

서울지역 급성위장관염 환자 및 지하수에서 분리한 A형 로타바이러스의 유전자형

김은정^{1*} · 김무상¹ · 채영주¹ · 천두성²

¹서울시보건환경연구원, ²질병관리본부 간염 폴리오팀

Genotype of Group A Rotavirus Isolated in Acute Gastroenteritis Patients and Groundwater in Seoul, Korea

Eun-Jeung Kim^{1*}, Moo-Sang Kim¹, Young-Zoo Chae¹, and Doo-Sung Cheon²

¹Virus Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, 202-3, Yangjae-Dong, Seocho-Gu, Seoul 137-734, Republic of Korea

²Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Division of Enteric and Hepatitis Viruses, Seoul, Republic of Korea

(Received October 14, 2011 / Accepted November 18, 2011)

Fecal specimens from acute gastroenteritis in Seoul from 2009 to 2010 were collected and then tested for the presence of Group A Rotavirus by ELISA. Among a total of 1,916 samples investigated, 354 samples (18.4%) were positive. The predominant genotypes of positive samples were confirmed as P6G[4] (35%), P8G[3] (28%), P8G[1] (24%), P4G[2] (10%), P8G[9] (3%), respectively. Among a total of 70 ground water samples investigated, 2 samples (2.8%) were positive. The genotypes of positive samples were confirmed as P8G[3] (100%). By this molecular investigation, genotypic distribution associated with rotavirus will be used for control and prevention of rotavirus related diseases.

Keywords: genotype, groundwater, rotavirus, RT-PCR

로타바이러스는 Reoviridae에 속하는 이중나선 RNA 바이러스로 외부캡시드(outer capsid)에는 당단백(glycoprotein)인 VP7 단백질(protein)과 트립신(trypsin)에 의하여 활성화되는 VP4 단백질로 구성되어 있으며 이 두 가지 단백질은 중화항체를 생산하여 바이러스의 중요한 면역원성에 관여한다(15). 로타바이러스는 심한 탈수증을 유발하여 생명을 위협하는 영유아 장염의 가장 중요한 원인체이다(11). 로타바이러스는 2002년 서울시 소재 산후조리원에서 신생아 집단 설사를 시작으로 매년 발생하고 있으며, 핵가족화로 산후조리원을 선호하는 한국인의 특성에 따라 점차 증가할 것으로 예상된다. 특별한 치료약이 없는 상황에서 최선의 치료법은 로타바이러스가 유행하기 전에 백신을 접종하는 것이다. 로타바이러스에 대한 백신 개발이 매우 절실함에도 불구하고 로타바이러스는 인체 분리주들 사이에서 RNA 단편들의 잦은 교환으로 유전자재조합(genomic reassortment)이나 재배열(rearrangement)이 발생하여 변이형 로타바이러스가 생성된다(17). 이러한 변

이로 인하여 백신개발이 어려우며, 각 국가와 지역에서 지속적인 바이러스 유전자의 규명이 요구되고 있다. 또한 최근 개발도상국가에서는 먹는 물에서 발견되는 로타바이러스와 아데노바이러스로 인한 질병이 공중보건학적으로 중요한 문제를 야기하고 있다(9). 최근 산후조리원 신생아들에게 이 로타바이러스에 의한 집단 설사 발병 사례가 있어 문제가 야기되고 있으며, 국내 종합병원에 입원한 2세 미만 소아군의 약 70%에서 감염 원인체로 보고된 바 있다(12). 로타바이러스의 주요한 전파경로는 오염된 물, 오염된 식품, 환자간의 직접 전파로 알려져 있다. 이러한 로타바이러스 감염증을 예방하기 위한 가장 좋은 방법은 이 질병의 주요한 전파경로인 오염된 물을 차단하고 깨끗한 물을 공급하거나, 적합한 백신을 개발하는 방법이다. 그러나 현재까지 서울지역 지하수에서 로타바이러스의 오염조사는 보고된 바 없는 실정이며, 로타바이러스의 유전자형은 지역적으로, 유행시기적으로 다양하게 나타나므로 국내 설사환자에게 적합한 백신개발을 위해서는 국내 로타바이러스 분리주에 대한 G형과 P형의 분석은 필수적으로 선행되어야 할 과제이다. 본 연구에서는 서울지역 급성위장관염 환자에서 분리한 로타바이러스에 대한 유전자형의 분포를 조

* For correspondence. E-mail: ejvet@seoul.go.kr; Tel.: +82-10-2558-8931

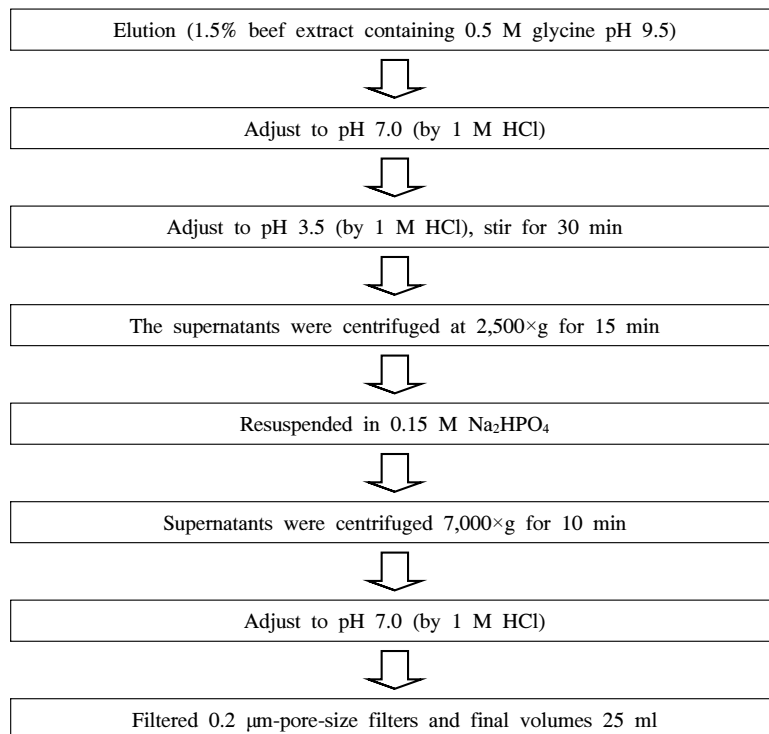


Fig. 1. Schematic diagram of filter elution and concentration.

사함과 동시에 서울지역의 지하수에서 로타바이러스 감염 실태를 파악하여 지역사회에서의 로타바이러스의 감염 및 예방 대책 수립을 위한 기초 역학 자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

2009년 1월부터 2010년 12월까지 서울지역 병의원으로부터 설사증상으로 입원 또는 내원한 환자의 대변을 수집하여 1,916건을 로타바이러스 검사에 이용하였다. 환경가검물은 서울지역 지하수 중 약수터 30지점, 식품제조용수 7지점, 학교 5지점, 공동주택 5지점, 공동음용수 9지점, 식당 6지점 및 식자재 세척용으로 쓰이는 생활용수 8지점 등 총 70지점이었다. 70지점 중 음용수가 62지점이고 비음용수는 8지점이었다. 양전하 필터(1-MDS Zetapore cartridge filter, CUNO, USA)를 이용하여 현장에서 1,500 L 여과를 하였다(1). 여과된 필터는 냉장상태로 보관하여 실험실로 이동하였으며, 전처리를 즉시 수행하였다(18).

시료 전처리

대변 1 g에 9 ml PBS (phosphate buffered saline 7.2, Sigma, USA)에 3-4개의 유리구슬(glass beads)을 넣고 5분간 진탕하여 부유된 가검물을 4°C에서 20분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하여 효소면역측정검사와 PCR검사를 하였다. 현장 여과된 필터는 실험실에서 pH 9.5로 조정된

1.5% 쇠고기 추출물 용액을 이용하여 바이러스 탈리하는 과정을 거친 후 pH 조정 및 원심분리 등을 수행하는 유기농집 농축 과정을 거친 후 약 20-30 ml 정도의 최종 시료농축액을 노로바이러스 검출을 위한 세포배양 및 유전자 분석을 수행하였다(Fig. 1).

로타바이러스 항원검사

로타바이러스 항원검사를 위하여 상업용 효소면역측정 키트(BioinCell, USA)를 사용하여 로타바이러스 항체가 코팅된 곳에 대변 상층액 100 µl와 HRP conjugated anti rotavirus 항체를 넣은 후 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응시킨 곳을 세척액으로 5회 세척 후 기질액을 첨가하고 실온 암실에서 15분간 반응시킨 다음 반응정지액 50 µl를 가한 후 450 nm에서 판독(ELISA Processor II, Behring, Germany)하였다. 환경가검물도 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

Primer 제작

유전자형분석(Genotyping)을 위하여 VP4와 VP7 유전자에 특이한 프라이머는 Gouvea 등(4)과 Gentsch 등(3)의 방법에 따라 Table 1과 같이 제작하였다(Bioneer, Korea).

바이러스 RNA 추출 및 유전자형 분석

원심분리한 대변 상층액과 환경가검물 최종농축액 200 µl에 대하여 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 10 µl를 1×RT

Table 1. Primers used for detection of Rotaviruses

	Primer	Sequence (5'-3')	Target
VP4 typing	Con3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	
	Con2	ATTCGGACCATTTATAACC	
	1T1	TCTACTTGGATAACGTGC	P[8]
	2T1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	P[4]
	3T1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	P[6]
	4T1	TGAGACATGCAATTGGAC	P[9]
	5T1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	P[10]
VP7 typing	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	
	End9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	
	aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	G1
	aCT2	CAATGATATTAACATTTTCTGTG	G2
	aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3
	aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4
	aFT9	CTAGATGTAACATAACTAC	G9

buffer, 2.5 mM dNTP, 6 mM MgCl₂, MuLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) 100 U이 혼합된 반응액에 첨가하고 VP4 유전자에 특이적으로 반응하는 프라이머인 Con2, Con3와 VP7 유전자에 특이적으로 반응하는 프라이머인 Beg9, End9을 PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 20°C 10분, 42°C 1 시간, 95°C에서 5분간 1회 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 2.5 µl에 1×PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, VP4의 프라이머인 con2, con3와 VP7의 프라이머인 Beg9, End9을 각각 10 pmol, Tag polymerase 1 U (Invitrogen)을 포함하는 25 µl의 반응액을 혼합한 후 PCR System 2700을 사용하여 PCR을 수행하였다. VP4의 PCR을 위해서는 94°C에서 2분 변성(denaturation) 시킨 후, 94°C 60초, 50°C 60초, 72°C 60초를 35회 실시하고 72°C에서 7분간 중합반응(extention) 시켰다. 1st PCR product 2 µl에 1×PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 6종의 유전자형 특이 프라이머(VP4)와 8종의 유전자형 특이 프라이머(VP7)를 각각 10 pmol (Table 1), Red Tag polymerase 1 U (Genedepot, USA)를 포함하는 총 25 µl의 반응액을 혼합한 후 PCR을 수행하였다. VP4의 PCR 과정은 94°C에서 4분 변성 시킨 후, 94°C 60초, 45°C 120초, 72°C에서 60초, 30회 실시하고 마지막으로 72°C에서 7분간 중합 반응시켰으며, VP7의 PCR 과정은 94°C에서 4분 변성시킨 후, 94°C 60초, 42°C 120초, 72°C에서 60초, 30회 실시하고 마지막으로 72°C에서 7분간 중합반응시켰다. PCR 산물은 1.5% 아가로스겔(Cambrex, USA)로 전기영동한 후 Gel Documentation System (Bio-Rad, USA)로 확인하여 유전자형을

결정하였다. 유전자형의 특이적인 밴드 크기는 P형의 경우 P[8] 345 bp, P[4] 483 bp, P[6] 267 bp, P[10] 583 bp, G형의 경우 G1은 749 bp, G2 652 bp, G3 374 bp, G9 306 bp의 증폭산물을 각각 형성함으로써 유전자형이 결정된다.

세포배양을 통한 로타바이러스 분리

로타바이러스 분리를 위한 세포주는 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포를 사용하였다. 세포배양은 5% 소태아혈청 (Fetal bovine serum; FBS)과 penicillin-streptomycin이 첨가된 minimum essential medium (MEM)을 사용하였으며 Kang 등(10), Sato 등(16)의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 단층(Monolayer)이 형성된 세포는 배양액을 제거하고 MEM 배지로 3회 세척하였다. 0.2 µm syringe filter로 여과한 가검물을 세포에 접종하였으며, 트립신이 함유되어 있고 혈청을 넣지 않은 MEM 배지를 첨가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 14 일 동안 세포병변효과(Cytopathic effect; CPE)가 나타나는지 관찰하였다

결과

임상가검물에서 로타바이러스 유전자형 분포

RT-PCR 실험을 통하여 유전자형 조합을 결정하였으며, 실험결과 G4P[6]형이 35%로 가장 높은 빈도로 확인되었고 G3P[8]형이 28%, G1P[8]형이 24%, G2P[4]형이 10%, G9P[8]형이 3%로 확인되었다(Table 2).

Table 2. Genotyping results of rotaviruses isolated from diarrhea patients and water samples in Seoul from 2009 to 2010

Genotype	No. of samples (%)					Total
	G1P[8]	G9P[8]	G3P[8]	G2P[4]	G4P[6]	
Patients	85 (24%)	11 (3%)	99 (28%)	35 (10%)	124 (35%)	354 (100%)
Water	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (2.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	70 (100%)

환경가검물에서 로타바이러스 유전자형 분포

효소면역측정법에서 판독된 양성검체를 대상으로 하여 RT-PCR을 통해 유전자형분석을 실시한 결과 2건 모두 G3P[8]형으로 확인되었다.

환경가검물 로타바이러스 세포배양 결과

로타바이러스 유전자형 분석을 수행하여 G3P[8]형으로 확인된 2건의 시료를 MA104 세포에 접종하여 로타바이러스 순수 분리를 시도한 결과, 모든 시료에서 로타바이러스 특유의 CPE를 나타내었다. 세포에 접종 후 CPE가 나타난 감염세포는 plaque assay법을 3회 반복하여 로타바이러스를 순수하게 분리하였다. 또한 CPE가 나타난 시료는 효소면역측정법과 유전자형 분석으로 재차 확인하였다.

고찰

본 연구에서는 2009년부터 2010년까지 서울지역에서 유행하는 로타바이러스 유전자형의 분포양상을 조사하기 위해 수행하였으며, 서울지역 병의원에 내원한 급성 위장관염 환자를 대상으로 유전자형을 결정하였고, 서울지역 지하수에서 분리한 로타바이러스로부터 유전자형을 결정하였다.

조사 결과 급성위장관염 환자에서는 G4P[6], G3P[8], G1P[8]형이 서울지역에서 유행하는 주요한 유전자형임을 알 수 있었다. G4P[6]는 서울, 경기 등 수도권지역에서 대규모 유행이 확인된 바 있는 유전자형이며(8), 2007년부터 2009년까지 서울지역에서 G9P[8], G1P[8], G3P[8]형이 유행하였으며 G3P[8]형이 11.7%라고 보고한 바(5) 있으나 본 연구에서는 G3P[8]형이 28%로 증가됨을 알 수 있었다. 또 다른 국내보고에서는 G1P[8]형이 36%, G3P[8]형이 16%로서 가장 유행하는 유전자형이며(13), 2003년도에 G3P[8]형이 유행하였음을 보고한 바 있다(7). 로타바이러스 유전자형에 대한 분포양상을 살펴보면 G4P[6], G3P[8], G1P[8]형이 예전부터 서울지역에서 우세한 분포를 나타내었으며, 연도별로 분포양상이 변화할 수 있으므로 지속적인 모니터링이 필요한 것으로 생각된다.

지하수에서 로타바이러스 RNA의 존재는 감염성을 증명할 수 없으므로 감염성을 결정하는 유일한 방법은 세포배양방법(9)으로 본 연구에서는 감염성을 확인하기 위해 세포배양을 실시하였다. 지하수 70지점에 대한 로타바이러스 조사 결과 3%에서 양성으로 나타났으며 먹는 물에서 유전자 검사결과 2.1% 검출로 보고한 결과(9)와 비슷한 양상을 보였다. 그러나 34.6%의 검출율을 보고한 결과(6)와는 상이한 양상을 나타내었다. 또한 로타바이러스 RNA 검출율 48%(14)와 상이한 양상을 나타내었는데 이는 세포배양을 하지 않고 유전자검사만 수행한 것으로 검출율이 높았다고 생각된다.

본 연구에서는 G3P[8]형이 지하수에서 검출되었는데 먹는 물에서 G1 또는 G3형의 유행이 보고 된 바 있다(19). 지하수에서 검출된 G3P[8]형은 본 연구결과 환자에서 검출되는 유전자 조합형 중 28%나 차지하고 있는 유전자형으로서 지하수에 기인한 환자 발생 가능성과 잠재적인 집단식중독 발생도

배제할 수 없다고 생각된다.

미국에서는 수인성 식중독의 절반이 소독하지 않은 지하수에 기인한다고 한다(2).

또한 앞으로 G3P[8]형은 백신 개발 시 우선적으로 고려되어야 할 유전자형이라고 생각되며, 국내 지하수 및 환자에서 지속적인 모니터링을 통한 더 많은 수의 로타바이러스 검출을 통하여 유전자형에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

적요

2009년부터 2010년까지 서울지역에서 산발적으로 발생한 급성위장관염 환자에 대하여 효소면역측정법(ELISA)을 이용하여 로타바이러스를 검출하였다. 총 1,916건 중 로타바이러스는 354건(18.4%)이 검출되었다. RT-PCR을 이용하여 유전자형 분석을 실시한 결과 P6G[4] (35%), P8G[3] (28%), P8G[1] (24%), P4G[2] (10%), P8G[9] (3%)로 나타났다. 서울지역 지하수 70지점을 대상으로 효소면역측정법을 이용하여 로타바이러스를 조사한 결과 2 지점에서 양성으로 검출되었으며, RT-PCR을 이용하여 유전자형 분석을 실시한 결과 P8G[3]로 나타났다. 이러한 연구결과는 서울지역 로타바이러스 질환의 예방을 위한 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., USA.
2. Fout, G.S., B.C. Martinson, M.W. Moyer, and D.R. Dahling. 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3158-3164.
3. Gentsch, J.R., R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das, and M.K. Bhan. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365-1373.
4. Gouvea, V., R.I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H.F. Clark, B. Forrester, and Y.Z. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282.
5. Han, T.H., C.H. Kim, J.Y. Chang, S.H. Park, and E.S. Hwang. 2010. Genetic characterization of rotavirus in children in South Korea from 2007 to 2009. *Arch. Virol.* 155, 1663-1673.
6. He, X.Q., L. Cheng, D.Y. Zhang, W. Li, X.M. Xie, M. Ma, and Z.J. Wang. 2009. First molecular detection of group A rotaviruses in drinking water sources in Beijing, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 120-124.
7. Huh, J.W., W.H. Kim, M.H. Yoon, and Y.H. Lim. 2009. Genotypic distribution of rotavirus strains causing severe gastroenteritis in Gyeonggi province, South Korea, from 2003 to 2005. *Arch. Virol.* 154, 167-170.
8. Jang, J.M., C.S. Son, S.E. Lee, and M.J. Kim. 2005. Epidemiologic characteristics and infection control measures for an outbreak of rotavirus infection in the Neonatal Unit. *Infect. Chemother.* 37, 311-318.
9. Jens, V., T.W. Monica, L. Rainer, B. Ibrahim, S. Sibel, K. Aynur, U. Alexandra, M. Farouk, and P. Herbert. 2009.

- Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of benin, west Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2798-2801.
10. Kang, S.Y., K.V. Nagaraja, and J.A. Newman. 1986. Primary isolated and identification of avian rotaviruses from turkeys exhibiting signs of clinical enteritis in a continuous MA104 cell line. *Avian. Dis.* 30, 494-499.
 11. Kapikian, A.Z., J. Flores, K. Midthun, M. Gorgilia, K. Nisikawa, R.M. Chanock, L. Potash, and I. Perez-Schael. 1990. Strategies for the development of a rotavirus vaccine against infantile diarrhea with an update on clinical trials of rotavirus vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 257, 67.
 12. Kim, K., J. Yang, S. Joo, Y. Cho, R.I. Glass, and Y. Cho. 1990. Importance of rotavirus and adenovirus type 40 and 41 acute gastroenteritis in Korea children. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2279-2284.
 13. Lee, S.Y., S.K. Hong, S.G. Lee, C.I. Suh, S.W. Park, J.H. Lee, J.H. Kim, D.S. Kim, H.M. Kim, Y.T. Jang, and *et al.* 2009. Human rotavirus genotypes in hospitalized children, South Korea. *Vaccine* 20, 97-101.
 14. Lodder, W.J., H.H. van den Berg, S.A. Rutjes, and A.M. de Roda Husman. 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5965-5971.
 15. Prasad, B.V., G.J. Wang, J.P.M. Clerx, and W. Chiu. 1988. Three dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199, 269-275.
 16. Sato, K., Y. India, T. Shinozaki, R. Fujii, and M. Matumoto. 1981. Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch. Virol.* 69, 155-160.
 17. Taniguchi, K. and S. Urasawa. 1995. Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6, 123-131.
 18. USEPA. 2001. USEPA manual of methods for virology. Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge 1 MDS cartridge filters and organic flocculation. EPA/600/4-84/013(N14). Office of Reserch and Development, U.S. Environmental protection Agency, Washington, D.C., USA.
 19. van Zyl, W.B., N.A. Page, W.O. Grabow, A.D. Steele, and M.B. Taylor. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4554-4560.