·论　著·

32 例甲型 H3N2 流感病毒感染严重急性呼吸道感染病例病毒全基因组分析*

潘　阳[1,2,3]，张　奕[1,2]，杨　鹏[1,2,3]，石伟先[1,2]，彭晓旻[1,2]，崔淑娟[1,2]，张代涛[1,2]，卢桂兰[1,2]，赵佳琛[1,2]，王全意[1,2,3△]
（1. 北京市疾病预防控制中心，北京 100013；2. 北京市预防医学研究中心，北京 100013；
3. 首都医科大学公共卫生学院，北京 100013）

摘　要：目的　了解北京地区严重急性呼吸道感染（SARI）病例中甲型流感病毒进化特征。**方法**　选择 2014－2016 年 SARI 病例分离 A（H3N2）亚型流感病毒毒株 32 株，提取病毒 RNA，使用 Ion Torrent PGM 二代测序仪进行了病毒全基因组测序。使用 Mega、Consurf 等软件对毒株各个基因进行了分子进化分析和分子特征分析。**结果**　18 株 2014－2015 年流行季毒株的血凝素（HA）基因属于 3C. 3a 分支，而 14 株 2015－2016 年流行季毒株 HA 基因属于 3C. 2a 分支。在 32 株测定株 HA 基因中共发现 7 个氨基酸位点变异，其中 2 个位于抗原决定簇。对神经氨酸酶基因和基质蛋白基因进行分析显示，所有的测定株均对 M2 离子通道抑制剂药物耐药，而对神经氨酸酶抑制剂药物敏感。**结论**　2014－2016 年 SARI 病例分离 A（H3N2）亚型毒株的基因特征与同时期北京地区流行株基本一致。两个流行季间出现了较为明显的抗原漂移，相对于同流行季疫苗株存在一定程度的变异。

关键词：甲型流感病毒；　疫苗；　基因组；　系统发生；　变异
DOI：10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 17. 013　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130（2017）17-2367-04

Whole-genome analysis for 32 influenza A（H3N2）viruses in severe acute respiratory infection cases*

PAN Yang[1,2,3], *ZHANG Yi*[1,2], *YANG Peng*[1,2,3], *SHI Weixian*[1,2],
PENG Xiaomin[1,2], *CUI Shujuan*[1,2], *ZHANG Daitao*[1,2], *LU Guilan*[1,2], *ZHAO Jiachen*[1,2], *WANG Quanyi*[1,2,3△]
（1. *Beijing Center for Disease Prevention and Control*, *Beijing* 100013, *China*; 2. *Research Centre for Preventive Medicine of Beijing*, *Beijing* 100013, *China*; 3. *Capital Medical University School of Public Health*, *Beijing* 100013, *China*）

Abstract: Objective　To investigate the genetic characteristic of whole-genome of influenza A/H3N2 viruses in severe acute respiratory infection cases in Beijing area. **Methods**　From 2014 to 2016, the viral RNA was extracted from 32 strains isolated from SARI cases, then sequenced by Ion Torrent PGM Sequencer. The phylogeny and molecular features of whole-genome were analyzed by Mega and Consurf software. **Results**　The HA gene of tested strains isolated in 2014－2015 influenza season belonged to lineage 3C. 3a and 3C. 2a, while those isolated in 2015－2016 influenza season belonged to cluster 3C. 2a. Moreover, compared with the vaccine strains, 7 variant amino acids of protein of HA1 were identified, and two of them were located in antigenic sites. All isolates were sensitive to neuraminidase inhibitors while showed resistance to blockers for M2 ion channel. **Conclusion**　The phylogenetic features of isolates studied in this study are similar with that of current circulating strains. However, the difference between isolates and vaccines should not be overlooked.

Key words: influenza A virus;　vaccine;　genome;　phylogenesis;　variation

甲型 H3N2［A（H3N2）］亚型流感是甲型流感的一种常见亚型，其季节性流行和大流行不仅导致了大量的门诊病例，同时导致了相当数量的重症病例，甚至引起患者死亡，产生了巨大的疾病负担[1-2]。甲型流感病毒是具有 8 个节段的单负链 RNA 病毒，其血凝素（HA）基因、神经氨酸酶（NA）基因和其他内部基因的适应性变异是产生病毒抗原漂移或抗原转换的内在原因[3]。因此有必要对流感病毒进行全基因组水平进化研究，揭示其进化变异规律。而目前的甲型流感病毒全基因组研究多聚焦于轻症病例分离毒株，对严重急性呼吸道感染（SARI）等重症病例分离株的病原基因特征仍存在欠缺。本研究即依托北京市 SARI 监测系统，对 32 例重症病例 A（H3N2）亚型流感病毒全基因组进行了测定分析，并将其与轻症毒株、流行株、疫苗株进行了比对研究。

1　材料与方法

1. 1　材料　对 2014 年 8 月至 2016 年 1 月北京市严重急性呼吸道感染监测系统发现的甲型 H3N2 流感病毒阳性患者样本使用 MDCK 细胞进行病毒分离。用豚鼠红细胞和国家流感中心下发流感病毒鉴定试剂盒进行血凝试验和血凝抑制试验。具有明显细胞病变，血凝滴度大于 16，抗 A（H3N2）血凝抑制效价（HI）≥20 且高于抗新 A（H1N1）、抗 B（Victoria 或 Yamagata）HI 效价 4 倍以上的毒株甲型流感病毒确认为 A（H3N2）亚型。分层随机选取 32 株 A（H3N2）亚型毒株作为本研究样本。

1. 2　仪器与试剂　病毒全基因组测序使用 Ion Torrent PGM 测序仪（美国 ABI 公司产）及配套试剂，依照操作规程完成。

1. 3　方法　病毒核酸提取使用 QIAmp viral mini kit 试剂盒（德国 QIAGEN 公司产）提取 140 μL 样本中的总 RNA，提取方法按试剂盒说明书进行，病毒 RNA 溶于 60 μL DEPC 水中，立即用于病毒全基因组序列测定。流感病毒全基因组扩增使用 PathAmp FluA 试剂盒（美国 ABI 公司产），按说明书进行。

*　**基金项目：**北京市自然科学基金资助项目（7152075）；首都卫生科研发展专项（2014-1-1011）。
作者简介：潘阳，男，助理研究员，主要从事呼吸道传染病病原学研究。　△　**通信作者**，E-mail：bjcdcxm@126. com。

对扩增后的全基因组 cDNA 依次使用 Ion Plus Fragment Library 试剂盒、Ion PGM Template OT2 200(美国 ABI 公司产)进行测序文库构建和扩增。随后使用 Ion Torrent PGM 测序仪和 Ion 316v2 芯片及配套试剂(美国 ABI 公司产)进行全基因组测定。

1.4 基因组数据分析　作为分析背景和分支标准的参比毒株序列通过 EpiFlu 数据库(http://platform.gisaid.org)获得,包括研究组先前通过北京市流感病原学监测网络分离的和网络数据库获取的 24 株 A(H3N2)流感病毒全基因组序列和 10 株 A(H3N2)流感病毒 HA、NA 基因序列。基因进化分析使用 MEGA(ver.6.0.5)软件完成。参数设置为选用邻-接法,Bootstrap 验证为 1 000 个循环[4]。HA1 蛋白抗原决定簇保守分数通过 Consurf 软件进行计算,参数选择 Max. Likelihood(ML)方法和 JTT 模型[5]。糖基化位点(PGSs)分析使用 Center for Biological Sequence NetNGlyc 1.0 server(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)服务器完成。

2　结　　果

2.1 分离株患者的流行病学特征　本研究分离测定的 32 株 A(H3N2)流感毒株来源病例的基本临床信息见表 1。研究纳入病例的男女比例相当,0～<5 岁、5～<15 岁、15～<65 岁和≥65 岁在全部病例中的构成比分别为 18.75%、15.63%、25.00%和 40.63%。在慢性基础病方面,所有 32 例病例中有 6 例患有慢性心血管疾病(高血压),2 例患有代谢性疾病(2 型糖尿病),慢性基础病病例全部为 65 岁以上患者。

表 1　32 例甲型 H3N2 流感病毒感染严重急性呼吸道感染病例临床信息

项目	0～<5 岁(*n*)	5～<15 岁(*n*)	15～<65 岁(*n*)	≥65 岁(*n*)	合计[*n*(%)]
性别					
男	4	3	3	7	17(53.12)
女	2	2	5	6	15(46.87)
本流行季流感疫苗接种	1	1	0	3	5(15.62)
临床体征					
发热	6	5	8	13	32(100.00)
咳嗽	6	5	8	13	32(100.00)
咽喉肿痛	2	4	2	8	16(50.00)
呼吸困难	1	1	0	5	7(21.87)
临床治疗					
抗病毒药物	0	0	0	2	2(6.25)
抗菌药物	6	5	6	12	29(90.63)
糖皮质激素	0	0	0	3	3(9.38)
预后结局					
治愈	3	2	2	2	28(87.50)
好转	0	0	0	2	3(9.37)
未愈	0	0	0	0	0(0.00)
死亡	0	0	0	1	1(3.13)

2.2 基因进化分析　对全部 32 株测定毒株进行 HA 基因进化分析显示,同一流行季内所有毒株间的相似度较高(核苷酸相似度为 99.12%～99.75%,氨基酸相似度为 98.81%～99.52%)。18 株 2014－2015 年流行季毒株的 HA 基因属于 3C.3a 分支,不同于 2014－2015 年流行季北半球疫苗株 A/Texas/50/2012(3C.1 分支),而与 2015－2016 年流行季北半球疫苗株 A/Switzerland/9715293/2013(3C.3a 分支)较为接近。14 株 2015－2016 年流行季毒株 HA 基因属于 3C.2a 分支,与同一流行季疫苗株 A/Switzerland/9715293/2013(3C.3a 分支)属于不同分支,具有一定差异。对 NA 和 PB2 等其他 6 个内部基因进行进化分析显示,测定株之间核苷酸和氨基酸同样存在高度相似的现象,即测定株在进化上属于同一起源,且与 A/Switzerland/9715293/2013 疫苗株较为接近见图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。

2.3 核苷酸变异分析　测定毒株的 HA1 蛋白与两个流行季疫苗株比较,共有 7 个氨基酸位点发生变异。其中 1 个位点位于 A 抗原决定簇突出环,1 个位于 B 抗原决定簇主环,另外 5 个位于 HA1 蛋白骨架区(表 2)。四个抗原决定簇的平均保守分数均小于 1,提示在这些区域内的变异频率仍处于较低水平。

表 2　A(H3N2)流感病毒测定株 HA1 区氨基酸变异情况

抗原表位	位点	2014－2015 年疫苗株表型*	2015－2016 年疫苗株表型**	测定株表型	突变频率[*n*(%)]	平均保守分数
A	133－137	TLEFN	TLEFN	－	－	0.04
	140－146	SFNW NGV	SFNW AGV	NFNW AGV/SFNW AGV	3(9.38)/29(90.62)	
B	156－160	IR RSN	RR GSN	VR GSN/IR GSN	8(25.00)/24(75.00)	0.10
	187－198	NEQFDKLYIWGV	NEQFDKLYIWGV	－	－	
C	52－54	VTN	VTN	－	－	－0.11

续表 2　A(H3N2)流感病毒测定株 HA1 区氨基酸变异情况

抗原表位	位点	2014－2015 年疫苗株表型*	2015－2016 年疫苗株表型**	测定株表型	突变频率[n(%)]	平均保守分数
	275	F	F	－	－	
	278	S	S	－	－	
D	207	Q	Q	－	－	0.04
	172－174	HLN	HLN	－	－	
E	63	S	S	－	－	0.05
	78	E	K	K	32(100.00)	
	81	T	T	－	－	
	83	I	I	－	－	
非抗原决定簇	138	N	N	S	1(3.13)	－
	202	G	V	G	32(100.00)	
	214	S	S	P/S	1(3.13)/31(96.87)	
	228	A	A	S/A	15(46.88)/17(53.12)	
	305	P	P	S/P	1(3.13)/31(96.87)	

注：* 疫苗株为 A/Texas/50/2012，** 疫苗株为 A/Switzerland/9715293/2013，氨基酸变异位点用下划线标出；－表示无数据。

2.4　核苷酸糖基化及基因耐药分析　在 32 株测定株中共发现了 10 个糖基化位点，分别为 24NSTA、38NGTI、61NSSI、79NCTL、142NWTG、149NGTS、181NVTM、262NSTG、301NGSI 和 499NGTY。上述糖基化位点均已得到证实，且未发现因氨基酸突变产生的新糖基化位点。对测定株的位于 M 基因的 S31N、V27A 等 M2 离子通道抑制剂耐药位点进行分析，全部毒株均发现了 S31N 突变，提示其对金刚烷胺类药物耐药。而测定株 NA 基因中未发现 R292K、I222R/K/V、I117V 等神经氨酸酶抑制剂耐药突变，提示其对达菲类药物敏感。

3　讨　论

北京地区严重急性呼吸道感染检测系统自 2014 年 8 月起正式运行。自运行开始至 2015 年 4 月，共监测到病例 8 952 例，其中采样检测 5 616 例。检测结果显示，388 例(6.91%)为 A(H3N2)阳性，高于 A(H1N1 09pdm)阳性(71 例，1.26%)、B 型 Victoria 系阳性(48 例，0.85%)和 B 型 Yamagata 系阳性(193 例，3.44%)数，反映了 A(H3N2)亚型流感病毒感染在 2014－2016 年两个流行季中的主导地位。而在所确诊的 A(H3N2)病毒感染 SARI 患者中，0～<5 岁、5～<15 岁、15～<65 岁和≥65 岁以上年龄组所占构成比分别约为 15%、15%、25%和 45%，提示老年人对该亚型病毒易感。根据上述构成比，随机选取了 32 株分离株，对其进行了全基因组分析。

本研究测定分析的 32 株 SARI 病例 A(H3N2)中未发现内部基因的重配现象。所有测定株的各基因在进化结构上成簇聚集，且具有相同的邻接关系。这说明北京地区该亚型病毒的进化来源比较单一，或基因重配严重改变了各节段的功能相关性，重配病毒适应性较低而难以持续循环[6]。

甲型流感病毒的抗原漂移和抗原转换多由 HA1 基因的变异引起[3]。本研究计算得到的 A(H3N2)毒株的 HA1 基因进化树与目前国内外相关报道一致，呈现多侧枝“仙人掌”样的进化结构[7]。这体现了 A(H3N2)亚型病毒在人群中广泛传播进而承受了较高的宿主免疫选择压力从而不断变异进化的特点。具体比较本研究测定的 SARI 患者分离毒株和北京地区流感病原学监测系统分离得到的毒株(后者由流感样病例患者分离获得)发现，两类毒株的序列相似度较高，且进化上高度接近。此结果一方面说明流感样病例等轻症患者与 SARI 病例等重症患者所感染的流感病毒在病原学上比较差异无统计学意义($P>0.05$)，即尚不存在证据表明可能存在导致重症感染的病毒亚型/分支或变异。另一方面，所有测定毒株 HA 基因均位于同一或邻近进化分支，体现了目前北京地区的流行株具有同一进化起源，基因多样性较低。研究组先前针对流感样病例分离株开展的 5 年期进化研究也获得了同样的结论[8]。而广东地区开展的类似研究则发现了较为明显的多个分支 A(H3N2)亚型病毒共同循环的特征[9]。这一差异部分验证了 Rambaut 等[10]的研究，即 A(H3N2)等季节性流感的病毒“储备库”位于东南亚和南亚等热带地区，在流行季来临时，变异或重组产生的新病毒从赤道热带地区向温带地区迁移。

流感疫苗是目前对抗流感流行的最有力武器[11]。而流感疫苗的效果与疫苗株和流行株的匹配程度密切相关[12]。值得注意的是，本研究测定的 18 株 2014－2015 年流行季毒株均属于 3C.3a 分支，与 2014－2015 年流行季北半球 A(H3N2)亚型疫苗株(A/Texas/50/2012)具有一定差异，提示可能 VE 较低。本研究组在同期数据分析中也发现 A(H3N2)亚型流感阳性 SARI 患者的疫苗接种率与流感阴性 SARI 患者的疫苗接种率没有显著性差异[13]。因此 2014－2015 年流行季 A(H3N2)亚型疫苗确实可能因匹配性不佳导致了 VE 降低。而在 2015 年春季以后，北京地区的流感流行株逐渐转换为 3C.2a 分支。研究表明，该分支与此前的 3C.3a 分支毒株相比，出现了 A138T、R142G、F159S 等抗原决定簇位点突变[14]。由于世界卫生组织(WHO)选定 A/Switzerland/9715293/2013 作为 2014－2015 年流行季北半球 A(H3N2)亚型疫苗株，2015－2016 年流行季再次出现了疫苗株与北京地区流行株分属不同分支的情况。Hammond 等[15]认为 3C.2a 分支流行株对 A/Switzerland/9715293/2013 疫苗株抗血清反应性良好，两者抗原性接近，而 Haveri 等[16]的研究发现 3C.3a 分支疫苗对 3C.2a 分支病毒感染的保护效果不佳。因此，2015－2016 年流行季 H3 亚型疫苗效果还有待更多后续研究。

本研究存在一定的局限性。最主要的问题在于样本分析例数较少。因此在结果分析中涵盖了全基因组测序数据和基因片段数据、SARI 病例病毒株和前期完成的流感样病例病毒株进行综合分析，以达到全面准确的目的。同时由于 SARI 监测在北京全面开展的时间较短，目前尚无 3 个流行季以上的长期 SARI 病例毒株基因数据。这方面的回顾性基因变异研究将是未来研究的一个方向，可为揭示不同类型患者中流感病毒的基因演变规律提供更多的基础数据。

参考文献

[1] Fowlkes A, Steffens A, Temte J, et al. Incidence of medically attended influenza during pandemic and post-pandemic seasons through the Influenza Incidence Surveillance Project, 2009-13[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(9): 709-718.

[2] 冯录召,余宏杰,杨维中. 流感大流行的疾病负担和经济影响研究进展[J]. 中华流行病学杂志,2007,28(4):405-407.

[3] 韩卫宁,许元根. 甲型流感病毒与免疫[J]. 国际病毒学杂志,2007,14(5):153-157.

[4] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.

[5] Glaser F, Pupko T, Paz I, et al. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information[J]. Bioinformatics, 2003, 19(1): 163-164.

[6] Nelson MI, Edelman L, Spiro DJ, et al. Molecular epidemiology of A/H3N2 and A/H1N1 influenza virus during a single epidemic season in the United States[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(8): 1000133.

[7] Eshaghi A, Duvvuri VR, Li A, et al. Genetic characterization of seasonal influenza A(H3N2) viruses in Ontario during 2010－2011 influenza season: high prevalence of mutations at antigenic sites[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2014, 8(2): 250-257.

[8] Pan Y, Shi W, Yang P, et al. Genetic variation in the hemagglutinin of A(H1N1) 09pdm and A(H3N2) influenza viruses in the Beijing area from 2009 to 2014[J]. Clin Lab, 2015, 61(3/4): 289-297.

[9] Zhong J, Liang L, Huang P, et al. Genetic mutations in influenza H3N2 viruses from a 2012 epidemic in Southern China[J]. Virol J, 2013, 10(1): 345.

[10] Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, et al. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus[J]. Nature, 2008, 453(7195): 615-619.

[11] 邵惠训. 流感疫苗的现状与未来[J]. 国际病毒学杂志,2010,17(4):110-115.

[12] 张莉,杨鹏,张代涛,等. 2010－2011 年北京市四次甲型 H1N1 流感病毒抗体水平动态变化分析[J]. 国际病毒学杂志,2011,18(6):191-192.

[13] 张奕,潘阳,杨鹏,等. 2014－2015 年北京市流行性感冒流行季严重急性呼吸道感染病例的临床特征及发生不良结局的危险因素分析[J]. 疾病监测,2015,30(12):1028-1032.

[14] Broberg E, Snacken R, Adlhoch C, et al. Start of the 2014/15 influenza season in Europe: drifted influenza A (H3N2) viruses circulate as dominant subtype[J]. Euro Surveill, 2015, 20(4): 124-125.

[15] Hammond A, Gusbi N, Sosa P, et al. Review of the 2014－2015 influenza season in the northern hemisphere[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2015, 90(23): 281-296.

[16] Haveri A, Ikonen N, Julkunen I, et al. Reduced cross-protection against influenza A(H3N2) subgroup 3C.2a and 3C.3a viruses among healthcare workers vaccinated with 2013/14 seasonal influenza vaccine[J]. Euro Surveill, 2015, 20(5): 21028.

(收稿日期:2017-02-04　修回日期:2017-04-04)

(上接第 2366 页)

肺炎诊断中灵敏度较高,因此,以上几个项目可作为喘息性肺炎诊断的可靠指标。

综上所述,喘息性肺炎患儿感染后,病原体及其代谢产物使机体出现免疫功能紊乱,早诊断早治疗,能够及时纠正免疫失衡,减少哮喘的发生,因此,检测 T 淋巴细胞亚群和自然杀伤细胞可作为诊断和了解病情的重要指标。

参考文献

[1] 柴少卿,季伟. 喘息性肺炎患儿外周血中共刺激分子 CD28 及淋巴细胞亚群的变化[J]. 内蒙古医学杂志,2010,42(12):1425-1428.

[2] 冯英,罗征秀,符州,等. 社区获得性肺炎婴幼儿喘息与病原体检出关系分析[J]. 临床儿科杂志,2013,31(11):1042-1045.

[3] 王旭艳. 喘息与社区获得性肺炎患儿病原体关系研究[J]. 陕西医学杂志,2015,44(1):15-17.

[4] 龙思琪,马莉,陈敏,等. 婴幼儿重症和非重症肺炎淋巴细胞亚群的差异分析[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(3):401-404.

[5] 朱晓华,陈强,柯江维,等. 支气管肺炎患儿免疫功能变化的临床分析[J]. 中国当代儿科杂志,2013,15(3):175-178.

[6] 曲辉,曲艳,任立红. 呼吸道感染后慢性咳嗽儿童免疫功能的研究[J]. 中国医师进修杂志,2012,35(22):61-62.

[7] Thaver D, Zaidi AK. Burden of neonatal infections in developing countries a review of evidence from Community-Based studies[J]. Ped Infec Dis, 2009, 28(1): 3-9.

[8] 黄赛虎,华军. 小儿乙型流感病毒肺炎免疫特点分析[J]. 儿科药学杂志,2014,20(11):20-22.

[9] 罗柳. 肺炎支原体感染伴喘息患儿免疫功能变化的研究[J]. 中国现代医药杂志,2013,15(6):36-38.

(收稿日期:2017-03-02　修回日期:2017-05-01)