

Comparison of R-mix Virus Culture and Multiplex Reverse Transcriptase-PCR for the Rapid Detection of Respiratory Viruses

Gayoung Lim, M.D., Tae Sung Park, M.D., Jin-Tae Suh, M.D., and Hee Joo Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kyung Hee University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Respiratory viral infections can become epidemic due to high contagiousity. Since there was no rapid diagnostic method for complete diagnosis in the past, diagnosis was solely made on the basis of clinical symptoms or the time of infection. With recent developments in rapid diagnostic methods like multiplex reverse transcriptase (RT)-PCR, R-mix virus culture, etc., early detection and effective treatment of respiratory viral infections is possible. Herein, we compared the efficiency of multiplex RT-PCR and the R-mix virus culture for the rapid detection of respiratory viruses.

Methods : We used 96 nasopharyngeal swab specimens for culturing respiratory viruses using R-mix (Diagnostics Hybrids Inc., USA). Afterwards, multiplex RT-PCR was performed using specimens stored at -70 °C.

Results : R-mix virus culture yielded positive results in 34 cases (35.4%) and multiplex RT-PCR in 73 cases (76.0%). Both methods yielded identical results in 51 cases (29 positive cases and 22 negative cases). Among 45 cases that showed different results, 40 showed negative results in R-mix virus culture and positive results in multiplex RT-PCR, and 1 showed positive result in R-mix virus culture and negative result in multiplex RT-PCR. Different viruses were detected in the remaining 4 cases by both the methods.

Conclusions : Multiplex RT-PCR provided faster results and had higher detection rates than R-mix virus culture. Further, unlike R-mix virus culture, multiplex RT-PCR can be used to identify new respiratory viruses. Therefore, multiplex RT-PCR is more useful than R-mix virus culture in the diagnosis of respiratory virus infection. (*Korean J Lab Med* 2010;30:289-94)

Key Words : R-mix virus culture, Respiratory virus detection, Multiplex respiratory RT-PCR

서 론

소아환자에서 급성 호흡기 감염은 내원하는 주요 원인 중의 하나이며, 개발도상국에서는 세균성 감염의 빈도가 감소하여 호흡기 바이러스가 급성 호흡기 감염의 주요 원인이 되었다[1]. 호흡기 감염의 주요 바이러스는 respiratory syncytial virus,

parainfluenza virus, influenza A virus, influenza B virus 등이 있다[2]. 이러한 호흡기 바이러스 진단방법은 신속 항원 비면역형광검사법(rapid antigen non-immunofluorescence tests), 신속 항원면역형광검사법(rapid antigen immunofluorescence based tests), 전통세포배양법(conventional culture), 신속세포배양법(rapid cell culture), 분자진단법(molecular methods) 등이 있다. 신속 항원 비면역형광검사법은 빠른 시간 내에 결과를 확인할 수 있는 장점이 있으나 민감도가 세포배양법에 비하여 낮아 위음성이 많은 단점이 있다[3, 4]. 현재 표준 검사법인 세포배양법은 검사결과를 확인하는데 5-9일 이상의 시간이 소요되어 호흡기 바이러스 감염의 조기 진단과 치료에 어려움이 있다[4-6]. 이러한 세포배양법의 단점을 보완하기 위해 24-72시간 내에 결과를 확인할 수 있고 민감도는 30-40%

Received : October 14, 2009

Manuscript No : KJLM09-119

Revision received : April 7, 2010

Accepted : May 3, 2010

Corresponding author : Hee Joo Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kyung Hee University
School of Medicine, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul
130-702, Korea
Tel : +82-2-958-8672, Fax : +82-2-958-8609
E-mail : leehejo@khmc.or.kr

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

로 전통배양법과 비슷한 R-mix 바이러스 배양법 등이 새로이 시행되고 있다[7, 8]. 또한 세포배양법뿐만 아니라 분자진단법도 개발되어 신속한 진단과 높은 민감도를 가진 multiplex reverse transcriptase (RT)-PCR, real time RT-PCR 등이 있다[9, 10]. 호흡기 바이러스 감염의 진단에서 무엇보다 시간이 중요하게 여겨지는 이유는 대부분의 호흡기 바이러스가 전염력이 강해 모든 연령에서 흔히 발생하고 있고 정확한 진단에 따른 적절한 치료와 예방을 위해서 원인 바이러스를 조기에 발견하는 것이 중요하기 때문이다[11, 12]. 이에 저자들은 바이러스성 호흡기 감염의 조기 진단을 위한 신속배양법(R-mix virus culture)과 분자진단법(multiplex RT-PCR) 두 검사의 결과를 비교해보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2008년 12월부터 2009년 2월까지 3차 의료기관에 호흡기 바이러스 배양검사가 의뢰된 96예를 대상으로 하였다. 대상 환자들의 나이, 성별, 진단명은 의무기록을 통해 후향적으로 조사하였다.

2. 검사방법

1) 검체

호흡기 바이러스 배양검사가 의뢰된 모든 검체는 코인두면봉을 하여 universal transport medium에 운반되었다. 수송된 검체는 검사할 때까지 4°C에 보관하였다. R-mix virus culture (Diagnostics Hybrids Inc., Athens, OH, USA) 후 -70°C에 보관하였던 검체로 multiplex RT-PCR (Seeplex RV detection kit, Seegene, Seoul, Korea)을 시행하였다.

2) R-mix virus culture

검사실로 수송된 검체를 잘 섞어 1 mL를 바이러스 수송시험관에 첨가한 후 유리구슬을 넣고 30초간 강하게 소용돌이혼합(vortex)하였다. 실온에서 700×g로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 꺼내어 표기된 보관용기에 넣고 선암종(A549)과 Mink Lung (Mv1Lu)으로 구성된 R-mix ready cells vials (Diagnostics Hybrids Inc)을 꺼내어 37°C heat 블록에 옮겨 4분간 해당 후 0.5 mL의 rinse buffer를 첨가하고 실온에 4분간 방치한 후 rinse buffer를 흡입하고 1.0 mL의 R-mix ready cells re-feed medium을 첨가하였다. R-mix vials 3개에 접종한 후

700×g로 한 시간 동안 원심분리한 후 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 respiratory virus DFA screening reagent (Diagnostics Hybrids Inc.)로 염색하여 형광 염색된 세포 유무를 형광현미경으로 확인하였다. 형광염색세포가 있을 경우 shell vial에 phosphate buffered saline을 첨가한 후 긁어 8 well slide에 분주하여 SpotPBS-w/Individual Monoclonal Ab (Diagnostics Hybrids Inc.)를 떨어뜨려서 관찰하였다. 형광 염색된 세포가 없을 경우에는 24시간 더 배양 후 respiratory virus DFA screening reagent로 염색 확인하였으며 형광염색된 세포가 한 개 이상이면 양성으로 보고하였다. R-mix virus culture는 influenza A와 B, parainfluenza 1, 2, 3, respiratory syncytial virus type A와 B, adenovirus 등 총 8종의 바이러스를 검사하였다.

3) Multiplex RT-PCR

바이러스 RNA는 준비된 검체 300 µL에서 Gene-spin Extraction Kit (INtRON, Seoul, Korea)를 사용하여 추출하고 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 연쇄증합반응은 Seeplex Respiratory Viruses Detection kit (Seegene)를 사용하여 반응액을 제조하였다. 연쇄증합 반응액은 3 µL의 cDNA, 4 µL의 5xRV Primer, 3 µL의 8-methoxypsoralen (8-MOP), 10 µL의 2xMultiplex Master Mix로 총 20 µL가 되도록 하였다. 연쇄증합반응은 94°C에서 15분 반응 후, 94°C 30초, 60°C 1.5분, 72°C 1.5분의 반응을 40회 반복하였고, 최종적인 연장 반응을 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 반응 산물은 ethidium bromide가 0.5 µL 포함된 2% 우무겔에서 전기영동하여 내부대조물질의 증폭 산물이 있을 때 핵산 추출과 증폭과정이 적절하였다고 판단하였고, 각 증폭산물의 밴드 크기는 키트에 포함된 표지 DNA와 비교하여 판독하였다. Multiplex RT-PCR은 influenza A와 B, parainfluenza 1, 2, 3, respiratory syncytial virus type A와 B, adenovirus, metapneumovirus, rhinovirus, corona virus 229E/NL63과 corona virus OC43 등 총 12종의 바이러스를 검사하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특성

2008년 12월부터 2009년 2월까지의 96개의 검체 중에서 다

른 종류의 바이러스가 검출되는 경우에는 각각 다른 예로 분석하였다. 대상 환자는 남녀 56:40명이었으며 1세 이하 환자가 66명 (68.8%), 2-11세 환자가 29명(30.2%)으로 대부분이 11세 이하의 소아환자였다(Table 1).

대상 환자들은 상기도감염과 하기도감염이 각각 15명(15.6%), 74명(77.1%)으로 90% 이상의 환자들이 호흡기 감염 환자였으며, 상기도감염환자들은 급성인두염, 급성편도선염, 급성중이염이 각각 8명, 3명, 1명이고 그 외 분류되지 않은 경우가 3명이었으며, 하기도감염환자들은 폐렴, 급성세기관지염, 크룹이 각각 48명, 17명, 9명이었다(Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of patients

Characteristics	N of patients (%)
Total N of patients	96
Sex (male/female)	56/40
Age (yr)	
0-1	66 (68.8)
2-5	22 (22.9)
6-11	7 (7.3)
59	1 (1.0)
Diagnosis	
Upper respiratory infection	15 (15.6)
Acute pharyngitis	8 (8.3)
Acute tonsillitis	3 (3.1)
Acute otitis media	1 (1.0)
Not available	3 (3.1)
Lower respiratory infection	74 (77.1)
Pneumonia	48 (50.0)
Acute bronchiolitis	17 (17.7)
Croup	9 (9.4)
Others*	7 (7.3)

*Acute gastric enteritis, 4; Urinary tract infection, 2; rule out sepsis, 1.

Table 2. Comparison between the results of R-mix culture and multiplex RT-PCR

Multiplex RT-PCR	R-mix culture		Total (%)
	Positive (%)	Negative (%)	
Positive*	33 [†] (34.3)	30 [‡] (31.3) 10 [§] (10.4)	73 (76.0)
Negative	1 (1.0)	22 (22.9)	23 (24.0)
Total	34 (35.4)	62 (64.6)	96 (100)

*Multiplex RT-PCR results suggested that 14 patients were co-infected. [†]4 cases showed different results with R-mix culture and multiplex RT-PCR. [‡]Multiplex RT-PCR analysis was positive for 8 respiratory viruses (influenza A/B, parainfluenza 1/2/3, respiratory syncytial virus type A/B, adenovirus) and 4 other respiratory viruses (metapneumovirus, rhinovirus, coronavirus 229E/NL63, and corona virus OC43). [§]Multiplex RT-PCR results were positive for only 4 extra respiratory viruses (metapneumovirus, rhinovirus, coronavirus 229E/NL63, and corona virus OC43).

2. R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR 결과

1) R-mix virus culture 결과

R-mix virus culture는 96개의 검체 중에서 34예(35.4%)가 양성이었다. Influenza A 15예(44.1%), respiratory syncytial virus 14예(41.2%)로 가장 많았으며 그 외에 parainfluenza 1, 2, 3은 각각 1예(2.9%), 2예(5.7%), 1예(2.9%)였으며, adenovirus와 influenza A virus가 동시에 검출된 경우가 1예(2.9%)였다(Table 2). 따라서 34예에서 총 35개의 바이러스가 검출되었다(Tables 2, 3).

2) Multiplex RT-PCR 결과

Multiplex RT-PCR은 73예(76%)의 양성을 보였고 14예에서 2가지 이상의 바이러스가 동시에 검출되었다(Tables 2, 3). 동시에 검출된 예에서 2가지 바이러스가 10예, 3가지 바이러스가 3예, 4가지 바이러스가 1예로 나타나 96예의 검체에서 총 92개의 바이러스가 검출되었다(Table 4). 검출된 바이러스에서 respiratory syncytial virus가 31예(33.7%), influenza A virus가 25예(27.2%) 순으로 가장 많았으며 coronavirus 229E/NL63, coronavirus OC43/HKU1, adenovirus, rhinovirus가 각각 13예(14.1%), 7예(7.6%), 7예(7.6%), 5예(5.4%) 순이었다.

3) R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR 비교

R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR의 결과를 비교하여 보면(Table 2) 두 검사가 일치하는 결과를 갖는 것은 총 51

Table 3. R-mix virus culture and multiplex RT-PCR results of respiratory viruses

Respiratory viruses	N of positive results (%)	
	R-mix culture	Multiplex RT-PCR
Influenza A*	16 (45.7)	25 (27.2)
Respiratory syncytial virus	14 (40.0)	31 (33.7)
Parainfluenza 1	1 (2.9)	2 (2.2)
Parainfluenza 2	2 (5.7)	0 (0.0)
Parainfluenza 3	1 (2.9)	1 (1.1)
Adenovirus	1 (2.9)	7 (7.6)
Coronavirus 229E/NL63	-	13 (14.1)
Coronavirus OC43/HKU1	-	7 (7.6)
Rhinovirus	-	5 (5.4)
Metapneumovirus	-	1 (1.1)
Total	35 [†] (100)	92 [‡] (100)

*Co-infection with adenovirus: 1 case. [†]Cases with co-infection are separately included in the total number of cases. R-mix virus culture, 1 positive case; multiplex RT-PCR, 14 positive cases.

Table 4. Co-infection with respiratory viruses detected by multiplex RT-PCR

Respiratory viruses	N of patients
Corona virus 229E/NL63+RSV A	6
Corona virus 229E/NL63+influenza A	2
Corona virus 229E/NL63+adenovirus	1
Corona virus 229E/NL63+corona virus OC43/HKU1+adenovirus	1
Corona virus 229E/NL63+adenovirus+rhinovirus	1
Corona virus OC43/HKU1+RSV A+rhinovirus	1
Corona virus OC43/HKU1+adenovirus, rhinovirus+RSV A	1
Adenovirus+influenza A	1

Abbreviation: RSV, respiratory syncytial virus.

예(53.1%)로 두 검사에서 모두 양성인 경우에는 29예, 음성인 경우는 22예였다. R-mix culture와 multiplex PCR 결과에서 모두 양성을 보인 예는 33예였는데 이 중에서 4예는 두 검사에서 다른 종류의 바이러스가 검출되었다.

R-mix virus culture에서는 음성이었던 것이 multiplex RT-PCR에서는 양성으로 나온 결과가 40예였다. 이들 중 R-mix culture에서 검출 가능한 8종의 바이러스(influenza A와 B, parainfluenza 1, 2, 3, respiratory syncytial virus type A와 B, adenovirus)에서 양성을 보인 것은 23예였으며 multiplex RT-PCR에서 추가로 검사하는 4종 바이러스(metapneumovirus, rhinovirus, coronavirus 229E/NL63과 corona virus OC43)만 검출된 예는 10예, R-mix culture에서 검출 가능한 8종의 바이러스와 함께 multiplex RT-PCR에서 추가된 4종의 바이러스가 함께 검출된 것은 7예였다.

고 찰

호흡기 바이러스 질환은 가장 호발하는 질환 중의 하나로 급성질환의 절반 정도를 차지하고 있다. 미국의 통계를 살펴보면 일 년에 한 사람당 3-5.6회 정도의 유병률을 갖는 것으로 발표되고 있으며 1세 이하에서 가장 높고 6세 이전까지의 유병률이 높았다[13]. 소아에서 호흡기 감염은 일과성으로 지나치는 경우가 대부분이지만 드물게 합병증을 낳겨 성인기까지 문제를 가지고 가기도 하고, 생명에 위협을 주기도 해서 신속한 진단과 그에 따른 적절한 치료가 필요하다[14]. 본 연구에서는 조기진단을 위한 진단법인 R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR법을 비교해보고자 하였다. 호흡기 바이러스 배양검사가 의뢰된 96개의 검체 중에서 59세 남자환자 1명을 제외하고 모두 11세 이하의 소아환자들로 소아에서 호흡기 감염의 빈도가 높는데

이는 Kim 등[2]의 연구에서 호흡기 바이러스 양성이 분리된 환자들 중에서 소아인 경우가 94.4%로 본 연구와 유사하였으며, Kim 등[15] 연구에서도 평균나이가 6.9세로 호흡기 바이러스 검사가 의뢰된 환자들의 연령이 본 연구에서와 같이 낮았다.

또한 Kim 등[2]의 연구에서 2004-2006년 호흡기 바이러스 감염의 소아환자들의 진단명 분포를 살펴보면 소아에서는 상기도 감염이 20.3%, 하기도 감염이 76.4%로 본 연구와 유사하게 하기도 감염의 비율이 높았다.

본 연구에서 R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR 결과 비교상 multiplex RT-PCR에서 양성률이 높았다. R-mix virus culture의 양성률은 34.3%로 전통배양법과 간접면역형광염색법을 사용한 Kang 등[16]의 연구에서의 바이러스의 양성률 21.6%보다는 높은 결과였으나 R-mix virus culture를 이용한 다른 연구결과의 양성률과 유사하였다[7, 8, 17]. Multiplex RT-PCR은 R-mix virus culture에서 음성이었던 검체에서도 바이러스가 검출되었는데 Roh 등[18]의 연구에서도 R-mix virus culture에서 음성인 25개의 검체 중 9개의 검체에서 multiplex RT-PCR이 양성인 나왔다. Multiplex RT-PCR이 양성률이 높은 이유는 바이러스의 생존과 검체 보존 등에 제약을 적게 받기 때문이라 생각되었다[17]. 또한 multiplex RT-PCR이 R-mix virus culture에서보다 4종의 바이러스가 추가되어 있어 multiplex RT-PCR의 양성률을 증가시켰을 것이라 생각되었다.

본 연구에서는 metapneumovirus는 검출되지 않았는데 이는 검체를 모은 시기가 12월부터 2월로 metapneumovirus가 유행하는 3월부터 5월까지의 시기와 달라 검출되지 않은 것으로 생각되었다[19].

2가지 이상의 바이러스가 검출된 것이 R-mix virus culture에서는 1예, multiplex RT-PCR에서는 14예였다. Multiplex RT-PCR은 2가지 이상의 바이러스가 검출된 비율이 22.5%로 Kim 등[19]의 혼합감염결과와 유사하였다. 또한 multiplex RT-PCR에서 2가지 이상의 바이러스가 검출된 결과를 살펴보면 14예 중에서 corona virus가 13예에서 모두 검출되었다. Canducci 등[20]의 결과에서도 corona virus가 검출되었을 때 혼합감염으로 다른 바이러스가 동시에 검출되는 것이 46.4%로 높은 비율을 차지하고 있었다. Corona virus가 이전 발표들보다 많이 검출된 것은 단독감염의 예보다 혼합감염으로 검출된 예가 많아서라고 생각되었다[19, 21].

결론적으로 multiplex RT-PCR이 R-mix virus culture보다 양성률이 높고 조기에 검사결과를 확인할 수 있었지만 혼합감염의 비율도 높아서 검출된 모든 바이러스가 호흡기 감염을

일으켰는지는 임상적으로 확인이 어려웠다. 하지만 R-mix virus culture에서 검출 가능한 8종의 바이러스 외에 4종(metapneumovirus, rhinovirus, corona virus 229E/NL63과 corona virus OC43)의 바이러스도 호흡기 감염질환을 일으킬 수 있으므로 이들의 결과도 확인을 하는 것이 임상적 진단과 치료계획에 도움을 줄 수 있을 것이다[22].

요 약

배경 : 바이러스에 의한 호흡기 감염일 경우 강한 전염력으로 인해 유행하는 경향이 많지만 예전에는 확진을 위한 조기 진단법이 없어 임상적 증상과 감염의 발생시기 등에만 의존하여 진단을 했다. 그러나 최근에는 multiplex reverse transcriptase (RT)-PCR, R-mix virus culture 등 신속 진단법이 개발됨에 따라 조기에 적절한 치료가 가능해졌다. 이에 조기 진단 방법인 multiplex RT-PCR과 R-mix virus culture를 비교해보고자 하였다.

방법 : 호흡기 바이러스 배양이 의뢰된 96개의 검체를 대상으로 하였다. 검체는 코인두면봉이었으며 R-mix virus culture (Diagnostic Hybrids Inc., USA) 후 -70°C 에서 보관한 검체로 multiplex RT-PCR (Seegene, Korea) 검사를 시행하였다.

결과 : R-mix virus culture에서는 34예(35.4%), multiplex RT-PCR에서는 73예(76.0%)가 양성이었다. R-mix virus culture와 multiplex RT-PCR의 결과에서 51예(양성 29예, 음성 22예)가 일치하였다. 45예의 불일치 결과를 살펴보면 R-mix virus culture 음성, multiplex RT-PCR 양성인 것이 40예, R-mix virus culture 양성, multiplex RT-PCR 음성인 것이 1예, R-mix virus culture, multiplex RT-PCR 이 모두 양성이지만 검출된 바이러스가 다른 것이 4예였다.

결론 : R-mix virus culture보다 multiplex RT-PCR은 빠른 시간 내에 결과를 도출할 수 있었고 양성률이 높았다. R-mix virus culture에서 검출하지 못하는 새로운 호흡기 바이러스도 multiplex RT-PCR에서는 확인할 수 있어 호흡기 바이러스 감염 진단에 유용할 것으로 생각되었다.

참고문헌

- Kim MR, Lee HR, Lee GM. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. *J Infect* 2000;41:152-8.
- 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. (김선형, 허지훈, 배숙영, 김장수, 윤수영, 임채승 등. 2004-2006년의 호흡기 바이러스 감염의 역학. *대한진단검사의학회지* 2006; 26:351-7.)
- Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol* 2007;40(S1):S11-4.
- Leland DS and Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:49-78.
- McPherson RA and Pincus MR, eds. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21st ed. Philadelphia: Saunders, 2007:975-84.
- Barenfanger J, Drake C, Mueller T, Troutt T, O'Brien J, Guttman K. R-Mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2001;22:101-10.
- LaSala PR, Bufton KK, Ismail N, Smith MB. Prospective comparison of R-mix shell vial system with direct antigen tests and conventional cell culture for respiratory virus detection. *J Clin Virol* 2007;38:210-6.
- St George K, Patel NM, Hartwig RA, Scholl DR, Jollick JA Jr, Kauffmann LM, et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol* 2002;24:107-15.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:716-47.
- Yoo SJ, Kuak EY, Shin BM. Detection of 12 respiratory viruses with two-set multiplex reverse transcriptase-PCR assay using a dual priming oligonucleotide system. *Korean J Lab Med* 2007;27:420-7. (유수진, 박은영, 신보문. Dual priming oligonucleotide system을 이용한 다중 역전사 PCR 키트를 통한 12가지 호흡기 바이러스의 검출. *대한진단검사의학회지* 2007;27:420-7.)
- Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. *J Clin Virol* 2004;30:81-5.
- Maitreyi RS, Broor S, Kabra SK, Ghosh M, Seth P, Dar L, et al. Rapid detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2000;16:41-7.
- Fauci AS and Kasper DL, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. Boston: McGraw-Hill, 2008: 1120-32.
- Ahn HS, ed. *Pediatrics*. 9th ed. Seoul: Daehan, 2008:629-53. (안효섭 편. 소아과학. 9판. 서울: 대한교과서, 2008: 629-53.)
- Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 res-

- piratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2009;156:111-6.
16. Kang JO, Kim EC, Lee KM, Lee NY, Lee CG. Surveillance for respiratory virus testing situation in Korea and epidemiology for the respiratory viruses detected in 5 university hospitals. *Korean J Clin Microbiol* 2007;10:102-8. (강정옥, 김의종, 이규만, 이남용, 이창규. 국내 의료기관의 호흡기 바이러스 검사현황 및 5개 대학병원에서 검출된 호흡기바이러스 역학. *대한임상미생물학회지* 2007;10:102-8.)
 17. Yoon KH and Cho JH. Detection of respiratory viruses in children by multiplex reverse transcriptase PCR, direct immunofluorescence assay, and shell vial culture. *Korean J Clin Microbiol* 2009;12:110-5. (윤귀현 및 조지현. 소아에서 다중 역전사효소 PCR법, 직접면역형광법, 셸바이알배양법을 이용한 호흡기 바이러스의 검출. *대한임상미생물학회지* 2009;12:110-5.)
 18. Roh KH, Kim J, Nam MH, Yoon S, Lee CK, Lee K, et al. Comparison of the Seeplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses. *Ann Clin Lab Sci* 2008;38:41-6.
 19. Kim KH, Lee JH, Sun DS, Kim YB, Choi YJ, Park JS, et al. Detection and clinical manifestations of twelve respiratory viruses in hospitalized children with acute lower respiratory tract infections: focus on human metapneumovirus, human rhinovirus and human coronavirus. *Korean J Pediatr* 2008;51:834-41. (김금향, 이정호, 선동신, 김용배, 최영진, 박준수 등. 하기도 감염으로 입원한 소아에서 12종 바이러스의 검출 및 임상 양상. *Korean J Pediatr* 2008;51:834-41.)
 20. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berre S, Terulla C, et al. Two-year prospective study of single infections and coinfections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol* 2008;80:716-23.
 21. Sung H, Park SJ, Woo YD, Choi BH, Kim MN. Evaluation of Seeplex RV detection kit for detecting rhinovirus, human metapneumovirus, and coronavirus. *Korean J Lab Med* 2008;28:109-17. (성홍섭, 박숙자, 우영대, 최병후, 김미나. Rhinovirus, Human Metapneumovirus, Coronavirus 검출을 위한 Seeplex™ RV Detection 키트의 평가. *대한진단검사의학회지* 2008;28:109-17.)
 22. Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:141-6.