

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2018.0033

· 论 著 ·

福州市人感染 H7N9 流感病毒基因特性分析

姚栩, 蒋晓虹, 张彩云, 谢迺鸿, 陈玲玲

福州市疾病预防控制中心, 福建 福州 350005

摘要: 目的 了解福州市人感染 H7N9 流感病毒基因特性及进化分布。方法 对 2013—2016 年福州市流感监测网络实验室从监测哨点医院采集的不明原因肺炎病例中人感染 H7N9 流感病毒核酸检测阳性的标本进行病毒分离, 选取部分 H7N9 禽流感病毒株进行基因组基因序列测定, 使用 DNAMAN.exe 分析软件进行基因序列比对, 并对病毒关键位点的氨基酸变异情况进行分析, 绘制遗传进化树进行进化分布分析。结果 血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 基因进化树分析结果显示福州市人感染 H7N9 禽流感病毒株与以上海、浙江为代表的长三角分支相近。7 株病毒株中均出现可导致宿主特异性改变、病毒传播力、致病力、毒力及复制能力增强的相关致病位点突变。病毒的 HA 蛋白受体结合区均发生 G186V 和 Q226L 这 2 个关键氨基酸位点的变异, HA 蛋白裂解位点序列均为 PEIPKGR↓GLF, 含有 2 个碱性氨基酸。7 株病毒的 NA 蛋白茎杆区 69~73 位氨基酸均出现缺失。病毒的 M2 蛋白均发生 S31N 突变。结论 福州市人感染 H7N9 病毒株具有遗传多样性及复杂性, 呈现致病力增强、对金刚烷胺类药物耐药等特点, 在监测工作中应加强病原学的监测和遗传变异特性的研究。

关键词: 人感染 H7N9 禽流感病毒; 基因特征; 序列分析

中图分类号: R373.1+3 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2018) 02-0140-06

Genetic characteristics of avian influenza A (H7N9) virus in Fuzhou city of China

YAO Xu, JIANG Xiao-hong, ZHANG Cai-yun, XIE Nai-hong, CHEN Ling-ling

Center for Disease Control and Prevention of Fuzhou City, Fuzhou, Fujian 350005, China

Corresponding author: YAO Xu, E-mail: yaoxu1966@sina.com

Abstract: Objective To understand the genetic variations and evolutionary distribution of Avian influenza A (H7N9) virus in Fuzhou city of China. **Methods** The virus strains were isolated from specimens tested positive for the H7N9 avian influenza virus during 2013 and 2016. Genomes of the avian influenza A (H7N9) virus were aligned to analyze the nucleotide sequences and deduced amino acid sequences. The phylogenetic tree was constructed using DNAMAN software. **Results** Comparing to virus strains from Zhejiang province and Shanghai city, the HA and NA gene evolution of the H7N9 strains in Fuzhou city are categorized into the Yangtze River Delta evolution branch in the phylogenetic tree. Two alkaline amino acid variances in the cleavage site of HA (G186V and Q226L) were found that are crucial sites related to the receptor of HA protein; in addition, one mutation (E627K) in the PB2 protein and one drug resistance mutation (S31N) in the M2 protein were found. **Conclusions** The genetic characteristics of the prevailed avian influenza A (H7N9) viruses in Fuzhou city of China are different from the representative strains of Zhejiang province and Shanghai city of China.

Key words: Avian influenza A (H7N9) virus; Genetic characteristics; Sequence analysis

2013 年 2~3 月, 一种由新 H7N9 亚型禽流感病毒导致的人感染 H7N9 流感在我国上海、安徽等省市出现流行, 此后, 浙江、江苏等地也陆续

出现 H7N9 流感病毒疫情, 患者均出现严重的肺炎和急性呼吸窘迫综合征且重症患者病情发展迅速^[1]。人感染 H7N9 禽流感病毒系首次从人群中发现的一种新型 H7N9 亚型禽流感病毒, 病毒序列分析表明, 该病毒可能为三重重配病毒, 3 者均来源于禽类或野禽^[2]。即病毒的 H7 亚型血凝素基

作者简介: 姚栩, 硕士, 主任技师, 主要从事病毒性疾病的研究工作

通讯作者: 姚栩, E-mail: yaoxu1966@sina.com

因来源于 A/Duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) 样病毒, 神经氨酸酶来源于 A/wild bird/Korea/A14/2011 (H7N9) 样病毒, 其余 6 个节段的内部基因则来源于 H9N2 禽流感病毒, 病毒基因组亲缘性分析显示它们均来源于上海、江苏等地的鸡群^[2-3]。H7N9 作为新型重组亚型禽流感病毒, 近年来其感染人数不断上升, 涉及地区也不断扩大。福建省于 2013 年 4 月 23 日确诊该省首例人感染 H7N9 流感病例^[4]。福州市于 2013 年 4 月 27 日报告了首例个人感染 H7N9 流感病例, 此后, 福州市于 2014、2015、2016 年的冬春季连续出现多起人感染 H7N9 流感疫情, 并呈现出典型流行峰。为了解福州市人感染 H7N9 流感病毒的基因特性, 本研究筛选部分人感染 H7N9 流感病毒株进行基因组特性分析, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本 福州市流感监测网络实验室从监测哨点医院采集的不明原因肺炎病例的呼吸道标本中, 按照《人类感染禽流感病毒 (H7N9) 的诊断和治疗指南 (2014 版)》^[5] 及《人感染禽流感病毒 (H7N9) 标本采集及实验室检测策略》^[6] 的方法进行病毒鉴定, H7N9 病毒核酸阳性的标本送福建省疾病预防控制中心流感参比实验室复核。

1.2 病毒核酸检测 病毒 RNA 提取、病毒核酸检测在生物安全 II 级 (BSL-2) 实验室进行, 操作及阴阳判定严格按照试剂盒说明书标准进行。流感病毒核酸检测试剂购自上海之江生物科技有限公司; 病毒 RNA 提取试剂盒 (QIAamp Viral RNA Mini Kit) 购自 QIAGEN 公司 (德国), 试剂均在有效期内使用。ABViiA7Dx 荧光 PCR 仪用于 real-time RT-PCR 试验。

1.3 毒株 福建省疾病预防控制中心流感参比实验室在生物安全 III 级 (BSL-3) 实验室对 H7N9 流感病毒核酸检测阳性的标本采用鸡胚和 MDCK 细胞进行病毒分离, 并将分离的病毒株保存送国家流感中心鉴定确认。国家流感中心选取部分毒株进行全基因组序列测定, 测序结果上传至国家流感中心流感病毒序列数据库。

1.4 序列分析比对及进化树构建 从美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 Genbank 及 Influenza Sequence Database 数据库上下载收录的具有代表性的人感染 H7N9 流感病毒基因片段的核苷酸序列进行比对分析, 参照毒株为国内主要流行省份代表株 (包括人和禽) H7N9 流感病毒株: A/An-

hui/1-DEWH730/2013 (H7N9); A/Fujian/1/2013 (H7N9); A/Hangzhou/1/2013 (H7N9); A/Shanghai/4664T/2013 (H7N9); A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013 (H7N9); A/treesparrow/Shanghai/01/2013 (H7N9); A/environment/Fujian/SC337/2013 (H7N9); A/environment/Shanghai/S1439/2013 (H7N9); A/chicken/jiangxi/13538/2014 (H7N9); A/Zhejiang/17/2014 (H7N9), 同时从国家流感中心流感病毒序列数据库下载福州市的 H7N9 流感病毒的基因系列, 分别为 A/Fujian/04/2013 (H7N9); A/Fujian/05/2013 (H7N9); A/Fujian/14/2014 (H7N9); A/Fujian/08/2015 (H7N9); A/Fujian/24/2015 (H7N9); A/Fujian/03/2016 (H7N9); A/Fujian/04/2016 (H7N9)。

使用 DNAMAN.exe 分析基因序列, 寻找可用的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 并将基因序列翻译为氨基酸序列。使用 ClustalX.exe/Bioedit.exe 进行序列比对、变异分析、系统进化树构建。使用 MEGA6.exe 查看系统进化树并进行分析。

2 结果

2.1 福州市人感染 H7N9 流感病毒检测结果分析

2013—2016 共对报告的 162 例不明原因肺炎病例标本应用 real-time PCR 法进行病原核酸检测, 检测到病毒核酸阳性共 70 份, 总检出率为 43.2%。其中 H7N9 阳性标本为 25 份, 占 15.4%, 其中男性 23 例、女性 2 例, 男女性别比为 11.5:1, 共死亡 8 例, 人感染 H7N9 流感病毒病死率 32.0%。甲型 H1N1 阳性标本为 40 份, 占 24.7%; H3 阳性标本为 3 份, 占 1.9%; 乙型病毒阳性标本为 2 份, 检出率为 1.2%。2013—2016 年检测的人感染 H7N9 流感病毒阳性率分别为 9.1% (4/44)、12.1% (7/58)、25.9% (7/27)、21.2% (7/33), 差异无统计学意义 ($\chi^2=4.981$, $P=0.173$)。获得毒株完整序列并进行比对分析的福州市人感染 H7N9 病例信息见表 1。

2.2 福州市人感染 H7N9 流感病毒核苷酸和氨基酸序列同源性对比和分析 采用分析软件对福州市分离株血凝素 (HA) 基因、神经氨酸酶 (NA) 基因、核蛋白 (NP) 基因、聚合酶 A (PA) 基因、RNA 聚合酶 1 (PB1) 基因及聚合酶 2 (PB2) 基因编码区的核苷酸和氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明福州市人感染 H7N9 流感毒株与国内其他省份 H7N9 流感病毒代表株的核苷酸的同

源性分别为 90.6%~99.9%、94.1%~99.8%、94.1%~100.0%、96.7%~100.0%、95.9%~100.0%、94.8%~99.9%。氨基酸序列比对的同

源性分别为 94.4%~99.8%、94.2%~100.0%、98.0%~100.0%、98.3%~99.9%、99.1%~99.9%、97.4%~99.9%。

表 1 2013—2016 年福州市人感染 H7N9 病例信息概况

编号	性别	年龄 (岁)	发病日期 (年-月-日)	诊断日期 (年-月-日)	病例分类	转归	发病前 10 d 内	
							是否与疑似或确诊病例接触过	是否接触过禽类
FJ/04/13	男	69	2013-04-29	2013-05-02	重症	治愈	否	是
FJ/05/13	男	9	2013-04-26	2013-05-04	轻症	治愈	否	是
FJ/14/14	男	80	2014-02-02	2014-02-06	重症	死亡	否	是
FJ/08/15	男	48	2015-01-07	2015-01-12	重症	死亡	否	否
FJ/24/15	男	2	2015-01-17	2015-01-23	重症	治愈	否	是
FJ/03/16	男	65	2016-01-14	2016-01-18	重症	死亡	否	是
FJ/04/16	男	58	2016-02-14	2016-02-22	重症	治愈	否	否

2.3 福州市人感染 H7N9 流感病毒种系进化树分析 使用 ClustalX.exe/Bioedit.exe 进行序列比对、应用 MEGA6.exe 分析软件绘制基因种系发生树，进化树构建采用邻位相接法 (neighbor-joining, N-J)。从种系发生树可以看出，福州市人感染 H7N9 流感病毒株 HA 和 NA 基因进化树分析结果均与以上海、浙江为代表的长三角分支相近。HA 基因进化树分析表明 2013 年和 2014 年分离株与 A/environment/Fujian/SC337/2013 (H7N9) 及 A/Anhui/1-DEWH730/2013 (H7N9) 亲源性较近，而 2015 年和 2016 年毒株与 A/Zhejiang/17/2014 (H7N9) 分离株更接近，结果见图 1。NA 基因进化树分析表明 2013 年和 2014 年分离株与 A/environment/Fujian/SC337/2013 (H7N9) 及福建首例 A/Fujian/1/2013 (H7N9) 较近，而 2015 年和 2016 年毒株与 A/Zhejiang/17/2014 (H7N9) 分离株更接近。结果见图 2。

2.4 病毒相关致病位点分析 以 A/Aichi/2/1968/ (H3N2) 氨基酸序列为基准对 7 株福州市人感染 H7N9 流感病毒株的氨基酸位点进行分析，发现福州市分离株 HA 蛋白受体结合区均发生了 G186V 和 Q226L 的氨基酸位点突变，HA 蛋白裂解位点序列均为 PEIPKGR↓GLF，含有 2 个碱性氨基酸。7 例福州市人感染 H7N9 流感病毒 HA 蛋白上有 5 个潜在糖基化位点，分别为 30 (N-G-T)、46 (N-A-T)、249 (N-D-T)、421 (N-W-T)、493 (N-N-T) 与参比序列 A/Anhui/1-DEWH730/2013 (H7N9) 及 A/Shanghai/4664T/2013 (H7N9) 分析相比未发生变异和缺失。NA

蛋白上有 7 个潜在糖基化位点，分别为 42 (N-C-S)、52 (N-T-S)、63 (N-E-T)、66 (N-I-T)、87 (N-L-T)、147 (N-G-T)、202 (N-A-S)，未发生糖基化位点的缺失。所有毒株均发现 NA 蛋白茎秆区的 69~73 位 (QISNT) 氨基酸缺失，提示禽流感病毒由野生水禽适应陆生家禽^[7-8]。此外，部分毒株 PB2 蛋白发生了 E627K 位点突变，提示病毒蛋白可在人体中有效合成，增强禽流感病毒对哺乳动物适应性^[9]。福州市毒株均未发现 PB2 片段上的 D701N 突变和 PA 片段上的 L336M 突变。7 株分离毒株的 M2 蛋白均发生 S31N 突变，该变异表明 H7N9 流感病毒对金刚烷胺类药物 (M2 离子通道抑制剂) 产生耐药性。相关致病位点分析见表 2。

3 讨论

人感染 H7N9 流感病毒，属于正黏病毒科甲型流感病毒属。该基因组由 8 个分节段单股负链 RNA 组成，编码 8 组结构蛋白和 2 种非结构蛋白。研究表明，在 H7N9 禽流感病毒的 8 种编码基因中，HA 基因的进化速度最快，使得病毒快速变异^[10]。目前我国 H7N9 流感病毒基因进化序列存在两大分支，一是以广东广西为代表的珠三角分支，二是以江苏、浙江为代表的长三角分支^[11]。本研究通过序列同源性对比分析发现福州分离株的 HA、NA 基因与国内其他地区，如安徽、浙江、江西等地区分离到的 H7N9 毒株相似性较高。通过进化树分析可知，2013 年和 2014 年的福州分离株的 HA 和 NA 基因与上海、浙江等省市的 H7N9 禽流感病毒进化距离最短；2015 年和 2016 年的福

州分离株的 HA 和 NA 基因与浙江、江西等地区的 H7N9 禽流感病毒进化距离最短。遗传进化树分析表明了此次分离的福州病毒株在不同时间点的遗传多样性，并说明福州地区 H7N9 病毒出现持续重配和进化。

人流感病毒和禽流感病毒具有很强的受体识别特异性。人流感病毒识别的受体类型为唾液酸 $\alpha 2, 6$ 半乳糖 (SA $\alpha 2, 6$ Gal)，禽流感病毒识别的受体类型为唾液酸 $\alpha 2, 3$ 半乳糖 (SA $\alpha 2, 3$ Gal)；其中，SA $\alpha 2, 6$ Gal 受体主要存在于人上呼吸道黏膜上皮细胞表面，SA $\alpha 2, 3$ Gal 受体主要存在于人肺泡上皮细胞和禽类的肠道黏膜上皮细胞。这种受体识别特异性是造成禽流感病毒无法在人与禽类之间相互传播的主要障碍。研究表明 HA 受体结合位点发生了 G186V 和 Q226L 这两个的氨基酸位点变异时，病毒对人呼吸道上皮细胞唾液酸 $\alpha 2, 6$ 半乳糖受体的结合能力增强，使得 H7N9 禽流感变得容易感染人类上呼吸道系统^[1,7]。在本研究中，

7 株病毒株的 HA 蛋白受体结合区均发生氨基酸位点 Q226L 和 G186V 的变异，说明这些毒株对人流感病毒识别的 SA $\alpha 2, 6$ Gal 受体的结合能力增强，提示福州地区流行的新型 H7N9 禽流感病毒能够有效地感染人类。另外 HA 蛋白裂解位点序列均为 PEIPKGR↓GLF，含有 2 个碱性氨基酸，而典型的高致病性流感病毒 A/Hong Kong/486/1997 (H5N1) 和 A/Netherlands/219/2003 (H7N7) 其裂解位点附近含有较多碱性氨基酸 RRRKRR↓GLF，具有很高的宿主细胞感染能力，提示福州市 H7N9 禽流感病毒对禽类依然是低致病性的，也没有发现文献中报道的能使禽流感病毒在上呼吸道增殖并通过飞沫传播的变异，其人传人的可能性很小。在高致病性禽流感 H5N1 病毒的 PB2 片段中可检测到同时存在 E627K 和 D701N 突变的现象^[2]，当流感病毒株发生 PB2 片段上的 D701N 突变时，提示该病毒对哺乳动物细胞亲和力的增加^[10]。本研究所有病毒株虽未发现 D701N 突变，但部分毒株 PB2

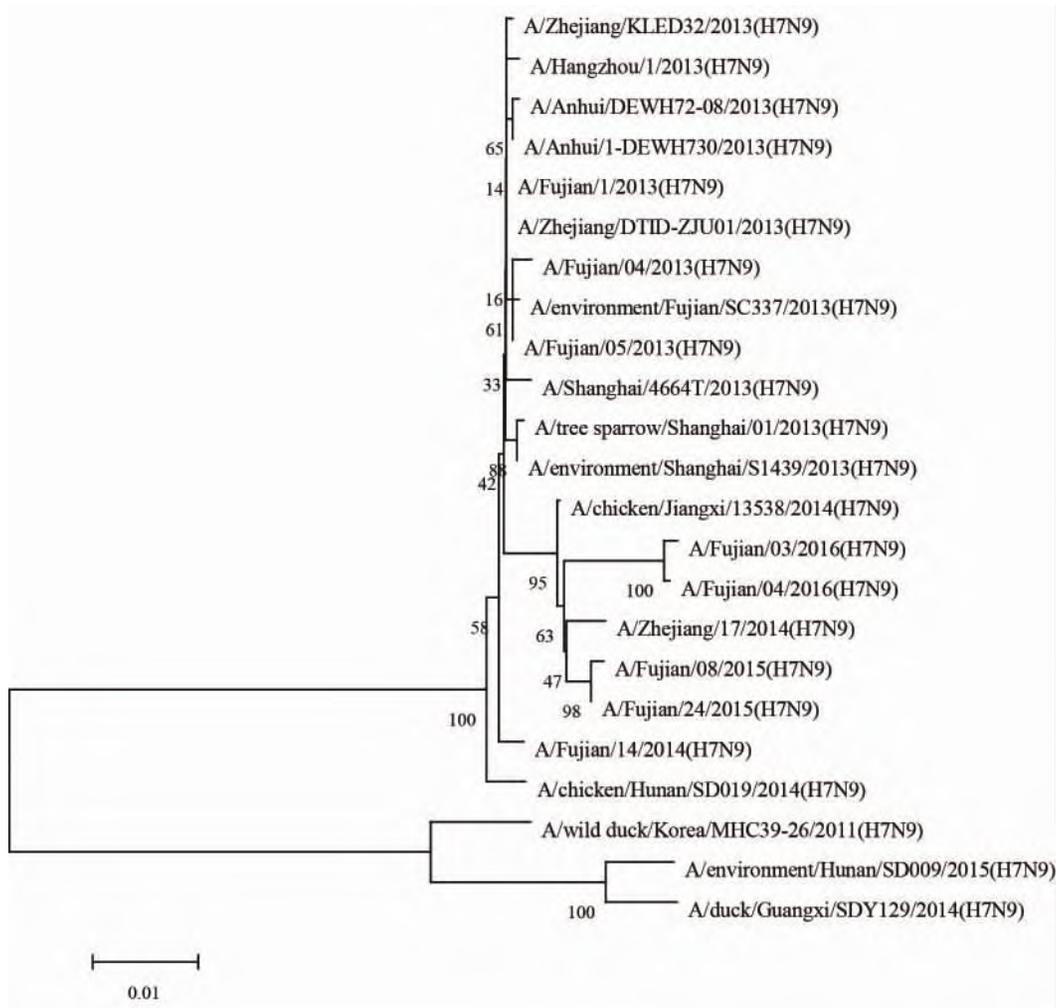


图 1 福州市人感染 H7N9 流感病毒株 HA 基因的系统进化树

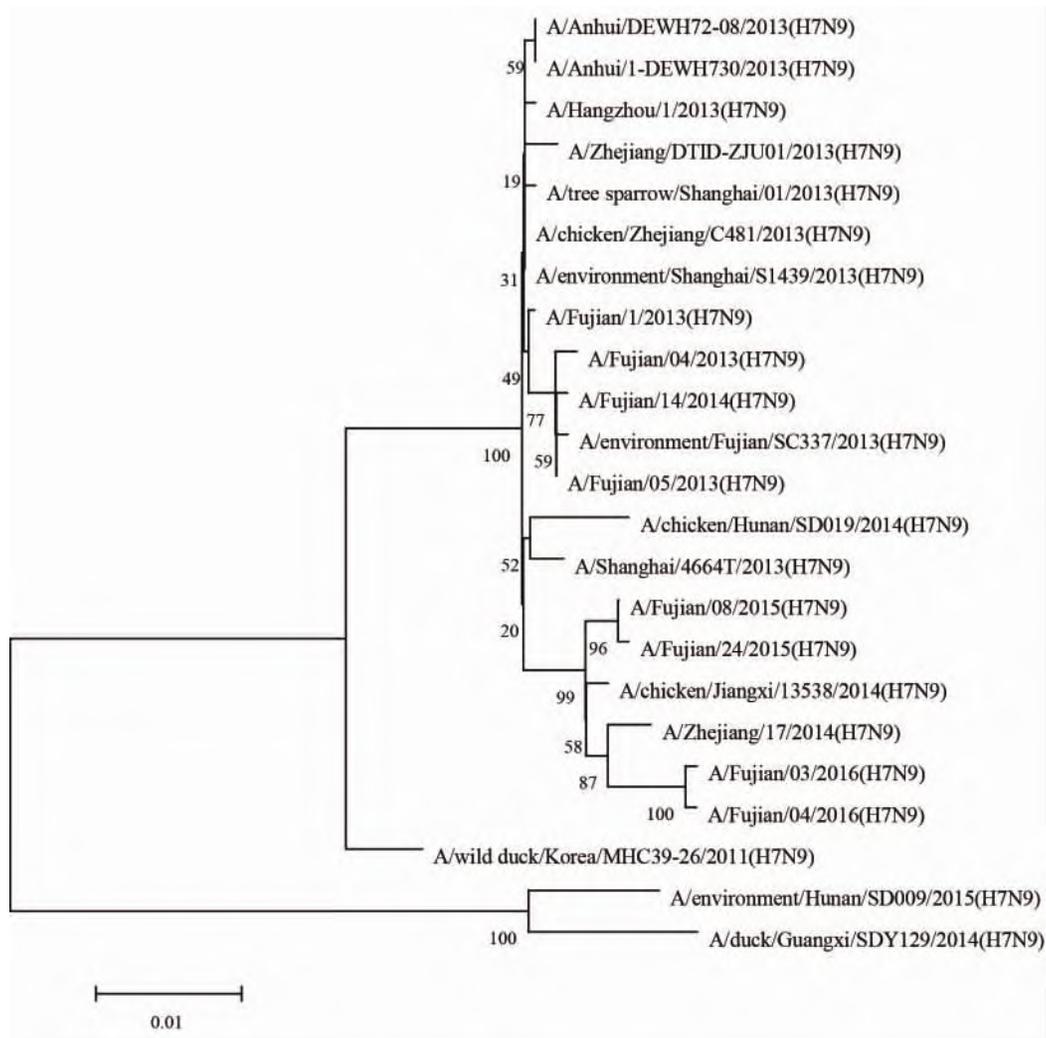


图 2 福州市人感染 H7N9 流感病毒株 NA 基因的系统进化树

表 2 福州市人感染 H7N9 流感病毒株相关位点分析

毒株	HA			裂解位点	NA	M2	PB2			PA	
	186	225	226		69~73	31	158	627	701	336	353
A/Fujian/04/2013	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	E	D	L	K
A/Fujian/05/2013	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	K	D	L	K
A/Fujian/14/2014	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	K	D	L	K
A/Fujian/08/2015	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	E	D	L	K
A/Fujian/24/2015	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	E	D	L	K
A/Fujian/03/2016	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	K	D	L	K
A/Fujian/04/2016	V	G	L	PEIPKGR↓GLF	缺失	N	E	E	D	L	K

片段上发生了 E627K 位点突变，提示福州地区 H7N9 禽流感病毒在人体内复制能力有所增强。有研究显示，NA 蛋白茎秆区 69~73 位序列缺失是禽流感病毒由野生水禽适应陆生家禽的结果^[8]，此次所有的病毒株均发现 NA 蛋白茎秆区 69~73 位

序列氨基酸缺失，提示病毒对哺乳动物呼吸道的感染能力增强。

综上所述，2013 年到 2016 年福州地区出现的人感染 H7N9 禽流感病毒具有从野生水禽向陆生家禽传播特性，病毒存在持续遗传重配及对人体适

应性和致病力增强特点。特别是 2017 年 1 月, 广东省疾病预防控制中心在分离到的人感染 H7N9 流感病毒株中发现其血凝素链接肽发生了基因插入性突变, 提示病毒突变为对禽类高致病性的病毒^[12]。因此, 需要持续对人感染 H7N9 流感病毒进行病原学检测, 及时关注病毒突变情况, 为有效防制人感染 H7N9 流感疫情提供科学有效的依据。

参考文献

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (20): 1888-1897.
- [2] Chen Y, Liang W, Yang S, *et al.* Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterization of viral genome [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9881): 1916-1925.
- [3] Xiong CL, Zhang ZJ, Jiang QW, *et al.* Evolutionary characteristics of A/Hangzhou/1/2013 and source of avian influenza virus H7N9 subtype in China [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57 (4): 622-624.
- [4] Weng YW, Zhang YJ, Xie JF, *et al.* Confirmation of first case of human infection with influenza A (H7N9) virus in Fujian Province.: laboratory diagnosis and viral sequence analysis [J]. *Zhongguo Renshou Gonghuanbing Xuebao*, 2013, 29 (6): 543-546. (in Chinese)
翁育伟, 张拥军, 谢剑锋, 等. 福建省首例人感染 H7N9 禽流感病例实验室诊断和病毒序列分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29 (6): 543-546.
- [5] National Health and Family Planning Commission of People's Republic of China Guideline on diagnosis and treatment of human infection with avian influenza A (H7N9) virus (2014 version) [EB/OL]. (2014-01-27) [2014-01-29]. <http://www.nhfdc.gov.cn/zwgk/wtwj/201401/8c1828375a7949cd85454a7-6bb84f23a.shtml>. (in Chinese)
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 人类感染禽流感病毒 (H7N9) 的诊断和治疗指南 (2014 版) [EB/OL]. (2014-01-27) [2014-01-29]. <http://www.nhfdc.gov.cn/zwgk/wtwj/201401/8c1828375a7949cd85454a76bb84f23a.shtml>
- [6] Chinese Center for Disease Control and Prevention. Strategy on specimen collection and laboratory detection of human infection with avian influenza A (H7N9) virus [EB/OL]. (2013-06-26) [2014-01-29]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/rgrgzbxqlg_5295/rgrglgyh/. (in Chinese)
中国疾病预防控制中心. 人感染禽流感病毒 (H7N9) 标本采集及实验室检测策略 [EB/OL]. (2013-06-26) [2014-01-29]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/rgrgzbxqlg_5295/rgrglgyh/.
- [7] Lin ML, Liang LJ, Song YC, *et al.* Genomic characterization of avian influenza A (H7N9) virus in Guangdong, China [J]. *Guangdong Yixue*, 2017, 38 (6): 894-899. (in Chinese)
林幕雷, 梁丽君, 宋英超, 等. 广东省 2015 年人感染 H7N9 禽流感病毒基因特征性分析 [J]. *广东医学*, 2017, 38 (6): 894-899.
- [8] Zhang HW. The characteristics of avian influenza virus (H7N9) and its potential threats to human health [J]. *Dier Junyi Daxue Xuebao*, 2013, 34 (6): 591-594. (in Chinese)
张宏伟. H7N9 禽流感的病毒特征及其对人类健康的潜在威胁 [J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34 (6): 591-594.
- [9] Hatta M, Hatta Y, Kim JH, *et al.* Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 3 (10): 1374-1379.
- [10] Zhao B, Zhang X, Zhu W, *et al.* Novel avian influenza A (H7N9) virus in tree sparrow Shanghai, China, 2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20 (5): 850-853.
- [11] Wu J, Lu J, Faria NR, *et al.* Effect of live poultry market interventions on influenza A (H7N9) virus, Guangdong, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22 (12): 2104-2112.
- [12] Tan HQ, Cheng JP, Tan HF, *et al.* Genomic characterization of avian influenza A (H7N9) virus in Zhaoqing, China, 2014-2016 [J]. *Zhongguo Renshou Gonghuanbing Xuebao*, 2017, 33 (3): 202-207. (in Chinese)
谭翰清, 程洁萍, 谭海芳, 等. 2014-2016 年广东省肇庆市人感染 H7N9 禽流感病毒组特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33 (3): 202-207.

收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2017-12-29 责任编辑: 刘磊