

1998년 봄 제주도에서 유행한 hand-foot-mouth disease 환아에서 분리한 coxsackievirus A16

김의중^{1,2}, 이정희², 정현진¹, 이영준¹

서울대학교 의과대학 임상병리학교실 서울대학교병원 임상의학연구소¹

Coxsackievirus A16 Isolated from Patients with Hand-Foot-Mouth Disease in Cheju Province in the Spring of 1998

Eui-Chong Kim^{1,2}, Jung-Hee Lee², Hyun-Jin Jung¹, and Young-Joon Lee¹

Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine¹,
Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital², Seoul, Korea

Background : Hand-foot-mouth disease (HFMD) is mainly caused by the infection of coxsackievirus A16. But recently several epidemics of HFMD with meningitis or myocarditis due to enterovirus 71 have been reported in Southeast Asia. It was necessary that the possibility of enterovirus 71 epidemic in Korea should be ruled out. This study was designed for the determination of causative agents of HFMD in Cheju province in the spring of 1998.

Methods : Serum specimens were collected from 45 pediatric patients with HFMD at Cheju Hankook Hospital in March and April, 1998. Virus isolation was performed with RD cell culture through up to three passages. Reverse transcription-PCR and nucleotide sequencing were performed by the method of Oberste et al. (J Clin Microbiol 1999;37:1288-93). The serotypes of viral isolates were determined by BLAST program of National Center for Biotechnology Information, U. S. A.

Results : Virus could be isolates from 4 patients, whose age was ranged from 11 months to 3 years. All of 4 viral isolates showed about 430-bp product of RT-PCR using primers 011 and 012. The serotype showing the highest similarity with the nucleotide sequences of all of these viral isolates was coxsackievirus A16.

Conclusions : The causative enteroviral agent of HFMD in Cheju province in the spring of 1998 was coxsackievirus A16. We could not detect enterovirus 71 from the patients' sera in Cheju Province in the spring of 1998. (Korean J Clin Microbiol 1999;2:172-176)

Key words : Hand-foot-mouth disease, Coxsackievirus A16, Polymerase chain reaction

서 론

Hand-foot-mouth disease는 주로 coxsackievirus A16에 의하여 어린이에서 발생하는 경한 피부발진형 감염증

이다. 이 질환은 감염된 어린이의 손, 발과 입에 수포성 발진이 관찰되는 것이 특징이기 때문에 hand-foot-mouth disease라는 이름이 붙혀졌다. Hand-foot-mouth disease는 가축에서 발생하는 foot-and-mouth disease와는 전혀 다른 질병이다.

원 본 접 수 : 1999년 8월 18일 접수번호 : CM 99-2-12
수정본접수 : 1999년 9월 4일
교 신 저 자 : 김 의 중
(110-744) 서울시 종로구 연건동 28
서울대학교병원 임상병리과
전화: 02) 760-3500 FAX: 02) 764-3698
E-mail: euichong@plaza.snu.ac.kr

1947년 Dalldorf와 Sickles[1]가 coxsackievirus를 분리한 이래 coxsackievirus를 크게 A형과 B형으로 나누게 되었으며, 여러 종류의 혈청형이 발견되었고 혈청형에 따라 임상증상이 서로 다르다는 사실이 밝혀졌다. 1957년 Robinson 등은 어린이에서 구강내 수포성 또는 궤양성 병변이 있고 손과 발에 발진이 관찰되는 특이

한 질환이 coxsackievirus A16에 의한 감염과 관련이 있음을 보고하였다[2]. 이어서 1960년 영국의 버밍햄에서 이 질환이 유행하였고 그가 관찰했던 증상에 의거하여 hand-foot-mouth disease라고 명명하게 되었다. 그 후 hand-foot-mouth disease의 유행이 많이 보고되었고, 그 원인은 주로 coxsackievirus A16인 것으로 밝혀졌다. 간혹 coxsackievirus A5, A7, A9, A10, B2와 B5도 hand-foot-mouth disease의 원인으로 보고되었다[3].

국내에서는 이 등이 1990년에 발생한 뇌막염을 동반한 hand-foot-mouth disease 환자 18 명에서 혈청 항체 검사를 실시한 결과 그 중 11명이 enterovirus 71에 대한 항체역가(1:64-1:256)를 보였고, 1 명이 coxsackievirus A16에 대한 항체역가(1:128)를 보였음을 보고한 바 있다[4]. 1997년 말레이시아 사라와크에서 심근염을 동반한 증증의 증상을 보이는 hand-foot-mouth disease가 크게 유행하였고, 원인 바이러스는 enterovirus 71인 것으로 보고되었다[5]. 따라서 저자들은 1998년 봄 제주도에서 유행한 hand-foot-mouth disease의 원인 바이러스를 규명하고, 이 바이러스가 최근 동남아시아에서 유행하고 있는 enterovirus 71인 지를 감별하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1998년 3월과 4월에 제주도 한국병원 소아과에 내원하여 hand-foot-mouth disease로 진단받은 환자 45 명의 혈청을 수집하여 배양할 때까지 -20℃에 냉동보관하였다. 바이러스 배양을 위하여 2 ml의 배양액이 들은 시험관의 벽에 증식한 RD cell monolayer에 혈청 100 µl를 접종하고, 일주일간 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하면서 세포병변효과(CPE)를 관찰하였다. 일주일 후에도 CPE가 관찰되지 않은 경우 세포배양액을 냉동하였다가 녹인 cell lysate 100 µl를 다시 RD cell에 접종하여 배양하였다. 이 과정을 3 회 반복(3 passages)하여도 CPE가 관찰되지 않으면 음성으로 판정하였다.

CPE가 관찰되면 배양액을 냉동하였다가 녹여서 cell lysate를 만들고, QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, U.S.A.)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 바이러스 RNA의 RT-PCR을 위하여 우선 random hexamer (Boehringer Mannheim, Germany)와 AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 cDNA를 구하고, Oberste 등이 고안한 primer 011과 primer 012를 사용하여 PCR을 시행하였다[6]. 염기서열을 분석하기 위하여 QIAEX II Gel Elution Kit (QIAGEN, U.S.A.)로 증폭산물을 순수 분리하였고, Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, U.S.A.)와 자동염기서열분석기 (Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열반응에 사용한 primer는 011과 012이었으며, 분석기에서 나온 011

과 012의 결과를 서로 비교하여 보완하였다.

분석한 염기서열과 상동성이 가장 높은 enterovirus의 혈청형을 알아내기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 검색 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 이용하였다.

결 과

총 45 명의 혈청을 RD cell에 접종하여 배양한 결과 4 명에서 CPE가 관찰되었다. 이들은 모두 3 회씩의 반복 배양(passage)을 통하여 CPE를 관찰할 수 있었다. 바이러스 배양이 양성을 보인 4 명은 구강내 궤양성 병변을 호소하여 1998년 3월 10일부터 4월 18일까지의 기간 중에 제주한국병원에 내원한 환자였으며, 연령분포는 11 개월에서 3 세까지이었고, 남아가 3 명, 여아가 1 명이었다. 분리한 4 개의 바이러스주는 SNUH315, 326, 331, 347로 명명하였다.

Primer 011과 012를 이용한 RT-PCR의 결과 모두 약 430 bp 크기의 증폭산물이 검출되었다. 바이러스의 염기서열을 NCBI의 BLAST 프로그램에서 검색한 결과 coxsackievirus A16 GA95-2095 바이러스주와 상동성이 가장 높았으며, 그 score는 654-712 bits이었고, 일치하는 확률은 100%이었다. 그 다음 상동성이 일치하는 바이러스주는 coxsackievirus A16 PA94-5753과 TX95-2147로서 혈청형은 coxsackievirus A16으로 동일하였고, 바이러스주만 차이가 있었다. 환자 4 명의 혈청으로부터 분리한 4 개의 바이러스주, SNUH315, 326, 331, 347의 염기서열 및 아미노산 서열을 coxsackievirus A16 GA95-2095, PA94-5753과 TX95-2147 바이러스주의 염기서열 및 아미노산 서열과 비교하여 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 도시하였다.

고 찰

Enterovirus는 family Picornaviridae에 속하는 RNA 바이러스로서, 이 바이러스군(group)에는 poliovirus, coxsackievirus A, coxsackievirus B, echovirus와 enterovirus 68-71이 포함된다. 이들은 혈청형으로 서로 구별되며, 지금까지 총 67 종의 혈청형이 밝혀졌다[7]. Enterovirus의 혈청형을 규명하기 위하여 면역형광염색법 또는 항체중화시험 등을 이용하였다. 그러나 이 방법들은 많은 검사 시간이 소요되며, 항혈청의 양이 제한되어 있고, 또한 결과 판독이 주관적이라는 단점이 있다. 따라서 최근 염기서열을 분석하여 혈청형을 알아내려는 연구가 진행되어 왔다. Rotbart 등은 혈청형을 알아내기 위하여 5' NTR 염기서열을 이용하였으나[8], 동일한 혈청형 내에서도 다양한 염기서열이 관찰됨으로써 혈청형을 규명하는데 이용할 수 없게 되었다[9]. 또한

strain	10	20	30	40	50	60	70	80
GA95-2095	GCTTGGCAAA	CTGCTACCAA	CCCATCTGTG	TTTGTGAAAA	TGACGGACCC	ACCAGCTCAA	GTGTCAGTCC	CCTTCATGTC
PA94-5753	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
TX95-2147	*****	*A**C**T*	**G*****	*****	***A*****	C*****G	*****T*	***T*****
SNUH315	*****G*	***C*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH326	*****	***C*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****T*
SNUH331	*****G*	***C*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****T*
SNUH347	*****G*	***C*****	*****	*****	*****	*****	*****T*	*****
strain	90	100	110	120	130	140	150	160
GA95-2095	ACCAGCCAGT	GCATACCAAT	GGTTTATGA	TGGTTATCCC	ACCTTCGGAG	AGCATCTCCA	AGCAAATGAC	CTAGATTATG
PA94-5753	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
TX95-2147	*****T**	*****	*****C**	*****C**T	**T**T**G*	*A**C**T*	*****	*****
SNUH315	*****	*****	*****	C*****	*****	*****	*****	*****
SNUH326	*****	*****	*****	C*****	*****	*****	*****	*****
SNUH331	*****T*	*****	*****	C*****	*****	*****	*****	*****
SNUH347	*****T*	*****	*****	C*****	*****	*****	*****	*****
strain	170	180	190	200	210	220	230	240
GA95-2095	GTCAATGCCC	ATGGGCACTT	ATGGGCACTT	TTAGCATTAG	GACAGTAGGG	ACTGAAAAGT	CACCACACTC	CATTACCCTG
PA94-5753	*****	*****	*****G**	*****	*G*****	*****	*****	*****
TX95-2147	*C**G*****	T*****C**	*****C*	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH315	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH326	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH331	*****	A*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH347	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
strain	250	260	270	280	290	300	310	320
GA95-2095	AGGGTATACA	TGAGGATTAA	ACACGTCAGG	GCATGGATCC	CAAGGCCTCT	GAGAAATCAA	CCCTATTTGT	TTAAGACCAA
PA94-5753	*****G****	*****G****	*****	*****A*	*****	*****	*****	*****
TX95-2147	**A**G*****	*****A*****	*****	**G*****A*	*****T*	*****C**	*****A*	*C*****
SNUH315	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH326	*****	*****	*****	*****	*****	*****G**	*****	*****
SNUH331	*****	*****	***T*****	*****	*****	*****A**	*****	*****
SNUH347	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
strain	330	340	350	360				
GA95-2095	CCCAAATTAT	AAAGGAAATG	ATATTAAGTG	CACCAGCACT				
PA94-5753	***C*****	*****	*****	*****				
TX95-2147	*****	*****	***C*****	T**T*****C				
SNUH315	*****	*****	*****	***C*****				
SNUH326	*****	*****	*****	*****				
SNUH331	*****	*****	*****	*****				
SNUH347	*****	*****	*****	*****				

Fig. 1. Comparison of nucleic acid sequences of 4 enteroviral isolates from patients with hand-foot-mouth disease with coxsackievirus A16 GA95-2095, PA94-5753, and TX95-2147 strains (GenBank accession no. AF081613, AF081628, and AF081636, respectively). Number one of nucleic acid sequence in this figure is No. 28 of partial nucleotide sequence of Coxsackievirus A16 isolate GA95-2095 VP1 gene.

Strain	10	20	30	40	50	60
GA95-2095	AWQTATNPSV	FVKMTDPPAQ	VSVPFMSPAS	AYQWFYDGY	TFGEHLQAND	LDYGQCPNNM
PA94-5753	*****	*****	*****	*****	*****	*****
TX95-2147	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH315	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH326	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH331	*****	*****	*****I	*****	*****	*****
SNUH347	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Strain	70	80	90	100	110	120
GA95-2095	MGTFISRTVG	TEKSPHSITL	RVYMRIKHVR	AWIPRPLRNQ	PYLFTKNPNY	KGNDIKCTST
PA94-5753	*****	*****	*****V****	*****	*****	*****
TX95-2147	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH315	*****	*****	*****	*****	*****	*****T*
SNUH326	*****	*****	*****	*****K*	*****	*****
SNUH331	*****	*****	*****	*****	*****	*****
SNUH347	*****	*****	*****	*****K*	*****	*****

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of 4 enteroviral isolates from patients with hand-foot-mouth disease with coxsackievirus A16 GA95-2095, PA94-5753, and TX95-2147 strains (GenBank accession no. AF081613, AF081628, and AF081636, respectively). Number one of amino acid sequence in this figure is No. 10 of partial amino acid sequence of Coxsackievirus A16 isolate GA95-2095 VP1 gene.

enterovirus는 혈청형에 따라 그 염기서열이 매우 다양하기 때문에 모든 혈청형을 증폭할 수 있는 primer를 고안하기 힘들었으나, 1996년 Kilpatrick 등[10]이 inosine을 포함하는 degenerate primer를 제작하여 poliovirus 그룹을 모두 증폭할 수 있는 기법을 제안한 다음 enterovirus의 모든 혈청형을 증폭할 수 있는 primer를 고안하는 것이 가능해졌다. 따라서 Oberste 등은 이 기법을 응용하여 enterovirus의 모든 혈청형을 증폭할 수 있는 3 개의 primer를 고안하였으며, 이 degenerate primer를 이용하여 VP1의 3' 부위를 염기서열을 분석하면 enterovirus의 혈청형을 알아낼 수 있음을 밝혔다[6]. 그는 우선 primer 011과 012를 사용하여 PCR을 실시하고, 증폭이 되지 않을 경우에는 primer 011과 040을 사용할 것을 권하였다[6]. 또한 이들은 분석한 염기서열을 모두 GenBank에 수록하여 놓음으로써 다른 연구자가 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성이 높은 혈청형을 쉽게 찾을 수 있도록 하였다. 따라서 본 연구에서는 RD cell에서 배양한 enterovirus의 RNA를 RT-PCR로 증폭하고, Oberste 등이 고안한 방법에 따라 염기서열을 분석하여 혈청형을 규명하였다. 현재 이 방법은 미국 질병예방관리센터 (Centers for Disease Control and Prevention)에서 enterovirus의 혈청형을 규명하기 위한 표준방법으로 사용되고 있다.

Hand-foot-mouth disease는 특징적으로 감염된 어린이의 입안에 궤양성 병변이 관찰되고, 손과 발에 수포성 발진을 동반하며, 주로 봄철에 유행하기 때문에 임상적으로 쉽게 진단할 수 있는 감염병이다. 제주한국병원 소아과에서 hand-foot-mouth disease로 진단한 총 45명의 혈청을 대상으로 실시한 본 연구에서는 단지 4명에서만 CPE가 관찰되었다. 이렇게 적은 수가 배양검사에서 양성을 보인 이유는 발병일로부터 여러 날이 지나 혈액 중 바이러스가 사라진 다음 혈액을 채취하였을 가능성이 있고, 4명의 경우 모두 3 회의 반복배양을 거쳐서 비로소 CPE가 형성된 점을 감안하면 본 실험에서 배양에 사용한 RD cell은 coxsackievirus A16의 증식에 적합하지 않았다고 생각할 수 있다. 따라서 배양 양성률을 높이려면 발병 후 수일이내에 검체를 채취해야 하며, RD cell 이외에도 BGM cell, HeLa cell, WI-38 cell 또는 HEp-2 cell을 바이러스 배양 검사에 추가로 사용하여야 할 것이다[8]. 본 연구에서는 혈청으로부터 직접 RT-PCR을 실시하지 않았다. 앞으로 검체에서 직접 RT-PCR을 실시한 결과와 바이러스 배양 결과를 비교하여, RT-PCR을 검체에서 직접 실시하는 것이 신속한 진단을 위하여 유용한 지를 검토해야 할 것으로 생각한다. 또한 본 연구에서는 환자의 혈청만을 대상으로 하였기 때문에 양성률이 매우 낮았으나, 환자의 대변 또는 인후도말을 추가하면 바이러스 양성률이 높아질 것으로 기대된다.

본 연구에서 대상으로 삼은 hand-foot-mouth disease

환아 중에는 수막염을 동반한 경우가 없었기 때문에 enterovirus 71이 검출되지 않았을 것으로 생각할 수 있겠지만, 만일 1998년 봄 제주도에서 유행한 hand-foot-mouth disease의 원인이 enterovirus 71이었다면 본 연구에서 한 증례라도 검출되었을 것이다. 따라서 그 당시 hand-foot-mouth disease 유행의 원인은 enterovirus 71이 아닐 것으로 생각한다.

이 등[4]이 혈청 항체 검사를 통하여 1990년의 환자를 대상으로 보고한 예는 hand-foot-mouth disease 환자 중에서 뇌막염을 동반한 경우만을 대상으로 하였기 때문에 그 원인이 coxsackievirus A16은 한 예밖에 없었고, 모두 enterovirus 71이었을 것으로 추측할 수 있다. 1997년 말레이시아 사라와크에서 enterovirus 71에 의하여 심근염을 동반한 중증의 증상을 보이는 hand-foot-mouth disease가 크게 유행하였는데, 이 등[4]의 보고를 통하여 우리 나라에서는 이미 enterovirus 71에 의한 hand-foot-mouth disease의 유행이 존재하고 있었음을 알 수 있다. Enterovirus 71에 의한 hand-foot-mouth disease는 coxsackievirus A16의 경우와는 달리 심근염 또는 수막염과 같은 중증의 병변을 동반하기 때문에 hand-foot-mouth disease가 유행하는 경우 반드시 그 원인을 정확하게 밝힐 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 enterovirus 71을 검출할 수 없었으나, 앞으로 enterovirus 71에 의한 유행이 우리 나라에서도 가능하기 때문에 enterovirus 71에 의한 집단발생을 신속하게 진단할 수 있는 검사방법을 확립해야 할 것이며, 본 연구에서 실시한 검사방법은 enterovirus에 의한 감염증의 진단에 큰 도움을 줄 것으로 생각한다.

요 약

배 경 : Hand-foot-mouth disease (HFMD)는 주로 coxsackievirus A16에 의한 감염으로 발병한다. 그러나 최근 enterovirus 71에 의한 수막염 또는 심근염을 동반한 HFMD가 동남아시아에서 유행하고 있다. 따라서 우리 나라에서도 enterovirus 71에 의한 HFMD가 유행하는 지를 밝힐 필요가 있다. 저자들은 1998년 봄 제주도에서 유행한 HFMD의 원인 바이러스를 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

방 법 : 1998년 3월과 4월에 제주한국병원에 내원하여 HFMD로 진단받은 45명의 환아로부터 혈청을 채취하였다. 환자 혈청을 RD cell에 접종하여 세포병변효과를 관찰하였으며, 3 회 반복하여 배양하였다. RT-PCR과 염기서열분석은 Oberste 등의 방법 (J Clin Microbiol 1999;37:1288-93)에 따라 실시하였다. 분리한 바이러스의 혈청형을 규명하기 위하여 미국 National Center for Biotechnology Information의 BLAST 프로그램을 이용하였다.

결 과 : 4명의 환자로부터 바이러스를 분리하였으

며, 이들의 연령은 11개월에서 3세까지 분포하였다. Primer 011과 012를 이용한 RT-PCR에서 약 430-bp 크기의 증폭산물이 4 개의 바이러스주에서 모두 관찰되었다. 염기서열을 분석한 결과 4 개의 바이러스주는 모두 coxsackievirus A16와 상동성이 가장 높았다.

결론 : 1998년 봄 제주도에서 유행한 HFMD의 원인 바이러스는 coxsackievirus A16이었다. 1998년 봄 제주도에서 HFMD 환자로부터 enterovirus 71은 검출되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Dalldorf G, Sickles G. *An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. Science* 1948;108:61.
2. Robinson CR, Doane FW, Rhoades AJ. *Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer, 1957. Isolation of group A Coxsackievirus. Can Med Assoc J* 1958;79:615.
3. Modlin JF. *Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 1995:1620-36.*
4. 이영아, 오세호, 홍수종, 김영휘, 문형남, 홍창의. 수족 구병의 임상적 고찰-뇌막염을 중심으로. 소아과 1993;36:842-8.
5. Lam SK. *Emerging infectious diseases-Southeast Asia. Emerging Infect Dis* 1998;4:145-7.
6. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. *Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol* 1999;37:1288-93.
7. Modlin JF. *Picornaviridae-Introduction. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 1995:1606-13.*
8. Rotbart HA and Romero JR. *Laboratory diagnosis of enteroviral infections. In : Rotbart HA, ed. Human enterovirus infections. Washington DC, ASM Press, 1995:401-18.*
9. Kopecka H, Brown BA, Pallansch MA. *Genotypic variation in Coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. Virus Res* 1995;38:125-36.
10. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Mulders MN, Holloway BP, et al. *Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. J Clin Microbiol* 1996;34:2990-6.