

국내 일본뇌염 확진 사례의 진단검사 결과 분석

질병관리청 감염병진단분석국 바이러스분석과 이예지, 왕진숙, 강혜지, 이덕용, 한영국*

*교신저자: mghan@korea.kr, 043-719-8190

초 록

일본뇌염은 모기가 매개하는 인수공통감염병으로 회복 후 일부 환자에서 신경학적 후유증을 유발하는 질환이다. 병원체는 일본뇌염 바이러스로 혈청형은 하나이나 유전형은 5가지로 나누어지며 바이러스 혈종의 지속 기간이 짧아 유전자 검출률이 낮으므로 진단검사는 항체 검출을 중심으로 이루어지고 있다. 또한 플라비바이러스에 속하는 다른 바이러스와 혈청학적 교차반응으로 확인 진단에 어려움이 있다. 이 글에서는 항체 검출검사 결과에 근거하여 진단검사용 검체 종류와 채취 시기에 대해 고찰하였으며 확진 사례에서 감염된 일본뇌염 바이러스 유전형을 추정하고 웨스트나일열에 대한 혈청학적 교차반응을 조사하였다. 분석은 2020년에 확진된 일본뇌염 환자를 대상으로 하였다. 모든 대상자에서 일본뇌염 바이러스는 검출되지 않았으며, 급성기에 채취한 뇌척수액에서 모두 IgM 항체는 양성이었다. 회복기에 채취한 혈청에서는 IgG 항체가 급성기 혈청에 비해 4배 이상 상승하거나 1:256 이상으로 높았다. 바이러스 중화항체도 급성기에 비해 회복기 혈청에서 상승하였거나 높게 측정되었으며 웨스트나일열은 모두 음성으로 판정되었다. 바이러스 유전형별 중화항체가 및 IgG 항체가 조사 결과에 근거하여 감염된 일본뇌염 바이러스 유전형은 GⅠ과 GⅤ로 추정되었다.

주요 검색어: 일본뇌염, 일본뇌염 바이러스, 유전형, 중화항체, 확인진단검사

들어가는 말

일본뇌염(Japanese encephalitis)은 매년 전 세계적으로 약 67,900명의 환자가 발생한다고 보고되어 있으며, 대부분 불현성 감염으로 나타나나 250명 중 한 명 정도에서 임상증상이 나타난다. 일본뇌염은 급성으로 진행하여 고열, 현기증, 구토, 복통, 지각 이상 등을 보이며, 사망률은 20~30%이며 생존자의 30~50%에는 신경학적 후유증을 남기는 감염병이다[1-3]. 일본뇌염은 작은빨간집 모기(*Culex tritaeniorhynchus*)에 의해 주로 전파되며 돼지와 학·백로 등의 섭금류가 증폭숙주의 역할을 한다. 일본뇌염은 모기의 활동이 왕성한 여름부터 가을(8~11월)에 주로 발생한다[4,5].

일본뇌염 병원체는 일본뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus)로, 플라비바이러스과(*Flaviviridae*), 플라비바이러스속에

속한다. 유전자는 (+) 단일가닥 RNA이고 크기는 약 11 kb이며, 7개의 비구조단백질(Non-structural protein)과 3개의 구조단백질(Structural protein)로 이루어져 있다. 구조단백질 중 표피 단백질(Envelope protein) 유전자의 염기서열에 따라 5가지 유전형(Genotype(G) I, II, III, IV, V)으로 나뉜다[6,7].

국내에서는 1947년에 일본뇌염 환자가 처음 확인되었고, 2001년부터 2009년에는 10명 내외로 환자가 발생하였으나 2010년에는 26명으로 증가하면서 환자가 늘어나는 경향을 보인다[8,9]. 국내에 유행하는 일본뇌염 바이러스의 유전형은 1990년대 이후부터는 유전형 GⅢ에서 GⅠ으로 바뀌었으며, 유전형 GⅤ는 2010년에 모기에서 처음 검출되었다. 그 이후 국내에서 채집한 모기에서 유전형 GⅠ과 GⅤ가 검출되고 있다[5].

일본뇌염 바이러스는 감염 후 혈중에 존재하는 바이러스의

양이 적고, 감염 후 중화항체가 빠르게 생성되기 때문에 유전자를 검출하기가 어려우나 뇌척수액(Cerebrospinal fluid, CSF)이나 뇌 조직에서 바이러스가 검출된 사례도 보고되고 있다[10,11]. 발열 후 4일이 지나면 IgM 항체가 생성되고, 거의 동시에 IgG 항체도 형성된다. 발열 9~10일 후 CSF에서 검출되는 IgM 항체는 바이러스의 중추신경계 감염에 대한 95% 이상의 특이도가 있는 것으로 보고되어 있다[12](그림 1). 일본뇌염의 혈청학적 진단은 웨스트나일열 등과 같은 혈청군(Serocomplex)에 속하는 병원체와 교차반응이 있어 감별진단이 필요하다[13].

이 글에서는 일본뇌염 환자의 IgG 항체가 변화, 유전형 GI, GIII 및 GV에 대한 중화항체가 비교와 웨스트나일열 감별진단 결과에 대하여 기술하였다.

몸 말

1. 일본뇌염 확인 진단검사 결과

일본뇌염 혈청학적 검사는 선별검사의 일종인 효소면역측정법(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)에서 IgM 항체 검사, 그리고 간접면역형광항체법(Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)으로 IgG 항체가 상승 여부를

조사하였다. IFA 슬라이드는 일본뇌염 바이러스 유전형 GI, GIII, GV를 각각 감염시킨 BHK-21 세포를 이용하여 제작하였다. IgG 항체가는 유전형별로 항체가 및 상승 정도에 차이가 있었으며 유전형 중 가장 높은 항체가 또는 4배 이상 상승한 유전형의 항체가에 근거하여 판정하였다. 급성기와 회복기 혈청의 항체가 4배 이상 증가는 사례 3번, 4번, 6번 및 7번에서 확인되었으며 1:256 이상의 높은 항체가를 유지하거나 2배 상승은 사례 1번 및 5번에서 관찰되었다.

2. 일본뇌염 중화항체 검사 결과

일본뇌염 중화항체가의 유전형별 차이를 이용하여 감염된 일본뇌염 바이러스의 유전형을 추정하였다(그림 2, 표 1)[14-17]. 사례 1번과 7번을 제외하고 사례 3~6번은 급성기 혈청 채취 시기가 발병 후 6일 이내였으며 9~14일 차이를 두고 회복기 혈청을 채취하였다. 사례 1번의 경우 일본뇌염 바이러스 유전형 GI, GIII 및 GV에 대한 회복기 혈청의 중화항체가가 유지되거나 낮아지는 경향을 보여 중화항체가를 이용하여 유전형을 추정하기 어려웠다. 처음 채취한 혈청은 증상 발현 후 15일이 경과한 것으로 보아 IgG 항체와 중화항체가 형성된 시기에 채취된 것으로 추측되었다. 반면 사례 7번의 경우는 사례 1번과 같이 급성기 혈청의 채취가 증상 발현 후에 늦게 이루어졌고, 회복기 혈청 채취 간격도 20일 이상 차이가 나는데도 불구하고 다른 유전형에 비해 GV의 중화항체가만 상승하였다.

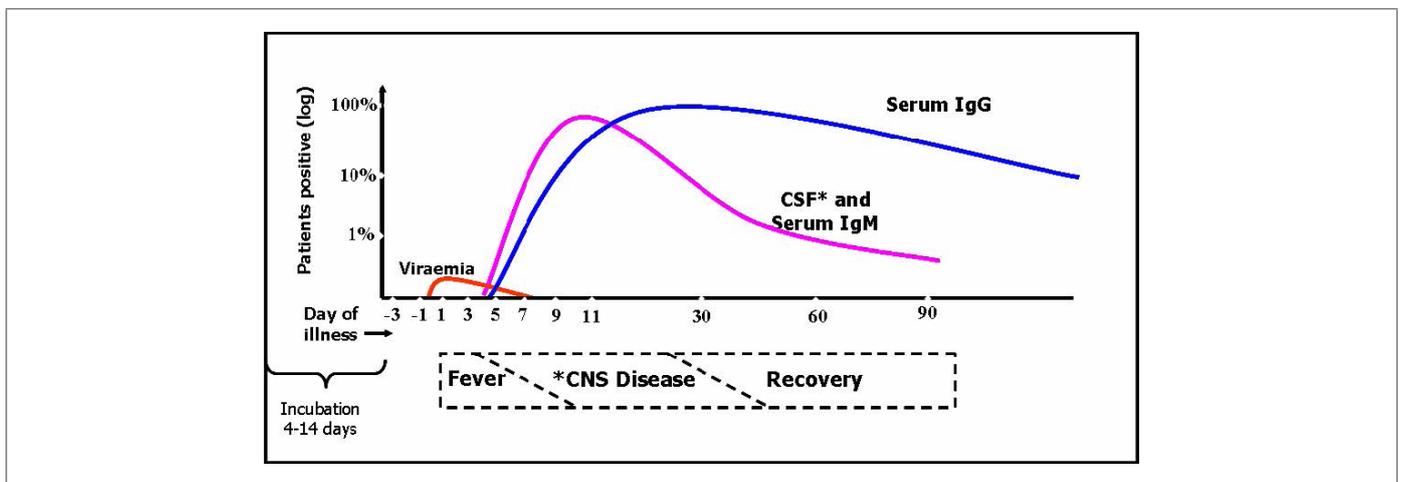


그림 1. 일본뇌염 바이러스 감염 후 증상 및 항체반응[12]

* CSF, Cerebrospinal fluid; CNS, Central nervous system

사례 3번 및 4번은 사례 7번과 유사하게 급성기 혈청에 비해 회복기 혈청의 중화항체가 상승이 유전형 GV에서 크게 상승함이 관찰되었고, 사례 5번은 급성기와 회복기 혈청의 중화항체가 상승을 볼 수 없었으나 유전형 GV의 중화항체가 다른 유전형의 항체에 비해 최대 32배 높았다. 이러한 결과를 종합하여 사례 3번, 4번, 5번 및 7번은 유전형 GV에 감염된 것으로 추정되었다. 사례 6번은 급성기 대비 회복기 혈청에서 유전형 GI와 GV에 대한 중화항체가 유지되었으나 유전형 GI에 대한 중화항체가 4배 상승하여 감염된 바이러스 유전형으로 추정하였다.

3. 웨스트나일열 감별진단

일본뇌염 양성사례의 웨스트나일열 감별진단은 IFA 및 중화항체검사법을 이용하여 수행하였고, 일본뇌염 바이러스 유전형 GI에 대한 결과를 이용하여 비교하였다(표 2). 웨스트나일 바이러스 IgG는 사례 3번 및 4번을 제외한 나머지 검체에서 검출(1:16~1:128)되었으나 회복기 혈청에서 4배 이상의 상승을 보이는 사례는 없었다. 이들 사례에서 일본뇌염 바이러스 GI의 IgG 항체가 1:64 이상 검출되었다. 웨스트나일 바이러스 중화항체(PRNT₅₀)는 사례 3번, 4번 및 6번에서는 검출되지

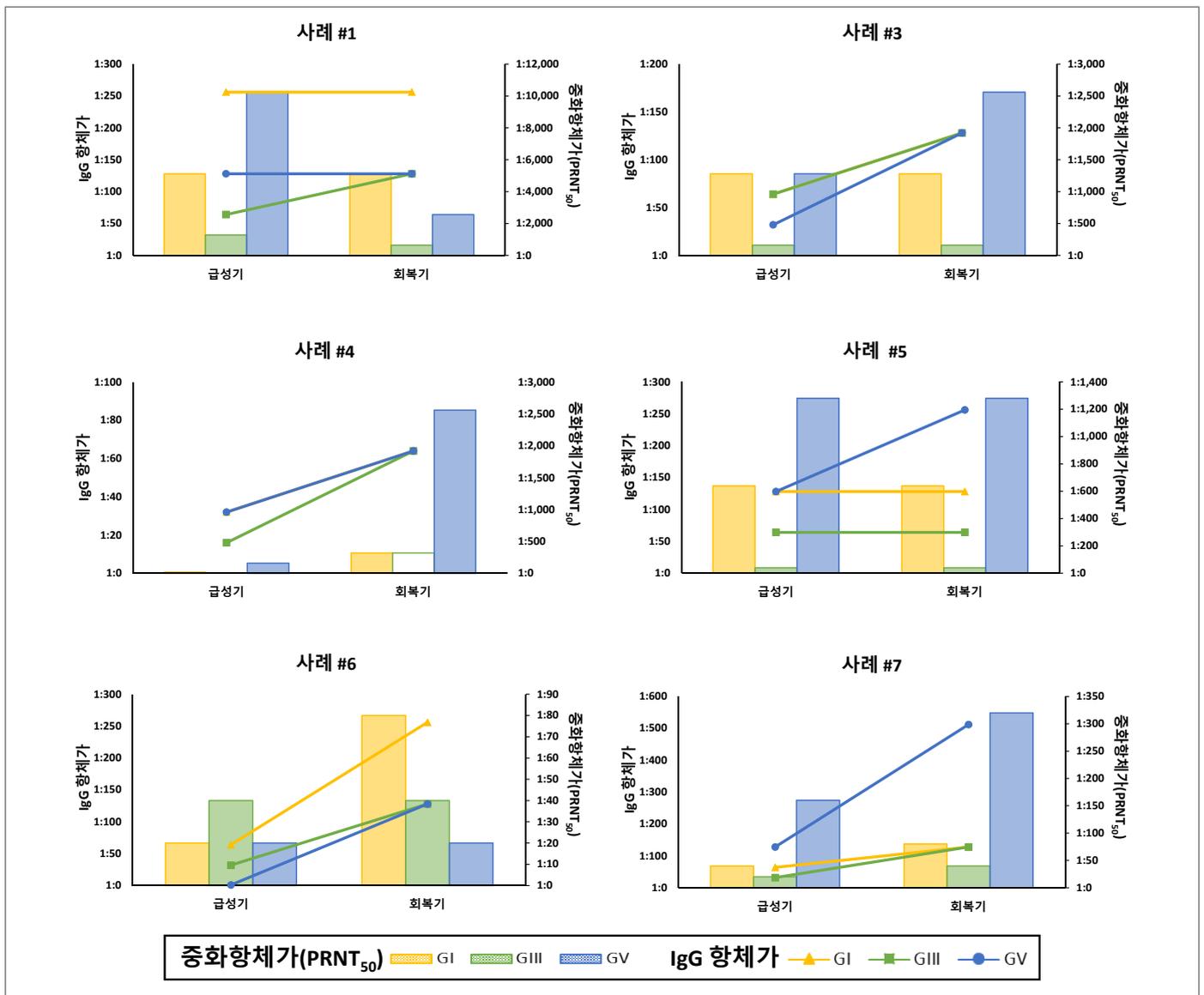


그림 2. 일본뇌염 바이러스 유전형별 IgG 및 중화항체가 변화

않았으며, 나머지 사례에서는 1:10~1:80의 중화항체가를 보였다. 웨스트나일 바이러스 중화항체가 검출된 검체들은 일본뇌염 바이러스 중화항체가 1:40 이상인 검체였다. 일본뇌염 바이러스와 웨스트나일 바이러스의 IgG와 중화항체가를 비율로 비교하였을 때, 웨스트나일 바이러스에 비하여 일본뇌염 바이러스의 IgG 항체가는 2~128배, 중화항체가는 2~320배까지 차이를 보였다(표 2). 보고된 문헌[18,19]에 근거하여 사례에서 측정된 웨스트나일 바이러스 중화항체는 같은 혈청군에 속하는 일본뇌염 바이러스와의 혈청학적

교차반응으로 검출된 항체로, 웨스트나일열 음성으로 판정하였다.

표 1. 일본뇌염 환자 혈청을 이용한 유전형별 중화항체가 비교

사례	발병 후 검체 채취일	중화항체가 비율(PRNT ₅₀)			추정 일본뇌염 바이러스 유전형
		GV/GI	GV/GIII	GI/GIII	
#1	15	2	8	4	추정 불가
	35	0.5	4	8	
#3	6	1	8	8	GV
	18	2	16	8	
#4	5	8	160	20	GV
	16	8	8	1	
#5	0	2	32	16	GV
	9	2	32	16	
#6	0	1	0.5	0.5	GI
	14	0.25	0.5	2	
#7	18	4	8	2	GV
	40	4	8	2	

표 2. 일본뇌염 및 웨스트나일열 IgG와 중화항체가 비교

사례	발병 후 검체 채취일	일본뇌염 바이러스(GIII)/WNV 항체가 비율	
		IgG 항체가	중화항체가(PRNT ₅₀)
#1	15	4	16
	35	8	16
#3	6	64	160
	18	128	160
#4	5	16	1*
	16	64	320
#5	0	64	2
	9	4	4
#6	0	32	40
	14	8	40
#7	18	2	20
	40	2	4

* 일본뇌염 및 웨스트나일 바이러스 중화항체가 모두 1:10 미만

맺는 말

국내 일본뇌염 의심 사례에서 일본뇌염 바이러스의 유전자가 2015년 1건, 2018년 2건의 뇌척수액에서 검출되었다[20,21]. 이러한 결과는 일본뇌염 의심 사례로부터 민감한 검사법인 유전자 검출검사를 위해서는 증상 발현 즉시 검체채취가 이루어지는 것이 중요하다고 하겠으나 유전자 검출검사는 혈중에 바이러스 유지기간(viremia)이 짧고 바이러스의 증식량이 낮기 때문에 검사법의 민감도는 높으나 유전자 미검출 사례가 대부분이다[12]. 그렇지만 급성기 뇌척수액은 혈액에 비해 유전자 검출 가능성이 높고 검출되는 IgM은 일본뇌염 바이러스에 대한 특이도가 95% 이상이기 때문에 일본뇌염 진단검사에 있어 중요한 검체이다. 정확한 진단을 위한 항체 역가 상승을 확인하기 위해서는 회복기의 혈청으로 항체검사를 하여야 하며, 회복기 혈청은 급성기 혈청 채취일 기준 14일 이후에 채취하는 것이 권고되고 있다. 중화항체검사는 다른 항체검사에 비해 노동집약적이고 시간도 오래 걸리지만 다른 플라비바이러스와의 교차반응을 확인할 수 있는 최적의 감별검사법이므로 보다 효율적인 검사법 개발이 필요하다고 하겠다.

국내에서 웨스트나일열 환자는 해외 유입사례를 제외하고 현재까지 보고된 사례는 없다. 그러나 일본뇌염 항체 검출검사 수행 시 웨스트나일 바이러스 등의 플라비바이러스와 교차반응이 일어나기 때문에 일본뇌염 항체가 검출된 사례에 대해서는 증상이 유사한 웨스트나일 바이러스에 대한 감별진단이 필요하다.

일본뇌염 바이러스의 표피단백질은 감염 시 중화항체를 형성하는데 중요한 역할을 하며, 각 유전형의 표피단백질의 상동성은 GI과 GIII는 89.7%, GIII와 GV는 79.3% 정도이다. 일본뇌염 바이러스는 단일 혈청형이기 때문에 모든 유전형의 중화항체가 교차반응을 보이지만, 백신 접종한 쥐, 돼지, 말을 이용한 일본뇌염 바이러스 유전형별 방어능 실험에서 GI, GIII, GV의 중화항체가 차이가 있는 것이 보고되었다. 일본과 베트남에서 일본뇌염 바이러스 유전형 GV의 유입 여부를 조사하고자 일본뇌염 바이러스 유전형별 중화항체를 비교하였다[14-17]. 보고된 연구 결과들을 종합할 때

본 보고서에서 조사한 일본뇌염 양성 사례 6건에서 감염된 일본뇌염 바이러스 유전형은 GI과 GV로 추정되며 이러한 결과는 국내 서식 모기에서 검출되는 일본뇌염 바이러스 유전형과 일치된 결과라고 하겠다. 일본뇌염 환자의 감염된 일본뇌염 바이러스의 유전형을 중화항체가로 추정하는 것은 백신접종이나 과거 불현성 감염에 의한 항체와 구분되어야 하므로 활용에 한계점이 없는 것은 아니다. 따라서 최근 감염에 의한 항체 형성 여부를 확인할 수 있는 추가 실험법의 확립이 필요하며, 일본뇌염 확진자를 대상으로 유전형별 항체가에 대한 추가검사를 추진할 계획이다.

① 이전에 알려진 내용은?

일본뇌염은 가을철에 집중적으로 환자가 발생하고 있으며, 진단검사는 뇌척수액과 혈청을 이용한 유전자와 항체 검출검사를 수행하고 있다. 국내 모기에서 검출되는 일본뇌염 바이러스의 유전형은 GI과 GV이다.

② 새로이 알게 된 내용은?

일본뇌염 양성 사례 중 웨스트나일열에 대한 감별진단 결과, 웨스트나일열은 음성이었으며, 일본뇌염 환자를 대상으로 유전형별 중화항체가와 항체전환(Serocomversion) 결과를 이용하여 감염된 일본뇌염 바이러스의 유전형을 GI과 GV로 추정하였다.

③ 시사점은?

일본뇌염 진단검사에 있어서 의심 증상 발생 즉시 채취한 급성기 검체(뇌척수액, 혈청)와 회복기 혈청의 확보가 중요하다. 감염된 일본뇌염 바이러스의 유전형 규명은 백신 접종력, 항체 지속력 등의 축적된 역학자료와 통합분석으로 유전형간 교차방어 정도를 이해하는데 활용 가능할 것이다.

참고문헌

1. Vaughn DW, Hoke CH Jr. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev.* 1992;14:197-221.
2. Zheng Y, Li M, Whang H, Liang. Japanese encephalitis and Japanese encephalitis virus in mainland China. *Review in Medical*

- Virology. 2012;;22(5):301–322.
3. Campbell GL, Hills SL, Fischer M. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2011;89(10):766–774, 774A–774E.
 4. Im JH, Kim TS, Chung MH, Baek JH, Kwon HY, Lee JS. Current Status and a perspective of Mosquito–Borne Diseases in the Republic of Korea. *Vector–Borne and Zoonotic Diseases*. 2021;21(2):69–77.
 5. Sanborn MA, Wuertz KM, Kim HC, Yang Y, Li T, Pollett SD, Jarman RG, Berry IM, Klein TA, Hang J. Identification of Japanese Encephalitis virus Genotype V and Other Mosquito–borne Viruses in Camp Humphreys, Republic of Korea, using Metagenomic Analysis. *bioRxiv*. 2021; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.15.435489>
 6. Turtle L and Solomon T. Japanese encephalitis—the prospects for new treatments. *Nature Reviews* 2018.
 7. Solomon T. Recent advances in Japanese encephalitis. *Journal Neurovirology*. 2003;9:274–283.
 8. Wang H, Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Therapeutics and clinical Risk Management* 2015;11:435–448.
 9. 질병관리청. 감염병포털(<http://www.kdca.go.kr/npt/>).
 10. Mathur A, Kumar R, Sharma S, Kulshreshtha R, Kumar A, Caturvedi UC. Rapid diagnosis of Japanese encephalitis by immunofluorescent examination of cerebrospinal fluid. *Indian Journal of Medical Research*. 1990;91:1–4.
 11. Desai A, Shankar SK, Ravi V, Chandramuki A, Devi–Gouie M. Japanese encephalitis virus antigen in the brain and its topographical distribution. *Acta neuropathologica*. 1995;89:368–37.
 12. World Health Organ. *Manual for the Laboratory Diagnosis of Japanese Encephalitis virus Infection*. 2007.
 13. Auerswald H, Ruget AS, Ladreyt H, In S, ao S, Sorn S Tum S, Duong V, Dussart P, Cappelle J, Chevalier V. Serological Evidence for Japanese Encephalitis and West Nile virus Infections in Domestic Birds in Cambodia. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:15.
 14. Kang BK, Hwang JM, Moon H, Han SY, Kim J, Yang DK, Park BK, Song D. Comparison of the antigenic relationship between Japanese encephalitis virus genotypes 1 and 3. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2016;5:26–30.
 15. Cao L, Fu S, Gao X, Li M, Cui S, Li X, Cao Y, Lei W, He Y, Wang H, Yan J, Gao J, Lian G. Low Protective Efficacy of the Current Japanese Encephalitis Vaccine against the Emerging Genotype 5 Japanese Encephalitis virus. *PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*. 2016;10(5):E000466.
 16. Maeki T, Tajima S, Kyaw AK, Matusmoto F, Miura K, Yamashita A, Yoshikawa A, Negishi K, Noguchi Y, Tadoboro K, Abe K, Taruya J, Koh J, Ito H, Ikegaya A, Abe F, Wada M, Nishigata T, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Morita K, Lim CK, Saijo M. Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain With Those against Genotype I and III strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016. *Japanese Journal of infectious Diseases*. 2018;71:360–364.
 17. Nguyen TTT, Tajima S, Ikeda M, Nguyen TT, Le TTH, Pham HTT, Pham DQ, Le MTQ, Maeki T, Taniguchi S, Kato F, Moi ML, orita K, Lim CK, Saijo M, Hasebe F. Neutralization Potency of Sera From Vietnamese Patients With Japanese Encephalitis (JE) against Genotype I and V JE Viruses. *Japanese Journal of infectious Diseases*. 2019;72:115–117.
 18. Maeki T, Tajima S, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Lim CK, Saijo M. Analysis of cross–reactivity between flaviviruses with sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019;(25):786–790.
 19. Gulati BR, Singha H, Singh BK, Virmani N, Khurana SK, Singh RK. Serosurveillance of Japanese encephalitis virus infection among equines in India. *Journal of Veterinary Science*. 2011;112(4):341–345.
 20. Woo JH, Jeong YE, Jo JE, Shim SM, Ryou JS, Kim KC, Lee WJ, Lee JY. Genetic Characterization of Japanese Encephalitis virus Genotype 5 Isolated from Patient, South Korea, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2020;26(5):1002–1006.
 21. 이혁진, 이은주, 최우영, 한명국. 2018년 국내 일본뇌염 실험실 검사 현황. *주간 건강과 질병*. 2019;12(33):1260–1266.

Abstract

Laboratory-based diagnosis results of Japanese encephalitis in the Republic of Korea

Ye-Ji Lee, Jin-Sook Wang, Hae Ji Kang, Deog-young Lee, Myung-Guk Han

Division of Viral Diseases, Bureau of infectious Diseases Diagnosis Control, Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA)

Japanese encephalitis (JE) is a vector-borne zoonotic disease caused by the Japanese encephalitis virus (JEV). The virus belongs to genus *Flavivirus*, Family *Flaviviridae*, and classified into five (I-V) genotypes according to the nucleotide sequence of the envelope protein. Because of low JE viral titer and rapid production of neutralizing antibodies, serological tests are commonly used for diagnostic tests. But Serological cross reactivity of *flavivirus* make difficult to diagnosis of JE. This report considered the types of samples for diagnostic tests and the timing of sample collections based on the antibody testing results. In addition, JE confirmed case was estimated infected genotype and for differential diagnosis of West Nile fever, cross-reactivity was confirmed. The analysis was conducted on Japanese encephalitis patients confirmed in 2020. Virus detection test (PCR test) was negative in all samples. We confirmed IgM positive using enzyme-linked immunosorbent assay in the acute phase of cerebrospinal fluid. In the indirect immunofluorescence assay test, the IgG antibody titers increased more than four times in the convalescent sera compared to the acute sera or were maintained as high as 1:256 or more. Neutralizing antibody titers in the PRNT were elevated or maintained in the convalescent sera compared to the acute stage in all sera. West Nile fever antibodies showed lower antibody titers than JE, and all were determined to be West Nile fever negative. On the results, the genotypes of JEV were estimated to be GI and GV with neutralizing antibodies.

Keywords: Japanese encephalitis, Japanese encephalitis virus, Genotypes, Neutralizing antibody, Confirmation test

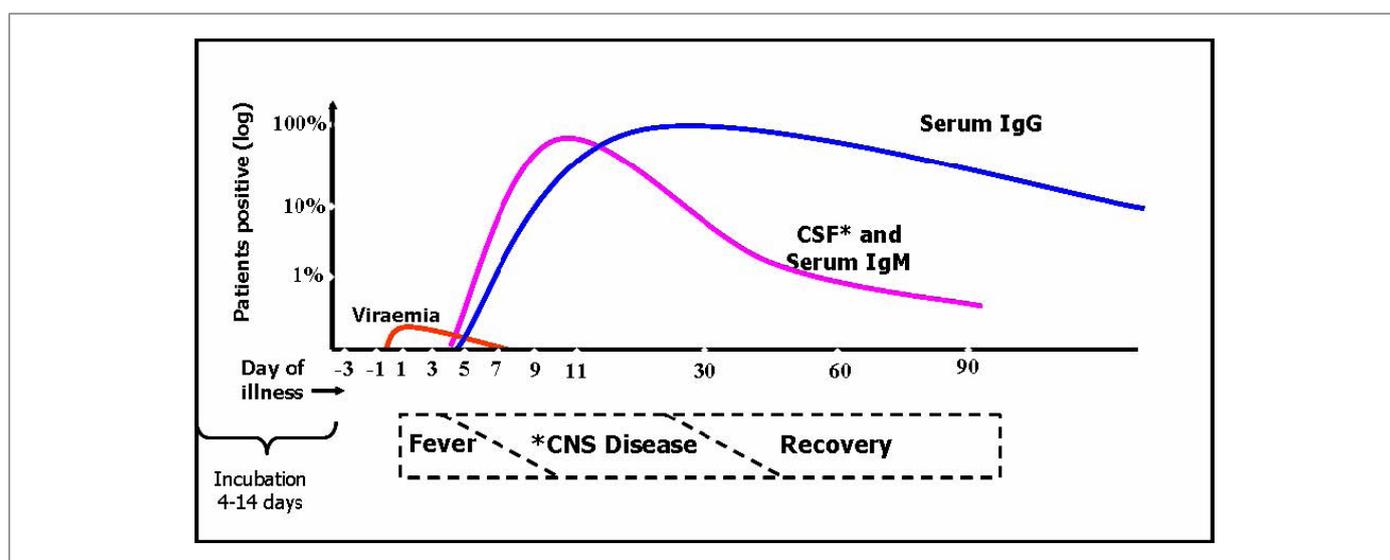


Figure 1. Schematic antibody response in Japanese encephalitis infection [12]

* CSF, Cerebrospinal fluid; CNS, Central nervous system

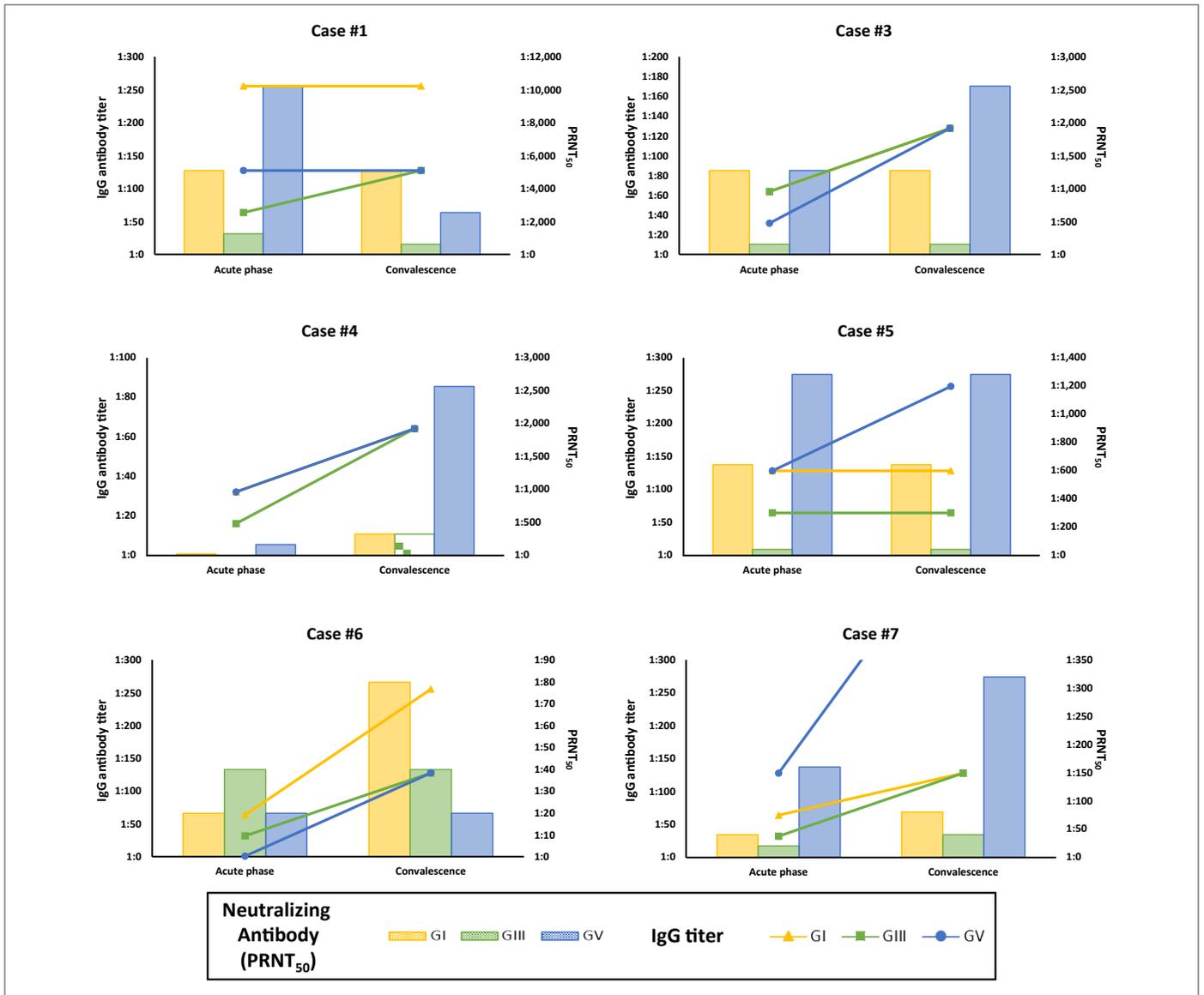


Figure 2. Changes in IgG and neutralizing antibody titer by genotypes of Japanese encephalitis virus (JEV)

Table 1. Comparison of neutralizing antibody titer by Japanese encephalitis virus (JEV) genotypes from Japanese encephalitis (JE) cases

Case No.	Day after onset	Neutralizing Antibody titer (PRNT ₅₀)			Predicted JEV Genotype
		GV/GI	GV/GIII	GI/GIII	
#1	15	2	8	4	Unpredictable
	21	1	8	8	
	35	0.5	4	8	
#3	6	1	8	8	GV
	18	2	16	8	
#4	5	8	160	20	GV
	16	8	8	1	
#5	0	2	32	16	GV
	9	2	32	16	
#6	0	1	0.5	0.5	GI
	14	0.25	0.5	2	
#7	18	4	8	2	GV
	40	4	8	2	

* PRNT, Plaque reduction neutralization test

Table 2. Ratio of IgG and neutralizing antibody titers of Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV)

Case No.	Day after onset	IgG		PRNT ₅₀	
		JEV(GIII)/WNV	JEV(GIII)/WNV	JEV(GIII)/WNV	JEV(GIII)/WNV
#1	15	4		16	
	35	8		16	
#3	6	64		160	
	18	128		160	
#4	5	16		1*	
	16	64		320	
#5	0	64		2	
	9	4		4	
#6	0	32		40	
	14	8		40	
#7	18	2		20	
	40	2		4	

* Neutralizing antibody titers of JEV, WNV are under 1:10