

H9N2 亚型禽流感病毒厦门分离株 全基因组的分子生物学特性

蔡振鸿¹, 陈琼², 赵冉², 孔繁德³, 程小文⁴

(1. 厦门市思明区市政管理中心, 福建厦门 361005;

2. 厦门市动物疫病预防控制中心, 福建厦门 361009;

3. 厦门出入境检验检疫局, 福建厦门 361026;

4. 厦门市动物卫生监督所, 福建厦门 361000)

摘要: 为了解厦门市 H9N2 亚型禽流感病毒的分子生物学特性, 从而为科学防控禽流感提供依据, 对 2015 年的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒厦门分离株 (A/chicken/Xiamen/09/2015 分离自活禽交易市场、A/chicken/Xiamen/10/2015 分离自某养殖场) 进行全基因组序列扩增、测定及分子生物学分析。结果显示: 2 株分离株的 8 个基因片段来自 3 个不同亚群; M、NP 基因与安徽、江西、江苏 (泰州) H7N9 亚型禽流感分离株高度同源; 6 个基因出现毒力增强, 以及与耐药性、哺乳动物嗜性相关的突变。研究结果提示, H9 亚型与 H7 亚型流感病毒间存在基因重组风险, H9N2 亚型禽流感病毒的流行会对公共卫生产生潜在安全隐患。

关键词: 禽流感病毒; H9N2 亚型; 全基因组测定; 序列分析

中图分类号: S852.65 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X (2018) 08-0069-08

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.019

Analysis on Molecular Biological Characteristics of the Whole Genome of H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses from Xiamen City of Fujian Province

Cai Zhenhong¹, Chen Qiong², Zhao Ran², Kong Fande³, Cheng Xiaowen⁴

(1. Siming District Public Facilities Management Center, Xiamen, Fujian 361005, China;

2. Xiamen Animal Disease Prevention and Control Center, Xiamen, Fujian 361009, China;

3. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361026, China;

4. Xiamen Animal Health Supervision Institution, Xiamen, Fujian 361000, China)

Abstract: In order to recognize the molecular biological characteristics of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) and provide scientific basis for AI prevention and control in the future, some study consisting of whole genome amplification, sequencing and molecular biological analysis were carried out towards two H9N2 influenza strains isolated from Xiamen City (A/chicken/Xiamen/09/2015 was from a live poultry market, A/chicken/Xiamen/10/2015 was from a poultry farm). Results showed that the 8 gene fragments of the two isolates came from 3 different subgroups. The M and NP gene of Xiamen isolates were highly homologous to H7N9 strains isolated from Anhui, Jiangxi and Jiangsu (Taizhou) Provinces, 6 genes of Xiamen isolates showed enhanced virulence and other mutations related to drug resistance and mammalian tropism. According to the study results, there was genetic recombination risk between H9 and H7 subtype influenza virus, and the prevalence of H9N2 subtype AIV posed a potential safety hazard to public health.

Key words: avian influenza virus; H9N2 subtype; whole genome sequencing; sequence analysis

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20174050)

通信作者: 赵冉

H9N2 亚型禽流感病毒属于低致病性甲型流感病毒, 于 20 世纪 90 年代初传入我国, 已在家禽中建立了稳定的传播种系, 主要引起感染家禽低死亡率、轻度呼吸道症状及产蛋率减少等症状, 并不造成家禽大面积死亡。近年来流行病学调查发现, H9N2 亚型禽流感病毒分布广泛, 已成为我国家禽感染的主要亚型之一。不仅如此, H9N2 亚型禽流感病毒流行株已突破宿主种间屏障, 可感染哺乳动物, 甚至人。早在 1998—1999 年, 我国香港、广州等地就有 4 人感染 H9N2 亚型禽流感病毒报道。H9N2 亚型禽流感病毒在流感病毒的进化、跨宿主感染、致病性及耐药性方面起着至关重要的作用, 可为高致病性流感病毒提供内部基因。1997 年香港感染人的 H5N1, 2013 年内陆地区感染人的 H7N9、2014 年感染人的 H10N8 等亚型流感病毒, 均有部分内部基因来源于 H9N2 亚型禽流感病毒^[1-3]。

尽管目前并没有 H9N2 亚型禽流感病毒人传染人的报道, 但此病毒的分布和宿主范围较广, 病毒流行率高、变异和进化速度快, 加之我国家禽饲养方式复杂, 家禽与人群接触密切, 发生病毒交叉感染的概率非常高, 存在演变进化成导致大流行的新型流感病毒潜能。因此, 本研究在对厦门市 H9N2 亚型禽流感病毒流行病学调查的基础上, 选取 2 株 2015 年禽源分离株进行全基因测序, 分析其遗传进化特点、关键基因位点变异情况, 旨在进一步了解当地 H9N2 亚型禽流感病毒流行株毒力特点, 为今后科学防控禽流感提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和鸡胚

核酸提取试剂盒(磁珠法): 购自 ABI 公司; HA、H5、H7、H9 荧光 RT-PCR 试剂盒: 购自深圳市匹基生物工程有限公司; One Step RT-PCR Kit: 购自宝生物(大连)工程公司; SPF 鸡胚: 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司; 特异性引物: 宝生物(大连)工程公司合成。

1.2 病毒分离鉴定

采集新鲜的咽喉及泄殖腔棉拭子, 用磁珠法

提取病毒基因组 RNA; 采用荧光 RT-PCR 进行 HA、H5、H7、H9 等亚型的筛查, 将 H9 阳性样品用滤膜法过滤除菌后, 接种 10~11 日龄鸡胚尿囊腔, 72 h 后收获鸡胚尿囊液; 用荧光 RT-PCR 法再次进行 H9 亚型验证, 将确定为 H9 阳性的毒株保存备用。

1.3 病毒全基因扩增及测序

应用 One Step RT-PCR Kit 试剂盒的反应体系, 对病毒全基因序列的不同片段分别进行扩增, 利用琼脂糖凝胶电泳确定扩增产物条带大小。阳性扩增产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 基因组序列同源性及关键氨基酸位点分析

用 Lasergene Seqman 软件, 对测序结果进行序列拼接, 借助 Lasergene Meg Align 软件进行同源性及关键位点分析, 并与 H9N2 亚型禽流感代表毒株(A/chicken/Beijing/1994、A/duck/Hongkong/Y280/1997、A/duck/Hongkong/Y439/1997、A/quail/Hongkong/G1/1997、A/chicken/Shandong/6/1996、A/chicken/Shanghai/F/1998) 进行比对分析。

1.5 绘制系统发育树

借助 MEGA 5.2 分析软件, 确定毒株 8 个基因片段的遗传分类情况。

2 结果

2.1 分离毒株鉴定

分离出 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒: A/chicken/Xiamen/09/2015 来源于 2015 年 9 月厦门市活禽交易市场, A/chicken/Xiamen/10/2015 来源于 2015 年 10 月厦门市某养殖场, 宿主均为鸡。基因测序 HA 为 H9, NA 为 N2, 确定 2 株分离株均为 H9N2 亚型禽流感病毒, 全基因序列在 GenBank 的登录号为 MG204043-MG204058。

2.2 HA 关键氨基酸位点分析

2 株分离株 HA 开放阅读框序列大小均为 1 683 bp。分离株和 H9N2 亚型禽流感病毒代表株的 HA 蛋白裂解位点和受体结合位点变化见表 1, HA 潜在糖基化位点变化见表 2, 抗原位点与疫苗株之间的变化见表 3。HA 裂解位点为 PSRSSRGL, 均无多个连续的碱性氨基酸插入,

表1 HA裂解位点和受体结合位点的比较分析

毒株	裂解位点 333~338	受体结合位点 109、161、163、191、198、202、203	受体结合位点右侧缘 146~150位	受体结合位点左侧缘 232~237位
A/chicken/Beijing/1994	PARSSR	YWTNVLY	GTSKA	NGQQGR
A/duck/Hongkong/Y280/1997	PARSSR	YWTNTLY	GTSKA	NGLQGR
A/duck/Hongkong/Y439/1997	PAASNR	YWTHELY	GTSRA	NDQQGR
A/quail/Hongkong/G1/1997	PARSSR	YWTHELY	GISRA	NDLQGR
A/chicken/Shandong/6/1996	PARSSR	YWTNLY	GTSKA	NGQQGR
A/chicken/Shanghai/F/1998	PARSSR	YWTNLY	GTSKA	NGQQGR
A/chicken/Xiamen/09/2015	PSRSSR	YWTNTLY	GTSTA	NGLMGR
A/chicken/Xiamen/10/2015	PSRSSR	YWTNTLY	GTSTA	NGLMGR

表2 HA潜在糖基化位点的比较分析

毒株	潜在糖基化位点									
	29	105	141	206	218	298	305	313	492	551
A/chicken/Beijing/1994	NST		NVT		NRT	NTT	NVS		NGT	NGS
A/duck/Hongkong/Y280/1997	NST		NVS		NRT	NTT	NVS		NGT	NGS
A/duck/Hongkong/Y439/1997	NST		NVT		NRT	NTT	NVS		NGT	NGS
A/quail/Hongkong/G1/1997	NST	NGT	NVT	NDT	NRT	NST	NIS		NGT	NGS
A/chicken/Shandong/6/1996	NST		NVS		NRT	NTT	NVS		NGT	NGS
A/chicken/Shanghai/F/1998	NST		NVS		NRT	NTT	NVS		NGT	NGS
A/chicken/Xiamen/09/2015	NST		NVS			NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
A/chicken/Xiamen/10/2015	NST		NVS			NTT	NVS	NCS	NGT	NGS

符合低致病性禽流感特征；裂解位点的第2位氨基酸由非极性氨基酸A突变成极性氨基酸S。分离株受体结合位点为109、161、163、191、198、202、203，氨基酸序列为YWTNTLY，第198位氨基酸突变为T，与A/duck/Hongkong/Y280/1997一致。受体结合位点右侧缘146~150位氨基酸序列为GTSTA，第149位氨基酸突变为T；左侧缘232~237位氨基酸序列为NGLMGR，第235位氨基酸突变为M。第234位氨基酸（相当于H3第226位氨基酸）由Q突变为L，具有和人流感受体唾液酸- α 2,6-半乳糖(SA α 2,6Gal)受体结合的特性。2株分离株均有7个潜在糖基化位点，位于29、141、298、305、313、492、551，依次为NST、NVS、NTT、NVS、NCS、NGT、NGS，与疫苗株F/98比较增加313位点，与BJ/94比较缺失218位点，增加313位点。分离株与目前疫苗株的抗原位点比较发现，7个抗原位点中3个发生突变，位于第216、267、316位点（表3）。

2.3 NA关键氨基酸位点分析

2株分离株NA序列为1401 bp，编码467个氨基酸，颈部均缺失9个碱基，分别编码63、64、65位氨基酸T、E、I（表4）。2株分离株糖基化位点存在2个位点的差异，分离株A/chicken/

表3 HA抗原位点的分析

毒株	抗原位点						
	181 (163)	234 (216)	280 (262)	281 (263)	285 (267)	296 (278)	334 (316)
A/chicken/Shandong/6/1996	G	Q	D	L	N	G	A
A/chicken/Shanghai/F/1998	G	Q	D	L	N	G	A
A/chicken/Xiamen/09/2015	G	L	D	L	S	G	S
A/chicken/Xiamen/10/2015	G	L	D	L	S	G	S

表4 NA的HB位点及颈部缺失情况比较分析

毒株	唾液酸吸附位点(HB)		颈部缺失 63~65
	366~373	399~404	
A/chicken/Beijing/1994	IKKDSRSG	DSDNWS	
A/duck/Hongkong/Y280/1997	IKEDSRSG	DSDNWS	缺失
A/duck/Hongkong/Y439/1997	ISKDSRSG	DNNNWS	
A/quail/Hongkong/G1/1997	IKKDSRSG	DSDIRS	
A/chicken/Shandong/6/1996	IKEDTRSG	DSDNWS	缺失
A/chicken/Shanghai/F/1998	IKKDSRSG	DSDNWS	缺失
A/chicken/Xiamen/09/2015	IKNGSRSG	DSDDWS	缺失
A/chicken/Xiamen/10/2015	IKNGSRSG	DSDDWS	缺失

Xiamen/09/2015有6个糖基化位点；分离株A/chicken/Xiamen/10/2015有8个糖基化位点，后者比前者多出70和264两个糖基化位点，与BJ/94比较均缺失61和402位点、增加368位点（表5）。

表 5 NA 潜在糖基化位点的比较分析

毒株	潜在糖基化位点											
	61	69	70	86	146	200	234	264	306	368	402	
A/chichen/Beijing/1994	NIT	NST		NWS	NGT	NAT	NGT					NWS
A/duck/Hongkong/Y280/1997		NST		NWS	NGT	NAT	NGT					NWS
A/duck/Hongkong/Y439/1997	NIT	NNT	NTT	NWS	NGT	NAT	NGT		NMT			NWS
A/quai/Hongkong/G1/1997	NIT	NNT	NTT	NWS	NGT	NAT	NGT					NRS
A/chicken/Shandong/6/1996		NST		NWS	NGT	NAT	NGT					NWS
A/chicken/Shanghai/F/1998		NST		NWS	NGT	NAT	NGT					NWS
A/chicken/Xiamen/09/2015		NST		NWS	NGT	NAT	NGT					NGS
A/chicken/Xiamen/10/2015		NNT	NTT	NWS	NGT	NAT	NGT	NIS				NGS

HB 位点 366~373 序列为 IKNGSRSG, 399~404 序列 DSDDWS, 与几株经典株比较, 在第 368、369、402 位点均发生突变, 而 368、402 两个糖基化位点的变化刚好在结合位点上, 推测与毒力相关。

2.4 聚合酶复合体关键氨基酸位点分析

2.4.1 分离株 PB2 序列大小为 2 280 bp, 编码 760 个氨基酸。2 株分离株 PB2 中, 与毒力相关的 627、701、475、253、591、714 位点氨基酸无差异, 依次为 E、D、L、D、Q、S。这些位点与疫苗株 SH/F98 相同, 与 BJ/94 比较, 在 591 位点发生由 D 到 Q 的突变。

2.4.2 分离株 PB1 序列大小为 2 274 bp, 编码 757 个氨基酸, 没有碱基缺失。与毒力相关的第 13、113、198、317、678 位点依次为 P、I、K、M、I。这些位点与疫苗株 SH/F98 相同, 与 BJ/94 比较, 在 113 位点发生由 V 到 I 的突变, 317 位点发生由 V 到 M 的突变。

2.4.3 分离株 PA 序列大小为 2 151 bp, 编码 717 个氨基酸。A/chicken/Xiamen/09/2015 的第 20、55、100、225、268、85、186、336 位点依次为 A、D、V、S、L、T、G、L。这些关键位点与 SH/F98 株相同; A/chicken/Xiamen/10/2015 第 20、55、100、225、268、85、186、336 位点依次为 A、D、A、S、L、T、G、L, 第 100 位点发生 V 到 A 的突变。

2.5 NP 关键氨基酸位点分析

分离株的 NP 序列大小为 1 497 bp, 编码 498

个氨基酸, 无插入或缺失变异, 仅发生个别点突变。2 株分离株与毒力相关的第 184、319 位点分别为 N、N。这些位点与疫苗株和 4 株标准株比较, 未发生突变。

2.6 基质蛋白 M 关键氨基酸位点分析

分离株 M 序列大小为 982 bp, 编码区由 M1、M2 组成, M1 编码 252 个氨基酸 (碱基序列 1~759), M2 编码 97 个氨基酸 (碱基序列 1~26 和 715~982)。2 株分离株 M2 中与耐药性相关的第 27、30、31、37、41、43 依次为 V、A、N、

H、W、L, 第 31 位由 S 突变为 N; 与宿主特异性相关的第 11、14、16、20、57 位氨基酸依次为 T、G、E、S、Y, 与标准株 BJ/94 比较第 16 位氨基酸 G 均突变为 E。分离株 M1 中与毒力相关第 30 位和第 215 位氨基酸分别为 30D 和 215A。

2.7 非结构蛋白 NS 关键氨基酸位点分析

分离株 NS 序列为 838 bp, 其中 NS1 编码 217 个氨基酸 (碱基序列 1~654), NS2 编码 121 个氨基酸 (碱基序列 1~27 和 500~838)。NS1 蛋白具有两个比较重要的功能区, 其中的一个功能区位于分子的羧基端, 与香港和国外的绝大部分 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 (230 个氨基酸) 比较, 分离株羧基端缺失 13 个氨基酸, 羧基端基序为 LSTK, 明显不同于高致病性基序 ESEV/EPEV 和低致病性人源基序 RSKV。2 株分离株与毒力相关的第 39、42、70、71、86、92、149 位点依次为 D、S、E、E、A、D、A, 两株间无差异, 与 BJ/94 及疫苗株比较, 未见突变, 分离株 80~84 处氨基酸未见缺失, 184~188 序列为 GFEWN, 符合当前国内鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒毒株的典型特征。值得注意的是标准株 G1 在第 92 位为 E, 第 185 位为 L, 这两个关键位点与其他标准株、疫苗株及分离株不同。

2.8 遗传演化分析

2 株 H9N2 亚型禽流感病毒厦门分离株各基因系统进化树见图 1。HA 基因属于 Y280 亚群, NA、NP、NS、PA、PB1 基因属于 F/98 亚群, M、

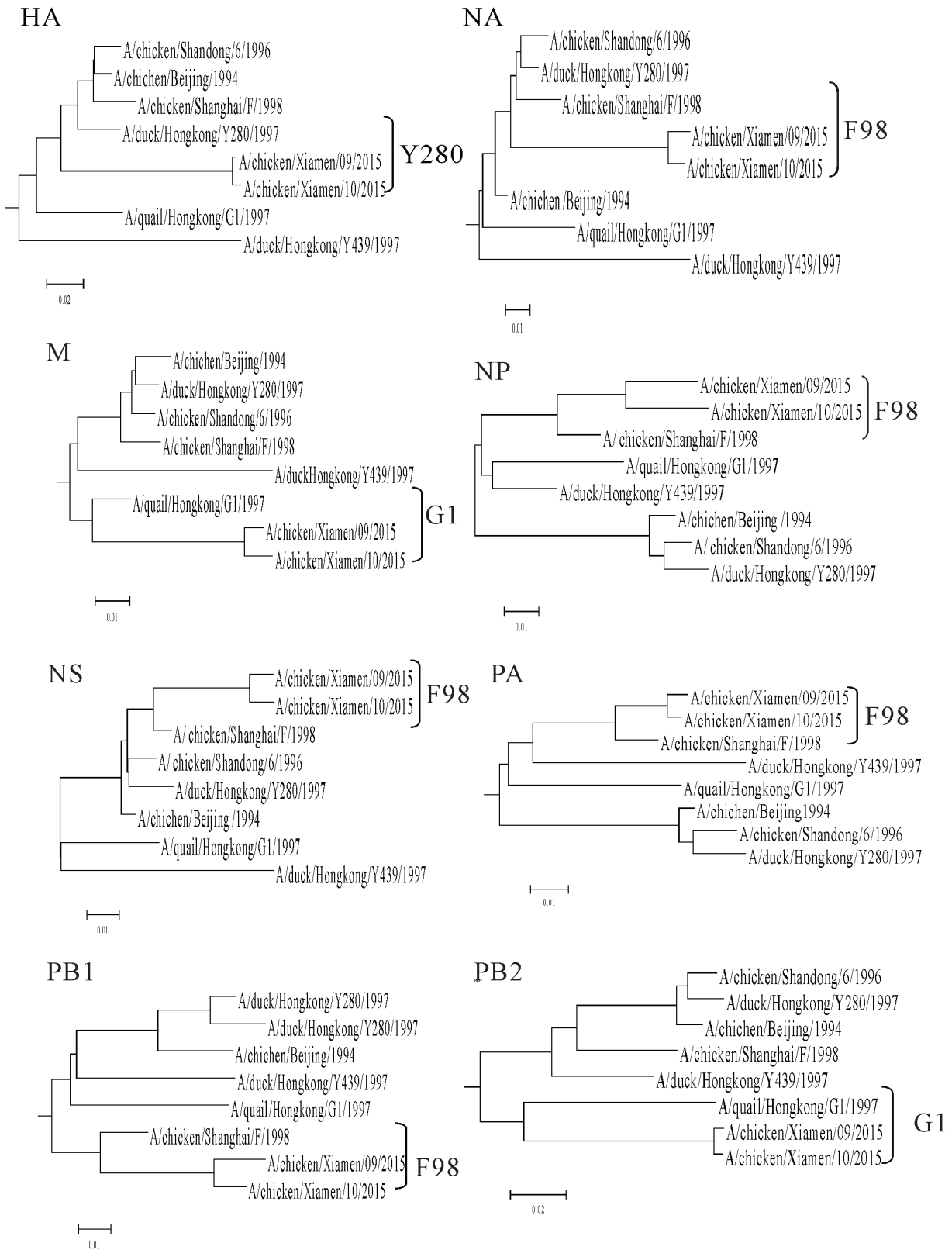


图1 两株H9N2亚型禽流感病毒厦门分离株各基因系统进化树

PB2 基因属于 G1 亚群, 2 株分离株来自 3 个不同亚群(表 6)。A/chicken/Xiamen/09/2015 与疫苗株 SD/96 和 F/98 的遗传距离为 13.1% 和 11.7%, A/chicken/Xiamen/10/2015 与疫苗株 SD/96 和 F/98 的遗传距离为 13% 和 11.7%。2 株分离株之间的同源性为 HA 99.4%、NA 98.5%、M 98.7%、NP 95.7%、NS 98.6%、PA 99.1%、PB1 97.5%、PB2 99.4%。分离株与 GenBank 上序列比对发现, 不仅与近几年的 H9N2 亚型禽流感病毒分离株高度同源, 部分内部基因还与高致病性 H7N9 亚型流感病毒高度同源。其中 A/chicken/Xiamen/09/2015 的 M 基因与 A/chicken/Jiangxi/18449/2014 (H7N9) 同源性高达 99.7%; 分离株 A/chicken/Xiamen/10/2015 NP 基因与 A/chicken/Anhui/1-YK_RG202/2013 (H7N9) 同源性高达 99%, M 基因与 A/chicken/Taizhou/TZJF02/2015 (H7N9) 同源性高达 99.8%。

表 6 分离株的基因分型

毒株	HA	NA	M	NP	NS	PA	PB1	PB2
A/chicken/Xiamen/09/2015	Y280	F/98	G1	F/98	F/98	F/98	F/98	G1
A/chicken/Xiamen/10/2015	Y280	F/98	G1	F/98	F/98	F/98	F/98	G1

3 讨论与结论

2 株 H9N2 亚型禽流感病毒厦门分离株 HA 受体结合位点左侧缘均发生 Q234 L 的突变, 使其具有与哺乳动物唾液酸 $\alpha 2-6$ 受体结合的能力, 具有向人类感染的嗜性; 受体结合位点第 198 位、右侧缘第 149 位、左侧缘第 235 位均发生 T、T、M 的突变, 未见相关报道, 生物学特性有待进一步研究; 裂解位点为 PSRSSRGL, 符合近几年主要流行的 H9 低致病性禽流感毒株特征; 分离株 218 处糖基化位点缺失, 同时出现 234L、235M 突变, 值得关注; 与目前疫苗株相比, 7 个抗原位点中已有 3 个发生突变(位于第 216、267、316 位), 可能会导致目前使用的 H9N2 亚型禽流感病毒疫苗免疫失败。

NA 潜在糖基化位点比较发现, NA 第 69、86、146、200、234 位相对保守, 61、70、155、264、306、368 易发生突变。分离株 A/

chicken/Xiamen/10/2015 比分离株 A/chicken/Xiamen/09/2015 多 2 个糖基化位点, 分别位于第 70、264 位。2 株分离株与表 5 中另外 6 株标准株比较, 糖基化位点均多出 368 位点, 在 402 位点均存在缺失, 唾液酸结合位点 HB 的第 368、369、402 位点突变为 N、G、D, 而 368、402 两个糖基化位点的变化刚好在结合位点上, 推测与这种突变与病毒毒力相关, 有待进一步证实。

2 株分离株 PB2 序列相对保守, 毒力相关位点未见突变, 仍为低致病性禽源病毒特征。PB1 蛋白 L13P、S678N 位点突变能够促进聚合酶亚单位与 NP 蛋白在新宿主环境中的相互作用, 通过对聚合酶活性的调控来影响流感病毒对哺乳类动物的致病性^[4]。R198K、M317I 位点的变异可以提高对小鼠的致病力^[5]。两株分离株均存在 L13P、R198K 的突变, 推测可能对哺乳动物具有感染力。PA 蛋白的 V100A 突变被认为具有人流感病毒及高致病力特征^[6]。A/chicken/Xiamen/10/2015 株发生 V100A 突变, 可能存在毒力增强的趋势。

两株分离株 M1 具有 30D、215A 位点, 这两个位点可增加其对小鼠的致病力^[7]。M2 的 V27A、A30T 和 S31N 位点的变异, 可导致流感病毒对金刚烷胺类药物产生耐药性^[12-13]。两株分离株 M2 第 31 位氨基酸 S 均突变为 N, 提示分离株已对金刚烷胺产生耐药性。与宿主特异性相关的第 11、14、16、20、57 位氨基酸与疫苗株和标准株比较, 在第 16 位发生 G 到 E 的突变。可见两株分离株的毒力、耐药性和宿主特异性开始发生变化。

NS1 蛋白 PL 基序 ESEV/EPEV 可作为区别高致病性和低致病性流感病毒的标志之一^[11]。NS1 氨基酸突变、特殊片段缺失会引起病毒毒力增强, 如 H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白的 P42S 突变, 可增加病毒对小鼠的致病力。D92E、A149V 突变可提高病毒对干扰素的抗性, 表现高致病性特征^[8]。263~277 位的缺失提高了病毒对鸡的致病力^[9]。D92E 以及 80~84 位氨基酸残基的缺失, 能增强病毒毒力或提高对细胞因子的抗性, 是对哺乳动物高致病性的一个明显特征^[10]。本试验的 2 株分离株与

目前国内绝大多数分离株一样,仅有217个氨基酸,C末端缺失高致病性PL基序(ESEV/EPEV)。分离株上述几个关键位点均未发生高致病性突变,第39、70、71和86位氨基酸序列表现为低致病性分子特征。

2株分离株除PB2和NS两个片段序列高度保守,仍表现为低致病性特征外,其余6个片段中与毒力、宿主特异性、耐药性相关的位点均存在不同程度的突变,可见从厦门市分离的这2株毒株,已经出现毒力增强、耐药及感染哺乳动物倾向的进化。遗传进化分析发现,2株分离株均为三重重组体,内部基因M与NP与2013—2015年安徽、江西、江苏(泰州)鸡群中分离的H7N9亚型禽流感病毒高度同源,提示H9亚型与H7亚型流感病毒间存在基因重组风险,H9N2亚型禽流感病毒的流行将对公共卫生产生潜在的安全隐患。

综上所述,加大H9N2等弱毒株与高致病性禽流感病毒毒力相关亚型流感病毒的监测和研究,对禽流感防控十分必要,同时具有重要的公共卫生意义。

参考文献:

- [1] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "inter-nal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the USA, 1999, 96 (16): 9363-9367.
- [2] KAGEYAMA T, FUJISAKI S. Genetic analysis of novel avian A (H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 [J]. Euro surveill, 2013, 18 (15): 20453.
- [3] QI W B. Genesis of the novel human-infecting influenza A (H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China [J]. Euro surveillance, 2014, 19 (25): 1-13.
- [4] GABRIEL G, DAUBER B, WOLFF T, et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the USA, 2005, 102: 18590-18595.
- [5] KATZ J M, LU X H, TUMPEY T M, et al. Molecular correlates of influenza AH5N1 virus pathogenesis in mice[J]. Journal of virology, 2000, 74 (22): 10807-10810.
- [6] JAKHESARA S J, BHATT V D, PATEL N V, et al. Isolation and characterization of H9N2 influenza virus isolates from poultry respiratory disease outbreak[J]. Springer plus, 2014, 3 (1): 1-8.
- [7] FAN S, G DENG, J SONG, et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice[J]. Virology, 2009, 384: 28-32.
- [8] LI Z, JIANGY, JIAO P, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses[J]. Journal of virology, 2006, 80: 11115-11123.
- [9] 龙进学, 薛峰, 彭宜, 等. H5N1亚型禽流感病毒NS第263-277位核苷酸缺失提高病毒对鸡的致病力[J]. 微生物学报, 2006, 46 (2): 301-305.
- [10] LONG J X, PENG D X, LIU Y L, et al. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene[J]. Virus genes, 2008, 36 (3): 471-478.
- [11] WANG S, SHI W M, MWEENE A, et al. Genetic analysis of the nonstructural (NS) genes of H9N2 chicken influenza viruses isolated in China during 1998—2002[J]. Virus genes, 2005, 31: 329-335.
- [12] HAYDEN F G. Amantadine and rimantadine-clinical aspects[M]. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1996: 59-77.
- [13] YAVARIAN J, AZAD T M, ZHENG X, et al. Amantadine resistance in relation to the evolution of influenza A (H3N2) viruses in Iran[J]. Antiviral research, 2010, 88 (2): 193-196.

(责任编辑: 朱迪国)