

# H9N2 禽流感不同毒株鸡胚交叉中和指数及其与 HA 基因氨基酸同源性相关的研究

刘娟<sup>1</sup> 张伟<sup>2</sup> 徐怀英<sup>2</sup> 马秀丽<sup>2</sup> 李建<sup>1</sup> 黄兵<sup>2</sup> 秦卓明<sup>1,2,3</sup> 崔言顺<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学 山东 泰安 271018; 2. 山东农业科学院 山东 济南 250100; 3. 山东省健牧生物药业 山东 济南 250100)

**摘要:** 对国内 1998–2011 年流行的 22 株 H9N2 分离株进行病原鉴定和 HA 基因的序列测定, 结合在 GenBank 中公开的 46 株国内外 H9N2 病毒进行序列比对, 绘制系统发育树。选取在时间、地点和遗传进化方面具有代表性意义的 6 株 H9N2 毒株, 分别制备单因子血清, 进行鸡胚交叉中和试验, 计算不同毒株之间的鸡胚交叉中和指数, 确定 H9N2 不同毒株之间的抗原相关系数, 并与其 HA 基因氨基酸的同源性进行相关比较。以期在分子水平上探讨我国疫苗免疫压力下 H9N2 禽流感病毒的变异, 研究病毒的抗原性变化, 探讨 HA 基因变异对抗原性的影响。结果表明: 鸡胚中和指数与 HA 氨基酸同源性呈显著相关 ( $P < 0.01$ ,  $r = 0.6398$ ), 表明在多年的疫苗免疫压力下, H9N2 病毒已经在分子水平和抗原性上发生了一定程度的变异。该结果为研制新型的 H9N2 疫苗提供理论支持。

**关键词:** H9N2; HA 基因; 抗原性; 相关性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000–7091(2013)05–0023–06

## Relationship between the Neutralization Index in Chicken Embryo and the Homologies of HA Gene of Different H9N2 AIV Isolates

LIU Juan<sup>1</sup> ZHANG Wei<sup>2</sup> XU Huai-ying<sup>2</sup> MA Xiu-li<sup>2</sup> LI Jian<sup>1</sup> HUANG Bing<sup>2</sup>,  
QIN Zhuo-ming<sup>1,2,3</sup> CUI Yan-shun<sup>1</sup>

(1. Shandong Agriculture University, Taian 271018, China; 2. Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China; 3. Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, China)

**Abstract:** In this paper 22 prevailed H9N2 AIV isolates in China from 1998 to 2011 were identified, purified, sequenced, analyzed and compared with the 46 H9N2 references in GenBank. Then the phylogenetic tree was re-constructed based on those H9N2 strains. First of all 6 representative isolates were chosen, which belong to different genotype, to make for signal positive serum. Secondly, the cross neutralization test was determined by using positive serums in specific pathogen free (SPF) chicken embryos, respectively. Thirdly, the correlation of the virus neutralization index (VN) in chicken embryo was compared with the amino acid homologies of HA gene of different H9N2 isolates by SPSS 14.0 software in order to explore the relationship between antigenic variations and genetic evaluations of the prevailed H9N2 isolates undergo the effect of vaccination. Importantly, the correlation coefficient and index of VN and amino acid homology was significantly correlated ( $P < 0.01$ ,  $r = 0.6398$ ), which suggested that the H9N2 virus undergo more than ten years of vaccination has changed to some degree at the molecular level and antigenicity. Collectively, these data implied that antigenic variations of H9N2 isolates result in the genetic mutations of HA, which was essential for developing the new vaccine.

**Key words:** H9N2; HA gene; Antigenicity; Relationship

低致病性禽流感 (Low pathogenic avian influenza, LPAI) 主要是由正黏病毒科 A 型流感病毒属

H9N2 亚型禽流感病毒引起的家禽、野鸟和部分哺乳动物发病的一种低致病性传染病, 对产蛋高峰鸡、

收稿日期: 2013–05–13

基金项目: 山东省科技攻关重点支持项目 (2009GG10009006); 济南市成果转化支持项目 (2012CG92)

作者简介: 刘娟 (1986–), 女, 山东青岛人, 硕士, 主要从事禽病分子病毒学研究。

通讯作者: 秦卓明 (1968–), 男, 河南淮阳人, 研究员, 博士, 主要从事禽病和分子病毒学研究。

崔言顺 (1959–), 男, 山东莱芜人, 教授, 主要从事动物病毒研究。

肉种鸡和商品肉鸡危害极大<sup>[1-2]</sup>。该病自 1992 年在我国确诊以来,已有 20 年的流行史,不同毒株间毒力和免疫原性差异较大,特别是自 2007 年以来,免疫失败的现象时有发生,给临床疫病的防控带来诸多困难<sup>[3-4]</sup>。

LPAI 病毒基因组由 8 个单股负链 RNA 片段组成,其中,血凝素(HA)基因的变异频率最高,且在病毒的吸附和穿膜的过程中起关键作用,是构成病毒囊膜纤突的主要成分,与病毒的血凝活性<sup>[5]</sup>、中和抗体等抗原性密切相关<sup>[6]</sup>,是导致免疫失败的主要原因<sup>[7-8]</sup>。

本研究通过对近年来在国内发生的 H9N2 亚型毒株进行病毒分离鉴定,测定其 HA 基因,依据系统发育树选取代表株制备单因子阳性血清,进行鸡胚交叉中和试验,利用统计学软件对其抗原性和基因的遗传变异进行相关比较,旨在探讨二者变异的关联度。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

1998-2011 年山东、江苏等不同地区可疑 H9N2 流行株,利用 10~11 日龄 SPF 鸡胚进行病毒增殖纯化培养,经用特异性 H9N2 阳性血清作 HI 交叉抑制试验进行鉴定,排除 NDV 等具有血凝性的病毒。−70℃ 保存,作为毒种备用。

### 1.2 主要试剂

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶、RNasin、dNTP 购自 Promega 公司; Taq 酶、pMD18-T 载体试剂盒等购自 TaKaRa(大连)公司; SPF 鸡胚由山东无特定病原鸡试验种鸡场提供;感受态细胞 DH5α 由山东省禽病免疫与诊断重点实验室惠赠。

### 1.3 引物设计

参照 GenBank 中 H9N2 亚型 AIV 的 HA 序列设计引物,用于扩增 HA 基因,序列为 P1: 5'-AGC AAAAGCAGGGGAATTT-3', P2: 5'-AGTAGAAAC AAGGGTGTTTT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.4 RT-PCR

按试剂盒说明提取病毒 RNA,利用适量 DEPC 水溶解。在 PCR 管中加入 5×RT Buffer 2 μL, RNA 5.2 μL, 10 μmol/L dNTP 0.8 μL, 20 μmol/L P1 0.8 μL, 40 U/μL RNasin 0.5 μL, 经 70℃ 加热 5 min 后,加入下列成分: 200 U/μL M-MLV 0.7 μL。反应总体积 10 μL,轻轻混匀,42℃ 30 min,然后 95℃

2 min。然后以 RT 产物作为模板进行 PCR。PCR 反应体系: RT 产物 5 μL; 10×PCR Buffer 4 μL; 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL; 20 μmol/L P2 1 μL; Ex-Taq 0.5 μL,加灭菌去离子水至 50 μL。反应条件: 95℃ 3 min,此后 94℃ 40 s, 54℃ 40 s, 72℃ 2 min,进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖中电泳进行检验。

### 1.5 序列测序

按照试剂盒说明回收 PCR 产物,按 pMD18-T 载体试剂盒说明进行连接。将经过双酶切和 PCR 扩增双重鉴定的阳性质粒送上海博尚生物技术有限公司测序。利用 Lasergen 7.1 和 Mega 5.1 软件对分离株以及 GenBank 中下载的 46 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因进行核苷酸(氨基酸)同源性比较和系统进化分析。

### 1.6 阳性血清制备

依据系统发育树,参考毒株所在的不同分支,结合病毒来源和年代差异筛选 6 株代表病毒,分别接种 SPF 鸡胚,无菌收获抗原液,检验合格后灭活,按常规制备油乳剂灭活苗,分别免疫 SPF 鸡 2 次,间隔 2 周。第 2 次免疫 3 周后采集血清,−70℃ 保存<sup>[9]</sup>。

### 1.7 交叉中和试验

参照文献方法<sup>[9]</sup>,采用固定病毒稀释血清法对上述 6 个毒株进行鸡胚病毒交叉中和试验,同时设病毒对照和空白对照,计算其病毒交叉中和指数。

### 1.8 中和指数与 HA 基因氨基酸同源性的相关比较

利用统计学软件 SPSS 14.0 对 H9N2 亚型 AIV 鸡胚交叉中和指数和 HA 基因的氨基酸同源性进行相关分析,比较 H9N2 病毒的抗原性变异和 HA 基因变异的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒分离和鉴定

将可疑病料接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚,鸡胚大部分在 48~96 h 死亡,取尿囊液检测具有血凝性。盲传 3 代后,经用特异性 H9N2 阳性血清作 HI 交叉抑制试验,排除新城疫和禽流感 H<sub>5</sub> 亚型、减蛋综合症(EDS-76)等具有血凝性的病毒,鉴定为 H9N2 病毒,获得 22 株病毒。

### 2.2 HA 基因序列比较、分子特征分析和系统进化

#### 2.2.1 HA 基因核苷酸(氨基酸)序列同源性比较

对 22 株 H9N2 毒株 HA 基因进行测序,其 HA 基因核苷酸序列全长均为 1 742 bp,含一个长度为 1 683 bp 的开放阅读框(ORF),编码 560 个氨基酸。1998-2011 年间 H9N2 HA 基因核苷酸同源性为

89.8% ~ 99.9% ,氨基酸同源性为 90.1% ~ 100% ,不同年代的毒株同源性差异较大。一般来讲 ,同一时期的流行毒 ,其核苷酸或氨基酸同源性较高: 如 1998 - 2005 年的毒株其核苷酸同源性为 92.3% ~ 98.9% ,氨基酸同源性为 93.1% ~ 99.2% ; 2005 - 2011 年的核苷酸同源性为 92.8% ~ 99.9% ,氨基酸同源性为 93.4% ~ 100% 。

目前国内的 H9N2 流行株十分复杂 ,既有与经典毒株 CK/BJ/1/94 同源性较高的毒株 ,也有与 CK/BJ/98( 1998 年流行) 同源性较高的毒株 ,但大部分流行毒株已与传统毒株有较大差异。特别是与经典疫苗株 CK/SD-6/1996 和 CK/GD/SS/1994 的差别 ,如 1998 - 2005 年的传统分离株与疫苗株核苷酸同源性为 94.9% ~ 96.4% ( 氨基酸同源性为 95.4% ~ 98.8% ) ,但与 2010 - 2011 年的核苷酸同源性已降低至不足 90% ,且这种差距还在不断扩大。这表明 经过 15 年的疫苗免疫( 1998 年开始) , H9N2 流行株已经在分子水平上发生改变。

**2.2.2 HA 基因裂解位点和分子特征分析** 进一步分析发现 22 株病毒中 ,有 19 株病毒的蛋白裂解位点为 RSSR ↓ GLF ,符合低致病性禽流感的序列特征 这与生物学检测指标一致。但有 3 株病毒的裂解位点发生突变为 RSSR ↓ GIF ,生物学检测也是弱毒。其中 ,筛选制备血清的 6 株病毒中 ,CK/SD/SD2005( 简写: JN5/05 ,下同) 、CK/JS/YZ/2000 ( YZ/00) 、CK/SD/BD2008 ( BD/08) 、CK/SD/S2/1998( S2/98) 、CK/SD/SX/2010( SX/10) 等 5 株病毒的裂解位点均为 RSSR ↓ GLF ,只有 CK/Plmh/2010 ( Plmh2/10) 一株病毒的裂解位点为 RSSR ↓ GIF。

但其突变的原因有待进一步研究。

22 株病毒的受体结合位点和潜在的糖基化位点总体保持稳定。109 ,161 ,163 ,191 ,202 ,203 位的受体结合位点分别是 Y、W、T、N、L、Y ,与经典原始毒株 CK/BJ/1/94 保持一致。198 位受体结合位点存在 V、A 这 2 种情况。有 12 株病毒的 234 位受体结合位点由 Q 突变为 L ,具有与哺乳动物唾液酸 α 2-6 受体结合的特性。其中: 筛选出的 6 株病毒均有 8 个潜在的糖基化位点。198 位受体结合位点变化较多 ,存在 V、A 这 2 种情况。234 位受体结合位点处 ,Plmh2/10、S2/98、SX/10 这 3 株病毒均由 Q 突变成 L ,具有与哺乳动物唾液酸 α 2-6 受体结合的特性。这表明 部分 H9N2 流行株已具备攻击哺乳动物的潜在能力。

**2.2.3 HA 基因系统进化分析和毒株抗原性的选择** 基于 H9N2 的 HA 基因核苷酸序列全长绘制了系统发育树 ,见图 1。很明显 ,H9N2 亚型可分为欧亚谱系和北美谱系 ,而欧亚谱系又分为多个亚系 ,分别为 HK-78、HK-99、BJ94、SD98-09、SH02-10、GD07-08、SD09-11、ZJ07-11 等。本研究涉及的 22 株 H9N2 因时间、地点等分属不同的亚系 ,见表 1。

依据系统发育树 ,参考 H9N2 流行毒株所在的不同分支、病毒来源和年代差异筛选 6 株代表毒株 ( JN5/05、YZ/00、Plmh2/10、BD/08、S2/98 和 SX/10) ,分别制备单因子阳性血清 ,进行抗原性比较。其中 ,BD/08 和 SX/10 属于同一个分支 ,氨基酸同源性高达 98.2% ,目的是验证相同基因型的毒株 ,其抗原性是否一致。

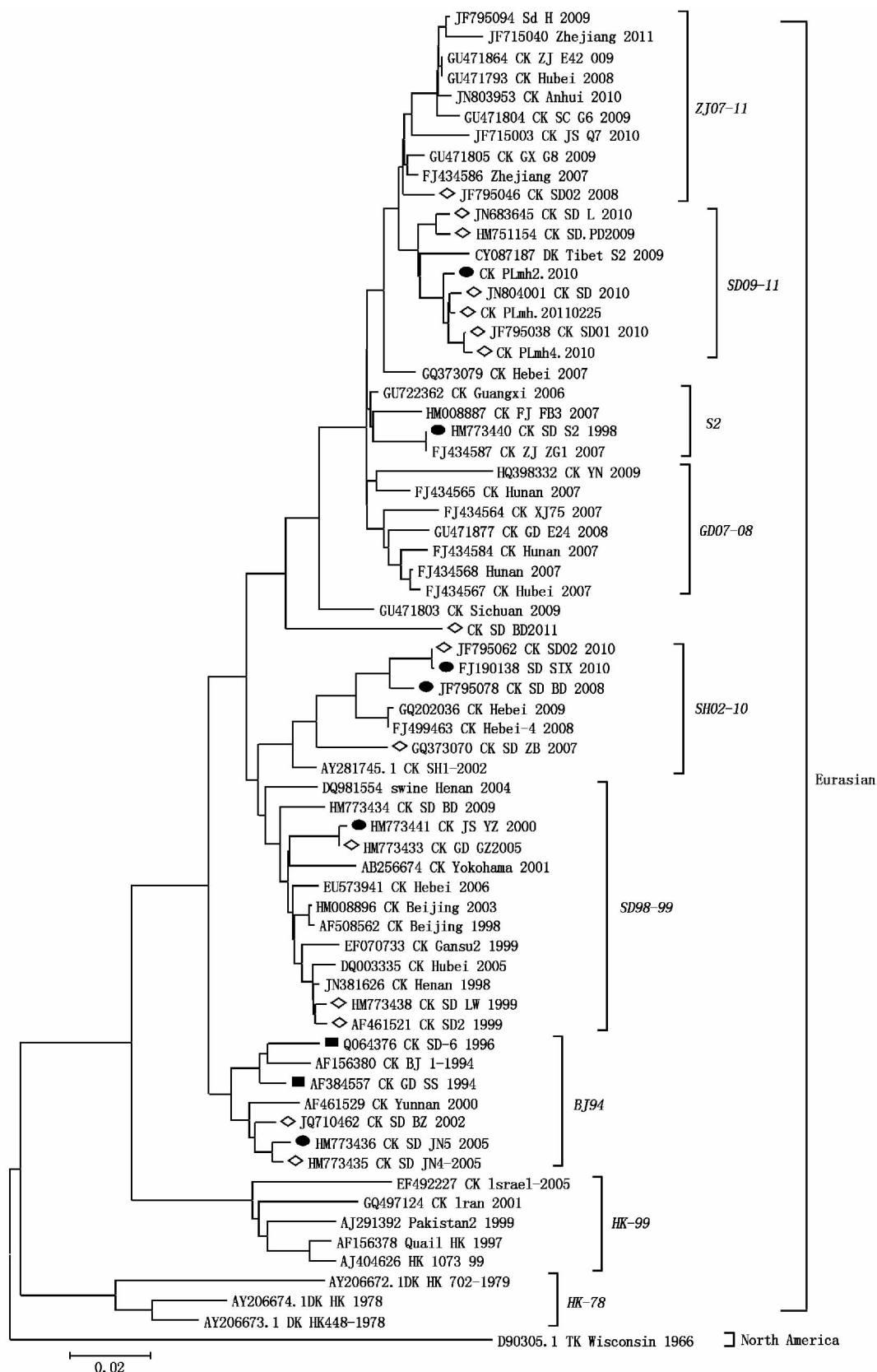
表 1 H9N2 亚型禽流感分离株和基因型

Tab.1 Different H9N2 influenza virus isolates and genotypes

毒株 Strain	基因型 Genotype	分离地点 Location	毒株 Strain	基因型 Genotype	分离地点 Location
CK/SD2/1999	SD98-09	山东泰安	CK/SD/2010	SD09-11	山东潍坊
CK /SD/LW/1999	SD98-09	山东潍坊	CK/SD/P4/2010	SD09-11	山东烟台
<b>CK/JS/YZ/2000</b>	SD98-09	江苏扬州	<b>CK/SD/SX/2010</b>	SH02-10	山东聊城
<b>CK/SD/S2/1998</b>	S2	山东聊城	<b>CK/ PLmh2/2010</b>	SD09-11	山东烟台
CK/GD/GZ/2005	SD98-09	广东广州	CK/PLmh4/2010	SD09-11	山东烟台
<b>CK/SD/JN5/2005</b>	BJ94	山东济南	CK/PLmh20110225	SD09-11	山东烟台
CK/SD/JN4/2005	BJ94	山东济南	CK/SD01 /2010	SD09-11	山东烟台
CK/SD/PD/2009	SD09-11	山东滨州	CK/SD02 /2008	ZJ07-11	山东威海
<b>CK/SD/BD/2008</b>	SH02-10	山东滨州	CK/SD/H/2009	ZJ07-11	山东聊城
CK/SD/BD/2009	SD98-09	山东滨州	CK/SD/L/2010	SD09-11	山东聊城
CK/SD/BD/2011	Not sure	山东滨州	CK/SD/SIX/2010	SH02-10	山东平邑
CK/SD/BZ/2002	BJ94	山东滨州	CK/SD/ZB/2007	SH02-10	山东滨州

注: CK. 鸡源; SD. 山东; 黑体字表示用来制备单因子血清的毒株。

Note: CK. Indicate Chicken; SD. Indicate Shandong; Black isolates were chosen to make reference serum.



2.3 中和效价和氨基酸同源比较

6 株 H9N2 亚型 AIV 鸡胚交叉中和试验结果见表 2。结果表明: 同种病毒和对应血清中和效价最高; 同一分支内的毒株效价次之; 反之, 遗传距离愈远, 其中和效价则愈小。不同毒株的中和效价存在差异, 反应出 H9N2 亚型毒株之间的抗原性差异。

表 2 H9N2 亚型禽流感不同毒株间的鸡胚中和效价

Tab.2 Results of virus neutralization tests among H9N2 AIV strains in embryo

毒株 Strain	JN/05 <sup>*</sup>	YZ/00	Plmh2/10	BD/08	S2/98	SX/10
JN/05 <sup>**</sup>	284	112	512	126	113	84
YZ/00	281	142	168	112	109	128
Plmh2/10	178	94	512	91	71	188
BD/08	200	71	385	102	89	81
S2/98	512	128	220	183	354	83
SX/10	159	128	149	89	71	223

注: <sup>\*</sup>. H9N2 抗体; <sup>\*\*</sup>. H9N2 抗原。  
Note: <sup>\*</sup>. Anti-serum against H9N2; <sup>\*\*</sup>. H9N2 isolates.

H9N2 亚型禽流感病毒中和指数结果见表 3。结果显示: 6 株病毒的中和指数为 0.27 ~ 0.88。其中, JN5/05 对 YZ/00 的中和值最高, 为 0.88, 显著高于对其他毒株的中和指数, 暗示其可能具有较好的免疫原性。同处于一个分支的 BD/08(2008 年分离) 和 SX/10(2010 年分离), 其中和指数为 0.56, 二者显然具有较高的交叉保护性, 其氨基酸同源性为 98.2%。这个结果再次证实不同病毒的中和指数可

能与氨基酸同源性高度相关, 同时验证了试验结果的可靠性。而不同年代的毒株, 差异较大, 如 1998 年分离的 S2/98 对 SX/10(2010 年分离) 的中和值为 0.27, 在 6 株病毒中最低, 与 Plmh2/10(2010 年分离) 的中和值仅为 0.29, 也较低。这间接证实: 自 1998 年以来, 我国的 H9N2 亚型 AIV 病毒已在抗原性上发生改变。

表 3 H9N2 亚型禽流感不同毒株间的鸡胚中和指数和氨基酸同源性比较

Tab.3 Comparison with indexes of virus neutralization tests in embryo and homologies of H9N2 AIV strains

毒株 Strain	JN/05	YZ/00	Plmh2/10	BD/08	S2/98	SX/10
JN/05	*	95.7 <sup>#</sup>	93.2	96.4	95.9	96.2
YZ/00	0.88 <sup>##</sup>	*	93.4	96.4	94.6	95.7
Plmh2/10	0.79	0.47	*	94.5	97.7	94.5
BD/08	0.63	0.55	0.67	*	95.5	98.2
S2/98	0.76	0.53	0.29	0.67	*	95.9
SX/10	0.46	0.72	0.50	0.56	0.27	*

注: <sup>#</sup>. H9N2 毒株 HA 基因的氨基酸同源性; <sup>##</sup>. 鸡胚中和指数。  
Note: <sup>#</sup>. Means the amino acids homologies of HA gene; <sup>##</sup>. Means indexes of VN.

2.4 H9N2 亚型 AIV 中和指数与氨基酸同源性的相关性

利用统计学 SPSS 14.0 对 H9N2 亚型 AIV 病毒中和指数与其 HA 基因氨基酸的同源性进行相关分析, 结果发现 H9N2 各毒株之间的抗原中和指数与其 HA 基因氨基酸的同源性呈显著相关 ( $P < 0.01$ )  $r = 0.6398$ 。

图 2 则具体显示了 H9N2 不同毒株之间病毒中和指数与其 HA 基因氨基酸同源性一一对应的相关性。对图 2 的分析表明: 当 2 个毒株 HA 基因氨基酸序列高度同源时, 其病毒中和效价亦较高; 反之亦然。这表明: H9N2 亚型 AIV 的中和能力与 HA 基因的遗传变异高度相关。

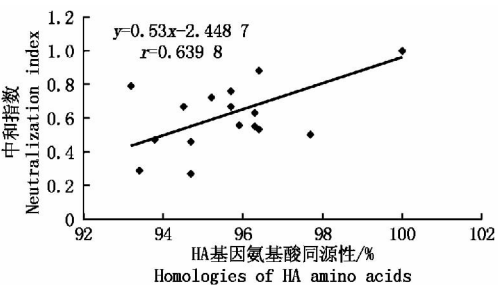


图 2 H9N2 亚型 AIV 病毒中和指数与其 HA 基因核苷酸的同源性

Fig.2 Correlations between homologies of HA amino acids and neutralization index of H9N2 AIV strains

3 讨论

H9N2 流感病毒不仅在家禽中广泛流行, 还可

以感染哺乳动物和人,对公共卫生健康 构成了严重威胁<sup>[10-16]</sup>。对病毒进行 HA 基因的遗传变异分析发现,2005 年后分离的 17 株野毒中有 12 株病毒的 234 位为 L,具有与哺乳动物唾液酸  $\alpha$  2-6 受体结合的特性。22 株病毒与香港分离到的人源 H9N2 禽流感病毒的 HA 基因同源性为 90.9% ~ 96.3%,且部分毒株已具备唾液酸  $\alpha$  2-6 受体,这表明: H9N2 流行毒对人感染的能力在逐渐增强,这与程小雯等<sup>[17]</sup>的结论相同。因此,必须关注 H9N2 防治过程中的公共卫生意义。

有关 H9N2 亚型 AIV 抗原性变异的争论较多<sup>[6,18]</sup>。本研究对筛选的 6 株 H9N2 亚型病毒血清进行交叉中和试验,结果发现各毒株之间仍具有一定的交叉保护,中和指数大都在 0.27 以上(而大于 0.1 就属于一个血清型),远未突破形成新血清型的阈值<sup>[9]</sup>。这表明, H9N2 流行株尽管存在一定的抗原性差异,但仍属于一个血清型,仍能够产生一定的交叉保护。不可忽视的是 H9N2 疫苗免疫保护率在逐年下降,研制新的疫苗刻不容缓。进一步通过统计学软件分析证实:免疫压力下的 H9N2 流行毒基因点突变形成的氨基酸变异正在对抗原性产生一定的影响。因此,该结果对于科学防控 H9N2 禽流感病毒意义重大。

#### 参考文献:

- [1] 甘孟侯. 全球禽流感的流行形势 [J]. 中国预防兽医学报, 2004(06): 69-72.
- [2] Alexander D J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australasia, 2002-2006 [J]. Avian Dis, 2007, 51(1 Suppl): 161-166.
- [3] 鲁健, 田科雄. H9N2 禽流感病毒研究进展 [J]. 实用预防医学, 2011, 18(02): 383-385.
- [4] 王友令, 袁小远, 徐怀英, 等. 高抗体水平肉种鸡 H9N2 的分离鉴定及 HA 基因序列分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 23-27.
- [5] 丛彦龙, 刘金华. 流感病毒血凝素在宿主特异性转变中的分子基础 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(06): 737-742.
- [6] 岳华, 汤承, 杨发龙, 等. 中国大陆 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因遗传分析及抗原相关性研究 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 36(02): 200-205.
- [7] 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(02): 122-128.
- [8] 陈陆, 郑鹿平, 赵军, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白 SI45N 变异株致病性及抗原特性 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(01): 82-89.
- [9] 秦卓明, 徐怀英, 欧阳文军, 等. 新城疫不同毒株交叉鸡胚中和指数及其与 F 和 HN 基因变异的相关性 [J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 226-233.
- [10] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9654-9658.
- [11] Bano S, Naeem K, Malik S A. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens [J]. Avian Dis, 2003, 47(3 Suppl): 817-822.
- [12] 于博, 章振华, 姜北宇, 等. 4 个 H9N2 亚型禽流感病毒毒株 HA 基因序列比较与分析 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15169-15171.
- [13] 程宁宁, 潘志明, 耿士忠, 等. 禽流感病毒 A/Chicken/Yangzhou/N/2005(H9N2) HA 基因的克隆及序列分析 [J]. 中国家禽, 2007, 29(24): 23-25.
- [14] 詹丽娥, 乔忠, 薛俊龙, 等. H9N2 亚型禽流感病毒株的分离和鉴定 [J]. 山西农业科学, 2004, 32(4): 74-76.
- [15] 王友令, 袁小远, 徐怀英, 等. 一株商品肉鸡腺胃 H9N2 的分离鉴定及 HA 基因序列分析 [J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 37-41.
- [16] Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China [J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.
- [17] 程小雯, 刘建军, 何建凡, 等. 深圳地区人和鸡群中 H9N2 亚型流感病毒病原学和血清流行病学调查 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16(04): 19-21.
- [18] 陈陆, 刘守川, 赵军, 等. 不同 H9N2 亚型禽流感病毒分离株致病力研究及 HA 抗原性变异分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(24): 5100-5107.