

一例混合感染中 H3N2 和 H7N9 流感病毒的分子遗传特性

杜雪飞¹ 丁洁¹ 祁贤^{2*} 崔仑标² 石利民¹

(1. 南京市疾病预防控制中心 江苏 南京 210009)

(2. 江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009)

摘要:【目的】揭示一例混合感染中 H3N2 和 H7N9 流感病毒的分子遗传特性。【方法】通过荧光定量 PCR 法对标本进行流感病毒分型检测。通过二代测序技术对病毒分离物进行全基因组测序分析。【结果】2013 年 4 月在南京市检测到一例人季节性 H3N2 流感病毒和禽流感 H7N9 病毒混合感染, 混合病毒分别命名为 A/Nanjing/M1/2013 (H3N2) (M1-H3N2) 和 A/Nanjing/M2/2013 (H7N9) (M2-H7N9)。分离株 M2-H7N9 HA 蛋白的 Q226L 位点和 PB2 蛋白 E627K 位点发生突变, 增强了病毒对人体的感染能力。【结论】报道了一起人混合感染 H3N2 和 H7N9 流感病毒病例, 提示人可能成为流感病毒基因“混合器”, 应高度关注 H7N9 病毒与人季节性流感病毒的基因重配现象。

关键词: 甲型流感病毒, 混合感染, H3N2 亚型, H7N9 亚型

Genetic characterization of influenza A H3N2 and H7N9 viruses in a mixed infection case in Nanjing, 2013

DU Xue-Fei¹ DING Jie¹ QI Xian^{2*} CUI Lun-Biao² SHI Li-Min¹

(1. Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: [Objective] To analysis the molecular genetic characteristics of influenza A virus H3N2 and H7N9 viruses in one case of mixed infection. [Methods] Using a set of primers and probes for influenza virus genotyping, specimens were detected by real-time quantitative PCR method. Whole-genome sequences of virus isolates were obtained by second-generation sequencing technology. [Results] In April 2013, one mixed infection with seasonal H3N2 influenza virus and avian influenza H7N9 virus were confirmed in Nanjing, and two mixed viruses were isolated, which named A/Nanjing/M1/2013 (H3N2) (M1-H3N2) and A/Nanjing/M2/2013 (H7N9) (M2-H7N9), respectively. Some important molecular markers associated with host adaptation and virulence were identified in M2-H7N9 virus. M2-H7N9 virus had substitution Q226L (H3 numbering) in the receptor-binding site of hemagglutinin, which may facilitate the viruses to bind to sialic acid (SA)-2,6-Gal-terminated saccharides that are abundant in human upper respiratory epithelium. There was substitution at position

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK20131450); 江苏省医学重点人才项目(No. RC2011084); 南京市医学科技发展专项资金项目(No. YKK10129)

*通讯作者: Tel: 86-25-83759506; 信箱: qixiansync@hotmail.com

收稿日期: 2014-11-24; 接受日期: 2015-01-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-16

627 (E→K) in the PB2 protein, which enhances the ability of the virus infection on the human.

[Conclusion] This study provided a direct evidence for human as “mix vessel” of influenza virus, and the reassortment of seasonal influenza viruses and avian H7N9 viruses should be concerned.

Keywords: Influenza A virus, Mixed infection, H3N2 subtype, H7N9 subtype

甲型流感病毒(Influenza A virus)是引起人类季节性流感和周期性流感大流行的主要病原, 分类上属于正粘病毒科。根据病毒粒子表面两个糖蛋白血凝素 (Hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 的抗原差异, 甲型流感病毒可分为不同的血清型^[1]。野生水禽是甲型流感病毒的主要自然储存宿主, 目前已经发现了 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型^[2]。2012 年以来, 在拉丁美洲的蝙蝠体内检测到 2 种新的流感病毒亚型, 分别命名为 H17N10 和 H18N11^[3], 但它们在甲型流感病毒生态中的作用并不清楚。

除了自然储存宿主, 甲型流感病毒还可以跨物种感染人和其他多种动物(包括家禽、猪、马、犬、猫、海洋哺乳动物等), 引起发病并可能形成稳定的宿主特异性病毒谱系。传统上认为, 由于宿主限制性因素, 禽流感病毒一般不容易跨种传播感染人^[1]。但自从 1997 年香港 H5N1 亚型禽流感病毒感染人事件以来, 人感染禽流感病毒的病例频繁发生, 禽流感成为持续引人注目的重大公共卫生事件^[4]。目前有文献记载的可以感染人的禽流感病毒主要有 H5、H9、H7 和 H10 等亚型。2013 年春, 一种新的基因重配 H7N9 亚型禽流感病毒在中国的长江三角地区出现, 持续引起多人感染并造成严重疾病^[5-6]。目前该病毒已经扩散到华中和华南地区, 继续引发新的病例, 至 2014 年 7 月 14 日, 全国(包括港澳台)共报告 149 例感染病例。H7N9 亚型禽流感病毒对人类健康和公共卫生造成严重的威胁, 病毒的演化趋势也成为关注的热点。2013 年 4 月, 南京发现 1 例季节性 H3N2 病毒和 H7N9 禽流感病毒混合感染的病例, 本文在全基因组序列分析的基础上, 对这起混合感染病例中 2 种病毒的分子遗传特征进行了详细分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养液、0.25%胰酶和胎牛血清等均购自美国 Gibco 公司; 核酸提取 RNeasy Mini Kit、Qiagen QiaAmp Viral RNA Kit、High Pure PCR Product Purification Kit 以及荧光定量 RT-PCR 试剂盒 Quant-iTect Probe RT-PCR Kit 均购自德国 QIAGEN 公司; 流感病毒核酸分型检测(包括 A 型、B 型、H1、H3、H5、H9 和 H7)引物探针由中国国家流感中心提供; Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 和二代测序平台购自美国 Illumina 公司。

1.2 标本检测

2014 年 4 月 26 日, 南京市疾控中心微生物检测中心收到 1 份流感样病例咽拭子标本。患者为一名 15 周岁中学生, 表现发热(39 °C)、轻微咳嗽、头痛等症状, 没有禽类动物接触史。采用荧光定量 PCR 法对标本进行流感病毒核酸分型检测(包括 A 型、B 型、H1、H3、H5、H9 和 H7)。

1.3 病毒分离

将标本接种 MDCK (Madin-Darby canine kidney)细胞, 按常规方法进行病毒分离。所有操作在江苏省疾控中心生物安全三级实验室里进行。

1.4 病毒基因组测序

根据 Qiagen QiaAmp Viral RNA Kit 说明书提取基因组 RNA, 以 U12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3')反转录引物生成单链 cDNA, 通过 A 型流感病毒通用引物一步法扩增流感病毒基因组 8 个节段, PCR 产物根据 High Pure PCR Product Purification Kit 说明书纯化产物作为高通量测序模板。

通过 Qubit 2.0 荧光计将纯化的 PCR 产物准确定量后, 使其稀释成 2×10^7 ng/L 作为测序模板, 按

照 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 说明构建测序文库。主要步骤包括 DNA 的 Tagmentation、PCR 扩增、纯化、文库标化及混合。取 800 μ L 混合样加入 Illumina MiSeq platform 测序试剂样品孔进行仪进行全基因序列测定, 序列读取以 A/Anhui/1/2013(H7N9) 作为参考序列 (GISAID, accessions EPI439503–EPI439510)。采用 CLC Genomics workbench (CLC Bio) 对测序结果进行拼接整理。

1.5 进化分析

测序获得的序列采用 BLASTn 软件在线分析, 确定 GenBank 和 GISAID 数据库中的参考核苷酸序列和毒株分类。用 MegAlign program (DNASTar, 美国) 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对。采用 Maximum likelihood 法 (MEGA 4.1, 美国) 构建病毒基因组进化树, 序列比对采用 ClustalX 1.83 软件。

2 结果

2.1 标本检测和病毒分离

通过荧光定量 PCR 对标本进行检测, 结果流感病毒 B 型、H1、H5 和 H9 核酸检测阴性, 而 A 型、

H3 和 H7 核酸阳性, 初步判定为标本存在 A 型流感病毒 H3 和 H7 混合感染现象 (图 1)。标本接种 MDCK 细胞, 细胞 24 h 开始出现病变, 72 h 病变达到 90%。对病毒培养物进行流感病毒核酸分型检测, 结果流感病毒 A 型 H3 和 H7 亚型特异性核酸阳性。

2.2 基因组测序和进化树分析

通过 2 代测序平台, 在标本 MDCK 细胞接种物中, 获得 2 株流感病毒的全基因组序列, 通过 BLASTn 软件在线分析, 确定分别为 H3N2 和 H7N9 流感病毒序列。将这两株混合病毒分别命名为 A/Nanjing/M1/2013 (H3N2) (M1-H3N2, GISAID 序列号为 EPI450524–EPI4505225 和 EPI456672–EPI456677) 和 A/Nanjing/M2/2013 (H7N9) (M2-H7N9, GISAID 序列号为 EPI450526–EPI450527 和 EPI453647–EPI453652)。毒株 M1-H3N2 全基因组 8 片段核苷酸和推导的氨基酸序列与 2012–2013 年流行的人季节性 H3N2 病毒 (如 A/Beijing/01/2012 等) 的相似性都高达 99%; 而毒株 M2-H7N9 全基因组 8 片段核苷酸和推导的氨基酸序列与 2013 年中国出现新 H7N9 流感病毒 (如 A/Jiangsu/1/2013 等) 的相似性也都高达 99%。

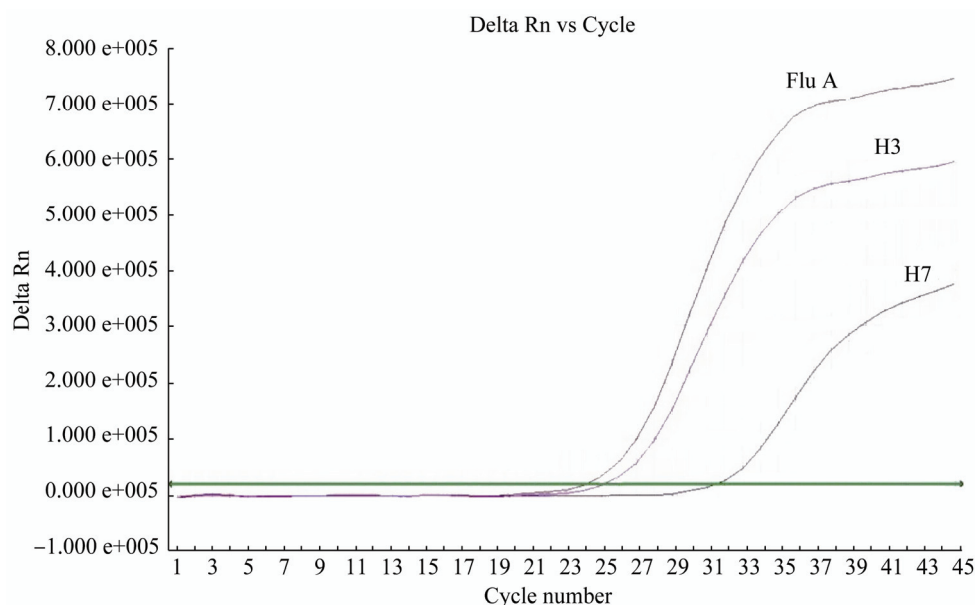


图 1 标本 Real-time PCR 检测结果
Figure 1 Detection of sample by real-time PCR

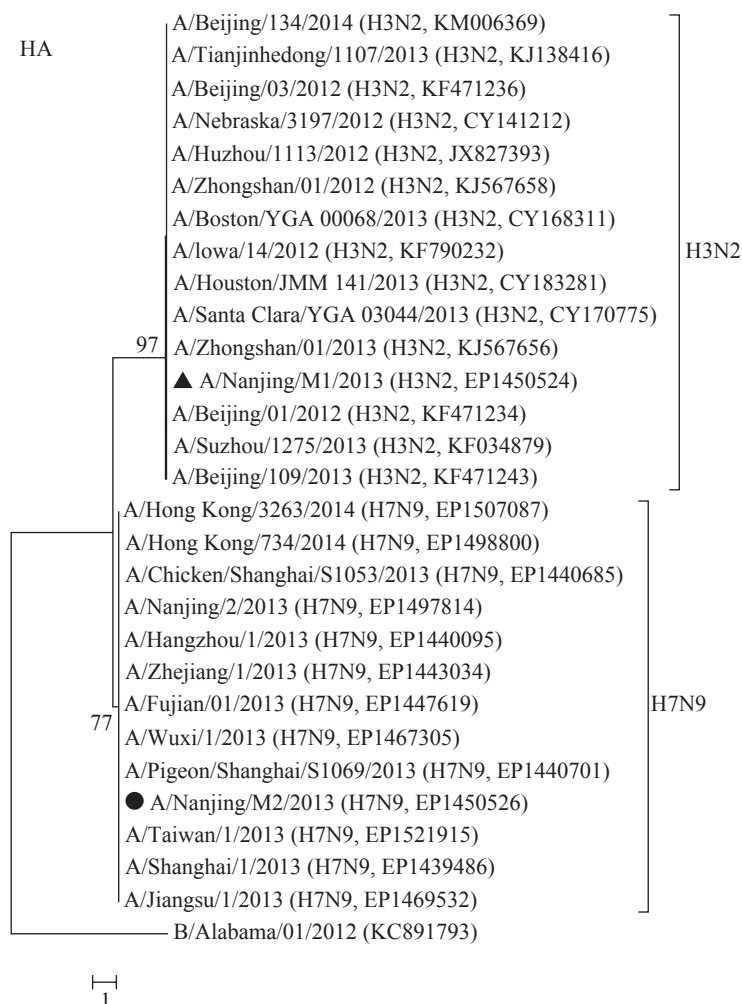
以 B 型流感病毒相对应的基因片段核苷酸序列为根, 用最大似然法构建分离株 M1-H3N2 和 M2-H7N9 的 8 基因进化树(图 2)。8 基因进化树上, 分离株 M1-H3N2 和 M2-H7N9 分别与人季节性 H3N2 病毒和 H7N9 病毒处于一个分支, 进一步证实 2 个分离株的不同基因来源, 表明分离培养物和原始标本中人季节性 H3N2 病毒和 H7N9 病毒混合感染的存在。

2.3 分离株的分子特征

在全基因组序列分析的基础上, 对分离株 M1-H3N2 和 M2-H7N9 的编码蛋白关键氨基酸位点

进行了分析(表 1)。分离株 M1-H3N2 具有典型的人季节性 H3N2 流感病毒分子特征: HA 蛋白的裂解位点含有 1 个碱性氨基酸; HA 蛋白的受体结合区 226 位和 228 位氨基酸分别是 Q 和 S, 对人呼吸道上皮细胞 $\alpha 2-6$ 半乳糖苷唾液酸(SA $\alpha 2-6$ Gal)受体具有较强的亲嗜性; NA 蛋白 276 (H \rightarrow Y)和 294 (R \rightarrow K)位点没有发生突变, 保留了病毒对神经氨酸酶抑制剂的敏感。PB2 蛋白 627 位氨基酸为 K, 表明病毒能够很好适应人体上呼吸道细胞温度; NS1 蛋白的 PL 基序发生缺失。

就分离株 M2-H7N9 而言, 其 HA 蛋白的裂解



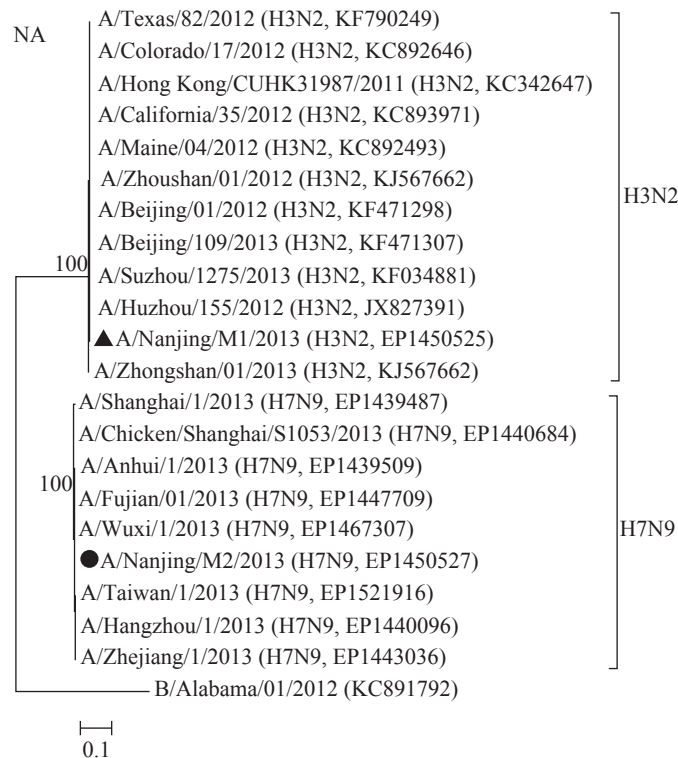


图2 分离株 A/Nanjing/M1/2013 (H3N2)和 A/Nanjing/M2/2013 (H7N9) HA 与 NA 基因进化树

Figure 2 Phylogenetic analysis of HA and NA genes of A/Nanjing/M1/2013 (H3N2) and A/Nanjing/M2/2013 (H7N9)

Note: The tree was constructed by maximum likelihood (MEGA 4.1). Horizontal distances are proportional to genetic distance. Vertical lines are for spacing branches and labels. ▲: A/Nanjing/M1/2013 (H3N2); ●: A/Nanjing/M2/2013 (H7N9). All the isolates were listed name, subtype and GenBank or GISAID accession. The bold words indicate the virus host lineages.

位点氨基酸序列为 PEIPKGRGLF, 含有 1 个碱性氨基酸, 具有低致病性禽流感病毒的分子特性; HA 蛋白的受体结合区 226 位氨基酸发生突变(Q→L), 理论上增强了对人呼吸道上皮细胞 α 2-6 半乳糖苷唾液酸(SA α 2-6Gal)受体的结合能力。NA 蛋白在 69-73 位(以 N2 氨基酸序列排序)缺失了 5 个氨基酸, 这是禽流感病毒由野生水禽适应陆生家禽(鸡、鹌鹑等)的结果。NA 蛋白 276 (H→Y)和 R294K (R→K)位点没有发生突变, 保留了病毒对神经氨酸酶抑制剂的敏感。PB2 蛋白 E627K 的突变, 被认为是禽流感病毒适应哺乳动物的一个重要标记, 分离株 M2-H7N9 蛋白 627 位氨基酸有 E 突变为 K, 对人体的适应能力明显增强。

3 讨论

甲型流感病毒一个显著的特点是血清型复杂,

变异进化频繁。基因重配是流感病毒进化的一种主要方式。不同亚型或者不同宿主来源的流感病毒通过基因重配而产生的子代病毒, 具有明显的选择优势。基因重配也是产生人类流感大流行病毒的一种主要方式, 除了 1918 年西班牙流感(H1N1)外, 1957 年亚洲流感(H2N2)、1968 年香港流感(H3N2)和 21 世纪甲型 H1N1 流感(2009)都是由基因重配病毒引发^[1,7]。这些大流行重配病毒有一共同特点是都含有之前人群中流行的流感病毒基因。我们之前的研究表明, 2013 年初在中国长江三角地区出现的 H7N9 禽病毒内部基因重配异常活跃^[8]。如果基因进化活跃的 H7N9 病毒与人季节性流感病毒(H1N1 或 H3N2 病毒)发生基因重配, 就可能产生引起人类新的流感大流行毒株。本研究从流感样症状的患者体内检测到禽流感 H7N9 病毒和人季节性 H3N2 病毒

表 1 分离株 A/Nanjing/M1/2013 (H3N2)和 A/Nanjing/M2/2013 (H7N9)编码蛋白关键氨基酸位点分析
Table 1 Analysis of the key functional amino acid sites in different viral proteins of A/Nanjing/M1/2013 (H3N2) and A/Nanjing/M2/2013 (H7N9)

蛋白 Proteins	突变位点 Mutation sites	分离株 Viruses	
		A/NJ/M1/2013 (H3N2)	A/NJ/M2/2013 (H7N9)
PB2	D701N	D	D
	E627K	K	K
	Q591K	Q	Q
PB1	N375S	S	N
	I368V	I	V
PB1-F2	N66S	N	N
HA	HA1 与 HA2 裂解位点	EKQTRGIF	PEIPKGRGLF
	Q226L	I	L
	G228S	S	G
NA	柄区缺失	—	69–73 位
	H276Y	H	H
M1	R294K	R	R
	N30D	D	D
	T215A	A	A
M2	S31N	N	N
NS1	PL	—	RSEV
	D92E	D	D
	P42S	S	S

混合感染,提示人可能成为流感病毒基因“混合器”,应高度关注 H7N9 病毒与人季节性流感病毒的基因重配现象。值得注意的是,本研究尚不清楚病毒在混合感染过程中是否发生了基因重配。接下来的工作需要通过蚀斑技术对病毒进行克隆纯化,进一步分析病毒发生基因重配的可能性,为评价病毒的未来演化提供重要参考。

基因点突变是流感病毒进化的另一种重要方式。一般情况下,禽流感病毒若要突破种属障碍能够成功跨种感染人,一些重要蛋白的关键氨基酸位点要发生相应的改变^[9]。与高致病性 H5N1 禽流感病毒相比,H7N9 病毒属于低致病性禽流感病毒,但感染人的能力明显高于前者^[5],这一现象可以从 H7N9 病毒的分子特征上得到部分解释^[10]。HA 蛋白与宿主细胞表面受体的结合是感染发生的关键

一步。与 HA 蛋白结合的细胞受体有两类:α2-3 半乳糖苷唾液酸(SAα2-3Gal)和 α2-6 半乳糖苷唾液酸(SAα2-6Gal)。禽类消化道主要表达 SAα2-3Gal 受体,与之适应,禽流感病毒主要结合 SAα2-3Gal 受体^[11];而人呼吸道上皮细胞主要表达 SAα2-6Gal 受体^[12]。因此禽流感病毒跨物种感染人的首要前提是 HA 蛋白受体结合特性的转变,即由 SAα2-3Gal 受体亲嗜性向 SAα2-6Gal 受体亲嗜性转变。HA 蛋白受体结合区的一些关键氨基酸位点在受体亲嗜性转变中起着关键作用,本研究中 M2-H7N9 分离株的 HA 蛋白受体结合区的 Q226L 位点发生突变,理论上增强了对 SAα2-6Gal 受体的结合能力,这可能是该病毒能够感染人的一个分子基础。此外,分离株 M2-H7N9 的 PB2 蛋白 E627K 位点发生突变,增强了病毒在人体内复制能力^[13]。虽然 H7N9 病毒具

备了感染人的某些分子特征,但一般认为,目前病毒还没有发生重大宿主适应性变异,还不具备持续的人传人能力。但病毒未来进化变异趋势值得关注,除了基因重配,持续的点突变也可能增强 H7N9 病毒对人体的适应和传播能力,从而可能产生引起人类新的流感大流行毒株。

参 考 文 献

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(1): 152-179
- [2] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. Journal of Virology, 2005, 79(5): 2814-2822
- [3] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(10): e1003657
- [4] Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(2): 243-267
- [5] Gao HN, Lu HZ, Cao B, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 368(24): 2277-2285
- [6] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 368(20): 1888-1897
- [7] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic[J]. Nature, 2009, 459(7250): 1122-1125
- [8] Cui L, Liu D, Shi W, et al. Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3142
- [9] Cauldwell AV, Long JS, Moncorge O, et al. Viral determinants of influenza A virus host range[J]. The Journal of General Virology, 2014, 95(6): 1193-1210
- [10] Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus[J]. Nature, 2013, 499(7459): 500-503
- [11] Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site[J]. Virology, 1997, 233(1): 224-234
- [12] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. Nature, 2006, 440(7083): 435-436
- [13] Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses[J]. Journal of Virology, 2001, 75(11): 5398-5404

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:(1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介,并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现,同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。