

2009—2010年珠海口岸入境人员中发热病例 流感病毒分子流行病学研究

莫秋华¹, 谭华¹, 林继灿¹, 刘志明¹, 杜田², 史咏梅¹, 涂承宁¹, 叶立青¹, 安胜利³, 杨泽¹

1. 珠海国际旅行卫生保健中心, 广东 珠海 519020; 2. 深圳市福田区疾病预防控制中心;

3. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院生物统计学系

摘要: **目的** 研究2009甲型H1N1流感疫情全球大流行期间珠海口岸入境发热旅客流感病毒的分子流行病学特征。**方法** 选择2009年5月至2010年4月经珠海各口岸入境的976例发热旅客(体温 $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$)为研究对象,采集咽拭子样本并提取病毒核酸,采用3个多重RT-PCR实验进行甲型、乙型和2009新甲型H1N1流感病毒的筛查以及甲型流感病毒的分子分型检测。此外,随机选择8株2009甲型H1N1流感病毒进行HA和NA基因全长RT-PCR扩增和序列分析。采用SPSS17.0软件对流行病学和实验数据进行统计学分析。**结果** 976例发热旅客中检出流感病毒阳性病例331例,其中甲型流感占96.98%(321/331),乙型流感占3.02%(10/331);321例甲型流感病毒分子分型结果为新甲型H1N1流感92例,占28.66%,人季节性H1N1流感65例,占20.25%,人季节性H3N2流感164例,占51.09%。序列分析显示珠海口岸输入性新甲型H1N1流感病毒的HA和NA基因与甲型流感典型毒株A/California/04/2009(H1N1)的同源性分别达到99.86%和99.89%。**结论** 本研究所阐明的珠海口岸流感病毒的分子流行病学特征对于指导国境口岸流感的防控具有重要参考价值。

关键词: 流感; 流感病毒; 甲型H1N1流感; 分子流行病学

中图分类号: R373.1 **文献标识码:** B

Molecular epidemiology study of influenza viruses of entry passengers with fever at Zhuhai port

MO Qiu-hua*, TAN Hua, LIN Ji-can, LIU Zhi-ming, DU Tian, SHI Yong-mei,

TU Cheng-ning, YE Li-qing, AN Sheng-li, YANG Ze

*Zhuhai International Travel Health Care Center, Guangdong, Zhuhai 519020, China

Abstract: **Objective** To study the molecular epidemiology characteristics of influenza viruses of entry passengers with fever at Zhuhai port during the 2009 influenza A (H1N1) pandemic globally. **Methods** A total of 976 entry passengers with fever (temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) were selected as the research objects from all the ports of Zhuhai during May 2009 to April 2010. Their throat swab specimens were collected and the virus nucleic acid was extracted. Three multiplex RT-PCR assays were used to screen type A, B and novel A (H1N1) 2009 influenza viruses simultaneously and detect the subtypes of influenza A viruses. In addition, the full length of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of randomly selected 8 strains of A (H1N1) 2009 influenza viruses were amplified by RT-PCR for sequence analysis. Finally, SPSS17.0 software was used for statistical analysis of both epidemiological and experimental data. **Results** Of 976 febrile passengers detected, 331 cases were positive for influenza viruses, of which 96.98% (321/331) were influenza A and 3.02% (10/331) were influenza B. Of 321 influenza A viruses that were subtyped, 92 (28.66%) were novel influenza A (H1N1) 2009, 65 (20.25%) were human seasonal influenza A (H1N1) and 164 (51.09%) were human seasonal influenza A (H3N2). These results showed that the most common subtypes of influenza viruses do still circulate in normal ways during the 2009 influenza A (H1N1) pandemic. Sequence analysis showed that the homologies of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes between the influenza A (H1N1) 2009 strains isolated at Zhuhai port and the prototypical strain of A/California/04/2009 (H1N1) were 99.86% and 99.89%, respectively. It was clearly visible that the genetic relationship between them was very close. Logically, the biological characteristics of them can be speculated to be similar. **Conclusion** The molecular epidemiologic characteristics of influenza viruses at Zhuhai port

基金项目: 国家传染病重大专项传染病监测技术平台项目(2009ZX10602-02); 珠海出入境检验检疫局科研基金项目(ZH2009-3)

通讯作者: 杨泽, E-mail: zychfb@163.com

illustrated in this study have important reference value to guide the prevention and control of influenza at the frontier port.

Key words: Influenza; Influenza virus; Influenza A (H1N1); Molecular epidemiology

流行性感冒简称流感,主要是由甲型和乙型流感病毒(Influenza viruses)引起的急性呼吸道传染病,能引起心肌炎、肺炎、支气管炎等多种并发症。由于流感病毒具有高度传染性,极易发生流行,甚至是世界范围的大流行,并呈季节性流行趋势。1918—1919 年在欧洲暴发的“西班牙流感”是历史上最严重的一次流感大暴发,导致至少 2 000 万人死亡,是第一次世界大战所导致的死亡人数的 2 倍以上。1957 年和 1968 年起源于亚洲的全球流感疫情分别导致约 400 万和 200 万人死亡。在世界范围内,每年季节性流感会造成约 300 万~500 万的感染病例和约 25 万~50 万的死亡病例^[1-4]。在 2009 年新甲型 H1N1 流感全球暴发期间,为了延缓疫情扩散,保障人民身体健康,珠海检验检疫局按照国家“外堵输入”的甲型流感的防控工作要求,在我国第二大陆路口岸—拱北口岸及九洲、横琴和高栏港等珠海市 7 个口岸全力以赴开展流感疑似病例的监测工作。

流感病毒以其抗原变异频繁且幅度大而著称,因此流感病毒的实验室检测和分子分型尤为重要,它能为流感防治提供分子生物学的证据。珠海检验检疫局卫生检疫实验室以珠海口岸 2009—2010 年入境的发热旅客为研究对象,针对流感病毒开展了比较全面的分子流行病学研究,现将结果报告如下:

1 对象与方法

1.1 对象 2009 年 5 月—2010 年 4 月全球甲型 H1N1 流感疫情大流行期间,珠海检验检疫局自 2009 年 5 月 1 日起在珠海市 4 个陆路口岸(拱北、横琴、珠海跨境工业园和斗门)和 3 个水路口岸(九洲、湾仔和高栏港)全面启动新甲型 H1N1 流感病毒监测工作,采集经上述 7 个口岸入境的流感疑似病例咽拭子样本,将体温 $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ 的发热旅客样本列为本次分子流行病学调查的研究对象。

1.2 主要试剂 咽拭子病毒采样管(含 3 ml 病毒保护液)购自友康基业生物科技(北京)有限公司;咽拭子样本的核酸提取采用北京天恩泽基因科技有限公司的一管式病毒 RNAout 试剂盒;RT-PCR 试剂为宝生物工程(大连)有限公司的 PrimeScript one step RT-PCR Kit (Ver.2);引物均由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.3 主要仪器 RT-PCR 实验在美国 RioRad 公司 C1000 型 PCR 热循环仪上进行;RT-PCR 产物的成像

分析由法国 VILBER LOURMAT 公司的 BIO-PRINT 凝胶成像系统完成。

1.4 流感病毒基因检测及分型 咽拭子样本采样后低温运输,并在 6 h 内进行处理。首先充分震荡将病毒颗粒从拭子纤维上震脱到溶液中,短暂离心后转移并分装样本到 2 ml 冻存管于 -70°C 超低温冰箱保存,同时留取 200 μl 用于病毒核酸提取,具体步骤按试剂盒说明书进行。流感病毒基因检测首先采用本实验室建立的一步法三重 RT-PCR 技术同时筛查甲型、乙型和新甲型 H1N1 流感病毒基因^[5],然后针对甲型流感病毒阳性的样本用两组三重 RT-PCR 实验分别进行 HA 基因(H1 与 H3)和 NA 基因(N1 与 N2)的分型检测,分型引物序列见表 1。

表 1 甲型流感病毒分型引物

组号	引物名称	序列(5'-3')	大小(bp)
组 1	HuHAH1-FP	ACTACTGGACTCTGCTKGAAC	327
	HuHAH1-RP	CAATGAAACCGCAATGGCTCC	
	HuHAH3-FP	AAACGGAACGCTAGTGAAAACAATC	225
	HuHAH3-RP	TCCGGCAGATCATAAGGGTAACAGT	
组 2	HuNAN1-FP	ACTACGAGGAATGCTCCTGTTATC	271
	HuNAN1-RP	GTGCTTTTGTCTCCCTATCCAA	
	HuNAN2-FP	TTGGGTGACGAGAGAACCTTAT	160
	HuNAN2-RP	AAATGGAACACCCAATCATT	

1.5 新甲型 H1N1 流感病毒 HA、NA 基因测序 分别从拱北、九洲和横琴 3 个较大口岸的输入性新甲型 H1N1 流感病例中选择 8 株病毒样本进行 HA 和 NA 基因的全长核酸测序分析,其中包括珠海市第一例输入性新甲型 H1N1 流感病例,另 7 株随机选择。自主设计 HA 和 NA 基因的全长扩增引物并建立 RT-PCR 实验方法。HA 基因的上游引物是:5'-AT-GAAGGCAACTAGTAGTTC-3',下游引物是:5'-TTAAATACATATTCTACACTGTAG-3',扩增片段长度为 1 701 bp;NA 基因的上游引物是:5'-AT-GAATCCAAACCAAAAAGATAATAAC-3',下游引物是:5'-TTACTTGTCAATGGTAAATGGCA-3',扩增片段长度为 1 410 bp。RT-PCR 扩增的产物送上海英潍捷基生物技术有限公司进行 PCR 产物直接测序或克隆测序。采用分子生物学软件 DNAMAN6.0 和

CLUSTAL X(2.0)对测序结果和相应的氨基酸序列进行同源比对分析。

1.6 统计学分析 将所有数据输入到 Microsoft Excel 电子表格中进行整理,同时采用 SPSS17.0 软件进行 χ^2 检验等统计学分析并获得概率 P 值。如果 $P > 0.05$, 结论为差异无统计学意义; 如果 $P \leq 0.05$, 结论为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流行病学特征

2.1.1 流感检出率 在 2009 年 5 月至 2010 年 4 月疫情监测期间, 7 个口岸送检的体温 $\geq 37.5^\circ\text{C}$ 的入境发热病例样本 976 例, 其中拱北口岸送检病例 820 例,

占 84.02%, 其次是九洲和横琴口岸, 分别占 9.02% 和 5.32%。本研究将该部分输入性病例样本列为珠海口岸入境发热旅客流感病毒分子流行病学调查的研究对象。经三重 RT-PCR 方法同时筛检甲型流感 (包括新甲型 H1N1)、乙型流感病毒^[9], 共检出流感阳性病例 331 例, 检出率为 33.91%, 其中甲型流感 321 例, 乙型流感 10 例 (表 2)。此外, 在甲型流感中检出 92 例新甲型 H1N1 流感病例。在 92 例新甲型 H1N1 流感输入病例的国籍分布中, 中国大陆居民占绝大多数, 为 65 例, 而澳门、香港和台湾的居民分别是 15 例、5 例和 1 例, 另外泰国 2 例, 澳大利亚、越南、加拿大和德国各 1 例。

2.1.2 性别分布 在 976 例发热病例中男性 675 例,

表 2 珠海口岸发热旅客流感阳性病例检测结果

口岸	病例数 (例)	构成比 (%)	体温 范围 ($^\circ\text{C}$)	甲型流感						乙型流感		合计	
				新甲型 H1N1 流感		季节性甲型流感		合计		检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)
				检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)				
拱北	820	84.02	37.5~42.0	79	9.63	202	24.63	281	34.27	9	1.10	290	35.37
九洲	88	9.02	37.5~39.9	9	10.23	14	15.91	23	26.14	0	0	23	26.14
横琴	52	5.32	37.5~39.8	3	5.77	11	21.15	14	26.92	1	1.92	15	28.85
其它	16	1.64	27.6~39.0	1	6.25	2	12.50	3	18.75	0	0	3	18.75
合计	976	100.00	37.5~42.0	92	9.43	229	23.46	321	32.89	10	1.02	331	33.91

注: 其它口岸: 包括湾仔, 珠澳跨境工业园, 斗门和高栏港

女性 301 例。流感阳性病例检出率男性为 32.99%, 女性为 36.21%, 其中新甲型 H1N1 流感检出率男性为 9.33%, 女性为 9.63% (表 3)。对男女不同性别流

感和甲型流感阳性检出率进行比较, P 值分别为 0.311 和 0.882, 可认为男性和女性的流感阳性检出率和新甲型 H1N1 流感检出率差异无统计学意义。

表 3 流感病毒感染者的性别分布

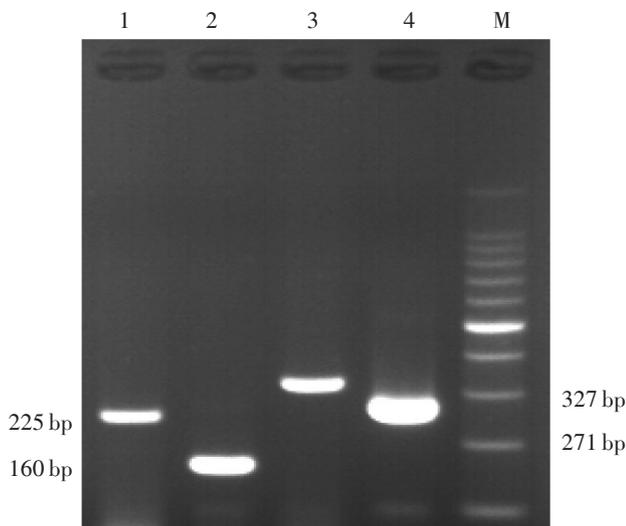
性别	病例数 (例)	甲型流感						乙型流感		合计	
		新甲型 H1N1 流感		季节性甲型流感		合计		检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)
		检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)				
男	675	63	9.33	152	22.52	215	31.85	7	1.04	222	32.89
女	301	29	9.63	77	25.58	106	35.22	3	1.00	109	36.21
合计	976	92	9.43	229	23.46	321	32.89	10	1.02	331	33.91

2.1.3 年龄分布 将受检样本按年龄分成 6 个年龄组, 分别为 ≤ 10 岁, 11~, 21~, 31~, 41~, ≥ 51 岁年龄组, 各年龄段流感检出率和新甲型 H1N1 流感检出率见表 4。经统计学分析, 各年龄段流感检出率差异无统计学意义 ($\chi^2=2.569, P=0.766$), 其中各组新甲型 H1N1 流感检出率差异有统计学意义, ($\chi^2=25.449, P=0.000$)。

2.2 甲型流感分子分型结果 经多重 RT-PCR 分型检测, 321 例甲型流感病例全部分出型别, 分别是: 新甲型 H1N1 流感 92 例, 占 28.66%; 人季节性 H1N1 流感 65 例, 占 20.25%; 人季节性 H3N2 流感 164 例, 占 51.09%。典型 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 分型数据见表 5。

表 4 流感病毒感染者不同年龄段检出结果

年龄组 (岁)	病例数 (例)	甲型流感						乙型流感		合计	
		新甲型 H1N1 流感		季节性甲型流感		合计		检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)
		检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)				
≤10	96	11	11.46	18	18.75	29	30.21	0	0	29	30.21
11~	133	21	15.79	26	19.55	47	35.34	2	1.50	49	36.84
21~	305	40	13.11	64	20.98	104	34.10	3	0.98	107	35.08
31~	200	9	4.50	54	27.00	63	31.50	1	0.50	64	32.00
41~	140	9	6.43	40	28.57	49	35.00	2	1.43	51	36.43
≥51	102	2	1.96	27	26.47	29	28.43	2	1.96	31	30.39
合计	976	92	9.43	229	23.46	321	32.89	10	1.02	331	33.91



注:泳道 1 为 H3 基因;泳道 2 为 N2 基因;泳道 3 为 H1 基因;
泳道 4 为 N1 基因;泳道 5 为 100 bp DNA Marker

图 1 甲型流感病毒分型多重 RT-PCR 产物凝胶电泳图

表 5 甲型流感病毒感染者分型结果

口岸	新甲型 (H1N1)		人季节性 (H1N1)		人季节性 (H3N2)		合计	
	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)	检出数 (例)	检出率 (%)
拱北	79	28.11	58	20.64	144	51.25	281	100.00
九洲	9	39.13	2	8.70	12	52.17	23	100.00
横琴	3	21.43	4	28.57	7	50.00	14	100.00
其他	1	33.33	1	33.34	1	33.33	3	100.00
合计	92	28.66	65	20.25	164	51.09	321	100.00

注:其他口岸:包括湾仔,珠澳跨境工业园,斗门和高栏港。

2.3 新甲型 H1N1 流感病毒 HA、NA 基因序列分析
8 株新甲型 H1N1 流感病毒的测序结果与美国疾病预防控制中心(美国 CDC)于 2009 年 4 月 27 日上载到 GenBank 的典型甲流病毒毒株 A/California/04/2009 (H1N1)的 HA (FJ966082)和 NA (FJ966084)基因序列进行同源对比分析。整体比对结果显示,HA 和 NA 的同源性分别达到 99.86%和 99.89%。在两两比对中,珠海市第 1 例输入性新甲型 H1N1 病例 (ZHJ9001)的 HA 基因与 FJ966082 的同源性为 99.47%,只有 9 个位点存在变异,对应的氨基酸序列有 5 个位点变异(分别是:P86S、T200A、S206T、H299R 和 I324V),均未涉及到 HA 受体结合的关键氨基酸位点和糖基化位点^[6];NA 基因与 FJ966084 的同源性为 99.65%,只有 5 个位点存在变异,对应的氨基酸序列有 3 个位点变异(分别是:V105I、N247D 和 I316M),但均未涉及到 NA 蛋白中发挥神经氨酸酶活性所必需的 15 个保守的极性氨基酸位点^[6,7],也未见耐药位点 H274Y 变异的发生。

3 讨论

流感病毒是正粘病毒科(Orthomyxoviridae)分节段单股负链 RNA 病毒,根据其核蛋白(nucleoprotein, NP)和基质蛋白(matrix protein, MP)抗原性不同,流感病毒主要分为甲、乙、丙三型,其中甲型流感病毒可以感染人类、禽类和其他一些哺乳动物,如猪、马等,而乙型和丙型流感病毒目前的证据显示主要是感染人类。由于甲型流感病毒抗原性易通过基因重配和突变发生变异,根据其包膜表面血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)抗

原性的不同,又分为 16 种 HA 亚型(H1~H16)和 9 种 NA 亚型(N1~N9),至今人间流行的主要有 H1、H2、H3 和 N1、N2 几种抗原构成的亚型,如 H3N2 和 H1N1 是目前人季节性流感中共同流行的两个优势基因亚型组合。由于人群缺少对新变异病毒株的免疫力,因此甲型流感的变异往往引起新的世界性大流行^[1,3,8]。

2009 年 4 月在墨西哥暴发并导致全球广泛传播和上万人死亡的流感病毒是新变异的 H1N1 亚型毒株,将其命名为新甲型 H1N1 流感病毒,也可称为 2009 Influenza A (H1N1) 流感病毒,它是猪流感、人流感和禽流感病毒通过基因片段重组后产生的一种新的混合型病毒株。在新甲型 H1N1 流感暴发流行期间,即 2009 年 5 月至 2010 年 4 月共 1 年时间,本研究从 976 例珠海口岸入境发热旅客中检出 321 例甲型流感病例,分子分型结果显示, H3N2 和 H1N1 (含新甲型 H1N1) 这两种亚型几乎各占一半,构成比分别为 51.09% 和 48.91% (新甲型 H1N1 占 28.66%)。该数据表明,即使在新甲型 H1N1 流感全球大流行期间,人季节性 H3N2 和 H1N1 仍呈常态流行,并未象有关媒体所报道的在流行期间几乎 90% 以上的病例是新甲型 H1N1。从性别分布看,男女发病率无论甲型流感还是新甲型 H1N1 流感差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。曹宁家等^[9]对陕西省 1 493 例新甲型 H1N1 流感患者的性别分布进行回顾分析,结果也显示男女发病率差异无统计学意义。从年龄分布看,本研究 30 岁以下年龄组新甲型 H1N1 流感的检出率明显高于 30 岁以上年龄组 ($P < 0.01$)。李灵辉等^[10]分析了甲型流感第一波流行期间广东省 4 319 人新甲型 H1N1 阳性率的年龄变化趋势,同样显示 30 岁以上的各年龄组阳性率呈明显下降趋势。Greenbaum JA 等^[11]的研究表明成年人群对此次流行的甲型 H1N1 流感病毒具有一定的免疫力,可能这是 30 岁以上年龄组发病率较低的一个重要原因。

本研究随机选择的 8 株输入性新甲型 H1N1 流感病毒株其 HA 和 NA 基因与典型甲流病毒毒株 A/California/04/2009(H1N1) 的基因序列同源性分别高达 99.86% 和 99.89%, 可以认为这 8 例珠海口岸输入性的甲型流感病例与墨西哥、美国典型毒株亲缘关系很近,来源于同一个祖先。氨基酸序列分析结果显示,珠海市第 1 例输入性新甲型 H1N1 病毒株的 HA 和 NA 蛋白与典型株比对分别仅有 5 个和 3 个变异位点,这些位点均未涉及到 HA 的受体结合位点、糖基

化位点或 NA 的神经氨酸酶活性位点和神经氨酸酶抑制剂类药物的耐药位点^[6,7],推测珠海市的输入性甲流病例仍保持与典型流行株病毒相同或相似的抗原性、受体结合特性、致病性、药物敏感性及其他生物学特性。

综上所述,本研究基本阐明了在 2009 年新甲型 H1N1 流感世界大流行期间珠海口岸入境发热旅客流感病毒的分子流行病学特征。研究结果对于指导国境口岸流感病毒的防控具有重要意义。

参考文献

- [1] Cox NJ, Subbarao K. Influenza [J]. Lancet, 1999, 354(9186): 1277-1282.
- [2] Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA, et al. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1416): 1829-1839.
- [3] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza [J]. Lancet, 2003, 362(9397): 1733-1745.
- [4] Gensheimer KF, Meltzer MI, Postema AS, et al. Influenza pandemic preparedness [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(12): 1645-1648.
- [5] 莫秋华, 杨翠兰, 林继灿, 等. 一步法多重 RT-PCR 快速筛查 A 型、B 型和新甲型 H1N1 流感病毒 [J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(8): 1545-1547.
- [6] 祁贤, 汤奋扬, 李亮, 等. 新甲型 H1N1 (2009) 流感病毒的早期分子特征 [J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 81-90.
- [7] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase [J]. Nature, 1983, 303(5912): 41244.
- [8] Stephenson I, Zambon M. The epidemiology of influenza [J]. Occup Med (Lond), 2002, 52 (5): 241-247.
- [9] 曹宁家, 张鸿, 袁婕, 等. 甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性患者 1 493 例临床特征分析 [J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(10): 1368-1369.
- [10] 李灵辉, 张欣, 钟豪杰, 等. 广东省 2009 年甲型 H1N1 流感大流行第一波人群感染状况分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(12): 1329-1331.
- [11] Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y, et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(48): 20365-20370.

收稿日期: 2012-05-28