

我国 H₇N₂ 亚型禽流感病毒 CK/HB/1/02 株分离鉴定

王传彬, 田克恭, 王宏伟, 孙明, 遇秀玲, 金萍, 陈西钊

(全国畜牧兽医总站农业部兽医诊断中心, 北京 100094)

Isolation and Identification of H₇N₂ Avian Influenza Virus Strain

CK/HB/1/02 in China

WANG Chuan-bin, TIAN Ke-gong, WANG Hong-wei, SUN Ming, YU Xiu-ling,
JIN Ping, CHEN Xi-zhao

(National Veterinary Diagnostic Center, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China)

Abstract: A virus isolate from domestic chicken agglutinated chicken erythrocytes and was found as globular enveloped virion of 90nm~100nm diameters under TEM. The isolate was identified as H₇N₂ Avian influenza virus(AIV) by HI and NI assays and designated as A/Chicken/Hebei/1/2002(H₇N₂, or briefly as CK/HB/1/02. After inoculating to SPF chicken, the virus was recovered from cloacal swabs and the antibody to H7 was detected at 7 days post-infection (DPI). The IVPI was 0.00 and postmortem examination showed hemorrhages in several tissues and organs indicating that the virus was LPAIV. HA gene of the isolate exhibited 99.4% nucleotide sequence identity to A/Afri. Star./Eng-Q/79(H₇N₁) virus, 96.8%~98.2% to H₇N₂ virus isolated from Italy and Israel, and only about 81.0% to American H₇N₂ Strain. The amino acid at the cleavage site of HA is -KGR-GLF-, which implies the isolate should be of low pathogenicity.

Key words: Avian influenza virus; H₇N₂ subtype; Isolation and Identification; Pathogenicity

摘要:从鸡组织中获得了一株分离物,能凝集鸡红细胞,经负染后电镜观察可见球形、外被囊膜的病毒颗粒,直径约90~100nm;经血凝抑制和神经氨酸酶抑制试验鉴定为 H₇N₂ 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV),命名为 A/Chicken/Hebei/1/2002(H₇N₂)(简称 CK/HB/1/02)。将该病毒接种 SPF 鸡,测得静脉接种致病指数(IVPI)为 0.00,剖检可见实验鸡多种组织器官有出血性变化,判为低致病力 AIV;接种后 7d 从实验鸡泄殖腔棉拭中回收病毒,并在血清中检测到 H₇ 亚型 AIV 抗体。经 RT-PCR 扩增了病毒 HA1 基因片段(约 1.1kb),测定其核苷酸序列并与 GenBank 中的序列比较。结果表明,该病毒的 HA1 基因序列与 AIV 标准株 A/Afri. Star./Eng-Q/79(H₇N₁)的 HA1 基因同源性最高,为 99.4%;与以色列和意大利 H₇N₂ AIV 的同源性较高,为 96.8%~98.2%;与美国 H₇N₂ 病毒的同源性很低,约为 81.0%;其 HA 裂解位点的氨基酸序列为 -KGR-GLF-,符合低致病力 AIV 的特征。

关键词: 禽流感病毒; H₇N₂ 亚型; 分离鉴定; 致病性

中图分类号: S831.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)06-0632-05

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的血凝素包括 H₁~H₁₆种亚型,其中 H₅和 H₇亚型常为高致病力的禽流感(High Pathogenic Avian Influenza, HPAI)病毒^[1]。HPAI 在全世界范围内均有发生,给养禽业带来严重危害,并威胁人类健康,是

国际兽医局(OIE)规定的 A 类传染病^[2],我国也将此病列为一类动物疫病^[3]。

近年来, H₅ 亚型禽流感在亚洲肆虐,受到人们的关注,但不可忽略的是, H₇ 亚型禽流感也常常是高致病力的 AIV。近几年 H₇N₂ 在北美造成了重大

收稿日期:2005-06-24,修回日期:2005-09-12

作者简介:王传彬(1969-),男,江苏省连云港市人,兽医师,博士,从事动物病毒病诊断及研究。

Tel:010-62891257, E-mail:nvdcwang@sina.com

损失,2003 和 2004 年,荷兰和加拿大还分别发生了 H₇ 亚型 AIV 感染人的事件,而最近朝鲜发生的 H₇ 亚型禽流感又带来了新的威胁。因此,研究国内 H₇ 亚型禽流感病原的特性,对于动物疫病防制和公共卫生都具有重要意义。但到目前为止,我国已经分离到的 AIV 包括 H₁、H₃、H₄、H₅、H₉ 及 H₁₄ 等亚型,未见关于鸡群 H₇ 亚型 AIV 分离株的正式报道。

本文报道了从国内鸡群分离鉴定的 1 株 H₇N₂ 亚型 AIV,分析了该病毒 HA1 基因序列特征,测定了病毒对 SPF 鸡的致病指数,分析了病毒的潜在致病力,证实了鸡在感染后能向外界排出病毒,描述了机体在感染后的抗体消长规律。其研究结果,可为 H₇ 亚型禽流感的防制和研究提供技术数据和实验材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鸡肺、肝、脾,取自河北省某县 2002 年临床送检鸡。10 日龄 SPF 鸡胚,6 周龄 SPF 鸡,购自北京实验动物研究中心,附有监测报告(禽流感阴性)。抗 AIV H₅、H₇、H₉ 亚型血凝素标准血清及抗原,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。抗 H₁N₁、H₂N₂、H₃N₃ 亚型 AIV 神经氨酸酶标准血清,日本北海道大学兽医学院惠赠。新城疫病毒(NDV)标准阳性血清及抗原,购自中国兽药药品监察所。AIV A/CK/HN/1/98(H₉N₂)由本单位保存。总 RNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、AMV 反转录酶均购自 Promega 公司。透射电子显微镜,日立公司生产。II 型生物安全柜,Bellco 公司生产。JH-I 型负压隔离饲养器,天津净化设备厂生产。

1.2 RT-PCR 引物

参照 AIV-HAGEN(H₇N₇)的 HA1 序列,自行设计一对引物,包括血凝素裂解位点,由赛百盛公司合成。

上游引物 P1: 5' CAGACAAAATATGCCT TGGGC 3' ,

下游引物 P2: 5' TTGTAATCTGCCGAG TTCCC 3' ,

1.3 病毒分离

将送检病料磨碎、冻融和过滤除菌后,接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,37℃ 继续孵育。72h 左右鸡胚死亡后,收集尿囊液,用同样方法作传代培养。按常规方法^[1],用 1% 鸡红细胞悬液测定分离物对红细胞的凝集活性。

1.4 病毒血凝素亚型鉴定

按文献^[1]介绍的方法,用禽流感病毒 H₅、H₇、

H₉ 亚型标准血清和 NDV 抗血清,进行红细胞凝集抑制(HI)试验,确定病毒的血凝素亚型。同时设 H₅、H₇、H₉ 血凝素抗原和 NDV 血凝素抗原对照。

1.5 病毒神经氨酸酶亚型鉴定

按文献^[1]介绍的神经氨酸酶(NA)活性抑制(NI)试验方法,先测定病毒液的 NA 活性,再用各亚型神经氨酸酶标准血清处理病毒液,以同样方法测定 NA 活性,判断各亚型标准血清是否能抑制病毒的 NA 活性。

1.6 病毒形态观察

收集具有血凝活性的鸡胚尿囊液,经差速离心悬浮至原体积的 1/100,再经 20%~60% 蔗糖等密度梯度离心,收集病毒带透析除去蔗糖,再经醋酸铀负染,用透射电子显微镜观察。

1.7 测定病毒对 SPF 鸡致病性

将 SPF 鸡随机分为二组,在二个负压隔离器中饲养。将经检验无菌的尿囊液病毒液(对 1% 鸡红细胞凝集效价为 2⁸)用生理盐水作 1:10 稀释,接种一组鸡(10 只),每只鸡经翅静脉注射 0.1mL。另外一组鸡(4 只)注射同量生理盐水作为对照组。

每天观察并记录鸡群情况,至接种后 10d,按照文献^[1]介绍的方法,计算静脉接种致病指数(IV-PI)。剖检部分实验鸡,观察各组织脏器病变。

定期采集实验鸡的血样,分离血清,用 H₇ 亚型标准抗原测定血凝抑制(HI)抗体水平。

于接种后 7d,采集实验鸡泄殖腔棉拭,经双抗处理、过滤除菌后接种 9 日龄 SPF 鸡胚。继续孵育 3d,测定尿囊液血凝活性,并用 HI 试验鉴定分离物。

1.8 HA1 基因序列分析

提取鸡胚尿囊液中病毒的 RNA 作为模板,以 P1 为引物,按常规方法反转录,再用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增,以琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物。回收纯化扩增产物,送上海申友公司测定核苷酸序列,与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性比较,并对该基因编码的氨基酸序列进行分析,判断该毒株的潜在致病力。

1.9 病毒命名

按照流感病毒的国际系统分类命名标准^[4],对分离株进行命名。

2 结果

2.1 病毒分离

鸡胚在接种后 72h 左右死亡,胚体充血。初代尿囊液对 1% 鸡红细胞的凝集效价为 64~128,经 1

次传代后,尿囊液的血凝价为 256~512。

2.2 病毒血凝素亚型鉴定

收获尿囊液,配成 8 单位的血凝素抗原,测定血凝抑制效价,结果见表 1。分离株的血凝活性能被 H₇ 标准血清抑制,而不被 H₅、H₉ 和 NDV 标准血清抑制,由此判定其血凝素为 H₇ 亚型。

表 1 分离物 HI 试验鉴定结果

Table 1 HI titers of the isolates (in log₂)

| Antigen detected | Standard serum | | | |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | NDV | H ₅ | H ₇ | H ₉ |
| H ₅ | <1 | 10 | 3 | 2 |
| H ₇ | <1 | 5 | 9 | 1 |
| H ₉ | <1 | 3 | 1 | 9 |
| NDV | 10 | <1 | <1 | <1 |
| Isolate | <1 | 1 | 8 | 1 |

2.3 神经氨酸酶亚型鉴定

神经氨酸酶抑制试验结果见表 2,神经氨酸酶活性能被 H₂N₂ 标准血清抑制,而不被 H₁N₁、H₅N₃ 标准血清抑制,由此判定分离物的神经氨酸酶为 N₂ 亚型。综合以上血凝素和神经氨酸酶的鉴定结果,分离株为 H₇N₂ 亚型 AIV。

2.4 病毒形态

电镜观察可见病毒分离株为球形颗粒,直径约 90~100nm,外层可见囊膜结构,表面有突起(图 1)。

表 2 分离物 NI 试验鉴定结果

Table 2 NI titers of the isolates

| Antigen detected | Standard serum | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| | H ₁ N ₁ | H ₂ N ₂ | H ₅ N ₃ | SPF 鸡 |
| Isolate | <2 | 640 | <2 | <2 |
| A/CK/HN/1/98(H ₉ N ₂) | <2 | 320 | <2 | <2 |

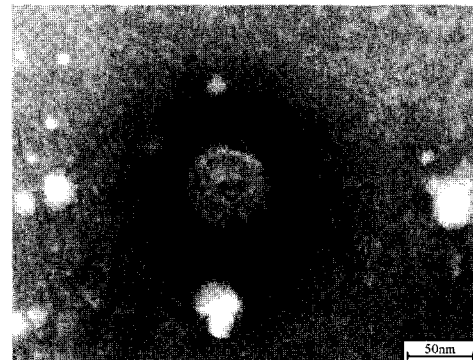


图 1 病毒分离株 A/Chicken/Hebei/1/2002 (H₇N₂) 透射电镜照片

Fig. 1 Picture of A/Chicken/Hebei/1/2002 (H₇N₂) under TEM

2.5 SPF 鸡静脉接种致病指数

接种 SPF 鸡后逐日观察的结果见表 3。至接种后 10d 未见明显症状。统计结果表明,CK/HB/1/02 AIV 的静脉接种指数(IVPI)为 0.00。剖检鸡可见多种组织出血性变化,包括腺胃乳头、盲肠扁桃体出血,胰腺出血斑等,此综合判定为低致病力禽流感

表 3 CK/HB/1/02 AIV 人工感染鸡试验结果

Table 3 The observation results of CK/HB/1/02 AIV inoculated chicken

| Clinical Symptom | Days post-inoculation (DPI) | | | | | | | | | | Total | Score |
|------------------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| Normal | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 |
| Sick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0×1 | 0 |
| Seriously Sick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0×2 | 0 |
| Dead | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0×3 | 0 |
| Total | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 0 |

病毒。

2.6 人工感染鸡 H₇ 抗体检测

实验鸡在接种病毒后 1 周可检出 H₇ 亚型 AIV 血清抗体,2/8 的个体为阳性(HI 效价 ≥ 5log₂) 接种后第 3 周 H₇ 抗体阳转率达 100%(8/8)。抗体消长情况见图 2,接种后 3~5 周为抗体高峰期,之后抗体水平缓慢下降,至接种后 33 周,仍可检测到抗体。

2.7 病毒回收

实验鸡接种病毒分离株后第 7d,可从鸡泄殖腔的棉拭中分离到具有血凝活性的病毒,经血清学鉴定为 H₇ 亚型 AIV。对照组病毒分离结果为阴性。

2.8 HA 基因片段扩增测序

RT-PCR 产物经电泳后,得到与预期大小相符的 DNA 片段,而空白尿囊液阴性对照无扩增条带。

测得分离株 HA 基因 1081bp 片段的核苷酸序列,包括 HA1 和裂解位点序列。

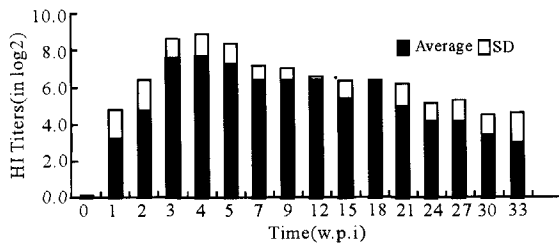


图2 CK/HB/1/02 AIV 感染鸡 HI 抗体消长规律

Fig.2 HI antibody titer of CK/HB/1/02 infected chicken

2.9 HA 基因序列同源性比较

经 BLAST 软件比较,分离株的 HA1 基因与 GenBank 中 A/Afri. St./Eng-Q/983/79 (H₇N₁) 病毒的 HA1 基因序列同源性最高,为 99.4%;与以色列、意大利 H₇N₂ AIV 的同源性较高(为 96.8%~98.2%);与美国 H₇N₂ 病毒同源性很低,仅为 81%左右见表 4。

2.10 HA 裂解位点氨基酸序列

该病毒在 HA1 和 HA2 亚单位之间的裂解位

表 4 AIV 分离株与其它 H₇ AIV HA 基因同源性比较
Table.4 Homology rate comparison of HA gene of the AIV isolate to other H₇ AIV strains

| Strains | GenBank ID | Identity to CK /HB/1/02(%) |
|--|------------|----------------------------|
| A/Afri. Star. /Eng-Q/938/79(H ₇ N ₁) | AF202232 | 99.4 |
| A/turkey/Israel/Ramon/79(H ₇ N ₂) | AF202235 | 98.2 |
| A/gull/Italy/692-2/93(H ₇ N ₂) | AF202248 | 96.9 |
| A/psittacine/Italy/1/91(H ₇ N ₂) | AF202242 | 96.8 |
| A/duck/Hong Kong/293/78(H ₇ N ₂) | IAU20461 | 92.6 |
| A/chicken/NY/14714-2/99(H ₇ N ₂) | AY240921 | 81.7 |
| A/chicken/NY/3572/98(H ₇ N ₂) | AY240917 | 81.1 |
| A/chicken/PA/149092-1/02(H ₇ N ₂) | AY240900 | 81.1 |
| A/Chicken/NewYork/13142-5/94(H ₇ N ₂) | AF072384 | 80.9 |

点处,氨基酸序列特征为-KGR-GLF-(见图 3),仅包含 1 个碱性氨基酸(-R)残基,符合低致病力 AIV 的 HA 裂解位点的序列特征。

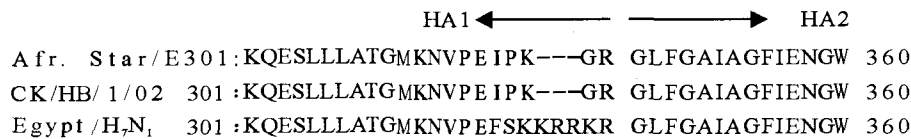


图 3 HA 裂解位点氨基酸

Fig.3 Amino acid residues at cleave-site of HA

2.11 病毒命名

根据病毒分离株的血清型、宿主、分离地区、分离顺序、分离时间和亚型,将病毒分离株命名为:A/Chicken/Hebei/1/2002(H₇N₂)简称 CK/HB/1/02。

3 讨论

禽流感病毒为 A 型流感病毒,按血凝素抗原性可分为 H₁~H₁₆ 种亚型。高致病力禽流感病毒(HPAIV)常为 H₅ 和 H₇ 血凝素亚型,能给养禽业带来毁灭性打击。自首次报道由高致病力的 A 型流感病毒引起的禽类暴发疾病以来,由高致病力 A 型流感病毒引起的禽类暴发性疾病的报道已有 18 次,其中 9 次由 H₇ 亚型 AIV 引起^[1],因此 H₇ 亚型 AIV 一直是国内外监测的重点之一。但到目前为止,我国已经鉴定和分离到的 AIV 包括 H₁、H₃、H₄、H₅、H₉ 及 H₁₄ 等亚型,尚未见关于鸡群 H₇ 亚型 AIV 分离株的正式报道。本研究从河北省的产蛋鸡群分离到了 1 株 AIV,经鉴定为 H₇N₂ 亚型,说明

国内鸡群存在 H₇ 亚型 AIV 感染。迄今虽未见大面积流行,但应当加强对该病毒的监测工作,并进行相关的储备性研究。

分离株经人工接种 SPF 鸡后,实验鸡症状不明显,静脉接种致病指数为 0.00,但实验鸡剖检和组织学检查可见明显病变,符合低致病力禽流感(LPAI)的特征;从其静脉接种致病指数看,亦符合欧洲共同体对 LPAI 的定义;其 HA 裂解位点的氨基酸序列为 KGR-GLF,与高致病力 AIV 毒株 A/FPV/Egypt/45(H₇N₁)相比较,缺少 3 个碱性氨基酸,符合低致病力 AIV 裂解位点的序列特征^[5]。因此,判定为低致病力 AIV。

CK/HB/1/02 病毒人工接种 SPF 鸡后,从第 7 天开始,用标准抗原做 HI 试验能检测到 H₇ 抗体,且抗体水平随时间推移呈规律性升高,此结果证实了所分离的毒株确为 H₇ 亚型 AIV,同时说明该病毒能感染 SPF 实验鸡,并刺激机体产生抗 H₇ 的特异抗体。

分离株经静脉接种 SPF 鸡后 1 周,可从鸡泄殖腔棉拭中回收病毒,此结果说明病毒已经感染了实验鸡,并能通过消化道排出,这意味着病毒具备在鸡体内增殖并向外界排出的能力。

近年 H₇N₂ 亚型 AIV 流行于美国,造成重大损失,荷兰于 2003 年发生了 H₇ 亚型禽流感感染并致死人的事件,而最近朝鲜也发现了 H₇ 亚型禽流感。虽然本研究结果表明目前的 H₇N₂ AIV 分离株是低致病力 AIV,但应给予足够重视。国外曾有相关报道,当低致病力 H₇ 病毒出现以后,高致病力毒株可以随后形成,意大利 1999 年 H₇N₁ 爆发流行的过程就是一个典型的例子^[6]。因此,我国应加强对 H₇ 亚型低致病力 AIV 的监测,及时发现和控制感染,防止产生新的高致病力毒株,造成新的流行,进而威胁人类健康。

分离株 HA1 基因序列与标准毒株 A/Afri. Star./Eng-Q/79(H₇N₁) 同源性最高,与以色列、意大利 H₇N₂ AIV 的同源性较高,而与美国分离的

H₇N₂ 亚型毒株同源性均较低,表明其 HA 基因可能源于欧亚群系的 H₇ 亚型禽流感病毒。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 第 2 版,北京:中国农业出版社,2002. 16,97,138-156.
- [2] Dennist J, Alexander. A review of influenza in different bird species [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000,74:3-13.
- [3] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌. 禽流感研究:鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. *中国兽医杂志*,1994,20(10):3-5.
- [4] 郭元吉. 流行性感胃病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997. 6-7.
- [5] Wood G W, Mclauley J, Bas W E, *et al.* Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A virus of H₅ and H₇ subtypes [J]. *Archive Virology*, 1993, 130:209-213.
- [6] Banks J, Speidel E C, Moore E, *et al.* Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H₇N₁ avian influenza viruses in Italy [J]. *Archives of Virology*, 2001,146: 963-973.