

上海 2010—2013 年 H3N2 流感病毒流行特征

周妍^{1a}, 赵百慧^{1b}, 郭家胤², 黄峥², 张曦^{1b}

摘要: [目的] 了解上海市 2010—2013 年流行的甲 3 流感病毒血凝素(HA)基因突变及其抗原变异情况与流感流行的关系。[方法] 用实时荧光聚合酶链反应(real-time PCR)检测 2010—2013 年因类流感症状(ILI)到流感哨点医院就诊的监测病例,分析甲 3 亚型流感病毒流行特征。鸡胚传代甲 3 亚型阳性标本,收获尿囊腔液用作提取病毒的 RNA,进行逆转录聚合酶链扩增,扩增产物纯化后进行测序,用 MegAlign 软件对血凝素(HA)1 区域氨基酸位点进行对比分析,用 MEGA 软件对 HA 基因进化树进行分析。[结果] 2010—2013 年间,上海市甲 3 亚型流感病毒为 2010、2012、2013 年主要流行株。流行特征具有明显的年度和季节特点,与全国一致。与 2011 年世界卫生组织推荐的疫苗株相比,上海市甲 3 亚型流感病毒 HA1 区域在 2010 年发生明显抗原改变,共发生 35 处氨基酸替代,其中 23 处位点改变较大,6 个氨基酸位点涉及 HA1 的 4 个抗原决定簇。2011 年后的毒株在进化树上也形成一个独立的分支。[结论] 上海市 2012 年较大规模的甲 3 亚型流感病毒流行与病毒的抗原性漂移有关。

关键词: 流行性感冒病毒; 甲 3 亚型; 基因特性; 进化树; 抗原性漂移

Epidemiologic Characteristics of H3N2 Isolates in Shanghai, 2010–2013 ZHOU Yan^{1a}, ZHAO Bai-hui^{1b}, GUO Jia-yin², HUANG Zheng², ZHANG Xi^{1b} (1.a.Technical Services Management Office b.Microbiology Laboratory, Shanghai Municipal Center for Diseases Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2.Microbiology Laboratory, Changning District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200023, China). Address correspondence to ZHANG Xi, E-mail: xzhang@scdc.sh.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the relationship of influenza A virus HA genetic drift and its antigenic drift with the epidemiologic situation of H3N2 circulated in Shanghai from 2010 to 2013. [Methods] Real-time polymerase chain reactor was used to test the patients with influenza like illness (ILI) who visited Shanghai influenza sentinel hospitals and analyze epidemiologic characteristics of H3N2 viruses. Embryonated eggs were inoculated with virus for amplification of viral yield, and allantoic fluids from virus positive embryos were used to extract viral RNA. HA gene sequences were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction and sequenced with ABI 3730xl. The amino acid changes were analyzed with MegAlign software and the phylogenetic tree was drawn by MEGA software. [Results] H3N2 subtype was the dominant influenza strain in the years of 2010, 2012, and 2013. A seasonal variation of H3N2 influenza incidence in Shanghai was recognized, which concurred with the other regions of China. The H3N2 viruses isolated in 2010 were different in amino acid sequences on HA1 domain protein molecule from the WHO vaccine strains in 2011. There were 35 amino acid substitutions, among which twenty-three positions showed significant changes and six lie in four antigen determinant regions. The phylogenetic tree showed the strains isolated after 2011 belonged to a different branch. [Conclusion] Antigenic drift of influenza subtype H3N2 is correlated with the influenza epidemics in Shanghai.

Key Words: influenza virus; H3N2; genetic characteristic; phylogenetic tree; antigenic drift

甲 3 亚型(H3N2)流行性感冒病毒是引起人类流感的主要病原之一,它曾经引起世界性的流感大流行。流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)是最主要的病

毒抗原,它不仅与机体的免疫应答密切相关,而且该抗原基因的变异还是流感发生抗原性变异的分子基础。2010 年到 2013 年上海市流感病毒流行的主要亚型在 4 年中不断变化, H3N2 亚型在 2010—2011 年间活动明显减弱,直到 2012 年中旬才开始逐渐占据优势。尽管 2013 年在人群中出现了禽流感亚型 H7N9,但是 H3N2 阳性率仍然居高不下,并引起一些聚集性病例。因此,本研究拟对上海市 2010—2013 年间就诊的类流感(influenza like illness, ILI)患者进行检测,并对这 4 年中分离到的 H3N2 流感病毒株进行 HA 基因特征分析,从分子水平对 H3N2 亚型抗原变异与流行特征的

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0098

[基金项目] Fogarty 基金项目(编号: TW005741-07); 人-动物-环境 H7N9 禽流感病原学研究(编号: 2013QLG001)

[作者简介] 周妍(1979—), 女, 硕士, 主管技师; 研究方向: 病毒分子生物学; E-mail: yzhou@scdc.sh.cn

[通信作者] 张曦, E-mail: xzhang@scdc.sh.cn

[作者单位] 1. 上海市疾病预防控制中心 a. 技术服务办公室 b. 微生物实验室, 上海 200336; 2. 长宁区疾病预防控制中心微生物实验室, 上海 200023

相关性进行分析。本文报道该项分析结果。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2010—2013 年间从上海市 18 家流感监测哨点医院的门诊、急诊处采集符合 ILI 指征的患者上呼吸道鼻咽拭子, 冷藏保存并在 24 h 内送至相应的流感监测网络实验室待检。

1.2 标本的检测

使用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit (德国凯杰生物技术有限公司) 对标本中的流感病毒 RNA 进行抽提, 抽提得到的核酸再使用商品化 H3 亚型流感核酸扩增试剂盒 (上海之江生物科技有限公司) 对标本进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测, 所有操作按照试剂盒内提供的操作说明进行, 并同时设立阴、阳性对照。H3N2 阳性标本进入接种流程。

1.3 病毒分离和鉴定

阳性标本经处理后同时接种狗肾传代细胞和 9~11 日龄 SPF 级鸡胚, 阳性分离物用血凝抑制实验进行鉴定, 具体操作步骤参考世界卫生组织 (WHO) 推荐的《流感实验室和病毒学监测手册》(Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza)^[1]。狗肾传代细胞、流感标准毒株和抗血清由国家流感中心和 WHO 提供。含有 H3N2 病毒的鸡胚新鲜的尿囊液按照 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit (德国凯杰生物技术有限公司) 中的 RNeasy Mini Kit Handbook 所提供的方法抽提病毒株的 RNA。

1.4 序列测定

合成用于 H3N2 亚型流感病毒全基因测序的引物 (上海生工生物工程股份有限公司), 引物序列来自 WHO 推荐, 引物合成后使用焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理的水分别稀释到 50 mol/L 浓度备用。使用 Invitrogen SuerScriptIII One-step RT PCR Kit (上海英骏生物技术有限公司) 对 HA 基因进行扩增, 反应体系 50 μ L, 包括 2 $\times$ Reaction Buffer 缓冲液 25 μ L, 5 mmol 浓度 Mg^{2+} 5 μ L, SuperScript III RT Platinum Taq Mix 2 μ L, 50 mmol 上游引物 F1 1 μ L, 50 mmol 下游引物 F2 1 μ L, RNA 酶抑制剂 RNasin (Promega) 0.5 μ L, 上述抽提的 RNA 5 μ L, 补水到 50 μ L。反应条件如下: 60 $^{\circ}$ C 1 min 变性, 50 $^{\circ}$ C 30 min 反转录, 94 $^{\circ}$ C 2 min 热启动, 接下来 94 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 扩增 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min 进行延伸。扩增获得的

PCR 产物送测序公司进行测序 (上海桑尼生物科技有限公司)。

1.5 生物信息学分析

从 GenBank 中下载 WHO 2009—2010 年和 2011—2012 年推荐的 H3N2 疫苗株的 HA 基因序列。使用 Lasergene 7.0 软件包中的 SeqMan 软件对测序返回的序列进行拼接, 使用该软件包中的 MegAlign 软件对 HA1 区域的氨基酸进行对比分析。使用 MEGA (5.10) 软件对所有 HA 基因序列进行分析并绘制系统进化树。进化树的构建使用 Neighbor-Joining 方法, 重复数选择为 1000。

2 结果

2.1 H3N2 流感病毒流行特征分析

2010—2013 年间在上海市流行的流行性感冒病毒的亚型主要是甲 1 型 (H1N1pdm2009)、甲 3 型 (H3N2) 和乙型 (B)。原季节性甲 1 型 (H1N1) 没有检测到。4 年间上海市流感网络实验室共检测标本 13 845 份, 其中阳性标本 5 136 份, 阳性率为 37.10%。5 136 份阳性标本中, H3N2 亚型 2 245 份, 占有阳性标本的比例为 43.71%。将每月流感病毒阳性标本数按照时间轴绘制图 1。从图中可以看到在 2010—2013 年间, H3N2 亚型在 2010、2011 两年活动明显减弱, 这两年特别是 2011 年上海市流行的主要亚型是 B 型。2012 年 3 月份, H3N2 亚型流感病毒活动开始增强并造成该年份夏季流行高峰。2013 年 H3N2 亚型和 H1N1pdm09 亚型交替出现, 同时人群中还出现了一种新型禽流感病毒亚型 H7N9; 下半年 H3N2 亚型活动增强, 并在 10—12 月份引发数起聚集性病例。

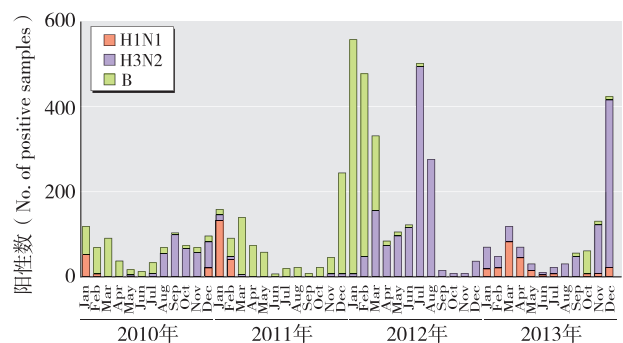


图 1 上海市 2010—2013 年流感病毒阳性标本数量月分布图

Figure 1 Monthly distributions of influenza-positive samples in Shanghai, 2010–2013

2.2 H3N2 亚型流感病毒 HA1 区序列的基因特性分析

对 2010—2013 年间的 18 株 H3N2 亚型流感病毒 HA 基因进行序列测定, 核苷酸未发生丢失或插入。

HA1 区域为 987 个核苷酸, 由此 HA1 区的推导氨基酸为 329 个。这些 H3N2 亚型的 HA1 区的氨基酸同源性在 93.3%~100% 之间, 分离年代越接近的毒株之间的同源性越好。这 4 年间共发生了 35 个氨基酸替换, 其中 23 处位点改变较大, 6 个氨基酸位点涉及 HA1 的 4 个抗原决定簇(表 1)。142、145 位点位于抗原决定簇的 Ca2 区, 162 位点位于抗原决定簇的 Sa 区, 192、194 位点位于抗原决定簇 Sb 区, 78 位点位于抗原决定簇 Cb 区。

在这 4 年期间, 有一次较大的变异, 在系统进化

树上分成两个明显的分支(图 2)。2010 年上半年和 2011—2013 年的 H3N2 毒株分别分布在两个分支上, 说明 2010—2011 年这一时间段是病毒发生变异的时间节点。有趣的是 2010 年的毒株呈现一个过渡状态, 其中一部分围绕在 WHO 推荐的 2009—2010 年疫苗株 A/Perth/16/2009 形成一个分支, 另外一部分围绕在 2011—2012 年疫苗株 A/Victoria/361/2011 周围形成另一个分支。2012—2013 年上海市 H3N2 毒株与疫苗株 Victoria 更为接近。

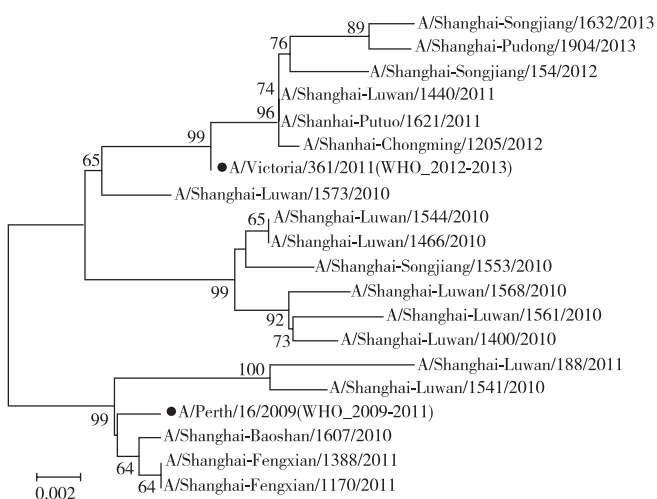
表 1 上海市 2010—2013 年 H3N2 亚型流感病毒 HA1 区不同位点的氨基酸替代

Table 1 The sites with amino acids substitutions in HA1 domain of H3N2 influenza viruses in Shanghai, 2010–2013

病毒株 (Virus strain)	H3N2 亚型病毒株 HA1 区域氨基酸替换明显的位点 (Sites with significant amino acid substitutions in HA1 domain of H3N2 influenza viruses)																						
	53	78*	94	142*	145*	162*	192*	194*	220	230	260	261	33*	45*	48*	62*	144*	198*	212*	223*	278*	280*	312*
A/Victoria/361/2011	D	G	Y	R	N	P	I	L	P	I	I	R	R	N	I	E	N	S	A	I	K	E	S
A/Pudong/1904/2013	.	.	.	G	S	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Songjiang/1632/2013	.	.	.	G	S	.	.	.	X	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chongming/1205/2012	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Songjiang/154/2012	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Luwan/1440/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Putuo/1621/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Fengxian/1170/2011	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	Q	S	T	K	K	A	T	V	N	.	N
A/Fengxian/1388/2011	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	Q	S	T	K	K	A	T	V	N	.	N
A/Luwan/188/2011	.	D	.	.	.	S	.	.	.	.	M	Q	Q	S	T	K	K	A	T	V	N	K	N
A/Luwan/1400/2010	N	.	H	.	.	.	.	.	.	V	.	.	Q	S	T	.	.	A	.	V	N	A	N
A/Luwan/1466/2010	N	.	H	.	.	.	.	.	.	V	.	.	Q	S	T	.	.	A	.	V	N	A	N
A/Luwan/1541/2010	.	.	.	.	.	S	.	.	L	.	M	Q	Q	S	T	K	K	A	T	V	N	.	N
A/Luwan/1568/2010	N	.	H	.	.	.	.	.	X	V	.	.	Q	S	T	.	.	A	.	V	.	A	N
A/Luwan/1573/2010	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	S	T	.	.	A	.	V	N	.	.
A/Perth/16/2009	.	G	Y	R	N	P	I	L	P	I	I	R	Q	S	T	K	K	A	T	V	N	E	N

[注]表中列出改变比较大的 23 个位点。*: 该位点位于抗原决定簇。#: 该位点改变有明显的时间界限(2011 年后)。

[Note] The table lists 23 sites with significant changes. * represents the sites lying in antigenic determinants. # indicates the site changes with definite beginning (after 2011).



[注]黑圆点表示的是 WHO 推荐的疫苗株。

[Note] Black dots represent WHO recommended vaccine strains.

图 2 上海市 2010—2013 年 H3N2 亚型流感病毒 HA 基因系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of H3N2 virus HA gene in Shanghai, 2010–2013

3 讨论

HA 是流感病毒的重要表面抗原, 与流感病毒的抗原变异密切相关。甲 3 亚型的 HA1 区域至少有 A、B、C、D 和 E 五个抗原决定簇, 尤其是 A 与 B 抗原决定簇对流感病毒抗原性的影响最大^[2-4]。针对流感病毒进化速率的大量研究表明, 宿主为鸟类的流感病毒基因非同义突变速率是最低的, 老的流感亚型(如季节性 H1N1)、B 型流感病毒以及内在蛋白的突变速率处于中间状态, 而分离自人体的 H3N2 流感病毒以及在禽类及猪中引发流感的病毒进化速率是很快的^[5-6]。流感病毒突变速率变化快慢的决定因素仍是免疫选择压力的强弱, 在人群免疫压力下, HA 常常发生抗原漂移, 引起病毒抗原性的改变, 使以往人群在流感病毒感染后机体内所产生的特异性抗体, 不能阻止新病毒的侵入, 从而引起流感的暴发或流行。另外环境因素, 如温度、湿度、光照、风速也与流感的变异以

及流行趋势密切相关。研究表明在雨水丰沛的夏季适合甲型流感病毒的存活和传播^[7]。本研究中 H3N2 亚型流感病毒在 2012 年夏季在人群中引起了一些聚集性病例并形成发病高峰,这一结果与既往香港的研究结果相一致^[8]。

2011 年 WHO 北半球流感疫苗会更改 H3N2 亚型流感疫苗组分,由使用 2 年的 A/Perth/16/2009 病毒株更改为 A/Victoria/361/2011 病毒株。这说明在人群中流行的 H3N2 亚型流感病毒的抗原已经发生变异^[9]。上海市 2009 年上半年流感病毒优势株是 H3N2 亚型,随后其活动减弱直到 2012 年 3 月,流感监测数据表示此时 H3N2 亚型流感病毒活动明显增强,并引发几起聚集性病例,而且这种流行趋势持续于 2012 年全年。本研究结果与该时间段在上海儿童中进行研究的 H3N2 亚型流行趋势一致^[10]。通常认为 HA1 蛋白分子的氨基酸替换发生 4 个以上并分布在两个以上的抗原决定簇上具有流行病学意义^[11]。在对 18 株 2010—2013 年间的 H3N2 亚型病毒株 HA 基因测序之后发现,HA1 区域已经发生 35 个氨基酸替换,其中 23 个位点的替换明显,6 个位点分布在 4 个不同的抗原决定簇上。正是由于 H3N2 亚型流感病毒抗原性发生了变异,才于 2012 年在人群中再次引起 H3N2 亚型流感病毒的流行。有人认为 226 位氨基酸的改变能引起病毒 HA 蛋白与受体结合的特异性改变^[12-14]。本研究所测定的 H3N2 流感病毒株在 223 位点发生了改变但是在 226 位点并没有发生改变。造成这一现象的原因有待进一步研究。HA 基因的系统进化树表明,4 年期间 H3N2 亚型流感病毒发生了明显的变异,形成一个新的分支。而这种变异是具有流行病学意义的,即造成 H3N2 亚型流感病毒活动在平静了近 2 年之后又在 2012 年春季造成小规模流行,并且引起 2012 年夏季流行高峰。

上述结果表明,2010—2013 年间上海市 H3N2 亚型流感病毒 HA 蛋白编码区的变异带来的抗原漂移是造成新一轮流行性感冒流行的原因。由于流感病毒 HA 抗原性变异的幅度与其引起的流行程度有关,因此密切关注 H3N2 亚型的抗原性变异情况,对及时预测其流行情况有着重要的意义。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011 [EB/OL]. [2014-02-01] http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/index.html.

- [2] 郭元吉,程晓雯.流行性感病毒及其实验室技术[M].北京:中国三峡出版社,1997.
- [3] CATON AJ, BROWNLEE GG, YEWEDELL JW. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype) [J]. Cell, 1982, 31 (2Pt 1): 417-427.
- [4] FANTONI A, ARENA C, CORRIAS L, et al. Genetic drift of influenza A (H3N2) viruses during two consecutive seasons in 2011-2013 in Corsica, France [J]. J Med Virol, 2014, 86 (4): 585-591.
- [5] CHEN R, HOLMES EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23 (12): 2336-2341.
- [6] LUDWIG S, HAUSTEIN A, KALETA EF, et al. Recent influenza A (H1N1) infections of pigs and turkeys in northern Europe [J]. Virology, 1994, 202 (1): 281-286.
- [7] TAMERLUS J, NELSON MI, ZHOU SZ, et al. Global influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions [J]. Environ Health Perspect, 2011, 119 (4): 439-445.
- [8] 郭巍,李克.香港 1997—2008 年甲型流感季节性波动与气候因素的相关性分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32 (10): 1005-1008.
- [9] BARR IG. WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A (H1N1) pdm09, A (H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. Vaccine, 2014 [EB/OL]. <http://www.readcube.com/articles/10.1016/j.vaccine.2014.02.014>.
- [10] CAI J, WANG X, ZHAO B, et al. Prevalence, genetic drift of haemagglutinin, and antiviral resistance of influenza A/H3N2 viruses circulating in Shanghai in children during 2009-2012 [J]. J Med Virol, 2014, 88 (6): 1026-1033.
- [11] GORMAN OT, BEAN WJ, KAWAOKA Y, et al. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses [J]. J Virol, 1991, 65 (7): 3704-3714.
- [12] WAN H, PEREZ DR. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells [J]. J Virol, 2007, 81 (10): 5181-5191.
- [13] VINES A, WELLS K, MATROSOVICH M, et al. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction [J]. J Virol, 1998, 72 (9): 7626-7631.
- [14] NOBUSAWA E, NAKAJIMA K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity [J]. Virology, 1988, 167 (1): 8-14.

(收稿日期: 2014-02-12)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)