

대장균에서 발현된 A군 로타바이러스 VP6 단백질을 이용한 로타바이러스 감염의 혈청학적 진단의 유용성

경상대학교 의학전문대학원 소아청소년과학교실, *미생물학교실, 건강과학연구원,
†중앙대학교 의과대학 미생물학교실

서지현 · 김소영 · 박지숙 · 임재영 · 박찬후 · 우향옥 · 윤희상 · 김원용[†]
강형련* · 백승철* · 이우곤* · 조명제* · 이광호*

Usefulness of *Escherichia coli*-expressed Recombinant VP6 Proteins of Group A Rotavirus in Serodiagnosis of Rotavirus Infection

Ji-Hyun Seo, M.D., So-Young Kim, M.D., Ji Sook Park, M.D., Jae-Young Lim, M.D.,
Chan-Hoo Park, M.D., Hyang-Ok Woo, M.D., Hee-Shang Youn, M.D., Wonyong Kim, Ph.D.[†],
Hyung-Lyun Kang, Ph.D.*, Seung-Chul Baik, M.D.*, Woo-Kon Lee, Ph.D.*,
Myung-Je Cho, Ph.D.* and Kwang-Ho Rhee, M.D.*

Departments of Pediatrics and *Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine, Institute of Health Science, Jinju, †Department of Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The serologic diagnosis of rotaviral infections is not commonly used in clinical practice, but is used in seroepidemiologic studies. In this study, the usefulness of *Escherichia coli*-expressed recombinant VP6 proteins of group A rotavirus in the serodiagnosis of rotavirus infections by ELISA was evaluated.

Methods: The recombinant VP6 proteins of group A rotavirus expressed in *E. coli* Rosetta II strain were purified and identified. One hundred sera from 22 children (4 healthy neonates, 13 healthy children, and 5 immunocompromised children) who had serial sera samples prior to and after rotavirus infections were provided by the Gyeongsang National University Hospital, a member of the National Biobank of Korea. IgG, IgA, and IgM antibodies against rVP6 were analyzed by ELISA in all of the patients and Western blot analysis in 4 neonates.

Results: ELISA tests using rVP6 proteins of group A rotavirus as antigen revealed that IgG, IgA, and IgM antibodies increased after rotaviral infections in most neonates and healthy children. IgG antibodies also increased after rotaviral infections in most immunocompromised children without an adequate increase in IgM or IgA antibodies. Western blot analysis in four neonates revealed very early IgM antibody responses, even in the sera with low optical densities in ELISA tests.

Conclusion: Our study showed that ELISA using rVP6 as an antigen is a valid diagnostic tool for seroepidemiologic studies of rotavirus infections and Western blot analysis is a sensitive test in detecting IgG, IgA, and and IgM antibodies in patients with rotavirus infections. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 13: 134~145)

Key Words: Rotavirus, VP6, ELISA

접수 : 2010년 8월 13일, 수정 : 2010년 8월 17일, 승인 : 2010년 9월 3일

책임저자 : 윤희상, 660-751, 경남 진주시 칠암동 92, 경상대학교 의학전문대학원 소아청소년과학교실

Tel: 055-750-8158, Fax: 055-752-9339, E-mail: hsyoun@gnu.ac.kr

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-313-E00267).
본 연구는 경상대학교병원 인체자원단위은행에서 제공한 인체자원을 이용하여 수행되었음.

서 론

로타바이러스는 5세 이하 소아에서 탈수 및 수양성 설사 등을 유발하는 가장 흔한 원인으로 주로 4개월에서 24개월 사이 영유아에서 유증상 감염을 유발한다¹⁾. 일생 동안 적어도 5번 정도 로타바이러스에 노출되지만 첫 감염에서만 심한 급성 위장관염으로 발현하고 이후에 다른 군이나 혈청형에 노출되더라도 대부분 증상이 없거나 미미하다고 알려져 있어 로타바이러스 감염의 증상 발현에 있어 획득 면역이 중요한 역할을 하는 것을 시사한다²⁾.

1980년대에는 무증상이거나 경한 증상으로 발현했던 신생아 로타바이러스 감염은 태반을 통한 모체로부터의 IgG 항체 전달에 의한 것이고³⁾, 이런 신생아 로타바이러스 감염은 영아기 재감염 시 심한 설사로 발현되는 것을 막아주고, 이와 같은 이유로 모체로부터 받은 로타바이러스 IgG 항체가 없어지는 시기인 돌 전후 로타바이러스 감염이 심한 급성 위장관염으로 발현됐던 것으로 이해되었다⁴⁾.

그러나 최근에 신생아 시기에 심한 유증상의 로타바이러스 감염 증가와 더불어 신생아 괴사성 장염 등의 후유증으로 인한 사망과^{5,6)} 5세 이상의 소아와 성인, 노년층에서의 로타바이러스의 유증상 감염이 보고되고 있다^{7,8)}. 이런 로타바이러스의 유증상 감염이 신생아와 성인에서 발생하는 것은 해당지역에 유행하는 로타바이러스 혈청형의 변화 때문이라는 보고가 있다^{9,10)}.

그러나 경제발달과 전반적인 생활환경 개선으로 과거 모든 영유아에게서 돌 전후로 발생하던 로타바이러스 감염과 가족 내 전파를 통한 성인 감염이 감소하게 되어 산모와 성인에게서 로타바이러스 항체 농도가 감소하게 되었다. 이로 인해 신생아, 5세 이상의 소아와 성인에서의 로타바이러스에 의한 유증상 감염이 증가하였다고 판단할 수도 있다. 이러한 로타바이러스 감염 역학의 변화가 있었는지 확인하기 위해서는 로타바이러스 항체를 정량적으로 비교할 수 있는 예민도와 특이도가 높은 검사 방법의 개발이 필요하다.

로타바이러스 감염을 혈청학적으로 진단하는 것은 임상에서는 흔히 이용되지 않고 로타바이러스 백신 투여 후 IgA 항체가 음성에서 양성으로의 전환되는 것이

나 중화항체 역가가 증가하는 것을 측정하여 백신 효과 판정에 사용하거나¹¹⁾ 혈청역학연구에 사용되고 있다¹²⁾.

로타바이러스는 내부에 11개의 이중 나선 RNA가 존재하고, 내부단백질인 VP6와 외부단백질로 구성되어 있다. 내부단백질인 VP6는 로타바이러스에 가장 많은 양을 차지하는 구조단백질로 A-G의 7개의 군(group)을 나누는 기준이 되며, 진단 검사의 표적 항원으로 이용된다. 사람에게 감염을 일으키는 것은 A군, B군과 C군이며, 그 중에서도 A군이 대부분을 차지한다¹⁾. VP6 단백질은 중화항체는 생성되지 않으나 다른 군의 로타바이러스와 반응하는 교차항체를 만들어 이 단백질에 대한 항체가 로타바이러스에 대한 감염을 막아준다는 보고가 있다¹³⁾.

본 연구에서는 A군 로타바이러스의 VP6 유전자를 대장균에서 발현시켜 확보한 rVP6 단백질이 항원성이 있는지를 확인하고, 이것을 항원으로 한 효소면역측정법이 혈청 내의 로타바이러스 IgG, IgA, IgM 항체를 정량적으로 평가할 수 있는지 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

경상대학교병원 IRB 심의(GNUNIRB-5613)를 거친 후, 경상대학교병원 인체자원은행으로부터 -20°C 에 냉동 보관되어 있었던 혈청을 제공받았다. 2004년 12월 31일 이전에 구토 또는 설사로 경상대학교병원에 입원하여 분변 항원검사(아산 이지테스트 로타스트립, 아산 제약, 한국)로 로타바이러스 감염을 확진 받았던 소아들 중 로타바이러스 백신을 투여 받은 적이 없으며, 진단 받기 전, 진단 당시, 회복기 이후의 연속적인 혈청을 확보할 수 있었던 22예를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 로타바이러스 항원: 중앙대학교 의과대학 김원용 교수로부터 로타바이러스 VP6 유전자가 포함된 DNA 클론을 분양받았다. 로타바이러스의 공통항원인 VP6의 유전자 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 확보하여(Fig. 1) VP6 유전자를 클로닝하기 위하여 유전자의 N 말단과 C 말단에 각각 제한 효소 *NdeI* (TACATG)과 *BamHI* (GGATCC)를 포함하는 로타

```

1   ATGGAGGTTCTGACTCACTGTCAAAAAAGCTTAAAGATGCTAGGGACAA   50
51  AAITGTTGAAGGTACATTATATCTAATGTTAGCGAICTTATTTCAGCAAT   100
101 TCAATCAAATGATAGTAACTATGAATGGAAATGATTTTCAGACTGGAGGA   150
151 ATTGGCAATTTACCTGTTAGAAATGGACTTTCGATTTGGTCTATTAGG   200
201 TACAACACTTTTGAAC TTGGGTGCTAATTATGTTGAGAATGCAAGAACTA   250
251 TAATTGAATATTTTATTGAC TTTAATTGATAATGATGATGGATGAAATG   300
301 GCAAGAGAATCTCAAAGAAATGGAGTAGGCCCAATCTGAAGCGTTGAG   350
351 AAAGTTAGCGGGAATTAATTTAAGAGAATAAATTCGATAATTCATCAG   400
401 AATACATAGAAAATGGAAC TTACAAAATAGAAGACAGCGCACCGGATTT   450
451 GTTTTTATAAACCTAACATAITTCATATCTAGCTTCACTTACTCTAAA   500
501 TAGATCTAACCAATGCATGATAATTTAATGGGAACCATGTGGCTTAATG   550
551 CTGGATCAGAAATCAAGTGGCTGGATTGACTACTCATGCGCCATAAATG   600
601 CACCAGCGAACATACAGCAATTTGAACATATCGTCCAGCTTAGGCGCGCA   650
651 CTGACTACAGTACTATACTTATTAACCTGATGCAGAGAGATTAGTTTTC   700
701 CAAGAGTAATTAATTCAGCTGATGGCGGACTACATGGTCTTTAATCCA   750
751 GTTATCTAAGACAAAACATGTAGAGGTGAATTTTTGTTGAATGGACA   800
801 AATATTAATACATATCAGGCTAGATTGGTACTATCATCGCAAGAAAT   850
851 TTGATGCAATTCGTTTATTTTCAGTTGATGCGTCCACCTAATATGACA   900
901 CCAGCTGTATATGCACTGTTCCACAAGCACAACTTTTCAGCACCATGC   950
951 AACAGTTGGACTTACATTACGTAATTAATCTGCGGTTTGTGAATCAGAGC   1000
1001 TTGCGGACGCAAAATGAAACTCTGTAGCAAATGTGACCGCGGTGCGTCAA   1050
1051 GAATATGCCATACAGTTGGACCGGATTTCCACCAGGCGTGAATTGGAC   1100
1101 TGAATTAATTAATACTAATTCGCCATCTAGAGAAGATAAATTCGAACGCG   1150
1151 TTTTCACGGTAGCTCCATTAGAAGCATGTTGATTAAGTGA
    
```

Fig. 1. The nucleotide sequences of rotavirus VP6 gene was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank.

Table 1. PCR Primer for Amplification of Rotavirus VP6 Gene

Primer	Primer sequence	PCR product size (bp)
RotaVP6F	TACATGGAGGTTCTGTACTC (<i>NdeI</i>)	1,194
RotaVP6R	GGATCCTCACTTAATCAACA (<i>BamHI</i>)	

바이러스 VP6 시발체(Table 1)를 디자인하였다. Taq DNA polymerase를 이용하여 VP6 유전자를 증폭하여 정제하였다(Fig. 2). 이것을 삽입체로 이용하여 pGEM-T/rotavirus VP6 클론을 획득하였다. 단백질 발현벡터인 pET-15b를 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 자른 후 pGEM-T/rotavirus VP6 클론과 결합시켜 pET15b-rotavirus VP6 클론을 획득하여 단백질 발현 숙주세포인 *E. coli* Rosseta II에 형질전환시켜 로타바이러스 VP6 단백질을 과발현시켰다. 이것을 초음파 세포파쇄기(Vibra Cell, Sonics & Materials, Danbury, CT)로 파쇄한 다음 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리시켰다. 상층액과 침전물(봉입체, inclusion body)을 분리하여 전기영동을 실시하였다(Fig. 3). 봉입체를 포함하는 세포파쇄액 침전물을 2 M 요소, 4 M 요소 순으로 섞어 각각 4°C에서 교반한 후 침전물을 2회에 걸쳐 분리하였다. 마지막으로 8 M 요소를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 교반시

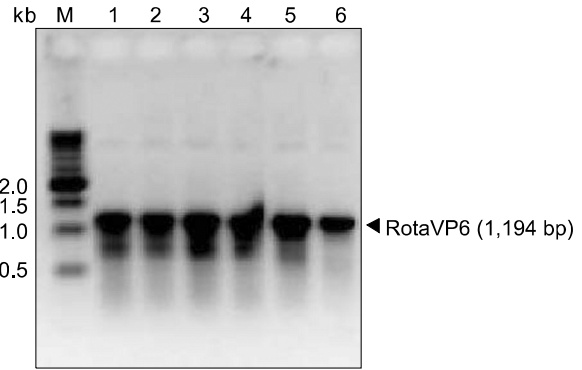


Fig. 2. Amplicons with a size of 1,194 bp represent rotavirus VP6 (lanes 1~6).

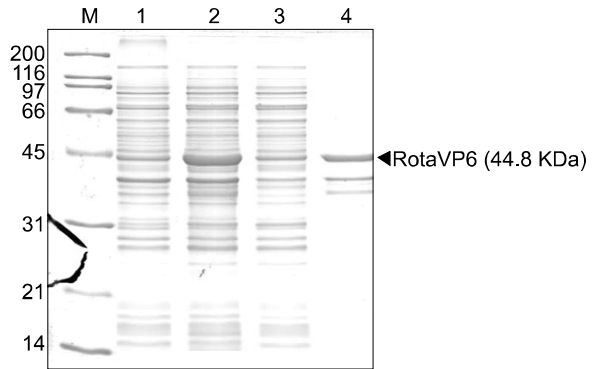


Fig. 3. The recombinant proteins from recombinant *E. coli* pET15b/rotavirus VP6 were analyzed by electrophoresis (12% SDS-PAGE). M: protein size marker, 1: *E. coli* pET15b/rotavirus VP6 whole cell lysate without IPTG induction, 2: *E. coli* pET15b/rotavirus VP6 whole cell lysate with IPTG induction, 3: supernatant of the whole cell lysate with IPTG induction, 4: precipitate of the whole cell lysate with IPTG induction.

켜 침전물을 완전히 녹였다. 이 수용액을 14,500 rpm에서 30분간 원심한 후 상층액을 분리하여 L-arginine을 최종 농도가 0.8 M이 되게끔 첨가 한 후, 4°C에서 하룻밤 동안 교반시켜 refolding을 실시하였다. 이것을 Ni-NTA column을 이용하여 재조합 단백질을 정제한 후, -70°C 초저온 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다(Fig. 4).

2) **IgG, IgA, IgM 효소면역측정법:** 정제된 로타바이러스 rVP6 항원에 대한 사람의 IgG, IgA, IgM 항체 역가를 측정하기 위해 일반적인 효소면역측정법을 시행하였다. 로타바이러스 rVP6 항원을 0.05 M carbonate 완충액(pH 8.0)으로, 10 μg/mL 농도가 되도록 희석한

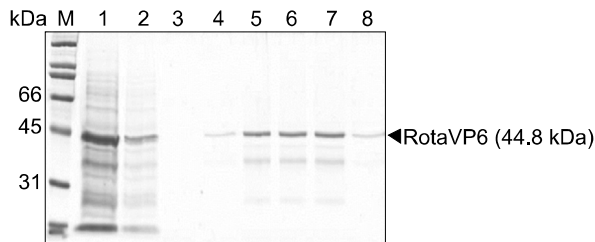


Fig. 4. The purified refolded rotavirus VP6 proteins were analyzed by electrophoresis (12% SDS-PAGE). M: protein size marker, 1: flow through, 2: wash out, 3~8: fractions eluted with 20, 40, 80, 160, 320, and 500 mM imidazole, respectively.

후 96 well이 있는 효소면역측정판에 구멍 당 $50 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 4°C 에서 하룻밤 동안 부착시켰다. 항원이 부착된 효소면역측정판을 PBS-0.05% Tween 20 (PBST) 액으로 1회 세척한 다음, 3% bovine serum albumin (BSA)-PBST 용액을 $150 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하고, 37°C 에서 3시간 동안 처리하여 항원이 부착되지 않는 부위를 차단하였다. 양성 대조혈청과 음성 대조혈청 그리고 환자의 혈청을 PBST로 희석(IgG 1 : 500, IgA 1 : 100, IgM 1 : 500)하여, $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 유도하였다. PBST 용액으로 3회 세척한 뒤 peroxidase conjugated goat anti-human IgG, IgA, IgM (Bethyl Lab., USA)을 1% BSA/PBST에 1 : 10,000으로 희석하여 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 2차 항체반응을 실시하였다. PBST 용액으로 5회 세척하고 o-phenylene diamine (OPD) 기질 용액을 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하여 실온에서 30분간 발색 반응을 유도하였다. 동량의 2 N 황산용액을 첨가하여 발색반응을 중단시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 혈청은 2번 검사하여 그 평균 흡광도를 결과로 사용하였다.

판정기준치(cut off value)는 음성대조군 46개 혈청의 평균값+3×표준편차로 결정하였는데 IgG 0.130, IgA 0.062, IgM 0.074였다. 효소면역측정법 측정판 간 IgG, IgA 및 IgM 변이계수(coefficient of variance)는 각각 10.7, 8.5, 8.6%였다. 따라서 연속적으로 측정된 흡광도가 IgG인 경우 21.4%, IgA인 경우 17%, IgM인 경우 17.2% 이상의 상승이 있으면 항체 역가가 증가하였다고 판단하였다(data not shown)¹⁴⁾.

3) IgG, IgA, IgM 면역 블로팅: 10~20% SDS-

polyacrylamide gradient separating gel과 3% stacking gel로 된 0.75 mm 두께의 slab gel에 로타바이러스 rVP6 항원 $35 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 분주한 후 Mighty Small II (Hofer Scientific Instruments, San Fernando, CA)에서 15 mA에서 60분간 전기영동 하였다. 이 gel을 transfer buffer (20 mM Tris, 144 mM glycine, 25% methanol, 0.01% sodium dodecyl sulfate)에 담가 분획된 단백질을 고정하였다. Polyacrylamide gel과 nitrocellulose (NC) membrane (0.2 micron, Bio-Rad Laboratories)을 음극으로부터 grid → sponge → 3 MM filter paper → NC membrane → gel → 3 MM filter paper → sponge → grid 순으로 조립하여 Mighty Small Transphor (Hofer Scientific Instruments)에 넣고 120 mA로 60분간 4°C 내외의 ice-cold transfer buffer (20 mM Tris, 0.01% SDS, 144 mM glycine [pH8.3], 25% methanol)에서 electro-transfer시켰다. 이 NC membrane을 TBS-Tween 20 buffer (TBST; TBS; 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl [pH8.0], 0.05% Tween)로 세척하고 1% bovine serum albumin (BSA)-TBST 용액으로 NC membrane의 나머지 단백질 결합 부위를 차단시켰다. 이것을 3 mm 간격으로 strip을 만들어 1 : 10로 희석시킨 혈청과 37°C 에서 30분간 반응시켰다. TBST buffer로 3분 간격으로 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG, IgA, IgM (Bethyl Lab., USA)을 1% BSA/PBST에 각각 1 : 1,000, 1 : 500, 1 : 500으로 희석하여 첨가하여 37°C 에서 30분간 처리하였다. TBST buffer로 3분간 5회 세척한 다음 기질용액을 넣어 실온에서 15분간 효소반응을 진행시켰다. 기질용액은 alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgSO_4 [pH9.5]), 0.03% nitroblue tetrazolium substrate (w/v Sigma, St. Louise, MO)와 0.015% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) substrate (w/v Sigma)를 첨가하여 제조하였다. 효소반응은 반응 중지용 완충액(20 mM tris-HCl, 50 mM EDTA, [pH8.0])으로 중지시켰다.

결 과

1. 대상 환자 및 혈청

22명의 대상 환자는 건강한 신생아 4명(4일~21일),

Table 2. Demographic Data and Clinical Characteristics of the Patients with Rotaviral Infections

Group	Sex/Age	Clinical manifestations at diagnosis
Neonate 1	M/4 days	Tachypnea
Neonate 2	M/7 days	No specific findings
Neonate 3	M/9 days	Vomiting, diarrhea
Neonate 4	F/21 days	Diarrhea, abdominal distension
Healthy child 1	F/1.5 mo	Fever, diarrhea
Healthy child 2	M/5 mo	Fever, lethargy
Healthy child 3	M/7 mo	Vomiting, diarrhea
Healthy child 4	M/9 mo	Fever, diarrhea
Healthy child 5	F/9 mo	Diarrhea, dehydration
Healthy child 6	F/12 mo	Vomiting, diarrhea
Healthy child 7	M/12 mo	Fever, diarrhea
Healthy child 8	F/12 mo	Fever, vomiting, diarrhea
Healthy child 9	M/1 yr 5 mo	Fever, vomiting, diarrhea
Healthy child 10	F/1 yr 7 mo	Fever, vomiting, diarrhea
Healthy child 11	M/2 yr 11 mo	Fever, vomiting, diarrhea
Healthy child 12	M/2 yr 11 mo	Diarrhea
Healthy child 13	M/3 yr 5 mo	Fever, diarrhea
Immunocompromized child 1 (Down syndrome with acute ITP)*	M/2 yr 1 mo	Diarrhea
Immunocompromized child 2 (aplastic anemia)	M/3 yr 11 mo	Fever, diarrhea
Immunocompromized child 3 (ALL)	M/12 yr	Diarrhea
Immunocompromized child 4 (CML)	M/12 yr	Fever, diarrhea
Immunocompromized child 5 (ALL)	M/12 yr	Fever, diarrhea

*He was treated with high dose intravenous gammaglobulin for acute ITP 15 days before rotaviral gastroenteritis. ITP: immune thrombocytopenic purpura, ALL: acute lymphoblastic leukemia, CML: chronic myelogenous leukemia.

건강한 영유아 13명(1.5개월~3년 5개월), 백혈병 등으로 면역억제나 항암요법을 받고 있었던 면역이 저하된 소아 5명(2년 1개월~12세)의 3개 군으로 구분할 수 있었고, 남아가 15명, 여아가 7명이었다(Table 2). 각 환자당 3~10개씩 총 100개 혈청이 효소면역측정에, 신생아 4명에서 각 3~4개씩 총 13개 혈청이 면역 블로팅에 사용되었다.

2. 효소면역측정법

1) 건강한 신생아: 신생아 4명 중 2명은 설사 등의 위장관 증세가 동반되어 있었으나 1명은 과호흡, 1명은 특이 증세가 없이 분변 로타바이러스 항원이 양성이었다.

로타바이러스 감염 진단 전 또는 진단 당시 혈청에서 IgG 항체 역가는 4명 모두 증가되어 있었고 IgA와 IgM 항체는 음성이었다. IgG 항체 역가는 감염 진단 후 2주 이내 확보된 혈청에서 4명 모두에서 증가하지 않았으

나 2명에서 측정된 100일 이후 혈청에서는 증가하였다(Fig. 5B, D). IgA 항체 역가는 감염 진단 후 2주 이내 확보된 혈청에서 4명 중 1명만 증가하였으나(Fig. 5A), 2명에서 측정된 100일 이후 혈청에서 증가하였다(Fig. 5B, D). IgM 항체 역가는 감염 진단 후 2주 이내 확보된 혈청에서 4명 모두 증가하였고, 2명에서 측정된 100일 이후 혈청에서 더 이상의 항체 역가 증가는 없었다(Fig. 5).

2) 건강한 영유아: 13명 모두 설사 등의 위장관 증세가 동반되었다. 로타바이러스 감염 진단 전 또는 진단 당시 혈청에서 IgG 항체 역가는 13명 모두 증가되어 있었고, IgA와 IgM 항체는 생후 45일, 9개월 된 영아 2명을 제외한 11명에서 양성이었다. 감염 진단 후 확보된 혈청에서 2년 11개월 된 2명을 제외한 11명에서 IgG 항체 역가가 증가하였고, IgA, IgM 항체 역가도 증가되어 있었다(Fig. 6). IgG 항체 역가 증가가 없었던 2명 중 1명은 IgA와 IgM 항체 역가 증가가(Fig. 6L), 1명은 IgA

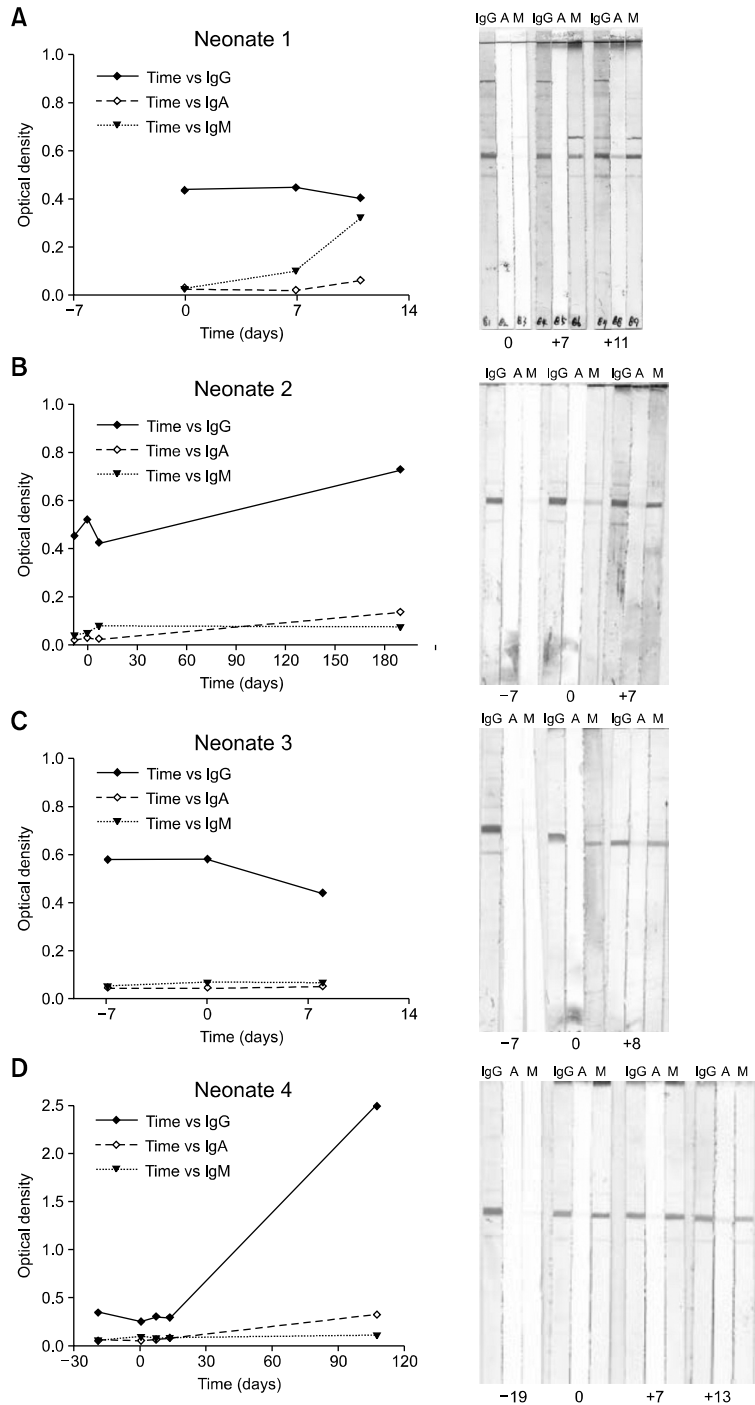


Fig. 5. Results of both ELISA and immunoblotting for detecting IgG, IgA, and IgM antibodies against rVP6 of rotavirus are shown in four healthy neonates who were diagnosed with rotaviral gastroenteritis, Sample date 0: the date when stool was confirmed positive for rotavirus antigen.

항체 역가만 증가가 있었다(Fig. 6K).

3) 면역이 저하된 소아: 면역억제치료를 항암요법을 받고 있었던 5명 모두 설사 등의 위장관 증세가 동반되었다. 로타바이러스 감염 진단 전 또는 진단 당시 혈청에서 IgG 항체는 5명 전부 양성하였고, IgA와 IgM

항체는 4명은 양성이었으나 1명에서는 진단 270일 전 혈청은 양성, 60일 전 혈청에서 음성으로 전환되어 있었다(Fig. 7B). 감염 진단 후 확보된 혈청에서 IgG 항체 역가는 1명을 제외한(Fig. 7A) 4명에서 증가하였으나 IgA 항체 역가는 2명에서만(Fig. 7B, C) 증가하였고,

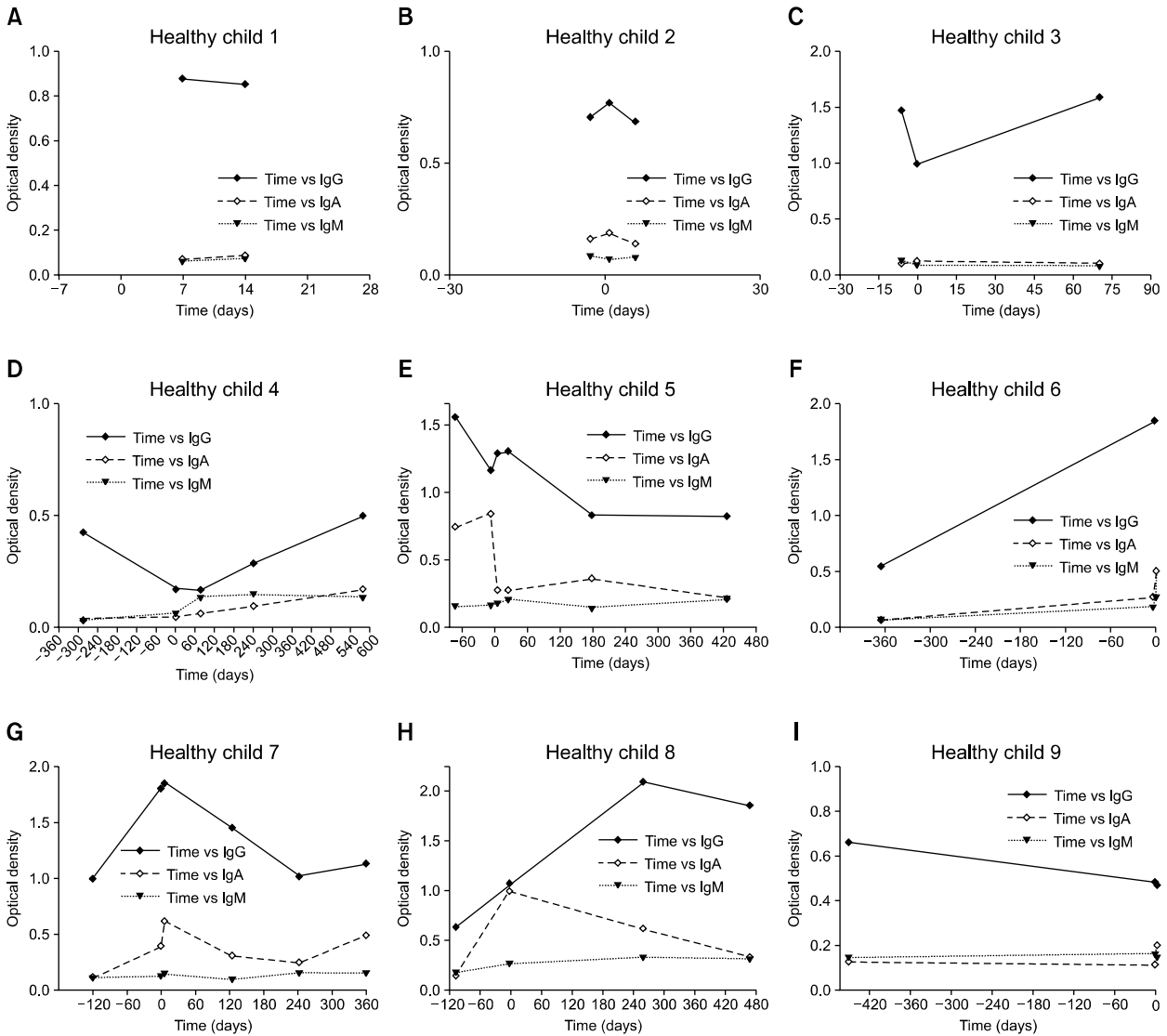


Fig. 6. Changes in optical densities of ELISA for detecting IgG, IgA, and IgM antibodies against rVP6 of rotavirus are shown in 13 healthy children who were diagnosed with rotaviral gastroenteritis. Sample date 0: the date when stool was confirmed positive for rotavirus antigen.

IgM 항체 역가는 5명 모두 증가하지 않았다.

3. 면역 블로팅

면역 블로팅 검사에서는 로타바이러스 감염 진단 전 혈청에서 IgG 항체는 4명 모두 양성이고 IgA와 IgM 항체는 모두 음성이었다. IgM 항체는 감염 진단 초기부터 4명 모두 양성이 되었으나, IgA 항체는 감염 14일 이내 혈청에서 1명에서만 양성이었다(Fig. 5).

고 찰

로타바이러스의 내피를 구성하는 VP6 단백질은 모든 로타바이러스 혈청형에서 공통항원으로 존재하기 때문에 분변에서 효소면역반응을 이용한 A군 로타바이러스의 VP6 항원 검출법을 로타바이러스 진단에 가장 많이 이용하고 있다¹⁾. 혈청 내 VP6 단백질에 대한 항체는 로타바이러스 감염이 있었음을 나타내지만 중

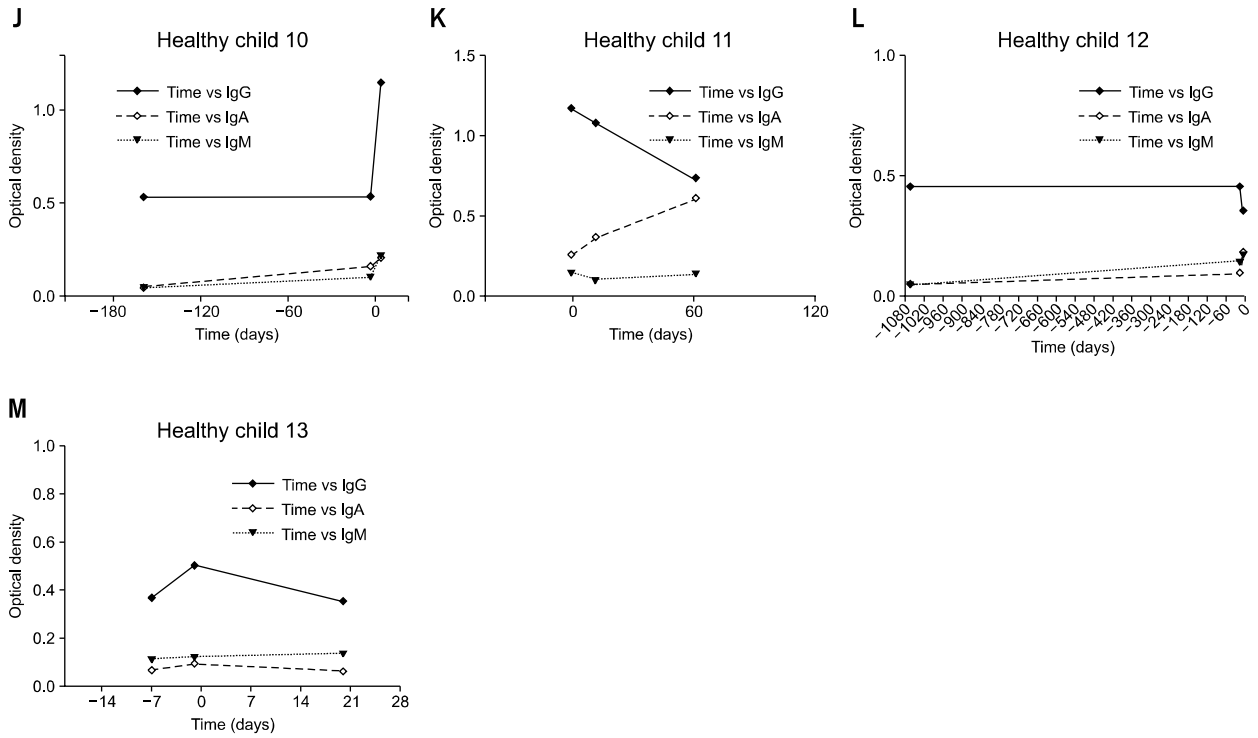


Fig. 6. Continued.

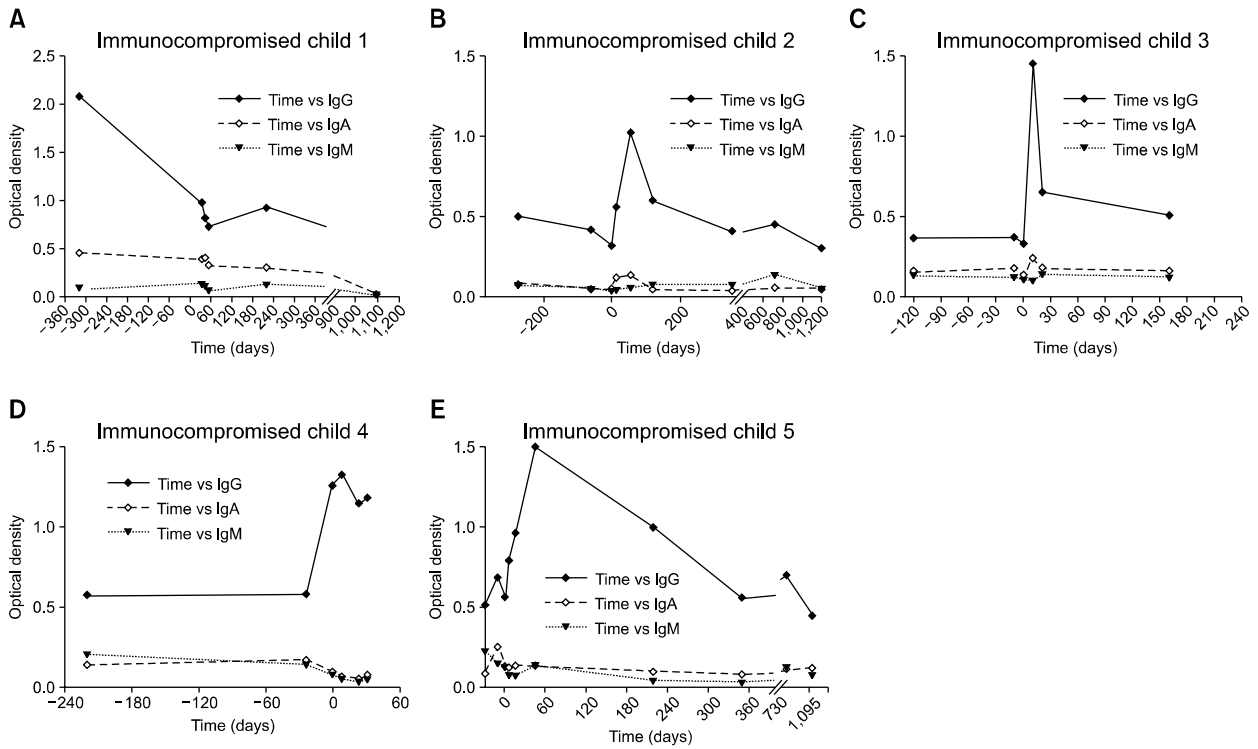


Fig. 7. Changes in optical densities of ELISA for detecting IgG, IgA, and IgM antibodies against rVP6 of rotavirus are shown in five immunocompromised children who were diagnosed with rotaviral gastroenteritis. Sample date 0: the date when stool was confirmed positive for rotavirus antigen.

화 항체는 아닌 것으로 알려져 있다¹³⁾. 그러나 본 연구는 로타바이러스 감염 유무를 확인하여 진단하는 것을 목적으로 하였으므로 로타바이러스의 공통 항원인 VP6 단백을 표적 항원으로 이용하였다.

로타바이러스 감염을 혈청학적으로 진단하는 것은 임상에서는 흔히 이용되지 않고 로타바이러스 백신 효과 판정이나 혈청역학 연구에 사용된다. 경구로 투여되는 로타바이러스 백신 효과 판정에는 혈청 IgA 항체가 음성에서 양성으로의 전환되는 것이나 중화항체 역가가 증가하는 것을 기준으로 삼고 있다¹¹⁾. 본 연구에서는 대장균에서 발현된 rVP6 단백질의 항원성 여부와 이것을 이용한 효소면역측정법이 로타바이러스 IgG, IgA, IgM 항체 역가를 정량적으로 평가할 수 있는지를 파악하여, 개발된 효소면역측정법이 혈청역학 연구에 있어 유용한지를 확인하고자 하였는데, 한 개인에게서 백신 투여 전후에 여러 번 연속적으로 채취된 혈청에서 IgG, IgA, IgM 항체 역가를 측정하면 백신의 효과 판정에서도 사용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

Xu 등¹⁵⁾은 1개월에서 30개월 사이에 로타바이러스 장염이 걸렸던 영유아를 대상으로 로타바이러스 특이 IgG, IgA, IgM 항체를 조사하였는데, 생후 6개월 미만의 영아는 IgG 항체 역가가 높았고 로타바이러스 장염에 걸렸을 때 IgM 항체가 음성이거나 역가가 낮았다. 이는 태반을 통해서 전달된 모체의 로타바이러스 IgG 항체가 바이러스의 증식을 억제하고, 항체 반응을 억제하기 때문이라고 하였다. 반면 6개월 이상의 영아에서는 급성기에 IgM 항체 역가가 증가하고, 12개월 이상의 유아에서는 회복기에 IgA 항체 역가가 증가하며 로타바이러스 장염 항체 검사에서 혈청 IgG 항체 역가가 가장 진단적 가치가 있다고 하였다. 본 연구의 건강한 신생아와 영유아에서는 감염 후 IgG, IgA, IgM 항체 중 최소한 한 종류의 항체 역가가 증가가 동반되어 있었다. Xu 등¹⁵⁾의 연구와 달리 본 연구의 건강한 신생아에서 시행된 면역 블로팅 검사에 의하면 IgM 항체는 진단 초기부터 4명 모두 양성으로 판정되었다. 이는 본 연구에서 사용한 항원은 바이러스 전체가 아니라 정제된 단일 항원인 rVP6이기 때문에 예민도가 더 높았을 것으로 판단된다. Xu 등¹⁵⁾의 연구에서는 IgG 항체가 로타바이러스 감염 진단 3주 후에 증가하였지만 본 연구의 건강한 신생아에서는 100일 이후에 IgG 항체 역가

증가가 확인되어 IgG 항체 역가 증가가 신생아에서는 더 늦게 나타나는 것으로 여겨지나, 더 많은 신생아 감염 환자를 대상으로 한 추가 연구가 필요할 것이다.

면역이 저하된 소아에서는 감염 후 확보된 혈청에서 급성 혈소판 감소증으로 고용량 정맥용 감마글로불린 주사를 로타바이러스 감염 진단 15일 전에 투여 받은 1명을 제외하고는 IgG 항체 역가는 4명에서 증가되었으나 IgA 항체 역가는 2명에서만 증가하였고, IgM 항체 역가는 5명 모두 증가하지 않았다. 5명 중 3명은 12세로 백혈병으로 항암요법 중 설사가 동반한 유증상 로타바이러스 감염이 있었다. 고용량 정맥용 감마글로불린 주사를 투여 받은 환자에게서 정상 면역반응인 외부에서 침투한 병원체에 대한 IgG, IgA, IgM 항체 생성이 억제되는 것은 예측 가능한 일이다. 그러나 항암요법 등의 면역억제 치료가 로타바이러스 감염 시 IgG 항체 반응은 영향을 주지 않고 IgM, IgA 항체 반응을 억제하는지 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

본 연구의 22명 모두 진단 전 또는 진단 당시 채취된 혈청에서 IgG 항체는 양성이었다. 이는 영아 초기에는 모체로부터 넘어온 IgG 항체로, 이후에는 로타바이러스 자연 감염에 의한 IgG 항체로 여겨진다. 본 연구는 22명의 소수를 대상으로 시행한 결과이기 때문에 우리나라에서 일차 감염 및 재감염에 관한 역학을 확인하기 위해서는 더 많은 대상으로 연구를 수행해야 될 것으로 판단된다. 본 연구와 같은 A군 로타바이러스 rVP6 항원에 대한 IgG 항체 보유율을 조사한 다른 연구에서도 연구 대상 모두 IgG 항체 양성이었다¹⁶⁾.

건강한 영유아 13명 중 2년 11개월 된 2명은 IgG 항체 역가 증가가 없었는데 1명은 IgA와 IgM 항체 역가 증가가, 1명은 IgA 항체 역가만 증가가 있었다. 이 2명은 재감염된 사례로 판단되는데 이 경우 IgM 항체 역가 증가가 없이도 IgA 항체 역가 증가가 일어날 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 로타바이러스 감염 후 유발된 혈청 항체 반응은 소아의 재감염 시 심한 설사를 방어하나 아직까지 어떤 항체가 방어에 관여하는지는 확실하지 않다. Hjelt 등¹⁷⁾은 로타바이러스 위장관염 또는 무증상감염이 있는 덴마크 소아에서 혈청 IgA, IgG 항체를 측정하여 IgA 항체 역가가 높으면 증상이 덜 심했다고 하면서 IgA 항체가 방어에 관여한다고 하였다. Velázquez 등¹⁸⁾도 24개월 이하의 멕시코 영유아 200명

을 대상으로 출생 시부터 4개월 간격으로 혈청을 채취하여 조사한 결과, 로타바이러스에 대한 혈청 IgA 항체는 2차례 감염 이후에 혈청에서 충분히 나타나며 2차례 감염 이후 중증 질환에 대한 방어율이 가장 높다고 했다. 이와 반대로, Clemens 등¹⁹⁾이 방글라데시 소아를 대상으로 시행한 연구에서는 건강한 소아보다 로타바이러스 장염 소아에서 IgG 항체 역가가 유의하게 낮았다고 하면서 IgG 항체가 중증 질환의 방어에 관여한다고 하였다. 일부에서는 혈청 IgG와 IgA 항체가 동시에 로타바이러스 감염에 대한 방어와 관련이 있다고도 하였다^{18,20)}. 로타바이러스 일차 감염 초기에는 IgM 항체 반응이 먼저 일어나고 항체 역가는 1개월 정도 지난 후 감소한다. IgA, IgG 항체 역가는 회복기에 증가하기 시작하여 IgA 항체 역가는 6개월 정도 지나면 감소하기 시작하며 IgG 항체 역가는 6개월이 지나도 높게 유지한다. 로타바이러스 재감염에 의해서도 IgM, IgG, IgA 항체 역가는 증가하는 것으로 알려져 있다^{12,18,21)}.

본 연구에서 건강한 신생아 4명에서는 감염 진단 전 혈청의 효소면역측정법과 면역블로팅 검사에서 IgA와 IgM 항체가 음성으로 나왔고 감염 초기 혈청의 면역블로팅 검사에서 IgM 항체 양성을 확인할 수 있어 IgM 항체 반응이 먼저 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 건강한 영유아 13명 중 감염 전 혈청이 확보되어 있는 1세 이전 영아가 총 4명이었는데 3명은 진단 당시 IgA, IgM 항체를 가지고 있어 재감염으로 판단되었고 1명은 IgA와 IgM 항체가 없어 일차 감염으로 판단되었다.

건강한 신생아 4명에서 A군 로타바이러스 rVP6 항원의 IgG, IgA, IgM 항체 검사에서 효소면역측정법과 면역 블로팅 검사 결과가 일치하여 효소면역측정법이 유효한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 건강한 신생아 4명에서 IgM 항체 반응 양성을 감염 초기부터 확인할 수 있는 것과 같이 면역 블로팅 검사는 예민도와 특이도가 높은 검사이지만, 감염이 비교적 흔하고 한 개인에게 일생 동안 여러 번 반복 감염되는 로타바이러스의 혈청학적 검사에서는 대부분의 연구 대상자가 항체 양성으로 판정되며, 각 개인의 항체를 양적으로 확인할 수 없기 때문에 과거와 현재 감염을 구분 못 하고, 검사에 시간과 비용이 많이 들어 혈청역학 연구에 있어 효소면역측정법보다 유용성이 떨어질 것으로 판단된다.

본 연구는 표본 수가 적고 감염 전, 감염 당시, 감염

후의 일정한 시간에 채취한 혈청을 대상으로 조사한 것이 아니었다. 따라서 로타바이러스 감염 후 장관 내 면역이 어떠한 항체와 관련이 있는지는 이 연구를 통해서 알 수 없고, 본 연구에서 대상 환자의 임상 증상이 기술되어 있으나 선행적 연구가 아니고, 증상의 심한 정도가 기술되지 않았으므로 증상과 항체와의 상관관계를 맺을 수 없는 한계점이 있다. 그러나 로타바이러스 감염 후 대부분 IgG 항체 역가 증가가 나타나고 IgA와 IgM 항체 역가 증가도 동반한다. IgG 항체 역가 증가가 없는 경우라도 IgA 항체 역가 증가는 항상 동반한다. 면역억제제 치료나 항암요법으로 면역이 저하된 소아에서는 IgM이나 IgA 항체 역가 증가가 없더라도 IgG 항체 역가 증가는 있다.

따라서 로타바이러스 혈청역학 연구에 있어 A군 로타바이러스의 rVP6 단백질을 항원으로 사용하는 효소면역측정법으로 IgG, IgA, IgM 항체 역가를 동시에 측정하면 특정기간에 걸쳐 연령별로 발생하는 최근 감염의 빈도를 포함한 로타바이러스 감염 부담을 판단할 수 있어 해당 지역사회에서 일어나는 감염 역학의 변화를 평가할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

목적: 로타바이러스 감염역학의 변화를 연구하기 위해 A군 로타바이러스의 VP6 유전자를 대장균에 발현시켜 확보한 rVP6 단백질이 항원성이 있는지를 확인하고 이것을 항원으로 한 효소면역측정법이 로타바이러스 IgG, IgA와 IgM 항체를 정량적으로 평가할 수 있는지 확인하고자 하였다.

방법: 경상대학교병원에서 로타바이러스 감염을 진단 받은 소아들 중 진단 받기 전, 진단 당시, 회복기 이후의 연속적인 혈청을 확보할 수 있었던 22명에게서 100개의 혈청을 경상대학교병원 인체자원은행으로부터 제공받아 로타바이러스 VP6 유전자를 클로닝 하여 대장균에 발현시켜 제조한 rVP6 항원으로 한 효소면역측정법으로 IgG, IgA와 IgM 항체 역가를 측정하였다. 이 중 건강한 신생아 4명에서는 면역 블로팅을 같이 시행하였다.

결과: 건강한 신생아와 영유아 17명에서 감염 후 확보된 혈청에서 IgG, IgA, IgM 항체 중 최소한 한 종류의

항체 역가 증가가 동반되어 있었다. 면역이 저하된 소아 5명 중 4명에서는 IgG 항체 역가는 증가되었으나 IgA 항체 역가는 2명에서만 증가하였고, IgM 항체 역가는 5명 모두 증가하지 않았다. 신생아 4명에서 시행된 면역 블로팅 검사에서는 IgM 항체인 경우는 효소면역측정법보다 예민하게 진단 초기부터 4명 모두 양성으로 판정되었다.

결론: A군 로타바이러스의 VP6 유전자를 대장균에 발현시켜 확보한 rVP6 단백질은 항원성이 있으며 이것을 항원으로 한 효소면역측정법은 로타바이러스 감염 후 IgG, IgA, IgM 항체 역가 증가를 정량적으로 평가할 수 있어 지역사회에서 발생한 로타바이러스 감염역학의 변화를 연구하는데 유용할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Chung JY. Acute viral gastroenteritis: recent trends and updates. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;10 (Suppl 1):53-7.
- 2) Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis* 1983;147:95-106.
- 3) Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1983;309:72-6.
- 4) Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis* 1993;168:282-7.
- 5) Park SI, Kwon HO, Lee JH, Jung SJ. Clinical features of rotaviral gastroenteritis in neonates. *Korean J Pediatr* 2005;48:1121-5.
- 6) Seo HJ, Jung YJ, Park SK, Choi SH, Lee JH, Kim MJ, et al. Rotavirus-associated neonatal necrotizing enterocolitis. *Korean J Pediatr* 2009;52:56-60.
- 7) Hwang PJ, Kwak JH, Lee TJ, Jeong SJ. Clinical features of acute noroviral gastroenteritis in children: comparison with rotaviral gastroenteritis. *Korean J Pediatr* 2009;52: 453-7.
- 8) Iijima Y, Iwamoto T, Nukuzuma S, Ohishi H, Hayashi K, Kobayashi N. An outbreak of rotavirus infection among adults in an institution for rehabilitation: long-term residence in a closed community as a risk factor for rotavirus illness. *Scand J Infect Dis* 2006;38:490-6.
- 9) Kang KS, Shin KS, Cui XJ, Kim WY. VP7 genotypes of group A rotavirus isolated from infants and toddlers with rotavirus gastroenteritis in Jeju. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;9:147-52.
- 10) Ramani S, Arumugam R, Gopalarathinam N, Mohanty I, Mathew S, Gladstone BP, et al. Investigation of the environment and of mothers in transmission of rotavirus infections in the neonatal nursery. *J Med Virol* 2008;80: 1099-105.
- 11) Kim DS, Lee TJ, Kang JH, Kim JH, Lee JH, Ma SH, et al. Immunogenicity and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine in healthy infants in Korea. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:177-8.
- 12) Brüssow H, Werchau H, Liedtke W, Lerner L, Mietens C, Sidoti J, et al. Prevalence of antibodies to rotavirus in different age-groups of infants in Bochum, West Germany. *J Infect Dis* 1988;157:1014-22.
- 13) Ward RL, McNeal MM. VP6: A candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 2010;202(Suppl):S101-7.
- 14) Bishop RF, Cipriani E, Lund JS, Barnes GL, Hosking CS. Estimation of rotavirus immunoglobulin G antibodies in human serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay: expression of results as units derived from a standard curve. *J Clin Microbiol* 1984;19:447-52.
- 15) Xu J, Dennehy P, Keyserling H, Westerman LE, Wang Y, Holman RC, et al. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:273-9.
- 16) Mukhopadhyaya I, Anbu D, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, Kavanagh O, et al. Anti-VP6 IgG antibodies against group A and group C rotaviruses in South India. *Epidemiol Infect* 2010;138:442-7.
- 17) Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol* 1987;21: 39-47.
- 18) Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 2000;182:1602-9.
- 19) Clemens JD, Ward RL, Rao MR, Sack DA, Knowlton DR, van Loon FP, et al. Seroepidemiologic evaluation of antibodies to rotavirus as correlates of the risk of clinically significant rotavirus diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 1992;165:161-5.
- 20) O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific anti-

bodies in children with natural rotavirus infections. J Infect Dis 1994;169:504-11.

21) Hjelt K, Grauballe PC, Schiøtz PO, Andersen L, Kra-

silnikoff PA. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985;4:60-6.