

·学科进展与展望·

禽流感病毒与人类禽流感

戚中田

(第二军医大学微生物学教研室,全军医学微生物学重点实验室,上海 200433)

[摘要] 禽流感病毒属甲型流感病毒,主要引起禽类流感。1997年首次证明禽流感病毒(A/Hong Kong/156/97)H5N1亚型可感染人,其后在我国内地、香港及荷兰等地又至少发生了5起禽流感病毒的人间感染。目前,禽流感病毒正在我国及亚洲部分地区肆虐,已造成很大的经济损失和社会影响,禽流感已成为严重危害人类健康的新发传染病。本文拟就禽流感病毒的基因特征、致病性及特异检测等方面的进展做一综述。

[关键词] 病毒,禽流感,基因组,致病性,特异检测

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)是禽流感(avian influenza, 简称AI亦称bird flu)的病原体,主要引起禽类或人的急性呼吸道传染病。2003年12月份以来,在我国周边国家和地区的一些养鸡场相继暴发禽流感,迄今已有约4.5亿只鸡病死或被宰杀,造成很大的经济损失。这次家禽感染的禽流感病毒亚型为H5N1,并且又感染到人,出现了人间禽流感患者并有死亡病例。自1997年首次报道人类禽流感以来,已发生禽流感病毒人间感染200余例,死亡40余人,给人类健康带来了威胁^[1],也造成了巨大的社会影响^[2]。2004年1月27日,我国国家禽流感实验室确诊发生在广西隆安县的禽只死亡也为高致病性(high pathogenicity)禽流感所致。本文拟就禽流感病毒的基因组特点、分类与致病性及特异检测和防治等做一综述。

1 禽流感病毒的基因组特点

禽流感病毒在分类学上属于粘病毒科(orthomyxoviridae),该病毒科主要包括甲型、乙型和丙型三个流感病毒属^[3]。甲型流感病毒属(genus influenzae A)成员除感染人外,还能感染鸡、鸭、猪等脊椎动物,禽流感病毒就属于甲型流感病毒属。丙型流感病毒主要感染人,也可能感染猪;乙型流感病毒仅感染人而不感染其他动物。与侵犯人类的甲型流

感病毒一样,禽流感病毒的基因组为单负链线状RNA,长约14 000个核苷酸(nt)。基因组的特点是其序列的“不连续性”,它由8个(RNA1—RNA8)基因节段(segment)组成,每个RNA基因节段5'端的起始序列均为TCATCTTTGTCC 13个核苷酸,3'端的最后12个核苷酸也相同,均为AGCAAAAGCAGG,这是禽流感病毒基因节段极易发生重配(reassortment)的重要原因之一。基因节段根据长短从大到小依次命名,每个节段的核苷酸长度、编码蛋白的氨基酸(aa)数及主要功能等如表1所示。

RNA1、RNA2和RNA3编码的PB2、PB1和PA蛋白,具有RNA依赖的RNA聚合酶活性,与病毒RNA复制有关。RNA4和RNA6编码的病毒血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是最重要的2种病毒表面结构蛋白,是病毒亚型分类的依据。RNA5编码的核蛋白(nucleoprotein, NP)位于病毒体内部,与每个RNA节段结合构成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)。RNA7编码的基质膜蛋白(membrane protein, M)包裹病毒核心,位于RNA与包膜之间。RNA8编码病毒的非结构蛋白,其功能是抑制宿主细胞蛋白质合成,促进病毒在细胞内的增殖。M蛋白和NP蛋白是禽流感病毒的分型(属于甲型流感病毒)依据,而HA和NA蛋白则是禽流感病毒亚型分类的依据。

本文于2004年2月5日收到。

表1 禽流感病毒基因组各节段的大小与功能

基因节段	长度(nt)	编码蛋白(aa数)	主要功能
RNA1	2300—2400	PB2(759)	与病毒RNA聚合酶活性有关
RNA2	2300—2400	PB1(757)	病毒RNA依赖的RNA聚合酶
RNA3	2200—2300	PA(716)	具有解旋酶活性
RNA4	1700—1800	病毒血凝素(HA)(约560)	结合靶细胞受体,介导病毒与靶细胞融合,诱导中和抗体,凝集红细胞
RNA5	1500—1600	核蛋白(NP)(498)	与基因组RNA结合,参与形成核糖核蛋白(RNP)颗粒
RNA6	1400—1500	神经氨酸酶(NA)(454)	水解细胞多糖受体,促使子代病毒释放
RNA7	1000—1100	基质蛋白(M1、M2)(252、97)	病毒基质膜蛋白,有保护作用
RNA8	800—900	NS1、NS2(约220、110)	非结构蛋白,抑制宿主细胞蛋白合成

2 禽流感病毒及其致病性

禽流感病毒呈球形,核衣壳螺旋对称,具有包膜结构,病毒体直径为80—120nm。初分离的病毒体可呈丝状,直径约20nm,长达300—3000nm。病毒体内的核心部分为NP蛋白包裹的8个RNA基因组节段,其外为基质膜蛋白M1形成的一层球形蛋白衣壳,衣壳内除有病毒RNA和NP蛋白外,还有病毒编码的3种RNA聚合酶PB2、PB1和PA。衣壳的外面为类脂构成的包膜,其中镶嵌着3种重要的病毒蛋白质(病毒血凝素、神经氨酸酶和基质膜蛋白M2),成熟的HA由重链(血凝素1,HA1)和轻链(血凝素2,HA2)组成,HA与NA在膜上的比例约为(4~5):1。

禽流感病毒的变异主要是指HA(尤其是HA1)和NA这2种蛋白的改变,它们的变异决定了病毒的宿主亲嗜性(感染人或禽)、致病性(高致病性或低致病性)、免疫性和暴发流行等^[4]。HA分子中有4个以上的氨基酸突变或2个抗原决定簇位点的改变,就可能成为一个新变种。禽流感病毒的变异主要有两种类型,一种是发生在HA或NA分子内的点突变,称为抗原性漂移(antigenic drift),这种变异是一种“量变”的累积,比较缓慢,一般不引起暴发流行。另一种变异是发生在基因节段之间的重配,称为抗原性转换(antigenic shift),这种不同毒株间基因节段的重配可引起病毒基因组的“质变”,产生人群中对其缺乏免疫力的新毒株,故可引起人群暴发流行。1957年和1968年的两次人群流感大流行,就分别是由来自禽流感的RNA2、RNA4和RNA6节段以及RNA2和RNA4节段与人流感病毒基因片段重配所致。目前已发现甲型流感病毒属的血凝素至少有15个亚型(H1—H15),神经氨酸酶至少有9个亚型(N1—N9)。甲型流感病毒属的成员都有较严格的宿主特异性^[5],人流感病毒多为H1、H2和H3亚型,而禽流感病毒多为H5、H7和H9亚型。人流感病毒

一般不直接感染禽类,禽流感病毒也不直接感染人。但1997年以来^[6]发生的数起感染人的禽流感病毒株,经基因测序证明并没有发生重配。Subbarao等^[7]证明,1997年在香港分离的感染人的禽流感H5N1毒株,所有的8个基因片段都来自禽流感病毒。Suarez等^[8]证明感染人的禽流感病毒与感染鸡的禽流感病毒的基因同源性>99%,而两者与GenBank中已知的人或禽流感病毒的同源性却小于95%。基因进化分析显示,感染人的两株禽流感病毒(H5N1亚型与H9N2亚型)的亲缘关系十分接近,但它们与人流感病毒株的进化距离均较远。

禽类是甲型流感病毒的“储藏库”,目前已发现的所有的人流感病毒均可在禽中分离到,它们对禽并不致病。但禽流感病毒为何能直接感染人?这个问题值得进一步研究^[9]。看来禽流感病毒的致病性是由多基因决定的^[10,11],表2列举的是目前已知的与宿主(人或禽)亲嗜性相关的流感病毒氨基酸位点。目前在我国及亚洲部分地区流行的H5N1病毒与1997年^[12]在香港第一次跨物种感染的禽流感病毒为同一亚型^[8]。1998—2000年在我国大陆和香港地区感染人的禽流感病毒均为H9N2亚型^[13]。2003年发生在荷兰的感染人的禽流感病毒为H7N7亚型^[14]。将高致病性禽流感病毒的任一基因节段替换,均会使其失去致病性;而将两低致病性的亲本毒株重配,也可产生高致病性的重配株。HA蛋白酶切位点的附近有多个碱性氨基酸残基,这可能是高致病性禽流感病毒的重要特征之一。

3 禽流感病毒的特异检测与防治

目前已有用于禽类感染的检测诊断产品^[15]和预防疫苗^[16—21],但尚无批准用于人的禽流感病毒检测试剂和疫苗^[22]。故我国规定,对人间禽流感病例的诊断与检测结果的复核工作,由中国疾病预防控制中心承担;人间禽流感病例的最终确诊,也由国家卫生部组织的人禽流感防治专家组做出。

表2 可能与宿主特异性相关的病毒蛋白位点

蛋白及其位点	预测的氨基酸残基		实测的氨基酸残基			
	嗜禽毒株	嗜人毒株	禽流感病毒 (H5N1、H9N2)	人流感病毒 (H3N2)		
M1	137	T	A	T	A	
M2	16	E	G	E/G	G	
	20	S/N	N	S	N	
	28	I	I/V	V	Y	
	55	L	F	F	F	
	78	Q	K	Q	K	
NP	33	V	I	V	I	
	61	I	L	I	L	
	100	R	V	R	V	
	136	L	M	M	M	
	214	R	K	R	K	
	283	L	P	L	P	
	293	R	K	R	K	
	313	F	Y	F	Y	
	375	D	G/E	D	G	
	PA	28	P	L	P	L
55		D	N	D	N	
65		S	L	S	L	
100		V	A	V	A	
382		E	D	E	D	
400		Q/T/S	L	L	L	
409		S	N	N/S	N	
552		T	S	T	S	
PB2		44	A	S	A	S
		81	T	M	T/A	M
	199	A	S	A/S	S	
	271	T	A	T	A	
	588	A	I	A	I	
	613	V	T	V	T	
	661	A	T	T	T	
	674	A/S	T	A	T	
702	K	R	K/R	R		

3.1 鸡胚接种或细胞培养法分离病毒

对急性期可疑病人,取咽液或鼻咽拭子浸液,可接种鸡胚羊膜腔进行培养分离;也可用原代或传代细胞进行病毒分离。1997年引起香港禽流感流行的毒株 A/Hong Kong/156/97(H5N1)就是用此法从感染禽流感的患者中分离的。应该注意的是,对怀疑为高致病禽流感病毒的分离培养,应在 P3 实验室进行。

3.2 荧光 PT-PCR 法检测病毒基因

根据禽流感病毒(主要是 H5、H7 和 H9 亚型)的 HA(或 NA)基因序列,设计各亚型的特异扩增引物与探针^[23],在对标本中的病毒 RNA 进行提取和逆转录后,采用 Taqman 技术进行实时定量荧光 PCR 检测。

3.3 双抗体夹心、免疫荧光或血凝法检测病毒抗

原^[17,24]

该法系以禽流感病毒抗体包被检测板孔或将其点在硝酸纤维素膜上,采用酶免疫法或胶体金技术检测病毒抗原。也有用病毒血凝试验对病毒体颗粒进行初筛;或用间接免疫荧光法,以荧光标记的特异性抗体检测玻片标本或培养细胞中的病毒抗原。

3.4 检测血清抗体^[25]

抗体检测应分别采取发病初期(5天以内)和恢复期(10—14天)血清,常用 ELISA 法或补体结合试验进行检测。前者以包被的特异抗原(HA、NA、NP 和/或 M)检测相应的抗体,后法包括两个抗原-抗体系统,即特异抗原抗体系统和试验指示系统(羊红细胞-溶血素系统),双份血清抗体效价升高4倍或以上有诊断意义。也可采用血凝抑制(HI)试验进行抗体检测,该法还可同时对病毒型别进行鉴定。

3.5 中和试验

该法系将患者血清样本与已知毒株作用,然后观察该毒株对鸡胚或敏感细胞的致病效应,以此判断待检血清标本中是否存在病毒中和抗体及抗体效价。中和抗体在体内存在时间较长,不仅有助于感染的诊断,还可反映患者体内的抗病毒免疫状态。

禽流感病毒的抵抗力很弱,对热、干燥、紫外线、有机溶剂及常用的消毒剂敏感,可被 56℃ 30 分钟、65℃ 10 分钟或 100℃ 1 分钟加热灭活。对家禽感染禽流感的控制,可有效降低人感染禽流感的几率。不近距离接触病禽,注意房间通风换气与日照,都有助于预防禽流感的感染。接种流感病毒灭活疫苗或亚单位疫苗,对人群禽流感的防治也有积极意义。有关人用禽流感疫苗,及以多个亚型基因片段为基础的禽流感病毒基因检测芯片和以多株特异性单克隆抗体为基础的禽流感病毒蛋白检测芯片,目前都在研发中。

参 考 文 献

- [1] Webby R J, Webster R G. Are we ready for pandemic influenza? *Science*, 2003, 302 (5650): 1519—1522.
- [2] Katz J M. The impact of avian influenza viruses on public health. *Avian Dis.*, 2003, 47(3 Suppl.): 914—920.
- [3] 郭元吉. 正粘病毒科. 闻玉梅主编. 现代医学微生物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999, 1005—1020.
- [4] Subbarao K, Shaw M W. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. *Rev. Med. Virol.*, 2000, 10(5): 337—348.
- [5] Perkins L E, Swayne D E. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.*, 2003, 47(3 Suppl.): 956—967.

- [6] Ku A S, Chan L T. The first case of H5N1 avian influenza infection in a human with complications of adult respiratory distress syndrome and Reye's syndrome. *J. Paediatr. Child Health*, 1999, 35(2):207—209.
- [7] Subbarao K, Klimov A, Katz J et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279(5349):393—396.
- [8] Suarez D L, Perdue M L, Cox N et al. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.*, 1998, 72(8):6678—6688.
- [9] Naffakh N, Massin P, Escriou N et al. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.*, 2000, 81(Pt 5):1283—1291.
- [10] Bright R A, Cho D S, Rowe T et al. Mechanisms of pathogenicity of influenza A (H5N1) viruses in mice. *Avian Dis.*, 2003, 47(3 Suppl.):1131—1134.
- [11] Shaw M, Cooper L, Xu X et al. Molecular changes associated with the transmission of avian influenza A H5N1 and H9N2 viruses to humans. *J. Med. Virol.*, 2002, 66(1):107—114.
- [12] Osterhaus A D, de Jong J C, Rimmelzwaan G F et al. H5N1 influenza in Hong Kong: Virus characterizations. *Vaccine*, 2002, 20 Suppl. 2: S82—83.
- [13] Saito T, Lim W, Suzuki T et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine*, 2001, 20(1—2):125—133.
- [14] Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004 Jan 26 [Epub ahead of print].
- [15] Shan S, Ko L S, Collins R A et al. Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302(2):377—383.
- [16] Nicholson K G, Colegate A E, Podda A et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: A randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 2001, 357(9272):1937—1943.
- [17] Sims L D, Guan Y, Ellis T M et al. An update on avian influenza in Hong Kong 2002. *Avian Dis.*, 2003, 47(3 Suppl.):1083—1086.
- [18] Matsuoka Y, Chen H, Cox N et al. Safety evaluation in chickens of candidate human vaccines against potential pandemic strains of influenza. *Avian Dis.*, 2003, 47(3 Suppl.):926—930.
- [19] Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.*, 2003, 32(1):25—32.
- [20] Tollis M, Di Trani L. Recent developments in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis. *Vet. J.*, 2002, 164(3):202—215.
- [21] Wood J M, Nicholson K G, Stephenson I et al. Experience with the clinical development of influenza vaccines for potential pandemics. *Med Microbiol Immunol (Berl.)*, 2002, 191(3—4):197—201. Epub 2002 Sep. 11.
- [22] Takada A, Kuboki N, Okazaki K et al. Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J. Virol.*, 1999, 73(10):8303—8307.
- [23] Yuen K Y, Chan P K, Peiris M et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 1998, 351(9101):460—461.
- [24] Katz J M, Lim W, Bridges C B et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J. Infect Dis.*, 1999, 180(6):1763—1770.
- [25] Rowe T, Abernathy R A, Hu-Primmer J et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin Microbiol.*, 1999, 37(4):937—943.

AVIAN INFLUENZA VIRUSES AND THEIR INFECTIONS IN HUMANS

Qi Zhongtian

(Department of Microbiology, Second Military Medical University; PLA Key Laboratory for Medical Microbiology, Shanghai 200433)

Abstract Classified into genus *influenzavirus A* of *Orthomyxoviridae*, avian influenza viruses are mainly responsible for avian influenza. Until 1997, when human infections with avian influenza H5N1 virus (A/Hong Kong/156/97) were identified for the first time in Hong Kong, avian influenza viruses were thought to be limited in their ability to directly infect humans. At least 5 outbreaks of human infections with either avian influenza viruses H5N1, H9N2 or H7N7 have occurred worldwide since then. The viral subtype of the current epidemic in China and some other Asian countries remains H5N1, and has caused nearly 30 people dead. Obviously, this pandemic avian influenza in humans has become a new emerging infectious disease with great threat to public health. In this present review, the author summarizes the recent progress on genomic structure, pathogenicity, and specific detection of the emerging infectious agents.

Key words virus, avian influenza, genome, pathogenicity, specific detection