

반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출

계명대학교 의과대학 임상병리학교실

박수진 · 장영우 · 전효진 · 전동석 · 김재룡

= Abstract =

Semiquantitative PCR for Detection of Human Cytomegalovirus

Soo Jin Park, M.D., Young Woo Jang, M.D., Hyo Jin Chun, M.D.,
Dong Seok Jeon, M.D., and Jae Ryong Kim, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine,
Keimyung University, Taegu, Korea

Background : Human cytomegalovirus(HCMV) is one of the major etiologic agents of severe illness and death in immunocompromised patients. Some techniques, such as serology, virus culture, HCMV antigen test and DNA hybridization methods have been developed to detect HCMV infection but there are several drawbacks in them. The polymerase chain reaction(PCR) technique for detecting HCMV DNA, although it promises a high sensitivity, risks the possibility of detecting latent HCMV infection and leading to false-positive results. Thus, we performed semiquantitation of PCR-amplified DNA, so viral load could be assessed by measuring the DNA titer.

Methods : We performed amplification of HCMV DNA using nested PCR and shell vial assay of peripheral blood, urine and BAL from forty-eight transplant recipients or immunocompromised patients. And semiquantitative PCR assay is performed in samples positive for HCMV DNA.

Results : Eighteen(37.5%) of the 48 patients were positive for HCMV DNA in

〈접수 : 1996년 2월 6일〉

〈수정본 접수 : 1996년 5월 6일〉

* 교신저자 : 박 수 진

대구광역시 중구 동산동 194번지 계명대학교 동산의료원
임상병리과 외국실 (전화 : 053-250-7220, 7275)

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출 —

PCR assay, twelve(25.0%) for HCMV in shell vial assay, two(6.4%) of the 31 patients for HCMV IgM antibodies and 26(83.9%) for HCMV IgG antibodies. In semiquantitative PCR, DNA titer in specimens positive for HCMV in shell vial assay were much higher than negative.

Conclusions : We think PCR has the potential to be an effective and reliable procedure for a rapid diagnosis of HCMV infection and a measure of viral load might make it possible to establish the degree of viral burden associated with the development of clinical symptoms (Korean J Clin Pathol 1996;16(4):545~55).

Key Words : Human Cytomegalovirus, Shell vial assay, Nested PCR, Semiquantitative PCR

서 론

인형 거대세포바이러스(human cytomegalovirus, 이하 HCMV이라 함)는 건강인에서는 무증상 내지 경증의 감염을 일으키지만(1) 선천성으로 감염된 영아나 면역체계에 이상이 있는 환자에서는 아주 심한 감염증을 유발한다(2, 3). 신이식환자에서는 HCMV 감염증의 빈도가 60-80%로 매우 높은 것으로 알려져 있으며(4), 일단 HCMV 감염이 발생하면 ganciclovir와 같은 항바이러스 제제가 개발되기 전에는 세포성 면역을 증가시키기 위해 면역억제 요법의 중단과 이때 이식거부반응이 동반되는 경우에는 신절제술까지 시행되기도 하였으나, 최근에는 항바이러스 제제의 투여와 함께 면역억제 요법은 유지시키고 있다(5). 이때, 조기에 항바이러스 요법을 실시하는 것이 효과적이므로 이를 위해서는 신속한 진단이 요구된다(6).

임상적으로 진단된 HCMV 감염의 확진을 위해서는 바이러스 검사가 필요하다. HCMV 감염의 진단검사로는 혈청학적 방법(7)외에 바이러스 배양법(8), 효소결합 면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, 이하 ELISA라 함)를 이용한 바이러스 항원의 검출(9, 10), 면역형광법과 shell vial assay(11, 12) 및 DNA 교합법(13) 등이 있으며 조기진단을 위해서는 검사방법이 신속하고 정확해야 한다.

Shell vial법은 바이러스 배양검사의 일종으로서 원침에 의해 수주세포의 바이러스 감염을 촉진시킨 후 감염된 숙주세포의 핵에서 HCMV 항원을 면역형광항체법으로 검출함으로서 2-3 일 내에 검사가 가능하다. 또

한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR이라 함)은 목표로 하는 DNA 철판만을 특이적으로 증폭할 수 있는 방법으로서 예민도와 특이도가 높은 방법으로 미량의 검체로 신속한 분석이 가능하며 온전한 바이러스 입자 없이 분해된 DNA만으로 검출이 가능한 장점이 있다. 그러나, 건강인에서도 잠복감염의 빈도가 높고 면역억제 상태의 환자에는 HCMV 질환없이 바이러스를 배출할 수 있으므로 PCR에서 HCMV DNA가 검출될 때 긍정 HCMV 질환 뿐만 아니라 잠복감염의 가능성도 있어 바이러스의 정량검사가 필요하다. Cagle 등(14)은 HCMV 감염이 의심되는 환자의 검체로 부터 반정량 PCR을 실시하여 임상 증상의 발현과 연관된 바이러스 양의 정도를 측정하였으며 조기 항바이러스 요법의 가능성을 제시하였다.

이에 본 연구는 HCMV 감염이 의심되는 이식환자 및 면역억제 상태의 환자를 대상으로 PCR과 shell vial 배양법을 실시하여 그 결과를 비교하고, PCR 양성인 검체로 바이러스 양의 정도를 측정하고자 반정량 PCR을 실시하여 진단적 유용성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 환자 검체 및 인형 거대세포바이러스 표준균주

본 연구는 1993년 5월부터 1995년 3월까지 HCMV 감염증이 의심되는 이식환자 및 면역억제 상태의 환자 48명에서 채취된 전혈, 소변 및 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage, 이하 BAL이라 함) 등의 검체를 대상으로 하였으며 Ficoll hypaque density-gradient법으로 단핵구를 분리하여 RPMI 1640 배지

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출 —

에 부유시키고 혈장, 소변 및 BAL 등을 전 처리 없이 실험 전까지 냉동 보관하였다. HCMV 표준균주는 AD 169 바이러스주(ATCC VR-538)를 이용하였으며 MRC-5 세포주(human lung diploid cell line, ATCC CCL-171)에 접종하여 배양한 상층액을 실험에 사용하였다.

2. Shell vial 배양법

Shell vial에 4일간 배양한 단일층의 MRC-5 세포 위에 혈장, BAL 및 450 nm 여과기로 통과시킨 소변을 각각 0.2 mL씩 접종시키고 2,600 rpm에서 45분간 원심 분리하였다. 그 위에 5% FCS와 1% antibiotics-antimycotics을 포함한 Dulbecco's modified Eagle media(D-MEM)와 Hank's balanced salt solution(HBSS) 배지 1 mL씩 분주하고 37°C CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 냉장 보관된 아세톤으로 세포를 고정시키고 단클론성 항HCMV 항체(DAKO사, Denmark)와 fluorescein isocyanate(이하 FITC라 함)로 접합된 항면역글로불린 항체(DAKO사, Denmark)로 간접 면역형광 염색을 하여 감염된 세포의 핵에 형광을 보이는지를 관찰하였다. 배양검사시 양성 대조로는 HCMV AD 169 바이러스를, 음성 대조로는 증류수를 검체 대신에 사용하였다. 이때, 단클론성 항체로는 HCMV immediate early 항원과 early 항원에 각각 반응하는 두 개의 항체를 복합하여 사용하였다.

3. 중합효소연쇄반응을 위한 검체처리 방법

환자의 전혈 5 mL에서 분리한 단핵구와 혈장, 소변

및 BAL 등의 검체를 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였으며 DNA 분리는 검체 1.5 mL로부터 12,000 rpm에서 20분간 원침한 침사를 사용하여 proteinase K-chloroform법[15]을 이용하였으며 정제된 DNA 침사는 증류수에 녹여 검사 전까지 -20°C에 보관하였다.

4. Oligonucleotide primers

각 oligonucleotide primer는 한국 생공(주, 한국)에서 구입하여 사용하였다. HCMV의 immediate early antigen 지배 유전자의 네 번째 exon(EcoRI fragment of AD 169 strain) 영역의 primer로 nested-PCR을 실시하였으며 이때 DNA 증폭이 충분한지를 결정하기 위해서 DRB1 유전자의 세 번째 intron 영역의 primer를 사용하여 내부 대조로 하였다. 각 primer의 영역, 염기 서열 및 PCR 증폭 산물 크기는 Table 1과 같다.

5. 중합효소연쇄반응

PCR은 hot-air capillary thermocycler인 FTC-2000(대한메디칼(주), 한국)을 이용하여 시행하였다. 일차 PCR은 Table 2와 같이 반응 혼합물의 성분과 농도를 조정하여 predenaturation은 94°C에서 10초, annealing은 55°C에서 1초, elongation은 72°C에서 20초의 조건으로 40회 반복한 다음 postelongation은 72°C에서 20초간 실시하였다. 이차 PCR은 일차 PCR 산물을 표적 DNA로 하였고, DNA의 증폭 유무를 확인하기 위해서 내부 대조로 사용한 DRB1 유전자에 대한 PCR도 일차 PCR과 동일한 조건에서 증폭하였다.

PCR 산물의 분석은 1.6% synergel(Diversified

Table 1. Primer used for detection of HCMV and DRB1 gene

Region	Primer	Sequence	Product size
4th exon of HCMV IE gene	Outer primers		242 bp
	P1	5' -TGAGGATAAGCGGGAGATGT	
	P2	5' -ACTGAGGCAAGTTCTGCAGT	146 bp
	Inner primers		
3rd intron of DRB1 gene	Pa	5' -AGCTGCATGATGTGAGCAAG	
	Pb	5' -GAAGGCTGAGTTCTGGTAA	
3rd intron of DRB1 gene	C5	5' -TGCCAAGTGGAGCACCCAA	796 bp
	C3	5' -GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	

Table 2. Component of reaction mixture for capillary PCR

Component	Final conc.	Volume
Master mix		5-9 μ L
Tris HCl	50 mM	
BSA	500 μ g/mL	
MgCl ₂	30 mM	
dNTP	2 mM ea	
Primer	5 μ M ea	
Taq. polymerase	0.5 unit/10 μ L	
Template DNA	0.5 fg	1-5 μ L
Total		10 μ L

Biotech 사, 미국)을 포함한 0.8% agarose gel에서 전기 영동하고 ethidium bromide로 염색하여 특이 증폭 산물의 띠를 관찰한 다음 polaroid 카메라로 촬영하였다.

6. 반정량 중합효소연쇄반응

HCMV PCR 양성인 검체를 대상으로 반정량 PCR 을 시행하였고, DNA 역가를 구하여 shell vial 배양상 양성과 음성으로 분류하여 그 역가를 비교하였다. 이때 내부 대조로서 인형 지놈의 DNA의 *DRB1* 유전자를 선택하여 그 primer를 반응액내 포함시키고, DNA 역가는 검체로부터 분리된 DNA를 10배 계단 회석한 후 PCR을 실시하여 전기영동상 특징 띠를 보이는 최고 회석 배수의 음성 로그로 표현하였다. 이때 회석 용액은 검체의 DNA가 반응 용기 표면에 비특이적으로 부착되는 것을 방지하기 위해 10 ng의 HCMV 음성인 인형

지놈의 DNA를 포함하는 용액을 사용하였다.

7. 혈청학적 검사

항 HCMV IgG와 IgM 항체 검사를 시행하였는데 ELISA법 (Titertek[®])을 이용하여 흡광도차가 0.1 미만 시는 음성으로 0.1과 0.2사이는 재검사를 시행하고 0.2 초과 시는 양성으로 판정하였다.

성 적

1. 중합효소연쇄반응법과 shell vial 배양법의 민감도

PCR검사의 민감도를 측정하기 위해 HCMV 표준균 주로부터 분리된 DNA를 10 ng의 HCMV 음성인 인형 지놈의 DNA를 포함하는 용액으로 10배 계단 회석 하여 nested PCR을 시행한 결과 DNA 10 fg 까지 감지할 수 있었는데 이는 HCMV DNA의 20 copies에 해당한다 (Fig. 1).

또한 shell vial 배양법의 경우에는 표준 HCMV를 배지로 10배 계단 회석하여 상기한 방법으로 배양한 결과는 10^2 회석 (DNA 10 pg, HCMV DNA 2×10^4 copies) 까지 검출되었다.

2. 임상 검체내 HCMV 검색

Nested PCR 검사에서 양성인 환자는 48례 중 18례 (37.5%)였으며 검체별로 보면 소변에서는 30.6%, 전혈에서 분리한 단핵구는 8.0%, BAL은 50% 그리고 혈장에서는 한 예에서도 검출되지 않았다. Shell vial 법에 양성인 환자는 12례 (25.0%)였으며 이 중 한명을 제외한 모든 환자에서 PCR 양성을 보았다 (Table 3, 4).

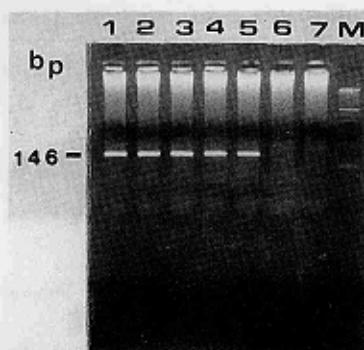


Fig. 1. Sensitivity of PCR detection of HCMV DNA from MRC-5 cell culture supernatant. Lane 1 through 6 indicates HCMV DNA concentration of 100, 10, 1 pg, 100, 10, 1 fg per lane in agarose gel electrophoresis. Lane 7: negative control, lane M: size marker.

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출 —

Table 3. Comparison of HCMV-PCR with shell vial culture

HCMV-PCR	HCMV culture	
	Positive	Negative
Positive	11*	7
Negative	1	29
Total	12	36

*: Number of patients

Table 4. Number of positive results in HCMV-PCR and Shell vial culture

Samples	HCMV-PCR		Shell vial culture	
	Total	Positive	Total	Positive
lymphocyte	25*	2(8.0)	ND [†]	ND
urine	49	15(30.6)	50	11(22.0)
plasma	40	0(0)	43	1(2.3)
BAL	2	1(50.0)	2	0(0)
Total	116	18	95	12

*: Number of specimens

[†]ND: not done

Numbers of parentheses are percents.

Table 5. Comparison of HCMV-PCR with serology

HCMV-PCR	HCMV IgM antibodies			HCMV IgG antibodies		
	Positive	Negative	ND [†]	Positive	Negative	ND
Positive	0	7	11	5	2	11
Negative	2*	22	6	21	3	6
Total	2	29	17	26	5	17

*: Number of patients

[†]ND: not done

3. 반정량 중합효소연쇄반응

HCMV PCR 양성인 18례를 대상으로 반정량 PCR 을 실시하여 전기영동 상에서 특정 띠를 보이는 최고 회식 배수의 음성 로그로 표현한 DNA 역가는 0에서 4

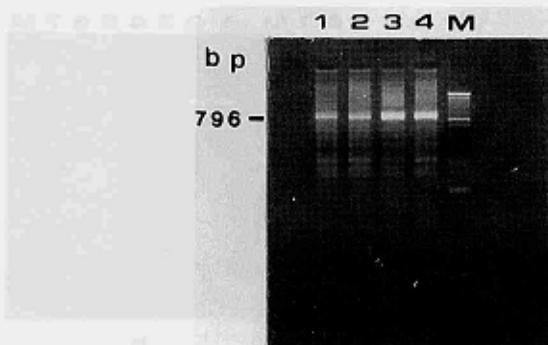
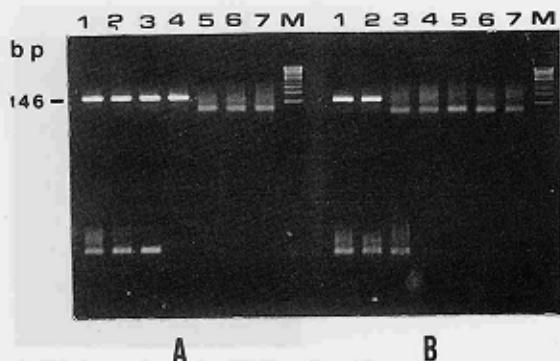


Fig. 2. PCR detection of HLA DRB1 genes as internal control. Lane 1 to 4: 796 bp PCR products from HCMV-negative human genomic DNA. Lane M: size marker.

의 범위로 나타났고, 이때 DNA 증폭 유무를 확인하기 위해 내부 대조로 사용한 DRB1 유전자의 증폭을 확인하였다(Fig. 2). Shell vial 배양상 양성인 11개의 검체에서는 DNA 역가가 '1에서 4'의 범위로 나타났고, 음성인 7개의 검체에서는 회색하지 않은 상태에서만 양성으로 DNA 역가가 '0'으로 나타났다 (Fig. 3, 4, 5).

4. 혈청학적 검사

혈청학적 검사를 실시한 31명의 환자 중에서 항 HCMV-IgM 항체에서 양성을 보인 예는 2명(6.5%)이었고, 항 HCMV-IgG 항체 양성은 26명(83.9%)이었다(Table 5).



A B

Fig. 3. Semiquantitative PCR of HCMV DNA from urine specimens positive by both nested PCR assay and shell vial culture(A and B). Lane 1 through 7 indicates negative log value of dilution factor(seriously diluted urine DNA from 10^1 to 10^7). The DNA "titer" is expressed as the negative log of the highest dilution that produces a specific band detectable by ethidium bromide staining on an agarose gel. Lane M does size marker.

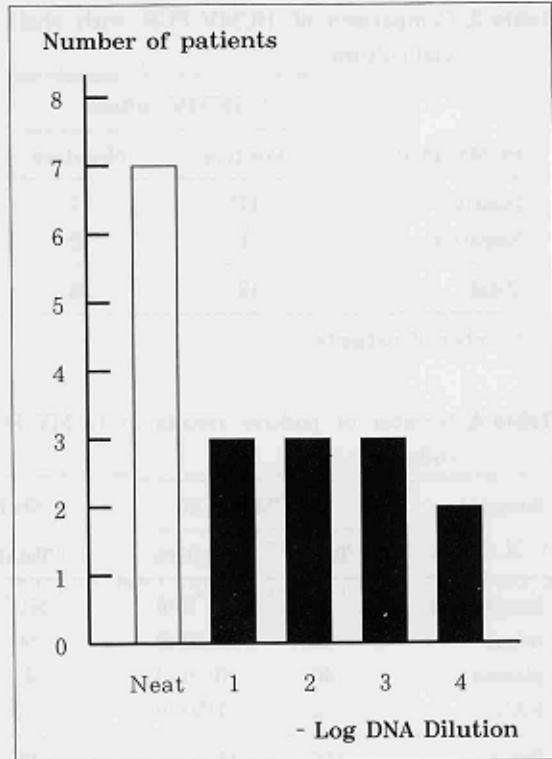


Fig. 5. Number of patients according to DNA titer (- log DNA dilution) of PCR-amplified CMV DNA from specimens negative(□) or positive(■) by shell vial assay.

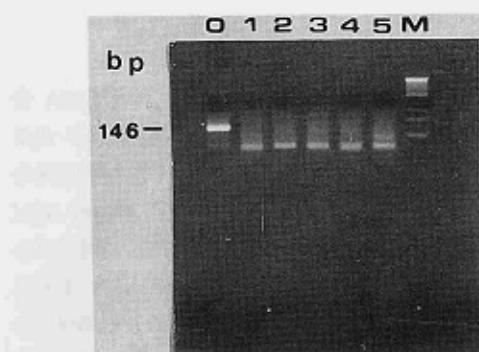


Fig. 4. Semiquantitative PCR of HCMV DNA from urine specimen positive by nested PCR assay but negative by shell vial culture. Lane 0 indicates undiluted urine DNA and lane 1 through 5 does negative log value of dilution factor(seriously diluted urine DNA from 10^1 to 10^5). The DNA "titer" is described in Fig. 3. Lane M does size marker.

고 찰

HCMV 감염은 장기이식 환자에서 이식 거부 반응과 함께 이식의 성공을 제한하는 중요한 요인이다. HCMV 질병은 임상적으로는 발열, 백혈구감소증, 혈소판감소증, 폐렴, 간염 및 이식 조직의 기능 저하 등의 소견이 있을 때 의심되며, 이때 검사 소견이 확진에 도움이 된다. 특히 장기이식 환자의 HCMV 감염은 효과적인 치료를 위해서는 조기 진단이 중요하므로 신속하고 정확한 HCMV 검사가 필요하다. HCMV 감염의 진단검사로는 혈청학적 방법(7)외에 바이러스 배양법(8), 효소결합 면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, 이하 ELISA라 함)를 이용한 바이러스 항원의 검출(9, 10), 면역형광법과 shell vial

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인체거대세포바이러스 검출 —

assay[11, 12] 및 DNA 교접법[13] 등이 있다.

혈청학적 검사는 환자의 혈청내의 항 HCMV 항체를 검출하는 방법으로서 ELISA법과 latex 응집법을 예로 들 수 있으며 검사 방법이 간편한 장점이 있으나 다음과 같은 문제점이 있다. 1) 비특이적인 반응으로 인한 위양성의 가능성성이 있고, 2) HCMV 항체를 검출하기 위해 서로 다른 항원을 사용하므로 검사법에 따라서 그 결과가 상이할 수 있는데 이는 환자가 가진 HCMV 항체가 시약에 포함된 HCMV 항원과 서로 반응하지 않아 위음성의 결과가 초래될 수 있으며 또한 환자의 항원 상태를 반영하지 못한다는 점 등이다[16]. 3) 면역 반응의 생리적 자연으로 초기 진단이 어렵고, 4) IgG 항체는 일차 감염 후 생성되어 평생 지속되고 급성 질환의 임상증상 없이 나타날 수 있으므로 진단적인 가치가 없으며, IgM 항체는 면역적격 상태의 환자에서는 최근의 감염을 시사하는 유용한 검사이지만 면역억제 상태의 환자에서는 면역 반응의 저하로 인해 항체 생성이 안될 경우가 있으며 재발 감염에서도 IgM 반응이 있을 수 있어서 그 진단적인 유용성이 떨어진다[17]. 또한 임상 증상이 있고 난 후에 항체 반응이 있으므로 임상 증상에 선행하여 양성의 결과를 나타내는 PCR법이나 바이러스 배양법에 의해 HCMV 감염의 초기 진단법으로는 혈청학적 검사가 부적합하다. Smith 등 [16]의 보고에 따르면 86명의 건강한 현혈자를 대상으로 HCMV 항체검사, 바이러스 배양검사 및 PCR을 실시한 결과 HCMV 항체의 양성을 86%이며 HCMV DNA에서는 8%의 양성을 보였으나, 바이러스 배양 검사에서는 한 명의 현혈자에서도 HCMV는 검출되지 않았다. Krech 등[18]의 보고에 따르면 서구사회 성인의 45-70%에서, 제 3세계 성인의 거의 100%에서 항체 양성을 보인다. 본 연구에서는 항체 검사를 시행한 31명의 환자 중에서 IgM은 2명 (6.5%) 그리고 IgG는 26명 (83.9%)에서 양성으로 나타났는데, 일반적으로 일차 감염 후 8주에서 12주 사이에 항체 반응이 있으나 저자들은 장기간의 추적 검사를 실시하지 않았고 이식 환자 및 면역억제 상태의 환자를 대상으로 하였으며 항체 양성을 높은 지역이므로 혈청학적 검사의 유용성이 떨어져서 그 결과와 PCR법이나 shell vial 배양법의 결과 사이에는 상관관계가 없는 것으로 보인다.

HCMV 감염증의 직접적인 진단법으로는 임상검체로부터 바이러스 항원이나 DNA를 검출하는 방법과 바이

러스 배양법이 있는데, 바이러스 배양법은 기준이 되는 방법이지만 시간과 비용이 많이 들어 용이하게 이용되지 못하고 있으나, shell vial법과 항원 검색법의 개발로 검사 소요 시간이 많이 단축되었다[19]. 항원 검사법은 단시간내 검사는 되지만 예민도가 바이러스 배양법보다 떨어지며, DNA 재조합법은 정확하지만 검사 절차가 복잡하여 임상적으로 활발히 이용되지 못하고 있으나 최근에 PCR법이 비교적 신속하고 예민도와 특이도가 높아서 임상적으로 유용성이 높은 방법으로 평가되고 있다. PCR에 의한 HCMV DNA 검출은 이미 선천성으로 감염된 영아의 소변[20], 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, 이하 HIV이라 함)에 감염된 환자의 말초 혈액[21], 신장과 풀수 이식 환자의 말초 혈액, 소변, 타액, 신장 및 폐조직[22] 등에서 보고되었다.

Shibata 등[21]의 보고에 따르면 HCMV DNA의 양성을 바이러스 배양검사의 양성을보다 더 높게 나타났으며 바이러스 배양검사에서 양성인 모든 검체는 PCR에서 양성으로 나타나 PCR법이 더 예민한 방법임이 증명되었고, 면역결핍 상태와 PCR에서 HCMV DNA의 양성사이에는 직접적인 연관성이 있는 것으로 나타났다. Smith 등[16]의 보고에서도 PCR법이 바이러스 배양법보다 더 예민한 방법임이 증명되었고, Rowley 등[23]의 보고에서는 28명의 신이식환자를 대상으로 6개월동안 HCMV PCR, HCMV 항체검사와 바이러스 배양법을 실시하여 각 검사에서 양성으로 나타나는 시기는 환자마다 달랐고 대부분의 경우에 PCR이 가장 먼저 양성으로 나타났는데, PCR법에 의한 HCMV DNA의 검출과 세포배양법에 의한 바이러스의 검출사이에는 상관관계가 있었으며 PCR이 세포배양법보다 더 예민한 것으로 나타났다. 또한 van Dorp 등[19]의 보고에 따르면 바이러스 혈증이 HCMV 감염의 초기에 나타났고 소변에 바이러스의 출현은 감염 후기에 나타났으며 PCR과 다른 검사법사이에는 상관관계가 있었다고 한다.

본 연구에서는 48명의 이식환자 및 면역체계에 이상이 있는 환자를 대상으로 말초혈액, 소변 및 BAL 등의 검체를 이용하여 바이러스 배양검사로는 shell vial법을 실시하였고, HCMV DNA 검사로는 nested-PCR법을 실시하여 그 결과를 서로 비교하였다. Nested PCR는 HCMV DNA 20 copies에 해당하는 10 fg의 DNA까

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출 —

지 검출할 수 있는 예민도를 보였는데 이는 다른 보고 [24]와 일치하고 있다. Shell vial법에 의한 HCMV 배양검사를 실시하여 25.0%의 양성을 보였고, 또한 PCR에서는 37.5%의 양성을 보여 PCR 검사가 보다 예민한 것으로 확인되었다.

Shell vial 법의 양성을 PCR법보다 낮은 이유는 1) HCMV 배양 검사에서 사용한 단클론성 항체의 특이성이 제한되어 모든 HCMV를 검출하지 못하며, 2) 예민도의 제한점으로 인하여 검체내 바이러스 양이 적은 경우에 배양법으로 검출이 안 될 가능성이 있으며 [21] 검체의 보관 상태나 처리 과정에서 바이러스 감염성의 감소가 있을 수 있다고 한다. 또한 Spector 등 [25]은 예민도에 있어서 바이러스 배양법이 DNA 교접법보다 떨어진다고 하였으며 shell vial 배양법에서 여러개의 단클론성 항체를 복합하여 사용하면 배양법의 예민도를 높일 수 있다고 한다[26]. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 HCMV immediate early 항원과 early 항원에 각각 반응하는 두 개의 항체를 동시에 사용하였다. PCR은 매우 민감한 방법으로 위양성이 문제가 되므로 검체간에 오염의 기회를 줄이기 위해 검체 채취의 방법, DNA 추출 및 PCR의 준비시에 세심한 주의를 기울였고, 위음성을 배제하기 위해 내부 대조를 사용하였다. 또한 우리나라와 같이 HCMV 항체보유율이 높은 지역에서는 초감염보다는 잠복 바이러스의 재활성에 의한 재감염이 문제가 될 것으로 생각되며, 급성 감염과 잠복감염을 감별하기 위해서는 바이러스의 정량검사가 필요하다고 생각된다.

Cagle 등[14]은 두 명의 폐 이식환자에서 이식 후 수 일마다 채취한 BAL 검체로 반정량 PCR을 시행하여 DNA 역가를 측정하였고 그 증가가 HCMV 감염의 임상증상과 바이러스 배양법, 세포학적 검사 및 조직학적 검사 등의 진단법에 선행함을 관찰하였으며 잠복감염때문에 PCR 양성 또는 음성의 결과만으로는 항바이러스 치료의 여부를 결정할 수 없다고 하였다. 혈액이나 소변 등의 검체로 PCR을 시행하여 HCMV DNA 가 검출되었을 때 급성 질환뿐만 아니라 잠복 감염의 가능성도 있으므로, Chen 등[27]은 신장 조직으로 HCMV PCR을 실시하여 양성을 보인 경우 급성 질환을 시사하며 조직학적인 검사에 비해 더 민감하고 객관적인 방법이라고 하였다. Shibata 등[28]은 풀수이식 환자의 폐조직으로 정량 PCR을 실시하여 HCMV에

의한 폐렴과 HCMV 양성이지만 다른 원인에 의한 폐렴을 구분하였다.

이에 본 연구에서는 PCR 양성인 검체를 대상으로 바이러스 양의 정도를 알아보고자 반정량 PCR을 실시하여 증폭 산물이 관찰되는 최고 회석 배수의 음성 로그로 표현한 DNA 역가는 '1-4', shell vial법상 음성인 검체에서는 회석하지 않은 경우에만 양성으로 DNA 역가는 '0'으로 나타났다. 따라서 PCR 검사에서 양성인 예 중에는 잠복 감염의 경우도 있을 것으로 사료되지만, 본 연구에서는 동일한 환자에서 장기간의 추적 검사를 실시하지 않았으므로 정확한 것은 알 수 없었으며, 향후 이에 대한 보완적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 PCR이 예민하고 신속한 방법이므로 HCMV 감염증을 조기에 진단하는데 유용한 것으로 보이며, PCR 양성인 경우에 반정량 PCR을 실시함으로써 임상 증상의 발현과 연관된 바이러스의 양의 정도를 알 수 있고, 항바이러스 제제의 조기 투여 및 치료 효과의 판정과, 잠복 또는 재활성 HCMV 감염을 감시하는데 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

배경 : 인형 거대세포바이러스(human cytomegalovirus, 이하 HCMV이라 함)는 면역이 억제된 환자에서 기회 감염을 유발하는 바이러스로서 HCMV 감염증은 특히 장기이식 환자 및 암환자에서는 중요한 감염병 중의 하나이다. HCMV 감염의 진단 방법으로는 혈청학적 검사, 바이러스 배양법, 항원 검사법 및 DNA 교접법 등이 개발되어 있으나 여러 가지 제한들이 있어 널리 이용되지 못하고 있다. 최근에는 PCR법이 많이 이용되고 있으나 HCMV 잠복 감염의 빈도가 높으므로 본 연구에서는 임상 증상의 발현과 연관된 바이러스 양의 정도를 평가하기 위하여 반정량 PCR을 실시하였다.

방법 : HCMV 감염이 의심되는 48명의 환자를 대상으로 전혈에서 분리한 단핵구, 혈장, 소변 및 BAL 등을 검체로 하여 shell vial 배양법, nested PCR, 반정량 PCR 및 HCMV 항체 검사를 시행하여 그 결과를 비교하였고, 양성 바이러스 대조로 AD169 HCMV 바

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인형거대세포바이러스 검출 —

이러스주를 사용하고, Immediate early gene에 대한 2쌍의 primer를 이용한 PCR 증폭 산물의 크기는 146bp이었다.

결과 : Nested PCR법의 예민도는 HCMV DNA 20 copies에 해당하는 DNA 10fg이었고, shell vial법으로는 표준 HCMV 바이러스 10^2 화석까지 검출되었다. 반정량 PCR을 실시하여 shell vial 양성인 검체의 DNA 역가가 음성인 검체의 DNA 역가보다 높게 나타났으며, 48명의 환자에서 HCMV 검출율을 살펴보면 PCR에서는 18명(37.5%), shell vial 배양법에서는 12명(25.0%), 항 HCMV IgM 항체 검사에서 31명 중 2명(6.4%)과 항 HCMV IgG 항체 검사에서는 31명 중 26명(83.9%)이 양성으로 나타났고, shell vial 법에서 양성을 보인 환자 중에 한 명을 제외한 모든 환자는 PCR에서 양성을 보였다.

결론 : 본 실험의 결과를 통하여 HCMV 감염증을 진단하는데 PCR법이 다른 진단 방법보다 더 민감하며 신속한 방법임이 확인되었고 반정량 PCR을 실시하여 검체내의 바이러스 양의 정도를 알 수 있었으며, 앞으로 명백한 임상 질환이 발병하기 전에 항바이러스 제제의 투여를 가능하게 하며 HCMV 감염의 경과 추적 및 항바이러스요법의 효과를 판정하는데 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Kinney JS, Onorato IM, Stewart JA, Pass RF, Stagno S, Cheeseman SH, et al. Cytomegaloviral infection and disease. *J Infec Dis* 1985;151:772-4.
- Pass RF, Stagno S, Britt WJ, Alford CA. Specific cell mediated immunity and the natural history of congenital infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1983;148:953-61.
- Jorda MC. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev Infect Dis* 1983;5: 205-15.
- Betts RF, Hanshaw JB. Cytomegalovirus in the compromised host(s). *Ann Rev Med* 1977;28:103-10.
- Burns KD, Johnson-Whittaker L, Couture RA, Eidus L, Garber G. Successful treatment of renal allograft rejection in the presence of cytomegalovirus disease. *Am J Nephrol* 1990;10:162-6.
- Collaborative DHPG treatment Study Group. Treatment of serious cytomegalovirus infection with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine in patients with AIDS and other immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1986;308:801-5.
- Booth JC, Hannington G, Bakir TM, Stern H, Kangro H, Griffiths PD, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive hemagglutination techniques for detection cytomegalovirus IgG antibody. *J Clin Path* 1982;355:1345-51.
- Crawford SW, Bowden RA, Hachman RX, Gleaves CA, Meyers JD, Clark JG. Rapid detection of cytomegalovirus pulmonary infection by bronchoalveolar lavage and centrifugation culture. *Ann Intern Med* 1988;180:180-5.
- Mccheating JA, Stange S, Stick PR, Griffith PD. Detection of cytomegalovirus in urine samples by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol Methods* 1985;16:367-73.
- Pronovost AD, Baumgarten A, Andiman WA. Chemiluminescent immuno-enzymatic assay for rapid diagnosis of viral infections. *J Clin Microbiol* 1982;16:345-9.
- Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984;19: 917-9.

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인체기대세포바이러스 검출 —

12. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;21:217-21.
13. Chou S, Merigan TC. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N Engl J Med* 1983;308:921-5.
14. Cagle PT, Buffone G, Holland VA, Samo T, Demmler GJ, Noon GP, et al. Semiquantitative measurement of cytomegalovirus DNA in lung and heart-lung transplant patients by in vitro DNA amplification. *Chest* 1992;101:93-96.
15. Chan VT-W. Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. In: Herington CS, McGee JO'D, eds. Diagnostic Molecular pathology: A practical approach. vol II. 1st ed. 1. Oxford: IRL Press, 1992:1-24.
16. Smith KL, Kulski JK, Cobain T, Dunstan RA. Detection of cytomegalovirus in blood donor by the polymerase chain reaction. *Transfusion* 1993;33:497-503.
17. Pass RF, Griffiths PD, August AM. Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections. *J Infect Dis* 1983;147:40-6.
18. Krech UT, Tobin J. A collaborative study of cytomegalovirus antibodies in mothers and children in 19 countries. *Bull WHO* 1981;59:605-10.
19. van Dorp WT, Vlieger A, Jiwa NM, van Es LA, van der Ploeg M, van Saase JLCM, et al. The polymerase chain reaction, a sensitive and rapid technique for detecting cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Transplantation* 1992;54:661-4.
20. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;158:1177-84.
21. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnhem M. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988;158:1185-92.
22. Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1989;48:72-6.
23. Rowley AH, Wolinsky SM, Sambol SP, Barkholt L, Ehrnst A, Andersson JP. Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by in vitro enzymatic amplification. *Transplantation* 1991;51:1028-33.
24. Ishigaki S, Takeda M, Kura T, Ban N, Saitoh T, Sakamaki S, et al. Cytomegalovirus DNA in the sera of patients with cytomegalovirus pneumonia. *Br J Hem* 1991;79:198-204.
25. Spector SA, Rua JA, Spector DH, McMillan R. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *J Infect Dis* 1984;150:121-6.
26. Chou SW, Scott KM. Rapid quantitation of cytomegalovirus and assay of neutralizing antibody by using monoclonal antibody to the major immediate-early viral protein. *J Clin Microbiol* 1988;26:504-7.
27. Chen YT, Mercer GO, Cheigh JS, Mouradian JA. Cytomegalovirus infection of renal allografts. *Transplantation* 1992;53:99-102.
28. Shibata M, Terashima M, Kimura H,

— 박수진 외 4인 : 반정량 중합효소연쇄반응에 의한 인체거대세포바이러스 검출 —

Kuzushima K, Yoshida J, Horibe K, et al. Quantitation of Cytomegalovirus DNA in lung tissue of bone marrow transplant recipients. Human pathology 1992;23:911-5.