

## General-Primer를 이용한 무균성뇌막염 원인 바이러스 분석

국립보건원 바이러스질환부 소화기계바이러스과  
<sup>1</sup>중앙대학교 자연과학대학 생물학과

김문보<sup>1</sup> · 김기순 · 배유병 · 송철용<sup>1</sup> · 윤재득 · 이광호<sup>1</sup> · 신학균\*

=Abstract=

### General Primer-Mediated PCR Detection of Enteroviruses Causing Aseptic Meningitis

M.B. Kim<sup>1</sup>, K.S. Kim, Y.B. Bae, C.Y. Song<sup>1</sup>,  
J.D. Yoon, K.H. Lee<sup>1</sup> and H.K. Shin<sup>2</sup>

*Lab. of Enteroviruses, Dept. of Virology, National Institute of Health*  
*<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Science, Chung-Ang University*

Aseptic meningitis, an acute inflammation of the meninges, is a common illness during childhood. Virus is the most important cause of aseptic meningitis. Especially enterovirus causes approximately above 85% of all cases of aseptic meningitis. In 1993, there was a big epidemic of aseptic meningitis by ECHO 9 and ECHO 30 viruses. And ECHO 3 virus was isolated as a causative agent of aseptic meningitis in 1994. This study was aimed to detect the causative agent of aseptic meningitis in 1995 and to analyze the 5'-noncoding region which was used to detect virus. Virus was isolated from 87 stools and cerebrospinal fluid specimens of the patients by cultured RD and HEp-2 cell. Neutralizing antibody tests using enterovirus serum pool were performed on the specimens with cytopathic effect. 3 of ECHO 7 viruses and 5 of Coxsackie B3 viruses were isolated from stool specimens and 1 of ECHO 7 and Coxsackie B3 mixed type was confirmed from cerebrospinal fluid specimens. RNA was isolated from the culture supernatants of infected cells and general primers were selected in highly conserved part of the 5'-noncoding region of the enteroviral genome for RT-PCR. PCR product from this virus showed a 152bp band on gel electrophoresis. Sequence of obtained DNA was compared with prototype sequences by accessing to the Genebank database. 5'-noncoding region of isolated Coxsackie B3 virus, which has point mutations in nucleotide sequence positions 493, 497, 502, 523, was closely related to that of polio virus type 1, Mahoney strain. In case of isolated ECHO 7 virus, nucleotide has been changed from cytosine to thymine at position 581 and from thymine to cytosine at position 583. We concluded the causative agents of the outbreak of aseptic meningitis during June to July in 1995 were both ECHO 7 and Coxsackie B3 virus, and the primer used in this study could allow a rapid diagnosis of enteroviruses by PCR.

**Key Words:** Aseptic meningitis, PCR, Coxsackie B3, ECHO 7.

본 연구는 '96 보건의료기술 연구개발사업(No HMP-96-D-6-1054)의 일환으로 수행되었습니다.  
This study was supported by a Grant (No. HMP-96-D-6-1054) of '96 Good Health R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. To whom correspondence should be addressed

## 서 론

무균성뇌막염 (Aseptic meningitis)은 두통, 구토 등의 뇌막 자극 증세를 보이는 전염성 증후군으로 발병부위는 주로 leptomeninges이며 임상 검사상 세균, 진균 또는 결핵균 등의 감염이 없이 발현되는 중추신경계 염증 질환이다. 이러한 무균성뇌막염의 원인으로는 여러 바이러스들 (Coxsackie, ECHO, Herpes simplex, Mumps, EBV, HIV-1, Arboviruses)에 의한 것이 대부분이며 이외에 종양성 질환, 화학물질, 약물 등에 의해서도 발현될 수 있다 [1]. 일반적으로 바이러스에 의한 무균성뇌막염은 하계절(7, 8, 9월)이 주발생 시기이나 봄에 발생하는 경우도 있고, 인구과밀 지역이나 빈곤한 생활상태에서 대발생이 일어날 수 있으며, 주로 소아에서 발생되고 영유아, 노령층에서 중증 감염이 올 수 있다 [2, 3]. 감염전파 방식은 오염된 대변이나 경구 감염이 주된 경로이나 호흡기 분비물에 의한 전파도 중요한 의의가 있는 것으로 알려져 있다 [4]. 장내 바이러스에 의한 무균성뇌막염의 진단은 중화항체법 (neutralizing antibody test)을 이용한 면역 검사가 수행되고 있으며, RD (Rhabdomyo sarcoma), HEp-2 (Human epidermoid carcinomas), Vero (Africa green monkey kidney) 등에 의한 세포배양법과 여러 임상 가검물(혈액, 뇌척수액, 대변등)에서 PCR (polymerase chain reaction)을 이용한 진단이 활용되고 있다 [5, 6, 7, 8]. 또한 최근에는 초기 감염을 진단할 수 있는 IgM capture ELISA도 실용화 되고 있는 단계이다 [9, 10]. 이러한 장내 바이러스의 감염에 의한 무균성뇌막염은 전세계적으로 보고되고 있으며, 최근에는 미국, 멕시코, 러시아, 프랑스 등에서 유행이 있었던 것으로 보고되었다 [11, 12, 13]. 인접국가인 일본의 경우 1981년 부터 1991년까지 10년간 8,595건의 장내 바이러스가 분리되었으며, 1995년에는 1,619명의 환자로부터 장내바이러스가 분리되었다. 유행을 주도하는 바이러스도 ECHO 30형 바이러스에서 Coxsackie B 바이러스로 변화되며, 주로 감염되는 연령층도 4-7세에서 신생아 (0-2개월)로 변화하는 추세이다 [14]. 우리나라에서는 1990년에 무균성뇌막염이 다발한 이후 1993년 5월경부터 7월까지 전국적으로 전례없는 대유행이 있었으나, 감염원을 분석하는 바이러스의 연구가 현실적으로 적극적일 수 없어 정확한 역학조사 결

과는 아직 미비한 실정이다. 김 등은 1993년에 무균성뇌막염 환자로부터 ECHO 9과 ECHO 30형의 바이러스를 1994년에 ECHO 4와 Coxsackie B형의 바이러스를 보고하였다 [24, 25]. 또한 최근에 ECHO 7 바이러스의 보고가 점차 늘고 있어 ECHO 7 바이러스의 추세에 관하여 귀추가 주목되고 있다. 본 연구는 1995년 우리나라에 유행을 일으켰던 무균성뇌막염의 원인바이러스를 밝히고, PCR법을 이용하여 5'-noncoding RNA의 염기서열을 비교, 분석하므로써 우리나라에서 장내 바이러스에 의한 무균성뇌막염의 감염 및 역학조사에 만전을 기할것을 강조하고자 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상

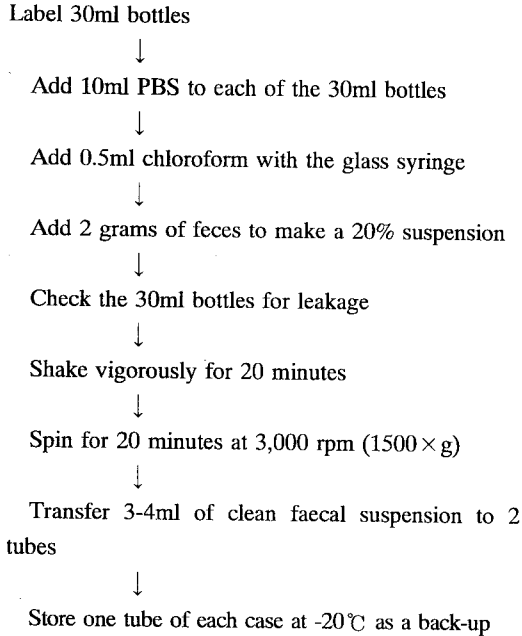
1995년 5월말부터 10월말까지 5개월간 서울, 부산, 대구, 대전, 광주, 전남, 전북 등 지방보건환경 연구원 및 신촌 세브란스병원 소아과로부터 임상증상이 전형적인 무균성뇌막염의 양상을 보이는 환자의 stool, CSF (Cerebro Spinal Fluid), serum, throat swab 등 37건의 가검물을 대상으로 하였다. 대부분의 가검물은 입원 후 1회 채취하였고, 검사전까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하며 사용하였다.

### 2. Faecal suspension 준비

가검물중 CSF와 serum, VTM 배지에 넣은 throat swab 등은 바로 세포배양에 사용하였으나 분변 가검물은 Fig. 1과 같은 처리과정을 거쳐 세포에 접종하였다.

### 3. 세포배양

RD, HEp-2, HeLa, VR세포중에서 장내 바이러스에 감수성이 높은 RD (ATCC CCL 136)와 HEp-2 (ATCC CCL23)세포를 WHO (World Health Organization)로부터 분양받아 사용하였다. 이들 세포는 Hoechst 33258 형광색소로 염색하여 Mycoplasma 시험을 수행한 뒤 사용하였다. 단층 배양된 RD와 HEp-2 세포에 가검물을 접종(0.2ml/25cm<sup>2</sup> flask)한 후 세포병변을 관찰하였으며, 100% CPE (cytopathic effect)가 관찰될 때 세포를  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 Freezing/Thawing 시킨 다음 현탁액을 다시 같은 세포에 접종하므로써 바이러스를 분



**Fig. 1.** Preparation of clean faecal suspension

리하였다. 24시간 안에 급격한 세포병변 현상이 관찰될 경우 가검물에 의한 독성 (Toxin)이 남아 있는 것으로 간주하고 -20°C에서 다시한번 freezing/thawing한 후 그 배양액을 RD와 HEp-2 세포에 재 접종하므로써 Enterovirus serotyping을 시작하기전에 모든 Toxic effect를 배제하였다. HEp-2세포에서만 세포병변이 관찰되는 것은 Polio virus에 대한 typing을 병행하여 실시하였다.

#### 4. Enterovirus serum pool에 의한 중화시험

중화시험에 사용한 혈청은 네덜란드 RIVM (National Institute of Public Health and Environmental Protection)에서 제작한 enterovirus serum pool을 WHO로부터 분양받아 사용하였으며, 각각의 항혈청은 5% 우태아혈청이 함유된 EMEM으로 20배 희석하여 사용하였다. 96 Well Plate의 각 Well에 준비된 각각의 항혈청을 50µl 씩 넣고 EMEM배지를 50µl 넣은 후, 적당히 희석한( $10^1 \sim 10^3$ ) 가검물 (바이러스)을 50µl씩 첨가하고 1분간 혼합하여 36°C에서 1시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 RD세포를 150,000 cells/ml 되도록 하여 100µl/well씩 분주하고 배양하면서 세포병변을 관찰하였다. Coxsackie B group의 serum pool은 50배 희석하여 사용하였으며 Cox-

sackie B serum pool에서 중화반응을 보인 세포 배양액은 Coxsackie B1-B6로 세분화된 serum pool을 사용하여 다시 typing 하였다. Polio virus에 대한 typing도 장내 바이러스와 유사한 방법으로 실시하였으며, 세 가지 type의 polio virus 동정을 위하여 항혈청을 P1형 + P2형, P1형, + P3형, P2형 + P3형의 3개 군으로 나누어 사용하였다. 그리고 세포병변을 나타내는 가검물은 HEp-2 세포에서 바이러스이 역가 (TCID<sub>50</sub>/ml)를 측정하였다.

#### 5. RNA추출

세포병변이 확인된 세포배양액으로부터 Piore and Nicoletta [17]의 방법에 의해 guanidinium thiocyanate를 이용하여 장내 바이러스 RNA를 추출하였다. 실험에 사용된 대부분의 시약 및 기구들은 멸균하여 사용하였으며, 실험자의 손이나 실험실내에 존재하는 RNase에 의해 바이러스의 RNA가 소멸되는 것을 최소화하였다.

#### 6. Oligonucleotide 합성

PCR에 사용한 primer는 장내바이러스의 general primer로서 enterovirus genome 중 5'-non-coding의 염기서열 변화가 가장 적다하고 보고된 부위에서 Zoll 등 [18]이 고안한 것을 수정하여 사용하였다 (Fig 2). DNA molecules의 합성은 automatic synthesizer (ABI, Model 380A)를 이용하여 Shinda 등 [19]의 β-Cyanoethyl phosphoramidite 방법으로 실시하였으며, 생산된 2 set의 De-tritylated Oligonucleotide는 Becker 등 [20]의 방법에 따라 HPLC로 정제한 후 20% polyacrylamide gel에서 확인하였다.

#### 7. Noncoding RNA PCR

PCR은 94°C에서 30초 denature, 52°C에서 30초 annealing 시킨 후, 72°C에서 1분간 extension시킴으로써 수행하였다. Geneamp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer사)을 사용하였으며 PCR에 의해 생성된 DNA는 gel electrophoresis (100V, 700mA)를 실시한 후 etidium bromide로 염색하여 확인하였다.

#### 8. DNA sequencing

염기서열 분석은 PCR product를 곧바로 sequencing에 이용하는 direct sequencing 방법을

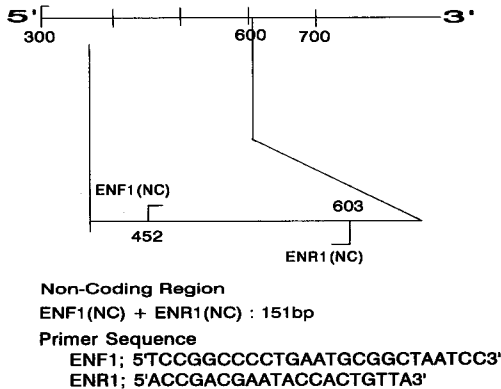


Fig. 2. The genomic structure of enterovirus non-coding region and noncoding primers.

사용하였다. Noncoding gene fragments의 5'과 3'양 쪽 방향으로 reading하여 DNA sequence를 분석하였으며 또 분석된 DNA sequence는 soft program인 DNASIS와 PROSIS를 이용하여 알려져있는 장내바이러스의 분리주들과 homology를 비교하였다 [21, 22, 23, 24, 25] (Table 1).

## 성 적

### 1. 역학적 조사

임상양상이 전형적인 무균성뇌막염으로 의심되어 국립보건원에 의뢰된 37건의 가검물은 남자가 29명 (78.4%), 여자가 8명 (21.6%)으로 여자보다 남자가 훨씬 많은 발병양상을 나타내었으며, 10세 미만의 경우가 33명 (89.2%)으로 대부분 4세 미만의 저연령층에서 많이 발생하였다. 이들 중 1995년에 바이러스가 분리된 9건의 가검물도 모두 4세 미만이었다 (Table 2). 지역간의 특이성은 없었으며, 발병후 얼마 경과되지 않은 초기 가검물에서만 바이러스가 분리되었고 4일 이상의 시일이 경과된 가검물에서는 바이러스가 분리되기 어려운 특징이 있었다.

### 2. 장내바이러스 Typing

세포배양에서 특이적인 세포병변 현상을 나타낸 배양액은 장내바이러스 typing을 실시하였다 (Fig 3). RIVM enterovirus serum pool을 이용하여 Hep-2 세포와 RD세포에서 장내바이러스를 typing한 결과 CSF에서 1건의 Coxsackie 바이러스가, stool 가검물에서 3건의 ECHO바이러스와

Table 1. Enterovirus sequences used in this study

Abbreviation	Virus	Reference
PV1	Poliovirus type 1 (Mahoney)	Racaniello and Baltimore, 1981
PV2	Poliovirus type 2 (Lansing)	La Monica et. al., 1986
PV3	Poliovirus type 3 (P3/Leon/37)	Stanway et. al., 1984
CB3	Coxsackievirus B3	Michael Lindberg et. al., 1987
E11	ECHO virus 11	Dahlund L.J., 1995

5건의 Coxsackie B virus가 분리되었다. 이들 분리주는 여러종류의 장내바이러스 면역혈청군과 중화시험을 실시한 결과 Coxsackie 바이러스는 Coxsackie 면역혈청 E군과 G군에서 중화된 Coxsackie B3형으로 동정되었고, ECHO 바이러스는 면역혈청 A와 C에서 중화된 ECHO 7형으로 각각 동정되었으며 바이러스의 역가는  $10^{6.5}$  -  $10^{7.5}$  사이였다 (Fig. 4).

바이러스가 면역혈청 중 한가지만을 중화하거나 3종류 이상을 중화한 경우에는 재실험을 실시하였으며, 이와 같은 양상으로 관찰되는 바이러스의 경우 본 실험의 면역혈청군으로는 판정할 수가 없어서 other enterovirus로 표시하였다. 장내바이러스의 typing은 RIVM serum pattern에 따라 판정하였으며 본 실험에서 분리된 ECHO 7과 Coxsackie B3는 다른 장내바이러스들과 cross reaction은 없는 것으로 나타났다 [15].

Polio pool 면역혈청과 50% 정도 중화반응을 나타내었던 바이러스 배양액을 대상으로 polio virus typing을 실시하였으나, 각각의 혈청군 (polio 1+2형, 1+3형, 2+3형)에서 특이적인 세포병변이 관찰되지 않아 분리할 수 없었으며 바이러스 역가 또한 매우 낮게 나타났다.

### 3. 장내바이러스 RNA 검출

중화시험법으로 분리동정된 장내바이러스 coxsackie B3와 ECHO 7이 정확한 장내바이러스 인지를 확인하기 위하여, Picornavirus family에 공통으로 함유되어 있으며 유전적 변이(genetic variation)가 가장 적은 부위로 알려진 5'-non-coding 부위에서 primer를 제작하여 RNA PCR을 실시한 결과 분리된 9주 모두에서 장내바이러스의 5'noncoding 부위가 확인되었다. Primer EV1과 EV2와의 PCR결과 152 bp의 DNA가 확인되었다.

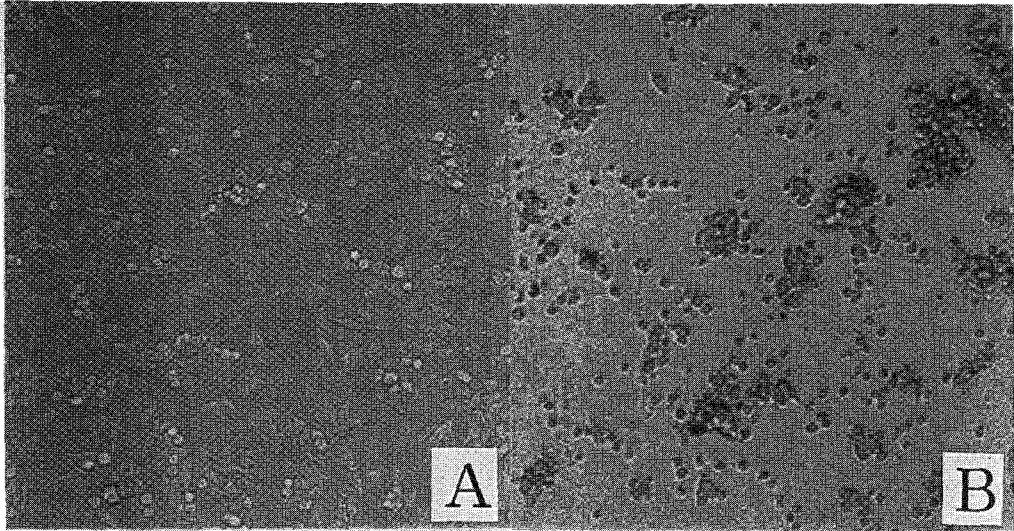


Fig. 3-1. Cultured normal(A) and cytopathich effect(B) of RD cells.

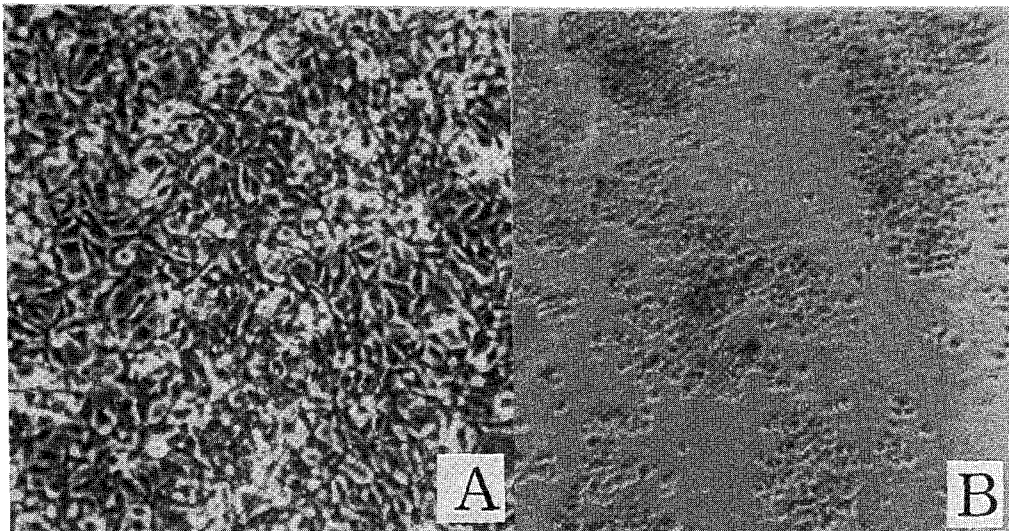


Fig. 3-2. Cultured normal(A) and cytopathic effect(B) of HEp-2 cells.

PCR의 음성대조로 VSV와 증류수를 장내바이러스와 동일한 방법으로 PCR을 실시한 결과 특이한 DNA의 오염은 확인되지 않았으며 양성대조로는 WHO reference laboratory (NIH, Japan, 1995)에서 분양받은 ECHO 3 virus를 사용하였다(Fig. 5). 또한 바이러스 배양액에서 RNA를 추출하여 PCR을 실시하지 않고, 100% 세포병변이 확인된 바이러스 배양액 자체를 주형으로 PCR을 실시한 결과 152bp의 특이한 장내바이러스 DNA

band는 관찰할 수 없었다.

#### 4. 염기서열분석

DNASIS를 이용하여 분리된 장내바이러스 noncoding sequence를 분석하고 원형바이러스 주 (Table 1)와 homology를 비교한 결과 분리된 ECHO 7 바이러스는 전체 염기서열이 보고된 ECHO 바이러스와 98.7%의 동질성을 나타냈으며, 분리된 Coxsackie B3 바이러스는 1985년에

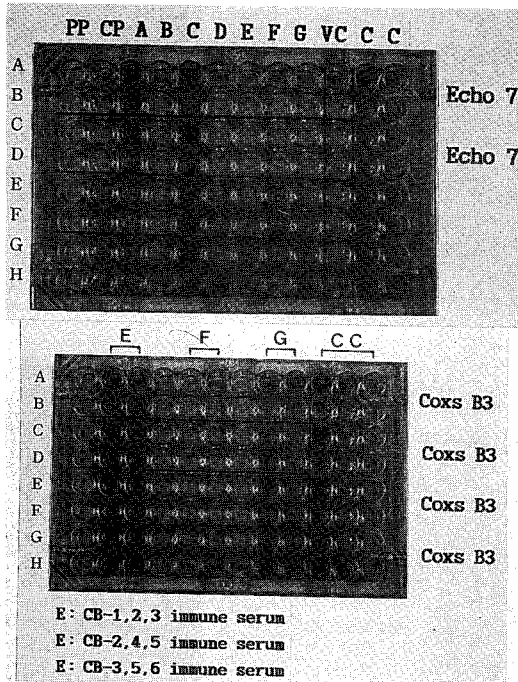
Table 2. Isolation of viruses from human sources, by sex, NIH, 1993~1995

		MALE									FEMALE										
		Age group(Age in years)									Unknown	Age grou(Age in years)									Unknown
Total	Subtotal	0	5	10	15	20	30	40	50	Subtotal		0	5	10	15	20	30	40	50		
		4	9	14	19	29	39	49	69		4	9	14	19	29	39	49	69			
Total		20	16	9	6	1	-	-	-	-	4	4(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cox.	ANT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cox.	A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B3	6	4	4(4)	-	-	-	-	-	2	2(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B5	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ECHO	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ECHO	4	3	4	3	2	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	3	3	3	3(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	4	3	1	2	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Polio	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Entero	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rhino		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

The parenthesized numbers indicates virus isolating cases in the year of 1995.

보고된 주 (CB3 strain)와 97.4%의 동질성을 나타내었다. 그리고 두 분리주 (ECHO 7, CB3) 사이에는 91.8%의 homology가 있었다(Fig. 6).

그리고 원형바이러스주와 비교하여 볼 때 분리된 Coxsackie B3 바이러스는 493번, 497번, 502번, 503번 등 4곳에서 염기가 치환되어 있었

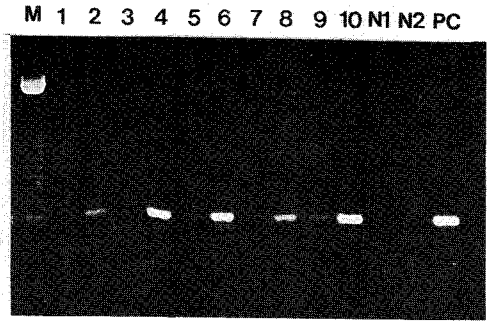


**Fig. 4.** Results of neutralizing antibody test for ECHO 7 are stained with 0.5% crystal violet(above) and for Coxsackie B3(below). Each well was neutralized with appropriated enterovirus antiserum pool obtained from WHO/RIVM followed by virus challenge. PP, polio antisera pool, CP, Coxsackie antisera pool, A~G, enterovirus antisera pool, VC, virus control, CC, Cell control.

고 같은 과 (family) 내의 polio 1형 바이러스와 염기서열이 유사함을 알 수 있었으며, 분리된 ECHO 7 바이러스는 581염기 thymine이 cytosine으로, 583번 염기 cytosine이 thymine으로 각각 치환되어 point mutation이 되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

## 고 찰

장내 바이러스는 Picornaviridae에 속하며 20~30nm의 envelope이 없는 icosahedral 모양의 바이러스로서 linear한 single stranded RNA genome을 가지고 있다. 이들 바이러스에 의한 양성중추신경계 감염질환인 무균성뇌막염은 Coxsackie 바이러스와 Enteric Cytopathogenic Human Orphan (ECHO) 바이러스가 전세계적으로 대유행을 주도하고 있다. Mumps 바이러스도 유행성 무균성 뇌막염을 일으키나 최근에는 현저히 감소하였고



**Fig. 5.** Gel electrophoresis of the PCR products of specimens from the patient with aseptic meningitis. Lane 1-10, 152bp DNA band patterns which was derived from enterovirus specific RT-PCR. N1-N2, Negative control which was used H2O and Varicella zoster viral genome as a template, respectively. PC means positive control band prepared from ECHO 3. M: 123bp ladder.

주발생시기는 가을, 겨울철이다. 1993년 우리나라에서 전례없는 대유행을 일으켜 많은 관심을 모았던 무균성뇌막염의 특징은 발열, 복통, 두통, 구토, 발진, 설사, 결막염증세등 대다수에서 이원적 임상증상을 보여 감염원을 정확히 밝힐 수는 없으나, 이들이 장내 바이러스들(Coxsackie B, ECHO9, 30)에 의한 뇌막염임이 밝혀졌으며 [15, 16], 2세에서 15세 연령층에서 주로 발생되고 6월에 제일 높은 발병율을 보이는 특징이 있었다 [26, 27].

본 연구는 중화시험에 의해 분리 동정된 국내 유행 무균성뇌막염 바이러스가 정확한 장내 바이러스인지, 장내 바이러스라면 염기서열이 어느 정도의 동질성을 가지는지, 그리고 무균성 뇌막염을 주도하는 바이러스의 형이 해마다 어떻게 변화하는지를 밝히기 위해 고안되었다. 장내 바이러스의 분리율은 feces에서 29~95% CSF에서 13~70% 정도이며, HEp-2, HeLa, VR, RD 세포 등이 감수성있는 세포로 보고되어 있다 [14]. 세포에 접종할 수 있도록 처리된 가검물 (stool, throat swab, serum, CSF)을 위의 4가지 세포에 모두 접종하여 관찰한 결과, 세포병변 형성기간이 너무 긴 VR세포와, 현미경상에서 세포병변을 쉽게 구분하기 어려운 HeLa세포는 부적당하여 본 실험에서 사용하지 않았으며, Polio virus와 Coxsackie virus에 감수성이 높은 HEp-2세포와 ECHO 및 other entero virus에 감수성이 높은 RD 세포만을 사용하였다. 세포병변은 주로 stool과 CSF에서

```

FILE NAME      1      10      20      30      40      50      60
DNAECHO .SEQ  TCCGGCCCCTGAATGCGGTTAATCCTAACTGCGGACGACATACCCCTAATCCAAGGGGCA
|||||
NIHECHO .SEQ  TCCGGCCCCTGAATGCGGTTAATCCTAACTGCGGACGACATACCCCTAATCCAAGGGGCA
1      10      20      30      40      50      60

FILE NAME      61      70      80      90      100     110     120
DNAECHO .SEQ  GTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCGTGTTTCCTT
|||||
NIHECHO .SEQ  GTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCGTGTTTCCTT
61     70     80     90     100    110    120

FILE NAME      121     130     140     150
DNAECHO .SEQ  TTATTTTATACTGGCTGCTTATGGTGACAAT
|||||
NIHECHO .SEQ  TTATTTTACATTGGCTGCTTATGGTGACAAT
121     130     140     150

FILE NAME      1      10      20      30      40      50      60
LINDCOX .SEQ TCCGGCCCCTGAATGCGGTTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCCTAAGCCAGAGGGCA
|||||
NIHCOX .SEQ  TCCGGCCCCTGAATGCGGTTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCCAACCCAGGGGGCA
1      10      20      30      40      50      60

FILE NAME      61      70      80      90      100     110     120
LINDCOX .SEQ  GTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCGTGTTTCATT
|||||
NIHCOX .SEQ  GTGTGTCGTAACGGGTA ACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCGTGTTTCATT
61     70     80     90     100    110    120

FILE NAME      121     130     140     150
LINDCOX .SEQ  TTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAAT
|||||
NIHCOX .SEQ  TTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAAT
121     130     140     150

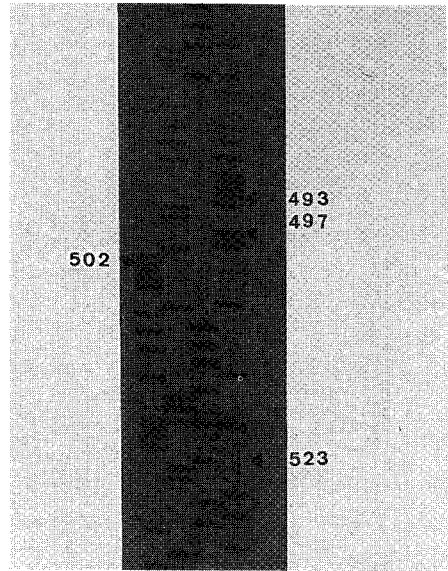
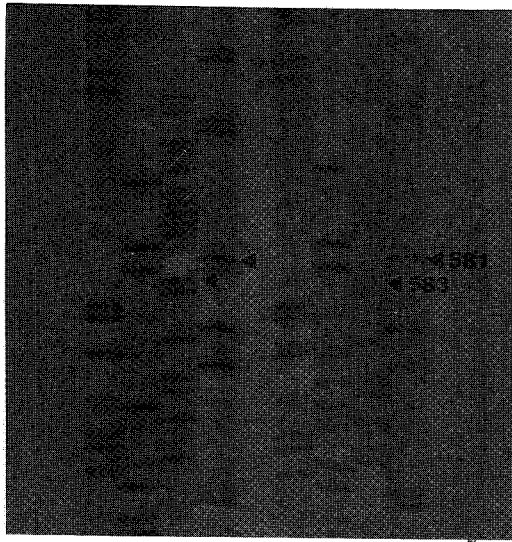
```

Fig. 6. Comparison of nucleotide sequence of noncoding region of the ECHO 7 and Coxsackie B3 virus by DNASIS

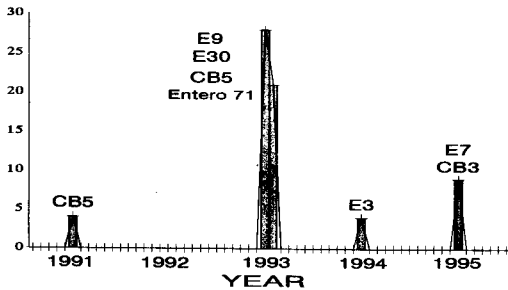
명확하게 관찰되었으며, throat swab이나 serum에서는 1건의 세포병변도 나타나지 않았는데 이는 가검물의 양 뿐만 아니라 운송방법이나 운송상태에도 기인하는 것으로 생각된다. Toxin에 의한 세포병변은 24시간 이내에 관찰되기 때문에 쉽게 감별할 수 있었으며 이들은 점종세포에 적응시켜 toxin을 제거한 후 재감염시킴으로써 세포병변을 관찰하였다. Serum pool에 의한 중화시험은 WHO에서 추진하는 방법을 사용하였는데, 이들 serum pool에 coxsackie B group을 typing하는 혈청이 준비되어있지 않은 까닭에 본 실험에서는 coxsackie B 바이러스를 일본의 Denka serum pool로 typing하였다. 또한, 이들 serum pool은 정확히 2 well이 중화되어야 typing할 수 있으며 한 well만 중화되거나 여러 well이 중화되는 경우에

는 반복시험하여 결정하였다. 분리된 Coxsackie B3은 최근 몇 년 동안 일본에서 유행을 일으킨 유형과 동일하였다. 일본의 경우 1994년에는 ECHO 6형과 ECHO 9형이 유행한 것으로 보고되어 있다. 또한 분리된 ECHO 7형은 1995년 우리나라와 일본에서 동시에 분리된 것으로 사료된다. ECHO 7 바이러스는 그 보고가 점차 늘고 있어 ECHO 7의 추세에 대한 추구가 주목되고 있다. 저자들은 1993년에 국내 최초로 무균성뇌막염의 원인바이러스로 ECHO 9과 ECHO 30형을 보고한 바 있으며, 1994년에는 ECHO 3형을 보고하였다 [15, 16]. 이는 무균성뇌막염의 유행균주가 해마다 변하고 있으며, ECHO 9이나 ECHO 30형이 주도할 경우 다른 나라의 경우와 같이 심각한 outbreak가 일어나는 것으로 사료된다(Fig. 8).





**Fig. 7.** Nucleotide sequences of noncoding region of isolated ECHO 7 virus(A), and Coxsackie CB3 virus(B). Sequence differences from prototype viruses were marked by arrowhead and the number indicates position of substituted bases.



**Fig. 8.** Monthly reported cases of causative enteroviruses for aseptic meningitis, Korea, from 1991 to 1995.

장내 바이러스는 5'-noncoding DNA 부분에 homology가 높은 highly conserved part가 있어서 general primer를 제작하여 PCR법으로 여러가지 장내 바이러스 확인에 사용할 수 있는 특징이 있으며, noncoding 부분은 picornavirus의 복제 및 translation에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이들 primer는 66종의 장내 바이러스중 Coxsackie A 11형, 17형, 24형, ECHO16형, 22형, 23형을 제외한 60종에서 동일한 결과를 나타낸다고 보고되었다 [19, 28, 29]. 본 실험의 PCR에 사용한 primer는 본 실험실에서 PCR mate (ABI사)로 직접 제작하였으며 장내 바이러스 noncoding region에서 152bp가 검출되도록 제작하였다. 음성

대조를 이용한 vesicular stomatitis virus나 H<sub>2</sub>O에서 특이 band가 검출되지 않은 것으로 보아 PCR 과정 중의 DNA오염은 없었던 것으로 사료된다 [30, 31]. PCR은 현존하는 검사법중 가장 정확한 시험법이나 primer를 제작하고, 가검물로부터 장내 바이러스의 RNA를 추출해야하며 많은 회수의 cycle을 반복할 경우 southern blot을 병행해야 하는 단점이 있다. 저자들은 이런 번거로움을 피하고 대량으로 실험실 진단을 가능하게 하기 위하여 IgM capture ELISA를 고안 중에 있다 [32].

무균성뇌막염은 4~7세 사이에 가장 많이 발병하는 것으로 보고되었다. 본 실험의 결과에서도 소아연령층에서 무균성뇌막염으로 의뢰된 가검물이 대부분을 차지하였다. 또한 본 연구에서도 바이러스 분리율이 저조한 것은 가검물 채취시기 및 보관에 문제가 있었기 때문인 것으로 사료된다. 가검물은 장내 바이러스 특성상 가능한 발병 초기에 채취하여야 하고 건조되거나 얼리고 녹이는 것을 반복하지 말아야 하며, 관련된 정보와 같이 신속하게 실험실로 운반되어야 한다. 이런 점에서도 분변 가검물은 바이러스의 생존기간이 길고, 높은 역가의 바이러스를 함유하고 있는 장점이 있다 [33].

일본의 경우 매년 크고 작은 장내 바이러스의

유행이 지속되고 있다. 저자들은 무균성뇌막염의 원인 바이러스였던 ECHO3, 7, 9, 30, Coxs B3, B5 바이러스외에도 ECHO 4, ECHO 6 등의 바이러스에 대한 단클론항체를 제작하여 IgM Capture ELISA를 확립시켜서, 중화시험법과 같이 많은 시간과 노력이 필요한 방법대신 신속하고 간편하게 무균성뇌막염을 진단하는 것이 필수적이라고 사료되며, 앞으로 우리나라에서 장내 바이러스에 의한 무균성뇌막염의 감염 및 역학조사에 더욱 만전을 기해야할 것으로 생각한다.

## 결 론

1995년 서울, 부산, 대구, 대전, 광주 등지에서 발생한 무균성뇌막염으로 의심되는 환자의 가검물로부터 분자생물학적, 혈청역학적 조사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수집한 가검물 87건(Stool, CSF, Throat swab, serum 등)을 대상으로 세포배양 및 enterovirus serum pool에 의한 중화시험을 실시한 결과 3주의 ECHO virus 7형 및 6주 Coxsackie virus B3 형이 분리, 동정 되었다.

2. 분리된 virus의 RNA를 추출하여 RT-PCR법으로 확인한 결과 장내바이러스 특유의 유전적 동질성을 나타내는 152bp의 5'-noncoding region을 확인하였다.

3. Noncoding region의 염기서열을 direct sequencing법으로 확인하고 이를 비교 분석한 결과 분리된 ECHO 7 virus는 2개의 염기가 치환되어 원형바이러스주(prototype)와 98.7%의 homology를 나타내었으며, Coxsackie B3 virus는 4개의 염기가 치환되어 원형바이러스주와 97%의 homology를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Bernard N. Fields, David M: Knipe Fields Virology Vol. 1. 2nd Ed. 549-606, 1990.
2. Yamashita K, Miyamura K, Ymadera S, Kato N, Akatsuka M, Inouye S and Yamazaki S: Enteroviral aseptic meningitis in Japan. Jap J Med Sci Biol 45: 151-161. 1992.
3. Rodriguez R S, Gomez BD., Pallansch M, Vazquez J and Karabatsos N: Epidemic outbreak of viral meningitis caused by type 30

- ECHO virus. Bio Med Hosp Infant 49: 412-415, 1992.
4. Sakae K: The relationship of clinical manifestations and age distribution in enterovirus infection-viral isolation and seroepidemiology in Aichi prefecture. Kansenshogaku Zasshi 66: 1670-1681, 1992.
5. Bruning JH, L Corliss and Hatch MH: Laboratory methods for the titration of live virus vaccines using cell culture techniques WHO/BLG/EPI/19-58, 1989.
6. Chen FY, Lina D, Brian PH, Mark AP and Olen MK: Detection and identification of vaccine related polioviruses by the polymerase chain reaction Virus. Resear 20: 159-179, 1991.
7. Glimaker M, Abebe A, Johansson B, Ehrnst A, Olcen P and Strannegard O: Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in faecal samples from patients with aseptic meningitis. J Med Virol 38: 54-61, 1992.
8. Redline RW, Genest DR and Tycko B: Detection of enteroviral infection in paraffin-embedded tissue by the RNA polymerase chain reaction technique. Am J Clin Pathol 96: 568-571, 1991.
9. Glimaker M, Samuleson A, Magnus L, Ehrnst A, Olcen P and Forsgren M: Early diagnosis of enteroviral meningitis by detection of specific IgM antibodies with a solid-phase reverse immunosorbent test(SPRIST) and mu-capture EIA. J Med Viral 36: 193-201. 1992.
10. Pozetto B, Gaudin OG, Lucht FR, Hafid J and Ros A: Detection of immunoglobulin G.M. and A antibodies to enterovirus structural proteins by immunoblot technique in echovirus type-4 infected patients. J Virol Methods 29: 143-155 1990.
11. Viktorov GI, Marinina KI, Eremitkasa Ig, Kolomina EI, Ruban AE and Zhirnov VA. Coxsackie B enterovirus infection in Astrakhan Province Ter Arkh (USSR) 63: 31-33, 1991.
12. Alexander JP, Chapman LE, Pallansch MA, Stephenson WT, Torok TJ and Anderson LJ. Coxsackievirus B2 infection and aseptic meningitis:a focal outbreak among members of

- high school football team. *J Infect Dis* 167: 1201-5, 1993.
13. Boudierlique C, Debillon T, Koujyoumdjian S, Joseph MG, Champion G and Limal JM: Severe manifestations of non-polio myelitic enterovirus infections in newborn infants.
  14. 「Aseptic meningitis, Japan, 1992」 *Infectious Agents Surveillance Report NIH, JAPAN*, 14 1-2. 1993.
  15. 김문보, 김기순, 김창민, 서순덕, 윤재득, 신학균: 1993년 한국에서 발생한 Aseptic meningitis 환자로부터 장내바이러스 RNA 검출. *J Korean Soc Virol* 24: 77-86, 1994.
  16. 김동수, 박재현, 김중현, 윤재득, 김문보, 김기순, 서순덕: 1994년도 무균성 뇌막염 환자에서 원인 바이러스 동정. *감염* 27(1): 73-81, 1995.
  17. Piore C and S Nicoletta: Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochem* 162: 156-159, 1987.
  18. Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, Vander Poel HJ and Galama JM: General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application of diagnostic routine and persistent infections. *J Clin. Microbiol* 30: 160-165, 1992.
  19. Shinda ND, Biernat J, McManus J and Köster H: Polymer Support oligonucleotide Synthesis XVIII: Use of  $\beta$ -Cyanoethyl-N, N-diakylamino-1 N-morpholino Phosphoramidite of deoxynucleoside for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res* 12: 4539-4557, 1984.
  20. Becker CR, Efcavitch JW, Heiner CR and Kaiser NF: Use of a reverse phase column for the HPLC purification of synthetic oligonucleotides. *J Chromatogr* 326: 293-299, 1985.
  21. Racaniello VR. and Meriam C: Poliovirus temperature sensitive mutant containing a single nucleotide deletion in the 5'-noncoding region of the viral RNA *J Virol* 155: 498-507.
  22. La Monica N, Meriam C and Racaniello VR: Mapping of sequences required for mouse neurovirulence for poliovirus type 2 Lansing. *J Virol* 57: 515-525, 1986.
  23. Stanwasy G, Cann AJ, Hauptmann R, Hughes P, Clarke LD, Mountford RC, Minor PD, Schild GC and Almond JW: The nucleotide sequence of poliovirus type 3 leon 12 a, b: Comparison with poliovirus type 1, *Nucleic Acid Res* 11: 5629-5641, 1983.
  24. Michael Lindberg, PER OK Stalhandske and ULF Pettersson: Genome of Coxsackievirus B3. *Virology* 156: 50-63, 1987.
  25. Dahllund LJ, Nissinen L, Pulli T, Hyttinen VP, Stanway YG and Hyypia T: The Genome of Echovirus 11. *J Virus Res* 35: 215-222, 1995.
  26. 채수안, 윤혜선, 박종영, 이경자, 유기양, 정우갑, 이규만: 소아 Acute aseptic meningitis의 임상적 연구. *감염* 25: 405-412, 1993.
  27. 유현수, 김길형, 이학수: 1993년에 유행한 무균성 뇌막염에 대한 임상적 고찰. *감염* 27: 365-370, 1995.
  28. Rohll JB, Percy N, Ley R, Evans DJ, Almond JW and Barclay WS: The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* 68: 4384-4391.
  29. Iizuka N, Yonekawa H and Nomoto A: Nucleotide sequences important for translation initiation of enterovirus RNA. *J Virol* 65: 4867-4873, 1991.
  30. Nicholson F, Meeto G, Aiyar S, Banatvala JE and Muir P: Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested PCR for rapid diagnosis of enterovirus infection *J Virol Methods* 48: 155-166, 1994.
  31. 윤석중, 홍성진, 이영혁, 김민희, 김교순, 박규현, 이재연, 이원영: 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 무균성 뇌막염 바이러스의 진단. *소아과* 37: 1226-1223, 1994.
  32. NT. Dorries R and Meulen V: Specificity of IgM antibodies in acute human coxsackie virus B infections, analysed by indirect solid phase enzyme immunoassay and immunoblot techniques. *J Gen Virol* 64: 159-167, 1983.
  33. Spool Melnick JL and Wimberly IL: Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: New LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull WHO* 63-543-550, 1985.