

流感病毒动物实验生物安全实践与探讨

刘晓宇, 鹿双双, 池宏伟, 郎绍辉, 卢选成

(中国疾病预防控制中心实验动物中心, 北京, 102206)

【摘要】 流感病毒动物感染实验具有一定生物危害风险, 对研究人员乃至公众的健康都会造成威胁。不同型和亚型的流感病毒的危险度又有所不同, 故本文梳理了国内外有关法规标准及文献资料并结合工作实践, 针对流感病毒动物感染实验生物安全分级及生物安全管理进行探讨。

【关键词】 流感病毒、动物实验、生物安全管理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0068-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 06. 014

Practice and exploration of biosafety management in animal experiments on influenza virus

LIU Xiao-yu, LU Shuang-shuang, CHI Hong-wei, LANG Shao-hui, LU Xuan-cheng
Laboratory Animal Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Animal experiment on influenza virus infection carries certain biohazard risk, with a threat to the health of researchers and public health. The risk levels differ by influenza virus types and subtypes. This article combs the domestic and national laws and rules, and explores the biosafety management of animal study on influenza virus.

【Key words】 Influenza virus, Animal experiments, Biosafety management

流感病毒因其变异快、传播速度快、人群普遍易感、控制难度大等原因易发生世界范围的大流行。20 世纪至今发生的人类流感大流行就有 1918 年 H1N1 西班牙流感^[1]、1957 年 H2N2 亚洲流感^[2]、1968 年 H3N2 香港流感^[3]以及 2009 年席卷全球的新型甲型 H1N1 流感^[4,5], 流感大流行严重威胁人类健康、造成了重大经济损失和社会恐慌。除此之外, 自 1997 年我国香港暴发人感染 H5N1 高致病性禽流感疫情后^[6], 禽流感病毒(AIV)跨种属传播也引起了高度重视, 人感染禽流感的病例数和地区不断增加。2013 年我国暴发 H7N9 疫情^[7,8]; 同年 5 月, 我国台湾报道首例人感染 H6N1 禽流感病

毒病例^[9]; 2013 年底我国又出现 H10N8 感染人案例^[10,11]; 2014 年我国四川和湖南首次发生 H5N6 感染人病例^[12-14]。

为应对可能发生的流感大流行、研究流感病毒致病机理、研发新型流感疫苗, 世界范围内很多实验室都在开展流感研究, 其中流感病毒动物感染实验是这些研究中不可或缺的组成部分。由于流感病毒动物感染实验有一定风险, 对研究人员乃至公众的健康都会造成威胁, 故各国对从事不同型别及亚型流感病毒动物感染所需生物安全实验室级别进行严格规定。本文梳理了国内外有关法规标准及文献资料, 就流感病毒动物感染实验生物安全分

【基金项目】 国家重点研发计划“生物安全关键技术研发”重点专项“国家生物安全监测网络系统集成技术研究”(2016YFC1200800)。

【作者简介】 刘晓宇(1979-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 病原生物学, 实验动物科学 E-mail: liuxy1004@163.com。

【通讯作者】 卢选成(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 生物安全, 实验动物科学, 博士, E-mail: luxc@chinacdc.cn。

级及生物安全管理进行探讨,供开展流感病毒感染性动物实验的同行参考。

1 流感病毒概述

流感病毒(influenza virus)根据病毒颗粒核蛋白(NP)和膜蛋白(MP)抗原特性及其基因特性的不同可分为甲、乙、丙三型。甲型流感病毒对人类危害最大,是引起世界流感大流行的主要型别^[15]。甲型流感病毒根据其表面血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)结构及其基因特性的不同又分成多种亚型,曾认为 HA 有 16 个亚型(H1~H16),NA 有 9 个亚型(N1~N9),近年在蝙蝠体内又发现了 H17N10 和 H18N11 流感样病毒^[16,17]。

禽流感病毒属甲型流感病毒,主要引起禽类从呼吸系统到严重全身败血症等多种症状的传染病。根据对禽的致病性,禽流感分为高致病性禽流感(HPAI)和低致病性禽流感(LPAI)^[18,19]。目前发现的高致病性禽流感均为 H5 和 H7 亚型^[19,20]。因 HA 受体不同,一般情况下禽流感病毒不能感染人,但由于病毒不断变异,某些亚型禽流感病毒可通过跨种间传播造成人的感染^[19]。目前,已感染造成人类感染的禽流感病毒亚型包括 H5N1、H5N2、H5N6、H7N1、H7N2、H7N3、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7 和 H10N8^[21-25]。

用于流感病毒动物感染实验的动物主要有小鼠、大鼠、地鼠、雪貂和猴等^[26-29]。雪貂在流感发病机制和临床表现方面与人类最为相似,且对流感病毒敏感,是研究流感病毒传播最好的动物模型。但因雪貂缺乏近交系和无特殊病原体个体及价格过高等因素,一定程度上限制了其应用。小鼠由于遗传学背景清晰、易于饲养,目前是最常用的流感动物模型。鉴于小鼠上呼吸道缺乏 α -2,6 唾液酸受体,小鼠接种的多数毒株需经过小鼠适应的流感病毒毒株。但高致病性(如 H5N1)和低致病性(如 H9N2 和 H7N9)禽流感病毒可不经小鼠适应而直接感染小鼠^[26, 30-32]。

2 流感病毒实验室生物安全风险评估依据

流感病毒不仅型别多、亚型多,不同病毒危险度也有所不同。除此之外,流感病毒基因还易发生变异,人群对新的毒株没有免疫能力。

世界卫生组织(WHO)在《实验室生物安全手

册(第3版)》中划分1级、2级、3级和4级(危险度由低至高)危险度的依据为:感染性微生物可能对个体和群体造成的危险^[33]。同时要求各国(地区)按照危险度等级,并考虑微生物的致病性、传播方式和宿主范围、当地具备的有效预防措施以及当地具备的有效治疗措施等四个因素制定各自的微生物分类目录。我国根据病原微生物的传染性、感染后对个体或群体的危害程度,将病原微生物分为一类、二类、三类和四类病原微生物(危险性由高至低),其中一类和二类病原微生物统称为高致病性病原微生物^[34]。各国在对不同型别/亚型的流感病毒进行危险度分级(分类)时,基本也遵照以上原则。美国和加拿大病原微生物危险度分级制度与WHO一致,分为1级、2级、3级和4级。

针对危险度1~4级微生物,WHO提出不同等级生物安全水平实验室所应具备的最低要求的指南和建议。我国《病原微生物实验室生物安全管理条例》^[34]则对一级、二级、三级和四级生物安全实验室能开展的活动进行了明确规定。

感染性动物实验由于存在较高的生物风险,包括涉及高浓度病原微生物、易产生气溶胶、存在动物抓咬风险及动物逃逸等危险因素,故开展感染性动物实验所需生物安全实验室(ABSL)级别通常与从事病毒培养所需实验室(BSL)级别一致。

3 流感病毒动物感染实验所需生物安全实验室级别比较

在我国,从事某种病原微生物实验活动所需生物安全实验室级别主要遵照2006年发布的《人间传染的病原微生物名录》(简称《名录》)^[35]。如拟开展实验活动的病原不在《名录》范围内(如新发传染病),则依据病原危险性,由国家或所在单位生物安全专家委员会召开风险评估会议,规定其危害程度分类并对实验活动所需生物安全实验室级别。

在美国,主要依据为由美国卫生和公共服务部出版的《微生物和生物医学实验室生物安全手册》(第5版)^[36]。

在加拿大,主要依据为加拿大公共卫生署发布的《病原体安全数据单》^[37]。

下表将列举中、美、加三国主要型别/亚型流感病毒动物感染实验所需生物安全实验室级别的情况(表1)。

表 1 三国主要亚型/亚型流感病毒动物感染实验所需生物安全实验室级别
Tab.1 Laboratory Safety and Containment Recommendations of three countries

	中国 China	美国① the United States	加拿大① Canada	备注 Remarks
H1N1②	ABSL-2	ABSL-2	ABSL-2	
H2N2	ABSL-3	ABSL-3	未提	1957 大流感
H5N1	ABSL-3	ABSL-3	ABSL-3	
H5N6	ABSL-3	ABSL-3	ABSL-3	
H7N9	ABSL-3	ABSL-3	ABSL-3	
乙型	ABSL-2	ABSL-2	ABSL-2	
丙型	ABSL-2	未提	ABSL-2	

注:①美国和加拿大关于生物安全实验室级别的规定未明确到每种亚型,仅为原则性规定。②2009 年新型 H1N1 流感刚出现时,国家卫计委将其定为二类病原;随后,新型 H1N1 流感转变为季节流感后,卫计委重新定位其为三类病原。

值得进一步强调的是,以上流感病毒危险性分类及实验活动所需实验室级别并不是永久性的。随着某种流感病毒在人群中免疫情况的变化、病毒进一步变异、或随着研究的深入、出现有效疫苗或治疗方法等,其危险性分类及相应的实验室级别要求都可能发生变化。

4 重组流感病毒实验活动风险评估原则

随着近年来科学界对流感病毒尤其是高致病性禽流感病毒如何传播、新型病毒亚型如何出现、致病性如何变化等问题的研究逐步升温,以及反向遗传学技术使得在实验室重组流感病毒成为可能,评估重组流感病毒危险性、规定从事实验活动相应的生物安全实验室级别显得尤为重要。

美国威斯康星-麦迪逊大学和荷兰伊拉斯谟医学中心的科研团队通过雪貂适应性传代、借助基因工程技术,验证了 H5N1 病毒 HA 上的几个氨基酸的变化就使病毒具有了在雪貂中传播的能力^[31, 38];我国有研究将 H5N1 型禽流感病毒与 2009 年引发全球流感大流行的 H1N1 型病毒进行混合,发现一些杂交病毒能够感染并可通过空气在雪貂中有效传播^[39]。雪貂受流感病毒影响的方式与人类相似,因此雪貂感染实验及雪貂传代适应的病毒,具有人际传播的风险^[38, 40, 41]。以上研究虽然对阐明流感病毒跨种间传播机制及致病力机理具有重要意义,但其存在的生物安全风险往往也是事前无法准确预见的。WHO 也意识到该问题的严重性,于 2012 年召开会议专题讨论重组流感病毒研究的问题^[40, 41]。目前各界对于重组流感病毒风险评估的原则基本上为:对重组病毒感染性和致病力未知时,应采取较高生物安全水平实验室 (BSL3 或 BSL4) 从事实验活动。

当然,重组技术也可以将高致病性病毒降为低

致病性病毒^[40, 41]。Samadhan 等将高致病性禽流感改造为低致病性禽流感,便于在 BSL-2 实验室开展原本需要在 BSL-3 实验室开展的病毒诊断及疫苗研究^[28]。

综上所述,鉴于流感病毒亚型多、甲型流感病毒亚型多,流感病毒自身易发生变异,且人为实验室重组流感病毒随时发生,开展流感病毒动物感染实验前必须进行生物安全风险评估。故建议,针对国家已有规定的亚型或亚型,研究人员必须严格按照国家要求在相应生物安全水平的设施中开展实验;针对新发的或尚无规定的,必须依据其致病性、传播途径、稳定性、易感性、对人体或群体危害程度、防治措施等生物安全关键指标,由生物安全委员会或相关机构或组织专家进行生物安全风险评估,确定其生物安全等级。对于研究尚未明确的流感病毒亚型,建议相关实验活动应从严管理,随后根据该病毒的最新研究进展,进行动态风险评估。

参考文献:

[1] Vasold M. Spanish influenza 1918/19 in Nurnberg: H1N1 and the consequences [J]. Pflege Z, 2008, 61 (12) : 674 - 676.

[2] 杜宁, 杨霄星, 杨磊, 等. 1957 年亚洲流感 (H2N2) 病原学概述 [J]. 病毒学报, 2009, 25 (Suppl) : 12 - 16.

[3] Laver WG, . M. Air GM, Dopheide TA, et al. Amino acid sequence changes in the haemagglutinin of A/Hong Kong (H3N2) influenza virus during the period 1968 - 77 [J]. Nature, 1980, 283 (5746) : 454 - 457.

[4] Leventhal A, Mor Z. Pandemic A/H1N1 2009 as an international health event with a global impact [J]. Harefuah, 2009, 148 (12) : 804 - 808, 857.

[5] New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009 [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84 (25) : 249 - 257.

[6] Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, et al. The RNA polymerase PB2 subunit of influenza A/HongKong/156/1997 (H5N1) restricts the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes

- [corrected][J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32634.
- [7] Chen E, Y Chen Y, Fu L, et al. Human infection with avian influenza A(H7N9) virus re-emerges in China in winter 2013 [J]. Euro Surveill, 2013, 18: Issue 43.
 - [8] Schenk, C, Plachouras D, Danielsson N, et al. Outbreak with a novel avian influenza A(H7N9) virus in China—scenarios and triggers for assessing risks and planning responses in the European Union, May 2013 [J]. Euro Surveill, 2013, 18: Issue 20.
 - [9] Yuan J, Zhang L, Kan X, et al. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A(H6N1) virus causing human infection in Taiwan [J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(9): 1367–1368.
 - [10] Zhang T, Bi Y, Tian H, et al. Human infection with influenza virus A (H10N8) from live poultry markets, China, 2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(12): 2076–2079.
 - [11] Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection; a descriptive study [J]. Lancet, 2014, 383(9918): 714–721.
 - [12] Zhang R, Chen T, Ou X, et al. Clinical, epidemiological and virological characteristics of the first detected human case of avian influenza A(H5N6) virus [J]. Infect Genet Evol, 2016, 40: 236–242.
 - [13] Pan M, Gao R, Lv Q, et al. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings [J]. J Infect, 2016, 72(1): 52–59.
 - [14] Bi, Y, Mei K, Shi W, et al. Two novel reassortants of avian influenza A (H5N6) virus in China [J]. J Gen Virol, 2015, 96 (Pt 5): 975–81.
 - [15] 程小雯, 郭元吉. 流行性感病毒及其实验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社. 1997: 1.
 - [16] 谭伟, 谢芝勋. 蝙蝠甲型流感病毒 H17N10 新亚型的研究进展 [J]. 病毒学报, 2015, 31(01): 80–84.
 - [17] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11 [J]. Trends Microbiol, 2014, 22 (4): 183–191.
 - [18] Suarez DL. Avian influenza: our current understanding [J]. Anim Health Res Rev, 2010, 11(1): 19–33.
 - [19] Alexander, DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza [J]. Vaccine, 2007, 25(30): 5637–5644.
 - [20] Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza [J]. Rev Sci Tech, 2000, 19(2): 463–482.
 - [21] Claas EC, de Jong JC, van Beek R, et al. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection [J]. Vaccine, 1998, 16(9–10): 977–978.
 - [22] Tanner WD, Toth DJ, Gundlapalli AV. The pandemic potential of avian influenza A (H7N9) virus: a review [J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(16): 3359–3374.
 - [23] Su S, Bi Y, Wong G, et al. Epidemiology, evolution, and recent outbreaks of avian influenza virus in China [J]. J Virol, 2015, 89(17): 8671–8676.
 - [24] Xiao C, Ma W, Sun N, et al. PB2–588 V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses [J]. Sci Rep, 2016, 6: 19474.
 - [25] Ostrowsky B, Huang A, Terry W, et al. Low pathogenic avian influenza A (H7N2) virus infection in immunocompromised adult, New York, USA, 2003 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (7): 1128–1131.
 - [26] 刘崇海, 蒋利萍, 魏钰书. 流感病毒感染动物模型的研究进展 [J]. 国际病毒学杂志, 2006, 13(01): 9–12.
 - [27] Pulit-Penalosa JA, Sun X, Creager HM, et al. Pathogenesis and transmission of novel highly pathogenic avian influenza H5N2 and H5N8 viruses in ferrets and mice [J]. J Virol, 2015, 89(20): 10286–10293.
 - [28] Belser JA, Szretter KJ, Katz JM, et al. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses [J]. Adv Virus Res, 2009, 73: 55–97.
 - [29] Itoh Y. Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model [J]. Pathol Int, 2016, 66(3): 132–141.
 - [30] 彭春香. 小鼠模型在不同亚型流感病毒致病性及跨种传播中的应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(12): 1736–1742.
 - [31] Bi, Y, Lu L, Li J, et al. Novel genetic reassortants in H9N2 influenza A viruses and their diverse pathogenicity to mice [J]. Virol J, 2011, 8: 505.
 - [32] Bi, Y, Xie Q, Zhang S, et al. Assessment of the internal genes of influenza A (H7N9) virus contributing to high pathogenicity in mice [J]. J Virol, 2015, 89(1): 2–13.
 - [33] 世界卫生组织, 实验室生物安全手册(第3版) [M]. 日内瓦: 世界卫生组织, 2004: 1.
 - [34] 中华人民共和国国务院令. 病原微生物实验室生物安全管理条例 [S]. 2004, 424: 2.
 - [35] 卫科教发. 中华人民共和国卫生部, 人间传染的病原微生物名录 [S]. 2006, 15, 2006: 1–32.
 - [36] 美国疾病控制中心, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition [M].
 - [37] 加拿大公共卫生署, 病原体安全数据单 (Pathogen Safety Data Sheets and Risk Assessment). <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/>. 2016/01
 - [38] Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets [J]. Nature, 2012, 486(7403): 420–428.
 - [39] Zhang Y, Zhang Q, Kong H, et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet [J]. Science, 2013, 340(6139): 1459–1463.
 - [40] 贾晓娟, 黄力勤, 刘文军. 实验室重构流感病毒的生物安全问题 [J]. 生物工程学报, 2013, (12): 1736–1742.
 - [41] 董时军, 刁天喜. 高致病性禽流感 H5N1 病毒基因改造引发争议案例剖析 [J]. 军事医学, 2013, 37(08): 635–638.