

2019 年广州市甲型 H1N1 流感病毒全基因组序列的遗传特征分析

曹 蓝, 吴 迪, 陈艺韵, 曾 庆, 夏 丹, 陆剑云, 狄 飚, 张周斌, 李魁彪

摘要: 目的 对甲型 H1N1 流感病毒进行基因组全序列遗传特征分析, 为流感的科学防控提供新数据。方法 选取 7 株 2019 年广州市甲型 H1N1 流感病毒进行全基因组序列测定, 分析其遗传特征。结果 7 株病毒的核苷酸同源性最高为 PB2 基因 (98.8%~99.9%), 最低为 NA 基因 (97.3%~99.2%)。总体上, 不同月份的 H1N1 流感分离株在遗传进化上以时间分布为聚类特征, 特别是 2019 年 6 月份以后的 H1N1 分离株与我国使用的 2020—2021 年疫苗推荐株 A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1) 亲缘关系最近, 位于同一进化分支。疫苗株所在分支的分离株除 PA 和 M1 蛋白外, 其余蛋白均有不同数量的相同特异性氨基酸突变。分离自监测哨点医院流感样病例的毒株与社区流感暴发疫情的毒株属于同一进化分支。全基因组 8 片段的遗传进化树显示, 未发现不同基因来源的基因重配现象。结论 广州市甲型 H1N1 流感疫情流行株与门诊监测流行株高度同源, 进化起源相同。全基因组序列上推荐疫苗株与流行株匹配性较好, 未发现基因重配现象。

关键词: 甲型 H1N1 流感病毒; 全基因组; 遗传进化

中图分类号:S858;R181 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2021)04-0323-07

Genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Guangzhou in 2019

CAO Lan, WU Di, CHEN Yi-yun, ZENG Qing, XIA Dan,
LU Jian-yun, DI Biao, ZHANG Zhou-bin, LI Kui-biao

(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China)

Abstract: In this study, the genetic characteristics of novel influenza A (H1N1)pdm09 viruses were analyzed, to provide research data for the scientific prevention and control of influenza. Seven strains of novel influenza A (H1N1)pdm09 viruses in Guangzhou in 2019 were selected for sequencing. The genetic characteristics were analyzed in bioinformatics software. Among the eight segments of the seven viruses, the nucleotide sequence similarity of PB2 genes was the highest (98.8%~99.9%) and that of NA genes was the lowest (97.3%~99.2%). In general, the distribution of H1N1 influenza isolates in different months was time-dependent. The isolates after June in 2019 had the closest genetic relationship to the vaccine recommended strain (A/Guangdong Maonan/1536/2019 H1N1), and they were in the same evolutionary branch. Except for PA and M1 proteins, all proteins of the viruses from this branch had various amino acid mutations. The strains isolated from the influenza-like cases in monitoring hospitals belonged to the same evolutionary branch as those from the cases of community influenza outbreaks. The phylogenetic tree of each gene showed that there was no recombination among different genes from different sources. In conclusion, the strains of novel influenza A (H1N1) from monitoring cases in Guangzhou showed homology with the strains from the cases of influenza outbreaks in the community. The whole genome sequences matched the recommended vaccine strain well. No recombination was found.

广东省自然科学基金(No.2019A1515011510, No.2019A1515011407)、广州市卫生和计划生育科技项目(No. 20191A011064, No. 20201A011052, No. 20201A011067)、广州市医学重点学科建设项目(No.2021-2023-11)、国家科技重大专项(No.2017ZX10103011-005)和广东省医学科学技术研究(No. A2019149, No. A2019379, No. A2020399)联合资助。

通讯作者:李魁彪,Email:likuibiao@qq.com;

ORCID:0000-0002-7003-3831

作者单位:广州市疾病预防控制中心,广州 510440

Keywords: influenza A (H1N1)pdm09 virus; whole genome; genetic evolution

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2019A1515011510, No. 2019A1515011407), Guangzhou Health and Family Planning Science and Technology Project (No. 20191A011064, No. 20201A011052, No. 20201A011067), Project for Key Medicine Discipline

Construction of Guangzhou Municipality (No. 2021-2023-11), National Science and Technology Project (No. 2017ZX10103011-005), and Guangdong Medical Scientific Research Fund (No. A2019149, No. A2019379, No. A2020399)

Corresponding author: Li Kui-biao, Email: likuibiao@qq.com

长期以来,季节性流感威胁着人类健康,每年造成严重的人群发病和死亡。甲型 H1N1 流感病毒自 2009 年首次出现以来,由于不断快速的发生基因变异,已代替了原季节性 H1N1 流感而持续流行。Mi L 等^[1]在对 1977 年以来全球 H1N1 流感病毒抗原进化模型的研究中发现,在 8 个主要进化模式中有 6 个进化模式起源于亚洲,进一步发现,我国南方地区 H1N1 流感病毒的进化要早于北方地区,提示南方地区 H1N1 流感病毒在我国 H1N1 流感传播进化过程起到重要作用。而广州市地处华南地区,是我国重要的经济发展中心,也是包括 H1N1 流感在内的多种传染病流行的重要地区。早期研究发现,广州市流感流行呈现双峰的流行特点,甲型 H1N1 流感和季节性 H3N2 流感交替出现^[2],同时甲型 H1N1 流感病毒也是近期广州市流感疫情的主要病原^[3]。既往的研究中重点对 HA 和 NA 基因进行了变异分析,而对甲型 H1N1 基因组全序列的分子进化研究相对较少,因此本研究选取 7 株 2019 年广州市甲型 H1N1 流感流行株进行了全基因组测序,为全面掌握近期广州市甲型 H1N1 流感病毒的分子流行病学特点提供研究数据。

1 材料与方法

1.1 毒株来源 收集 2019 年广州市流感监测哨点医院流感样病例和社区流感暴发疫情病例的呼吸道标本,通过荧光定量 RT-PCR 方法进行甲型 H1N1、甲型 H3N2 和乙型流感病毒核酸检测(试剂盒购于江苏硕世生物科技公司),并将流感阳性标本接种 MDCK 细胞系进行病毒分离,培养产物经过血凝实验-血凝抑制试验(HA-HI)对流感病毒培养物进行鉴定(血球为自制豚鼠血,血清由中国疾病预防控制中心提供)。根据分离时间的不同,本研究中随机选取 7 株甲型 H1N1 流感病毒进行全基因组测序。

1.2 全基因组序列测定 参考 Deng YM 等^[4]关于流感病毒全基因组测序的方法,并参考近期甲型 H1N1 流感病毒各基因全长序列,应用 Oligo 6 软件设计甲型 H1N1 流感病毒全序列各基因片段全长测序引物(引物由广州天一辉远生物公司合成),见表 1。通过 RT-PCR 方法扩增 HA、NA、PB2、PB1、PA、NP、M 和 NS 全长序列,阳性鉴定产物送至广州天一辉远生物公司,通过 ABI 3730 进行病毒一代

测序。

表 1 甲型 H1N1 流感病毒各基因片段扩增引物

Tab.1 Amplification primers for gene fragments of the avian influenza A(H1N1)pdm09 virus

引物名称	引物序列(5'-3')
HA-F	TGTAAAACGACGCCAGTATGAAGCAATAC
HA-R	CAGGAAACAGCTATGACCGATGGATGTATATTTC
NA-F	TGTAAAACGACGCCAGTAGCAAAA
NA-R	CAGGAAACAGCTATGACCGTGAT
PB2-1-F	AGCRAAACAGGTCAAWTATATTCAAT
PB2-1-R	ATSACAYTRTCRATDGTTCAATTCC
PB2-2-F	GTRTTYTCACARGAGATTGCATG
PB2-2-R	AGTAGAAACAAGGTCGTTTWAAACWATT
PB1-1-F	AGCAAAAGCAGGAAACCATT
PB1-1-R	TTRAACATNCCCACATCATCAT
PB1-2-F	ACTGGAGAYAAYACYAARGGA
PB1-2-R	AGTAGAAACAAGGCATTTTCATG
PA-1-F	AGCAAAAGCAGGTACTGATCC
PA-1-R	TTGGTTCTGCATTGCTTATC
PA-2-F	CAATTACCTCCTGGCTTGAAG
PA-2-R	AGTAGAAASAAGGTACYTTTGGA
NP-F	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC
NP-R	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC
M-F	AGCAAAAGCAGGTAGATRTTAAAG
M-R	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTACTC
NS-F	AGCAAAAGCAGGGTGACAAA
NS-R	AGAACACAAGGGTGTNTTA

1.3 分子特征分析 通过 DNA Star7.1 软件拼接全序列各基因片段,同时对各基因进行同源性分析。采用 MEGA 6.0 软件,以基因 ORF 为基本单元,对不同进化分支变异氨基酸进行分析。

1.4 遗传进化分析 以 GISAID 数据库中历年 WHO 推荐的甲型 H1N1 流感病毒疫苗株各基因片段作为参比序列(A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1)、A/Hawaii/70/2019 (H1N1)、A/Brisbane/02/2018 (H1N1)、A/Michigan/45/2015 (H1N1)、A/California/7/2009 (H1N1)、A/Christchurch/16/2010 (H1N1)、A/Brisbane/59/

2007 (H1N1)、A/Solomon/Islands/3/2006 (H1N1)、A/New/Caledonia/20/1999 (H1N1)等)。使用 MEGA 软件绘制各基因遗传进化树,参数设置为:Neighbor-joining 法(参数设置为 1 000 replications)及 Maximum composite likelihood model 核苷酸替代模型。

2 结 果

2.1 总体情况 2019 年累计从 10 541 份监测标本中检测到甲型 H1N1 流感阳性标本 703 份,其中分离甲型 H1N1 流感毒株 70 株(均感染 MDCK 细胞经一代培养)。本研究中 7 株病毒中,5 株分离自流感监测病例,2 株分离自流感暴发疫情病例。2 株分离于 2019 年 1 月,2 株分离于 2019 年 3 月,2 株分离于 2019 年 6 月,1 株分离于 2019 年 12 月。

2.2 全基因组序列测定 全序列各基因扩增产物经毛细管电泳鉴定,经过序列拼接,获得全基因各片段开放阅读框序列(HA 基因:1 701 bp、NA 基因:1 410 bp、PB2 基因:2 280 bp、PB1 基因:2 274 bp、PA 基因:2 151 bp、NP 基因:1 497 bp、M1 基因:759 bp、NS1 基因:693 bp)。7 株病毒全基因序列中,核苷酸同源性最高为 PB2 基因(98.8%~99.9%),最低为 NA 基因(97.3%~99.2%),氨基酸同源性最高为 PB2 蛋白(99.3%~100%),最低为 NA 蛋白(96.4%~99.4%),全基因组同源性见表 2。

表 2 2019 年广州市 H1N1 流感分离株
全序列基因的同源性分析

Tab.2 Sequence similarity analysis of whole genes from novel influenza A (H1N1)pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

基因	核苷酸/%	氨基酸/%
HA	97.7~99.9	96.6~99.6
NA	97.3~99.2	96.4~99.4
PB2	98.8~99.9	99.3~100
PB1	98.6~99.9	98.8~99.9
PA	98.5~100	99.2~100
NP	98.7~100	99.2~100
M1	98.5~100	99.2~100
NS1	98.6~100	96.5~100

2.3 遗传进化分析 总体上,不同月份的 H1N1 流感分离株按时间分布,分别于 A/Michigan/45/2015 (H1N1)、A/Brisbane/02/2018 (H1N1)、A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1)、A/Hawaii/70/2019(H1N1)疫苗株聚为一簇,特别是 2019 年 6 月份以后的 H1N1 分离株与世界卫生组织 2020—2021 年推荐使用的疫苗推荐株 A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1) 亲缘关系最近。分离于哨点医院流感样症状监测病例的毒株与社区流感暴发疫情的毒株归属于同一进化分支。全基因组遗传进化树显示,未发现不同基因来源的基因重配现象。

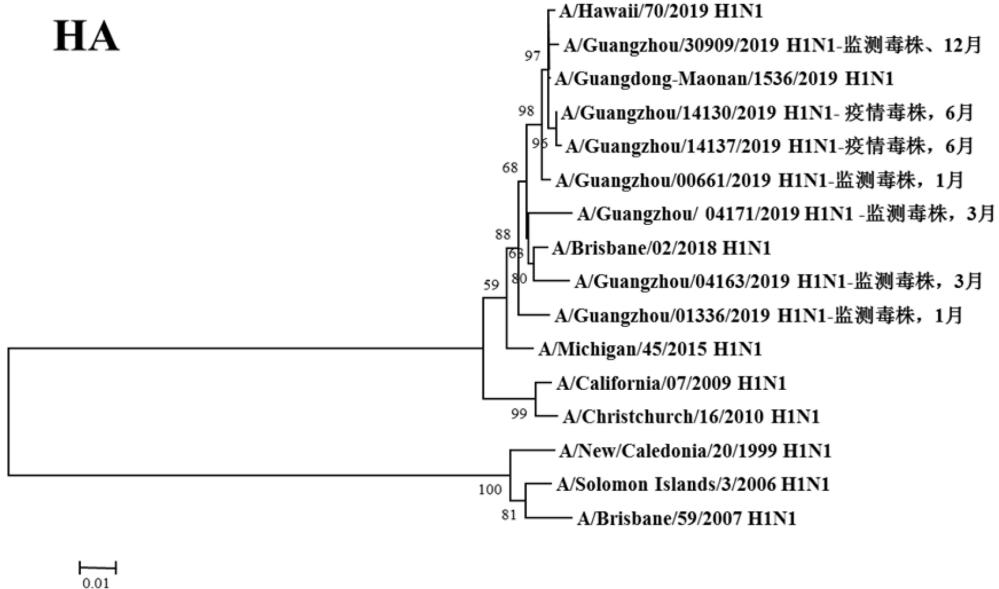


图 1 2019 年广州市甲型 H1N1 流感分离株 HA 基因遗传进化树

Fig.1 Genetic evolution analysis of HA genes from novel influenza A (H1N1)pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

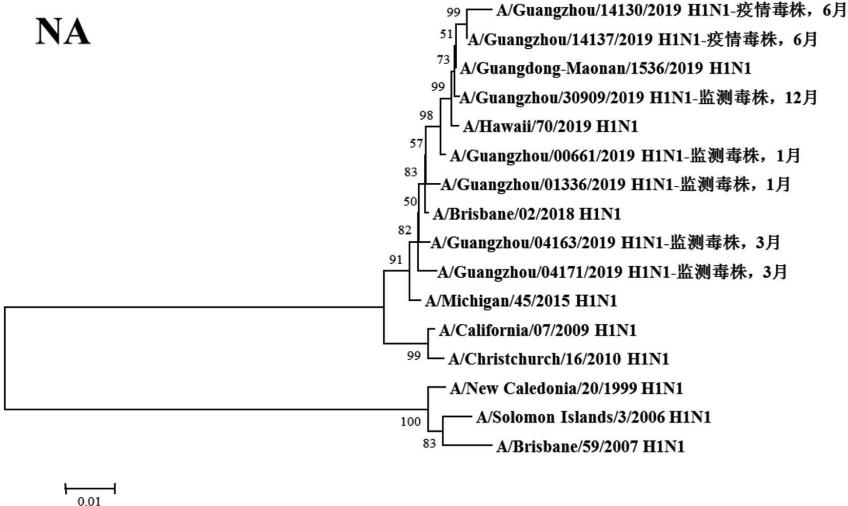


图 2 2019 年广州市甲型 H1N1 流感分离株 NA 基因遗传进化树

Fig.2 Genetic evolution analysis of NA genes from novel influenza A (H1N1) pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

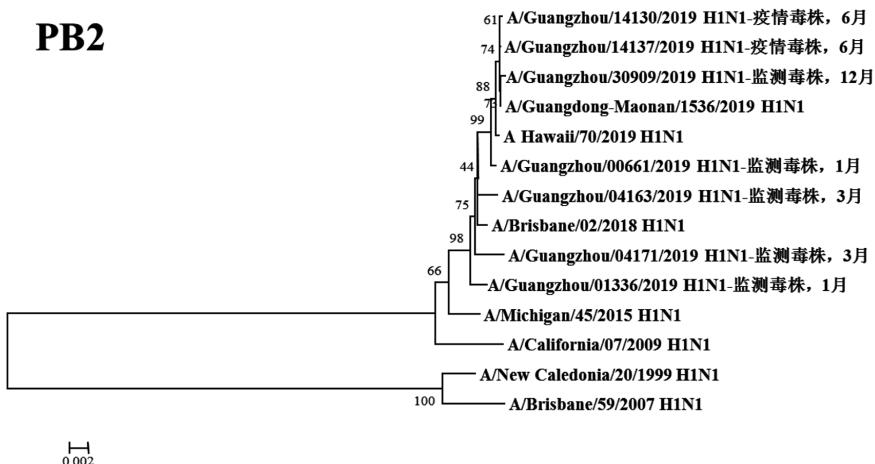


图 3 2019 年广州市甲型 H1N1 流感分离株 PB2 基因遗传进化树

Fig.3 Genetic evolution analysis of PB2 genes from novel influenza A (H1N1) pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

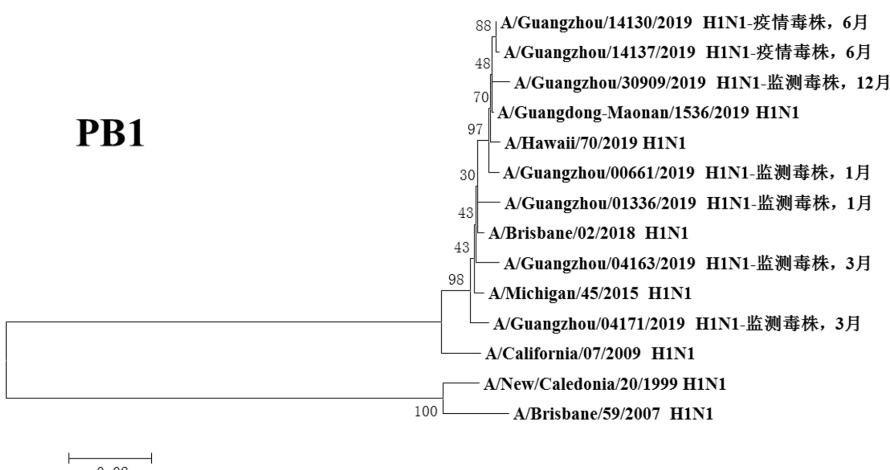


图 4 2019 年广州市甲型 H1N1 流感分离株 PB1 基因遗传进化树

Fig.4 Genetic evolution analysis of PB1 genes from novel influenza A (H1N1) pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

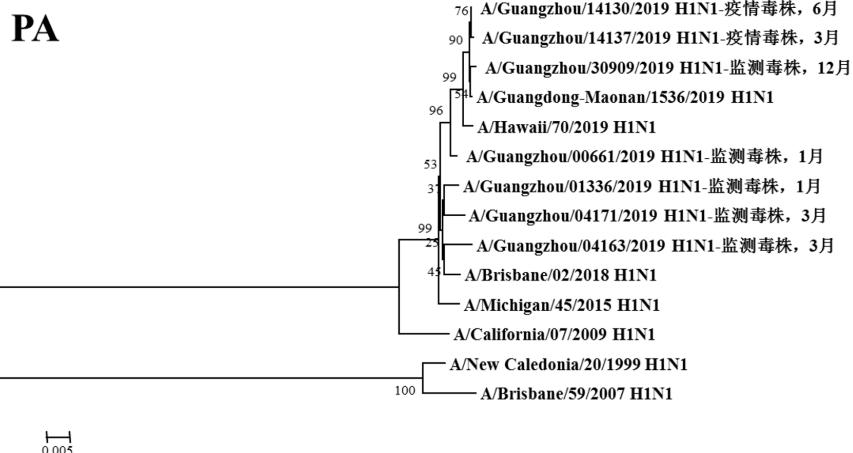


图5 2019年广州市甲型H1N1流感分离株PA基因遗传进化树

Fig.5 Genetic evolution analysis of PA genes from novel influenza A (H1N1)pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

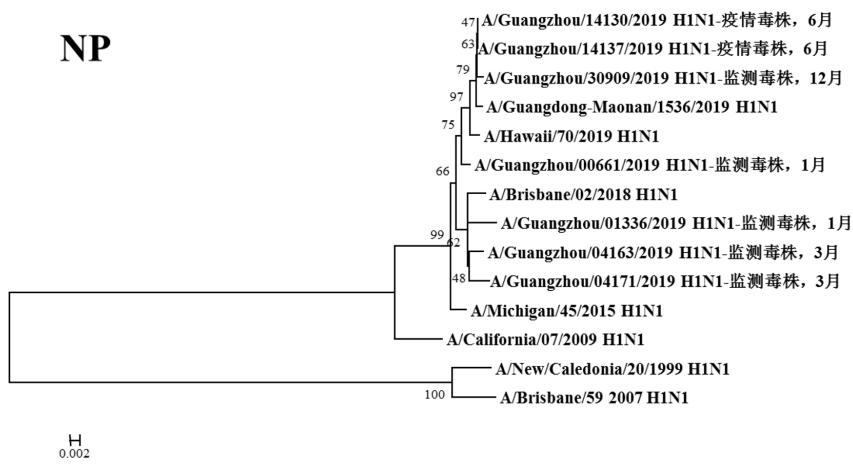


图6 2019年广州市甲型H1N1流感分离株NP基因遗传进化树

Fig.6 Genetic evolution analysis of NP genes from novel influenza A (H1N1)pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

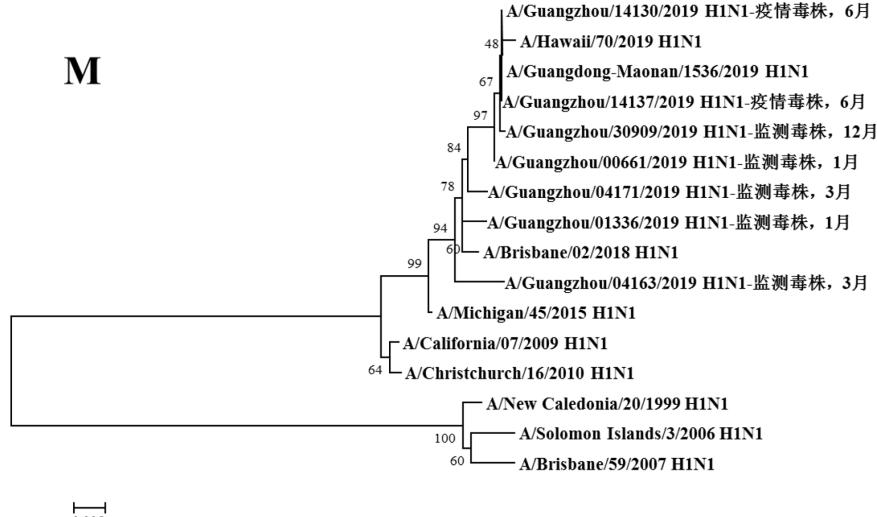


图7 2019年广州市甲型H1N1流感分离株M基因遗传进化树

Fig.7 Genetic evolution analysis of M genes from novel influenza A (H1N1)pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

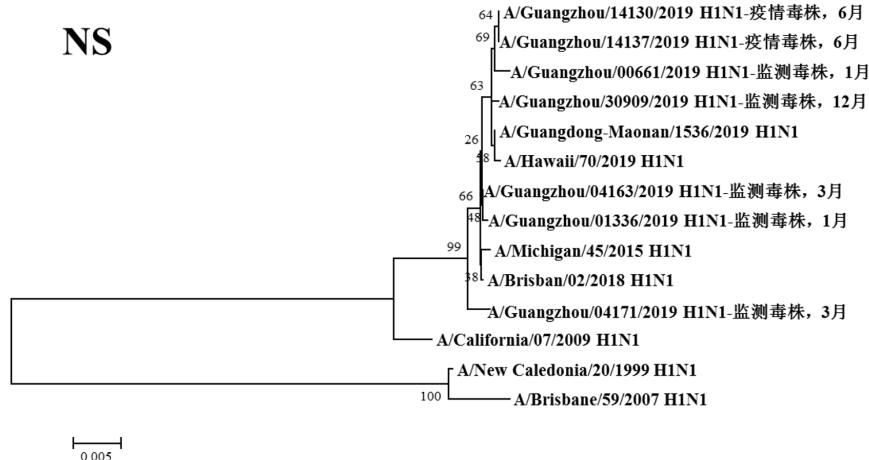


图 8 2019 年广州市甲型 H1N1 流感分离株 NS 基因遗传进化树

Fig.8 Genetic evolution analysis of NS genes from novel influenza A (H1N1) pdm09 isolates in Guangzhou in 2019

2.4 全基因分子特征分析 HA 蛋白抗原位点分析结果显示,与 2020—2021 年疫苗推荐株 A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1) 相比, 01336、04163、04171 分离株发生 I202T 变异, 14130、14137、30390 分离株发生 D204A 变异。大部分毒株 HA 蛋白有 7 个糖基化位点, 04171 分离株发生 104-NGT 糖基化位点缺失。在 NA 蛋白神经氨酸酶抑制剂耐药位点上,所有分离株未发生耐药突变。

根据全基因进化树结果显示, A/Guangzhou/00661/2019 (H1N1)、A/Guangzhou/14130/2019 (H1N1)、A/Guangzhou/14137/2019 (H1N1) 和 A/Guangzhou/30309/2019 (H1N1) 毒株全基因片段均与我国 2020—2021 年疫苗推荐株 A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1) 归属同一进化分支,对上述 4 株分离株毒株全基因氨基酸位点与另 3 株分离株进行变异分析,结果显示,除 PA、M1、M2 和 NS2 蛋白外,其余蛋白均有不同数量的相同特异性氨基酸突变,见表 3。同时对两株流感疫情分离株 A/Guangzhou/14130/2019 (H1N1) 和 A/Guangzhou/14137/2019 (H1N1) 进行全基因氨基酸变异位点特异性分析显示,两毒株具有 HA-K188E、NA-I40T、PB1-M646L、NS1-I145V 等共同的氨基酸变异位点。

3 讨 论

自 2017 年开始,WHO 推荐北半球使用的 3 株 H1N1 疫苗株(A/Michigan/45/2015 (H1N1)(2017—2019)、A/ Brisbane/02/2018 (H1N1)(2019—

表 3 同分支分离株基因组特异性氨基酸变异分析

Tab.3 Analysis of genome specific amino acid variations in homocladistic isolates

疫苗株	同分支分离株 ^①
A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1)	00661 14130 14137 30309
HA	N146D, T202I
NA	F74S, T452I
PB2	T81I, G225S, V667I
PB1	V200I, K386R
PA	—
NP	V425I
M1	—
M2	—
NS1	T80A, A155T
NS2	—

① The amino acid mutations of 00661, 14130, 14137 and 30309 isolates, which belonged to the same clade, were compared with those of 01336, 04163 and 04171 isolates.

2020)、A/Guangdong-Maonan/1536/2019 (H1N1) (2020—2021) 亲缘关系较近,遗传进化上不断进化,2020—2021 年疫苗株与 2019 年 6 月之后的流行株在全基因组上位于同一遗传进化簇上,提示 2020 年下半年启动使用的疫苗株与流行株匹配性较好。但该分支中 00661 毒株分离于 2019 年 1 月,说明广州地区甲型 H1N1 流感病毒流行的复杂性,不排除较早期流行株与近期流行株共同流行的情况,进而存在病毒重配风险,因此及时监测流行的变

异情况、评估疫苗株与流行株的匹配性尤为重要。

广州流感流行表现为一年两次的流行高峰,本研究发现6月份以后的流行株全基因组序列在遗传进化上与疫苗株(2020—2021)共同形成独立进化分支,进一步氨基酸位点分析也显示,该分支分离株与疫苗株具有多个位点相同的特异性氨基酸突变,揭示2019年下半年流行株与疫苗株匹配性较好的分子基础。本研究中2株流感疫情流行株与门诊监测流行株高度同源,进化起源相同。但对2株疫情分离株全基因组氨基酸变异分析显示,在HA、NA、PB1和NS1蛋白存在不同于监测毒株的特异性氨基酸变异,这些位点是否与病毒传播能力相关,进而引发流感疫情暴发,需要进一步研究。

由于流感病毒基因组分节段的特点,当不同亚型流感病毒共同感染宿主细胞时可发生基因重配^[5],这也是流感病毒不断进化的重要方式之一,新重配的病毒常引起人间流感的大流行,在历史上有3次流感大流行就是由重配流感病毒所引起^[6-7]。2009年引起全球广泛流行的pdm2009 H1N1(本研究中也称“甲型H1N1”)即是由南美H1N1禽流感病毒的PB2、PA基因,人H3N2流感病毒的PB1基因、南美H1N1经典猪流感病毒的HA、NP、NS和欧亚类禽H1N1猪流感病毒的NA、M基因重配进化而来^[8]。大量研究发现,pdm2009 H1N1流感病毒宿主范围多样,可以感染火鸡^[9]、犬^[10]、猫^[11-13]、野鸟^[14]等,提示pdm2009 H1N1流感病毒有重配产生新型流感病毒的可能^[15]。因此开展甲型H1N1流感病毒全基因组进化分析对新型重配病毒的发现有着重要意义。在本研究中所选取的9株2019年广州市甲型H1N1流感病毒未发现不同基因来源的基因重配现象。2020年新型冠状病毒在全球广泛流行,我国及时启动了全面且有效的防疫对策,在采取高风险地区封闭管理、学校和托幼机构休学、加强佩戴口罩和卫生消毒等一系列防疫措施后,我国的新冠病毒传播得以有效控制,同时也控制了包括甲型H1N1流感病毒在内的呼吸道病原体的流行和传播。2020年广州市流感监测数据显示,截至目前尚未监测到甲型H1N1流感病毒,但随着复工复产、人流活动的增加,下一阶段是否会发生甲型H1N1流感病毒流行,以及继续2019年下半年流行株持续流行,还是在此基础上出现新变异株,需要持续监测。

利益冲突:无

引用本文格式:曹蓝,吴迪,陈艺韵,等.2019年广州市甲型H1N1流感病毒全基因组序列的遗传

特征分析[J].中国人兽共患病学报,37(4):323-329. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.038

参考文献:

- [1] Liu M, Zhao X, Hua S, et al. Antigenic patterns and evolution of the human influenza A (H1N1) Virus[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14171. DOI: 10.1038/srep14171
- [2] 曹蓝,李魁彪,马钰,等.2017年广州市流感暴发疫情病原学监测与分析[J].热带医学,2018,18(12):1619-1622.
- [3] 鲁恩洁,陈艺韵,陈宗道,等.广州市2017—2018年流感疫情原学监测结果分析[J].国际病毒学杂志,2020,27(2):124-127. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.008
- [4] 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: 43-48. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.04.019
- [5] Landolt GA, Karasin AI, Phillips L, et al. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41:1936-1941. DOI: 10.1128/jcm.41.5.1936-1941.2003
- [6] Frost WH. Statistics of influenza morbidity: with special reference to certain factors in case incidence and case fatality[J]. Public Health Rep, 1920,35:584-597.
- [7] Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12: 9-14. DOI: 10.3201/eid1201.051254
- [8] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. Science, 2009, 325:197-201. DOI:10.1126/science.1176225
- [9] Pantin-Jackwood M, Wasilenko JL, Spackman E, et al. Susceptibility of turkeys to pandemic-H1N1 virus by reproductive tract insemination[J]. Virol J, 2010, 7: 27. DOI: 10.1186/1743-422X-7-27
- [10] Lin D, Sun S, Du L, et al. Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus[J]. J Gen Virol, 2012,93:119-123. DOI: 10.1099/vir.0.037358-0
- [11] Zhao FR, Liu CG, Yin X, et al. Serological report of pandemic (H1N1) 2009 infection among cats in Northeastern China in 2012-02 and 2013-03[J]. Virol J, 2014, 11. DOI: 10.1186/1743-422X-11-49
- [12] Sponseller BA, Strait E, Jergens A, et al. Influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus infection in domestic cat[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16:534-537. DOI: 10.3201/eid1603.091737
- [13] Campagnolo ER, Rankin JT, Daverio SA, et al. Fatal pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus infection in a Pennsylvania domestic cat[J]. Zoonoses Public Health, 2011, 58:500-507. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01390.x
- [14] Schrenzel MD, Tucker TA, Stalis IH, et al. Pandemic (H1N1) 2009 virus in 3 wildlife species, San Diego, California, USA[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17:747-749. DOI: 10.3201/eid1706.101355
- [15] Zhu WF, Zhang H, Xiang XY, et al. Reassortant eurasian avian-Like influenza A(H1N1) virus from a severely ill child, Hunan Province, China, 2015[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(11):1930-1936. DOI: 10.3201/eid2211.160181