국내 소아로 부터 분리된 장바이러스(Enterovirus)의 5′-Noncoding Region의 Sequencing 분석

정민아 · 류정우 · 김동수 · 윤재득* · 김기순* · 이윤성*

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 국립보건원*

= Abstract =

Enterovirus Sequencing Analysis of 5′ Noncoding Region in Korean Children

Min A Chung, M.D., Chung Woo Lou, M.D., Dong Soo Kim, M.D.
Jae Deuk Yun*, Ki Soon Kim* and Yoon Sung Lee*.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine Severance Hospital, Seoul, Korea
Department of Virology, National Institute of Health, Seoul, Korea

Purpose : Meningitis is an inflammation of meninges by various kinds of organisms. AImost 85% of aseptic meningitis is caused by Enterovirus. This study was done to detect the causative virus of those with aseptic meningitis through sequencing the 5'-noncoding region to compare prototype and homology.

Methods : RNA was extracted from Coxsackie B1, Echovirus 3, 7, 9, 30. DNA was synthesized by RT-PCR and we compared homology with prototype from WHO by direct sequencing.

Results :

1) PCR products from these viruses showed same bands of 155 bp and 440 bp on gel electrophoresis.

2) Coxsackievirus and Echovirus 11 prototype sequences were compared, which showed 12 bp changes with 92.1%.

3) Coxsackievirus B1 from a patient showed 94.1% homology when compared with prototype.

4) Echovirus 3 showed 92.8%, echovirus 7 92.8%, echovirus 30 82.9% homology.

Conclusion : 5'-NCR of enterovirus has high homology which was good for use of diagnosis and more long sequencing requires for typing of viruses.

Key Words : Aseptic menigitis, Enterovirus

서 론

인간 Enterovirus는 크게 나누어 폴리오 바이러

책임저자 : 정민아, 연세대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : 02)361-7747 Fax : 02)393-3080

스와 nonpoliovirus로 나누고 nonpoliovirus는 다시 Coxsackievirus A1~A24, Coxsackievirus B1~B6, Echovirus 1~33, Enterovirus 68~72로 분류된다. 일반적으로 Enterovirus는 증상이 없는 불현성감염에서부터 뇌막염, 심근염 및 뇌염에 이르기까지 다양한 종류의 질병의 원인이 되지만 가장 흔한 것은 불현성 감염이다.

뇌막염이란 수종의 감염원에 의한 뇌막의 염증이다. 일반적으로 뇌막염은 무균성 뇌막염, 세균성 뇌막염, 결핵성 뇌막염으로 크게 분류한다. 우리나라에서는 위생환경 개선과 정부의 철저한 보건계획 그리고 범국민적인 BCG 예방접종 등에 힘입어 세균성과 결핵성 뇌막염은 현저하게 감소되었다. 그러나 무균성 뇌막염은 계속해서 발생되고 있으며 1993년과 1997년도에는 범국가적인 유행이 있어서 문제가 되기도 하였다.

무균성 뇌막염은 과거에는 볼거리 환아에서 가장 흔하게 일어난다고 알려져있지만, 볼거리 백신이 개발된 후 볼거리 바이러스에 의한 무균성 뇌막염은 현저히 줄어들었다. 그대신 근자에 들어서 무균성 뇌막염의 85% 이상이 enterovirus에 의한 것으로 알려져있다. 이와 같은 enterovirus에 의한 무균성 뇌막염의 빈도는 우리나라에서도 같은 양상이다[1, 2]. 그러나, 무균성 뇌막염의 원인은 시간과 장소에 따라서 변할 수 있다. 연구자들은 1993년 봄부터 연세의대 세브란스 병원을 방문한 무균성 뇌막염 환자의 원인 바이러스를 가지고 5' noncoding region을 분석하였고 분자 생물학적인 진단적 가능성을 알아보고자 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1. 환자및 가검물

연세대학교 의과대학 부속병원에서 1993년 봄부터 1996년까지 무균성 뇌막염으로 진단 받고 치료받았던 환아 47명을 대상으로 하였다. 환자에서 수집한 뇌척수액과 대변은 실험직전까지 섭씨 영하 20도에서 보관 후 실험직전에 상온에서 녹여 사용되었다.

2. 대변 부유액

대변은 변 2g를 취하여 10ml phosphated buffered saline에 0.5ml chloroform이 첨가된 용액에 넣어 20% 부유액으로 만들었다. 이것을 20분 동안 강하게 흔든 후 1500rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리후 상청액을 취하여 두개로 나누어 한 개는 실험에 사용하였고 나머지 하나는 -20℃에서 보관하였다.

3. 세포배양

RD-cdc, HEp-2-c, Hela, VR세포 중에서 enterovirus에 감수성이 높은 RD(ATCC CCL 136)와 HEp-2-c(ATCC CCL 23)세포를 WHO로부터 분양받아 사용하였다. 이들 세포는 Hoechst 33258 형광색소로 염색하여 Mycoplasma 시험을 수행한 뒤 사용하였다. 단층 배양된 RD와 HEp-2-c세포에 가검물을 접종(1.2ml/25cm^2 flask)한 후 세포병변(Cytopathic Effect : CPE)을 관찰하였다. 100% cytopathic effect가 관찰될 때 세포를 -20℃에 동결시킨 후 녹인 부유액을 같은 cell line에 재접종하므로서 serotyping을 시작하기 전에 toxic effects를 제거하였다.

배양 부유액은 장바이러스 typing을 위한 중화시험에 사용하였으며, HEp-2-c 세포에서만 세포병변이 관찰되는 것은 poliovirus에 대한 typing을 실시하였다. 24시간 안에 급격한 cytopathic effect현상이 관찰될 경우 가검물에 의한 독성(toxin)이 남아있는 것으로 간주하고 -20℃에서 Freezing/Thawing을 반복한 후 그 배양액을 RD-cdc와 HEp-2-c 세포에 재 접종하였다.

4. Serum Pool에 의한 장바이러스 유형 분류

중화시험에 사용한 혈청은 네델란드 RIVM(National Institute of Public Health and Environmental Protection)에서 제작한 Enterovirus serum pool을 WHO로부터 분양 받아 사용하였으며, 각각의 항혈청은 5% 우태아혈청이 함유된 EMEM (Sigma Co., St. Louis, Mo)으로 20배 희석하여 사용하였다. 96 well plate의 각well에 준비된 각각

의 항혈청을 50 μL씩 넣고 EMEM(Sigma Co., St. Louis, Mo)배지를 50 μL 넣은 후, 적당히 희석한 (10^{-1}~10^{-3}) 가검물(바이러스)을 50 μL씩 첨가하고 1분간 혼합하여 36℃에서 1시간 중화반응을 시켰다. 그 후 RD세포를 150,000cells/ml되도록 하여 100 μL씩 분주한 후 날마다 cytopathic effect를 관찰하였다. 폴리오 바이러스에 대한 typing도 Enterovirus와 유사한 방법으로 실시하였으며, 세 가지 type의 Poliovirus 동정을 위하여 항혈청을 P1형+P2형, P1형+P3형, P2형+P3형의 군으로 나누어 사용하였다. 그리고 cytopathic effect를 나타내는 가검물은 바이러스의 역가를 측정하였다.

5. RNA추출

세포병변이 확인된 세포배양액으로부터 Piore와 Nicoletta[3]방법에 의해 guandinium thiocyanate를 이용하여 장바이러스 RNA를 추출하였다. 실험에 사용된 모든 기구들은 멸균하여 사용하였으며, 실험실내에 존재하는 RNase에 의해 바이러스의 RNA가 소멸되는 것을 최소화하였다.

6. Oligonucleotide 합성

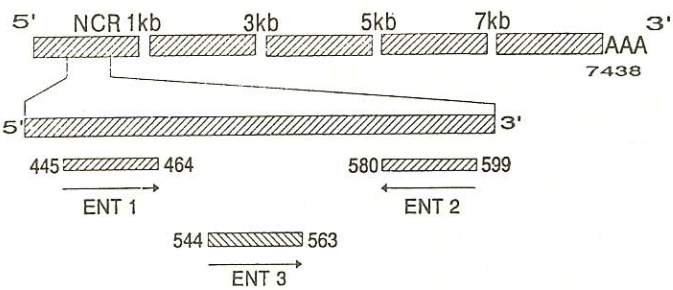
Enterovirus의 PCR에 사용한 primer는 Enterovirus genome의 5'noncoding region의 염기서열 변화가 거의 없는 부위에서 Rotbart 등[4] 이 고안한 것을 합성하여 사용하였다(Fig 1). DNA molecules의 합성은 automatic synthesizer(ABI, Model 380A)를 이용하여 Shina[5] 등의 β-Cyanoethyl phosphoramidite 방법으로 실시하였으며, 생산된 2set의 Detritylated Oligonucloetide는 Becker[6] 등의 방법에 따라 HPLC로 정제한 후 20% polyacrylamide gel에서 확인하였다.

7. Noncoding RNA PCR

PCR은 94℃에서 30초 denature시키고, 52℃에서 30초 annealing 시킨 후, 72℃에서 1분간 extension시킴으로써 수행하였다. Geneamp RNA PCR kit(Perkin-Elmer사, Norwalk, CT.)을 사용하였으며 PCR에 의해 생성된 DNA는 gel-electerophoresis (100V, 70mA, 10분)를 실시한 후 etidium bromide로 염색하여 확인하였다.

8. PCR-direct sequencing

sequencing 반응에 사용한 프라이머는 PCR에 사용된 프라이머(primer1, 2)와 동일한 것으로 HPLC 정제 후 사용하였다. 우선 특정 band가 확인된 PCR 산물을 S-300HR MicroSpin column (Pharmacia, Uppsala Sweden.)으로 정제한 후 DNA의 양에 따라 5~7 μL을 취하여 PCR-directed sequencing kit(USB 70170, Amersham, Amersham International Plc, Amersham.)을 이용하여 sequencing을 수행하였다. 특정 염기의 표지는 S-dATP(Amersham, Amersham International Plc, Amersham.)를 사용하였으며, 6% polyacylamaide gel에 전기영동한 후 건조된 gel을 X-ray film에 48~72시간 노출한 뒤 현상하여 염기서열을 분석



ENT1 :5'TCCTCCGCCCCTGAATGCG3'
ENT2 :5'ATTGTCACCATAAGCAGCCA3'
ENT3 :5'AAACACGGACACCCAAAGTA3'

Fig. 1. Genomic positions and properties of the primer sets used in this study.

하였다. 정확한 염기서열의 분석을 위하여 모든 sequencing은 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin Elmer, Norwalk, CT.)으로 다시 한 번 수행하였으며 확인된 sequence는 DNASIS software를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 임상경과

임상경과와 뇌 척수액결과는 무균성뇌막염에 합당하였다. 모든 환자는 합병증 없이 치료되었다.

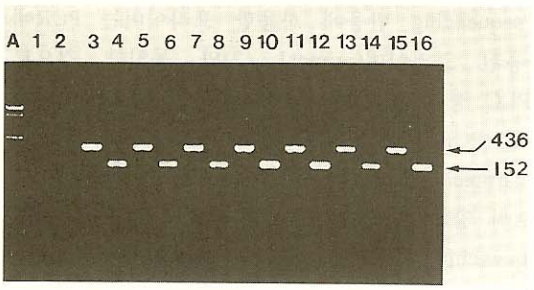


Fig. 2. Acrylamide gel electrophoresis profiles of the amplifed 5'NCR of several enteroviral RNA by RT-PCR. Arrows indicate the 436bp and 152bp. A:100bp DNA ladder, Lane 1, 2 : negative control of cell culture supernatant, Lane 3, 4 : positive control of echovirus 3 from ATCC, Lane 5, 6 : coxsacke B1, Lane 7, 8 : coxsackie B3, Lane 9, 10 : echovirus 3, Lane 11, 12 : echovirus 7, Lane 13, 14 : echovirus 9, Lane 15, 16 : echovirus 30.

2. 바이러스 분리

1993년에는 Echovirus 9가 분리된 가장 흔한 바이러스 였다. 그 외 Echovirus 30, Coxsackievirus B5, Enterovirus 71이 분리되었다. 1994년에 Echovirus 3이, 1995년에 Coxsackie B3, 1996년에 Coxsackie B1이 가장 흔한 원인 바이러스였다.

1994년에는 또한 Coxsackie B3이 분리되었고, 1995년에 Echovirus 7과 Echovirus 20, 1996년에는 Echovirus 9가 분리되었다. 바이러스 분리율은 65.5%였다.

3. PCR 결과

장바이러스 특이 Primer를 사용한 환자의 PCR의 결과 정상 RD-cdc 세포배양 현탁액에서(lane 1, 2) 음성을 보였다. 양성대조군(lane 3, 4), Coxsackie B1(lane 5, 6), Coxsackie B3(lane 7, 8), Echovirus 3(lane9, 10), Echovirus 7(lane11, 12), Echovirus 9(lane13, 14)와 Echovirus 30(lane15, 16)에대한 ATCC로부터 기대하였던 155bp와 440 bp크기의 PCR products를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

4. DNA sequencing

Lindberg Coxsackievirus와 Echovirus 11 prototype의 순서를 비교한 결과 12bp변화를 보여 92.1% 동일성을 보였다(Fig. 3) ATCC로 부터 Lindberg Coxsackievirus와 Coxsackievirus B3은 100% 동일성을 보였고 ATCC로부터 얻은 Coxsackievirus B3와 환자로부터 분리된 Coxsackievirus B1은 94.1%의 동일성을 보였다(Fig. 4). 그러나 4명의 다른 환자로부터 분리된 4개의 Cox-

```
                      10         20         30         40         50
LINDCOX.SEQ      1 TCCGGCCCCT GAATGCGGTT AATCCTAACT GCGGAGCACA CACCCTCAAG
DNAECHO.SEQ      1 ********** ********** ********** *****CG*** T****CT**T

                      60         70         80         90        100
LINDCOX.SEQ     51 CCAGAGGGCA GTGTGTCGTA ACGGGCAACT CTGCAGCGGA ACCGACTACT
DNAECHO.SEQ     51 ***AG***** ********** ********** ********** **********

                     110        120        130        140        150
LINDCOX.SEQ    101 TTGGGTGTCC GTGTTTCATT TTATTCCTAT ACTGGCTGCT TATGGTGACA
DNAECHO.SEQ    101 ********T* *******C** *****TT*** ********** **********
```

Fig. 3. Comparison of necletide sequences of NCR of Lindberg coxsackieirus(LINDCOX) and echovirus 11 prototype(DNAECHO) by DNASIS. there are 12bp changes with 92.1% homology.

```
                      10         20         30         40         50
LINDCOX.SEQ        1 TCCGGCCCCT GAATGCGGTT AATCCTAACT GCGGAGCACA CACCCTCAAG
CB3YS2.SEQ         1 ---------- ---------- ---------- ---------- -*********
CB1YS2.SEQ         1 ---------- ---------- ---------- ---------- --***A**CA

                      60         70         80         90        100
LINDCOX.SEQ       51 CCAGAGGGCA GTGTGTCGTA ACGGGCAACT CTGCAGCGGA ACCGACTACT
CB3YS2.SEQ        51 ********** ********** ********** ********** **********
CB1YS2.SEQ        51 ****T***** **C******* ********** ********** **********

                     110        120        130        140        150
LINDCOX.SEQ      101 TTGGGTGTCC GTGTTTCATT TTATTCCTAT ACTGGCTGCT TATGGTGACA
CB3YS2.SEQ       101 ********** ********** ********** ********** **********
CB1YS2.SEQ       101 ********** *******C** A*****T*** *T********* **********
```

Fig. 4. Comparison of nucleotide wequences of NCR of Lindberg coxsackievirus(LINDCOX). coxsackievirus B3(CB3YS2) from ATCC and coxsackievirus B1(CB1YS2) isolated from patient with aseptic meningitis. There is 100% homology between Lindberg coxsackievirus and coxsackievirus B3 from ATCC. However, 96bp are changed with 94.1% homology between Lindberg coxsackievirus and coxsackievirus B1 from a patient with aseptic meningtis.

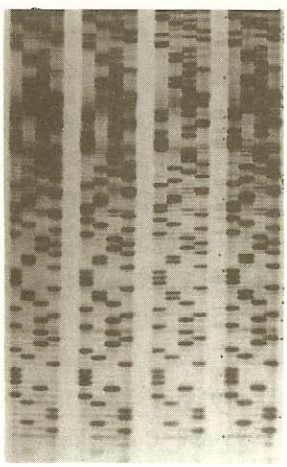


Fig. 5. Nuclotide sequeces of 5'NCR of coxsackie B1 isolated from 4 different patients with aseptic meningitis show 100% homology.

sackievirus B1은 100% 동일성을 보였다(Fig. 5). Echovirus 11 prototype을 환자로부터의 Echovirus와 동일성을 비교하였는데 Echovirus 7에서는 92.8%, Echovirus 9에서는 94.1%, Echovirus 30에서는 82.9%의 동일성이 관찰되었다. 흥미로운것은 Echovirus 3과 Echovirus 7사이에 100%의 동일성이 발견되었다(Fig. 6).

고 찰

이번 연구는 매년 뇌막염을 일으키는 다른 종류의 장바이러스로 전기영동검사상 155bp와 440bp에 단일 띠를 보이는 PCR산물을 관찰할 수 있었다. DNA sequencing은 각각의 다른 바이러스에서 몇몇 point mutation을 보였다.

무균성 뇌막염이라는 용어는 뇌척수액에서 흔한 세균감염원이 발견되지 않는 뇌막 염증의 임상적 증상을 일컫는다[7, 8]. 실제로 무균성 뇌막염은 임상적 경과가 양성이며 뇌실질의 침범이 없는 것으로 대다수의 경우 바이러스 감염에 의한 것이다. 그러나 바이러스가 아닌 병원체에 의한 감염, 예를 들어 특정 세균으로 염색에 의해 잘 보이지 않고 또는 표준 배양검사상에서 자라지 않는 경우, 마이코플라즈마, 진균 등에 의한 뇌막염의 경우 바이러스성 무균성뇌막염의 양상과 동일하게 나타난다[9]. 또한 동종면역질환, 암, 특정 약물에 대한 반응 등도 종종 무균성 뇌막염처럼 발현되기도 한다.

장바이러스는 무균성 뇌막염의 가장 흔한 원인이다. 장바이러스는 피코나 바이러스 과에 속하는데, 이는 68개의 혈청형의 RNA바이러스이며 폴리오바이러스 1, 2, 3, Coxsackievirus A1~A24, Coxsackievirus B1~B6, Echovirus 1~33, A형 간염 바이러스와 Enterovirus 68~72를 포함한다[10]. 과거에, 폴리오바이러스는 소아기 감염의 주요한 관심사였다. 그러나 폴리오 예방접종이 널리 사용되면서, 비폴리오바이러스(장바이러스)의 65종류 이상이 감기에서 심근염 또는 뇌염에 이르는 다양한 소아기 질병뿐만 아니라 소아기 무균성뇌막염의 주요한 원인이다[10]. 또 다른 보고에 따르면

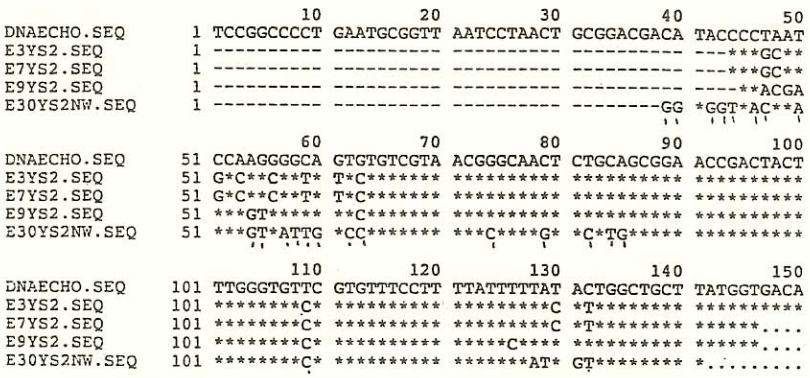


Fig. 6. Comparison of nucleotides sequences of NCR among the different echovirus serotypes isolated from the patients with aseptic meningitis which showes a different homology. DNA-ECHO; echovirus 11 prototype, E3YS2 : echovirus 3, E7YS2 : echovirus type 7, E9YS2 : echovirus 9, E30YS2 : echovirus 30.

Enteroviral genome이 다발성 근염, 확장성 심근염, 만성 피로 증후군 환아의 조직에서 발견되었다[11].

소아는 장바이러스가 중추신경 감염의 주된 원인 바이러스이다[12]. 장바이러스 뇌막염은 남자아이에 더 흔하다[13]. 임상양상은 열, 구토, 두통, 목 경직을 보인다. 영아에서는 종종 세균성뇌막염과 폐혈증을 감별하기가 어렵다. 본 연구에서 환아들은 가장 흔한 증상으로는 열, 다음에 두통, 구토를 보였다. 다른 보고서에는 무균성뇌막염은 임상증상이 약하고 의식변화가 작지만 다른 원인의 뇌막염보다는 구토의 빈도가 높았다는 보고와 비슷하다.

이학적 검사상 경부강직, Kernig sign, Brudzinski sign 등을 보였다. 그러나 세균성 뇌막염에서의 빈도보다는 낮았다. 그러므로, 무균성뇌막염은 원인 없이 열, 두통, 구토가 있을 때 고려해봐야한다[12, 14]. 뇌막자극증상은 약하거나 없으며 50~90%가량이다. 뇌척수액 분석상 일반적으로 약간 백혈구 수치가 올라가며, 단백질이 정상이거나 약간 올라가며, 당은 정상이다[9, 15].

무균성뇌막염의 진단에 있어 가장 정확한 방법은 가검물에서 바이러스 동정이다. 가검물은 RD-cdc과 HEp-2-c세포에서 배양되었고 세포병변을 관찰하였다. 진단은 신속하고 정확하게 이루어져야 하는데 배양 후에 24~48시간사이에 30~40%가 양성을 보이고 7일 이내에 90%가 양성을 보인다고 한다[16]. 바이러스 분리는 뇌척수액 검사상 백혈구의 증가 전에 가능하다면 초기진단시에 매우 효과적일 수 있다[16, 17]. 바이러스 배양과 분리는 한국에서 널리 사용되지 않았기 때문에 외국에 보내서 동정하였다. 일반적으로 분리율은 연구사이에 차이가 있으나 약 25~70%가량이다. 본 연구에서는 바이러스 분리율이 65.5%였다.

본 연구에서, 1993년에 Echovirus 9, 1994년에 Echovirus 3, 1995년에 Coxsackievirus B3, 1996년에는 Coxsackievirus B1이 가장 흔한 원인 바이러스였다. Echovirus 7, Echovirus 20, Echovirus 30, Enterovirus 71이 아울러 발견되었다.

미국에서 14년동안 주요한 분리체는 Echovirus 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 30과 Coxsackievirus A9, B1, B3, B5였다[20]. 이것은 우리의 연구와 비슷하였다. 특정 혈청형은 매년 유행하는 많은 Enterovirus보다 더 흔하게 무균성 뇌막염과 관련있다. 그러나 주요한 Enterovirus혈청형은 다른 지역에서 또한 비슷하리라는 생각이든다.

현재까지 Enterovirus감염은 바이러스 분리에 의하여 진단되었고 혈정형은 중화 항혈청의 panel로 하였다. 분자생물학의 사용은 무균성뇌막염의 진단에 있어 Enteroviral genome이 같은 것을 이용하는 유전자적 방법을 가능케 하였다. Hybridization

study는 한 종류의 장바이러스로부터 만든 probe를 사용하여 많은 다른 장바이러스 RNA를 검출하는데 사용되었다[19].

장바이러스 genome은 폴리오바이러스와 Coxsackievirus B(CVB)genome을 연구하여 밝혀졌다. Positive sense로 single strand이며 3' terminus에 polyadenylate되어 있으며, 길이가 7.4 kilobase로 양쪽 5'와 3' termini의 염기사이에 염기서열이 translation 되지 않는다. 같은 nucleotide sequence를 가진 60개 이상의 장바이러스에서 그러한 5' noncoding 부분이 발견되었다[19]. 1993년 한국에서 유행한 무균성 뇌막염은 진단에 위에서의 방법을 사용한 Yoon et al[2]에 의하여 발견되고 보고되었다. 우리의 PCR결과는 바이러스배양에서 같은 155bp와 440bp band를 보여준 것에 의하여 진단을 확증할 수 있었다. 민감도는 95~100%까지이며, 대부분의 연구에서 특이성은 100%에 가깝다. 그러나 비싼 가격과 기술적 어려움 때문에 널리 사용하기에는 더 많은 시간이 걸릴 것이다. 최근 들어서는 kit가 개발되어 유용성에 대하여 연구하고 있다.

무균성뇌막염의 환자에서 분리된 각각 다른 장바이러스 혈청형은 표준 장바이러스 prototype과 비교하였을때 몇몇 point mutation이 있었다. 이것은 지역에 따라서 장바이러스는 변이를 보일 수 있다는 것을 의미한다. 사실은 본 연구에서 유행시에 다른 환자로부터 분리된 같은 바이러스 혈청형 중에서는 어떠한 변이도 발견하지 못하였다. 이번 연구는 제한 효소 부위를 찾아보려고 하였으나 찾을 수 없었고 아마도 더 긴 bp를 sequencing해야 될 것으로 생각되었다.

결론적으로, 서로 다른 지역에서 뇌수막염을 유발하는 주요한 장바이러스 혈청형은 비슷하다고 생각되지만 지역에 따른 변이가 있을 것으로 생각되었다.

요 약

목 적 : 무균성뇌막염은 소아에서 주로 발생하는 질환으로, 흔히 장 바이러스에 의해 초래된다. 저자들은 그동안 우리나라에서 분리된 무균성뇌막염 원인바이러스의 5'-NCR에 대한 sequencing을 통하여 prototype과의 homology를 비교하고 이 연구를 진단에 이용하기 위한 기초자료로 이용하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

방 법 : 과거 4년간 우리나라에서 분리한 장바이러스 Coxsackie B1, Echovirus 3, 7, 9, 30을 이용하여 RNA를 분리하고 RT-PCR을 이용하여 DNA를 합성한 후, direct sequencing을 이용하여 WHO에서 얻은 prototype과 homology를 비교하였다.

결 과 :

1) PCR product는 155bp와 440bp부위에 특징적인 띠를 관찰할 수 있었다.

2) 155bp에 관한 sequencing homology를 보면 prototype의 Coxsackie virus와 echovirus는 92.1%의 homology를 보였다.

3) 환자에서 분리한 Coxsackie B1은 prototype과 94.1%의 homology를 보였다.

4) 환자에서 분리한 Echovirus 3은 92.8%, Echovirus 7은 92.8%, Echovirus 9는 94.1%, Echovirus 30은 82.9%의 homology를 보였다.

결 론 : 장바이러스의 5'-NCR은 homology가 높아서 진단에 이용하기에 좋으며 이 부위를 통한 typing을 위해서는 더 긴 부위를 sequencing할 필요가 있다.

참 고 문 헌

1) Kim DY, Jung KP, Oh HK, Soh CO, Jung JY. Clinical and epidemiological studies of aseptic meningitis. J Korean Pediatr Assoc 1994;37:1420-6.

2) Yoon SJ, Hong SJ, Lee YH, Kim MH, Kim KS, Park KH, Lee JM, Lee WY. Detection of enterovirus in patients with aseptic meningitis by reverse transcription and polymerase chain reaction. J Korean Pediatr Assoc 1994;37:1226-34.

3) Piore C, Nicoletta S. Single step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Analy Biochem 1987;162:156-9.

4) Rotbart HA. Nucleic acid detection systems for

enteroviruses. Clin Microbiol Rev 1991;4:156-68.

5) Shina ND, Biernat J, McManus J, Kster H. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: Use of -cyanothyl-N, N-dialkylamino-1N-morpholino phosphoramitide of deoxynucleoside for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of final product. Nucleic Acid Res 1984;12:4539-57.
6) Becker CR, Efiacitec JW, Heiner CR, Kaiser MF. Use of a reverse phase column for the HPLC purification of synthetic oligonucleotides. J Chromatogr 1985;326:293-9.
7) Wallgren A. Une nouvelle maladie infectiouse du systeme nerveus central? Acta Paediatr Scand 1925;4(Suppl):158-82.
8) Wallgren A. Die Agiologie der Enzephalomeningitis bei Kindern, besonders des Syndromes der akuten abakteriellen(aseptichen) Menigitis. Acta Pediatr Scand 1951;40:541-65.
9) Rotbart HA. Viral meningitis and the aseptic meningitis syndrome. IN Scheld WM, Whitley, RJ, and DJ Durack, Infections of the Central Nervous System. New York, Raven Press, 1991, p.19-40.
10) Melinik JL. Enteroviruses. Polioviruses, Coxsackie viruses, Echo viruses and Newer Enteroviruses. In Fields BN : Virology(3rd ed.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996, p.655-712
11) Zoll GJ, Melchers WJG, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJA, Galama JMD . Generd primer mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnositc routine and persistent infections. J Cli Microbiol 1992; 30:160-5.
12) Wilfert CM, Lehrman SN, Katz SL. Enteroviruses and meningitis. Pediatr Infect Dis 1983;2:333-41.
13) Moore M. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. J Inf Dis 1992;146:103-8.
14) Singer Jl, Maur PR, Riley JP, Smith PB. Management of central nervous system infections during an epidemic of enteroviral aseptic meningitis. J Pediatr 1980;96:559-63.
15) Karandanis D, Shulman JA. Recent survey of infectious meningitis in adults : review of laboratory findings in bacterial, tuberculous, and aseptic meningitis. South Med J 1976;69:449-57.
16) Wildin S, Chonmaitree T. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of the viral meningitis. Am J Dis Child 1987;141:454-7.
17) Park YA, Cho EY, Kim KS, Park YS, Moon HN, Hong CY. Aseptic meningitis in 1991: isolation of causative agent. J Korean Pedatr Assoc 1993;36:506-11.
18) Horstmann DM, Yamada N. Enterovirus infections of the central nervous system. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 1968;44:236-53.
19) Zhang HY, Yousef GE, Mowbray JF. Detection of enterovirus RNA in experimentally infected mice by molecular hybridization: specificity of subnomic probes in quantitative slot blot and in situ hybridization. J Med Virol 1988;26:375-86.