

研究报告

2009–2015 年中国甲型 H1N1 流感病毒血凝素基因进化分析

颜文娟¹ 郭艳¹ 李小杉¹ 李伟² 宣杨¹ 宋玥¹ 方坤¹ 卫平民^{1*}

(1. 东南大学公共卫生学院 江苏 南京 210009)

(2. 南京市疾病预防控制中心 江苏 南京 210003)

摘要:【目的】为了解中国地区 2009–2015 年甲型 H1N1 流感病毒流行态势, 分析血凝素 (Hemagglutinin, HA) 基因的变异情况及其遗传进化特征。【方法】汇集国家流感中心 2009–2015 年流感周报的流感流行数据, 分析甲型 H1N1 流感的流行病学特征; 从全球共享禽流感数据倡议组织数据库及美国国家生物技术中心数据库下载甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因序列, 采用生物学软件进行系统进化和遗传特性的分析。【结果】2009–2015 年全国共发生 4 次甲型 H1N1 流感的流行高峰。2009–2015 年毒株与参考毒株 A/California/07/2009(H1N1) 的 HA 基因同源性逐年降低。遗传进化分析显示同一年份的毒株在系统进化树上基本呈现集中分布, 2011 年的毒株独立形成 2 个分支。分子特征表现为 HA 基因的 4 个抗原决定簇氨基酸位点均有变异, 其中 Ca 区的 203 位、Sa 区的 163 位和 Sb 区的 185 位氨基酸位点逐渐替换为新的氨基酸。除 2010 年与 2012 年, 其他年份的毒株通过不同模型均得到正向压力选择 HA 氨基酸位点 240。【结论】甲型 H1N1 流感在中国地区成为主要流行的亚型之一。HA 基因与其编码的氨基酸逐年变异, 未来进一步的流感监测能力还需加强。

关键词: 甲型 H1N1 流感, 血凝素, 分子特征, 进化分析

Evolution of hemagglutinin gene of influenza A/H1N1(09pdm) virus in China, 2009–2015

YAN Wen-Juan¹ GUO Yan¹ LI Xiao-Shan¹ LI Wei² XUAN Yang¹ SONG Yue¹
FANG Kun¹ WEI Ping-Min^{1*}

(1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210003, China)

Abstract: [Objective] To analyze the tendency, genetic characteristics and evolution of hemagglutinin

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81273143); The 11th High-level Talents Cultivation and Funded Project of “Six Talent Peak” in Jiangsu Province (No. 2014-WSN-40); Science and Technology Planning Funded Project of Jiangsu Province (Provincial Key Research Program) (No. BE2015679)

*Corresponding author: Tel: 86-25-83795531; E-mail: mpw1963@126.com

Received: April 18, 2016; **Accepted:** August 11, 2016; **Published online** (www.cnki.net): September 07, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81273143); 江苏省“六大人才高峰”第十一批高层次人才选拔培养资助项目 (No. 2014-WSN-40); 江苏省科技计划 (省重点研发计划) 资助项目 (No. BE2015679)

*通讯作者: Tel: 86-25-83795531; E-mail: mpw1963@126.com

收稿日期: 2016-04-18; **接受日期:** 2016-08-11; **优先数字出版日期** (www.cnki.net): 2016-09-07

gene of the influenza A/H1N1(09pdm) virus circulating in China between 2009 and 2015. **[Methods]** Epidemiological data of A/H1N1(09pdm) and hemagglutinin sequences were analyzed. Epidemiological data were collected from the website of Chinese National Influenza Center and HA sequences of the influenza A/H1N1(09pdm) virus were filtered from The Global Initiative on Sharing All Influenza Data and National Center for Biotechnology Information. Phylogenetic trees and the mutations of amino acids were constructed and analyzed by biological software. **[Results]** A total of 4 activity influenza peaks emerged between 2009 and 2015. Compared with vaccine strain A/California/07/2009(H1N1), the HA gene sequence of 2009–2015 shared different nucleic acid sequence similarity decreased with years. The phylogenetic analysis showed that HA gene of the same year clustered nearly on the phylogenetic tree. The HA gene from 2011 divided into two clusters. The amino acid substitutions of HA protein were observed in all four epitopes. Position 203 in epitope Ca, position 163 in epitope Sa and position 185 in epitope Sb changed into new amino acid gradually. The positive pressure site was observed HA protein site 240 in each year except 2010 and 2012. **[Conclusion]** The influenza A/H1N1(09pdm) has become one of the main subtypes in China. The HA gene and amino acid changes gradually and this emphasize the importance of reinforcing virus surveillance.

Keywords: A/H1N1(09pdm), Hemagglutinin, Molecular characteristics, Evolution analysis

甲型 H1N1 流感自 2009 年 4 月在墨西哥暴发后^[1], 随即在全球引起了 21 世纪首次流感大流行。中国内地首例甲型 H1N1 流感病例于 2009 年 5 月在四川发生^[2], 随即在我国全国范围内引起流感大流行。虽然 2010 年 8 月世界卫生组织宣布甲型 H1N1 流感大流行时期已经渡过, 但该亚型病毒仍在不断变异进化, 局部地区仍旧会持续暴发不同程度的流感流行^[3]。分子遗传进化分析表明该流感病毒基因组是由禽流感、猪流感和人流感病毒基因组混合而成的三源基因重配的新型流感病毒, 其血凝素基因由猪流感病毒进化而来^[4-5]。

流感病毒的血凝素基因 Hemagglutinin, (HA) 编码的血凝素是流感病毒重要的表面抗原和保护性抗原, 具有产生中和性抗体和凝集红细胞等特性, 并在病毒的受体识别和复制过程中起重要作用^[6]。HA 的抗原位点、受体结合位点和糖基化位点等关键的氨基酸突变是病毒抗原性和致病性发生变异重要的分子基础之一^[7], 其基因的改变与流感疫情的发生与流行密切相关。本研究通过公开数据库获取的中国地区流感的流行病学资料及甲型 H1N1 流感病毒的 HA 基因核苷酸序列, 分析 2009 年之后甲型 H1N1 流感病毒在中国地区的流行态势, 对核苷酸序列进行系统进化及氨基酸位点变异分析。为我国甲型

H1N1 流感流行及大流行预警提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2009 年至 2015 年国家流感中心 (<http://www.cnic.org.cn/chn/>) 流感周报中国流感流行的数据, 自 2009 年第 37 周至 2015 年第 52 周, 共 328 周。

截至 2015 年 12 月 31 日, 从全球共享禽流感数据倡议组织(The Global Initiative on Sharing All Influenza Data, GISAID) 数据库 (<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend>) 及美国国家生物技术中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 流感病毒数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) 下载中国地区甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因序列, 共 1 054 条。删除重复的序列和部分同年份同地区同源性较高的序列, 得 374 条序列: 包括 2009 年 160 条、2010 年 88 条、2011 年 58 条、2012 年 8 条、2013 年 33 条、2014 年 19 条和 2015 年 8 条。

1.2 方法

采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5.2.1 软件进行序列比对、基因、氨

基酸的变异分析及系统进化树的构建,采用 N-J 法构建 H1N1 病毒 HA 基因进化树(Bootstrap=1 000)。通过 NetNGlyc 1.0 Server 糖基化位点预测器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/output.php>)对潜在糖基化位点进行预测分析。通过 Data monkey (<http://www.datamoney.org/dataupload.php>)在线软件对 HA 基因的选择性压力进行分析。采用 BEAST v1.8.0 软件进行 Bayesian skyline reconstruction 的构建。

2 结果与分析

2.1 流行病学特征分析

由 2009–2015 年全国流感监测网络实验室监测数据显示,该时间段全国共发生 4 次甲型 H1N1 流感的流行高峰,分别是 2009 年 6 月–2010 年 2 月、2011 年 1–3 月、2012 年 12 月–2013 年 7 月和 2013 年 11 月–2014 年 4 月。2015 年末又呈现上升趋势。2009 年主要为甲型 H1N1 亚型流行;2010 年以甲型 H1N1 亚型、B 型和 H3N2 亚型轮流交替流行;2011 年初以甲型 H1N1 流行为主,3 月以后逐渐由 B 型取代;2012 年则以 H3 亚型与 B 型流感交替流行为主;2013 年 1–7 月主要为甲型 H1N1 流行,7 月以后 H3 亚型病例数逐渐增多;2014 年初甲型 H1N1、H3 亚型与 B 型均有流行,4 月以后主要为 H3 亚型;2015 年以 B 型和 H3 亚型为主(图 1)。2009–2015 年甲型 H1N1 流感病例在我国南北方省

份分布情况表明,南北方均出现 4 次甲型 H1N1 流感流行高峰,第 1、2 次流行高峰,南方省份发病例数多于北方省份,南方在第 3、4 次流行的持续时间长于北方省份。

2.2 同源性分析

将不同年份甲型 H1N1 流感毒株与参考毒株 A/California/07/2009(H1N1)的 HA 基因序列进行比对,其中 2009–2015 年的 HA 基因与参考毒株的一致性分别为 99.2%–99.8%、98.7%–99.7%、98.3%–99.5%、98.4%–98.6%、97.5%–99.5%、97.9%–98.4 和 97.8%–98.3%。2009–2015 年甲型 H1N1 流感毒株与参考毒株的 HA 基因遗传距离分别为 0.005、0.006、0.011、0.016、0.017、0.018 和 0.021,氨基酸遗传距离分别为 0.008、0.010、0.018、0.020、0.022、0.022 和 0.021。各年份内毒株 HA 基因核苷酸的平均遗传距离为 0.004、0.005、0.011、0.010、0.008、0.006 和 0.009。

2.3 系统进化分析

用 MEGA 5.2.1 N-J 法绘制的甲型 H1N1 亚型 HA 基因系统发育进化树如图 2 所示(图中的进化树只包含部分毒株,剔除了部分位于进化树上相同终端分支并且相同年份的序列),不同年份的毒株由不同的颜色表示。结果显示甲型 H1N1 流感病毒同一年份的毒株在系统进化树上基本呈现集中分布。2009–2010 年的毒株主要分成两个分支;2011 年的

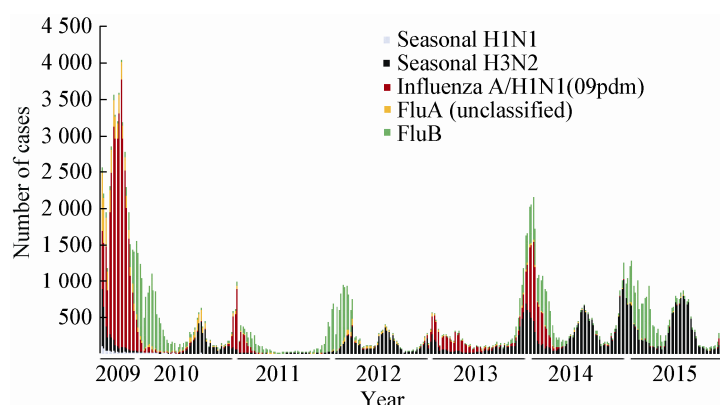


图 1 中国地区 2009–2015 年流感流行情况

Figure 1 Distribution of influenza virus strains in China from 2009 to 2015

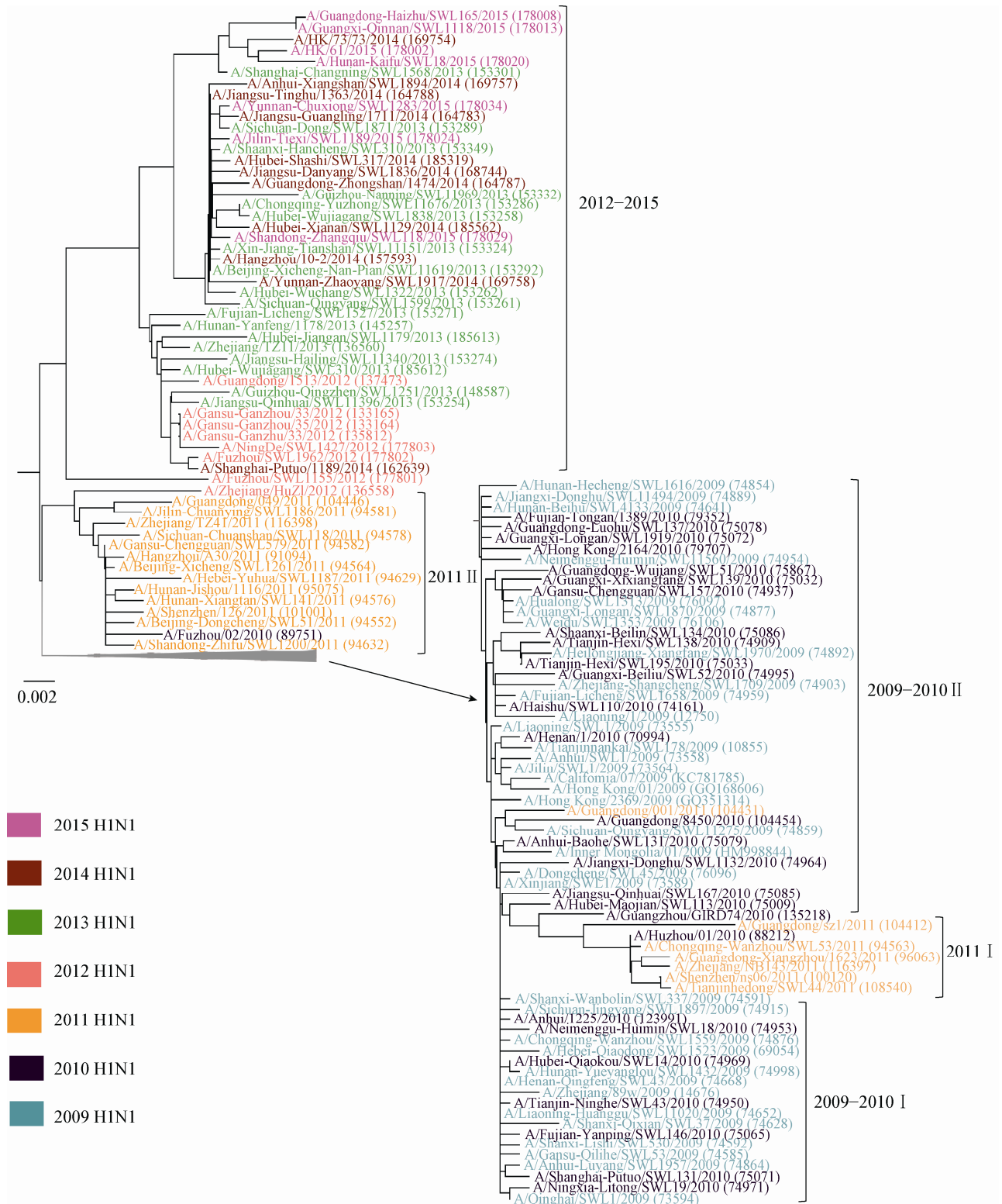


图 2 中国 2009–2015 年甲型 H1N1 流感毒株 HA 基因系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of the HA gene segments of A/H1N1(09pdm) during 2009–2015 in China

注: 标尺值 0.002 代表毒株间的进化距离。

Note: Scale value 0.002 represents the level of number of difference.

毒株独立形成两个支;2012–2015 年的毒株聚集形成一大支。2009–2010 的两大分支的毒株在南北地区的分布上无显著差异,2011 I 分支与 2011 II 分支比较均发生 V216A、P288S、I312V 和 I389F 氨基酸变异,大多数毒株发生 S145T 和 K80T 氨基酸变异。从地域分布上看,2011 I 分支 13 株毒株来自南方,北方毒株有 2 株,分别占 86.7%和 13.3%,2011 II 分支上有 26 株南方毒株和 12 株北方毒株,分别占 68.4%和 31.6%。

2.4 HA 分子特征分析

2.4.1 抗原位点:甲型 H1N1 流感病毒有 4 个抗原决定簇,即 Ca、Cb、Sa 和 Sb,包含 44 个抗原位点^[8-9]。以 A/California/07/2009(H1N1)为参考毒株得到中国地区甲型 H1N1 流感病毒在 2010–2015 年间

氨基酸的变异情况(表 1)。与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)相比,抗原位点发生变异的有 20 处,占 45.45% (Cb 2 个、Ca 6 个、Sa 7 个、Sb 5 个)。Ca 区的 203 位、Sa 区的 163 位和 Sb 区的 185 位氨基酸位点逐年变异,替换为新的氨基酸。

2.4.2 受体结合位点:甲型 H1N1 流感病毒的受体结合位点分别由 220 环(218–225 位)、130 环(132–135 位)和 190 螺旋(187–195 位)构成^[10]。本次研究的甲型 H1N1 流感病毒血凝素基因所编码氨基酸序列的 134、190、191、193、195、219、222、223 及 224 位发生变异。其中自 2013 年起,223 位发生 Q223R 突变的频率相对较高。2013 年的 HA 序列有 27.27%发生 Q223R 变异,2014 年发生变异的有 31.58%,2015 年有 25.00%。

表 1 中国 2009–2015 年甲型 H1N1 流感病毒血凝素基因 HA 抗原决定簇位点变异
Table 1 Amino acids mutation of antigenic epitopes in the HA gene of influenza A/H1N1(09pdm) in China, 2009–2015

Epitope	Site	A/California/07/2009	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Cb	70	L	L/F	L	L	L	L	L	L
	73	A	A/S/T	A	A	A	A	A	A
Ca	138	H	H	H/Y/N	H/N	H/R	H	H	H
	167	N	N	N	N/L/V	N	N	N	N
	168	D	D	D	D	D	D	D	D/N
	170	G	G	G	G/R	G	G	G	G
	203	S	T/S	T/S	T	T	T	T	T/S
	235	E	E	E	E/K	E	E	E	E
Sa	153	K	K	K/E	K	K	K	K/E	K
	154	K	K	K	K	K	K/E	K	K
	155	G	G/E	G/E	G/E	G	G	G	G
	160	K	K/M	K	K/R	K	K	K	K
	161	L	L	L	L	L/I	L	L	L
	162	S	S	S	S/N/I	S	S/N	S	S
Sb	163	K	K	K/T	K/T/N	K	Q/K/N	Q/K	Q
	185	S	S/N	S/T	T/S	T	T/S	T	T
	186	A	A/T	A/T	A	A	A	A	A
	190	S	S/N/G	S/G	S	S	S/I/R	S/R	S
	191	L	L/I	L/I	L/I	L/I	L/I	L/I	L/I
	193	Q	Q	Q	Q	Q	Q/K	Q	Q

2.4.3 糖基化位点:HA 蛋白糖基化位点在稳定 HA 三维结构和诱导机体产生保护性抗体方面起一定作用,其增加或减少对病毒的生物学特性均有一定影响^[11]。在本次研究中,对所有纳入的序列进行潜在糖基化位点的预测,固定的糖基化位点 10NNTS、11NTS、23NVT、87NGT 和 287NTS 存在于所有毒株;糖基化位点 119NTS 存在于 2010 年的 1 株、2011 年的 2 株和 2013 年的 2 株;2011 年有 3 株出现糖基化位点 162NTS,1 株出现 162NKS;2013 年 2 株出现 162NNS;第 239 位糖基化位点 NTT 只存在于 2011 年的 1 株;2013 年的 1 株第 276 位糖基化位点 NTT 消失;糖基化位点 431NET 与 472NNT 分别存在于 2010 年与 2011 年的 1 株;2009 年的 2 株和 2010 年的 3 株第 481 位糖基化位点消失;2009 年的 1 株和 2011 年的 1 株糖基化位点 540NGS 消失。

2.5 选择性压力分析

研究采用 SLAC、FEL 和 REL 模型对各年份的 HA 序列进行选择压力分析。2009 年的序列通过 SLAC 和 FEL 模型均得到正向选择压力位点 240;2010 年序列通过 SLAC 和 FEL 模型均得到正向选择压力位点 145;2011 年序列通过 FEL 模型得到 145 和 338 两个正向选择压力位点,通过 REL 得到 20 个正向选择压力位点;2013 年序列通过 SLAC、FEL 和 REL 模型均得到正向选择压力位点 240;

2014 年序列通过 REL 得到 20 个正向选择压力位点;2015 年序列通过 REL 得到 5 个正向选择压力位点(表 2)。

2.6 进化动力学分析

通过 Bayesian skyline reconstruction 建立模型,对 2009–2015 年甲型 H1N1 流感流行的历史和进化动态进行估计。结果表明(图 3),流感病毒遗传多样性在 2009 年维持稳定状态,分别在 2010 年及 2011 年有两次下降趋势,2012 年 6 月呈现上升趋势,此后至 2015 年维持于稳定状态。

3 结论与讨论

国家流感中心流感监测结果显示,2009–2015 年全国流感流行主要为 B 型、甲型 H1N1 和季节性 H3N2 亚型,3 种亚型的流感病毒交替或同时流行。甲型 H1N1 流感共 4 次流行高峰,已成我国流感流行的重要亚型之一,其流行呈现一定的季节性,主要在冬春季节。甲型 H1N1 流感的流行在南北基本同步,但南方省份的流行时间相对较长,例数较多。江苏、云南和天津等地的结果与本研究的统计结果基本一致^[12-14],说明甲型 H1N1 流感的流行呈全国性。同源性分析结果显示,2009–2015 年甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因与参考毒株 A/California/07/2009(H1N1)的同源性逐年降低,核苷酸与氨基酸的遗传距离逐渐增大,提示甲型 H1N1 流感病毒逐渐进化变异。

表 2 中国 2009–2015 年甲型 H1N1 流感毒株正向选择压力位点分布
 Table 2 The distribution of positively selected sites among A/H1N1(09pdm) in China, 2009–2015

Year	SLAC	FEL	REL
2009	240	145/240/391	145/391
2010	145	145	145/391
2011	ND	145/338	3/8/15/101/116/145/160/179/180/184/232/239/240/251/269/338/391/418/468/489
2012	ND	ND	ND
2013	240	240	180/240/544
2014	ND	ND	6/13/15/101/103/137/144/170/180/200/207/240/251/273/289/370
2015	ND	ND	185/208/240/286/508

注: ND: 未发现。
 Note: ND: Not detected.

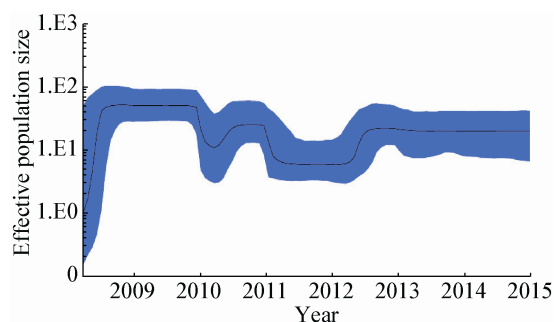


图3 甲型 H1N1 流感 HA 基因进化动力学

Figure 3 Evolutionary dynamics of the HA gene of A/H1N1(09pdm)

注：黑色实线为估计中位数，蓝色区域为 95%置信区间。

Note: The black line is the median estimate, and the blue range shows the upper and lower bounds of the 95% confidence interval.

系统进化分析显示本研究的 2009–2010 年毒株属于 Anton 等^[15]研究的 Group 1，体现在 P83S、S128P、S203T 和 I321V 位点变异；2011 II 分支属于 Group 7，氨基酸位点的变异主要为 S143G、S185T 和 A197T；2012–2015 年毒株属于 Group 6，具有 S185T 和 P97H 的氨基酸位点变异。从系统进化树上除 2011 年，其他同年份的毒株基本聚集分布，2011 年甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因在进化树的分布具明显差异，地域分析显示 2011 年的两个分支南北毒株比例具有差异，2011 I 分支主要为南方毒株，提示我国 2011 年不同地域分离到的甲型 H1N1 流感病毒的抗原性和基因特性发生的变异具有显著的差异。

一般认为，具有流行病学意义的新甲型流感病毒在血凝素重链 HA1 蛋白分子上至少有 4 个以上氨基酸发生替换，涉及 2–3 个抗原决定簇^[16]。抗原位点的突变结合受体结合位点突变也可导致病毒抗原漂移^[17]。本研究氨基酸位点变异频率较高的 P83S、S203T 和 I321V 在 Khandaker 等^[18]的研究中也存在，而在他们研究中变异较高的位点 A197T 与 S143G 在本研究中主要出现在 2011 年的序列中。有研究发现 D222G 氨基酸位点变异是甲型 H1N1 流感病毒的第一个潜在致病标志，并可能导致临床重症，具有重要的临床意义^[19]。本研究纳入的序列中发生 D222G 氨基酸位点变异的频率不高，而自 2013 年起，

223 位发生 Q223R 突变的频率相对较高，该位点变异是否存在生物学意义需进一步研究探讨。

由于缺乏病毒 RNA 聚合酶，流感病毒 RNA 具有较高的自发突变率，这种高突变率有助于其免疫逃逸^[20]。于流感病毒而言，对于免疫逃逸的变体，其正向选择往往发生于宿主交叉免疫水平较低的人群，可影响流感疫苗的近期效果^[21]。正向选择位点 240 位于 HA 蛋白的受体结合位点。除 2010 年及 2012 年外，该位点均被检测为正向选择压力位点。Li 等^[22]认为，正向选择位点若与受体结合能力有关，则这些位点的选择可能有助于 H1N1 流感的宿主从猪到人的适应。

进化动力学结果显示，2009 年流感遗传多样性维持于较高水平，2010 年出现一次下降趋势，可能由于 2009 年甲型 H1N1 流感暴发后，全国积极采取相应公共卫生措施的影响。Ebranati 等^[23]认为病毒遗传多样性的波动与其引起的暴发流行相对应，本研究结果显示，2011 年第二季度至 2012 年第一季度，病毒遗传多样性维持于较低水平，此时该亚型流感也处于低发状态。2012 年第二季度病毒遗传多样性增加，监测结果显示 2013 年及 2014 年出现该型流感的流行。流感基因遗传多样性的增加在一定程度上表明甲型 H1N1 流感的感染增多。

通过本研究对中国地区甲型 H1N1 流感病毒的流行病学及 HA 基因遗传特性分析，其抗原位点的变异、糖基化位点的变化、正向选择压力位点的存在及遗传多样性的波动均预示该亚型在未来的时间里可能继续成为优势毒株。提示对流感病毒连续监测的重要性，并监测不同区域中病毒的潜在发展变化，为流感的分析预警及制定防控策略提供科学依据。

参考文献

- [1] Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A(H1N1): Early findings[J]. Science, 2009, 324(5934): 1557-1561
- [2] Wang W, Pan M, Chang GH, et al. Laboratory confirmation of the first influenza A(H1N1) imported case in mainland China[J]. Chinese Journal of Virology, 2009, 25(S): 4-7 (in Chinese)
王伟, 潘明, 常国辉, 等. 中国内地首例确诊甲型 H1N1 流感病例的实验室检测[J]. 病毒学报, 2009, 25(S): 4-7

- [3] WHO. Pandemic influenza A(H1N1)-draft donor report[EB/OL]. [2011-03-01]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_donor_032011/en/
- [4] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 197-201
- [5] Xie JX, Yin JH, Li SH, et al. Evolution analysis of hemagglutinin gene of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2009, 30(6): 613-617 (in Chinese)
谢佳新, 殷建华, 李淑华, 等. 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒血凝素基因进化分析[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(6): 613-617
- [6] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69(1): 531-569
- [7] Koel BF, Mögling R, Chutinimitkul S, et al. Identification of amino substitution supporting antigenic change of influenza A(H1N1)pdm09 viruses[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(7): 3763-3775
- [8] Igarashi M, Ito K, Yoshida R, et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8553
- [9] Brownlee GG, Fodor E. The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2001, 356(1416): 1871-1876
- [10] Gamblin SJ, Haive LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin[J]. *Science*, 2014, 303(5665): 1838-1842
- [11] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(S1): S24-S28
- [12] Zi HR, Guo Y, Deng F, et al. Molecular characteristics of hemagglutinin and neuraminidase genes of influenza A/H1N1(09pdm) viruses, Jiangsu province, 2013[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 2015, 35(6): 812-822 (in Chinese)
资海荣, 郭艳, 邓斐, 等. 江苏省 2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感病毒血凝素和神经氨酸酶分子特征分析[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2015, 35(6): 812-822
- [13] Li J, Zhao XN, Cao YH, et al. Analysis of HA and NA genes of influenza A H1N1 virus in Yunnan province during 2009–2014[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(6): 674-678 (in Chinese)
李娟, 赵晓南, 曹艺会, 等. 云南省 2009–2014 年甲型 H1N1 流感病毒 HA 及 NA 基因特征分析[J]. *病毒学报*, 2015, 31(6): 674-678
- [14] Guo LR, Kong M, Li XY, et al. Surveillance analysis of influenza in Tianjin from 2010 to 2013[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(13): 2795-2797 (in Chinese)
郭丽茹, 孔梅, 李晓燕, 等. 2010 年–2013 年天津市流感病原学监测分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(13): 2795-2797
- [15] Anton A, Pozo F, Niubo J, et al. Influenza A(H1N1)pdm09 virus: viral characteristics and genetic evolution[J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2012, 30(S4): 10-17
- [16] Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin[J]. *Annual Review of Immunology*, 1990, 8(1): 737-787
- [17] Shih AC, Hsiao TC, Ho MS, et al. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(15): 6283-6288
- [18] Khandaker I, Suzuki A, Kamigaki T, et al. Molecular evolution of the hemagglutinin and neuraminidase genes of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses in Sendai, Japan, during 2009–2011[J]. *Virus Genes*, 2013, 47(3): 456-466
- [19] Hough HS, Garner J, Zhou YF, et al. Emergent 2009 influenza A(H1N1) viruses containing HA D222N mutation associated with severe clinical outcomes in the Americans[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2012, 53(1): 12-15
- [20] Holmes EC. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution[J]. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(12): 543-546
- [21] Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus[J]. *Science*, 2004, 305(5682): 371-376
- [22] Li WF, Shi WF, Qiao HJ, et al. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 183
- [23] Ebranati E, Pariani E, Piralla A, et al. Reconstruction of the evolutionary dynamics of A(H3N2) influenza viruses circulating in Italy from 2004 to 2012[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137099