

2002년 부산지역 무균성뇌수막염 원인바이러스 분리 및 특성

역학조사과*, 부산광역시보건복지여성국 보건위생과

조경순* · 박호국

Isolation and Characteristics of Enterovirus Causing Aseptic Meningitis in Busan, 2002

*Epidemiology Division**, *Busan Metropolitan city*

Kyung-Soon Cho, Ho-Kuk Park

Abstract

Enteroviruses isolation was attempted from samples obtained from aseptic meningitis-suspected patients in hospitals in Busan during 2002. Enteroviruses were found in 83 of 703 cases. Echovirus serotypes 2, 3, 6, 7, 9, 13, 25, 29, 30 were isolated in 72 cases while coxsackievirus serotypes B3 and B4 were isolated in 11 cases. The occurrence was found to be distributed from April to November with the highest rate during June and July. The strains of Vero and HEp-2 of echovirus and coxsackievirus, respectively, are highly infectious. Age distribution of patients, 61 patients in Enteroviruses and 11 patients in coxsackievirus, respectively, occurred in 0 to 10 year old. The sex distribution of the patients is as follows, 52 males(62.7%), 31 females(37.3%). Occurrence rate was found to be higher in male patients. Electron micrograph of echovirus and coxsackievirus show that they are small nonenveloped, isometric-shaped viruses. Isolated RNA from strains of echovirus and coxsackievirus showing cytopathic effects were used to undergo nested PCR which resulted in a 436bp single band in all the strains.

Key words: Aseptic meningitis, Enterovirus, Echovirus, Coxsackievirus

서 론

무균성 뇌막염은 심한 두통, 구토, 고열, 지각과민 등의 뇌막자극 증세를 보이는 전염성 증후군으로 원인은 장내바이러스에 의한 것이 대부분이다. 그 중에서도 coxsackievirus B와 echovirus가 가장 흔한 원인 바이러스로 알려져 있으나, 볼거리에 동반되는 바이러스성 뇌막염도 끊이지 않고 있다⁹⁾. 장내바이러스에 의한 무균성 뇌막염은 전 세계적으로 보고되고 있으며, 최근 미국, 멕시코, 러시아, 프랑스 등에서 유행되었던 것으로 보고되었으며¹⁾, 일본의 경우 1981년 이후 바이러스 분리가 이루어지기 시작하여 1997-1998년도에는 에코바이러스 30형이 전국적으로 유행하였으며, 1999년에는 echovirus 6, 17형, coxsackievirus B5형이 가장 많이 분리되었고, 2000년도에는 enterovirus 71형, echovirus 9, 11, 25형, 2001년에는 echovirus 11과 coxsackievirus B3형이 흔하게 분리되었다. echovirus와 enterovirus 71형은 수년에서 10여 년 간격으로 크게 유행하는 경향을 보였고 2002년 5월 이후 무균성 뇌수막염 환자 수와 바이러스 분리 수 모두가 증가추세를 보였으며, 특히 echovirus 9, 11, 13, 30 형이 분리되었다¹¹⁾. 우리나라에서도 1990년대에 이르러 바이러스성 뇌수막염 환자 발생 사례가 빈번하였으며, 장내바이러스 분리현황을 보면 1993년 echovirus 9와 echovirus 30에 의한 대유행이 있었으며, 1994년에 echovirus 4와 coxsackievirus B가 1997년도에는 에코바이러스 30형, 1998년

도에는 echovirus 6형, 1999년에는 coxsackievirus B2, 2000년에는 enterovirus 71, 2001년에는 coxsackievirus B5가 가장 많이 분리되어 매년 유행하는 장내바이러스 형이 바뀌는 양상을 보였다^{10,11)}. 바이러스성 뇌수막염의 원인이 되는 엔테로바이러스는 지역에 따라, 시기에 따라 혈청형이 매년 변하고 있고, 예후는 대체적으로 양호하나 드물게 급성 뇌염이 발생할 수도 있으며 enterovirus 71형과 연관된 치명적인 사례도 보고된 바 있다¹¹⁾.

따라서 본 연구에서는 바이러스성 뇌수막염이 다발적으로 발생한 2002년도에 부산지역의 10개 지정 병원으로부터 내원한 환자들을 대상으로 원인 바이러스를 분석하여 특성을 알아보고 앞으로 전국적인 역학조사의 지표자료를 제공하기 위하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스 분리시료

바이러스 분리용 검체는 2002년도 부산지역의 10개 지정병원으로부터 내원한 뇌수막염으로 의심되는 환자의 대변, 뇌척수액, 인후도찰물 등을 채취하여 수송용 용기와 배지에 넣고 냉장온도를 유지하면서 신속하게 운반하여 사용하였다.

시료 전처리 시험

환자로부터 채취된 대변검체는 -20℃에 냉동한 후 해동시켜서 장내바이러스용

PBS (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KHPO₄ 0.2 g, 800 ml DDW, pH 7.0-7.4, MgCl₂ · 6H₂O 0.1g in 100 ml, CaCl₂ 0.1 g in 100 ml)에 10% 농도로 희석하여 10분간 강하게 진탕한 후 원심분리 (500 × g, 20분)하여 상등액을 6-7 ml 회수하였다. 이 상등액에 1/10 분량의 클로로포름을 첨가하고 10분간 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 회수하고 검체를 1×, 10×, 100×로 희석하여 사용하였다. 인후도찰물을 채취한 면봉은 바이러스 수송용 배지 2 ml (Difco)에 넣어 진탕한 다음 멸균된 핀셋으로 면봉을 제거하고 항생물질 (penicillin 5 units/ml, streptomycin 5 µg/ml, amphotreicin B 0.25 µg/ml)을 첨가하여 잘 혼합하고 4°C에서 15분 간격으로 흔들며 주면서 1시간 방치한 다음 저온 원심분리하여 상등액을 접종 가검물로 사용하고 나머지는 -70°C에 보관하였다. 뇌척수액은 특별한 전처리 과정없이 사용하였지만 혈액세포를 함유한 액은 가볍게 흔들며 접종 전에 항생제를 처리해서 원심분리한 후 상등액을 접종하였으며 세포에 접종 전까지 -20°C에 보관하였다.

바이러스 분리용 세포주

국립보건원으로부터 세포 배양을 위하여 분양 받은 RD (Rhabdomyosarcoma), HEP-2 (human epidermoid carcinoma), Vero (african green monkey kidney), BGM (Buffalo green monkey)세포주는 penicillin (0.05 units/ml) / streptomycin (0.05 µg/ml)과 5% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 MEM (minimum

essential medium, GibcoBRL) 배지로 배양하여 24 well 배양판에 분주하고 34°C, 5-7% 이산화탄소 항온기 내에서 단층배양시킨 후 2% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 MEM 배지를 1 ml첨가하여 전처리한 가검물을 1×, 10×, 100×로 희석하여 각각 100 µl씩 접종하고 1-10일간 배양하면서 세포병변 (cytopathic effect, CPE) 효과를 관찰하였다.

전자현미경 관찰

분리된 바이러스를 연속적으로 2~3회 계대배양하여 역가를 높인 후 4% uranyl acetate에 약 1분간 negative stain한 다음, 전자현미경 (JEM 1200 EX2, JEOL, TEM)으로 80KV (×120 K)에서 관찰하였다.

PCR

세포병변 효과가 나타난 세포배양액으로부터 Tri-reagent (Molecular research Center Inc. USA), viral RNA extraction kit (Qiagen, Germany) 또는 DNA QIAamp blood mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하고 이것을 각 바이러스 유전자를 증폭하기 위한 temperate로 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 반응액 (cDNA template, dNTP mixture, 양 방향의 primer, 10X PCR buffer, Taq polymerase)을 thermal cycler를 이용하여 증폭한 후 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색한 후 특정 band를 관찰하였다. 그리고 분리한 enteroviruses의 확인시험은 국립보건원에 의뢰하였다. Reverse transcription 및 nested

PCR을 위해 사용된 primer sets는 다음과 같다(Fig. 1).

결과 및 고찰

2002년도 부산지역의 병·의원으로부터 의뢰된 바이러스성 뇌수막염으로 의심되

는 환자의 가검물을 대상으로 바이러스 분리를 시도한 결과 총 703건 중 83건의 장내바이러스를 분리하였다(Table 1). 우리나라에서는 바이러스성 뇌수막염에 대한 관심이 그리 높지 않았지만 1990년 많은 환자들이 발생한 이후 1993년, 1996년, 1997년에 전국적인 대유행이 일어났다¹⁰⁾.

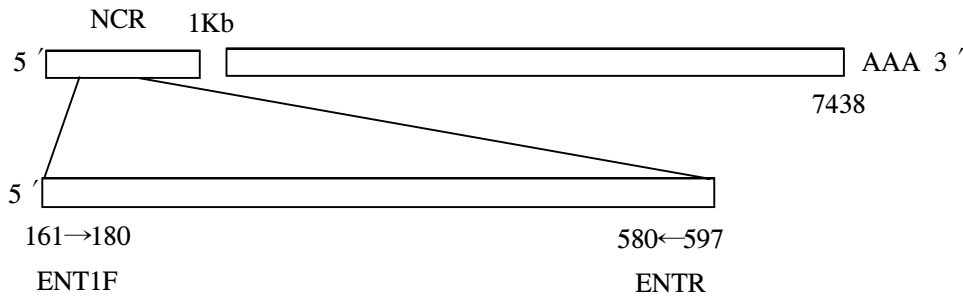


Fig. 1. Genomic position and properties of the primer sets used in this study.
 ENT1F+ENTR - > 437bp, ENT1F: 5'AAGCACTTCTGTTTCCCCGG 3',
 ENTR: 5'ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'

Table 1. Isolated alimentary tract viruses in Busan from 2002

Virus	Echovirus group		Coxsackievirus group	
	Month	Serotype (No. of outbreak)	Month	Serotype (No. of outbreak)
2002	Apr.	E6(1),E9(1)	May	B3(1)
	May	E6(6),E13(1),E30(1)	July	B(1),B3(4)
	Jun	E2(3),E3(1),E6(8),E9(4),E13(1),E25(4)	Aug.	B3(2)
	July	E6(17),E9(8),E25(1)	Oct.	B4(1)
	Aug.	E6(3),E29(3),E7(1)	Nov.	B4(2)
	Sep.	E6(2),E7(2)		
	Oct.	E7(2),E29(2)		

1998년 이후에는 소규모 유행을 일으키고 있는 것으로 확인되었으나 2002년도에는 장내 바이러스들의 다양한 혈청형이 분리되었고 바이러스성 뇌수막염 환자가 전국적으로 발생율이 높았다. 일반적으로 바이러스성 뇌수막염을 일으키는 원인 바이러스는 다양하지만 우리나라의 경우 1991년 원인 바이러스 동정이 시작된 이래 1991년에 coxsackievirus B5, 1993년에 echovirus 9가 주종을 이루었으며 1994년과 1995년에는 coxsackievirus B3와 echovirus 7이 대부분을 차지하였다. 또한 1996년에는 coxsackievirus B1, echovirus 9에 의해 발병하였다¹⁰. 2002년에 분리된 원인 바이러스의 경우 Table 1에서 나타낸 바와 같이 echovirus 2, 3, 6, 7, 9, 13, 25, 30이 70건으로 가장 많았고, coxsackievirus B3와 B4 혈청형이 10건으로 주종을 이루고 있고, echovirus 6은 부산지역을 중심으로 유행하였다 하면서 유행성 눈병 환자에게 분리되었다⁵. echovirus 13형은 2002년 5월에 국내에서 최초로 분리하였으며, 6월에도 1건 분리되었고 서울, 부산, 광주, 경기도지역에서 검출되었다. 에코바이러스 13형은 외국에서도 거의 분리되지 않았으나, 영국과 독일 등 유럽국가에서는 2000-2001년에, 호주와 미국에서는 2001년도에 증가하여 수막염 유행을 일으켰다⁶. 2000년에 coxsackievirus B2 및 echovirus 11이, 2001년에 coxsackievirus B5가 주종을 나타낸 것에 비해 보다 다양한 바이러스들이 분리되었다³. 일반적으로 echovirus 3은 바이러스성 뇌수막염의 유행과 밀접한 관련이

있는 것으로 알려져 있으나, 이 외에도 4, 6, 9, 11, 14, 25, 30형이 유행 혈청형으로 점차 대두되고 있다¹³. 이와 같이 바이러스성 뇌수막염의 유행 군주가 해마다 변하고 있음을 알 수 있다¹¹. 바이러스에 의한 월별발생 시기는 하계절 (7, 8, 9월)이 주 발생시기이지만^{11,15}, 2000년의 경우 동절기인 12월과 1월에, 2001년에는 5월에 집중적으로 발생한 결과³)와 다소 차이를 나타내었으나, 2002년의 경우 4월부터 11월까지 넓은 발생 분포를 나타내면서 특히 6월과 7월에 가장 발생율이 높아 1993년도와 1996년도에 발생한 대유행과 비슷한 양상을 나타내었다¹⁰. 이처럼 월별발생 양상이 연속적이지 못하므로 바이러스성 뇌수막염의 유행현황 파악은 매년 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다. 연령별로 보면 echovirus 9, 11형은 주로 어린이 연령층에서 분리되었으며, 13형은 폭 넓은 연령층에서 분리되었으며, 바이러스성 뇌수막염 환자는 0세와 3세 이상 연령에서 많았다. 일반적으로 echovirus 9형은 바이러스성 뇌수막염 외 발진 환자에서, 11형은 상기도 감염증 환자에서 많이 분리된 보고가 있다⁶. 무균성 뇌수막염은 어느 연령에서나 발생할 수 있으나 10세미만의 소아에서 다른 연령군보다 2-10배 많이 발생한다고 한다². Chonmaitree 등⁴)이 1983년부터 1987년까지 보고한 바에 의하면 1세 이하에서 발생율이 69%라고 하였으나 우리나라의 경우는 1996년 부산지역 허 등⁷)을 1-4세, 1993년 부산지역 정 등⁸)을 3-7세 군에서 가장 많은 발생률

을 보인다고 보고하였으며, 김 등은 학동기전이 47.5% 보인다고 하였다. 본 연구의 연령별 감염 현황을 살펴보면 Fig. 2에서와 같이 0-10세 사이의 어린이가 주로 발생하였고, 1세 미만의 어린이가 가장 발생률이 높았으며, 그 다음은 1-4세의 어린이가 높았고, 5세 이후부터는 급격하게 발생빈도가 감소된다. 이렇게 소아에게서 문제가 되는 이유는 이러한 원인바이러스에 노출된 적이 없고 또 면역방어 기전이 아직도 미숙하기 때문으로 알려져 있다¹⁰⁾.

성별 발생빈도는 1998년 부산지역 허⁷⁾ 등은 남녀비가 3.3:1, 1993년 부산지역 정⁸⁾은 1.6:1, 김 등¹²⁾은 약 2:1로 저자에 따라 다양하게 보고하였으며, 본 조사에서는 1989년 및 1990년도에 조사한 뇌막염 환자⁹⁾에 대한 보고와 같이 여아에 비해 남아의 비율이 비교적 높게 나타났다(Fig. 2). 세포병변 효과를 관찰하기 위해서 RD,

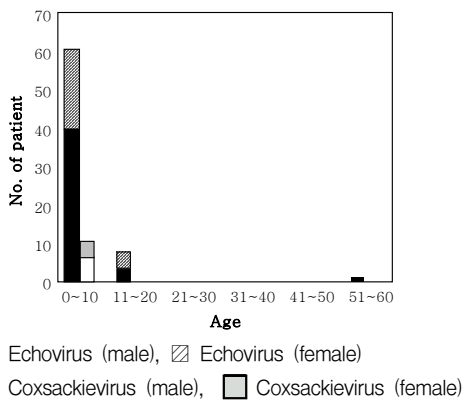


Fig. 2. Age and sex groups distribution of the patients. with Aseptic Meningitis in Busan, 2002 year.

HEp-2, Vero 및 BGM 세포주에 분리된 바이러스를 접종한 결과 Fig. 3과 4에서와 같이 echovirus와 coxsackievirus는 Vero 와 HEp-2 세포주에서 강한 세포 병변 효과를 나타내었다. 전자현미경으로 촬영한 echovirus 및 coxsackievirus의 형태학적 양상은 Fig. 5와 같이 모두 크기가 30~35 nm로 아주 작고 envelope이 없는 icosahedral 모양의 전형적인 picornaviridae의 특징을 나타내었다. 세포병변 효과가 나타난 세포배양액에 대하여 전술한 방법에 따라서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 RNA- cDNA hybrid는 본 연구에 사용된 primer, 즉 Ent1F와 EntR을 이용하여 PCR을 수행한 결과 Fig. 6과 같이 echovirus 및 coxsackievirus 모두 437 bp의 장내바이러스 특이 band를 확인할 수 있었다. 음성대조로 증류수를 동일한 방법으로 PCR을 실시한 결과 오염이 의심되는 특이한 DNA band는 확인되지 않았다. 이러한 결과는 1993년부터 1996년까지 국내에서 분리된 5종의 장내바이러스 (coxsackievirus B1, echovirus 3, 7, 9, 10)¹⁶⁾와 일치하였으며, serotype은 국립보건연구원 소화기계 바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였다. 바이러스성 뇌수막염의 진단에서 가장 정확한 진단 방법은 바이러스 분리이다. 바이러스 분리율을 높이기 위해서는 검체 채취시기, 검체 수송 및 관리가 중요하므로 장내 바이러스 특성상 가능한 발병초기에 채취하여야 하며 건조하거나 얼리고 녹이는 것을 반복하지 않는 상태에서 관련된 정보와 함께 4℃에서 신속하

게 운반되어야 한다^{9,11)}. 따라서 신속하고 간편하게 바이러스를 분리 진단하는 것이 필수적인 것으로 판단된다. 검체는 활성화된 RD, HEp-2, Vero 및 BGM 세포주에 접종하여 세포병변 효과를 보는 것으로 접종 후 24-48시간 내에 30-40% 양성을 나타내고 7일 이내에 90%의 양성을 나타내어 빠르고 정확한 진단을 내릴 수 있지만 그 분리율이 보고자에 따라서 25-70% 정도로 다소 차이가 날 수 있기 때문에 최근에 들어서 분자 생물학의 발전으로 유전자 기법을 이용한 방법을 진단에 이용하려는 시도가 계속되고 있다^{9,14)}. 이러한 유전자 기법에 의한 진단은 민감도가 높아서 임상적으로 많은 도움이 되지만 경

비가 비싸고 진단방법의 기술적인 면 등을 고려해 볼 때 대중화는 아직 시간이 걸릴 것이다⁹⁾. 신속한 바이러스의 분리 동정은 항생제 남용의 감소, 불필요한 검사의 감소 등 보건적 차원에서도 효과적이며, 또한 장내바이러스에 의해 일어나는 질환을 인식하고 유행 추세에 대해 보다 적극적이고 연속적인 역학적 조사 및 연구의 활성화가 필요하다. 본 연구의 경우 부산지역만의 연구결과이므로 전국적인 분포에 따른 다양한 혈청형이나 분리율에 대한 비교가 부족하다고 사료되므로, 이후 전국규모의 분포에 대한 연구 결과가 기대되며 또한 예방 차원에서 지속적인 관심이 필요할 것이라 사료된다.

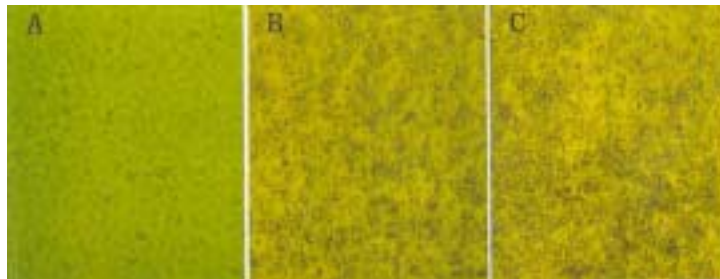


Fig. 3. Micrographs of CPE in the virus-infected cells.
Vero cells infected with no virus(A), Echovirus(B),
Coxsackievirus(C), Magnification $\times 100$.

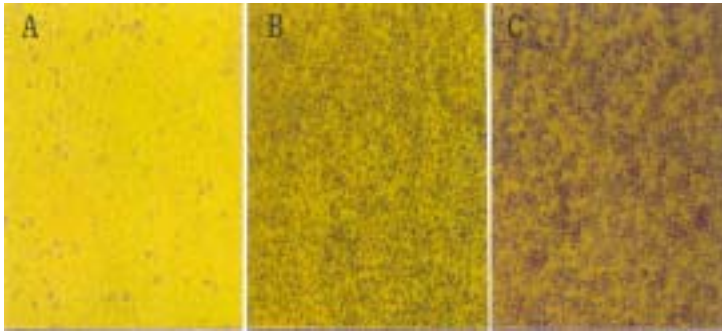


Fig. 4. Micrographs of CPE in the virus-infected cells.
HEP-2 cells infected with no virus(A), Echovirus(B),
Coxsackievirus(C), Magnification $\times 100$.

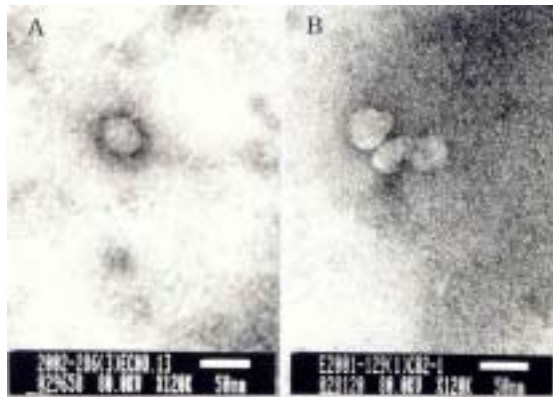


Fig. 5. Transmission electron micrographs of virus isolates.
Echovirus(A), Coxsackievirus(B)

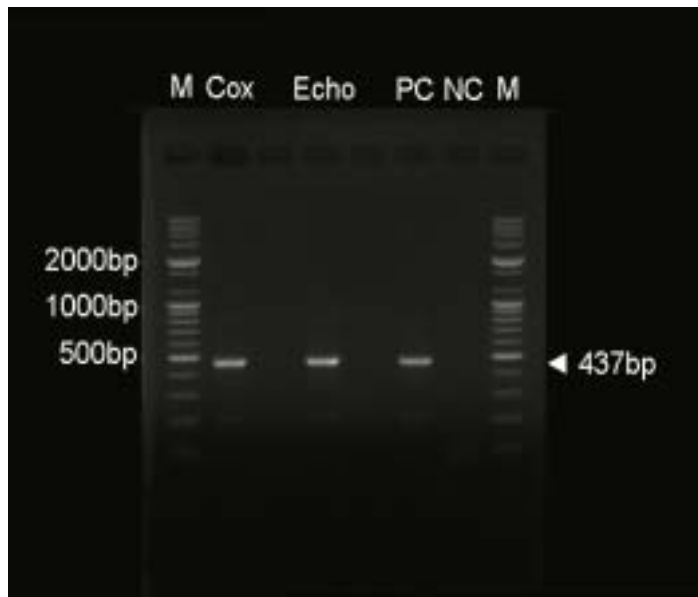


Fig. 6. Detection of RT-PCR analyses with clinically isolated Coxsackievirus and Echovirus.

M : Marker, NC : Negative control which was used H₂O as a template, PC : Positive control band prepared from Echo.

요 약

2002년도 부산지역의 병·의원으로부터 의뢰된 바이러스성 뇌수막염으로 의심되는 환자의 가검물을 대상으로 바이러스 분리를 시도한 결과 703건의 검체 중 83건의 장내바이러스를 분리하였다. 이 중 echovirus 2, 3, 6, 7, 9, 13, 25, 29, 30 혈청형이 72건으로 가장 많았고, coxsackievirus B3과 B4 혈청형이 11건으로 예전에 비해 보다 다양한 경향을 나타내었다. 월별발생 양상은 4월부터 11월까지 넓은 발생 분포를 나타내었지만 특히 6월과 7월에 가장 발생율이 높았다. echovirus와 coxsack-

ievirus는 Vero와 HEp-2 세포주에서 강한 병변 효과를 나타내었다. 연령별 및 성별 감염 현황은 0-10세 사이의 어린이가 주로 발생하였고, 여아에 비해 남아의 비율이 비교적 높게 나타내었다. 전자현미경으로 촬영한 echovirus 및 coxsackievirus의 형태학적 양상은 모두 envelope가 없고 크기가 30~35 nm로 아주 작은 구형의 특징을 나타내었다. 세포병변 효과가 나타난 세포 배양액에 대하여 nested PCR을 수행한 결과 echovirus 및 coxsackievirus 모두 437 bp 위치에 단일 띠를 나타내었으며, serotype은 국립보건연구원 소화기계 바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였다.

참 고 문 헌

1. Alexander J.P., Chapman L.E., Pallansh M.A., Stephenson W.T. Torok T.J. and Anderson L.J. 1993. Coxsackievirus B2 infection and aseptic meningitis focal outbreak among members of high school football team. *J. Infect Dis.* 167, 1201-1205.
2. Abraham M. Rudolph. 1991. Rudolph's Pediatrics. p1817-1818. California, Prentice-Hall International Inc.,
3. Cho, K.S., and M.J. Jung. 2003. Isolation of Enterovirus Causing Aseptic Meningitis in Busan, 2000-2002 years. *Kor. J. Micro.* 39, 248-252.
4. Chonmaitree, T., C.D. Baldwin, H.L. Lucia. 1989. Role of virology laboratory in diagnosis and management if patients with central nervous system disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 1-14.
5. Dept. of virology in National Institute Health. 2003. Isolation of Coxsackievirus from patients with aseptic meningitis. *Communicable diseases Monthly Report*, 14, 372.
6. Dept. of virology in National Institute Health. 2002. Status of isolation domestic Enteroviruses. *Communicable diseases Monthly Report*, 13, 154.
7. Huh, J.Y., T.S. Kim, W.J. Jo, and S.W. Kim. 1998. Clinical investigation of aseptic meningitis prevalent in Busan. *Pediatrics*, 41, 38-46.
8. Jeong, S.W. J.Y. Kim, Y.H. Kim, and S.W. Kim. 1995. Clinic and study on casative virus of aseptic meningitis. *Busan pediatrics society*, 8, 25-342.
9. Kim, D.S., W.B. Gwang, J.D. Yun, M.B. Kim, G.S. Kim, and S.D. Seo. 1996. Isolation of Virus from patients with aseptic meningitis in 1995. *Infect.* 28, 351-358.
10. Kim, D.S. 1997. Aseptic meningitis in young children, *The child's Infect.* 4, 43-47.
11. Kim M.B., K.S. Kim, Y.B. Bae, C.Y. Song, J.D. Yoon, K.H. Lee, and H.K. Shin. 1996. General primer-Mediated PCR Detection of Enteroviruses Causing Aseptic Meningitis. *J. Kor. Soc. Vir.* 26, 215-225.
12. Kim, W.C., Y.J. Lee, D.S. Jin, and D.J. Yun. 1966. Clinical investigation of aseptic meningitis. *Pediatrics*, 9, 165-169.
13. Ktugman, S. 1992. Infectious disease of children 9th ed. St. Luois. p. 623-628. Mosby-Year Book Co.
14. Wildin, S. and T. Chonmaitree. 1987. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management

- of the viral meningitis. *Am. J. Dis. Child.* 141, 454-457.
15. Yamashita K., K. Miyamura, S. Ymadera, N. Kato, M. Akatsuka, S. Inouye, and S. Yamazaki. 1992. Enteroviral aseptic meningitis in Japan. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 45, 151-161.
16. Yoon, J.D., T.S. Kim, K.S. Kim, H.R. Lee, Y.S. Kim, M.R. Tong, Y.B. Bae, Y.S. Lee, and K.H. Lee. 1996. Stuides on Enteroviruses in Korea-Rapid Diagnosis and Serotyping of Enteroviruses by PCR-RFLP. *Report of National Institute of Health.* 33, 131-140.