

讲座与综述

广东地区流感流行、爆发和分子变异研究

黄 平

【摘要】 广东地区在中国乃至全球流感大流行中占有重要地位。本文总结近年广东地区流感流行、爆发和分子变异的资料,归纳出本地区的流感流行特征,揭示了流感爆发和变异的部分规律,为预报流感爆发和预防控制流感流行提供科学依据。

【关键词】 流感; 正粘病毒科; 抗原性变异

【中图分类号】R511.7; R373.13 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1008-6013(2003)02-0144-04

Study on epidemic, outbreak and molecular variation of influenza Guangdong HUANG Ping
Centers for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China

【Abstract】 Guangdong had a notable impact on the global influenza pandemic. In this paper, the influenza epidemic, outbreak and molecular variation were concluded, the specific feature of influenza epidemic were summed up, and regularity of influenza outbreak and molecular variation were partly revealed. It provided the scientific basis for early reporting and prevention influenza.

【Key words】 influenza; orthomyxoviridae; antigenic variation

(*Chin J Dis Control Prev* 2003, 8(2): 144-147)

20 世纪发生 4 次甲型流感大流行,其中 3 次与我国有关。1957 年我国贵州地区发生甲 2 型(H₂N₂, 亚洲流感)流感爆发;1968 年香港地区出现甲 3 型(H₃N₂, 香港流感)流感爆发;1977 年我国鞍山地区再次发生甲 1 型(H₁N₁, 俄国流感)流感爆发。1997 年我国香港地区出现甲 5 型(H₅N₁)流感病例,

1998 年和 1999 年广东地区出现甲 9 型(H₉N₂)流感病例^[1]。

流感流行是由于流感毒株抗原变异所引起。新型流感毒株出现机制包括: 基因重配,1957 年的 H₂N₂ 毒株和 1968 年的 H₃N₂ 毒株均是由于人类流感病毒与禽流感病毒基因重配而产生; 动物流感毒株,1918 年的甲 1 型毒株(H₁N₁, 西班牙流感)是由于猪流感病毒直接感染人类;1997 年的甲 5 型毒株(H₅N₁流感)和 1998 年甲 9 型毒株(H₉N₂流感)是由于禽流感病毒直接感染人类; 毒株隐匿,1977 年的 H₁N₁ 毒株在消失 27 年后(即 1950 年)再次出现并引起流感流行,与流感毒株隐匿有关; 抗原变异,流行毒株不断进行核苷酸置换及氨基酸变异,引

【基金项目】 卫生部青年科学研究基金(93283);WHO 研究基金(WP/ICP/PHC/014/VD/95);美国疾病控制中心(CDC)的 WHO 流感项目基金(9768931)

【作者单位】 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300

【作者简介】 黄 平(1963-),男,安徽芜湖人,博士在读,主任医师。主要研究方向: 传染病的研究与预防。

[4] Shimizu K, Shiratori T, Kobayashi M, et al. Pecombinant human interleukin-11 decrease severity of acute necrotizing pancreatitis in mice [J]. *Pancreas*, 2000, 21(2): 134-140

[5] Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, et al. A new model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive dose of arginine in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 1990, 35(3): 367-374

[6] Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, et al. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension [J]. *J Hypertens*, 1993, 11(6): 639-645

[7] Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, et al. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(22): 8664-8667.

[8] Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(18): 11038-11043

[9] Czako L, Takacs T, Varga IS, et al. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: Inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin [J]. *J Physiol Paris*, 2000, 94(1): 43-50

[10] 尚占民, 王宝恩, 张淑文, 等. 大鼠急性重症胰腺炎模型的建立 [J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8(8): 921.

(收稿日期 2003-09-16)

(修回日期 2004-01-28)

(刘慧慧校)



起病毒抗原决定簇位点的改变,即抗原变异。这种抗原变异的蓄积,引发流感变异株流行,甲 3 型流感在近 34 年中由于抗原变异而在全球引起多次流感流行^[1,2]。

20 世纪 80 年代初,Shortridge 等根据流行病学资料提出“世界流感变异起源地”概念,Webster 等认为中国南方地区的生态环境有利于流感病毒的生息和变异。广东地区于 20 世纪 70 年代开展流感监测,1988 年建立广东地区流感监测网络,此后按照世界卫生组织(WHO)的流感规划开展流感监测与研究^[2]。

自 1968 年甲 3 型流感首次在香港地区引起爆发流行以来,甲 3 型流感是近 34 年人群流行的主要毒株;其它两亚型是甲 1 型和乙型流感,但流行规模和毒株变异程度远小于甲 3 型流感。根据美国流感专家报告,1972~1992 年美国发生多次流感流行(非大流行),多与甲 3 型流感有关,仅美国至少有 42.5 万人因甲 3 型流感流行而引起超额死亡^[3]。

我国广东地区于 20 世纪 90 年代开展流感分子生物学研究。通过调查、实验和研究,发现流感流行爆发和变异规律,以及预测爆发方法和控制措施。采用方法包括以下 5 方面:流感流行病学、病原学和血清学监测;流感爆发调查;血清学抗原分析和 PCR-RFLP(聚合酶链反应-限制性内切酶酶切图谱长度多态性分析)方法分析;抗原决定簇基因核苷酸序列检测和核苷酸-氨基酸序列的分子流行病学研究;致病性基因位点和抗原决定簇基因分子变异研究。研究内容涉及流感流行特征、新型毒株发现、监测方法、分子变异特点、爆发机制、“相”变异和流感防治等领域。

1 流行特征

根据 1988~2001 年流感疫情和监测资料,发现广东地区通常每年只有 1 个流感流行期,有 1~2 个流感流行峰,高峰在每年 3~7 月;爆发年份的流行期可适当提前和延期;各年龄组人群均易感,流行地区集中在大、中城市及其周边地区^[4,5]。与此比较,郭元吉等报告,我国北方地区流感流行高峰在每年冬、春季节,而东南亚地区在每年冬季 11 月份至次年 2 月份和夏季 4~6 月。这是广东省亚热带地理位置的流感流行特征。

2 爆发特点

20 世纪流感大流行均与甲型流感有关,自 1968 年甲 3 型流感出现后,该亚型流感毒株影响最大。在

1988~2001 年中,甲 3 型流感导致 1996 年广东地区流感爆发引起 10 万多人发病,并波及国内外。1996 年 2~7 月,广东大部分地区发生流感流行,爆发点集中在中小学和幼儿园。根据爆发调查和实验室检测,发现此次流行特点包括:流感病毒甲 3 型流行,优势毒株呈“O”相生物学性状;流行高峰在 4、5 月,无明显夏季高峰;流行地区广泛,波及区域主要集中在全省大、中城市及其附近地区;呈学校型爆发,罹患者多为青少年及婴幼儿^[5]。

3 实验室监测

广东地区自 20 世纪 70 年代率先在省级疾控中心开展流感监测,1988 年按照 WHO 流感监测要求,建立广东省人类流感监测网络。这是国家流感监测网络建立后,国内最早的省级流感监测网络。在 1988~2001 年病原学监测中,发现 9 年流行优势毒株为 H₃N₂ 毒株,1988 年和 1991 年优势毒株为 H₁N₁ 毒株,1994 年和 1997 年优势毒株为 B 型毒株。血清学抗原分析发现,1994 年、1995 年、1996 年、1998 年和 1999 年均发生血清学抗原变异,其中 1996 年 H₃N₂ 毒株明显的抗原变异引起广东地区流感流行^[2,3,6]。

检测发现目前人群中存在没有发生变异的“O”相变异 H₃N₂ 毒株,其抗原性与当前流行的“O”相变异 H₃N₂ 毒株不同。今后在鉴定 H₃N₂ 毒株时,需根据毒株的来源和相特性选择适合的标准血清进行鉴定^[6]。

1998 年 8 月和 11 月,韶关和汕头市分别在呼吸道感染患者咽拭标本中分离到抗原性不同的流感病毒 5 株和 4 株,合计 9 株。经过血清学鉴定,均为 H₃N₂ 流感毒株。其中韶关市 1 例 H₃N₂ 感染者血清中,抗 H₃N₂ 血凝抑制抗体滴度 1:160。1999 年 11 月,广州市在呼吸道感染患者咽拭标本中分离 1 株流感病毒,经过血清学鉴定,也为 H₃N₂ 流感毒株。这是首次在人群中分离到 H₃N₂ 流感毒株^[3,7]。

1996 年甲 3 毒株爆发高峰期(4~5 月),在广州市进行一般人群血清采样,检测抗甲 3 抗体,发现各年龄组抗 A/GD/1/96 毒株抗体阳性率依次为:5 a~、0 a~、15 a~、25 a~、60 a~,与流行病学资料基本一致^[8]。比较 1998~2000 年一般人群血清中抗甲 1、甲 3 和乙型流感抗体滴度,发现 3 年中以甲 3 型抗体滴度为主,但 1999 年三种抗体均达到高峰。这提示一般人群对流感流行株有免疫力,预测不会引起流感爆发,除非发生明显流感毒株抗原变异^[4]。

4 分子流行病学研究

扩增甲3毒株 HA₁ 基因 316 片段 (N_t547-863bp), 采用 PCR-RFLP 方法鉴定流感病毒 H₃N₂ 毒株。在美国疾病控制中心 (CDC) 的协助下, 发现我国 (四川、广西、广东、武汉、天津和上海) 1996 年 28 株毒株均为武汉变异株系 (M_woI 酶切成 174bp 和 142bp); 与此比较, 美国同期流行武汉变异株系 (41/50), 其次为阿拉斯加变异株系 (S_{sp}I 酶切成 287bp 和 29bp)。PCR-RFLP 方法是重要的流感毒株分子流行病学筛选实验, 在流感变异研究中具有重要意义^[9]。

采用核苷酸序列分析方法, 率先研究广东地区流感病毒分子变异。甲3型流感病毒自 1968 年在香港出现至 1994 年, HA₁ 基因已有 11.6% 核苷酸和 15.5% 氨基酸发生变异^[10,11]。根据 HA₁ 基因变异分析, 可以归纳为: 流感病毒 H₃N₂ 毒株 HA₁ 基因每年置换 4~6 个核苷酸和 2~3 个氨基酸; 到 20 世纪 90 年代初, 核苷酸置换频率在逐渐减慢, 已从平均 5.91 个/年下降到 4.38 个/年, 氨基酸变异也从平均 4.50 个/年下降到 2.13 个/年。核苷酸置换有六种方式, 其中 A→G 和 C→T 两种置换方式占 73.2% (93/127), 为主要置换方式。由于三联密码的变偶性, 几乎一半的核苷酸 (59/114) 置换以后, 氨基酸未发生变异。HA₁ 基因编码的氨基酸中, 18.3% (60/328) 位点发生变异。苏氨酸 (Thr) 等八种氨基酸最常发生变异, 占变异氨基酸总数的 80.0% (48/60)。

1995 年广东地区毒株 A/GD/01/95 毒株和 A/GD/08/95 毒株与 1994 年 A/GD/28/94 毒株 HA₁ 基因比较, 有 35 个核苷酸发生置换, 置换比例达到 3.55% (35/984)。其中, A/GD/01/95 毒株置换比例为 2.54% (25/984), A/GD/08/95 毒株置换比例为 2.84% (28/984)。1995 年两株病毒之间 18 个核苷酸位点置换一致, 有 6 个氨基酸变异 (另有 2 个氨基酸变异回复到 A/GD/28/94 毒株以前的氨基酸位点)^[12]。与 1995 年毒株比较, 1996 年广东地区 4 株甲3型流感毒株有 32 个核苷酸发生置换, 置换比例达到 3.25% (32/984), 至少有 6 个氨基酸变异^[13]。可以发现, 1995 年和 1996 年广东地区毒株的变异水平远高于以前出现毒株的变异, 这是 1996 年流感爆发的分子结构基础。

5 爆发机制研究

1996 年广东地区绝大多数市、县均出现甲3型

流感局部爆发或小规模流行, 并向周边地区传播。采用血清学抗原分析方法, 比较 1996 年流行毒株 A/GD/1/96 与 1995 年三株来源不同的毒株的抗原性, 结果显示发生了明显的抗原变异。

HA 是流感病毒毒粒的主要糖蛋白, 分子量 75K。HA 基因编码的抗原决定簇有 A、B、C、D 和 E 位点, 各位点之间存在着一定程度的氨基酸区域重叠。Cox 等报告, 变异毒株的条件是至少有 4 个氨基酸在 2 个以上的抗原决定簇位点被置换。候云德报道, 血凝素分子 5 个抗原位点 (A-E) 中至少有三个不同位点发生改变, 才可以引起流感流行。然而, 1995 年广东地区毒株尽管已有 HA 中的 A、B、C 和 D 四位点发生氨基酸改变, 但并未引起流感流行。这可能的原因包括: 毒株的抗原变异幅度尚未达到阈值; 机体免疫力因素的存在。而 1996 年毒株在 1995 年氨基酸变异的基础上, 不仅五个抗原决定簇位点均发生氨基酸变异, 而且每个抗原决定簇的氨基酸位点变异范围增大, 尤其是 A、C、E 抗原位点的改变, 终于引起广东乃至全国的流感流行^[13]。

流感病毒的侵袭力不仅取决于抗原变异, 毒粒对于呼吸道上皮细胞的吸附作用 (即受体结合作用) 也是毒力的重要表现。HA 基因的受体结合位点的氨基酸改变将提高毒粒的感染可能性。一般受体结合位点由第 190、第 194 位点、第 226 位点等氨基酸组成; 与 Lindstrom 等研究结果比较, 此次实验研究揭示 1995 年和 1996 年广东地区毒株尽管也发生受体结合位点的氨基酸改变, 但在此次流感爆发起因中未起主导作用; 而编码抗原的基因变异是导致流感广泛流行的主要原因。人群对新变异株普遍易感, 尤其是青少年和婴幼儿。

6 “相”变异研究

根据实验室病毒分离和鉴定发现, 1996 年流感流行毒株的生物学特性包括: 毒株适应于 MDCK 细胞株生长, 而难以适应鸡胚生长环境; 毒株凝集豚鼠红细胞良好, 而难以凝集鸡红细胞。该现象自 1995 年已在实验中发现, 其分子基础与 HA 基因编码氨基酸的第 145 号和第 193 号位点变异有关。在的来自韶关和湛江市的毒株中, 采用鸡胚分离的毒株均在鸡胚羊膜腔中盲传 3~4 次, 以适应鸡胚生长环境。考虑到这种变异的不稳定性, 要求基层流感监测点在尽快建立细胞培养技术的同时, 努力增加鸡胚羊膜腔接种盲传的次数, 以提高病毒分离阳性率。此外采用 PCR-RFLP 方法, 发现广东地区 1999 年 2 株“D”相毒株 HA₁ 基因被 HindIII 酶切成 270bp

和 700bp, 而 2 株“O”相毒株酶切成 370bp 和 570bp^[7]。

7 防治措施

根据流感流行特点, 广东省疾病预防控制中心提出流感预防以人群集聚区域为重点监测对象; 以老人和儿童为主要保护人群; 以预报和发现流感流行监测为首要任务; 以降低流感超额死亡率为评价预防效果的主要指标^[5]。

开展流行病学、病原学和血清学监测, 进行血清学抗原分析和 PCR-RFLP 方法分析; 加强流感监测和毒株检测, 及时发现新型流感毒株, 如 H₅N₁ 和 H₉N₂ 毒株。根据基因变异引发抗原漂移和抗原变异蓄积的理论, 并根据血清学抗原分析和人群流感抗体水平结果, 预报预测甲 3 型变异株和其它型流感毒株^[1, 4, 5]。

WHO 每年 9 月根据全球流感血清学和抗原分子变异结果, 提出下一年度疫苗候选株流感毒株。但由于流感毒株变异, 疫苗免疫接种一般仅维持 1 年的免疫保护作用。当然, 如果该型或亚型毒株未引起变异, 免疫保护作用将延长。作者鼓励和扩大一般人群接种流感疫苗, 以提高人群基础免疫水平, 尤其是婴幼儿、老人以及青少年^[3, 4]。

8 疫情与预测

2003 年冬, 甲 3 型流感在非洲、欧洲和北美洲流行, 流行毒株主要是 A/Fujian/411/2002-like, 局部地区是 A/Panama/2007/99-like。美国 CDC 截止 12 月 17 日统计发现, 全国流感样病例上升, 36 个州流感爆发, 12 个州局部流行。在 2003 年前 40 周, 全美国分离出 269 株流感毒株, 甲 3 型毒株为 265 株, 甲 1 型和 B 型各 2 株。在 265 株流感毒株中, 203 (77%) 株是 A/Fujian/411/2002-like, 62 (23%) 株是 A/Panama/2007/99-like。美国部分儿童因感染流感而死亡。目前欧美地区的疫情尚未控制。

此外, 香港地区于 2003 年 12 月 9 日发现一例 5 a 儿童, 感染流感 H₉N₂ 毒株; 这是香港地区继 1999 年之后第二次报告流感 H₉N₂ 病例。与此同时, 截止 12 月 16 日韩国 4 个省(市) 9 个农场有禽流感流行, 19 000 只鸡因感染流感 H₅N₁ 毒株而死亡。

由于 A/Fujian/411/2002-like 毒株在 2002 年

首先在我国福建地区出现, 我国部分人群已感染该毒株。时值 2003 年 12 月下旬, 我国北方地区尚无大规模流感疫情。因此, 目前在非洲、欧洲和北美洲流行的甲 3 型流感毒株如果不出现进一步抗原变异, 作者认为 2004 年春、夏在我国南方地区引发大规模流感疫情的可能性不大; 但是, 局部地区学校、幼儿园有可能发生流感流行。尽管如此, 各级卫生行政、疾病控制、临床医疗部门及时地采取多种预防流感措施仍是十分必要的。

【参考文献】

- [1] 黄平, 陈伟师, 倪汉忠, 等. 广东省 1988~1998 年流感流行与监测分析 [J]. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(2): 15-17.
- [2] 黄平, 沈桂章, 陈伟师, 等. 流感病毒变异起源 [J]. 广东卫生防疫, 1995, 21(1): 78-79.
- [3] 黄平, 林锦炎, 倪汉忠, 等. 广东地区 1998~2001 年流感分析 [J]. 华南预防医学杂志, 2002, 28(3): 21-23.
- [4] Huang P, Ni HZ, Zhou HQ, et al. Analysis of the 1991~2000 influenza epidemic in Guangdong Province, China [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2001, 32(4): 59-62.
- [5] 黄平, 沈桂章, 倪汉忠, 等. 广东省 1996 年流感流行分析 [J]. 疾病监测, 1997, 12(6): 205-207.
- [6] 周惠琼, 江立敏, 张巧云, 等. 不同抗原性甲 3(H₅N₂) 亚型流感病毒的鉴定及分子生物学研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(5): 552-555.
- [7] 彭国文, 倪汉忠, 刘少梅, 等. 广东省 1998~2000 年人群禽流感病原学监测 [J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(2): 154-155.
- [8] 倪汉忠, 沈桂章, 周惠琼, 等. 1996 年广东省流感实验监测 [J]. 广东卫生防疫, 1997, 23(2): 1-3.
- [9] 黄平, Bender CA, 沈桂章, 等. 用 PCR-RFLP 方法分析流感 H₅N₂ 亚型毒株 [J]. 疾病控制杂志, 1997, 1(3): 176-178.
- [10] 黄平, 倪汉忠, 沈桂章, 等. 流感病毒 A/Guangdong/28/94 HA1 基因序列分析 [J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1996, 16(2): 133-134.
- [11] 黄平, 蔡初的, 郝瑞丰, 等. 流感病毒 H₅N₂ 亚型 HA1 基因变异的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(6): 3-7.
- [12] 黄平, 沈桂章, 倪汉忠. 1995 年广东地区流感病毒 H₅N₂ 亚型 HA1 基因变异分析 [A]. 广东省微生物学、免疫学和生物工程学学术交流会议论文集 [C]. 湛江, 1997.
- [13] 黄平, 沈桂章, 倪汉忠, 等. 广东地区 1996 年流感爆发的分子变异基础 [J]. 中国病毒学, 2001, 16(1): 1-5.

(收稿日期 2003-07-23)

(方益荣校)