

doi:

一株鸭源禽流感(H9N2)全基因序列分析 及其排毒规律的研究

杨玲玲^{1,4}, 牛凯¹, 王涛¹, 王晓艺², 常维山^{1*}, 刘玉庆^{3*}

(1. 山东农业大学动物科技学院 预防兽医细胞免疫实验室, 山东泰安 271018; 2. 烟台市牟平区姜格庄街道畜牧兽医工作站, 山东烟台 264114;
3. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100; 4. 山东省潍坊市潍城区畜牧兽医管理局, 山东潍坊 261000)

[收稿日期] 2017-03-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究一株鸭源 H9N2 亚型 AIV(JN1 株)全基因组的分子特征和遗传进化情况以及感染雏鸭后的排毒规律,对其生物学特性、全基因组序列以及遗传进化进行了分析,通过点眼滴鼻方式感染 3 周龄健康雏鸭,利用建立的实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测鸭的排毒规律,并测定血清抗体效价。该毒株的鸡胚半数感染量为 $10^{-7.54}/0.2$ mL,鸡胚最小致死量的平均死亡时间为 72 h,静脉致病指数为 0.266,抗原相关系数为 0.47。系统发育分析表明,JN1 株的 HA 与 CK/HK/G9/97 和 DK/HK/Y280/97 在同一分支上,NA、M、NP、PA、PB1、PB2 基因与 SH/F/98 同源性较高,NS 基因则与 H5N1 亚型 AIV 进化关系较近。HA 的裂解位点为 PSRSSR↓GL,存在 6 个潜在糖基化位点,在 234 位的氨基酸残基为 L,NA 基因颈部存在缺失。雏鸭在感染该病毒后,饮食正常,精神良好,3~17 d 均有排毒,咽拭子和泄殖腔棉拭子排毒规律基本一致,分别在第 3 天和第 13 天出现排毒高峰。该 H9N2 亚型 AIV 属欧亚大陆分支,为低致病性禽流感,病毒可通过呼吸道和泄殖腔向外界排毒,排毒时间较长。

[关键词] H9N2 亚型 AIV;序列分析;排毒

Sequence Analysis of a Strain H9N2 Subtype Avian Influenza Virus and the Dynamics of Viral Shedding of Ducks

YANG Ling-ling^{1,4}, NIU Kai¹, WANG Tao¹, WANG Xiao-yi², CHANG Wei-shan^{1*}, LIU Yu-qing^{3*}

(1. Laboratory of Preventive Veterinary Cellular Immunity, College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 2. Muping District of Yantai City Animal Husbandry and Veterinary Station Jiang Ge Zhuang Street, Yantai, Shandong 264114, China; 3. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 4. Animal husbandry and veterinary administration of WeiCheng, Weifang, Shandong 261000, China,)

Corresponding author: CHANG Wei-shan, E-mail: wchang@sdaa.edu.cn; LIU Yu-qing, E-mail: liuyuqing@163.com

基金项目: 山东省农业产业技术创新体系家禽团队岗位经费(SDAIT-11-09)

作者简介: 杨玲玲,硕士研究生,从事细胞免疫学研究;牛凯,硕士研究生,从事细胞免疫学研究,为共同第一作者。

通讯作者: 常维山, E-mail: wchang@sdaa.edu.cn; 刘玉庆, E-mail: liuyuqing@163.com

Abstract: To study the genetic characteristics and dynamics of viral shedding of a strain of duck-origin H9N2 subtype avian influenza separated from the laboratory, the biological characteristics, genome sequence and phylogenetically were analyzed. Three weeks old ducklings were infected by intranasal inoculation, SYBR Green I fluorescence quantitative RT-PCR analysis of viral shedding. The results showed that the EID_{50} was $10^{-7.54}/0.2$ mL, the MDT was 72 h, the IVPI was 0.266, and the HI correlation indices (R) exceeded 0.47. HA gene was located on the same branch with CK/HK/G9/97 and DK/HK/Y280/97. NA, M, NP, PA, PB1, PB2 genes had higher homology with SH/F/98, the cleavage site of HA gene was PSRSSR ↓ GL, 6 potential glycosylation were found on HA gene, the 234 site amino acid was L. The neuraminidase gene had deletions at 63, 64 and 65 amino acids. Viral RNA can be detected in cloacal and throat swabs from the third day to seventeenth day. The content of AIV in both cloacal and throat swabs is higher on the third and thirteenth day. The results showed that duck-origin H9N2 subtype avian influenza belongs to Eurasia branch, and can be shed into the environment through throat and cloaca for a long time.

Key words: H9N2 subtype avian influenza virus; sequence analysis; shedding

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科流感病毒属的 A 型流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种急性接触性传染病,呈世界性发生和流行。目前已知的禽流感有 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[1]。自 1994 年我国首次报道鸡群分离到 H9N2 亚型 AIV 以来^[2], H9N2 亚型低致病性 AIV 广泛存在于我国大部分地区^[3]。鸡、火鸡、鸭、鹅和鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等均可感染^[4]。家鸭被认为是 AIV 的巨大储存库,在 AIV 由野生水禽到陆生禽类的传播过程中充当中间媒介的作用。自 1999 年 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒引起鸭、鹅高发病率和高致死率,打破了对水禽仅为流感病毒的携带者而不发病死亡的传统认识^[5-6]。

实验研究了一株从发病鸭体内分离到的 H9N2 亚型 AIV,命名为 JN1 株。通过对该 H9N2 亚型 AIV 进行全基因序列测定及遗传进化分析,明确了其全基因特征和遗传进化关系,利用点眼滴鼻人工接种 3 周龄雏鸭,研究 H9N2 亚型 AIV 感染雏鸭后的排毒规律及雏鸭感染后的抗体水平,为预防和控制禽流感的发生提供参考。

1 材料

1.1 病毒及实验动物 毒株来自济宁送检样品,由实验室分离,命名为 JN1 株。SPF 种蛋购自山东省家禽研究所。试验用雏鸭购自山东省泰安市某

孵化场。H5、H9N2 亚型禽流感血凝抑制试验标准抗原与标准血清购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 主要仪器与试剂 7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公司);TRIzol UP、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;SanProp 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;PrimeScriptTM RT Reagent Kit、PMD18-T Vector、SYBR Premix EX TaqTM、PrimerScriptTM RT Reagent Kit、PMD18-T Vector Cloning Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计与合成 用于荧光定量 PCR 的 H9N2 亚型禽流感 HA 基因(KY212947) cDNA 的扩增引物为:HA-F: TCGGAACGGGACCTACAATA, HA-R: CACAAGAGATGAGGCCGACAG;内参基因 β -actin(M26111) cDNA 的扩增引物为: β -actin-F: ACTTCTGTTGCTGCCGTTCT, β -actin-R: AGC-CCCGTGATGGTTACTG。利用 Primer5.0 软件设计,引物自身不形成二级结构,引物间没有互补序列。用于扩增 H9N2 亚型 AIV 全基因的引物是根据 GenBank 上公布的禽源 H9N2 亚型 AIV 全基因序列并参照孟芳等^[7]发表的引物进行设计,所有引物由上海生工生物有限公司合成。

2 方 法

2.1 生物学特性测定 取新鲜病毒尿囊液,按照国际兽医局(OIE)方法进行鸡胚半数感染量(EID_{50})、鸡胚最小致死量的平均死亡时间(MDT)、静脉致病指数(IVPI)的测定。

2.2 抗原相关性分析 取 JN1 株尿囊液,按常规方法制备油乳剂灭活苗。颈部皮下接种 6 周龄 SPF 鸡,每次免疫 0.5 mL/只,首免后 2 周加强免疫,0.5 mL/只,二免后 21 d 采血,分离血清,进行血凝交叉抑制实验,计算其 HI 滴度($\log_2^n$)。HI 交叉相关指数的计算按免疫学常规进行, $R = \sqrt{(r_1 \times r_2)}$, r_1 = 甲病毒对乙血清的中和抑制滴度/甲病毒对甲血清的中和抑制滴度; r_2 = 乙病毒对甲血清的中和抑制滴度/乙病毒对乙血清的中和抑制滴度。

2.3 JN1 株全基因测序与序列分析 参照 TRIzol UP 说明书提取病毒 RNA,用流感病毒反转录通用引物 Uni12(5'-AGCAAAAGCAGG-3'),按照 Prime-Script™ RT Reagent Kit 说明书进行反转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、凝胶回收和纯化后连接至 PMT18-T 载体转入 DH5 α ,用 PCR 方法鉴定重组质粒,将阳性重组质粒送由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。应用 Lasergene 7.1 软件拼接测序的基因片段并推导氨基酸序列,构建 8 个基因的系统发育树,同时对其编码的氨基酸进行分析,最后将序列上传至 NCBI。实验用的参考株分别为 DK/HK/Y280/97(AF156376)、CK/SH/F/98(AF461532)、CK/BJ/1/94(KF188294)、Qa/HK/G/97(AF156378)、Ty/Wisconsin/1/66(AB295601)、DK/HK/Y439/97(KF188265)。

2.4 JN1 株排毒规律的研究

2.4.1 试验分组与攻毒 20 只 3 周龄健康雏鸭,通过点眼滴鼻途径每只接种 1 mL 病毒尿囊液($10^{7.84} EID_{50}$ /只)。于感染后 0、2、3、5、7、9、11、13、15、17 d 采集泄殖腔以及咽拭子,用于排毒规律的测定;于感染后第 7、11、14、17、20 天经颈静脉随机采集 5 只雏鸭的血液分离血清,参照 OIE(2008)标准进行 HA/HI-test 测定抗体滴度。所有样品置

于-20℃冰箱保存。

2.4.2 样品棉拭子荧光定量 PCR 检测 参照 TRIzol UP 说明书提取棉拭子中病毒 RNA,用分光光度计测定 RNA 纯度和浓度,合成 cDNA。按照建立的荧光定量 PCR 检测方法,对样品进行检测并对数据结果进行统计学分析。

3 结 果

3.1 生物学特性测定 JN1 株 EID_{50} 为 $10^{-7.54}$ /0.2 mL,MDT 为 72 h,IVPI 为 0.26,表明该毒株为低致病力毒株。

3.2 抗原相关性分析 $R = \sqrt{(8/9) \times (1/4)} = 0.47 < 0.5$ 。由此可知,JN1 株和 H9N2 标准株之间抗原性差异显著。

3.3 JN1 株全基因序列分析

3.3.1 全基因核酸序列比较 将 JN1 株 8 个基因序列提交到 GenBank,登录号为 KY212942 - KY212949。JN1 株的全基因序列与 GenBank 上公布的多个 H9N2 亚型 AIV 的全基因序列进行同源性比较,结果显示,JN1 株的各个基因与 GenBank 上下载的 H9N2 毒株的核苷酸的相似性范围:HA 80.3% ~ 98.0%、NA 83.3% ~ 99.6%、M 92.3% ~ 100%、NP 89.1% ~ 99.7%、NS 91.0% ~ 98.3%、PA 87.4% ~ 99.7%、PB1 89.8% ~ 99.8%、PB2 84.2% ~ 99.6%(表 1)。

3.3.2 HA 基因上关键氨基酸位点分析 JN1 株 HA 基因片段长 1690 bp,具有完整的开放阅读框,编码 560 个氨基酸。氨基酸序列分析表明:JN1 株的 HA 裂解位点处的氨基酸序列为 PSRSSR↓GL 仍符合低致病性 H9N2 亚型 AIV 的特点。HA 受体结合位点与 DK/HK/Y280 基本一致,仅在 198 位不同;受体结合位点左侧壁(232-237)为 NGLMGR,右侧壁为 GTSTA。第 234 位氨基酸残基为 Leu,具有同哺乳动物唾液酸 α -2,6 受体结合的特性。利用 NetNGlyc1.0 分析 HA 基因潜在的糖基化位点,发现 JN1 株中存在 6 个潜在糖基化位点,与 DK/HK/Y280 相比,缺少了 218~220 位 NRT 位点和 551~553 位 NGS 位点,增加了 313~315 位 NCS 位点(表 2)。

3.3.3 NA 上关键氨基酸位点分析 JN1 株 NA 基

因片段长度 1457 bp,编码 466 个氨基酸。氨基酸序列分析表明:JN1 株缺少 63~65 位 T、E、I 三个氨基酸残基,这一缺失导致 JN1 株减少了 61~63 位潜在的糖基化位点。红细胞吸附位点分析表明:NA 基因红细胞吸附位点 367~372 位点处为 KKDSRS,400~403 位点处为 SDNW,431~433 位点处为 PQE,与欧亚经典毒株基本一致,研究表明,此区域对 NA 的酶活性具有重要的作用^[8](表 3)。

表 1 JN1 株与流感病毒主要参考株的核苷酸相似性比较

Tab 1 Comparison of nucleotide similarity of JN1with influenza virus reference strains									
毒株 Strains	简称 Abbreviation	A/duck/ShanDong/JN1/2015(H9N2)							
		HA	NA	NS	NP	M	PA	PB1	PB2
A/Quail/Hong Kong/G1/97	Qa/HK/G1/97	86.6	93.0	91.0	93.0	92.3	92.3	92.5	86.4
A/Chicken/Beijing/1/94	CK/BJ/1/94	89.1	96.7	91.8	90.8	95.9	91.0	93.0	92.9
A/Duck/Hong Kong/Y439/97	DK/HK/Y439/97	82.2	89.7	94.6	94.8	92.6	92.0	91.5	93.9
A/Duck/HongKong/Y280/97	DK/HK/Y280/97	90.0	97.1	91.0	89.7	98.0	89.6	91.2	91.7
A/Chicken/Shanghai/F/98	CK/SH/F/98	88.3	99.6	91.7	99.7	100	99.7	99.8	99.6
A/Turkey/Wisconsin/1/1966	Ty/Wisconsin/1/66	80.2	88.8	93.6	89.1	98.0	87.4	89.8	84.2

表 2 HA 蛋白关键位点的氨基酸序列比较

Tab 2 Comparison of the key amino acid residues in the amino acid sequence of HA protein																	
毒株 strains	蛋白裂解位点 Cleavage sites	受体结合位点 Receptor binding sites								糖基化位点 Potential glycosylation sites							
		109	161	163	191	198	202	203	234	29	141	218	298	305	313	492	551
DK JN 1	PSRSSR↓GL	Y	W	T	N	K	L	Y	L	NST	NVS	-	NTT	NVS	NCS	NGT	-
CK BJ 94	PARSSR↓GL	Y	W	T	N	V	L	Y	Q	+	NVT	NRT	+	+	-	+	NGS
CK SH F 98	PARSSR↓GL	Y	W	T	N	A	L	Y	Q	+	+	NRT	+	+	-	+	NGS
DK HK Y280 97	PARSSR↓GL	Y	W	T	N	T	L	Y	L	+	+	NRT	+	+	-	+	NGS
QA HK G1 97	PARSSR↓GL	Y	W	T	H	E	L	Y	L	+	NVT	NRT	NST	NIS	-	+	NGS
DK HK Y439 97	PAASNR↓GL	Y	W	T	H	E	L	Y	Q	+	NVT	NRT	+	+	-	+	NGS
TK Wisconsin 66	PAVSSR↓GL	Y	W	T	H	E	L	Y	Q	+	NVT	NRT	+	NIS	-	+	NGS

+:具有与 DK JN 1 株相同的糖基化位点;-:糖基化位点缺失
+:Contain the same potential glycosylation sites as DK JN1; -:Lost potential glycoslation sites

表 3 NA 蛋白糖基化位点及红细胞吸附位点氨基酸序列分析

Tab 3 Comparison of potential glycosylation sites and HB sites in the amino acid sequence of NA protein												
毒株 strains	糖基化位点 Potential glycosylation sites									红细胞吸附位点 HB site		
	61	69	86	146	200	234	264	306	402	367~372	400~403	431~433
DK JN 1	-	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	-	-	NWS	KKDSRS	SDNW	PQE
CK BJ 94	NIT	+	+	+	+	+	-	-	+	KKDSRS	SDNW	PQE
CK SH F 98	-	+	+	+	+	+	-	-	+	KKDSRS	SDNW	PQE
DK HK Y280 97	-	+	+	+	+	+	-	-	+	KEDSRS	SDNW	PQE
QA HK G1 97	NIT	NNT	+	+	+	+	-	-	-	KKDSRS	SDIR	PQE
DK HK Y439 97	NIT	NNT	+	+	+	+	-	+	+	SKDSRS	NNNW	PQE
TK Wisconsin 66	NIT	NNT	+	+	+	+	-	-	+	SKDSRS	SNNW	PQE

+:具有与 DK JN 1 株相同的糖基化位点;-:糖基化位点缺失
+:Contain the same potential glycosylation sites as DK JN1; -:Lost potential glycoslation sites

3.3.4 JN1 株 PB2、PB1 和 PA 基因的序列分析

PB2 基因 627 位氨基酸的变化对于病毒感染哺乳动物有着极大的影响,禽源 PB2 的第 627 位谷氨酸 (Glu,E)突变为赖氨酸 (Lys,K)时,病毒能在小鼠体内高效复制^[9]。JN1 株 PB2 基因片段长度为 2280 bp,编码 760 个氨基酸,627 位不存在突变。PB1 中的 L13P 和 S678N 的氨基酸差异是导致对小鼠致病力增强的关键,JN1 株的 13 位出现了 L/P 的变异,但 678 位仍为 S,表明 JN1 株对小鼠的致病力有增强的趋势。PA 基因中的 S224P 和 N383D 突变,能够增强 H5N1 亚型 AIV 对鸭的致病力^[10],而 JN1 株为 S224 和 383D。

3.3.5 JN1 株 M、NP、和 NS 基因的序列分析

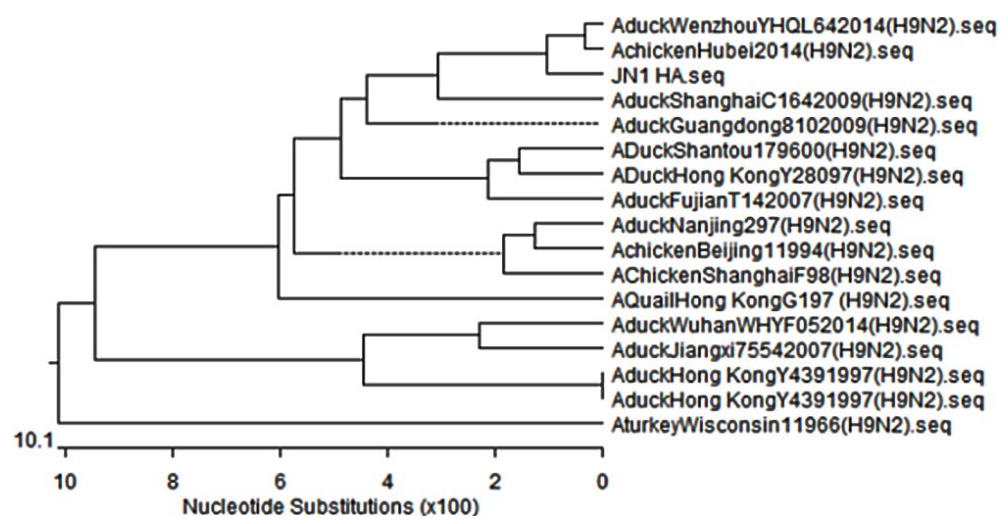
JN1 株 M 基因片段长度 1027 bp,编码有完整的 M1 和 M2 蛋白。氨基酸序列分析发现 JN1 株 M2 蛋白在 31 位 S 上发生了 N 的取代。NP 基因蛋白的 A184K 变异可能在影响禽流感病毒的繁殖与致病力方面具有关键的作用^[11],而 N319K 的变异可能是对小鼠致病力增强的关键^[12],JN1 株 184 位为 K,319 位则为 N。JN1 株的 NS1 的第 92 位氨基酸为 D,具有目前国内鸡源 H9N2 毒株的典型特征。149 位为 A,而非 V,具有与高致病性 AIV 相关的 NS 基因特征。

3.3.6 JN1 株各基因的系统发生树分析

为了进一步探究 JN1 株 AIV 各基因的遗传进化关系,应用 MegAlign 软件,绘制了 JN1 株 8 个基因片段的系统发育基因进化树。JN1 株 HA 属于以 CK/HK/G9/97 和 DK/HK/Y280/9 毒株为代表的 I 群(G9 群)。参考 C. Li 等^[13]对中国分离的 H9 亚型 AIV 的系统发生分析结果,NA、M、NP、PA、PB1、PB2 基因位于系统发育树的 SH/F/98-like 分支。NS 基因经 Blast 对比,发现其与 H5N1 亚型 AIV 进化关系较近,说明本分离 JN1 株 NS 基因可能由 H5N1 传播而来(图 1-图 4)。

3.4 雏鸭感染 JN1 株 AIV 病毒后的排毒规律

在实验过程中,攻毒雏鸭未出现死亡情况,无明显临床症状。利用实验室建立的荧光定量检测方法对攻毒样品进行检测。雏鸭泄殖腔棉拭子与咽拭子荧光定量 PCR 检测结果见图 5,从图可以看出,雏鸭感染 AIV 病毒后,泄殖腔棉拭子和咽拭子的排毒规律基本一致。在攻毒后第 2 天即可检测到排毒,在检测过程中,出现了两个排毒高峰,无论是泄殖腔棉拭子还是咽拭子,均在第 3 天达到排毒高峰,在第 11 天排毒量降到最低,第 13 天突然升高,后降低。在排毒过程中,咽拭子排毒量要高于泄殖腔棉拭子,但差异不显著(P>0.05)。



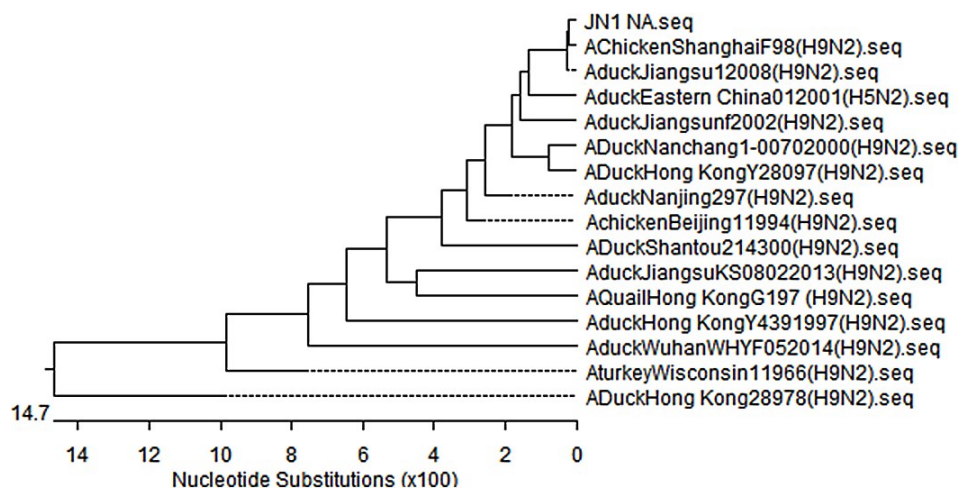


图 1 JN1 株和其他 AIV 毒株 HA、NA 的系统发生树

Fig 1 Phylogenetic trees of the individual genes HA and NA of JN1 strain and other AIV

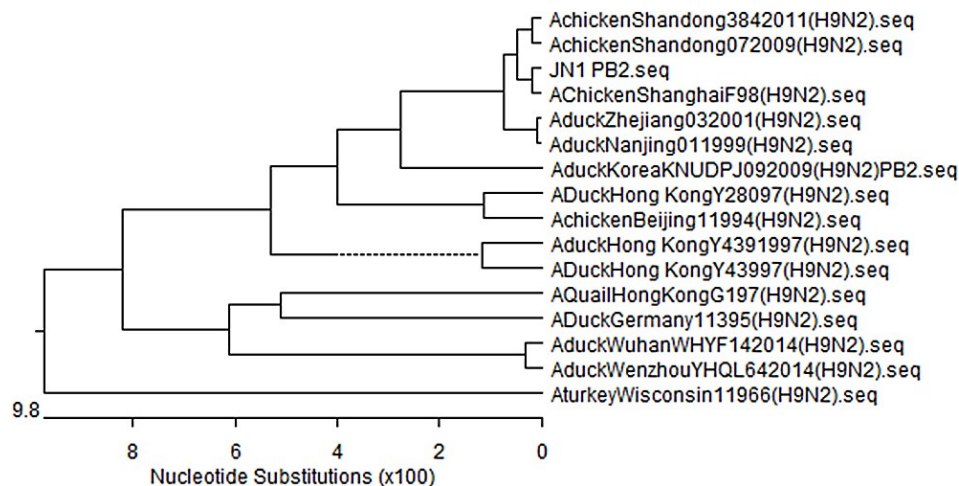


图 2 JN1 株和其他 AIV 毒株 PB2、PB1 的系统发生树

Fig 2 Phylogenetic trees of the individual genes PB2 and PB1 of JN1 strain and other AIV

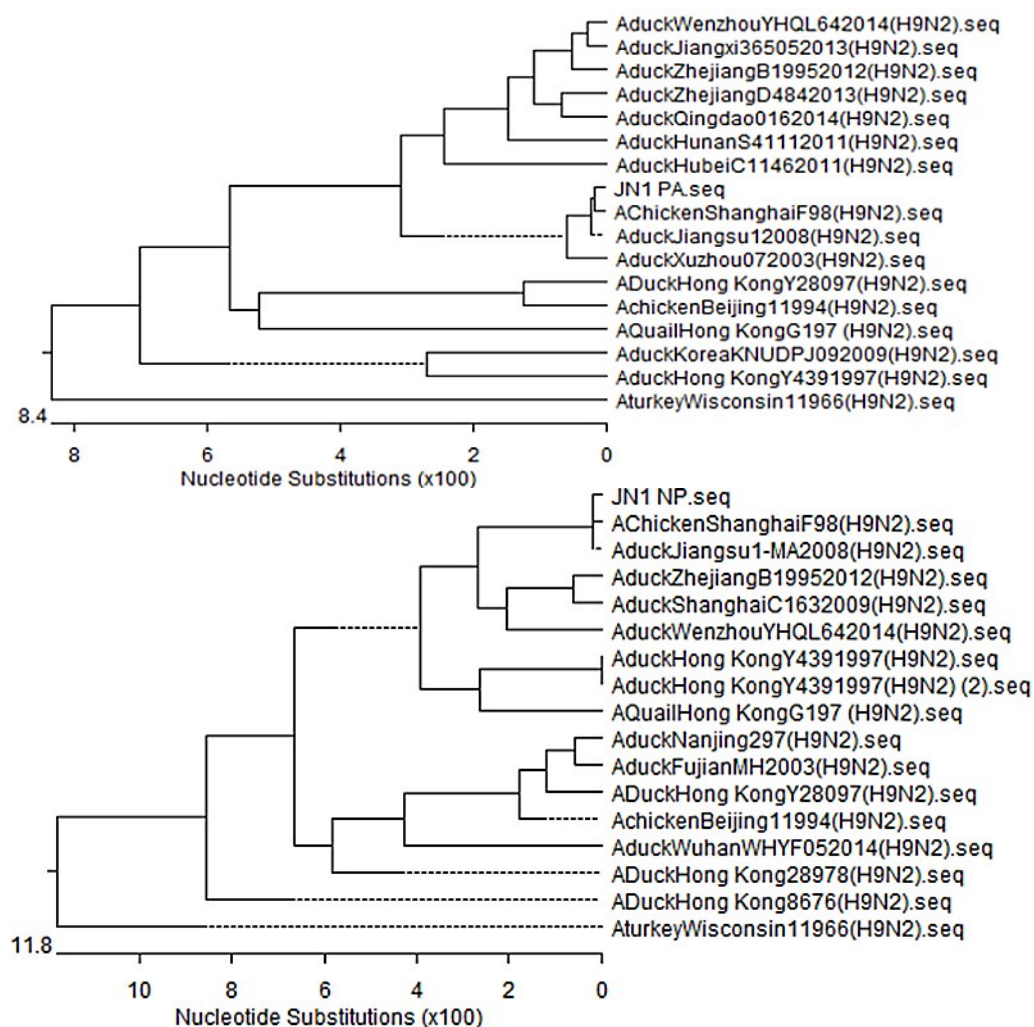
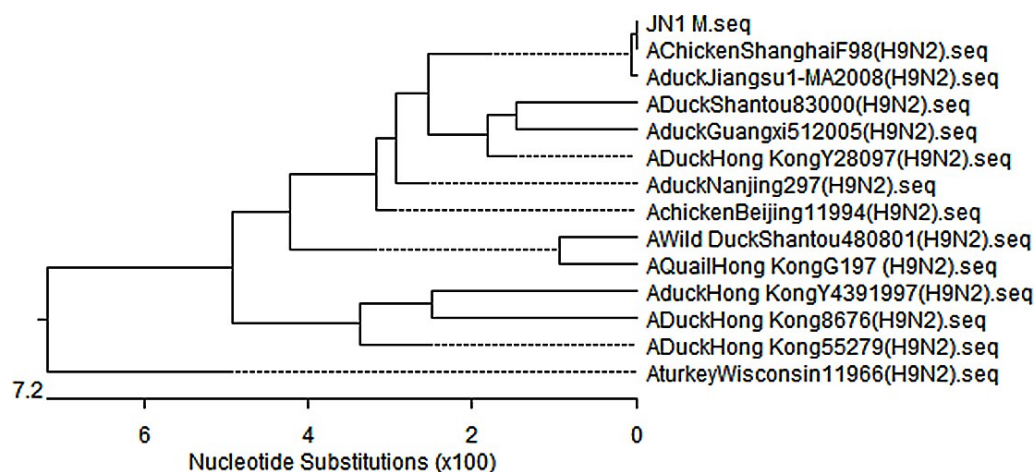


图 3 JN1 株和其他 AIV 毒株 PA、NP 的系统发生树

Fig 3 Phylogenic trees of the individual genes PA and NP of JN1 strain and other AIV



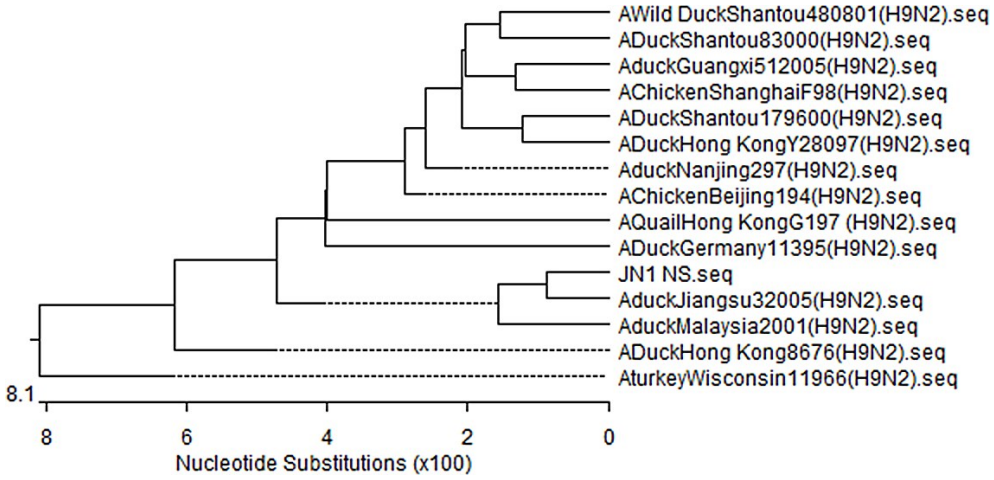
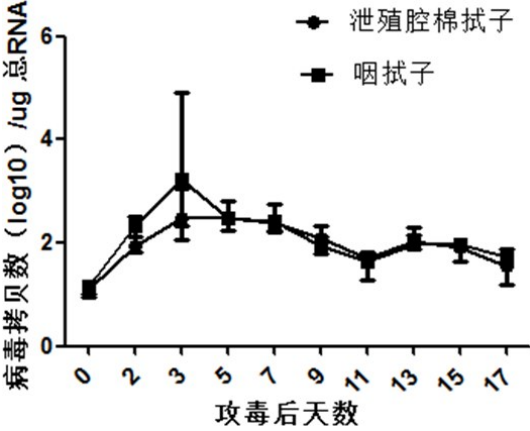


图 4 JN1 株和其他 AIV 毒株 M、NS 的系统发生树

Fig 4 Phylogenic trees of the individual genes M and NS of JN1 strain and other AIV



纵坐标为每微克总 RNA 中病毒拷贝数，
其中病毒拷贝数以 log10 为单位进行表示

图 5 AIV 病毒在试验鸭泄殖腔棉拭子与咽拭子中的排毒规律

Fig 5 Results of AIV excretion in cloaca
and pharynx after inoculation

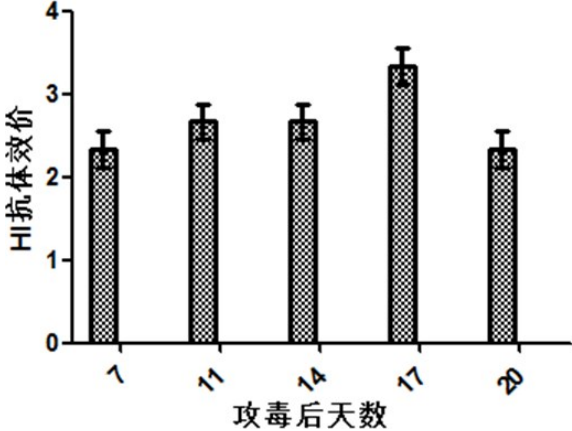


图 6 抗体检测结果

Fig 6 The result of antibody test

3.5 攻毒样品血清抗体水平检测 试验攻毒前对 3 周龄的雏鸭采血取血清进行 HI 试验结果为阴性。攻毒感染后 21 d 内观察雏鸭，攻毒组的雏鸭精神状态良好，食欲正常，无死亡情况和无明显的发病症状。攻毒后 7 d、11 d、14 d、17 d、20 d，采血取血清进行 HI 试验结果显示，雏鸭接种 JN1 株之后 7~17 d 抗体效价缓慢上升，但抗体效价一直维持在较低水平(图 6)。

4 讨论

研究发现，鸭源 H9N2 亚型 AIV 血凝素裂解位点氨基酸序列特征与分离地区密切相关，中国大陆地区欧亚种系的鸭源 H9N2 亚型 AIV 裂解位点为-RSSR↓GL-，其他国家和地区分离的鸭源 H9N2 亚型 AIV 不具备这一特征^[14]。从血凝素第 226 位受体结合位点看，中国鸭源 H9N2 亚型 AIV 有相当一部分为 L，具有同哺乳动物唾液酸 α-2,6 受体结合的特性^[15]。通过对 JN1 株 AIV HA 蛋白潜在的糖基化位点分析表明缺少了 218~220 位和 551~553 位的糖基化位点，而在 313~315 增加了一个潜在的糖

基化位点,新增糖基化位点的出现可能改变病毒的抗原性并影响受体结合特性而感染新的宿主^[13-14]。

Liu 等^[16]报道我国近年来 H9N2 亚型 AIV NA 基因颈部第 63、64、65 位点上有 3 个氨基酸(T、E、I)连续缺失,而与中国邻近的韩国、巴基斯坦鸡源 H9N2 亚型 AIV 分离株 NA 没有类似的氨基酸丢失^[17],该缺失被认为是我国 H9N2 亚型 AIV 的一个分子标签,有报道此缺失可增强致病性^[18]。本试验中 JN1 株,符合上述特征。

M 基因的编码区由两部分组成,分别编码 M1 蛋白和 M2 蛋白。M2 蛋白 27 位 V,30 位 A,尤其是 31 位 S 的变异在对离子通道阻断剂(金刚烷胺和金刚乙胺)产生抗性方面发挥着重要作用^[19]。JN1 株在 31 位 S 上发生了 N 的取代,这说明这些病毒对金刚烷胺产生了耐药性,应该引起高度重视。

JN1 株 NS1 基因第 92 位氨基酸为 D,Seo 等^[20]研究发现 NS1 蛋白的第 92 位氨基酸为 D 时,毒株通常具有低致病,但是氨基酸序列分析发现其 149 位氨基酸为 A,而不是 V,具有与高致病性 AIV 相关的 NS 基因特征。同时,在对 NS 基因序列进行核酸进化分析时发现,NS 基因与 H5N1 亚型 AIV 基因同源率高达 99%,而和 H9N2 亚型 AIV 的同源率最高仅在 94.6%,这说明 JN1 株 NS 基因很可能是从 H5N1 亚型 AIV 传播而来。

H9 亚型 AIV 在鸭中很少引起发病,但研究结果表明,水禽尤其是鸭,是流感病毒的贮存库,对 AIV 的发生及传播起到了非常重要的作用。本试验利用分离到的鸭源 H9N2 亚型 AIV(JN1 株)人工感染 3 周龄雏鸭,研究结果表明,H9N2 亚型 AIV 在感染后第 2~21 天均有排毒,在感染后第 3 天达到排毒高峰,之后在第 13 天出现第 2 个排毒高峰,咽拭子和泄殖腔棉拭子规律一致。王蛟等^[21]在对 H9N2 亚型 AIV 对樱桃谷鸭致病性的研究中,得出经滴鼻攻毒的雏鸭在攻毒后第 4 天到达排毒高峰,在第 10 天检测不到病毒;魏宝芝等^[22]对 H9N2 亚型 AIV 进行气源性传播特点的研究中,第 4 天开始

排毒,第 6 天排毒量最高,到第 14 天检测不到病毒。本试验中在攻毒后第 11 天排毒量检测结果接近阴性,在第 13 天出现第 2 个排毒高峰,推测原因是在试验过程中存在再感染的存在。血清 HI 抗体效价结果显示,雏鸭感染后血清效价一直维持在较低的水平。Kida 等^[23]曾报道,在感染流感和免疫流感过程中,鸭产生的抗体效价低,维持时间短,并且可以在短时间内感染同一种亚型的流感病毒。

参考文献:

- [1] Alexander Dennis J. An overview of the epidemiology of avian influenza[J]. Vaccine, 2006, 25(30):1016-1051.
- [2] 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, 10: 3-5.
Chen B L, Zhang J Z, Chen W B, *et al.* Isolation and preliminary serological identification of avian influenza virus-type A from chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1994, 10: 3-5.
- [3] 刘东,刘红祥,王群义,等. 规模化肉鸡场 H9N2 亚型禽流感与传染性支气管炎流行病学调查[J]. 中国家禽, 2014, 6: 62-64.
Liu D, Liu H X, Wang Q Y, *et al.* The epidemiological investigation of H9N2 subtype avian influenza and infectious bronchitis in large-scale broiler farms[J]. China Poultry, 2014, 6: 62-64.
- [4] B.W.卡尔尼克. 禽病学(第十版)[M]. 高福,苏敬良,译. 北京:中国农业出版社,1999:742-758.
B.W. Carnik. Disease of poultry(tenth edition)[M]. Gao F, Su J L, translation. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 742-758.
- [5] Kim J K, Negovetich N J, Forrest H L, *et al.* Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2009, 3(4):121-128.
- [6] Fereidouni S R, Starick E, Beer M, *et al.* Highly pathogenic avian influenza virus infection of mallards with homo- and heterosubtypic immunity induced by low pathogenic avian influenza viruses[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6706.
- [7] 孟芳. H9N2 亚型禽流感 HA 基因演化及其内部基因在 H5N2 亚型流感病毒演化中的作用[D]. 山东农业大学, 2015.
Meng F. HA genetic variation analysis of H9N2 Avian Influenza Virus and its internal impact on H5N2 mutants generated[D]. Shandong Agricultural University, 2015.

- [8] Webster R G, Air G M, Metzger D W. Antigenic structure and variation in an influenza virus N9 neuraminidase[J]. J Virol, 1987, 61(9):2910-2916.
- [9] Shinya Kyoko, Hamm Stefan, Hatta Masato, *et al.* PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice[J]. Virology, 2004, 320(2):258-266.
- [10] Song J, Feng H, Xu J, *et al.* The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1avian influenza viruses in domestic ducks [J]. Journal of Virology, 2011, 85(5):2180-2188.
- [11] Wasilenko J L, Lee C W, Sarmiento L *et al.* NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens[J]. J Virol, 2008, 82(9):4544-4553.
- [12] Gabriel G, Dauber B, Wolff T, *et al.* The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(51):18590-18595.
- [13] 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.
- [14] 万春和, 傅光华, 程龙飞, 等. 鸭源 H9N2 AIV 血凝素基因序列比较[J]. 病毒学报, 2012, (2):158-164.
- Wan C H, Fu G H, Cheng L F, *et al.* Sequence comparison of the hemagglutinin gene of the duck-origin H9N2 subtype avian influenza viruses[J]. Chinese Journal of Virology, 2012, (2):158-164.
- [15] Ito T, Kawaoka Y, Shi W, *et al.* Host-range barrier of influenza A viruses[J]. Vet Microbiol, 2000, 74(1/2):71-75.
- [16] Liu Jin-Hua, Okazaki K, Shi Wei-Min, *et al.* Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002[J]. Virus Genes, 2003, 27(2):197-202.
- [17] Tosh C1, Nagarajan S, Behera P, *et al.* Genetic analysis of H9N2 avian influenza viruses isolated from India[J]. Arch Virol, 2008, 153(8):1433-1439.
- [18] Munier S, Larcher T, Cormier-Aline F, *et al.* A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens[J]. J Virol, 2010, 84(2):940-952.
- [19] Intharathep P, Laohpongspaisan C, Rungrotmongkol T, *et al.* How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel[J]. J Mol Graph Model, 2008, 27, (3):342-348.
- [20] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses [J]. Virus Res, 2004, 103(1/2):107-113.
- [21] 王 蛟, 刁有祥, 孙晓艳, 等. H9N2 亚型禽流感病毒对樱桃谷肉鸭的致病性[J]. 中国兽医学报, 2014, (11):1732-1737.
- Wang J, Diao Y X, Sun X Y, *et al.* Experimental infection with a duck-origin H9N2 avian influenza virus in cherry valley ducks [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, (11):1732-1737.
- [22] 魏宝之, 杨 燕, 胡家卿, 等. H9N2 亚型 AIV 全基因序列分析及重组病毒 R01/NASS 气源性传播的特点[J]. 畜牧兽医学报, 2013, (07):1099-1108.
- Wei B Z, Yang Y, Hu J Q, *et al.* Whole Genome Sequence Analysis of H9N2 AIV and the characteristic of airborne transmission of the recombinant virus R01/NASS[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2013, (7):1099-1108.
- [23] Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response[J]. Infect Immun, 1980, 30(2):547-553.

(编辑:李文平)