

一株鸭源 H9 亚型禽流感病毒分离株生物学特性研究

刘宇卓¹, 魏和生², 黄福林², 李银¹, 魏雪涛¹, 张敬峰¹

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所 家禽重大疫病控制研究室, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省高淳县畜牧兽医站, 江苏 高淳 211300)

摘要:对分离到的 1 株鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 (NJ01 株) 的生物学特性进行了研究。研究结果显示: 其静脉致病指数 (MPI) 为 0, 脑内致病指数 (CPI) 为 0.26, 血凝解脱时间 (NHAT) 为慢, 血凝热稳定时间 (HOT) 为 30 min。以 $10^{8.0}$ ELD₅₀/羽的剂量静脉感染 26 日龄非免疫鸭, 可使 40% 鸭致死, 且从攻毒后存活鸭 1 d + 2 d 喉拭子中 100% 分离到该病毒; 而以相同剂量静脉感染 1 月龄 SPF 鸡后不出现死亡, 但攻毒后 4 ~ 6 d 的泄殖腔拭子中, 均可 100% 再分离到该病毒。毒株血凝素基因的 RT-PCR 试验结果显示, 与 1997 年香港 3 个分离株的同源性为 94.8% ~ 96.0%, 其 HA 裂解位点处氨基酸序列为 -RSSRG-。研究结果表明该 NJ01 株为低致病性禽流感病毒, 属欧亚大陆分支, 在 SPF 鸡及非免疫鸭体内均能很好地复制。

关键词: 禽流感; H9 亚型; 生物学特性; 病毒

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001 - 8581 (2007) 09 - 0097 - 03

Biological Characteristic of A Duck - derived H9 Subtype Avian Influenza Virus

LIU Yu - zhuo¹, WEI He - sheng², HUANG Fu - lin², LI Yin¹, WEI Xue - tao¹, ZHANG Jing - feng¹

(1. Key Laboratory of Poultry Disease Diagnosis, Institute of Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Gaochun County, Gaochun 211300, China)

Abstract: The biological characteristic of a strain H9N2 A/V that isolated from duck was investigated in this paper. The results indicated that MPI was 0, CPI was 0.26, NHAT was slow, HOT was 30 minutes. The assay of intravenous pathogenicity showed that the mortality of 26 - day - old ducks was 40% and the reisolated rate of throat swabs of susceptible ducks was 100% on the 1 ~ 2 day after challenging with $10^{8.0}$ ELD₅₀ NJ01 virus per duck, respectively. In addition, the reisolated rate of cloaca swabs of 30 - day - old special free chicks was 100% on the 4 ~ 6th day after challenging with the same dose. The Hemagglutinin (HA) gene was amplified by RT - PCR and the sequence analysis results indicated that the homology of HA nucleotide sequence was between 94.8% and 96.0% as compared with three strains isolated from Hongkong, the amino acid sequence of cleavage site region was -RSSRG-. It was concluded that the NJ01 strain was low pathogenic avian influenza virus and belong to Eurasian lineage. It can replicate in SPF chicken and non - immune ducks.

Key words: Avian Influenza; H9 subtype; Biological characteristic

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的一种禽类 (家禽和野禽) 感染或疾病综合症。鸡、火鸡、鸭、鹅和鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等均可感染^[1]。最早从鸭中分离到流感病毒的是捷克斯洛伐克和英国, 我国自 1994 年陈伯伦报道从鸡中分离到 H9 亚型禽流感后, 我国以 H9 亚型为主的中低致病力禽流感广泛流行。随着禽流感病毒的不断变化, 近几年来时有野禽及迁徙鸟感染发病的报道 (主要是高致病性禽流感), 这样随着候鸟的迁延, 禽流感病毒迅速在全球蔓延, 而且中等毒力以下的 A/V, 尤其是 H9N2 病毒在家禽中循环, 是目前影响我国乃至整个亚洲养禽业的主要流感病毒亚型。自从 1997 年以来, 相继从具有感冒症状的人体内分离到 H9N2 病毒, 表明低致病性 A/V 对公众的健康也已经构成了威胁^[3]。

本研究室自发病雏鸭体内分离到 1 株禽流感病毒, 经鉴定为 H9N2 亚型, 命名为 A/Duck/NanJing/01/1999

(H9N2), 简称 NJ01。笔者对其生物学特性进行了一系列研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 毒株 NJ01: 由江苏省农科院兽医研究所禽病研究室分离、鉴定和保存。SPF 鸡胚、SPF 鸡: 购自南京药械厂。非免疫鸭: 购自南京某鸭场。

1.2 方法

1.2.1 脑内接种致病指数 (CPD)、静脉致病指数 (MPI) 测定 均按参考文献 [4] 的方法进行。

1.2.2 病毒血凝解脱时间 (NHAT) 试验、血凝素热稳定性 (HOT) 试验 均按参考文献 [3] 的方法进行。

1.2.3 NJ01 毒株对鸭的感染性试验 取此病毒尿囊液, 通过静脉注射感染 26 日龄非免疫樱桃谷雏鸭, 攻毒量为 $10^{8.0}$ ELD₅₀/羽份, 注射 10 只; 另取 5 只作为对照, 每只静脉注射 0.5 mL 灭菌生理盐水。均观察 14 d。对死

收稿日期: 2007 - 07 - 03

基金项目: 江苏省科技推广项目。

作者简介: 刘宇卓 (1967 -), 女, 黑龙江泰康人, 硕士, 副研究员, 主要从事禽病的防制研究。

亡鸭进行剖检,并取脏器进行病毒分离,同时于攻毒后第1~5 d,用棉拭子采集存活鸭的喉头分泌物,置30%甘油盐水中,于-18℃保存,用于病毒的重分离,保存及病毒分离方法按参考文献[6]的方法。

1.2.4 NJ01毒株对鸡的感染性试验 取毒液静脉注射1月龄SPF鸡,攻毒量为 $10^{8.0}$ ELD₅₀/羽份,注射10只,另5只作为对照,每只静脉注射0.5 mL灭菌生理盐水,观察14 d。攻毒后4~6 d连续采集泄殖腔拭子,方法同上。

1.2.5 NJ01毒株HA基因RT-PCR测定 根据GenBank上发表的H9N2亚型AM的HA基因的序列,设计了1对引物,采用RT-PCR方法,测定并分析HA基因片段的序列,方法见文献[7]。PCR引物序列为P1: 5' AGCAAAA GCA GGGGAA GTTCACA 3', P2: 5' AGTAGAAA-CAAGGGTGT TTTT GCCAAT 3'。

2 结果与分析

2.1 CPI的测定 脑内接种1日龄SPF雏鸡后,连续观察8 d,对照组正常,根据CPI=总分/总和计算其值为0.26。

2.2 IVP的测定 取分离毒液静脉接种6周龄SPF鸡后,观察10 d,结果发现接种组个别鸡只出现一过性下痢,很快恢复正常,而对照组鸡在观察期内均正常,通过计算,NJ01株的MPI值为0。

2.3 NHAT测定 用常规方法测定NJ01株毒液的HA后,振荡,使之混合均匀,置4℃过夜,观察见出现凝集,再振荡后室温放置2 h,仍出现凝集,即知本毒株为慢解脱型。

2.4 HOT测定 取毒液装入6支试管,1 mL/支,置56℃恒温水浴,水浴至1、3、5、10、30、60 min时,分别测定各管毒液的HA,结果在30 min后,其HA价降至 2^2 ,因此,其HOT值为30 min。

2.5 对26日龄鸭的感染性试验

2.5.1 攻毒后死亡鸭的病毒重分离 以含 $10^{8.0}$ ELD₅₀的NJ01静脉攻击26日龄鸭后,于48 h内出现死亡,死亡率为40%;对死亡鸭喉头、泄殖腔拭子及组织病毒重分离情况见表1。由表1可知,喉拭子及肺组织的病毒重分离率均为100%,而泄殖腔及肝、肾的病毒重分离率都较低。

表1 攻毒后死亡鸭病毒重分离情况

攻毒鸭数 (只)	死亡 (只)	棉拭子		组织		
		喉拭子	泄殖腔拭子	肺	肝	肾
10	4	4/4	0/4	4/4	1/4	0/4

注:表中结果为病毒重分离阳性数/死亡鸭数。

2.5.2 攻毒后存活鸭的病毒重分离 以含 $10^{8.0}$ ELD₅₀的NJ01静脉攻击26日龄鸭后,存活鸭不同时间泄殖腔及喉拭子病毒重分离情况见表2。由表2可知,在1~2 d,喉拭子的病毒重分离率最高,均达100%,而泄殖腔拭子

的病毒重分离率均为0%。

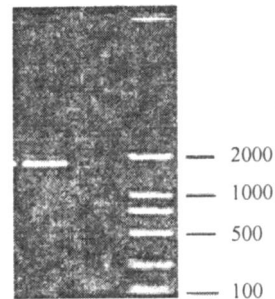
表2 攻毒后存活鸭不同时间不同来源拭子病毒重分离结果

1d		2d		3d		4d		5d	
喉	泄殖腔	喉	泄殖腔	喉	泄殖腔	喉	泄殖腔	喉	泄殖腔
6/6	0/6	6/6	0/6	2/4	0/4	1/4	1/4	0/4	0/4

注:表中代表病毒重分离阳性数/存活鸭数。

2.6 NJ01株对鸡的感染性试验结果 以含 $10^{8.0}$ ELD₅₀的NJ01静脉攻击1月龄鸡后,在攻毒后4~6 d内连续采集试验鸡泄殖腔拭子进行病毒分离。病毒分离结果:连续3 d的病毒重分离率均为100% (5/5、10/10、5/5),说明NJ01毒株能在其体内很好地复制,对1月龄SPF鸡的感染性很强。

2.7 毒株HA基因的RT-PCR测定 扩增出1条约1742 bp的条带(见图1),与预期大小相符合。其HA裂解位点处氨基酸序列为-RSSRG-,没有出现连续的碱性氨基酸。其与GenBank上发表的1997年香港分离株HA基因同源性分析表明,其与香港分离株(A/Chicken/HongKong/G9/97、A/Duck/HongKong/Y280/97、A/Pigeon/HongKong/Y233/97)的氨基酸同源性为94.8%~96.0%。



1. HA gene; 2. marker

图1 NJ01株HA基因PCR产物

3 讨论

我国近几年对部分省、市、区商品蛋鸡场及养鸡专业村进行的禽流感血清学调查发现,H9亚型阳性鸡群占阳性鸡群总数的93.67%。H9亚型AI主要引起鸡的发病和死亡,肉鸡在应激条件下可造成一定死亡,蛋鸡的产蛋率可由90%~95%下降到20%^[2]。在实际生产过程中,育成鸡感染H9亚型AM后极易并发其它疾病,使得死亡率增加,存活鸡的发育缓慢,淘汰率大大增加。尤其是在很多养殖场里因不重视低致病力AM的预防,找不到真正的病因,往往造成重大的经济损失。因此,重视并加强对低致病力AM的免疫预防迫在眉睫。

H9亚型AI在鸭中很少引起发病,但研究结果表明,水禽尤其是鸭,是流感病毒的贮存库,对AM的发生及传播起到了非常重要的作用。本研究室分离到的这株AIH9亚型AM,由上述研究结果可知为低毒力毒株,但用含 $10^{8.0}$ ELD₅₀的毒量静脉攻击26日龄非免疫樱桃谷

鸭,可使 40%致死,并且攻毒后存活鸭 1~2 d 的喉拭子病毒重分离率达到 100%;1 月龄 SPF 鸡被攻毒后 4~6 d 的泄殖腔拭子病毒重分离率达到 100%。说明其在鸡、鸭体内均能复制,并且向体外排毒。攻毒能致死非免疫鸭这一点暂时无法解释,但郭雪峰等的研究表明,不同 H9N2 毒株对 SPF 鸡的损害相似,虽然看不到明显的肉眼病理变化,但组织病理学的变化较为明显和一致,主要引起组织的充血、出血和组织的坏死,损害波及多个器官,以脑、心肌及胰腺为重^[8]。如果与其它细菌或病毒混合感染,将引起严重的经济损失。所以说,一般情况下, H9 亚型 A/V 虽然不能引起水禽的明显临床症状,但水禽是其贮存宿主并具有传播作用,加强水禽免疫刻不容缓。

对扩增出的 NJ01 株 HA 基因序列分析表明,其与 GenBank 上发表的 1997 年香港分离株 HA 基因的氨基酸同源率为 94.8%~96.0%。说明 NJ01 分离株系属欧亚大陆分支,为中国大陆的重组病毒。其在 HA 裂解位点处氨基酸序列为 -RSSRG-,具有典型的低致病性毒株特点,这与所做的其它毒力试验结果相符。

本研究室还对该毒株的免疫原性及繁殖规律进行了研究^[6,9],结果表明,其对鸭具有良好的免疫原性,并且在鸡胚上能够很好地繁殖,是一株较好的制苗用毒株。

参考文献:

- [1] B. W. 卡尔尼克. 禽病学 (第十版) [M]. 高福, 苏敬良译. 北京: 中国农业出版社, 1999. 742~758.
- [2] 甘孟侯. 禽流感 (第二版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 98~230.
- [3] Doan C, Nguyen, Timothy M. Uyeki, Samadhan Jadhao, et al. Isolation and Characterization of Avian Influenza Viruses, Including Highly Pathogenic H5N1, from Poultry in Live Bird Markets in Hanoi, Vietnam, in 2001 [J]. Journal of Virology, 2005, 79 (7): 4201~4212.
- [4] 兽医生物制品质量标准 2001 版 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 230~231.
- [5] 刘振湘. 七彩山鸡新城疫病毒的分离及生物学特性测定 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (4): 318~319.
- [6] 刘宇卓, 李银, 张敬峰, 等. 鸭 H9 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗的免疫原性 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21 (4): 316~321.
- [7] 李曦, 于康震, 田国斌, 等. H9N2 禽流感病毒中国分离株血凝素基因序列的初步分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24 (4): 2~4.
- [8] 郭雪峰, 廖明, 辛朝安. H9N2 亚型禽流感病毒的致病特性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2001, 22 (3): 70~72.
- [9] 李银, 刘宇卓, 张敬峰, 等. 一株鸭源 H9 亚型禽流感病毒在鸡胚上传代及繁殖规律的研究 [J]. 江苏农业科学, 2006, (4): 94~96.

(上接第 93 页)

参考文献:

- [1] 李阳兵, 王世杰, 李瑞玲. 岩溶生态系统的土壤 [J]. 生态环境, 2004, 13 (3): 434~438.
- [2] 周政贤. 茂兰喀斯特森林科学考察集 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1987.
- [3] 曹建华, 袁道先, 潘根兴. 岩溶生态系统中的土壤 [J]. 地球科学进展, 2003, 18 (1): 37~44.
- [4] 李强, 戴亚南, 游省易, 等. 云南白水台钙华沉积成因及主要沉积类型研究 [J]. 中国岩溶, 2002, 21 (3): 178~181.
- [5] 刘再华, 李强, 孙海龙, 等. 云南白水台钙华水池中水化学日变化及其生物控制的发现 [J]. 水文地质工程地质, 2005, 32 (6): 10~15.
- [6] 戴亚南, 游省易, 李强, 等. 云南白水台泉华台地旅游业可持续发展浅析 [J]. 中国岩溶, 2002, 21 (3): 227~232.
- [7] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [8] 刘文利, 罗广军. 不同林型下土壤理化性质的差异研究 [J]. 吉林林业科技, 2006, 35 (1): 26~28.
- [9] 孟昭虹, 周嘉. 哈尔滨城市土壤理化性质研究 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2005, 21 (4): 102~105.
- [10] 龙健, 李娟, 邓启琼, 等. 贵州喀斯特山区石漠化土壤理化性质及分形特征研究 [J]. 土壤通报, 2006, 37 (4): 635~639.

- [11] 任可爱, 肖和艾, 李玲. 洞庭湖区稻田土壤有机质和 N、P、K 含量变化 - 以湘阴县为例 [J]. 农业现代化研究, 2005, 26 (2): 150~153.
- [12] 孙儒泳, 李博等. 普通生态学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [13] 任京辰, 张平究, 潘根兴. 岩溶土壤的生态地球化学特征及其指示意义 —— 以贵州贞丰 - 关岭岩溶石山地区为例 [J]. 地球科学进展, 2006, 21 (5): 504~512.
- [14] 谭宏伟, 周柳强, 谢如林, 等. 广西亚热带岩溶地区石灰性土壤钾素特征研究 [J]. 中国生态农业学报, 2006, 14 (3): 58~60.
- [15] 刘世全, 高丽丽, 蒲玉琳, 等. 西藏土壤 P 素和 K 素养分状况及其影响因素 [J]. 水土保持学报, 2005, 19 (1): 75~78.
- [16] 游秀花. 马尾松天然林不同演替阶段土壤理化性质的变化 [J]. 福建林学院学报, 2005, 25 (2): 121~124.
- [17] 路洪海, 周蓓, 章程. 不同地质背景下发育的土壤及其对物种多样性的影响 [J]. 地理与地理信息科学, 2007, 23 (1): 83~86.
- [18] 刘志良, 郑诗樟, 石和芹. 丘陵红壤不同植被恢复方式下土壤酶活性的研究 [J]. 江西农业学报, 2006, 18 (6): 91~94.
- [19] Saif H T, Sneek N E, Bighan J M. Pedogenic influence on base saturation and calcium/magnesium ratios in soils of South-eastern Ohio [J]. Soil Sci Soc Am J., 1997, 61 (2).