

封闭式饲养鸡场 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因 在 5 年内的遗传变异

刘红旗 张评许 刘秀梵* 刘文博 贾立军

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘要 选择一个于 1998 年开始发生 H9 亚型禽流感的封闭式大型养鸡场,连续 5 年内分离到 22 株 H9N2 亚型病毒,对其中 9 株与 1998 年分离株进行 HA 基因序列和病毒抗原性的比较结果表明,这些分离株均与 1998 年的具有较高的序列同源性,且在本研究期内 HA 基因的这些变化尚未产生引起交叉保护性改变。初步推断这些分离株均系 1998 年分离株在场内循环传播变化得来,其 HA 基因的变异可能与频繁的疫苗免疫选择压力有关。这为进一步研究禽流感病毒变异的规律和制定正确的禽流感防治对策具有重要意义。

关键词 H9N2 亚型禽流感病毒,血凝素基因,遗传变异

中图分类号 S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)06-0706-06

自 1994 年我国首次报道鸡群 H9 亚型禽流感的流行以来^[1],部分省、市、自治区均已发生该亚型禽流感流行^[2~4]。虽然分离到的病毒在实验室对非特异病原鸡(Specific Pathogen Free chickens)的致病性很低,但在现场可造成严重产蛋下降,肉鸡和青年鸡的复合型呼吸道疾病和死淘率升高,往往造成严重经济损失。目前,使用分离病毒制成灭活疫苗,用于防制该亚型禽流感,已成为很多鸡场的常规实践。然而在不断使用疫苗的选择压力下,鸡群中的流感病毒的遗传变异情况如何,迄今未见国内外有研究报告。本研究选择一个于 1998 年开始发生 H9 亚型禽流感,1999 年初开始使用同源灭活疫苗(98 年分离株)的大型封闭养鸡场,在持续 5 年的不同时段分离到 H9N2 亚型禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV),并对这些分离株的 HA 基因序列和抗原性进行比较分析,以揭示在封闭式鸡场内 H9 亚型禽流感病毒的变化情况,以期为制定正确防治对策提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:同一大型封闭式鸡场连续 5 年的分离株。ckSH98(F)为 1998 年分离株^[5];ckSH99 和 ckSH00 分别是该场采用 ckSH98(F)疫苗株免疫后 1999 年和 2000 年分离株;ckSH1/01、ckSH2/01、ckSH3/01 和 ckSH4/01 为该场 2001 年分离株;ckSH1/02、ckSH2/02 和 ckSH3/02 为该场 2002 年分离株。经常规血凝和血凝抑制试验鉴定为 H9N2 亚型禽流感病毒。

* 通讯作者。Tel 86-514-7979386;Fax 86-514-7323112;E-mail:xiufan@yahoo.com

作者简介:刘红旗(1973-),男,湖南邵阳人,博士,主要从事禽流感分子流行病学研究。E-mail:liuhqdl@sina.com.cn

其他作者:彭大新 程 坚

收稿日期:2003-01-10,修回日期:2003-06-30

毒。

1.1.2 SPF (Specific Pathogen Free) 种蛋 : 购自山东省家禽研究所 SPF 鸡场。

1.1.3 SPF 鸡 : SPF 种蛋委托扬州大学实验动物中心孵化后 , 在本实验室实验动物房饲养。

1.2 血凝素 (Hemagglutinin, HA) 基因编码区核苷酸全序列的获取

按参考文献 [5] 的方法进行。为确保扩增结果的保真度 , 采用了 AMV 反转录酶 (Promega 公司) 和 High Fidelity PCR System-5 kb 系统 (Roche 公司) 进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系为 : $10 \times$ PCR buffer (Mg^{2+} $5 \mu L$; dNTP (10mmol/L) $1 \mu L$; 上游引物 $1 \mu L$; 下游引物 $1 \mu L$; cDNA 模板 $12 \mu L$; 超纯水 $29.5 \mu L$; $0.5 \mu L$ (5.0U/ μL) Expand High Fidelity PCR System enzyme mix。PCR 反应条件为 : $94^{\circ}C$ 4min , $94^{\circ}C$ 30s , $48^{\circ}C$ 30s , $72^{\circ}C$ 2min , 5 个循环 , $94^{\circ}C$ 30s , $52^{\circ}C$ 30s , $72^{\circ}C$ 2min , 30 个循环 , $72^{\circ}C$ 延伸 10min , $4^{\circ}C$ 10min。经电泳鉴定为预期长度的 PCR 特异性条带 , 按 Agarose Gel DNA Extraction Kit 的说明方法回收和纯化后 , 将目的片段送宝生物 (大连) 有限公司测序。

1.3 HA 基因编码区核苷酸及推导的氨基酸全序列分析

借助 DNA Star4.0 软件包 MegAlign 软件 , 采用 Clustal 方法对本研究获得的序列和参考文献中的序列进行比较。

1.4 交叉免疫保护试验

按常规方法免疫和攻毒 , 方案参考文献 [6] 进行 (见表 1) , 另设一组作为非免疫非攻毒对照组。攻毒后 5d 采集泄殖腔棉拭子样品按常规方法病毒分离 , 计算每组的病毒分离率。

1.5 交叉血凝抑制试验

于交叉免疫保护试验中攻毒后 7d , 分别采非交叉攻毒组鸡血 , 分离血清进行交叉血凝抑制试验。根据试验所得的 HI 效价 , 通过抗原变异传统分析法公式计算抗原比^[7] , 分析它们之间的抗原关系。

1.6 统计分析

用 SPSS 8.0 for windows 软件的卡方检验和校正检验进行组间差异分析。

2 结果

2.1 HA 基因编码区核苷酸分析与比较

测序结果表明 , 扩增所得的 9 个毒株 HA 基因编码区均由 1680 个核苷酸组成 , 与 H9 亚型禽流感病毒原型毒株 A/turkey/Wisconsin/66^[8] 的相比 , 无核苷酸的插入和缺失。

2.2 HA 基因核苷酸及推导的氨基酸序列

我们对本研究获得的 9 个毒株 HA 基因与 1998 年的分离株的进行比较发现 , 1999 年分离株 (ckSH99) 的 HA 基因与使用疫苗前分离株 (ckSH98) 相比序列同源性很高 ; 而 1999 年以后分离的 8 个毒株与 ckSH99、ckSH98 相比 , HA 基因序列发生了较大的变化 , 核苷酸和推导的氨基酸序列同源性较低 , 分别为 93.5% ~ 94.8% 和 94.4% ~ 96.8%。2000 ~ 2001 年分离的 5 个毒株 HA 基因之间的序列同源性较高 , 核苷酸和推导的氨基酸序列同源性分别为 98.1% ~ 99.8% 和 98.2% ~ 99.5%。而 2002 年分离的 3 个毒株 HA 基因之

间的序列同源性很高,核苷酸和推导的氨基酸序列同源性分别为 99.5% ~ 99.8 % 和 98.9% ~ 99.5% ,但与 2002 年以前分离的 7 株相比却存在较大差异,核苷酸和推导的氨基酸序列同源性分别为 93.5% ~ 95.1 %和 94.1 % ~ 97.5 %。根据 HA 基因编码区序列(55 ~ 1152nt)构建的遗传发生树(图 1)表明,本研究分离的 9 个毒株分为明显的 3 个组,即: 1998 年和 1999 年分离株为 I 组,1999 ~ 2001 年分离的 5 个毒株比较靠近为 II 组,2002 年分离的 3 个毒株为 III 组。从氨基酸残基替代情况来看,同组 HA 基因相比绝大部分替换的氨基酸比较稳定,而组间 HA 基因氨基酸残基相比波动较大。此外,本研究还将获得的 9 个毒株 HA 基因与 ckBj194 和 ckGd94(H9N2) HA 基因序列(1 ~ 1660nt)的同源性进行了比较。独特的氨基酸残基比较发现 :T³、I⁴、I²¹⁷、R³¹⁵、S⁵⁰⁴ 氨基酸残基均与 ckBj194 株相同,而与 ckGd94 不同。10 个毒株 HA 基因序列与 ckBj194 和 ckGd94(H9N2)HA 基因序列相比,核苷酸和推导的氨基酸序列同源性分别为 94.6% ~ 98.0 %和 95.1% ~ 97.8 %。

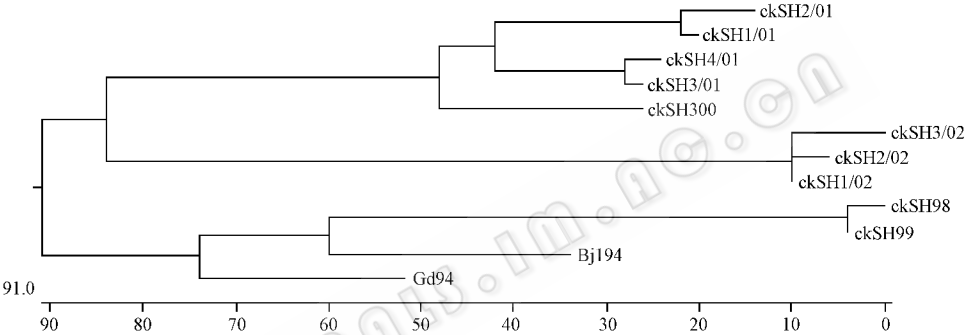


图 1 12 个毒株 HA 基因遗传发生树(55 – 1152)

Fig. 1 Phylogenetic tree of 1098 nucleotides (bases 55 to 1152) of HA genes of 12 strains
Conducted by MegAlign in DNASTar package using the method of Clustal.

2.3 HA 基因上几个关键位点的氨基酸序列比较

以人 H3 亚型流感病毒 A/Achi/2/68 毒株的 HA 基因氨基酸序列作为参照^[9],推导并比较了本研究毒株 HA 基因的几个关键位点的氨基酸序列。结果表明,9 个毒株 HA 基因裂解位点 326 ~ 329 位氨基酸没有发生变化,均为 R-S-S-R,为低致病性禽流感病毒的特征性序列。除 ckSH00 外,其它毒株的 HA 均含有 7 个潜在的糖基化位点,且构成糖基化位点的氨基酸均没有变化,而 ckSH00 在 Asn-296 位失去了一个潜在的糖基化位点。HA 受体结合位点袋状结构的氨基酸序列除 190 位的变化较大外,被认为与病毒感染宿主特异性有关的 226 位氨基酸也发生了一定的变化,ckSH98、ckSH99 和 ckSH00 的为 Gln[Q],2001 年后分离的 7 株病毒均为 Leu[L],而其它位点的氨基酸均高度保守。构成抗原决定簇的氨基酸除 205 位发生了变化外(ckSH98 和 ckSH99 的为 Thr[T],其它 5 个毒株的为 Ala[A])其它位点的残基均高度保守。

2.4 交叉免疫保护试验

通过常规的免疫和攻毒试验,以泄殖腔排毒情况作为结果判定指标来比较 ckSH98、ckSH99、ckSH00 和 ckSH1/01 疫苗的交叉免疫保护效果,结果见表 1。攻毒后病毒分离结果表明,各免疫组与非免疫组之间差异极为显著($P < 0.01$),这表明各免疫组有很好的保护

效果,而各免疫组之间无显著差异($P > 0.05$),这说明各毒株制成的油乳剂灭活苗对各毒株有较好的交叉免疫保护作用。

表 1 交叉免疫保护试验病毒分离率

Table 1 The isolation rate of the cross-protection test

Vaccinaated strains	Groups	Post-vaccinated challege strains			
		ckSH98	ckSH99	ckSH00	ckSH1/01
ckKSH98	Vaccinated	2/25 [*]	2/25	2/24	2/24
	Control	23/25	N	N	N
ckSH99	Vaccinated	3/25	2/25	2/24	3/25
	Control	N	21/23	N	N
ckSH00	Vaccinated	N	3/25	1/25	2/25
	Control	N	N	23/25	N
ckSH1/01	Vaccinated	2/24	2/25	N	1/25
	Control	N	N	N	24/25

The isolation rate of the non-immunized and non-challenged group was 0/20 ; ^{*} the isolation rate ; N in this table was not tested.

2.5 交叉血凝抑制试验

根据本试验方法 1.7 中公式计算得到各毒株之间的抗原比见表 2 ,它们之间的 r 值均位于 2/1 ~ 1/2 之间 ,这表明它们之间的抗原性无明显差异。

表 2 交叉血凝抑制试验结果

Table 2 Results of the cross-HI test

Chicken sera	Virus			
	ckSH98	ckSH99	ckSH00	ckSH1/01
S-ckSH98	1 :512 [*]	1 :256	1 :256	1 :256
		1.414 [#]	2	2
S-ckSH99	1 :256	1 :256	1 :128	1 :256
			1.414	2
S-ckSH00	1 :128	1 :256	1 :256	1 :256
				1.414

^{*} HI titer ; [#] r value of the antigenic rate.

3 讨论

构成流感病毒基因组的 8 个基因片段中 ,HA 基因的变异率是最高的。然而在自然界 ,禽流感病毒的变异率低 ,且核苷酸的突变大部分都表现为静突变和回复突变 ,因此进化几乎处于静止状态 ,这可能是由于禽类免疫系统对病毒变异的压力不够。本研究中的 9 个毒株是 1999 ~ 2002 年期间从同一大型封闭养鸡场的鸡群分离到的 ,由于是封闭群体 ,我们可以认为 1999 ~ 2002 年分离的毒株是从 1998 年的毒株变化而来 ,而不是从外面传进来的。独特的氨基酸残基置换和核苷酸置换相比较 ,证实了上述推测 ,如 :T³、T⁴、V¹⁵、N⁴⁰、
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

S¹⁴³、I²¹⁷、L²³⁰、I²⁵³、R³³⁵和 R³⁸¹ ,该场 H9N2 亚型病毒 HA 基因发生了这样大的变异 ,可能与该场频繁地使用该亚型的疫苗有关。此外 ,从本研究的情况来看 ,这种变化可以分为 3 个明显的阶段 ,表现为一个变异高峰之后处于相对平稳状态 ,然后又出现一个变异高峰 ,但再以后 HA 的变化如何 ,还有待于进一步追踪监测。

流感病毒 HA 蛋白是病毒重要的表面糖蛋白 ,其含有与病毒生物学功能相关的多个功能域 ,这些区域的一些氨基酸的变化 ,可能会导致病毒的一些生物学功能的改变。本研究毒株的裂解位点氨基酸序列均为低致病性毒株特征性序列 R-S-S-R^[10] ,然而核苷酸序列分析发现 ,这些毒株 HA 裂解位点氨基酸序列的第 2 位残基对应的核苷酸序列为 AGT 和 AGC ,如果它们的第 3 个核苷酸发生 T→A 或 C→A 的变异 ,那么该位置的残基就会变异为 R ,从而使裂解位点氨基酸序列具有高致病性毒株的特点(R-X-R-R)^[10,11]。流感病毒 HA 受体结合位点的特异性决定其感染的宿主范围。当病毒在适应新的宿主时 ,决定受体结合特异性的 226 位氨基酸通常首先发生变化^[12]。本研究中 2001 和 2002 年的 8 个毒株均具有与香港人 H9N2 毒株相同的氨基酸 Leu-226。前面提到受体特异性的变化一般是在病毒适应新的宿主时才发生 ,该场病毒是否已感染了饲养员还有待于进一步调查研究。HA 上潜在的糖基化位点对病毒的多种生物学特性有影响 ,如 :受体结合的亲和力^[13]、病毒毒力^[9]等。本研究毒株 ckSH00 由于 919 位核苷酸 A→G 的变化 ,在该处失去了一个糖基化位点 ,这一糖基化位点的失去 ,是否会引起病毒生物学特性的改变 ,还有待于通过反向遗传学方法进一步的研究。HA 是流感病毒重要的表面抗原 ,也是诱导保护性中和抗体的主要抗原 ,这些决定簇的氨基酸的变化 ,一般会引起 HA 蛋白抗原性的变异。本研究中的 9 株病毒 ,虽然出现了一些氨基酸残基变化 ,但交叉免疫保护试验和交叉血凝抑制试验结果表明这些变化尚未导致抗原性明显的变化。

在本研究中 ,H9 亚型禽流感病毒在进入一个大型的封闭性饲养场后 ,在连续使用疫苗的情况下 ,还能不断地分离到 H9N2 亚型病毒 ,说明感染可在鸡场长期维持 ,疫苗免疫虽能预防发生临诊疾病 ,但不能阻止病毒在鸡体内复制和鸡群内传播 ,因此 ,也不能消除已经建立的感染。这一点对我们制定正确的防制对策有很重要的意义 ,而且 ,在群内循环传播的病毒会发生较大的变异 ,但在追踪的 4 年内 ,这种变异还没有影响到毒株之间的交叉保护。至于流感病毒在封闭群体中发生变异的规律如何还需要对群体维持的病毒作更长时间的追踪监测 ,提高分离的频率 ,然后对其 HA 基因及其他基因的变异进行比较分析才能得出结论。

参 考 文 献

- [1] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌. 禽流感研究 I: 鸡 A 型流感病毒分离与血清学初步鉴定. 中国兽医杂志, 1994, 22 (10): 3~5.
- [2] 辛朝安,罗开健,廖明,等. 禽流感的诊断与防治. 养禽与禽病防治, 2000, 7: 9~10.
- [3] 郭元吉,李建国. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 105~108.
- [4] 唐秀英,田国斌,赵传删,等. 中国禽流感流行株的分离与鉴定 [畜禽重大疫病生物技术防治研究]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 339~344.
- [5] 程坚,刘红旗,彭大新,等. 两株 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因序列分析. 江苏农业研究, 2001, 22(1): 71~72.

- 74.
- [6] 程 坚, 刘秀梵, 彭大新, 等. 表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力. 微生物学报, 2002, **42**(4): 442 ~ 447.
- [7] 甘孟侯 主编. 禽流感. 第一版. 北京: 北京农业大学出版社, 1995. 62 ~ 64.
- [8] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, *et al.* Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *J Virol*, 1991, **182**(2): 475 ~ 485.
- [9] Kawaoka Y, Webster R G. Evolution of the A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. *Virology*, 1985, **146**(1): 130 ~ 137.
- [10] Perdue M L, Garcia M, Senne D, *et al.* Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res*, 1997, **49**(2): 173 ~ 186.
- [11] Senne D A, Panigrahy B, Kawaoka Y, *et al.* Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis*, 1996, **40**(2): 425 ~ 437.
- [12] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, *et al.* Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 2000, **74**(18): 8502 ~ 8512.
- [13] Matrosovich M N, Gambaryan A S, Teneberg S, *et al.* Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, 1997, **233**(1): 224 ~ 234.

Genetic Mutations of Hemagglutinin Genes of H9N2 Subtype Influenza A Viruses in the Field in a Five-year Period

Liu Hongqi Zhang Pinghu Liu Xiufan* Liu Wenbo Jia Lijun

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Infection in chicken flocks on a farm, where AI outbreak took place in 1998, was monitored in a four-year consecutive period and 22 H9N2 subtype viruses were isolated. The HA gene and antigenicity of 9 strains among isolates were compared with that of isolate of 1998. The results indicated that mutations of HA genes of H9 subtype influenza A viruses were observed during five years. However these mutations of HA genes didn't lead to sufficient antigenic variation to change the cross-protective pattern of these strains. These findings may be fruitful for making further study of genetic mutations of AIVs in the field and improving the control strategies.

Key words: H9N2 subtype avian influenza virus, Hemagglutinin gene, Genetic mutation

* Corresponding author. Tel 86-514-7979386 Fax 86-514-7323112 E-mail: xiufan@yahoo.com

Other authors: Peng Daxin, Chen Jian

Received date 01-10-2003