

行鸡群抗体监测,由于时间紧促,关于 H₅N₁ Re-4 + Re-6 二价苗二免 90 天后以及三免 60 天以后抗体的消长规律等问题仍需我们进一步的研究。因 H₅N₁ Re-4 + Re-6 的疫苗 7 月份才在我县开始大面积使用,因此尚未能较长时间跟踪监测 H₅N₁ Re-4、Re-5、Re-6 抗体的消长规律,有待于以后开展进一

步的跟踪监测工作。

参考文献

- [1] GB/T18936-2003. 中华人民共和国国家标准。高致病性禽流感诊断技术[S]. 2003, 6.

我国 29 株 H9N2 禽流感毒株 HA 基因的同源性与遗传进化分析

李琳¹, 陈瑞爱¹, 贺东生^{1,2}, 赖汉章¹, 李宏星¹, 汤钦¹

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东新兴 527400; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

前言

禽流感病毒属正粘病毒科, 其基因共编码十种蛋白, HA 是其中变异频率最高的一种表面糖蛋白。主要决定病毒的抗原性和致病性^[1]。H9N2 禽流感病毒为低致病性禽流感的代表, 1994 年在中国首次报道, 接着迅速流行于中国大陆^[2]。它可导致家禽产生轻微的呼吸道症状, 产蛋量下降, 一般不会导致感染家禽大批死亡, 但是传播广泛, 且与其他病原混合继发感染家禽后, 其致病力能显著提高, 给养殖业带来巨大危害。本试验通过对 29 株 H9N2 AIV 分离毒株的 HA 基因的遗传演化分析, 进一步了解了我国 H9N2 亚型的禽流感的流行趋势, 为我国禽流感的防制提供理论依据。

材料和方法

RNA/DNA 提取试剂盒、RT-PCR 一步法试剂盒、PMD18-T 载体、EX Taq、DH5a 等均购自宝生物(大连)有限公司; Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司; 9~10 日龄的 SPF 鸡胚, 购自新兴大华农禽蛋有限公司。将病料分离鉴定为 H9N2 亚型禽流感病毒后, 利用设计合成的引物参照 TaKaRa 公司的 RNA 提取试剂盒和 RT-PCR 一步法试剂盒说明书扩增出 HA 基因, PCR 产物经纯化回收后, 插入 PMD18-T 载体, 转化入感受态细菌 DH5a 扩增, 将阳性单克隆菌液进行测序, 借助 DNASTar、MegAlign 等软件, 分析 HA 基因的同源性; 同时, 从 Influenza Virus Sequence Database 数据库中选取有代表性的 56 株 H9N2 亚型 AIV 亚洲株作为参考株, 利用 MEGA4.0 生物信息学软件, 对 HA 基因绘制系统进化树。

结果和讨论

本实验室分离鉴定、测序了分布 11 个省市不同集约化养殖场的 29 株 H9N2 亚型 AIV 分离毒株, 共得到 29 个毒株的 HA 基因的核苷酸序列, 通过 Lasergene DNAsstar 的 EditSeq 截取所有毒株 HA 基因核苷酸序列的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)表明, 所有分离株 HA 基因 ORF 长度均为 1683 个核苷酸(nt), 共编码 560 个氨基酸(AA)。氨基酸前 18 位为信号肽序列, 第 19~337 位为 HA1 蛋白, 第 339~560 位为 HA2 蛋白。同源性与遗传变异分析结果表明: 分离株与疫苗株 F 株的核苷酸序列的同源性在 90.4%~92.2%, 与疫苗株 SS 株的核苷酸序列同源性在 91.7%~93.2%, 与疫苗株 Re-2 株核苷酸序列同源性在 91.2%~93.3%, 表明分离毒株与疫苗株的同源性较低, 遗传关系较为疏远; 这 29 株病毒位于 h9.4.2 的(1)、(2)、(4)、(6) 亚分支上; 每个亚分支流行没有明显的地域分布差异; 不同亚分支可在不同时间不同地域流行; 同一亚分支包含的毒株没有明显的时间分布规律; 无论从时间的推移上还是地域的转变中, 病毒均没有表现出明显的时间演变与地理分布特征, 进一步显示了 H9N2 亚型禽流感病毒的复杂性和多样性。

参考文献

- [1] Liu H Q; Liu X F; Cheng J, et al. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of twenty-six avian influenza viruses of subtype H9N2 isolated from chickens in China during 1996-2001[J]. Avian Dis, 2003, 47: 116-117.
[2] 陈伯论, 张泽纪, 陈伟斌, 等. 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, 22 (10):3-5.
- [3] 王秀荣, 李冬梅, 陈化兰, 等. 禽流感病毒 N1 和 N2 亚型神经氨酸酶 RT-PCR 鉴别方法的建立 [J]. 中国兽医科技, 2004,
- [4] 林秋敏, 施少华, 万春和, 黄瑜, 等. H9N2 亚型禽流感诊断与防控技术研究进展来源. 福建畜牧兽医, 2011 年, 第 1 期, 34-39.

3 株 H9 亚型禽流感病毒的分离鉴定

李冰¹, 陈瑞爱¹, 贺东生^{1, 2}, 李琳¹, 李宏星¹, 汤钦¹

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东广州 510642;

2. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

前言

H9N2 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 可引起低致病性禽流感。自 1994 年 H9N2 亚型禽流感病毒首次在中国报道以来, H9 亚型禽流感已经在中国大陆广泛流行。近年来 H9 亚型禽流感在国内大多数地区禽类中流行广泛, 造成了巨大经济损失。禽流感病毒血凝素蛋白 (HA) 是病毒感染宿主细胞重要的致病因子, 且变异频繁, 是造成禽流感疫情防控困难的重要因素。本研究对分离获得的三株病毒的 HA 基因序列与代表毒株、疫苗株及国内新发毒株进行同源性比较, 以初步了解免疫鸡群中 H9N2 AIV 感染的原因, 进而为当前我国 H9 亚型禽流感防控提供参考。

材料与方法

鸡的肝、脾、肺、气管等组织病料来自华南动物疫病检测中心收检病料; SPF 鸡胚由广东大华农动物保健品股份有限公司提供。新城疫阳性血清、H9 亚型禽流感阳性血清购自哈尔滨兽医研究所; AMV 反转录酶, DNA 聚合酶购自 Takara 公司。本研究按照常规方法分离获得了三株禽流感病毒, 首先利用血清学方法对病毒进行初步鉴定。提取病毒基因组 RNA, 反转录后利用特异性引物 H1 和 H2 扩增得到了三株病毒的 HA 基因, 回收 PCR 扩增获得的目的片段并连入 pMD-18T 载体进行测序鉴定。利用 DNASTar 软件对本研究分离的三株病毒的 HA 基因序列与参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97、广泛应用的疫苗株 A/Chicken/Shanghai/F/98 以及近年国内新发毒株的 HA 基因序列进行同源性比较。

结果与讨论

本研究通过鸡胚接种的方式分离得到了三株禽流感病毒, 经血清学方法及 RT-PCR 鉴定此三株病毒均为 A 型 H9 亚型禽流感病毒。测序鉴定结果表明三株病毒的 HA 蛋白裂解位点均为 PSRSSR/GLF, 是典型的低致病性禽流感病毒。利用 DNASTar 软件对本研究分离的三株病毒与近年国内新发毒株、参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 以及广泛应用的疫苗株 A/Chicken/Shanghai/F/98 的 HA 基因序列进行同源性比较, 结果表明本研究分离到的三株病毒其 HA 基因核苷酸序列同源性较高, 在 98.6% - 99.8% 之间; 与国内流行毒株 A/chicken/Anhui/XMS/2011 有着较高的同源性, 同源率约为 99.0%; 与参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 的同源率约为 92.5%, 而与目前广泛使用的 H9N2 亚型禽流感灭活疫苗的种毒株同源率较低, 约为 90.0%。因此, 初步推断疫苗株与流行株之间的抗原差异可能是导致近年来 H9N2 亚型禽流感病广泛发生的重要因素。禽流感病毒流行情况和遗传演化较为复杂, 使得该病的防制困难重重。因此广泛开展禽流感流行病学调查, 对于当前流行毒株的起源及演化趋势进行研究, 对于 H9N2 亚型禽流感病的防控意义重大。

参考文献

- [1] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KARUSS S, et al. Two lineages of H9N2 influenza viruses continue to circulate in landbased poultry in southeastern China [J]. International Congress Series, 2001, 1219: 187-189.
- [2] HUANG Y, HU B, WEN X, et al. Diversified reassortant H9N2 avian influenza viruses in chicken flocks in northern and eastern China [J]. Virus Res, 2010, 151(1): 26-32