

中国大陆 H7N9 禽流感病毒流行病学特征及血凝素和神经氨酸酶的分子进化

李鹏媛, 徐浩, 顾豪高, 马蒙蒙, 陆家海, 郝元涛, 张定梅*

(中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系, 广东广州 510080)

摘要:【目的】对中国大陆人感染 H7N9 禽流感的流行病学特征进行描述分析,并对不同地区、不同时间、不同宿主来源的 H7N9 禽流感血凝素及神经氨酸酶基因进行分子进化分析,为 H7N9 禽流感的科学防控提供依据。【方法】汇总各公开网站发布的人感染 H7N9 禽流感病例信息,分析人感染 H7N9 禽流感的流行病学特点;从 Genbank 筛选 H7N9 禽流感毒株的核酸序列及氨基酸序列,利用 MEGA5.0、Bioedit 等软件构建进化树,分析核苷酸及所编码蛋白关键位点的变异情况。【结果】全国共报告 451 例人感染 H7N9 禽流感病例,病死率为 19.96%,男女性别比约为 2.25:1;60 岁以上(含 60 岁)病例占全部病例的 45.76%;浙江,广东,江苏,上海四省市报告病例较多;2013 年 4 月前和 2014 年 1 月至 2 月为两个发病高峰。进化树显示 H7N9 禽流感毒株分为美洲来源支和欧亚来源支,分离的时间地点越接近进化关系越近。自韩国 2011 年野鸟中分离的 H7N9 毒株的 NA 基因与中国 2013 年及 2014 年分离的 H7N9 毒株 NA 基因进化关系较近。广东第一例人 H7N9 禽流感的 NA 基因与 2013 年 5 月分离自山东环境中的 H7N9 禽流感的 NA 基因及 2013 年 4 月来自浙江人感染 H7N9 禽流感的 NA 基因的同源性较高。所有人感染 H7N9 毒株 NA 茎区 69~73 位缺失了 QISNT 序列。【结论】老人及男性是感染 H7N9 禽流感的高危人群,冬春季是疫情高发期,病例集中分布于东南沿海地区。分子进化分析表明 H7N9 禽流感毒株有时间和空间的聚集性,时间空间距离越短则进化关系越接近。广东地区 H7N9 禽流感病毒可能是北方的候鸟迁徙所致,中国 H7N9 毒株 NA 片段可能来自韩国禽类携带的毒株。人感染 H7N9 禽流感病毒的毒力及耐药性尚未发生变异。NA 茎区 69~73 位缺失 QISNT 序列可能与该病毒具有感染人类的能力有关。

关键词:禽流感;H7N9;进化;血凝素;神经氨酸酶

中图分类号:R183.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)06-0932-09

Epidemiological Characteristics of Influenza Virus H7N9 and Evolutionary Analysis of Hemagglutinin and Neuraminidase Genes

LI Peng-yuan, XU Hao, GU Hao-gao, MA Meng-meng, LU Jia-hai, HAO Yuan-tao, ZHANG Ding-mei*

(Department of Medical Statistics and Epidemiology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objectives】To describe and analyze the epidemiological characteristics of the human infection with avian influenza H7N9 virus in mainland China and conduct a molecular evolution analysis of H7N9 virus hemagglutinin and neuraminidase gene isolated from different areas and hosts at different time, which provides scientific basis for preventing avian influenza A (H7N9) outbreaks. 【Methods】The cases of the human infection with avian influenza H7N9 virus were collected from websites and the epidemiological characteristics were analyzed. HA and NA gene sequences of avian influenza A H7N9 virus were obtained from Genbank to construct phylogenetic trees with MEGA5.0 software. The mutations of nucleotide sequence and corresponding amino acids were analyzed with Bioedit software. 【Results】There were 451 cases reported throughout the country. The mortality rate was 19.96%. The ratio of male to female was 2.25:1. The patients older than 60 years (including 60) account for 45.76% of all. There were more patients reported in Zhejiang, Guangdong, Jiangsu and Shanghai than in other provinces. Two incidence peaks occurred: one was around April 2013 and the other was from January 2014 to February 2014. Phylogenetic trees showed that there were two branches of

收稿日期:2014-08-13

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81201283),国家“十二五”传染病防治科技重大专项(2012ZX10004-213,2012ZX10004-902)

作者简介:李鹏媛,本科在读,预防医学专业,E-mail:lipengyuanpy@foxmail.com; *通信作者:张定梅,博士,讲师,传染病流行病学,E-mail:zhdingm@mail.sysu.edu.cn.

the strain, coming from America and Eurasia, respectively. The closer the time and area of strain separation happened, the higher homology they shared. The NA gene of H7N9 strain isolated from wild birds in South Korean 2011 shared high homology with those isolated from mainland China in 2013 and 2014. NA gene of the first human infection with avian influenza A H7N9 virus in Guangdong shared high homology with ones isolated from Shandong environment in May 2013 and the ones isolated from human patients in Zhejiang in April 2013. There was a 5-amino acid deletions (QISNT) in stalk 67~73 of NA gene of shared by all of the avian influenza A H7N9 virus isolated from human patients. 【Conclusions】 The aged and male are at high risk of being infected with avian influenza A H7N9 virus. Outbreaks usually happens in winter and spring in the southeast coastal areas. There were clusters of molecular evolution in time and space. The outbreak of avian influenza A H7N9 virus in Guangdong may be due to the migration of birds from the north. NA gene of H7N9 stains in China may come from the stains carried on by Korean birds. There was no mutations discovered in the human infection avian influenza A H7N9 virus, while the 69~73 stalk deletion (QISNT) may be concerned with the ability of infecting human.

Key words: avian influenza virus; H7N9; evolution; hemagglutinin; neuraminidase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(6):932-940]

我国于 2013 年 2 月 19 日出现首例人感染 H7N9 禽流感病例^[1],截至 2014 年 7 月 4 日,全国已报告约 451 例^[2-3]。目前人感染 H7N9 禽流感仍以散发为主,大规模流行的可能性较小。H7N9 感染人群具有独特的性别、年龄分布流行病学特征,但是关于该病毒的来源、传播方式、发病机制等仍知之甚少^[4]。H7N9 禽流感病毒属甲型流感病毒,甲型流感的宿主范围广泛,包括多种禽类、哺乳动物和爬行动物,不同甲型流感病毒可通过抗原漂移和抗原转换重配为新的流感病毒并传播给其他物种;其次,动物宿主的存在也会导致病毒在人群外的持续循环传播^[5],不排除通过不断的分子变异 H7N9 逐渐适应人类宿主引起大范围暴发流行的可能性,及时掌握 H7N9 禽流感病毒的流行病学特征特别是分子进化规律对于有效防控 H7N9 禽流感有重要意义。本文对 2013 年 2 月份以来 H7N9 禽流感的流行病学特征进行描述,并对不同地区、不同时间、不同宿主来源的血凝素及神经氨酸酶基因进行分子进化分析,以期对 H7N9 禽流感的科学防控提供依据。

1 材料与方 法

收集中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会网站^[6],世界卫生组织(WHO)网站^[7]以及 Flutrackers 论坛上公开发布的病例资料^[2]进行流行病学分析。利用 ArcGIS10.2 软件在矢量化中国省级行政区划图基础上绘制了病例地区分布图。

从 National Center of Biotechnology Information (NCBI)选择下载 A/H7N9 新毒株及禽类来源毒株的核苷酸序列及氨基酸序列。利用 ClustalX2.1 对

核酸序列进行多序列比对,并修剪序列长度使其一致后,利用 MEGA5.0 构建分子进化树,采用 Neighbor-Joining 法,bootstrap=1 000。在此基础上,利用 Bioedit 软件中 Alignment 下的 Sequence Identity Matrix 构建矩阵,分析序列间同源性相似性。

利用 Bioedit 中的 ClustalW 程序对我国不同地区或时间来源的新型甲型 H7N9 毒株的氨基酸序列进行比对,分析毒力位点和耐药位点变异规律。利用 NetNGlyc 1.0 Server 糖基化位点预测器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对其进行潜在糖基化位点的氨基酸序列分析,并分析其与不同临床结局关系。

2 结 果

2.1 流行病学特征分析

截至 2014 年 7 月 4 日,共报告 451 人感染 H7N9 禽流感病例,其中 90 人死亡,病死率为 19.96%。女性 138 人,男性 310 人,3 例性别不详,男女性别比约为 2.25:1。年龄范围 0~91 岁,60 岁以上病例占全部病例的 45.76%,60 岁以上死亡病例占全部死亡病例的 60.23%。病例年龄分布及死亡病例年龄分布见图 1。浙江省确诊 139 例,江苏 59 例,上海 39 例,广东 113 例,而东北,西南地区少见,西北地区尚未发现,见图 2。2013 年 4 月为疫情高发月份,之后疫情趋于平稳,2014 年开始疫情复发,迎来第二波高峰,自 2014 年 2 月开始呈现逐步下降趋势(图 3)。

2.2 HA 及 NA 基因进化及同源性分析

我们利用从 NCBI 上下载的 24 条 HA 序列及

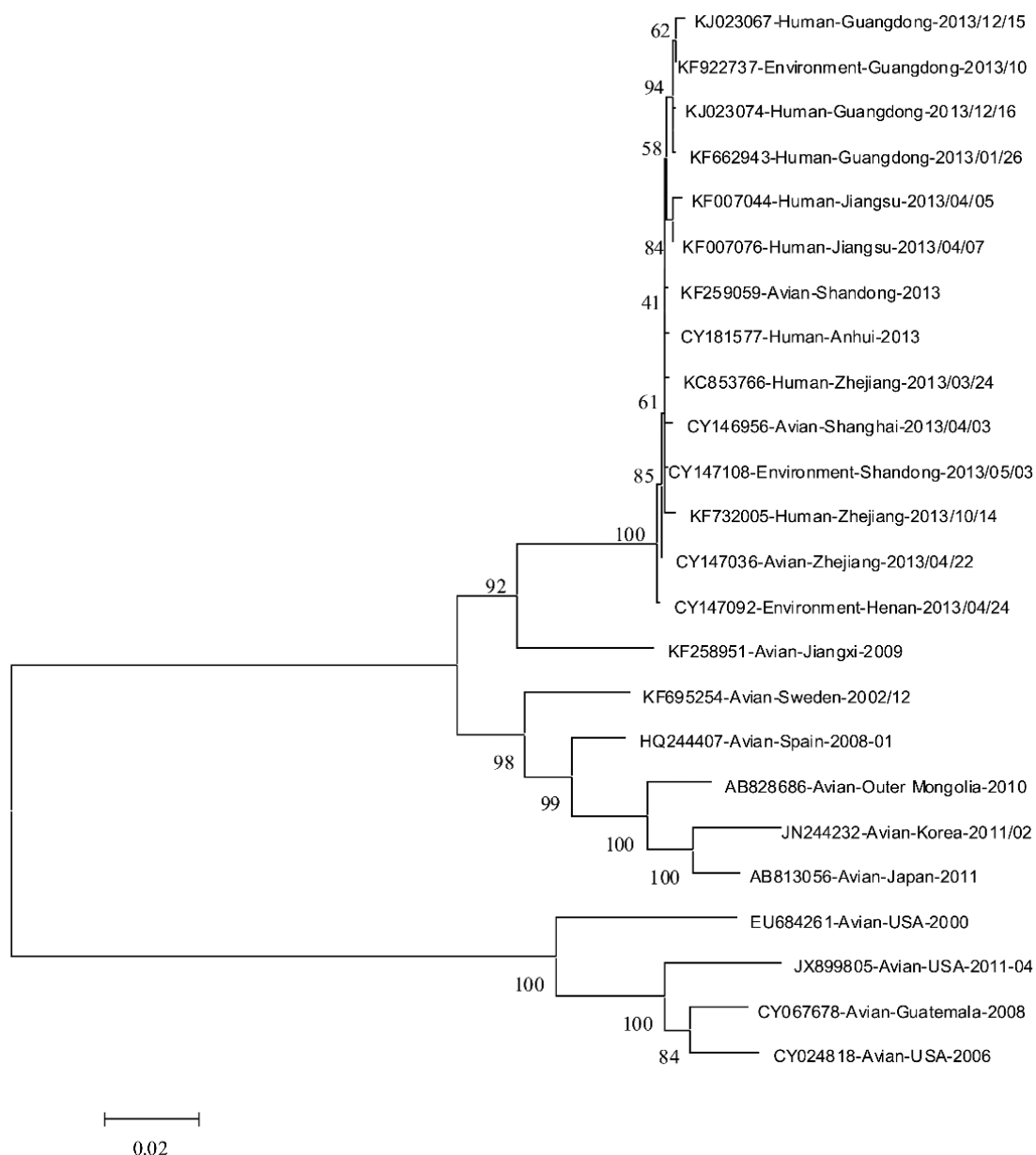


图 4 甲型 H7N9 病毒 HA 核苷酸序列进化树

Fig.4 Influenza H7N9 virus HA nucleotide sequence phylogenetic tree

The pattern of name in phylogenetic tree: Genbank accession-host-area-time

16 进化关系很近 (图 4)。从图 5 中可以看出来自韩国野鸟中的 JN244223-Avian-Korea-2011/02 毒株的 NA 基因与中国 2013 年 17 株毒株的 NA 基因具有较近的进化关系。

在此基础上,我们对这 24 条 HA 基因和 NA 基因又分别做了核苷酸的同源性计算,利用 Bioedit 软件中的 ClustalW 对齐序列后绘制了 Identity Matrix。我们发现,在 HA 基因的同源性分析中,国内毒株彼此间同源性得分均在 0.99 以

上,但美洲的四个毒株与国内毒株的同源性得分最高为 0.762。从 NA 基因的同源性分析中可以看出,2013 年 8 月分离自广东第一例人 H7N9 禽流感的 NA 基因 KF662949-Human-Guangdong-2013/08/10 与来自 2013 年 5 月分离自山东环境中的 H7N9 禽流感的 NA 基因 CY147110-Environment-Shandong-2013/05/03 及 2013 年 4 月来自浙江人感染 H7N9 禽流感的 NA 基因 KF500926-Human-Zhejiang-2013/04 的同源性得

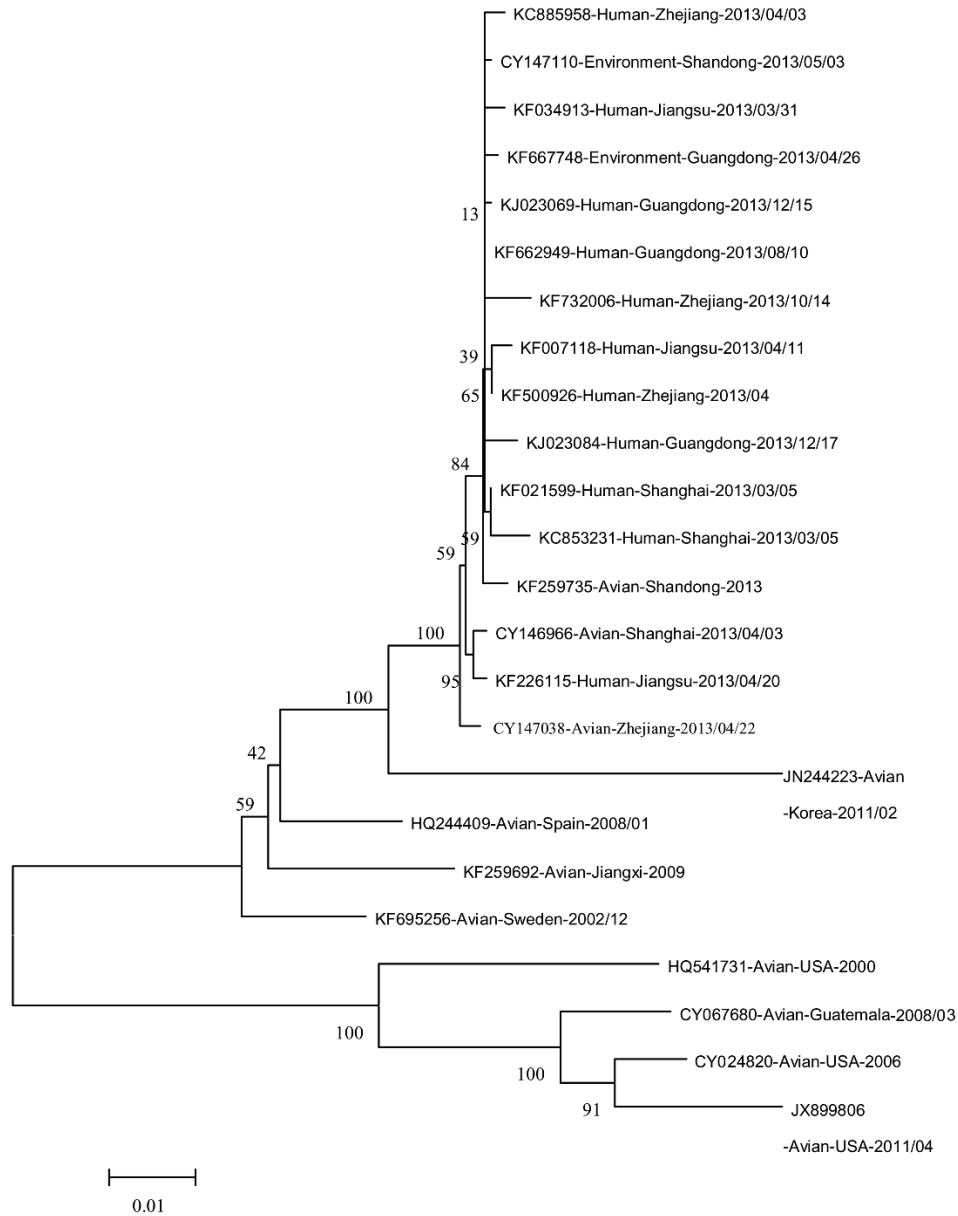


图 5 甲型 H7N9 病毒 NA 核苷酸序列进化树

Fig.5 Influenza H7N9 virus NA nucleotide sequence phylogenetic tree

The pattern of name in phylogenetic tree ;Genbank accession-host-area-time

分较高，其中广东第一例人 H7N9 禽流感毒株 KF662949-Human-Guangdong-2013/08/10 的 NA 序列与山东分离的 CY147110-Environment-Shandong-2013/05/03 的同源性得分为 0.999。在此基础上我们又分析了其他宿主为禽类或环境来源毒株与 KF662949-Human-Guangdong-2013/08/10 NA 片段的同源性关系，其中分离自上海麻雀的 KF609529-Avian-Shanghai-2013/05/09 与它的同源性得分为 1.000。

2.3 HA 及 NA 氨基酸序列分析

2.3.1 HA 氨基酸序列裂解位点及潜在糖基化位点分析 利用糖基化位点预测服务器对 HA 氨基酸序列进行糖基化位点预测，糖基化位点为 30, 46, 249, 421, 493, 共五个(表 1), 比较发现 HA 的氨基酸序列糖基化位点与 2009 年的 H7N9 毒株相比未发生改变。

2.3.2 NA 氨基酸序列耐药位点及潜在糖基化位点分析 对可能会导致流感病毒对神经氨酸酶抑制剂耐药性的改变的 NA 119R、120E、152D、153R、200N、226R、229E、245D、276H、278E、279E、

294R、332D、351K、427E^[8]位点进行多序列比对,未发现存在耐药性突变。NA 氨基酸的糖基化位点一般为 42, 52, 63, 66, 87, 147, 202, 共 6 个。除了 KF034913-Human-Jiangsu-2013/03/31 的 NA 缺

少 52 位的糖基化位点外,其余均未发生改变(表 2)。人感染 H7N9 毒株 NA 茎区 69~73 位缺失了 QISNT 序列,而 2009 年江西的 KF259692-Avian-Jiangxi-2009 作为对照毒株未出现。

表 1 HA 序列糖基化位点

Table 1 Glycosylation site of HA gene

Genbank Accession	30	46	249	421	493	Area	Time
CY147036	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Zhejiang	2013/04/22
KF732005	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Zhejiang	2013/10/14
KC853766	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Zhejiang	2013/03/24
KF997831	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Shanghai	2013/05
CY146956	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Shanghai	2013/04/03
KF922737	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Guangdong	2013/10
KJ023067	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Guangdong	2013/12/15
KJ023074	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Guangdong	2013/12/16
KF662943	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Guangdong	2014/01/26
KF007044	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Jiangsu	2013/04/05
KF007076	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Jiangsu	2013/04/07
CY181577	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Anhui	2013
CY147092	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Henan	2013/04/24
CY147108	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Shandong	2013/05/03
KF259059	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Shandong	2013
KF258951	NGT	NAT	NDT	NWT	NNT	Jiangxi	2009

表 2 NA 序列糖基化位点

Table 2 Glycosylation site of NA gene

Genbank Accession	42	52	63	66	87	147	202	Area	Time
KF259735	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Shandong	2013
CY147110	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Shandong	2013/05/03
KF662949	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Guangdong	2013/08/10
KF667748	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Guangdong	2013/04/26
KJ023069	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Guangdong	2013/12/15
KJ023084	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Guangdong	2013/12/17
KF226115	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Jiangsu	2013/04/20
KF007118	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Jiangsu	2013/04/11
KF034913	NCS	---	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Jiangsu	2013/03/31
CY146966	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Shanghai	2013/04/03
KF021599	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Shanghai	2013/03/05
KC853231	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Shanghai	2013/03/05
CY147038	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Zhejiang	2013/04/22
KF732006	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Zhejiang	2013/10/14
KC885958	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Zhejiang	2013/04/03
KF500926	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Zhejiang	2013/04
KF259692	NCS	NTS	NET	NIT	NLT	NGT	NAS	Jiangxi	2009

3 讨 论

2013年2月以来在中国大陆流行的人感染H7N9禽流感,目前已造成451人感染,性别比显著高于H5N1亚型流感;感染病例年龄中位数为62岁,年龄呈明显的负偏态分布,老人和男性感染率较高,而H5N1禽流感则在10~30岁年龄段人群高发,因此H7N9感染人群具有独特的性别、年龄分布特征,与其他亚型流感显著不同^[4,9]。目前为止H7N9禽流感已导致90人死亡,病死率为19.96%,病死率较高,但低于H5N1高致病性禽流感。感染途径与H5N1类似,但感染病例数却呈快速增加^[4,10-11],且对于H7N9人禽共患的流行病学特征也尚未研究清楚。这可能是由于低致病性禽流感导致患病家禽症状不明显,携带病毒而引起更大范围的传播。未见高危职业或暴露史与H7N9病死有关,感染症状出现后拖延就诊时间可能是造成病例死亡的原因之一^[12-13]。疫情于2013年4月及2014年1月至二月呈现两次高峰,且第二次高于第一次,提示冬春季为疫情高发期。目前资料表明H7N9没有出现广泛人与人传播^[5],但已有相关实验证实人类来源的A/Anhui/1/2013毒株在豚鼠模型上实验存在接触传播^[14],并且存在家庭内多人感染的情况。随着感染病例的增多,不排除H7N9发生变异逐渐适应人体发生广泛流行的情况。从地区分布看,病例主要集中于长江中下游及东南沿海地区,以长江三角洲和珠江三角洲疫情较为严重,同时研究发现H7N9禽流感城镇人口比例大于H5N1^[10],表明H7N9禽流感的发生可能与人口密度大、禽类消费量大有关。

血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是流感病毒的膜表面蛋白:HA使病毒颗粒吸附于敏感细胞表面的唾液酸受体造成感染;NA具有水解唾液酸的活性,当成熟的流感病毒经出芽的方式脱离宿主细胞之后,由NA水解与HA结合的低聚糖侧链末端的唾液酸,在病毒从感染细胞的释放和扩散中发挥重要作用。HA和NA还是流感病毒抗原性的主要部位,其点突变引起的抗原漂移和8个节段基因重组引起的抗原转移,是引起人类流感大流行的遗传基础。此外,NA还是抗流感药物的重要作用靶点,其改变会引起耐药性的产生^[15-17]。

本研究对H7N9禽流感病毒HA与NA基因的进化分析表明在世界范围H7N9禽流感病毒大致分为两支,一支为美洲来源,包括美国和危地马拉,一支为欧亚来源,包括西班牙、瑞典、蒙古、韩国、日本和中国,这与孙一桐等人的研究结果^[18]相一致。来自中国的H7N9禽流感毒株位于同一分支,与来自其他国家的毒株相比进化距离较近;同时发现分离时间越相近的毒株,其同源关系越接近,表明同地区、同一时间段的毒株表现出更高的同源性。

从NA基因的同源性分析中可以看出,2013年8月分离自广东第一例人H7N9禽流感的NA基因KF662949-Human-Guangdong-2013/08/10与来自2013年5月分离自山东环境中的H7N9禽流感的NA基因CY147110-Environment-Shandong-2013/05/03及2013年4月来自浙江人感染H7N9禽流感的NA基因KF500926-Human-Zhejiang-2013/04的同源性得分较高,其中广东第一例人H7N9禽流感毒株KF662949-Human-Guangdong-2013/08/10与山东分离的CY147110-Environment-Shandong-2013/05/03的同源性得分为0.999,与分离自上海麻雀的KF609529-Avian-Shanghai-2013/05/09同源性得分为1.000,结合分离时间来看,推测可能候鸟迁徙将病毒传播到广东地区,这也可能是广东地区在2013年秋季才开始出现H7N9禽流感疫情并且感染人数迅速上升的原因之一。此外,值得注意的是,JN244223-Avian-Korea-2011/02与国内毒株的同源性分析结果在HA和NA的同源性矩阵中存在明显的差异,NA与国内毒株的同源性得分不低于0.929,显著高于HA,并且JN244223-Avian-Korea-2011/02与国内2013年10株毒株的同源性得分甚至高于KF259692-Avian-Jiangxi-2009与国内其他毒株的得分,这也支持我国流行的H7N9毒株NA片段来自韩国禽类携带的毒株的观点^[15]。

宿主蛋白酶可以将甲型流感病毒的HA裂解为HA1和HA2,这是AIV感染宿主细胞的先决条件,HA1具有与宿主细胞受体结合的特性,HA2是参与和细胞膜融合的重要亚单位,如果HA易被切割,则病株就有较高的致病力^[19-20]。研究表明,高致病力毒株的HA在其裂解位点附近均有多个碱性氨基酸,而低致病力毒株的HA在其裂解位点只有一个精氨酸(R),不超过2个碱性氨基酸^[21],

HA 酶切位点的变异是禽流感病毒毒力的强弱的重要因素^[22]。通过变异分析,我们发现 H7N9 禽流感的裂解位点均为 PEIPKGR ↓ GLF, 含有两个碱性氨基酸,为低致病性特点,国内流行的 H7N9 禽流感的 HA 主要位点尚未发现突变,表明相对于 H5N1 等高致病禽流感病毒而言,其仍为低致病性,而目前病死率较高的原因一方面可能是因为存在无症状感染者,另一方面目前死亡的病例多为老年男性,并有部分病例合并有较严重的基础疾病,可能与抵抗力低下,抽烟等不良生活习惯有关。

HA 和 NA 是流感病毒表面两种重要的糖基化蛋白。HA 和 NA 在各亚型的甲型流感病毒里均含有保守的糖基化位点,其中 NA 由于不同亚型可能伴有不同的缺失从而糖基化位点数目不同,其中保守的糖基化位点一般为 2-4 个。研究认为糖基化对于病毒重要位点具有保护作用,在病毒的疫苗研制,宿主选择及毒力变异中起到重要作用^[23]。HA 的氨基酸序列糖基化位点与 2009 年的 H7N9 毒株相比未发生改变,表明不同毒株毒力的不同与 HA 的糖基化位点的变化无关。KF034913-Human-Jiangsu-2013/03/31 的 NA 缺少 52 位的糖基化位点,感染该毒株的为 1 重症病例,于 4 月 24 日死亡^[24-26]。这一突变可能影响了其毒力,导致致病性增强,临床治疗效果差^[27]。NA 的耐药性位点均未发现出现突变,表明 NA 抑制剂仍对 H7N9 人禽流感治疗有效。人感染 H7N9 毒株 NA 茎区 69 ~ 73 位缺失了 QISNT 序列,而 2009 年分离自江西鸭子体内的 KF259692-Avian-Jiangxi-2009 未出现该缺失,表明这一突变可能与该病毒具有感染人类的能力有关^[18,28],有待于进一步研究分析。

参考文献:

- [1] 魏铭言. 上海 2 人感染 H7N9 禽流感死亡系全球首例 [EB/OL]. <http://news.sina.com.cn/c/2013-04-01/023926696718.shtml>, 2013-04-01 /2014-07-04.
Wei MY. Two people in Shanghai first died from H7N9 influenza virus infection throughout the world [EB/OL]. <http://news.sina.com.cn/c/2013-04-01/023926696718.shtml>, 2013-04-01 /2014-07-04.
- [2] Giuseppe. FluTrackers 2013/14 Human Case List of Provincial/Ministry of Health/Government Confirmed Influenza A(H7N9) Cases with Links [EB/OL]. <http://www.flutracker.com/forum/showthread.php?t=202713>, 2014-07-04
- [3] World Health organization. Situation updates -Avian influenza (WHO) [EB/OL]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/archive/en/, 2014-07-04.
- [4] 魏茂提, 赵国平, 高宏伟, 等. H7N9 禽流感病例流行病学特征初步分析 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2013(05): 351-355.
Wei MT, Zhao GP, Gao HW, et al. Epidemiological characteristics of confirmed avian influenza A (H7N9) cases in mainland China-A Preliminary Report [J]. J LogistUniv CAPF; Med Sci, 2013(05): 351-355.
- [5] 刘春艳, 艾军红. 甲型 H7N9 禽流感病毒的病毒学特征 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013(6): 405-408.
Liu CY, Ai JH. Virological characteristics of avian influenza A H7N9 virus [J]. Chin J ContempPediatr, 2013, 15(6): 405-408.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 [EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/>, 2014-07-04.
The people's Republic of China National Health and Family Planning Commission [EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/>, 2014-07-04.
- [7] World Health Organization [EB/OL]. <http://www.who.int/en/>, 2014-07-04.
- [8] Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants [J]. AntimicrobAgents Chemother, 2001, 45(12): 3403-3408.
- [9] Taubenberger JK, Morens DM. Influenza viruses: breaking all the rules [J]. MBio, 2013, 4(4).
- [10] Cowling BJ, Jin L, Lau EH, et al. Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases [J]. Lancet, 2013, 382(9887): 129-137.
- [11] Tranto SC, Ouyang X, Zheng J, et al. Structural analysis of the novel influenza A (H7N9) viral Neuraminidase interactions with current approved neuraminidase inhibitors Oseltamivir, Zanamivir, and Peramivir in the presence of mutation R289K [J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14 (16): S7.
- [12] Gabbard JD, Dlugolenski D, Van Riel D, et al. Novel H7N9 influenza virus shows low infectious dose, high growth rate, and efficient contact transmission in the guinea pig model [J]. J Virol, 2014, 88(3): 1502-1512.

- [13] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 496-499.
- [14] Gabbard JD, Dlugolenski D, Van Riel D, et al. Novel H7N9 influenza virus shows low infectious dose, high growth rate, and efficient contact transmission in the guinea pig model [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1502-1512.
- [15] 于玉凤, 郭晓兰, 王颖, 等. H7N9 禽流感病毒对人类致病的分子基础分析 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2013, 34(5): 657-665.
Yu YF, Guo XL, Wang Y, et al. Analysis of molecular basis about pathogenicity of avian influenza A H7N9 virus to human [J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci*, 2013, 34(5): 657-665.
- [16] 江丽芳. H7N9 禽流感病毒研究现状 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2013, 34(5): 651-656.
Jiang LF. Current knowledge for the research of avian influenza A (H7N9) Virus [J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci*, 2013, 34(5): 651-656.
- [17] 龙北国, 江丽芳. 高级医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
Long BG, Jiang LF. *Advanced Medical Microbiology* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.
- [18] 孙一桐, 金能智, 张海蓉, 等. A/H7N9 流感病毒神经氨酸酶进化分析 [J]. *病毒学报*, 2014, 30(1): 44-50.
Sun YT, Jin NZ, Zhang HR, et al. Evolutionary analysis of neuraminidase gene of A/H7N9 influenza virus [J]. *Chin J Virol*, 2014, 30(1): 44-50.
- [19] Pasick J. Advances in the molecular based techniques for the diagnosis and characterization of avian influenza virus infections [J]. *Transbound and Emerg Dis*, 2008, 55(8): 329-338.
- [20] 张素霞, 王昕, 陈雪峰, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素裂解位点碱性氨基酸对应 mRNA 核苷酸的二级结构分析 [J]. *科学通报*, 2008, 53(2): 203-209.
Zhang SX, Wang X, Chen XF, et al. Analysis of two level structure of mRNA corresponding basic amino acids at hemagglutinin cleavage sites of A/H5N1 influenza virus [J]. *Chin Sci Bull*, 2008, 53(2): 203-209.
- [21] Wasilenko JL, Pantin-Jackwood M, Khan TA, et al. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from poultry in Pakistan 2006-2008 [J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 247-252.
- [22] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus [J]. *Virology*, 1999 (258): 1-20.
- [23] Chen W, Zhong Y, Qin Y, et al. The evolutionary pattern of glycosylation sites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49224.
- [24] Li J, Yu X, Pu X, et al. Environmental connections of novel avian-origin H7N9 influenza virus infection and virus adaptation to the human [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(6): 485-492.
- [25] Qi X, Qian YH, Bao CJ, et al. Probable person to person transmission of novel avian influenza A (H7N9) virus in Eastern China, 2013: epidemiological investigation [J]. *BMJ*, 2013, 347(2): f4752.
- [26] 雨齐. 无锡 32 岁 H7N9 确诊女患者死亡另 1 例疑似病例获确诊 [EB/OL]. http://www.wxrb.com/node/news_wuxi/2013-4-27/98FAABG9I436864.html, 2013-04-27/2014-08-02.
Yu Q. The 32-year-old female patient who was diagnosed of H7N9 infection in Wuxi has died, another borderline case has been diagnosed [EB/OL]. http://www.wxrb.com/node/news_wuxi/2013-4-27/98FAABG9I436864.html, 2013-04-27/2014-08-02.
- [27] Hu Y, Lu S, Song Z, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance [J]. *The Lancet*, 2013, 381(9885): 2273-2279.
- [28] Wang QZ, Long JX, Hu SL, et al. Biological significance of amino acids deletion in NA stalk of H5N1 avian influenza virus [J]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2006, 46(4): 542-546.

(编辑 刘清海)