

行鸡群抗体监测,由于时间紧促,关于 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>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 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>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 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>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 基因的同源性遗传进化分析

李琳<sup>1</sup>, 陈瑞爱<sup>1</sup>, 贺东生<sup>1,2</sup>, 赖汉章<sup>1</sup>, 李宏星<sup>1</sup>, 汤钦<sup>1</sup>

(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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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,为我国禽流感的防控提供理论依据。

### 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 DNASTar 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 influenzaviruses 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,

34(4):9-13.

[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<sup>1</sup>,陈瑞爱<sup>1</sup>,贺东生<sup>1,2</sup>,李琳<sup>1</sup>,李宏星<sup>1</sup>,汤钦<sup>1</sup>

(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,是造成禽流感疫情控制困难的重要因素。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