

1999년 부산지역 급성 호흡기 감염환자로부터 분리한 인플루엔자바이러스의 특성

역학조사과

조경순 · 구평태 · 정구영 · 조현철 · 이미옥 · 진성현 · 이주현 · 이채남 · 빈재훈

Characteristics of Influenzavirus Isolated from Acute Respiratory Patients in Busan, 1999

Epidemiology Division

Kyung-Soon Cho, Pyung-Tae Ku, Gu-Young Jeong, Hyeon-Cheol Jo, Mi-Ok Lee,
Seong-Hyun Jin, Ju-Hyeon Lee, Chae-Nam Lee and Jae-Hun Bin

Abstract

Investigate the epidemics for influenza outbreaks. The outbreak pattern of the internal and external patients housed in the 10 designated hospitals and 16 health centers was monitored to investigate and the characteristics of the virus isolates are as follows. 213 strains of influenza virus was isolated from the oral specimen of 1686 respiratory disease patients in Busan, 1999. Among these isolates, 203 strains were A-type and the rest were B-type. The outbreak pattern for sex and age groups is as follows. The male outbreak was similar to the female outbreak: male outbreak, 45.5% and female outbreak, 54.5%. Most of the patients were less than 10 years old. The monthly influenza outbreak was consistent from Jan. to Dec. in 1999. The 96 strains from the A-type isolates were A/Sydney/05/97(H3N2)-like, the 107 strains were A/Beijing/262/95(H1N1)-like, and all of the 10 B-type isolates were B/Harbin/07/94-like.

Key words : acute respiratory disease, influenzavirus, flu patient.

서 론

급성호흡기 질환을 일으키는 인플루엔자 바이러스는 Orthomyxoviridae에 속하며^{1, 2)},

인플루엔자 A와 B 바이러스, C 바이러스의 두 개의 속을 갖는다. A형은 가장 유행 빈도가 높으며 항원변이도 자주 일어나며 범세계적 대유행의 주역이 되고 있고, B형은 일반적으로 국지적인 유행에 한정되며 항원 변이도 A형 보다 적게 일어나고 그 기간도 다소 늦다. 그리고 C형은 현재까지 별로 문제가 되지 않으며 산발적인 소규모 발생에 국한되고 있다. A와 B 바이러스는 3개의 RNA 중합효소(PB1, PB2, PA), hemagglutinin (HA), nucleoprotein(NP), neuraminidase (NA), matrix proteins (M1, M2) 그리고 nonstructural protein(NS1, NS2)을 합성하는 각각 8개 분질의 단일가닥 RNA를 가지는데 반면, C 바이러스는 구조적으로는 A, B 바이러스와 유사하나 7개 분질의 RNA를 갖는다^{3, 9)}. 인플루엔자 A 바이러스는 HA와 NA의 항원변이에 의해 아형이 결정되며, 현재 HA에는 14종의 아형(H1~H14)이 있고, NA에는 9종의 아형(N1~N9)이 알려져 있지만, 사람 감염과 관련된 인플루엔자 A형 바이러스는 H1N1, H2N2 및 H3N2가 있다. H1N1은 1977년에 출현하였으며, 보통 소련형 인플루엔자로 알려져 있고, H2N2는 1957년 처음 나타나서 1968년까지 유행되었으며 보통 아시아 인플루엔자라고 불렸으며, H3N2는 1968년에 출현하여 현재까지 변이 바이러스가 유행하고 있으며 홍콩 인

플루엔자라고 부르고 있다^{3, 6, 10)}.

인플루엔자 바이러스 감염은 기침이나 재채기를 할 때 나오는 포말에 의해 가장 잘 전파되고 사람에서 사람으로 직접 접촉도 중요한 요인이 된다. 인플루엔자 A 바이러스는 무증상에서부터 치명적인 결과를 가져오는 원발성 바이러스성 폐렴까지 다양한 임상상을 나타내며 잠복기는 24시간에서 4~5일이며, 갑작스런 두통, 오한, 아픈기침으로 시작하여 발열, 근육통, 쇠약, 식욕부진으로 이어진다. 특히 소아의 경우 열성경련이 일어날 수 있으며, 구토, 복통과 같은 위장관 증상을 나타내며, 호흡기 증상과 관련된 발열의 14%가 인플루엔자 바이러스에 의한 것이다. 위막성 후두염(croup), 인두염, 기관지염 등과 같은 합병증, 세균감염과 복합된 폐렴 및 중추신경계 증상도 나타나기도 한다^{2, 11)}. 본 연구는 법정전염병 3군인 인플루엔자 바이러스의 분리 및 항원 분석을 통하여 미래의 유행에 대처하기 위한 역학적 기초자료를 제공하고자 1999년도 부산광역시 10개 감시지정병원의 외래 또는 입원한 급성호흡기 감염증 환자와 16개 보건소의 환자를 대상으로 월별 및 연령별 발생추이를 조사하고 환자 가검물로부터 인플루엔자 바이러스를 분리하여 그 특성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

1999년 1월부터 12월까지 부산광역시의 10개 감시지정병원의 외래 또는 입원한 급성호흡기 감염증 환자와 16개 보건소 환자로부터 1686건의 인후가검물을 채취하였다. 채취한 가검물은 바이러스 수송용 배지(virus transport medium, Difco)에 넣어 냉장온도를 유지하면서 실험실로 운반하여 바이러스 분리에 사용하였다.

2. 세포주

국립보건원 호흡기계 바이러스로부터 분양 받은 mardin-darby canine kidney (MDCK) 세포주를 penicillin(0.05 units/ml)/streptomycin(0.05µg/ml)과 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Minimum essential medium(MEM)을 기본배지로 하여 5% CO₂ 농도를 유지하면서 37℃로 조정된 CO₂ incubator에서 배양하였다.

3. 바이러스의 분리

검체를 전처리하기 위하여 실험실로 옮긴 인후가검물에 penicillin(5units/ml)/streptomycin(5µg/ml) 및 nystatin(1000units/ml)을 첨가하여 4℃에서 1시간 방치한 후, 3000 rpm으로 20분간 저온 원심분리하여 상청액을 집중 가검물로 사용하였다. 미리 준비해 둔 24-well 배양용기에 단층배양시켜 놓은 MDCK 세포주에 3-well 당 각 well에 집중용 배양액 0.5ml를 넣은 후 전처리된 가검물 0.3ml씩 다중집종하고 5% CO₂, 37℃로 조정된 CO₂ incubator에서 10일간 배양하면서, 매일 현미경하에서 세포병변효

과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다.

세포병변효과를 나타내는 검체는 2~3회 연속계대배양하여 역가를 증가시킨 후 바이러스를 분리하여 동정하기 위한 배양액 및 감염세포를 확보하였다. 11일간 발육시킨 계태아의 장노막과 양막에 가검물을 각각 0.2ml씩 접종하여 34℃에서 3일간 배양한 후 계태아를 4℃ 냉장고에 하루동안 넣어 둔 다음 양막액과 요막액을 채취하여 인플루엔자바이러스 배양액으로 사용한다.

4. 혈구응집시험 및 바이러스의 동정

기니아피그 심장에 혈액을 채취하여 혈구응집시험(hemagglutination test, HA test)용 인산완충액(PBS, pH7.2)으로 혈구를 3번 세척하여 적혈구가 1%농도가 되도록 한다. 96웰 플레이트에 바이러스 배양액을 1번 웰에 100ul 넣고 2번 웰부터 12번 웰까지 PBS 50ul을 넣어 1번 웰의 50ul를 취하여 2번 웰에 넣어 2배 단계희석한 후 12번 웰을 음성대조군으로 두고 1% 기니아피그 적혈구를 모든 웰에 50ul을 넣는다. 플레이트를 잘 진탕시켜 실온에서 1시간 정치시킨 후 응집이 일어나는 최종 웰의 희석배수 혈구응집의 HA 역가를 판독한다. 1:8 이상의 역가를 나타내는 검체에 대하여 2~3회 연속 단계대배양하여 역가가 높은 바이러스 항원을 준비하였다. 바이러스의 동정은 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin을 사용한 간접면역형광법(indirect fluorescent anti-body test, IFA)으로 동정하고 국립보건원 호흡기 바이러스과에 의뢰하여 HA 및

혈구응집억제시험(hemagglutination inhibition test, HI test)으로 아형과 항원특성을 검사한 후 일부는 미국 CDC(centers for disease control and prevention)에 있는 세계보건기구 인플루엔자 센터에 검체를 송부하여 재확인하였다.

5. 바이러스의 형태학적 특성

분리된 바이러스를 연속적으로 2~3회 계대하여 4% uranyl acetate에 약 1분간 negative stain한 다음, 전자현미경(JEM 1200 EX2, JEOL, TEM)으로 80 KV($\times 120$ K)에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 인플루엔자 환자의 발생양상

1999년 1월부터 12월까지 급성호흡기 환자 1686명의 인후 가검물에서 바이러스

를 분리한 결과 Table 1과 같이, 213주의 인플루엔자 바이러스가 분리되었으며, 인플루엔자 바이러스 중 203주는 A형, 10주는 B형으로 나타났다. 이 등¹³⁾이 1996년에서 1997년까지의 국내 급성 호흡기 환자의 바이러스를 분리하여 보고한 결과 A형 및 B형 바이러스의 분리율이 비슷한 경향을 나타내었으나, 본 연구 결과 A형이 현저하게 높은 비율로 분리되어 1998년의 분리양상과 유사한 결과를 나타내었다¹³⁾.

Influenza A/Beijing/262/95(H1N1)-like는 부산지역 인플루엔자 유행예측 조사과정에 1999년 1월에 5세 여아의 인후도찰물에서 분리하였는데 국내에서는 최초로 분리된 인플루엔자 바이러스이었다¹⁴⁾. 1999년 5월에 부산 소재 한 대학교의 학생들이 동남아시아(베트남, 필리핀) 항해 실습 운항 중의 배 안에서 감기몸살, 고열, 설사 등의 증세로 환자가 집단발생하였는데 역학조사와 시험결과에 의하면 세균은

Table 1. Number of influenza virus isolates from patient with respiratory disease in Pusan, 1999

virus	No. of patient		Total
	male	female	
InfluenzaA/Sydney/05/97(H3N2)-like	35	61	203
InfluenzaA/Beijing/262/95(H1N1)-like	59	48	
InfluenzaB/Harbin/07/94-like	3	7	10
Total	97	116	213

검출되지 않았고 인후도찰물 16건에서 인플루엔자 A(H3N2)형을 6건 분리하였으므로 인플루엔자 바이러스 감염에 의해서도 집단발생을 일으킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

2. 성별, 연령별 및 월별 인플루엔자 환자의 발생양상

인플루엔자 환자의 성별 및 연령별 발생 분포는 Table 1 및 Fig. 1과 같이 성별로는 총 213명의 환자 중 116명(54.5%)의 여성 환자가 97명(45.5%)의 남성 환자에 비해 다소 높은 발생 양상을 나타내었다. 연령별로는 10세 이하의 어린이의 경우 Influenza A/Beijing/262/95(H1N1)형이 절대적으로

높은 발병률을 나타내었으며, 0~10세에서 109명(46.9%)으로 대부분을 차지하였으며 10대 이상의 경우 각각 5~10% 범위 내로 비교적 낮은 발병률을 나타내었다. 특히 71~80세 사이에서는 0.43%로 거의 발병되지 않았으나 경제적인 부담 때문에 증세가 가벼운 환자들이 병원 진료를 기피하는 현상으로 발병률이 감소하였는지 여부는 확실하지 않다. 또한 월별 발병률(Fig. 2)은 99년 1월부터 4월까지 꾸준한 발병률을 나타내었으며, 특히 4월에 가장 높은 유행을 나타내었고, 5월에도 발병하였다. 이와 같은 결과는 1997년 및 1998년의 월별 발병률과^{1, 10)} 유사한 경향을 나타내었으므로 이러한 계절에 호흡기 질환의 예방에 특히 많은 주의를 기울여야 하고 6월에도

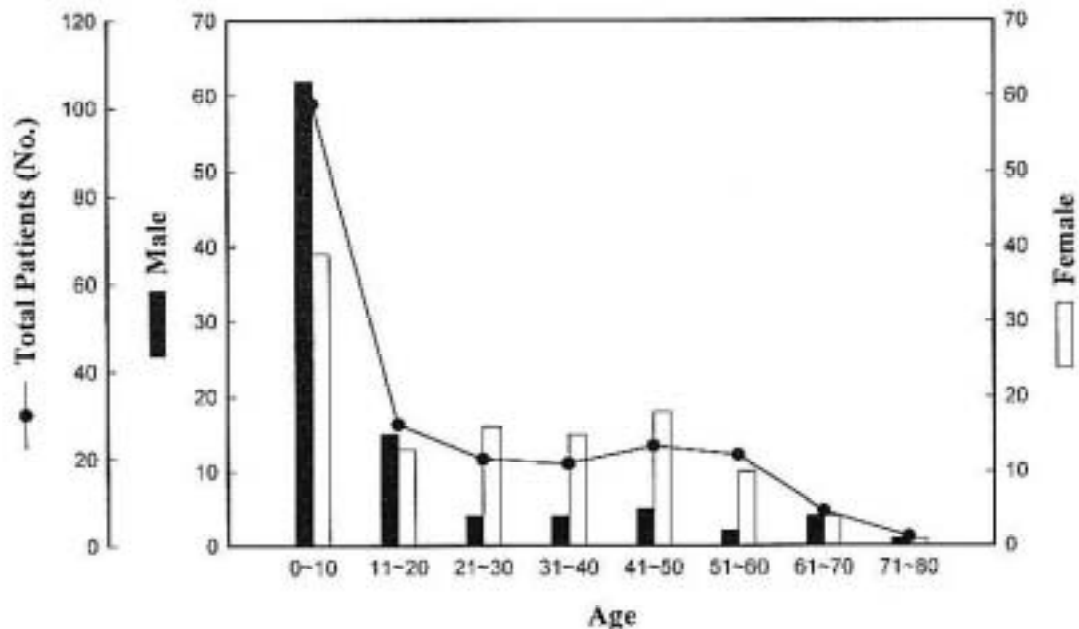


Fig. 1. Outbreak ratio of influenza patients by age and sex groups.

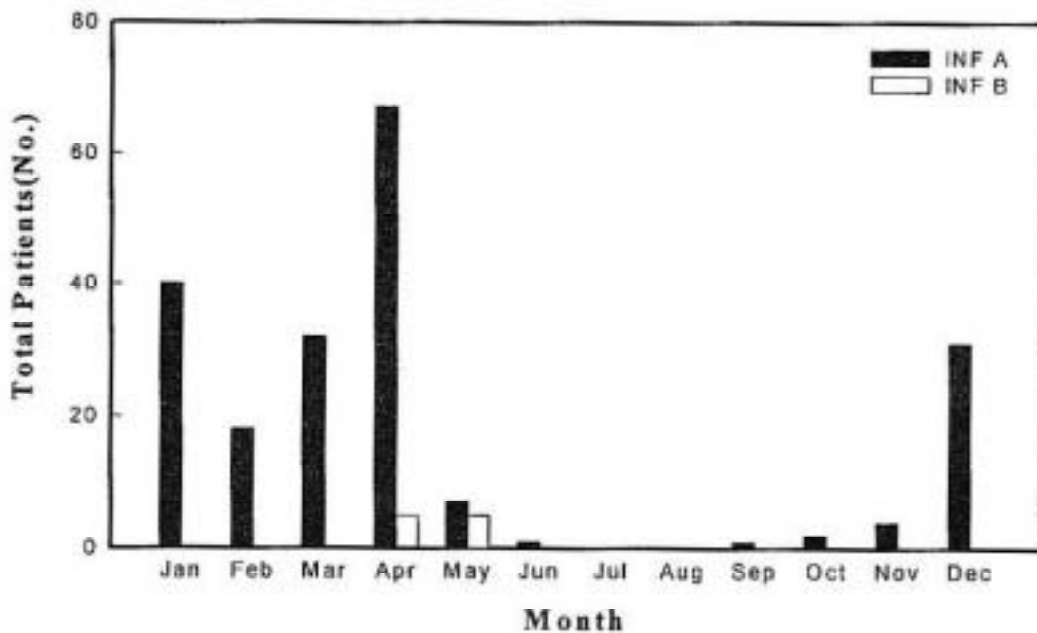


Fig. 2. Outbreak ratio of influenza patients by month.

Influenza A/Sydney/05/97(H3N2)-like가 1건 분리되었는데 인플루엔자 절기는 북반구에서 10월에서 다음 해 4월로 정하고 있으나 인플루엔자 감시체계는 1년 내내 이루어져야 하며, 그럼으로써 다음 절기에 유행할 인플루엔자 아형에 대한 예측이 가능하리라고 사료된다. 1999년 동절기의 첫 유행주로 9월 말경에 인플루엔자 A(H3N2)형을 부산에서 분리하여 국립보건원에서 확인시험한 후 미국 CDC에 있는 세계보건기구 인플루엔자 센터에 검체를 송부하여 확인 의뢰한 결과 Influenza A/Sydney/05/97(H3N2)-like 임이 확인되어 보건복지부에서 독감주의보가 내려졌고¹⁷⁾, 이 바이러스주는 10월과 11월에 서서히 유행하다가 12월에 유행성이

높았다(Fig. 2).

3. 세포병변 효과 및 혈구응집반응

환자의 인후가검물을 전처리하여 단층 배양한 MDCK 세포주에 접종한 결과 뚜렷한 세포병변 효과를 나타내었고(Fig. 3) 바이러스 배양액을 인산완충액으로 1:2에서 1:256까지 단계희석하여 1% 기니아피의 혈구로 혈구응집반응을 시험한 결과 인플루엔자 바이러스 항원은 혈구응집이 일어나는 최종 윌의 희석배수 1:16윌과 1:48(1:32와 1:64의 중간 희석배수)윌의 평균 희석배수인 1:32의 혈구응집 역가가 나타났다(Fig. 4).

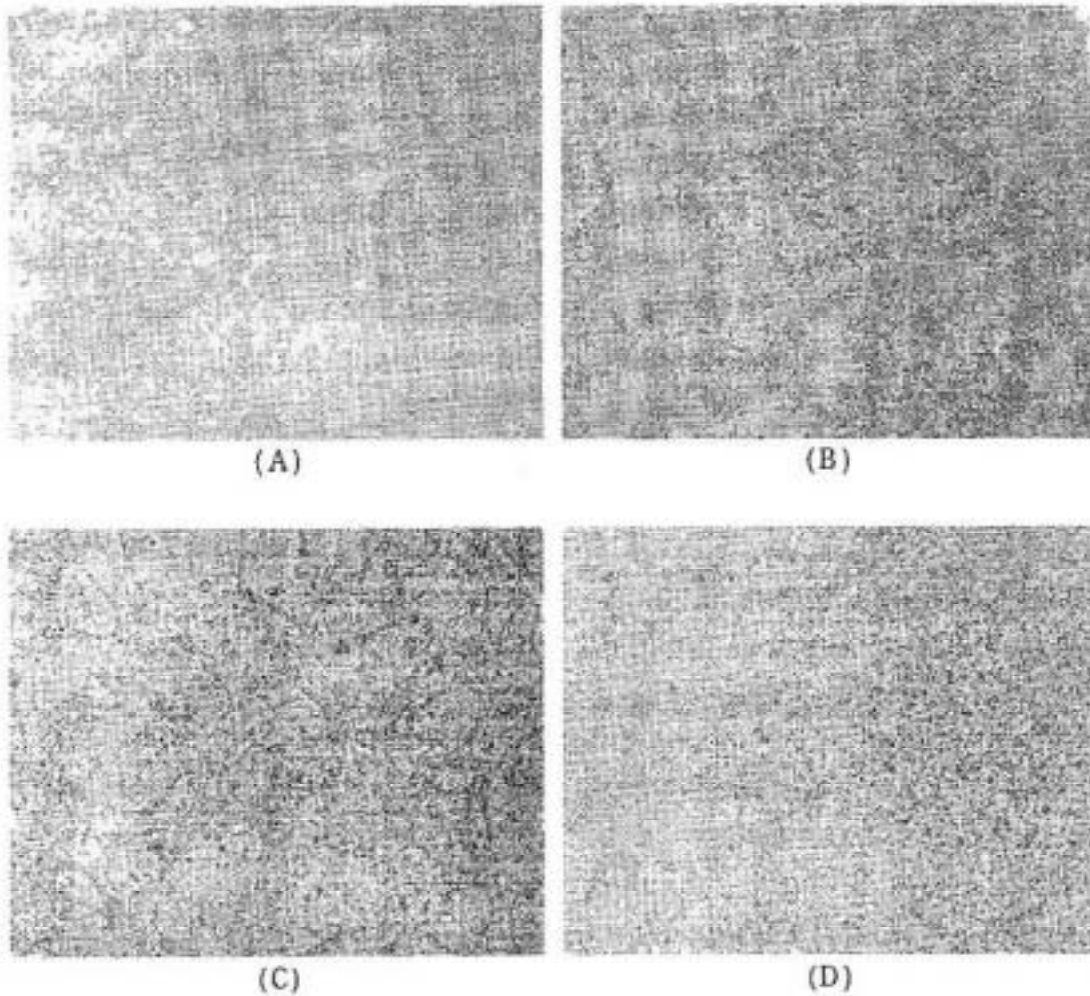


Fig. 3. Micrographs of CPE in the virus-infected cells. MDCK cells infected with no virus(A), influenza A virus(H1N1)(B), influenza A virus(H3N2)(C), influenza B virus(D), Magnification $\times 100$.

4. 인플루엔자 바이러스 분리주의 전자 현미경적 특징

바이러스를 증식·배양 및 분리하여 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 4와 같이 인플루엔자 A형(H1N1 및 H3N2, 4-A,B)은 85nm, 120nm, B형(4-C)은 70nm로서 모두

구형을 나타내었으며, 또한 A형은 바이러스 표면의 지질 이중층과 일정한 간격의 돌이 관찰되었는데, 이것은 neuraminidase, haemagglutinin 및 ion channel 등이 위치해 있었던 것으로 추측된다(Fig. 4).

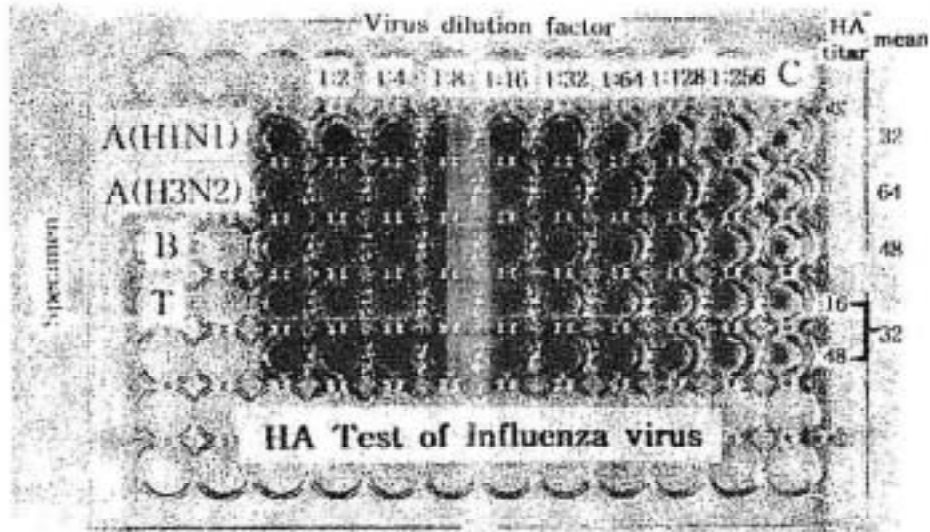


Fig. 4. Hemagglutinin test of influenzavirus antigen.
 A(H1N1) : Influenza A virus(H1N1), A(H3N2) : Influenza A virus(H3N2),
 B : Influenza B virus, T : test, C : control, HA : Hemagglutination.

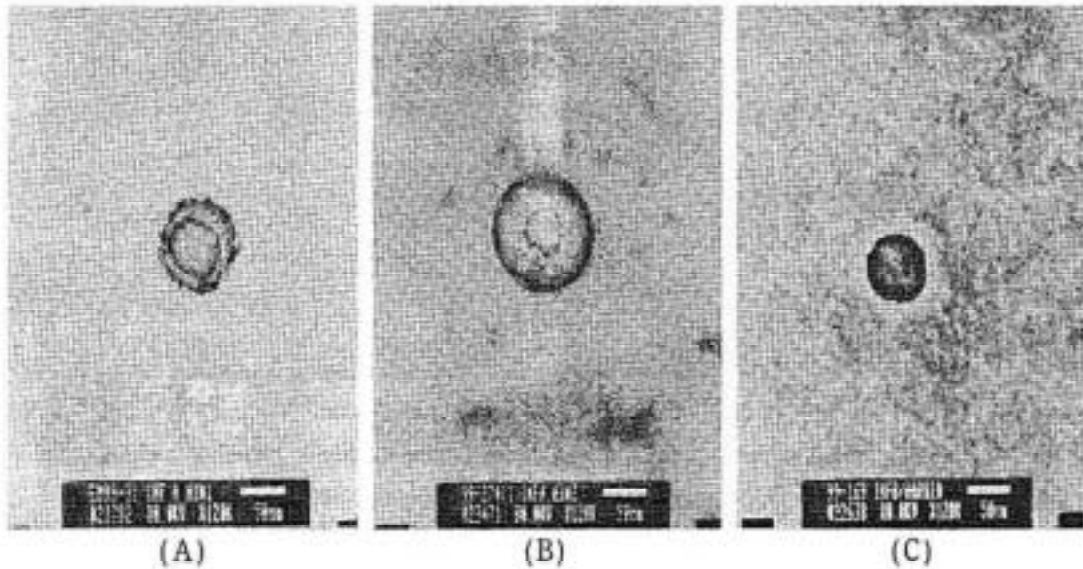


Fig. 5. Transmission electron micrographs of virus isolates.
 Influenza A virus(H1N1)(A), influenza A virus(H3N2)
 (B), influenza B virus(C).

5. 바이러스의 항원 특성

분리한 인플루엔자 바이러스의 아형 결정을 위하여 혈구응집 억제시험 및 간접면역형광법을 실시한 결과 203주의 A형 바이러스 중 96주는 A/Sydney/05/97(H3N2) 유사주였으며, 107주는 A/Beijing/262/95(H1N1) 유사주로 확인되었다. B형으로 확인된 10주는 모두 B/Harbin/07/94 유사주로 판정되었다. WHO 보고¹²⁾ 결과 아시아에서는 A형보다 B형이 많이 분리되었으나 일본에서는 A형이 대다수로 나타났다. 이와 같이 인플루엔자 유행양상은 다소 차이를 보이고 있으나 본 연구 결과는 일본에서의 발생양상과 유사하게 나타났다. 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 호흡기 질환은 폐렴증상이 가장 심하고 모세기관지염과 croup이 중요한 원인 질환이라고 보고^{8, 15)} 되었으며, 선행질환을 가지고 있으면서 인플루엔자 A형에 감염된 환자의 9.3%가 사망하였다¹⁶⁾. 본 연구에서는 환자 개개인의 임상증상 및 경과에 관하여 조사하지 못하였으므로 환자의 병력에 관해서는 자료화 할 수 없을 뿐 만 아니라 부산지역만을 대상으로 조사되었으므로 일차적으로 부산지역에서의 호흡기 감염 양상을 이해하는 데는 무리가 없다고 하겠으나 본격적으로 이용되기까지는 앞으로 상당기간에 걸쳐 자료의 축적이 이루어져야 할 것으로 생각된다. 인플루엔자와 같이 항원성의 변이가 심한 병원체의 경우 해마다 빈번한 유행을 일으키고 있어 이로 인한 경제적 손실이 적지 않다. 항원대변이에 의한 인플루엔자 A 바이러스의

유행주기는 10~15년이며, 인플루엔자 B 바이러스는 3년을 유행주기로 보고 있기 때문에 인플루엔자 유행에 대한 신속한 정보수집, 병원체 변화의 예측, 예방접종의 효율성 평가 등을 통하여 그 피해를 최소화할 수 있는 적절한 방역 대책이 수립되어야 하는 질환의 하나로서 2000년 8월에 제3군 전염병으로 개정되었으므로 인플루엔자 유행예측을 보다 더 신속히 파악하고 역학조사를 함으로써 인플루엔자 독감의 유행을 연구하는 기초적인 자료로서의 의미는 클 것으로 기대된다.

요 약

인플루엔자에 대한 역학적 기초자료로 이용하고자 1999년 1월부터 12월까지 부산지역 10개소 지정병원의 외래 또는 입원한 환자의 발생양상과 분리된 바이러스의 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 1999년 1월부터 1999년 12월까지 부산지역 호흡기 환자 1686명의 인후 가검물로부터 213주의 인플루엔자 바이러스가 분리되었으며, 이 중 203주는 A형, 10주는 B형으로 나타났다.
2. 인플루엔자 환자의 성별 및 연령별 발생분포는 여성 환자가 54.5%로서 남성 환자의 45.5%에 비해 다소 높은 발생양상을 나타내었으며, 10세 이하의 환자가 46.9%로 대부분을 차지하였다. 또

한 유행 발생양상은 1999년 1월부터 4월까지 지속적인 발생을 나타내었으며, 12월에 한차례의 발생을 나타내었다.

3. 분리한 A형 바이러스 중 96주는 A/Sydney/05/97(H3N2) 유사주였으며, 107주는 A/Beijing/262/95(H1N1) 유사주로 확인되었으며, B형으로 확인된 10주는 모두 B/Harbin/07/94 유사주로 판정되었다.
4. Influenza A/Beijing/262/95(H1N1)-like는 1999년 1월에 부산판내 병원에 입원한 5세 여아의 인후도찰판에서 분리하였는데 국내 최초분리 인플루엔자 바이러스주이었다.
5. 1999년 5월에 부산 소재 한 대학교 학생들의 항해실습 운항 중에 배 안에서 감기몸살, 고열, 설사 등의 증세를 나타내는 환자가 집단발생하였는데 인후도찰판 16건에서 인플루엔자 A(H3N2)형을 6건 분리하였다.
6. 1999년 동절기의 첫 유행주로 9월말경에 Influenza A/Sydney/05/97(H3N2)-like를 부산에서 일찌기 분리하여 보건복지부에서 독감 주의보가 내려졌다.

감사의 글

바이러스 확인 및 동정시험에 도움을 주신 국립보건원 호흡기계 바이러스과 과장님, 연구관님, 선생님들께 감사드리며,

검체 채취에 적극적으로 협조하여 주신 부산시 10개 지정 병·의원의 원장님, 소아과장님, 전공의 선생님, 16개 보건소 진료실 의사 선생님들께 진심으로 감사드립니다. 그리고 기니아피그를 사육하면서 혈액을 채취하여 주신 축산물위생검사소 실험실 선생님들께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. Cho, K.S., K.Y. Jeong, I.H. Cha, Isolation of influenza Virus from patients with respiratory disease in Busan, 1997. *K. J. Life Sci.* 8. 667~672, 1998.
2. Kilbourne E.D. Influenza. Plenum Medical Book, New York, 1987
3. Kim J.K. Y.B. Cho, and S.B. Paik. Studies on the antigenicity of influenza virus isolated from patients in 1982. Report *NIH Kor.* 20. 141~145, 1983.
4. Lamb, R.A. The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. pp. 21-69. In P. Palese and D.W. Kingsbury (eds.). *Genetics of influenza viruses.* Springer-Verlag, New York, 1983.
5. Leland, D.S. Concepts of clinical diagnostic virology. pp. 3~43. In Lennette E.H.(ed.). *Laboratory diagnosis of viral infections(2nd ed.)*. New York. Marcel Dekker, Inc. 6. Lindstrom, S., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, P. Huang, S.H. Xi

- and K, 1992.
6. Lindstrom, S., S. Sugita, a. Endo, M. Ishida, P. Huang, S.H. Xi and K, Nerome. Evolutionary characterization of recent human H3N2 influenza A isolates from Japan and China: novel changes in the receptor binding domain. *Arch. viol.* 141. 1349~1355, 1996.
 7. M'kel, M., T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Leinonen, P. Saikku, M. Kimpimaki, S. Blomqvist, T. Hyypia, and P. Arstila. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J. Clin. Microbiol.* 36. 539~542, 1998.
 8. Martin, W. Influenzaidiagnosis, management, and prophylaxis. *B. M. J.* 308. 1341~1345, 1994.
 9. Richey, M.B., P. Palese, and E.D. Kilbourne. RNAs of influenza A, B and C viruses. *J. Virol.* 18. 738~744, 1976.
 10. Scholtissek, C., W. Rohde, V. von Hohnigen, and R. Rott. On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. *Virology.* 87. 13~20, 1978.
 11. Sweet, C. and J. Smith. Pathogenicity of influenza virus. *Microbiol. Rev.* 44. 303~330, 1980.
 12. WHO : Influenza weekly epidemiological record. 72. 130~131, 1997.
 13. 조경순, 정구영, 구평대, 민상기, 김병준, 빈재훈. 1998년 부산지역에서 인플루엔자 바이러스의 분리. 부산광역시 보건환경연구원보. 9. 40~47, 1999.
 14. 이남용, 기창석, 김수정, 이용화, 정규영, 이상렬, 김지희. 1996~1997년 겨울철에 유행한 인플루엔자의 임상역학적 분석 및 원인 바이러스의 분리. 감염. 29. 263~270, 1997.
 15. 이환중, 윤보영, 김미란, 윤종구. 소아급성하기도 감염의 원인 바이러스 및 이의 유행양상. 감염. 27. 319~332, 1995
 16. 부산일보, 국제신문, 베이징 A형 독감 바이러스 국내 첫 발견. 1995. 2. 5.
 17. 부산일보, 국제신문, 인플루엔자 독감환자 부산에서 전국 첫 발견. 1999. 10. 14.