



2017年河北省蛋鸡养殖场 H9N2 亚型禽流感病毒的遗传演化和抗原性分析

张义冉^{1,2} 王贞¹ 孙怡朋¹ 刘长清² 刘金华^{*1}

1 中国农业大学动物医学院 北京 100094

2 北京市华都峪口禽业有限责任公司 北京 101206

摘要:【背景】H9N2 亚型禽流感病毒在鸡群中广泛流行,引起巨大损失。【目的】了解河北省蛋鸡养殖场 H9N2 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的基因序列和抗原性的变异情况,为该病原的科学防控提供理论依据。【方法】于 2017 年从河北省部分蛋鸡养殖场分离鉴定出 7 株 H9N2 亚型 AIV,对其 HA 基因进行序列测定,并进行遗传演化、关键氨基酸位点及抗原性分析。【结果】7 株分离毒株 HA 基因同源性在 95.5%–97.2%之间;与 2016 年前的流行毒株相比,分离病毒 HA 裂解位点均为典型低致病性 AIV 特征,在受体结合区域出现变异,潜在糖基化位点无明显差异;抗原分析结果显示分离毒株与早期分离株相比抗原性发生了变异,形成了新的抗原群;抗原性相关位点分析显示,分离毒株在 9 个位点发生了较为明显的突变,可能是导致抗原性变异的分子基础。【结论】河北省蛋鸡养殖场 H9N2 亚型 AIV 中的流行毒株在关键功能区发生基因突变,并且抗原性发生变异,提示应持续监测 H9N2 亚型 AIV 的遗传变异情况,并及时更换疫苗株。

关键词: 蛋鸡养殖场, H9N2 亚型 AIV, 分离鉴定, 遗传演化, 抗原性变异

Genetic evolution and antigenic characteristics of H9N2 avian influenza viruses in laying-hen farms in Hebei province in 2017

ZHANG Yi-Ran^{1,2} WANG Zhen¹ SUN Yi-Peng¹ LIU Chang-Qing² LIU Jin-Hua^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China

2 Beijing Huadu Yukou Poultry Limited Liability Company, Beijing 101206, China

Abstract: [Background] H9N2 avian influenza viruses are widespread in chickens and cause great losses. [Objective] Elucidate the sequence characteristics and the variation of antigenicity of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) in Hebei province to understand heterologous protection of AIV. [Methods] Seven strains of H9N2 subtype AIV were isolated and identified from farms in Hebei province in 2017. We sequenced the HA genome of 7 H9N2 isolated strains. Then, the phylogenetic trees, amino acid in key functional sites and antigenicity were analyzed. [Results] The homology of HA genes for 7 isolated strains

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0501404-2)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-62733837; E-mail: ljh@cau.edu.cn

Received: 04-03-2019; **Accepted:** 17-05-2019; **Published online:** 27-05-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0501404-2)

***通信作者:** Tel: 010-62733837; E-mail: ljh@cau.edu.cn

收稿日期: 2019-03-04; **接受日期:** 2019-05-17; **网络首发日期:** 2019-05-27

was between 95.5% and 97.2%. Comparing with the epidemic strains before 2016, the cleavage sites and the glycosylation sites were not significantly different from those of the previous strains, except the receptor binding sites of the HA proteins. The antigenicity of the isolated strains changed and a new antigen group formed. The analysis of the HA amino acid sites related to the antigenicity shows that there was a significant mutation in 9 antigenic sites of the newly isolated strains, which may be the molecular basis of antigenic variation. **[Conclusion]** The prevalent strains of H9N2 subtype AIV in laying-hen farms in Hebei province have mutated in key functional areas and presented antigenic variation, reminding us the importance of continuous surveillance of the genetic evolution and antigenic variation of H9N2 AIV. Changing the candidate strain of vaccine in time is important for the prevention and control of H9N2 AIV.

Keywords: Laying hens farms, H9N2 avian influenza virus, Isolation and identification, Genetic evolution, Antigenic variation

H9N2 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)在我国鸡群中广泛流行, 该病毒可引起鸡的上呼吸道感染症状, 当继发感染其他病原时可造成产蛋量明显下降和鸡只死亡, 给家禽养殖业造成巨大的经济损失^[1]。

近年来, H9N2 亚型 AIV 在我国家禽中的分离率逐年增高, 且致病性有明显增强趋势^[2]。对我国 H9N2 亚型 AIV 的基因遗传进化分析发现流行株在不断形成新的亚分支的同时, 某些基因片段的一些关键氨基酸位点表现出了明显变异, 其中 HA 基因的氨基酸位点变异不仅影响病毒在家禽中的致病性, 还可能促进病毒跨种间感染人等哺乳动物, 增加其威胁公共卫生安全的潜在风险, 例如, 在 HA 裂解位点 P5 位置(316 位点, H9 编码)由丙氨酸到丝氨酸突变使得裂解位点氨基酸从模式 -PARSSR- 向 -PSRSSR- 的变异会增加病毒的毒力^[3]; 越来越多的 H9N2 亚型 AIV 携带 HA-Q226L 突变^[4], 该突变导致病毒的受体结合特性由类禽转变为类人, 并且 HA-Q226L 还有利于 H9N2 流感病毒在雪貂间通过直接接触途径传播^[5]。

我国长期采用疫苗免疫的措施来防控鸡群中的 H9N2 亚型 AIV。起初 H9N2 灭活疫苗可以有效地控制该病毒的流行, 但是由于 AIV 的抗原性变异频率较高, 病毒不断发生抗原漂移改变自身抗原性, 以此来逃避宿主免疫系统的攻击和疫苗免疫产生的免疫压力, 导致疫苗免疫保护作用降低。

因此, 对 H9N2 亚型 AIV 抗原性变异进行及时

监测和系统分析, 有利于及时筛选并更换与流行毒株抗原性匹配的疫苗毒株, 同时密切监测疫苗免疫对病毒特性造成的影响, 这对于科学防控 AIV 具有非常重要的意义。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

口咽拭子样品采集自河北省石家庄、邢台、邯郸、唐山、保定和衡水等地蛋鸡养殖场患病鸡群, 患病鸡主要表现为呼吸道症状, 采食饮水下降, 剖检发现其腺胃乳头部分有出血点, 疑似感染 AIV。

1.2 病毒及血清

血凝抑制试验中所用的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒阳性血清、新城疫病毒阳性血清均由本实验室制备并保存。6 株用于抗原性分析的毒株分别为 Ck/SH/F/98、A/chicken/Shandong/ZB/2007 (Ck/SD/ZB/07)、A/chicken/Hebei/0617/2007 (Ck/HeB/0617/07)、A/chicken/Jiangsu/TS/2010 (Ck/JS/TS/10)、A/chicken/Tianjin/1/2015 (Ck/TJ/1/15)和 A/chicken/Hebei/20/2016 (Ck/HeB/20/16)及其对应血清均由本实验室制备并保存。

1.3 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 (RaPure Total RNA Mini Kit), Magen 公司; 反转录试剂盒, Thermo 公司; DNA Marker、6×DNA Loading Buffer, 北京全式金生物技术有限公司; GoldenView 核酸染料, 北京索莱宝公司; 6 周龄 SPF 鸡和 9-11 日龄 SPF 鸡胚,

北京梅里亚实验动物技术有限公司。低温台式离心机, Eppendorf 公司; PCR 自动循环仪, 北京北方华奥贸易有限责任公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 紫外凝胶成像仪, 上海天能有限公司。

1.4 引物设计与合成

AIV 反转录通用引物为 Unit 12: 5'-AGCAAAGCAGG-3'。

H9N2 亚型 AIV HA 和 NA 基因片段的引物序列分别为: HA HA-1F: 5'-AGCAAAGCAGGGGAATTT-3'; HA-878R: 5'-TATGACCTTTAAATCAGTCTTCAGGATT-3'; HA-737F: 5'-AGGGAAGAATTGATTATTATT-3'; HA-1743R: 5'-AGTAGAAAACAA GGGTGTTTTT-3'; NA-1F: 5'-AGCAAAGCAGGAGTAAAAT-3'; NA-920R: 5'-GTCTATTGGATCCC TTCCAATTGTCTCT-3'; NA-767F: 5'-GCTGACACTAGAATACTATTTATT-3'; NA-1466R: 5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTCT-3'。

所用引物均由北京擎科新业生物科技有限公司合成, 引物的贮存浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 工作浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。

1.5 病毒分离与鉴定

将采集的样品加入含双抗(青、链霉素浓度各 10 000 UL/mL) PBS 溶液振荡混匀后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存过夜, 8 000 r/min 离心 5 min 后取上清液经尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化箱培养, 弃掉 24 h 内死亡的鸡胚, 将 24 h 后死亡的鸡胚及 72 h^[6]未死亡的胚置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 无菌收取尿囊液, 进行红细胞凝集(Hemagglutination assay, HA)试验, 并进行 RT-PCR 鉴定。将阳性的尿囊液通过有限稀释法接种鸡胚进行纯化, 将纯化后的病毒进行分装, 冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.6 HA 基因的扩增及序列分析

对经过鉴定的分离毒株进行病毒 RNA 的提取和 HA 基因的扩增, 扩增产物送至北京擎科新业生物科技有限公司进行序列测定。利用 DNASTar 软件, 参考流感病毒数据库中 H9N2 亚型 AIV 各片段的序列, 将测序结果进行拼接、比对。利用 MegAlign

软件对所测毒株的 HA 基因序列进行核苷酸同源性分析。利用 MEGA 6.0 软件将测定的序列结果进行序列比对, 分析 AIV 的裂解位点、受体结合位点和糖基化位点等相关关键氨基酸位点。采用邻位相接(Neighbor-Joining)法对本研究中分离鉴定的代表毒株构建进化树, Bootstrap 选择 1 000 次重复进行系统进化树的构建, 对于 Bootstrap support $\geq 70\%$ 分支, 则可认为对应的基因片段来源相同, 可划分为一个分支。

1.7 免疫血清的制备

将纯化好的尿囊液按常规方法制备油乳剂灭活疫苗, 颈部皮下接种 6 周龄 SPF 鸡, 一免后 2 周加强免疫一次, 二免 2 周后收取血清。

1.8 交叉血凝抑制试验

将 Ck/SH/F/98、Ck/SD/ZB/07、Ck/HeB/0617/07、Ck/JS/TS/10、Ck/TJ/1/15、Ck/HeB/20/16、A/chicken/Hebei/0115/2017、A/chicken/Hebei/0918/2017 和 A/chicken/Hebei/1027/2017 的 10 倍稀释后的血清分别按相应倍数稀释至与自身抗原反应的血抑效价为 1 280, 并用分离毒株和抗原性分析毒株与以上抗血清进行血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI)试验^[7]来测定 2017 年间养殖场 H9N2 亚型 AIV 流行毒株的抗原性。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离鉴定及序列测定

将采集的样品处理后, 经过鸡胚分离, 收集尿囊液进行 HA 试验, HA 阳性的样品用流感病毒各亚型标准阳性血清和新城疫病毒阳性血清进行 HI 试验, 结果显示仅 H9N2 亚型 AIV 的标准阳性血清能特异性抑制病毒血凝, 由此判断所分离病毒可能为 H9N2 亚型 AIV。

病毒经有限稀释法接种鸡胚进行纯化后, 7 株病毒的血凝效价在 2^7-2^{11} 之间, 具体数值见表 1。将纯化样品提取病毒 RNA 后利用 HA 和 NA 基因片段引物进行扩增并送往测序公司测序, 测序结果确定分离病毒为 H9N2 亚型 AIV。

表 1 H9N2 亚型禽流感分离毒株 HA 测定结果

Table 1 The HA titer of H9N2 isolated strains

| 序号 Number | 毒株 Virus | 简称 Abbreviation | 血凝效价 HA titer |
|--------------|---------------------------|--------------------|------------------|
| 1 | A/chicken/Hebei/0115/2017 | Ck/HeB/0115/17 | 2 ¹¹ |
| 2 | A/chicken/Hebei/0318/2017 | Ck/HeB/0318/17 | 2 ⁸ |
| 3 | A/chicken/Hebei/0427/2017 | Ck/HeB/0427/17 | 2 ⁷ |
| 4 | A/chicken/Hebei/0511/2017 | Ck/HeB/0511/17 | 2 ¹⁰ |
| 5 | A/chicken/Hebei/0626/2017 | Ck/HeB/0626/17 | 2 ⁹ |
| 6 | A/chicken/Hebei/0918/2017 | Ck/HeB/0918/17 | 2 ¹⁰ |
| 7 | A/chicken/Hebei/1027/2017 | Ck/HeB/1027/17 | 2 ¹¹ |

2.2 病毒基因遗传演化分析

2.2.1 HA 基因同源性比较

将 7 株分离毒株与 GenBank 公共数据库中的毒株进行同源性分析, 结果发现分离毒株 HA 基因序列(1 654 bp)与中国 2016–2017 年鸡源 H9N2 毒株序列(如 A/chicken/Shandong/366SZ/2017、A/chicken/China/333/2017、A/chicken/Anhui/AB39/2017、A/chicken/Hebei/H2247/2017、A/chicken/Fujian/I33/2017、A/chicken/Changzhou/0304/2016 和 A/chicken/Jiangxing/X2294/2017)的同源性较高, 达 98.0%–99.8%。利用 MegAlign 软件对所测毒株的 HA 基因序列进行比对, 结果显示 7 株分离毒株之间序列同源性在 95.5%–97.2%。

2.2.2 HA 基因遗传进化分析

根据本实验室已发表的进化树分支划分方法^[8], 利用 MEGA 6.0 软件对分离毒株、GenBank 公共数据库中同源性最高的代表毒株以及文献中代表毒株的序列进行遗传进化分析, 绘制 HA 基因遗传进化树(图 1)。结果显示: 7 株分离毒株位于目前我国 H9N2 亚型 AIV 的流行分支, 且与 2017 年分离毒株形成了一个亚分支。

2.2.3 HA 蛋白裂解位点和受体结合位点分析

各分离毒株的 HA 蛋白裂解位点组成均为典型的低致病性 AIV 特征, 与近年来的流行毒株相比未发生变化。受体结合位点比对结果表明(表 2), 133、137 和 138 位氨基酸与 2007–2016 年流行毒株相比存在一定的差异, 表现为 S/D、K/T/N、A/T 的替换, 190-helix 区 189 和 190 位氨基酸与 2016 年前

的流行毒株相比也有一定的差异, 表现为 T/A/D、T/V 的替换, 提示分离毒株的受体结合位点发生了较为明显的变异, Q226L 的替换具备了结合人源唾液酸受体的能力^[3]。

2.2.4 HA 潜在糖基化位点分析

分离毒株 HA 潜在糖基化位点分析表明(表 3), 病毒 HA1 存在 6 个潜在糖基化位点, 分别是 11、64 (Ck/HeB/0511/17 除外)、123、280、287 和 295 位, HA2 在 146 和 205 位存在 2 个潜在糖基化位点, 与近年来流行毒株相比并未出现明显的差异。

2.3 病毒抗原性分析

根据上述分离毒株的遗传演化分析结果, 并结合毒株分离时间, 筛选 3 株分离毒株作为代表毒株制备血清, 分别为 Ck/HeB/0115/17、Ck/HeB/0918/17 和 Ck/HeB/1027/17。

选取 7 株分离毒株及 6 株 2016 年之前分离的毒株, 分别与 9 种毒株的抗血清进行交叉血凝抑制试验。HI 试验结果(表 4)显示分离毒株与其他早期毒株抗血清 HI 反应的效价相差 1–4 个滴度, 进一步抗原图谱分析(图 2)发现 2017 年间的流行毒株发生了抗原性变异。

2.4 HA 蛋白抗原性相关氨基酸位点分析

对 7 株分离毒株各抗原性相关位点进行统计发现, 与 6 株用于抗原性分析毒株相比, 在已有报道的抗原性相关位点中, 72、127、131 位等共 9 个位点发生了较为明显的突变(表 5), 可能是导致分离毒株发生抗原性突变的主要原因。

3 讨论与结论

AIV 属于 RNA 病毒, 变异速度非常快。不同亚型病毒在鸡群中持续传播流行, 不断发生抗原漂移改变自身抗原性, 以此来逃避宿主免疫系统的攻击和疫苗免疫产生的免疫压力, 导致疫苗免疫保护作用降低。近年来 H9N2 亚型 AIV 的感染宿主范围不断扩大, 目前已经有研究表明该亚型病毒可感染哺乳动物^[3], 对人类的健康造成极大威胁。

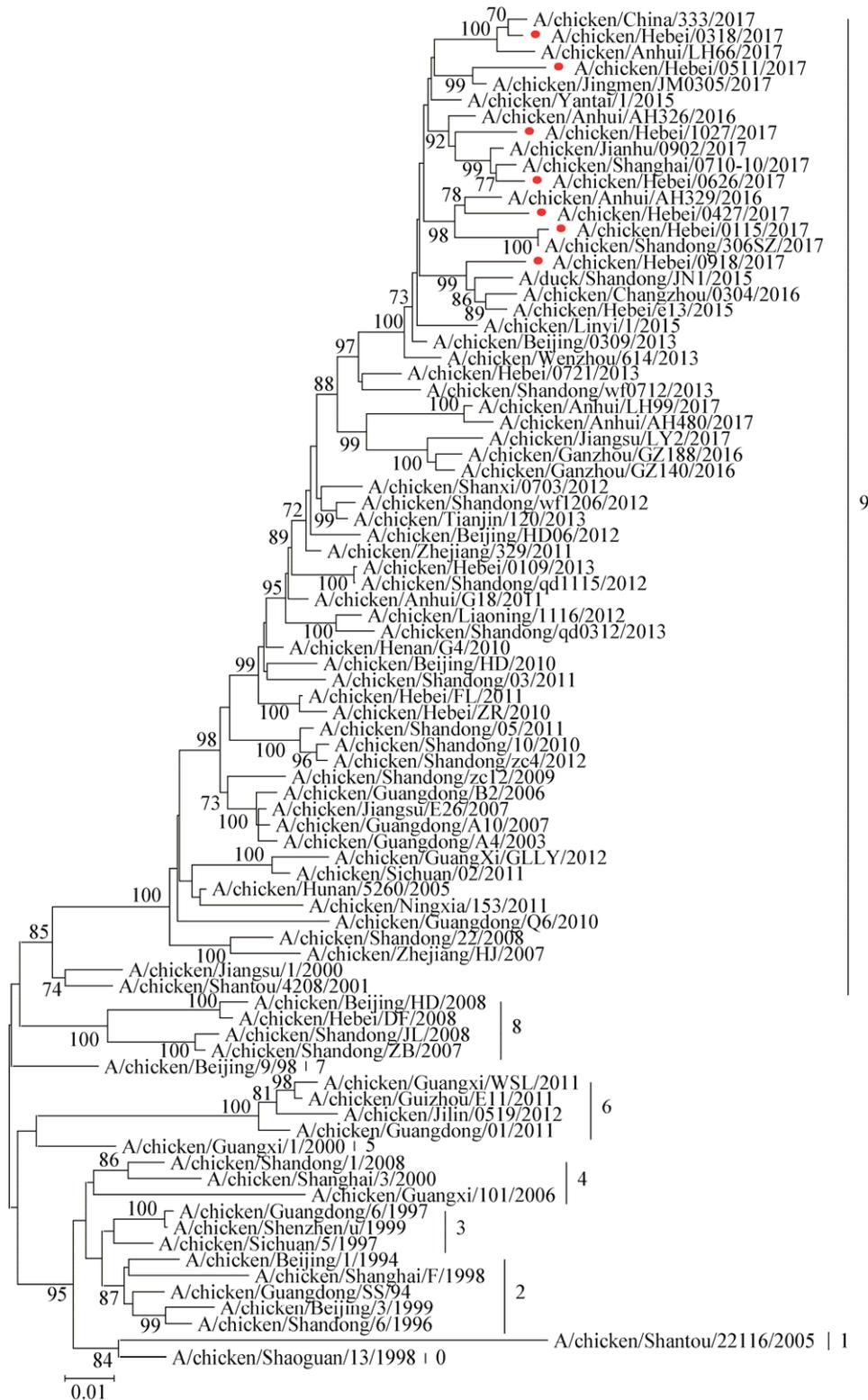


图 1 H9N2 亚型禽流感分离毒株 HA 基因进化树

Figure 1 The phylogenetic tree of HA genes of H9N2 isolated strains

注: 圆形: 分离毒株.

Note: Circular: Isolated strains.

表 2 H9N2 亚型禽流感分离毒株 HA 裂解位点和受体结合位点分析

Table 2 Analysis of cleavage sites and receptor binding sites in the HA proteins of H9N2 AIVs

| 毒株 Virus | 裂解位点 Cleavage sites | 受体结合位点 Receptor binding sites | | |
|----------------------------|------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|
| | | 130-Loop (132–138) | 190-Helix (188–190) | 220-Loop (221–228) |
| Ck/SD/ZB/07 ^a | PARSSR/GL | YSGTSKA | DTT | PLVNGQQG |
| Ck/HeB/YT/10 ^a | PSRSSR/GL | YSGTSKA | DTT | PLVNGLHG |
| Ck/GD/01/11 ^a | PARSSR/GL | YSGTSKA | DTV | PLVNGQQG |
| Ck/BJ/0701/15 ^a | PSRSSR/GL | YSGTSKA | DAT | PLVNGLMG |
| Ck/TJ/1/15 ^a | PSKSSR/GL | YDGTSTA | DTT | PLVNGLMG |
| Ck/BJ/11/16 ^a | PSRSSR/GL | YSGTSKA | DTT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/20/16 ^a | PSRSSR/GL | YDGTSTA | DDT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0115/17 | PSRSSR/GL | YDGTSTA | DDT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0318/17 | PSRSSR/GL | YDGTSTA | DTT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0427/17 | PSRSSR/GL | YDGTSTA | DDT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0511/17 | PSRSSR/GL | YSGTSKA | DDT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0626/17 | PSRSSR/GL | YDGTSTNT | DDT | PLVNGLMG |
| Ck/HeB/0918/17 | PSRSSR/GL | YDGTSTA | DDT | PLVNGLMG |

注: ^a: 2007–2016 年流行毒株. Ck/HeB/YT/10: A/chicken/Hebei/YT/2010; Ck/GD/01/11: A/chicken/Guangdong/01/2011; Ck/BJ/0701/15: A/chicken/Beijing/0701/2015; Ck/BJ/11/16: A/chicken/Beijing/11/2016. 粗体表示与早期对照毒株相比存在差异的位点.

Note: ^a: Pandemic strains in 2007–2016. Ck/HeB/YT/10: A/chicken/Hebei/YT/2010; Ck/GD/01/11: A/chicken/Guangdong/01/2011; Ck/BJ/0701/15: A/chicken/Beijing/0701/2015; Ck/BJ/11/16: A/chicken/Beijing/11/2016. Bold represent the different sites from early strains.

表 3 H9N2 亚型禽流感分离毒株 HA 潜在糖基化位点突变分析

Table 3 The potential glycosylation sites in HA protein of the isolated H9N2 AIVs

| 毒株 Virus | HA1 | | | | | | HA2 | |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 11 | 64 | 123 | 280 | 287 | 295 | 146 | 205 |
| Ck/SD/ZB/07 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | – | NGT | NGS |
| Ck/HeB/YT/10 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/GD/01/11 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | – | NGT | NGS |
| Ck/BJ/0701/15 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/TJ/1/15 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/BJ/11/16 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/20/16 ^a | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0115/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0318/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0427/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0511/17 | NST | – | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0626/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/0918/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| Ck/HeB/1027/17 | NST | NPS | NVS | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |

注: ^a: 2007–2016 年流行毒株; –: 无相应潜在糖基化位点.

Note: ^a: Pandemic strains in 2007–2016; –: No potential glycosylation sites.

表 4 H9N2 亚型禽流感病毒的交叉 HI 抗原性分析

Table 4 The antigenic analysis of isolated AIVs

| 病毒(抗原) Virus (Antigen) | 抗血清 Antisera | | | | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Ck/SH/ F/98 | Ck/SD/ ZB/07 | Ck/HeB/ 0617/07 | Ck/JS/ TS/10 | Ck/TJ/ 1/15 | Ck/HeB/ 20/16 | Ck/HeB/ 0115/17 | Ck/HeB/ 0918/17 | Ck/HeB/ 1027/17 |
| Ck/SH/F/98 | 1 280 | 320 | 20 | 320 | < | < | < | 20 | < |
| Ck/SD/ZB/07 | 640 | 1 280 | 40 | 160 | < | < | < | < | < |
| Ck/HeB/0617/07 | 1 280 | 1 280 | 1 280 | 640 | 160 | 40 | 40 | 80 | 80 |
| Ck/JS/TS/10 | 2 560 | 1 280 | 40 | 1 280 | 80 | 20 | 20 | 80 | 80 |
| Ck/TJ/1/15 | 160 | 160 | < | 160 | 1 280 | 160 | 320 | 320 | 320 |
| Ck/HeB/20/16 | 160 | 320 | 160 | 320 | 640 | 1 280 | 640 | 640 | 640 |
| Ck/HeB/0115/17 | 160 | 320 | 160 | 320 | 160 | 640 | 1 280 | 640 | 1 280 |
| Ck/HeB/0318/17 | 160 | 320 | 160 | 160 | 640 | 640 | 1280 | 640 | 1 280 |
| Ck/HeB/0427/17 | 160 | 160 | 160 | 160 | 320 | 1280 | 1280 | 640 | 640 |
| Ck/HeB/0511/17 | 160 | 320 | 160 | 320 | 160 | 640 | 1280 | 640 | 640 |
| Ck/HeB/0626/17 | 160 | 320 | 320 | 320 | 320 | 640 | 1280 | 1 280 | 640 |
| Ck/HeB/0918/17 | 160 | 160 | 80 | 320 | 160 | 1 280 | 320 | 1 280 | 640 |
| Ck/HeB/1027/17 | 160 | 160 | 80 | 160 | 320 | 640 | 640 | 640 | 1 280 |

注: 同源毒株和抗血清的 HI 效价用粗体表示; <: HI 效价<20.

Note: HI titers of homologous strains and antisera are indicated in bold; <: HI titer <20.

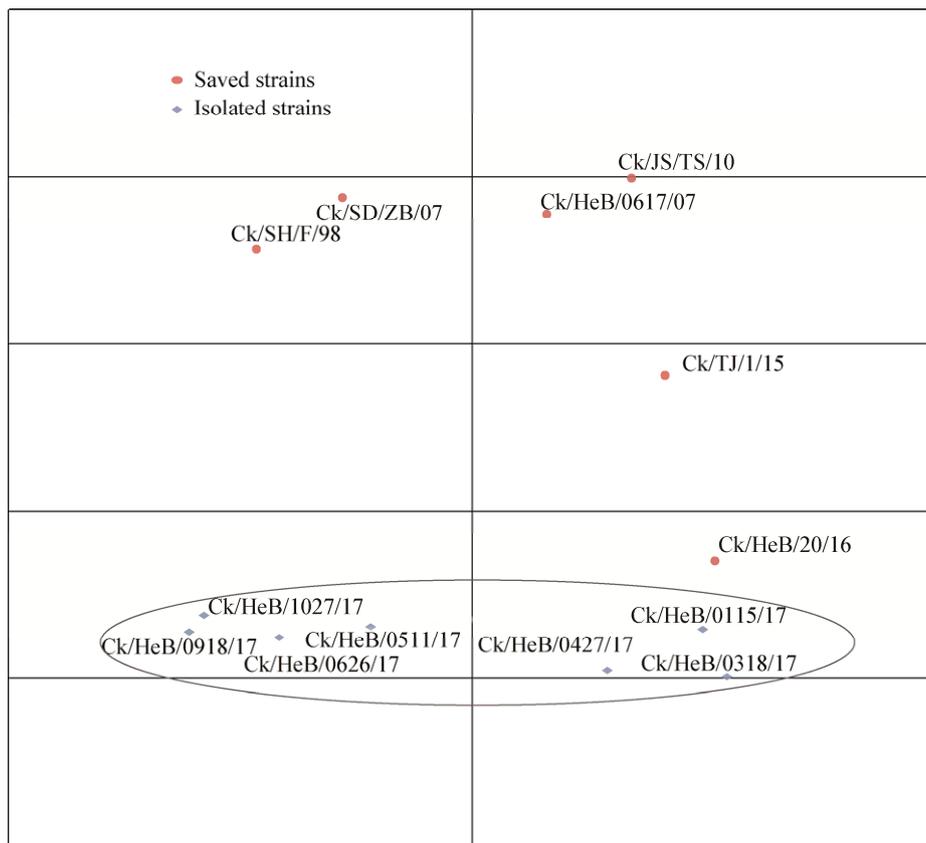


图 2 通过 HI 试验进行 H9N2 亚型 AIV 抗原图谱分析

Figure 2 The antigenmap analysis generated by using HI experiment

注: 此抗原性图谱是利用在线软件 AntigenMap (<http://sysbio.cvm.msstate.edu/AntigenMap>)分析制成. 图中一个网格代表病毒和抗血清在 HI 反应中的反应滴度存在 2 倍差异.

Note: The antigenic mapping is analyzed by online software AntigenMap (<http://sysbio.cvm.msstate.edu/AntigenMap>). A grid represents a two-fold difference in titer between the virus and the antiserum in the HI response.

表 5 HA 蛋白抗原性相关位点突变分析

Table 5 Analysis of antigenic amino acids in the HA proteins of isolated H9N2 AIVs

| 病毒 Virus | 抗原性相关位点 Antigenic amino acids sites | | | | | | | | | | |
|----------------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 72 | 74 | 127 | 135 | 146 | 148 | 149 | 150 | 179 | 182 | 183 |
| Ck/SH/F/98 | G | G | S | D | Q | N | N | A | T | T | N |
| Ck/SD/ZB/07 | G | R | S | D | Q | S | N | A | T | T | N |
| Ck/HeB/0617/07 | G | R | S | D | Q | N | N | A | T | T | N |
| Ck/JS/TS/10 | G | R | S | D | Q | N | N | A | T | T | N |
| Ck/TJ/1/15 | E | R | D | G | K | N | G | N | T | R | D |
| Ck/HeB/20/16 | E | R | D | G | R | D | G | N | D | R | N |
| Ck/HeB/0115/17 | E | R | D | G | R | N | G | N | T | R | E |
| Ck/HeB/0318/17 | E | R | D | G | R | N | G | E | T | R | D |
| Ck/HeB/0427/17 | E | R | D | G | R | N | G | E | T | R | D |
| Ck/HeB/0511/17 | E | R | D | G | R | N | G | N | E | R | G |
| Ck/HeB/0626/17 | E | R | D | G | R | D | G | N | D | R | S |
| Ck/HeB/0918/17 | E | R | N | G | R | N | G | E | T | R | E |
| Ck/HeB/1027/17 | E | R | N | N | R | D | G | N | D | R | N |

注：粗体表示的氨基酸位点代表分离毒株与之前毒株的差异位点。

Note: Bold represent the difference sites between the isolated strains and the previous antigen groups.

本研究自 2017 年期间于河北省部分蛋鸡养殖场分离出 7 株 H9N2 亚型 AIV，并对其 HA 基因进行遗传进化及抗原性分析。结果显示 7 株分离毒的同源性在 95.5%–97.2% 之间。研究报道，H9N2 亚型 AIV 的 HA 蛋白裂解位点在 1994–2005 年以 PARSSR/GL 为主，自 2005 年起，由 PSRSSR/GL 组成的裂解位点开始占据优势地位并在之后的流行过程中始终占据主导流行地位^[3]。2017 年间的 H9N2 分离毒株裂解位点组成基本均为 PSRSSR/GL，与 2007–2015 年流行毒株相比未发生变化，已有研究证明该位点的突变会增强病毒对鸡和小鼠的致病力^[3]。HA 潜在糖基化位点表明分离毒株与之前流行毒株相比未发生明显变化。

流感病毒 HA 蛋白的受体结合区域由 130-Loop、190-Helix 和 220-Loop 以及基部保守的氨基酸组成。HA 蛋白受体结合位点氨基酸的改变是 AIV 跨宿主传播的必需因素，如 Q226L 和 G228S^[9]能够显著提高 AIV 结合人样唾液酸受体的能力，本研究中的 7 株分离毒株 226 位受体结合位点均发生了

Q/L 的变化，Q226L 突变可增强 H9N2 亚型 AIV 的 HA 结合人源唾液酸受体的能力，进而增加了 H9N2 亚型 AIV 感染人的风险。130-Loop 区受体结合位点区域中 133、137 和 138 位氨基酸与早期流行毒株相比存在较为明显的差异，但这些位点的突变对于 H9N2 亚型 AIV 受体结合特异性是否有影响仍有待探究。190-Helix 区 189 位和 190 位氨基酸与 2007–2015 年流行毒株相比表现为 T/A/D、T/V 的替换，相关文献报道 T190V 是 H9N2 亚型 AIV 跨越种间障碍感染哺乳动物的关键因素^[10]，能够增强其在哺乳动物中的感染能力，该突变虽然不改变 H9N2 亚型 AIV 的受体结合特异性，但能显著增加病毒在哺乳动物细胞中的受体亲和力。综上所述研究表明，2017 年分离的 7 株 H9N2 流行毒株的受体结合位点发生了较为明显的变异，具备了结合人源唾液酸受体的能力，具有潜在感染人的风险。

在 HA 基因进化树中，7 株分离毒株位于目前我国 H9N2 亚型 AIV 的流行分支^[8]，且与 2017 年

分离毒株形成了一个亚分支。抗原分析结果显示分离毒株与用于抗原性分析的毒株相应的抗血清 HI 效价相差 1-4 个滴度, 结合抗原图谱分析, 说明 2017 年间的流行毒株发生了抗原性变异。通过对 7 株毒株各抗原性相关位点进行统计发现 72、127、131 位等共 9 个位点发生了较为明显的突变, 可能是导致分离毒株发生抗原性突变的主要原因^[11]。

我国长期采用灭活疫苗防控 H9N2 亚型 AIV, 然而该病依然广泛流行。本研究表明, 当前 H9N2 亚型 AIV 已发生部分变异, 其受体结合位点部分氨基酸发生改变, 但当前灭活疫苗对其起到防控作用较弱。由于 AIV 的抗原性容易发生变异, 使得灭活疫苗在防控 H9N2 亚型 AIV 中有一定的局限或滞后性。因此, 养殖场将禽流感减毒活疫苗应用到禽流感防控中以增强鸡群对抗原性变异病毒的免疫力显得尤为重要; 同时, 建议养殖企业加强对本地区或场区周边区域禽流感毒株的流行变异趋势监测, 以及筛选与流行毒株抗原性匹配的疫苗候选毒株, 提前对养殖场鸡群感染风险做出评估, 针对毒力较强、变异较大的流行毒株开展免疫鸡群的攻毒保护试验, 验证疫苗的保护效果, 及时淘汰保护效果不佳的疫苗, 筛选使用经验证保护力强的 H9N2 亚型禽流感疫苗, 确保鸡群健康; 此外, 利用弱毒疫苗, 使之能够同时产生细胞免疫和体液免疫是防控禽流感的新方法。已有研究^[12]表明, 冷适应弱毒疫苗能够引起鸡体内对不同抗原群的 H9N2 亚型 AIV 的免疫保护反应。

REFERENCES

- [1] Gan MH. Avian Influenza[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2004: 1 (in Chinese)
甘孟侯. 禽流感[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1
- [2] Li XY, Shi JZ, Guo J, et al. Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 avian influenza viruses[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(11): e1004508
- [3] Sun YP, Tan YY, Wei K, et al. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2963-2968
- [4] Sun YP, Pu J, Jiang ZL, et al. Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 146(3/4): 215-225
- [5] Wan HQ, Sorrell EM, Song HC, et al. Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2923
- [6] World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance[EB/OL]. (2002-05). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68026>
- [7] Edwards S. OIE laboratory standards for avian influenza[J]. Developments in Biologicals, 2006, 124: 159-162
- [8] Pu J, Wang SG, Yin YB, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(2): 548-553
- [9] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus[J]. Science, 2006, 312(5772): 404-410
- [10] Teng QY, Xu DW, Shen WX, et al. A single mutation at position 190 in hemagglutinin enhances binding affinity for human type sialic acid receptor and replication of H9N2 avian influenza virus in mice[J]. Journal of Virology, 2016, 90(21): 9806-9825
- [11] Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, et al. Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(51): 20748-20753
- [12] Wei YD, Qi L, Gao HJ, et al. Generation and protective efficacy of a cold-adapted attenuated avian H9N2 influenza vaccine[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30382