

부산지역 무균성 뇌막염 원인 바이러스의 분리 및 동정 -1998년을 중심으로-

조경순 · 김만수 · 정구영 · 민상기 · 구평태 · 김병준
윤재득 · 지영미 · 김기순 · 김영희 · 정영기
부산광역시보건환경연구원 · 국립보건원 · 동의대학교 미생물학과*
(1999년 2월 4일 접수)

Isolation and Identification of Aseptic Meningitis Virus in Pusan, 1998

Kyung-Soon Cho, Man-Soo Kim, Gu-Young Jung, Sang-Kee Min, Pyung-Tae Ku,
Byung-Jun Kim, Jae-Deuk Yoon, Young-Mee Jee, Ki-Soon Ki,
Young-Hee Kim, and Young-Ki Chung

Institute of Health & Environment, Pusan 614-103, Korea

**National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea*

***Dept. of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea*

(Manuscript received 4 February, 1999)

The incidence of aseptic meningitis infection is ensuing and threatening the health of children. Enteroviruses are the major agents of aseptic meningitis and identification of virus has been a clue to diagnosis and epidemiology. The outbreak of aseptic meningitis occurred in Pusan, 1998. Patients were concentrated from April through November. Children were more susceptible than adults. Among 306 cases of specimens from stool, throat swab tested, only 7.2% were positive on virus isolation, 12 cases from stool and 10 from throat, respectively. All isolated 7 serotypes of viruses represented cytopathic effect on cultured cells. Three types of echovirus 6, 25, 30 and coxsackievirus B2, B3, B4, B6 were identified by neutralizing antibody test. Isolated coxsackievirus and echovirus were observed by an electron microscope with negative staining.

Key words : aseptic meningitis, enterovirus, cytopathic effect, echovirus, coxsackievirus, neutralizing antibody test

1. 서 론

장내바이러스는 사람이 유일한 숙주이며 식기, 물, 식품 등을 통하여 감염이 가능한 소화기계 바이러스이다.^{1,2)} 자연계에서도 염소처리된 식수나 하수도 및 유기물이 함유된 환경 내에서도 장기간 살아남을 수 있으므로 위생관리가 매우 중요하다.

무균성 뇌막염은 주로 장내 바이러스에 의하여 발병하며 분변-경구 또는 경구-경구 경로를 통해 사람에서 사람으로 전파되므로^{3,4)} 위생학적으로 문제가 되는 모든 경로에서 감염경로를 차단하는 것이 쉽지는 않으며 면역력이 약하거나 바이러스에 전혀 노출된 적이 없는 소아에서 쉽게 감염이 일어나고 분포도도 세계적이다.⁵⁾

무균성 뇌막염이란 뇌막에 염증이 있는 것을 의미하나 뇌실질에 염증이 동반되는 경우엔 뇌염이라 하고 징후가 없으면 뇌막염이라고 하는데 일반적으로 세균을 동정할 수 없는 임상증후군을 이르며 그 경과가 비교적 양호한

경우를 말한다.^{6,7,8)} 무균성 뇌막염의 발병 원인은 약물이거나, 자가면역성 질환등 다양한 원인으로 발병되지만 감염이 주원인이며 그 중에서도 바이러스가 80% 이상을 차지한다. 무균성 뇌막염에 관한 확실한 병인론은 정립되어 있지 않으나 장내 바이러스인 echovirus나 coxsackievirus, poliovirus 등을 원인체로 보고 있다. 이들 소화기계 바이러스가 어떤 경로로 감염되는지에 대한 확실한 경로는 밝혀지지 않았다. 대부분의 장내 바이러스들이 대변에서 분리되고 있는 것으로 보아 이들의 관리가 필요하다. 최근에는 수계 환경 내에서의 이들 바이러스 검출에 관심이 모아지고 있다.

우리 나라에서도 1990년대에 이르러 무균성 뇌막염 환자 발생사례가 빈번해지고 있는데 이미 1993년, 1996년, 1997년에 전국적인 대유행을 일으켰다. 1998년에도 발생이 있었는데 본 보고에서는 1998년 부산지역의 종합병원 및 부산광역시 보건환경연구원에 의뢰된 사례를 중심으로

그 발생 현황을 분석하고 일부 장내 바이러스를 동정하게 되어 앞으로의 유행예측의 지표 자료로 삼기 위하여 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 분리시료 채취

바이러스의 분리를 위하여 1998년 4월부터 12월까지 부산시내의 10개 지정병원으로부터 무균성 뇌막염 질환으로 내원한 환자 306명으로부터 대변 및 인후 가검물을 신속히 냉장 운반하여 바이러스 분리를 위한 시료로 사용하였다.

2.2. 바이러스분리용 시료 준비

대변은 complete PBS(NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2g, 800ml DDW, pH 7.2-7.4, MgCl₂ · 6H₂O 0.1g in 100ml, CaCl₂ 0.1g in 100ml)에 10% 농도로 넣고 총량이 10 ml로 한 다음 잘 흔들고 원심분리(3,000 rpm, 20분)하여 상등액만 회수하고 상등액의 1/10의 chloroform을 첨가하고 잘 섞은 후 다시 원심분리하여 상등액을 6-7 ml만 회수하여 다음 실험 과정에 사용하고 나머지는 -70℃에 보관하여 사용하였다. 인후분비물은 인후부 도말을 넣은 수송용 배지 tube를 진탕한 다음 멸균된 핀셋을 이용하여 면봉을 짚 후 면봉은 버리고 항생물질 { penicillin(5 units/ml)/streptomycin(5 µg/ml)/nystatin(1,000units/ml) } 을 첨가하여 잘 혼합한 다음 4℃에서 1시간 방치하였다. 이를 4℃에서 원심분리(3,000rpm, 20분)한 후 상등액을 2개의 tube에 분주하고 그중 하나만을 세포에 접종하고 나머지는 -70℃에 보관하였다.

2.3. 바이러스 분리

임상 가검물로부터 바이러스의 분리를 위하여 전통적인 방법인 세포배양법을 사용하였으며 사용세포는 국립보건원으로 부터 분양받은 Vero cell, HEp-2, RD 세포주이었다. 분양받은 세포주를 DMEM(Dulbecco's modified eagles medium, Gibcobl)배지를 사용하여 24 well plate에 단층 배양시킨 후 처리된 가검물을 3 well씩 다중접종하고(0.2ml/25cm² flask) 34℃, 5-7% CO₂ 항온기내에서 1-10일 동안 배양하면서 세포병변(cytopathic effect, CPE)을 관찰하였다. 세포병변을 나타내는 검체는 2-3회 연속 계대 배양으로 역가를 증가시킨 후 바이러스를 분리하였고 동정을 위하여 사용하였다.

2.4. 전자 현미경적 관찰

분리된 바이러스를 연속적으로 계대하여 4% uranyl acetate에 약 1분간 negative 염색한 다음 전자현미경(JEM 1200 EX 2, JEOL)으로 관찰하였다.

2.5. 중화항체법

분리 바이러스의 형을 동정하기 위한 중화항체반응 시험 용으로는 coxsackievirus의 확인용으로는 Denka Seiken CB 항혈청을 사용하였으며 echovirus의 확인용으로는 WHO/RIVM 항혈청을 사용하였다. 중화 항체 반응에는

50 µl의 단계별 희석 바이러스 가검물과, 2% 우태아 혈청이 함유된 DMEM으로 20배 희석된 각각의 항혈청 50 µl을 1분간 혼합하여 36℃에서 1시간 반응시켰다. 그 후에 100 µl의 RD 세포(150,000 cells/ml)를 섞어 34℃, CO₂ 항온기에 넣어 세포병변을 관찰하고 crystal violet으로 염색한 후 증류수로 씻은 후 물기를 제거하고 염색의 결과를 관찰하여 보라색의 양성 반응을 나타내는 것으로 바이러스형을 결정하였다.

3. 결 과

3.1. 바이러스 분리

부산지역의 종합병원으로부터 의뢰된 무균성 뇌막염 환자로 의심되는 환자의 가검물 306건을 대상으로 1998년 한해를 기준으로 바이러스 분리를 시도한 결과는 Table 1에 나타내었다. 바이러스의 분리 비율은 전체 의뢰 가검물 중 7.2%에서만 바이러스가 분리되었으며 바이러스가 분리된 분리원으로는 분변이 12사례이었고 인후분비물은 10사례이었다.

부산지역 월별 장내 바이러스분리 빈도에서는 환자발생이 4월에서 12월에 걸쳐서 나타났으며 1월에서 3월 사이에는 분리사례가 없었다. 분리대상 연령별로는 10세 미만이 대부분을 차지하였으며 10세 이상의 어린이는 두 명이었고 성인도 4 사례 분리되었다. 남녀의 분리 비율은 거의 같은 양상을 나타내었다.

3.2. 세포병변 효과

HEp-2, Vero 및 RD 세포에 대한 분리 바이러스의 세포병변효과 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. Coxsackievirus B2, B3, B4 혈청형은 세 가지 세포 모두에서 세포병변이 나타났고 coxsackievirus B6혈청형은 HEp-2와 Vero세포에서 약한 감수성을 나타내었으나 RD 세포에서는 모두 강한 감수성을 나타내었다. Echovirus 6 혈청형은 공통적으로 HEp-2 세포에서는 약한 감수성을 나타내었으나 Vero 세포와 RD세포에서는 강한 감수성을 나타내었다. Echovirus 25 혈청형은 RD세포에 강한 세포병변을 일으켰으며 echovirus 30 혈청형은 HEp-2 세포에서 약한 감수성의 양상을 띄었으나 Vero와 RD세포에서는 모두 강한 세포병변이 관찰되었다.

3.3. 전자현미경 관찰

전자현미경으로 촬영한 coxsackievirus 및 echovirus의 형태학적 양상은 Fig. 1에 나타내었다. 형태학적으로 두 바이러스가 유사하였으며 envelope가 없었다.

3.4. 중화항체법

중화항체 반응을 시행하여 바이러스를 동정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 분리 바이러스로는 coxsackievirus가 B2, B3, B4, B6 혈청형으로 4형이 동정되었으며 echovirus는 6, 25, 30 혈청형의 세 종류로서 본 분리 조사에서는 모두 7혈청형이 확인되었으며 한 사례는 형을 결정할 수 없었다. 가장 많이 분리된 바이러스 종류로는 coxsackievirus로서 그 형별로는 B2혈청형이 3주, B3혈청형이 8주였고

Table 1. Isolated enteroviruses in the patients with aseptic meningitis in Pusan, 1998

Month	Age	Sex	Specimens	CPE*			Neutralization test
				HEp-2	Vero	RD	
April	3	Female	Stool	+	+	+	Echo 25**
April	4	Female	Stool	±	+	+	Echo 6
April	4	Male	Stool	+	+	+	Echo 25
June	7	Female	Throat	±	+	+	Echo 6
June	9	Female	Stool	+	+	+	CB 2***
June	5	Female	Stool	±	±	+	CB 6
July	6	Male	Stool	±	+	+	Echo 6
July	13	Male	Stool	+	+	+	CB 3
July	5	Male	Stool	+	+	+	CB 2
July	3	Female	Stool	+	+	+	CB 2
Sept	31	Male	Stool	±	+	+	Echo 30
Sept	4	Male	Throat	±	-	+	Untypable
Sept	4	Male	Stool	+	+	+	CB 3
Sept	28	Female	Throat	±	+	+	Echo 6
Sept	5	Female	Throat	+	+	+	CB 3
Oct	8	Male	Stool	+	+	+	CB 4
Oct	2	Male	Throat	+	+	+	CB 3
Nov	5	Female	Throat	+	+	+	CB 4
Dec	14	Male	Throat	+	+	+	CB 3
Dec	48	Female	Throat	+	+	+	CB 3
Dec	39	Male	Throat	+	+	+	CB 3
Dec	5	Female	Throat	+	+	+	CB 3

CPE*: Cytopathic effect, +; positive reaction, -; negative reaction, ±; positive or negative reaction, Echo**: echovirus, CB***: coxsackievirus.

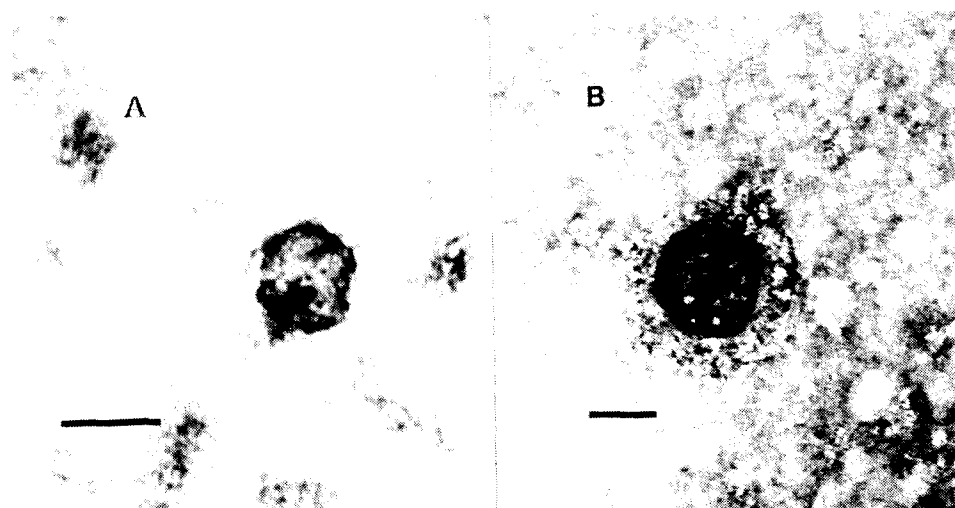


Fig. 1. Electron micrograph of coxsackievirus(A) and echovirus(B) Bar represents 50nm.

B4혈청형이 2주, 그리고 B6혈청형이 1주의 빈도로 분리되었다. Echovirus의 경우에는 6혈청형이 4주, 25혈청형이 2주, 그리고 30혈청형이 1주로 동정되었다.

4. 고찰

인체에 병원성을 유발하는 바이러스의 감염기전은 여러 요소가 관여하고 한번 발생시 전염성이 강한 경우 폭발적인 전염력으로 환자발생을 가져올 수 있다. 도시의 인구 밀집화 현상이나 위생이 불량하거나 공동생활을 해야하는 도시에서는 전염경로의 차단이 문제될 수 있으며 공중보건에 어려움이 있을 수 있다. 이러한 관점에서 유행 예측을 통한 예방을 위한 노력이 필요하다.

일반적으로 흔히 분리되는 장내바이러스의 종류가 coxsackievirus, echovirus, poliovirus, enterovirus, calicivirus 등으로 다양한 혈청형이 알려져 있으나 우리 나라에서 병원성이 문제가 되는 형은 주로 coxsackievirus B2, B3, B4, B5, B6혈청형이었으며 echovirus는 6, 9, 30혈청형으로 알려져 있다. 박³⁾등의 결과에 의하면 1997년 부산에서의 무균성 뇌막염 원인바이러스가 coxsackievirus B5, echovirus 6, 30혈청형이었고 혈청형이 결정되지 않은 것도 있다고 하였다. 1998년 부산지역에서는 모두 7혈청형의 바이러스를 분리하였는데 coxsackievirus는 B2, B3, B4, B6혈청형이었으며 echovirus는 6, 25, 30혈청형이 분리되었는데 이는 전년도에 비하여 4혈청형이 더 분리된 것이다. 그 외에 calicivirus도 확인이 되었는데 이는 앞으로 더욱 다양한 장내바이러스가 분리될 수 있음을 시사한다.

본 역학 조사에서는 바이러스의 분리를 위하여 306건의 분변 및 인후 분비물을 대상으로 바이러스의 분리를 시도하였는데 결과적으로는 7.2% 정도의 바이러스분리로 보아 계속적인 시도가 요구된다고 사료되며 분변에서의 바이러스 분리율과 인후분비물이 거의 같은 결과로 나타났는데 이는 장내 바이러스의 분리에 두 가검물이 모두 가능한 것으로 사료되어 졌다.

월별로 바이러스의 분리를 비교하여 본 결과 4월부터 12월 사이에 대부분의 분리가 이루어 졌는데 박^{3,6)}등이 보고한 4월에서 9월 사이에 부산지역의 무균성 뇌막염의 발생빈도가 높다는 결과와도 부분적으로 일치하는 것을 볼 수 있었다.

박³⁾이 보고한 부산지역에서의 무균성 뇌막염의 발생현황에서는 평균연령이 6.2 ± 3.29 세이었는데 이는 본 자료에서 제시한 결과와도 유사한 양상이었다. 성별이나 나이별로 무균성 뇌막염 원인 바이러스의 분리빈도를 비교하여 본 결과는 98년의 부산지역에서의 대부분의 분리 연령이 10세 미만으로 나타났으며 10세 이상으로는 두 명이 있었으며 20대 이상의 성인 남녀에서도 분리를 나타내었다. 남아와 여아의 비율이 같은 양상을 나타내었는데 이 결과는 김,¹⁾ 박³⁾이 보고한 발생양상과 유사하고 별로 차이가 없었다.

이상의 결과를 볼 때 장내바이러스의 발생은 계속 진행될 것으로 보이는데 분리원의 다양화, 최근의 식수원에서 바이러스 분리를 시도하고 있는바 더 많은 분리를

계속하면 지금까지 밝혀진 사례 외에도 더 다양한 양상의 바이러스 분리가 가능할 것으로 보이고 역학 조사를 지속하여 집단 발생의 위험을 사전에 막을 수 있는 대책을 강구하여야 할 것으로 보인다.

5. 결론

무균성 뇌막염은 장내바이러스에 의하여 발생하며 원인 바이러스의 양상이나 빈도가 다양할 수 있는데 1998년 부산지역의 분리양상은 다음과 같았다.

- 1) 1998년 부산시내의 종합병원으로부터 수거된 총 306건의 무균성 뇌막염 환자의 가검물을 대상으로 역학조사를 위한 원인 바이러스 검출 결과 7.2%가 바이러스 양상반응을 나타내었고 동정이 되지 않은 예도 있었다.
- 2) 바이러스 분리원으로는 분변이 12사례이었고 인후 분비물은 10사례이었다.
- 3) 98년 부산지역에서의 무균성 뇌막염 원인 바이러스 검출은 4월부터 12월까지였으며 4월과 6월에 각각 3주, 7월에 4주, 9월에 4주, 10월에 2주, 11월에 1주, 그리고 12월에 4주로 나타났다.
- 4) 바이러스 분리 연령별로는 2세에서 14세 사이였으며 성인은 4사례로 나타났다.
- 5) 98년도의 경우 남녀의 바이러스 분리비율이 1:1로 같았다.
- 6) 바이러스의 확인은 세포병변효과, 전자현미경 관찰, 그리고 중화항체법으로 혈청형을 동정하였다.
- 7) 분리된 장내 바이러스의 종류는 무균성 뇌막염 원인 바이러스로 알려진 echovirus와 coxsackievirus 이었으며 분리된 혈청형에는 echovirus 6 혈청형이 4주, echovirus 25 혈청형이 2주, echovirus 30 혈청형이 1주이었고 coxsackievirus B2 혈청형이 3주, coxsackievirus B3 혈청형이 8주, coxsackievirus B4 혈청형이 2주, coxsackievirus B6 혈청형이 1주로 분리되었으며 바이러스형을 결정지을 수 없는 것이 1주로 나타났다.

이상의 결과로 보아 부산지역의 무균성 뇌막염의 환자가 소아이며 해마다 보고되고 있는 추이로 보아 지속적인 대책과 아울러 장기적인 발생가능에 대한 예방책을 홍보하여야 할 것으로 보이고 지속적인 역학조사가 이루어져야 할 것으로 보인다.

참고 문헌

- 1) 김탁수, 허지연, 박영희, 정민규, 김성원, 1997, 무균성 뇌막염에서 증상발현부터 진단까지 걸린 시간에 따른 시기별 유행기간의 검토, 소아감염, 3(2), 168-173.
- 2) Berlin, L. E., M. L. Rorabaugh, F. Heldrich, K. Roberk, T. Doran, and J. F. Modlin, 1993, Aseptic meningitis in infants 2 years of age: diagnosis and etiology, J. Infec. Dis., 168, 888-892.
- 3) 박영희, 김원정, 손병희, 김성원, 1998, 1997년에 부산지역에서 유행한 무균성 뇌막염, 소아 감염, 5(1), 115-120.
- 4) 김동수, 1997, 소아의 무균성 뇌막염, 소아감염, 4(1), 43-47.

- 5) Wenner, H. A., 1972, The enteroviruses, *Am. J. Clin. Patho.*, 57, 751-761.
- 6) 박소미, 류정우, 김동수, 윤재득, 이홍래, 김기순, 배유병, 1996, 1996년 봄철 무균성 뇌막염 환자에서 원인 바이러스 검출, *감염*, 29(25), 387-395.
- 7) Dagan, R., J. A. Jenista, and M. A. Menegus, 1988, Association of clinical presentation, laboratory findings and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infections, *J. Pediatr.*, 113, 975-978.
- 8) Moore, M., 1992, Enteroviral diseases in the United States, 1970-1977, *J. Infect. Dis.*, 146, 103-108.