

## Genetic Characterization of Norovirus GII.3 Circulating in Korea

JongIm Kim<sup>1</sup> and KwiSung Park<sup>2\*</sup>

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

Noroviruses (NoV) are the major viral pathogen that causes epidemic acute gastroenteritis and outbreaks of food-borne illness. The major genotypes responsible for the epidemics of NoV are GII.4 and GII.3. However, most studies of NoV have been associated with GII.4 genotype and only few studies have been done with GII.3 genotype. Here, we selected 18 GII.3 strains, which recently circulated in Korea, and determined the partial sequences of the capsid gene. Phylogenetic analysis comparing these sequences with 29 reference strains from the GenBank database was performed using the MEGA program. All NoV GII.3 strains formed 2 distinct genetic lineages and variant groups. Lineage A showed 94.1~97.6%, 90.2~94.6% nucleotide identities from lineage B and variant group, respectively. Lineage B showed 90.2~94.6% nucleotide identities from variant group. These different genetic lineages based on the phylogenetic analysis of capsid sequences imply that the circulating Korean NoV GII.3 strains have potential antigenic variation.

**Key Words:** Gastroenteritis, Norovirus GII.3, Phylogenetic analysis, Sequence comparison

### 서 론

바이러스성 급성위장관염의 주요 병원체로는 로타바이러스, 노로바이러스, 아데노바이러스, 아스트로바이러스 등이 있다 (1). 이 중 많은 부분을 차지하는 것이 로타바이러스와 노로바이러스이며, 특히 노로바이러스는 성인에서도 검출률이 높고, 가족이나 사회공동체에서 집단으로 감염을 일으키는 경우가 많다 (2, 3). 노로바이러스는 1929년 Zahorsky 등에 의해 winter vomiting disease로 최초 보고되었고, 1972년 Kapikian 등이 면역전자현미경으로 확인하였다 (4).

노로바이러스는 분변-구강 혹은 구토에 의한 비말형성에 의해서 주로 전파되며, 보통 12~2월 사이의 겨울철에 유행한다. 12~48시간의 잠복기를 거쳐 메스꺼움, 구토,

설사, 복통의 주요증상을 나타내며 때로는 두통, 오한 및 근육통을 유발하기도 한다. 보통 증상은 1~2일 정도 짧게 나타나지만, 경우에 따라 심각한 증세를 보이기도 한다 (5).

이 바이러스는 5개의 Genogroup (G)으로 나뉘며, 이들 중 GI, GII, GIV가 사람을 숙주로 하고, GIII, GV은 각각 소아 쥐를 감염시킨다 (6). 사람에서 주로 문제를 일으키는 GI, GII의 노로바이러스는 캡시드 부위의 다양성을 근거로 GI은 14개, GII는 17개의 유전자형으로 분류되어 있다 (7, 8). 이러한 항원의 다양성 때문에 한 가지 유전자형에 감염되는 경우에도 다른 형에 의한 재감염이 일어나기도 하며, 면역력은 잠시 동안만 지속되어 반복적으로 재감염이 일어나기도 한다 (9, 10). 국내에서 가장 빈번하게 유행하는 유전자형은 GII.4형으로 이것에 대한 전체 염기서열 분석을 포함한 분자생물학적 특성의 보고는 종종 이루어져 왔으나 (11~13), GII.3형에 대한 분석 결과는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 최근 급성위장관염 및 집단 식중독의 주요 병원체인 노로바이러스 중 GII.3형에 대한 부분적인 캡시드 유전자 염기서열을 결정하고, 계통분석을 이용하여 유전적 변이를 분석하였다.

Received: August 31, 2011 / Revised: November 9, 2011

Accepted: November 14, 2011

\*Corresponding author: KwiSung Park, Chungcheongnam-Do Institute of Health and Environmental Research, 44-1 Gayang2-dong, Dong-gu, Daejeon, 300-801, Korea.

Phone: +82-42-620-1654, Fax: +82-42-620-1659

e-mail: kwisungp@korea.kr

## 재료 및 방법

### 바이러스

2008년부터 2010년까지 순천향대학교 천안병원에 급성 위장관염으로 내원한 환자로부터 수거된 분변 중 노로바이러스 GII.3형인 것을 대상으로 하였다(Table 1). 검체는 멸균된 0.1 M PBS (phosphate buffered saline 7.2, Sigma St. Louis, MO, USA) 9 ml에 분변 1 g을 넣어 희석한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 사용하였고, 시험에 사용될 때까지 -70°C에서 보관하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

노로바이러스는 semi-nested RT-PCR법을 이용하여 검사하였다. 전 처리된 상층액을 150 μl 취하고 magnetic bead (Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 제조사의 사용방법에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 Kojima 등에 의해 보고된 노로바이러스에 특이적인 프라이머가

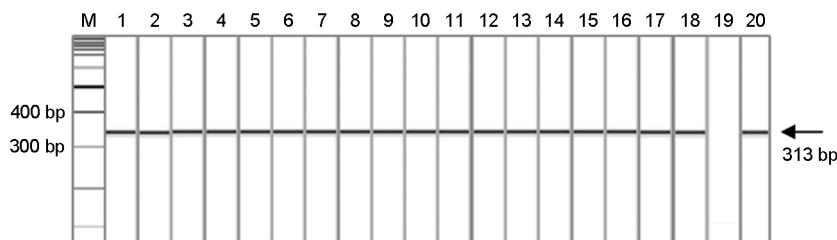
포함된 1st Norovirus Detection kit (GI) (Cellgenomics, Seoul, Korea)와 1st Norovirus Detection kit (GII) (Cellgenomics, Seoul, Korea)를 이용하여 각각 수행하였다 (14). 추출된 RNA 5 μl를 각각의 키트에 추가한 후 47°C에서 40분간 cDNA를 합성하고, 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 45초 동안 35회 반복하여 PCR 반응을 수행하였다. 그 후 1차 반응산물 2 μl를 취하여 2nd Norovirus Detection kit (GI) (Cellgenomics, Seoul, Korea)와 2nd Norovirus Detection kit (GII) (Cellgenomics, Seoul, Korea)를 사용하여 2차 PCR을 수행하였는데, 조건은 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 45초 동안 25회 반복하였다. PCR 증폭에 의해 생성된 DNA 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 EtBr (Ethidium bromide, Bioneer, Daejeon, Korea)로 염색하여 확인하였다.

### 노로바이러스의 유전형 확인과 계통분석

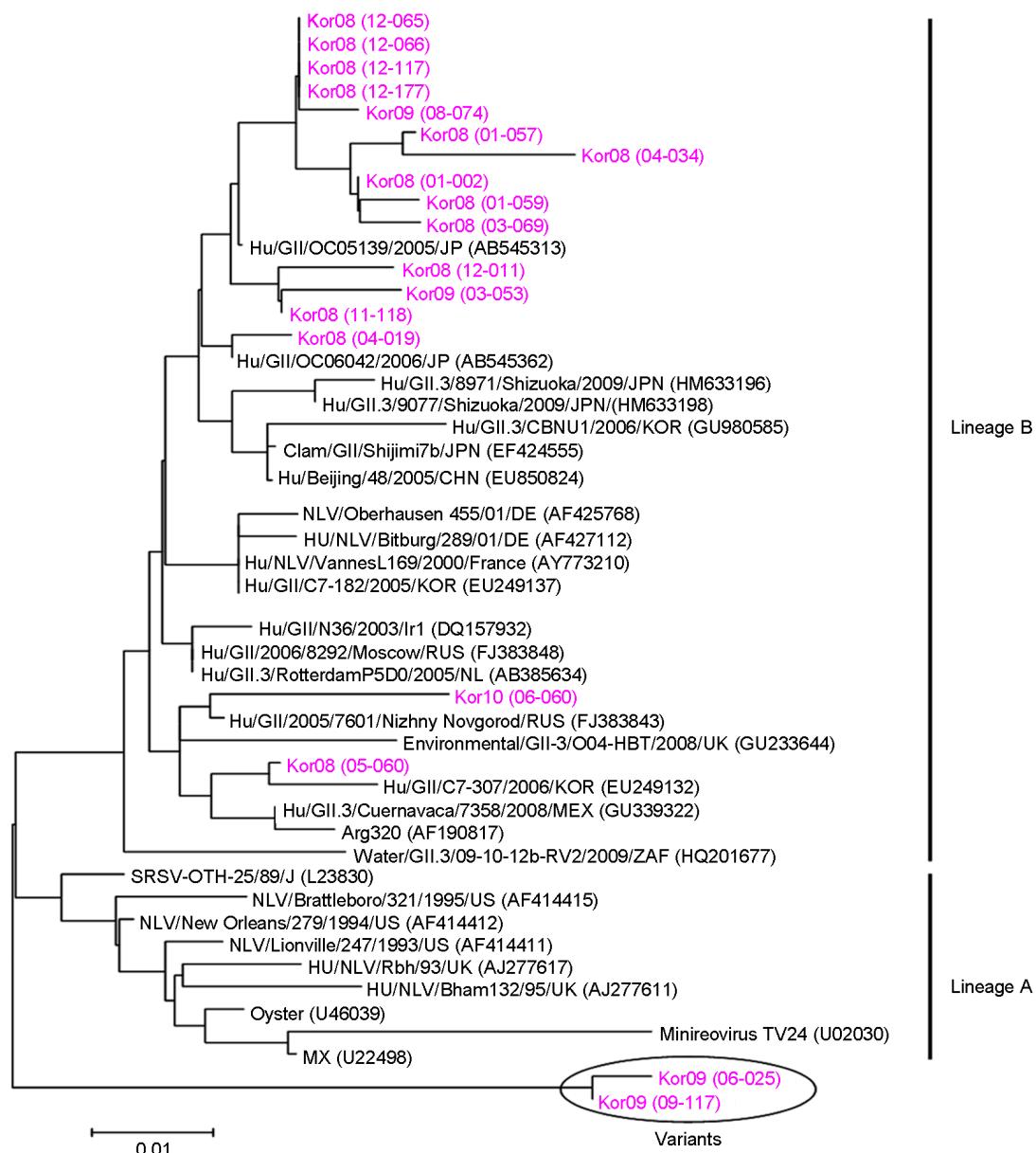
염기서열 분석을 위하여 각 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제한 DNA는 ABI PRISM Dye terminator (Applied

**Table 1.** Norovirus GII.3 strains isolated from patients' stool with acute gastroenteritis

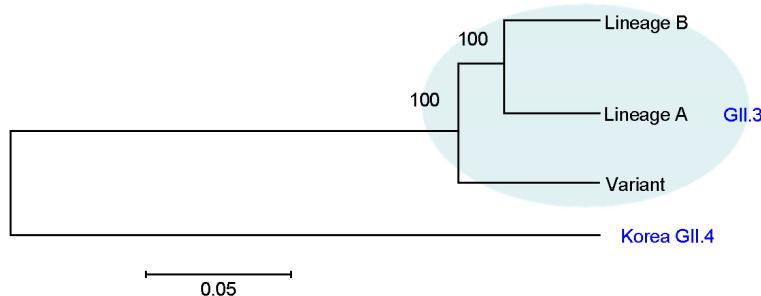
Isolate	Gender	Age	Year	Month	Accession no.
Kor08 (01-002)	F	5 yr	2008	Jan	JN704616
Kor08 (01-057)	F	2 yr	2008	Jan	JN704617
Kor08 (01-059)	M	under 1yr	2008	Jan	JN704618
Kor08 (03-069)	F	15 yr	2008	Mar	JN704619
Kor08 (04-019)	M	2 yr	2008	Apr	JN704620
Kor08 (04-034)	F	3 yr	2008	Apr	JN704621
Kor08 (05-060)	M	1 yr	2008	May	JN704622
Kor08 (11-118)	F	1 yr	2008	Nov	JN704623
Kor08 (12-011)	F	3 yr	2008	Dec	JN704624
Kor08 (12-065)	M	1 yr	2008	Dec	JN704625
Kor08 (12-066)	F	under 1yr	2008	Dec	JN704626
Kor08 (12-117)	M	1 yr	2008	Dec	JN704627
Kor08 (12-177)	M	under 1yr	2008	Dec	JN704628
Kor09 (03-053)	F	1 yr	2009	Mar	JN704629
Kor09 (06-025)	F	38 yr	2009	Jun	JN704630
Kor09 (08-074)	M	5 yr	2009	Aug	JN704631
Kor09 (09-117)	M	1 yr	2009	Sep	JN704632
Kor10 (06-060)	M	1 yr	2010	Jun	JN704633



**Figure 1.** Gel electrophoresis of PCR products of capsid region of 18 norovirus GII.3 isolates from patients with gastroenteritis; Lane M, 100 bp DNA ladder; Lane 1~18, 18 norovirus GII.3 isolates; Lane 19, negative control; Lane 20, positive control.



**Figure 2.** Phylogenetic analysis based on a 205 bp sequence of the capsid region of Korean norovirus GII.3 strains and reference strains. Nucleotide sequences were analyzed using the neighbor-joining method.



**Figure 3.** Phylogenetic analysis of the capsid region of norovirus GII.3 lineages and Korea GII.4.

**Table 2.** Identities of nucleotide and amino acid of capsid region between the lineages and variant group

	Lineage B	Variants
Lineage A	Nucleotide	94.1~97.6
	Amino acid	94.1~100
Lineage B	Nucleotide	–
	Amino acid	–
		90.2~94.6
		95.6~100
		91.7~94.1
		94.1~100

Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분 동안 25회 반복하여 염기서열 결정반응을 수행하였다. 반응한 산물은 3 M sodium acetate (pH 5.8)와 에탄올로 침전시킨 후 ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 각 염기서열은 National Center for Biotechnology Information의 Genbank에 JN704616~JN704633으로 등록하고(Table 1), basic local alignment search tool (BLAST)을 이용하여 가장 가까운 원형주와 비교하여 유전자형을 결정하였다. 그 후 GII.3형의 유전자형을 갖는 18개의 분리주에 대한 염기서열은 원형주들과 함께 Clustal X (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany)를 이용하여 다중정렬을 수행하였다(15, 16). 정렬된 자료는 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tempe, AZ, USA) 프로그램을 이용하여 계통분석을 실시하였다(17).

## 결과

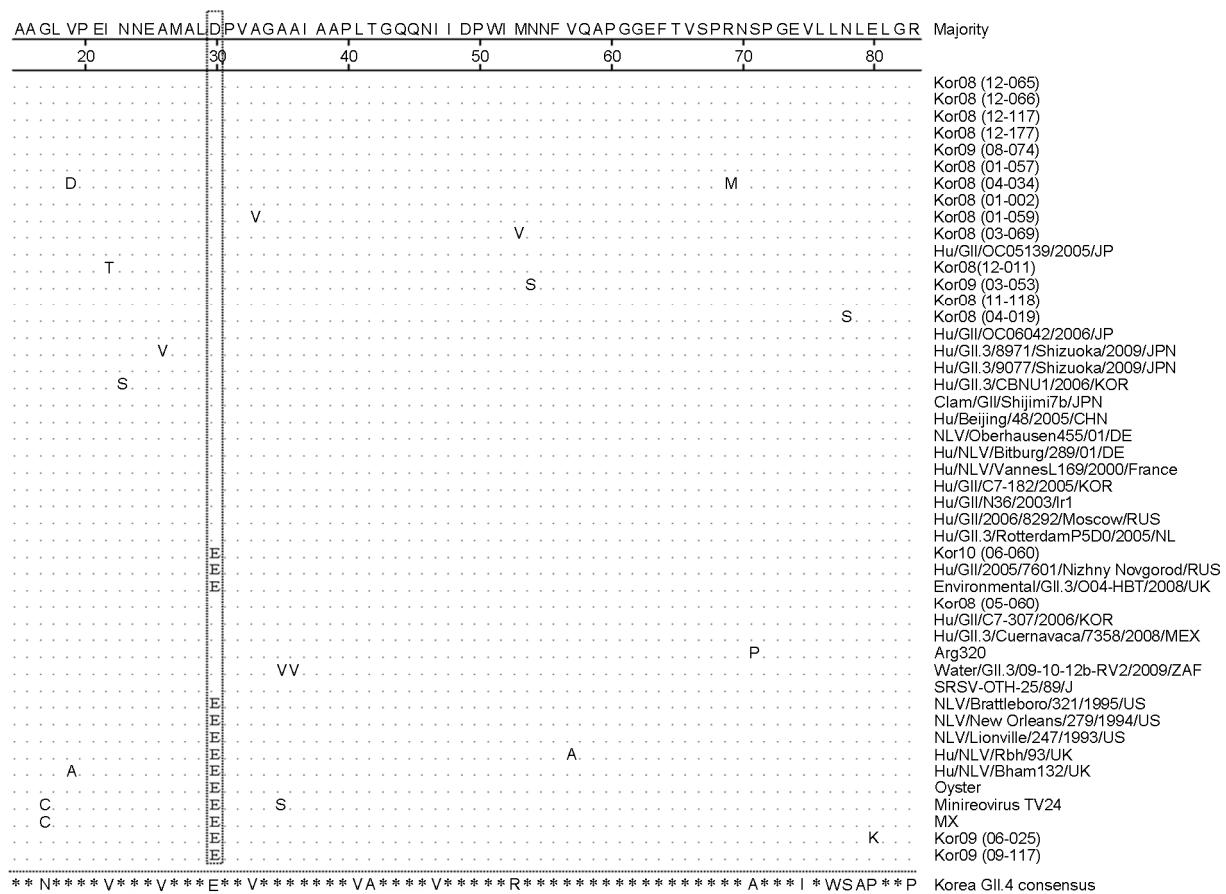
우리나라에 유행하는 노로바이러스 GII.3형에 대한 유전적 다양성분석을 위하여 2008년부터 2010년까지 분리된 바이러스 18주를 대상으로 캡시드 유전자를 증폭하여 313 bp의 절편을 확인한 후, 염기서열을 분석하였다(Fig. 1). 계통분석은 현재 GenBank 데이터베이스에 등록되어

있는 29개의 참조주를 포함하여 이루어졌다. 2008년도의 분리주들과 가장 가까운 참조주는 2005년 일본에서 분리된 "Hu/GII/OC05139/2005/JP" 주 이었고, 2010년의 국내 분리주인 "Kor10 (06-060)" 주는 2005년도 러시아에서 분리된 "Hu/GII/2005/7601/Nizhny Novgorod/RUS"와 연관관계가 가장 높았다(Fig. 2). 47주의 노로바이러스 GII.3의 계통분석 결과, 2개의 그룹(Lineage A, B)으로 나누어졌으며, 국내의 18개의 분리주 중 16개의 분리주가 Lineage B에 속하였다. 2009년에 분리된 "Kor09 (06-025)"와 "Kor09 (09-117)" 주는 이들과는 계통학적으로 연관성이 낮아 변이주(Variants)로 분류되었다(Fig. 2). 각각의 클러스터에 대하여 염기서열의 상동성을 비교를 한 결과, Lineage A는 국내 분리주가 대다수 포함된 Lineage B와 94.1~97.6%의 상동성을 보였고, 변이주의 그룹과는 90.2~94.6%를 나타내었다. Lineage B는 변이주 그룹과 91.7~94.1%의 상동성을 보였다. 또한 아미노산 서열에 대한 상동성 비교에서는, Lineage A는 Lineage B와 94.1~100%, 변이주 그룹과는 95.6~100%의 상동성을 나타내었다. 또한 Lineage B와 변이주 그룹과는 94.1~100%의 상동성을 보였다(Table 2). GII.3형은 국내에서 유행한 GII.4형의 분리주들 사이에 69.3~72.2% 염기서열의 차이를 보이며 계통학적 차이를 나타내었다(Fig. 3).

참조주를 포함한 47주의 노로바이러스 GII.3형의 아미노산 서열을 비교한 결과, 대부분이 산발적으로 일어나는 돌연변이에 의한 아미노산 치환이었지만, 16번 위치의 D/E는 돌연변이가 빈번하게 일어나는 부위로 확인되었다. 이들과 국내의 GII.4형의 비교에서 73.5~80.9%의 아미노산 서열의 차이를 보이고 있었다(Fig. 4).

## 고찰

노로바이러스는 바이러스성 설사 질환의 주요한 병원



**Figure 4.** Comparison of norovirus GII.3 amino acid sequences and Korea GII.4 consensus sequence in the capsid region. The box is conserved mutation site.

체로 전체 바이러스성 설사의 약 10%를 차지하고 있고, 특히 최근에 집단 발생하는 식중독의 대부분 원인으로 보고되고 있다. 또한 노로바이러스는 환경적 요인에 저항성이 매우 큰 바이러스로 높은 감염성과 광범위한 전염력을 보이는데, 최근 단체 급식이 대형화되고 외식의 기회가 증가함에 따라 노로바이러스에 대한 감염 기회가 증가되고 있는 추세이다 (18, 19). 노로바이러스의 진단은 1992년 민감도와 특이도가 높은 노로바이러스의 RT-PCR 법이 개발되어 세계적으로 사용되고 있고, 현재에는 real time RT-PCR 등이 사용 중이다 (20, 21).

노로바이러스의 유전자형 중 약 75% 이상은 GII.4형으로, 대부분의 노로바이러스 유전학적 국내연구는 GII.4형에 집중되어 GII.3형을 분석한 자료는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내의 노로바이러스 GII.3형을 대상으로 캡시드 유전자에 대한 염기서열을 결정하고, 외국에서 보고된 참조주들을 포함하여 계통분석을 실시하였다.

노로바이러스 GII.3는 세 개의 클러스터로 구성되어 있다고 보고되어 있다 (22). 클러스터 I은 1975년~1979년 사이에 유행한 바이러스이고, 클러스터 II는 1987년~1995년에 유행한 바이러스이다. 마지막 클러스터 III은 1998년~2006년에 유행한 바이러스라고 분석하였다. 본 연구에서의 Lineage A는 클러스터 II에 속하는 것이며, Lineage B는 클러스터 III에 속하는 것으로 판단된다. 국내의 노로바이러스 연구가 2000년대 초반이라는 것을 감안하면, 그 이후에 분리된 노로바이러스 GII.3는 세 개의 클러스터로 구성되어 있다고 보고되어 있다 (22). 클러스터 I은 1975년~1979년 사이에 유행한 바이러스이고 클러스터 III 또는 Lineage B에 포함된다. 국내의 분리주들 중에 특이한 것은 2009년에 분리된 "Kor09 (06-025)"와 "Kor09 (09-117)"으로 기존에 국내 유행 노로바이러스 GII.3형들과는 5.4~9.8%의 염기서열상 차이를 보였다. 이들은 또한 계통도에서도 새로운 클러스터를 구성하여, 이

번 분석에서 변이주라고 지정하였다. 국내의 GII.3형의 노로바이러스와 GII.4형과는 27.8~30.7%의 염기서열의 차이를 보였고, 19.1~26.5%의 아미노산 서열의 차이를 보여 유전적으로 독립적인 것을 확인할 수 있었다. 보고된 참조주들을 포함한 아미노산 서열을 비교한 결과, 돌연변이는 산발적으로 여러 부분에서 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 16번 위치에 아미노산이 D와 E가 공존하여 나타나는 것은 이 부위가 빈번하게 돌연변이가 나타나는 부분이라는 것을 생각할 수 있다. RNA 바이러스의 돌연변이 발생률은 매우 높은데, 이는 바이러스의 RNA 게놈 복제를 담당하는 RNA 의존성 RNA 중합효소가 교정기능을 갖지 않기 때문이다 (23). 결론적으로 본 연구는 국내의 노로바이러스 GII.3형에 대한 캡시드 유전자 염기서열을 결정하였고, 계통분석을 실시하여 유전적 변이를 분석하였다.

#### Acknowledgement

We thank Dr. Park JoonSoo and Choi YoungJin for kindly providing us with the specimens used for detection of Norovirus.

#### 참 고 문 헌

- 1) Glass RI, Bressee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser R, *et al.* Gastroenteritis viruses: an overview. Novartis Found Symp 2001;238:5-19.
- 2) Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, *et al.* Virus Diversity in a Winter Epidemic of Acute Diarrhea in France. J Clin Microbiol 2002;40:4266-72.
- 3) Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AF, Rahman M, *et al.* Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. J Clin Virol 2007;40:218-23.
- 4) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 1972;10:1075-81.
- 5) Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, *et al.* Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. Ann Intern Med 1982;96:756-61.
- 6) Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. J Virol Methods 2004;116:109-17.
- 7) Ambert-Balay K, Bon F, Le Guyader F, Pothier P, Kohli E. Characterization of new recombinant noroviruses. J Clin Microbiol 2005;43:5179-86.
- 8) Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Arcangeletti MC, *et al.* Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. J Med Virol 2006;78:1486-92.
- 9) Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. J Clin Microbiol 2004;42:2271-4.
- 10) Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. Science 1993;259:516-9.
- 11) Park KS, Jeong HS, Baek KA, Lee CG, Park SM, Park JS, *et al.* Genetic analysis of norovirus GII.4 variants circulating in Korea in 2008. Arch Virol 2010;155:635-41.
- 12) Park JW, Lee SG, Lee YM, Jheong WH, Ryu S, Paik SY. Full sequence analysis and characterization of the South Korean Norovirus GII-4 variant CUK-3. Virol J 2011;8:167.
- 13) Jeong AY, Yun SI, Jee YM, Kang YS, Lee YM. Molecular characterization of Korean isolate of human norovirus, the Hu/NLV/Gunpo/2006/KO Strain. Korean J Microbiol 2009; 45:105-11.
- 14) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J Virol Methods 2002;100:107-14.
- 15) 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.
- 16) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987;4: 406-25.
- 17) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24:1596-9.
- 18) 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.

- 19) Gong YW, Oh BY, Kim HY, Lee MY, Kim YH, Go JM, *et al.* Molecular epidemiologic investigation of Norovirus infections in Incheon City, Korea, from 2005 to 2007. *J Bacteriol Virol* 2008;38:249-57.
- 20) Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2529-34.
- 21) Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human Noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:2587-95.
- 22) Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, *et al.* Comparative evolution of GII.3 and GII.4 Norovirus over a 31-Year Period. *J Virol* 2011;85:8656-66.
- 23) Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4171-5.