

## Enterovirus에 대한 분자생물학적 검증법 및 Genotype 방법의 개발

울산대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>1</sup>국립보건원 바이러스질환부 소화기계바이러스과

김은순 · 남정현 · 김기순<sup>1</sup> · 윤재득<sup>1</sup> · 김유겸

=Abstract=

### The Development of Molecular Detection Method and Differentiation of Genotypes of Enterovirus

Eun Soon Kim, Jung Hyun Nam, Ki Soon Kim<sup>1</sup>, Jae Deuk Yoon<sup>1</sup>  
and Yoo Kyum Kim

*Department of Microbiology, College of Medicine, Univ. of Ulsan, Seoul 138-736,*

*<sup>1</sup>Division of Enteroviruses, Department of Virology, National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea*

In this study, the feasibility of identification and genotypic differentiation of enteroviruses was investigated by using nested reverse transcription-polymerase chain reaction (nested RT-PCR), single-stranded conformation polymorphism (SSCP), and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques.

Two hundred seventy-four clinical samples were assayed by both nested RT-PCR and tube culture method using MRC-5 and MK cells; 58 (86.6%) out of 67 enterovirus culture-positive samples contained enteroviral RNA. In addition, 114 (55.1%) of 207 samples from patients with suspected enteroviral CNS disease with negative viral cultures were positive by the nested RT-PCR.

The nested RT-PCR products were genotyped by the SSCP method and the results were compared with serotypes. We could differentiate 6 subtypes, 3 of which are similar to coxsackievirus B3, B5, echovirus 11, plus 3 other subtypes. RFLP cleaved with *Sty* I, *Bgl* I, and *Xmn* I yielded characteristic patterns for each laboratory strains.

This study demonstrates the usefulness of the RT-PCR for the rapid diagnosis of enterovirus infection and the potentials of the SSCP method for differentiation of enterovirus strains.

**Key Words:** Enterovirus, RT-PCR, RFLP, SSCP, Genotype

### 서 론

상기도 감염 질환, 뇌막염 [1] 및 심근염의 원인 바이러스 중 하나이며, dilated cardiomyopathy [2~4] 및 chronic fatigue syndrome [5~7]의 원인

바이러스로도 추측이 되고 있는 enterovirus (Ev) 감염진단은 고식적 방법인 세포배양술에 의해 이루어지고 있다. 그러나 민감도를 높이기 위해서는 여러 종류의 세포배양을 하여야만 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있다. 실제로 4종의 세포를 사용할 때는 2종의 세포를 사용할 때 보다 분리

본 연구는 1996년도 교육부 지원 기초의학 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어졌음

동정률을 18% 증가시킬 수 있었다는 연구결과가 이를 입증하고 있다 [8]. 따라서 Ev의 효과적인 분리동정을 위하여서는 여러 종류의 세포가 필요하다는 어려움이 있고, enteroviral meningitis 경우 세포배양술에 의한 바이러스의 뇌척수액에서의 검출은 43~77%에 불과하므로 [9] 새로운 진단방법의 개발이 필요하다.

Rhinovirus, cardiovirus, aphthovirus와 함께 picornavirus family에 속하는 Ev는 single-stranded RNA 바이러스이며, poliovirus (types 1-3), coxsackievirus A (types A1-A22, A24), coxsackievirus B (types B 1-B6), echovirus (types 1-9, 11-27, 29-33), enterovirus (types 68-72) 등의 혈청형을 포함하고 있다.

Ev 감염은 질환에 따라 호발하는 혈청형에 차이가 있는 것으로 알려져 있다 [1]. 예를들어 paralytic disease 경우 53%가 poliovirus에 의하며, 78%의 encephalitis와 meningitis 경우 echovirus에 의하며, carditis 경우 63%가 coxsackievirus B (CB)에 의하며, 발진을 일으키는 경우 32%가 coxsackievirus A (CA)에 의해서라고 알려져 있다. 그러나 질환에 따른 호발 혈청형이 차이가 나는 원인에 대하여서는 아직 연구가 미진하며, 이 원인은 부분적으로 phenotype의 일종인 혈청형에 의한 Ev의 분류에 의한 것으로 추측된다. 즉 혈청형에 따른 병리기전을 이해하기에는 한계가 있다. 따라서 Ev의 genotype에 의한 분류와 각 genotype에 따른 호발질환의 차이를 조사하고, 이에 따른 각 genotype에 대한 분자생물학적인 연구가 Ev의 tropism을 이해하기 위하여서는 필수적이라 할 수 있다.

본 연구는, Ev 감염의 진단 방법 중 세포배양법과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법을 비교하고, restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법 및 single-stranded conformation polymorphism (SSCP)을 이용하여 genotyping을 시행하여 기존의 중화 반응을 이용한 혈청형과의 관계를 조사하여 혈청형을 대체할 새로운 genotyping 방법의 가능성을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

서울중앙병원에 입원한 무균성 뇌막염이 의심되는 환자를 대상으로 뇌척수액, 혈액, 인두스왑 및 변 검체를 채취하여 연구를 시행하였다. RFLP

및 SSCP를 위해서는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입한 CB3, CB4, CB5, 및 echovirus 11을 사용하였다.

### 2. Primers

Reverse transcription 및 nested PCR을 위해 사용된 primer는 다음과 같다: outer upstream primer (OUP1); 5'-GGTGYGAAGAGYCTAYTGAG-3', outer downstream primer (ODP1); 5'-CACYGGRTGG-CYAATCCA-3', inner upstream primer (IUP2); 5'-TCCTCCGGCCCTGAATGCG-3', inner downstream primer (IDP2); 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' (Y: C or T, R: A or G)

### 3. RNA 추출 및 reverse transcription

Ultraspec-I (Cinna/Biotex, Houston, TX)을 이용하여 enteroviral RNA를 추출하였다. 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. Ultraspec-I 용액 (1 ml)에 검체 0.2 ml를 넣어 부유액을 만든 다음, 0.2 ml의 chloroform을 섞은 후 15초 동안 진탕혼합하여 4°C에서 5분 동안 보관하였다. 그후 12,000 X g에서 15분간 원심분리하여 5분 동안 얼음에 보관한 후 무색의 상층액을 취하였다. RNA의 침전을 위해서 동량의 isopropanol, yeast tRNA (10 mg/ml, 1 µl)를 넣은 후 -20°C에서 2시간 보관하였다. 다시 12,000 X g에서 15분간 원심분리하여 RNA pellet을 취한 후, 75% ethanol로 2회 반복하여 세척한 후 진공건조 하여 DEPC-treated deionized water에 60°C에서 10분간 반응시켜 사용하였다.

Reverse transcription은 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate (Promega, Madison, WI), 15 pmol outer downstream primer, 200 U Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Germany), 1 U RNase inhibitor, 10 µl viral RNA sample을 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 90°C에서 5분간 변성시켰다.

### 4. Enzymatic amplification

First enzymatic amplification은 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 µl cDNA, 0.2 mM each dNTP, 20 pmol OUP1 및 ODP1, 1 U Taq DNA polymerase (AmpliAq, Perkin Elmer Cetus, Branchburg, NJ)를 혼합 반응시켜 시행하였다. DNA

thermal cycler (Perkin Elmer 9600, Norwalk, CT)에서의 반응조건은 94℃에서 5분, 52℃에서 15초, 72℃에서 15초 1 cycle 시행 후, 94℃ 15초, 52℃ 15초, 72℃ 15초 30 cycles, 94℃ 15초, 52℃ 15초, 72℃ 5분 1 cycle 시행하였다.

두번째 enzymatic amplification은 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 μl first PCR 산물, 0.2 mM each dNTP, 25 pmol IUP2 및 IDP2, 1.25 U Taq DNA polymerase를 혼합 반응시켜 시행하였다. 반응조건은 94℃에서 4분 반응 후, 94℃ 1분, 55℃ 90초, 72℃ 20초 (매회 1초씩 증가)로 35회 시행 후 72℃에서 5분간 extension 시킨 후 3% agarose gel에서 전기영동하여 154 bp의 PCR 산물을 관찰하였다.

## 5. 임상가검물 접종 및 세포배양술

Ev의 검증을 위하여서는 LLC-MK2 cell (ATCC CCL-7 [monkey kidney]), MRC-5 cell (ATCC CCL-171 [embryonal lung, diploid, male, human])을 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 세포배양술에 의한 Ev의 검증법을 간략하게 설명하면, 각 세포주를 멸균된 tube에 0.5 ml씩 seeding하여 5° 사면 선반에 넣어 2~3일 배양 후 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 minimum essential media (MEM)를 0.5 ml씩 첨가하고, 다시 3~4일 후 10% FBS가 함유된 MEM을 제거하고 5% FBS가 함유된 MEM을 1 ml씩 첨가하여 배양하였다가 임상가검물 접종 1~3일 전에 5% FBS가 함유된 MEM을 1 ml 첨가하여 사용하였다. 뇌척수액 접종은 시험관당 0.2 ml씩 직접 접종하였으며, 인두스압 검체의 경우에는 4 ml serum-free media에서 잘 혼합한 후 0.2 ml씩 접종하였다. 변 검체의 경우는 serum-free media를 이용하여 10% 부유액을 만들어 원심분리 및 여과 과정을 거쳐 0.2 ml을 접종하였다. 혈액의 경우에는 혈청을 0.2 ml씩 접종하였다.

## 6. RFLP

ATCC에서 구입한 CB3, CB4, CB5, 및 echovirus 11을 monkey kidney cell에서 배양 후 상층액에서 viral mRNA를 추출하였다. RT-PCR 과정을 거친 후 10 μl를 *Sty* I, *Bgl* I, 및 *Xmn* I을 이용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다.

## 7. SSCP

Nested PCR 산물 (20 μl)을 3% agarose gel에 전

기영동한 후 잘라내어 Microspin Sephacryl S-200 HR columns (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue 및 0.05% xylene cyanol이 들어 있는 용액과 1:1 혼합하여 98℃에서 5분 반응시켜 변성 시킨 후 5분간 4℃에 방치하였다. 변성된 cDNA는 MDE gel (FMC product Inc., Rockland, ME)에 4 Watt에서 1시간 전기영동 (XCell II, Novex, San Diego, CA)하여 silver stain (Bio-Rad, Richmond, CA) 후 관찰하였다. 온도는 thermostatically controlled refrigerated circulator (Hoeffer RCB 500, San Francisco, CA)을 사용하여 10±0.5℃로 고정하여 시행하였다.

## 8. Neutralization test

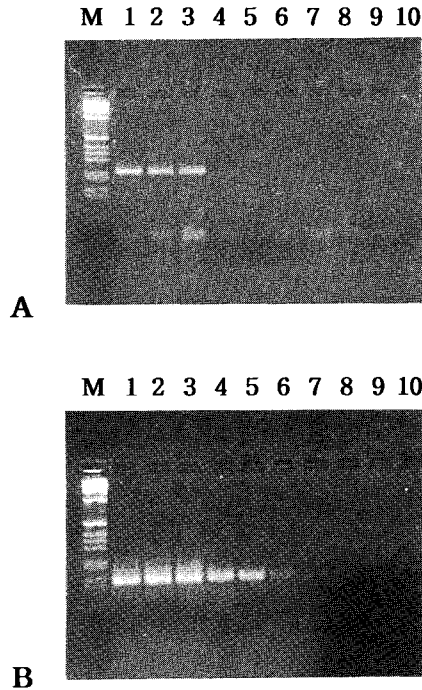
중화시험은 네덜란드 RIVM (Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene, Amsterdam, Netherlands) enterovirus serum pool을 세계보건기구로부터 분양받아 사용하였으며, 각각의 항혈청은 5% FBS가 함유된 EMEM 배지로 20배 희석하여 사용하였다. 96 well plate의 well에 준비된 각각의 항혈청을 50 μl씩 넣고 EMEM 배지를 50 μl씩 넣은 후 적당히 희석한 (10<sup>-1</sup>-10<sup>-3</sup>)액을 50 μl씩 첨가하고 1분간 혼합하여 36℃에서 1시간 중화반응을 시켰다. 그 후 RD 세포를 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml 되도록 하여 10 μl씩 분주한 후 매일 세포 병변을 관찰하였다. CB subtyping이 필요한 경우 antiserum (Denka Seiken, Osaka, Japan)을 이용하여 유사한 방법으로 시행하였다.

## 결과 및 성적

### 1. RT-PCR과 nested RT-PCR의 민감도 비교

RT-PCR의 경우 4 × 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>까지 띠를 관찰할 수 있었으며, nested RT-PCR의 경우에는 4 × 10<sup>-1</sup> TCID<sub>50</sub>까지 띠를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 즉 nested RT-PCR이 10<sup>5</sup> 정도 민감도가 높은 것으로 관찰되었다.

또한 뇌척수액의 PCR에 대한 억제효과를 관찰하기 위하여 정상 뇌척수액에 Ev를 희석하여 nested RT-PCR 시행한 결과 4 TCID<sub>50</sub>까지 띠를 관찰할 수 있었다 (data not shown). 즉 뇌척수액은 약 10배 정도 억제효과가 있다고 추측할 수 있었다.



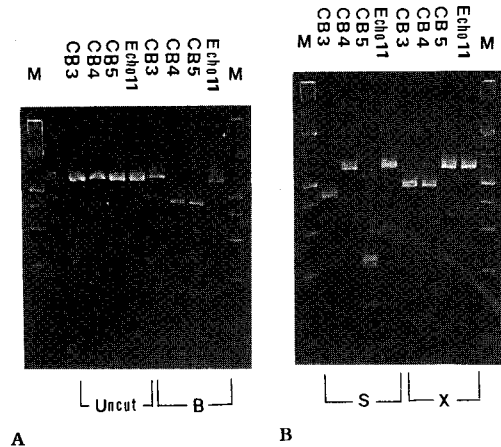
**Fig. 1.** PCR products were visualized by 3% agarose gel electrophoresis. (A) First round of nested PCR amplification using primer OUP1 and ODP1. (B) Second round of nested PCR using primer IUP2 and IDP2. Lane M, DNA size marker. Lane 1-9, PCR products derived from the amplification of 10-fold dilutions of virus corresponding to  $4 \times 10^6$  (Lane 1) to  $4 \times 10^{-2}$  (Lane 9) TCID<sub>50</sub>. Lane 10, PCR reagent blank.

## 2. 세포배양술과 RT-PCR 비교

274개의 임상가검물을 대상으로 비교한 결과, 세포배양술에 의해서는 67/274 (24.5%), nested RT-PCR에 의해서는 172/274 (62.8%)의 양성률을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 임상가검물 별로 양성률을 관찰한 결과 두 방법 모두 변 검체에서 높은 양성률을 보였으나 혈액을 임상가검물로 사용할 때에는 nested RT-PCR이 보다 효과적인 방법임을 관찰할 수 있었다 (12% vs 52%).

## 3. RFLP 결과

CB3, CB4, CB5, 및 echovirus 11의 nested RT-PCR 산물을 *Bgl* I, *Sty* I, 및 *Xmn* I 제한효소로 잘라 결과를 관찰하였다 (Fig. 2). CB3의 경우 *Bgl* I에 의해서는 절단되지 않았으며 *Sty* I에 의해서는 12, 73, 212 bps DNA 단편을, *Xmn* I에 의해서는 62, 235 bps DNA 단편을 관찰할 수 있었다. CB4의



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of nested PCR product (297 bp) from four different prototype strains (CB3, CB4, CB5, Echovirus 11) and their RE digestion with restriction enzyme, (A) B: *Bgl* I; M, DNA size marker. (B) S: *Sty* I and X: *Xmn* I.

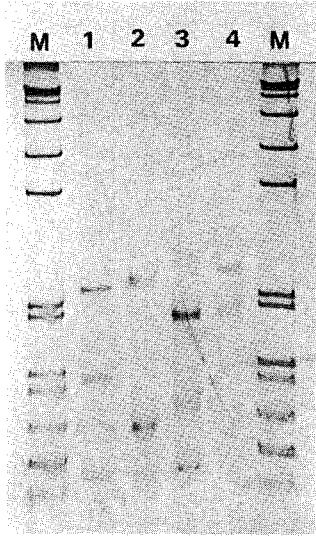
**Table 1.** Detection of Enterovirus from clinical samples

PCR	Cell Culture	
	Positive	Negative
Positive	58	114
Negative	9	93

경우는 *Bgl* I에 의해서 80, 217 bps DNA 단편을, *Sty* I에 의해서는 절단되지 않았으며, *Xmn* I에 의해서는 62, 235 DNA 단편을 관찰할 수 있었다. CB5의 경우는 *Bgl* I에 의해서는 80, 217 bps DNA 단편을, *Sty* I에 의해서는 83, 102, 112 bps DNA 단편을, *Xmn* I에 의해서는 절단되지 않았다. Echovirus 11 경우는 *Bgl* I, *Sty* I, *Xmn* I에 의해서는 절단되지 않았다. 이러한 결과로 3개의 제한효소를 사용할 시에는 subtype이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 4. SSCP 및 serotype 결과

CB3, CB4, CB5 및 echovirus 11의 nested RT-PCR 산물을 SSCP한 결과 각각의 특징적 SSCP 유형을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 74건의 임상가검물에서 시행한 SSCP 결과, 51건 (68.9%), 10건 (13.5%), 6건 (8.1%), 4건 (5.4%), 2건 (2.7%), 1건 (1.4%)의 6종의 특징적 유형을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이 중 5건에서 혈청형을 조사한 결과 CB1 4건, CB2 1건을 관찰할 수 있었다.

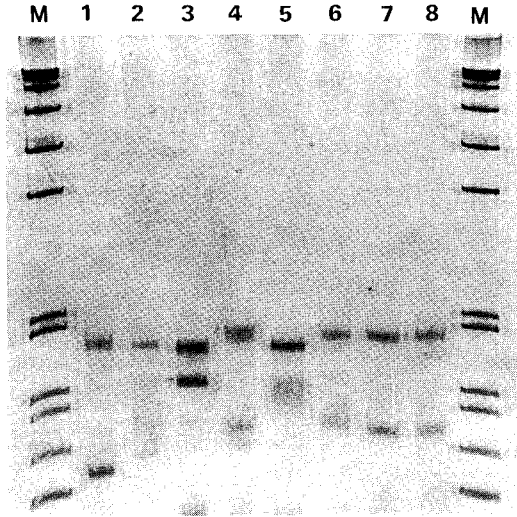


**Fig. 3.** SSCP analysis of enterovirus genotype. The PCR products from 4 prototype strains migrated with different electrophoretic mobilities upon separation. M, DNA size marker; Lane 1, Coxsackievirus B3; Lane 2, Coxsackievirus B4; Lane 3, Coxsackievirus B5; Lane 4, Echovirus 11.

## 고찰

Enterovirus 감염의 진단은 세포배양술이 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법은 배양기간에 따른 임상적 의미의 반감, 낮은 민감도 외에도 세포병변효과를 판단하여야 하는 경향이 필요하다는 약점이 있다. 핵산증폭기술의 발전은 임상가검물에 존재하는 소량의 병원체의 발견도 가능하게 하였다. Ev 감염 진단에도 PCR이 이용되고 있으며 [10,11], 국내에서도 수년전 부터 시행되고 있다 [12]. 이러한 방법들은 주로 5' terminal 쪽의 conserved region을 target으로 한 primer를 사용하고 있다. 본 연구에서도 이 부위를 target으로 하는 RT-PCR을 시행하였다. Ev RNA 검증을 위한 RT-PCR 시행시 중요한 사항은 Ev는 체액 안에 낮은 농도로 (뇌척수액의 경우 10-100 TCID<sub>50</sub>) 존재한다는 사실이다 [13]. 본 연구에서 시행한 RT-PCR의 민감도는  $4 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>, nested RT-PCR의 경우에는  $4 \times 10^{-1}$  TCID<sub>50</sub>로 관찰되었다. 따라서 단순한 RT-PCR은 Ev 감염의 입증을 위해서는 적당하지 않다고 사료된다.

대부분의 바이러스질환은 바이러스의 tropism에 의해 숙주범위가 결정되며, 이후 숙주 면역기능의 변화 또는 바이러스의 감염세포에 대한 직



**Fig. 4.** Representative results of differentiation of EV genomes detected in clinical samples by PCR-SSCP. M, DNA size marker; Lane 1, Coxsackievirus B4; Lane 2, 5, 6, 7, Cerebro spinal fluid (CSF) samples; Lane 3, Throat swab; Lane 4, Blood; Lane 8, Coxsackievirus B3.

접적인 손상에 의해 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다 [14,15]. 바이러스의 tropism은 감염세포의 specific viral receptor 유무 [16,17], 세포유입 후 posttranslation 과정에 필요한 효소에 대한 반응 정도 [18,19], 온도, pH barrier 등의 외부환경과 세포분화 정도 [20,21] 등에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다. Ev의 경우에도 viral receptor와 tropism과의 관계에 대하여 연구가 진행되고 있다 [22,23].

또한 최근 연구결과에 의하면 두개의 2차 구조를 포함하고 있는 5'-nontranslation region (NTR)은 [24] RNA-protein 상호작용에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 [25]. 130부터 640번째 nucleotide는 stem-loop 구조를 하고 있으며 internal ribosome entry site 또는 ribosome landing pad로 기능하는 것으로 알려져 있다 [26~30]. 또한 site-directed mutagenesis 연구 결과에 의하면 471부터 484번째 nucleotide의 변화는 poliovirus의 attenuation과 neurovirulence에 영향을 미친다는 것이 알려졌다 [24]. 따라서 환자의 임상가검물에서 추출된 wild EVs의 5'-NTR을 SSCP와 RFLP 및 염기서열 분석을 통하여 cardiotropic enterovirus와 neurotropic enterovirus의 tropism 차이를 비교관찰 하는 것은 enterovirus의 병리기전을 이해하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 일차적으로

무균성 뇌막염이 의심되는 환자의 임상가검물 또는 laboratory strain을 대상으로 RFLP 및 SSCP를 시행하여 genotype 가능성을 조사하였다. 74건의 nested RT-PCR 양성인 임상가검물을 대상으로 SSCP를 시행한 결과 6종의 genotype으로 분류 가능하였으며, 이 중에서 type 1의 경우에는 51/74 (68.9%)의 높은 빈도를 보여 1996년에 발생한 무균성 뇌막염의 주 원인 Ev일 가능성을 보였다. 또한 이 중 일부는 중화반응검사를 시행하여 혈청형을 조사한 결과 가장 많이 발견된 type 1의 경우 CB1임이 판명되었다. 이러한 혈청형 결과는 type 1의 SSCP 유형이 CB3와 유사하다는 결과와는 맞지 않았다. 따라서 CB1의 SSCP를 시행하여 이의 유형을 비교분석할 필요가 있고, 염기서열 분석을 시행하여 type 1의 CB1 또는 CB3와의 homology를 조사하는 것이 필요하다고 사료된다.

이러한 neurotropic Ev genotype 결과와 cardiotropic Ev에서의 호발 genotype과의 차이를 분석하기 위하여 현재 저자들은 심장이식수술을 시행한 dilated cardiomyopathy 환자의 조직에서 enteroviral RNA를 검출하여 genotyping을 시행하고 있다.

## 결 론

본 연구는 무균성 뇌막염이 의심되는 환자를 대상으로 임상가검물을 채취하여 기존의 세포배양술과 nested RT-PCR 기법을 사용하여 Ev 양성 여부를 판정하였으며, 또한 RFLP와 SSCP 방법을 이용한 genotyping 가능성을 검증하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Nested RT-PCR은 세포배양술에 의해 양성 판정을 받은 경우의 86.6%에서, 음성 판정 경우의 55.1%에서 enteroviral RNA를 검출할 수 있었다.

2. RFLP 기법을 사용하여 Ev의 genotype이 가능하였으나 수종의 제한효소를 사용하여야 한다는 단점이 있었다.

3. SSCP에 의해 신속 간편하게 임상가검물에서 genotyping이 가능하였으며, 74건의 wild strain enteroviral RNA를 6종으로 분류할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Melnick JL: Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. p. 549-605. *In* BN Fields and DM Knipe (ed.),

Virology. Raven Press, New York, 1990.

2. Schwaiger A, Umlauf F, Weyrer K, Larcher C, Lyons J, Muhlberger V, Dietze O, Grunewald K: Detection of enteroviral ribonucleic acid in myocardial biopsies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by polymerase chain reaction. *American Heart Journal* 126: 406-410, 1993.
3. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC: Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 89: 2582-2589, 1994.
4. Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME: Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues. *J Clin Investigation* 90: 156-159, 1992.
5. Gow JW, Behan WM, Simpson K, McGarry F, Keir S, Behan PO: Studies on enterovirus in patients with chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 18: Suppl 1: S126-129, 1994.
6. Clements GB, McGarry F, Nairn C, Galbraith DN: Detection of enterovirus-specific RNA in serum: the relationship to chronic fatigue. *J Med Virol* 45: 156-161, 1995.
7. Bowles NE, Bayston TA, Zhang HY, Doyle D, Lane RJ, Cunningham L, Archard LC: Persistence of enterovirus RNA in muscle biopsy samples suggests that some cases of chronic fatigue syndrome result from a previous, inflammatory viral myopathy. *J Medicine* 24: 145-160, 1993.
8. Dagan R and Menegus MA. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol* 19: 219-228, 1986.
9. Chonmaitree T, Baldwin CD, Lucia HL: Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev* 2: 1-14, 1989.
10. Nicholson F, Meeto G, Aiyar S, Banatvala JE, Muir P: Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection.

- J Virol Methods 48: 155-166, 1994.
11. Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ Jr: Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 13: 177-182, 1994.
  12. Kim, Eun S, Cho, Young K, Kim, Yoo K: The detection of enteroviruses using enzymatic amplification and non-radioactive labeled nucleic acid hybridization techniques. *Ulsan Univ Med J* 2: 58-63, 1993.
  13. Wilfert CM, Lehrman SN, Katz SL: Enteroviruses and meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2: 333-341, 1983.
  14. Mims CA: The pathogenetic basis of viral tropism. *Am J Pathology* 135: 447-455, 1989.
  15. Murray MG, Bradley J, Yang XF, Wimmer E, Moss EG, Racaniello VR: Poliovirus host range is determined by a short amino acid sequence in neutralization antigenic site I. *Science* 241: 213-215, 1988.
  16. Jondal M, Klein G, Oldstone MB, Bokish V, Yefenof E: Surface markers on human B and T lymphocytes. VIII. Association between complement and Epstein-Barr virus receptors on human lymphoid cells. *Scand J Immunol* 5: 401-410, 1976.
  17. Fingeroth JD, Weiss JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT: Epstein-Barr virus receptor of human B-lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci* 81: 4510-4514, 1984.
  18. Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG: Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus haemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci* 84: 36-40, 1987.
  19. Webster RG, Kawaoka Y, Bean WJ Jr: Molecular changes in A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus associated with acquisition of virulence. *Virology* 149: 165-173, 1986.
  20. Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Kennedy PG, Ghotbi Z, Clements JE, Stanley J, Pezeshkpour G: Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: Susceptibility to infection and gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol* 58: 67-74, 1986.
  21. Gonczol E, Andrews PW, Plotkin SA: Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science* 224: 159-161, 1984.
  22. Racaniello VR: Cell receptors for picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 161: 1-22, 1990.
  23. Ren R and Racaniello VR: Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice. *J Virol* 66: 296-304, 1992.
  24. Skinner MA, Racaniello VR, Dunn G, Cooper J, Minor PD, Almond JW: New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol* 207: 379-392, 1989.
  25. Rohll JB, Percy N, Ley R, Evans DJ, Almond JW, Barclay WS: The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* 68: 4384-4391, 1994.
  26. Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E: A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol* 62: 2636-2643, 1988.
  27. Jang SK, Davies MV, Kaufman RJ, Wimmer E: Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA *in vivo*. *J Virol* 63: 1651-1660, 1989.
  28. Pelletier J and Sonenberg N: Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325, 1988.
  29. Pelletier J and Sonenberg N: Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J Virol* 63: 441-444, 1989.
  30. Trono D, Pelletier J, Sonenberg N, Baltimore D:

Translation in mammalian cells of a gene linked  
to the poliovirus 5' noncoding region. Science

241: 445-448, 1988.

---