

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.02

3 株 H9 亚型禽流感毒株的分离鉴定和交叉攻毒保护试验比较

蔡青秀, 张园园, 魏 波, 蒋贻海, 凌红丽*

(青岛蔚蓝生物制品有限公司, 山东青岛 266114)

[收稿日期] 2017-03-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0006-08 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为了解山东部分地区 H9 亚型禽流感病毒变异情况, 将 2015 年采自潍坊、聊城、烟台的 H9N2 禽流感疑似病料, 进行 RT-PCR 扩增、测序、遗传进化分析, 并将 3 株分离株纯化后进行了血清学和交叉攻毒保护试验。结果显示: 3 株分离株之间的 HA 和 NA 基因同源性很高, 分别为 97%~97.6% 和 93.5%~94.4%, 而与早期分离株和疫苗株的同源性较低, 分别为 74.9%~90.3% 和 86.3%~92.3%; 遗传进化分析显示 3 株分离株与 GenBank 中近年的 H9N2 分离株亲缘关系近, 同属 Y280-like 分支, 而与早期分离株的亲缘关系较远。交叉攻毒保护实验结果证明, 不同地点分离的 H9N2 禽流感流行毒株间有较好的交叉保护力。本研究为指导禽流感疫情防控以及疫苗研制提供了依据。

[关键词] H9N2 亚型禽流感病毒; HA 基因; NA 基因; 遗传进化分析; 交叉攻毒保护

Isolation and Identification of Three H9 Subtype Avian Influenza Virus and Cross-immunity Protection Comparison

CAI Qing-xiu, ZHANG Yuan-yuan, WEI Bo, JIANG Yi-hai, LING Hong-li*

(Qingdao Vland Biological Products Co., Ltd., Shandong 266114, China)

Corresponding author: LING Hong-li, E-mail: linghl@vlandgroup.com

Abstract: To explore the genetic mutations of H9 subtype avian influenza virus in Shandong province, tissues suspected of being infected with AIV H9 subtype from Weifang, Liaocheng and Yantai were collected in 2015. They were detected by RT-PCR method. After sequencing, genetic evolution was analyzed and cross-immunity protection was carried out. The results show that the isolates have high homologies with H9N2 strains of recent years up to 97%~97.6% and 93.5%~94.4% respectively, while shared low homologies with H9N2 strains of early years and vaccine strains, 74.9%~90.3 and 86.3%~92.3% respectively. Genetic evolution analysis results show that the three strains belonged to genetic Y280-like sublineage. There was a good cross protection force among the three H9 subtype isolates from different places. This study has provided guidance for the avian influenza

基金项目: 国家国际科技合作专项(2014DFA31830)

作者简介: 蔡青秀, 硕士, 从事动物疫苗的研发。

通讯作者: 凌红丽。E-mail: linghl@vlandgroup.com

epidemic prevention and control, and also a basis for the research and development of vaccine.

Key words: H9N2 subtype avian influenza virus; HA gene; NA gene; genetic evolution analysis; cross challenged test

禽流感是由禽流感病毒引起的禽类的一种传染病,分为高致病性禽流感和低致病性禽流感,高致病性禽流感引起家禽高发病率和死亡率,而低致病性禽流感则导致家禽出现呼吸道症状、生长发育受阻及产蛋下降等,严重危害养禽业的健康发展^[1]。我国自 1992 年首次报道从鸡群中分离到 H9N2 亚型禽流感病毒以来,目前绝大部分省市都有 H9 亚型禽流感的流行,给我国养禽业造成了巨大的经济损失^[2-3]。

禽流感基因组为 8 节段的负链 RNA,很容易发生基因突变和重排现象^[4],尤其是在免疫压力等因素的作用下,国内外已有许多关于禽流感在家禽中不断发生变异的报道^[5-6]。H9 亚型禽流感灭活疫苗的广泛应用使得该病得到了有效控制,但是近几年来 H9 亚型禽流感在免疫鸡群中仍时有发生^[7],仍然是影响我国养禽业健康发展的重要疾病之一。因此,加强 H9N2 AIV 遗传演化的检测和分析十分必要。本研究通过对 2015 年在山东地区分离得到的 3 株 H9N2 禽流感毒株进行序列遗传变化的分析和交叉攻毒保护试验,以期了解山东部分地区近

年来 H9N2 亚型 AIV 的遗传变异情况,为 H9 亚型禽流感的防控策略及疫苗研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和鸡胚 病料分别采自 2015 年山东潍坊、聊城、烟台地区疑似禽流感病死鸡的肺、气管等组织。10 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通试验动物技术有限公司。

1.1.2 毒株和血清 NDV 阳性血清、EDSV 阳性血清及 SPF 鸡阴性血清均购自中国兽医药品监察所; H9 亚型、H7 亚型、H5 亚型 AIV 阳性血清购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.1.3 试剂和载体 Trizol reagent、DEPC 水购于 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Takara 公司;pET-32a 载体为本实验室保存;无水乙醇、异丙醇、氯仿等均为国产分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 上公布的禽流感 H9N2 的 HA 和 NA 基因序列,利用 Primer 5 软件分别设计了 2 对扩增引物,各引物的序列用途及扩增长度详见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物
Tab 1 Primers used for PCR

引物 Primer	序列 Sequence	片段 Fragment	长度/bp Length
HA-F	5'-CAAGATGGAAGTAGTATCACT-3'	HA	1683
HA-R	5'-TTGCCAATTATATACAAATGT-3'		
NA-F	5'-AGCAGAAGCAGGAGTGAAAATGAACTC-3'	NA	1401
NA-R	5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTTCTAAAAATGCG-3'		

1.2 方法

1.2.1 病料的处理 将山东不同区域采集的疑似禽流感病鸡的肺、气管等组织病料分别剪碎研磨后,按1:5比例加入灭菌生理盐水(内含1000 U/mL 双抗),制成匀浆。在-20℃反复冻融3次,8000 r/min

离心15 min,取上清,经 0.22 μm 滤膜无菌过滤。
1.2.2 鸡胚接种 将上述 3 份滤液分别经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚,0.2 mL/胚,37℃继续孵育。24 h 内死亡鸡胚弃去,观察至 96 h,无论死胚、活胚逐胚收获尿囊液,标记后冻存。

1.2.3 血清学鉴定

1.2.3.1 红细胞凝集试验(HA) 按现行《中国兽药典》附录进行,分别测定各鸡胚液对 1%鸡红细胞的凝集效价。

1.2.3.2 血凝抑制试验(HI) 将有血凝性的鸡胚液用灭菌生理盐水稀释成 4HA 单位的抗原液,分别与 H9 亚型 AIV 阳性血清、NDV 阳性血清、ESDV 阳性血清、H5、H7 亚型 AIV 阳性血清和 SPF 鸡阴性血清作 HI 试验。

1.2.4 分子生物学鉴定

1.2.4.1 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增 病毒 RNA

的提取参照 Trizol Reagent 说明书进行。所用试剂均为 RNase-free,器皿均用 DEPC 水处理并经过高压灭菌。RT-PCR 反应根据 Takara 公司 One-step RT-PCR 试剂盒说明书进行。

1.2.4.2 HA、NA 基因的 TA 克隆和序列分析 HA 基因、NA 基因全长 PCR 产物经核酸电泳鉴定大小正确后,利用凝胶回收试剂盒回收,回收产物分别连接 pET-32a 进行 TA 克隆,每个毒株的 HA 和 NA 基因分别选 3 株 PCR 鉴定阳性克隆株送南京金斯瑞公司测序,测序结果与 GenBank 中的参考序列(表 2)进行同源性和遗传进化分析。

表 2 参考序列

Tab 2 Reference strains

毒株名称 Strain	分离时间 Time	分离地点 Location	登录号 Accession No.
A/Duck/HongKong/Y439/97	1997	香港	KF188265
A/Duck/Hong Kong/Y280/97	2000	香港	AF156376
A/Chicken/Shanghai/F/98	2004	上海	AF156377
A/chicken/Shandong/6/96	2005	山东	DQ064376
A/chicken/Guangxi/G8/2009	2009	广西	GU471805
A/chicken/Hebei/B5/2010	2010	河北	KJ426405
A/chicken/Zhejiang/C3188/2010	2010	浙江	KM113177
A/chicken/Henan/HF/2012	2012	河南	KC879298
A/chicken/Shanghai/C1/2012	2012	上海	KC417046
A/chicken/Anhui/1224/2013	2013	安徽	KU762379
A/chicken/Guangdong/LG1/2013	2013	广东	KC951122
A/chicken/Shanghai/015/2014	2014	上海	KP404000
A/chicken/Jilin/SD001/2014	2014	吉林	KM054788
A/chicken/Guangdong/KPS01/2015	2015	广东	KT023063
A/chicken/Shandong/1167/2015	2015	山东	KT338300

1.2.5 毒种纯化与增殖 采用鸡胚终点稀释法并结合血清中和试验方法进行:将 WF 株、LC 株、YT 株抗原液做 1000 倍稀释后与等量的 ND 阳性血清、H5 亚型 AIV 阳性血清(体积比为 1 : 1 : 1),室温作用 1 小时,进一步做 10 倍递进稀释,取 10-2、10-3、10-4 三个稀释度(最终稀释度为 10-5、10-6、10-7)各接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚,每胚 0.1 mL,

置 37 ℃ 继续孵育。选接种后 72~120 h 死亡且病痕明显的鸡胚,逐枚收获鸡胚液并测定 HA 效价,选择最高稀释度的一枚感染胚液为传代接种物。按照上述方法将毒种纯化 3 代。将第三代感染胚液用灭菌生理盐水作 10-4 稀释,经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.1 mL,选接种后 72~120 h 死亡且病痕明显的鸡胚,收获鸡胚液混合,定量分装。

1.2.6 病毒含量测定 将鸡胚液用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释,取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 4 个稀释度,各尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚,0.1 mL/胚,置 37 ℃继续孵育。24 h 以前死去的鸡胚弃去不计,观察至 120 h,无论死胚、活胚逐胚收获鸡胚液,分别测定红细胞凝集价,凝集价不低于 1:16(微量法)者判为感染,按照 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。

1.2.7 单因子血清的制备 取 1 月龄 SPF 鸡 12 只,分 3 组,分别颈部皮下注射 WF、LC、YT 病毒株弗氏完全佐剂灭活疫苗 0.5 mL/只,免疫后 7 d、14 d 采血检测 HI 抗体,免疫后第 14 天分别免疫 WF、LC、YT 病毒株弗氏不完全佐剂灭活疫苗,免疫后 21 d、28 d 采血检测,直至血清 HI 效价达 9~10log₂,若免疫后 21 d 仍未达到,则加强免疫,达到要求后,采血分离血清。

1.2.8 交叉血凝抑制试验 在同一条件下,用 4 个血凝单位的病毒抗原分别交叉测定三种单因子血清对每种病毒的 HI 效价。HA 和 HI 试验参照现行《中国兽药典》方法进行。

1.2.9 交叉免疫攻毒保护试验

1.2.9.1 疫苗制备 将 WF 株、LC 株及 YT 株分别用灭菌生理盐水作 1000 倍稀释,分别经尿囊腔途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚,0.1 mL/胚,接种后继续在 37 ℃孵育至 120 h,每 8~12 h 照蛋一次,弃去接种后 24 h 内死亡的鸡胚,收获 24~120 h 的死胚及 120 h 的活胚尿囊液,测定病毒液的血凝效价及 EID₅₀。收获的病毒液中分别加入终浓度为 0.2% 的甲醛溶液,置 37 ℃恒温摇床内灭活 24 h。分别取 3 个毒种的灭活病毒抗原液,以吐温-80 及司本-80 为乳化剂,白油为佐剂,分别乳化制成 WF 株、LC 株及 YT 株共 3 个毒株的油包水型灭活疫苗,油水比为 2:1。

1.2.9.2 免疫 将 60 只 21 日龄的 SPF 鸡分成 4 个组,每组 15 只鸡,第 1、2、3 组为免疫组,分别经颈部皮下注射 WF 株、LC 株及 YT 株灭活疫苗,0.3 mL/只,第 4 组为对照,不免疫。

1.2.9.3 HI 效价测定 于免疫后 21 d,所有试验鸡

采血,对各试验组鸡分别用 WF 株、LC 株及 YT 株 3 种 HI 试验抗原进行 HI 效价测定。

1.2.9.4 交叉攻毒保护试验 采血后,各试验鸡分别用禽流感 H9 亚型流行毒株攻击,每组 15 只鸡,各取 5 只分别攻 WF 毒株、LC 毒株和 YT 毒株。攻毒剂量为 100 倍稀释毒 0.5 mL/只,翅静脉注射,攻毒后第 5 天采集所有试验鸡的泄殖腔及咽拭子进行病毒分离,观察不同毒株灭活疫苗对不同毒株攻击的交叉保护情况。

2 结果

2.1 病毒的分离培养 WF 株、LC 株及 YT 株病料分别接种 5 枚 SPF 鸡胚观察至 96 h 分别有 2 枚、3 枚和 2 枚死亡,逐胚收获鸡胚液,标记。将收获的鸡胚液进行 HA 试验,结果死亡胚都有血凝性,接种存活胚和对照组的 HA 效价 1:2。接种死亡胚的检测情况详见表 3。

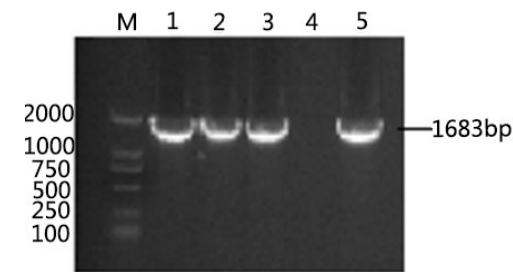
表 3 病毒分离结果

Tab 3 Results of virus isolation			
接种胚号 Embryos	死亡时间/h Death time/h	胚体病变 Diseased embryo	HA/log ₂
WF-1	72	有	6
WF-2	96	有	8
LC-1	72	有	8
LC-2	72	有	7
LC-3	96	有	6
YT-1	96	有	8
YT-2	80	有	8

2.2 HI 试验 将有血凝活性的分离物分别用灭菌生理盐水稀释成 4HA 单位的抗原液,血凝抑制试验结果表明,分离病毒只被禽流感病毒 H9 亚型阳性血清特异性抑制,血凝抑制效价为 2⁷~2⁸,不被禽流感病毒 H5、H7 亚型阳性血清、新城疫病毒阳性血清抑制,初步判定分离毒株是 H9 亚型禽流感病毒。

2.3 RT-PCR 检测和 TA 克隆 HA 基因、NA 基因 PCR 产物经核酸电泳鉴定大小正确后(图 1、图 2),利用凝胶回收试剂盒回收并分别连接 pET-32a 进行 TA 克隆,每个毒株的 HA、NA 基因分别选 3 株

PCR 鉴定阳性克隆株送南京金斯瑞公司测序,测序结果与 GenBank 中 H9N2 禽流感毒株的参考序列进行核苷酸序列同源性比较,并用 MEGA 4.0 软件绘制基因进化树。

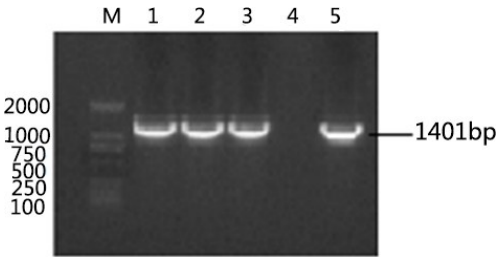


M. Marker DL2000; 1. WF 株 HA; 2. LC 株 HA;
3. YT 株 HA; 4. SPF 鸡胚液; 5. 阳性对照

M. Marker DL2000; 1. HA of WF strain; 2. HA of LC strain;
3. HA of YT strain; 4. Negative control; 5. Positive control

图 1 H9N2 AIV 分离株 HA 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig 1 HA genes amplified by RT-PCR of
H9N2 AIV isolate strains



M. Marker DL2000; 1. WF 株 NA; 2. LC 株 NA;
3. YT 株 NA; 4. SPF 鸡胚液; 5. 阳性对照

M. Marker DL2000; 1. NA of WF strain; 2. NA of LC strain;
3. NA of YT strain; 4. Negative control; 5. Positive control

图 2 H9N2 AIV 分离株 NA 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig 2 NA genes amplified by RT-PCR of
H9N2 AIV isolate strains

2.4 HA 基因序列分析 测序结果显示,WF 株、LC 株、YT 株的 HA 基因全长大小相同,都为 1683 bp,其与 GenBank 中 H9N2 参考序列进行比对发现,本研究中分离到的 WF 株、LC 株、YT 株之间核苷酸同源性为 97%~97.6%,推导的氨基酸同源性为 97.8%~98.2%;与 GenBank 中早期分离株

(HongKongY439、HongKong Y280)、经典疫苗株 (Shandong/6/96、Shanghai/F/98) 的同源性较低,为 74.9%~90.3%,推导的氨基酸序列为 80.0%~91.7%。与 GenBank 上发表的 2009~2015 年的 H9 亚型禽流感毒株的同源性较高,高达 92.1%~98.9%,推导的氨基酸序列同源性为 93.5%~98.6%。遗传进化分析结果与同源性分析结果一致,近年分离株和早期分离株明显分为不同簇,而本研究中的 3 个分离株与近年分离株的亲缘关系最近,属于 Y280-like 分支(图 3)。

2.5 NA 基因序列分析 测序结果显示,WF 株、LC 株、YT 株的 NA 基因全长大小相同,都为 1401 bp,其与 GenBank 中 H9N2 参考序列进行比对发现,本研究中 3 个分离株之间核苷酸同源性为 93.5%~94.4%,推导的氨基酸同源性为 94.6%~95.3%;与 GenBank 中早期分离株 (HongKongY439、HongKong Y280)、经典疫苗株 (Shandong/6/96、Shanghai/F/98) 的同源性较低,为 86.3%~92.3%,推导的氨基酸序列为 87.1%~93.7%。与 GenBank 上发表的 2009~2015 年的 H9 亚型禽流感毒株的同源性较高,高达 94.2%~99.2%,推导的氨基酸序列同源性为 95.3%~99.6%。遗传进化分析结果与同源性分析结果一致,近年分离株和早期分离株明显位于不同簇,而本研究中的 3 个分离株与近年分离株的亲缘关系最近,同属 Y280-like 分支(图 4)。

2.6 毒种纯化与增殖 采用鸡胚终点稀释法并结合血清中和试验方法将 WF 株、LC 株和 YT 株毒种连传三代进行了纯化,选择三代时最高稀释度的一枚感染胚液作为毒种进行病毒繁殖。

2.7 病毒含量 经测定,WF 株、LC 株、YT 株毒种病毒含量分别为 $10^{8.17}$ 、 $10^{7.83}$ 和 $10^{7.68}$ EID₅₀/0.1mL。

2.8 HI 抗体测定 不同地点分离的 3 株禽流感 H9 亚型流行毒株所制备出的 3 种灭活疫苗免疫 SPF 鸡 21 d 后,分别用同样 3 株抗原进行 HI 抗体效价检测,结果 WF 株、LC 株和 YT 株制备的疫苗 HI 效价分别为 8.8~10.0log₂、9.4~9.8log₂ 和 6.0~10.4log₂(表 4),可见同一灭活苗免疫组鸡的血清样

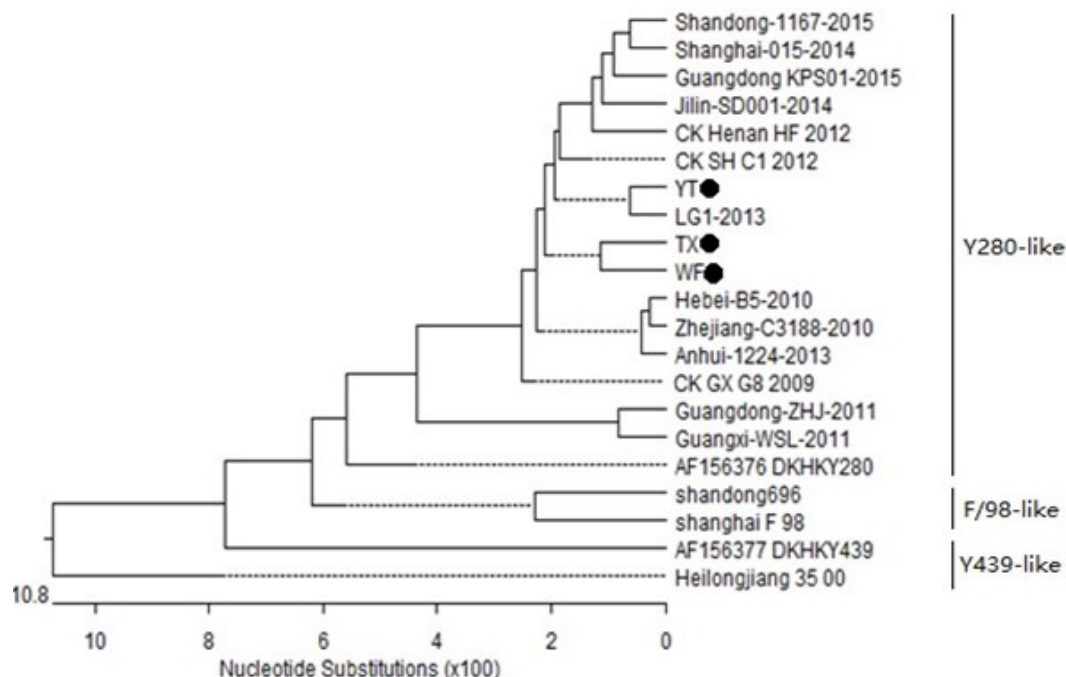


图 3 HA 基因全长遗传进化树分析

Fig 3 Phylogenetic tree based on complete HA genes

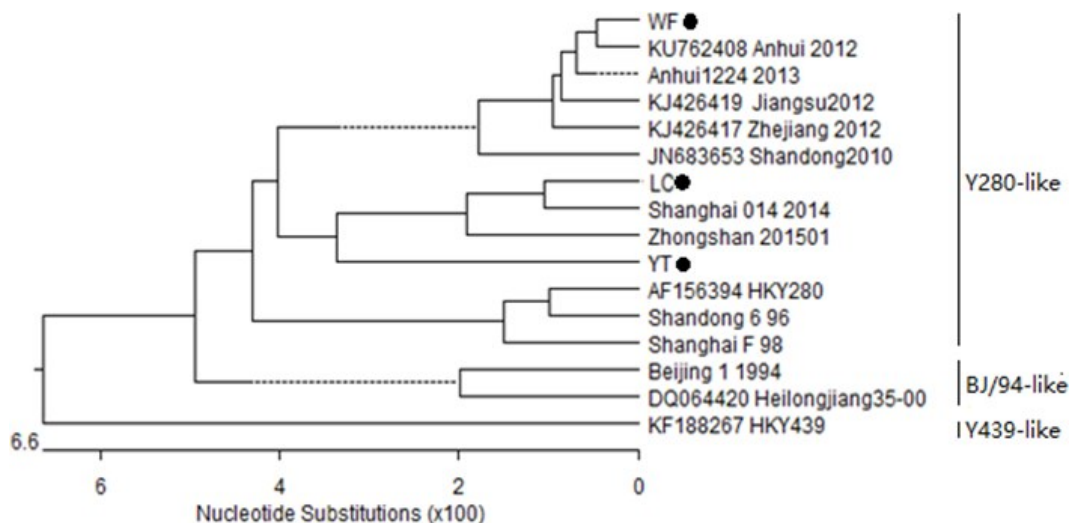


图 4 NA 基因全长遗传进化树分析

Fig 4 Phylogenetic tree based on complete NA genes

品采用不同毒株作为抗原进行测定,其 HI 抗体效价几何平均值存在较大差异,差异范围为 0.2 ~ 4.4log₂,用同源毒株作为抗原测定免疫组鸡的血清样品,可获得较高的 HI 抗体效价。

2.9 流行毒株间的交叉攻毒保护试验 结果显示

攻毒对照组均 5/5 分毒阳性,对照成立。不同区域分离的 WF 株和 YT 株制备的疫苗对 WF 株和 YT 株交叉攻毒均能达到 100% (5/5) 保护;但对 LC 株攻毒均为 80% (4/5) 保护;LC 株制备的疫苗用 3 种不同毒株攻毒均能达到 100% (5/5) 保护(表 5)。

表 4 3 个不同毒株灭活疫苗免疫后用不同抗原
进行 HI 试验的结果

Tab 4 HI test results based on three strains of three different inactivated vaccines				
灭活疫苗 Inactivated vaccine	试验鸡数 Chicken number	AI(H9)HI 测定结果/(GMT log ₂)		
		WF	LC	YT
WF 株	15	10.0	8.8	9.8
LC 株	15	9.8	9.4	9.6
YT 株	15	8.0	6.0	10.4
对照组	15	0	0	0

表 5 流行毒株间的交叉攻毒保护试验
Tab 5 Cross-immunity protection among epidemic isolates

疫苗 Inactivated vaccine	鸡只数 Chicken number	攻毒实验结果(阳性数/攻毒数) Results(P/N)		
		WF 株	LC 株	YT 株
WF 株	15	0/5	1/5	0/5
LC 株	15	0/5	0/5	0/5
YT 株	15	0/5	1/5	0/5
对照组	15	5/5	5/5	5/5

3 讨 论

H9N2亚型禽流感在国内的发生最早可追溯到1994年^[8],直到1998年下半年至1999年上半年,在山东省大面积爆发该病^[9]。目前该病在中国多省地区广泛存在,不仅是严重危害中国养禽业的主要疾病之一,而且还危害到人类的健康。1998年大面积推广应用针对疫情的H9N2亚型禽流感疫苗,对控制疫情的流行发挥了重要作用,BJ94-like类型的毒株在临床上的分毒率明显下降^[10]。但Y280-like亚群禽流感毒株逐渐增多,在国内养殖场广泛流行,免疫失败的比例逐年增加,在2010年达到高峰,系统进化树发现,该类型的毒株目前已经成为优势流行株^[11]。姜本红等^[12]在鸡胚上研究了H9N2亚型禽流感的HA基因在抗体选择压力下的变异,结果显示某些非优势毒株的HA基因在抗体免疫选择压力下发生了抗原性变化,抗原表位变异后能抵抗特异性抗体的中和作用进而由非优势毒

株演变为优势毒株。本研究中分离得到的三株禽流感毒株属于Y280-like这一簇,与目前H9N2 AIV经典疫苗株SH/F/98、SD/6/96的同源性低,亲缘关系较远,而与近年流行株的亲缘关系密切。因此,疫苗株与流行株之间的抗原差异可能是导致近年来H9亚型禽流感免疫保护效果不好的重要原因之一。

本研究中的WF株、LC株和YT分离株与不同地域分离株进行遗传进化分析显示,本研究中的3株山东分离株和国内不同地域分离的H9N2亚型禽流感毒株并没有表现出特殊的地域偏好性,与地理位置上相隔较远的广东、广西、上海、浙江等地的近年分离株的同源性亦较高。提示包括山东省在内的全国H9N2亚型禽流感的HA和NA基因可能处在一个比较稳定的遗传演化过程^[13],而病毒是通过候鸟或者运输发生传播是值得研究的一个问题,明确病毒的传播途径和方式对禽流感的防控具有重要意义。

本研究采用2015年在山东分离的3株H9亚型禽流感病毒流行毒株,分别制备灭活疫苗,免疫SPF鸡,免疫后21 d,采血测定HI效价,然后分别用上述3株毒株进行攻击,观察不同区域分离的H9亚型流行毒株的交叉免疫攻毒保护效果,结果显示,用不同地点分离的这3株H9N2 AIV流行毒株所制备出的3种灭活疫苗免疫SPF鸡21 d后,HI抗体效价均明显上升,达到6.0~10.4log₂;这3种灭活疫苗所诱导产生的HI抗体效价存在一定的差异,差异范围为0.2~4.4log₂,用同源毒株作为抗原测定免疫鸡的血清样品可获得较高的HI抗体效价。每个疫苗免疫组分别用WF株、LC株、YT株进行攻毒后,对照鸡均100%分毒阳性,3种灭活疫苗对这3株流行毒株攻毒的保护率80%~100%(4/5~5/5)。结果证明了本研究中这3个不同地点分离的H9N2 AIV流行毒株相互间有较好的交叉保护力,这也与序列分析结果显示3株流行毒株的亲缘关系较近相一致。

当前H9N2亚型禽流感病毒在中国很多地区流行,又因为禽流感病毒是分节段的单股负链RNA

病毒,同一毒株在复制的过程中以及不同毒株之间很可能发生基因突变和基因重组,所以加强对 H9N2 亚型禽流感病毒的生物学特性和分子流行病学研究,对于家禽养殖和公共卫生安全方面具有重要的现实意义。本研究通过对 3 株不同地点分离的 H9N2 AIV 毒株进行了 HA、NA 基因的遗传进化分析和生物学特性分析,为了解山东省 H9N2 AIV 的流行变异情况和疫苗研制提供了依据。

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M].10 版.高 福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版, 1999: 742-758.
Karnik B W. Diseases of poultry[M]. 10th Edition. Gao F, Su J L, Translate. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 742-758.
- [2] Li C, Yu K, Tian G, *et al.* Evolution of H9N2 Influenza viruses from domestic poultry in Mainland China[J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.
- [3] 孙泉云, 陈 琦, 夏炉明. H9N2 亚型禽流感流行现状[J]. 动物医学进展, 2011, 32(10): 107-111.
Sun Q Y, Chen Q, Xia L M. The epidemic situations of H9N2 subtype avian influenza [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(10): 107-111.
- [4] Zhao M J, Liu Q T, Sun Q, *et al.* Full genome sequence of a natural reassortant H9N2 avian influenza virus isolated from domestic ducks in Jiangsu Province, China[J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00463-13.
- [5] Meng F, Xu H Y, Zhang W, *et al.* Genetic evolution and substitution frequency of avian influenza virus HA gene in chicken H9N2 subtype in China in the last 20 years[J]. PubMed, 2016, 56(1): 35-43.
- [6] Duong M T, Thomas P P, Vu Thi N B, *et al.* Prevalence and diversity of H9N2 avian influenza in chickens of Northern Vietnam, 2014[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016, 44: 530-540.
- [7] Su X N, Xie Q M, Liao C T, *et al.* Sequence and phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9N2 influenza viruses isolated from chicken in China from 2013 to 2015[J]. Journal of Integra-

tive Agriculture, 2016, 15(11): 2604-2612.

- [8] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
Chen B L, Zhang Z J, Chen W B. Avian influenza research I. Separation of chicken type A avian influenza and serological preliminary identification [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1994, 20(10): 3-5.
- [9] Li C J, Yu K Z, Tian G B, *et al.* Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China[J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.
- [10] 王泽霖, 刘 岩, 李建丽, 等. H9N2 亚型禽流感病毒抗原性变异的研究[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(3): 351-354.
Wang Z L, Liu Y, Li J L, *et al.* Research on antigenic drift of H9N2 subtype avian influenza viruses [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 27(3): 351-354.
- [11] 刘红旗, 张评许, 刘秀梵, 等. 封闭式饲养鸡场 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因在 5 年内的遗传变异[J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 706-711.
Liu H Q, Zhang P H, Liu X F, *et al.* Genetic mutations of hemagglutinin genes of H9N2 subtype influenza A viruses in the field in a five-year period[J]. Acta microbiologica Sinica, 2003, 43(6): 706-711.
- [12] 娄本红, 朱秀同, 孙贝贝, 等. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的变异[J]. 微生物学报, 2009, 7: 955-957.
Lou B H, Zhu X T, Sun B B, *et al.* Mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under selective pressure of antibody [J]. Acta microbiologica Sinica, 2009, 7: 955-957.
- [13] 张 伟, 徐怀英, 孟 芳, 等. 1999~2013 年山东 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的演化和 HI 抗原性差异分析[J]. 中国科学, 2015, 45(2): 190-199.
Zhang W, Xu H Y, Meng F, *et al.* Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes and HI antigen variance analysis [J]. Science China, 2015, 45(2): 190-199.

(编 辑: 李文平)