

# 中国 2000 ~ 2001 年流行性感冒流行概况

张焯 李梓 郭俊峰 王敏 温乐英 郭元吉

**【摘要】** 目的 了解中国 2000~2001 年流行性感冒(流感)流行及抗原性变异情况。方法 鸡胚传代病毒用于抗原性分析,病毒液提取 RNA 进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),扩增产物纯化后测序。然后用 MegAlign(Version 1.03)和 Editseq(Version 3.69)软件进行基因种系发生树分析。结果 2001 年流行的 H1N1 亚型病毒血凝素蛋白重链(HA1)区氨基酸序列与 A/上海/7/99(H1N1)相比,在抗原决定簇 D 区的第 190 位发生了氨基酸替换,基因种系发生树表明 2001 年的 H1N1 亚型流感病毒存在基因特性不同的两系病毒株。国内人群中仍然同时流行着两种抗原性明显不同的 B 型流感病毒(Yamagata 系和 Victoria 系),Yamagata 系病毒占大多数,Victoria 系的 HA1 区基因与 B/山东/7/97 毒株相比,其 197 和 199 位氨基酸发生了替换。B 型的基因种系发生树也证实 Victoria 系病毒株的抗原性改变。2000 年分离的 H3N2 亚型流感病毒的 HA1 区氨基酸序列与 A/悉尼/5/97(H3N2)间有 7~8 个氨基酸的差异,2001 年分离的 H3N2 病毒株与 2000 年的病毒株相比,又在 83、186、202、222 位发生了氨基酸替换,表明 H3N2 亚型病毒株间的抗原性发生了较明显的变异。结论 2000~2001 年中国流感的流行情况较为平静,H3N2 亚型的抗原性发生了变异,H1N1 亚型和 B 型病毒的抗原性虽没发生明显的变异,但它们均同时流行着两系抗原性不同的毒株。

**【关键词】** 流感病毒;抗原性变异;流行病学监测

**Influenza activity in China from 2000 to 2001** ZHANG Ye, LI Zi, GUO Jun-feng, WANG Min, WEN Le-ying, GUO Yuan-ji. Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

**【Abstract】 Objective** To understand the epidemics and antigenic drift of influenza viruses in China from 2000 to 2001. **Methods** The viruses were grown in embryonated hen eggs with 9-10 days old. The egg allantoic fluids with influenza viruses were used. Virion RNA was transcribed into cDNA by reverse transcriptase while cDNA amplified by PCR. Products of PCR were purified. RNA sequence analysis was then performed. Finally, phylogenetic analysis of the sequencing data was performed with MegAlign (Version 1.03) and Editseq (Version 3.69) software. **Results** Data from comparison of amino acid sequence on HA1 domain of HA protein molecule between H1N1 viruses isolated in 2001 and A/Shanghai/7/99 (H1N1) strain indicated that there was only one difference of amino acid located at 190 position (antigenic determinant D). However, phylogenetic analysis showed that there were two distinguishable genetically lineages of H1N1 viruses co-circulating in men in China in 2001. Two antigenically distinct genetic lineages of influenza B viruses were still existing in men in China. Most of influenza B viruses were Yamagata-like strain and there were two different amino acid sequences located at 197 and 199 position on HA1 domain of HA protein molecule, between Victoria-like virus isolated and B/Shandong/7/97 strain. When comparing amino acid sequences on HA1 protein domain of H3N2 viruses isolated in 2000 with those of A/Sydney/5/97 (H3N2) virus, it was revealed that there were 7-8 differences of amino acid sequences between them. However, there were four differences related to amino acid sequences on HA1 protein domain between H3N2 viruses isolated in 2000 and in 2001. These results were further demonstrated by analysis of polygenic tree. **Conclusions** Influenza was not prevalent in China from 2000 to 2001. The antigenic drifts of H3N2 and B/Victoria-like viruses occurred. Two antigenically distinct genetic lineages of influenza B viruses were still co-circulating in men in China. Two genetically distinct lineages of influenza A (H1N1) virus were also co-circulating in men in China.

**【Key words】** Influenza viruses; Antigen switching; Epidemiological monitoring

每年全球约有 10% 的人口即 6 亿人患流行性

感冒(流感)<sup>[1]</sup>。我国被国际上公认为是流感的多发地,自 1957 年以来 3 次流感大流行均首发于我国,且在香港特区和内地分别发现了禽 H5N1 和 H9N2 亚型毒株能感染人<sup>[2]</sup>。我国的流感流行情况一直受

世界瞩目,因此 WHO 将我国列为国际流感监测的前哨。为了更好地监测流感动态,自 2000 年开始我国与 WHO 合作,在全国建立了 23 个流感监测点,监测我国流感的流行情况,并及时发现流感病毒的变异,为流感的预测及流感疫苗生产提供有利的科学依据。这项工作已于 2000 年正式开始启动。国家流感中心负责对各个监测点送检的流感病毒进行最终的鉴定和抗原性分析,推荐我国流感病毒流行株及疫苗株等工作。2000 年我们对 18 个监测点送检的 467 份流感病毒标本进行鉴定分型,并且参与了 2000 年冬季至 2001 年春季北京流感的流行季节采样分离工作。2001 年全国 23 个流感监测点全年共收到病毒标本 852 份,2001 年 11 月至 2002 年 2 月份国家流感中心在北京某医院采样 96 份,分离出阳性标本 36 份。

### 材料与方法

1. 毒株 流感病毒由各个监测点所提供和国家流感中心从流感样患者分离出。经 9~10 日龄鸡胚传代,所收获的鸡胚尿囊液作为实验用抗原。用做测定血凝素重链(HA1)区序列的病毒有:A/上海/7/1999(H1N1)、A/武汉/421/2001(H1N1)、A/甘肃/154/2001(H1N1)、A/CNIC/143/2001(H1N1)、A/深圳/1/1999(H3N2)、A/福建/151/2000(H3N2)、A/哈尔滨/180/2001(H3N2)、A/贵州/112/2001(H3N2)、A/广州/1237/2001(H3N2)、A/天津/198/2001(H3N2)、A/北京/125/2001(H3N2)、A/武汉/431/2001(H3N2)、A/CNIC/123/2001(H3N2)、B/浙江/2/2001、B/四川/63/2001。

#### 2. 流感病毒鉴定及抗原性分析的方法:

(1) 流感病毒鉴定:采用红细胞凝集抑制试验,方法详见参考文献 3]。

(2) 抗原性分析:采用交叉红细胞凝集抑制试验,方法见参考文献 3]。

(3) 病毒 RNA 的提取和逆转录 PCR(RT-PCR):用新鲜的病毒液按德国 Qiagen 公司的 Rneasy Mini Kit 中的 Rneasy Mini Kit Handbook 所提供的方法提取病毒 RNA。逆转录及 PCR 方法见参考文献 4]。扩增产物送大连宝生生物公司测序。

(4) 基因种系发生树:采用 DNASTAR MegAlign 软件绘制基因种系发生树。

### 结 果

#### 一、流行情况

2000 年是我国与 WHO 流感监测协作方案的启动年,也是我国流感活动处于较平静的一年。全年仅有四川、宁夏、辽宁、天津、广东、湖北武汉、福建、重庆和新疆等地报道有流感局部爆发,未见有流行的报道。2000 年 1 月 6~11 日四川省大竹县城区西中学发生流感爆发,全校 548 名学生中,流感样病人 75 例,发病率达 13.7%,其中 64 例住院治疗,11 例留校隔离。3~4 月初广东省的广州市、深圳市、韶关市和四川省等地均发生流感样门诊病人明显增多的现象。4 月 12~17 日四川省简阳市卫生学校共发生流感样病人 267 例,发病率达 11.6%,遗憾的是,当时未做病毒的分离工作。进入 5 月份以来,我国南方流感活动有所加强。广东省、湖北省武汉市和福建省均有流感局部爆发。上半年流感的爆发主要是由 B 型流感病毒引起,5 月份以后的爆发主要是 H1N1 亚型,其次为 H3N2 亚型毒株所造成。而香港特区流感的爆发是由 H3N2 或 H1N1 亚型毒株造成。2000 年春季,广东地区所发生流感病例也主要是由 H3N2 毒株所引起。

2000 年国家流感中心共收到 467 份送检标本,其中阳性标本 296 株,H1N1 亚型 106 株,H3N2 亚型 59 株,B 型 131 株。由图 1 可见,2000 年的优势株是 B 型流感病毒株,其次为 H1N1 亚型流感病毒株。从全年流感病毒分离的情况看,上半年 B 型株占主流,而下半年 H1N1 亚型流感病毒占优势。而这种 H1N1 亚型毒株占主要优势为 1990 年以来的首次。

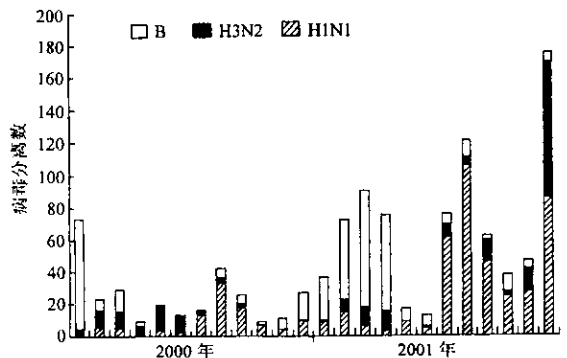


图1 2000~2001年国家流感中心分离流感病毒株的月份分布

2001 年我国全年的流感活动同样较为平静,没有局部爆发的报道,由图 2 可见随着门诊流感样病例的增加,流感病毒的分离率也逐渐增加,分别在 7~10 周、31~34 周和 49~52 周出现 3 个流感样病例峰。2001 年我们共收到送检标本 852 份,其中阳

性标本 823 份。由图 1 可见,我国 2001 年的流感优势株为 B 型和 H1N1 亚型病毒株,上半年优势株是 B 型病毒株,7~9 月主要为 H1N1 亚型病毒。全年 H3N2 亚型处于弱势,直到年末其活动才逐步加强,并逐渐成为优势株。

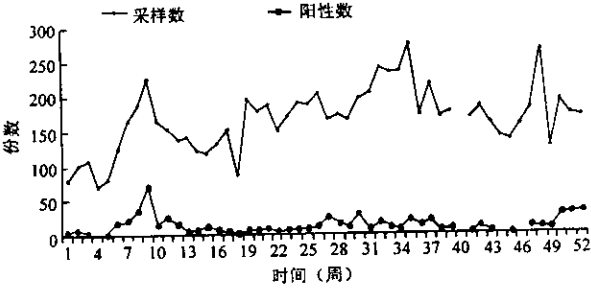


图2 2001 年国家流感中心采样分离流感病毒的时间分布

### 二、流感病毒 HA1 区核苷酸及氨基酸比较

我们测定了 2000~2001 年间分离的 H1N1、H3N2、B 型流感病毒共 14 株的 HA1 区核苷酸序列并推导出其氨基酸序列,同时从 GenBank 上摘录有关流感病毒 HA1 区的序列,与之相比较,序列号为 AF008722、AF180584、AB027401、AF100349、AF050063、AF299384、AF299382、M58428、X53039,应用 DNASTAR MegAlign 软件绘制基因种系发生树。

我们测定的 H3N2 亚型流感病毒株的 HA1 区蛋白质氨基酸序列均含 328 个氨基酸。如表 1 所见,它们与 A/悉尼/5/97(H3N2)及 A/武汉/359/95(H3N2)相比,核苷酸发生了突变并导致了氨基酸的替换。2000 年的病毒株发生了氨基酸替换的位点有 50、144、172、192、194、225 和 226。其中 144 位于抗原决定簇 A 区,192 位于抗原决定簇 B 区,194 位于 RBS 的后壁,225 和 226 位于 RBS 的左侧壁。2001 年末分离的 A<sub>3</sub> 亚型病毒与 2000 年的病毒株相比在 83、186、202、222 位存在着氨基酸的差异。83 位于抗原决定簇 E 区。2000 年以后分离的 H3N2 流感病毒株与 A/悉尼/5/97(H3N2)相比均在 144 位插入一个糖基化位点。H3N2 亚型毒株的基因种系发生树见图 3,可见,2000~2001 年 H3N2 亚型流感病毒的抗原性及基因特性发生了变异,其基因特性已明显不同于 A/悉尼/5/97(H3N2)病毒。

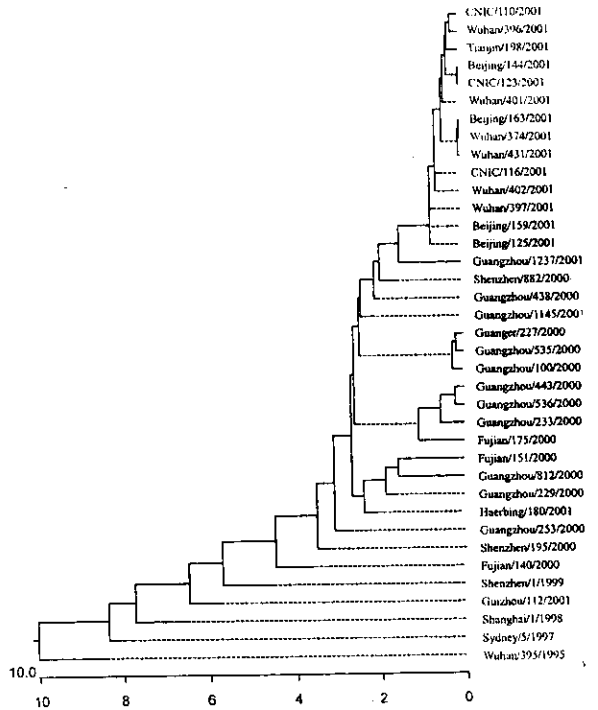


图3 H3N2 亚型流感病毒种系发生树

2001 年分离的 H1N1 亚型流感病毒的 HA1 区蛋白氨基酸序列也含有 328 个氨基酸。它们与 1999~2000 年的流行株 A/上海/7/99(H1N1)相比,在 34、151、165、182、190、221 位点发生了改变,其中第 190 位点位于抗原决定簇的 D 区。H1N1 亚型流感病毒的种系发生树如图 4,2001 年的 H1N1 亚型流感病毒的基因特性已不同于 A/上海/7/99(H1N1),2001 年的 H1N1 流感病毒株间存在着基因特性不同的两个系列。

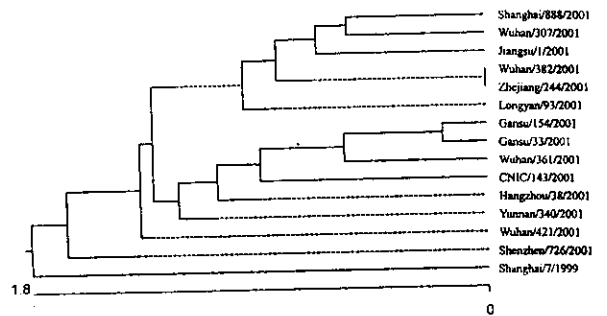


图4 H1N1 亚型流感病毒种系发生树

我们测定了 2001 年分离的 Victoria 系 B 型流感病毒株的核苷酸序列,并推导其氨基酸序列,它们与 B/Victoria/2/87 相比共有 14 个氨基酸位点发生改变,其中第 197 和 199 位的氨基酸替换发生在抗原决定簇。比较 B 型流感病毒的种系发生树,如图

表1 H3N2 亚型流感病毒核苷酸和氨基酸的同源性

病 毒	核苷酸替换数		氨基酸替换数		氨基酸序列同源性(%)	
	A/悉尼/5/97	A/武汉/359/95	A/悉尼/5/97	A/武汉/359/95	A/悉尼/5/97	A/武汉/359/95
A/福建/151/2000	16	26	7	16	97.87	95.12
A/哈尔滨/180/2001	14	25	8	17	97.56	94.82
A/贵州/112/2001	9	17	4	13	98.78	96.04
A/北京/125/2001	20	31	14	24	95.73	92.68
A/CNIC/123/2001	20	31	13	23	96.04	92.99
A/广州/1237/2001	18	29	15	28	95.43	91.46
A/武汉/431/2001	19	30	12	22	96.34	93.29
A/天津/198/2001	19	30	13	23	96.04	92.99

5,可以看出,我国 2000~2001 年的 B 型流感病毒株仍存在两个抗原性明显不同的毒株系 Yamagata 系和 Victoria 系,它们的基因特同性发生了改变。

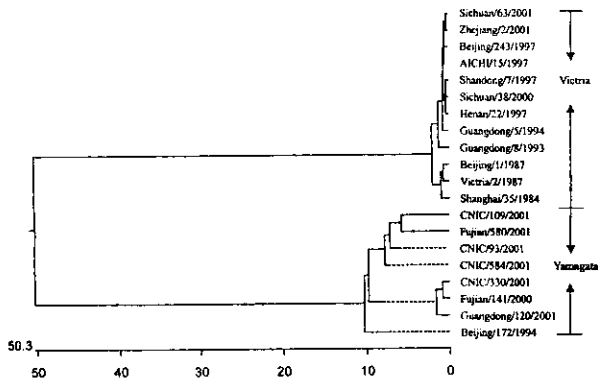


图5 B 型流感病毒种系发生树

### 三、流感病毒抗原性变异情况

2000 年及 2001 年我们共进行了 4 次抗原性分析,将抗原性分析的结果综和起来比较,结果表明,我国内地无论 1998 年、1999 年、2000 年及 2001 年所分离到的 H3N2 亚型病毒株,其抗原性与 A/悉尼/5/97 (H3N2) 毒株均存在有不同程度的差异。2001 年的病毒株与 2000 年的相比其抗原性也发生了变异。

2000~2001 年 H1N1 亚型毒株的抗原性不同于 A/京防/262/95 (H1N1) 毒株,而类似于 A/沪防/7/97 (H1N1) 病毒。2001 年年末我国分离的 H1N1 亚型流感病毒的抗原性与 A/沪防/7/97 (H1N1) 病毒也有所不同。

在我国的人群中同时流行着抗原性明显不同的两个种系的 B 型流感病毒,分别为 Yamagata 系 (B/深圳/423/99 和 B/上海/20/2000) 和 Victoria 系 (B/鲁防/7/97 和 B/浙江/2/2001)。在我国分离的 B 型病毒株绝大多数为 Yamagata 系。Victoria 系 B 型流感病毒只是在我国的四川、云南、贵州、浙江等地分离到。

### 讨 论

2000 年和 2001 年我国的流感活动较为平静,全国范围内没有发生流感的流行,只在一些省份有小范围的爆发。我国流感的流行有一定的地域和时间的特点,北方流行多发冬春季,南方则有冬季和夏季两个流行峰。这些特点使我国的流感活动有两个活动高峰,一个是冬季高峰,一个是夏季高峰。2000 年及 2001 年我国的流感病毒的分离情况也体现了这一特征。

总的来说,2000~2001 年我国的流感病毒的抗原性未发生明显的变异,特别是 H1N1 亚型和 B 型流感病毒的抗原性基本上与前一年的流行株相似。有研究表明 H1N1 亚型流感病毒间,根据其基因特点可分为两个系<sup>[5]</sup>,我们比较的 2001 年的 H1N1 亚型的病毒株也存在两个系。然而,它们通过血清学测定无法显示出,只有通过基因种系发生树分析方可显示出。H3N2 亚型流感病毒株的抗原性发生了比较明显的变异。有人认为流感病毒基因的突变,导致氨基酸序列替换至少 4 个或以上同时分布在两个或以上的抗原决定簇区,才具有流行病学上的意义<sup>[6,7]</sup>。根据我们的实验结果,可以认为 H3N2 亚型流感病毒发生了具有流行病学意义的抗原性变异。奇怪的是, H3N2 亚型流感病毒抗原性发生了变异,但从这两年的流行情况来看它并没有引起流感的流行,这是否能说明是由于前一个流行季节均由 H3N2 病毒引起,人群中对 H3N2 的抗体水平还有一定的保护作用,但随着人群抗体水平的降低才会引起 H3N2 的流行。我国的 B 型流感病毒一直存在两个抗原性不同种系,Victoria 系流感病毒自 1999 年以后在西方国家一直未分离到,直至 2001 年 3 月后才重新分离获得,而在此期间我国一直有 Victoria 系的流行,且我国的 Victoria 系流感病毒的抗原性已发生了

变异。流感病毒通过其抗原性不断的发生变异,在人群中不断的造成流行,给人们带来诸多危害,我们密切监测流感的流行及抗原性变异情况,以便能科学地预测流感流行和为流感疫苗的生产提供有力的科学依据。

(除本实验室测定的病毒 HA1 区序列和在 Genebank 摘录外,参与 HA1 基因比较的病毒序列是由美国 CDC 和日本的 NIID 提供的,在此表示感谢)

### 参 考 文 献

- 1 王君,戴富强,刘敏.流行性感冒疫苗在小学生中临床效果及经济效益评估.中华流行病学杂志,2001,22:477.
- 2 郭元吉,李建国,程晓雯,等.禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发

- 现.中华实验和临床病毒学杂志,1999,13:105-108.
- 3 郭元吉,程晓雯.流行性感冒病毒及其实验技术.北京:中国三峡出版社,1997.100-102.
- 4 Saiki RK, Delfand DH, Stattels A, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239:487-491.
- 5 郭元吉,董婕,王敏,等.甲 I(H1N1)亚型流感病毒相变异分子生物学基础的研究.中华实验和临床病毒学杂志,2000,14:9-13.
- 6 Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Annu Rev Immunol, 1990, 8:737-771.
- 7 Isabelle H, Yan L, Michael B, et al. Molecular evolution of influenza A/H3N2 viruses in the provinces of Quebec (Canada) during the 1997-2000 period. Virus Research, 2001, 77:89-96.

(收稿日期 2002-08-27)

(本文编辑:张林东)

## · 网络信息 ·

# 如何在因特网上查找流行病学信息

## I. 事实数据库与应用软件

黄亚明 刘树春 郭继军

要认识并利用因特网上流行病学信息资源,必须充分重视美国疾病预防控制中心(CDC)、WHO 等世界权威机构网站上的相关数据库及应用软件,同时关注一些大型相关网站及专业学术机构网站上的信息。值得注意的是,由于流行病学与基础和临床各学科都存在密切关系,所以生物医学各学科专业网站上也分布大量流行病学信息。

MMWR(Morbidity and Mortality Weekly Report)(<http://www.cdc.gov/mmwr/>)是美国 CDC 编辑出版的反映各类疾病发病率与死亡率的快报性出版物,并以数据为基础建立了数据库,用户可以利用 MMWR 数据库检索一些重要疾病的发病率或死亡率信息。MMWR 数据集包含了 1982 年 2 月 12 日以来的 MMWR 杂志及其增刊以及 CDC 出版的疾病监测概要、建议标准、报告等出版物上发表的所有论文全文。1993 年 9 月以后出版的 MMWR 论文包含所有图表。用户可通过论文中包含的特定词汇或短语对论文进行检索、阅读、下载文献全文,也可以直接检索浏览最近出版的周报文献。

点击网页左侧栏目中的“Diseases Trends”→“Search Morbidity Tables”或“Search Mortality Tables”,即可进入 MMWR 的发病率或死亡率报表检索网页。用户可对 1996 年以来特定星期美国 50 个州的发病率或 122 个城市的死亡率报表进行检索。点击“Diseases Trends”→“MMWR Summary of Notifiable Diseases”可进入 MMWR 须申报疾病总结报告网页(<http://www.cdc.gov/mmwr/summary.html>),

可免费阅读或下载 1993 年以来每年最后一周出版的 MMWR 杂志全文,即美国须申报疾病的各年度发病率、死亡率总结报告全文。全文以 PDF 格式提供下载服务。

### CDC Wonder

CDC Wonder(<http://wonder.cdc.gov/>)是 CDC 在网上建立的方便用户利用的数据检索系统。该系统覆盖了 CDC 网站可提供数据与统计信息服务的全部内容。通过此系统,用户可检索 MMWR 及包括科研数据、调查监督数据、卫生统计数据 and 实验室信息等 CDC 出版的各类报告、预防准则及公共卫生数据。数据集包括死亡率、癌症发病率、医院门诊量、艾滋病、行为危险因素、糖尿病等。可立即对检索获得的数据进行总结与分析。

新用户和临时用户可在其首页上通过点击“Anonymous User”按钮进入系统。经常使用该系统的用户需免费注册成为该系统的会员,并被分配给用户代码和口令。利用登录用户代码和口令进入系统,可享受更多的用户服务。

登录进入 CDC Wonder 后,页面显示出一个功能列表:“Summary”向用户详尽介绍在此检索系统中可用的数据集、报告及准则等内容;“Previous queries”允许用户对以前应用过的检索策略进行修改并进一步执行检索。“Previous results”可以使用户浏览以前执行检索的检索结果。而“Get Info”则可进入统计数据、报告及准则的检索,其页面上列出的供选择的数据集包括慢性病预防档案、人口普查数据、国际疾病分类第 9 修订版疾病分类代码搜索器、伤害死亡率数据、死亡主要原因、MMWR、死亡率、出生率、CDC 国家职业安全与卫生研究所死亡率数据、性传播疾病死亡率、性传播疾病报告等。点击数据集名称即可进入相应的检索界面。