

서울시내 엔테로바이러스의 감염실태 및 유전자형분석

바이러스검사팀

장정임 · 김영은 · 황영옥 · 이재인 · 진영희 · 권은영 · 육동현 · 신기영

Epidemiological Characteristics and Genotyping of Human Enterovirus in Seoul, Korea

Virus Team

**Jung-im Jang, Young-eun Kim, Young-ok Hwang, Jae-in Lee,
Young-hee Jin, Eun-young Kwon, Dong-hyun Yuk and Gi-young Shin**

Abstract

Human enteroviruses(HEVs) are common causative agents of aseptic meningitis and other enterovirus related diseases. In this study, we isolated HEVs from stool, CSF(cerebrospinal fluid), serum, and throat swab samples from patients with enterovirus related disease in Seoul, Korea from 2011 to 2014. We analyzed the genetic characteristics of HEVs isolated from these patients. For genetic analysis, we amplified the 5'-noncoding region and partial VP1(virion protein 1) region of HEVs by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). We classified them based on the nucleotide sequences of the VP1 region. The majority of HEV infections in Seoul occurred from June to August. Genotyping of isolated HEVs showed that the frequency with which individual types circulated from year to year varied considerably and 49 isolates were determined as untypeable strains. This enterovirus surveillance system plays an important role in preparing for severe outbreaks. The genetic characteristics of HEV may provide potentially useful data required for epidemiological studies.

Key words : Human enteroviruses, HEVs, Coxsackievirus, VP1, aseptic meningitis

서 론

엔테로바이러스는 영유아 및 소아층에 주로 감염되며 분변-경구, 호흡기 경로로 전파되는 병원균으로서 매년 세계적으로 유행하며 수백만명이 감염되는 바이러스이다. 엔테로바이러스는 수족구병의 원인바이러스로 알려져 있으며 불현성 감염에서부터 일반적인 감기증상, 출혈성결막염, 무균성수막염, 확장성심근염, 포진성구협염, 뇌염, 소아마비와 같은 임상증상을 보이거나(1) 백신이나 항바이러스제가 개발되어있지 않아 생명이 위협받을 수 있는 경우도 발생한다. 엔테로바이러스는 피코나바이러스과 엔테로바이러스속에 속하며, 외막이 없는 정이십면체 형태이며, genome의 형태는 양성단일가닥 7.4kb의 RNA이다(2).

최근 역전사융합효소연쇄반응법(reverse transcription PCR, RT-PCR)을 시행하여 엔테로바이러스 구조단백질인 P1부분 캡시드 단백질의 구성요소인 VP1 유전자 부위에 대한 염기 서열의 상동도 분석을 통해 엔테로바이러스를 분류하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 혈청형 특이 정보를 포함하고 있는 VP1 유전자 분석을 토대로 폴리오바이러스(PV1~3), 엔테로바이러스 A군(CA2~8, 10, 12, 14, 16, EV71), 엔테로바이러스 B군(Echo1~7, 9, 11~21, 24~27, 29~33, CA9, CB1~6, EV69, EV73), 엔테로바이러스 C군(CA1, 11, 13, 15, 17~22, 24) 및 엔테로바이러스 D군(EV68, 70)으로 분류하고 있다(3~5).

특히 엔테로바이러스 71형에 의한 수족구병 국내 사망자가 2009년에 처음 발생한 후 매년 꾸준히 사망자가 보고되었으며, 2014년 미국(6) 및 2011년 일본(7)에서 호흡기감염을 통해 엔테로바이러스 D68형이 유행하여 엔테로바이러스 연구의 중요성이 대두되었다. 이 연구에서는 질병관리본부와의 협력사업인 엔테로바이러스 실험실 감시사업을 통해 2011년부터 2014년까지 서울시에서 발생한 엔테로바이러스 의사환자들로부터 분리한 엔테로바이러스의 유전자 분석을 통하여 서울지역에서 유행하고 있는 엔테로바이러스의 유전적 다양성과 그 특성을 확인하고 그에 대한 감염병 예방 대책 수립과 새로운 진단법 개발, 항바이러스제

및 백신개발에 대한 기초자료를 제공하는데 중요한 역할을 하기 위해 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 임상시료와 RNA 추출

2011년부터 2014년까지 서울시에서 발생한 엔테로바이러스 의사환자들을 대상으로 1,410건의 분변, 직장도말, 뇌척수액, 혈청 등을 수집하였다. 분변가검물은 1g을 멸균된 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4, Sigma, USA) 9 ml에 넣어 5분 동안 진탕 후, 4°C 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 사용하였고, 뇌척수액, 혈청 및 인후도말액은 진탕 후 RNA추출에 사용하였다.

2. RT-PCR

5'-noncoding region부위에 대한 실시간 역전사융합효소반응(real-time RT-PCR)을 이용하여 엔테로바이러스 양성검체를 확인하였다. 실시간 역전사융합효소반응에서 확인된 양성검체의 RNA로부터 VP1부위에 대한 RT-PCR을 실시하였다. VP1-VP3 부위의 RT-PCR과 2nd PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 표기하였다(3, 8). RT-PCR은 Thermal cycler(2720 Thermal cycler Applied Biosystems, USA)를 이용하였으며, 반응액은 RNA추출물 1 ul와 RNase free DW 19 ul으로 하였다. 반응조건은 역전사반응(42°C, 45분)과 역전사효소 불활화 과정(94°C, 5분)을 1회 거친 후, denaturation(94°C, 30초), annealing(55°C, 30초), extension(72°C, 40초)을 40회 반복하고, final extension(72°C, 5분)을 1회 수행하였다. Second PCR은 RT-PCR 산물 1 ul에 RNase-free DW 19 ul를 첨가하여 반응시켰으며, initial denaturation(94°C, 5분) 1회, PCR(94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 40초)을 40회 수행한 후, final extension(72°C, 5분)을 1회 수행하였다. 1.5% agarose gel에 2nd PCR 산물을 30분간 전기영동(Mupid-21J, Cosmo Bio Korea)하여 image

Table. 1 The sequence of primers used for VP3-VP1 RT-nested PCR

	Primer	Region	Positions(nt)	Sequence(5' → 3')
1 st PCR	EV-1F	VP3-VP1	2207-2226	5' - GCR ATG TTR GGR ACW CAT GT - 3'
	EV-2F	VP3-VP1	2207-2226	5' - GCS ATG TTR GGM ACR CAY GT - 3'
	EV-1R	VP3-VP1	3002-3021	5' - GGR TTB GWK GAN GTY TGC CA - 3'
2 nd PCR	EV-3F	VP1	2603-2628	5' - CCH GCD CTH ACC GCW GTG GAR ACD GG - 3'
	EV-4F	VP1	2603-2628	5' - CCM ATM CTH CAA GCH GAG AYY GG - 3'
	EV-2R	VP1	2951-2973	5' - GGR SCN CCD GGW GGY ACA WAC AT - 3'
	EV-3R	VP1	2951-2973	5' - GGH GCV CCY GGY GGY ACR TAC - 3'

Y=C or T ; R=A or G ; K=G or T ; W=A or T ; S=G or C ; M=A or C ; H= A or T or C ; B=G or T or C ; D=G or A or T ; V= G or A or C ; N=G or A or T or C.

analyzer(Vilber Lourmat, France)로 350 bp와 371 bp band를 확인하였다.

3. Nucleotide Sequencing

2차 PCR 산물의 염기서열 분석은 MacroGen (MacroGen, Seoul, Korea)에서 Big Dye Dideoxy nucleotide sequencing kit와 ABI PriSM 3730XL Analyzer(Applied Biosystems, U.S.A.)을 사용하여 수행하였으며, 확인된 염기서열은 Blast(NIH) 프로그램을 이용하여 유전형 을 결정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 엔테로바이러스 실험실 표본감시 사업에 참여하는 서울 지역 병·의원에 내원한 환자들 중 엔테로바이러스 의심환자를 대상으로 엔테로바이러스의 유전형을 조사하였다. 총 1,410건의 분변, 뇌척수액(CSF), 혈청 및 인후도말액 검체로부터 바이러스 RNA를 추출하여 5'-noncoding region(5'-NCR)에 대한 실시간 RT-PCR을 수행한 결과, 2011년과 2014년 동안 엔테로바이러스 의심환자로부터 확인한 엔테로바이러스 양성 검체는 2011년 36건(36/430, 8.4%), 2012년 23건(23/299 7.7%), 2013년 24건(24/317 7.6%) 및

2014년 59건(59/363, 16.3%) 등 총 142(142/1410, 10.1%)건으로 확인되었다. 엔테로바이러스 의사환자로부터 분리한 엔테로바이러스는 10세 이하의 영·유아에게서 주로 발생하였으며 3월에서 부터 10월 사이에 엔테로바이러스가 유행하는 시기라는 보고(8)와 마찬가지로 6월에서 9월 사이에 집중적으로 관찰되었다(표 2).

2011년부터 2013년까지는 설사증상을 보이는 급성장염증상에 대하여 엔테로바이러스의 분석을 진행하였으나, 2014년부터는 검사범위를 엔테로 바이러스 의사환자로 확대함과 동시에 임상증상에 대한 정보를 수집하였다. 2014년 엔테로바이러스 양성 환자 59명에 대한 임상증상을 확인한 결과, 고열(40.7%), 두통(22.0%), 구토(8.5%), 인후통(5.1%) 및 설사(5.1%) 증상 순으로 관찰되었으며 이들 외의 증상을 보인 경우는 11명(18.6%)이었다(표 3).

중화혈청법에 기반한 엔테로바이러스의 혈청형과 VP1 유전자의 상동도 분석에 따른 계통유전학적 분류에 따른 엔테로바이러스 유전자형 사이에 대략적인 일치성이 보고된 후, 엔테로바이러스 분류는 VP1의 염기서열분석 방법이 적용되고 있다(9~12).

5'-noncoding region에 대한 실시간 RT-PCR 결과 엔테로바이러스 양성으로 확인된 142건에 대

해 역전자 PCR(RT-PCR)로 VP1 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하였다(표 4). 년도별 주로 검출된 유전자형은 2011년에는 Echovirus 30형(n=7, 19.4%), CAV2(n=4, 11.1%), EV71(n=4, 11.1%)이었으며, 2012년에는 Echovirus 6형(n=5, 21.7%), CAV4(n=4, 17.4%), CBV3(n=3, 13.0%)이었다. 2013년에는 CAV9(n=5, 21.7%), Echovirus 30형(n=3, 13.0%)이 주로 검출되었으며 2014년에는 CBV5(n=24, 40.7%), Echovirus 11형(n=4, 6.8%) 등이 주로 검출되었다. 4년간의 엔테로바이러스 감시 결과, 특정 유전자형의 지속적인 출현은 관찰되지 않았으며, 해마다 출현하는 유전자형은 다양했다. 이러한 결과는 미국에서 수행된 엔테로바이러스 감시에서 특정 유전자형의 출현은 해마다 다양하게 나타났

는 보고(13, 14)와 일치하는 것으로 엔테로바이러스 출현의 일반적 현상인 것으로 추정할 수 있다.

엔테로바이러스 5'-noncoding region이 확인된 142건 중 49건(34.5%)에서 VP1 유전자가 증폭되지 않았거나, sequencing되지 못해 유전자형에 대한 분석을 수행하지 못하여 untypeable로 판정하였다. 이러한 결과는 미국에서 2009~2013년 사이에 수행된 엔테로바이러스 감시 결과, 검출된 엔테로바이러스 중 71.4%의 유전자형이 결정되었다는 보고(14)와 2010~2013년 덴마크 국가 엔테로바이러스감시 결과, 검출된 엔테로바이러스 중 68.5%만이 염기서열이 분석되었다는 보고(15)와 유사한 결과로써, 5'-noncoding region의 증폭에 의한 엔테로바이러스의 검출에 비해 VP1 부위에 대한 nested PCR의 감도가 떨어진다는 결론을

Table. 2 The incidences of enterovirus infection in Seoul by real time RT-PCR

Year Month	2011		2012		2013		2014	
	No. of tested	No. of Positive(%)	No. of tested	No. of Positive(%)	No. of tested	No. of Positive(%)	No. of tested	No. of Positive(%)
1	28	0(0)	45	1(0.3)	47	1(0.3)	4	0(0)
2	22	0(0)	18	1(0.3)	22	0(0)	1	0(0)
3	85	0(0)	27	0(0)	20	0(0)	2	0(0)
4	40	0(0)	24	0(0)	37	0(0)	22	0(0)
5	47	1(0.2)	26	1(0.3)	31	0(0)	20	3(0.8)
6	37	8(1.9)	22	9(3.0)	19	4(1.3)	26	4(1.1)
7	34	6(1.4)	26	7(2.3)	24	5(1.6)	36	12(3.3)
8	34	6(1.4)	29	3(1.0)	28	3(0.9)	70	18(5.0)
9	41	10(2.3)	19	0(0)	25	5(1.6)	49	12(3.3)
10	14	3(0.7)	9	1(0.3)	21	3(0.9)	73	4(1.1)
11	28	1(0.2)	25	0(0)	15	3(0.9)	31	4(1.1)
12	20	1(0.2)	29	0(0)	28	0(0)	29	2(0.6)
Total	430	36(8.4)	299	23(7.7)	317	24(7.6)	363	59(16.3)

Table 3. Medical symptoms of enteroviruses detected from enteroviral patients in 2014

Symptoms No.(%)	Fever	Headache	Vomiting	Throat pain	Diarrhea	Others
	Rank1	Rank2	Rank3	Rank4	Rank5	
N=59	24(40.7)	13(22.0)	5(8.5)	3(5.1)	3(5.1)	11(18.6)

가능케 한다. 이는 5'-noncoding region의 증폭은 실시간(real time) RT-PCR을 사용하기 때문에 일반적인 PCR에 비해 감도가 높기 때문이며, VP1 부위에 대한 nested RT-PCR은 70여종에 이르는 인체감염 엔테로바이러스에 대한 염기서열 보존성과 동시에 이들을 구분하기 위한 상이성을 동시에 확보하여야 하는 어려움에 기인한 것으로 생각한다. 따라서 untypeable 엔테로바이러스의 유전자형을 규명하기 위한 진단법의 개선은 반드시 필요한 것으로 생각한다.

엔테로바이러스의 감시 및 유전자형 분석은 1) 공중보건 전문가에게 개개의 엔테로바이러스의 장기간 출현 양상을 제공하고, 2) 출현 유전형에 관련된 질병, 예를 들면 수족구병이나 무균성수막염을 예측하게 하며, 3) 특정 유전자형에 의한 유행을 감지하게 할 수 있고, 4) 새로운 진단법이나 치료법의 개발을 도울 수 있으며, 5) 폴리오바이러스의 출현을 감지할 수 있게 한다(14). 따라서 본 논문은 서울지역에서 유행하는 엔테로바이러스의 유전형과 감염상태를 파악함으로써 바이러스성 질

Table 4. Genotypes of enteroviral partial VP1 region detected in Seoul

Group	Genotype	Year				Subtotal
		2011	2012	2013	2014	
Human Enterovirus A	CA2	3	1		2	6
	CA4		4		1	5
	CA6			1	2	3
	CA10	1				1
	CA12	3				3
	CA14				1	1
	CA16	3				3
	EV71	4		1	1	6
Human Enterovirus B	CB1		1		2	3
	CB3		3			3
	CB4		1		1	2
	CB5				24	24
	CA9			5		5
	Echo6		5			5
	Echo9	2			4	6
	Echo11				3	3
	Echo18	7				7
	Echo25				3	3
Human Enterovirus D	Echo30			3		3
	Echo116		1			1
Untypable		13	7	14	15	49
Total		36	23	24	59	142

CA means coxsakievirus A, CB means coxsakievirus B.

환들의 치료 및 예방 자료로 활용될 수 있으며 특히 서울지역에서 발생하는 엔테로바이러스성 질환을 위한 기초자료로 활용될 것으로 생각된다.

결 론

1. 서울에서 2011년부터 2014년까지 발생한 엔테로바이러스 의사환자들로부터 대변, 혈청, 뇌척수액 및 인후도말액 등 1,409건의 검체를 수집하였다.
2. 실시간 RT-PCR을 이용하여 5'-noncoding region을 증폭함으로써 엔테로바이러스를 검출한 결과, 142건이 엔테로바이러스 양성인 것으로 조사되었다.
3. 엔테로바이러스 양성은 10세 이하의 영유아에서 주로 발생하였으며, 시기적으로는 6~9월 사이에 집중적으로 발생하였다.
4. 142건의 엔테로바이러스 중 93건의 유전자형이 결정된 반면 49건의 유전자형은 규명되지 않았는데 이러한 untypeable 유전자형의 출현은 현재의 진단법에서는 일반적인 현상으로 추정되며, 진단법의 개선이 필요하다.
5. 주로 발견되는 유전자형은 해마다 달랐으며, 지속적으로 발견되는 유전자형은 발견되지 않았다.

참고문헌

1. Thoelen, I, Moës, E, Lemey, P, Mostmans, S, Wollants, E and Lindberg, AM : Analysis of the Serotype and Genotype Correlation of VP1 and the 5' Noncoding Region in an Epidemiological Survey of the Human Enterovirus B Species. *J Clin Microbiol.*, 42(3):963~971, 2004.
2. Knipe, DM and Howley, PM : *Fields Virology*, 4thed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.685~775, 2011.
3. Kim, HJ, Kang, BH, Hwang, SY, Hong, JY, Kim, KS and Cheon, DS : Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virology*, 9(38), 2012.
4. Hu, YF, Yang, F, Du, J, Dong, J, Zhang, T and Wu, ZQ : Complete Genome Analysis of Coxsackievirus A2, A4, A5, and A10 Strains Isolated from Hand, Foot, and Mouth Disease Patients in China Revealing Frequent Recombination of Human Enterovirus A. *J Clin Microbiol.*, 49(7): 2426~2434, 2011.
5. Hyypia, T, Hovi, T, Knowles, NJ and Stanway, G : Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virology*, 78:1~11, 1997.
6. Yi, T, Ferdaus, H, Jennifer, ES, Ari, S, Rangaraj, S, Rebecca, AH, Xudong, L, Nadia, F, Timothy, BS, Tommy, TYL, James, DC, Tina, VH, Edward, CH and Suman, RD : Molecular Evolution and Intraclade Recombination of Enterovirus D68 during the 2014 Outbreak in the United States. *J Virol.*, 90(4):1997~2007, 2016.
7. Atsushi, K, Hideyuki, K, Junichiro, S, Urara, K, Masao, T and Masashi, S : Enterovirus 68 in children with acute respiratory tract infections, Osaka, Japan. *Emerg Infect Dis.*, 17(8):1494~1497, 2011.
8. Hyeon JY, Hwang SY, Kim HJ, Song JH, Ahn JB, Kang BH, Kim KS, Choi WY, Chung JK, Kim CH, Cho KS, Jee YM, Kim JH, Kim KS, Kim SH, Kim MJ and Cheon DS : Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human Enterovirus, South Korea, 1999-2011. *Emerg Infect Dis.* 19(8):1268~1275, 2013.
9. Oberste, MS, Maher, K, Kilpartric, DR,

- Flemister, MR, Brown, BA and Pallansch, MA : Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *J Clin Microbiol.*, 37(5):1288~1293, 1999.
10. Oberste, MS, Maher, K, Kilpartric, DR and Pallansch MA : Molecular Evolution of the Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J Virol.*, 73(3):1941~1948, 1999.
 11. Caro, V, Guillot, S, Delpeyroux, F and Crainic, R : Molecular Strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol.*, 82:79~91, 2001.
 12. Strikas, RA, Anderson, LJ, Parker, RA : Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970~1983. *J Infect Dis.*, 153:346~51. 1986.
 13. Allan, N, Steven, O and Mark, AP : Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.*, 44(8):2698~2704, 2006.
 14. Abedi, GR, Watson, JT, Pham, H, Nix WA, Oberste, MS and Gerber, SI : Enterovirus and Human Parechovirus Surveillance—United States, 2009 - 2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 64(34):940~943. 2015.
 15. Condell, O, Midgley, S, Christiansen, CB, Chen, M, Chen, NX, Ellermann-Eriksen, S, Mølvadgaard, M, Schønning, K, Vermedal, HS, Andersen, PH, Voldstedlund, M and Fischer, TK : Evaluation of the enterovirus laboratory surveillance system in Denmark, 2010 to 2013. *Euro Surveill.* 21(18). 2016.