원저
Lab Med Online
Vol. 9, No. 2: 73-76, April 2019
https://doi.org/10.3343/lmo.2019.9.2.73

임상미생물학 LMO

로타바이러스 검출을 위한 두 가지 면역크로마토그래피법 신속검사의 평가

Performance Evaluation of Two Immunochromatographic Assays for Rotavirus Detection in Stool Specimens

김수경* · 김영진* · 조선영 · 박태성 · 이희주
Suekyeung Kim, M.D.*, Young Jin Kim, M.D.*, Sun Young Cho, M.D., Tae Sung Park, M.D., Hee Joo Lee, M.D.

경희대학교병원 진단검사의학과
Department of Laboratory Medicine, Kyung Hee University Hospital, Kyung Hee University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Rotavirus is a major pathogen causing enteritis worldwide in children under five years of age. In recent years, immunochromatographic assay (ICA) has been widely used as a diagnostic test for rotavirus detection. This study aimed to compare and evaluate the performance of ICA-based rotavirus rapid test kits from two manufacturers.
Methods: Residual stool samples from a total of 130 children with acute enterocolitis from November 2017 to January 2018 were used. We compared the results of the two immunochromatographic methods (SD BIOLINE Rotavirus kit and GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test) with those of the currently used enzyme immunoassay method.
Results: Positive agreement, negative agreement, and total agreement rates between the SD BIOLINE rotavirus kit and the enzyme immunoassay were 98.0%, 100%, and 99.2%, respectively. Positive agreement, negative agreement, and total agreement rates between the GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test and the enzyme immunoassay were 96.0%, 100%, and 98.4%, respectively.
Conclusions: Both rotavirus rapid test kits showed very good agreement with the conventional enzyme immunoassay. Therefore, it could be a useful test to detect rotavirus directly from stool samples in a short time.

Key Words: Rotavirus, Immunochromatography, Enzyme immunoassay

서 론

로타바이러스는 전 세계적으로 5세 이하의 소아에서 장염을 유발하는 주요 원인균 중 하나로, 주로 개발 도상국에서 매해 평균 40만 명의 소아 환자들이 로타바이러스 관련 장염으로 사망하는 것으로 알려져 있다[1, 2]. 로타바이러스는 *Reoviridae*과에 속하며, 3층의 캡시드(capsid)로 구성되어 있는데 이 중 핵심(core)에 바이러스 유전체(genome)를 포함하고 있다[3]. 이 중 바이러스 유전체는 11개의 분절의 이중 가닥 RNA 핵산으로 이루어지며, 6개의 구조 단백(VP1–4, VP6, VP7)과 6개의 비구조 단백(NSP1–NSP6)의 유전정보를 가지고 있다[3]. 구조단백 중 VP6의 항원성에 따라 총 7개 군으로 분류되며 VP4 또는 VP7에 따라 혈청형이 결정된다[1, 4, 5], 이 중 특히 A군 로타바이러스에 의한 인체 감염이 흔하다[6]. 바이러스 감염에 의한 증상 범위는 비교적 넓은 편으로 경증의 경우 일시적으로 경미한 설사를 동반하나, 중증의 경우 발열, 구토, 탈수 증세를 동반하기도 한다[1]. 주로 환자의 대변 검체에서 바이러스를 검출하며 진단을 위한 검사법으로는 면역크로마토그래피법(Immunochromatographic assay, ICA), 효소면역측정법, 라텍스 응집법 등이 전통적으로 사용되어 왔으며, 이 밖에 분자학적인 검출 방법으로 핵산 검출법인 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), real-time PCR도 민감도와 특이도가 높아 바이러스의 검출, 유전형 확인 및 역학 조사 등에 널리 이용되고 있다

Corresponding author: Hee Joo Lee, M.D., Ph.D.
https://orcid.org/0000-0001-8117-5512
Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Kyung Hee University, 23 Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Korea
Tel: +82-2-958-8674, fax: +82-2-958-8609, E-mail: leehejo@khmc.or.kr

*These authors contributed equally to this work.

Received: August 10, 2018
Revision received: October 5, 2018
Accepted: October 5, 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.

[7-9]. 특히 최근 들어 국내 회사를 포함한 다양한 제조사들에서 면역크로마토그래피법을 이용한 신속검사 키트가 출시되어 검사가 시행되고 있으며, 몇몇 연구들에 따르면 각 키트들의 성능이 일부 차이를 보이는 것으로 보고되었다[11]. 따라서 임상 검사실에서는 검사 도입 시 면역크로마토그래피법 키트 간의 진단적 정확도를 평가하는 과정이 필요할 것으로 생각된다. 우리 연구에서는 소아 환자 설사변 검체를 대상으로 국내에서 시판 중인 두 가지 로타바이러스 신속검사인 SD BIOLINE Rotavirus kit (Standard Diagnostics INC, Yongin, Korea)와 GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test (Greencross Medical Science, Yongin, Korea)의 성능을 해당 검사실에서 이용 중인 효소면역측정법과 비교하여 평가하였다.

재료 및 방법

1. 대상

2017년 10월부터 2018년 2월까지 로타바이러스 효소면역측정법 검사가 의뢰된 소아 환자의 설사변 잔여 검체를 이용하였다. 이 연구는 임상연구심의위원회(IRB)의 심의면제를 승인받았다.

2. 효소면역측정법

효소면역측정법 검사에는 RIDASCREEN® Rotavirus (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) 시약과 Gemini (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Germany) 장비를 이용하여 검사하였다. 로타바이러스의 VP6에 대한 단클론항체를 이용한 샌드위치 효소면역측정법을 이용한 검사법으로, 100 μL의 분변 검체를 검체희석액 1 mL와 잘 섞은 후 2회의 반응 및 세척 과정을 거쳤다. 3번째 반응 후 반응 정지액을 첨가하고 450 nm에서의 흡광도를 측정했다. 위의 과정들은 제조사의 지침대로 시행하였다. 잔여 검체는 -70℃에 보관하였다.

3. 면역크로마토그래피법

SD BIOLINE Rotavirus kit (Standard Diagnostics INC)와 GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test (Greencross Medical Science)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라 면역크로마토그래피법 검사를 시행하였다. 바이러스에 대한 마우스 단클론성 항체와 토끼 항로타 바이러스 항체를 이용한 검사로 면봉으로 검사하고자 하는 분변의 서로 다른 4–5개 위치를 찔러 면봉에 50 mg의 분변을 채취하여, 분변을 채취한 면봉을 검체희석액이 들어 있는 검체 채취 용기에 넣은 후 잘 혼합해 바이러스를 추출했다. 이를 검체 점적부위에 3–4 방울을 점적하고, 10–20분 후 결과를 판독하였다. 대조선과 검사선 위치에 모두 밴드가 나타나는 경우 양성으로 판독하였다.

4. PCR

효소면역측정법과 두 가지 면역크로마토그래피법에서 한 가지 검사에서만 양성인 검체의 경우 PCR이 추가로 시행되었다. 효소면역측정법 검사 결과가 음성인 검체도 PCR이 시행되었다. PCR에는 Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene, Seoul, Korea)를 사용하였으며 제조사의 지침대로 검사를 시행하였다.

5. 통계학적 분석

면역크로마토그래피법과 효소면역측정법 검사 결과 간의 양성일치율, 음성일치율, 총 일치율, 카파통계량을 산출하였다. 통계분석에는 SPSS (version 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다.

결 과

연구 기간 동안 RIDASCREEN으로 로타바이러스 항원 검사가 의뢰된 검사 건수는 총 260건이었다. 이 중 양성 검체는 51건, 음성 검체는 209건이었다. 이 중 비교평가에 사용한 검체는 로타바이러스 양성 검체 50개와 PCR에서 음성이 확인된 검체 80개, 총 130개가 사용되었다. 음성 검체 중 PCR 검사를 시행하지 않은 129개의 검체는 제외하였다.

효소면역측정법 결과와 두 가지 신속항원 검사 결과를 비교하여 일치 여부를 확인하였다(Table 1). SD BIOLINE Rotavirus kit와 효소면역측정법의 양성일치율, 음성일치율, 총 일치율, kappa 값은 각각 98.0% (95% CI: 89.4–99.9%), 100% (95% CI: 95.5–100.0%), 99.2%

Table 1. Comparison of rotavirus detection results of SD BIOLINE Rotavirus kit and GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test with those obtained by ELISA

		ELISA		
		Positive	Negative	Total
ICA (SD)	Positive	49	0	49
	Negative	1	80	81
	Total	50	80	
ICA (GENEDIA)	Positive	48	0	48
	Negative	2	80	82
	Total	50	80	

SD, Positive agreement rate: 98.0% (95% confidence interval: 89.4–99.9%); negative agreement rate: 100% (95% confidence interval: 95.5–100.0%); total agreement rate: 99.2% (95% confidence interval: 95.8–99.9%); Kappa coefficient = 0.984 (95% confidence interval: 0.953–1.015).
GENEDIA, Positive agreement rate: 96.0% (95% confidence interval: 85.7–99.8%); negative agreement rate: 100% (95% confidence interval: 95.5–100.0%); total agreement rate: 98.4% (95% confidence interval: 94.6–99.6%); Kappa coefficient = 0.967 (95% confidence interval: 0.922–1.012).
Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ICA, immunochromatographic assay; SD, SD BIOLINE Rotavirus kit; GENEDIA, GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test.

https://doi.org/10.3343/lmo.2019.9.2.73

(95% CI: 95.8–99.9%), 0.984 (95% CI: 0.952–1.000)로 나타났다. 또한 GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test와 효소면역측정법의 양성일치율, 음성일치율, 총 일치율, kappa 값은 각각 96.0% (95% CI: 85.7–99.8%), 100% (95% CI: 95.5–100.0%), 98.4% (95% CI: 94.6–99.6%), 0.967 (95% CI: 0.922–1.000)로 나타났다. 두 제조사의 로타바이러스 신속 검사 키트 모두 기존의 효소면역측정법과 매우 좋은(very good) 일치율[10]을 보였다.

고 찰

A군 로타바이러스는 소아 환자에서 심각한 급성 설사를 유발하는 주요 원인 중의 하나이다[4]. 기존에는 효소면역법이나 라텍스 응집법이 A군 로타바이러스 감염의 진단법으로 널리 사용되어 왔으나 최근에는 20분 내외로 빠르게 결과를 얻을 수 있고 검사법이 간단한 면역크로마토그래피법을 이용한 로타바이러스 신속검사 키트가 다양하게 개발되어 사용되고 있다. 이 연구에서는 두 제조사의 로타바이러스 면역크로마토그래피법 키트와 효소면역측정법 간의 일치율을 평가하였다. 그 결과 효소면역측정법과 두 면역크로마토그래피법 키트(SD BIOLINE Rotavirus kit와 GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test) 간에 양호한 일치도를 보였다.

이 연구에서는 모든 검체를 대상으로 PCR을 시행하지 못하였으므로 PCR 결과를 기준으로 한 민감도를 평가하지 못한 제한점이 있다. PCR 검사의 경우, 높은 민감도와 특이도로 인해 로타바이러스 검출의 표준검사법으로 인식되고 있으며[8, 11-13], 표준 검사법을 RT-PCR로 설정하여 비교한 연구에서, 우리 연구에서 사용된 효소면역측정법 검사인 RIDASCREEN의 민감도는 PCR 검사법과 비교했을 때 82.1–88.9%로 양호한 것으로 평가되었다[2, 14]. 효소면역측정법 양성 검체에 대하여 PCR을 시행하지 않은 이 연구에서는 PCR 결과를 기준으로 한 면역크로마토그래피법의 민감도를 직접 산출할 수 없었으나 우리 연구에서 RIDASCREEN과 높은 일치율을 보인 SD BIOLINE Rotavirus는 77.3–93.57%의 민감도를 보인다고 보고되었다[4, 11]. GENEDIA Rotavirus는 PCR 단독 결과를 기준으로 평가된 민감도는 검색되지 않았고, 효소면역측정법과 PCR 동시 양성 검체를 이용한 연구에서 99.0%의 민감도를 보인 것으로 발표된 연구가 있었다[7]. 그러나 이는 PCR법을 단독 기준검사법으로 이용한 연구보다 민감도가 높게 평가되었을 가능성이 있다.

로타바이러스 항원 효소면역측정법 검사 양성이면서 PCR 음성인 예는 연구에 따라 드물지 않게 발견된다[2, 15]. 기존 연구에 의하면 효소면역측정법 양성인 검체에서 PCR 음성인 경우, 효소면역측정법의 위양성으로 해석할 수 있는 경우는 다른 미생물과의 교차반응성(cross reactivity)이나 비특이적 반응에 의한 것이고, PCR의 위음성으로 해석할 수 있는 경우는 오랜 보관으로 인한 RNA 분해 또는 사용한 프라이머(primer)로 검출할 수 없는 유전자 변이를 가진 바이러스의 경우 등이 보고되었다[15].

Table 2. Two discrepant results between ELISA and ICA

	ELISA	ICA (SD)	ICA (GENEDIA)	PCR
Sample 1	Positive	Negative	Negative	Positive
Sample 2	Positive	Positive	Negative	N/A

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ICA, immunochromatographic assay; SD, SD BIOLINE Rotavirus kit; GENEDIA, GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test; PCR, polymerase chain reaction.

우리 연구에서 효소면역측정법과 두 가지 면역크로마토그래피법 검사 간에 불일치를 보인 경우는 2예가 있었다(Table 2). 2예 모두 면역크로마토그래피법 검사는 1회만 시행하였다. 효소면역측정법 검사에서만 단독 양성 반응을 보이고 두 가지 면역크로마토그래피법에서 모두 음성인 1개의 검체는 PCR 검사를 시행한 결과 양성으로 확인되어 두 면역크로마토그래피법 모두에서 위음성을 보인 것으로 판단하였다. 또 다른 1개 검체의 경우 효소면역측정법과 SD BIOLINE Rotavirus kit에서는 양성 결과를 보였으나, GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test에서만 음성 결과를 보였다. 다만 이 검체의 경우 추가로 PCR을 시행하지 못했다.

기존 보고된 연구에서 면역크로마토그래피법과 효소면역측정법을 비교하였을 때 유사한 민감도와 특이도를 보였고[7, 15], PCR과 비교했을 때는 바이러스 역가에 따라 면역크로마토그래피법이 상대적으로 낮은 민감도를 보이는 것으로 나타났다[8, 11, 17]. 하지만 면역크로마토그래피법 키트의 경우, PCR이나 효소면역측정법과 달리 검사를 위한 추가 장비나 전처리 과정을 필요로 하지 않으며, 실온에서 바로 검사할 수 있기 때문에 적은 노동력으로 신속하게 검사 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다[13, 16].

결과적으로 이 연구에서 평가하였던 두 가지 로타바이러스 면역크로마토그래피법 키트 모두 효소면역측정법과 상당히 높은 일치율을 보였으므로, 기존에 시행되어 온 검사들과 함께 신속한 로타바이러스의 검출에 사용될 수 있는 적합한 검사법으로 생각된다.

요 약

배경: 로타바이러스는 전 세계적으로 5세 이하의 소아에서 장염을 일으키는 주요 병원균이다. 최근에는 로타바이러스 검출을 위한 검사방법으로 면역크로마토그래피법(ICA)이 널리 사용되고 있다. 이 연구의 목적은 두 제조사의 로타바이러스 신속 검사 키트의 성능을 비교 평가하고자 하였다.

방법: 2017년 11월부터 2018년 1월까지 수집된 총 130개의 소아 급성 장염환자의 잔여 분변 검체를 사용했다. 기존에 시행되어 온 효소면역측정법과 면역크로마토그래피법에 기반한 두 개의 로타바

이러스 신속 검사 키트(SD BIOLINE Rotavirus kit와 GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test) 간의 검사 결과를 비교하였다.

결과: SD BIOLINE Rotavirus kit와 효소면역측정법의 양성일치율, 음성일치율, 총 일치율은 각각 98.0%, 100%, 99.2%로 나타났다. GENEDIA Rotavirus Ag Rapid Test와 효소면역측정법의 양성일치율, 음성일치율, 총 일치율은 각각 96.0%, 100%, 98.4%로 나타났다.

결론: 두 제조사의 로타바이러스 신속 검사 키트 모두 기존의 효소면역측정법과 매우 좋은 일치율을 보였다. 따라서 짧은 검사 시간 내에 간편하게 분변 검체에서 직접 로타 바이러스 검출이 가능한 유용한 검사로 생각된다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

1. Pereira LA, Raboni SM, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida SM, Debur MC, et al. Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and impact of immunization on pediatric hospitalization. Braz J Infect Dis 2011;15:215-9.
2. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2012;12:136-41.
3. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. Emerg Infect Dis 1998;4:561-70.
4. Chieochansin T, Vutithanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Evaluation of the rapid test for human rotavirus A in Thai children with acute gastroenteritis. Clin Lab 2014;60:511-4.
5. Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev 1989;53:410-49.
6. Kim J, Kim HS, Kim HS, Kim JS, Song W, Lee KM, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of rotavirus and adenovirus in stool samples. Ann Lab Med 2014;34:216-22.
7. Kim HS, Noh JS, Hyun J, Kim HS, Kim JS, Song W, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the detection of rotavirus. J Lab Med Qual Assur 2013;35:107-14.
8. De Grazia S, Bonura F, Pepe A, Li Muli S, Cappa V, Collura A, et al. Performance analysis of two immunochromatographic assays for the diagnosis of rotavirus infection. J Virol Methods 2017;243:50-4.
9. World Health Organization. Manual of rotavirus detection and characterization methods. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_IVB_08.17_eng.pdf (Updated on Oct 2009).
10. Altman DG, ed. Practical statistics for medical research. 1st ed. London: CRC press, 1990:461-71.
11. Kaplon J, Fremy C, Pillet S, Mendes Martins L, Ambert-Balay K, Aho SL, et al. Diagnostic accuracy of seven commercial assays for rapid detection of group A rotavirus antigens. J Clin Microbiol 2015;53:3670-3.
12. Corcoran MS, van Well GT, van Loo IH. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014;33:1663-73.
13. Khamrin P, Tran DN, Chan-it W, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, et al. Comparison of the rapid methods for screening of group A rotavirus in stool samples. J Trop Pediatr 2011;57:375-7.
14. Gautam R, Lyde F, Esona MD, Quaye O, Bowen MD. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. J Clin Virol 2013;58:292-4.
15. Kim HS and Kim JS. Discrepancies between antigen and polymerase chain reaction tests for the detection of rotavirus and norovirus. Ann Clin Lab Sci 2016;46:282-5.
16. Lee SY, Hong JH, Lee SW, Lee M. Comparisons of latex agglutination, immunochromatography and enzyme immunoassay methods for the detection of rotavirus antigen. Korean J Lab Med 2007;27:437-41.
17. Wolffs PF, Bruggeman CA, van Well GT, van Loo IH. Replacing traditional diagnostics of fecal viral pathogens by a comprehensive panel of real-time PCRs. J Clin Microbiol 2011;49:1926-31.

.

https://doi.org/10.3343/lmo.2019.9.2.73