

猪流感福建流行毒株的分离、鉴定

魏 宏, 张德明, 庄向生, 周伦江, 王隆柏, 陈少莺, 刘玉涛

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建福州 350013)

摘要:疑似猪流感(SIV)病猪的鼻拭子尿囊腔接种10日龄SPF鸡胚, 72 h后致死鸡胚。取尿囊液进行血凝试验, 分离物能使多种禽类和哺乳动物红细胞发生凝集; 取尿囊液接种鸭胚、鹅胚, 48 h后即致死鸭胚、鹅胚; 取尿囊液接种鸡、鸭、鹅胚等成纤维原代细胞和Vero PK BHK MA-104等传代细胞, 发现病毒能使成纤维细胞、Vero出现变圆、皱缩、脱落等病变; 尽管PK BHK21 MA-104等细胞接种后不出现病变, 但培养上清能凝集鸡红细胞; 亚型鉴定该株病毒属猪流感病毒H1N1。进行病毒对BALB/c小鼠、信鸽、8周龄仔猪的回归试验, 发现该株流感病毒能使信鸽和8周龄仔猪发病; BALB/c小鼠接种病毒后临床上不表现症状, 但体内产生针对该病毒的抗体。

关键词:猪流感; 福建分离毒株; 分离; 鉴定

中图分类号: S858.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2007)02-0119-03

Isolation and Identification of a Prevalent Swine

Influenza Virus Strain from Fujian

WEI Hong, ZHANG De-ming, ZHUANG Xiang-sheng, ZHOU Lun-jiang,

WANG Long-bai, CHEN Shao-ying, LIU Yu-tao

Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: Nasal swab material from a swine influenza virus(SIV)-suspected case was inoculated into the allantoic cavity of 10-day-old chicken embryos, and 72 h later, the inoculated embryos died. The infected allantoic fluid could haemagglutinate erythrocytes of several avian and mammalian species and was lethal to chicken and goose embryos 48 h postinoculation. The isolate could propagate in CEF, MDEF, GEF, Vero, PK, BHK and MA-104 cells, inducing cytopathic changes of rounding, wrinkling and detachment in CEF, MDEF, GEF and Vero cell cultures, but not in the other cell lines. The isolate belonged to the H1N1 subtype, and was pathogenic to inoculated pigeons and 8-week-old piglets. Inoculated BALB/C mice showed no clinical symptoms but could produce SIV antibodies, indicating that the isolate had potential zoonotic significance.

Key words: swine influenza virus(SIV); Fujian isolate; isolation; characterization

猪流感(swine influenza virus, SIV)是由A型流感病毒引起的猪急性、传染性呼吸道疾病。其特征为突发、咳嗽、呼吸困难、发热、衰竭及迅速康复^[1]。猪是禽流感病毒“禽-猪-人”传播链中重要的中间宿主, 了解SI的疫情动态将为动物流感及人流感的疾病预测及防控提供重要依据。李海燕等^[2-4]、伍锐等^[5]、王连想等^[6]从我国上海、福建、湖北、黑龙江、吉林、浙江、湖北等省、市猪群分离到多株SIV, 其中包括H1N1、H1N2、H3N1、H3N2等经典的SI毒株, 也

分离到新的H5N1、H9N2流感流行毒株等。对猪群SI的血清学调查发现: 除经典的H1亚型外, 我国猪群中H3亚型猪流感的感染相当普遍; 同时也从猪群中检测到H9、H5亚型抗体^[4]。序列分析发现, 国内流行的经典H1N1毒株HA基因核苷酸序列与已发表的中国香港、中国大陆、美国及欧洲分离的经典H1亚型毒株相近, 与欧洲类禽SIV分离株亲缘关系较远; 而分离到H9和H5亚型猪流感病毒均与我国分离的禽流感病毒部分基因高度同源。这说明了国内

收稿日期: 2006-03-07

作者简介: 魏 宏(1978—), 女, 实习研究员, 学士; 通讯作者: 庄向生(1954—), 男, 研究员, E-mail: zhuangxs@faas.cn

基金项目: 福建省科技重点项目(2002-N-048)

多种种属动物之间可能发生流感病毒的相互传播. 本文对2002年分离于福建省的猪流感病毒毒株进行鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 流感病毒亚型 HI 抗原、抗体(哈尔滨兽医研究所);鸡新城疫阳性血清由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜病室保存.

1.1.2 细胞、病毒和引物 MA-104、Vero、BHK₂₁、PK 等细胞;猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR2332 (PRRSV)、猪伪狂犬病毒 FA 株 (PRV)、猪圆环病毒 (PCV) 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜病室保存.

1.1.3 试验动物和胚体 本试验所用的 BALB/C 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供;信鸽经 HI 试验检测为流感 H1、H3、H5、H7、H9 亚型抗体阴性;8 周龄大白仔猪来自福州古二猪场, HI 试验检测为流感 H1、H3、H5 亚型抗体阴性;SPF 鸡胚购于上海种蛋场;鸭胚、鹅胚购于福州斗门孵化场.

1.2 方法

1.2.1 病料处理及胚体接种试验 取高烧期病猪的鼻拭子,以 1:5 (V:V) 与无菌 PBS 稀释,加入 1 万单位的双抗置 37℃ 作用 2 h 后,取 0.2 mL 尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 4 枚,对照组接种 0.2 mL PBS;弃去 24 h 内死亡的鸡胚,隔 6 h 观察并记录鸡胚的死亡情况;收集的死亡鸡胚尿囊液分装并冻存于 -70℃ 冰箱;同法接种鸭胚、鹅胚.

1.2.2 血凝和血凝抑制试验、间接 ELISA 检测猪流感抗体 鸡、鸭、鹅、家兔、猪、小鼠等动物的红细胞按常规方法制备;血凝和血凝抑制试验参考常规方法进行^[7];间接 ELISA 方法参考常规方法^[8].

1.2.3 鸡胚半数致死量和半数感染量测定 取 104 枚 10 日龄 SPF 鸡胚,分成 13 组,每组 8 枚;将分离物以 10^{-1} ~ 10^{-12} 稀释;每稀释度接种 8 枚鸡胚,收集死亡胚体尿囊液进行血凝试验,并计算 ELD₅₀、EID₅₀^[8].

1.2.4 细胞接种试验 鸡、鸭、鹅胚等成纤维原代细胞制作按常规方法进行;生长良好的 Vero、MA-104、PK、BHK 细胞分别接种 0.5 mL 尿囊液;37℃ 作用 2 h;弃上清液,加入维持液,连续培养 96 h,观察细胞病变;出现病变的细胞冻融 3 次、离心,取上清液检测凝集价.

1.2.5 分离物的毒价滴定和中和试验 按文献[7-8]进行试验.

1.2.6 PCR 方法检测病料 利用 RT-PCR 方法检测 PRRSV,按文献[9-10]方法进行试验;复合 PCR 方法检测 PCV,按文献[10]方法进行试验;PCR 方法

检测 PRV,按文献[11]方法进行试验.

1.2.7 动物接种试验 BALB/C 小鼠接种试验:取 0.2 mL 病毒腹腔注射 BALB/C 小鼠 4 只,对照组 2 只注射 0.2 mL 生理盐水;于接种第 1、7、14、21 d,尾静脉采血,分离血清.

信鸽接种试验:取 0.2 mL 病毒肌肉注射信鸽 4 只,对照组 2 只注射 0.2 mL 生理盐水;于接种第 1、7、14、21 d,翅静脉采血,分离血清.

仔猪接种试验:取 0.5 mL 病毒对 4 头 8 周龄仔猪进行滴鼻,对照组 2 头滴 0.5 mL 生理盐水;并间隔 12 h 测试仔猪的体温,于接种第 1、7、14、21 d,前腔静脉采血,分离血清.

2 结果

2.1 病料 PCR 检测结果

猪伪狂犬病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、圆环病毒 II 型等病原检测为阴性;初步排除了这几种呼吸道病原感染的可能.

2.2 临床病猪鼻拭子接种鸡胚试验结果

鼻拭子接种 72 h 后,鸡胚发生死亡;胚体出血、但不出现水肿、卷曲、萎缩;取致死鸡胚的尿囊液接种 9~10 日龄鸡胚,接种 48 h 后,鸡胚发生死亡.

2.3 血凝和血凝抑制结果

分离毒能凝集鸡、鸭、鹅、信鸽、家兔、猪等多种动物的红细胞,其中与信鸽、猪的红细胞的凝集价最高;H1 阳性血清能抑制分离毒对鸡红细胞的凝集;但 H3、H5、H7、H9 阳性血清则不能;间接 ELISA 方法检测流感的抗体试验,H5N1、H3N1 阳性血清能与分离毒发生免疫学反应,但不能抑制分离毒的血凝性质;同时,新城疫病毒的阳性血清不能抑制分离毒的血凝性质.

2.4 鸭胚、鹅胚接种试验结果

分离毒接种 48 h 后,鸭胚发生死亡;胚体全身出血、但不出现水肿、卷曲、萎缩;分离毒接种 72 h 后,鹅胚发生死亡;胚体全身出血,但不出现卷曲、萎缩.

2.5 鸡胚半数致死量、半数感染量、毒价滴定及中和试验测定结果

分离毒的 ELD₅₀、EID₅₀ 及毒价分别为 $10^{-7.85}$ 、 $10^{-10.25}$ 、 $10^{-6.25}$;猪流感病毒 H1N1 阳性血清能够抑制分离毒在鸡胚成纤维细胞上增殖滴度;但鸡新城疫的阳性血清则不能抑制.

2.6 细胞接种结果

分离毒能使成纤维细胞、Vero 出现拉网、变圆、皱缩、脱落等病变(图 1);尽管 PK、BHK₂₁、MA-104 等细胞接种后不出现病变,但培养上清液能凝集鸡的红细胞.

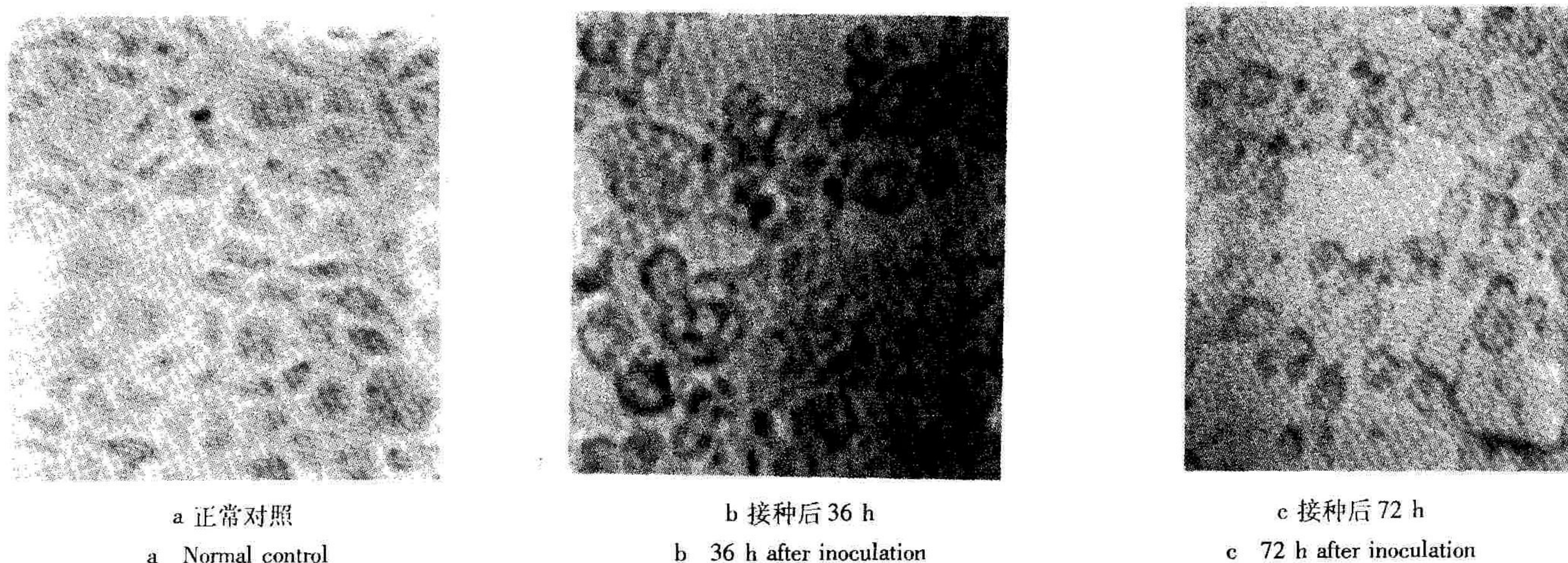


图1 接种病料后病变的 Vero 细胞

Fig.1 Cytopathic effect in Vero cells inoculated with isolate

2.7 病毒对 BALB/C 小鼠、信鸽、8 周龄仔猪的回归试验

2.7.1 BALB/C 小鼠接种试验 试验小鼠接种病毒后精神、采食、饮水情况都正常;接种后第 7 d 试验组的血清中即查出 HI 抗体;第 14 d 检测出抗体较接种前升高 4 倍以上;这说明尽管 BALB/C 小鼠接种流感病毒后不表现临床症状,但还是发生了感染。

2.7.2 信鸽接种试验 接种后第 3 d, 试验组 3 只信鸽出现抑郁、拉稀、厌食、嘴中含有大量黏液等;第 5、7 d 各有 1 只死亡;1 只试验鸽耐过;1 只则一直表现正常;对照组 2 只信鸽则正常;试验信鸽接种后 10 d HI 抗体升高了 4 倍以上;说明该猪流感病毒对信鸽有致病性。

2.7.3 仔猪接种试验 鼻腔接种后 24~36 h, 试验猪全部出现抑郁、厌食、发烧、流鼻涕等症状,解热镇痛治疗有明显效果,48 h 后全部都恢复正常,2 周后试验猪的血清流感 HI 抗体升高了 4 倍以上。

3 讨论

病料 PCR 检测结果,可排除 HCV、PRV、PRRS、PCV2 等几种呼吸道病原感染的可能。分离毒能致死鸡、鸭、鹅胚;能凝集多种动物红细胞;而新城疫阳性血清不能抑制其对鸡红细胞的凝集;与猪流感 H1 亚型阳性血清发生中和而不与新城疫的阳性血清发生中和;可以初步判断分离的病原很可能是正粘病毒而非副粘病毒;分离毒能够使接种仔猪出现典型流感症状,并能够从病猪血液中检测到流感 HI 抗体出现 4 倍以上升高;可判断该病原是猪流感病毒 H1N1 亚型。

分离毒能使接种的信鸽出现临床症状并发生死亡,说明该株病毒可能具有比较重要的流行病学意义;因为信鸽作为飞禽,它的迁徙生态范围比猪、小鼠、鸡

等动物广得多;且接触的动物种类和数量远比这些动物多;所以它在流感病毒的传播环节中意义更大。

参考文献:

- [1] 斯特劳 B E,阿莱尔 S D,蒙加林 W L,等.猪病学[M]. 8 版.北京:中国农业大学出版社,2000:287-295.
- [2] 李海燕,李雁冰,于康震,等.猪流感病毒的分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2002,24(1):12-17.
- [3] 李海燕,于康震,辛晓光,等.部分省市猪流感的血清调查及猪流感病毒的分离与鉴定[J].动物医学进展,2003,24(3):67-72.
- [4] 李海燕,于康震,杨焕良,等.中国猪源 H5N1 和 H9N2 亚型流感病毒的分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2004,26(1):1-6.
- [5] 伍锐,金梅林,陈焕春,等.猪流感病毒分离与鉴定[J].中国病毒学.2003,18(6):553-556.
- [6] 王连想,毕英佐,曹永长,等.6 株猪流感病毒分离株 HA 部分基因的克隆和序列分析[J].中国兽医学报,2003,23(5):438-441.
- [7] 殷震,刘景华,毛春生,等.动物病毒学[M]. 2 版.北京:科学出版社,1997:67-76,336-354.
- [8] 黄祯祥,洪涛,刘崇柏,等.医学病毒学基础及实验技术[M].北京:科学出版社,1990:142-147.
- [9] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南[M].金冬雁,黎孟枫,译.2 版.北京:科学出版社,1999:16-55,880-887.
- [10] 芦银华,许立华,华修国,等.猪圆环病毒 2 型及猪繁殖与呼吸综合症病毒的快速检测[J].中国病毒学,2003,18(2):184-186.
- [11] 姜焱,陈溥言,等.伪狂犬病毒上海株 gE 和 gI 基因的克隆及序列分析[J].中国预防兽医学报,2002,24(4):245-248.

【责任编辑 柴 焰】