

吕琦,李枫棣,龚姝然,等. A/Guangdong/Th005/2017(H7N9)禽流感病毒对禽类致病力的研究[J].中国实验动物学报,2019,27(5):555-560.

Lyu Q, Li FL, Gong SR, et al. The virulence of A/Guangdong/Th005/2017(H7N9) influenza virus in poultry[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5): 555-560.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.002

A/Guangdong/Th005/2017(H7N9)禽流感病毒对禽类致病力的研究

吕琦,李枫棣,龚姝然,戚菲菲,王顺意,王冠澎,姜静,鲍琳琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 追踪 H7N9 禽流感病毒在流行中对禽类的致病力变化的趋势,并分析可能的致病机制。**方法** 通过病毒在禽类中的传代实验分析 H7N9 禽流感病毒在禽体内循环后病毒致病力变化情况,检测传代病毒感染鸡后,体温、体重变化,监测其临床症状,测定感染鸡的咽拭子和肛拭子病毒滴度。比较第 5 波 H7N9 疫情分离株 A/Guangdong/Th005/2017(Th005)和第 1 波病人分离株 A/Anhui/1/2013(Anhui)对鸡的致病性。**结果** Th005 毒株对鸡的静脉注射致病指数(intravenous pathogenic index, IVPI)评分是 3,为高致病性禽流感病毒。感染 Th005 毒株后,鸡体重显著下降,体温升高超过 42℃,随后降低直至全部死亡。而感染 Anhui 毒株后,鸡体重持续上升,无明显临床症状。Th005 毒株在鸡体内传代后对鸡仍具有致死能力。Anhui 毒株在鸡体内传代后对鸡的致病力略有提高,表现为感染后出现一过性眼部水肿,可以检测到泄殖腔排毒。**结论** Th005 毒株对鸡表现出高致病力和排毒能力,可能对禽养殖业造成损害且增加病毒在环境中长期存在。应当加强对致病力持续上升的 H7N9 禽流感病毒的监控。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒;鸡;致病性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0555-06

The virulence of A/Guangdong/Th005/2017(H7N9) influenza virus in poultry

LYU Qi, LI Fengdi, GONG Shuran, QI Feifei, WANG Shunyi, WANG Guanpeng, JIANG Jing, BAO Linlin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases;

Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: BAO Linlin. E-mail: bllmsl@aliyun.com.

【基金项目】十三五科技重大专项(2017ZX10304402-001-003);创新工程项目(2016-12M-1-014, 2016-12M-006);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-035-03)。

Funded by the Chinese National Major S & T Project (2017ZX10304402-001-003), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2016-12M-1-014, 2016-12M-006) and the Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes (ZZ13-035-03).

【作者简介】吕琦(1982—),女,硕士研究生,主要研究方向为流感病毒动物模型的创制。Email:lwdk1988@hotmail.com

【通信作者】鲍琳琳(1979—),女,副研究员,博士生导师,主要从事新发及再发传染病动物模型创制的研究。Email:bllmsl@aliyun.com

【Abstract】 Objective In 2017, a large number of poultry deaths occurred in several poultry markets, and H7N9 avian influenza virus was isolated from the dead chickens. This study will track the tendency of the pathogenicity of H7N9 virus and analyze the possible pathogenic mechanism. **Methods** The pathogenicity of the A/Guangdong/Th005/2017 (Th005) and A/Anhui/1/2013 (Anhui) viruses were compared with the intravenous pathogenicity index (Intravenous Pathogenic Index, IVPI) test in chickens. The body temperatures, body weights, and clinical symptoms of the chickens in the infection groups were continuously measured post-infection. Meanwhile, pharyngeal swabs and cloacal swabs were collected for viral titer determinations. **Results** Compared with the Anhui strain, the pathogenicity of Th005 was significantly increased in chickens. The IVPI score of Th005 reached 3 in avian. Th005 infected chickens caused a significant decrease in body weight, body temperature increased above 42℃, and all died. However, the Anhui strain caused no obvious symptoms in chickens. The virulence of Anhui strain was further increased after circulated in chickens. **Conclusions** Th005 exhibits a high pathogenicity to poultry which may impair poultry industry and increase the existence of viruses in the environment. Surveillance for the H7N9 influenza viruses, such as Th005, which had risen the virulence, should be stepped up.

【Keywords】 H7N9 subtype avian influenza virus; chicken; pathogenesis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

H7 亚型在禽类间早已存在。有记载的最早疫情是 1904 年由 H7N7 亚型禽流感病毒导致的意大利鸡瘟。此后 H7 亚型在自然界持续存在,并于 2000 年前后多次在意大利的鸡群中爆发(H7N1/H7N3)^[1]。截至 2013 年, H7 亚型禽流感病毒已导致 7000 万禽类死亡,波及区域遍布全球。2013 年初,出现 H7N9 感染人的病例^[2]。随后 H7N9 持续流行,共发生 5 波大的流行,在 2017 年第 5 波流行开始,发生多起家禽疫情,禽类出现死亡,并且能从禽类体内分离出 H7N9 禽流感病毒, H7N9 病毒已从低致病性向高致病性转变^[3]。

H7N9 对禽的致病力变化引起了多方的关注,为了确定第 5 波疫情中 H7N9 病毒株对禽的致病力,我们选用第 5 波 H7N9 分离株 A/Guangdong/Th005/2017 (Th005),以第 1 波 H7N9 分离株 A/Anhui/1/2013 (Anhui) 作为参比,通过测定鸡 IVPI 确定 2 波流行株对禽致病力的变化;通过 2 株病毒感染鸡后体温、体重、临床症状以及排毒情况分析比较 2 株病毒对鸡的致病的特点;通过病毒在鸡中的传代实验分析 H7N9 禽流感病毒在禽体内循环后病毒对禽致病力变化,以及病毒在禽中的流行趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

42 只 SPF 级白来航鸡,6 周龄,体重为(600 ± 50)g,由北京勃林格殷格翰维通公司提供【SCXK(京)2014-0002】,对其进行筛选,选出对于目前流行的流感病毒血清抗体(抗 H1、H3、H5、H7)均为阴

性者。感染实验按照世界卫生组织(World Health Organization, WHO)指导原则,均在动物生物安全三级实验室中进行(卫 ABSL3-021),所有操作经中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所伦理委员会审核并批准(批准号:BLL17005),实验动物的使用遵循 3R 原则。

1.1.2 病毒

(1) H7N9 禽流感病毒: A/Guangdong/Th005/2017 (H7N9) (简称 Th005) 由中国科学院微生物所惠赠, A/Anhui/1/2013 (H7N9) (简称 Anhui) 由中国疾病预防控制中心病毒预防控制研究所提供。

(2) Th005 鸡传代株(简称 Th005 C): 由原代病毒静脉感染实验鸡,取实验鸡死亡当天的鼻拭子上清和肺部组织研磨液于鸡胚中扩增。

(3) Anhui 鸡传代株(简称 Anhui C): 由原代病毒静脉感染实验鸡,取感染后第 5 天的鼻拭子上清于鸡胚中扩增。

1.1.3 试剂与仪器

RDE 酶(receptor-destroying enzyme) (Sigma, C8772-1VL), 火鸡血(中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源北方中心), 胎牛血清(Gibco, 16140-071), 青/链霉素(penicillin/streptomycin) 双抗生素溶液(Gibco, 15140-122), MEM 培养基(Gibco, 11095-098)。

生物安全柜(Thermo, 1287, 美国), 二氧化碳细胞培养箱(Thermo, 371, 美国), -80℃ 超低温冰箱(Thermo, 905, 美国), 15 mL, 50 mL 管离心机(Sigma, 6K15, 美国), 1 mL 管台式离心机(Kubota, 日本), 电动研磨器/均质器(Retsch, #MM400, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 Th005 和 Anhui 毒株的鸡静脉注射致病指数 IVPI 评分的比较

Th005 和 Anhui 毒株分别感染 6 周龄白来航鸡, 每组 10 只, 鸡翅下静脉注射 0.1 mL 病毒稀释液, 病毒稀释液采用生理盐水 10 倍梯度稀释, 感染后连续 10 d 记录实验鸡临床症状和死亡率。IVPI 实验评价方法参考世界动物卫生组织 (Office International des épizooties, OIE) 评分标准^[4]: IVPI 指数为每只鸡为期 10 d 的平均临床症状观察分数, 24 h 内动物完全死亡为 3 分, 10 d 内动物完全无症状为 0 分。评分 1.3 以上则判定病毒为高致病性禽流感病毒。症状评分: 0 为正常, 1 为生病, 2 为严重生病, 3 为死亡; 以下症状中呈现一种为“生病”, 呈现两种或两种以上为“严重生病”: 呼吸系统相关症状、精神沉郁、腹泻、头冠发紫, 头面水肿, 神经系统症状。

1.2.2 Th005、Th005 C、Anhui 和 Anhui C 毒株感染鸡致病力的比较

Th005、Th005 C、Anhui、Anhui C 毒株分别滴鼻感染 6 周龄白来航鸡, 每组 5 只, 感染剂量为每只 10⁶ TCID₅₀, 感染后第 0 ~ 14 天, 测定体重和肛温; 第 0 ~ 7、9、11、14 天收集咽、肛拭子测定病毒滴度。

1.2.3 滴度的测定

10 倍梯度稀释待检测拭子, 稀释液接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL 病毒稀释液, 37℃, 5% CO₂, 孵育 1 h 后, 吸走上清, 培养板中加入 200 μL 病毒培养基 (MEM 培养基中加入 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素), 3 d 后, 取细胞上清, 用 1% 火鸡血测定凝血活性, 判定细胞感染情况。利用 Reed-Muench 计算组织细胞半数感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)^[5]。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 11.5 软件包对本实验中数据进行处理, 实验结果以平均值±标准差表示, 不同组间的数据差异采用 ANOVA 单因素方差分析, 两组之间则采用 *t* 检验分析组间差异是否显著, *P* < 0.05 则认为结果差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Anhui 和 Th005 毒株的鸡静脉注射致病指数 (IVPI) 评分比较

静脉感染 Th005 毒株后, 实验鸡 1 d 内全部死

亡, IVPI 指数为 3; 感染 Anhui 株后, 实验鸡 10 d 内均无临床症状出现, IVPI 指数为 0。根据 OIE 文件中 IVPI 评判要求, Anhui 株为低致病性禽流感毒株, Th005 株为高致病性禽流感毒株。

2.2 Anhui 和 Th005 及传代株感染鸡的致病力比较

2.2.1 Anhui 和 Th005 及传代株感染鸡后临床症状和体征比较

Anhui、Anhui C、Th005 和 Th005 C 毒株分别滴鼻感染白来航鸡, 每组 5 只, 连续称重 14 d, 感染后 Anhui 和 Anhui C 组实验鸡体重持续增长, 但 Anhui C 组比 Anhui 组实验鸡体重增长更缓慢; Th005 和 Th005 C 组实验鸡均出现体重下降, 两组间鸡体重下降率无显著性差异 (图 1)。

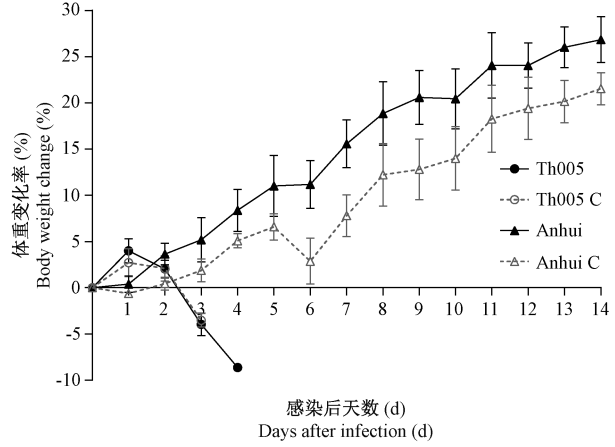


图 1 Anhui 和 Th005 及其传代株感染实验鸡体重变化率
Figure 1 Body weight change rate of the Anhui, Th005 and their progeny-infected chickens

Anhui、Anhui C、Th005 和 Th005 C 毒株分别滴鼻感染白来航鸡, 每组 5 只, 感染后连续 14 d 检测体温, Anhui 和 Anhui C 组实验鸡体温在正常范围内波动 (40.5 ~ 42℃), 各组间体温无显著性差异; 感染后第 2 天, Th005 和 Th005 C 组实验鸡体温超过 42℃, 体温超过正常范围, 此后感染鸡体温降低直至死亡, 各组间体温无显著性差异 (图 2)。

Anhui、Anhui C、Th005 和 Th005 C 毒株分别滴鼻感染白来航鸡, 每组 5 只, 感染后 14 d 内记录鸡的存活率, Anhui 和 Anhui C 组实验鸡在感染后 14 d 内均未出现死亡; Th005 和 Th005 C 组实验鸡感染后 3 ~ 5 d 内全部死亡 (图 3)。

Anhui、Anhui C、Th005 和 Th005 C 毒株分别滴鼻感染白来航鸡, 每组 5 只, 感染后 14 d 内观察鸡的临床症状和体征变化, Anhui 组实验鸡无症状,

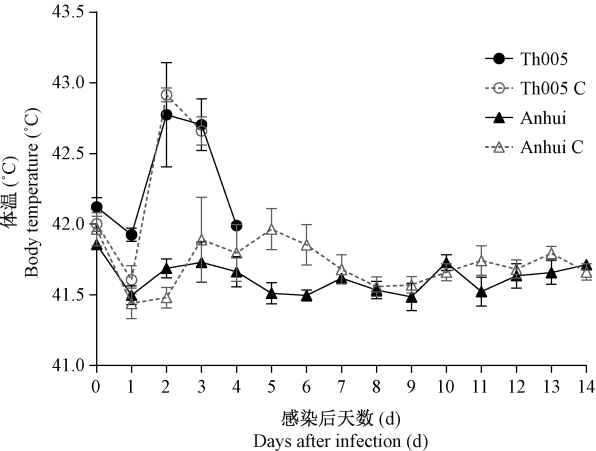


图 2 Th005、Anhui 及其传代株感染实验鸡体温变化
Figure 2 Body temperature of the Anhui, Th005 and their progeny-infected chickens

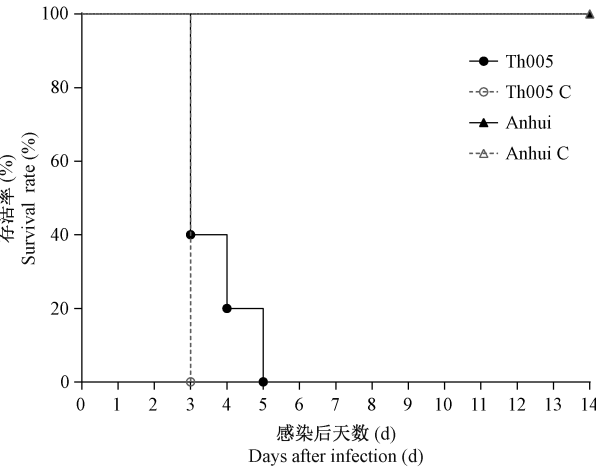


图 3 Th005、Anhui 及其传代株感染实验鸡存活率
Figure 3 Survival rate of the Anhui, Th005 and their progeny-infected chickens

Anhui C 组实验鸡在感染后第 5 天出现了一过性头面水肿及结膜炎,症状持续 1 d 后消失;Th005 和 Th005 C 组实验鸡在感染后第 2 天出现食欲降低,进食量减少,感染后第 3 天开始出现精神沉郁、体表瘀斑、肉垂紫绀、头面水肿和死亡(图 4)。

2.2.2 Anhui 和 Th005 及其传代株感染鸡后排毒情况比较

Anhui、Anhui C、Th005 和 Th005 C 毒株分别滴鼻感染白来航鸡,每组 5 只,感染后第 0 ~ 7、9、11、14 天收集咽、肛拭子测定病毒滴度。Anhui 和 Anhui C 组实验鸡咽拭子未检测到病毒滴度;Anhui 组实验鸡肛拭子未检测到病毒滴度,Anhui C 组肛拭子在感染后第 2 ~ 9 天能够检测到病毒复制,在感染后第 7 天病毒滴度达到峰值($10^{2.58}$ TCID₅₀/

mL)(图 5)。

Th005 和 Th005 C 组鸡咽拭子能够持续检测到病毒复制,病毒滴度持续上升直至实验鸡全部死亡,在感染后第 4 天和第 3 天病毒滴度到达最高值,分别为 $10^{4.33}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{3.89}$ TCID₅₀/mL;鸡肛拭子同样能够持续检测到病毒复制,滴度持续上升至实验鸡全部死亡,在感染后第 4 天和第 3 天到达峰值,分别为 10^5 TCID₅₀/mL 和 $10^{5.37}$ TCID₅₀/mL。同时,肛拭子的滴度峰值要高于咽拭子(图 5)。

3 讨论

自 2013 年我国发现全球首例人感染 H7N9 禽流感病毒病例以来,该病毒持续流行于我国家禽中。在前 4 波流行中,一直对禽无致病性。然而,从 2017 年第 5 波流行开始,我国禽类养殖场出现禽类死亡,并能从禽类体内分离出 H7N9 禽流感病毒^[2]。为了确认第 5 波疫情中 H7N9 病毒对禽的致病力变化,我们选取第 5 波病毒分离株 Th005 代表株感染禽类,以第 1 波分离株 Anhui 株作为参比,比较其对禽的致病力的变化。

通过鸡的静脉致病指数 IVPI 测定可以看出:Anhui 株为低致病性禽流感病毒株,Th005 株为高致病性禽流感病毒株。Anhui 株感染鸡后没有任何症状,但是 Anhui 株在鸡体内传代后感染鸡,在感染后 2 ~ 9 d,肛拭子可以持续检测到病毒滴度。这说明 Anhui 株在禽类循环中可能获得了新的宿主嗜性,对禽类的致病性逐渐增强;并且通过泄殖腔持续向外界排毒,使 H7N9 增加了接触其他宿主的机会,从而持续传播。这为第 1 波疫情爆发后,持续出现 5 次疫情提供了依据。并且 H7N9 通过持续向外界排毒,进而达到在禽类中的反复适应,逐渐增强对禽类的致病力,这也能部分解释疫情中 H7N9 为何可以从无致病性向高致病性的转变。

Th005 及其传代株感染鸡后,3 ~ 5 d 内全部死亡。另外,咽拭子和肛拭子能够分离出高的病毒滴度,并逐渐升高一直持续到病死,肛拭子的病毒滴度峰值高于咽拭子。结合 Anhui 感染鸡的排毒情况,可以看出 H7N9 禽流感病毒感染禽类后泄殖腔为重要的病毒复制及排毒通道。Th005 的传代株较原始株相比,致病力基本不改变,均对鸡呈现高致病性,说明 Th005 对禽类不但保持高致病能力,还可在禽类循环后依旧保持高致病能力,也说明了 H7N9 病毒依然具有在禽中持续流行并对禽类具有



注:(A) 感染 Th005 及其传代株后,实验鸡的临床症状:精神沉郁、头冠紫绀和头面水肿;(B) 未感染对照实验鸡;(C) 感染 Th005 及其传代株后,实验鸡后腿部可观察到体表瘀斑;(D) 未感染对照实验鸡腿部;(E) 感染 Anhui C 株后,实验鸡后面部出现水肿和结膜炎症状;(F) 感染 Anhui C 株后,实验鸡后面部出现水肿和结膜炎症状在出现 1 d 后消失。

图 4 Th005、Anhui 及其传代株滴鼻感染实验鸡的临床表现

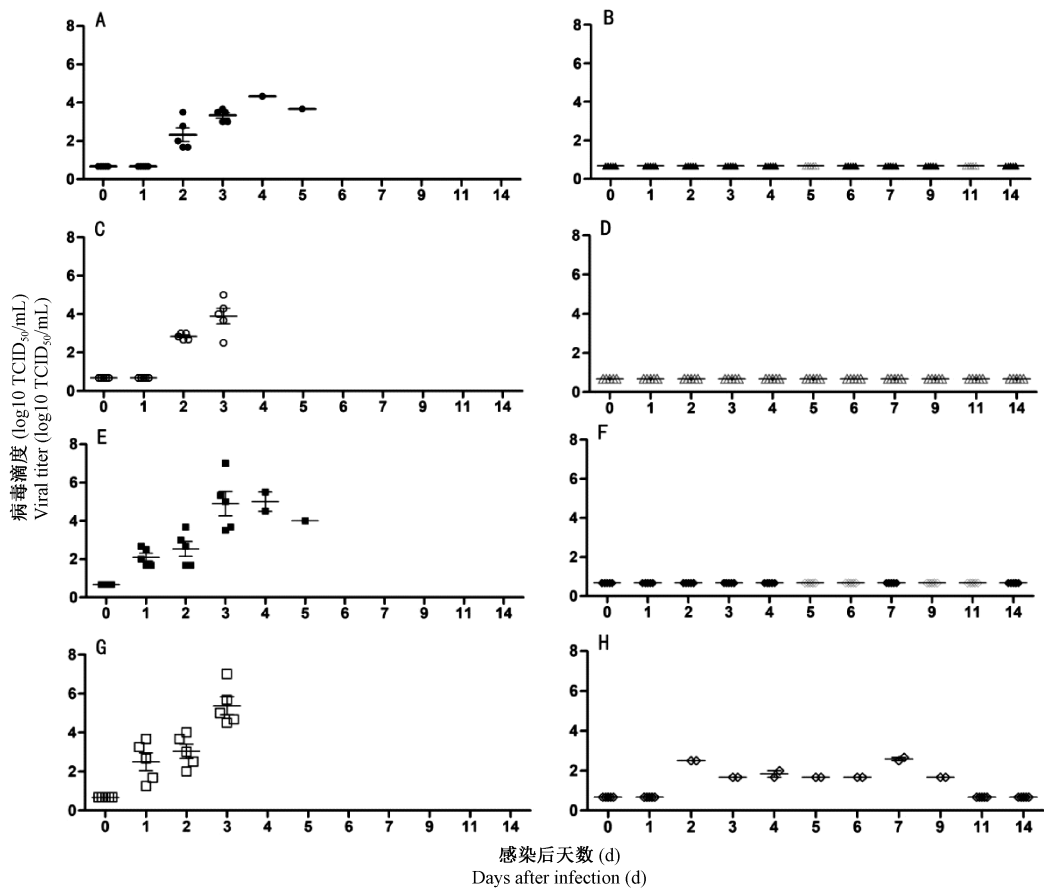
Note. (A) Clinical symptoms of chickens after infection with Th005 and its passaged strains; depression, cyanosis of wattles, and edema of the face. (B) Chicken without infection. (C) Skin surface bruising in chicken legs after infected with Th005 and its passaged strains. (D) Chicken legs without infection. (E) Conjunctivitis and edema of the face in an Anhui C-infected chicken. (F) Conjunctivitis and edema of the face in the Anhui C-infected chicken disappeared next day.

Figure 4 Clinical symptoms of chickens infected with Th005, Anhui, and their progeny by nose dripping

高致病力的能力,提示农业部门应对 H7N9 保持高度警惕并采取防范措施。

另外,笔者对 Anhui、Th005 及其传代株测序结果分析:与 Anhui 株比较,Th005 株在 HA 裂解位点有“-KRIA-”碱性氨基酸的插入,提示 Th005 株已具备高致病性禽流感的分子特征^[6-7],这很可能是 H7N9 病毒由低致病性转变为高致病性的重要原因。Anhui C 与 Anhui 比较,在 HA 节段上发生了

N133D 和 N158-159D 的双突变, Pantin-Jackwood 等^[8-9]认为 HA-N133D/N158-159D 双突变可以降低 HA 的热稳定性并且增加 HA 蛋白对禽类唾液酸受体的结合能力,这也从分子水平上证实了 H7N9 在禽间循环过程中逐渐获得了宿主嗜性,这与我们实验中 Anhui 传代株较原始株相比对鸡的致病力增强的结果相吻合。



注:感染后鸡咽拭子中病毒滴度:(A)Th005 组,(B) Anhui 组,(C)Th005 C 组,(D) Anhui C 组;感染后鸡肛拭子中病毒滴度:(E)Th005 组,(F) Anhui 组,(G)Th005 C 组,(H) Anhui C 组。

图 5 Th005、Anhui 及其传代株滴鼻感染实验鸡的咽、肛拭子病毒滴度

Note. Viral titers in oropharyngeal swabs from chickens:(A) Th005,(B) Anhui,(C) Th005 C,(D) Anhui C; Viral titers in cloacal swabs from chickens:(E) Th005,(F) Anhui,(G) Th005 C,(H) Anhui C.

Figure 5 Viral titers in oropharyngeal swabs and cloacal swabs of the Th005, Anhui, and their progeny infected chickens

参 考 文 献(References)

[1] Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathol, 2004, 33(4):393-404.

[2] Wang X, Jiang H, Wu P, et al. Epidemiology of avian influenza AH7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013 - 2017: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(8): 822 -832.

[3] Shi J, Deng G, Kong H, et al. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans [J]. Cell Res, 2017, 27(12): 1409-1421.

[4] OIE AHS. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [J]. Bulletin-Office International des épizooties, 2008; 1092-1106.

[5] Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. Influenza A virus isolation, culture and identification [J]. Nat Protoc, 2014, 9 (11): 2663-2681.

[6] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus [J]. Virology, 1999, 258(1): 1 -20.

[7] Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential [J]. Avian Dis, 1996, 40 (2): 425-437.

[8] Retamal M, Abed Y, Rhéaume C, et al. In vitro and in vivo evidence of a potential A(H1N1)pdm09 antigenic drift mediated by escape mutations in the haemagglutinin Sa antigenic site [J]. J Gen Virol, 2017, 98(6): 1224-1231.

[9] Pantin-Jackwood MJ, Miller PJ, Spackman E, et al. Role of poultry in the spread of novel H7N9 influenza virus in China [J]. J Virol, 2014, 88(10): 5381-5390.