

충주 지역 설사 환아의 Rotavirus G Serotype 분포에 관한 연구

건국대학교 의과대학병원 소아과, ¹충북대학교 수의과대학

심 재 건 · 권 재 봉 · 강 신 영¹

Distribution of Rotavirus G Serotypes in ChungJu Area

Jae Geon Sim, M.D., Jae Bong Kwon, M.D. and Shien Young Kang, Ph.D.¹

Department of Pediatrics, Kon-Kuk University Hospital, Chungju;

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Chongju, Korea

Purpose: It is important to have the epidemiologic data of rotavirus serotypes for the application of polyvalent rotavirus vaccines. Epidemiological studies of rotavirus serotypes in Korea have been reported only in limited areas with small number of cases. Authors tried to investigate the distribution of rotavirus G serotypes in ChungJu area with RT-PCR.

Method: Stool specimens were collected from 202 children with acute diarrheal symptoms, who admitted to or visited Kon-Kuk University Hospital in ChungJu from June 1998 to May 1999. Samples were screened for rotavirus with EIA method (TestPack Rotavirus, Abbott Laboratories) and rotavirus G Serotypes were determined by RT-PCR.

Results: Rotavirus was positive in 46.6%. The incidence of G serotypes was as follows; G1 10%, G2 10%, G3 28%, G4 26%, and G9 20%. There were three cases of multiple serotypes; G1 with G9, G2 with G9, and G4 with G9. Serotype of G8 was not found.

Conclusion: The proportion of G serotypes in ChungJu is much different from previous reports. Serotype of G9 was found which had not been reported in Korean children till now. Long term plans for the investigation of rotavirus serotypes must be needed in wide area. (**J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 3: 41~46**)

Key Words: Rotavirus, Serotype G, VP7

서 론

급성 설사는 매우 주요한 질환으로, 소아에서 호

접수 : 1999년 11월 1일, 승인 : 2000년 2월 18일

책임저자 : 심재건, 380-060, 충청북도 충주시 교현동 620-5
건대부속병원 소아과

Tel: 0441) 845-2501(223), Fax: 0441) 844-4826

E-mail: psychild@kku.edu

흡기 감염 다음으로 발생율이 높은 질환이며, 설사를 유발한다고 알려진 여러 바이러스중에서 특히 rotavirus가 여러 나라, 특히 선진국에서 설사의 주요 원인 바이러스로 알려져 있다. 국내에서도 많은 소아가 rotavirus에 의한 설사로 병원에 입원하여 치료를 받고 있으나, 환자 발생에 비하여 rotavirus 감염에 대한 임상적인 연구는 많이 이루어져 있지 않은 상태이다. 아직까지 우리 나라에서는 소아 연

령 군에서 바이러스성 설사에 대한 연구는 많지 않으며, 특히 rotavirus의 group, serotype 및 이의 분포와 빈도 등은 선진국뿐만 아니라 동남아, 남미, 이집트, 아프리카 등 거의 전세계에서 보고하고 있으나, 국내에서는 제한된 연구만이 보고되어 있다^{1~4)}.

Rotavirus는 double stranded RNA virus로 11개의 genome을 가지고 있으며, 이중 외각의 피막을 구성하는 VP7 과 VP4 단백질이 면역원성과 관계한다고 알려져 있다. VP6 단백질의 항원형에 따라 현재 A에서 G까지 7개의 group(혈청군)으로 분류되고 있으며, A group은 VP7과 VP4에 의하여 각각 G와 P serotype(혈청형)으로 분류하고 있다. VP7에 대한 항체는 혈청형에 특이하며 VP4에 대한 항체는 혈청형간에 교차반응을 한다고 알려졌다⁵⁾.

현재 rotavirus G serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12이 인간에게서 발견되었다고 보고하고 있으며^{6~8)}, 시기적, 지역적인 변화는 있으나 전 세계적으로 G serotype 1, 2, 3, 4가 제일 많은 분포를 차지한다고 알려져 있다^{9~13)}. 현재 여러 나라에서 rotavirus에 대한 immunoprophylaxis에 많은 연구와 투자가 이루어지고 있으며, 여러 가지 rotavirus strain을 이용한 vaccine이 개발되고 있다⁵⁾. 이들 중 이미 제품화되어 임상에서 사용되기 시작한 제품도 있으나, 국내에서 이 vaccine의 임상적 유용성은 아직 알려지지 않은 상태이다. Rotavirus에 대한 vaccine이 적절한 면역 기능을 유발하여 감염을 방어하려면, 여러 가지 serotype에 대한 면역 기능을 한꺼번에 유발시킬 수 있어야 하며, 이는 vaccine이 일정 지역에서만 효과가 있을 가능성을 내포한다. 외국에서 개발된 polyvalent rotavirus vaccine의 임상적인 효용성을 예측하기 위해서는 국내 rotavirus serotype의 분포가 알려져 있어야 하지만 현재까지 우리나라 rotavirus serotypes의 종류와 빈도에 대한 연구는 극히 일부만이 조사되어 있다. 이는 국내에서 polyvalent rotavirus vaccine의 효용성을 적절히 판단할 근거가 매우 부족하다는 것을 의미한다.

본 연구자는 rotavirus serotype epidemiology에 대한 기본 자료를 구축하여, 국내에서 설사를 일으키는 바이러스의 빈도와 소아의 연령 및 계절에 따

른 변화를 조사하고, 국내 실정에 맞는 rotavirus vaccine 선택에 도움이 되는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

대상 및 방법

1998년 6월부터 1999 5월까지 급성 설사를 주소로 건국대학교 의료원 충주병원에 내원 또는 입원한 소아로부터 설사 시작 3일 이내의 대변을 채취하였다. 세균성 설사 또는 항생제 등 설사의 원인이 바이러스가 아니라고 판단되는 경우는 연구 대상에서 제외시켰다.

검체는 보존제를 포함하지 않은 상태로 영하 70도의 냉동고에 보관하였다.

보관된 sample에서 Abbott사의 TestPackRotavirus를 이용하여 rotavirus의 유무를 선별하였다.

1. 대변에서 rotavirus의 mRNA 분리

0.5 ml의 PCR tube에 500 μ l의 Catrimox-14TM RNA Isolation kit RIK2.11 (TAKARA Co.)을 넣고 10 μ l의 stool sample을 더하였다. 실온에서 10분 동안 방치한 후 2분 동안 15,000 g로 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후에 증류수 500 μ l를 첨가하고 잘 섞은 후 2분 동안 15,000 g로 원심 분리하여 세척하였다. 완전히 마르기 전에 증류수를 첨가한 후 -20°C에 보관하였다.

2. Primers

본 실험에 사용된 primers는 Gouvea 등의 연구에 의거하여 제작하였다¹⁴⁾. cDNA는 rotavirus의 capsid glycoprotein인 VP7의 sequence를 이용하여 제작하였으며 (Beg9, End9), 각각의 serotype은 VP7의 mRNA에서 각각의 특이적인 부분을 포함하고 있는 상보적인 sequence를 이용하여 각 serotype에 대한 primer set를 제작하였다(Table 1).

3. RT-PCR amplication

TAKARA One Step RNA PCR kit (AMV)를 사용하여 RT-PCR을 진행시켰다. 준비된 1 μ g RNA에

Table 1. Primer Sets

Primer	Sequence (5'-3')	Position	Strain (type)
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28	Wa (1)
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062-1036	SA11 (3)
RVG9	GGTCACATCATACAATTCT	1062-1044	SA11 (3)
aAT8	GTCACACCATTGTAAATTCTG	178-198	69M (8)
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335	Wa (1)
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411-435	DS (2)
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498	ST3 (4)
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709	P (3)
aFT9	CTAGATGTAACATACTAC	757-776	WI61 (9)

cited from Gouvea V et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol 1990;28(2):276-82.

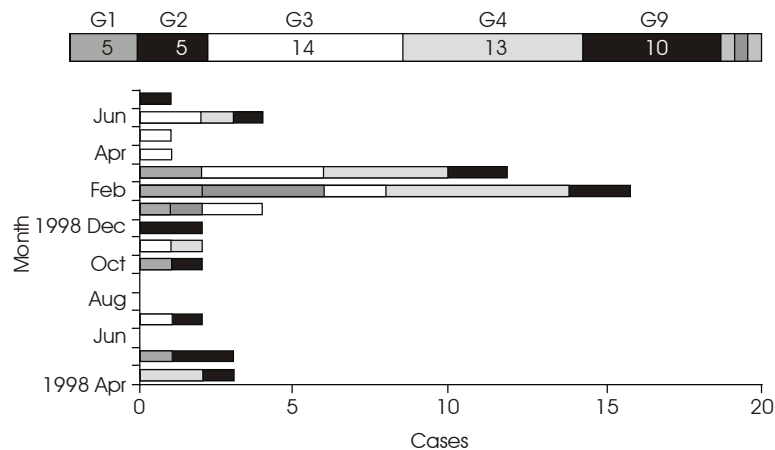


Fig. 1. Seasonal variation of positive rotaviruses from diarrhea samples.

1 unit AMV Reverse Transcriptase, 1 unit RNase Inhibitor, 1 unit AMV-Optimized Taq, 10x One Step RNA PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP Mixture, Primer set를 넣어 모두 50 µl가 되게 만든 후 thermocycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler: TP3000)에서 50°C에서 30분, 94°C 2분 이후 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 5분으로 30 cycle을 반복시켰다.

4. PCR product의 분석

PCR 한 후 얻어진 50 µl의 PCR product 중에서

25 µl를 1% agarose gel에 loading한 후 전기 영동시켰다. Gel내에 ethidium bromide를 미량 포함시켜 U.V. illuminator로 사진 촬영 후 크기에 따라 serotype을 분석하였다.

결 과

수집된 202례의 검체에서 95례가 EIA 검사에서 rotavirus 양성으로 판별되었다.

설사 환자에서 rotavirus의 양성 비율은 발생 시기에 따라 0~87.1%이었으며, 1999년 1~3월에

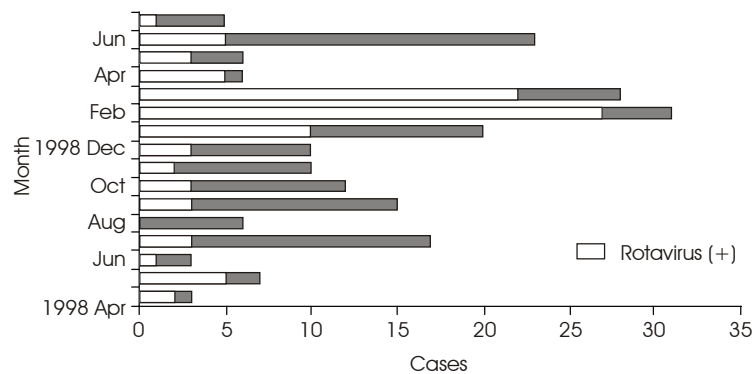


Fig. 2. Seasonal variation of rotavirus G serotypes.

rotavirus에 의한 설사의 발병 비율이 높았다. 절기가 겨울이 아닌 시기에도 rotavirus는 소수이지만 꾸준히 존재함을 보여주고 있었다(Fig. 1).

Rotavirus 양성인 검체에서 RT-PCR에 의해 serotype 판정이 가능했던 것은 50례이었다.

이 중 G serotype 1 (G1)이 5례(10%), G serotype 2 (G2)가 5례(10%), G serotype 3 (G3)가 14례(28%), G serotype 4 (G4)가 13례(26%), G serotype 9 (G9)이 10례(20%)였으며, G1과 G9이 함께 있는 것과, G2과 G9이 함께 있는 것, G4와 G9이 함께 있는 경우가 각 1례씩 있었다. G8은 발견되지 않았다. G1과 G2의 비율이 G3, G4의 비율에 비하여 낮았으며, G9이 년 중에 걸쳐 적은 비율이지만 계속 나타나고 있었다(Fig. 2).

고 찰

Rotavirus에 대한 효과적인 vaccine의 개발을 위해 많은 기관들이 노력하고 있으며, 일정 지역에 적합한 polyvalent vaccine의 개발 및 선정을 위해서는 그 지역에 분포하는 혈청형에 대한 자료가 필요하다.

국내에서 rotavirus serotype에 관한 자료는 기존에 서울을 주요 대상으로 한 연구가 있었으며, 이들은 많은 시간적인 차이가 있으나 모두 G1, G2의 분포 비율이 제일 높은 것으로 보고하고 있다^{2,4)}.

본 연구에서는 흔히 많은 비율을 차지한다고 알

려져 있는 G1, G2보다 G3, G4이 더 많이 분리되고 있었으며, 특이하게 G9이 상당한 비율로 분리되고 있었다. 이러한 결과는 지역적인 특성을 나타낸다고 생각되며, 유행하는 rotavirus 혈청형의 시기적인 변화에 의한 영향도 있을 수 있다고 판단된다. 국내 최초로 소아에서 보고되는 serotype G9의 의미는 매우 크며, 이들이 접하는 비율이 비교적 높다는 점은 향후 연구 방향 설정의 고려 대상이 된다고 생각된다. 기존의 연구에서는 G serotype 1, 2, 3, 4의 분포만을 조사했으므로 다른 혈청형은 조사가 되지 않았으며, 본 연구의 결과가 혈청형 분포의 시기적, 지역적 특성을 타나낸 것인지, 많은 연구자들이 보고하고 있는 gene의 변이에 의한 것 등과 같은 다른 원인에 따른 것인지에 대한 판별은 좀더 장기적이고 광범위한 지역에서 다양한 방법을 적용한 연구 결과가 있어야 판단이 가능할 것이다^{15~22)}. 이번 연구 결과만을 가지고 생각해 본다면 현재 개발되고 있는 rotavirus에 대한 vaccine은 대부분 serotype G 1, 2, 3, 4에 중점을 두고 있으므로, 이에 대한 보완을 하지 않는다면 임상에서 광범위하게 사용하는 경우 많은 vaccine failure를 보일 수 있을 것이다.

Rotavirus serotype을 결정하는 방법으로 monoclonal antibody를 이용하는 것이 고전적인 방법이지만, 현재 상업적으로는 G serotype 1, 2, 3, 4에 대해서만 검사가 가능하다²³⁾. 이번 연구에서 사용한 RT-PCR 기법은 현재 많은 연구자들이 이용하고

있으며, primer의 design에 따라 여러 serotype을 판별할 수 있는 장점이 있다^{20,24~27}). RT-PCR을 이용하여 rotavirus serotype을 결정하는 경우 대변에서 rotavirus mRNA를 추출하는 기법에 문제가 있을 수 있으며, 본 연구에서 serotype을 할 수 있었던 비율이 낮은 이유도 mRNA 추출 성공율이 낮은 데 기인한다²⁸). 기존에 국내에서 RT-PCR법을 사용했던 다른 연구에서도 mRNA의 추출율이 비교적 낮아 이에 대한 보완이 필요할 것으로 판단된다^{1,2}). 본 연구에서 serotype을 결정하지 못했던 경우에서의 serotype 분포 비율은 추정하기 어려우나, serotype을 결정할 수 있었던 경우와 비슷한 분포를 보였을 가능성이 가장 높다고 생각된다. 모든 sample에서 serotype을 결정했을 때 이번 결과와 전혀 다른 serotype의 분포를 보인다고 가정하여도 G3와 G4 분포 비율이 비교적 높다는 것과 G9가 존재한다는 것은 이번 연구 결과에서 중요한 의미를 나타내는 것으로 판단된다.

요 약

목 적: 설사 환자에서 rotavirus 장염의 빈도는 매우 높으며 rotavirus에 대한 예방 접종이 실용화되었으나 국내 rotavirus 혈청형 분포에 대한 체계적인 연구 결과는 매우 드물고, 혈청형의 정확한 분포 비율도 아직까지는 알려져 있지 않다. Rotavirus 설사 환자의 G 혈청형 분포를 RT-PCR 기법을 이용하여 조사하였다.

대상 및 방법: 1998년 6월부터 1999년 5월까지 설사를 주소로 내원 또는 입원한 소아 202명을 대상으로 하였다. 설사 시작 후 3일 이내의 대변을 채취하여 영하 20°C의 냉동고에 보존하였다. EIA (TestPack Rotavirus, Abbott Laboratories)법으로 rotavirus 양성인 검체를 선별하였으며, 양성 반응을 보인 검체를 대상으로하여 RT-PCR을 이용하여 rotavirus G serotype을 결정하였다.

결 과: 총 202 검체 중에서 rotavirus 양성은 95례였으며, 이 중 serotype 판정이 가능했던 것은 50례이었다. G serotype 1이 5례(10%), 2 (G2)가 5례

(10%), 3 (G3)가 14례(28%), 4 (G4)가 13례(26%), 9 (G9)이 10례(20%)였으며, G1과 G9이 함께 있는 것과, G2과 G9이 함께 있는 것, G4와 G9이 함께 있는 경우가 각 1례씩 있었다. G8은 발견되지 않았다.

결 론: 국내에 기존에는 알려지지 않았던 G9이 상당수 있으며, 일반적으로 제일 많다고 알려진 G1보다 G3, G4가 더 많은 비율을 차지하는 등 이번 연구 결과는 기존에 발표되었던 자료와는 많은 상이점을 보인다. 이는 지역적인 요인 및 시기 상의 일시적인 현상이라고 볼 수도 있으나, 보다 정확한 역학적인 자료를 얻기 위해서는 보다 광범위하고 장기적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) 김경희. 역전사중합효소 연쇄반응법을 이용한 rotavirus A군의 VP7형별. J of Kor Soc of Virology 1993; 23:39-45.
- 2) 김동수, 박범수, 정동혁, 안재문, 김철중, 강신영. 국내 일부지역 설사환자의 로타바이러스 감염실태 및 분리 동정. 소아과 1999;42(4):501-9.
- 3) 김원용, 소임옥, 박철민, 임성준, 김기정, 정상인 등. 한국인 영아에서 분리된 G1 로타바이러스의 VP7 단백질 유전자 염기서열 및 발현. 대한바이러스학회지 1998;28:247-65.
- 4) Park H, Woo S, Seoh J, Chong Y, Seo J. VP7 Genotypes of human rotavirus from hospitalized children with severe diarrhea by reverse transcription-polymerase chain reaction. J Korean Soc Microbiol 1997; 32:675-83.
- 5) Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiological Reviews 1989;410-49.
- 6) Beards G, Xu L, Ballard A, Desselberger U, McCrae M. A serotype 10 human rotavirus. J Clin Microbiol 1992;30:1432-5.
- 7) Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, et al. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. J Clin Microbiol 1991;30:9-16.
- 8) Santos N, Lima R, Nozawa C, Linhares R, Gouvea V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. J Clin Microbiol 1999;37:2734-6.

- 9) Arista S, Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Di Stefano R. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol* 1997;142:2065-71.
- 10) Begue R, Dennehy P, Huang J, Martin P. Serotype variation of group A rotaviruses over nine winter epidemics in southeastern new england. *J Clin Microbiol* 1992;30:1592-94.
- 11) Gouvea V, Ho MS, Glass R, Woods P, Forrester B, Robinson C, et al. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J Infect Dis* 1990;162:362-7.
- 12) O'Mahony J, Foley B, Morgan S, Morgan J, Hill C. VP4 and VP7 genotyping of rotavirus samples recovered from infected children in Ireland over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 1999;37:1699-703.
- 13) Steele A, Niekerk Mv, Mphahlele M. Geographic distribution of human rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes in five south african regions. *J Clin Microbiol* 1995;33:1516-19.
- 14) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:276-82.
- 15) Adhikary AK, Zhou Y, Kakizawa J, Numaga J, Akihara S, Fang ZY, et al. Distribution of rotavirus VP4 genotype and VP7 serotype among Chinese children. *Acta Paediatr Jpn* 1998;40:641-3.
- 16) Cao X-R, Akihara S, Fang Z-Y, Nakagomi O, Ushijima H. Genetic Variation in the VP4 and NSP4 Genes of Human Rotavirus Serotype 3 (G3 Type) Isolated in China and Japan. *Microbiol Immunol* 1999;43:171-5.
- 17) Gerna G, Steele AD, Hoshino Y, Sereno M, Garcia D, Sarasini A, et al. A comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotaviruses. *J Gen Virol* 1994;75:1781-4.
- 18) Pongsuwanna Y, Taniguchi K, Wakasugi F, Sutivijit Y, Chiwakul M, Warachit P, et al. Distinct yearly change of serotype distribution of human rotavirus in Thailand as determined by ELISA and PCR. *Epidemiol Infect* 1993;111:407-12.
- 19) Timenetsky MdCST, Gouvea V, Santos N, Carmona RCC, Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol* 1997;78:1373-8.
- 20) Ushijima H, Mukoyama A, Hasegawa A, Nishimura S, Konishi K, Bosu K. Serotyping of human rotaviruses in the Tokyo area (1990-1993) by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies and by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 1994;44:162-5.
- 21) Wen L, Nakayama M, Yamanishi Y, Nishio O, Fang ZY, Nakagomi O, et al. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Arch Virol* 1997;142:1481-9.
- 22) Zhou Y, Nakayama M, Hasegawa A, Kim B, Nishimura S, Chiba S, et al. Serotypes of Human Rotaviruses in 7 Regions of Japan from 1984 to 1997. *Kansenshogaku Zasshi* 1999;73:35-42.
- 23) Masendycz PJ, Palombo EA, Gorrell RJ, Bishop RF. Comparison of enzyme immunoassay, PCR, and type-specific cDNA probe techniques for identification of group A rotavirus gene 4 types (P types). *J Clin Microbiol* 1997;35:3104-8.
- 24) Dubois E, Le Guyader F, Haugarreau L, Kopecka H, Cormier M, Pommepuy M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1794-800.
- 25) Larralde G, Flores J. Identification of gene 4 alleles among human rotaviruses by polymerase chain reaction-derived probes. *Virology* 1990;179:469-73.
- 26) Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, Urasawa T, Ukae S, Chiba S, et al. Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1992;109:303-12.
- 27) Wilde J, Yolken R, Willoughby R, Fiden J. Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;337:323-26.
- 28) Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 1990;28:1300-7.