

부산지역에서 유행하는 인플루엔자바이러스의 유전자 특성 및 계통분석 ('07 ~ '08)

박연경[†] · 조경순 · 이미옥 · 민상기 · 최성화 · 김남호 · 김성준 · 박호국
역학조사과

Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Influenza Virus Isolated in Busan during the 2006-2008 Season

Yon-Koung Park[†], Kyung-Soon Cho, Mi-Oak Lee, Sang-Kee Min, Seung-Hwa Choi, Nam-Ho Kim, Seong-Joon Kim and Ho-Kuk Park

Epidemiology Division

Abstract

To monitor the newly emerged influenza virus variants and to investigate the prevalence pattern, our laboratory performed isolation of the virus from surveillance sentinel hospitals. In the present study, we analysed influenza A/H1N1, A/H3N2, B viruses isolated in Busan during 2006/07 to 2007/08 season by sequence analysis of the hemagglutinin (HA1 subunit) and neuraminidase (NA) genes. The isolates studied were selected by the stratified random sample method from the total of 277 isolates, and that they were 15 with A/H1N1, 16 with A/H3N2 and 29 with B. Based on the phylogenetic tree, HA gene showed that A/H1N1 isolates had 96.7% to 97.7% homology with the A/Brisbane/59/07 and A/H3N2 isolates had 98.4% to 99.7% homology with the A/Brisbane/10/07 and B isolates had 96.5% to 99.7% homology with the B/Florida/4/06 (Yamagata lineage), which are all the vaccine strain for the North Hemisphere in 2008-2009 season. In the case of NA gene, A/H1N1 isolates had 97.8% to 98.5% homology and A/H3N2 isolates had 98.9% to 99.4% homology and B isolates had 98.9% to 100% homology with each vaccine strain in 2008-2009 season, respectively. Characterization of the hemagglutinin gene revealed that amino acid at the receptor-binding site and N-linked glycosylation site were highly conserved. This result provides the useful information for the control of influenza viruses in Busan and understanding for vaccine strain selection.

Key Words : Influenza, Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Phylogenetic tree

서 론

호흡기계감염증을 유발하는 Orthomyxoviridae에 속하는 인플루엔자바이러스는 전 세계적으로 발생되고 있으며 전형적으로 2년에서 3년 주기로 발생률이 증가하며 매년(U.S.A에서) 기본적으로 20,000이상의 사망자를 발생시키고 있다¹⁾. 또한 (수)십년단위로 다른 subtype의 genetic reassortment와 gene recombination²⁾을 통해 폭발적인 유행률과 치사율을 유발한다.

1918년 "Spanish flu"을 유발한 H1N1, 1957년 "Asian flu"을 유발한 H2N2, 1968년 "Hong Kong flu"를 유발한

H3N2, 1977년 H1N1이 다시 유행하여^{3,4)} 현재는 H1N1, H3N2, B 세 가지 type의 인플루엔자바이러스가 유행하고 있으며 2003년에는 고병원성조류인플루엔자바이러스인 H5N1가 391여명의 사람에게 감염되어 247여명의 사망자를 발생시켜 새로운 대유행의 가능성을 시사했다⁵⁾.

이런 인플루엔자바이러스는 NP와 M의 구조 단백질의 차이에 의해 A, B, C type으로 나누어 지며 C형은 사람에게 감염되지 않고 B형은 사람에게만 감염되며 A형은 여러 개의 subtype을 가지고 있으며 subtype에 따라 사람을 비롯한 여러 동물에게 감염을 유발한다. 인플루엔자바이러스는 표면에 hemagglutinin(HA)와 neuraminidase(NA)

[†] Corresponding author. E-mail: akacia@korea.kr
Tel: +82-51-757-6936, Fax: +82-51-753-1424

라는 중요한 glycoprotein을 가지고 있는데 이것은 세포에 바이러스가 침입 할 때 주요 항원으로 작용하며 인플루엔자바이러스의 subtype을 결정하는 요소가 된다^{4,6)}. 인플루엔자바이러스는 8개의 RNA segment를 가지고 있는데 주 항원으로 작용하는 HA는 이 중 4번째 RNA segment인 single polypeptide에서 합성되어 HA1과 HA2라는 두개의 polypeptides로 잘라진다. HA1 부분이 HA2부분보다 변이가 빈번이 일어나며 숙주 상피세포에 바이러스 uptake와 neutralizing 항체 공격 대상이 된다⁷⁾. NA도 항체를 생성시키지만 HA에 의한 항체는 감염을 방지하는 역할을 하지만 NA에 대한 항체는 있다고 하여 감염이 안 되는 것은 아니며 단지 심각한 감염이나 증상을 약간 경감시키는 작용을 한다. NA는 receptor-destroying enzyme으로 주로 불리며 mucosal secretion을 통과할 수 있게 해주며⁸⁾ 감염된 세포의 바이러스 방출에 관여한다. 인플루엔자바이러스 A형의 경우 HA는 H1~H16, NA는 N1~N9까지 유전적으로 다양한 type을 가지며 HA와 NA가 조합되어 인플루엔자 타입이 결정된다. 인플루엔자바이러스 B형의 경우 인플루엔자바이러스 A형과 같은 큰 antigen shift는 존재하지 않지만 유전적으로 구분될 만한 변이가 있어 2개의 lineage(Victoria와 Yamagata)로 나누어지며⁹⁾ 이 두 lineage사이에서 재조합이 일어날 수도 있는데 2006~2007, 2007~2008절기의 백신은 HA는 Victoria, NA는 Yamagata lineage인 B/Malaysia/2506/04가 백신 주로 선택되었었다. 이렇게 HA와 NA가 조합 또는 재조합되어 인플루엔자 타입이 결정되고 같은 type(예;H3N2, H1N1, B/Victoria lineage)에서도 주요항원부위 등의 변화가 일어나 매년 마다 WHO에서는 그 전 절기의 인플루엔자 바이러스를 조사하여 남반구와 북반구의 백신을 추천하고 전 세계적으로 백신접종이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 2006~2007절기, 2007~2008절기에 부산에서 분리되었던 인플루엔자 바이러스의 sequence를 분석하여 주요 항원의 변화를 관찰하고 백신주와 비교도 수행하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

질병관리본부 국립보건연구원 인플루엔자바이러스팀에서 분양받은 Mardin-Darby canine kidney(MDCK) 세포주를 사용했고 세포배양용 배지는 penicillin(0.05units/ml)/streptomycin(0.05 μ g/ml)과 10% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 Minimum essential medium(MEM)(Invitrogen, USA), 바이러스 분리용 배지는 MEM에 Vitamin Solution INVITROGEN, USA), Glucose

Solution(SIGMA, UK). Trypsin(SIGMA, UK), Penicillin/Streptomycin(SIGMA, UK)을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 5% CO₂, 37°C로 조정된 CO₂ 배양기에서 배양되었다⁴⁾.

검체처리 및 바이러스 배양

부산시내 10개 병원에 내원한 인플루엔자 의사환자에게서 인후도찰 또는 비인후도찰한 면봉을 VTM에 담아 4°C를 유지하여 실험실로 수송하였다. VTM 1ml에 penicillin(5units/ml)/streptomycin(5 μ g/ml) 및 nystatin (1000 units/ml)을 첨가하여 4°C에서 1시간 방치한 후, 3000 rpm(한일 원심분리기, HM-160)으로 20분간 저온 원심분리하여 상층액을 접종액으로 사용하였다. 바이러스의 배양을 위해 24well 배양용기에 MDCK접종하여 24시간 배양했다. 이렇게 준비된 well에 바이러스 분리용 배지 0.5 ml를 넣은 후 전처리 된 가검물 0.2 ml씩 접종하고 5% CO₂, 34°C로 조정된 CO₂ 배양기에서 10일간 배양하면서 매일 현미경하에서 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. CPE가 나타난 세포 배양액에서 바이러스 유전자 확인 검사를 실시하였다⁴⁾.

바이러스 RNA 분리 및 아형 확인 RT-PCR

원심분리된 140 μ l 배양액을 QIAamp viral RNA Mini Kit(QIAGEN; Germany)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR을 통한 아형 확인 및 염기서열 분석을 위한 template로 사용하였다.

인플루엔자바이러스를 확인하고 아형을 분석하기 위해 RNA 10 μ l를 RT-PCR pre-mix kit for influenza virus detection(COSMOgentech, korea)에 넣어 부피가 50 μ l가 되도록 한 후 42°C 1시간, 95°C 3분, 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분을 35회, 72°C 5분 1회를 PTC-100™(MJ Research, Inc. USA)로 실시하여 HA gene을 증폭하였다. 증폭산물 확인을 위해 0.5×TAE buffer에 1.5%가 되도록 agarose gel을 제작한 후 증폭산물을 10 μ l씩 loading하여 100V에 30분간 전기영동 한다. SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, USA)를 전기영동 buffer 100ml당 8 μ l 첨가하여 agarose gel을 5분에서 10분간 염색하고 증폭산물을 UV에서 관찰하여 A/H1, A/H3, B형을 확인하였으며 이렇게 확인된 인플루엔자의 배양액은 -70°C에 넣어 보관했다⁴⁾.

염기서열분석을 위한 HA와 NA 유전자에 대한 RT-PCR

분리된 바이러스를 층화무작위표본추출(stratified random sampling)법으로 H1 15건, H3 16건, B 29건을 표본 추출하여 HA와 NA에 대한 염기서열 분석을 위한 RT-PCR을 수행하였다. 분석을 위해 HA와 NA대해 특이

적으로 제작된 각각의 primer를 이용하였다^{1,2,10,11,12)} (Table 1).

RNA 10 μ l, primer 2.5 μ l(10 pmol)를 RT-PCR one-step ReadyMix(COSMOGentech, korea)에 넣어 부피가 50 μ l가 되도록 한 후 각 gene에 적합한 조건으로 PTC-100™ (MJ Research, Inc. USA)로 실시하여 증폭하였다(Table2). 증폭산물 확인을 위해 0.5×TAE buffer에 1.5%가 되도록 agarose gel을 제작한 후 증폭산물을 2 μ l씩 loading하여 100V에 30분간 전기영동 한다.

염기서열 분석

원하는 사이즈에서 증폭된 DNA를 QIAquick PCR

puification kit 및 Gel extraction kit(COSMOGentech, korea)를 이용하여 정제하였다. 이를 template로 하여 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Perkin Elmer, USA)와 ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer(Perkin Elmer, USA)를 이용해 염기서열을 분석 하였다. 염기서열분석을 위한 primer는 HA 경우 amplification에 사용된 primer를 사용 했고 N1, N2는 특이적인 inner primer를 추가하여 분석하였다(Table 3)^{1,11)}. 확인된 염기서열은 SeqMan program(DNASTAR, Madison, WI)으로 align 하고 ClustalX방법으로 Lasergene program (DNASar, Madison, WI)을 이용하여 계통수를 작성하고 아미노산을 분석하였다.

Table 1. Primer used for amplification of the viral genome

Subtype	Gene	Name	Sequence(5'→3')	Size(bp)
A/H1	HA	F6	AAGCAGGGGAAAATAAAA	1188
		R1193	GTAATCCCGTTAATGGCA	
A/N1	NA	F1	AGCAAAAGCAGGAGTGAAAA	1413
		R1413	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTT	
A/H3	HA	F7	ACTATCATTGCTTTGAGC	1178
		R1184	ATGGCTGCTTGAGTGCTT	
A/N2	NA	F14	GTGAAGATGAATCCAAATCAA	1407
		R1420	GCGAAAGCTTATATAGGC	
B	HA	F98	ATAACATCGTCAAACCTCACC	739
		R836	GCACCATGTAATCAACAACA	
B	NA	F	GCTACCTTCAACTATACAAACG	230
		R	AACGAGGGTATGTCCACTCC	

Table 2. RT-PCR condition for the amplification of different genes

Subtype	PCR condition
A/H1	95℃, 5min, 94℃ 20s, 45℃ 30s, 72℃ 7min 30cycle, 72℃ 7min
A/N1	95℃ 1min, 94℃ 20s, 45℃ 30s, 72℃ 1min 30s 30cycle, 72℃ 7min
A/H3	94℃ 5min, 94℃ 1min, 50℃ 2min, 72℃ 3min 25cycle, 72℃ 10min
A/N2	95℃ 1min, 95℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 1min 35cycle, 72℃ 20min
B	95℃ 5min, 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 1min 35cycle, 72℃, 10min

Table 3. Inner primer used for sequence

Subtype	Gene	Name	Sequence(5'→3')
N2	NA	F106	GGTAACTACTGTAACATTGCA
		F372	GAGAACCCTTATGTGTCATGCG
		F695	CAGGAGTCGGAATGCGTTTGT
		F823	GTC AGG AAG TGC TCA GCA
		F1063	AGT GAA AGG CTG GGC CTT
N1	NA	F119	CTGGAAGTCAAAACCACACTG
		F450	ATTCAAATGGGACCGTTA
		F697	AAGAGTCTGAATGTGTCT
		F901	CGACCTTGGGTGTCITTTTAATC
		R595	CTGGACCAGAAATTCGGATTG
		R955	CAC TGC AGA TGT ATC CTA TTT GA

결과 및 고찰

인플루엔자바이러스 분리 및 아형 확인

2006년 10월 부터 2008년 6월까지 총 인플루엔자 의 사 환자 1,822건의 (비)인후도찰물에서 277건의 인플루 엔자를 분리했다. 절기별로는 2006~2007절기 1,154건 중에 52건(4.5%), 2007~2008절기 668검체 중 210건 (31.4%)에서 인플루엔자바이러스를 분리하였다. 아형별로

살펴보면 2006~2007절기에는 A/H1형 11건, A/H3형 27건, B형 14건 분리, 2007~2008절기에는 A/H1형 31 건, A/H3형 35건, B형 144건 분리했다. 2007년에 비해 2008년의 인플루엔자바이러스 검출률은 7배, 검출건수는 4배 증가하였다. 특히 다른 형에 비하여 인플루엔자바이 러스 B형이 10배 정도 많이 검출 되었다. 이런 유행은 부 산 뿐만 아니라 전국에서도 같은 양상을 보였다¹³⁾.

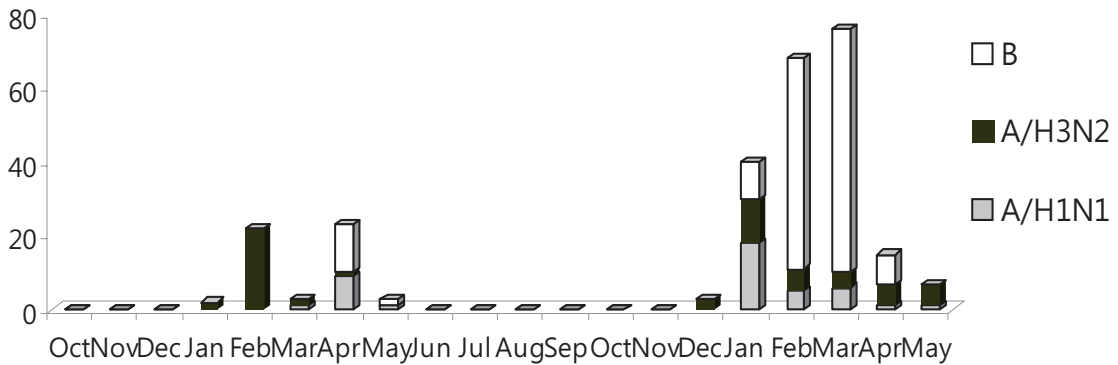


Fig. 1. Number of positive samples each month between January 2007 and June 2008 from 1,822 ILI(influenza like illness)

염기서열 및 HA 아미노산 분석

Phylogenetic tree

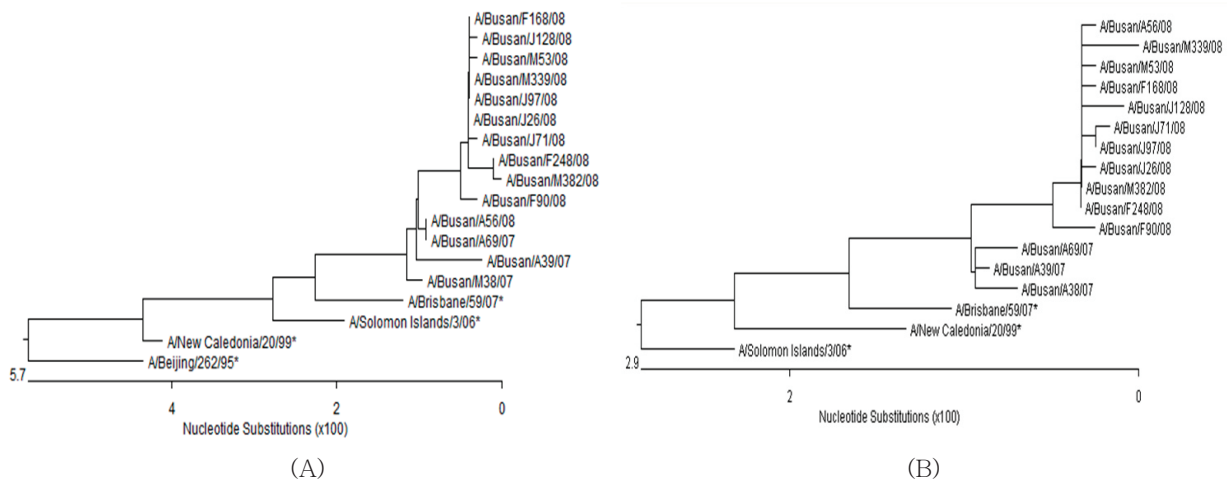


Fig. 2. Phylogenetic tree of hemagglutinin(HA)1 region of the HA gene (A) and neuraminidase(NA) gene (B) of H1N1 isolates with H1N1 vaccine strains since 1999.(* vaccine strain)

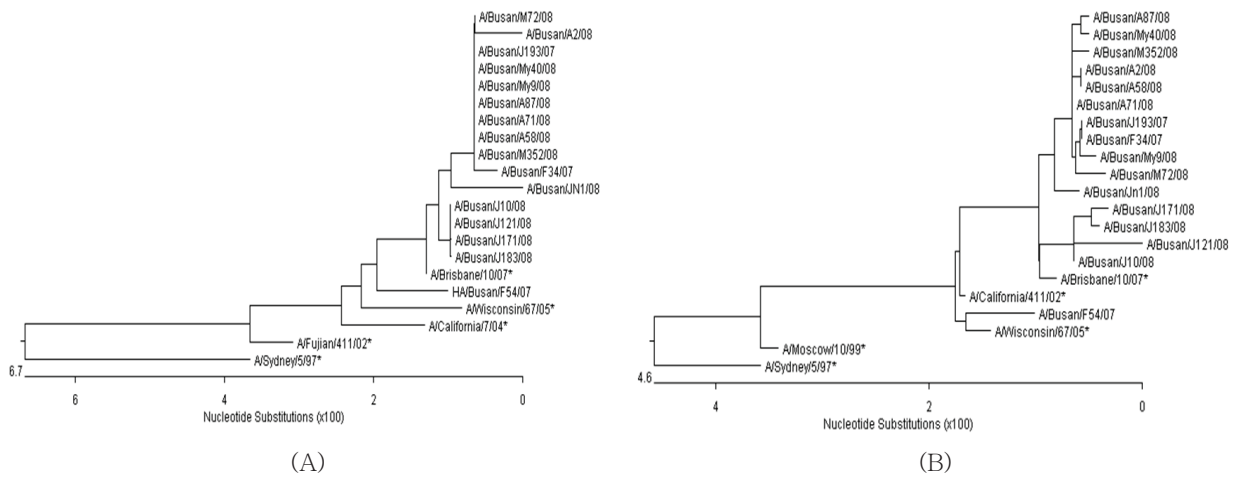


Fig. 3. Phylogenetic tree of hemagglutinin(HA)1 region of the HA gene (A) and neuraminidase(NA) gene(B) of H3N2 isolates with H3N2 vaccine strains since 1999.(* vaccine strain)

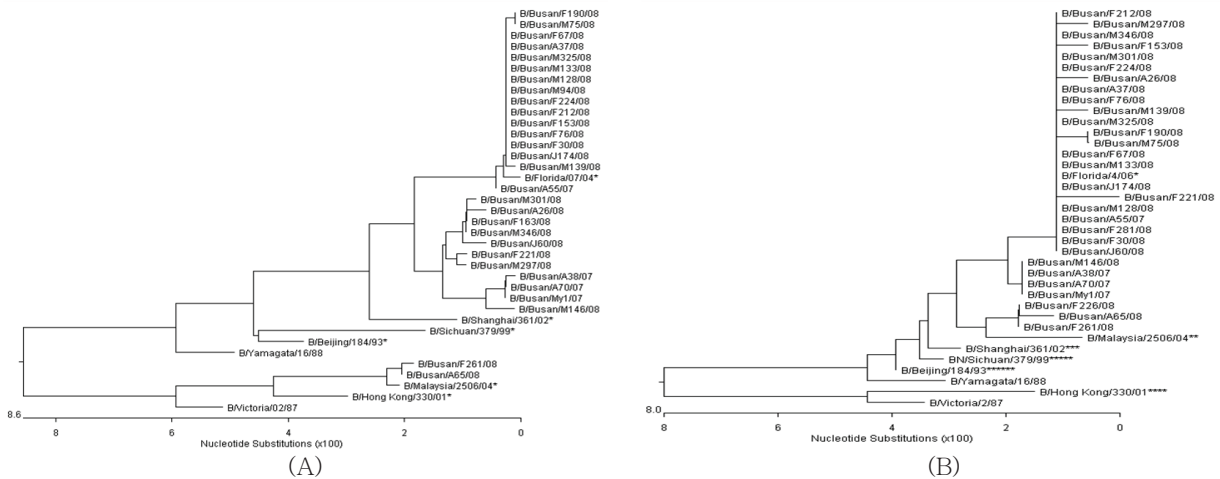


Fig. 4. Phylogenetic tree of hemagglutinin(HA)1 region of the HA gene (A) and neuraminidase(NA) gene (B) of influenza B isolates with H3N2 vaccine strains since 1999.(* vaccine strain)

부산에서 유행한 인플루엔자바이러스의 HA유전자 중 변이가 심한 HA1 domain과 NA 유전자의 Phylogenetic tree분석을 실시하였다. influenza A/H1N1의 HA 유전자의 경우 2008~2009년 절기 백신주인 A/Brisbane/59/07과는 96.7%~97.7%의 유사성을 보였으나 이 바이러스가 유행한 절기의 백신 주인 A/Solomon Islands/3/06, A/New Caledonia/20/99와는 96.5%~97.3%, 95.6%~96.6%의 유사성을 보였다. 인플루엔자바이러스 A/H1N1의 NA의 경우 A/Brisbane/59/07과 97.8%~98.5%, A/Solomon Islands/3/06과 96.7%~97.6%, A/New Caledonia/20/99과 96.8%~97.7%의 유사성을 보여 2008~2009절기의 백신주인 A/Brisbane/59/07과 가장

유사성이 컸다(Fig. 2).

A/H3N2의 분리주 중 A/Busan/F54/07은 HA와 NA에서 이 바이러스가 유행한 절기의 백신 주인 A/Wisconsin/67/05와 유사주로 나타났고 이 주를 제외한 모든 분리주는 HA 유전자에서는 2008~2009 절기 백신주인 A/Brisbane/10/07과는 98.4%~99.7%의 유사성을 보였으며 A/Wisconsin/67/05와는 96.5%~97.5%의 유사성을 보였다. NA 유전자는 A/Brisbane/10/07과 98.9%~99.4% (98.3%), A/Wisconsin/67/05와 98.0%~98.6% (99.1%), A/California/7/04와 98.3%~98.9% (99.1%)의 유사성을 보여 A/Brisbane/10/07과 가장 큰 유사성을 보였으며 분리주들이 유행할 시기의 2006~2007절기와 2007~2008절기의

백신주인 A/Wisconsin/67/05와는 가장 큰 차이를 보였다 (A/Busan/F54/07 identity) (Fig. 3).

인플루엔자바이러스 B의 HA와 NA의 phylogenetic tree를 비교해보면 2008년 2월과 4월 분리주 중 각 1주 (A/Busan/F261/08, A/Busan/A65/08)에서 HA는 Victoria lineage, NA는 Yamagata lineage에 속하는 reassortant인 B/Malaysia/2506/04(B reassortant lineage)와 유사하였다. 이 2건의 분리주를 제외하고는 HA와 NA유전자 모두 Yamagata lineage에 속했다. 2008~2009년 절기 백신주인 B/Florida/4/06(Yamagata lineage)과 96.5%~99.7%(86.4%)의 유사성을, 이 바이러스가 유행한 절기의 백신 주인 B/Malaysia/2506/04(B reassortant lineage)와는 86.7%~87.7%(99.5%, 99.4%)의 유사성을 보여 B/Florida/4/06과 유사성이 크게 나타났다(A/Busan/F261/08, A/Busan/A65/08 identity). 인플루엔자바이러스 B의 NA는 reassortants 분리주가 96.7%와 97.3%의 유사성을 나타내는 것을 제외한 나머지 분리주는 B/Florida/4/06에 98.9%~100%의 유사성, 분리주 유행시기의 백신주인 B/Malaysia/2506/04와는 94.5%~96.7%를 나타내어 2008~2009절기의 백신주와 더 유사성을 보였다(Fig. 4). 2006~2007절기, 2007~2008절기에 분리되었던 인플루엔자 바이러스를 살펴본 결과 유행시기에 채택되었던 백신과는 유전자적으로 2008~2009절기 백신보다는 전반적으로 모두 유사성이 낮음을 알 수 있었다. WHO에서도 백신주 선택시 인플루엔자바이러스 A/H1N1, A/H3N2, B의 2007~2008절기 백신주에서 다시 추천하지 않고 2008~2009절기를 위한 백신주를 모두 교체하여 세계적으로도 비슷한 양상을 보임을 알 수 있었다¹⁴⁾.

분리된 인플루엔자 바이러스의 HA 아미노산 분석

A/H1의 N-linked glycosylation site는 14(NNS), 27(NVT), 58(NCS), 91(NGT), 129(NHT), 163(NLS), 290(NSS)에서 모든 백신주와 동일 하였으나 A/Busan/J128/08분리주의 경우 272번째 부위의 NAP가 NAS로 치환되어 백신주를 포함한 대부분의 분리주가 7개의 glycosylation site를 가지는 것에 반해 8개의 glycosylation site를 가지고 있었다.

Kim 등¹⁵⁾에 의해 2002년 국내 분리주와 비교해 보면 같은 위치에 7개의 glycosylation site를 가져 비슷한 양상을 보였으나 A/Seoul/15/2002는 오히려 163(NLS)에서 KLS로 치환되어 6개의 glycosylation site를 가져 전혀 다른 양상을 보였다. Conserved receptor binding site는 모두 보존이 잘 되어 있었다. H1에는 항체와 결합하는 two strain-specific (Sa and Sb) and common antigenic sites(Ca and Cb) hemagglutinin¹⁶⁾이 존재하

는데 분리주에서는 백신주와 비교시 5곳에서 아미노산 치환 관찰 되었다. Ca site 중 Asn(N)/Lys(K) -171, Glu(E)/Lys(K)-173에서 1개의 분리주와 2개의 분리주가 다른 양상을 보였고 Sb site 중 Lys(K)/Met(M)-192, Ala(A)/Thr(T)-193, Thr(T)/Lys(K)-197에서 모든 분리주가 백신주와는 다른 양상을 보였다 (Fig. 5).

A/H3의 경우 N-linked glycosylation site는 15개의 분리주에서 8(NST), 22(NGT), 38(NAT), 63(NCT), 122(NES), 126(NWT), 133(NGT), 144(NNS), 165(NVT), 246(NST), 285(NGS)인 11개의 위치에서 2008~2009절기 백신주와 동일 하였으며 A/Busan/F128/07분리주의 경우 144부위의 NNS가 DNS로 치환되어 10개의 glycosylation site를 가지고 있었다. 2006~2007년 타이완에서 분리된 A/H3의 경우도 11개의 부위에서 모두 같은 양상을 보였으며 치환되는 아미노산은 없었다³⁾. 5개의 conserved receptor binding site는 모두 보존이 잘 되어 있었으며 A/H3의 항원 부위인 A, B, C, D, E¹⁷⁾ 중 A 부위의 Ile(I)/Lys(K)-140, Arg(R)/Gly(G)-143, Asn(N)/Asp(D)-144, B 부위의 Leu(L)/Ser(S)-157, Lys(K)/Arg(R)-158, E 부위의 Asn(N)/Lys(K), Gln(Q)-173 아미노산 변화가 관찰 되었으며 C와 D부위에서는 아미노산 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

B의 HA 아미노산의 경우 Victoria lineage인 2주의 분리주를 제외하고는 2007년과 2008년 분리주 모두 2008~2009년 절기 백신주인 B/Florida/4/06와 유사하였다. 항원형 결정에 중요한 역할을 하는 N-linked glycosylation site는 Victoria lineage와 Yamagata lineage에서 모두 4부분을 가지고 있었다¹⁸⁾. 25(NVT), 59(NCT), 145(NAT), 197(NKT)위치에서 N-linked glycosylation site를 가지고 있었으며 Victoria lineage인 2개의 분리주와 B/Malaysia/2506/04는 145와 197위치에서의 아미노산 배열이 NVT와 NET였을 뿐 site의 수는 4개로 동일하였으나 2008~2009절기 백신주인 B/Florida /4/06는 Asn(N)/Asp(D)-197로 변환되어 3개의 glycosylation site를 가지고 있어 본 연구의 분리주들과는 다른 양상을 보였다. Conserved receptor binding site인 Phe(F)-95, Trp(W)-158, His(H)-191, Try(Y)-202 (B/Yamagata/16/88 numbering)는 치환되지 않고 잘 보존되어 있었다(Fig. 7., Fig. 8.)¹⁹⁾. B의 antigenic sites인 120 loop, 150 loop, 160 loop, 190 helix 중에서 120 loop에서는 분리주와 백신주(B/Florida/ 4/06) 모두 아미노산이 일치하였고 190 helix는 분리주는 모두 같은 아미노산을 가졌으나 백신주인 B/Florida/4/06과 비교시 1개의 아미노산에서 Lys(K)/Asp(D)-196치환을 보였다.

ATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTYVTHSVNLLLEDNHNGKLC LLKGGKAPLQLGNC SVAGWILGNPECGLLISKESWSYIVERPNPENGTCYPGHPADYEELREQLS	Majority
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110	
.....	A/Busna/J26/08
.....	A/Busna/J71/08
.....	A/Busna/J97/08
.....	A/Busna/J128/08
.....	A/Busna/F90/08
.....	A/Busna/F168/08
.....	A/Busna/F248/08
.....	A/Busna/M53/08
.....	A/Busna/M339/08
.....	A/Busna/M382/08
.....	A/Busna/A56/08
.....	A/Busna/M38/07
.....	A/Busna/A39/07
.....	A/Busna/A69/07
.....	A/Brisbane/59/07*
.....	A/Soomon Islands/3/06*
.....	A/New Ca edonia/20/99*
.....	A/Beijing/262/95*

SVSSFERFEIIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGESSFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQMTLYHKENAYVSVSSSHYSRKFTEIAKR	Majority
120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220	
.....	A/Busna/J26/08
.....	A/Busna/J71/08
.....	A/Busna/J97/08
.....	A/Busna/J128/08
.....	A/Busna/F90/08
.....	A/Busna/F168/08
.....	A/Busna/F248/08
.....	A/Busna/M53/08
.....	A/Busna/M339/08
.....	A/Busna/M382/08
.....	A/Busna/A56/08
.....	A/Busna/M38/07
.....	A/Busna/A39/07
.....	A/Busna/A69/07
.....	A/Brisbane/59/07*
.....	A/Soomon Islands/3/06*
.....	A/New Ca edonia/20/99*
.....	A/Beijing/262/95*

PKVRDQEGRI NYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDECDAKCQTPQGA INSSLPPQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSR	Majority
230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330	
.....	A/Busna/J26/08
.....	A/Busna/J71/08
.....	A/Busna/J97/08
.....	A/Busna/J128/08
.....	A/Busna/F90/08
.....	A/Busna/F168/08
.....	A/Busna/F248/08
.....	A/Busna/M53/08
.....	A/Busna/M339/08
.....	A/Busna/M382/08
.....	A/Busna/A56/08
.....	A/Busna/M38/07
.....	A/Busna/A39/07
.....	A/Busna/A69/07
.....	A/Brisbane/59/07*
.....	A/Soomon Islands/3/06*
.....	A/New Ca edonia/20/99*
.....	A/Beijing/262/95*

Fig. 5. Amino acid comparison between HA1 domain of influenza A H1N1 isolates and vaccine strain(*). Dots represent amino acid similar to the consensus.

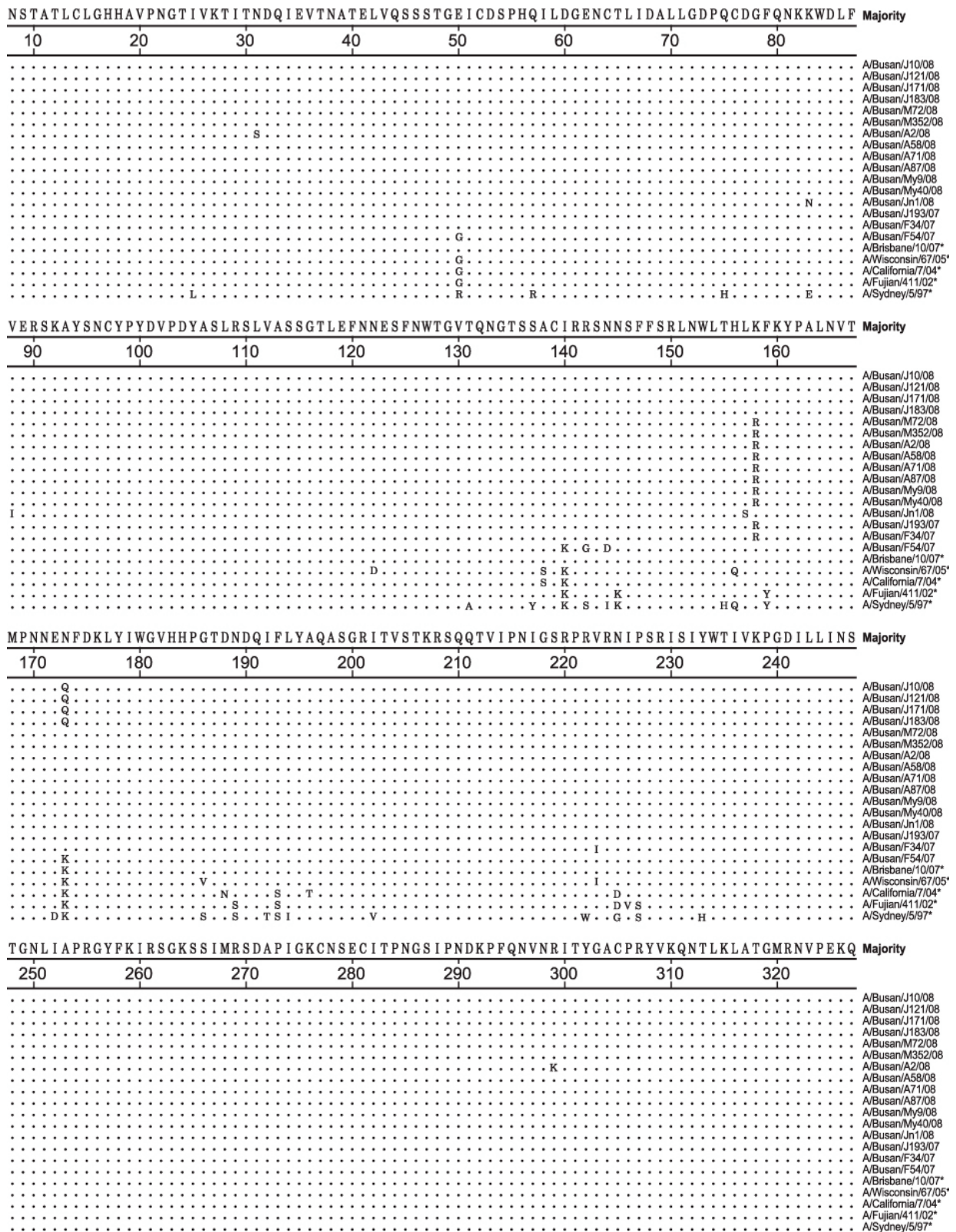


Fig. 6. Amino acid comparison between HA1 domain of H3N2 isolates and vaccine strain(*). Dots represent amino acid similar to the consensus.

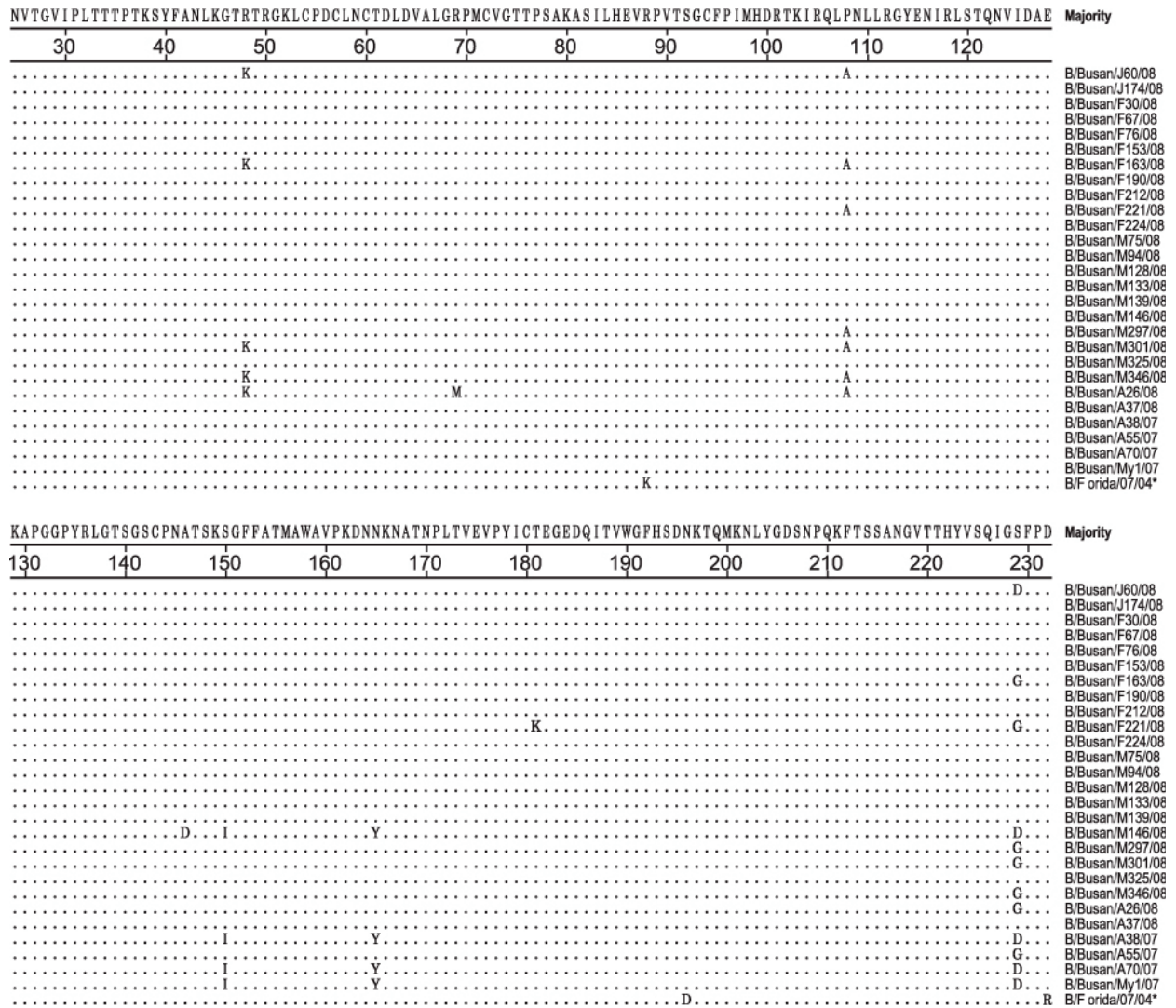


Fig. 7. Amino acid comparison between HA1 domain of B isolates(Yamagata lineage) and vaccine strain(*). Dots represent amino acid similar to the consensus,

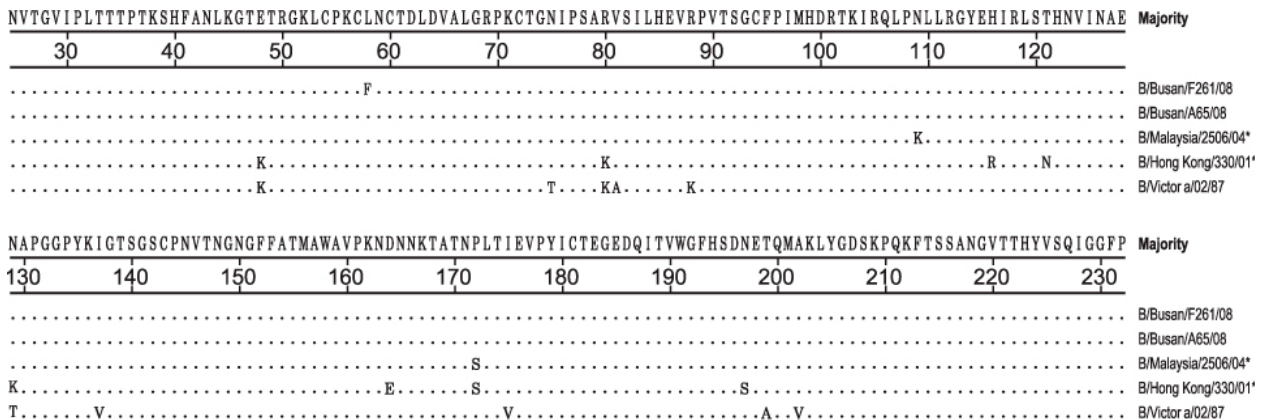


Fig. 8. Amino acid comparison between HA1 domain of B isolates(B reassortant lineage) and vaccine strain(*). Dots represent amino acid similar to the consensus,

150 loop에서는 4개의 분리주에서 Ser(S)/Ile(I)-150 치환을 160 loop에서는 150 loop에서 치환이 나타났던 분리주에서만 Asn(N)/Try(Y)-165치환이 나타났다²⁴⁾.

인플루엔자바이러스 A/H1, H3와 B형에서 대체로 conserved receptor binding site와 N-linked glycosylation site 잘 보존 되어 있었으나 antigenic sites는 일정 부위에서 아미노산 치환이 관찰 되었다. 그러나 antigenic drift라고 할 수 있는 두 개 이상의 antigenic site에서 4개 이상의 아미노산변이는 관찰 되지 않았다^{3,25)}.

이렇듯 2006~2007절기, 2007~2008절기 부산 분리주를 백신주와 비교시 2008~2009절기 백신주와 가장 유사하였으며 대부분의 분리된 인플루엔자바이러스에서 주요 부위에 큰 변화는 보이지 않았다. 그러나 인플루엔자바이러스는 계속적인 항원성 변이가 발생하며 이로 인해 새로운 항원형 바이러스가 나타날 수 있으며, 한 두건 씩 나타난 N-linked glycosylation site와 antigen site 변화의 영향을 알아보기 위해서는 백신주와의 HI 테스트 및 생체 실험 등을 통해 비교하여 분석해 볼 필요가 있다고 여겨진다. 이런 인플루엔자 바이러스에 대한 지속적인 조사와 연구는 백신 선택을 돕고 항원성 변화 추세를 알아 새롭게 발생할 수 있는 인플루엔자 outbreak를 예방할 수 있는 기초 자료로 사용될 것으로 사료된다.

요 약

2006년 10월 부터 2008년 6월까지 총 인플루엔자 의 사 환자 1,822건의 (비)인후도찰물에서 277건의 인플루엔자를 분리했다. 절기별로는 2006~2007절기 1,154건 중 52건(4.5%), 2007~2008절기 668검체 중 210건(31.4%)에서 인플루엔자바이러스를 분리하였다.

인플루엔자바이러스 A/H1N1의 HA 유전자의 경우 2008~2009절기 백신주인 A/Brisbane/59/07과는 96.7%~97.7%, A/Solomon Islands/3/06 96.5%~97.3%, A/New Caledonia/20/99와는, 95.6%~96.6%의 유사성을, NA의 경우 A/Brisbane/59/07과 97.8%~98.5%, A/Solomon Islands/3/06과 96.7%~97.6%, A/New Caledonia/20/99와 96.8%~97.7%의 유사성을 보여 2008~2009절기의 백신주인 A/Brisbane/59/07과 가장 유사성이 컸다

A/H3N2의 분리주 중 1주를 제외한 모든 분리주가 HA 유전자에서 2008~2009절기 백신주인 A/Brisbane/10/07과는 98.4%~99.7%의 유사성을 보였으며 A/Wisconsin/67/05와는 96.5%~97.5%의 유사성을 보였으며 NA 유전자는 A/Brisbane/10/07과 98.9%~99.4%,

A/Wisconsin/67/05과 98.0%~98.6% , A/California/7/04과 98.3%~98.9%의 유사성을 보였다.

인플루엔자바이러스 B의 HA는 2주를 제외하고는 2008~2009년 절기 백신주인 B/Florida/4/06(Yamagata lineage)과 96.5%~99.7%의 유사성을, B/Malaysia/2506/04(B reassortant lineage)와는 86.7%~87.7%의 유사성을 보여 B/Florida/4/06과 유사성이 크게 나타났다. NA는 reassortants 분리주가 96.7%와 97.3%의 유사성을 나타내는 것을 제외하고는 B/Florida/4/06에 98.9%~100%의 유사성, 분리주 유행시기의 백신주인 B/Malaysia/2506/04와는 94.5%~96.7%을 나타내어 2008~2009절기의 백신주와 더 유사성을 보였다

HA 유전자에서 conserved receptor binding site는 아미노산의 치환 없이 모든 분리주에서 잘 보존되어 있었으며 N-linked glycosylation site도 인플루엔자 바이러스 A/H1 1주, A/H3 1주를 제외하고는 모두 같은 수의 N-linked glycosylation site를 B의 경우 2008~2009절기 백신주보다는 1개 많은 4개의 N-linked glycosylation site를 가지며 가지고 있었다. Antigenic sites의 경우 인플루엔자바이러스 A/H1의 Sb의 경우 3개의 아미노산에서 백신주들과 다른 아미노산을 가지고 있으며 A/H3에서는 A, B, E 부위에서 아미노산변화가 나타났고 C, D 부위는 변화가 없었다. B의 4개의 분리주에서 150 loop와 160 loop에서 B/Florida/4/06와 1개 아미노산치환이 있었으며 190 helix에서는 모든 분리주가 B/Florida/4/06와 비교하여 1개의 아미노산에서 치환이 나타났다.

참 고 문 헌

1. Daum, T. L., Canas, C. L., Smith, B. C., Klimov, A., Huff, W., Barnes, W. and Lohman, L. K. Genetic and Antigenic Analysis of the First A/New Caledonia/20/99-like H1N1 Influenza Isolates Reported in the Americas. *Emerging Infectious Diseases* 8(4), pp408-412(2002)
2. Chana, C.H., Lin, K.L., Chana, Y., Wang, Y. L., Chi, Y. T., Tu H. L., Shieh, H. K. and Liu, Wu-Tse. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 136, pp38-43(2006)
3. Chutinimitkul, S., Chieochansin, T., Payungporn, S., Samransamruajkit, R., Hiranras, T., Theamboonlers, A. and Poovorawan Y. *Molecular*

- characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. *Virus Research* 132, pp122-131 (2008)
4. National Institute of Health Korea. 감염병실험실 진단, 제 3개정, pp865-868(2005)
 5. WHO, 2008. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Available from : http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_12_16/en/index.html(2008)
 6. Brooks, G. F., Butel, J. S. and Ornston, L. N. *Medical Microbiology*. Appleton&Lange, pp449-459(1995)
 7. Chi, X. S., Bolar, T. V., Zhao, P., Tam, J. S., Rappaport, R. and Cheng, S. M. Molecular Evolution of Human Influenza A/H3N2 Virus in Asia and Europe from 2001 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), pp6130-6132 (2005)
 8. Colman, P. M. Influenza virus neuraminidase : Structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Science* 3, pp1687-1696(1994)
 9. X. Sherry Chi, Trentice V. Bolar, Ping Zhao, Ruth Rappaport, and Sheau-Mei Cheng. Cocirculation and Evolution of Two Lineages of Influenza B Viruses in Europe and Israel in the 2001-2002 Season. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 41(12), pp 5770-5773(2003)
 10. Elisabet P. Rocha, Xiyang Xu, Henrietta E. Hall, James R. Allen, Helen L. Regnery and Nancy J. Cox Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *Journal of General Virology* 74, pp2513- 2518(1993)
 11. Xiyang, X., Nancy, J. C., Catherine A. B., Helen L. R. and Michael, W. S. Variation in Neuraminidase Genes of Influenza A (H3N2) Viruses. *VIROLOGY* 224, pp175-183(1996)
 13. CDC. Public Health Weekly Report, KCDC. 23(1). pp377-384(2008)
 14. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines : [http://www.biohealthbase.org / GSearch/vaccineRecommend.do?](http://www.biohealthbase.org/GSearch/vaccineRecommend.do?)
 15. Kim, Y. Y., Lee, J. Y., Hwang, J. H., Kim, K. A., Jang, S. W., Park, M. S., Kim, W. J., Cho, H. W., Lee, H. H. and Kang, C. Characterization of Hemagglutinin and Neuraminidase Genes and Oseltamivir Resistance of Influenza Viruses Isolated in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*. 35(2), pp149~155(2005)
 16. Caton, A. J., Brownlee, G. G., Yewdell, J. W., Gerhard, W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31, pp417-427(1982).
 17. Wiley, D. C., Wilson, I. A., Skehel, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289, pp373-378.(1981)
 18. Lindstrom, S. E., Hiromoto, Y., Nishimura, H., Saito, T., Nerome R. and Nerome, K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus : multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* 73, pp4413-4426(1999)
 19. Wang, Q., Tian, X., Chen, X. and Ma, J. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *PNAS* 104(43), pp16874~16879(2007)
 20. Colman, P. M., Hoyne, P. A., Lawrence, M. C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* 67, pp2972-2980(1993)
 21. Colman, P. M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 3, pp1687-1696(1994)
 22. Colman, P. M., Hoyne, P. A., and Lawrence, M. C. Sequence and Structure Alignment of Paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase with Influenza Virus Neuraminidase. *JOURNAL OF VIROLOGY*, pp2972-2980(1993)
 23. Tsai, H. P., Wang, H. C., Kiang, D., Huang, S. W., Kuo, P. H., Liu, C. C., Su, I. J. and Wang, J. R. Increasing Appearance of Reassortant Influenza B Virus in Taiwan from 2002 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), pp2705-2713(2006)

24. Qinghua Wang, Feng Cheng, Mingyang Lu, Xia Tian, and Jianpeng Ma, Crystal Structure of Unliganded Influenza B Virus Hemagglutinin. JOURNAL OF VIROLOGY, 82(6) , pp3011-3020(2008)
25. Wilson, I.A., Cox, N.J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Annu. Rev. Immunol., 8, pp737-771(1990)