

돼지 인플루엔자 바이러스의 혈청학적 역학조사 및 유전학적 분석

류영수·김로미*

전국대학교 수의학부
수의과학연구소*

(1997년 8월 20일 접수)

Sero-epidemiology and genetic characterization of swine influenza virus

Young-soo Lyoo, Lomi Kim*

*Veterinary Medicine Kon-kuk University 93-1 Mojin-dong Seoul, Korea
National Veterinary Research Institute, 480 Anyang 6-Dong Kyunggido Korea, 430-016**

(Received Aug 20, 1997)

Abstract : Total of 1085 swine sera (1996~1997) from nation-wide were tested for the presence of antibodies to influenza A virus. Fifty nine percent of the tested sera showed seropositive by HI test. Positive sera consisted of 24% of H3, 15% of H1, and 20% of the sample had both antibodies, respectively. Sera collected from various region represented 7~27% seropositivity to H1N1, 15~25% to H3N2, respectively. Swine influenza field isolate from nasal swab was characterized antigenically and genetically to elucidate its relatedness with other known strains of influenza A virus. The study was focused on the HA gene which is related to pathogenicity and antigenic variability of the influenza virus. By RT-PCR using influenza A/H1N1 specific primers, influenza virus H1N1 specific DNA fragment was amplified from A/Swine/Iowa/15/30(H1N1), US field isolate but not in H3N2 strain. PCR products were sequenced by dideoxy chain termination method to determine nucleotide homology with other strains of influenza A virus. The US field isolate and A/Swine/Indiana/1726/88 strain had 97% of nucleotide homology and 98% of amino acid homology. Based on the results obtained from this experiment, the field isolate was genetically related to A/Swine/Indiana/1726/88 and had higher homology with A/Swine/Indiana/1726/88 than with classical swine influenza virus, A/Swine/Iowa/15/30. The field isolate had no amino acid changes at the antigenic site compare to that of the A/Swine/Indiana/1726/88. The proteolytic enzyme cleavage site between HA1 and HA2 had no alteration and the amino acid arginine was intact. There is no evidence has been found that the field isolate has genetic shift or genetic drift which might altered antigenic determinant.

Key words : influenza A virus, haemagglutinin(HA), H1N1, H3N2, RT-PCR, sequence homology.

서 론

Influenza virus는 사람, 말, 조류, 돼지 등의 동물에서 질병을 일으키고 있으며, 이들 중간에도 서로 감염된다는 보고들이 많다^{1,2}. Influenza virus의 중간 전파여부는 많이 연구되어져 왔고, life cycle이 짧은 돼지의 influenza virus가 human strain보다 항원성의 변화가 적고, 변이원성이 적어 reservoir 역할을 하는지에 대해 지대한 관심을 가지고 연구하고 있으며¹, 1918년의 pandemic도 최근의 연구에 의하면 돼지와 유사한 influenza virus가 원인체였고, 이후에도 사람이 돼지 influenza virus에 감염된 보고가 많다²⁻⁶. 반대로 돼지가 사람의 influenza virus에 의해 감염된 예로 human H1N1 subtype variants에 대한 항체가 돼지 혈청중에서 검출된 예도 있다^{7,8}. 이런 보고를 통해서 influenza virus의 중간 전파여부가 많이 연구되어져 있음을 알 수 있다. influenza A strain의 대유행은 human strain과 non-human strain의 influenza virus가 공동숙주에 복합감염되어 reassortment가 자연적으로 생겨 발생한 것이라는 추측도 있다. 돼지는 human influenza virus에 감수성이 있어 H1N1, H3N2 subtype의 잠재적인 reservoir 역할을 할 수 있다³. Scholtissek *et al*은 돼지에서 서로 다른 subtype의 virus가 감염되어 이들이 증식과정에서 서로 유전자를 교환하여 reassortment virus의 출현 및 새로운 pandemic이 일어나는데 중요하다고 제안하였다⁹. 이러한 사실들은 human influenza virus의 발생과정에서 돼지 influenza virus가 중요한 위치를 차지한다고 볼 수 있다. 종간 전파의 기전을 밝히기 위해서 병원성에 관여하는 중요한 인자이며, 중화항체를 생성하는 influenza virus의 haemagglutinins(HAs)의 기원과 진화과정을 조사하는 것도 많이 사용되어지는 방법이다. Influenza virus는 HA와 NA에 주로 변이가 일어나고, antigenic shift나 antigenic drift가 일어나기도 한다. HA중에서는 HA1에서 주로 변이가 일어나고 변이원성이 심해서 면역을 시키기도 용이하지 않다.

Influenza virus A type중 주로 어떤 subtype의 영향을 받고있는지 전국 농장을 대상으로 돼지 혈청을 수집하여 지역별, 계절별로 항체 검사를 실시하여 항체 보유율을 조사하였고, 돼지에서 분리된 influenza virus의 항원성과 유전학적 특징을 면역원성과 관계하고, 변이원성이 심한 것으로 알려져 있는 HA gene을 대상으로 PCR과 HA

의 부분염기서열 분석을 통해 분리주와 reference strain간의 homology를 비교하는 방법을 사용하였다. 또 염기서열 분석과 아미노산으로 전환시켜 아미노산 서열을 비교 분석하여 항원성에 관여하는 부분이나 감염력에 관여하는 cleavage site의 돌연변이 여부를 조사하였다. 사람에서 발생했던 influenza virus와 외국에서 발생했던 다른 돼지 influenza virus의 염기서열과도 비교하여 homology를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 항혈청 제조를 위하여 4주령된 닭(레그혼)을 사용하였다. 정제된 influenza virus로 면역을 실시하기 전에 혈청검사를 미리 실시하여(HI test), influenza virus에 대한 항체가 없음이 확인되었다.

공시바이러스 : 연구에 사용되어진 바이러스는 subtype이 완전히 밝혀진 influenza virus A/Swine/Iowa/15/30(H1N1), A/Port Chalmers/1/73(H3N2)이며, 돼지에서 분리된 분리주(US isolate)가 사용되었고, 분리주는 1992년 미국 중부 양돈장의 호흡기 증상을 보이는 돼지의 nasal swab으로부터 분리되었다.

바이러스 증식 : Virus는 10일령의 SPF embryonated eggs에 각 virus suspension별로 0.2ml씩 allantoic cavity에 접종하여 37℃에서 72시간 동안 배양하여 증식시켜 사용하였다^{1,6,10,11}.

바이러스 정제 : Polyethylene glycol(M.W. 8000, Sigma, USA)을 allantoic fluid에 첨가하여 최종농도 8%(w/v)가 되게 만들어 얼음 위에 90분 동안 교반하였다. 7000rpm에서 30분 원심분리를 실시한 후, pellet을 수거하여 STE buffer(0.1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.8, 1mM EDTA)에 현탁하였다. Ultraclear centrifuge tube(Beckman, USA)을 30%, 45%, 60% sucrose로 채우고 0.5ml virus solution을 상층에 얹어 20℃, 100,000g에서 2시간 동안 SW28 rotor(Beckman)를 이용하여 원심분리를 하였다. Interface virus band를 수거하여 STE buffer에 회석하였다. Virus solution을 다시 20℃, 100,000g에서 150분간 원심분리를 실시한 후, virus pellet을 STE buffer(100U RNasin/ml, Promega)에 현탁하여 4℃에서 overnight 하였다^{1,2}.

바이러스 불활화 : 0.1M BEI(Binary Ethylenimine) solution을 virus solution에 섞어 최종농도가 0.01M이 되게 만들어 불활화시킨 후 BEI를 중화시키기 위하여 멸균된

과 비교분석을 하였다. 비교된 strain은 influenza virus의 H1N1에 속하며, 다음과 같다. A/Swine/Iowa/15/30, A/Swine/Indiana/1726/88, A/Seoul/20/91, A/Ohio/101/83, A/WSN/33이며 HA domain을 부분적으로 비교 분석하였다. 염기서열과 아미노산의 homology 비교는 DNASIS Program을 사용하였다.

결 과

불활화 바이러스를 면역시킨 후 닭 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤 항혈청을 얻었다. A/Swine/Iowa/15/30, A/Port Chalmers/1/73에 대한 항혈청을 A/Swine/Iowa/15/30, A/Port Chalmers/1/73, US isolate를 사용하여 HI test로 항체가를 조사하였다. 결과는 Table 1과 같다.

HI test를 이용하여 혈청중 influenza virus에 대한 항체

Table 1. Cross HI test using hyper-immune sere prepared in chickens immunized with field isolate H1N1 and H3N2 influenza viruses

Hyper-immune sere produced in chickens	Virus strains		
	A/Sw/Iowa/15/30	A/Port Chalmers/1/73	US isolate
A/swine/Iowa/15/30(H1N1)	160	< 20	2560
A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	< 20	2560	< 20

가를 조사하였다. 총 1085개의 혈청으로 역학조사를 실시하여 혈청역가 20배 이상을 양성으로 판정하였고, H1N1과 H3N2 strain들에 모두 반응을 나타내는 것중 20~40배 정도 차이가 나는 것들은 cross reaction으로 간주하였다. Influenza virus A type에 대한 항체 양성률은 59%였다(Fig 1). 이를 다시 subtype 별로 살펴보면 59%중 H3가 24%, H1이 15%, H1과 H3의 항체가 공존하는 것이 20%를 나타내었다(Fig 2). 지역별로 나누어서 항체가를 조사한 결과는 Fig 3과 같다. 지역별로는 전라지방의 항체 음성률이 가장 높았고, 대체로 두가지 type에 대한 항체가



Fig 2. Prevalence of the antibodies to influenza A virus by HI test.

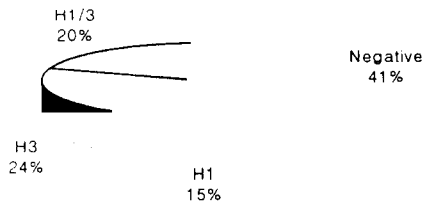


Fig 3. Distribution of the H1 and H3 subtype of influenza A virus by HI test using H1N1 and H3N2 viruses.

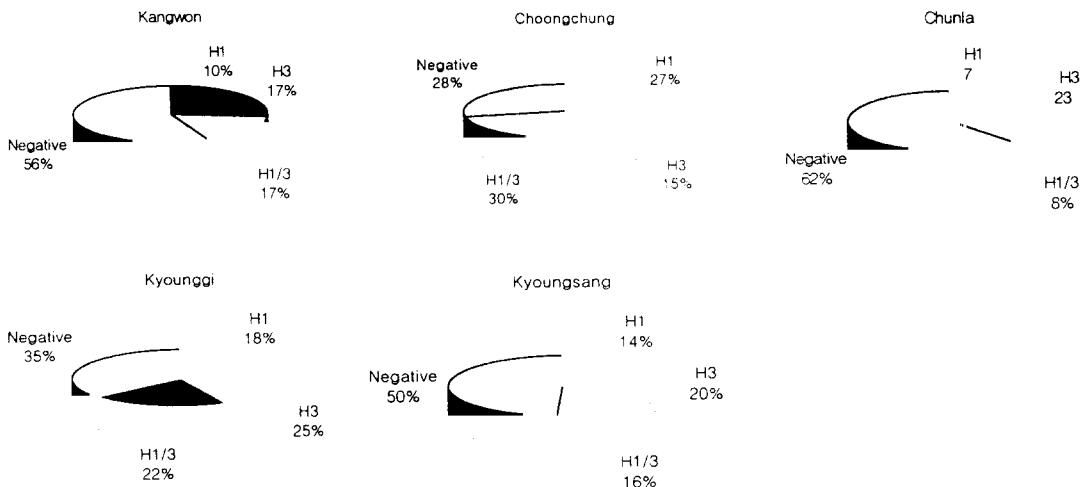


Fig 4. Regional distribution and prevalence of the H1 antibodies to the H1 and H3 subtype of influenza A virus in swine.

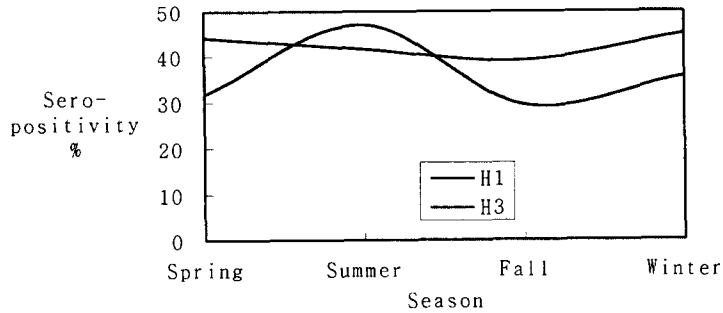


Fig 5. Comparison of seasonal trend in HI antibodies to the H1 and H3 of influenza A virus by HI test using H1N1 and H3N2 viruses with chicken RBCs.

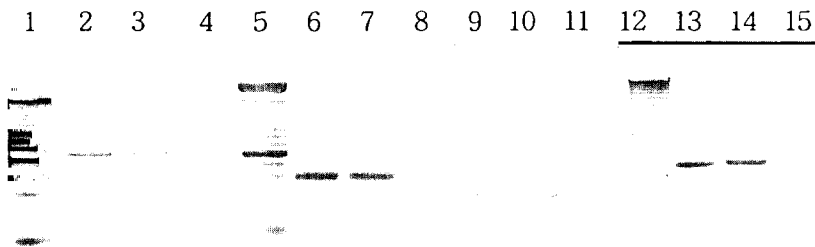


Fig 6. RT-PCR and nested PCR amplification of the HA gene of influenza A virus strains using primers specific to the H1 subtype. Lane 1, 5 : DNA size marker(100bp DNA ladder), lane 12 ; 1Kb ladder, lane 2 ; A/swine/Iowa/15/30, lane 3 ; US isolate, lane 4 ; A/Port Chalmers/1/73, lane 2, 3 showed 591bp products by RT-PCR using H1-474 and H1-1065R but not in lane 4. Lane 6, 9 ; A/swine/Iowa/15/30, lane 7, 10 ; US isolate, lane 8, 11 ; A/Port chalmers/1/73, lane 6, 7 showed 380bp PCR products and lane 9, 10 showed 259bp PCR products but lane 8, 11 had no PCR products detected/ Primers used in the nested PCR amplification were H1-685, H1-1065R and H1-809, H1-1065R. Lane 13 ; A/swine/Iowa/15/30, lane 14 ; US isolate lane 15 ; A/Port Chalmers/1/73, lane 13, 14 showed 961bp PCR products, but no band was detected in lane 15.

Table 2. Comparison of the nucleotide and amino acid homology in partial A gene of the different H1N1 strains of influenza A virus

Virus strain	US isolate	A/wsn/33	Ohio/101/83	sw/In/1726/88	Seoul/20/91	sw/Iowa/15/30
	% of nucleotide homology(% of amino acid homology)					
US isolate	100(100)	80(79)	74(71)	97(98)	75(69)	85(88)
A/wsn/33	80(79)	100(100)	87(81)	80(80)	86(81)	86(85)
Ohil/101/83	75(75)	87(81)	100(100)	75(71)	96(95)	82(79)
sw/In/1726/88	97(98)	80(80)	75(71)	100(100)	75(70)	86(89)
Seoul/20/91	75(69)	86(81)	96(95)	75(70)	100(100)	81(78)
sw/Iowa/15/30	85(88)	86(85)	82(79)	86(89)	81(78)	100(100)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
US	AAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTATGTTAACAATAAGGAGAAGGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCAT								
Sw/Ind	AAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTATGTTAACAATAAGGAGAAGGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCAT								
Sw/Iowa	AAGAAGGAAATTCATACCCAAAGCTTAGCAAATCCTATGTTAACAATAAAGGAAAAAGAAGTCCTTGTGCTATGGGGTGT								
Ohio	GAGAAAAATGGCTCGTACCCAAATCTGAGCAAGTCCTATGTGAACAACAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGT								
Seoul	GAGAAGAATGGCTTGTACCCAAATCTGAGCAAGTCCTATGTAACAACAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGT								

	90	100	110	120	130	140	150	160
US	TCACCATCCACCTACCAGTACTGACCAACAAAGTCTCTACCAGAATGCAGATGCTTATGTTTTGTTGGGTCATCAAAGT							
Sw/Ind	TCACCATCCACCTACCAGTACTGACCAACAAAGTCTCTACCAGAATGCAGATGCTTATGTTTTGTTGGGGTCATCAAAGT							
Sw/Iowa	TCATCATCCGCCTACCAGTACTGATCAACAAGTCTCTATCAAAATGCAGATGCTTATGTTTTCTGTAGGGTCATCAAAT							
Ohio	TCATCACCCGTCTAACATAGAGGACCAAAAGCCATCTATCGTAAAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATT							
Seoul	TCATCACCCGTCTAACATAGGGGACCAAAAGGGCCATCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATT							

	170	180	190	200	210	220	230	240
US	ACAACAAGAAATTCAGCCAGATATAGCAACAAGACCCAAGGTGAGAGGTCAAGCAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAC							
Sw/Ind	ACAACAAGAAATTCAGCCAGAAATAGCAACAAGACCCAAGGTGAGAGGTCAAGCAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAC							
Sw/Iowa	ATTACAGGAGGTTCACTCCAGAAATAGCAGCGAGACCCAAGTGAAGGTCAGGCAGGGAGGATGAACTATTACTGGACAT							
Ohio	ATAACAGGAGATTCACCCAGAAATAGCAAAAAGACCCAAGTAAAGAAATCAAGAAAGGAGAATTAACTACTACTGGACTC							
Seoul	ATAGCAGAAGATTCACCCAGAAATAGCAAAAAGACCCAAGTAAAGAGATCAAGAAAGGAAGAATTAACTACTACTGGACTC							

	250	260	270	280	290	300	310	320
US	TAGTAGAGCCAGGGGACACAATAACATTCCAAGCAACTGGAATCTAGTGGTACCAAGATATGCCTTCGCAATGAATAGAG							
Sw/Ind	TAGTAGAGCCTGGAGACACAATAACATTCCAAGCAACTGGAATCTAGTGGTACCAAGATATGCCTTCGCAATGAAAAGAG							
Sw/Iowa	TACTAGAACCCGGGACACACAATAACATTTGAGGCAACTGGAATTTAGTGGCACCAAGATATGCCTTCGCACTGAATAGAG							
Ohio	TGCTGGAACCCGGGACACAATAATATTTGAGGCAAAATGGAATCTAATAGCGCCATGGTATGCCTTCGCACTGAGTAGAG							
Seoul	TGCTGGAACCCGGGACACAATAATATTTGAGGCAAAATGGAATCTAATAGCGCCATGGTATGCCTTCGCACTGAGTAGAG							

	330	340	350	360	370	380	390	400
US	GTTCTGGATCTGGCATTATCATTTTCAGACACACCAATCCACGATTGTAATACGACTTGTCAAACACCCAAAGGTGCTATAA							
Sw/Ind	GTTCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCAGTCCACGATTGTAATACGACTTGTCAAACACCCAAAGGTGCTATAA							
Sw/Iowa	GTTCTGGATCCGGTATCATCACTTCAAACGCACCCAGTGCATGATTGTGACACGAAGTGTCAAACACCTCATGGTGCCATAA							
Ohio	GCTTTGGGTCAGGAATCATCACCTCAAACGCATCGATGGATGAAATGTGACCGGAAGTGTCAAACACCCAGGGAGCTATAA							
Seoul	GCTTTGGGTCAGGAATCATCACCTCAAACGCATCAATGGATGAAATGTGACCGGAAGTGTCAAACACCCAGGGAGCTATAA							

	410	420	430	440	450	460	470	480
US	ACACCAGCCTCCCATTTTCAGAAATATACATCCAGTACGATTGGAGAATGTCCCAAAATATGTCAAAGCACAAAATTGAGAA							
Sw/Ind	ACACCAGCCTCCCATTTTCAGAAATATACATCCAGTACAAATTTGGAGAATGTCCCAAAATATGTCAAAGCACAAAATTGAGAA							
Sw/Iowa	ACAGCAGTCTCCCTTTCCAGAATGTACATCCAGTACAAATAGGAGAGTGCCCAAAATACGTCAAAGAGCACAAAATTAAGGA							
Ohio	ACAGTAGTCTTCCCTTTTCAGAAATGTACACCCAGTACAAATAGGAGAGTGCCCAAAAGTACGTACAGGAGTACAAAATTAAGGA							
Seoul	ACAGTAGTCTTCCCTTTTCAGAAATGTACACCCAGTACAAATAGGAGAGTGCCCAAAAGTATGTACAGGAGTACAAAATTAAGGA							

	490	500	510	520	530	540	550	560	
US	TGGCTACAGGACTAAGGAATATCCCGTCTATTCAATCT	<u>AGAGG</u>	CTGTTTGGAGCCTTGCTGGCTTTATTGAAGGGGGATGGA						
Sw/Ind	TGGCTACAGGACTAAGGAATATCCCGTCTATTCAATCT	<u>AGAGG</u>	CTGTTTGGAGCCTTGCTGGCTTTATTGAAGGGGGATGGA						
Sw/Iowa	TGGTTACAGGACTAAGAAACATCCCATCTATCCAGTCT	<u>AGAGG</u>	CTGTTTGGAGCCTTGCCGGTTTTATTGAAGGGGGATGGA						
Ohio	TGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCC	<u>AGA</u>	-----						
Seoul	TGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCC	<u>AGA</u>	-----						
	570	580	590	600	610	620	630	640	650
US	CAGGAATGATAGATGGATGGTATGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGATCAGGATATGCAGCTGACCGAAAGAGCACGACG								
Sw/Ind	CAGGAATGATAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGATCAGGATATGCAGCTGACCGAAAGAGCACACAG								
Sw/Iowa	CTGGATTGATAGATGGATGGTATGGTTACCATCATCAGAATGGACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGACCAAAGAGCACACAA								
	660	670	680	690	699				
US	AATGCCATTGACGGGATCACTAACAAAGTAAACTCTGTTATTGAAAAGA								
Sw/Ind	AATGCCATTGACGGGATCACTAACAAAGTAAACTCTGTTATTGAAAAGA								
Sw/Iowa	AATGCCATTGACGGGATCACTAACAAGGTGAATTCTGTTATCGAGAAGA								

Fig 7. Comparison of the nucleotide sequences of the HA domain by among various influenza A virus strains written in mRNA sense. Proteolytic enzyme cleavage site is underlined.

비슷한 수준으로 존재하였다. 계절별 항체가 변동은 Fig 5와 같이 계절별로 유의한 차이가 없었다.

Influenza A/Swine/Indiana/1726/88 strain에서 비교적 변화가 없는 부분을 primer로 선택하여 제작하였다. RT-PCR을 이용하여 influenza virus A/Swine/Iowa/15/30, US isolate에서 primer H1-474와 H1-1065R을 사용하여 591 base pair, internal primer sets(H1-685, H1-1065R)를 이용하여 nested set PCR을 하여 influenza virus A/Swine/Iowa/15/30, US isolate에서 380 base pair, internal primer sets(H1-809, H1-1065R)를 사용하여 nested set PCR로 influenza virus A/Swine/Iowa/15/30, US isolate에서 256base pair band가 검출되었다. 그러나 influenza virus A/Port Chalmers/1/73에서는 band가 검출되지 않았다(Fig 6). H1-809와 H1-1770R을 primer로 사용하여 961bp의 product를 위와 마찬가지로 얻을 수 있었다(Fig 6). Influenza virus A/Ohio/101/83, A/Seoul/20/91 strain은 이미 발표된 HA1 부분만을 사용하여 526bp의 염기서열과 174개의 아미노산을 비교 분석하였고, influenza virus A/Swine/Iowa/15/30, A/WSN/33, A/Swine/Indiana/1726/88은 HA1 domain 일부와 HA2 domain 일부까지 700bp의 염기서열을 비교 분석하였고, 248개의 아미노산도 함께 비교하였다.

고 찰

Influenza A virus는 인수공통전염병의 하나로 돼지가 reservoir 역할을 하는 것으로 추정되고 있으며⁶, 사람에게서는 심하게는 사망까지 이른다는 보고도 있으며, 최근까지 중간 전파의 기전이 활발하게 연구되고 있다. 1997년 발표된 Taubenberger의 연구에서는 1918년 human pandemic의 원인이 된 virus가 돼지의 H1N1 influenza virus와 nucleotide sequence 결과가 일치함을 보였다¹⁵. 1918년 pandemic에서는 2천만명 이상이 사망했는데, 이 수치는 15년동안 미국에서 AIDS로 사망한 사람의 2배에 달하는 것이다. Influenza virus는 조류에서 돼지로 감염되고, 돼지에서 사람으로의 전파가 가능하다고 여겨지고 있다. 1918년의 pandemic은 virus의 virulence가 강해졌기 때문이고, 이것은 haemagglutinin의 돌연변이로 세포내 감염 능력을 높였기 때문으로 생각된다¹⁵. 그러므로 변이가 심한 influenza virus가 새로운 human pandemic을 일으킬 수 있는 가능성이 있어 공중보건학적으로도 중요한 의미를 가진다. 국내 influenza virus의 발생상황 조사를 위해서는 전국적으로 다양한 일령, 지역, 계절별로 돼지 혈

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
US	KKGNSYPKLSKSYVNNKEKEVLVWGIHHPPTSTDQQLYQNADAYVFGSSKYNNKFKPDIATRPKVRGQAGRMNYYWT								
Sw/Ind	KKGNSYPKLSKSYVNNKEKEVLVWGIHHPPTSTDQQLYQNADAYVFGSSKYNNKFKPEIATRPKVRGQAGRMNYYWT								
Sw/Iowa	KKENSYPKLSKSYVNNKGEVLVWGVHHPPTSTDQQLYQNADAYVSVGSSKYRRFTPEI AARPKVRGQAGRMNYYWT								
Ohio	EKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVWGVHHPPTSTDQQLYQNADAYVSVVSSHYNRRFTPEIAKRPKVRNQEGRINYYWT								
Seoul	EKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVWGVHHPPTSTDQQLYQNADAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWT								
	***** * **			* ** **		**		**	
	90	100	110	120	130	140	150	160	
US	LVEPGDITFQATGNLVVPRYAFAMNRGSGSGI I ISDTPVHDCNTTCTPKGAIN TSLPFQNIHPVTI GECPKYVKSTKL								
Sw/Ind	LVEPGDITFTEATGNLVVPRYAFAMNRGSGSGI I ISDTPVHDCNTTCTPKGAIN TSLPFQNIHPVTI GECPKYVKSTKL								
Sw/Iowa	LLEPGDITFTEATGNLVAPRYAFALNRGSGSGI I TSNAPVHDCDTKQTPHGA I NSSLPFQNVHPVTI GECPKYVKSTKL								
Ohio	LLEPGDITIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGI I TSNASMDECDAKCQTPQGA I NSSLPFQNVHPVTI GECPKYVRSTKL								
Seoul	LLEPGDITIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGI I TSNASMDECDAKCQTPQGA I NSSLPFQNVHPVTI GECPKYVRSTKL								
	*								
	170	180	190	200	210	220	230	240	
US	RMATGLRNIPSIQSRGLFGA I AGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSGYAADRKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA								
Sw/Ind	RMATGLRNIPSIQSRGLFGA I AGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSGYAADRKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA								
Sw/Iowa	RMVTGLRNIPSIQSRGLFGA I AGFIEGGWTGLIDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA								
Ohio	RMVTGLRNIPSIQSR								
Seoul	RMVTGLRNIPSIQSR								
US	VGKEFNHL								
Sw/Ind	VGKEFNHL								
Sw/Iowa	VGKEFNHL								

Fig 8. Comparison of the deduced amino acid sequences of the HA domain among various influenza A virus strains. Shaded regions are potential glycosylation sites. *s represent antigenic sites according to A/Swine/Indiana/1726/88¹. Amino acid at the 176, R (Arginine) represents cleavage site which is related to viral infectivity and pathogenicity.

청을 채취하여 항체가를 조사하였다. Chicken RBC를 사용하여 HI test를 실시하였고, 표준항원으로는 이미 그 특성이 밝혀진 influenza A/Swine/15/30, A/Port Chalmers/1/73를 사용하였다.

항체가 판정하는 항체가 20배 이상을 항체 양성으로 결정하였다⁶ Influenza A virus 전체에 대한 항체 양성률은 59%였고, 이 중 H1 subtype에 대한 항체 양성률은 15%, H3 subtype에 대한 항체 양성률은 24%, H1과 H3 복합감염으로 인한 항체 양성률은 20%로 나타났다. 외국의 혈청검사를 한 자료와 비교를 하면, 1990~91년 미국에서 도축돈을 대상으로 실시한 항체검사 결과 H1N1에 대한 항체 양성률 25%, H3N2에 대한 항체 양성률 40% 수준¹⁶ 보다는 약간 낮은 편이었으나 유의성 있는 큰 차이는 없었고, 국내 조사에서도 H3 influenza virus에 대한

항체가 더 높거나 다른 시험결과와 비슷한 경향을 보였다. 이것은 국내 조사에서는 다양한 일령을 포함하여, 모체이행항체가 소실되고 재감염이 이루어지기 전의 항체가 낮은 자돈이 시험에 공해졌기 때문일 수 있다. 자돈들은 influenza virus에 대한 모체이행항체를 초기항체에 수준 따라 약 2~4개월간 유지한다¹⁷. Wibberley et al이 1987년 영국에서 실시한 H3N2에 대한 혈청검사에서는 31%의 돼지에서 10배 이상의 항체를 나타냈다¹⁴. 우리나라 돼지의 혈청검사 결과로 볼 때, 국내에서도 H1과 H3 subtype의 virus가 공존하고 있음이 확인되었다. 이는 국내 돼지 유전자원이 대다수 미국 및 유럽에서 수입된 것을 감안하면 역학적으로 일치하는 결과임을 알 수 있다. 복합감염된 예를 합산하여 계절별로 수집한 혈청을 비교했을 때, H3의 경우는 계절에 상관 없이 일정한

게 40~45%의 항체양성 수준을 유지했고, 여름과 가을 사이에는 약간은 낮아지는 경향을 보였다. H1의 경우는 전체적으로 30~47% 정도의 항체가 양성률을 나타냈으며, 봄부터 여름 사이에 항체가 수준이 높아졌으며, 여름 이후 가을까지는 낮아지는 양상을 보였다(Fig 5). 이 결과는 Kupradinum *et al*이 1986년 태국에서 혈청역학 조사를 하였을 때, 계절에 따른 뚜렷한 항체가의 차이를 보였던 것과는 달리¹⁸ 국내에서는 계절변동에 따른 항체가의 현격한 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 Kupradinum *et al*은 같은 subtype의 virus를 항원으로 HI test를 했어도 항원 virus strain에 따라 항체가의 차이가 있음을 밝혔다¹⁸. 그러므로 이 실험에서도 다른 strain을 항원으로 사용하였다면 값의 차이가 있을 것으로 예상된다. 동물접종을 하여 제조한 항혈청으로 HI test를 실시한 결과는 Table 1과 같고, 이 결과로 볼 때 미국 분리주는 H1 subtype과 유사한 HA 항원성을 갖는 것으로 생각 된다. US isolate의 유전학적 특성을 조사하기 위하여 PCR을 실시하였다. 1.3~6 plaque forming unit 만큼의 양만 존재해도 PCR로 HA gene 을 검출해내는 것이 가능하며, 또 subtype까지의 감별도 가능하다¹⁹. 실험에서는 influenza virus중 면역원성과 관련된 것으로 알려져 있는 HA domain을 대상으로 하였고, PCR을 이용하여 influenza virus의 HA gene을 검출해내는 방법은 Schorr *et al*의 방법을 사용하였다^{1,12}. Primer는 A/Swine/Indiana/1726/88의 conserved region에서 제작하였다^{1,12}. H1-474와 H1-1065R을 사용하여 591bp, H1-685와 H1-1065R을 사용하여 380bp, H1-809와 H1-1065R을 사용하여 256bp, H1-809와 H1-1770R을 사용하여 961bp의 H1 subtype에 특이한 band를 검출할 수 있었다. 이 실험에서 US isolate와 reference strain으로 사용한 A/Swine/Iowa/15/30에서는 H1에 특이한 band인 591bp, 380bp, 256bp, 961bp의 band가 검출되었는데, influenza virus A/Port Chalmers/1/73에서는 검출되지 않았으며, 이는 사용된 primer가 H1N1의 sequence를 이용한 것이기 때문이며, 본 실험의 결과로 미루어 보아 이들 primer set을 이용하면 H1N1 및 H3N2 바이러스를 구분할 수 있을 것으로 사료된다. 이 band들은 influenza virus의 H1 subtype의 HA1 domain에 특이한 band임이 Schorr *et al*에 의해 확인되었다¹². US isolate는 H1 subtype으로 구분할 수 있었다. 항원성과 유전학적인 특징을 조사하기 위해 haemagglutinin의 HA domain의 HA1 domain과 proteolytic enzyme cleavage site와 HA2 domain

을 포함하여 부분적으로 sequencing 하여 이미 발표된 H1N1의 다른 strain과 염기서열과 아미노산 서열을 비교하였다. HA2 portion은 돼지 influenza virus에서 HA1 portion에 비해 비교적 변이가 없는 부분으로 알려져 있다^{6, 11,20}. 그래서 이 실험에서는 변이가 심한 HA1 portion과 감염력과 관련있는 것으로 알려져 있는 cleavage site와 HA2 portion의 일부분의 염기서열 분석과 아미노산 분석을 실시하였다. US isolate는 744bp에 해당하는 부분을 sequencing 하였고, 이중 699bp의 염기를 비교하였다. 비교를 위한 표준 strain으로는 A/Swine/Indiana/1726/88을 사용했는데, 540번째 염기부터 비교하였고, 아미노산은 170번째부터 비교하였다. US isolate는 A/Swine/Indiana/1726/88 strain과 97%의 nucleotide homology와 98%의 아미노산 homology를 보여 유전적인 특성이 유사하고 H1N1 subtype에 가까운 것으로 추측할 수 있었다. Classical swine influenza virus인 A/Swine/Iowa/15/30과는 84%, 85% nucleotide homology와 88%씩의 아미노산 homology를 보였다. 돼지 influenza virus H1N1 strain과 human influenza virus H1N1 strain의 연관성은 염기서열 분석으로 많이 연구되어져 왔다²¹. 이 실험에서는 human strain중 A/WSN/33, A/Ohio/101/83, A/Seoul/20/91과 비교하였는데, US isolate가 A/WSN/33과 80%의 nucleotide homology를 보였고, A/Seoul/20/91 strain과는 75%의 nucleotide homology를 나타내었다. 이것은 classical swine influenza virus가 A/Seoul/20/91 strain과 81%의 nucleotide homology를 나타낸 것보다 더 낮은 연관성을 보인다. 감염력과 관련된 것으로 생각되는 HA1과 HA2의 proteolytic enzyme cleavage site에는 변함없이 Arginine이 존재하였다. H1 human virus가 돼지 virus 보다도 변이가 더 심한데, 그 이유로는 돼지 virus는 structural restraints가 더 많고, life cycle이 짧아 virus가 짧은 passage 과정을 겪기 때문이다¹.

바이러스의 항원성과 병원성에 관계하는 염기서열이 밝혀져 있는 바, 아미노산을 분석한 결과 glycosylation site(Asn-X-Ser/Thr)는 Fig 8에서 보는 바와 같이 125~127(N-T-T), 136~138(N-T-S)의 sequence로 US isolate, A/Swine/Indiana/1726/88 strain에서 공히 존재하였으며, A/Ohio/101/83, A/Seoul/20/91에서는 108~120에(N-A-S)로 존재하였다. 그러나 A/Swine/Iowa/15/30에서는 이 glycosylation site는 존재하지 않았다. HA1 domain과 HA2 domain의 cleavage site인 Arginine은 Fig 8에서 보는 바와 같이

176번 위치에 모두 존재하였으며, 이로 미루어 보아 이들 바이러스의 세포내로의 이동과 병원성은 보유하고 있을 것으로 사료된다. Influenza A/Swine/Indiana/1726/88은 4개의 antigenic site가 있는 것으로 알려져 있고, HA gene은 1778개의 nucleotide로 이루어져 있다. 그중 HA polypeptide에 326개의 아미노산이 있으며, HA2 polypeptide에 222개의 아미노산이 있다¹. Antigenic site 분석은 Luoh *et al*이 제시한 것에 따랐다¹. 이것은 Fig 8에 표시되어 있다. Antigenic site는 hydrophilic portion에서 형성될 가능성이 더 크다. Hydrophobicity가 높은 아미노산에서의 변화는 HA의 구조에는 영향을 덜 미친다⁶. Antigenic site에서 변화된 아미노산은 돼지 influenza virus만 비교해보면 18번 위치에서 Swine/Iowa/15/30은 glycine이나 나머지는 glutamic acid이며, 34번 위치에서 모두 threonine이다. US isolate는 이 항원성과 관련된 부분이 A/Swine/Indiana/1726/88과 모두 일치해 유사한 항원성을 보일 것으로 예상된다. Swine/Iowa/15/30은 A/Swine/Indiana/1726/88과 antigenic site에서 1곳의 아미노산이 변했다. 이것은 교차 혈청검사를 했을 때 US isolate의 HI titer가 높은 것과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 아미노산의 변이에서 valine에서 alanine이나 leucine에서 valine과 같은, 전하를 띄지 않는 아미노산을 포함하는 변이는 항원성에 별로 영향을 주지 않으나 glycine에서 glutamic acid로의 변이와 같은 전하를 띄는 변화들은 항원성과 관련된 위치에 영향을 줄 수 있다는 의견도 있다¹. Antigenic site 이외의 위치에서의 변화도 직접 항체와의 결합과는 관련없더라도 항체가 항원부위를 인식하는 것을 방해하여 면역을 어렵게 만드는 경우도 있다¹. Hypervariable region은 부분적으로 HA domain의 항원성에 영향을 주는 부위와 겹쳐져 있는 경우가 많다^{20,21}. Glycosylation site도 antigenic conservation이나 variation에 영향을 줄 수 있는데 이는 carbohydrate side chain의 항원성이 있는 부분에 대한 masking작용 때문으로 알려져 있다^{1,22}.

결론

혈청학적 역학 조사를 실시한 결과 국내 돼지에서는 59%가 influenza virus에 대한 항체를 보유하고 있는 것으로 나타났고, H1N1과 H3N2 두가지 subtype에 대한 항체를 모두 가지고 있는 것으로 나타나 두가지 subtype이 국내에서 모두 발생하고 있는 것으로 추측할 수 있었다.

돼지 influenza virus의 혈청학적인 비교시험(HI test)과 HA gene을 PCR을 사용하여 증폭시킨 유전적인 시험결과, 교차 HI 시험에서는 H1에 가까운 결과를 얻었고, PCR에서는 H1 subtype에 특이한 band가 검출되어 H1 subtype임을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 이용된 PCR 방법은 H1N1과 H3N2의 감별 진단법으로도 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 유전학적 특징을 조사하기 위해 HA gene의 염기서열과 아미노산 서열분석을 하였는데, US isolate는 A/Swine/Indiana/1726/88과 97% nucleotide homology와 98%의 아미노산 homology를 보여 유전적인 특성이 유사하고 H1N1 subtype에 가까운 것으로 추측할 수 있었다. Classical swine influenza virus인 Swine/Iowa/15/30과의 nucleotide와 아미노산 homology 비교에서는 US isolate가 human pandemic의 원인이 되었던 고전적인 돼지 influenza virus 보다는 A/Swine/Indiana/1726/88과 유사함을 알 수 있었고, 항원성과 관련된 부분이 모두 일치해 유사한 항원성을 보일 것으로 예상된다. HA1 domain과 HA2 domain의 cleavage site인 arginine은 시험에 공한 influenza virus에서 존재하였으며, 이로 미루어 보아 바이러스의 세포내로의 감염력과 병원성은 보유하고 있을 것으로 사료된다. 본 실험성적에서 얻어진 중요한 결론은 분리된 바이러스가 A/Swine/Indiana/1726/88과 비교하여 genetic shift나 genetic drift가 일어나지 않았다는 것이며, 사람의 influenza virus와 homology를 비교하여 쉽게 돼지에서 사람으로 사람에서 돼지로 influenza virus가 cross infection이 일어나는 것이 용이하지 않다고 추정할 수 있었다.

참고 문헌

1. Luoh SM, McGregor MW, Hinshaw VS. Hemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1 swine influenza viruses. *J Virology*, 66:1066-1073, 1992.
2. Rota PA, Rocha EP, Harmon MW, *et al*. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *J Clin Microbiology*, 27:1413-1416, 1989.
3. Hinshaw VS, Bean Jr WJ, Webster RG, *et al*. The prevalence of influenza viruses in swine and antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man

- and swine. *Virology*, 84:51-62,1978.
4. Patriarca PA, Kendal AP, Zakowski PC, *et al.* Lack of significant person to person spread of swine influenza like virus following fatal infection of an immunocompromised child. *Am J Epidemiology*, 119: 152-158, 1984.
 5. Wells DL, Hopfensperger DJ, Adren NH, *et al.* Swine influenza virus infection. *JAMA*, 265:478-481, 1991.
 6. Wentworth DE, Thompson BL, Xu X, *et al.* An influenza A(H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for a fatal case of human influenza. *J Virology*, 68:2051-2058, 1994.
 7. Arikawa J, Yamane N, Totsukawa K, *et al.* Serological evidence of H1 influenza infection among Japanese hogs. *Acta Virol*, 23:508-511, 1979.
 8. Nerome K, Ishida M, Oya A, *et al.* The possible origin of H1N1 virus in the swine population of Japan and antigenic analysis of the isolates. *J Gen Virology*, 62:171-175, 1982.
 9. Scholtissek C, Burger H, Bachmann PA, *et al.* Genetic relatedness of haemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*, 129:521-523, 1983.
 10. Brown IH, Manvell RJ, Alexander DJ, *et al.* Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. *Veterinary Record*, 132:461-462, 1993.
 11. Noble S, McGregor MW, Wentworth DE. Antigenic and genetic conservation of the hemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. *J Gen Virology*, 74:1197-1200, 1993.
 12. Schorr E, Wentworth D, Hinshaw VS. Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. *Am J Vet Res*, 55:952-956, 1994.
 13. 박봉균. Binary Ethylenimine으로 불활화한 Newcastle Disease virus의 항원성과 면역원성에 관한 연구. 수의학 석사학위 논문. 1985.
 14. Wibberley G, Swallow G, Roberts DH. Characterization of an influenza A(H3N2) virus isolated from pigs in England in 1987. *Br Vet J*, 144:196-201,1988
 15. Taubenberger J, Reid AH, Krafft AE, *et al.* Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*, 275:1793-1796, 1997.
 16. Wells DL, Hopfensperger DJ, Adren NH. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person to person transmission. *JAMA*, 265:478-481, 1991.
 17. Beilage EG, Schen kL, Schrader C. The influence of maternal antibodies on the frequency, severity and serology of the infection with influenza A virus. *Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy*, 7-10, 1996.
 18. Kupradinum S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, *et al.* The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol*, 118:289-297, 1991.
 19. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, *et al.* Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, 35:259-265, 1991.
 20. Wiley DC, Wilson IA. Structural Identification of the antibody binding site of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, 289:373-378, 1981.
 21. Nerome K, Sakamoto S, Yano N, *et al.* Antigenic characteristics and genomic composition of a naturally occurring recombinant influenza isolated from a pig in Japan. *J Gen Virology*, 64:2611-2620, 1983.
 22. Air GM, Laver WG. The molecular basis of antigenic variation in influenza virus. *Adv Virus Res*, 31:53-102, 1986.