

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.11.1215

· 论 著 ·

成都某部一起感染 Yamagata 系乙型流感病毒血凝素基因分析

刘媛¹, 王文博², 何怡蓓³, 邹自英¹, 朱紫衣¹, 熊杰^{1*}

1. 西部战区总医院检验科, 成都 610083

2. 西部战区疾病预防控制中心, 成都 610021

3. 成都中医药大学医学技术学院, 成都 610075

[摘要] **目的** 分析成都某部感染乙型流感病毒遗传进化与血凝素(HA)基因突变位点。**方法** 通过犬肾上皮细胞(MDCK细胞)体外分离患者咽拭子标本流感病毒毒株,用PCR获取乙型流感病毒HA基因并测序,与NCBI数据库在线比对并利用MEGA 6.06软件构建系统发育进化树,分析突变位点。**结果** 通过MDCK细胞接种,分离出1株乙型流感病毒株,以感染病例咽拭子核酸及分离毒株的核酸为模板进行PCR扩增得到1 755 bp全长HA基因,获得的序列提交至GenBank数据库,获得基因登录号为MH236281。通过在线比对及系统发育树构建,该病例感染的病毒为Yamagata系乙型流感病毒。与乙型流感病毒Yamagata系的代表毒株Influenza B/Yamagata/16/88(GenBank No. M36105)相比,HA基因点突变碱基为57个;与世界卫生组织(WHO)推荐的疫苗株Influenza B/Utah/08/2014(GenBank No. KU592766)相比,突变碱基数为20个。进一步对HA1氨基酸突变位点进行分析,与四川地区往年流行株相比均发生了不同程度的突变,其中与2010年四川温江的分离株(GenBank No. KP461138)相比突变位点较少,仅有4处点突变;与WHO推荐的疫苗株Influenza B/Utah/08/2014相比,有2个氨基酸位点发生了变异,分别为L176Q和M255V,但突变没有处于HA1上的抗原决定簇区域。其中176位点是一个全新的突变,以往四川流行毒株、Yamagata系的代表毒株Influenza B/Yamagata/16/88及WHO推荐的疫苗株Influenza B/Utah/08/2014的HA1 176位点均为亮氨酸(L),而本研究病例感染的乙型流感毒株HA1 176位点突变为谷氨酰胺(Q)。**结论** 成都地区驻地部队2017—2018流行季感染的乙型流感病毒HA基因已发生一些突变,但突变尚未造成抗原性的改变。

[关键词] 流感病毒属B型;血凝素;突变;系统发育树

[中图分类号] R 737.13

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2019)11-1215-08

Hemagglutinin genetic analysis of a Yamagata influenza B virus infected in a military camp in Chengdu

LIU Yuan¹, WANG Wen-bo², HE Yi-bei³, ZOU Zi-ying¹, ZHU Zi-yi¹, XIONG Jie^{1*}

1. Department of Clinical Laboratory, The General Hospital of Western Theater Command of PLA, Chengdu 610083, Sichuan, China

2. Center for Disease Control and Prevention of Western Theater Command of PLA, Chengdu 610021, Sichuan, China

3. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To analyze the genetic evolution and hemagglutinin (HA) gene mutation sites of influenza B virus in Chengdu. **Methods** Influenza virus was isolated from patient's throat swab samples using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells *in vitro*. The HA gene of influenza B virus was obtained by PCR and was sequenced. The phylogenetic tree was constructed and mutation sites were analyzed by online comparison with NCBI database and MEGA 6.06 software. **Results** One strain of influenza B virus was isolated by MDCK cells, and 1 755 bp full-length HA gene was obtained by PCR amplification using the nucleic acids of the throat swab and the isolated strain as templates. The obtained sequence was submitted to the GenBank database, and the gene accession number was MH236281. By online alignment and phylogenetic tree construction, the virus infected in this case was confirmed to be Yamagata type B influenza virus. There were 57 HA point mutation bases as compared with Influenza B/Yamagata/16/88 (GenBank No. M36105). There were 20 mutated bases in HA as compared with the World Health Organization (WHO)-recommended vaccine strain Influenza B/Utah/08/2014 (GenBank No. KU592766). HA1 amino acid mutation site was further analyzed. Compared with the epidemic strains in

[收稿日期] 2018-05-22

[接受日期] 2018-07-14

[基金项目] 中国博士后科学基金(2018T111157, 2017M613427). Supported by China Postdoctoral Science Foundation (2018T111157, 2017M613427).

[作者简介] 刘媛, 博士, 主治医师. E-mail: liuyuan198231@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 028-86570510, E-mail: xiongjie1969@126.com

Sichuan in recent years, HA1 amino acid sites have undergone varying degrees of mutations, of which there were only 4 point mutations compared with Wenjiang/2010 isolate (GenBank No. KP461138). Compared with the WHO-recommended vaccine strain Influenza B/Utah/08/2014, two amino acid sites mutated (L176Q and M255V), but the mutation was not located in the antigenic determinant region of HA1. Among them, site 176 was a new mutation. The amino acid was leucine (L) at site 176 of HA1 epidemic strains in Sichuan, Influenza B/Yamagata/16/88, and the WHO-recommended vaccine strain Influenza B/Utah/08/2014, whereas the amino acid was glutamine (Q) in the influenza B strain isolated in this study.

Conclusion Mutations have occurred in the *HA* gene of influenza B virus infected in Chengdu during 2017—2018, while these mutations have not yet caused antigenic changes.

[Key words] influenza virus B; hemagglutinin; mutation; phylogenetic tree

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(11): 1215-1222]

2017 年冬季至 2018 年春季, 我国南北方均进入流感冬季流行高峰季节, 该流行季期间医院报告的门诊急诊流感样病例比例高于之前 3 年同期水平, 流感病毒检测阳性率达往年高峰水平, 特别是乙型流感病毒 (influenza B virus, FluB) 在流感流行季造成了严重危害^[1]。乙型流感病毒是一种季节性流感病毒, 分为 Yamagata 系 (BY 系) 和 Victoria 系 (BV 系) 2 个谱系, 代表毒株分别为 Influenza B/Yamagata/16/88 (GenBank No. M36105) 和 Influenza B/Victoria/2/87 (GenBank No. M58428)^[2]。根据中国国家流感中心网站信息显示, 当前我国流行的乙型流感病毒以 Yamagata 系为主^[3]。

乙型流感病毒感染症状有发热、畏寒、咽痛伴头痛等上呼吸道感染症状^[4], 在抵抗力较差的老年人和低龄儿童中易造成肌体损伤、肺炎等^[5]。目前我国的流感疫苗为三联苗, 组分包括甲型 H1、甲型 H3 和乙型 Victoria 系 3 个毒株, 不含乙型 Yamagata 系毒株^[6]。鉴于上一个流感流行季乙型流感病毒的严重危害, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 在发布的北半球 2018—2019 年度季节性流感疫苗推荐组分中优先推荐四价流感疫苗组分, 相比往年的三价流感疫苗, 新增了乙型 Yamagata 系 B/Phuket/3073/2013 类似毒株^[7]。

血凝素 (hemagglutinin, HA) 是流感病毒表面的一种糖蛋白, 负责使病毒与宿主细胞膜上的唾液酸受体结合, 同时也是诱导机体产生中和抗体的重要靶标, HA 的变异可引起流感病毒抗原性改变, 从而逃避宿主免疫^[8], 对其基因序列的持续监测也是各个国家流感监测的主要任务。本研究拟对 2017 年冬季流感流行期驻成都某部一起乙型流感感染疫情的毒株序列进行测定, 并对其 *HA* 基因关

键位点进行分析, 以揭示成都地区乙型流感病毒的变异特点, 为今后该地区部队疫情防控提供指导。

1 材料和方法

1.1 试剂 PureLink™ 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 引物、反转录 Goldenstar™ RT6 cDNA 合成试剂盒、高保真 DNA 聚合酶 I5-MIX 购自成都擎科梓熙生物技术有限公司; FastKing 一步法 qRT-PCR 试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 乙型流感病毒核蛋白单克隆抗体 (B017) 购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; FITC 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (immunoglobulin, IgG) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 生化试剂及耗材购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 病例及咽拭子标本 咽拭子标本采集于西部战区总医院呼吸道感染病例, 男性, 26 岁, 为驻成都某部战士, 发热 3 d, 伴有咳嗽、咽痛等症状, 于 2017 年 11 月 23 日收治入院。入院后血常规及生物化学指标检测显示白细胞计数 ($4.97 \times 10^9/L$) 无显著升高, 淋巴细胞比例 (0.497) 升高, 超敏 C-反应蛋白 (4.28 mg/L) 处在正常值范围。采集咽拭子标本, 编号 20171123, 用 PureLink™ 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒提取病毒核酸, 具体操作参照说明书进行, 经 qRT-PCR 检测筛查呼吸道感染病毒, 结果显示为乙型流感病毒。

1.3 呼吸道病毒 qRT-PCR 检测 以咽拭子提取的病毒核酸为模板, 采用 qRT-PCR 方法检测甲型流感病毒 (influenza A virus, FluA)、乙型流感病毒和人腺病毒 (human adenovirus, HAdV)。反

应条件: 42 °C 20 min; 95 °C 1 min; 94 °C 5 s, 55 °C 10 s, 72 °C 11 s, 40 个循环。所用引物和探针序列: *FluA*-F 为 5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3', *FluA*-R 为 5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA CG-3', *FluA*-probe 为 5'-FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ1-3'; *FluB*-F 为 5'-TCC TCA ACT CAC TCT TCG AGC G-3', *FluB*-R 为 5'-CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG-3', *FluB*-probe 为 5'-FAM-CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG-BHQ1-3'; *HAdV*-F 为 5'-TTT GAG GTY GAY CCC ATG GA-3', *HAdV*-R 为 5'-AGA ASG GTG TRC GCA GGT A-3', *HAdV*-probe 为 5'-FAM-ACC ACG TCG AAR ACT TCG AA-BHQ1-3'。

1.4 病原分离 将犬肾上皮细胞 (Madin-Darby canine kidney cell, MDCK 细胞; 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库) 接种于 6 孔板, 密度为 1×10^8 个/孔, 用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基于 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h。第 2 天先无菌化处理咽拭子标本, 在 1 000 μ L 咽拭子标本中加入 20 μ L 双抗, 4 °C 条件下孵育 2 h; 细胞用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗 3 遍, 将处理好的咽拭子标本加到细胞上, 35 °C 孵箱吸附 2 h; 更换为 2 mL 病毒生长液 (0.2% BSA、1% 青/链霉素、25 mmol/L HEPES、2 μ g/mL TPCK-胰酶); 35 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 持续观察细胞病变。待 80% 细胞产生病变时, 收集上清, 分装保存于一 80 °C 冰箱。

1.5 免疫荧光检测 将 MDCK 细胞接种于 96 孔板, 密度为 1.5×10^4 个/孔, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h; 接种分离的毒株, 感染剂量设置 10 倍倍比梯度稀释, 感染后 24 h 弃上清, PBS 洗 1 次, 加甲醇 100 μ L/孔, -20 °C 固定 20 min; PBS 洗 1 次, 加 3% BSA 100 μ L/孔, 室温封闭 2 h; PBS 洗 1 次, 将一抗 (乙型流感病毒核蛋白单克隆抗体) 用 1% BSA 进行 1:1 000 比例稀释, 加稀释后的一抗 100 μ L/孔, 室温孵育 2 h; PBS 洗 3 次, 加稀释后的二抗 (FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG, 1:200 比例稀释) 100 μ L/孔, 室温避光孵育 30 min; PBS 洗 2 次, 荧光显微镜下观察拍照。

1.6 *HA* 全长基因 PCR 扩增 提取感染病例咽拭子及其分离毒株的核酸, 采用反转录试剂盒制备 cDNA, 操作按照试剂盒说明书进行。采用高保真酶 PCR 反应扩增乙型流感病毒 *HA* 基因。反应体系: IS-MIX 25 μ L, 上游引物 *FluB HA-F* 1 μ L, 下游引物 *FluB HA-R* 1 μ L, 无菌纯水 21 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 混匀。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。引物序列为 *FluB HA-F*: 5'-ATG AAG GCA ATA ATT GTA C-3', *FluB HA-R*: 5'-TTA TAG ACA GAT GGA GCA TGAAAC-3', 产物长度为 1 755 bp。PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳判断结果, 由成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

1.7 *HA* 基因序列分析 将获得的 *HA* 基因序列通过美国国家生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 在线 BLAST 系统 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行分析, 下载 GenBank 数据库中与之相近的序列, 通过 DNAMAN 和 MEGA 6.06 软件对其序列进行比对, 分析此次感染的乙型流感病毒 *HA* 基因的突变特点。

1.8 系统发育进化树构建 从 GenBank 数据库下载乙型流感病毒 *HA* 基因序列, 采用邻位相连法 (neighbor-joining) 构建系统发育进化树, 通过自举分析 (bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集为 1 000 次, 构建系统发育进化树。

2 结 果

2.1 呼吸道病毒检测及病原分离 对咽拭子核酸进行常见的呼吸道病原体 qRT-PCR 检测, 结果如图 1 所示, 甲型流感病毒和人腺病毒通用引物均未出现扩增曲线, 而乙型流感病毒出现扩增曲线, 初步提示该病例感染的病原体为乙型流感病毒。为进一步确证, 采用 MDCK 细胞对咽拭子进行病原分离。咽拭子接种 3 d 后细胞出现明显病变效应, 接种 4 d 后 90% 的细胞死亡, 对照组细胞生长状态良好 (图 2)。收集细胞上清, 进行梯度稀释, 感染 MDCK 细胞后 24 h 通过免疫荧光检测细胞内乙型流感病毒核蛋白表达情况, 在感染的细胞内可检测到大量乙型流感病毒核蛋白的表达, 分离的病毒在稀释 1 000 倍时仍能感染较多细胞 (图 3)。

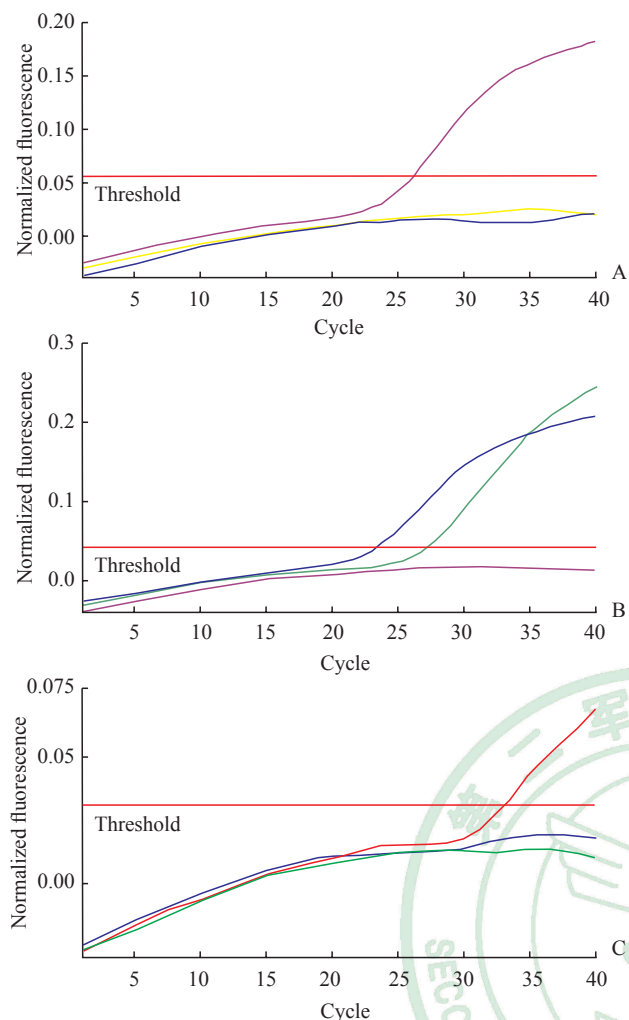


图 1 咽拭子中呼吸道病原体的 qRT-PCR 检测

Fig 1 qRT-PCR detection of respiratory pathogens in throat swabs

A: Influenza A virus; B: Influenza B virus; C: Human adenovirus

以感染病例咽拭子和分离毒株提取的病毒核酸为模板, 均可扩增出大小为 1 755 bp 的目的片段 (图 4), 二者测序序列一致, 提交至 GenBank 数据库, 获得 GenBank 登录号为 MH236281。

2.2 乙型流感病毒 HA 基因系统发育进化树 利用 HA 基因核酸序列构建系统发育进化树, 结果如图 5 所示, 本研究感染病例 HA 基因 (GenBank No. MH236281) 与 Yamagata 系的代表毒株 Influenza B/Yamagata/16/88 (GenBank No. M36105) 处在相同的进化分支上, 而与 Victoria 系的代表毒株 Influenza B/Victoria/2/87 (GenBank No. M58428) 处在不同分支上, 说明此次感染的乙型流感病毒为 Yamagata 系。

2.3 基因变异位点分析 为进一步分析此次感染的 Yamagata 系毒株 HA 基因的变异特点, 利用 MEGA 6.06 软件比对往年四川分离株及 WHO 推荐的疫苗株 HA 核酸序列的差异, 结果如表 1 所示。Influenza B/Utah/08/2014 (GenBank No. KU592766) 为 WHO 推荐的北半球乙型流感病毒代表毒株之一, 病例 HA 基因与之相比, 发生了 20 个碱基的点突变; 与 Yamagata 系的代表毒株 Influenza B/Yamagata/16/88 (GenBank No. M36105) 相比, 点突变碱基达到 57 个; 与 1992 年和 1999 年四川地区流行的乙型流感毒株相比, 均发生了较多位点的碱基突变; 与 2010 年四川温江的分离株相比, 有 17 个碱基发生突变, 说明此次分离的毒株已发生多处碱基突变。

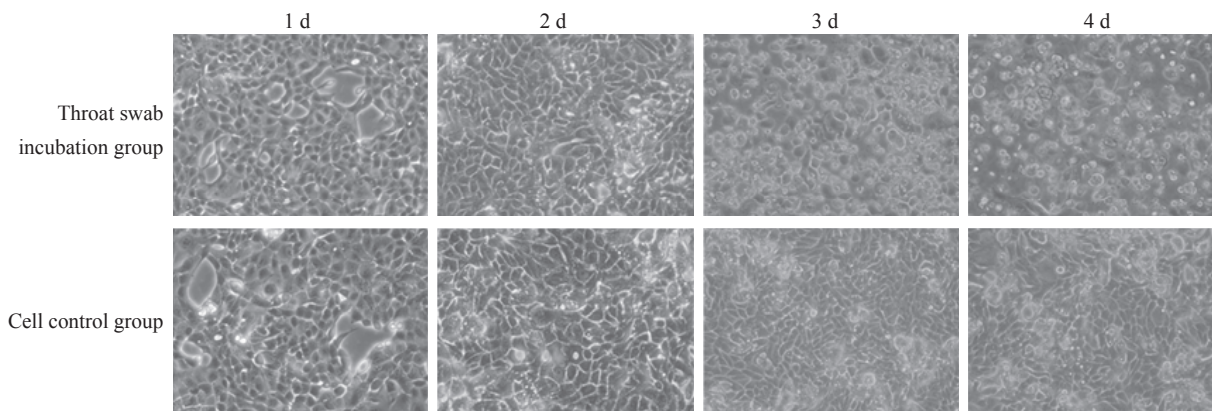


图 2 乙型流感病毒的分离培养

Fig 2 Isolation and incubation of influenza B virus

Original magnification: $\times 100$

进一步对其 HA1 的氨基酸序列进行比对, 结果如表 2 所示。与四川地区往年流行株相比均发生

了不同程度的突变, 其中与 2010 年四川温江的分离株相比突变位点较少, 仅有 4 处点突变。

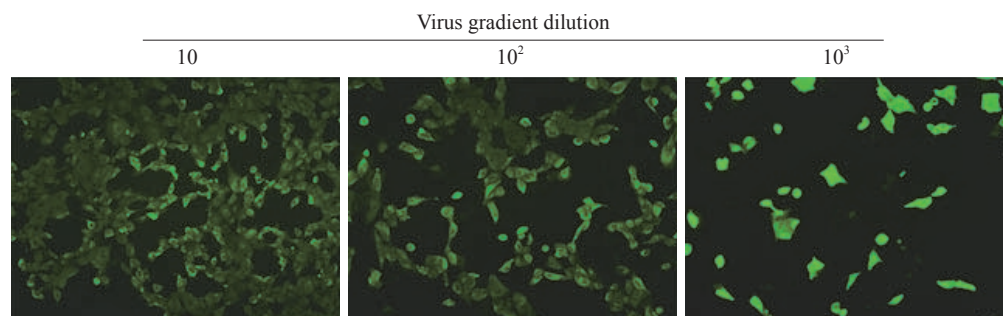


图 3 免疫荧光检测乙型流感病毒感染的 MDCK 细胞内核蛋白表达

Fig 3 Immunofluorescence detection of nucleoprotein expression in MDCK cells infected with influenza B virus

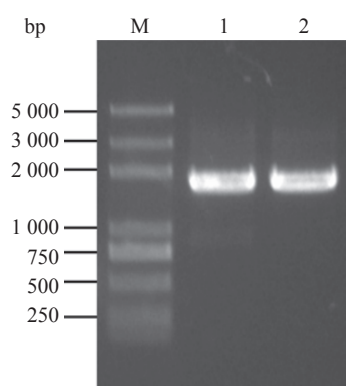
MDCK: Madin-Darby canine kidney. Original magnification: $\times 100$ 

图 4 乙型流感病毒 HA 基因 PCR 产物电泳图

Fig 4 Electrophoresis of PCR product of the influenza B HA gene

HA: Hemagglutinin; M: Marker; 1: Throat swab nucleic acid as template; 2: Isolated virus strain nucleic acid as template

与 WHO 推荐的疫苗株 Influenza B/Utah/08/2014 (GenBank No. KU592766) 相比, 有 2 个氨基酸位点发生了变异, 分别为 L176Q 和 M255V, 这 2 个位点均不在乙型流感病毒 HA1 上的抗原决定簇区域内。值得一提的是, HA1 的 176 位点是一个全新的突变, 以往四川流行毒株、Yamagata 系的代表毒株 Influenza B/Yamagata/16/88 (GenBank No.M36105) 及 WHO 推荐的疫苗株 Influenza B/Utah/08/2014 (GenBank No. KU592766) 的 HA1 176 位点均为亮氨酸 (leucine, L), 而本研究病例感染的乙型流感毒株 HA1 176 位点突变为谷氨酰胺 (glutamine, Q), 其突变意义仍有待深入研究。

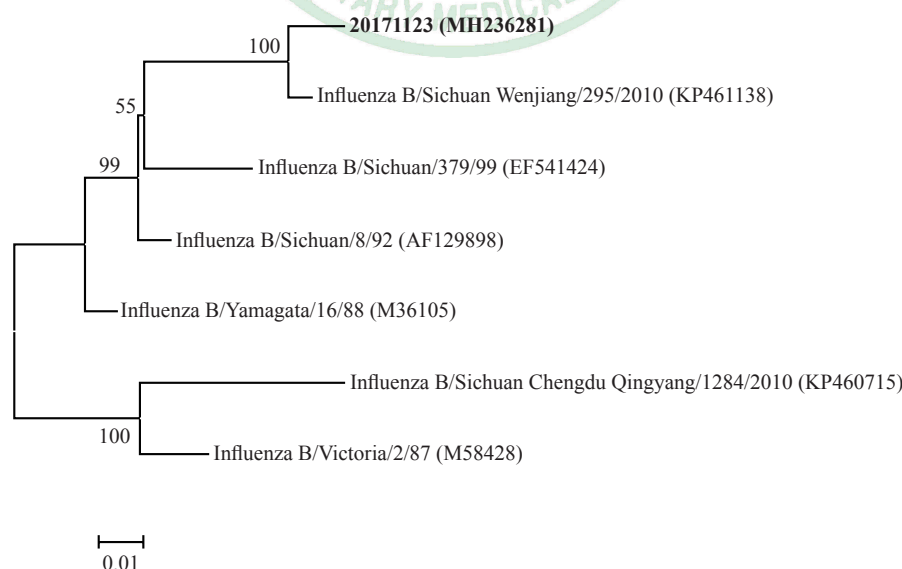


图 5 基于 HA 基因的系统发育进化树

Fig 5 Phylogenetic evolutionary tree based on the HA gene

The 20171123 (MH236281) is the sequence obtained in this study. The numbers in parentheses indicate the accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.01 sequence divergence. HA: Hemagglutinin

表1 乙型流感病毒代表毒株 HA 全长基因核苷酸序列变异位点

Tab 1 Variation sites of influenza B virus HA full-length gene nucleotide sequences

Site	Virus strain						Site	Virus strain					
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
76	T	•	•	G	•	•	637	T	•	•	•	•	C
128	G	•	A	•	•	•	640	C	•	•	•	T	•
121	C	•	T	•	•	•	644	A	•	G	•	•	•
127	G	•	•	A	•	•	645	C	•	•	•	A	•
133	C	•	T	T	T	•	655	G	•	A	A	A	•
135	T	•	•	C	•	•	657	G	•	A	A	A	•
167	T	•	C	C	C	•	670	C	T	•	•	•	•
192	G	•	A	A	A	•	700	T	•	C	•	•	•
206	C	•	•	•	T	•	707	G	•	•	A	•	•
214	G	•	A	A	A	•	709	G	A	A	A	A	A
215	G	•	A	A	A	•	715	A	G	•	•	•	•
216	A	•	•	C	•	•	736	C	•	T	•	•	•
229	T	•	C	C	C	•	738	A	•	•	G	G	•
256	G	•	A	A	A	•	745	A	•	•	G	•	•
266	G	•	A	•	•	•	746	G	•	A	•	•	•
273	C	•	•	T	•	•	748	T	•	•	C	•	•
276	C	•	T	•	•	•	757	A	•	•	G	•	•
283	T	•	G	G	G	•	763	A	G	•	•	•	•
286	T	•	A	A	A	•	766	A	•	G	G	G	•
304	T	•	C	C	C	C	803	G	A	•	•	•	A
307	A	G	•	•	•	G	844	G	•	A	A	A	A
308	G	•	•	A	•	•	847	T	•	•	G	•	•
312	G	•	•	A	•	•	848	G	•	•	A	•	•
328	G	•	•	A	•	•	877	G	•	A	•	•	•
364	A	G	•	•	•	G	883	C	•	•	T	•	•
367	A	•	G	G	G	•	892	A	•	G	•	•	•
397	G	•	T	A	T	•	901	A	•	•	•	G	•
403	G	•	A	A	A	•	907	A	•	C	C	C	•
415	A	•	T	•	•	•	940	T	•	C	•	C	•
425	G	•	A	A	A	•	944	G	•	A	A	A	A
427	T	•	C	C	C	•	986	A	•	G	G	G	G
435	A	•	G	•	•	•	1024	A	•	G	G	G	•
436	A	•	G	G	G	•	1081	G	•	A	A	A	•
451	C	•	•	T	•	•	1118	C	•	*	*	T	*
466	C	•	•	T	•	•	1195	G	•	*	*	A	*
471	G	•	•	•	A	•	1207	A	G	*	*	G	*
481	T	•	•	•	•	A	1213	A	•	*	*	G	*
486	C	•	T	•	•	•	1222	T	•	*	*	C	*
495	A	•	G	•	G	•	1228	C	T	*	*	•	*
498	T	•	A	G	G	•	1261	A	•	*	*	G	*
499	T	C	C	C	C	C	1276	C	•	*	*	T	*
505	T	•	C	•	•	•	1324	T	C	*	*	C	*
508	T	•	C	C	C	C	1336	A	•	*	*	G	*
529	T	C	C	C	C	C	1348	C	T	*	*	T	*
534	A	•	G	G	G	•	1363	T	•	*	*	A	*
545	T	•	—	A	A	•	1372	A	•	*	*	G	*
546	A	•	—	•	•	•	1426	T	C	*	*	•	*
547	C	•	—	•	•	•	1492	A	•	*	*	G	*
552	A	•	C	C	C	•	1495	C	•	*	*	T	*
553	T	•	A	A	A	•	1519	A	•	*	*	G	*
562	C	•	T	T	T	•	1582	C	•	*	*	T	*
567	A	T	T	T	T	T	1594	C	T	*	*	T	*
574	G	•	A	A	A	A	1598	T	•	*	*	C	*
584	T	•	•	C	•	•	1603	C	•	*	*	T	*
589	C	T	T	•	T	T	1660	T	•	*	*	C	*
592	T	•	C	•	•	•	1696	A	•	*	*	G	*
596	G	•	A	A	A	•	1700	C	•	*	*	A	*
600	G	•	•	A	•	•	1738	T	C	*	*	•	*
601	G	•	A	A	A	•	1744	T	A	*	*	•	*
634	G	•	T	T	T	A	1753	T	C	*	*	•	*

No.1: 20171123 HA (MH236281); No.2: Influenza B/Utah/08/2014 (KU592766); No.3: Influenza B/Yamagata/16/88 (M36105); No.4: Influenza B/Sichuan/379/99 (EF541424); No.5: Influenza B/Sichuan/8/92 (AF129898); No.6: Influenza B/Sichuan Wenjiang/295/2010 (KP461138). • indicates the same base as strain No.1; * indicates that the sequence in the GenBank database is incomplete; — represents a base deletion

表 2 乙型流感病毒毒株 HA1 区氨基酸变异位点比较

Tab 2 Comparison of amino acid variation sites in the HA1 region of influenza B virus

Site	Virus strain					
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
33	V	•	•	A	•	•
44	Y	•	H	H	H	•
52	R	•	K	K	K	•
60	D	•	N	T	N	•
72	G	•	A	•	•	•
77	V	•	M	•	•	•
79	T	•	•	I	•	•
80	T	•	I	•	•	•
91	V	•	•	I	•	•
92	R	•	•	K	•	•
120	K	•	N	•	N	•
126	Q	•	H	•	•	•
130	D	•	N	N	N	•
133	K	•	R	•	•	•
145	G	•	•	•	E	•
150	A	•	V	•	•	•
153	K	•	R	•	R	•
154	I	•	N	S	S	•
166	K	•	R	R	R	•
169	Y	•	-	N	N	•
171	N	•	T	T	T	•
176	Q	L	L	L	L	L
182	Y	•	•	H	•	•
186	E	•	K	K	K	•
187	G	•	•	E	•	•
200	N	•	D	•	•	•
202	T	•	•	•	N	•
206	S	•	K	N	N	•
223	V	•	•	I	•	•
233	D	•	•	G	G	•
236	D	•	N	•	•	•
255	V	M	•	•	•	M
270	V	•	•	I	•	•
301	E	•	A	•	•	•
302	E	•	K	K	K	K
316	K	•	E	E	E	E

No.1: 20171123 HA (MH236281); No.2: Influenza B/Utah/08/2014 (KU592766); No.3: Influenza B/Yamagata/16/88 (M36105); No.4: Influenza B/Sichuan/379/99 (EF541424); No.5: Influenza B/Sichuan/8/92 (AF129898); No.6: Influenza B/Sichuan Wenjiang/295/2010 (KP461138). • indicates the same amino acid as strain No.1; - represents deletion of an amino acid. V: Valine; Y: Tyrosine; R: Arginine; D: Aspartate; G: Glycine; T: Threonine; K: Lysine; Q: Glutamine; A: Alanine; I: Isoleucine; N: Asparagine; E: Glutamate; S: Serine; H: Histidine; M: Methionine; L: Leucine

3 讨 论

据 WHO 估计, 每年约有 10 亿人感染流感病

毒^[9], 其已成为危害人类健康的一大公共卫生问题。接种疫苗是预防流感的最有效方法, 但由于流感病毒毒株的变化、抗原漂移及免疫减弱等原因, 上一个流感季接种的疫苗在未来不一定具有预防效果, 因此 WHO 每年都会公布下一个流感季推荐疫苗株。

流感病毒分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 3 型, 其中乙型流感病毒属正黏病毒科, 有包膜结构, 基因组为分段的负链 RNA^[10]。乙型流感病毒仅在人类中传播, 无亚型^[11], 但有报道称在海豹体内分离出了乙型流感病毒^[12]。首次分离出的乙型流感病毒株为 B/Lee/40^[13]。目前, 流行的乙型流感毒株分为 2 个谱系: B/Victoria/2/87 系和 B/Yamagata/16/88 系^[2]。尽管缺乏亚型, 乙型流感病毒通过遗传重组在不同谱系的共循环株中进行抗原性变异, 并从累积突变中获得抗原漂移。

2017 年冬至 2018 年春季, 我国南北方均暴发了 Yamagata 系乙型流感病毒导致的流感, 在全国大范围流行并造成了较大危害^[1]。

本研究中, 我们对驻成都某部 2017 年冬季一起乙型流感病毒感染的毒株 HA 基因进行了系统分析, 通过构建系统发育进化树, 发现此次感染的毒株属于 Yamagata 系, 但通过基因位点分析, 其与 Yamagata 系的原始毒株 B/Yamagata/16/88 对比已发生了较多变异, 与四川地区以往流行的 Yamagata 系毒株也发生了不同程度的变异。但可以看出与最近流行的 Yamagata 系毒株序列比较相近, 突变位点相对较少。

近日, WHO 正式发布了 2018—2019 年度北半球季节性流感疫苗推荐组分^[7], 与 2017—2018 年度北半球流感季节的疫苗组分相比, 除了 B/Victoria 系病毒组分和 A (H3N2) 亚型病毒组分有更新外, WHO 首次优先给出了四价流感疫苗的组分。这一改变的原因可能是由于上一个流感流行季 Yamagata 系乙型流感病毒造成了严重危害。本研究中感染病例的乙型流感病毒 HA 基因与 WHO 推荐的最新的疫苗株相比, HA1 氨基酸位点只发生了 2 处点突变, 而且均没有处于 HA1 抗原决定簇区域, 说明最新的四价流感疫苗对成都地区流行的 Yamagata 系病毒具有预防效果。

另外需要指出的是, 本研究中感染病例的乙型流感病毒 HA1 176 位点处产生了 1 个全新的突

变,以往流行株大多为亮氨酸(L),而本研究病例感染的乙型流感毒株 HA1 176 位点突变为谷氨酰胺(Q),该突变对乙型流感病毒感染特性和抗原特性的改变仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 周密,李雷雷,毛晨梅,胡必杰. 今年我国流感流行的深度解析[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28:631-635.
- [2] ROTA P A, WALLIS T R, HARMON M W, ROTA J S, KENDAL A P, NEROME K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983[J]. *Virology*, 1990, 175: 59-68.
- [3] 中国国家流感中心. 中国流感流行情况概要(截至2018年2月25日)[EB/OL]. (2018-03-06)[2018-05-20]. http://www.chinaivdc.cn/cnic/zyzx/lgzq/201803/t20180306_159451.htm.
- [4] BUI C H T, CHAN R W Y, NG M M T, CHEUNG M C, NG K C, CHAN M P K, et al. Tropism of influenza B viruses in human respiratory tract explants and airway organoids[J/OL]. *Eur Respir J*, 2019, 54(2). pii: 1900008. doi: 10.1183/13993003.00008-2019.
- [5] FRANK H, WITTEKIND C, LIEBERT U G, SIEKMEYER M, SIEKMEYER W, SCHUSTER V, et al. Lethal influenza b myocarditis in a child and review of the literature for pediatric age groups[J]. *Infection*, 2010, 38: 231-235.
- [6] [s. n.]. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017—2018 northern hemisphere influenza season[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2017, 92:117-128.
- [7] World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018—2019 northern hemisphere influenza season[EB/OL]. (2018-02-22)[2018-05-20]. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en/.
- [8] CHEN J R, MA C, WONG C H. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza[J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29: 426-434.
- [9] GHEBREHEWET S, MACPHERSON P, HO A. Influenza[J/OL]. *BMJ*, 2016, 355: i6258. doi: 10.1136/bmj.i6258.
- [10] CRUNKHORN S. Infectious disease: fighting influenza B[J/OL]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 828. doi: 10.1038/nrd.2017.234.
- [11] NEROME R, HIROMOTO Y, SUGITA S, TANABE N, ISHIDA M, MATSUMOTO M, et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism[J]. *Arch Virol*, 1998, 143: 1569-1583.
- [12] OSTERHAUS A D, RIMMELZWAAN G F, MARTINA B E, BESTEBROER T M, FOUCHIER R A. Influenza , virus in seals[J]. *Science*, 2000, 288: 1051-1053.
- [13] KRYSTAL M, ELLIOTT R M, BENZ E W Jr, YOUNG J F, PALESE P. Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 4800-4804.

[本文编辑] 商素芳