



원숭이두창바이러스의 분리 배양과 전장유전체 정보 분석

이민지, 김진원, 최치환, 신화철, 최명민, 이상은, 이화중, 정윤석*

질병관리청 감염병진단분석국 고위험병원체분석과

초 록

엠폍스(원숭이두창)는 서아프리카와 중앙아프리카 지역의 풍토병으로 알려져 왔으나, 2022년 5월부터 유럽, 북미 등 비풍토병 지역에 환자가 발생하고 전세계적으로 확산되었다. 이에 질병관리청은 엠폍스의 국내 유입과 환자 발생에 대비하기 위하여 이전에 개발된 유전자검출검사법을 재검증하고 전국적인 진단검사체계를 구축·운영하였다. 이를 통해 2022년 6월, 유럽을 방문한 내국인의 검체에서 원숭이두창바이러스 특이 유전자를 검출하여 국내 첫 엠폍스 환자의 발생을 확인하였다. 또한, 첫 환자의 검체에서 원숭이두창바이러스를 분리·배양하여 원인 병원체를 확보하고, 전자현미경을 통한 바이러스의 형태학적 특성(mulberry-shape)을 확인하였으며 차세대염기서열 분석을 통하여 전장유전체 정보를 분석하였다. 전장유전체 분석 결과, 국내 첫 환자의 원숭이두창바이러스는 최근 유행하고 있는 서아프리카 계통의 클레이드Ⅱb 리니지 B.1.1에 속함을 확인하였다. 이러한 엠폍스의 유행 상황에서 바이러스의 특성 및 병원성 등을 규명하기 위해서는 바이러스의 확보 및 유전정보의 분석이 지속적으로 필요하다. 또한 이렇게 확보된 바이러스와 유전정보는 향후 엠폍스에 대한 진단제, 백신 및 치료제의 개발에도 유용하게 활용할 수 있을 것으로 보인다.

주요 검색어: 엠폍스; 원숭이두창바이러스; 병원체; 전장유전체 정보

서 론

엠폍스는 인수공통감염병으로 원숭이두창바이러스(*Monkeypox virus*, MPXV)에 의해 유발된다. 사람에서의 MPXV 감염은 1970년 처음으로 확인된 이후, 아프리카 지역에서 산발적으로 유행하였고, 2022년 5월부터 비풍토병 지역에 확산되면서 유럽과 미국을 포함한 총 92개국에서 확진자 84,000명 이상이 보고되었으며, 아시아에서는 19개국(인도, 싱가포르, 일본, 태국, 필리핀, 대만, 한국, 중국[홍콩 포

함], 베트남, 스리랑카, 인도네시아, 중동 8개국)에서 확진자가 발생하였다(2023년 2월 15일, 미국질병통제예방센터[US Center for Disease Control and Prevention, CDC] 발표 기준). MPXV는 콩고-바신 계통과 서아프리카 계통으로 나뉘는데 2022년 전세계에 유행한 엠폍스의 원숭이두창바이러스는 서아프리카 계통이다. 이전까지 서아프리카 계통 바이러스는 콩고-바신 계통 바이러스에 비해 감염성과 치명률이 낮은 것으로 알려졌으며, 엠폍스는 일반적으로 기초감염재생산지수(basic reproduction number, R_0)가 1보다 낮은 것으로 평가

Received March 17, 2023 Accepted March 21, 2023

*Corresponding author: 정윤석, Tel: +82-43-719-8270, E-mail: rollstone93@korea.kr

Copyright © Korea Disease Control and Prevention Agency



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



KDCA
Korea Disease Control and Prevention Agency

핵심 요약

① 이전에 알려진 내용은?

엠펙스(원숭이두창)는 2022년 5월부터 유럽과 북미 등에서 유행이 지속되고 있다. 국내에서는 엠펙스를 법정감염병 제 2급 및 검역 감염병으로 지정하였고, 실시간유전자증폭검사법을 활용한 실험실 진단검사를 통하여 2022년 6월 22일, 국내 첫 환자 발생을 확인하였다.

② 새로이 알게 된 내용은?

국내 첫 엠펙스 환자의 검체로부터 분리한 바이러스는 2022년 이후 전세계에 유행하고 있는 서아프리카 계통 바이러스인 클레이드 IIb의 리니지 B.1.1에 속함을 확인하였다.

③ 시사점은?

유행하고 있는 엠펙스의 원숭이두창바이러스 특성 및 변이 분석을 위해 바이러스의 분리배양 및 유전체 정보를 지속적으로 확보하는 것이 필요하다.

되었다. 그러나 2022년 엠펙스의 경우 남성 간 성관계를 갖는 집단에서는 R_0 가 1보다 크다는 보고가 있다[1]. 또한, 2022년 유행 엠펙스의 경우, 일부 환자에서 기존에 알려진 엠펙스 임상증상과 다소 상이한 경우가 보고되고 있다[2,3]. 이러한 2022년 엠펙스에서 나타나는 상이한 특성과 관련된 원인은 바이러스의 유전정보 및 특성 분석을 통해 파악이 가능할 것으로 판단된다. 한편 감염병 위기 상황에 대한 실험실 대응방안을 마련하기 위하여 원인 병원체를 확보하고 이에 대한 유전체 정보를 비롯한 특성 분석이 필요하다. 이에 질병관리청에서는 국내 첫 엠펙스 환자의 검체로부터 바이러스를 분리·배양하여 원인 병원체를 확보하였고, 전자현미경 관찰 및 전장유전체정보 분석을 통하여 분리된 MPXV의 특성을 분석하였다.

방 법

세계보건기구(World Health Organization), CDC에서 발

표한 자료와 질병관리청에서 출간한 지침, 보도자료 및 관련 논문들을 활용하였다.

질병관리청 고위험병원체분석과에서는 자체 개발한 실시간유전자증폭검사(real-time polymerase chain reaction [PCR])를 이용한 유전자검출검사를 수행하여 국내 엠펙스 첫 환자를 확인하였고, 환자의 검체를 Vero E6 세포에 접종하여 MPXV를 분리·배양하였다. 분리 배양된 MPXV를 전자현미경(Libra120; Carl Zeiss)을 통해 관찰하여, 폭스 바이러스의 형태학적 특징인 ‘mulberry-shape’을 확인하였으며, 차세대염기서열분석법(Illumina MiSeq System; Illumina)을 통하여 전장유전자염기서열을 확보하였고 이로써 MPXV임을 확인하였다.

결 과

1. 실시간유전자증폭검사를 이용한 국내 첫 엠펙스 환자 확인

엠펙스의 임상 증상은 발진을 유발하는 다른 감염병의 증상과 유사하므로 임상 증상만으로 엠펙스를 구별하기 어렵기 때문에 정확한 진단을 위해서는 실험실 진단검사가 필요하다. 또한 2022년 엠펙스의 경우에는 이전에 알려진 엠펙스의 특징적인 발진이 일부 환자에게서 나타나지 않는 경우가 있다. 국내 첫 환자의 경우에도 엠펙스의 특징적인 발진 없이 생식기에 병변이 관찰되었으며, 역학적 연관성으로 엠펙스 의사환자로 분류되어 진단검사를 실시하였다[2-4]. 진단검사를 위해서 피부병변액과 가피, 구인두도말, 혈액이 검체로 채취되었으며, 검체로부터 핵산을 추출하여 실시간유전자증폭검사를 실시한 결과, MPXV 특이 유전자(F3L)가 증폭 및 검출되어 엠펙스 환자로 판정되었다(그림 1). 또한, 검체에서 추출한 핵산으로부터 MPXV 유전자(ATI, B2R)를 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭한 후 얻은 산물을 염기서열 분석법으로 분석하였다(그림 2). 분석 결과 이들 증폭산물은 MPXV 유

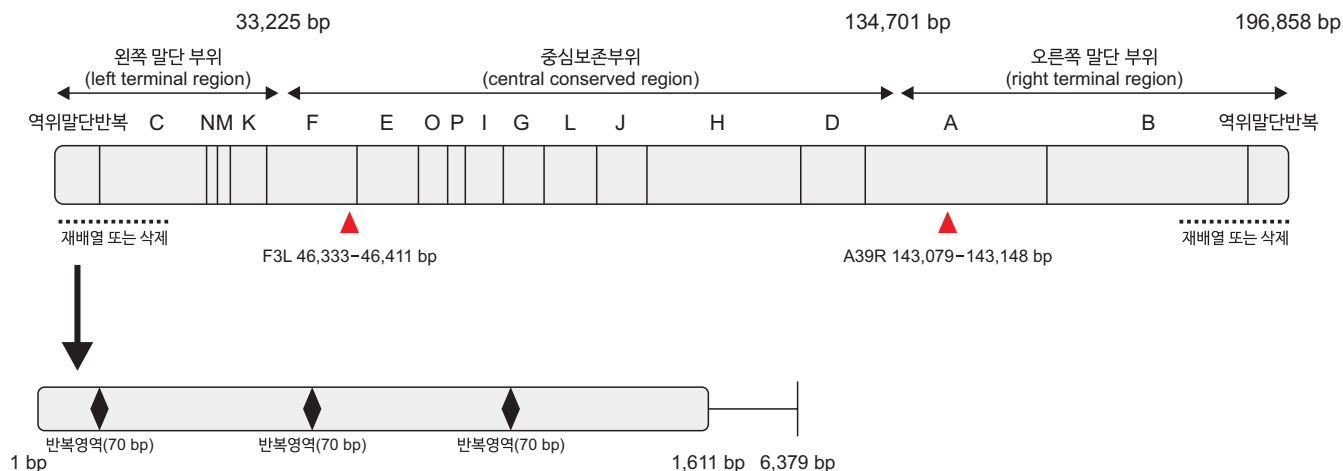


그림 1. MPXV 유전자 구조와 실험실 진단검사 실시간유전자증폭검사의 타겟 부위

MPXV는 이중 가닥의 선형 DNA 게놈(약 197kb 크기)을 갖는 바이러스이며, 엠폭스 실시간유전자증폭검사의 타겟 유전자(F3L, A39R)의 위치를 붉은색 삼각형으로 표시함(중심보존부위, 바이러스 복제와 비리온 조립과 같은 기본 기능을 담당; 양쪽말단부위, 바이러스의 독성과 면역 회피에 관여한다고 알려짐; 역위말단반복, 레플리콘의 안정화 및 복제에 관여하는 유전자 구조). MPXV=Monkeypox virus.

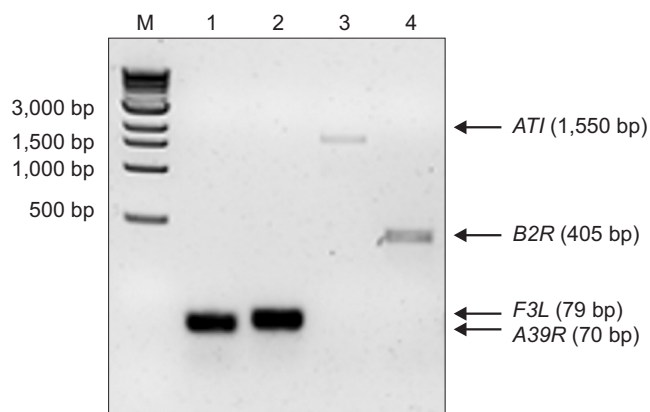


그림 2. MPXV 유전자 증합효소연쇄반응(PCR)

검체에서 추출한 핵산으로부터 증폭된 MPXV 유전자(1.A39R, 2.F3L, 3.ATI, 4.B2R) 증폭산물의 전기영동 결과. MPXV=Monkeypox virus; PCR=polymerase chain reaction.

전자 염기서열과 99% 이상 일치하는 것을 확인하여 환자의 검체에는 MPXV가 존재함을 재확인하였다[3].

2. MPXV 분리 및 배양

질병관리청에서는 국내 첫 엠폭스 환자의 피부병변 검체를 이용한 세포배양을 통해 MPXV를 분리·배양하였다. 바이러스 분리·배양을 위해서 Vero E6 세포주를 사용하였고, 바이러스수송배지(virus transport medium)에 채취된 검체에 세

균 및 진균의 오염을 배제하기 위하여 항생제 카테일(penicillin/streptomycin/nystadine)을 4:1의 비율로 혼합한 후 4℃에서 30분간 반응하고, 반응액과 2% Fetal bovine serum이 포함된 배양액을 3:1의 비율로 혼합하여 세포에 접종하였다. 접종은 1시간 동안 37℃, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 정지함으로써 이루어졌다. 이러한 세포 배양 기술을 이용한 바이러스의 분리·배양 여부는 세포주의 바이러스 감염에 의해 나타나는 세포병변효과(cytopathic effect)를 관찰함으로써 확인할 수 있으며, 국내 첫 엠폭스 환자의 검체를 접종한 Vero E6 세포는 접종 후 약 36시간에 세포병변효과를 보였다(그림 3). 세포병변효과가 관찰된 세포를 반복적으로 동결·해동하여 바이러스를 수확한 후, 단일 플라크(single plaque) 분리배양 실험을 통하여 바이러스를 순수 분리하였다. 순수 분리된 MPXV를 Vero E6 세포에 감염한 후 추출한 핵산을 이용하여 실시간유전자증폭검사를 통해 MPXV 특이 유전자(F3L)를 검출하였고, MPXV 표적 유전자(B2R, ATI)를 PCR을 통해 증폭시켜 얻은 산물을 염기서열 분석한 결과 MPXV 유전자 염기서열(OP022170.1, OP022171.1, OP018607.1)과 99% 이상의 상동이 있음을 확인하였다. 이렇게 분리배양하여 확보한 국내 MPXV를 MPXV-ROK-P1-2022로 명명하였다[5].

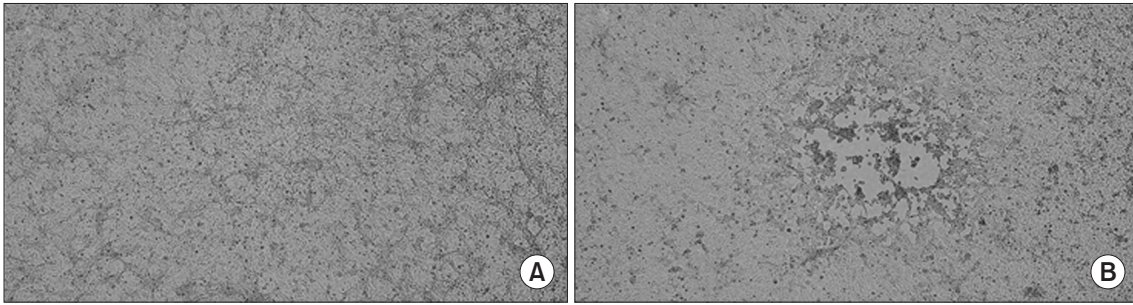


그림 3. MPXV 감염에 의한 세포병변효과

MPXV 감염 36시간 이후, Vero E6 세포에서 세포병변효과 관찰됨. (A)정상세포(10×). (B)바이러스 감염 세포(10×). MPXV=Monkeypox virus.

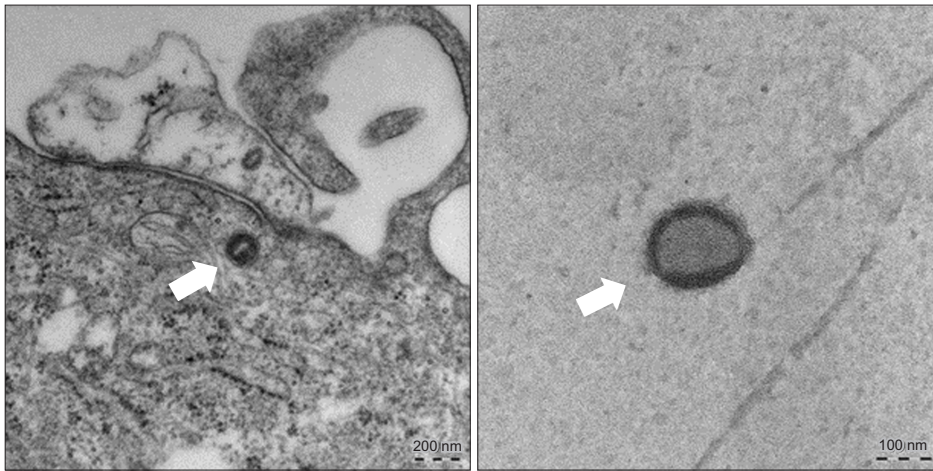


그림 4. MPXV의 전자현미경 관찰

MPXV가 감염된 Vero E6 세포를 파라포름알데히드가 포함된 인산염 완충액으로 고정하고 아세트산우라닐 용액을 이용하여 염색한 후 전자현미경을 통해 관찰한 결과, 딸베리-형태(mulberry-shape)의 바이러스 입자 확인(화살표). MPXV=Monkeypox virus. Reused from the article of Kim et al. (Osong Public Health Res Perspect 2022;13:308-11) [5].

3. 전자현미경을 통한 MPXV의 형태학적 분석

MPXV 입자는 약 200×250 nm 크기의 타원형 또는 벽돌 모양으로, 전자현미경을 통한 형태학적 분석이 가능하다 [6]. 전자현미경을 통한 형태학적 분석법은 고전적인 병원체 동정법으로 진단의 보조적인 수단으로 사용될 수 있으나 형태학적으로 유사한 다른 바이러스들과 감별이 어려워 형태학적 분석만으로 확진하기는 어렵다. MPXV 또한 형태학적으로 다른 올소폭스바이러스와 유사하며, 전자현미경을 통한 바이러스의 관찰은 진단검사의 보조적인 수단으로 사용할 수 있다. 국내 첫 환자 검체에서 분리한 MPXV를 Vero E6 세포에 감염시킨 후 고정용액으로 고정하고 전자현미경을 통해 관찰한 결

과, 폭스바이러스의 전형적인 형태인 딸베리-형태(mulberry-shape)의 바이러스 입자가 확인되었다(그림 4) [5].

4. MPXV 유전체 염기서열 분석

국내 첫 환자 검체로부터 분리한 MPXV를 Illumina MiSeq 장비 기반의 차세대염기서열분석법으로 분석하여 전장유전자염기서열(Genbank accession number: OP204857)을 확보하였다. 생산된 염기서열 리드(paired-end read)는 참조유전체(reference genome, Genbank: NC_063383)와 매핑(mapping) 후 유전체를 완성하는 ‘reference-based assembly’ 방법과 오버랩된 리드를 이용하여 유전체를 분석하는 ‘de novo

assembly' 방법을 통해 확보하였다. 확보된 유전체 염기서열은 197,000 bp의 길이와 397X 시퀀싱 깊이(sequencing depth)를 가지며, 특이적인 유전체 구조변이는 발견되지 않았다.

MPXV는 3개의 클레이드로 나뉘는데, 중앙아프리카 지역에서 유행한 콩고-바신 계열의 바이러스를 클레이드 I, 서아프리카 계열의 바이러스를 클레이드 IIa와 IIb로 분류한다[7]. 2017년부터 최근까지 유행하고 있는 바이러스는 클레이드 IIb에 속하며, 대부분의 사례가 클레이드 IIb의 리니지 B.1로 확인되었으나 2022년 미국 등에서 발생한 몇 건의 사례의 경우, 클레이드 IIa의 리니지 A.2로 확인되었다[6]. 국내 첫 엡폭스 환자 검체에서 분리된 바이러스를 Nextstrain을 이용한 유전체 계통분석결과, 클레이드 IIb의 리니지 B.1.1에 속함을 확인하였고, 이는 2022년 유럽에서 발생한 엡폭스의 MPXV와 최근연 관계에 있음을 확인하였다[8].

논 의

2022년 5월 이후 엡폭스의 이례적인 전세계 유행에 따라 국내에서는 엡폭스를 법정감염병 제2급 및 검역감염병으로 지정하고, 실시간유전자증폭검사법을 활용한 실험실 진단 검사체계를 구축하여 국내 엡폭스 유입·발생 및 확산에 대비하였다. 2022년 6월, 유럽을 방문한 내국인의 피부병변 등에서 MPXV 특이 유전자가 검출되면서 첫 엡폭스 확진자가 발생하였다[3]. 이에 첫 환자의 검체로부터 MPXV를 분리·배양하여 원인 병원체를 확보하고[5], 차세대염기서열 분석법을 통하여 분리된 바이러스의 전장유전체를 분석하였다. 분석결과, 국내 첫 번째 확진자로부터 분리된 MPXV는 최근 유행을 주도하고 있는 서아프리카 계통의 클레이드IIb의 리니지 B.1.1에 속하는 바이러스임을 확인하였다[8]. 방문한 유럽 국가는 2022년 엡폭스 발생이 보고된 국가로, 국내 첫 번째 확진자로부터 분리된 MPXV 또한 유럽국가에서 유행한 엡폭스

의 MPXV와 같은 클레이드에 속하고, 염기서열 간 높은 상동성(99.87-99.99%)을 보임을 확인하였다.

최근 유행하고 있는 클레이드 IIb는 일부 집단에서 사람 간 비교적 높은 감염률, 변이, 적응 등의 측면에서 이전에 풍토병 지역에서 유행하던 바이러스와 구분되는 특징을 나타내는 것으로 보고되고 있어[7], 유행 바이러스의 병원성 및 특성을 정확하게 분석하기 위해 지속적으로 병원체를 확보하고 유전체적 정보를 확보·분석하는 것이 필요하다. 또한 다른 나라에서 발생한 엡폭스의 MPXV 유전체정보를 모니터링하여 국내 발생 엡폭스의 MPXV와 비교·분석함으로써 유전자 변이의 양상을 확인하고, 진단제, 백신 및 치료제 개발을 위한 자료로 활용하기 위해 MPXV의 분리 배양 및 전장유전체 분석이 지속적으로 필요하다.

Declarations

Ethics Statement: Not applicable.

Funding Source: None.

Acknowledgments: None.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions: Conceptualization: YSC, HY, ML. Data curation: ML, JWK, CHC, HS. Formal analysis: ML, CHC, HY. Investigation: ML, JWK, CHC, HS, MMC. Methodology: SEL, MMC. Project administration: HY. Resources: ML, JWK, CHC, HS. Supervision: YSC, HY. Visualization: ML. Writing - original draft: ML, HY. Writing - review & editing: all authors.

References

1. Endo A, Murayama H, Abbott S, et al. Heavy-tailed sex-

- ual contact networks and monkeypox epidemiology in the global outbreak, 2022. *Science* 2022;378:90-4.
2. Lee SY, Park YJ, Lee HM. Government measures against monkeypox. *Public Health Wkly Rep* 2022;15:2410-2417.
 3. Jang YR, Lee M, Shin H, et al. The first case of monkeypox in the Republic of Korea. *J Korean Med Sci* 2022;37:e224.
 4. Korea Disease Control and Prevention Agency, Korean Society for Laboratory Medicine. Guidelines for the laboratory diagnosis of monkeypox. Korea Disease Control and Prevention Agency; 2022. p. 8-10.
 5. Kim JW, Lee M, Shin H, et al. Isolation and identification of monkeypox virus MPXV-ROK-P1-2022 from the first case in the Republic of Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 2022;13:308-11.
 6. Isidro J, Borges V, Pinto M, et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus. *Nat Med* 2022;28:1569-72. Erratum in: *Nat Med* 2022;28:2220-1.
 7. Adnan N, Haq ZU, Malik A, et al. Human monkeypox virus: an updated review. *Medicine (Baltimore)* 2022;101:e30406.
 8. Choi CH, No JS, Kim JW, et al. Complete genome sequence of monkeypox virus strain MPXV-ROK-P1-2022 isolated from the first monkeypox patient in the Republic of Korea. *Microbiol Resour Announc* 2022;11:e0085322.
 9. Shchelkunov SN, Totmenin AV, Safronov PF, et al. Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology* 2002;297:172-94.

Isolation and Whole Genome Analysis of *Monkeypox virus* from a Patient with Mpox

Minji Lee, Jin-Won Kim, Chi-Hwan Choi, Hwachul Shin, Myung-Min Choi, Sang Eun Lee, Hwajung Yi, Yoon-Seok Chung*

Division of High-Risk Pathogens, Bureau of Infections Disease Diagnosis Control,
Korea Disease Control and Prevention Agency, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Monkeypox virus (MPXV), a zoonotic pathogen that causes mpox (monkeypox), was endemic to Africa with sporadic outbreaks. However, since May 2022, outbreaks of mpox have occurred in non-endemic regions, including the USA and Asian countries. Between May and June 2022, the mpox test (developed in 2016 by Korea Disease Control and Prevention Agency) was precisely reevaluated for provision against the import and outbreak of MPXV-2022. Furthermore, on 11 July 2022, we completed the expansion of laboratory capacity for the diagnosis of mpox to 18 regional laboratories through education regarding the mpox test protocol and distribution of test reagents. The first case of mpox in the Republic of Korea was confirmed on 22 June 2022 using the mpox test, and the virus was isolated from the specimens of the first identified patient with mpox for electron microscopic imaging and whole genome analysis. Electron microscopic images revealed that the isolated virus had a mulberry-like appearance, which is the typical morphology of poxviruses. Moreover, whole genome sequencing confirmed that the isolated virus belonged to clade IIb lineage B.1.1 of West African origin, the currently prevalent MPXV. The isolated viruses and their genetic information may be useful not only in understanding the pathogenesis of mpox but also in developing vaccines, therapeutic reagents, and diagnostic tools against it.

Key words: Mpox; Monkeypox virus; Pathogen; Whole genome sequencing

*Corresponding author: Yoon-Seok Chung, Tel: +82-43-719-8270, E-mail: rollstone93@korea.kr

Introduction

Mpox, previously known as monkeypox, is a zoonotic disease caused by the *Monkeypox virus* (MPXV). Since its first identification in humans in 1970, MPXV infections have sporadically occurred in Africa. However, since May 2022, the disease has spread to nonendemic areas, resulting in over 84,000 confirmed cases in 92 countries, including Europe, the

United States, and 19 Asian countries (India, Singapore, Japan, Thailand, the Philippines, Taiwan, the Republic of Korea [ROK], China [including Hong Kong], Vietnam, Sri Lanka, Indonesia, and eight Middle Eastern countries) as of February 15, 2023, according to the US Center for Disease Control and Prevention (CDC). MPXV is divided into two clades: Congo Basin and West African clades. The West African clade is responsible for the global outbreak in 2022.

Key messages

① What is known previously?

Since May 2022, the outbreak and spread of mpox have occurred in non-endemic regions, such as the USA, Europe, and Asian countries. On 22 June 2022, the first case of mpox in the Republic of Korea was confirmed using the mpox test developed by KDCA.

② What new information is presented?

Using whole genome analysis, we elucidated that the MPXV isolated from the first identified patient in the Republic of Korea belonged to clade IIb lineage B.1.1 of West African origin, which is the currently prevalent MPXV.

③ What are implications?

To understand the precise pathogenesis of MPXV-2022, monitoring and analyzing the genetic information of viruses isolated from patients with mpox is necessary.

Previously, the West African clade was known to have lower infection and fatality rates than the Congo Basin clade, and MPXV was generally evaluated to have a basic reproduction number (R_0) lower than 1. However, epidemiological reports revealed that the R_0 for MPXV-2022 is greater than 1 among men who have sex with men [1]. In addition, some cases of mpox outbreaks that occurred after 2022 have shown slightly different clinical symptoms compared to those of mpox outbreaks that occurred before 2022 [2,3]. The cause of these unusual characteristics observed in the post-2022 mpox outbreaks is expected to be determined through an analysis of the viral genetic information and characteristics. To prepare for epidemiological crises, it is necessary to secure the causative agent and conduct genetic and other characteristic analyses. The Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA)

obtained the causative pathogen by culturing the MPXV isolated from specimens from the first Korean patient with mpox and analyzed the characteristics of the isolated MPXV using electron microscopy and whole genome analysis.

Methods

Data released by the World Health Organization and CDC, as well as the guidelines and reports from the KDCA, were utilized in this study.

Division of High-Risk Pathogens in the KDCA performed real-time polymerase chain reaction (PCR) to identify the first confirmed case of mpox in the ROK. Then, the sample from the patient was inoculated into Vero E6 cells for isolation and cultivation of MPXV. The isolated and cultured MPXV had a mulberry-shape, a morphological characteristic of poxvirus, observed using electron microscopy (Libra120; Carl Zeiss). Additionally, the full-length gene sequence was obtained using next-generation sequencing (Illumina MiSeq System; Illumina) technology, which confirmed the presence of MPXV.

Results

1. Confirmation of the first patient with mpox in the Republic of Korea using RT-PCR

Given that the clinical symptoms of mpox are similar to those of other rash-causing infectious diseases, distinguishing mpox by clinical symptoms alone is difficult, and laboratory diagnostic tests are necessary for accurate diagnosis. In addition, in post-2022 outbreaks, some patients do not manifest rashes, a characteristic of mpox. In the first confirmed case in the ROK, lesions without mpox-specific rashes were observed

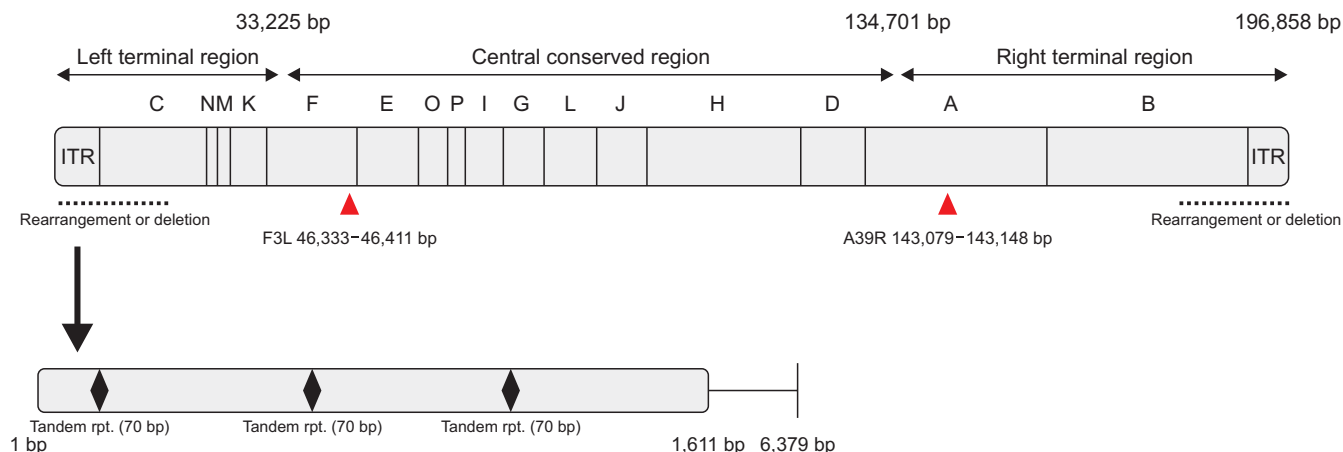


Figure 1. The target regions of the mpox diagnostic test developed by KDCA on the MPXV genome
MPXV has a linear DNA genome (about 197 kbs) of double strand. The diagnostic target regions of the mpox test (real-time PCR) developed by KDCA are shown in red arrows (central conserved region, genome region involved in basic functions such as replication and assembly of virion; terminal regions, genome regions involved in virus virulence and immune evasion; ITR, DNA structure found at the end of some replicons and essential for the stability and replication of the replicon). ITR=inverted terminal repeat; KDCA=Korea Disease Control and Prevention Agency; MPXV=Monkeypox virus; PCR=polymerase chain reaction.

on the genital tract, thereby classifying the patient as a suspected mpox case based on epidemiological relevance [2-4]. Skin lesion fluid, crusts, oropharyngeal smear, and blood specimens were collected for diagnostic testing. Nucleic acids were extracted from the collected specimens, and RT-PCR was performed. With the MPXV-specific gene (F3L) amplified and detected, the patient was confirmed to have mpox (Figure 1). In addition, the MPXV genes (ATI and B2R) were amplified from the PCR products and sequenced (Figure 2). Sequencing revealed that these PCR products matched the MPXV gene sequence by more than 99%, confirming the presence of MPXV in the patient's specimens [3].

2. MPXV isolation and cultivation

The KDCA isolated and cultivated MPXV using the skin lesion fluid specimen from the first patient with mpox in the ROK. To isolate and cultivate the virus, the Vero E6 cell line was utilized, and an antibiotic cocktail (penicillin, streptomycin, and nystatin) at a 4:1 ratio was added to prevent bacterial

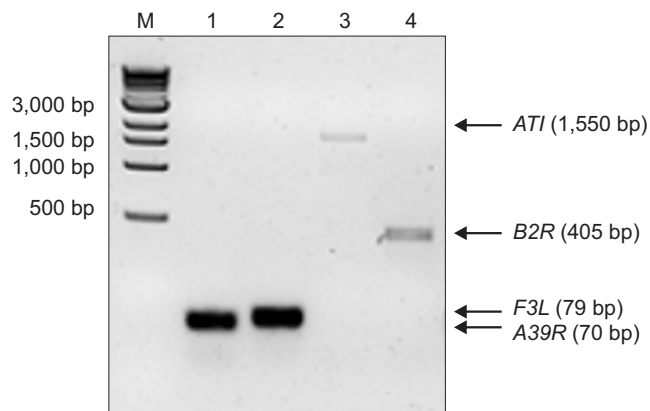


Figure 2. Conventional polymerase chain reaction (cPCR) products of specimen
Agarose gel electrophoresis after cPCR. M, size maker; Lane 1, A39R; lane 2, F3L; lane 3, ATI; lane 4, B2R.

and fungal contamination in the specimens collected from the virus transport medium (VTM). After allowing the contents of the mixture to react for 30 minutes at 4°C, the reaction and culture solutions containing 2% fetal bovine serum were mixed at a ratio of 3:1 and then inoculated into the cells. The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 1 hour. The success of virus isolation and cultivation using this cell culture technology

was confirmed by observing the cytopathic effect (CPE) caused by viral infection. Vero E6 cells inoculated with the specimens from the first Korean patient with mpox showed CPE after approximately 36 hours of inoculation (Figure 3). Viruses were harvested by repeatedly freeze thawing the cells in which CPE was observed. The pure lines of viruses were isolated using single plaque isolation technique. Then, Vero E6 cells were infected with the pure lines of MPXV, and RT-PCR was performed on the infected cells to detect MPXV-specific genes (F3L) using nucleic acids extracted from the patient's specimens. Finally, the PCR products obtained by amplifying MPXV target genes (*B2R*, *ATI*) were sequenced, and the analysis confirmed more than 99% homology with the MPXV gene nucleotide sequence (OP022170.1, OP022171.1, and OP018607.1). This MPXV obtained through isolation and cultivation in the ROK was named MPXV-ROK-P1-2022 [5].

3. Morphological analysis of MPXV using electron microscopy

MPXV particles are oval- or brick-shaped and approximately 200 by 250 nm in size, and electron microscopy can be performed for the morphological analysis of MPXV [6]. Although morphological analysis through electron microscopy is a classical pathogen identification method and can be used

as an auxiliary means of diagnosis, differentiating morphologically similar viruses is difficult, making it difficult to confirm the diagnosis through morphological analysis alone. MPXV is morphologically similar to other orthopox viruses, and electron microscopy can be used as an auxiliary means of diagnostic testing. Vero E6 cells, which were infected with MPXV isolated from the first patient with mpox in the ROK, were fixed with a fixative solution and observed under an electron microscope. Results confirmed the presence of mulberry-shaped virus particles, which are a typical form of poxvirus (Figure 4) [5].

4. MPXV genome sequencing

MPXV isolated from the first Korean patient with mpox was analyzed using next-generation sequencing technology based on the Illumina MiSeq sequencing platform to obtain a full-length gene sequence (Genbank assessment number: OP204857). The resultant paired-end reads were used to obtain the genome sequence using two methods: reference-based and de novo assembly. In reference-based assembly, the paired-end reads were mapped to the reference genome (Genbank: NC_063383) to reconstruct the genome sequence. In de novo assembly, the overlapping paired-end reads were stitched together to complete the genome sequence. The obtained genome sequence had a length of 197,000 bp and a sequencing

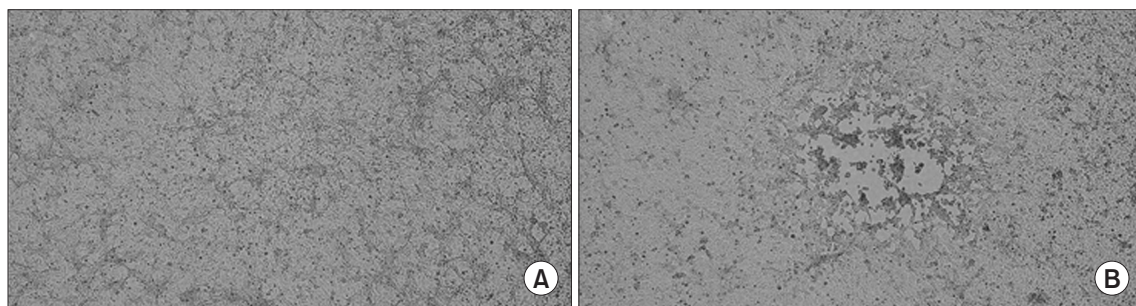


Figure 3. Cytopathic effects in Vero E6 cells infected with MPXV
The cytopathic effects were detected in MPXV-infected Vero E6 cells 36 hours after infection with the specimen of an Mpox patient. (A) Normal (10×). (B) MPXV-infected (10×). MPXV=Monkeypox virus.

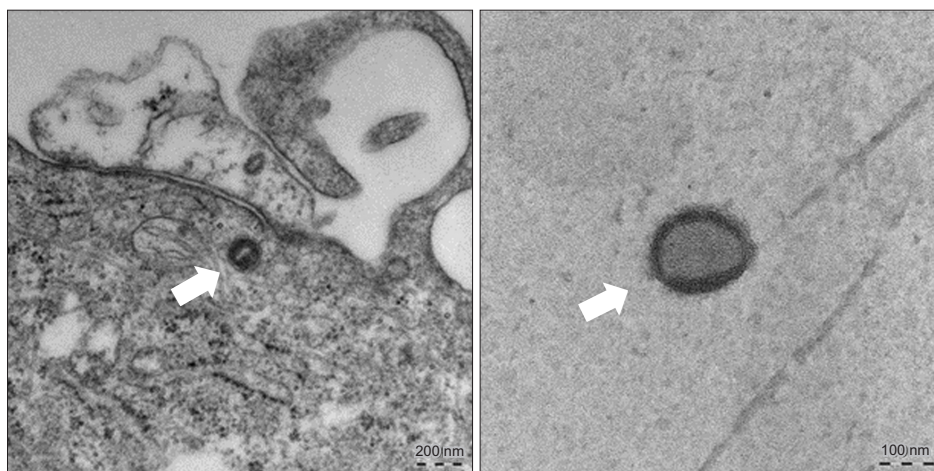


Figure 4. Electron microscopic images of the MPXV isolated from the first patient with mpox

The viral particle of mulberry-shape is indicated in white arrow in the infected cell. In order to observe virus particles, cells were fixed with 0.1M phosphate buffer containing paraformaldehyde, and then fixed samples were stained with uranyl acetate solution. MPXV=Monkeypox virus. Reused from the article of Kim et al. (*Osong Public Health Res Perspect* 2022;13:308-11) [5].

depth of 397X, and no specific genetic structural variations were found.

MPXV is classified into three clades: Congo-Basin strains (Clade I) and West African strains (Clades IIa and IIb) that are prevalent in the central and western regions of Africa, respectively [7]. MPXV prevalent from 2017 until recently is classified as clade IIb, of which most cases have been identified as B.1 lineage of clade IIb, with some cases that occurred in the US in 2022 confirmed as A.2 lineage of clade IIa [6]. Phylogenetic analysis using Nextstrain revealed that the MPXV from the first patient with mpox in the ROK belongs to B.1.1 lineage of clade IIb and confirmed that it is most homologous to the strain of mpox that occurred in Europe in 2022 [8].

Discussion

After the unprecedented global spread of mpox in May 2022, mpox was designated as a statutory infectious disease class 2 in the ROK. To prevent its influx, occurrence, and spread in the ROK, an RT-PCR-based laboratory diagnostic

test system was implemented. In June 2022, the first mpox case was confirmed in a Korean who had returned from a visit to Europe [3]. The causative pathogen was obtained by culturing the MPXV isolated from specimens from the patient with mpox [5], and full-length genome analysis of the isolated strain was performed using next-generation sequencing technology. The analysis revealed that the MPXV isolated from the first confirmed case in the ROK belongs to lineage B.1.1 of clade IIb (West African MPXV) responsible for the current mpox outbreaks [8]. The European country visited was experiencing mpox outbreaks in 2022, and the MPXV isolated from the first confirmed case in the ROK displayed 99.87–99.99% genomic sequence homology with the MPXV causing the outbreaks in the European country, indicating that they belong to the same clade.

The clade IIb, which is currently circulating, is reported to have unique characteristics compared to the previously prevalent MPXV strains in endemic regions, including higher infection rates among certain human populations, mutations, and adaptations [7]. This underscores the importance of

continuously acquiring and analyzing pathogen and genomic information to accurately assess the pathogenicity and characteristics of the epidemic. To identify mutation patterns, it is necessary to monitor MPXV genome information generated in other countries and compare and analyze them with those of the MPXV prevalent in the ROK. Continuous isolation and culturing of MPXV strains and their full-length genome analysis are also needed to generate resources necessary for the development of diagnostic tools, vaccines, and treatments.

Declarations

Ethics Statement: Not applicable.

Funding Source: None.

Acknowledgments: None.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions: Conceptualization: YSC, HY, ML. Data curation: ML, JWK, CHC, HS. Formal analysis: ML, CHC, HY. Investigation: ML, JWK, CHC, HS, MMC. Methodology: SEL, MMC. Project administration: HY. Resources: ML, JWK, CHC, HS. Supervision: YSC, HY. Visualization: ML. Writing – original draft: ML, HY. Writing – review & editing: all authors.

References

1. Endo A, Murayama H, Abbott S, et al. Heavy-tailed sexual contact networks and monkeypox epidemiology in the global outbreak, 2022. *Science* 2022;378:90-4.
2. Lee SY, Park YJ, Lee HM. Government measures against monkeypox. *Public Health Wkly Rep* 2022;15:2410-2417.
3. Jang YR, Lee M, Shin H, et al. The first case of monkeypox in the Republic of Korea. *J Korean Med Sci* 2022;37:e224.
4. Korea Disease Control and Prevention Agency, Korean Society for Laboratory Medicine. Guidelines for the laboratory diagnosis of monkeypox. Korea Disease Control and Prevention Agency; 2022. p. 8-10.
5. Kim JW, Lee M, Shin H, et al. Isolation and identification of monkeypox virus MPXV-ROK-P1-2022 from the first case in the Republic of Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 2022;13:308-11.
6. Isidro J, Borges V, Pinto M, et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus. *Nat Med* 2022;28:1569-72. Erratum in: *Nat Med* 2022;28:2220-1.
7. Adnan N, Haq ZU, Malik A, et al. Human monkeypox virus: an updated review. *Medicine (Baltimore)* 2022;101:e30406.
8. Choi CH, No JS, Kim JW, et al. Complete genome sequence of monkeypox virus strain MPXV-ROK-P1-2022 isolated from the first monkeypox patient in the Republic of Korea. *Microbiol Resour Announc* 2022;11:e0085322.
9. Shchelkunov SN, Totmenin AV, Safronov PF, et al. Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology* 2002;297:172-94.