

Human Norovirus Genogroups Detected from Acute Gastroenteritis Patients in Seoul from May 2013 to April 2015

Heejin Ham*, Seah Oh, Hyunjung Seung, Jungim Jang and Changho Han

*Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Virus Team,
Kyunggido, Korea*

Norovirus is an important cause of acute nonbacterial gastroenteritis in communities worldwide. It was evaluated the prevalence of norovirus infections in patients with acute gastroenteritis occurring in Seoul from May 2013 to April 2015, with regular surveillance. 7.3% (252/3,485) of the fecal specimens were determined to be positive for noroviruses by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR). Norovirus genogroup distribution was 19.1% (48/252) genogroup GI, 71.4% (180/252) genogroup GII, and 9.5% (24/252) genogroup G1+GII respectively. It was most norovirus detection rates from November 2013 to March 2015. And it was rotavirus 0.2% (7/3,485), astrovirus 0.03% (1/3,485), sapovirus 0.03% (1/3,485) and, it was non-detective on adenovirus. Norovirus genotypes identified were nine kinds of genogroup GI (GI-1, GI-2, GI-3, GI-4, GI-6, GI-7, GI-8, GI-12, GI-14) and eight kinds of genogroup GII (GII-2, GII-3, GII-4, GII-5, GII-6, GII-7, GII-14, GII-16, GII-17). The genetic characteristics of norovirus and the epidemiological patterns of a viral pathogen from acute gastroenteritis patients may give potentially effective data for epidemiological studies in Seoul, Korea.

Key Words: Norovirus, GI, GII, RT-PCR, Gastroenteritis outbreak

INTRODUCTION

노로바이러스는 Caliciviridae에 속하는 single stranded RNA를 genome으로 가지는 virus로서 (1) 5개의 genogroup I-V로 나뉘어져 있고, 이들 중 genogroup I, II, IV는 사람에게서 검출되며, genogroup III, V는 소와 생쥐에서 각각 검출된다 (2). 노로바이러스는 세포배양을 할 수 없기 때문에 진단법으로는 전자현미경관찰법, 항체가 조사법, RT-PCR법 등이 있다 (2). 또한, norovirus genogroup I은 14종의 유전자 아형이, genogroup II는 17종이 각각 밝혀져 있고 (3~5), 노로바이러스는 국가적 관리대상으로 1~4군

법정 감염병 이외의 지정 감염병으로 관리되고 있다(보건복지부령 제345호) (6).

노로바이러스는 분변에서 경구로 전파될 뿐 아니라 사람 대 사람의 감염, 오염된 식품이나 물 등을 통해 집단으로 발병하는 대표적인 급성 위장관염의 원인체로 작용하여 우리 생활과 밀접하게 관련이 있을 뿐 아니라 단체생활과도 큰 관련이 있다 (1). 노로바이러스는 환경에 대한 저항성이 커서 약 40일 정도 생존할 수 있고, 염소 소독에 대한 저항성이 비교적 큰 것으로 알려져 있으며, 27 nm 정도로 크기가 작아서, 토양침투가 쉽고, 저온이 유지되는 지하수에서는 장기간 생존이 가능하다 (3, 7). 노로바이러스에 의한 임상증상은 주로 구토와 설사가 빈번히 일어나

Received: June 24, 2015/ Revised: November 9, 2015/ Accepted: November 13, 2015

*Corresponding author: Heejin Ham. Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Virus Team, 30, Janggunmael 3gil, Gwacheon, Kyunggido, 13818, Korea.

Phone: +82-2-968-5094, Fax: +82-2-964-8174, e-mail: hhj3814@seoul.go.kr

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

며 발병 후 1~2일이 지나면 자연치유가 되는데, 증상이 사라진 이후에도 3~14일간 분변에서 바이러스가 검출되는 것이 특징이므로 환자가 증세가 호전된 후에도 바이러스를 전파하는 감염원으로 작용할 수 있어서 집단 발병 시 2차 감염의 위험이 높다 (4). 한편, 이러한 겨울발생 때문에 노로바이러스는 계절적인 뚜렷한 발생경향으로 인해 그 감염증이 'winter vomiting disease'로 불리기도 한다 (4).

본 연구에서는 2013년 5월부터 2015년 4월까지 서울시 관내 식중독으로 신고된 3,485건의 분변 검체를 검사하여 노로바이러스의 유전적 분석을 통해 서울에서 유행하는 유전타입을 조사하고, 국내외 유전형 비교를 통해 상관성을 파악하였다.

MATERIALS AND METHODS

식중독 가검물 전처리

2013년 5월부터 2015년 4월까지 서울시내 각 구 보건소로부터 식중독 의심 분변 가검물 3,485건을 수집하였고, 분변 1 g을 멸균된 0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Sigma, USA) 9 ml에 넣어 4℃, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 하였으며, 바이러스 RNA 추출을 위하여 상층액을 사용하였다.

노로바이러스 RNA 추출

Viral RNA mini kit (QIAgen, Germany)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 검체 140 µl에 AVL buffer (guanidine thiocyanate 함유) 560 µl를 15초간 혼합하여 실온에서 10분 동안 방치하였고, 95~100% 에탄올 560 µl를 넣어 혼합 후 10초간 잘 섞어주었으며, 이 용액 630 µl를 spin column tube에 옮긴 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였고, spin column tube 아래 수집된 용액을 제거 후 위의 과정을 1회 더 반복하였다. 또한 AW1 Buffer (guanidine hydrochloride 함유) 500 µl를 첨가 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였고, spin column tube 하단에 수집된 용액을 제거 후 AW2 Buffer를 500 µl를 첨가 후 13,000 rpm에서 2분 원심분리 하였으며, spin column을 새 spin column tube에 꽂은 후 buffer AVE (sodium azide 함유) 50 µl를 첨가하고 실온에서 1분간 정치한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리, RT-PCR을 위한 주형(template)으로 사용하였다.

노로바이러스 유전자 검출

One step RT-PCR

One step RT-PCR을 위해 추출한 RNA 20 µl을 RT-PCR 진단 Kit (Bioneer, Korea)에 각각 넣은 후 반응액이 완전히 섞이도록 하였다. 유전자 증폭을 위해 Thermal cycler (2720 Thermal cycler, Applied Bio-systems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 47℃에서 40분, 95℃에서 15분 DNA를 변성시키고, 95℃ 30초, 54℃ 30초, 72℃ 45초를 1회로 하여 35회 반응시킨 후, 72℃에서 7분간 연장 반응시켰다. 프라이머는 Kim 등 (8)에 보고된 염기서열을 바탕으로 제작하였다.

Semi-nested PCR

RT-PCR 진단 Kit (Bioneer, Korea)에 제공된 PCR tube에 멸균 증류수를 18 µl씩 넣고 반응이 종료된 1차 RT PCR 산물을 2 µl씩 각각 취하여 완전히 혼합한 후, 95℃에서 DNA를 5분간 변성시키고, 95℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 45초를 1회로 하여 25회를 반응시킨 후 72℃에서 7분간 연장 반응시켰다. PCR 증폭 생성물 5 µl를 1.5% agarose gel의 각 홈에 검체를 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위한 100 bp DNA ladder (Bioneer)를 3.5 µl loading하였고, 30분간 전기영동(MUPID-21 J, Cosmo Bio, Korea)하여 Image analyzer (Vilber Lourmat, France)로 GI는 314 base pair에서, GII는 313 base pair에서 양성을 각각 확인하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

급성 위장관염에서 검출된 노로바이러스 양상

2013년 5월까지 2015년 4월까지 각 구 보건소로부터 의뢰된 서울시내 식중독 의심 검체는 의심 환자를 비롯하여 식품취급자 등 총 3,485건이었고, 노로바이러스가 검출된 검체는 252건(7.3%)으로 나타났다(Table 1). 그 외 rotavirus 7건(0.2%), astrovirus 1건(0.03%), sapovirus 1건(0.03%)으로 각각 나타났으며 adenovirus는 검출되지 않았다. Oh 등 (1)은 2010년 1월부터 2013년 4월까지 서울시내 집단 식중독 환자들 검체들에서 노로바이러스 검출율이 9.77% (438/4,484)라고 보고하였고, Ham 등 (2)은 서울시내 병원의 위장관염 환자 검체들에서 2007년부터 2011년까지 5년 동안 노로바이러스 검출율이 16.6% (1,861/11,202)라고 보고하였으며, Ham 등 (9)은 서울시내 병의

Table 1. Detected noroviruses from patients with acute gastroenteritis between May 2013 and April 2015 in Seoul by periodic surveillance

Y*=Year, M*=Month

Y*	M*	No. tested samples	No. Positive (%)			
			G1	GII	GI+GII	Total
2013	May	124				
	Jun	158				
	Jul	50				
	Aug	73	1			1
	Sep	85				
	Oct	47				
	Nov	147		1		1
	Dec	290		14		14
	Subtotal	974	1	15		16
2014	Jan	59				
	Feb	71	4	8	3	15
	Mar	296		9	1	10
	Apr	119	1			1
	May	63	2			2
	Jun	207	1			1
	Jul	284		1		1
	Aug	268	1			1
	Sep	87		3		3
	Oct	51				
	Nov	174	22	1		23
	Dec	286	8	54	11	73
	Subtotal	1,965	39	76	15	130
2015	Jan	90	1	20		21
	Feb	138	1	42	5	48
	Mar	220	6	25	4	35
	Apr	98	0	2	0	2
	Subtotal	546	8	89	9	106
Total		3,485	48	180	24	252

원의 위장관염 환자 검체들에서 2012년에서 2013년까지 노로바이러스 검출율이 17.9% (302/1,685)라고 보고하였고, Kim 등 (3)은 경기도 관내 병원으로부터 2001년부터 2007년까지 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 검출율이 4.41% (612/13,606)로 보고하였다. 또한, Kim 등

(10)은 부산지역 관내 병원으로부터 2008년부터 2010년까지 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 검출율이 10.4% (426/4,101)로 보고하였고, Kim 등 (5)은 제주 지역 관내 병원으로부터 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 검출률이 2008년 9.2%, 2009년 10.3%,

Table 2. Confirmation results on genotype of detected noroviruses from patients with acute gastroenteritis between May 2013 and April 2015 in Seoul by periodic surveillance

Year	Type Mon.	GI (n=48)													GII (n=180)													GI+GII M*	Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-12	13	14	UN*	M*	1	2	3	4	5	6	7	8-13	14	15	16	17	UN*	M*		
2013	May																												1	
	Jun																													
	Jul																													
	Aug																													
	Sep																													
	Oct																													
	Nov																											1		1
	Dec																											4		14
Subtotal		1													6 1 3													5	16	
2014	Jan																												15	
	Feb																											3		
	Mar																											1		
	Apr																													
	May																													
	Jun																													
	Jul																													
	Aug																													
	Sep																													
	Oct																													
	Nov																											1		
	Dec	2	1	2		2	1								2	8		1	4	1	34	4	11							
Subtotal		2	1	1	26	3	1	1						1	3	2	2	10	2	3	1	10	3	35	8	15	130			
2015	Jan																												2	
	Feb																													
	Mar																													
	Apr																											2		
Subtotal		1	1					2						1	3	1					4	10	1	61	8	2	9	106		
Total	May																												2	
	Jun																													
	Jul																													
	Aug																													
	Sep																													
	Oct																													
	Nov																											2		
	Dec	2	1	2		2	1								2	14	1	3	1	4	1	38	4	11						
	Jan																													
	Feb																													
	Mar																													
	Apr																											2		
Total		3	1	2	26	5	1	1						1	1	4	3	3	2	16	3	10	1	22	4	61	48	10	24	252
%		1.2	0.4	0.8	10.3	2.0	0.4	0.4						0.4	0.4	1.6	1.2	1.2	0.8	6.3	1.2	4.0	0.4	8.7	1.6	24.2	19.0	4.0	9.5	100.0

*UN=unknown, *M=mixed

2010년 12.3%였다고 각각 보고하는 등 노로바이러스 검출률이 각 지역별로, 년도별로 각각 증감이 되풀이됨을 알 수 있었다.

한편, 집단 식중독 사례에서의 조사 결과를 살펴보면, Oh 등 (1)은 2010년 1월부터 2013년 4월까지 서울지역 집단 식중독 461사례 가운데 65사례에서 노로바이러스가 검출되어 전체 식중독 사례 중 14.1% (65/461)이었다고 보고하였고, Ko 등 (4)은 경기도내에서 2005년 1월에 노로바이러스 집단 식중독이 1건, 2006년 12월에도 노로바이러스 집단 식중독이 3건, 2007년에는 1~5월, 11~12월에 걸쳐 16건의 노로바이러스 집단 식중독이 발생하였다고 보고하고 있다.

결과를 월별로 분석해 본 결과 전체적으로는 1월 21건, 2월 63건, 3월 45건, 4월 3건, 5월 2건, 6월 1건, 7월 1건, 8월 2건, 9월 3건, 11월 24건, 그리고 12월 87건으로 각각 나타나, 11월부터 3월까지인 주로 겨울철과 봄철에 많이 발생하는 경향을 나타냈다(Table 1, 2). Oh 등 (1)은 2010년 1월부터 2013년 4월까지 조사에서 매년 1월에서 4월 사이에 노로바이러스가 호발한다고 보고하였고, Ham 등 (2)은 2007년부터 2011년까지 5년 동안 10월에서 4월까지 즉, 가을부터 봄까지 노로바이러스가 유행하다고 보고하였으며, Ham 등 (9)은 2012년에서 2013년까지는 10월에서 3월까지 노로바이러스가 유행한다고 보고하였고, Kim 등 (3)은 2001년부터 2007년까지에서 10월부터 2월까지, Kim 등 (10)은 2008년부터 2010년까지 1월, 3월, 4월 즉, 겨울에서 초봄까지 각각 노로바이러스가 유행함을 보고하는 등 노로바이러스 감염에 의한 위장관염 등이 10월부터 4월까지로 나타난 본 조사와 대체적으로 동일하였다.

노로바이러스의 두 개의 그룹 GI, GII, 그리고 G1+GII에 대한 분포를 각각 살펴보면, GI, GII, 그리고 G1+GII에 대한 분포가 19.1% (48/252), 71.4% (180/252), 9.5% (24/252)로 각각 나타나 대부분이 GII임을 알 수 있었다(Table 2). 검출된 노로바이러스 중 GI의 아형으로는 GI-1의 경우 3건, GI-2 1건, GI-3 2건, GI-4 26건, GI-6 5건, GI-7 1건, GI-8 1건, GI-13 1건, GI-14는 1건, 그리고 GI-other 4건 그리고 GI-mixed 3건 등으로 각각 나타나 GI-4가 GI genogroup 가운데 54.2% (26/48)로 가장 많았고, GII의 아형으로는 GII-2가 3건, GII-3 2건, GII-4 16건, GII-5 3건, GII-6 10건, GII-7 1건, GII-14 22건, GII-16 4건, GII-17 61건, GII-other 48건 그리고 GII-mixed 10건 등으로 각각 나타나 GII-4와 GII-14, GII-17이 10.7% (16/150), 14.7% (22/150), 40.7% (61/150)씩

각각 나타났고, GII-other도 26.7% (48/180)로 나타나 GII-4, GII-14, GII-17 등이 GI genogroup 가운데 가장 많이 나타났다. Oh 등 (1)은 2010년 1월부터 2013년 4월까지 서울시내 집단 식중독 환자들 검체들에서 노로바이러스 GII genogroup이 75.92% (309/438)이었고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 54.05% (167/309)이라고 보고하였고, Ham 등 (2)은 서울시내 병의원의 위장관염 환자 검체들에서 2007년부터 2011년까지 5년 동안 노로바이러스 GII genogroup이 95.5% (1,778/1,861)이었고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 617건으로 가장 많았다고 하였으며, Ham 등 (9)은 서울시내 병의원의 위장관염 환자 검체들에서 2012년에서 2013년까지 노로바이러스 GII genogroup이 94.4% (285/302)이었고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 64.6% (195/302)이라고 보고하였고, Kim 등 (3)은 경기도 관내 병의원 으로부터 2001년부터 2007년까지 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 GI genogroup이 20건, GII genogroup이 233건으로 GII genogroup이 월등히 많았고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 43.22%, GII-17 genotype이 15.38%라고 각각 보고하였다. 또한, Kim 등 (10)은 부산지역 관내 병의원으로부터 2008년부터 2010년까지 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 GII genogroup이 78.2% (272/348)이었고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 49.1%로 가장 많이 검출되었다고 보고하였으며, Kim 등 (5)은 제주지역 관내 병의원으로부터 의뢰된 급성 위장관염 검체에서 노로바이러스 GII genogroup이 88.5% (231/261)이었고, GII 가운데서도 GII-4 genotype이 70.5% (184/231)이라고 각각 보고하였다. 이번 조사 결과 최근까지 가장 많았던 GII-4 genotype (16/252) 보다는 GII-17 genotype (61/252)가 최근 급증하고 있음을 알 수 있었다. 이는 노로바이러스의 유행 양상이 다소 변화한 것으로 보여지며 이에 대한 대책이 이루어져야 할 것으로 보여진다. 또한, GI-4 genotype (26/252)의 증가도 눈에 띄게 나타나 이에 대한 추가 연구들도 이루어져야 할 것으로 보여진다.

REFERENCES

- 1) Oh SA, Park SH, Ham HJ, Seung HJ, Jang JI, Suh SW, *et al.* Molecular characterization of norovirus and rotavirus in outbreaks of acute gastroenteritis in Seoul. *J Bacteriol Virol* 2013; 43:307-16.
- 2) Ham HJ, Oh SA, Kim CK, Jang JI, Jo SJ, Choi SM. Molecular

- characteristics of human noroviruses genogroup I and genogroup II detected in acute gastroenteritis patients in Seoul. *J Environ Health Sci* 2012;38:57-65.
- 3) Kim WH, Yong KC, Park PH, Kim YH, Song CS, Kim KG, *et al.* Genetic analysis of human noroviruses detected from acute gastroenteritis patients in Gyeonggi, Korea. *J of KIHE* 2007;20:11-8.
- 4) Ko EM, Seok WS, Lee TJ, Im EJ, Son SY. Epidemiological characteristics of gastroenteritis outbreaks by norovirus in Gangwondo 2007. *Rep Inst Health Environ* 2008;19:30-40.
- 5) Kim YJ, Lee MG, Kam SK. Characteristics of norovirus occurrence in Jeju. *J Environ Sci International* 2014;23:219-29.
- 6) Jung WY, Eom JH, Kim BJ, Yun MH, Ju IS, Kim CS, *et al.* Investigation of norovirus occurrence and influence of environmental factors in food service institutions of ChungCheong area. *J Fd Hyg Safety* 2010;25:153-61.
- 7) National Institute of Environmental Research: Future Direction of Improvement in Drinking Water Safety, International Seminar on the World Water Day 2008 Manual 2008;125-9.
- 8) Kim SH, Cheon DS, Kim JH, Lee DH, Jheong WH, Heo YJ, *et al.* Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of Norovirus. *J Clin Microbiol* 2005;43:4836-9.
- 9) Ham H, Oh S, Seung H, Jo S. Molecular characteristics of noroviruses genogroup I and genogroup II detected in patients with acute gastroenteritis. *Ann Lab Med* 2015;35:242-5.
- 10) Kim NH, Min SK, Park EH, Park YK, Jin SH, Ryu BS. Study on gastroenteric norovirus genotypes in Busan, Korea, from 2008 to 2010. *Ann Rep of Busan Met Inst Health Environ* 2010;20:9-17.
-