

## Dengue Virus Infection 원인바이러스 검출 및 유전형 특성 분석(2016~2020)

신효정 · 박성익 · 송지현 · 문나영 · 강선희 · 김사라 · 손동철

바이러스검사과

Detection of Causative Virus And Genetic Characteristics  
of Dengue Virus Detected From the Dengue Patients(2016-2020)

H. J. Shin, S. I. Park, J. H. Song, N. Y. Moon, S. H. Kang, S. R. Kim and D. C. Son

### Viral Disease Division

#### Abstract

Recently, the number of arthropod-borne diseases is increasing rapidly including Dengue fever(DF) and Chikungunya fever. Dengue fever(DF) is caused by dengue virus(DENV). DENV is a member of the genus Flavivirus in the family Flaviviridae and circulates as four serotypes(1-4). Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) are major severe symptoms caused by DENV infection. The sequential infection by different serotypes of DENV is a major factor for the induction of DHF and DSS. Also, concurrent infection is a suspicious factor for the induction of DHF and DSS. Firstly, we detected other virus of arthropod-borne diseases including Chikungunya virus, West Nile virus, Japanese Encephalitis virus and Zika virus from the sera of patients suspected of DF(2016-2020). Also, we were trying to confirm concurrent infection of DENV from the sera of DF patients. And then, we analyzed serotype distribution and genetic characteristics of DENV detected from 4 patients. We used partial sequences of CprM segment and constructed a phylogenetic tree using MEGA6. Finally, we confirmed that there is no prevalent serotypes and could not find new cluster in the phylogenetic tree. On the basis of this result, continuous monitoring is needed to obtain variants information of DENV. Also these accumulated genetic information can be expected to be used as basic data for development of antiviral therapeutics and vaccines for DENV.

**Key Words :** Arthropod-borne diseases, Dengue virus, Serotypes(혈청형)

## I . 연구사업

### 1. 서 론

뎅기열(Dengue Fever)은 공중보건을 위협하는 주요 질병으로 전 세계 인구의 절반 정도가 감염에 노출되어 있다. 최근 50년간 30배 이상 발생 수가 증가하였으며 대부분 열대 및 아열대지방의 약 125개 국가의 풍토병으로 알려져 있다<sup>1</sup>. 뎅기열은 주로 감염된 매개모기에 의해 전파되며 주요 매개체는 이집트숲모기(*Aedes aegypti*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*) 등이 있다. 이집트숲모기는 열대 및 아열대 지역에서 발견되며 국내에서는 서식하지 않고 흰줄숲모기는 북미, 유럽, 국내를 포함한 아시아 지역에 서식하고 있다. 그러나 국내에 서식하는 흰줄숲모기에서 뎅기바이러스 유전자가 검출된 사례는 없다<sup>2</sup>. 또한 뎅기열은 수직감염, 혈액을 통한 감염이 가능하기 때문에 감염된 환자에 의해 전파되지 않도록 관리가 필요하다.

뎅기바이러스 감염증은 임상 증상에 따라 일반 뎅기열 증상과 중증 뎅기열 증상으로 구분 한다<sup>3</sup>. 일반 뎅기열을 경미한 증세로 보며 발열, 두통, 근육통, 관절통, 식욕부진의 증상을 보이고 피부 발진, 코피, 잇몸의 경미한 출혈 등이 나타나기도 한다. 뎅기출혈열(dengue hemorrhagic fever, DHF)과 뎅기쇼크증후군(Dengue shock syndrome, DSS)로 진행되면 이를 중증 뎅기열 증상으로 본다. 이 경우 혈장 유출로 인한 흉막 삼출, 복수, 저단백혈증 등이 나타나면서 매우 심한 쇠약감, 불안증세, 식은땀을 보인다. 또한 뎅기쇼크증후군이 계속되면 장출혈로 인한 혈변이 나타나고 경과에 따라 사망할 확률이 40~50%에 달

한다. 그러나 적극적인 치료를 잘 받으면 사망률을 낮출 수 있다.

뎅기바이러스는 positive-sense single-strand RNA 바이러스로 Flavivirus속 Flaviviridae과에 속한다<sup>4</sup>. 혈청형에 따라 4가지 타입(DENV 1~4)으로 분류 할 수 있으며 같은 혈청형끼리는 약 75%의 상동성을 갖는다<sup>5</sup>. 뎅기바이러스에 1차 감염 된 후 다른 혈청형에 2차 감염되면 anti-body-dependent enhancement의 기작에 의해서 감염증세가 중증 뎅기열로 나타날 수 있는데 이것은 1차 면역반응에서 생긴 항체가 2차 면역반응에서 중화반응의 역할을 못하고 오히려 면역반응에 피해갈 수 있는 감염경로를 제공하기 때문이다. 이는 뎅기열 백신개발을 어렵게 하는데 실제로 2015년 뎅기바이러스에 감염된 환자가 Denvaxia 접종 후 중증 뎅기열 증세로 사망한 사례가 있다<sup>6</sup>. 또한 2개 이상의 혈청형에 감염되는 것을 concurrent 감염이라고 하며 뎅기열 유행국가에서 최근 증가하고 있다. 중증 뎅기열 발생이 concurrent 감염과 상관성이 있다는 연구결과가 발표되었는데<sup>7, 8, 9, 10</sup> 아직까지 명확한 기작이 알려져 있지 않으나 concurrent 감염이 증가하고 있으므로 적극적으로 감시해야 할 필요가 있다.

이번 연구에서는 2016년부터 2020년까지 경북지역에 의뢰된 뎅기열 검체 65건 중 음성 검체 55건을 대상으로 한 뎅기열 외 모기매개 감염병 4종 검사와 양성 검체 10건을 대상으로 한 중복감염 검사를 진행하였다. 또한 다양한 혈청형의 concurrent 감염 여부를 확인하여 뎅기열 중증 증상과 비교하고자 하였다. 마지막으로 뎅기열 양성 환자에서 검출된 뎅기바이러스 유전자의 염기서

열을 이용하여 계통수를 그렸으며 이를 토대로 뎅기바이러스 유전자형 분포 및 유전적 연관성을 타국가에서 보고된 유행주와 비교 분석하였다. 본 연구 결과를 통해 모기매개 감염병의 의뢰체계를 되돌아보고 나아가 뎅기열의 발생 양상을 예측하는 기초자료로 활용하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 검체 선정 및 처리

2016년부터 2020년까지 연구원에 의뢰되어 -70°C에 보관된 뎅기열 환자의 혈액가검물 65건을 실험에 사용하였다. 혈액가검물은 5,000×g, 4°C의 조건으로 5분간 원심분리하여 상층액인 혈청만 분리해서 사용하였다.

### 2.2. 핵산 추출

혈청 140 uL를 QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 QIAcube 핵산추출자동화장비(QIAGEN, Germany)로 제조사의 매뉴얼에 따라 핵산을 추출하였으며, 60 uL의 DEPC로 elution하였다.

### 2.3. 유전자 증폭

#### 2.3.1. Real-time RT-PCR

혈액가검물의 모기매개 감염병의 유전자 검출 검사를 위해 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 상용화된 제품인 PowerChek™ ZIKV/DENV/CHIKV Real-time PCR Kit, PowerChek™

JEV&WNV Real-time PCR Kit(Kogene, Korea)와 7500 Fast 실시간유전자증폭장비(ABI, USA)를 사용하였다. 핵산 증폭은 50°C에서 30분간 역전사반응, 95°C에서 10분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 45초씩 45회 반복하였다.

#### 2.3.2. Conventional RT-PCR

뎅기바이러스의 혈청형 확인을 위해 질병관리청 감염병 실험실 검사법 표준절차서의 뎅기바이러스 검사법에 따라 프라이머 D1, S1, S2, S3, S4(Table 1.)를 제작하였다. RT-PCR은 HyQ RT-PCR premix, TD(SNC, Korea)를 이용하여 핵산추출물 5 uL, 10 pM D1 프라이머 1 uL와 TS1, TS2, TS3, TS4 프라이머를 각 1 uL 씩 넣어 총 25 uL의 반응액을 만들었다. 유전자증폭장비 (BIO-RAD, USA)를 사용하여 50°C에서 30분간 역전사반응, 95°C에서 15분간 pre-denaturation 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 40회 반복한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 증폭 산물을 자동화 전기영동 장치 QIAxcel (Qiagen, Germany)을 이용하여 혈청형1 (478–484bp), 혈청형2(127–134bp), 혈청형3 (292–294bp), 혈청형4(394bp), PC(217–223bp)의 결과를 확인하였다.

뎅기바이러스의 계통수를 그리기 위한 염기서열을 얻기 위해 참고 논문<sup>11</sup>의 프라이머와 동일하게 D1, D2 프라이머(Table 1.)를 제작하였고 HyQ RT-PCR premix(SNC, TD)를 이용하여 핵산추출물 5 uL, 10 pM D1, D2 프라이머 mix 2 uL를 넣고 총 25 uL의 반응액을 만들어 50°C에서

## I . 연구사업

30분간 역전사, 95°C에서 15분간 pre-denaturation 후 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 35회 반복한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 증폭 산물은 자동화 전기영동 장치 QIAxcel (Qiagen, Germany)을 이용하여 약 511bp의 밴드 결과를 확인하였다.

Table 1. Primer list

Sequences (5'-3')	
D1	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G
D2	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC
TS1	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G
TS2	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG
TS3	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C
TS4	TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC

### 2.4. 유전자형 및 유전적 연관성 분석

확인된 PCR 산물은 염기서열 분석업체인 마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 얻었다. 염기서열은 MEGA6 프로그램을 통해 염기서열의 결정 및 비교분석을 수행하였고, 기존에 보고된 뎅기바이러스 참고주를 Pubmed GeneBank에서 다운받아 neighbor-joining 방법으로 계통학적 모식도를 완성하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 뎅기 의뢰 잔여검체에서 다른 모기매개바이러스 검출 실험

최근 2016년부터 2019년까지 본 연구원으로 모기매개 감염병 검사 의뢰건수가 급격히 증가하였다(Table 2). 이것은 모기매개 감염병 유행국가로의 여행자 수가 증가한 것과 관련되며 2020년은 코로나19의 영향으로 의뢰건수가 급격히 감소하였다. 또한 의뢰되는 감염병의 경향을 보면 뎅기 열에만 편중되어 있음을 알 수 있다.

Table 2. Case of requests for mosquito-borne infectious diseases by year

	2016	2017	2018	2019	2020
일본뇌염	-	-	-	0	1
뎅기열(양성)	7(0)	18(5)	18(2)	22(3)	2(0)
치쿤구니야열	0	3(0)	0	0	0

모기매개 감염병은 증상만으로 정확한 진단이 어렵다. 각각의 주요증상을 보면 발열, 두통, 근육통 등이 공통적으로 나타나며 현기증, 구토, 관절통 등 특이적인 증상도 있지만 이것만으로 정확한 진단을 하는 데는 어려움이 있다(Table 3).

특히 뎅기열과 치쿤구니야열은 초기 임상증상이 유사하여 감별하기가 어렵다. 치쿤구니야열은 뎅기열보다 증상이 길게는 1년 정도까지 오래 지속되며 나이가 많을수록 오래 지속되는 경향이 있다. 반면 뎅기열은 증상이 발현 된 후 빠르게 출혈이 나타나며 중증으로 진행 될 수도 있다. 두 감염병의 진단에 따라 치료방법을 달리 해야 하므로

적절한 감염병 의뢰 및 정확한 검사를 하는 것이 중요하다.

이러한 연구 목적으로 2016년에서 2020년까지 의뢰된 뎅기 의뢰 검체 중 55건의 음성 검체를 대상으로 치쿤구니야, 지카, 일본뇌염 및 웨스트나일 바이러스 4종을 검출하고자 하였다. 핵산추출물은 자동화핵산추출장비를 사용하여 얻었고 유전자 증폭방법으로는 multi Realtime RT-PCR 법을 이용하였다. 본 실험의 결과로 1건의 뎅기 음성 검체에서 치쿤구니야 바이러스 유전자를 검출하였다. 이 검체는 2019년 7월 경북 ○○시 보건소에서 의뢰된 환자로 태국으로 8일 동안 여행한 이력이 있으며 발열, 근육통, 발진, 설사, 복통, 구토의 증상이 있었다.

Table 3. Symptoms by mosquito-borne infectious diseases

일본뇌염	뎅기열	웨스트나일열	지카열	치쿤구니야열
발열, 두통, 근육통				
현기증, 구토	발진, 관절통	구토	관절통, 관절염	발진, 관절통

### 3.2. 뎅기열 및 치쿤구니야열 중복감염 확인 실험

뎅기 유행국가에서 수행된 뎅기열 및 치쿤구니야열 중복감염에 관한 연구에서 뎅기열 양성환자의 약 10%가 치쿤구니야열과 중복감염이 확인되었다는 보고가 있다<sup>12</sup>. 도내 의뢰된 뎅기 양성 검체에서도 중복감염의 여부를 확인하고자 2016년

부터 2020년까지 뎅기 양성 검체 10건을 대상으로 치쿤구니야와 추가로 지카, 일본뇌염, 웨스트나일 바이러스 4종에 대한 검출 검사를 진행하였다. 검사방법은 앞선 실험에 사용하였던 multi Realtime RT-PCR 방법을 이용하였다. 검사 결과 10건의 검체 모두 중복감염이 확인되지 않았다.

### 3.3. 뎅기바이러스 Concurrent 감염 확인 실험

뎅기바이러스는 혈청형에 따라 1~4의 4가지 타입으로 구분된다. 최근 뎅기열 유행국가에서 두 가지 이상의 혈청형 concurrent 감염 사례가 증가하고 있어 우리 도내 의뢰된 뎅기열 양성 환자의 concurrent 감염 여부를 확인하고 뎅기열 종상과 비교해보고자 하였다.

정확한 혈청형을 확인하기 위해 기존의 multiplex PCR 방법에서 primer mixture(D1, S1, S2, S3, S4)를 사용하지 않고 각각의 혈청형에 해당하는 primer만 사용하여 확인하였다. 검사 대상은 뎅기열 양성 검체 10건으로 각각 4가지 타입 씩 PCR을 동시에 진행한 결과 두 개의 검체에서 concurrent 감염으로 의심되는 결과를 보였다. 한 검체에서 두 개의 혈청형, 또 다른 검체에서 세 개의 혈청형에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었다. 그러나 생산된 PCR 산물을 염기서열분석을 시도하였으나 반응에 실패하였고 정확한 염기서열을 얻지 못하였다. 그 원인으로 실제로 여러 혈청형 타입의 PCR 산물들이 혼재하기 때문으로 볼 수도 있지만 비특이적 반응의 PCR 산물로도 볼 수 있기 때문에 concurrent 감염으로 결론을 내리기에는 어려움이 있었다. 추후 연구 계획 시

## I . 연구사업

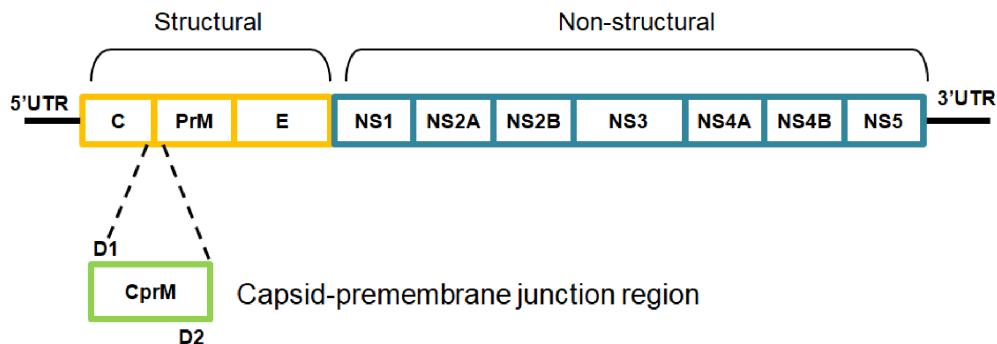


Figure 1. RT-PCR target region of DENV

PCR 방법을 달리하여<sup>13</sup> 정확한 염기서열분석을 할 필요가 있다.

### 3.4. 계통수 분석

경북지역에서 발생한 뎅기열 환자의 혈액검물을 대상으로 기존에 보고된 참고주와 함께 뎅기바이러스의 유전적 연관성을 분석하였다. 연관성을 보기 위한 타겟 유전자로 뎅기바이러스 유전자 중 다양성이 높은 부위인 Capsid-premembrane(CprM) junction 부위 약 511bp를 정하였고 유전자증폭 및 염기서열분석에 사용하였다 (Fig 1).

뎅기열 양성 환자 10건의 검체 중 4개의 검체에서 염기서열분석이 가능하였고 얻은 염기서열은 참고주의 염기서열과 함께 MEGA6.0 프로그램을 사용하여 Neighbor-Joining method, Tamura 3-parameter method로 계통수(Fig 2)를 그렸다.

뎅기바이러스 유전자형으로는 혈청형 1, 2, 3, 4 타입이 있고 각 혈청형 내에서도 다양한 유전자형이 나누어진다. 본 실험의 계통수 결과를 보면 4개

의 검체(●,▲,■,◆) 모두 다른 혈청형에 나타나고 있다. 경북지역의 뎅기 환자들은 어느 특정한 혈청형의 뎅기바이러스에 감염되기 보다는 다양한 타입에 감염되고 있다. 또한 4개의 검체 모두 특이적인 변이를 보이는 검체는 없었다.

## 4. 결 론

최근 해외여행 증가 및 기온변화로 모기 서식지의 변화가 일어나고 있다. 이에 따라 모기매개감염병의 발생 양상에 변화가 일어날 수 있으며 뎅기열 환자 수가 최근 급격히 증가한 것과도 연관될 가능성이 있다. 뎅기열 중증 환자 수 또한 급격히 증가하면서 중증 뎅기열의 발생 원인에 대한 연구결과에 관심이 쏠리고 있다.

본 연구 결과로 경북지역의 2016년에서 2020년까지 의뢰된 뎅기열 음성 검체 중에서 1건의 치쿤구니야 바이러스가 검출 되었다. 이는 뎅기열의 심환자 검사의뢰체계의 재검토의 필요성을 시사한다.

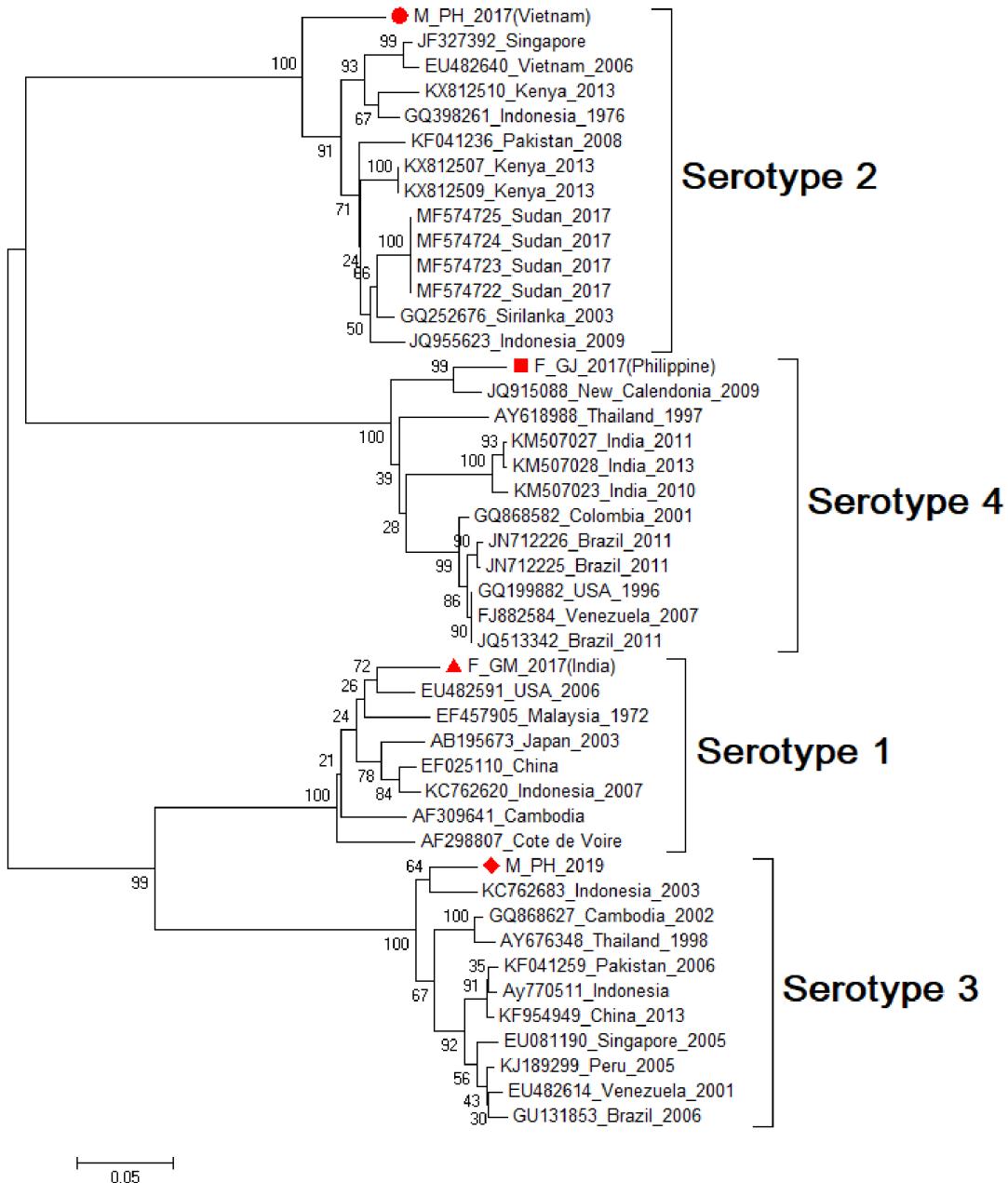


Figure 2. The phylogenetic tree of Dengue virus of Dengue fever patients. The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.0

## I . 연구사업

---

또한 본 연구에서 뎅기열과 치쿤구니야열의 중복감염 여부와 뎅기열 혈청형에 대한 concurrent 감염여부를 확인 하고자 하였다. 아직까지는 도내 뎅기열 양성환자에서 중복감염이 확인되지 않았지만 지속적으로 모니터링하며 중증 뎅기열과의 연관성을 알아보기 위한 자료로 축적해 나갈 필요가 있다. 또한 체계적이고 정확한 진단을 위하여 다양한 혈청형을 동시에 검출할 수 있는 검사방법 도입이 필요하다.

마지막으로 계통수 분석을 통해 유전적 연관성을 확인할 수 있었는데 문제는 뎅기바이러스가 다양한 혈청형에서 나타난다는 것이다. 한 가지 혈청형이 나타나는 것보다 다양한 혈청형이 나타나는 것이 sequential infection의 확률이 높아진다. 이 것은 중증 뎅기열의 발생증가로 이어질 수 있다. 아직은 도내 뎅기열 환자 수가 많지는 않지만 지속적으로 증가할 가능성이 높고 양성 판정을 받은 환자는 특히 뎅기열 전파방지에 주의해야 할 것이다.

이번 연구에서는 경북지역의 뎅기열 의뢰 검체를 활용하여 뎅기열 발생 양상에 대해 이해하고자 하였다. 본 연구 결과가 앞으로의 뎅기열 발생 양상을 분석할 수 있는 기초 자료로 활용되고 모기매개 감염병의 검사의뢰체계 및 검사법의 개선에 기여할 수 있기를 기대한다.

## 참 고 문 헌

1. World Health Organization & Specific Programme for Research and Training in Tropical Disease. Dengue Guideline for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. WHO,

- [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf)(2009).
2. 2020년 바이러스성 모기매개 감염병 관리지침, 질병관리청, pp.45–62(2020).
  3. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control 2<sup>nd</sup> edition, WHO* (1997).
  4. Calisher CH, Gould EA, “Taxonomy of the virus family Flaviviridae,” *Adv Virus Res.*, **59**, pp.1-17 (2003).
  5. Louis Lambrechts, Thomas W. Scott, and Duane J. Gubler, Scott B. Halstead, “Consequences of the Expanding Global Distribution of Aedes Albopictus for Dengue Virus Transmission”, *PLoS Negl Trop Dis.* 4(5):e646(2010).
  6. Drug company under fire after revealing dengue vaccine may harm some, *The New York Times*, (2017).
  7. Sri Masyeni, Benediktus Yohan, and R. Tedjo Sasmono, “Concurrent infection of dengue virus serotypes in Bali, Indonesia”, *BMC Res Notes*, 12:129(2019).
  8. Soroy Lardo, Yaldiera Utami, Benediktus Yohan, Seri MMU. Tarigan, Widayat Djoko Santoso, Leonard Nainggolan, R. Tedjo Sasmono, “Concurrent infections of dengue viruses serotypes 2 and 3 in patient with severe dengue from Jakarta, Indonesia”, *Asian Pac J of Trop Med.* **9**, pp.134-140 (2016).
  9. F.M. de Carvalho Araújo, R.M.R. Nogueira, J.M.G. de Araújo, I.L.C. Ramalho, M.L.F. de Sá Roriz, M.E.L. de Melo, et al., “Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil”, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **101**(8), pp.925-928 (2006).

10. Wang, D.Y. Chao, S.R. Lin, C.C. King, S.C. Chang, "Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan", *J Microbiol Immunol Infect*, **36**(2), pp.89-95 (2003).
11. Rober S. L., Charles H. C., Duanev J. G., Gwong-Jen C., A. V. Vordnamt, "Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction", *Journal of Clinical Microbiology*, **30**(3), pp.545-551(1992).
12. Maninder K., Kanwardeep S., Shailpreet K S., Pushpa D., Manpreet K., Sapna S., Nacchartarjit Si., "Coinfection of chikungunya and dengue viruses: A serological study from North Western region of Punjab, India", *J Lab Physicians*, **10**(4) (2018).
13. Timo Ernst, Suzi McCarthy, Glenys Chidlow, Dagwin Luang-Suarkia, Edward C. Holmes, David W. Smith, Allison Imrie, "Emergence of a New Lineage of Dengue Virus Type 2 Identified in Travelers Entering Western Australia from Indonesia, 2010-2012", *Neg Trop Dis*, **9**(1): e3442(2015).

