

长沙 A(H1N1)亚型季节性流感暴发疫情的 实验室诊断及其 HA 基因特性分析

宋克云* 张如胜 欧新华

(长沙市疾病预防控制中心微生物检验科 湖南 长沙 410002)

摘要: 对 2009 年长沙麓山国际学校流感暴发疫情进行实验室诊断, 并探索新分离的 A(H1N1) 亚型流感病毒血凝素(HA)的基因特性。对流感暴发疫情的 25 份鼻/咽拭子标本进行 RT-PCR 检测和流感病毒分离, 然后利用 CEQ 8000 Genetic Analysis System 对病毒分离株(A/Yuelu/314/2009) 进行测序, 测序结果提交至 GenBank(登录号: FJ912843)并用 ClustalX 和 Mega4.1 软件进行序列分析。结果显示, 分离出 A(H1N1)亚型流感毒株 18 株, 检出 21 份 A(H1N1)亚型流感病毒核酸阳性; A/Yuelu/314/2009(H1N1) HA 基因序列与 2008~2009 年疫苗株(A/Brisbane/59/2007)比较显示: 核苷酸和氨基酸同源性均为 99%, 有 6 个位点的氨基酸发生了变异(V148A、S158N、G202A、I203D、A206T、W435R), 其中一个 S158N 氨基酸变异位于 B 抗原表位, HA 基因序列上共有潜在糖基化位点 9 个(27、28、40、71、151、176、303、497、536), 与 A/Brisbane/59/2007 相同且氨基酸序列保守。本实验诊断出此次流感暴发疫情的病原体为 A(H1N1)型季节性流感病毒, 研究还发现 A/Yuelu/314/2009(H1N1)长沙分离株与 A/Brisbane/59/2007 疫苗株基因序列比较显示并未形成一个新的变种, 推测是由于分离株与疫苗株之间基因特性的改变和人群对 A(H1N1)亚型流感病毒免疫力降低导致了此次长沙麓山国际学校 A(H1N1)亚型流感的暴发。

关键词: A(H1N1)亚型流感病毒, 实验室诊断, 血凝素, 基因特性

An Outbreak of Seasonal Influenza Viruses A(H1N1) in Changsha Was Diagnosed by Laboratory and the HA Gene Characteristic Was Analyzed

SONG Ke-Yun* ZHANG Ru-Sheng OU Xin-Hua

(Center for Disease Control and Prevention of Changsha, Changsha, Hunan 410002, China)

Abstract: To determine the etiologic agent of an outbreak of influenza viruses from Changsha Foothill Mountain International School in 2009, and to analyze the HA Gene Characteristic of the H1N1 influenza viruses. Twenty-five nasopharyngeal swab specimens from the outbreak of influenza viruses were tested by conventional RT-PCR and influenza viruses isolated simultaneously. Virus isolated (A/Yuelu/314/2009) from the outbreak was sequenced by CEQ™ 8000 Genetic Analysis System and the sequencing results submitted to GenBank (Accession No: FJ912843), then the sequencing data was analyzed by ClustalX and Mega4.1

* 通讯作者: Tel: 86-731-4735659; ✉: songkeyun2003@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-06-03; 接受日期: 2009-08-19

softwares. Results showed the influenza viruses A(H1N1) of positive were 18 cases by influenza viruses isolated tests and 21 cases by conventional RT-PCR, respectively. The nucleotide and amino acid sequence homology of the HA gene of A/Yuelu/314/2009 are 99% compare with the vaccine strain (A/Brisbane/59/2007) in 2008~2009 years. The HA sequence data also showed that had 6 amino acid mutations (V148A, S158N, G202A, I203D, A206T, W435R), and the S158N located at antigenic site B of HA protein. Nine potential glycosylation sites (27, 28, 40, 71, 151, 176, 303, 497, 536) in the HA sequence of A/Yuelu/314/2009 is the same with A/Brisbane/59/2007, and the sequences of potential glycosylation sites were conserved. In this study, laboratory evidence diagnosed seasonal influenza A virus (H1N1) as the etiologic agent of the outbreak. The virus isolated (A/Yuelu/314/2009) strain of H1N1 subtype is not a new variant in Changsha in 2009 compare with the vaccine strain (A/Brisbane/59/2007), the outbreak of influenza A virus (H1N1) from Changsha Foothill Mountain International School maybe are caused by the change in genetic characteristics between vaccine strains and the decreased of immunity to influenza A virus (H1N1) in the crowd.

Keywords: Influenza A virus(H1N1), Laboratory diagnosis, HA, Genetic characteristics

流行性感冒病毒(Influenza virus)简称流感病毒,是引起流感的病原体,属正粘病毒科,流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型,甲型流感病毒根据血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)抗原性的不同分为若干亚型:HA 可以分为 16 个亚型,NA 分为 9 个亚型^[1]。流感病毒具有较强的传染性,又以呼吸道飞沫传播,极易造成流行。

2009 年 2 月 20 日至 3 月 9 日,湖南省长沙市麓山国际学校陆续出现发热、咳嗽、咽痛等症状的病例,累计发病 336 例,根据现场流行病学调查和实验室检测结果,认定为一起 A(H1N1)亚型季节性流感病毒暴发事件;H1N1 亚型流感病毒和其他甲型流感病毒一样,流感病毒 HA 基因变异决定了其抗原性特点,同时 HA 基因变异与流感的流行及流行规模的大小密切相关,为了解 HA 基因在此次流感暴发疫情中所扮演的角色,我们对此次疫情 A(H1N1)亚型流感病毒分离株 HA 基因进行了核苷酸序列测定,并和 WHO 同期推荐的 A(H1N1)亚型流感病毒国际疫苗株 HA 基因序列以及其他国内 A(H1N1)亚型流感病毒分离株进行了基因序列比较,现将此次流感暴发疫情的实验室检测及 HA 基因序列测定分析报告如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

GeneAmp PCR System 9700(美国 ABI 公司); 基因测序仪: CEQTM 8000 Genetic Analysis System(美国 Beckman 公司); Centrifuge 5415R(Eppendorf 公司);

PowerpacTM Universal(美国 BIO-RAD 公司); G: BOX 凝胶成像系统(基因有限公司); QIAGEN[®] OneStep RT-PCR kit, RNeasy[®] Mini Kit(德国 QIAGEN 公司); DNA 纯化回收试剂盒: Universal DNA Purification kit(北京天根公司); DNA 测序试剂盒: Genome-LabTMDTCS-Quick Start kit(美国 Beckman 公司)。

1.2 标本来源

核酸检测和病毒分离标本来自长沙市岳麓区疾控中心送检的 25 例鼻/咽拭子标本; 基因测序标本采用本次暴发疫情的 A(H1N1)亚型流感病毒分离株: A/湖南岳麓/314/2009(A/Yuelu/314/2009); 标本采集、保存和运输方法按照《中国流感/人禽流感监测实施方案》进行^[2]。

1.3 流感病毒分离及鉴定

按照《WS 285-2008 流行性感冒诊断标准》^[3]对 25 份鼻/咽拭子处理后常规接种狗肾传代细胞(MDCK 细胞),当 75%~100%细胞出现病变时收获病毒液,利用红细胞凝集抑制试验进行病毒鉴定(鉴定的标准血清由国家流感中心提供),阳性标本送国家流感中心进一步鉴定复核。

1.4 流感病毒核酸检测

RNA 核酸提取采用 RNeasy[®] Mini Kit(QIAGEN 公司),提取步骤参照试剂盒说明书,提取的 RNA 保存于-20°C 备用。对 25 例鼻/咽拭子标本利用 RT-PCR 方法进行 A 型流感 M 片段、B 型流感 NS 片段、H1 亚型 HA 片段、H3 亚型 HA 片段核酸检测,采用 QIAGEN[®] OneStep RT-PCR kit,反应体积(25 μ L): ddH₂O 7 μ L; 5 \times Q-solution 5 μ L; 5 \times QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5 μ L; dNTP mix (10 mmol/L)

1 μL ; 20 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物(为国家流感中心提供, FluA-M-F30、FluA-M-R264; FluB-NS-F485、FluB-NS-R988; H1HA-F768、H1HA-R1094; H3-F671、H3-R940)各 0.5 μL ; QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix 1 μL 。反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 5 μL 扩增产物与 1.0 μL 上样缓冲液混匀后点样于含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙啶的 2%琼脂糖凝胶中, 90 V 电泳 30 min 后放于凝胶成像系统中成像, 观察有无预期长度的 DNA 目的片段。

1.5 HA 基因 PCR 扩增及核苷酸序列测定

针对 A(H1N1)亚型流感病毒 HA 编码基因序列 (GenBank 登录号: FJ686983), 利用 Vector NTI suite 8 软件自行设计四条测序引物, HA1-F: 5'-ATGAAAGTAAA ACTACTGGTCTGT-3'; HA1-R: 5'-TTGGCACTT CGCATCACATT-3'; HA2-F: 5'-TGGATCAGGAAT CATCAACT-3'; HA2-R: 5'-TTAGATGCATATTCTA CACT-3'。利用上述测序引物对 A/Yuelu/314/2009 流感病毒分离株进行 RT-PCR 扩增(RNA 提取、扩增体系及条件同 1.4 流感病毒核酸检测), 扩增后的 RT-PCR 产物(约 20 μL)利用 DNA 纯化回收试剂盒(Universal DNA Purification kit)进行纯化回收, 然后利用 DNA 测序试剂盒(GenomeLabTM DTCS-Quick Start kit)对 PCR 纯化回收产物进行测序前 PCR 反应(方法及 PCR 模板浓度参考试剂盒说明书), PCR 反应后进行产物回收纯化, 纯化所得 PCR 产物利用基因测序仪(CEQTM 8000 Genetic Analysis System)进行测序, 具体操作步骤参照仪器及试剂盒说明书。

1.6 HA 基因核苷酸序列比较及进化树分析

将所测得的 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因序列提交至 GenBank 后进行 Blast 比较, 同时将 HA 基因序列与 WHO 推荐的 2008~2009 年 A(H1N1)亚型流感病毒国际疫苗株(A/Brisbane/59/2007)及国内其他 A(H1N1)亚型流感病毒分离株(A/Wuhan/371/95、A/Beijing/262/95、A/Guangzhou/1684/2006、A/Guangzhou/483/2006、A/Jiangxi/595/2006、A/Ningbo/125/2007、A/Ningbo/772/2008) HA 基因序列利用 ClustalX 和 Mega 4.1 软件进行基因进化和氨基酸结构分析。

1.7 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因与新甲型 H1N1 流感病毒的比较

将 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因序列 (GenBank 登录号: FJ912843.1)与新甲型 H1N1 流感

病毒国内外代表株 A/Beijing/3/2009(GQ225381.1)、A/California/04/2009 (GQ117044.1)进行核苷酸序列比较。

2 结果

2.1 流感暴发疫情实验室检测

对送检的 25 例鼻/咽拭子标本, 分离出 A(H1N1)亚型流感病毒 18 株(经国家流感中心鉴定复核 18 株); 检出 21 份 A(H1N1)亚型流感病毒核酸阳性, B 型和 H3 亚型流感病毒核酸全部阴性。结果显示核酸检测和流感病毒分离鉴定 2 种方法阳性符合率高, 核酸检测敏感性更高, 更快速。

2.2 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因测序 RT-PCR 扩增

利用 HA 测序引物 HA1-F、HA1-R; HA2-F、HA2-R 对 A/Yuelu/314/2009 分离株进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物 DNA 片段均位于目的片段处: 888 bp (HA1)、868 bp(HA2), 见图 1。

2.3 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因序列核苷酸比较及氨基酸进化分析

A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因序列已被 GenBank 收录, 登录号为 FJ912843, 在 NCBI 网页进

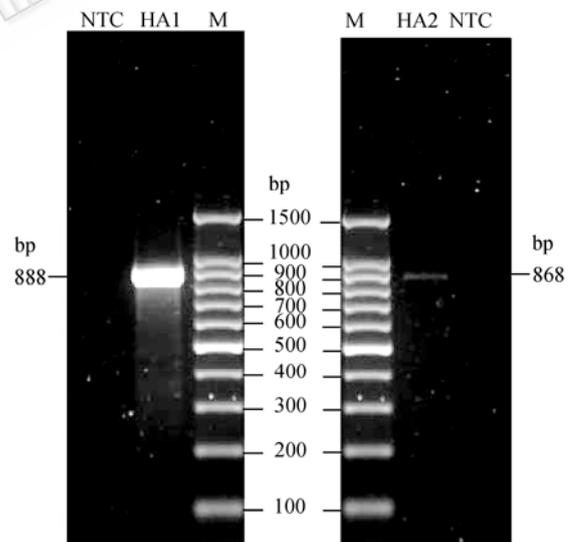


图 1 A/Yuelu/314/2009 H1N1 分离株 HA 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of the HA gene of the H1N1 influenza virus isolated strain (A/Yuelu/314/2009)

注: M: 100 bp 分子量标准品; HA1: HA1 引物 RT-PCR 产物; HA2: HA2 引物 RT-PCR 产物; NTC: 阴性控制。

Note: M: 100 bp DNA marker; HA1: RT-PCR products of the primers of HA1; HA2: RT-PCR products of the primers of HA2; NTC: Negative control.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

行 Blast 比较显示, 该基因序列为 A(H1N1)亚型流感病毒, 与 WHO 推荐的 A(H1N1)亚型流感病毒 2008~2009 年国际疫苗株(A/Brisbane/59/2007)核苷酸和氨基酸同源性均为 99%, 与分子进化树显示一致(图 2); 进化树分析显示两个主要分支, 一支是 1995 年的 A/Beijing/262/95 和 A/Wuhan/371/95、另一支是 A/Yuelu/314/2009、A/Brisbane/59/2007 和 2006 年以后国内其他 A(H1N1)亚型流感病毒分离株(A/Guangzhou/1684/2006、A/Guangzhou/483/2006、A/Jiangxi/595/2006、A/Ningbo/125/2007、A/Ningbo/772/2008), 其中, A/Yuelu/314/2009 与 A/Brisbane/59/2007 亲缘关系最近(图 2)。

2.4 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因氨基酸序列抗原表位的变异情况

A 型流感病毒 HA 基因由重链(HA1)与轻链(HA2)连接而成, 连接处的核苷酸序列均为 AGG 编码 1 个精氨酸(R), HA 基因上共有 A、B、C、D、E 5 个抗原表位^[4]: A 位于由 140~146 位氨基酸构成的突出环上及 133~137 位氨基酸; B 位于 155 位上面的主环(156~160)及球区末端围绕 α 螺旋结构的 187~198 位氨基酸; C 位于球区下方 53, 54, 275 和 278 所在的区, 由 52 位 Cys 与 277 位 Cys 间二硫键相连所形成三维结构的膨胀部; D 位于 HA 三聚体交界处, 由 207, 172~174 位等表面氨基酸组成; E 是由 63, 78, 81, 83 位形成的表面氨基酸区。经与 A/Brisbane/59/2007(H1N1)比较发现, 本次疫情暴发

所分离的毒株 A/Yuelu/314/2009(H1N1)整个 HA 基因上共发生 6 个氨基酸变异: V148A、S158N、G202A、I203D、A206T、W435R, 值得注意的是 S158N 氨基酸变异发生在 B 抗原表位, 而其他 4 个抗原表位上氨基酸相对保守, 见图 3; 6 个氨基酸变异中的 4 个发生在抗原表位周围, 但病毒分离鉴定实验显示氨基酸变异未影响抗原的血清学变化。

2.5 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因氨基酸序列受体结合位点与潜在糖基化位点变异情况

唾液酸是流感病毒感染细胞时与细胞表面结合的受体, 而与唾液酸结合的是 HA1 蛋白上的受体结合位点(RBS), RBS 包括 190 螺旋(190~198), 130 环(135~138), 220 环(221~228)以及这些结构附近保守的氨基酸^[5]。经比较发现, 本次疫情暴发所分离的毒株 A/Yuelu/314/2009 在 RBS 的附近有 3 个位点发生氨基酸变异: G202A、I203D、A206T; 其余 RBS 位点的氨基酸未见变异。流感病毒 HA 蛋白糖基化的主要作用是稳定 HA 蛋白结构, 防止 HA 被水解以及阻碍抗体的识别。潜在糖基化位点是由糖苷键通过 N 糖苷键结合在 Asn(天冬酰胺)-X-Thr(苏氨酸)或 Asn(天冬酰胺)-X-Ser(丝氨酸)的 Asn 残基上形成^[6], 所测的 A/Yuelu/314/2009 HA 基因片段共有 9 个潜在糖基化位点(27、28、40、71、151、176、303、497、536), 其中在 HA1 蛋白上有 7 个潜在糖基化位点, 与 WHO 同期推荐的疫苗株 A/Brisbane/59/2007(H1N1)相同, 未发现氨基酸替换现象, 见图 3。

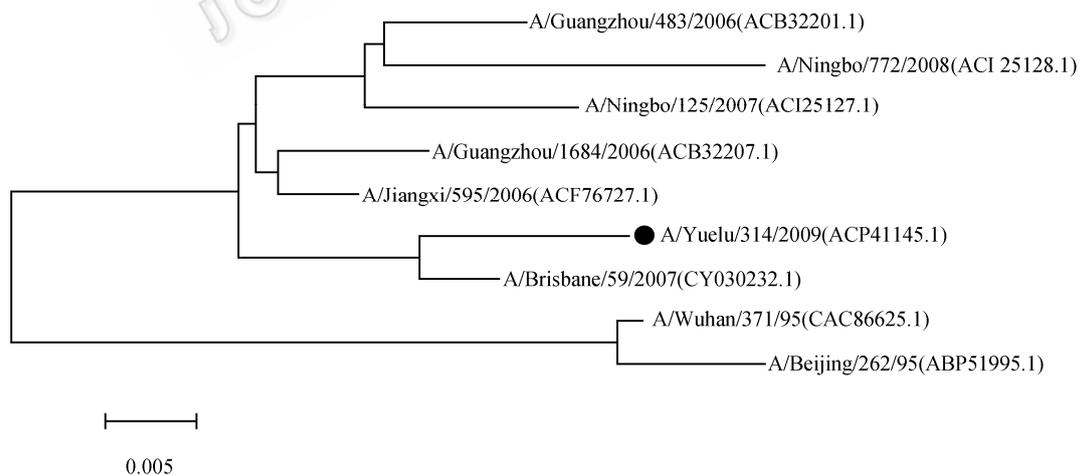


图 2 A/Yuelu/314/2009(H1N1)分离株 HA 基因进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree for the HA gene of the H1N1 influenza virus isolated strain(A/Yuelu/314/2009)

注: 病毒名称后括弧内字母与数字代表基因库中基因登录号; 线条: 0.005 代表每个核苷酸位置。

Note: Letter and number in parentheses behind the name of virus; Gene logging number in GenBank; Bar: 0.005 substitutions per nucleotide position.

```

80
A/Brisbane/59/2007MKVKLLVLLCTFTATYADTI CIGYHANNST DTVDVTVLEKN VTVTHSVNLL ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG
A/Yue hu/314/2009 -----
160
A/Brisbane/59/2007NPECELLISK ESWSYIVEKP NPENGTCPYGFADYEEELRE QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHITVTGVS A SCSHNGESSF
A/Yue hu/314/2009 ----- A ----- N -----
240
A/Brisbane/59/2007YRNLWLGTGKNGLYPNLSKS YANNKEK VL VLWGVHHPNIGIQKALYHT ENAYVSVSS HYSRKFPTPEI AKRPKVRDQE
A/Yue hu/314/2009 ----- AD-T -----
320
A/Brisbane/59/2007GRINYYWTLLEPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FAISRFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQGAINSSLPFQN VHPVTIGECP
A/Yue hu/314/2009 -----
400
A/Brisbane/59/2007KYVRSALRMVTGLRNIPSI QSRGLFGAIA GFIEGGWTGM VDGWYGYHHQNEQGSYAAD QKSTQNAINGITNKVNSVIE
A/Yue hu/314/2009 -----
480
A/Brisbane/59/2007KMNTQFTAVG KEFNKLERRMENLNKKVDDG FIDIWTYN AELLVLENERLDFHDSNVKN LYEKVKSQKNNAKEIGNGC
A/Yue hu/314/2009 ----- R -----
540
A/Brisbane/59/2007FEFYHKCNDECMESVKNGTY DYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS FWMCSNGSLSQ
A/Yue hu/314/2009 -----
545
A/Brisbane/59/2007CRICI
A/Yue hu/314/2009 -----

```

图 3 A/Yuelu/314/2009(H1N1)分离株 HA 蛋白与疫苗株 A/Brisbane/59/2007(H1N1)氨基酸序列比较

Fig. 3 The amino acid sequences of the HA gene of the H1N1 influenza virus isolated strain (A/Yuelu/314/2009) compared with sequences of the vaccine strain (A/Brisbane/59/2007)

注: 下划线表示潜在糖基化位点.

Note: Underline Means potential glycosylation site.

2.6 A/Yuelu/314/2009 分离株 HA 基因与新甲型 H1N1 流感病毒的区别

通过与新甲型 H1N1 流感 HA 基因序列的比较, 显示 A/Yuelu/314/2009 分离株与新甲型 H1N1 流感病毒国内外代表株 A/Beijing/3/2009(GQ225381.1)、A/California/04/2009(GQ117044.1)HA 基因的核苷酸同源性均为 77%, 差异明显。

3 讨论

据 WHO 公布的数据, 估计全球每年流感病例达 6~12 亿。每一次流感流行都给社会带来严重的经济损失, 由于抗原易变异, 人群对变异株普遍易感, 传播迅速, 因此对流感病毒进行早期、快速且准确的诊断对流感暴发疫情的控制具有关键的作用, 针对本次麓山国际学校流感暴发疫情, 本研究采用国家流感中心提供的流感病毒核酸检测引物、探针和流感病毒分离鉴定方法, 成功的对 A(H1N1)亚型流感病毒进行了诊断, 为此次流感暴发疫情的处置提供了有力的保障, 实验显示核酸检测和流感病毒分离鉴定两种方法阳性符合率高, 核酸检测敏感性更高、更快速, 可代替流感病毒分离鉴定用于流感

病毒的早期诊断。

将 A/Yuelu/314/2009 毒株与当前流行的新甲型 H1N1 流感病毒国内外代表株(A/Beijing/3/2009、A/California/04/2009)HA 基因序列进行比较显示, 核苷酸同源性仅为 77%, 与新甲型 H1N1 流感病毒存在明显差异, 而与疫苗株 A/Brisbane/59/2007(H1N1)核苷酸同源性高达 99%, 可见 A/Yuelu/314/2009 毒株仍然为 A(H1N1)亚型季节性流感毒。这也说明对流感暴发疫情中分离的流感病毒进行基因测序分析具有现实意义。

A/Yuelu/314/2009(H1N1)与 WHO 2008~2009 年推荐的疫苗株 A/Brisbane/59/2007(H1N1)HA 基因的核苷酸比较及氨基酸进化分析结果表明两者核苷酸和氨基酸同源性为 99%, 分子进化树显示两者亲缘关系最近, 提示了 WHO 推荐疫苗株的合理性。袁洁, 苏良^[7] 等对长沙市 2004~2006 年流感病毒分离株统计结果显示: 流感暴发的优势毒株在 2004 年以 A(H3N2)亚型为主; 2005 年以 A(H1N1)亚型为主, 2006 年以 B 型为主, 而在 2007~2008 年又以 A(H3N2)亚型为主。该结果与流感病毒流行过程中主要流行株呈动态替换的趋势(即新的流行株产生

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

后,旧流行株往往消失)的观点^[8]相符,另一方面由此推测正是长沙地区2006~2008年A(H1N1)亚型流感病毒活动水平低,导致人群对其特异性免疫力下降而使其易感性增加,是造成此次长沙麓山国际学校A(H1N1)亚型流感暴发的原因之一。

KoSasa等报道HA是决定流感病毒毒力的一个关键^[9],HA蛋白通过氨基酸的不断变异来逃避宿主免疫系统,尤其以HA抗原HA1区基因的变异最为重要,HA1基因为抗原和受体的结合位点,具有高度易变性,是流感病毒发生抗原性漂移的主要原因。本研究通过对A/Yuelu/314/2009(H1N1)与疫苗株A/Brisbane/59/2007(H1N1)HA基因上的氨基酸序列进行比较,显示A/Yuelu/314/2009(H1N1)HA基因上共发生6处氨基酸变异,其中1处氨基酸变异发生在B抗原表位,其他4个氨基酸变异发生在抗原表位周围,病毒分离鉴定实验显示这6个氨基酸变异并未影响到抗原的血清学变化;比较还发现A/Yuelu/314/2009(H1N1)在RBS的附近有3个位点也发生了氨基酸变异。一般认为,一个新的变种,必须在HA1蛋白分子上有4个以上氨基酸序列发生替换,并且替换必须涉及到2~3个抗原表位^[8],所以此次的A/Yuelu/314/2009(H1N1)分离株还未形成一个新的变种;但是由于A/Yuelu/314/2009(H1N1)HA片段B抗原表位和RBS的附近发生了氨基酸变异,这也可以在某种程度上解释A(H1N1)亚型流感病毒是导致此次流感暴发的原因之一,但是这种基因特性的变异是否会导致A(H1N1)亚型流感病毒继续成为优势流行株?目前还不清楚,尚需要更多本

地区A(H1N1)亚型流感病毒的抗原性和基因特性数据来证实。

参 考 文 献

- [1] 张卓然,倪语星. 临床微生物学和微生物检验. 北京:人民卫生出版社,2004,pp.351-352.
- [2] 中国疾病预防控制中心. 中国流感/人禽流感监测实施方案. <http://www.Chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n294176/n339986/appendix/20050819003.doc> (2005.8.19).
- [3] 中华人民共和国卫生行业标准流行性感冒诊断标准WS 285-2008. 北京:人民卫生出版社,2008,pp.3-14.
- [4] 周丽,程小雯,吕星,等. 深圳市2007年H3N2亚型流感病毒基因特性分析. 中国热带医学,2008,8(6):900-908.
- [5] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, 2004, **303**(5665): 1838-1842.
- [6] Basak S, Pritchard DG, Bhowan AS, et al. Glycosylation sites of influenza viral glycoproteins: characterization of tryptic glycopeptides from the A/USSR(H1N1) hemagglutinin glycoprotein. *J Virol*, 1981, **37**(2): 549-558.
- [7] 袁洁,苏良,叶文,等. 长沙市流行性感冒病毒病原学检测结果分析. 实用预防医学,2006,8(4):917-918.
- [8] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒及其实验技术. 北京:中国三峡出版社,1997,pp.2-43.
- [9] Kobasa D, Takada A, Shinya K, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, **431**(7009): 703-707.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下,希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *SE*。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。