

2000-2002년 바이러스성 뇌수막염의 발생양상 및 특성

조경순* · 정명주¹

부산광역시보건환경연구원, ¹경성대학교 교양과정부

2000년~2002년 사이 부산지역의 병·의원으로부터 의뢰된 바이러스성 뇌수막염 환자로 의심되는 환자의 가검물을 대상으로 바이러스 분리를 시도한 결과 2000년에는 검체 292건 중 2건, 2001년에는 371건 중 4건, 2002년에는 703건 중 83건의 장내바이러스를 분리하였다. 2000년에 분리된 원인 바이러스의 경우 echovirus 11 혈청형과 coxsackievirus B2 혈청형이, 2001년에는 coxsackievirus B5 혈청형만이 분리되었으며, 2002년에는 echovirus 2, 3, 6, 7, 9, 13, 25, 30 혈청형이 70건으로 가장 많았고, coxsackievirus B3과 B4 혈청형이 10건으로 예전에 비해 보다 다양한 경향을 나타내었다. 월별발생 양상은 2000년에는 동절기인 12월과 1월에, 2001년에는 5월에 집중적으로 발생하였으며, 2002년에는 4월부터 11월까지 넓은 발생 분포를 나타내었지만 특히 6월과 7월에 가장 발생율이 높았다. Echovirus와 coxsackievirus는 Vero와 HEp-2 세포주에서 강한 병변 효과를 나타내었다. 전자현미경으로 촬영한 echovirus 및 coxsackievirus의 형태학적 양상은 모두 envelope가 없고 크기가 30~35 nm로 아주 작은 구형의 특징을 나타내었다. 세포병변 효과가 나타난 세포배양액에 대하여 nested PCR을 수행한 결과 echovirus 및 coxsackievirus 모두 436 bp 위치에 단일띠를 나타내었으며, serotype은 국립보건원 소화기계바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였다.

Key words □ aseptic meningitis, coxsackievirus, echovirus, enterovirus

장내바이러스는 coxsackievirus A (types A1-A22, A24), coxsackievirus B (types B1-B6) poliovirus (types 1-3), echovirus (types 1-9, 11-27, 29-33) 및 enterovirus (types 68-71) 등이 있으며, 이들은 단일가닥의 RNA picornavirus에 속한다(11, 13, 15). 이들은 사람이 유일한 숙주이며 주로 분변-경구 또는 경구-경구(호흡기) 경로를 통해 사람에서 사람으로 전파된다. 소아는 면역학적으로 감염되기 쉽고 감염의 발생률은 성별과 무관하나 남아에서 심한 증세를 보이며, 분변-피부-경구의 경로로 소아에서 소아로 쉽게 전파되고 가족내 전파도 쉽게 일어나며 식기, 물, 식품 등을 통해서도 감염이 될 수 있고 특히 하절기에 많이 발생한다(1, 5, 15, 16). 또한 자연계에서도 염소 처리된 식수나 하수도 및 유기물이 함유된 환경 내에서 장시간 살아 남을 수 있으므로 위생관리가 매우 중요하다. 장내바이러스는 전 세계적으로 분리되고 있으며 그 종류 및 분리양상도 다르며, 장의 점막에서 증식하고 혈액을 통하여 전신으로 퍼진다(10). 임상증상은 비교적 약한 편이나 심한 경우엔 마비성 소아마비나 뇌막염 또는 심근염을 일으킬 수 있으며 다양한 혈청학적 특성을 가지고 있어서 임상학적으로 유사성에 의한 혼란이 나타날 수 있다(4, 6, 8, 10). 무균성 뇌수막염이란 뇌막에 염증이 있는 것으로 뇌실질에 염증이 동반되는 경우에 뇌염이라 하고 징후가 없으면 뇌막염이라고 한다(7, 11, 14). 무균성 뇌수막염의 발병 원인은 약물이나 자가면역성 질환 등 다양한 원인으로 발병되지만 감염이 주원인이며 특

히 바이러스가 85% 이상을 차지한다(10). 최근 우리나라에서도 장내 바이러스의 발생이 해마다 보고되고 있으며 특히 1990년대에 들어 1990년, 1993년, 1996년에 대대적인 유행이 있었고, 1997년에 전국에 걸쳐 다발적으로 발생하였다(8). 이것의 감염원인 바이러스의 혈청형이 다양하고 역가가 높은 바이러스의 분리가 힘든 상황에서 효과적인 백신의 실용화가 어려운 상황이므로 분리빈도에 대한 장내바이러스의 유행현황과 역학이 매우 중요하다.

따라서 본 연구에서는 2000~2002년 부산지역의 바이러스성 뇌수막염 유행예측조사 과정 중 분리된 장내바이러스를 분석하여 앞으로의 역학조사의 지표 자료 및 백신 개발의 기초 자료를 제공하기 위하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스 분리시료

바이러스 분리용 검체는 2000~2002년 사이 부산지역의 10개 지정병원으로부터 내원한 의심환자의 대변, 뇌척수액, 인후가검물 등을 채취하여 사용하였으며, 2000년에는 검체가 292건, 2001년에는 371건, 2002년에는 703건이었고 채취된 시료는 수송용 용기에 넣어 냉장온도를 유지하면서 신속하게 운반하여 사용하였다.

시료 전처리 시험

환자로부터 채취된 대변가검물은 -20°C에 냉동한 후 해동시켜

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 018-733-7004, Fax: 051-757-2879
E-mail: viruscho@naver.com

서 장내바이러스용 PBS (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 800 ml DDW, pH 7.0-7.4, MgCl₂ · 6H₂O 0.1 g in 100 ml, CaCl₂ 0.1 g in 100 ml)에 10% 농도로 희석하여 10분간 강하게 진탕한 후 원심분리(VS-15CFN, 한스텍, 500 × g, 20 분)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. 인후가검물을 채취한 면봉은 바이러스 수송용 배지 2 ml (Difco, Detroit, USA)에 넣어 진탕한 다음 멸균된 핀셋으로 면봉을 제거하고 항생물질(penicillin 5 units/ml, streptomycin 5 µg/ml, amphotericin B 0.25 µg/ml)을 첨가하여 잘 혼합하고 4°C에서 15분 간격으로 흔들여 주면서 1시간 방치한 다음 저온 원심분리하여 상등액을 접종 가검물로 사용하고 나머지는 -70°C에 보관하였다. 뇌척수액은 특별한 전처리 과정없이 사용하였지만 혈액세포를 함유한 액은 가볍게 흔들여 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 (africa 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% FBS가 첨가된 MEM 배지를 1 ml 첨가하여 전처리한 가검물을 1×, 10×, 100×로 희석하여 각각 100 µl씩 접종하고 1~10일간 배양하면서 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 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, USA), viral RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) 또는 DNA QIAamp blood mini kit (Qiagen)를 이용하여 RNA를 추출하고 이것을 각 바이러스 유전자 증폭하기 위한 template로 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 반응액(cDNA template, dNTP mixture, 양 방향의 primer, 10× 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 sets 는 Table 1과 같다.

Table 1. Primers used in this study

I.D.	Sequence	Region	Position	Final conc. (µM)
ENTF	5'AAGCACTTCTGTTTCCCCGG 3'	5'NCR	161-180	10 pmol
ENTR	5'ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'	5'NCR	580-597	10 pmol

결과 및 고찰

2000년~2002년 사이 부산지역의 병·의원으로부터 의뢰된 바이러스성 뇌수막염 환자로 의심되는 환자의 가검물을 대상으로 바이러스 분리를 시도한 결과 2000년에는 검체 292건 중 2건, 2001년에는 371건 중 4건, 2002년에는 703건 중 83건이 장내바이러스를 분리하였으므로 전년도에 비해 점차 증가 추세를 나타내었다(Table 2). 우리나라에서는 바이러스성 뇌수막염에 대한 관심이 그리 높지 않았지만 1990년 많은 환자들이 발생한 이후 1993년, 1996년, 1997년에 전국적인 대유행이 일어났다(3). 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 발병하였다(3). 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 있어, 2000년에 coxsackievirus B2 및 echovirus 11이, 2001년에 coxsackievirus B5가 주종을 나타낸 것에 비해 보다 다양한 경향을 나타내었다. 일반적으로 echovirus 3은 바이러스성 뇌수막염의 유행과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으나, 이 외에도 4, 6, 9, 11, 14,

Table 2. Isolated alimentary tract viruses in Busan from 2000-2002

Year	Month	Echo group	Coxsackie group	
		Serotype (No. of outbreak)	Month	Serotype (No. of outbreak)
2000	Dec.	E11(1)	Jan.	B2(1)
2001	-	-	May	B5(4)
	Apr.	E6(1), E9(1)	May	B3(1)
2002	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)		

25, 30형이 유행 혈청형으로 점차 대두되고 있다(12). 이와 같이 바이러스성 뇌수막염의 유행 군주가 해마다 변하고 있음을 알 수 있다(4). 바이러스에 의한 월별 발생 시기는 하계절(7, 8, 9월)이 주 발생시기이지만(4), 2000년의 경우 동절기인 12월과 1월에, 2001년에는 5월에 집중적으로 발생하였으므로 다소 차이를 나타내었으나, 2002년의 경우 4월부터 11월까지 넓은 발생 분포를 나타내면서 특히 6월과 7월에 가장 발생율이 높아 1993년도와 1996년도에 발생한 대유행과 비슷한 양상을 나타내었다(3). 이처럼 월별 발생 양상이 연속적이지 못하므로 바이러스성 뇌막염의 유행현황 파악은 매년 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다. 세포병변 효과를 관찰하기 위해서 RD, HEp-2, Vero 및 BGM 세포주에 분리된 바이러스를 접종한 결과 Fig. 1과 2에서와 같이 echovirus와 coxsackievirus는 Vero와 HEp-2 세포주에서 강한 병변 효과를 나타내었다. 전자현미경으로 촬영한 echovirus 및 coxsackievirus의 형태학적 양상은 Fig. 3과 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. 4와 같이 echovirus 및 coxsackievirus 모두 436bp의 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)(9)와 일치하였으며, serotype은 국립보건원 소화기계 바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였다.

바이러스성 뇌수막염의 진단에서 가장 정확한 진단 방법은 바이러스 분리이다. 바이러스 분리율을 높이기 위해서는 검체 채취 시기, 검체 수송 및 관리가 중요하므로 장내 바이러스 특성상 가능한 발병초기에 채취하여야 하며 건조하거나 얼리고 녹이는 것

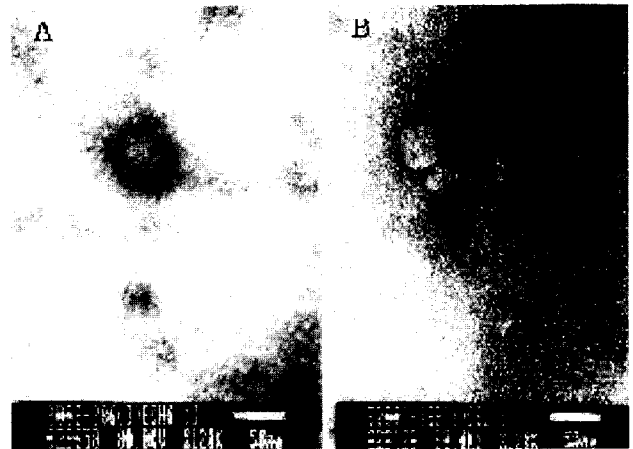


Fig. 3. Transmission electron micrographs of virus isolates. Echovirus (A), coxsackievirus (B).

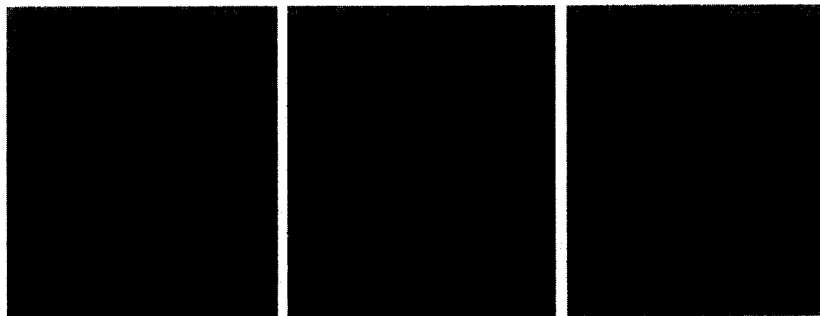


Fig. 1. Micrographs of CPE in the virus-infected cells. Vero cells infected with no virus (A), echovirus (B), coxsackievirus (C), magnification × 100.

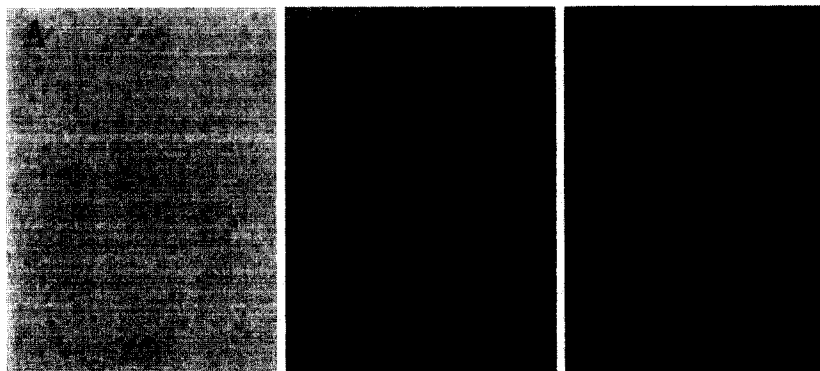


Fig. 2. Micrographs of CPE in the virus-infected cells. HEP-2 cells infected with no virus (A), echovirus (B), coxsackievirus (C), magnification × 100.

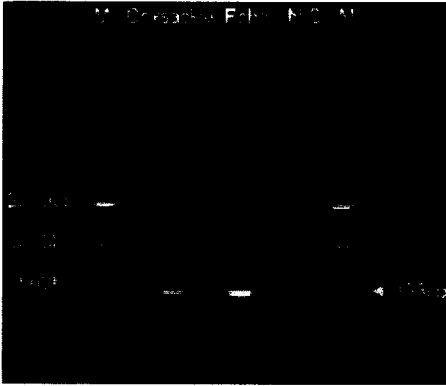


Fig. 4. Detection of RT-PCR analyses with clinically isolated coxsackievirus and echovirus. M : Marker, NC : Negative control which was used H₂O as a template

을 반복하지 않는 상태에서 관련된 정보와 함께 4°C에서 신속하게 운반되어야 한다(3, 4). 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(2, 18). 이러한 유전자 기법에 의한 진단은 민감도가 높아서 임상적으로 많은 도움이 되지만 경비가 비싸고 진단방법의 기술적인 면 등을 고려해 볼 때 대중화는 아직 시간이 걸릴 것이다(2). 신속한 바이러스의 분리 동정은 항생제 남용의 감소, 불필요한 검사의 감소 등 보건적 차원에서 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.

감사의 글

장내바이러스 확인동정 시험에 도움을 주신 국립보건원 소화기체바이러스과 선생님들께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. 김경희. 1995. Small round-structured virus (SRSV)의 국내에서의 중요도 및 국내 분리주(Seoul-SRSV) 유전자의

염기서열에 관한 연구. 대한바이러스학회지 25, 23-30.
 2. 김동수, 강완복, 윤재득, 김문보, 김기순, 서순덕. 1996. 1995년도 무균성 뇌막염 환자에서 원인 바이러스 동정. 감염 28, 351-358.
 3. 김동수. 1997. 소아의 무균성 뇌막염. 소아감염 4, 43-47.
 4. 김문보, 김기순, 배유병, 송철용, 윤재득, 이광호, 신학균. 1996. General-primer를 이용한 무균성 뇌막염 원인바이러스 분석. 대한바이러스학회지 26, 215-225.
 5. 김원용, 송미옥, 박철민, 임성준, 김기정, 정상인, 최철순, 임인석. 1998. 한국인 영아에서 분리된 G1 로타바이러스의 G7 단백질전자 염기서열 및 발현. 대한바이러스학회지 28, 247-265.
 6. 김탁수, 허지연, 박영희, 정민구, 김성원. 1997. 무균성 뇌막염에서 증상발현부터 진단까지 걸린 시간에 따른 시기별 유행기간의 검토. 소아감염 3, 168-173.
 7. 박소미, 류정우, 김동수, 윤재득, 이홍래, 김기순, 배유병. 1996. 1996년 봄철 무균성 뇌막염 환자에서 원인바이러스 검출. 감염 29, 387-395.
 8. 박영희, 김원정, 손병희, 김성원. 1998. 1997년 부산지역에서 유행한 무균성뇌막염. 소아감염 5, 115-120.
 9. 윤재득, 김동수, 김기순, 이홍래, 김영성, 동미란, 배유병, 이운성, 이광호. 1996. 우리나라장내 바이러스에 대한 연구-PCR-RFLP를 이용한 장내 바이러스의 진단 및 분석. 국립보건원보 33, 131-140.
 10. 조경순, 김만수, 정구영, 민상기, 구평태, 김병준, 윤재득, 지영미, 김기순, 김영희, 정영기. 1999. 부산지역 무균성 뇌막염 원인 바이러스의 분리 및 동정. 한국환경과학회지 8, 165-169.
 11. Dagan, R., J.A. Jenista, and M.A. Menegus. 1988. Association of clinical presentation, laboratory finding and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infections. *J. Pediatr.* 113, 975-978.
 12. Ktugman, S. 1992. Infectious disease of children, 9th ed. p. 623-628. Mosby-Year Book Co. St. Louis.
 13. Melnick, J.L. 1990. Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. p. 549-605. In B. Fields and D.M. Knipe (ed). *Virology*, Raven Press, New York.
 14. Moore, M. 1992. Enteroviral diseases in the United States, 1970-1977. *J. Infect. Dis.* 146, 103-108.
 15. Pinto, R.N., R. Gaiardo, F.X. Abad, and A. Bosch. 1995. Detection of fastidious infectious viruses in water. *Environ. Sci. Tech.* 29, 2636-2638.
 16. Uhnou, I., G. Wadell, L. Svensson, and M.E. Johanson. 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* 20, 365-372.
 17. Watanabe, T. 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi-morphology of cultured fungi and key to species. CRC press, Boca Raton, Florida.
 18. 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.
 19. Wu, P.-C., H.-J. Su, and C.-Y. Lin. 2000. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. *Sci. Total Environ.* 270, 33-42.

(Received October 28, 2003/Accepted November 28, 2003)

ABSTRACT: Isolation of Enterovirus Causing Aseptic Meningitis in Busan, 2000-2002 Years**Kyung-Soon Cho*** and **Myung-Ju Jung**¹ (Institute of Health & Environment, Busan 613-806, Korea, ¹School of Liberal Arts, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea)

Enteroviruses isolation were attempted from samples obtained from aseptic meningitis-suspected patients in hospitals in Busan during 2000-2002. Enteroviruses were found in 2 of 292 cases in 2000, 4 of 371 cases in 2001, 83 of 703 cases in 2002. In 2000, the isolated viruses were found to be echovirus serotype 11 and coxsackievirus serotype B2. Coxsackievirus serotype B5 was isolated in 2001 and in 2002, echovirus serotypes 2, 3, 6, 7, 9, 13, 25, 30 were isolated in 70 cases while coxsackievirus serotypes B3 and B4 were isolated in 10 cases. Various specimens tended to emerge over the years. The occurrence in 2000 tended to be mostly focus during the cold months, December through January, while in 2001, it occurred in May. In 2002, 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. 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 436 bp single band in all the strains. The serotype was sent to the Department of Virology at the Korean National Institute of Health for identification.