

Sequencing and Molecular Characterization of the Genome of Echovirus 30 Isolated from a Korean Aseptic Meningitis Patient

JongIm Kim¹ and KyoungAh Baek^{2*}

¹Department of Nursing, Woosong Information College, Daejeon; ²Chungcheongnam-Do Institute of Health and Environmental Research, Daejeon, Korea

Echovirus 30 is one of the distinct serotypes of enteroviruses and commonly isolated agent causing sporadic to large outbreaks with aseptic meningitis in many regions over the world. Recently, an outbreak of echovirus 30 associated with aseptic meningitis occurred in Korea in 2008. In order to analyze echovirus 30 in Korea, the virus was isolated from cerebrospinal fluid samples of a male patient with aseptic meningitis and its genome sequence was determined. The sequence of Korean echovirus 30 isolate was compared with those of reference strains (Bastianni, FDJS03-84, zhejiang-17-03, 14916net87). At the nucleotide level, the P1 region (84.8~89.0%) had the highest identity value; at the amino acid level, the P3 region (97.0~98.5%) showed the highest value. When the cleavage sites were compared, most sites were identical except those between VP1 and 2A; the Bastianni stain had TT/GA, whereas the other four strains contained NT/GA. The China strains (FDJS03-84 and zhejiang-17-03) were grouped together and the other strains were distinct from each branch in the phylogenetic tree based on the complete genome sequences.

Key Words: Echovirus 30, Sequence analysis, RT-PCR, Phylogenetic tree

서 론

에코바이러스 30형은 분류학적으로 Picornaviridae과의 장바이러스(Enterovirus)속에 속하며, 27~30 nm 크기의 외막을 갖지 않는 정이십면체의 바이러스이다. 현재까지 장바이러스에는 80여종 이상의 혈청형이 존재한다. 이것들은 다시 유연관계에 따라 A~D 그룹으로 나뉘고, 이 중 에코바이러스 30형은 B 그룹에 속한다 (1~3).

에코바이러스 30형을 포함하는 장바이러스는 분변-구강 경로를 통하여 사람에게 전파된다. 임상증상은 감기 등의 가벼운 증상부터 심각한 마비까지 매우 다양한데, 대표적인 증상은 무균성수막염, 수족구병, 포진성구협염

등이다. 유행은 주로 하절기에 발생하며, 주요 감염 연령층은 영·유아이다 (4, 5). 에코바이러스 30형은 무균성수막염의 대유행을 일으키는 주요 혈청형의 하나로써, 국내에서는 1997년과 2008년에 크게 유행하였다 (6, 7).

장바이러스의 게놈은 약 7.2~7.5 kb 크기의 단일 가닥으로 된 양성(positive sense) RNA를 유전물질로 가지고 있다. 하나의 open reading frame (ORF)과 5' 및 3' 말단에 단백질로 발현되지 않는 non-coding region (NCR)으로 구성되어 있는데, ORF는 전체 유전자의 약 90%를 차지한다 (8). ORF로부터 만들어지는 polyprotein은 바이러스의 단백질 분해효소에 의해서 여러 개의 작은 단백질로 나누어진다. 하나의 polyprotein은 P1, P2, P3로 구분되는데, P1 부분은 바이러스의 캡시드 단백질의 구성요소인 VP4, VP2, VP3, VP1을 순서대로 암호화 하고 있다. P2 부분은 2A^{pro} 단백질 분해효소와 현재까지 기능이 정확하게 알려지지 않은 단백질을 암호화하고 있으며, P3 부분은 VPg와 3C^{pro} 단백질 분해효소 및 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)가 암호화 되어 있다. VPg는 primer로

Received: September 21, 2011/ Revised: October 31, 2011

Accepted: November 8, 2011

*Corresponding author: KyoungAh Baek, Chungcheongnam-Do Institute of Health and Environmental Research, 44-1 Gayang2-dong, Dong-gu, Daejeon, 300-801, Korea.
Phone: +82-42-620-1637, Fax: +82-42-620-1649
e-mail: micbaek@korea.kr

서 3'에 작용하여, 음성가닥(negative sense strand)의 게놈 형성에 관여한다 (9).

현재까지 국내에서 유행하는 장바이러스 중 전체 염기서열이 분석되어 있는 것은 엔테로바이러스 71형, 에코바이러스 5형, 에코바이러스 18형 등 몇몇 혈청형에 불과하다 (10, 11). 또한 장바이러스는 동일 혈청형 내에서도 염기서열의 변이가 많이 일어난다고 알려져 있지만, 국내 분리주와 원형주와의 유전자 염기서열의 비교는 거의 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 국내에서 분리된 에코바이러스 30형에 대한 전체 염기서열을 분석하고, 원형주를 포함한 참조주들과 비교함으로써 국내 유행 에코바이러스 30형에 대한 유전적 차이를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스의 분리 및 동정

바이러스는 2008년 순천향대학교 천안병원 소아과에 무균성수막염으로 내원한 7세 남아의 뇌척수액으로부터 분리하였다. Buffalo green monkey kidney 세포를 사용하여 바이러스를 증식하였는데, Dulbecco's modified eagle medium (JBI, Daegu, Korea)에 0.01% penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 56°C에서 30분간 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS, JBI)을 5%의 농도로 첨가하여 37°C CO₂ 항온배양기에서 배양하였다. 24 well plate에 세포를 2×10^4 cells/well로 24시간 단층배양 후, 밀도가 약 70% 정도로 되었을 때, phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 뇌척수액 100 µl를 2개의 well에 이중으로 접종하였다. 약 2시간 정도 세포에 바이러스를 흡착시키고, 2%의 FBS가 포함된 배양액을 추가한 후 일주일 정도 배양하여 위상차현미경(IX70-S8F2, Olympus, Tokyo, Japan)에서 세포병변 효과를 확인하였다. 바이러스의 혈청형은 VP1 부분의 염기서열을 대상으로 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 수행하였을 때 가장 높은 상동성을 보이는 혈청형인 에코바이러스 30형으로 동정하였다 (3).

RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA 추출은 Viral RNA Purification kit (Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 추출장비인 MagExtractor (Toyobo)에서 이루어졌다. Magnetic bead에 결합된 RNA는 diethylpyro-

carbonate가 포함된 증류수 50 µl에 녹여 cDNA 합성을 위한 RNA 주형으로 사용하였다. cDNA 합성은 추출된 RNA를 주형으로 10 mM dNTP (Bioneer, Daejeon, Korea) 4 µl, 5 × RTase 완충용액(Invitrogen) 4 µl, MMLV RNA Reverse Transcriptase (Invitrogen) 200 U, Oligo-dT₍₁₅₎ (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 1 µl, RNA 5 µl에 최종 부피가 20 µl가 되도록 증류수를 첨가한 후, 20°C에서 10분, 37°C에서 90분, 95°C에서 5분간 Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)에서 반응시켰다.

5' 말단의 염기서열 결정

바이러스 게놈의 5' 말단에 대한 염기서열 분석을 위해서 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Kit (Invitrogen)를 이용하였다. 합성된 cDNA 5' 말단에 TdT tailing 반응을 수행하였고, 추가된 염기서열 부분에 대하여 AUAP primer (5'-ggccacgcgtcgactagtag-3')를 sense primer로 이용하고, Ent-R (Table 1)을 anti-sense primer로 사용하여 kit에 제시된 조건에 따라 PCR을 실시하였다. 그 후 바이러스에 특이적인 primers를 제작하여 nested PCR을 수행하였다.

PCR 및 염기서열 결정

5' 말단을 제외한 나머지 부분의 염기서열을 결정하기 위하여, GenBank 데이터베이스에 등록되어 있는 동일 혈청형의 염기서열을 바탕으로 전체 게놈에 대한 부분적인 primers를 제작하고(Table 1) PCR을 수행하였다. 제작된 primer sets들은 공통적으로 다음의 과정을 거쳐 PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 10 mM의 dNTP (Bioneer) 6 µl, 10X Taq DNA polymerase buffer (Bioneer) 5 µl, 10 pM의 sense와 anti-sense primer를 각각 1 µl씩 첨가하고, Taq DNA polymerase (Bioneer) 2 U, cDNA 5 µl를 첨가하였다. 그 후 증류수를 이용하여 최종 부피가 50 µl가 되도록 한 후 94°C에서 5분간 초기 변성과정을 거치고, 다시 94°C에서 45초, 54°C에서 45초, 72°C에서 90초의 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 7분 동안 Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems)에서 반응하였다. PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제과정을 수행하였고, 회수된 DNA를 주형으로 1 pM의 sense와 anti-sense primer를 각각의 염기서열 결정에 이용하였다. ABI PRISM

Table 1. Specific primer sets for PCR and sequencing of Echovirus 30

Primer set		Sequence	Position	Region
1	Ent-F	5'-AAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	161-181	5'NCR
	Ent-R	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	596-577	5'NCR
2	457-F	5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'	457-475	5'NCR
	1431-R	5'-CACTGAACTCCATTGCCTGAC-3'	1431-1411	VP2
3	1313-F	5'-CCACCAAGGATGTCTGCTCG-3'	1313-1332	VP2
	2473-R	5'-CCTTCGGGGTCATTTTGGTAT-3'	2473-2453	VP1
4	2343-F	5'-ACGCCACCAGATATACCTACAACA-3'	2343-2366	VP3
	3479-R	5'-GTGCGCTGTGGTGGTACTAACTAA-3'	3479-3456	2A
5	3260-F	5'-TGATGTGCAAGGCGTGACC-3'	3260-3278	VP1
	4439-R	5'-ACGGCATTTGGACTTGAAGTGA-3'	4439-4417	2C
6	4245-F	5'-CTATTGGAGAGTCAGATTGCTACC-3'	4245-4268	2C
	5382-R	5'-AGGTTGGCACTTTGGATTTTG-3'	5382-5361	3B
7	5155-F	5'-TGGACAGTGAGGCAGTTAGAGAAT-3'	5155-5178	3A
	6463-R	5'-CCTTTGGCCACTTTCTCTGC-3'	6463-6444	3D
8	6225-F	5'-ACAGAGCCCATGAACTTGAG-3'	6225-6246	3D
	7195-R	5'-ACGTGGTCTTGAGTGTTTTATAGGA-3'	7172-7195	3D
9	7009-F	5'-TGATAATGACACCGGCTGATAAAG-3'	7009-7032	3D
	3'NCR-R	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCC-3'	7465-7445	3'NCR

Dye terminator (Applied Biosystems)를 사용하여 96℃ 10초, 50℃ 5초, 60℃에서 4분 동안 25회 반복하였다. 반응 후 산물은 3 M sodium acetate (pH 5.8)와 에탄올로 침전한 후 ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA) 프로그램에 포함되어 있는 Seqman을 이용하여 contig를 구성하였다.

원형주와의 염기서열 비교 및 계통 분석

결정된 에코바이러스 30형의 염기서열은 여러 가지 프로그램들을 이용하여 비교하였다. 대상은 1958년 미국에서 분리된 Bastianni (Accession no. AF311938) 원형주와 비교되어 있는 3개의 참조주, 즉 중국에서 1984년에 분리된 FDJS03-84 (Accession no. AY948442)주, 2003년에 분리된 zhejiang-17-03 (Accession no. DQ246620)주, 1987년 네덜란드에서 분리된 14916net87 (Accession no. DQ534205)주를 이용하였다 (12~14). 먼저 분석된 염기서열은 Lasergene (DNASTAR)에 포함된 EditSeq을 이용하여 아미노산 서열로 변환되었다. 추론된 아미노산 서열은 각각의 cleavage

site에 따라 나누었는데, 즉 P1, P2, P3 부분으로 나누어진 염기서열과 아미노산 서열은 MegAlign (DNASTAR)을 이용하여 상동성을 비교하였다. 추가적으로 Clustal X 2.1 (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany)를 이용하여 다중정렬을 수행하고, 정렬된 자료는 MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tempe, AZ, USA) 프로그램을 이용하여 계통도를 작성하였다 (15, 16).

결과 및 고찰

일반적으로 RNA 바이러스들은 돌연변이가 빈번하게 발생하여 변종 바이러스의 출현 가능성이 높고, 특히 장 바이러스는 환경에서 오랫동안 생존 가능하여 외부 환경의 영향으로 인한 새로운 돌연변이체가 출현할 수도 있다 (17). 또한 폴리오바이러스에 대한 백신주와 다른 장 바이러스의 유전자 재조합으로 인한 새로운 바이러스의 출현 가능성이 제기되고 있다 (18, 19). 그에 따라 국내에서 주로 유행하는 장바이러스들에 대한 전체 염기서열을

결정하고 이를 보고하는 것은 앞으로 신·변종 바이러스의 출현에 대한 대비로써 매우 중요한 의미를 갖는다. 그러나 현재까지 국내에서 유행하고 있는 장바이러스 혈청형 중 전체 염기서열이 분석되어 보고된 것은 엔테로바이러스 71형, 에코바이러스 5형과 18형에 불과한 실정이다 (10, 11). 에코바이러스 30형은 다른 장바이러스들에 비해 상대적으로 유행 빈도가 높는데, 2001년 대만, 2003년

과 2004년 미국과 중국, 2004년과 2006년에는 일본 등 세계 여러 나라에서 유행이 보고되어 있고 (20~22), 국내에서도 1997년과 2008년에 크게 유행하였다 (6, 7). 이에 본 연구에서는 무균성수막염 증상의 7세 남아에서 추출한 뇌척수액으로부터 에코바이러스 30형을 분리하여 전체 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록하였고(Accession no. JN704615), 보고되어 있는 외국의 참조주들과 비교하였다. 이 혈청형의 원형주는 1958년 무균성수막염 환자의 뇌척수액으로 처음 분리된 Bastianni 주이고 (12), 그 외에 GenBank 데이터베이스에 중국과 대만 그리고 네덜란드에서 분리된 에코바이러스 30형의 전체 염기서열이 보고되어 있다 (23~25). 우리나라 에코바이러스 30형의 전체 게놈의 염기서열은 7,432개의 염기로 구성되었고, 7,445개의 염기로 구성된 Bastianni 주와 13개 차이를 보였다. 분석에 이용된 모든 에코바이러스 30형들은 공통적으로 2,194개의 아미노산으로 구성되어 있었다(Table 2). 전체 게놈을 5'NCR, P1, P2, P3, 3'NCR로 나누어 국내 분리주와 상동성을 비교하였다. 전체 염기서열에 대한 비교에서 83.3~83.9%의 상동성을 나타내었고, 세부적으로 5'NCR은 84.8~88.7%, P1 부분은 84.8~89.0%, P2 부분은 81.0~82.7%, P3 부분은 78.7~83.2%, 3'NCR은 83.7~86.8%의 상동성을 나타내었다. 아미노산 서열에 대한 비교에서 P1 부분은 96.3~98.8%, P2 부분은 95.3~96.9%, P3 부분은 97.0~98.5%의 상동성을 보였다(Table 3). 장바이러스를 포함하는 RNA 바이러스들은 동일 혈청형 안에서 유전자 변이가 존재한다 (26). 복제과정에서의 오류로 인한 염기서열의 변이가 동일 혈청형 안에서도 여러 부위 발견되며, 구조단백질 부위의 변이는 동일 혈청형 내에서 항원성의 변이를 일으킨다. 일반적으로 장바이러스의 경우 동

Table 2. Genome components of Korean Echovirus 30 isolate

Region	Nucleotide sequence			Amino acid sequence		
	Start	End	Length	Start	End	Length
5'NCR	1	744	744	-	-	-
Polyprotein	745	7,329	6,585	1	2,194	2,194
P1	745	3,324	2,580	1	860	860
P2	3,325	5,058	1,734	861	1,438	578
P3	5,059	7,326	2,268	1,439	2,194	756
VP4	745	951	207	1	69	69
VP2	952	1,734	783	70	330	261
VP3	1,735	2,448	714	331	568	238
VP1	2,449	3,324	876	569	860	292
2A	3,325	3,774	450	861	1,010	150
2B	3,775	4,071	297	1,011	1,109	99
2C	4,072	5,058	987	1,110	1,438	329
3A	5,059	5,325	267	1,439	1,527	89
3B	5,326	5,391	66	1,528	1,549	22
3C	5,392	5,940	549	1,550	1,732	183
3D	5,941	7,326	1,386	1,733	2,194	462
3'NCR	7,327	7,432	106	-	-	-

Table 3. The percentage of identities in nucleotide and amino acid sequence between the Korean Echovirus 30 and Bastianni strain

Strain		Complete	5'NCR	P1	P2	P3	3'NCR
Bastianni	Nucleotide	83.9	84.8	84.8	82.7	83.2	86.8
	Amino Acid	-	-	96.3	96.7	98.5	-
14916net87	Nucleotide	83.7	88.7	89.0	81.2	78.7	83.7
	Amino Acid	-	-	98.8	96.5	97.1	-
FDJS03-84	Nucleotide	83.3	87.6	87.1	81.8	79.3	86.4
	Amino Acid	-	-	97.2	95.3	97.0	-
zhejiang-17-03	Nucleotide	83.6	87.8	87.0	81.0	79.1	85.4
	Amino Acid	-	-	97.9	96.9	97.2	-

일 혈청형 내의 염기서열 변이는 NCR이나 비구조단백질을 암호화하는 부위가 구조단백질을 암호화하는 부위보다 낮은 비율의 변이를 보인다 (27, 28). 그러나 이번 결과에서는 구조단백질인 P1이 비구조단백질인 P2와 P3에

비해 높은 상동성을 보여 염기서열의 변이가 영역에 관계없이 일어나고 있는 것으로 확인되었다. 국내 분리주와 3개의 참조주와의 cleavage site를 비교한 결과, 원형주인 Bastianni 주의 VP1/2A 부분은 TT/GA이고, 국내 분리주

Table 4. Predicted N-terminal cleavage sites of Korean Echovirus 30 and reference strains

		Kor-ECV30	Bastianni	14916net87	FDJS03-84	zhejiang-17-03
P1	VP4	–	–	–	–	–
	VP2	LN/SP	LN/SP	LN/SP	LN/SP	LN/SP
	VP3	HQ/GL	HQ/GL	HQ/GL	HQ/GL	HQ/GL
	VP1	YQ/ND	YQ/ND	YQ/ND	YQ/ND	YQ/ND
P2	2A	NT/GA	TT/GA	NT/GV	NT/GV	NT/GV
	2B	EQ/GV	EQ/GV	EQ/GV	EQ/GV	EQ/GV
	2C	RQ/NN	RQ/NN	RQ/NN	RQ/NN	RQ/NN
	3A	FQ/GP	FQ/GP	FQ/GP	FQ/GP	FQ/GP
P3	3B	FQ/GA	FQ/GA	FQ/GA	FQ/GA	FQ/GA
	3C	VQ/GP	VQ/GP	VQ/GP	VQ/GP	VQ/GP
	3D	EQ/GE	EQ/GE	EQ/GE	EQ/GE	EQ/GE

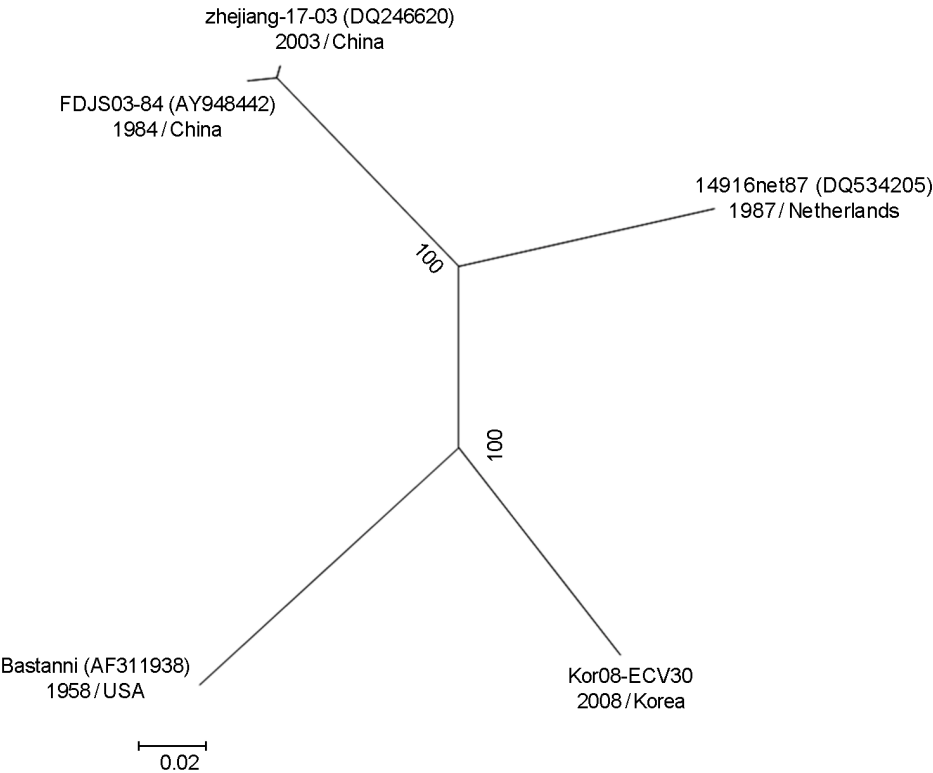


Figure 1. Phylogenetic analysis based on the complete genome sequence of Korean echovirus 30 and reference strains. Nucleotide sequences were analyzed using the neighbor-joining method.

를 포함한 나머지 참조주들은 NT/GA로 구성되어 있었다 (Table 4). VP1/2A 부분은 보고된 장바이러스의 cleavage site에서 가장 빈번하게 나타나는 변이 부분이다 (10). 또한 보고되어 있는 에코바이러스 30형의 4개의 분리주를 포함하여 계통 분석을 실시한 결과, 중국의 분리주들은 98.8%의 상동성을 보이며 같은 클러스터를 형성하고 있었지만, 나머지는 14.1~19.2%의 높은 유전적 변이를 보이며 독립적인 가지를 형성하고 있었다(Fig. 1). 본 연구에서는 국내 장바이러스의 주요 유행 혈청형인 에코바이러스 30형을 대상으로 전체 계통의 염기서열을 밝히고, 이들을 보고되어 있는 참조주들과 비교하였다. 국내의 장바이러스 유행이 증가함에도 불구하고 국내에서 유행하고 있는 장바이러스에 대한 유전정보는 매우 빈약하다. 그러므로 장바이러스에 대한 역학조사와 더불어 이러한 유전학적 데이터를 축적하여 공유하는 것은 매우 중요한 일이라 할 수 있다.

Acknowledgement

We thank Dr. Park JoonSoo and Choi YoungJin for the specimen used for virus isolation.

참 고 문 헌

- Huttunen P, Santti J, Pulli T, Hyypä T. The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *J Gen Virol* 1996;77:715-25.
- Mayo MA, Pringle CR. Virus taxonomy. *J Gen Virol* 1998; 79:649-57.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999;73:1941-8.
- Kok PW, Leeuwenburg J, Tukei P, van Wezel AL, Kapsenberg JG, van Steenis G, *et al.* Serological and virological assessment of oral and inactivated poliovirus vaccines in a rural population in Kenya. *Bull World Health Organ* 1992;70:93-103.
- Yerly S, Gervais A, Simonet V, Caflisch M, Perrin L, Wunderli W. Rapid and sensitive detection of enteroviruses in specimens from patients with aseptic meningitis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:199-201.
- Baek K, Yeo S, Lee B, Park K, Song J, Yu J, *et al.* Epidemics of enterovirus infection in Chungnam Korea, 2008 and 2009. *Virology* 2011;8:297.
- Jee YM, Cheon DS, Choi WY, Ahn JB, Kim KS, Chung YS, *et al.* Updates on enterovirus surveillance in Korea. *Inf Chemotherapy* 2004;36:294-303.
- Racaniello VR, Baltimore D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4887-91.
- Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357-65.
- Park K, Song J, Baek K, Lee C, Kim D, Cho S, *et al.* Genetic diversity of a Korean echovirus 5 isolate and response of the strain to five antiviral drugs. *Virology* 2011;8:79.
- Park K, Yeo S, Baek K, Cheon D, Choi Y, Park J, *et al.* Molecular characterization and antiviral activity test of common drugs against echovirus 18 isolated in Korea. *Virology* 2011;8:516.
- Lindberg AM, Andersson P, Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J Gen Virol* 2003;84:1223-35.
- Paananen A, Savolainen-Kopra C, Kaijalainen S, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M. Genetic and phenotypic diversity of echovirus 30 strains and pathogenesis of type 1 diabetes. *J Med Virol* 2007;79:945-55.
- Zhao YN, Perlman DS, Park S, Jiang RJ, Chen L, Chen Y, *et al.* FDJS03 isolates causing an outbreak of aseptic meningitis in China that evolved from a distinct Echovirus 30 lineage imported from countries of the Commonwealth of Independent States. *J Clin Microbiol* 2006;44:4142-8.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4: 406-25.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22: 4673-80.
- Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4171-5.
- Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, *et al.* Natural genetic exchanges between vaccine

- and wild poliovirus strains in humans. *J Virol* 2000;74:8434-43.
- 19) Santti J, Hyypiä T, Kinnunen L, Salminen M. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol* 1999;73:8741-9.
- 20) Wang HY, Xu AQ, Zhu Z, Li Y, Ji F, Zhang Y, *et al.* The genetic characterization and molecular evolution of echovirus 30 during outbreaks of aseptic meningitis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2006;27:793-7.
- 21) Wang JR, Tsai HP, Huang SW, Kuo PH, Kiang D, Liu CC. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J Clin Microbiol* 2002;40:4439-44.
- 22) Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, Chen L, Perlin DS. Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis* 2005;11:562-7.
- 23) Chen GW, Huang JH, Lo YL, Tsao KC, Chang SC. Mosaic genome structure of echovirus type 30 that circulated in Taiwan in 2001. *Arch Virol* 2007;152:1807-17.
- 24) Paananen A, Savolainen-Kopra C, Kaijalainen S, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M. Genetic and phenotypic diversity of echovirus 30 strains and pathogenesis of type 1 diabetes. *J Med Virol* 2007;79:945-55.
- 25) Zhao YN, Perlin DS, Park S, Jiang RJ, Chen L, Chen Y, *et al.* FDJS03 isolates causing an outbreak of aseptic meningitis in China that evolved from a distinct Echovirus 30 lineage imported from countries of the Commonwealth of Independent States. *J Clin Microbiol* 2006;44:4142-8.
- 26) Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, *et al.* Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:202-27.
- 27) Kinnunen L, Pöyry T, Hovi T. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:49-61.
- 28) Diedrich S, Driesel G, Schreier E. Sequence comparison of echovirus type 30 isolates to other enteroviruses in the 5' noncoding region. *J Med Virol* 1995;46:148-52.
-