

호흡기바이러스 검출을 위한 배양법, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법의 비교

Comparison of Culture, Direct Immunofluorescence Assay, and Multiplex Reverse Transcriptase PCR for Detection of Respiratory Viruses

윤귀현¹ · 조지현²

Kui Hyun Yoon, M.D.¹, Ji Hyun Cho, M.D.²

원광대학교 산본병원 진단검사의학과¹, 원광대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Department of Laboratory Medicine¹, Wonkwang University Sanbon Hospital, Gunpo; Department of Laboratory Medicine², College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

Background: Rapid detection of causative viruses is important for the management of acute respiratory illnesses. To increase the detection rate and decrease the turnaround time (TAT) and cost, we used 24-well plates instead of R-mix shell vials and changes the report time from once on day 3 to twice on days 1 and 5 of culture. The detection rate and TATs of each culture method, direct immunofluorescence assay (DFA), and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (mPCR) were compared.

Methods: Among 2,062 nasopharyngeal swabs (NPSs) received from January 2009 to January 2011, 707 NPSs were cultured in R-mix shell vials and 1,355 NPSs were cultured in 24-well plates. We analyzed 538 NPSs simultaneously using DFA, mPCR, and culture and compared the detection rate for 7 viruses (adenovirus, influenza A and B virus; parainfluenza virus 1, 2, and 3; and respiratory syncytial virus [RSV]).

Results: The detection rate when using shell vials was 28.4% (201/707) and was 29.4% (399/1,355) on day 1 and 33.3% (452/1,355) on day 5 when using 24-well plates. In addition, of the 53 viruses that were detected on day 5, 34 were adenovirus, 7 were parainfluenza virus, 4 were influenza A virus, 3 were influenza B virus, 4 were RSV, and 1 was a mix of influenza B and parainfluenza virus. The TAT when using shell vials and 24-well plates was 4.8 days and 2.5 days, respectively. The detection rate for the 7 respiratory viruses using culture, DFA, and mPCR was 24.3%, 20.8%, and 38.5%, and the TAT was 3.7 days, 1.0 day, and 1.4 days, respectively.

Conclusions: Using 24-well plates for virus culture is an efficient method for the detection of respiratory viruses.

Key Words: respiratory viruses, virus culture, immunofluorescence assay, multiplex PCR

서 론

호흡기바이러스는 주로 소아와 노인, 면역저하 환자뿐 아니라

건강한 성인에서도 급성호흡기감염의 주요 원인이 된다. 주요 7종 호흡기바이러스에는 respiratory syncytial virus (RSV), influenza A 와 B virus (Flu-A, Flu-B), parainfluenza virus 1, 2, 3 (PIV1/2/3), adenovirus (ADV)가 있고[1, 2], 그 외 rhinovirus, enterovirus, human metapneumovirus (hMPV), coronavirus 등이 호흡기감염의 원인으로 밝혀지고 있다[3-5]. 2009년 4월 멕시코에서 시작된 신종 인플루엔자가 우리나라에는 5월에 첫 환자를 시작으로 전세계적으로 전파되어 대유행이 된 것처럼 호흡기바이러스들은 매우 전염성이 높아 짧은 시간에 많은 사람들을 이환시킬 수 있기 때문에 그 유행양상의 파악 및 감시가 매우 중요하고, 호흡기바이러스에 대한 신속한 검사와 치료가 더욱 관심을 끌게 되었다[6-8].

호흡기바이러스 검사에는 크게 배양법, 신속항원검사법, 면역형광법, 효소면역법, 핵산증폭법 등이 있으나, 국내에서는 2007년 Kang 등[9]의 보고에 따르면 조사기관의 49.2%에서 바이러스 검사를 하고 있으며, 주로 500병상 이상의 대학병원이었으며, 41.9%에서

Corresponding author: Kui Hyun Yoon

Department of Laboratory Medicine, Wonkwang University Sanbon Hospital, 1142 Sanbon-dong, Gunpo 435-040, Korea

Tel: +82-31-390-1861, Fax: +82-31-391-2085, E-mail: wooju67@paran.com

*This paper was supported by Wonkwang University in 2010.

Received: July 27, 2011

Revision received: September 2, 2011

Accepted: September 19, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2011, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

핵산증폭법과 배양법을, 22.6%에서 면역형광법을 사용하고 있다. 면역형광법은 검체의 질과 검사자의 숙련도가 요구되나 당일검사가 가능하다. 핵산증폭법은 민감도가 높아, 배양이 불가능하거나 바이러스가 낮은 농도로 존재하는 경우 유용하고, 최근에는 여러 가지 바이러스를 동시에 검사할 수 있고 실시간 핵산증폭법을 이용하여 검사시간의 단축뿐 아니라 정량보고도 가능하게 되었다[3, 10, 11]. 병원 검사실에서 사용하는 R-Mix shell vial (SVC) 배양법은 미리 냉동 보관된 세포층을 사용함으로써 바이러스 배양 과정을 단순화하고, 면역형광법을 이용하여 신속한 동정이 가능하게 되었으나 배양 비용이 증가하는 단점이 있다. Dunn 등[12]은 R-mix 18-24시간 배양 후 전체 배양 양성의 92.1%를 보고할 수 있고, 전체 양성 보고일을 29일에서 23일로 단축하였으며, 면역형광법 음성 이면서 배양 양성의 87.1%를 검출할 수 있다고 보고하였다. 호흡기 바이러스의 빠른 진단은 환자의 적절한 치료와 격리로 불필요한 검사와 항균제의 사용, 재원일수, 의료 및 사회비용을 줄일 수 있어 중요성이 점점 증가하고 있다[13].

이에 저자들은 보험수가와 검사비용 때문에 shell vial 1개에 접종하여 3일 또는 5일째 보고하던 배양법을, 24-well plate를 이용하여 배양 1일에 예비보고, 5일째 최종보고 하는 방법으로 변환하였으며, 2가지 배양 방법 및 동시에 실시한 직접면역형광법과 다중역전사효소연쇄반응법의 검출률과 보고시간의 변화를 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2009년 1월 1일부터 2011년 1월 31일까지 원광의대병원에 내원한 환자 중에서 호흡기바이러스 검사가 의뢰된 비인두면봉(flocked nasopharyngeal swab)의 2,062검체를 대상으로 하였다. 2009년 1월 1일부터 2010년 1월 31일에는 SVC법으로 3일 또는 5일째 1회 보고하였으며, 2010년 2월 1일부터 2011년 1월 31일에는 24-well plate 배양법을 사용하여, 1일째 예비보고와 5일째 최종보고를 하였다. 538검체에서는 배양, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 동시에 의뢰되었으며, 바이러스 검출방법의 양성률과 보고시간 분석은 주요 7종 호흡기바이러스(ADV, Flu-A/B, PIV1/2/3, RSV)를 대상으로 하였다.

2. 방법

1) R-mix shell vial 배양과 24-well plate 배양

SVC (ReadyCell, Diagnostic Hybrids Inc., USA) 배양은 배양 3일 또는 5일째 직접면역형광법을 이용하여 동정하여 보고하였고, 24-well plate (Nunc A/S, Denmark) 배양은 배양 1일과 5일째 SVC 배양과 동일한 방법으로 동정하여 보고하였다.

2) 다중역전사효소연쇄반응법(Seeplex RV detection kit, See-Gen Inc., Korea)은 제조사의 지시에 따라 cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas Co., Ontario, Canada)를 합성한 후, set A는 ADV, hMPV, coronavirus 229E/NL63 (229E), PIV1/2/3를, set B는 Flu-A, Flu-B, RSV A/B, rhinovirus A, coronavirus OC43 (OC43)를 증폭시킨 후 2% 한천 겔에 전기영동하여 확인하였다.

3) 직접면역형광법(D3 DFA Screening & ID kit, Diagnostic Hybrids Inc.)은 주요 7종 호흡기바이러스에 대한 항체가 섞인 선별항체가 양성인 경우 각각의 항체로 동정하였고, 100배 시야에서 2개 이상의 양성세포가 있을 때 양성으로 판정하였다.

4) 통계처리는 MedCalc ver. 11.6 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) 프로그램을 사용하였다. SVC와 24-well plate 배양 방법간 양성률 비교는 Chi-square test, 양성보고시간 비교는 *t*-test를 이용하였고, 배양, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 동시에 실시된 검체에서의 양성률과 보고시간의 비교에는 각각 Cochran's Q test와 Kruskal-Wallis test를 이용하였다(*P* value < 0.05).

결 과

1. Shell vial 배양과 24-well plate법의 비교

전체 바이러스 배양 양성률은 31.7% (653/2,062)이었고, 검출된 바이러스는 RSV (10.0%), ADV (6.7%), Flu-A (6.6%), PIV3 (4.1%), PIV1 (1.8%) 순이었다(Table 1). 배양 방법 간 양성률은 SVC법 28.4% (201/707), 24-well plate법 1일째 보고 29.4% (399/1,355)로 차이가 없었으나, 24-well plate 5일째 보고에 53예의 바이러스가 추가 검출되어 양성률 33.3% (452/1,355)로 유의한 차이(*P*=0.0234)를 보였다. 5일째 보고에 추가 검출된 바이러스는 ADV 34예, Flu-A 4예, Flu-B 3예, PIV 7예, RSV 4예, Flu-B와 PIV 중복감염 1예로, 느리게 자라는 것으로 알려진 ADV가 주로 차지하였다. 바이러스 양성보고시간은 SVC법은 4.8±1.4일에서 24-well plate법 2.5±1.5일로 단축되었다(*P*<0.0001).

2. 배양법, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법의 양성률과 보고시간 비교

배양법, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 모두 의뢰된 538검체에 대한 주요 7종 호흡기바이러스 양성률은 각각 24.3%, 20.8%, 38.5%로 다중역전사효소연쇄반응법에서 유의하게 높았으며(*P*<0.001), 배양과 직접면역형광법 비교에서는 배양에서 조금 높았으나 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 2). 양성보고시간은 직접면역형광법에서 1.0±0.8일로 가장 빨랐

고, 다중역전사효소연쇄반응법 1.4 ± 0.8 일, 배양 3.7 ± 2.0 일 순이었으며, 각 검사방법 별로 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.0001$). 배양에서는 직접면역형광법 음성 검체에서 ADV 14예, Flu-A 12예를 추가 검출하여 ADV와 Flu-A에 높은 민감도를 보였고, 직접면역형광법에서는 배양음성 검체에서 RSV 13예를 검출하고, Flu-A와 RSV가 중복 감염된 1예를 검출하여 RSV에 높은 민감도를 보였다(Table 3).

다중역전사효소연쇄반응법은 배양과 직접면역형광법에 음성인 70검체에서 양성을 보여 주요 7종 호흡기바이러스의 양성률은 38.5% (207/538)로 높은 민감도를 보였고, 7종 이외 호흡기바이러스를 포함할 경우 다중역전사효소연쇄반응법 양성률은 59.7% (321/538) 이었다. 배양과 직접면역형광법에서 동일한 바이러스가 검출된 5예에서 다중역전사효소연쇄반응법은 음성 3예 및 다른

바이러스 2예를 검출하였다. 배양과 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법에서 모두 다른 결과를 보인 경우는 2예였고, 배양에서만 검출된 경우는 ADV 2예, 직접면역형광법에서만 검출된

Table 2. Comparison of detection rate and turnaround time of culture, direct immunofluorescence assay, and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of 7 respiratory viruses in 538 nasopharyngeal swabs tested simultaneously

| Method | Detected viruses | | TAT [†] |
|---------|------------------|----------|------------------|
| | N | rate (%) | (mean \pm SD) |
| Culture | 131 | 24.3 | 3.7 \pm 2.0 |
| DFA | 112 | 20.8 | 1.0 \pm 0.8 |
| mPCR | 207 | 38.5* | 1.4 \pm 0.8 |

* P value = 0.0001, [†] P value < 0.0001.

Abbreviations: TAT, turnaround time; DFA, direct immunofluorescence assay; mPCR, multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Table 1. Comparison of shell vial and 24-well plate culture methods for the detection of 7 major respiratory viruses in 2,062 nasopharyngeal swabs

| Methods (N) | Viruses | | | | | | | | | | | | Total no of detected viruses (%) | TAT Mean \pm SD |
|-----------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|------------|----------|----------|---------|----------|----------|------------|----------------------------------|----------------------------|
| | ADV | ADV PIV3 | Flu-A | Flu-A RSV | Flu-B | Flu-B PIV3 | PIV1 | PIV1 RSV | PIV2 | PIV3 | PIV3 RSV | RSV | | |
| Shell vial (707) | 41 | 2 | 74 | | | | 6 | | 1 | 30 | 1 | 46 | 201 (28.4) | 4.8 \pm 1.4 |
| 24-well plate (1,355) | | | | | | | | | | | | | | 2.5 \pm 1.5 [†] |
| Day 1 report | 63 | | 59 | 1 | 34 | 1 | 31 | 1 | 2 | 51 | | 156 | 399 (29.4) | |
| Day 5 report | 34 | | 4 | | 3 | 1 | 1 | | 2 | 4 | | 4 | 53* (33.3) | |
| Total (2,062) (%) | 138 (6.7) | 2 (0.1) | 137 (6.6) | 1 (0.05) | 37 (1.8) | 2 (0.1) | 38 (1.8) | 1 (0.05) | 5 (0.3) | 85 (4.1) | 1 (0.05) | 206 (10.0) | 653 (31.7) | |

* P value = 0.0234, [†] P value < 0.0001.

Abbreviations: ADV, adenovirus; Flu-A, influenza A; Flu-B, influenza B; PIV1, parainfluenza virus 1; PIV2, parainfluenza virus 2; PIV3, parainfluenza virus 3; RSV, respiratory syncytial virus; TAT, turnaround time.

Table 3. Detection of respiratory viruses by culture, direct immunofluorescence assay (DFA), and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (mPCR) in 538 nasopharyngeal swabs tested simultaneously

| DFA | Culture | N | mPCR | | | | | | | | | | | | other | Neg |
|-----------|---------|-----|------|---------|-------|-----------|-----------|-------|-----------|-----|---------|-----|-----|-----|-------|-----|
| | | | ADV | ADV RSV | Flu-A | Flu-A ADV | Flu-A RSV | Flu-B | Flu-B RSV | PIV | PIV ADV | RSV | | | | |
| ADV | ADV | 14 | 14 | | | | | | | | | | | | | |
| ADV | NG | 1 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| Flu-A | Flu-A | 35 | 1* | | 31 | 1 | 2 | | | | | | | | | |
| Flu-A | NG | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | |
| Flu-A/RSV | Flu-A | 1 | | | | | | | | | | | | | 1* | |
| PIV | PIV | 5 | | | | | | | | | 2 | 1 | | 1* | 1* | |
| RSV | RSV | 42 | | | | | | 1 | | | | | | 40 | 1* | |
| RSV | NG | 13 | | 1 | | | | | | | | | | 9 | 1* | |
| Neg | ADV | 14 | 12 | | | | | | | | | | | | 2 | |
| Neg | Flu-A | 12 | 1* | | 11 | | | | | | | | | | | |
| Neg | Flu-B | 3 | | | | | | 3 | | | | | | | | |
| Neg | PIV | 4 | | | | | | | | 4 | | | | | | |
| Neg | RSV | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| Neg | NG | 392 | 25 | | 24 | | 1 | 5 | 1 | 4 | | | 10 | 112 | 210 | |
| Total | | 538 | 53 | 2 | 67 | 1 | 4 | 8 | 1 | 10 | 1 | 60 | 114 | 217 | | |

*mismatch result by culture/DFA and mPCR.

Abbreviations: ADV, adenovirus; Flu-A, influenza A virus; Flu-B, influenza B virus; PIV1, parainfluenza virus 1; PIV2, parainfluenza virus 2; PIV3, parainfluenza virus 3; RSV, respiratory syncytial virus; TAT, turnaround time; Neg, negative; NG, no growth; Other, other than the 7 major respiratory viruses.

경우는 RSV 2예였다. 다중역전사효소연쇄반응법에서 7종 외 호흡기바이러스 양성은 114예로 hMPV 51예, rhinovirus 48예, OC43 3예, hMPV/rhinovirus 2예, 229E 9예, 229E/OC43 1예였다.

고 찰

SVC법은 3개의 vial에 접종하여 18-24시간과 48시간 배양 후에 직접면역형광법 선별항체와 개별항체로 염색하여 바이러스를 동정하도록 권장하고 있으나 보고기간과 양성률에 대해서는 보고자에 따라 다르다. Weinberg 등[14]은 R-mix shell vial 48시간 배양 후 75% 민감도를 보고하였으며, 특히 ADV 25%, PIV3 67%로 낮은 양성률을 나타내었다. 또한 민감도에서, R-mix shell vial 24시간 배양 26%, 120시간(5일) 배양 47%로 차이가 나타나, 24시간 배양이 매우 유용한 진단방법으로 보이지 않으며, 120시간 배양이 전통적 배양법에 비하여 양성률의 증가와 보고시간 단축이 가능함을 보고하였다. 한편, Dunn 등[12]은 R-mix 18-24시간 배양 후 전체 배양 양성률의 92.1%를 보고할 수 있다고 하였고, 양성보고시간의 단축을 보고하였다. 따라서 제조사의 방법은 비용뿐 아니라 느리게 자라거나 바이러스 양이 적은 경우는 좀 더 배양이 필요한 경우가 있어 각각의 검사실에서는 이를 변형하여 적용하고 있다[11,12,14]. 본 연구에서는 배양 양성률뿐 아니라 음성 결과도 환자의 치료결정에 중요하기 때문에 24-well plate법으로 바꾸어 배양 1일째 예비보고를 하였고, Flu-A와 PIV2를 제외하고는 양성보고시간이 2일 이상으로, ADV 3.5일, PIV1 3.8일이 걸리므로[12] 배양 5일째 최종 보고하도록 하였다. 본 연구에서 SVC법을 사용한 기간 중에는 3일째 보고를 하거나 양성률 증가를 목적으로 5일째 보고로 변경한 기간이 포함되어 전체적으로 SVC법의 보고시간이 4.8일로 길었으나, 배양과 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 모두 의뢰된 538검체에서는 SVC법과 24-well plate법이 포함되어 있어 보고시간은 3.7일이었다. 비록 같은 기간에 같은 검체로 동시에 두 가지 배양법으로 비교하지는 않았지만 배양기간의 연장(5일째 보고)으로 늦게 자라는 것으로 알려진 ADV 검출이 증가하여 전체적인 양성률의 증가와 1일 예비보고로 양성보고시간을 단축할 수 있었다. 본 연구에서는 보고시간과 양성률을 향상시키기 위해 배양 1일과 5일째에 보고하는 방법을 선택하였는데, 이를 위해서는 검체마다 최소한 2개 세포층에 접종하여야 한다. 그러나 국내 보험수가는 R-mix shell vial 2개를 사용할 수 없으므로, 24-well plate의 세포층을 자체 제작하고 검체 당 2개 well을 사용하도록 하였다. 즉, R-mix 세포주를 구입하여 배양하고 증식시켜 세포보관용액에 1 mL씩 분주하여 -70°C에 냉동보관 하였으며, 검체 건수를 예측하여 1주일에 두 번 24-well plate에 세포를 분주하여 3일 배양한 후 검체 접종에 사용하였다. 24-well plate를 사용할 때 세포가 well에

서 증식하는 정도와 오염을 확인하는 것이 중요하므로 plate 마다 검체를 접종하지 않은 2 well을 음성대조로 사용하였고, 계대배양 중 R-mix의 세포구성 비율이 달라져 바이러스 양성률에 변화가 생길 수 있기 때문에 처음 증식하여 분주한 세포주로 6개월간 사용하였으며, 배양 결과를 직접면역형광법과 다중역전사효소연쇄반응법으로 비교하였다. 24-well plate를 사용하여 배양 1일과 5일째 두 번 보고함으로써 검사실의 업무량이 증가되었으나 각 well에 검체를 접종하는 과정은 SVC법에서 세포를 해동하고 세척하는 과정이 불필요하므로 매우 간단하였다. 양성률 향상과 함께 보고시간의 단축으로 Bonner 등[13]의 보고처럼 의사의 환자 치료방침 결정에 큰 도움을 줌으로써 항생제 처방이나 불필요한 검사 감소 및 입원기간의 단축 효과가 있었으리라 생각된다.

다중역전사효소연쇄반응법은 민감도가 높고, 검사 1-2일 내에 호흡기바이러스의 검사가 가능하여 유용한 방법으로 생각되었다[15]. 그러나 증상이 없는 소아의 비인두검체 뿐 아니라 급성호흡기 감염 후 2-5주까지 비강에서 호흡기바이러스가 검출[16, 17]되었다는 보고가 있고, 본 연구에서도 다중역전사효소연쇄반응법에서 주요 7종 호흡기바이러스에 대한 중복감염을 보였던 9예 중에서 7예는 배양이나 직접면역형광법에서 한 가지 바이러스만 양성을 보였고, 2예는 배양과 직접면역형광법에서 모두 음성을 보여 이들의 임상적 의미와 중복감염에 대한 해석에는 아직도 논란이 되고 있다[18, 19]. 다중역전사효소연쇄반응법에서 주요 7종 호흡기바이러스에 대한 검출률이 38.5%로써 검사방법 중 가장 높았으며, 직접면역형광법이나 배양법으로 확인할 수 없는 그 외 바이러스를 포함하면 양성률은 59.7%에 이르고, 이 중 대부분은 hMPV와 rhinovirus가 차지하였다. 특히 Flu-B는 배양음성 검체에서 배양양성 검체보다 더 많이 검출되었다. 그러나, 배양법이나 직접면역형광법에서 검출된 바이러스와 다중역전사효소연쇄반응법에서 다른 결과를 보인 11예(2.0%) 중 2예는 세가지 검사방법에서 모두 다른 결과를 보여 해석이 어려웠고, 5예(0.9%)는 다중역전사효소연쇄반응법만 다른 결과를 보였으며, 배양에서만 양성인 ADV 2예, 직접면역형광법에서만 양성인 RSV가 2예 있었다. 따라서 다중역전사효소연쇄반응법의 결과해석이나 중복감염의 경우 임상증상과 관련된 해석 및 이에 대한 연구가 필요하고, 배양이나 직접면역형광법이 결과 판독에 도움이 될 것으로 생각되었다. 한편, 직접면역형광법은 TAT가 평균 1일로 가장 짧았으며, 검체의 질에 대한 평가가 가능하다는 장점과 함께 검체처리와 배양 환경에 영향을 받는 RSV의 경우 배양법보다 검출률이 높았다.

hMPV는 2001년 처음 네덜란드에서 보고[4]된 이래 우리나라에서도 급성하기도감염 환자에서 4.7-15.6%의 양성률을 보고[20-23]하였다. Yeom 등[21]은 급성하기도감염으로 입원한 환자를 대상으로 hMPV 양성률은 6.9%, 평균연령은 2.8개월, 남녀비는 1.5:1이었

고, 진단명은 폐렴(60.0%), 모세기관지염(33.3%), 후두염(6.6%)이었다고 보고하였다. 본 연구에서도 hMPV는 9.9% (53/538) 양성률을 보였고, 평균연령 2.3세, 남녀비는 1.4:1로, 소아에서 주요 호흡기감염원임을 알 수 있었다. 또한 전체 연구 기간 중 다중역전사효소연쇄반응법에 의해 검출된 hMPV 124예도 3세 이하가 대부분이었고 14세까지 검출되었다. hMPV는 주요 7종 호흡기바이러스에 포함되지 않아 직접면역형광법과 배양의 확인 과정에 널리 이용되고 있지 않으나 추후 호흡기바이러스 선별항체에 포함되어야 할 것으로 생각되었다.

호흡기바이러스 배양에 24-well plate를 이용하여 배양 1일과 5일째 보고하는 방법은 SVC법 3일째 보고방법보다 검출률 향상과 보고시간의 단축 및 재료를 절감할 수 있었으며, hMPV를 호흡기바이러스의 통상 검사대상에 포함하는 것이 필요할 것으로 생각되었다.

요 약

배경: 호흡기바이러스의 신속하고 정확한 진단이 환자의 치료방향을 결정하는데 중요하다. 배양법의 검출률을 높이고, 양성보고시간과 비용을 줄이기 위해, 기존의 shell vial 배양 3일째 보고를 24-well plate 배양 1일과 5일째 보고로 바꿔 비교하였다. 또한 배양법과 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법의 양성률과 보고시간도 비교하여 보았다.

방법: 2009년 1월 1일부터 2011년 1월 31일까지 원광대학병원에서 호흡기바이러스 배양검사가 의뢰된 2,062 비인두면봉 검체를 대상으로 하였다. 2009년 1월 1일부터 2010년 1월 31일 사이 707검체는 R-mix shell vial를 이용하여 배양 3일째, 2010년 2월 1일부터 2011년 1월 31일 사이 1,355검체는 24-well plate를 이용하여 배양 1일과 5일째 직접면역형광법으로 동정하여 배양방법 간 양성률과 양성보고시간을 비교하였다. 배양, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 동시에 의뢰된 538검체에 대해 주요 7종 호흡기바이러스의 양성률과 양성보고시간을 비교하였다.

결과: shell vial 배양 3일째 양성률은 28.4% (201/707), 24-well plate 1일째 29.4% (399/1,355), 5일째 33.3% (452/1,355)로 24-well plate 5일째 양성률이 높았고($P=0.0234$), 24-well plate 배양 5일째 동정된 바이러스는 53예로 adenovirus 34예, Flu-A 4예, Flu-B 3예, PIV 7예, RSV 4예, Flu-B/PIV 1예이었으며, 양성보고시간은 shell vial 배양 4.8 ± 1.4 일에서 24-well plate법 2.5 ± 1.5 일로 단축되었다($P=0.0001$).

배양, 직접면역형광법 및 다중역전사효소연쇄반응법이 모두 의뢰된 538검체에 대한 각각의 양성률은 24.3%, 20.8%, 38.5%로 다중역전사효소연쇄반응법이 높고($P=0.0001$), 양성보고시간은 각각

3.7 ± 2.0 일, 1.0 ± 0.8 일, 1.4 ± 0.8 일이었다($P<0.0001$).

결론: 24-well plate를 이용한 호흡기바이러스의 배양법은 shell vial 법에 비해 유용한 방법이었다.

참고문헌

1. 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.
2. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. Pediatr Infect Dis J 2004;23(S1):S11-8.
3. 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.
4. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 2001;7:719-24.
5. Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES. Respiratory picornavirus infections in Korean children with lower respiratory tract infections. Scand J Infect Dis 2007;39:250-4.
6. Kim WJ. Epidemiology, clinical manifestations, and management of pandemic novel influenza A (H1N1). Korean J Med 2009;77:157-64.
7. Wie SH and Kim WJ. Diagnosis and management of Novel influenza A(H1N1). Korean J Fam Med 2009;30:843-7.
8. Kwon A, Kim JS, Kin HS, Song W, Park JY, Cho HC, et al. Comparison of rapid antigen test and real-time reverse transcriptase PCR for diagnosing novel swine influenza A (H1N1). Korean J Clin Microbiol 2010;13:109-13.
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.
10. 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.
11. 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.
12. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carrol KC. Sensitivity of respi-

- ratory virus culture when screening with R-Mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004;42:79-82.
13. Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, Klasner AE, Kimberlin DW. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics* 2003;112:363-7.
 14. Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2004;30:100-5.
 15. Lim G, Park TS, Suh JT, Lee HJ. Comparison of R-mix virus culture and multiplex reverse transcriptase-PCR for the rapid detection of respiratory viruses. *Korean J Lab Med* 2010;30:289-94.
 16. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol* 2004;72:695-9.
 17. Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkaranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002;66:417-20.
 18. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:1003-7.
 19. Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, et al. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol* 2007;79:463-8.
 20. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* 2006;43:585-92.
 21. Yeom HH, Park JS, Jeong DJ, Kim CJ, Kim YB, Lee DH, et al. Human metapneumovirus infection in Korean children. *Korean J Pediatr* 2006;49:401-9.
 22. Kim YK and Lee HJ. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections in Korean infants and young children. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1111-2.
 23. 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.