

2013—2018年我国H9亚型禽流感 分子流行病学监测

刘东, 宋姗姗, 于静, 刘红祥, 高天佐, 李彬, 王群义, 刘丰波, 刘平, 栾栋祖, 杜元钊
(青岛易邦生物工程有限公司动物基因工程疫苗国家重点实验室, 山东青岛 266032)

摘要: 为了解我国H9亚型禽流感流行状况及流行毒株分子遗传进化特征, 2013—2018年采集我国大部分地区养殖场鸡群的喉、泄殖腔拭子, 进行了H9亚型禽流感病原学检测。对H9亚型禽流感检测阳性的病料进行病毒分离鉴定, 并选取80株分离株进行HA基因遗传进化分析, 并对其受体结合位点以及糖基化位点进行分析。研究表明: 这80株分离株中, 除2013年分离的1株毒株外, 其余79株均属于Y4亚群; 虽然这些分离株的裂解位点均属于低致病性禽流感特征, 但具有致病性增强的风险。因此, 加强H9亚型禽流感的分子流行病学监测, 及时掌握H9亚型禽流感病毒的最新变异情况, 对于我国禽流感防控具有重要意义。

关键词: H9亚型禽流感; HA基因; 进化分析

中图分类号: S851.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)08-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.001

Molecular Epidemiological Monitoring of H9 Subtype Avian Influenza in China from 2013 to 2018

Liu Dong, Song Shanshan, Yu Jing, Liu Hongxiang, Gao Tianyou, Li Bin,
Wang Qunyi, Liu Fengbo, Liu Ping, Luan Dongzu, Du Yuanzhuo
(Qingdao Yebio Bioengineering Co., Ltd, National Key Laboratory of
Animal Genetic Engineering Vaccine Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: With the purpose of recognizing the prevalence status of H9 subtype avian influenza virus (AIV) and its molecular evolution characteristics, and timely mastering the latest variation information, laryngeal and cloacal swabs were collected from chicken farms in most areas of China from 2013 to 2018, and pathogenic detection of H7N9 subtype AIV were conducted. Then virus isolation and identification were carried out towards the samples which were detected AIV-positive, and variations of HA gene fragments of 80 isolated strains were analyzed, as well as the receptor binding sites and glycosylation sites. The results showed that all of the isolated strains belonged to Y4 subgroup except one strain isolated from 2013. Although the cleavage sites of these isolated strains had characteristics of low pathogenic avian influenza, there was still a risk of increased pathogenicity. Therefore, strengthening the molecular epidemiological surveillance of H9 subtype AIV is of great significance for avian influenza prevention and control in China.

Key words: H9 subtype avian influenza virus; HA gene; phylogenetic analysis

禽流感 (Avian influenza, AI) 是由禽流感病毒 (AIV) 引起的禽类全身性或呼吸系统性疾病。AIV 属于正黏病毒科 A 型流感病毒属, 其关键致病性基因为 HA 基因。在宿主胰蛋白酶的作用下, HA 基因能裂解为 HA1 和 HA2, 因而产生具有感

染性的病毒粒子^[1]。

根据对禽类致病性的不同, AI 又分为高致病性 (High pathogenic AI, HPAI) 和低致病性 (Low pathogenic AI, LPAI) 或温和性 (Mildly pathogenic AI, MPAI)^[2]。MPAI 虽然对禽类的致病性较弱,

但其基因来源复杂、分布广，又易继发其他致病微生物感染，对养禽业具有潜在危害，尤其是 H9 亚型。目前监测发现，有些毒株的基因组已发生了多元重组，基因片段来源也多样化^[3]。因此，有必要实时监测当前 H9N2 亚型 AIV 流行毒株 HA 基因的遗传变异情况。本研究对 2013 年到 2018 年 4 月河北、河南、江苏、安徽、山东、湖南、吉林和四川等省份养殖场采集的鸡群喉、泄殖腔拭子以及疑似病料进行了 H9 亚型 AIV 病原学检测，对其 HA 基因进行扩增、测序与分析，绘制了系统进化树并进行了分子遗传进化分析，为 H9 亚型 AI 防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

采集 2013—2018 年我国河北、河南、江苏、安徽、山东、湖南、吉林和四川等 15 个省份养殖场疑似流感暴发鸡群的喉、泄殖腔拭子以及病料样品。

1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒：购自天恩泽生物公司；HiScript®II One Step RT-PCR Kit：购自诺唯赞生物公司；DNA Marker DL2000：购于宝生物工程(大连)有限公司。

超净工作台（北京东联哈尔 -DL-CJ-1NDII），低温冷冻离心机（湖南湘仪 TGL-6），

PCR 扩增仪（美国 Bio-rad T100），微波炉（格兰仕）和紫外光凝胶成像系统（培清 -JS-680C）。

1.3 引物

按照农业行业标准《禽流感病毒 RT-PCR 试验方法》（NYT772-2004）中的 H9 亚型 AIV RT-PCR 检测方法，选用 H9-732U/H9-732L 特异性引物，扩增 H9 亚型血凝素基因片段。引物序列如下：H9-732U 5'-TCAACAACTCCACCGAACTGT-3'；H9-732L 5'-TCCCGTAAGAACATGTCCATACCA-3'。引物由北京华大基因科技有限公司合成。

根据 GenBank 上已经发表的 AIV 毒株参考序列，设计扩增 HA 全长基因片段引物。设计的引物序列为：上游 5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCA-GGGG-3'；下游 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGA-AACAAGGGTGTTTT-3'。引物由北京华大基因科技有限公司合成。

1.4 病毒 RNA 提取

参照天恩泽 RNA 提取试剂盒说明书，具体如下：取组织研磨液 200 μL，加 1 000 μL 溶液 A，混匀；加 200 μL 氯仿溶液，震荡混匀，12 000 r/min，4 °C 离心 10 min；小心吸取水相 600 μL 加入到新的 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中；加等体积的溶液 B 混匀，分两次加到离心吸附柱中，12 000 r/min，离心 30 s；弃穿透液，加 700 μL 洗液，12 000 r/min，离心 30 s；弃穿透液，12 000 r/min，空离 30 s；将离心柱转移至新的 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中，加 60 μL 洗脱液，12 000 r/min，离心 30 s，得到 RNA，-20 °C 保存备用。

1.5 HA 基因 RT-PCR

采用 HiScript®II One Step RT-PCR Kit 试剂盒，进行 RT-PCR 反应。反应条件为：50 °C 30 min，94 °C 3 min，94 °C 45 s，52 °C 30 s，72 °C 1 min 45 s，33 次循环，72 °C 10 min。

1.6 基因序列测定

将 PCR 产物送往北京华大基因科技有限公司进行测序。

1.7 H9 亚型毒株分子进化分析

利用 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中的 Influenza virus resource 数据库，搜索 H9 亚型 AIV HA 基因序列，并同测序结果进行 Alignment 在线对比，然后利用 MEGA 7.0 软件，绘制进化树，选取代表毒株进行 HA 基因分子演化分析，了解近年来我国 H9 亚型 AIV 毒株 HA 基因的演化特点。

2 结果

2.1 HA 区域核苷酸及推导氨基酸同源性分析

通过 PCR 产物纯化测序和序列拼接, 得到 80 个毒株的 HA 基因开放阅读框, 其中 2013 年 11 株, 2014 年 15 株, 2015 年 8 株, 2016 年 18 株, 2017 年 17 株, 2018 年 11 株。BLAST 检索发现, 80 株 H9 亚型 AIV HA 基因核苷酸同源性为 85.4%~99.6%, 氨基酸同源性为 85.9%~99.9%。

2.2 HA 基因遗传进化分析

从 GenBank 中选取 5 个 H9 亚型代表毒株及 11 个我国普遍使用疫苗毒株的 HA 基因序列(表 1), 与分离的 80 株毒株 HA 基因进行对比和遗传进化树分析(图 1)。从图中可看出 2013—2018 年分离到的 H9 亚型 AIV 大部分在 H9.4.2.5 分支上, 只有 2013 年云南的 A-CK-yunnan-2013 在 H9.4.2.6 分支上。H9.4.2.5 分支又有许多小分支, 其中: 79 个分离株在 Y4 亚群, 与 Y4 疫苗株的核苷酸同源性在 93.7% 以内; 60 个分离株在 WJ57 亚群, 与 WJ57 疫苗株核苷酸同源性在 95.5% 以内。遗传进化树分析显示: 2013—2018 年的分离毒株在遗传进化树上基本按时间顺序排列, 而且随着时间推移, 新分离毒株逐渐远离疫苗毒株。

表 1 选用的 H9 亚型 AIV 参考株

毒株	亚群	GenBank 登录号
A/Duck/HongKong/Y280/97	Y280	AF156376
A/Chicken/Beijing/1/94	BJ94	AF156380
参考株 A/Quail/HongKong/G1/97	G1	AF156378
A/Duck/HongKong/Y439/97	Y439	AF156377
A/Turkey/Wisconsin/1/1966	W66	DQ067444
A/Chicken/Guangdong/SS/94	SS94	AF384557
A/Chicken/Shandong/6/96	SD696	AF508570
A/Chicken/Shanghai/F/98	F98	AY743216
A/chicken/Shandong/HL/2010	HL	KC821004
疫苗株 A/chicken/Jiangsu/SZ0207/2013	SZ	KT216644
A/chicken/Shandong/YB06/2006 (H9N2)	YB	JQ710463
A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012	WJ57	KJ000710
A/chicken/Guangdong/Y4/2009	Y4	JN802572

2.3 HA 基因关键氨基酸变异分析

参照人源 H3N2 流感病毒 A/Achi/2/1968 毒株的 HA 基因氨基酸序列^[8], 推导并比较 80 个毒株

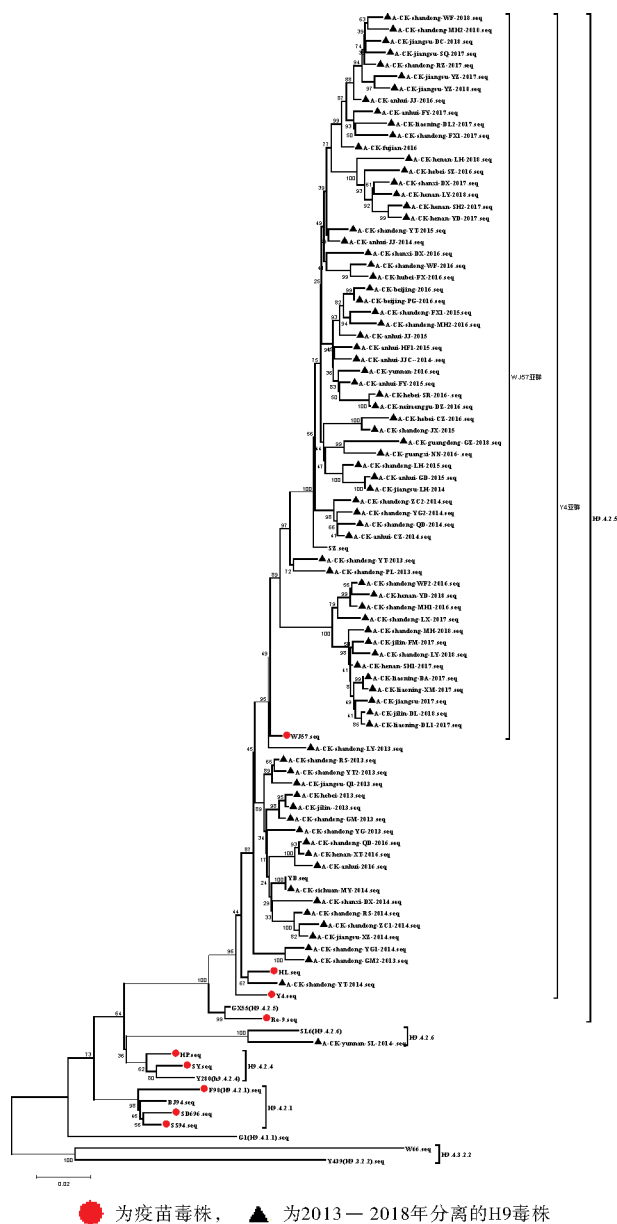


图 1 2013—2018 年我国大陆部分地区 H9 亚型 AIV 的 HA 基因多样性分析

HA 基因关键位点的氨基酸序列。结果显示: 80 株病毒 HA 基因裂解位点氨基酸序列(321~329)中, 除 1 株为 PSRSSN、1 株为 PSRSNR 外, 其余 78 株均为 PSRSSR, 均符合低致病性禽流感特征。这些毒株的裂解位点氨基酸序列虽为低致病性特征, 但不同于参考毒株 Y280 (PARSSR), 其第 2 位氨基酸残基由非极性氨基酸 (A) 突变为极性氨基酸 (S)。通过核苷酸序列分析发现, 这 80 株毒

株 HA 裂解位点序列的第 5 位氨基酸残基均为 S，由 AGT 编码。

H9 亚型 AIV HA 基因在 109、161、163、191、198、202、203 和 146~150 及 232~237 位 (H9 序列位置) 构成受体结合位点的袋状结构。80 株病毒基因受体结合位点右侧壁 (146~150) 比较保守，主要模式为 GTSKA，受体结合位点左侧壁 (232~237) 中的 234 和 235 位正在发生突变，主要模式为 NGLMGR，而国内参考毒株 Y280 的模式为 NGLQGR，BJ94、F98 的模式为 NGQQGR。受体结合位点的改变主要是在 198 位，呈现 T/V/A/K 的突变，226 位氨基酸位点与唾液酸受体 α -2,6Gal 和 α -2,3Gal 的结合特性有关。本研究中的所有 H9N2 亚型 AIV 的 226 位氨基酸均为亮氨酸 (L)，而早期的大多为谷氨酰胺 (Q)。这说明 2013 年以后的 H9N2 病毒具备了结合 α -2,6Gal 唾液酸受体的能力，病毒感染哺乳动物，甚至是人的概率大大增加 (表 2)。

表 2 H9 亚型 AIV 裂解位点和袋状结合区的突变

毒株	HA 裂解位点	HA 受体结合位点							HA 226 位氨基酸	毒株数量 / 株
		109	161	163	191	198	202	203		
BJ94	PARSSR	Y	W	T	N	V	L	Y	Q	
F98	PARSSR	Y	W	T	N	A	L	Y	Q	
G1	PARSSR	Y	W	T	H	E	L	Y	L	
SD696	PARSSR	Y	W	T	N	A	L	Y	Q	
SS94	PAGSSR	Y	W	T	N	A	L	Y	Q	
W66	PAVSSR	Y	W	T	H	E	L	Y	Q	
Y280	PARSSR	Y	W	T	N	T	L	Y	L	
Y439	PAASNR	Y	W	T	H	E	L	Y	Q	
HL	PSRSSR	Y	W	T	N	T	L	Y	F	
SZ	PSRSSR	Y	W	T	N	T	L	Y	L	
YB	PSRSSR	Y	W	T	N	V	L	Y	L	
WJ57	PSRSSR	Y	W	T	N	V	L	Y	L	
Y4	PSRSSR	Y	W	T	N	A	L	Y	L	
SY	PARSSR	Y	W	T	N	V	L	Y	Q	
HP	PARSSR	Y	W	T	N	V	L	Y	L	
Re-9	PSRSSR	Y	W	T	N	A	L	Y	L	
	PSRSSR									76/80
	PSRSSN									2/80
	PSRSNR									1/80
	PSKSSR									1/80
		Y	W	T	N	T	L	Y	L	52/80
		Y	W	T	N	V	L	Y	L	9/80
		Y	W	T	N	A	L	Y	L	16/80
		Y	W	T	N	E	L	Y	L	3/80

4 个毒株 (4/80) 含有 8 个潜在的糖基化位点，而且这 4 个毒株只有在 2013 年和 2014 年分离得到 (表 3)，9 个毒株含有 6 个糖基化位点，也是 2013 年和 2014 年的分离株。与 Y280 相比，其他毒株在第 203 位氨基酸大多发生了 T → I/V，导致了第 200 位糖基化位点逐渐缺失，第 297 位氨基酸发生了 P → S 的变化，使得 295 位多出了一个潜在的糖基化位点 NCS。新的糖基化位点的出现或者原有糖基化位点的缺失均有可能通过改变受体结合位点和 HA 蛋白的抗原性来感染新宿主。

表 3 H9 亚型 AIV HA 蛋白糖基化位点

毒株	HA1						HA2		数量 / 株
	11	123	200	280	287	295	154	213	
BJ94	NST	NVT	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
F98	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
G1	NST	NVT	NRT	NST	NIS	TCP	NGT	NGS	
SD696	NST	NVS	DRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
SS94	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
W66	NST	NVT	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
Y280	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
Y439	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
HL	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
SZ	NST	NVS	NRI	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
YB	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
WJ57	NST	NVS	NRI	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
Y4	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
SY	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
HP	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	
Re-9	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	
	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	11/80
	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	4/80
	NST	NVS	NRI/V	NTT	NVS	NCP	NGT	NGS	9/80
	NST	NVS	NRI/V	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS	56/80

3 讨论

H9N2 亚型 AIV 在世界范围内广泛分布，在遗传进化上，可以分为北美系和欧亚系两大分支，而欧亚系又进一步衍生出以 BJ/94-like 或 Y280-like、G1-like、Y439-like 以及 F/98-like 等为代表的病毒亚群^[4]。根据新的亚系命名系统，我国 H9N2 亚型 AIV 分离毒株主要来源于 H9.4.2 分支，而 4.2 分支又演化为 4.2.1~4.2.6 分支。本次分离到的 80 株 H9N2 亚型 AIV 毒株均属于 H9.4.2.5 分支的独立 (Y4) 亚群。

本研究分析了2013—2018年分离得到的80株H9N2亚型AIV的HA基因序列,发现这80株HA基因的裂解位点序列大多为PSRSSR,与参考毒株Y280不同,其第2位氨基酸残基由非极性氨基酸(A)突变为极性氨基酸(S)。氨基酸序列分析发现,这80株病毒在HA裂解位点序列的第5位氨基酸残基均为S,由AGT编码,如果发生A替换T/C,该位点的S就会变为R,那么这些毒株就会变为高致病性病毒株,因而具有潜在毒力增强的风险。

毒株的潜在糖基化位点也是影响毒株毒力的关键位点之一。在本研究分离的80株毒株中,2013—2014年有4株含有8个潜在糖基化位点,与F98、Y280等参考毒株相比多出了295NCS这一潜在糖基化位点,有9株含有6个潜在糖基化位点,与F98、Y280等参考毒株相比消失的潜在糖基化位点是200NRT,而其余分离株,特别是2015年以后的毒株,在第203位氨基酸大多发生了T→I/V的变化,导致了第200位糖基化位点逐渐缺失,第297位氨基酸发生了P→S的变化,使得295位多出了一个潜在的糖基化位点NCS。新的糖基化位点的出现或者原有糖基化位点的缺失均有可能通过改变受体结合位点和HA蛋白的抗原性来感染新宿主。

目前灭活疫苗免疫仍是防控H9N2亚型禽流

感的主要方法。该方法虽然起到了一定的防控作用,但由于疫苗的长期使用,导致免疫压力持续存在,使得H9N2亚型AIV可能会不断重组和变异^[5]。因此,疫苗株的选择一定要与现场流行毒株匹配,否则就起不到理想的保护作用。为及时了解 and 掌握H9N2亚型AIV的流行动态及变异情况,必须做好病毒的长期跟踪监测工作,这样可以根据病毒的流行和变异情况,及时研发有效的针对性疫苗,确保H9N2亚型AIV的防控效果。

参考文献:

- [1] WEBSTER R G, ROTT R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin[J]. Cell, 1987, 50: 665-666.
- [2] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [3] JACKWOOD M W, STALLKNECHT D E. Molecular epidemiologic studies on North American H9 avian influenza virus isolates from waterfowl and shorebirds[J]. Avian disease, 2007, 51 (1): 448-450.
- [4] 张凯. H9N2亚型禽流感的流行病学调查及H9N2亚型禽流感病毒对番鸭致病性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [5] 孙文琪. 2014—2016年华东地区H9N2亚型禽流感病毒遗传进化分析及气溶胶传播特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.

(责任编辑: 朱迪国)