2014~2016年江苏地区H9N2亚型禽流感病毒遗传进化及其分子特征的分析

陈新武^{1†}, 段旭彤^{2†}, 王彦哲¹, 季雅宁³, 石晓娜, 李雪松¹, 杨健美¹, 刘芹防¹, 陈鸿军¹, 滕巧泐^{1*}, 李泽君^{1*}

1. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241;

2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110000;

3. 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: tengqy@shvri.ac.cn; lizejun@shvri.ac.cn

收稿日期: 2018-10-06; 接受日期: 2018-10-29; 网络版发表日期: 2018-12-12

上海市自然科学基金(批准号: 18ZR1449000)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(批准号: 2017JB04)资助

摘要 H9N2亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)在我国广泛流行, 给养禽业造成了巨大的经济损失, 还对公共卫生安全存在潜在威胁. 2014~2016年, H9N2亚型禽流感病毒在江苏地区的活禽市场的鸡中的阳性率为8.39%~13.74%. 选取10株H9N2分离株进行全基因组测序及遗传进化分析. 结果表明, H9N2分离株的HA基因与早期的江苏分离株位于同一小分支上, 且同源性较高, 但NA基因与早期江苏病毒株的同源性较低, 核苷酸同源性为91.4%~93.9%, 氨基酸同源性为91.2%~93.8%. 这些病毒株的基因型依然为B69, 为目前的优势基因型. 所有H9N2病毒分离株的HA蛋白的226位点为L. 固相受体结合实验结果显示, H9N2分离株具有人源 $\alpha 2, 6$ 唾液酸受体的结合特性.

关键词 禽流感病毒, H9N2, 进化分析, 基因型

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科A型流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的禽类高度接触性传染病, 有16个HA亚型和9个NA亚型^[1]. 根据禽流感病毒致病性的不同, 可分为高致病性禽流感病毒和低致病性禽流感病毒. 目前, 我国的低致病性禽流感疫情以H9N2亚型禽流感为主. 自1994年我国首次报道鸡(*Gallus gallus domesticus*)群中分离到H9N2亚型AIV以来^[2], 该亚型禽流感病毒在我国范围内广泛存

在, 可导致产蛋量下降, 与其他病原共感染时常导致高死亡率, 给养禽业造成了巨大的经济损失^[3~5]. H9N2 AIV也可直接感染哺乳动物, 在1999, 2003, 2013和2018年, 分别发生H9N2 AIV感染人的事件(http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_24January14.pdf)^[6~8]. 猪(*Sus*)是AIV“禽-猪-人”传播链中重要的中间宿主, 是人流感病毒与AIV发生重组的搅拌器和放大

引用格式: 陈新武, 段旭彤, 王彦哲, 等. 2014~2016年江苏地区H9N2亚型禽流感病毒遗传进化及其分子特征的分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1295~1309
Chen X W, Duan X T, Wang Y Z, et al. The phylogenetic analysis and molecular characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated in Jiangsu province from 2014 to 2016 (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 1295~1309, doi: [10.1360/N052018-00204](https://doi.org/10.1360/N052018-00204)

器, H9N2 AIV也可在猪中感染与传播^[9]。此外, H9N2 AIV内部基因具有非常好的兼容性, 可与其他亚型流感病毒发生重排, 从而产生新型重排流感病毒, 2013年H7N9亚型流感病毒和H10N8亚型流感病毒的内部基因就是由H9N2 AIV提供的, 其中H7N9病毒可导致大于25%的感染者死亡, 在社会上引发了巨大的恐慌^[10,11]。

H9N2 AIV为单股负链的RNA病毒, 基因组分为8个片段, 极易发生突变和重排。研究表明, H9N2 AIV的基因型在进化过程中可呈现多样性, 根据HA基因可分为7个分型, 分别为A~G^[12]。2009~2012年期间, H9N2 AIV可分为8个基因型(B64~B71), 其中B69为优势基因型^[13]。定期分析H9N2 AIV遗传进化及其分子特性, 及时了解病毒变异和重组情况, 对H9N2 AIV的防控是非常必要的。受体结合是流感病毒感染和适应宿主的第一步, 受体的特异性是流感病毒跨宿主传播的关键^[14]。之前已有学者发现, H9N2 AIV通过HA蛋白发生Q226L的改变, 其受体结合特性从主要结合禽源受体 α 2,3唾液酸受体转换为结合人源受体 α 2,6唾液酸受体^[4,15]。本研究在我国江苏省分离获得了10株H9N2 AIV(2014~2016年), 对其进行了全基因组测序, 分析了其遗传进化, 绘制了基因型, 并分析了其分子特性, 包括受体结合特性, 为H9N2 AIV的有效防控提供了依据。

1 材料与方法

1.1 病毒的分离

将从江苏省活禽市场收集的咽喉拭子样品(2014~2016年), 加入1.0 mL灭菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS), 5000 r/min离心10 min, 取上清液, 过滤除菌。将上述处理的上清液经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚, 0.1 mL/胚, 弃去接种24 h死亡的鸡胚, 37℃孵育72 h后置4℃过夜, 收集鸡胚尿囊液。经血凝实验和国家标准中特异性H9特异性引物PCR检测为阳性的尿囊液, -80℃保存。江苏H9N2病毒株Ck/Jiangsu/825/2009, Ck/Jiangsu/925/2009, Ck/Jiangsu/C1020/2012, Ck/Jiangsu/C1243/2012和Ck/Jiangsu/A2093/2011为实验室保存^[13]。

1.2 病毒的增殖与纯化

将上述病毒分离株, 稀释后接种9~11日龄SPF鸡胚, 通过有限稀释法纯化3次。纯化的病毒扩增后, 分装作为种毒, -80℃保存。

1.3 全基因组测序和遗传进化树分析

利用Trizol(购自TaKaRa公司, 日本)提取H9N2亚型禽流感病毒各分离株的总RNA, 反转录成cDNA, 用文献中引物^[16]进行8个片段的PCR扩增。PCR产物测序的结果用Seqman软件拼接, 并用MEGA5.2软件的Clustal对比方法及neighbor-joining方法绘制了发育进化树, bootstrap值设置为500。各个进化树皆以Ty/Wisconsin/1966(H9N2)为根。分析的基因片段对应的位置分别为HA基因(256~1073 bp)、NA基因(1~1377 bp)、PB2基因(31~2258 bp)、PB1基因(1~2208 bp)、PA基因(1~2128 bp)、NP基因(31~1438 bp)、M基因(1~946 bp)、NS基因(13~825 bp)。此外, 用Lasergene软件(Dnastar, Madison, WI)中的MegAlign软件分析不同病毒株的核苷酸或氨基酸的同源性。

1.4 固相受体结合实验

将Streptavidin-96-well strip plates(购自Thermo公司, 美国)用洗脱液洗3遍, 3 min/次; 加入100 μ L的糖基3'SLN-PAA或6'SLN-PAA(由糖基学会提供), 4℃过夜, 然后用洗脱液洗3次, 加入32U血凝效价的H9N2病毒液, 4℃过夜; 洗脱液洗3次, 加入100 μ L鸡源H9多抗(自制, 1:1000), 4℃保持2 h; 洗脱液洗3次, 加入100 μ L 1:4000稀释的HRP-羊抗鸡(购自Sigma公司, 德国)二抗, 4℃保持2 h; 洗脱液洗3次, 加入100 μ L邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)显色4 min, 加入50 μ L 2 mol/L硫酸终止液终止显色; OD₄₉₂下读值。

2 结果

2.1 H9N2 AIV分离

2014~2016年期间, 在江苏省多个活禽市场的鸡或鸭(*Anatinae*)中共采集拭子1090份, 其中鸡的样品为908份, 鸭的样品为82份。H9N2亚型禽流感病毒主要分离于鸡, 不同年代的H9N2阳性率为8.39%~13.74%,

而在鸭的分离率会较低, 不同年代H9N2阳性率为3.57%~6.06%(表1).

2.2 HA基因遗传进化分析

为了进一步分析H9N2 AIV遗传进化关系, 挑选了10株2014~2016年期间分离于活禽市场的H9N2 AIV分离株. 在鸡胚上进行有限稀释纯化病毒, 并进行全基因组测序. 依据国内流行株及国内外参考毒株核苷酸序列的同源性, 利用MEGA5.2软件绘制了HA基因的系统发育树(图1). 结果表明, 该10株H9N2 AIV的HA基因皆属于Ck/BJ/1/1994分支下的Subgroup II亚分支, 而商品疫苗株Ck/Shanghai/F/1998位于Ck/BJ/1/1994分支下的Subgroup I亚分支. 本研究中, 9株分离株的HA基因同源性很高, 彼此的核苷酸的同源性为95.6%~98.8%, 氨基酸同源性为95.7%~99.1%, 聚在相近的分支上, 且分布在早期江苏分离株Ck/Jiangsu/C1020/2012和Ck/Jiangsu/C1243/2012邻近, 但有一株分离株Ck/Jiangsu/F345/2015分布于另一株早期江苏分离株Ck/Jiangsu/A2093/2011的附近, 二者核苷酸和氨基酸的同源性均为100%.

2.3 NA基因遗传进化分析

依据国内流行株及国内外参考毒株核苷酸序列的同源性, 利用MEGA5.0软件绘制了NA基因的系统发育树(图2). 结果表明, 与大部分2009~2012年H9N2 AIV一致, 这些分离株的NA基因皆属于Ck/Shanghai/F/1998分支. 进一步分析发现, 这10株分离株的NA皆位于同一个小分支上, 同源性很高, 核苷酸同源性为96.4%~98.2%, 氨基酸同源性为96.1%~97.9%. 但与早期江苏分离株Ck/Jiangsu/A2093/2011, Ck/Jiangsu/C1020/2012, Ck/Jiangsu/C1243/2012和Ck/Jiangsu/DD6/2013同源性相对较低, 核苷酸同源性为91.4%~94.0%, 氨基酸同源性为91.2%~94.2%.

2.4 内部基因遗传进化分析

H9N2 AIV具有非常好的兼容性, 可为其他亚型流感病毒提供内部基因, 从而形成新的重排病毒. 10株H9N2 AIV分离株的PB2基因属于Ck/Zhejiang/B2013/2012分支(图3A), 核苷酸的同源性为94.8%~99.6%, 氨基酸同源性为98.2%~100%, 其中Ck/Jiangsu/F344/2015和Ck/Jiangsu/F345/2015 PB2的氨基酸同源性为100%. 分离株的PB1基因属于Ck/Shanghai/F/1998分支, 9株病毒株的PB1聚在进化树的一个小分支上(图3B), 1株病毒株Ck/Jiangsu/F345/2015与其他9株病毒株的遗传距离较远. PB1同源性分析比较结果显示, Ck/Jiangsu/F345/2015与其他9株病毒株的同源性略低, 核苷酸同源性为95.1%~96.4%, 氨基酸同源性为97.5%~98.8%. 同期, 这9株病毒株的核苷酸同源性为96.5%~98.8%, 氨基酸同源性为98.2%~99.2%. 这些分离株与2009~2012年的江苏分离株Ck/Jiangsu/825/2009, Ck/Jiangsu/925/2009, Ck/Jiangsu/A2093/2011, Ck/Jiangsu/C1020/2012, Ck/Jiangsu/C1243/2012和Ck/Jiangsu/DD6/2013之间的核苷酸同源性为95.6%~98.3%, 氨基酸同源性为97.5%~99.5%. 分离株的PA基因属于Ck/Shanghai/F/1998分支, 其中3株Ck/Jiangsu/E1065/2014, Ck/Jiangsu/E135/2014和Ck/Jiangsu/E1158/2014聚在一个小分支上, 另外7株病毒聚在另一小分支上(图3C), 两者之间的核苷酸同源性为96.1%~96.7%, 氨基酸同源性为98.9%~99.6%. NP基因属于Ck/Shanghai/F/1998分支(图3D), 但其中3株Ck/Jiangsu/F344/2015, Ck/Jiangsu/F345/2015和Ck/Jiangsu/G236/2016之间的同源性较高, 而其余7株间的同源性较高. 分离株的M基因属于Ck/Zhejiang/B2013/2012分支, 且聚集在一个小分支上(图3E). 分离株的NS基因也属于Ck/Zhejiang/B2013/2012分支, 但其中Ck/Jiangsu/E158/2014远离其余的9株分离株(图3F).

表1 2014~2016年期间江苏省活禽市场中H9N2 AIV分离情况

年份	2014	2015	2016	2014	2015	2016
	鸡			鸭		
阳性率	8.39%	13.74%	10.37%	6.06%	3.57%	4.76%
(H9N2病毒数/样品总数)	(34/405)	(36/262)	(25/241)	(2/33)	(1/28)	(1/21)

图 1 HA基因进化树

缩写如下: Ck, Chicken; Dk, Duck; Qa, Quail; Sw, Swine; Ty, Turkey

缩写如下: Ck, Chicken; Dk, Duck; Qa, Quail; Sw, Swine; Ty, Turkey

图 3 内部基因的遗传进化树

A, PB2; B, PB1; C, PA; D, NP; E, M; F, NS; 缩写如下: Ck, Chicken; Dk, Duck; Qa, Quail; Sw, Swine; Ty, Turkey

图3续1

图3续4

2.5 基因型分析

在H9N2 AIV的进化过程中, 形成多种基因型. 为了进一步了解该亚型病毒的基因型, 根据分离株8个片段的系统发育树, 绘制了病毒分离株的基因型(图4). 结果表明, 10株2014~2016年的江苏分离H9N2 AIV的基因型皆为B69, 与2009~2012年H9N2 AIV的基因型相同. 该基因型依然为目前国内H9N2 AIV的优势基因型.

2.6 分子特性分析

在本研究中, 10株江苏省2014~2016年分离株在HA蛋白226位点上皆为L(表2). 随机挑选其中的3株病毒株(Ck/Jiangsu/E135/2014, Ck/Jiangsu/E158/2014和Ck/Jiangsu/E1196/2014), 用固相受体结合实验检测其受体结合特性. 结果表明, 该3株病毒皆表现为主要结合人源受体 α 2,6唾液酸受体的特性(图5). 比较与受体

结合相关氨基酸位点183和228位点, 这10株病毒与较早分离的H9N2 AIV一致, 分别为N和G. 与Ck/Jiangsu/825/2009毒株不同(含PSKSSR), 分离株的HA裂解位点全部为PSRSSR. 与疫苗株Ck/Shanghai/F/1998及2009~2012年的H9N2分离株一致, 本研究中的H9N2 AIV分离株的NA蛋白均缺失62~64位氨基酸(表2). 研究发现, 当M2蛋白为27V或31N时, 流感病毒表现为金刚烷耐药性^[17], 而这些分离株的M2蛋白全部为27V和31N, 表明这些毒株均为金刚烷耐药毒株. 此外, 这些毒株的PB2蛋白627和701位点均为禽源的E和D.

3 讨论

低致病性H9N2亚型禽流感病毒主要流行于欧亚等国家, 与其他病原共感染时常导致高死亡率, 给养禽业造成了巨大的经济损失^[4]. 上海市动物疫病预防控

图4 H9N2 AIV基因型分析
a表示病毒株分离数

图 5 H9N2 AIV受体结合特性分析(网络版彩图)

表 2 H9N2 AIV HA, NA, M2和PB2蛋白上的氨基酸序列

病毒	基因型	受体结合位点上的氨基酸 (H3 numbering)			HA裂解位点	NA蛋白缺失	M2蛋白		PB2蛋白	
		183	226	228			27	31	627	701
Ck/Shanghai/F/1998	B3	N	Q	G	PARSSR	62~64	V	S	E	D
Ck/Jiangsu/825/2009	B69	N	L	G	PSKSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/925/2009	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/A2093/2011	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/C1020/2012	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/C1243/2012	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/E135/2014	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/E158/2014	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/E1065/2014	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/E1158/2014	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/E1196/2014	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/F344/2015	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/F345/2015	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/G46/2016	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/G149/2016	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D
Ck/Jiangsu/G236/2016	B69	N	L	G	PSRSSR	62~64	V	N	E	D

制中心的一份2009年监测报告显示, 在上海三大活禽批发市场中的样品H9亚型AIV平均阳性率为8.14%, 在免疫H9N2亚型AIV灭活苗的抗体合格率达到100%的样品中分离到了8株H9亚型AIV(8/90)^[18]. 2009~2012年H9N2 AIV在全国多个省市活禽市场的分离率为8.20%~11.58%^[13]. 相似的, 在本研究中, 活禽市场里的鸡携带H9N2 AIV的阳性率达到8.39%~13.74%, 但鸭子的H9N2 AIV分离率低于鸡.

流感病毒的表面蛋白有两种, 分别为HA蛋白和

NA蛋白, 在流感病毒感染与传播中起着重要作用, 也是病毒的主要抗原^[19,20]. 遗传进化分析结果表明, 10株江苏省H9N2病毒(2014~2016年)的HA基因都处在早期的江苏H9N2分离株的小分支上, 且它们的核苷酸和氨基酸的同源性都较高, 说明分离株HA基因进化速度较慢. 尽管如此, 这些分离株和2009年后的大部分H9N2病毒的HA基因与疫苗株Ck/Shanghai/F/1998的遗传距离较远, 在不同的亚分支上. 分离株的NA基因与江苏早期分离株(Ck/Jiangsu/A2093/2011, Ck/Jiang-

su/C1020/2012和Ck/Jiangsu/C1243/2012)同源性较低,表明NA基因在序列上变化较快,值得后期重点监测。但造成这一现象的原因尚不清楚,可能是因为该基因进化速率快,或者是因为其他亚型流感病毒的NA基因重排,需进一步深入研究。

自2009年开始, H9N2 AIV流行株的基因型发生了较大的改变, 主要为B69基因型^[13]。相较于以前的毒株, 该基因型的H9N2病毒能更稳定地存在于自然界, 且对鸡的致病性和接触传播性更强^[5]。研究表明, M基因是增强该基因型的H9N2 AIV致病性的关键基因之一^[21]。本研究中的10株H9N2分离株的基因型并没有发生变化, 仍然是B69。

禽流感病毒偏嗜 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体, 人流感病毒偏

嗜 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体。禽流感病毒的受体结合特性由 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体向 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体转变, 是禽流感病毒感染人的关键。早期, H9N2 AIV只感染水禽和鸡, 其受体特异性为禽源的 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体。继1999年人感染H9N2 AIV后, 倾向结合人源 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体的H9N2 AIV陆续出现^[6]。本研究中的H9N2 AIV HA蛋白皆为226L, 呈现为主要结合人源 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体的特性, 固相受体结合实验也进一步证实该结论。

总之, H9N2 AIV分离株的基因型依然未发生变化, B69为优势基因型, 但近年来其受体结合特性转变为人源 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体, 且NA基因序列变化也较大, 可能对人和公共卫生的潜力危险进一步加大, 需要加强对该病毒的监测。

参考文献

- 1 Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, 56: 152–179
- 2 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, 20: 3–5
- 3 吴海燕, 李明义, 范根成, 等. 33株H9N2亚型禽流感病毒分离株分子流行特别的研究. *中国动物检疫*, 2010, 27: 31–33
- 4 Li X, Shi J, Guo J, et al. Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 Avian Influenza viruses. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004508
- 5 Pu J, Wang S, Yin Y, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 548–553
- 6 Peiris M, Yuen K, Leung C, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 1999, 354: 916–917
- 7 Butt K M, Smith G J D, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol*, 2003, 43: 5760–5767
- 8 Xu J, Li S, Yang Y, et al. Human infection with a further evolved avian H9N2 influenza A virus in Sichuan, China. *Sci China Life Sci*, 2018, 61: 604–606
- 9 Wang J, Wu M, Hong W, et al. Infectivity and transmissibility of avian H9N2 influenza viruses in pigs. *J Virol*, 2016, 90: 3506–3514
- 10 Chen H Y, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*, 2014, 383: 714–721
- 11 Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1888–1897
- 12 Dong G, Luo J, Zhang H, et al. Phylogenetic diversity and genotypical complexity of H9N2 influenza A viruses revealed by genomic sequence analysis. *PLoS ONE*, 2011, 6: e17212
- 13 Teng Q, Xu D, Shen W, et al. A single mutation at position 190 in hemagglutinin enhances binding affinity for human type sialic acid receptor and replication of H9N2 avian influenza virus in mice. *J Virol*, 2016, 90: 9806–9825
- 14 Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14: 129–149
- 15 Wan H, Perez D R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J Virol*, 2007, 81: 5181–5191
- 16 Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology*, 2005, 340: 70–83
- 17 Aamir U B, Wernery U, Ilyushina N, et al. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology*, 2007, 361: 45–55
- 18 周锦萍, 李凯航, 鞠厚斌, 等. 上海地区活禽批发市场H9亚型禽流感病毒调查. *中国动物传染病学*, 2010, 18: 56–61
- 19 Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, 440: 435–436

- 20 Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, et al. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J Virol*, 1999, 73: 6743–6751
- 21 Pu J, Sun H, Qu Y, et al. M gene reassortment in H9N2 influenza virus promotes early infection and replication: contribution to rising virus prevalence in chickens in China. *J Virol*, 2017, 91: e02055

The phylogenetic analysis and molecular characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated in Jiangsu province from 2014 to 2016

CHEN XinWu^{1†}, DUAN XuTong^{2†}, WANG YanZhe¹, JI YaNing³, SHI XiaoNa¹, LI XueSong¹,
YANG JianMei¹, LIU QinFang¹, CHEN HongJun¹, TENG QiaoYang^{1*} & LI ZeJun^{1*}

*1 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;
2 College of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China;
3 College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China*

H9N2 avian influenza virus (AIV) circulates widely in China, causing a large economic loss to poultry industry and posing a big potential threat to public health. From 2014 to 2016, the positive ratio of H9N2 AIV isolation from chicken in the living market of Jiangsu province is 8.39%–13.74%. Ten H9N2 virus isolates were selected for whole genome sequencing and phylogenetic analysis. The result demonstrated that the HAs of those H9N2 virus isolates belonged to the same lineage and had a high homology with earlier Jiangsu isolates. In contrast, NA genes of those isolates evolved far away from the earlier Jiangsu isolates. Compared to earlier isolates, the nucleotide homology of NA genes and amino acid homology of NA protein were ranged from 91.4% to 93.9% and 91.2% to 93.8%, respectively. All those H9N2 viruses belonged to genotype B69 which predominates at present in China. The result of MegAlign analysis showed that 226 site in the hemagglutinins of those H9N2 isolates were Leucine. Further, it was proved that those H9N2 virus isolates preferred to bind to human type α 2,6 sialic acid receptor in solid-phase receptor binding assay.

avian influenza virus, H9N2, phylogenetic analysis, genotype

doi: [10.1360/N052018-00204](https://doi.org/10.1360/N052018-00204)