

安徽省 2 株人感染 H9N2 流感病毒基因特征

何军 刘丽萍 侯赛 龚磊 吴家兵 胡万富 王建军

230601 合肥, 安徽医科大学公共卫生学院(何军、王建军); 安徽省疾病预防控制中心微生物检验科(何军、刘丽萍、胡万富), 急性传染病防治科(侯赛、龚磊、吴家兵)

通信作者: 王建军, Email: wjj@ahcdc.com.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.05.025

【摘要】 目的 分析 2015 年安徽省 2 株人感染 H9N2 禽流感病毒分离株全基因组特征。**方法** 对安徽省 2015 年 4 月和 9 月流感监测网络实验室先后发现并确诊的 2 例 H9N2 禽流感病毒感染病例及其病毒分离株全基因组序列进行分析, 使用 Mega 6.0 等软件解析 2 株 H9N2 毒株全基因组特征。**结果** 安徽省首次报道人感染 H9N2 禽流感病毒病例, 对病毒分离株分析显示, 其 HA 和 NA 基因与中国 2013 年禽间流行的 H9N2 病毒高度同源, 属于 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 支系; 而 PB2 和 MP 基因属于 A/quail/Hong Kong/G1/97 支系, 与 H7N9、H10N8 和 H6N2 具有较高的相似度。氨基酸序列比对发现该 2 株病毒出现多个人易感倾向位点分子特征: HA 蛋白发生 Q226L、H183N 和 E190T 突变, 且 HA 裂解位点为 PSRSSR/GL 排列, NA 蛋白茎部发生 63~65 位氨基酸缺失, M2 蛋白 S31N 突变, 以及 PA-100A、PA-356R 和 PA-409N。**结论** 安徽省首次报道的人感染禽源 H9N2 流感病毒为 H9N2 系间重配病毒, 存在多个人易感位点。

【关键词】 H9N2 流感病毒; 全基因组; 序列比对; 氨基酸位点

基金项目: 安徽省科技合作计划项目(1503062008); 上海市科委计划项目(14495810301)

Genomic characteristics of 2 strains of influenza A (H9N2) virus isolated from human infection cases in Anhui province He Jun, Liu Liping, Hou Sai, Gong Lei, Wu Jiabing, Hu Wanfu, Wang Jianjun School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230601, China (He J, Wang JJ); Department of Microbiology Laboratory (He J, Liu LP, Hu WF), Department of Acute Infectious Diseases (Hou S, Gong L, Wu JB), Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230601, China
Corresponding author: Wang Jianjun, Email: wjj@ahcdc.com.cn

【Abstract】 Objective To understand genomic characteristics of 2 strains of influenza A (H9N2) virus isolated from human infection cases in Anhui province in 2015. **Methods** Two human infection with H9N2 virus were confirmed by national influenza surveillance laboratory network in Anhui through viral isolation in April and September, 2015, respectively. The full genomic sequences of the two viral isolates were analyzed in this study by using molecular bioinformatics software Mega 6.0. **Results** Human infection with H9N2 virus was first reported in Anhui province. The analysis of genomic sequence showed that the HA and NA genes of the two H9N2 isolates belonged to A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)-like lineage, and shared high identity with H9N2 virus circulating in poultry in 2013. The PB2 and MP genes belonged to the A/quail/Hong Kong/G1/97-like lineage, and shared high homology with H7N9, H10N8 or H6N2 viruses. The amino acid sequence alignment results showed that several mutations for human infection tropism presented in the two virus strains, including Q226L, H183N and E190T in HA; S31N in M2; 63-65 deletion in NA. In addition, the H9N2 influenza virus strains possessed the PSRSSR/GL motif in HA. Meanwhile several human-like signatures, including PA-100A, PA-356R and PA-409N were also found in the two virus strains. **Conclusion** The H9N2 viruses isolated from human infection cases in Anhui province belonged to a reassortant virus originated from different lineage H9N2 avian influenza virus. The virus has possessed several human susceptibility locus.

【Key words】 H9N2 influenza virus; Genome; Sequence alignment; Amino acid position

Fund programs: Scientific and Technological Cooperation Projects of Anhui Province (1503062008); Shanghai Municipal Commission of Science and Technology Program (14495810301)

H9N2 流感病毒长期在家禽和野鸟中循环流
行^[1-2]。根据流行病学和遗传学研究可将 H9N2 病毒

血凝素基因(HA)分为欧亚系和美洲系, 欧亚系又包
括 3 个分支: A/chicken/Beijing/1/94(BJ/94)、A/quail/

Hong Kong/G1/97 (G1) 和 A/duck/Hong Kong/Y439/97 (Y439), BJ/94 和 G1 类似株病毒自 1990 年后成为我国禽间主要流行株^[3]。1998 年, 人类首次从猪中分离到 H9N2 病毒^[4], 1 年后首例人感染 H9N2 病例在香港地区出现^[5]。近年来, 禽间分离到 HA-226L 突变的 H9N2 病毒逐渐增多, 该突变使其更易于感染表达 SA- α -2, 6 Gal 受体的呼吸道上皮细胞, 增加人类感染的可能性^[6], 同时 HA 蛋白裂解位点、NA 蛋白茎部有无缺失以及 PA 蛋白的 100、356 和 409 位点氨基酸残基特征亦与人易感倾向相关。由于该亚型病毒引起的临床症状较轻, 极易被忽视, 故人感染病例鲜有报道。安徽省于 2015 年 4 月和 9 月先后发现 2 例儿童感染 H9N2 流感病例, 症状较轻均已治愈; 安徽省流感参比中心用实时荧光定量 RT-PCR 同时检测 A 型通用、H1pdm (2009)、H3、H5、H7、H9、N1、N2 亚型, H9 和 N2 检测呈阳性; 经中国 CDC 病毒病预防控制所国家流感中心确诊后进行病毒分离培养, 获得 A/Anhui/33329/2015 (H9N2) (AH/33329) 和 A/Anhui/43269/2015 (H9N2) (AH/43269) 2 株毒株。本研究重点描述 2 株 H9N2 病毒全基因组分子进化特征, 聚焦其重要氨基酸位点突变情况, 为进一步研究该病毒提供理论依据。

材料与方法

1. 材料: 合肥市 H9N2 咽拭子样本来自于人感染 H7N9 流感疫情处置过程中密切接触者 (密接) 病例; 滁州市咽拭子样本来自于流感样监测病例, 2 例标本均按生物安全要求冷链运输至安徽省流感参比中心。

2. 序列来源及参比序列: 2 株 H9N2 毒株全基因组序列信息从国家流感中心序列数据库中获取; 参比序列: A/Lengshuitan/11197/2013 (H9N2) (L11197)、A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2) (SH/98)、BJ/94、G1、Y439、A/Jiangxi/1/2013 (H10N8) (JX1)、A/Shanghai/1/2013 (H7N9) (SH1)、A/Shanghai/2/2013

(H7N9) (SH2)、A/Anhui/1/2013 (H7N9) (AH1)。以上毒株 8 个基因片段的 GenBank 或 GISAID 号分别为 KM455869 ~ KM455876; AY253750 ~ AY253756、AY743216; AF156380、AF156480、AF156466、AF156452、AF156438、AF156423、AF156409、AF156398; AF156477、AF156378、AF156463、AF156449、AF156435、AF156421、AF156407、AF156396; AF156476、AF156377、AF156462、AF156448、AF156434、AF156420、AF156406、AF156395; KM392408 ~ KM392415; EPI439486 ~ EPI439494; EPI439495 ~ EPI439502; EPI439503 ~ EPI439510。

3. 基因序列分析: 所有序列使用 BioEdit 软件修齐, 并用 Mega 6.0 软件, 采用邻接 (NJ) 法构建系统进化树 (Bootstrap=1 000)。

4. 氨基酸序列分析: 使用 DNAMAN 软件分析基因序列, 寻找可用开放阅读框 (ORF) 并推导出氨基酸序列, 导入 BioEdit 软件进行变异位点分析。

结 果

1. 流行病学特征: 合肥市病例张某某, 女, 4 岁, 托幼儿童; 2015 年 4 月 14 日发病, 主要症状为发热 (最高 39.5 °C)、咳嗽; 4 月 16 日治愈, 病程 3 d; 为人感染 H7N9 流感患者密接追踪时发现, 4 月 15 日检测为 H9 阳性; 经流行病学调查, 患儿发病前无活禽接触史, 但有活禽市场暴露史。滁州市病例陶某某, 男, 6 岁, 学生; 2015 年 9 月 6 日发病, 以发热症状为主 (最高 38.7 °C); 9 月 7 日治愈, 病程 2 d, 为常规流感监测时发现; 9 月 8 日检测为甲型流感病毒通用核酸性阳性, 9 月 16 日经安徽省 CDC 实验室复核, 结果为 H9N2 阳性; 经流行病学调查, 患儿无活禽及活禽市场暴露史。

2. 各基因片段相似性分析: 安徽省 2 株人感染 H9N2 流感毒株 8 个基因片段经 NCBI 网站 BLAST 功能查找同源性最高序列及相似性见表 1, 其 HA 基

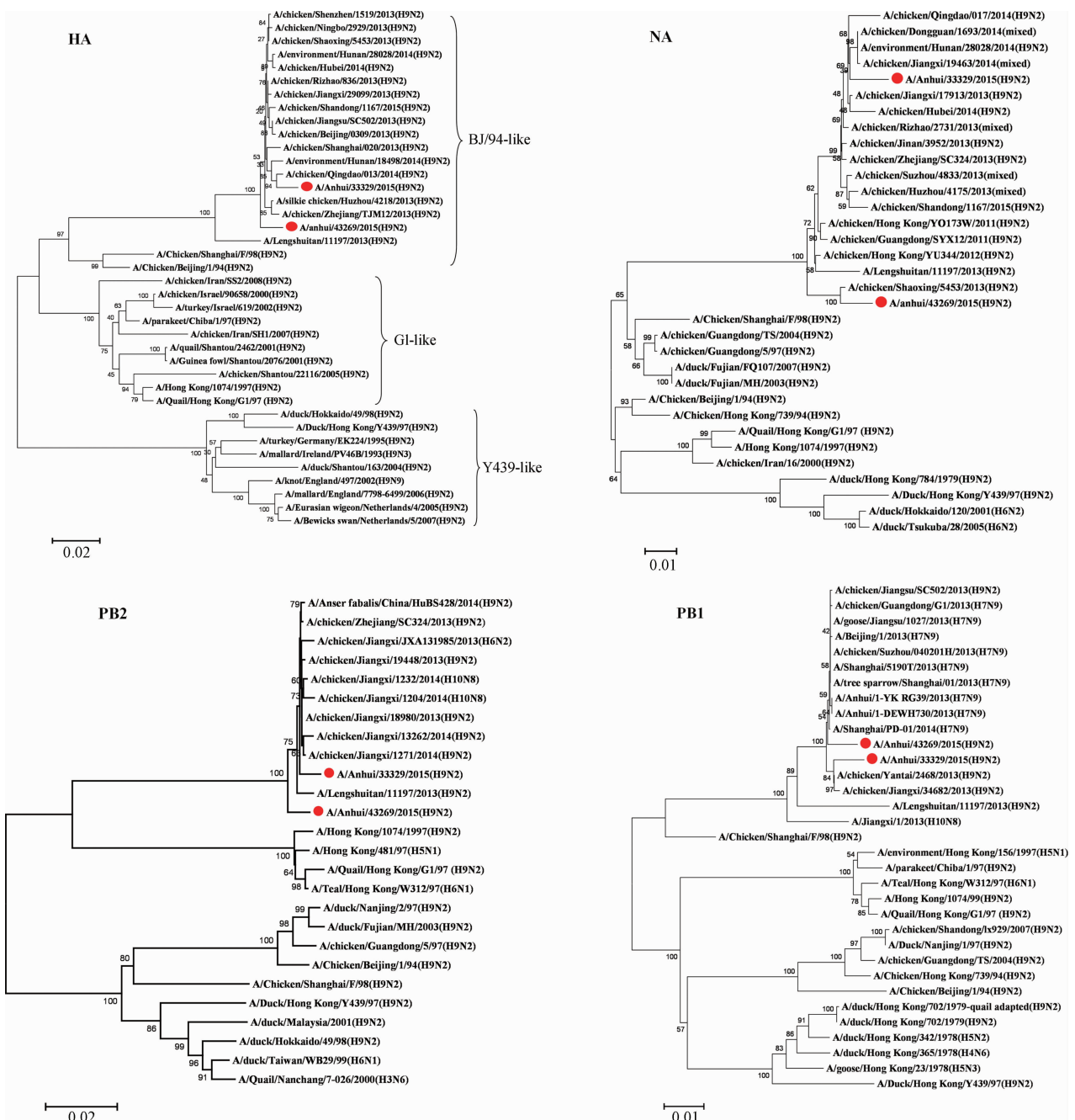
表 1 安徽省 2 株人感染 H9N2 流感病毒同源性

基因名称	A/Anhui/33329/2015(H9N2)		A/Anhui/43269/2015(H9N2)	
	最高同源序列	相似度 (%)	最高同源序列	相似度 (%)
PB2	A/chicken/Jiangxi/18980/2013(H9N2)	99	A/chicken/Jiangxi/18980/2013(H9N2)	99
PB1	A/chicken/Yantai/2468/2013(H9N2)	99	A/goose/Jiangsu/1027/2013(H7N9)	99
PA	A/Shanghai/02/2013(H7N9)	99	A/chicken/Shanghai/015/2014(H9N2)	99
HA	A/chicken/Qingdao/013/2014(H9N2)	99	A/environment/Hunan/28028/2014(H9N2)	99
NP	A/chicken/Qingdao/009/2014(H9N2)	99	A/chicken/Jiangxi/12562/2013(H9N2)	99
NA	A/chicken/Jiangxi/17913/2013(H9N2)	99	A/chicken/Shaoxing/5453/2013(H9N2)	99
M	A/chicken/Shanghai/015/2014(H9N2)	99	A/chicken/Hangzhou/174/2013(H7N9)	99
NS	A/chicken/Qingdao/2044/2013(H9N2)	99	A/duck/Wuxi/0405006/2013(H7N9)	99

因分别与 A/chicken/Qingdao/013/2014 (H9N2) 和 A/environment/Hunan/28028/2014 (H9N2) 同源性最高, 相似度达 99%; NA 基因分别与 A/chicken/Jiangxi/17913/2013 (H9N2) 和 A/chicken/Shaoxing/5453/2013 (H9N2) 毒株的同源性达 99%; AH/33329 的 PA 基因和 AH/43269 的 PB1、M、NS 基因与上海市、江苏省、浙江省的 H7N9 禽流感病毒高度同源, 相似度均为 99%。

3. 各基因片段系统进化分析: 选用 BJ/94、G1 和 Y439 毒株相似序列, 以及 2013 年湖南省人感染 H9N2 毒株 (L11197) 和江西省人感染 H10N8 毒株

(JX1) 的相似序列进行基因进化分析。结果显示, 2 株 H9N2 毒株 PB2 与 MP 基因属于 G1 类似株, 其余 6 个基因属于 SH/98 类似株^[7], MP 与上海市、浙江省、江苏省分离的 H7N9 亲缘关系较近, PB2 基因与江西省分离的 H10N8 和 H6N2 亲缘关系相似; Anhui/43269 的 PB1 基因与 H7N9 毒株亲缘关系较近, PA 基因中该毒株与 H10N6 和 H10N8 更为相似; 2 株 H9N2 分离株在 NP 基因中呈现明显不同的 2 个独立分支, 且 NA 基因中也出现在不同的分支上, 而 HA 和 NS 基因上安徽省 H9N2 分离株高度同源 (图 1)。



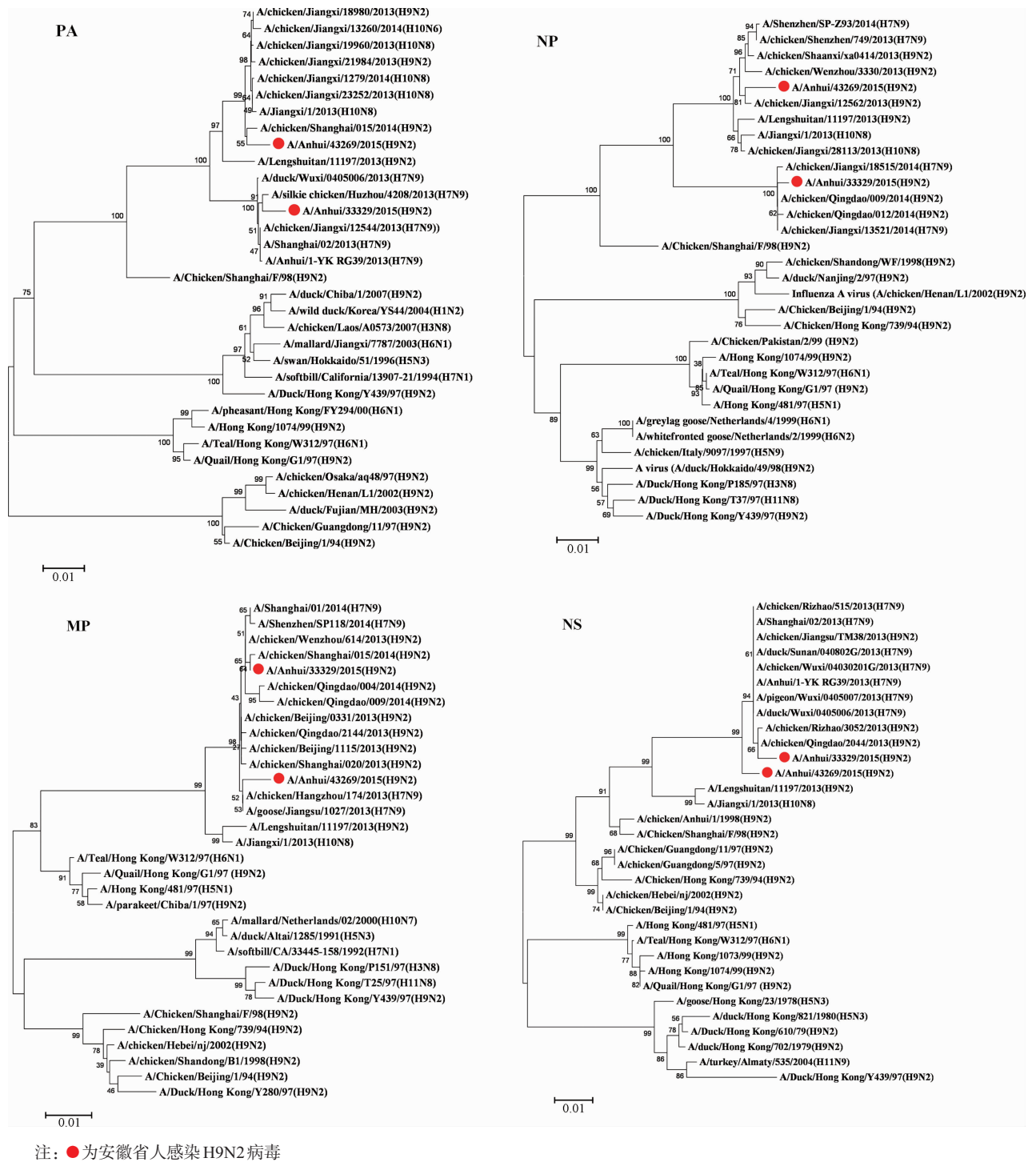


图1 H9N2病毒8个片段进化树

4. 氨基酸位点分析:安徽省2株H9N2毒株HA蛋白受体结合位点均发生Q226L、Q227M、H183N、E190T突变,M2蛋白发生S31N突变,NS1蛋白发生G47S、L77F、V111I、V180I突变和NS2蛋白发生G22R突变,PB1蛋白均有I368V突变,且HA裂解位点均为PSRSSR\GL排列,NA蛋白茎部均发生63~65位氨基酸缺失。AH/43269的HA蛋白发生T189D突变,NA蛋白发生Q93L、V192I、S266R和

V287I突变,PB1蛋白发生N158S突变。AH/33329的NA蛋白发生G111S、K143Q、I254V突变,PB1蛋白发生K197R、T434N、T469I、V591I突变,PA蛋白发生V100A、K356R、S409N和D394N多位点突变(表2)。

讨论

安徽省2株H9N2毒株HA蛋白均发生Q226L、

表 2 安徽省 2 株 H9N2 流感病毒氨基酸位点对比

蛋白名称	位点	人源 H9N2				禽源 H9N2				人源 H10N8		人源 H7N9	
		AH/33329	AH/43269	L11197	SH/98	BJ/94	G1	Y439	JX1	SH1	SH2	AH1	
HA (H3 排序)	138	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	
	183	<i>N</i>	<i>N</i>	N	N	N	H	H	-	-	-	-	
	189	T	<i>D</i>	T	T	T	T	T	-	-	-	-	
	190	<i>T</i>	<i>T</i>	A	A	V	E	E	-	-	-	-	
	198	<i>N</i>	T	T	T	T	N	A	-	-	-	-	
	226	<i>L</i>	<i>L</i>	L	Q	Q	L	Q	-	-	-	-	
	227	<i>M</i>	<i>M</i>	M	Q	Q	Q	Q	-	-	-	-	
	228	G	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	
分裂位点		PSRSSR\GL	PSRSSR\GL	PSRSSR\GL	PARSSR\GL	PARSSR\GL	PARSSR\GL	PARSSR\GL	-	-	-	-	
NA	茎部缺失	YES	YES	YES	YES	NO	NO	NO	-	-	-	-	
	93	Q	<i>L</i>	Q	Q	Q	Q	Q	-	-	-	-	
	111	<i>S</i>	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	
	143	<i>Q</i>	K	K	K	K	K	K	-	-	-	-	
	192	<i>V</i>	<i>I</i>	I	V	V	V	V	-	-	-	-	
	254	<i>V</i>	I	V	I	I	I	I	-	-	-	-	
	266	<i>S</i>	<i>R</i>	S	S	S	S	S	-	-	-	-	
	287	<i>V</i>	<i>I</i>	V	V	V	V	V	-	-	-	-	
PB2	253	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	591	Q	Q	Q	Q	L	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	627	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K	K	
	701	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
PB1	158	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	197	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	
	368	V	V	V	I	I	I	I	V	I	V	V	
	434	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	469	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	591	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	
PA	100	A	V	V	V	V	V	V	V	A	A	A	
	356	R	K	R	K	K	K	K	R	R	R	R	
	394	N	D	D	D	D	H	D	D	N	N	N	
	409	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	
M2	31	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	
NS1	26	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
	47	S	S	S	G	G	G	G	S	S	S	S	
	77	F	F	F	L	L	L	L	F	F	F	F	
	111	I	I	V	V	V	V	V	V	I	I	I	
	180	I	I	V	V	V	V	V	V	I	I	I	
NS2	22	R	R	R	G	G	G	G	R	R	R	R	

注:斜体为突变位点

H183N、E190T 突变, Q226L 突变使 H7N9 获得与人上呼吸道上皮细胞唾液酸 SA α -2,6 Gal 受体结合的分子基础^[8]; H183N、E190T 和 Q226L 位点的突变与呼吸道飞沫传播密切相关^[9]。M2 蛋白发生 S31N 突变, 提示其可能对金刚烷胺类药物不敏感。禽间流行循环的 H9N2 病毒发生重要的分子突变后, 感染人类的能力增强, 且具备潜在的人际间传播能力, 如果这些分子突变占据主要优势, 将会形成潜在的流感大流行风险。

早在 1998 年中国已开始实施禽间疫苗接种计划, 用于预防禽间 H9N2 流行^[10], 而我国首次证实的

5 例人感染 H9N2 病毒也刚好发生在 1998 年^[11], 随后零星报道的 H9N2 病例大部分集中在香港地区和南方省份, 而中部地区仅 2013 年湖南省报道 1 例^[12], 安徽省 2 例人感染禽源 H9N2 病例为本省首次报道。由于该病毒感染后临床症状呈典型的流感样症状, 与其他季节性流感不易区分。因此需进一步提高流感监测网络灵敏度, 尽早发现新亚型流感病毒, 追踪感染源, 阻断新病毒的进一步传播。近些年禽间 H9N2 病毒分离率的逐年增加^[13], 病毒抗原性和宿主特异性的不断变化, 以及人群的偶发感染等均与该病毒基因进化相关, 因此对 H9N2 病毒的分子

特征研究尤为重要。

安徽省2例病例由于发现时已痊愈,基因组进化分析显示感染病毒的外部基因与当前禽间流行的H9N2病毒高度同源,且部分内部基因与已感染人类的H10N8和H7N9流感病毒相似度较高,同源性较高的毒株均来自活禽交易频繁的江苏、浙江、江西等地。此外,基因进化分析显示, PB2和M基因源自G1类似株,而香港人感染H5N1内部基因也来自于G1系^[14],且PA基因含有人流感病毒分子特征。因此,本研究报道的2株人感染H9N2流感病毒,在适宜的条件下极有可能形成新病原,对人类健康造成威胁。

志谢 感谢中国CDC病毒病预防控制所国家流感中心工作人员的大力支持以及合肥市、滁州市同仁的密切配合

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 74 (1/2): 3-13. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00160-7.

[2] Perk S, Panshin A, Shihmanter E, et al. Ecology and molecular epidemiology of H9N2 avian influenza viruses isolated in Israel during 2000-2004 epizootic[J]. *Dev Biol*, 2006, 124: 201-209.

[3] Sun YP, Pu J, Jiang ZL, et al. Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 146 (3/4): 215-225. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.010.

[4] Peiris JSM, Guan Y, Markwell D, et al. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "Human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? [J]. *J Virol*, 2001, 75 (20): 9679-9686. DOI: 10.1128/JVI.75.20.9679-9686.2001.

[5] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2[J]. *Lancet*, 1999, 354 (9182): 916-917. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)03311-5.

[6] Wan HQ, Perez DR. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells [J]. *J Virol*, 2007, 81 (10):

5181-5191. DOI: 10.1128/JVI.02827-06.

[7] Gu M, Chen HZ, Li QH, et al. Enzootic genotype S of H9N2 avian influenza viruses donates internal genes to emerging zoonotic influenza viruses in China[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 174 (3/4): 309-315. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.09.029.

[8] Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity[J]. *Virology*, 2001, 281 (2): 156-162. DOI: 10.1006/viro.2000.0799.

[9] Sorrell EM, Wan HQ, Araya Y, et al. Minimal molecular constraints for respiratory droplet transmission of an avian-human H9N2 influenza A virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(18): 7565-7570. DOI: 10.1073/pnas.0900877106.

[10] Zhang PH, Tang YH, Liu XW, et al. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998-2002)[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (12): 3102-3112. DOI: 10.1099/vir.0.2008/005652-0.

[11] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽H9N2亚型流感病毒能感染人的发现[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13 (2): 105-108. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.1999.02.001.

[12] Guo YJ, Li JG, Cheng XW, et al. Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 1999, 13 (2): 105-108. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.1999.02.001.

[12] Huang YW, Li XD, Zhang H, et al. Human infection with an avian influenza A (H9N2) virus in the middle region of China [J]. *J Med Virol*, 2015, 87 (10): 1641-1648. DOI: 10.1002/jmv.24231.

[13] Pu J, Wang SG, Yin YB, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(2): 548-553. DOI: 10.1073/pnas.1422456112.

[14] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (16): 9363-9367. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9363.

(收稿日期:2015-12-15)

(本文编辑:万玉立)