

摘 要

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由正黏病毒科流感病毒属 A 型流感病毒猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 引起的一种急性、高度传染性呼吸道疾病。在中国, EA H1N1 SIV 于 2001 年被发现, 并逐渐成为我国猪群中 SIV 的主要流行亚型; 2016 年以来, G4 重组基因型 EA H1N1 SIV 成为我国猪群 SIV 的主要基因型。猪被称为流感病毒的“混合器”在流感病毒的传播过程中起着重要作用。猪呼吸道分布有 α -2,3 半乳糖苷受体 (禽源) 和 α -2,6 半乳糖苷受体 (人源), 禽、猪和人源病毒可在猪体内发生重组和适应性突变给公共卫生安全带来隐患。中国有着复杂的 SIVs 生态系统, 对猪流感病毒的流行病学、遗传演化和致病性分析进行研究具有重要意义。

本研究于 2020~2021 年间, 从中国山东、河南、广东、云南以及贵州省共采集猪鼻拭子共 880 份, 其中流感病毒核酸阳性样品为 80 份, 阳性率为 9.10%; 用 MDCK 细胞成功分离 H1N2 亚型 SIV 6 株, 分毒率为 0.68%。采集广东地区的血清样本共 160 份, 经 HI 鉴定 H1 亚型 SIV、H3 亚型 SIV 和 H9 亚型 IV 的血清阳性率分别为 61.25%、51.875% 和 18.75%。

遗传演化分析发现, SW/188/20、SW/198/20、SW/209/20、SW/510/21 以及 SW/700/21 5 株 H1N2 亚型 SIV 的 PB2、PB1、PA 和 NP 基因属于 pdm/09 分支, HA 和 M 基因属于 EA 分支, NA 基因为近人源分支, NS 基因属于北美三重重组 (triple-reassortant TR) 分支; SW/417/21 的 PB2、PB1、PA、M 和 NP 基因隶属于 pdm/09 分支, HA 基因属于 EA 分支, NA 基因为近人源分支, NS 基因属于 TR 分支。分析 6 株 SIV 的分子特征发现, 在 PB2 蛋白上与病毒致病性增强相关的位点 A676T、L89V、I495V 和 T271A 均发生突变, PA 蛋白上有一个与致病性增强相关的位点 P224S 发生突变; NP 蛋白上 Q357K 和 D53E 位点均发生突变, NA 蛋白上 N369K 位点均发生突变, 这些位点的突变提示病毒对人的适应性增加。

体外复制结果显示: 6 株 SIV 都可以在 MDCK、A549 以及 3D4-21 细胞上良好复制, 病毒在 MDCK 细胞的复制滴度为 0~8.0 lgTCID₅₀/mL; 在 A549 细胞的复制滴度为 0~4.5 lgTCID₅₀/mL; 在 3D4-21 细胞的复制滴度为 0~9.5 lgTCID₅₀/mL。

小鼠致病性试验表明, 本研究分离的 6 株 SIVs 均可引起小鼠体重不同程度的减轻, 减轻幅度为 1.6%~8.3%; 所有病毒均可在小鼠鼻甲骨、气管和肺脏中有效复制; 肺脏中病毒复制滴度最高, 为 0.33 lgEID₅₀/g/mL~7.5 lgEID₅₀/g/mL; 除 SW/188/20 外, 其余病毒均在肾脏有效复制, 复制滴度范围为 1.5~2.43 lgEID₅₀/g/mL; SW/198/20 和

SW/209/20 可以在脾脏中有效复制，病毒复制滴度分别为 $1.10 \lg\text{EID}_{50}/\text{g/mL}$ 和 $1.0 \lg\text{EID}_{50}/\text{g/mL}$ 。所有感染小鼠血清均转阳，滴度为 $1:20 \sim 1:640$ 。

猪致病性试验结果表明：毒株 SW/198/20 感染猪后，可在猪群中有效接触传播和排毒；感染组猪 1~7dpi 持续排毒，排毒高峰出现在 5dpi，滴度为 $6.3 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ；同居组猪 3~9dpi 持续排毒，排毒高峰出现在 5dpi，滴度为 $7.7 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。3dpi 感染组猪脏器病毒复制滴度为 $2.5 \sim 4.5 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL/g}$ ，同居组猪脏器病毒复制滴度为 $0 \sim 3.5 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL/g}$ ；5dpi 感染组猪脏器病毒复制滴度为 $2.5 \sim 5.3 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL/g}$ ，同居组猪脏器病毒复制滴度为 $2.5 \sim 5.7 \lg\text{TCID}_{50}/\text{mL/g}$ ；14dpi 所有猪血清均转阳，HI 滴度范围为 $1:20 \sim 1:1280$ 。

综上所述，本研究分离的 6 株 SIV 可在人源以及猪源细胞中良好复制；在小鼠体内也能良好复制并引起体重不同程度的下降；SW/198 感染后可在猪体内良好复制并且引起接触传播；血清学检测结果表明 H1、H3 和 H9 亚型流感病毒在南方猪群中均存在，需加强进一步的监控。

关键词：猪流感病毒；遗传演化；复制；致病性；血清学

英文缩略词

英文缩写词	英文全称	中文全称
IV	Influenza virus	流感病毒
SIV	Swine influenza virus	猪流感病毒
NP	Nucleoprotein	核蛋白
MP	Matrix protein	膜蛋白
HA	Hemagglutinin	血凝素
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
PB2	Polymerase basic protein2	聚合酶蛋白 B2
PB1	Polymerase basic protein1	聚合酶蛋白 B1
PA	Polymerase acidic protein	聚合酶蛋白 A
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
Amp	Ampicillin	氨苄西林
vRNP	viral Ribonucleoprotein	核酸核蛋白复合体
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	改进的 Eagle 培养基
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
NCBI	National center for biotechnology information	美国国家生物信息中心
MCMC	Markov Chain Monte Carlo	马尔可夫蒙特卡罗算法
EID ₅₀	50% Embryo infective dose	鸡胚半数感染量
BEAST	Bayesian Evolutionary Analysis By Sampling Trees	基于抽样数的贝叶斯进化分析
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose 50%	组织半数感染量
BLAST	Basic local alignment search tool	局部比对搜索工具

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
A	Alanine	丙氨酸
D	Aspartic acid	天冬氨酸
E	Glutamic acid	谷氨酸
G	Glycine	甘氨酸
H	Histidine	组氨酸
I	Isoleucine	异亮氨酸
K	Lysine	赖氨酸
L	L-Leucine	亮氨酸
M	Methionine	蛋氨酸
N	Asparagine	天冬酰胺
P	Proline	脯氨酸
Q	Glutamine	谷氨酰胺
R	Asparagine	精氨酸
S	Serine	丝氨酸
T	Threonine	苏氨酸
V	Valine	缬氨酸

目 录

1 前言	1
1.1 猪流感病毒的概述	1
1.1.1 流感病毒的结构	1
1.1.2 流感病毒的理化特性和培养特性	2
1.1.3 病毒的基因组组成	2
1.1.4 流感病毒的复制过程	6
1.2 猪流感流行病学	7
1.2.1 猪在流感病毒传播过程中的作用	7
1.2.2 猪流感病毒的流行情况	8
1.2.3 猪流感病毒的危害	10
1.3 本研究目的与意义	11
2 材料与方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 主要试剂	12
2.1.2 主要仪器	13
2.1.3 相关生物学软件	13
2.1.4 引物	13
2.1.5 本研究所用毒株	15
2.1.6 细胞和实验动物	15
2.2 方法	15
2.2.1 样品采集	15
2.2.2 样品 RT-PCR 检测	16
2.2.3 病毒的分离	18
2.2.4 火鸡红细胞的制备	18
2.2.5 红细胞凝集试验 (HA)	18
2.2.6 红细胞凝集抑制实验 (HI)	18
2.2.7 病毒的全基因组测序与分析	19
2.2.8 病毒的体外复制能力测定	23

2.2.9 小鼠的感染实验	23
2.2.10 猪的感染实验	24
2.2.11 待检血清的处理	24
3 结果	25
3.1 样品检测	25
3.1.1 鼻拭子样品检测结果	25
3.1.2 血清样本检测结果	26
3.2 猪流感病毒的全基因扩增与序列分析	27
3.2.1 PB2 基因序列分析	28
3.2.2 PB1 基因序列分析	30
3.2.3 PA 基因序列分析	32
3.2.4 HA 基因序列分析	34
3.2.5 NP 基因位点分析	38
3.2.6 NA 基因序列分析	41
3.2.7 M 基因序列分析	44
3.2.8 NS 基因序列分析	46
3.3 猪流感病毒体外复制能力的测定	48
3.3.1 病毒在 MDCK 细胞上的复制情况	48
3.3.2 病毒在 A549 细胞上的复制情况	49
3.3.3 病毒在 3D4-21 细胞上的复制情况	50
3.4 小鼠的致病性试验	51
3.4.1 小鼠脏器内病毒载量的滴定	52
3.4.2 小鼠血清检测结果	53
3.5 猪的致病性试验	54
3.5.1 排毒能力的测定	54
3.5.2 病毒在脏器中的复制能力	56
3.5.3 血清抗体滴度的测定	57
4 讨论	59
4.1 遗传演化分析	59
4.2 病毒体外复制能力的分析	60

4.2.1 病毒在 MDCK 细胞上生长情况的分析.....	60
4.2.2 病毒在 A549 细胞上生长情况的分析	60
4.2.3 病毒在 3D4-21 细胞上生长情况的分析	61
4.3 病毒对小鼠的致病性分析.....	61
4.4 SW/198/21 对猪致病性的研究	62
5 全文总结	63
参 考 文 献.....	64
附录	71
致 谢	72

1 前言

1.1 猪流感病毒的概述

猪流感 (Swine influenza, SI), 由正黏病毒科流感病毒属 A 型流感病毒-猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 引发的一种急性高度传染性呼吸道疾病 (Ottis *et al.*, 1980)。该病的临床表现以: 急性、呼吸困难、发热、咳嗽、打喷嚏、体重减轻、高发病率以及低死亡率为特征。根据核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 和膜蛋白 (Matrix protein, MP) 蛋白的遗传和抗原特性, 流感病毒可被分为 A、B、C 和 D 四种类型 (Brown, 2000)。A 型流感病毒可以感染多种动物, 例如马、猪、犬、猫、貂等 (Webster, Bean, Gorman, Chambers, & Kawaoka, 1992)。在 A 型流感病毒中, 人流感病毒优先与 α -2, 6 半乳糖苷受体结合, 禽流感病毒优先与 α -2, 3 半乳糖苷受体结合。研究表明在猪的气管上皮细胞中同时含有 α -2, 3 和 α -2, 6 两种半乳糖苷受体, 因此猪可被这两种流感病毒感染 (Ito *et al.*, 1998)。所以猪被认为是产生大流行的“混合器”, 对猪流感病毒的系统监测对于下一次潜在大流行的预警至关重要。

1.1.1 流感病毒的结构

流感病毒既可以形成直径约为 80-120 纳米的球体, 也可以形成长度可达 20 微米的细丝 (Ouchi *et al.*, 1996)。然而, 在鸡胚或 MDCK 细胞中传代时, 丝状体病毒通常会消失 (de Jong *et al.*, 1988; Nerome *et al.*, 1985)。病毒的 M1 蛋白对病毒的形态具有决定性的作用, M2 蛋白对病毒形态的形成也具有重要作用 (Tang *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2007), 另外, 有研究表明 NP 蛋白可能以与 M1 蛋白相互作用的方式, 影响流感病毒粒子的形态。无论病毒粒子的形状如何, HA 是最丰富的病毒包膜蛋白, 其次是 NA 和 M2 (Qi *et al.*, 2006)。宿主细胞的细胞膜可以构成病毒粒子最外层的脂质囊膜, 两种糖蛋白纤突, 即 HA 和 NA, 镶嵌在病毒囊膜的表面; 另外, 非糖基化质子通道蛋白 M3 也以镶嵌的方式存在于病毒的囊膜中。HA 可以凝集红细胞, NA 可以水解黏液蛋白和细胞表面的唾液酸, 在病毒完成复制以后, 使病毒离开细胞表面 (Li *et al.*, 2005)。HA 和 NA 蛋白均易发生变异, 且具有亚型特异性, 其抗体具有保护作用。囊膜下层为基质蛋白 M1, M1 抗原性稳定, 具有特异性。最内层是病毒粒子的核心-核糖核蛋白 (vRNP) 复合体 (Peiris *et al.*, 2001), 由聚合酶蛋白 PB2、PB1、PA 和核蛋白 NP 构成。NP 为可溶性抗原, 具有特异性, 抗原性稳定。NS2 蛋白或称为 NEP 蛋白, 为病毒的核输出蛋白, 也存在于纯化的病毒粒子中。

根据介导病毒进入和释放的表面抗原 HA 和 NA 的遗传和抗原特性, 将 A 型流感病毒分为不同的亚型, 迄今为止, 在从野生水禽中分离出的 A 型流感病毒中发现了 16 种 HA (H1~16) 和 9 种 NA 亚型 (N1~9) (Tong *et al.*, 2012)。最近在蝙蝠中发现了另外两种 HA 亚型 (H17 和 H18) 和 NA 亚型 (N10 和 N11) (Tong *et al.*, 2013), 但与更传统的野生禽类流感病毒中的 HA 和 NA 亚型相比, 它们似乎不识别唾液酸。尽管 A 型流感病毒存在多种可能的亚型组合, 但只有三种亚型在人群中持续存在, 这三种亚型分别导致了以下流行病: 1918 年和 2009 年 (H1N1)、1957 年 (H2N2) 和 1968 年 (H3N2)。目前, 只有 H1N1 和 H3N2 亚型, 在人群中流行 (Gamblin *et al.*, 2010; Katz *et al.*, 2014; Maruyama *et al.*, 2016)。

1.1.2 流感病毒的理化特性和培养特性

从整体组成来看, 流感病毒粒子的 RNA 占比约为 1%, 碳水化合物约为 5%~8%, 脂类约为 20%, 剩余约 70% 均为蛋白质 (Qi *et al.*, 2006)。流感病毒一般均能在鸡胚羊膜腔和尿囊腔中增殖, 病毒增殖后以游离的方式存在于羊水或尿囊液中, 通过红细胞凝集试验 (HA) 可以检验出。在组织培养方法中, 最常用的细胞系为犬肾细胞 (MDCK)。流感病毒抵抗力低并且不耐热, 56℃处理 30min 即可灭活。室温下传染性丧失很快, -70℃以下或冻干后可以长期存活。

1.1.3 病毒的基因组组成

猪流感病毒的基因组由 8 个单股负链 RNA (viral RNA, vRNA) 片段组成, 长度在 890-2341 个核苷酸之间。8 个 vRNA 片段具有相同的结构, 在 5' 和 3' 端均具有不同长度的非编码区。在所有的 vRNA 片段 5' 末端的 13 个核苷酸和 3' 末端的 12 个核苷酸都高度保守, 并且两者之间有部分序列互补, 形成发卡结构。基因片段的命名可根据其主要编码的蛋白质来命名, 即 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 片段 (Lowen, 2017)。这些蛋白质共编码 12 种蛋白质: 表面蛋白 HA、NA 和 M2 内部蛋白 PB2、PB1、PB1-F2、PA、NP、M1、NS2 和非结构蛋白 NS1; 肠间截短多肽 (N40) 是最近发现的一种蛋白质, 最初在 mRNA 中 PB1 密码子 40 的 AUG5 处翻译: 它似乎与聚合酶复合物相互作用, 其表达的缺失可导致复制受损。(Maruyama *et al.*, 2016)。

1.1.3.1 RNA 聚合酶复合体蛋白

RNA 聚合酶是一个由 PB2、PB1 和 PA 三种蛋白组成的复合体, 分别由 vRNA1、vRNA2 和 vRNA3 片段编码。RNA 聚合酶复合体负责病毒基因组的转录和复制。在电镜下观察聚合酶复合体可以看出其三个亚基结合在一起, 形成一个紧密的球状结构。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/767064053106010025>