

• 诊治分析 •

2023 年湖州市区 pdm09 H1N1 流感病毒
NA 基因特征分析

沈樟, 徐德顺

【关键词】 流感病毒; pdm09 H1N1; 基因变异; 神经氨酸酶

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.07.017

【中图分类号】 R373.1 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)07-0904-03

pdm09 H1N1 流感病毒自 2009 年爆发引起全球大流行, 目前已成为流感流行常见亚型之一^[1]。该病毒包含由 8 个基因片段, 其中神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 是嵌入流感病毒包膜表面的一种重要的功能糖蛋白^[2]。主要负责成熟病毒从宿主细胞中释放, 在感染下一个宿主细胞进行复制转录, 最终使机体出现临床症状和体征^[3]。NA 蛋白是目前预防和治疗流感病毒药物神经氨酸酶抑制剂 (neuraminidase inhibitors, NAIs) 的主要作用靶点^[4]。近年来由于 NAIs 的广泛使用, 对其耐药的病毒株已经出现, 影响了 NAIs 的疗效^[5]。此外, NA 基因序列改变可能会降低流感疫苗免疫效果^[6]。持续监测流感病毒 NA 基因序列变异情况对于流感防控具有重要意义。本研究对湖州市区 2023 年分离的 pdm09 H1N1 流感病毒 NA 基因进行分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 按照全国流感监测方案 (2017 年版)^[7], 收集 2023 年 1—12 月湖州市第一人民医院和南浔区人民医院两家国家级流感监测哨点医院采集的发病 3 d 内流感样病例 (体温 $> 38^{\circ}\text{C}$, 伴咳嗽或咽痛之一者) 鼻咽拭子标本, 置于 -80°C 冰箱至检测。

1.2 方法

1.2.1 病原检测 采样荧光定量 PCR 检测流感病毒核酸。核酸检测为阳性的样本按《流感诊断标准》WS285-2008 附录 A “病毒分离培养和鉴定方法” 进行流感病毒分离: 吸取 400 μl 处理过的标本接种于

悬浮的犬肾细胞 (MDCK) 细胞培养管 (上海伯杰生物科技有限公司) 中, 置 $(35\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、含 5% 二氧化碳培养箱内的摇晃床上培养, 如果 3 d 内无细胞病变 (CPE), 则盲传 2 代; 2 代后无 CPE 出现, 判为阴性。用人红血球做血凝实验, 滴度 1:8 及以上的用流感标准抗血清 (浙江省疾控中心提供) 进行血凝抑制试验 (HI) 以鉴定流感病毒分离株型别。

1.2.2 基因测序 随机选取 25 株经抗血清验证为 pdm09 H1N1 亚型的流感病毒分离株进行全基因组测序, 采用杰毅生物技术有限公司的 NG Smaster 病原宏基因组一站式建库仪及其配套试剂盒构建 RNA 全基因组文库, 通过美国 illumina 公司的 NextSeq 550 测序仪进行测序。

1.2.3 序列分析 采用 Bio-Edit 软件 (版本 1.423) 对 25 株分离株核苷酸序列进行整理, 利用 MEGA 7 软件中 Clustal W 方法进行多序列比对, 采用邻位归并法 Neighbour-joining 方法构建 NA 基因系统进化树, Bootstrap 值进行 1 000 次重复运算。采用 Kimura 2-parameter model 模型进行 NA 蛋白耐药位点分析。利用 NetNGlyc-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 网站预测 NA 蛋白 (去信号胎蛋白) 的糖基化位点。本研究序列分析中所用的参考株序列 [包括 WHO 推荐的疫苗株: A/Wisconsin/67/2022 (2023-2024 北半球疫苗代表株)] 下载于美国国家生物技术信息中心 (NCBI)。

2 结果

2.1 NA 基因同源性及进化树分析 25 株分离株 NA 基因之间核苷酸和氨基酸同源性分别是 99.36% ~ 100% 和 99.15% ~ 100%, NA 基因核苷酸平均通

作者单位: 313000 浙江省湖州, 湖州市疾病预防控制中心

通信作者: 沈樟, Email: sz667668@126.com

传距离为 0 ~ 0.006; 与疫苗株 A/Wisconsin/67/2022 (2023—2024) 核苷酸同源率为 98.87%~99.22%, 氨基酸同源率为 98.94%~99.36%, NA 基因核苷酸平均遗传距离为 0.008 ~ 0.011。

pdm09 H1N1 流感病毒分离株 NA 基因进化树中, 25 株项目中的 pdm09 H1N1 流感病毒分离株与疫苗株 A/Wisconsin/67/2022 (2023-2024) 相比存在一定的进化距离, 但属于同一个大分支上, 共属于 6B.1A.5a.2a 分支, 自展值为 99; 25 株 pdm09 H1N1 流感病毒分离株又聚成一簇, 自展值为 87。

2.2 NA 蛋白耐药位点分析 与疫苗株 A/Wisconsin/67/2022 (2023-2024) 相比, 25 株 pdm09 H1N1 流感病毒分离株 NA 蛋白中共发生 13 个氨基酸突变, 见表 1。与 NAIs 耐药相关的 9 个关键氨基酸位点 (119、136、155、223、247、275、293、295、313) 没有发生变异。

2.3 NA 蛋白潜在糖基化位点分析 通过对 WHO

推荐的 2023—2024 年度流感疫苗代表株 NA 蛋白潜在糖基化位点分析, 结果显示该推荐的年度流感疫苗有 8 个潜在的糖基化位点, 分别为 42NQS、50NKS、58NNT、63NQT、68NIS、88NSS、146NGT 及 235NGS。与疫苗株 A/Wisconsin/67/2022 (2023-2024) 相比, 25 株 pdm09 H1N1 流感病毒分离株没有新增与缺失潜在糖基化位点。

3 讨论

本研究对随机抽取的 25 株湖州市区 2023 年 pdm09 H1N1 流感分离株和 WHO 推荐的 2023—2024 年疫苗株的 NA 基因序列进行分析, 结果显示, 分离株与疫苗株 NA 基因核苷酸同源率为 98.87%~99.22%, 氨基酸同源率为 98.94%~99.36%; 基因遗传进化分析显示, 分离株和疫苗株均处于同一个分支上, 同属于 6B.1A.5a.2a 进化分支, 自展值为 87/99。

表 1 25 株 pdm09 H1N1 流感病毒分离株与疫苗株相比 NA 蛋白 13 个氨基酸耐药位点突变情况

毒株	13	41	72	77	86	98	188	200	234	328	334	339	466
A/Wisconsin/67/2022(2023—2024)	V	G	T	R	A	A	T	S	V	P	S	L	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1194/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	I
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1202/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	I
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1214/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1181/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1184/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1238/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	I
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1252/2023(H1)	I	G	T	K	T	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1265/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1198/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1227/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	N	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1189/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	S	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1304/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1322/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	I	N	V	P	S	S	I
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1284/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1357/2023(H1)	I	G	T	R	A	T	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1398/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1403/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1270/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1317/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1232/2023(H1)	I	E	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1268/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	I
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1298/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL37/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	I	P	S	S	T
A/Zhejiang-Nanxun/SWL1211/2023(H1)	I	G	T	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T
A/Zhejiang-Wuxing/SWL1281/2023(H1)	I	G	I	R	A	A	T	N	V	P	S	S	T

注: 毒株名称中 Wuxing 是指来自湖州市第一人民医院毒株; Nanxun 是指来自南浔人民医院毒株。A: 丙氨酸; R: 精氨酸; N: 天冬酰胺; E: Glutamic acid; G: 甘氨酸; I: 异亮氨酸; K: 赖氨酸; P: 脯氨酸; S: 丝氨酸; T: 苏氨酸; V: 缬氨酸; R: 精氨酸; N: 天冬酰胺; L: 亮氨酸

这说明 2023 年湖州市区流行的 pdm09 H1N1 流感病毒与 WHO 推荐的 2023—2024 年疫苗株有较高的同源性, 匹配度较好, 理论上接种推荐疫苗株对当前流行的 pdm09 H1N1 流感具有较好的保护效果。

NAIs 是目前预防和治疗流感病毒感染主要抗流感药物之一, 这类药物以 NA 蛋白的酶活性位点作为靶点^[4]。研究表明^[8], NAIs 对不同亚型流感病毒预防和治疗效果存在一定的差异。另外, 由于 NAIs 的广泛使用, pdm09 H1N1 亚型对 NAIs 的敏感性发生了较大的变化, 耐药发生率甚至高达 1.5%^[8-9]。酶活性位点 H275Y 是 pdm09 H1N1 流感病毒主要的耐药位点^[10], 酶活性位点 E119K、D199G 和 I223Y 与 NAIs 敏感性降低有关^[11]。本研究发现湖州市区流行株 NA 基因酶活性中心关键位点氨基酸仍高度保守, NA 蛋白中与 NAIs 耐药相关的 9 个关键氨基酸位点均未发生变异。与杭州市^[12]、江苏省^[13]、上海市松江区^[14]和深圳市盐田区^[15]流行的 pdm09 H1N1 病毒研究结果一致。但本研究分析也显示, 湖州市区部分流行株的非酶活性位点发生变异, 而非酶活性位点的改变是否影响病毒对 NAIs 敏感性需进一步行药敏实验分析。

研究认为糖基化位点的改变或增减都会对病毒的生物特性产生影响; 特别是当糖基化位点的改变可能改变流感病毒的抗原特性、宿主适应性和致病力^[16]。与疫苗株 A/Wisconsin/67/2022(2023-2024)相比较, 本研究分析的 25 株流感分离株在 NA 蛋白中潜在糖基化位点没有新增与缺失。这说明 2023 年湖州市区流行的 pdm09 H1N1 流感病毒抗原未发生变化, 进一步说明注射当年度疫苗对 pdm09 H1N1 流感病毒理论上有很好的预防效果。

综上所述, 2023 年湖州市区流行的 pdm09 H1N1 理论上对 NAIs 类的抗流感药物较为敏感, 注射当年度疫苗有一定的预防效果。但甲型流感病毒的流行具有不可预测性, 应加强对此病毒的 NA 基因持续监测, 及时发现毒株基因变化情况, 对于降低流感病毒对人群健康造成的危害具有重要意义。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

[1] 刘晓蕾, 叶文, 袁洁, 等. 长沙市 2016—2023 年 A(H1N1)pdm09 流

- 感病毒血凝素基因进化特征[J]. 中国热带医学, 2023, 23(11): 1151-1156.
- [2] JAGADESH A, SALAMA A, MUDGAL P, et al. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines[J]. Arch Virol, 2016, 161(8): 2087-2094.
- [3] ANDERSON T K, CHANG J, ARENDSE W, et al. Swine influenza A viruses and the tangled relationship with humans[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2021, 11(3): a038737.
- [4] 吴巨龙, 宋绍霞, 刘侗, 等. 2018—2020 年山东省甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因变异和耐药分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5): 577-581.
- [5] LEE N, HURTA C. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: a clinical perspective[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(6): 520-526.
- [6] GIURGEAL T, MORENS D M, TAUBENBERGER J K, et al. Influenza neuraminidase: a neglected protein and its potential for a better influenza vaccine[J]. Vaccines, 2020, 8(3): 409.
- [7] 国家卫生健康委办公厅关于印发全国流感监测方案(2017年版)的通知(国卫办疾控函(2017)296号)[EB/OL]. [2024-01-26] https://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/xcrxjb/201712/t20171207_156180.html.
- [8] 刘东洋, 杨月清, 樊红霞, 等. 2017—2019 年呼和浩特市甲型 A(H1N1)pdm09 流感病毒基因特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 39(4): 376-382.
- [9] TAKASHITA E, DANIELS R S, FUJISAKI S, et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018[J]. Antiviral Res, 2020, 175: 104718.
- [10] HUANG W J, CHENG Y H, LIX Y, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of human influenza viruses during the 2016—2017 influenza season in Mainland China [J]. J Infect Chemother, 2018, 24(9): 729-733.
- [11] 赵雪, 滕峥, 房方皓, 等. 上海市 2018—2019 年度 A(H1N1)pdm09 亚型流感病毒的耐药性及 NA 基因特性研究[J]. 上海预防医学, 2020, 32(5): 401-407.
- [12] 吴英萍, 崔大伟, 秦志梅, 等. 2009—2012 年杭州地区甲型 H1N1 流感病毒 HA 与 NA 基因的进化分析[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(4): 272-275.
- [13] 彭杰夫, 祁贤, 王慎骄, 等. 2017—2019 年江苏甲型 H1N1pdm09 流感病毒抗原性及基因特性分析[J]. 江苏预防医学, 2020, 31(5): 473-475, 519.
- [14] 吴佳瑾, 刘玲, 赵雪, 等. 2017—2019 年度上海市松江区 A(H1N1)pdm09 流感病毒 HA 和 NA 基因特征分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(5): 423-430.
- [15] 崔栋, 肖娜, 顾嘉颖, 等. 2016—2019 年深圳市盐田区甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因特征研究[J]. 国际病毒学杂志, 2022, 29(5): 420-425.
- [16] 谢蒙生, 方斌, 黄成静, 等. 2017—2020 年湖北省甲型 H3N2 亚型流感病毒流行特征和进化分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(1): 50-57.

收稿日期: 2024-02-08

(本文编辑: 孙海儿)