

一株欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒分子特征分析

赵化阳¹,王金亮²,刘金华²,许冠龙²,侯东军³,文晶亮¹,邢佳鹏¹,郑杰¹,张连祥¹

(1. 华都集团北京市兽医生物制品厂,北京 102209;2. 中国农业大学动物医学院,北京 100193;3. 中国动物疫病预防控制中心,北京 100125)

[收稿日期] 2016-09-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0027-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为调查国内猪流感病毒流行和遗传演化状况,将2013年从山东某屠宰场的采集样品接种 SPF 鸡胚,分离到1株病毒,通过 RT-PCR 鉴定和全基因测序,并运用生物软件对病毒基因组关键氨基酸位点和遗传演化关系进行分析。结果显示,分离株 A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1) 为欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒,基因片段未发生重排,与中国大陆近几年分离株类似。HA 蛋白受体结合位点具有结合哺乳动物气管上皮细胞特性;HA 蛋白抗原位点与欧亚类禽 H1N1 猪流感代表株 A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1) 仅有一处不同,Q196H;裂解位点氨基酸为 PSIQR/GL, PB2 蛋白毒力关键氨基酸位点为 T271 和 E627,分离株为典型低致病力毒株。本毒株的分离鉴定为分析中国大陆猪流感流行状况和分子特征提供了数据。

[关键词] H1N1 猪流感病毒;欧亚类禽;分子特征

Molecular Characteristic Analysis of an Isolate of Eurasian Avian-like H1N1 Swine Influenza Virus

ZHAO Hua-yang¹, WANG Jin-liang², LIU Jin-hua², XU Guan-long², HOU Dong-jun³,

WEN Jing-liang¹, XING Jia-peng¹, ZHENG Jie¹, ZHANG Lian-xiang¹

(1. Hua-du Group Beijing Veterinary Biologics Factory, Beijing 102209, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

3. China Animal Diseases Control Center, Beijing 100125, China)

Abstract: To investigate SIV epidemic and mutant in China, we isolated one strain of SIV at one slaughter house in Shandong province in 2013, and it was identified as Eurasian avian-like H1N1 SIV (EA H1N1 SIV) by gene sequencing. Genes aligning analyzed by MEGA6.0 software shows that the isolate A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1) is similar with EA H1N1 SIV epidemic in Northern China in recent years. Analysis of HA receptor sites amino acids illuminates that the isolate prefer to bind mammalian cells, not avian cells. Amino acids at the HA antigen site are same with A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1), except the site 196 (Q196H). The isolate shows characteristic of low pathogenic according to the cleavage site amino acid (PSIQR/GL) and T271 and E627 on PB2 coded protein. The information of this isolate is valuable for investigating SIV epidemiology in China.

Key words: H1N1 swine influenza virus; Eurasian avian-like; molecular characteristic

一般认为猪是流感病毒的基因“混合器”,其气管上皮细胞既有 $\alpha - 2,3 - \text{Sias}$ 受体,又具有 $\alpha - 2,6 - \text{Sias}$ 受体,既可感染禽流感病毒,又可以感染人类流感病毒,在 A 型流感病毒变异重排和传播中发挥重要作用^[1]。目前,全球猪群流行着 H1N1, H1N2 和 H3N2 等亚型流感病毒^[2]。其中,经典 H1N1 猪流感首次在 1918 年分离到^[3],欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒首次分离于 1979 年^[4]。近些年,欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒在中国大陆猪群逐步蔓延^[5-6],在欧洲及中国造成多起人类感染病例,且有一例死亡病例^[7],而且该类型病毒多数可以通过飞沫在哺乳动物(雪貂)模型中有效传播^[8],对人类健康构成较大威胁,因此监测和研究欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒具有重要的公共卫生学意义。本研究对 2012-2013 年流感季分离鉴定的一株欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒进行遗传演化和分子特征进行分析,为猪流感的防控提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 毒株的分离与鉴定 2013 年 1 月,从山东某屠宰场共采集猪咽喉棉拭子样品 600 份,样品经青链霉素 PBS 缓冲液处理,冷藏运输至实验室。接种 10 日龄 SPF 鸡胚,3 d 后收集尿囊液,用 1% 鸡红细胞检测血凝活性,血凝阴性的样本,盲传 2 代,再次检测血凝性。具有血凝性的样品,提取核酸,进行

RT-PCR 方法鉴定。

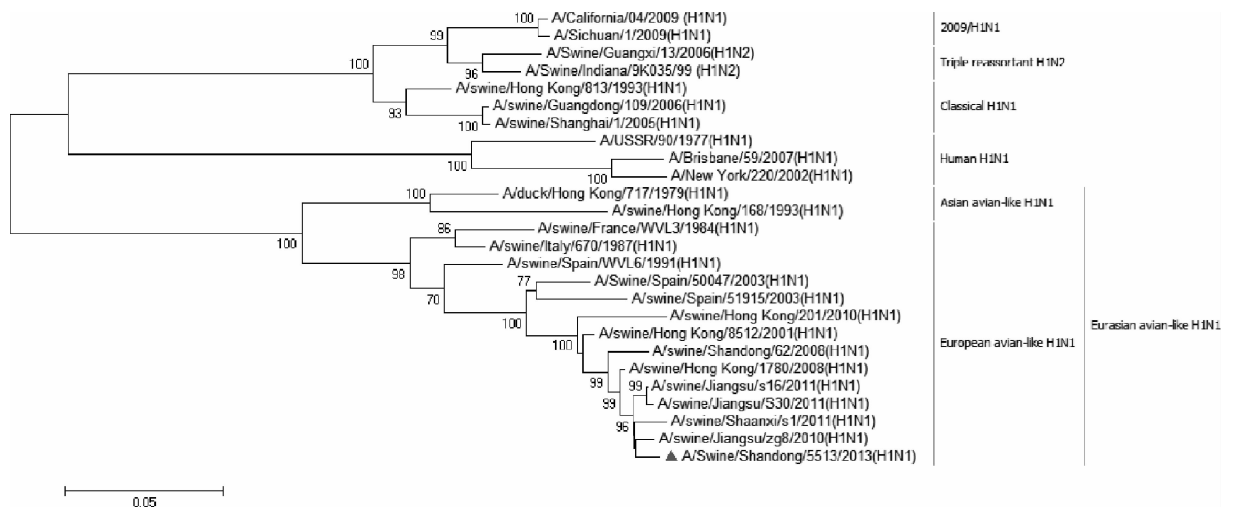
1.2 病毒基因序列测定 猪流感病毒引物设计和 RT-PCR 扩增方法参照已有文献^[6,9]。引物由上海生工公司合成,PCR 产物送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.3 病毒的遗传进化与分子特征分析 应用 NCBI 网站资源对分离株基因序列进行同源性比对;采用 MEGA6.0 软件进行进化分析并绘制进化树,算法采用 Neighbour-joining 法,Bootstrap 值选择 1000 重复;并使用 MEGA6.0 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,然后对氨基酸序列进行流感病毒分子特征分析^[5]。

2 结果

2.1 SIV 病毒的分离鉴定与命名 采集样品经病毒分离、RT-PCR 鉴定及序列比对,确认分离 1 株 H1N1 亚型猪流感病毒,命名为 A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1) (简称 SW/SD/5513/13)。

2.2 病毒的遗传进化分析 在 NCBI 网站下载猪流感病毒代表性毒株基因序列,通过与分离株进行基因比对,分析其遗传进化关系。结果表明,SW/SD/5513/13 的 HA 基因属于欧洲类禽 H1N1 流感病毒分支,与近些年在大陆和香港猪流感病毒遗传关系较接近(图 1)。NA 及其他 6 个内部基因进化树比对结果显示,均未发生基因重排。



▲代表分离毒株 - A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1)

图 1 EA H1N1 SIV 分离株 HA 基因进化树

2.2.1 病毒的同源性分析 分离的 SW/SD/5513/13 毒株测序结果经 NCBI BLAST,发现 8 个基因片 段均处于欧亚类禽进化分支,与近期欧洲及亚洲流 行的 SIV 同源性均大于等于 99% (表 1)。

表 1 病毒基因片段同源性分析

Isolate	Genes	Strains with the highest identify	Identify	Accession NO
A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1)	PB2	A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1)	99%	CY085889.1
	PB1	A/swine/Jiangsu/s16/2011 (H1N1)	99%	JF820283.1
	PA	A/swine/Shaanxi/s1/2011 (H1N1)	99%	JX860682.1
	HA	A/swine/Jiangsu/zg8/2010 (H1N1)	99%	CY085886.1
	NP	A/swine/Shandong/62/2008 (H1N1)	99%	FJ536795.1
	NA	A/swine/Jiangsu/S30/2011 (H1N1)	99%	KF057130.1
	M	A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1)	99%	CY085889.1
	NS	A/swine/Jiangsu/S30/2011 (H1N1)	99%	KF057130.1

2.2.2 HA 主要氨基酸位点及抗原位点分析

2.2.2.1 裂解位点 对氨基酸序列分析发现,分离株 SW/SD/5513/13 HA 裂解位点氨基酸序列为 PSIQSR/GL,与近年来欧洲类禽 H1N1 病毒 HA 裂解位点氨基酸组成相同,碱性氨基酸数量相对较

少,为低致病力毒株。

2.2.2.2 受体结合位点 分离株 SW/SD/5513/13 毒株在 HA 蛋白受体结合位点处第 155、159、226 和 228 分别为 V、N、Q 和 G,190 位氨基酸为 D,225 位氨基酸为 E (表 2),符合感染哺乳动物宿主的条件。

表 2 猪流感病毒分离株 HA 受体结合位点分析

Viruses	Amino acid reside relevant in receptor for binding (H3 numbering)							
	155	159	183	190	225	226	227	228
A/Swine/Shandong/5513/2013 (H1N1) ¹	V	N	H	D	E	Q	A	G
A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1) ²	V	N	H	D	E	Q	A	G
A/California/04/2009 (H1N1) ³	V	N	H	D	D	Q	E	G
A/swine/Guangdong/109/2006 (H1N1) ⁴	V	N	H	D	G	Q	T	G
A/USSR/90/1977 (H1N1) ⁵	T	G	H	D	G	Q	A	G

1: Isolate; 2: EA H1N1; 3: 2009/H1N1; 4: Classical swine H1N1; 5: Human H1N1;

2.2.2.3 糖基化位点 分离株 SW/SD/5513/13 与近年流行欧亚类禽 H1N1 SIV 的毒株具有相同数量的糖基化位点 (第 13、26、198、277、484、543 位)。

2.2.2.4 抗原位点 对 H1 亚型病毒 HA1 上 5 个抗原决定簇区域:Sa、Sb、Ca1、Ca2 和 Cb 进行氨基酸位点分析,与各类型猪流感对照株比较发现,分离株 SW/SD/5513/12 与 SW/HK/1780/2008 抗原位点氨基酸组成最为相似,只在第 196 位氨基酸 (196H) 与 SW/HK/1780/2008 毒株不同 (196Q) (表 3)。

2.2.3 致病力分析 分离株 SW/SD/5513/2013 PB2 蛋白未发生 T271A 和 E627K 突变,且 701 位氨基酸为 N,结果表明该毒株可在哺乳动物体内复制,但致病力较低。

3 讨论

基因重排是流感病毒变异的重要方式之一。由于猪群对禽流感和人流感病毒均易感,因此,猪体内可能会重排产生对人类具有高致病性的新型流感病毒。目前在世界范围内,猪流感病毒疫苗使

用率极低,难于预防和控制其扩散,因此监测猪群流感发病状况,分析猪流感病毒分子遗传演化,确切地掌握猪流感的变化趋势,为人类流感病毒的发生提供预警。作为猪流感病毒的一个重要类型,欧亚类禽 H1N1 猪流感首先分离自欧洲大陆的意大利^[4],2005 年后在中国大陆逐渐大范围流行^[6]。虽然其致病力相对较低,但可感染人类,可以通过空气飞沫传播,因此值得关注。

本研究对山东地区 2013 流感季节的分离株,进行遗传演化和分子特征分析。发现该毒株未发生基因重排,所有基因片段同源性最高的毒株均为欧洲类禽类型。HA 基因进化树分析,该毒株与 SW/Jiangsu/zg8/2010 (H1N1)、SW/Shaanxi/s1/2011 等 2008 年后中国大陆分离的类禽猪流感病毒同源性较高^[5-6],表明了欧亚类禽猪流感在我国猪群感染具有持续性。与 EA H1N1 代表毒株 A/swine/Hong Kong/1780/2008 (H1N1) 相比,分离株 SW/SD/5513/2013 HA 受体结合位点发生 190D

表 3 猪流感分离毒株 HA 抗原位点分析

<i>Antigenic sites (H3 numbering)</i>	A/Swine/Shandong/ 5513/2013 (H1N1) ¹	A/swine/Hong Kong/ 1780/2008 (H1N1) ²	A/California/04/ 2009 (H1N1) ³	A/swine/Guangdong/ 109/2006 (H1N1) ⁴	A/USSR/90/ 1977 (H1N1) ⁵
Sa	127	P	P	P	P
	128	N	N	N	K
	158	G	G	G	N
	160	S	S	S	S
	162	P	P	P	P
	163	K	K	K	N
	165	S	S	S	S
	166	K	K	K	K
	167	S	S	S	S
Sb	156	K	K	K	E
	159	N	N	N	G
	192	Q	Q	Q	K
	193	T	T	S	T
	196	H	Q	Q	R
	198	N	N	A	E
Ca1	169	T	T	I	V
	173	G	G	G	E
	182	V	V	I	V
	207	S	S	S	S
	240	G	G	G	G
	273	A	A	T	A
Ca2	140	S	S	P	S
	143	G	G	G	G
	145	N	N	K	S
	224	R	R	R	R
	225	E	E	D	G
Cb	78	S	S	S	S
	79	W	W	W	W
	81	Y	Y	Y	Y
	82	I	I	I	I
	83	I	I	V	A
	122	K	K	K	K

1: Isolate; 2: EA H1N1; 3: 2009/H1N1; 4: Classical swine H1N1; 5: Human H1N1

等突变,表明可有效感染哺乳动物和人类;分离株潜在的糖基化位点数量与参考株一致。除 Sb 抗原决定簇 196 位氨基酸位点不同,分离株病毒抗原性与类禽代表毒株 SW/HK/1780/2008 其余 31 个抗原位点氨基酸完全相同,但与 2009H1N1、经典猪流感和人源猪流感毒株 HA 抗原位点存在大于 10 个氨基酸位点的不同。PB2 关键氨基酸位点未发生突变,对哺乳动物致病力也相对较低,保持了欧亚类禽猪流感的低致病性特征。

对分离毒株分子特征分析表明,该毒株与 2008 年来流行毒株基因特性基本类似,但存在个别氨基酸的突变,导致更有效的感染人类和哺乳动物呼吸道。应进一步监测我国猪群中 SIV 流行株的基因

变异、基因型优势,以及病毒的致病力和传播特性,分析目前流行毒株潜在的人际间传播可能。

参考文献:

[1] Ito T, Couceiro J N, Kelm S, *et al.* Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998, 72(9):7367-7373.

[2] Brown I H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs[J]. Vet Microbiol, 2000, 74(1/2):29-46.

[3] Shope R E. Swine influenza; I. Experimental transmission and pathology[J]. J Exp Med, 1931, 54(3):349-359.

[4] Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, *et al.* Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man[J]. B World Health Organ, 1981, 59(1):75-78.

微生物浊度法与管碟法测定吉他霉素效价的比较研究

徐 嫒,韩宁宁,于丽娜,戴 青,赵 晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-07-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0031-03 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 为比较微生物浊度法和管碟法测定吉他霉素效价,以《中国药典》(2015年版)吉他霉素抗生素微生物检定法浊度法和《中国兽药典》(2010年版)吉他霉素抗生素微生物检定法管碟法为依据测定一批吉他霉素效价。结果显示:浊度法测定效价平均值为 1691 U/mg, *RSD* 为 0.9%;管碟法测定效价平均值为 1687 U/mg, *RSD* 为 1.0%,两种方法测定结果无显著性差异($P>0.05$)。本实验表明,浊度法测定吉他霉素效价与管碟法相比更加快速、便捷,而且可避免吉他霉素多组分的影响因素。

[关键词] 浊度法;管碟法;吉他霉素;效价

Comparison of the Antibiotic Potency of Kitasamycin by Turbidimetric Method and Diffusion Method

XU Yuan, HAN Ning-ning, YU Li-na, DAI Qing, ZHAO Hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to compare turbidimetric method with diffusion method for measuring of antibiotic potency of kitasamycin, a bath of kitasamycin potency was measured by turbidimetric method according to quality standards in Chinese Pharmacopoeia 2015 version and diffusion method according to quality standards in Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2010 version. Results of potency average were 1691 U/mg by turbidimetric method with *RSD* of

作者简介:徐 嫒,硕士,从事抗生素检验工作。

通讯作者:赵 晖。E-mail:171977364@qq.com

- [5] 付新亮,方 博,王丽芳,等. 一株 H1N1 亚型猪流感病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 348-352.
- [6] Liu Jin-hua, Bi Yu-hai, Qin Kun, *et al.* Emergence of Europeanavian influenza virus-like H1N1 swine influenza A viruses in China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2643-2646.
- [7] Qi X, Cui L, Jiao Y, *et al.* Antigenic and genetic characterization of a European avian-like H1N1 swine influenza virus from a boy in China in 2011[J]. Arch Virol, 2013, 158 (1): 39-53.
- [8] Yang H, Chen Y, Qiao C, *et al.* Prevalence, genetics, and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses[J]. PNAS, 2016, 113(2): 392-397.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [10] Moreno A, Di Trani L, Faccini S, *et al.* Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus [J]. Vet Microbiol, 2011, 149(3/4): 472-477.

(编辑:李文平)