

H7N3 亚型禽流感病毒分离株的生物学特性研究

史惠^{1,2}, 廖明², 罗开健², 任涛², 张桂红²

(1 福建省动物疫病预防控制中心, 福建 福州 350003; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为了了解经分离纯化、鉴定保存的 1 株鸭源 H7N3 亚型禽流感病毒株的一些生物学特性, 参照判定禽流感致病性的标准方法对其进行生物学特性的研究。结果显示其鸡胚半数感染量(EID_{50})、组织培养半数感染量($TCID_{50}$)及最小致死量致死鸡胚平均死亡时间(MDT)分别为 $0.5 \times 10^{-6.3} \text{ mL}^{-1}$ 、 $0.5 \times 10^{-2.3} \text{ mL}^{-1}$ 及 136.8 h; 1 日龄鸡脑内接种致病指数(ICPI)及 6 周龄鸡静脉接种致病指数(IVPI)均为 0; 本毒株不引起鸭及 BALB/c 鼠的发病和死亡, 这些都表明本毒株为低致病性禽流感病毒。

关键词: H7N3 亚型禽流感病毒; 生物学特性; 致病性

中图分类号: S852.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)03-0120-02

Studies on the Biological Characteristics of H7N3 Subtype of Avian Influenza Virus

SHI Hui^{1,2}, LIAO Ming², LUO Kai-jian², REN Tao², ZHANG Gui-hong²

(1 Fujian Province Animal Disease Control Center, Fuzhou 350003, China;

2 College of Veterinary and Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To investigate the biological characteristics of the duck-derived H7N3-AIV, EID_{50} , $TCID_{50}$, MDT, ICPI, IVPI were tested. The results were $0.5 \times 10^{-6.3} \text{ mL}^{-1}$, $0.5 \times 10^{-2.3} \text{ mL}^{-1}$, 136.8 h, 0, 0 respectively. The BLAB/c mice and the ducks which were infected with H7N3-AIV did not show morbidity and mortality. The results indicated that this virus was a low pathogenic avian influenza virus (LPAIV).

Key words: H7N3 subtype of avian influenza virus; biological characteristics; pathogenicity

禽流感(Avian influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的禽类全身性或呼吸器官性传染病^[1]。AIV 基因组由 8 个负链 RNA 组成, 共编码 10 种蛋白, 其中的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)糖蛋白是病毒毒力相关蛋白。流感病毒有变异的特点, 主要是 H 与 N 的变异。H 有 H1~H16, 而 N 仅有 N1~N10^[2]。其中 H5、H7 亚型常表现为高致病性, 除了给养禽业带来严重经济损失外, 还可感染人, 甚至导致死亡^[3]。Swayne 等^[4]通过最小致死量致死鸡胚平均死亡时间(MDT)试验表明新出现的 H5 及 H7 的 HPAIV 已变成对鸡毒力更强的病毒。更有研究发现 A 型流感病毒很容易由野生水禽传播给家禽^[5]。鉴

于此, 本研究对 1 株鸭源 H7N3-AIV 毒株进行生物学特性的测定。

1 材料与方法

1.1 毒株

A/Duck/Guangdong/1/1996(H7N3), 简称 H7N3 株, 由华南农业大学禽病研究室分离、纯化, 并经中国预防医学科学院病毒学研究所国家流感中心鉴定。其 HA 效价 $\geq 9 \log 2$ 。

1.2 鸡胚与实验动物

SPF 鸡胚购自广东永顺生物制药有限公司; 28 日龄非免疫黄鸡: 从华南农业大学种鸡场购进 1 日

收稿日期: 2007-08-30

作者简介: 史惠(1978—), 女, 助理兽医师, 硕士; 通讯作者: 廖明(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 农业结构调整重大技术研究专项(06-06-02B); 广东省科技计划项目(2005A20901003, 2006B21101001); 广东省自然科学基金创新团队项目(5200638); 教育部创新团队项目(IRT0723); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0752)

龄健康鸡苗,隔离饲养至28日龄,经AGP、HI检验禽流感为阴性;21日龄麻鸭从广东三水鸭场购进,隔离饲养至21日龄,经AGP、HI检验为禽流感病毒阴性;SPF级6~8周龄雌性BALB/c鼠,从广州中山大学实验动物中心购进。

1.3 生物学特性的测定

1.3.1 一些常见指标的测定 鸡胚半数感染量(EID_{50})、组织培养半数感染量($TCID_{50}$)、最小致死量致死鸡胚平均死亡时间(MDT)、1日龄鸡脑内接种致病指数(ICPI)及6周龄鸡静脉接种致病指数(IVPI)的测定参考文献[6-7]的方法进行。

1.3.2 对28日龄非免疫黄鸡的致病性 将16只28日龄非免疫鸡分成2组,每组8只,实验组每只肌肉注射 $10^7 EID_{50}$ 量的H7N3株尿囊液0.2 mL,对照组每只肌肉注射非免疫鸡胚尿囊液0.2 mL。每天观察其临床症状及体温变化,并于攻毒后第3、5、7 d分离病毒。

1.3.3 对21日龄非免疫麻鸭的致病性 将10只21日龄麻鸭随机分为2组,每组5只,实验组每只鼻内感染 $10^7 EID_{50}$ 量的H7N3株尿囊液0.1 mL,对照组以非免疫鸡胚尿囊液滴鼻0.1 mL,连续观察2周,于攻毒后第3、5 d各取其喉头及泄殖腔拭子,进行病毒分离^[7]。

1.3.4 对SPF级6~8周龄雌性BALB/c鼠的致病性 将50只BALB/c鼠分成2组,实验组40只,以 $10^7 EID_{50}$ 量鼻内感染0.05 mL/只。对照组10只,以生理盐水滴鼻,0.05 mL/只。每组各选出5只进行标记,每天测量其体温及体质量,连续观察14 d,攻毒后第14 d将存活的小鼠摘眼球采血,测定其HI抗体。并于攻毒后第2、3、4、5、6、7、8、9、10 d各处死实验组2只小鼠,取其脑、肺、肝、脾、肾脏进行病毒分离^[7]。另按体积比1:9,取各脏器放入福尔马林溶液中固定,用于组织病理观察。

1.3.5 不同体积分数的福尔马林、不同的作用时间对H7N3株的灭活效果 将H7N3株绒毛尿囊液用安瓿瓶分装为9个小瓶,每3瓶为1组。各组分别加入体积分数为0.05%、0.10%、0.20%的福尔马林,混匀,置37℃恒温箱,每隔8 h取出摇匀后放回继续作用;至24、36、48 h每组各取出1份,每份尿囊液经尿囊腔途径各接种10日龄非免疫鸡胚3枚,0.2 mL/胚。将鸡胚置37℃孵育72 h,后4℃冻存过夜,收获各胚的绒毛尿囊液并测定其HA效价,以HA效价为0判为AIV绒毛尿囊液已被完全灭活;判断在不同体积分数的福尔马林、不同的作用时间下,AIV绒毛尿囊液是否被完全灭活^[3]。

2 结果

2.1 EID_{50} 、 $TCID_{50}$ 、MDT、IVPI及ICPI结果

按Reed-Muench法计算 EID_{50} ,H7N3株对鸡胚

的半数感染量为 $0.5 \times 10^{-6.3} \text{ mL}^{-1}$ 、组织培养半数感染量为 $0.5 \times 10^{-2.3} \text{ mL}^{-1}$ 、鸡胚平均死亡时间为136.8 h,静脉接种指数及脑内接种指数均为0。

2.2 对28日龄非免疫黄鸡的致病性

攻毒后7 d,全部鸡只存活,已攻毒的鸡只的体温、食欲、饮欲、精神未见异常。攻毒后第3、5 d病毒分离结果呈阳性。

2.3 对28日龄非免疫麻鸭的致病性

攻毒后7 d,全部鸭存活,已攻毒的鸭的体温、食欲、饮欲、精神未见异常。攻毒后第3、5 d病毒分离结果呈阳性。

2.4 对SPF级6~8周龄雌性BALB/c鼠的致病性

该病毒不引起小鼠的体质量及体温的异常变化,也不引起发病及死亡。从血液中没有检测到相应的抗体,组织切片中也没有观察到异常变化。但攻毒后从小鼠的肺、脑、肝中分离到该病毒,尤其从肺中分离的该病毒持续时间较长。

2.5 不同体积分数的福尔马林、不同的作用时间对H7N3株的灭活效果

灭活试验结果表明,除了体积分数为0.05%的福尔马林在37℃经24 h无法灭活尿囊液外,体积分数为0.05%的福尔马林在37℃经36、48 h或体积分数为0.10%、0.20%的福尔马林在37℃经24、36、48 h均可使H7N3株的尿囊液完全灭活。

3 讨论

根据禽流感的判定标准及致病性试验结果来看,分离到的鸭源禽流感病毒属于低致病力禽流感毒株。虽然该毒株不引起鸭子的发病或死亡,但能在鸭体内复制并能排毒。

该毒株未在小鼠体内进行盲传,所获得结果均为小鼠首次感染所得。而且在攻毒后的第5 d,通常所说的排毒高峰期,从脑、肝中也分离到该病毒。这初步说明该病毒能在鼠体内全身感染。Joseph等^[8]的研究也表明H7亚型的毒株能在小鼠体内复制,且对小鼠有不同的致死率。而是否所有AIV H7亚型分离株都具有直接感染哺乳动物的能力还有待于进一步研究。

从不同体积分数的福尔马林、不同的作用时间对本毒株的灭活效果及温度、时间对本毒株抗原HA效价的影响结果来看,体积分数为0.10%的福尔马林对H7N3株绒毛尿囊液不仅灭活完全,且对效价影响不大。

H7亚型AIV对禽类和人类具有巨大的潜在危险性,国外多次报道H7N3亚型禽流感病毒感染人,且不同毒株对禽类有不同的致病性。我国尚未发现

(下转第124页)