

流感病毒变异及流感监测技术

马鑫^{1,2} (综述), 郑玉建¹ (审校)

摘要: 流感与禽流感病毒的类型繁多, 极易产生变异, 其监测技术是预防和控制流感流行的重要途径。本文对不同流感病毒的变异类型及其机制进行了分析, 介绍了流感病毒监测的常用技术, 讨论了生物学技术和地理信息系统监测技术及其应用前景。

关键词: 流感; 遗传变异; 监测

中图分类号: R 511.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2008)08-0518-04

Mutation of influenza virus and monitoring technology of influenza MA Xin^{1,2}, ZHENG Yu-jian.
1 Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2 Xinjiang Uigur Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830000, China

Corresponding author: MA Xin, Email: maxin216@yahoo.com.cn

Abstract: The influenza and avian influenza are two kinds of important human and animal diseases. The viruses of these diseases have numerous types and can easily mutate, so the monitoring technology was vital to the disease prevention and control. The paper not only analyzed the mutation type and mechanism of influenza virus, but also introduced several common monitoring technologies on influenza virus. At last, the advantages, disadvantages and application prospect of these monitoring technologies were discussed in this paper.

Keywords: influenza; heredity mutation; monitoring

流行性感(流)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 以其病原的易变性和疾病的传播速度快而著称。流感不同于普通感冒: 流感的病原是流感病毒, 普通感冒的病原除了鼻病毒外, 还有呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒以及细菌等微生物。流感发生突然, 常以流行形式出现, 传播迅速, 波及面广, 发病率高。

1 流感流行与病毒变异

流感病毒最显著的特点是极易发生变异, 其抗原性变异的频率之高、幅度之大是自然界其他生物无法比拟的。变异可使其逃避宿主免疫的识别与清除, 从而能多次反复有效地突破人群的免疫屏障, 引起流感流行。

1.1 病毒亚型多, 易变异和重组 流感病毒以其基因快速突变、表面抗原频繁变异而引起每年新的流行。抗原性变异是 A 型流感病毒的自然变异, 分为抗

原漂移和抗原转移^[1], 变异率最高的是血凝素(HA), 其次是神经氨酸酶(NA)。由于人群对新亚型病毒没有免疫力, 也没有疫苗可以进行保护, 因此导致了历史上几次高致病性流感的大流行。

流感病毒血凝素蛋白糖基化的主要作用是稳定血凝素蛋白结构, 防止血凝素被水解以及阻碍抗体的识别。这一变化对病毒的繁殖、致病性和抗原性变化有一定影响。H3N2 亚型流感病毒的 HA 与流感的发生和流行最为密切, 其血凝素基因序列每年都发生改变。H3N2 毒株的 HA1 通过同时出现多个抗原位点变化, 或多个抗原位点逐渐变化以及单个抗原变化加受体改变而引起 H3N2 流行。虽然多个抗原位点的改变才能最终引发流行株的产生, 但伴随抗原位点出现或在其改变前累积的非抗原位点在多数毒株中出现并维持, 提示这些非抗原位点改变具有一定的生物学意义^[2]。Wolf 等^[3]研究认为 H3N2 流行高峰的间歇期毒株 HA 的突变呈中性变化。对于毒株多位点非渐进式的改变产生的原因, 一方面是毒株流行后人群的免疫压力的选择作用, 另一种情况可能是毒株由其他国家或地区引入。历年来的人流感病毒 H3N2 亚型的起源和进化分为两个分支谱系, 并在 1984/1985 年进行了交替转换; 且有一部分人的 H3N2 亚型分离株其 HA1 核苷酸序列与猪分

作者单位: 1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 新疆 乌鲁木齐 830000

作者简介: 马鑫, 女, 河北省保定人, 大学本科, 主要从事疾病预防与控制工作

通讯作者: 马鑫, Tel: 0991-3837873, Email: maxin216@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-03-27

离株的进化亲缘关系最为接近^[9]。

1.2 流感进化速度加快 H5N1、H7N7、H9N2 等病毒通过在动物体内感染后不断进化, 成为人畜共患的高致病性流感病毒。

张欣等^[9] (2006) 发现标准血清对大部分 B 毒株的抑制效价明显降低, 其 Victoria 系流感毒株与 B/浙江/2/01 之间 63.44% 毒株的单向血凝抑制效价有 4 倍以上差异, 且 B 型流感毒株的氨基酸替换多数位于抗原决定簇。与 WHO 2006 年标准株 A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 相比, H1 亚型流感毒株的 9 个位于抗原决定簇的氨基酸发生了替换, 这在 B 型的基因种系发生树也得到证实。尽管 H1N1 亚型流感病毒的基因特性与 A/New Caledonia/20/99 有一定差异, 但到了 2006 年下半年至 2007 年初, 由 GD32 演化而来的流行毒株已有 2 个抗原决定簇 Ca1 区和 Sb 区发生氨基酸替换。Victoria 系的 HA1 区基因与 B/HongKong/330/这种变化和 B/Malaysia /2506 /2004 一致, 同时发现人群针对 H1N1 亚型和 B/Victoria 的抗体水平较低。H1N1 亚型和 B/Victoria 系病毒株发生的变异, 以及人群保护性抗体水平较低, 共同造成其当地的流行。事实上, 某一谱系流感病毒的生存周期是受到多种因素的影响的, 造成了相异谱系新毒株出现的时间无法预料。

1.3 流感的时空变异 吕常荣等^[9]基于 ArcGIS 的空间分析和统计模块, 对全球高致病性禽流感灾害的时空变异进行分析。发现 2003 年以来全球高致病性禽流感暴发有 3 个流行高峰期, 正好在 2004 年和 2005 年的冬季。同时全球高致病性禽流感暴发的频率在最近几年里呈不断上升的趋势, 地理空间范围也不断扩散, 而且暴发在时间和空间上表现得更加集中。全球高致病性禽流感分布的总体特征表明在家禽密度高的区域, 邻近家禽生产地的湖泊和水库附近, 或者鸟类迁徙路线的交叉处, 特别是那些重迭的区域可能是高致病性禽流感的多发地区。这说明野生鸟类中在欧洲高致病性禽流感的传播可能起到关键性的作用。

2 流感的监测技术

流感监测在低尺度和中尺度上是通过实地进行的生物学技术为主的监测。随着技术的进步, 地理信息系统 (geographic information systems, GIS) 等技术已在流感的监测中发挥着重要的作用。

2.1 生物学技术

2.1.1 病毒细胞培养 病毒分离鉴定方法是从感染的组织细胞中分离病毒直接进行鉴定。作为一种经典方法, 其结果可靠, 但需要的时间较长, 一般细胞培养需 3~4 d, 不适合病毒的快速检测。

2.1.2 血清学诊断技术 血清学是检测血清中抗体的滴度变化。自 1974 年 Jennings 等成功的将酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术用于检测注射流感病毒所产生的抗体消长规律之后, Van Deusen 等^[9] (1983) 建立了平板微量神经氨酸酶抑制试验 (NI) 试验方法, 可对多种分离物同时进行抗原分类。此后 ELISA 检测禽流感抗体的标准的以及双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (DAS-ELISA) 法的建立, 大大缩短了禽流感病毒 (AIV) 的诊断时间。中国在 1987 年用 AIV 鸡胚尿囊液经超速离心、浓缩, 用福尔马林灭活剂制备了琼脂扩散抗原, 后又建立了 ELISA 检测法的最佳条件及其标准^[9]。血清学检测主要有:

2.1.2.1 血凝试验 (HA) 和血凝抑制试验 (HI) HA 试验主要用于检测分离病毒的血凝性; HI 主要用于鉴定血凝素亚型。禽类血清中非特异性血凝因子, 需要用受体破坏酶 (RED) 或高碘酸钠法去除非特异性抑制因子。HA 和 HI 特异性好, 常用于鉴定亚型。

2.1.2.2 神经氨酸酶试验 (NA) 和 NI 利用 NA 可测知流感病毒的神经氨酸酶活性。1983 年 Van 等建立了平板微量 NI 方法, 可对多种分离物同时进行抗原分类, 成为世界卫生组织推荐用于 NA 亚型分类的经典技术。

2.1.2.3 琼脂扩散试验 (AGP) 应用 AGP 方法可以检测到所有 A 型禽流感病毒产生的抗体, 其优点是简便快捷, 特异性强, 不受病毒亚型的限制, 缺点是灵敏性较低。中国已建立了 AGP 诊断试剂盒以及聚丙烯酰胺凝胶电泳技术^[9]。

2.1.2.4 ELISA 法 ELISA 已成为禽流感流行病学普查及早期快速诊断的最有效和最实用的方法之一。禽流感间接 ELISA 和禽流感抗体 Dot-ELISA 诊断技术建立之后, 又建立了流感间接 (重组核蛋白) ELISA 诊断技术 (rRNP-ELISA), 可以 100% 检出 AGP 阳性以及 HI 疑似阳性的血清样品^[10], 是检测 A 型禽流感病毒特异性抗体的一种特异、敏感、快速的血清学诊断技术。

2.1.2.5 中和试验 (NT) NT 是一种经典方法, 如同时结合运用 H5 型特异的 Western-blot 试验, 其敏感性可达 80%, 特异性达 96%。

2.1.2.6 免疫荧光技术 (IFA) IFA 其敏感性比 HI 高 40~150 倍, 建立在单克隆抗体基础上的免疫荧光

方法具有实验条件要求低、操作简便等优点。

2.1.3 分子生物学诊断技术

2.1.3.1 聚合酶链反应 (PCR) 诊断技术 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术是目前发展最成熟分子诊断技术, 具有高度的敏感性和特异性, 并可大大缩短病毒的检出时间。实时荧光定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。其敏感性比病毒分离培养法的敏感性要高 12%~26%。

2.1.3.2 NASBA 法 即依赖核酸序列的扩增 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)。与经典的病原分离方法相比, NASBA 技术更快、更容易操作, 可适用于禽流感快速诊断、生产企业和活禽市场的禽流感的监测、进出口口岸的检验检疫。

2.1.3.3 核酸探针技术 cDNA 探针杂交法因其较好的特异性和敏感性, 已成为从分子水平探讨 AI 的发病机制和早期快速诊断的新手段^[11]。

2.1.3.4 M 检测法 M 检测法为近期美国食品药品监督管理局认证的内源性病毒编码酶检测法。将新合成的 A- 酮糖 N- 乙酰神经氨酸标记上色素原, 形成 M 底物, 当存在 A 型和 B 型流感病毒时, 含有色素原的底物被病毒的 M 分解, 释放出色素原, 可通过光测定装置进行检测。M 检测不能用于 C 型流感病毒的检测。

2.1.3.5 基因芯片技术 Li 等^[12] (2001) 建立了用以鉴别流感病毒型和亚型的 DNA 芯片检测方法, 从而达到鉴别型和亚型的目的。香港科技大学最近与一家基因芯片公司合作, 成功研制出一种名为“H5 型禽流感病毒侦测箱”的新试剂。能在 5 h 内测出鸡是否感染禽流感病毒。

2.1.4 胶体金技术 胶体金是一种新兴技术, 成为荧光素、放射性同位素和酶标记技术以外的又一大补充。与三大标记技术相比, 免疫胶体金试纸条检测禽流感可以现场操作、结果直观、灵敏度高、操作简单, 适用于 AVI H5 亚型的特异性诊断和流行病学调查。

2.2 GIS 监测技术 用 GIS 技术分析流感流行与地理环境、气候及宿主动物分布的关系, 在传染病预防和控制方面发挥重要的作用。

近年德国 Vechta 大学开发的 VetGIS 软件, 用于畜牧业流行性疾病数据的收集、分析和管理工作, 并在 1999-2000 年意大利禽流感疫情监测中发挥了重要作用^[13]。

在中国, 2005 年方立群, 曹春香^[14]应用 GIS 分析了中国大陆高致病性禽流感的空间分布特征, 以及高发区域及其疫情分布相关的环境因素。分析显示中国大陆高致病性禽流感的空间分布为随机分布, 且具有明显的地域聚集性, 并探讨了疫情发生的相关环境因素, 显示禽流感疫情多发生在冬季气温较低, 相对温度和平均气压较高的气象条件下; 2007 年王建华等^[15]和王靖飞等^[16]利用 ArcGIS 9.0 软件建立了禽流感疫情监测 GIS, 并借助该系统直接和清晰地揭示了禽流感疫情现状和趋势。孙根年, 杨欢欢^[17]于 2006 年通过 Internet 搜集各国禽流感信息, 以及与禽流感发生地相关的环境信息, 利用 GIS 分析了全球禽流感的时空动态及其与候鸟迁徙的关系。认为 1) 近百年来全球禽流感的暴发具有年际尺度的周期性, 从 40 年周期缩短为 10 年周期, 发生频率加快、危险性增大, 禽流感的暴发与生态环境恶化的趋势一致; 近 3 年全球禽流感的年内分布具有明显的季节性, 主要集中在秋末冬初和冬末春初, 该时段季节交替、气温变化剧烈, 应是禽流感暴发的诱因。(2) 通过对 2000 年前和近 3 年禽流感发生地的地理制图研究, 发现全球禽流感疫源地分布在从西欧经地中海至西亚, 从中南半岛、东南亚穿越太平洋至拉丁美洲的弧形地带, 这里是全球海陆交互作用最为强烈的复杂地带, 气候潮湿、凉爽, 水禽、飞禽活动集中, 人类活动排放的某些有毒化学物质及其导致的水域污染是流感病毒变异的诱因。(3) 将近 3 年全球禽流感的时空分布与候鸟迁徙路线相比较, 在亚、欧、非“世界岛”内春、秋季 8 条路线上, 禽流感的时空分布与候鸟迁徙具有良好的对应关系, 因此, 候鸟迁徙应是全球禽流感传播的一个重要途径。

2.3 流感、禽流感预测模型 流感、禽流感流行趋势的预测预报工作是预警工作的重要组成部分, 通过建立流感、禽流感流行趋势预测模型或技术体系, 以先进技术驱动流感、禽流感预警并以此支撑流感预防控制系统; 保证疫情暴发时的防控。

盛庆云等^[18]在收集 2003 年以来世界禽流感暴发数据的基础上, 应用灰色动态理论进行禽流感暴发关联分析, 分析并解决了禽流感暴发时, 正确认识禽类禽流感 (H5N1) 暴发次数与人感染禽流感患者数、病死人数的关系; 分析世界禽流感暴发以来, 禽类中禽流感暴发次数、人感染禽流感情况; 分析世界禽流感流行趋势, 并根据分析结果建立了禽流感暴发预测模型。禽流感流行趋势的研究, 使我们建立了禽流感预警的长效机制; 实践证实的科学分析方法,

将为应对大规模的禽流感暴发提供先进技术; 禽流感流行趋势模型建立,拓宽了视野,使我们摆脱了过去禽流感预防控制工作中,缺乏预见性,因而缺乏主动性的被动局面。从而增加了禽流感预防预见性,提高了禽流感预防控制工作质量。

参考文献

- [1] Dennis J,Alexander M. A review of avian influenza in different bird species [J]. *Veter Microbiol*, 2000, (74):3- 13.
- [2] Qin AJ, Shao HX, Qian K, et al. Development and application of monoclonal antibodies specific to hemagglutinin of subtype H5 and H9 avian influenza [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 23(5):161- 163.(in Chinese)
秦爱建,邵红霞,钱轶,等.抗禽流感病毒 H5 和 H9 亚型血凝素特异性单克隆抗体的研制及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 23 (5):161- 163.
- [3] Wolf YI, Viboud C, Holmes EC, et al. Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus [J]. *Biol Direct*,2006,1:34.
- [4] Wang Y, Chen SX, Xue Y, et al. Analysis and studies on the amino acid sequence homology, mutant, regularity, structural and functional relationship of HA1 of human influenza virus(H3N2) [J]. *Chinese Journal of Virology*,2002, 18(2):118- 125. (in Chinese)
王勇,陈淑霞,薛颖,等. H3N2 亚型人流行性感冒病毒血凝素的蛋白序列同源性比较、变异规律及结构与功能的分析 [J]. *病毒学报*, 2002, 18(2):118- 125.
- [5] Zhang X, Ni HZ, Deng AP, et al. Molecular basis of the prevailing of influenza virus in Guangdong province in 2006 [J]. *Journal of Tropical Medicine*,2007, 7(6):525- 528. (in Chinese)
张欣,倪汉忠,邓爱萍,等.2006 年广东省流感病毒流行的分子基础 [J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(6):525- 528.
- [6] Lv CR, Wen JH, Yin ZE, et al. The temporal-spatial variability analysis of the global avian influenza disaster [J]. *Journal of Catastrophology*, 2007, 27(2):25- 30. (in Chinese)
吕常荣,温家洪,尹占娥,等.全球高致病性禽流感灾害的时空变异 [J]. *灾害学*, 2007, 27(2):25- 30.
- [7] Van Deusen RA, Hinshaw VS. Micro neuraminidase inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidase [M]. *Avian Dis*,1983,27(3):745- 750.
- [8] Li HY, Xin XG, Tian GB, et al. Optimum for indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian influenza virus in chicken [J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1998,20(4):223- 235. (in Chinese)
李海燕,辛晓光,田国斌,等.间接酶联免疫吸附试验检测禽流感抗体的最佳工作时间条件 [J]. *中国禽传染病*,1998,20(4):223- 235.
- [9] Zhao ZL, Lin XH, Cui XD, et al. Urea-polyacrylamide gel electrophoresis in the avian flu diagnosis [J]. *Chinese entry-exit quarantine of animals and plant*, 1998,4:33- 34. (in Chinese)
赵增连,林祥海,崔向东,等.尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳法在禽流感诊断中的应用 [J]. *中国进出境动植物检*,1998,4:33- 34.
- [10] Li HY, Yu KZ, Xin XG, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay employing recombinant nucleoprotein for detection of antibody to avian influenza virus in chicken [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22 (3):321- 325. (in Chinese)
李海燕,于康震,辛晓光,等.禽流感病毒重组核蛋白 ELISA 诊断技术的研究 [J]. *中国预防兽医学报*,2000,22(3):321- 325.
- [11] Huang GM, Xin CA. Detection of nucleic acid of A IV by a dig-labeled probe prepared by polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2001, 37(12): 3- 7. (in Chinese)
黄庚明,辛朝安.PCR 制备地高辛标记的探针检测禽流感病毒核酸 [J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(12):3- 7.
- [12] Li J, Chen S, Evan SD. H1 Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR [J]. *J Clin Microbio*, 2001, 39 (2) : 696- 7041.
- [13] Ehles M, Mdler M, Marangon S, et al. The use of geographic information system (GIS) in the frame of the contingency plan implemented during the 1999- 2001 avian influenza (AI) epidemic in Italy [J]. *Avian Dis*, 2003, 47:1010- 1014.
- [14] Fang LQ, Cao CX. Studies on the spatial distribution and environmental factors of highly pathogenic avian influenza in Mainland China, using geographic information system technology [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2005, 11:839- 842. (in Chinese)
方立群,曹春香.地理信息系统应用于中国大陆高致病性禽流感的空间分布及环境因素分析 [J]. *中华流行病学杂志*,2005,11: 839- 842.
- [15] Wang JH, Guo Y, Yang H. Design and development of geographical information system of bird influenza surveillance based on Arc GIS [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science Edition*, 2007,1:46. (in Chinese)
王建华,郭跃,杨华.基于 Arc GIS 的禽流感疫情监测信息系统设计与建立 [J]. *重庆师范大学学报 自然科学版*, 2007,1:46.
- [16] Wang JF, Cui SJ, Liu WB, et al. Application of geographical information systems for disease control and epidemiological studies [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2003,10:4- 7. (in Chinese)
王靖飞,崔尚金,刘文斌,等.应用地理信息系统(GIS)进行疫病控制及流行病学研究 [J]. *畜牧兽医科技信息*,2003,10:4- 7.
- [17] Sun GN, Yang HH. Space - time dynamic analysis of global avian influenza based on combined internet and GIS [J]. *Geography and Geo-Information Science*, 2006,6:24- 28. (in Chinese)
孙根年,杨欢欢.基于 Internet 与 GIS 的全球禽流感时空动态分析 [J]. *地理与地理信息科学*,2006,6:24- 28.
- [18] Sheng QY, Luo YH, Xiang K, et al. Analysis the avian flu epidemic trend using gray predicted technical [J]. *Chinese Journal of Public Health Management*, 2007,23 (4):368- 370. (in Chinese)
盛庆云,罗玢珩,向昆,等.应用灰色预警技术分析禽流感流行趋势 [J]. *中国公共卫生管理*,2007,23(4):368- 370.