

奥司他韦对我国 A(H3N2) 亚型流感病毒红细胞凝集和抑制试验的影响

成艳辉, 黄维娟, 李希妍, 隗合江, 谭敏菊, 赵翔, 杨磊, 肖宁, 王大燕*, 舒跃龙

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 国家流感中心, 卫生部医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 102206)

摘要:比较加入神经氨酸酶抑制剂奥司他韦(Oseltamivir)对我国 A(H3N2)亚型流感病毒红细胞凝集(Hemagglutination, HA)和凝集抑制(Hemagglutinin inhibition, HI)试验结果的影响,以期获得病毒更真实的 HA 和抗原性变异分析结果。选择 2014 年 10 月-2015 年 5 月在中国大陆分离的 395 株 A(H3N2)亚型流感病毒,在 HA 及 HI 试验中加入神经氨酸酶抑制剂 Oseltamivir,对实验结果进行比较分析,根据 HA 试验,挑选其中部分毒株进行基因组测序,比较 NA 氨基酸位点变异情况。在 HA 试验中加入神经氨酸酶抑制剂 Oseltamivir 后,44.8%的毒株 HA 滴度未改变;43.8%的毒株 HA 滴度下降,仅有 11.4%的毒株 HA 滴度升高。加入 Oseltamivir 后,与 A/TX/50/2012 鸡胚株抗原性类似的毒株的比例高于未加入 Oseltamivir 时,与 A/SZ/9715293/13 细胞株抗原性类似的毒株的比例低于未加入 Oseltamivir 时类似株的比例,统计学分析有显著性差异。以 A/TX/50/2012 细胞分离株和 A/SZ/9715293/133 鸡胚分离株作为参考病毒,Oseltamivir 对实验结果的影响无显著性差异。挑选 19 株 A(H3N2)亚型流感毒株进行基因组测序,进行 NA 蛋白氨基酸位点分析,与 A/TX/50/2012 鸡胚分离株相比加入 20nM Oseltamivir 后,滴度降低超过 4 倍的 5 株毒株,没有共同氨基酸位点变异,但 A/山东莱城/119/2015 流感毒株有 D151G 氨基酸位点突变;A/吉林铁西/1194/2015 流感毒株有 V412I 和 T434A 氨基酸位点变异。加入 20nM Oseltamivir 后,滴度降低为 2~4 倍的毒株,具有 I26T、G93S、V149I、N234D、T267K、S416G 等位点突变。在对我国近年流行的 A(H3N2)亚型流感病毒进行血凝滴度和抗原性分析中,加入 Oseltamivir 可获得更为真实的 HA 和 HI 结果,分析病毒的变异情况,评价疫苗的匹配性。

关键词:流感病毒;神经氨酸酶抑制剂;A(H3N2)亚型

中图分类号:R373.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2017)01-0013-06

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003091

流行性感冒是一种由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒根据病毒核蛋白及膜蛋白的抗原特性及其基因特性的不同分为 A、B、C、D 四种型别。目前在人群中流行的季节性甲型流感病毒有 A(H1N1)pdm09 和 A(H3N2)亚型。

既往对 2005-2009 年 A(H3N2)亚型流感病毒的研究发现,人季节性 A(H3N2)亚型流感病毒受体结合特性发生了明显的变化,主要表现在对不同宿主来源的红细胞的凝集能力发生了改变,病毒生长特性发生了变化,特别是在鸡胚中的生长能力^[1],并且很多病毒经 MDCK 细胞传代后与雪貂抗血清的血凝抑制效价降低,研究发现这些改变不是血凝素(HA)基因突变造成的,而是由于神经氨酸酶

(NA)基因的 151 位点突变影响了病毒与红细胞的结合^[1]。

虽然存在上述可能的影响因素,HI(Hemagglutinin inhibition,血凝抑制)实验由于其操作相对简单、费用较低,目前依然是病毒抗原性分析、疫苗有效性评价的主要依据。本研究通过比较在进行红细胞凝集试验及红细胞凝集抑制试验的过程中加入或不加入神经氨酸酶抑制剂的结果,为近期我国 A(H3N2)亚型流感病毒抗原分析方法的优化提供依据,以期获得病毒更可靠的抗原性变异结果,为流感疫苗推荐提供有价值的依据。

材料与方法

1 细胞与病毒 MDCK(狗肾细胞)细胞为国家流感中心保存。本文所用 A(H3N2)亚型毒株均为国家流感中心保存,经 MDCK 细胞分离培养扩增,毒株分离日期为 2014 年 10 月至 2015 年 5 月。

2 参考病毒与抗血清制备 参考抗原采用 WHO 推荐的国际疫苗株。A/Texas/50/2012(下文缩写为 A/TX/50)和 A/Switzerland/9715293/2013 的

收稿日期:2016-11-01;修回日期:2016-12-22

基金项目:十二五国家科技重大专项项目“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(项目编号:2014ZX10004002-001-003),题目:H7N9 等新型流感病毒跨种传播机制研究

作者简介:成艳辉(1981-),女,内蒙古赤峰市人,助理研究员,主要从事流感病毒研究工作, Tel:010-58900861, E-mail:chengyanhui@cnic.org.cn

*通讯作者:王大燕(1975-),研究员, Tel:010-58900858, E-mail:dayanwang@cnic.org.cn

鸡胚(简称鸡胚株)和细胞分离株(简称细胞株)(下文缩写成 A/SZ/9715293)为美国疾病预防控制中心提供。雪貂血清由中国国家流感中心制备,羊抗血清由中国国家流感中心委托昆明罗望子科工贸有限公司制备,参考抗原抗血清的制备方法见参考文献^[2]。

3 神经氨酸酶抑制剂 本研究所使用的为奥司他韦(Oseltamivir)羧酸盐,Oseltamivir 的使用浓度参考文献^[1]。由罗氏(Roche)公司提供。

4 试剂配制

4.1 配制 Oseltamivir 母液 先用无菌水将 Oseltamivir 配制成 1mM 浓度,再稀释成 40 μ M 液体,每管 400 μ l 分装保存在-20 $^{\circ}$ C。

4.2 配制含不同浓度 Oseltamivir 的 PBS 溶液 20nM 为 10ml PBS 中加入 5 μ l 浓度为 40 μ M 的 Oseltamivir 母液,40nM 为 10ml PBS 中加入 10 μ l 浓度为 40 μ M 的 Oseltamivir 母液,80nM 为 10ml PBS 中加入 20 μ l 浓度为 40 μ M 的 Oseltamivir 母液。

4.3 配制含有 20nM Oseltamivir 的豚鼠红细胞悬液 将 10ml 的 1% 红细胞悬液中加入 5 μ l 浓度为 40 μ M 的 Oseltamivir 母液。

5 红细胞凝集(Hemagglutination; HA)试验和凝集抑制(Hemagglutination inhibition; HI)试验 红细胞凝集试验和用于病毒抗原分析的红细胞凝集抑制试验(HI)方法参见《流感监测技术指南》。使用含有 20nM Oseltamivir 的红细胞进行凝集试验的方法见^[3],含有 20nM Oseltamivir 的红细胞凝集抑制试验方法见^[4]。

6 核酸提取、RT-PCR 扩增 使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒(QIAGEN)提取病毒的 RNA。基因的扩增使用 One Step RT-PCR Kit 试剂盒(QIAGEN)。扩增引物来自 <http://gsc.jcvi.org/projects/msc/influenza/>网站,由大连宝生物公司合成。

7 PCR 产物纯化及序列测定 使用 ExoSAP-IT 试剂(USB)对 PCR 产物进行纯化,采用 Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)进行测序反应,测序产物利用 Bigdye X Terminator Purification kit 试剂盒(ABI)进行纯化后,在 3730XL 自动测序仪(ABI)上读取序列。

8 序列分析 采用 Lasergene 软件包中的 Seqman 程序对序列进行拼接。用 MEGA version 5.0 软件进行序列的比对和进化分析。文中参与序列分析的疫苗株为 A/TX/50/12 和 A/SZ/9715293/13,其血

凝素(HA)基因与神经氨酸酶(NA)基因序列来自全球共享禽流感数据倡议组织(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, GISAID),序列号分别为: EPI391247、EPI391246、EPI543761、EPI543760。

9 统计学分析方法 用 SPSS 17.0 软件进行 X^2 检验,并计算 P 值。

结 果

1 红细胞凝集试验(HA)结果

为比较在 HA 试验中,Oseltamivir 对红细胞和病毒结合的影响,将 395 株 A(H3N2)亚型流感病毒分别进行未加入 Oseltamivir 的 HA 试验和加入有 20nM Oseltamivir 的 HA 试验,结果见图 1。结果显示,44.8% 的毒株在 HA 实验中加入 Oseltamivir 后,HA 滴度未改变;43.8% 的毒株在加入 Oseltamivir 后,HA 滴度降低为原来的 2~16 倍,仅有 11.4% 的毒株在加入 Oseltamivir 后,HA 滴度升高。

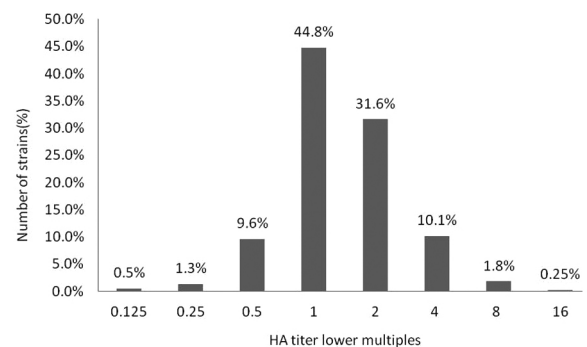


图 1 加入 20nM Oseltamivir 后 HA 滴度降低的倍数

Figure 1 Change in HA titer with addition of 20 nM oseltamivir

Abscissa: Fold change in HA titer with addition of oseltamivir;
Ordinate: Percentage of strains

2 HI 试验结果

利用 HI 实验方法对 395 株病毒进行抗原性分析,以 A/TX/50/2012 和 A/SZ/9715293/13 的鸡胚株和细胞株分别作为参考病毒,以参考病毒免疫后的雪貂血清作为参考血清,结果见表 1。实验中加入的 Oseltamivir 浓度为 20nM Oseltamivir。

3 神经氨酸酶(NA)氨基酸位点变异

根据在 HA 试验中加入 Oseltamivir 后 HA 滴度的变化情况(表 2),选择其中 19 株病毒进行序列测定,选取测序毒株的详细信息及 HA 结果见表 2。

与 A/TX/50/2012 鸡胚分离株相比,19 株病毒的 NA 氨基酸位点变异情况见表 3。加入 20nM Oseltamivir 后,HA 滴度降低超过 4 倍的 5 株毒株,没有共同氨基酸位点变异,其中 A/山东莱城/119/2015 流感毒株有 D151G 氨基酸位点突变;A/吉林铁西/1194/2015 流感毒株有 V412I 和 T434A 氨基

酸位点变异。加入 20nM Oseltamivir 后,滴度降低 2~4 倍的毒株,分别具有 I26T、G93S、V149I、N234D、T267K、S416G 位点突变。加入 20nM Oseltamivir 后,滴度不变的毒株,也在 NA 基因的 77、82、176、222、315、339、374、386、435 和 468 等位点与 A/TX/50/2012 鸡胚株存在差异。

表 1 Oseltamivir 对 A(H3N2)亚型流感病毒 HI 实验结果的影响

Table 1 Effect of oseltamivir on the HI results of influenza H3N2 viruses

Reference antigens	Without/With 20nM Oseltamivir	No. of similar strain(ratio)	No. of Low response strain(ratio)	P values
A/TX/50/2012 E	Yes	14(3.5)	381(96.5)	0.000
	No	75(19.0)	320(81.0)	
A/TX/50/2012 C	Yes	309(78.2)	86(21.8)	0.069
	No	287(72.7)	108(27.8)	
A/SZ/9715293/13 E	Yes	105(26.6)	290(73.4)	0.746
	No	101(25.6)	294(74.4)	
A/SZ/9715293/13 C	Yes	372(94.2)	23(5.8)	0.005
	No	350(88.6)	45(11.4)	

E: Egg strain; C: Cell strain

表 2 挑选的测序毒株信息及 HA 结果

Table 2 Information and HA titer of strains selected for sequencing

Reference antigens	Collection Date	HA titer		Raise / lower multiples
		(Without Oseltamivir)	(With Oseltamivir)	
A/Texas/50/2012E	2012/4/15	32	32	无变化
A/Texas/50/2012C	2012/4/15	64	32	升高 2 倍
A/SZ/9715293/13E	2013/12/6	128	128	无变化
A/SZ/9715293/13C	2013/12/6	32	16	升高 2 倍
A/Xinjiang-Hami/1644/2014	2014/12/2	32	256	升高 8 倍
A/Tianjin-Jinnan/1593/2014	2014/12/2	32	256	升高 8 倍
A/Liaoning-Heping/1573/2014	2014/12/1	128	128	无变化
A/Qinghai-Chengdong/1518/2014	2014/12/6	128	128	无变化
A/Anhui-Qiaocheng/1137/2015	2015/2/5	32	32	无变化
A/Henan-Hubin/1104/2015	2015/2/9	32	32	无变化
A/Beijing-Huairou/122/2015	2015/1/5	64	64	无变化
A/Hebei-Cixian/112/2015	2015/1/6	64	64	无变化
A/Guangxi-Longan/130/2015	2015/1/12	64	64	无变化
A/Yunnan-Wuhua/1281/2015	2015/5/7	32	32	无变化
A/Henan-Shihe/1562/2014	2014/12/3	128	64	降低 2 倍
A/Jilin-Dongchang/11/2015	2015/1/1	128	64	降低 2 倍
A/Hunan-Yuhu/11001/2014	2014/12/16	32	16	降低 2 倍
A/Beijing-Huairou/1243/2015	2015/2/2	64	32	降低 2 倍
A/Liaoning-Haizhou/1614/2014	2014/12/8	128	32	降低 4 倍
A/Xinjiang-Hami/1607/2014	2014/11/19	256	32	降低 8 倍
A/Jilin-Ningjiang/1610/2014	2014/12/18	256	32	降低 8 倍
A/Shandong-Laicheng/119/2015	2015/1/7	64	8	降低 8 倍
A/Jilin-Tiexi/1194/2015	2015/3/10	128	8	降低 16 倍

讨 论

HA 与 NA 蛋白是流感病最主要的表面抗原,

HA 是 I 型糖蛋白,氨基端在囊膜外,梭基端在囊膜内,在流感病毒吸附及跨膜过程中起重要作用,流感病毒中,突变率最高的蛋白便是 HA,除了组成受体结合位点的氨基酸外,整个 HA 分子都是高度变异

的^[5-7]。NA 是 II 型糖蛋白,与 I 型糖蛋白相反,氨基端在囊膜内,梭基端在囊膜外。NA 具有酶的功

能,可把结合在细胞表面的 HA 分子、NA 分子、糖蛋白或糖脂上的唾液酸残基水解下来,从而使病毒

表 3 A(H3N2)亚型流感病毒神经氨酸酶(NA)氨基酸位点变异情况

Table 3 Change in amino acids of neuraminidase(NA) of the influenza A(H3N2) virus

Reference antigens	multiple	26	44	77	82	88	93	136	143	147	149	150	151	176	221	222	234	267	312	315	339	374	386	392	412	416	434	435	459	468
A/Texas/50/2012E	1.0	I	S	I	A	S	G	Q	V	N	V	H	D	I	E	I	N	T	I	S	D	Y	P	I	V	S	T	E	P	P
A/Texas/50/2012C	2.0
A/SZ/9715293/13E	1.0	R	.	.	D	T
A/SZ/9715293/13C	2.0	R	.	.	D	T
A/Xinjiang-Hami/1644/2014	0.1	M	D	T
A/Tianjin-Jinnan/1593/2014	0.1	D	.	.	.	D	T	A	.
A/Liaoning-Heping/1573/2014	1.0	M	D	F	T	H	.
A/Qinghai-Chengdong/1518/2014	1.0	.	.	.	L	R	.	.	D	.	.	.	V	T
A/Anhui-Qiaocheng/1137/2015	1.0	M	D	N	.	.	.	T
A/Henan-Hubin/1104/2015	1.0	R	.	.	.	D	T	K	.
A/Beijing-Huairou/122/2015	1.0	M	D	T
A/Hebei-Cixian/112/2015	1.0	.	M	S	D	S	T
A/Guangxi-Longan/130/2015	1.0	.	M	D	T	S	T
A/Yunnan-Wuhua/1281/2015	1.0	R	.	.	.	D	R	T
A/Henan-Shihe/1562/2014	2.0	R	.	.	.	D	.	D	T
A/Jilin-Dongchang/11/2015	2.0	R	.	.	.	D	T
A/Hunan-Yuhu/11001/2014	2.0	.	.	.	S	K	.	.	I	R	.	.	.	D	.	.	K	T
A/Beijing-Huairou/1243/2015	2.0	T	M	D	T
A/Liaoning-Haizhou/1614/2014	4.0	.	.	.	S	.	.	.	I	R	.	.	.	D	.	.	K	T	G
A/Xinjiang-Hami/1607/2014	8.0	.	.	.	L	R	.	.	.	D	.	.	.	V	T
A/Jilin-Ningjiang/1610/2014	8.0	.	P	M	D	T
A/Shandong-Laicheng/119/2015	8.0	R	G	.	.	D	T
A/Jilin-Tiexi/1194/2015	16.0	R	.	.	.	D	I	A

倍数:指加入 Oseltamivir 后 HA 滴度降低的倍数

Multiples:Decreases in multiples of HA titers with addition of oseltamivir

颗粒从宿主细胞受体上释放,有利于新生代病毒离开细胞进一步传播;NA 具有去除裸露的糖蛋白体末端的唾液酸的生物学的功能^[9]。和 HA 一样,NA 也具有高度变异的特性^[5,8,10]。NA 对 HA 与细胞唾液酸受体结合的切割能力有较大影响,一定程度上可导致流感病毒致病力的不同^[11]。NA 可以使新的病毒颗粒从感染细胞表面释放出来,同时能防止子代病毒颗粒相互聚集,使病毒更为广泛的扩散,增强感染力^[12]。

NA 抑制剂包括奥司他韦(Oseltamivir)、扎那米韦(Zanamivir)、帕拉米韦(Peramivir)等,可以与 NA 结合,阻断 NA 的唾液酸酶的功能从而抑制新产生的病毒从被感染的细胞中释放出去^[13]。其中 Oseltamivir 早在 2001 年就已进入我国市场,本研究选择其进行相关实验^[14]。

HA 是病毒表面主要与细胞结合的蛋白,我们通常所说的红细胞凝集(血凝)活性主要是 HA 蛋白发挥作用,而 NA 即神经氨酸酶,NA 蛋白的主要生理功能是水解细胞表面的 N-乙酰神经氨酸,将病毒从细胞表面释放。HA 和 NA 在功能上相互影

响,并会发生协同突变,以利于病毒的复制和传播^[9]。NA 在发挥水解作用时候由于需要与唾液酸结合,也会相当于呈现出细胞结合能力,我们研究中的部分 H3N2 病毒(43.5%),其 NA 蛋白呈现出较为明显的细胞结合力,因此加入奥司他韦抑制 NA 作用,阻断 NA 与细胞的结合,就会减少 NA 对 HA 的血凝作用的影响^[1]。而部分病毒的 NA 蛋白在发挥水解作用时,与细胞表面的结合力较弱,是否加入达菲对血凝的影响就不明显(44.8%)。还有少部分病毒(11.4%),其 NA 的酶切水解活性相对较强,可以较高效的水解 N-乙酰神经氨酸释放病毒,去除 HA 和细胞的结合(表现为较快发生血凝滴度的降低),如果加入达菲阻断 NA 的作用,反而会由于抑制了 NA 的水解作用而使 HA 滴度保持在较高水平不呈现降低。

2014~2015 年 WHO 推荐的流感疫苗组分中 A(H3N2)亚型是 A/TX/50/2012 鸡胚分离株,本试验选取 A/TX/50/2012 鸡胚分离株做参考进行 NA 基因氨基酸位点变异分析,发现在加入 Oseltamivir 后 HA 滴度显著改变的 A/山东莱城/119/

2015 流感毒株有 D151G 氨基酸位点突变, A/吉林铁西/1194/2015 有 V412I 和 T434A 氨基酸位点变异;其中 D151G 在既往研究中发现可以导致病毒的血凝滴度受 Oseltamivir 影响^[1], 而 V412I 和 T434A 以及在其他毒株存在的 93、149、267、315、339、374、468 等位点的氨基酸替换的确切作用和机制, 需要进一步试验证实。

目前使用的流感疫苗的有效成分是 HA 蛋白, 在分析流感流行株与疫苗株的匹配性时, 需要分析流行毒株与疫苗株在 HA 蛋白的抗原性差异情况, 而 HI 试验操作相对比较简单, 是比较常用的方法。当待检病毒与参考抗血清的 HI 效价低于参考病毒与参考抗血清自身 HI 效价 8 倍(含 8 倍)或以上时, 则认为待检病毒是该参考抗血清检测到的低反应株;反之, 当相差 8 倍以内时(不含 8 倍), 则认为待检病毒是参考病毒的类似株^[15]。在本文中, 对 395 株 H3N2 亚型病毒的 HI 结果显示, 以 A/TX/50/2012 细胞分离株和 A/SZ/9715293/133 鸡胚分离株作为参考病毒, Oseltamivir 对实验结果的影响无显著性差异。而加入 Oseltamivir 后, 与 A/TX/50/2012 鸡胚株抗原性类似的毒株的比例高于未加入 Oseltamivir 时, 与 A/SZ/9715293/13 细胞株抗原性类似的毒株的比例低于未加入 Oseltamivir 时的比例, 统计学分析有显著性差异。

因此, 通过本研究证明, 在对我国 2014-2015 年流行的 H3N2 病毒进行血凝滴度和抗原性分析中, 加入 Oseltamivir 有助于获得更为真实可靠的 HA 和 HI 结果, 以分析病毒的变异情况, 评价疫苗的匹配性。对于 Oseltamivir 耐药株, 可以使用其他 NA 抑制剂来代替 Oseltamivir 进行相关实验。

参考文献:

[1] Yi Pu Lin, Victoria Gregory, Patrick Collins, Johannes Kloess, Stephen Wharton, Nicholas Cattle, Angie Lackenby, Rodney Daniels and Alan Hay. Resulting from Substitution of Aspartic of Human Influenza A (H3N2) Viruses Resulting from Substitution of Aspartic Acid 151 in the Catalytic Site; a Role in Viruses Attachment? [J] J Virol, July 2010, 6769-6781.
[2] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997:91-93.

[3] WHO CL-2 Laboratory Protocol. Division of Virology and WHO Collaborating Centre for Influenza Reference and Research[EB/OL]. SOP No 29/C2.
[4] WHO CL-2 Laboratory Protocol. Division of Virology and WHO Collaborating Centre for Influenza Reference and Research[EB/OL] SOP No 30/C2.
[5] Nicholson K G, Wood J M and Zambon M. Influenza[J]. Lancet, 2003, 362(9397):1733-45.
[6] Kaverin N V, Rudneva I A, Ilyushina N A, Varich N L, Lipatov A S, Smirnov Y A, Govorkova E A, Gitelman A K, Lvov D K, Webster R G. Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 10):2497-505.
[7] Fleury D, Barrère B, Bizébard T, Daniels R S, Skehel J J, Knossow M, Nat Struct Biol. A complex of influenza hemagglutinin with a antibody that binds outside the virus receptor binding site[J]. Nat Struct Biol, 1999, 6(6):530-4.
[8] Webster R G, Webby R G, Dean W J, German O T, Yoon S W. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiological Reviews, 1992, 56:152-179.
[9] 王鼎. 甲型流感病毒表面血凝素(HA)与神经氨酸酶(NA)之间的相互作用[D]. 暨南大学, 2011.
[10] Couth R B, Kasel J A. Induction of partial immunity to influenza by a neuraminidase-specific influenza A virus vaccine in humans[J]. J Infect Dis, 1974, 129:411-420.
[11] 黄平, 沈桂章, 倪汉忠, 周惠琼. 广东地区 1996 年流感暴发的分子变异基础[J]中国病毒学, 2001, 16(01):1-5.
[12] Mckimm Breschkin J L, Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors [J] Antiviral research, 2000, 47(1):1-17.
[13] 董长颖, 韩冰孝. 流感病毒 H3N2 神经氨酸酶双点突变对病毒抗药性影响的研究[J] 畜牧兽医学报, 2012, 43(8):1260-1265.
[14] 罗小琴, 吴德峰. 抗流感病毒药物研究进展[J]家畜生态学报, 2015, 36(3):86-90.
[15] 李希妍, 成艳辉, 谭敏菊, 隗合江, 蓝雨, 黄维娟, 肖宁, 王大燕, 舒跃龙. 2014-2015 监测年度中国 B 型流感病毒病原学特征分析[J] 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(1):9-15.

Effect of Oseltamivir on the Hemagglutination Test and Hemagglutination Inhibition Test of the Influenza A(H3N2) Virus in China

CHENG Yanhui, HUANG Weijuan, LI Xiyan, WEI Hejiang, TAN Minju, ZHAO Xiang,
YANG Lei, XIAO Ning, WANG Dayan*, SHU Yuelong

(Chinese National Influenza Center, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory for Medical Virology, National Health and Family Planning Commission, Beijing 102206, China)

Abstract: We compared the effect of oseltamivir on the hemagglutination (HA) test and hemagglutinin inhibition (HI) test of the influenza A(H3N2) virus in China to obtain the “true” HA titer and antigenic variation. A total of 395 influenza H3N2 strains isolated in mainland China from October 2014 to May 2015 were analyzed with HA and HI tests, with or without oseltamivir. Gene sequencing was undertaken for selected viruses, and the amino-acid sequence of neuraminidase (NA) protein was compared with the vaccine strain. In the HA test in the presence of oseltamivir, the HA titer was unchanged in 44.8%, decreased in 43.8%, and increased in 11.4% of tested strains. In the presence of oseltamivir, the proportion of viruses similar to A/TX/50/2012 egg isolates was significantly higher, and the proportion of viruses similar to A/SZ/9715293/2013 cell isolates significantly lower, than the proportion obtained from the test without the presence of oseltamivir. A significant difference was detected between the tests with or without oseltamivir. In A/TX/50/2012 cell isolates and A/SZ/9715293/2013 egg isolates, no significant difference was detected between the tests with or without oseltamivir. Nineteen selected strains of influenza A(H3N2) were sequenced, and the amino-acid sites were compared with A/TX/50/2012 egg isolates. Five strains had a more-than-fourfold decrease in HA titer when addition of oseltamivir showed no common mutation in amino acids, whereas the A/Shandong Laicheng/119/2015 strain had a D151G mutation and the A/Jilin Tiexi/1194/2015 strain had a V412I and T434A mutation in the NA protein. The strain had a two-to-fourfold decrease in HA titer when addition of oseltamivir showed I26T, G93S, V149I, N234D, T267K and S416G mutations in NA protein. These data show that, for recent circulating influenza H3N2 viruses, the presence of oseltamivir can be used to obtain more accurate HA and HI titers for antigenic analysis and vaccine evaluations.

Key words: Influenza virus; Neuraminidase inhibitors; A(H3N2) subtype

* Corresponding author: WANG Dayan, E-mail: dayanwang@cnic.org.cn