

临床健康鸟,从样品中检测到了 H1 ~ H16 血清亚型,进一步证实了野鸟可以携带或感染 AIV 但不发病,对野鸟迁徙沿途的生态环境和养殖环境构成一定的威胁。本次调查证实了新疆野鸟血清样品中的 H5 平均阳性率为 7.79%,2010 年高达 14.29%;在 2010 年检测出 H7 亚型(8.33%)。众所周知,H5 和 H7 亚型是属于高致病性禽流感的范畴,若没有任何症状或病情的野鸟携带 AIV,尤其是高致病性 AIV 无疑将对新疆地区家禽养殖环境构成潜在的威胁和隐患。此次研究结果警示我们对环境中的野生鸟类持续地进行 AI 的监测对疫情的预警和预报具有十分重要的意义。

## 参考文献

- [1] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, et al. Waldenstrom J, Osterhaus A, Fouchier RAM. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. (2006) Science 312: 384-388.
- [2] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992;56:152 - 179. [PMC free article] [PubMed]
- [3] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, et al. Global patterns of influenza a virus in wild birds. Science. 2006;312:384 - 388. [PubMed]
- [4] Vincent J Munster, Chantal Baas, Pascal Lexmond, et al. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. PLoS Pathog. 2007 May; 3(5): e61.

## 一株野生灰雁禽流感 H9 亚型病毒全基因序列测定与分析

成进<sup>1\*</sup>,沙依兰古丽<sup>1</sup>,夏俊<sup>2</sup>,孟春<sup>1</sup>,汪萍<sup>1</sup>,陆桂丽<sup>1</sup>,廖明<sup>2\*</sup>,任涛<sup>2</sup>,史军<sup>2</sup>

(1. 新疆畜牧科学院兽医研究所,乌鲁木齐 830000;2. 中国华南农业大学,广东 广州天河区 510642;

3. 新疆维吾尔自治区野生动物疫源疫病监测站,乌鲁木齐 830063;)

禽流感病毒(AIV)可感染许多物种,但野生鸟类是在自然界中禽流感病毒的储存库。研究证实<sup>[1,2]</sup>,在野生禽类体内实际存在所有已知的 A 型流感病毒抗原亚型,即 HA 和 NA 表面抗原的组合。这些病毒在自然环境中可发生遗传重组,这可能是病毒在水禽之间以及其他可感染的动物之间有效传播的重要因素。这种野生贮存宿主对流感的生态学起着重要的作用<sup>[3]</sup>。

2005 年,中国的青海湖大量的野生鸟类感染了 H5N1 的高致病性禽流感病毒(High pathogenic avian influenza virus, HPAIV)并死亡<sup>[4]</sup>。对新疆 2005 年 HPAIV 疫情进行调查分析认为其疫情与野生鸟类的生态环境有关<sup>[5]</sup>。本文就分离自新疆野生灰雁的 AIV 分离株 A/Grey goose/XJBZH/1/09(H9N2)进行了全基因克隆和序列检测,旨在对该毒株全基因的变异及演化进行研究与分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验所用毒株为分离自新疆博斯腾湖野生

灰雁毒株 A/Grey goose/XJAKS/1/08(H9N2)。E. coli 感受态细胞 DH5 $\alpha$  由本研究室自备。RT-PCR 相关试剂、PGEM-T 载体、RT-PCR 试剂盒、IPTG、X-gal、E<sub>x</sub> Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 EcoR I 和 DNA Marker DL2000 均为宝生物工程(大连)有限公司产品。克隆载体 PGEM-T 载体为 Promega 公司产品。DNA 胶回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒为 Promega 公司产品;引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法根据 AIV H9 亚型不同片段基因的序列,对每个片段设计两对特异性引物,对目的基因进行克隆测序,利用 DNASTAR 软件将 AIV 毒株 A/Grey goose/XJBZH/1/09(H9N2)的 8 个基因的核苷酸序列与国内外不同动物和人源的禽流感参考毒株进行同源性比较分析和分子遗传进化分析。

### 2 结果与分析

本文成功扩增和克隆了 AIV 毒株 A/Grey goose/XJBZH/1/08(H9N2)的 HA、NA、NS、M、NP、PB1、PB2 和 PA 等基因片段。同源率分析表明,A/Grey goose/XJBZH/1/09(H9N2)株 HA 基因与分离自新疆鸡源的 A/Chicken/Xinjiang/01/2010

作者简介:成进(1956-),女,研究员,主要从事预防兽医学研究

\* 通讯作者

(H9N2)具有极高的同源性(99.3%),与其他家禽的参考毒株也有较高的同源性,显示出该毒株与家禽H9亚型禽流感病毒的密切关联性。该毒株HA和NA基因与A/pigeon/HongKong/WF53/03(H9N2)株有很高的同源性,同源率分别为91.5%和91.1%,与其他鸟类参考毒株的同源性很低,显示出很大差异。该毒株HA基因与所选人源参考毒株同源率很低,NA基因则与H9亚型的A/Shanguan/408/98(H9N2)株的同源率高,为93.8%。该毒株的M、NP、PA和PB2等基因与所选不同动物源的全部参考毒株同源率均很低。

值得注意的是,A/Grey goose/XJBZH/1/09(H9N2)株的HA、NA、NS、PB1等基因与A/swine/Yangzhou/1/2008(H9N2)株具有极高的同源率(分别为97.5%、97.8%、96.9%和97.5%),表明该毒株的这4个片段与猪源AIV发生了重组或重排。

系统进化分析表明,该毒株属于欧亚种系,且位于Y280-like亚群。值得一提的是该毒株PB1基因则与不同亚型和不同动物来源的毒株均具有很高的同源性 and 密切的亲缘关系,尤其是与H5亚型的人源毒株A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)也具有高同源率(91.1%),显示出该基因片段进化的复杂性,提示该毒株的PB1基因很可能是流感病毒在自然界通过不同宿主动物的感染与传递导致该基因发生互换或重组,在进化上与不同亚型病毒形成不

同片段混杂重组的状态。

由于该分离自野生灰雁的A/Grey goose/XJBZH/1/09(H9N2)株NA基因与人源毒株A/Shanguan/408/98(H9N2)的同源率很高(93.1%),PB1基因则与H5亚型的人源毒株A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)具有高同源率(91.1%),而H9亚型的禽流感病毒又是导致家禽严重经济损失的疫病,因此,对野鸟禽流感H9亚型病毒的遗传进化研究以及对家禽养殖业和人类健康的影响都应引起高度重视。

#### 参考文献

- [1] Hinshaw, V. S. and R. G. Webster. 1982. The natural history of influenza A viruses. In A. S. Beare (ed.). Basic and Applied Influenza Research. CRC Press. Inc., Boca Raton, FL., 79-104.
- [2] Hinshaw, V. S., R. G. Webster, R. G. Rodriguez. 1981. Influenza Viruses; Combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animal and other sources. Arch Virol 67: 191-201.
- [3] B. W. 卡尔尼克主编 禽病学(第十版). 北京: 中国农业出版社, 1999, 742-771.
- [4] Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. Nature. 2005; 436: 191-192. [PubMed].
- [5] 成进, 盛卓君, 巴格德力等, 新疆高致病性禽流感流行病学调查与疫源分析[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(12): 38-40.

## 2009年~2011年中国南方H4亚型禽流感病毒生物学特性研究

张文亮, 张曦, 朱占松, 谭丹, 崔鹏飞, 施建忠, 邓国华\*, 陈化兰

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 农业部动物流感重点开放实验室/兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

我国南方地区一直以来是禽流感的易发地, 目前该区域已分离到的禽流感病毒除高致病性禽流感(HPAIV)外, 也存在多种低致病性禽流感(LPAIV)并存现象, 尤其是近年来H6和H9等LPAIV呈现广泛流行态势。2009年以来, 在中国南方地区的正常禽流感疫情监测过程中分离到多株H4亚型禽流感病毒(AIV), 发现H4亚型禽流感病毒的分离率逐渐

提高。本研究对2009年至2011年间分离的55株病毒进行RNA提取、基因组扩增、序列分析、相关抗原性分析以及对小鼠的感染能力评估, 以了解我国当前南方地区H4亚型AIV的遗传进化关系, 抗原性关系, 遗传演化关系及评价该亚型毒株感染哺乳动物的能力。

14株病毒的抗原性分析表明, 这些H4亚型AIV分离株可大致分为4个抗原亚群, 亚群间抗原性差异显著, 表明我国不同地区分离的H4亚型AIV的抗原性差异较大。对55株病毒的表面基因

\* 通讯作者