

H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白 S145N 变异株致病性及抗原特性

陈 陆, 郑鹿平, 赵 军, 王川庆, 王泽霖*

(河南农业大学禽病研究所, 郑州 450002)

摘 要: 为确定近年来 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV) HA 蛋白 S145N 点突变对病毒毒力变化和抗原性变异的影响, 笔者对从全国不同地区分离的 12 株 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白 S145N 变异株和 HP 疫苗参考株进行了半数鸡胚感染量(EID_{50})、半数鸡胚致死量(ELD_{50})、平均鸡胚致死时间(MDT)、雏鸡脑内致病指数(ICPI)、鸡静脉致病指数(IVPI)和 8 周龄 SPF 鸡感染排毒试验, 并与抗 H9N2 亚型 AIV HP 参考株 HA 蛋白单抗 2A4 和 F6 的血凝抑制(HI)和中和反应特性进行测定。结果发现, H9N2 亚型 AIV HA 蛋白 S145N 变异株毒力偏强, 能引起部分 SPF 鸡发病和死亡, 感染 8 周龄 SPF 鸡排毒时间更早, 排毒期更长。单抗 2A4 和 F6 不能抑制 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白 S145N 变异株的血凝特性, 也不能中和病毒感染 CEF 细胞。研究结果表明, H9N2 亚型 AIV 呈现变异趋势, 有毒力增强和抗原性变异毒株出现。S145 为 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的 1 个抗原位点, 是血凝抑制抗体结合的位点, 但有该位点漂变导致抗原变异毒株出现, 并可逃避免疫作用。这提示该病的防控面临着新的挑战。

关键词: 禽流感病毒; H9N2 亚型; HA 蛋白; S145N; 致病性; 抗原变异

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0082-08

Characteristics of Pathogenic and Antigenic Variation of H9N2 Avian Influenza Viruses HA S145N Mutants in China

CHEN Lu, ZHENG Lu-ping, ZHAO Jun, WANG Chuan-qing, WANG Ze-lin*

(Institute of Poultry Disease, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the effect of HA S145N mutation on pathogenicity and antigenicity of H9N2 avian influenza viruses (AIV), the EID_{50} , ELD_{50} , MDT, ICPI, IVPI and the duration of shedding virus from infected 8-week-old SPF chickens of different H9N2 AIV strains with HA S145N mutation isolated from Mainland China were determined. The HI and VN activity of monoclonal antibody 2A4 and F6 on different H9N2 AIV isolates were assayed. The determined pathogenicity suggested that the H9N2 AIVs with HA S145N mutation have higher pathogenicity and can cause the death of SPF chickens. The 8-week-old SPF chickens infected by H9N2 AIVs with HA S145N mutation shed virus earlier and last for a longer time. Monoclonal antibody 2A4 and F6 can inhibit the hemagglutinin activity of H9N2 AIVs with HA S145N mutation, however it can not neutralize the virus infection on CEF cells. The results showed that the H9N2 subtype AIVs have the tendency to evolve, resulting in the occurrence of mutants which have higher virulence and variable antigenicity. The site (S145) is one of HA protein epitope of the H9N2 subtype AIV. The higher virulent mutants may cause death of chickens and lead to more economic loss. The antigenic mutants may escape from immune clearance, which pose a new challenge to the immunoprophylaxis for the H9N2 avian influenza.

收稿日期: 2011-07-21

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2008GB2D000182; 2011GB2D000007)

作者简介: 陈 陆(1971-), 男, 河南省罗山县人, 副教授, 博士, 主要从事动物传染病学研究与教学工作, E-mail: chenluhau@126.com

* 通讯作者: 王泽霖(1942-), 男, 江苏省苏州人, 教授, 主要从事动物传染病学研究和禽用疫苗研发工作, E-mail: wangzelin@163.com

Key words: avian influenza virus; H9N2 subtype; HA glycoprotein; S145N; pathogenicity; antigenic variation

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)是危害养禽业和人类健康的重要病原,已发现有 16 个血凝素(HA)亚型^[1]和 10 个神经氨酸酶(NA)亚型。H9N2 亚型 AIV 最早于 1966 年分离于火鸡,虽然表现低致病性,但由于传播广泛,能造成免疫抑制并使宿主容易发生继发感染,特别是可导致鸡群产蛋下降或完全停止,给养禽业造成巨大经济损失,其危害不容忽视。近年来,H9N2 亚型禽流感的流行变得日益频繁,病毒也进入了一个快速进化阶段,有可能进一步发生遗传变异而进化出毒力更强的毒株,或是受体结合位点的突变导致出现具有与人和哺乳动物流感病毒受体结合的能力,或者出现抗原性变异后导致免疫失败^[2-4]。因此,H9N2 亚型 AIV 的进化与变异不仅会给目前禽流感的防控带来困难,而且还有传染给人的潜在威胁,所以,加强 H9N2 亚型 AIV 变异株的监测和防控措施研究具有重要的现实意义。血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)是 A 型流感病毒主要表面抗原和保护性抗原,与病毒的感染性、致病性、宿主特异性、增殖及组织嗜性有关。但 HA 基因变异频率很高,其变异直接决定了 AIV 的致病性和抗原性变异,甚至单氨基酸(尤其是抗原位点或潜在糖基化位点氨基酸)的突变即可影响到病毒抗原性和致病性,导致变异株与单抗呈现独特的反应特性^[5-8]。作者对 1998—2008 年临床分离 H9N2 亚型 AIV 毒株进行致病性和抗原性研究时发现,部分毒株出现毒力增强和变异趋势,对鸡胚和 SPF 鸡致病性较一般毒株强,现有的疫苗对其不能提供完全保护,序列分析发现该类毒株 HA 蛋白 145 位氨基酸由 S (Ser) 漂变为 N (Asn) (S145N),造成 145—147 位氨基酸多出 1 个糖基化位点 NGT,且与相应的单抗不发生反应^[9]。为了确定该类 S145N 变异毒株的特征和流行情况,对 GenBank 中收录的 H9N2 亚型 AIV HA 基因进行分析,在登录的 1 368 条序列中,中国大陆分离株 573 株,145 位 S 突变为 N 的毒株共 34 株(约 5.9%)。对上述 34 株中与别人交换或赠送收集到的 9 株及本实验室分离保存的 3 株变异株进行致病性和抗原性研究,以确定 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白 S145N 点突变对病毒致病性和抗原特性的影响,研究和分析当前 H9N2 亚型 AIV 的变异特点和规律,拟为该病的防控提供指导。

1 材料与方法

1.1 毒株

12 株 H9N2 亚型 AIV S145N 变异株(编号: N1~N12)的背景材料见表 1,其中,N1、N3 和 N12 由河南农业大学禽病研究所分离、纯化、鉴定和保存,N2 由江苏省农业科学院李明研究员惠赠,N4 和 N5 由扬州大学刘秀梵院士惠赠,N6、N7 和 N8 由青岛农业大学尹燕博教授惠赠,N9 由扬州大学秦爱建教授惠赠,N10 和 N11 由山东省农业科学院张秀美研究员惠赠。HP 株是由国家流感中心鉴定,并经农业部批准的现行制苗用毒株之一。

1.2 H9N2 多抗血清、单抗 2A4 和 F6

单抗 2A4 和 F6 是河南农业大学禽病研究所分离 H9N2 亚型 AIV HP 株为抗原免疫 BALB/c 小鼠,应用杂交瘤技术,经 HI 方法筛选制备的抗 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的单抗^[10];多抗血清是以 H9N2 亚型 AIV HP 疫苗株免疫 SPF 公鸡获得的。

1.3 变异株对鸡胚的致病性试验

参照有关文献介绍的方法^[9]测定 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株半数鸡胚感染量(EID₅₀)、半数鸡胚致死量(ELD₅₀)和平均鸡胚致死时间(MDT)。

1.4 变异株对 SPF 鸡的致病性试验

1.4.1 1 日龄雏鸡脑内致病指数(ICPI)和 6 周龄鸡静脉致病指数(IVPI) 参照有关文献介绍的方法^[11]测定 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株 1 日龄雏 ICPI 和 6 周龄鸡 IVPI。

1.4.2 8 周龄 SPF 鸡人工感染排毒试验 选择 N1、N3 和 HP 株尿囊液(10⁷ EID₅₀)用灭菌 PBS 液作 1:10 稀释,由静脉接种 8 周龄 SPF 鸡,每组 5 只,每只 0.2 mL。从接毒后第 3—10 天采集喉头和泄殖腔拭子,1 次冻融,加入双抗或除菌,随即接种 SPF 鸡胚,每个拭子样本接种 2 枚,37℃培养 72 h,收取尿囊液并测定 HA 效价,同一拭子接种的 2 枚鸡胚中之一 HA 效价≥4log₂ 即判为病毒分离阳性。

1.5 免疫鸡对变异株的攻毒保护试验

28 日龄 SPF 鸡 50 只,分成 3 组。第 1 组 20 只,每只肌肉注射 HP 株灭活疫苗 1 羽份(0.5 mL·只⁻¹);第 2 组 20 只,每只肌肉注射 HP+N3 株(1:1)灭活疫苗 1 羽份(0.5 mL·只⁻¹);第 3 组 10 只,不免疫作对照。免疫 3 周后采血,分别用疫苗毒 HP 株、

变异株 N3 作抗原,测定 HI 抗体。同时各组中一半鸡用 HP 株攻毒,另一半用变异株 N3 攻毒,均隔离喂养。攻毒的方法、病毒分离和判定标准同 1.4.2。

1.6 单抗 2A4 和 F6 对变异株的 HI 特性测定

按照 GB/T 18936-2003《高致病性禽流感诊断技术》进行,将 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株分别配制成 4 单位抗原,在同一条件下分别与 HA 单抗 2A4 和 F6 进行 HI 试验,鉴定单抗对 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株的 HI 特性。

1.7 单抗 2A4 和 F6 对变异株的中和特性测定

利用固定单抗稀释病毒法^[12],测定单抗 2A4 和 F6 对 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株的中和活性。中和试验在鸡胚成纤维细胞上进行,72 h 时观察细胞病变,记录结果,按 Reed-Muench 公式计算 TCID₅₀ 值。按公式计算中和指数:中和指数 = 中和组 TCID₅₀/对照组 TCID₅₀。以中和指数 > 50 者判

定为中和活性阳性,10~49 为可疑,<10 为阴性。

1.8 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株 HA 基因的扩增及推导氨基酸序列分析

本实验室分离的 N1、N3、N12 和 HP 株 HA 基因的扩增及序列测定参照文献[2]进行,PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化并测序,并与 GenBank 中提交的其它变异毒株 HA 基因序列用 DNASTAR 进行分析,比较 HA 蛋白裂解位点及糖基化位点差异。

2 结 果

2.1 变异株对鸡胚的致病性

12 株 H9N2 亚型 AIV 变异株 EID₅₀、ELD₅₀ 和 MDT 测定结果见表 1。由表 1 可以看出,12 个变异株 EID₅₀ 和 ELD₅₀ 低于 HP 株,MDT 较短,表现出对 SPF 鸡胚较强的致病性和增殖侵袭能力。

表 1 12 个 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株 EID₅₀、ELD₅₀ 和 MDT 及与单抗 2A4 和 F6 的反应特性

Table 1 Results of EID₅₀, ELD₅₀ and MDT of 12 H9N2 influenza virus mutants and HP strain and HI titer of 2A4 and F6 to different isolates

分离株编号及名称 No. and name of virus isolates		分离年代和地点 Isolation time and location		EID ₅₀ (/0.2 mL)	ELD ₅₀ (/0.2 mL)	MDT /h	HI 效价(log2) HI titer of isolates to different antibody		
							多抗	单抗 2A4	单抗 F6
							polyclonal antibody	monoclonal antibody2A4	monoclonal antibody F6
N1	A/CK/Henan /A3/1998	1998	河南 Henan	10 ^{-8.1}	10 ^{-8.8}	66.5	13	—	—
N2	A/Duck/Chicken/Xuzhou/01/1999	1999	江苏 Jiangsu	10 ^{-9.25}	10 ^{-9.25}	66	11	—	—
N3	A/CK/Henan /2002	2002	河南 Henan	10 ^{-9.0}	10 ^{-9.25}	69.9	13	—	—
N4	A/Chicken/Anhui /2002	2002	安徽 Anhui	10 ^{-9.25}	10 ^{-9.5}	66.6	11	—	—
N5	A/Chicken/Jiangsu /2003	2003	江苏 Jiangsu	10 ^{-8.0}	10 ^{-9.0}	77.9	11	—	—
N6	A/Chicken/Jilin/dl1024/2007	2007	吉林 Jilin	10 ^{-9.0}	10 ^{-9.25}	78.7	13	—	—
N7	A/Chicken/Shandong/lx316 /2007	2007	山东 Shandong	10 ^{-9.25}	10 ^{-9.25}	70.1	12	—	—
N8	A/Chicken/Liaoning/hld1024/2007	2007	辽宁 Liaoning	10 ^{-9.5}	10 ^{-9.5}	66.2	12	—	—
N9	A/Chicken/Jiangsu/A ₁₁ /2007	2007	江苏 Jiangsu	10 ^{-8.25}	10 ^{-9.0}	82.5	13	—	—
N10	A/Chicken/Shandong/SG1/2009	2009	山东 Shandong	10 ^{-8.5}	10 ^{-8.7}	—	13	—	—
N11	A/Chicken/Shandong/SG2/2009	2009	山东 Shandong	10 ^{-8.25}	10 ^{-9.0}	80.7	13	—	—
N12	A/CK/HN /yuzhou/2009	2009	河南 Henan	10 ^{-8.75}	10 ^{-9.25}	72.4	11	—	—
HP 株	A/CK/HN/2002 (疫苗株 vaccine strain)	2002	河南 Henan	10 ^{-7.4}	10 ^{-7.7}	98.4	11	17	17

2.2 变异株对 SPF 鸡的致病性

10 个 H9N2 亚型 AIV 变异株 ICPI 和 IVPI 测定结果见表 2。由表 2 可以看出,N1~N9 和 N11 变异株表现出较强的毒力,可引起部分 1 日龄和 6 周龄 SPF 鸡发病或死亡,HP 株不能引起 SPF 鸡发病。虽然变异株毒力偏强,但从 ICPI、IVPI 的结果来看,尚未达到高致病力的程度。

表 2 10 个 H9N2 亚型 AIV 分离株 ICPI 和 IVPI 测定结果

Table 2 The ICPI and IVPI of 10 H9N2 influenza virus isolates

分离株编号 No. of virus isolates		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N11	HP 株
1 日龄 SPF 鸡脑内接种 1-day-old SPF chickens injected via intracerebral inoculation	死亡率/% Death rate	20	100	30	62.5	50	25	75	62.5	25	25	0
	ICPI	0.338	1.719	0.437	0.594	0.344	0.313	0.594	0.546	0.250	0.234	0
6 周龄 SPF 鸡静脉接种 6-week-old SPF chickens injected via intravenous inoculation	死亡率/% Death rate	0	60	20	30	0	0	0	10	0	0	0
	IVPI	0.230	1.100	0.660	0.690	0.210	0.430	0.300	0.520	0.220	0.230	0

表 3 N1、N3 变异株和 HP 株人工感染 8 周龄 SPF 鸡排毒试验结果

Table 3 The results of virus shedding of 8-week-old SPF chickens at the indicated time after challenge with H9N2 influenza viruses N1,N3 and HP strains respectively

分离株编号 No. of Virus isolates	排毒鸡数量/攻毒鸡数量 No. of chickens shedding/total no. of chickens challenged							
	第 3 天 The 3 rd day	第 4 天 The 4 th day	第 5 天 The 5 th day	第 6 天 The 6 th day	第 7 天 The 7 th day	第 8 天 The 8 th day	第 9 天 The 9 th day	第 10 天 The 10 th day
N1	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
N3	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
HP 疫苗株 HP vaccine strain	0/5	1/5	2/5	3/5	5/5	3/5	0/5	0/5

2.3 H9N2 疫苗株和变异株疫苗对免疫鸡的攻毒保护试验

用疫苗株 HP 或用 HP 和变异株 N3 混合免疫 28 日龄 SPF 鸡,3 周后均出现 7~9log₂ 的 HI 抗体。此抗体水平能阻止疫苗株 HP 攻毒后的排毒,但不能阻止变异株 N3 攻毒后的排毒(表 4)。用疫苗株 HP 免疫的和用 HP 与 N3 混合免疫的 SPF 鸡,在用变异株 N3 攻毒的第 2—6 天虽不出现任何临床表现,包括部分鸡的发病、瘫痪或死亡,但均可从多数鸡分离到病毒,二者的阳性鸡比例差异不大。说明免疫抗体(包括同源抗体)虽能阻止其发病或死亡,但均不能有效地阻止其攻毒后的排毒,显示 H9

N1、N3 变异株和 HP 株人工感染 8 周龄 SPF 鸡排毒试验结果见表 3。由表 3 可以看出,N1 和 N3 分离株接种鸡在第 3—9 天能通过泄殖腔排毒,排毒期为 7 d,HP 株接种鸡排毒时间在第 4—8 天。结果表明,N1 和 N3 排毒时间更早,排毒期较长,排毒率更高。

变异毒株有很强的逃逸能力。

2.4 HA 单抗 2A4 和 F6 对变异株的 HI 特性

单抗 2A4 和 F6 与变异株的 HI 反应特性见表 1。由表 1 可以看出,2A4 和 F6 单抗能够抑制 HP 株血凝特性,不能抑制 12 株变异株的血凝特性。结果表明,12 株变异株 HA 抗原发生变异,缺失了与单抗 2A4 和 F6 结合的位点。

2.5 单抗 2A4 和 F6 对部分分离株的中和特性

单抗 2A4 和 F6 对变异株和 HP 株的中和指数均小于 10。结果表明,抗 HP 参考株 HA 单抗 2A4 和 F6 对 H9N2 亚型毒株均无中和活性,即不能抑制该病毒在鸡胚成纤维细胞上增殖。

表 4 H9N2 疫苗株和变异株灭活疫苗对免疫鸡的攻毒保护试验

Table 4 Protection efficacy of H9N2 HP and/or variant N3 inactivated vaccines against homologous and heterologous infection

疫苗类别 Vaccine type	抗体滴度		攻毒病毒株 Challenge virus	排毒鸡数量/攻毒鸡数量				
	HI antibody titer (log2)			No. of chickens shedding/Total No. of chickens challenged				
	HP 抗原	N3 抗原		第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
	HP antigen	N3 antigen		The 2 rd day	The 3 rd day	The 4 th day	The 5 th day	The 6 th day
HP	9.4	9.0	N3	3/10	5/10	8/10	8/10	3/10
	8.4	8.0	HP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
HP+N3	8.0	7.8	N3	5/10	6/10	8/10	10/10	6/10
	8.0	7.8	HP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
对照	≤2	≤2	N3	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Control	≤2	≤2	HP	0/5	1/5	2/5	4/5	5/5

2.6 变异株 HA 蛋白推导氨基酸序列分析

12 株 H9N2 亚型 AIV 变异株和 HP 株 HA 蛋白受体结合位点、潜在糖基化位点以及裂解位点序列比较见表 5。由表 5 可以看出,12 株变异株 HA 蛋白氨基酸受体结合位点和裂解位点序列与 HP 株相同或相似,呈低致病力毒株特征。与 HP 株相比,12 株变异株 HA 蛋白 145 位氨基酸发生漂变(S→

N)导致在 145—147 位氨基酸多出 1 个糖基化位点 NGT,该糖基化位点的出现与抗原位点的丢失及变异株毒力增强有一定的联系,但其机理尚不清楚。这一位点的氨基酸漂变,导致变异株与单抗的反应性丢失,说明该位点(S145)为 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的 1 个抗原位点,是一个具有血凝抑制特性的抗原位点,但可能不是一个中和表位位点。

表 5 H9N2 亚型变异株 HA 蛋白氨基酸序列关键位点的序列比较

Table 5 The comparison of HA amino acid sequence of H9N2 influenza virus isolates

毒株 Virus	受体结合位点								潜在糖基化位点								裂解位点
	Receptor-binding sites								Potential glycosylation sites								Cleavage sites
	109	161	163	191	198	202	203	29-21	82-84	141-143	145-147	218-220	298-300	305-307	492-494	551-553	333-341
N1	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
N2	Y	W	T	N	T	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
N3	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
N4	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N5	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N6	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N7	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N8	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N9	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRA	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
N10	Y	W	T	N	T	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NAT	NVS	NGT	NGS	PSVSSR↓KLF
N11	Y	W	T	N	T	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PSVSSR↓GLF
N12	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
HP 株	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	*	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF

* 表示相应位置没有潜在糖基化位点

* show the loss of potential glycoprotein site at corresponding positions

3 讨 论

HA 糖蛋白是 A 型流感病毒主要的表面抗原和保护性抗原。HA 糖蛋白的抗原特性直接影响病毒的感染性、致病性、宿主特异性及组织嗜性。但 HA 基因变异频率很高,不同位点,尤其是重要氨基酸位点的变异能导致 AIV 的抗原性和致病性变异。A 型流感病毒的 16 个 HA 亚型中,只有几个亚型 HA 的结构特征和抗原图谱得以解析,Wiley 等^[13]最早通过对抗原漂变变异株和免疫逃逸突变株的序列分析,结合 X 线晶体衍射技术,确定了 H3 亚型 HA 分子 3D 结构上的抗原表位区域。在此基础上,H1^[14]、H2^[15]、H5^[16]和 H9^[17-18]亚型 HA 蛋白抗原图谱均得以解析,不同亚型,甚至同一亚型不同变异株的抗原性存在一定差异。流感病毒 HA 蛋白序列呈现多态性,甚至单氨基酸的漂变也导致了变异株与单抗呈现独特的反应特性^[5-8]。因此,通过测定不同 HA 蛋白单抗与临床分离或人工传代构建的流感变异株和免疫逃逸突变株的反应特性,比较具有不同反应特性病毒株的 HA 序列差异可确定 HA 蛋白抗原位点^[15]。免疫逃逸突变株能抵抗单抗的中和作用,对这些突变株测序分析能预测 HA 蛋白结构^[19-20],并对流行毒株进行抗原分群。笔者对临床分离 H9N2 亚型 AIV 株进行致病性和抗原性研究时发现,部分毒株出现毒力增强和变异趋势,对鸡胚和 SPF 鸡致病性较一般毒株强,现有的疫苗对其不能提供完全保护(另文发表),序列分析发现该类毒株 HA 蛋白 145 位氨基酸由 S 变异为 N,造成 145—147 位氨基酸多出 1 个糖基化位点 NGT,且不与相应的单抗发生反应,从而可以鉴定 S145 为 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的一个抗原位点,是血凝抑制抗体作用位点。为了确定该类变异毒株的特征和流行情况,对 GenBank 中提交的 H9N2 亚型 AIV HA 基因进行分析,在登录的 1 368 条序列中,中国大陆分离株 573 株,145 位 S 突变为 N 的毒株共 34 株(约 5.9%),从上述 34 株中选择收集到的 9 株变异株及本实验室分离保存的 3 株进行了致病性和抗原性研究,以确定 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白发生 S145N 变异对病毒致病性和抗原特性的影响,研究结果进一步证明,H9N2 亚型 AIV HA 蛋白 S145N 点突变导致致病性及抗原性变异,S145 为 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的一个抗原位点。

HA 蛋白潜在的糖基化位点是影响 AIV 抗原性的重要因素,不同位置的寡糖链对 HA 蛋白的生物学功能有截然不同的作用^[21]。抗原位点的糖基化空间上阻止感染抗体的靠近和结合^[22]。本研究中,变异株抗原位点的变异(S145)导致了该位点抗原性的丢失,巧合的是,该位点的氨基酸漂变出现 1 个潜在的糖基化位点。蛋白结构分析显示糖基化位点的出现使血凝素头部蛋白减少了一个 β 折叠,三维空间构象的变化,有可能利用空间位阻效应屏蔽了抗原决定簇所在区域,阻止了抗体对抗原的结合,导致抗原性的改变。有研究证明,糖基化通过掩蔽蛋白表面比单一氨基酸替换在改变氨基酸抗原性上更有效^[22]。

HA 蛋白潜在的糖基化位点也是影响 AIV 致病性的重要因素,受体结合位点附近的糖基会影响病毒和宿主细胞的结合水平,裂解位点附近的糖基可能通过干扰蛋白酶进入裂解位点影响蛋白酶对 HA 前体蛋白的裂解。大部分文献报道,HA 蛋白潜在的糖基化位点的出现和增加会使病毒株的毒力下降,H9N2 亚型 AIV 株 T188N 的替换导致 1 个潜在糖基化位点的获得,从而使变异株的毒力下降^[23]。Kaverin 等^[24]报道 H5 亚型 HA 1 个新的糖基化位点的出现导致病毒突变株对小鼠毒力下降。Tsuchiya 等^[25]报道 H2 亚型 HA 糖基化位点的出现在细胞融合和受体结合活性上下降,从而导致毒力下降。本研究中,H9N2 亚型 AIV 变异株 HA 蛋白在 145—147 位氨基酸出现 1 个新的潜在糖基化位点,但同时表现为毒力增强,这一结果与以往的报道有所不同,作者认为糖基化位点在序列上所处的位置可能是导致这一差异的原因,因为该糖基化位点刚好处于发生漂变的关键氨基酸位点上。当然,其中的确切机制和相关性尚有待研究。

在疫苗的免疫压力和自然选择下,H9N2 亚型 AIV 有可能发生遗传变异而进化出毒力更强的毒株。本试验研究证明,H9N2 亚型 AIV HA 蛋白发生 S145N 变异毒株具有较强的毒力,甚至能够引起 1 日龄和 6 周龄 SPF 鸡死亡。HA 裂解位点氨基酸序列是决定 AIV 毒力强弱的因素。HA 裂解位点氨基酸序列表明,该类变异株 HA 蛋白裂解位点氨基酸没有发生变异,具有低致病性毒株裂解位点的序列特征,仍属于低致病性流感毒株。本试验把鸡新城疫病毒(NDV)毒力的测定方法引入到 H9N2 亚型 AIV 的毒力判定中来,尽管它不很完

善,但可提供参考。ICPI 和 IVPI 指数也证明变异株尚未达到高致病性禽流感毒力水平,但在 H9N2 亚型流行毒株中无疑是致病性偏强或很强的毒株。当前 H9 亚型禽流感在我国一些地区呈流行加重态势,不时有免疫失败、大面积暴发、大批死亡的报道,无疑与这类毒株的出现有一定关系。虽然没有出现像高致病性禽流感那样严重的死亡,但因其感染面广、传播速度快、混合感染严重,尤其是在肉鸡生产中常有大面积暴发、大批死亡,所以给养鸡生产带来的经济损失相当巨大,更为持久。因此,必须加强 H9 亚型 AIV 的防控,深入研究 H9 亚型 AIV 的遗传变异规律,警惕更高致病性毒株的出现。作者对在 GenBank 登录的 H9N2 亚型 AIV HA 基因序列进行检索与分析,发现中国大陆分离株 573 株中有 34 株的 145 位 S 突变为 N 的毒株,约占 5.9%,结果表明,我国 H9N2 亚型 AIV 有不断变异的趋势,有毒力增强毒株出现,能逃逸免疫作用,有成为流行优势毒株的可能。

4 结 论

通过对我国不同年代、不同地区分离的 H9N2 亚型 AIV S145N 变异株的致病性和抗原性的测定与分析,表明目前 H9N2 亚型 AIV 呈现变异趋势,有毒力增强和抗原变异株出现。S145N 变异株不与相应单抗发生 HI 反应和中和反应,表明 S145 是 H9N2 亚型 AIV 的血凝抑制抗体作用位点。H9N2 亚型 AIV 毒力增强变异株的出现可引起家禽死亡并导致更大的临床危害。单位点氨基酸漂变导致的抗原性变异可导致临床上一些流行的变异株会逃逸现有疫苗诱导抗体的中和作用,出现免疫失败现象,成为疫苗有效性的最大障碍。这种毒力增强的抗原变异毒株能逃逸免疫作用,具有成为优势流行毒株的可能性,这使得临床防控此病面临的形势更加严峻,对疫苗株的选择提出了更高的要求,同时,也提示人们需要不断监测 H9N2 亚型 AIV 的变异趋势和规律,更好地为临床防控该病提供依据和指导。

参考文献:

- [1] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *J Virol*, 2005, 79: 2814-2822.
- [2] ZHANG P, TANG Y, LIU X, et al. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998-2002)[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89: 3102-3112.
- [3] SUN Y, PU J, JIANG Z, et al. Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 146(3-4): 215-225.
- [4] PARK K J, KWON H I, SONG M S, et al. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programme[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(1): 36-50.
- [5] ROGERS G N, PAULSON J C, DANIELS R S, et al. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity[J]. *Nature*, 1983, 304: 76-78.
- [6] PING J, LI C, DENG G, et al. Single-amino-acid mutation in the HA alters the recognition of H9N2 influenza virus by a monoclonal antibody[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1): 168-171.
- [7] XU Q, WANG W, CHENG X, et al. Influenza H1N1 A/Solomon Island/3/06 virus receptor binding specificity correlates with virus pathogenicity, antigenicity, and immunogenicity in ferrets[J]. *J Virol*, 2010, 84: 4936-4945.
- [8] XU L, BAO L, LV Q, et al. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A (H1N1) influenza viruses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Virol J*, 2010, 7: 32-35.
- [9] 赵 军, 柴丽娜, 王泽霖, 等. 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, 2: 122-127.
- [10] 刘守川. 抗禽流感病毒(AIV)血凝素(HA)单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2006.
- [11] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽药生物制品质量规程(2001 年版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [12] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [13] WILEY D C, WILSON I A, SKEHEL J J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation[J]. *Nature*, 1981, 289: 373-378.
- [14] CATON A J, BROWNLEE G G, YEWEDELL J W,

- et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin[J]. *Cell*, 1982, 31: 417-427.
- [15] TSUCHIYA E, SUGAWARA K, HONGO S, et al. Antigenic structure of the hemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2475-2484.
- [16] PHILPOTT M, HIOE C, SHEERAR M, et al. Hemagglutinin mutations related to attenuation altered cell tropism of a virulent avian influenza A virus[J]. *J Virol*, 1990, 64: 2941-2947.
- [17] KAVERIN N V, RUDNEVA I A, ILYUSHINA N A, et al. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: Analysis of H9 escape mutants[J]. *J Virol*, 2004, 78(1): 240-249.
- [18] OKAMATSU M, SAKODA Y, KISHIDA N, et al. Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses [J]. *Arch Virol*, 2008, 153 (12): 2189-2195.
- [19] FERREIRA HL, LAMBRECHT B, VAN BORM S, et al. Identification of a dominant epitope in the hemagglutinin of an Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 1 virus by selection of escape mutants[J]. *Avian Dis*, 2010, 54(1): 565-571.
- [20] WEI J, YAN B, CHEN Z, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemagglutinin of H5N1 and antigenic investigation of avian influenza H5N1 viruses isolated from China[J]. *Can J Microbiol*, 2011, 57(1): 42-48.
- [21] TSUCHIYA E, SUGAWARA K, HONGO S, et al. Role of overlapping glycosylation sequins in antigenic properties, intracellular transport and biological activities of influenza A/H2N2 virus hemagglutinin[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 3067-3074.
- [22] SKEHEL J J, STEVENS D J, DANIELS R S, et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody[J]. *PNAS*, 1984, 81: 1779-1783.
- [23] SCHULZE I T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin [J]. *J Infect Dis*, 1997, 176: 24-28.
- [24] KAVERIN N V, RUDEVA I A, ILYUSHINA N A, et al. Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2497-2505.
- [25] TSUCHIYA E, SUGAWARA K, HONGO S, et al. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus hemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1137-1146.

(编辑 白永平)