

2009~2012年越南北部地区监测：流感病毒对奥司他韦耐药情况

Hoang Vu Mai-Phuong^a, Nguyen Co Thach^a, Nguyen Le Khanh Hang^a, Nguyen Thi Kim Phuong^b和Le Quynh Mai^a

通讯作者: Hoang Vu Mai-Phuong (e-mail: lom9@nihe.org.vn 或 hoangmp9906@gmail.com)。

引言：越南已出现季节性甲型流感病毒和A(H5N1)禽流感病毒对抗病毒药物耐药的报道，引发了对抗病毒药物治疗效果的担忧。

方法：本研究对2009~2012年间两个来源的流感病毒标本进行了分析：一是来自越南北部哨点医院流感样病例的流感病毒阳性标本，二是从A(H5N1)确诊病例中分离的病毒标本。使用焦磷酸测序检测流感病毒的突变：包括A(H1N1)和A(H5N1)的H275Y位点，A(H3N2)的E119V位点和A(H5N1)的I117V位点。对所有的甲型和乙型流感病毒使用神经氨酸酶抑制试验测定50%抑制浓度(IC₅₀)。

结果：共有341份甲型流感阳性标本，其中最多的是甲型H1N1流感病毒[A(H1N1)pdm09, 215份]。2009年，100%(19/19)的季节性A(H1N1)流感病毒对奥司他韦耐药，1.4%(3/215)的甲型H1N1流感病毒对奥司他韦耐药。A(H5N1)禽流感病毒或A(H3N2)流感病毒中未发现H275Y突变。

讨论：在越南，目前尚无季节性流感疫苗和A(H5N1)禽流感疫苗，因此，需要对病例进行有效治疗。流感病毒对奥司他韦产生耐药引起人们的关注。越南应该继续开展流感病毒流行株对奥司他韦耐药性的主动监测。

流感病毒每年都在世界范围内引起流行。引起人类感染的流感病毒常见的有两种：甲型流感和乙型流感。甲型流感病毒曾在20世纪引起过几次流感大流行，2009年还发生了由甲型H1N1流感病毒[A(H1N1)pdm09]引起的大流行^[1]。2006年越南开始启动全国流感监测，到目前为止收集的数据显示，不同监测地区年复一年流行的流感病毒存在相似的季节高峰和亚型^[2]。2003~2012年，越南的63个省份中，有40个省份共确诊了123例人感染H5N1禽流感[A(H5N1)]病例，其中81例(66%)来自越南北部^[3]。虽然目前越南正在研制A(H1N1)pdm09和A(H5N1)的流感疫苗，但是目前仅能通过私人交易渠道买到。

神经氨酸酶抑制剂奥司他韦和扎那米韦是目前推荐治疗流感的主要抗病毒药物^[4,5]，但是甲型流感病毒对它们产生耐药的报道越来越多^[6,7]。奥司他韦是目前越南卫生部推荐治疗疑似A(H5N1)和A(H1N1)pdm09的一线药物。临床分离的甲型流感病毒对奥司他韦耐药与神经氨酸酶活性位点V116、I117、E119、Q136、K150、D151、D199、I223、H275和N295出现残基替代有关^[8]。对于乙型流感病毒，有两个主要的替代点：R152和D198残基^[8,9]。据报道，越南2005年的A(H5N1)^[6]、2007年的季节性A(H1N1)^[10]和2009年的A(H1N1)pdm09^[7,11]对奥司他韦耐药株于I117V、H275Y和N295S位点发生了突变。由于其

他抗病毒药物的局限性，以及奥司他韦耐药带来的风险，已经使人们对奥司他韦治疗流感的效果产生了担忧。本文报告了越南北部建立常规抗病毒药物耐药性监测项目的试点研究结果。

材料和方法

在越南北部建立抗病毒药物耐药监测项目的第一步是对临床标本、监测哨点收集的病毒分离株以及A(H5N1)进行基因分型。对甲型和乙型流感病毒分离株使用表型分型法对神经氨酸酶活性进行测量。然后应用焦磷酸测序技术检测常见的突变位点—I117V、E119V和H275Y，这些位点与流感病毒对奥司他韦易感性降低或对奥司他韦产生耐药有关。对2009~2012年越南全国流感监测数据也进行了分析。

标本来源

作为2009~2012年越南北部流感样病例哨点监测系统工作的一部分采集了咽拭子，然后在国家卫生和流行病学研究所国家流感中心使用标准方法(传统RT-PCR方法)对标本进行筛查^[2]。对甲型流感和乙型流感阳性的咽拭子进行病毒培养^[2,6]。另外，对2009~2012年期间在越南北部综合性医院ICU病房住院的A(H5N1)病例采集咽拭子、咽喉拭子或气管拭子，从这些标本中也分离病毒毒株。

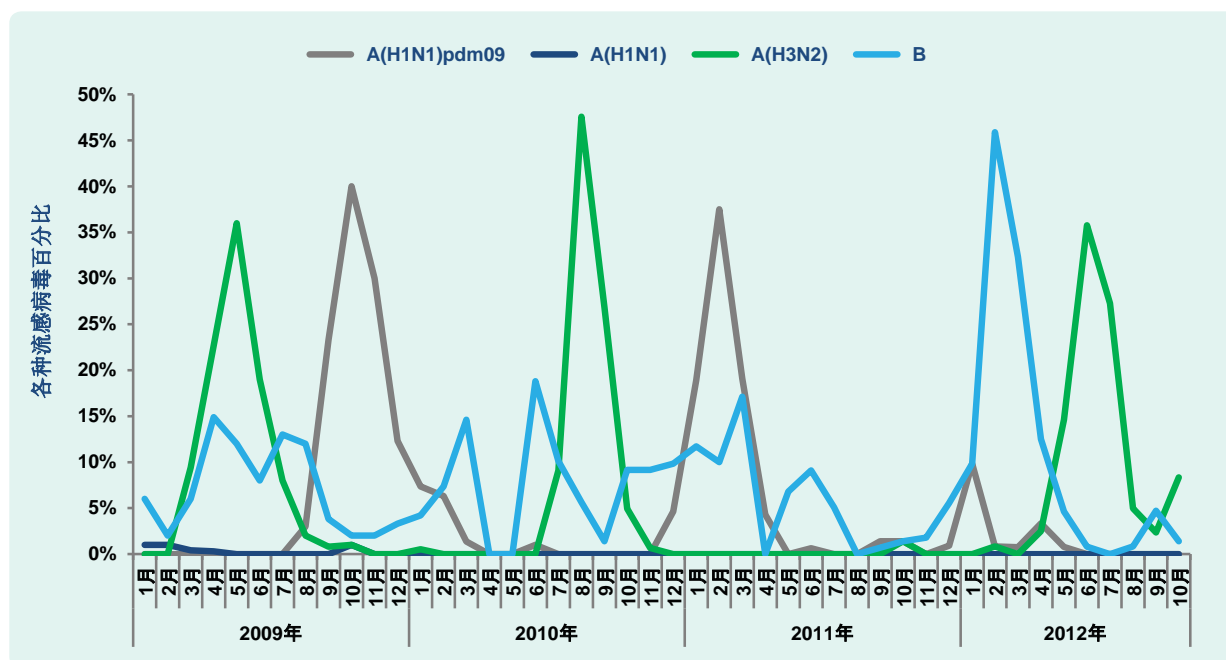
^a 国家卫生与流行病学研究所国家流感中心，越南河内。

^b 第108部队医院，越南河内。

投稿日期：2013年3月21日；刊发日期：2013年6月26日

doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.010

图1. 2009~2012年越南北部不同型别流感病毒百分比



使用犬肾上皮细胞 (MDCK细胞, 来自美国 Type Culture Collection) 进行病毒培养。RT-PCR阳性的A(H5N1)病例咽拭子被接种到生物安全三级培养设备中。分离病毒后, 将病毒储存在零下80°C以备进一步分析。选择血凝抑制试验出现8个以上血凝单位的所有流感毒株进行神经氨酸酶抑制试验^[6,8,10,11]。

焦磷酸测序法

使用焦磷酸测序法进一步对所有RT-PCR流感病毒阳性的标本(341份)和流感毒株(67株)进行分类。病毒RNA直接从临床标本中提取, 或者使用病毒RNA提取试剂盒(Qiagen, 美国)按照其说明书从MDCK细胞病毒增殖上清液中提取。对A(H1N1)pdm09、季节性A(H1N1)、A(H3N2)以及A(H5N1), 使用带有特异性引物的Qiagen ProMark PCR试剂盒进行RT-PCR扩增^[12,13]。按照前述程序, 使用3套RT-PCR引物产生相应的神经氨酸酶基因片段的扩增子, 这些神经氨酸酶基因片段包括了编码目标残基117、119和275的序列^[14]。

使用PyroMark Q24 ID平台(Qiagen, 美国)完成焦磷酸测序和数据分析。简言之, 生物素化的PCR产物通过缓冲液进行系列清洗, 产生单链DNA, 在100 μ M浓度下, 作为模板对残基特异性测序引物进行杂交^[11,15]。

表1. 2009~2010年越南北部甲型流感病毒各种亚型及耐药突变情况

甲型流感病毒亚型	年份			
	2009	2010	2011	2012
A(H1N1)	19	0	0	0
I117V	0	0	0	0
H275Y	19	0	0	0
A(H3N2)	4	57	0	39
E119V	0	0	0	0
A(H1N1)pdm09	132	25	46	12
I117V	0	0	0	0
H275Y	2	0	1	0
A(H5N1)	4	3	0	0
合计	159	85	46	51

神经氨酸酶抑制 (Neuraminidase inhibition, NAI) 试验。

奥司他韦羧酸盐(GS4071)和它的活性形式(GS4104)由瑞士巴塞尔公司罗氏实验室提供。流感病毒参考株由澳大利亚墨尔本世界卫生组织(WHO)流感参与与研究合作中心提供。A(H5N1)病毒在进行神经氨酸酶抑制试验前用1%福尔马林灭活24小时。神经氨酸酶抑制试验按照以前描述的程序进行^[8]。

表2. 2009~2012年越南北部不同亚型未突变流感病毒和突变流感病毒(H275Y)对奥司他韦羧化物的50%抑制浓度

流感病毒亚型	毒株	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ 中位数 (nM)	解释
A(H1N1) (6株)				
突变株	A/Viet Nam/32036/2009	703.48	571.96	抑制作用大大降低
	A/Viet Nam/ELI197/2009	582.81		
	A/Viet Nam/Q271/2009	455.80		
	A/Viet Nam/31808/2009	541.61		
	A/Viet Nam/34381/2009	583.30		
	A/Viet Nam/N116/2009	564.74		
A(H1N1)pdm09 (27株)				
未突变株	24 virus strains	-	1.07	-
突变株	A/Viet Nam/33419/2009	125.99	124.16	抑制作用大大降低
	A/Viet Nam/36530/2011	127.91		
	A/Viet Nam/DN42/2009	118.59		
A/H3N2 (14株)				
未突变株	14株	-	0.19	-
A(H5N1) (7株)				
未突变株	7株	-	8.56	-
乙型流感				
-	13株	-	24.79	-

IC₅₀ - 50%抑制浓度

结果

2009~2012年, 季节性流感病毒呈全年性的循环, 也经常出现甲型和乙型流感病毒的同时循环(见图1)。RT-PCR共检测出341份甲型流感阳性标本(见表1)。其中, A(H1N1)pdm09在整个研究期间最多(215份), 其次是A(H3N2)100份, A(H5N1)7份。季节性A(H1N1)病毒仅在2009年分离到(19份)。

通过对神经氨酸酶基因H275Y位点检测, 发现2009年分离的19株季节性A(H1N1)流感病毒, 100%出现奥司他韦耐药, 2009年收集的215株A(H1N1)pdm09流感病毒, 1.4%(3/215)出现耐药。H275Y突变在A(H5N1)和A(H3N2)流感病毒中未发现。I117V在A(H1N1)、A(H5N1)或A(H1N1)pdm09毒株中均未发现。I119V在A(H3N2)病毒中也未发现(见表1)。

共有67株病毒进行了神经氨酸酶抑制试验, 包括6株季节性A(H1N1)、14株A(H3N2)、7株A(H5N1)、27株A(H1N1)pdm09和13株乙型流感。6株季节性A(H1N1)的IC₅₀在541.61~703.48nM, 高于参考病毒株(A/Mississippi/3/2001, 奥司他韦耐药), 而且比参考野毒株(A/Mississippi/3/2001, 奥司他韦敏感)要高出1000倍。在27株A(H1N1)pdm09流感病毒中, IC₅₀在118.59~127.91nM, 比参考野毒株高

250倍。在无突变的A(H1N1)pdm09、A(H5N1)和乙型流感病毒中, IC₅₀的中位数分别是1.07nM, 8.56nM和24.79nM, 即对奥司他韦均敏感(见表2)。

讨论

本文对越南北部流感病毒耐奥司他韦的情况进行研究, 结果显示2009年循环的季节性A(H1N1)由于具有H275Y突变而产生对奥司他韦耐药, 其IC₅₀值也提示耐药。这一发现与日本、美国和欧洲报道的2008~2009年季节性流感病毒100%耐药的情况一致[12,13,15]。WHO也报道过2008~2009年间A(H1N1)耐药株在世界范围内传播。

越南在2009年6月首次检测出A(H1N1)pdm09, 而且在2009~2011年流感流行季节是主要的流行株。但是, 本研究中, 只在2009年的2份标本以及2011年的1份标本中发现对奥司他韦耐药的突变(H275Y), 2009年耐药率为1.5%。2009年7月越南报道了另外一组7例对奥司他韦耐药的A(H1N1)pdm09聚集性病例[5]。WHO全球流感监测与反应系统在2009~2010年流感大流行期间观测到A(H1N1)pdm09病毒耐药率为1.7%, 本研究结果与其一致[16,17]。其他研究也报道了类似结果, 从美国的耐药率0.5%到英国的0.8%和亚太地区的1.1%[12,14,18-20]。

本研究通过基因型和表型检测判断A(H5N1)、A(H3N2)和乙型流感病毒对奥司他韦的敏感性。在还没有A(H5N1)疫苗可用的情况下,这些结果进一步保证了越南可使用奥司他韦治疗A(H5N1)病例。但是,2005年报道发现1株耐奥司他韦的A(H5N1)病毒,而且2009~2010年从人类和禽类分离的A(H5N1)病毒中也发现了与降低对奥司他韦易感性有关的突变(I117V)。因此,继续开展病毒奥司他韦耐药情况监测对于公共卫生非常重要,因为奥司他韦是目前治疗H5N1感染应用最广泛的抗病毒药物^[16]。

本研究有以下几点局限性。最主要的局限性是生物学标本和毒株的数量,因为我们培养A(H3N2)和A(H1N1)pdm09流感病毒上遇到了困难,加上标本质量问题,导致可供检测的病毒分离株减少。另外,需要说明的是表型(及序列测定)只能提示病毒耐药,因为 IC_{50} 值和实际临床耐药之间的关系仍有待进一步证实。本研究结果只能代表越南北部,可能并不能提供越南全国奥司他韦耐药的准确情况。全国流感监测系统收集的数据并没有发现存在抗病毒药物的周期性使用,因此很难假设本研究中发现的耐药是由于交叉耐药所致。将来应该进一步扩大主动监测以包括医院和个体诊所中奥司他韦的使用情况。

总之,流感病毒表型分析和序列分析结果表明,2009~2012年越南季节性A(H1N1)流感病毒和A(H1N1)pdm09流感病毒出现了对奥司他韦的耐药。将来越南对抗病毒药物耐药的流感病毒可能会增加。建议越南将本试点研究扩大到其他地区,以增强主动监测,监控奥司他韦使用情况,对更多的标本进行分析,对流行病学信息进行回顾总结。

引用本文地址:

Hoang Vu MP et al. Oseltamivir resistance among influenza viruses: surveillance in northern Viet Nam, 2009-2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2013, 4(2):26-33. doi:10.5365/wpsar.2013.4.1.010

利益冲突

未申报。

资金

本研究由韩国CDC资助。

致谢

衷心感谢国家卫生和流行病学研究所对我们工作的大力支持,感谢 WHO 驻越南代表处和澳大利亚墨尔本 WHO 合作中心提供的技术支持。

参考文献:

1. Dawood FS et al. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360:2605-2615. doi:10.1056/NEJMoa0903810 pmid:19423869
2. Nguyen HT et al.; Vietnam National Influenza Surveillance and Evaluation Team. National influenza surveillance in Vietnam, 2006-2007. *Vaccine*, 2009, 28:398-402. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.139 pmid:19853073
3. *Cumulative number of avian influenza A(H5N1) cases reported to WHO*. Geneva, World Health Organization, 2012 (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/, accessed 31 December 2012).
4. Hurt AC, Ho HT, Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2006, 4:795-805. doi:10.1586/14787210.4.5.795 pmid:17140356
5. An V et al. Molecular characterization of influenza A(H1N1)pdm09 virus circulating during the 2009 outbreak in Thua Thien Hue, Vietnam. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2013, 7:235-242. doi:10.3855/jidc.2883 pmid:23493002
6. Le QM et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*, 2005, 437:1108. doi:10.1038/4371108a pmid:16228009
7. Le QM et al. Vietnam H1N1 Investigation Team. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 362:86-87. doi:10.1056/NEJMc0910448 pmid:20007549
8. Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Research*, 2002, 53:47-61. doi:10.1016/S0166-3542(01)00192-9 pmid:11684315
9. Sheu TG et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52:3284-3292. doi:10.1128/AAC.00555-08 pmid:18625765
10. Nguyen, LKH. *Study on influenza infections in northern Viet Nam during the early years of 2000s* [in Vietnamese]. Viet Nam, 2010, 66-68.
11. Hurt AC et al. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2011, 16(23):19884. pmid: 21679678
12. Hurt AC et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Research*, 2009, 83:90-93. doi:10.1016/j.antiviral.2009.03.003 pmid:19501261

13. Meijer A et al.; European Influenza Surveillance Scheme. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15:552–60. doi:10.3201/eid1504.081280 pmid:19331731
14. Lackenby A et al. Continued emergence and changing epidemiology of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus, United Kingdom, winter 2010/11. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2011, 16(5):19784. pmid:2135056
15. Deyde VM et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54:1102–1110. doi:10.1128/AAC.01417-09 pmid:20028826
16. McKimm-Breschkin JL et al. Reduced sensitivity of influenza A (H5N1) to oseltamivir. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13:1354–1357. doi:10.3201/eid1309.07-0164 pmid:18252107
17. Summary of influenza antiviral susceptibility surveillance findings, September 2010 – March 2011. Geneva, World Health Organization, 2011 (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/antiviral_susceptibility/en/, accessed 31 December 2011).
18. Storms AD et al.; US Antiviral Resistance Surveillance Working Group. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010–11. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18:308–311. doi:10.3201/eid1802.111466 pmid:22305467
19. Dharan NJ et al. Oseltamivir-Resistance Working Group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA: Journal of the American Medical Association*, 2009, 301:1034–1041. doi:10.1001/jama.2009.294 pmid:19255110
20. *Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir – 2008/2009 influenza season, northern hemisphere, 18 March 2009*. Geneva, World Health Organization, 2009 (http://www.who.int/influenza/resources/documents/H1N1webupdate20090318_ed_ns.pdf, accessed 31 May 2010).