欧亚禽系H1N1猪流感病毒在中国的流行和遗传进化

苏惠娟^{1,2}, 李鹏^{1,2}, 阳姤^{1,2}, 金梅林^{1,2}, 陈焕春^{1,2}, 周红波^{1,2*}

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: hbzhou@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2018-10-06; 接受日期: 2018-10-29; 网络版发表日期: 2018-12-11

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0500205, 2016YFC1200201)、国家自然科学基金(批准号: 31761133005, 31572545, 31772752)和湖北省杰出青年基金(批准号: 2016CFA056)资助

摘要 H1N1猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)对公共卫生构成了潜在的威胁, 流感病毒基因组序列的遗传进化及特定的氨基酸差异可以影响病毒的致病性和毒力. 本研究组对中国猪流感的流行情况进行统计分析, 发现中国主要流行的是欧亚禽系H1N1亚型SIV, 进一步对欧亚禽系的H1N1 SIVs进行基因型分析发现其可分为11个基因型, 并且重配型的欧亚禽系H1N1亚型SIV, 特别是病毒的PB2, PB1, PA和NP基因源于pandemic H1N1/2009的重配毒株近年来出现得越来越频繁. 此外, 从湖北省分离到的1株新的欧亚禽系猪流感病毒(A/swine/Hubei/221/2006 (H1N1)), 通过与中国欧亚禽系H1N1猪流感病毒的同源比较发现, 该分离株的基因组片段与此前从人体内分离到的欧亚禽系猪流感病毒A/Hunan/42443/2015(H1N1)的基因组片段亲缘关系很近. 总之, 本研究通过对中国欧亚禽系H1N1猪流感病毒的流行状况和遗传进化进行分析, 为猪流感的预防和控制提供了一定的理论依据.

关键词 欧亚禽系, H1N1猪流感病毒, 流行, 遗传进化

猪流感是由猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)引起的猪的一种急性、热性和高度接触性的呼吸道传染病, 发病率高达100%, 是规模化养猪场普遍存在且危害严重的疾病之一, 严重制约了我国生猪养殖产业的发展. 猪作为禽、猪和人流感病毒共同的易感宿主, 更是流感病毒基因重配或重排的“混合器”和新型流感病毒产生的“孵化器”. 猪体内的流感病毒是人类流感病毒的潜在来源, 而人-猪流感病毒的重配很可能引起下一次人类流感大流行. 因此, 猪流感对我国的

生猪健康养殖和人类的公共卫生安全造成巨大威胁, 对猪流感的预防和控制则具有重大意义.

目前在世界范围内流行的SIVs主要包括H1N1, H1N2和H3N2亚型^[1]. H1N1亚型猪流感病毒又分为经典H1N1(classical swine H1N1, CS-H1N1)、欧亚禽系H1N1(Eurasian avian-like H1N1, EA-H1N1)和类人H1N1(human-like H1N1). 其中, 经典H1N1猪流感病毒在遗传进化上与引起1918年西班牙大流感的H1N1亚型流感病毒密切相关, 并在人类中作为重配毒株

引用格式: 苏惠娟, 李鹏, 阳姤, 等. 欧亚禽系H1N1猪流感病毒在中国的流行和遗传进化. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1287–1294

Su H J, Li P, Yang C, et al. Prevalence and genetic evolution of EA-H1N1 swine influenza virus in China (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 1287–1294, doi: [10.1360/N052018-00197](https://doi.org/10.1360/N052018-00197)

(H1N1/2009)出现导致2009年H1N1流感大流行^[2]。欧亚禽系H1N1猪流感病毒起源于H1N1禽流感病毒^[3~5]。1979年从比利时和德国的猪群中分离出一种与经典猪流感病毒遗传进化不同的H1N1禽流感病毒^[6]，这种病毒现在被称为欧亚禽系H1N1猪流感病毒，其迅速在猪群中流行并迅速超过了原有的经典猪流感病毒。目前，欧亚禽系猪流感病毒已在欧亚多个国家的猪群中检测到^[7]，在中国香港地区自2005年起其已被列入猪群中最为流行的毒株之一^[8]。

研究显示欧亚禽系H1N1猪流感病毒优先与人类受体结合，并在实验中发现雪貂能够通过呼吸道气溶胶途径感染某些欧亚禽系H1N1猪流感病毒^[9]。目前，在中国大陆已报道的欧亚禽系H1N1猪流感病毒感染人类的案例有3起^[10~13]，并且有研究表明欧亚禽系H1N1猪流感病毒在猪群中进行长期进化后有可能进行有效传播并在人类中流行^[9]。然而，我们对于欧亚禽系H1N1猪流感病毒的遗传进化和生物学特性却知之甚少。因此，通过开展对欧亚禽系H1N1猪流感病毒的研究，有助于了解猪流感病毒的遗传进化过程和流行趋势，以应对猪流感病毒对人类健康所带来的威胁和挑战。

本研究对中国欧亚禽系H1N1猪流感病毒的遗传进化，病毒基因型分类、分布和流行趋势进行系统分析，以全面地了解当前欧亚禽系H1N1猪流感病毒在我国的流行现状，为预防猪流感病毒的流行提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病毒的分离鉴定和序列测定

取疑似流感发病猪的鼻拭子和咽喉拭子，将拭子放入含有20%甘油和适量双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)中。离心后取上层清液，经尿囊腔接种9日龄SPF鸡胚，弃去24 h内死亡鸡胚，收取24~72 h的鸡胚尿囊液，用HA(血凝)试验测定鸡胚尿囊液的血凝效价，将有血凝价的尿囊液经过鸡胚进行有限稀释克隆纯化。取纯化后的含病毒的尿囊液，提取病毒RNA，合成cDNA。用针对流感病毒全基因组的通用引物扩增PCR产物，亚型鉴定由全基因组序列测序确定。

1.2 系统发育分析

从GenBank和GISAID下载已收录的H1N1猪流感

病毒分离株的基因组序列。利用MEGA 6软件进行病毒基因组的基因序列的比对和分析，利用基于距离的方法邻接法(neighbor-joining, NJ)来进行系统发育进化树的构建。

1.3 基因型分类

根据系统发育分析，将各病毒的基因分为不同的遗传谱系，我们选取欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒进一步进行遗传进化分析，其主要分为欧亚禽系谱系、pdmH1N1/2009大流行谱系、经典猪流感谱系和三源重配毒株谱系。

2 结果与分析

2.1 一株新型猪流感病毒的分离鉴定

一株H1N1亚型猪流感病毒于湖北省的猪群中分离到，将分离到的流感病毒进行有限稀释克隆纯化并完成了病毒全基因组的克隆和测序。病毒的HA及NA测序结果Blast分析表明，该病毒为H1N1亚型猪流感病毒，系统发育分析表明该分离株是一株新型重配毒株，病毒的基因片段来源于欧亚禽系H1N1谱系和pdmH1N1/2009谱系。

2.2 中国猪流感病毒的分类统计分析

从流感病毒数据库下载到511株猪流感病毒中国分离株，其中H1N1亚型有277株，H1N2亚型有77株，H3N2亚型有96株，H5N1亚型有14株，H9N2亚型有38株，H3N8，H5N6和H6N6亚型均2株，H4N1，H4N8和H10N5亚型均1株。由此可见，H1N1亚型SIV是我国流行的主要猪流感病毒。H1N1亚型SIVs中，EA-H1N1 SIVs是主要的组成部分。根据277株H1N1病毒HA和NA的系统发育进化树结果，我们发现所有H1N1亚型猪流感病毒中，包括193株EA-H1N1 SIVs，46株pdmH1N1/2009 SIVs和29株经典H1N1猪流感病毒(classical swine, CS-H1N1 SIVs)，部分基因组不完整的病毒未包含其中。上述结果表明，在中国，EA-H1N1 SIVs是猪流感病毒的主要组成部分(图1)。

2.3 欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒的遗传进化分析

我们分析了中国EA-H1N1 SIVs基因组的遗传进

图1 中国猪流感病毒随时间的分布变化

化关系(图2, 除HA和NA外, 其余6个基因片段遗传进化树未列出)。194株(含本研究分离的1株)EA-H1N1 SIVs的基因组序列从NCBI和GISAID数据库下载, 本研究分离株的基因组序列由直接测序获得。进行分析的SIVs中192株EA-H1N1 SIVs从猪体内分离, 2株病毒A/Hunan/42443/2015和A/Jiangsu/1/2011从人体内分离。中国的EA-H1N1 SIVs主要分离自北京、福建、广东、广西、山东、上海、四川、天津、浙江、云南和湖北等20个地区。

下载所有在中国分离的EA-H1N1 SIVs 基因组序列(按HA基因分类), 总共194株病毒。对所有病毒的8个基因片段进行遗传进化分析, 然后根据基因的进化来源对每株病毒的8个基因片段进行分类, 分类后统计, 得到中国EA-H1N1 SIVs的基因型分类图(图3), 基因型被划分为5类, 分别为Group1, Group2, Group3, Pandemic H1N1和Triple-reassortant H1N1^[9]。中国的欧亚禽系H1N1猪流感被分为11个基因型, 将这些基因型按字母从A到K的排序进行命名(图3), 大多数病毒为以下5个基因型: A, B, C, H和J。其中基因型A, B和C的病毒的8个基因片段均来源于EA-H1N1 SIVs。基因型H的病毒的4个基因片段PB2, PB1, PA和NP来源于Pandemic H1N1/2009, 其余4个基因片段来源于EA-H1N1 SIVs。基因型J的病毒的HA和NA基因来源于

EA-H1N1 SIVs, 其余6个基因片段来源于pandemic H1N1/2009亚型SIV。本研究中的分离株A/swine/Hubei/221/2016属于基因型H, 研究表明同属于该基因型的A/Hunan/42443/2015毒株造成了人的重症肺炎^[12], 因此, 该分离株也有可能具有较强的感染能力和毒力。

2.4 欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒在中国的分布

对5种基因型的EA-H1N1 SIVs按分离的省份进行统计分析, 发现广东省是分离到EA-H1N1 SIVs最多的省份, 其次为江苏和广西, 重配的基因型H和基因型J的病毒大部分分布于山东、天津、广东、广西、湖北和湖南。

2.5 欧亚禽系H1N1猪流感在中国的流行趋势

我们分析了毒株数目较多的EA-H1N1 SIVs的基因型(A, B, C, H和J), 将这5个基因型的毒株按年份进行统计, 得到这5个基因型的毒株数目在中国随时间变化的趋势图(图4)。现有数据表明, 2007~2013年基因型A的EA-H1N1 SIVs一直占大多数, 基因型H于2013年首次出现后, 在2014年数量明显增多。

2.6 氨基酸序列位点分析

遗传进化分析发现, A/swine/Hubei/221/2016

图 2 中国欧亚禽系H1N1猪流感病毒的基因组序列的遗传进化图

左为HA, 右为NA. ■表示A/swine/Hubei/221/2016; ■表示A/swine/Guangdong/6/2010和A/swine/Hong Kong/813/1993, 代表经典猪流感组; ●表示A/swine/England/453/2006和A/duck/Bavaria/1/77 (H1N1); ◆代表pdm H1N1/2009病毒

Internal segments						External segment		Isolates analysed	
PB2	PB1	PA	NP	MP	NS	HA	NA	Count	Percentage
A	■	■	■	■	■	■	■	81	42
B	■	■	■	■	■	■	■	7	4
C	■	■	■	■	■	■	■	31	16
D	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
E	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
F	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
G	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
H	■	■	■	■	■	■	■	9	5
I	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
J	■	■	■	■	■	■	■	33	17
K	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
Partial sequence								27	14
Total samples								194	100

■ Group1 ■ Group2 ■ Group3 ■ pandemic H1N1 ■ Triple-reassortant H1N1

图 3 欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒基因型分类

(H1N1)与人体内分离的H1N1病毒(A/Hunan/42443/2015)高度同源. 因此, 进一步对这两株H1N1病毒做了氨基酸差异分析(表1), 结果显示, 两株病毒间的氨基

酸差异较小. 两株病毒HA蛋白上的151和204位的氨基酸存在差异, 其中, A/swine/Hubei/221/2016的HA蛋白第151位和204位分别为丙氨酸(alanine, A)和缬氨酸

表 1 A/swine/Hubei/221/2016和A/Hunan/42443/2015之间的氨基酸差异

基因	毒株	突变位点											
PB2		13	61	220	355	391	411	461	553	590	655	667	718
	A/swine/Hubei/221/2016	K	R	I	I	E	V	V	I	S	V	V	R
	A/Hunan/42443/2015	Q	K	V	R	D	I	I	V	G	L	I	K
PB1		105	171	216	278	362	533	581					
	A/swine/Hubei/221/2016	D	M	G	E	T	S	D					
	A/Hunan/42443/2015	N	V	D	K	M	N	N					
PA		30	58	225	228	263	269	386	432	626	639		
	A/swine/Hubei/221/2016	T	D	N	N	T	K	E	I	R	T		
	A/Hunan/42443/2015	I	G	S	S	A	R	D	V	K	A		
HA		2	151	204	319	371							
	A/swine/Hubei/221/2016	K	A	V	K	R							
	A/Hunan/42443/2015	E	V	D	E	Q							
NP		128	373	424	484								
	A/swine/Hubei/221/2016	E	T	T	G								
	A/Hunan/42443/2015	D	N	I	E								
NA		16	76	122	286	314	329						
	A/swine/Hubei/221/2016	T	A	V	S	M	S						
	A/Hunan/42443/2015	A	T	I	N	I	N						
M1		36	37	207									
	A/swine/Hubei/221/2016	N	I	C									
	A/Hunan/42443/2015	S	T	S									
NS1		21	54	56	62	80	81	84	109	170	171	216	
	A/swine/Hubei/221/2016	R	I	A	K	A	L	L	H	T	V	S	
	A/Hunan/42443/2015	Q	V	T	R	T	I	V	Q	I	D	P	
NS2		14	34	89									
	A/swine/Hubei/221/2016	L	R	A									
	A/Hunan/42443/2015	M	Q	V									

(valine, V), A/Hunan/42443/2015的HA蛋白第151和204位分别为V和天冬氨酸(aspartic acid, D). 研究表明这两个位点均属于病毒的HA受体结合位点, 因此这两个位点的差异可能会导致这两株病毒与受体结合能力的不同.

3 讨论

本研究从NCBI数据库和GISAID数据库下载中国所有猪流感病毒的基因组序列, 然后对其进行遗传进

化分析和基因型分类分析. 结果显示, 在2007年以前, 中国猪群中主要流行H3N2亚型猪流感病毒, 从2008年开始, H1N1亚型的猪流感病毒大幅度增加, 且增加的H1N1亚型猪流感病毒主要以欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒为主. 因此, 我们对中国的欧亚禽系H1N1亚型猪流感病毒流行情况进行了分析, 发现中国的欧亚禽系H1N1猪流感病毒总共有11个基因型, 其中, 基因型为A, B, C, H和J的病毒数量最多. 基因型为A, B和C的病毒的8个基因片段均来源于欧亚禽系H1N1猪流感病毒. 基因型为H的病毒有4个基因片段PB2, PB1, PA和

图4 各基因型欧亚禽系H1N1猪流感病毒在中国的时间分布图

NP来源于Pandemic H1N1/2009病毒. 基因型J的病毒HA和NA基因来源于欧亚禽系H1N1亚型禽流感病毒, 其余6个基因片段来源于pandemic H1N1/2009病毒. 此外, 本研究分离到一株新的H1N1猪流感病毒(A/swine/Hubei/221/2016(H1N1)). 该毒株和已报道的病毒A/Hunan/42443/2015(H1N1)均属于欧亚禽系H1N1流感病毒, 经基因型分析, 这两个病毒均为H基因型病毒, 并且H型的病毒自2013年出现后有增多的趋势, 因此, 预测未来可能会出现越来越多的基因型为H的重配病毒株. 值得关注的是有研究报道A/Hunan/42443/2015(H1N1)造成了人的重症肺炎^[12]. 因此, 基因型H的病毒有可能成为传染性强且毒力强的毒株, 未来可能对我国猪群造成严重威胁.

本研究进一步通过对A/swine/Hubei/221/2016(H1N1)毒株进行全基因组测序及遗传进化分析发现, 病毒内部基因发生了一定的重配, 其中聚合酶片段PB2, PB1, PA和NP基因均来源于pandemic H1N1/2009, 而其他4个基因片段HA, NA, M和NS基因来源于欧亚禽系H1N1亚型流感病毒. 对病毒8个基因组片

段的遗传进化分析发现, 病毒的所有基因片段均与病毒A/Hunan/42443/2015(H1N1)亲缘关系很近. A/Hunan/42443/2015(H1N1)是于2015年从人体内分离得到的一株新型的欧亚禽系H1N1猪流感病毒, 该病毒在小鼠(*Mus musculus*)体内的复制滴度和对小鼠的毒力均比另外一株人的欧亚禽系H1N1分离株A/Jiangsu/1/2011(H1N1)要强, 虽然目前尚未发现其能进行人际间传播^[12], 但是, 鉴于新型欧亚禽系H1N1病毒在猪群中的传播, 应当加强猪与人之间的流感监测. 上述发现表明了欧亚禽系猪流感病毒具有跨种传播造成人感染的能力, 随着欧亚禽系H1N1猪流感病毒在我国猪流感病毒中比例的不断增加, 给我国养猪业带来的风险日益增加, 对人类健康造成的威胁也与之俱增, 因此, 对我国欧亚禽系猪流感病毒的流行状况的调查分析、病毒的遗传进化分析以及病毒传播的监测变得尤为重要.

流感病毒PB2蛋白上的几个氨基酸位点对于哺乳动物中流感病毒的复制能力和毒力起着重要作用^[14-16]. 研究表明, pandemic H1N1/2009病毒通过S590G和R591Q突变导致在人类细胞中获得更强的聚合酶活性, 这两个位点的适应性突变对此病毒缺少E627K的突变起到补偿作用^[17]. 对A/swine/Hubei/221/2016(H1N1)和A/Hunan/42443/2015(H1N1)病毒进行氨基酸序列比对发现两株病毒的PB2基因590位的氨基酸存在差异, 其590位分别为S和G, 因此, 欧亚禽系H1N1猪流感病毒有可能通过此位点的适应性突变而获得在人类细胞中复制的能力. 此外, 对在中国分离鉴定的欧亚禽系H1N1猪流感病毒的基因片段进行氨基酸位点分析发现这些毒株的PB2都包含哺乳动物适应性位点^[9], 表明欧亚禽系H1N1猪流感病毒具备感染人类的潜力.

总之, 本研究对中国欧亚禽系H1N1猪流感病毒的流行和遗传进化进行了分析, 综合其他研究者的报道, 发现欧亚禽系H1N1猪流感病毒可能是目前在猪体内流行的流感病毒中构成流感大流行的最大威胁, 应予以高度关注.

参考文献

- 1 Brown I H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 29-46
- 2 Garten R J, Davis C T, Russell C A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 2009, 325: 197-201
- 3 Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. A fatal relationship—influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunol*, 1999, 12: 175-196

- 4 Scholtissek C, Bürger H, Bachmann P A, et al. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*, 1983, 129: 521–523
- 5 Schultz U, Fitch W M, Ludwig S, et al. Evolution of pig influenza viruses. *Virology*, 1991, 183: 61–73
- 6 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. *Bull World Health Organ*, 1981, 59: 75–78
- 7 Vincent A, Awada L, Brown I, et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health*, 2014, 61: 4–17
- 8 Vijaykrishna D, Smith G J D, Pybus O G, et al. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature*, 2011, 473: 519–522
- 9 Yang H, Chen Y, Qiao C, et al. Prevalence, genetics, and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 392–397
- 10 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. *Arch Virol*, 2013, 158: 39–53
- 11 Wang D, Qi S, Li X, et al. Human infection with Eurasian avian-like influenza A(H1N1) virus, China. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19: 1709–1711
- 12 Zhu W, Zhang H, Xiang X, et al. Reassortant Eurasian avian-like influenza A(H1N1) virus from a severely ill child, Hunan Province, China, 2015. *Emerg Infect Dis*, 2015, 22: 1930–1936
- 13 Zu R, Dong L, Qi X, et al. Virological and serological study of human infection with swine influenza A H1N1 virus in China. *Virology*, 2013, 446: 49–55
- 14 Fan S, Hatta M, Kim J H, et al. Novel residues in avian influenza virus PB2 protein affect virulence in mammalian hosts. *Nat Commun*, 2014, 5: 5021
- 15 Gao Y, Zhang Y, Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000709
- 16 Steel J, Lowen A C, Mubareka S, et al. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000252
- 17 Mehle A, Doudna J A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21312–21316

Prevalence and genetic evolution of EA-H1N1 swine influenza virus in China

SU HuiJuan^{1,2}, LI Peng^{1,2}, YANG Cha^{1,2}, JIN MeiLin^{1,2}, CHEN HuanChun^{1,2} & ZHOU HongBo^{1,2}

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

H1N1 swine influenza virus (SIV) has posed a potential threat to public health. Genetic evolution and amino acid substitutions of whole genome sequence of influenza virus have been shown to be associated with the virulence and pathogenicity of the virus. We made a statistical analysis of the prevalence of swine influenza virus in China and found that Eurasian avian-like H1N1 (EA-H1N1) SIVs were the main prevalent SIVs in China. We further analyzed the genotypes of EA-H1N1 SIVs, and the results showed that these viruses were divided into 11 genotypes, and there is an increasing number of reassorted EA-H1N1 SIVs in recent years, especially for those viruses whose viral genes PB2, PB1, PA and NP derived from pandemic H1N1/2009. Besides, we isolated a novel EA-H1N1 SIV (A/swine/Hubei/221/2006 (H1N1)). We find that this isolated virus is highly homologous to a previous human isolated EA-H1N1 virus A/Hunan/42443/2015 (H1N1). Taken together, this study analyzes the prevalence and genetic evolution of EA-H1N1 SIVs in China, which provides a theoretical basis for the prevention and control of swine flu.

Eurasian avian-like, H1N1 swine influenza virus, prevalence, genetics and evolution

doi: [10.1360/N052018-00197](https://doi.org/10.1360/N052018-00197)