

1997년도 부산지역 호흡기환자로부터
인플루엔자 바이러스의 분리

조경순 · 민상기 · 구평태 · 김병준 · 김성준 · 정구영

역 학 조 사 과

1997년도 부산지역 호흡기환자로부터 인플루엔자 바이러스의 분리

역학조사과

조경순 · 민상기 · 구평태 · 김병준 · 김성준 · 정구영

Isolation of Influenza virus from Patients with Respiratory Disease in Pusan, 1997

Epidemiology Division

K. S. Cho, S. K. Min, P. T. Ku, B. J. Kim, S. J. Kim, K. Y. Jeong

Abstract

This study was done to detect the causative agent of patient with respiratory disease in Pusan, 1997. Male and female patients with respiratory disease in Pusan, 1997, were 31.9% and 68.1%, respectively. In the aspect of outbreak by month, patients with respiratory disease were mostly concentrated at February, March, April, October,

November and December. Fifteen strains of influenza virus were isolated from 1,268 swabbed samples of throat, thirteen strains and 2 strains among 15 isolates were classified with influenza A and B virus, respectively. One of 13 influenza A virus was confirmed as A/Johannesburg/33/94-like strain, and the other isolates of influenza A virus were confirmed as A/Sydney/05/97-like strains. Two isolates of influenza B virus were confirmed as B/Beijing/08/93-like strains.

Key Words : respiratory disease, influenza, virus

I. 서 론

호흡기 질환은 바이러스를 포함하여 박테리아, 마이코플라즈마, 클라미디아 등의 많은 미생물들이 단독 또는 복합감염의 형태로 나타날 수 있다. 이들중 바이러스에 의한 호흡기 질환은 계절적인 특성에 따라서 감염율에 많은 차이를 나타내고, 강한 전파력으로 집단적인 발생양상을 나타내며, 높은 이환율과 유행율을 보임으로써 공중보건학적인 중요성이 증대되고 있다⁽¹⁾. Virus에 의한 호흡기 질환의 원인체들은 orthomyxovirus, paramyxovirus, adenovirus 및 picornavirus 등 여러 종류의 바이러스가 관여하는 것으로 알려져 있다⁽²⁾. 이들 중 orthomyxovirus에 속하는 influenza virus는 envelope 를 보유하는 RNA virus로써 우리나라를 비롯한 세계 여러 지역에서 가장 흔한 호흡기 질환의 원인 바이러스 중의 하나이며⁽⁴⁾, 균 특이항원인 nucleoprotein과 matrix protein의 교차반응에 의하여 A, B 및 C의 세가지 형으로 분류된다⁽⁶⁾. 이들 중 A와 B형이 사람에서의 influenza 원인으로 널리 알려져 있고⁽⁶⁾ C형은 산발적인 소규모 발생에 국한되고 있다. Influenza virus는 RNA가 분절화되어 있기 때문에 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)가 상호 독립적으로 변이를 일으켜 항원의 변이가 다양하며, 이들 항원변이에 의해 바이러스의 아형이 결정된다. Influenza virus의 감염에 의한 임상증상은 무증상에서부터 원발성 바이러스성 폐렴까지 다양한 임상상을 나타낸다. 잠복기는 대체로 24시간에서 4~5일이며, 잠작

스러운 두통, 오한, 마른기침과 같은 증상을 시작으로 발열, 근육통, 쇠약, 식욕부진으로 이어지며, 여러가지 합병증과, 세균감염과 복합된 폐렴 및 중추신경계 증상까지도 나타내는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 호흡기 환자에 대한 역학의 기초자료를 제공하기 위하여 1997년도 부산시에 있는 4개소의 지정병원에 내원한 호흡기환자를 대상으로 월별 및 연령별 발병추이를 조사하고 환자 가검물로부터 influenza virus를 분리하여 분리주의 특성을 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

1997년 1월부터 12월까지 부산시내의 지정병원 4개소에 호흡기 질환으로 내원한 환자 1,268명의 인후부를 멸균된 면봉으로 도찰하여 채취하였고, 이를 바이러스 수송용 배지(virus transport medium; Difco)에 넣어 실험실로 신속히 운반하여 바이러스 분리를 위한 재료로 하였다.

2. 세포주

국립보건원 호흡기바이러스과로부터 분양받은 MDCK (Mardin-Darby canine kidney) 세포주를 penicillin(5units/ml)/streptomycin(5 μ g/ml)과 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 EMEM을 기본배지로하여 5%의 CO₂ 농도를 유지하는 CO₂ incubator에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다.

3. 바이러스의 분리 및 동정

검체를 전처리하기 위하여 면봉을 제거한 바이러스 수송용 배지에 penicillin(5 units/ml)/streptomycin(5 μ g/ml) 및 nystatin(1,000units/ml)을 첨가하여 잘 혼합한

다음 4℃에 1시간 동안 방치하였다. 이를 3,000rpm으로 20분간 4℃에서 원심분리한 후 상층액 0.3ml를 24-well 배양용기에 단층배양시켜 놓은 MDCK (Mardin-Darby canine kidney) 세포주에 3 well씩 다중접종하고 5% CO₂, 34℃의 조건으로 10일간 배양하면서 현미경으로 매일 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 세포병변효과를 나타내는 검체는 2~3회 연속 계대배양하여 역가를 증가시킨 후 바이러스를 분리하였고, 동정을 위한 배양액 및 감염세포를 확보하였다. 한편, 동일 검체 1ml를 10~11일령의 계태아 난황낭에 접종하여 34℃에서 3일간 배양한 다음, 양막 및 요막액을 채취하였고, 혈구 응집시험(hemagglutination test; HA test)으로 1:8 이상의 역가를 나타내는 검체에 대하여 역시 2~3회 연속 난계태아 배양하여 역가가 높은 바이러스 배양액을 준비하였다. 바이러스의 동정은 국립보건원 호흡기계 바이러스과에 의뢰하여 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin을 사용한 간접면역형광법(indirect fluorescent antibody test, IFA)으로 동정하고 혈구 응집 시험(hemagglutination test; HA test) 및 혈구 응집 억제시험(hemagglutination inhibition test; HI test)으로 아형과 항원특성을 검사한 다음, 미국 CDC (Centers for Disease Control and Prevention)에 재의뢰하여 확인하였다.

4. Influenza virus의 형태학적 특성

분리된 인플루엔자 바이러스를 연속적으로 2~3회 계대하여 4% Uranyl acetate에 약 1분간 negative stain한 다음, 전자현미경 (Transmission electron microscope, TEM)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성별, 연령별 및 월별 호흡기 환자의 발생 양상

1997년 1월부터 12월까지 부산시내의 지정병원 10개소에 내원한 호흡기 환자의 성별 및 연령별 발생분포는 Fig. 1과 같다. 성별로는 총 1,268명의 환자중 863명

(68.1%)의 여성환자 및 405명(31.9%)의 남성 환자가 내원하여 여성이 남성보다 약 2배정도 높은 발병률을 나타내었으며, 연령별로는 50대(24.6%), 60대(23.3%), 40대(15.8%)가 대부분이었고, 10세 이하의 어린이는 3.2%의 발병률을 보였다.

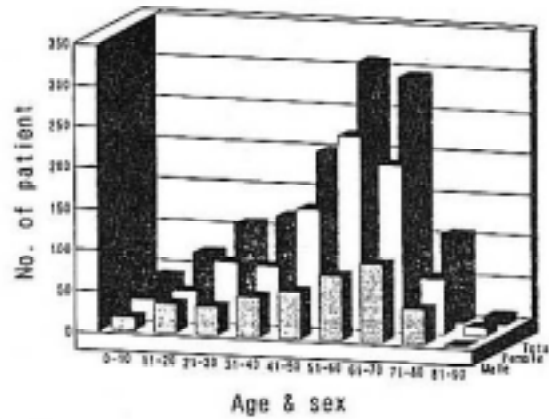


Fig. 1. Outbreak frequency of patient with respiratory disease by age and sex.

호흡기 환자의 월별 발생분포는 Fig. 2와 같이 2월, 3월, 4월, 10월, 11월, 12월에 10% 이상의 높은 발병율을 나타내어 4% 미만의 발병율을 나타낸 5월, 6월, 7월, 8월, 9월과 대조적이었다.

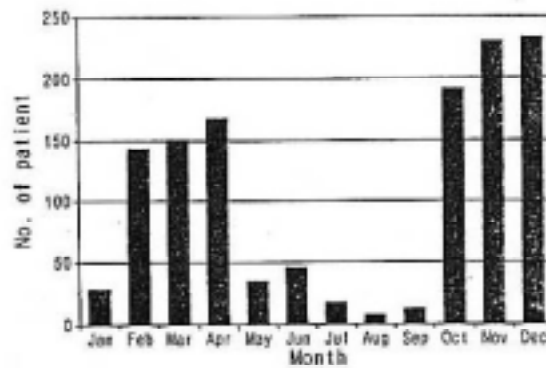


Fig. 2. Outbreak frequency of patient with respiratory disease by month.

호흡기 질환은 다양한 원인으로 유발될 수 있으나¹⁴⁾ 각각의 원인에 의한 임상 증상이 서로 유사한 경우가 많아 진단에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 1997년 한해 동안 부산지역의 호흡기 환자 발생양상을 검토한 결과 남성보다 여성환자가 더 많았으며, 연령별로는 유아나 어린이보다 성인이 더 많은 호흡기 질환을 앓고 있다는 것이 확인되었다. 그러나 호흡기 질환의 예방, 진단 및 치료에 필요한 역학의 기초자료로는 본 연구에서 검토된 자료 외에 원인 또는 증상에 따른 광범위한 자료의 수집이 필요하며, 이러한 자료의 조사가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 월별 호흡기 환자의 발생 추이를 살펴 본 결과, 봄철인 3, 4월과 가을에서 겨울에 이르는 10, 11, 12월에 집중적으로 발생하여 이러한 계절에 호흡기 질환의 예방에 특히 많은 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다.

2. 인플루엔자 바이러스의 분리

1997년 1월부터 12월까지 호흡기환자 1,268명의 인후부 가검물로부터 인플루엔자 바이러스를 분리한 결과는 Table 1과 같다. 호흡기환자의 가검물로부터 모두 15주의 인플루엔자 바이러스가 분리되었으며, 이들 중 13주는 A형, 2주는 B형 인플루엔자 바이러스로 분류되었다.

Table 1. Number of influenza virus isolates from patient with respiratory disease in Pusan, 1997

No. of patient	No. of isolates		Total
	Influenza A	Influenza B	
Male 405	5	0	5
Female 863	8	2	10
Total 1,268	13	2	15

이 등¹⁰⁾은 1996년에서 1997년까지 국내의 급성 호흡기 환자 461명 중 58명으로부터 A형, 다른 40명의 환자로부터 B형 인플루엔자 바이러스를 분리하여 보고한 바 있다.

본 연구에서의 분리율이 이들 연구자들의 분리율보다 현저하게 낮은 것은 가검물 채취시에 환자의 임상증상에 관계없이 모든 호흡기 환자를 대상으로 하였기 때문인 것으로 추측된다. 또한 이 등¹¹⁾이 1990~1991년이 겨울철에 인플루엔자 A형 31례와 B형 11례를 분리하였고, 인플루엔자 A형의 경우 22주가 6세 미만의 어린이 및 유아로부터 분리되었으며, 인플루엔자 B형의 경우는 6세 이상에서 과반수 이상으로 분리되었다고 보고하였다. 본 연구에서 인플루엔자 바이러스가 분리된 환자의 연령층은 10대에서부터 50대까지 다양하게 분포하였고 10세 미만의 어린이나 유아로부터는 분리되지 않아 이 등¹¹⁾과 상이한 결과를 나타내었다.

3. 인플루엔자 바이러스 분리주의 전자현미경적 특징

환자의 인후두 가검물을 전처리하여 단층배양된 MDCK 세포주에 접종한 결과 명확한 세포변성 효과를 나타내어 (Fig. 3) 바이러스를 증식, 배양 및 분리할 수 있었다. 이들 인플루엔자 바이러스를 negative stain으로 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 형태학적으로 A형은 구형, B형은 난원형에 가까운 형태를 보였다. 또한 바이러스 표면의 lipid bilayer 층이 명확하게 관찰되었고 (Fig. 4의 A), Fig. 4의 B에서와 같이 바이러스 표면 가장자리에 일정한 간격의 틈이 관찰되었는데 이는 neuraminidase, haemagglutinin, ion channel 등이 위치해 있던 곳으로 추측된다.

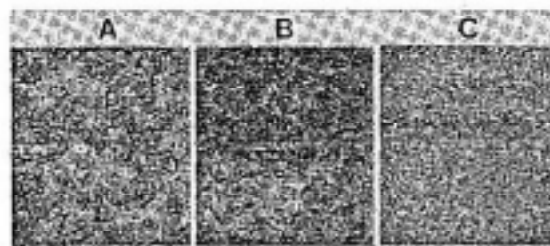


Fig. 3. Cytopathic effect on MDCK cell monolayers infected with influenza virus isolates. A, 72-h exposed to A/Sydney/05/97-like strain (A-12 strain) ; B, 72-h exposed to B/Beijing/184/93-like strain (B-2 strain) ; C, monolayered MDCK cell

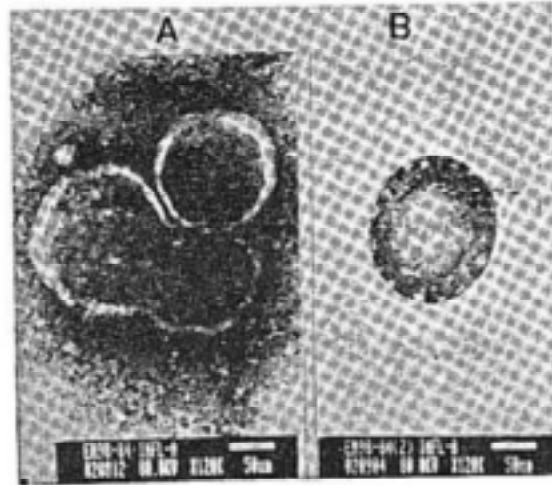


Fig. 4. Transmission electron micrographs of influenza virus isolates. A, A/Sydney/05/97-like strain (A-12 strain) ; B, B/Beijing/184/93-like strain (B-2 strain)

4. 바이러스의 항원 특성

분리한 인플루엔자 바이러스의 아형결정을 위하여 혈구 응집 억제시험을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 혈구 응집 억제 시험 결과 분리한 15주 중 13주가 A형 인플루엔자 바이러스로, 2주가 B형 인플루엔자 바이러스로 확인되었다. A형으로 확인된 13주 중 12주는 A/Sydney/05/97 (H3N2) 유사주였으며, 1주는 A/Johannesburg/33/94 (H3N2) 유사주로 확인되었다. B형으로 확인된 2주의 분리주는 모두 B/Beijing/08/93 유사주로 판정되었다.

인플루엔자는 해마다 전 세계적인 유행을 일으키는 급성 호흡기 질환으로 높은 이환율과 사망율을 보인다. WHO²²⁾는 1996년 10월부터 1997년 3월에 걸쳐 북반구에서 중등도 이상의 인플루엔자 유사 질환이 발생되었으며, 아시아에서는 A형보다 B형이 많이 분리되었으나 일본에서는 A형이 대다수 였다고 보고하였다. 이와 같은 최근 인플루엔자 유행양상은 저자들의 연구 결과와 다소 차이를 보이고 있으나 일본에서의 발생 양상과는 유사하다는 것을 알 수 있다. 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 호흡기 질환은 A형과 B형에 관계없이 폐렴증상이 가장 심하고 모세기관지염과 croup이

Table 2. Hemagglutination inhibition test of influenza virus isolates

Isolates	Antiserum*							
	B/Bei	B/Gua	A/Joh/33	A/Wuh	A/Nan	A/Sou	A/Joh	A/Syd
A- 1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80
A- 2	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10
A- 3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40
A- 4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80
A- 5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160
A- 6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320
A- 7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320
A- 8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320
A- 9	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320
A-10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320
A-11	<10	<10	<10	160	160	320	320	1280
A-12	<10	<10	<10	80	80	160	160	1280
A-13	<10	<10	<10	320	160	640	320	1280
B- 1	640	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
B- 2	1280	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

*, B/Bei : B/Beijing/184/93 ; B/Gua : B/Guangdong/08/93 ; A/Joh/33 : A/Johannesburg/33/94 ; A/Wuh : A/Wuhan/359/95 ; A/Nan : A/Nanchang/933/95 ; A/Sou : A/South Africa/1147/96 ; A/Joh : A/Johannesburg/03/97 ; A/Syd : A/Sydney/05/97

중요한 원인질환이라고 보고된 바 있으며^{11,13}, 이 등¹⁰은 선행질환을 가지고 있으면서 인플루엔자 A형이 분리되었던 환자의 9.3%가 사망하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 환자 개개인의 임상증상 및 경과에 관하여 조사하지 못하였기 때문에 환자의 병력에 관하여는 자료화 할 수 없었다. 또한 본 연구는 부산지역의 호흡기 환자만을 대상으로 하였기 때문에 전국적인 인플루엔자 발생이나 유행과는 다소 차이가 있을 것으로 사료된다. 그러나 인플루엔자 발생 및 원인 바이러스의 분리에 관한 자료가 부족한 현실정에서 본 연구 결과는 인플루엔자에 대한 중요한 역학적 기초자료가 될 것으로 기대된다.

IV. 결 론

인플루엔자에 대한 역학적 기초자료로 이용하고자 1997년 부산지역에 있는 지정병원 4개소를 내원한 호흡기 환자의 발생양상과 인플루엔자 바이러스를 분리한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 1997년 부산지역 호흡기 환자의 성별 발생양상은 여성이 68.1%, 남성이 31.9%로 여성이 약 2배정도 높은 호흡기 질환을 나타내었다. 연령별로는 50대(24.6%), 60대(23.3%), 40대(15.8%)가 대부분이었으며, 10세이하의 어린이 및 유아 호흡기 환자는 3.2%로 낮은 분포율을 나타내었다. 또한 월별 발생양상은 2, 3, 4, 10, 11, 12월에 다발하는 것으로 나타났다.
2. 인플루엔자 발병률의 연령별로는 10대(33.6%), 20대(26.7%), 40대(20%), 50대 이상(13.3%), 30대(6.7%) 순서로 나타났다.
3. 호흡기 환자 1,268명의 인후부 가검물로부터 15주의 인플루엔자 바이러스가 분리되었으며, 이들 중 13주는 A형, 나머지 2주는 B형 인플루엔자 바이러스로 확인되었다.
4. 분리된 A형 인플루엔자 바이러스 13주 중 12주는 A/Sydney/05/97(H3N2) 유사주로, 1주는 A/Johannesburg/33/94(H3N2) 유사주로 확인되었으며, 2주의 B형 인플루엔자 바이러스는 모두 B/Beijing/08/93 유사주로 확인되었다.

V. 참고문헌

1. Regional office for the western pacific, WHO, 1987, *Regional workshop on acute respiratory infection*. Manila, Philippines.

2. Mandell, G. L., Douglas, R. G. and Bennett, J. E., 1990, *Principles and practice of infectious disease*, 3rd ed., vol I, 489-493.
3. Numazaki, Y., Oshima, T., Ohmi, A., Tanaka, A., Oizumi, Y., Komatsu, S., Takagi, T., Karahashi, M. and Ishida, N., 1987, A microplate method for isolation of viruses infants and children with acute respiratory infections, *Microbiol. Immunol.*, 31, 1085-1095.
4. 이남용, 기창석, 김수정, 이용화, 정규영, 이상일, 김지희., 1997, 1996-1997년 겨울철에 유행한 인플루엔자의 임상역학적 분석 및 원인바이러스의 분리, *감염*, 29, 263-270.
5. Ray, C. G., 1994, Influenza, respiratory syncytial virus, adenovirus, and other respiratory viruses. 451-466, In Ryan, K. J. : *Sherris medical microbiology an introduction to infectious disease*. 3rd ed. Prentice-Hall International Inc.
6. Ritchey, M. B., Palese, P. and Kilbourne, E.D., 1976, RNAs of influenza A, B, and C Viruses, *J. Virol*, 18, 738-744.
7. Ebisawa, I. T., Kitamoto, O., Takeuchi, Y. and Makino, M., 1969, Immunocytologic study of nasal epithelial cells in influenza. *Am. Rev. Respir. Dis*, 99, 507-515.
8. Louri, D. B., Blumenfeld, H. L., Ellis, J. T., Kilbourne, E. D. and Rogers, D. E., 1959, Studies on influenza in the pandemic of 1937-58. II. Pulmonary complications of influenza, *J. Clin. Invest*, 38, 213-265.
9. Stuart-Harris, C. H., 1965, *Influenza and other virus infections of the respiratory tract*, Edward Arnold Ltd, London.
10. 이환중, 윤보영, 김미란, 윤종구., 1995, 소아 급성 하기도 감염의 원인 바이러스

및 이의 유행양상, 감염, 27, 319-332.

11. WHO, 1997, *Influenza weekly epidemiological record*, 72, 130-131.

12. Martin, W., 1994, Influenza : diagnosis, management, and prophylaxis., *B. M. J.*, 308, 1341-1345.