

铜川市 2013–2015 年 A 型流感病毒 HA 基因特性研究

李俊, 苏翠, 陈晓宁, 刘新利, 李悦玲

铜川市疾病预防控制中心, 陕西 铜川 727031

摘要: **目的** 应用生物信息学数据库和工具, 了解 2013–2014 年铜川市 A 型 H1N1 和 2013–2015 年 A 型 H3N2 流感病毒血凝素 (HA) 基因特性及其抗原变异情况。 **方法** 收集铜川市哨点医院流感样病例标本, 采用 MDCK 细胞分离流感病毒。用 RT-PCR 对部分 A 型 H1N1、H3N2 流感病毒进行 HA 基因序列扩增和纯化, 序列测定, 并用 MEGA 软件构建种系发生树分析。 **结果** 2013–2015 年铜川市流感核酸检测标本共 2 333 份, 流感阳性 476 份, 阳性率 20.40%。4 株 A 型 H1N1 亚型流感病毒与 WHO 推荐 A/California/07/2009 (H1N1) 疫苗株氨基酸序列比对, 共发生 11 次氨基酸突变, 其中 3 个氨基酸位点突变发生在抗原决定簇。3 株 A 型 H3N2 亚型与 WHO 推荐的北半球 2013–2014 年 A/Victoria/361/2011 (H3N2) 疫苗株比对共有 9 个氨基酸位点发生了突变, 其中 3 个氨基酸位点发生在抗原决定簇; 与 WHO 推荐的北半球 2014–2015 年 A/Texas/50/2012 (H3N2) 疫苗株比对共有 10 个氨基酸位点发生了突变, 有 5 个氨基酸位点发生在抗原决定簇。 **结论** 2013–2015 年铜川市流行的 A 型 H1N1、H3N2 亚型流感病毒氨基酸发生突变导致抗原漂移。

关键词: 流感病毒 A 型; 基因特征; 抗原变异

中图分类号: R373.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)12-1451-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2016.12.012

Characteristics of HA gene of influenza A virus in Tongchuan City, 2013–2015

LI Jun, SU Cui, CHEN Xiao-ning, LIU Xin-li, LI Yue-ling

Tongchuan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Tongchuan, Shaanxi 727031, China

Abstract: **Objective** To define the genetic characteristics of hemagglutinin of influenza A (H1N1) virus from 2013 to 2014 and of influenza A (H3N2) virus from 2013 to 2015 as well as their antigen mutations in Tongchuan City by bioinformatics data-

基金项目: 铜川市科学技术研究发展计划项目 (NO:KJ2014-03)

作者简介: 李俊 (1983-), 男, 本科学历, 检验师, 主要从事病毒检验工作。

人群是慢病防控工作应当重点关注的人。应当考虑从扩大孕产妇、儿童保健工作覆盖面, 提高新生儿疾病诊疗技术, 降低 5 岁以下婴幼儿死亡率^[11-12]。针对老年人群, 要全民开展健康教育, 提高健康意识, 以 40 岁及以上人群为重点, 定期进行体检及重点疾病筛查及早诊早治工作, 从而降低人群主要疾病的死亡率。

综上所述, 随着人民生活方式的不断改变, 居民的疾病谱、死因谱也在发生着改变, 目前, 以心脑血管疾病、恶性肿瘤、呼吸系统疾病等疾病为主的慢性非传染性疾病是危害惠州市国家级死因监测点居民健康的主要疾病, 男性的死亡率高于女性, 5 岁以下婴幼儿和 60 岁以上老人是重点关注人群。因此, 根据惠州市 2 个国家级死因监测点居民死因的特点, 应积极探索慢性非传染性疾病病因及防控模式, 进一步提高居民健康状况、降低人群死亡率。

参考文献

[1] 潘敬菊, 张岚, 张庆军, 等. 应用捕获-再捕获方法评价 2009–2011 年湖北省死因监测数据完整性[J]. 中国慢性病预防与控制, 2014, 22(1): 36–38.

- [2] 江国虹, 张辉, 李威, 等. 天津市利用全死因监测系统开展吸烟归因死亡的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(3): 381–383.
- [3] 底秀娟, 李少芳, 轩水丽, 等. 2009–2011 年河南省死因监测系统数据报告完整性分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(22): 4187–4189.
- [4] 窦斐, 陈辉, 姜广启. 2011–2013 年天津市西青区居民死因监测结果分析[J]. 职业与健康, 2015, 31(14): 1939–1941.
- [5] 郭维明. 美国死亡率、死因分析及其对中国的启示[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2014, 9(1): 29–34.
- [6] 刘佳, 蔡亚平. 2002–2009 年中国大陆城乡居民死因分析[J]. 中国卫生统计, 2012, 29(4): 510–513.
- [7] 刘贵浩, 耿庆山, 薛允莲. 2009 年广东省居民死亡情况及死因分析[J]. 中国老年医学杂志, 2012, 32(3): 619–621.
- [8] 陈青山, 周荣群, 沈超华. 广东省五华县 2008–2010 年居民死因监测分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(1): 181–183.
- [9] 徐胜平, 张德楷, 喻同琦, 等. 2008–2012 年湖北麻城市城乡居民意外伤害死因分析[J]. 中国健康教育, 2014, 30(7): 608–611.
- [10] 丘文清, 琚雄飞, 刘雪梅, 等. 惠州市 2007–2011 年居民伤害死因分析[J]. 国际医药卫生导报, 2013, 19(11): 1718–1720.
- [11] 刘佳慧, 黄广文. 湖南省 2009–2014 年 5 岁以下儿童死亡率与死因分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(1): 72–75.
- [12] 刘淑卿, 胡广平, 黄锦池, 等. 2013 年台山市死因监测分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(11): 1362–1365. 收稿日期: 2016-06-15

base and tools. **Methods** Nasopharyngeal swab specimens were collected from patients with influenza-like illness in sentinel hospitals in Tongchuan City. Influenza viruses were isolated with MDCK cells. Hemagglutinin genomic sequences of parts of type A H1N1 and H3N2 influenza viruses were amplified and purified by RT-PCR, and then sequenced and analyzed with phylogenetic tree using MEGA software. **Results** A total of 2,333 suspected influenza specimens were detected for nucleic acid in Tongchuan City from 2013 to 2015, and 476 were positive for influenza viruses, with the positive rate of 20.40%. Comparison of amino acid sequences of four strains of H1N1 virus with A/California/07/2009 (H1N1) vaccine strain recommended by WHO showed that there were a total of 11 amino acid mutations, with 3 mutations occurring in the antigenic determinant. As for the amino acid sequences of three strains of type A H3N2 influenza viruses, when they were compared with A/Victoria/361/2011(H3N2) vaccine strains for the northern hemisphere in 2014–2015 recommended by WHO, 9 amino acid mutations were found, with 3 mutations in the antigenic determinant. When they were compared with A/Texas/50/2012 (H3N2) vaccine strains for the northern hemisphere in 2014–2015 recommended by WHO, 10 amino acid mutations were found, with 5 mutations in the antigenic determinant.

Conclusions Amino acid mutations occur in the hemagglutinin antigenic sites in type A H1N1 and H3N2 influenza viruses prevalent in Tongchuan City in 2013–2015, which results in antigenic drift.

Key words: Influenza A virus; Genetic characteristics; Antigenic mutation

流感是有包膜的单股负链 RNA 病毒,属正粘病毒科,根据核衣壳蛋白和基质蛋白不同,分为甲、乙、丙 3 种型别,均可感染人^[1]。为了解铜川市 A 型 H1N1、H3N2 亚型流感流行株基因特性,对 3 年铜川市分离到的部分 A 型流感毒株 HA 基因进行序列测定与分析,为铜川市 A 型 H1N1、H3N2 亚型流感病毒防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集 标本来自 2014 年铜川市国家级流感哨点医院(铜川市人民医院)门诊、急诊、儿科等患有呼吸道感染,体温≥38℃,伴有咳嗽或咽痛之一的疑似流感症状病人,发病 3 d 以内鼻咽拭子,-20℃保存下送市疾控流感实验室检测及病毒培养。

1.2 核酸检测和病毒分离 采用商品化流感甲/乙型荧光定量 PCR 试剂盒对哨点医院标本进行核酸检测,同时设立阴阳性对照。阳性标本通过 MDCK(狗肾细胞)细胞进行病毒分离,当细胞病变达 75%~90%收获并放入-70℃保存^[2]。用 1%豚鼠红细胞悬液和鉴定血清进行血凝抑制试验(HI)鉴定,鉴定用血清由国家流感中心提供。

1.3 病毒 RNA 提取及逆转录 对分离到的 A 型流感毒株用德国 Qingen RNeasy Mini Kit(CatNo74104)核酸提取试剂盒提取病毒 RNA,操作步骤见说明书。逆转录选用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622(Thermo)逆转录试剂盒。试剂盒各组分离心混匀后置冰上,取无菌无 RNAase 离心管一支加总 RNA 5 μl,再加入合成好的 Uni12 引物 1 μl,无 RNase 水 6 μl,离心混匀后,置 65℃金属浴或 PCR 中 5 min,迅速拿出置冰上,再加入 5 倍 buffre 4 μl,RibLock inlibifor 1

μl,10 mM dNTP 2 μl,RT 酶 1 μl,轻轻混匀,放置 PCR 中 25℃5 min、45℃60 min、70℃5 min,取出迅速放冰上保存于-70℃冰箱待用。

1.4 RT-PCR 扩增 A 型流感病毒 HA 基因 RT-PCR 所用引物参照文献^[3]由北京奥克鼎盛生物公司合成。见表 1。用 Uni12 逆转录好的 cDNA 产物做为模板分段进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。反应体系:2X Mix 20 μl,引物 M13F/S4R 或 S4R/M13F 各 0.5 μl,模板 1 μl,ddH₂O 18 μl,总体系 40 μl。反应条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;48℃~65℃退火 30 s;72℃延伸 1 min;共 35 个循环;72℃延伸 5 min;4℃保存。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 A 型流感病毒 HA 引物

引物名称	引物序列	片段大小(bp)
IFlu-A 通 Uni12	AGC AAA AGC AGG	
IFluA-1F-M13F	TCC CAG TCA CGA CGT CGT AGC	
IFluA-1R-M13R	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAG	
IFluA-HA-S4-1451R	ACC AGA AGT TCA GCA TTR TAW	1 385
IFluA-HA-S4-1565R	AAA CAA CCA TTN CCN ATN TCC	1 495
IFluA-HA-S4-1157F	CTA TTT GGA GCH ATH GCN GG	730
IFluA-HA-S4-1198F	GGA ATG RTA GAT GCT TCG TA	685

1.5 序列测定及分析 PCR 产物送北京奥克鼎盛生物公司测序。测序结果用 DNAMAN 拼接。核苷酸采用 MEGA5.0 比对,采用 NJ 法构建基因进化树,Bootstrap 计算重复值设为 1 000 次。并从 NCBI 下载近年 WHO 推荐疫苗株和流行代表株血凝素(HA)基因序列,比对分析铜川市 A 型病毒基因核苷酸和氨基酸同源性及差异。

2 结果

2.1 2013–2015 年铜川 A 型流感病毒监测情况

2013-2015 年铜川市核酸检测共 2 333 份流感标本,A 型流感阳性 476 份,阳性率 20.40%。其中 2013 年 A 型流感阳性 70 份,A 型 H3N2 流感 36 份,占 51.43%; A 型 H1N1 流感 34 份,占 48.57%。2014 年流感阳性 185 份,A 型 H1N1 流感 114 份,占 61.62%,A 型 H3N2 71 份,占 62.28%。2015 年流感阳性 221 份,A 型 H3N2 流感 137 份,占 61.99%,A 型 H1N1 84 份,占 38.01%。2013-2015 年铜川市通过 MDCK(狗肾细胞)细胞培养共分离 A 型流感病毒 152 株,2013 年 12 株,其中 H1N1 病毒 3 株;H3N2 病毒 9 株,2014 年 73 株,其中 H1N1 病毒 71 株,H3N2 病毒 2 株;2015 年分离出 H3N2 病毒 67 株。

2.2 HA 同源性分析

2.2.1 H1N1 同源性分析 见图 1。2013-2014 年 4 株 A 型 H1N1 亚型毒株在同源性上比较接近,基因一致率 97.77%,同源性 98.20%~98.30%,同在一个分支上。但随时间推移 4 株 A 型 H1N1 毒株距 WHO 推荐的 A/California/07/2009(H1N1)疫苗株同源性越来越远,说明铜川市分离的 A 型 H1N1 流感病毒 HA 基因发生了明显的变异。

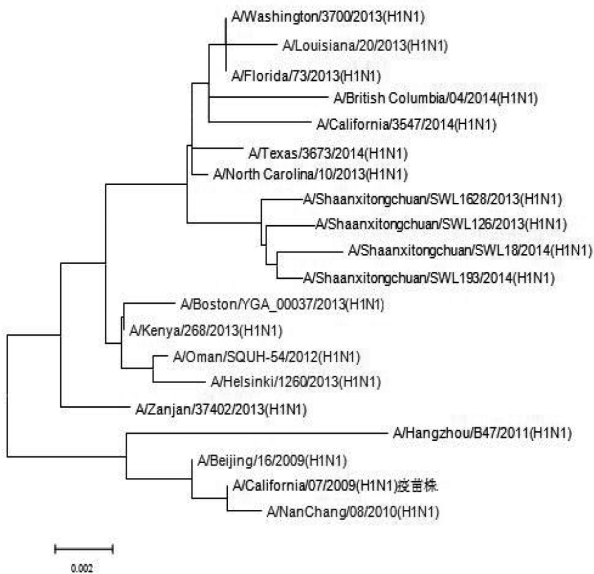


图 1 2013-2014 年铜川市 A 型 H1N1 流感 HA 基因进化树

2.2.2 H3N2 同源性分析 见图 2。2013-2015 年 3 株 A 型 H3N2 在同源性上比较近,同在一个小分支上,与 WHO 推荐北半球 2013-2014 年 A/Victoria/361/2011(H3N2)疫苗株比较,基因一致率 96.21%,同源性 98.50%~99.70%。与 WHO 推荐北半球 2014-2015 年 A/Texas/50/2012(H3N2)疫苗株基因一致率 95.65%,同源性 98.50%~99.60%。且不在一个大分支上,说明铜川市分离的 A 型 H3N2 流感病毒基因同样也发生了变异。

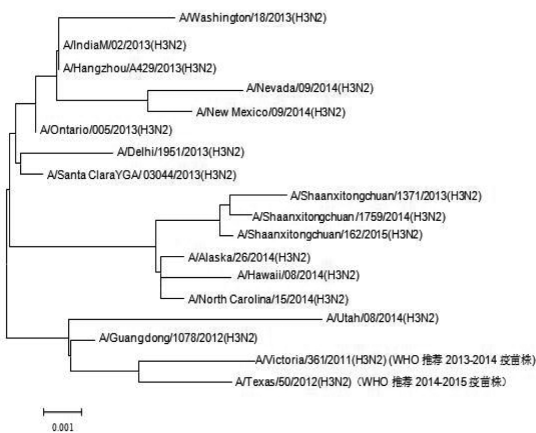


图 2 2013-2015 年铜川市 A 型 H3N2 流感 HA 基因进化树

2.3 HA 氨基酸变异分析

2.3.1 H1N1 氨基酸变异分析 A 型 H1N1 流感病毒 HA 蛋白有 4 个抗原决定簇分别是:Cb(87~92 残基)、Sa(141~142.170~174.176~181 残基)、Sb(201~202 残基),其中 Ca 由 Ca1 和 Ca2 两部分构成^[4]。Ca1(183~187.220~222.252~254)Ca2(154~159.238~239 残基)。4 株 A 型 H1N1 流感病毒与 2009 年世界卫生组织(WHO)推荐的 A/California/07/2009(H1N1)疫苗株 HA 基因序列比对共有 11 个氨基酸位点发生了突变,所有毒株在 Cb、Ca2 区没有发生突变,但在 Sa 区 180 位 K>Q,Sb 区 202 位 S>T,Ca1 区 220 位 S>T 发生了氨基酸突变且在抗原决定簇上^[5],提示铜川市 A 型 H1N1 出现了抗原漂移。4 株 A 型 H1N1 基因具体位点突变见表 2。

表 2 A 型 H1N1 流感病毒血凝素(HA)不同氨基酸位点替代

毒株	100	114	180	202	220	273	300	338	391	468	516
A/California/07/2009(H1N1)	P	D	K	S	S	A	K	I	E	S	E
A/Shaanxitongchuan/SWL1628/2013(H1N1)	S	N	Q	T	T	T	E	V	K	N	K
A/Shaanxitongchuan/SWL126/2013(H1N1)	S	N	Q	T	T	T	E	V	K	N	K
A/Shaanxitongchuan/SWL193/2014(H1N1)	S	N	Q	T	T	T	E	V	K	N	K
A/Shaanxitongchuan/SWL18/2014(H1N1)	S	N	Q	T	T	T	E	V	K	N	K

2.3.2 H3N2 氨基酸变异分析 目前已知的 A 型 H3N2 流感病毒 HA 上的抗原决定簇有 5 个区,即 A、B、C、D 和 E^[6]。A 区(140~146、133~137);B 区

155(156~160)187~198;C 区(53、54、275、278);D 区(207、174);E 区(63、78、81、83)。上述抗原决定簇的氨基酸发生替换,一般均会引起 HA 蛋白的抗原

性漂移。3 株 A 型 H3N2 流感病毒分别与 WHO 推荐的 2013–2014 年 A/Victoria/361/2011(H3N2) 和 2014–2015 年 A/Texas/50/2012(H3N2) 疫苗株 HA 基因序列比对发现, 2013–2014 年共有 9 个氨基酸位点发生了突变, 有 3 个氨基酸位点发生在抗原决定簇, 分别是

表 3 A 型 H3N2 流感病毒血凝素(HA)不同氨基酸位点替代

毒株	31	126	136	140	143	157	196	210	223	276	324	345
A/Victoria/361/2011(H3N2)2013–2014 疫苗株	Q	T	A	R	N	F	S	A	N	N	K	R
A/Texas/50/2012(H3N2)2014–2015 疫苗株	R	N	A	R	N	F	P	A	N	N	K	V
A/Shaanxitongchuan/1371/2013(H3N2)	R	A	S	G	S	S	S	S	D	K	R	V
A/Shaanxitongchuan/1759/2014(H3N2)	R	A	S	G	S	S	S	S	D	K	R	V
A/Shaanxitongchuan/162/2015(H3N2)	R	A	S	G	S	S	S	S	D	K	R	M

3 讨 论

流感病毒根据病毒表面血凝素抗原的不同分为 16 个亚型(H1~H16), 根据神经氨酸酶抗原的不同分为 9 个亚型(N1~N9)。流感病毒血凝素抗原(HA)是机体重要的免疫原性, 诱导血凝抑制抗体具有中和病毒感染和抑制血凝作用, 而且流感发生抗原性变异与流感的暴发流行密切相关, 流感病毒正是通过不断改变其抗原性来逃避宿主特异性免疫识别和清除, 从而不断引起流行^[7]。作为 A 型具有代表性亚型流感新变种, 它必须在其 HA1 区域上有 4 个以上氨基酸序列发生替换, 且替换必须涉及到 2~3 个抗原决定簇位点^[8]。才具有分子流行病学意义。

通过对铜川市 2013–2014 年铜川市 A 型 H1N1 和 2013–2015 年 A 型 H3N2 流感病毒基因序列发现:2013–2014 年铜川市流行 A 型流感 H1N1 毒株序列与 A/California/07/2009(H1N1) 疫苗株相比已经形成了独立分支, 随着时间的推移 WHO 推荐疫苗株对国内和国外某些地区流行的 A 型流感在同源性上逐年降低, 有缓慢变异的趋势, 抗原决定簇已经发生具有流行病学意义的变异。这些氨基酸抗原决定簇位点的变异, 都可能引起流感的流行和暴发^[9]。WHO 推荐 A/California/07/2009(H1N1) 疫苗株至今从未更换过, 疫苗对于人体保护效果具有一定的滞后性^[10]。铜川市流行的 A 型流感 H1N1 亚型大部分变异发生在 HA1 区, HA2 区对病毒抗原性的影响相比 HA1 区较小, 但这些位点与病毒的入侵密切相关, 对病毒的增殖力有影响, 而且这些氨基酸位点还会随着时间的推移在宿主免疫选择压力下发生突变的可能性更加普遍。2013–2015 年 3 株 A 型 H3N2 流感毒株分别与 2013–2014 年 A/Victoria/361/2011(H3N2) 和 2014–2015 年 A/Texas/50/2012(H3N2) 疫苗株比对发现, 铜川市流行的 H3N2 氨基酸序列发生替换, 改变流感的抗原性, 试图逃避宿主免疫系统的特异性识别和清除, 突破人群的免疫屏障^[11]。

136A>S、140R>G、157>F>S。与 2014–2015 年 A/Texas/50/2012(H3N2) 共有 10 个氨基酸位点发生了突变, 有 5 个发生在抗原决定簇, 分别是 136A>S、140R>G、143N>S、157F>S、196P>S。见表 3。

从图 2 中可以看到我国杭州市 A 型流感 H3N2 随着时间的推移已经生成了新的变种, 疫苗的接种可能在一定程度上保护效果不佳。

因此, 密切关注 A 型流感的变异情况, 充分认识到 A 型流感基因序列变异对其流行状况和疫苗使用效果的影响, 加强流感病毒变异的基础研究和调查分析, 将会更好地防控流感流行。

感谢陕西省疾病预防控制中心病毒病预防控制所各位老师大力支持和帮助。

参考文献

[1] 谢剑锋, 沈晓娜, 王美爱, 等. 福建省甲型 H1N1 流感病毒基因特征研究[J]. 病毒学报, 2014, 1(1): 37–43.

[2] 李晓明, 蒲灵子, 唐雨新, 等. 株洲市 2008–2013 年流行性感冒监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(10): 1238–1240.

[3] Höper D, Hoffmann B, Beer M. A comprehensive deep sequencing strategy for full-length genomes of influenza A[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19075.

[4] 潘虹, 刘瑞弘, 文奇, 等. 甲型 H1N1 流感监测及其 HA1 基因特性分析, 以 2013–2014 年新余市为例[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(2): 247–251.

[5] 马萍, 许晶, 张蕾, 等. 陕西省 2012–2014 年甲型 H1N1 流感的基因特性研究[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(1): 9–13.

[6] 吴衍恒, 欧慧, 师舞阳, 等. 2010–2013 年中山市流感病毒(H3N2)血凝素基因特征分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(4): 420–423.

[7] 怀清杰, 王宇, 梁爽, 等. 哈尔滨市新甲型 H1N1 流感病原学及基因特性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24): 3570–3571.

[8] 陈玉红, 李美蓉, 陆红云, 等. 2013 年宜春市甲型 H1N1 流感病毒分离鉴定及 HA 基因分子进化分析[J]. 疾病监测, 2016, 31(2): 101–105.

[9] 黄维娟, 成艳辉, 李希妍, 等. 2014–2015 监测年度中国 H3N2 亚型流感病毒病原学特征分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(1): 3–8.

[10] 马雪平, 姚桂玲, 高杰英. 流感疫苗的研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 3(3): 176–178.

[11] 杨先知, 崔大伟, 谢国良, 等. 杭州市 2013–2014 年流感暴发流行期甲型流感病毒 H3N2 亚型基因特性分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(8): 586–590.