

무균성 수막염 환자의 뇌척수액 채취 시기와 장바이러스 RNA 검출과의 관계

이규만 · 박순영 · 강희정 · 이은희*

한림대학교 의과대학 임상병리학교실, 녹십자 임상검사센터*

서 론

무균성 수막염은 중추신경계 감염 중 가장 발생 빈도가 높은 질환으로서 대부분의 경우 폴리오바이러스를 제외한, 에코바이러스, 콕삭키바이러스를 포함하는 장바이러스(enterovirus)에 의해 발생된다¹⁾. 장바이러스에 의한 감염의 진단은 주로 세포배양을 통한 바이러스의 검출에 의존하여 왔으나 결과를 얻기까지에는 수일 내지 수주일이 걸리고 또한 일부의 장바이러스에 대해서는 세포가 감수성을 나타내지 않는²⁾ 단점이 있겠다. 이에 반하여 근래에 이용되기 시작한 장바이러스 지놈의 배열 중 보존(conserved) 부위를 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 인체감염 장바이러스의 대부분을 검출할 수 있을 뿐 아니라³⁻⁵⁾ 빠른 시간내에 결과를 얻을 수가 있어 환자의 조기 진료에 도움이 된다^{6, 7)}. 장바이러스의 분리를 위해서는 가능한 한 증상이 발현된 직후 채취된 검체를 이용하는 것이 좋으며⁸⁾, 대변검체를 이용할 경우 장바이러스는 간헐적으로 배설되기 때문에 24~48 시간 간격으로 검체를 채취하여야 한다⁹⁾. 검체 채취시기에 따라 채취된 검체내의 장바이러스 농도가 차이가 난다는 이와 같은 관찰로 미루어 검체 채취시기에 따라 장바이러스 PCR 결과가 다를 수 있으리라는 것은 충분히 예견이 된다. 무균성 수막염시 장바이러스 PCR을 위한 검체로서는 뇌척수액, 대변, 혈액, 객담 검체가 이용될 수 있으나 우리나라에서는 대부분의 경우 감염병소에서 채취된 뇌척수액 검체가, 더우기 1회에 한하여 채취되어 의뢰된다. 이러한 이유는 아마도 무균성 수막염이 합병증

이 별로 없이 단기간내에 증상이 호전되는 임상 경과를 보이고, 핵산이 수시간 내에 10^6 배로 증폭되는 PCR¹⁰⁾ 검사 결과에 대한 의사의 신뢰때문이라 생각된다. 따라서 본연구의 목적은 무균성 수막염의 원인적 진단을 위해 의뢰되는 뇌척수액 검체에서 검체채취 시기와 장바이러스 RNA 검출 관계를 알아보고자 하는데에 있다.

대상 및 방법

1. 검 체

에코바이러스 제 9형에 의한 수막염이 유행하였던 시기인 1993년 5월부터 8월까지 한림대학부속 한강성심병원에 입원하였던 환자 중 발병일의 추정 가능성이었던 환자 24 명으로부터 의뢰된 뇌척수액 37 검체를 대상으로 PCR을 시행한 후 Southern blot로 장바이러스 RNA의 존재 유무를 확인하였다.

2. PCR

뇌척수액 100 μ l에 RNasin 40U를 가한 후 TRI REAGENT[®]BD(Molecular Research Center, INC, Cincinnati, OH)를 가하여 RNA를 추출하고 이소프로판올로 침전한 후 에탄올로 세척하였다. Primer와 probe는 5' noncoding region에서 유래된, 염기서열이 밝혀진 9종의 장바이러스에 대해 100% 동질성을 나타낸 것으로서^{11, 12)}(Table 1) 상품화 된 것(Genemed Biotechnologies, Inc., San Francisco, CA)을 구입하여 제조회사가 권하는 방법에 준하여 시행하였다. 즉 역전사반응을 위하여 침전된 RNA 4 μ l에 2 μ l의 antisense primer(10pmol/ μ l), 8 μ l의

Table 1. Oligonucleotides for PCR Detection of Enteroviruses

| Function | Nucleotide sequence, 5' to 3' |
|------------------|-----------------------------------|
| Antisense primer | ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA |
| Sense primer | CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T |
| Probe | GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA |

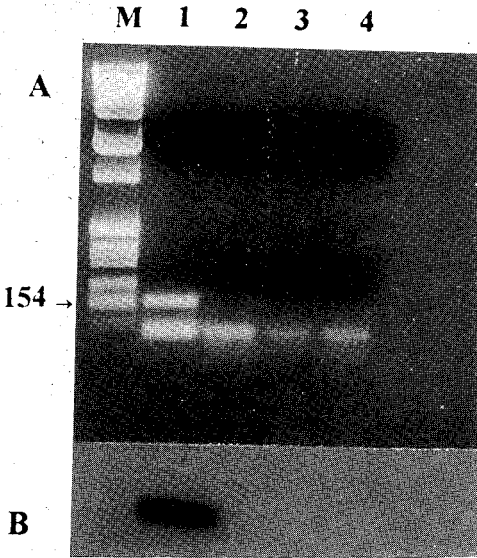


Fig. 1. Enzymatic amplification of enteroviral RNA in CSF. By minigel electrophoresis (upper), a band of 154 bases in length is seen in lane 1. Hybridization with the oligomeric probe (bottom) confirms the presence of amplified product from enteroviral RNA. The lane on the far left is a sizing ladder.

dNTP(10mM/μl), 마지막으로 avian reverse transcriptase를 가한 후 42℃에서 90 분간 가온하였다. 여기에 sense primer(10pmol/μl), antisense primer (10pmol/μl) 각각 8μl, 10U Taq polymerase를 포함하는 PCR 시약을 가하여 denaturation(90℃) 1분, annealing(50℃) 1분, extension(72℃) 1분을 1회로 하여 총 37회에 걸쳐 PCR을 시행한 후 증폭된 산물은 RPN 1590 5'-end labelling kit(Amersham International plc, England)를 사용하여 ³²P로 end-label한 probe를 이용하여 slot blot hybridization으로 분석하였고¹³⁾ 양성 대조바이러스로는 콕사키 바이러스 B3(10³ TCID₅₀)를, 음성대조로서는 인산

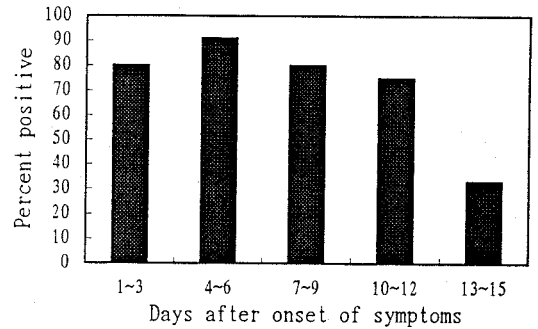


Fig. 2. Percentage of PCR-positive CSF specimens according to the time between the onset of symptoms and CSF collection.

완충생리식염수를 사용하였다. 결과의 판정은 전기영동상 154 bp의 band가 보이지 않으면서 hybridization에서 관찰이 안될 경우 음성으로, 그외의 경우는 양성으로 판정하였다.

결 과

뇌척수액 37 검체 중 29(78%) 검체에서 PCR 양성을 나타내었으며 증상이 발현된 시기를 기준으로 하였을 경우 증상발현 1~3 일 후에 의뢰된 5검체 중 4 검체에서 PCR 양성을 나타내었으며, 4-6 일 후에는 11 검체중 10, 7~9일 후에는 10 검체중 8, 10~12일 후에는 8검체중 6, 12~15일 후에는 3 검체중 1 검체에서 양성결과를 나타내었다 (Fig. 1, 2). 2회 이상에 걸쳐 시기를 달리하여 채취된 검체가 의뢰되었던 11명의 환자 중 10명의 환자에서 PCR 양성 결과를 나타내었고 이 중 2명의 환자에서는 처음에 의뢰된 뇌척수액 검체에서는 모두 PCR 음성 결과를 나타내었으나 2일, 5일 후에 재채취된 뇌척수액에서는 모두 양성 결과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. PCR Results in CSF Samples According to the Time between the Onset of Symptoms and CSF Collection

| Patient's Age/Sex | Days after onset of symptoms (Results of PCR) | | |
|-------------------|---|-------|-------|
| 31/F | 5(+) | 15(+) | |
| 6/M | 3(+) | 7(+) | 9(+) |
| 7/M | 4(+) | 5(+) | 15(-) |
| 7/M | 5(+) | 12(-) | |
| 29/F | 4(+) | 9(+) | |
| 15/F | 8(+) | 12(+) | |
| 2/M | 1(+) | 9(+) | |
| 41/M | 2(+) | 7(+) | |
| 6/M | 4(-) | 6(+) | |
| 26/M | 7(-) | 12(+) | |
| 7/M | 7(-) | 11(-) | |

고 찰

원인균이 밝혀진 무균성 수막염의 80~92%는 폴리오바이러스 이외의 장바이러스에 의해^{14, 15)} 발병하므로 무균성 수막염의 진단에 있어서는 장바이러스에 검사에 우선권을 두어야 한다. 장바이러스에 대한 검체로는 뇌척수액, 대변, 객담, 혈액 등이 이용되고 있으며 무균성 수막염의 경우 감염병소에서 채취된 뇌척수액이 가장 흔히 이용된다. 장바이러스 검사는 세포배양을 이용하여 검체에서 장바이러스를 분리하거나 장바이러스의 RNA를 검출하는 방법이 주로 사용되고 있다. 세포병변효과는 보통 4~7일 후에야 나타나므로¹⁶⁾ 최근에는 무균성 수막염의 조기진단에 PCR을 이용한 노력이 시도되어 왔다^{6, 7)}. Severini 등¹⁷⁾은 nested PCR을 이용할 경우 1/100 PFU(plaque forming unit)의 농도에서도 콕삭키 B1 바이러스의 RNA를 검출할 수 있음을 보고하였다. 장바이러스의 RNA 검출에 있어서 PCR의 높은 예민도는 다른 사람들에 의해서도 관찰되었다^{4, 18)}. 장바이러스 감염시 장바이러스는 간혈적으로 대변내로 배설된다⁹⁾. 뇌척수액에서 장바이러스 농도가 어떠한 변화를 보이는지에 대한 연구는 보고된 바 없지만 장바이러스의 농도가 수막

염의 경과 중 변화를 보이리라는 것은 충분히 예측할 수가 있겠으며 뇌척수액 검사상 정상 소견을 보인 환자의 뇌척수액 검체에서 장바이러스가 분리될 수 있음^{6, 8)}은 이러한 예측을 뒷받침한다고 하겠다.

본 연구에서 발병 후 12일을 기점으로 하여 뇌척수액의 PCR 양성율에 변화가 있음을 보여주고 있고 이 기간내에서는 뇌척수액 검체의 채취시기가 장바이러스 RNA 검출에 영향을 거의 미치지 않음을 나타내고 있다. 처음에 의뢰된 뇌척수액에서는 PCR 음성 결과를, 나중에 의뢰된 뇌척수액에서는 PCR 양성 결과를 나타내어 장바이러스에 의한 수막염을 입증 할 수 있었던 2 예는 정확한 원인적 진단을 위해서는 시간을 달리하여 채취된 검체에서 장바이러스 RNA를 검출하는 것이 필요함을 시사한다고 하겠다.

경험적으로 미루어 볼때 PCR을 이용한 검사에 대한 신뢰도는 매우 높은 것 같다. PCR을 이용하여 장바이러스의 RNA를 검출할 경우 예민도는 PCR 운용방법에 따라 다르기때문에^{11, 17, 19)} 뇌척수액에서의 장바이러스 PCR 결과 해석시 이 점을 고려하여야 할 것으로 생각된다.

결 론

뇌척수액은 무균성 수막염의 진단에 주로 이용되는 검체이다. PCR을 이용하여 뇌척수액에서 장바이러스 RNA를 검출할 경우 검출율은 뇌척수액 채취 시기에 의해서 영향을 받으며 발병 후 12일 이내에, 시기를 달리하여 2회 이상 채취된 뇌척수액을 이용하면 PCR 양성율을 높일 수 있고 나아가서 장바이러스성 수막염의 진단에 정확성을 기할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) White DO, Fenner FJ: *Picornaviridae; In White DO, Fenner FJ(Eds): Medical virology. 4th ed. San Diego, Academic Press, Inc, 1994, p.381-406*
- 2) Hughes PJ, North C, Minor PD, Stanway G:

- The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. J Gen Virol* 70:2943-2952, 1989
- 3) Hypiä T, Auvinen P, Maaronen M: *Polymerase chain reaction for human picornaviruses. J Gen Virol* 70:3261-3268, 1989
- 4) Rotbart HA: *Diagnosis of enteroviral meningitis with polymerase chain reaction. J Pediatr* 117:85-89, 1990
- 5) Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, Spadaro J, Kao SY, Loeffelholz M: *Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. J Clin Microbiol* 32:2590-2592, 1994
- 6) Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA: *Enteroviral meningitis in infancy: Potential role for polymerase chain reaction in patient management. Pediatrics* 94:157-162, 1994
- 7) Yerly S, Gervais A, Simonet V, Caffish M, Perrin L, Wunderli W: *Rapid and sensitive detection of enteroviruses in specimens from patients with aseptic meningitis. J Clin Microbiol* 34:199-201, 1996
- 8) Chonmaitree T, Baldwin C, Lucia H: *Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. Clin Microbiol Rev* 2:1-14, 1989
- 9) Minor PD, Morgan-Capner P, Schild GC: *Enteroviruses; In Zuckerman AJ, Banatvala JE, Patisson JR(Eds): Principles and practice of clinical virology, John Wiley & Sons Ltd, 1994, p.417-439*
- 10) Mullis KB, Faloona FA: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymology* 155:335-350, 1987
- 11) Rotbart HA: *Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol* 28:438-442, 1990
- 12) Rotbart HA: *Nucleic acid detection system for enteroviruses. Clin Microbiol Rev* 4:156-168, 1991
- 13) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. 7th ed. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.9.31-9.57*
- 14) Mclean DM, Coleman MA, Larke RPB, McNaughton GA: *Viral infections of Toronto children during 1965. Can Med Associ J* 94:839-844, 1966
- 15) Moore M: *Enteroviral disease in the United States, 1970-79. J Infect Dis* 146:103-108, 1982
- 16) Overall JC Jr: *Diagnostic virology; In McClatchey KD(Eds): Clinical laboratory medicine, Williams & Wilkins, 1994, p.1359-1385*
- 17) Severini GM, Mestroni L, Ffalschi A, Camerini F, Giacca M: *Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. J Clin Microbiol* 31:1345-1349, 1993
- 18) Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ Jr: *Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. Pediatr Infect Dis J* 13:177-182, 1994
- 19) Glimåker M, Abebe A, Johansson B, Ehrnst A, Olcén P, Strannegård Ö: *Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in faecal samples from patients with aseptic meningitis. J Med Virol* 38:54-61, 1992

= Abstract =

Relation of Sampling Time to the Detection of Enteroviral RNA in Cerebrospinal Fluid from the Patients with Aseptic Meningitis

Kyu Man Lee, M.D., Soon Young Park, M.D., Hee Jung Kang, M.D.
and Eun Hee Lee, M.D.*

*Department of Clinical Pathology, Hallym University College of Medicine
and Green Cross Reference Lab**

Aseptic meningitis, the most common infection of the central nervous system, is an acute illness mostly caused by enteroviruses. Cerebrospinal fluid(CSF) has been used for the detection of enteroviral RNA but the detection has been mostly performed in a single CSF specimen obtained during the illness. A major objective was to evaluate the relation of sampling time to the recovery of enteroviral RNA in CSF. Thirty seven CSF specimens were obtained from 24 patients between May and August 1993, when an outbreak of aseptic meningitis by echovirus type 9 occurred. Enteroviral RNA in CSF was detected by polymerase chain reaction(PCR). Data about onset of symptom development were obtained by review of medical records. Enteroviral RNA was detected by PCR in 29 of 37 CSF specimens. PCR yielded positive results in 4 of 5 CSF specimens obtained on day 1 to 3, 10 of 11 on day 4 to 6, 8 of 10 on day 7 to 9, 6 of 8 on day 10 to 12, 1 of 3 on day 13 to 15 postonset. Of 11 patients from each of whom more than one CSF were obtained on different day postonset, PCR yielded positive results in 2 of 3 cases in whom enteroviral RNA detection was negative in the first CSF. These results indicate that two or more CSF specimens obtained within 12 days postonset are required for improving the accuracy of the diagnosis of enteroviral meningitis.

Key Words : Aseptic meningitis, Enterovirus, Enteroviral RNA, CSF, PCR