

서울지역 설사환자에서 분리한 A군 Rotavirus의 multiplex PCR을 이용한 VP4, VP7 유전자형

바이러스검사팀

김은정 · 황영옥 · 김정순 · 지형선 · 서병태

VP4 and VP7 Genotyping of Group A Rotavirus Isolated from Diarrhea Patients in Seoul by Multiplex PCR

Virus Team

Eun-jeung Kim, Young-ok Hwang, Jeong-soon Kim,
Hyoung-sun Chi, and Byung-tae Seo

Abstract

The incidence and distribution of the human rotavirus G types(VP7 associated: G1~G4) and P types(VP4 associated: P[4], P[6], P[8], P[10]) were determined from 89 rotavirus strains isolated from diarrhea patients between 2001 and 2002 using reverse transcription and multiplex polymerase chain reaction. G types were identified from 83(95.5%) and P types were from 82(92.1%) strains. The predominant genotypes were P[4]G2(28.1%) and P[6]G4(27%) with much lower incidence of genotypes P[10]G1 (1.1%) and P[10]G3(1.1%). P[9] type was not detected. A significant genotypic shift was observed that P[4] was the most prevalent genotype accounted for 75% during the spring season of 2001, coinfection with P[4] and P[6] for 17.5%. P[6] increased gradually to account for 53% of the strains analysed in the following 2002 spring season. Mixed G types revealing cofections G2/G3 and G3/G4 were found at low frequency(2.2%).

Key Words: Human group A Rotavirus, Genotyping, VP4, VP7

서 론

Rotavirus는 심한 탈수증을 유발하여 생명을 위협하는 영유아 장염의 가장 중요한 원인체로서¹⁾, 국내 종합병원에 입원한 2세 미만 소아군의 약 70%에서 감염 원인체로 보고되었으며²⁾, 최근 산 후조리원 신생아들에게 이 Rotavirus에 의한 집단 설사 발병사례가 발생하고 있어 문제가 야기되고 있다.

Rotavirus는 Reoviridae과에 속하는 이중나선 RNA 바이러스로 outer capsid에는 glycoprotein인 VP7 protein과 trypsin에 의하여 활성화되는 VP4 protein으로 구성되어 있으며 이 두 가지 protein은 중화항체를 생산하여 바이러스의 중요한 면역원성에 관여한다³⁾. Inner capsid는 group 및 subgroup의 공통항원을 소유하는 VP6 protein이며 core에는 VP1, VP2, VP3 protein과 11개의 RNA 절편들이 들어있다⁴⁾.

Rotavirus는 VP6 protein의 항원형에 따라 A군에서 G군까지 분류되며 전세계적으로 유아 장염의 주된 원인체는 A군으로 알려져 있으며, A군은 다시 VP7과 VP4에 의해 G type과 P type으로 분류되고 있다. 현재 14종의 G type과 18종의 P type이 사람과 동물에 분포되어 있는데 사람에서는 주로 G1, G2, G3, G4와 P[8], P[4]가 분리되고 있다⁵⁾.

깨끗한 물을 공급하고 위생상태를 개선하려는 노력이 이 질병 발생을 감소시키기에는 불충분하므로 예방을 위한 첫번째 방법으로 백신이 개발되어 왔으며 최초의 로타바이러스 백신은 1998년 미국과 유럽에서 개발되었다⁶⁾. 그러나 Rotavirus의 혈청형과 유전자형은 지역적으로, 유행시기적으로 다양하게 나타나므로 국내 실사환자에게 적합한 백신 개발을 위해서는 국내 Rotavirus 분리주에 대한 G type과 P type의 분석은 필수적으로 선행되어야 할 과제이다.

우리나라에서 Rotavirus의 연중 유행 시기는 전국적으로 늦가을에서 겨울 사이로 알려져 있는데⁷⁾, 1993년에서 1998년까지 5년간 발생한 Rotavirus 감염의 연도별 유행 시기의 변동 양상을 분석한 결과 유행 시기가 겨울에서 봄으로 늦

춰지는 양상을 보였고⁸⁾, 2000년에도 3월에 가장 높은 분리율을 나타내었다⁹⁾. 이러한 보고는 봄철에 항체가 없는 새로운 형의 출현을 시사할 수 있으므로 본 연구에서는 2001년 4월~5월과 2002년 3월~5월을 중심으로 Rotavirus의 G type과 P type을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험가검물

Rotavirus에 대한 가검물이 가장 많이 나오는 시기인 2001년 4월부터 5월까지와 2002년 1월 및 3월부터 5월까지 서울시내 병원에서 수거한 설사 환자의 분변 검체를 가검물로 하였다. 이 가검물로부터 국립보건원에서 제작한 Plate를 분양받아 ELISA을 이용하여 Rotavirus 양성으로 판명된 분변 가검물 중 89건에 대하여 P typing과 G typing 실험을 하였다.

2. RNA 추출 및 바이러스 cDNA 합성

150 μ l의 stool suspension을 450 μ l Tri-reagent(Molecular Research Center)와 잘 섞은 후 상온에서 5~10분간 둔 다음 chloroform 100 μ l를 넣은 후 vortex하고 10분간 상온에 방치하였다. 7,500 rpm, 4°C에서 15분간 원심 후 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 넣고 vortex하였다. -20°C에서 하룻밤 정치한 후 4°C에서 14,000rpm, 30분간 원심하여 상층액을 제거하였다. 800 μ l의 70% 냉에탄올을 넣고 4°C에서 14,000 rpm, 15분간 원심한 후 상층액을 제거하고 RNA pellet을 10~30분간 건조 후 DMSO와 DEPC로 처리한 증류수 25 μ l를 넣고 vortex하였다. 추출된 RNA를 95°C에서 5분간 끓여 denaturation 시킨 후 RT mixture를 넣고 42°C에서 60분간 Reverse transcription을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

3. P typing을 위한 PCR

합성된 cDNA를 con2 primer와 con3 primer¹⁰⁾

를 사용하여 876 bp를 증폭하고 각각의 P type-specific primer(1T1, 2T1, 3T1, 4T1, 5T1)를 사용하여 94°C 3분간 denaturation한 후 94°C 30초, 42°C 45초, 72°C 60초의 cycle을 25회 실시하고 72°C에서 7분간 extension시킨 다음 전기영동으로 PCR 산물 확인하여 P type을 결정하였다. P[8]은 345 bp(primer 1T1), P[4]는 483 bp(primer 2T1), P[6]는 267 bp(primer 3T1), P[9]는 391 bp(primer 4T1), P[10]는 583 bp(primer 5T1)의 증폭산물을 각각 형성함으로써 type이 결정된다. Rotavirus의 genotyping을 위해 사용한 primer는 Table 1과 같다.

4. G typing을 위한 PCR

합성된 cDNA를 End9 primer, Beg9 primer²⁾를 사용하여 1062 bp를 증폭한 후 각각의 G type-specific primer(aBT1, aCT2, aET3, aDT4)를 사용하여 94°C 3분간 denaturation한 후 94°C 30초, 42°C 45초, 72°C 60초의 cycle을 25회 실시한 후 72°C에서 7분간 extension시키고 전기영동으로 PCR 산물을 확인하여 G type을 결정하였다. G1 type은 749 bp(primer aBT1), G2

는 652 bp(primer aCT2), G3는 374 bp(primer aET3), G4는 583 bp(primer aDT4)의 증폭산물을 각각 형성함으로써 type이 결정된다.

결 과

1. P type (VP4)

Rotavirus 양성반응을 나타낸 89건의 검체에 대하여 multiplex PCR법에 의해 P type을 분석한 결과 Table 2와 같이 2001년에 P type은 전기영동상에서 483 bp의 증폭된 band를 확인한 P[4] type이 30건(75%)으로 가장 많이 검출되었고 P[6]가 1건(2.5%), 두 가지 type이 혼합된 P[4]+P[6]가 7건(17.5%)(Fig. 1A), UT (untypable)가 2건(5%)으로 나타났다. 2002년에는 P[6]가 26건(53%)로 가장 많이 나타났고(Fig. 1B), P[4]가 9건(18.4%), P[8]이 5건 (10.2%), P[10]이 4건(8.2%), UT가 5건 (10.2%)으로 나타났다. 2001년에는 P[4]와 P[6] 2종류만이 나타났으나 2002년에는 4종으로 증가하였다.

2001년에는 P[4]가 주종을 이루고 P[4]

Table 1. Sequences of primers used for the rotavirus genotyping

	Primer	Sequence(5'-3')	Target	Reference
	con3(rev)	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA		
	con2	ATTTCCGACCATTATAACC		
VP4 typing	1T1	TCTACTTGGATAACGTGC	P[8]	10
	2T1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	P[4]	
	3T1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	P[6]	
	4T1	TGAGACATGCAATTGGAC	P[9]	
	5T1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	P[10]	
	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGCTCTGG		
	End9(rev)	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		
VP7 typing	aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	G1	11
	aCT2	CAATGATATTAACATTTTCTGTG	G2	
	aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3	
	aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	

Table 2. P typing results of rotaviruses isolated from diarrhea patients in Seoul

Year	No. of samples (%)							Total
	P[4]	P[6]	P[8]	P[9]	P[10]	P[4]+P[6]	UT	
2001	30(75.0)	1(2.5)	-	-	-	7(17.5)	2(5.0)	40
2002	9(18.4)	26(53.0)	5(10.2)	-	4(8.2)	-	5(10.2)	49
Total	39(44.0)	27(30.0)	5(6.0)	-	4(4.0)	7(8.0)	7(8.0)	89

UT : untypable.

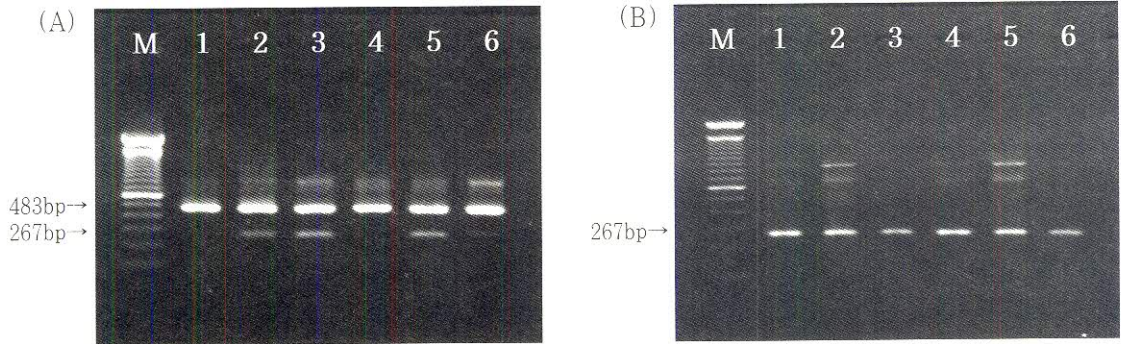


Fig. 1. Typing of human group A rotavirus VP4 genes by multiplex PCR.

Amplification products of the VP4 genes in stool samples taken from six different patients. (A) Lanes 1, 4; type P[4], lanes 2, 3, 5, 6; mixed P[4] and P[6] types. Lane M, molecular weight makers(100 bp ladder). Size of amplified bands are indicated. (B) Lanes 1 to 6; P[6] types. Lane M, molecular weight makers(100 bp ladder).

Table 3. G typing results of rotaviruses isolated from diarrhea patients in Seoul

Year	No. of samples (%)							Total
	G1	G2	G3	G4	G2+G3	G3+G4	UT	
2001	7(17.5)	19(47.5)	-	12(30.0)	1(2.5)	-	1(2.5)	40
2002	13(26.5)	6(12.2)	2(4.1)	24(49.0)	-	1(2.0)	3(6.1)	49
Total	20(22.5)	25(28.1)	2(2.3)	36(40.5)	1(1.1)	1(1.1)	4(4.5)	89

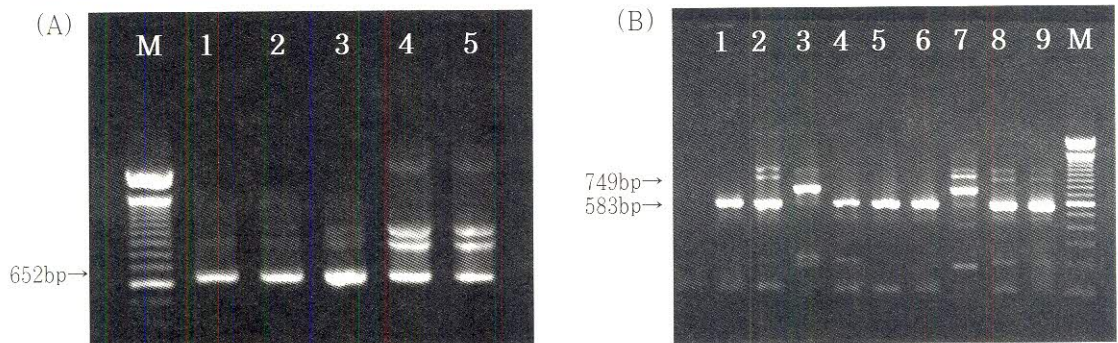


Fig. 2. Amplification products of the VP7 genes in stool samples. (A) Lanes 1 to 5; G2 types. Lane M, molecular weight makers (100 bp ladder). Size of amplified bands are indicated. (B) Lanes 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9; G4 types. Lanes 3, 7; G1 types. Lane M, molecular weight makers (100 bp ladder).

와 P[6]형이 같이 나타나는 혼합형이 검출되었으나 2002년에는 P[6]형으로 shift가 일어났다.

2. G type (VP7)

총 89건에 대한 G typing 결과는 Table 3과 같았다. 2001년에는 G2가 19건(47.5%)으로 가장 많이 검출되었으며(Fig. 2A), G4가 12건(30%), G1이 7건(17.5%), G2+G3가 1건(2.5%), UT가 1건(2.5%)이었다. 2002년에는 G4가 24건 (49%)로 가장 많았고, G1이 13건(26.5%)(Fig. 2B), G2가 6건(12.2%), G3가 2건(4.1%), G3+G4가 1건(2%), UT가 3건(6.1%)로 나타났다. 전체적으로 G4가 36건(40.5%)으로 가장 많았으며 G2가 25건(28.1%), G1이 20건(22.5%) 순이었다.

3. P type (VP4) 및 G type (VP7) 조합형에 대한 분석

P type 및 G type 조합형에 대한 분석은 Table 4에서와 같이 2001년에는 P[4]G2 type이 19건 (47.5%)으로 가장 많이 검출되었고 P[4]G1이 4건(10%), P[4]G4가 5건(12.5%), P[4]+P[6]G4가 6건(15.0%), P[6]G4가 1건(2.5%), P[4]G2+G3가 1건(2.5%), P[4]+P[6]G1이 1건(2.5%)으로 나타났다. 2002년에는 P[6]G4가 23건(47%), P[4]G2가 6건(12.2%), P[4]G1이 3건(6.1%), P[8]G1이 4건(8.2%), P4[10]G3가 1건(2%), P4[10]G1이 1건(2%), P4[10]+P[8]G1이 2건(4.1%), P[6]G3+G4가 1건(2%)으로 나타났다. 전체적으로 2001년에는 P[4]G2가 주로 많이 나타나지만 P[4]G4와 P[4]+P[6]G4가 출현하였고 2002년에 P[6]G4로 Shift가 일어났다.

고 찰

서울 지역 설사 환자에서 검출된 A형 Rotavirus 양성 검체 중 2001년 4월~5월까지의 검체에서 40건, 2002년 1월에 6건, 3월~5월에 43건 총 89건을 대상으로 multiplex PCR법을 이용하여 P type (VP4) 및 G type (VP7)에 대한 분석

을 실시한 결과 P type은 92.1%, G type은 95.5%의 분석률을 나타내었다. Suzuki 등¹²⁾은 세포배양으로 분리된 일본 소 Rotavirus의 G와 P 혈청형을 PCR법으로 조사한 결과 G 혈청형 (VP7)은 95%, P 유전자형 (VP4)은 92.5%이었으며 Arguelles 등¹³⁾은 PCR법을 이용하여 VP4는 90%를 VP7은 93%를 보여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었으나 김 등¹⁴⁾은 PCR법으로 51%의 매우 낮은 VP4 형별 분석을 나타내었다.

Table 4. G/P typing results of rotaviruses isolated from diarrhea patients in Seoul

G/P Type	No. of samples (%)		
	2001	2002	Total
P[8]G1	-	4(8.2)	4(4.5)
P[4]G4	5(12.5)	-	5(5.6)
P[4]+P[6]G4	6(15.0)	-	6(6.7)
P[4]G2+G3	1(2.5)	-	1(1.1)
P[4]+P[6]G1	1(2.5)	-	1(1.1)
P[4]G2	19(47.5)	6(12.2)	25(28.1)
P[4]G1	4(10.0)	3(6.1)	7(7.9)
P[6]G4	1(2.5)	23(47.0)	24(27.0)
P[6]G3+G4	-	1(2.0)	1(1.1)
P[10]G1	-	1(2.0)	1(1.1)
P[10]+P[8]G1	-	2(4.1)	2(2.3)
P[10]G3	-	1(2.0)	1(1.1)
UT/G1	2(5.0)	3(6.1)	5(5.6)
UT/G4	-	1(2.0)	1(1.1)
UT/G3	-	1(2.0)	1(1.1)
P[8]/UT	-	1(2.0)	1(1.1)
P[4]/UT	1(2.5)	-	1(1.1)
P[6]/UT	-	2(4.1)	2(2.3)
Total	40	49	89

UT : untypable.

이러한 결과에 비추어 볼 때 본 연구에 사용된 multiplex PCR방법은 매우 감도가 높은 방법이라 생각된다.

Rotavirus 양성 검체에 대한 P type 분석 결과 2001년에는 P(4)가 75%로 가장 많이 검출되었는데 이 결과는 1997년 국내 인체 분리주에서 P(8)가 91%로 우세하다고 한 보고¹⁵⁾와는 다르나 2000년 국내 분리주에서 P(4)가 57%로 가장 많이 나타난 것과는 유사한 결과이므로 국내분리주는 P(8)형에서 P(4)형으로 shift 된 것을 알 수 있다. 한가지 특이한 결과로는 2001년에 P(4)와 P(6)의 혼합형이 17.5%가 나타나면서 2002년에는 P(6)가 53%로 증가하였다는 점이다. 이러한 결과로 P(4)에서 P(6)으로 Shift가 일어난 것을 추측할 수 있다. Zhang 등¹⁶⁾의 연구결과에 따르면 1998~1999년에는 G1이 88%로 우세하였으나 G1과 G3의 혼합형이 4% 나타나고 1999~2000년에는 G3가 78.95%로 증가하여 G1에서 G3으로의 shift를 주장하였다. 이와 유사한 양상으로 본 연구에서도 2002년에 shift가 일어났다고 추측된다. P(4)와 P(6)의 혼합형과 같이 혼합형의 출현에 대한 연구 결과를 토대로 다음 시기에 유행할 혈청형의 예측도 가능할 것으로 생각된다. 이와 같이 P type은 해를 거듭할수록 변이해 간다는 사실을 알 수 있었다.

2002년 1월의 검체 분석 결과에서는 2001년과 유사한 결과를 보여 shift의 시점은 2월~3월로 예상되며 서울 시내 산후조리원에서 Rotavirus에 의해 발생한 신생아 집단 설사도 3월인 점으로 볼 때 사람에게 있어서 항체가 아직 형성되지 않은 새로운 형이 3월에 출현하여 집단 발병을 유발하고 5월까지도 높은 발생률이 지속되는 것으로 추정된다. 앞으로 향후 몇 년에 걸친 Rotavirus의 유전자 형별 분석을 통하여 더욱 정확한 shift 기점과 원인을 조사할 필요가 있다고 생각된다.

P typing 방법을 이용한 연구에서 P(8)은 G1, G3, G4와 조합되는 반면 일반적으로 P(4)는 G2와 조합되었다^{10,17~18)}. 그러나 본 연구결과에서는 2001년에 P(4)G4가 12.5%나 검출되었다. 특이한 것은 P(4)와 P(6)의 혼합 감염 검체에서 7건 중 6건이 이미 G type은 G4로 되어 있는 것을 관

찰할 수 있었다. 2001년 결과에서 P(4)G2가 47.5%, P(4)G4는 12.5%, P(4)+P(6)G4가 15%로 나타났는데 2002년에는 P(4)G2가 12.2%로 감소하면서 P(4)G4와 P(4)+P(6)G4는 관찰되지 않았고 P(6)G4만 관찰된 것으로 보아 shift가 일어날 때 G type이 P type보다 먼저 shift되는 것으로 추정된다.

Rotavirus 양성 검체에 대한 연도별 G type 분석결과에서 2001년에는 G2 47.5%, G4 30%로 나타났으나 2002년에는 G4 49%, G1 26.5%, G2 12.2% 순으로 나타나 G2에서 G4로 유행양상이 바뀌었다. 국내보고에 의하면 김 등^{2,14,19,20)}은 1987~1989년 사이 서울에서 유행하였던 Rotavirus주들의 VP7 분포를 Mab ELISA로 조사하였는데 G1이 89%이고 G2가 10%이었으며 1997년 11월과 12월 사이의 검체에서는 G1이 91%¹⁵⁾로 본 실험결과와는 다르게 나타났다. 세계적으로 G1이 유행되고 있는 보고^{21~23)}와는 다르지만 1989~1994년 보고에서는 1992년에 G2가 31%로 상승하였고⁶⁾, 본 연구의 2001년 결과는 2000년 검체에서 G2가 50%, G4가 36.7%, G1이 11.7%라고 지 등⁹⁾이 보고 한 것과 유사하게 나타났다. 2002년 결과는 시기적으로 아직 2002년 검체에 대한 보고가 없으므로 비교할 수 없으나 G type 역시 해를 거듭할수록 변이해 가고 있음을 추정할 수 있었다. 그러나 typing 되지 못한 검체가 4.5% 관찰되었으므로 이에 대한 연구가 요구된다. 현재의 백신은 G1, G2, G3, G4를 혼합한 4가 백신이다. 그러나 최근 사람에서는 드물고 동물에서 유래하는 G6, G8, G9에 대한 보고^{24~26)}가 잇달아 나오고 있기 때문에 우리나라에서도 이들 type에 대한 검색이 요구되고 있다.

Rotavirus 양성 검체의 VP4 및 VP7 조합형에 대한 분석을 살펴보면 전체적으로 P(4)G2가 28.1%로 가장 많이 나타났으며 P(6)G4가 27%로 검출되었다. 세계적으로 P(8)G1이 가장 우세하며 P(8)G4, P(4)G2, P(8)G3순으로 나타났^{17,27~28)}. 본 연구 결과에서는 P(8)G1은 4.5%로 적게 나타난 반면 P(4)G2가 우세하게 나타나 세계적인 추세와는 다른 양상을 나타내었는데 Rotavirus는 해를 거듭할수록 shift 되므로 연구

시기가 달랐기 때문이라고 생각된다. 한 가지 팔목할 만한 사실은 2002년 서울시 소재 한 산후조리원에서 신생아 집단 설사증 발생시 A군 Rotavirus로 판정된 검체를 genotyping 해 본 결과 2002년 봄에 주로 나타나고 있는 P(6)G4형과 같은 type으로 판명되었고, 2001년에는 1건밖에 분리되지 않았다는 점으로 보아 이에 대한 더 많은 조사 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험결과에서 P(4)와 P(6)가 동시에 검출되는 양상이 7예에서 관찰되었고 1개의 검체에서 G2와 G3의 혼합형, G3와 G4의 혼합형도 1건이 나타났다. Rotavirus 감염자에서 한가지 이상의 Rotavirus주가 동시에 분리되는 경우²⁾가 있었는데 P(8)과 P(6)의 혼합형 등 세계적으로 혼합 감염에 대한 보고는 상당히 많다²⁹⁻³¹⁾. P(4)와 P(6)가 동시에 검출된 후에 P(6)로 shift된 결과는 혼합 감염수가 많을수록 Rotavirus에서 reassortment를 위한 적합한 환경이 되고 새로운 strain의 출현을 피할 수 없다고 한 O'Halloran의 보고³¹⁾와 일치하였다.

Rotavirus에 대한 백신 개발이 매우 절실함에도 불구하고 Rotavirus는 인체 분리주들 사이 또는 인체 분리주와 동물 분리주들 사이에서 RNA 단편들의 잦은 교환으로 genomic reassortment나 rearrangement가 발생하여 변이형 Rotavirus가 생성된다³²⁾. 이러한 변이는 백신 개발에 어려운 이유가 되며 각 국가와 지역에서 지속적인 바이러스 유전자의 규명이 요구되는 원인이 된다³³⁾. 또한 현재의 reassortant 백신은 가장 유행하는 G 항원(G1-G4)을 포함하여 설계되었기 때문에 이러한 백신은 다른 나라에서 유행하는 G1~G4로 typing되지 않는 strain에 대해서는 효과가 없으므로 이 백신의 우리나라에서의 효능 예측을 위해서도 G type (VP7)과 P type (VP4)의 분석은 반드시 수행되어야 하며 수년간에 걸친 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

본 연구에서는 2001년과 2002년에 서울 지역 병원에 내원한 설사 환자로부터 가검물을 수집하여 검출된 Rotavirus의 VP4와 VP7의 유전자형에 대하여 분석하여 비교함으로써 Rotavirus 백신 개발에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

2001년부터 2002년까지 설사 환자로부터 분리된 89건의 A군 Rotavirus 분리주로부터 multiplex PCR을 이용하여 rotavirus G types(VP7 : G1~G4) 과 P types(VP4 : P(4), P(6), P(8), P(10))을 분석하였다. G types(VP7)은 83건으로 95.5%가 분석되었고, P types(VP4)은 82건으로 92.1%가 분석되었다.

P(4)G2(28.1%)와 P(6)G4(27%)가 가장 많이 검출되었으며 P(10)G1(1.1%)와 P(10) G3(1.1%)는 가장 적게 검출되었다. P(9) type은 검출되지 않았다. 2001년 봄에는 P(4)가 75%로 가장 많이 검출되었고 P(4)와 P(6)의 혼합형이 17.5%로 나타났으나 2002년 봄에는 P(6)가 53%로 증가하여 중요한 genotypic shift가 관찰되었다. G type의 혼합형도 G2/G3와 G3/G4가 2.2%로 낮게 나타났다.

참고문헌

1. Kapikian, A. Z., Flores, J., Midthun, K., Gorgilia, M., Nisikawa, K., Chanock, R.M., Potash, L., and Perez-Schael, I.: 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(1990).
2. Kim, K., Yang, J., Joo, S., Cho, Y., Glass, R.I. and Cho, Y.: Importance of rotavirus and adenovirus type 41 and 41 acute gastroenteritis in Korea Children. *J. Clin. Microbiol.*, 28:2279(1990)
3. Prasad, B.V, Wang, G.J., Clerx, J.P.M. and Chiu, W.: Three dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.*, 199:269(1988).
4. Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J.: Identification

- of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein, *J. Gen. Virol.*, 75:3423(1994)
5. Estes, M.K., and Cohen, J.: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, 53:410(1989)
 6. Conn, A.J.: Diarrhoea Viruses: Astroviruses; Caliciviruses ; Reoviruses (Rotaviruses) from our own course and tutorial In www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Diarrhoea.html(1999)
 7. 장혜경, 김창열, 오성희, 이하백, 이근수: 소아 rotavirus 설사증에 대한 고찰, *소아과*, 31:961(1988)
 8. 손영주, 박홍선, 정순이, 박미라, 최규철: Rotavirus 감염의 유행시기의 변동 양상, *소아과*, 43:49(2000)
 9. 지영미, 김기순, 안정배, 천두성, 강영화, 정윤석, 이선화, 김운호, 윤재득: 바이러스성 설사질환의 역학조사 및 원인체 분석을 통한 예방대책 수립에 관한 연구. *국립보건원보*, 37:96(2000)
 10. Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P.A., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K., and Bahn, M.K.: Identification of group A rotavirus gene 4 by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.*, 30:1365(1992).
 11. O'Mahont, J., Foley, B., Morgan, S., Morgan, J.G., and Hill, C. : VP4 and VP7 genotyping of rotavirus samples recovered from infected children Ireland a 3-Year Period. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1699(1999)
 12. Suzuki, Y., Sanekata, Y., Sato, M., Tajima, K., Matsuda, Y., and Nakagomi, O.: Relative frequencies of G(VP7) and P(VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3046(1993)
 13. Arguelles, M. H., Villegas, G. A., Castello, A., Abrami, A., Ghiringhelli, P.D., Semorile, L., and Glikmann, G.: VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires Argentina. *J. Clin. Microbiol.*, 38:252(2000)
 14. 김경희: A군 Rotavirus(국내분리주)의 Gene 4형별. *J. Kor. Soc. Virol.*, 22:61(1992)
 15. 차광중, 송진욱, 조홍찬, 김용휘, 유대열, 이충복, 이종기 : 국내분리 유아 로타바이러스의 혈청형과 염기서열 분석, *J. Kor. Soc. Virol.*, 29:75(1999).
 16. Zhang, J., Wang, N., and Deng, B.: VP7 typing of rotavirus from children with diarrhea in Chongqing Region. *Zhonghua. Liu Xing Bing Xue Za Zhi.*, 22:300(2001)
 17. Gentsch, J.R., Woods, P.A., Ramachandran, M., Das, B.K., Leite, J.P., Alfieri, A., Kumar, R., Bahn, M.K., and Glass, R.I.: Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.*, 174:S30(1996)
 18. Santos, N., Riepenhoff-Talty, M., Clark, H.F., Offit, P., and Gouvea, V.: VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 32:205(1994)
 19. 이재석, 박장환, 김경희, 이건희, Glass, R., Moe, C., Humphrey, C., 윤혜선, 조양자: A형 rotavirus, adenovirus 40/41 및 astrovirus에 의한 신생아실에서의 유행성장염. *한양의학술지*, 14:29(1994)
 20. Kim, Y.B., Kim, K.H., and Yang, J.M.: cDNA cloning and nucleotide sequence determination for VP7 coding RNA segment. *Kor. J. Microbiol.*, 30:397(1992)
 21. Bishop, R.F., Masendycz, P.J., Bugg,

- H.C., Carlin, J.B., and Barnes, G.L.: Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J. Clin. Microbiol.*, 39:1085 (2001)
22. Cubitt, W.D., Steele, A.D., and Iturriza, M.: Characterization of rotavirus from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9 P2A[6] and G3P2A[6]. *J. Med. Virol.*, 61:150(2000)
23. Koshimura, Y., Nakagomi, T., and Nakagomi, O.: The relative frequencies of G serotypes of rotaviruses recovered from hospitalized children with diarrhea: A 10-year survey(1987~1996) in Japan with a review of globally collected data. *Microbiol. Immunol.*, 44:499(2000)
24. Adah, M.I., Wade, A., and Raniguchi, K.: Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3969(2001)
25. Cooney, M.A., Gorrell, R.J., and Palombo, E.A.: Characterisation and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. *J. Med. Microbiol.*, 50:462(2001)
26. Cunliffe, N.A., Dove, W., Bunn, J.E., Ben Ramadam, M., Nyangao, J.W., Riveron, R.L., Cuevas, L.E., and Hart, C.A.: Expanding global distribution of rotaviruses serotype G9 : detection in Libya, Kenya, and Cuba. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:890(2001)
27. Beards, G., Desselberger, U., and Flewett, T.H.: Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes 1983 to 1988. *J. Clin. Microbiol.*, 27:2827(1989)
28. Woods, P., Gentsch, J., Gouvea, V., Mata, L., Simhon, A., Santosham, M., Bai, Z., Urasawa, S., and Glass, R.I.: Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J. Clin. Microbiol.*, 30:781(1992)
29. Buesa, J., de Souza, CO., Asensi, M., Martinez, C., Prat, J., and Gil, M.T.: VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia Spain. *Eur. J. Epidemiol.*, 16:501(2000)
30. Noppornpanth, S., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. : Predominant human rotavirus genotype G1P[8] infection in infants and children in Bangkok Thailand. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 19:49(2001)
31. O'Halloran, F., Lynch, M., Cryan, B., O'Shea, H., and Fanning, S.: Molecular characterization of rotavirus in Ireland: detection of novel strains circulating in the population. *J. Clin. Microbiol.*, 38:3370(2000)
32. Taniguchi, K., and Urasawa, S.: Diversity in rotavirus genomes. *Virology.*, 6:123(1995)
33. 김원용, 송미옥, 박철민, 임성준, 김기정, 정상인, 최철순, 임인석: 한국인 영아에서 분리된 G1 로타바이러스의 VP 단백질 유전자 염기서열 및 발현. *J. Kor. Soc. Virol.*, 28:247(1998)