

광주지역에서의 성매개 바이러스성 질병에 관한 연구

임상병리과
조교수 이영중

I. 서론

성인성 질병(sexually transmitted diseases)을 유발하는 바이러스로는 human immunodeficiency virus(HIV), herpes simplex virus type-II(HSV-II), cytomegalovirus(CMV), human papillomavirus(HPV) 및 hepatitis B virus(HBV) 등 여러가지가 있다. 이들 바이러스들은 전세계적으로 급격한 전파추세를 보이고 있고 또한 효과적인 치료제가 없어 이에 대한 대비책이 시급한 실정이며, 특히 HSV-II나 HPV 등은 여성 자궁경부암을 유발하며 심한 통증을 수반한다(1,2,3).

HSV-II는 herpesviridae에 속하며 혈청학적, 생물학적 및 생화학적 방법에 의해 일반인에게 흔히 감염되어 있는 HSV-I과 구분되며 임신부가 출산시에 HSV-II를 산도에 가지고 있으면 신생아 전염가능성이 40% 정도인 것으로 알려지고 있다(4). HSV-II에 대한 바이러스 동정시험은 Shin 등에 의해 이미 보고된 바 있다(5). 같은 family에 속하는 CMV는 renal allograft recipient 중 32-96%에서 발생하며 이들의 대부분은 무증상이지만 pneumonitis, hepatitis, retinitis, hyperpyrexia 및 transplant rejection syndrome을 일으키기도 한다(6,7).

CMV에 감염이 되면 세포가 특이하게 커지며 intranuclear inclusion이 생기고 대부분 clinical 및 latent 감염이 되어 무증상으로 지내게 되는데, 매우 중요한 점은 immunocompromised individual에게 생명의 위협을 줄 수도 있고 임신부에게는 태아에 만성적이고 치명적인 감염을 유발시킬 수도 있다는 것이다(8,9). CMV는 cervical secretion, blood transfusion, transplantation, saliva, urine 이외에 주로 breast feeding에 의해 전파가 되는데 이는 불결한 위생상태가 아니고 생활수준이 높은 일본, 스웨덴, 핀란드, 독일 등에서의 발생율이 높은 것으로 알 수 있다.

미국의 경우 일반군의 30-75%에 감염되어 있으며, 세계적으로 100%의 감염율을 나타내는 국가가 있는 반면 사회경제학적 및 지리학적 여건에 따라서는 평생동안 CMV에 감염되지 않은 상태로 지낼 수도 있다^(10,11). 선천성 감염은 신생아의 1%를 차지하고 있다⁽¹²⁾.

세포배양 방법에 의한 HPV 및 HBV의 분리, 동정은 분리상의 어려움으로 현재 주로 polymerase chain reaction(PCR) 방법 등으로 항원진단을 하고 있으며⁽¹³⁾, HIV, HSV-II 및 CMV의 경우는 바이러스 분리가 용이하기 때문에 세포배양 방법을 이용하여 바이러스 분리 및 동정을 시도하고 있다^(12,14). CMV는 HSV-II에 비해 세포배양에서 천천히 replicate하며 또한 Human embryonic lung(HEL) 세포가 가장 감수성이 있는 것으로 알려져 있다⁽¹⁴⁾. HSV-I, HSV-II 및 CMV는 서로 공통항원을 가지고 있기 때문에 혈청내 항체시험시 이 항원을 blocking 시키지 않은 경우 위양성이 나타날 수 있다. 본 실험에서는 광주지역에서 피부비뇨기과 내원환자 및 정상인에 대해 면역형광항체실험으로 혈청내 HSV-II 및 CMV에 대한 IgM, IgG 시험을 통한 바이러스 감염 여부 파악과 urine으로부터의 CMV 분리시도를 하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 및 가검물 채취

조사대상군은 1995년 6월부터 1996년 4월까지 11개월간 광주지역에서 개원하고 있는 두 곳의 피부비뇨기과 내원환자로 하였으며 이들 중에는 임질이나 매독 등 다른 성인성 질환에 감염되어 있는 자들도 있다.

CMV 및 HSV-II에 대한 IgG, IgM 검출을 위한 가검물은 대상군의 혈액을 채취하여 원심분리한 다음 혈청을 분리하여 -70°C에 보관한 후 필요시에 사용하였다. CMV의 분리를 위한 가검물은 CMV의 감염이 예상되는 대상군의 소변을 채취하여 실험실로 운반한 후 일부는 바로 배양세포에 접종하고 일부는 -70°C에 보관하였다.

2. 사용세포 및 배양

면역형광항체실험용 세포로는 Vero(African green monkey kidney, ATCC CCL-81) 및 HEL299(Human embryonic lung, ATCC CCL-137)을 사용하였고, 바이러스는 HSV-I(ATCC VR-733, F주), HSV-II(ATCC VR-734, G주) 및 CMV(ATCC VR-538, AD169)를 사용하였으며, CMV 분리용 세포로는 상기된 HEL299를 사용하였다. 이들은 각기 용도에 따라 56°C에서 30분간 heat-inactivation된 FBS(Fetal bovine serum)가 2% 및 10% 함유된 minimal

essential medium (MEM, Gibco)으로 37°C humidified, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

3. 면역형광항체실험용 slide 제조

10% FBS가 함유된 MEM으로 배양된 Vero 및 HEL299 세포의 배양 상층액을 버리고 HSV-I, HSV-II 및 CMV를 각각 적당량 접종하여 37°C 항온기에서 60분간 흡착시킨 후 2% FBS가 들어있는 MEM을 첨가하여 37°C humidified, 5% CO₂ 항온기에서 배양하면서 세포병변 효과(cytopathogenic effect, CPE)를 관찰하였다. 80-90% 정도의 CPE가 발생(HSV-I과 HSV-II 접종 Vero 세포에서는 2-3일, CMV 접종 HEL299 세포에서는 7일 이상)하면 각 세포를 배양용기에서 분리시킨 다음 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)를 넣어 1,000 rpm에서 10분동안 2회 세척하였다. 다시 PBS로 suspension시켜 spot slide에 세포들을 적하시킨 다음 공기 중에서 완전히 건조되면 cold acetone에 10분 동안 넣어 세포를 고정시켰으며 -70°C의 온도에 보관하면서 사용하였다.

4. HSV-II 및 CMV에 대한 혈청내 IgM 및 IgG 검색^(15,16)

HSV-II 항체검사를 위하여 56°C에서 30분간 열처리된 가검혈청 100 μ l와 HSV-I 및 CMV의 혼합액 100 μ l를 섞었으며, CMV 항체검사를 위하여 동일한 혈청 100 μ l와 HSV-I 및 HSV-II의 혼합액 100 μ l를 섞어 각각 37°C에서 60분간 반응시켜 공통항원 제거를 시도한 다음 4,000 rpm에서 30분간 원심한 후 상층액을 취하여 면역형광항체실험을 실시하였다. HSV-II 및 CMV가 감염된 세포가 coating되어 -70°C에 보관중인 spot slide를 꺼내어 공기 건조시킨 후 PBS로 20배 희석된 가검혈청 및 대조혈청을 well당 25 μ l씩 적하시켜 37°C에서 60분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척 후 40배 희석된 fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated goat anti-human IgM 및 IgG를 각각 well당 25 μ l씩 떨어뜨리고 동일한 조건에서 다시 60분간 반응시켰다. PBS로 2회, DDW로 1회 세척한 다음 mounting medium을 떨어뜨려 cover slip으로 덮고 형광현미경으로 관찰하였다.

5. Urine으로 부터 CMV 분리실험^(17,18,19)

10% FBS가 함유된 MEM으로 배양한 HEL299 세포에 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 떨어뜨린 다음 동일한 배지로 suspension하여 24 well plate에 well당 2 ml씩 분주하여 37°C humidified, 5% CO₂ 항온기에서 단층이 형성될 때까지 배양하였다. Urine을 4°C 상태로 실험실에 가져온 다음 우선 pH를 7.3으로 조절하고 FBS를 넣어 10% 농도로 맞춘 다음 penicillin(500 unit/ml)-streptomycin(500 μ g/ml)을 처리한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심하고

상층액을 취하여 urine내에 있는 세포 및 결정체 등을 제거하였다. 24 well plate의 배양상층액을 제거하고 0.5 ml의 urine을 접종하여 4,000 rpm에서 30분동안 원심접종한 다음 여액을 제거하고 2% FBS가 함유되어 있는 MEM을 2 ml 가량 첨가하여 37°C humidified, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 일주일에 1회씩 배양상층액을 교체하면서 세포병변효과를 30일간 관찰하였으며 배양상층액을 버린 후 methanol로 세포를 고정시킨 다음 항원 탐색을 위한 면역형광항체실험을 실시하였다. 고정된 세포에 PBS로 20배 희석된 CMV 항혈청을 25 μ l씩 처리한 다음 37°C humidified chamber에서 1시간동안 반응시킨 후 3회 세척하고 40배 희석된 FITC conjugated goat anti-human IgG를 25 μ l씩 동일한 방법으로 처리하였다. PBS 및 DDW로 세척하고 mounting medium을 떨어뜨려 cover slip으로 덮은 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 가검혈청내 HSV-II와 CMV에 대한 IgM 및 IgG 검색

피부비뇨기과 내원환자 및 일반인 혈청내 HSV-II 와 CMV에 대한 IgM 및 IgG를 면역형광항체실험으로 검색한 결과는 Table 1 과 2에 제시된 바와 같다. Table 1과 같이 260명의 피부비뇨기과 내원환자중 14명(5.4%)으로 부터 anti-HSV-II IgM이 검출되었고 정상인에서는 전혀 검출되지 아니하였으며, anti-CMV IgM은 2집단에서 공히 발견되지 아니하였다. Table 2와 같이 260명의 피부비뇨기과 내원환자 중 227명(87.3%), 그리고 60명의 일반인 중 51명(85.0%)에서 anti-HSV-II IgG가 검출되어 HSV-II 항체양성율에서는 별다른 차이를 나타내지 아니하였으며, anti-CMV IgG는 2집단 모두에서 100%의 양성율을 보였다.

면역형광항체실험법에 의한 피부비뇨기과 내원환자의 anti-HSV-II IgM 양성율은 5.4%로 자료화하여 제시하지는 않았지만 효소면역분석법에 의한 양성율보다 훨씬 낮게 나타났다. 이러한 이유는 면역형광항체실험의 특이도가 높아 위양성을 나타낼 수 있는 다른 factors와 반응을 하지 않기 때문이라고 여겨지고 있으며, 정상인의 경우에 있어서도 두 실험방법 사이에는 매우 큰 차이가 발견되었다. Anti-CMV IgM의 경우도 면역형광항체실험법에 의한 양성율은 정상인이 0.0%가 나왔으며 효소면역분석법에 의한 양성율과 역시 매우 큰 차이를 보여 주었다.

Table 2에 제시된 바와 같이 anti-HSV-II IgG는 피부비뇨기과 내원환자 및 정상인에서 각각 86.2%, 83.7%로 큰 차이가 없었으며, anti-CMV IgG는 2집단에서 공히 100%로 나타나 이들 바이러스에 대한 IgG 검사는 별로 의의가 없음을 알 수 있었다.

바이러스 항체보유율 조사 및 진단하고자 하는 바이러스에 대한 혈청내 항체 위

양성율을 낮추기 위하여 공통항원을 가지고 있는 바이러스와 미리 반응시켜 공통항원을 제거하고자 시도하였으나 특별한 결과를 얻지 못하였으며, Table 2에 제시된 바와 같이 공통항원에 의한 위양성율이 여전히 높게 존재함을 알 수 있었으며, 따라서 공통항원 제거에 의한 항체진단방법의 자체확립이 절실히 요구되었다.

Table 1. Detection of anti-HSV-II IgM and anti-CMV IgM on sera from outpatients of urology & skin clinic and normal persons by immunofluorescent assay

Sera from	Total	Anti-HSV-II IgM			Anti-CMV IgM		
		Posi.	Nega.	Posi.rate(%)	Posi.	Nega.	Posi.rate(%)
Outpatient of urology and skin clinic	260	14	246	5.4	0	260	0.0
Normal person	60	0	60	0.0	0	60	0.0
Total	320	14	306	4.4	0	320	0.0

Table 2. Detection of anti-HSV-II IgG and anti-CMV IgG on sera from outpatients of urology & skin clinic and normal persons by immunofluorescent assay

Sera from	Total	Anti-HSV-II IgG			Anti-CMV IgG		
		Posi.	Nega.	Posi.rate(%)	Posi.	Nega.	Posi.rate(%)
Outpatient of urology and skin clinic	260	227	33	87.3	260	0	100.0
Normal persons	60	51	9	85.0	60	0	100.0
Total	320	278	42	86.9	320	0	100.0

2. Urine으로부터의 CMV 분리시험

피부비뇨기과 내원환자로 부터 채취한 34건의 urine을 감수성 세포인 HEL299에 접종한 결과 2건에서 세포병변 효과가 관찰되었으나 면역형광항체시험을 통하여 항원을 확인한 결과 음성으로 확인되었다. HSV와 CMV의 진단은 세포배양 방법에 의한 바이러스 분리가 가장 민감한데 특히 CMV의 경우 임상적 증상 및 가검물 채취시기, 가검물 운송기간 및 온도, pH 등 제반 조건이 결여될 시 바이러스 분리에 매우 어려움을 나타내고 있다.

IV. 결 론

피부비뇨기과 내원환자 및 정상인 집단에 대하여 성적 접촉에 의하여 전파될 수 있는 herpes simplex virus(HSV)-II 와 cytomegalovirus(CMV)의 감염율을 면역형광항체실험법으로 조사하였으며, 또한 urine으로부터 CMV 분리를 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피부비뇨기과 내원환자 및 정상인 집단의 anti-HSV-II IgM 검출율은 각각 5.4%, 0.0%로 나타났으며, anti-CMV IgM은 전혀 검출되지 아니 하였다.
2. Anti-HSV-II IgG 검출율은 피부비뇨기과 내원환자에서 87.3%(260명 중 227명), 정상인에서 85.0%(60명중 51명)으로 나타나 큰 차이를 발견할 수 없었으며, anti-CMV IgG는 2집단에서 공히 100%의 양성율을 보였다.
3. HEL299 세포를 이용하여 34건의 urine으로부터 CMV 분리를 시도한 결과 2건에서 CPE와 유사한 세포형태가 관찰되었으나 면역형광항체실험 결과 모두 음성으로 확인되었다.

▶ 본 연구는 1995년도 광주보건대학 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝힙니다.

참고문헌

1. Poste G., et al. Herpesvirus hominis infection of the female genital

- tract. *Obstet. Gynecol.* **40**:871-890. (1972)
2. Elisabeth Boden, *et al.* Papilloma virus infection of the vulva. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **68**:179-184. (1989)
 3. Syrjanen K., *et al.* Sexual behaviour of woman with human papilloma virus(HPV) lesions of the uterine cervix. *Br J Vener Dis*, **60**:243. (1984)
 4. Naib Z. M., *et al.* Association of maternal genital herpetic infection with spontaneous abortion. *Obstet. Gynecol.* **35**:260-263. (1970)
 5. Shin Y. O., *et al.* Study on herpes simplex-2 infection in Korea. *The Report of NIH Republic of Korea.* **22**:277-285. (1985)
 6. Musiani M., *et al.* Cytomegalovirus antibody in the urine of renal transplant patients. *J. Med. Microbiol.* **10**:473-476. (1977)
 7. Fiala M., and Payne J. E. Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression. *J. Infect. Dis.* **132**:421. (1975)
 8. Weller R. T. H. The cytomegaloviruses: Ubiquitous agents with protean clinical manifestation. *N. Engl. J. Med.* **285**:203-214; 267-274. (1971)
 9. Hanshaw J. B. Congenital cytomegalovirus infection: A 15-year perspective. *J. Infect. Dis.* **123**:555-561. (1971)
 10. Dworsky M., *et al.* Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, **72**:295-299. (1983)
 11. Pass R. F., *et al.* Cytomegalovirus infections in a day care center. *N. Engl. J. Med.* **307**:477-479. (1982)
 12. Stagno S., *et al.* Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin. Perinatol.* **1**:31-42. (1983)
 13. Steven A. J., *et al.* Evidence of prevalent genital type human papillomavirus infections in adults and children. *J. Infect. Dis.* **162**:60-69. (1990)
 14. Stagno S. Diagnosis of viral infections of the newborn infant. *Clin. Perinatol.* **8**:579-589. (1981)
 15. Nahmias A. J., *et al.* Type specific surface antigens of cells infected with herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**:21-27. (1971)
 16. Nahmias A. J., *et al.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**:386. (1969)
 17. Hudson J. B., *et al.* Cytomegalovirus infectivity: Analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Viol.*

72:235-237. (1976)

18. Alpert G., *et al.* Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *J. Infect. Dis.* **152(3)**:631. (1985)
19. Janssen H. P., *et al.* Immunological detection of cytomegalovirus early antigen on monolayers inoculated with urine specimens by centrifugation and culture for 6 days as alternative to conventional virus isolation. *J. Clini. Microbiol.* **26(7)**:1313-1314. (1988)

Study on the sexually transmitted viral diseases in Kwangju area

Lee, Young-jong
Dept. of Clinical Pathology
Kwangju Health College

> Abstract <

In order to grasp the infection rates of herpes simplex virus(HSV)-II and cytomegalovirus(CMV), the immunofluorescent assay(IFA) was performed on sera from outpatients of urology & skin clinic and normal persons in Kwangju area. In addition, cell culture was also performed to isolation of CMV.

Anti-HSV-II IgM in antibody was found 5.4% of outpatients of urology & skin clinic and not found in normal persons. There was no significant difference on the positive rates of anti-HSV-II IgG among two groups. Anti-CMV IgM was not found and anti-CMV IgG was shown in all specimens.

In attempt to isolate CMV from 34 urine samples, two specimens showed CPE-like morphology on HEL299 cells which are susceptible to viruses. However, those turned out to be antigen-negative by immunofluorescent staining.