

DOI: 10.16506/j.1009-6639.2018.06.006

· 论 著 ·

活禽市场环境 H9N2 亚型禽流感病毒分子生物学研究

陈腊梅¹, 吕君¹, 唐勇军²

1. 长沙市开福区疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410003;

2. 中南大学湘雅医院呼吸内科(呼吸与危重症医学科) 国家临床重点学科

摘要: 目的 监测活禽市场环境中 H9N2 禽流感病毒红细胞凝集素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 糖蛋白基因的分子进化特征, 为防控人 H9N2 禽流感病毒提供依据。方法 2016 年 8 月至 2017 年 8 月, 采集自长沙市开福区活禽市场的 76 份环境样本开展禽流感病毒核酸检测, 然后对 4 份 H9 亚型禽流感病毒核酸阳性样本进行 HA 和 NA 基因 RT-PCR 扩增和核苷酸测序, 测序结果经在线 BLAST 比对和 Mega 6 软件构建进化树分析。结果 从 76 份环境样本中检出 A 型禽流感病毒核酸阳性样本 45 份, H9 亚型阳性样本 30 份, 占总样本的 39.47%。鉴定出 H9N2 亚型禽流感病毒 2 株, HA 和 NA 基因进化分析显示, 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒与 2014—2017 年国内 H9N2 亚型禽流感病毒聚集形成一个主要分支, 与 A/duck/Hong Kong/Y439/1997、欧亚和北美谱系代表株进化分支距离较远。本研究中的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒在 HA 蛋白连接肽位点出现 2 个碱性氨基酸 (amino acids, aa), 对禽表现为低致病性的分子特征; 受体结合位点区域 (receptor binding site, RBS) aa 为 LMG, 为人源受体。结论 2016—2017 年, 长沙市开福区活禽市场环境中 H9 亚型禽流感病毒污染较重, 环境中的 H9N2 亚型禽流感病毒对禽表现为低致病性的分子特征, 具有容易感染人的受体特征。

关键词: 活禽市场; 禽流感病毒; H9N2 亚型; 基因; 进化分析

中图分类号: R373.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-6639 (2018) 06-0426-06

Molecular characteristics of avian influenza A (H9N2) viruses isolated from environmental samples in the live poultry markets

CHEN La-mei*, LYU Jun, TANG Yong-jun

* Center for Disease Control and Prevention of Kaifu District, Changsha, Hunan 410003, China

Corresponding author: TANG Yong-jun, E-mail: tyj7736@163.com

Abstract: Objective To understand the molecular characteristics of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of avian influenza A (H9N2) viruses isolated from environmental samples in the live poultry markets, and to provide evidence for the prevention and control of human infection with avian influenza A (H9N2) viruses. **Methods** Seventy-six environmental samples were collected from the live poultry markets in Kaifu District of Changsha from August 2016 to August 2017. Conventional RT-PCR was performed using HA and NA universal primer sets among 4 single H9 positive specimens and PCR products were sequenced. The phylogenetic trees were constructed using MEGA 6 software based on the sequence homology of HA and NA genes of the viruses. **Results** Out of 76 environmental samples, 45 were positive for influenza A virus and 30 for H9 subtype. Two H9N2 subtype AIV were identified by conventional RT-PCR. HA and NA phylogenetic analysis revealed that the 2 strains of H9N2 viruses were clustered with the H9N2 viruses isolated in China from 2014 to 2017, but were far away from the viruses of A/duck/Hong Kong/Y439/1997, Eurasian and North American lineage strains. Genetic analysis showed there were 2 basic amino acids (aa) at the HA cleavage site of the 2 strains of H9N2 viruses, posing low pathogenic threats to live poultry, and LMG at the HA receptor binding sites (RBS), showing the affinity to human receptors. **Conclusions** H9 subtype AIV exists in the environmental areas of live poultry markets in Kaifu District of Changsha from 2016 to 2017, and the 2 strains of H9N2 subtype AIV are low pathogenic to poultry but may facilitate human infection.

Key words: Live poultry market; Avian influenza A virus; H9N2 subtype; Gene; Phylogenetic analysis

基金项目: 长沙市科技计划项目 (kq1701022)

作者简介: 陈腊梅, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事新发传染病应急检测研究

通信作者: 唐勇军, E-mail: tyj7736@163.com

禽流感病毒依据其表面红细胞凝集素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 糖蛋白抗原性的不同, 可分为 18 个 HA 亚型 (H1-H18) 和 11 个 NA 亚型 (N1-N11)^[1-2]。截至 2017 年 5 月 31 日, 全球共报告 27 例人感染 H9N2 亚型禽流感病毒病例, 其中 26 例发生在中国^[3]。禽流感病毒的致病性与病毒的基因特征相关。禽流感病毒由 8 个基因节段组成, 其中基因节段 4 编码 HA 蛋白, 在感染宿主和增加致病力方面起重要作用^[4-6]。基因节段 6 编码的 NA 蛋白编码氨基酸 (amino acids, aa) 出现茎缺失则可增加病毒在小鼠体内的毒力^[7]。H9N2 亚型禽流感病毒的 6 个内部基因节段是新型 H7N9 和 H10N8 亚型禽流感病毒的重配来源^[8-9]。人 H5N1、H7N9 和 H10N8 亚型禽流感病毒的感染来源主要为活禽市场^[10-12], Huang 等^[13] 研究显示, 人 H9N2 亚型禽流感病毒与活禽市场环境中分离到的 H9N2 亚型禽流感病毒相似性高达 98.5%~99.8%, 其感染来源为活禽市场, 张如胜等^[14] 研究显示, 2014 年长沙市辖区禽类场所环境中 H9N2 亚型禽流感病毒核酸阳性率较高, 存在传播禽流感病毒的风险。

2015 年, 湖南省长沙市发现 1 例人感染 H9N2 亚型禽流感病毒轻症病例, 该病例经治疗后痊愈, 但病例感染来源不明^[15]。2016—2017 年, 我国出现第五波人感染 H7N9 疫情, 为有效应对人感染禽流感疫情, 本中心对辖区活禽市场开展了环境禽流感病原学监测, 对监测出来的 H9 亚型禽流感病毒进行了 HA 和 NA 基因核苷酸测序, 并对其致病性和受体等分子特征进行了分析, 为防控人禽流感提供依据。

1 材料与与方法

1.1 样本来源 2016 年 8 月至 2017 年 8 月, 采集长沙市开福区辖区活禽市场 76 份环境样本, 包括禽类屠宰洗涤水 47 份、鸡笼涂抹样 19 份和其他样本 10 份 (脱毛机涂抹样 4 份、墙壁涂抹样 3 份、地面涂抹样 2 份和禽类饮水 1 份) 进行环境禽流感病毒核酸监测, 其中禽类屠宰洗涤水 A 型禽流感病毒核酸阳性率为 57.45% (27/47), 高于鸡笼涂抹样 A 型禽流感病毒核酸阳性率 26.32% (5/19); 活禽市场的选择以及样本采集按照相关监测方案^[16] 进行。

1.2 禽流感病毒核酸检测 利用通用型核酸提取试剂盒 (广州华瑞安生物) 进行 RNA 核酸提取,

具体操作参照试剂盒说明书, 然后利用禽流感病毒 real-time PCR 核酸检测试剂盒 (江苏硕世生物科技有限公司) 进行 A 型及 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒核酸检测, 检测方案按照相关标准和方案进行^[16-17]。

1.3 H9 亚型禽流感病毒 HA、NA 基因 RT-PCR 扩增及核苷酸序列测定 将在 2017 年长沙市开福区活禽市场环境中检出的 4 份 H9 亚型禽流感病毒核酸阳性禽类屠宰洗涤水样本 (H5 和 H7 亚型禽流感病毒核酸阴性) RNA 分别进行 HA 和 NA 基因片段 RT-PCR 核酸扩增, 具体方法参照文献^[14]。另外将阳性 RT-PCR 产物进行核苷酸序列测定, 由广州 Thermo Fisher Scientific 公司完成。

1.4 环境中 H9N2 亚型禽流感病毒 HA、NA 蛋白分子进化分析 HA、NA 基因测序结果提交至国立生物信息中心 (NCBI), 利用在线 BLAST 软件进行相似性分析。从 GenBank 下载 2014—2017 年国内人、禽、环境来源 H9N2 亚型禽流感病毒和各谱系代表株 (A/Quail/Hong Kong/G1/97、A/duck/Hong Kong/Y280/97、A/duck/Hong Kong/Y439/1997、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94) HA、NA 基因片段核苷酸序列, 利用 MEGA 6 软件的 Neighbor-joining 方法构建进化树。

1.5 环境中 H9N2 亚型禽流感病毒 HA、NA 蛋白重要位点 aa 特征分析 从 GenBank 下载环境 H9N2 亚型禽流感病毒株 (A/environment/Changsha/92/2014、A/environment/Changsha/490/2014 和 A/Environment/Hunan/28184/2014 (H9N2)), 人感染 H9N2 亚型禽流感病毒株 (A/Hunan/44557/2015、A/Zhongshan/201501/2015、A/Guangdong/MZ058/2016 和 A/Lengshuitan/11197/2013)、禽感染 H9N2 亚型禽流感病毒株 (A/chicken/Ganzhou/GZ126/2016 和 A/chicken/Zhejiang/77082/2014) 和 H9N2 亚型禽流感病毒各谱系代表株 (A/Quail/Hong Kong/G1/97、A/duck/Hong Kong/Y280/97、A/duck/Hong Kong/Y439/1997、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94) HA、NA 基因片段编码 aa 序列, 利用 BioEdit 软件将上述禽流感病毒和本研究中的环境 H9N2 亚型禽流感病毒 (A/environment/Hunankaiifu/361/2017、A/environment/Hunankaiifu/002/2017) 进行多重比对、分析各蛋白重要位点 aa 特征。

2 结果

2.1 活禽市场环境禽流感病毒核酸监测结果 对

76 份环境样本开展禽流感病毒核酸检测, 共检出 A 型禽流感病毒阳性 45 份, 其中 H9 亚型阳性 30 份, 占总样本的 39.47%; H5 亚型阳性 17 份; H7 亚型阳性 8 份; H5、H9 亚型阳性 9 份; H5、H7 亚型阳性 6 份; H7、H9 亚型阳性 6 份; H5、H7、H9 亚型阳性 4 份; 其他亚型 10 份。

2.2 活禽市场环境样本 H9N2 亚型禽流感病毒核苷酸序列测定结果 通过测序获得 2 条 HA 基因序列和 1 条 NA 基因序列, GenBank 登录号分别为 MG220414、MG220415 和 MG220418。在线 BLAST 相似性比对分析表明: 本研究中活禽市场环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒 A/environment/Hunankaifu/361/2017 和 A/environment/Hunankaifu/002/2017 HA 基因分别与 A/duck/Japan/AQ-HE28/2015 (H9N2) 和 A/chicken/Hubei/01/2015 (H9N2) 相似性最高, 分别为 98.32% 和 99.02%; A/environment/Hunankaifu/361/2017 (H9N2) NA 基因与 A/chicken/Anhui/AH120/2015 (H9N2) 相似性最高 (97.74%), 其中 A/environment/Hunankaifu/002/2017 NA 基因通过 N2 亚型流感病毒实时荧光 PCR 检测试剂盒 (北京卓诚惠生生物科技股份有限公司) 检测验证为 N2 亚型。

2.3 H9N2 亚型禽流感病毒进化树构建 H9N2 亚型禽流感病毒在遗传进化上可以分为北美和欧亚两个大分支, 其中欧亚分支又进一步进化形成以 A/Quail/Hong Kong/G1/97、A/duck/Hong Kong/Y280/97、A/duck/Hong Kong/Y439/1997、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94 等 H9N2 亚型 AIV 株为代表的谱系进化亚分支^[18-19]。HA 基因构建进化树显示包括本研究中的 A/environment/Hunankaifu/361/2017 (H9N2)、A/environment/Hunankaifu/002/2017 (H9N2) 与 2014—2017 年国内大多数人、环境和禽 H9N2 亚型禽流感病毒形成一个主要分支, 与 A/duck/Hong Kong/Y280/97、A/Quail/Hong Kong/G1/97、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94 H9N2 谱系代表株进化分支距离较近, 在一个大分支内, 但与另一个大分支的 A/duck/Hong Kong/Y439/1997、欧亚和北美谱系代表株进化距离远。

NA 基因进化分析显示 2 个大分支, 国内 H9N2 亚型禽流感病毒分离株形成一个主要分支, 其中本研究中的 A/environment/Hunankaifu/361/2017 (H9N2) 与国内 2014—2017 年 H9N2 亚型

禽流感病毒形成一个亚分支, A/duck/Hong Kong/Y280/97、A/Quail/Hong Kong/G1/97、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94 H9N2 谱系代表株形成另外一个亚分支, 另外一个主要分支由 A/duck/Hong Kong/Y439/1997、欧亚和北美谱系代表株组成, 见图 1。

2.4 H9N2 亚型禽流感病毒 HA、NA 蛋白重要位点 aa 分析 利用 BioEdit 软件对 2014—2017 年的部分 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 及 NA 蛋白重要位点 aa 进行比对, 显示 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒 (A/environment/Hunankaifu/361/2017 和 A/environment/Hunankaifu/002/2017) HA 基因编码 aa 的 HA1 和 HA2 蛋白连接肽第 334-340 位出现 2 个碱性 aa (SRSSRGL, 其中 R 为碱性 aa), 对禽表现为低致病性的分子特征^[6], 与其他人、禽和环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒的致病分子特征相似, 但 2014 年分离自湖南的环境 H9N2 亚型禽流感病毒 (A/Environment/Hunan/28184/2014) HA1 和 HA2 蛋白连接肽出现 3 个碱性 aa (SRSRRGL), 见表 1。在受体结合位点区域 (receptor binding site, RBS), 本研究中的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒与其他人、禽和环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白第 234-236 位 (对应 H3 型流感病毒编码 aa 第 226-228 位) aa 为 LMG, 显示目前的 H9N2 亚型禽流感病毒受体为人源受体^[6], 见表 1。

NA 蛋白 aa 重要位点比对分析显示, 本研究中的 A/environment/Hunankaifu/361/2017 与其他人、禽和环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒在第 38-39 和 46-50 位点未出现茎缺失现象, 但在第 63-65 位点, 包括本研究中 H9N2 亚型禽流感病毒在内的绝大多数 H9N2 亚型禽流感病毒出现茎缺失现象^[7], 仅 1 株人源 H9N2 亚型禽流感病毒广东株 A/Guangdong/MZ058/2016 第 63-65 位点未出现茎缺失现象, 见表 1。

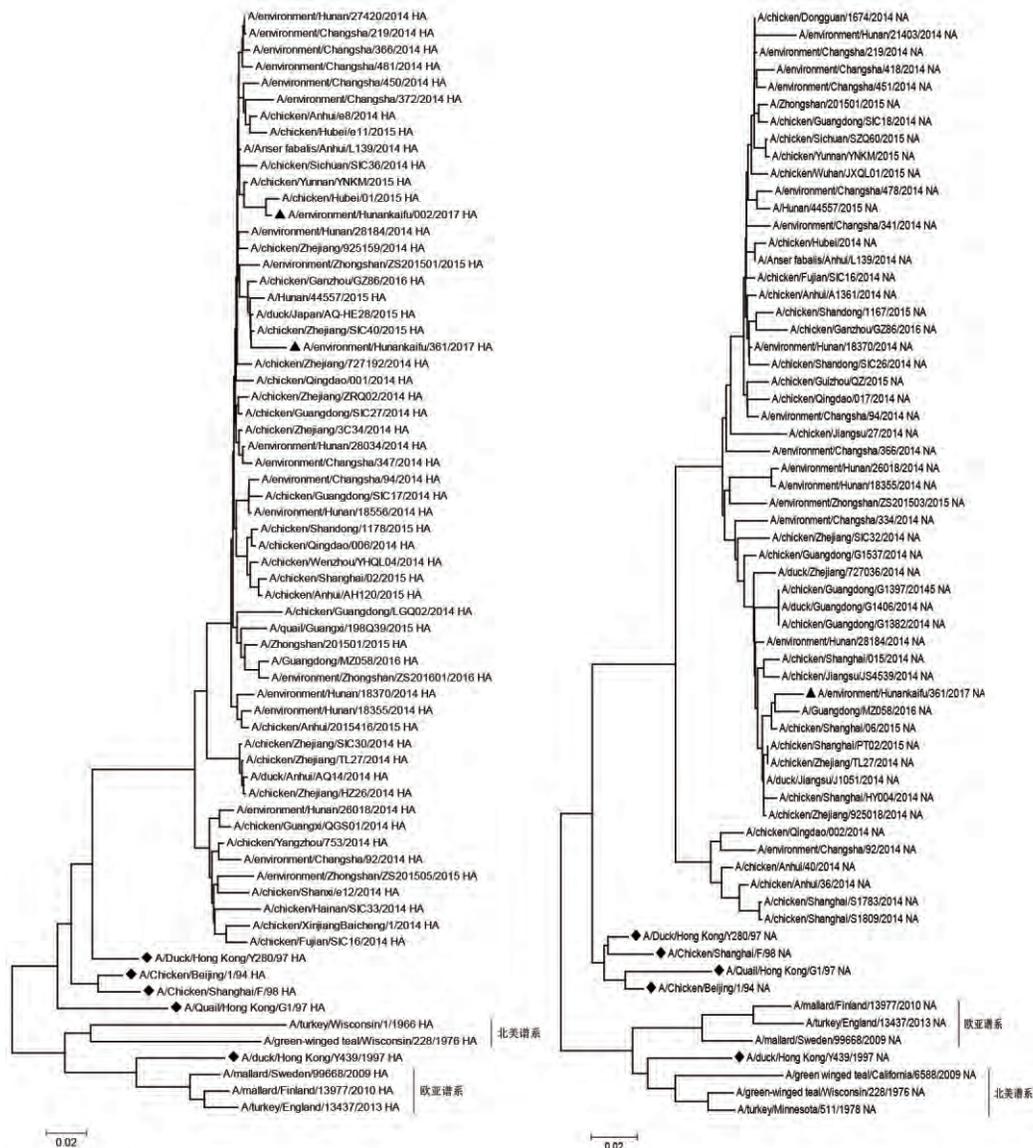
3 讨论

目前, 能够造成人类感染的禽流感病毒亚型越来越多^[8,9,20-29]。2013 年 11 月和 2015 年 9 月, 湖南省分别报告 1 例人感染 H9N2 亚型禽流感病毒实验室诊断病例^[13,15], 且 2014 年长沙市辖区活禽市场禽流感病毒污染情况不容乐观, H9 亚型禽流感病毒核酸阳性率高达 38.12%^[14]。本研究显示 2016 年 8 月至 2017 年 8 月, 长沙市开福区活禽市场环境中 H9 亚型禽流感病毒核酸阳性率仍然较高

(39.47%)，虽然活禽市场经过休市和关闭等措施能够显著降低活禽市场禽流感病毒核酸阳性率，但由于禽自身携带禽流感病毒，一旦活禽市场开放营业，活禽市场环境中禽流感病毒核酸阳性率随即快速上升，在禽类感染禽流感病毒状况未得到控制的情况下，活禽市场环境中 H9 亚型禽流感病毒污染状况将会持续。

由于地理的因素，禽流感病毒主要进化形成北美和欧亚两大谱系分支，本研究以中国大陆 2014—2017 年的 H9N2 亚型禽流感病毒和相关谱系代表株构建 HA 和 NA 基因进化树，显示活禽市场

环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒 A/environment/Hunankaifu/361/2017 和 A/environment/Hunankaifu/002/2017 与 2014—2017 年国内 H9N2 亚型禽流感病毒聚集形成一个主要分支，与 A/duck/Hong Kong/Y280/97 等 H9N2 亚型禽流感病毒谱系代表株进化分支距离近，但与 A/duck/Hong Kong/Y439/1997、欧亚和北美谱系代表株进化分支距离较远，与刘晓蕾等^[15]研究结果相似，BLAST 分析显示 HA 和 NA 基因与 2015 年分离自湖北和安徽等地区的禽源 H9N2 亚型禽流感病毒核苷酸相似性最高，表明除了地理阻隔，随着时



注：▲本研究获得的 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 和 NA 基因序列；◆A/duck/Hong Kong/Y280/97, A/Quail/Hong Kong/G1/97, A/duck/Hong Kong/Y439/1997, A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Beijing/1/94 H9N2 亚型禽流感病毒谱系代表株 HA 和 NA 基因序列

图 1 2016—2017 年长沙市开福区活禽市场 H9N2 亚型禽流感病毒 HA、NA 进化树构建分析

表 1 活禽市场 H9N2 亚型禽流感病毒与参考株病毒 HA、NA 蛋白重要位点 aa 特征分析

H9N2 亚型 禽流感病毒株	HA					NA		
	连接肽	受体结合位点区域				茎缺失		
	334-340	191	197	198	234-236	38-39	46-50	63-65
开福环境株 1	SRSSRGL	N	E	T	LMG	无	无	有
开福环境株 2	SRSSRGL	N	D	T	LMG	无序列	无序列	无序列
长沙环境株 1	SRSSRGL	N	T	A	LMG	无	无	有
长沙环境株 2	SRSSRGL	N	T	T	LMG	无	无	有
湖南环境株 1	SRSRRGL	N	T	T	LMG	无	无	有
湖南环境株 2	SRSSRGL	N	D	T	LMG	无	无	有
中山人源株	SRSSRGL	N	T	T	LMG	无	无	有
广东人源株	SRSSRGL	N	T	T	LMG	无	无	无
冷水滩人源株	SRSSRGL	N	T	A	LMG	无	无	有
广州鸡源株	SRSSRGL	N	D	T	LMG	无	无	有
浙江鸡源株	SRSSRGL	N	T	T	LMG	无	无	有

注：开福环境株 1：A/environment/Hunankaifu/361/2017 (H9N2)；开福环境株 2：A/environment/Hunankaifu/002/2017 (H9N2)；长沙环境株 1：A/environment/Changsha/92/2014 (H9N2)；长沙环境株 2：A/environment/Changsha/490/2014 (H9N2)；湖南环境株 1：A/Environment/Hunan/28184/2014 (H9N2)；湖南环境株 2：A/Hunan/44557/2015 (H9N2)；中山人源株：A/Zhongshan/201501/2015 (H9N2)；广东人源株：A/Guangdong/MZ058/2016 (H9N2)；冷水滩人源株：A/Lengshuitan/11197/2013 (H9N2)；广州鸡源株：A/chicken/Ganzhou/GZ126/2016 (H9N2)；浙江鸡源株：A/chicken/Zhejiang/77082/2014 (H9N2)

间的推移，2014—2017 年国内 H9N2 亚型禽流感病毒核苷酸序列的不断变异、演变形成了目前的进化分支，提示需要持续对 H9N2 亚型禽流感病毒进化状况开展监测工作。

HA 蛋白重要位点分析显示本研究中的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒 (A/environment/Hunankaifu/361/2017 和 A/environment/Hunankaifu/002/2017) HA1 和 HA2 蛋白连接肽出现 2 个碱性 aa，对禽表现为低致病性的分子特征^[30]，另外本研究中的 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒与其他人、禽和环境来源的 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白 RBS 区域 aa 为均 LMG，显示目前的 H9N2 亚型禽流感病毒受体均为人源受体，具有与 SA-2，6-Gal 结合的能力，容易造成人群感染^[31]，与国内其他研究数据相似^[14]。NA 蛋白 aa 重要位点分析显示，本研究中的 H9N2 亚型禽流感病毒在第 63~65 位点，与其他绝大多数 H9N2 亚型禽流感病毒均出现茎缺失现象，仅 1 株人源 H9N2 亚型禽流感病毒 (A/Guangdong/MZ058/2016) 未出现茎缺失现象，提示 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因进化的多样性。

虽然目前环境中 H9N2 亚型禽流感病毒表现为低致病性，但由于其具有容易感染人的分子特征，且该病毒是其他重配病毒内部基因的重要来源，在目前活禽市场环境 H9 亚型禽流感病毒污

染源头未得到有效控制的情况下，建议相关公共卫生部门密切关注活禽市场环境 H9N2 亚型禽流感病毒的污染及分子流行特征，为人禽流感疫情提供决策依据。

参考文献

- [1] Tong S, Zhu X, Li Y, *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses [J]. PLoS Pathog, 2013, 9 (10): e1003657.
- [2] Tong S, Li Y, Rivallier P, *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (11): 4269-4274.
- [3] Freidl GS, Meijer A, de Bruin E, *et al.* Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A (H5N1) [J]. Euro Surveill, 2014, 19 (18): 20793.
- [4] Senne DA, 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 [J]. Avian Dis, 1996, 40 (2): 425-437.
- [5] Srinivasan K, Raman R, Jayaraman A, *et al.* Quantitative description of glycan-receptor binding of influenza A virus H7 hemagglutinin [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e49597.
- [6] Lin TN, Nonthabenjawan N, Chaiyawong S, *et al.* Influenza A (H9N2) virus, Myanmar, 2014-2015 [J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23 (6): 1041-1043.

- [7] Zhao Y, Li S, Zhou Y, *et al.* Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from chickens in Shandong, China, between 1998 and 2013 [J]. *Biomed Res Int*, 2015; 267520.
- [8] Gao R, Cao B, Hu Y, *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (20): 1888-1897.
- [9] Chen H, Yuan H, Gao R, *et al.* Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection; a descriptive study [J]. *Lancet*, 2014, 383 (9918): 714-721.
- [10] Wan XF, Dong L, Lan Y, *et al.* Indications that live poultry markets are a major source of human H5N1 influenza virus infection in China [J]. *J Virol*, 2011, 85 (24): 13432-13438.
- [11] Shi J, Deng G, Liu P, *et al.* Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets-Implication of the source of current H7N9 infection in humans [J]. *Chin Sci Bull*, 2013, (16): 1857-1863.
- [12] Zhang T, Bi Y, Tian H, *et al.* Human infection with influenza virus A (H10N8) from live poultry markets, China, 2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20 (12): 2076-2079.
- [13] Huang Y, Li X, Zhang H, *et al.* Human infection with an avian influenza A (H9N2) virus in the middle region of China [J]. *J Med Virol*, 2015, 87 (10): 1641-1648.
- [14] 张如胜, 姚栋, 叶文, 等. 2014 年长沙市禽类场所环境 H9N2 亚型禽流感病毒分子流行特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33 (3): 212-221.
- [15] 刘晓蕾, 袁洁, 欧新华, 等. 长沙市首例人感染 H9N2 禽流感病毒的分离及基因特征分析 [J]. *现代预防医学*, 2016, 43 (17): 3225-3231.
- [16] 中国疾病预防控制中心. 职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案 (2011 版) [EB/OL]. (2011-11-29) [2017-10-23]. <http://www.cnic.org.cn/chn/down/show-down.php?downid=662>.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 全国流感监测方案 (2010 年版) [EB/OL]. (2010-09-10) [2017-10-23]. <http://www.moh.gov.cn/mohjbyfkzj/s3577/201009/48940.shtml>
- [18] Xu KM, Smith GJ, Bahl J, *et al.* The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from southern China, 2000 to 2005 [J]. *J Virol*, 2007, 81 (19): 10389-10401.
- [19] Lu JH, Liu XF, Shao WX, *et al.* Phylogenetic analysis of eight genes of H9N2 subtype influenza virus; a mainland China strain possessing early isolates' genes that have been circulating [J]. *Virus Genes*, 2005, 31 (2): 163-169.
- [20] To KK, Ng KH, Que TL, *et al.* Avian influenza A H5N1 virus; a continuous threat to humans [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2012, 1 (9): e25.
- [21] Ogata T, Yamazaki Y, Okabe N, *et al.* Human H5N2 avian influenza infection in Japan and the factors associated with high H5N2-neutralizing antibody titer [J]. *J Epidemiol*, 2008, 18 (4): 160-166.
- [22] Pan M, Gao R, Lv Q, *et al.* Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings [J]. *J Infect*, 2016, 72 (1): 52-59.
- [23] Zhang R, Chen T, Ou X, *et al.* Clinical, epidemiological and virological characteristics of the first detected human case of avian influenza A (H5N6) virus [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 40: 236-242.
- [24] Wei SH, Yang JR, Wu HS, *et al.* Human infection with a avian influenza A H6N1 virus; an epidemiological analysis [J]. *Lancet Respir Med*, 2013, 1 (10): 771-778.
- [25] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, *et al.* Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. *Lancet*, 2004, 363 (9409): 587-593.
- [26] Ostrowsky B, Huang A, Terry W, *et al.* Low pathogenic avian influenza A (H7N2) virus infection in immunocompromised adult, New York, USA, 2003 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18 (7): 1128-1131.
- [27] Hirst M, Astell CR, Griffith M, *et al.* Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10 (12): 2192-2195.
- [28] Arzey GG, Kirkland PD, Arzey KE, *et al.* Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18 (5): 814-816.
- [29] Cheng VC, Chan JF, Wen X, *et al.* Infection of immunocompromised patients by avian H9N2 influenza A virus [J]. *J Infect*, 2011, 62 (5): 394-399.
- [30] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, *et al.* Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus [J]. *Science*, 2006, 312 (5772): 404-410.
- [31] Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, *et al.* X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (20): 11181-11186.

收稿日期:2017-10-23 修回日期:2018-05-20