

부산지역에서 유행한 엔테로바이러스 71형의 분자역학적 특성

박동주[†] · 박소현 · 민상기 · 조경순
바이러스과

Molecular Epidemiological Characterization of Enterovirus 71 isolated in Busan

Park Dong-ju[†], Park So-hyun, Min Sang-kee and Cho Kyung-soon
Virology Division

Abstracts

Enterovirus 71(EV-71) is responsible for frequent large-scale outbreaks of hand, foot, and mouth disease(HFMD), herpangina, and severe neurological complications such as encephalitis, aseptic meningitis, and even death. This study was performed to investigate epidemiological characteristics and diversities of EV-71 isolated from 2011 to 2013 in Busan. A total of 2,978 specimens were collected from children and screened for the isolation of enterovirus by cell culture and realtime RT-PCR. 458 positive specimens(15.4 %) were identified with enterovirus infections and 50 positive isolates out of them were EV-71. Most of EV-71 isolates were from children's specimen under 10 years old and 26 isolates(52 %) were 0 - 1 years old. The positive rates of EV-71 were 1.7 % and 2.0 % in CSF and stool samples, respectively. Aseptic meningitis was the most common clinical manifestation(46 %); herpangina(4 %), and HFMD disease(4 %). The 22 VP1 gene sequences of EV-71 were 98 - 100 % homologous with that of the Human Enterovirus 71(HEV71) isolate H11-23-KOR. The result of phylogenetic analysis of EV-71 isolates based on VP1 gene showed that most of them were classified into subgenotype C4a.

Key words : Enterovirus 71, Aseptic meningitis, Real-time RT-PCR, VP1 gene, Phylogenetic tree

서 론

엔테로바이러스 71형(EV-71)은 분류학적으로 Picornaviridae과 Enterovirus속에 속하는 양성 단 일가닥의 RNA바이러스이다^{1,2)}. 엔테로바이러스 71형을 포함하는 엔테로바이러스는 25 - 45 nm 크기의 외피가 없는 정이십면체 형태를 가지며 현재까지 80여종 이상의 혈청형이 알려져 있다¹⁾. 엔테로바이러스의 유전자는 약 7,500개정도의 염기서열

로 이루어져 있으며, 하나의 open reading frame (ORF)과 5' 및 3' 말단에 non-coding region (NCR)으로 구성되어 있다^{3,4)}. ORF로부터 발현된 polyproteins의 P1부분은 VP4, VP2, VP3, VP1을 암호화하고 있고 이중 VP1과 VP4부위의 염기서열에 따라 아유전형을 결정한다^{3,5)}. 이들은 전통적인 분류법으로 침범하는 숙주의 종류와 바이러스 병인에 따라 폴리오바이러스(3 serotypes), A군 콕사키바이러스(23 serotypes), B군 콕사키바이러스(6

[†] Corresponding author. E-mail : djpark17@korea.kr
Tel : +82-51-309-2811, Fax : 82-51-309-2819

serotypes), 에코바이러스(28 serotypes) 및 기타 엔테로바이러스로 나누어지며 혈청 중화에 따라 혈청형으로 세분화된다^{6,7)}. 최근에는 바이러스의 capsid protein인 VP1부위의 유전자 염기서열을 이용한 계통분석을 통하여 Human enterovirus (HEV) A, B, C, D의 유전자형으로 분류한다^{6,8)}. HEV-A에는 11개 혈청형의 A군 콕사키바이러스(CV-A)와 EV-71를 포함하고 HEV-B는 38개 혈청형의 B군 콕사키바이러스(CV-B), 에코바이러스(ECV), EV-69, EV-73 및 콕사키바이러스 A9형(CV-A9)이 속한다. HEV-C는 11개의 CV-A를 포함하며 HEV-D는 EV-68과 EV-70이 속한다⁹⁾.

엔테로바이러스는 주변 환경의 표면에서 생존 가능하여 직접 접촉하거나 비말을 통해 분변-구강 경로 및 호흡기를 통하여 사람에게 전파된다⁹⁾. 임상 증상은 무증상 감염에서부터 발열, 피부발진, 인후염, 수족구병, 헤르페스목구멍염, 심근염 또는 무균성 수막염과 뇌염을 일으킬 정도로 매우 다양한 증상을 보이는 질환이다^{10,11)}. 매년 봄부터 여름에 걸쳐 유행하고 있으며, 온대 지방인 우리나라에서는 5월부터 시작하여 7 - 8월 여름철에 엔테로바이러스에 의한 뇌수막염이 유행하고 있다¹¹⁾. 엔테로바이러스는 지구온난화에 따른 기후변화로 인한 환경적 이동에 영향을 받는 것으로 보고되어 있다²⁾. 또한 엔테로바이러스는 실내 온도에서 비교적 안정하여 수일 동안 생존가능하며, -20 °C에서도 오랫동안 저장할 수 있으므로 일년 내내 발병할 수 있다⁷⁾.

특히, EV-71형은 HEV-A에 속하며 수족구병을 일으키는 대표적인 엔테로바이러스이다. 이러한 수족구병은 주로 콕사키바이러스 A16형(CV-A16) 또는 EV-71형에 의해 발병하고, CV-A16은 자연 치유되는 반면 EV71형은 바이러스성 수막염, 뇌염, 급성 이완성 마비 등의 신경학적 합병증을 일으켜 영아나 소아에게 심각한 질병을 일으킨다^{12,13)}.

EV-71형의 감염은 전 세계적으로 1960년대부터 유행하였으나, 현재 서태평양지역에서 더 높은 감염률을 보이고 있으며 2009년 5월 12개월 여아가 국내 최초로 EV-71형에 의한 수족구병의 신경계 합병증으로 사망한 것이 알려진 이후 EV-71형의 감염에 대한 관심이 높아졌다¹⁴⁻¹⁶⁾. 구조적으로 EV-71형 capsid protein의 VP1과 VP4을 암호화하는 유전자를 토대로 A, B, C 세 가지 유전자 그룹으로 나눌 수 있으며 이는 B1-B5와 C1-C5의 아형으로 분류되어진다^{14,17)}. 1990년대부터 서태평양지역을 중심으로 심각한 뇌질환과 관련된 EV-71형의 집단 감염사례가 많이 발생하고 있으며 1997년 말레이시아에서 B3, 1998년 대만에서 C2, 2000년과 2003년 말레이시아에서 B4와 B5, 2000년 중국에서 C4, 2000년 한국은 C3 아형이 유행하였다^{3,18)}. 또한 2009년과 2010년 국내에서 EV-71형에 의한 수족구병이 전국적으로 유행하였으며 신경계 합병증으로 인한 사망사례가 보고되었다²⁾. 현재까지 엔테로바이러스 감염의 치료는 대증적 치료가 대부분이며, 신경계 합병증을 동반한 EV-71형 감염은 효과적인 바이러스 치료제가 없는 실정이다¹¹⁾. 면역체계가 완벽하게 발달하지 않은 5세미만의 소아의 경우 중추신경계에 감염되어 심각한 합병증을 나타낼 수 있으며 우리나라는 인구밀도가 높고 영아시기부터 아이를 보육시설에 맡기는 경우가 많아 EV-71형 집단 감염에 대한 위험성이 높다³⁾. 이러한 EV-71과 같은 엔테로바이러스 감염 진단은 주로 혈청학적 방법인 항체검사 또는 배양을 통한 바이러스를 검출하는 방법이다. 항체 검사는 간접적인 방법이며, 배양법은 일주일정도 소요되며 일부 바이러스는 숙주세포에 민감성을 나타내지 않는 단점이 있다¹⁾. 현재는 채취한 검체로부터 엔테로바이러스 유전자를 직접 검출하는 역전사효소 증합효소 연쇄반응법을 이용하여 신속하게 검사하면 몇 시간

이내에 결과를 얻을 수 있다^{19,20}). 본 실험에서는 검체와 세포배양액으로부터 엔테로바이러스의 존재 유무를 확인하기 위해 Reverse Transcriptase-PCR(RT-PCR)법을 이용하였다.

본 연구는 최근 3년간 부산지역에서 분리 동정된 EV-71형을 대상으로 분자생물학적 및 계통학적 분석을 통해 부산지역에서 유행하고 있는 EV-71형의 아형을 확인하였다. 또한 이들의 염기서열에 대한 데이터베이스를 구축하고 향후 새로운 진단법 개발 및 백신제 개발에 기초 자료로서 이용하고자 한다.

재료 및 방법

검체 대상

본 연구는 2011년부터 2013년까지 질병관리본부에서 운영하는 엔테로바이러스 실험실 감시사업에 참여한 부산 소재 의료기관의 환자를 대상으로 하였다. 해당 의료기관으로부터 임상적으로 엔테로바이러스 감염이 의심되는 환자의 검체와 채취된 검체에 대한 성별, 연령, 진단 소견, 임상 증상 등의 임상 정보를 동시에 확보하였다. 임상 정보는 진단 소견과 임상증상을 추출하여 조사하였다.

세포주, 성장 배지 및 세포배양

질병관리본부 백신연구과로부터 분양받은 human rhabdomyosarcoma(RD), African green monkey kidney cell(Vero), buffalo green monkey cell(BGM) 세포주를 사용하였으며, 각 세포들은 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 56 °C에서 30분간 불활성화 시킨 fetal bovine serum(FBS)를 2 % 농도로 첨가하여 37 °C CO₂ 항온배양기에서 배양하였다. 75 cm² flask에 각 세포를 접종하여 24시간 단층배양 후 밀도가 약 70 % 정도로 되었을 때, phosphate buffered saline

(PBS)로 세척하였다. 0.25 % trypsin을 처리하여 세포를 부유시키고 2 % FBS가 포함된 DMEM 배지로 부유한 세포를 현탁하였다. 이 세포 부유액을 24 well plate의 각 well에 1 mL씩 분주하여 24 - 48시간동안 배양한 후 배지를 제거하고 새로운 배지를 1 mL씩 분주하였다. 검체 150 µL를 각각의 well에 접종한 후 7 - 14일 동안 배양하여 도립현미경(Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 세포변형효과를 관찰하였다. 약 70 %의 세포병변이 관찰되었을 때 세포 배양액을 -70 °C에 냉동 보관하였다.

검체의 전처리 및 RNA 추출

엔테로바이러스 감염이 의심되는 환자로부터 분변 뇌척수액, 인후도찰물을 채취하였다. 각각의 검체는 4 °C에서 운반하였고 -70 °C를 유지하여 보관하였다. 인후도찰물은 VTM(virus transport medium)을 사용하여 채취하였고 뇌척수액은 별도의 전처리 없이 사용하였다. 분변의 전처리는 10 % chloroform과 glass beads가 첨가된 phosphate buffered saline(pH 7.4) 완충용액에 2 g의 분변을 넣고 20분간 강하게 진탕하였다. 3,000 rpm으로 4 °C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 본 실험에서 사용하였다. 각 검체와 세포 배양액으로부터 RNA 추출은 viral RNA extraction kit(Quigen, Germany)를 사용하였으며, column에 결합된 RNA는 diethylpyrocarbonate(DEPC)가 포함된 멸균수 130 µL에 녹여 cDNA 합성을 위한 RNA 주형으로 사용하였다.

5' 말단 영역의 실시간 RT-PCR

엔테로바이러스의 5' 말단의 non-coding region의 유전자를 표적으로 하여 real-time RT-PCR을 수행하였다. primers(EN1: 5'-CCCTGAATGCGGCT

AA-3'; EN2: 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCC-3'; EN3: FAM-CCGACTACTTTGGGT GT-BHQ)를 포함한 Accupower enterovirus real-time PCR kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 검체로부터 추출한 RNA 50 µL를 첨가하였다. Real-time RT-PCR 조건은 42 °C에서 45분, 95 °C에서 5분 1회 수행한 다음 95 °C에서 5초, 55 °C에서 20초로 45회 실시하였으며, Thermal cycler(Exicycler™96, Bioneer, Korea)를 이용하여 증폭산물을 실시간으로 검출하였다. Real-time RT-PCR에 의한 증폭산물의 Ct(threshold cycle)값이 35이하와 delta RN값이 2500이상이면 양성으로 설정하였으며 검체로부터 엔테로바이러스가 검출되었음을 의미하였다.

VP1 영역의 nested-PCR

VP1 영역의 증폭을 위하여 Table 1에 제시된 primer가 포함된 Enterovirus VP1 detection kit (iNtRON, Korea)를 이용하였다. 1차 RT-PCR 반응액은 RT-PCR buffer, dNTPs, I-starTaq DNA polymerase 및 primer가 premix된 tube(bioneer, Korea)에 추출한 RNA 2 µL와 DNase/RNase free water 18 µL를 넣어 총 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 1차 RT-PCR 조건은 Thermal cycler (Bio-RAD, USA)를 이용하여 42 °C에서 45분, 94 °C에서 5분 동안 1회 수행, 94 °C에서 30초, 55 °C에서 30초, 72 °C에서 40초 동안 40회 반복한 후

72 °C에서 5분 동안 수행하였다. 2차 PCR 반응액은 2차 PCR kit에 1차 PCR 반응산물 2 µL와 DNase/RNase free water 18 µL를 넣어 총 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 2차 RT-PCR 조건은 94 °C에서 5분, 94 °C에서 30초, 55 °C에서 30초, 72 °C에서 40초 동안 40회 반복한 후 72 °C에서 5분 동안 수행하였다. 증폭된 PCR 산물들은 SYBR (SYBR safe, Invitrogen, USA)이 첨가된 1.5 % 아가로스겔에 5 µL씩 loading하여 100V에서 25분간 전기영동한 후, UV 조사하여 375 bp의 DNA 단편의 유무를 확인하였다.

염기서열 분석

Nested-PCR에 의해 증폭된 엔테로바이러스 VP1 영역의 염기서열을 결정하기 위해 마크로젠 사에 염기서열을 의뢰하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 BLAST search program을 이용하여 기존에 보고된 바이러스와 상동성을 확인하였으며, 이러한 염기서열을 토대로 phylogenetic tree를 작성하였다. 분리된 EV-71형의 염기서열은 Genbank에 등록된 EV 540V/VNM/05(AM490151), EV CY11/BJ/CHN/2008(FJ469153), EV DTID/ZJU-62(FJ158600), EV shzh01-3(AY895132), EV 0915-MA-87(AF009549), EV 933V/VNM/05(AM490161), EV KOR-EV71-01(AY125966), EV SHZH98(AF302996), EV 8M/AUS/6/99(AF376109), EV BrCr/USA

Table 1. Oligonucleotides used for RT-PCR

Nested PCR	Primer	Oligonucleotides
VP1 1st PCR	224N-1F	5'-GCR ATG TTR GGR ACW CAT GT-3'
	224N-2F	5'-GCS ATG TTR GGM ACR CAY GT-3'
	224N-14R	5'-GGR TTB GWK GAN GTY TGC CA-3'
VP2 2nd PCR	89N-2F	5'-CCH GCD CTH ACC GCW GTG GAR ACD GG-3'
	89N-17F	5'-CCM ATM CTH CAA GCH GAG AYY GG-3'
	89N-14R	5'-GGR SCN CCD GGW GGY ACA WAC AT-3'
	89N-19R	5'-GGH GCV CCY GGY GGY ACR TAC-3'

(U22521), EV Nagoya/Japan-73(AB059813), EV 2952-SD-81(AF135888), EV 4F/AUS/4/99(AF376105), EV 2027/SIN/01(AF376111), 및 EV SB12282-SAR-03(AY905546)와 비교하였으며 ClustalX program으로 alignment하고 MAGA4를 사용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

결과 및 고찰

엔테로바이러스 분리 및 VP1 유전자 확인

2011년부터 2013년까지 3년 동안 엔테로바이러스 감염증으로 의심되는 환자의 분변, 뇌척수액 및 인후도찰물 총 2,978건의 검체를 엔테로바이러스에 감수성을 가지는 RD, BGM 및 Vero 세포주에 검체를 접종하여 세포 변형 효과를 관찰하였다. 각 검체로부터 RNA를 추출하여 real-time RT-PCR을 수행한 결과, 458건의 검체에서 Ct값이 35이하와 delta RN값이 2500이상으로 나와 엔테로바이러스가 검출되었음을 확인하였다. 기존의 보고된 논문에서 따르면 5'-NCR 영역은 엔테로바이러스의 보존된 영역으로 유전자 검색에서 표적부위로 이용되지 않으나 염기서열 분석 시 바이러스의 유전자형과 혈청형이 일치하지 않는 경우가 많다고 보고되어 있다. 최근에는 엔테로바이러스의 유전자형을 확인하기 위해 VP1 영역을 증폭하여 염기서열을 분석하는 방법이 널리 사용되고 있으며, 본 연구에서도 유전자형 확인을 위해 PCR을 이용하여 real-time RT-PCR에서 양성인 검체로부터 VP1 영역을 증폭하였다. PCR 산물을 전기 영동한 결과, 375 bp의 DNA 단편을 확인하였으며 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 각각의 VP1 유전자의 염기서열을 분석하여 24종의 엔테로바이러스 유전자형을 분리하였다.

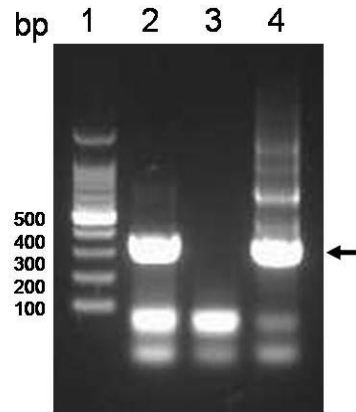


Fig. 1. Electrophoresis analysis of the PCR products of VP1 partial region from enterovirus 71. The VP1 partial region was amplified by RT-PCR. Lane1: 100bp DNA ladder, lane 2: VP1 partial region of positive case, lane 3: negative control, lane 4: positive control.

EV-71형의 성별, 검체 유형별 및 연령별 유행양상

연구 기간 동안 2,978건의 검체 중에서 엔테로바이러스 양성으로 확인된 검체는 458건으로 전체 양성률은 15.4 %이었다. 엔테로바이러스는 2011년에는 검체 건수 1200건 중 양성 검체 215건(17.9 %), 2012년에는 검체 건수 813건 중 130건(16 %), 2013년에는 전체 건수 965건 중 113건(11.7 %)이 분리되었다. 이 결과로 보아 부산지역에서 2011년과 2012년은 비슷한 수준으로 유행하였으나 2013년에 조금 감소하는 경향을 보였으며 주로 6월 하절기에 집중되어 발생하는 것을 확인하였다. 최근 3년간 양성 검체 중 EV-71형이 차지하는 평균 비율은 10.9 %이며 2011년 6.0 %(13건), 2012년 10.8 %(14건), 2013년 20.4 %(23건)로 해마다 비율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 이전 부산지역에서 분리된 EV-71형의 비율은 2007년에는 8.1 %, 2008년과 2009년에는 EV-71형이 검출되지 않았다⁹⁾. 이러한 결과로 보아 2011년 이후 부산지역에서 엔테로바이러스 감염 중 EV-71형이 차지하는 비율이 해마다 증가하는 것으로 나타났다.

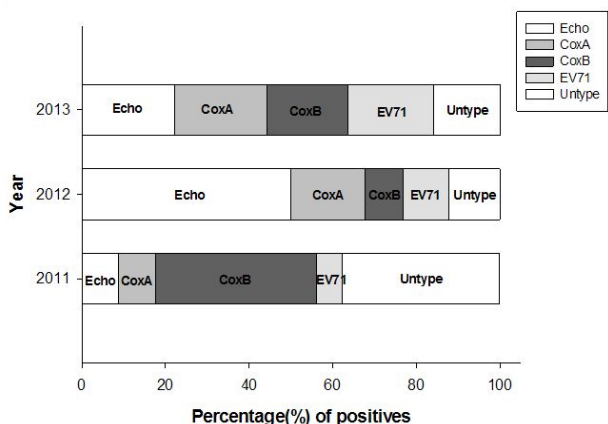


Fig. 2. Enterovirus genotypes identified in Busan from 2011 to 2013.

검체 유형별 엔테로바이러스 감염의 양성 건수는 분변이 1,414건 중 287건(20.3%), 뇌척수액 1,247건 중 156건(12.5%), 인후도찰물 317건 중 15건(4.7%) 순으로 나타났다. 각 검체 유형별 EV-71형이 차지하는 비율은 분변이 28건(2.0%)으로 가장 높았으며, 뇌척수액이 21건(1.7%)이었으며, 인후도찰물이 1건(0.3%)으로 가장 낮음을 확인하였다(Fig. 3). 2008년 국내 무균성 뇌수막염 환자를 대상으로 한 연구에서 분변 77.1%, 뇌척수액 59.1%, 인두검체 50.9%로 뇌척수액과 분변에서 높은 양성률을 보여 유사한 결과를 관찰하였다²⁾.

EV-71형이 분리된 검체 50건 중 22건(44%)이 남자였으며, 여자는 28건(56%)으로 나타났다. 성별 EV-71형이 차지하는 비율은 남자가 1,707건 중 22건으로 1.3%, 여자가 1,271건 중 28건으로 2.2%이었다(Fig. 4). 이는 주로 여자보다 남자에서 더 높은 발생률을 보인다는 기존에 보고된 연구와 상이한 결과를 나타내었다^{3,16)}. 연령별 EV-71형의 분리율은 1세 이하에서 26건(0.9%), 5-9세에서 14건(0.5%), 2-4세에서 7건(0.2%), 10세 이상에서 3건(0.1%)으로 나타났다(Fig. 5).

EV-71형으로 확인된 검체 중 1세 이하가 26건으로 대다수를 차지하였다. EV-71형은 대부분의 감염

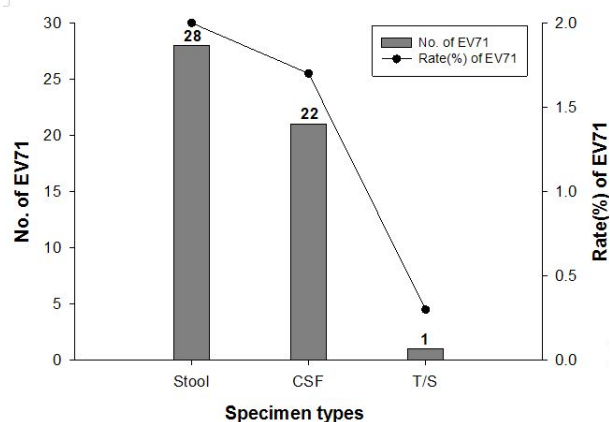


Fig. 3. Distribution of the specimen types with enterovirus 71 infection.

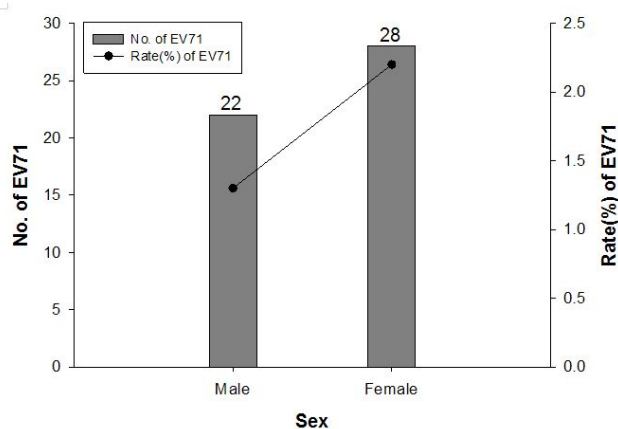


Fig. 4. Sexual distribution of the positive cases with enterovirus 71 infection.

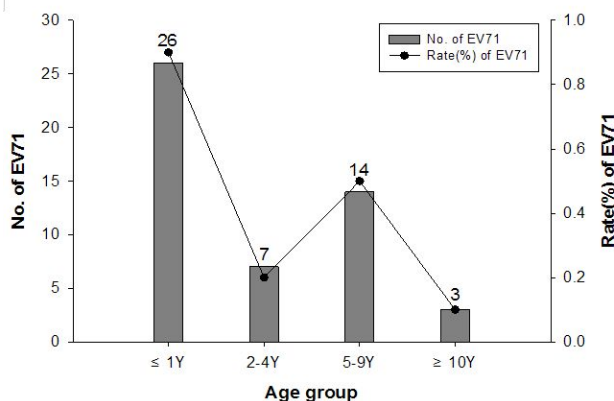


Fig. 5. Age distribution of the positive cases with enterovirus 71 infection.

연령층은 영·유아이며, 수족구병을 일으켜 어린이에게 신경계 합병증을 일으켜 사망까지 유발시키기도 하는 것으로 알려져 있으며 WHO 보고에 의하면 엔테로바이러스 감염은 1세 이하에서 가장 높다고 보고하고 있다^{12,13}). 이러한 특성으로 연령이 증가할수록 검사 건수가 적어지는 경향을 보였으며, 대부분 10세 이하의 연령에서 엔테로바이러스가 분리되었다.

EV-71형의 임상적 특성 분석

분리된 EV-71형의 임상적인 특성을 분석한 결과, 대부분이 무균성 뇌수막염 증상으로 EV-71형 진단명 중 46 %를 나타냈으며, 수족구병과 포진성 구협염이 4 %로 보고되었다(Table 2). 이 결과로 보아 EV-71형 감염의 주 증상으로 무균성 뇌수막염 증상을 보이며, 이는 EV-71형 감염에 의한 수족구병이나 포진성 구협염은 무균성 뇌수막염과 같은 신경계 합병증을 유발할 수 있다는 보고를 뒷받침하는 결과이다^{11,16}). 분리된 EV-71형 임상 증상으로 고열이 38건(76 %)으로 많이 나타났으며, 두통 15건, 구토 12건, 경부강직 4건 순으로 높게 나타남을 확인하였다(Table 3). 질병관리본부의 보고에 따르면 수족구병과 무균성 뇌수막염에서 EV-71형이 가장 많이 차지하였으며 발열과 두통이 더 빈번하게 발생한다고 하였다. 또한 Choi 등의 연구 결과에서 EV-71형 감염 시, 최초 임상 징후로 고열이 92.9 %이었다²¹). 본 연구에서 EV-71형 감염 시 고열과 두통이 비교적 높은 비율로 차지하는 것으로 보아 유사한 양상을 나타내었다. Ryu 등의 연구는 국내에서 발생한 수족구병과 포진성 구협염의 원인바이러스가 2008년에 콕사키바이러스 A10(34 %), 에코바이러스 30(22.6 %)인 반면, 2009년에는 EV-71형이 55.2 %로 바뀌고 있다는 결과와 유사하게 EV-71형 감염에 의한 수족구병과 포진성 구협염이 나타남을

Table 2. Clinical category of samples with enterovirus 71

Clinical category	Sample infected with EV-71(n=50)
Aseptic meningitis	23(46 %)
with neonatal sepsis	2(4 %)
with encephalitis	1(2 %)
Neonatal sepsis	5(10 %)
Herpangina	2(4 %)
Hand, foot, and mouth disease	2(4 %)
Icterus	1(2 %)
Unknown	14(28 %)

Table 3. Presenting symptoms of samples with enterovirus 71

Presenting symptoms	Samples infected with EV-71(n=50)
Fever	38(76 %)
Headache	15(30 %)
Vomiting	12(24 %)
Stiff neck	4(8 %)
Vesicular exanthema	2(4 %)
Sore throat	2(4 %)
Diarrhea	2(4 %)
Respiratory manifestation	2(4 %)
Paralysis	1(2 %)
Decreased mental status	1(2 %)
Convulsion	1(2 %)
Abdominal pain	1(2 %)
Erythematous eruption	1(2 %)

확인하였다²²). 드물게 신생아패혈증도 5건(10 %)으로 EV-71형과 연관성이 있음을 확인하였다.

EV-71형의 염기서열 결정 및 계통 분석

3년 동안 분리된 EV-71형 22주의 VP1 염기서열을 분석한 결과, HEV 71 isolate H11-23-KOR VP1 유전자(KC162873)와 98 - 100 %, EV-71형 10주에서 HEV 71 isolate Kor07-EV71-09g VP1 유전자(EU729121)와 94 - 99 %, 8주에서 EV A71 strain B5-03172-TW-2011 VP1 유전자(KF154354)와 98 - 99 %의 상동성을 보였다.

phylogenetic tree를 작성하여 기존에 보고된

EV-71형의 아형과 유연관계를 분석한 결과, 2011년부터 2013년까지 36주의 EV-71형은 C4a 아형에 속하는 Human enterovirus A 540V/VNM/05 (AM490151)와 유연관계가 있었으며, 6주의 EV-71형은 C4a 아형에 속하는 Human enterovirus 71 isolate DTID/ZJU-62(FJ158600)와 유연관계가 있는 것으로 보아 3년간 분리된 대부분의 EV-71형이 C4a 아형에 속하는 것을 확인하였다(Fig.

6). 그 외에 5주의 EV-71형은 B5 아형인 Human enterovirus 71 isolate SB12282-SAR-03(AY905546)에 속하였다. 2000년대 초반까지 중국에서 C4b 아형이 주로 유행하였으나 2005년 이후는 주로 C4a 아형에 의한 유행이 일어나고 있는 것과 관련하여 최근 3년간 부산에서 분리된 EV-71형의 아형과 유사한 결과를 보였다. 이는 중국에서 유행하는 EV-71형의 C4a 아형이 지속적으로 국내로 유입되

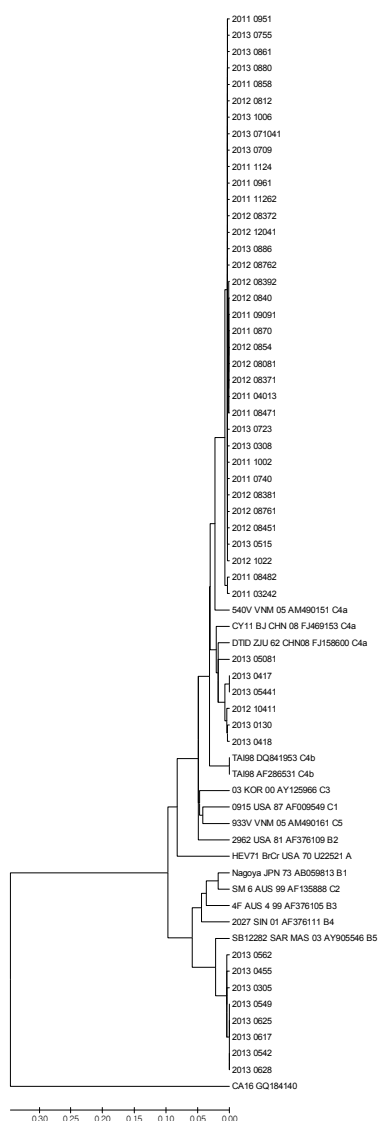


Fig. 6. Phylogenetic analysis based on VP1 gene of enterovirus 71 in Busan from 2011 to 2013. Phylogenetic tree was constructed by comparison of the partial sequences of VP1 region from enterovirus 71. Nucleotide sequences were analyzed using the neighbor-joining method.

고 있는 것으로 보이며, EV-71형이 꾸준하게 발생하여 국내에 토착화되고 있는 것으로 사료된다.

본 연구는 부산지역에서 분리한 EV-71형에 대한 발생 양상을 연구하였으며 EV-71 유전자형의 분석 및 국내외 유전자형과 비교하였다. 이러한 연구 결과를 통해 EV-71형 감염의 신속한 진단에 기여할 수 있으며 EV-71형 감염증 관리, 치료제 및 예방백신 개발 등 효율적인 관리대책에 필요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

부산지역에서 2011년부터 2013년까지 엔테로바이러스 의심 환자로부터 검체 2,978건을 채취하여 이 중 458건에서 엔테로바이러스를 검출하였다.

1. 연도별로 2011년에는 EV-71형이 13건으로 6.0 %를 차지하였으며, 2012년에는 14건으로 10.8 %, 2013년에는 23건으로 20.4 %를 차지하였다.
2. 각 검체 유형별 EV-71형 분리율은 분변에서 28건(2.0 %)으로 높은 비율을 나타냈으며, 뇌척수액에서 22건(1.7 %), 인후도찰물에서 1건(0.3 %)을 차지하였다. 성별 양성 건수 중 EV-71형 분리율은 남자 1.3 %, 여자 2.2 %로 여자의 비율이 높았으며, 대부분 1세 이하에서 26건의 EV-71형 바이러스가 검출되었다.
3. 수집된 검체로부터 EV-71형 감염의 임상 특성을 조사한 결과, 무균성 뇌수막염이 48 %로 높은 빈도로 나타났으며 수족구병과 포진성 구협염 증상도 나타나는 것을 확인하였다.
4. 분리된 EV-71형과 기존에 보고된 EV-71형의 VP1염기서열을 비교 분석한 결과, 대부분이 HEV 71 isolate H11-23-KOR VP1 유전자(KC162873)와 HEV 71 isolate Kor07-EV71-09g

VP1 유전자(EU729121)에서 각각 98 - 100 % 및 94 - 99 %의 상동성을 보였다.

5. 분리된 EV-71형의 VP1 유전자 영역을 phylogenetic tree를 작성한 결과, 42 분리주가 EV71형의 C4a 아형과 유연관계가 있는 것을 확인하였다.

부산지역에서 분리 및 동정된 엔테로바이러스 중 EV-71형의 연령별과 성별 분리율 및 임상 특성을 연구함으로써, EV-71형 감염 발생 시 신속한 진단 및 환자 관리에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 EV-71형의 염기서열 분석 및 아유전형의 연구를 통해 향후 새로운 진단법 개발 및 백신제 개발에 필요한 기초 자료로 이용할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. D. Song, S. Y. Kim, S. A. Jo, H. I. Hahm, S. H. Hwang, Y. T. Lim, H. H. Kim, C. H. Chang, and E. Y. Lee, "Performance evaluation of real-Q enterovirus quantification kit for enterovirus by real-time PCR", *Korean J Lab Med*, 30, 624 - 630(2010)
2. I. S. Park, H. S. Lee, S. H. Choi, H. J. Kim, S. Y. Hwang, D. S. Cheon, and J. K. Chang, "Epidemiology and clinical characteristics of enterovirus infections in children: a single center analysis from 2006 to 2010", *Korean J Pediatr Infect Dis*, 20, 81 - 88(2013)
3. M. S. Choi and Y. I. Rho, "Hand foot mouth disease with meningomyeloencephalitis caused by enterovirus 71", *J Korean Chil Neurol Soc*, 19, 169 - 175(2011)
4. C. C. Kok, P. Phuektes, E. Bek, and P. C. McMinn, "Modification of the untranslated regions of human enterovirus 71 impairs

- growth in a cell-specific manner", *J Virol*, 86, 542 - 552(2012)
5. J. I. Kim, and K. A. Baek, "Sequencing and molecular characterization of the genome of echovirus 30 isolated from a Korean aseptic meningitis patient", *J Bacteriol Virol*, 41, 301 - 307(2011)
 6. S. H. Park, S. S. Choi, S. A. Oh, C. K. Kim, S. J. Cho, J. H. Lee, S. H. Ryu, S. H. Park, S. K. Jung, J. I. Lee, G. Y. Park, S. M. Choi, Y. Z. Chae, B. H. Kang, D. S. Cheon, and H. S. Kim, "Detection and characterization of enterovirus associated with herpangina and hand, foot, and mouth disease in Seoul Korea", *Clin Lab*, 57, 959 - 967(2011)
 7. S. H. Cha, "Recently prevalent infectious diseases among children: meningitis due to enteroviral infection", *J Korean Med Assoc*, 51, 935 - 941(2008)
 8. S. V. D. Sanden, J. V. Eek, D. P. Martin, H. V. D. Avoort, H. Vennema, and M. Koopmans, "Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963 - 2010", *Infect Gnent Evol*, 11, 886 - 894(2011)
 9. N. H. Kim, S. K. Min, E. H. Park, Y. K. Park, S. M. Kwan, and S. H. Jin, "Study on human enterovirus genotypes isolated in Busan during the 2007 - 2009", *부산보건 환경연구원보*, 19, 20 - 27(2009)
 10. J. H. Kim, S. J. Kim, and D. S. Cheon, "Hand-foot-mouth disease related to enterovirus 71", *J Korean Med Assoc*, 52, 886 - 894(2009)
 11. S. H. Kim, "A case of enterovirus 71 infection presented with acute flaccid paralysis in Jeju island", *J Korean Chil Neurol Soc*, 20, 250 - 255(2012)
 12. K. K. Wong, Y. A. Malik, and M. Rahman, "Molecular detection of human enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Klang Valley, Malaysia", *Curr Res J Biol Sci*, 4, 323 - 328(2012)
 13. C. Hsueh, S. M. Jung, S. R. Shin, T. T. Kuo, W. J. Shieh, S. Zaki, T. Y. Lin, L. Y. Chang, H. C. Ning, and D. C. Yen, "Acute encephalomyelitis during an outbreak of enterovirus type 71 infection in Taiwan: report of an autopsy case with pathologic, immunofluorescence, and molecular studies", *Mod Pathol*, 13, 1200 - 1205(2000)
 14. A. Mirand, I. Schuffenecker, C. Henquell, G. Billaud, G. Jugie, D. Falcon, A. Mahul, C. Archimbaud, E. Terletskaia-Ladwig, S. Diedrich, H. P. Huemer, M. Enders, B. Lina, H. Peigue-Lafeuille, and J. L. Bailly, "Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries", *J Gen Virol*, 91, 2263 - 2277(2010)
 15. J. M. Bible, M. Iturriza-Gomara, B. Megson, D. Brown, P. Pantelidis, P. Earl, J. Bendig, and C. Y. W. Tong, "Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006", *J Clin Microbiol*, 46, 3192 - 3200(2008)

16. K. H. Kim, "Enterovirus 71 infection: an experience in Korea, 2009", *Korean J Pediatr*, 54, 616 - 622(2010)
17. P. Phuektes, B. H. Chua, S. Sanders, E. J. Bek, C. C. Kok, and C. McMinn, "Mapping genetic determinants of the cell-culture growth phenotype of enterovirus 71" *J Gen Virol*, 92, 1380 - 1390(2011)
18. X. Tan, X. Huang, S. Zhu, H. Chen, Q. Yu, H. Wang, X. Huo, J. Zhou, Y. Wu, D. Yan, Y. Zhang, D. Yan, Y. Zhang, D. Wang, A. Cui, H. An, and W. Xu, "The persistent circulation of enterovirus 71 in peoples's republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008", *Plos one*, 6(2011)
19. J. H. Kim, J. H. Lee, J. K. Lee, W. K. Bang, J. Y. Hong, and E. C. Kim, "Analysis of enterovirus genotypes using single strand conformational polymorphism", *Korean J Clin Microbiol*, 4, 134 - 138(2001)
20. Y. R. Na, H. C. Joe, Y. S. Lee, J. H. Bin, H. S. Cheigh, and S. K. Min, "Comparison of the real-time nucleic acid sequence-based amplification assay, reverse transcription-PCR (RT-PCR) and virus isolation for the detection of enterovirus RNA", *J Life Sci*, 18, 374 - 380(2008)
21. C. S. Choi, Y. J. Choi, U. Y. Choi, J. W. Han, D. C. Jeong, H. H. Kim, J. H. Kim, and J. H. Kang, "Clinical manifestations of CNS infections caused by enterovirus type 71", *Korean J Pediatr*, 52, 11 - 16(2011)
22. W. S. Ryu, B. H. Kang, J. Y. Hong, S. Y. Hwang, J. H. Kim, and D. S. Cheon, "Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related diseases during a recent 2-year period in Korea", *J Clin Microbiol*, 48, 2490 - 2494(2010)