

朱峻锋, 刘朔, 尹馨, 等. 2株鸭源 H10N6 亚型禽流感病毒的遗传进化分析及其致病性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 77-82.

ZHU J F, LIU S, YIN X, et al. Genetic evolution and pathogenicity of two duck-derived H10N6 subtype avian influenza viruses [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 77-82.

2株鸭源 H10N6 亚型禽流感病毒的遗传进化分析及其致病性研究

朱峻锋¹, 刘朔², 尹馨², 彭程², 刘华雷², 蒋文明^{2,3*}, 张传美^{1*}

(1. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109;

2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032;

3. 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(南方), 山东 青岛 266032)

摘要: 为了掌握 H10N6 亚型禽流感病毒在我国的遗传进化特征和生物学特性, 本研究通过基因组测序和遗传进化分析, 对 2020 年在福建某活禽市场上分离得到的 F1464 和 F1473 两株鸭源 H10N6 亚型禽流感病毒基因组进行分析, 并进一步研究了其对 SPF 鸡及小鼠的致病性。结果: 序列分析显示, HA 基因与人感染的 H10N8 和 H10N3 亚型禽流感病毒同源性分别为 91.4%~91.5% 和 95.3%~95.4%; 遗传进化分析显示, 2 株病毒属于欧亚谱系分支, 可能是由包括 H1、H2、H3、H4、H9、H10 和 H11 在内的多种 AIV 亚型重组而来; SPF 鸡感染试验显示, F1464 和 F1473 毒株均为低致病性病毒; 小鼠感染试验显示, F1464 毒株可以在小鼠鼻甲、肺、脾脏中高效复制, 并导致小鼠体重下降, 而 F1473 毒株仅在鼻甲和肺中复制, 对小鼠的致病力更低。本研究为 H10 亚型禽流感的防控和公共卫生风险评估提供了数据支持。

关键词: H10N6; 禽流感病毒; 遗传进化; 致病性

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)01-0077-06

Genetic evolution and pathogenicity of two duck-derived H10N6 subtype avian influenza viruses

ZHU Junfeng¹, LIU Shuo², YIN Xin², PENG Cheng², LIU Hualei², JIANG Wenming^{2,3*}, ZHANG Chuanmei^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;

3. Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266032, China)

Abstract: In order to understand the genetic evolution and biological characteristics of H10N6 subtype avian influenza viruses (AIVs) in China, we sequenced the genome and analyzed the genetic evolution of two duck-derived H10N6 subtype avian influenza viruses (F1464 and F1473) isolated from a live poultry market in Fujian Province in 2020, and studied their pathogenicity to poultry and mice. Sequence analysis showed that the homology of HA gene to human infection with H10N8 and H10N3 subtypes AIV was 91.4% to 91.5% and 95.3% to 95.4%, respectively. Genetic evolution analysis showed that the two strains belonged to the Eurasian lineage and might have been recombined from multiple subtypes of AIV, including H1, H2, H3, H4, H9, H10 and H11. The results of the SPF chicken infection test showed that both F1464 and F1473 strains were lowly pathogenic. The results of the mouse infection test showed that the F1464 strain could replicate efficiently in the turbinate, lung and spleen of the mice, and caused their weight loss. The F1473 strain replicated only in the turbinate and lung, and was less virulent in mice. This study provided data support for prevention and control of H10 subtype avian influenza and for public health risk assessment.

Keywords: H10N6; avian influenza virus; genetic evolution; pathogenicity

收稿日期: 2023-01-10; 修回日期: 2023-10-23

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2022CXGC010606)

第一作者: 朱峻锋, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 蒋文明, 博士, 研究员, 研究方向为畜禽重要疫病防控, E-mail: civeul@163.com; 张传美, 博士, 副教授, 研究方向为动物传染病的诊断与防治, E-mail: zhangchuanmei100@163.com。

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 是正黏病毒科、A 型流感病毒属, 一般仅感染禽类, 有些 AIV 能越过物种界限进行扩散, 并引起人类及其他哺乳动物的疾病或亚临床感染^[1-3]。依据 AIV 在 SPF 鸡中致病性, 可以将其分为高致病性 AIV 与低致病性 AIV 两种类型^[4]。

目前, 在野生水禽中已经鉴定出 16 种血凝素 (HA) 和 9 种神经氨酸酶 (NA) 亚型, 并从蝙蝠体内发现了 H17N10、H18N11 两种亚型^[3]。1949 年 H10N7 亚型 AIV 在德国鸡群中首次分离。随后, 在许多鸟类、哺乳类动物中均有不同程度的分布, 其中包括家鸡、水貂等。之后, H10 亚型 AIV 在各国家禽及野鸟间蔓延传播, 并且在此期间病毒不断地重组导致宿主范围不断扩大^[5]。瑞典于 1984 年报道了 H10N4 亚型 AIV 感染了哺乳动物雪貂, 造成大批死亡, 且结果发现, 病毒 PB2 蛋白出现 K526R 与 D701N 的哺乳动物适应性相关突变现象^[6]。2003 年从我国湖北省猪体内首次分离出 H10N5 亚型 AIV^[7]。2010 年, 澳大利亚报道了多例临床症状明显的人感染 H10N7 病毒病例^[8]。2013 年在我国江西省首次出现人类感染 H10N8 亚型 AIV 死亡案例, 感染试验结果显示, 病毒可在小鼠肺组织中高效复制^[9]。多项研究表明, H10 亚型 AIV 可以跨物种侵染哺乳动物并有可能进一步发生适应性突变, 对人类健康构成威胁。2021 年 4 月江苏省报告了第 1 例人感染 H10N3 亚型禽流感病毒案例, 研究表明这种新型重组病毒对小鼠具有高致病性, 存在人类感染的风险^[10]。

持续监测、了解和探索已知和新型 AIV 并评估其对动物和人类健康的潜在影响是疫病防控的前提。本实验室在 2020 年全国主动流行病学调查中, 在鸭的口咽拭子中分离到 2 株 H10N6 亚型 AIV, 对这 2 株分离到的病毒进行了全基因组测序、遗传演化分析及动物感染试验, 分析该病毒的生物学特性, 评估该病毒的公共卫生风险, 以期对国内 H10 亚型禽流感综合防治工作有所借鉴。

1 材料与方法

1.1 病毒及实验动物

A/duck/Fujian/F1464/2020 (H10N6) (简称 F1464)、A/duck/Fujian/F1473/2020 (H10N6) (简称 F1473) 由中国动物卫生与流行病学中心分离鉴定并保存; 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司; 6 周龄 SPF 鸡和 SPF 鸡胚均购自济南斯帕法斯家禽有限公司。

1.2 主要试剂

病毒核酸提取试剂盒购自济凡生物科技 (常州)

有限公司; HiScript II One Step RT-PCR Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 胶纯化试剂盒购自索莱宝公司。

1.3 病毒全基因组测序及遗传演化分析

根据病毒 RNA 提取试剂盒的说明书, 对 2 株 H10N6 亚型 AIV 进行 RNA 提取, 以它为模板, 参照 Hoffmann 等^[11]的引物和反应条件, 分别用 RT-PCR 方法扩增基因组中各个目的片段。在此基础上通过比较不同核酸片段大小和长度来判断该样品是否为禽流感病毒样本。对扩增产物进行纯化、测序和鉴定。测序结果采用 DNASTar 软件 Seqman Pro 拼接序列。

下载 GenBank 和 GISAID 数据库中 AIV 基因组序列, 在 MEGA 11.0 中用 Clustal W 法比较病毒各基因片段序列, 通过 Neighbor-Joining 构建了 8 条基因片段遗传进化树, Bootstrap 值设置为 1 000。

1.4 病毒纯化和鸡胚半数感染量 (EID₅₀) 测定

2 株病毒用 PBS 按 10 倍倍比稀释, 稀释度为 10⁻⁶~10⁻⁹, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每个稀释度分别接种 5 次。37 ℃ 孵育 48 h 后, 收集稀释度最大、血凝价最高的鸡胚尿囊液, 按照上述操作步骤, 如此循环纯化 3 代后, 再将收集到的尿囊液进行分装, -80 ℃ 冻存备用。使用时, 取出 -80 ℃ 保存的纯化的含病毒尿囊液并 10 倍倍比稀释, 每个稀释度分别接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚并在 37 ℃ 条件下孵化 48 h, 统计各稀释度具有血凝活性的鸡胚数, 根据 Reed-Muench 法计算各毒株 EID₅₀。

1.5 静脉接种指数 (IVPI) 测定

病毒在生理盐水中 10 倍稀释后, 每羽 SPF 鸡用 0.1 mL 稀释后的病毒液进行翅下静脉注射, 每组 10 只, 感染后对试验鸡的临床症状和死亡情况进行持续 10 d 的观察与记录。IVPI 为每只鸡在 10 d 内的临床观察得分平均值, 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, 出现呼吸系统相关症状、精神沉郁、腹泻、头冠紫红、头面水肿、神经系统症状为 1 分。IVPI 超过 1.2, 则判定为高致病性 AIV^[12]。

1.6 小鼠感染性试验

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠经干冰麻醉后, 用 10⁶ EID₅₀ 的病毒剂量通过鼻腔感染小鼠 8 只, 每只接种 50 μL 尿囊液。在攻毒后 14 d 内, 每天监测小鼠的疾病体征、体重变化 (相对于攻毒前的体重变化) 和死亡情况以初步鉴定该病毒对机体的影响。病毒感染后 3 d, 每组随机选择 3 只小鼠进行剖杀, 分别取小鼠的脑、鼻甲、脾脏、肾脏和肺脏, 用鸡胚滴定各脏器内病毒含量。各种组织脏器经匀浆机匀浆后, 2 000 g 离心 10 min, 将上清液转移到灭菌离心管中,

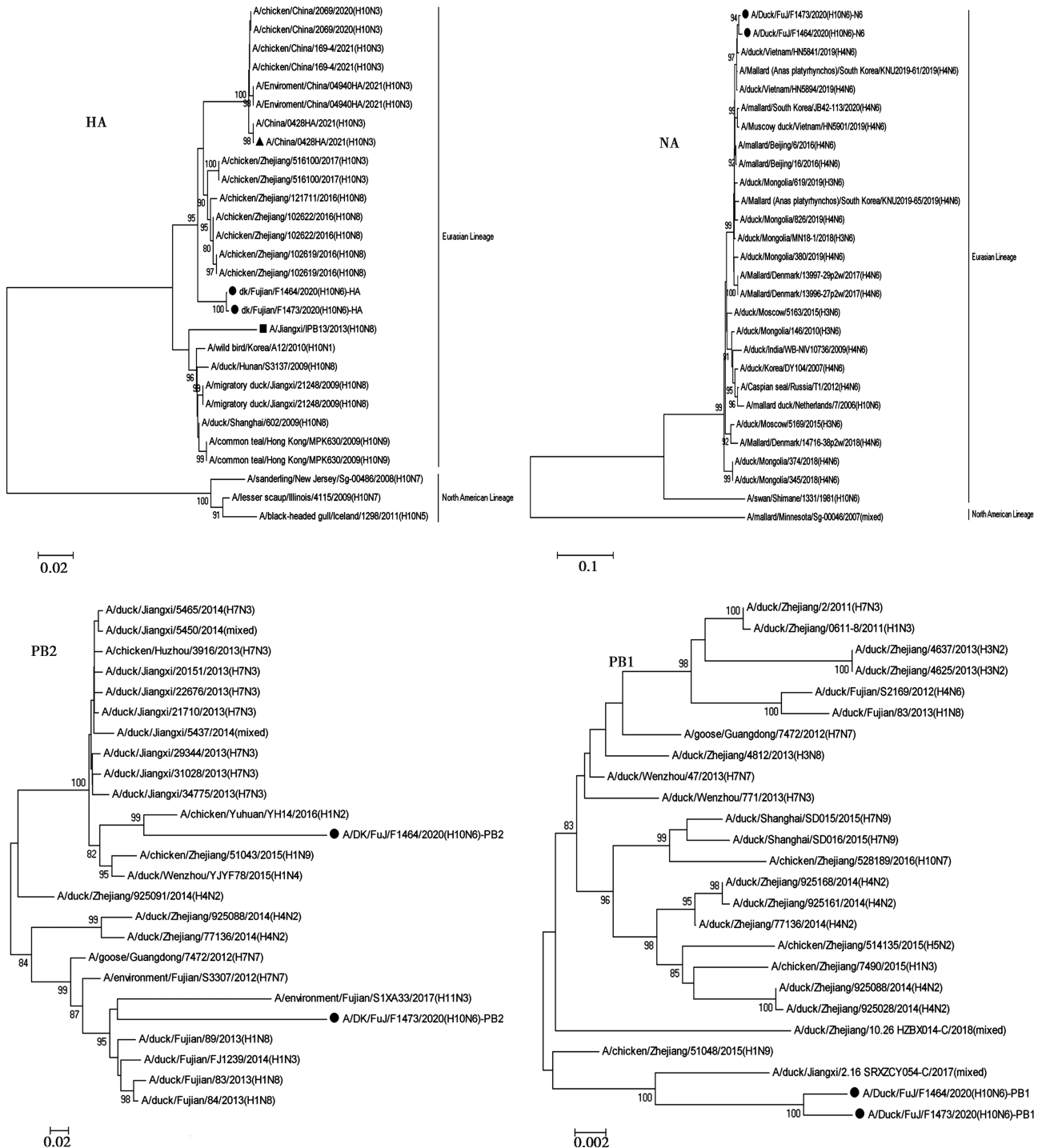
用含抗生素的无菌 PBS 进行 10 倍比稀释，每个稀释接种 3 枚 10 日龄的鸡胚，根据 Reed-Muench 法计算病毒滴度，以测定病毒在小鼠体内各脏器的复制水平。

2 结果

2.1 鸭源 H10N6 亚型 AIV 的序列与遗传演化分析

为了明确本研究中 2 株 H10N6 病毒的起源，首

先对全基因组进行测序，并对 HA 和 NA 以及其他 6 个基因片段进行遗传进化分析（图 1 和图 2）。结果表明，2 株 H10N6 病毒 HA 基因均属于欧亚谱系。BLAST 分析结果表明，这 2 株 H10N6 的 HA 基因与浙江毒株 A/chicken/Zhejiang/102622/2016（H10N8）最相似，NA 基因与 A/duck/Vietnam/HN5894/2019（H4N6）的关系最为密切。



注：▲和■表示不同年份人感染的 H10 毒株；●为本试验分离毒株，下同。

图 1 两毒株 HA、NA、PB2 和 PB1 基因片段遗传进化分析

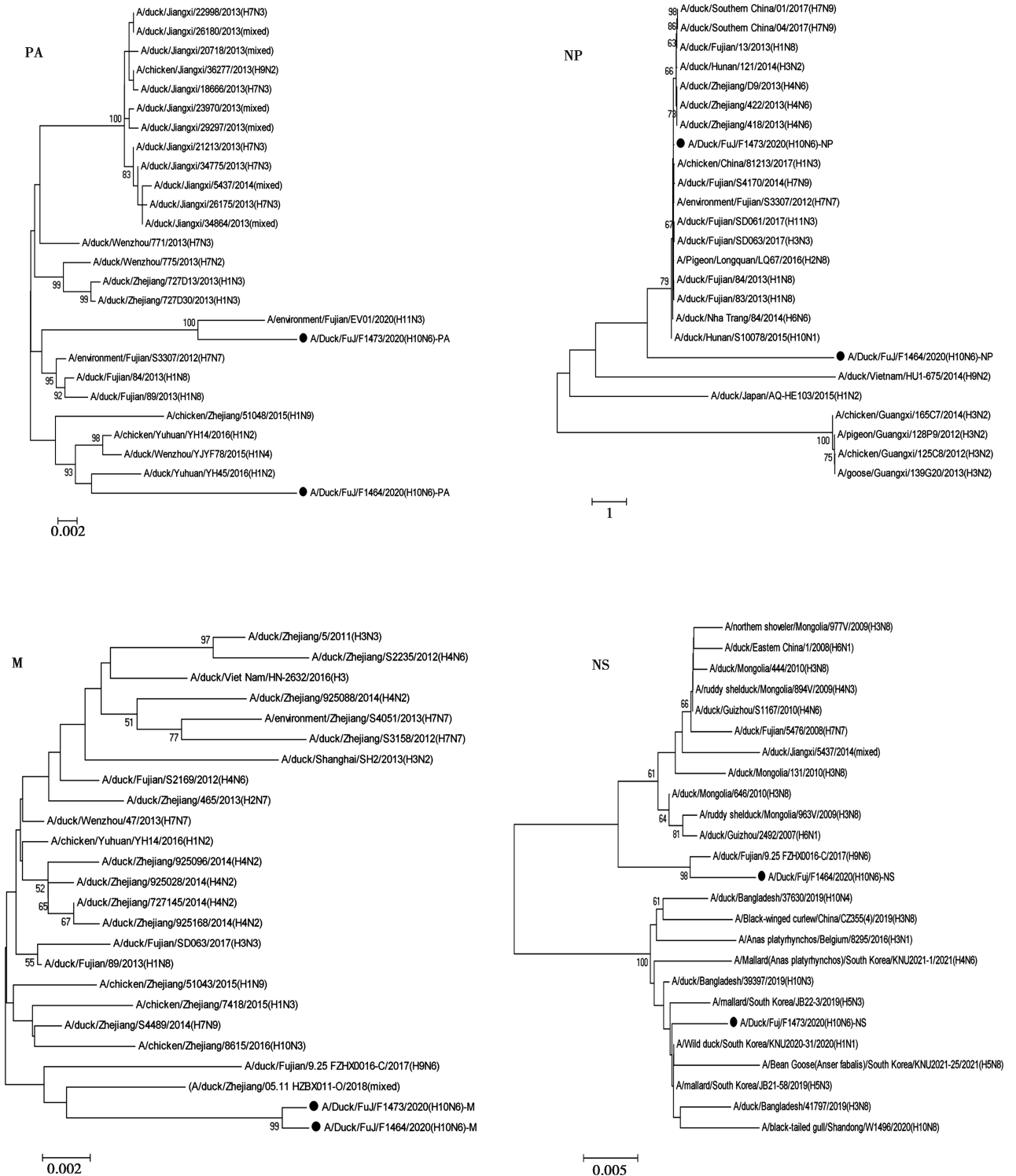


图2 两毒株 PA、NP、M 和 NS 基因片段遗传进化分析

PB2、PB1、PA、M、NS、NP 基因与 2013 年以来从中国、韩国、越南等国家的家禽中分离出的各种亚型 AIV 密切相关 (表 1)。HA 序列分析结果显示, 2 株 H10N6 亚型 AIV 的 HA 基因之间的同源性为 99.8%, 与 2013 年的人感染 H10N8 亚型 AIV 和 2021

年的人感染 H10N3 亚型 AIV 同源性分别为 91.4% ~ 91.5% 和 95.3% ~ 95.4%。经由对上述试验结果的分析, 2 株鸭源 H10N6 亚型 AIV 与 2013 年的 H10N8 亚型 AIV 有较远的亲缘关系, 与 2021 年的 H10N3 亚型 AIV 亲缘关系较近。

表 1 2株 H10N6 亚型 AIV 各基因节段同源性分析

病毒	基因	同源性最高的毒株	同源性/%	登录号
F1473	PB2	A/duck/Fujian/FJ1239/2014 (H1N3)	97.5	KP658005
	PB1	A/chicken/Zhejiang/51048/2015 (H1N9)	97.6	KY971086
	PA	A/environment/Fujian/EV01/2020 (H11N3)	98.3	ON968462
	HA	A/chicken/Zhejiang/102622/2016 (H10N8)	97.7	MG366511
	NP	A/Pigeon/Longquan/LQ67/2016 (H2N8)	97.9	KY415760
	NA	A/duck/Vietnam/HN5894/2019 (H4N6)	99.3	MW935144
	M	A/chicken/Zhejiang/102622/2016 (H10N8)	98.7	MG366532
	NS	A/duck/Fujian/9.25_ FZHX0016-C/2017 (H9N6)	99.3	KT266946
F1464	PB2	A/chicken/Yuhuan/YH14/2016 (H1N2)	97.6	MW102231
	PB1	A/chicken/Zhejiang/51048/2015 (H1N9)	97.7	KY971086
	PA	A/chicken/Yuhuan/YH14/2016 (H1N2)	97.4	KY604965
	HA	A/chicken/Zhejiang/102622/2016 (H10N8)	97.8	MG366511
	NP	A/chicken/Guangxi/165C7/2014 (H3N2)	96.3	KT022319
	NA	A/duck/Vietnam/HN5894/2019 (H4N6)	99.1	MW935144
	M	A/chicken/Zhejiang/102622/2016 (H10N8)	98.9	MG366532
	NS	A/Wild duck/South Korea/KNU2020-31/2020 (H1N1)	99.5	OK217178

2.2 IVPI

2株 H10N6 亚型 AIV 静脉感染 SPF 鸡后，感染组 10 只鸡在 10 d 内无任何可见临床症状出现，因此判定 F1473 和 F1464 毒株的 IVPI 均为 0，为低致病性 AIV。

2.3 BALB/c 小鼠致病性试验

以 10^6 EID₅₀ 的剂量将 2 株 H10N6 亚型 AIV 各感染 8 只小鼠，3 d 后滴定不同脏器内的病毒滴度，结果显示 (图 3)，2 株病毒在小鼠肺脏及鼻甲中的平均滴度分别为 $1.5 \lg \sim 4.5 \lg$ EID₅₀/mL 和 $3.25 \lg \sim 6.92 \lg$ EID₅₀/mL，2 株病毒在小鼠的大脑及肾组织中均未被发现。在 14 d 观察期内，F1473 毒株组与对照组相比小鼠体重上升较慢，而 F1464 毒株组在感染后 4 d 出现明显的体重下降 (图 4)。体重变化与脏器病毒滴定结果一致，F1464 毒株组不仅在鼻甲和肺脏中的病毒滴度比 F1473 毒株组高，脾脏中也监测到病毒复制。

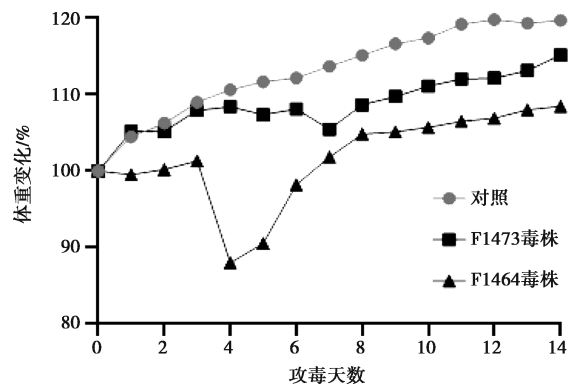


图 4 小鼠感染 14 d 内体重变化

3 讨论

自 1997 年以来，H5 和 H7 亚型禽流感引起了全世界的关注，不仅给养禽业造成巨大经济损失，还导致了上千人的感染病例^[13]。近年来，一些其他亚型的 AIV 也出现了人感染病例，如 H10、H3 等。H10 亚型 AIV 的传入对人类健康构成潜在威胁，其不断重组和感染引起了人们对 H10 亚型 AIVs 的更多关注，但目前世界范围内发现的 H10N6 亚型禽流感病毒样本较少。

2020 年，本实验室在全国的主动流行病学调查中，从鸭体内分离出 2 株 H10N6 亚型 AIV。遗传进化和系统发育分析表明，这 2 株分离株属于欧亚谱系，是由多个亚型的 AIV 重组而来。根据遗传进化分析结果，这些重组最有可能发生在中国、越南和韩国，因为这 2 株 H10N6 亚型 AIV 的基因与中国、越南和韩国分离毒株亲缘关系最近。可能是家禽体内

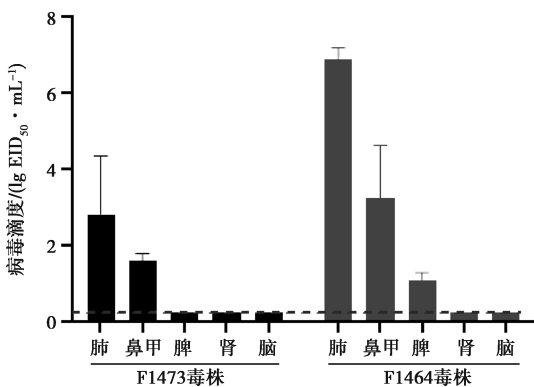


图 3 小鼠感染两毒株 3 d 后各脏器病毒滴度

H10N8 流感病毒与越南的 H4N6 亚型 AIV 重组后, 又继续与其他流感病毒进行重组, 并通过一系列重组获得其他流感病毒的内部基因, 提示这 2 株 H10N6 亚型 AIV 可能是由包括 H1、H2、H3、H4、H9、H10 和 H11 在内的多种 AIV 亚型重组而来, 其原因可能是携带病毒的野鸟在东亚至澳大利亚的迁徙过程中与东亚其他国家的病毒发生了重组。由于来自野生鸟类的 AIV 很少直接感染人类, 与其他家禽甲型流感病毒重组可能使它们具有某些基因特征从而感染人类。

BALB/c 小鼠致病性试验结果表明, 2 株 H10N6 亚型 AIV 可以感染小鼠, 并在小鼠呼吸系统 (肺脏和鼻甲) 中有效复制, 但均不能突破小鼠血脑屏障在其脑内增殖。病毒在多系统的复制和滴度的高低决定了毒株的致病力不同, F1464 毒株的致病力强于 F1473 毒株, 出现一过性的体重下降。这 2 株 H10N6 病毒在下呼吸道 (肺) 中复制的滴度高于上呼吸道 (鼻甲), 说明病毒具备结合人样受体的能力。

随着病毒的不断进化, H10 亚型病毒可能会导致潜在的人类感染风险问题, 因此应加强对 H10 亚型 AIV 的监测, 逐步深化拓展对其生物学特性的相关研究, 以此更好地服务于国内流感疫情防控和预警预报等工作。

参考文献:

- [1] SUTTON T C, LAMIRANDE E W, CZAKO R, et al. Evaluation of the biological properties and cross-reactive antibody response to H10 influenza viruses in ferrets [J]. *J Virol*, 2017, 91 (19): e00895-17.
- [2] WANG Y, WANG M, ZHANG H, et al. Emergence, evolution, and biological characteristics of H10N4 and H10N8 avian influenza viruses in migratory wild birds detected in eastern China in 2020 [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (2): e0080722.
- [3] EL-SHESHENY R, FRANKS J, MARATHE B M, et al. Genetic characterization and pathogenic potential of H10 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in Bangladesh [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 10693.
- [4] GERMERAAD E A, SANDERS P, HAGENAARS T J, et al. Virusshedding of avian influenza in poultry: a systematic review and meta-analysis [J]. *Viruses*, 2019, 11 (9): 812.
- [5] SI Y J, PARK Y R, BAEK Y G, et al. Pathogenesis and genetic characteristics of low pathogenic avian influenza H10 viruses isolated from migratory birds in South Korea during 2010-2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): 2588-2599.
- [6] KLINGEBORN B, ENGLUND L, ROTT R, et al. An avian influenza A virus killing a mammalian species—the mink [J]. *Arch Virol*, 1985, 86 (3/4): 347-351.
- [7] WANG N, ZOU W, YANG Y, et al. Complete genome sequence of an H10N5 avian influenza virus isolated from pigs in central China [J]. *J Virol*, 2012, 86 (24): 13865-13866.
- [8] ARZEY G G, KIRKLAND P D, ARZEY K E, et al. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18 (5): 814-816.
- [9] DENG G, SHI J, WANG J, et al. Genetics, receptor binding, and virulence in mice of H10N8 influenza viruses isolated from ducks and chickens in live poultry markets in China [J]. *J Virol*, 2015, 89 (12): 6506-6510.
- [10] GAO R, ZHENG H, LIU K, et al. Genesis, evolution and host species distribution of influenza A (H10N3) virus in China [J]. *J Infect*, 2021, 83 (5): 607-635.
- [11] 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.
- [12] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) [M]. 6th Edition. Paris: Office Intl Des Epizooties, 2008: 465-481.
- [13] SUTTON T C. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses [J]. *Viruses*, 2018, 10 (9): 461.