

2019–2020 年苏中地区某活禽市场 H9N2 禽流感病毒分子进化

翟晓虎¹, 贺卫华¹, 赵学刚¹, 李玲¹, 祁贤^{*2}

1 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300

2 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009

翟晓虎, 贺卫华, 赵学刚, 李玲, 祁贤. 2019–2020 年苏中地区某活禽市场 H9N2 禽流感病毒分子进化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1731-1740

Zhai Xiaohu, He Weihua, Zhao Xuegang, Li Ling, Qi Xian. Genetic evolution of avian influenza A (H9N2) virus in a live poultry market in central Jiangsu, China, 2019–2020[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1731-1740

摘要:【背景】20 世纪 90 年代以来, H9N2 禽流感病毒成为危害我国养禽业及人类健康和公共卫生的重要病原。【目的】了解苏中地区 2019–2020 年活禽市场 H9N2 禽流感病毒的分子进化特征。【方法】通过荧光定量 PCR 法对本标进行流感病毒分型检测, 原始标本用 SPF 鸡胚进行病毒分离, 用特异性引物对病毒分离物进行全基因组测序, 利用 BLAST、ClustalX 和 MEGA 6 等软件进行序列比对和系统发育分析。【结果】2019–2020 年间从苏中地区某农贸市场采集到 231 份环境和禽类标本, 共检出 34 份甲型流感病毒, 其中 33 份为 H9N2 亚型。阳性标本接种 SPF 鸡胚, 分离到 20 株 H9N2 病毒。对其中 11 株病毒进行全基因组测序, 系统发育分析表明 11 株病毒的 HA 和 NA 都属于 H9N2 禽流感 Y280-like 系的 G57 基因型。根据 HA 和 NA 的进化特征, 11 株病毒可分为 5 个基因组合(A、B、C、D 和 E), 其中 A ($n=5$) 是优势流行基因组合。11 株 H9N2 分离病毒的 HA 蛋白 HA1 和 HA2 亚单位的裂解位点是一个碱性氨基酸 R, 具有低致病性禽流感病毒的特征。HA 蛋白的受体结合部位有 4 个氨基酸位点(I155T、H183N、A190T/V 和 Q226L) 发生突变, 推测这些病毒可能增强了对人 SA α 2-6Gal 受体的结合力。【结论】苏中地区活禽市场 H9N2 禽流感病毒进化活跃, 存在外溢传播人的风险, 应该加强对活禽市场禽流感病毒的监测和跨种传播的研究。

关键词: 禽流感病毒; H9N2 亚型; 活禽市场; Y280 系

基金项目: 江苏省重大科技示范项目(BE2017749)

Supported by: Science and Technology Demonstration Project of Jiangsu Province (BE2017749)

*Corresponding author: E-mail: qixiansyc@163.com

Received: 2021-09-14; Accepted: 2021-12-01; Published online: 2022-02-17

Genetic evolution of avian influenza A (H9N2) virus in a live poultry market in central Jiangsu, China, 2019–2020

ZHAI Xiaohu¹, HE Weihua¹, ZHAO Xuegang¹, LI Ling¹, QI Xian^{*2}

¹ Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu, China

² Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Since the 1990s, H9N2 avian influenza virus has become a major threat to human and animal health. [Objective] To understand the molecular evolutionary characteristics of H9N2 avian influenza virus in a live poultry market in central Jiangsu, 2019–2020. [Methods] The specimens were detected by real-time quantitative PCR method, and SPF chicken embryos were used for the isolation of virus strains from the specimens. The whole genome of each isolate was sequenced with specific primers. BLAST, ClustalX and MEGA 6 were used for sequence alignments and phylogenetic analysis. [Results] A total of 231 environmental and poultry specimens were collected from a farmers' market from 2019 to 2020, from which of 34 influenza A virus strains were detected, including 33 strains of H9N2 subtype. Twenty strains of H9N2 virus were isolated with SPF chicken embryos, and the whole genomes of 11 strains were sequenced and aligned. The HA and NA gene sequences indicated that the 11 strains belonged to G57 genotype of Y280-like lineage. According to the evolutionary characteristics of HA and NA, the 11 strains can be divided into 5 gene constellations (A, B, C, D and E), of which constellation A ($n=5$) was dominant. The cleavage site of HA1 and HA2 subunits of HA protein of the 11 strains was a basic amino acid R, which indicated low pathogenicity. Four mutations (including I155T, H183N, A190T/V and Q226L) were occurred in the receptor-binding region of HA protein, indicating that these viruses had enhanced ability of binding to human SA α 2-6Gal receptor. [Conclusion] The H9N2 avian influenza virus in the live poultry market in central Jiangsu is characterized by active evolution and has a risk of transmission to people. Efforts should be made to strengthen the monitoring and the research on cross-species transmission of avian influenza virus in the live poultry market.

Keywords: avian influenza virus; H9N2 subtype; live poultry market; Y280 lineage

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)属于正粘病毒科甲型流感病毒属,是严重危害禽类和养禽业的病原。根据血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)抗原性的多样性,鉴定了甲型流感病毒的许多血清型。目前已经在野生水禽中发现了 H1–H16 和 N1–N9 等亚型,近年来在北美的蝙蝠中发现了 H17N10 和 H18N11 亚型流感病毒^[1–4]。H9N2 亚

型 AIV 于 1966 年在美国的火鸡中首次发现,目前在东亚、中东、欧洲、北非和美洲都有暴发和流行^[5–6]。1992 年陈伯伦等从我国广东某暴发疾病的鸡场中分离出 H9N2 AIV,这是中国首次报道的禽流感^[7],之后 H9N2 病毒逐步扩大传播范围,成为我国家禽中占优势的禽流感病毒亚型及养禽业健康发展的重要制约因素^[6,8]。自 1998 年以来,我国累计报道了 60 多例人感染

H9N2 禽流感病例, H9N2 禽流感病毒与 H5Ny (y=1、6)和 H7Ny (y=2、3、7、9)一并成为危害动物和公共卫生的重要病原体^[9-10]。研究显示, 人感染禽流感病例大多有活禽或活禽相关环境暴露史^[8-10]。活禽市场为不同来源禽流感病毒进行基因重配和跨种感染人提供了理想场所, 因此加强活禽市场禽流感病毒的监测, 对跟踪病毒进化和禽流感的防治具有重要意义。

本文通过病毒分离和基因组测序, 分析了 2019–2020 年苏中地区活禽市场中 H9N2 病毒的基因特征和进化起源。

1 材料与方法

1.1 材料

9–11 日龄的无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)鸡胚, 中牧实业股份有限公司南京药械厂; 甲型及乙型流感病毒核酸检测试剂盒, 江苏硕士生物技术有限公司; QIAamp Viral RNA 试剂盒, Qiagen 公司; SuperScriptTM III 第一链合成系统和 High Pure PCR Product Purification Kit, Invitrogen 公司; Nextera XT DNA Sample Preparation 试剂盒, Illumina 公司。RT-qPCR 仪, ABI 公司; Illumina MiSeq 测序平台, Illumina 公司。

1.2 标本采集和分型检测

2019 年 3 月, 江苏发生一起人感染 H9N2 禽流感病例。从 2019 年 1 月–2020 年 12 月, 从患者住处附近的某活禽市场采集到 231 份环境或禽类标本, 其中包括笼具表面擦拭标本 121 份、禽肉案板标本 45 份、清洗污水 20 份和禽类粪便 45 份。标本的流感病毒核酸分型检测采用 RT-qPCR 技术, 具体分型包括甲型/乙型流感病毒通用检测、3 种 HA 亚型(H5、H7 和 H9)和 4 种 NA 亚型(N1、N2、N6 和 N9)。

1.3 病毒分离和鉴定

将环境和禽类标本接种 9–11 日龄 SPF 鸡胚, 接种部分是尿囊腔, 37 °C 条件下培养 72 h。采用血凝试验测定病毒分离物的血凝特性, 用 0.9%生理盐水配制 1%鸡红细胞, 病毒分离物进行 2 倍系列稀释, 在 V 型血凝板上进行混合后室温孵育 20–30 min 观察结果。在江苏省疾病预防控制中心生物安全三级(BSL-3)实验室里进行病毒分离。

1.4 病毒基因组测序

按照操作说明提取病毒 RNA。采用引物 U12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3')扩增病毒基因组 RNA 的 cDNA, 用单链合成试剂盒构建反应体系。按照 Illumina 公司的试剂盒测序构建文库。测序工作按照产品说明书进行, 在 Illumina MiSeq 测序平台的样品孔中加入测序文库样品 800 μL。使用 CLC Genomics Workbench (CLC Bio)程序软件对测序数据进行处理与分析。

1.5 进化分析

在常见的基因库公网上(包括 GISAID 和 GenBank)应用 BLASTn 软件初步确认分离病毒的 HA、NA 亚型及基因组节段核苷酸最大相似的参考菌株。核苷酸和氨基酸序列比对采用 MAFFT 软件。使用 MEGA 6 软件的 maximum likelihood 法构建分离株的系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 标本检测

通过荧光定量 PCR 对 231 份标本进行检测, 结果检出 31 份 H9N2 阳性核酸和 3 份 H5N6 阳性核酸。阳性标本主要集中在冬、春季(11 月–3 月), 笼具表面、禽肉案板、清洗污水和禽类粪便都有检出。结果表明, 活禽市场禽流感病毒的流行有一定的季节性, 病毒在活

禽市场特定环境里的存在较为普遍。

2.2 病毒分离与鉴定

将 31 份 H9N2 阳性样本接种 SPF 鸡胚, 分离到 20 株病毒。20 株病毒具有较高的血凝活性, 其中 4 株 HA 效价是 1:512、13 株为 1:1 024、3 株为 1:2 048, 核酸检测均为 A 型 H9N2 流感病毒阳性。

2.3 核苷酸相似性比较和进化树分析

对 11 株环境和家禽分离株进行全基因组测序, 序列上传 GISAID 数据库。序列比较结果显示, 11 株病毒基因组核苷酸序列与 1 株江苏人分离株 A/Jiangsu/1/2019 的相似性为 88.8%–100.0% (表 1)。11 株 H9N2 流感病毒的 8 个基因片段(HA、NA、PB2、PB1、NP 和 NS) 都与近年来中国南方流行的 H9N2 病毒序列相似性最高(98%–99%)。

采用 MEGA 6 软件中的最大似然法构建 11 株 H9N2 环境、家禽分离株和 1 株人分离株 A/Jiangsu/1/2019 的 HA 和 NA 系统发育树(图 1)。目前全球 H9-HA 基因进化分为 2 大谱系——欧亚系和美洲系, 其中欧亚系目前主要流行 3 个世系: Y280-like (代表毒株 A/duck/Hong Kong/Y280/97)、G1 (代表毒株 A/quail/Hong Kong/G1/1997)和 Y439 (代表毒株 A/duck/Hong Kong/Y439/1997)^[6,11-12]。本研究中, 在 HA 基因进化树上(图 1), 12 株 H9N2 江苏分离病毒(包括 11 株 H9N2 病毒环境、家

禽和人分离株 A/Jiangsu/1/2019)位于欧亚系 Y280-like 进化树上, 属于 Y280-like 世系。根据进化树 bootstrap 值和核苷酸差异度, 12 株 H9N2 病毒可以进一步分为 3 个小的进化分支 (sub-clades), 各进化分支内的核苷酸差异度 $\leq 2\%$, 进化分支间的核苷酸差异度 $\geq 7\%$ 。各进化分支的毒株数量分别为 1.1 ($n=7$)、1.2 ($n=4$)和 2 ($n=1$)。

与 HA 基因相似, NA 基因进化树上(图 2) N2 基因也分为欧亚系和美洲系两大谱系, 其中欧亚系同样有 Y280-like、G1-like 和 Y439-like 这 3 个世系在流行。12 株病毒的 NA 基因属于 Y280 世系。NA 进化树中, 12 株江苏分离株也进一步分为 2 个小的进化分支, 各进化分支内的核苷酸差异度 $\leq 2.5\%$, 进化分支间的核苷酸差异度 $\geq 4\%$ 。各分支的毒株数量分别为 1.1 ($n=8$)和 1.2 ($n=4$)。对 12 株病毒的 HA 和 NA 基因进化分支进行组合, 构建了基于 HA 和 NA 片段的基因组合(表 2)。12 株病毒可分为 5 个基因组合(A、B、C、D 和 E), 其中基因组合 A ($n=5$)是优势流行基因型。HA 和 NA 基因进化分析表明, 2019–2020 年江苏活禽市场 H9N2 亚型流行株 HA 和 NA 基因表现出异质性特点, 有亚型内基因重配现象的发生。此外, HA 和 NA 进化树上, 人分离株和 4 株农贸市场分离病毒同处于一个小的进化分支上, 遗传关系较近, 表明它们有共同的起源。

表 1 11 株 H9N2 活禽市场分离株与 1 株人分离株及 3 株参考株(HA 和 NA)基因核苷酸序列相似度

Table 1 Nucleotide sequence similarity of H9N2 in 11 poultry market isolates, 1 human isolate and 3 reference strains (HA and NA) (%)

基因片段 Gene segment	11 isolates	JS/1/2019	dk/hk/Y280/97	dk/hk/Y439/1997	ql/hk/G1/1997
HA	90.7–99.8	92.6–99.9	87.9–89.7	80.3–80.9	84.7–85.3
NA	94.3–99.9	95.7–99.9	89.1–90.1	83.3–84.4	86.3–87.4

Note: JS/1/2019: A/Jiangsu/1/2019(H9N2); dk/hk/Y280/97: A/duck/Hong Kong/Y280/97(H9N2); dk/hk/Y439/1997: A/duck/Hong Kong/Y439/1997(H9N2); ql/hk/G1/1997: A/quail/Hong Kong/G1/1997(H9N2).

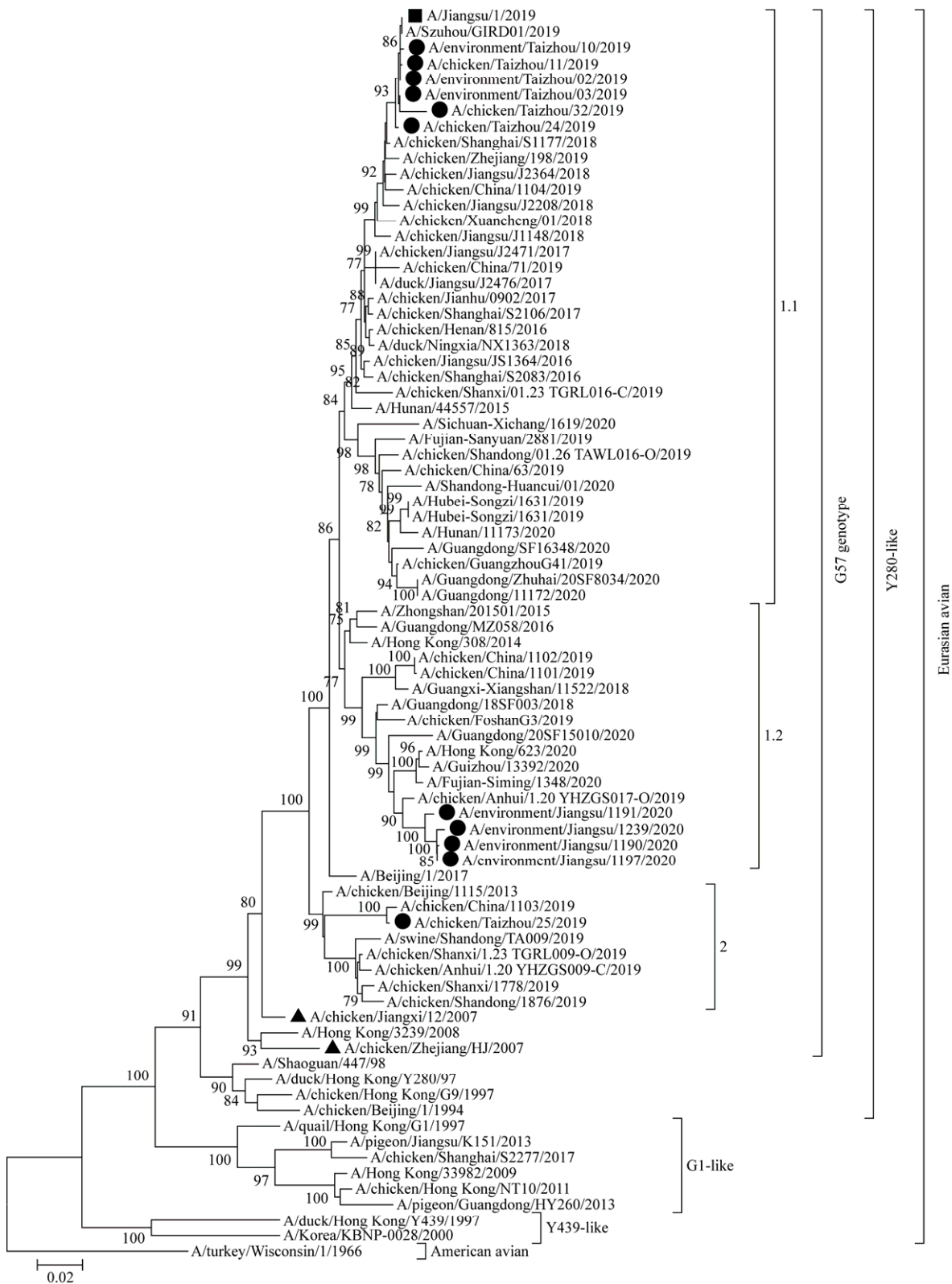


图 1 12 株 H9N2 分离株与参考株 HA 基因片段的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of HA genes of 12 H9N2 isolates and reference strains.



图 2 12 株 H9N2 分离株与参考株 NA 基因片段的系统发育树
 Figure 2 Phylogenetic tree of NA genes of 12 H9N2 isolates and reference strains.

表 2 2019–2020 年苏中地区 12 株 H9N2 分离株 HA 和 NA 基因组合

Table 2 HA and NA gene combinations of 12 H9N2 isolates in central Jiangsu (2019–2020)

病毒 Virus	基因组合 Gene constellation	血凝素基因 HA	神经氨酸酶基因 NA
A/Jiangsu/1/2019 (H9N2)	A	1.1	1.1
A/environment/Taizhou/02/2019	A	1.1	1.1
A/environment/Taizhou/03/2019	A	1.1	1.1
A/environment/Taizhou/10/2019	A	1.1	1.1
A/chicken/Taizhou/32/2019	A	1.1	1.1
A/environment/Taizhou/11/2019	B	1.1	1.2
A/chicken/Taizhou/24/2019	B	1.1	1.2
A/environment/Jiangsu/1190/2020	C	1.2	1.1
A/environment/Taizhou/1197/2020	C	1.2	1.1
A/environment/Taizhou/1239/2020	C	1.2	1.1
A/environment/Taizhou/1191/2020	D	1.2	1.2
A/chicken/Taizhou/25/2019	E	2	1.2

2.4 分离株的分子特征

11 株环境和禽类分离株 HA 蛋白 HA1 与 HA2 亚单位的裂解位点氨基酸模式为 RSRSSR↓GL, 未插入多个碱性氨基酸, 具有低致病性禽流感病毒的分子特征。甲型流感病毒有 2 种受体, 包括研究发现 H9N2 禽流感病毒 HA 蛋白的某些氨基酸突变, 可以改变病毒对禽类受体 (α 2-3 半乳糖苷连接的唾液酸, SA α 2-3Gal) 和人类受体 (α 2-6 半乳糖苷连接的唾液酸, SA α 2-6Gal) 的结合力^[13-14]。这些位点主要包括 I155T、H183N、A190T/V、Q226L 和 G228S 等(氨基酸排序按照 H3 亚型 HA 序列), 其中 Q226L 和 G228S 突变发挥关键作用。本研究中, 11 株病毒 HA 蛋白除了 228 位氨基酸仍然是 G, 其他 4 个位点都发生了突变, 理论上增强了病毒对人类 SA α 2-6Gal 受体的结合力(表 3)。NA 蛋白 274 (H→Y)位点维持氨基酸残基 H, 理论上表明病毒未产生对神经氨酸酶抑制剂(如扎那米韦和奥司他韦)的抗性^[15]。此外, 11 株病毒的 PB2 蛋白 E627 位氨基酸未突变, 表明病毒对人体的适应力和致病力都有一定的局限性。

3 讨论与结论

2019 年 3 月江苏发现一例人感染 H9N2 病例。本研究从患者居所附近活禽市场的环境和禽类标本中检测到 31 份 H9N2 亚型阳性标本, 对其中 11 株病毒基因序列进行分析, 发现 2019 年采集活禽市场病毒与该患者体内分离到的病毒 A/Jiangsu/1/2019 (H9N2)核苷酸高度同源, 揭示了活禽市场在 H9N2 禽流感病毒外溢感染人的重要作用。21 世纪初以来, 全球主要流行地区陆续报道了多起人感染 H9N2 禽流感病例, 特别是近年来有增多的趋势^[16-17]。血清学调查显示, 普通人群有约 1.3%的抗体阳性, 养禽业和活禽市场从业者等职业人群也有近 15%抗体阳性率^[18-20], 未来仍需持续加强对活禽市场的管理和职业人群的监测。

本研究中, 11 株 H9N2 环境分离株和人分离株 HA 蛋白的裂解位点具有一个碱性氨基酸, 表明病毒对鸡的致病性未突变为高致病性。HA 对 2 种不同唾液酸受体亲和力的改变, 在禽流感病毒跨种感染人中发挥重要作用^[21-22]。

12 株 H9N2 分离病毒 HA 蛋白的受体结合部位

表 3 2019–2020 年苏中地区 12 株 H9N2 病毒的氨基酸功能

Table 3 Amino acid function of 12 strains of H9N2 virus in central Jiangsu (2019–2020)

基因 Gene	突变 Mutation	生物学功能 Biological function	分离株 Isolates	
			人分离株(JS1) Human	11 株环境/禽分离株 11 environment/poultry isolates
HA	I155T	增强病毒对人受体 SA α 2-6Gal 的亲合力 Enhanced the binding for human receptor SA α 2-6Gal	T	T
	H183N		N	N
	A190T/N		T	T
	Q226L		L	L
	G228S		G	G
NA	H274Y	神经氨酸酶抗性 Neuraminidase resistance	H	H
PB2	E627K	增强对哺乳类致病性	E	E
	D701N	Increased virulence in mammals	D	D
PB1	I368V		V	V
NS1	D92E		N	N
M2	S31N	金刚烷胺类抗性 Antiviral resistance	D	D

Note: JS: A/Jiangsu/1/2019.

有 4 个关键氨基酸位点(I155T、H183N、A190T/V 和 Q226L)发生突变,根据相关研究推测这些病毒可能增强了对人类 SA α 2-6Gal 受体的亲和力^[21-22],需要密切关注病毒跨种感染人相关的 HA 蛋白分子突变。

本研究中,12 株病毒在 HA 和 NA 进化树上处于不同的进化分支,进一步可以分为 5 个基因组合,结果提示 H9N2 病毒由于核苷酸的突变处在持续进化状态中,H9N2 病毒最大的特点是变异快速和基因型众多。H9N2 病毒可以感染鸡、鹌鹑、火鸡和鸭等多种家禽,对养禽业的健康发展危害甚重。此外,H9N2 病毒在家禽中的长期流行为不同亚型禽流感病毒的重配进化提供了丰富的基因池^[23-25],特别是为近年来出现的一些危害人类公共卫生和动物健康的禽流感病毒(H5N1、H5N6、H7N9 等)提供了内部基因。H9N2 病毒最大的特点是变异快速和基因型众多。Chen 等^[26]和 Pu 等^[27]的研究发现,1994–2013 年间,在我国家禽中有 117 种基因型在流行,反映出 H9N2 病毒核苷酸的高突变

和内部基因重配的活跃。从 2013 年开始,G57 基因型逐渐成为优势流行基因型。同时,G57 基因型 H9N2 病毒其他亚型流感病毒是提供内部基因的主要供体,包括 H7N9、H5N6 和 H10N8 等^[27]。值得关注的是,H9N2 病毒内部基因与其他流感病毒重配能力强,为人类未来流感大流行毒株的产生提供了可能的基因来源。

与人感染 H5N1 (病死率为 52.8%)、H5N6 (病死率为 65%)和 H7N9 (病死率为 39.2%)相比^[9-10,28],人感染 H9N2 病毒虽然症状较轻、病死率较低,但对人类健康和公共卫生造成的重大威胁不容忽视。H9N2 病毒在禽类中普遍存在,地理分布范围广,虽然有禽用疫苗在应用,但病毒免疫逃逸能力强,根除难度大^[26,29]。本研究对江苏省首例人感染 H9N2 病例的活禽市场进行溯源研究,进一步显示该病毒的重大公共卫生意义^[30]。然而本研究的标本采集范围只局限在某一活禽市场,未来需要扩大监测和采样范围,在时间和空间维度上持续开展对禽流感病毒(包括 H5、H9、H7 和其他亚型)在人群、

猪群、家禽、野禽和环境中的生态监测, 在流行病学和分子生物学水平上密切关注病毒的演化, 特别是跨种传播能力的改变。

REFERENCES

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Advances in Genetics*, 1992, 56(1): 152-179
- [2] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global patterns of influenza A virus in wild birds[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 384-388
- [3] Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(5): 2814-2822
- [4] Tong SX, Zhu XY, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen XF, Recuenco S, Gomez J, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): e1003657
- [5] Homme PJ, Easterday BC. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-Turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. *Avian Diseases*, 1970, 14(1): 66-74
- [6] Peacock THP, James J, Sealy JE, Iqbal M. A global perspective on H9N2 avian influenza virus[J]. *Viruses*, 2019, 11(7): 620
- [7] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. *中国家禽*, 1997, 19(11): 5-7
Chen BL, Zhang ZJ, Chen WB. Isolation and preliminary serological identification of avian influenza virus-type A from chickens[J]. *China Poultry*, 1997, 19(11): 5-7 (in Chinese)
- [8] Li C, Wang SG, Bing GX, Carter RA, Wang ZJ, Wang JL, Wang CX, Wang L, Wu G, Webster RG, et al. Genetic evolution of influenza H9N2 viruses isolated from various hosts in China from 1994 to 2013[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(11): e106
- [9] Peiris JSM, De Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(2): 243-267
- [10] 姜慧, 赖圣杰, 秦颖, 张志杰, 冯录召, 余宏杰. 全球人感染禽流感疫情及其流行病学特征概述[J]. *科学通报*, 2017, 62(19): 2104-2115
- Jiang H, Lai SJ, Qin Y, Zhang ZJ, Feng LZ, Yu HJ. A review of global human infection with avian influenza and epidemiological characteristics[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(19): 2104-2115 (in Chinese)
- [11] Kwon HJ, Cho SH, Kim MC, Ahn YJ, Kim SJ. Molecular epizootiology of recurrent low pathogenic avian influenza by H9N2 subtype virus in Korea[J]. *Avian Pathology*, 2006, 35(4): 309-315
- [12] Youk SS, Lee DH, Jeong JH, Pantin-Jackwood MJ, Song CS, Swayne DE. Live bird markets as evolutionary epicentres of H9N2 low pathogenicity avian influenza viruses in Korea[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 616-627
- [13] Suttie A, Deng YM, Greenhill AR, Dussart P, Horwood PF, Karlsson EA. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(6): 739-768
- [14] Sun XJ, Belser JA, Maines TR. Adaptation of H9N2 influenza viruses to mammalian hosts: a review of molecular markers[J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 541
- [15] Ho HT, Hurt AC, Mosse J, Barr I. Neuraminidase inhibitor drug susceptibility differs between influenza N1 and N2 neuraminidase following mutagenesis of two conserved residues[J]. *Antiviral Research*, 2007, 76(3): 263-266
- [16] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shorridge KF. Human infection with influenza H9N2[J]. *Lancet*, 1999, 354(9182): 916-917
- [17] Dong X, Xiong JS, Huang CL, Xiang J, Wu WJ, Chen NS, Wen DN, Tu C, Qiao XL, Kang L, et al. Retracted article: human H9N2 avian influenza infection: epidemiological and clinical characterization of 16 cases in China[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(3): 564
- [18] Chen Y, Zheng Q, Yang K, Zeng F, Lau SY, Wu WL, Huang S, Zhang J, Chen H, Xia N. Serological survey of antibodies to influenza A viruses in a group of people without a history of influenza vaccination[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011, 17(9): 1347-1349
- [19] Huang R, Wang AR, Liu ZH, Liang W, Li XX, Tang YJ, Miao ZM, Chai TJ. Seroprevalence of avian influenza H9N2 among poultry workers in Shandong province, China[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2013, 32(10): 1347-1351
- [20] Wang M, Fu CX, Zheng BJ. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(24): 2583-2584

- [21] Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. *Nature*, 2006, 440(7083): 435-436
- [22] Cauldwell AV, Long JS, Moncorgé O, Barclay WS. Viral determinants of influenza A virus host range[J]. *The Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 6): 1193-1210
- [23] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong?[J]. *PNAS*, 1999, 96(16): 9363-9367
- [24] Gao RB, Cao B, Hu YW, Feng ZJ, Wang DY, Hu WF, Chen J, Jie ZJ, Qiu HB, Xu K, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368(20): 1888-1897
- [25] Bi YH, Chen QJ, Wang QL, Chen JJ, Jin T, Wong G, Quan CS, Liu J, Wu J, Yin RF, et al. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 810-821
- [26] Chen ZK, Huang QH, Yang SH, Su S, Li BQ, Cui N, Xu CT. A well-defined H9N2 avian influenza virus genotype with high adaption in mammals was prevalent in Chinese poultry between 2016 to 2019[J]. *Viruses*, 2020, 12(4): 432
- [27] Pu J, Wang SG, Yin YB, Zhang GZ, Carter RA, Wang JL, Xu GL, Sun HL, Wang M, Wen C, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus[J]. *PNAS*, 2015, 112(2): 548-553
- [28] Bi YH, Tan SG, Yang Y, Wong G, Zhao M, Zhang QC, Wang Q, Zhao XN, Li LQ, Yuan J, et al. Clinical and immunological characteristics of human infections with H5N6 avian influenza virus[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 68(7): 1100-1109
- [29] Swayne DE. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza[J]. *Avian Diseases*, 2012, 56(4 Suppl): 818-828
- [30] Song WJ, Qin K. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: a forgotten potential pandemic strain?[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2020, 67(3): 203-212