

실험실 감시에 의한 인천 지역에서의 인플루엔자 역학 및 유행 양상, 2003/2004~2004/2005

이미연, 공용우, 오보영, 정승혜, 김혜영, 이제만

인천보건환경연구원

배 경 : 인플루엔자는 주로 겨울철에 유행하는 전염성이 높은 바이러스성 호흡기 질환이다. 인플루엔자 바이러스는 주요 항원 변이로 인해 매년 새로운 바이러스가 출현할 가능성이 크다. 국내에서는 1997년에 인플루엔자 감시망이 구축되었고 2000년에는 전국적인 감시망으로 확대되어 발생 추이를 조사하고 있다. 이에 본 연구에서는 인천 지역에서 2003/2004~2004/2005 유행 절기 동안 실험실 감시에 의해 확인된 인플루엔자 유행 양상을 조사하여 방역 대책 자료로 활용하고자 하였다.

방 법 : 인플루엔자 바이러스를 분리하기 위해 2003/2004~2004/2005 유행 절기인 10월부터 다음해 5월까지 인천 지역 1개 보건소 및 7개 민간의료기관에 내원한 인플루엔자 유사 환자로부터 인후 도찰물 등의 호흡기 검체를 채취하였다. 이후 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 세포에 접종하여 세포병변을 관찰한 후 RT-PCR 방법에 의해 확인하였다.

결 과 : 인플루엔자 바이러스가 처음 분리된 시기는, 2003/2004 절기에는 2003년 47주(11월 셋째 주)에, 2004/2005 절기에는 2004년 43주(10월 4째 주)로서, 2004/05 절기에는 지난 절기보다 약 4주 빠르게 유행이 시작된 것으로 확인되었다. 인플루엔자 바이러스 분리 결과 2003/2004 절기에는 총 532건의 검체 중 330검체 (62.0%)에서 확인되었으며, 분리주 중 A/H3N2형은 161주(48.8%), A/H1N1형은 1주(0.3%), B형이 168주 (50.9%)였다. 2004/2005 절기에는 총 457건의 검체 중 278검체에서 (60.8%) 바이러스가 분리 되었고, 이중 A/H3N2형은 232주(83.5%), A/H1N1형은 5주(1.8%), B형은 38주(13.7%)이었다. 연령별로는 두 절기 모두 7~19세의 학령기층에서 높은 발생 분포를 보였다.

고 찰 : 인천 지역에서의 인플루엔자 실험실 감시 결과 2003/2004 및 2004/2005 절기 모두 60% 이상의 높은 양성율을 보였으며 A/H3N2형에 의한 유행이 우세한 것으로 나타났다. 향후 참여 의료기관 참여를 증가시키는 등의 방안을 통해 전국적인 방역대책 수립과 호흡기질환 감시체계 구축 기반 자료로 활용하는 것이 가능하리라 본다.

서 론

인플루엔자 바이러스는 *Orthomyxovirus* 과에 속하는 단쇄, 나선형 RNA 바이러스로 핵산의 구성에 따라 A, B, C형으로 분류된다. A형 인플루엔자 바이러스는 표면항원인 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)에 의해서 아형(subtype)이 결정되는데 HA는 바이러스를 체세포에 부착시키는 역할을 하며 15가지 아형(H1-H15)이 있고[1], NA는 인플루엔자 표면항원인 동시에 새로 합성된 바이러스를 세포 밖으로 방출하는데 중요한 역할을 하며 9가

지 아형(N1-N9)이 있다[2]. 이중 세 가지 HA (H1, H2, H3)와 두 가지 NA (N1, N2)가 주로 사람에서 발생하는 인플루엔자 유행 및 대유행을 초래하게 된다[3]. B형 인플루엔자는 A형 보다 경미한 증상을 나타내며 주로 아이들에서 발생을 하고, A형보다 항원변화가 적으며, 면역학적으로 안정적이고, 오직 사람에게만 감염된다. C형 인플루엔자는 대부분 증상이 없고 사람에서 감염된 예가 거의 없으며 유행과도 연관이 없다[4]. 인플루엔자 바이러스 감염 시 소아와 고령층에서 높은 감염률을 보이며, 심장질환, 만성 폐질환, 악성 종양, 당뇨병, 만성 신장 질환 등을 가진 사람은 치명적인 호흡기 합병증으로 사망하기도 한다[5]. 인플루엔자 바이러스는 항원변이라는 독특한 특징을 가지고 있어, 새로운 유행형이 나타날 때는 기존에 알려진 것보다 훨씬 높은 사망률을 야기 할 수 있다[6]. 1997년과 1999년 홍콩에서 A/H5N1형 및 A/H9N2형에 의한 조류 독감 발생 후 유전자 분석결과 인간 인플루

접 수 일: 05/7/29 게재승인일: 05/9/16

교신저자: 이미연

(400-102) 인천시 중구 신흥동 2가 18-4

보건환경연구원

TEL: 032)440-5445 FAX: 032)440-5449

E-mail: kite1014@hanmail.net

엔자 바이러스와의 재조합 없이 조류 바이러스로부터 직접 감염된 것이 밝혀짐으로써 신종 인플루엔자 바이러스 유행에 대한 경각심을 불러 일으켰다[7]. 질병 진단 기술의 발전과 예방의학에 대한 높아진 관심 및 인플루엔자의 주기적 산발적 대유행에 대한 경각심 고조는 인플루엔자에 대한 더욱 폭넓은 이해와 지식을 전달해주었을 뿐만 아니라 이를 보다 대중적인 문제로 인식하게 했다 [8]. 본 연구는 2003/2004, 2004/2005 인플루엔자 표본감시 절기에 인천시내 보건소 및 소아과, 병의원에 내원한 인플루엔자 의사 환자를 대상으로 인플루엔자 바이러스 분리와 아형분석을 통해 주별, 연령별 발생추이를 조사하고 유행양상을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

2003/2004~2004/2005 유행 절기인 10월부터 다음해 5월까지 인천 지역 1개 보건소 및 7개 민간의료기관에 내원한 38℃ 이상의 갑작스러운 발열과 더불어 기침 또는 인후통을 보이는 인플루엔자 의사 환자(ILI: influenza like illness)에게서 2003/2004 유행기 532건, 2004/2005 유행기 457건의 총 989검체를 채취하였다.

2. 방 법

1) 검체채취 및 처리

인플루엔자 의사 환자의 인후부를 멸균된 면봉으로 도말하여 바이러스 수송용 배지(VTM, Becton-Dickinson Maryland, USA)에 넣은 후, 냉장 운반하여 바이러스 분리 후 아형분석을 실시하였다. 인플루엔자 바이러스에 감수성이 높은 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 세포주를 질병관리본부 호흡기바이러스과에서 분양받아 5% fetal bovine serum (FBS, JRH, USA) 이 첨가된 Minimum Essential Medium (MEM, JBI, WEIGENE, USA)을 이용하여 5% CO₂, 37℃ 조건에서 배양하였다.

2) 바이러스 분리

바이러스 수송배지에서 면봉을 제거한 후 penicillin 5

U/mL, streptomycin 5 µg/mL 및 nystatin 100 µg/mL (Gibco, USA)을 각 100 µL씩 첨가하여 잘 혼합한 후 15분 간격으로 흔들어 주면서 4℃에서 1시간 동안 반응하였다. 이를 3,000rpm으로 4℃에서 20분간 원심 분리한 후 MDCK 세포주가 단층으로 형성된 24-well 조직배양접시에 상층액 200 µL를 duplicate로 접종하고 5% CO₂, 34℃의 조건으로 10일간 배양하였다. 세포병변효과(cytopathic effect:CPE)가 관찰되면 이를 수확하여 바이러스 유무 및 아형분리에 사용하였다.

3) RNA 분리

세포병변효과를 보인 배양액을 ZR-Viral RNA Kit (ZYMO Research, Orange ca, USA) 또는 Trizol reagent (MRC, Molecular Research Center Inc. Ohio, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 즉 배양액 150 µL에 Viral RNA Buffer를 450 µL 넣어 섞은 후 그 혼합물을 Zymo-spin column (ZYMO Research, Orange ca, USA)에 옮겨 15-60초 간 10,000 × g로 원심 분리한 후 상층액은 버린다. Wash buffer 300 µL를 Zymo-spin column에 넣어 15-60초간 10,000 × g로 2회 세척 후, RNase 제거증류수 20 µL에 녹여 추출하였다. 추출한 RNA는 -70℃에 보관하면서 cDNA합성을 위한 주형으로 사용하였다.

4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

반응조건은 RNA 6 µL에 10 pM specific primer 1 µL, R-Nase inhibitor 40 U/µL 0.5 µL, dNTP 10 mM 1 µL, MMLV reverse transcriptase 200 U/µL 0.5 µL와 5 × RT buffer 4 µL를 넣어 최종부피가 20 µL가 되도록 조정한 후, 37℃ 10분, 42℃ 60분, 94℃ 3분에서 반응시켰다.

5) PCR

A/H3N2, A/H1N1 및 B형의 HA 유전자에 대해 특이적으로 제작된 6종류의 시발체 (Table 1) 및 Taq polymerase를 이용하였고 PCR 반응조건은 94℃에서 5분 동안 변성한 후, 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분간 35회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product는 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 자동영상분석기로 판독(Bio-rad, California, USA)하였다(Table

Table 1. Sequence of primers used for typing and subtyping of Influenza viruses

Subtype	Primer	Sequence(5' → 3')	Product size (bp)
HA(A/H1)	AHI BF	ATAGGCTACCATGCGAACAA	944
	AHI BR	CTTAGTCCTGTAACCATCCT	
HA(A/H3)	AH3 BF	AGCAAAGCTTTTCAGCAACTG	591
	AH3 BR	GCTTCCATTTGGAGTGATGC	
HA(B)	BHA BF	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	767
	BHA BR	TGGAGGCAATCTGCTTACC	

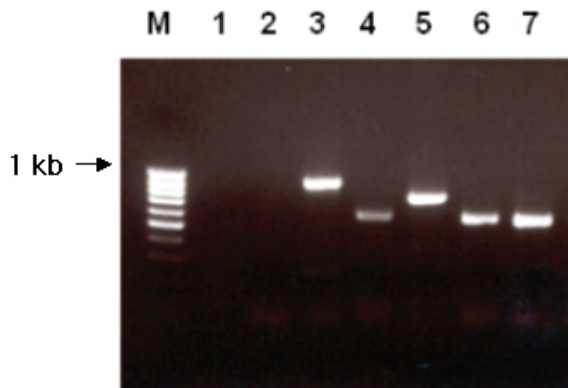


Fig. 1. Detection and subtyping of influenza virus from clinical specimen by multiplex RT-PCR. M, 100 bp size marker; lanes 1 to 2, negative control; lanes 3 to 5, influenza virus positive control (A/H1N1, A/H3N2, B);lanes 6 to 7, A/H3N2 isolates

1) (Fig. 1).

결 과

1. 인플루엔자 의사환자 보고수

조사기간 동안 2003/2004 절기 532건, 2004/2005 절기 457건의 인플루엔자 의사환자 보고가 있었다(Fig. 2).

Table 2. Types and number of influenza viruses isolated, 2003/2005

Season	Specimen	Isolated (positive rate)	A		B	First isolation
			H1N1	H3N2		
2003/2004	532	330(62.0%)	1	161	168	week 47, 2003
2004/2005	457	278(60.8%)	5	232	41	week 44, 2004
Total	989	608(61.5%)	6	393	209	

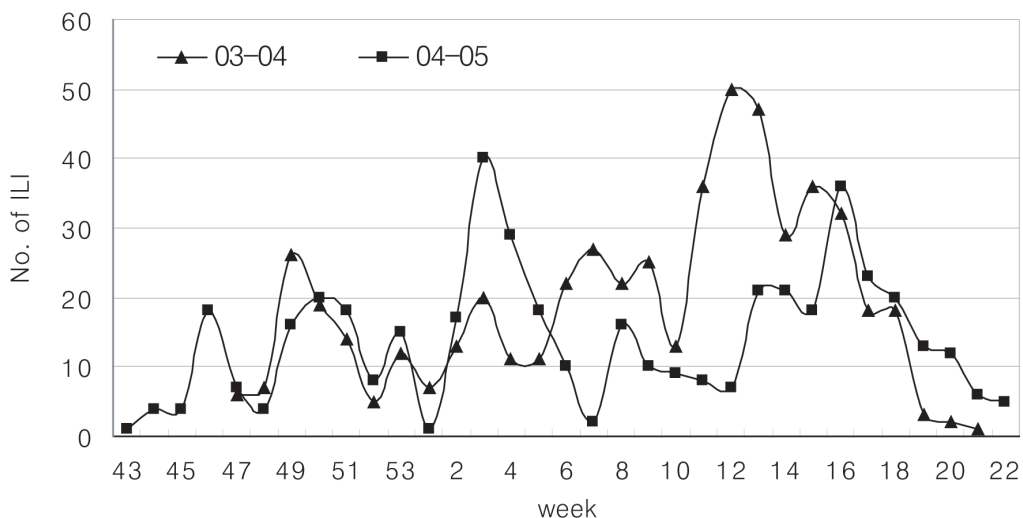


Fig. 2. A number of influenza-like illnesses reported during the 2003/2005 season

2003/2004 절기에는 2003년 47주(11월 세째 주)에 처음 보고되었고, 2003년 49주(12월 1째 주)부터 증가하기 시작하여, 2004년 11주(3월 2째 주)부터 2004년 18주(5월 1째 주)까지 7주간 유행하였으며 유행의 정점은 2004년 12주(3월 세째 주)였다. 2004/2005 절기에는 2004년 43주(10월 4째 주)를 시작으로 2005년 2주(1월 2째 주)부터 2005년 6주(2월 1째 주)까지 증가하였고, 2005년 13주(3월 4째 주)부터 2005년 18주(5월 1째 주)까지 한 번 더 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2).

2. 아형별 바이러스 분리 현황

2003/2004 절기 532건의 의사 환자 검체를 분석한 결과, 330건(62.0%)이 바이러스분리 양성으로 확인되었는데, 아형별 분석을 보면 A/H3N2형 161주(48.8%), A/H1N1형 1주(0.3%), B형은 168주(50.9%)이었다. 2004/2005 절기에는 457건의 의사환자 검체를 분석하여 278건(60.8%)에서 바이러스가 분리 되었으며, 분리된 바이러스는 A/H3N2형 232주 (83.5%), A/H1N1형 5주(1.8%), B형은 38주(13.7%)이었다(Table 2).

3. 인플루엔자 바이러스의 시기별 분리 현황

의사 환자 발병일 기준으로 시기별 분리현황을 보면 2003/2004 절기에는 2003년 47주(11월 3째 주)에 A/H1N1

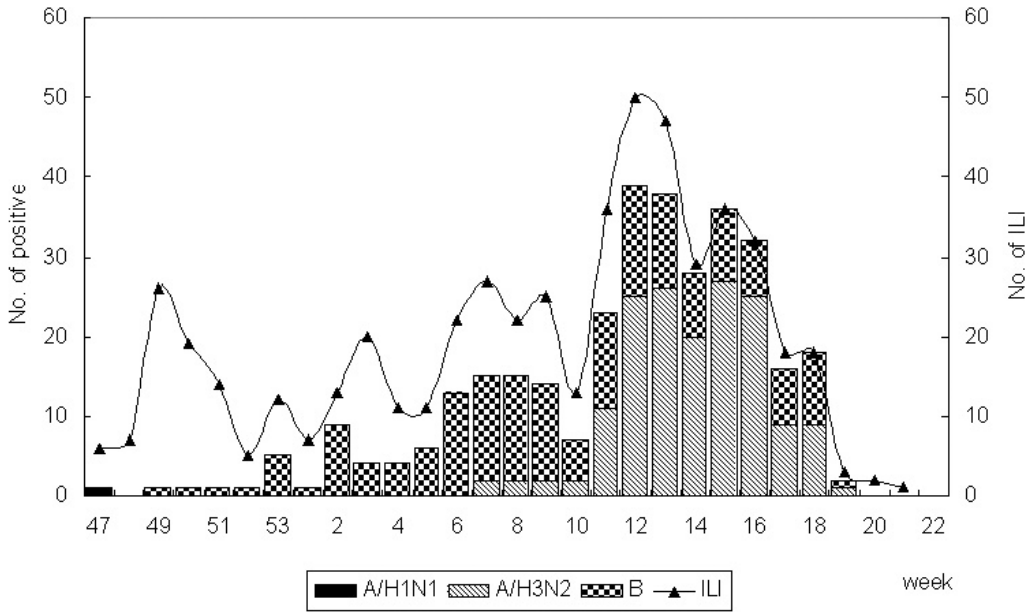


Fig. 3. A number of influenza-like illnesses reported and influenza subtypes isolated during the 2003/2004 season

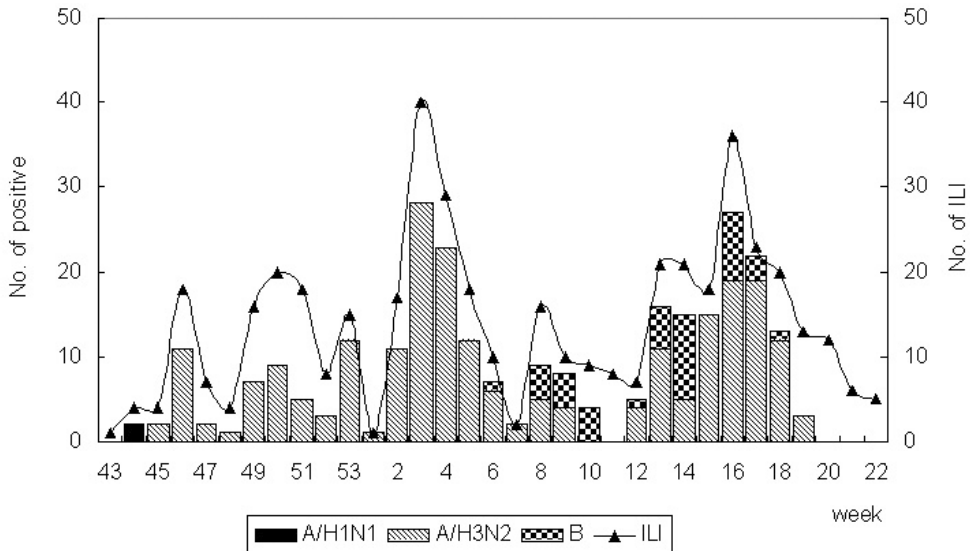


Fig. 4. A number of influenza-like illnesses reported and influenza subtypes isolated during the 2004/2005 season

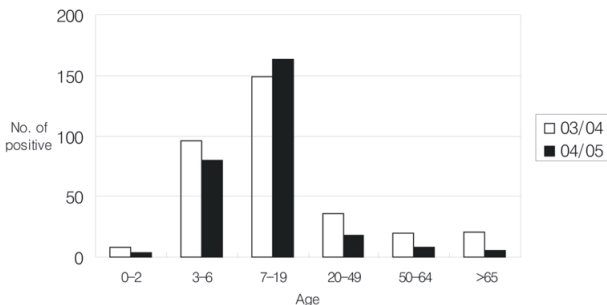


Fig. 5. A number of influenza viruses isolated during the 2003/2005 season by age groups

이 처음 분리되었고, 2003년 49주(12월 1째 주)에 B형이 분리되기 시작하여 2004년 6주(2월 2째 주)까지 유행하였으며, 2004년 7주(2월 3째 주)부터 A/H3N2형도 같이 분리되었다. B형은 2003년 53주(12월 4째 주)부터 2004년 18주(5월 1째 주)까지 꾸준히 분리되었고, 2004년 7주(2월 3째 주)에 A/H3N2형이 분리된 이후 2004년 12주(3월 둘째 주)부터 5주간 유행하였으며, 2004년 12주(3월 3째 주)부터는 A/H3N2가 B형에 비해 우세하였다(Fig. 3). 2004/2005 절기에는 2004년 44주(10월 5째 주)에 처음 A/H1N1이 처음 분리되었고, 2004년 45주(11월 1째 주)에 A/H3N2형이 분리되기 시작하여 2005년 3주(1월 3째 주)에

정점을 이루었다. 주로 B형 바이러스가 먼저 분리된 2003/2004 절기와 달리 2004/2005 절기에는 A/H3N2형이 주로 분리되어 2005년 2주(1월 2째 주)부터 2005년 6주(2월 1째 주)까지 큰 발생을 보였으며, 2005년 6주(2월 1째 주)부터 B형도 같이 분리되기 시작하여 2005년 12주(3월 3째 주)부터 2005년 18주(5월 1째 주)까지 또 한 번의 발생양상을 보였다. 두 절기 동안 인천지역에서는 A/H3N2형과 B형 바이러스가 동시에 분리되었다(Fig. 3)(Fig. 4).

4. 인플루엔자 바이러스의 연령별 분리 현황

두 유행기에 인플루엔자 바이러스가 분리되었던 608명 환자의 연령별 분포를 보면, 2세 이하의 영 유아 12명 (2.0%), 3-6세 학령전기 소아 176명 (28.9%), 7-19세의 학령기 312명 (51.3%), 20-49세 성인층 54명 (8.9%), 50-64세 장년층 28명 (4.6%), 65세 이상 노년층은 26명 (4.3%)으로 학령기에서 가장 높은 양성률을 보였다(Fig. 5).

고 찰

질병관리본부에서는 1997년부터 70-83명의 표본감시 의사를 중심으로 인플루엔자 표본감시제도를 도입하였으며, 2000년에는 전염병예방법 개정으로 인플루엔자를 제3군 법정전염병으로 지정하고 2000년 9월부터 전국적인 표본감시체계를 구축하였다. 2003년 10월에는 보고체계를 개편하여 환례 정의, 서식, EDI 보고프로그램을 개발하여 인터넷기반 보고체계, 환례 정의 및 서식을 단순화 하였다[9-10]. 이러한 인플루엔자 표본감시 체계와 법적 기반을 바탕으로, 2003/2004 절기와 2004/2005 절기 동안 인천지역의 보건소와 소아과 및 병의원이 참여하는 실험실 감시에 의한 인플루엔자 의사환자 및 아형별 분리 현황을 분석하였다. 2003/2004 절기 인플루엔자 의사환자 발생 대비 바이러스 분리 현황은 유행시점 초기에는 약간의 차이를 보이거나, 그 이후에는 바이러스 분리율이 높아 유사한 흐름을 보였고, 2004/2005 절기에는 초반과 후반에 두 번의 현저한 발생을 보였으며, 두 절기 모두 3월 ~ 4월 의사환자 및 바이러스 분리가 많이 발생됨을 볼 수 있었다. 우리나라에서는 1990년부터 1998년까지 influenza virus가 A형은 매년, B형은 2년 주기의 유행이 나타나는 것으로 알려져 있다[11]. 2002/2003 절기에는 A/H3N2에 의한 유행이었는데 [9], 이번 연구에서는 2003/2004 절기에 B형이 전 기간에 걸쳐 꾸준히 유행하였으며, 중반부터 A/H3N2형도 비슷한 양상으로 유행하였고, 2004/2005절기에는 A/H3N2형이 주로 분리되다 후반부터 B형도 같이 발생하는 양상을 보여 본 연구에서는 두 절기 모두 A/H3N2형과 B형이 동시에 발생함을 알 수 있었다. 연령별 분리 현황을 보면 평균 감염률은 10~20%로 추산되나 두 절기 모두 7~19세 사이의 학령기층에서 51.3%의 높은 양성률을 보였으며 유행기 특징군이나 특

정 연령층에서는 40-50%에 이르기기도 한다는 외국의 논문과도 일치하였다[12]. 인플루엔자 표본감시의 목적은 국가 인플루엔자 관리대책 수립을 위한 기초 자료를 확보하고, 예방백신의 효과 분석과 백신 생산을 위한 자료로 활용하는 것이다. 이는 환자가 가장 먼저 내원하는 일차 진료기관인 병의원과 실험실의 연계 하에, 각 지역뿐 아니라 중앙부서 차원의 자료 수집으로 인플루엔자 의사환자의 발생 경향을 감시하여, 유행을 초기에 파악하고 유행 주를 분리하여 주요 항원의 특성을 파악함으로써 새로운 바이러스의 출현을 예측 할 수도 있을 것이다. 인플루엔자 감시체계를 보다 활성화 하려면 지역별 인플루엔자 실험실 표본감시 참여기관의 편차를 줄일 수 있는 노력과 동시에 표본감시에 참여하는 병의원에 동기를 부여 할 수 있도록 중앙부서 차원의 지원이 요청된다. 최근에 Respiratory syncytial virus 등 다양한 호흡기 바이러스 검출에 여러 개의 서로 다른 primer를 이용하여 한 개의 시험관 내에서 역전사 중합효소반응을 한꺼번에 수행할 수 있는 single-step single-tube multiplex RT-PCR 진단법이 도입되어, 호흡기 바이러스집단 발생 시 이러한 검사법의 도입으로 원인 바이러스의 신속한 진단이 가능해졌다 [13-15]. 인플루엔자 표본감시체계 도입 이후 인천지역에서 2004년 10월 26일(44주) 국내 첫 A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 바이러스를 분리하여 전국에 인플루엔자 주의보를 발령하였다. 본 연구의 결과는 지역 및 국가 인플루엔자 대유행에 대비한 지속적인 감시와 향후 발전 방안 모색을 위한 자료로 활용될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kida H, Shortridge KF, Webster RG. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 1988;162:160-6.
2. Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of Immune recognition of influenza by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1990;33:165-89.
3. Wiely DC and Skehel TT. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann Rev Biochem* 1987;56:365-94.
4. Gubreva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000;355:827-35.
5. Glezen WP. Influenza surveillance in urban area. *Can J Infect Dis* 1993;4:272-274.
6. Stuar-Harris, Schild CN, G Oxford JS. The epidemiology of influenza. In *Influenza. The Virus and the Disease* 1985;2:118-256.
7. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chamber TM, Kawaka Y. Evolution and ecology of influenza A virus. *Microbiol Rev* 1992;56:152-79.
8. Peter A, Patriarca and Nancy J. Cox. Influenza Pandemic

- Preparedness Plan for the United States. 1997;176(1):S4-7.
9. Korean Centers for Disease Control and Prevention. 2003-2004 Influenza management. 2003.
 10. Korean Centers for Disease Control and Prevention. 2004-2005 Influenza management. 2004.
 11. Nah SY and Park SE. Epidemiology of Influenza Virus over 8 Years (1990~1998) in Seoul, Korea. KSID 1999; 31:210-6.
 12. Monto AS and Kioumeh F. The Tecumseh study of respiratory illness. Am J Epidemiology 1993;102:553-3.
 13. Zambon MC, Ellis JS, Sadler CJ, Fleming DM. The use of multiplex PCR for typing and subtyping influenza viruses in a sentinel surveillance scheme in the UK. Options for the Control of Influenza III. Elsevier, Amsterdam 1996:607-14.
 14. Park SW, Kwon TK, Kim ES, Woo YD, Kim YS, Kim YK. Rapid Detection and Identification of Human Respiratory Syncytial Virus, Human Parainfluenza Virus Type 1, 2 and 3 by single-tube Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. J microbiol Virol 2002;32(2):203-9.
 15. Shin GC, Park C, Lee JY, Na BK, Park JW, KANG C, et al. Development of Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Detection and Typing of Parainfluenza Viruses. J Bacteriol Virol 2001;31(2):199-206.
 16. Hwang YO, Seo BT, Choi BH. Analysis of Isolation and Subtyping of Influenza Virus in Seoul, during 1999~2003. J Bacteriol Virol 2004;34(1):67-74.
 17. Hwang YO, Lee JI, Seo BT. Analysis of Influenza Virus Isolates in Seoul During 2003/2004 Season. J Kor Soc Microbiol 2005;41(1):53-9.

Epidemiological Analysis of Influenza by Laboratory Surveillance in Incheon, 2003/2004~2004/2005

Mi-Yeon Lee, Young-Woo Gong, Bo-Yong Oh, Seung-Hye Jung, Hye-Young Kim, and Jea-Mann Lee

Incheon Institute of Health and Environment, Incheon, Korea

Background: Influenza is a highly contagious respiratory disease. Influenza virus, which causes epidemics every winter season, has the high possibility of appearing with new virus types every year due to antigen variation. Therefore, we intended to analyze the data on the epidemiology of influenza that had been acquired by laboratory surveillance in Incheon during the 2003/2004 and 2004/2005 seasons and to apply the knowledge to the control and prevention of influenza in Korea.

Methods: Specimens were inoculated into Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and, when cytopathic effect (CPE) was seen, culture supernatants were tested by multiplex RT-PCR for typing and subtyping of influenza viruses.

Results: The first virus of the season was isolated at week 47 (3rd week on November) in 2003 during 2003/2004 and at week 43 (4th week on October) in 2004 during 2004/2005, which was about 4 weeks earlier than in the 2003/2004 season. From 532 specimens cultured for influenza virus during the 2003/2004 season, 330 (62.0%) viruses were isolated: 161 (48.8%) A/H3N2, 1 (0.3%) A/H1N1, and 168 (50.9%) B. During 2004/2005 season, 457 specimens were tested and 278 (60.8%) were positive for influenza virus: 232 (83.5%) A/H3N2, 5 (1.8%) A/H1N1, and 38 (13.7%) B. The incidence of influenza was the highest in the school-age children and young adults of 7 to 19 years age group in both seasons.

Conclusion: Influenza virus was isolated at a high rate (more than 60%) by the laboratory influenza surveillance system in Incheon during the 2003/2004 and 2004/2005 seasons: the predominant strain was influenza A/H3N2 subtype. (*Korean J Clin Microbiol* 2005;8(2):165-171)

Keywords: Influenza virus, Influenza like illness, Epidemiology, Virus culture

Address reprint requests to : Mi-yeon Lee, 18-4, Sinheung-dong 2-ga, Jung-gu, Incheon 400-102, Korea.

Tel. +82-32-440-5445 Fax. +82-32-440-5449 E-mail: kite1014@hanmail.net