1998－1999년 절기에 부산지역에서 유행한 급성호흡기 질환의 바이러스 분리

조경순 · 진성현 · 이주현 · 이채남 · 빈재훈

역 학 조 사 과

부산광역시 보건환경연구원보 제 9 집, Page(12 ~ 26), 1999.
Rep. Pusan Inst. Health & Environ. Vol.9, Page(12 ~ 26), 1999.

1998-1999년 절기에 부산지역에서 유행한 급성호흡기 질환의 바이러스 분리

역 학 조 사 과

조경순 · 진성현 · 이주현 · 이채남 · 빈재훈

Isolation and Identification of Respiratory Disease Virus in Pusan,1998-1999

Epidemiology Division

K. S. Cho, S. H. Jin, J. H. Lee, C. N. Lee, J. H. Bin

Abstract

This study was performed to monitor the causative agent of patient with respiratory disease in Pusan, 1998-1999. The results obtained were as follows. Among 1,320 cases of specimens from throat swab, influenzavirus infections were detected 232, adenovirus infections were in 14, coxsackievirus infections were in 11, and echovirus

infections were in 2. The 222 strains out of 232 strains of influenzavirus showed A-type and the rest of them represented B-type. The outbreak pattern for sex- and age-groups is as follows. The male outbreak was similar to the female outbreak : male outbreak, 47.4% and female outbreak, 52.5%. Most of the patients was less than 10 years old. The monthly influenza outbreak was consistent from Dec. 1998 to Apr. 1999. and The 113 strains from the A-type isolates was A/Sydney/05/97 (H3N2)-like, the 109 strains A/Beijing/262/95(H1N1)-like, and all of the 10 B-type isolates B/Harbin/07/94-like. Electron micrograph of negative-stained showed about 95 nm and about 71 nm with influenzavirus and adenovirus, respectively. coxsac kievirus and echovirus showed non-enveloped, isometric particle of about 30 nm diameter.

Key words : respiratory disease, influenza, virus

Ⅰ. 서 론

급성 호흡기질환을 일으키는 호흡기 바이러스는 respiratory syncytial virus(RSV), 아데노바이러스, 인플루엔자바이러스, 파라인플루엔자바이러스, 라이노바이러스, 레오바이러스, 코로나바이러스, 장바이러스가 있다(Leland 1982 : Mäkelä et al. 1998).

인플루엔자바이러스는 Orthomyxoviridae에 속하며, 인플루엔자 A와 B 바이러스 및 C 바이러스의 두 개의 속을 갖는다. A형은 가장 유행 빈도가 높으며 항원변이도 자주 일어나며 범세계적 대유행의 주역이 되고 있고, B형은 일반적으로 국지적인 유행에 한정되며 항원변이도 A형 보다 적게 일어나고 그 기간도 다소 늦다. 그리고 C형은 현1제까지 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 분절의 단일가닥 RNA를 가지는 반면, C 바이러스는 구조적으로는 A, B 바이러스와 유사하나 7개 분절의 RNA를 갖는다

(Richey et al. 1976 ; Lamb 1983). 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 변이바이러스가 유행하고 있으며 홍콩 인플루엔자라고 부르고 있다(Lindstrom et al. 1996 ; Kim et al. 1983 ; Scholtissek et al. 1978). 인플루엔자바이러스 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, 마른기침으로 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(Kilbourne 1987 ; Sweet et al. 1980).

아데노바이러스는 1953년 열성질환이 있는 군인과 편도절제술을 받은 어린이의 선조직을 조직 배양함으로써 처음 분리된 이후, 현재 1형부터 47형까지 모두 47형의 종류가 밝혀져 있으며, 영아기 호흡기 감염의 5~8%에서 원인이 되는 것으로 그 외 인두 결막염, 유행성 결막 각막염, 출혈성 방광염, 급성설사, 장중첩증 및 뇌염 등 여러 가지 질환의 원인이 되고 있다(이 1998).

장내바이러스는 RNA 바이러스인 피코나바이러스에 속하며, 폴리바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스 및 엔테로바이러스로 분류된다. 콕사키바이러스와 에코바이러스는 분변·구강경로에 의하여 무균성 뇌막염 등을 일으키지만, 포말 감염에 의하여 감기 및 가벼운 열성질환을 나타내는 급성상부 호흡기도 감염증도 일으킬 수 있다.

본 연구는 호흡기계 바이러스의 분리 및 항원 분석을 통하여 미래의 전염성 유행에

대처하기 위한 역학적 기초자료를 제공하고자 1998년 10월부터 1999년 6월까지 부산광역시의 10개 감시지정병원의 외래 또는 입원한 급성호흡기 감염증 환자를 대상으로 월별 및 연령별 발생추이를 조사하고 환자 가검물로부터 호흡기계 감염 바이러스를 분리하여 그 특성을 살펴보고자 한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 공시재료

1998년 10월부터 1999년 6월까지 부산광역시의 10개 감시지정병원의 외래 또는 입원한 급성호흡기 감염증 환자로부터 1320건의 인후가검물을 채취하였다. 채취한 가검물은 바이러스 수송용배지(virus transport medium, Difco)에 넣어 냉장온도를 유지하면서 실험실로 운반하여 바이러스 분리에 사용하였다.

2. 세포주

국립보건원 호흡기계 바이러스과로부터 분양받은 MDCK(Mardin-darby canine kidney) 세포주는 penicillin(0.05 units/.)/streptomycin(0.05 ng/.)과 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 MEM(minimum essential medium)배지로 세포배양 하였고, HEP-2(human epidermoid carcinomas), Vero(Africa green monkey kidney) 및 RD (Rhabdomyo sarcoma) 세포주는 penicillin(0.05 units/㎖)/streptomycin(0.05 ng/㎖)과 5% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)배지로 세포배양하여 5% CO_2 농도로 조정된 37℃ incubator에서 배양하였다.

3. 바이러스의 분리 및 동정

검체를 전처리하기 위하여 실험실로 옮긴 인후가검물에 penicillin(5 units/㎖)/streptomycin(5 μg/㎖) 및 nystatin(1000 units/㎖)을 첨가하여 4℃에서 15분 간격으로 흔들어 주면서 1시간 방치한 후, 3000 rpm으로 20분간 저온 원심분리하여 상청액을 접종 가검물로 사용하였다. 미리 준비해 둔 24-well 배양용기에 단층배양시켜 놓은 MDCK, HEP-2, Vero 및 RD 세포주에 3-well 당 각 well에 접종용 배양액 0.5 ㎖를 넣은 후 전처리 된 가검물 0.3 ㎖씩 다중접종하고 5% CO_2로 조정된 33℃ incubator에서 10일간 배양하면서, 매일 현미경하에서 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 세포병변효과를 나타내는 검체는 2~3회 연속 계대배양하여 역가를 증가시킨 후 바이러스를 분리하여 동정을 위한 배양액의 항원 및 감염세포를 확보하였다. MDCK 세포주에서 CPE 양성검체는 11일간 발육시킨 계태아의 장뇨막과 양막에 가검물을 각각 0.2 ㎖씩 접종하여 34℃에서 3일간 배양한 후 계태아를 4℃ 냉장고에 하루동안 넣어 둔 다음 양막액과 요막액을 채취하고, 1% 기니아피그 적혈구로 혈구응집시험(hemagglutination test, HA test)을 하여 1 : 8 이상의 역가를 나타내는 검체에 대하여 2~3회 연속 난계대배양하여 역가가 높은 바이러스 항원을 준비하였다. 인플루엔자 바이러스의 동정은 국립보건원 호흡기계 바이러스과에 의뢰하여 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin을 사용한 간접면역형광법(indirect fluorescent antibody test, IFA)으로 동정하고 HA 및 혈구응집억제시험(hemagglutination inhibion test, HI test)으로 아형과 항원특성을 검사한 후 일부는 미국 CDC(centers for disease control and prevention)에 의뢰하여 재확인하였다. 아데노바이러스는 간접면역형광법으로 동정하고, 장내바이러스는 CPE 확인 후 전자현미경으로 판찰한 다음 국립보건원 소화기계 바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였다.

4. 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(×120

K)에서 관찰하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. 호흡기계 환자의 발생양상

1998년 10월부터 1999년 6월까지 급성호흡기 환자 1320명의 인후가검물에서 바이러스를 분리한 결과 Table 1과 같이, 232주의 인플루엔자바이러스가 분리되었으며, 이 중 인플루엔자바이러스 A형이 222주, B형이 10주, 아데노바이러스가 14주로 관찰되었다. 그리고 소화기계 바이러스에 속하는 록사키바이러스 B group과 에코바이러스가 각각 11주와 2주가 관찰되었다. 이 등(1997)이 1996년에서 1997년까지의 국내 급성 호흡기 환자의 바이러스를 분리하여 보고한 결과 A형 및 B형 바이러스의 분리율이 비슷한 경향을 나타내었으나, 본 연구 결과 인플루엔자 A형이 현저하게 높은 비율로 분리되어 차이가 있었다. 1998년도 보건복지부 보고(이 등 1998) 결과 아데노바이러스 감염은 연중 지속적으로 발생되었으나, 본 연구 결과는 1999년 1월과 2월에만 나타났으므로 포괄적인 감염양상에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 장내 바이러스의 전파 경로는 주로 분변 및 구강경로에 의하지만, 확실한 경로는 아직 밝혀지지 않았다(Field 1985). 그러나 1998년 장내 바이러스 분리에 대한 연구 결과(Cho et al. 1999) 분변 및 인후 가검물에서 장내 바이러스의 분리 비율이 유사한 경향을 나타내었으므로 이들에 대한 철저한 관리가 필요할 것으로 생각된다. 경구에 의해 삼켜진 장내 바이러스는 위장의 강산, 담즙에서도 잘 견디며, 위를 통과하여 장관계에 도달한 후 중추신경계, 간, 폐, 심장 등의 여러 장기로 퍼져 나가며, 임상양상도 매우 다양하므로 바이러스의 정확한 동정은 매우 중요하다 (Berlin et al. 1993).

Table 1. Number of virus isolates from patient with respiratory disease in Pusan(1998. 10~1999. 6)

virus	No. of patient		Total
	male	female	
InfluenzaA/Sydney/05/97(H3N2)-like	46	67	222
InfluenzaA/Beijing/262/95(H1N1)-like	61	48	
InfluenzaB/Harbin/07/94-like	3	7	10
Adeno virus	4	10	14
Coxsackie virus	7	4	11
Echo virus	1	1	2
Total	122	137	259

2. 성별, 연령별 및 월별 호흡기계 환자의 발생양상

인플루엔자 환자의 성별 및 연령별 발생분포는 Fig. 1과 같이 성별로는 총 259명의 환자중 122명(47%)의 남성 환자 및 137명(53%)의 여성 환자가 발생하여 비슷한 양상을 나타내었으나, 10세 이하의 어린이의 경우 남성 환자가 75명으로 54명의 여성 환자 보다 비교적 높은 발병율을 나타내었으며, 10대 이후부터는 여성의 경우 2배 이상의 발병율을 나타내었다. 연령별로는 0~10세에서 129명(50%)으로 대부분을 차지하였으며 10대 이상의 경우 각각 5~10% 범위내로 비교적 낮은 발병률을 나타내었다. 특히 71~80세 사이에서는 0.40%로 거의 발병되지 않았으나 경제적인 부담 때문에 증세가 가벼운 환자들이 병원 진료를 기피하는 현상으로 발병률이 감소하였는지 여부는 확실하지 않다. 1998년 10월부터 1999년 6월까지의 월별 발병율(Fig. 2)은 98년 12월 한차례 높았다가 서서히 감소하였으나 다시 1999년 2월부터 증가 추세를 보이면서 4월에 가장 높은 발병율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 1997년의 월별 발병율(Cho et al. 1998)과 유사한 경향을 나타내었으므로 이러한 계절에 호흡기 질환의 예방에 특히 많은 주의를 기울여야할 것으로 사료된다.

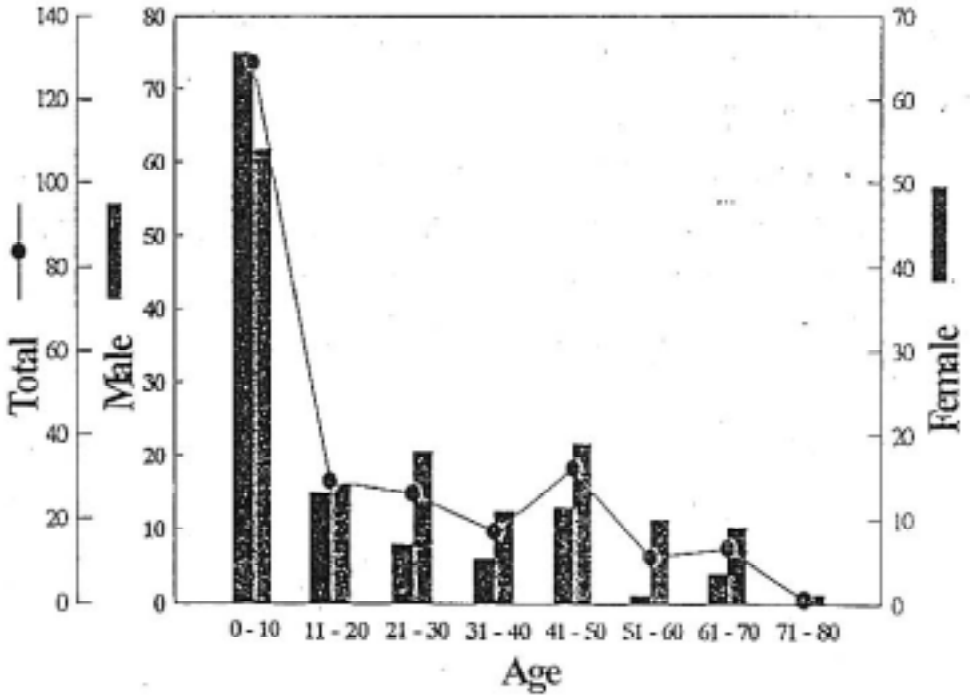

Fig. 1. Outbreak ratio of respiratory disease patients by age and sex groups.

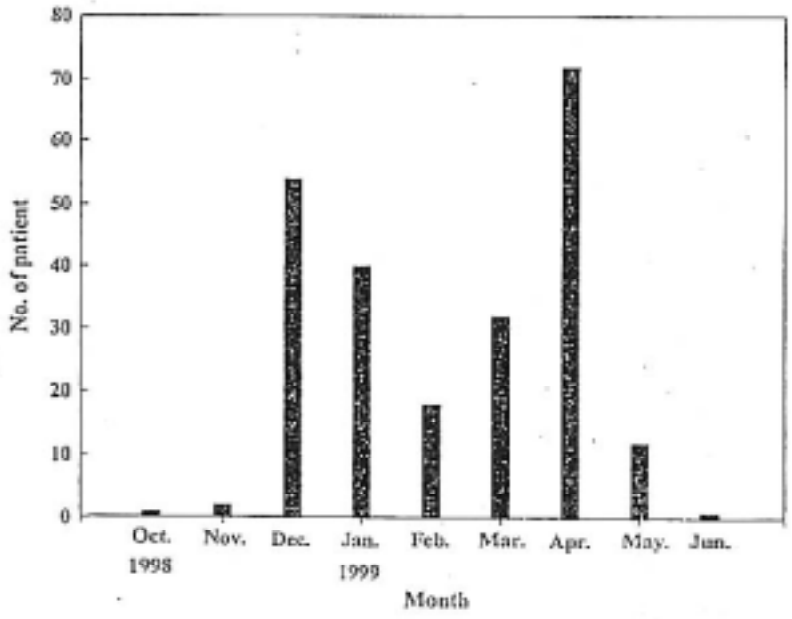

Fig. 2. Outbreak ratio of respiratory disease patients by month.

3. 호흡기계 바이러스 분리주의 전자현미경적 특징

환자의 인후가검물을 전처리하여 세포주에 단층배양한 결과 인플루엔자 의심 바이러스주는 MDCK 세포에서(Fig. 3), 아데노 의심 바이러스는 HEP-2 세포에서 (Fig. 4), 그리고 장내 의심 바이러스는 RD 세포에서(Fig. 5) 뚜렷한 세포병변효과를 나타내었으므로 이 바이러스를 증식·배양 및 분리하여 전자현미경으로 관찰한 결과, Fig. 6과 같이 인플루엔자 A형(H3N2 및 H1N1, 6-A,B)과 B형(6-C)은 모두 약 95 nm 크기의 구형을 나타내었으며, 바이러스 표면의 지질 이중층이 뚜렷하게 관찰되었다. 아데노바이러스(6-D)는 외피가 관찰되지 않았으며, nucleocapsid는 icosahedral symmetry이고 크기는 약 71 nm로서 바이러스 입자표면에 capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었다. 콕사키바이러스 B group과 에코바이러스(6-E,F)는 모두 외피가 없는 isometric 형으로 크기는 30-45 nm인 것으로 나타났다.

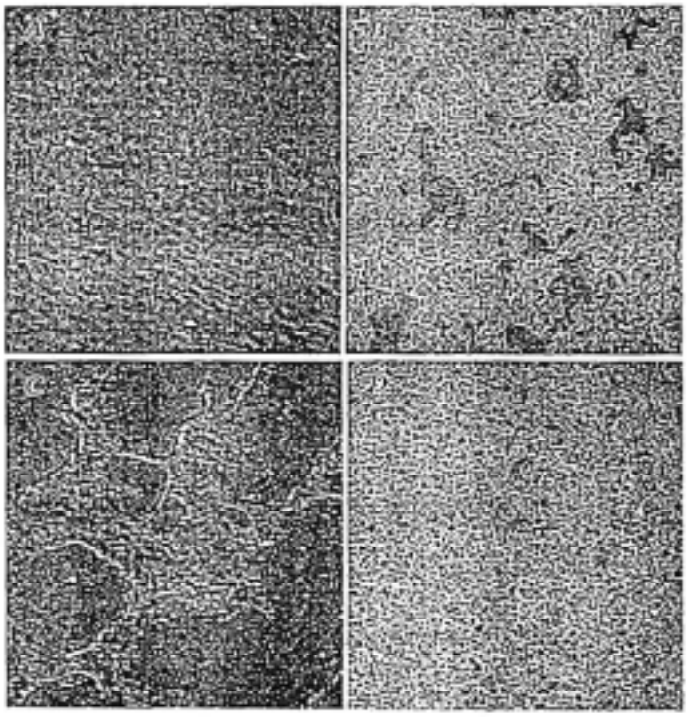

Fig. 3. Micrographs of CPE in the virus-infected cells.
MDCK cells infected with no virus(A), influenza A virus(H1N1)(B), influenza A virus(H3N2)(C), influenza B virus(D), Magnification ×100.

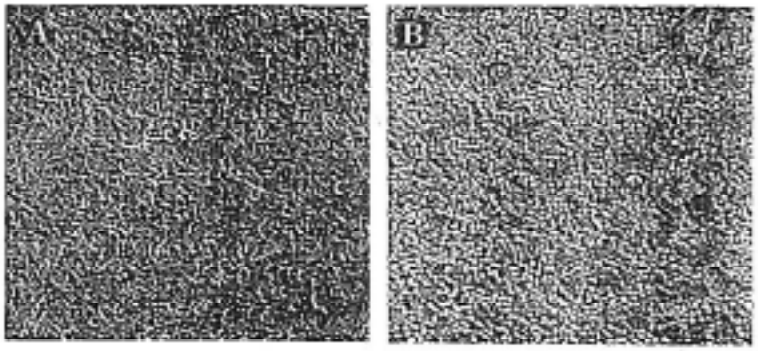

Fig. 4. Micrographs of CPE in the virus-infected cells.
HEP-2 cells infected with no virus(A), adeno virus(B),
Magnification ×100.

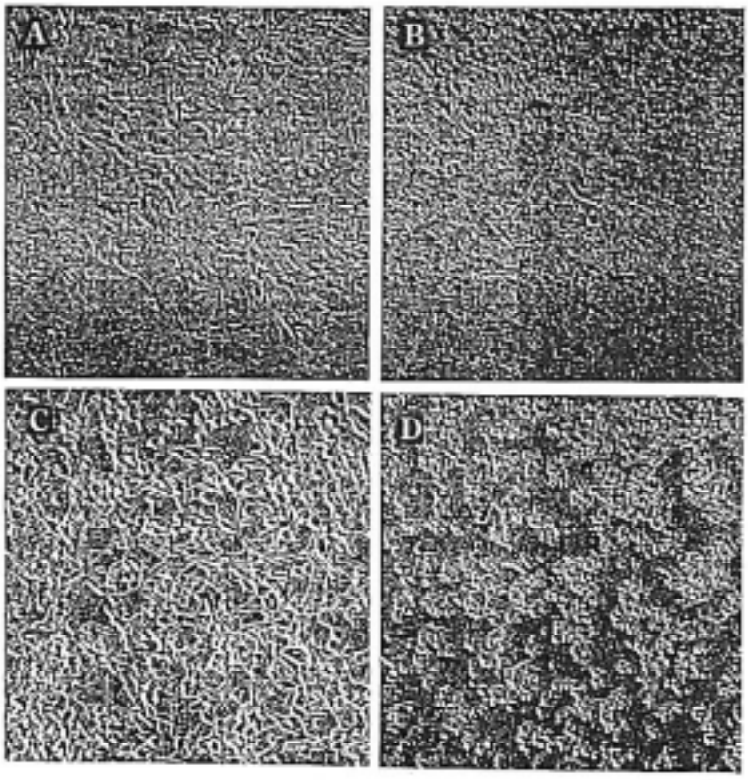

Fig. 5. Micrographs of CPE in the virus-infected cells.
RD cells infected with no virus(A,C), coxsacki virus(B),
echovirus(C), Magnification ×100.

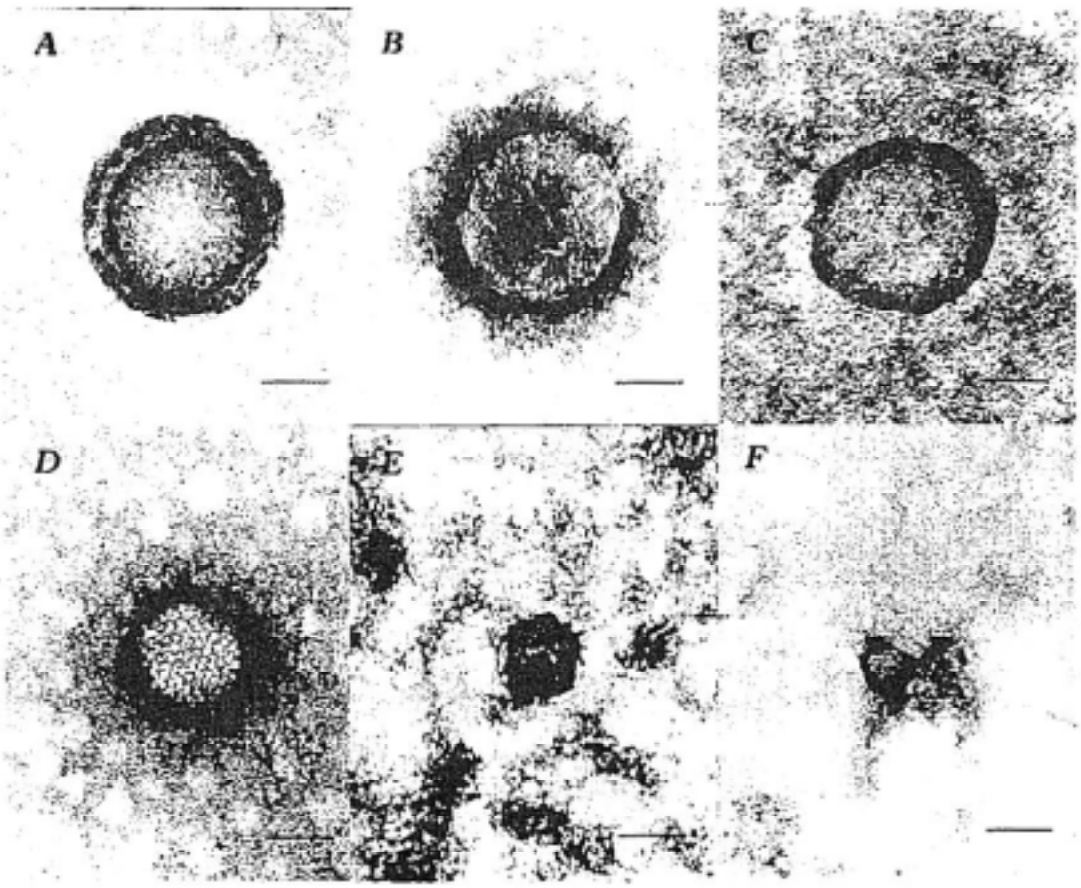

Fig. 6. Transmission electron micrographs of virus isolates.
Influenza A virus(H1N1)(A), influenza A virus(H3N2)(B), influenza B virus(C), adenovirus(D), coxsackivirus(E), echovirus(F), Bar ; 50 nm.

4. 바이러스의 항원 특성

분리한 인플루엔자바이러스의 아형 결정을 위하여 혈구응집 억제시험 및 간접 면역형광법을 실시한 결과 222주의 A형 바이러스 중 113주는 A/Sydney/05/97(H3N2) 유사주였으며, 109주는 A/Beijing/262/95(H1N1) 유사주로 확인되었다. B형으로 확

인된 10주는 모두 B/Harbin/07/94 유사주로 판정되었다. WHO 보고(WHO 1997) 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. 인플루엔자바이러스 감염에 따른 호흡기 질환은 폐렴증상이 가장 심하고 모세기관지염과 croup이 중요한 원인 질환이라고 보고13,14되었으며 선행질환을 가지고 있으면서 인플루엔자 A형에 감염된 환자의 9.3%가 사망하였다[15]. 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 이해하는데는 무리가 없다고 하겠으나 본격적으로 이용되기까지에는 앞으로 상당기간에 걸쳐 자료의 축적이 이루어져야 할 것으로 생각된다. 항원 대변이에 의한 인플루엔자 A 바이러스의 유행주기는 10~15년이며, 인플루엔자 B 바이러스는 3년을 유행주기로 보고 있어 항원성의 변이가 심한 병원체의 경우 해마다 빈번한 유행을 일으키고 있으며 이로 인한 경제적 손실이 적지 않을 것이다. 호흡기계 질환의 유행에 대한 신속한 정보수집, 병원체 변화의 예측, 예방접종의 효율성 평가 등을 통하여 그 피해를 최소화할 수 있는 적절한 방역 대책의 수립이 지속적으로 유지되어 질병의 유행예측을 신속히 파악하고 역학조사를 함으로서 호흡기계 바이러스에 의한 질병의 유행을 연구하는 기초적인 자료로서의 의미는 클 것으로 기대된다.

Ⅳ. 결　　과

호흡기계 바이러스에 대한 역학적 기초자료로 이용하고자 1998년 10월부터 1999년 6월까지 부산지역 10개소 지정병원의 외래 또는 입원한 환자의 발생양상과 분리된 바이러스의 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 1998년 10월부터 1999년 6월까지 부산지역 호흡기 환자 1320명의 인후 가검물로부터 259주의 급성 호흡기 질환 바이러스가 분리되었으며, 이 중 222주는 인플루엔자 A형 바이러스, 10주 는 인플루엔자 B형 바이러스 그리고 14주의 아데노

바이러스가 나타났다. 또한 소아기계 바이 러스에 속하는 콕사키바이러스 B group과 에코바이러스가 각각 11주 및 2주가 분리되었다.

2. 인플루엔자 환자의 성별 및 연령별 발생분포는 남성이 47%, 여성이 53%로 거의 비슷한 양상 을 나타내었으며, 10세 이하의 환자가 50%로 대부분을 차지하였다. 또한 월별 발생양상은 1998년 12월부터 1999년 4월까지 지속적인 발생율을 나타내었다.

3. 분리한 A형 바이러스 중 113주는 A/Sydney/05/97(H3N2) 유사주, 109주는 A/Beijing/262/95(H1N1) 유사주로 확인되었으며, B형으로 확인된 10주는 모두 B/Harbin/07/94 유사주로 판정되었다.

4. 전자현미경적 특징은 인플루엔자 A형 및 B형 바이러스는 모두 약 95 nm 크기의 구형으로써 지질이중층이 뚜렷하게 관찰되었으며, 아데노바이러스는 약 71 nm의 icosahedral symmetric 형으로 입자표면에 capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었다. coxsackie B group virus와 echo group virus는 모두 30-45 nm 크기의 외피가 없는 isometric 형으로 나타났다.

감 사 의 글

바이러스 확인 및 동정 시험에 도움을 주신 국립보건원 호흡기계 및 소화기계 바이러스과 과장님, 연구관님 그리고 선생님들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 이규만, 마상혁, 김한성, 강태영, 사공영희. 기타 호흡기 바이러스 유행연구체계 구축과 신속 진단법의 효율성에 대한 연구, 보건복지부 제1차년도 최종보고서, 1998
2. 이남용, 기창석, 김수정, 이용화, 정규영, 이상렬, 김지희. 1996-1997년 겨울철에 유행한 인플루 엔자의 임상역학적 분석 및 원인 바이러스의 분리. 감염 1997 :

29 : 263-70
3. 이영종. 외피비보유 DNA 바이러스. 인체바이러스학, 고려의학, 1998 pp. 131-40
4. 이환종, 윤보영, 김미란, 윤종구. 소아급성하기도 감염의 원인 바이러스 및 이의 유행양상. 감염 1995 : 27 : 319-32
5. Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF. Aseptic meningitis in infants 2 years of age diagnosis and etiology. J Infect Dis 1993 : 168 : 888-92
6. Cho KS, Jeong, KY, Cha IH. Isolation of influenza Virus form patients with respiratory disease in Pusan, 1997. K J Life Sci 1998 : 8 : 667-72
7. Cho KS, Kim YH. Isolation of echovirus serotype 25 from patient with hand, foot and mouth disease in Pusan, 1998. J K Soc Microbiol 1999 : 34 : 157-62
8. Field NB. Virology, part A. Raven Press, New York, 1985 pp. 739-94
9. Kilbourne ED. Influenza. Plenum Medical Book, New York, 1987
10. Kim JK, Cho YB, Paik SB. Studies on the antigenicity of influenza virus isolated from patients in 1982. Report NIH Kor. 1983 : 20 : 141-45
11. Lamb RA. The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. Springer-Verlag, New York, 1983 pp. 21-69
12. Leland DS. Concepts of clinical diagnostic virology. New York, 1992 pp. 3-43
13. Lindstrom S, Sugita S, Endo A, Ishida M, Huang P, Xi SH, Nerome K. Evolutionary characterization of recent human H3N2 influenza A isolates from Japan and China : novel changes in the receptor binding domain. Arch viol 1996 : 141 : 1349-55
14. M kel M, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimaki M, Blomqvist S, Hyypia T, Arstila P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. J Clin Microbiol 1998 : 36 : 539-42
15. Martin W. Influenza diagnosis managrment. and prophylaxis. B M J 1994 : 308 : 1341-45
16. Richey MB, Palese P, Kilboume ED. RNAs of influenza A, B and C viruses. J

Virol 1976 : 18 : 738-44

17. Scholtissek C, Rohde W, von Hoynigen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. Virology 1978 : 87 : 13-20
18. Sweet C, Smith J. Pathogenicity of influenza virus. Microbiol Rev 1980 : 44 : 303-30
19. WHO, Influenza weekly epidemiological record. 1997