

하기도 감염 소아에서 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 리노바이러스의 검출

서울대학교 의과대학 소아과학교실

곽영호 · 최은화 · 이환중

Detection of Rhinovirus from Children with Lower Respiratory Tract Infections by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Young Ho Kwak, M.D., Eun hwa Choi, M.D. and Hoan Jong Lee, M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Rhinovirus has long been considered as the most important cause of uncomplicated upper respiratory infection and a trigger of asthma exacerbation, and was recently been widely appreciated for its association with lower respiratory tract illness.

Methods : One hundred and sixty-six children with lower respiratory tract infections were enrolled. They had been hospitalized at the Seoul National University Children's Hospital from August 1997 to March 2000. All the children had been previously healthy and under 5 years of age. Rhinovirus was detected in nasal aspirates by semi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and confirmed by digestion pattern of the amplicon with a restriction enzyme. Presence of other respiratory pathogens was also analysed.

Results : Of the 166 children, rhinoviruses were detected in 8 children (4.8%). Majority of rhinovirus was detected in the patients who had been hospitalized in the late fall and winter, and all the infected children recovered completely. Other respiratory pathogens identified were; mycoplasma in 7 (4.2%), respiratory syncytial virus in 15 (9.0%), parainfluenza virus in 8 (4.8%), adenovirus in 4 (2.4%) and influenza virus in 3 (1.8%).

Conclusion : Rhinovirus may be a significant cause of acute lower respiratory infections in healthy children. Further investigation on the diagnosis and clinical characteristics of rhinoviral infection is warranted.

Key Words : Rhinovirus, Respiratory infection, Polymerase chain reaction

서 론

리노바이러스(rhinovirus)는 감기(common cold)의 가장 흔한 원인이 되는 바이러스로 북반구에서 9월에 발생하는 상기도 감염의 약 90%에서 원인이 된다(1). 리노바이러스는 임상적으로 주로 상기도 감염을 유발하는 바이러스로 인식되어 왔다. 또 다른 임상적 의의로서 천식 환자와 만성 기관지염 환자에서 임상증상을 악화시키는 중요한 요인(trigger factor)

으로 알려져 있으나 이러한 현상이 바이러스에 의한 하기도의 직접적인 감염(direct infection)에 기인하는 것인지 시토카인에 의한 2차적 반응인지에 대하여는 논란이 계속되어 왔다. 한편, 리노바이러스가, 특히 소아나 신생아 및 면역 억제 환자에서, 심한 급성 하기도 감염과 관련이 있음은 지속적으로 보고되어 왔으며(2), 분자 유전학적 기법이 발전함에 따라서 최근 연구들에서 리노바이러스가 하기도에서 증식하며 직접적으로 하기도에 염증을 유발할 수 있다는 사실이 점차 밝혀지고 있다.

이러한 연구 결과들을 토대로 하여 리노바이러스에 관한 관심이 점차 증가되고 있으나 리노바이러스 분리의 표준법으로 여겨지던 배양법(culture method)이 가지는 복잡함과 비

본 연구는 2001년 서울대학교병원 일반연구비(04-2001-050)의 지원으로 이루어졌음.

접수: 2003년 1월 9일, 승인: 2003년 1월 15일

교신저자: 이환중, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02)760-3633, Fax: 02)745-4703

E-mail: hoanlee@plaza.snu.ac.kr

용의 문제로 인해 구미를 제외한 지역에서의 리노바이러스의 연구들은 소수에 그치고 있으며 국내의 연구는 찾아보기 어렵다. 이러한 제한점을 타개하고자 최근 분자 유전학적 기법을 응용한 역전사 중합효소연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)에 의한 리노바이러스의 검출이 배양법의 대안으로 개발되었다. 이 기법을 활용하여 임상 검체에서 직접적으로 리노바이러스의 감염을 증명하는 연구들이 최근 보고되고 있으나, 현재까지 평소에 건강하던 소아의 급성 하기도 감염 환자를 대상으로 임상검체에서 RT-PCR 방법으로 리노바이러스를 검출한 연구는 없는 실정이다.

저자들은 기존의 보고에서 다루지 않았던 대상인 건강한 5세 이하 소아들의 임상검체(비 흡인물)에서 역전사 중합효소반응법을 이용하여 리노바이러스의 감염을 진단함으로써 리노바이러스가 소아의 하기도 감염에서 차지하는 중요성을 파악하고, 유행 양상 및 임상적 특징을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1997년 8월 1일부터 2000년 3월 31일까지 급성 하기도 감염 증상으로 인해 서울대학교병원 소아응급실을 방문하거나 소아과에 입원한 소아들 중 비 흡인물을 채취하여 -70°C 에 보관되어 있었던 환아는 모두 550명이었다. 이들 중 환아의 연령이 5세 이하이며, 의무 기록의 분석을 통하여 급성 하기도 감염의 증거(나음, 천명음 등 신체 검사소견이 양성이거나 흉부 X선 소견에서 이상소견을 보이는 경우)를 보여 임상적으로 급성 하기도 감염(크룹, 급성 기관지염, 급성 모세기관지염 및 폐렴)의 진단을 받은 소아들을 선별하여 연구의 대상으로 하였다. 이들 중 콧물, 기침, 발열 등과 같이 상기도 감염에 국한된 소견을 보이는 경우는 연구에서 제외하였다. 또한 의무기록의 검토를 통하여 기저 질환 즉 면역결핍 질환 및 악성종양으로 면역억제 치료를 받고 있던 환아와 선천성 심장병 및 만성 호흡기계, 신경계 질환 환자를 제외한 166명의 환아를 대상으로 하였다. 대상 환아들 중 RT-PCR로 리노바이러스가 검출된 경우를 리노바이러스에 의한 급성 하기도 감염으로 정의하였으며, 동시에 다른 호흡기 바이러스가 검출되거나 세균감염이 진단된 경우는 혼합감염으로 정의하였다.

2. 연구 방법

1) 검체의 채취 및 처리

Mucus trap과 흡인 카테터(suction catheter)를 이용하여 하기도 감염의 증상을 보인 환아의 비강에서 비 흡인물(nasal aspirate)을 채취하여 -70°C 로 유지되는 냉장고(deep freezer)에 보관하였다. 의무기록의 검토를 통하여 선정된 166명의 환아들의 비 흡인물 검체를 해빙하여 RT-PCR에 사용하였다.

2) 리노바이러스 RNA의 추출 [RNAid PLUS with spin kitTM, (Bio 101, CA, USA)]

각 검체로부터 얻어진 일정량의 검체($400\ \mu\text{L}$)에 세포 용해액(cell lysis solutionTM, kit에 포함되어 있는 시약, $200\ \mu\text{L}$)을 가한 후 acid phenol ($200\ \mu\text{L}$)을 가하였다. 이 혼합액에 chloroform isoamyl alcohol ($100\ \mu\text{L}$)을 가한 후 얼음 위에서 15분간 반응시킨 후, 원침(centrifugation, 4°C , $10,000\ \text{g}$, 20분)하여 RNA가 포함된 상층액을 새 시험관으로 옮겼다. 다시 chloroform isoamyl alcohol ($100\ \mu\text{L}$)을 가하여 RNA를 추출한 후 원침(4°C , $10,000\ \text{g}$, 20분)하여 RNA가 포함된 상층액을 새 시험관으로 옮겼다. 분리된 상층액에 RNA-MATRIXTM (kit에 포함된 시약, $12\ \mu\text{L}$)을 가한 후 상온에서 5분간 방치한 후 다시 원침(4°C , $10,000\ \text{g}$, 1분)하여 RNA/RNA MATRIX의 복합체가 침전(pellet)을 형성하도록 하였으며, 상층액은 버리고 생성된 백색 침점물을 RNA 세척액(RNAWASH solutionTM, kit에 포함된 시약, $300\ \mu\text{L}$)을 가하여 두 차례에 걸쳐 세척하였다. 세척한 침전을 DEPC로 처리된 물 $40\ \mu\text{L}$ 에 부유시킨 후 55°C 에서 5분간 방치하였으며, 원침(4°C , $5,000\ \text{g}$, 3분)하여 상층액에 용해되어 있는 RNA를 분리하여 즉시 역전사를 시행하였다.

3) 역전사(Reverse transcription, RT)

시발체(random primer, $2\ \mu\text{L}$)를 추출한 RNA ($9.8\ \mu\text{L}$)에 가한 후 혼합액을 68°C 에서 3분간 가열하여 secondary structure를 제거하였다. 혼합액을 5분간 얼음 위에서 식힌 후 역전사에 사용될 혼합액[5×buffer (including MgCl_2) $4\ \mu\text{L}$, $10\ \text{mM}$ dNTP $2\ \mu\text{L}$, RNase inhibitor $1\ \mu\text{L}$, AMV-RT (Roche, Mannheim, Germany) $1.2\ \mu\text{L}$]을 제작하였다. 이 혼합액으로 thermocycler를 이용하여 다음과 같은 조건(42°C 60분, 95°C 5분, 4°C 에서 보관)하에 역전사를 시행하였다. 얻어진 역전사 산물을 즉시 PCR에 이용하거나 -20°C 에 보관하였다.

4) 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

Arruda 등(3)이 비 흡인물(nasal washing fluid)에서 RT-PCR을 이용하여 리노바이러스를 검출한 이후 다양한 시발체를 이용한 RT-PCR이 제안되었다. 이러한 분자 생물학적인 방법을 이용한 대다수의 연구들은 리노바이러스 RNA의 보존된 영역(preserved area)인 5'-untranslated region의 일부를 시발체로 사용한 공통점이 있으나 이러한 시발체를 이용하여 역전사 중합효소반응을 시행 할 경우 *Picornaviridae* family에 속하는 다른 바이러스인 장 바이러스(poliovirus, echovirus, coxsackievirus)가 함께 검출되는 제한점이 있어왔다. 이에 저자들은 피코나 바이러스에 특이한 서열(*Picornaviridae*-specific sequence)을 이용하여 1차 PCR ("touchdown PCR", OL26과 OL27 primer pair를 사용)을 시행한 후 다시 리노바이러스에 특이한 서열(rhinovirus-specific sequence)을 이용하여 2차 PCR (semi-nested PCR, OL26과 OL200 primer pair를 이용)을 시행하여 두 PCR에서 모두 양성을 보이는 경우만을 리노바이러스 감염으로 정의하였다(Figure 1).

(1) 1차 PCR ("touchdown" PCR, detection of *Picornaviridae*-specific RNA)

다음과 같은 혼합액[삼차 증류수 29.5 μ L, 10 \times reaction buffer 5 μ L, 25 mM MgCl₂ 5 μ L, 10 mM dNTP mix 1 μ L, Taq polymerase (Promega, WI, USA) 0.5 μ L]을 사용하였으며 시발체(primer)는 OL26F (5'-GCA CTT CTG TTT CCC C-3')과 OL27R (5'-CGG ACA CCC AAA GTA G-3')을 사용하였다. 주형(template) cDNA (5 μ L)를 시발체가 혼합된 혼합액에 가한 후 thermocycler를 이용하여 다음과 같은 조건(94.0 $^{\circ}$ C 5분, 94.0 $^{\circ}$ C 30초, 55.0 $^{\circ}$ C 30초, 72.0 $^{\circ}$ C 1분, 72.0 $^{\circ}$ C 7분)으로 총 30 회(cycles)의 PCR을 시행하였다. 이후 agarose gel electrophoresis법(2% agarose gel, 100 V)으로 약 380 bp 크기(Table 1)의 피코나 바이러스에 특이한 증폭체(*Picornaviridae*-specific amplicon)를 확인하였다.

(2) 2차 PCR (semi-nested PCR, rhinovirus-specific RNA의 검출)

다음과 같은 혼합액[삼차 증류수 32.5 μ L, 10 \times reaction buffer 5 μ L, 25 mM MgCl₂ 5 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, Taq polymerase (Promega, WI, USA) 0.5 μ L]을 사용하였으며 시발체는 OL26F와 OL200R (5'-GGC AGC CAC GCA GGC T-3')을 사용하였다.

첫번째 PCR에서 얻어진 amplicon (5 μ L)을 시발체가 포함된 혼합액에 가한 후 thermocycler를 이용하여 다음과 같은 조건[94.0 $^{\circ}$ C 5분, 94.0 $^{\circ}$ C 10초(denaturation), 55.0 $^{\circ}$ C 20초

Table 1. Characteristics of *Bgl*I Digestion of OL26-OL27 Amplicons from Sequenced Human Picornaviruses* (Papadopoulos, et al., 1999)

	OL26	OL27	Size	<i>Bgl</i> I position	Fragments
Rhinovirus					
1a	84-99	456-471	387	279	191/192
1b	170-185	542-557	387	365	191/192
2	164-179	532-547	383	357	189/190
9	164-179	532-547	383	357	189/190
14	182-197	551-566	384	376	190/190
16	166-181	536-551	385	361	191/190
85	164-179	533-548	384	357	189/191
89	168-183	540-555	387	363	191/192
Poliovirus					
1	165-180	541-556	391	—	391
2	168-183	545-560	392	—	392
3	167-182	544-559	392	—	392
Coxsackievirus					
A9	170-185	546-561	391	384	177/203
A16	174-189	550-565	391	—	391
A21	164-179	539-554	390	—	390
B1	167-182	543-558	391	—	391
B3	168-183	544-559	391	—	391
B4	170-185	546-561	391	384	177/203
Echovirus					
1	53-68	429-444	391	—	391
2	53-68	429-444	391	—	391
3	53-68	429-444	391	—	391
4	53-68	429-444	391	267	177/203
5	53-68	429-444	391	—	391
9	169-184	543-558	389	382	176/209
11	171-186	547-562	389	—	391
25	168-183	544-559	391	—	391

*Position of OL26 and OL27 primers, size of generated amplicons, position of *Bgl*I restriction site and resulting fragments after digestion, in currently sequenced rhinoviruses and enteroviruses

(annealing), 72.0 $^{\circ}$ C 1분(extension), 72.0 $^{\circ}$ C 1분(post-PCR extension)]으로 총 25회(cycles)의 PCR법을 시행하였다. 두번째의 PCR은 F-primer가 같으므로 semi-nested PCR 기법을 사용한 것이며(Figure 1), agarose gel electrophoresis법(2% agarose gel, 100 V)을 이용하여 약 202 bp 크기의 리노바이러스에 특이한 증폭체(rhinovirus-specific amplicon)를 확인하였다.

5) 증폭 산물의 제한 효소 *Bgl*II에 의한 절단 양상 확인

최근 밝혀지고 있는 리노바이러스 및 장 바이러스(enterovirus)의 염기 서열 자료를 활용하여, 특정 제한효소에 의한 리노바이러스의 특이한 절단 양상을 확인함으로써, 증폭 산물이 리노바이러스에 서 유래함을 확인하였다. 제한효소인 *Bgl*II은 리노바이러스의 경우 첫번째 PCR의 산물(OL26F-OL27R 시발체 쌍에 의한 증폭 산물)의 중심부에 작용 부위

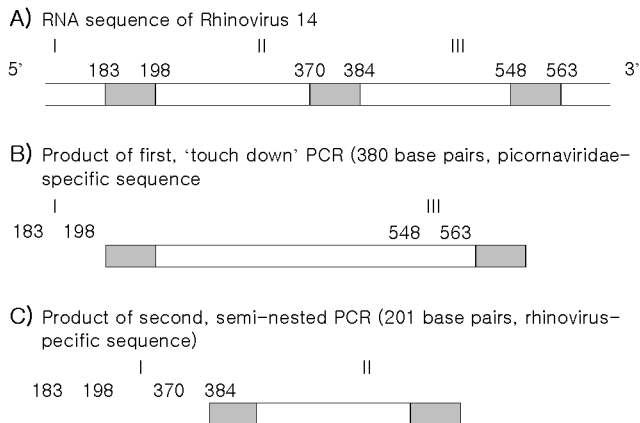


Figure 1. Three conserved regions in the 5'-untranslated regions of rhinoviruses whose sequences were used for RT-PCR primers. Numbering shown is for HRV 14. Region I, II and III represent the sequence corresponding to OL26, OL200 and OL27 primer used, respectively (Stanway, et al., 1984).

가 있어 동일한 크기로 자른다는 사실이 밝혀져 있다(4). 앞서 시행한 RT-PCR을 통하여 리노바이러스 감염으로 확인된 예들을 대상으로 제한효소(*Bgl*I; New England BioLabs, CA, USA) 30 U를 touchdown PCR의 산물(1.0 μ g)에 가한 후 혼합물을 37.0°C에서 60분간 증탕하였다. 이후 agarose gel electrophoresis법(2% agarose gel, 100 V)을 이용하여 절단된 증폭체의 크기를 확인하였으며, 리노바이러스의 경우 약 190 bp씩 동일한 크기의 밴드(band)로 절단되나 장 바이러스(poliovirus, echovirus, coxsackievirus)의 경우 절단이 되지 않거나, 동일한 크기로 절단되지 않으므로 리노바이러스를 확인 할 수 있었다(Table 1).

6) 전기 영동(Gel electrophoresis)

Seakem ME 아가로스(0.4 g)와 0.5×TBE (20 mL)를 섞어 hot plate에서 휘저으며 끓인 후 60°C의 물에서 약 30분간 냉각시켰다. 수평으로 놓인 gel plate에 겔(gel)을 붓고 약 30분간 굳힌 후 증폭체(10 μ L)와 염색약(tracking dye, 2 μ L)을 혼합하였다. PCR molecular marker 6 μ L와 염색약(dye)을 혼합하여 100볼트에서 5분간, 85볼트에서 45분간 전기영동하였으며 전기영동이 끝난 후 ethidium bromide 용액에 30분간 염색 후 증류수로 탈색하였다. 이후 자외선 램프로 PCR 분자량 표식(molecular weight marker)와 비교하여 증폭 산물을 확인하여 카메라(Polaroid cameraTM)로 촬영하였다.

7) 다른 병원체에 의한 감염예의 분석

연구의 대상이 된 환아들의 임상기록을 검토하여 객담 혹은 혈액배양검사 및 혈청검사를 통하여 급성 하기도 감염의 원인이 될 수 있는 세균감염의 증거를 검토하였으며, 다른 호흡기 바이러스의 감염여부를 확인하였다. 소아에서 흔히

급성 하기도 감염을 초래하는 아데노바이러스, 호흡기세포융합바이러스(respiratory syncytial virus), 인플루엔자 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스에 대하여는 대상 환아들의 비 흡인물로 이미 시행한 바이러스 진단 검사의 결과를 활용하였다. 아데노바이러스와 호흡기세포융합바이러스 감염은 간접면역형광법을 이용한 항원 검출과 HEp-2 세포를 이용한 배양법으로 진단하였으며, 인플루엔자 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스 감염은 LLC-MK2 및 MDCK 세포를 이용한 배양법으로 진단하였다. 이 자료를 이용하여 리노바이러스 감염과 다른 호흡기 바이러스감염의 빈도 및 유행 양상을 비교 분석하였다.

8) 의무 기록 분석

RT-PCR을 이용하여 리노바이러스 감염이 확인된 예들을 대상으로 의무 기록을 검토하여, 환아들의 연령, 발병 계절, 다른 호흡기 바이러스와 비교한 임상 증상의 특징, 치료 및 입원 경과 등을 분석하였다.

결 과

1. 연구 대상 환아들의 임상상(Table 2)

연구의 대상이 된 총 166명의 환아들의 연령은 평균은 17.5개월(SD±15.4 months)로 생후 1개월부터 58개월까지 분포하였으며, 남아는 110명, 여아는 56명으로 남녀비는 1.96:1이었다.

대상 환아들의 임상증상으로 기침은 162명(97.6%)에서 보였으며, 콧물은 125명(75.3%), 바이러스 감염에 흔히 동반되는 설사 및 구토는 55명(33.1%)에서 관찰되었다. 임상 징후로는 액와에서 측정한 체온이 38.1°C 이상인 환아가 113명(68.1%)이었으며, 빈호흡(생후 12개월 미만; 60회/분 이상, 생후 12개월 이상; 40회/분 이상)은 87명(52.4%), 흉벽 함몰은 86명(51.8%)에서 보였다. 하기도 감염의 명확한 증거인 나음과 천명음은 각각 133명(80.1%), 69명(41.6%)에서 청진되었으며, 나음 혹은 천명음 중 한가지 이상의 소견을 보이는 경우는 166명 모두에서 해당되었다. 심각한 하기도 감염을 시사하는 청색증과 무호흡은 각각 9명(5.4%), 6명(3.6%)에서 발생하였으며, 동맥혈 검사상의 저산소증(산소포화도 $\leq 93\%$)은 10명(6.0%)에서 관찰되었다. 모두 4명(2.4%)의 환자가 사망하였으며 원인이 밝혀진 1명은 아데노바이러스에 의한 폐렴과 호흡부전으로 사망하였으며 나머지 3예에서는 원인이 되는 병원체가 밝혀지지 않았다.

총 166명의 환아들 중 144명(86.7%)에서 흉부 방사선 촬영

Table 2. Characteristics of the 166 Children Investigated*

Age	
Average	17.5 months
Range	1 month to 58 months
≤6 months	52 (31.3)*
6-24 months	66 (39.8)
>24 months	48 (28.9)
Sex	
Male	110 (66.3)
Female	56 (33.7)
Clinical feature	
Cough	162 (97.6)
Rhinorrhea	125 (75.3)
Diarrhea or vomiting	55 (33.1)
Fever(≥38.1℃)	113 (68.1)
Tachypnea [†]	87 (52.4)
Chest retraction	86 (51.8)
Rale	133 (80.1)
Wheezing	69 (51.8)
Wheezing and/or rale	166 (100.0)
Nasal flaring or grunting	8 (4.8)
Cyanosis	9 (5.4)
Apnea	6 (3.6)
Hypoxia, SaO ₂ ≤93%	10 (6.0)
Chest radiography	
Performed	144 (86.7)
Positive finding	83 (50.0)
Initial WBC count, mean	11,549/mm ³
Management and outcome	
Hospital stay, mean	5.9±4.0 day
Use of antibiotics	77 (46.4)
Oxygen supply	35 (21.1)
ICU care	9 (5.4)
Death	4 (2.4)

*Number of parentheses (%)

[†]Defined as follows: under 12 months old: >60/minute, over 12 months old: >40/minute

이 시행되었으며, 이상소견이 발견된 경우는 83명(50.0%)였다. 내원 당시 백혈구 수치 검사는 146명(88.0%)에서 시행되었으며 평균은 11,549/mm³ (SD±5,570)이었다.

2. 리노바이러스의 검출

총 166명의 대상환아들의 비 흡인물 검체를 대상으로 RT-PCR을 시행하여 8예(4.8%)에서 리노바이러스 감염을 확인하였다. 리노바이러스 감염으로 확인된 8예 모두는 1차 PCR에서 약 380 bp 크기의 band를 관찰할 수 있었으며(Figure 2), 2차 PCR에서 202 bp 크기의 band가 검출되었다(Figure 3). *Picornaviridae* family에 속하는 장 바이러스와의 감별하기 위하여 1차 PCR의 산물에서 시행한 *Bgl*I restriction enzyme digestion에서도 8예 모두 190 bp의 크기로 균일하게 처리된 band를 보여 리노바이러스 감염을 확인하였다(Figure 4).

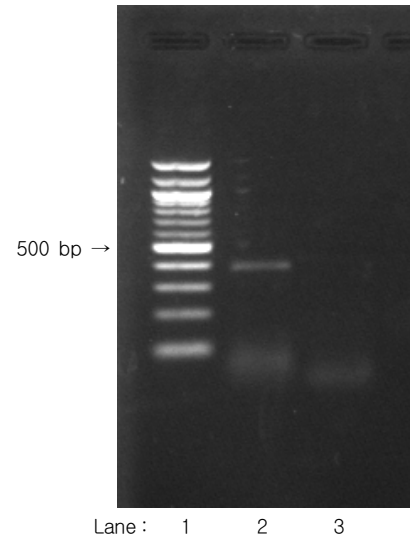


Figure 2. Result of the first, *Picornaviridae*-specific PCR. Lane 1: DNA molecular size marker (100-b ladder: each bar represents 100 base pair). Lane 2: Picornavirus-specific, 380-base pair PCR amplicon. Lane 3: negative control.

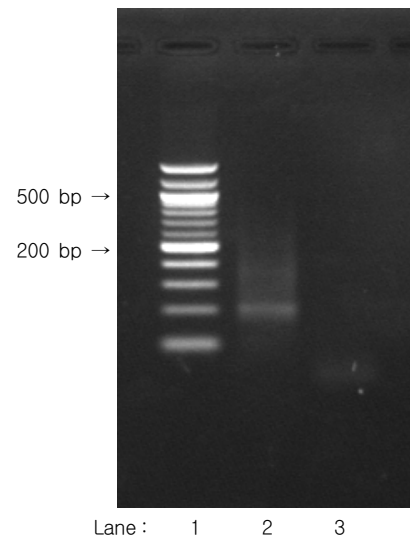


Figure 3. Result of the second, rhinovirus-specific PCR. Lane 1: DNA molecular size marker (100-b ladder). Lane 2: Rhinovirus-specific, 202-base pair PCR amplicon. Lane 3: negative control.

3. 리노바이러스 감염 환아의 임상상(Table 3)

리노바이러스 감염이 확인된 8명의 연령은 6개월부터 58월까지 분포하였으며, 남아와 여아는 각각 4명이었다. 임상진단으로는 폐렴이 5명, 급성 모세기관지염이 3명이었다. 임상 증상 및 징후에서 38.1℃ 이상의 발열은 5명, 나머지는 8명 모두에서, 천명음은 3명에서 들렸으며 흉부함몰은 4명에서 관찰되었다. 환아들의 입원 당시 백혈구 수치는 1명을 제외한

7명에서 측정(범위 4,700-21,800/mm³)되었으며 4명의 환아에서 항생제가 투여되었다. 리노바이러스 외에 하기도 감염을 유발할 수 있는 병원체로 항 마이코플라즈마 항체가 3명에서 양성(1회 측정에서 >1:640 혹은 2주 간격으로 2회 측정 시 4배 이상 증가)으로 나와 중복감염으로 추정되었다. 모두 8명 중 3명은 1997년 9월에 진단되었으며, 1997년 12월, 1998년 10월 및 1999년 6월에 각각 1명, 1999년 11월에 2명에서 리노바이러스가 검출되었다. 이환된 환아들의 재원 기간은 재원 일수는 1일에서 11일까지였으며, 세균성 부비동염 및 중이염 등의 합병증이나 사망례 없이 모두 회복하였다.

4. 다른 호흡기 병원체의 동정(Figure 5, Table 4)

총 166명의 환아들 중 급성 하기도감염의 원인이 되는 병

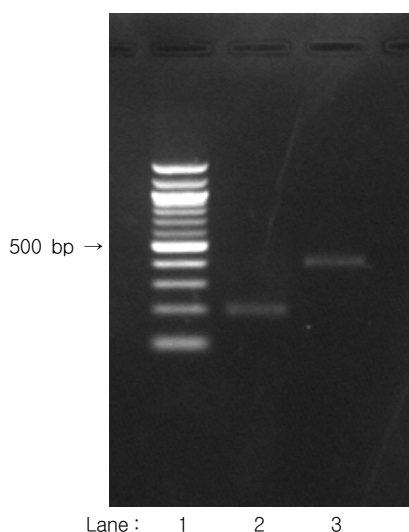


Figure 4. Result of rhinovirus identification by *Bgl*I digestion of the first PCR amplicon. Lane 1: DNA molecular size marker (100-b ladder). Lane 2: Rhinovirus-specific, evenly digested, 190 bp band. Lane 3: negative control (enterovirus).

원체는 모두 42명(25.3%, 마이코플라즈마와 리노바이러스의 복합감염 3예 포함)에서 확인되었다. 환아들이 보인 급성 하기도 감염의 원인으로 세균감염이 진단된 예는 없었으며, 마이코플라즈마 감염이 7예(4.2%)이었다. 호흡기 바이러스 감염은 모두 38명(22.9%)에서 진단되었으며, 호흡기세포융합바이러스가 15명(9.0%)으로 가장 흔하였고, 파라인플루엔자 바이러스가 8명(4.8%), 아데노바이러스가 4명(2.4%), 인플루엔자 바이러스가 3명(1.8%)에서 분리되었다.

고 찰

리노바이러스는 *Picornaviridae* family에 속하는 세가지 속(genus) 중의 하나로 picornavirus에 속하는 enteroviruses, hepatitis A virus와 같이 RNA 바이러스에 속하며 그 genome은 single strand RNA이다. 크기는 약 30 nm이며 외피(envelope)를 가지고 있지 않고 icosahedral 구조를 보이는 바이러스로 혈청형은 100종 이상이 알려져 있다. 리노바이러스의 임상적 의의는 주로 상기도 감염의 원인 바이러스로 의미가 있으며 또 다른 의의로는 천식 환자와 만성 기관지염 환자에서 임상증상을 악화시키는 중요한 요인(trigger factor)으로 연구되어 왔다. 천식 환자에서 리노바이러스가 초래하는 하기도 감염 증상에 대하여 바이러스가 하기도에 직접적으로 감염(direct infection)을 일으켜 발생하는 것인지 혹은 시토킨에 의한 2차적 반응인지에 대하여는 오랜 기간 논란이 계속되어 왔으며, 관련 시토킨에 관한 많은 연구 결과가 보고되고 있다(1, 2). 이러한 논란은 약 100종 이상의 혈청형 중에서 주로 사람에서 감염을 일으키는 혈청형이 신체의 중심부 체온(core temperature) 보다 낮은 35℃에서 잘 배양된다는 사실과 리노바이러스가 상기도 및 하기도에 병리학적으로 확인할 수 있는 뚜렷한 병변을 만들지 않는다는 사실에 비추어 리노바이러스가 하기도에 직접적인 침윤을 일으키기

Table 3. Features of Rhinovirus-associated Lower Respiratory Tract Infection of 8 Previously Healthy Children at the Seoul National University Children's Hospital, from Aug. 1997 to Mar. 2000

No.	Age/Sex	Clinical diagnosis	Symptoms and signs				Initial WBC (/mm ³)	Use of antibiotics	Hospital stay (day)	Other pathogen isolated	Outcome	Month of isolation
			Fever	Wheezing	Rale	Retraction						
1	13 mo/M	Pneumonia	+	-	+	-	11,690	Yes	4	Mycoplasma	Recovered	Sep, 1997
2	41 mo/M	Pneumonia	+	-	+	-	15,300	Yes	5	Mycoplasma	Recovered	Sep, 1997
3	30 mo/F	Pneumonia	+	-	+	-	4,700	Yes	11	Mycoplasma	Recovered	Sep, 1997
4	6 mo/F	Bronchiolitis	+	+	+	+	7,300	No	8	None	Recovered	Dec, 1997
5	58 mo/F	Pneumonia	+	-	+	-	21,800	Yes	4	None	Recovered	Oct, 1998
6	34 mo/M	Pneumonia	-	+	+	+	11,300	No	2	None	Recovered	Jun, 1999
7	17 mo/M	Bronchiolitis	-	+	+	+	14,040	No	4	None	Recovered	Nov, 1999
8	21 mo/F	Bronchiolitis	-	-	+	+	ND*	No	1	None	Recovered	Nov, 1999

*ND: not done

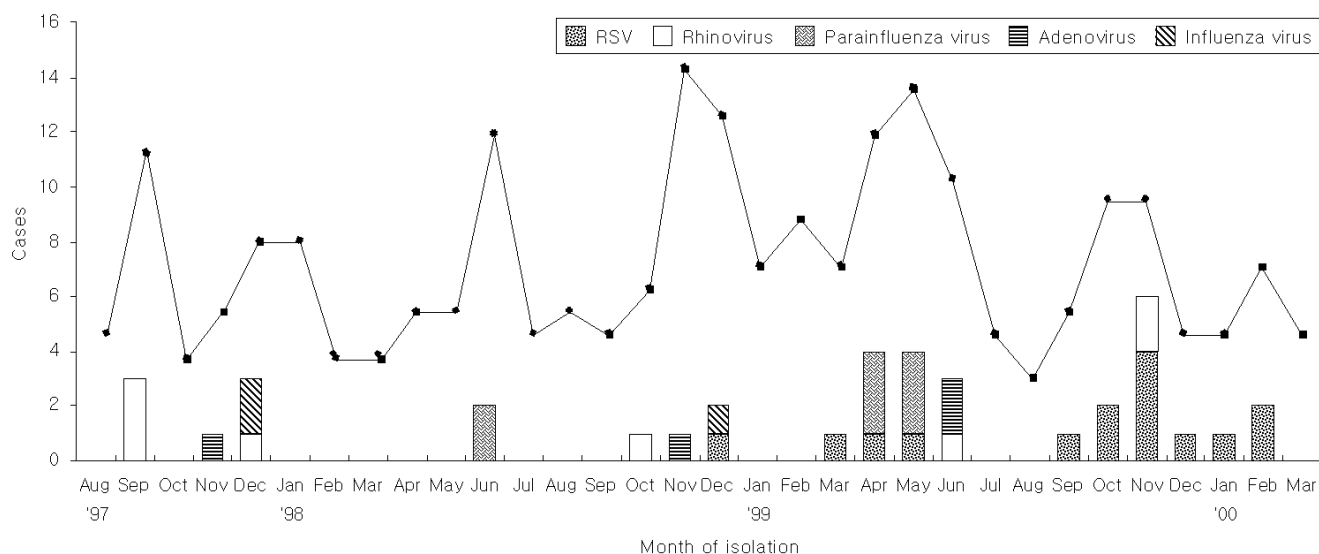


Figure 5. Rhinoviruses and other respiratory viruses isolated in the Seoul National University Children's Hospital, from Aug. 1997 to Mar. 2000. Bold line represents the total number of children investigated on each month.

Table 4. Pathogens Associated with Lower Respiratory Tract Infection of 166 Previously Healthy Children in the Seoul National University Children's Hospital, from Aug. 1997 to Mar. 2000*

Pathogens	
Mycoplasma	7 [†] (4.2)*
Virus	38 [†] (22.9)
Respiratory syncytial virus	15 (9.0)
Influenza virus	3 (1.8)
influenza A	3
influenza B	0
Parainfluenza virus	8 (4.8)
parainfluenza 2	1
parainfluenza 3	4
unspecified	3
Adenovirus	4 (2.4)
Rhinovirus	8 [†] (4.8)
Total	166 (100)

*Number of parentheses (%)

[†]Includes 3 dual infections of mycoplasma and rhinovirus

어려울 것으로 추정되었기 때문이다.

그러나 소아(5-8), 신생아(9) 및 기관지 폐 이형성증(bronchopulmonary dysplasia)을 가진 소아(10)에서 리노바이러스가 심한 하기도 질환과 연관이 있음은 널리 알려진 사실이다. 또한 치명적인 급성 하기도 감염 증상을 보인 면역 억제 환자에서 리노바이러스가 검출되어(11, 12), 리노바이러스와 급성 하기도 감염의 연관성에 대한 관심이 증대되고 있다. 이러한 간접적인 증거(indirect, clinical evidence)들이 지속적으로 보고됨에 따라 구미의 연구자들은 리노바이러스가 직접적으로 하기도에서 증식함을 증명하기 위한 연구를 진행하여

왔으며, 최근 발전하고 있는 분자 생물학적 기법을 이용한 연구들을 통하여 리노바이러스가 하기도에 도달하여 염증을 유발할 수 있다는 직접적인 증거(direct evidence)가 축적되고 있다. 이러한 연구 중 하나로 리노바이러스로 감염시킨 환자의 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid)에서 리노바이러스의 RNA를 검출한 연구가 보고되었으나 이는 상기도에 존재하는 리노바이러스에 의한 폐포세척액의 오염이라는 문제를 해결하지 못하여 직접적인 증거로 받아들여지지 않았다.

그러나 최근의 한 연구에서는 기관지 상피세포(Human bronchial epithelial cells, HBECs)에서 배양된 리노바이러스를 자원자들(천식환자와 정상인)의 비강에 접종한 후 하기도 상피조직을 생검하였으며, 생검조직에서 *in situ hybridization*을 이용하여 리노바이러스에 특이한 RNA를 검출하였다. 이 연구에서는 직접 하기도 상피에 침투한 리노바이러스의 RNA를 증명함으로써 상기도에 존재하는 리노바이러스에 의한 오염이라는 문제를 해결한 것으로, 리노바이러스가 비강 감염 후 하기도에 도달할 수 있고 하기도 상피세포에 침투할 수 있으며, 증식하여 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)와 함께 시토키인(IL-16 등)을 통한 pro-inflammatory response를 유발한다는 점이 입증되었다(13). 따라서 리노바이러스에 의한 하기도 감염은 예외적인 상황이 아니며, 리노바이러스를 더 이상 상기도 감염을 국한적으로 유발하는 바이러스로 간주할 수 없음이 밝혀지고 있다.

리노바이러스가 하기도 감염을 직접적으로 유발한다는 증거가 축적되면서 리노바이러스에 대한 연구가 최근 증가하고 있다. 그러나 여전히 다른 호흡기 바이러스(호흡기세포융합

바이러스, 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스) 등에 비해 제한적인 이유는 기존의 리노바이러스 연구가 배양법을 사용한 것과 관련이 있다. 리노바이러스의 배양은 HeLa Ohio-Salisbury, human foreskin fibroblast cell 혹은 MRC-5 등의 세포주(cell line)를 필요로 하며 35℃에서 회전 배양기(roller drum)를 이용하여야 하는 등 상당한 비용과 시간을 요하는 복잡한 과정이며 이러한 과정을 통하여 얻는 결과도 그 감수성이 낮음이 알려져 있다. 이러한 제한점으로 인하여 구미를 제외한 지역에서의 리노바이러스의 연구는 소수에 그치고 있으며(3, 14), 국내의 연구는 찾아보기 어렵다. 배양법이 리노바이러스 감염의 표준진단법으로 여겨져 왔으나 이러한 제한점을 이유로 점차 분자생물학 기법을 응용한 RT-PCR이 대안으로 제시되고 있다. Aruda 등(15)은 리노바이러스 혈청형 39 (human rhinovirus, HRV 39)로 감염시킨 자원자들의 비강 분비물에서 RT-PCR을 이용하여 리노바이러스 RNA를 검출함으로써 조기에 리노바이러스 감염을 진단하는 방법을 제안하였으며, 이후 여러 연구자들에 의하여 다양한 시발체를 사용한 RT-PCR 기법들이 소개되어 왔다.

RT-PCR을 이용하여 리노바이러스를 검출하는 방법은 2단계로 나누어 볼 수 있다. 우선 picornaviruses의 genome에 공통적으로 존재하는 부위와 반응하는 시발체를 사용한 RT-PCR를 통하여 리노바이러스와 다른 picornaviruses를 모두 검출한다. 이는 100가지 이상 존재하는 다양한 리노바이러스의 혈청형과 가능한 많이 반응하는 시발체를 작성하기 위하여는 필연적으로 많은 picornaviruses (poliovirus, coxsackieviruses, echovirus 등)에도 공통적으로 존재하는 RNA 서열(sequence)을 사용하여야 하기 때문이다. 이후 리노바이러스와 다른 picornaviruses와의 감별을 위하여 리노바이러스에 특이한 시발체를 사용하거나(16-18), nested PCR을 이용하는 방법(19), 제한 효소를 이용하는 방법(4) 및 면역형광염색(immunofluorescent assay)을 함께 이용하는 방법(20) 등을 통하여 리노바이러스와 다른 picornaviruses를 구분하여 검출하게 됨으로써 특이성(specificity)을 가진 검사법이 된다.

RT-PCR의 또 다른 장점은 신속한 진단이 가능하며, 배양법에 비하여 감수성이 뛰어나다는 것이다. Ireland 등(16)은 감기 증상을 보인 성인 27명의 비 흡인물을 대상으로 배양법으로는 1예도 감염을 증명할 수 없었으나 RT-PCR법으로 12명(44.4%)에서 리노바이러스 감염을 증명하였다. Hyypia 등(21)의 연구에서도 감기 증상을 보이는 성인의 비 흡인물 400개를 대상으로 연구하여 모두 192명(48%)에서 리노바이-

러스를 검출하였으며 이들 중 65개의 검체는 RT-PCR에서만 양성으로, 1개의 검체는 배양법으로만 양성인 증명이 되었으며 121개의 검체는 RT-PCR법과 배양법에서 모두 양성을 보여 RT-PCR법의 감수성이 배양법보다 우수함을 보였으며, 리노바이러스 감염의 진단 방법으로 배양법을 대체할 수 있음을 주장하였다.

RT-PCR법이 가지는 높은 특이성 및 감수성에 근거하여 감염 여부를 알 수 없는 환자의 임상 검체에서 리노바이러스의 검출을 시도하는 연구들이 최근 보고되고 있다. 중이염을 앓고 있는 환자의 중이액(middle ear fluid)에서 RT-PCR을 이용하여 리노바이러스를 검출한 연구(22) 및 급성 호흡기 감염 증상을 보인 환자의 비인두 흡인물(nasopharyngeal aspirate)에서 RT-PCR법을 통하여 리노바이러스를 검출한 연구(23) 등이 그 사례이다. 그러나 아직까지 급성 하기도 감염 증상을 보이는 소아를 대상으로 임상검체에서 RT-PCR을 통하여 리노바이러스를 검출한 연구는 없는 상태이다.

저자들은 166명의 연구 대상 환아들의 비 흡인물에서 우선 1차 PCR으로 picornaviruses에 특이한 RNA를 검출한 후 리노바이러스에 특이한 2차 PCR을 시행함으로써, 리노바이러스의 감염을 진단하였다. 연구 방법의 확립과정에서 장 바이러스(enterovirus)의 감염이 확인된 검체에서 동일한 검사를 시행하였을 경우 1차 반응에서는 약 380 bp의 band를 보였으나 2차 반응에서 증폭이 일어나지 않았으며(data not shown), 다른 호흡기 바이러스감염이 증명된 예들에서도 반응이 일어나지 않아 본 연구의 RT-PCR법이 리노바이러스에 특이성을 가지고 있을 것으로 사료된다. 또한 Papadopoulos 등(13)이 제안한 특정 제한 효소(*Bgl*II)를 이용한 절단 양상(digestive pattern)의 분석을 통하여 1차 RT-PCR 반응의 증폭체(amplicon)에서 리노바이러스의 특이 반응을 보임으로써, RT-PCR법의 특이성을 재차 확인하였다.

리노바이러스를 급성 하기도 감염의 원인으로 연구한 경우는 외국의 보고에서도 드물다. Jacobs 등(1971)은 1세 이하 영아의 호흡기 질환 환아들을 대상으로 배양법을 이용하여 원인 병원체를 연구하여 호흡기세포융합바이러스가 40%, 리노바이러스가 6.1%에서 동정되었음을 보고하였다. 또한 Paisley 등(5)은 8개월의 연구 기간 중 급성 하기도 감염으로 입원한 소아 환자 179명 중 102명(56.9%)에서 배양법으로 원인 병원체를 규명하였으며, 이들 중 바이러스가 동정된 경우는 70명(39.1%)으로 호흡기세포융합바이러스감염이 가장 흔하여 67명(37.4%, 복합감염 14예 포함), 리노바이러스는 7명(3.9%, 복합 감염 3예 포함)으로 두번째로 흔한 원인 바이러

스로 보고하였다. 이러한 기존의 연구들은 모두 기저질환을 가지고 있는 환자들을 포함한 연구로 기저 질환이 있는 소아에서 호흡기 바이러스의 감염이 빈번한 것은 널리 알려진 사실이다. 기존의 리노바이러스 연구에서도 이러한 사실은 확인이 되는 바 Krilov 등(24)은 2년간 하기도 감염을 주소로 입원한 소아환자를 대상으로 배양법으로 리노바이러스 감염이 확인된 총 32명의 환자들의 임상상을 연구하였으며, 25명(78.1%)의 환아가 기저질환을 가지고 있음을 보고하였다. 또한 McMillan 등(7)은 배양법으로 리노바이러스가 확인된 소아 환자 48명 중 20명(41.6%)이 기저질환을 가지고 있는 것으로 보고하였으며, Kim 등(8)에 의하면 배양법으로 리노바이러스 감염이 진단된 하기도 감염 환자의 69%가 미숙아, 과민한 기관지의 병력, 선천성 심장질환 등의 과거력을 가지고 있었다.

본 연구에서는 배양법에 비해 높은 감수성을 가진 RT-PCR법을 이용하여 기저질환이 없는 소아를 대상으로 하였으며, 총 166명의 환자들 중 8명(4.8%)에서 리노바이러스가 검출되었다. 이 결과는 감염빈도가 높을 것으로 추정되는 기저질환이 있는 환자들을 제외된 점을 감안한다면 기존의 배양법을 이용한 리노바이러스의 분리 빈도와 유사하거나 이를 상회하는 것으로 사료된다. 이는 RT-PCR법이 배양법을 대체할 수준의 높은 감수성을 가진다는 것을 보여준과 동시에 우리나라에서도 리노바이러스가 소아의 급성 하기도 감염에 중요한 원인이 됨을 시사한다.

최근 들어 국내에서도 호흡기세포융합바이러스 감염(25), 아데노바이러스 감염의 양상(26) 및 일정기간에 분리된 호흡기 바이러스의 유행 양상 및 감염의 임상상에 대한 보고(27, 28)가 잇따르고 있으나 소아 하기도 감염의 중요한 원인으로 추정되는 리노바이러스에 대한 연구는 매우 드물다. 국내에서 시행된 연구로 리노바이러스 감염에 대한 진단이 포함되지 않은 한 연구에 의하면 1990년 11월부터 1994년 4월까지 하기도 감염증상을 보인 소아 804명의 비 흡입물을 검사하여 모두 369명(45.9%)에서 원인 바이러스가 분리되었으며 호흡기세포융합바이러스가 27.2%, 파라인플루엔자 바이러스 3형이 7.8%, 인플루엔자 바이러스 A형과 아데노바이러스가 각각 3.9%에서 분리되었다(27). 이에 비해 기저 질환이 없는 소아만을 대상으로 한 본 연구에서는 전체의 22.9%에 해당하는 38명의 환자에서 바이러스가 하기도 감염의 원인으로 밝혀졌으며, 호흡기세포융합바이러스가 15예(9.0%), 파라인플루엔자 바이러스와 리노바이러스가 각각 8예(4.8%), 아데노바이러스가 4예(2.4%), 인플루엔자 바이러스가 3예(1.8%)에서

검출되어 기존의 국내 보고와 비교하여 보았을 때도 리노바이러스가 우리나라 소아 하기도 감염에 중요한 원인 바이러스일 것으로 사료된다.

리노바이러스의 임상 양상에 대한 기존의 연구들은 배양법으로 리노바이러스의 감염이 증명된 환자들의 임상 양상을 분석한 것이 대부분이며 급성 하기도 감염에 국한된 연구 보고는 드물다. 리노바이러스 감염이 성인에 비하여 소아에서 심한 증상을 유발하는 것은 최초의 리노바이러스 혈청형이 밝혀진 시기부터 잘 알려진 사실로 리노바이러스 감염이 증명된 성인 20명과 소아 15명의 임상상을 비교하였을 때 성인이 주로 상기도 감염의 증상을 보였음에 비하여 소아에서는 고열과 함께 호흡 곤란, 흉벽 함몰, 나음 및 천명음의 빈도가 높아, 연령에 따라 임상상이 다른 특징을 보였다(29). 이에 비하여 소아연령에 국한하여 다른 호흡기 바이러스, 특히 아데노바이러스 및 호흡기세포융합바이러스에 의한 감염과 비교하였을 경우 리노바이러스에 의한 급성 하기도 감염 증상은 다른 호흡기 바이러스에 비하여 경미한 것으로 여겨지고 있다. 리노바이러스는 흔히 감기철("cold season")로 여겨지는 9월부터 다음해 5월까지 유행하며 특히 감기철의 처음과 끝부분인 늦가을과 봄에 발생이 빈번하나, 연중 어느 계절에도 발생이 가능하여 여름 감기의 중요한 원인이 된다. 다른 호흡기 바이러스(파라인플루엔자 바이러스 등)와는 달리 한 지역에서 특정 혈청형이 수년간에 걸쳐서 반복적으로 나타나지 않아 매년 주된 혈청형이 바뀌며, 여러 혈청형이 한 시점에 동시에 유행하기도 하는 양상을 보인다. 또한 리노바이러스 감염은 흔히 다른 호흡기 바이러스의 유행과 함께 증가하기도 한다(30, 31).

본 연구에서는 1997년 9월에 3예를 비롯 1997년 12월, 1998년 10월, 1999년 6월에 각 1예 및 1999년 11월에 2예에서 리노바이러스 감염이 증명되어 늦가을에서 겨울에 이르는 시기에 흔하였다. 특히 1999년 6월과 1999년 11월의 증례는 파라인플루엔자 및 호흡기세포융합바이러스의 유행시기에 리노바이러스 감염이 발생하여(Figure 5) 다른 호흡기 바이러스와 같은 시기에 유행한다는 기존의 보고와 일치하는 양상을 보였다. 또한 총 4예의 사망례(1예는 아데노바이러스가 분리되었으며 나머지 3예는 원인 병원체가 밝혀지지 않음)에서 리노바이러스가 검출되지 않았으며, 이환된 8명의 환자들은 모두 별다른 합병증 없이 모두 완쾌되어 비교적 경미한 양상의 하기도 감염을 유발하는 것으로 추정되며 이 역시 기존의 보고와 유사한 결과로 사료된다.

요 약

목적 : 최근 리노바이러스가 하기도 감염의 직접적인 원인이 된다는 증거가 축적되고 있으며, 역전사 중합효소반응(RT-PCR)을 이용한 리노바이러스의 검출 방법이 개발되었다. 저자들은 소아 하기도 감염 환자에서 역전사 중합효소반응으로 리노바이러스 감염을 진단함으로써 리노바이러스가 하기도 감염에서 차지하는 중요성과 감염증의 임상적 특징을 파악하고자 하였다.

방법 : 1997년 8월부터 2000년 3월까지 서울대학교병원 소아과에 입원한 하기도 감염 환자 중 연령이 5세 이하이며, 기저 질환을 가진 환자를 제외한 166명의 환아들을 대상으로 역전사 중합효소반응을 이용하여 리노바이러스 감염을 진단하였다. 급성 하기도 감염의 원인이 되는 다른 병원체에 대하여는 객담 및 혈액배양검사와 혈청검사를 토대로 세균 및 마이코플라즈마 감염을 진단하였으며, 다른 호흡기 바이러스의 감염은 각 바이러스에 적절한 배양법으로 진단하였다. 리노바이러스가 검출된 환아들을 대상으로 임상적 특징을 분석하였으며, 하기도 질환의 원인으로써 리노바이러스가 기여하는 바를 평가하였다.

결과 : 총 166명의 환아들 중 42명(25.3%)에서 원인 병원체가 확인되었으며, 리노바이러스 감염은 8명(4.8%)에서 진단되었다. 리노바이러스 이외의 원인으로는 마이코플라즈마 감염이 7예에서 진단되었으며, 호흡기 바이러스는 모두 38예(22.9%)로 RSV가 15(9.0%)예, 파라인플루엔자 바이러스가 8예(4.8%), 아데노바이러스와 인플루엔자 바이러스는 각각 4예(2.4%)와 3예(1.8%)에서 분리되었다. 리노바이러스에 의한 급성 하기도 감염은 늦가을에서 겨울에 이르는 시기에 흔하며, 임상 진단으로는 폐렴이 많았고, 이환된 환아들은 심한 합병증이나 사망한 경우 없이 모두 회복하였다.

결론 : 리노바이러스는 소아 급성 하기도 감염의 주요 원인 바이러스의 하나로 추정되므로 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: *Principles and practice of infectious disease, 4th ed.* churchill livingstone, New York, 1990-1998
- 2) Feigin RD, Cherry JD: *Textbook of pediatric infectious disease, 3rd ed. vol 1.* WB Saunders, Philadelphia, 1839-1865
- 3) de Arruda E, Hayden FG, McAuliffe JF, de Sousa MA,

- Mota SB, McAuliffe MI, Geist FC, Carvalho EP, Fernandes MC, Guerrant RL: *Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil.* J Infect Dis 164:252-258, 1991
- 4) Papadopoulos NG, Hunter J, Sanderson G, Meyer J, Johnston SL: *Rhinovirus identification by BglI digestion of picornavirus RT-PCR amplicons.* J Virol Method 80:179-185, 1999
- 5) Paisley JW, Lauer BA, McIntosh K, Glode MP, Schachter J, Rumack C: *Pathogens associated with acute lower respiratory tract infection in young children.* Pediatr Infect Dis J 3:14-19, 1984
- 6) Kellner G, Popow-Kraupp T, Kundi M, Binder C, Wallner H, Kunz C: *Contribution of rhinoviruses to respiratory viral infections in childhood: A prospective study in a mainly hospitalized infant population.* J Med Virol 25:455-469, 1988
- 7) McMillan JA, Weiner LB, Higgins AM, Macknight K: *Rhinovirus infection associated with serious illness among pediatric patients.* Pediatr Infect Dis J 12:321-325, 1993
- 8) Kim JO, Hodinka RL: *Serious respiratory illness associated with rhinovirus infection in a pediatric population.* Clin Diag Virol 10:57-65, 1998
- 9) Abzug MJ, Beam AC, Gyorkos EA, Levin MJ: *Viral pneumonia in the first month of life.* Pediatr Infect Dis J 9:881-885, 1990
- 10) Chidekel AS, Rosen CL, Bazzzy AL: *Rhinovirus infection associated with serious lower respiratory illness in patients with bronchopulmonary dysplasia.* Pediatr Infect Dis J 16:43-47, 1997
- 11) Rabella N, Rodriguez P, Ortegui M, Mercader M, Gurgui M, Prats G: *Conventional respiratory viruses recovered from immunocompromised patients: Clinical considerations.* Clin Infect Dis 28:1043-1048, 1999
- 12) Ghosh S, Champlin R, Couch R, Englund J, Raad I, Malik S, Luna M, Whimbey E: *Rhinovirus infections in myelosuppressed adult blood and marrow transplantation recipients.* Clin Infect Dis 29:528-532, 1999
- 13) Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL: *Rhinoviruses infect the lower airways.* J Infect Dis 181:1875-1884, 2000
- 14) Hazlett DTG, Bell TM, Tukei PM, Ademba GR, Ochieng WO, Magana JM, Gathara GW, Wafula EM, Pamba A, Ndinya-Achola JO, Arap Siongok TK: *Viral etiology and epidemiology of acute respiratory infections in children in Nairobi, Kenya.* Am J Trop Med Hyg 39:632-640, 1988
- 15) Arruda E, Hayden FG: *Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR.* Molecul Cell Probes 7:373-379, 1993
- 16) Ireland DC, Kent J, Nicholson KG: *Improved detection*

- of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR. *J Med Virol* 40:96-101, 1993
- 17) Kammerer U, Kunkel B, Korn K: Nested PCR for specific detection and rapid identification of human Picornaviruses. *J Clin Microbiol* 32:285-291, 1994
 - 18) Pitkaranta A, Arruda E, Malberg H, Heyden FG: Detection of rhinoviruses in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 35:1791-1793, 1997
 - 19) Andeweg AG, Bestebroer TM, Huybreghs M, Kimman TG, de Jong JC: Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested RT-PCR. *J Clin Microbiol* 37:524-530, 1999
 - 20) Andreoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattré P: Differential detection of rhinoviruses and Enteroviruses RNA sequence associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol* 61:341-346, 2000
 - 21) Hyypia T, Puhakka T, Ruuskanen O, Makeal M, Arola A, Arstila P: Molecular diagnosis of human rhinovirus infection: Comparison with virus isolation. *J Clin Microbiol* 36:2081-2083, 1998
 - 22) Pitkaranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Heyden FG: Detection of rhinoviruses, Respiratory Syncytial Virus, and Coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 102:291-295, 1998
 - 23) Steininger C, Aberle SW, Popow-Kraupp T: Early detection of acute rhinovirus infection by a rapid reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1: 129-133, 2001
 - 24) Krilov L, Pierik L, Keller E, Mahan K, Watson D, Hirsch M, Hamparian V, McIntosh K: The association of rhinoviruses with lower respiratory tract disease in hospitalized patients. *J Med Virol* 19:345-352, 1986
 - 25) 윤보영, 박진영, 이환중, 윤종구: Respiratory syncytial virus A, B 아형의 유행 양상 및 임상상. *감염* 28:481-491, 1996
 - 26) 표진원, 이환중: 소아의 adenovirus 호흡기 감염증. *감염* 28:493-501, 1996
 - 27) Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK: Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 14: 1054-1059, 1995
 - 28) 나송이, 홍정연, 최은화, 윤보영, 이환중: 소아의 급성 바이러스성 하기도 감염증의 원인 및 임상상. *소아과* 39: 1690-1699, 1996
 - 29) Reilly CM, Hoch SM, Stokes J Jr, McClelland L, Hanparian VV, Ketler A, Hilleman MR: Clinical and laboratory findings in case of respiratory illness caused by coryzaviruses. *Ann Intern Med* 57:515-525, 1962
 - 30) Monto AS, Cavallaro JJ: The Tecumseh study of respiratory illness. II. Patterns of occurrence of infection with respiratory pathogens, 1965-1969. *Am J Epidemiol* 94:280-289, 1971
 - 31) Monto AS, Bryan ER, Ohmit S: Rhinovirus infections in Techumsch, Michigan: Frequency of illness and number of serotypes. *J Infect Dis* 156:43-49, 1987