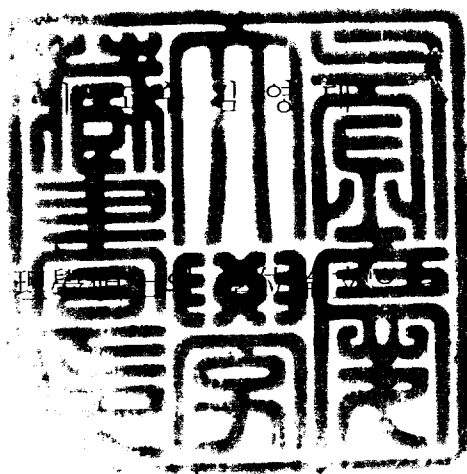


2006. 2. 28.

이학석사 학위논문

Virus culture test를 이용한 RSV와 Adenovirus의 조기검출



이 論文을 金 英 浩 氏 謹 製 출 함

2006년 2월

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

미 생 물 학 과

정 해 홍

이 논문을 정해홍의 이학석사
학위논문으로 인준함

2006년 2월

주 심 이학박사 최 태 진

위 원 이학박사 김 영 태

위 원 이학박사 김 군 도



목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	10
1. 실험 재료	10
1-1 세포주(cell line)	10
1-2 배지(media)	10
1-3 검체(sample)	11
1-4 시약(reagent)	11
2. 실험 방법	11
2-1. Cell line culture	12
2-2. 검체의 보관 및 전처리	12
2-3. 바이러스 배양	13
2-4. 배양 세포의 Indirect immunofluorescence assay	13
2-5. Plate Centrifugation	14
2-6 실험 및 분석	14
IV. 결 과	16
1. 검출 시간	16
2. CPE 발견 시간	22
3. IFA에서의 양성 세포 수 산정	28
4. 조기 검출의 비율	36

5. 3일 이내에 검출되어진 검체의 비율	38
V. 고 찰	40
VI. 요 약	43
VII. 참고문헌	45

List of Tables

Table 1. Comparison of detection times of RSV samples between conventional culture and plate centrifugation methods	17
Table 2. Comparison of detection times of Adenovirus samples between conventional culture and plate centrifugation methods	20
Table 3. Comparison of CPE detection times of RSV samples between conventional culture and plate centrifugation methods	23
Table 4. Comparison of CPE detection times of Adenovirus samples between conventional culture and plate centrifugation methods	26
Table 5. Stained cell count of RSV positive sample in both methods	30
Table 6. Stained Cell count of Adenovirus positive sample in both methods	34
Table 7. Early detection rate for RSV and Adenovirus	37
Table 8. Detected sample for 3days	39

List of Figures

Figure 1. Structure of respiratory syncytial virus	4
Figure 2. Structure of Adenovirus	6
Figure 3. Detection patterns of virus culture test	9
Figure 4. Detection patterns of RSV positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods ..	18
Figure 5. Detection patterns of Adenovirus positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods	21
Figure 6. Detection patterns of CPE form RSV positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods	24
Figure 7. Detection patterns of CPE form Adenovirus positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods	27
Figure 8. Stained cell according to IFA in conventional culture	29
Figure 9. Comparison number of stained cell of RSV positive sample in both methods	31
Figure 10. Stained cell according to IFA in Plate centrifugation	33
Figure 11. Comparison number of stained cell of Adenovirus positive sample in both methods	35

Studies on the early dedection of RSV and Adenovirus using virus culture test

Hae-Hong Jung

*Department of Environmental Microbiology, Graduate school of
Industry, Pukyong National University*

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) and Adenovirus have detected from nasal pharyngeal aspirates by virus culture test at the laboratory of medical institution. The dignosis of respiratory RSV and adenovirus infections are usually dependent on the results based upon the conventional culture techniques. However, These techniques are required for several days (up to 10 days) to identify the development of cytopathic effect. In the present study, We have introduced and evaluated the methods of a plate centrifugation step in virus culture test.

Forty seven RSV positive nasopharyngeal specimens and thirty two Adenovirus positive nasopharyngeal specimens were tested by both conventional culture and plate centrifugation techniques using a 24-well plate with Hep-2 cells. The plate centrifugation in virus culture test was also retrospectively performed for 6 Adenovirus positive and 50 adenovirus negative samples. Rsluts from both methods were analyzed by the detection time, The first CPE time, and the number of stained cells at the

third day.

Out of the 47 RSV positive samples, Thirty-five (74.46%) samples were detected at the earlier time by plate centrifugation methods than these of conventional culture techniques. Ten (21.27%) samples were detected at the same day. Two (4.25%) samples were detected earlier by conventional culture techniques. Out of 32 Adenovirus positive samples, Twenty-seven (84.37%) were detected at the earlier time by plate centrifugation methods than those of conventional culture techniques. Four (12.5%) samples were detected at the same day. One (3.12%) sample was detected faster by conventional culture techniques. In general, the detection time was faster by plate centrifugation method compared to the conventional culture test.

I. 서 론

Respiratory syncytial virus (RSV)와 Adenovirus는 소아에서 기도에 감염되어 호흡기계 질환을 일으키는 중요한 바이러스이며 면역력이 약한 환자에게는 치명적일 수도 있다(1). 그 빈도 또한 높아 소아 폐렴환자 중 29-47%가 바이러스와 관련이 있음이 밝혀져 있다(2). Respiratory RSV는 처음 일반 감기와 유사한 증세가 있는 실험실 침팬지의 콧물에서 분리 되었다고 해서 “Chimpazee Coryza agent”라 불렸었다(3). 1957년에 위막성 후두염을 가진 어린이와 폐렴을 가진 다른 어린이로부터 분리되어 사람에게 병변이 일어나는 것이 확인되었다. 조직 세포에 배양했을 때 합포체(syncytium)를 잘 형성하여 ‘Respiratory syncytial virus’라고 재명명되었다. pneumovirus 속으로 분류되고 직경이 80-150nm에서 길이 20 μ m까지 있다. 형태는 필라멘트 형 혹은 구형으로 여러 형태이고 스파이크를 지닌 envelope에 싸여 Paramyxovirus와 유사하지만 차이점이 있다(Figure 1). 그리고 단일 나선의 RNA를 가지고 있다(4). RSV에 의한 호흡기질환은 주로 온화한 겨울 기후 동안에 주로 발생하고 우리나라의 경우 가을에서 겨울로, 겨울에서 봄으로 바뀌는 환절기에 많이 발생한다. 성인에는 RSV의 감염이 가벼운 상기도 감염을 일으키지만 연령이 낮을수록 심각하게 발전할 수 있다(5). 주로 환자와 가까운 접촉으로 인해 감염이 된다. RSV는 열에는 매우 약해서 55 $^{\circ}$ C 이상에서 10분 내에 99%의 바이러스가 생물학적 활성을 잃게 된다. 그리고 pH 5 이하에서는 급속히 비활성화 된다. 잠복기는 4-5일 정도이고 최초 감염은 코, 인두, 인후 등 상부 호흡기도 점막에서 시작되며 차츰 기관지, 모세기관지, 폐포에 까지 감염이 진행된다(4). 하기도가 감염될 때 환자는 기침, 열, 재채기, 천명, 과호흡, 중이염으로 발전한다. 현재로서는 감염을 피 할 특별한 예방법이 없고 항원성의 다양성으로 인하여 유아에게서의 예방접종도 불가능 하다. 3세 이후부터 RSV에 대한 특이 적 항체의 보유가 가능하다.

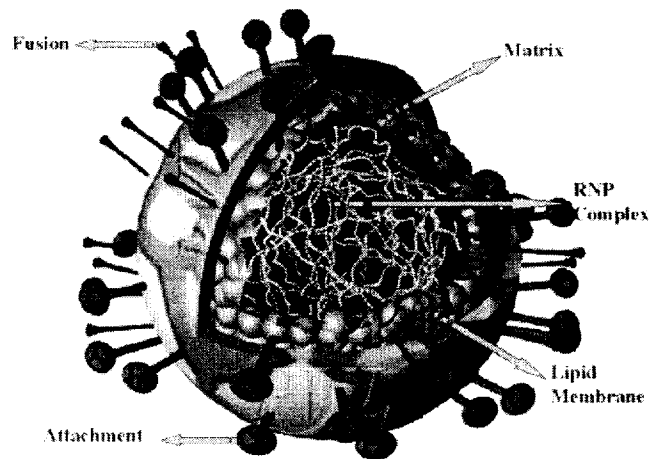


Figure 1. Structure of respiratory syncytial virus

합병증은 현재까지 알려져 있지 않으며 회복 기간은 7-12일정도 소요된다. 일반적으로 치사율은 현대적인 치료에 의해 병원에 입원한 어린이의 경우 20% 이하이다. 환자의 비인강(nasopharynx)의 호흡기 상피 세포에 증식하기 때문에 비인두의 도발 혹은 비강의 세척액 검체는 바이러스 분리에 가장 좋은 검체이다. 배양시 이 바이러스에 감수성을 가지는 Hep-2 세포에서 잘 자란다(6).

Adenovirus는 1953년 어린이의 인두편두 조직의 초대 배양에서 처음 분리 되었다. 1962년에는 설치류에서 12형이 종영을 일으킬 수 있다는 것을 확인하였으나 사람에게서는 아직 확인되지 않았다. 유행 시기는 주로 늦겨울, 봄, 이른 여름이며 유아나 어린이의 급성 상하기도 질환의 중요한 원인 바이러스이며 산업화된 나라에 있어서 모든 급성 호흡기 질환의 2-5%를 차지한다(7). 호흡기 질환 외의 급성 질환은 위장염(gastroenteritis), 결막염(conjunctivitis), 유행성 각결막염(epidemic keratoconjunctivitis), 급성출혈성 방광염(acute hemorrhagic cystitis), 백일해양 증후군(pertussis-like syndrom), 간염(hepatitis)그리고 아데노이드 조직에 잠복 감염성 질환이 일어난다(8). 감염지역은 전 세계적으로 일어나며 전염은 산발적인 유행 질환으로 다양하게 일어나고 잠복기는 5-8일 정도이다. 감염의 첫째 부위는 결막 구강 인두 혹은 장관일 수 있고 그리고 결과적으로 감염은 주변의 편두 조직에 확산된다. 드물지만 태아의 폐 뇌나 간, 신장에서 분리 될 수 있다. 최근에는 골수 이식 환자에서도 감염이 발생하고 있다. 직경이 60-80nm이고 피막이 없으며 20면체 capsid의 면면에는 6개의 단체 결합체인 hexon capsomer가 자리 잡고 있다. virion 하나에 총 252개의 capsomer가 존재한다(Figure 2). 핵산은 이중나선의 DNA를 가지고 있다. 진단검사를 위해 구강인두분비물, 대변(fecce), 뇨(urine)에서 분리할 수 있으며 질병 초기에 적절한 채취 및 감수성 있는 숙주세포에 신속하게 접종 할 경우 바이러스의 분리율을 높일 수 있다(9).

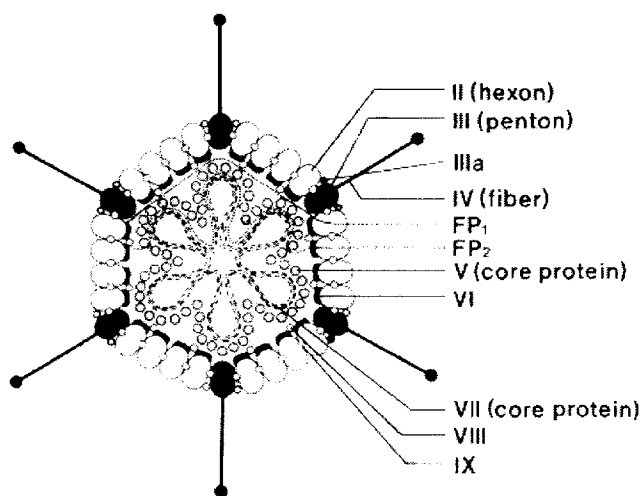


Figure 2. Structure of Adenovirus

현재 RSV와 Adenovirus 검출을 하기 위한 방법으로서는 혈청항체검출법이 많이 이용되고 있으나 특이성과 민감도가 낮은 단점이 있기 때문에 바이러스 배양법이 신속성은 떨어지지만 특이성과 민감도가 높기 때문에 우수한 방법으로 알려져 있다(1). 이 외에도 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction)에 의해 보다 예민하게 바이러스 존재 유무를 확인하는 방법이 있으나 인력과 비용의 부담으로 이 방법은 아직 일반적인 의료기관에서 광범위하게 이용되고 있지 못한 실정이다(10).

바이러스 배양법은 1949년에 Enders등이 소아마비를 일으키는 Polio virus 를 실험실에서 배양한 세포에 감염시켜 증식시킨 것이 그 시초가 되어 1952년에 Dulbecco가 배양세포를 이용하여 개발한 플라그 측정법(plaque assay)이 오늘날 보편적인 정량법으로 확립되었다. 현재 임상에서 이루어지는 바이러스 배양법은 먼저 인체나 동물에서 유래한 세포주(cell line)를 특수 표면 처리한 플라스틱 용기에 멸균한 배양액과 함께 적절한 환경으로 배양하게 되면 용기 바닥에 부착되어 증식하면서 세포 단층(monolayer)을 이루게 되고 이러한 배양세포에 바이러스를 함유한 검체를 접종하게 되면 바이러스가 복제 증식하는 과정에서 숙주세포의 세포병변효과(cytopathic effect; CPE)가 나타나고 이를 위상차 현미경으로 관찰함으로써 바이러스의 존재나 증식을 간접적으로 판단할 수 있게 된다(11, 12). 직접적으로 확인하기 위해서 CPE가 나타났을 때 바이러스에 대한 특이항체를 이용하여 간접 면역형광법(indirect immunofluorescence assay; IFA)으로 숙주세포 핵의 염색여부를 형광현미경으로 확인하여 바이러스의 유무를 판단하게 된다(11, 13).

현재 의료기관의 바이러스 검사실에서는 RSV와 Adenovirus검사를 위해 비인두 흡입물을 검체로 하여 바이러스 배양법으로 검사가 이루어지고 있는데 RSV와 Adenovirus의 CPE를 관찰하기 위해서는 3-10일 이상이 소요된다. 하지만 RSV와 Adenovirus에 의한 기도 감염의 경우 세균에 의한 호흡기 감염과의 구별이 용이하지 않아 신속히 치료 방향을 결정하기 위해서는 바이러스의 조기 검출이 요구된다(14). 조기 검출에 대한 많은 연구들이

이루어지고 있지만 질병의 성격에 비추어 볼 때 아직 환자에게는 시기적절한 치료를 위한 신속성을 보여주고 있지 못한 것이 현실이다. 의료기관의 검사실에서는 계속적으로 조기 검출을 위한 방법들을 연구되어지고 있는데 Adenovirus의 경우 shell vial culture를 통해 conventional culture법 보다 조기 검출의 가능성을 열어 보인 적이 있다(15). 이는 대량으로 검사를 시행하는 검사실에서는 비용과 인적 부담으로 쉽게 적용되고 있지 않고 conventional culture 방법을 이용하는 의료기관이 대부분이다.

본 연구에서는 conventional culture법에서 검체의 접종 방법과 배양 방법에 변화를 주어 conventional culture법 간의 비교 실험을 통해 조기검출의 효율성을 알아보고 검사실에서의 유용성을 실험해 보았다. 배양 세포에 원심력을 가하면 세포의 generation time을 감소시키고(16), 세포 유전자의 활성화를 통하여 증식 주기를 변화시키고(17), 세포 수명을 증가시키는 것으로 알려져 있으나 아직 이에 대한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다(18). 검사실에서 이루어지고 있는 보편적인 방법은 검체의 접종 후 3일 이내에 CPE가 나타나면 배양세포를 떼어내서 IFA에 들어가고 그렇지 않더라도 3일째에 무조건 IFA에 들어간다(19). 여기서 음성이 나오면 계속적으로 CPE를 관찰하고 8일 이내에 CPE가 나타나면 IFA에 들어가고 CPE가 나타나지 않으면 8일째에 IFA에 들어간다(Figure 3)(20, 21). 결국에는 CPE가 나타나지 않더라도 즉 음성인 검체일 경우 두 번의 IFA를 해야 하며 시간이 오래 걸리게 되는 것이다. 본 실험에서는 매일 CPE를 관찰하고 IFA를 시행했으나 대부분의 의료원 바이러스 검사실에서 이를 적용하기에는 비용과 인력의 문제점이 있어 거의 현실적으로는 불가능하다. 따라서 plate 원심분리법을 기존의 conventional culture법에 적용함으로써 바이러스 조기 검출의 유용성을 조사하였다.

접종일	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------

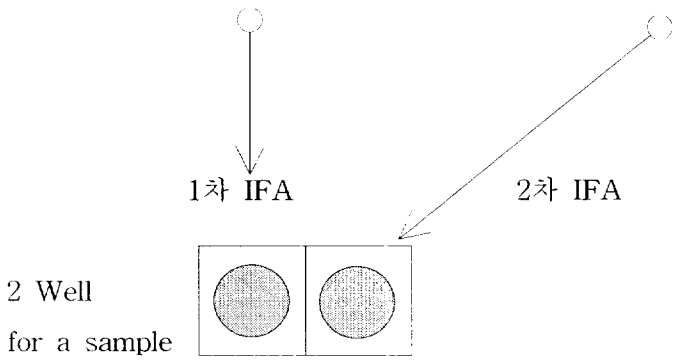


Figure 3. Pattern of virus culture test

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 세포주(cell Line)

Cell line은 ATCC 세포주은행에서 실험이 이루어지기 2개월 전에 분양을 받아서 계대 배양 10-15회를 거친 Hep-2 cell (human epidermoid carcinoma)을 사용하였다. 25T flask와 24well plate에 배양 후 monolayer가 충분하게 확보 되었을 때 실험에 사용하였다.

1-2. 배지(media)

Minimum essential media (MEM: Gibco)을 기본배지로 사용하고 pH유지를 위해 sodium bicarbonate를 첨가하여 적정하였으며, 세균의 오염을 막기 위한 항생제로 Gibco사의 antibiotic-antimycotic을 첨가하였으며 filtering을 통해 멸균하여 사용하였다. Filtering을 했을 때 pH가 0.2 상승함을 감안하여 pH 7.2로 먼저 적정하여 filtering 후 최종 pH 7.4가 되게 하였다. 기본 배지에 fetal bovine serum (FBS)을 10% 첨가한 것을 성장 배지로 사용하였으며, FBS 2%를 가한 배지는 세포 밀도를 유지하기 위한 유지 배지로 사용하였다.

1-3. 검체(sample)

RSV양성으로 이미 판정 난 검체로서 47개와 Adenovirus 양성으로 이미 판정 난 검체 32개를 확보하여 이를 실험 검체로 이용하였으며 이 검체들은 -70℃에서 냉동 보관된 검체로서 환자로 부터 채취한지 1일에서 15일 사이의 검체이다. 이들은 호흡기 바이러스 질환으로 의심되는 환자의 비인두흡인액(nasopharyngeal aspirate)으로 채취 직후 viral transport media에 넣어 보관 하였다.

1-4. 시약(reagent)

- (1) Phosphate buffered saline (pH 7.6): 슬라이드 세척용
- (2) Hanks' balanced salt solution (HBSS): 검체 희석과 배양 세포 세척용
- (3) Trypsin-EDTA: 부착세포를 떼어낼 때 사용
- (4) Mouse anti-respiratory syncytial virus monoclonal antibody : 슬라이드에 도말한 세포에 1차 반응항체
- (5) FITC-Conjugated anti-mouse IgG: 발색반응을 위한 2차 항체

2. 실험 방법

Conventional culture법에 비해 plate centrifugation법을 시행한 실험에 있어 RSV와 Adenovirus의 검출 시간과 IFA를 통한 현미경 관찰을 통해 어떠한 영향을 미치는지에 대해 초점을 맞추어 실험하고 결과를 정리하였다.

먼저 RSV와 Adenovirus 양성 검체의 conventional culture법을 했을 때와 plate centrifugation방법을 했을 때의 IFA를 통한 검출 시간을 알아보았다. RSV와 Adenovirus 양성 검체의 conventional culture법을 했을 때와 plate centrifugation방법을 했을 때의 위상차 현미경을 통한 CPE 발견시간을 알아보았다. RSV와 Adenovirus 양성 검체의 배양 중 검출 당시의 IFA를 거친 현미경 상의 양성 세포 수를 알아보았다.

2-1. Cell line culture

ATCC 세포은행으로부터 Hep-2 cell (human epidermoid carcinoma)을 분양받아 계대 배양 횟수 15-20회를 거친 세포를 숙주세포로 24-well plate와 25T flask에 36℃에서 CO₂ (5%)로 배양하였으며 fetal bovine serum (FBS)를 10% 첨가한 MEM을 세포의 성장 배지로 사용 하였으며, 성장 배지는 제조시 pH는 7.4로 4℃냉장 보관하며 제조일로 7일이 넘지 않은 배지만을 사용하였다. 사용 전에 37℃ water bath를 이용해 30분 동안 예열시켜 사용하였으며 계대 배양시 flask바닥의 부착세포를 떼어내기 위해 pH7.4 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 후 trypsin-EDTA를 2분 간 처리 하였으며 계대 배양 다음날 FBS를 2% 첨가한 MEM배지로 플라스크와 Plate의 배지를 교체해 주고 계속 3일 단위로 교체함으로서 세포 상태를 유지 시켰다.

2-2. 검체의 보관 및 전처리

RSV와 Adenovirus 양성 검체 모두 동일하게 처리하였으며 미생물의 오염을 막기 위해 철저히 aseptic clean bench에서 작업을 하였으며 고압증기 멸균이나 E.O gas 멸균을 거친 기구를 사용하였다. Viral transport

media (VTM)로 phosphate buffered saline (pH7.4)에 bovine albumin을 최종 농도 5%가 되게 첨가하고 항생제로 vancomycin, gentamycin, fungizone을 첨가하여 제조하였다. 이를 conical 튜브에 2ml을 넣고 여기에 검체인 비인후흡인액을 2-3ml 정도 담아 검사실까지 운반, 냉동 보관하였다. Vial transport media (VTM)에 넣어져 냉동된 검체를 37℃ water bath에 녹여 Hanks' balanced salt solution (HBSS)을 3ml 첨가하고 검체를 균질하게 vortex로 혼합한 후 2000-3000xg으로 30분 동안 4℃에서 원심분리를 한 후 상층액을 300μl 취해 하나의 plate well에 분주한다. 이렇게 각각 한 검체에 2개의 plate를 준비하고 각 plate에 10개의 well을 준비하여 여기에 검체를 분주하였다.

2-3. 바이러스 배양

검체가 접종되면 36℃ CO₂ 5%의 배양기에 넣어 배양하였으며 접종 후 24시간 경과 후 배지를 2% FBS MEM 배지로 교체했다. 하루 24시간을 10일 동안 위상차 현미경을 이용해 Hep-2 cell의 CPE 여부를 관찰하였다.

2-4. 배양 세포의 Indirect immunofluorescence assay(IFA)

Day 1부터 day 10까지 매일 하나씩 well 바닥의 세포를 scraper로 긁어내어 E-tube에 담아 media 성분을 제거하기 위해 cell washing을 하였는데 E-tube를 원심분리 한 다음 상청을 제거하고 phosphate buffer solution (pH7.6)을 넣고 혼합 후 다시 원심분리 하여 상청을 제거했다. 이러한 세척을 2차례 반복하였고 마지막 가라앉은 cell에 300μl PBS(pH7.6)을 넣어 부드럽게 혼합한 다음 10 hole slide에 30μl씩 분주를 하여 자연 건조시켰다. 약 1시간 정도 자연 건조 후 100% acetone에 10분 간 처리하여 고정

을 하고 다시 2분 간 건조 후 바이러스에 대한 특이항체(단클론 항체 IgG)를 각 Hole에 30 μ l 씩 분주하여 습윤 상자에 넣고 이 슬라이드를 36 $^{\circ}$ C에서 45분 간 반응시켰다. 이 때 45분의 시간을 엄수 하였으며 반응 시간이 끝나면 흐르는 증류수에 세척 후 FITC-conjugated anti-mouse IgG를 각 Hole에 30 μ l 씩 분주하여 45분 간 습윤상자에 넣어 36 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 이 또한 시간을 엄수 하였으며 반응 시간이 끝난 슬라이드는 흐르는 PBS(pH7.6)로 한번 세척 후 Jar에 PBS (pH7.6)를 500ml정도 담아 Jar에 슬라이드를 넣고 stirer를 이용해 10분 간 세척을 하였다. 다음으로 증류수에 1분간 담구어 세척하고 자연 건조를 30분 간 하였다. Axioskop2 형광현미경을 사용하여 400배에서 핵이 형광으로 염색된 세포의 존재 유무를 파악하여 검체 접종일로부터의 일수를 기록하고 200배에서 한 hole 내의 핵이 염색된 세포 수를 산정하여 이를 기록하였다.

2-5. Plate Centrifugation

Conventional culture방법에서 검체 접종 때와 배양 방법에 있어 차이를 두었는데 접종 직후 plate를 700xg에서 45분간 35 $^{\circ}$ C로 원심분리 하였다. 그리고 24시간 후에 2% FBS MEM로 배지를 교체해 주고 48시간 후에 700xg에서 45분간 35 $^{\circ}$ C로 원심분리 하였다.

2-6 실험 및 분석

각각 하나의 검체를 conventional culture법으로 배양할 plate의 10well에 접종을 하고 plate centrifugation방법을 할 plate의 10well에 접종을 하여 매일 CPE유무를 관찰하고 scraping하여 IFA를 통해 양성 세포 유무를 관

찰하였다. 양성 세포가 나타난 것은 현미경 x100 하나의 field에서 양성세포 수를 산정 하였다. 각 검체 별로 conventional culture법을 했을 때와 plate centrifugation방법을 했을 때에 따른 접종일로부터의 배양 일수 별로 검출 건수를 비교 하였고, conventional culture법과 plate centrifugation방법을 했을 때에 따른 접종일로부터의 배양 일수 별로 CPE 발견 건 수를 비교 하였다. 그리고 3일 이내에 검출된 검체를 대상으로 검출될 당시 IFA상의 핵이 염색된 양성 세포의 수를 conventional culture방법과 plate centrifugation방법을 했을 때로 나누어 비교해 보았다.

IV. 결 과

1. 검출 시간

1-1. RSV 양성 검체의 검출 시간에 따른 검체 수

RSV 양성 검체의 conventional culture법과 plate centrifugation방법을 했을 때의 검출 시간을 알아보고 접종 다음 일을 day 1로 하여 10일까지 각 일별로 검출된 검체의 수를 파악하고, 전체 검체에 대한 비율(%)을 알아보았다.

RSV 양성 검체를 conventional culture방법으로 했을 경우 하루 만에 검출된 검체는 없었으며 2일 만에 검출된 검체가 2건으로 4.3%, 3일 만에 검출된 검체가 11건으로 23.4%, 4일 만에 검출된 검체가 18건으로 38.3%, 5일 만에 검출된 검체가 5건으로 10.6%, 6일 만에 검출된 검체가 4건으로 8.5%, 7일 만에 검출된 검체가 2건으로 4.3%, 8일 만에 검출된 검체가 1건으로 2.1%, 9일 만에 검출된 검체가 1건으로 2.1%, 10일 만에 검출된 검체가 2건으로 4.3%이었다. 50%이상이 2-4일 사이에 검출 되었다. 가장 많은 검체가 검출된 일수는 4일이었다(Table 1). Plate centrifugation 방법을 행한 배양에서는 하루 만에 검출된 검체가 6건으로 12.8%, 2일 만에 검출된 검체가 9건으로 19.1%, 3일 만에 검출된 검체가 14건으로 29.8%, 4일 만에 검출된 검체가 10건으로 21.3%, 5일 만에 검출된 검체가 5건으로 10.6%, 7일 만에 검출된 검체가 1건으로 2.1%, 하루 만에 검출되는 경우가 있었으며 50% 이상이 1-3일 만에 검출이 되었다. 그리고 가장 많은 검체가 검출된 일수는 day 3 이었다. Table 1에 RSV 검출 현황을 요약하였으며 이 표를 근거로 검출 시간을 그래프로 표시한 결과 conventional culture법보다 plate centrifugation방법을 시행 했을 때 조기에 검출되었다(Figure 4).

Table 1. Comparison of detection times of RSV samples between conventional culture and plate centrifugation methods.

Detection times	No. of RSV detected sample (%)	
	Conventional culture	Plate centrifugation
day 1		6(12.8%)
day 2	2(4.3%)	9(19.1%)
day 3	11(23.4%)	14(29.8%)
day 4	18(38.3%)	10(21.3%)
day 5	5(10.6%)	5(10.6%)
day 6	4(8.5%)	
day 7	2(4.3%)	1(2.1%)
day 8	1(2.1%)	
day 9	1(2.1%)	
day 10	2(4.3%)	
No detection		
Total	47(100%)	47(100%)

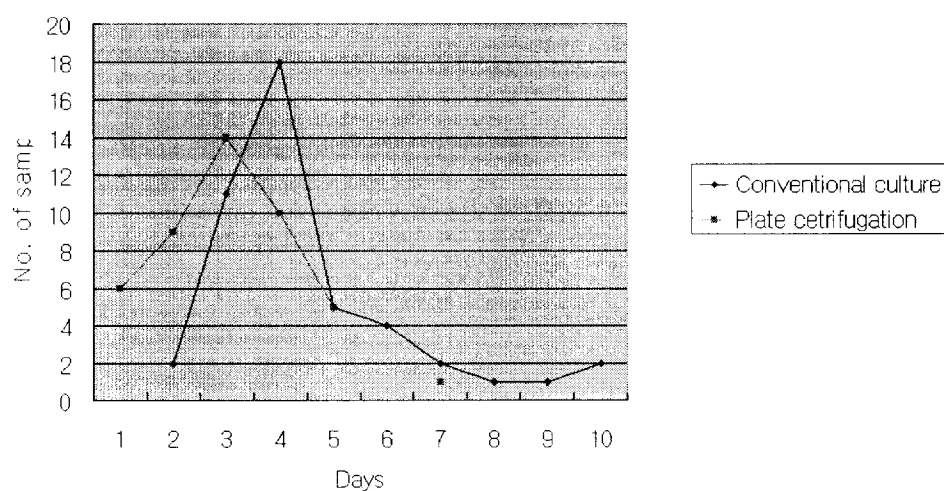


Figure 4. Detection patterns of RSV positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods.

1-2. Adenovirus 양성 검체의 검출 시간에 따른 검체 수

Adenovirus 양성 검체의 conventional culture방법과 plate centrifugation 방법을 행했을 때의 검출 시간을 알아보고 접종 다음 일을 day 1로 하여 10일까지 각 일별로 검출된 검체의 수를 파악하고, 전체 검체에 대한 비율(%)을 알아보았다.

Adenovirus의 conventional culture법을 시행 했을 경우 1-2일 만에 검출된 검체는 없었으며 3일 만에 검출된 검체가 7건, 4일 만에 검출된 검체가 16건, 5일 만에 검출된 검체가 4건, 6일 만에 검출된 검체가 2건, 7일 만에 검출된 검체가 1건, 8일 만에 검출된 검체가 1건으로 9-10일 째 검출된 경우는 없었다. 검체의 50%가 3-4일 사이에 검출되었다. 가장 많은 검체가 검출된 일수는 day 4 이었다(Table 2).

Plate centrifugation방법 에서는 하루 만에 검출된 검체가 2건, 2일 만에 검출된 검체가 9건, 3일 만에 검출된 검체가 14건, 4일 만에 검출된 검체가 6건, 6일 만에 검출된 검체가 1건으로 하루 만에 검출되는 경우가 있었으며 50% 이상이 1-3일 만에 검출이 되었다. Plate centrifugation 방법을 이용했을 때 다수의 검체들이 conventional culture법에 비해 조기 검출됨을 알 수 있었다. 가장 많은 검체가 검출된 일수는 Day 3 이었다(Table 2). Adenovirus 검출 시간은 conventional culture법보다 plate centrifugation방법을 시행했을 때 검출 시간이 조기에 이루어짐을 확인할 수 있었다(Figure 5).

Table 2. Comparison of detection times of Adenovirus samples between conventional culture and plate centrifugation methods

Detection times	No. of Adenovirus detected sample(%)	
	Conventional culture	Plate centrifugation
1day		2(6.3%)
2days		9(28.1%)
3days	7(21.8%)	14(34.8%)
4days	16(50.0%)	6(18.8%)
5days	4(12.5%)	
6days	2(6.3%)	1(3.1%)
7days	1(3.1%)	
8days	1(3.1%)	
9days		
10days		
No detection		
Total	32(100%)	32(100%)

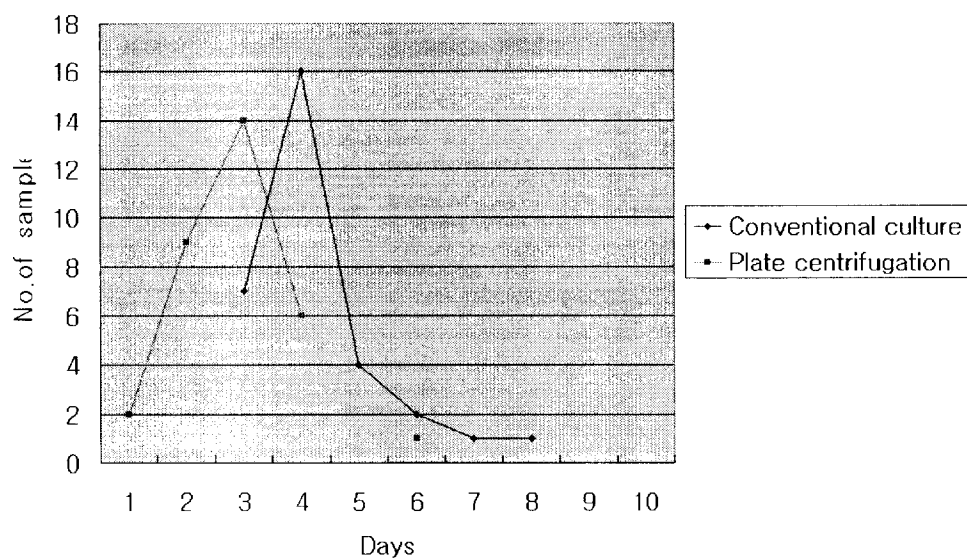


Figure 5. Detection patterns of Adenovirus positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods.

2. CPE 발견 시간

2-1. RSV 양성 검체의 CPE 발견 시간에 따른 검체 수

RSV 양성 검체를 접종한 배양 세포를 매일 위상차 현미경으로 관찰하여 처음 CPE가 관찰된 일수를 파악하여 일수 별로 발견된 검체수를 알아보았다. Conventional culture법의 경우 1-3일까지 CPE가 관찰된 검체는 없었으며 4일에 관찰된 검체가 5건으로 10.6%, 5일 만에 관찰된 검체가 8건으로 17.0%, 6일 만에 관찰된 검체가 8건으로 17.0%, 7일 만에 관찰된 검체가 6건으로 12.8%, 8일 만에 관찰된 검체가 10건으로 21.3%, 9일 만에 관찰된 검체가 5건으로 10.6%, 10일 만에 관찰된 검체가 3건으로 6.4%, 10일이 지나도록 관찰되지 않은 검체가 4건으로 8.5%였다(Table 3).

Plate centrifugation방법에서는 1-2일까지 CPE가 관찰된 검체는 없었으며 3일 만에 관찰된 검체가 7건으로 14.9%, 4일 만에 관찰된 검체가 11건으로 23.4%, 5일 만에 관찰된 검체가 12건으로 25.5%, 6일 만에 관찰된 검체가 9건으로 19.1%, 7일 만에 관찰된 검체가 4건으로 8.5%, 8일 만에 관찰된 검체가 1건으로 2.1%, 9일 만에 관찰된 검체가 1건으로 2.1%으로 나타났다(Table 3). Figure 6에서 conventional culture법에서 보다 plate centrifugation방법을 시행 했을 때 많은 수의 검체들이 조기에 CPE를 보였음을 확인 할 수 있었다.

Table 3. Comparison of CPE detection times of RSV samples
between conventional culture and plate centrifugation
methods

CPE detection times	No. of CPE detected RSV positive sample(%)	
	Conventional culture	Plate centrifugation
day 1		
day 2		
day 3		7(14.9%)
day 4	5(10.6%)	11(23.4%)
day 5	8(17.0%)	12(25.5%)
day 6	8(17.0%)	9(19.1%)
day 7	6(12.8%)	4(8.5%)
day 8	10(21.3%)	1(2.1%)
day 9	5(10.6%)	1(2.1%)
day 10	3(6.4%)	
No detection	4(8.5%)	
Total	47(100%)	47(100%)

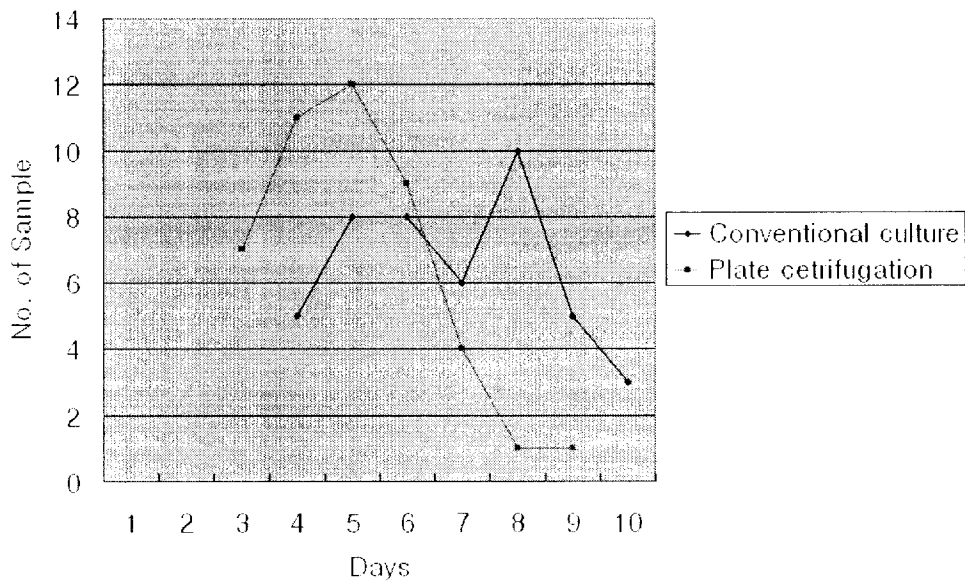


Figure 6. Detection patterns of CPE form RSV positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods.

2-2. Adenovirus 양성 검체의 CPE 발견 시간에 따른 검체 수

Adenovirus 양성 검체를 접종한 배양 세포를 매일 위상차 현미경으로 관찰하여 처음 CPE가 관찰된 일수를 파악하여 일수 별로 발견된 검체 수를 알아보았다.

Adenovirus의 conventional culture법의 경우 1-3일까지 CPE가 관찰된 검체는 없었으며 4일 만에 검출된 검체가 1건으로 3.1%, 5일 만에 검출된 검체가 4건으로 12.5%, 6일 만에 검출된 검체가 6건으로 18.8%, 7일 만에 검출된 검체가 10건으로 31.3%, 8일 만에 검출된 검체가 7건으로 21.8%, 9일 만에 검출된 검체가 3건으로 9.4%으로 나타났으며 10일이 지나도록 발견되지 않은 검체가 1개로 3.1%이다(Table 4).

Plate centrifugation방법에서는 1-2일까지 CPE가 관찰된 검체는 없었으며 3일 만에 검출된 검체가 6건으로 18.8%, 4일 만에 검출된 검체가 10건으로 32.3%, 5일 만에 검출된 검체가 11건으로 34.3%, 6일 만에 검출된 검체가 4건으로 12.5%, 7일 만에 검출된 검체가 1건으로 3.12%를 보였다. Figure 7에서 보게 되면 conventional culture법에서 보다 plate centrifugation방법을 시행했을 때 많은 수의 검체들이 조기에 CPE를 보였음을 확인 할 수 있다.

Table 4. Comparison of CPE detection times of Adenovirus samples between conventional culture and plate centrifugation methods

CPE detection times	No. of CPE detected Adenovirus positive sample(%)	
	Conventional culture	Plate centrifugation
day 1		
day 2		
day 3		6(18.8%)
day 4	1(3.1%)	10(32.3%)
day 5	4(12.5%)	11(34.3%)
day 6	6(18.8%)	4(12.5%)
day 7	10(31.3%)	1(3.12%)
day 8	7(21.8%)	
day 9	3(9.4%)	
day 10		
No detection	1(3.1%)	
Total	32(100%)	32(100%)

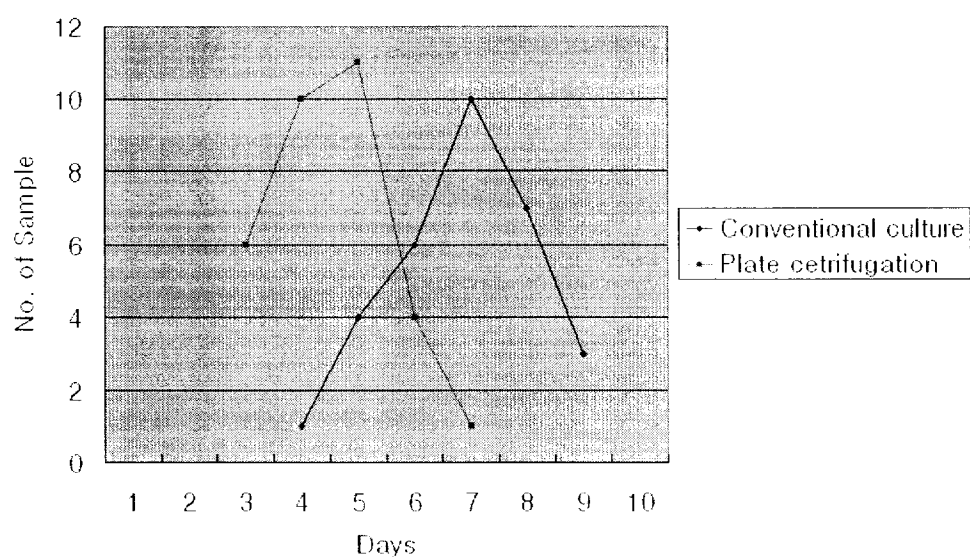


Figure 7. Detection patterns of CPE form Adenovirus positive samples between conventional culture and plate centrifugation methods.

3. IFA에서의 양성 세포 수 산정

3-1. 3일째 배양 세포에서 RSV가 검출된 sample의 형광염색 상의 양성 세포 수

RSV 양성 검체의 conventional culture방법에서 3일 이내에 양성을 보인 검체 13을 처음 검출에서 관찰한 핵 염색된 양성 세포 수를 관찰하여 수를 counting하고 동일한 검체를 plate centrifugation방법을 했을 때의 처음 검출에서 IFA를 통해 염색하여 관찰한 결과 Figure 8과 같이 핵 염색된 양성 세포의 수를 counting 하였다.

Sample1의 경우 conventional culture법에서 159개이고 plate centrifugation방법에서는 287이었다. Sample2의 경우 각각 116개와 153이었다. Sample3의 경우 각각에서 9개와 134이었다. Sample4의 경우 각각 21개이고 52이었다. Sample5의 경우 각각 10개이고 31이었다. Sample6의 경우 각각 87개이고 306이었다. Sample7의 경우 각각 8개이고 213이었다. Sample8의 경우 각각 24개이고 109이었다. Sample9의 경우 각각 36개이고 148이었다. Sample10의 경우 각각 23개이고 318이었다. Sample11의 경우 각각 6개이고 28이었다. Sample12의 경우 각각 7개이고 61이었다. Sample13의 경우 각각 13개이고 241이었다. Figure 9에서와 같이 plate centrifugation방법을 시행 했을 때 양성 세포의 수는 많은 차이를 보였다 (Table 5).

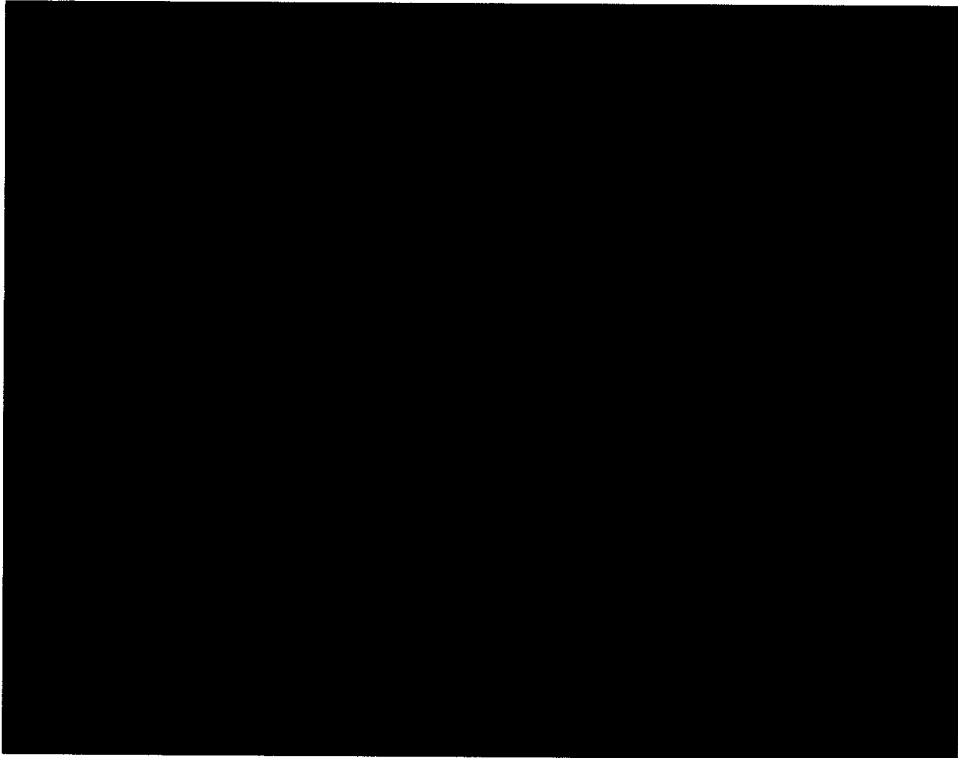


Figure 8. Stained cells according to IFA in conventional culture method
(No. of Stained cells = 36)

Table 5. Stained cell count of RSV positive samples in both methods

Sample	No. of stained cells at day 3	
	Conventional culture	Plate centrifugation
1	159	287
2	116	153
3	9	134
4	21	52
5	10	31
6	87	306
7	8	213
8	24	109
9	36	148
10	23	318
11	6	28
12	7	61
13	13	241

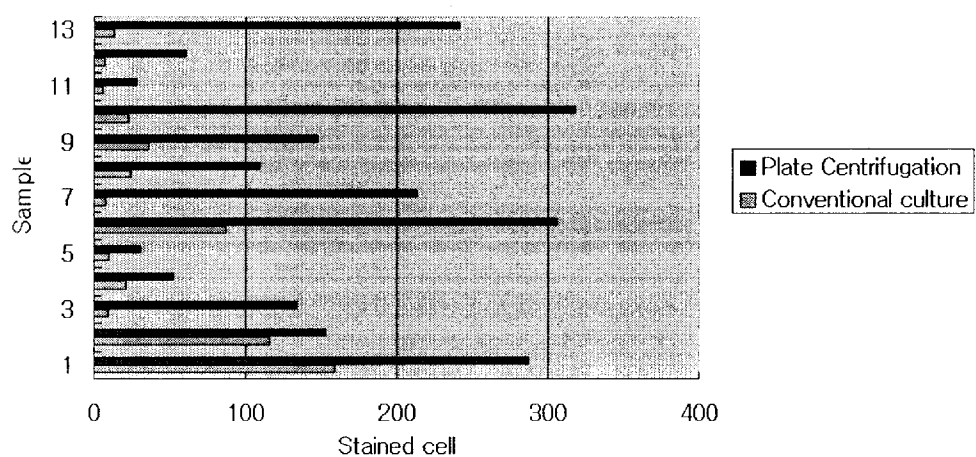


Figure 9. Comparison number of stained cells of RSV positive samples in both methods

3-2. 3일째 배양 세포에서 Adenovirus가 검출된 sample의 형광염색상의 양성 세포 수

Adenovirus 양성 검체의 conventional culture법에서 3일 이내에 양성을 보인 검체 13을 처음 검출에서 관찰한 핵 염색된 양성 세포 수를 관찰하여 수를 counting하고 동일한 검체를 plate centrifugation방법을 시행 했을 때의 처음 검출에서 IFA를 통해 염색하여 관찰한 결과 Figure 10와 같이 핵 염색된 양성 세포의 수를 counting 하였다. Sample1의 경우 conventional culture법에서 15개이고 plate centrifugation방법에서는 21이었다. Sample2의 경우 conventional culture법에서 8개이고 plate centrifugation방법에서는 26이었다. Sample3의 경우 conventional culture법에서 4개이고 plate centrifugation방법에서는 16이었다. Sample4의 경우 conventional culture법에서 14개이고 plate centrifugation방법에서는 7이었다. Sample5의 경우 conventional culture법에서 8개이고 plate centrifugation방법에서는 18이었다. Sample6의 경우 conventional culture법에서 11개이고 plate centrifugation방법에서는 13이었다. Figure 11에서와 같이 conventional culture법에서와 plate centrifugation방법을 시행 했을 때의 양성 세포의 수는 많은 차이를 보였다(Table 6).



Figure 10. Stained cells according to IFA in plate centrifugation method
(No. of Stained cells = 148)

Table 6. Stained cell numbers of Adenovirus positive samples in both conventional culture and plate centrifugation methods

Sample	No. of stained cell at day 3	
	Conventional culture	Plate centrifugation
1	15	21
2	8	26
3	4	16
4	14	7
5	8	18
6	11	13

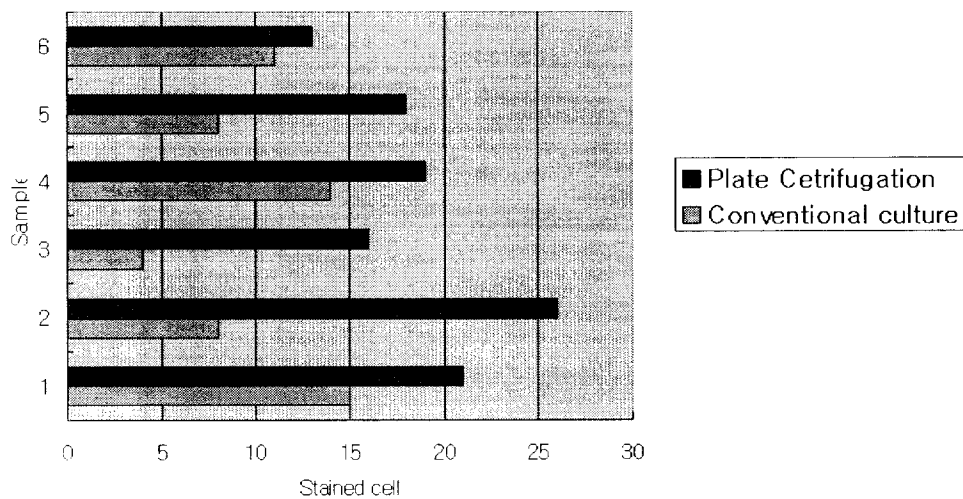


Figure 11. Comparison of stained cell numbers of Adenovirus positive samples in both methods

4. 조기 검출의 비율

RSV 양성인 검체에서는 conventional culture법에서 검출 되어진 시간 보다 plate centrifugation방법에서 더욱 빨리 검출된 경우가 35건으로 74.46%를 차지했으며 두 방법 모두 동일한 시간에 검출되어진 경우가 10건으로 21.27%, conventional culture법에서 오히려 더 빨리 검출 할 수 있었던 경우는 2건으로 4.25%를 차지하였다(Table 7).

Adenovirus 양성인 검체에서는 conventional culture법에서 검출 되어진 시간 보다 plate centrifugation방법에서 더욱 빨리 검출된 경우가 27건으로 84.37%를 차지했으며 두 방법 모두 동일한 시간에 검출된 경우가 4건으로 12.5%, conventional culture법에서 오히려 더 빨리 검출 할 수 있었던 경우는 1건으로 3.12%를 차지하였다(Table 7).

Table 7. Early detection rate for RSV and Adenovirus

	Early detection by plate centrifugation	Detection on the same day	Early detection by conventional culture	Total
No. of RSV positive sample(%)	35(74.46)	10(21.27)	2(4.25)	47(100)
No. of Adenovirus positive sample(%)	27(84.37)	4(12.5)	1(3.12)	32(100)

5. 3일 이내에 검출 되어진 검체의 비율

RSV 양성 검체의 경우 conventional culture법에서는 3일내에 IFA를 통해 양성임을 발견하게 된 경우는 13건으로 27.65%를 차지했으며 Plate centrifugation방법에서 3일 이내에 양성임을 발견한 경우는 29건으로 61.70%를 차지하였다(Table 8).

Adenovirus 양성 검체의 경우 conventional culture법에서는 3일 내에 IFA를 통해 양성임을 발견하게 된 경우는 7건으로 21.87%를 차지했으며 plate centrifugation방법에서 3일 이내에 양성임을 발견한 경우는 25건으로 78.12%를 차지하였다(Table 8).

Table 8. Virus detection in the day 3 samples

	Conventional culture	Plate centrifugation	Total
RSV positive sample(%)	13(27.65)	29(61.70)	47(100)
Adenovirus positive sample(%)	7(21.87)	25(78.12)	32(100)

V. 고 찰

본 논문에서는 기존의 conventional culture방법에 plate centrifugation하는 방법을 적용하여 배양 세포에 원심력을 가할 경우 세포의 generation time을 감소시키고, 세포유전자의 활성화 세포대사의 변화 세포수명의 증가의 효과를 기대하며 이러한 자극이 실제 virus culture 검사의 신속성과 정확성에 얼마만큼 영향을 주는지에 대해서 또한 임상에서는 어떠한 영향을 줄 것인 지에 대하여 알아보았다.

RSV와 Adenovirus에 의한 호흡기 질환 환자의 경우 병원성 세균에 의한 호흡기 질환 환자와는 다른 방향의 치료를 결정해야하기 때문에 신속성과 정확성이 매우 중요하게 요구된다(22). 효소중합반응을 이용한 신속하고 정확한 검사법이 있지만 검사에 소요되는 과다한 비용은 환자의 부담으로 이어져 현실적으로 도입이 어렵다. RSV와 Adenovirus를 인후흡인액을 통해 검출하는데 있어 virus culture법이 진단용으로 널리 이용되어지고 있지만 조기검출이 어렵다는 단점을 늘 안고 왔다. 이에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있지만 아직 아쉬움이 많은 부분이다. Adenovirus의 경우 shell vial culture법을 통해 conventional culture법보다 조기검출의 가능성을 열어 보인 적이 있는데 이는 대량으로 검사를 시행하는 검사실에서는 비용과 인적 부담으로 이용하기에 쉽지가 않으며 conventional culture방법으로 이루어지는 의료기관이 대부분이다(23).

본 실험과정에서 700xg로 45분 동안 35℃로 원심분리를 한 후 Plate를 관찰했을 때 media의 색이 alkali화 되어있었으며 pH meter를 이용해 pH를 측정한 결과 7.8-8.1을 보였다. 원심분리 후 5% CO₂ 배양기에서 곧 pH가 7.4가까이 돌아왔으나 45분의 긴 시간동안 높은 pH에 세포들이 노출되었다는 점에 있어 본 실험의 결과에 얼마나 어떻게 영향을 미쳤는지에 우려가 되었다. Well의 바닥이 실질적으로 고르지가 않고 가장자리가 높고 중심이 낮은 형태였으나 원심분리 후 부착세포의 위치에는 큰 변화가 없었다. 그러나 미처 부착되지 않고 부유되어있는 소수의 세포들이 중심에 몰

리며 CPE 관찰에 어려움이 다소 있었다. 바이러스의 역가는 검체의 보관과 운반 과정에서의 조건에 영향을 많이 받으므로 본 실험에 이용되어진 검체들은 -70°C 에서 보관되져 다소 역가가 떨어졌을 것으로 추측되었으나 실험 결과에는 큰 영향을 주지 않았다.

본 실험에서의 테이터들을 의료기관의 검사실에서 이루어지는 검사 패턴에 비추어 그 유용성을 알아보았다. 바이러스 검사실에서는 검체의 접종 후 3일 이내에 CPE가 나타나면 배양 세포를 떼어내서 IFA에 들어가고 그렇지 않더라도 3일째에 무조건 IFA에 들어간다. 여기서 음성이 나오면 계속적으로 CPE를 관찰하고 8일 이내에 CPE가 나타나면 IFA에 들어가고 CPE가 나타나지 않으면 8일째에 IFA에 들어간다. 결국에는 CPE가 나타나지 않더라도 즉 음성인 검체일 경우 두 번의 IFA를 해야 하며 시간이 오래 걸리게 된다. 본 실험에서는 매일 IFA를 했으나 검사실에서 이를 적용하기에는 비용과 인력의 문제점이 있어 거의 현실적으로는 불가능하다. Plate centrifugation방법을 했을 경우 CPE의 조기 발견과 3일째 IFA에서 많은 수의 양성 검체들이 검출되어지는 것으로 볼 때 불필요한 2차 IFA를 줄일 수 있을 것으로 사료되고, 1차 IFA가 3일 째가 아닌 2일 째로, 2차 IFA가 10일째가 아닌 8일 째로 당겨지는 패턴의 변화로 더 조기에 검출되어지는 검체의 수를 늘리는 것도 좋을 것으로 사료 된다.

CPE의 발견 시간에서도 plate centrifugation방법을 했을 때 더욱 조기에 발견 되어 짐을 알 수 있었는데 특히 3일 째까지 CPE가 나타나지 않으면 3일 째에 IFA를 하고 그래도 나타나지 않으면 8일째에 IFA를 해야 함으로 결국 많은 시간이 지연되었다. 이러한 경우의 검체에서도 plate centrifugation방법을 했을 경우 CPE가 8일 이내에 나타남으로 조기에 IFA를 시행 할 수 있을 것이다. 3일 이내 plate centrifugation방법을 했을 때 더욱 많은 양성 세포 수가 발견되는 이점이 있었다. 세포의 수가 많으면 많을수록 검출에 대한 확신을 심어줄 수 있고 여러 가지 요인으로 인한 artifact와의 구별에도 용이하다. 보편적으로 IFA에서 양성 세포의 수가 하나의 x100 field에서 2개 이상 발견이 되면 바이러스 양성으로 진단하고 있

으며 음성일 경우라도 artifact나 염색 과정에서 일부분의 세포가 떨어져 소실되어 음성으로 잘못 진단하는 경우가 발생한다. 그러므로 양성 세포의 비율이 높게 나타남은 이러한 문제점을 보완하는데 많은 도움이 될 것이고 보다 확실한 검출 근거를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다. 각 검체에서 두 가지 방법을 시행했을 때 plate centrifugation방법을 했을 경우 보다 더 빨리 검출된 검체가 월등히 많아 같은 시료에서 plate centrifugation방법을 이용하는 것이 조기 검출에 우수함을 알 수 있었다. 그리고 3일 이내에 검출되어진 검체의 수가 plate centrifugation방법에서 월등히 많음으로서 불필요한 IFA를 줄일 수 있을 것으로 사료되어진다.

본 실험에서 conventional culture방법에서 보다 plate centrifugation방법을 했을 때 다량의 검체가 더 빨리 검출이 되어 짐을 알 수 있었는데 이를 통해 진단의 오류를 막고 조기에 진단하여 의사가 환자를 신속하게 치료 방향을 결정하고 환자에게 적용함에 있어 많은 도움이 될 것으로 보여 진다.

V. 요약

본 연구에서는 virus culture test에서 검체의 접종 방법과 배양 방법에 차이를 두어 plate centrifugation방법을 거쳤을 때와 conventional culture 방법 간의 차이를 알아보고 검사에서의 유용성을 알아보고자 하였다. 이미 RSV 양성으로 진단받은 환자의 검체 47개와 Adenovirus양성으로 진단받은 환자의 검체 32개를 대상으로 각각 하나의 검체에 일반적인 conventional culture방법과 검체 접종 후 plate centrifugation방법을 700xg에서 45분간 35℃로 시행한 두 가지 방법을 모두 시행하여 최초 검출 시간과 숙주 세포의 CPE 발진 시간, 3일째 배양의 IFA를 통한 관찰에서 핵이 염색된 양성 세포의 수를 알아보았다.

RSV 양성 검체와 Adenovirus 양성 검체의 두 방법에 따른 조기 검출 비율을 비교했을 때 RSV 양성 검체의 경우 conventional culture방법에 비해 plate centrifugation방법을 했을 때 더욱 빨리 검출된 검체는 35개로 74.46%를 차지하였으며 두 방법 모두 동일한 일수에 검출된 검체는 10개로 21.27%, conventional culture방법에서 더욱 빨리 검출된 검체는 2개로 4.25%를 차지하였다. Adenovirus 양성 검체의 경우 conventional culture방법에 비해 Plate centrifugation방법을 했을 때 더욱 빨리 검출된 검체는 27개로 84.37%를 차지하였으며 두 방법 모두 동일한 일수에 검출된 검체는 4개로 12.5%, conventional culture방법에서 더욱 빨리 검출된 검체는 1개로 3.12%를 차지하였다. 두 가지 양성 검체 모두에서 plate centrifugation 방법을 했을 때 더욱 빨리 검출되어짐을 알 수 있었다. 3일 이내에 검출된 검체의 수를 비교해 보면 RSV 양성 검체의 경우 conventional culture방법에서는 13개로 27.65%를 차지하고 plate centrifugation방법을 한 것에서는 29개로 69.7%로 42.05%가 2차 IFA를 하지 않아도 되고, Adenovirus양성 검체의 경우 conventional culture방법에서는 7개로 21.87%를 차지하고

plate centrifugation방법을 한 것에서는 25개로 78.12%로 56.25%가 2차 IFA을 하지 않아도 됨으로 해서 인력과 비용의 불필요한 소모를 줄 일 수 있을 것으로 사료 된다.

VII. 참고문헌

1. 강정옥. 비인두 흡입물(Nasopharyngeal aspirate)에서 Respiratory syncytial virus검출을 위하여 직접면역형광법과 효소면역법 비교. 대한임상병리학회지 1990;10:135-9
2. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Jr., ed. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1992:1007
3. Williams SD Kwok S. Polymerase chain reaction : Application for viral detection. In: Lennette EH, ed. Laboratory diagnosis of viral infections. 2nd rev. ed New york: Marcel Dekker, 1992:17-8.
4. Spendlove RS. McClain ME, Lennette EH. 'Enhancement' of or alteration of the virus capsid by proteolytic enzymes. J Gen virol 1970;83-94
5. Shaw CB, Obermyer N, Wetmore SJ, Spirou GA, Farr RW. Incidence of adenovirus and respiratory syncytial virus in chronic otitis media with effusion using the polymerase chain reaction. Otolaryngol-Haed-Neck-Sung, 1995;113(3) :234-41
6. Minnich L, Ray CG: Comparison of direct immunofluorescent staining of clinical specimens for respiratory virus antigen with conventional isolation techniques. J Clin Microbiol 12 : 391, 1980

7. Escobar JA, Dover AS, Dens A, et al. Etiology of respiratory tract infection in children in Cali, Colombia. *Pediatric* 1976;57:123-30
8. Leland DS. Concepts of clinical diagnostic virology. In Lennette EH, ed. *Laboratory diagnosis of viral infection*. 2nd rev. ed. New York: Marcel Dekker, 1992:17-8
9. Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Law B, Hammond GW. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987;25:763-7
10. Freymuth F, Quibric M, Petitjean J : Comparison of two new tests for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence techniques. *J Clin Microbiol* 24 : 1013, 1986
11. Garden PS, ed. *Rapid virus diagnosis*. 2nd ed. London: Butterworth & Co, 1980:97.
12. Pothier P, Nicolas JC, Maur GPDS, et al : Monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus and their use for rapid detection of virus in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol* 21 : 286, 1985
13. Gardner PS, McQuillin J : *Rapid virus diagnosis. application of immunofluorescence*. 2nd ed. Butterworth, London, pp 56-91, 1980

14. Pothier P, Nicolas JC, Maur GPDS, et al : Monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus and their use for rapid detection of virus in nasopharyngeal secretions. J Clin Microbiol 21 : 286, 1985
15. 김수정. 아데노바이러스의 신속한 검출을 위한 Shell vial culture와 Conventional culture 의 비교. 대한 임상병리학회지 1997;11:481-5
16. Olsen MA, Shuck KM, sambol AR, Flor SM, O'Brien J, Cabrera BJ. Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: a practical and highly sensitive method. J Clin Microbiol 1993;31:422-5
17. West PG, Aldrich B, Hartwig R., Haller GH. Enhanced detection of cytomegalovirus in confluent MRC-5 cell treated with dexamethasone and dimethyl sulfoxide. J Clin Microbiol 1988;26:2510-4
18. Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. Clin Microbiol Rev 1993;6:150-75
19. Bartholoma NY, Forbes BA. Successful use of shell vial centrifugation culture and 16 to 18-hour immunofluorescence staining for the detection of influenza A and B in clinical specimens Am J Clin Pathol 1989;92:487-90
20. Johnston SLG Siegel CS. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 1990;28:2394-7

21. Lennette DA. Collection and preparation of specimens for viological examination. In: Lennette EH, ed. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1985:687.
22. Stott EJ, Taylor G : Respiratory syncytial virus. Brief review. Arch Virol 84 : 1, 1985
23. Bromberg K, Tannis G, Daidone B, et al : Comparison of Hep-2 cell culture and Adbott respiratory syncytial virus enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 25 : 434, 1987