

급성 위장관염에 병발하는 양성 무열성 경련 소아 환자의 대변에서 검출된 바이러스 및 유전자형 분석 연구

서울대학교 의과대학 소아과학교실 소아소화기영양분과, *국립보건원 바이러스부 소화기바이러스과
양혜란 · 지영미* · 고재성 · 서정기

Detection and Genotyping of Viruses Detected in Children with Benign Afebrile Seizures Associated with Acute Gastroenteritis

Hye Ran Yang, M.D., Young Mee Jee*, Jae Sung Ko, M.D. and Jeong Kee Seo, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Seoul National University,

*Division of Enteroviruses, Department of Virology, National Institute of Health, Seoul, Korea

Purpose: Rotaviruses, noroviruses, astroviruses, and enteric adenoviruses cause acute gastroenteritis (AGE) in children. Some children with AGE have afebrile convulsions associated with viral gastroenteritis. The purpose of this study was to detect and genotype viruses from children with AGE or benign infantile seizures associated with mild gastroenteritis (BIS-MG).

Methods: Between August 2004 and June 2005, 311 children with AGE were included. Four viral agents, including rotavirus, norovirus, astrovirus, and adenovirus, were analyzed from stool specimens of each patient using the latex agglutination method, enzyme immunoassay, and reverse transcriptase polymerase chain reaction. Genotyping of each virus was performed in 217 of the 311 children.

Results: Among 217 children (male, 121; female, 96; mean age, 20.6±15.4 months), rotavirus was detected in 109 (50.2%), norovirus in 28 (12.9%), adenovirus in 13 (6.0%), and astrovirus in 2 children (0.9%). Genotyping of rotavirus revealed positive results in 97 children; P[8]G3 in 36, P[4]G2 in 21, P[6]G4 in 10, P[4]G4 in 9, P[8]G9 in 6, P[8]G1 in 6, P[4]G3 in 4, P[4]G9 in 3, and P[6]G2 in 2. Genotyping of norovirus showed GII-4 in 27 of 28 children and GII-6 in 1 child. Sixteen children were diagnosed with BIS-MG. Rotavirus was detected in 13 of 16 children with BIS-MG, and norovirus in 2 children. Genotyping of rotavirus detected in children with BIS-MG revealed P[8]G3 in 6 children, P[4]G2 in 2 children, and P[4]G9 in 1 child.

Conclusion: Analysis of viruses from stool specimens indicates that both rotavirus and norovirus are the main viruses related to BIS-MG in children. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 12: 183~193)

Key Words: Gastroenteritis, Afebrile seizure, Rotavirus, Norovirus, Genotype, Children

접수 : 2009년 8월 2일, 승인 : 2009년 9월 3일

책임저자 : 서정기, 110-744, 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 어린이병원 소아청소년과 소화기영양분과

Tel: 02-2072-3627, Fax: 02-2072-3455, E-mail: jkseo@snu.ac.kr

본 연구는 서울대학교병원 지정연구비 지원을 받아 수행되었음(연구과제 번호 04-2005-008-0).

서 론

영유아에서 흔히 발생하는 열성 경련은 대개 양성 경과를 밟는 반면, 열이 없는 상태에서 발현하는 무열성 경련은 원인질환에 따라 치료나 예후가 달라지므로 무열성 경련의 원인을 정확히 규명하는 것이 중요하다.

로타바이러스(rotavirus), 노로바이러스(norovirus), 아스트로바이러스(astrovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 등은 소아에서 급성 위장관염을 유발하는 대표적인 바이러스로 알려져 있다^{1,2)}. 바이러스에 의한 급성 위장관염에 이환된 소아는 주로 발열, 구토, 설사 등의 증상을 보이는데, 일부 소아 환자에서는 발열이나 신경학적 이상이 없는 상태에서 급성 위장관염과 관련하여 무열성 경련(afebrile seizure)을 보이는 것으로 보고되어 왔다³⁾.

급성 위장관염에 병발하는 양성 영아기 경련(benign infantile seizures associated with mild gastroenteritis, BIS-MG)은 평소 건강하던 영유아가 급성 위장관염 증세를 보이면서 갑자기 무열성 경련을 보이는 경우에 해당하며 다른 기질적 원인이 없고 뇌파 소견도 정상이다³⁾. BIS-MG 환자에서 경련은 장염증세가 시작되면서 초기 5일 이내에 발생하는데, 환자의 50% 이상에서 대변검사상 로타바이러스가 양성으로 확인되어 로타바이러스에 의한 장염이 중요한 원인으로 인식되어 왔으며⁴⁾, 최근 들어 노로바이러스에 의한 BIS-MG의 가능성도 제시되고 있다⁵⁾.

바이러스 위장관염과 동반되어 발생한 BIS-MG는 예후가 양호하다고 알려져 있어 다른 무열성 경련의 원인들과는 차이가 있으므로 이에 대한 체계적인 연구의 필요성이 대두되었으나 BIS-MG의 임상양상에 대한 일부 논문들을 제외하고는 아직까지 원인 바이러스에 대한 국내외 연구가 거의 이루어지지 못 하였다^{6~8)}.

이에 본 연구에서는 급성 위장관염으로 내원한 소아 환자 및 급성 위장관염에 병발하는 무열성 경련, 즉 BIS-MG 소아환자의 대변에서 각각 바이러스를 검출하여 원인 바이러스를 규명하고, 각 바이러스의 유전자형을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2004년 8월부터 2005년 7월까지 분당서울대학교병원 소아청소년과에 급성 위장관염으로 입원하여 대변 검사를 시행하였던 311명의 소아 환자 중에서 로타바이러스, 아스트로바이러스, 노로바이러스에 대한 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 검사와 아데노바이러스에 대한 PCR 검사를 병행하여 실시하였던 217명을 대상으로 하였다.

BIS-MG는 모든 형태의 경련(전신성 또는 부분)으로 발현하며, 발병 전의 정신신경발달이 정상이고, 신경학적 기저질환이 없으며, 38°C 이상의 발열이 없고, 4세 이전에 발병하며, 뇌파와 뇌신경영상 소견이 정상이어야 하는 기준을 모두 만족하는 경우에 진단하였다.

급성 위장관염 진단 하에 입원하였던 환자 중에서 발열, 급성 뇌손상, 전해질 불균형, 대사 이상, 탈수 등에 유발된 경련을 보이는 경우는 연구대상에서 제외하였다. 또한 이전에 경련의 병력이 있었던 경우도 연구에서 제외하였다.

대상 환자를 무열성 경련 유무에 따라서, 단순한 급성 위장관염에 해당하는 AGE군(n=201)과 무열성 경련이 동반된 급성 위장관염을 보인 BIS-MG군(n=16)으로 나누어 분석하였다.

2. 연구 방법

1) 검사 방법

(1) 혈액 및 대변검사; 모든 환아에서 일반혈액검사, 혈청 전해질(Na, K, Cl, tCO₂) 및 이온화 칼슘, 혈당을 측정하였다. 모든 대상환아의 대변에서 라텍스 응집반응 검사(Orion Diagnostica, Espoo, Finland)에 의한 로타바이러스, 아데노바이러스 항원검출 검사를 시행하였으며, 효소면역측정법에 의한 아스트로바이러스 항원검출 검사를 시행하였다. 또한 모든 환자에서 대변 배양 검사를 실시하여 세균성 장염의 가능성을 배제하였다.

(2) 뇌파 검사, 뇌척수액 검사 및 영상검사; 모든 BIS-MG 환자에서 뇌파 검사(interictal EEG)를 시행하였다. 일부 환자에서 뇌척수액 검사를 시행하여 채취한 뇌척수액에서 세포수 측정, 화학검사, 세균응집반응검

사, 세균배양검사, 헤르페스바이러스에 대한 중합효소 연쇄반응검사를 실시하였다. 또한 뇌 전산화단층촬영 또는 뇌 자기공명영상검사를 시행하여 경련을 유발하는 다른 기질적인 원인을 배제하였다.

2) 대변에서의 바이러스 검출⁹⁾

(1) 대변 가검물의 처리; 환자의 대변 가검물을 PBS (phosphate buffered saline solution)에 넣어 10% 대변 부유액을 만든 후 4°C에서 30분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하였다.

(2) 로타바이러스, 노로바이러스, 아스트로바이러스의 RNA (ribonucleic acid) 추출; 200 μ L의 대변 상층액을 600 μ L Tri-reagent와 잘 섞은 후 상온에서 5~10분간 둔 후 chloroform 200 μ L를 넣고 vortex하여 10분간 상온에 두고, 14,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 넣고 vortex하였다. 상온에서 10분간 둔 후 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심한 후 상층액을 제거하였다. 1,000 μ L의 70% 에탄올을 넣고 14,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 후 상층액을 제거하였다. 10~30분간 건조한 후 10 μ L의 DEPC (diethyl pyrocarbonate)로 처리한 증류수를 넣고 vortex하여 각 바이러스의 RNA를 추출하였다.

(3) 아데노바이러스의 DNA (deoxyribonucleic acid) 추출 및 PCR; 50 μ L 대변 상층액에 5N NaOH 5.5 μ L를 첨가하여 최종 농도를 0.5N로 한 후 37°C에서 15분간 변성시킨 후 5N HCl을 5.5 μ L넣어 중화하고 H₂O로 희석하였다. 이렇게 얻은 추출액 10 μ L와 15 mM MgCl₂를 포함한 10x 완충액 5 μ L, 25 mM MgCl₂, 10 mg/ml BSA 0.5 μ L, dNTP 4 μ L, 아데노바이러스에 대한 양 방향 시발체 hexAA1885 및 hexAA1913 각각 0.4 μ L, Taq polymerase 0.5 μ L, 증류수 24.2 μ L를 넣은 반응 혼합액을 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 70°C에서 30초의 cycle을 35회 수행하여 바이러스를 증폭하였다. 아데노바이러스 유전자형 분석을 위해 사용한 시발체들은 Table 1에서 제시된 바와 같다¹⁰⁾.

(4) RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)에 의한 로타바이러스 검출 및 유전형 분석

① 로타바이러스 cDNA의 합성 및 PCR; 추출된 RNA 5 μ L에 DMSO (dimethyl sulfoxide) 3.5 μ L를 넣고 5분간 끓여 변성시킨 후 얼음에서 식히고 4 μ L 5x RT buffer, 2 μ L 100 mM dithiothreitol, 0.5 μ L dNTP, 1 μ L

RNase inhibitor, 100 ng 시발체, 1 μ L reverse transcriptase (Promega corp. WI, USA)를 넣고 최종 볼륨을 증류수로 20 μ L로 맞춘 후 42°C에서 1시간 인큐베이션 하여 cDNA를 합성하였다. RT product 5 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L, 2.5 mM dNTP 혼합액 4 μ L, 시발체 10 pmoles, Taq polymerase 2.5 U 그리고 35 μ L 증류수를 포함한 PCR 혼합물을 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분의 cycle을 30회 수행하였다.

② 로타바이러스의 유전자형 분석; G typing을 위해 앞에서 합성한 cDNA를 End9 시발체, Beg9 시발체를 사용하여 1,062 bp를 증폭한 후 각각의 G type 시발체 (aBT1, aCT2, aET3, aDT4)를 사용하여 94°C 1분, 42°C 2분, 72°C 2분의 cycle을 20회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 5분간 연장반응 시킨 후 전기영동으로 PCR 산물을 확인하여 G type을 결정하였다.

P typing을 위해 앞에서 합성한 cDNA를 con2 시발체와 con3 시발체를 사용하여 876 bp를 증폭한 후 각각의 P type 시발체(1T1, 2T1, 3T1, 4T1, 5T1)를 사용하여 94°C 1분, 50°C 2분, 72°C 2분의 cycle을 20회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 5분간 연장반응 시킨 후 전기영동으로 PCR 산물을 확인하여 P type을 결정하였다.

로타바이러스 유전자형 분석을 위해 사용한 시발체들은 Table 1에서 제시된 바와 같다^{11,12)}.

(5) 아스트로바이러스 cDNA의 합성 및 PCR; 추출한 RNA 주형 5 μ L에 MgCl₂를 포함한 5x RT buffer 5 μ L, mon 348 2.5 μ L (10 pmole), dNTP 8 μ L, reverse transcriptase (Promega corp. WI, USA) 0.5 μ L, 증류수 4 μ L를 넣어 25 μ L의 혼합물을 Perkin Elmer DNA thermal cycler 480을 사용하여 42°C에서 60분간 배양하여 아스트로바이러스 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 주형 5 μ L와 15 mM MgCl₂를 포함한 10x 완충액 5 μ L, mon 348 및 mon 340 시발체 각각 2.5 μ L, dNTP 6 μ L, Taq polymerase 0.5 μ L, 증류수 28.5 μ L를 포함한 50 μ L의 반응 혼합액에 대해 Perkin Elmer DNA thermal cycler 480을 사용하여 증폭하였다. 94°C에서 3분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 50°C에서 20초, 72°C에서 30초의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 5분간 연장반응 시켜 바이러스를 증폭하였다. 아스트로바이러스 유전자형 분석을 위해 사용한 시발체들은 Table 1에서 제시된 바와 같다¹³⁾.

Table 1. Sequence of Primers Used for the PCR or RT-PCR⁹⁾

Virus		Primer	Sequence (5'→3')	Reference
Adenovirus		hexAA1885 hexAA1913	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	Allard et al. ¹⁰⁾
Rotavirus	P typing	Con3 Con2	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA ATTCGGACCATTATAACC	Gentsch et al. ¹¹⁾
		1T1 2T1 3T1 4T1 5T1	TCTACTTGGATAACGTGC CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC TGTTGATTAGTTGGATTCAA TGAGACATGCAATTGGAC ATCATAGTTAGTAGTCGG	
Rotavirus	G typing	Beg9 End9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	Gouvea et al. ¹²⁾
		aBT1 aCT2 aET3 aDT4	CAAGTACTCAAATCAATGATGG CAATGATATTAACATTTTCTGTG CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	
Astrovirus		Mon340 Mon348	CGTCATTATTTGTTGTCATACT ACATGTGCTGCTGTTACTATG	Belliot et al. ¹³⁾
Norovirus	First PCR	36 35	ATAAAAGTTGGCATGAACA CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT	Moe et al. ¹⁴⁾
	Second PCR	NV82 SM82 NV81	TCATTTTGATGCAGATTA CCACTATGATGCAGATTA ACAATCTCATCATCACCATA	

(6) RT-PCR에 의한 노로바이러스 검출 및 염기서열 분석

① 노로바이러스 cDNA의 합성 및 PCR: 추출한 RNA 주형 5 µL에 MgCl₂를 포함한 5x RT buffer 3 µL, 노로바이러스 polymerase 부위의 antisense primer 35 1 µL (10 pmole), dNTP 4 µL (2.5 mM), reverse transcriptase (Promega corp. WI, USA) 0.5 µL (100 U), RNase inhibitor 0.5 µL (20 U), 증류수 1 µL를 넣어 총 15 µL의 혼합액을 Perkin Elmer DNA thermal cycler 480을 사용하여 42°C에서 90분간 배양함으로써 역전사를 시행하여 바이러스 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 주형 15 µL와 15 mM MgCl₂를 포함한 10x PCR buffer 3.5 µL, 역방향 시발체 35와 시발체 36 각각 1 µL, Taq polymerase 0.5 µL (2.5U, Bioneer inc. Korea), 증류수 29 µL를 포함한 50 µL의 반응혼합액을 thermocycler를 사용

하여 증폭하였다. 즉, 94°C에서 3분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분의 cycle을 40회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 15분간 연장 반응을 시켰다. Nested PCR을 위해 첫 번째 PCR 산물 1 µL, 10x PCR 완충액, NV 81, NV 82, SMV 82 시발체 각각 1 µL (10 pmole), dNTP 1 µL (2.5 mM), Taq polymerase 0.5 µL (2.5 U), 증류수 36.5 µL를 포함한 50 µL 반응 혼합액을 처음 PCR과 같은 조건으로 증폭시켰다. 노로바이러스 유전자형 분석을 위해 사용한 시발체들은 각각 Table 1에서 제시된 바와 같다¹⁴⁾.

② 노로바이러스의 염기서열 분석: 증폭한 부분의 염기서열 분석을 위해 TOPO TA cloningTM kit (Invitrogen corp. La Jolla, CA, USA)을 사용하여 클로닝을 시행하였다. 흰색 집락을 골라서 ampicillin 50 µg/mL을 포함한 LB medium에 배양한 후 plasmid DNA를

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega corp., WI, USA)을 사용하여 추출하였다. DNA 주형 2 μ L, Dye terminator 4 μ L, 시발체(10 pmole, 0.6 μ L), 증류수를 넣어 10 μ L가 되게 한 후 Perkin Elmer DNA thermal cycler 480을 사용하여 96°C에서 30 초, 50°C에서 15초, 60°C에서 4분의 cycle을 25회 수행하였다. 정제를 위해 ethanol과 3M Sodium acetate를 첨가하여 -70°C에서 침전을 시켰고, 완충액 2 μ L를 넣어 vortex 한 후 90°C에서 2분간 변성시킨 후 ABI prism 377 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, California, USA)에서 전기영동을 시행하였다. 증폭된 부분의 염기서열에 MegAlign Program (Lasergene 7.2, DNASTar corp., WI, USA)을 적용하여 분석하였다.

바이러스의 계통도는 PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) 4.0b (Sinauer Associates Inc., MA, USA)를 사용하여 maximum parsimony method에 의해 구성되었다.

3. 통계학적 분석

통계학적 분석을 위하여 SPSS 17.0 (SPSS inc, Chicago, USA)을 이용하여 *Chi-Square test*를 시행하였으며, *p-value* 0.05 미만을 통계적으로 유의하다고 판정

하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징

대상환자 총 217명 중에서 남아가 121명, 여아가 96명이었으며, 환아들의 평균 연령은 20.6±15.4개월(범위: 생후 10일~108개월)이었다.

전체 217명 중 16명(7.4%)이 급성 위장관염의 경과 중에 다른 기질적 원인 없이 무열성 경련을 보여서 BIS-MG군에 해당하였다. BIS-MG에 해당한 16명(남아 8명, 여아 8명)의 평균 연령은 16.3±4.4개월(범위: 6~25개월)이었다. 이들이 보인 경련의 형태는 모두 전신 발작에 해당하였는데, 10명(62.5%)에서는 전신성 강직-간대 발작, 5명(31.2%)은 전신성 강직 발작, 1명(6.3%)은 탈력 발작을 보였다(Table 2).

2. 대변에서 검출한 장염 원인바이러스의 분석 (Fig. 1)

총 217명 중, 라텍스 응집반응 및 효소면역측정법에 의한 대변검사 결과에서는 로타바이러스가 109명(50.2%)에서 검출되었으며, 아데노바이러스가 13명(6.0%),

Table 2. Clinical Features of Patients with BIS-MG and Detected Viruses Related to BIS-MG*

Case	Sex	Age (mo)	Seizure type	Rotavirus genotyping	Norovirus genotyping
1	M	18	Generalized tonic-clonic seizure	P[4]G9	(-)
2	M	17	Generalized tonic-clonic seizure	P[4]G2	(-)
3	F	15	Generalized tonic-clonic seizure	P[8]G3	(-)
4	F	13	Atonic seizure	P[8]G3	(-)
5	M	6	Generalized tonic-clonic seizure	P[4]G2	(-)
6	F	17	Generalized tonic-clonic seizure	P[8]G3	(-)
7	F	18	Generalized tonic-clonic seizure	P[8]G3	(-)
8	F	21	Generalized tonic seizure	P[8]G3	(-)
9	F	15	Generalized tonic seizure	P[8]G3	(-)
10	M	25	Generalized tonic seizure	Rota (+)	(-)
11	M	15	Generalized tonic seizure	Rota (+)	(-)
12	M	18	Generalized tonic-clonic seizure	Rota (+)	(-)
13	M	13	Generalized tonic seizure	Rota (+)	(-)
14	F	15	Generalized tonic-clonic seizure	(-)	GII-4
15	M	22	Generalized tonic-clonic seizure	(-)	GII-4
16	F	12	Generalized tonic-clonic seizure	(-)	(-)

*BIS-MG: benign infantile seizures associated with mild gastroenteritis.

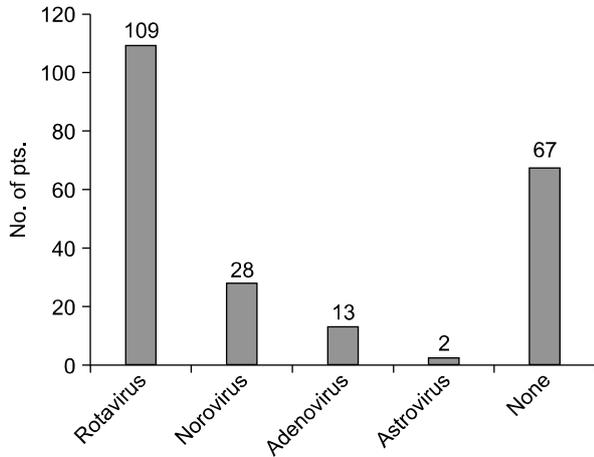


Fig. 1. Viruses detected from stool specimens of children with acute gastroenteritis (n=217). Two patients had coinfection by norovirus and adenovirus. No virus was detected in 67 of 217 children.

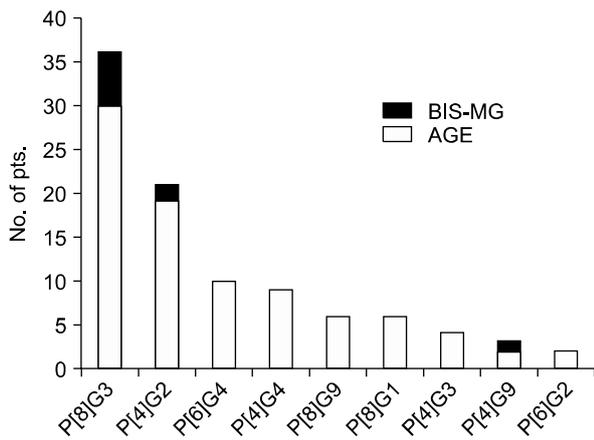


Fig. 2. Genotypes of rotaviruses detected in stool specimens of children with acute gastroenteritis (AGE) and children with benign infantile seizures associated with mild gastroenteritis (BIS-MG).

아스트로바이러스가 2명(0.9%)에서 검출되었다.

장염 바이러스들에 대한 분자유전학적 검사 결과에서는 로타바이러스가 97명(44.7%)에서 검출되었으며, 노로바이러스가 28명(12.9%), 아데노바이러스가 7명(3.2%), 아스트로바이러스가 1명(0.5%)에서 검출되었다.

전체 217명 중에서 2명(0.9%)은 노로바이러스와 아데노바이러스 동시감염 환자였다. 67명(30.9%)의 대변에서는 아무런 바이러스도 검출되지 않았다.

대상 환자 217명에서 시행한 대변 세균배양검사 결

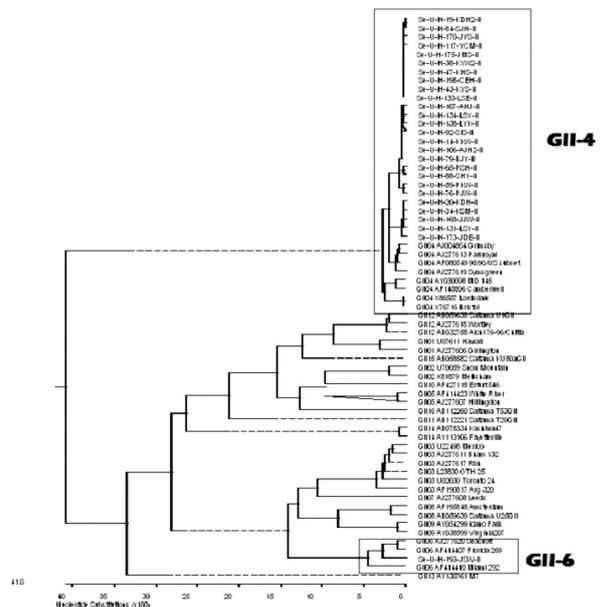


Fig. 3. Phylogenetic tree of norovirus in Korean children with acute gastroenteritis by maximum-parsimony tree analysis method (GII-4: Genogroup II-4, GII-6: Genogroup II-6).

과는 모두 음성이었다.

3. 검출된 바이러스의 유전자형 분석

대변항원검사에서 로타바이러스가 검출된 109명 모두에서 시행한 RT-PCR 검사상 총 97명에서 로타바이러스가 확인되었는데, 이들의 유전자형은 P[8]G3가 36명으로 가장 많았고, P[4]G2 21명, P[6]G4 10명, P[4]G4 9명, P[8]G9과 P[8]G1 6명, P[4]G3 4명, P[4]G9 3명, P[6]G2 2명이었다(Fig. 2).

노로바이러스가 검출된 28명에서의 유전자형 분석 결과, GII-4가 27명에서 검출되었으며, GII-6가 1명에서 확인되었다. 노로바이러스의 계통도는 Fig. 3과 같다.

아데노바이러스가 검출된 13명 모두에서 시행한 PCR 검사결과 7명에서 확인되었으며, 아데노바이러스는 41형이 4명으로 가장 많았고, 그 외에 1형, 3형, 6형이 각각 1명씩이었다.

4. BIS-MG 환자의 대변에서 검출된 바이러스 및 유전자형 분석결과

BIS-MG 16명 중 13명(81.3%)에서 로타바이러스가 대변에서 검출되었으며, 2명(12.5%)에서는 노로바이러

스가 대변에서 검출되었다. 나머지 1명(6.1%)에서는 아무런 바이러스도 검출되지 않았다(Table 2).

로타바이러스 감염이 확인된 13명 중 분자유전학적 검사상 로타바이러스가 검출된 9명의 BIS-MG 환자에서 확인된 로타바이러스 유전자형은 P[8]G3가 6명, P[4]G2가 2명, P[4]G9 1명이었다(Fig. 2). 로타바이러스의 유전자형은 BIS-MG군과 AGE군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.234$).

노로바이러스 감염이 확인된 2명의 BIS-MG 환자에서 검출된 노로바이러스 유전형은 2명 모두 GII-4에 해당하였다.

고 찰

급성 위장관염에 병발하는 무열성 경련, 즉 양성 영아기 경련(benign infantile seizures associated with mild gastroenteritis, BIS-MG)은 1982년 Morooka¹⁵⁾에 의해 처음 기술되었다. 이후 BIS-MG는 과거력에 신경학적 질환이 없고 발달상태가 정상이었으며 간질의 가족력이 없는 평소 건강하던 영유아가 발열이 없는 상태에서 경련을 보이며, 경련을 일으킬만한 다른 기질적인 원인이 없고 주로 전신성 강직-강대 발작 양상의 경련을 보이며, 뇌파에서 이상소견을 보이지 않고, 예후가 양호하다는 임상적인 특징을 보이는 것으로 기술되어 왔다¹⁶⁾.

바이러스는 소아에서 장염을 일으키는 주요 원인 병원체이다. 로타바이러스를 비롯한 장염 바이러스들은 여전히 영유아에서 심각한 문제가 되고 있으며, 국내외에서 시행한 연구 결과들에 따르면, 로타바이러스, 아스트로바이러스, 장 아데노바이러스, 노로바이러스 등이 바이러스성 장염의 원인 병원체에 해당되지만 이 중 로타바이러스가 가장 흔하고 심한 임상양상을 나타내는 원인 바이러스로 알려져 있으며¹²⁾, 최근에는 노로바이러스에 의한 위장관염의 비중이 급격히 늘고 있어서 주목을 받고 있다¹⁷⁾.

BIS-MG의 경련은 장염 시작 5일 이내에 발생하며, 지금까지 로타바이러스에 의한 장염이 중요한 원인으로 인식되어 왔다^{3,18)}. Wong¹⁹⁾도 대규모의 급성장염 환자를 대상으로 연구를 시행하여 이 중 무열성 경련을 보인 일부 환자(3.5%)에서 시행한 검사상 세균성 원인균이 19%, 로타바이러스가 44%, 아무런 원인균도 밝혀

지지 않은 경우가 나머졌다고 보고하여 로타바이러스 감염에 의한 뇌병증을 BIS-MG의 중요한 원인으로 보았다.

본 연구에서도 BIS-MG에 해당하는 환자 16명 중 13명(81.3%)에서 로타바이러스가 확인되어 로타바이러스가 BIS-MG의 중요한 원인 바이러스로 나타났다.

로타바이러스는 전 세계적으로 영유아기에 급성 설사를 유발하여 문제가 되는데, A, B, C군 로타바이러스가 사람에서 감염을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다^{20,21)}. 로타바이러스는 한국의 어린 소아에서도 가장 흔한 급성 설사의 원인 바이러스로서 대부분의 환자(84%)가 생후 6~24개월의 연령에 해당되는데, 무증상 감염도 흔히 있지만 임상증상으로 설사, 구토, 발열 증상을 보이거나 일시적인 간효소치 상승 등을 일으키기도 하며, 일부에서 무열성 경련도 일으키는 것으로 보고되었다²²⁾. 장염에 병발하여 발생한 경련은 반복하여 발생할 수도 있지만 장기적인 예후는 매우 좋아서 신경학적 후유증을 남기지는 않는 것으로 보고되어 왔다¹⁶⁾.

로타바이러스가 중추신경계 증상을 유발하는 이유에 대한 연구는 거의 미비하여 병태생리와 기전에 대해서는 거의 밝혀진 바가 없는 상태이다.

2004년 Kawashima 등²³⁾은 강력한 자유 라디칼인 nitric oxide가 뇌에 염증을 유발할 수 있으므로 바이러스에 의한 경련과 neuronal nitric oxide간에 연관성이 있을 것이라는 가정 하에 혈액과 뇌척수액에서 nitric oxide를 측정하고 결과 로타바이러스 장염 환자의 혈청 및 뇌척수액에서의 nitric oxide가 다른 뇌수막염, 뇌염, 열성 경련 환자나 대조군에 비해 높은 농도를 보였다고 하였다. 하지만 이에 대해서는 후속적인 연구가 나오지 않은 상태에서 향후 추가적인 연구로 입증해야 할 부분이라고 여겨진다.

일본에서 시행되었던 Nishimura 등²⁴⁾의 연구에 의하면 장염 증상과 함께 경련을 보였던 일본 소아에서 급성기에 채혈한 혈액샘플과 뇌척수액에서 RT-PCR을 이용하여 로타바이러스 RNA를 검출하였다고 보고하여 로타바이러스가 혈액을 타고 뇌-혈관 장벽을 통과하여 중추신경계에 침입하여 경련을 일으켰을 것으로 추정하였다. 이들은 RT-PCR을 이용하여 무열성 경련을 보이는 환자에서 로타바이러스의 존재를 확인하는 데에는 성공하였으나 BIS-MG를 일으킨 로타바이러스의 유

전자형을 확인하지는 않았다.

이후 1998년 로타바이러스 장염에 걸린 2세 된 남아에서 무열성 경련 1예가 보고되었는데, 이 환아에서 시행한 뇌척수액 검사에서 로타바이러스 RNA와 항로타바이러스 IgG 항체가 검출되었고 로타바이러스의 VP4 유전자형이 P8, VP7 유전자형이 G4로 확인되었다²⁵⁾.

이후에도 일부 논문들이 소아에서 로타바이러스 감염과 더불어 발생한 무열성 경련을 보고하고는 있지만, 아직까지 BIS-MG과 관련된 로타바이러스 유전자형의 분석에 대한 연구가 거의 이루어지지 못 하였기에 이에 대한 분자역학적 연구에 대한 필요성이 대두되었다.

국내 로타바이러스의 혈청형에 대해 2000년 서울대병원에서 발표한 논문에 의하면 1998~1999년 유행한 로타바이러스의 95%가 혈청형 G1, 2, 3, 4에 속하였으며, 로타바이러스의 혈청형이 기존의 G1에서 G4로 이행하고 있다고 하였다²²⁾.

2000~2001년 경남지역에서의 보고에서는 P 유전자형은 P[4], P[6]가 많았고, G 유전자형은 G2, G1이 많았으며, 조합형은 P[4]G2, P[6]G1, P[6]G2, P[4]G1 또는 P[6]G1 순으로 많았다고 보고한 바 있다²⁶⁾. 다른 연구에 의하면 국내 로타바이러스의 P형에서는 P1A와 P1B가 가장 흔한 혈청형이고, G형 중에서는 G1형과 G2형이 가장 우세하였으나 G4와 G3도 상당부분을 차지하고 이 외에도 미결정주의 수가 많아 새로운 G 유전자형이 국내에서 유행하고 있을 가능성을 시사하였다²⁷⁾.

2002~2004년 인천지역에서 시행한 조사에서는 P[6]G4, P[4]G2, P[8]G1, P[8]G3, P[10]G3, P[8]G4, P[8]G9 순으로 확인되었으며²⁸⁾, 정읍에서의 시행된 연구 결과 로타바이러스 유전자형은 G9P[8]가 39%로 가장 많았고, G1P[8] 24%, G3P[8] 17%, G2P[4] 13% 순으로 보고되었다²⁹⁾. 이와 같이 로타바이러스의 혈청형, 유전자형은 조사를 시행한 시기별, 지역별로 분포상의 차이를 보였다.

본 연구는 2004년에서 2005년에 걸쳐 경기도 지역의 소아 장염 환자를 대상으로 이루어진 연구로서, 로타바이러스가 확인된 환자들에서 유전자형을 분석한 결과, G 유전자형의 경우 G3, G2, G4가 각각 41.2%, 23.7%, 19.6%를 차지하였으며 G9와 G1도 9.3%와 6.2%를 차지하였다. P 유전자형은 P1A[8], P1B[4], P2A[6]가 각각 51.5%, 35.1%, 13.4%를 차지하였다. 이에 따라 조합형

은 P[8]G3가 가장 많았으며, P[4]G2, P[6]G4, P[4]G4, P[8]G9, P[8]G1, P[4]G3, P[4]G9, P[6]P2 순으로 많아서 기존의 보고들과 다소 차이가 있었다.

지금까지 국내외에서 BIS-MG 환자의 대변에서 추출한 로타바이러스 유전형에 대한 유일한 기존 연구인 최 등⁸⁾의 보고에 의하면, 2001~2002년에 걸쳐 경기도 구리 지역에서 발생한 소아 장염 환자 전체의 유전형 중에서 P[4]G2가 가장 많았으며 다음으로 P[6]G4의 순이었다. 그런데, BIS-MG 환자의 로타바이러스 유전형은 P[4]G2가 환자 11명 중 6명(54.5%)에서 확인되어 가장 많았으며, P[6]G2, P[8]G2, P[4]G3, P[6]G4가 각각 1명에서 확인되었던 반면, 신경증상이 없었던 로타바이러스 장염 환자들도 비록 P[4]G2, P[6]G4가 각각 18.3%로 가장 많았지만 P[4]G2가 BIS-MG 환자에 비해 상대적으로 적은 비중을 차지하여 통계적으로는 유의한 차이를 보였다고 하였다.

본 연구에서는 로타바이러스가 검출된 BIS-MG 환자에서 확인된 로타바이러스 유전자형은 P[8]G3가 가장 많았으며, P[4]G2와 P[4]G9도 함께 확인되었으며 다른 유전자형은 전혀 나타나지 않아서, 최 등⁸⁾의 보고와는 다른 결과를 보였다. 이러한 결과는 두 연구의 시기별, 지역별 차이에 따른 결과로 보인다. 즉, 전체 로타바이러스 장염 환자들에서 유전자형 분포가 본 연구의 경우 P[8]G3와 P[4]G2, P[6]G4, P[4]G4, P[8]G9, P[8]G1, P[4]G3, P[4]G9, P[6]P2의 순서였던 반면, 최 등⁸⁾의 연구에서는 P[4]G2, P[6]G4, P[8]G3, P[4]G3, P[6]G2 순서였고 P[4]G9가 전혀 발견되지 않는 등 두 연구 간에 뚜렷한 차이를 보인 까닭에 BIS-MG 환자에서도 각 지역과 시기별 우세한 유전자형이 많이 확인된 것으로 보이며, 로타바이러스의 유전자형 자체가 BIS-MG 발병의 병인으로 작용하지는 않는 것으로 여겨진다. 단지 최 등⁸⁾의 연구에서 BIS-MG에서 가장 많이 검출되면서 단순 로타바이러스장염 환자와 유의한 차이를 보였던 P[4]G2 유전자형이 본 연구의 BIS-MG 환자 일부에서도 확인된바 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다.

지금까지 언급한 로타바이러스 외에 노로바이러스도 BIS-MG와의 관련성이 시사되고 있는데, Abe 등¹⁶⁾은 로타바이러스뿐만 아니라 small round structured virus (SRSV)도 유사한 임상양상을 보이는 환자에서 발

견될 수 있다고 언급한 바 있다.

노로바이러스는 77 kb 크기의 RNA 바이러스로서 인체 감염을 일으키는 calicivirus에 속하며 5가지의 유전자형이 있지만 인체감염은 GI, GII, GIV에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있다. 전 세계적으로 GII 유전자형이 흔하며, 최근에는 주로 GII-4 유전자형의 노로바이러스 발병이 이루어지고 있다¹⁷⁾. 본 연구에서도 RT-PCR 결과 대변에서 노로바이러스가 확인된 28명 중 GII-4 유전자형이 27명(96.4%)에서 확인되어 이와 유사한 결과를 보였다.

BIS-MG의 원인으로 노로바이러스는 지금까지 거의 주목을 받지 못 하였는데, 2007년 Kawano 등³⁰⁾이 BIS-MG를 일으키는 원인 바이러스 분석 결과 대변 가검물의 71%에서 원인 바이러스가 검출되었는데, 이 중 30명에서는 로타바이러스가, 9명에서는 노로바이러스가 확인되었으며, 그 외에 사포바이러스, 아데노바이러스, 콕사키A4바이러스가 일부에서 검출되었다고 하여 로타바이러스 외에 노로바이러스가 BIS-MG의 중요 바이러스임을 보고하였다. 이 때 노로바이러스에 의한 무열성 경련 환자는 발생 연령이 로타바이러스 감염에 의한 무열성 경련 환자보다도 어렸고, 경련들의 지속 기간도 길었다고 하였다³⁰⁾. 또한 Chen 등⁵⁾은 노로바이러스 감염 환자가 로타바이러스에 비해 유의하게 경련 발생이 많았으며, 56명 중 41명에서 GII-4 유전자형에 해당하였다고 보고하여 노로바이러스가 소아의 경련성 질환에서 중요한 원인임을 시사하였다.

본 연구에서는 BIS-MG 환자 16명 중 로타바이러스가 13명, 노로바이러스가 2명에서 검출되어 급성 위장관염에 병발하여 발생한 BIS-MG 환자의 대부분을 차지하였으나, 발병 연령에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며 노로바이러스의 유전자형은 모두 GII-4에 해당하였다.

이와 같이 BIS-MG의 원인으로 로타바이러스가 여전히 중요하므로 기본적으로 BIS-MG 환자에서 로타바이러스에 대한 대변검사를 요하지만, 노로바이러스 역시 BIS-MG와의 연관성이 시사되므로 무열성 경련을 보이는 소아 장염환자에서는 RT-PCR을 이용한 노로바이러스 감염여부의 확인을 적극적으로 고려해야 할 것이다.

영유아에서 열성 경련은 비교적 흔히 볼 수 있는 질

환으로서 대개 양성 경과를 밟는 반면, 발열이 없는 상태에서 보이는 소아기의 무열성 경련은 원인에 대한 검사를 필요로 하거나 장기간의 항경련제 복용 여부를 결정해야 하는 경우가 많으므로 경련의 원인을 정확히 규명하고 원인질환을 이해할 필요가 있다. 이러한 근거로 임상에서 BIS-MG를 진단하고 병태생리와 원인 바이러스를 이해하는 것은 매우 중요하다고 하겠다.

본 연구에서 저자들은 급성 위장관염에 병발하는 양성 무열성 경련을 보인 소아 환자의 대변에서 시행한 바이러스 분석하였고, 그 결과 비록 바이러스 유전자형과 BIS-MG의 관련성을 밝히지는 못 하였으나 BIS-MG에서 로타바이러스와 노로바이러스가 중요한 원인 바이러스임을 확인할 수 있었다.

이러한 본 연구의 결과는 향후 무열성 경련을 보이는 소아 환자가 장염 경과와 관련되어 병발한 BIS-MG의 임상적 특징을 보이는 경우 로타바이러스와 더불어 노로바이러스 감염 여부를 함께 확인해 봄으로써 BIS-MG의 원인 바이러스를 밝히고 환자의 치료와 예후를 예측하는 데 유용한 것으로 여겨진다.

최근 분자유전학적 기법이 발전함에 따라 향후 추가적인 연구를 통해 BIS-MG 소아 환자의 혈액, 뇌척수액, 대변에서 로타바이러스 및 노로바이러스 유무와 유전자형을 밝히려는 지속적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

목 적: 로타바이러스, 노로바이러스, 아스트로바이러스, 장 아데노바이러스는 소아에서 급성 위장관염을 일으키는 주요 원인 바이러스이다. 일부 소아에서는 급성 위장관염 경과 중에 무열성 경련을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 급성 위장관염 및 급성 위장관염에 병발하는 양성 무열성 경련(BIS-MG) 소아 환자의 대변에서 검출한 바이러스와 바이러스 유전자형을 분석하고자 하였다.

방 법: 2004년 8월에서 2005년 7월까지 분당서울대 병원 소아청소년과에 급성 위장관염으로 입원한 311명 소아 환자를 대상으로 하였다. 모든 대상 환자의 대변에서 로타바이러스, 노로바이러스, 아스트로바이러스, 아데노바이러스에 대한 검사를 실시하여 장염 원인 바이러스를 검출하였고, 217명의 소아에서 분자유전학적

검사에 의하여 각 바이러스의 유전자형을 분석하였다.

결 과: 급성 위장관염 소아 환자 217명(남아 121명, 여아 96명, 평균 연령 20.6±15.4개월) 중에서 로타바이러스가 109명(50.2%), 노로바이러스가 28명(12.9%), 아데노바이러스가 13명(6.0%), 아스트로바이러스가 2명(0.9%)에서 검출되었다. 로타바이러스의 유전자형 분석결과 P[8]G3가 36명, P[4]G2 21명, P[6]G4 10명, P[4]G4 9명, P[8]G9과 P[8]G1 6명, P[4]G3 4명, P[4]G9 3명, P[6]G2 2명이었다. 노로바이러스의 유전자형은 GII-4가 27명, GII-6 1명이었다. 16명의 소아가 급성 위장관염에 병발하는 양성 무열성 경련으로 진단되었으며, 로타바이러스가 13명, 노로바이러스가 2명에서 검출되었고, 나머지 1명은 아무런 바이러스도 발견되지 않았다. BIS-MG군에서 검출된 로타바이러스 유전자형은 P[8]G3 6명, P[4]G2 2명, P[4]G9 1명이었으며, 노로바이러스 유전자형은 2명 모두 GII-4였다.

결 론: 급성 위장관염에 병발하는 양성 무열성 경련을 보인 소아 환자의 대변에서 시행한 바이러스 분석결과 로타바이러스와 노로바이러스가 중요한 원인 바이러스였으며, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

- Goodgame RW. Viral causes of diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:779-95.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-62.
- Specchio N, Vigevano F. The spectrum of benign infantile seizures. *Epilepsy Res* 2006;70 Suppl 1;156-67.
- Uemura N, Okumura A, Negoro T, Watanabe K. Clinical features of benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev* 2002;24:745-9.
- Chen SY, Tsai CN, Lai MW, Chen CY, Lin KL, Lin TY, et al. Norovirus infection as a cause of diarrhea-associated benign infantile seizures. *Clin Infect Dis* 2009;48:849-55.
- 김보미, 김기식, 김종환, 김광남, 유기양. 급성 위장관염에 동반된 초발 비열성 경련에 대한 임상적 연구. *대한소아신경학회지* 1995;3:104-10.
- 윤서희, 안승희, 김황민, 이해용, 임백근, 차병호. 소아 열성 경련과 정도의 위장관염을 동반한 양성 경련의 임상적 고찰. *대한소아신경학회지* 2008;16:130-8.
- 최재형, 김정미, 김용주, 오재원, 김창렬, 염명걸 등. 신경학적 이상이 동반된 로타바이러스 위장관염 환아에서의 로타바이러스 유전형. *대한소아과학회지* 2006;49:513-8.
- 지영미, 안정배, 김기순, 천두성, 강영화, 김운호 등. 바이러스성 실사질환의 역학조사 및 병원체 분석을 통한 예방대책 수립에 관한 연구. *국립보건원보* 2001;38:127-51.
- Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 1990;28:2659-67.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1365-73.
- 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.
- Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 1997;142:1323-34.
- Moe CL, Gentsch J, Ando T, Grohmann G, Monroe SS, Jiang X, et al. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1994;32:642-8.
- Morooka K. Convulsion and mild diarrhea. *Shonika (Tokyo)* 1982;23:131-7.
- Abe T, Kobayashi M, Araki K, Kodama H, Fujita Y, Shinozaki T, et al. Infantile convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev* 2000;22:301-6.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001 ~2007. *J Infect Dis* 2009 [e-publication ahead of print]
- Hung JJ, Wen HY, Yen MH, Chen HW, Yan DC, Lin KL, et al. Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile convulsion in children: clinical analysis of 40 cases. *Chang Gung Med J* 2003;26:654-9.
- Wong V. Acute gastroenteritis-related encephalopathy. *J Child Neurol* 2001;16:906-10.
- Eiden JJ, Wilde J, Firoozmand F, Yolken R. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:539-43.
- James VL, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant human group C rotavirus inner capsid protein (VP6) to detect human group C rotaviruses in fecal samples. *J Clin*

- Microbiol 1998;36:3178-81.
- 22) Seo JK, Sim JG. Overview of rotavirus infections in Korea. *Pediatr Intern* 2000;42:406-10.
- 23) Kawashima H, Inage Y, Ogihara M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, et al. Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion. *Life Sci* 2004;74:1397-405.
- 24) Nishimura S, Ushijima H, Nishimura S, Shiraishi H, Kanazawa C, Abe T, et al. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev* 1993;15:457-9.
- 25) Hongou K, Konishi T, Yagi S, Araki K, Miyawaki T. Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsions in infants. *Pediatr Neurol* 1998;18:354-7.
- 26) 소경진, 이미현, 마상혁, 김병철, 양재명. 2000~2001년 경상남도에서 유행한 로타바이러스 유전자형. *소아감염* 2004;11:59-72.
- 27) 지영미, 안정배, 천두성, 최우영, 김운호, 이정수 등. 국내 유행 바이러스성 장염의 역학. *소아감염*. 2004;11:7-19.
- 28) 이제단, 김혜영, 이미연, 이강범, 천두성, 지영미. 인천 지역의 로타바이러스 감염실태 및 유전자형 분포조사. *J Bacteriol Virol* 2007;37:39-45.
- 29) Kim JS, Kang JO, Cho SC, Jang YT, Min SA, Park TH, et al. Epidemiological profile of rotavirus infection in the Republic of Korea: results from prospective surveillance in the Jeongeub District, 1 July 2002 through 30 June 2004. *J Infect Dis* 2005;192 Suppl 1:49-56.
- 30) Kawano G, Oshige K, Syutou S, Koteda Y, Yokoyama T, Kim BG, et al. Benign infantile convulsions associated with mild gastroenteritis: a retrospective study of 39 cases including virological tests and efficacy of anticonvulsants. *Brain Dev* 2007;29:617-22.
-