

서울시내 소화기 및 호흡기 환자에서 분리한 엔테로바이러스 감염실태 및 유전형분석

장정임[†] · 오세아 · 박상훈 · 함희진 · 조석주 · 최성민 · 강병학* · 황서연* · 김진석*

서울특별시 보건환경연구원, *질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터

Genotypes and Infection Status of Human Enterovirus Associated with Enteric and Respiratory Patients in Seoul, Korea

Jungim Jang[†], Seah Oh, SangHun Park, HeeJin Ham, Sukju Jo, Sungmin Choi,
Byunghak Kang*, SeoYeon Hwang*, and JinSeok Kim*

Seoul metropolitan Government Institute of Health & Environment, Seoul, Korea

*Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Osong, Korea

ABSTRACT

Objective: Human enteroviruses (HEVs) are a common causative agent of gastrointestinal or respiratory infections. In this study, to examine the genotypic diversity and characteristics of HEVs associated with patients in Seoul, we collected and analyzed stool and throat swab samples taken from patients with acute gastroenteritis or a common cold from 2011 to 2012. We researched the difference in genetic characteristics of HEVs from gastroenteritis and respiratory patients.

Methods: For genetic analysis, we amplified the 5'-noncoding region and partial VP1 region of HEVs by RT-PCR. The genotypes of HEVs were further identified based on nucleotide sequences of the VP1 region.

Results: The majority of the HEV infections in Seoul occurred from June to August. The molecular characteristic assay showed that although the majority of HEVs can be propagated by a fecal-oral route, Coxsackievirus A2 (n=13, 19.4%), A4 (n=8, 11.9%), and A5 (n=4, 6.0%) can be preferentially transmitted by a respiratory route.

Conclusions: This Enterovirus surveillance system plays an important role in preparing for a severe outbreak. The genotypic characteristics of HEV may provide potentially useful data needed for epidemiological studies.

Keywords: coxsackievirus, gastroenteritis, human enterovirus, respiratory route, VP1

I. 서 론

엔테로바이러스는 매년 전 세계적으로 수 백만 명이 감염되는 바이러스이며, 영유아 및 소아의 경우 소화기 질환의 주요 원인 바이러스로 알려져 있다. 엔테로바이러스에 의한 감염은 봄부터 이른 가을에 걸쳐 유행하며 불현성 감염에서부터 일반적인 감기

증상, 수족구병, 급성 출혈성 결막염, 무균성 수막염, 확장성 심근염, 포진성 구협염, 뇌염, 소아마비와 같은 임상증상을 보인다.¹⁾ 특히, 엔테로바이러스 71형 (Enterovirus 71; EV71)에 의한 감염의 경우에는 1997년 말레이시아, 1998년 대만, 1999년 호주, 2000년 싱가포르, 1997년과 2000년 일본, 2008년 중국 등에서 집단 발병 사례가 보고 되었으며,^{2,3)} 우리나라

[†]Corresponding author: Seoul metropolitan Government Institute of Health & Environment, Seoul, 137-734, Korea, Tel: +82-2-570-3428, Fax: +82-2-570-3275, E-mail: immy77@seoul.go.kr

Received: 13 March 2012, Revised: 15 April 2013, Accepted: 24 April 2013

에서도 2009년과 2010년에 EV71 감염에 의한 사망자가 발생하기도 하였다.^{4,6)} 따라서, 엔테로바이러스 감염에 의한 사회적, 경제적 피해를 줄이기 위하여 1993년부터 질병관리본부를 중심으로 엔테로바이러스에 대한 대대적인 감염병 감시 및 역학조사가 수행되고 있다.²⁾

엔테로바이러스는 피코나비리과에 속한 엔테로바이러스 속에 속하고 정이십면체 형태에 외막이 없으며 대략 7.2~7.5 kb의 양성 단일 가닥 RNA를 가지고 있다.⁷⁾ 엔테로바이러스의 표준 진단법인 세포 배양을 통한 바이러스 분리와 중화 항체법에 의한 혈청형 동정법에 의하여 70여가지 이상의 다양한 혈청형 등이 밝혀졌으며, 이를 바탕으로 폴리오바이러스(Poliioviruses), 콕사키 A 바이러스(coxsackie A virus, CVAs), 콕사키 B 바이러스(coxsackie B virus, CVBs) 및 에코바이러스(echoviruses)와 기타 엔테로바이러스(numbered enteroviruses)로 분류되어왔다.⁸⁾ 하지만 최근에는 RNA-dependent RNA-polymerase를 이용하여 특정 유전자의 염기서열을 결정하고,⁹⁾ 계통분석에 의한 염기서열간의 유전적 상동성을 기반으로 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)과 엔테로바이러스 D군(EV68, 70)으로 분류하고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

엔테로바이러스는 세포질에 감염된 후 하나의 다단백질(Polyprotein)을 합성하며, 이 다단백질은 단백질 분해효소에 의해서 3개의 구조단백질 P1, P2, P3로 나뉘어진다. P1부분은 VP4, VP2, VP3, VP1을 암호화한다.⁷⁾ 반면에 P2와 P3 부위는 단백질 가공과정(protein processing)과 유전체 복제(genome replication)에 필요한 단백질들을 암호화한다.¹⁾ P1부분을 구성하는 VP1은 성숙한 피코나비리온의 표면에 존재하는 주요 캡시드 단백질로써 중화항체 형성을 유도하는 중화부위를 포함하기 때문에 혈청학적 특이성 및 VP1 유전자 서열의 상동도 분석을 통해 엔테로바이러스를 분류하는데 이용된다.

엔테로바이러스는 사람을 숙주로 하며, 주로 분변-구강 경로를 통하여 전파되며, 소화기를 통해 감염된다고 알려져 있다. 폴리오바이러스는 인체에 들어오면 혈류를 타고 체내의 여러 기관으로 퍼지게

되며, 분변뿐만 아니라 상기도의 분비물로도 배출될 수 있으며, 콕사키바이러스 A21의 경우는 호흡기만을 통해 전파되기도 한다.¹³⁾ 현재 서울지역에서 호흡기를 통해 전염되어 질환을 유발하는 엔테로바이러스에 대한 연구 조사는 거의 없는 실정이다. 이 연구의 목적은 엔테로바이러스에 대한 VP1유전자의 서열분석을 통해 소화기질환자와 호흡기질환자에서 확인된 엔테로바이러스의 유전형을 조사하고, 특히 호흡기질환자에서 확인된 엔테로바이러스 유전형의 typing에 대하여 알아보려 한다. 따라서 이 연구에서는 2011년부터 2012년까지 급성설사질환 및 호흡기 질환을 가지고 있는 환자들로부터 분리한 엔테로바이러스의 분자생물학적 분석을 통하여 서울지역에서 유행하고 있는 엔테로바이러스의 유전적 다양성을 확인하고 그에 대한 감염병 예방 대책 수립과 새로운 진단법 개발 및 백신개발에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 환자의 분변 검체와 인후도말액의 진처리

2011년부터 2012년까지 서울지역 3개 병원으로부터 급성장관염으로 의심되는 환자 729건의 분변검체를 수집하고, 5개의 병원으로부터 호흡기질환 환자 1171건의 인후도말액을 수집하였다. 분변 1g을 멸균된 0.1M PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Sigma, USA) 9ml에 넣어 진탕 후, 4°C 3000 rpm에서 30분간원심 분리하여 상층액을, 3 ml 인후도말액(BD, Universal Viral Transport)은 진탕 후 사용하였다.

2. 엔테로바이러스 RNA 추출과 유전자검출

RNA를 추출하기 위해서 QIAamp Viral RNA mini kit(QIAZEN, Hilden, Germany)의 매뉴얼에 따라 140 ul의 검체로부터 RNA template를 추출하여, Realtime RT-PCR과 RT-PCR에 바이러스의 RNA template로 사용하였다. 5'-noncoding region과 VP1-VP3 부위의 1차 RT-PCR 및 2차 PCR에 사용된 프라이머는 Table 1에 표기하였다. 엔테로바이러스의 5'-noncoding region의 Realtime RT-PCR을 통해 알아보기 위해 Realtime RT-PCR Premix tube에 검체로부터 추출한 RNA 5 ul와 DNase/RNase-free water

Table 1. The sequence of primer used for VP3-VP1 RT-nested PCR⁶⁾

Primer	Region	Positions(NT)	Sequence(5'→3')
ENTF	5'UTR	161-180	AAGCACTTCTGTTCCCGG
ENTR	5'UTR	580-599	ATTGTCACCATAAGCAGCCA
EV-1F	VP3-VP1	2207-2226	GCR ATG TTR GGR ACW CAT GT
EV-2F	VP3-VP1	2207-2226	GCS ATG TTR GGM ACR CAY GT
EV-1R	VP3-VP1	3002-3021	GGR TTB GWK GAN GTY TGC CA
EV-3F	VP1	2603-2628	CCH GCD CTH ACC GCW GTG GAR ACD GG
EV-4F	VP1	2603-2628	CCM ATM CTH CAA GCH GCH GAG AYY GG
EV-2R	VP1	2951-2973	GGR SCN CCD GGW GGY ACA WAC AT
EV-3R	VP1	2951-2973	GGH GCV CCY GGY GGY ACR TAC AT

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

45 ul를 첨가하여 50 ul가 되도록 한 후 반응액이 완전히 섞이도록 하였다. Thermal cycler(Exicycler TM 96, Bioneer)를 이용하여 Reverse transcription reaction(42도 15분)과 Inactivation reverse transcriptase 과정 (95도 10분) 1회 처리 후 Denaturation(94도 10초)과 annealing 및 extension과정(60도 1분)을 45회 반복 처리하여, Exicycler analyze 프로그램으로부터 증폭커브를 분석하여 엔테로바이러스 양성검체를 1차 스크리닝한다. 5'-noncoding region에 대한 Realtime RT-PCR에서 양성검체를 모아 VP1 부위의 일부를 cDNA를 합성하기 위하여 우선, Enterovirus RT-PCR Premix tube에 검체로부터 추출한 RNA 1 ul와 DNase/RNase-free water 19 ul를 첨가하여 20 ul가 되도록 한 후 반응액이 완전히 섞이도록 하였다. Thermal cycler(2720 Thermal cycler Applied Biosystems, USA)를 이용하여 Reverse transcription reaction과 inactivation of reverse transcriptase 과정 1회(42도에서 45분 94도 5분) 처리 후, denaturation, annealing, extension 의 조건을 40회(94도 30초 55도 30초 72도 40초) 처리 후, Final extension 1회(72도 5분)를 수행하였다. RT-PCR product 1 ul와 DNase/RNase-free water 19 ul를 첨가하여 20 ul가 되도록 한다. 반응액이 완전히 섞이도록 한 후 Thermal cycler(2720 Thermal cycler Applied Biosystems, USA)를 이용하여 initial denaturation 1회(94도 5분), 40회 (94도 30초 55도 30초 72도 40초) 처리 후, 1회(72도 5분)의 조건으로 2차 PCR을 수행하였다. 1.5% Agarose gel에 2차 PCR product를 30분간 전기영동(Mupid-

21 J, Cosmo Bio Korea)하여 Image analyzer(Vilber Lourmat, France)로 350 bp과 371 bp 유전자를 확인하였다.

3. 엔테로바이러스의 유전형확인

2차 PCR로 증폭된 PCR산물을 ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up (Affymetrix, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA를 주형으로 각각의 유전자형에 특이적인 primer를 사용하여 BigDye 3.1 kit (ABI prism Applied Biosystems, USA)로 sequencing reaction을 하였다. 반응산물을 BigDye XTerminator purification kit (Applied Biosystems, USA)로 정제한 후 Automated DNA sequencer (ABI 3730 XL, Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 Lasergene software(DNASTAR Inc., Madison, Wi, USA) 프로그램을 통해 염기서열을 통합분석 하였다. 이후 K-caliciNet (<http://www.k-calici.net/>) 홈페이지를 이용하여 데이터를 비교 분석하여 Genotype을 결정하고 저장하였다.

III. 결 과

1. 연령 및 계절별 엔테로바이러스 양성분포

본 연구에서는 엔테로바이러스 표본감시사업에 참여하는 서울 지역 병의원에 내원한 환자들 중 급성 위장질환 혹은 호흡기질환 환자를 대상으로 엔테로바이러스의 감염여부를 조사하였다. 총 1,900건의 분변 및 인후도말액 검체로부터 바이러스 RNA를 추

Table 2. The incidences of Enterovirus infection in Gastroenteritis and Respiratory patients in Seoul by periodic surveillance

M*	Y*		Total				2011				2012			
			No. tested		No. Positive(%)		No. tested		No. Positive(%)		No. tested		No. Positive(%)	
	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*	Stool	T.S.*
1	73	187	1(1.4)	1(0.5)	28	98	0(0)	0(0)	45	89	1(2.2)	1(1.1)		
2	40	184	1(2.5)	1(0.5)	22	36	0(0)	0(0)	18	148	1(5.6)	1(0.7)		
3	112	132	0(0)	3(2.3)	85	54	0(0)	3(5.6)	27	78	0(0)	0(0)		
4	64	100	0(0)	6(6.0)	40	51	0(0)	5(9.8)	24	49	0(0)	1(2.04)		
5	73	81	2(2.7)	9(11.1)	47	39	1(2.1)	2(5.1)	26	42	1(3.8)	7(16.7)		
6	59	92	17(28.8)	21(22.8)	37	56	8(21.6)	8(14.3)	22	36	9(40.9)	13(36.1)		
7	60	32	13(21.7)	9(28.1)	34	9	6(17.6)	5(55.6)	26	23	7(26.9)	4(17.4)		
8	63	27	9(14.3)	5(18.5)	34	1	6(17.6)	1(100)	29	26	3(10.3)	4(15.4)		
9	60	27	10(16.7)	1(3.7)	41	0	10(24.4)	0(0)	19	27	0(0)	1(3.7)		
10	23	103	1(4.3)	7(6.8)	14	75	0(0)	6(8.0)	9	28	1(11.1)	1(3.6)		
11	53	131	1(1.9)	7(5.3)	28	86	1(3.6)	7(8.1)	25	45	0(0)	0(0)		
12	49	75	1(2.0)	5(6.7)	20	60	1(5.0)	5(8.3)	29	15	0(0)	0(0)		
Total	729	1171	56(6.4)	75(6.4)	430	565	33(7.7)	42(7.4)	299	606	23(7.7)	33(5.4)		

Y*=Year, M*-Month, T.S.*=Throat swab

출하여 유전자의 보존성이 높은것으로 알려져 있는 5'-noncoding region을 target으로 RT-PCR을 수행한 결과, 2011년과 2012년 동안 급성위장질환 환자의 729건의 검체는 7.7%(n=56), 호흡기질환 환자의 1171건의 검체는 6.4%(n=75)가 확인되었다. 엔테로바이러스에 의한 감염은 10세 이하의 영·유아 주로 발생하였으며(Table 4), 5월에서 9월 사이에 집중적으로 관찰되었고 의뢰된 급성위장질환 환자의 검체들은 5월 2.7%(n=2), 6월 28.8%(n=17) 7월 21.7%(n=13), 8월 14.3%(n=9), 9월 16.7%(n=10)로 봄에서 이른 가을까지 주로 검출되는 특징을 보였다. 이 결과는 급성위장질환의 경우 3월~10월 사이에 엔테로바이러스가 유행하는 시기라는 보고와 일치한다.³⁾ 또한 호흡기질환 환자 검체의 경우 4월 6.0%(n=6), 5월 11.1%(n=9), 6월 22.8%(n=21) 7월 28.1%(n=9), 8월 18.5%(n=5) 9월 3.7%(n=1), 10월 6.8%(n=7), 11월 5.3%(n=7), 12월 6.7%(n=5)로 1월에서 3월을 제외한 사계절에서 확인되는 특성을 보였다. 호흡기질환을 일으키는 환자의 경우 엔테로바이러스가 검출되는 경우를 보면 급성위장질환과 마찬가지로 3~10월 사이에 유행하면서 이른 봄(3~4월)과 이른 겨울(10~12월)에 감기증상을 보이는 엔테로바이러스의 검출이 확인되었다(Table 2).

2. 엔테로바이러스 유전형에 따른 임상증상과의 관계

호흡기질환 환자 검체들로부터 5'-noncoding region을 PCR한 결과 검체 75건을 확인하였다. 다시 검출된 75건의 엔테로바이러스 RNA를 추출하여 VP1 region을 target으로 PCR을 수행하여 유전자를 분석하였다. 75건 중 45건의 엔테로바이러스들의 경우 모든 검체에서 고열 증상을 보였으며, Human Enterovirus A 부류에 속하는 CoxsackievirusA2, A6, A8, A10, A16의 경우 인후통, 오한, 기침, 가래, 근육통, 콧물, 두통, 구토, 설사와 같은 일반 감기(common cold) 증상을 CoxsackievirusA4, A5는 일반 감기 증상과 함께 herpangina 혹은 수족구(Hand-foot-mouth disease) 유사증상이 보였다. 또한 Human Enterovirus B부류에 속하는 CoxsackievirusB1, B3, B4, B5, Echovirus18은 모든 검체에서 고열증상을 동반하였으며, 기침, 인후통, 콧물, 코막힘, 근육통, 두통, 구토, 식욕부진과 같은 일반 감기 증상을 보였으며, Echovirus6의 경우 일반 감기 증상 외에도 herpangina의 증상이 보였다(Table 3). 각 검체에 대한 유전형별 임상증상에서도 모든 엔테로바이러스 양성인 호흡기질환 환자들은 고열 증상이 나타났으며 인후염, 기침, 가래 증상도 다수 나타남을 확인하였다. 10세 이하의 영·유아에서 엔테로바이러스

Table 3. Presenting Symptoms of Enterovirus Genotypes in Seoul, 2011~2012

Genotype	Clinical symptoms	No.
CoxsackievirusA2	Fever+chill	1
	Fever+chill+cough	1
	Fever+chill+cough+phlegm	1
	Fever+chill+nausea+abdominal pain	1
	Fever+chill+Headache+vomiting+diarrhea	1
	Fever+chill+Throat pain+Headache+Muscular pain+Nasal mucus+phlegm+vomiting	1
	Fever+cough+phlegm	2
	Fever+cough+Headache+Nasal mucus+vomiting	1
	Fever+Throat pain	2
	Fever+Throat pain+Headache+nasal congestion+phlegm	1
	Fever+fatigue+drowsy	1
Coxsackievirus A4	Fever+chill+Muscular pain+Nasal mucus	1
	Fever+chill+cough+Headache+Nasal mucus+nasal congestion+husky voice	1
	Fever+cough+Throat pain+Nasal mucus+phlegm	1
	Fever+cough+Throat pain+herpangina	1
	Fever+Throat pain	1
	Fever+Throat pain+Headache+Herpangina	1
	Fever, nasal congestion	1
	Fever+herpangina	1
CoxsackievirusA5	Fever+Throat pain	2
	Fever+Throat pain+Muscular pain+hand-foot-and-mouth disease-like symptom	1
CoxsackievirusA6	Fever+cough+Nasal mucus	1
	Fever+Throat pain	1
CoxsackievirusA8	Fever+Throat pain	1
CoxsackievirusA10	Fever+chill+cough+Throat pain+Nasal mucus+, nasal congestion+phlegm	1
	Fever+cough+Nasal mucus+phlegm+vomiting+diarrhea+anorexia	1
	Fever+cough+Nasal mucus	1
	Fever	1
CoxsackievirusA16	Mild Fever+Nasal mucus+anorexia	1
Coxsackievirus B1	Fever+cough+Nasal mucus	1
	Fever+Nasal mucus+nasal congestion	1
Coxsackievirus B3	Fever+Throat pain	1
	Fever+nasal congestion, anorexia	1
Coxsackievirus B4	Fever	1
Coxsackievirus B5	Fever+chill, Throat pain+Headache+, Muscular pain	2
	Fever+cough+vomiting+anorexia	1
	Fever+Throat pain	1
Echovirus6	Fever+chill	1
	Fever+anorexia, herpangina	1
Echovirus18	Fever+chill+cough+Throat pain+Headache+Muscular pain	1
	Fever+Headache+Nasal mucus+nasal congestion	1

Table 4. Clinical symptoms of Enterovirus infected patients in Seoul, 2011~2012

	Age	Gen	Fev	T.P.	Chi	M.P.	Cou	Hea	Phl	N.M.	Her	Oth
CA2/2011/SE08-18	13	M	1		1							1
CA2/2011/SE08-20	12	F	1				1		1			
CA2/2011/SE08-24	30	M	1		1		1		1			
CA2/2011/SE10-26	5	M	1				1		1			
CA2/2011/SE10-51	6	F	1		1		1					
CA2/2011/SE11-43	4	M	1				1	1		1		1
CA2/2011/SE11-68	9	M	1	1								
CA2/2011/SE11-83	4	F	1	1								
CA2/2011/SE12-05	5	F	1	1				1	1			1
CA2/2011/SE12-22	7	M	1	1	1	1		1	1	1		
CA2/2011/SE12-26	5	F	1									1
CA2/2011/SE12-28	4	F	1		1							
CA2/2012/SE01-05	7	M	1		1			1				2
CA4/2012/SE05-50	6	M	1	1				1			1	
CA4/2012/SE05-51	3	M	1	1								
CA4/2012/SE05-53	3	M	1	1			1			1		
CA4/2012/SE06-20	2	F	1		1		1	1		1		
CA4/2012/SE06-25	3	M	1									1
CA4/2012/SE06-38	3	F	1								1	
CA4/2012/SE07-09	5	F	1	1		1					1	
CA4/2012/SE07-36	4	M	1		1	1				1		
CA5/2011/SE08-08	31	M	1	1		1						1
CA5/2012/SE08-15	7	M	1	1								
CA5/2012/SE08-16	5	F	1	1								
CA6/2012/SE05-72	3	F	1				1			1		
CA6/2012/SE06-21	5	M	1	1								
CA8/2012/SE09-20	5	M	1	1								
CA10/2011/SE04-21	4	M	1									
CA10/2011/SE05-28	4	F	1				1		1	1		2
CA10/2011/SE06-41	8	M	1	1	1		1		1	1		1
CA10/2012/SE08-28	3	F	1				1			1		
CA16/2011/SE05-12	4	M	1							1		1
CB1/2012/SE06-04	4	M	1				1					
CB1/2012/SE06-50	6	M	1							1		1
CB3/2012/SE06-17	6	M	1	1								
CB3/2012/SE06-37	3	M	1									2
CB4/2012/SE11-61	6	F	1									
CB5/2011/SE06-45	8	M	1	1	1	1		1				
CB5/2011/SE08-16	7	M	1	1								
CB5/2011/SE10-82	29	F	1	1	1	1		1				
CB5/2011/SE11-78	3	M	1				1					2

Table 4. Continued

	Age	Gen	Fev	T.P.	Chi	M.P.	Cou	Hea	Phl	N.M.	Her	Oth
E6/2012/SE07-10	3	M	1								1	1
E6/2012/SE08-26	5	F	1		1							
E18/2011/SE06-11	18	F	1					1		1		1
E18/2011/SE06-47	38	M	1	1	1	1	1	1				

Gen=gender, Fev=fever, T.P.= Throat pain, Chi=Chill, M.P.= Muscular pain, Cou=cough, Hea=Headache, Phl= phlegm, N.M.= Nasal mucus, Her= herpangina, Oth=others

Table 5. Genotype of Enteroviruses detected from Gastroenteritis and Respiratory patients in Seoul

Human Enterovirus Type	Genotype	No. detected in Stool	No. detected in Throat swap
Human Enterovirus A	CoxsackievirusA2	5(11.6%)	13(19.4%)
	Coxsackievirus A4	4(9.3%)	8(11.9%)
	CoxsackievirusA5	0(0%)	4(6%)
	CoxsackievirusA6	0(0%)	3(4.5%)
	CoxsackievirusA8	1(2.3%)	1(1.5%)
	CoxsackievirusA10	1(2.3%)	3(4.5%)
	CoxsackievirusA12	2(4.7%)	0(0%)
	CoxsackievirusA16	3(6.98%)	2(3.0%)
Human Enterovirus B	Enterovirus71	4(9.3%)	0(0%)
	Coxsackievirus B1	1(2.3%)	2(3.0%)
	Coxsackievirus B3	3(6.98%)	4(6.0%)
	Coxsackievirus B4	1(2.3%)	1(1.5%)
	Coxsackievirus B5	0(0%)	4(6.0%)
	Echovirus6	5(11.6%)	2(3.0%)
	Echovirus9	2(4.7%)	0(0%)
	Echovirus18	7(16.3%)	2(3.0%)
Untypable Human Enterovirus		4(9.3%)	18(26.9%)
Total		39/43	49/67

의 감염에 민감한 것을 확인하였다(Table 4).

3. 급성위장관염 및 호흡기증상을 보이는 환자들로부터 검출된 바이러스의 양상

5'-noncoding region 부분에 대한 PCR 결과 급성 위장관염 환자들의 샘플의 경우 56건의 엔테로바이러스 양성검체를 확보하였으며, 일반감기 증상을 나타내는 호흡기환자들의 샘플 중 75건으로부터 엔테로바이러스 양성임을 확인하였다. 또한 131건의 양성검체에 대하여 엔테로바이러스의 유전자형 분류에 이용되는 VP1 유전자 염기서열을 분석하여 유전형을 확인하였다. 양성인 검체들 중 이들의 유전형은 CVA2(n=18, 16.4%), CVA4(n=12, 10.9%), ECV18

(n=9, 8.2%), CVB3(n=7, 6.4%), ECV6(n=7, 6.4%), CAV16(n=5, 4.5%) CAV5,10(n=4, 3.6%), EV71(n=4, 3.6%), CBV5(n=4, 3.6%), CAV6, 12(n=3 2.7%), CBV1(n=3 2.7%), CAV8(n=2, 1.8%), CBV4(n=2, 1.8%), ECV9(n=2, 1.8%)로 분석되었다. 그러나 22건의 경우 VP1의 유전자가 증폭되었으나 sequencing 되지 못해 유전형에 대한 분석을 수행하지 못하였다 (Table 5). 설사질환을 보이는 급성위장관염 증상환자들은 엔테로바이러스가 확인된 총 43건의 검체 중에서 CVA2(n=5), CVA4(n=4), EV71(n=4) 등이 포함되어 있는 엔테로바이러스 A형(46.5%)과 CVB3(n=3), Echovirus 6(n=4), echovirus 18(n=7) 등으로 구성되어 있는 엔테로바이러스 B형(44.2%) 들이 고

르게 검출되었다(Table 5). 반면, 발열, 인후통, 오한, 근육통과 같은 일반적인 감기증상을 보이는 환자들의 인후도말액으로부터 분리한 엔테로바이러스의 유전형(총67건)은 CVA2(n=13), CVA4(n=8), CVA5(n=4) 등을 포함하는 엔테로바이러스 A형(50.7%)들이 주로 검출되었다(Table 4). 하지만, 엔테로바이러스 B형(20.9%)의 경우에는 전체적으로 엔테로바이러스 A형보다 검출되는 비율이 낮았으며, CVB3(n=4), CVB5(n=4), CVB1(n=2) 등이 관찰되었다.

IV. 고 찰

성숙한 피코나바이러스 비리온의 표면 단백질인 VP1에는 많은 중화부위가 존재하며 중화부위에 결합하는 혈청형에 따라 바이러스를 분류하는 방법과 VP1 유전자의 상동도 분석에 따른 계통분류가 일치하는 것으로 알려진 후,⁹⁾ VP1의 염기서열분석은 엔테로바이러스의 분류에 기본적으로 적용되고 있다.¹⁰⁾ 이번 연구에서는 2011년부터 2012년 까지 급성위장관염 증상환자와 호흡기질환 증상 환자들의 샘플을 수집하여 바이러스 RNA를 추출한 뒤 장내바이러스의 유전자 검색에 이용되는 보존성이 높은 것으로 알려져 있는 5'-noncoding region을 target으로 PCR을 수행하였다. 그러나 5'-noncoding region의 경우 염기서열 분석에 따른 바이러스형이 혈청형과 일치하지 않는 경우가 많아 유전형의 분석을 위해서는 엔테로바이러스의 VP1 유전자의 염기서열을 비교하여 유전자형을 분석이 필요하였고 이를 바탕으로한 엔테로바이러스의 아형 바이러스들과 호흡기 질환과의 상관관계를 살펴보았다.¹⁴⁾

그 결과 급성위장질환을 보이는 환자의 검체에서는 호흡기질환 환자의 검체보다 훨씬 더 다양한 엔테로바이러스 유전형들이 검출되었다. 바이러스성 급성위장질환은 소화기를 통해 전파된다고 알려진 엔테로바이러스 A형-D형까지 다양한 바이러스 감염에 의해 유발되는 것으로 생각되는 반면, 호흡기질환은 주로 엔테로바이러스 A형에 속하는 콕사키바이러스 A형에 의한 감염양상을 보였다. 상기도 감염을 일으키는 콕사키바이러스 A21는 호흡기를 통해 전파되고¹³⁾ 엔테로바이러스 68형의 경우 산에 약하고 낮은 적정 성장(33°C)의 특성^{15,16)}을 보인다고 알려져있다.

엔테로바이러스 A형과 B형은 고전적 분류에서 콕

사키바이러스 A형과 B형으로 분류되었던 바이러스들로, 콕사키바이러스의 감염이 호흡기나 소화기를 통해서 질환을 일으키는 것으로 생각되며, 이에 대한 예방 및 관리가 필요하다.

결론적으로 본 논문은 호흡기와 소화기를 통해 전파되는 엔테로바이러스의 유전형연구를 통해 서울지역에서 유행하는 엔테로바이러스의 유전형과 감염실태를 파악함으로써 바이러스성 질환들의 치료 및 예방 자료로 활용될 수 있으며 특히 서울지역에서 발생하는 엔테로바이러스성 호흡기 감염증 관리를 위한 기초자료로 활용될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 질병관리본부에서 주관하는 급성설사질환 실험실감시사업(ENTERNET, 수인성질환과)과 인플루엔자 및 호흡기바이러스 실험실감시사업(KINRESS, 사업번호: 4851-300, 인플루엔자바이러스과 및 호흡기바이러스과)의 지원에 따라 실험을 진행하였으며 강병학선생님, 김진석선생님, 황서연선생님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Korea Human Resource Development Institute for Health and Welfare. Lecture manual on Enterovirus genetic Test Education. Yearly manual. KOHI; 2012. p. 15-32.
2. Kang BH. National laboratory surveillance for enterovirus. *Public Health weekly report KCDC* 2008;1(37) : 617-620. Available from: URL: <http://www.cdc.go.kr/phwr>.
3. Kang BH. An outbreak of enterovirus 71 in China and enterovirus surveillance in Korea. *Public Health weekly report KCDC* 2008; 1(6): 87-88. Available from: URL: <http://www.cdc.go.kr/phwr>.
4. Jee YM, Cheon DS, Kim K, Cho JH, Chung YS, Lee J et al. Genetic analysis of the VP1 region of Human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000. *Arch Virol* 2003; 148: 1735-1746.
5. Kang BH. Laboratory-based surveillance of enterovirus associated diseases in Korea, 2010. *Public Health weekly report KCDC* 2011; 4(51): 935-939. Available from: URL: <http://www.cdc.go.kr/phwr>
6. Park SH, Choi SS, OH SA, Kim CK, Cho SJ, Lee JH et al. Detection and Characterization of Enterovi-

- rus Associated with Herpangina and Hand, Foot and Mouth Disease in Seoul, Korea. *Clin Lab* 2011; 57: 959-967.
7. Knipe DM, Howley PM, Fields virology, 4thed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 685-775.
 8. Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, and Stanway G. Classification of enteriviruses based on molecular and biological properties. *J Gen virol* 1997; 78: 1-11.
 9. Caro V, Guillot S, Delpeyroux F and Crainic Radu. Molecucar Strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol* 2001; 82: 79-91.
 10. 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* 1999;37(5):1288-1293.
 11. 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* 1999;73(3):1941-1948.
 12. Thoelen I, Moës Elien, Lemey P, Mostmans S, Wolants E, Lindberg AM et al. 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* 2004; 42(3):963-971.
 13. Xiang Z., Gonzalez R., Wang Z., Ren L., Xiao Y., Li J., et al. Coxsackievirus A21, Enterovirus 68, and Acute Respiratory Tract Infection, China. *Emerg Infect Dis* 2012;18(5): 821-824.
 14. W. Allan Nix, M. Steven Oberste, and Mark A. Pallansch. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2698-2704.
 15. Atsushi K, Hideyuki K, Jun-ichiro S, Urara K, Masao T, Masashi S, et al. Enterovirus 68 in children with acute respiratory tract infections, Osaka, Japan. *Emerg Infect Dis* 2011;17(8):1494-1497.
 16. Center for Disease Control and Prevention. Cluster of acute respiratory illness associated with Enterovirus 68 – Asia, Europe, and United States, 2008-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011;60(38): 1301-1304.