



Real-Q RV Detection Kit를 이용한 호흡기 감염을 유발하는 바이러스의 동정 성능 평가

Evaluation of the Real-Q RV Detection Kit for the Identification of Viruses That Result in Respiratory Infections

이은엽 · 신새암 · 김미영 · 이영경 · 강희정 · 김현수 · 김재석 · 송원근 · 김한성

Eunyup Lee, M.D., Saeam Shin, M.D., Miyoung Kim, M.D., Young Kyung Lee, M.D., Hee Jung Kang, M.D., Hyun Soo Kim, M.D., Jae-Seok Kim, M.D., Wonkeun Song, M.D., Han-Sung Kim, M.D.

한림대학교성심병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Anyang, Korea

Viral respiratory infections are one of the most common infections worldwide. It is important to detect the virus early and precisely. In this study, we evaluated the limit of detection (LoD) and usefulness of the Real-Q RV Detection kit (BioSewoom, Seoul, Korea). We measured the LoD of the Real-Q RV Detection kit using 10 strains of standard viruses. We then compared the detection results by the Allplex Respiratory Panel Assay kit (Seegene, Seoul, Korea) using 123 clinical specimens. The discrepant results were confirmed by sequencing. Among the 10 standard viruses, the LoD of human rhinovirus (HRV) was the lowest and that of parainfluenza virus 2 and 3 was relatively high as detected by Real-Q RV Detection kit. Agreements of the two kits ranged from 95.9% to 100%. Three specimens detected negative by the Allplex Respiratory Panel kit were detected as adenovirus (AdV) by the Real-Q RV Detection kit and were confirmed by sequencing. Similarly, a specimen detected negative by the Allplex Respiratory Panel kit was detected as HRV by the Real-Q RV Detection kit and was confirmed by sequencing. A specimen detected as human enterovirus by the Allplex Respiratory Panel kit was detected as HRV by the Real-Q RV Detection kit and was confirmed by sequencing. Real-Q RV Detection kit showed good diagnostic performance and can be useful for detecting major viruses that cause respiratory infections.

Key Words: Respiratory virus, Multiplex real-time PCR, Real-Q RV Detection kit

바이러스에 의한 호흡기감염은 세계적으로 가장 흔한 감염성 질환이며 사망을 유발하는 주요 질환 중 하나이다[1, 2]. 그러므로 호흡기감염에서 신속하고 정확한 원인 바이러스의 검출은 이환율과 사망률을 줄이는 데 중요하다[3, 4]. 기존의 바이러스의 검출은 시간과 노력의 소모가 큰 세포배양법, 혹은 민감도가 낮은 항원검

출법 등을 이용하였는데[5], 최근 실시간 다중 PCR (multiplex real time PCR)의 개발로 여러 바이러스를 동시다발적으로 검출할 수 있게 되어 호흡기감염을 일으키는 바이러스를 보다 빠르게 높은 민감도로 진단할 수 있게 되었다[5, 6].

상업화된 실시간 다중 PCR kit 중 하나인 Real-Q RV Detection 15종 kit (BioSewoom, Seoul, Korea)는 기존의 13종 kit를 개량한 것으로 Adenovirus (AdV), Human rhinovirus (HRV), Human coronavirus (CoV) NL63/HKU1, CoV 229E, CoV OC43, Influenza A virus (Flu A), Influenza B virus (Flu B), Parainfluenza virus 1 (PIV 1), PIV 2, PIV 3, Respiratory syncytial virus A (RSVA), Respiratory syncytial virus B (RSVB), Human bocavirus (HBoV), Metapneumovirus (MPV)를 검출할 수 있다.

저자들은 Real-Q RV Detection kit의 바이러스 검출한계를 평가하고, 기존에 허가를 받은 실시간 다중 PCR kit인 Allplex Respiratory Panel Assay kit (Seegene, Seoul, Korea)와의 비교를 통해 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

Corresponding author: Han-Sung Kim <https://orcid.org/0000-0002-5481-5390>

Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, 22 Gwanpyeong-ro 170beon-gil, Dongan-gu, Anyang 14068, Korea

Tel: +82-31-380-3932, Fax: +82-31-380-1798, E-mail: kimhs@hallym.or.kr

Received: January 9, 2018

Revision received: January 29, 2018

Accepted: January 30, 2018

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

© 2019, 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/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Real-Q RV Detection kit의 검출한계를 평가하기 위해 병원성바이러스은행(Korea Bank for Pathogenic viruses, Seoul, Korea)에서 다음의 총 10주의 표준 바이러스를 구매하였다: Adenovirus (KBPV-VR-1), Human betacoronavirus (KBPV-VR-8), Human alphacoronavirus (KBPV-VR-9), Human rhinovirus (KBPV-VR-39), Respiratory syncytial virus A (KBPV-VR-41), Influenza A virus H1N1 (KBPV-VR-33), Influenza B virus (KBPV-VR-34), Parainfluenza virus 1 (KBPV-VR-44), Parainfluenza virus 2 (KBPV-VR-45), Parainfluenza virus 3 (KBPV-VR-46).

2017년 9월부터 10월까지 호흡기검체 바이러스 PCR 검사가 의뢰된 123개의 비인후 도찰물, 객담 등의 호흡기 검체를 대상으로 하였다.

표준바이러스주의 핵산 추출은 QIAamp DSP Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 QIAcube (Qiagen) 장비에서 시행하였다. 임상 검체의 핵산 추출은 STARMag 96 Virus kit (Seegene)를 이용하여, MagNa Pure 96 (Roche, Basel, Switzerland) 장비에서 시행하였다.

각 표준 바이러스에서 추출된 핵산은 RNase free water로 5배 단계희석(5-fold serial dilution)하여 Real-Q RV Detection kit로 제조사 지침에 따라 다중 PCR을 2회 수행하여 2회 모두 양성을 보인 최소 농도의 값을 검출한계로 적용하였다. 임상 검체로부터 추출된 핵산은 Real-Q RV Detection kit와 Allplex Respiratory Panel Assay kit를 이용하여 제조사 지침에 따라 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 실시간 다중 PCR을 시행한 후 각 kit에서의 바이러스 검출 결과를 비교하였다. Allplex Respiratory Panel 1, 2, 3 kit는 AdV, HRV, CoV NL63/HKU1, CoV 229E, Cov OC43, Flu A, Flu B, PIV 1, PIV 2, PIV 3, PIV 4, RSVA, RSVB, HBoV, MPV, Human enterovirus (HEV)의 총 16종의 바이러스를

Table 1. The lowest detected concentration of the 10 reference viruses with the Real-Q RV Detection kit

Viruses	Pathogenic virus Bank No.	Titers (PFU/mL)	The lowest detected concentration (PFU/mL)
AdV	KBPV-VR-1	4.0×10^8	2.56
CoV OC43	KBPV-VR-8	6.1×10^5	4.88
CoV 229E	KBPV-VR-9	1.0×10^5	0.16
HRV	KBPV-VR-39	1.2×10^5	0.008
RSV A	KBPV-VR-41	2.4×10^6	0.154
Flu A	KBPV-VR-33	8.4×10^5	6.72
Flu B	KBPV-VR-34	1.6×10^5	0.256
PIV 1	KBPV-VR-44	3.9×10^5	0.624
PIV 2	KBPV-VR-45	2.0×10^7	160
PIV 3	KBPV-VR-46	1.6×10^6	64

Abbreviations: PFU, plaque-forming unit; AdV, Adenovirus; CoV, Human coronavirus; HRV, Human rhinovirus; RSVA, Respiratory syncytial virus A; Flu A, Influenza A virus; Flu B, Influenza B virus; PIV, Parainfluenza virus.

검출할 수 있는 제품으로, Real-Q RV Detection kit에서 음성 결과를 보인 검체 중 Allplex Respiratory Panel kit에만 포함되어 있는 HEV 혹은 PIV 4에 대해 양성을 보인 검체(HEV 2건, PIV 4 6건)와 Real-Q RV Detection kit에서 HRV, Allplex Respiratory Panel kit에서 HEV 결과를 보인 검체(1건)는 일치율 분석에서 제외하였다.

Real-Q RV Detection kit에서 양성, Allplex Respiratory Panel kit에서 음성을 보인 검체(AdV 3건, HRV 1건), Real-Q RV Detection kit에서 HRV, Allplex Respiratory Panel kit에서 HEV가 검출된 검체(1건)는 염기서열분석(sequencing)을 실시하였다. 반대의 경우는 염기서열분석을 실시하지 않았다. HRV는 5'-untranslated region (UTR)을, AdV는 Hexon gene 부위를 재증폭한 후 해당 염기서열을 분석하였다(Cosmogenetech, Seoul, Korea). 분석한 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) database에 등록된 해당 바이러스의 염기서열과 일치하는지 비교하였다.

총 10주의 표준 바이러스에서 Real-Q RV Detection kit의 가장 낮은 검출 농도를 측정하였다. 표준바이러스 중 HRV의 검출한계가 가장 낮았으며, PIV 2와 PIV 3는 상대적으로 높은 검출한계를 보였다(Table 1).

총 123개의 검체 중 Real-Q RV Detection kit에서 음성 검체는 62개, 양성 검체는 61개였으며, 그중 6개는 두 가지 바이러스가 동시에 검출되었다. Allplex Respiratory Panel kit에서 음성 검체는 52개, 양성 검체는 71개였으며, 그중 5개는 두 가지 바이러스가 동시에 검출되었다. 두 kit 간 일치율은 95.9%에서 100%까지 나타났다(Table 2).

Table 2. Agreements between the results from the Real-Q RV Detection kit and Allplex Respiratory Panel kit

Viral targets	Number of samples				Agreement (%)
	+/+	-/-	+/-	-/+	
AdV	0	118	0	5	95.9
CoV NL63	0	122	1	0	99.2
CoV OC43	1	122	0	0	100.0
HRV	27	91	3	2	95.9
RSVA	4	118	1	0	99.2
RSVB	12	111	0	0	100.0
Flu A	1	121	1	0	99.2
PIV 1	5	116	2	0	98.4
PIV 2	7	115	1	0	99.2
PIV 3	1	122	0	0	100.0

+/+, positive for Allplex Respiratory Panel kit (Seegene, Seoul, Korea) and positive for Real-Q RV Detection kit (BioSewoom, Seoul, Korea); -/-, negative for Allplex Respiratory Panel kit and negative for Real-Q RV Detection kit; +/-, positive for Allplex Respiratory Panel kit and negative for Real-Q RV Detection kit; -/+, negative for Allplex Respiratory Panel kit and positive for Real-Q RV Detection kit.

Abbreviations: AdV, Adenovirus; CoV, Human coronavirus; HRV, Human rhinovirus; RSVA, Respiratory syncytial virus A; RSVB, Respiratory syncytial virus B; Flu A, Influenza A virus; PIV, Parainfluenza virus.

Table 3. Sequencing analysis of the discrepant sample results from the Real-Q RV Detection kit and Allplex Respiratory Panel kit

Patients	Multiplex real time PCR results		Sequencing results	Sequence identity (%)	Compared sequences from the NCBI database (sequence coverage)
1	Real-Q RV Detection kit*	AdV	AdV	98	MF315029.1 (18890-19097)
	Allplex Respiratory Panel kit†	Negative			
2	Real-Q RV Detection kit	AdV	AdV	99	KY471323.1 (18275-18486)
	Allplex Respiratory Panel kit	Negative			
3	Real-Q RV Detection kit	AdV	AdV	98	MF315029.1 (18890-19096)
	Allplex Respiratory Panel kit	Negative			
4	Real-Q RV Detection kit	HRV	HRV	95	KC306837.1 (215-295)
	Allplex Respiratory Panel kit	Negative			
5	Real-Q RV Detection kit	HRV	HRV	92	KF958308.1 (483-570)
	Allplex Respiratory Panel kit	HEV			

Abbreviations: AdV, Adenovirus; HRV, Human rhinovirus; HEV, Human enterovirus.

*Real-Q RV Detection kit (BioSewoom, Seoul, Korea); †Allplex Respiratory Panel kit (Seegene, Seoul, Korea).

두 kit 간 불일치를 보인 검체 중 Real-Q RV Detection kit에서 AdV로 양성, Allplex Respiratory Panel kit에서 음성을 보인 검체(3건)는 염기서열분석 결과 모두 AdV가 확인되었고, Real-Q RV Detection kit에서 HRV로 양성, Allplex Respiratory Panel kit에서 음성을 보인 검체(1건)는 염기서열분석 결과 HRV가 확인되었다. Real-Q RV Detection kit에서 HRV로 양성, Allplex Respiratory Panel kit에서 HEV가 검출된 검체(1건)는 염기서열분석 결과 HRV가 확인되었다(Table 3).

Real-Q RV Detection kit는 HRV에서 가장 낮은 검출한계를 보였으며 PIV 2, PIV 3에서 상대적으로 높은 검출한계를 보였는데, 기존의 연구에서 보고된 AvanSure RV real-time PCR kit (LG Life Sciences, Seoul, Korea)에서도 HRV에서 낮은 검출한계를 보였고, PIV 2에서 상대적으로 높은 검출한계를 보였다[7, 8]. Allplex Respiratory Panel Assay kit에서는 PIV 1에서 낮은 농도의 검출한계를 보였으며 PIV 4와 MPV에서 상대적으로 높은 검출한계를 보였다[9]. Prodesse assays for respiratory viruses (Hologic, San Diego, CA, USA), FilmArray Respiratory Panel (BioFire Diagnostics Inc., Salt Lake City, UT, USA), Verigene RV+ test (Nanosphere, Northbrook, IL, USA)에서는 바이러스 간 검출한계의 큰 차이는 보이지 않았다[10]. xTAG Respiratory Viral Panel (Luminex, Austin, TX, USA)에서는 FluB와 MPV에서 낮은 검출한계를 보였으며, AdV에서 높은 검출한계를 보였다[11]. 이와 같이 여러 다중 PCR kit 간 검출한계 값과 그 양상에 차이를 보이는 이유는 제조사마다 사용하는 표적 유전자와 primer가 다름에 기인할 것으로 추정된다[8, 12].

Real-Q RV Detection kit와 Allplex Respiratory Panel Assay kit의 비교에서 두 kit 간 약 96-100%로 높은 일치율을 보였지만, 그 중 AdV와 HRV에 대해서는 각각 95.9%로 상대적으로 일치율이 낮았다. AdV의 경우 Real-Q RV Detection kit에서만 양성을 보이고 Allplex Respiratory Panel Assay kit에서는 음성을 보인 3건의 검체

에서 모두 AdV의 염기서열을 확인할 수 있었다. HRV의 경우 5건에서 불일치를 보였는데, 이 중 3건은 Real-Q RV Detection kit에서는 음성 결과를 보였고, Allplex Respiratory Panel Assay kit에서만 양성 결과를 보였다. 1건은 Real-Q RV Detection kit에서 양성, Allplex Respiratory Panel Assay kit에서 음성 결과를 보였고 1건은 Real-Q RV Detection kit에서 HRV, Allplex Respiratory Panel Assay kit에서 HEV 결과를 보였다. Real-Q RV Detection kit에서만 HRV가 검출된 검체 2건의 염기서열분석 결과 HRV가 확인되었다. 이전의 연구에서 HRV와 HEV의 5'-UTR이 유사하기 때문에 이에 대해 시행한 PCR에서 교차반응이 있는 것으로 보고되었다[13, 14]. Real-Q RV Detection kit에서 음성을 보이고 Allplex Respiratory Panel Assay kit에서만 양성을 보인 검체는 CoV, RSVA, FluA, PIV 2에서 각각 1건씩 있었으며, PIV 1은 2건 있었다. 이번 연구에서는 Allplex Respiratory Panel Assay kit에서만 검출되고 Real-Q RV Detection kit에서 음성 결과를 보인 검체는 염기서열분석을 시행하지 않았다는 제한점이 있다.

Plasmid를 이용한 연구에 따르면 low-copy 검체에서 불일치율이 더 높게 나타났는데[15], 사용된 호흡기 검체에서의 cycle threshold (Ct) 값이 다양하였기 때문에 위와 같은 불일치 결과를 보인 것으로 설명할 수 있다[16]. 이번 연구에서도 불일치 검체의 Ct 값의 평균은 35, 양성 일치 검체의 Ct 값의 평균은 31로 나와 Ct 값이 높은 경우 불일치율이 높은 경향을 보였다(자료 미제시).

이번 연구에서는 5배 단계 희석하여 검출된 바이러스 중 가장 낮은 희석단계의 농도를 2회만 측정하여 검출한계를 추정하였으므로 충분한 평가가 이루어지지 않았다. 또한 HRV와 RSVB를 제외하고는 양성검체가 부족하여 두 kit 간 일치율을 충분히 반영할 수 없는 제한점이 있었다.

저자들은 Real-Q RV Detection kit의 검출한계를 추정하였고, 기존에 허가된 제품과 상응하는 결과를 보이는 것을 확인하였다.

Real-Q RV Detection kit가 호흡기 바이러스의 검출에 있어서 유용할 것으로 생각한다.

요 약

호흡기바이러스 감염은 세계적으로 가장 흔한 감염성 질환이며 사망을 유발하는 주요 질환 중 하나로 신속하고 정확한 원인바이러스의 검출이 중요하다. 이번 연구에서 실시간 다중 PCR kit인 Real-Q RV Detection kit (BioSewoom, Korea)의 호흡기 바이러스 검출한계와 임상적 유용성을 평가하고자 하였다. 총 10주의 표준 바이러스를 대상으로 하여 Real-Q RV Detection kit의 검출 한계를 측정하였으며, Allplex Respiratory Panel Assay kit (Seegene, Korea)와의 비교를 위해 123개의 비인후 도찰물, 객담 등의 호흡기 검체를 대상으로 하여 제조사의 권고방법대로 검사하였다. 두 kit 간 일치 결과를 보이는 검체는 염기서열 분석을 시행하였다. 표준바이러스 중 Human rhinovirus (HRV)의 검출한계가 가장 낮았으며, Parainfluenza virus 2 (PIV 2)와 Parainfluenza virus 3 (PIV 3)는 상대적으로 높은 검출한계를 보였다. 두 kit 간 일치율은 95.9%에서 100%까지 나타났다. Real-Q RV Detection kit에서 Adenovirus (AdV), Allplex Respiratory Panel kit에서 음성을 보인 검체(3건)는 염기서열분석 결과 모두 AdV가 확인되었고, Real-Q RV Detection kit에서 HRV, Allplex Respiratory Panel kit에서 음성을 보인 검체(1건)는 염기서열분석 결과 HRV가 확인되었다. Real-Q RV Detection kit에서 HRV로 양성, Allplex Respiratory Panel kit에서 Human enterovirus (HEV)가 검출된 검체(1건)는 염기서열분석 결과 HRV가 확인되었다. Real-Q RV Detection kit는 호흡기 바이러스의 검출에 있어서 유용할 것이다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

감사의 글

본 연구는 (주)바이오세움의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

- Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003;289:179-86.
- Lee KH, Gordon A, Foxman B. The role of respiratory viruses in the etiology of bacterial pneumonia: an ecological perspective. *Evol Med Public Health* 2016;95-109.
- Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Deffernez C, Thomas Y, Rochat T, et al. Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1197-203.
- Charles PG. Early diagnosis of lower respiratory tract infections (point-of-care tests). *Curr Opin Pulm Med* 2008;14:176-82.
- Vallières E and Renaud C. Clinical and economical impact of multiplex respiratory virus assays. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013;76:255-61.
- Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:217-49.
- Kim S, Eom KW, Cho CR, Um TH. Comparison of the ability of multiplex and singleplex PCR to detect human respiratory viruses. *Lab Med Online* 2016;6:240-5.
- Rheem I, Park J, Kim TH, Kim JW. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection of respiratory viruses in clinical specimens. *Ann Lab Med* 2012;32:399-406.
- Huh HJ, Kim JY, Kwon HJ, Yun SA, Lee MK, Lee NY, et al. Performance evaluation of Allplex Respiratory Panels 1, 2, and 3 for detection of respiratory viruses and influenza A virus subtypes. *J Clin Microbiol* 2017;55:479-84.
- Butt S, Maceira VP, McCallen ME, Stellrecht KA. Comparison of three commercial RT-PCR systems for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2014;61:406-10.
- Krunic N, Yager TD, Himsworth D, Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R. xTAG RVP assay: analytical and clinical performance. *J Clin Virol* 2007;40:S39-46.
- Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1900-6.
- Jo YA, Kim HS, Lee YK, Kim JS, Song W, Kang HJ, et al. Interpretation of weak-positive bands in a multiplex PCR using Seeplex RV12 ACE detection kit. *J Lab Med Qual Assur* 2011;33:89-93.
- Le SY, Chen JH, Sonenberg N, Maizel JV. Conserved tertiary structure elements in the 5' untranslated region of human enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* 1992;191:858-66.
- Dabisch-Ruthe M, Vollmer T, Adams O, Knabbe C, Dreier J. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, Respi-

- Finder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. BMC Infect Dis 2012; 12:163.
16. Ko DH, Kim HS, Hyun J, Kim HS, Kim JS, Park KU, et al. Comparison of the Luminex xTAG Respiratory Viral Panel Fast v2 Assay with Anyplex II RV16 detection Kit and AdvanSure RV Real-Time RT-PCR Assay for the detection of respiratory viruses. Ann Lab Med 2017;37:408-14.