

서울시 산후조리원에서 유행한 호흡기세포융합 바이러스의 유전적 특성분석

바이러스검사팀

유진경 · 이재인 · 송미옥 · 박소현 · 곽보람 · 황영옥 · 김일영

Molecular Characterization of Respiratory Syncytial Virus(RSV) Detected from Outbreaks in Postpartum Care Centers in Seoul

Virus Team

**Jin-kyung Yu, Jae-in Lee, Mi-ok Song, So-hyeon Park,
Bo-ram Kwak, Young-ok Hwang and Il-young Kim**

Abstract

In Korea, 75.1% of married women were found to use postpartum care centers after childbirth and their babies also were taken care in those centers. Because the use of such community facilities has increased, the incidence of respiratory syncytial virus infection has increased over the last few years in Seoul. Human respiratory syncytial virus(HRSV) is the most common cause of acute respiratory infection in infants, and it can be transferred easily among infants having weak immune system. We investigated genetic characteristics of HRSV isolates from 7 outbreaks that occurred in neonatal care centers over 15 months. Eight HRSV-A and 33 HRSV-B isolates were detected 347 nasopharyngeal swab. Sixteen HRSV-B isolates showed the BA9 genotype on analyzing the hypervariable region in G protein.

Key words : Human respiratory syncytial virus(HRSV), Postpartum care center,
Phylogenetic tree, BA9 genotype.

서 론

2018년 산후조리실태조사에 따르면 2017년 출산한 산모의 75.1%가 산후조리원을 이용 2015년 전국 출산력 및 가족보건 복지실태조사에 따른 59.6% 보다 15.5% 상승한 수치이다(1~2). 감염에 취약한 신생아의 약 75%가 평균 2주간의 집단 생활을 하며, 이 기간 동안 집단생활을 하지 않는 신생아에 비해 수많은 감염에 더 많이 노출되고 있는 것이다.

전 세계적으로 호흡기세포융합바이러스(Human Respiratory Syncytial Virus, HRSV)는 영유아에서 발생하는 급성호흡기 질환 중에서 두 번째로 많이 발생하는 질환이며, 생후 1년 이내 혹은 2년 이내에 거의 모든 신생아가 감염된다(3). 2018년 보건복지위원회 국정감사 자료 '산후조리원 내 감염 발생 현황'에 따르면 산후조리원 내 감염 중 호흡기세포융합바이러스(Human Respiratory Syncytial Virus, HRSV)가 29.0%로 가장 높은 비율로서 산후조리원 내 감염의 주요 원인으로 나타났다.

호흡기세포융합바이러스는 외막을 가진 단일 가닥의 negative-sense RVA 바이러스로 10개의 유전자가 11개의 단백질을 발현한다. 호흡기세포융합바이러스는 세포결합단백질인 G 단백질과 F 단백질의 항원적 차이에 의해 A와 B형, 두 개의 혈청형으로 나뉜다. 각각의 혈청형은 G 유전자의 특성에 따라 A형은 11개의 genotype(GA1-7, SAA1, NA1-2, 그리고 ON1) B형은 23개의 genotype(GB1-4, SAB1-4, URU1-2, BA1-12, 그리고 THB)으로 나누어진다(4).

본 연구는 산후조리원 집단 감염에서 분리된 호흡기세포융합바이러스의 유전적 특성을 파악하여 산후조리원 HRSV 감염관리에 대한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 검체 수집

2017년 2월에서 2018년 4월까지 기간에 7개의 산후조리원에서 총 347개의 인후도찰물이 수집되

었으며, 이중 155개는 신생아, 192개는 성인의 검체였다. 인후도찰물은 바이러스 수송 배지(viral transport medium, VTM)를 이용하여 검체 채취 후 4°C를 유지하여 이송되었다. 검체 도착 후 가능한 빠른 시간 안에 바이러스의 RNA를 추출한 후 Real-time PCR을 시행하였으며, 잔여 검체 및 검사 후 남은 RNA는 유전자 분석을 위하여 -80°C에 보관하였다.

2. RNA 추출 및 HRSV 검출

QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, CA, USA)를 이용하여 140ul의 VTM으로부터 바이러스의 RNA를 추출하였으며, PowerChek RSV Real-time PCR kit(Kogene, Korea)를 사용하여 HRSV를 검출하였다.

3. HRSV 염기서열 분석 및 phylogenetic 분석

HRSV-B 양성 검체를 대상으로 G 유전자 부위를 증폭하기 위한 RT-PCR은 HYQ one step RT PCR kit(SNC, Korea)를 이용하였으며, 프라이머와 PCR 조건은 Tapia Li 등의 논문에 나온 조건을 변형하여 시행하였다 (5). 프라이머의 염기서열은 표 1과 같으며, PCR 조건은 다음과 같다 : 50°C에서 30분간 역전사 반응을 시행하고 94°C에서 15분 반응 ; 35 cycles 94°C에서 30초, 58°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분 반응을 35회 반복한다, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응한다. PCR 산물은 1.5% 아가로즈겔을 이용하여 크기를 분석하였다. For sequencing of PCR product, BigDye v3.1 chemistry was used on Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. 염기서열 분석을 위하여 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer에서 BigDye v3.1 chemistry를 사용하였다.

HRSV-B의 G 유전자의 염기서열은 BioEdit (Tom Hall) 프로그램을 사용하여 편집하였으며, phylogenetic trees 분석을 위하여 MEGA 6.0 프로그램의 Neighbor-Joining methods를 사용하였다. Phylogenetic trees 분석에 이용한 참고서열은 이전에 발표된 염기서열을 GenBank로부터 얻었다.

결 과

1. HRSV 검출 및 G 유전자 부위 증폭

15개월의 기간 동안 산후조리원내 HRSV 집단 감염이 7번 발생하였으며, 주로 늦가을에서 봄(10월~4월) 사이에 발생하였다(표 2). 1, 2 그리고 3번째 집단감염은 HRSV-A 의한 것으로 2017년 2월, 3월 그리고 10월에 발생하였는데 이 기간은 지역사회내 HRSV-A의 유행시기와 일치한다. 4번에서 7번째 집단감염은 2017년 10월에서 2018년 4월 사이에 발생하였으며, HRSV-B에 의한 것으로 이 기간 지역사회내 유행하였던 HRSV는 B형이었다.(Korea Influenza and Respiratory Viruses Surveillance System, KINRESS, <http://www.cdc.go.kr>).

2. Phylogenetic 분석 및 아미노산 변이

Phylogenetic 분석을 위한 HRSV-B 16개의 유전정보를 얻을 수 있었는데, 각각 4번째 집단발생

에서 2개, 6번째 집단발생에서 5개 그리고 7번째 집단발병에서 9개의 유전정보를 얻었다.

8개의 HRSV-A와 HRSV-B 17개는 G 유전자 부위가 증폭되지 않거나 유전자 산물이 유전정보를 분석하기에 충분하지 않아 유전정보를 얻는데 실패하였다. 16개의 HRSV-B는 모두 BA9 유전형에 속한 것으로 분석되었다(그림 1).

16개의 HRV-B 염기서열에서 세 부위의 아미노산에(T254I, T290I, T312I) 변화가 있었으며 이는 기존에 보고된 BA 유전형에서는 보이지 않았던 변이이다(그림 2).

고 찰

HRSV-B의 유전형은 G 유전자의 두 번째 hypervariable region(HVR2) 부위의 염기서열을 바탕으로 분류된다. HRSV-B는 22개의 유전형이 있는데, GB1에서 GB4, SAB1에서 SAB4, URU1와 URU2, BA1에서 BA10, BA-C 그리고

Table 1. Primer list for sequencing of G protein region

Target	Primer name	Sequence(5' > 3')	Size
G	G1-B-FW	ACA AGC AAA TTT TGG CCC TA	874
	G1-B-REV	CAG GGA ACG AAG TTG AAC AC	
	G2-B-FW	CAC ACC ACA CAA CAG CAC AA	1015
	G2-B-REV	CCC AGA AAT CTT CGT TTC CTC	

Table 2. Number of RSV positive samples of each outbreak cases

Case No.	Month/Year	Test no.	HRSV(A)(%)	HRSV(B)(%)	Negative
1	Feb/2017	30	4(13.33)	0	26
2	Mar/2017	15	1(6.67)	0	14
3	Oct/2017	51	3(5.88)	0	48
4	Nov/2017	30	0	6(20)	24
5	Jan/2018	28	0	2(7.14)	26
6	Mar/2018	40	0	4(10)	36
7	Apr/2018	153	0	21(13.72)	132

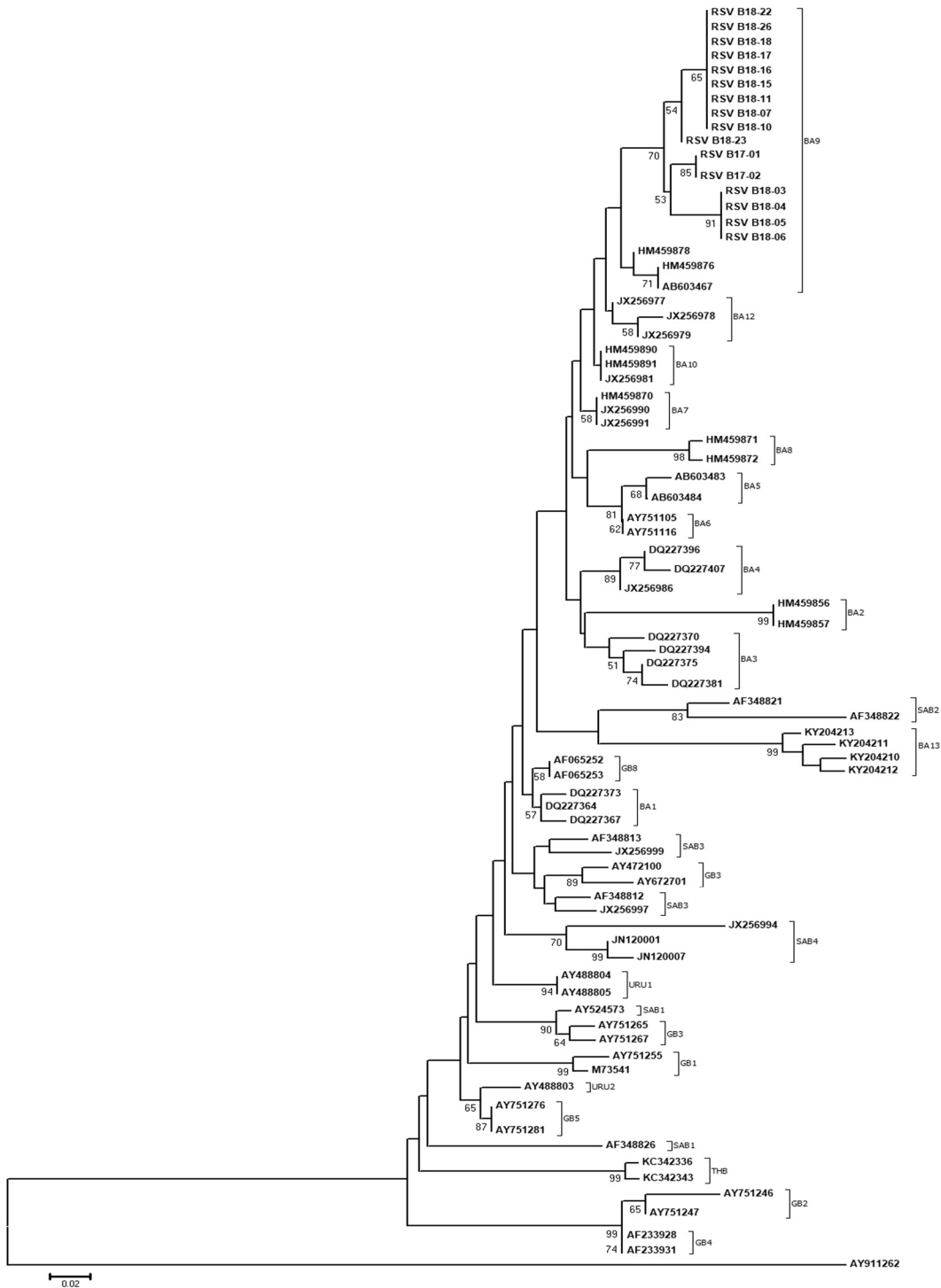


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the HRSV-B strains based on the partial nucleotide sequences of the second hypervariable region(HRV2) of G protein. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining algorithm in MEGA 6.0 software. Only bootstrap values greater than 50% are displaced at the branch nodes.

THB가 있다(4). 1999년 Argentina의 Buenos Aires에서 유전자의 HRV2 부위에 60개의 뉴클레오타이드의 중복을 가지는 BA 유전형이 발견되었는데(6~7) 이들은 현재 전세계적으로 거의 모든 다른 유전형을 대체하고 있다(8).

기존의 연구에서 한국에서는 BA4와 BA9 유전형이 많았는데(9~10) 이번 연구에서 분리된 16개의 HRSV-B는 모두 BA9 유전형으로 기존에 우세한 유전형과 일치하였다. 이는 산후조리원내 HRSV 발생이 특별한 것이 아니라 HRSV 유행시기에 외부로부터 바이러스가 유입되었을 것이라 추측을 가능하게 한다.

이번에 분리된 모든 HRSV-B 바이러스가 BA9 유전형에 속하지만 T254I, T290I와 T312I와 같은 기존의 BA 유전형에서는 없었던 아미노산의 변화가 있었다. 세 개의 아미노산 변화는 본 연구에서 얻어진 16개의 HRSV-B에 공통적으로 나타난 변이로서 최근에 밝혀진 국내 HRSV-B 유전정보가 부족하여 비교하지는 못하였으나 이러한 변이가 국내에서 발생하는 HRSV-B에도 나타나는지에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다. 이러한 변이에 대한 결과는 BA 유전형을 더 세분화하는 기초 자료로서의 가치를 가질 것으로 생각된다.

본 연구가 서울의 산후조리원에서 발생한 HRSV 집단발병으로 지역적인 한계가 있으나 지역사회에서의 HRSV 유행시기와 산후조리원 집단발병의 시기가 일치고 지역사회에서 유행하는 유전형과 같은 유전형의 HRSV가 발병의 원인이라는 점은 산후조리원내 방문객 등의 관리의 중요성을 보여준다.

참고문헌

1. 2018 산후조리 실태조사 결과, 한국보건사회연구원, 2018.
2. 2015년 전국 출산력 및 가족보건·복지실태조사. 한국보건사회연구원, 2015.
3. Cane, PA : Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. Rev Med

- Virol, 11:103~116, 2001.
4. Thongpan, I, Mauleekoonphairoj, J, Vichiwattana, P, Korkong, S, Wasitthanasem, R, Vongpunsawad, S and Poovorawan, Y : Respiratory syncytial virus genotypes NA1, ON1, and BA9 are prevalent in Thailand, 2012-2015. PeerJ, 27(5):e3970, 2017.
5. Tapia, LI, Shaw, CA, Aideyan, LO, Jewell, AM, Dawson, BC, Haq, TR and Piedra, PA : Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. PLoS One, 13:9(3):e90786, 2014
6. Trento, A, Galiano, M, Videla, C, Carballal, G, García-Barreno, B, Melero, JA and Palomo, C : Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. J Gen Virol, 84(Pt 11):3115~20, 2003.
7. Trento, A, Viegas, M, Galiano, M, Videla, C, Carballal, G, Mistchenko, AS and Melero, JA, Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment(G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. J. Virol, 80(2): 975~984, 2006.
8. Trento, A, Casas, I, Calderón, A, Garcia-Garcia, ML, Calvo, C, Perez-Breña, P and Melero JA : Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene. J. Virol, 84:7500~12, 2010.
9. Hwang, SJ, Park, DJ, Gu, PT, Koo, HS and Lee, MO : Characteristics of respiratory syncytial virus isolated from acute respiratory infectious disease in Busan. J. Bacteriol Virol, 46:173~80,

- 2016.
10. Park, E, Park, PH, Huh, JW, Yun, HJ, Lee, HK, Yoon, MH, Lee, S and Ko, G : Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014. *Epidemiol Infect.* 145(15):3226~3242, 2017.