

## Molecular Epidemiology of Mumps Virus Circulated in Gwangju

Sun Hee Kim<sup>1</sup>, Mihee Seo<sup>1</sup>, Jung Wook Park<sup>1</sup>, Sun Ju Cho<sup>1</sup>, Yi Deun Ha<sup>1</sup>, Dong-Ryong Ha<sup>1</sup>,  
Eun-Sun Kim<sup>1</sup>, Hae Ji Kang<sup>2</sup>, Sung Soon Kim<sup>2</sup>, Kisoon Kim<sup>2</sup> and Jae Keun Chung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Health and Environment Institute of Gwangju, Gwangju; <sup>2</sup>National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, Chungcheongbuk-do, Korea

The recent mumps epidemic in South Korea has generated a large amount of public concern. This study has attempted to analyze molecular epidemiological changes of mumps virus circulating in Gwangju metropolitan area, South Korea. 953 throat swab samples were collected from patients with parotitis from May 2013 to July 2014. The majority (71.5%) of these cases have occurred in middle or high school students aged from 15 to 19 years. All samples were tested using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) that targets the short hydrophobic (SH) gene of the virus. Mumps virus SH gene was detected in 39.2% (374/953) of samples. And 82 RT-PCR products were randomly selected for nucleotide sequencing analysis. All of these sequences were determined as genotype I by phylogenetic analysis and showed the highest nucleic acid similarity (99%) with Dg1062/Korea/98 (GenBank accession no. AY309060). These results suggested that appearance of new genotype or genetic variation at the nucleotide level could be ruled out to evaluate main cause of recent mumps outbreak in Gwangju metropolitan area.

**Key Words:** Mumps, Parotitis, Short hydrophobic gene, Genotype I

### INTRODUCTION

유행성이하선염은 국가예방접종사업의 대상이 되는 제2군 법정감염병의 하나로 유행성이하선염 바이러스 (Mumps virus) 감염에 의하여 이하선 부종이 특징적으로 나타나는 급성 바이러스성 질병이다. 유행성이하선염 바이러스의 감염은 타액의 비말을 통한 직접적인 접촉이나 호흡기 감염을 통해 주로 전파되며, 감염 후 16~18일의 잠복기를 거쳐 이하선염 증세와 함께 호흡기 질환을 동반하기도 하지만 30~40%는 불현성 감염으로 증상이 나타나지 않을 수도 있다. 대부분의 감염자는 가벼운 임상 경과를 보이며 자연치유 되지만 뇌수막염, 췌장염 등과

같은 합병증이 있을 수 있으며, 특히 사춘기 이후에 감염된 경우 고환염, 부고환염 또는 난소염 등이 잘 유발되는 것으로 알려져 있다 (1).

사람이 유일한 숙주이자 병원소로 알려져 있는 유행성이하선염 바이러스는 분류학적으로 *Paramyxoviridae* 과, *Paramyxovirinae* 아속의 *Rubulavirus* 속에 속하는 바이러스로, 약 15.3 kb의 단일가닥 (-) RNA를 유전자로 가지고 있으며, 3' 말단으로부터 nucleocapsid associated protein (NP), phospho protein (P), matrix protein (M), fusion protein (F), small hydrophobic protein (SH), hemagglutinin-neuraminidase protein (HN), large protein (L) 순의 배열로 구성되어 있다 (1). 이 중 SH 단백질 유전자는 가장 변이가 심하여 이 유전자의 변이 정도에 따라 현재 A~N까지 12개의 유전

Received: April 29, 2015/ Revised: May 28, 2015/ Accepted: June 2, 2015

\*Corresponding author: Jae Keun Chung. Health and Environment Institute of Gwangju, 149 Hwajeong-ro, Seo-gu, Gwangju, 502-837, Korea.  
Phone: +82-62-613-7630, Fax: +82-63-613-7549, e-mail: jkchung@korea.kr

\*\*This research was performed as part of the laboratory investigation of legal infectious disease which is managed by Health & Environment Institute of Gwangju Metropolitan city.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

형이 보고되고 있지만, 혈청형은 한 가지로 영구면역이 가능한 것으로 알려져 있다 (2).

우리나라에서는 1998년 개정된 표준예방접종지침에 따라 홍역-볼거리-풍진(MMR) 예방접종을 12~15개월과 4~6세에 2회 접종하는 방식이 도입되어 현재까지 유지되고 있으나, 유행성이하선염 환자발생은 지속적으로 증가하는 추세를 보여 왔으며 2007년도 이후로는 보다 급격한 증가율을 보이고 있다. 또한 유행성이하선염은 일반적으로 5~10세 사이의 소아에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있었으나, 최근에는 15세 이상 연령층인 중·고등학생들 사이에서의 발병률이 급격히 증가하는 경향을 보이고 있다 (3). 이러한 호발연령층의 변화는 학습에 대한 집중도가 높은 시기의 중·고등학생들에게 등교중지를 통한 격리조치가 권장됨에 따라 사회적으로도 큰 부담이 되고 있다.

유행성이하선염 발병연령층의 변화는 미국, 네덜란드 등 전 세계적으로 동일한 양상을 보이는 것으로 보고되고 있으며 (4~6), 이에 따라 국내외적으로 유행성이하선염 발생에 따른 역학조사 및 원인 규명에 대한 다양한 분석이 시도되었으나 정확한 원인은 알려지지 않은 실정이다 (7~11). 특히, 유행성이하선염 바이러스의 혈청형은 한 가지이지만 유전적인 다양성 분석에 중요한 SH 유전자에 의한 분리주간의 차이나 유행주와 백신주간의 차이를 규명하고자 하는 접근법이 많이 시도되고 있다 (5, 9). 이에 본 연구에서는 2013년 5월부터 2014년 7월까지 광주지역에서 발생한 유행성이하선염 의심환자의 인후도찰물을 수집하여, 유전자 검출법을 통하여 유행성이하선염 바이러스 감염여부를 확인하고, 확인된 바이러스의 SH 유전자의 염기서열 분석을 통해 지역 내 유행주의 유전형을 분석함으로써 바이러스의 유전적 변이 경향 및 해외유입여부를 파악하고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### 검체 수집

2013년 5월부터 2014년 7월까지 광주시내 병·의원으로부터 유행성이하선염 의심환자의 인후도찰 가검물(throat swab) 953건을 수집하였다. 환자로부터 채취된 가검물은 바이러스 수송용 배지(viral transport medium, Becton Dickinson, Italy)에 넣은 후, 즉시 혹은 냉장보관 하였다가 24시간 이내에 실험실로 운반하였다.

SH 유전자 증폭(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

수집된 가검물은 진탕하여 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후, 상층액을 viral RNA mini kit (QIAgen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사에서 제공된 절차에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 바로 RT-PCR을 위한 template로 사용하였다.

유행성이하선염 바이러스 SH 유전자 분석은 F1 (5'-GTAGCAGCCTTAGTTTTGAGCAT-3')과 HN3 (5'-TGAA-GAGTTTTGAGGGCTCCAT-3') primer를 RT-PCR premix (Solgent, Korea)에 분주하여 반응액으로 사용하였다. 유전자 증폭을 위하여 PCR System 9700 (Applied Bio-system, USA)를 이용하여 50℃에서 30분간 cDNA를 합성하고 94℃에서 15분간 전변성한 후, 94℃ 30초, 50℃ 40초, 72℃ 50초간 35회를 반복한 다음 72℃에서 5분간 연장하여 4℃에 정치하였다. 증폭한 반응산물은 1.5% agarose gel (Cambrex, USA)에서 전기영동한 후 증폭유무를 확인하였다.

### 염기서열 분석(Nucleotide sequencing)

검출된 유행성이하선염 바이러스의 SH 유전자에 대한 PCR 반응산물(629 bp)은 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Germany)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하고, ABI PRISM BigDye Terminator (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing reaction을 하였다. 반응산물은 BigDye XTerminator purification kit (Applied Biosystems, USA)로 정제한 후 Automated DNA sequencer (ABI prism 3100, Applied Biosystems, USA)로 염기서열 분석을 하였다. 결정된 유전자 염기서열 비교 및 계통수 분석은 Lasergene software (DNASTAR Inc. USA)에 포함된 Editseq와 Seqman 프로그램을 이용하여 계통분석을 실시하였으며, 진화적 거리 행렬은 Lasergene에 포함된 MegAlign의 sequence distance를 이용하여 계산하였다.

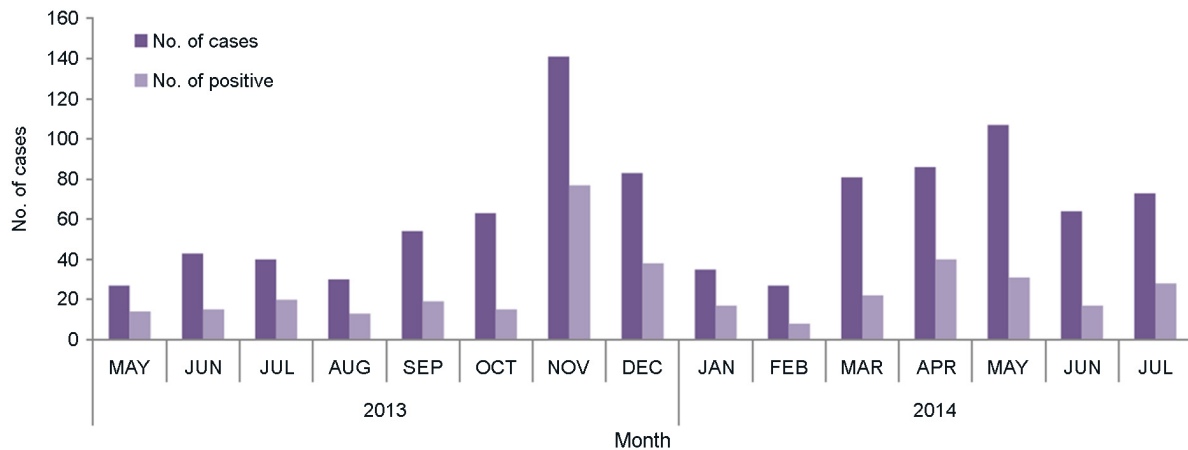
## RESULTS

### 유행성이하선염 바이러스 검출

2013년 5월부터 2014년 7월까지 수집된 953건을 대상으로 유행성이하선염 바이러스 SH 유전자에 대한 RT-PCR을 실시하여 374건(39.2%)에서 유전자 증폭을 확인하

**Table 1.** Results of RT-PCR using the mumps SH gene stratified by age group

Age in years	Total	<5	5~9	10~14	15~19	20~29	≥30
No. of tested cases	953	58	98	77	681	19	20
No. of RT-PCR positive cases	374	4	5	25	326	8	6
RT-PCR positive rate (%)	39.2	6.9	5.1	32.5	47.9	42.1	30.0

**Figure 1.** Number of mumps suspected cases and RT-PCR positive cases by monthly in an outbreak in Gwangju city, May 2013-July 2014 (n=953).

였다. 월별 검체 수집량에 있어서는 2013년 11월과 2014년 5월에 각각 총 수집 검체량의 14.8%(141건)와 11.2%(107건)을 차지하여 가장 높은 검체 수집율을 보였으나, SH 유전자에 대한 RT-PCR 검출건수에서는 11월이 전체 검출건수의 20.6%(77건), 그리고 2014년 4월이 10.7%(40건) 순으로 높게 나타났다(Fig. 1).

수집된 검체의 연령별 분포에 있어서는, 15~19세 연령군이 681건으로 전체 수집검체의 71.5%를 차지하였고, 5~9세 연령군(98건, 10.3%), 10~14세 연령군(77건, 8.1%), 5세 미만 연령군(58건, 6.1%) 그리고 30세 이상(20건, 2.1%)과 20~29세 연령군(19건, 2.0%) 순으로 나타났다. 또한 연령별 유행성이하선염 바이러스 검출률에 있어서는 15~19세 연령군이 47.9%로 가장 높게 나타났으며, 20~29세 연령군은 42.1%, 10~14세 연령군은 32.5%, 30세 이상 연령군에서는 30.0%, 5세 미만 연령군과 5~9세 연령군에서는 각각 6.9%와 5.1%로 확인되었다(Table 1). 유행성이하선염 바이러스 SH 유전자 증폭이 확인된 검체 374건 중 연령별 분포를 살펴보면, 15~19세 연령군에 해당하는 검

체가 326건으로 양성검체의 87.2%를 차지하였으며, 성별에 있어서는 남성이 302건(80.7%), 여성이 72건(19.3%)으로 남성이 여성의 4배 이상인 것으로 확인되었다(Fig. 2).

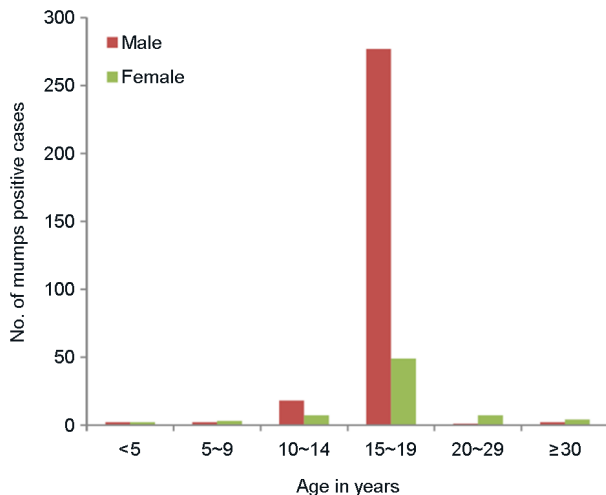
#### SH 유전자 염기서열 분석

유행성이하선염 바이러스 분리주에 대한 유전형을 결정하고자 선별된 분리주 82건에 대하여 SH 유전자 염기서열 분석을 실시하고 GenBank에 등록된 분리주의 염기서열과 비교 분석한 결과, 국내 분리주인 Dg1062/Korea/98 (GenBank accession no. AY309060)와는 99%, 일본에서 보고된 바 있는 MP93-AK (GenBank accession no. AB003424)와는 98%의 상동성을 보여 83건 모두 유전형 I로 확인되었다. 또한 백신주인 Jeyl Lyhn 주와 분리주와의 유전적 차이는 19.0%로 나타났다(Fig. 3).

## DISCUSSION

최근 국내 유행성이하선염 발생현황은 2006년에 2,089

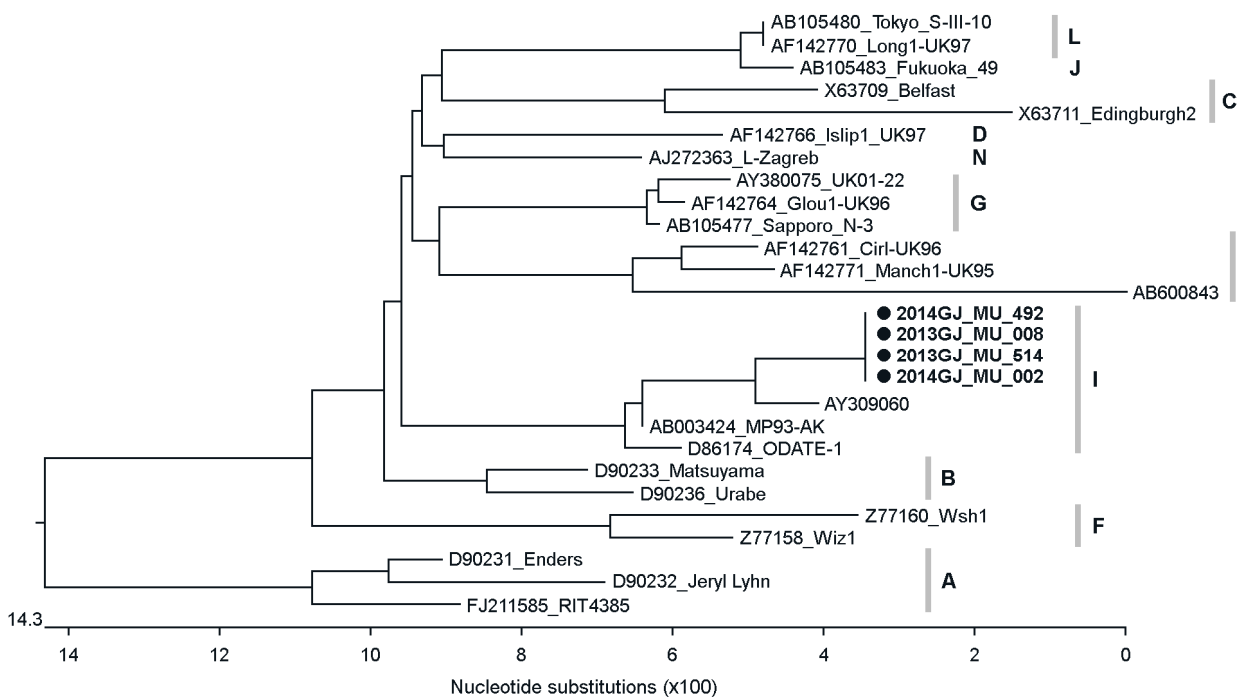
명, 이듬해인 2007년에는 4,557명, 2009년에는 6,399명, 2012년에는 17,024명 그리고 2014년에는 25,696명으로 크



**Figure 2.** Number of mumps RT-PCR positive cases by age and sex in an outbreak in Gwangju city, May 2013-July 2014 (n=374).

게 증가되었음을 질병관리본부 감염병 웹 통계시스템 (<http://is.cdc.go.kr/dstat/index.jsp>)을 통해 확인할 수 있다. 특히 광주지역의 경우, 2014년에 3,211명의 환자발생신고가 기록되었는데 이는 전년도인 2013년 환자발생신고 수치인 641명의 5배 이상에 해당한다 (3). 감염병 웹 통계시스템의 수치는 임상증상에 근거한 자료로 환자와 의사환자를 모두 포함하고 있어, 유행성이하선염의 유행규모를 정확히 파악하기 위해서는 실험실 진단이 병행되어야 한다. 유행성이하선염의 실험실 진단에는 혈청학적 진단법, 바이러스 분리법, 간접면역형광법 및 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 유전자 검출법이 이용되고 있으며 (7~11), 유전자 검출법의 target인 SH 유전자는 유전형 결정에 이용됨에 따라 유전자 진단과 동시 유전형의 변이를 분석할 수 있어 유용한 진단법으로 널리 사용되고 있다 (5, 9).

본 연구에서는 2013년 5월부터 2014년 7월까지 총 953건의 유행성이하선염 의사환자의 인후도말 가검물을 수집하여 SH 유전자 검출법을 통해 374건(39.2%)의 검체에서 유행성이하선염 바이러스 SH 유전자의 증폭을



**Figure 3.** Phylogenetic tree of selected mumps virus strains in the study and in GenBank. The tree is based on SH gene sequence alignment (206 bp). Strains detected in the study are marked with full dots (●). Capital letters denote mumps virus genotype.

확인할 수 있었다(Table 1). 연령별 검체 수집분포에 있어서 15~19세 연령군의 검체 수집율이 전체 검체 수집률의 71.5%를 차지하였는데 이는 중고등학교를 중심으로 교내 집단발병에 의한 결과이며, 유전자 검출률 역시 47.9%로 가장 높게 나타났다. 반면, 9세 이하 연령군에서는 집단발병보다는 산발적 발생사례의 검체로 구성되었으며, 유전자 검출률은 5.1~6.9%로 평균 검출률인 39.2%보다도 6배 이상 낮은 결과를 보였다. 이와 같은 이하선염의 산발적 발생사례의 경우에서는 유행성이하선염 바이러스 외의 이하선염 유발 바이러스 즉, Epstein-Barr virus, human herpesvirus (HHV)-6, human parainfluenza virus (HPIV), human bocavirus 등에 의한 감염을 고려해 볼 필요가 있다. 이들 바이러스는 유행성이하선염 바이러스와는 달리 집단유행규모로 이하선염을 유발하지는 않는 것으로 보고되고 있으며, 이미 핀란드나 미국 등의 연구에서 이하선염 산발적 발생사례 중 이들 바이러스가 각각 14%와 38%를 차지하는 것으로 보고된 바 있다 (10, 11).

유행성이하선염 바이러스의 혈청형은 한 가지이지만 SH (small hydrophobic) 단백질은 변이가 심한 부위로 이 단백질의 유전적 상이성으로 유전형이 구분되어, 현재까지 A-N까지 12가지 유전형이 보고되고 있다 (2). 이들 유전형은 특정 지역에서만 제한적으로 유행하고 있어 유전자 분석을 통해 유행성이하선염 바이러스의 해외유입 여부 등을 추정할 수 있다. 유전형 C-E, G와 H는 전형적으로 유럽지역에서, 유전형 B, F 그리고 I는 아시아지역에서 주로 유행하는 것으로 알려져 있지만 (12), 1998-2001년 국내에서 분리된 유행성이하선염 바이러스 유전형에 대한 조사에서는 H와 I 두 가지 유전형으로 나타났다. 이때 확인된 유전형 H는 유럽에서 발생한 바이러스의 염기서열과 같은 유전형 안에서도 큰 차이를 보여 유전형 H가 국내에서 토착화되었다는 점과 유전형 H가 매년 증가하여 최근 유행성이하선염 환자의 증가와의 연관성이 높을 것이라는 점을 보고하였다 (13, 14). 그러나 2013-2014년에 광주지역에서 유행한 유행성이하선염 바이러스 유전형에 대한 본 연구의 결과에서는 집단유행뿐 아니라 산발 발생을 포함한 대상검체 모두 유전형 I로 나타났으며, 기존의 국내에서 보고된 바 있는 Dg1062/Korea/98 (GenBank accession no. AY309060)형과 99%의 상동성을 보이는 것으로 확인됨에 따라 유행성이하선염의 재유행의 원인으로 새로운 유전형의 등장을 고려하기는 어려울 것으로 판단된다 (15, 16).

또한 본 연구에서 실시한 각 유전형의 표준주와 백신주 그리고 분리주간의 SH 유전자에 대한 계통학적 분석에 있어서 백신주인 A형의 Jeryl Lynn 주와 분리주간의 유전적 차이가 19.0%로 가장 큰 차이를 보이기는 하였으나, 백신에 의해 유도된 항체의 분리주에 대한 중화능력 분석이 수반되지 않은 단계에서 백신주와의 유전적 차이로 인한 재유행을 설명하기에는 한계점이 있다. 그러나, 본 연구에서도 확인된 바와 같이 청소년층을 중심으로 유행성이하선염 환자가 늘어나는 것은 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 공통된 특징으로, 최근 여러 연구에서 MMR 백신 접종 후 시간경과에 따른 면역원성 연구가 진행되었으며 그 결과 시간이 지남에 따라 항체가 감소함이 확인되었다는 보고는 국내의 경우에도 고려해 볼 만하다고 생각된다 (17, 18).

본 연구의 결과로 2013-2014년도 광주지역에서 발생한 유행성이하선염의 유행이 새로운 유전자형의 유입이나 유전자 변이가 아닌 국내에 토착화된 I 유전형에 의한 청소년층 사이의 재유행임을 확인할 수 있었다. 향후 유행성이하선염에 대한 관리를 위해서는 실험실 진단을 통한 유전형 분석은 지속적으로 수행되어야 하며, 국내 유행주에 대한 백신의 면역원성 평가와 함께 각 연령층에 대한 항체가 조사를 통한 면역도 평가 등 다각적인 연구가 추가로 필요할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- 1) Steven AR, Christian JS, Kathryn MC. Mumps Virus. In: Davis MK, Peter MH. Fields Virology 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p.1024-41.
- 2) Jin L, Örvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, *et al.* Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol* 2015;25:85-101.
- 3) Korea Centers for Disease Control and Prevention. Disease web statistics system. Available from: <http://is.cdc.go.kr/nstat/index.jsp>
- 4) Barskey AE, Glasser JW, LeBaron CW. Mumps resurgences in the United States: A historical perspective on unexpected elements. *Vaccine* 2009;27:6186-95.
- 5) Kaaijk P, Van der Zeijst B, Boog M, Hoitink C. Increased mumps incidence in the Netherlands: review on the possible role of vaccine strain and genotype. *Euro Surveill* 2008;13.
- 6) Sane J, Gouma S, Koopmans M, de Melker H, Swaan C, van

- Binnendijk R, *et al.* Epidemic of mumps among vaccinated persons, the Netherlands, 2009-2012. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:643-8.
- 7) Park DW, Nam MH, Kim JY, Kim HJ, Sohn JW, Cho Y, *et al.* Mumps outbreak in a highly vaccinated school population: Assessment of secondary vaccine failure using IgG avidity measurements. *Vaccine* 2007;25:4665-70.
- 8) Ryu JU, Kim EK, Youn YS, Rhim JW, Lee KY. Outbreaks of mumps: an observational study over two decades in a single hospital in Korea. *Korean J Pediatr* 2014;57:396-402.
- 9) Okajima K, Iseki K, Koyano S, Kato A, Azuma H. Virological analysis of a regional mumps outbreak in the northern island of Japan-mumps virus genotyping and clinical description. *Jpn J Infect Dis* 2013;66:561-3.
- 10) Davidkin I, Jokinen S, Paananen A, Leinikki P, Peltola H. Etiology of mumps-like illnesses in children and adolescents vaccinated for measles, mumps, and rubella. *J Infect Dis* 2005; 191:719-23.
- 11) Barskey AE1, Juieng P, Whitaker BL, Erdman DD, Oberste MS, Chern SW, *et al.* Viruses detected among sporadic cases of parotitis, United States, 2009-2011. *J Infect Dis* 2013;208:1979-86.
- 12) Palacios G, Jabado O, Cisterna D, de Ory F, Renwick N, Echevarria JE, *et al.* Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43:1869-78.
- 13) Lee JY, Kim YY, Shin GC, Na BK, Lee JS, Lee HD, *et al.* Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998-2001. *Virus Res* 2003;97:111-6.
- 14) Lee JY, Na BK, Kim JH, Lee JS, Park JW, Shin GC, *et al.* Regional outbreak of mumps due to genotype H in Korea in 1999. *J Med Virol* 2004;73:85-90.
- 15) Lee JY, Na BK, Lee HD, Chang SW, Kim KA, Kim JH, *et al.* Complete nucleotide sequence of a mumps virus Genotype I strain isolated in Korea. *Virus Genes* 2004;28:201-5.
- 16) Kashiwagi Y, Takami T, Mori T, Nakayama T. Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. *Arch Virol* 1999;144:593-9.
- 17) Vandermeulen C, Roelants M, Vermoere M, Roseeuw K, Goubau P, Hoppenbrouwers K. Outbreak of mumps in a vaccinated child population: a question of vaccine failure? *Vaccine* 2004;22:2713-6.
- 18) Davidkin I, Jokinen S, Broman M, Leinikki P, Peltola H. Persistence of measles, mumps, and rubella antibodies in an MMR-vaccinated cohort: a 20-year follow-up. *J Infect Dis* 2008;197:950-6.