

호흡기, 소화기계 감염환자로부터 전염성 바이러스 분리 및 특성

조 경 순

부산광역시 보건환경연구원

서 론

급성 호흡기 감염의 바이러스는 Influenza virus, respiratory syncytial virus, adenovirus, parainfluenza virus 등이 있다(4). 인플루엔자 바이러스는 orthomyxoviridae에 속하여, 인플루엔자 A와 B바이러스 및 C 바이러스의 두 개의 속을 갖는다. A형 바이러스는 H1N1, H2N2 및 H3N2가 있으며, 가장 유행빈도가 높으면서 항원 변이도 자주 일어나서 범세계적 대유행의 주역이 되고 있다. B형은 국지적으로 발생된다. 감염은 기침이나 재채기를 할 때 나오는 비말에 의해 가장 잘 전파되고 사람에서 사람으로 직접 접촉도 중요한 전파 방법이다.

아데노 바이러스는 49형의 종류가 밝혀져 있으며, 영아기 호흡기 감염의 5~8%에서 원인이 된다. 또한 파라인플루엔자 바이러스는 소아의 호흡기질환의 원인이며 잠복기는 2~5일간으로 발열과 기침이 주요 증상이나 성인에서는 쉼목소리를 수반할 때가 많으며 소아의 초기감염에서는 하부기도까지 침입하여 기관지염이나 폐렴을 일으킬 때도 있다.

장내바이러스(enteroviruses)는 감기, 무균성 뇌막염, 심근염, 뇌염등 중증의 질병에까지 인체에 다양한 질병을 일으키는 가장 일반적인 감염원의 하나로서 picornaviridae에 속하며 혈청형에 따라 크게 poliovirus, coxsackievirus group A·B, echovirus 로 나누고, 그리고 설사질환을 일으키는 SRSV(Small round structure virus), rota virus, enteric adenovirus 등으로 나눌 수 있다.

감염경로는 대변에 오염된 물, 토양을 통한 경구적인 전파가 대부분으로 사람으로부터 분비된 바이러스를 포함하고 있는 오수, 폐수가 지하수, 하천, 해수 등을 통하여 다시 사람에게로 전염되어 감염된다.

따라서 본 연구는 부산지역에서 분리된 호흡기계 및 소화기계 급성 감염 바이러스의 특징과 계절적 발생추이, 환자의 성별, 연령별 발생에 대해 검토하였고, 바이러스는 그 어떤 병원체 보다도 전염성과 발병율이 높아 신속한 분리와 진단이 필수적이며 아직은 특이한 치료제가 개발되어 있지 않으므로 유행예측 조사로 사전에 원인 바이러스를 분리하여 예방 및 확산을 방지하도록 하며, 조기에 치료할 수 있도록 기본적인 자료 및 기틀을 제공하고 바이러스 전염병 유행의 역학조사를 파악하는데 그 목적을 두었다.

연구대상 및 방법

1. 공시재료

1999년 1월부터 2000년 12월까지 부산광역시의 16개 보건소 및 10개 감시지정병원의 외래 및 입원한 급성호흡기 감염증 및 소화기계 감염증 환자로부터 1999년도에 채취한 가검물 2261건은 바이러스 수송용배지(virus transport medium, Difco)에 넣어 냉장온도를 유지하면서 실험실로 운반하여 바이러스 분리에 사용하였다.

2. 세포주

국립보건원 호흡기계 바이러스과로부터 분양받은 MDCK, Vero 및 BGM 세포주는 penicillin(0.05 units/ml)/streptomycin(0.05 μ g/ml)과 7% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 MEM배지로 세포배양 하였고, HEP-2 세포주는 penicillin(0.05 units/ml)/streptomycin(0.05 μ g/ml)과 5% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM배지로 세포배양하여 5% CO₂ 농도로 조정된 34°C incubator에서 배양하였다.

3. 바이러스의 분리 및 동정

(1) 인후가검물 전처리 법

검체를 전처리하기 위하여 실험실로 옮긴 인후가검물에 penicillin(5 units/ml)/streptomycin(5 μ g/ml) 및 nystatin(1000 units/ml)을 첨가하여 4°C에서 15분 간격으로 흔들어 주면서 1시간 방치한 후, 3000 rpm으로 20분간 저온 원심분리하여 상층액을 접종 가검물로 사용하였다. 미리 준비해 둔 24-well 배양용기에 단층배양시켜 놓은 MDCK, HEP-2, Vero 및 BGM 세포주에 3-well 당 각 well에 접종용 배양액 0.5 ml를 넣은 후 전처리 된 가검물 0.3 ml씩 다중접종한다.

(2) 대변가검물 전처리 법

대변가검물은 -20°C 냉동기에 1일간 냉동하고 해동시킨 후, 장내 바이러스용 PBS(NaCl 8.0g, KCl 0.2g, NaHPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2g, 800ml DDW, pH 7.0~7.4, MgCl₂·6H₂O 0.1g in 100ml, CaCl₂ 0.1g in 100ml)에 10% 농도로 희석하여 10분간 강하게 진탕하여 원심분리(1000×g, 20분)하여 상층액을 6~7ml 회수한다. 1/10의 chloroform을 첨가하여 10분간 혼합한 후, 원심분리하여 상층액을 회수하여 검체를 1×, 10×, 100×로 희석하여 사용한다. 미리 준비해둔 24 well 배양용기에 단층배양시켜 놓은 HEP-2, Vero 및 BGM 세포주에 3 well 당 각 well에 접종용 배양액(2% FBS가 첨가된 MEM·DMEM 배지) 1 ml을 넣은 후 전처리된 가검물 0.1ml 씩 다중접종한다.

접종한 플레이트는 5% CO₂로 조정된 37°C 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 세포주에

서 CPE 양성검체는 11일간 발육시킨 계태아의 장노막과 양막에 가검물을 각각 0.2 ml씩 접종하여 34°C에서 3일간 배양한 후 계태아를 4°C 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 inhibition test, HI test)으로 아형과 항원특성을 검사한 후 일부는 미국 CDC (Centers for Disease Control and Prevention)에 의뢰하여 재확인하였다. 아데노 바이러스는 간접면역형광법으로 동정하고, 장내 바이러스는 CPE를 확인하고, Rotavirus는 Latex test를 시험한 후 전자현미경으로 관찰한 다음 국립보건원 소화기계 바이러스과에 의뢰하여 확인 동정하였으며, SRSV는 국립보건원에 의뢰하여 시험하였다.

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.

연구결과 및 고찰

1. 바이러스 감염증 환자의 발생양상

1999년 1월부터 1999년 12월까지 호흡기 및 소화기계 환자 2261건의 가검물을 채취하여 바이러스를 분리한 결과 279주의 호흡기계 감염증 바이러스(Table 1)와 83주의 소화기계 감염증 바이러스가 분리되었으며, 이중 인플루엔자 바이러스 A형이 96주, B형이 107주로 각각 29.6%, 33.0%로 대부분을 차지하였다. 2000년 1월부터 10월까지 1551건의 가검물을 채취하여 바이러스를 분리한 결과 214주의 호흡기계 감염증 바이러스와 26주의 소화기계 감염증 바이러스가 분리되었으며, 이중 홍역 바이러스가 141주로 대부분을 차지하였다.

2. 성별, 연령별 및 월별 발생양상

1999년의 바이러스 분리의 성별 분포는 총 360명의 환자 중 179명(49.7%)의 남성 및 181명(50.3%)의 여성으로 비슷한 양상을 나타내었다. 이중 호흡기계의 경우 279명의 감염환자 중 남성이 130명(46.6%), 여성이 149명(53.4%)로 여성이 높은 양상을 나타내었으나(Table1), 소화기계의 경우 83명의 감염환자 중 남성이 51명(61.4%), 여성이 32명(38.5%)으로 남성의 감염율이 비교적 높게 나타났다(Table2).

1999년의 연령별 분포는 10세 이하의 어린이가 194명(59.9%)로 대부분을 차지하였으며, 이중 인플루엔자 바이러스가 99명(30.6%)로 가장 높은 감염율을 나타내었다.

1999년 1월부터 1999년 12월까지 월별 감염율은 호흡기계 감염증 바이러스의 경우 1월부터 4월까지, 그리고 12월에 증가 추세를 보이면서 4월에 가장 높은 감염율을 나타내었다. Adenovirus는 주로 동절기에 분리되었고, 10세 이하가 감염율이 높았다. 호흡기계 감염 아데노바이러스는 sero type 3 이 대부분이었고, 장내 아데노바이러스 2건은 serotype 41 이었다

소화기계 감염증 바이러스의 경우는 9,10,11월을 제외한 모든 월별에 관찰되었으며, 이중 12월에 비교적 높은 양상을 나타내었는데 동절기에 바이러스성 설사환자의 발생이 높았기 때문이다.

소화기계 바이러스는 주로 하절기를 중심으로 발생하고 있으나 봄이나 늦가을, 또는 겨울에도 산발적으로 발생하는 경우가 있어 일년 내내 감염의 위험이 존재한다고 볼 수 있다. 주 발생연령층은 영유아지만 소아 및 노령층에서도 발생할 수 있으며 이러한 경우 종종 감염을 초래할 수 있다.

1999년은 echo와 coxsackie 바이러스가 하절기에 집중적으로 발생하는 경향을 보이며, 소화기계 바이러스는 대개 치명적은 아니며, 바이러스종에 따라 고열, 두통, 구토등의 증상을 보인 후 자연적으로 치유되지만 최근에는 심한 두통을 나타내는 경우도 발생하고 있으며 드물게는 사망하기도 한다.

3. 바이러스 분리주의 전자현미경적 특징

환자의 가검물을 전처리하여 세포주에 단층 배양한 결과 인플루엔자 의심 바이러스주는 MDCK세포에서, 아데노 의심 바이러스와 mumps 의심 바이러스주는 HEP-2세포에서 파라인플루엔자 의심 바이러스주는 vero 세포에서, 그리고 coxsackie B 의심 바이러스와 echo 의심 바이러스주는 BGM 세포에서 장아데노바이러스는 HEp-2 세포에서 뚜렷한 세포병변 효과를 나타내었다.

바이러스를 증식, 배양 및 분리하여 전자 현미경으로 관찰한 결과, 호흡기계 바이러스 중 인플루엔자 바이러스 A형(H1N1, H3N2)은 95nm, B은 70nm크기의 구형을 나타내었으며, 바이러스 표면의 지질이중층이 뚜렷하게 관찰되었다. 아데노 바이러스는 외피가 관찰되지 않았으며, nucleocapsid는 icosahedral symmetry이고 크기는 약 71nm로서 바이러스 입자표면에 capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었다. 파라인플루엔자 바이러스는 외피가 있는 구형이고 크기는 180nm였다. Mumps virus도 외피가 있는 구형의 큰 viron으로 170nm 크기가었다.

소화기계 바이러스 중 콕사키 바이러스 B group과 에코바이러스는 모두 외피가 없는 isometric형으로 크기는 30~45nm인 것으로 관찰되었다. E-Adeno 바이러스는 84nm의 크기로서 외피가 없고, 입자표면에 capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었다. 그리고 rota 바이러스는 크기가 70nm이며 외층 capsid 단백질과 내층 capsid 단백질이 두 층으로 되어 전형적인 수레바퀴모양을 나타내었다.

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

Virus	No. of patient		Total
	male	female	
Influenza A/Sydney/05/97(H3N2)-like	35	61	96
Influenza A/Beijing/262/95(H1N1)-like	59	48	107
Influenza B/Harbin/07/94-like	3	7	10
Adenovirus	8	7	15
Parainfluenza virus	0	1	1
Mumps virus	25	25	50
Total	130 (46.6%)	149 (53.4%)	279 (100%)

Table 2. Number of virus isolates from patients with enteroviruses in Busan, 1999

Virus	No. of patient		Total
	Male	Female	
SRSV ¹⁾	17	11	28
Rotavirus	13	9	22
Echovirus	8	6	14
Coxsackie B virus	11	6	17
Enteric-Adenovirus	2	0	2
Total	51 (61.9%)	32 (38.1%)	83 (100%)

¹⁾ SRSV : Small round structure virus

요 약

호흡기계 및 소화기계에 감염된 전염성 바이러스에 대한 역학적 기초자료로 이용하고자 1999년 1월부터 12월까지 부산지역에서 분리된 전염성 바이러스의 특징과 계절적 발생추이, 환자의 성별, 연령별 발생에 대해 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 1999년도 바이러스 가검물 2261건에서 분리한 호흡기계감염 바이러스 279건과 소화기계 감염 바이러스 83주를 분리하였으며, 이중 인플루엔자 바이러스 A형이 96주(29.6%), B형이 107주(33.0%)로 대부분을 차지하였다.
2. 1999년의 바이러스 분리의 성별 분포는 총 360명의 환자 중 179명(49.7%)의 남성 및 181명(50.3%)의 여성으로 비슷한 양상을 나타내었다. 이중 호흡기계의 경우 279명의 감염환자 중 남성이 130명(46.6%), 여성이 149명(53.4%)으로 여성의 감염율이 비교적 높았으나, 소화기계의 경우 83명의 감염환자 중 남성이 51명(61.4%), 여성이 32명(38.5%)으로 남성의 감염율이 거의 2배정도 높게 나타났다.
3. 1999년의 연령별 분포는 10세 이하의 어린이가 194명(59.9%)으로 대부분을 차지하였으며, 이중 인플루엔자 바이러스가 99명(30.6%)으로 가장 높은 감염율을 나타내었다. 유행성 이하선염 바이러스의 감염어린이 중에 11~15세의 연령층이 15명으로(53.3%)로 가장 높게 나타났다.
4. 1999년 월별 감염율은 호흡기계 감염증 바이러스의 경우 1월부터 4월까지, 그리고 12월에 증가 추세를 보이면서 4월에 가장 높은 감염율을 나타내었다. 소화기계 감염증 바이러스의 경우 9, 10, 11월을 제외한 모든 월별에 관찰되었으며, echo와 coxsackie 바이러스는 무균성 수막염 환자에서 하절기에 집중적으로 발생하였다. 동절기에 유행하는 설사 바이러스는 12월에 비교적 높은 양상을 나타내었다.
5. 인플루엔자 바이러스는 MDCK 세포에서, 아데노 바이러스와 유행성 이하선염 바이러스는 HEp-2 세포에서, 파라인플루엔자 바이러스는 Vero 세포에서, 그리고 echo, coxsackie B 바이러스와 장내 바이러스는 HEp-2, Vero, BGM 세포에서 뚜렷한 세포병변 효과를 나타내었다.
6. 분리한 바이러스는 전자현미경으로 관찰한 결과 인플루엔자 바이러스 A형 (H1N1, H3N2)은 95nm, B형은 70nm 크기의 구형을 나타내었으며, 바이러스 표면의 지질 이중층이 뚜렷하게 관찰되었다. 아데노 바이러스는 외피가 관찰되지 않았으며, nucleocapsid는 symmetry이고 크기는 71nm로서 바이러스 입자 표면에 icosaheral capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었고, 파라인플루엔자 바이러스와 유행성 이하선염 바이러스는 외피가 있는 구형의 큰 viron으로 180, 170nm 크기이었다.
7. Echo와 coxsackie B group 바이러스는 모두 외피가 없는 isometric 형으로 크기는 30~45nm 이었고, enteric adeno 바이러스는 84nm 크기로서 외피가 없고, 입자 표면에 capsomer의 배열이 명확하게 관찰되었고, rotavirus는 크기가 70nm이며 외층 capsid 단백질과 내층 capsid 단백질이 두층으로 되어 있는 전형적인 수레바퀴 모양을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 호흡기계 및 소화기계에 감염되는 전염성 바이러스는 연중 지속적으로 분리되고 있으며 전염성이 강하여 집단 발생은 일으키는 경우도 많고 최근 들어 유행성 이하선염과 홍역 바이러스의 발생률이 높은 추이를 나타내고 있지만 아직은 특이한 바이러스 치료제가 개발되어 있지 않았으므로 지속적인 대책과 아울러 장기적인 발생 가능에 대한 예방책을 홍보하여야 할 것으로 보이며 계속적인 바이러스성 전염병 유행예측조사 및 역학조사가 적극적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.