

只/人工·h), 致倦库蚊为优势蚊种, 有关学者曾对宁德口岸三都澳港区和白马港区蚊类进行调查, 亦提示以库蚊为优势种属。本次监测只捕获伊蚊幼虫, 可能与监测方法有关, 白纹伊蚊系日间活动, 高峰主要在中午, 早晚难以捕到。

本次监测未捕获蠓, 可能与监测方法有关, 库蠓以吸动物血为主, 野外草丛中也难捕到。且吸血蠓种活动, 库蠓属以清晨和傍晚为主, 蠓属以白天为主, 此次调查尚不能说明当地不存在蠓科动物。

参考文献

[1] 孙俊. PCO 在疾病预防控制中的作用[J]. 中国媒介生物及控制杂志, 2004, 8(15): 328-329.

[2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1240(1292、1339、1293、1311、1300、1191、1294)-2003. 国境口岸鼠类(蚤、螨、蜱、蝇、蚊、蜚蠊、蠓类)监测规程[S].

[3] 金达莱, 王进喜, 王光辉. 宁德口岸白马港鼠类及其寄生虫调查报告[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2000, 23(3): 154-156.

收稿日期: 2010-10-21; 修回日期: 2010-12-29 责任编辑: 黄春燕

• 流行病学调查研究 •

# 福州市 2010 年甲型 H1N1 流感病毒分离株血凝素基因分子进化分析

纪惠玲<sup>1</sup>, 季钧洵<sup>2</sup>, 夏晓峰<sup>1</sup>, 陈艳<sup>1</sup>, 陈智伟<sup>1</sup>, 张彩云<sup>1</sup>, 姚栩<sup>1</sup>

1. 福州市疾病预防控制中心 福建 350004; 2. 厦门大学医学院, 福建 361005

**摘要:** 目的 了解福州市 2010 年甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因的突变和分子进化。方法 采用 RT-PCR 技术扩增流感病毒 A/Fuzhou/2/2010(H1N1) 血凝素 HA 基因, 测定核苷酸序列, 用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对, 用 Bioedit 软件的 ClustaW 程序进行序列同源性分析, 用 Mega 5.0 软件以邻位相连算法(NJ) 构建系统进化树。结果 福州市 2010 年甲型 H1N1 流感分离株 A/Fuzhou/2/2010(H1N1) 与福州市 2009 年首例甲型 H1N1 流感病毒株 HA 基因同源性为 98.9%, 与疫苗参考株 A/California/07/2009 HA 基因同源性为 98.5%; HA1 区段有 11 个位点发生改变。结论 福州市 2010 年甲型 H1N1 流感病毒血凝素虽然个别氨基酸位点发生了突变, 但在抗原决定簇位点的氨基酸并没有发生变化, 未出现具有显著意义的抗原漂移。

**关键词:** 甲型 H1N1 流感病毒; 血凝素基因; 同源性; 福州市

中图分类号: R 373.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-2705(2011)03-0024-03

引起 2009 年流感大流行的是一种新型甲型 H1N1 流感病毒, 它包含有猪流感、禽流感和人流感 3 种基因片段。甲型流感病毒表面的血凝素蛋白(HA) 是流感病毒的重要抗原, 其氨基酸序列的改变可导致抗原变异; HA 也是流感疫苗的主要组成部分。甲型流感病毒 HA 与宿主细胞表面受体的结合是感染发生的关键一步。因此加强新型甲型 H1N1 流感病毒监测, 及时发现具有流行病学意义的变异株很有必要。

我市流感监测网络实验室 2009—2011 年流感监测哨点医院甲型 H1N1 核酸阳性标本检出时间分布显示: 2009 年 5 月发现首例输入性甲型 H1N1 病例, 至 2010 年 1 月间甲型 H1N1 流行强度较高; 2010 年 2~4 月强度明显减弱, 5~7 月未监测到阳性病例, 8~11 月又出现散发病例, 12 月底起流行又显著变强。为了解我市 2010 年底再次发生甲型 H1N1 流感流行的毒株 HA 基因变异特点, 本文选择 2010 年 12 月底病例分离株 A/Fuzhou/2/2010(H1N1) 进行 HA 基因测序, 结果报告如下:

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 分离株来自福州市流感监测网络实验室 2010 年底从哨点医院采集的咽拭子标本, 经 Real time PCR 检测甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性, 采用狗肾传代细胞培养分离病毒, 经国家流感中心鉴定确认。

**1.2 RNA 提取** 使用德国 QIAGEN 公司的 QIAamp Virus RNA Mini Kit Handbook 所提供的方法提取病毒核酸。

**1.3 RT-PCR** HA 两对引物由 Invitrogen 公司合成。反应体系(25 μL): 5× buffer 5 μL, dNTP(25 mM) 1 μL, Rnase inhibitor 0.1 μL, Enzyme Mix 1 μL, 上下游引物各 0.5 μL, RNase Free Water 12 μL, RNA 模板 5 μL。反应条件: 60 °C 1 min; 42 °C 10 min; 50 °C 40 min; 95 °C 15 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 次循环; 72 °C 10 min。产物置于 -20 °C 保存备用。

**1.4 纯化及序列测定** RT-PCR 产物 50 μL 送 TaKaRa(大连宝生物公司) 纯化和测序。

**1.5 基因序列分析及同源性比对** 从 NCBI GenBank 选择 12 条序列, 使用 Clustal X 1.8.3 进行序列比对。用 Mega 5.0 软件以邻位相连法(NJ) 构建进化树。标准参照毒株为 WHO 提供的疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)。其它用于参比的代表株有: GQ288372(A/Fuzhou/01/2009(H1N1)), FJ969540(A/California/07/2009(H1N1)), CY063803(A/Singapore/ON2193/2009(H1N1)), CY083942(A/San Diego/INS194/2009(H1N1)), CY062867(A/Athens/INS160/2009(H1N1)), CY063099(A/California/VRDL91/2009(H1N1)), CY081580(A/Beijing/3872/2010(H1N1)), HQ712173(A/Karaj/5327/2010(H1N1)), HQ891281(A/Vladivostok/7/2010(H1N1)), JF500442(A/Tehran/5963/2010(H1N1)), JF500448(A/Karaj/6072/2010(H1N1)), CY081591(A/Bei

第一作者简介: 纪惠玲, 副主任技师。专业: 微生物检验。

jing/3907/2010(H1N1))。

## 2 结果

2.1 PCR产物测序结果 RT-PCR的2个产物经电泳凝胶成像结果与设计相符,见图1。克隆产物经测序,用DNAStar中的SeqMan进行拼接,得到长1701bp的完整的血凝素基因(Genbank Accession Number: JF719758)。

2.2 HA基因序列分析 利用HA基因的核苷酸序列推导出其氨基酸序列,与我市首例甲流病毒株 A/Fuzhou/1/2009(H1N1)对比,氨基酸序列在84,143,153,184,190,197位点发生改变。与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)对比,氨基酸序列在83(P>S)、84(S>M)、143(S>G)、153(K>E)、184(S>T)、190(S>R)、197(A>T)、203(S>T)、321(I>V)、374(E>K)、451(S>N)、483(T>N)位点发生改变,但HA抗原决定簇

位点未出现变异,见图2(1~17位为信号肽)。

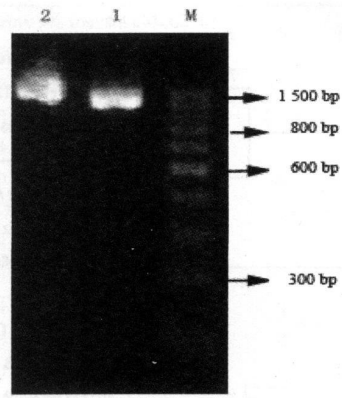


图1 RT-PCR产物电泳凝胶结果

A/California/07/2009(H1N1)	MKAILVLLYTFATANADTLICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNKGLCKLRGVAPLHLGKCHIAWILG	80
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....	80
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....M.....	80
A/California/07/2009(H1N1)	NPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKS	160
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....S.....	160
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....SN.....G	160
A/California/07/2009(H1N1)	FYKNLIWLVKKGNYSYKLSKSYINDKGEVLVLWGIHHPSTADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKPELAIRPKVRDQ	240
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....T.....	240
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....E.....T.....R.....T.....T.....	240
A/California/07/2009(H1N1)	EGRMNYWTLVPEGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAINSTLPPQNIHPITIGKC	320
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....	320
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....	320
A/California/07/2009(H1N1)	PKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAIGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI	400
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....V.....	400
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....V.....K.....	400
A/California/07/2009(H1N1)	EKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDYHDSNVKNLYEKVRSQKKNNAKEIGNG	480
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....	480
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....N.....	480
A/California/07/2009(H1N1)	CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAI SFWMC SNGSL	560
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....	560
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....N.....	560
A/California/07/2009(H1N1)	QCRCICI	566
A/Fuzhou/01/2009(H1N1)	.....	566
A/Fuzhou/02/2010(H1N1)	.....	566

图2 2010年底分离株与 A/Fuzhou/1/2009(H1N1)及 A/California/07/2009(H1N1)氨基酸序列比对

2.3 同源性比对及进化树 福州市2010年甲型H1N1流感分离株HA基因与2009年首例甲型H1N1流感病毒株同源性为98.5%,与疫苗株参考株 A/California/07/2009(H1N1)同源性98.5%,与2010年6株甲型H1N1流感病毒株同源性均在99%以上。从进化树上可以观察到与伊朗的2株毒株进化距离最近,此外2010年H1N1的HA序列聚成一个大类群,而2009年聚成另一个类群,见图3。

## 3 讨论

福州市首例甲型H1N1流感病毒于2009年5月检出以来,至2010年12月福州地区确诊病例超过1500例。但其间流行强度并不一致,特别是2010年5~7月间未监测到甲型H1N1阳性病例,而8~11月开始又出现散发流行,12月底至2011年2月再形成流行高峰。由于甲型流感病毒容易发生变异,随着病毒的传播,特别是疫苗接种计划的实施,人群的免疫屏障逐步建立,病毒发生抗原漂移的可能性加大。

因而在加强流感监测同时,探讨前后两次流行高峰毒株HA基因变异,并与疫苗株进行比较有十分必要。

本次测定毒株与福州市首例甲流病毒株 A/Fuzhou/1/2009(H1N1)对比,HA氨基酸序列在9个位点发生改变,其中6个位点在HA1区,3个在HA2区;与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)进行比对,有12个位点发生改变,其中9个位点在HA1区,3个在HA2区。结果表明HA1区比HA2区具有更高的变异率,与相关研究报道一致<sup>[1]</sup>。该毒株虽然HA变异位点较多,但都不在已知的抗原位点上,因此这些突变还不会影响抗原性的改变,未出现具有流行病学意义的抗原漂移。一般认为流感病毒在发生抗原漂移产生变异株的过程中,HA变异至少要涉及4个氨基酸的变化,且要分布在2个以上的抗原决定簇上<sup>[2]</sup>。进一步分析HA的裂解位点序列为PSIQR↓GLFGAI,与典型H1N1亚型病毒在HA切割位点处的氨基酸序列相一致,尚未出现高致病性毒株的分子特征(RXR/KR↓GLF)。

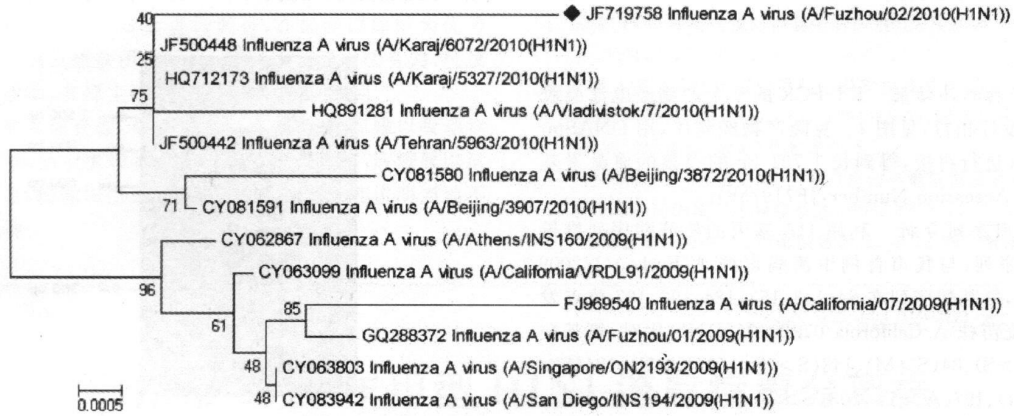


图 3 福州市甲型 H1N1 流感病毒株(登录号 JF719758) HA 基因种系进化树

此次同源性比对检测显示,福州甲型 H1N1 流感病毒血凝素基因变异呈逐步量变累积过程。从进化树上可以观察到 2010 年 H1N1 的 HA 序列聚成一个大类群,而 2009 年聚成另一个类群。据本实验室先前对 2009 年福州首例甲流病毒株 A/Fuzhou/1/2009(H1N1) 及 1 例死亡病例病毒株 A/Fuzhou/721/2009(H1N1) 进行的血凝素基因 HA1 氨基酸序列分析结果:HA1 区氨基酸序列完全相同,提示福州前后两次流行高峰毒株 HA 基因出现变异,随着时间的推移,其病毒的 HA 在逐步发生抗原漂移。本次仅对 1 株 2010 年流行株进行 HA 测序比对,不能完全代表 2010 年全面情况,今后要对更多毒株进行研究,特别要注意关键位点突变和重组的

发生,及时发现流感变异株,确定流行株,推荐疫苗组分,为防控策略的制定提供重要的科学依据。

参考文献

[1] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway [J]. Nature, 2006, 440(7083): 435-436.  
 [2] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin [J]. J Infect Dis, 1997, 176(Suppl 1): S24-S28.

收稿日期: 2011-04-05 责任编辑: 方林

• 流行病学调查研究 •

福建省 2009 年中央转移支付项目地氟病区监测结果分析

林本翔, 陈志辉\*, 林兆和  
福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

**摘要:** 目的 了解福建省地方性氟中毒病区现状。方法 用分层整群抽样法从全省 36 个地氟病区县抽取 11 个病区, 每县抽 3 个村为调查点, 每个调查点测定饮用水氟含量、检查 8~12 岁儿童氟斑牙患病率, 对 16 岁及以上成人进行氟骨症普查, 并对临床疑似氟骨症患者进行 X 线拍片。结果 33 个病区村饮水氟含量均值均 < 1.0 mg/L, 共检出 8~12 岁儿童氟斑牙病例 37 例, 氟斑牙检出率为 5.1%, 除改水工程报废的长泰县儿童氟斑牙流行强度为流行边缘外, 其它监测县儿童氟斑牙流行强度为阴性, X 线氟骨症检出率 19.0% (24/126)。结论 饮水型地方性氟中毒病区实施改水降氟措施效果显著。

**关键词:** 饮用水卫生; 氟中毒; 改水降氟; 氟骨症

中图分类号: R 123; R 599 文献标志码: B 文章编号: 1007-2705(2011)03-0026-02

我省 9 个地(市) 84 个县(市、区)中, 共查出 36 个县(市、区)属于饮水型地方性氟中毒病区。为掌握实施改水降氟措施后地氟病区现状, 2009 年 4 月至 10 月, 省疾控中心按照国家《项目管理方案》、《项目技术方案》和《2009 年福建省地方病防治项目管理方案》的要求, 对地氟病区开展监测工作, 现

将结果分析如下。

1 材料和方法

1.1 调查点的选择 用分层整群抽样法从全省 36 个地氟病区县选择平和、长泰、永安、翔安、仙游、城厢、长乐、安溪、建阳、福鼎和长汀 11 个县(市、区)作为调查县, 在每个调查县所有病区村随机抽取 3 个作为调查点。

1.2 调查内容与指标 以自然村为单位, 调查改水工程运转情况、饮水氟含量、儿童氟斑牙患病率、氟斑牙流行强度及成

基金项目: 2008 年度中央支持地方公共卫生项目地方病防治项目。

第一作者简介: 林本翔(1970-), 男, 主管医师。专业: 地方病防治。

\* 通讯作者: 陈志辉, Email: fjcdcidd@pub5.fz.fj.cn.