



CHICK
PROGRAM

总第19期/2015年1月

H9N2流感病毒基因型的进化促进了新型H7N9病毒的出现

重要意义

在中国出现的一种可感染人的新型H7N9流感病毒，引发了世界的普遍关注。然而，我们仍没有完全理解这些禽源H9N2病毒如何促进了新型H7N9病毒的出现。在本文中显示，出现了一种“适应性”（G57）基因型病毒，其抗原性发生了改变，对鸡的适应性也有所加强。它成为中国免疫鸡群中主要流行的基因型，在H7N9病毒出现之前，引起了2010-2013年的大范围暴发，增加了H9N2与其它亚型病毒之间的重组，并最终为新型H7N9病毒提供了所有的内部基因。H9N2流感病毒在家禽中的流行和变异能够为具有大流行潜力的新型重组病毒的出现提供重要预警。

在中国出现的一种可感染人的新型H7N9流感病毒，引发了世界的普遍关注。禽源H9N2病毒为新型重组病毒的内部基因提供了全部6个片段。然而，我们仍没有完全理解这些禽H9N2病毒的流行和演化如何促进了新型H7N9病毒的出现。本文表明，在十余年中多种H9N2基因型病毒共同流行，出现了G57基因型病毒，其抗原性发生了改变，对鸡的适应性也有所加强。并成为中国免疫鸡群中主要流行的基因型，在H7N9感染人类之前，引起了2010-2013年的大范围暴发，并最终为新型H7N9病毒提供了所有的内部基因。H9N2流感病毒在家禽中的流行和变异能够为具有大流行潜力的新型重组病毒的出现提供重要预警。

2013年3月，在中国东部地区首次报道出现了人感染一种新型禽源H7N9 A型流感病毒的病例，可引起患者严重的呼吸系统症状和死亡。迄今为止，该新型病毒已造成两次人类感染的爆发，包括375例已知病例，其中115人死亡。系统发育分析表明，该病毒是来源于H7亚型，N9亚型和H9N2亚型禽流感病毒的1株三源重组病毒。H7和N9基因可能是由候鸟传播到国内的鸭群，随后又传播到活禽市场的鸡群，随后与流行的H9N2病毒进行重组，形成了在人感染病例中分离鉴定出的H7N9病毒。

H9N2流感病毒对禽类有低致病性，主要在上呼吸道进行复制，无特定病原体（SPF）鸡感染后有轻微或不存在临床症状。1994年，H9N2亚型最早发现于中国广东省南部的鸡场；随后在鸡群中变得普遍，并可以造成产蛋量下降和致死性的混合感染，从而造成巨大的经济损失。为了减少H9N2感染对鸡群的影响，自1998年以来，鸡群开始接种商业灭活疫苗，如 A/chicken/Guangdong/SS/1994 (Ck/GD/SS/94) ， A/chicken/Shandong/6/1996 (Ck/SD/6/96) ， 以及 A/chicken/Shanghai/F/1998 (Ck/SH/F/98)。这些H9N2疫苗最初对疫情和病毒传播起到了控制作用。然而尽管进行大剂量的



鸡计划

CHICK PROGRAM

接种，上述 H9N2 疫苗的效力开始减弱，尤其是 2007 年以后，H9N2 流感病毒在免疫鸡群中持续存在，并引起散发性的疾病爆发。然而，H9N2 病毒在鸡群，特别是大规模疫苗接种的鸡群中的流行和分子演化，以及它们在 H7N9 病毒出现中起到的作用，仍然没有得到充分的理解。在这项研究中，我们系统地研究了农场鸡群中 H9N2 病毒的流行和演化，及其在新型 H7N9 病毒出现中起到的作用。

结果

在人类 H7N9 感染爆发之前，H9N2 病毒从农场鸡群中的分离率有所增加。我们追溯性的调查了 2010 年 1 月至 2013 年 12 月，主要是中国东北地区农场鸡群中 H9N2 亚型流感病毒的感染情况（图 1 和表 S1）。我们对 2010–2013 年期间，19 个省份中出现病症的 1975 个鸡场的气管拭子或肺部样本进行了病毒分离鉴定。这些鸡群已进行了 H9N2 病毒免疫，但仍然出现了呼吸疾病症状，和/或产蛋量下降 5–20%。1975 个农场中，637 个为 H9N2 感染阳性，病毒分离率高达 32.25%（表 S1）。H9N2 病毒的平均分离率逐年提高，从 2010 年的 22.08% 上升到 2013 年的 47.08%。此外，在温暖的季节仍然会发生 H9N2 感染（七月至九月），在通常情况下这一时期的流感感染的报道相对较少（图 1）。尽管接种了疫苗，自 2010 年以来，这些调查地区的 H9N2 病毒感染大幅增加，表明在农场鸡群中出现了抗原性变异毒株，并且引起了到目前（2013 年 H7N9 禽流感病毒感染人类）为止的最大规模爆发。

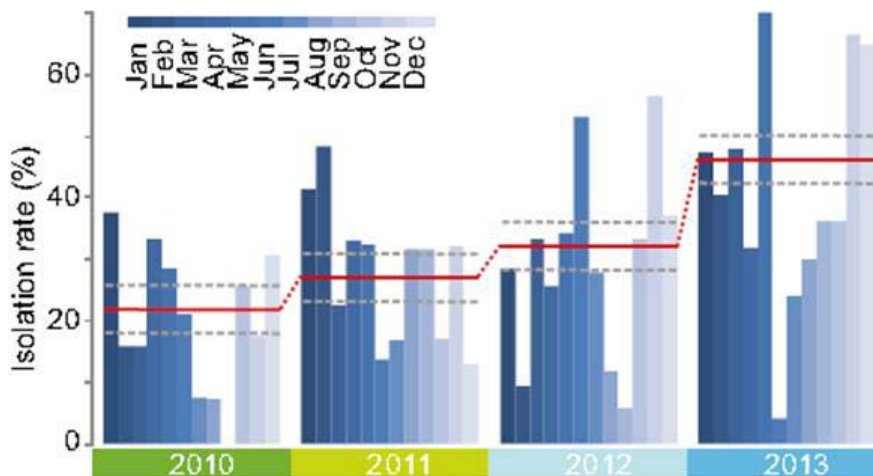


图 1. 2010–2013 年期间调查地区的出现症状的养鸡场中 H9N2 流感病毒的分离率 (%)。直方图显示每月的分离率；红色水平线（用点连接）表示年平均分离率；灰色的水平虚线表示 95 %CI。



鸡计划

CHICK PROGRAM

2010-2013年鸡群中H9N2病毒遗传多样性的减少显示存在普遍爆发。通常认为，抗原漂移变异株引起的流感广泛爆发的特征是，病毒全基因组或血凝素（HA）片段的遗传多样性减少。因此，如果特定时间内在广泛地区分离到的病毒序列同源性高度相似，则可以合理的推断发生了疾病的普遍爆发。我们想知道除我们调查的地区之外，其他地区是否也受到了影响。为了解决这个问题，我们对1994年-2013年之间所有可用的中国禽源病毒H9N2序列进行了收集，并对这些H9N2病毒的全基因组序列相似性进行了时空动态分析。成对同源性比对分析显示，从2009年-2010年开始，这些病毒的所有基因片段的多样性均有所减少，并在2010-2013年期间达到峰值（图2和图S1）。只有2011年的病毒的HA基因和2013年病毒的神经氨酸酶（NA）基因的相似性略有降低。几乎同一时间，几乎所有的基因片段的序列多样性减少的现象表明，适应性最强的病毒被选择出来，获得了优势地位，并且在中国各地的鸡群中造成了广泛爆发。在流感病毒的演变过程中提出了遗传“瓶颈”的概念。就我们所知，尽管H9N2病毒在中国在过去20年中持续流行，这是第一次观察到该病毒存在这样的瓶颈（图2和图S1）。

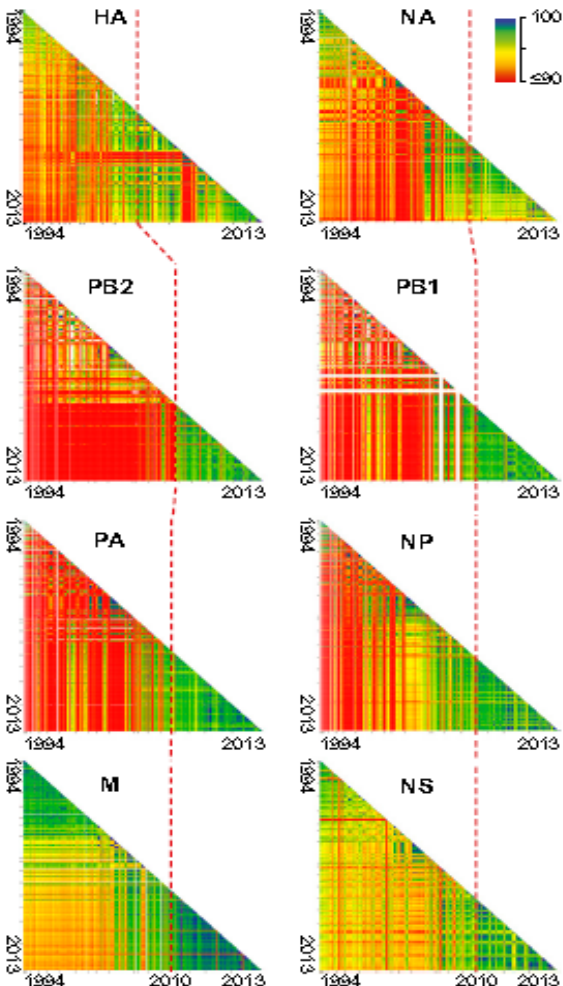


图2 中国鸡群广泛爆发（2010-2013年）的H9N2流感病毒分离株的遗传多样性减少。50%以上序列全长相同的所有鸡H9N2病毒的核苷酸序列成对比较被绘制为热图。根据分离时间将1994年至2013年的病毒分离株在X轴由左到右，Y轴自上而下进行排序。轴线上的标记表示分离年份。红色虚线表示2010年。颜色表示一致性水平，从≤90%（红色）至100%（蓝色）或由于序列长度一致性小于50%，一致性水平不可得（白色）。



CHICK PROGRAM

自2010年以来G57基因型H9N2流感病毒成为鸡群中的优势毒株。为了解H9N2病毒流行毒株的进化演变，我们构建了全部8个基因片段的系统进化树。进化树使用20%临界值自动分割为小分支。如果需要的话，根据各小分支的末端节点和已经报道的分类方法进行手动合并，形成大分支。在八个片段的各进化树中，大部分2010-2013年的病毒毒株属于同一进化大分枝（图3A和图S2）。在每个流行的大分支中，大多数2010-2013年的毒株可与几个早期毒株一起共同进一步分为一个大群（图3A和图S2），表示它们之间具有同一个瓶颈事件中幸存的祖先。在聚合酶碱性蛋白II（PB2），NP（核蛋白），HA，NA和非结构（NS）基因中，一小部分的流行毒株形成了一个不同的大分支（HA）或较小的群（HA和其他片段）。在大分支的基础上，可以将1994年至2013年在中国发现的禽H9N2病毒进一步分为69个基因型（数据集S1）。大多数2010-2013年的病毒株被划分为一个单独的基因型，G57型。在2007年G57毒株首次发现于江西、江苏等省的鸡群中，其发病率在2009年大幅增长。自2010年以来，G57已成为在全国流行的主要毒株（数据集S1和图3B）。

这一主要基因型是通过自1994年以来的持续重组形成的（图3C）。G57的NA基因来源于A/chicken/Beijing/1/1994-like毒株。1998年，一株禽源病毒A/chicken/Shanghai/F/1998（SH/98）的聚合酶碱性蛋白I（PB1）基因、聚合酶酸性蛋白（PA）基因、NP和NS基因形成了四个新的谱系，并引起了中国东部地区鸡群的严重发病。1998年以后，SH/98-like病毒与A/quail/HongKong/G1/1997-like病毒和A/chicken/Jiangsu/1/2000-like病毒发生了重组，引入了其基质蛋白（M）和HA基因，在2005年形成了A/chicken/Hunan/5260/2005-like病毒。该病毒包含有G57基因型病毒的8个基因片段中的7个。最后一个片段PB2，是从鸭的病毒（A/duck/Shantou/163/2004-like）传播到鸡群中形成的，在2007年形成了主要的G57基因型。自2007年以来，G57型病毒已经扩散到国内水禽、野生鸟类和猪中（数据集S1）；在2014年，该基因型病毒从香港的患者身上分离出来（数据集S1），这表明其感染宿主范围极为广泛。

显然，在2010-2013年的普遍爆发中，在鸡群中形成了一个占主导地位的G57基因型，结束了十多年来多种基因型病毒共同流行的局面，产生了携带相同基因谱系的多个H9N2病毒。



鸡计划

CHICK PROGRAM

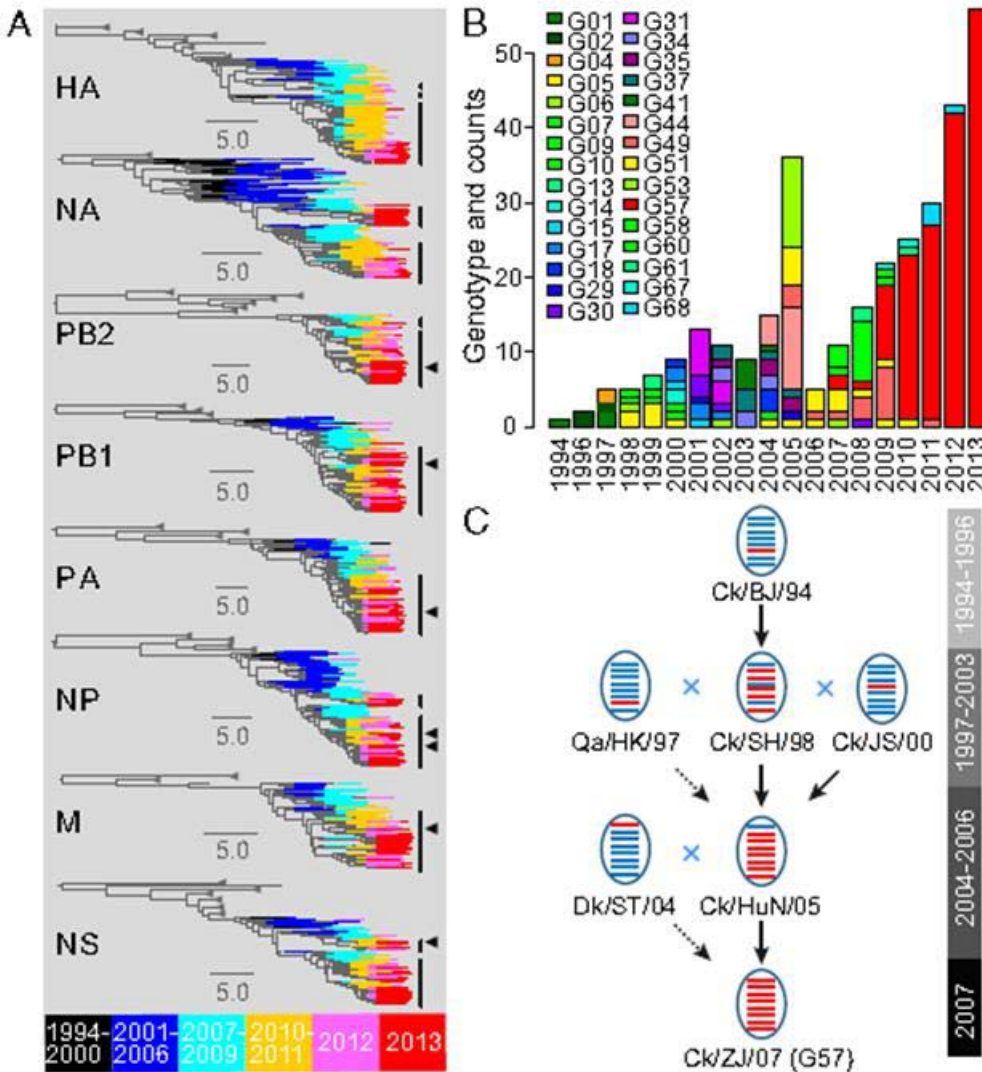


图3, 1994至2013年分离的禽H9N2流感病毒与2013年中国疫情爆发前两周人H7N9病毒分离株的系统进化分析。(A) 禽H9N2病毒表面基因和内部基因与H7N9新型人类病毒的系统发育树。因为其拓扑结构相同, 没有显示仅包含H9N2病毒内部基因的进化树。含有大多数2010-2013年的病毒分支被完全显示出来, 其他分支被压缩(灰色三角形表示)。右侧每个节点的横线颜色表示分离年份(见彩条)。时间刻度为年。垂直的黑线表示主要是2010年到2013年的H9N2病毒的主要分支(长线)和次要分支(短线), 黑色箭头表示H7N9病毒的位置。图S2同上。(B) 1994年至2013年中国鸡群分离的H9N2病毒基因型多样性。这里显示的是在至少2年中周期性出现的基因型。所有基因型均可以在数据集S1中找到。(C) 重

组产生G57基因型的简明示意图。椭圆表示病毒颗粒。用水平条带表示8个基因片段(从顶部依次为: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M和NS)。红色表示属于G57分支; 蓝色表示属于其他分支。虚线箭头指示种间基因传递。Ck/BJ/94, A/chicken/Beijing/1/1994; Qa/HK/97, A/quail/HongKong/G1/1997; Ck/SH/98, A/chicken/Shanghai/F/1998; Ck/JS/00, A/chicken/Jiangsu/1/2000; Ck/HuN/05, A/chicken/Hunan/5260/2005; Dk/ST/04, A/duck/Shantou/163/2004; Ck/ZJ/07, A/chicken/Zhejiang/HJ/2007 (G57基因型)。2007年检测到的另一G57病毒(A/chicken/Jiangxi/12/2007)并未显示。



CHICK PROGRAM

G57型H9N2病毒对鸡群的感染性增加。重组似乎是有利的，因为它可以快速产生出具有高度适应性的病毒基因型。为了确定重组对G57感染性的影响，我们从G57及其他基因型的禽H9N2病毒中选择了9株代表性毒株，以测试其在接种鸡和同居鸡中的复制情况（图4上，A-C）。具体来说，包括4株2010-2011年的G57型病毒，2011年分离的1株G68型病毒（与G57相比，仅HA片段不同），其余4株病毒来自2010年以前流行的其他主要基因型。在接种后，尽管所有的测试病毒在气管中的分离率均为100%（图4A），大多数G57型病毒的复制滴度显著高于其他基因型的早期病毒（10-100倍滴度； $P < 0.05$ ；图4B）。G57型病毒在泄殖腔中的复制也明显增强，其滴度相当于早期分离株的10-1,000倍（图4B），同时也解释了为何所有接种的G57病毒的检出率均为100%，但接种的早期病毒只有20-60%（图4A）。此外，大多数的G57病毒在泄殖腔的排毒持续的时间较长[直到感染后7天（DPI）；图4C]。G68型病毒的复制能力居于G57型病毒和其他早期病毒基因型之间（图4A-C）。与其在接种鸡的复制结果类似，尽管除G02基因型病毒之外，其余各基因型病毒在同居鸡中的分离率均为100%，结果显示G57在同居鸡中具有更高的病毒滴度，随后是G68病毒（图4A-C）。这些结果表明，这种在鸡群中改良性的适应可能是的G57型H9N2病毒在2010-2013年广泛爆发的原因之一。

2010年以来G57型H9N2病毒分离株的抗原漂移。抗原漂移，主要发生于HA糖蛋白，可以降低疫苗效力，引起病毒感染暴发。系统发育分析表明，2010年至2013年的H9N2病毒，主要位于6分支和9分支，而疫苗株位于2分支（图S2）。为了确定流行的G57型H9N2病毒是否已经出现了抗原漂移，我们通过对26株代表性的H9N2病毒进行血凝素抑制（HI）试验来探究这种可能性。由于H9N2流感在鸡群的爆发主要发生在2010年以后，H7N9病毒也出现在2011-2012年左右，在HA系统发育进化树的基础上，我们选择了2010至2011年的病毒进行HI试验。不同抗原性的一些早期代表毒株也被包含在内，将两个有代表性的疫苗株作为对照（Ck/SD/6/96和Ck/SH/F/98；表S2）。在2010-2011年流行的G57型病毒，以及一些早期病毒（主要是2009年），与疫苗株与疫苗抗体血清之间的HI滴度相比，仅相当于其1/8甚至更低。这些结果表明，最近的H9N2病毒与疫苗株抗原性不同。

为了确定抗原漂移是否已经减少了疫苗在野外的保护效果，我们比较了H9N2病毒在疫苗接种鸡和同居鸡中的感染效率。将免疫鸡分为低抗体水平组（HI效价6-9）和高抗体水平组（HI效价10-12）。在免疫鸡实验研究中也选择在上述未免疫鸡实验中使用的9株病毒（图4A-C，上部），因为它们也都是基于HA进化树（图S2）和HI反应（表S2）的代表性毒株。在接种疫苗的鸡中，2010/2011年的G57型病毒在气管中持续增长，无论抗体水平如何，其检出率均为100%（图4A）。但是，其它基因型的早期病毒的复制明显被抑制，如在低抗体水平组鸡中的分离率为0-70%（除A/chicken/Shandong/ZB/2007, ZB/07之外）（图4中），在高抗体水平组鸡中的分离率为0-30%（图4A下）。ZB/07是之前鉴定的抗原变异株。将接种鸡与未接种鸡接触后，不管抗体水平如何，所有的G57型病毒具有100%的气管传播能力（图4A），而早期病毒的传播速度显著降低，且分离到了1种病



鸡计划

CHICK PROGRAM

毒 (ZB/07), 且在高抗体水平鸡群中传播效率很低 (40% (图4A)。虽然所有的G57型病毒具有100%的复制率和传播率, 其在气管和泄殖腔中的滴度下降, 但仍显著高于早期病毒 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, ANOVA) 图 4B)。对其排毒情况进行比较发现 (图 4C), G57病毒有更长的排毒时间, 在高抗体滴度免疫鸡群的同居鸡中持续到7dpi。虽然ZB/07的排毒时间与那些G57型病毒类似, 但H9N2阳性鸡只的数目较少 (图4A)。值得注意的是, G57型病毒显示在免疫鸡的泄殖腔中的复制和传播增强, 而其它基因型的早期病毒则未检测到 (图4中、下), 与未接种疫苗的鸡类似 (图4上)。G68型病毒的复制和传播居于G57和其它基因型的早期病毒之间 (图4)。这些结果表明, 近期的G57病毒抗原变异株具有逃避免疫压力的能力, 从而导致2010-2013年鸡群H9N2感染的普遍发生。

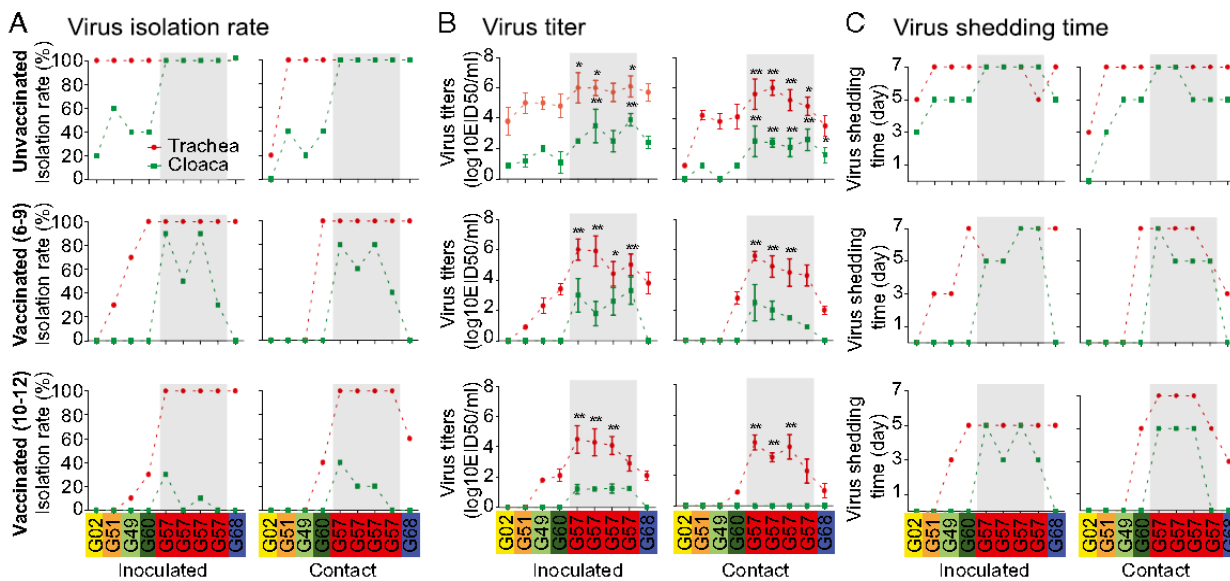


图4. 免疫鸡和未免疫鸡感染禽H9N2病毒。从G57或其他基因型中选择了9株代表性禽H9N2病毒, 来检测其对攻毒鸡和同居鸡的感染性。如该图所示, 每个x轴从左至右分别为,

A/chicken/Beijing/3/1999 (G02); A/chicken/Hebei/0617/2007 (G51); A/chicken/Shandong/22/2008 (G49); A/chicken/Shandong/ZB/2007 (G60); A/chicken/Jiangsu/TS/2010 (G57); A/chicken/Hebei/YT/2010 (G57); A/chicken/Shandong/sd01/2010 (G57); A/chicken/Shandong/06/2011 (G57); 以及 A/chicken/Guangdong/01/2011 (G68)。鸡只 (每组10只) 鼻内接种 1×10^6 EID₅₀ 的各个病毒, 来测试其病毒复制能力。24小时后, 在各攻毒组中放入5只空白鸡, 与攻毒鸡产生接触, 以测试其病毒传播能力。在3, 5, 和7dpi采集气管 (红色虚线) 和泄殖腔 (绿色虚线) 拭子, 进行病毒检测和/或滴定。所有的感染实验均在未免疫鸡只 (上) 和免疫鸡只 (中, 抗体滴度6-9; 下, 抗体滴度10-12) 中进行。抗体滴度表示为在HI试验滴定终点的log₂倒数。虚线表明不同的病毒基因型感染存在的差异, 但与这些基因型之间的关系没有任何意义。(A) 鸡群H9N2病毒的分离率 (B) 在3dpi H9N2病毒的平均滴度。误差线为SD值。G57/G68的病毒滴度较其它基因型的早期病毒显著升高 (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, 单向ANOVA)。(C) H9N2病毒的排毒时间。



CHICK PROGRAM

G57型禽源H9N2病毒为新型H7N9病毒提供了全部的六个内部基因。以往研究表明，新型H7N9病毒的全部六个内部基因均来源于中国最近流行的禽H9N2病毒（3-5）。为了确定这些内部基因是否均来自于G57型病毒分支，我们将1994至2013年所有可用的禽H9N2病毒的全部内部基因与2013年的H7N9疫情爆发前两周分离的人H7N9病毒共同构建了系统进化树。这里并不包括在后期分离到的H7N9毒株，从而可以更好地识别最初爆发的原因，因为这些后期病毒在爆发之后，在病毒的传播过程中，与本地的H9N2病毒进行了进一步的基因交换。之前研究显示，人H7N9分离株的六个内部基因与2010-2013年的H9N2禽源毒株亲缘关系较近，且均属于G57基因型（图3A和图S2）。具体来说，除NS基因外，最初的H7N9分离株的内部基因与H9N2病毒G57基因型大分支中的分离株最为相似。人H7N9病毒分离株的NS基因属于一个小分支，该小分支主要包括从上海附近的江浙一带分离的G57型H9N2病毒，而上海正是H7N9人流感病毒感染最初爆发的地区。除H7N9之外，主要于2010年以后在禽类、猪或人类中出现的11种新重组亚型病毒（例如，H5N2，H7N7，H10N8病毒），同样具有G57-like的内部基因（数据集S1）。

讨论

流感病毒的分段基因组特性可以允许来自不同的病毒片段的重组，产生可能引起大流行的新的流感病毒。在本研究中，我们研究了H9N2病毒的演变在H7N9病毒重组毒株起源中的作用。我们的研究结果显示，在鸡群近20年的流行过程中，H9N2流感病毒通过基因重组和突变逐渐进化，并且选择出了“最适”的基因型，G57。G57病毒抗原性的改变和适应性的增强，导致病毒逃避免疫，引起2010年至2013年的广泛爆发，并最终成为农场鸡群的主要H9N2基因型。该基因型病毒通过重组为新型H7N9病毒提供了6个内部片段。

针对H9N2病毒的疫苗在鸡群中的广泛使用对病毒的HA基因施加连续突变的压力，从而导致抗原性的改变。我们的研究显示疫苗抗血清对近期的H9N2分离株效果减弱，病毒在免疫鸡群中的复制和传播能力增强。结合2010-2013年病毒毒株的多样性减少，其HA基因的进化关系十分密切，表明所观察到的抗原性的变化在最近的禽H9N2病毒中很常见。除了HA的抗原特性，基因组结构和某些片段组合的兼容性可能对病毒的适应性具有重要作用。在未免疫鸡只的实验中显示，G57病毒攻毒鸡和同居鸡比其它基因型攻毒鸡只的复制能力更强，表明G57病毒实现了最优片段组合。另一个最近的G68基因型病毒，除HA片段之外，与G57病毒的其他片段均相同，与其他基因型的早期病毒相比，其代表毒株(A/chicken/Guangdong/01/2011)在攻毒鸡和同居鸡中的病毒滴度也更高，说明其他片段也促进了2010年后流行毒株的感染能力的增强。在对免疫鸡只的感染试验中，G57病毒的复制和传播能力也表现出优势。这些结果表明，在免疫压力和跨越免疫瓶颈的最优基因选择下，G57型病毒最终成为2010-2013年疾病爆发期间占主导地位的基因型。这次疫情是自1998年大量农业疫苗开始在中国使用之后，首次全国范围内



CHICK PROGRAM

的H9N2病毒疫情爆发。

如上所述，H9N2生态环境的形成，是H7N9病毒起源的第一步，因为它大大增加了H9N2与流感病毒的其他亚型之间重组的可能性。H7和/或N9病毒引入鸡群以及随后与H9N2病毒的重组是最终的步骤。江苏、上海和浙江，是新型人H7N9病毒爆发的最初省份，是H9N2，H7和N9病毒共同流行的最佳地理位置。这些省份是最大的鸡肉消费市场之一，位于长江三角洲沿岸的鸟类迁徙路线上。使用分化时间的分子钟技术估计，这些H7N9病毒出现于2011-2012年之间，正好处于H9N2禽流感广泛暴发的时间段。此外，自从H9N2疫情爆发后，出现了超过10个非H7N9的新型重组病毒，进一步凸显了主要流行的G57型病毒与其他亚型病毒重组所起到的作用，引起我们对潜在的大流行流感病毒产生的担忧。

总而言之，我们的研究提供了感染鸡群的H9N2流感病毒如何促进感染人类的H7N9病毒产生的整体情况（图S3）。我们演示了农场鸡群中“最适毒株”G57型H9N2病毒如何被选择和进化，同时解释了新型H7N9病毒如何获得了该基因型病毒的内部基因。H9N2流感病毒在家禽中的流行和变异能够为具有大流行潜力的新型重组病毒的出现提供重要预警。

材料和方法

伦理学声明。所有的动物研究是经北京市科协（批准号SYXK，北京，2007-0023）批准，并根据由北京实验动物管理委员会颁布的北京市实验动物福利伦理指导原则进行，经中国农业大学动物福利委员会批准，按照中国农业大学（CAU）动物护理和使用委员会的指导方针进行（ID：SKLAB-B-2010-003）。

病毒分离鉴定。从2010年1月至2013年12月，本实验室对来自中国19个省（安徽，北京，广东，广西，福建，河北，黑龙江，河南，湖北，江苏，江西，吉林，辽宁，内蒙古，陕西，山东，四川，天津和新疆）的养鸡场送检的发病鸡只或死亡鸡只的肺组织进行诊断。我们对进行了H9N2亚型流感疫苗接种，仍然表现出明显的呼吸系统疾病和/或产蛋量下降5-20%的鸡群进行采样。为进行病毒分离，如先前所述，采取气管拭子并放置在含有抗生素的1.0毫升传输介质[含50%（体积/体积）甘油的PBS]中。使用含有抗生素的PBS将肺匀浆。样品在4°C以1000×g离心10分钟，将0.2毫升的上清液接种到10日龄的SPF鸡胚尿囊腔，并在37°C培养48小时。收获尿囊液，并检测其HA活性。如前所述，使用已知的流感病毒亚型抗血清鉴定HA阳性样品。收获含H9N2病毒的尿囊液，并在-80°C保存，直到进行下一步实验。通常一个农场会在同一时间将多个样品送往实验室。如果分离到一个或一个以上的H9N2病毒，则该农场被鉴定为H9N2阳性农场。通过H9N2阳性农场数量与送样农场总数的比值来确定病毒分离率。

基因组测序。根据分离时间和地点，从2010年到2013年选取76株H9N2病毒进行测序。每个省每月至少选取1株测序；如



CHICK PROGRAM

果单月有多个分离株，根据地理位置选择额外的病毒进行测序。同时对11株2008-2009年期间从患病免疫鸡群分离的H9N2病毒进行了基因组测序。使用QIAamp病毒RNA MINIKIT盒 (Qiagen) 提取病毒RNA，用H9N2型流感病毒特异性引物，使用一步法RT-PCR试剂盒(Qiagen)进行标准的RT-PCR。通过Sanger测序或ABI3730遗传分析仪进行全基因组DNA测序 (Applied Biosystems 公司) 或高通量二代测序(Ion torrent)。

序列采集和比对。我们从流感研究数据库 (FluDB) (www.FluDB.org)、全球禽流感共享数据库 (www.gisaid.org) 以及美国国家生物技术信息中心流感病毒资源库 (NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU)) 获得了之前中国发布的所有H9N2流感病毒序列 (1994至2013年)。通过鉴别分离株库中所有相似的基因片段，筛除重复的上传序列，每个分离株包含1至8段基因。从上述数据库中收集2014年4月之前发布的所有H7N9甲型流感病毒序列，与本研究中的序列进行结合来进一步分析 (表S3)。所有已公布序列的序列号均列入表S4和数据集S2中。用MAFFT V6对每个基因区段的序列进行比对，手动调节来消除移码错误，随后进行翻译。下游的系统发育分析在含有中断部分的区域进行。这些区域包括以下中断部分: PB2, 1, 168-2, 199; PB1, 61-1, 437; PA, 796-2103; HA, 190-1, 563; NP, 67-1, 014; NA, 91-1, 272; MP, 88-948和NS, 79-807。

系统发育分析和分群。用RAxML来构建每个基因片段的最大似然系统发育树。假定核苷酸替换的普遍时间可逆模型，并且根据离散Gamma分布假定存在速率变化。构建两套进化树: 一组包括1994年以来从中国大陆和香港分离到的所有宿主的H9N2毒株 (全基因片段)，另一组还包括来自中国大陆和香港的所有宿主的H7N9分离株 (所有六个内部片段)。使用sumtrees将多个100 bootstrap最大似然 (ML) 进化树构建成一个规则一致进化树。使用贝叶斯进化分析采样进化树软件构建各段基因的贝叶斯系统发育树 (BEAST)。在相应的RAxML树中，各个树中的替换和变异速率模型是一样的，具有附加的分子时钟对数正态分布假设。BEAST进化树与RAxML规则一致树同一时间生成，以减少Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 采样所需计算时间，来获得固定分布。使用进化树后端样品的最终30%的2000份等距样本来构建最大可信度分群进化树 (MCC) ($N=25 \times 10^6$ 总样本)。使用0.20的中位数分支长度距离阈值将得到的MCC进化树划分为大分支。简要地说，在所有大分支中，中位数分支长度距离等于或小于20%的大分支被划分为cluster。然后如果需要的话，根据该分支的后段和已有的分类方法手动合并大分支。每个分支都有一个唯一的分支ID。

基因型分析。我们对1994年至2013年中国鸡群分离到的H9N2病毒基因型进行分析。如果可以对一个分离株的全部8个基因片段进行序列比对和分支划分，则可以对该分离株进行基因分型。分离株的基因型是通过8个基因片段的分支划分组合来确定的。根据最初的分离株的分离时间来分配基因型的ID。

HI试验。通过HI试验对本研究及之前研究中的中国H9N2病毒分离株的抗原性特征进行鉴定。所使用的血清抗体来自两个



CHICK PROGRAM

代表性的H9N2疫苗株A/chicken/Shandong/6/1996 和 A/chicken/Shandong/F/1998)。如前所述进行HI测定，初始血清稀释度为1:10。HI滴度表示为血凝抑制最高血清稀释度的倒数。

病毒感染实验。根据之前的文献报道进行试验设计，分别在免疫鸡只和未免疫鸡只中进行。3周龄SPF白来航鸡皮下接种一次A/chicken/Shandong/6/1996商用疫苗（HA含量， $10^{1 \log 2}$ ）。免疫后3周测定血清的同源抗原HI滴度，并表示为滴定终点的 \log_2 倒数。将接种疫苗的鸡随机分成2组进行感染实验：低抗体水平组（HI滴度6-9）和高抗体水平组（HI滴度10-12）。6周龄SPF白来航鸡被用作未免疫对照组。选取9株H9N2病毒对鸡进行攻毒（图4）。每个攻毒组的鸡（每组10只）鼻内接种0.2毫升含有 10^6 EID₅₀（鸡胚半数感染量）的病毒。在3, 5和7dpi收集气管和泄殖腔拭子。通过测定阳性样品的EID₅₀计算病毒滴度；检测下限为 $1.0 \log_{10}$ EID₅₀/ml。在同居组感染24小时后，使5只鸡与攻毒鸡产生物理接触（即在相同的笼中，共享食物和饮水）。如上所述，在3, 5和7dpi采集气管和泄殖腔拭子，进行病毒检测和滴定。

统计分析。实验组进行统计学方差分析比较。P<0.05被认为统计学差异显著。