

泉州市 2009年甲型 H1N1流感基因特性分析

郑友限, 陈明春, 王耿, 龚彩婷, 陈杰毅, 林锦忠

摘要:目的 了解福建省泉州市 2009年甲型 H1N1流感病毒的 HA 和 NA 基因特征, 探讨该病毒的遗传变异及分子特性。方法 采集泉州市甲型 H1N1流感患者咽拭子, 采用实时荧光聚合酶链反应方法检测病毒核酸及 MDCK 细胞培养进行病毒分离、鉴定, 提取其中 2 株代表性毒株病毒核糖核酸 (RNA), 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增病毒 HA 和 NA 基因, 纯化产物进行核苷酸序列测定, 用 DNA star megalign 软件进行序列分析。结果 1 020 份咽拭子检出甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 200 份; 季节性流感病毒核酸阳性 70 份, 其中 H3N2 亚型 53 份, H1N1 亚型 14 份, B 型 3 份, 并分离到 29 株甲型 H1N1 流感病毒株; HA 基因核苷酸序列测定显示, 该毒株与北美流行株高度同源, 由 HA 基因核苷酸序列推导的氨基酸系列与疫苗株 A/Brisbane/59/2007 比较, 有 22 个位于抗原决定簇的氨基酸位点发生变异, 但受体结合特异性仍为人样受体, NA 基因耐药性位点分析显示, 对达菲药物依然敏感。结论 2009 年泉州市甲型 H1N1 流感流行毒株与北美流行株高度同源, 相对于疫苗代表株出现了 HA 蛋白抗原性漂移。

关键词: 甲型 H1N1 流感病毒; 实时荧光聚合酶链反应; 序列分析

中图分类号: R 183.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0010-03

Surveillance and analysis of genetic characteristics of predominant strains of influenza A(H1N1) in Quanzhou city in 2009 ZHENG You-xian, CHEN Ming-chun, WANG Geng et al Department of Microorganic Laboratory, Quanzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Fujian Province(Quanzhou 362000, China)

Abstract Objective To understand the influenza A(H1N1) surveillance in Quanzhou city in 2009 and to analyze hemagglutinin(HA) and neuraminidase(NA) gene of influenza A(H1N1) virus and its genetic variation and molecular characteristics. **Methods** The specimens of throat swabs from the patients with influenza were collected and detected with real time RT-PCR. Viruses were isolated with Madin-Darby Canine Kidney cells and identified with serological test. Two influenza virus isolates were extracted, and their HA and NA genes were amplified with reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The purified PCR products were sequenced. The data obtained were analyzed with DNAMAN software. **Results** Totally 200 influenza type A(H1N1) virus RNA were detected from 1 020 specimens and 70 seasonal influenza virus RNA were detected. Totally 29 influenza A(H1N1) virus strains were identified. The nucleotide homology in the HA gene was highly homologous with that of in North America influenza pandemic. The amino acids sequences deduced from the nucleotide sequences in HA region of the isolated strain had 22 variations compared with A/Brisbane/59/2007 vaccine strain recommended by WHO. The characteristics of the receptor was human. The analysis of amino acid sequences of NA indicated that the virus possessed oseltamivir sensitivity. **Conclusion** The influenza A(H1N1) strains caused the epidemic in 2009 in Quanzhou city was highly homologous with that of in North America influenza pandemic. And they are antigenical and genetical differences compared to the vaccine strain.

Key words influenza A(H1N1) virus; real time RT-PCR; sequence analysis

研究显示, 2009年各国流行的甲型 H1N1 流感病毒在氨基酸序列水平上高度同源, 其病毒基因组内存在 4 源重配, 包含人、古典型猪流感和禽流感等 3 种流感病毒的核糖核酸基因片段^[1-3]。以前在猪和人群中均未发现以这种方式重配的流感病毒, 人群无天然免疫力^[4]。为了解其抗原特性及基因进化特点, 为进行分子生物学研究奠定基础, 本研究对福建省泉州市 2009 年 7 月 - 12 月流感样病例进行病原学监测, 并对 2 株甲型 H1N1 流感毒株的 HA 基因进行了核苷酸序列测定。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 2009 年 7 - 12 月, 在泉州市哨点医院泉州市第一医院和泉州市儿童医院采集流感样病例咽拭子 1 020 份。1 020 流感样病例中男性 625 例, 女性 595 例, 其中 0 ~ 5 岁有 366 例, 占 35.9%, 5 ~ 10 岁有 179 例, 占 17.5%, 10 ~ 15 岁有 143 例, 占 14.0%, 15 ~ 60 岁有 300 例, 占 29.4%, ≥ 60 岁有 32 例, 占 3.1%。全部病例中, 幼托人员有 402 例, 学生 336 例, 商务或其他人员 150 例, 离退休人员 32 例。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 甲型、乙型及 H1、H3 亚型流感病毒核酸测定试剂盒 (上海之江生物科技有限公司), Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step Quantitative Kit 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 甲型 H1N1 流感病毒标准抗原及其抗血清流感诊断试剂盒 (国家流感中心); MDCK 细胞 (国家流感中心)。

1.2.2 病毒核酸提取 采用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 提取病毒 RNA, 具体操作参照试剂盒说明书。

1.2.3 实时荧光聚合酶链反应 (Real time-PCR) 检测 采用 Real time-PCR 检测技术检测甲型、乙型及季节性 H1、H3 亚型流感病毒, 具体操作参照试剂说明书, 甲型 H1N1 流感病毒检测采用 WHO 推荐方法, 并采用 Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step Quantitative Kit 试剂盒, 具体参照文献 [5]。

1.2.4 病毒分离及鉴定 选取经 Real time-PCR 检测甲型 H1N1 流感病毒阳性标本, 采用常规 MDCK 细胞进行病毒分离培养, 阳性培养物用血凝抑制试验 (HI) 鉴定型别。鉴定采用甲型 H1N1 流感病毒标准抗原及其抗血清流感诊断试剂盒, 具体实验方法参照文献 [6]。在 BSL-2 负压实验室进行

甲型 H1N1 流感病毒阳性标本分装、处理和接种。

1.2.5 甲型 H1N1 流感病毒 HA 和 NA 基因核苷酸序列测定

从新收获的病毒培养液中选择毒株 A/quanzhou/852/2009 (H1N1)、A/quanzhou/860/2009 (H1N1), 采用 QIAmp Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取病毒 RNA, 采用 OneStep RT-PCR Kit 试剂盒进行逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR), 具体操作参照说明书。RT-PCR 产物纯化后送上海之江公司测序, 测序用引物序列按照文献 [7], 反转录引物: 5' AGCAAAAGCAGC 3'; HA F: 5' AGCGGAAAAGCAGGGGAAAATAAAAC 3', HA R: 5' CAATGAAACCGCAATGGCTCC 3'; NA F: 5' GCAAAGCAGGAGTA AAGATGAA TC 3', NA R: 5' CTAATAATTCGAAAGCTTATATAGGC 3'; 引物由大连宝生物公司合成。

1.2.6 基因比对和种系发生树 与美国 NCBI 的 GenBank 上公布的部分甲型 H1N1 流感病毒株的 HA 和 NA 基因序列进行比较, 参考 WHO 推荐的当前季节性流感疫苗株代表株 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) 的序列, 采用 DNASTAR MEGA 软件分析基因, 用 Clustal 方法绘制种系发生树, 分析泉州市甲型 H1N1 流感病毒分离株 HA 和 NA 基因变异情况。

2 结果

2.1 核酸分型与毒株分离 (表 1) 1 020 份咽拭子标本, 共检出甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 200 份; 检出季节性流感病毒核酸阳性 70 份, 其中 H3N2 亚型 53 份, H1N1 亚型 14 份, B 型 3 份。表 1 可见, 季节性流感多数集中在 7-9 月份, 尤其是 8 月份, 检出阳性最多, 占 57.1% (40/70); 甲型 H1N1 流感则多数集中在 10-12 月份, 尤其是 12 月份, 占 53.5% (107/200)。对甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性的部分咽拭子进行 MDCK 细胞培养, 分离到甲型 H1N1 流感病毒毒株 29 株。

表 1 2009 年 7-12 月泉州市流感监测病毒核酸分型分布

月份	检测数	阳性数	阳性率 (%)	Real time RT-PCR 检测结果			
				H1	H3	B	甲型 H1N1
7	172	13	7.6	1	10	2	0
8	190	40	21.1	7	32	1	0
9	198	11	5.6	1	6	0	4
10	149	42	28.2	5	5	0	32
11	143	57	39.9	0	0	0	57
12	168	107	63.7	0	0	0	107
合计	1 020	270	26.5	14	53	3	200

2.2 甲型 H1N1 流感病毒 HA 核苷酸序列分析 (图 1) 对 2 株分离到的甲型 H1N1 流感病毒经测序建立 HA1 基因进化树, 结果可见, 2 株分离株与国内以及北美地区及部分亚洲国家流行的甲型 H1N1 流感病毒高度同源, 为同一进化分支, 与当前季节性流感疫苗株代表株 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) 则有较大距离。

2.4 甲型 H1N1 流感病毒 HA 和 NA 氨基酸序列 HA 基因 1 701 个碱基, 编码 566 个氨基酸, 分别由信号肽 (含 16 个氨基酸残基及一个甲硫氨酸)、重链 HA1 (含 328 个氨基酸残基)、轻链 HA2 (含 221 个氨基酸残基); HA1 和 HA2 以一个精氨酸 (Arg) 相连。与 WHO 推荐的当前季节性流感疫苗代表株 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) 相比, HA 的 4 个抗原决定簇 A、B、C、D 的氨基酸均有发生较大的改变, 其中发生在抗

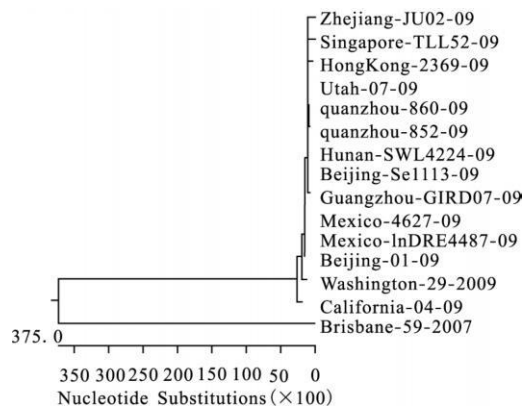


图 1 泉州市 2 株甲型 H1N1 流感病毒 HA1 基因系统进化树分析

原决定簇 A 区的改变有 S136T、S141R、N142A、E144A、S145K、B 区的有 L152I、T155V、G156K、N158G、G159N、L160S、N187T、G189A、I190D、K192Q、A193S、H196Q、T197N、E198A、C 区的有 Q54H、M275V、K277D, 前一个字母代表原来的氨基酸, 后一个字母代表突变后的氨基酸。HA 抗原性存在较大差异, 因此使用季节性流感疫苗对本次甲型 H1N1 流感的预防效果是非常有限的。HA 抗原的 226 位为 Q, 228 位为 G, 具备 H1 亚型病毒典型的结合人样受体 [7], 可识别末端含有 α -2,6 半乳糖苷 (SA 2,6Gal) 的唾液酸。HA 抗原 225 位的 D 和 227 位的 E 与人 H1 亚型病毒的氨基酸完全一致 [8], 提示甲型 H1N1 流感病毒 HA 的受体结合特异性完全符合感染人类的条件。通过对甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因耐药性位点进行分析显示, 其 274 位未发生由 H 到 Y 的突变, 提示病毒对达菲等神经氨酸酶抑制剂类药物依然敏感, 与临床的治疗效果相一致。

3 讨论

分析结果显示, 泉州市 2009 年季节性流感和甲型 H1N1 流感呈现此消彼长特点, 7、8 月份检测标本检出阳性均为季节性流感病毒, 从 9 月份开始, 检出甲型 H1N1 流感病毒的标本逐渐增多, 季节性流感病毒阳性标本逐渐减少, 12 月份所有阳性标本均为甲型 H1N1 流感病毒。对其中 2 株分离毒株进行 HA 和 NA 基因的核苷酸序列测定, 结果表明, 该 2 毒株与美国最早分离测序的毒株 A/California/04/2009 高度同源, 为同一进化分支。氨基酸序列分析结果显示, 与 WHO 推荐的当前季节性流感疫苗代表株 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) 相比, HA1 的 4 个抗原决定簇 A、B、C、D 的氨基酸均有发生较大的改变, 其中 A 区有 5 个位点, B 区 14 个位点, C 区 3 个位点, 一般认为, HA 抗原分子上的氨基酸发生 4 个以上的替换并分布在 > 2 个的抗原决定簇才具有流行病学意义 [6], 可以推测本次流行株出现 HA 抗原漂移现象, 由于季节性流感疫苗和甲型 H1N1 流感病毒在抗原性上存在较大差异, 所以目前的流感疫苗不能有效预防本次甲感疫情 [9]。HA 抗原受体位点分析, 甲型 H1N1 流感病毒可识别末端含有 α -2,6 半乳糖苷 (SA 2,6Gal) 的唾液酸, 与人季节性流感 H1 亚型病毒的氨基酸完全一致, 显示甲型 H1N1 流感病毒 HA 的受体结合特异性完全符合感染人类的条件, 具备人传播人的分子基础。由于 NA 基因 274 位未发生由 H 到 Y 的突变, 病毒对达菲等神经氨酸酶抑制剂类药物依然敏感, 因此使用达菲等神经氨酸酶抑制剂类药物作为甲型 H1N1 流感的治疗和预防药物, 可有效控制疫情的扩大和蔓延。

参考文献

- [1] WHO. Viral gene sequences to assist update diagnostics for swine influenza A (H1N1) [EB/OL]. [2010-03-18]. http://www.emm-who.int/arabic/csr/h1n1_viral_gene.pdf
- [2] Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine origin influenza A (H1N1) virus in humans [J]. N Engl J Med, 2009; 360(25): 2605-2615.
- [3] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. Nature, 2009; 459(7250): 1122-1125.
- [4] Outbreak news Swine influenza [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(18): 149-153
- [5] WHO. CDC protocol of real time RT-PCR for influenza A (H1N1)

[EB/OL]. [2010-04-30]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimepcr/>

- [6] 郭元吉,程小雯. 流行感冒病毒及其试验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 43-102
- [7] WHO. Sequencing primers and protocol [EB/OL]. [2010-05-12]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/Genamp_rimers_20090512.pdf
- [8] 舒跃龙. 新 A(H1N1) 病毒疫情及病原学概况 [C]. 全国新甲型 H1N1 防控培训, 2009: 5
- [9] 李翔,董红军,方挺,等. 宁波市 H1N1 型流感病毒监测分析 [J]. 中国公共卫生, 2010; 26(4): 392-394.

收稿日期: 2010-06-12

(孔繁学编辑 刘铁校对)

【专题报道之一】

云南省甲型 H1N1 流感重症病例流行病学分析

李琼芬, 郝林会, 陈磊

摘要: 目的 分析云南省 2009 年甲型 H1N1 流感重症病例流行病学特征, 为重症病例预防与控制提供依据。方法 采用描述流行病学方法对重症病例流行病学特征进行描述分析; 采用 1:1 配对病例-对照研究方法, 对轻症病例与重症病例平均就诊时间、平均确诊时间进行比较分析。结果 2009 年, 云南省 16 个州市中有 12 个州市有重症病例报告, 但主要集中在曲靖市和昆明市, 占总重症病例的 87.39%; 轻症病例以学生为高发人群, 重症病例以离退休人员为高发人群; 轻症病例平均就诊时间、平均确诊时间均短于重症病例, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 云南省 2009 年甲型 H1N1 流感重症病例发病时间高峰为 12 月份, ≥ 70 岁年龄组发病为主, 离退休人员为高发人群。

关键词: 甲型 H1N1 流感; 重症病例; 流行病学分析

中图分类号: R 183.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0012-02

Epidemiological analysis of severe cases of novel influenza A (H1N1) in Yunnan, 2009 LI Qiong-fen, HAO Lin-hui, CHEN Lei. Department of Public Health Emergency Management, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention (Kunming 650022, China)

Abstract Objective To provide the evidence for prevention and control of severe case of novel influenza A (H1N1) through analyzing epidemiological characteristics and risk factors of severe infection in Yunnan. **Methods** We described epidemiological characteristics of severe cases of novel influenza A (H1N1) and conducted a 1:1 matched case-control study and compared the mean time of onset to first visit and mean time of onset to confirmation between severe cases and non-severe cases. **Results** Twelve prefectures reported severe cases among 16 prefectures in Yunnan. Most of severe cases (87.39%) were reported in Qujing and Kunming city. Students and peasants were at a higher risk of getting infected among non-severe cases. Whereas 70-75 age group which were mostly retired citizens was at a higher risk of severe infection. Non-severe cases had shorter mean time of onset to first visit and mean time of onset to confirmation; the difference between non-severe and severe cases was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The number of severe cases of novel influenza A (H1N1) peaked in December 2009. Most of severe cases were detected in Qujing and Kunming city. The elderly over 70 years and retired citizens were the populations at higher risk.

Key words influenza A (H1N1); severe case; epidemiologic analysis

云南省 2009 年共报告甲型 H1N1 流感确诊病例 3 323 例, 其中重症 230 例 (包括危重病例), 死亡 20 例。为了解甲型 H1N1 重症病例流行病学特征, 探讨发病危险因素, 为防控工作提供理论依据, 本研究对云南省 2009 年甲型 H1N1 重症病例进行了调查分析。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源 收集云南省 2009 年 1 月 1 日 - 2009 年 12 月 31 日发生的甲型 H1N1 流感报告确诊病例, 包括轻症、重

症、危重及死亡病例, 资料来源于云南省传染病网络报告系统、甲型 H1N1 流感网络专报系统及部分现场调查调查。

1.2 方法 资料收集及现场调查均由统一培训过的流行病学医师完成。调查内容包括病例的一般情况、发病日期、就诊日期、确诊日期。病例报告及诊断标准: 按照卫生部《甲型 H1N1 流感监测方案 (第二版)》^[1]、《甲型 H1N1 流感诊疗方案 (第三版)》^[2]。采用 1:1 配对病例-对照研究的方法, 重症病例与轻症病例的匹配条件为年龄 (± 1 岁)、性别、地区 (同一县市); 分析发病强度、病例分布特点, 比较轻症病例与重症病例平均就诊时间 (从发病日期至就诊日期间隔)、平均确诊时间 (从就诊时间至确诊日期间隔)。

1.3 统计分析 采用 Excel 2003 软件进行描述分析, 用

作者单位: 云南省疾病预防控制中心突发公共卫生事件处置中心, 昆明 650022

作者简介: 李琼芬 (1965-), 女, 云南昆明人, 主任医师, 博士, 主要从事重大传染病的预防与控制。