

# 비인두면봉 검체에서 호흡기바이러스 검출을 위한 ExiPrep16 자동핵산추출기 평가

## Evaluation of ExiPrep16 Automated System for the Extraction of Nucleic Acids from Nasopharyngeal Swabs for the Detection of Respiratory Viruses

이경선<sup>1</sup> · 박도심<sup>1</sup> · 윤귀현<sup>2</sup> · 이영진<sup>1</sup> · 조지현<sup>1</sup>Koung Sun Lee, M.D.<sup>1</sup>, Do Sim Park, M.D.<sup>1</sup>, Kui Hyun Yoon, M.D.<sup>2</sup>, Young Jin Lee, M.D.<sup>1</sup>, Ji Hyun Cho, M.D.<sup>1</sup>원광대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 원광대학교 산본병원 진단검사의학과<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan; Department of Laboratory Medicine<sup>2</sup>, Wonkwang University Sanbon Hospital, Gunpo, Korea

**Background:** Automated nucleic acid extraction offers a standardized sample treatment method, low error rate, and avoids sample nucleic acid contamination for use in molecular diagnostics. Here, we evaluated the performance of automated ExiPrep16 system (Bioneer Co.) in comparison with the manual Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit (VGspin; iNtRON Biotechnology Inc.) for the detection of respiratory viruses from nasopharyngeal flocked swabs.

**Methods:** To compare the agreement rate and analytical sensitivity between ExiPrep16 and VGspin, previously collected 78 patient samples and 11 pooled samples of each respiratory viruses and their serially diluted samples (until 1/10<sup>8</sup>), were tested by multiplex reverse-transcriptase PCR (Seeplex RV 12 ACE Detection kit; SeeGene Inc.). In addition, we repeatedly analyzed the threshold cycle of the pooled and 1/10<sup>3</sup> dilution of adenovirus (ADV) and influenza virus A (Flu-A) by using real-time PCR to evaluate the precision and crossover of the ExiPrep16 system.

**Results:** The analytical sensitivity of the ExiPrep16 was comparable to that of VGspin, and the highest detectable dilution varied in the range of 1/10 to 1/10<sup>6</sup> depending on the viruses. The total, overall positive and negative percent agreements of ExiPrep16 in comparison with VGspin were 95.7%, 96.2%, and 95.2%, respectively. The mean (CV%) of pooled and 1/10<sup>3</sup> dilution of ADV were, respectively, 19.2 cycle (2.1%) and 31.6 cycle (4.3%) and those for Flu-A were 22.6 cycle (3.1%) and 35.5 cycle (2.6%). No carryover was detected.

**Conclusions:** Compared to the manual VGspin, ExiPrep16 ensured nucleic acid extraction for efficient detection of respiratory viruses.

**Key Words:** Nucleic acid amplification, Molecular diagnostics, respiratory virus

## 서론

최근 호흡기바이러스감염의 진단에 널리 사용되고 있는 분자진

**Corresponding author:** Ji Hyun Cho

Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Wonkwang University, 895 Muwang-ro, Iksan 570-711, Korea  
Tel: +82-63-859-1861, Fax: +82-63-842-3786, Email: cjh@wonkwang.ac.kr

Received: August 21, 2012

Revision received: November 9, 2012

Accepted: November 12, 2012

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

© 2013, 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.

단검사(molecular diagnostic tests)는 배양을 포함한 기존검사에 비하여 가장 예민한 방법으로 평가되고 있다. 또한 높은 민감도를 가지므로 비교적 감염 초기에도 정확한 진단이 가능하게 되었고, 항바이러스제 치료, 불필요한 검사의 중단, 병원 내 감염관리와 보건정책의 설정에 매우 유용한 도구가 되었다[1]. 2009년 전세계적인 신종플루(The 2009 H1N1 Pandemic)의 유행에 따라 국내에서도 비인두플록트스왑(flocked nasopharyngeal swab)을 포함한 호흡기검체에서 바이러스 검출에 분자진단검사가 널리 사용되게 되었다[2].

검체로부터 핵산을 추출하는 과정은 분자진단검사의 첫 단계로서, 이 과정의 자동화는 수작업과 비교하여 업무흐름을 개선할 뿐만 아니라, 추출된 핵산의 질을 일정하게 하고, 추출의 여러 단계에서 검체 간 오염을 방지할 수 있고, 작업자의 감염원에 대한 노출

을 줄일 수 있다는 장점이 있어[3-5], 특히 다수의 검체를 검사하는 경우에 매우 효율적이다. 그러나, 검체 특성이나 대상 미생물 이외에도 수작업과 자동화기기, 시약과 추출 방법에 따라 추출된 핵산의 질에 상당한 차이가 있음이 보고되고 있어, 특히 자동화기기의 도입 시 이런 요소를 잘 고려해야 한다[4-8].

최근 핵산증폭과 검출과정이 더욱 발전하고 표준화되어 감에 따라, 상대적으로 핵산추출과정이 분자진단검사의 결과에 더욱 큰 영향을 미치게 되어 검사실에서 새로운 핵산추출방법의 도입, 특히, 자동화장비의 도입이 필요하게 되었다[1, 4, 6-8]. 국내 검사실에서도 호흡기검체에서 바이러스의 검출을 목적으로, 기존 수작업 방법을 대신하여 자동핵산추출기의 사용이 증가하게 되었다[2, 3]. 그러나, 호흡기바이러스를 검출하는데 있어서 자동핵산추출기에 대한 임상평가가 충분히 이루어지지 못한 측면이 있으므로 저자들은 기존 수기법인 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit VGspin (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)와 자동핵산추출기기인 ExiPrep16 (Bioneer Co., Daejeon, Korea)에 의해 추출한 핵산을 사용한 주요 호흡기바이러스 검출 성적을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

2008년 1월 1일부터 2009년 12월 31일까지 원광의대병원에 내원한 환자 중에서 호흡기바이러스 분자진단검사가 의뢰된 검체 중 -70°C에 냉동보관된 비인두플로트스왑 검체를 사용하였다. 단, ExiPrep16의 정밀도와 검체 간 오염의 평가에는 2011년 보관된 검체 중에서 adenovirus (ADV)와 influenza virus A (Flu-A) 양성 및 음성 검체와 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 핵산추출

자동핵산추출기기인 ExiPrep16과 수기법인 VGspin을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 핵산을 추출하였다. 두 가지 방법의 비교를 위하여 처음 비인두플로트스왑 검체량은 200 µL, 최종 핵산추출 용량은 50 µL로 동일하게 하였다.

#### 2) 호흡기바이러스 검출

추출된 핵산은 Revert Aid First Standard cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Ontario, Canada)를 이용하여 제조사의 지시대로 cDNA로 합성하였다. cDNA 2 µL와 Seeplex RV 12 ACE Detection kit (SeeGene Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 다중역전사중합효소연쇄반응으로 GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems,

Foster, CA, USA)를 사용하여 호흡기바이러스를 검출하였다. 이방법의 대상 호흡기바이러스는 12종으로 ADV, Flu-A/B, parainfluenza virus type 1/2/3 (PIV-1, -2, -3), respiratory syncytial virus A/B (RSV-A, -B), human metapneumovirus (hMPV), human rhinovirus A (hRV-A), coronavirus OC43/229E (CoV-OC43, -229E)이었다.

ExiPrep16에 의한 핵산추출 과정의 정밀도와 검체 간 오염을 평가하기 위하여 Flu-A와 ADV 검출은 실시간중합효소연쇄반응으로 실시하였다. Flu-A는 AccuPower Influenza A Real-Time RT-PCR Kit (Bioneer Co.)를 사용하여 제조사의 설명에 따랐으며, ADV는 Kohdera 등[9]의 방법(시발체: 5'-GACATGACTTTTCGAGGTC-GATCCCATGGA-3', 5'-CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAG-GTA-3')을 사용하였으며, Greenstar PCR Master Mix (Bioneer Co.)를 사용하여 총 20 µL (핵산 5 µL, 시발체 각각 1 µL, Mater mix 10 µL) 반응용량으로, Exicycler96 Real-time Quantitative Thermal Block (Bioneer Co.)을 이용하여 증폭(95°C 10분-95°C 20초-55°C 30초 조건으로 45회 반복 후 72°C 5분)하고, 용해온도(melting temperature)를 확인하기 위하여 60°C에서 94°C까지 온도를 상승(1°C/sec)하도록 프로그램하여 threshold cycle (Ct) 값을 측정하였다.

### 3) 핵산추출법의 평가

#### (1) 검출민감도(Analytical sensitivity) 평가

핵산추출방법의 검출민감도를 비교하기 위하여, 다중역전사중합효소연쇄반응에 의하여 양성으로 보고되었던 보관검체 중에서, PIV-2를 제외한 호흡기바이러스 11종(ADV, Flu-A/B, PIV-1/3, RSV-A/B, hMPV, hRV-A, coronavirus OC43/229E)에 대하여 전기영동상 매우 강한 밴드를 나타낸 검체를 바이러스마다 각각 5검체씩, 총 55검체를 선택하였다. 각각 5검체를 잘 혼합하여 하나의 pool을 만들고, 이 11개의 pool을 PBS를 사용하여 1/10<sup>8</sup>까지 10배수 계대 희석하여 총99개 검체를 만들어 사용하였다.

계대 희석된 검체에서 VGspin과 ExiPrep16으로 핵산을 각각 추출하고 동일한 방법으로 증폭하여 전기영동상에서 확실한 밴드가 관찰되면 양성, 관찰되지 않으면 음성으로 판독하였으며, 희미한 밴드가 관찰되는 경우에는 핵산을 다시 추출 및 검사하여 동일한 밴드가 관찰되면 약양성("w+"), 관찰되지 않으면 약약양성("ww+")으로 판독하였다.

#### (2) VGspin과 ExiPrep16의 일치율(Agreement rate) 평가

두 가지 핵산추출 방법의 일치율을 분석하기 위하여, 이미 VGspin과 다중역전사중합효소연쇄반응에 의하여 양성으로 보고되어 냉동보관된 환자 검체를 사용하였다. 양성 검체수가 적은 PIV-2를 제외한 11종 바이러스에 대하여서는 과거 전기영동상을 검토하여 밴드의 강도가 다양하게 포함되도록 바이러스마다 4검체(매우

강, 강, 중, 약)씩 44검체 및 음성 34검체를 선택하였다. 선택된 78검체를 ExiPrep16으로 핵산을 추출하고, 동일한 방법으로 12종 호흡기바이러스를 검출한 성적을 비교하였다. 추가로, 검체 간 오염평가에 사용한 ADV 양성 및 음성 각각 8검체의 결과를 포함하여 일치율을 분석하였다.

### (3) 정밀도(Precision) 비교

검출민감도 평가에 사용되었던 RNA 바이러스인 Flu-A와 DNA 바이러스인 ADV의 pool과  $1/10^3$  희석액을 사용하였다. 2가지 바이러스에 대하여 실시간 중합효소연쇄반응으로 분석하여 5일간 하루에 2시간 이상의 간격으로 2회 시행하였고, 매번 실시할 때마다 2번 반복 측정하여 Ct 값을 측정하였고, pool과  $1/10^3$  희석액의 평균 Ct 값과 표준편차(standard deviation, SD)와 총 변이계수(coefficient of variation, CV)를 측정하였다.

### (4) 검체 간 오염(Carry-over)과 증폭 억제물질의 존재에 대한 평가

ExiPrep16은 1회에 최대 16검체를 배치할 수 있으므로, ExiPrep16을 이용한 핵산추출 과정의 검체 간 오염 평가에는, Flu-A

pool과 PBS, ADV의 pool과 PBS를 각각 8개씩 사용하였다. 양성 및 음성 검체를 번갈아 8개씩 배치하여 핵산을 추출하고, 실시간 중합효소연쇄반응으로 분석하여 Ct 값을 측정하였다. 한편, ADV 경우에는 추가로 PBS 대신 음성 환자 검체와 양성 환자 검체를 8개씩 사용하여 분석하였으며, cDNA 합성과정에 의한 영향을 파악하기 위하여, cDNA 합성과정은 생략하였다.

한편, ExiPrep16에 의한 핵산추출 후 증폭억제물질의 존재를 확인하기 위하여, 이번 실험에 사용한 251검체 이외에 2012년 2월부터 9월까지 2,282개 플록투스웍 검체의 환자 검사결과에서, 실시간 중합효소연쇄반응 후 internal control 물질의 증폭 여부를 후향적으로 확인하였다.

### 4) 통계처리

VGspin과 ExiPrep16 사이의 일치율 평가는 정성검사 비교 가이드라인[10]에 따라서 MediCalc version 11.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) 프로그램을 이용하여 일치율(% agreement)과 kappa 값을 구하였다. ExiPrep16을 이용한 핵산추출 과정의 정밀도를 평가하기 위하여 CLSI EP5-A2 정량검사 가이드라인[11]을

**Table 1.** Comparison of the analytical sensitivity between manual Viral gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit (VGspin) and automatic ExiPrep16 system

N	Viruses	Extraction methods	Dilutions								
			Undiluted	1/10 <sup>1</sup>	1/10 <sup>2</sup>	1/10 <sup>3</sup>	1/10 <sup>4</sup>	1/10 <sup>5</sup>	1/10 <sup>6</sup>	1/10 <sup>7</sup>	1/10 <sup>8</sup>
1	ADV	VGspin	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	+	+	+	w+	-	-
2	Flu-A	VGspin	+	+	ww+	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	ww+	-	-	-	-	-	-
3	Flu-B	VGspin	+	w+	-	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	ww+	-	-	-	-	-	-	-
4	PIV-1	VGspin	+	+	w+	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	PIV-3	VGspin	+	+	+	w+	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	RSV-A	VGspin	+	+	+	w+	ww+	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	w+	w+	-	-	-	-	-
7	RSV-B	VGspin	+	+	+	w+	ww+	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	w+	-	-	-	-	-
8	hMPV	VGspin	+	w+	-	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	hRV-A	VGspin	+	w+	-	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	w+	-	-	-	-	-	-	-
10	Coronavirus-OC43	VGspin	+	+	ww+	-	-	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	ww+	-	-	-	-	-
11	Coronavirus-229E	VGspin	+	+	+	w+	ww+	-	-	-	-
		ExiPrep16	+	+	+	+	w+	ww+	-	-	-

+: thick band, w+: thin band confirmed repeatedly, ww+: thin band, but cannot be confirmed repeatedly.

Abbreviations: ADV, adenovirus; Flu-A, influenza virus A; Flu-B, influenza virus B; PIV, parainfluenza virus; RSV, respiratory syncytial virus; hMPV, human metapneumovirus; hRV, human rhinovirus.

변용하여 Analyse-It version 2.20 (Analyse-it Software Ltd, City West Business Park, Leeds, UK) 프로그램을 이용하여 Ct 값의 평균과 CV 및 표준편차를 분석하였다.

## 결 과

### 1. VGspin과 ExiPrep16의 핵산추출 방법의 검출민감도의 비교

총 99검체 중에서 ExiPrep16에 검출민감도가 1단계 높았던 경우는 ADV, PIV-3, CoV-OC43/229E이었으며, VGspin에서 1단계 높았던 경우는 RSV-A/B, hMPV이었고, 동일하였던 경우는 Flu-A/B, PIV-1, hRV-A이었다.

11종의 호흡기바이러스에 대하여 VGspin과 ExiPrep16 사이에 검출민감도는 동일하거나 희석배율 1단계 이내의 차이가 관찰되었으며, ADV는  $1/10^6$  희석액에서도 바이러스가 검출되었고, 나머지 RNA 바이러스는  $1/10^5$  농도까지 다양한 희석농도에서 검출되었다 (Table 1).

### 2. VGspin과 ExiPrep16에 대한 호흡기 바이러스검사의 일치율 비교

VGspin과 ExiPrep16의 총일치율(overall % agreement) 95.7%, 양성일치율(positive % agreement) 96.2%, 음성일치율(negative % agreement) 95.2%이었으며, kappa=0.914 (Value of  $\kappa$  Strength of agreement: <0.20 Poor, 0.21-0.40 Fair, 0.41-0.60 Moderate, 0.61-0.80 Good, 0.81-1.00 Very good)로서 매우 높은 일치율이 관찰되었다(Table 2).

실제 환자 78검체에서, VGspin에 양성되었던 52검체(ADV만 12검체, 나머지 호흡기바이러스 10종마다 4검체 포함) 중에서 RSV-A와 hRV-A가 검출된 2검체에서 ExiPrep16은 음성이었으며, VGspin에 음성되었던 42검체 중 2검체에서는 ExiPrep16에서 각각 hMPV와 ADV가 반복적으로 확인되었다.

**Table 2.** Agreement rate between manual VGspin kit and automatic ExiPrep16 system for the detection of respiratory viruses in flocked nasopharyngeal swabs

ExiPrep16	VGspin		Total	Agreement* (%)
	Positive	Negative		
Positive	50	2 <sup>†</sup>	52	96.2
Negative	2 <sup>†</sup>	40	42	95.2
Total	52	42	94	95.7

\*Measurement of agreement (K) between ExiPrep16 and VGspin was 0.914; <sup>†</sup>including 1 case of RSV-A and 1 case of hRV-A; \*including 1 case of hMPV and 1 case of ADV.

### 3. ExiPrep16의 정밀도 평가

검체 Pool과  $1/10^3$ 희석액을 이용한 정밀도 평가에서, ADV Pool과  $1/10^3$ 희석액의 평균 Ct 값은 19.2 cycle과 31.6 cycle에 해당하였으며, 각각의 농도에서 CV와 2SD는 2.1%와 0.8 cycle, 4.3%와 2.7 cycle이었다. Flu-A 경우는 각각 22.6 cycle에서 3.1%와 1.4 cycle, 35.5 cycle에서 2.6%와 1.8 cycle이었다(Table 3).

### 4. ExiPrep16의 검체 간 오염과 증폭 억제물질의 존재

고농도 ADV pool과 PBS, Flu-A pool과 PBS, ADV 양성과 음성 환자 검체를 각각 8검체씩 교대로 배치하여 3세트를 검사한 결과, 검체 간 오염은 관찰되지 않았다.

한편, 8개월 동안 환자 2,282 플록트스왑 검체에 대한 실시간중합효소 연쇄반응검사의 기록에서 internal control 물질이 증폭되지 않은 경우는 16건(0.7%)이었으며, 본 실험의 251검체에서는 모두 internal control 물질이 증폭되었다.

## 고 찰

비인두플록트스왑 검체에서 수작업에 의한 호흡기바이러스의 핵산추출에 사용한 VGspin은 실리카겔 막(silica gel membrane)을 이용한 column법이며, ExiPrep16 Viral DNA/RNA Prep kit은 magnetic bead를 이용한 방법으로 모두 호흡기검체를 포함한 다양한 검체의 핵산추출에 사용될 수 있다[4]. 호흡기바이러스의 검출률은 분자진단검사 방법 및 보고자에 따라 차이를 나타내지만, 국내에서 Yoon 등[12]은 본 연구와 동일한 VGspin방법으로 핵산을 추출하고 다중역전사중합효소연쇄반응에 의한 비인두플록트스왑 검체에서의 호흡기바이러스 검출률은 55.8%로, 면역형광법의 검출률 32.0%와 배양법의 검출률 40.0%에 비교하여 가장 높았다고 보고하였다. Yoo 등[13]은 MagMax Viral RNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA)로 추출된 핵산을 사용하여, 동일한 방법으로 호흡기바이러스를 검사하였을 때 검출률 56.0%와 면역형광법 33.0%로 VGspin 추출방법과 유사한 결과를 나타내었기에, 이번 연구에서 VGspin을 자동핵산추출기기인 ExiPrep16 평가의

**Table 3.** Reproducibility of Ct values analysed by real-time PCR using nucleic acid extracted by automatic ExiPrep16 system

Viruses	Level	Threshold cycle			Total CV (%)
		Mean	2 SD	95% CI	
ADV	Undiluted	19.2	0.8	19.08-19.44	2.1
	$1/10^3$	31.6	2.7	31.01-32.20	4.3
Flu-A	Undiluted	22.6	1.4	22.30-22.91	3.1
	$1/10^3$	35.5	1.8	35.11-35.89	2.6

Abbreviations: Ct, threshold cycle; CI, confidence interval.



비교검사로 사용할 수 있을 것으로 판단하였다.

호흡기바이러스 11종에 대하여 pool 검체와  $1/10^8$ 까지 희석액, 총 99검체를 대상으로 VGspin과 ExiPrep16으로 추출한 핵산을 사용한 검출민감도를 비교하였을 때에, ExiPrep16의 검출민감도가 높은 경우는 4가지(ADV, PIV-3, Coronavirus OC43/229E)이었고, 낮은 경우는 3가지(RSV-A/B, hMPV)이었으나, 그 차이도 모두 1단계 이내 희석배수이었으며, 민감도에 차이가 없었던 경우는 4가지(Flu-A/B, PIV-1, hRV-A)로, 2가지 핵산 추출 방법의 검출민감도는 유사할 것으로 생각되었다. 한편, 11종 호흡기바이러스에 대하여 증폭산물의 전기영동상 밴드 두께가 다양하게 포함되도록 선택한 78 환자 검체에 대한 성적에서, VGspin에 양성으로 보관하였던 44검체 중 2검체(RSV-A, hRV-A)에서 ExiPrep16에 음성이었으나 검체 부족으로 확인할 수 없었던 반면, VGspin법에 음성이었던 34검체 중 2검체에서 hMPV와 ADV가 검출되었는데, 재추출하여 검사하여도 동일 바이러스가 검출되었기에 VGspin법에서 위음성이었을 것으로 판단되었다. 특히, 이 연구에서 냉동보관된 검체를 사용하였기에 핵산의 변성이 일어났을 가능성을 고려하면 ExiPrep16의 핵산추출 과정의 검출민감도가 VGspin법과 비교하여 낮은 것을 것으로 판단되었다. 또한, 본 연구에서 VGspin과 ExiPrep16 사이에 총 일치율 95.7%, 양성 일치율 96.2%, 음성 일치율 95.2%이었으며, kappa 값은 0.914임에 따라, 2가지 핵산추출 방법이 높은 일치율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 예민도를 비교하는 과정에서 표준검체를 사용하지 못하여 정확한 바이러스 농도가 제시되지 못하거나, 대상 바이러스를 11종으로 하였으나 희석검체에 대하여 대부분 반복 검사하여 결과를 확인하지 않았기에, 이에 대한 고려가 필요할 것으로 생각되었다.

ExiPrep16을 이용한 핵산추출 및 실시간중합효소연쇄반응에 의한 바이러스 검출방법의 정밀도를 분석하기 위하여 ADV와 Flu-A pool 검체와  $1/10^3$  희석액을 사용하였는데, 대상 바이러스의 절대농도를 알 수 없었기에, 정량분석법에 대한 CLSI EP5-A2 [11]를 준용하여 Ct 값의 변화 폭에 대하여 평가하였다. 이번 연구에서는 호흡기바이러스검사가 정성검사이기에 정량검사법의 평가에 해당하는 4주간 값을 비교하지는 않았으나, ADV  $1/10^3$  희석액에서 Ct 값의 2SD 범위가 2.7 cycle로써 최고 6.5 ( $=2^{2.7}$ )배까지 변화하였을 뿐, 나머지는 2 cycle 이내로써 4배 이내의 농도 변화를 나타내었다. 한편, 혈청 검체를 대상으로 이번 연구와 유사하게 수작업 column 방법인 High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)으로 추출된 핵산을 사용하여, 실시간 중합효소연쇄반응으로 HBV DNA 정량검사를 평가한 보고[14]에 따르면, Ct 값의 변화 폭은 그에 대한 농도 값의 변화보다는 작게 표현된다. 이번 연구에서의 평균 Ct 값과 유사한 정도의 HBV 평균 Ct 값 -CV값을 보면, 17.6 cycle-0.1%, 21.1 cycle-0.1%, 24.7 cy-

cle-0.2%, 31.3 cycle-0.7%, 35.1 cycle-4.2%이었기에, 이번 연구에서의 CV 값 변화 2.1%-4.3% 보다는 좁은 범위이었으나, 상대적으로 균질하지 않은 호흡기 검체의 특성과, 호흡기바이러스 검사가 정성 검사임을 감안하였을 때에 정밀도는 적절한 수준으로 유지되는 것으로 판단하였다.

한편, 핵산 추출 과정에서 ExiPrep16의 검체 간 오염을 확인하기 위하여, ExiPrep16 기기에 1회 최대 장착 검체 수인 16검체를 3가지 조건, 즉 고농도 ADV pool과 PBS, Flu-A pool과 PBS 및 ADV 양성과 음성 환자 검체 각각 8개를 반복 배치하여 검사하였던 바, 검체 간 오염은 발견되지 않았다. 또한, 본 실험에서 ExiPrep16으로 핵산을 추출하고 검사한 총 251개 검체에서 모두 internal control 물질이 증폭되었으나, 2012년 2월부터 9월까지 실제 환자 2,282 플록트스왑 검체에서는 16건(0.7%)에서 internal control 물질이 증폭되지 않은 경우를 확인할 수 있었기에, ExiPrep16을 사용하는 경우에 증폭억제 물질에 대한 고려가 필요할 것으로 생각되었다. Chan 등[3]은 비인두흡입물(nasopharyngeal aspirate)을 대상으로 자동핵산추출 장비인 NucliSenseeasyMAG (bioMerieux, Netherlands)와 BioRobot 9604 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를, 수기법인 QIAamp RNA or DNA extraction kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)와 비교하였는데, Flu-A, RSV, ADV 바이러스를 대상으로 추출 농도  $10^7$ - $10^{10}$  copies/mL 범위와 낮은 농도 범위(Ct 31-33 cycle)에서 핵산추출 성적과, 환자 검체에 대한 Flu-A/B, RSV, PIV-3, ADV 진단 예민도에 차이가 없었고, 증폭 억제물질이나 검체 간 오염도 관찰되지 않았다고 보고하여 이번 연구와 유사한 결과이었다. 따라서, 비인두검체에서 호흡기바이러스 핵산추출은 다른 검체나 병원에 비하여, 현재 사용되는 핵산 추출 방법을 적용하였을 때에 비교적 큰 영향을 받지 않는 과정일 수 있을 것으로 추정될 수 있었으나, 검사실에 도입하기 전에 확인과정이 필수적일 것으로 판단되었다. 특히, 점액성이 높은 객담은 검체의 특성상 별도의 전처리 과정이 필요하며, 결핵균의 경우에는 자동화 장비와 시약에 따라서 심한 차이가 보고되므로, 추후 다양한 검체와 병원균을 대상으로 ExiPrep16에 대한 평가가 있어야 할 것으로 생각되었다[7, 8].

이번 연구에서 사용한 VGspin과 같이 수작업에 의한 column 방법으로 핵산을 추출하는 경우 1시간에 최대 24검체를 처리할 수 있다고 하지만, 핵산 추출 과정에 수 차례 검체와 시약을 첨가하고 원심하는 과정을 거쳐야 한다[4]. 반면에 ExiPrep16은 최대 16검체에서 DNA와 RNA를 동시에 자동으로 추출하는 데에 1시간 정도가 소요되며, 검체 숫자에 따른 시약손실이 없다. 따라서, 한번에 처리해야 하는 검체 숫자가 16개 이내인 검사 항목이나, 계절에 따라 검체 숫자 변화가 많은 호흡기바이러스 검사의 핵산추출 단계를 ExiPrep16 기기를 이용하여 자동화시킴으로써, 보다 효율적

이고 신속한 검사가 실시될 수 있을 것으로 판단되었다. 그러나, ExiPrep16은 16개 이상 다수 검체를 자동적으로 처리하기에는 시약 세트에 검체수와 동일하게 기구를 사용하여 수기로 구멍을 내어야 하고, 기기 숫자를 늘려야 하므로, 다수 검체를 처리하는 목적으로는 검사실의 공간이나 작업 효율성 및 경제성에 대한 검토가 필요할 것이며, 비인두플로트스왑 검체 이외의 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 기관지폐포세척액, 소변 등의 검체에 대해서는 추후 확인이 필요할 것으로 생각되었다.

결론적으로, ExiPrep16를 이용하여 비인두플로트스왑 검체에서 검체 간 오염없이 주요 호흡기바이러스 핵산을 추출하였으며, 기존 수작업에 비교하여 유사한 검출민감도와 정밀도를 확인할 수 있었으며, 추후 다양한 검체와 병원균에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 판단되었다.

## 요 약

**배경:** 핵산 추출 과정의 자동화는 수작업에 비교하여 일정한 추출 과정을 제공함으로써 핵산의 질을 일정하게 하고, 추출과정의 실수율과 오염률을 낮출 수 있다. 비인두플로트스왑(nasopharyngeal flocked swabs, NPFS) 검체를 대상으로 자동화된 핵산 추출 장비인 ExiPrep16 system (Bioneer Co., Korea, ExiPrep16)의 호흡기바이러스 검출능을 평가하기 위하여, Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit (iNtRON Biotechnology Inc., Korea; VGspin) 수기법과 비교 분석하였다.

**방법:** ExiPrep16과 VGspin의 검출민감도 및 일치율 평가를 위하여, 호흡기바이러스 11종에 대하여 각각 양성 검체 5개를 혼합하여 만든 pool 및  $1/10^8$  까지 계대 희석한 검체와 냉동 보관된 78환자 검체를 다중역전사중합효소연쇄반응(Seeplex RV 12 ACE Detection kit, SeeGene Inc., Korea)으로 분석하였다. ExiPrep16의 정밀도와 오염률을 평가를 위해 adenovirus (ADV)와 influenza virus A (Flu-A)의 pool 및  $1/10^3$  희석검체를 실시간중합효소연쇄반응으로 반복 분석하여 threshold cycle (Ct) 값을 측정하였다.

**결과:** ExiPrep16과 VGspin을 이용한 호흡기바이러스의 검출민감도는, 대상 바이러스에 따라 달랐으며  $1/10$ 에서  $1/10^6$  희석배수까지 변화하였으나 전체적으로 비슷하였다. 두 가지 방법의 총 일치율은 95.7%, 양성 일치율 96.2%, 음성 일치율은 95.2%이었다. ExiPrep16의 정밀도 평가에서, ADV의 Pool과  $1/10^3$ 희석액의 평균 Ct 값과 변이계수는 평균 19.2 cycle에서 2.1%, 31.6 cycle에서 4.3%이었으며, Flu-A 경우는 22.6 cycle에서 3.1%, 35.5 cycle에서 2.6%이었다. ExiPrep16의 검체 간 오염은 관찰되지 않았다.

**결론:** 비인두플로트스왑(nasopharyngeal flocked swabs; NPFS) 검체를 대상으로 ExiPrep16을 사용한 핵산 추출 방법의 적용은 수기

법인 VGspin과 비교하여 호흡기바이러스 검출에 매우 유용하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2011학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

## REFERENCES

1. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. Clin Microbiol Rev 2008;21:716-47.
2. Lee JH, Shin SR, Cho JH. Evaluation of direct immunofluorescence test with PCR for detection of novel influenza A (H1N1) virus during 2009 pandemic. Yonsei Med J 2011;52:680-2.
3. Chan KH, Yam WC, Pang CM, Chan KM, Lam SY, Lo KF, et al. Comparison of the NucliSens easyMAG and Qiagen BioRobot 9604 nucleic acid extraction systems for detection of RNA and DNA respiratory viruses in nasopharyngeal aspirate samples. J Clin Microbiol 2008;46:2195-9.
4. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 2006;19:165-256.
5. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Schmid KW, Brockmeyer NH, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. J Clin Lab Anal 2007;21:244-8.
6. Beuselinck K, van Ranst M, van Eldere J. Automated extraction of viral-pathogen RNA and DNA for high-throughput quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol 2005;43:5541-6.
7. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol 2005;43:2471-3.
8. Thakur R, Sarma S, Goyal R. Comparison of DNA extraction protocols for *Mycobacterium Tuberculosis* in diagnosis of tuberculous meningitis by real-time polymerase chain reaction. J Glob Infect Dis 2011;3:353-6.
9. Kohdera U, Kino M, Ito M. Detection of adenovirus DNA in throat swabs and blood by SYBR green real-time PCR assay in patients with adenovirus-associated tonsillitis. Jpn J Infect Dis 2006;59:394-6.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline. 2nd ed, EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute,

- 2008.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline. 2nd ed, EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
12. 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.
13. 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.
14. Cho JH, Lee HS, Lee KE, Park DS, Lee YJ, Moon HB, et al. Evaluation of a quantitative RealArt HBV LC PCR assay for hepatitis B virus by real-time PCR. *Korean J Clin Microbiol* 2007;10:25-31.