

## 5株H9N2亚型禽流感病毒分离鉴定及HA基因的序列分析

侯娟娟, 王艳, 高亚东, 李春秀, 李山峰, 孙景昱, 张越, 尹建华\* (青岛汇丰动物保健品有限公司, 山东青岛 266109)

**摘要** [目的]对山东省部分地区疑似H9N2亚型禽流感病毒的5份病料样品进行鉴定,并确定其所属系谱。[方法]通过鸡胚接种、血清学试验、RT-PCR检测和基因测序等方法对样品进行分离、鉴定和分析。[结果]5个分离株与A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)的同源性在90%以上,并属同一分支,与参考株A/chicken/Henan/G19/2011(H9N2)的同源性不到90.0%,与其亲缘关系最近的疫苗株A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012(H9N2)的同源性在92.1~93.5%。[结论]分离的5个毒株均属于欧亚系I群h9.4.2.5分支,且与参考株和疫苗株之间产生一定的遗传距离。

**关键词** H9N2亚型禽流感;分离鉴定;HA基因

中图分类号 S852.65 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)23-0078-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.23.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Isolation and Identification of 5 Strains of H9N2 Subtype Avian Influenza Virus Sequence Analysis of HA Gene

HOU Juan-juan, WANG Yan, GAO Ya-dong et al (Qingdao Hui Feng Animal Health Products Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract** [Objective]The homology five samples of suspected H9N2 subtype avian influenza virus were collected from parts of Shandong Province, China, and their pedigree was determined. [Method] The samples were isolated, identified and analyzed by inoculation of chicken embryo, serological test, RT-PCR and gene sequencing. [Result]The homology of five isolates with A/chicken/Guangxi/55/2005 (H9N2) was above 90%, belonged to the same branch, and that with the reference strains A/chicken/Henan/G19/2011 (H9N2) was less than 90.0%, the homology with the most closely related vaccine strain A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012 (H9N2) was at about 92.1%~93.5%. [Conclusion]The five isolates belong to the Eurasian h9.4.2.5 branch department I group, produce certain genetic distance between the reference strain and the vaccine strain.

**Key words** H9N2 subtype avian influenza; Isolation and identification; HA gene

禽流感(avian influenza, AI)俗称“鸡瘟”,从1878年意大利暴发高致病性禽流感以来<sup>[1]</sup>,人类对禽流感的认识不断增加,1955年, Schäfer<sup>[2]</sup>证实“鸡瘟”是由A型流感引起的。低致病性禽流感H9N2亚型毒株自1966年被分离发现至今已有50余年,1994年在我国广东首次分离到,临床表现为产蛋下降,并造成一定的死亡,实验室复制出典型的临床症状,但不致鸡死亡<sup>[3]</sup>。近年来,禽流感在我国部分地区时有发生,对我国养殖业造成严重损失,根据流感病毒囊膜表面有许多糖蛋白凸起,一类为由血凝素(HA)分子的三聚体构成;另一类为由神经氨酸酶(NA)分子的四聚体构成。根据HA和NA的不同,可以分为HA(H1~H16)16种,NA(N1~N10)10种。HA是禽流感病毒表面的糖蛋白,是重要的保护性抗原,其裂解位点的序列可影响AIV致病性的强弱<sup>[4]</sup>。禽流感病毒会随着流行和发病时间的延长,同一病毒可能会从低致病性向高致病性改变,也可能出现因宿主同时感染多种亚型病毒而发生不同亚型禽流感病毒间的遗传重组,形成新的禽流感亚型病毒<sup>[5]</sup>。笔者将山东部分地区分离的5份疑似H9亚型禽流感的病死鸡解剖采集病料,并进行病原分离和鉴定,通过RT-PCR进行HA基因扩增、测序,结合查阅文献资料<sup>[6-7]</sup>,从美国国家生物信息中心(NCBI)下载参考株等序列进行基因序列分析,进一步了解所分离的毒株变异情况。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

1.1.1 样品与毒株。青岛汇丰动物保健品有限公司于

2020—2021年在山东部分地区养殖场采集疑似H9亚型禽流感发病鸡群病料5份,分别为HFA9-1WF、HFA9-2CY、HFA9-3XT、HFA9-4LW、HFA9-5LC。

1.1.2 试剂及引物。H9亚型禽流感病毒特异性血清、禽流感(H5、H7亚型)阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清购自中国兽医药品检查所;病毒核酸提取试剂盒购自北京索莱宝公司;RandomPrimer[nonadeoxyribonucleotide mixture;pd(N),]、Recombinant RNase Inhibitor、dNTP Mixture、M-MLV、5×Buffer、Premix Taq™(TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)购自Takara公司;引物由青岛汇丰动物保健品有限公司提供。

1.1.3 SPF蛋、SPF鸡。购自济南赛斯家禽科技有限公司。

1.2 仪器 超净工作台,购自苏州净化设备有限公司;台式高速离心机,购自德国Sigma公司;涡旋器,购自其林贝尔仪器制造有限公司;梯度PCR仪,购自美国ABI公司;化学发光凝胶成像系统,购自法国Vilber Lourmat公司;琼脂糖水平电泳槽,购自北京六一仪器厂;恒温恒湿培养箱,购自天津市莱玻特瑞设备有限公司;金属浴,购自杭州博日科技股份有限公司;各种量程移液枪,购自Eppendorf公司。

## 1.3 方法

1.3.1 病料采集与处理。从发病鸡群中挑出有典型临床症状的鸡,解剖采集病鸡气管、肝脏、肺脏等病变严重的部位,用灭菌生理盐水冲洗,再剪碎,以1:5(W/V)加入灭菌生理盐水,用研磨器研磨匀浆后,反复冻融3次,6 000 r/min离心10 min,取上清过滤除菌后加双抗,于-20℃保存备用。

1.3.2 病毒分离-鸡胚接种。将“1.3.1”中制备的组织液分别经尿囊腔接种10日龄SPF鸡胚,0.2 mL/胚,每份组织液接种

作者简介 侯娟娟(1987—),女,河南安阳人,助理兽医师,硕士,从事畜禽生物制品的开发及应用研究。\*通信作者,工程师,硕士,从事动物保健品的开发及应用研究。

5 枚鸡胚,接后于 37 °C 恒温培养箱内继续孵化,将 24 h 内死亡的鸡胚弃去,收获 24~96 h 死亡的鸡胚,测定其 HA 效价,并通过 PCR 方法进行鉴定。

#### 1.4 血凝试验

**1.4.1 红细胞悬液制备。**选 2~4 只 2~6 月龄公鸡,将血液采集到含有抗凝剂的溶液中混合均匀,以 1 500 r/min 离心 5 min,吸弃上清,再加入原体积生理盐水悬浮红细胞并离心洗涤,共离心洗涤 3~4 次,直至上清液无色清亮。最后一次离心以 2 000 r/min 离心 5 min。吸弃上清液,将沉淀的红细胞摇匀后吸取 1 mL 加入 99 mL 生理盐水摇匀配制成 1% 红细胞悬液。

**1.4.2 红细胞凝集价 (HA)。**将“1.3.1”中收取的尿囊液分别进行血凝试验,在 96 孔微量板上每孔加入 25  $\mu$ L 生理盐水,再用加样器吸取 25  $\mu$ L 待检样品加入第 1 孔中,吹打混匀后吸取 25  $\mu$ L 加入第 2 孔中依次作倍比稀释直至所需倍数孔,并吸弃 25  $\mu$ L,最后孔留作阴性对照。稀释完成后,每孔加入 25  $\mu$ L 1% 红细胞悬液,并振荡混匀,于 37 °C 15 min 观察结果。

**1.5 血凝抑制试验** 将分离株分别与抗 H9 亚型禽流感病毒特异性血清、禽流感 (H5、H7 亚型) 阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清反应。

**1.5.1 四单位配制。**4 个 100% 血凝单位 (即 4HAU) 血凝素的配制根据现行《中国兽药典》附录方法。

**1.5.2 血凝抑制试验 (HI)。**用生理盐水将被检血清 2 倍比稀释,吹吸 7 $\pm$ 2 次混匀,加入含 4HAU 的血凝素液,并设立生理盐水 (即红细胞) 和血凝素对照,充分振荡后在 37 °C 作用 15 min;再加入 1% 红细胞悬液,静置室温 40 min 或 37 °C 15 min,判定结果,以 100% 红细胞凝集抑制的血清最高稀释度作为判定终点 (即血清凝集抑制价)。

**1.6 样品病毒 RNA 提取** 用索莱宝总 RNA 提取试剂盒 (Total RNA Extraction Kit) 提取样品 RNA。

#### 1.7 病毒 RNA 反转录 (RT) 和 PCR 扩增

**1.7.1 反转录体系。**总体积 20  $\mu$ L:2.0  $\mu$ L dNTP Mixture、4.0  $\mu$ L 5 $\times$ Buffer、0.5  $\mu$ L M-MLV、1.0  $\mu$ L RandomPrimer (nonadeoxyribonucleotide mixture;pd(N)<sub>9</sub>)、0.5  $\mu$ L Recombinant RNase Inhibitor、12.0  $\mu$ L RNA。反转录程序:30 °C 10 min、42 °C 1 h。

**1.7.2 PCR 扩增体系。**总体积 25  $\mu$ L:9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、12.5  $\mu$ L Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)、0.5  $\mu$ L 上游引物、0.5  $\mu$ L 下游引物、2.0  $\mu$ L DNA。PCR 程序:95 °C 5 min;95 °C 30 s,53 °C 45 s,72 °C 1 min 40 s,30 个循环;72 °C 10 min。

**1.8 电泳鉴定** 配制浓度为 1% 的琼脂糖凝胶,在电泳槽中加入 TAE 溶液,分别在凝胶孔中加入 PCR 扩增样品、DNA Marker 2 000 bp、对照,电泳 30 min 后,通过紫外凝胶成像仪观察结果。

**1.9 基因序列测定与 Blast 分析** 将扩增并经电泳鉴定后的 PCR 产物送往擎科生物科技有限公司测序,将测序结果拼接后在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 在线 Blast 系统比对序列。

**1.10 序列分析** 在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站下载 H9 亚型毒株参考株和疫苗株的 HA 基因序列,同分离株样品测序结果用 MegAlign 进行 HA 基因序列分析,绘制进化树,并进行核苷酸同源性比较。

## 2 结果与分析

**2.1 病料在鸡胚上的分离结果** 将采集于各地的 5 份病料组织液经尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚,连续观察 72 h,结果发现 5 份样品在 60~72 h 出现不同数量的死亡,分别收取各组鸡胚尿囊液进行鉴定,结果见表 1。

表 1 5 份病料在鸡胚上的分离结果

Table 1 Results of separation of 5 sick materials on chicken embryo

名称 Name	接胚日龄 Embryo age	接胚剂量 Embryo dosage//mL/胚	接胚数量 Embryo quantity	死胚率 Dead embryo rate//%
HFA9-1WF	10	0.2	5	60
HFA9-2CY	10	0.2	5	20
HFA9-3XT	10	0.2	5	20
HFA9-4LW	10	0.2	5	40
HFA9-5LC	10	0.2	5	60

**2.2 血凝抑制试验结果** 5 份尿囊液样品 HA 效价均在 1:128~1:256,各组样品对 H9 亚型禽流感病毒特异性血清的 HI 效价在 1:102 4~1:512 0,对禽流感 (H5、H7 亚型) 阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清 HI 效价均为 0 (表 2)。

表 2 血凝抑制 (HI) 试验结果

Table 2 Results of hemagglutination inhibition (HI) test

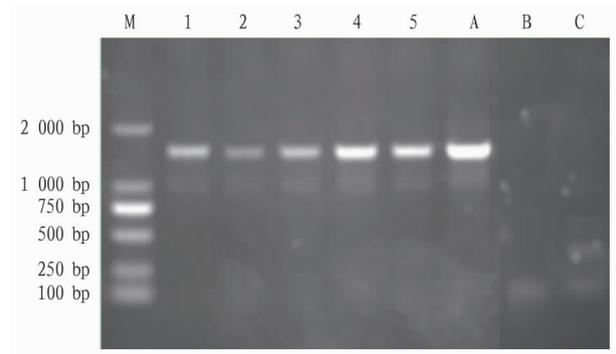
名称 Name	HA	H9	H5	H7	ND	EDS
HFA9-1WF	1:256	1:102 4	0	0	0	0
HFA9-2CY	1:128	1:256 0	0	0	0	0
HFA9-3XT	1:128	1:256 0	0	0	0	0
HFA9-4LW	1:256	1:102 4	0	0	0	0
HFA9-5LC	1:256	1:512 0	0	0	0	0

**2.3 PCR 扩增与电泳结果** 将 5 份尿囊液样品提取 RNA,经反转录、PCR 扩增后,结果见图 1。从图 1 可以看出,5 份样品均在 1 600 bp 处出现目的条带,与预期片段大小相符,并无其他杂带,说明扩增的目的基因产物特异性较高。

**2.4 测序与 Blast 结果** 将扩增的 PCR 产物送至青岛擎科梓熙生物科技有限公司测序,5 份样品均测序成功。分别将基因序列经 Seqman 软件拼接后,在美国国家生物技术信息中心 NCBI 上进行 Blast 分析,结果显示,与 5 份样品同源性最高的均为 H9N2 亚型禽流感病毒。

**2.5 HA 基因核苷酸序列分析** 根据相关研究报道<sup>[8]</sup>,H9 亚型禽流感分为欧亚系、北美系两大分支,北美系的代表株是 A/turkey/Wisconsin/66 (H9N2),欧亚系分支分为 I 群、II 群和 III 群 3 个亚系,分别以 A/Duck/HongKong/Y280/97 (H9N2)、A/Quail/HongKong/G1/97 (H9N2)、A/Duck/HongKong/Y439/97 (H9N2) 为代表株。将分离的 6 个毒株的 HA 基因序列与从 GenBank 中选出并下载的 H9 亚型毒株参考株和疫苗株的 HA 基因序列进行比对 (表 3),并绘制进化

树。经过序列比对分析,结果显示,分离的 6 个毒株之间的 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因核苷酸同源率为 93.3% ~ 97.2%,并且它们处于同一分支,与参考株 A/chicken/Beijing/1/1994(H9N2)的核苷酸同源率在 85.9%~87.1%,与 A/chicken/Henan/G19/2011(H9N2)的同源性较高,在 89.2%~89.8%,与北美系代表株 A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)的同源性较低,在 74.7%~76.2%;与疫苗株 A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012(H9N2)的核苷酸同源率最高,在 92.1%~93.5%,与 A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)的同源性在 90.3%~91.7%。由图 2 可知, A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)、A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012(H9N2)与欧亚系 I 群的 A/Duck/Hong Kong/Y280/97(H9N2)在同一分支, A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)是欧亚系 I 群 h9.4.2.5 的代表株,而 6 个分离株与 A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)在同一支,且同源性较高,因此该试验所分离的 5 个毒株均属于欧亚系 I 群 h9.4.2.5 分支。



注: M. DL 2000D Marker; 1. HFA9-1WF; 2. HFA9-2CY; 3. HFA9-3XT; 4. HFA9-4LW; 5. HFA9-5LC; A. 阳性对照; B. 阴性对照; C. 空白对照

Note: M. DL 2000D Marker; 1. HFA9-1WF; 2. HFA9-2CY; 3. HFA9-3XT; 4. HFA9-4LW; 5. HFA9-5LC; A. Positive control; B. Negative control; C. Blank control

图 1 5 份分离株 PCR 电泳结果

Fig.1 PCR electrophoresis results of 5 isolates

表 3 选取的 H9 亚型 AIV 参考株和疫苗株的情况

Table 3 Selected reference strains and vaccine strains of H9 subtype AIV

类型 Type	毒株 Strain	缩写 Abbreviation	GenBank 序列登录号 GenBank serial login number
疫苗株 Vaccine strain	A/chicken/Guangxi/55/2005(H9N2)	GX	EU086245.1
	A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012(H9N2)	WJ57	KJ000710.1
	A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)	F98	AY743216.1
	A/chicken/Shandong/6/96(H9N2)	SD696	DQ064376.1
	A/chicken/Hong Kong/G9/1997(H9N2)	G9	KF188366.1
	A/Hong Kong/33982/2009(H9N2)	HK33982	KF188316.1
参考株 Reference strain	A/chicken/Shandong/YB06/2006(H9N2)	YB	JQ710463.1
	A/chicken/Henan/G19/2011(H9N2)	G19	JN804274.1
	A/chicken/Beijing/1/1994(H9N2)	BJ94	KF188294.1
	A/Duck/Hong Kong/Y280/97(H9N2)	Y280	AF156376.1
	A/Quail/Hong Kong/G1/97(H9N2)	G1	AF156378.1
	A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)	W66	DQ067444.1
	A/Duck/Hong Kong/Y439/97(H9N2)	Y439	AF156377.1

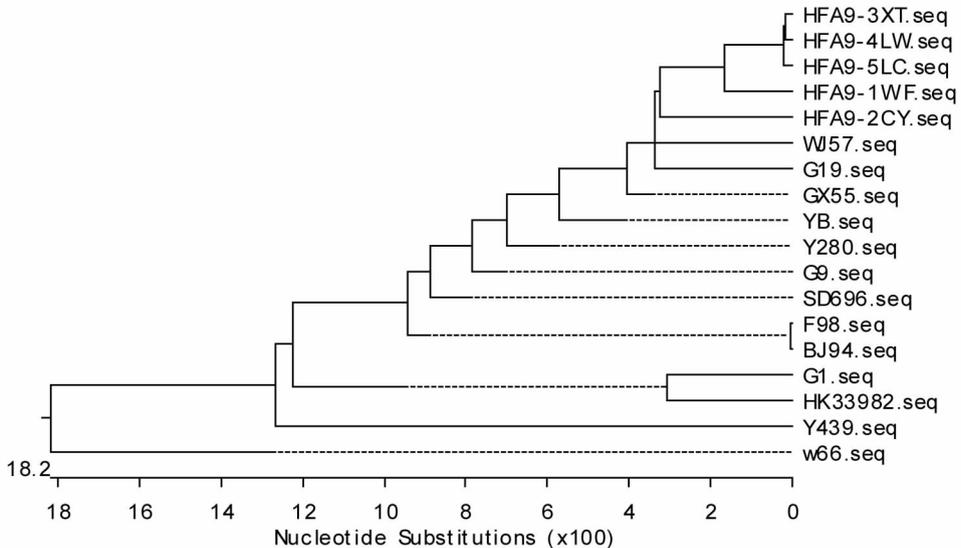


图 2 5 株 H9N2 亚型 AIV 分离株 HA 基因进化树分析

Fig.2 Analysis of HA gene evolution tree of 5 H9N2 subtype AIV isolates

**2.3 105 亿 CFU/g 多粘菌·枯草菌 WP 对烟草安全性** 经田间观察,试验期间,各处理区烟草株高、叶色正常,没有畸形、生长不良等明显药害症状,也没有发现该药剂对其他生物有明显致害性影响。

### 3 结论与讨论

通过室内抑菌试验,发现 105 亿 CFU/g 多粘菌·枯草菌 WP 抑菌率(76.67%)比 40% 菌核净 WP(93.22%)和 10% 多抗霉素 WP(88.32%)低,但仍达 76% 以上,对赤星病菌有显著的抑制作用。

辽宁省丹东市凤城地区多年连续种植烟草,赤星病年发生较重,如不及时防治会造成明显的产量损失。该研究田间试验结果表明,试验药剂 105 亿 CFU/g 多粘菌·枯草菌 WP 对烟草赤星病有很好的防治效果,当制剂用量为 975 g/hm<sup>2</sup> 时,2 次防效分别为 83.80% 和 82.58%,显著优于其他药剂 10 亿 CFU/g 多粘类芽孢杆菌 WP(66.22% 和 62.25%)、100 亿 CFU/g 枯草芽孢杆菌 WP(72.18% 和 71.87%)、10% 多抗霉素 WP(72.18% 和 71.87%) 和 40% 菌核净 WP 的防治效果(75.25% 和 63.89%),且存在显著差异( $P < 0.05$ )。

根据辽宁省铁岭市开原市田间试验,105 亿 CFU/g 多粘菌·枯草菌 WP 药剂防治烟草赤星病效果最为突出,2020 和 2021 年 2 次防效分别达 77.51% 和 79.10%,相较于其他药剂的防治效果更佳且更稳定,在存在显著差异( $P < 0.05$ )。

多粘类芽孢杆菌和枯草类芽孢杆菌的混合制剂已被证

明可有效防控烟草赤星病,同时不会对烟草产生不良反应<sup>[10]</sup>。通过该试验,进一步证明新药剂 105 亿 CFU/g 多粘菌·枯草菌 WP 对烟草赤星病有很好的防治效果。但由于赤星病是一种烟草生长后期的病害,只有烟叶进入成熟采收期才表现感病,因此,此类活体微生物农药使用时有一定的技术要求,应在发病前喷施在叶片上,连续施用 2~3 次,使生防菌能大量繁殖起来,才能发挥更好的预防和治疗效果。

### 参考文献

- [1] 中国烟叶生产购销公司.中国烟叶生产实用技术指南[M].北京:中国农业出版社,2020.
- [2] 朱贤朝,王彦亭,王智发.中国烟草病害[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [3] 朱宇航.四川烟草赤星病病原种类、流行动态与药剂防治初步研究[D].雅安:四川农业大学,2019.
- [4] 陈玉国,董宁禹,霍正威,等.几种农药对烟草赤星病的防治效果[J].浙江农业科学,2021,62(12):2490-2492.
- [5] 易龙,肖崇刚,马冠华,等.防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J].微生物学报,2004,44(1):19-22.
- [6] RAZA W, YANG W, SHEN Q R. Paenibacillus polymyxa; Antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment[J]. Journal of plant pathology, 2008, 90(3): 419-430.
- [7] 张霞,唐文华,张力群.枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害和促进植物生长的作用[J].作物学报,2007,33(2): 236-241.
- [8] 姜莉莉,陈彦闯,辛明秀.枯草芽孢杆菌在防治植物病害上的应用及研究进展[J].安徽农学通报,2009,15(7): 37-39, 110.
- [9] 原小迪,张思颖,李钰,等.玉米病害生防菌剂研究现状[J].安徽农业科学,2022,50(5): 1-4.
- [10] 孙铭凯.105 亿 CFU/g 多粘·枯草芽孢杆菌可湿性粉剂的研制[D].沈阳:沈阳农业大学,2019.

(上接第 80 页)

### 3 讨论与小结

(1) 本研究对 5 份疑似 H9 亚型禽流感病料进行分离、鉴定,确定所分离的 5 份毒株均为 H9N2 亚型禽流感,并对 5 个毒株进行测序,与从美国国家生物信息中心(NCBI)下载的序列进行比对分析,并绘制进化树,通过分析显示,所分离的 5 个毒株均属于欧亚系 I 群 h9.4.2.5 分支,5 个毒株的 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因核苷酸同源率为 93.3%~97.2%,分离株与参考株 A/chicken/Henan/G19/2011(H9N2)的同源性在 89.2%~89.8%,与其亲缘关系最近的疫苗株 A/chicken/Jiangsu/WJ57/2012(H9N2)的同源性在 92.1%~93.5%,说明分离株与参考株和传统的疫苗株产生了一定的遗传距离,出现了抗原差异。

(2) 对于 H9 亚型禽流感病毒的防控,免疫接种仍是有效的防控措施,然而随着疫苗的长期使用,免疫压力的出现,使 H9N2 亚型禽流感毒株发生变异和重组<sup>[9-10]</sup>,如果疫苗株与流行株匹配度不高,就会导致疫苗株的保护率下降。因此,对于 H9N2 亚型禽流感的流行、变异情况的持续跟踪和监测,对筛选疫苗候选株有重要意义,今后可继续推进疫苗的研发,使 H9N2 亚型禽流感得到更有效的防控,这对了解

该地区的 H9 亚型禽流感流行的变异情况及疫情防控对策具有重要意义。

### 参考文献

- [1] PERRONCITO E. Epizootia tifoide nei gallinacci[J]. Annali Accad Agri Torino, 1978, 21: 87-126.
- [2] SCHÄFER W. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest[J]. Z Naturforsch B, 1955, 10(2): 81-91.
- [3] 叶柱德,胡江锋.H9N2 亚型禽流感病毒疫苗研究进展[J].动物医学进展,2008,29(2): 89-92.
- [4] 陈一兵,刘岳龙,霍金富.禽流感病毒血凝素糖蛋白(HA)的结构及其生物学功能[J].动物医学进展,2004,25(6): 4-6.
- [5] 李晓峰,秦鄂德.禽流感病毒的传播、致病机制及其防治[J].解放军医学杂志,2009,34(2): 125-130.
- [6] KAWAMURA H, SHIMIZU F, TSUBAHARA H. Avian adenovirus: Its properties and serological classification[J]. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), 1964, 4: 183-193.
- [7] VAN REGENMORTEL M H V, FAUQUET C M, BISHOP D H, et al. Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses academic[M]. San Diego: Academic Press, 2002.
- [8] 王金良,沈志强,李峰,等.3 株 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因变异分析[J].中国家禽,2009,31(10): 19-22.
- [9] 孟芳,徐怀英,张伟,等.近 20 年中国部分地区鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因遗传演化及其变异频率[J].微生物学报,2016,56(1): 35-43.
- [10] 孙文琪.2014~2016 年华东地区 H9N2 亚型禽流感病毒遗传进化分析及气溶胶传播特性研究[D].扬州:扬州大学,2017.