역학 · 관리보고서 2

전장유전체 염기서열분석 유전형검사법(wgSNP)을 통한 결핵 집단발생의 감염경로 분석

질병관리청 감염병진단분석국 세균분석과 **송승은, 김동혁, 하지민, 전정훈, 황규잠***

*교신저자 : kyuhwang61@korea.kr, 043-719-8110

초 록

결핵의 집단발생 시 감염원 추적과 감염경로를 확인하기 위해 결핵균 유전형검사가 이용되고 있다. 기존 결핵균 유전형검사에는 Spoligotyping법과 24 유전자좌 MIRU-VNTR법을 사용하였으나, 변별력이 다소 떨어져 감염경로 추적에 어려움이 있었다. 질병관리청에서는 보다 변별력이 향상된 분석법으로 알려진 전장유전체 염기서열분석 유전형검사법(wgSNP)으로 대체하기 위해 2019년부터 시범 사업을 진행하고 있다.

본 글에서는 감염경로 확인이 불가능했던 집단발생 사례에 wgSNP법을 적용하여 감염경로를 재분석한 결과를 보고하고자 한다. 2015년부터 2018년 동안 국내 한 지역 내 4개 대학교에서 시행한 집단시설 역학조사를 통해 결핵균 11주를 수집하였다. 기존 유전형검사법으로 분석한 결과, 모든 균주의 유전형이 TBG0014로 동일한 것을 확인하였고, 역학적 연관관계 분석으로 집단감염으로 확인되었으나, 대학 간의 연관성은 확인되지 않았었다. 대학 간 연관성 분석을 위해 wgSNP법을 적용하여 분석한 결과, 각 대학교 내 결핵균주 간 유전자변이(SNP)는 0~1개로 확인되어 동일 감염원으로 발생되었음을 재확인하였으나, 대학 집단 간 유전자변이(SNP)는 196~264개로 3개 대학교에서 발생한 집단발생 사례는 서로 연관관계가 없는 것으로 확인하였다.

이 결과를 토대로, 집단시설 결핵역학조사의 분자역학검사법으로 wgSNP법을 적용하고자 하며 분석된 감염원 추적 등의 정보는 결핵 집단발생의 관리를 위해 제공하고자 한다.

주요 검색어 : 결핵, 유전형 분석, 전장유전체염기서열분석

들어가는 말

결핵은 *Mycobacterium tuberculosis* complex(MTBC)에 감염되어 유발되는 감염병으로, 전 세계적으로 연간 약 천만 명의 신환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 국내의 경우 해마다 20,000여명 이상의 신환자가 보고되고 있어 결핵관리를 위한 적극적인 대응이 요구되고 있다. 결핵은 매개체 없이 공기감염(비말핵)을 통해 전파되며, 감염인의 약 5~10%가 활동성 결핵으로 이환된다. 활동성 결핵환자 중 약 50%는 감염 2년 내에 발병하며, 나머지 50%는 평생에 걸쳐 발병하기 때문에 통상적인 역학조사만으로는 감염원 추적과 감염경로 확인에 한계가 있다[1].

이러한 문제점을 극복하기 위해 미국, 영국 등 세계 여러 나라에서는 감염된 결핵균 간의 연관관계 확인을 위해 결핵균 유전형검사(TB molecular typing)를 활용하고 있다. 이 결과를 이용하여 결핵환자 간 감염경로 뿐 아니라 특정지역 또는 인구집단 내 유행주 확인, 동일 전파경로에 포함된 추가 환자 또는 역학적 연관성을 확인하지 못한 환자군에서 발생한 집단발생의 조기 인지, 결핵실험실 내 오염, 재발 및 재감염 환자 감별 등으로 확대 적용하고 있다. 우리나라에서는 2015년부터 결핵균 유전형검사를 적용하여 집단시설 결핵역학조사용 결핵균에 대한 연관성 분석을 위한 '결핵균 감염경로 추적감시망'을 운영하고 있다.

결핵균 유전형검사법은 1990년대 중반부터 IS6110-RFLP가

사용되다가 변별력, 재현성, 검사자의 생물안전, 분석기술의 발전 등으로 2000년대 중반부터 12, 15, 24 유전자좌 MIRU-VNTR(Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat)법과 Spoligotyping법이 활용되고 있다. 최근에는 전장유전체염기서열(whole genome sequencing, WGS) 분석법이 대중화됨에 따라 결핵균 유전형분석법에도 WGS를 활용하는 사례가 증가하고 있다[2]. WGS법을 활용한 유전형검사법으로는 전장유전체염기서열 내 단일염기다형성 분석법(Whole Genome Single Nucleotide Polymorhism analysis, wgSNP)이 있으며, 이 방법은 결핵균 전체 유전자(약 4.4Mb)의 90% 이상을 분석하기 때문에 기존 검사법(전체 유전자의 약 1%를 대상으로 분석)에 비해 변별력이 월등히 높은 장점을 가지고 있다[3].

본 글에서는 기존의 Spoligotyping과 24 유전자좌 MIRU-VNTR 검사법으로는 감염경로 확인이 불가능한 사례를 대상으로 wgSNP법을 적용하여 감염경로를 재분석한 결과를 소개하고자 한다.

몸 말

결핵균 감염경로 추적감시망을 통해 2015년부터 2018년까지 3,167개 집단시설(학교, 직장, 의료기관 등) 로부터 수집한 결핵균 3,461주를 대상으로 Spoligotyping법과 24 유전자좌 MIRU-VNTR법으로 분석한 결과, 일개 지역 내 4개 대학교에서 선별된 11주의 결핵균의 유전형이 TBG0014(Spoligotyping: Beijing clade, 24 유전자좌 MIRU-VNTR: 244233352644425173353823)로 동일한 것을 확인하였다(그림 1).

A 대학교에서는 지표환자(2015년)로부터 TBG0014형 1주가 수집되었고 추가환자는 없었다. B 대학교에서는 2016~2017년 사이에 7명의 환자가 발생하였고 동일 유전형임을 확인하였다. C 대학교에서 2017년 동일 유전형 1주가 분리되었고 역학조사 결과 B 대학교의 집단발생과 밀접접촉자로 확인되었다. D 대학교에서 2016년과 2018년에 동일 유전형을 가진 결핵균이 각각 1주씩 분리되었고, 역학조사 결과 학내 전파로 확인되었다. B 대학교와 C 대학교 간의 역학적 연관관계는 확인되었으나, 다른 학교 간의 연관관계는 확인되지 않은 상태였다.

wgSNP 결과, 11개의 TBG0014는 A 대학교, B와 C 대학교, D 대학교의 3개 집단으로 구분되었다. 각 집단 내 결핵균 간 유전자 변이 개수(SNP)는 0~1개로 확인되었고, A 대학교와 B 대학교 간 SNP는 264개였으며, A 대학교와 D 대학교 간의 SNP는 196개였다.

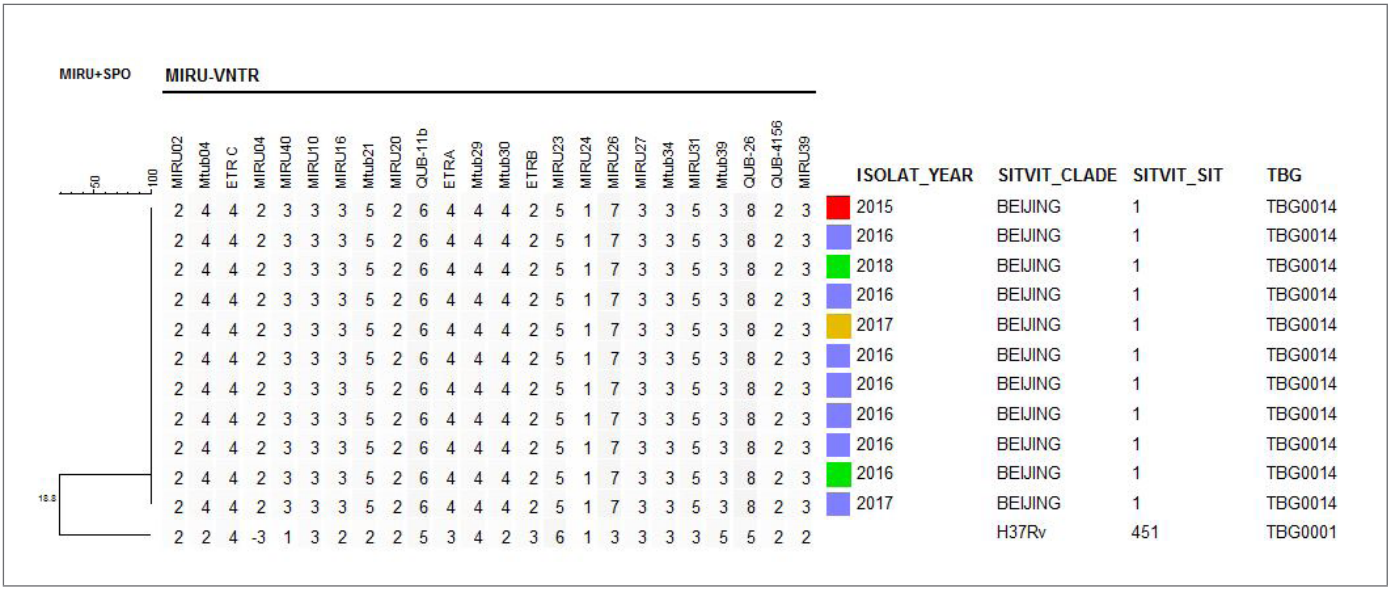

그림 1. 동일 지역 내 발생한 결핵균의 Spoligotyping과 24 유전자좌 MIRU-VNTR 분석을 통한 유전형 분석결과

* 역학조사 사례에 따라 색을 달리하여 표시함. 붉은색 : A대학교, 보라색 : B 대학교, 황색 : C 대학교, 초록색 : D 대학교

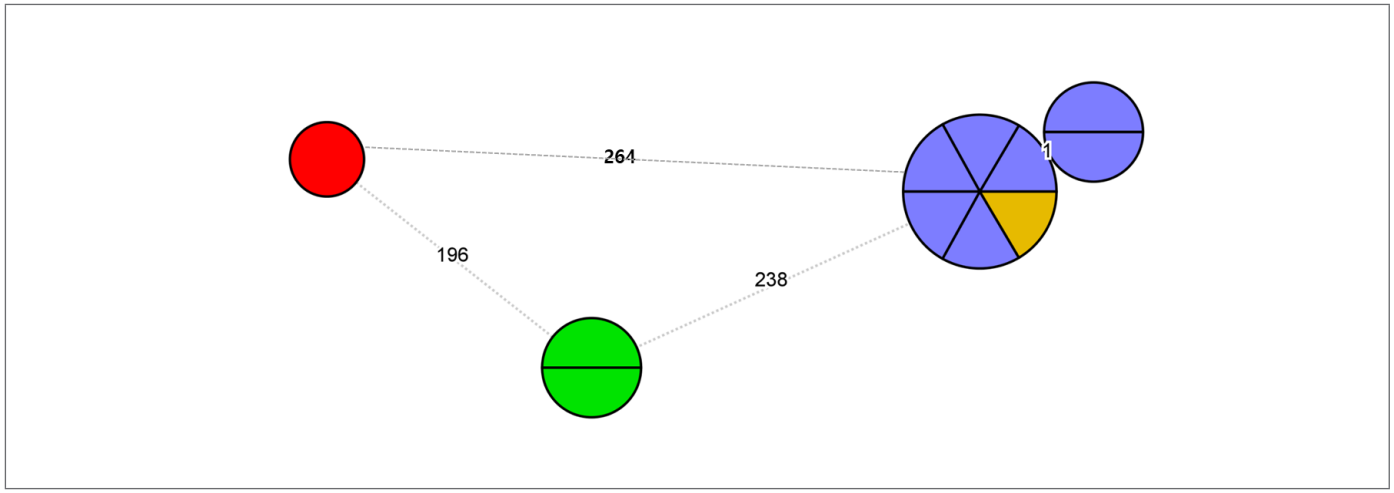

그림 2. TBG0014를 wgSNP를 통해 분석한 최소 신장트리

*숫자는 SNPs를 나타내며, 역학조사 사례에 따라 원의 색을 달리하여 표시. 붉은색 : A대학교, 보라색 : B 대학교, 황색 : C 대학교, 초록색 : D 대학교

마지막으로 B대학교와 D 대학교 간의 SNP는 238개였다(그림 2).

wgSNP를 통해 분석한 TBG0014 균주들은 역학적 연관관계와 동일한 양상으로 구분되어 기존 검사법보다 높은 변별력을 보이는 것을 확인하였다.

맺는 말

결핵균 유전형검사는 기존 역학조사만으로 확인하지 못하는 결핵균의 감염경로를 분석하여 접촉자 관리, 인수공통 결핵 및 다제내성 결핵균의 발생과 전파 확인 등 보다 정교한 결핵균 전파경로 분석을 가능하게 하고 있다.

Spoligotyping법과 24 유전자좌 MIRU-VNTR 검사법 결과, 여러 균주가 동일한 유전형(genomic cluster)을 보이는 사례를 해석하기 위해서는 역학적 연관관계를 확인해야 한다. 역학적 연관관계를 가지면서 유전형이 동일한 경우, 최근감염으로 분석이 가능하다. 하지만, 동일한 유전형을 가지나 역학적 연관관계를 보이지 않을 때는 결과 분석이 불가능하기 때문에 심층 역학조사(cluster investigation)를 수행하거나 보다 변별력 높은 검사법을 통한 분석이 필요하다. 결핵균 전장유전체염기서열 분석은 기존의 검사법에 비해 변별력을 크게 증가시킨 동시에 항결핵제 내성검사를 동시에 수행할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이에 2016년 영국을 필두로 미국 등 여러 국가에서 전장유전체염기서열분석을 결핵균 유전형검사법으로 활용하고 있으며, 국내에서도 결핵균 유전형검사법인 wgSNP를 도입하기 위한 사업을 진행하고 있다. wgSNP 결과데이터를 분석하기 위한 공식적인 기준값은 없으나 미국에서는 5개, 영국에서는 12개 이내의 SNP 차이를 동일 감염경로 내 전파로 추정하고 있다[4,5].

국내 동일 지역 내 genomic cluster를 대상으로 wgSNP를 수행하였을 때, 집단발생과 관련한 균주 간의 SNP는 1개 이내로 확인되었고, 역학적 연관성을 가지지 않는 경우의 SNP는 196개 이상으로 wgSNP법을 적용하여 기존 검사법으로 확인이 불가능한 감염경로 분석이 가능하였다. 향후 집단시설 결핵역학조사 사례분석을 목적으로 wgSNP 기준값 설정을 위한 지속적인 분석을 수행할 예정이다. 또한, 다제내성 결핵, 소아 결핵 등 공중보건학적인 파급력이 큰 집단을 대상으로 wgSNP법을 적극적으로 확대해 나갈 계획이며, 감염원 추적 등의 유전체 분석정보는 결핵 집단발생의 관리를 위해 지속적으로 제공하고자 한다.

① 이전에 알려진 내용은?

결핵균 감염경로 확인을 위해 유전형검사법이 사용되고 있다. 전장유전체 염기서열분석법을 활용한 결핵균 유전형검사법(wgSNP)은 기존 검사법(Spoligotyping과 24 유전자좌 MIRU-VNTR) 대비 향상된 변별력을 가지고 있다.

② 새로이 알게 된 내용은?

기존 결핵균 유전형검사법(Spoligotyping과 24 유전자좌 MIRU-VNTR)으로 분석이 불가능한 동일 유전형을 가진 균주(genomic cluster)를 대상으로 wgSNP를 수행한 결과, 집단에 따라 균주의 유전형이 구분되는 것을 확인하였고 이는 역학적 연관관계와 연관이 있는 것을 확인하였다.

③ 시사점은?

집단시설 결핵역학조사의 분자역학검사법으로 wgSNP법을 적용하고자 하며 분석된 감염원 추적 등의 정보는 결핵 집단발생의 관리를 위해 제공하고자 한다.

참고문헌

1. WHO. Global tuberculosis report 2018. 2019.
2. Dario GDV and Laura P-L. The Evolution of Genotyping Strategies to Detect, Analyze, and Control Transmission of Tuberculosis. *Microbiol Spectrum.* 2016;6(5). doi: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0002-2016.
3. CDC. http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping
4. Maeve KL. *et al*. The use of whole-genome sequencing in cluster investigation of an MDR-TB outbreak. *Eur Respir J.* 2018;51(6):1702323
5. Casali N. *et al*. Whole genome sequence analysis of a large isoniazid-resistant tuberculosis outbreak in London: a retrospective observational study. *Plos Med.* 2016;13:e1002137.

Abstract

The use of whole genome single nucleotide polymorphisms (wgSNP) analysis in cluster investigation of tuberculosis outbreak cases

Song Seung-Eun, Kim Dong Hyeok, Ha Jee Min, Chun Jeong-Hoon, Hwang Kyu Jam
Division of Bacterial Diseases, Bureau of Infectious Disease Diagnosis Control, Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA)

Mycobacterium tuberculosis (M.tb) is a species of pathogenic bacteria in the family Mycobacteriaceae and the causative agent of tuberculosis. Understanding the dynamics of M.tb disease transmission through complex genotyping is critical to creating policies and monitoring the disease with the end goal of TB elimination. Current genotyping methods combine the results of two assays, spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*-specific multiple locus (Variable Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR,) to give an M. tuberculosis TBG type. However, whole genome single nucleotide polymorphism (wgSNP) analysis was used to determine the genetic relatedness between strains is a preferred method due to its improved discrimination.

Between 2015 and 2018, a total of 11 strains were collected through TB contact investigation by four universities in a region in Korea. Analysis of spoligotyping and 24-loci MIRU-VNTR showed that all strains were of the same genotype, namely TBG0014. Patients at each university had an epidemiologic link, confirming that the event was an outbreak, but epidemiological relationships between universities could not be identified. In each outbreak case, the number of SNPs between tuberculosis strains was 0-1, but the number of SNPs between universities was 196-264.

A wgSNP analysis was performed to explore the genetic relationship between TB isolates that could not be confirmed through conventional methods. As a result, there were 0-1 SNPs between TB isolates in the outbreak. The number of SNPs between TB cases at the three universities was 196-264, and it was identified that there were no transmission cases among universities.

A wgSNP analysis recommend performed to assess the potential of recent transmission and this information will be provided to the national TB management program.

Keywords: *Mycobacterium tubercuosis*, molecular typing, wgSNP

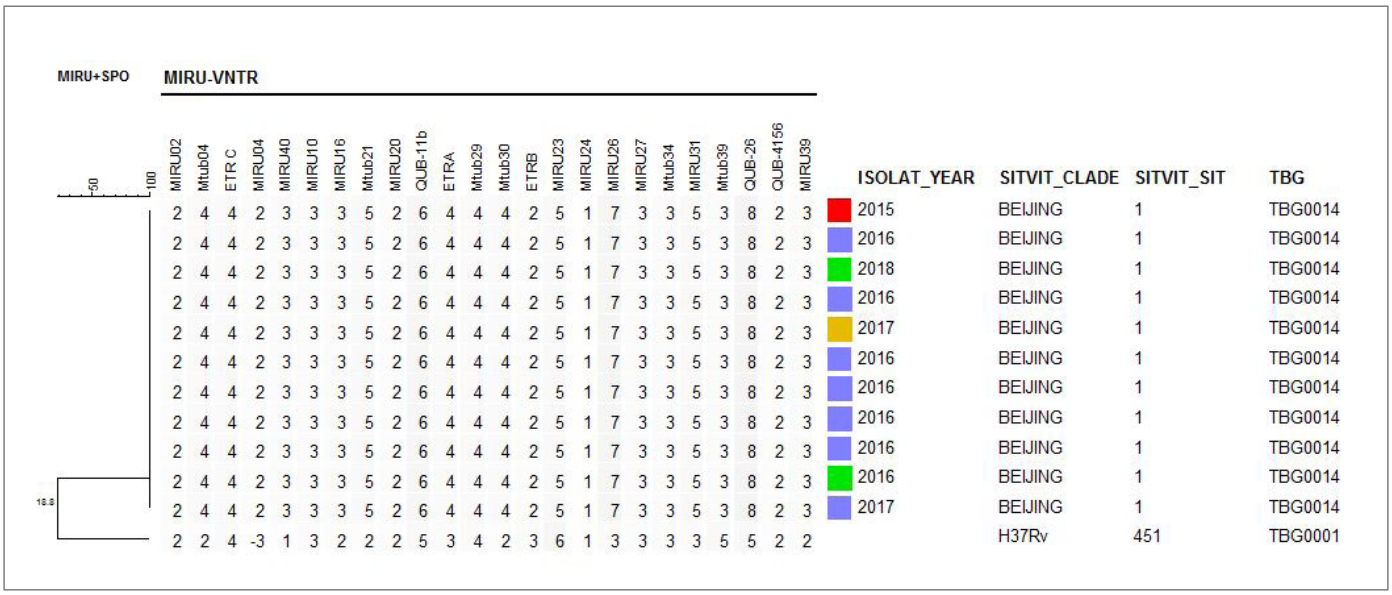

Figure 1. Phylogenetic tree of TBG0014 derived from Spoligotyping and 24-loci MIRU-VNTR

*Colored square reflect according to TB epidemiological investigation case. Red: A university, Purple: B university, Yellow: C university, Green: D university

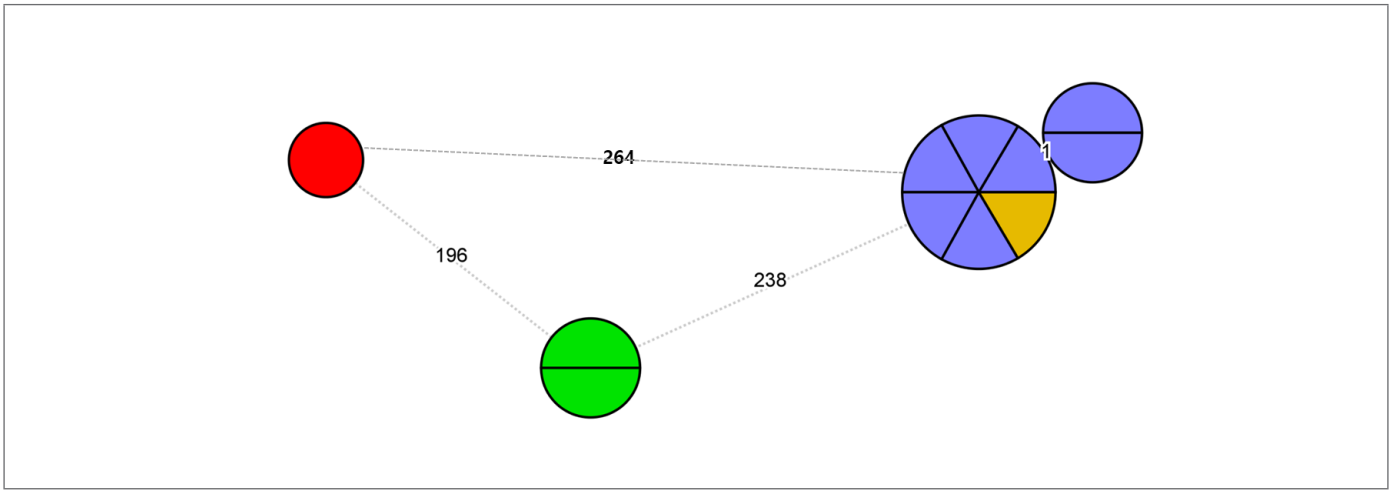

Figure 2. Minimum spanning tree of TBG0014 derived from wgSNP

*The number indicates the SNPs and colored rings display according to TB contact tracing case. Red: A university, Purple: B university, Yellow: C university, Green: D university