

谭 丹,黄建龙,王昌建,等. 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒的致病性[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):187-188.

## 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒的致病性

谭 丹<sup>1,2</sup>,黄建龙<sup>2</sup>,王昌建<sup>2</sup>,刘道新<sup>2</sup>,邓国华<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所/农业部动物流感重点开放实验室/兽医生物技术国家重点实验室,黑龙江哈尔滨 150001;

2. 湖南省动物疫病预防控制中心,湖南长沙 410129)

**摘要:**为了解从我国洞庭湖地区鸡和鸭中分离的 H9N2 亚型禽流感病毒的生物学特性,本研究选用具有代表性的 2 株病毒对 SPF 鸡及 BALB/c 小鼠进行致病性试验。结果显示:2 株毒株均能使鸡感染并排毒,并且使同居鸡感染排毒,但不引起鸡明显的临床症状及死亡;2 株毒株感染 SPF 鸡后能在鸡喉分离到高滴度病毒,明显高于泄殖腔,且排毒期主要集中于第 1~7 天;从感染鸡脏器中病毒复制情况看,供试的 2 株病毒均未在脑等组织脏器中复制,而 2 株病毒感染 BALB/c 小鼠后,在小鼠脏器中复制情况却不一致,A/CK/HuN/S4591/2011(H9N2)毒株在小鼠鼻甲及肺脏中均能检测到病毒,但是 A/DK/HuN/S4111/2011(H9N2)毒株仅在小鼠鼻甲中检测到较高滴度的病毒。

**关键词:**H9N2 亚型禽流感病毒;致病性;SPF 鸡;BALB/c 小鼠

**中图分类号:**S852.65<sup>+</sup>7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)05-0187-02

H9N2 亚型禽流感病毒在 1966 年的美国威斯康辛州一个火鸡养殖场中首次被分离到,1994 年陈伯伦等首次在中国从临床病鸡体内分离到 H9N2 亚型禽流感毒株<sup>[1]</sup>。Choi 等对香港活禽市场禽群的抽样检测,表明 H9N2 亚型禽流感病毒是 2001—2003 年间的禽流感病毒优势亚型<sup>[2]</sup>。近年来,H9N2 亚型禽流感的流行变得日益频繁,病毒也进入了一个快速进化阶段,受体结合位点的突变导致出现具有能结合人和哺乳动物流感病毒受体的特性,在中国南方地区和香港均出现了人感染 H9N2 亚型 AIV 的病例<sup>[3]</sup>。有专家预测 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 和 NA 基因相对频繁的变异,使其可能成为毒力较强的毒株,成为下次流感大流行的亚型,对公共健康具有潜在的重大威胁<sup>[4]</sup>,因此,加强 H9N2 亚型禽流感病毒变异株的监测和研究具有重要的现实意义。本研究从外表健康的鸡和鸭体内分离的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒毒株对 SPF 鸡和 BALB/c 小鼠进行感染性试验,以期了解这些毒株的致病性和种间传播能力,为该地区禽流感的防控提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病毒

基于对 2011—2012 年从我国洞庭湖地区鸡和鸭中分离毒株序列的分析结果,选取 2 株具有代表性的 H9N2 亚型禽流感毒株开展 SPF 鸡和 BALB/c 小鼠感染性试验。2 株病毒分别为 A/DK/HuN/S4111/2011(H9N2)和 A/CK/HuN/S4591/2011(H9N2)。

#### 1.2 试验动物

11 日龄 SPF 鸡胚和 4 周龄 SPF 鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 SPF 实验动物中心提供;6 周龄 BALB/c 小

鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

#### 1.3 方法

1.3.1 鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>)的测定 纯化种毒用无菌 0.01 mol/L 的 PBS 液(pH 值 7.2)进行 10 倍稀释后,以每个稀释度 0.1 mL 的剂量经尿囊腔接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 4 枚,37℃ 孵化器内孵育 72 h 后,收获所有鸡胚(包括死亡和未死亡鸡胚)的尿囊液,测定血凝价,按照 Reed-Muench 法计算 EID<sub>50</sub>。

1.3.2 SPF 鸡感染试验 每只鸡鼻腔接种 1×10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub> 的病毒悬液 100 μL,共接种 11 只 SPF 鸡,同时放入 2 只 SPF 鸡作为同居感染对照,于负压隔离器中饲养。感染后每隔 24 h 采集泄殖腔和喉头拭子放入 1 mL 的含有双抗的 PBS 中,-80℃ 保存,连续采集 14 d,拭子接种鸡胚进行病毒滴度测定,分析其排毒规律。鸡感染后第 3 天,随机解剖感染鸡群中 3 只鸡,取组织脏器(脑、胸腺、气管、心、肝、脾、肺、肾、胰脏、盲肠扁桃体、法氏囊)用于病毒分离测定,病毒感染 21 d 后采集存活鸡血清,检测血清转阳情况。

1.3.3 BALB/c 小鼠感染试验 将 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 8 只小鼠,1 组作为对照,其余 2 组用于攻毒,攻毒之前称小鼠体质量,记为第 0 天体质量数据,将 BALB/c 小鼠经 CO<sub>2</sub> 轻度麻醉后,每只小鼠 50 μL 1×10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub> 的病毒剂量鼻腔接种,每株病毒感染 8 只 BALB/c 小鼠,攻毒后连续 14 d 于每天同一时间称量小鼠体质量,记录小鼠临床表现、发病及体质量变化情况,同时攻毒后第 3 天,将 3 只小鼠无菌安乐死,采集脑、鼻甲、脾、肾和肺用于病毒分离测定。

1.3.4 病毒滴度测定 采集的喉、泄殖腔拭子及脏器,研磨后振荡充分混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 3 min。脏器按照 0.1 g 组织加 1 mL 含双抗的 PBS,匀浆前加入 1 粒高压灭菌的钢珠,在组织匀浆机中充分研磨(频率 30 次/s 研磨 3 min),组织匀浆液于 4℃ 12 000 r/min 离心 3 min,在生物安全柜中,用含有双抗的 900 μL PBS 对拭子及脏器进行 10 倍比稀释,将不同稀释度的样品稀释液及原样品液接种 11 龄

收稿日期:2013-09-10

作者简介:谭 丹(1987—)女,湖南隆回人,硕士研究生,主要从事流感病毒分子生物学研究。Tel:13936279212;E-mail:tandan198709@163.com。

通信作者:邓国华,博士,研究员。E-mail:dgh1971@163.com。

鸡胚,每个稀释度接种 2 个鸡胚(每胚 0.1 mL),接种后的鸡胚于 37℃ 孵化器中孵育 48 h,收取鸡胚尿囊液,测定有无血凝活性,采用 Reed - Muench 法计算病毒的滴度。

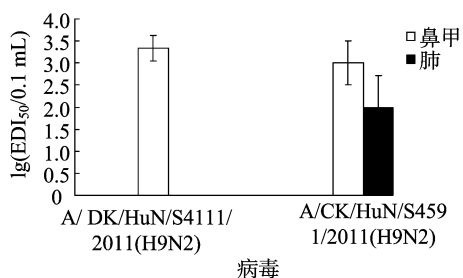
## 2 结果

### 2.1 病毒对 SPF 鸡的感染

2 株 H9N2 亚型禽流感病毒株鼻腔接种鸡后,均能使鸡感染排毒,但均不表现明显的临床症状,鸡被感染后采集其血清进行抗体检测发现,大部分鸡(23/33)的 H9N2 血清抗体为阳性。从感染鸡喉、泄殖腔排毒情况来看,能在 2 株 H9N2 亚型病毒株感染 SPF 鸡的鸡喉分离到高滴度病毒,明显高于泄殖腔,且排毒期主要集中于第 1~7 天。对同居鸡的喉和泄殖腔也进行了检测,均能检测到 H9N2 亚型禽流感病毒,可判断 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒株均能使同居鸡感染排毒,说明这些毒株在鸡群中具有一定的水平传播能力。从感染鸡脏器中病毒的复制情况看,所有毒株均未在脑、肺脏、肝脏、心脏、肾脏、脾脏、胰腺、法氏囊等组织脏器中复制。

### 2.2 病毒对 BALB/c 小鼠的感染

2.2.1 组织脏器的病毒分离滴定 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒以 50  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub>感染小鼠之后,小鼠并没有出现明显的临床症状,第 3 天解剖采集小鼠脑、肾脏、脾脏、鼻甲、肺脏器官,分别溶于 1 mL 加双抗 PBS 缓冲液中,匀浆后取上清稀释进行病毒滴定,结果(图 1)显示: A/CK/HuN/S4591/2011(H9N2)感染小鼠后,能在小鼠鼻甲及肺中复制; A/DK/HuN/S4111/2011(H9N2)感染小鼠后,在鼻甲分离到比较高的病毒滴度,但在肺脏中未分离到。



病毒滴度  $\leq 0.5$  为该脏器未检测到病毒

图1 感染小鼠脏器病毒滴定

2.2.2 小鼠体质量的变化 图 2 显示,2 株 H9N2 亚型禽流感病毒株感染后 6 d,小鼠体质量呈现下降,其余时间体质量呈持续增加。

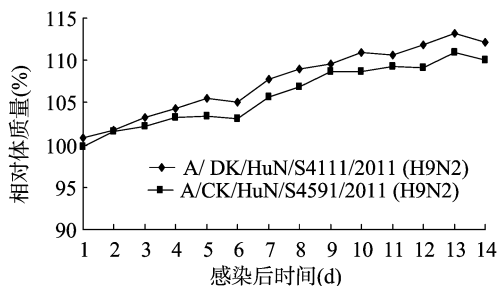


图2 小鼠感染病毒后体质量变化情况

## 3 讨论

Dong 等研究发现目前已分离的 H9N2 毒株至少有 98 种基因型<sup>[5]</sup>,各种基因型毒株对不同宿主的致病能力不一致<sup>[6-7]</sup>。Bi 等<sup>[8]</sup>在鸡体内分离到的双重组 H9N2 病毒的致病性试验发现该病毒感染鸡后能在鸡的肺部进行复制,但并不引起任何发病症状,然而感染小鼠后却能够引起小鼠死亡,而且死亡率高达 100%。朱光剑等从野生赤颈鸭、雉鸡、斑嘴鸭和绿头鸭的拭子中分离到 17 株 H9N2 毒株,对其致病性研究发现,H9N2 亚型病毒能够感染小鼠并在小鼠的肺部和气管组织中进行自由复制,肺部出现炎症,肺泡受到损伤,小鼠在感染 H9N2 病毒之后的 3~6 d,引起 20%~40% 的死亡率<sup>[9]</sup>。王守春等对 2007—2010 年在我国流行的 H9N2 毒株对 SPF 鸡的致病性研究发现,部分毒株对 SPF 鸡呈现较强的致病力<sup>[10]</sup>。本研究 2 株 H9N2 毒株对 SPF 鸡的致病性增强,在鸡喉内均能检测到高滴度的 H9N2 病毒,排毒期也延续到第 7 天,且同居鸡均感染排毒;而 2 株病毒感染 BALB/c 小鼠后在小鼠脏器中复制情况却不一致, A/CK/HuN/S4591/2011(H9N2) 毒株在小鼠鼻甲及肺脏中均能检测到病毒,而 A/DK/HuN/S4111/2011(H9N2) 毒株仅在小鼠鼻甲中检测到较高滴度的病毒。

### 参考文献:

- [1] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌. 禽流感研究 I: 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,1994,22(10): 3-5.
- [2] Choi Y K, Ozaki H, Webby R J, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China[J]. J Virol, 2004, 78(16): 8609-8614.
- [3] Butt K M, Smith G J, Chen H, et al. Human infection with an Avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5760-5767.
- [4] 徐克敏,李康生. H9 可能是人类下次流感大流行的亚型[J]. 国外医学:微生物学分册,2003(2): 7-9.
- [5] Dong G, Luo J, Zhang H, et al. Phylogenetic diversity and genotypical complexity of H9N2 influenza A viruses revealed by genomic sequence analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(2): 17212.
- [6] Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China[J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.
- [7] Guo Y J, Krauss S, Senne D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. Virology, 2000, 267(2): 79-88.
- [8] Bi J, Deng G, Dong J, et al. Phylogenetic and molecular characterization of H9N2 influenza isolates from chickens in Northern China from 2007—2009[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13063.
- [9] 朱光剑. 中国南方 H9N2 禽流感病毒的分子进化分析及其对小鼠致病性研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2012.
- [10] 王守春, 张毅, 卢春晓, 等. 2007 年—2010 年 H9N2 亚型禽流感病毒分离株对 SPF 鸡的致病特性研究[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(3): 3-6.