

北京市某区 1 例人感染 H7N9 禽流感病毒的 HA 和 NA 基因特征分析

吴杨¹, 牛桓彩¹, 庄鹏¹, 李东迅¹, 刘重程¹, 李飒¹, 舒高林¹, 潘阳²

1. 北京市昌平区疾病预防控制中心, 北京 102200; 2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013

摘要: **目的** 了解北京市某区 1 例人感染 H7N9 禽流感病毒基因特征, 为禽流感病例的早期发现、疫情控制提供参考。**方法** 提取病例临床样本病毒核酸, 反转录扩增后进行病毒血凝素基因 (hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶基因 (neuraminidase, NA) 序列测定。获得的病毒序列与全球流感共享数据库中 H7N9 禽流感病毒株进行序列分析, 比较该病毒与北京市既往发现株和其他省市毒株同源性, 构建系统发育树, 并对部分耐药位点和糖基化位点进行分析。**结果** 北京市某区 1 例 H7N9 禽流感病毒为低致病性禽流感。HA、NA 与北京既往发现的 29 株毒株氨基酸同源性为 97.2%~100% 和 96.8%~100%, 基于系统进化分析与之最为相近的疫苗株为 A/Hunan/02650/2016。HA 蛋白受体结合位点发生了 G186V、Q226L 突变, HA 和 NA 的糖基化位点均未发生变化。**结论** 该区出现的 H7N9 病毒与北京地区既往发现 H7N9 毒株具有高度同源性, 部分氨基酸位点存在变异, 但未发生耐药突变。

关键词: H7N9; 禽流感; 序列分析

中图分类号: R183.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)06-0667-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.06.008

Genetic characteristics of hemagglutinin and neuraminidase of avian influenza A (H7N9) virus from one human infection case in a district of Beijing

WU Yang¹, NIU Huan-cai¹, ZHUANG Peng¹, LI Dong-xun¹, LIU Zhong-cheng¹, LI Sa¹, SHU Gao-lin¹, PAN Yang²

1. Changping District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102200, China;

2. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: PAN Yang, E-mail: Panyang10@gmail.com

Abstract: **Objective** To study the genetic characteristics of avian influenza A (H7N9) virus from one human infection case in a district of Beijing so as to provide references for early detection of avian influenza cases and control of the epidemic. **Methods**

Nucleic acid of clinical sample of the case was extracted and detected by one-step RT-PCR. After the reverse transcription amplification, the coding regions of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes were sequenced. The results of sequencing were compared with their corresponding sequence in Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) database, and homology analysis of the virus strain in this district and other ones previously detected in Beijing and other provinces and cities was conducted. A phylogeny tree was constructed. Sequence alignment and homology-modeling methods were used to study specific mutations regarding phenotypes, specifically addressing the human receptor binding properties. **Results** The results demonstrated that it was a low-pathogenic strain. There were minor differences in HA and NA proteins between 29 human H7N9 strains previously detected in Beijing and the strain found in this district, with the homology of 97.2%–100% and 96.8%–100%, respectively. The strain was highly homologous to candidate vaccine viruses (A/Hunan/02650/2016) based on phylogenetic analysis. Viral amino acid variation showed that this strain had mutations at 186 (G186V) and 226 (Q226L) sites in HA protein. The HA and NA glycosylation sites were conservative. **Conclusions** The sequences of H7N9 virus strain found in this district are highly homologous to those of the virus strains previously detected in Beijing. Though the strains have some significant mutations of amino acid in HA and NA proteins, all isolates show no drug-resistant mutations.

Key words: H7N9; avian influenza; sequencing analysis

基金项目: 北京市昌平区卫生科技发展专项 (编号: 昌卫科 2018-2-05)

作者简介: 吴杨 (1990-), 女, 北京人, 硕士, 微生物检验师, 主要从事生物化学与分子生物学研究工作。

通信作者: 潘阳, E-mail: Panyang10@gmail.com。

H7N9 亚型禽流感病毒属于正黏病毒科流感病毒属甲型流感病毒, 病毒核酸由 8 个单股负链 RNA 组成, 分别为血凝素 (hemagglutinin, HA), 神经氨酸酶 (neuraminidase, NA), 碱性聚合酶 (basic polymerase 1, PB1; basic polymerase 2, PB2), 酸性聚合酶 (acidic

polymerase, PA), 核蛋白(nucleoprotein, NP), 基质蛋白(matrix protein, M), 非结构蛋白(non-structural protein, NS)。H7N9 禽流感病毒主要在禽间循环传播,但也可通过禽-人密切接触传播或人-人密切接触传播^[1-2]。第一例 H7N9 禽流感病毒出现在 2013 年 3 月,疫情从华东江浙沪皖开始往华南、华北蔓延,北方地区也出现病例报告。自 2013 年开始,H7N9 病毒已导致 5 次疫情爆发,共计病例 1 564 起,致死率约为 39%,其中第五次疫情爆发(2016 年 12 月—2017 年 10 月)累计感染病例达 758 人,严重危害了公众健康^[3-4]。

针对人感染 H7N9 禽流感病毒的起源有多种说法,有研究报道是由 HXN9 和 H7NY 重配产生可感染人的 H7N9^[5],也有研究称该病毒是一种新型多元重配株^[6-8],无论是哪种重组模式,掌握病毒真实的起源和变异情况对研究其致病性和遗传变异性至关重要。针对该区县出现的一例 H7N9 禽流感病例分别进行 HA、NA 基因进化特征分析,可以及时了解 H7N9 在流行过程中的出现的新变化,为该区在今后的 H7N9 禽流感预防和控制工作提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源 2017 年 4 月 19 日北京市某区报告的一例人感染 H7N9 禽流感病例。患者于 4 月 10 日 2 时出现发热、咳嗽症状,体温 38.5℃,在某卫生院就诊无好转,4 月 17 日转送至某三甲医院重症监护病房进行治疗。采集咽拭子样本,低温运至实验室,24 h 内开展检测。

1.2 样本检测

1.2.1 病毒核酸提取 使用 MagNA Pure LC 2.0 全自动核酸提取仪提取 140 μl 样本中的总 RNA,病毒 RNA 溶于 60 μl DEPC 水中,立即用于测序检测。

1.2.2 H7N9 检测 提取核酸利用人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)(江苏硕世,中国)进行初步检测,反应体系和条件参考试剂盒说明书。

1.2.3 HA 及 NA 基因 RT-PCR 使用 RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, 美国)和 Uni12^[9] 进行流感病毒全基因组反转录,反应体系和条件参考试剂盒说明书。随后使用 AmpliTaq Gold 360 Master Mix 和 HA、NA 特异性引物进行 HA 和 NA 基因扩增,扩增引物分别为 HA-F:5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G-3'、HA-R:5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3';

NA-F:5'-TAT TGG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GT-3'、NA-R:5'-ATA TGG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT-3'。扩增体系和条件参考试剂盒说明书。扩增产物进行 PCR 产物纯化及凝胶电泳检测。

1.2.4 HA 及 NA 基因序列测定 使用 ABI3130XL 测序仪及配套试剂进行 HA 和 NA 基因序列测定。每个序列平行测定两次,使用默认参数输出序列结果。

1.3 基因进化分析

1.3.1 氨基酸同源性分析 从 GISAID 数据库下载作为参比的 H7N9 病毒 HA、NA 序列,与本实验测序毒株 HA、NA 基因序列汇总后使用 MEGA 5.0 软件,CLUSTAL W 程序进行序列同源性分析。

1.3.2 系统进化分析 将测序的 HA、NA 片段分别利用 MEGA 5.0 软件邻接法构建系统发育树,每个树图都进行 1 000 次重复 bootstrap 检验,进化距离矩阵由 Kimura 2-parameter 模型生成,其他所需的毒株氨基酸序列来源于 GISAID。

1.3.3 关键氨基酸位点分析及糖基化位点分析 将获得的毒株序列与推荐疫苗株进行氨基酸位点比较。HA 编码顺序以 H3 为准,NA 编码顺序以 N2 为准。通过在 ExPASy 网站 PROSITE 数据库化 <https://prosite.expasy.org/> 对 HA 和 NA 蛋白 N-糖基化位点进行预测分析。

2 结果

2.1 病例情况 据调查,患者家中共有 1 处鸡舍,位于居住地 1 公里以外的果园中,鸡舍中养了 13 只鸡、3 只鹅,家禽无病死现象。发病前患者曾到某早市的活禽市场购买仓鼠,售卖摊位旁边有活禽摊位。

2.2 标本检测 病例样本初步检测为 H7N9 禽流感病毒核酸阳性,将该毒株名称为 Beijingchangping/1/2017。

2.3 氨基酸同源性分析 将本实验所得病毒 HA、NA 序列与疫苗株及北京历年毒株序列进行氨基酸序列同源性分析。本研究中 H7N9 株与北京地区既往发现的 29 株 H7N9 感染病例相比,HA 氨基酸同源性为 97.2%~100%,其中与 A/Beijing/22136/2017、A/Beijing/22669/2017、A/Beijing/22670/2017、A/Beijing/25687/2017、A/Beijing/27154/2017HA 同源性为 100%(文中未给出);与全国其他省市近 5 年既往发现的感染病例相比同源性为 97.3%~100%;与疫苗株 A/Anhui/1/2013 相比同源性为 98.2%。NA 氨基酸同源性 与北京地区既往发现的 29 株 H7N9 感染病例相比同

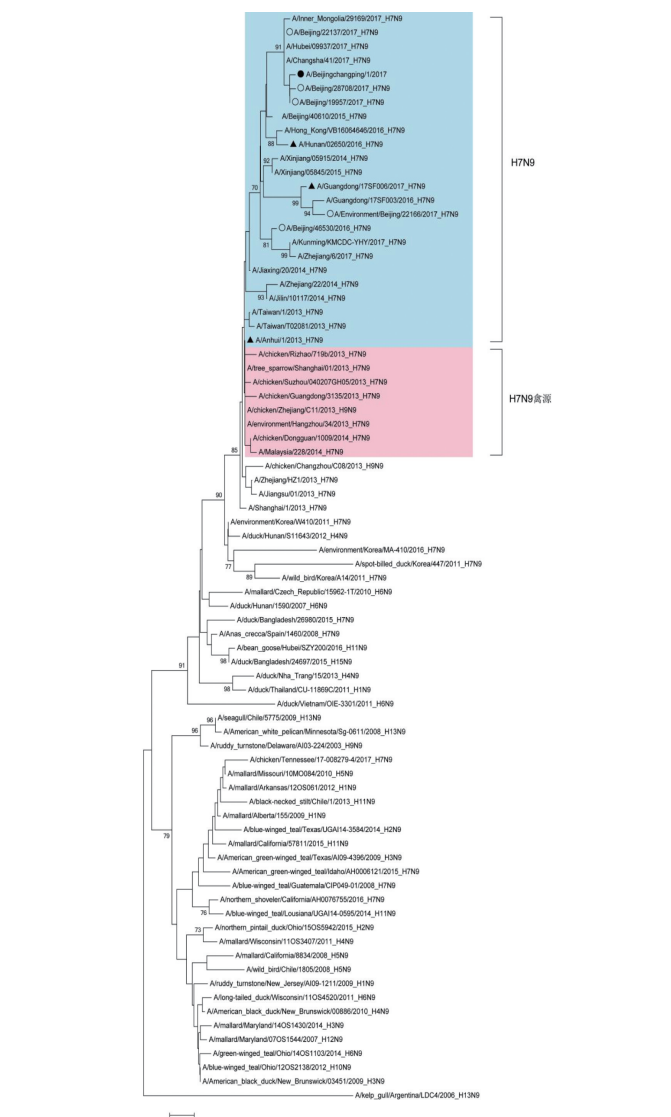
源性为 96.8%~100%,其中与 A/Beijing/22136/2017 同源性最高为 100%;与全国其他省市 NA 蛋白同源性为 95.5%~99.6%,与疫苗株 A/Anhui/1/2013 同源性 97.7%。

2.4 系统进化分析 基于基因的系统进化显示如图 1、2,病毒 HA 基因与中国近期发现分离的 H7N9 禽流感毒株进化距离最为接近,属于长江三角洲分支^[1]。同时与中国禽源的 H7N3(A/duck/Fujian/6390/2010、A/duck/Wenzhou/771/2013、A/duck/Zhejiang/1208/2009、A/duck/Shaoxing/5516/2013、A/duck/Jiangxi/5444/2014)也处在一个分支上。NA 基因与内陆其他 H7N9 株处在同一分支,并与韩国 2011 年后出现的禽源 H7N9 株处在同一大分支(A/environment/Korea/W410/2011、A/environment/Korea/MA-410/2016、A/spot-billed duck/Korea/447/2011、A/wild bird/Korea/A14/2011)。从系统进化树可以看出与 HA、NA 最为相近的疫苗株为 A/Hunan/02650/2016。



注:●本研究所得 H7N9 株,▲中国 H7N9 疫苗株,○北京市既往 H7N9 株。

图 1 基于 HA 基因的系统进化树



注:●本研究所得 H7N9 株,▲中国 H7N9 疫苗株,○北京市既往 H7N9 株。

图 2 基于 NA 基因的系统进化树

2.5 关键氨基酸位点分析及糖基化位点分析 病毒的 HA0 断裂位点区域为 PEIPKGR↓GL,没有连续碱性氨基酸结构,为低致病性禽流感。本实验所得序列与其他省市毒株序列关键氨基酸位点碱基见表 1(以 H3 编码顺序),该毒株 HA 全长 1 683 bp,编码 560 个氨基酸,存在 G186V 和 Q226L、D225G 位点突变,未出现 110Y/160A/226L/228S、158D/224K/226L、196R/226L/228S 任意一种突变组合。HA 有 4 个潜在糖基化位点:HA1(氨基酸 19~339 位)上存在两个糖基化位点,HA2(氨基酸 340~560 位)上存在两个糖基化位点,分别为 30 NGTK、46 NATE 和 249 DNTV、493 NNTY。

本实验所得毒株的 NA 片段全长 1 398 bp,共编码 465 个氨基酸,茎部 69~73 位氨基酸缺失,在 120、

153、276、294 位耐药位点未发生突变,见表 2。NA 有 7 个糖基化位点,分别为 42 NCTH、52 NTSQ、63 NETN、66 NITN、82 NLTK、142 NGTI、197 NASA,与参

考疫苗株相比 HA 及 NA 的糖基化位点均没有变化,较为保守。

表 1 H7N9 禽流感病毒 HA 关键氨基酸位点

毒株	HA0	130 loop					140 loop	150 loop								190 helix								220 loop							
	315-331	110	131	133	136	138	145	153	155	156	157	158	159	160	186	187	188	189	190	192	193	194	196	219	221	222	224	225	226	227	228
Anhui/1/2013 (vaccine)	PEIPKG-R/GL	Q	R	N	T	A	S	W	L	S	N	T	A	A	V	S	T	A	E	T	K	L	G	A	P	Q	N	G	L	S	G
●Beijingchangping /1/2017	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fujian/1/2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Guangdong/ 15SF001/2015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Guangxi/08970/ 2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E	—	—	—	—	—
Henan/01/2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hong_Kong/ 5942/2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hubei/ 09937/2017	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hunan/26938/2014	PEVPKG-R/GL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Inner_Mongolia/ 29169/2017	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Jiangxi/01/2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Shandong/01/2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xinjiang/05845/2015	—	—	—	—	—	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Yunnan/0129/2017	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zhejiang/22/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注:H3 numbering。
表 2 H7N9 禽流感病毒 NA 关键氨基酸位点

毒株	耐药位点(N2 numbering)			
	120	153	276	294
Anhui/1/2013(vaccine)	E	R	H	R
●Beijingchangping/1/2017	—	—	—	—
Guangdong/17SF006/2017	—	—	—	K
Hong_Kong/VB1606464/2016	—	—	—	—
Hubei/09937/2017	—	—	—	—
Hunan/02650/2016	—	—	—	—
Inner_Mongolia/29169/2017	—	—	—	—
Jiangsu/01/2013	—	—	—	—
Shanghai/1/2013	—	—	—	K
Taiwan/T02081/2013	—	—	—	K
Xinjiang/05845/2015	—	—	—	—
Zhejiang/22/2014	—	—	—	K

3 讨 论

研究显示,中国 2013 年的 H7N9 禽流感病毒由 H7N3、H7N9、H9N2 三种亚型重组而来,其中 H9N2 又有两种来源,可以说 H7N9 禽流感病毒是一株四元重组株,HA 基因与浙江鸭的禽流感毒株 H7N3 高度同源,NA 基因与韩国野鸟的禽流感毒株 H7N9 高度同源,其它六个片段分别来自两种 H9N2 亚型^[6, 10-11]。本研究中,HA 基因与本国禽来源的 H7N3 株亲缘关系最近,NA 基因与韩国出现的 H7N9 株同处一个大分

支,与之前研究结果一致。

流感病毒感染宿主细胞是由 HA 蛋白和细胞表面的唾液酸共同介导完成的,HA 受体结合位点的氨基酸变化与病毒的宿主特异性直接相关^[12]。由于形成的糖苷键不同一般禽源流感病毒难以通过飞沫传播感染人类^[12-14],但在 H7N9 禽流感病毒的进化与传播过程中某些位点突变(如 220loop)获得了能够与人类受体结合的特性^[11,14]。通过对 H7N9 禽流感病毒和禽 H7N3 的 HA 受体结合位点的比较,发现当 H7N9 禽流感病毒发生 G186V 和 Q226L 的氨基酸突变,HA 复合体中半乳糖 Gal-2 会变成侧立状态(在 H7N3 中半乳糖 Gal-2 呈现平铺状态),Q226L 位点突变改变了 220loop 和 130loop 的位置,G186V 位点的突变阻碍了 Gal-2 位点与水分子的结合,这些改变最终使得原本不可结合的 H7 禽流感病毒可与人类受体结合^[5, 13, 15-17]。本研究中测得的病毒序列发生了 G186V 和 Q226L 的氨基酸突变,可以感染人类宿主,并在 225 位点发生了 D→G 突变,其它位点未发生改变。有研究指出 HA 中一些其他相关位点如-A107T、-D225G、G228S、A138S 的替换,也可能会共同加强 H7N9 病毒复制、结合和致病能力^[13, 18-20]。H7N9 禽流感病毒感染模式与 H5N1

类似,一些学者通过对 H5N1 感染雪貂模型的研究发现,当出现一些特定组合的突变可使得 H5N1 病毒在雪貂上呼吸道大量增殖并通过飞沫传播^[21-23],这也提示当 H7N9 禽流感病毒中出现这类组合突变可能会增加感染力,而本研究中毒株未发生以上突变,说明其通过飞沫传染到人的可能性较小。

HA 蛋白在裂解位点含连续 4 个或以上碱性氨基酸位点属于高致病性禽流感^[14, 24-25],Beijingchangping/1/2017 仅含两个碱性氨基酸,属于低致病性。该病毒糖基化位点较以往菌株有所减少,而糖基化数目的变化会影响病毒感染力及复制滴度^[16],增加或减少都有可能增加与人受体结合的能力^[11-12],具体影响还需进一步实验证明。

NA 是流感病毒另一种重要的表面糖蛋白,是抗病毒药物神经氨酸酶抑制剂作用的靶点^[11]。通过对本研究毒株分析可知 NA 蛋白的 69-73 位氨基酸发生缺失,推测其毒力可能增强^[26]。但 NA 基因未发生 E120G、R153K、H276Y、R294K 的耐药性突变,也未发生糖基化位点的缺失或插入,从分子角度说明病毒对神经氨酸酶抑制剂类药物仍旧敏感。并且还有学者提到 -R217/222Q 位点突变可能提高病毒对神经氨酸酶抑制剂的抵抗性^[27], -M26I, -N142S, -G389D 位点突变可能影响 H7N9 病毒的传播和致病能力^[19]。但在本研究中均未出现该位点的突变。

本研究对该区发现的一株 H7N9 禽流感病毒的 HA、NA 片段进行了初步分析,其他六个片段未作深入探讨和研究,PA、PB1、PB2、等序列中某些片段的缺失或者突变也可能造成病毒毒力增强或出现耐药性影响^[2, 6, 13, 28-31]。由于实验获得病例数较少,阳性样本有限,若要全面详细地掌握本地区禽流感分布现状还需持续性对本地区出现的新发病例进行检测和研究。H7N9 禽流感病毒在传播过程中还可能不断发生重组突变,所以应加强对 HA 受体结合位点及相关位点突变的监测,为 H7N9 禽流感防控提供科学依据。

参考文献

- [1] Yang L, Zhu W, Li X, et al. Genesis and spread of newly emerged highly pathogenic H7N9 avian viruses in mainland China [J]. J Virol, 2017, 91(23): e01217-e01277.
- [2] 徐小雯,姜梅,孙振璐,等.烟台市一起家庭聚集性人感染 H7N9 禽流感疫情调查及存活病例 1 年随访分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(2): 212-215.
- [3] Quan C, Shi W, Yang Y, et al. New threats from H7N9 influenza virus: spread and evolution of high- and low-pathogenicity variants with high genomic diversity in wave five [J]. J Virol, 2018, 92(11): e00301-e00318.
- [4] Zhu W, Dong J, Zhang Y, et al. A gene constellation in avian influenza A (H7N9) viruses may have facilitated the fifth wave outbreak in China [J]. Cell Rep, 2018, 23(3): 909-917.
- [5] 张宝,黄克勇,郭劲松,等. H7N9 病毒的来源和重组模式[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(7): 1017-1021.
- [6] 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.
- [7] Chen Y, Liang W, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. Lancet, 2013, 381(9881): 1916-1925.
- [8] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans [J]. Nature, 2013, 499(7459): 496-499.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [10] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses [J]. Lancet, 2013, 381(9881): 1926-1932.
- [11] 刘营. 山东省人感染 H7N9 禽流感流行病学与病毒全基因序列分析[D]. 济南:山东大学, 2016.
- [12] 王颖,于玉凤,郭晓兰,等. H7N9 禽流感病毒对人类致病的分子基础分析[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(5): 657-665.
- [13] 江丽芳. H7N9 禽流感病毒研究现状[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(5): 651-656.
- [14] 张蔚,施一. 禽流感病毒跨种传播的分子机制[J]. 生命科学, 2015, 27(5): 539-548.
- [15] Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice [J]. Nature, 2013, 501(7468): 556-559.
- [16] 彭欠欠. H9N2 亚型流感病毒 HA 蛋白糖基化位点变化影响病毒生物学特性的研究[D]. 扬州:扬州大学, 2017.
- [17] Xu L, Bao L, Lau SY, et al. Hemagglutinin amino acids related to receptor specificity could affect the protection efficacy of H5N1 and H7N9 avian influenza virus vaccines in mice [J]. Vaccine, 2016, 34(23): 2627-2633.
- [18] 刘春艳,艾军红. 甲型 H7N9 禽流感病毒的病毒学特征[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(6): 405-408.
- [19] 林慕蕾. 广东省人感染 H7N9 禽流感病毒对神经氨酸酶抑制剂的敏感性及其分子特征研究[D]. 广州:南方医科大学, 2017.
- [20] Zhao Y, Yu Z, Liu L, et al. Adaptive amino acid substitutions enhance the virulence of a novel human H7N9 influenza virus in mice [J]. Vet Microbiol, 2016, 187: 8-14.
- [21] Das P, Li J, Royyuru AK, et al. Free energy simulations reveal a double mutant avian H5N1 virus hemagglutinin with altered receptor binding specificity [J]. J Comput Chem, 2009, 30(11): 1654-1663.
- [22] Zhang W, Shi Y, Lu X, et al. An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level [J]. Science, 2013, 340(6139): 1463-1467.
- [23] Hatta M, Hatta Y, Kim JH, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice [J]. PLoS Pathog, 2007, 3(10): 1374-1379.
- [24] Suguitan AJ, Matsuoka Y, Lau YF, et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals [J]. J Virol, 2012, 86(5): 2706-2714.
- [25] 徐晓龙,包红梅,陈化兰,等. 影响禽流感病毒致病性和传播的关键氨基酸位点的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 165-168.
- [26] Liu Q, Lu L, Sun Z, et al. Genomic signature and protein sequence analysis of a novel influenza A (H7N9) virus that causes an outbreak in humans in China [J]. Microbes Infect, 2013, 15(6-7): 432-439.
- [27] Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y. Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses [J]. J Virol, 2014, 88(9): 4877-4896.
- [28] Qi Y, Fan H, Qi X, et al. A novel pyrosequencing assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistance-conferring mutations among clinical isolates of avian H7N9 influenza virus [J]. Virus Res, 2014, 179: 119-124.
- [29] Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, et al. Characterization of drug-resistant influenza A (H7N9) variants isolated from an oseltamivir-treated patient in Taiwan [J]. J Infect Dis, 2015, 211(2): 249-257.
- [30] 资海荣,李伟,周丹,等. 新型甲型 H7N9 流感病毒 PB1-F2 蛋白基因进化及变异分析[J]. 东南大学学报(医学版), 2014, 33(4): 416-421.
- [31] 孙海燕,童海江,崔大伟,等. 2013—2015 年浙江地区人感染 H7N9 禽流感病毒蛋白关键位点分子特征分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 9(4): 330-335.

收稿日期: 2019-07-23