

昆明市 2009~2013 年 B 型流感病毒血凝素及耐药基因分析

曹亿会, 李娟, 蒋立, 赵晓南, 宁德明, 罗春蕊, 徐闻[△] (云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

【摘要】 目的 研究 B 型流感病毒 HA、NA 全基因序列, 为流感防控提供支持。**方法** 从云南省疾病预防控制中心流感实验室分离毒株中挑选代表株进行 HA 和 NA 全基因序列分析。**结果** 发现 Bv 型毒株和标准株比有 K129N、K80R、K48E 的变异, 其中 K129N 在 120 环区域, 除 2009 年分离株外, 其他 Bv 株均有 75 位点的变异。By 毒株 HA 基因相同突变位点比较多, 如 N116K、S150I、N165Y、S229D、D196N 等, 云南分离株都有 D196N 的变异位点, 增加了糖基化位点的可能性。研究发现所有的 NA 基因没有发生耐药性基因的突变, 同源性相对比较高, 但有基因重组毒株生成。**结论** 云南分离株 B 型流感病毒突变位点多, 并且有重组毒株生成, 说明加强监测耐药株的重要性。

【关键词】 B 型流感病毒; 神经氨酸酶; 血凝素; 突变

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.022 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0920-03

Analysis on hemagglutinin and drug resistance gene of influenza B virus in Kunming City during 2009—2013 CAO Yi-hui, LI Juan, JIANG Li, ZHAO Xiao-nan, NING De-ming, LUO Chun-rui, XU Wen[△] (Yunnan Provincial Center for Disease Prevention and Control, Kunming, Yunnan 650022, China)

【Abstract】 Objective To study the HA and NA complete genome sequence of influenza B virus to provide support for controlling influenza. **Methods** The representative strains isolated from the influenza laboratory of our center were performed the HA and NA complete genome sequence analysis. **Results** Compared with the standard strain, the K129N, K80R, K48E mutation were found in the Bv type virulent strains, in which K129N was in 120 ring area, except isolated strains in 2009, other Bv strains all had 75 locus mutation. The HA gene in By virulent strain had many same mutation loci, such as N116K, S150I, N165Y, S229D and D196N. The isolated strains in Yunnan all had D196N mutation locus, which increasing the possibility of glycosylation locus. The research found that all the NA genes had no drug-resistance gene mutation, the homology was relatively higher, but the recombinant strains were generated. **Conclusion** The isolated strains of influenza B in Yunana have many mutation sites, moreover the generation of recombinant strains is found, indicating the importance for strengthening drug resistance monitoring.

【Key words】 influenza B; neuraminidase; hemagglutinin; mutation

流行性感冒(简称流感)是流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 分为甲(A)、乙(B)、丙(C)3 种型别, 其中 B 型流感病毒是感染人类的主要病原体之一, 根据其抗原性不同可以分为 Yamagata 系(By)和 Victoria(Bv)系^[1-2], B 型流感病毒的两种亚型可以在不同时间不同地区流行, 两种亚型也可以在同一地区流行^[3], B 型流感病毒虽未造成过流感大流行, 但可在流感季节导致局部流行, 并能引起重症和死亡, 在某些特定的情况下所导致的疾病负担甚至超过 A 型流感病毒^[4-5], 由于流感病毒膜蛋白血凝素(HA)识别并结合靶细胞表面的唾液酸受体, 对于流感病毒感染非常重要^[6-7], 而 HA1 区基因变异频率最高^[8], 其变化可能会导致的抗原漂移, 从而影响流感疫情的发生和流行。神经氨酸酶(NA)催化裂解唾液酸使子代病毒释放并防止病毒形成聚集体, 其基因变异可以导致病毒的耐药性发生改变。HA 和 NA 的协同作用, 以利于病毒的复制和传播^[9]。故本文分析了云南省疾病预防控制中心 2009~2013 年分离的 B 型流感毒株 HA、NA 的基因序列变化特征, 为 B 型流感病毒感染的监测和预防提供依据。

1 材料与方法

1.1 毒株来源 所有流感毒株来源于云南省疾病预防控制中心流感网络实验室。流感样病例标本经过犬肾传代细胞(MD-

CK)分离、血清活性及滴度鉴定, 按全国流感/人禽流感监测实施方案操作。所用的标准血清由中国疾病预防控制中心提供。本文所用的毒株均送国家流感中心复核。

1.2 病毒 RNA 的提取、HA 和 NA 基因的 PCR 扩增 本实验采用德国 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit 核酸提取试剂盒提取病毒 RNA, 然后用 One Step RT-PCR Kit 试剂盒(QIAGEN)进行反转录获取 cDNA, 提取及反转录过程严格按照产品说明书操作。基因扩增 PCR 反应条件为 60 ℃ 1 min; 42 ℃ 20 min; 50 ℃ 20 min; 95 ℃ 15 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 10 min 延伸, 扩增产物的纯化和测序都有上海生物工程技术服务公司完成。扩增血凝素 HA 和神经氨酸酶 NA 基因的 PCR 引物序列由中国疾病预防控制中心提供, 上海生物工程技术服务公司合成。

1.3 HA 和 NA 基因序列分析 采用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 程序对序列进行拼接, 使用 MEGA5.0 软件进行序列比对、分析, 采用邻位相邻法分别构建 HA1 和 NA 的基因进化树。参考株 HA1 基因和 NA 基因序列来自 NCBI 的 Genbank 数据库。

2 结果

2.1 B 型流感病毒 Victoria 系进化树结果分析 以国际疫苗

株 Brisbane/32/2002 为根,其他国际国内流行株为参考,与本研究的毒株相比都有 K129N、K80R、K48E 的突变,其中 2009 年分离的毒株遗传距离相对较近,2010 年分离的毒株聚在一起成簇,和 2009 年的毒株相比,有 N75K、N165K、S172P 的点位突变,在此基础上 Yunnanwuhua/511/2010 和 YunnanAnning/1242/2010 还有 L58P 共同的突变位点。

2.2 B 型流感病毒 Yamagata 系进化树结果分析 参照 Bangladesh/3333/2007、Wisconsin/01/2010 等国际疫苗株,发现云南省毒株 HA 基因有较多的相同突变位点,如 S150I、N165Y、S229D、D196N 等,并伴随其他位点的突变。毒株之间遗传距离较近,处于同一个分支上,6 株 Yamagata 毒株都有共同的 N116K 突变,其中 2013 年分离的毒株 Yunnanxishan/

11/2013、Yunnanxishan1383/2013 具有共同 K298E、E312K 的突变位点。

2.3 B 型流感病毒 NA 基因进化树结果分析 通过进化树可以看出,毒株 NA 基因处于 2 个分支上,Bv 和 By 毒株处于不同分支,其中 B/yunnanxishan/1383/2013、B/yunnanxishan/11/2013 所在的分支和其 HA1 基因所在的分支有变化,HA 基因的进化树可以看出这 2 株是和 Yamagata 系在一个分支上,而 NA 进化树图上,这 2 株处于 Victoria 系分支上,说明 HA1 基因和 NA 基因发生了重配。本次研究的 12 株毒株均未发现有耐药性突变,氨基酸变异的位点见表 1。毒株之间的 NA 基因的同源性比较高,达到 94.8%~99.9%。见图 1。

表 1 毒株 NA 氨基酸位点的变化

毒株名称	氨基酸变异位点														
	44	87	89	133	137	142	145	157	198	210	200	233	371	395	409
B/Bangladesh/5945/2009	P	H	R	M	T	I	P	E	K	N	R	N	F	M	A
B/yunnanguangnan/34/2009	S	H	R	R	T	T	P	E	K	N	G	H	S	K	A
B/yunnanzhengxiong/325/2009	S	H	R	R	T	T	P	E	K	N	G	H	S	K	A
B/yunnananning/1242/2010	P	H	R	M	T	I	P	E	K	N	R	N	F	M	A
B/yunnananning/154/2012	R	R	P	R	I	I	L	K	R	S	R	H	F	M	T
B/yunnananning/191/2011	R	C	P	R	I	I	L	K	R	S	R	H	F	M	T
B/yunnanwuhua/16/2012	R	C	P	R	I	I	L	K	K	S	R	H	F	M	T
B/yunnanwuhua/511/2010	P	H	R	M	T	I	P	E	K	N	R	N	F	M	A
B/yunnanwuhua/179/2010	P	H	R	M	T	I	P	E	K	N	R	N	F	M	A
B/yunnanxishan/11/2013	S	H	R	R	T	T	P	E	K	N	G	H	S	K	A
B/yunnanxishan/1220/2010	S	H	R	R	T	T	P	E	K	N	G	H	S	K	A
B/yunnanxishan/1383/2013	S	H	R	R	T	T	P	E	K	N	G	H	S	K	A
B/yunnanxishan/1718/2011	R	C	P	R	I	I	L	K	R	S	R	H	F	M	T
Hubei/Wujiagang/158/2009	R	R	L	R	I	I	L	K	R	S	R	H	F	M	T

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
B/Bangladesh/5945/2009	1	0.967	0.968	0.990	0.955	0.952	0.994	0.994	0.992	0.968	0.969	0.969	0.953	0.956	1
B/yunnanguangnan/34/2009	2	0.033	0.995	0.964	0.949	0.946	0.948	0.966	0.963	0.991	0.992	0.991	0.947	0.950	2
B/yunnanzhengxiong/325/2009	3	0.032	0.005	0.965	0.931	0.949	0.967	0.967	0.967	0.991	0.993	0.964	0.949	0.952	3
B/yunnananning/1242/2010	4	0.010	0.008	0.045	0.951	0.948	0.950	0.996	0.953	0.964	0.963	0.964	0.949	0.951	4
B/yunnananning/154/2012	5	0.043	0.091	0.049	0.049	0.996	0.997	0.953	0.953	0.950	0.961	0.961	0.998	0.999	5
B/yunnananning/191/2011	6	0.048	0.034	0.051	0.052	0.004	0.994	0.950	0.950	0.947	0.949	0.948	0.995	0.994	6
B/yunnanwuhua/16/2012	7	0.046	0.032	0.050	0.050	0.003	0.005	0.932	0.932	0.949	0.950	0.949	0.996	0.996	7
B/yunnanwuhua/511/2010	8	0.006	0.034	0.033	0.054	0.047	0.050	0.048	0.996	0.966	0.967	0.967	0.951	0.954	8
B/yunnanwuhua/179/2010	9	0.008	0.035	0.033	0.058	0.047	0.050	0.048	0.004	0.964	0.966	0.965	0.951	0.954	9
B/yunnanxishan/11/2013	10	0.032	0.009	0.009	0.036	0.050	0.053	0.034	0.036	0.966	0.999	0.948	0.951	10	
B/yunnanxishan/1220/2010	11	0.031	0.008	0.007	0.035	0.049	0.051	0.050	0.033	0.034	0.004	0.996	0.949	0.952	11
B/yunnanxishan/1383/2013	12	0.031	0.009	0.008	0.036	0.049	0.052	0.051	0.034	0.035	0.001	0.004	0.949	0.951	12
B/yunnanxishan/1718/2011	13	0.047	0.053	0.051	0.051	0.032	0.055	0.054	0.049	0.052	0.051	0.051	0.996	13	
Hubei/Wujiagang/158/2009	14	0.044	0.059	0.045	0.001	0.006	0.006	0.046	0.046	0.049	0.049	0.049	0.004	14	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	

注:表 2 数字代表的毒株和左边毒株编号相对应。如:1 代表 B/Bangladesh/5945/2009;2 代表 B/yunnanguangnan/34/2009 等。

图 1 流感病毒 NA 基因氨基酸同源性比较

3 讨 论

B 型流感病毒的 HA1 基因有 4 个重要表位,120 环(116~137),150 环(141~150),160 环(162~167),190 环(194~202),其中 120 环表位决定抗原,是流感病毒高度变异区^[10],在 129~137 环发生了氨基酸的替代很容易抗原改变^[11]。Bv 型毒株和标准株比均在 120 环区域有 K129N 变异,有报道该亚型的 120 环还包括了 75 和 77 这 2 个位点,此间氨基酸的改变可能会导致病毒的抗原性改变^[12]。云南分离株除了 2009 年分离株外,其他 Bv 株均有 75 位点的变异,Yunnanwuhua/179/2010 还具有 V146I 的氨基酸变异点,处于 160 环

的变异区,此变异和当地的 Bv 流感病毒的流行是否有关系有待进一步研究。By 型毒株变异区比较多,这与黄维娟等^[5]研究一致,所有的毒株都在 120 环内有 N116K 变异,而 Yunnanxishan/11/2013、Yunnanxishan/1383/2013 毒株还伴随着 K298E、E312K 等突变,此外云南分离株还在 150 环结束位置有 S150I 的变异。160 环是 B 型流感病毒 HA 基因唯一能够发生核苷酸插入、缺失和单个氨基酸替代的区域^[13]。该区域的变异有可能会改变病毒抗原特性,以及病毒和宿主的特异性。本次研究的毒株在此区域有 N165Y 的变异,如此密集的氨基酸替换位点有可能和其在该地区的流行呈正相关。这也被广泛认为是流感病毒长期保存而没有发现抗原漂移的原因^[14-15]。而替换氨基酸差异也可能就是形成不同株系的原因之一。190 环是流感病毒 HA 基因和受体结合的位点,194~196 位点是潜在糖基化位点^[16]。而云南分离株都有 D196N 的变异位点。据报道,病毒的糖基化是保持 HA 结构的稳定性,使之免于被水解或被体内的抗体识别。

本次研究的毒株 NA 基因也有部分改变,但没有发现耐药株,如 I221T、E105K、E117G、R150K、D197N、A245T、H273Y 等耐药位点的突变^[17]。根据岳秀芳等^[18]报道 NA 基因在 198、222、250、402 等位点基因突变可以降低神经氨酸酶抑制

剂的灵敏度。本研究中发现,云南分离株 NA 之间的差异不大,但和国际流行株 B/Bangladesh/5945/2009 相比, B/yunnananning/154/2012、B/yunnananning/191/2011、B/yunnanxishan/1718/2011,3 株在 198 位点上发生了和国内流行株 Hubei/Wujiagang/158/2009 相同的氨基酸变异。据报道两种毒株在同一个地区同一个地方同时流行传播,此时增加了不同病毒基因组之间的重配,从而导致新毒株产生的可能性,从 NA 和 HA 的进化树分支可以看出 2013 年的毒株发生了分歧,说明有了基因重组,也可能是这个原因造成的。

参考文献

- [1] Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, et al. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza B virus since 1983[J]. *Virology*, 1990, 175(1): 59-68.
- [2] Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al. Evolutionary pattern of the haemagglutinin of influenza B virus isolated in Japan: cocirculation lineages in the same epidemic season[J]. *J Virol*, 1990, 64(6): 2860-2865.
- [3] World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2003 influenza season[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2002, 77(41): 341-348.
- [4] Roy T, Agrawal AS, Mukherjee A, et al. Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006—2010 revealed co-circulation of Yamagata-like and Victoria-like strains in eastern India[J]. *Genet Evol*, 2011, 11(7): 1595-1601.
- [5] 黄维娟, 谭敏菊, 蓝雨, 等. 2011~2012 年度中国 B 型流感病毒病原学特征分析[J]. *病毒学报*, 2013, 29(1): 32-37.
- [6] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 三峡出版社, 1997: 28-58.
- [7] 崔大伟, 郑书发, 范剑, 等. 五重荧光定量 RT-PCR 法检测呼吸道病毒[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(5): 333-335.
- [8] Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(3): 66-70.

- [9] Myers JL, Hensley SE. Oseltamivir-resistant influenza viruses get by with a little help from permissive mutations[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9(4): 385-388.
- [10] Wang Q, Cheng F, Lu M, et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin[J]. *Virol*, 2012, 82(6): 3011-3020.
- [11] Lugovtsev VY, Vodeiko GM, Strupczewski CM, et al. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin[J]. *Virology*, 2007, 365(2): 315-323.
- [12] Wang Q, Cheng F, Lu M, et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin[J]. *Virology*, 2008, 82(6): 3011-3020.
- [13] McCullers JA, Wang GC, He S, et al. Reassortment and insertion deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature[J]. *Virol*, 1999, 73(9): 7343-7348.
- [14] Roy T, Agrawal AS, Mukherjee A, et al. Chawla-Sarkar, Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006—2010 revealed co-circulation of Yamagata-like and Victoria-like strains in eastern India[J]. *Genet Evol*, 2011, 11(7): 1595-1601.
- [15] Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, et al. Kawaoka, Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors[J]. *JAMA*, 2007, 297(13): 1435-1442.
- [16] Shen J, Kirk BD, Ma J, et al. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin[J]. *Med Virol*, 2009, 81(1): 114-124.
- [17] 邢晓会, 赵翔, 李希妍, 等. 全球 B 型流感病毒耐药相关突变株 NA 和 HA 序列特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(10): 946-954.
- [18] 岳秀芳, 夏咸柱, 于志军, 等. 两株 B 型流感病毒的基因组序列分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(3): 267-273.

(收稿日期: 2015-09-26 修回日期: 2015-12-15)

(上接第 919 页)

- [1] Diabetes Sci Technol, 2007, 1(2): 158-163.
- [2] 毕小云, 张莉萍. POCT 血糖仪使用现状调查分析[J]. *重庆医学*, 2011, 40(3): 256-258.
- [3] 谢杏仪, 何琨仪, 何思华, 等. 血糖仪比对试验及其质量管理的研究[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(2): 163-164.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构 POCT 血糖检测仪管理和临床操作规范(试行)[S]. 北京: 卫生部办公厅, 2010: 12.
- [5] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(16): 11-63.
- [6] 周玉宝, 刘芳, 武易, 等. POCT 检测现状与质量管理[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(21): 3003.

- [7] Burnett RW, D'Orazio P, Fogh-Audersden N, et al. IFCC recommendation on reporting results for blood glucose[J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 307(1/2): 205-209.
- [8] 中华检验医学杂志编辑委员会, 中华医学会检验分会. 首届中国 POCT 高峰论坛学术会议纪要[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(12): 1336-1338.
- [9] 解宏杰, 邱玲, 国秀芝, 等. 四种型号便携式血糖仪的准确度验证[J]. *现代检验医学杂志*, 2013, 28(2): 113-117.
- [10] 李家明, 周讯, 刘清梅, 等. 24 种型号便携式血糖仪的性能评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(2): 265-267.

(收稿日期: 2015-08-06 修回日期: 2015-12-25)