

국내분리 유아 로타바이러스의 혈청형과 염기서열 분석

건국대학교 축산대학 동물생명과학부¹, 중부대학교 동물자원학과²,
KIST생명공학연구소³, 건국대학교 축산대학 수의학부⁴,
대구효성카톨릭대학교 의과대학 미생물학교실⁵, 日本 藤田保健衛生大學 醫學部⁶
차광종^{1*} · 송진욱¹ · 조홍찬¹ · 김용휘² · 유대열³ · 이종복⁴ · 이종기⁵
谷口孝禧⁶ · 유제현¹

=Abstract=

Serotype and Nucleotide Analysis of Human Rotavirus Isolates in Korea

Kwang-Jong Cha^{1*}, Jin-OoK Song¹, Hong-Chan Cho¹, Yong-Hee Kim², Dae-Yeul Yu³,
Joong-Bok Lee⁴, Chong-Kee Lee⁵, Taniguchi Koki⁶ and Jae-Hyeun Yu¹

*School of Animal Life Science, College of Animal Husbandry, Konkuk University¹,
Jung-Bu University², Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology³,
School of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry, Konkuk University⁴,
Department of Microbiology School of Medicine Catholic University of
Taegu-Hyosung⁵, Fujita Health University, Japan⁶*

Rotaviruses belong to Reoviridae causes diarrhea in human beings as well as domestic animals. This study was conducted to see what type of human rotaviruses are distributed in Seoul and Kyung-gi province. Twenty two of 81 patients showed rotavirus positive with diagnostic kit and RNA electrophoresis. We isolated all of rotaviruses from the patients. Electropherotypes of 22 isolates showed 4:2:3:2 pattern whereas those migration patterns were long type. All of those isolates belonged to group A. Twenty out of 22 isolates reacted with monoclonal antibodies specific to G1, P1A and subgroup II, whereas rest of them, A-29 and K-30 reacted with subgroup I specific monoclonal antibody. The nucleotide sequence of an isolate K-21 showed 98~100% and 90~96% homologies with those of Wa and KU strain, respectively.

Key Word: Reoviridae, Electropherotypes, Human rotavirus, Nucleotide sequence, Homology

서 론

로타바이러스 (RV)는 1973년 Bishop 등 [1]에 의해 위장염을 앓고 있는 어린아이의 소장 음모 상피세포에서 처음 발견된 수레바퀴 (Rota) 모양의 바이러스로서 유아와 어린아이 뿐만 아니라 많은 포유동물과 조류 등 어린 동물에 있어서 비

세균성 위장염의 주요한 원인 바이러스로 알려졌다 [17]. 로타바이러스는 온대지방의 동절기에 많이 발생하고 임상증상으로는 구토와 설사를 주로 하는 위장염 증상 외에 발열과 호흡기도 염의 증상도 있으며 때로는 탈수증상을 일으키기 때문에 수혈이 필요하기도 하다 [4,5]. 개발도상국에서는 매년 유아 100만명 이상이 로타바이러스에 의한 위장염으로 죽고, 전세계에 걸쳐 매년 1억5천

접수 : 1999년 6월 15일

*책임저자; 차광종, 서울시 광진구 모진동 93-1 건국대학교 축산대학 동물생명과학부 유가공연구실
Tel.: (02) 450-3688.

어린이가 설사병과 구토를 일으키고 있다 [12,16, 18,24,31].

로타바이러스는 분류학상 reoviridae과에 속하며 크기가 70 nm이고 구형으로 내각 (Inner capsid) 과 외각 (outer capsid)으로 되어 있고, 이 두 capsid 는 38 nm 크기의 이십면체 핵을 둘러 싸고 있다 [27]. 핵 내부는 11 double-stranded (ds) RNA 염색체 분자로 구성되어 있으며 0.2×10^5 에서 2.2×10^6 의 분자량을 가진다 [7,22]. RNA 분질은 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 의해 분리되어 각각의 로타바이러스 strain의 고유한 전기영동 양상 (electropherotype pattern)을 나타내게 된다 [8].

외각은 VP4 (유전자 분절 4로 code됨)와 VP7 (유전자 분절 8, 9로 code됨) 단백질로 구성되어 있는데 이 두 단백질은 바이러스 중화에 관여하여 형 특이적 항원구성물을 가지고 있다 [29]. VP7 단백질은 중화시험에 의해 14개의 G 혈청형이 확인되었고 [6,23] 사람에서는 G1, G2, G3, G4, G8, G9와 G12 등 7종의 다른 혈청형이 검출되었다 [17,35]. VP4 단백질은 면역 측정법, 중화시험과 연계한 P 유전자형의 서열 분석비교에 의해 18개의 P 혈청형이 확인되었고 [9,20], 사람에는 P1A, P1B, P2, P3과 P4 등 적어도 5종의 혈청형이 검출되었다 [11,21].

내각은 중화에 관여하지 않고 균 및 아균항원을 가진 VP6 (유전자 분절 6으로 code됨) 단백질이다. 로타바이러스는 VP6의 항원형에 따라 A 군 (group)에서 F 군까지 다양한 혈청형을 가지고 있는데 지금까지 A, B, C 군은 사람과 동물들에서 모두 발견되었으며 D, E, F 군은 동물들에서만 발견된 것으로 밝혀져 있다 [6]. A 군에 속하는 로타바이러스는 4:2:3:2 양상을 가지며 돼지, 양, 말, 개, 고양이, 토끼, 사람에서 발견되었고 주로 위장염과 연관이 있는 것으로 나타났다 [26]. B 군의 경우는 4:2:2:3 양상으로 돼지, 소, 사람에서 발견되었고, C 군은 4:3:2:2 양상을 가지고 있으며 B 군과 마찬가지로 돼지, 소, 사람에서 발견된 것으로 알려져 있다 [30].

본 연구에서는 국내 유아환자로부터 분변을 채취하여 로타바이러스 감염을 검사하고 바이러스를 분리하여 dsRNA 이동 양상과 VP7과 VP4 혈청형을 결정하였고 이들 중 가장 빈도가 높은 K-21 로타바이러스의 염기배열을 분석하였다.

Table 1. Sources of human rotaviruses

Patients	Sex	Ages	Date	Place	Identification
A-8	F	3M	97.12.	Ansan	+ (P)
A-9	F	6M	97.12	Ansan	+ (P)
A-15	M	8M	97.12.	Ansan	+ (P)
A-17	F	1Y	97.12.	Ansan	+ (P)
A-24	M	2M	97.12.	Ansan	+ (P)
A-29	M	2Y	97.12.	Ansan	+ (P)
A-34	M	3M	97.12.	Ansan	+ (P)
K-10	M	5M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-14	M	2Y	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-16	M	6M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-18	F	4M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-21	F	5M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-23	M	3Y	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-30	F	2Y	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-33	M	3M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-34	F	4M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-35	M	9M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-39	F	8M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-40	M	2Y	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-41	M	1M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-43	F	4M	97.11.	Seoul	+ (P, K)
K-44	M	2Y	97.11.	Seoul	+ (P, K)

M: months, Y: years, P: PAGE, K: Rota kit, +: positive, M: male, F: female

재료 및 방법

1. 로타바이러스

본 실험에 사용된 바이러스는 1997년 11월과 12월 사이 고려대학교 부속 구로병원에 설사증으로 입원한 유아환자 45명과 경기 안산 중앙병원에 입원한 유아환자 36명의 설사 변에서 분리하여 -20℃에 보관, 사용하였으며, PAGE와 Slidex Rota Kit 2 (Bio Merieux)에 의하여 양성 반응을 나타낸 분변에서 바이러스를 분리한 후 MA 104세포에 3~4일 배양하여 사용하였다 (Table 1). 표준주로는 Wa, KU, S2, YO, Hosokawa주 (일본 사っぽ로 의과대학에서 분양 받음) 등을 사용하였다.

2. 세포배양

로타바이러스를 증식시키기 위해 사용된 MA 104세포는 미국 Stanford University 의과 대학의 Dr. Greenberg Lab.에서 분양 받았다. 세포의 증식과 유지에는 M199배지에 7% FCS (Fetal calf serum: Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah.)와 1% L-glutamin penicillin streptomycin (L-GPS: Irvine scientific. santa Anna. CA.)를 혼합하여 사용하였다. 세포배양액은 T-flask에서 3~4일 후에 단층이 형성된 세포를 계대배양하여 사용하였다.

3. 로타바이러스 분리

바이러스 분리는 Paul 등 [25]의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 무혈청 M199로 약 10%의 분변 현탁액을 만들어 얼음 속에서 5분간 초음파 처리한 후 2000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층 액만을 뽑아 0.45 µm filter로 여과된 것을 0.2% 트립신 (Type IX, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) 0.5 µl/ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 활성화시켰다. 무혈청 M199로 T-flask를 2번 세척하였고 바이러스를 각 well에 감염시켜 37°C에서 1시간 흡착시켰다. M199 (0.2% 트립신 0.5 µl/ml)를 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고 현미경으로 CPE (cytopathic effect)를 관찰하여 로타바이러스 감염 정도를 확인하였다. 3~4일 후 CPE가 완전히 일어난 것은 3번의 동결과 해동을 반복하여 시험관에 담아 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

4. 로타바이러스 회전배양

Chiarini 등 [2]의 방법에 따라 바이러스는 0.2% 트립신 10 µl/ml을 넣어 37°C 배양기에서 30분 동안 활성화시켰고, MA 104세포의 단층이 형성된 시험관에, 활성화시킨 바이러스를 넣어 회전배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 다음 무혈청 M199 ml당 0.2% 트립신 1 µl를 첨가하여 37°C 배양기에서 6일간 회전 배양하면서 세포변성효과 (CPE)를 관찰한 후 동결과 해동을 3회 반복하여 바이러스를 회수, -80°C에 보관하면서 사용하였다.

5. 로타바이러스의 RNA 분리

Isizaki 등 [15]의 방법에 따라 분변 현탁액 150 µl와 M199 150 µl를 튜브에 넣고, disruption

buffer (6% SDS (sodium dodesyl sulfate), 0.6% 2-mercaptoethanol, 0.36 M EDTA) 60 µl를 첨가하여 혼합하였다. 배양기에서 30분간 반응시킨 후 포화 페놀과 클로로포름 (1:1)을 360 µl 첨가한 후 5분 동안 강하게 혼합하였다. 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액 300 µl에 5 N NaCl 5 µl와 에탄올 600 µl를 첨가하고, -80°C에서 1시간 동안 동결시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였고 튜브의 액을 모두 제거하였다. 1시간 동안 진공 건조시킨 잔유물에 loading buffer (glycerol 4 ml, 1 M Tris (pH 6.8) 2.5 ml, bromophenol blue 7 mg, 0.6% 2-mercaptoethanol 2 ml)를 50 µl씩 넣어 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

6. PAGE에 의한 RNA 분석

dsRNA의 전기영동은 Herring 등 [14]의 방법에 따라 30% (w/v) acrylamide와 0.8% (w/v) bis-acrylamide (acrylamide 13.3 ml, 0.75 M Tris buffer (pH 8.8) 20 ml, 증류수 4.7 ml, 0.1 M EDTA (pH 8.0) 0.4 ml, 3% ammonium persulfate 1.6 ml, TEMED 70 µl)를 사용하였고, running buffer (Trizma base 6 g, glycine 28.9 g, 0.1 M EDTA 10 ml)로 채운 후 20 mA에서 17시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 겔을 0.009 M 질산은을 첨가하고 1시간 동안 흔들어 염색하였고 증류수로 2번 세척한 다음, 발색제 (37% formaldehyde 2 ml가 첨가된 0.75 M NaOH)로 발색한 후 5% 초산으로 발색을 중지시켰다. dsRNA 띠를 확인한 후 fluorescent light box 위에서 사진 촬영하였다.

7. ELISA에 의한 G typing

Taniguchi 등 [34]의 방법에 따라 YO-156, S2-37, YO-5, KU, S2-2G10, YO-IE2, ST-2G7 등 (유래: rabbit antiserum)의 단일 클론항체를 10 mM phosphate-buffered saline 용액 (PBS pH 7.4)에 10,000배로 희석하였고, 96 well plate의 각 well에 100 µl씩 넣어 4°C에서 하루 배양하였다. 0.05% Tween-20이 포함된 PBS-tween으로 2번 세척하고 1% BSA (PBS-Tween)를 각 well에 200 µl씩 넣어 4°C에서 5시간 동안 blocking하였다. 10 mM PBS-Tween으로 2회 세척하고 PBS-Tween과 바이러스를 1:1로 희석하여 각 well에 50 µl씩 넣어 4°C에서 다시 하루 동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 3회 세척한 후 anti-HRV hyperimmune rabbit serum (PBS로 100배 희석)을 각 well에 50 µl씩 넣고 배양기에서

Table 2. Location in the VP7 gene and sequences of oligonucleotide primers

Primer name	Sequences (5'-3')	Product		Location	
		length (base pairs)	Nucleotide nos.	Strain (serotype)	
C1	(-) GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG		1039-1062	SA11 (3)	
C2	(+) GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGCTCGG	1062	1-28	Wa (1)	
S1	(+) CAAGTACTCAAATCAATGATGG	749	314-335	Wa (1)	
S2	(+) GACTACAATGATATTACTAC	657	409-425	S2 (2)	
S3	(+) GACGCGACGTTGCAATTG	582	481-498	SA11 (3)	
S4	(+) TCAAACGACAAATACAGCTA	394	669-688	ST-3 (4)	
S8	(+) GTCACACCATTTGTAAATTCG	885	178-198	69M (8)	
S9	(+) CTAGATGTAACACTACAACACTAC	306	757-776	WI-61 (9)	

Table 3. Location in the VP4 gene and sequences of oligonucleotide primers

Primer name	Sequences (5'-3')	Product		Location	
		length (base pairs)	Nucleotide nos.	Strain (serotype)	
A	(+) TGGCTTCGTTTCATTTATAGACA		11-32	KU (P1A)	
B	(-) CTAAATGCTTTTGAATCATCCCA	1084	1072-1094	KU (P1A)	
C	(-) ATATTCCTACGAGTTTAGTATC	498	487-508	KU (P1A)	
D	(-) ACTAACATGTGGTTCAACTGCGAT	338	325-348	DS-1 (P1B)	
E	(-) CTGAGCACGTTGATAAGTCAC	745	733-755	1076 (P2)	
F	(-) CGTATATTGATAGTTCATGGG	911	900-921	K8 (P3)	

1시간 동안 배양하였다. 다시 PBS-Tween으로 3회 세척한 후 Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (PBS-Tween으로 1000배 희석)를 50 µl씩 넣고 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 이것을 PBS-Tween으로 4회 세척하고 substrate solution (0.1 M citrate- phosphate buffer pH 5.0: 25 ml, o-phenylendiamine 2 · HCl: 10 mg, 30% H₂O₂: 10 µl)을 각 well에 100 µl씩 넣어 발색하였고 20% H₂SO₄를 25 µl씩 첨가하여 발색을 중지시켰다. ELISA reader (Model: EL311, Bio-TEK Instruments, USA)로 490 nm에서 optical density치를 측정하여 최종 값을 얻었다.

8. Reverse Transcription: Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)에 의한 G와 P typing

Gouvea 등 [13]의 방법에 따라 VP7의 1차 증폭은 완충용액 (10×buffer)과, 3.5% DMSO, 0.75 M DTT, 5 unit RNase inhibitor, 200 nM dNTP, 2 µg dsRNA 및 100 pmol primer (Table 2의 C1과 C2)를 각각 혼합한 다음 97℃에서 5분간 가열하고 즉시 얼음 속에서 냉각하였다. 냉각된 혼합액에 11.5

unit reverse transcriptase (Seikaku Kogyo, Tokyo)와 1.75 unit Taq DNA polymerase (Bokusui Brown Inc.)을 가한 후 강하게 혼합하였다. 첫 번째로 42℃에서 30분간 가열한 후, 94℃에서 5분, 40℃에서 3분, 72℃에서 3분간 연속적으로 처리하였고, 94℃, 1분; 40℃, 2분; 72℃, 3분의 순으로 25회 처리하였다. 마지막으로 72℃에서 7분 동안 처리한 후 냉장 저장하였고, PCR 산물 10 µl를 1%의 agarose gel에 주입하여 전기영동한 후 자외선 상에서 사진 촬영하여 판독하였다. VP4의 1차 증폭은 dsRNA에 3.5% DMSO, DDW를 첨가하여 97℃에서 2분간 처리한 후 즉시 얼음 속에서 냉각시켰다. 완충용액 (10×buffer), 0.75 M DTT, RNase inhibitor, 200 nM dNTP, 100 pmol primer (Table 3의 A와 B), 11.5 unit reverse transcriptase와 1.75 unit Taq DNA polymerase을 가한 다음 강하게 혼합하였다. 첫 번째로 42℃에서 30분간 가열한 후, 94℃에서 1분, 45℃에서 1분, 72℃에서 3분간 25회 연속적으로 처리하였고, 마지막으로 72℃에서 7분 동안 처리한 후 냉장 저장하여 PCR 산물 10 µl를 1%의 agarose gel에 주입하여 전기영동한 후 사진

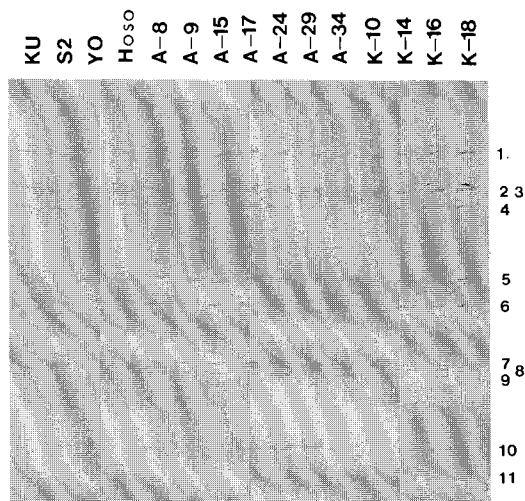


Figure 1. Electrophoretic analysis of viral genomic RNAs from HRV strains KU, S2, YO, Hosokawa, A-8, A-9, A-15, A-17, A-24, A-29, A-34, K-10, K-14, K-16 and K-18 in 30% polyacrylamide gel.

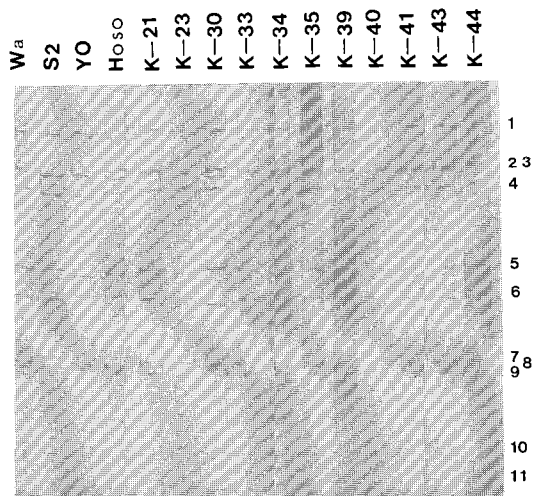


Figure 2. Electrophoretic analysis of viral genomic RNAs from HRV strains Wa, S2, YO, Hosokawa, K-21, K-23, K-30, K-33, K-34, K-35, K-39, K-40, K-41, K-43 and K-44 in 30% polyacrylamide gel.

촬영하여 판독하였다. VP7과 VP4의 2차 증폭은 1차 PCR 산물에 10×buffer, DDW, 3.5% DMSO와 200 nM dNTP, mixture primers (VP7은 Table 2의 S1, S2, S3, S4, S8, S9와 C1; VP4는 Table 3의 C, D, E, F와 B), 1.75 unit Taq DNA polymerase를 첨가하여 94℃에서 1분, 45℃에서 2분, 72℃에서 1분간 25회 연속적으로 처리한 다음 다시 72℃에서 7분 동안 처리한 후 냉장 저장하였다. 2차 PCR 산물 10 μl를 1%의 agarose gel에 주입하여 TAE + EtBr (1 μg/ml) 혼합용액에서 전기영동한 후 사진 촬영하여 판독하였다.

9. DNA 염기서열 분석

로타바이러스 K-21의 VP7과 VP4 cDNA 염기서열은 Sanger 등 [28]의 방법에 따라 dideoxy nucleotide chain termination procedure을 이용하여 version 2.0 DNA sequencing kit (US Biochemical, Cleveland, OH)사용하여 sequence분석기 (ABI, Prism: Model 310, Version 2.0)로 분석하였다.

결 과

1. 설사증 입원환자로부터 로타바이러스 양성률 검사

1997년 11월과 12월 사이 고려대학교 부속 구로병원에 설사증으로 입원한 환자 45명과 경기

안산 중앙병원에 입원한 유아환자 36명의 설사변을 PAGE와 Rota Kit (Bio Merieux)로 검사하였다. 그 결과 Table 1과 같이 고려대학 구로병원에 입원한 유아환자 15명 (33%)과 안산 중앙병원에 입원한 유아환자 7 (19%)명이 양성 반응을 나타냈다.

2. MA 104세포에 로타바이러스 감염

양성 반응을 나타낸 유아분변에서 로타바이러스를 분리하기 위해 분변 유체액을 세포배양용 T-flask에서 단층을 형성한 MA 104세포에 감염시켜 CPE를 관찰하였다. 6차 계대배양에 걸쳐 CPE를 관찰할 수 있었다.

3. 전기영동에 의한 dsRNA 양상

유아분변과 배양된 바이러스에서 분리한 ds-RNA를 30% acrylamide gel을 이용하여 전기영동한 결과는 Figure 1과 2에 나타낸 바와 같다. 22개 바이러스 시료는 모두 표준 HRV인 Wa, KU, S2, YO, Hosokawa와 같이 로타바이러스 A 군의 전형적인 RNA 전기영동 (electropherotype) 양상인 4:2:3:2로 나타났고, dsRNA 이동 양상을 비교해 보면 22개 시료 바이러스와 표준바이러스 Wa (G1), KU (G1), YO (G3), Hosokawa (G4)는 long type을 나타냈지만 S2 (G2)는 short type으로 나타났다. dsRNA의 11 분절을 비교하면 A-8, A-17, A-24, A-

Table 4. ELISA serotyping of HRV in culture fluids

Sample No.	Anti-VP6			Anti-VP7				Ascribed serotype
	YO-156 (common)	S2-37 (I)	YO-5 (II)	KU-4 (1)	S2-2G10 (2)	YO-1E2 (3)	ST-2G7 (4)	
A-8	1214	3	1711	758	93	48	65	G1
A-9	1193	10	956	881	11	36	27	G1
A-15	1755	20	1908	828	117	37	55	G1
A-17	1262	6	1190	880	8	44	40	G1
A-24	712	21	2069	681	70	216	5	G1
A-29	1408	1773	141	196	41	7	23	-
A-34	797	21	2025	887	79	13	11	G1
K-10	1445	25	1201	806	41	10	9	G1
K-14	829	1	1780	740	80	8	6	G1
K-16	1018	2	2079	725	44	12	14	G1
K-18	1584	7	1052	636	9	9	49	G1
K-21	961	8	2108	885	43	62	35	G1
K-23	1783	13	2102	848	40	2	16	G1
K-30	1809	1697	126	231	73	30	10	-
K-33	937	10	1553	665	8	54	202	G1
K-34	856	19	1631	800	27	8	8	G1
K-35	1202	47	1652	735	94	4	33	G1
K-39	1757	31	1148	795	106	1	41	G1
K-40	806	52	1860	808	186	3	55	G1
K-41	887	34	1469	1037	37	8	97	G1
K-43	920	10	1923	765	167	13	265	G1
K-44	1219	25	1852	1512	424	29	261	G1
Wa	1554	22	1761	1242	88	17	15	G1
KU	692	21	1277	1095	23	31	27	G1
S2	1475	1663	263	235	899	67	44	G2
YO	1227	18	1615	180	43	903	32	G3
ST	1598	18	1720	201	61	49	1017	G4

Parentheses show the specificity of the monoclonal antibodies; YO-156, commonly reactive to group A rotavirus; S2-37, subgroup I-specific; YO-5, subgroup II-specific; KU-4, serotype 1-specific; S2-2G10, serotype 2-specific; YO-1E2, serotype 3-specific; ST-2G7, serotype 4-specific. The data were the sum of the $OD_{490} \times 1,000$ in two wells. Values >300 in each ELISA test were considered to show positive reactions

34, K-10, K-16, K-18, K-21, K-33, K-34, K-39, K-40, K-41, K-43, K-44 등은 표준바이러스 Wa strain과 유사했지만, A-9, A-15, A-29, K-23, K-30 등은 표준바이러스 Wa, KU, YO, Hosokawa와 약간 다른 양상으로 나타났다.

4. ELISA에 의한 G typing

분리된 로타바이러스의 형을 구분하기 위하여 A 군 항원 단크론성 항체를 이용하였는데 A 군에 특이항체인 YO-156에 공시한 바이러스가 모두 반응하였다. 또한 아군 I와 II의 특이항체인 S2-37과 YO-5는 다음에서 서술한 바와같은 결과를 얻을 수 있었다. Capture antibody로서 VP7 혈청

형을 결정하는 KU-4, S2-2G10, YO-1E2, ST-2G7 MAbs를 사용하여 표준바이러스 Wa (G1), KU (G1), S2 (G2), YO (G3), Hosokawa (G4)와 22개 바이러스 시료를 비교하였던 바 Table 4와 같이 A-8, A-9, A-15, A-17, A-24, A-34, K-10, K-14, K-16, K-18, K-21, K-23, K-33, K-34, K-35, K-39, K-40, K-41, K-43, K-44의 20개 시료 바이러스와 표준바이러스 Wa, KU은 A 군, 아군 II, G1 특이항체에 반응하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 A-29와 K-30은 A 군, 아군 I이고 KU-4, S2-2G10, YO-1E2, ST-2G7 등의 단크론성 항체와는 반응하지 않았으며 RNA 양상도 long type으로 일반적인 HRV와 다르게 나타났다.

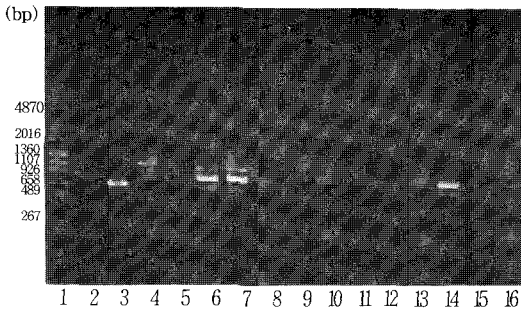


Figure 3. PCR typing of human rotavirus VP7 serotypes. Viral RNA extracted from the virus-infected culture fluids was used as the template for PCR. Lanes: 1, molecular weight marker (DNA MW pHY marker, Takara); 2, serotype 1 (strain KU); 3, serotype 2 (strain S2); 4, serotype 3 (strain YO); 5, serotype 4 (strain Hosokawa); 6, sample A-8; 7, A-9; 8, A-15; 9, A-17; A-24; 11, A-29; 12, A-34; 13, K-10; 14, K-14; 15, K-16; 16, K-18.

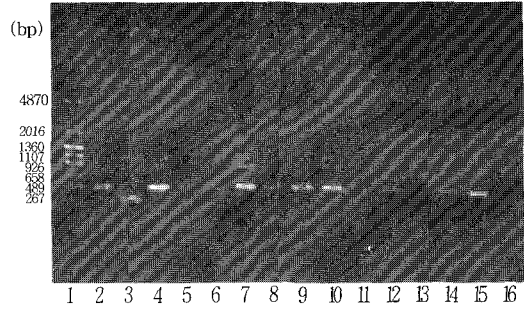


Figure 5. PCR typing of human rotavirus VP7 serotypes. Viral RNA extracted from the virus-infected culture fluids was used as the template for PCR. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, P1A (strain KU); 3, PIB (strain S2); 4, P1A (strain YO); 5, P1A (strain Hosokawa); 6, sample A-8; 7, A-9; 8, A-15; 9, A-17; 10, A-24; 11, A-29; 12, A-34; 13, K-10; 14, K-14; 15, K-16; 16, K-18.

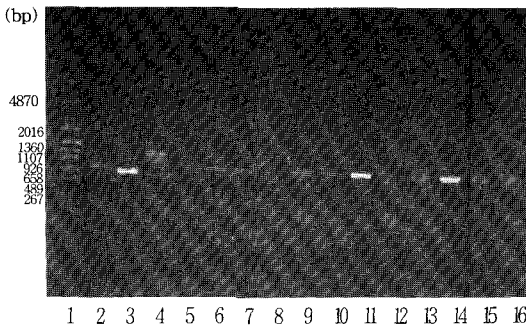


Figure 4. PCR typing of human rotavirus VP7 serotypes. Viral RNA extracted from the virus-infected culture fluids was used as the template for PCR. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, serotype 1 (strain KU); 3, serotype 2 (strain S2); 4, serotype 3 (strain YO); 5, serotype 4 (strain Hosokawa); 6, sample K-21; 7, K-23; 8, K-30; 9, K-33; 10, K-34; 11, K-35; 12, K-39; 13, K-40; 14, K-41; 15, K-43; 16, K-44

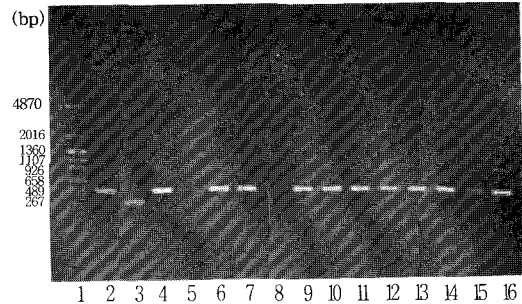


Figure 6. PCR typing of human rotavirus VP7 serotypes. Viral RNA extracted from the virus-infected culture fluids was used as the template for PCR. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, P1A (strain KU); 3, PIB (strain S2); 4, P1A (strain YO); 5, P1A (strain Hosokawa); 6, sample K-21; 7, K-23; 8, K-30; 9, K-33; 10, K-34; 11, K-35; 12, K-39; 13, K-40; 14, K-41; 15, K-43; 16, K-44.

5. PCR에 의한 G와 P Typing

유아 설사 변에서 분리한 로타바이러스와 표준 로타바이러스로 감염된 배양액을 PCR에 의해 oligonucleotide primer로 1차, 2차 증폭하여 1% agarose gel 상에서 전기영동한 결과를 Figure 3, 4, 5, 6와 Table 5에 나타내었다.

표준 로타바이러스 strain인 KU (G1), S2 (G2), YO (G3), Hosokawa (G4)와 비교하여 A-8, A-9, A-15, A-17, A-24, A-34 K-10, K-14, K-16, K-18, K-

21 K-23, K-30, K-34 K-35, K-39, K-40, K-41, K-43, K-44의 22개 시료 중 20개 시료 (91%)가 KU (G1)와 같이 혈청형 G1으로 나타났고 ELISA 결과와 일치하였다. 시료 A-29와 K-30은 PCR 결과에서도 나타나지 않았다 (Figure 5, 6과 Table 5).

표준 로타바이러스 strain KU (P1A), S2 (P1B), YO (P1A), Hosokawa (P1A)와 비교하여 A-8, A-9, A-15, A-17, A-24, A-34 K-10, K-14, K-16, K-18, K-21 K-23, K-30, K-34 K-35, K-39, K-40, K-41, K-43, K-44의 22개 시료 중 20개 시료 (91%)가 KU (P1A), YO (P1A), Hosokawa (P1A)와 같이 혈청형 P1A로

Table 5. PCR serotyping of HRV in culture fluids

Sample No.	G serotype*	P serotype
A-8	G1	P1A
A-9	G1	P1A
A-15	G1	P1A
A-17	G1	P1A
A-24	G1	P1A
A-29	-	-
A-34	G1	P1A
K-10	G1	P1A
K-14	G1	P1A
K-16	G1	P1A
K-18	G1	P1A
K-21	G1	P1A
K-23	G1	P1A
K-30	-	-
K-33	G1	P1A
K-34	G1	P1A
K-35	G1	P1A
K-39	G1	P1A
K-40	G1	P1A
K-41	G1	P1A
K-43	G1	P1A
K-44	G1	P1A
KU	G1	P1A
S2	G2	P1B
YO	G3	P1A
ST	G4	P1A

*G serotype was coincide with results of ELISA

나타났고 시료 A-29와 K-30은 PCR 결과에서도 나타나지 않았다 (Figure 5, 6와 Table 5).

6. 로타바이러스 K-21의 VP7 및 VP4 유전자의 염기서열 결정

PCR에 의해 동일 혈청형 (G1, P1A)의 표준 HRV인 Wa, KU와 K-21의 염기서열을 분석 비교한 결과 K-21의 VP7 염기서열은 300 bases 중 Wa와는 100%, KU와는 98%의 상동성을 나타냈다 (Figure 7). K-21의 VP4 염기서열은 307 bases 중 Wa와는 96.74%, KU와는 90.88%의 상동성을 나타내었다 (Figure 8).

고 찰

세계적으로 로타바이러스는 유아 바이러스성 설사의 주요한 원인체로서 이에 대한 백신개발 노력이 꾸준히 진행되어 오고 있지만 VP7과 VP4

혈청형 양쪽에 대해 면역을 획득해야 로타바이러스 감염으로 인한 설사에 대해 저항성을 갖게 되고 또한 사람 로타바이러스는 자연계에서 계속하여 변이하기 때문에 백신개발의 어려움이 있다. 따라서 문제점을 전체적으로 해결하기 위한 방법이 절실히 요구되고 있다 [3,17].

본 연구에서는 서울 경기지역 유아 설사 환자 변을 채취하여 바이러스를 분리, dsRNA 양상과 VP7 및 VP4 혈청형을 결정하였고 이들 중 가장 발생 빈도가 높은 K-21의 염기서열을 분석하였다. 서울 경기지역의 유아 설사환자 81명중 22명 (27%)이 로타바이러스 양상으로 나타났고 이것은 Kim 등 [19]이 서울지역 유아 설사환자를 대상으로 검사한 결과 47%가 로타바이러스 양성이었다고 보고된 것보다 낮은 수준이었다.

22개 바이러스를 전기영동에 의해 dsRNA 양상을 분석한 결과 A 군의 전형적인 양상인 4:2:3:2로 나타났고 RNA 전기영동 분절 10과 11의 이동 양상은 long type으로 나타났다. 로타바이러스는 strain에 따라 long, short과 super short type으로 분명히 다르고, 일반적으로 human rotavirus (HRV)의 G1, G3, G4와 G9 혈청형은 long type, G2 혈청형은 short type 그리고 G8 혈청형은 super short type이다 [33]. 이는 본 실험 결과와 일치함을 알 수 있었다. ELISA에 의한 VP6의 군 및 아군 결정 그리고 VP7의 G 혈청형 결과는 22개 바이러스 중 20개 바이러스가 A 군, 아군 II, G1, long type으로 나타났으며, HRV는 일반적으로 아군 II의 경우 G1, long type RNA 양상이고, 아군 I의 경우 G2, short type RNA 양상으로 20개 바이러스는 일치하였지만 [33], A-29와 K-30은 A군, 아군 I이고 KU-4, S2-2G10, YO-IE2, ST- 2G7 등의 MAbs와는 반응하지 않았으며 RNA 양상도 long type으로 일반적인 HRV와 다르게 나타났다. Gerna 등 [10]은 이탈리아 유아로부터 아군 I, G6, long type RNA 양상을 가지는 BRV와 관련된 2 strain을 분리했고, Urasawa 등 [35]은 태국 유아로부터 아군 I, G10, long type RNA 양상을 가지는 bovine rotavirus (BRV)와 관련된 strain을 분리하였다. 바이러스 A-29와 K-30도 HRV와는 다른 새로운 strain으로 생각된다.

혈청형과 유전형이 일치하는지 알기 위해서 VP7과 VP4 유전자의 PCR을 실시하였던 바 VP7의 혈청형은 ELISA 결과와 일치하였고 G1이 91%로 단연 우세하게 나타났으며 1987년 1월-1989년

WA ¹	1	ggctttaaaa	gagagaattt	ccgtctggct	aacggttagc	tccttttaat
K-21	33				cggttagc	tccttttaat
KU ²	1	ggctttaaaa	gagagaattt	ccgtttggct	aacggttagc	tccttttaat
WA	51	glatggatt	gaatatacca	caattcta	cttttgata	tcaatcattc
K-21	51	glatggatt	gaatatacca	caattcta	cttttgata	tcaatcattc
KU	51	glatggatt	gaatatacca	caattcta	cttttgata	tcaatcattc
WA	101	tactcaacta	tatattaata	tcagtgactc	gaataatgga	ctacattata
K-21	101	tactcaacta	tatattaata	tcagtgactc	gaataatgga	ctacattata
KU	101	tactcaacta	tatattaata	tcagtgactc	gaataatgga	ctacattata
WA	151	tatagatttt	tgttgattac	tgtagcatta	tttgctttga	caagagctca
K-21	151	tatagatttt	tgttgattac	tgtagcatta	tttgctttga	caagagctca
KU	151	tatagatttt	tgttgattac	tgtagcatta	tttgctttga	cgagagctca
WA	201	gaattatgga	cttaacttac	caataacagg	atcaatggac	gctgtatata
K-21	201	gaattatgga	cttaacttac	caataacagg	atcaatggac	gctgtatata
KU	201	gaattatgga	cttaacttac	caataacagg	atcaatggac	actgtatata
WA	251	ctaactctac	tcaagaagaa	gtgtttctaa	cttctacgtt	atgtctgtat
K-21	251	ctaactctac	tcaagaagaa	gtgtttctaa	cttctacgtt	atgtctgtat
KU	251	ctaactctac	tcaagaagaa	gtgtttctaa	cttctacatt	atgtctat
WA	301	tatccaactg	aagcaagtac	tcaaatcaat	gatgggtgact	ggaaagactc
K-21	301	tatccaactg	aagcaagtac	tcaaatcaat	ga	
KU	301	tatccaactg	aagcaagtac	tcaaatcaat	gatgggtgact	ggaaagactc

Figure 7. Comparisons of the nucleotide sequences of VP7 of K-21 with those of standard type.

5월 사이 서울지역에서 유행하였던 로타바이러스들 중 VP7의 혈청형은 G1이 91%로 단연 우세하였다고 Kim 등 [19]이 보고 한 것과 유사하였다. VP4의 혈청형은 P1A가 91%로 단연 우세하게 나타났다.

발생빈도가 가장 높은 혈청형 (G1, P1A)인 K-21의 염기서열을 동일 혈청형인 Wa와 KU와 비교해 보면 VP7의 염기서열은 Wa와는 100%, KU와는 98% 상동성을 나타냈고 VP4의 염기서열은 Wa와는 96.74%, KU와는 90.88% 상동성을 나타냈

다. VP7의 염기서열 및 아미노산 서열은 동일 혈청형 간에는 상동성이 91~100%이고 다른 혈청형 간에는 71~86%로 명확한 차이가 있고, VP7의 혈청형 1~4형 strain에 대해 VP4의 아미노산 서열은 혈청형 1, 3, 4형간에는 93~97%로 높은 상동성을 나타내고 혈청형 2형간에도 98%의 높은 상동성을 나타내지만 혈청형 1, 3, 4형과 2형 간에는 88~90% 상동성밖에 없다고 보고했다 [32]. 이와 같이 K-21은 표준 HRV Wa과 KU와 같은 혈청형 G1, P1A 으로 나타났고, K-21의 VP7 혈청형

차광종 등: 로타바이러스의 혈청형과 염기서열

WA ¹	1	ggctataaaa	tggttcact	catttataga	cagcttc	ca	ctaatt	data
K-21	36				tctta	ataatt	tata	
KU ²	1	ggctataaaa	tggttcgct	catttataga	cagcttc	ca	ctaatt	data
WA	51	ttcagtagat	ttacatgatg	aaatagagca	aattggatca	gaaaaaactc		
K-21	51	tttaatagat	ttacatgatg	aaatagagca	aattggatca	gaaaaaactc		
KU	51	ttcagtagat	ttacatgatg	aaatagagca	aattgggtca	gaaaaaactc		
WA	101	aaaatgtaac	tataaatccg	agtcatttg	cacagactag	atatgctcca		
K-21	101	aaaatgtaac	tataaatccg	agtcatttg	cacagactag	atatgctcca		
KU	101	aaaacgtaac	tgtaaatcqa	ggtcatttg	ccaaactag	atatgctcca		
WA	151	gtcaattggg	gtcatggaga	gataaatgat	tcgactacag	tagaaccaat		
K-21	151	gtcaattggg	gtcatggaga	gataaatgat	tcgactacag	tagaaccaat		
KU	151	gtcaattggg	gtcatggaga	gataaatgat	tcgaaccacag	tagaaccaat		
WA	201	gtagatggg	ccttatcagc	caactacatt	tactccacct	aatgattatt		
K-21	201	gtagatggg	ccttatcagc	caactacatt	tactccacct	aatgattatt		
KU	201	gtagatggg	ccttatcagc	ctactacatt	taaacacct	actgattatt		
WA	251	ggatacttat	taattcaaat	acaaatggag	tagtatatga	agta	caaat	
K-21	251	ggatacttat	taattcaaat	acaaatggag	tagtatatga	gaggaca	caaat	
KU	251	ggatacttat	taactcaaat	acaaatggag	tggtatacga	gagta	cgaaat	
WA	301	aatagtgact	ttggactgc	agtcggtgct	attgaccgc	acgttaaccc		
K-21	301	aatagtgact	ttggactgc	agtcggtgct	attgaccgc	acg		
KU	301	aatagtgact	ttggactgc	agtaggtgct	attgaccgc	acgttatcca		

Figure 8. Comparisons of the nucleotide sequences of VP4 of K-21 with those of standard type.

은 Wa 및 KU와 유사하지만 VP4 혈청형은 약간 다른 새로운 strain으로 생각된다.

국내에서도 대부분 세계적으로 빈발하는 G1과 P1A 혈청형이 많지만 이들 주와 감별이 어려운 변이주가 국내에서도 발생되고 있다. 앞으로 효과적인 백신개발과 저해물질을 개발하기 위해서는 전국적으로 로타바이러스를 더 많이 분리하여 항원적 특성과 변이에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

국내에 분포하는 사람 로타바이러스의 혈청형과 유전자형을 알기 위하여 서울과 경기도에 소재하는 두 병원에 입원한 설사병 환자로부터 진단키트와 전기영동을 이용하여 로타바이러스 분포 조사를 한 결과 27%가 로타바이러스의 감염에 의한 것으로 밝혀졌다. 이들 양성 환자로부터 분리한 22주의 바이러스 RNA를 electropherotyping

해본 결과 4:2:3:2 pattern을 보였으며 migration pattern은 long type임을 알 수 있었다. 또한 이들 분리 바이러스는 모두 A 군에 속하였으나 아군 II에 20주의 분리 바이러스가 G1, P1A로 나타났고, 나머지 2 분리 주 A-29와 K-30은 아군 I에 속함을 알 수 있었다. 분리주 중의 하나인 K-21의 VP7 염기서열을 보면 Wa와는 100%, KU와는 98%의 상동성을 보였으며, VP4 염기서열은 Wa와 96.7%, KU와는 90.8% 상동성을 보였다.

감사의 글

이 연구를 위해 도움을 주신 고려대학교 구로병원 병리학교실 이갑노 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck RJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283, 1973.
- 2) Chiarini A, Arista S, Giammanco A, Sinatra A: Rotavirus persistence in cell culture: select of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J Gen Virol* 64: 1101-1110, 1983.
- 3) Conner ME, Madson DO, Estes ME: Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr Top Microbiol Immunol* 105: 253, 1994.
- 4) Davidson GP, Bishop RF, Twonley RRW, Holmes IH, Puck BJ: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 242-246, 1975.
- 5) Ebina T, Tsukada K: Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiology and Immunology* 35: 583-588, 1991.
- 6) Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *American Soci Microbiol* 53(4): 410-449, 1989.
- 7) Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF: Rotaviruses; A review. *Curr Top Microbiol Immunol* 105: 123-184, 1983.
- 8) Galss RI, Gentsch J, Smith JCS: Rotavirus vaccines: Success by reassortant? *Science* 265: 1389-1391, 1994.
- 9) Gentsch JR, Glass RI, Woods P: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 1365-1373, 1992.
- 10) Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, Hoshino Y, Flores J: Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol* 30: 9-16, 1992.
- 11) Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM: Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7155-7159, 1990.
- 12) Gouvea V, Decastro L, Timenetsky MD, Greenberg HB, Santos N: Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 32: 1408-1409, 1994.
- 13) Gouvea V, Roger IG, Patricia W, Koki T, Clark HF, Barbara F, Zhao YF: Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid From Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 28: 276-282, 1990.
- 14) Herring AJ, Inglis NF, Ojek CK: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473-477, 1982.
- 15) Ishizaki H, Ohta C, Shirahata T, Goto H, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S: Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. *Am J Vet Res* 56(8): 1019-1024, 1995.
- 16) Kaga E, Iizuka M, Nakagomi T, Nakagomi O: The distribution of G (VP7) and P (VP4) serotypes among human rotaviruses recovered from Japanese children with diarrhea. *Microbiol Immunol* 38: 317-320, 1994.
- 17) Kapikian AZ, Chanock RM: Rotaviruses. *Virology* 2, 2nd: In B. N. Fields and D. M. Knipe (ed), Raven press, New York p1353-1404, 1990.
- 18) Kapikian AZ, Flores J, Vesikari T, Ruuska T, Madore HP, Green KY, Gorziglia M, Hoshino Y, Chanock RM, Midthun K, Perez-Schael I: Recent advances in development of a rotavirus vaccine for prevention of severe diarrheal illness of infants and young children.

- Adv Exp Med Biol* **310**: 255-264, 1991.
- 19) **Kim, YB, Kim, KH, Yang, JM**: cDNA cloning and nucleotide sequence determination for VP7 coding RNA segment of human rotavirus isolated in Korea. *K J Microbiol* **30**: 397-402, 1992.
 - 20) **Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa T**: Reactivity of anti-human rotavirus VP4 neutralizing monoclonal antibodies with animal rotaviruses and with unusual human rotaviruses having different P and G serotypes. *Res Virol* **144**: 201-207, 1993.
 - 21) **Li B, Gorziglia M**: VP4 serotype of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol* **31**: 3075-3077, 1993.
 - 22) **Liu M, Offit PA, Estes MK**: Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* **163**: 26-32, 1988.
 - 23) **Matsui SM, Mackow ER, Greenberg HB**: The molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv Virus Res* **36**: 181-214, 1989a.
 - 24) **Noel J, Mansoor A, Thaker U, Hermann J, Perronhenry D, Cubitt WD**: Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the hospitals for sick children, London, 1989-1992. *J Med Virol* **43**: 84-90, 1994.
 - 25) **Paul PS, Lyoo YS, Woode GN, Zheng S, Greenberg HB, Matsui S, Schwartz KJ, Hill HT**: Isolation of bovine rotavirus with a 'super-short' RNA electrophoretic pattern from a calf with diarrhea. *J Clin Microbiol* **26(10)**: 2139-2143, 1988.
 - 26) **Paul PS, Stevenson GW**: Rotavirus and Reovirus. Viral diseases. Section 2. Diseases of swine. 7th ed. Ed. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire, Taylor DJ: Wolfe Publishing Ltd press. p331-342, 1992.
 - 27) **Ruggeri FM, Greenberg HB**: Antibodies to the trypsin cleavage peptide Vp8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* **65(5)**: 2211-2219, 1991.
 - 28) **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR**: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **74**: 5463-5467, 1977.
 - 29) **Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I, Scott FMM, Brosnong GF, Miller DL, Herring AJ, Greenberg HB**: Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J Clin Microbiol* **28(3)**: 504-507, 1990.
 - 30) **Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM, Hargreaves FD**: Comparison of typical rotavirus from calves, piglets lambs and man. *J Gen Virol* **65**: 909-914, 1984.
 - 31) **Tabassum S, Shears P, Hart CA**: Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhoea in Bangladesh. *J Med Virol* **43**: 50-56, 1994.
 - 32) **Taniguchi K, Hoshino Y, Nishikawa K, Green KY, Maloy WL, Morita Y, Urasawa S, Kapikian AZ, Chanock RM, Gorziglia M**: Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: Nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J Virol* **62**: 1870-1874, 1988a.
 - 33) **Taniguchi K, Urasawa S**: Diversity in rotavirus genomes. *Virology* **6**: 123-131, 1995.
 - 34) **Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, Urasawa T, Ukae S, Chiba S, Urasawa S**: Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* **109**: 303-312, 1992.
 - 35) **Urasawa S, Urasawa T, Wakasugi F, Kobayashi N, Taniguchi K, Lintag IC, Saniel MC, Goto H**: Presumptive seventh serotype of human rotavirus. *Arch Virol* **113**: 279-282, 1990.