에 대한 소식자를 이용하여 reverse transcription (RT)-PCR ELISA 키트를 제작하였다. 제작된 RT-PCR ELISA 키트는 RT-PCR법과 비교되었는데, 바이러스 분리주와 무균성 수막염이 의심되는 환자 검체에 대하여 민감도와 특이도를 측

정하였다.

결과 : RT-PCR ELISA법의 검출한계는 세포배양을 통한 바이러스 분리법과 RT-PCR법보다 10–100배 높았으며, 또한 무균성 수막염 환자의 임상 시료를 대상으로 한 RT-PCR ELISA법의 검출률이 RT-PCR법 보다 7% 높게 나타났다($P=0.016$).

결론 : 본 연구에서 활용된 RT-PCR ELISA법은 높은 민감도와 특이도를 보여 장바이러스 진단법으로 이용할 것을 제안한다.

참고문헌

- Mayo M and Pringle CR. Virus taxonomy--1997. J Gen Virol 1998; 79:649-57.
- Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. Arch Virol 1999;144:2065-70.
- Zell R, Sidigi K, Henke A, Schmidt-Brauns J, Hoey E, Martin S, et al. Functional features of the bovine enterovirus 5'-non-translated region. J Gen Virol 1999;80:2299-309.
- Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, et al, eds. Fields virology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, 1996:655-712.
- Kocwa-Haluch R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. Polish J Environ Studies 2001;10:485-7.
- Roivainen M. Enteroviruses: new findings on the role of enteroviruses in type 1 diabetes. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:721-5.
- Yagi S, Schnurr D, Lin J. Spectrum of monoclonal antibodies to coxsackievirus B-3 includes type- and group-specific antibodies. J Clin Microbiol 1992;30:2498-501.
- De Clercq K. Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody-based competitive ELISA and isotype specific ELISA. J Virol Methods 1998;70:7-18.
- 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.
- Egger D, Pasamontes L, Ostermayer M, Bienz K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. J Clin Microbiol 1995;33:1442-7.

11. Kim MB, Kim KS, Bae YB, Song CY, Yoon JD, Lee KH, et al. General primer-mediated PCR detection of enteroviruses causing aseptic meningitis. *J Korean Soc Virol* 1996;26:215-25. (김문보, 김기순, 배유병, 송철용, 윤재득, 이광호 등. General -primer를 이용한 무균성뇌막염 원인 바이러스 분석. *대한바이러스학회지* 1996;26:215-25.)
12. Taggart EW, Byington CL, Hillyard DR, Robison JE, Carroll KC. Enhancement of the AMPLICOR enterovirus PCR test with a coprecipitant. *J Clin Microbiol* 1998;36:3408-9.
13. Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002;185:744-54.
14. Zimmermann H, Eggers HJ, Zimmermann A, Kraus W, Nelsen-Salz B. Complete nucleotide sequence and biological properties of an infectious clone of prototype echovirus 9. *Virus Res* 1995;39:311-9.
15. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15:532-7.
16. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgenstern GR, et al. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. *J Clin Pathol* 1998;51:652-6.
17. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1998;26:2576-80.
18. Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnosis routine and persistent infection. *J Clin Microbiol* 1992;30:160-5.
19. Lomakina NF, Fallacara F, Pacciarini M, Amadori M, Lomakin AI, Timina AM, et al. Application of universal primers for identification of Foot-and-mouth disease virus and Swine vesicular disease virus by PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 2004;149:1155-70.
20. Fong TT and Lipp EK. Enteric viruses humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:357-71.