

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2019.0035

• 卫生健康事业发展 70 年巡礼专栏 流感专题论著 •

2013—2018 年新乡市甲型 H1N1 流感病毒 流行特征和基因进化分析

马建敏, 李华峰, 史晓娟, 梁爽, 栾旭波, 徐璐

新乡市疾病预防控制中心, 河南 新乡 453002

摘要: **目的** 分析新乡市 2013 年 1 月至 2018 年 3 月甲型 H1N1 流感病毒的流行和基因进化特征, 了解新乡市甲型 H1N1 流感病毒的变异情况。**方法** 采用描述性统计学方法对新乡市甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性结果进行分析; 随机抽取不同时间分离的 20 株病毒进行血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 基因测序, 使用 DNAMAN 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对, 采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 法进行进化树分析。**结果** 2013—2017 年新乡市甲型 H1N1 流感呈低流行态势, 2018 年初成为优势流行株, 主要感染 0~15 岁人群 (123/150, 82.0%)。新乡市分离株与同期疫苗株 HA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 96.65%~98.47% 和 96.64%~99.29%, NA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.56%~99.22% 和 96.59%~99.19%。新乡流行株 HA 基因分属 2 个进化分支; 2013—2017 年初的流行株与同期疫苗株相比出现多处变异, 其中 2016—2017 年初的毒株同时出现抗原位点 Sa 区 S162N、K163Q、Sb 区 S185T 和 Ca 区 S203T 变异。NA 基因进化树与 HA 结果对应, 2013—2017 年初的流行株 NA 基因有 16 处氨基酸突变; 95% 的毒株糖基化位点有 8 个, 分别是第 42、50、58、63、68、88、146 和 235 位。**结论** 2013—2018 年新乡市传播的甲型 H1N1 流感病毒株发生了一定程度的变异, 2017—2018 年国际推荐的新的疫苗株更适用于当前流行株, 但仍需加强监测。

关键词: 甲型 H1N1 流感病毒; 流行特征; HA 基因; NA 基因; 序列比对; 进化分析

中图分类号: R373.2; R331 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2019) 03-0167-06

Epidemiological and phylogenetic analysis of influenza A (H1N1) pdm09 virus isolated from 2013 to 2018 in Xinxiang city of China

MA Jian-min, LI Hua-feng, SHI Xiao-juan, LIANG Shuang, LUAN Xu-bo, XU Lu

Center for Disease Control and Prevention of Xinxiang City, Xinxiang, Henan 453002, China

Corresponding author: MA Jian-min, E-mail: majianmin690@126.com

Abstract: Objective To analyze the epidemiologic feature and genetic evolution of influenza A (H1N1) pdm09 virus in Xinxiang city, Henan province of China from January 2013 to March 2018. **Methods** Descriptive statistical method was used to analyze the positive data of influenza A (H1N1) pdm09 virus. Twenty virus strains isolated at different times were randomly selected for sequencing of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed by DNAMAN software, and the phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining method. **Results** From 2013 to 2017, influenza A (H1N1) pdm09 virus maintained low prevalence in Xinxiang area, but became dominant in early 2018, mainly affecting people aged 0 to 15 years (123/150, 82.0%). The nucleotide and amino acid homologies of HA gene between Xinxiang isolates and the corresponding vaccine strain were 96.65%-98.47% and 96.64%-99.29%, respectively, while for NA gene were 97.56%-99.22% and 96.59%-99.19%, respectively. Xinxiang epidemic strains were divided into two branches in HA gene phylogenetic tree. Comparing to A/California/7/2009, multiple antigenic site mutations occurred in the epidemic strains from 2014 to early 2017, particularly the strains

基金项目: 2017 年河南省科技发展计划项目 (172102310093); 2017 年河南省医学科技攻关计划项目 (201702281)

作者简介: 马建敏, 硕士, 副主任技师, 主要从事病原学和分子生物学研究工作

通讯作者: 马建敏, E-mail: majianmin690@126.com

in 2016-2017 had mutations of both S162N and K163Q at Sa antigenic site, S185T at Sb site and S203T at Ca site. The NA gene phylogenetic tree corresponded to HA results. Sixteen obvious amino acid mutations were detected in the NA gene of Xinxiang strains during 2013 to early 2017, 95% of the strains had 8 glycosylated sites at positions of 42, 50, 58, 63, 68, 88, 146 and 235. **Conclusions** The influenza A (H1N1) pdm09 virus circulating in Xinxiang city of China during 2013 to 2018 showed a certain degree of variation.

Key words: Influenza A (H1N1) pdm09 virus; Epidemiological characteristics; HA gene; NA gene; Sequence alignment; Phylogenetic analysis

流感每年发生且能够引起大流行,发病率和死亡率高,因此,流感是世界各国一个严重的公共卫生问题。导致流感流行的主要病原体是甲型和乙型流感病毒,其中甲型流感病毒变异能力强,不断产生新病毒,逃避人体免疫。2009 年 4 月一种新的甲型 H1N1 流感病毒从墨西哥迅速传播到世界各地^[1]。大流行之后,甲型 H1N1 病毒一直保持季节性循环。由于甲型流感病毒较高的突变率和抗原漂移能力,每隔几年总会出现新的流感病毒。因此,分析甲型 H1N1 病毒的进化特征对于监测新的致病变种至关重要。

血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是流感病毒表面主要的糖蛋白,其中 HA 在病毒附着和中和抗体反应中起重要作用,已发现 HA 蛋白有 4 个抗原位点 Sa、Sb、Ca、Cb^[2]; NA 则帮助从受感染细胞表面释放子代病毒,是临床流感药物的重要靶蛋白。两者在所有流感病毒蛋白中变异率最高,且突变的发生与流感疫情的发生和流行密切相关^[3]。本研究通过对新乡市 2013—2018 年甲型 H1N1 流感病毒的流行和 HA、NA 基因进化特征进行分析,旨在了解新乡市甲型 H1N1 流感病毒的变异情况,为当地流感预警和有效防控提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 数据及毒株来源 2013 年 1 月至 2018 年 3 月的流感病原学监测数据来源于中国流感监测信息系统。流感样病例的定义以及标本的采集、保存和运输按照《全国流感监测方案》^[4],新乡市流感网络实验室对送检的 3 021 份标本进行核酸检测和病毒分离,病毒阳性数即检出的病毒核酸阳性数。测序株为实验室使用 MDCK 细胞分离的甲型 H1N1 流感病毒,随机抽取不同时间分离的毒株 20 株。

1.2 病毒 RNA 提取及基因扩增 取病毒培养物 100 μ l,使用德国 Qiagen 公司的 Rneasy Mini Kit (货号 74104)进行 RNA 提取,使用 Qiagen 公司的 One Step RT-PCR Kit (货号 210212)进行基因

扩增。具体操作方法见试剂盒说明书。H1N1 流感病毒 HA 和 NA 基因扩增引物来源于河南省疾病预防控制中心,序列参考文献^[5]。PCR 反应条件为 60 $^{\circ}$ C 1 min, 42 $^{\circ}$ C 20 min, 50 $^{\circ}$ C 20 min, 95 $^{\circ}$ C 15 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。RT-PCR 产物经 1.5% 凝胶电泳后进行分析,阳性产物送上海立菲生物技术有限公司测序。

1.3 序列分析 使用 DNAMAN 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对。采用 Mega5.0 软件中邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建进化树。选择 NCBI 基因库公布的全球同期参考株 16 株和疫苗株 A/California/7/2009 及 A/Michigan/45/2015 进行序列比对,并构建系统进化树。

1.4 统计学分析 采用描述性统计分析对数据进行处理。

2 结果

2.1 新乡市甲型 H1N1 流感病毒流行特点

2013—2018 年 3 月新乡市甲型 H1N1 流感病毒流行具有明显的季节性,冬春季节为发病高峰。2013—2017 年病毒维持低流行态势,2017 年第 52 周再次活跃,并于 2018 年 1 月达到高峰,之后下降,3 月份消失(图 1)。2013—2018 年甲型 H1N1 流感病毒每年检测的阳性率分别为 1.0%、3.3%、0、3.2%、3.9% 和 16.0%。

甲型 H1N1 病毒主要感染人群为 0~5 岁的婴幼儿(62.7%, 94/150),其次为 6~15 岁的儿童和青少年(19.3%, 29/150),成人和老年人感染比例较低(18.0%, 27/150)。男女性感染比例为 1.45:1。

2.2 甲型 H1N1 流感流行株同源性分析 2013—2017 年初的分离株与同期疫苗株 A/California/7/2009 的 HA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 96.65%~98.41% 和 96.64%~98.23%, NA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.73%~98.94% 和 96.59%~98.51%。2017—2018 年流行株与疫苗株 A/Michigan/45/2015 的 HA 基因核

苷酸和氨基酸同源性分别为 98.30%~98.47% 和 98.94%~99.29%，NA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.56%~99.22% 和 98.93%~99.19%。

2.3 HA 基因进化树分析 对 20 株新乡流行株以及 NCBI 公布的全球同期参考株 HA 基因构建核苷酸进化树 (图 2)，可见进化树分 2 个分支 (Clade)。2013—2014 年的大部分流行株与疫苗株 A/California/7/2009 共同位于分支 1，2016 年后的流行株和疫苗株 A/Michigan/45/2015 共同位于分支 2，表明 2014 年后新乡市流行病毒发生一定程度的变异，亲缘性更接近后来的疫苗株。

各分支都包含其他国家的流行株 (图 2)，说明 2013—2018 年的新乡甲型 H1N1 病毒株在全球同期也广泛流行。同一流行季的新乡株分布在不同的簇 (Cluster)，如 2017—2018 年的毒株分布在 3 个簇，亲缘性与不同国家和地区的流行株有关，推测新乡市同一年度可能有不同来源的 H1N1 病毒株共同流行。

2.4 HA 基因氨基酸变异 氨基酸序列比对分析发现，2013—2017 年初的流行株与同期疫苗株相比出现多处变异：2013—2014 年有 7 个共同的氨基酸变异和 6 处个别位点变异，其中 A/henanmuye/SWL52/2014 同时在 3 个抗原位点出现 5 个氨基酸突变；2016—2017 年初的流行株共同突变位点 12 个，且全部毒株同时在 3 个抗原位点出现了 4 个氨基酸突变 (表 1)。2017—2018 年的毒株与当年疫苗株比较，有 2 处共同变异 S74R、S164T，个别毒株出现个别抗原位点突变，如 Cb 区的 S47R、Ca 区的 P137S 和 H138Y。甲型 H1N1 流感病毒的受体结合位点主要由 190 螺旋 (190~198)、130 环 (135~138) 和 220 环 (221

~228) 这 3 个结构域构成^[6]。本研究结果显示，新乡流行株与当年疫苗株相比，受体结合位点均未出现变异。

2.5 NA 基因特征分析 NA 基因进化树分析与 HA 基因结果对应 (图 3)。2013—2017 年初的毒株与当年疫苗株比较，序列突变有 16 处，其中共同突变位点有 N44S、G77R、V81A、N100S、V241I、Y351E、N369K、N248D。

A/California/7/2009 疫苗株的糖基化位点 8 个，分别是第 50、58、63、68、88、146、235 和 386 位，疫苗株 A/Michigan/45/2015 则在第 42 位增加 1 个位点，同时第 386 位缺失糖基化。新乡病毒株的预测结果显示，95% (19/20) 的毒株与疫苗株 A/Michigan/45/2015 的糖基化位点相同，而 A/henanmuye/SWL311/2017 病毒株第 386 位糖基化缺失，在第 385 位产生了一个新的糖基化位点 (发生 E387S 变异)。

3 讨论

2013—2017 年初新乡市甲型 H1N1 流感呈季节性流行，且保持低发态势，2017 年第 52 周病毒阳性数上升并在 2018 年 1 月成为优势株，但很快在 3 月份停止活跃，这与省内其他地市 3 月份仍然持续流行 (结果未示) 的状况明显不同。该现象可能原因为 2017 年底我国流感进入高发，其活动强度较往年更强^[7]，各类媒体宣传报道，群众的防范意识增强，加之新乡市独有的免费和优惠接种流感疫苗政策^[8]，促使市民 (特别是孩子和老人) 及时接种疫苗，形成了人群免疫屏障。对新乡市人群中流感疫苗接种进行效果评价将是本课题组下一步研究的重点。

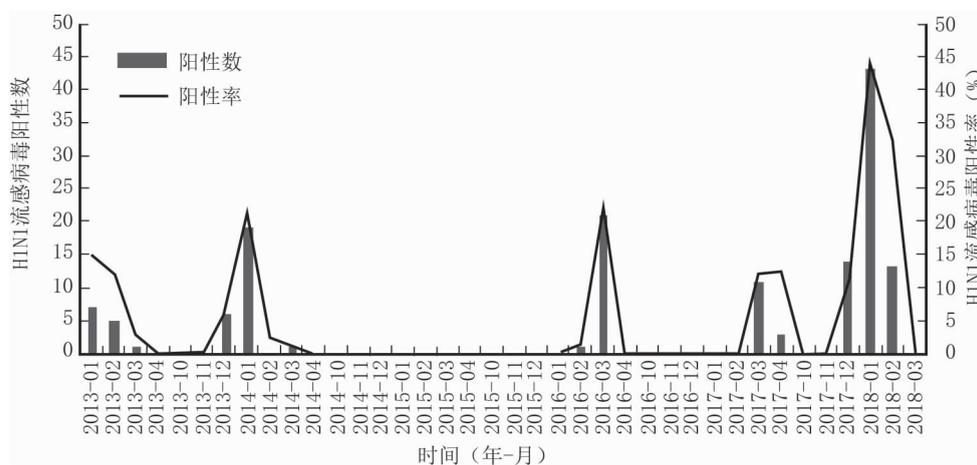
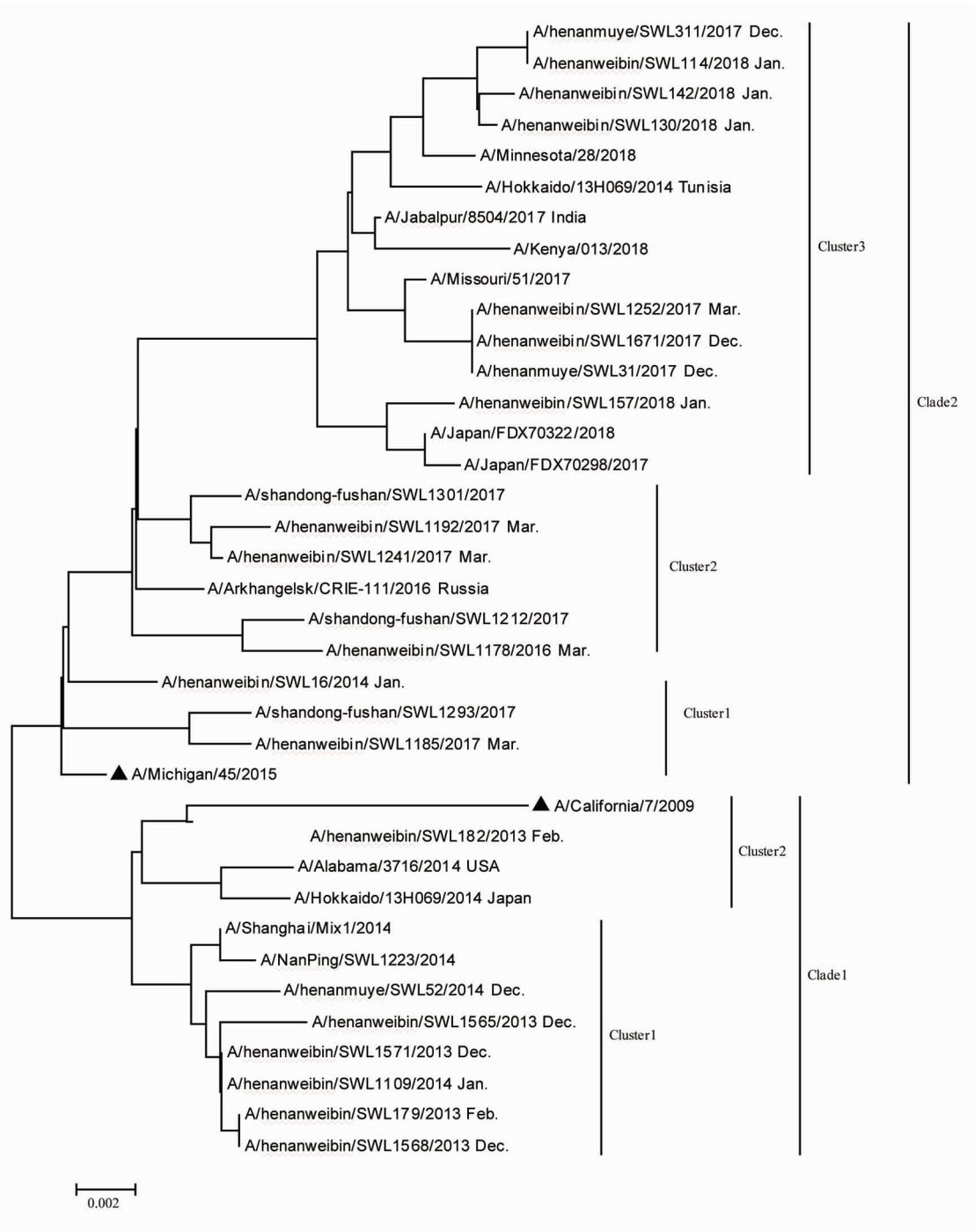


图 1 新乡市 2013—2018 年甲型 H1N1 流感病毒送检样本检测阳性情况



注：▲代表疫苗株。

图 2 2013—2018 年新乡市甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因进化树

基因进化树分析表明，2013—2018 年新乡市甲型 H1N1 流感株与世界范围内报道的毒株有同源性，但位于不同分支，说明毒株随着时间发生了变异。HA、NA 基因各分支完全匹配，表明未发生分支间的重配，但均发生了明显的氨基酸替换。

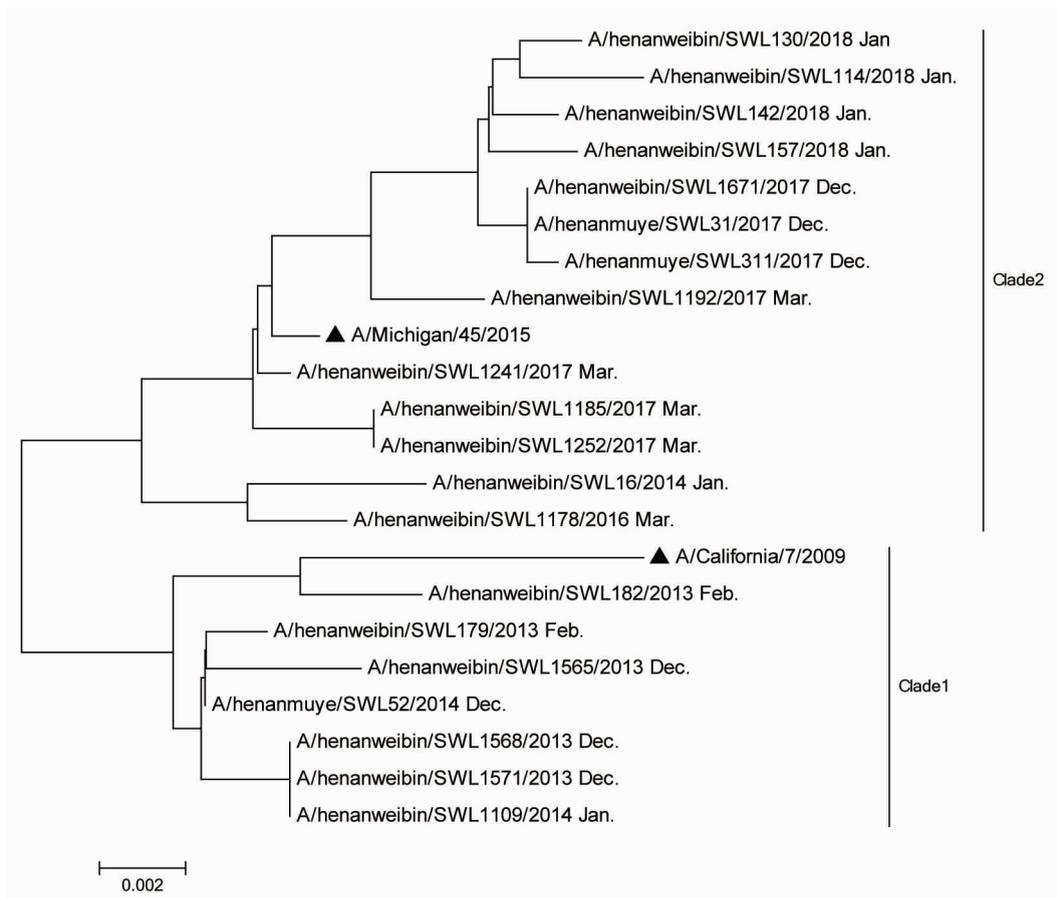
HA 基因变异是流感病毒抗原性变异的基础，

其抗原位点和受体结合位点的突变尤为重要。新乡市 2014 年开始有 1 株流行株在 3 个抗原位点产生了 4 个氨基酸突变，之后的毒株全部在 3 个抗原位点出现了 4 个氨基酸突变。据报道，抗原变异的产生通常需 HA 蛋白上有 2 个或 2 个以上抗原位点表现出 4 个以上的氨基酸替换^[9]。所以新乡市甲型 H1N1

表 1 2013—2014 年新乡市甲型 H1N1 流感病毒 HA 位点变异情况

毒株	Ca		Sa					Sa					Sb			Ca				
	83	84	97	141	162	163	185	203	215	216	234	256	263	271	283	321	324	374	451	499
A/California/7/2009	P	S	D	A	S	K	S	S	A	I	V	A	S	P	K	I	I	E	S	E
A/henanweibin/SWL182/2013	S	—	N	—	—	—	T	T	—	—	I	—	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL179/2013	S	—	N	—	—	Q	T	T	—	—	—	T	—	S	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1568/2013	S	—	N	—	—	Q	T	T	—	—	—	T	—	S	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1571/2013	S	—	N	—	—	Q	T	T	—	—	—	T	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1565/2013	S	—	N	—	—	Q	A	T	—	—	—	T	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanmuye/SWL52/2014	S	—	N	T	N	Q	T	T	—	—	—	T	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1109/2014	S	—	N	—	—	Q	T	T	—	—	—	T	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL16/2014	S	N	N	—	N	Q	T	T	—	—	—	T	—	—	E	V	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1178/2016	S	N	N	—	N	Q	T	T	—	T	—	T	—	—	E	—	—	K	N	K
A/henanweibin/SWL1192/2017	S	N	N	—	N	Q	T	T	—	T	—	T	—	—	E	V	V	K	N	K
A/henanweibin/SWL1241/2017	S	N	N	—	N	Q	T	T	—	T	—	T	—	—	E	V	V	K	N	K
A/henanweibin/SWL1185/2017	S	N	N	—	N	Q	T	T	G	T	—	T	—	—	E	V	V	K	N	K

注：Ca、Sa、Sb 为抗原结合位点；P：脯氨酸；S：丝氨酸；N：天冬酰胺；D：天冬氨酸；A：丙氨酸；T：苏氨酸；K：赖氨酸；Q：谷氨酰胺；G：甘氨酸；I：异亮氨酸；V：缬氨酸；E：谷氨酸。



注：▲代表疫苗株。

图 3 2013—2018 年新乡市甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因进化树

流感病毒流行株从 2014 年开始逐渐发生了抗原漂移。期间还有其他多处位点发生共同的氨基酸变异，这是否会影响到疫苗效果需要做进一步的抗原分析实验，由于受条件限制，本研究无法得到当地的数据。但由于 2014—2017 年初新乡市每年甲型 H1N1 流感病毒占有所有流感病毒的比例较低（0~

24%），因此该病毒对三价流感疫苗的免疫保护效果影响不大，但是仍对疫苗株的选择提出了更高要求。不过，2017—2018 年 WHO 推荐了新的疫苗株 A/Michigan/45/2015，研究结果显示，新乡同期流行株与疫苗株相似度较好，且未发现受体结合位点的突变，但发现有个别抗原位点的突变，所以

必须加强监测,及时发现大的变异。

NA 蛋白糖基化的存在和缺失也至关重要,因为它可能会导致糖蛋白功能的增加或丧失。抗原位点的糖基化是流感病毒免疫逃避的重要机制,也影响病毒的抗原性、致病力和受体结合能力。新乡市流行株与疫苗株 A/California/7/2009 相比均存在糖基化位点的增加和缺失,但 95% 的毒株与疫苗 A/Michigan/45/2015 糖基化位点相同。同时上述 HA 基因氨基酸位点的分析结果也提示国际推荐的 H1N1 疫苗株相对于新乡流行株具有滞后性,2017—2018 年推荐的疫苗株更适用于当前的病毒株。这也可以解释 2018 年初新乡市流感流行能够较省内其他地市及早终止的原因。

据报道,甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因 H275Y 位点突变可导致病毒对 NA 抑制剂类药物奥司他韦耐药^[10],而 S247N 突变株具有低水平的奥司他韦抗性^[11]。本次研究的新乡市流行株均未发现上述药物敏感性位点突变。但湖北^[12]和日本^[13]等地有关于检出耐药位点突变的报道,因此需要加强监测,及早发现和预防耐药株的传播。

总之,尽管 2013—2018 年新乡市传播的甲型 H1N1 流感病毒株 HA 和 NA 基因发生了一定程度的变异,但其与世界范围内报道的毒株同源,且当前流行株与 WHO 推荐的新疫苗株有较高的相似度。下一步仍需加强监测,密切关注病毒株的遗传变化和抗原变异情况,了解重大的进化变化,为流感预警和防控提供科学支持。

参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection-Mexico, March-April 2009 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, 58 (17): 467-470.
- [2] El Moussi A, Ben Hadj Kacem MA, Pozo F, *et al.* Genetic diversity of HA1 domain of heammagglutinin gene of influenza A (H1N1) pdm09 in Tunisia [J]. *Virol J*, 2013, 10 (1): 150.
- [3] Kradin RL, Fishman JA. *Influenza virus* [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 79-86.
- [4] Chinese National Influenza Center. National influenza surveillance programme [EB/OL]. [2018-11-01]. <http://www.chinaivdc.cn/cnic/zyzx/lgz/>. (in Chinese)
中国国家流感中心. 全国流感监测方案 [EB/OL]. [2018-11-01]. <http://www.chinaivdc.cn/cnic/zyzx/lgz/>.
- [5] Deng YM, Spirason N, Iannello P, *et al.* A simplified Sanger sequencing method for full genome sequencing of multiple subtypes of human influenza A viruses [J]. *J Clin Virol*, 2015, 68 (23): 43-48.
- [6] Camblin SJ, Haire LF, Russell RJ, *et al.* The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin [J]. *Science*, 2004, 303 (5665): 1838-1842.
- [7] General Office of the National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Administration of Traditional Medicine of China. Notice on the preventing and treatment of influenza in 2018: Guoweifa Mingdian NO. 1, 2018 [EB/OL]. (2018-01-08) [2018-10-16]. <http://www.nhfp.gov.cn/zygj/s3594q/201801/5737c258bb0c4a0493cb4f65fcf11be1.shtml>. (in Chinese)
国家卫生计生委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于做好 2018 年流感防治工作的通知: 国卫发明电〔2018〕1 号 [EB/OL]. (2018-01-08) [2018-10-16]. <http://www.nhc.gov.cn/zygj/s3594q/201801/5737c258bb0c4a0493cb4f65fcf11be1.shtml>.
- [8] Xinxiang Municipal People's Government. Notice on the issuance of the "implementation plan for influenza vaccination in Xinxiang municipality" issued by the office of Xinxiang Municipal People's Government. *Government Gazette* No. 10, 2008 [EB/OL]. [2018-11-01]. <http://www.xinxiang.gov.cn/sitegroup/root/html/ff8080812470b81b012470d4626b001d/20091030/172430204.html>. (in Chinese)
新乡市人民政府. 新乡市人民政府办公室关于印发《新乡市流感疫苗接种实施方案》的通知 (政府公报 2008 年第 10 期) [EB/OL]. [2018-11-01]. <http://www.xinxiang.gov.cn/sitegroup/root/html/ff8080812470b81b012470d4626b001d/20091030172430204.html>.
- [9] Shih AC, Hsiao TC, Ho MS, *et al.* Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (15): 6283-6288.
- [10] Hauge SH, Dudman S, Borgen K, *et al.* Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15 (2): 155-162.
- [11] Dapat IC, Dapat C, Baranovich T, *et al.* Genetic characterization of human influenza viruses in the pandemic (2009-2010) and post-pandemic (2010-2011) periods in Japan [J]. *Plos One*, 2012, 7 (6): e36455.
- [12] Fang B, Liu LL, Li X, *et al.* Evolutionary feature analysis of influenza A (H1N1pdm09) viruses in Hubei during the pandemic and post-pandemic Periods [J]. *Zhonghua Jibing Kongzhi Zazhi*, 2017, 21 (1): 13-18. (in Chinese)
方斌, 刘琳琳, 李翔, 等. 湖北省大流行期和流行后期新甲型 H1N1 流感病毒基因特性分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21 (1): 13-18.
- [13] Yoneda M, Okayama A, Kitahori Y. Oseltamivir-resistant seasonal A (H1N1) and A (H1N1) pdm09 influenza viruses from the 2007/2008 to 2012/2013 season in Nara prefecture, Japan [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2014, 67 (5): 385-388.

收稿日期: 2018-11-05 修回日期: 2019-03-10 责任编辑: 刘磊