

虎血清 H5 亚型流感病毒抗体调查

高玉伟¹ 周明² 刘丹² 王伟² 王立刚² 杨松涛¹
朱晓文¹ 黄耕¹ 王铁成¹ 夏咸柱^{1*}

(1 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130062)

(2 黑龙江省东北虎林园, 哈尔滨 150027)

摘要: 为查明我国圈养虎群中 H5 亚型流感病毒的流行情况, 应用血凝抑制 (HI) 方法检测了 1998 ~ 2009 年间采集于哈尔滨、宜昌、桂林、唐山、上海和郑州等地的 309 份虎血清样品的 H5 亚型流感病毒抗体效价。结果发现 1998 年 4 月至 2002 年 4 月采集的 20 份血清样品全部为 H5 亚型流感病毒 HI 抗体阴性。在 2002 年 7 月至 2003 年 6 月采样于上海、唐山、哈尔滨的 34 只虎中, 有 31 只曾出现过高热、抽搐和肺炎症状, 其中 24 只虎的血清样品 H5 亚型流感病毒 HI 抗体呈阳性 (抗体效价 1:10 ~ 1:320), 2 只无临床症状虎也为抗体阳性。对 2004 年随机采集自哈尔滨的 220 份血清样品调查发现抗体阳性率可达 25.9%, 其中 28 只有临床高热与肺炎病史的虎中有 14 只抗体呈阳性 (抗体效价 1:10 ~ 1:80), 其余无病史的 192 只虎中有 43 只抗体阳性。2009 年 8 月采集的 35 份血清中仅有 3 份 H5 阳性, 抗体阳性率下降为 8.6%。上述结果表明 H5 亚型流感病毒能够感染虎并对圈养虎的健康构成威胁, 而且其公共卫生意义更值得关注。

关键词: 虎; H5 亚型流感病毒; 抗体调查

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2010) 04 - 0444 - 06

Serologic survey for antibodies to H5 subtype influenza A virus in tigers

GAO Yuwei¹, ZHOU Ming², LIU Dan², WANG Wei², WANG Ligang², YANG Songtao¹, ZHU Xiaowen¹, HUANG Geng¹, WANG Tiecheng¹, XIA Xianzhu^{1*}

(1 The 11th Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

(2 Heilongjiang Siberia Tiger Park, Harbin 150027, China)

Abstract: To explore the prevalence of the H5 subtype influenza A virus in captive tigers in China, the antibodies of 309 tigers' serum samples, which were collected from Harbin, Yichang, Guilin, Shanghai, Zhengzhou, and Tangshan between 1998 and 2009, were detected using the hemagglutination inhibition test (HI). All 20 samples collected from April of 1998 to April of 2002 were HI antibody negative. Among 24 of 31 samples collected from July of 2002 to June of 2003 whose clinical signs such as fever and pneumonia were obvious, HI antibody were positive. Surprisingly, the antibody titers of paired sera from two tigers without clinical signs also were HI antibody positive. Of 220 samples randomly collected in 2004 in Harbin, 14 of 28 samples collected from tigers with clinical signs were HI antibody positive. In addition, we found that 43 samples collected from tigers without clinical signs also were positive with 1:10 - 1:80 antibody titers. In 2009, only 3 out of 43 samples were HI antibody positive. These results indicate that H5 subtype influenza virus have already acquired the ability to infect tigers and pose a threat to captive tigers and public health.

Key words: H5 subtype influenza A virus; Serologic survey; Tiger

1997 年“香港禽流感”暴发以来, H5N1 禽流感病毒一直在东南亚传播和流行 (Chen, 2009), 并且逐渐引发了对哺乳动物的致病性 (Chen *et al.*, 2004)。2003 年末禽流感疫情在禽类

中的大面积爆发导致了哺乳动物感染病例的大量出现。到目前为止, 除人类感染病例外, 已发现了犬科动物、猫科动物和鼬科动物的自然感染病例 (Thiry *et al.*, 2007; Beeler 2009; Reperant *et al.*,

基金项目: 十一五重大传染病专项资助项目 (2009ZX10004 - 4001)

作者简介: 高玉伟 (1975 -), 男, 助理研究员, 主要从事流感病毒学研究。

收稿日期: 2010 - 04 - 02; 修回日期: 2010 - 07 - 23

* 通讯作者, Corresponding author, E - mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

2009)。泰国在 2004 年报道了 H5N1 亚型禽流感病毒对虎 (*Panthera tigris*) 的致死性感染 (Keawcharoen *et al.*, 2004), 接下来发现有近 146 只虎感染发病, 发病虎临床常表现出高热、抽搐与肺炎等症状 (Amonsin *et al.*, 2006)。在国内, 我们在 2002 年就曾发现流感病毒对虎的感染 (夏咸柱等, 2003), 此后国内又有病例报道 (Mushtaq *et al.*, 2008)。H5N1 亚型禽流感病毒对虎的感染表明, 该病毒已对其造成了很大的危害, 而且病毒更有可能通过在野生哺乳动物宿主体内的进一步适应而对人类健康构成更大的威胁。目前还不了解 H5 亚型流感在我国虎群中的发生和现状。为此, 我们对 1998 年以来收集于哈尔滨、宜昌、桂林、南京、唐山、上海和郑州等地圈养虎血清样品进行了 H5 亚型流感病毒抗体检测和分析, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

检测用毒株为 A/Tiger/Harbin/01/2002 (H5N1) HAB/01 的第四代 MDCK 细胞培养物, 病毒滴度为 $10^{6.1}$ TCID₅₀/mL, -70°C 保存备用。MDCK 细胞来源于中国兽药监察所。按常规传代培养。

1.2 血清样品

1998 年 4 月至 2009 年 8 月收集于桂林、上海、哈尔滨、宜昌、唐山和郑州等地动物园的虎血清样品共计 309 份。

所有血清均经 56°C 灭活 30 min, -70°C 冰箱保存。标准阳性血清为鸡 H5 亚型阳性血清, 购自哈尔滨兽医研究所。受体破坏酶 (RDE) 购自 Sigma-Aldrich。

1.3 红细胞

鸡红细胞采自健康 SPF 鸡, 经稀释液洗涤、离心 3 次, 取红细胞泥按体积比用 PBS 稀释, 配制成 0.5% 的红细胞悬液, 4°C 保存备用。

1.4 血凝抑制 (HI) 抗体检测

按 WHO 标准方法将血清样品用受体破坏酶 (RDE) 处理后 HI 检测 (WHO, 2009)。同时设阳性血清对照、PBS 对照和 4 单位病毒抗原对照。HI 检测阳性后再次进行 HI 试验, 同时用未处理的血清作为对照组。

2 结果

2.1 血清样品调查结果

血清样品采集于桂林、上海、哈尔滨、宜昌、

唐山和郑州等地动物园的圈养虎。309 份样品中有 250 份样品采集于健康虎, 59 份血清采集于临床曾表现出高热、抽搐和肺炎等临床症状的虎。1998 和 1999 年采集于桂林和上海的虎血清样品均来源于健康虎。2002 年 7 月采集于哈尔滨的 9 份样品来源于确诊为流感病毒感染的发病虎, 其中 1 份是发病虎初期样品, 另外 8 份是康复后虎的样品。2003 年 2 月于哈尔滨某动物园表现高热和呼吸困难的 6 只虎的血清样品, 在发病后第 6 d 采集; 2002 年 12 月在宜昌采集 8 只虎的血清样品, 该 8 只虎曾在 2002 年 9 月表现出高热和呼吸困难。来源于桂林的血清样品与宜昌样品相似, 为 2002 年 12 月初采集的 6 份康复虎血清。唐山某动物园的两只虎在 2002 年 6 月出现高热、抽搐和肺炎等症状, 2002 年 7 月采集 2 份虎血清; 郑州某动物园的虎于 2003 年 6 月出现发热与腹泻等症状, 采集虎血清 3 份; 2004 年为进一步了解哈尔滨某虎园的流感流行情况, 随机采集了 220 份康复虎与健康虎的血清样品 (有 28 只虎曾表现出高热与肺炎等临床症状), 这些样品中有 5 只虎曾在 2002 年 7 月发病并在康复后采集血清进行检测。2009 年 8 月我们再次采集到哈尔滨某虎园的 35 只虎的血清样品, 这些虎均未表现过高热和肺炎等临床症状。另外根据对各虎园的饲喂情况进行了调查, 发现各虎园常以鸡骨架、冻鲜鸡肉作为虎日常食物, 其中哈尔滨、郑州等地还有饲喂鸭肉的情况。

2.2 HI 抗体检测结果

应用 HI 方法对血清样品进行了检测, 结果见表 1。309 份虎血清样品中有 101 份血清样品 H5 亚型流感病毒抗体阳性, 效价为 $1:10 \sim 1:320$ 。检测结果表明 1998 年 4 月至 2002 年 4 月采集的 20 份血清样品全部为 H5 亚型流感病毒 HI 抗体阴性。此后采集的样品开始出现 H5 亚型流感病毒的抗体阳性, 其中采集于临床表现出高热和呼吸困难等病史虎的血清样品多为抗体阳性, 在 2002 年 7 月至 2003 年 6 月采样于上海、唐山、哈尔滨的 34 只虎中, 有 31 只曾出现过高热、抽搐和肺炎症状, 其中 24 只虎的血清样品 H5 亚型流感病毒 HI 抗体呈阳性 (抗体效价 $1:10 \sim 1:320$), 2 只无临床症状虎也为抗体阳性。对 2004 年随机采集自哈尔滨的 220 份血清样品调查发现抗体阳性率可达 25.9%, 其中 28 只有临床高热与肺炎病史的虎中有 14 只抗体呈阳性 (抗体效价 $1:10 \sim 1:80$), 其余无病史的 192 只虎中有 43 只抗体阳性, 说明 H5 亚型流感病

毒可能对虎造成无症状感染。2009 年 8 月采集的 35 份血清中仅有 3 份 H5 阳性，抗体阳性率下降为 8.6%。

表 1 1998 至 2009 年虎血清样品 H5 亚型流感病毒抗体检测结果

Table 1 HI antibody titers to H5 influenza virus in tigers between 1998 and 2009

采集时间 (年/月) Collected time (Year/Month)	地点 Location	样品 (份) Sample	抗体滴度 Antibody titers	阳性样品 (份) Positive sample	发病情况简介 Annotation
1998/04	桂林 Guilin	2	-	0	健康虎 Normal tigers
1999/05	上海 Shanghai	14	-	0	健康虎 Normal tigers
2002/04	上海 Shanghai	4	-	0	健康虎 Normal tigers
2002/07	唐山 Tangshan	2	1:80	1	曾有临床症状 Clinical signs observed
2002/07	哈尔滨 Harbin	9	1:10 - 1:160	8	曾有临床症状 Clinical signs observed
2002/11	宜昌 Yichang	8	1:10 - 1:320	8	曾有临床症状 Clinical signs observed
2002/12	桂林 Guilin	6	1:20 - 1:160	5	3 只虎曾有临床症状 Clinical signs observed from 3 of 6 tigers
2003/02	哈尔滨 Harbin	6	1:10	3	临床症状后 6 d Six day post of clinical signs observed
2003/06	郑州 Zhengzhou	3	1:10	1	曾有临床症状 Clinical signs observed
2004/02	哈尔滨 Harbin	220	1:10 - 1:80	57	28 只虎曾有临床症状 Clinical signs observed from 28 of 220 tigers
2009/08	哈尔滨 Harbin	35	1:10 - 1:40	3	健康虎 Normal tigers

2004 年 2 月采样的 220 只虎中，有 5 只曾在 2002 年 7 月采集过血清样品，对这 5 只虎的双份血清样品的抗体效价进行比较，结果表明经过 19 个月，5 只虎体内仍有抗体，但滴度有所降低，检测结果如表 2。

表 2 发病虎双份血清样品中 HI 抗体变化情况

Table 2 Antibody titers in paired sera of tiger

编号 Sample	抗体滴度 Antibody titer	
	2002 年 7 月采集 Collected in July 2002	2004 年 2 月采集 Collected in Feb. 2004
1	1:80	1:20
2	1:40	1:20
3	1:20	1:10
4	1:20	1:20
5	1:80	1:40

3 讨论

近年来，H5N1 亚型流感病毒感染野生和家养

哺乳动物的报道不断增多，包括猫科动物、犬科动物、鼬科动物和家猪等 (Keawcharoen *et al.*, 2004; Amonsin *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2006; Songserm *et al.*, 2006; Songsermn *et al.*, 2006; Klopfleisch *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009)。其中，猫科动物受到的危害最为严重，2003 年 11 月在泰国的 Suphanburi 动物园里有两只虎感染了 H5N1 型禽流感而发病死亡 (Keawcharoen *et al.*, 2004)。2004 年 10 月 11 日在泰国一个公园的圈养虎中暴发了 H5N1 型高致死性禽流感，其中 418 只虎中有 146 只高烧，并发展成严重肺炎。经初步调查证实：这次感染与给虎喂了鸡肉有关 (Amonsin *et al.*, 2006)。在此之前数十年间极少有流感病毒感染猫科动物的公开报道。在我国，2002 年夏咸柱等发现了 H5 亚型流感病毒对圈养虎的致病性感染，此后国内也出现了零星的报道，说明我国圈养大型猫科动物可能也受到了 H5 亚型高致病性流感病毒的

威胁 (夏威柱等, 2003; 高玉伟等, 2006; Mush-taq *et al.*, 2008)。本研究调查表明在桂林、宜昌、唐山和哈尔滨等地的圈养虎体内均存在有 H5 亚型流感病毒的 HI 抗体。2002 年至 2003 年表现过高热与呼吸道症状的圈养虎抗体阳性率高达 77.4% (24/31), 在 2004 年 2 月对哈尔滨某虎园的进一步调查发现, 表现有高热与呼吸道症状的圈养虎抗体阳性率仍达到 50% (14/28), 上述数据说明, 在 2002 年至 2004 年这一时间段内, H5 亚型流感病毒对虎的感染较为普遍, 严重威胁着虎群的健康。

回顾性调查表明, 在 1998 年至 2002 年初收集自上海和桂林的 20 份健康虎血清样品中未检测到阳性抗体, 在 2002 年 7 月后, 开始检测到阳性抗体。2004 年对哈尔滨某虎园的 220 份样品检测表明, 从未表现过临床症状的 192 只虎中有 43 只虎抗体阳性, 说明 H5 病毒也可能存在无症状感染。综合上述结果, 推测 H5 亚型流感病毒对虎的感染可能源于 2002 年, 此后在 2005 年上海再度发现了 H5N1 亚型流感病毒对虎的感染 (Mushtaq *et al.*, 2008)。对 2009 年 8 月采集血清样品的检测后发现, 35 份血清中仅有 3 份抗体阳性, 抗体阳性率下降为 8.6%, 说明随着我国禽流感控制措施的强化, 虎感染禽流感的比例也在下降。未表现过临床症状的虎体内检测到抗体的现象的形成可能有两个原因: 一是 H5N1 亚型流感病毒毒株对哺乳动物个体间的致病性存在差异, 另一个是由于我们检测的抗体是针对 HA 抗原, 不排除有 H5N2 等低致病性毒株感染的可能。关于该病的传染源, 推测可能与饲喂鸡有关。在背景调查中, 我们发现各动物园常给虎饲喂鸡骨架与冻鲜鸡肉。

抗体检测结果表明 H5 亚型流感病毒感染虎后可诱导良好的免疫反应, 部份虎体内抗体可达到 1:320, 而且对康复虎的双份血检测发现, 历经 19 个月 HI 抗体仍存在, 说明其抗体持续期较长, 因而以此病毒为抗原研制出相应的主动与被动免疫制剂可能用于保护虎免受 H5 亚型流感病毒的威胁。

由于虎是珍贵的濒危动物, 在血清样品收集上存在着一定的困难, 所以本次调查还不能全面反映虎流感在全国范围内的流行情况。有必要进一步调查研究, 查明其流行情况并研究相应的防治措施。Rimmelzwaan 等 (2006) 指出, “猫科动物不仅是禽流感的受害者, 而且它们很可能又是禽流感的传播者”。因此, 我国虎流感病毒出现的情况及潜在的公共卫生意义如何, 都有必要进一步研究。阐明

流感病毒跨种感染虎的机制, 评价病毒能否在哺乳动物间水平传播, 以及是否会进化为对哺乳动物更具感染和致病力的病毒。

参考文献:

- Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwattanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A, Songserm T, Poovorawan Y. 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology*, **344**: 480 - 491.
- Beeler E. 2009. Influenza in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **39**: 251 - 264.
- Chen H. 2009. H5N1 avian influenza in China. *Science in China Series C: Life Sciences*, **52**, 419 - 427.
- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster R G, Yu K. 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 10452 - 10457.
- Gao Y W, Xia X Z, Wang C Y, Wang T C, Hou X Q, Huang G, Zou X H, Ju H Y. 2006. The phylogenetic analysis of HA gene of tiger influenza A virus and its expression in Baculovirus. *Acta Theriologica Sinica*, **26** (2): 123 - 128. (in Chinese)
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier R. A, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodom S, Theamboonlers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakom P, Osterhaus Albert D M E, Poovorawan Y. 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*, **10**: 2189 - 2191.
- Klopfleisch R, Wolf P U, Wolf C, Harder T, Starick E, Niebuhr M, Mettenleiter T C, Teifke J P. 2007. Encephalitis in a stone marten (*Martes foina*) after natural infection with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *J Comp Pathol*, **137**: 155 - 159.
- Mushtaq M H, Juan H, Jiang P, Li Y, Li T, Du Y, Mukhtar M M. 2008. Complete genome analysis of a highly pathogenic H5N1 influenza A virus isolated from a tiger in China. *Arch Virol*, **153**: 1569 - 1574.
- Qi X, Li X, Rider P, Fan W, Gu H, Xu L, Yang Y, Lu S, Wang H, Liu F. 2009. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PLoS ONE*, **4**: e4682.
- Reperant A, Rimmelzwaan F, Kuiken T. 2009. Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci Tech*, **28**: 137 - 159.
- Rimmelzwaan G F, van Riel D, Baars M, Bestebroer T M, van Amerongen G, Fouchier R A, Osterhaus D, Kuiken T. 2006. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol*, **168**: 176 - 183.
- Robertson S I, Bell D J, Smith G J, Nicholls M, Chan H, Nguyen T, Tran Q, Streicher U, Poon L, Chen H. 2006. Avian influenza H5N1 in viverrids: implications for wildlife health and conserva-

- tion. *Proc Biol Sci*, **273**: 1729 – 1732.
- Shi W F, Gibbs M J, Zhang Y Z, Zhang Z, Zhao X M, Jin X, Zhu C D, Yang M F, Yang N N, Cui Y J, Ji L. 2008. Genetic analysis of four porcine avian influenza viruses isolated from Shandong, China. *Arch Virol*, **153**: 211 – 217.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. 2006. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis*, **12**: 1744 – 1747.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2006. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis*, **12**: 681 – 683.
- Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H, Horzinek C. 2007. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol*, **122**: 25 – 31.
- Xia X Z, Gao Y W, Hu R L, Wang L G, Liu D, Zou X H, Huang G, He W Q, Wang W, Su W L, Liu W L. 2003. The first finding of tiger Influenza by virus isolation and specific gene amplification. *Chinese Journal of Veterinary Science*, **23** (2): 107 – 110. (in Chinese)
- Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao P, Deng G, Yu K, Yang C, Bu Z. 2008. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol*, **82**: 220 – 228.
- 高玉伟, 夏咸柱, 侯小强, 鞠会艳, 王承宇, 王铁成, 黄耕, 邹嘯环. 2006. 虎源流感病毒 HA 基因的系统发生分析及其在杆状病毒系统中的表达. *兽类学报*, **26** (2): 123 – 128.
- 夏咸柱, 高玉伟, 扈荣良, 王立刚, 刘丹, 邹嘯环, 黄耕, 贺文琦, 王玮, 苏伟林, 刘文良. 2003. 通过病毒分离鉴定和基因检测首次发现虎流感. *中国兽医学报*, **23** (2): 107 – 110.