

DOI:10.13350/j.cjpb.230403

• 论著 •

2021年武汉市乙型流感病毒监测及序列进化分析*

张祎婕,孔雯骅,李瑶,吴奕璇,杨小兵,孟派,孔德广,刘满清**

(武汉市疾病预防控制中心,湖北武汉 430024)

【摘要】 **目的** 分析武汉市2021年分离乙型流感病毒基因组变异情况及分子进化特征。 **方法** 采集2021年武汉市流感样病例咽拭子标本,进行核酸检测、病毒分离,选取34株乙型流感病毒代表毒株进行全基因组测序,利用生物信息学软件构建进化树并分析分子进化特征。 **结果** 2021年武汉市共监测病例标本2 242例,流感病毒核酸检测阳性218例,均为乙型流感病毒 Victoria系(Influenza B virus Lineage Victoria,BV),阳性率9.72%。2021年武汉分离的BV系流感病毒与疫苗株比,HA基因同源率为98.65%-99.24%,NA基因同源率为98.89%-99.54%。2021年武汉分离的BV系流感病毒归属于V1A.3a.1和V1A.3a.2分支,V1A.3a.2为2021年武汉市优势株。发现多处关键抗原表位发生了变异,未发现耐药位点变异。 **结论** 2021年武汉分离的BV系流感病毒较疫苗株均存在数个抗原位点变异,因此应加强对病毒变异的持续监测,为疫苗株更新、流感防控及临床诊疗措施的制定提供参考。

【关键词】 乙型流感;病毒分离;HA基因;NA基因;同源性

【中图分类号】 R373.13

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0385-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Apr;18(4):385-389.]

Epidemiological and evolutionary analyses of influenza B virus in Wuhan, 2021

ZHANG Yi-jie, KONG Wen-hua, LI Yao, WU Yi-xuan, YANG Xiao-bing, MENG Pai, KONG De-guang, LIU Man-qing (1. *Department of Pathogen, Wuhan Centers for Disease Prevention and Control, Wuhan 430030, China*)

【Abstract】 **Objective** To analyze the variation and evolution characteristics of influenza B virus in Wuhan in 2021.

Methods Throat swab specimens were collected from influenza-like cases in Wuhan sentinel hospitals in 2021. After virus isolation, complete genomes of 34 influenza B strains were sequenced using illumina Miseq sequencer, and the sequences were assembled using CLC Genomic Workbench v. 21, B/Washington/02/2019 as references. Phylogenetic trees were calculated with the maximum likelihood (ML) method using the nucleotide substitution model with the lowest Bayesian information criterion scores, as identified for each alignment in the MegaX software. **Results** In 2021, a total of 2 242 throat swabs were collected from influenza-like cases, 218 (9.72%) of them were positive for influenza virus, and all of latter were influenza B virus strains of Victoria lineages (BV). The isolated influenza B strains shared 98.65%-99.24% homology with the vaccine strain in HA gene, and 98.89%-99.54% in NA gene. Clade V1A.3a.2 was the dominant strain in Wuhan in 2021. Several key variations, such as R133G, N150K, N197D, were found in HA antigenic site, yet no mutation was found in the site related to drug resistance in NA. **Conclusion** Compared with the WHO vaccine strains, the BV influenza viruses isolated in Wuhan in 2021 had several antigenic site variations. Therefore, genome of influenza virus should be monitored continuously to provide reference for vaccine strain update, influenza prevention and control, and formulation of clinical diagnosis and treatment measures.

【Key words】 Influenza B; virus isolation; HA; NA; homology

***乙型流感病毒是流感的主要病原之一。乙型流感病毒和甲型流感病毒同属于有包膜的正粘病毒科,拥有密切的系统发育关系。两者都是分段的负义RNA病毒,都具有PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、MP和NS这八个片段的基因组^[1-2]。其中HA和NA所编码的病毒血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的变异,将改变病毒抗原特性来逃避机体已有的免疫保护,从而引起流感病毒的流行^[3]。同时神经氨酸酶也是抗流感病毒药物的靶点之一^[4-5]。所以探讨乙型流感病毒HA及NA区的变异

规律,跟踪其变异过程,对于流感的预测、流感疫苗株的筛选和流感耐药研究具有重要的参考意义。为了解武汉市乙型流感病毒流行情况及HA和NA基因的变异特征,对2021年武汉市流感监测中分离的34株

* **【基金项目】** 湖北省公共卫生青年拔尖人才资助项目基金。

** **【通讯作者】** 刘满清, Email: liumq33@hotmail.com

【作者简介】 张祎婕(1994-),女,湖北武汉人,硕士,检验技师,主要从事呼吸道病原检测工作。
E-mail: ZhangYijie@whcdc.org

乙型流感病毒进行全基因组测序和分析,为流感病毒的防控工作提供分子水平的病原学依据。

材料与方法

1 2021年武汉市流感样病例及流感暴发疫情病例咽拭子采集

2021年1月-12月按照全国流感监测方案,武汉市流感监测哨点医院武汉儿童医院、武汉市一医院,采集发病3天内的流感样病例以及采集各县市区流感暴发疫情病例的咽拭子后放入3-4 ml采样液的病毒采样管中,2-8℃保存,2日内运送至流感监测网络实验室。

2 咽拭子核酸检测

流感样病例及流感暴发疫情病例咽拭子经西安天隆科技有限公司全自动核酸提取仪 GeneRotex 96 和配套病毒 RNA 提取试剂盒 (CDC) T024 提取咽拭子标本病毒 RNA。经北京卓诚惠生生物科技股份有限公司产新型冠状病毒 (2019-nCoV)/甲型/乙型流感病毒核酸四重实时荧光 PCR 检测试剂盒和 Yamagata 系/Victoria 系乙型流感病毒核酸双重实时荧光 PCR 检测试剂盒 (货号: A7834 和 A2492) 检测。

3 病毒分离

核酸检测结果为 BV 系的咽拭子样本,接种犬肾细胞 (MDCK) 进行病毒培养,4 d 后收获培养物,使用 1% 豚鼠血红细胞进行毒株 HA 滴度测定。

4 流感样病例占门诊量百分比 (ILI%)

流感样病例占门诊量百分比 (ILI%)、ILI、门急诊病例就诊总数源于中国流感监测信息系统 (<http://10.249.1.170/>)。

5 基因测序

流感病毒核酸检测阳性率超过流行季峰值的 30% 判定为流行高峰^[6],2021 年非流行高峰每月随机选择 1-3 株 BV 毒株,流行高峰每月随机选择 3-6 株,选取的毒株通过湖北省疾控中心复核分型正确,毒株 HA 滴度在 1:8 以上,合计 34 株。毒株经西安天隆科技有限公司全自动核酸提取仪 GeneRotex 96 和配套病毒 RNA 提取试剂盒 (CDC) T024 提取病毒 RNA,使用北京微未来科技有限公司 ULSEN[®] 超灵敏度乙型流感全基因组捕获试剂盒 (货号: V-170917) 扩增,并在武汉市疾病预防控制中心实验室进行全基因组测序,测得毒株全基因组序列均已上传全球流感共享数据库 (Global Initiative of Sharing All Influenza Data, GISAID) (表 1)。

表 1 2021 年武汉市乙型流感毒株序列号
Table 1 GISAID ID of Influenza Bin Wuhan in 2021

编号 Numbers	采样日期 Sampling Date	GISAID ID	毒株名称 Name of strain	HA 滴度 HA test
1	2021-1-26	EPI_ISL_11484777	B/WuhanQiaokou/223/2021	256
2	2021-2-8	EPI_ISL_11480382	B/WuhanDongxihu/217/2021	128
3	2021-3-2	EPI_ISL_11499465	B/WuhanJiangnan/1224/2021	64
4	2021-3-29	EPI_ISL_11499468	B/WuhanQiaokou/1178/2021	128
5	2021-4-26	EPI_ISL_11501983	B/WuhanJiangnan/1403/2021	128
6	2021-4-26	EPI_ISL_11501984	B/WuhanQiaokou/1264/2021	128
7	2021-5-6	EPI_ISL_11501985	B/WuhanWuchang/72/2021	128
8	2021-5-13	EPI_ISL_11504025	B/WuhanDongxihu/2144/2021	128
9	2021-5-17	EPI_ISL_11504588	B/WuhanQiaokou/1326/2021	64
10	2021-5-17	EPI_ISL_11504589	B/WuhanJiangxia/2180/2021	32
11	2021-5-31	EPI_ISL_11504590	B/WuhanWuchang/2277/2021	128
12	2021-5-31	EPI_ISL_11504593	B/WuhanJiangxia/2203/2021	128
13	2021-6-7	EPI_ISL_11504596	B/WuhanJiangnan/1538/2021	128
14	2021-6-7	EPI_ISL_11504689	B/WuhanQiaokou/1375/2021	128
15	2021-6-7	EPI_ISL_11521064	B/WuhanWuchang/2289/2021	128
16	2021-6-7	EPI_ISL_11521077	B/WuhanQiaokou/2367/2021	64
17	2021-7-5	EPI_ISL_11521869	B/WuhanWuchang/79/2021	128
18	2021-7-5	EPI_ISL_11522911	B/WuhanQiaokou/2449/2021	64
19	2021-7-12	EPI_ISL_11523004	B/WuhanQiaokou/1475/2021	128
20	2021-8-16	EPI_ISL_11523176	B/WuhanQiaokou/1555/2021	128
21	2021-8-16	EPI_ISL_11523177	B/WuhanWuchang/717/2021	32
22	2021-8-16	EPI_ISL_11523261	B/WuhanQiaokou/2562/2021	64
23	2021-9-13	EPI_ISL_11523317	B/WuhanJiangnan/1795/2021	32
24	2021-9-13	EPI_ISL_11523616	B/WuhanQiaokou/1662/2021	64
25	2021-9-13	EPI_ISL_11523675	B/WuhanWuchang/2539/2021	64
26	2021-10-25	EPI_ISL_11523751	B/WuhanQiaokou/1781/2021	16
27	2021-10-25	EPI_ISL_11525165	B/WuhanWuchang/720/2021	32
28	2021-10-25	EPI_ISL_11525308	B/WuhanJiangxia/2398/2021	64
29	2021-11-8	EPI_ISL_11525309	B/WuhanJiangnan/1952/2021	16
30	2021-11-8	EPI_ISL_11525310	B/WuhanWuchang/55/2021	16
31	2021-11-8	EPI_ISL_11525651	B/WuhanQiaokou/1818/2021	16
32	2021-12-6	EPI_ISL_11525746	B/WuhanQiaokou/1876/2021	64
33	2021-12-6	EPI_ISL_11525776	B/WuhanWuchang/722/2021	16
34	2021-12-6	EPI_ISL_11526201	B/WuhanWuchang/724/2021	64

6 参考序列来源和进化树分析

根据病毒的系统发育关系,乙型流感病毒分为两个抗原性不同的谱系 B/Yamagata/16/88 和 B/Victoria/02/1987^[7]。HA 和 NA 进化分支参考 NextStrain (<https://clades.nextstrain.org/>)。参考序列由全球流感共享数据库 (GISAID) 下载, B/HongKong/3343/2014、 B/Yunnan-Gucheng/1948/2014、 B/Shanghai-Huangpu/171/2011、 B/Mozambique/203/2019、 B/HongKong/286/2017、 B/Kenya/180/2021、 B/Philippines/28/2019、 B/Hebei-Cixian/1706/2021、 B/Sichuan-Jingyang/12048/2019、 B/Hubei-Maojian/11535/2021、 B/Jiangxi-Zhanggong/15/2021、 B/Austria/1359417/2021 参考株分别代表进化分支 V1A、V1A、V1B、V1A. 1、V1A. 2、V1A. 3、V1A. 3a、V1A. 3a. 1、V1A. 3a. 2、B/Washington/02/2019 为世界卫生组织正式发布 2021

年北半球流感疫苗 BV 系组分推荐毒株, B/Austria/1359417/2021 为 2022 年南半球流感疫苗 BV 系组分推荐毒株。利用 MEGA-X 软件采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 分别构建 HA 和 NA 进化树, Bootstrap=1000。

结 果

1 2021 年武汉市流感病毒核酸检测结果及 ILI 监测

2021 年武汉市流感监测合计检测标本 2 242 例, 流感病毒阳性 218 例, 均为 BV 系流感病毒, 阳性率为 9.72%。2021 年武汉市哨点医院报告 ILI 共 7 871 例, 门急诊病例就诊总数为 1621781 例, ILI% 为 0.49。2021 年于 6 月和 12 月有 2 个流感流行季, 流行高峰分别为 4 月至 8 月和 11 月至 12 月, 流行季流感阳性率周峰值分别为 40% 和 44% (图 1)。

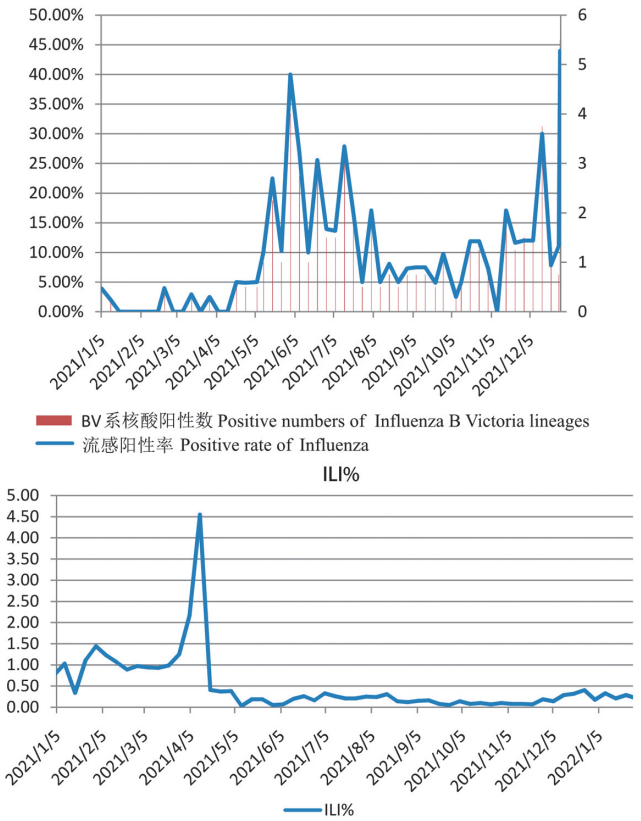


图 1 2021 年武汉市流感病毒核酸检测周阳性率和周 ILI%
Fig. 1 Weekly nucleic acid test positive rate and ILI% in Wuhan in 2021

2 同源性分析

对 2021 年度分离的本地毒株与 BV 系 WHO 建议疫苗株 B/Washington/02/2019 进行核苷酸和氨基酸同源性分析。完整 HA 基因的核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.65%-99.24%, 98.11%-98.80%。HA1 和 HA2 氨基酸同源性分别为 97.08%-97.96%, 99.56%-100%。NA 基因的核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.89%-99.54%, 99.14%-99.57%。

3 进化分析

疫苗株 B/Washington/02/2019 属于进化分支 V1A.3。HA 进化树表明 34 株乙型流感病毒毒株中, 8 株属于进化分支 V1A.3a.1, 26 株属于进化分支 V1A.3a.2, V1A.3a.2 为 2021 年优势株 (图 2)。NA 进化树表明 9 月一株毒株 B/WuhanWuchang/2539/2021 属于 HA 进化分支 V1A.3a.2 的毒株, NA 序列与进化分支 V1A.3a.1 距离更近 (图 3), 为 HA-V1A.3a.2/NA-V1A.3a.1 的系内重组株。

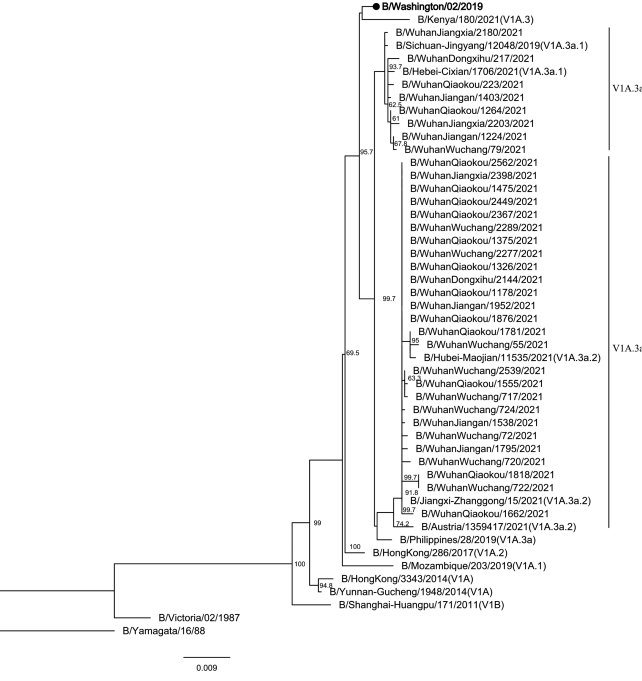


图 2 HA 进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of HA

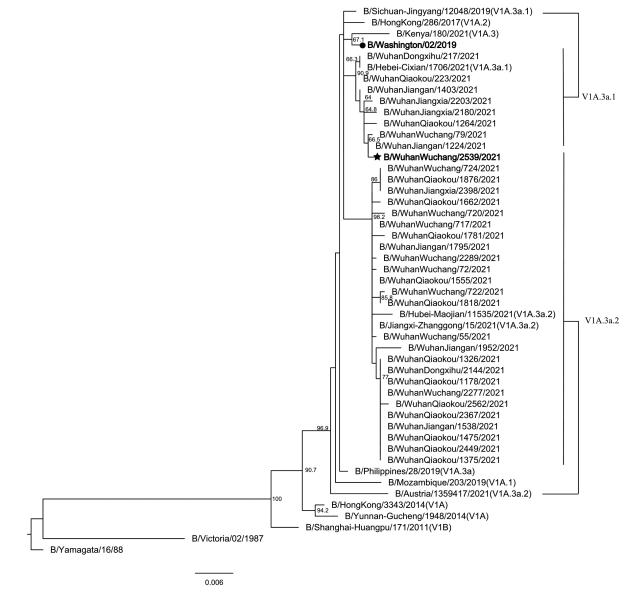


图 3 NA 进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of NA

4 HA 抗原表位和 NA 耐药位点分析

血凝素分为与受体结合的 HA1 和与受体膜融合的 HA2^[8-10]。HA 主要包括 4 个关键抗原表位,均位于 HA1:120 环(116-137)、150 环(141-150)、160 环(160-172)、190 螺旋(194-202)^[11]。与疫苗株 B/Washington/02/2019 比较,34 株毒株均在 120 环发生 R133G 突变,150 环发生 N150K 突变,190 螺旋发

生 N197D 突变。26 株属于进化分支 V1A. 3a. 2 的毒株均在 120 环发生 H122Q、A127T 突变,150 环发生 P144L 突变。10 月一株毒株在 160 环发生 A169K 突变(表 2)。NA 蛋白的关键抗原表位位于 N 端(140-157)^[12]。神经氨酸酶抑制剂耐药相关氨基酸位点框架残基 119 或 274 和功能性残基 152 或 292^[13]。34 株毒株均无 NA 蛋白的关键抗原表位变异。

表 2 HA1 氨基酸突变
Table 2 Amino acid substitutions of HA1

突变位点 Mutation	120 环 120~loop			150 环 150 ~loop		160 环 160 ~loop	190 螺旋 190~helix	其他 Others							
	122	127	133	144	150	169	197	37	184	203	220	241	252	279	290
V1A. 3a. 1 共有突变 V1A. 3a. 1 shared Mutation			G		K		D		E		M	Q		K	
V1A. 3a. 2 共有突变 V1A. 3a. 2 shared Mutation	Q	T	G	L	K		D		E	R				K	
B/WuhanQiaokou/223/2021			G		K		D		E		M	Q		K	V
B/WuhanDongxihu/217/2021			G		K		D		E		M	Q	M	K	
B/WuhanJiangan/1538/2021	Q	T	G	L	K		D	I	E	R				K	
B/WuhanWuchang/720/2021	Q	T	G	L	K	K	D		E	R				K	

34 株毒株 NA 蛋白发生的变异包括 A47T、D53N、N59S、L73F、K160E、V193I、G233E、T268A、V303I、K343E、G384D、G433D,其中 V303I、K343E 为进化分支 V1A. 3a. 1 的毒株特异性突变,D53N、N59S、G233E 为分支 V1A. 3a. 2 的特异性突变。

讨论

2021 年武汉市流感监测周阳性率曲线走势呈冬春季和夏季 2 个高峰(图 1),与 2017-2019 年武汉市(图 4)和刘琳琳等^[14]率先报道的 2016-2019 年湖北省流感病毒监测总阳性率曲线走势大体一致。武汉市 2020 年 8 月恢复流感监测,至 2020 年 12 月流感病毒核酸检测周阳性率持续为 0.00%。2021 年 1 月开始监测到流感阳性样本,分型为 BV。2021 年与以往流感病毒型别随季节(时间)呈现明显交替现象不同,全年流感病毒型别均为乙型流感病毒 Victoria 系,与 2021 年全国主要流行流感病毒型别一致。考虑受疫情防控政策影响,流感流行处于低水平范围。

2020 年 2 月 WHO 推荐北半球 BV 系疫苗株由分支 V1A. 1 的 B/Colorado/06/2017 更新为分支 V1A. 3 的 B/Washington/02/2019。2021 年武汉市流感监测中分离的 34 株乙型流感病毒中 8 株属于进化分支 V1A. 3a. 1,26 株属于进化分支 V1A. 3a. 2,与疫苗株虽同属于分支 V1A. 3,中国流感流行周报血清学监测反应 21-22 年度分离的 BV 系毒株里 34.3% 是 B/Washington/02/2019 的类似株,较 20-21 年度下降 48.6% (<https://ivdc.chinacdc.cn/cnic/zyzx/lgz/index.htm>),需要结合血清学共同判断疫苗的预防效

果。2021 年武汉市的乙型流感病毒 HA 的 4 个关键表位存在 R133G、N150K、N194D、H122Q、A127T、P144L、A169K 突变。V1A. 3a. 1 株存在特异性的 V220M 和 P241Q 突变^[8]。流感病毒 HA 区抗原表位 70-90 位和 110-210 位中 4 个以上氨基酸替换,且分布在 2 个以上抗原决定簇中,可以认为该氨基酸改变会导致病毒抗原性变化^[15]。V1A. 3a. 1 株及 V1A. 3a. 2 株较疫苗株均满足 HA 区抗原表位 4 个以上氨基酸替换,且分布于 2 个以上抗原决定簇,进化中处于正向选择压力的 HA 蛋白关键抗原位点的变异符合流感病毒抗原性的转变,提示病毒可能逃避宿主特异性免疫。

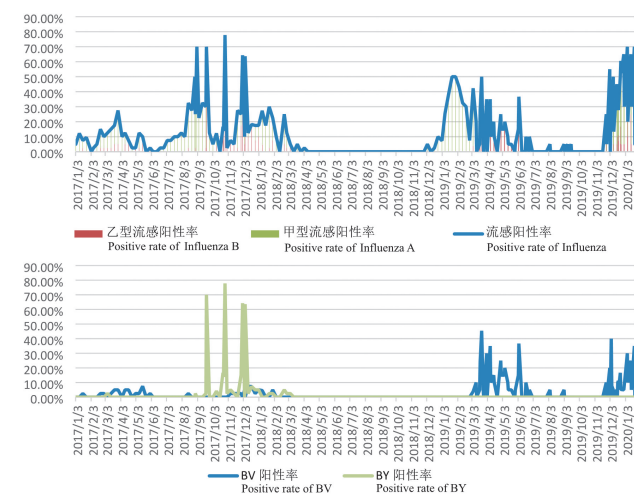


图 4 2017-2019 年武汉市流感病毒核酸检测周阳性率
Fig. 4 Weekly nucleic acid detection positive rate in Wuhan in 2017-2019

2021年武汉市34株乙型流感病毒均未发生耐药变异,对奥司他韦等神经酰胺酶抑制剂敏感^[13],为临床用药提供了分子依据。BV系病毒为维持NA的遗传多样性,较BY系(Influenza B virus Lineage Yamagata,BY)病毒存在更多谱系间和谱系内重排^[16]。武汉市B/WuhanWuchang/2539/2021,HA属于进化分支V1A.3a.2,而NA属于进化分支V1A.3a.1,且NA氨基酸突变除L73F突变外与V1A.3a.1株氨基酸突变一致,考虑该毒株属于HA-V1A.3a.2/NA-V1A.3a.1的系内重组株。同时,NA进化树中V1A.3a.1株和V1A.3a.2株参考序列B/Sichuan-Jingyang/12048/2019和B/Austria/1359417/2021与我市的V1A.3a.1株和V1A.3a.2株序列不属于同一进化分支。其中B/Sichuan-Jingyang/12048/2019的NA序列与澳大利亚的V1A.3a株B/Victoria/2113/2019和日本V1A.3a.2株B/Niigata-C/6/2019的NA序列,不同于多数V1A.3a.1株,归属于另一独立分支,B/Sichuan-Jingyang/12048/2019也属于系内重组株;近两年V1A.3a.2株的NA序列在全球也主要分为与南北半球地域相关的2个分支,而B/Austria/1359417/2021为2022年南半球流感疫苗BV系组分推荐毒株,因此与我市V1A.3a.2株NA序列进化关系相对较远。(https://nextstrain.org/flu/seasonal/vic/na/2y)

本研究使用高通量全基因组测序及生物信息学分析技术,是恢复流感监测后武汉市首年开展的流感病毒序列分析,发现并报道一株HA-V1A.3a.2/NA-V1A.3a.1的系内重组株。综上所述,通过对武汉市2021年乙型流感病毒流行病学和基因特征的分析,探讨了2021年乙型流感的HA和NA基因突变情况,分析了氨基酸突变对疫苗免疫逃逸和病毒耐药的影响,为武汉市流感病毒防控和临床诊疗工作提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Chen R, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza B virus[J]. J Mol Evol, 2008, 66(6): 655-663.
[2] 张晓春,何志群,汪川. 乙型流感病毒病原学研究现状[J]. 现代预防医学, 2020, 47(19): 3616-3618, 3639.

- [3] 吴巨龙,寇增强,孙林,等. 2019-2020年山东省A(H1N1)pdm09亚型流感病毒抗原性及血凝素基因特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 884-887, 892.
[4] 简千棋,侯敏,杨瑶,等. 2017-2019年昆明市A(H1N1)pdm09亚型流感病毒血凝素基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2021, 48(22): 4187-4191.
[5] 王体辉,段延华,韩淑琪,等. 2017-2020年度济宁市乙型流感病毒监测及HA和NA基因变异和进化分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(4): 5.
[6] 方斌,余晓,李翔,等. 2010-2015年湖北省H3N2亚型流感病毒抗原漂移分析[J]. 疾病监测, 2017, 32(5): 387-393.
[7] Nerome R, Hiromoto Y, Sugita S, 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(8): 1569-1583.
[8] Ni F, Kondrashkina E, Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin [J]. Virology, 2013, 446(1-2): 112-22.
[9] 张志敏,秦萌,董晓根,等. 2017年北京市丰台区6例乙型Victoria系流感病毒HA1基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2018, 45(22): 4176-4179.
[10] Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era [J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 1): 1-17.
[11] Wang Q, Cheng F, Lu M, et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin [J]. J Virol, 2008, 82(6): 3011-3020.
[12] 李静,方斌,刘琳琳,等. 湖北地区季节性H1N1流感病毒NA和M基因特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(06): 418-421, 425.
[13] Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3403-3408.
[14] 刘琳琳,韩诗,余晓,等. 2016-2019年湖北省流感疫情及病原学监测分析[J]. 疾病监测, 2020, 35(12): 1105-1109.
[15] 王如敏,崔蕾,潘家兴,等. 2019-2020年海南省乙型流感病毒Victoria系血凝素抗原性及其基因特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(12): 1430-1433.
[16] Langat P, Raghvani J, Dudas G, et al. Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(12): e1006749.

【收稿日期】 2022-10-28 【修回日期】 2023-01-15