

# H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 排毒及形成气溶胶的研究

曹永芝 马卫明\* 李晓霞 柴同杰\* 张海燕

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

**摘要:** 为研究 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 排毒及形成气溶胶规律, 将 SPF 鸡饲养于正负压隔离器中, 采用 AGI-30 收集器(All Glass Impinger AGI-30)和气管泄殖腔棉拭子在攻毒后不同时间收集空气、气管和泄殖腔样品, 并利用 HI、Dot-ELISA 和 RT-PCR 检测样品。结果发现攻毒后第 4 天开始形成气溶胶, 并持续到第 43 天, 实验证明 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 不仅可以在呼吸道和泄殖腔复制, 而且可以形成气溶胶。气管泄殖腔棉拭子在接种后第 3 天开始排毒, 至第 7 天攻毒鸡全部分离到病毒。排毒时间可持续到第 45 天。但泄殖腔的排毒量明显低于气管的排毒量, 这也说明 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感主要通过呼吸道排毒。

**关键词:** 禽流感, 排毒规律, 形成, 气溶胶

## Studies on Shedding Virus and the Formation of Aerosol of H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> Subtype AIV

CAO Yong-Zhi MA Wei-Ming\* LI Xiao-Xia CHAI Tong-Jie\* ZHANG Hai-Yan

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

**Abstract:** In order to study the regularity of shedding virus from infected SPF chickens and the formation of aerosol of H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV, SPF chickens were bred in a positive and negative pressure isolator. Aerosol samples were collected by AGI-30 (All Glass Impinger-30) extractor, and simultaneously trachea and cloaca samples were collected by tracheal swabs and cloacal swabs in different periods after challenged with viruses. The above-mentioned samples were detected by HI, Dot-ELISA and RT-PCR methods. The results indicated that aerosols were isolated from the 4 days to the 43 days after inoculation. It was proved that H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV could copy themselves in respiratory passage and cloaca, and then could formation of aerosols. AIV H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype could be isolated from cloacal and tracheal swabs 3 days after inoculation and lasted for 45 days, viruses were detected from all infected SPF chickens on 7 days.

**Keywords:** Avian influenza, Shedding virus, Formation, Aerosol

禽流感(Avian influenza, AI)是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的一种急性败血性、高度接触性传染病。根据 AIV 表面抗原血凝素(Hemagglutinin, HA)与神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的不同, 可将病

毒划分为不同的亚型。自从 1994 年我国首次分离到禽流感病毒以来, 已经证实我国 AIV 主要有 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 和 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 两个亚型<sup>[1-5]</sup>。H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型禽流感于 1878 年首次发现于意大利。H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型禽流感病毒从 1994

年开始被发现时,就已经在中国大陆的家禽中流行<sup>[6]</sup>。1997 年香港发生禽流感并报道了人因感染 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 亚型禽流感病毒致死的病例,这使人们对该病的公共卫生意义更加关注。同时,禽流感病毒的侵袭机制也成为国内外专家研究的热点之一<sup>[7-10]</sup>。因此开展对禽流感病毒 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型的研究,通过实验室检测并掌握该亚型的排毒和气溶胶形成规律,不仅在病毒学、兽医学等学科上具有重要的学术意义,而且在公共卫生等方面也具有重大的社会意义。本实验将 SPF 鸡饲养于正负压隔离器中,接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV,采用 AGI-30 收集器在攻毒后不同时间收集空气样品,并用气管、泄殖腔棉拭子收集气管和泄殖腔样品。采用 HA、Dot-ELISA 和 RT-PCR 等检测方法以确定接种鸡群排毒和气溶胶产生及消失规律。此实验结果对感染 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 畜禽场采取有效措施控制疫病蔓延和确定空栏时间有一定参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** A/Chicken/Guangdong/SS/1994(H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>), AI(H<sub>1</sub>-9) 单因子阳性血清由中国农科院哈尔滨兽医研究所提供。新城疫(ND)、产蛋下降综合症病毒(EDS-76)、鸡传染性支气管炎(ILT)和肿头综合征(SHS)标准诊断试剂均购自中国兽药监察所。H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 病毒的 ELD<sub>50</sub> 和 EID<sub>50</sub> 按照常规方法测定。

**1.1.2 SPF 鸡胚、21 日龄 SPF 鸡:** 由山东农科院家禽研究所 SPF 鸡场提供。

**1.1.3 主要试剂及配制方法:** 试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。试剂配置方法按照文献<sup>[11]</sup>。

**1.1.4 ELISA 试剂:** ELISA 抗原和酶标抗体均由哈尔滨兽医研究所禽流感研究中心研制。ELISA 全病毒抗原的蛋白含量为 2.96 mg/mL,辣根过氧化物酶标的兔抗鸡 Ig 的工作浓度 1~200。

**1.1.5 RT-PCR:** 根据 GenBank 发表的序列 (AY294658) 设计一段针对 HA 裂解位点的特异序列: 上游引物为 P1 5'-TTGCCATTCCACAATGTCAGTA-3'; 下游引物为 P2 5'-CGACTTATTAGTCACTTTGG-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组与攻毒:** 将 15 只 SPF 鸡预饲 1 周,分别称重做标记。其中第 1 组 10 只为接种组,用灭菌 PBS

稀释尿囊液,接种经测定 ELD<sub>50</sub>/EID<sub>50</sub> 为 10<sup>7</sup>/10<sup>10.2</sup>/0.2 mL, HA 效价为 10<sup>9</sup> 的 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 病毒 0.2 mL。健康对照组接种灭菌 PBS,通过气管、口腔和滴鼻每只共计接种 0.2 mL。每日饲喂经灭菌的饲料和水。

**1.2.2 气管、泄殖腔、血样的采集与处理:** 在接种后第 1 天、3 天、5 天、7 天、9 天、11 天、15 天、20 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天收集每只实验鸡的气管和泄殖腔棉拭子,此两拭子各放入盛有 2% 小牛血清和 1.5 mL PBS 的 2 mL 离心管中。采样液采集前后分别称重。反复冻融充分振荡洗涤拭子后取出,5000 r/min 离心 10 min,取上清。气管拭子保存液含青霉素(2000 U/mL),链霉素(2 mg/mL),卡那霉素(50 μg/mL)和制霉菌素(1000 U/mL);而泄殖腔棉拭子抗生素浓度提高 5 倍。分离病毒后接种 SPF 鸡胚,弃去 24 h 内死亡胚,孵育 5 d 后收取鸡胚尿囊液测血凝效价。如第一代 HA 阴性,利用其尿囊液传代,每代检测 HA 特性,直到第 3 代,如仍为阴性弃去;出现阳性样品,及时保留并进行鉴定。对接种组和健康对照组分别经翅静脉采集血液后分离血清,用 HI 测血凝效价。

**1.2.3 空气样品的采集与处理:** 用 AGI-30 收集器收集空气样品,温度控制在 18°C~21°C,相对湿度为 55%~65%,气流速度 12.5 L/min,采样时间为 20 min。采样液为 20 mL,其中采样液含 5% NCS 的 DMEM 细胞培养液,并加一滴橄榄油作为抗泡剂。每天采集空气样品,超速离心,密度梯度离心,梯度物质为蔗糖,接种于 SPF 鸡胚,收集病毒。采用血凝抑制实验、Dot-ELISA 和 RT-PCR 技术鉴定所收集到的病毒,进行血清亚型鉴定和动物致病性实验。

**1.2.4 SPF 鸡气管和消化道中病毒的 EID<sub>50</sub>:** 取第 7 天、第 14 天和第 21 天气管泄殖腔棉拭子样品,称重后用灭菌 PBS 分别连续 10 倍稀释。取 10<sup>-5</sup>~10<sup>-12</sup> 八个稀释度,每个稀释度经尿囊膜接种 4 枚 10 d SPF 鸡胚,0.2 mL/胚。对照组注射生理盐水。37°C 孵育,每隔 12 h 观察一次,弃去 24 h 死亡胚。连续观察和记录鸡胚死亡情况,按 Reed-Muench 公式计算 EID<sub>50</sub>。

**1.2.5 血凝交叉抑制实验:** 按常规方法<sup>[11]</sup> 进行 HI 实验。将具有血凝性的病毒:禽流感(AI<sub>1-9</sub>)新城疫(ND)、产蛋下降综合症病毒(EDS-76)、鸡传染性支气管炎(IB)和肿头综合征(SHS)进行交叉抑制反应。

**1.2.6 Dot-ELISA 鉴定:** 根据有关文献报道并加以改进对所采样品进行 Dot-ELISA 鉴定<sup>[12,13]</sup>。

**1.2.7 RT-PCR 鉴定:** 用 RT-PCR 再次鉴定 HI 和 Dot-ELISA 的结果。按说明 Trizol 法提取总 RNA。RT-PCR :按照试剂盒的说明依次加样, 并按照说明在 PCR 扩增仪上进行循环。琼脂糖电泳: 将 PCR 扩增产物 15 μL 混合上样缓冲液以及试剂盒提供的 Marker, 分别点样于琼脂糖凝胶孔中, 进行 5 V/cm 的电压电泳, 电泳后, 将凝胶放到紫外灯下观察结果。

2 结果

2.1 SPF 鸡气管和泄殖腔排毒量比较

气管和泄殖腔棉拭子中病毒的 EID<sub>50</sub> 表明气管的排毒量明显大于泄殖腔的排毒量。对照组为阴性。气管和泄殖腔棉拭子中病毒的 EID<sub>50</sub> 见表(1)。

2.2 气管棉拭子分离病毒结果

气管棉拭子在接种后第 3 天至第 5 天开始分离到病毒, 并且随接种时间的增长排毒量呈上升趋势。在接种后第 11 天~15 天出现排毒高峰, 以后排毒量逐渐减少, 直到第 45 天排毒全部结束。健康对照组没有分离到病毒。气管排毒情况见表(2)。

2.3 泄殖腔棉拭子分离病毒结果

泄殖腔开始排毒到排毒结束的时间与气管基本

一致, 但排毒量低于气管的排毒量。对照组没有分离到病毒。泄殖腔排毒情况见表(3)。

2.4 气溶胶分离病毒结果

接种组接种后第 4 天开始形成气溶胶, 一直持续到第 43 天。之后本实验用 AGI-30 收集器未采集到禽流感病毒。健康对照组一直没有分离到病毒。

2.5 形成抗体情况

接种后第 4 天开始测到抗体, 并且效价上升很快。到第 20 天达到 10 ± 0.25, 以后逐渐下降, 到第 45 天时下降到 6 ± 0.5。接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感后抗体变化情况见表(3)。

2.6 血凝与血凝交叉抑制实验结果

将气管、泄殖腔和气溶胶样品经常规处理后接种鸡胚, HA 结果与以上所述相符。将鸡胚尿囊液与具有血凝性的病毒: 禽流感(AI<sub>1-9</sub>)、新城疫(ND)、产蛋下降综合症病毒(EDS-76)、鸡传染性支气管炎(IB)和肿头综合征(SHS)分别进行交叉抑制反应。结果显示分离到的病毒只与 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感产生血凝抑制反应, 与其他病毒交叉抑制反应为阴性。健康对照组没有形成抗体。

2.7 RT-PCR 结果

用 RT-PCR 对气管、泄殖腔和气溶胶样品再次进行处理, 阳性样品显示出 1 条 282 bp 的特异带。RT-PCR 检测气管和泄殖腔排毒情况见图(1)。

表 1 H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> 禽流感病毒在不同日龄 SPF 鸡气管和泄殖腔中病毒的 EID <sub>50</sub>						
Table 1 EID <sub>50</sub> of rachea and cloaca in different days after inoculation with H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> avian influenza viruses (EID <sub>50</sub> / 0.2 mL)						
样品 Sample	接种时间 Inoculate time					
	7 d		14 d		21 d	
	T	C	T	C	T	C
Sample 1	3.2	2.0	6.0	3.1	4.7	1.9
Sample 2	2.5	1.2	7.2	3.7	5.0	2.2
Sample 3	3.0	1.5	6.9	4.0	4.2	2.5
Sample 4	2.0	<1	5.0	2.0	3.5	1.2
Sample 5	2.8	1.4	6.7	3.3	5.2	2.7
Sample 6	2.4	<1	4.8	2.1	3.1	2.0
Sample 7	3.1	2.1	7.2	3.6	4.5	2.5
Sample 8	3.0	1.8	6.6	2.9	3.9	2.2
Sample 9	2.7	1.3	6.3	3.1	4.2	1.9
Sample 10	3.3	2.0	7.0	3.1	3.3	2.3
Mean	2.80 ± 0.46	1.53 ± 0.42	6.37 ± 0.86	3.09 ± 0.64	4.16 ± 0.71	2.14 ± 0.42

注: T: 气管; C: 泄殖腔  
Note: T: Trachea; C: Cloaca

表 2 接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感后气管排毒情况  
Table 2 Isolation for viruses of tracheal swabs in chickens after inoculation with H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV

接种时间 Inoculate time	排毒情况 Shedding virus			
	+	++	+++	-
3 d	2/10 <sup>a</sup>	2/10 <sup>a</sup>	1/10 <sup>a</sup>	5/10 <sup>b</sup>
5 d	3/10	1/10	2/10	4/10
7 d	1/10	3/10	6/10	0/10
9 d	1/10	2/10	7/10	0/10
11 d	0/10	1/10	9/10	0/10
15 d	0/10	1/10	9/10	0/10
20 d	1/10	3/10	6/10	0/10
25 d	2/10	4/10	4/10	0/10
30 d	3/10	4/10	3/10	0/10
35 d	5/10	2/10	2/10	1/10
40 d	2/10	1/10	0/10	7/10
45 d	0/10	0/10	0/10	10/10

注：+++：Dot-ELISA 强阳性；++：Dot-ELISA 阳性；+：Dot-ELISA 弱阳性；-：Dot-ELISA 阴性；a：阳性只数/总只数，b：阴性只数/总只数  
Note：+++：Strongly positive of Dot-ELISA；++：Positive of Dot-ELISA；+：Weakly positive of Dot-ELISA；-：Negative -；a：Number of positive /total number of chickens；b：Number of negative /total number of chickens

表 3 接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感后泄殖腔拭子分离病毒情况  
Table3 Isolation for viruses of cloacal swabs in chickens after inoculation with H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV

接种时间 Inoculate time	排毒情况 Shedding virus			
	+	++	+++	-
3 d	1/10 <sup>a</sup>	2/10 <sup>a</sup>	1/10 <sup>a</sup>	6/10 <sup>b</sup>
5 d	2/10	2/10	2/10	4/10
7 d	3/10	5/10	2/10	0/10
9 d	3/10	4/10	3/10	0/10
11 d	2/10	3/10	5/10	0/10
15 d	2/10	4/10	4/10	0/10
20 d	3/10	4/10	3/10	0/10
25 d	4/10	4/10	2/10	0/10
30 d	6/10	3/10	1/10	0/10
35 d	7/10	1/10	0/10	2/10
40 d	3/10	0/10	0/10	7/10
45 d	0/10	0/10	0/10	10/10

注：+++：Dot-ELISA 强阳性；++：Dot-ELISA 阳性；+：Dot-ELISA 弱阳性；-：Dot-ELISA 阴性；a：阳性只数/总只数，b：阴性只数/总只数  
Note：+++：Strongly positive of Dot-ELISA；++：Positive of Dot-ELISA；+：Weakly positive of Dot-ELISA；-：Negative -；a：Number of positive /total number of chickens；b：Number of negative /total number of chickens

表 4 接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感后抗体变化情况  
Table 4 HI titer of the serum after inoculation with H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV(2<sup>n</sup>)

接种时间 Inoculate time	平均数 ± 标准差 $\bar{x} \pm s$
3 d	0
5 d	1 ± 0.75
7 d	4 ± 0.6
9 d	6 ± 0.5
11 d	8 ± 0.3
15 d	9 ± 0.3
20 d	10 ± 0.25
25 d	8 ± 0.3
35 d	7 ± 0.3
40 d	7 ± 0.75
45 d	6 ± 0.5

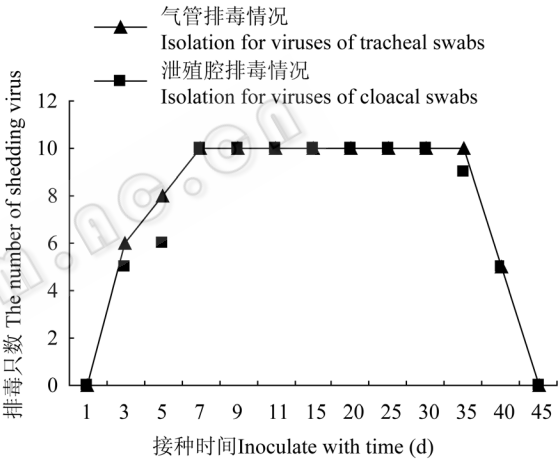


图 1 接种 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感后用 PCR 方法检测病毒情况  
Fig. 1 PCR product in chickens after inoculation with H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype AIV  
注：接种总数为 10 只  
Note: Total number of chickens is ten

3 讨论

为保证实验结果的准确性，该实验样品采用 Dot-ELISA 和 RT-PCR 等检测方法。由于 PCR 的灵敏性大于前者，所以部分数据存在差异。经 X<sup>2</sup> 检验两种方法检测气管和泄殖腔排毒情况的卡方值分别为 0.94 和 0.38，即 P>0.05，差异不显著。Guo 等<sup>[14]</sup>从 3 个亚系中分别选取具有代表性的毒株进行了系统性的致病性研究，认为 CK/BJ/1/94 类株主要在气管内复制。石火英等证明 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 在呼吸道的复制特性起主要作用<sup>[15]</sup>。本实验也说明泄殖腔的排毒量明显低于气管的排毒量，与其实验结果一致。所以 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感的气源性感染应当引起高度

重视。此实验进一步证明 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 的排毒可持续到第 45 天。

实验证明攻毒鸡从第 3 天开始分离到病毒, 到第 7 天 10 只鸡全部排毒。因此对发生禽流感的地区和鸡舍采取有效地隔离措施非常重要, 并且必须高于禽流感的排毒时间。实验证明接种后第 11 天至第 15 天出现排毒高峰, 至于出现排毒高峰和形成气溶胶高峰之间存在什么样关系需要进一步研究。H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 抗体大部分在第 5 天产生, 并且抗体效价上升迅速, 到第 20 天左右出现最高值。抗体水平维持时间比较长, 到第 45 天仍可达  $6 \pm 0.5$ 。因此有效的疫苗预防对抵抗 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 的侵害非常重要。

畜禽的许多重大传染病和动物疫源性人畜共患病的传播途径之一是气源性传染, 而气溶胶是病原微生物传播的重要媒介, 所以研究病毒气溶胶的发生与传播机制, 确定疫病的传播途径, 可以有效控制传染病的传播。此实验利用 AGI-30 气溶胶收集器采集样品并通过鉴定, 证明了气溶胶形成时间为攻毒后第 4 天, 这说明自然状态下气溶胶可以携带 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV。气溶胶持续到第 43 天开始消失, 但排毒时间持续到第 45 天。因此并不是存在病毒颗粒就可形成气溶胶, H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 气溶胶的形成受诸多因素影响。虽然有气溶胶的存在并不能说明此毒株可以通过其传播, 但由于禽流感有其自身的变异性, 感染此毒株的畜禽场仍然需要根据气溶胶的存亡规律慎重确定空栏时间, 最好大于 45 d。至于 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 以什么形式存在于气溶胶中, 在气溶胶中能存活多长时间, 不同的剂量和接种途径是否对气溶胶的形成和传播有影响, 空气中的病毒量达到多少才具备形成气溶胶的条件有待进一步研究。石火英、袁建琴等<sup>[16,17]</sup> 利用反向遗传技术, 证明此毒株未发现通过气溶胶传播, 但可以在呼吸道复制。此次实验进一步证明了, 这株病毒不仅可以在呼吸道和泄殖腔复制, 并且可以形成气溶胶。至于为什么不能通过气溶胶传播, 除报道的 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 的传播途径与流感病毒的 NA 基因有关外<sup>[17]</sup>, 还有哪些方面原因有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 白新盛, 卢景良. 1997 香港禽流感畜禽重大疫病生物技术防制研究. 北京: 中国农业出版社, 1998, pp.307-314.
- [2] 魏凤祥, 屈连东, 周琦, 等. 要正视禽流感的综合预防. 中国预防兽医学报, 2001, 23(5): 399-401.
- [3] Li KS, Xu KM, Peiris JS, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans. *J Virol*, 2003, 77(12): 6988-6994.
- [4] 陈伯伦, 张纪泽, 陈伟斌. 禽流感研究 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [5] 张纪泽, 陈伯伦, 陈伟斌. 禽流感研究. 禽流感的发生与血清学调查. 中国兽医杂志, 1994, 10(20): 6-7.
- [6] Li CJ, Yu KZ, Tian GB, *et al.* Evolution of H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology*, 2005, 340(1): 70-83.
- [7] Shortridge KF, Gao P, Guan Y, *et al.* Interspecies transmission of influenza viruses: H5N1 virus and a Hong Kong SAR perspective. *Vet Microbiol*, 2000, 74(1-2): 141-147.
- [8] To KF, Chan PK, Chan KF, *et al.* Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus. *Med Virol*, 2001, 63(3): 242-246.
- [9] Ku AS, Chan LT. The first case of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian influenza infection in a human with complications of adult respiratory distress syndrome and Reye's syndrome. *J Paediatr Child Health*, 1999, 35(2): 207-209.
- [10] Paul KS Chan. Outbreak of Avian Influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clinical Infectious Diseases*, 2002, 34: S58-S64.
- [11] 萨姆布鲁克 J 等著. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997, pp.343-344.
- [13] 张春杰, 王大军, 吴庭才, 等. 禽流感(H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型)酶标抗体的制备及双抗夹心 Dot-ELISA 检测方法的建立. 河南农业科学, 2006, 10: 101-111.
- [14] 李海燕, 辛晓光, 田国斌, 等. 禽流感抗体斑点-ELISA 诊断技术的研究. 中国预防兽医学报, 1999, 21(5): 321-324.
- [15] Guo YJ, Krauss S, Senne DA, *et al.* Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*, 2000, 267(2): 279-288.
- [16] 石火英, 孙蕾, 陈素娟, 等. H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型禽流感病毒复制特性的基因分析. 畜牧兽医学报, 2008, 39(2): 189-194.
- [17] 石火英, 刘秀梵. 利用反向遗传技术研究 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型 AIV 传播途径的分子机制. 微生物学报, 2006, 46(1): 48-54.
- [18] 袁建琴, 高斌战. H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 型禽流感病毒不同传播方式的分子机制. 中国兽医杂志, 2007, 43(8): 17-19.