

한국에서의 2009 신종 인플루엔자 A의 임상양상과 다양한 진단 방법들의 비교

Clinical Characteristics and Comparison of the Various Methods Used for the Diagnosis of the New Influenza A Pandemic in Korea

권민정 · 이창규 · 노경호 · 남명현 · 윤수영 · 임채승 · 조윤정 · 김영기 · 이갑노

Min Jung Kwon, Chang Kyu Lee, Kyoung Ho Roh, Myung Hyun Nam, Soo Young Yoon, Chae Seung Lim, Yun Jung Cho, Young Kee Kim, Kap No Lee

고려대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Laboratory diagnosis of new influenza A (H1N1) is crucial for managing patients and establishing control and prevention measures. We compared the diagnostic accuracies of the real time RT-PCR (rRT-PCR) test recommended for the confirmation of the new flu and the viral culture method used conventionally for viral disease with that of the rapid antigen test (RAT).

Methods: We performed RAT, R-mix culture, and real-time PCR by using 861 respiratory samples collected from December 2009 to January 2010 and evaluated the abilities of these methods to detect new influenza A. The relationship among the positive rates of RAT, grades of culture, and the cycle threshold (Ct) values of rRT-PCR was also evaluated.

Results: Of the 861 patients, 308 (35.8%) were diagnosed with new influenza A. The sensitivities, specificities, positive predictive values, and negative predictive values of the tests were respectively as follows: 59.7%, 99.5%, 98.4%, and 81.6% for RAT; 93.2%, 100%, 100%, and 96.3% for R-mix culture; and 95.8%, 100%, 100%, and 97.7% for rRT-PCR. Samples with weak positive grade in culture and those with Ct values of 30–37 in rRT-PCR showed positivities as low as 25.3% and 2.3% in RAT, respectively. The hospitalization rate and death rate of the confirmed patients were 3.2% and 0.3%, respectively, and gastrointestinal symptoms were observed in 7.2% of the patients.

Conclusions: R-mix culture and rRT-PCR tests showed excellent reliability in the diagnosis of new influenza A and could be very useful, especially for samples with low viral load.

Key Words: New influenza, Rapid antigen test, Culture, Real-time RT-PCR

서 론

인플루엔자는 겨울에서 초봄 사이 전 연령층에 걸쳐 발생하는 전염성이 높은 호흡기 질환으로 지속적인 항원변이를 통해 주기적

Corresponding author: Chang Kyu Lee

Department of Laboratory Medicine, Korea University College of Medicine,

Anam-dong 5-ga, Seongbuk-gu, Seoul 136-705, Korea

Tel: +82-2-920-5784, Fax: +82-2-920-5538

E-mail: cklee@korea.ac.kr

Received: October 1, 2010

Revision received: October 23, 2010

Accepted: October 25, 2010

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.

인 인플루엔자 유행을 일으킨다[1, 2]. 2009년 4월 중순 미국에서 돼지 유래 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스에 의한 사람 감염이 처음으로 확인된 이후 이로 인한 감염자와 사망자가 전 세계적으로 발생함에 따라 2009년 6월 11일 WHO는 공식적으로 21세기 최초의 인플루엔자 대유행을 선언하였다[1]. 국내에서도 9월 이후 환자들이 폭발적으로 증가하여 사회 경제적으로 심각한 문제들을 야기하였다.

인플루엔자 감염은 다른 바이러스나 세균에 의한 호흡기 증상과 감별이 쉽지 않아 임상적인 진단이 어려우며, 유소아, 노인 및 만성질환을 앓고 있는 사람들에게 입원과 사망률을 증가시키는 등 치명적인 결과를 초래할 수 있으므로 검사를 통한 조기 확진이 매우 중요하다[3, 4]. 조기 확진을 통하여 불필요한 검사와 치료를 지양하고 항바이러스제를 신속히 투여하여 임상 증상을 호전시킬 수 있으며 치명적인 합병증을 막을 수 있다. 동시에 빠른 역학조사를 통해 질병의 통제를 기대할 수 있다.

현재 국내에서는 신종 인플루엔자의 유행이 종료되었지만 2010년 8월 WHO의 신종 인플루엔자 현황에 의하면 오스트레일리아, 뉴질랜드, 중국, 가나, 케냐, 타이 등의 국가에서 계절 인플루엔자와 신종 인플루엔자가 함께 유행하는 양상을 보이고 있어 검사실 진단을 위한 방법들의 비교 검토는 매우 중요한 부분이라고 생각된다.

국내와 국외에서 신종 인플루엔자의 진단과 관련된 여러 문헌이 보고되었지만 바이러스 배양과 실시간 중합효소연쇄반응검사(real time RT-PCR, rRT-PCR)를 동시에 시행한 예는 거의 없고, 임상양상을 같이 조사한 논문은 많지 않다.

이에 저자들은 신종 인플루엔자 거점병원을 방문한 환자들을 대상으로 신종 인플루엔자 A (H1N1) 확진환자의 임상적 특징을 살펴보고 신속항원검사, 실시간 중합효소연쇄반응검사 및 바이러스 배양검사를 서로 비교 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2009년 12월부터 2010년 1월까지 서울시에 위치한 한 신종 인플루엔자 거점 병원에서 신종 인플루엔자의 감염이 의심되어 검사를 시행한 환자를 대상으로 하였다. 해당 기간 동안 총 861명의 환자가 연구에 포함되었으며 의무기록을 통하여 성별, 연령 등의 기본적인 인적 사항과 발현 증상, 체온, 환자와의 접촉여부 및 만성질환 병력에 대하여 조사하였다.

2. 검사 방법

모든 대상환자에게 신속항원검사와 실시간 중합효소연쇄반응검사 및 바이러스 배양검사를 시행하였다. 검체는 면봉으로 비인두 가검물을 채취하였다. 하나의 면봉 검체는 외래진료소와 응급실에서 신속항원검사를 위하여 사용되었고, 다른 면봉 검체는 바이러스 배양검사와 실시간 중합효소연쇄반응검사를 위한 것으로 검체 채취 후 Universal transport medium (UTM) 운반배지(Copan, Healthlink, Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH, USA)에 넣은 후 신속히 진단검사의학과 검사실로 운반하였다. 입원한 환자들에서는 비인두 흡인법으로 채취된 검체를 이용하였다.

1) 신속항원검사

SD BIOLINE Influenza Ag (Standard Diagnostics, Inc., Yongin, Korea) 키트를 이용하여 신속항원검사를 시행하였다. 비인두검체 면봉을 시약 내에 포함된 희석액 300 μ L가 담긴 시험관 속에 넣었다. 5회 이상 잘 섞은 후 면봉을 꺼내고 테스트 스트립을 시험관에 담고 제조사의 지침에 따라 15분 후 최종 판정하였다.

2) 바이러스 배양검사

인플루엔자 바이러스 배양을 위해서 R-mix Too (Diagnostic HYBRIDS, OH, USA) 세포를 이용하였고, 선별과 확진을 위해서는 D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID kit (Diagnostic HYBRIDS)를 이용하였다. UTM 배지에 수송된 비인두 검체를 1분간 진탕하고 5분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 접종원으로 사용하였다. -80°C에 보관하였던 R-mix Too 세포주를 37°C 항온수조에서 빠르게 해동시킨 후 planting medium과 함께 24 well plate에서 배양하였다. R-mix cell이 70% 이상 자랐을 때 planting medium을 제거하고 refeed medium 0.5 mL를 첨가한 후, 준비된 검체를 0.2 mL씩 접종하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 24 well plate의 cover-slip에 부착된 세포들을 슬라이드에 옮겨 3-4 방울의 DFA 선별 시약으로 30분 동안 반응시킨 후 200배 배율의 형광현미경에서 밝은 녹색으로 형광 염색된 세포의 유무를 관찰하였다[5, 6]. 전체 현미경 시야에서 양성세포가 5개 미만이면 1+, 시야 당 양성세포가 1-5개이면 2+, 시야 당 양성세포가 6-20개면 3+, 시야 당 20개 이상이면 4+로 판독하였다. 양성으로 나올 경우 인플루엔자 특이 A, 또는 B DFA 시약을 떨어뜨려 바이러스의 종류를 확인하였고 음성으로 나올 경우 보관된 또 다른 well을 24시간 더 배양하여 형광염색과정을 반복한 후 최종 판정하였다.

3) 실시간 중합효소연쇄반응검사

실시간 중합효소연쇄반응검사는 AccuPower New Influenza A (H1N1) Real time RT-PCR Kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)와 Exicycler 96 Real time Quantitative Thermal Block (Bioneer)를 이용하였다. 수송 배지에 운송된 검체를 ExiPrep Viral DNA/RNA Kit (Bioneer)를 이용하여 RNA를 추출하였다. PCR premix가 담긴 well에 IPC 1 μ L와 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수 44 μ L를 넣은 후 추출된 RNA 5 μ L를 첨가하여 총 반응액이 50 μ L가 되게 하였다. PCR 증폭을 위하여 45°C에서 15분간 역전사 반응을 거친 후 95°C에서 5분간 전변성(pre-denaturation) 반응, 95°C에서 5초간 변성 반응, 55°C에서 5초간 결합반응과 연장 반응을 40회 반복하였다. RNA 내부양성대조물질(IPC, Internal positive control)의 증폭산물을 통하여 핵산 추출과 PCR 과정이 적절한지 판단하였고 인플루엔자 A의 기질 단백질 M 유전자와 신종 인플루엔자에 특이적인 혈구응집소 유전자의 증폭 유무에 따라 실시간 중합효소연쇄반응검사의 결과를 분석하였다. 제조사가 권장한대로 FAM 형광(신종 인플루엔자 혈구응집소 유전자)의 cycle threshold (Ct)값이 37 미만이면 FAM 형광의 Δ Rn값이 2,500 이상이고, TAMRA 형광(IPC)의 Ct값이 36 미만이면 TAMRA 형광의 Δ Rn값이 2,000 이상인 것을 신종 인플루엔자 A (H1N1)로 진단하였다.

검사를 시행할 때마다 신종 인플루엔자 양성대조물질과 음성대조 물질이 각각 두 개씩 포함시켰다.

4. 분석

신종 인플루엔자의 최종 확진은 실시간 중합효소연쇄반응검사 또는 배양검사가 양성일 때로 하였다[7]. 확진환자들의 특성은 명목변수의 경우 빈도와 백분율로, 연속변수의 경우 중앙값과 범위로 표현하였다. 검사 방법의 유용성을 평가하기 위하여 3가지 진단 방법들의 민감도, 특이도, 양성예측치, 음성예측치를 구하였다. 아울러 배양 결과의 등급과 실시간 중합효소연쇄반응검사의 Ct값들에 따른 각 검사들의 양성률을 비교하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 특성

인플루엔자 검사를 시행한 환자는 총 861명으로 0세부터 97세까지 전 연령층에 분포하였고 평균 나이는 20.1세(중앙값 10.0세)였으며 성별은 남성 424명(49.2%), 여성 437명(50.8%)이었다. 증상 발생 후 진료소를 방문하기 전까지의 기간은 증상 발생 당일부터 7일까지였고 내원하기까지 평균 1.6일이 소요되었다. 검사자들의 92.1% (793명)는 외래에서 진료를 받았으며, 7.9% (68명)는 병세가 위중하여 외래진료를 거쳐 입원하였거나, 기존 질병으로 인해 이미 입원 중인 환자들이었다.

신종 인플루엔자로 확진된 경우는 총 308명으로 35.8%의 양성률을 보였으며, 외래환자 중의 양성률은 37.6% (298/793), 입원자 중의 양성률은 14.7% (10/68)였다. 이들의 성별 비는 남성 152명 (49.4%), 여성 156명(50.6%)이었다(Table 1). 확진환자의 연령은 0세부터 71세 사이에 분포하였으며 평균 나이는 16세(중앙값 8.5세)이었고 7세 미만이 확진자의 44.8%를 차지하였다. 임상 증상으로는 열감(88.3%)을 가장 많이 호소하였으나 실제로 체온이 37.8℃ 이상으로 측정된 경우는 162명(52.6%)이었다. 그 밖에 기침과 가래(72.1%), 콧물과 코막힘(44.8%), 근육통(39.0%), 인후통(37.7%), 두통(28.6%)의 증상들이 흔하게 나타났으며 소수에서 구토(3.6%), 복통(1.0%), 설사(2.6%)의 소화기계 증상과 호흡곤란(1.3%) 증상을 호소하였다. 6명은 내원 당시 특별한 임상적 증상이 없었음에도 불구하고 신종 인플루엔자 양성으로 확인되었는데 이들은 모두가 가족이나 동료들 중 열이 났거나 신종 인플루엔자로 확진을 받은 사람과 접촉한 후 본인의 요청으로 검사를 시행한 경우였다.

신종 인플루엔자 확진환자 중 고위험군[7]에 속하는 환자들은 28.2% (87/308)였으며, 5세 미만의 소아 74명(85%), 임신부 5명(6%), 만성 신장질환자 4명(4%)과 기타 65세 이상 노인, 만성 간, 폐질환자, 악성 종양환자가 각각 1명씩이었고, 이들 중 7명(8.0%)이 입원

Table 1. Demographic and clinical characteristics of 308 patients with confirmed new influenza A (H1N1)

Variables		Case	
		No.	%
Gender	Male	152	49.4
	Female	156	50.6
Treatment type	Outpatients	298	96.8
	Hospitalized	10	3.2
Underlying condition	Previously healthy	221	71.8
	High-risk group*	87	28.2
Age(yr)	0-7	138	44.8
	8-19	55	17.9
	20-29	58	18.8
	30-39	37	12.0
	40-49	10	3.2
	> 50	10	3.2
Symptoms	Febrile sense	272	88.3
	Cough/sputum	222	72.1
	Rhinorrhea	138	44.8
	Myalgia	120	39.0
	Sore throat	116	37.7
	Headache	88	28.6
	Vomitting	11	3.6
	Abdominal pain	3	1.0
	Diarrhea	8	2.6
	Dyspnea	4	1.3
	No symptom	6	1.9

*High-risk group includes patients with age above 65 yr, age below 5 yr, malignancy, pregnancy, chronic diseases of liver, kidney and lung.

하였다. 고위험군에 속하지 않고 평소 건강하였던 사람이 입원한 경우는 1.4% (3/221)였다. 전체 입원환자 중 9명은 평균 12일간 재원 후 퇴원하였고 나머지 1명은 사망하였다.

2. 진단방법들의 평가

신속항원검사의 경우 861명 중 187명의 환자에서 양성을 보여 21.7%의 양성률을 보였다. 배양검사의 양성률은 33.3% (287/861)이었고, 실시간 중합효소연쇄반응검사는 34.3% (295/861)이었다(Table 2). 신종 인플루엔자 확진환자 308명을 기준으로 하였을 때, 신속항원검사는 184명의 환자에서 인플루엔자 양성반응이 나타나 59.7%의 민감도를 보였으며 특이도, 양성예측치와 음성예측치는 각각 99.5%, 98.4%, 81.6%였다. 바이러스 배양검사에서는 308명 중 287명의 환자에서 신종 인플루엔자로 판정되어 93.2%의 민감도를 보였으며, 특이도와 양성예측치는 100.0%, 음성예측치는 96.3%였다. 실시간 중합효소연쇄반응검사의 경우 민감도, 특이도, 양성예측치와 음성예측치는 각각 95.8%, 100.0%, 100.0%, 97.7%였다.

실시간 중합효소연쇄반응검사와 배양검사가 동시에 양성 또는 음성인 경우는 각각 274 예, 553 예로 서로 96.1%의 일치율을 보였

Table 2. Performance of three tests for new influenza A (H1N1)

		Rapid antigen test		Culture		rRT-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
New influenza A (H1N1) confirmation*	Positive 308	184 (98.4%)	124 (18.4%)	287 (100%)	21 (3.7%)	295 (100%)	13 (2.3%)
	Negative 553	3 (1.6%)	550 (81.6%)	0	553 (96.3%)	0	533 (97.7%)
	Total 861	187	674	287	574	295	566
	Sensitivity	59.7%		93.2%		95.1%	
	Specificity	99.5%		100.0%		100.0%	
	PPV	98.4%		100.0%		100.0%	
	NPV	81.6%		96.2%		97.4%	

*Positive confirmation for new influenza A (H1N1) was made when the specimen was positive in either realtime RT-PCR or culture. Negative confirmation for new influenza A (H1N1) was made when the specimen was negative in both real-time RT-PCR and culture.

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 3. Summary of results from rRT-PCR, R-mix culture and rapid antigen test

Group	rRT-PCR	Culture	RAT	No.	Final interpretation
1	+	+	+	180	All true positive
2	+	+	-	94	False negative in RAT
3	+	-	-	20	False negative in culture and RAT
4	-	+	-	10	False negative in rRT-PCR and RAT
5	-	+	+	3	False negative in rRT-PCR
6	+	-	+	1	False negative in culture
7	-	-	+	3	False positive in RAT
8	-	-	-	550	All true negative

Abbreviations: RAT, rapid antigen test; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

다(Table 3).

실시간 중합효소연쇄반응검사, 배양, RAT 검사법이 모두 양성인거나 음성인 경우는 전체의 84.8% (730/861)를 차지하였다. 서로간에 결과가 일치하지 않는 경우는 모두 15.2% (131/861)였는데 실시간 중합효소연쇄반응검사 과 배양이 동시에 양성인면서 신속항원검사가 음성인 경우가 94예였으며, 실시간 중합효소연쇄반응검사는 양성이었지만 배양과 신속항원검사가 음성인 경우는 20예였다. 배양검사서 인플루엔자 A에 양성이고 실시간 중합효소연쇄반응검사 검사는 음성인 4, 5군은 총 13예였다.

실시간 중합효소연쇄반응검사의 Ct값에 따른 신속항원검사의 양성률은 15-20 구간에서 93.3%, 20-25 구간에서 95.2%이었고, 25-30 구간부터는 현저히 낮은 51.2%, 30-37 구간에서 2.3%로 집계되어 Ct값이 큰 검체에서 낮은 양성률을 보였다(Table 4). 바이러스 배양검사는 실시간 중합효소연쇄반응검사의 Ct값이 25 미만인 구간에서는 100% 양성률을 보였고, 25-30 구간에서 95.3%, 30-37 구간에서 65.9%였다. 실시간 중합효소연쇄반응검사서 자동분석 프로그램의 양성판정기준을 벗어난 3예가 있었는데, 1예는 Ct값 37.74, ΔRn값은 2,199이었고 다른 1예는 Ct값 37.78, ΔRn값은 1,148이었고 나머지 1예는 Ct값 37.49, ΔRn값은 1,448이었다. 그러나

Table 4. Comparison of R-mix culture and rapid antigen test results based on Ct values of rRT-PCR among the confirmed new influenza A patients

Ct values	No.	R-mix culture	Rapid Antigen test
		Positive No. (%)	Positive No. (%)
rRT-PCR 15- <20	15	15 (100.0)	14 (93.3)
20- <25	104	104 (100.0)	99 (95.2)
25- <30	129	123 (95.3)	66 (51.2)
30- <37	44	29 (65.9)	1 (2.3)
37- <38	3*	3 (100.0)	1 (33.3)
Underdetermined	13†	13 (100.0)	3 (23.1)

*The culture test results in this group are composed of two cases of 1+ grade and one case of 2+ grade; †The culture test results in this group are composed of eleven cases of 1+ grade, 2 cases of 1+ grade and 2 cases of 2+ grade.

Table 5. Comparison of rRT-PCR and rapid antigen test results based on the grades of R-mix culture results among the confirmed new influenza A patients

Culture	No.	rRT-PCR	Rapid Antigen test
		Positive No. (%)	Positive No. (%)
Culture grade*	4+	76 (100.0)	70 (92.1)
	3+	92 (97.8)	72 (78.3)
	2+	46 (95.8)	23 (47.9)
	1+	62 (87.3)	18 (25.3)

*There were 21 cases of negative culture results, though not presented in the table. Among these cases, all 21 were positive by rRT-PCR and only 1 tested positive by rapid antigen test.

PCR 증폭곡선을 로그 화면(log view)로 전환하여 살펴보았을 때 형광신호강도의 상승이 신종 인플루엔자 확진환자의 전형적인 증폭곡선과 유사한 패턴을 보였고, 배양검사서 모두 약양성, 신속항원검사서 양성밴드가 나타나 최종적으로 신종 인플루엔자 양성으로 판단하였다. 바이러스 배양검사의 등급에 따른 비교에서 신속항원검사의 양성률은 배양 등급에 일치하는 결과를 보였고 4+ 등급은 92.1%, 3+ 등급은 78.3%, 2+ 등급은 47.9%, 1+ 등급은 25.3%, 음성은 4.8%로 나타나 비례적으로 낮아졌다(Table 5).

고 찰

신종 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스는 북미의 돼지, 사람 및 조류 바이러스와 유라시아의 돼지바이러스에서 유래된 유전자들이 재편성되어 혼합된 신종 바이러스로[8] 인류의 대부분이 이 바이러스에 노출된 적이 없기에 단시간에 전세계적인 대유행을 일으키게 되었다.

신종 인플루엔자의 두드러진 인구학적 특성은 소아와 젊은 성인에서 환자들이 집중적으로 발생하고 있는 점이다[9-11]. 이번 연구에서도 대부분의 확진환자가 40대 미만에 분포하였고 연령의 중앙값이 8.5세였다. 최근 Hancock 등은 1950년대 이전에 출생한 사람들의 경우 1980년 이후에 출생한 사람들에 비해 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대한 교차반응 항체가 발견되는 비율이 8배 이상 높고, 이로 인하여 저연령층의 감염률이 높고 고연령층의 감염률이 낮다고 보고하였으며 그 기전으로 젊은 연령층은 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 노출된 경험이 없어 면역이 형성되지 않았으므로 감염에 취약한 반면, 노령층은 과거에 신종 인플루엔자 바이러스와 유전적, 항원적으로 밀접한 관련이 있는 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스에 감염 또는 백신접종 경로를 통해 노출된 경험이 있어 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대해서도 어느 정도의 방어 면역을 가지고 있기 때문이라고 설명하였다[12].

신종 인플루엔자에서는 위장관 증상이 환자의 10-25%에서 발생하여 계절 인플루엔자와 구별된다고 알려져 있는데[1] 이번 연구에서도 7.2%의 환자에서 복통, 구토, 설사 등의 위장관 증상을 보였다.

신종 인플루엔자의 양성률을 살펴보았을 때 외래환자의 경우 37.6% (298/793)이었지만 고위험군 환자들이 있는 입원환자에서는 그보다 더 낮은 14.7% (10/68)로 나타났다. 이는 기존 입원환자들이 감염 이외에도 여러 가지 요인들로 인해 발열증상이 생길 수 있어, 인플루엔자에 의한 발열과 구분하기 어렵고, 확진자로 밝혀질 경우 치명적인 합병증이 발생할 위험성이 높고, 병원 내의 집단 발병 위험성 때문에 실제적으로 신종 인플루엔자일 가능성이 적은 환자들이 다수 포함되었기 때문으로 생각된다. 양성률이 낮아도 입원환자들에서 신속한 인플루엔자 음성의 결과는 다른 열성 질환과의 감별에 도움을 줄뿐 아니라 불필요한 항바이러스제의 투여를 막을 수 있다.

입원환자들 중 양성으로 확진된 10명의 환자들의 의무기록을 검토하였을 때 7명이 신종 인플루엔자 감염 시 합병증이 발생할 위험이 높은 위험인자를 1개 이상 가지고 있는 것으로 밝혀져 상세가 위중한 입원환자에서 고위험군이 과반수 이상의 높은 비율로 발견되었다고 보고한 기존의 문헌자료와 일치하였다[1, 13]. 이들의 경과를 추적한 결과 9명은 치료 후 퇴원하였지만 1명은 결국 사망하였다.

사망자는 제4형 콩팥요세관 산증으로 진단받은 병력 있는 67세의 남자 환자로 어지러움과 쇠약을 주소로 외래진료를 받던 중, 갑작스럽게 호흡곤란 증상을 호소하여 코삽입관(nasal cannula)을 통해 산소투여를 실시하였으나, 저산소혈증이 호전되지 않아 바로 기관내 삽관 후 중환자실로 옮겨졌다. 이후 소변감소증(oliguria)과 저혈압이 발생하였고, 인공호흡기를 통한 기계적 조절환기(controlled mechanical ventilation)에도 산소포화도는 호전되지 않았다. 응급으로 시행한 가슴 X-선 촬영에서 양쪽 폐아래엽의 혼탁과 함께 다발성 폐렴의 소견이 확인되었고, 급성호흡곤란증후군양상을 띤 폐혈쇼크 진단하에 치료를 시작하였다. 이튿날 환자의 비인두 흡인물에서 시행한 실시간 중합효소연쇄반응검사에서 신종 인플루엔자 양성 결과가 확인되었고, 혈액배양검사에서 폐렴알균이 동정되었다. 결과 확인 후 바로 항바이러스제를 투여하였으나, 환자는 급성호흡곤란증후군에서 호전없이 빠르게 악화되었고, 결국 폐혈쇼크에 의한 다발장기부전으로 사망하였다. 호흡기 바이러스는 세균과 중복감염을 잘 일으키는데, 바이러스에 의한 호흡 상피세포의 파괴가 세균의 유착을 용이하게 한다는 점, 바이러스에 의해 유도된 면역억제상태가 세균의 중복감염을 야기한다는 점, 바이러스 감염에 대한 염증반응이 세균에 대한 수용체를 증가시킨다는 점이 그 원인으로 알려져 있으며, 특히 인플루엔자는 neuraminidase가 있어서 폐렴알균의 유착을 더욱 증가시키는 것으로 보고되어 있다[14, 15].

Flahault [16]는 신종 인플루엔자에서의 급성호흡곤란증후군의 발생률이 계절 인플루엔자에 비해 100-200배 더 높은 것으로 보고하였다. Perez-Padilla 등[13]은 호흡기 합병증이 동반된 신종 인플루엔자 감염 사례에 관하여 조사하였는데 대상환자 모두 흉부 X-선 소견에서 양쪽 폐하엽에서 반점성 폐포성 혼탁(patchy alveolar opacity), 간질성 혼탁이 흔히 관찰되었으며 사망자(대상환자의 38.9%)의 폐조직 검사에서 광범위한 폐포손상, 유리질막(hyaline membrane)의 비후와 섬유아세포의 증식 등이 확인되어, 조직학적으로도 급성호흡곤란증후군에 합당한 소견을 보였다. Perez-Padilla 등[13]은 신종 인플루엔자 감염환자에서 콧물, 두통, 근육통, 열, 호흡곤란 등이 갑자기 시작되었을 때 급성호흡곤란증후군으로 진행되는 경우가 많았으므로 증상의 갑작스런 발현을 신종 인플루엔자의 나쁜 예후인자로 보고하였는데 이번 연구에서 발생한 사망자도 호흡곤란 증상이 갑자기 발병한 후 급성호흡곤란증후군으로 진행한 경우였다. Garske 등[17]의 신종 인플루엔자의 위중도 평가에서 입원율과 사망률을 조사하였는데 미국의 경우 각각 8.9%, 0.57% 캐나다는 9.2%, 0.4%, 영국은 3.4%, 0.12%로 나타났다. 이번 연구에서는 확진자 중 10명이 입원하였는데, 그 중 신종 인플루엔자 감염이 입원의 원인인 경우가 7명이었고 이 중 1명이 사망하였으므로 신종 인플루엔자 바이러스로 인한 입원율과 사

망률은 각각 2.27% (7/308)와 0.3% (1/308)로 집계되었다.

신종 인플루엔자의 진단을 위한 방법들의 평가에서 신속항원검사는 시행 방법이 간편하고 10-15분 만에 결과 확인이 가능하므로 일선 진료현장에서 유용하게 사용할 수 있는 장점이 있는 반면 신종 인플루엔자 A와 계절 인플루엔자 A를 감별하지 못하는 단점이 있다[9]. SD BIOLINE Influenza 신속항원검사는 대부분은 5분 이내에 밴드가 나타났지만 8예는 15분까지 기다린 후 희미한 양성 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 처음에 음성처럼 보이는 경우가더라도 반드시 검사의 지침에 따라 충분한 시간 동안 테스트 스트립이 반응하도록 한 후 최종 결과를 판독하는 것이 중요하다.

최근 여러 종류의 인플루엔자 신속항원검사들이 널리 이용되고 있는데 이들의 정확도를 평가한 문헌 자료에 의하면 이 검사들의 인플루엔자 바이러스에 대한 민감도는 10-90%로 다양하게 보고되었다[9-11, 18, 19]. Yoo 등[20]은 동일한 신속항원검사 시약을 사용하여 인플루엔자를 진단한 연구에서 인플루엔자 A형에 대한 민감도는 61.9%, B형에 대한 민감도는 54.5%로 평가하여 인플루엔자의 형(type)에 따른 민감도의 차이를 보고하였고, Weinberg 등[21]은 계절 인플루엔자 A에 대한 신속항원검사, 셀바이얼 배양 및 전통배양검사의 민감도가 바이러스의 유행연도에 따라 달라지는 현상을 보고하였다. Mackie 등[22]이 현장검사실의 간호사들이 시행한 신속항원검사 결과와 DFA 검사 결과를 비교하였을 때 306예 중 27예의 검체가 불일치하는 결과를 보였는데 검사실 소속 직원이 신속항원검사를 다시 시행한 결과 27예 중 16예의 결과가 DFA 검사와 일치하는 것으로 나타났다. 이번 연구가 진행되던 시기는 신종 인플루엔자에 대한 검사량 증가로 인하여 여러 과에 소속된 의료 인력이 검사에 참여하였기 때문에 검사자에 따른 오차도 있었으리라 생각된다. 한편 Chan 등[19]이 계절 인플루엔자 A와 신종 인플루엔자 A를 대상으로 5종의 신속항원검사를 비교한 연구에 의하면 동일한 바이러스 농도에서 신종 인플루엔자 A (H1N1)와 계절 인플루엔자 A (H1N1)의 양성률은 비슷하다고 보고하였다.

실시간 중합효소연쇄반응검사를 기준으로 하였을 때 신속항원검사의 전체적인 민감도는 61.4%였다. Ct값에 따라 신속항원검사의 양성률을 비교하였을 때 Ct값 25 미만인 검체들은 90% 이상 양성으로 나타났지만 Ct값이 25-30 구간에서는 51.2%, 30-37 구간에서 2.3%의 양성률을 보여 Ct값이 큰 검체에서 신속항원검사의 검출률이 매우 낮게 측정되었다. 이처럼 높은 Ct에서 신속항원검사의 양성률이 급격히 감소하였는데 이는 표적유전자의 기하급수적인 증폭이라는 PCR 검사의 특성이 반영된 것으로 보인다. 배양검사를 기준으로 하였을 때 신속항원검사의 전체적인 민감도는 64.1%로 약간 증가하였지만 통계적 유의성은 없었다. 배양검사를 기준으로 하였을 때 신속항원검사의 양성률은 비례적으로 감소하였다. Daisy 등[23]은 신속항원검사서 양성으로 확인되기 위하

여 100,000개-1,000,000개 이상의 인플루엔자 바이러스 입자가 필요한 반면 R-mix 신속배양의 경우 진단에 필요한 최소 인플루엔자 바이러스의 입자가 10여 개라고 민감도의 차이를 설명하였다.

이번 연구에 사용된 D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID kit (Diagnostic HYBRIDS)검사는 R-mix 세포주를 이용한 신속배양법으로 배양 1-2일 내에 결과의 확인이 가능하기 때문에 5-6일 이상 걸리던 전통배양법에 비하여 결과 보고까지 걸리는 시간이 훨씬 단축되었다[6, 24]. 뿐만 아니라 Barenfanger 등[6]은 R-mix 신속배양법이 호흡기 바이러스의 진단에 있어 전통배양법과 견줄 만한 민감도를 보인 것으로 보고하였으며 George 등[25]은 접종한 지 24시간에서 인플루엔자 A의 검출에 대한 R-mix 신속배양검사의 민감도가 전통적인 배양법에 비해 매우 우수하다고 보고하였다. 2009 H1N1 Influenza Emergency Use Authorization (EUAs)가 제공한 자료에서는 Influenza A/California/07/2009 바이러스를 포함한 4종류의 신종 인플루엔자 바이러스를 여러 배율로 희석하여 접종한 후 D³ Ultra 2009 H1N1 Influenza A virus ID kit와 이번 연구에 사용한 D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID kit 사이에 well 당 검출되는 양성 세포의 수를 비교한 결과 모든 배율의 희석 검체에서 두 키트 사이의 결과가 유사하게 나타났다.

이번 연구에서 배양검사의 민감도, 특이도, 양성예측치, 음성예측치는 매우 우수하였다. 바이러스 배양검사는 배양세포를 이용한 자연 증폭 시스템을 이용하므로 민감도와 특이도가 높은 검사로 바이러스 진단검사의 표준검사로 사용되어 왔다. 따라서 신속항원검사와 실시간 중합효소연쇄반응검사의 정확성을 평가하기 위한 비교 검사로서 유용한 가치가 있다고 생각된다.

실시간 중합효소연쇄반응검사는 이번 신종 인플루엔자의 대유행에서 확진을 위해 권고된 검사의 하나로 결과의 신뢰도가 높고, 한 번에 여러 검체를 동시에 검사할 수 있으며 RNA 추출부터 결과 보고까지 소요되는 시간이 4-5시간으로 짧다. 이번 연구에서 사용된 AccuPower New Influenza A (H1N1) Real-Time RT-PCR kit (Bioneer)는 Exicycler 96 Real-Time Quantitative Thermal Block 장비에 적합하도록 구성된 검사인데 핵산 증폭 반응이 일어날 때 장비의 광학부가 검체에서 나오는 형광을 실시간으로 측정하여 컴퓨터로 전송하면 자동분석 소프트웨어가 양성대조물질과 내부표준물질의 시그널을 평가한 후 이들이 유효(valid)할 경우, 제조사의 지침에 따라 Ct값과 ΔRn값 두 가지 기준으로 결과를 자동 판독한다.

신속항원검사, 바이러스 배양 검사 및 실시간 중합효소연쇄반응 검사에서 결과의 불일치는 보이는 경우는 132예였다(Table 3). 2군에 속하는 94예의 검체들은 실시간 중합효소연쇄반응검사와 배양검사는 모두 양성인데 신속항원검사만 음성으로 나타났다. 이들의 평균 Ct값은 29.0이었는데 Table 5에 의하면 Ct값 30을 경계로 신속항원검사의 민감도가 51.2%에서 2.3%로 급격히 저하함을 볼

수 있다. 배양검사에서도 2군의 평균 배양검사 등급은 2+이었다. 따라서 바이러스 농도가 낮은 검체들에서 신속항원검사가 음성을 보임을 알 수 있었다. 3군의 경우 실시간 중합효소연쇄반응검사 결과만 양성인 경우로 20예의 검체가 이에 속하였는데 평균 Ct값이 32.5로 바이러스 농도가 낮은 검체에서 배양검사와 신속항원검사가 음성으로 나옴을 볼 수 있었다.

4군과 5군은 실시간 중합효소연쇄반응검사는 음성, 배양검사 양성인 그룹으로 13예가 있었는데 이들 중 9예는 배양검사의 등급이 1+ 등급으로 대부분 바이러스 농도가 낮은 검체들이었다. 이 경우 계절 인플루엔자의 가능성을 배제하기 위해 남은 검체를 이용하여 Seeplex FluA ACE Subtyping 시약(Seegene, Seoul, Korea)으로 아형분석을 시행하였고, 다른 실시간 중합효소연쇄반응 시약인 FluA New H1N1 real time Detection (Seegene) 시약을 이용하여 검사하였을 때, 계절 influenza H1, H2, H5에 모두 음성이었고, 신종 influenza A (H1N1)에 모두 양성이었다.

그리고 4, 5군의 배양검사에서 대부분 1+ 양성이었다는 것을 고려할 때, 검체 내에 바이러스 농도가 적은 상태에서 억제인자들로 인하여 최적의 PCR반응이 일어나지 않았을 가능성도 있다[26]. IPC는 실제로 양성이었지만 양성대조보다도 더 낮은 농도로 바이러스가 있거나, IPC반응과 경쟁적인 관계에서 반응이 억제되어 위 음성을 보였을 수도 있다고 생각된다. 그래서 일부 검사자들은 검체에서 보다 예민한 검출을 위해서 IPC를 빼고 증폭하는 경우도 있다[26]. Vandesompele 등은 one step rRT-PCR은 RNA의 역전사와 cDNA의 증폭에 필요한 모든 재료들이 함께 전 처리되어 있기 때문에 노동력 절감과 검체 오염을 줄이는 장점이 있지만 두 가지 반응이 하나의 반응 well에서 일어나므로 각각의 반응에 대한 최적화(optimization)를 분리해서 제공하기 어려운 단점이 있음을 지적하였다[26]. 인플루엔자의 정확한 아형 분석이 어려울 때, 결과가 불일치하거나 위양성의 가능성이 있을 경우 염기 서열 분석을 시행할 수 있다[11].

6군은 3군과 더불어 배양검사가 음성이고 실시간 중합효소연쇄반응검사가 양성이었다. 이들에 속한 21예 검체의 형광증폭곡선을 확인하고 Seeplex FluA ACE Subtyping 키트(Seegene)로 재검한 결과 모두 신종 인플루엔자 양성으로 확인되었다. 7군은 배양과 실시간 중합효소연쇄반응검사는 음성이면서 신속항원검사만 양성 이어서 신속항원검사의 위양성으로 생각되었는데 문헌에 의하면 빌리루빈, 헤모글로빈과 같은 비특이적인 물질이 위양성을 일으킬 수 있는 원인으로 알려져 있다[27, 28].

이번 연구에서 실시간 중합효소연쇄반응검사가 가장 우수한 검사 수행능을 보였지만 낮은 바이러스 농도의 검체들에서는 검사 방법들간의 불일치가 발생함을 알 수 있었다.

대규모의 antigenic drift 혹은 shift가 있을 경우 알려진 염기서열

에 기초한 시발체를 이용한 PCR에서는 검출이 되지 않을 수 있으므로 확인을 위해서는 배양법이 필요하다. 1997년 홍콩에서 발견된 조류 인플루엔자 A도 배양검사에서 먼저 확인되었기에 인체 감염을 일으키는 새로운 아형의 H5N1 바이러스를 규명해 낼 수 있었다[29].

따라서 전반적인 신속성, 정확성, 자동화, 한번에 다량의 검체를 처리할 수 있는 장점 때문에 실시간 중합효소연쇄반응검사가 권장되지만 인플루엔자의 형 별 분류가 어려울 때, 역학적인 감시목적, 백신주의 선택 등의 이유로 바이러스 배양은 여전히 중요한 검사법 중의 하나이다. 또한 인플루엔자와 다른 호흡기 바이러스가 같이 유행하고 있는 경우에는 인플루엔자를 동정하는 실시간 중합효소연쇄반응검사보다는 다른 호흡기 바이러스들을 동시에 검출할 수 있는 배양 검사가 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

빠른 시간 내에 결과를 확인해야 하는 응급실에서는 시행 과정과 결과해석이 간편한 신속항원검사가 여전히 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다. 다만 아직 증상이 명확하지 않은 입원환자들이나 중증 환자들, 감염환자와 접촉자들에 있어서는 바이러스 농도가 낮으리라 생각되므로 이들에서는 실시간 중합효소연쇄반응검사나 배양검사가 보다 유용하리라 생각된다.

요 약

배경: 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 검사실 진단은 환자관리와 유행대책 수립에 매우 중요하다. 연구자들은 확진을 위해서 실시간 중합효소연쇄반응검사와 바이러스 감염질환의 표준검사로 사용되어 왔던 배양검사를 신속항원검사와 함께 비교하였다.

방법: 2009년 12월부터 2010년 1월에 걸쳐 얻어진 총 861예의 호흡기 검체를 이용하여 신속항원검사, R-mix 신속배양검사, 실시간 중합효소연쇄반응검사를 동시에 시행하여 그 성적을 구하였고, 배양결과 등급과 실시간 중합효소연쇄반응검사의 cycle threshold (Ct)값에 따른 신속항원검사 결과와의 관계를 조사하였다.

결과: 861명 중 308명(35.8%)이 신종 인플루엔자 A (H1N1)로 확진되었고, 이용된 검사들의 민감도, 특이도, 양성예측치, 음성예측치는 신속항원검사가 59.7%, 99.5%, 98.4%, 81.6%, R-mix 배양검사가 93.2%, 100%, 100%, 96.3%, 실시간 중합효소연쇄반응검사가 95.8%, 100%, 100%, 97.7%였다. 신속항원검사의 양성률은 배양이 약양성인 경우는 25.3%, 실시간 중합효소연쇄반응검사의 Ct값이 30-37인 경우에는 2.3%로 매우 낮았다. 신종 인플루엔자 확진환자 중 입원율은 3.2%였고, 사망률은 0.3%였고, 위장관 증상은 7.2%에서 관찰되었다.

결론: R-mix 배양검사와 실시간 중합효소연쇄반응검사는 신종 인플루엔자의 진단에 매우 좋은 성적을 보였으며, 특히 낮은 농도의

바이러스 검체에서 유용한 검사였다.

참고문헌

- Kim WJ. Epidemiology, clinical manifestations, and management of pandemic novel influenza A (H1N1). *Korean J Med* 2009;77:157-64.
- Taubenberger JK and Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 2008;3:499-522.
- Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Thompson JM, Tollefson SJ, et al. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis* 2002;185:147-52.
- McBean AM, Babish JD, Warren JL. The impact and cost of influenza in the elderly. *Arch Intern Med* 1993;153:2105-11.
- Treanor JJ. Respiratory infections. In: Richman DD, Whitley RJ, et al. eds. *Clinical Virology*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM press, 2002.
- Barenfanger J, Drake C, Mueller T, Trout T, O'Brien J, Guttman K. R-Mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2001;22:101-10.
- WHO. Human infection with pandemic (H1N1) 2009 virus: updated interim WHO guidance on global surveillance. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/WHO_case_definition_swine_flu_2009_04_29.pdf (Updated on July 2009).
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009;325:197-201.
- Herzum I, Lutz T, Koch F, Geisel R, Gehrt A. Diagnostic performance of rapid influenza antigen assays in patients infected with the new influenza A (H1N1) virus. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:53-6.
- Biggs C, Walsh P, Overmyer CL, Gonzalez D, Feola M, Mordechai E, et al. Performance of influenza rapid antigen testing in influenza in emergency department patients. *Emerg Med J* 2010;27:5-7.
- Hwang YS, Kim KH, Lee MA. Evaluation of the efficacies of rapid antigen test, multiplex PCR, and real-time PCR for the detection of a novel influenza A (H1N1) virus. *Korean J Lab Med* 2010;30:147-52.
- Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, et al. Cross-reactive antibody response to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* 2009;361:1945-52.
- Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamoni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 2009;361:680-9.
- Peltola VT and McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23: S87-97.
- Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:189-95.
- Flahault A. First estimation of direct H1N1pdm virulence: From reported non consolidated data from Mauritius and New Caledonia. *PLoS Curr* 2009;RRN1010.
- Garske T, Legrand J, Donnelly CA, Ward H, Cauchemez S, Fraser C, et al. Assessing the severity of the novel influenza A/H1N1 pandemic. *BMJ* 2009;339:b2840.
- Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009;45:191-5.
- Chan KH, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origin influenza virus (H1N1). *J Clin Virol* 2009;45:205-7.
- Yoo Y, Sohn JW, Park DW, Kim JY, Shin HK, Lee Y, et al. Clinical evaluation of the SD Bioline influenza virus antigen test for rapid detection of influenza viruses A and B in children and adults during the influenza season. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1050-2.
- Weinberg A, Mettenbrink CJ, Ye D, Yang CF. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. *J Clin Virol* 2005; 33:172-5.
- Mackie PL, McCormick EM, Williams C. Evaluation of Binax NOW RSV as an acute point-of-care screening test in a paediatric accident and emergency unit. *Commun Dis Public Health* 2004;7:328-30.
- Daisy JA, Lief FS, Friedman HM. Rapid diagnosis of influenza A infection by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adults. *J Clin Microbiol* 1979;9:688-92.
- Gavin PJ and Thomson RB. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clin Applied Immunol Rev* 2004;4:151-72.
- St George K, Patel NM, Hartwig RA, Scholl DR, Jollick JA, Kauffmann LM, et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol* 2002; 24:107-15.
- Mackay IM. ed. *Real-time PCR in microbiology from diagnosis to characterization*. 1st ed. Norkolk: Caister Academic Press; 2007:101-269.
- Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM. Immunoassay and immunochemistry. In: McPherson RA, Pincus MR, et al. eds. *Henry's clinical*

- diagnosis and management by laboratory methods. 21th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007:812-4.
28. CDC. Interim guidance for the detection of novel influenza A virus using rapid influenza diagnostic tests. http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/rapid_testing.htm (Updated on Aug 2009).
29. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998;351:467-71.