DOI:10.16016/j.2097-0927.202203022

广东2020-2021年乙型流感病毒分子变异特征

谭 静[1,2],梁丽君[2],黄 平[1,2],黄晓玲[2],李柏生[2],曹 虹[1],邹丽容[2] 510515 广州,南方医科大学公共卫生学院[1];511430 广州,广东省疾病预防控制中心广东新发突发传染病防治工作站[2]

[摘要] **目的** 了解乙型流感Victoria株系(influenza B victoria lineage, Bv)疫情的分子基础,分析该株系流感的流行趋势。**方法** 基于广东流感监测网络(GDISN)采用时空分布方法筛选流感Bv毒株,检测HA/NA基因核苷酸序列;采用MEGA 7.026、Datamonkey 2.0、NetNGlyc 1.0 Server、SPSS 23.0软件等,分析其核苷酸/氨基酸序列的同源性、进化树、氨基酸与表位变异、糖基化位点和进化选择性等。**结果** 广东2021年毒株较2020年毒株同源性呈现明显差异($P<0.01$),2021年下半年毒株(17株)HA基因与疫苗株B/Austria/1359417/2021同源性高达(99.28±0.25)%。HA基因A表位($H_{137}N/Q$、$A_{142}T$和$R_{148}G$)、B表位($P_{159}L$和$N_{162}K$)和D表位($S_{209}N/D$和$T_{211}A$)以及RBS位点($P_{253}Q$)发生变异;2020年毒株呈Bv.1a.3株系特征,2021年毒株主要呈Bv.1a.3a.2株系特征。HA与NA基因潜在糖基化位点均无有意义改变;NA基因没有出现药敏位点变异;HA和NA基因氨基酸负向选择位点分别是73、138、437和497位点和179、321和335位点。**结论** 广东2021年毒株HA和NA基因较2020年毒株均发生较明显变异,尤以2021年下半年毒株的HA基因变异明显;Bv毒株HA基因表位出现新变异,提示引发下一流感季节广泛局部流行的预警。

[关键词] 乙型流感;乙型Victoria株系(Bv);进化;表位;负向选择

[中图法分类号] R195.4; R394.3; R511.7 [文献标志码] A

Molecular mutation features of influenza B viruses in Guangdong, 2020-2021

TAN Jing[1,2], LIANG Lijun[2], HUANG Ping[1,2], HUANG Xiaoling[2], LI Baisheng[2], CAO Hong[1], ZOU Lirong[2]

[1]School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [2]Guangdong Workstation for Emerging Infectious Disease Control and Prevention, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong Province, 511430, China

[**Abstract**] **Objective** To learn the molecular characteristics of influenza B Victoria lineage (Bv) and evaluate the influenza B spread trend about the epidemic. **Methods** Based on the Guangdong Influenza Surveillance Networks (GDISN) to selected the Bv with space-time sampling, the nucleotide sequences of HA/NA genes were detected. The evolution and mutations of both genes were analyzed in homology with MEGA 7.026 和 SPSS 23.0, in evolutionary tree with neighbor-joining method, in selective evolution with Datamonkey 2.0. **Results** The nucleotide homologies of HA/NA genes in the 2021 strains were statistically different from these of the 2020's ($P<0.01$), in which the those of HA genes in 17 strains isolated in the second half of 2021 were up to (99.28±0.25)% compared with these in the vaccine strain B/Austria/1359417/2021. As to HA genes, the epitope A (H137N/Q, A142T and R148G), B (P159L and N162K) and D (S209N/D and T211A) were mutated, therefore the 2020 and 2021 strains in Guangdong were respectively classified into Clade Bv.1a.3 and Bv.1a.3a.2. There were significantly no mutations in the

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2016A030313775);广州市科技计划项目(201904010286);广东省中医药局科研项目(20202024)

[通信作者] 黄 平,E-mail: pphuang1@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

potential glycosylation sites in HA/NA genes, as well in the NA known drug sensitive sites. Evolutionary selection conducted the negative selection sites in HA/NA genes, including amino acid sites 73, 138, 437 and 497 in HA and sites 179, 321 and 335 in NA. **Conclusion** Influenza Bv strains including HA and NA genes in Guangdong 2021 strain are significantly different from these of the 2020 strains, especially on HA genes in the second half of 2021.

[**Key words**] influenza B; influenza B victoria lineage; evolution; epitope; negative selection

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313775), the Project of Science and Technology Plan of Guangzhou City (201904010286), and the Scientific Research Project of Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine (20202024). Corresponding author: HUANG Ping, E-mail: pphuang1@163.com

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,历史上曾发生多次世界范围的大流行。根据抗原性不同,人类流感病毒分成甲、乙、丙三型。甲型流感病毒基因易变且易引起流行,乙型流感也常引起局部暴发[1]。近年乙型流感受到全球关注,有研究报道,年龄≥50岁人群乙型流感感染者中,临床病死率可达到2.5%(95%CI,0.7%~7.6%)[2]。

乙型流感病毒基因组具有单负链8个节段,其中血凝素(hemagglutinin,HA)基因位于第4节段,神经氨酸酶(neuraminidase, NA)基因位于第6节段[1]。HA在病毒包膜上以三聚体形式存在,识别并结合宿主细胞表面的受体结合位点(receptor binding sites, RBS),具有特异性[1];同时刺激宿主产生保护性中和抗体,是设计流感疫苗的常用靶点[1]。NA由4条糖蛋白链组成,单体头部是NA活性中心,具有型别特异性;此外NA持有神经氨酸酶活性(涉及感染细胞内成熟病毒释放)和抗原性(抗原特异性)。乙型流感8个节段中,以HA和NA基因的生物学功能最为重要,是流感疫情流行的分子基础。

国内山东济宁地区2018-2020年乙型流感Bv毒株流行,属于Bv.1a株系[3];2021年下半年,广东地区流感疫情频繁,较去年同期每月疫情上升50%~85%。结合本地区的监测工作,初步鉴定为乙型流感活动[4]。为深入了解广东地区2020-2021年乙型流感HA和NA基因的变异和进化特征,本研究开展毒株HA/NA基因分析,以期为乙型流感防治提供分子水平依据。

1 材料与方法

1.1 毒株来源

广东各地区流感监测网络采集流感咽拭并分离流感病毒;时空分布方法筛选流感毒株,其中2020年和2021年分别为8株和26株,合计34株。从GenBank下载全球人类乙型流感毒株的HA/NA基因序列共23对,包括世界卫生组织(World Health Organization, WHO)疫苗株4株[5],株系代表株5株(2008-2021年);此外亚洲7株(含中国3株),欧洲2株和北美5株。

1.2 引物设计与合成

根据2015-2020年全球乙型流感Bv毒株HA和NA基因核苷酸序列,采用Primer Premier 5.0软件(PREMIER Biosoft International,Palo Alto,CA,USA)设计和兼并,合成HA和NA基因扩增引物各3对。

1.3 基因扩增与鉴定

采用QIAGEN公司QIAamp Viral RNA mini Kit(Lot 169018932)提取RNA,置-20 ℃保存;采用Invitrogen的SuperScript® Ⅲ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq (Lot 1996333)进行RT-PCR扩增。扩增产物鉴定,Size Marker为100~2 500 bp。

1.4 序列检测

PCR产物纯化采用广州天一辉远基因科技有限公司磁珠法琼脂糖凝胶PCR回收试剂盒,测序用ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit,在ABI 3730 DNA Analyzer上测序。根据顺义和反义引物的测序结果,采用Lasergene v8.1.3软件(DNASTAR, Madison,WI,USA)拼接核苷酸(Nucleotide,Nt),验证检测序列的正确性。

1.5 变异与进化分析[6]

采用MEGA 7.026软件的Clustal W进行核苷酸同源性分析,用邻接法(Neighbor-joining)构建HA/NA基因进化树。通过BioEdit v7.2.6(Ibis Biosciences, Carlsbad,CA,USA)计算HA/NA上每个氨基酸(Amino acid,AA)位点的熵值(Entropy value),并进行评价。通过NetNGlyc 1.0 Server对氨基酸序列进行糖基化位点分析。通过Datamonkey 2.0,分别采用SLAC(Single likelihood ancestor counting)、FEL(Fixed-effects likelihood)和FUBAR(Fast, Unconstrained Bayesian App Roximation)方法,对HA/NA基因进行进化分析。

1.6 统计学分析

规整基因序列资料,采用SPSS 23.0对核苷酸和

氨基酸变异信息进行独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毒株分布

采用时空分布法筛选 2020 年(8 株)和 2021 年(26 株)毒株(2020 年 4-12 月监测无 Bv 分离株),包括潮州 5 株、东莞 1 株、广州 2 株、河源 1 株、惠州 3 株、江门 2 株、茂名 2 株、梅州 1 株、清远 2 株、汕头 1 株、汕尾 2 株、韶关 5 株、深圳 3 株、湛江 1 株、中山 1 株和珠海 2 株。

2.2 同源性与进化分析

广东 Bv 毒株 HA 和 NA 基因片段,分别为 1 875 bp 和 1 556 bp;编码区(ORF,Open reading frame)分别为 1 749 bp 和 1 401 bp。基因比对发现:①疫苗株 B/Colorado/06/2017 的 HA 基因 ORF 丢失 $Nt_{529-534}$ 序列(aaaaac);此后 2017 年以后的毒株[包括 2019 和 2021 年疫苗株(2 株)、广东毒株(34 株)和全球毒株(14 株)]均丢失 $Nt_{529-537}$ 序列(aaaaacgac);②以疫苗株 B/Brisbane/60/2008 的 NA 基因为基准,其 ORF 共有 1 401 bp,在 Nt_{223} 后插入 tcc,出现在 B/Bangladesh/8007/2021 和 B/Singapore/WUH7588/2021 毒株。

以 4 株疫苗株基因序列作为基准,计算 2020 年和 2021 年广东毒株的核苷酸同源性,结果如表 1 所示。同源性分析揭示:①4 株疫苗株中,广东 2021 年流行毒株 HA 基因同源性与疫苗株 B/Austria/1359417/2021 同源性最高[(99.19±0.26)%],而 NA 基因同源性却与 2019 年疫苗株 B/Washington/02/2019 同源性却最高[(99.23±0.11)%];②以 4 株疫苗株 HA 核苷酸序列为基准,2021 与 2020 年毒株 HA 基因均有统计学差异($P<0.01$),提示广东 2021 年毒株 HA 基因发生极其明显变异;③以疫苗株 B/Washington/02/2019 的 NA 核苷酸序列为基准,2021 年毒株与 2020 年毒株 NA 基因同源性有统计学差异($P<0.01$),提示广东 2020 年毒株 NA 基因有明显变异;④疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 基因与 2021 年毒株 HA 基因同源性为(99.19±0.26)%;而与 2021 年下半年毒株(17 株)HA 基因同源性高达(99.28±0.25)%,提示广东 2021 年下半年流行毒株 HA 基因与当前 WHO 推荐疫苗株基因依然高度契合。

广东 2020-2021 年的 34 株毒株 HA 基因进化特征,如图 1A 所示,结果显示:①广东 2020 年毒株(8 株)与广东 2021 年毒株(下半年分离,17 株)具有不同基因特征:2020 年毒株呈 Bv. 1a. 3 株系特征,2021 年毒株主要呈 Bv. 1a. 3a. 2 株系特征。;②广东 2020 年毒株与 2021 年毒株(上半年,9 株)具有疫苗株 B/Washington/02/2019 基因特征;国外 2020 年毒株包括欧洲(圣彼得堡)、美洲(加州和宾州)、亚洲(新加坡、爱知)和 2021 年美洲毒株(德州和新墨州);③广东 2021 年毒株(下半年分离)呈现疫苗株 B/Austria/1359417/2021 基因特征,具体表现国外是 B/Paris/9867/2020 最早出现(2020-11-25),随后是国内广东 B/Guangdong/073/2021 (2021-01-02),北京 B/Beijing/Chaoyang/12099/2021 (2021-08-31);另包括国外(密歇根、孟加拉和新加坡)2021 年 1 月后的分离毒株。

广东毒株 NA 基因进化如图 1B 所示,主要特征包括:①广东 2020 年毒株(8 株)与 2021 年(26 株)具有不同基因特征,广东 2020 年毒株 NA 基因与同期圣彼得堡、加州、新加坡、宾州、爱知、中国香港的毒株同源性类似;②广东 2021 年上半年毒株(1~6 月,9 株)与下半年部分毒株(17 株)也具有一定差异;③广东 2021 年 26 株 NA 基因相似度更接近疫苗株 B/Washington/02/2019 的基因(99.23±0.11)%。

2.3 氨基酸和抗原位点置换

HA 基因 ORF 的 1 749 bp 编码 582 个氨基酸(AA);以疫苗株 B/Washington/02/2019 的 HA 基因为基准,50 株中,31 个氨基酸位点发生置换,其中广东 34 株毒株有 26 个置换,全球 14 株(2020-2021 年)有 16 个置换,疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 基因有 8 个置换。以疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 基因为基准,广东和全球毒株置换差异一致。

以疫苗株 B/Washington/02/2019 的 HA 基因为基准,置换位点包括位点 $H_{137}Q/N$(广东$_{2021}$,16/26;全球$_{2021}$,1/6)、位点 $S_{209}D/N$(广东$_{2020}$,7/8 和广东$_{2021}$,26/26;全球$_{2020}$,8/8 和全球$_{2021}$,6/6)、位点 $A_{142}T$、$P_{159}L$ 和 $K_{215}R$(广东$_{2021}$,15/26;全球$_{2020}$,1/8 和全球$_{2021}$,4/6)、位点 $R_{148}G$、$G_{196}E$ 和 $R_{291}K$(广东$_{2021}$,26/26;全球$_{2020}$,2/8 和全球$_{2021}$,4/6)、位点 $V_{232}M$ 和 $P_{253}Q$(广东$_{2021}$,10/26;全球$_{2020}$,1/8 和全球$_{2021}$,4/6)。

疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 基因特征在于,位点 $A_{142}T$、$R_{148}G$、$P_{159}L$、$G_{196}E$、$S_{209}D$、$K_{215}R$ 和 $R_{291}K$ 已经发生置换;即在这些位点上,疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 氨基酸序列已体现出广东 2021 毒株特征。比较广东 2021 年下半年毒株与疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 基因差异,在于 $K_{071}E$(2/19)以及 $T_{182}I$、$PL_{184-185}SS$、$A_{214}T$ 和 $G_{519}R$(1/19)置换。

疫苗株 B/Washington/02/2019 的 NA 基因 ORF

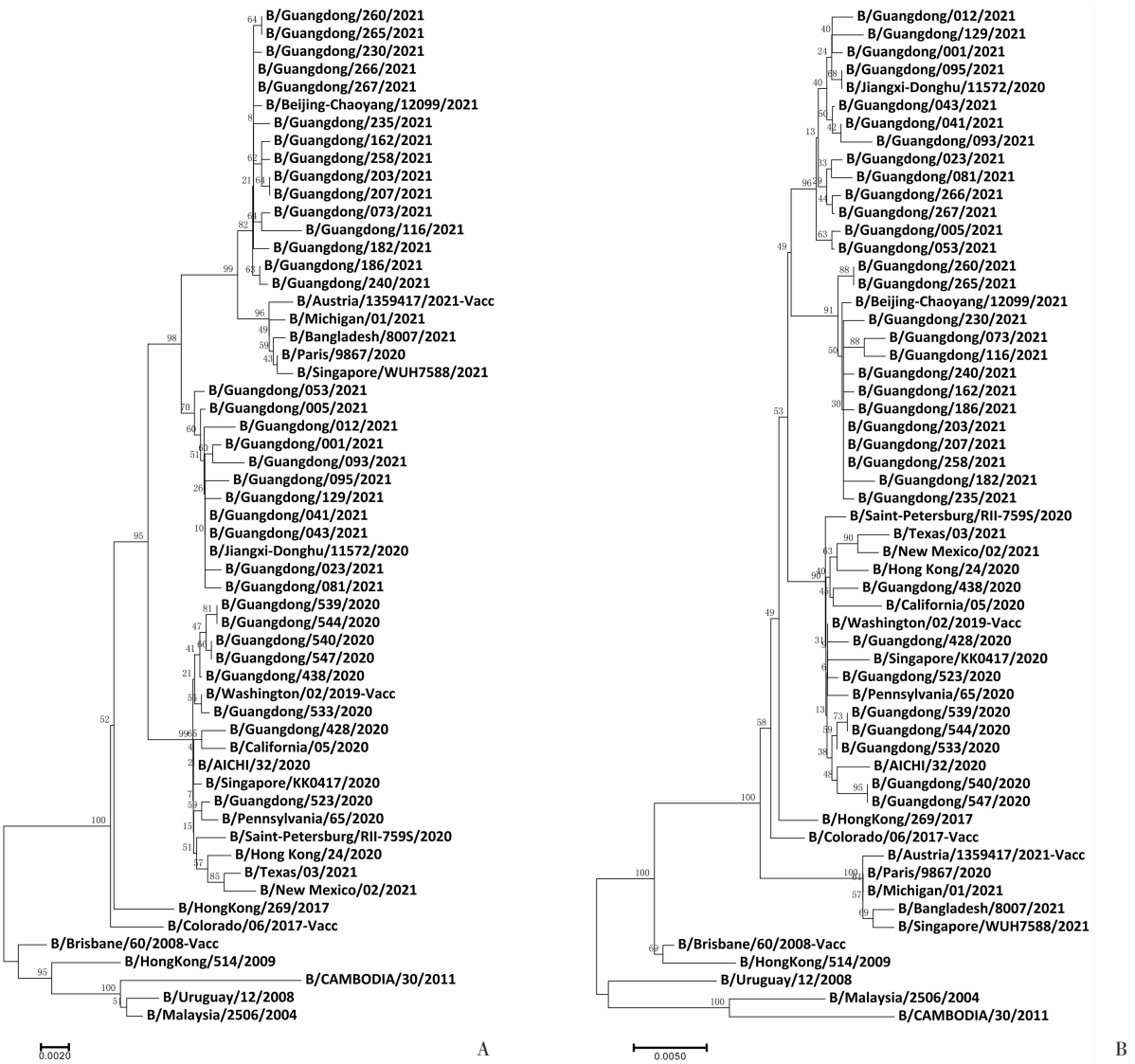
具有 1 401 bp,编码 466 个 AA;以此 NA 基因为基准,AA_{72} 后插入亮氨酸(L)见于 B/Bangladesh/8007/2021 和 B/Singapore/WUH7588 /2021 毒株。50 株中,共 29 个 AA 位点变异,其中广东(34 株)和全球(14 株)分别有 14 和 20 变异位点;此外,疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 6 个位点变异。

以 2019 年疫苗株 NA 基因为基准,变异特点包括:①广东 2020 年毒株仅 $E_{313}G$ 变异;②2021 年毒株包括 $D_{53}N$(13/26)、$N_{59}S$(13/26)、$G_{233}E/R$(14/26)、$V_{303}I$(13/26)和 $K_{343}E$(15/26);以及 $D_{53}N$、$N_{59}S$、$G_{233}E$、$V_{303}I$ 和 $K_{343}E$;③少数基因变异还包括 $F_{12}L$、$I_{45}M$、$P_{51}Q$、$P_{119}T$、$V_{249}I$、$I_{263}V$、$G_{379}E$ 和 $E_{406}D$。

表 1 广东毒株 HA/NA 基因同源性比较(%)

疫苗株	HA ($\bar{x}\pm s$)			NA ($\bar{x}\pm s$)		
	2020 年($n=8$)	2021 年($n=26$)	P	2020 年($n=8$)	2021 年($n=26$)	P
B/Brisbane/60/2008	97.76±0.09	97.43±0.16	<0.001	98.44±0.09	98.47±0.09	0.464
B/Colorado/06/2017	98.75±0.07	98.45±0.17	<0.001	99.14±0.09	99.17±0.09	0.448
B/Washington/02/2019	99.81±0.06	98.90±0.21	<0.001	99.79±0.08	99.23±0.11	<0.001
B/Austria/1359417/2021	98.50±0.05	99.19±0.26	<0.001	98.44±0.09	98.54±0.15	0.072

基因核苷酸(ORF)同源性是基于广东毒株与疫苗株的比较



A:HA 基因;B:NA 基因

图 1 广东流感 Bv 毒株 HA/NA 基因进化

2.4 糖基化位点与药敏位点变异

疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 HA 蛋白共有潜在糖基化位点 10 个,即 NVT_{40-42}、NCT_{74-76}、$NIT_{160-162}$、$NKT_{178-180}$、$NQT_{245-247}$、$NKS_{316-318}$、$NGT_{345-347}$、$NIT_{530-532}$、$NHT_{543-545}$ 和 $NVS_{575-577}$。此次变异中,HA 氨基酸 $D_{209}N$ 变异,导致增加糖基化位点 $NET_{209-211}$,见于 B/Guangdong/428/2020、B/Guangdong/523/2020 和 B/Guangdong/053/2021;$PL_{184-185}SS$ 变异,增加 $NSS_{183-185}$ 糖基化位点,见于 B/Guangdong/116/2021。疫苗株 B/Austria/1359417/2021 的 NA 蛋白共有潜在糖基化位点 4 个,NAS_{56-58}、NRS_{64-66}、$NGT_{144-146}$ 和 $NKT_{284-286}$;未发现置换变异。

以疫苗株 B/Brisbane/60/2008 的 NA 为基准,已报道 NA 单耐药位点共有 29 个[7]和双耐药位点 4 个;在本研究中未出现上述具体氨基酸位点变异。

2.5 熵值和选择性改变

根据 50 株毒株 HA 氨基酸熵值结果,熵值≥0.600 包括位点 148、165 和 291(均为 0.641),142、159 和 215(均为 0.680),137(0.717),196(0.731)和 209(0.779);NA 氨基酸包括位点 344(0.680)和 234(0.684)。见表 2。

50 株 HA 和 NA 基因,进行选择性分析(NA 未计入插入 L_{072},见 B/Bangladesh/8007/2021 和 B/Singapore/WUH7588/2021)。SLAC 和 FEL 两方法中 $\kappa_{HA}<\kappa_{NA}$,而 FUBAR 方法中 $\kappa_{HA}>\kappa_{NA}$,提示不同计算方法导致 HA 基因的 κ 值[转换(α)/颠换(β)]不同。SLAC 检验 $\omega=d_N/d_S$ 比值,如果 $\omega<1$,且 $P(\omega<1)<0.1$ 则存在负向选择位点,SLAC 检验分别位于 HA 基因 73,138,437 和 497 位点和 NA 基因 179,321 和 335 位点。

50 株毒株采用 FEL 检验,选择性分析显示,HA 和 NA 基因分别筛选出 28 个和 14 个负向选择位点;采用 FUBAR 检验,分别筛选出 HA 基因 15 个负向选择位点和 1 个正向选择位点(AA_{209}),NA 基因 10 个负向选择位点和 1 个正向选择位点(AA_{384})。根据多种方法结果一致性的原则,综合评价,HA 和 NA 基因氨基酸负向选择位点分别是 73,138,437 和 497 位点,及 179,321 和 335 位点。

3 讨论

自 2009 年流感 $H1N1_{pdm}$ 出现以后[8],广东流感各型别(包括 H_3N_2 和 B 型)共同存在流行季节中,交替成为优势型别。本研究中,①2020-2021 年流感优势毒株被鉴定为 B 型 Victoria 株系;②2020 年 4-12 月监测未分离到流感各亚型毒株,这可能与流感流行特征以及国内新冠疫情的严格防控措施有关系;③2021 年下半年 Bv 毒株多从局部疫情暴发人群中分离。

分别以 4 株疫苗株 HA 基因为基准比较广东 2020 与 2021 年毒株之间差异,发现 4 株疫苗株的基准的 2 年间 HA 基因同源性均有统计学差异($P<0.01$),NA 基因在 2020 年(与 2020 年前比较)也发生变异,但仅与 B/Washington/02/2019 基准差异明显,提示广东 Bv 流行株 HA 基因在 2021 年(与 2020 年比较)发生显著性变异。而且广东 Bv 流行株 HA 基因变异特征,主要呈现于 2021 年下半年的疫情毒株。杭州 2014-2019 年流行 Bv 的 Bv.1a 株系(类似疫苗株 Bv/Colorado/06/2017),HA 和 NA 基因同源性分别为 94.67% 和 97.13%[9]。

此次广东毒株变异(以疫苗株 B/Washington/02/2019 的 HA 基因为基准)见于 A 表位[$V_{132}I$(1/26,2021)、$H_{137}N/Q$(16/26,2021)、$A_{142}T$(15/26,2021);$R_{148}G$(26/26,2021)]、B 表位[$G_{156}R$(1/26,2021)、$P_{159}L$(15/26,2021);$N_{162}K$(26/26,2021)];D 表位[$S_{209}N$(7/8,2020)、$S_{209}D$(25/26,2021);$T_{211}A$(5/8,2020)]。与此比较,杭州 Bv.1a 株系毒株变异见于 A 表位($L_{125}I$、$H_{131}N$、$I_{132}V$)、B 表位($N_{141}D/G$、$G_{148}R$)和 D 表位($I_{195}V$)[9];云南地区 2017-2018 年流行乙型流感 By/Bv 毒株,其中 Bv 毒株 HA 基因具有 $V_{161}I$ 突变特征,同时 $S_{14}N$ 和 $V_{195}I$ 发生变异[10]。

表 2 50 株毒株 HA/NA 基因熵值

熵值	氨基酸位点[a]	
	HA	NA
<0.300	14, 88, 95, 125, 141, 143, 155, 174, 182, 184, 185, 194, 268, 71, 156, 519, 245, 214	12, 16, 45, 51, 70, 73, 80, 119, 263, 360, 372 , 400, 406, 460, 75, 76, 107, 249, 314, 379, 385, 284
<0.600	211, 560, 232, 253	53, 59, 304
≥0.600	148, 165, 291, 142, 159, 215, 137, 196, 209	344,234

a:基于疫苗株 B/Washington/02/2019 的基因序列

与2019年和2021年疫苗株HA基因比较,广东2020年毒株呈Bv.1a.3株系特征,2021年毒株主要呈Bv.1a.3a.2株系特征[5],但变异幅度更大。WHO已于2021年9月更换疫苗组Bv毒株为B/Austria/1359417/2021,与该疫苗株比较,2021年广东株在表位和RBS区域变异包括$H_{137}Q/N$、$R_{148}G$和$P_{253}Q$。以疫苗株B/Washington/02/2019的NA基因为基准,2021年广东毒株NA基因5个氨基酸($D_{53}N$、$N_{59}S$、$G_{233}E/R$、$V_{303}I$和$K_{343}E$)发生明显变异(50.0%~57.7%)。此变异幅度既超越疫苗株B/Austria/135941 7/2021(2021-10-09,仅$K_{343}E$),也超越2021年上半年的北京毒株B/Beijing/Chaoyang/12099/2021(2021-08-31,仅$D_{53}N$、$N_{59}S$和$G_{233}E$)。

10个HA和4个NA基因潜在糖基化位点,经分析均无明显变异趋势。NA基因已知药物敏感位点未发现变异。基因氨基酸位点的熵值反映该位点变异频率[6]。本研究中,50株毒株的HA和NA分别存在9个(148/165/291/142/159/215/137/196/209)和2个(344/234)易突变位点。

由于流感病毒缺乏RNA聚合酶校对功能,HA和NA基因易发生点变异[11],常使用错义替代与同义替代的比值(d_N/d_S)评估氨基酸位点所受的自然选择压力。当$d_N/d_S>1$时,表示该位点为正向选择位点;$d_N/d_S=1$时,该位点为中性进化不受选择;$d_N/d_S<1$时,则表示该位点为负向选择位点[6]。本研究中,50株Bv经SLAC、FEL和FUBAR 3种方法均筛选出HA和NA基因存在负向选择位点,分别位于73,138,437和497位点,及179,321和335位点。此次筛选出的负向选择位点,提示乙型流感病毒Bv毒株HA和NA基因在广东地区的自主变异进化明显,已超越免疫压力因素的作用。

在人类流感病原体中,甲型流感病毒(H1N1、H3N2)的HA/NA基因表现变异频繁,通常存在基因正向选择位点[12]。此次广东Bv毒株出现多个氨基酸的负向选择位点,在流行病学和基因进化中的意义有待于进一步探讨。然而,结合流感疫情现状,同时关联核苷酸/氨基酸的同源性比较、抗原表位的变异、负向选择位点筛选,可以推断广东乙型流感Bv毒株具有引发流感局部/洲际疫情的流行病学意义。总之,本研究提示,①Bv毒株分子(HA等)变异是导致广东2020-2021年流感局部暴发的原因;②2021年下半年的流感进一步变异,可能引起2022年Bv毒株局部流行;③尽管WHO的2021年9月推荐的疫苗株依然有效,但广东2021年Bv毒株的变异,提示WHO应考虑更新疫苗株的可能性。

参考文献:

[1] 贾文祥. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
JIA W X. Medical Microbiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.

[2] PORMOHAMMAD A, GHORBANI S, KHATAMI A, *et al*. Comparison of influenza type A and B with COVID-19: a global systematic review and meta-analysis on clinical, laboratory and radiographic findings[J]. Rev Med Virol, 2021, 31(3): e2179. DOI:10.1002/rmv.2179.

[3] 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): 301-305. DOI:10.3760/cma.j.cn112309-20200723-00368.
WANG T H, DUAN Y H, HAN S Q, *et al*. Influenza B virus monitoring and analysis of variation and evolution of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes in Jining City from 2017 to 2020 [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2021, 41(4): 301-305. DOI:10.3760/cma.j.cn112309-20200723-00368.

[4] 中国疾病预防控制中心传染病预防控制处. 2021年10月中国甲乙丙类传染病疫情动态概要[J]. 疾病监测, 2021,36(11): 1104-1105.
Division of Infectious Disease, Chinese Center for Disease Control and Prevention. Summary of national data of Class A, B and C communicable diseases in China, October 2021 [J]. Dis Surveill,2021, 36(11): 1104-1105.

[5] European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterization, summary Europe, October 2021 [EB/OL]. [2021-12-28]. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-october-2021.

[6] 黄钟洲, 梁丽君, 邹丽容, 等. 流感pH1N1病毒血凝素基因进化特征及选择性[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(17): 1780-1784. DOI:10.16016/j.1000-5404.2014.17.001.
HUANG Z Z, LIANG L J, ZOU L R, *et al*. Molecular evolution and evolutionary selection of influenza pH1N1 virus hemagglutinin gene[J]. J Third Mil Med Univ, 2014, 36(17):

1780-1784. DOI:10.16016/j.1000-5404.2014.17.001.

[7] World Health Organization. Summary of neuraminidase (NA) amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors (NAIs)[EB/OL]. [2021-12-28]. https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-neuraminidase-(na)-amino-acid-substitutions-associated-with-reduced-inhibition-by-neuraminidase-inhibitors-(nais).

[8] 谭静, 黄晓玲, 黄平. 新型甲型H1N1流感的进化、流行与挑战[J]. 新发传染病电子杂志, 2021, 6(2): 146-150. DOI:10.19871/j.cnki.xfcrbzz.2021.02.016.
TAN J, HUANG X L, HUANG P. The evolution, prevalence and challenges triggered of H1N1pdm influenza[J]. Electron J Emerg Infect Dis, 2021, 6(2): 146-150. DOI:10.19871/j.cnki.xfcrbzz.2021.02.016.

[9] 钱昕, 于新芬, 李钧, 等. 杭州地区2014-2019年乙型流感病毒HA和NA基因遗传进化分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2020, 40(7): 523-529. DOI:10.3760/cma.j.cn112309-20200312-00114.
QIAN X, YU X F, LI J, *et al*. Genetic evolution of influenza B virus hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes in Hangzhou between 2014 and 2019[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2020, 40(7): 523-529. DOI:10.3760/cma.j.cn112309-20200312-00114.

[10] 李多, 徐闻, 伏晓庆, 等. 2017年云南省乙型流感病毒监测结果及其血凝素基因特征分析[J]. 病毒学报, 2019, 35(4): 606-611. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003563.
LI D, XU W, FU X Q, *et al*. Analyses of surveillance results for influenza B virus and the characteristics of its hemagglutinin gene in Yunnan Province, China, in 2017[J]. Chin J Virol, 2019, 35(4): 606-611. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003563.

[11] 黄平, 钟静, 梁丽君, 等. 广东地区流感H3N2毒株血凝素基因特征、进化和变异分析[J]. 病毒学报, 2012, 28(4): 330-335. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002286.
HUANG P, ZHONG J, LIANG L J, *et al*. Molecular evolution of human influenza H3N2 virus hemagglutinin genes in Guangdong China[J]. Chin J Virol, 2012, 28(4): 330-335. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002286.

[12] 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.
JIAN Q Q, HOU M, YANG Y, *et al*. Analysis of the hemagglutinin gene characteristics of A (H1N1) pdm09 influenza viruses in Kunming from 2017 to 2019[J]. Mod Prev Med, 2021, 48(22): 4187-4191.

(**收稿**:2022-03-03;**修回**:2022-04-27)

(编辑 张 维)