

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.07.02

一株 H1N1 亚型猪流感病毒的分离鉴定及生物学特性分析

白 昀^{1,2}, 冯志新¹, 甘 源¹, 刘占军¹, 张 旭¹, 韦艳娜¹, 马庆红¹, 邵国青^{1*}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室 / 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 南京天邦生物科技有限公司, 江苏 南京 211102)

摘 要: 为调查南京地区猪流感流行情况, 本研究于 2011 年 2 月~5 月期间从南京某屠宰场采集健康猪的鼻拭子和肺脏组织样品共 690 份, 常规无菌处理后进行 RT-PCR 检测, 将检测为阳性的样品接种 9 日龄~11 日龄 SPF 鸡胚分离猪流感病毒(SIV)。对分离株进行血凝试验、EID₅₀ 测定、HA 及 NA 基因测序分析和感染小鼠及猪体试验。结果有 18 份样品 RT-PCR 显示为 SIV 阳性, 但只有一株可在 SPF 鸡胚中稳定增殖。该病毒分离株具有凝集 0.5 %鸡红细胞的活性, EID₅₀ 为 10^{6.32}/0.1 mL, 基因测序显示其 HA、NA 基因片段均与 09 年 H1N1 型流感流行株 A/California/04/2009 (H1N1) 高度同源, 将其命名为 A/Swine/Nanjing/50/2011 (H1N1)。小鼠人工感染试验表明该分离株可引起小鼠死亡(3/10), 猪体人工感染实验显示该分离株还能够引发猪体明显的流感症状及肺部病变。该病毒的分离鉴定及 HA、NA 基因序列分析为进一步调查 SIV 的流行规律提供了基础数据。

关键词: 猪流感病毒; H1N1 亚型; 分离鉴定; HA 基因; NA 基因

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)07-0521-05

Isolation, identification and biological characteristics of an H1N1 subtype isolate of swine influenza virus

BAI Yun^{1,2}, FENG Zhi-xin¹, GAN Yuan¹, LIU Zhan-jun¹, ZHANG Xu¹, WEI Yan-na¹,
MA Qing-hong¹, SHAO Guo-qing^{1*}

(1. National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agricultural, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2. Nanjing Tianbang Baio-industry Co. Ltd., Nanjing 211102, China)

Abstract: To investigate the swine influenza epidemic, we collected nasal swabs and lung tissues from 690 health slaughtered pigs in Nanjing area and 18 samples were positive for swine influenza virus (SIV) detected by RT-PCR. One virus was isolated by inoculation of 10-day-old embryonated eggs via allantoic cavities and identified as H1N1 subtype, designated A/Swine/Nanjing/50/2011(H1N1). The HA and NA sequence analysis shown that the isolate were closely identical to A/California/04/2009(H1N1). In addition, the pathogenic tests demonstrated the virus was able to cause death in mice (3/10) and induce clinical signs and lung lesions in pigs. This study provided useful information and basic data for the further investigation of epidemic principles and patterns of SIV in China.

Key words: swine influenza virus; H1N1 subtype; isolation and identification; HA gene; NA gene

*Corresponding author

收稿日期: 2012-08-05

基金项目: 江苏省农业自主创新项目(CX(11)2048)

作者简介: 白 昀(1980-), 男, 陕西华阴人, 助理研究员, 主要从事动物重要传染病研究。

* 通信作者: E-mail: 84391973@163.com

猪流感(Swine influenza, SI)是目前危害全世界养猪业的重要呼吸道疾病之一,是由 SI 病毒(SIV)引起的一种急性、热性和高度接触性的呼吸道传染病。其主要症状为咳嗽、喷嚏、流鼻涕、体温升高、嗜睡、呼吸困难和食欲下降等。SIV 与其它病原混合感染,会使疫情更为复杂,病情加重,死亡率增高,给养猪业造成严重经济损失。

近年来,我国不断有 SIV 的报道,2001 年 7 月以来,我国一些省份发生了猪的“无名高热病”,最终证实了其病原在含有 SIV 和 PRRSV^[1]。2002 年 6 月~10 月,安徽省大部分地区暴发了 SI,全省发病猪达 300 万头,直接损失达亿元^[2]。猪可以作为人流感和禽流感病毒的混合器^[3],人感染 SIV 在美国、欧洲和新西兰均报道,甚至可导致发病和死亡^[4]。2009 年 3 月起始于墨西哥的 H1N1 亚型流感疫情,再次证实 SIV 在人类流感研究和控制中具有重要地位^[5-6]。本研究从南京地区屠宰场的健康猪中采集样品,分离 SIV,并对其进行生物学鉴定和基因测序,为了解当前我国猪群中流行的流感病毒的来源与进化规律提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 本研究于 2011 年 2~5 月间采集江苏省南京市某屠宰场的健康猪群鼻拭子和肺脏组织共 690 份。样品经抗生素处理后用于病毒分离。

1.1.2 实验动物及 SPF 鸡胚 体质量为 15 g~20 g 小白鼠(ICR 系)购自扬州大学试验动物中心;9~11 日龄 SPF 鸡胚购自南京天邦生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 柱式动物 RNAout 试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天恩泽公司;M-MLV Reverse、EX Taq 购自 TaKaRa 公司;SIV H1 亚型抗体阴性健康断奶仔猪购自江苏明天农牧股份有限公司。

1.1.4 引物设计 根据 GenBank 中的 A 型流感病毒 M 基因的参考序列,在保守区设计一对检测引物,扩增片段约 244 bp,引物序列为:M-F:5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3';M-R:5'-AGGGCATTTTGGACAAATGGTCTA-3';HA、NA 基因序列扩增引物参考文献^[7]的方法;反转录引物为 Uni12:5'-AGCAAAAGCAGG-3',均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 病毒的分离

1.2.1 样品的采集和处理 拭子样品采集后立即放入样品处理液中(含青霉素和链霉素各 1 000 U/mL),棉拭子经挤压、涡旋振荡后,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,一份用于检测,其余置于 -20 °C 保存备用。肺脏组织样品剪碎、研磨,用样品处理液制成 1:10 组织悬液,反复冻融 3 次后,离心取上清液,一份用于检测,其余部分置 -20 °C 保存备用。

1.2.2 病毒核酸的提取和 RT-PCR 鉴定 采用 RNAout 试剂盒提取病毒 RNA,以 Uni12 为引物,按 M-MLV Buffer 要求进行 cDNA 制备。并以其为模板进行。PCR 扩增反应条件:95 °C 5 min;95 °C 1 min、52 °C 1 min、72 °C 40 s,30 个循环;72 °C 10 min。以 1.5 % 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.2.3 鸡胚接种 取 RT-PCR 检测为阳性的样品上清经尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚(0.1 mL),于 35 °C 孵化 72 h~96 h,收集 24 h 后死亡和存活的鸡胚尿囊液,放置 4 °C 过夜。测定其对 0.5 % 的鸡红细胞的凝集活性。有血凝性的阳性样品通过鸡胚接种有限稀释法纯化。

1.3 病毒的鉴定

1.3.1 鸡红细胞凝集(HA)试验 参考常规微量法(OIE 方法)进行^[8]。

1.3.2 HA、NA 全基因序列测定及分析 参考文献^[7]的方法进行 RT-PCR 扩增基因序列,分别将 PCR 产物用胶回收试剂盒回收,并克隆于 pMD18-T 载体中,提取重组质粒,由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序鉴定。使用 DNASTAR 软件包对所得的序列与 NCBI 数据库中的序列进行同源性比对,同时通过 MEGA5.0 软件构建了基于 HA 蛋白基因和 NA 蛋白基因的进化树。

1.3.3 鸡胚半数感染量(EID₅₀)的测定 取分离株的鸡胚尿囊液,以灭菌生理盐水作 10 倍倍比稀释至 10⁻⁸,每个稀释度接种 SPF 鸡胚 5 枚,0.1 mL/胚,同时设空白对照胚 3 枚,每枚鸡胚接种生理盐水 0.1 mL。35 °C 孵育 96 h 后收集尿囊液,死胚及时置 4 °C 冰箱保存。逐枚测定对 0.5 % 鸡红细胞的凝集价,按照 Reed-Muench 法计算病毒的 EID₅₀。

1.3.4 对小鼠的致病性 参照文献^[9]的方法进行。取分离株的鸡胚尿囊液经滴鼻、点眼的途径感染 ICR 小鼠,每只 0.1 mL。共接种 10 只,另设 3 只对照。每天观察小鼠并记录死亡情况,观察 14 d,剖杀所

有试验小鼠, 检查病理变化。

1.3.5 对猪体的致病性 将 10 头 4~5 周龄 SIV H1 亚型抗体阴性健康断奶仔猪分为两组: 一组为病毒感染组, 5 头猪, 气管注射接种纯化病毒, 接种量为 $3 \times 10^{7.32}$ EID₅₀/头; 另一组为对照组, 5 头猪, 气管注射 PBS。接种后 5 d 内, 每天下午定时测直肠温度, 观察临床症状, 直肠温度 $\geq 40^\circ\text{C}$ 视为发烧^[10]。接种后 5 d 剖杀所有实验猪, 观察肺部病变。

2 结 果

2.1 病毒的分离检测 采用 A 型流感的 M 基因检测引物对 690 份健康屠宰猪的鼻拭子和肺脏组织进行 RT-PCR 检测, 结果有 18 份样品可以扩增获得 244 bp 的目的片段(图 1)。

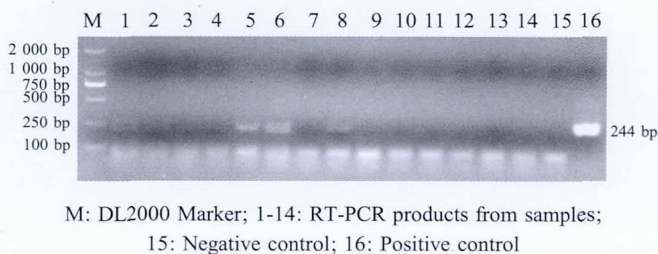


图 1 部分样品 RT-PCR 诊断结果
Fig.1 RT-PCR detection of partial samples

2.2 病毒的血凝试验 将 18 份 RT-PCR 呈阳性的样品接种 SPF 鸡胚后, 只有一株增殖特性良好, 对 0.5 % 的鸡红血球具有血凝性, 经纯化后, 血凝效价最终稳定在 $8 \log_2$, 72 h 内不引起鸡胚死亡。

2.3 HA 和 NA 基因序列的分析 利用 DNASTar 生物学软件将 HA 序列与 GenBank 中 H1~H16 亚型进行比对, NA 序列与 N1~N9 亚型进行比对。结果表明: HA 基因与 A/Swine/Nebraska/1/92 (H1N1) 处于同一分支内; NA 基因与 A/Swine/HongKong/NS29/2009(H1N1) 处于同一分支内, 根据世界卫生组织的命名规则, 命名为 A/swine/Nanjing/50/2011(H1N1)。

在 GenBank 中检索具有代表性的 A 型流感病毒的已知序列, 利用 Neighbor-Joining 方法(Bootstrap=1000)建立了推导氨基酸的无根进化树。HA 蛋白进化树结果显示, 该分离株与 SIV A/California/04/2009 (H1N1)、A/Jiangsu/1/2009 (H1N1) 及 A/swine/Iowa/1/1976(H1N1) 处于同一大群, 即亲缘关系较近, 而与人流感标准株 A/Puerto_Rico/8/34(H1N1) 和禽流感标准株 A/duck/Australia/749/1980 (H1N1) 的亲缘性远。

同样, NA 基因推导的氨基酸进化树结果基本相似(图 2、3)。表明这是一株 09 年猪源甲型 H1N1 流感流行株的衍生病毒株。

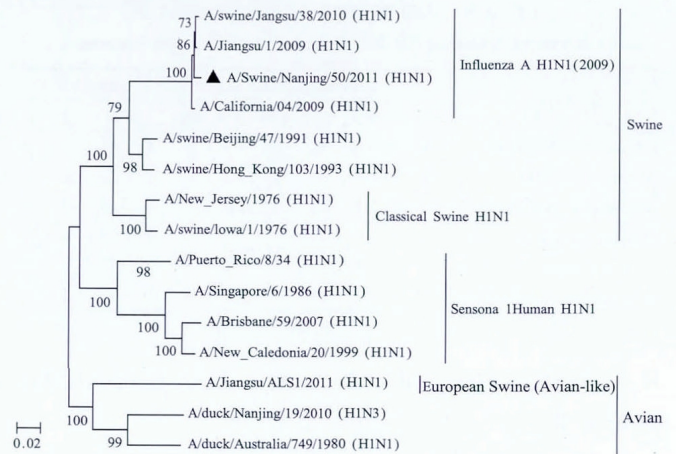


图 2 基于 HA 基因推导氨基酸序列的进化树分析
Fig.2 Phylogenetic trees based on deduced amino acid sequence of HA gene

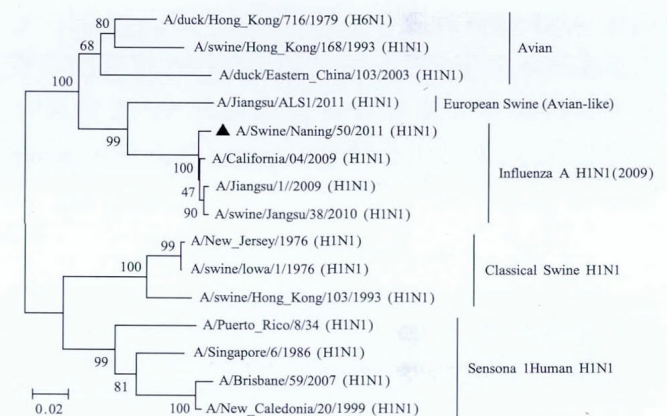


图 3 基于 NA 基因推导氨基酸序列的进化树分析
Fig.3 Phylogenetic trees based on deduced amino acid sequence of NA gene

该分离株的 HA 基因核苷酸和氨基酸与 A/California/04/2009 的同源性分别为 98.9 % 和 97.9 %。HA 基因编码区全长 1 701 bp, 共编码 566 个氨基酸, 包括 N 末端 17 个氨基酸的信号肽。HA 蛋白由 HA1(326 氨基酸)和 HA2(223 氨基酸)两部分组成。两者由一个碱性氨基酸 R 连接, 裂解位点序列为 IQSR↓G, 为典型的低致病性特征之一。与参考株 A/California/04/2009 相比, 分离株 HA 蛋白有 11 个氨基酸发生了突变, 全部位于 HA1 蛋白中, 分别为 S⁸⁶P、A⁹²T、P¹³¹S、E¹⁵⁸G、I¹⁹⁴L、A²⁰⁰T、T²⁰⁶S、R²¹⁹I、G²⁴¹D、T²⁸⁵P 和 V³²⁴I(表 1)。由于 92 位点的 T 突变为 A, 与参考株 A/California/04/2009 相比分离株减少了一个糖基化位点。分离株的 NA 基因核苷酸和氨基酸与 A/California/04/2009 的同源性分别为 99.1 % 和

98.9%，NA 蛋白共有 4 个氨基酸突变为 F²⁶I、P⁸²S、I¹⁰⁶V、D²⁴⁸N，糖基化位点没有变化。

表 1 A/swine/Nanjing/50/2011 与参考株 HA 氨基酸比较
Table 1 Amino acid of HA proteins of
A/swine/Nanjing/50/2011 and the reference viruses

Virus	Residues amino acids of HA proteins											
	86	92	131	158	194	200	206	219	241	285	324	
A/California/04/2009 ^a	P	T	S	G	L	T	S	I	D	P	I	
A/Jiangsu/1/2009 ^a	S	T	S	G	L	A	S	I	D	P	V	
A/swine/Jiangsu/38/2010 ^b	S	T	P	G	L	A	T	I	D	P	V	
A/swine/Jiangsu/46/2010 ^b	S	T	P	G	L	A	T	I	D	P	V	
A/swine/Jiangsu/285/2010 ^b	S	T	P	G	L	A	T	I	D	P	V	
A/swine/Nanjing/50/2011 ^b	S	A	P	E	I	A	T	R	G	T	V	

Note: a: Isolate from ill pig; b: Isolate from health pig

2.4 SIV 分离株 EID₅₀ 的测定 按照 Reed-Muench 法计算病毒的 EID₅₀ 为 10^{-6.32}/0.1 mL。

2.5 对小鼠的致病性 将 A/swine/Nanjing/50/2011 (H1N1) 分离株人工感染小白鼠(ICR 系)后,可引起精神不振、不愿运动、嗜睡,部分皮毛松乱等临床症状。5 d~8 d 先后有 3 只小鼠死亡(图 4)。剖检死亡小鼠可见肺炎病变。取其肺组织按常规处理后接种 9 日龄鸡胚,能够重新分离到 H1N1 亚型 SIV。而对照组的小鼠没有任何临床症状。这表明 A/swine/Nanjing/50/2011 (H1N1) 株对小鼠具有致病性。

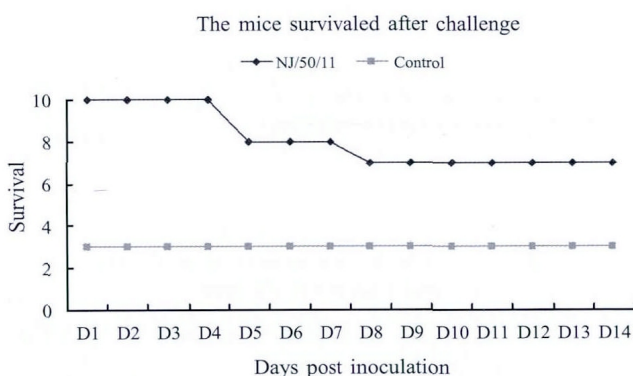


图 4 NJ50 株病毒接种小鼠后死亡曲线图
Fig.4 The pathogenicity of NJ/50/11 isolate to mice

2.6 对仔猪的致病性 试验猪在感染 A/swine/Nanjing/50/2011 (H1N1) 株后第 1 d 和第 4 d 出现发烧(直肠温度 $\geq 40^{\circ}\text{C}$, 图 5), 轻微减食, 后期部分猪出现咳嗽和轻微气喘现象, 但第 5 d 时开始好转, 体温恢复正常。感染后第 5 d 剖检显示, 感染猪的肺部均有程度不一的病理变化, 病变区域为深紫色牛肉样实变斑块或出血点(图 6), 气管中粘性液体较多, 腹股沟淋巴结轻度水肿。所有试验猪的肺脏组织中均分离到 H1N1 亚型 SIV。对照组未发现肺部有明显病变。

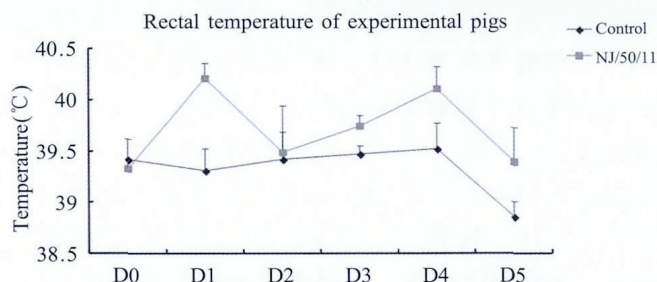
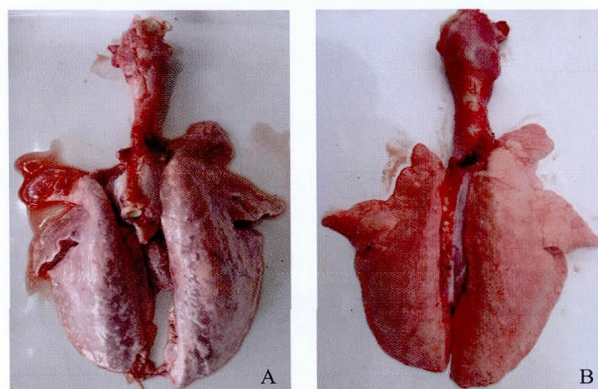


图 5 NJ50 株病毒接种仔猪体温变化曲线图
Fig.5 The rectal temperature reactions in pigs experimentally infected with NJ/50/11 isolate



A: Lung consolidation of experimental pigs following inoculation with NJ/50/11 isolate; B: Lung of control experimental pigs

图 6 人工感染猪肺部病变

Fig.6 Pathological change in lungs of pigs infected by SIV isolates

3 讨论

自 2009 年 3 月份, 源于北美的流感疫情向全球迅速扩散, 最终演变为 1968 年以来新世纪首次流感大流行, 我国江苏省 2009 年 6 月发现首个甲型 H1N1(2009)病例^[11]。此次新甲型 H1N1 流感病毒被证明是由欧洲 SIV(提供 NA 和 M 基因)和北美三源基因重配的猪 H1 流感病毒(提供 PB2、PB1、PA、HA、NP 和 NS 基因片段)通过基因重配的产物^[12], 已经成为全球甲型流感病毒优势流行株。虽然, 目前疫情已被控制, 但病毒在作为中间宿主的猪群中如何衍化仍是我们所感兴趣的。本研究于 2011 年 2~5 月间采集江苏省南京市某屠宰场的健康猪群鼻拭子和肺脏组织共 690 份, 通过 RT-PCR 检测显示有 18 份样品为 SIV 阳性, 阳性率为 2.61%, 初步显示了目前南京市健康猪群中猪流感的带毒情况。

参考 Caton 等确定的 H1N1 流感病毒 HA 蛋白 5 个抗原性位点区域(Ca1、Ca2、Cb、Sa 和 Sb)^[13-14]和

唾液酸受体结合位点区域(130 位环、190 位螺旋和 220 位环)^[15], 分离株 A/swine/Nanjing/50/2011(H1N1) 与参考株 A/California/04/2009 相比, HA 蛋白有 11 个氨基酸发生变异, 其中 3 个分别分布在 3 个抗原位点上: 1 个位于 Ca1 中(²⁰⁶T), 1 个位于 Sa 中(¹⁵⁸E), 1 个位于 Sb 中(¹⁹⁴I)。同时, 唾液酸受体结合位点区域也有 1 个变异位点, 位于 190 位螺旋(¹⁹⁴I)。预示其抗原性有可能发生一定的变化。另外, 通过对比从发病宿主和健康猪中分离到的 SIV 株显示 HA 蛋白的 131 位和 206 位存在明显差异, 即从发病宿主中分离到的 SIV 的 131 位 HA 蛋白氨基酸为 S 而健康猪中分离到的 SIV 株为 P, 同样, 发病宿主和健康猪中分离到的 SIV 株的 206 位 HA 蛋白氨基酸分别为 S 和 T, 这两个位点的突变对病毒株的毒力是否有影响还有待进一步研究。

基于猪在 SIV 种间传播链的中间宿主和多重宿主作用, 以及我国流感生态学的复杂性, 了解流行于健康猪群中流感病毒的致病性具有现实意义。目前, 分离 SIV 的样品来源主要是发病猪群的鼻腔和体内器官。本研究从屠宰场健康猪群的检测样品中分离到一株 SIV。研究结果表明, 该病毒可在鸡胚中稳定繁殖传代, EID_{50} 达 $10^{-6.32}/0.1$ mL, 可引起 ICR 小白鼠和实验猪发病, 并导致部分小鼠死亡(3/10), 表明该株病毒可能具有良好的抗原性, 如果将该病毒作为抗原研制猪流感疫苗, 可能将对预防我国猪群猪流感的流行与暴发起到重要的作用。

参考文献:

- [1] 沈雪忠, 谷根林, 杨宗照, 等. 杭州地区猪“无名高热”病因初探[J]. 畜牧与兽医, 2002, 10(34): 24-25.
- [2] 张小飞, 潘孝成, 赵瑞宏, 等. 安徽省猪流感的流行情况与防控[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 36-37.
- [3] 刘大飞, 刘明. H1N1 亚型猪流感病毒广东分离株全基因克隆及其遗传演化分析[J]. 病毒学报, 2008, 24(5): 396-401.

- [4] Gregory V, Bennett M, Thomas Y, et al. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland [J]. Arch Virol, 2003, 148(4): 793-802.
- [5] Shinde V, Bridges C B. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States 2005-2009 [J]. New England J Medicine, 2009, 360(25): 2616-2625.
- [6] 朱来华, 郑小龙, 肖西志, 等. 新型 A 型 H1N1 猪流感疫情动态及防控措施[J]. 动物医学进展, 2010, (1): 104-107.
- [7] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [8] OIE Standards Commission. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines 3rd [M]. International Comminttee OIE, Paris, France, 1996: 155-160.
- [9] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其试验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [10] Van Reeth K, Labarque G, De Clercq S, et al. Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection [J]. Vaccine, 2001, 19: 4479-4486.
- [11] 祁贤, 崔仑标, 李亮, 等. 江苏首例甲型 H1N1(2009)流感病毒分离及其血凝素分子遗传特征分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 305-310.
- [12] Smith G J, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [13] Caton A J, Brownlee G G, Yewdell J W, et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype) [J]. Cell, 1982, 31: 417-427.
- [14] Brownlee G G, Fodor E. The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1416): 1871-1876.
- [15] Gamblin S J, Haire L F, Russell R J, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin [J]. Science, 2004, 303(5665): 1838-1842.

(本文编辑: 赵晓岩)