

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

Yon-Koung Park\*, Nam-Ho Kim, Seung-Hwa Choi, Mi-Oak Lee, Sang-Kee Min, Seong-Joon Kim, Kyung-Soon Cho and Young-Nan Na

Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 613-806, Korea

Received December 2, 2009 / Accepted February 9, 2010

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

**Key words :** Hemagglutinin (HA), influenza, neuraminidase (NA), phylogenetic tree

## 서 론

호흡기계감염증을 유발하는 Orthomyxoviridae에 속하는 인플루엔자바이러스는 전 세계적으로 발생되고 있으며, 전형적으로 2년에서 3년 주기로 발생률이 증가하며 매년 기본적으로 20,000명 이상의 사망자를 발생시키고 있다[9]. 또한 (수)십 년단위로 아형들의 genetic reassortment와 gene recombination [4]을 통해 폭발적인 유행을 일으키는 치사율을 유발한다.

1918년 "Spanish flu"를 유발한 A/H1N1, 1957년 "Asian flu"를 유발한 A/H2N2, 1968년 "Hong Kong flu"를 유발한 A/H3N2가 전 세계적으로 대유행을 유발시켜 많은 사망자를 발생시켰으며[7,13] 현재는 인플루엔자바이러스 A/H1N1, A/H3N2, B 세 종류의 계절인플루엔자가 매년 전 세계적으로 발생하고 있다. 2003년에는 고병원성조류인플루엔자인 인플루엔자바이러스 A/H5N1이 391명의 사람에게 감염되어 247명의 사망자를 발생시켜 새로운 대유행의 가능성을 시사했다[17].

이런 인플루엔자바이러스는 구조 단백질의 차이에 의해 A, B, C 형으로 나뉘어 지며 이 중에서도 인플루엔자바이러스 B형은 사람에게만 감염되며, A형은 여러 개의 아형을 가지고 있으며 사람을 비롯한 여러 동물에게 감염을 유발한다. 인플

루엔자바이러스는 표면에 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)라는 중요한 glycoprotein들을 가지고 있는데 이것은 세포에 바이러스가 침입 할 때 주요 항원으로 작용하며 인플루엔자바이러스의 아형을 결정하는 요소가 된다 [1,13]. 인플루엔자바이러스는 8개의 RNA 분절을 가지고 있으며 HA는 이 중 4번째 RNA 분절에 해당되며 특징에 따라 HA1과 HA2라는 두개의 부위로 구분된다. HA1 부분의 변이가 HA2 부분보다 빈번히 일어나며 숙주 상피세포의 바이러스 결합과 숙주항체의 공격 대상이 된다[5]. HA에 의한 항체는 감염을 방지하는 역할을 하는 반면, NA의 항체는 단지 심각한 감염이나 증상을 약간 경감시키는 작용을 한다. NA는 주로 receptor-destroying enzyme으로 불리며 인플루엔자바이러스가 점막을 통과할 수 있게 해주며[8] 감염된 세포에서 바이러스가 방출될 수 있게 한다. 인플루엔자바이러스 A형의 경우 HA는 H1~H16, NA는 N1~N9까지 유전적으로 다양한 형태를 가지며 HA와 NA가 조합되어 인플루엔자 아형이 결정된다. 인플루엔자바이러스 B형의 경우는 인플루엔자바이러스 A형과 같은 큰 antigen shift는 존재하지 않지만 유전적으로 구분될만한 변이가 있어 2개의 lineage (Victoria와 Yamagata)들로 나뉘어 지며[6] 이 두 lineage들 사이에서 재조합이 일어날 수도 있는데 대표적인 것이 2006~2007, 2007~2008 절기의 백신주인 B/Malaysia/2506/2004이다. 이 백신주의 경우 HA는 Victoria, NA는 Yamagata lineage인 reassortant lineage에

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-757-6936, Fax : +82-51-753-1424

E-mail : akacia@korea.kr

해당된다. 이렇게 HA와 NA가 조합 또는 재조합되어 인플루엔자 타입이 결정되지만 같은 아형(예, H3N2, H1N1, B/Victoria lineage)에서도 주요항원부위 등의 변화로 인하여 매년 마다 WHO에서는 그 전 절기의 인플루엔자 바이러스를 조사하여 남반구와 북반구의 백신을 추천하고 전 세계적으로 백신접종이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 2006~2007 절기 및 2007~2008 절기에 부산에서 분리되었던 인플루엔자 바이러스의 염기서열을 분석하고 HA의 주요 항원의 변화를 백신주와 비교 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 배양

Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 세포주는 질병관리본부 국립보건연구원 인플루엔자바이러스팀에서 분양받아 사용했고 세포배양용 배지는 penicillin (0.05 units/ml)/streptomycin (0.05 µg/ml)과 10% FBS가 첨가된 Minimum essential medium (MEM) (Invitrogen, USA) 사용하였으며 바이러스 분리용 배지는 MEM에 Vitamin Solution (INVITROGEN, USA), Glucose Solution (SIGMA, UK), Trypsin (SIGMA, UK), Penicillin/Streptomycin (SIGMA, UK)을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 5% CO<sub>2</sub> 37°C로 조정된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었다[13].

### 검체처리 및 바이러스 배양

부산 시내 10개 병원에 내원한 인플루엔자 의사환자에게서 인후도찰 또는 비인후도찰한 면봉을 바이러스수송용배지에 담아 4°C를 유지하여 실험실로 수송하였다. 바이러스수송용 배지 1 ml에 penicillin (5 units/ml)/streptomycin (5 µg/ml) 및 nystatin (1,000 units/ml)을 첨가하여 4°C에서 1시간 방치한 후, 990×g로 20분간 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 접종액으로 사용하였다. 바이러스의 배양을 위해 24-well 배양용

기에 MDCK세포를 24시간 배양했다. 이렇게 준비된 well에 바이러스 분리용 배지 0.5 ml를 넣은 후 전처리된 가검물 0.2 ml씩 접종하고 5% CO<sub>2</sub> 34°C로 조정된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10일간 배양하면서 매일 현미경하에서 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. CPE가 나타난 세포 배양액에서 바이러스 유전자 확인 검사를 실시하였다[13].

### 바이러스 RNA 분리 및 RT-PCR을 이용한 아형 확인

원심분리된 배양액 140 µl을 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 µl를 RT-PCR pre-mix kit for influenza virus detection (CosmoGentech, Korea)에 넣어 부피가 50 µl가 되도록 한 후 42°C 1시간, 95°C 3분, (94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분)을 35회, 72°C 5분 1회를 조건으로 PCR (PTC-100™, Inc. USA)을 실시한 후 증폭산물 확인을 위해 1.5% agarose gel에 증폭산물을 10 µl 씩 loading하여 100 V에 30분간 전기영동을 수행하였다. SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, USA)을 전기영동 buffer 100 ml당 8 µl 첨가하여 agarose gel을 5분에서 10분간 염색하고 증폭산물을 UV 하에서 관찰하여 A/H1, A/H3, B형을 확인하였다[13].

### 염기서열분석을 위한 HA와 NA 유전자에 대한 RT-PCR

아형이 확인된 인플루엔자바이러스를 층화무작위표본추출(stratified random sampling)법으로 H1 15건, H3 16건, B 29건 표본 추출하여 HA 유전자와 NA 유전자에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 분석을 위해 HA와 NA 대해 특이적으로 제작된 각각의 primer를 이용하였다[4,9,10,20](Table 1). RNA 10 µl, primer 2.5 µl (10 pmol)를 RT-PCR one-step ReadyMix (COSMOGentech, Korea)에 넣어 부피가 50 µl가 되도록 한 후 각 gene에 적합한 조건으로 PCR을 실시하였다(Table 2).

Table 1. Primers used for amplification of the viral genomes

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

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

Subtype	PCR condition
A/H1	95°C 5 min, 94°C 20 sec, 45°C 30 sec, 72°C 7 min <b>30 cycle</b> , 72°C 7 min
A/N1	95°C 1 min, 94°C 20 sec, 45°C 30 sec, 72°C 1 min <b>30 sec 30 cycle</b> , 72°C 7 min
A/H3	94°C 5 min, 94°C 1 min, 50°C 2 min, 72°C 3 min <b>25 cycle</b> , 72°C 10 min
A/N2	95°C 1 min, 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 min <b>35 cycle</b> , 72°C 20 min
B	95°C 5 min, 94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 min <b>35 cycle</b> , 72°C, 10 min

아형확인에서 사용한 방법으로 증폭산물을 확인하였다.

#### 염기서열 분석

원하는 사이즈에서 증폭된 DNA를 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN, Germany) 및 Gel extraction kit (COSMOGentech, Korea)를 이용하여 정제하였다. 이를 주형으로 하여 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, USA)와 ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)를 이용해 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석을 위한 primer는 HA 유전자의 경우 PCR에 사용한 primer를 사용했고 NA 유전자는 특이적인 inner primer를 추가하여 분석하였다(Table 3)[9,20]. 확인된 염기서열은 DNASTAR (Madison, WI)를 이용하여 계통수를 작성하고 HA의 경우는 아미노산 분석까지 실시하였다.

Table 3. Inner primers used for sequencing

Subtype	Gene	Name	Sequence (5'→3')
N2	NA	F106	GGTAACTACTGTAAACATTGCA
		F372	GAGAACCTTATGTGTCATGCG
		F695	CAGGAGTCGGAATGCGTTTGT
		F823	GTCAGGAAGTGCTCAGCA
		F1063	AGTGAAAGGCTGGGCCTT
N1	NA	F119	CTGGAAGTCAAAACACACTG
		F450	ATTCAAATGGGACCGTTA
		F697	AAGAGTCTGAATGTGTCT
		F901	CGACCTTGGGTGCTTTTAATC
		R595	CTGGACCAGAAATCCGATTG
		R955	CACTGCAGATGTATCCTATTGA

#### 결과 및 고찰

##### 인플루엔자바이러스 분리 및 아형 확인

2006년 10월부터 2008년 6월까지 총 인플루엔자 의사 환자 1,822건의 인후도찰물 및 비인후도찰물에서 277건의 인플루엔자바이러스를 분리했다. 절기별로 2006~2007 절기 1,154검체 중 52건(4.5%), 2007~2008 절기 668검체 중 210건(31.4%)에서 인플루엔자바이러스를 분리하였다. 아형별로 살펴보면 2006~2007 절기에는 A/H1형 11건, A/H3형 27건, B형 14건이 분리되었으며, 2007~2008 절기에는 A/H1형 31건, A/H3형 35건, B형 144건이 분리되었다. 2006~2007 절기에 비해

2007~2008 절기의 경우 인플루엔자바이러스 검출율은 7배, 검출건수는 4배 증가하였으며 특히 다른 형에 비하여 인플루엔자바이러스 B형이 10배 정도 많이 검출되었다. 이런 유행은 부산뿐만 아니라 전국에서도 같은 양상을 보였다[3].

##### 분리된 인플루엔자바이러스의 염기서열 분석

부산에서 유행한 인플루엔자바이러스의 HA 유전자 중 변이가 심한 HA1 domain과 NA 유전자의 계통수 분석을 실시하였다. 인플루엔자바이러스 A/H1N1의 HA 염기서열의 경우 2008~2009 절기 백신주인 A/Brisbane/59/2007과는 96.7%~97.7%의 유사성을 보였으며, 분리된 바이러스가 유행한 절기의 백신주인 A/Solomon Islands/3/2006 및 A/New Caledonia/20/99와는 각각 96.5%~97.3%, 95.6%~96.6%의 유사성을 보였다(Fig. 1A). 인플루엔자바이러스 A/H1N1의 NA염기서열의 경우, A/Brisbane/59/2007과는 97.8%~98.5%,

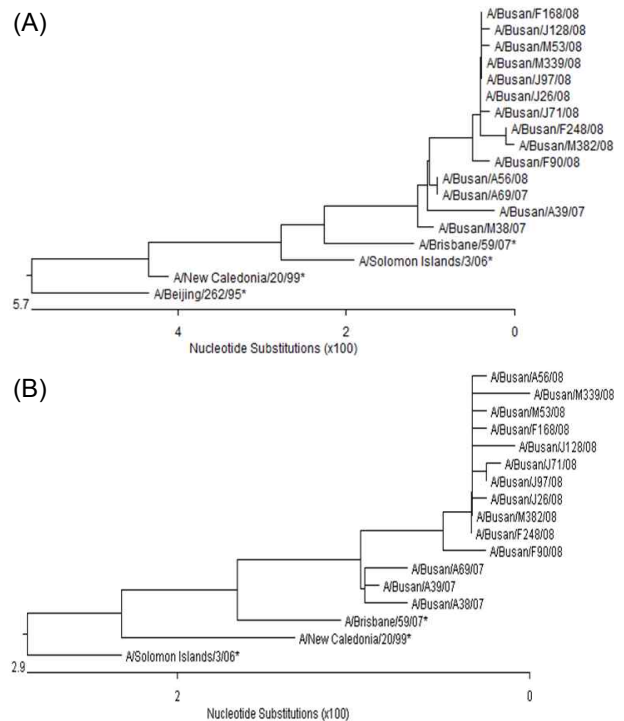


Fig. 1. Phylogenetic trees of hemagglutinin (HA) 1 region of the HA genes (A) and neuraminidase (NA) genes (B) of influenza H1N1 isolates with H1N1 vaccine strains (\*) since 1999.

A/Solomon Islands/3/2006과는 96.7%~97.6%, A/New Caledonia/20/99와는 96.8%~97.7%의 유사성을 보여 2008~2009 절기의 백신주인 A/Brisbane/59/2007과 가장 유사성이 컸다(Fig. 1B).

A/H3N2의 분리주 중 A/Busan/F54/2007은 HA와 NA 염기서열에서 이 바이러스가 유행한 절기의 백신 주인 A/Wisconsin/67/2005와 유사주로 나타났다, 이 주를 제외한 모든 분리주는 HA 유전자에서는 2008~2009 절기 백신주인 A/Brisbane/10/2007과는 98.4%~99.7%의 유사성을 보였으며 A/Wisconsin/67/2005와는 96.5%~97.5%의 유사성을 보였다(Fig. 2A). NA 유전자는 A/Brisbane/10/2007과는 98.9%~99.4%, A/Wisconsin/67/2005와는 98.0%~98.6%, A/California/7/2004와는 98.3%~98.9%의 유사성을 보여 A/Brisbane/10/2007과 가장 큰 유사성을 보였으며 분리주들이 유행한 시기의 2006~2007 절기와 2007~2008 절기의 백신주인 A/Wisconsin/67/2005와는 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 2B).

분리된 인플루엔자바이러스 B의 HA와 NA의 유전자 계통수를 비교해보면 2008년 2월과 4월 분리주 중 각 1주(A/Busan/F261/2008, A/Busan/A65/2008)에서 HA는 Victoria lineage이면서 NA는 Yamagata lineage에 속하는 B/Malaysia/2506/2004(B reassortant lineage)와 유사하였다. 이 2건의 분리주를 제외하고는 HA와 NA 유전자 모두 Yamagata lineage

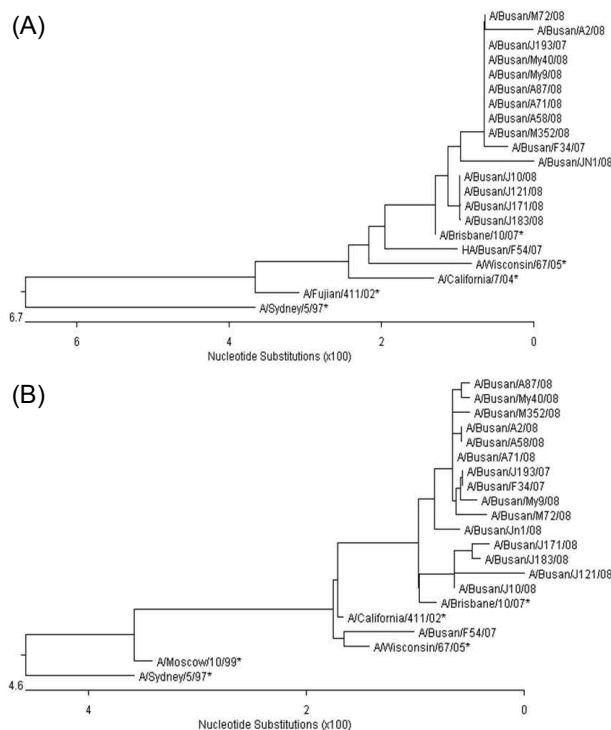


Fig. 2. Phylogenetic trees of hemagglutinin (HA) 1 region of the HA genes (A) and neuraminidase (NA) genes (B) of influenza H3N2 isolates with H3N2 vaccine strains (\*) since 1999.

에 속했다. 2008~2009 절기 백신주인 B/Florida/4/2006 (Yamagata lineage)과 96.5%~99.7%의 유사성을, 이 바이러스가 유행한 절기의 백신주인 B/Malaysia/2506/2004(B reassortant lineage)와는 86.7%~87.7%의 유사성을 보여 B/Florida/4/2006과 유사성이 큰 것으로 나타났다(Fig. 3A). 인플루엔자바이러스 B의 NA 유전자의 경우 reassortant lineage에 속하는 2주 분리주를 제외한 나머지 분리주에서 B/Florida/4/2006과 98.9%~100%의 유사성을, 분리주 유행시기의 백신주인 B/Malaysia/2506/2004와는 94.5%~96.7%의 유사성을 나타내어 2008~2009 절기의 백신주와 더 큰 유사성을 보였다(Fig. 3B). 2006~2007 절기 및 2007~2008 절기에 분리되었던 인플루엔자 바이러스를 백신주와 비교해본 결과 이 분리주가 유행한 시기의 백신주보다 2008~2009 절기 백신

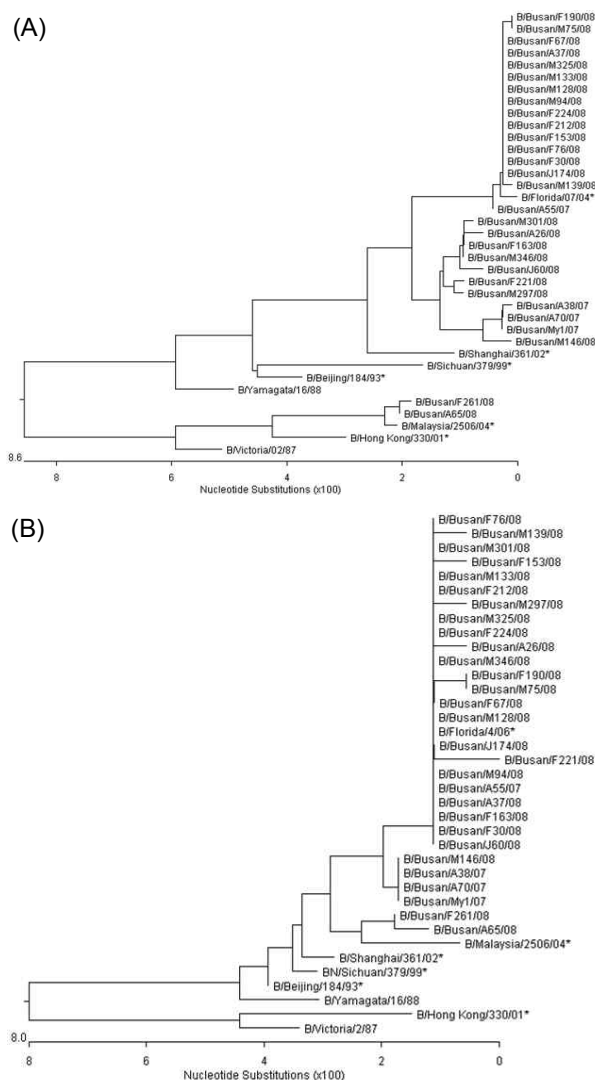


Fig. 3. Phylogenetic trees of hemagglutinin (HA) 1 region of the HA genes (A) and neuraminidase (NA) genes (B) of influenza B isolates with B vaccine strains (\*) since 1999

에서 유사성이 높음 알 수 있었다. WHO에서 백신의 효능을 높이기 위하여 인플루엔자바이러스 A/H1N1, A/H3N2, B의 2008~2009 절기를 위한 백신주를 모두 교체한 것과 그 백신주가 부산에서 분리된 인플루엔자바이러스와도 유사하여 전 세계적으로도 비슷한 형태의 인플루엔자바이러스가 유행하였음을 알 수 있었다[16].

#### 분리된 인플루엔자 바이러스의 HA 아미노산 분석

인플루엔자바이러스 A/H1의 N-linked glycosylation site는 14(NNS), 27(NVT), 58(NCS), 91(NGT), 129(NHT), 163(NLS), 290(NSS)에서 모든 백신주와 동일하였으나 A/

Busan/J128/2008분리주의 경우 272번째 부위의 NAP가 NAS로 치환되어 있어 백신주를 포함한 대부분의 분리주가 7개의 glycosylation site를 가지는 것에 반해 8개의 glycosylation site를 가지고 있었다. Kim 등[11]이 발표한 2002년 국내 인플루엔자 분리주와 비교해 보면 A/Seoul/15/2002 외의 모든 분리주는 7개의 glycosylation sites를 가져 비슷한 양상을 보였으며, conserved receptor binding sites도 모두 보존이 잘 되어 있었다. H1에는 항체와 결합하는 두 개의 strain-specific 부위(Sa and Sb)와 common-antigenic 부위(Ca and Cb) [2]가 존재하는데, 분리주에서는 백신주와의 비교 시 5곳에서 아미노산 치환이 관찰 되었다. Ca site 중 Asn (N)/Lys (K)-171,

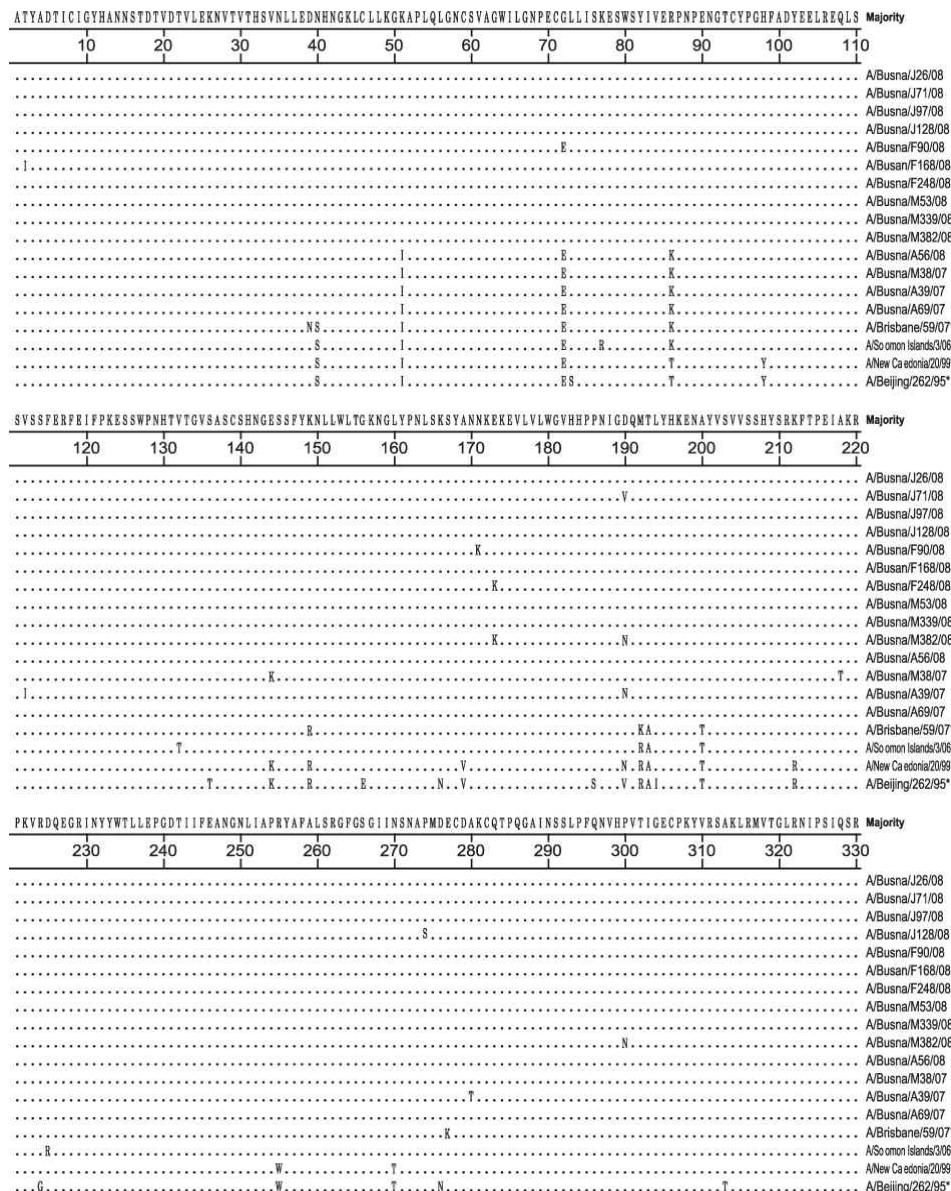


Fig. 4. Amino acids comparison between HA1 domains of influenza A/H1N1 isolates and vaccine strain (\*). A dot (.) indicates amino acid homology to the majority sequence.

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. 4).

인플루엔자바이러스 A/H3의 경우, N-linked glycosylation sites는 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 2008~2009 절기의 백신주와 동일하였으며, A/Busan/F128/07분리주의 경우는 144부위의 NNS가 DNS로 치환되어 10개의 glycosylation site를 가지고 있었다. 2006~2007년 타이완에서 분

리된 A/H3의 경우도 11개의 부위에서 모두 같은 양상을 보였으며 치환된 아미노산은 없었다[7]. 5개의 conserved receptor binding sites는 모두 보존이 잘 되어 있었으며 A/H3의 항원 부위인 A, B, C, D, E [19] 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. 5).

인플루엔자바이러스 B의 경우, HA가 Victoria lineage인 2  
주의 분리주를 제외하고는 2007년과 2008년 분리주 모두 2008  
~2009년 절기 백신주인 B/Florida/4/2006와와 유사한 아미

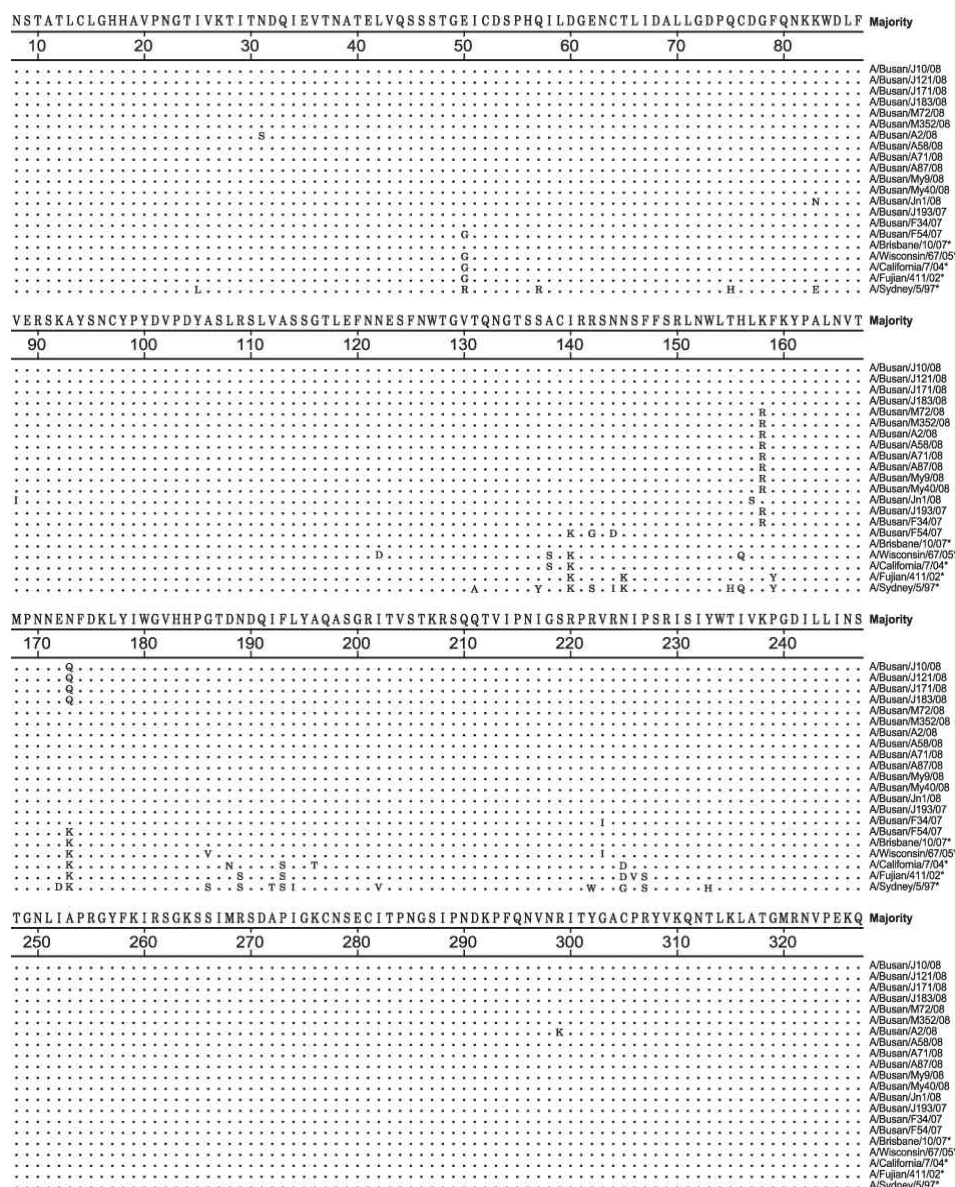


Fig. 5. Amino acids comparison between HA1 domains of influenza A/H3N2 isolates and vaccine strain (\*). A dot (.) indicates amino acid homology to the majority sequence.

노산배열을 나타내었다. 항원형 결정에 중요한 역할을 하는 N-linked glycosylation sites는 Victoria lineage와 Yamagata lineage에서 모두 4부분을 가지고 있었다[12]. 이 4부분은 25(NVT), 59(NCT), 145(NAT), 197(NKT)에 위치하고 있었으며 Victoria lineage인 2개의 분리주와 B/Malaysia/2506/2004는 145와 197 위치에서의 아미노산 배열이 NVT와 NET이었을 뿐 site의 수는 4개로 동일하였다. 그러나 2008~2009 절기 백신주인 B/Florida/4/2006은 Asn (N)/Asp (D)-197로 변환되어 3개의 glycosylation site를 가지고 있어 본 연구의 분리주들과는 다른 양상을 보였다. Conserved receptor binding sites인

Phe (F)-95, Trp (W)-158, His (H)-191, Try (Y)-202 (B/Yamagata/16/88 numbering)는 치환되지 않고 잘 보존되어 있었다(Fig. 6, 7)[15]. B의 항원부위인 120 loop, 150 loop, 160 loop, 190 helix 중에서 120 loop에서는 분리주와 백신주 (B/Florida/4/2006) 모두 아미노산이 일치하였고, 190 helix는 분리주에서 모두 같은 아미노산을 가졌으나 백신주인 B/Florida/4/06과 비교 시 분리주와 1개의 아미노산에서 Lys (K)/Asp (D)-196 치환을 보였다. 150 loop에서는 4개의 분리주에서 Ser (S)/Ile (I)-150 치환이 나타났으며, 160 loop에서는 150 loop에서 치환이 나타났던 분리주에서만 Asn (N)/Try

NVTGVIPLTTPKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDLDAVLRPMCVGTTTSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVDAE	Majority
30 40 50 60 70 80 90 100 110 120	
.....K.....A.....	B/Busan/J60/08
.....	B/Busan/J174/08
.....	B/Busan/F30/08
.....	B/Busan/F67/08
.....	B/Busan/F76/08
.....K.....A.....	B/Busan/F153/08
.....	B/Busan/F163/08
.....	B/Busan/F190/08
.....A.....	B/Busan/F212/08
.....	B/Busan/F221/08
.....	B/Busan/F224/08
.....	B/Busan/M75/08
.....	B/Busan/M94/08
.....	B/Busan/M128/08
.....	B/Busan/M133/08
.....	B/Busan/M139/08
.....	B/Busan/M146/08
.....A.....	B/Busan/M297/08
.....K.....A.....	B/Busan/M301/08
.....	B/Busan/M325/08
.....K.....M.....A.....	B/Busan/M346/08
.....	B/Busan/A26/08
.....	B/Busan/A37/08
.....	B/Busan/A38/07
.....	B/Busan/A55/07
.....	B/Busan/A70/07
.....K.....	B/Busan/My1107
.....	B/F orida/07/04*

KAPGGPYRLTSGSCPNATSKSGFFATMAWAVPKDNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGPHSDNKTQMKNLGDSNPQKFTSSANGVTHYVSQIGSFDP	Majority
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230	
.....D.....	B/Busan/J60/08
.....	B/Busan/J174/08
.....	B/Busan/F30/08
.....	B/Busan/F67/08
.....	B/Busan/F76/08
.....	B/Busan/F153/08
.....	B/Busan/F163/08
.....G.....	B/Busan/F190/08
.....	B/Busan/F212/08
.....K.....G.....	B/Busan/F221/08
.....	B/Busan/F224/08
.....	B/Busan/M75/08
.....	B/Busan/M94/08
.....	B/Busan/M128/08
.....	B/Busan/M133/08
.....	B/Busan/M139/08
.....D.....I.....Y.....D.....	B/Busan/M146/08
.....	B/Busan/M297/08
.....G.....	B/Busan/M301/08
.....	B/Busan/M325/08
.....G.....	B/Busan/M346/08
.....G.....	B/Busan/A26/08
.....	B/Busan/A37/08
.....I.....Y.....D.....	B/Busan/A38/07
.....	B/Busan/A55/07
.....I.....Y.....D.....	B/Busan/A70/07
.....	B/Busan/My1107
.....D.....	B/F orida/07/04*

Fig. 6. Amino acids comparison between HA1 domains of influenza B isolates (Yamagata lineage) and vaccine strain (\*). A dot (.) indicates amino acid homology to the majority sequence.

NVTGVIPLTTPKSHFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDLDAVLRPMCVGTTTSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTHNVINAE	Majority
30 40 50 60 70 80 90 100 110 120	
.....F.....	B/Busan/F261/08
.....	B/Busan/A65/08
.....K.....K.....	B/Malaysia/2506/04*
.....K.....K.....R.....N.....	B/Hong Kong/330/01*
.....K.....T.....KA.....K.....	B/Victoria/02/87

NAPGGPYKIGTSGSCPNVTNGGFFATMAWAVPKDNKNATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGPHSDNETQMAKLYGDSKPKFTSSANGVTHYVSQIGGFP	Majority
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230	
.....	B/Busan/F261/08
.....	B/Busan/A65/08
.....S.....	B/Malaysia/2506/04*
K.....E.....S.....S.....	B/Hong Kong/330/01*
T.....V.....V.....A.....V.....	B/Victoria/02/87

Fig. 7. Amino acids comparison between HA1 domain of influenza B isolates (B reassortant lineage) and vaccine strain (\*). A dot (.) indicates amino acid homology to the majority sequence.



(Y)-165 치환이 나타났다[14].

인플루엔자바이러스 A/H1, H3와 B형에서 대체로 conserved receptor binding sites와 N-linked glycosylation sites는 잘 보존 되어 있었으나, 항원부분의 일정 부위에서 아미노산 치환이 관찰되었다. 그러나 antigene drift라고 할 수 있는 아미노산 변이는 관찰되지 않았다[7,18].

이렇듯 2006~2007 절기 및 2007~2008 절기의 부산에서 분리된 인플루엔자바이러스를 백신주와 비교했을 시 2008~2009 절기 백신주와 가장 유사하였으며 주요 부위에서 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 백신주 혈청과의 혈구응집억제반응 및 동물실험 등을 통해 비교하여 분석해 볼 필요가 있다고 여겨진다. 이런 인플루엔자 바이러스에 대한 계속적인 조사와 연구는 백신 선택을 돕고 항원성 변화 추세를 알게되어, 새롭게 발생할 수 있는 인플루엔자의 대유행을 예방할 수 있는 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문에서 사용된 인플루엔자 의사환자 인후도찰물 및 비인후도찰물은 전국 인플루엔자 실험실표본감시사업에 참여하시고 계신 부산시 소재 협력병원(10곳)에서 채취하여 주셨습니다. 노고에 감사드립니다.

## References

- Brooks, G. F., J. S. Butel, and L. N. Ornston. 1995. Medical Microbiology. 449-459, Appleton & Lange.
- Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell, and W. Gerhard. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* **31**, 417-427.
- CDC. 2008. Public Health Weekly Report. 377-384, KCDC.
- Chana, C. H., K. L. Lin, Y. Chana, Y. L. Wang, Y. T. Chi, H. L. Tu, H. K. Shieh, and W.T. Liu. 2006. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **136**, 38-43.
- Chi, X. S., T. V. Bolar, P. Zhao, J. S. Tam, R. Rappaport, and S. M. Cheng. 2005. Molecular evolution of human influenza A/H3N2 virus in Asia and Europe from 2001 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 6130-6132.
- Chi, X. S., V. B. Trentice, Z. Ping, R. Ruth, and S. M. Cheng. 2003. Cocirculation and evolution of two lineages of influenza B viruses in Europe and Israel in the 2001-2002 season. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5770-5773.
- Chutinimitkul, S., T. Chieochansin, S. Payungporn, R. Samransamruajkit, T. Hiranras, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. *Virus Res.* **132**, 122-131.
- Colman, P. M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. 1994. *Protein Sci.* **3**, 1687-1696.
- Daum, T. L., C. L. Canas, B. C. Smith, A. Klimov, W. Huff, W. Barnes, and L. K. Lohman. 2002. Genetic and antigenic analysis of the first A/New Caledonia/20/99-like H1N1 influenza isolates reported in the Americas. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 408-412.
- Elisabet, P. R., X. Xiyan, E. H. Henrietta, R. A. James, L. R. Helen, and J. C. Nancy. 1993. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *J. Gen. Virol.* **74**, 2513-2518.
- Kim, Y. Y., J. Y. Lee, J. H. Hwang, K. A. Kim, S. W. Jang, M. S. Park, W. J. Kim, H. W. Cho, H. H. Lee, and C. Kang. 2005. Characterization of hemagglutinin and neuraminidase genes and oseltamivir resistance of influenza viruses isolated in Korea. *J. Bacteriol. Vira* **35**, 149-155.
- Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome. 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus : multiple co-circulating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* **73**, 4413-4426.
- National Institute of Health Korea. 2005. Laboratory diagnosis of Infectious disease. pp. 865-868.
- Tsai, H. P., H. C. Wang, D. Kiang, S. W. Huang, P. H. Kuo, C. C. Liu, I. J. Su, and J. R. Wang. 2006. Increasing appearance of reassortant influenza B virus in Taiwan from 2002 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2705-2713.
- Wang, Q., X. Tian, X. Chen, and J. Ma. 2007. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *PNAS* **104**, 16874-16879.
- WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines: <http://www.biohealthbase.org/GSearch/vaccineRecommend.do?>
- 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](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_12_16/en/index.html).
- Wilson, I. A. and N. J. Cox. 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 737-771.
- Wiley, D. C., I. A. Wilson, and J. J. Skehel. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* **289**, 373-378.
- Xiyan, X., J. C. Nancy, A. B. Catherine, L. R. Helen, and W. S. Michael. 1996. Variation in Neuraminidase Genes of Influenza A (H3N2) Viruses. *Virology* **224**, 175-183.



# 초록 : 부산지역에서 유행한 계절인플루엔자바이러스의 유전자 특성 및 계통분석('06~'08 절기)

박연경\* · 김남호 · 최성화 · 민상기 · 이미옥 · 김성준 · 조경순 · 나영란

(부산시보건환경연구원)

2006년 10월부터 2008년 6월까지 총 인플루엔자 의사 환자 1,822건의 인후도찰물 및 비인후도찰물에서 277건의 인플루엔자바이러스를 분리했다. 절기별로는 2006~2007 절기의 1,154검체 중 52건(4.5%), 2007~2008절기의 668검체 중 210건(31.4%)에서 인플루엔자바이러스를 분리하였다. 인플루엔자바이러스 A/H1N1의 HA 유전자의 경우, 2008~2009 절기의 백신주인 A/Brisbane/59/2007과는 96.7%~97.7%, A/Solomon Islands/3/2006 96.5%~97.3%, A/New Caledonia/20/99와는 95.6%~96.6%의 유사성을 나타냈으며, NA 유전자의 경우, A/Brisbane/59/2007과는 97.8%~98.5%, A/Solomon Islands/3/2006과는 96.7%~97.6%, A/New Caledonia/20/99와는 96.8%~97.7%의 유사성을 보여 2008~2009절기의 백신주인 A/Brisbane/59/07과 가장 유사성이 컸다. 인플루엔자바이러스 A/H3N2의 분리주 중 1주를 제외한 모든 분리주가 HA 유전자에서 2008~2009 절기 백신주인 A/Brisbane/10/2007과는 98.4%~99.7%의 유사성을 보였고, A/Wisconsin/67/2005와는 96.5%~97.5%의 유사성을 보였으며, NA 유전자에서는 A/Brisbane/10/2007과는 98.9%~99.4%, A/Wisconsin/67/2005와는 98.0%~98.6%, A/California/7/2004와는 98.3%~98.9%의 유사성을 보였다. 인플루엔자바이러스 B의 HA 유전자의 경우는 2주를 제외하고는 2008~2009 절기의 백신주인 B/Florida/4/2006과는 96.5%~99.7%의 유사성을 보였으며, B/Malaysia/2506/2004와는 86.7%~87.7%의 유사성을 보여 B/Florida/4/2006과의 유사성이 크게 나타났다. NA 유전자의 경우는 reassortant분리주가 96.7%와 97.3%의 유사성을 나타내는 것을 제외하고는 B/Florida/4/2006에 98.9%~100%의 유사성을 나타냈으며, 분리주 유행시기의 백신주인 B/Malaysia/2506/2004와는 94.5%~96.7%의 유사성을 나타내어 2008~2009 절기의 백신주와 더 큰 유사성을 보였다. HA 유전자에서는 conserved receptor binding site는 아미노산의 치환 없이 모든 분리주에서 잘 보존되어 있었으며, N-linked glycosylation site도 인플루엔자바이러스 A/H1 1주, A/H3 1주를 제외하고는 모두 같은 수의 N-linked glycosylation sites를 가졌으며, 인플루엔자바이러스 B의 경우는 2008~2009 절기의 백신주보다 1개가 많은 4개의 N-linked glycosylation sites를 가지고 있었다. Antigenic sites의 경우는 인플루엔자바이러스 A/H1의 Sb의 3개의 아미노산에서 백신주들과 다른 아미노산을 가지고 있으며, A/H3에서는 A, B, E 부위에서는 아미노산의 변화가 나타났고, C, D 부위에서는 변화가 없었다. 인플루엔자바이러스 B의 4개의 분리주에서는 150 loop와 160 loop에서 B/Florida/4/2006과 비교하여 1개의 아미노산에서 치환이 나타났으며, 190 helix에서 모든 분리주가 B/Florida/4/2006과 비교하여 1개의 아미노산에서 치환이 나타났다.