

H9 亚型禽流感病毒的分离及初步鉴定

朱春华, 江 斌, 刘斌琼, 林 甦, 陈 珍, 黄 瑜

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 2011 年从福建省 2 个肉鸡场分离到 2 株病毒, 分别为 FZ-04 株和 FZ-11 株。血凝试验结果表明, 分离株尿囊液可凝集 1% 鸡红细胞。血凝抑制试验结果表明, 分离株尿囊液只被抗禽流感病毒 H9 亚型标准阳性血清特异性抑制。采用 RT-PCR 法对分离株 M 基因和 H9 亚型 HA 基因保守片段进行扩增, 分别扩增出 229 bp 和 732 bp 特异性目的片段。结果表明, 分离株为 A 型 H9 亚型禽流感病毒。HA 基因遗传进化分析结果表明, 分离株与代表株 CK/FJ/G9/09 亲缘关系最近, 属于国内常见的 CK/BJ/1/94 群系。

关键词: 禽流感病毒; 肉鸡; 分离

中图分类号:

文献标识码: A

Isolation and Preliminary Identification of H9 Subtype Influenza A Viruse

ZHU Chun-hua, JIANG Bin, LIU Bin-qiong; LIN Su; CHEN Zhen; HUANG Yu

(Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian
Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 2011 two strains (FZ-04 and FZ-11) were isolated respectively from two broiler farms in Fujian. Hemagglutination test results showed that the isolated allantoic fluid can induce 1% chicken erythrocytes agglutination. Hemagglutination inhibition test results showed that the isolates allantoic fluids were only inhibited by avian influenza virus subtype H9 standard serum specifcily. Specified and conserved M (Matrix) gene and HA (Hemagglutinin) gene of H9 subtype were amplified by RT-PCR with the segment lengths of 229bp and 732bp respectively. The results indicated that the isolated strains were H9 subtype of influenza A virus. The phylogenetic analysis of HA genes showed that isolates and representative strains CK/FJ/G9/09 have a closest relationship, belonging to the major sublineage CK/BJ/1/94 in China.

Key words: avian influenza virus; broiler; isolation; identification

禽流感 (AI) 是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的禽类及其他鸟类的一种感染和/或疾病综合征^[1]。1966 年 Hommee 等从火鸡中分离到 H5N1 病毒 A/Turkey/Wisconsin/66 之后, H9 亚型的禽流感病毒也从许多国家的家禽和野生水禽中分离到^[2]。近年来 H9 亚型流感一直在国内多数地区家禽中流行^[3-5], 分离株的血凝素 (Hemagglutinin, HA) 基因抗原位点变异频繁^[6-7], 并且常与其他病原体并发和继发感染, 造成相当大的经济损失。目前种种迹象表明, H9 亚型的发病率和危害性日趋严重。

2011 年 1 月, 福建省福州市某 2 个肉鸡场出现疑似 H9 亚型禽流感的病例。2 个鸡场不同日龄

的鸡群均出现咳嗽等呼吸道症状, 病理剖检可见气管炎, 肿头等病变特征。经诊断, 初步鉴定为 H9 亚型禽流感病毒感染, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

禽流感 H9 亚型、H7 亚型和 H5 亚型标准阳性血清, 新城疫 (ND) 血清购自哈尔滨维科生物技术公司; SPF 鸡胚购自北京梅利亚实验动物有限公司; 减蛋综合征 (EDS) 病毒阳性血清、H9 亚型禽流感 A/chicken/Beijing/99 毒株由福建省农业科学院畜牧兽医研究所禽病室提供。

收稿日期: 2011-05-04 初稿; 2011-06-03 修改稿

作者简介: 朱春华 (1980—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物病毒学研究

通讯作者: 黄瑜 (1965—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2009N4001); 福建省农业科学院青年创新基金 (2009QB-15)

1.2 仪器和试剂

凝胶成像分析系统 (BIO-RAD)、PCR 仪 (Eppendorf 公司), Trizol 购自 Invitrogen。胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞自制。AMV 反转录酶、TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶和 pMD18-T 载体均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物设计

A 型流感特异性引物、H9 亚型特异引物均参照农业部 2007 年颁布的《高致病性禽流感防治技术规范》设计:

A 型流感型特异性引物

M-229U: 5'-TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3',

M-229L: 5'-AAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3',

产物大小为 229 bp;

H9 亚型扩增 HA 基因保守片段的特异性引物:

上游 5'-TCAACAACTCCACCGAACTGT-3',

下游 5'-TCCCCTAAGAACATGTCCATACCA -3',

产物大小为 732 bp。反转录引物序列为 5'-AGC AAAAGCAGG-3'。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.4 病毒分离

采集病鸡的气管、肺、肾组织于灭菌的玻璃研磨器匀浆, 用 PBS 配成 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的悬液, 冻融 2 次, $5\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌备用。

将处理好的病料组织悬液经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每枚 0.2 mL , 37°C 孵育, 剔除 24 h 内死亡的鸡胚, 每日观察 2 次, 无菌收集 48~96 h 的尿囊液, 连传 3 代, 无菌回收胚液, -30°C 保存备用。

1.5 病毒的血凝试验和血凝抑制试验

参考文献[8], 并按照 GB/T 18936-2003《高致病性禽流感诊断技术》对收集的尿囊液进行血凝试验和血凝抑制试验。

1.6 毒株 PCR 鉴定

将病毒尿囊液 $8\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取 $250\text{ }\mu\text{L}$ 上清与 $750\text{ }\mu\text{L}$ Trizol 混合, 再加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 预冷的氯仿, 充分混匀后, 冰浴 5 min; $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清, 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20°C 沉淀 1 h; $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 用 DEPC 处理的水重悬, -20°C 保存。用流感的反转录引物 Uni-12, 按照 AMV 反转酶说明书进行反转录合成 cDNA。PCR 扩增以 cDNA 为模板, 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, 反应体系

为: $10 \times \text{Bufer } 5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP mixture ($2.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4\text{ }\mu\text{L}$, Ex-Taq DNA polymerase $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 引物 ($20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1\text{ }\mu\text{L}$, 模板 cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $37.5\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件如下: 94°C 预变性 5 min, 按 94°C 30 s, 55°C 35 s, 72°C 2 min, 进行 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.7 HA 基因的遗传进化分析

将毒株 HA 基因 PCR 产物经切胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, PCR 方法鉴定重组质粒, 阳性质粒送大连宝生物公司测序。应用 DNASTAR 5.0 分析软件对测序基因序列与 GenBank 中下载的 H9 亚型流感病毒典型代表株、福建省不同时期分离的 H9 亚型流感毒株及国内 H5N1 代表株 GS/GD/1/96 进行核苷酸序列同源性分析。遗传进化分析所涉及的毒株见表 1。

2 结果与分析

2.1 病毒的血凝试验和血凝抑制试验

鸡胚接种分离到 2 株病毒, 血凝试验结果表明, FZ-04 和 FZ-11 尿囊液均可凝集 1% 鸡红细胞, 其血凝价分别为 $2^5 \sim 2^6$ 和 $2^7 \sim 2^8$ 。血凝抑制试验结果表明, 分离株病毒只被抗禽流感病毒 H9 亚型标准阳性血清特异性抑制, 血凝抑制效价均为 $8\log_2$, 不被抗 EDSV、NDV 和 H5、H7 亚型禽流感病毒标准阳性血清所抑制。

2.2 毒株 PCR 鉴定结果

RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析表明, A 型禽流感病毒特异性引物扩增 M 基因保守片段长度为 229 bp, HA 基因片段长度为 732 bp, 且分离株与阳性对照株 A/chicken/Beijing/99 扩增的产物大小产物相一致, 与预期的结果相符 (图 1), 进一步证实分离株为 H9 亚型禽流感病毒。

2.3 HA 基因的遗传进化分析

将分离株病毒扩增的 HA 基因保守片段与福建省早期分离株, 北美洲代表株 A/TK/WI/66, 欧亚代表株 A/CK/BJ/1/94、QA/HK/G1/97, 国内 H5N1 代表株 GS/GD/1/96 等毒株进行核苷酸同源性比较, 从系统发育树上结果可知 (图 2), 分离的 2 株病毒与国内 H5N1 代表株 GS/GD/1/96 亲缘关系最远, 与 2009 年福建分离株 CK/FJ/G9/09 处在同一进化分支上, 且同源性最高, 说明分离株与 CK/FJ/G9/09 株亲缘关系比较近。

表 1 本研究所涉及的毒株名称
Table 1 Viruses used in this study

毒株	亚型	登录号	缩写
A/Chicken/Hong Kong/G9/97	H9N2	AF156373	CK/HK/G9/97
A/ Chicken/Beijing/1/94	H9N2	AF156380	CK/BJ/1/94
A/chicken/Fujian/9104/2005	H9N2	CY023632	CK/FJ/9104/05
A/chicken/Fujian/9290/2005	H9N2	CY023640	CK/FJ/9290/05
A/chicken/Fujian/10954/2005	H9N2	CY023664	CK/FJ/10954/05
A/Chicken/Fujian/FB3 /2007	H9N2	FJ434575	CK/FJ/FB3/07
A/Chicken/Fujian/FG13/2007	H9N2	FJ434572	CK/FJ/FG13/07
A/chicken/Fujian/G9/2009	H9N2	JF715008	CK/FJ/G9/09
A/Chicken/Heilongjiang /35/00	H9N2	DQ064366	CK/HLJ/35/00
A/Duck/Hong Kong/Y439/97	H9N2	AF156377	DK/HK/Y439/97
A/turkey/Wisconsin/1/1966	H9N2	D90305	TK/WI/66
A/Quail/Hong Kong/G1/97	H9N2	AF156378	QA/HK/G1/97
A/Swine/Hong Kong/10/98	H9N2	AF222811	SW/HK/10/98
A/Goose/Guangdong/1/96	H5N1	AF144305	GS/GD/1/96

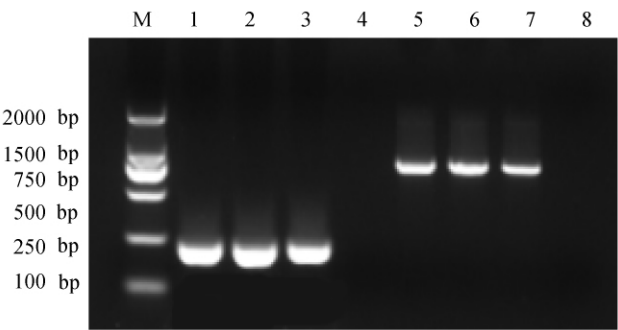


图 1 毒株 RT-PCR 鉴定
Fig 1 RT-PCR identification of the strains

注：M 为 DL2000；1、5 为 A/chicken/Beijing/99 株；2、6 为 FZ-04 株；3、7 为 FZ-11 株；4、8 为阴性对照；1~4 为 M 基因；5~8 为 HA 基因

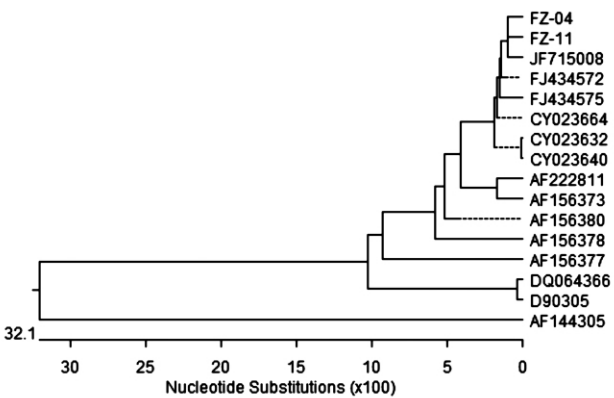


图 2 HA 基因保守片段的遗传进化树
Fig 2 The phylogenetic tree of conserved hemagglutinin gene

3 讨 论

本研究从疑似 H9 亚型禽流感病例中分离到 2 株病毒，经过血凝试验、血凝抑制试验和 RT-PCR 鉴定为 A 型 H9 亚型禽流感病毒，并将分离株命名为 A/chicken/Fujian/FZ04/2011（FZ-04）和 A/chicken/Fujian/FZ11/2011（FZ-11）。HA 基因遗传进化分析表明，分离株与代表株 A/CK/BJ/1/94 处于同一进化分支上，属于国内常见的欧亚分支中 A/CK/BJ/1/94 亚群。且与 A/CK /FJ/G9/09 株、CK/FJ/FG13/07 等福建省 6 株代表株病毒的亲缘关系比较近，这结果提示从 2005 年至今福建省 H9 亚型禽流感病毒可能是处在一个比较稳定

的遗传演化过程。

禽流感病毒流行情况和遗传演化较为复杂，存在广泛的基因重排现象，增大了该病防制难度，因此广泛开展禽流感流行病学调查、检测流行毒株起源、变化和变异趋势意义重大。1999 年发现的 H9N2 亚型 AIV 可突破种间屏障传染人和猪^[9]，这更是给予人们警示，在做好高致病性禽流感综合防制同时，也要防控 H9 亚型禽流感在本地区的发生和流行。相对于国内其他省份和地区，福建省关于 H9 亚型低致病禽流感的报道相对较少^[5,10-11]，本研究丰富了福建省 H9 亚型禽流感的流行病学内容，为更好地了解当前福建省 H9 亚型流感毒株的变异情况提供参考依据。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 74.
- [2] 李春艳, 肖晶, 李曦, 等. 微载体规模化培养 MDCK 细胞增殖 H9N2 亚型禽流感病毒的研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, (12): 1149—1153.
- [3] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. Two lineages of H9N2 influenza viruses continue to circulate in land-based poultry in southeastern China [J]. International Congress Series, 2001, 1219: 187—193.
- [4] 万春和, 傅光华, 程龙飞, 等. A/Chicken/Zhejiang/HJ/2007 (H9N2) 禽流感病毒 8 基因测序及遗传进化分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, (5): 750—757.
- [5] JI K, JIANG W M, LIU S, et al. Characterization of the hemagglutinin gene of subtype H9 avian influenza viruses isolated in 2007—2009 in China [J]. J Virol Methods, 2010, 163 (2): 186—189.
- [6] 赵军, 柴丽娜, 王泽霖. 1998~2008 年中国中部 H9N2 亚型 AIV 分离毒株 HA 基因的进化分析 [J]. 病毒学报, 2011, 27 (2): 122—128.
- [7] WU Z Q, JI J, ZUO K J, et al. Cloning and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza virus from different isolates in China during 2002 to 2009 [J]. Poult Sci, 2010, 89 (6): 1136—1143.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 581.
- [9] 刘健, 葛菲菲, 鞠厚斌, 等. 2007~2008 年上海地区 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因序列分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2010, (4): 41—46.
- [10] 程晓霞, 朱小丽, 王劲, 等. H9 亚型禽流感病毒的分离与鉴定 [J]. 现代农业科技, 2009, (13): 303—305.
- [11] 白泉阳, 孙颖杰, 郑腾, 等. H9 亚型禽流感病毒间接免疫荧光检测方法的建立与比较 [J]. 福建农业学报, 2008, 23 (2): 146—148.

(责任编辑: 柯文辉)