

1998년도 부산지역에서의 Influenza 바이러스의 분리

조경순* · 김영희*

동의대학교 미생물학과
*부산광역시보건환경연구원

Isolation and Identification of Influenza Virus from Pusan in 1998

Kyung-Soon Cho* and Young-Hee Kim*

Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan, 614-714, Korea
**Institute of Health & Environment, Pusan 613-103, Korea*

Abstract

This study was performed to monitor the circulation of various influenza virus strains since influenza is one of the commonest respiratory disease in man, its causative virus has been the subjects of extensive research. The authors investigated the epidemics of influenza in Pusan in 1998. Influenza viruses have been isolated from patients with respiratory disease whose ages range from 1 to 68. Virus isolation from female was higher than male. The isolation of virus was mostly concentrated in December in 1998. The isolated virus showed strong cytopathic effect on MDCK cells and identified as influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2) and influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1). A negative staining of electron micrograph showed 130 nm with H3N1 and 145 nm with H1N1 in diameter, respectively.

Key words – Cytopathic effect, MDCK cells

서 론

Influenza는 바이러스에 의하여 유발되는 호흡기계 질환으로 사람 외에 동물에게도 감염하는 특성을 가지고 있다. 환자에 따라 일차적인 바이러스 감염 후에 이차적으로 세균중독 감염을 유발하는 등의 합병증을 일으키기도 하는 전염성이 매우 강한 질환의 하나로서 사회 경제적으로 큰 손실을 가져오고 있다[2,8].

Influenza 바이러스는 Orthomyxoviridae과에 속하는 8개의 조각으로 된 단일가닥 RNA 유전자를 보유하고 있어

돌연변이가 매우 잘 일어나므로 이러한 특성은 influenza의 빈번한 유행의 원인이 되고 있으며 백신개발에도 어려움을 준다. 최근에는 influenza A(H1N1), A(H3N2) 그리고 influenza B가 동시에 혹은 교대로 유행을 일으키고 있으며 세계적인 유행도 가져오고 국지적 발생도 일어나며 계절적인 영향, 연령별 특성도 가지고 있다[1,3,4,6].

지금까지 Influenza 원인 바이러스에 관하여서는 핵 단백질과 기질단백의 항원성의 특성에 따라 A, B, 그리고 C형으로 분류되고 A형은 혈구응집소나 neuraminidase에 의해 여러 아형으로 분류된다. 또한 지역적으로나 계절별로

*Corresponding author

도 다양한 아형이 분리되고 있어 유행예측 및 백신 개발의 차원에서도 influenza 바이러스의 특성이 밝혀져야 한다. 최근에는 사람 외에 조류바이러스가 인체에 감염된 사례도 보고되어 유행예측의 감시체계가 요구되는 시대가 되었다[5,7].

본 보고에서는 influenza가 전 세계적으로 발생하고 있으므로 발생률이나 검출된 원인바이러스 아형에 대한 조사를 바탕으로 세계보건기구의 유행예측사업 차원에서의 자료로 활용하기 위하여 1998년 부산 지역의 호흡기 환자를 중심으로 influenza 바이러스 분리를 시도하여 얻은 결과를 보고하고자 하는 바이다.

재료 및 방법

분리용 시료

1998년 부산시내의 10개 지정의료기관으로부터 급성 호흡기 질환이 의심되는 환자 1222명의 인후가검물을 대상으로 하였다.

시료처리

환자로부터 인후가검물을 멸균된 면봉으로 채취하여 바이러스 수송용 배지(Virus transport medium, Difco)에 넣어 냉장 운반한 후 면봉을 제거하고 바이러스 수송용 배지에 penicillin(5 units/ml), streptomycin(5 µg/ml)을 첨가하여 vortexing하고 4°C에서 1시간 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 20분)를 행한 후 상층액 300 µl을 채취하여 사용하였다.

바이러스 분리 및 동정

바이러스 분리를 위하여 국립보건원으로부터 분양받은 Influenza 바이러스에 감수성이 강한 MDCK(Mardin-Darby canine kidney) 세포주를 사용하였다. 세포배양을 위하여 항생물질(penicillin 50 units/streptomycin 0.05 mg/ml)과 10% fetal bovine serum이 첨가된 EMEM(Eagle's minimum essential medium)배지에 세포를 37°C, 5-7% CO₂ 항온기내에서 24-well 배양용기에 배양하면서 단층배양을 유도하여 사용하였다.

준비된 인후 가검물을 3-well씩 다중 접종하여 단층배양 시킨 세포에 접종하고 34°C, 5-7% CO₂ 항온기내에서

1~10 일간 배양하면서 매일 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 100배 현미경으로 관찰하였다. 세포병변을 나타내는 검체는 2-3회 연속 계대 배양하여 확인한 후 바이러스를 회수하였다. 한편 동일한 검체를 11일경의 계대아의 장노막과 양막에 각각 0.2 ml씩 접종하여 34°C에서 3일간 배양한 다음 양막 및 요막액을 채취하였고 혈구응집시험으로 1: 8 이상의 역가를 나타내는 검체에 대하여 2-3회 연속 부화한 계대배양을 행하여 역가를 증가시켰다. 바이러스의 동정은 국립보건원 바이러스부에 의뢰하여 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin을 사용한 간접면역형광법(Indirect fluorescent antibody test, IFA)으로 동정하고 혈구응집시험 및 혈구응집억제 시험을 행하여 아형과 항원 특이성을 검사한 후 미국 CDC(Centers for Disease Control and Prevention)에 의뢰하여 재확인하였다.

분리 바이러스의 형태

분리된 바이러스의 형태학적 관찰을 위하여 분리 바이러스를 2-3회 연속 MDCK 세포에 계대한 후 상등액을 회수하여 4% uranyl acetate에 약 1 분간 negative stain한 후 투명전자현미경(JEM 1200 EX 2, JEOL, 배울, X 120K)으로 촬영하였다.

결과 및 고찰

Influenza는 전파력이 매우 강하고 세균과의 중복 감염을 유발 할 수 있으므로 세계보건 기구에서 유행예측사업의 일환으로 관심이 고조되고 있으며 백신 개발을 위한 과정의 하나로 유행형 및 아형의 조사가 매우 중요하다.

Influenza 바이러스의 A,B,C 세 가지 항원 중 사람에게서 가장 분리 빈도가 높은 influenza 바이러스는 A형인데 1998년도 부산지역에서의 분리된 influenza 바이러스의 종류는 influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2)형과 influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1)형이었는데 조[1]등이 1997년에 분리한 influenza 바이러스 B형은 검출되지 않았으며 같은 H3N2형도 한 균주는 97년도와 같은 아종이었으나 다른 한 아형은 달랐는데 이 같은 결과를 비교해 볼 때 influenza 바이러스의 발생 아형이 해마다 다른 양상을 나타낼 가능성을 내포하고 있었다.

분리빈도에서는 1997년의 부산 지역에서의 influenza 바이러스의 분리 빈도가 15주에[1] 불과 하였으나 1998년에는 64주로 나타나 앞으로는 더 높아질 것으로 보이며 이 같은 향상은 더욱 다양한 바이러스의 분리로 이어질 것으로 기대된다.

98년도의 월별 발생 빈도는 97년도와[1] 비슷한 양상을 나타내었으나 1998년에는 2월에 2주 3월에 3주, 10월에 1주, 11월에 3주 그리고 12월에 56주가 분리되어 12월에 집중적인 분리가 이루어 졌으며 4월에서 9월까지의 분리가 전혀 이루어지지 않았다. 바이러스 분리의 남녀에 대한 비율이 Table 1에서 보는바와 같이 1:1.2 비율로 나타났는데 여자가 남자보다 influenza 바이러스의 분리율이 약간 높은 것으로 나타났으나 조[1] 등의 호흡기 바이러스 감염율의 남녀 성비에서 여자가 남자보다 2배정도 높다는 결과와는 다소 차이가 있었는데 이는 해마다 다른 양상을 나타내는 influenza의 특성으로 볼 때 지속적인 분리로 예측을 위한 자료가 필요할 것으로 보인다.

연령별로 본 influenza 바이러스 분리는 1세의 영아에

서 68세의 노인에 이르기까지 다양하였는데 10세 미만이 26%로서 가장 높은 바이러스 분리율을 나타내었고 10대가 13%, 20대가 16%로서 나타났으며 30대는 6.6%로 비교적 낮은 비율을 나타내었으며 40대가 21%로서 소년기 다음으로 높은 분리율을 나타내었으며 50대와 60대는 8.2%로 같은 비율을 나타내었는데 이는 influenza 바이러스가 전 연령층으로 확대되어 있음을 볼 수 있었는데 매년 역학조사를 통하여 비교하면 발생예측을 비교할 수 있을 것으로 사료되었다.

분리 바이러스의 세포병변은 Fig. 1에 나타내었는데 MDCK 세포에서 세포병변이 관찰되었으며 전자현미경으로 관찰된 influenza 바이러스는(Fig. 2) 원형으로 나타났고 influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2)는 약 130 nm의 크기를 나타내었고 influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1)형은 145 nm로 나타났다. 돌연변이율이 높은 influenza 바이러스의 양상으로 볼 때 지속적인 비교자료가 요구되며 다른 사례의 보고를 기대하는 바이다.

Influenza는 이미 국제협력사업의 일환으로 세계보건기

Table 1. Isolation of influenza viruses from respiratory disease patients in Pusan, 1998

No. of isolates	Influenza A	
	Sydney/05/97-like(H3N2)	Beijing/262/95-like(H1N1)
Male	29	28
Female	36	34
Total	65	62

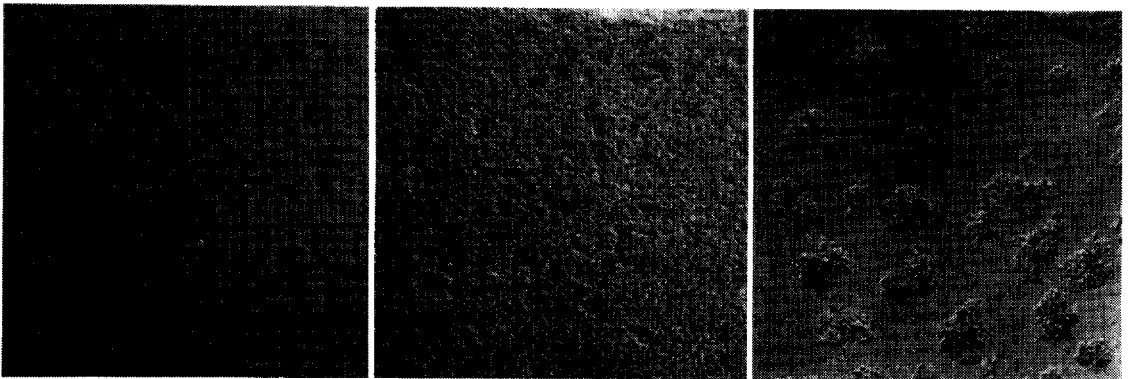


Fig. 1. Cytopathic effects on MDCK cells infected with isolated influenza virus. A; Normal cells of MDCK, B; 72-hr exposure of influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2), C; 72-hr exposure of influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1).

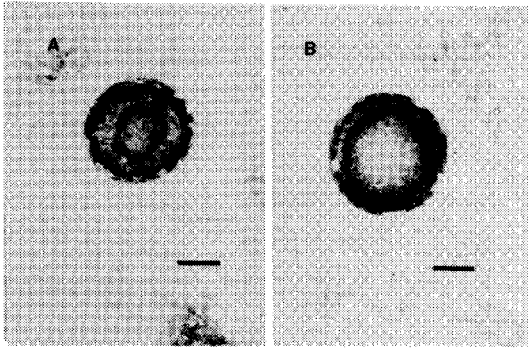


Fig. 2. Electron micrograph of isolated influenza viruses. A; influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2), B; influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1). Bar represents 50 nm.

구의 국제감시 질병으로 지정되어 공동감시사업을 하고 있는바 우리 나라에서도 바이러스의 수집과 항원분석을 통하여 미래의 유행과 대규모 세계적 유행을 예측하기 위하여 지역별 사업의 일환으로 지속적인 분리가 진행되어져야 할 것으로 보인다.

요 약

1998년 부산지역에서 호흡기 환자의 인후 가검물로부터 분리된 influenza 바이러스는 다음과 같은 양상을 볼 수 있었다.

1. 분리된 바이러스는 influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2)형과 influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1)형으로 동정되었다.
2. 바이러스분리는 4월에서 9월까지를 제외한 모든 달에서 이루어 졌으며 특히 12월에는 집중적인 양상을 보였다.
3. 연령별로 본 바이러스의 분리는 1세에서 68세까지 전 연령층에서 나타났으며 10세 이하가 가장 높은 분리율을 나타내었다.
4. 바이러스 분리 비율은 남녀가 1:1.2의 비율로 나타났다.

5. 분리 바이러스는 MDCK 세포에서 세포병변이 관찰되었다.

6. Influenza 바이러스를 Negative staining으로 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 원형의 바이러스로 influenza A/Sydney/05/97-like(H3N2)는 130 nm, influenza A/Beijing/262/95-like(H1N1) 형은 145 nm의 크기로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Cho, K. S., I. H. Cha, and G. Y. Jung. 1998. Isolation of influenza virus from patients with respiratory disease in Pusan. 1997. *Korean Journal of Life Science* **8(6)**, 667-672.
2. Field, B. N. 1985. *Virology*, pp.1157-1240, Raven Press. New York.
3. Kim, J. K., Y. B. Cho and S. B. Paik. 1983. Studies on the antigenicity of influenza virus isolated from patients in 1982. *Report of NIH Korea* **20**, 141-145.
4. Kim, J. S., K. Y. Park, M. G. Lee, Y. S. Kim, J. B. Ahn, and H. J. Yoon. 1995. Rapid and type-specific detection of human influenza viruses using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Korean Society for Microbiology* **30(2)**, 233-243.
5. Kupradium, S., P. Peanpijit, C. Bhodhikosoom, Y. Yoshika, A. Endo, and K. Nerome. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza virus from pigs in Thailand. *Arch. Virol.* **118**, 289.
6. Lee, N. Y., M. D., C. S. Ki, M. D., S. J. Kim, M. D., Y. W. Lee, M. D., G. Y. Jeong, M. D., S. I. Lee, M. D., and J. H. Kim, M. D. 1997. Epidemiological and clinical analysis of influenza and viruses isolation during winter of 1996-1997. *Infection* **29(4)**, 263-270.
7. Lindstrom, S., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, P. Huang, S. H. Xi, and K. Nerome. 1996. Evolutionary characterization of recent human H3N2 influenza A isolates from Japan and China: novel changes in the receptor binding domain. *Arch. Virology* **141**, 1349.
8. Sweet, C. and H. Smith. 1980. Pathogenicity of influenza virus. *Microbiological Reviews* **44(2)**, 303.