

최근 3년간 부산지역에서 유행하는 엔테로바이러스 유전자형 연구

김남호[†] · 민상기 · 박은희 · 박연경 · 권순목 · 진성현
역학조사과

Study on Human Enterovirus Genotypes Isolated in Busan during the 2007-2009

Nam-Ho Kim[†], Sang-Kee Min, Eun-Hee Park, Yon-Koung Park, Sun-Mok Kwan and Sung-Hyun Jin

Epidemiology Division

Abstract

Human enteroviruses (HEV) are considered as one of the major cause of central nervous system infections such as aseptic encephalomyelitis in pediatrics. This study was focused on providing the information including genetic characteristics and diversities of HEV prevailed during 2007~2009 in Busan, Korea. Total 2,743 specimens were collected from children and screened for the isolation of HEV by cell culture and RT-PCR. Among them 240 isolates were grouped into 21 different HEV serotypes using VP1 RT-PCR. The major etiological agents were CV-A6 and CV-B2 in 2007, E-6 and E-30 in 2008 and CV-B1 in 2009 respectively. The occurrence of HEV infections was the most frequent in the summer (May to August, 188 cases, 78.3%). Most of the isolates were identified from children's specimen under 10 years old specially with the highest occurrence in the 2~4 years old (15.2%) but there was no considerable differentiation between children sexes for the isolates. For analyzing genetic characterization, VP1 gene was amplified by RT-PCR and sequenced. The phylogenetic tree was established by Clustal W method using DNASTAR software. By the sequence analysis of the VP1 region, it was classified into 2 groups; HEV-A and HEV-B. The HEV-A group contained 6 serotypes and sequences of 31 isolates were compared within each serotypes. The HEV-B contained 10 serotypes and also the sequences of 41 isolates were compared within each serotypes. Homology analysis of the VP1 region showed that the identity scores of HEV-A and B isolates were different. In conclusion, genetic divergences were observed among isolates from children during 2007~2009 in Busan.

Key Words : Busan, HEV, phylogenetic tree, serotype

서 론

엔테로바이러스(human enteroviruses, HEV)는 27~30 nm 크기의 외막을 갖지 않는 바이러스로써 정이십면체의 형태를 이루고, 현재까지 약 70여종 이상의 혈청형이 알려져 있다. 이는 분류학적으로 Picornaviridae과의 Enterovirus속에 속하며, 이들 속에는 3가지 혈청형의 Poliovirus (PV; 1~3)와 23가지 혈청형의 Coxsackievirus A군(CVA; 1-22, 24), 6가지 혈청형의 Coxsackievirus B군(CVB; 1-6), 그리고 28가지 혈청형의 Echovirus군(ECV; 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33) 및 기타 엔테로바이러스(EV; 68-73) 등으로 구성되어 있다¹⁾. 그러나 최근 연구자들은 RNA dependent RNA polymerase 유전

자의 염기서열을 이용한 계통분석을 통하여 HEV A~D의 유전자형으로 분류하기도 한다²⁾. HEV-A에는 11가지 혈청형의 CV-A와 EV-71이 속하며, HEV-B는 모든 CV-B와 ECV, EV-69, EV-73 및 CV-A9의 38가지 혈청형이 여기에 포함된다. HEV-C는 11가지의 CV-A를 포함하며, 마지막으로 HEV-D는 EV-68과 EV-70의 두 가지 혈청형만이 여기에 속한다³⁾. 현재 이미 알려진 70여종의 HEV 혈청형 이외에도 90개 이상의 새로운 혈청형의 HEV가 동정되고 있다⁴⁾. 또한 많은 연구들에서 poliovirus와 non-polio enterovirus들에 있어서 유전자 재조합이 있다는 보고가 있으며, 그 예로 E-9형의 유전자 재조합⁵⁾에서부터 타이완에서는 1998~2001년, 2002~2005년 검출된 EV-71형에 유전자 재조합이 있다는 것이 보고되고 있다⁶⁾.

[†]Corresponding author. E-mail : brave1210@korea.kr
Tel : +82-51-757-6936, Fax : +82-51-753-1424

엔테로바이러스의 유전자는 약 7.2~7.5 kb 크기의 single stranded positive sense RNA의 형태를 갖는다²⁾. 바이러스의 유전자 중 한 부분을 차지하는 VP1 region은 HEV 동정에 우수한 유전적 상관관계가 있어 VP1 region은 genotyping에 이상적인 target 부분으로 사용되며⁷⁾, 주요 항원 부위이면서 중화 결정자로서의 기능을 한다⁸⁾.

HEV는 분변에 의해 오염된 강, 유원지, 양식장, 물환경에서 검출된다는 보고가 있다⁹⁾. HEV가 상당히 오랫동안 물환경내에서 축적되어 문제가 되는 것은 이러한 물환경이 감염력 있는 바이러스 입자들의 숙주로서 역할을 담당하여서 이다¹⁰⁾. 그 예로 매년 미국에서 발생하는 많은 수인성 식품매개 질환들에 식중독 유발 바이러스인 노로바이러스 이외에 HEV도 검출되고 있다는 보고가 나오고 있다¹¹⁾. HEV는 전세계적으로 퍼져있고 분변-구강 경로를 통하여 사람에게 전파되며¹²⁾, 소화기를 통해 감염된 후 인후두 부위나 소장의 림프절에서 일차적으로 증식한 후 신체의 각 장기로 이동하게 된다¹³⁾. 신체의 각 장기로 이동한 HEV는 광범위한 증상을 나타낸다. 위장관내에서 존재하고 있는 HEV는 무증상일 수도 있고¹⁴⁾, 질병을 유발할 수도 있다¹⁵⁾. EV-71에 의한 폐수종이나 뇌질환 합병증으로 사망하는 경우도 보고되고 있으며¹⁶⁾, 1997년 말레이시아, 1999년 호주, 2000년 싱가포르, 1997년과 2000년 일본 등을 포함하는 서태평양지역 나라들에서 심각한 뇌질환과 관련 있는 EV-71의 집단발병 사례들이 보고되고 있다¹⁷⁾. 면역체계가 아직 완벽하게 발달되지 않은 5세미만의 소아의 경우 HEV는 중추신경계 감염의 가장 중요한 요인 중의 하나로 인식되고 있다¹⁸⁾. HEV 배양에 이용되는 세포주는 HEV에 대한 특이한 세포 수용기를 갖고 있으며, 바이러스 종류에 따라 세포주에 대한 감수성이 다르므로 보통 2개 이상의 세포주를 이용하여 바이러스를 분리해야 한다¹³⁾. 최근에는 HEV의 유전자를 직접 검출하는 RT-PCR법이 개발되어 환자로 부터 채취한 검체에서 바이러스의 존재 유무를 신속하게 분석할 수 있게 되었다⁹⁾. 본 실험에서는 세포배양을 통해서 분리된 HEV를 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 국내에서 HEV의 분리와 혈청학적 동정 및 유전학적 동정은 2006년부터 질병관리본부 간염폴리오바이러스과를 위주로 이루어지고 있으나, 부산지역의 데이터는 거의 없는 실정이다. 또한 EV-71과 같이 치명률이 높은 바이러스와 산변종 엔테로바이러스가 유행할 가능성도 배제할 수 없다. 최근 중국, 아시아 등지에서 문제시되고 있는 EV-71의 유행에 따른 국내유입에 대한 우려 또한 간과할 수 없다. 그러므로 HEV에 대한 감시체계의 확립과 유전학적 데이터를 축적하는 것은 매우 중요한 일이라 할 수 있다.

이에 본 연구의 목적은 최근 3년간 부산지역에서 분리된 HEV를 대상으로 분자생물학 및 계통학적 분석을 통하여 부산 지역에서 유행하고 있는 HEV의 유전적 다양성을 확인하고, 그들의 염기서열에 대한 데이터베이스 구축을 위한 기초 자료로써 제공하고자 하였으며 이를 통하여 HEV에 대한 산변종 바이러스 출현 및 독성이 강한 엔테로바이러스의 국내 유입에 대한 기준을 제시하고, 향후 새로운 진단법 개발 및 백신제 개발에 대한 기초 자료로써 제공하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 및 엔테로바이러스 배양

국립보건원 간염폴리오바이러스과로부터 분양받은 human rhabdomyosarcoma (RD), human larynx epidermoid carcinoma (Hep-2)와 African green monkey kidney cell (Vero), buffalo green monkey kidney cell (BGM) 세포주를 사용하였으며 각 세포들을 DMEM (GIBCO modified eagle medium, Invitrogen, USA)에 penicillin-streptomycin (Sigma, USA)을 첨가하여 37°C CO₂ 항온배양기 (MCO-18AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다.

검체처리 및 바이러스 배양

HEV 감염 의사환자의 대변, 뇌척수액, 인후도찰물을 4°C를 유지하여 운송하였다. 분변의 경우 10%의 chloroform (Merck, Germany)을 처리한 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS, Sigma, USA) 완충용액에 분변 2 g 넣고 20분 동안 강하게 진탕한 후 3,000 rpm (UNION 32R PLUS, Hanil, Korea), 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 실험에 사용하였다. 56°C에서 30분간 불활성화 시킨 FBS (GIBCO fetal bovine serum, Invitrogen, USA) 5%를 첨가한 배양액을 이용하여 24well plate (Multidish 24wells, Corning, USA)에 각각의 세포를 2×10⁴ cell/well로 24시간 단층배양한 후, 세포의 밀도가 약 70% 정도 되었을 때 각각의 검체를 접종하였다. 세포배양액을 걸어낸 후에 PBS를 이용하여 세포를 세척하였으며 100 μL의 검체를 접종하고, 30분정도 두어 세포가 마르지 않을 정도로 배양하여 바이러스를 흡착시킨 후에 2%의 FBS가 포함된 배양액을 추가하였다. 그 후 2주일까지 도립 현미경(Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 세포병변효과 (cytopathic effect; CPE)를 관찰한 후에 약 70%의 세포병변이 관찰되었을 때에 초저온냉동고 (-70°C freezer, Nihon freezer, Japan)에서 냉동시키고 다시 용해하는 과정을 반복한 후 현탁액을 세포에 재접종하여 바이러스를 분리하였다.

RT-PCR of VP1 region

검체 및 배양액 200 ul을 ZR Viral RNA Kit (ZYMO Research, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였으며, VP1 region의 증폭을 위하여 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다. RT-PCR 반응액은 추출한 RNA 1 μL를 RT-PCR kit (BIONEER, KOREA)에 넣어 부피가 20 μL가 되도록 한 후 1회(42°C 45분, 94°C 5분), 40회(94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 40초), 1회(72°C 5분)를 Thermal cycler (C-1000 thermal cycler, BIO-RAD, USA)에서 수행하였다. 2차 PCR 반응액은 1st PCR 산물 1 μL를 2차 PCR kit (BIONEER, KOREA)에 넣어 부피가 20 μL가 되도록 한 후 1회(94°C 5분), 40회(94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 40초), 1회(72°C 5분)를 Thermal

cycler에서 수행하였다. PCR생성물(5 μL)은 prestaining (SYBR safe, Invitrogen, USA)된 agarose gel (TaKaRa, Japan)에 100 bp DNA ladder (TaKaRa, Japan)와 함께 loading 하고 30분간 전기영동 (Advance, Japan)하여 Image analyzer (Geldoc XR image system, BIO-RAD, USA)로 350 bp PCR band를 확인하였다.

염기서열 분석

350 bp에서 증폭된 2차 PCR 산물은 염기서열분석을 위하여 gel purification (QIAquick, USA)을 한 후 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit로 ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)를 이용해 분석하였다. 염기서열분석을 위한 primer는 엔테로바이러스 VP1 region RT-PCR에 사용된 것과 같으며(Table 1), 확인된 염기서열은 SeqMan program (DNASTAR, Madison, WI)으로 align하고 Clustal W 방법으로 Lasergene program (DNASTar, Madison,

WI)을 이용하여 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

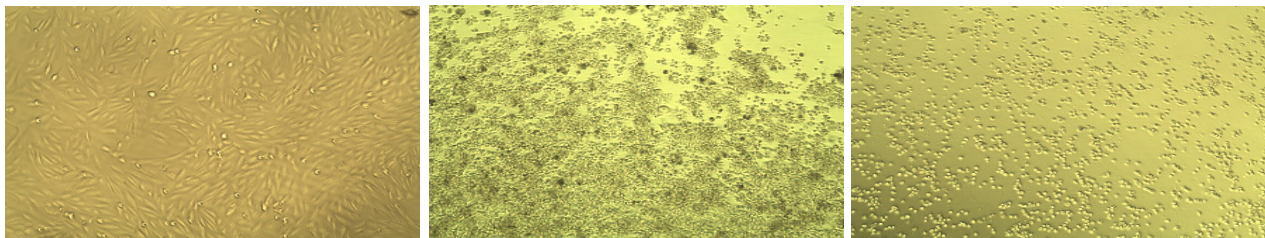
엔테로바이러스 분리 및 유전자 확인

부산지역에서 2007년부터 2009년까지 3년 동안 임상적으로 엔테로바이러스 의심환자 검체 총 2,743건(대변 1,503건, 뇌척수액 1,213건, 인후도찰물 27건)을 세포배양하여 160건에서 세포병변 현상을 관찰하였다. 세포병변 현상은 엔테로바이러스에 감수성을 갖는 RD, BGM, Vero, Hep-2 세포주에 검체를 접종하여 엔테로바이러스에 의한 세포의 원형화, 세포질의 수축, 세포 파괴 등의 세포병변 현상이 관찰된 것을 양성으로 판정하였다. 세포병변 현상은 검체를 세포에 접종한 후 세포주에 따라 3~5일에서 늦으면 2주일 이상이 지난 후에 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

Table 1. Primers used for RT-PCR and sequencing of human enterovirus detection

Method	Primer	Sequence (5'-3')
VP1 1st PCR	224N-1F	GCRATGTTTRGGACWCATGT
	224N-2F	GCSATGTTTRGGMACRCAYGT
	224N-14R	GGRTTBGWK GANGTYTGCCA
VP1 2nd PCR	89N-2F	CCHGCDCTHACCGCWGTGGARACDGG
	89N-17F	CCMATMCTHCAAGCHGCHGAGAYYGG
	89N-14R	GGRSCNCCDGGWGGYACAWACAT
	89N-19R	GGHGCVCCYGGYGGYACRTACAT

VP : virus protein



(A) (B) (C)

Fig. 1. Cells photographed through inverted microscope.

- (A); uninoculated RD cell
- (B); RD cell inoculated with echovirus 30
- (C); RD cell inoculated with sample

부산지역에서 2007년부터 2009년까지 3년 동안 임상적으로 엔테로바이러스 감염증으로 의심되는 환자의 대변 1,503건, 뇌척수액 1,213건, 인후도찰물 27건, 총 2,743건의 검체에서 RNA를 분리하여 VP1 region RT-PCR한 결과 129건의 검체에서 증폭산물인 350 bp band를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 증폭된 PCR 산물들은 정제시킨 후 염기서열을 결정하였으며, 각각의 VP1 유전자에 대한 염기서열을 이용하여 혈청형을 결정하였다.

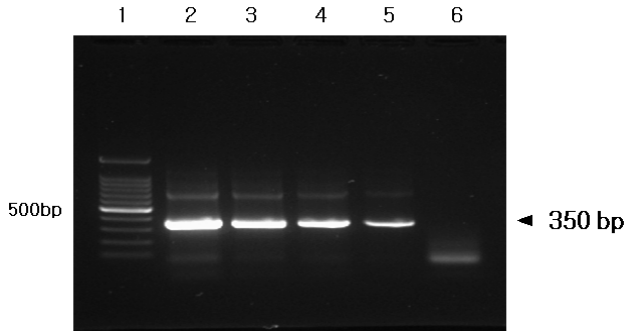


Fig. 2. Electrophoretic analysis of the 2nd PCR products after amplification of the VP1 region. Lane 1: 100 bp DNA ladder, lanes 2-4: positive cases of VP1 RT-PCR, lane 5: positive control, lane 6: negative control.

엔테로바이러스 유행양상 분석

총 2,743건의 검체 중 240건(8.7%)에서 엔테로바이러스가 검출되었다. 연도별로는 2007년에는 엔테로바이러스 감염 의심 환자 검체 1,001건에서 86건(8.6%)에서 엔테로바이러스가 분리되었고, 2008년의 경우 979건 중 85건(8.7%), 2009년 763건 중 69건(9.0%)이 분리되어 최근 3년간 엔테로바이러스가 부산지역에서 매년 비슷한 수준으로 유행하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에 사용된 검체 2,743건 중 1,315건이 6월부터 9월까지 4개월간 의뢰되어 전체건수의 48.0%를 차지하였다. 엔테로바이러스는 5월부터 분리율이 증가하기 시작해서 6월(15.5%), 7월(15.8%), 8월(15.3%)에 높게 나타나 엔테로바이러스 분리가 하절기(초여름~여름)에 집중되어 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이전 부산지역에서 분리된 엔테로바이러스의 분석 결과를 보면 2005년엔 13.3%의 분리율을, 2006년엔 3.7%의 분리율을 보이고 있다²⁰⁾. 같은 시기에 충남 지역에서 연구된 엔테로바이러스의 분석결과를 보면 2005년엔 15.2%의 분리율을 나타내었고²¹⁾, 2006년엔 9.6%의 분리율을 보이는 것으로 나타났다²²⁾. 이것으로 볼 때 지역적으로 차이는 있으나, 지역마다 매년 엔테로바이러스가 꾸준히 유행하고 있음을 알 수 있었다.

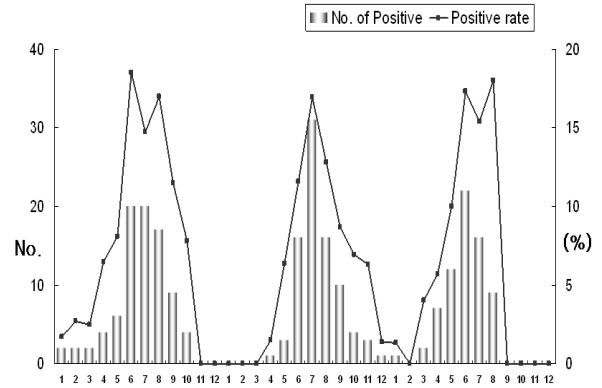


Fig. 3. Monthly distribution of the isolated HEV during 2007~2009 in Busan.

바이러스가 분리된 사례 중 성별이 확인되었던 226건 중 137건(57.1%)이 남자였고, 여자에서는 89건(37.1%)으로 나타났다. 성별에 따른 바이러스 분리율의 차이가 보이고 있으나 이는 검사건수에서 남녀 차이가 있었던 것으로 보이고 검사건수별 양성률은 남자 9.5%, 여자 8.7%로 성별에 따른 분리율이 차이를 보기에는 어려울 것으로 사료 된다(Fig. 4). 연령을 분석한 결과 1세 이하(1,274건)검체가 전체(2,743건) 검체의 46.4%를 차지하였다. 영유아의 바이러스성 수막염의 원인인 엔테로바이러스의 특성상 연령이 증가함에 따라 검사건수가 적어지는 경향을 보였으며, 대부분 10세 이하의 연령에서 엔테로바이러스가 분리되었다. 연령별 분리율은 2~4세에서 15.2%로 가장 높았고, 5~9세에서 10.4%로 다음으로 높게 나타났으며, 그 외 연령에서는 비슷한 분포를 나타내었다(Fig. 5).

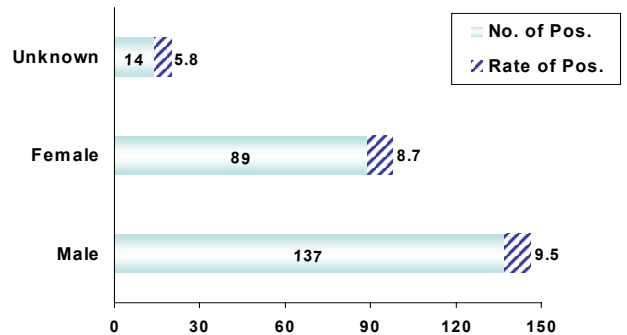


Fig. 4. Sex distribution of children infected with HEV isolates during 2007~2009 in Busan.

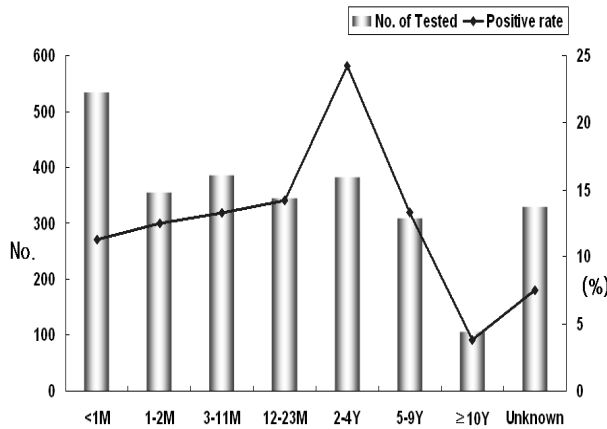


Fig. 5. Age distribution of children infected with HEV isolates during 2007~2009 in Busan.

엔테로바이러스 연도별 유행 혈청형

2007년부터 2009년까지 부산지역의 엔테로바이러스 감염증 의심환자의 검체 2,743건에서 분리된 240건의 엔테로바이러스에서 VP1 유전자에 대한 염기서열을 분석하여 혈청형을 확인하였다. 2007년도에 분리된 엔테로바이러스 총 86건 중 CV-B2 (23건), CV-A9 (20건)이 가장 많았으며, E-9 (8건), EV-71 (7건), CV-A2 (6건), CV-A10 (6건), CV-A5 (5건), CV-A6 (2건), CV-A24 (2건), CV-A8 (1건), E-30 (1건), Untype (5건)의 순으로 나타났다. 2008년도에 분리된 엔테로바이러스 총 85건 중 E-6 (37건), E-30 (18건)이 가장 많았으며, CV-B3 (14건), E-7 (5건), E-9 (3건), CV-A4 (3건), CV-B4 (2건), CV-A2 (1건), CV-A16 (1건), CV-B1 (1건)의 순으로 나타났다. 2009년도에 분리된 엔테로바이러스 총 69건 중 CV-B1 (32건)이 가장 많았으며, 그 외에 E-11 (10건), CV-A4 (5건), CV-A2 (4건), CV-A16 (4건), CV-B3 (1건), E-3 (1건), E-6 (1건), E-25 (1건), Untype (10건)의 순으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Distribution of HEV isolated during 2007~2009 in Busan

Enterovirus		Year			Subtotal
Group	Serotype	2007	2008	2009	
CV-A	CV-A2	6	1	4	11
	CV-A4		3	5	8
	CV-A5	5			5
	CV-A6	2			2
	CV-A8	1			1
	CV-A9	20			20
	CV-A10	6			6
	CV-A16		1	4	5
	CV-A24	2			2
CV-B	CV-B1		1	32	33
	CV-B2	23			23
	CV-B3		14	1	15
	CV-B4		2		2
Echovirus	E-3			1	1
	E-6	8	37	1	46
	E-7		5		5
	E-9		3		3
	E-11			10	10
	E-25			1	1
	E-V30	1	18		17
Enterovirus	EV-71	7			7
	Untype	5	0	10	15
	Total	86	85	69	240

CV-A : Coxsackievirus A, CV-B : Coxsackievirus B, EV : Enteroviruses

엔테로바이러스 유전자형 결정 및 계통분석

2007년부터 2009년까지 부산지역에서 분리된 엔테로바이러스 분리주들에 대하여 VP1 region sequencing을 통하여 엔테로바이러스의 유전형을 확인하여 HEV-A와 HEV-B 두 종류의 유전자형이 부산지역에서 유행하였음을 확인할 수 있었다. HEV-A로 분류된 혈청형은 6종(CV-A2, CV-A4, CV-A5, CV-A10, CV-A16, EV-71) 총 31건이었으며, HEV-B로 분류된 혈청형은 10종(CV-A9, CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, E-6, E-7, E-9, E-11, E-30) 총 41건으로 나타나 각각의 상동성 비교분석하였다.

Phylogenetic analysis

1) HEV-A 계통분석

HEV-A의 부산지역 분리주 31주를 이용하여 상동성 비교 분석을 실시한 결과 분리주 31주 사이에 21.8~100%의 상동성을 보였으며, HEV-A 중 CV-A2 분리주 10주 사이에서 67.1~100%의 상동성을, CV-A4 분리주 8주 사이에서 85.3~100%의 상동성을, CV-A5 분리주 2주 사이에서 83.2%의 상동성을, CV-A10 분리주 2주 사이에서 98.9%의 상동성을, CV-A16 분리주 5주 사이에서 95.8~100%의 상동성을, 마지막으로 EV-71 분리주 3주 사이에서 99.0~99.3%의 상동성을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 6).

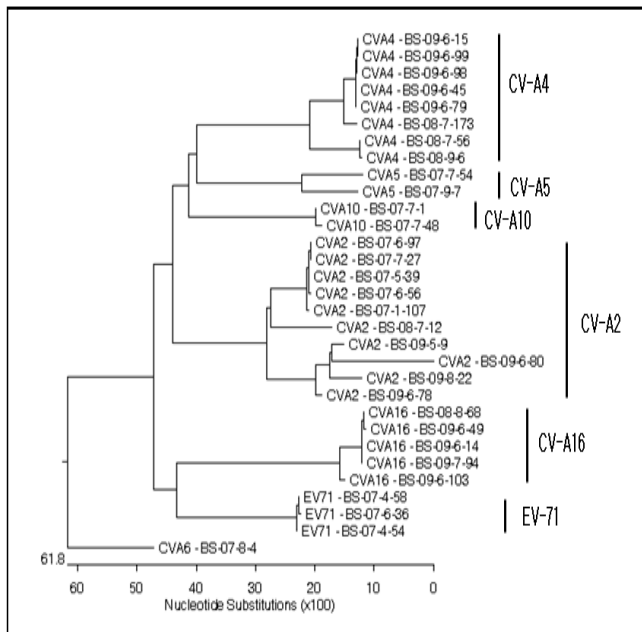


Fig. 6. Phylogenetic relationships in the VP1 region of HEV-A strains isolated from Busan region during 2007~2009. Phylogram was constructed by comparison of the partial sequences of the VP1 region, Nucleotide sequences encoding the VP1 were analysed by Clustal W method.

2) HEV-B 계통분석

HEV-B의 부산지역 분리주 41주를 이용하여 상동성 비교 분석을 실시한 결과 분리주 41주 사이에 56.0~100%의 상동성을 보였으며, HEV-B 중 CV-A9 분리주 2주 사이에서 97.2%의 상동성을, CV-B1 분리주 5주 사이에서 97.8~100%의 상동성을, CV-B2 분리주 4주 사이에서 96.2~100%의 상동성을, CV-B3 분리주 6주 사이에서 85.0~99.7%의 상동성을, CV-B4 분리주 2주 사이에서 97.2%의 상동성을, E-6 분리주 7주 사이에서 83.9~98.8%의 상동성을, E-7 분리주 3주 사이에서 94.1~96.0%의 상동성을, E-9 분리주 3주 사이에서 99.1~99.7%의 상동성을, E-11 분리주 4주 사이에서 59.3~93.1%의 상동성을, 마지막으로 E-30 분리주 5주 사이에서 80.6~98.5%의 상동성을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 7).

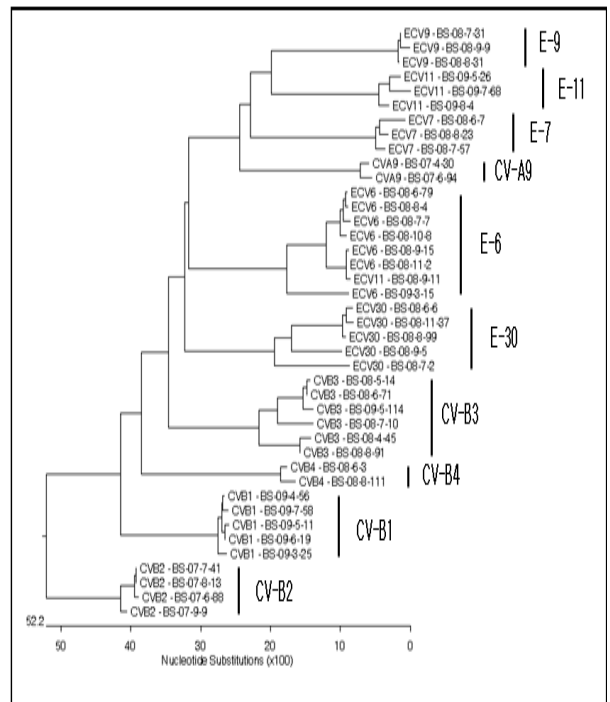


Fig. 7. Phylogenetic relationships in the VP1 region of HEV-B strains isolated from Busan region during 2007~2009. Phylogram was constructed by comparison of the partial sequences of the VP1 region, Nucleotide sequences encoding the VP1 were analysed by Clustal W method.

2005년도에 충남지역 유행을 주도한 E-18의 경우 분리주들 간에 95.8%~99.2%의 상동성을 보였고, 동일한 바이러스 종이 같은 시기에 유행하였음에도 불구하고 4.2%의 다양성을 보였으며²¹⁾, CV-B3의 경우 분리주들간에 80.5%~90.0%의 상동성을

보였다²²⁾. 또한 2006년도에 충남지역 유행을 주도한 E-5의 경우 분리주들간에 97.7%~99.4%의 상동성을 보였고, 외국의 원형주들과의 상동성 비교에서는 79.4%~85.9%의 수치를 보였다²³⁾. 유전형간의 핵산염기서열 상동성 비교를 실시한 결과 서로 같은 혈청형 간에도 상동성의 차이를 보이는 것은 엔테로바이러스가 한가닥의 RNA를 가져 돌연변이율이 매우 높다는 보고가 있다²⁴⁾. 본 연구를 통해서 최근 3년간 부산지역에 분리된 엔테로바이러스 혈청형들 사이에 다양한 상동성을 보이는 결과를 확인 할 수 있었으며, 이를 볼 때 부산지역에서 유행하는 엔테로바이러스 내에 상당한 정도의 유전자 변이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이번 연구에서 수행한 엔테로바이러스의 역학적 분석과 계통발생학적 관계 및 분자유전학적 연관 관계에 대한 연구는 향후 국내에서 수행될 엔테로바이러스 진단제 개발 및 백신개발에 대한 기초 자료로서 제공될 수 있을 것이며, 나아가 분자유전학적인 연구에 있어 한 단계 더 진보할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

부산지역에서 2007년부터 2009년까지 3년 동안 임상적으로 엔테로바이러스 의심 환자 검체 총 2,743건(대변 1,503건, 뇌척수액 1,213건, 인후도찰물 27건)의 검체 중 240건 (8.7%)에서 엔테로바이러스가 검출되었다. 연도별로는 2007년에는 엔테로바이러스 감염의심 환자 검체 1,001건에서 86건 (8.6%)에서 엔테로바이러스가 분리되었고, 2008년의 경우 979건 중 85건 (8.7%), 2009년 763건 중 69건 (9.0%)이 분리되었다. 본 연구에 사용된 검체 2,743건 중 1,315건이 6월부터 9월까지 4개월간 의뢰되어 전체건수의 48.0%를 차지하였다. 엔테로바이러스는 5월부터 분리율이 증가하기 시작해서 6월(15.5%), 7월(15.8%), 8월(15.3%)에 높게 나타나 엔테로바이러스 분리가 하절기(초여름~여름)에 집중되어 나타난 것을 확인할 수 있었다. 검사건수 별 양성률은 남자 9.5%, 여자 8.7%로 성별에 따른 분리율의 차이를 보기 어려웠으며, 대부분 10세 이하의 연령에서 바이러스가 분리 되었다.

2007년부터 2009년까지 부산지역에서 분리된 엔테로바이러스 분리주들에 대하여 VP1 region sequencing을 통하여 엔테로바이러스의 유전형을 확인하여 HEV-A와 HEV-B 두 종류의 유전자형이 부산지역에서 유행하였음을 확인할 수 있었다. HEV-A의 부산지역 분리주 31주를 이용하여 상동성 비교분석을 실시한 결과 분리주 31주 사이에 21.8~100%의 상동성을 보였으며, HEV-B의 부산지역 분리주 41주를 이용하여 상동성 비교분석을 실시한 결과 분리주 41주 사이에 56.0~100%의 상동성 보여 최근 3년간 부산지역에 분리된 엔테로바이러스 혈청형들 사이에 다양한 상동성을 보이는 결과를 확인 할 수 있었으며, 이를 볼 때 부산지역에서 유행하는 엔테로바이러스 내에 상당한 정도의 유전자 변이를 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Hyypia, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. and Stanway, G. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Pro Natl Acad Sci*, 89, pp.8847~8851(1992).
2. Hyypia, T., Hovi, T., Knowles, N.J., Stanway, G., Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt. 1), pp.1~11(1997).
3. Pallansch, M.A., Roos, R.P. Enterovirus: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, In *Fields virology*, 4th. Edited by Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott~Raven Publishers. pp.691~775(2001).
4. Oberste, M.S., maher, K., Nix, W.A., Michele, S.M., Uddin, M., Schnurr, D., al-Busaidy, S., Akoua-Koffi, C., Pallansch, M.A., Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human enterovirus B. *Virus Res* 128, pp.34~42(2007).
5. Andersson, P., Edman, K., Lindberg, A.M., Molecular analysis of the echovirus 18 prototype : Evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res*, 85, pp.71~83(2002).
6. Lin, K.H., Hwang, K.P., Ke, G.M., Wang, C.F., Ke, L.Y., Hsu, Y.T., Tung, Y.C., Chu, P.Y., Chen, B.H., Chen, H.L., Kao, C.L., Wang, J.R., Eng, H.L., Wang, S.Y., Hsu, L.C., Chen, H.Y., Evolution of EV71 genotype in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgroup C4 of EV71. *J. Med. Virol.* 78, pp.254~262(2006).
7. Nix, W.A., Oberste, M.S., Pallansch, M.A., Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44, pp.2698~2704(2006).
8. Palmenberg, A.C., Proteolytic processing of picornavirus 1 polyprotein. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 603~623(1990).
9. Rodgers, F.G., Concentration of viruses in faecal samples from patients with gastroenteritis. In: *Goddard, M., Bulter, M. (Eds.), Viruses and Wastewater Treatment*. Pergamon Press, New York, pp. 15~18(1981).
10. Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mass, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., et al., Distribution of human viral contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Swe

- den and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68, pp.5990~5998(2002).
11. Y.C. Shieh, C.I. Wong, J.A. Krantz, F.C. Hsu. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT~PCR and integrated cell culture~RT~PCR. *Journal of Virological Method* 149, pp.184~189(2008).
 12. Pallansch, M.A., Roos, R.P., Enteroviruses: poliovirus, coxsackievirus, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, Lamb, R. A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 839~893(2007).
 13. Melnick, J.L. Enteroviruses: poliovirus, coxsackievirus, echoviruses, and newer enteroviruses. In *Fields virology*, 3rd. Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Channock, R. M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E. Lippincott~Raven Publishers. pp. 655~712(1996).
 14. Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus Enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:pp.3666~3670(2002).
 15. Wyn~Jones, A.P., Sellwoods, J., Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology* 1, pp.945~962(2001).
 16. Ho M., Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 33, pp.205~216(2000).
 17. Shimizu, H., Utama, A., Onnimala, N., Li, c., Li~Bi, Z., Yu~Jie, M., Pongsuwanna, Y., Miyamura, T., Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr. Int.* 46, pp.231~235(2004).
 18. Paula Andreia Silva, Sabine Diedrich, Divina das Dore s de Paula Cardoso, Eckart Schreier, Identification of enterovirus serotypes by pyrosequencing using multiple sequencing primers. *Journal of Virological Methods* 148, pp.260~264(2008).
 19. Egger, D., Pasamontes, L., Ostermayer, M., Bienz, K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio~ and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 33, pp.1442~1447(1995).
 20. Na, Y. R. Isolation and genetic characterization of human enteroviruses in Busan pvince. Ph. D. Thesis, Chonnam National University, Chonnam, Korea (2009).
 21. Park KS, Sung SY, Kim JD, Song NS, Cha YT, Jeong Y J, Kim JK, Lee TJ, Seo WS. Laboratory Surveillance and Molecular Characterization for the enterovirus in Chung~Nam area. *Journal of CNIHE*, Vol, 16, pp. 11~25. (2006).
 22. Park KS, Sung SY, Park SM, Kim JD, Song NS, Baek K A, Lee TJ, Kim KJ, In CK Epidemiological Analysis of Enterovirus and Phylogenetic Stuey of the Prevalent Echovirus 5 in ChungNam area. *Journal of CNIHE*, Vol, 17, pp. 11~24(2007).
 23. Park KS, Baek KA, Kim K.J, Mun TJ, Park SM, Kim J D, Kim WS, Song NS, In CK Characterization of Complete Cenome of Coxsackievirus B3 from Patient with Aseptic Meningitis. *Journal of CNIHE*, Vol, 18, pp. 11~24(2008) .
 24. Drake, J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sciences.* 90:pp.4171~4175(1993).