

浙江省 1998 年 H3N2 流感流行的溯源研究

冯燕 徐昌平 黄巍 钟淑玲 严菊英 莫世华 卢亦愚

【摘要】 目的 对 1998 年浙江省的 H3N2 流感流行进行溯源研究。方法 采用 RT-PCR 扩增浙江省 1998 年 3 株 H3N2 流感流行代表株的全基因组序列,并与 GenBank 上 1995—1998 年世界其他地区 H3N2 流感流行株进行比较;同时,采用交叉血凝抑制实验,计算各毒株间的抗原比。结果 HA 基因进化树表明,1998 年浙江省 H3N2 优势流行株 A/Zhejiang/11/98、A/Zhejiang/18/98 与 1995—1996 年世界各地以及 1997 年我国大陆的 H3N2 流行株间存在显著差异,在进化树上虽与 A/Sydney/5/97 同属一簇,但和美国纽约以及中国香港 1997 年后期流行株更为接近。在 HA1、NA 和 MP 基因上,A/Zhejiang/18/98 与香港 1997 年后期流行株同源性最高,而在 PA、HA 和 NS 基因上,与纽约流行株的遗传距离也小于 A/Sydney/5/97。A/Zhejiang/18/98 与香港或纽约株在 HA1 区仅存在 1~3 个位点的氨基酸残基不同,而与 A/Sydney/5/97 存在 7 个位点的氨基酸残基差异,其中 3 个位点于抗原决定簇区。各毒株间的交叉血凝抑制实验表明 A/Zhejiang/18/98 与 A/Sydney/5/97 的抗原比已达 2.0,提示二者在抗原性上存在一定差异。此外,1997—1998 年 H3N2 各地流感流行的起始时间序列,也显示了该次流感传播的可能途径。结论 浙江省 1998 年 H3N2 流感的流行很可能是由 1997 年底 H3N2 新型流感变异株经纽约和香港输入中国大陆所导致。

【关键词】 H3N2 流感病毒;遗传距离;抗原比;溯源分析

Traceability of the A/H3N2 virus borne influenza pandemic in Zhejiang province, 1998 FENG Yan¹, XU Chang-ping¹, HUANG Wei², ZHONG Shu-ling¹, YAN Ju-ying¹, MO Shi-hua¹, LU Yi-yu¹. 1 *Virus Institute of Zhejiang Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China;* 2 *Department of Lab Medicine of Wenzhou Medical College*
Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Z303909)

【Abstract】 Objective To trace back to the influenza pandemic caused by A/H3N2 virus happened in Zhejiang province, 1998. Methods The whole genome of three isolates related to Zhejiang influenza virus was amplified through RT-PCR, and the identified sequences were aligned with the sequences downloaded from GenBank of the H3N2 strains which were circulating in other regions during 1995 to 1998. The crossing HAI titers of the reference strains were measured by HAI test and antigenic ratios were calculated. Results The Phylogenetic tree, constructed based on HA sequence showed that the dominant strains A/Zhejiang/11/98 and A/Zhejiang/18/98 were significant different from the isolates circulated in other regions during 1995 to 1996 and the strains isolated in the mainland of China, in 1997. Although the A/Zhejiang/11/98 and A/Zhejiang/18/98 strains were distributed in the same cluster with A/Sydney/5/97, the two strains were closer to the epidemic strains isolated in Hong Kong and New York in the later part of 1997. Based on HA1, NA and MP genes, A/Zhejiang/18/98 seemed to be the closest one to the Hong Kong epidemic strains, and the genetic distances between A/Zhejiang/18/98 and New York strains were shorter than that with A/Sydney/5/97 based on PA, HA and NS genes. There were only 1-3 amino acid differences between A/Zhejiang/18/98 and Hong Kong or New York strains, whereas 7 amino acid differences with A/Sydney/5/97, in which three were located in the antigenic determinant regions. Data from the crossing HAI test showed that the antigenic ratio between A/Zhejiang/18/98 and A/Sydney/5/97 had reached 2.0, indicating the antigenic difference to a certain extent. Additionally, the onset of the influenza epidemic during 1997 to 1998 also suggested the possible route of transmission related to this H3N2 virus. Conclusion The influenza pandemic occurred in Zhejiang province in 1998 was possibly caused by the importation of a newly identified H3N2 influenza variant via Hong Kong and New York in late 1997.

【Key words】 Influenza virus A/H3N2; Genetic distance; Antigenic ratio; Traceability

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.020

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(Z303909)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心病毒所 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室(冯燕、徐昌平、钟淑玲、严菊英、莫世华、卢亦愚);温州医学院检验医学系(黄巍)

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

流感已对全球经济和公共卫生构成了严重的威胁^[1]。每次流感大流行都是因流感病毒变异所形成的新型毒株从某一地区向世界范围内传播扩散的结果。1998 年由 H3N2 流感病毒引起的流感流行是近二十年来在浙江省及我国发生最严重的一次流感流行。引起该次流行的流感究竟来源何地,是由本地流行株的抗原变异造成还是由其他国家或地区输入所导致,尚不清楚。为此,本研究对浙江省 1998 年流感流行期间保存的 H3N2 流感代表株,进行了抗原性与全基因组序列分析,并与 1995—1998 年全球各地 H3N2 流感流行株以及当时的流感流行资料进行比较与分析,从抗原性与分子水平对 1998 年浙江省的 H3N2 流感流行进行溯源。

材料与方法

1. 材料:流感病毒代表株 A/Zhejiang/10/98, A/Zhejiang/11/98 以及 A/Zhejiang/18/98 为 1998 年浙江省 H3N2 流感流行期间本实验室从患者含漱液样本中分离得到,并经过血凝抑制实验证实^[2]。

2. 方法:

(1) 病毒 RNA 提取:采用德国 Qiagen 公司 RNeasy Mini 试剂盒,按试剂盒说明书对细胞阳性分离物提取病毒 RNA。

(2) 病毒基因组全序列的扩增:采用日本 TaKaRa 公司一步法 RT-PCR 试剂盒对病毒株 8 个基因组片段进行 RT-PCR 扩增,扩增引物及方法见参考文献^[3]。

(3) 序列测定与数据分析:扩增产物由南京金思特生物技术公司进行序列测定,获得的序列采用 DNAMAN 生物学软件拼接,并进行全序列比对;氨基酸残基推导以及同源性比对采用 BioEdit Sequence Alignment Editor Software 进行,系统树的构建以及遗传距离分析由 Mega3.1 软件进行。全球其他地区 H3N2 流行株序列从 GenBank 下载。

(4) 抗原性分析:A/Zhejiang/10/98 和 A/Zhejiang/11/98 免疫血清按常规方法免疫鸡制备得到,采用常量法交叉血凝抑制实验测定各免疫血清对上述毒株的血凝抑制抗体,计算抗原比^[4]。H3N2 代表株 A/Wuhan/359/95、A/Sydney/5/97 毒株与免疫血清由 WHO 提供。

结 果

1. 流行株 HA 基因系统进化树分析:对浙江省 1998 年流感流行代表株 A/Zhejiang/10/98, A/Zhejiang/11/98 和 A/Zhejiang/18/98 血凝素基因的 HA1 区进行序列测定,并与 1995—1998 年全球各地 H3N2 流感流行株的 HA1 区序列构建系统进化树,见图 1。

在 HA1 区的系统进化树上,1998 年浙江省流感优势流行株 A/Zhejiang/11/98 和 A/Zhejiang/18/98 与 1995—1996 年世界各地流行株、1997 年我国大陆流行株,以及 A/Wuhan/359/95 位于不同分支,存在显著差异;由图 1 可以看出,两优势株与香港 1997 年后期流行株 A/Hong Kong/CUHK41507/1997 等最为接近,与纽约 1997 年流行株也位于同一簇,但与 A/Sydney/5/97 间存在一定距离。非优势株 A/Zhejiang/10/98 与 A/Wuhan/359/95 位于同一分支。

2. 流行株基因组 8 个片段遗传距离分析:选择香港、纽约 1997 年流行株, A/Wuhan/359/95 和 A/Sydney/5/97 株,以及浙江非优势株 A/Zhejiang/10/98,分别与 1998 年浙江优势株 A/Zhejiang/18/98 进行基因组 8 个片段的遗传距离分析,见表 1。在 PA、HA1 和 NS 基因上, A/Zhejiang/18/98 与纽约的遗传距离均小于 A/Sydney/5/97;在 HA1、NA 和 MP 基因上, A/Zhejiang/18/98 与 A/Hong Kong/CUHK41507/1997 遗传距离最小,分别为 0.003、0.004 和 0

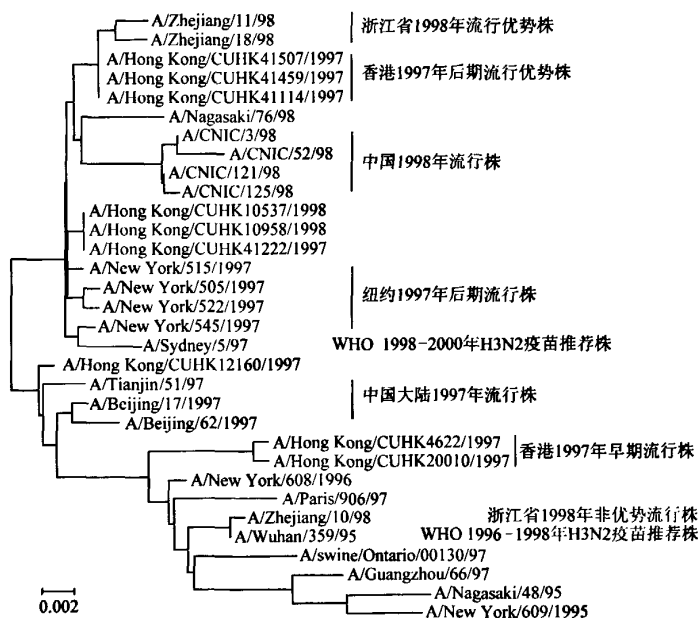


图 1 浙江省 1998 年 H3N2 流感流行株 HA1 区系统进化树分析

(GenBank 上 1997 年香港流行株仅有 HA、NA 和 MP 基因序列)。

表 1 浙江省 1998 年流感流行株 A/Zhejiang/18/98 与其他地区毒株各基因片段的遗传距离比较

基因片段	A/Wuhan/359/95	A/Sydney/5/97	A/New York/545/97	A/Hong Kong/41507/1997	A/Zhejiang/10/98
PB2	-	0.004	0.005	-	0.011
PB1	-	0.007	0.008	-	0.015
PA	-	0.004	0.003	-	0.016
HA1	0.023	0.010	0.007	0.003	0.024
NP	-	0.002	0.006	-	-
NA	0.018	0.005	0.005	0.004	0.015
MP	0.027	0.001	0.001	0	0.017
NS	-	0.005	0.004	-	0.006

3. 流行株 HA1 区氨基酸残基变异分析: 以 A/Sydney/5/97 为参考株, 分析香港、纽约 1997 年流行株 (A/Hong Kong/CUHK41507/1997、A/New York/545/97), 以及浙江优势流行株 A/Zhejiang/18/98 在 HA1 区域的氨基酸残基变异, 见表 2。与 A/Sydney/5/97 比较, 选择的 3 株流行株在 HA1 区域共存在 7 个位点的氨基酸残基变异。A/Zhejiang/18/98 与 A/Hong Kong/41507/1997 仅存在第 31 位上的氨基酸残基差异 (非抗原决定簇), 与 A/New York/545/97 存在 3 个位点的差异 (其中仅 1 个位于抗原决定簇), 而与 A/Sydney/5/97 存在 7 个位点的氨基酸残基差异, 其中 4 个 (第 137、142、194 和 226 位) 位于抗原决定簇上。

表 2 浙江省 1998 年流感流行株与其他地区毒株 HA1 区的氨基酸残基差异

病毒株	HA1 结构域						
	3	31	137	142	194	226	233
A/Sydney/5/97	I	N	Y	S	I	I	H
A/New York/545/1997	-	-	-	R	L	V	Y
A/Hong Kong/41507/1997	L	-	F	R	L	V	Y
A/Zhejiang/18/98	L	S	F	R	L	V	Y

4. 不同毒株间的抗原性比较: 浙江省流行株 A/Zhejiang/10/98、A/Zhejiang/18/98 与疫苗株 A/Wuhan/359/95 和 A/Sydney/5/97 的抗原性比较结果见表 3。A/Zhejiang/10/98 与 A/Wuhan/359/95 为同一类毒株, 抗原比为 0.7, 而与 A/Sydney/5/97 抗原比为 22.6; A/Zhejiang/18/98 与 A/Wuhan/359/95 和 A/Sydney/5/97 抗原比分别为 45.3 和 2.0。A/Hawaii 和 A/Canada 为北美 H3N2 代表株, 由于缺少资料, 无法计算抗原比, 但根据两毒株对 A/Sydney/5/97 的血凝抑制实验抗体水平可以看出, 1997 年北美 H3N2 流感流行株抗原性与 A/Zhejiang/18/98 相似。

5. 中国及美国 1997—1998 年 H3N2 流感流行起始时间: 据 WHO 1997—1998 年周报资料, 1997 年 9

表 3 浙江省 1998 年 H3N2 流感流行株与疫苗株的抗原性比较

抗原	抗体滴度 (1:)			
	A/Wuhan/359/95	A/Sydney/5/97	A/Zhejiang/10/98	A/Zhejiang/18/98
A/Wuhan/359/95	2560	160	2560	20
A/Sydney/5/97	160	5120	160	1280
A/Zhejiang/10/98	5120	160	2560	160
A/Zhejiang/18/98	160	2560	320	2560
A/Hawaii/05/97 ^[9]	80	2560	-	-
A/Canada/11/97 ^[9]	80	1280	-	-

注: A/Hawaii/05/97 与 A/Canada/11/97 血凝抑制抗体滴度参见文献 [5]

月美国即出现 2 例 H3N2 流感^[6], 至 12 月初 27 个州都报告出现流感样病例, 且实验室确诊 97% 为 H3N2 型流感^[7], 1998 年 1 月中旬至 2 月初, 该次流感流行达到高峰^[8]。我国香港在 1997 年 12 月出现 H3N2 流感病例, 并逐渐增加, 其后持续流行^[9]; 广州流感流行稍晚于香港, 起始于 1998 年 1 月, 高峰出现在 3—4 月^[10]; 而浙江省 1998 年流感起始于 2 月, 3—4 月病例急剧增加并达到高峰, 见表 4。

表 4 中国与美国 1997—1998 年流感流行起始时间

地区	1997 年			1998 年				
	9 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月
美国 ^[7-9]	起始	↑	↑↑	高峰	高峰	↓		
中国 香港 ^[10]			↑	↑↑				
广州 ^[11]				起始	↑	↑↑	高峰	↓
浙江					起始	↑↑	高峰	↓

讨 论

1998 年我国大陆发生了大范围的 H3N2 流感流行。据报道, 1998 年 3—4 月, 我国南方许多城市出现了流感流行, 而北方城市也在 11—12 月出现流感流行高峰, 仅北京市当时流感发病人数就达 100 万以上, 人群总发病率为 10.01%, 医院门诊患者中出现急性呼吸道症状的人数较普通年份增长了 3~4 倍^[11,12]。

浙江省 1998—1999 年也出现全省范围内的流感流行。本研究组在该次流行期间分离到两类 H3N2 流感病毒株, 一类是只能从犬肾传代细胞 (madin darby canine kidney, MDCK) 上分离得到 O 相毒株, 以 A/Zhejiang/11/98、A/Zhejiang/18/98 及 A/Zhejiang/6/99 等为代表, 占分离株的 90% 以上, 为优势流行株; 另一类以 A/Zhejiang/10/98 为代表的 D 相毒株, 该类毒株在 MDCK 细胞或鸡胚中均能增殖, 但所占比例很小, 属于非优势流行株^[13]。

本研究对1998年浙江省分离到的H3N2流感病毒代表株,进行全基因组8个片段的序列分析,结果表明优势流行株A/Zhejiang/11/98、A/Zhejiang/18/98与纽约和香港1997年后期流行株最为接近,但与A/Sydney/5/97仍有一定距离;该类毒株1998年后在全球各地持续流行,但1997年前全球无类似流行株传播。为了进一步分析浙江省流行株的来源,我们对A/Zhejiang/18/98、A/Sydney/5/97以及香港和纽约1997流行株进行了遗传距离分析,由于缺少1997年香港流行株基因组全序列,无法构建全序列系统进化树,但综合HA1进化树以及全基因组8个片段遗传距离分析结果,提示1998年引起浙江省流感的流行株与香港、纽约1997年下半年的H3N2流感流行株之间存在着密切的联系。

流感病毒HA1区域的氨基酸残基改变常与病毒抗原性变化密切相关,一般认为作为一个具有代表性的新变种必须在其HA1区要有大于4个以上的氨基酸残基发生变化,且这些变化还必须涉及2~3个抗原决定簇^[14]。根据HA1区的氨基酸残基序列(表2),从悉尼→纽约→香港→中国大陆,流行株呈现氨基酸残基变异逐渐增加的趋势。此外,交叉血凝抑制实验对各毒株间抗原性分析结果也表明,优势流行株A/Zhejiang/18/98虽为A/Sydney/5/97类似株,但两者在抗原性上也存在一定的差异(抗原比2.0),这与本研究基因分析结果以及段佩若等^[15]的报道相符。

A/Sydney/5/97(H3N2)流感流行株为1997年8月澳大利亚首次鉴定,由于该类毒株与以往的流行株在基因与抗原性上均存在显著差异,使人群普遍缺乏相应的抗体,从而引起全球其他地区的流行^[16]。根据WHO周报报道,1997年9月美国已出现H3N2流感病例,12月初出现大规模流行,而香港于1997年12月末出现H3N2流感病例的增加。根据GenBank上的资料,与浙江省1998年H3N2优势流行株性状接近的纽约流行株分离于1997年11月底至12月,香港流行株分离于1997年12月23—29日,而浙江省流感高发于1998年3月。

根据基因分析结果,尤其是HA1区氨基酸残基的变异分析,结合各地流感的起始与高发的时间序列,我们认为该次H3N2流感的传播路径很可能为悉尼→纽约→香港→中国大陆,从而引起浙江省1998年初流感的大范围流行。早期Julian等也曾提出,1997年香港H3N2流感有可能由纽约传入^[17],本研究结果对此做了进一步证实。

本研究通过对A/Zhejiang/11/98和A/Zhejiang/18/98的分子溯源,分析了引起浙江省1998年流感大流行的病毒来源与传播路径。上述结果表明,随着国际间交流的日益频繁,国外新型流感毒株输入我国并引起暴发与流行的可能性增大,我们在对本地流行株进行变异监测的同时,也应密切关注世界上其他地区流感的流行和变异状况,从而进一步完善我国流感的监测和预警体系。

参 考 文 献

- [1] WHO Media Centre Influenza Fact Sheet 211. 2003 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- [2] Yan JY, Zhou M, Lu YY, et al. Analysis on antigenicity and HI antibody level of influenza virus in Zhejiang province. Chin Pub Health, 2001, 17(7):625-627. (in Chinese)
严菊英,周敏,卢亦愚,等. 浙江省近年来流感病毒株的抗原性及人群免疫状况分析. 中国公共卫生, 2001, 17(7):625-627.
- [3] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol, 2001, 146(12):2275-2289.
- [4] Fan YH, Qi FC, Hui Q, et al. Comparative study on antigenicity variation of influenza virus in recent years. Chin J Biologicals, 2006, 19(2):180-181. (in Chinese)
范玉红,戚凤春,惠琦,等. 近年来流感病毒抗原性变异的比较. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(2):180-181.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity—United States, 1997-1998 season. MMWR, 1998, 47(10):196-200.
- [6] WHO. Influenza. Wkly Epidemiol Rec, 1997, 42:319.
- [7] WHO. Influenza. Wkly Epidemiol Rec, 1997, 51:387.
- [8] WHO. Influenza. Wkly Epidemiol Rec, 1998, 11:80.
- [9] WHO. Influenza. Wkly Epidemiol Rec, 1998, 8:56.
- [10] Huang P, Chen WS, Ni HZ, et al. Analysis on influenza epidemic and surveillance in Guangdong between 1988 and 1998. Strait J Preven Med, 2001, 7(2):15-17. (in Chinese)
黄平,陈伟师,倪汉忠,等. 广东省1988-1998年流感流行与监测分析. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(2):15-17.
- [11] Guo YJ. Influenza activity in China: 1998-1999. Vaccine, 2002, 20 Suppl 2:S28-35.
- [12] Shi YR, Tang YW, He X, et al. Epidemiological study on the influenza of genetal population in Beijing. Chin Pub Health, 2000, 16(2):149-150. (in Chinese)
石玉茹,唐耀武,贺雄,等. 北京市自然人群流行性感冒的流行病学调查. 中国公共卫生, 2000, 16(2):149-150.
- [13] Lu YY, Yan JY, Zhou M, et al. Comparison of characterization of hemagglutination and HA1 sequence of currently circulating strains if influenza A (H3N2) in Zhejiang province and in Japan. Chin J Epidemiol, 2003, 24(1):15-18. (in Chinese)
卢亦愚,严菊英,周敏,等. 浙江省与日本A3型流行性感冒病毒株的血凝特性及HA1序列比较. 中华流行病学杂志, 2003, 24(1):15-18.
- [14] Bush RM, Bender CA, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. Science, 1999, 286:1921-1925.
- [15] Duan PR, Han HY, Zhang RH, et al. Isolation and antigenicity analysis of influenza epidemic strains before and after the prevalence in Beijing. J Prevent Med Chin PLA, 2001, 19(1):19-22. (in Chinese)
段佩若,韩洪彦,张容惠,等. 北京流感暴发流行前后流行株的分离和抗原性分析. 解放军预防医学杂志, 2001, 19(1):19-22.
- [16] Besselaar TG, Schoub BD, Blackburn NK. Impact of the introduction of A/Sydney/5/97 H3N2 influenza virus into South Africa. J Med Virol, 1999, 59(4):561-568.
- [17] Tang JW, Ngai KL, Lam WY, et al. Seasonality of influenza A (H3N2) virus: a Hong Kong perspective (1997-2006). PLoS One, 2008, 3(7):e2768.

(收稿日期:2009-08-17)

(本文编辑:万玉立)