

2000~2001년 경상남도에서 유행한 로타바이러스 유전자형

소경진 · 이미현 · 마상혁* · 김병철† · 양재명‡

대구 파티마병원 소아과, 창원 파티마병원 소아과*, 서강대학교 생명공학과†

= Abstract =

Rotavirus P and G Genotypes Circulating in
Kyungsangnamdo, Korea, during 2000~2001

Kyeung Jin So, M.D., Mi Hyun Lee, M.D., Sang Hyeok Ma, M.D.*,
Byung Chyeol Kim, Ph.D.† and Jai Myung Yang, Ph.D.‡

*Department of Pediatrics, Fatima Hospital, Daegu,
Department of Pediatrics*, Fatima Hospital, Changwon, and
Department of Life Science†, Seogang University, Seoul, Korea*

Purpose : Rotaviruses are the major cause of gastroenteritis in infants and young children worldwide. It is important to get the epidemiologic data of rotavirus genotype for the application of rotavirus vaccine. So we tried to investigate the distribution of rotavirus genotypes with RT-PCR.

Methods : A total of 120 rotavirus latex agglutinin test positive stool samples were collected continually from 120 children from Sep. 2000 to Apr. 2001. Rotavirus P(VP4), G (VP7) genotypes were determined by RT-PCR.

Results : The genotype was identified in 116 stool samples of total 120 samples(96%). The incidence of G genotype was as follow; G1 17(14.2%), G2 74(61.7%), G4 1(0.8%), G9 1(0.8%). There were four cases of multiple genotypes; G1/G2, G1/G4, G1/G9, G8/G9 and genotype of G3, G8 were not found. Twenty three(19.2%) samples were nontypeable. The incidence of P was as follow; P[4] 77(64.2%), P[6] 22(18.3%), P4/P6 12(10%), P[4]/P[8] 1(0.8%) p[8] 1(0.8%). Seven(5.9%) samples were nontypeable.

Conclusion : Various combinations of G and P genotypes were observed. Most rotavirus strains were P[4]G2 62(51.74%), followed by P[6]G2 7(5.8%), and P[6]G1 7(5.8%), P[4]/P[6] G1 4(3%), P[4]/P[6]G2 4(3%), P[4]G1 3(2.5%), P[8]G2 1(0.8%), P[4]G4 1(0.8%) in Kyoung-sangnamdo, Korea during 2000~2001.

Key Words : Rotavirus, VP4, VP7, Genotype

서 론

로타바이러스는 영·유아에서 설사를 일으키는
주요 원인바이러스로서 전세계적으로는 매년 1억2

책임저자 : 마상혁, 창원 파티마병원 소아과
Tel : 055)270-1223, Fax : 055)265-7766
E-mail : msh6517@hanmail.net

천5백여명의 설사 환자가 발생하는데 이들 설사 환자의 약 40%가 로타바이러스 감염에 의한 것으로 추정된다¹⁾.

로타바이러스는 환자의 분변이 구강으로 들어와서 감염이 되며 2~4일의 잠복기를 거쳐 구토, 물설사, 탈수가 동반되는데 어린 영아의 경우 심각한 탈수가 동반되어 사망하기도 한다. 심한 물 설사를 하게되므로 설사 양상이 콜레라 감염환자와 유사하다고 하여 가성콜레라고도 하였다. 로타바이러스는 주로 십이지장과 상부 소장의 용모상피의 상층부와 중간층에 있는 상피세포에서 증식하며 위와 대장은 침범하지 않는다. 감염된 성숙한 상피세포는 파괴되어 위축되고, 선와세포의 증식이 일어나 빠른 속도로 용모 끝으로 이동하여 미성숙한 세포로 잠정적으로 대체되므로 용모들은 낮아지고 편평해지며, 미소용모는 산재되고 불규칙해진다. 점막의 고유층에 단핵구의 침윤과 세포내 대형질 세망의 cistern의 확대, 미토콘드리아 종대를 보인다. 용모의 정상적인 세포는 수분과 전해질을 흡수하고, 이당분해효소를 생산하는 기능을 가지고 있으며, 미숙한 선와세포는 분비기능을 가지고 있다. 로타바이러스 감염 시 설사의 기전은 성숙한 장세포의 파괴와 미숙한 선와세포의 증식으로 인해 Na-K ATPase의 활성도 감소, glucose-coupled Na transport의 장애, 이당분해효소, 특히 유당분해효소의 결핍증을 일으켜 수분과 전해질의 흡수가 저하되고, 분비가 증가되어 일어난다. 아직 로타바이러스 감염 시 치료약품을 개발이 되어 있지 않으며 설사와 탈수가 동반될 시 대증치료로서 적절한 수액 공급이 현재까지는 최선의 치료방법이다. 감염이 된 후 면역은 불완전하여 재감염이 될 수 있으며 재감염시에는 임상증상은 경미하다²⁾.

1973년 오스트레일리아에서 Bishop 등³⁾이 급성 설사 환자의 십이지장 용모 상피세포의 생검 조직에서 처음 발견되었으며 전자현미경으로 보면 생김 모양이 수레바퀴 모양과 비슷하다고 하여 로타바이러스(Rotavirus)라고 명명되었다. 직경 70 nm의 reoviridae과에 속하는 이중나선형의 RNA 바이러스이며, genome은 11개의 유전자분절로 구성되어 있고, 핵은 이중층의 20면체의 캡시드로 둘러싸여 있다. VP(Viral protein, VP)1과 VP3는 inner core 단백질

로 각각 RNA polymerase와 guanyltransferase이며 VP2는 inner capsid 단백질로 RNA 결합과 leucine zipper의 기능을 가지고 있다. VP6는 intermediate capsid 단백질로 군(Group) 및 아군(Subgroup) 항원을 띄고 있으며, VP7은 outer capsid 단백질로 중화항체형성의 기능을 가지며 VP4는 역시 outer capsid 단백질로 혈구응집, 중화항체형성, 수용체 결합 및 fusio단백의 기능을 가지고 있다. VP6의 항원성 차이에 의하여 군을 나누는데 A~G까지 나누고 있으며 현재까지 사람에게서 발견된 것은 A, B, C군이며 그 중 A군이 가장 많이 가장 흔한 원인으로 알려져 있고 유일하게 세포 배양에서 배양이 가능하다. 현재 임상에서 사용하고 있는 진단용 도구들은 A군만 진단할 수 있다^{2, 4)}. 그리고 VP6단백의 항원에 대한 단클론성 항체의 혈청학적인 반응에 따라 아군 I, II로 나누며^{5, 6)} VP4, VP7에 기초하여 각각 P형과 G형으로 명명하고 있는데^{5~8)} 현재 15가지의 G형⁹⁾, 13가지의 P 혈청형(serotype)과 21가지의 P 유전자형(genotype)이 알려지고 있으며¹⁰⁾ 사람에서 호발하는 로타바이러스의 유전자형은 10개의 G형과 8개의 P형이 알려져 있지만 G형에서는 G1, G2, G3, G4 등 4가지, P형에서는 P1A, P1B 혈청형이, 유전자형으로는 P[8], P[4]가 많이 유행하는 것으로 알려져 있다. 아직 방어적인 면역에서 VP4 단백질의 기능은 잘 알려져 있지 않지만 G, P형에 대한 정보는 각기 다른 지역에서 발생하는 드문, 혹은 새로운 유전자형의 발견에 중요하다¹¹⁾.

로타바이러스의 군은 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)시험에서 double strand RNA인 11개 분절의 밴드 모양으로 구별된다. 사람에게 감염이 되는 3가지 군중 A군은 PAGE의 double strand-RNA 밴드가 4:2:3:2 양상으로 나타나며 돼지, 말, 양, 개, 고양이, 토끼, 사람에서 발견되었고, 성인 설사를 유발한다고 알려진 B군은 4:2:2:3 양상으로, 돼지, 사람, 소에서 발견되었고 중국에서 심각한 수인성 설사병을 유발하였다. 또한 드물게 발생하는 것으로 알려진 C군은 4:3:2:2 양상으로 나타나며 B군과 마찬가지로 돼지, 사람, 소에서 발견되는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

로타바이러스 감염은 매우 흔한 감염으로 이미 국내에서도 해마다 로타바이러스 감염이 유행하고

있어¹³⁾ 국내에서도 로타바이러스의 백신의 사용은 절실하다. 로타바이러스 백신이 적절한 면역 반응을 유발하여 감염을 방어하려면 여러 가지 유전자형에 대한 면역 기능을 유발시킬 수 있어야 하며, 이는 백신이 일정지역에서만 효과가 있을 가능성을 유포한다. 지역과 시기에 따른 유전자형의 변이(diversity) 때문에 유행하는 로타바이러스의 분자역학과 항원의 다양성에 대한 정보는 각 지역에 맞는 백신 개발에서 매우 중요하다. 국내의 경우 분자역학적인 조사는 최근에 이루어져 자료가 많지 않은 편이며 최근에 이루어진 연구도 임상과 역학의 연관성이 별로 없는 것들이다. 그리고 외국에서 개발된 다가의 로타바이러스 백신의 임상적인 효용성을 예측하기 위해서는 국내 로타바이러스 유전자형에 대한 기본자료가 필요하다. 따라서 본 연구는 국내에서 유행하는 로타바이러스의 유전자형을 규명하고 이를 기초 역학자료 및 백신개발 및 도입에 있어 유용한 자료로 사용하며 임상양상과 역학적인 변화를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 검체의 수집

2000년 9월부터 2001년 4월까지 마산과티마병원 소아과에 내원하거나 입원하는 환자들 중 대변 검체에서 Latex agglutination 검사(Slidex Rota-Kit2, Bio Merieux, France)로 로타바이러스 양성 판정을 받은 환자들의 검체를 이용하였다.

2. 대변 가검물로부터 로타바이러스 RNA 추출

McCloskey 등¹⁴⁾이 사용한 방법을 이용하여 대변 가검물 약 5 g이 담긴 1.5 mL tube에 2×STE (0.2 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl 0.5 M EDTA) 500 μL, 10% SDS 70 μL, bentonite 8 mg, and phenol (pH 8.0) 혼합액을 넣고 4°C에서 30분 동안 stirring 한 뒤 10,000×g, 4°C에서 20분 간 원심분리하였다. 상층액에 100% 에탄올을 첨가하여 에탄올 조성이 16%가 되게 한 뒤 CF-11 cellulose(Whatman, England)를 310 mg 넣고 twist shaker를 이용 4°C에서 30분 이상 흔들여 준 뒤, 상온에서 8,000 rpm(Eppendorf 5415c, Germany)으로 2분간 원심분리하여

pellet을 얻었다. Washing buffer(2×STE 50 mL, H₂O 34 mL, 100% 에탄올 16 mL) 500 μL를 첨가하여 twist shaker를 이용 3분간 흔들여 준 뒤, 세척 과정으로 pellet이 흰색을 띠 때까지 3~4회 반복하였다. Pellet에 1×STE 200 μL를 넣고 vortexing한 뒤 상온에서 8,000 rpm(Eppendorf 5415c, Germany)으로 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 1.5 mL tube에 옮기고 상온에서 13,000 rpm으로 3분간 원심분리 후 상층액에 100% 에탄올 500 μL와 3 M sodium acetate(pH 5.5) 20 μL를 넣고 -70°C에서 15분간 방치하였다. 상온에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후, 70% 에탄올 200 μL을 넣고 13,000 rpm으로 5분 간 원심분리하였다. Pellet을 10분 간 진공 건조 후 증류수 10~20 μL로 녹이고 -70°C에 보관하였다. RNA를 12% PAGE로 분리한 뒤 소량의 RNA를 검출하기 위하여 민감도가 높은 silver nitrate staining을 이용하여 RNA를 염색하였다.

3. VP4 및 VP7의 RT-PCR

RT-PCR은 Gouvea^{15~17)}, Das¹⁸⁾, Gentsch¹⁹⁾, Gomara 등²⁰⁾이 사용한 방법을 이용하였다. 추출한 RNA 1~2 ng에, 20 pmole의 specific primer pairs (Con2/Con3 for VP4, Beg9/End9 for VP7)를 첨가하고 94°C에서 4분간 가열한 뒤 즉시 냉각시켰다. 반응액에 reverse transcriptase buffer(50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0.5 mM deoxynucleotide triphosphates(dNTPs), 12 units의 reverse transcriptase(Takara, Japan)를 첨가한 후 최종 부피가 20 μL가 되도록 증류수로 조절하고 42°C에서 1시간 30분간 역전사 반응을 시켰다. 로타바이러스 cDNA의 PCR을 위하여 25 mM TAPS(pH 9.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 반응 용액에 각각 300 μM의 dNTPs, 각각 20 pmole의 sense와 antisense primer pairs(Con2/Con3 for VP4, Beg9/End9 for VP7)를 첨가하고 cDNA 1 μL와 Taq DNA polymerase 0.6 unit을 첨가한 후 최종 부피가 25 μL가 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR 반응은 thermal cycler에서 35 cycle을 실시하며 첫 번째 반응은 94°C에서 5분, 두 번째 cycling 반응은 94°C에서 1분,

Table 1. Sequence and Size of the Primers Used for RT-PCR

Primer	Sequence(5'→3')	Detection	Sense	Position	Produced size
G typing					
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		+	1~28	1,062 bp
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		-	1,062~1,036	749 bp
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGAGG	G1	+	314~335	652 bp
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	G2	+	411~435	374 bp
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3	+	689~709	583 bp
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	+	480~498	885 bp
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	G8	+	178~198	306 bp
aFT9	CTAGATGTAACTACAACACTAC	G9	+	757~776	(-) for
RVG9	GGTCACATCATACAATTCT		-	1,062~1,044	aBT1~aFT9
FT5*	CACGTAACGTTGTTACGTC	G5	-	779~760	779 bp
DT6*	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	G6	-	499~481	499 bp
P typing					
Con3†	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA		+	11~32	
Con2	ATTCGACCATTATAACC		-	887~868	876 bp
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	P[8]	-	356~339	345 bp
2T-2	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	P[4]	-	494~474	483 bp
3T-3	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	P[6]	-	278~259	267 bp
4T-4	TGAGACATGCAATTGGAC	P[9]	-	402~385	391 bp

* (+) primer is Beg9
 † (+) primer for 1T-1~4T-4

42°C에서 1분, 72°C에서 1분에서 반응시키고 마지막 반응은 72°C에서 7분 반응시킨 후 4°C를 유지시켜 PCR 반응을 완료하였다. 반응액 5 µL를 ethidium bromide가 0.5 µg/mL 포함된 1.2% agarose gel에서 97V, 30분 전기영동 후 UV 하에서 관찰하였다.

4. PCR에 의한 P, G형의 결정

Gouvea 등¹⁷⁾이 사용한 방법을 이용하여 유전자형을 결정하였다. cDNA 합성용액 1 µL에 G, P 유전자형 결정을 위한 sense primer와 antisense primer를 각각 20 pmole(G 유전자형 6개, G1, G2, G3, G4, G8, G9; P 유전자형 4개, P[8], P[4], P[6], P[9]), 25 mM TAPS(pH 9.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 반응 용액에 각각 300 µM의 dNTPs를 넣고 증류수로 최종 부피가 50 µL가 되도록 조절한 뒤 Taq DNA polymerase 0.6 unit를 넣었다. P형을 결정하기 위해 사용한 primer(Table 1)와 PCR 결과 합성되는 생성물의 크기는 cDNA(Con3, Con2, 876 bp), P[8](Con3,

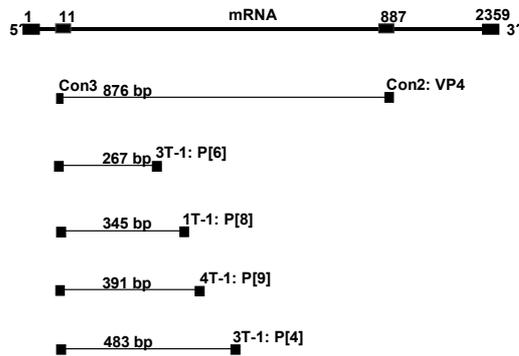


Fig. 1. Schematic representation of RT-PCR products of VP4 coding gene 4. The schematic shows PCR primers and expected size of amplified segments.

1T-1, 345 bp), P[4](Con3, 2T-1, 483 bp), P[6](Con3, 3T-1, 267 bp), P[9](Con3, 4T-1, 391 bp)이다(Fig. 1). G형을 결정하기 위해 사용한 primer(Table 1)와 PCR결과 합성되는 생성물의 크기는 cDNA(Beg9, End9, 1062 bp), G1(aET3, RVG9, 374 bp), G2(aCT2, RVG9, 652 bp), G3(aET3, RVG9, 374

bp), G4(aDT2, RVG9, 583 bp), G5(Beg9, FT5, 779 bp), G6(Beg9, DT6, 499 bp), G8(aAT8, RVG9, 885 bp), G9(aFT9, RVG9, 306 bp)이다(Fig. 2). PCR 반응은 thermal cycler에서 35 cycle을 실시하며 첫 번째 반응은 94℃에서 5분, 두 번째 cycling 반응은 94℃에서 1분, 42℃에서 1분, 72℃에서 1분에서 반응시키고 마지막 반응은 72℃에서 7분 반응시킨 후 4℃를 유지시켜 PCR 반응을 완료하였다. PCR 반응 산물은 agarose gel에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 하에서 예상한 크기의 DNA band를 확인한 후 유

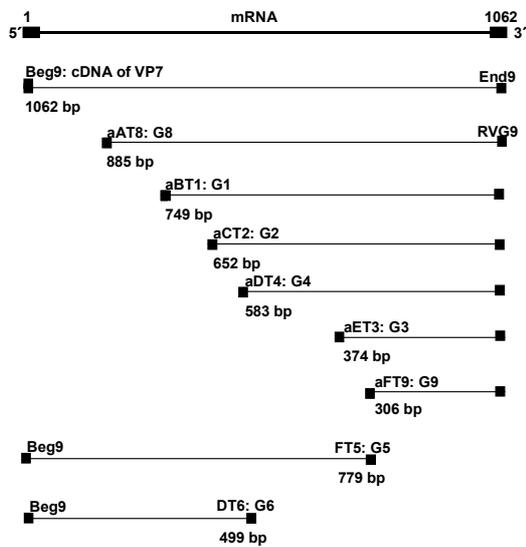


Fig. 2. Schematic representation of RT-PCR products of VP7 coding gene 9. Showing PCR primers and expected size of amplified segments.

Table 2. Patients Distribution According to Age

Age(Mo)	Male(No)	Female(No)	Total(No)
~1	12	6	18
2~3	3	3	6
4~12	33	17	50
13~24	30	12	42
25~36	1	1	2
>37		2	2
Total	79	41	120

Mo : month, No : number

전자형을 결정하였다.

결 과

총 대상 환자들은 120명이었고 남자가 79명(65.8%), 여자가 41명(34.2%)이었다. 연령별 분포에서는 생후 2일에서부터 12세까지 분포하였고 2세 이하 환자가 97%인 116명으로 대부분을 차지하였고, 특히 3개월 미만의 어린 영아들도 24명(20%)이었다 (Table 2).

계절적인 분포를 보면 9월, 10월 사이에는 산발적인 발생을 보이다가 12월부터 급격히 증가하여 익년 4월까지 환자가 발행하는 분포를 보였다(Fig. 3).

환자의 분변 검체의 현탁액으로부터 ds-RNA를 분리하여 12% PAGE를 이용하여 전기영동 한 결과에서는 11개의 RNA 절편들이 분리되었으며 4:2:3:2의 A군 로타바이러스의 전형적인 전기영동형을 보여 분리된 RNA가 로타바이러스에서 추출되었음을 확인하였다(Fig. 4).

환자들의 분변으로부터 로타바이러스 VP4, VP7 유전자를 RT-PCR로 증폭한 후 agarose gel에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator로 확인한 결과 VP4는 876 bp, VP7은 1,062 bp에서 유전자가 증폭되었다(Fig. 5a, 6a).

VP4와 VP7의 cDNA으로부터 PCR을 수행하고 PCR 산물을 취하여 agarose gel에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator로 확인한 결과 P형의 경우 P[4]는 483

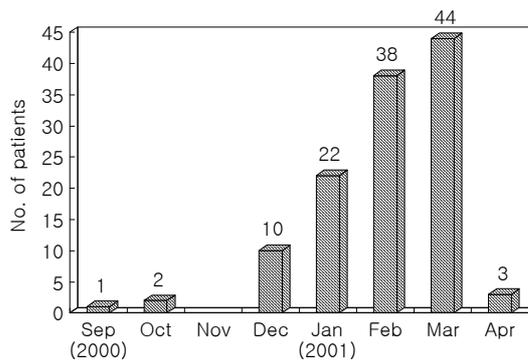


Fig. 3. Monthly distribution of patients.

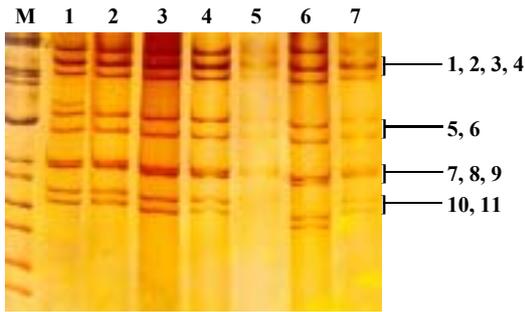


Fig. 4. Electrophoretic migration pattern of the rotavirus genomic double strand RNA. The RNAs were separated on a 12% polyacrylamide gel and stained by silver nitrate. Lane M, 1Kb+DNA marker(GIBCO-BRL, USA); lanes 1~7, human rotavirus RNA extracted from diarrheal patient stools. Numbers denote positions of double strand RNA segments.

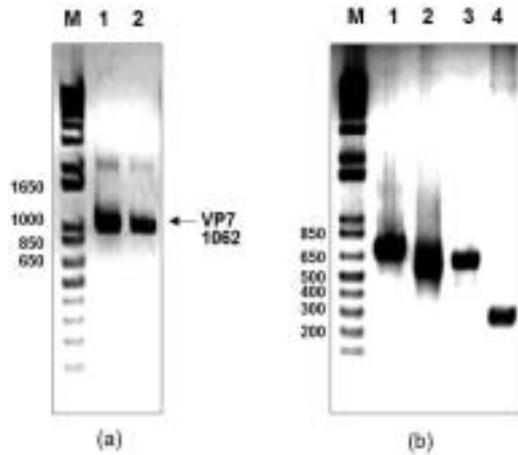


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of VP7 coding gene. (a) RT-PCR products of the entire VP7 coding gene. Lane M, 1Kb+DNA marker; lanes 1~2, PCR products. (b) PCR products performed by G type specific primer sets. Lane 1, G1(749 bp); lane 2, G4(583 bp); lane 3, G2(652 bp); lane 4, G9(306 bp).

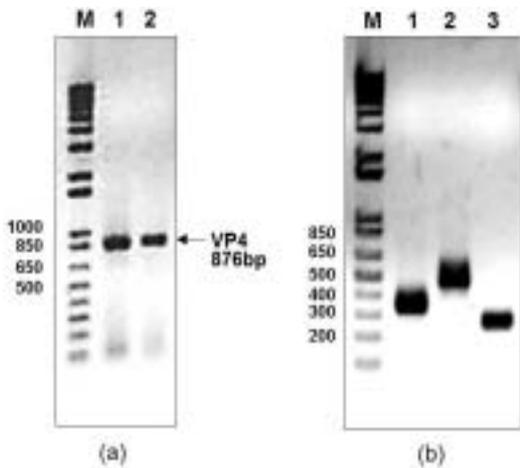


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of VP4 coding gene. (a) RT-PCR products of 876 bp from gene 4, 1Kb+DNA marker; lanes 1~2, PCR products. (b) PCR products performed by P type specific primer sets. Lane 1, P[8](345 bp); lane 2, P[4](483 bp); lane 3, P[6](267 bp).

bp, P[8]는 345 bp, P[6]는 267 bp에서 유전자가 증폭이 되었다(Fig. 5b). G형의 경우 G1은 749 bp, G2는 652 bp, G4는 583 bp, G9는 306 bp에서 유전자가 증폭이 되었다(Fig. 6b).

전체 검체 120개 중에서 G형은 97개(80.8%)에서 결정이 되었고 P형은 102개(85%)에서 결정되어 120개 검체 중 116개(97%)가 적어도 하나 이상의

유전자형이 결정되었다.

P형은 P[4]가 77례(64.2%)로 가장 많았으며 P[6]가 22례(18.3%)이었다. 혼합감염은 P[4]/P[6]가 12례(10%), P[4]/P[8] 1례 등으로 나타났고 유전자형이 결정되지 않은 것이 7례(5.9%)이었다(Table 3).

G형은 G2가 74례(61.7%)로 가장 많았고 G1이 17례(14.2%), G4, G1이 각각 1례였다. 혼합감염은 G1/G2, G1/G4, G1/G9, G8/G9이 각각 1례로 나타났고 유전자형이 결정되지 않은 것이 23례(19.2%)이었다(Table 4).

P형과 G형의 조합형을 분석에서는 P[4]G2가 62례(51.7%)로 가장 많았고 P[6]G1가 7례(5.8%), P[6]G2가 7례(5.8%), P[4]/P[6]G1가 4례(3%), P[4]/P[6]G2가 4례(3%), P[4]G1가 3례(2.5%), P[8]G2가 1례(0.8%), P[4]G4가 1례(0.8%) 등으로 나타났다(Table 5).

고 찰

로타바이러스는 영유아의 위장관염의 가장 흔한 원인으로서 연령층은 3~24개월 사이에 많이 발생하며²¹⁾ 열대지방에서는 계절적인 차이 없이 발생하고 온대지방에서는 연중 발생하나 춥고 건조한 계

Table 3. P Typing Results of Stools from Patients

Genotype	P[4]	P[6]	P[8]	P[4]/P[6]	P[4]/P[8]	UT
No. of patients(%)	77(64.2)	22(18.3)	1(0.8)	12(10)	1(0.8)	7(5.9)

No : number, UT : Untyped

Table 4. G Typing Results of Stools from Patients

Genotype	G1	G2	G4	G9	G1/G2	G1/G4	G1/G9	G8/G9	UT
No. of patients(%)	17(14.3)	74(61.7)	1(0.8)	1(0.8)	1(0.8)	1(0.8)	1(0.8)	1(0.8)	23(19.2)

No : number, UT : Untyped

Table 5. Distribution of P and G Genotypes Combination of Rotavirus

G/P type	No. of samples(%)						Total(%)
	P[4]	P[6]	P[8]	P[4]/P[6]	P[4]/P[8]	UT	
G1	3	7		4	1	2	17(14.3)
G2	62	7	1	4			72(61.7)
G4	1						1(0.8)
G9						1	1(0.8)
G1/G2	1						1(0.8)
G1/G4		1					1(0.8)
G1/G9		1					1(0.8)
G8/G9		1					1(0.8)
UT	10	5		4		4	23(19.2)
Total	77(64.2)	22(18.3)	1(0.8)	12(10)	1(0.8)	7(5.9)	120(100)

No : number, UT : Untyped

절에 발생한다^{2, 4)}. 우리나라에서도 1980년대부터 영유아의 설사 환자에 있어서 흔한 원인 바이러스로 주목을 받기 시작하였으며 계절적으로 춥고 건조한 늦가을에서 초겨울에 걸쳐서 전국적으로 발생하는 것으로 보고되었다^{22, 23)}. 하지만 이번 연구에서는 발생연령층이 대부분이 3~24개월에 분포하였으나 3개월 미만 환자들이 24명(20%)으로 나타나 감염이 되는 연령층이 낮아지고 있음을 알 수 있었고 계절적인 분포 역시 12월에 시작하여 익년 4월까지 발생하여 환자의 발생 정점이 2~3월 혹은 3~4월로 바뀌고 있음을 알 수 있다¹³⁾. 이번 연구 결과를 보면 이전에 보고된 바와 달리 3개월 이하의 어린 영아에서도 많은 감염이 되었음을 알 수 있었는데 이는 임상에서 매우 중요할 것으로 생각이 된다. 즉 3개월 미만의 어린 영아의 경우 발열

과 설사 등이 동반되는 경우 대개는 세균학적인 검사와 치료에 중점을 두게 되나 로타바이러스 감염이 유행하는 시기에 발열과 설사를 주소로 입원하는 어린 영아들의 경우 원인으로 로타바이러스를 고려해야 할 것이며 확인을 할 수 있다면 불필요한 항생제 치료는 지양할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서도 3개월 미만의 영아들의 경우 로타바이러스 감염을 확인 후 항생제를 중단 할 수 있었다. 그리고 과거에 보고된 바와 달리 유행시기가 변화되고 있으며 이런 역학적인 변화는 임상에서 바이러스 위장관염이 의심이 되는 환자를 대할 때 상당히 중요할 것으로 생각이 된다.

대부분의 국내보고에서는 신생아에 대한 감염에 대한 보고는 그리 많지 않았는데 이번 연구에서는 신생아 18명(15%)이 감염이 되었음을 확인할 수

있었다. 18명 중 7명은 증상이 없었으며, 2명은 위장관 증상이 없이 발열만 있었고, 2명은 위장관 증상 없이 경련만 있었으며, 위장관 증상이 있어 입원한 환자들은 배변의 횟수가 증가되었지만 심한 탈수가 동반된 경우는 없어 임상적으로 경미하였다.

신생아 환자 중 4명은 다른 병원이나 산후조리원에서 전원되었으며, 전원 될 당시 이미 로타바이러스에 감염이 된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 로타바이러스의 감염은 병원 내 감염, 혹은 집단 시설내에서 감염으로 나타날 수 있음을 알 수 있었다.

신생아에서 로타바이러스 감염은 흔하지 않으며 구토, 설사가 동반되는 연령아와는 다르게 임상양상이 나타나는데 증상이 없거나 경미하다고 알려져 있다. 그리고 바이러스에 노출될 경우 임상양상은 감염이 되지 않거나 감염이 되면 바이러스는 대변에서 배출되지만 증상이 경미한 경우, 위장관염으로 나타난다고 하며²⁴⁾ 증상이 있는 경우는 감염 1~2일 후 보챔, 수유부진 등의 증상이 나타난 후 수양변의 설사를 하며 변에 점액이 섞이거나 환원 물질이 증가하고 대부분이 증상이 경미하여 3-4일 병일 쯤 회복이 시작된다²⁵⁾. 그리고 감염 시 설사를 일으키는 빈도는 28~77%까지 다양하게 보고하고 있는데^{26~30)} 이는 수유방법차이, 설사의 정의의 차이, 재태연령의 차이, 모자동실 유무 등으로 인하여 나타난다고 하며 감염 시 설사의 빈도가 높지 않은 것은 모유 수유를 할 경우 포함된 체액성 항체, trypsin 억제물질, 항 바이러스 물질, 임프구, 대식세포 등을 포함하는 세포성 물질, 장내 정상 세균총, 약화된 신생아 로타바이러스 균주가 그 원인이 될 수 있다고 하나³¹⁾ 아직 확실한 원인은 모르고 있다. 주로 감염원은 산모로부터 기인할 수 있다고 하며^{32, 33)} 연령아와는 달리 연중 발생할 수 있다고 한다²³⁾. 감염 경로는 주로 분변-경구 경로로 바이러스를 배출하는 신생아로부터 부모나 간호인의 손을 통해 다른 신생아에게 옮겨지는 것이다^{34, 35)}. 이번 연구에서 감염된 신생아 중에서 증상이 없거나 발열만 있는 경우가 있었는데 증상이 없는 경우 감염 여부를 검사하기 전에는 잘 알 수 없어 무증상 감염 환자들이 감염원으로 작용할 수도 있을 수 있으므로 로타바이러스 유행시기에 신생아

의 관리에서 있어 무증상 감염 환자에 대한 관심이 필요하며 적절한 조치가 필요할 것이다. 그리고 신생아에서 발열만 있는 경우는 대개는 신생아 패혈증이라고 하여 세균성 감염으로 생각하고 치료하는 경우가 많은데 로타바이러스 유행시기에 신생아 감염 환자에서 드물지만 로타바이러스 감염도 감염원으로 고려가 되어야 할 것이다. 이번 연구에서는 신생아실에서 집단 감염의 증거를 찾을 수는 없었지만 감염이 확인된 로타바이러스는 병원내 감염이 잘 되므로 환자들의 철저한 격리와 간호인력, 의료진의 병원 내 감염 방지 노력이 필요하다.

소아에서 급성 위장관염에 동반된 경련이 있을 수 있는데 신생아를 포함하는 영, 유아에서 나타날 수 있고 원인 바이러스는 로타바이러스와 칼리시바이러스(Calicivirus) 등³⁶⁾인데 대부분이 별 합병증 없이 회복이 된다. 신생아에서도 중추신경계 이상 반응이 동반할 수 있는데 연속적인 서맥과 무호흡, 신생아 경련 등의 형태로 나타나고 신경학적인 방사선 검사 상 이상을 보이지 않으며 후유증없이 회복이 된다고 한다^{37, 38)}. 이번 연구에서 경련이 동반된 환자들은 입원 당시 위장관 증상이 없이 경련을 주소로 입원하였으며 분만 시 저산소증이나 신생아가사가 없었고 경련을 유발할만한 전해질 불균형, 저혈당, 빈혈 등의 다른 대사성 이상이 없었다. 뇌척수액 검사, 뇌파검사, 뇌단층촬영 등에서 이상 소견이 없었으며, 특별한 항경련제의 치료없이 회복이 되었다. 따라서 비록 증례수는 적지만 신생아 로타바이러스 감염 시 경련이 동반될 수 있음을 확인할 수 있었고 신생아 경련에서 로타바이러스 감염의 연관성에 대하여 고려되어야 할 것으로 사료되며 이는 추후 지속적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

로타바이러스 검사의 진단은 전자현미경법이 표준 진단방법이나 현실적으로 유용성이 떨어져 사용하기 힘든 면이 있어 단클론 또는 다클론 항체를 이용한 효소면역법, Latex agglutinin 검사를 주로 임상에서 많이 이용하고 있다. PAGE를 이용할 경우 108~109 viral particles/mL, 효소면역법은 105~106 viral particles/mL, 전자현미경법은 108 viral particles/mL이 필요하다^{39~41)}. 감염 초기에는 많은 양의 바이러스가 배출되어 진단이 용이하나 시간이

지나면서 바이러스 배출양이 감소하여 진단이 용이하지 않으며 이때 RT-PCR이 가장 감수성이 높다. 따라서 가능하면 감염 초기에 검체를 채취하는 것이 좋으며 RT-PCR이 대변검체에서 로타바이러스를 검출하는 표준방법으로 고려되어질 수 있을 것이다⁴²⁾.

유전자형의 결정에 있어 G형은 VP7의 특이성을 나타내는 것으로 outer capsid glycoprotein이며 동물의 다클론항체를 이용하여 상호중화반응을 통하여 14개의 유전자형이 결정이 되며 이것은 RT-PCR의 유전자형과도 일치한다. P형의 경우 동물의 다클론항체를 이용한 상호중화반응에서 낮은 중화항체 역가를 나타내어 P형 유전자형 결정에 사용되지 못하였다. P형의 유전자형 결정에 있어 어려운 점 때문에 유전자형과 유전자형의 표현이 혼용되어 사용되다가 Rotavirus Nomenclature Working Group에서 현재의 P 유전형으로 표현하기 시작했다. 최근의 분자유전학의 발전으로 항체를 이용한 혈청형의 결정보다는 RT-PCR을 이용한 유전자형 결정 방법으로 대체되었다. 그리고 RT-PCR을 통한 P, G형의 유전자형 결정은 단클론 항체를 이용한 방법으로는 불가능한 로타바이러스의 변이(diversity)에 대하여 중요한 정보를 제공해준다^{43~46)}.

Gentsch 등⁴⁷⁾은 세계적으로 유행한 유전자형은 G형의 경우 G1, G2, G3, G4, P형은 P[8], P[4]였다고 하였고, P, G형의 조합은 P[8]G1(53%), P[8]G4(14.3%), P[4]G2(10.7%), P[8]G3(5.4%)으로 나타났다고 하였다. 그 외에 드문 것으로는 P[6]와 G1, G2, G3, G4의 조합(0.8%), P[9], G1, G3 조합(1.1%), P[4]와 G1, G4의 조합(0.4%), P[8], G9(0.3%), P[3]와 G1, G3의 조합(0.3%) 등으로 나타났다고 하였다. 본 연구에서는 G형의 경우 G2가 74례(61.7%)로 가장 많이 나타났고 G1이 17례(14.3%), G4와 G9이 각각 1례, 혼합감염은 G1/G2, G1/G4, G1/G9, G8/G9으로 나타나 세계적으로는 G1이 가장 많은 유전자형인 것과는 차이가 있었다. P형의 경우 P[4]가 77례(64.2%)로 가장 많았고 P[6]가 22례(18.3%)이었고 혼합감염은 P[4]/P[6]가 12례(10%), P[4]/P[8] 1례로 나타나 외국과 비교하여 P[6]의 빈도가 높았다. P, G형의 조합은 G2P[4]가 62례(51.7%)로 가장 많았고 G1P[6]가 7례(5.8%), G2P[6]가 7례

(5.8%), G1P[4]/P[6]가 4례(3%), G2P[4]/P[6]가 4례(3%), G1P[4]가 3례(2.5%), G2P[8]가 1례(0.8%), G4P[4]가 1례(0.8%)로 나타나 세계적인 분포와는 다른 양상을 보여주고 있다. 국내에서는 김 등⁴⁸⁾이 1991년과 1992년에 서울과 청주 지역에서 환자에서 채취한 검체를 이용한 연구에서는 G1이 52.2%, G2가 17.8%로 나타났고, G3, G4는 검출되지 않았으며 유전자형이 결정되지 않는 것이 30.3% 차지하였다. 김 등⁴⁹⁾이 서울지역 환자의 검체를 이용한 연구에서는 G형의 경우 2001년의 경우 G2는 47.5%, G4는 30.0% G1은 17.5%로 나타났다. G2가 가장 많은 것과 G3가 검출되지 않은 것은 일치하나 G4가 본 연구보다는 많이 검출되었다. 2002년도의 연구 결과를 보면 G4는 49%, G1은 26.5%, G2는 12.2%, G3는 4.1%로 나타나 G4가 가장 많이 검출되어 2001년과 본 연구와는 다른 결과를 보여주고 있다. P, G형의 조합에서도 2001년에는 P[4]G2형이 47.5%로 가장 많았고 P[4]G4가 12.5%, P[4]G1이 10%, P[4]/P[6]G4가 15%, P[6]G4가 2.5%, P[4]G2/G3가 2.5%로 나타났으며 2002년에는 P[6]G4가 47%, P[4]G2가 12.2%, P[4]G1이 6.1%, P[8]G1이 8.2%, 그리고 P[10]G3, P[10]G1, P[10]/P[8]G1, P[6]G3/4가 각각 2.5%로 나타나 로타바이러스 유전자형은 변이에 의하여 시기적으로, 지역적으로 나라 별로 차이가 있음을 알 수 있다. 그리고 본 연구에는 P형의 경우 P[8], P[4], P[6], P[9], G형의 경우 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9를 찾기 위한 primer를 사용하여 유전자형이 결정되지 않은 것은 이번 연구에 포함된 유전자형이 아니거나 아형, 혹은 돌연변이가 원인으로 사료된다. 추후 연구 시에는 좀 더 많은 유전자형의 primer를 이용하고 로타바이러스 변이에 대한 충분한 정보를 가져야 할 것이다.

로타바이러스 유행 시 여러 가지 유전자형이 함께 유행하는 것은 로타바이러스의 변이때문인데 기전에 대해서는 아직 명확한 설명이 없지만 변이의 변화는 point mutation, genomic reassortment, genomic rearrangement, 동물 로타바이러스의 도입 등으로 인하여 변이형 로타바이러스가 생성된다고 한다⁵⁰⁾. 많은 P, G형의 조합은 사람 로타바이러스와 동물 로타바이러스 사이의 genomic reassortment, 혹은

genomic transmission에 의하여 다양하게 나타나며 동물 로타바이러스가 새로운 로타바이러스 유전자형 생성에 중요한 역할을 하게된다. 개발도상국에서 새로운 로타바이러스의 감염은 사람들끼리의 접촉, 사람과 동물과의 접촉에 연관성이 있으며 이런 지역은 인구밀집이 심하고 동물과의 접촉이 높다. 따라서 개발도상국이 선진국보다는 로타바이러스의 변이가 많은 편이다⁵¹⁾. 따라서 로타바이러스의 변이가 백신 개발의 어려운 이유가 되며 지속적인 바이러스 유전자 규명이 요구된다. 현재 개발되고 있는 백신들은 가장 흔히 유행하는 G 항원(G1~G4)을 포함하여 설계되었기 때문에 백신에 포함이 되지 않은 새로운 유전자형이 유행할 경우 백신 효과가 떨어지므로 P, G형의 분석은 향후 수 년간에 걸쳐서 지속적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

이번 연구에서도 소수의 혼합감염이 나타났는데 이는 한 세포나 숙주에 이중적인 감염이 된 형태로 전체적으로 약 2%를 차지하며 genomic reassortment가 일어나 로타바이러스의 새로운 변이종을 생성하는데 주된 기전으로 작용한다⁵²⁾.

로타바이러스에 감염된 환자들은 재감염이나 중한 감염을 예방할 수 있고 이는 감염 후 장 점막에서 분비형 바이러스 특이형 IgA가 생겨 어느 정도 방어력을 가지게 되기 때문이지만 항체의 지속기간이 길지 않은 것으로 나타났다. 그리고 새로운 로타바이러스의 감염이 반복이 되면 방어력은 최대가 된다. 따라서 효과적인 로타바이러스 백신은 자연감염과 유사한 감염을 일으키는 약독화 백신으로 한 번 이상의 접종이 필요한 것이다^{53~55)}. 로타바이러스 장염은 6개월 이하의 어린 영아에서 장염의 중요한 원인이 되었고 따라서 백신은 출생 후 수 개월 이내에 시작해야 한다^{56, 57)}.

로타바이러스 백신은 Vesikari 등⁵⁸⁾에 의하여 bovine 유전자형 G6 생백신인 1가 RIT 4237백신을 처음 개발하여 사용하였다. 1회 접종하여 핀란드에서 80%의 예방효과가 있었으나 다른 개발도상국에서는 효과가 떨어져 사용이 중단되었다.

Perez-Schael 등⁵⁹⁾에 의하여 베네주엘라에서 Rhesus 로타바이러스 유전자형 MMU 18006 G3 1가 백신을 이용하여 접종의 결과 가장 효과적이었는데 당시 지역적으로 유전자형 G3의 유행이 있었다. 따

라서 로타바이러스 백신은 유전자형에 특이하게 작용함을 알게 되었다. 이후 로타바이러스의 변이형이 잘 생기므로 한 가지 이상의 G 유전자형을 포함하는 백신이 개발되기 시작했다. 사람 로타바이러스 유전자형 G1, G2, G4와 Rhesus 로타바이러스 유전자형 G3를 포함하는 4가 백신(RRV-TV)이 개발이 되었고⁶⁰⁾ 1998년 미국에서는 2, 4, 6개월에 사용하는 기본 접종에 포함되었다. 하지만 1998년 8월부터 1999년 7월사이에 로타바이러스 백신 접종 후 명확한 발병기전은 알려지지 않았지만 15례의 장중첩증 환자가 발생하여 백신 접종이 중단되었다⁶¹⁾. Murphy 등⁶²⁾은 로타바이러스 백신 접종 3~14일 후 장중첩증의 위험성이 높아진다고 하였고 Karamaraz 등⁶³⁾도 후향적 코호트 연구에서 이를 확인하였다. 하지만 Simonsen⁶⁴⁾, Chang 등⁶⁵⁾은 백신 접종 후 장중첩증의 위험성은 그리 높지 않다고 하였다. 이후 로타바이러스 백신과 장중첩증의 연관성에 대한 논란은 증가되었고, 특히 로타바이러스 장염에 의한 사망률이 높은 개발도상국에서 백신 사용 시 얻을 수 있는 이익과 위험성에 대한 논란이 가중되었다^{66, 68)}. Chang 등⁶⁹⁾은 미국에서 실시한 자연적인 로타바이러스 감염과 장중첩증의 연관성에 대한 역학연구에서 자연적인 로타바이러스 감염과 장중첩증은 상관관계가 없다고 하였고 로타바이러스 백신 사용 시 나타난 장중첩증은 백신에 포함된 유전자형 중 Rhesus G3와 연관이 있을 것이라고 하였다. 따라서 향후 로타바이러스 백신 개발에 있어 장중첩증에 대한 안정성에 대하여 충분히 검토되어야 할 것이고 유전자형에 대한 조사뿐만 아니라 이번 연구에서는 포함이 되지 않았지만 국내에서 장중첩증에 대한 역학 조사가 함께 이루어져 향후 백신 도입 시 있을 수 있는 장중첩증과의 논란에 대하여 대비하여야 할 것이다.

요 약

목적: 로타바이러스는 영유아에서 설사를 일으키는 주요 원인바이러스로서 세계적으로 유행하며 국내에서도 해마다 유행하고 있다. 국내에서 유행하는 로타바이러스의 유전자형을 규명하고 이를 기초 역학자료 및 백신개발에 유용한 자료로 사용함

과 동시에 로타바이러스 감염 환자들의 연령, 계절적인 분포 및 임상양상을 조사하여, 최근의 국내 로타바이러스 감염의 역학 변화를 알아보는 것이 본 연구의 목적이다.

방 법 : 2000년 9월부터 2001년 4월까지 마산과 티마병원 소아과에 내원하거나 입원하는 환자들 중 대변 검체에서 Latex agglutination 검사(Slidex Rota-Kit2, Bio Merieux, France)로 로타바이러스 양성 판정을 받은 환자들의 검체를 이용하였다. 환자의 검체에서 RNA를 추출한 후 추출된 RNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성한 뒤 VP4, VP7에 대한 PCR을 실시하여 유전자형을 결정하였다.

결 과 :

1) 총 대상 환자들은 120명이었고 남자가 79명(65.8%), 여자가 41명(34.2%)이었다. 연령별로는 생후 2일에서부터 12세까지 분포하였고 2세 이하 환자가 97%인 116명으로 대부분을 차지하였다. 계절적인 양상은 9월, 10월 사이에는 산발적인 발생을 보이다가 12월부터 급격히 증가하여 익년 4월까지 환자의 발생을 보이는 분포를 보였다.

2) 전체 대변 검체 120개 중에서 G형은 97개(80.8%)에서 결정이 되었고 P형은 102개(85%)에서 결정되어 120개 검체 중 116개(97%)가 적어도 하나 이상의 유전자형이 결정되었다.

3) P형은 P[4]가 77례(64.2%)로 가장 많았으며 P[6]가 22례(18.3%), P[8]가 1례(0.8%)이었다. 혼합감염은 P[4]/P[6]가 12례(10%), P[4]/P[8](0.8%) 1례로 나타났고 유전자형이 결정되지 않은 것이 7례(5.9%)이었다.

4) G형은 G2가 74례(61.7%)로 가장 많았고 G1이 17례(14.2%), G4, G1이 각각 1례였다. 혼합감염은 G1/G2, G1/G4, G1/G9, G8/G9이 각각 1례로 나타났고 유전자형이 결정되지 않은 것이 23례(19.2%)이었다.

5) 조합형에 대한 분석을 하면 P[4]G2가 62례(51.7%)로 가장 많았고 P[6]G1가 7례(5.8%), P[6]G2가 7례(5.8%), P[4]/P[6]G1가 4례(3%), P[4]/P[6]G2가 4례(3%), P[4]G1가 3례(2.5%), P[8]G2가 1례(0.8%), P[4]G4가 1례(0.8%)로 나타났다.

결 론 : 2000년에서 2001년 사이 경상남도 지방에서 다양한 로타바이러스의 유전자형의 유행이 있

었고 조합형에 대한분석을 해보면 P[4]G2가 62례(51.7%)로 가장 많았고 P[6]G1가 7례(5.8%), P[6]G2가 7례(5.8%), P[4]/P[6]G1가 4례(3%), P[4]/P[6]G2가 4례(3%), P[4]G1가 3례(2.5%), P[8]G2가 1례(0.8%), P[4]G4가 1례(0.8%)로 나타났다. 이번 연구의 결과에서 국내에서 다양한 로타바이러스의 유전자형의 유행이 확인되었고, 역학이 변화하고 있음을 알 수 있었으며 유전자형의 결과는 향후 로타바이러스 백신의 개발과 도입에 있어 기초 자료로 사용되어질 수 있을 것이다. 로타바이러스는 특성상 변이가 잘 일어나 새로운 유전자형이 쉽게 나타날 수 있고 백신은 유전자형에 특이하게 작용하므로 추후 지속적인 로타바이러스의 유전자형에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Rotavirus vaccine. WHO WER. 1999;74(5):33-8.
- 2) Kapikian AZ, Chanock RM. Field BN, Knipe DM, Howley PM, Melnick JI, et al. Field Virology, 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996:1657-708.
- 3) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 1973;8:1281-3.
- 4) Berstein DI, Ward RL. Feigin RD, Cherry JD. Textbook of pediatric infectious diseases 4th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1998:1901-22.
- 5) Flores J, Nakagomi O, Nakagomi KT, Galss R, Gorrzilia M, Askka J, et al. The role of rotaviruses in pediatric diarrhea. Pediatr Infect Dis 1986;5:S63-62.
- 6) Kapikian AZ, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Banks CE, et al. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay(IAHA) : evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. Infect Immun 1981; 33:415-25.
- 7) Tursi JM, Albert MJ, Bishop RF. Production and characterization of neutralizing monoclonal

- antibody to a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern. *J Clin Microbiol* 1987;25:2426-7.
- 8) Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol* 1987;25:1757-62.
 - 9) Rao CD, Gowda K, Reddy BS. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology* 2000;276:104-13.
 - 10) Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K, et al. New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J Med Virol* 2000;60:63-9.
 - 11) Koopmans M, Brown D. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr* 1999;88:14S-19S.
 - 12) Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM, Hargreaves FD. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J Gen Virol* 1984;65:909-14.
 - 13) Son YJ, Park HS, Jung SL, Park MR, Choeh KC. The annual and seasonal changes in the prevalence of rotaviral infection from; 1993 to 1998. *Korean J Pediatr* 2000;43:49-54.
 - 14) Theil KW, McCloskey CM, Saif LJ, Redman DR, Bohl EH, Hancock DD, et al. Rapid, Simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1981;14:273-80.
 - 15) 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.
 - 16) Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:1333-40.
 - 17) Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR, *J Clin Microbiol* 1994;32:1333-40.
 - 18) Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994;32:1820-22.
 - 19) 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.
 - 20) Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desseisenberger U, Gray JJ. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *J Virol Methods* 1999;78:93-103.
 - 21) Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, Bresee JS, Glass RI. Hospitalization associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: Surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code. *J Infect Dis* 1998;177:13-7.
 - 22) Mun KL. Rota virus. *Korean J Pediatr* 1993; 36:1339-42.
 - 23) Jang HK, Kim CL, Oh SH, Lee HB, Lee KS. The investigation of rotaviral enteritis in children. *Korean J Pediatr* 1988;31:961-7.
 - 24) Remington JS, Klein JO. Infectious disease of the fetus newborn infant, 4th ed, Philadelphia: WB Saunders Co, 1995:1187-95.
 - 25) Chrystie IL, Totterdell BM, Banatvala JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* 1978;1:1176-78.
 - 26) Totterdell BM, Chrystie IL, Banatvala JE. Rotavirus infections in a maternity unit. *Arch Dis Child* 1976;51:924-28.
 - 27) Grillner L, Broberger U, Chrystie I, Ransjo U. Rotavirus infections in newborns: an epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 1985;17:349-55.
 - 28) Cameron DJ, Bishop RF, Veenstra AA, Barnes GL. Noncultivable viruses and neonatal diar-

- rhea : fifteen-month survey in a newborn special care nursery. *J Clin Microbiol* 1978;8:93-8.
- 29) Bryden AS, Thouless ME, Hall CJ, Flewett TH, Wharton BA, Mathew PM, et al. Rotavirus infections in a special-care baby unit. *J Infect Dis* 1982;4:43-8.
- 30) Dearlove J, Latham P, Dearlove B, Pearl K, Thomson A, Lewis IG. Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis. *Br Med J [Clin Res Ed]* 1983;286:1473-75.
- 31) Haffejee IE. Neonatal rotavirus infections. *Rev Infect Dis* 1991;13:957-62.
- 32) Zhong M, Yan P, Xie M. Human rotavirus infection in perinatal transmission. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1997;32:735-7.
- 33) Al-Frayh, AR, Ramia S, Bakir TM, Zaidi MA. Rotavirus shedding by neonates and possible mode of transmission. *J Trop Ped* 1987;33:246-8.
- 34) Murphy AM, Albery MB, Crewe EB. Rotavirus infection of neonates. *Lancet* 1977;2:1149-50.
- 35) Morris CA, Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975;1:4-5.
- 36) 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.
- 37) Riedel F, Kroener T, Stein K, Nuesslein TG, Rieger CH. Rotavirus infection and bradycardia-apnoea-episodes in the neonate. *Eur J Pediatr* 1996;155:36-40.
- 38) Foldenauer A, Vossbeck S, Pohlandt F. Neonatal hypocalcaemia associated with rotavirus diarrhoea. *Eur J Pediatr* 1998;157:838-42.
- 39) Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol* 1981;13: 976-81.
- 40) Christy C, Vosefski D, Madore HP. Comparison of three enzyme immunoassays to tissue culture for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1990;28:1428-30.
- 41) Flores J, Sears J, Schael IP, White L, Garcia D, Lanata C, et al. Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein VP7. *J Virol* 1990;64:4021-9.
- 42) Ramachandran M, Gentsch JR, Parashar UD, Jin S, Woods PA, Holmes JL, et al. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3223-9.
- 43) Matson DO, Estes MK, Burns JW, Greenberg HB, Taniguchi K, Urasawa S. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. *J Infect Dis* 1990;162:605-14.
- 44) Flores J, Taniguchi K, Green K, Perez-Schael I, Garcia D, Sears J, et al. Relative frequencies of rotavirus serotypes 1, 2, 3, and 4 in Venezuelan infants with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:2092-5.
- 45) Woods PA, Gentsch J, Gouvea V, Mata L, Santosham M, Bai ZS, et al. Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J Clin Microbiol* 1992;30:781-5.
- 46) Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, Greenberg HB, Urasawa S. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987;155:1159-66.
- 47) Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl):30S-36S.
- 48) Kim DS, Park BS, Jung DH, Ahn JM, Kim CJ, Kang SY. Prevalence and identification of rotaviruses in stool specimens of patients with acute diarrhea from several regions of Korea. *Korean J Pediatr* 1999;42: 501-9.

- 49) Kim EJ, Seo BT, Park SK, Lee JJ. Group A rotavirus VP4, VP7 genotypes by multiplex PCR in Seoul. *J of Bacteriology and Virology* 2002;32:291-87.
- 50) Taniguchi K, Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 1995;6:123-31.
- 51) Ahmed MU, Urasawa S, Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Wakasugi F, et al. Analysis of human rotavirus strains prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the 1988 monsoon. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2273-9.
- 52) Iturriza-Gomara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo : driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol* 2001;75:3696-705.
- 53) Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996;335: 1022-8.
- 54) Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection : 2-year prospective study. *J Infect Dis* 1991;164:277-83.
- 55) Ward RL, Bernstein DI. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *J Infect Dis* 1994;169: 900-4.
- 56) Crawley JM, Bishop RF, Barnes GL. Rotavirus gastroenteritis in infants aged 0~6 months in Melbourne, Australia : implications for vaccination. *J Paediatr Child Health* 1993;29:219-21.
- 57) Edelman R. Perspective on the development and deployment of rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis* 1987;6:704-10.
- 58) Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, Andre FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1984;51:977-81.
- 59) Perez-Schael I, Garcia D, Gonzalez M, Gonzalez R, Daoud N, Perez M, et al. Prospective study of diarrheal diseases in Venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol* 1990;30:219-29.
- 60) Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996;174(1 Suppl):65S-72S.
- 61) Intussusception among recipients of rotavirus vaccine-United States, 1998~1999. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep* 1999;16:48(27):577-81.
- 62) Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, et al. Rotavirus Intussusception Investigation Team : Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2001;344:564-72.
- 63) Kramarz P, France EK, Destefano F, Black SB, Shinefield H, Ward JI, et al. Population-based study of rotavirus vaccination and intussusception. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:410-6.
- 64) Simonsen L, Morens D, Elixhauser A, Gerber M, Van Raden M, Blackwelder W. Effect of rotavirus vaccination programme on trends in admission of infants to hospital for intussusception. *Lancet* 2001;358:1224-9.
- 65) Chang HG, Smith PF, Ackelsberg J, Morse DL, Glass RI. Intussusception, rotavirus diarrhea, and rotavirus vaccine use among children in New York state. *Pediatrics* 2001;108:54-60.
- 66) Nakagomi T. Rotavirus infection and intussusception : a view from retrospect. *Microbiol Immunol* 2000;44:619-28.
- 67) Weijer C. The future of research into rotavirus vaccine. *BMJ* 2000;321:525-6.
- 68) Cohen J. Medicine. Rethinking a vaccine's risk. *Science* 2001;293:1576-7.
- 69) Chang EJ, Zangwill KM, Lee H, Ward JI. Lack of association between rotavirus infection and intussusception : implications for use of attenuated rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:97-102.