

· 实验室研究 ·

基于纳米孔测序技术对新型重组 H3N2 禽流感病毒的测序鉴定及其基因特征分析

曹蓝 夏丹 陈艺韵 周腾飞 殷尚晖 刘艳慧 李魁彪 狄飏 张周斌 秦鹏哲

广州市疾病预防控制中心, 广州 510440

通信作者: 秦鹏哲, Email: petgyy@gmail.com

【摘要】目的 利用纳米孔测序技术对新型重组 H3N2 禽流感病毒进行测序鉴定并分析病毒的基因特征。**方法** 对 2021 年广州市某农贸市场外环境 H3N2 禽流感阳性样本进行鸡胚培养, 联合病毒全基因组序列靶向扩增和纳米孔测序技术进行病毒高通量测序。通过生物信息学软件, 分析病毒基因特点。**结果** 系统发育进化树显示, 该毒株各基因片段均属于欧亚进化分支, 宿主来源均为禽源。其 HA 基因与我国 H3N6 禽流感病毒亲缘关系较近。NA 基因与 2017–2020 年我国 H3N2 禽流感病毒亲缘关系较近。PB1 基因与 2016–2022 年我国广西壮族自治区、福建省 H5N6 禽流感病毒亲缘关系较近, 与广州市 H5N6 禽流感流行株 PB1 基因亲缘关系较远。其余内部基因片段来源复杂, 具有明显的遗传多样性。分子特征显示, 该毒株具有典型的低致病性禽流感病毒分子特征, 倾向结合禽源受体。生物特性相关重要蛋白位点上, 该毒株发生 PB2-L89V、PB1-L473V、NP-A184K、M1-N30D/T215A、NS1-P42S/N205S 等致病性增强突变。**结论** 本研究通过纳米孔测序鉴定一株新型重组 H3N2 禽流感病毒, 分析发现该病毒与 H5N6 禽流感病毒发生了基因重组。目前该病毒跨种传播能力较低, 但有必要密切关注 H3 亚型禽流感病毒的流行和变异。

【关键词】 禽流感病毒; 基因重组; 纳米孔测序

The identification of a novel reassortant H3N2 avian influenza virus based on nanopore sequencing technology and genetic characterization

Cao Lan, Xia Dan, Chen Yiyun, Zhou Tengfei, Yin Shanghui, Liu Yanhui, Li Kuibiao, Di Biao, Zhang Zhoubin, Qin Pengzhe

Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China

Corresponding author: Qin Pengzhe, Email: petgyy@gmail.com

【Abstract】 Objective To identify a novel reassortant H3N2 avian influenza virus using nanopore sequencing technology and analyze its genetic characteristics. **Methods** The positive samples of the H3N2 avian influenza virus, collected from the external environment in the farmers' market of Guangzhou, were cultured in chicken embryos. The whole genome was sequenced by targeted amplification and nanopore sequencing technology. The genetic characteristics were analyzed using bioinformatics software. **Results** The phylogenetic trees showed that each gene fragment of the strain belonged to the Eurasian evolutionary branch, and the host source was of avian origin. The HA gene was closely related to the origin of the H3N6 virus. The NA gene was closely related to the H3N2 avian influenza virus from 2017 to 2020. The PB1 gene was closely related to the H5N6 avian influenza virus in Guangxi Zhuang Autonomous Region and Fujian Province from 2016 to 2022 and was not related to the PB1 gene of the H5N6 avian influenza

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20230828-00105

收稿日期 2023-08-28 本文编辑 万玉立

引用格式: 曹蓝, 夏丹, 陈艺韵, 等. 基于纳米孔测序技术对新型重组 H3N2 禽流感病毒的测序鉴定及其基因特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2024, 45(4): 574-578. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20230828-00105.

Cao L, Xia D, Chen YY, et al. The identification of a novel reassortant H3N2 avian influenza virus based on nanopore sequencing technology and genetic characterization[J]. Chin J Epidemiol, 2024, 45(4): 574-578. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20230828-00105.



epidemic strain in Guangzhou. The other internal gene fragments had complex sources with significant genetic diversity. Molecular characteristics indicated that the strain exhibited the molecular characteristics of a typical low pathogenic avian influenza virus and tended to bind to the receptors of avian origin. On important protein sites related to biological characteristics, this strain had mutations of PB2-L89V, PB1-L473V, NP-A184K, M1-N30D/T215A, and NS1-P42S/N205S.

Conclusions This study identified a novel reassortant H3N2 avian influenza virus by nanopore sequencing, with the PB1 gene derived from the H5N6 avian influenza virus. The virus had a low ability to spread across species, but further exploration was needed to determine whether its pathogenicity to the host was affected.

【Key words】 Avian influenza virus; Gene reassortment; Nanopore sequencing

流感病毒是一种由 8 个单链 RNA 片段组成的包膜病毒^[1]。通过基因重组,流感病毒可以获得在人群中高效传播的能力^[2-3]。1968 年 H3N2 流感病毒是由禽源 H3N2 流感病毒与人源 H2N2 病毒交换了 PB1 和 HA 基因片段重组而来,导致 100 多万人感染死亡^[4]。H3 亚型流感病毒宿主范围从鸟类到各种哺乳动物十分广泛^[5],且在全球水禽中广泛流行^[6-7],易发生进化^[8]。有研究监测发现了与 H5N1 和 H9N2 禽流感病毒发生重组的新型 H3 亚型病毒^[9-11]。在我国 H3 亚型禽流感病毒不断进化^[12]。因此持续开展 H3 亚型禽流感病毒分子流行病学监测对其传播风险的评估和预警有重要意义。本研究在禽类外环境样本培养物中应用纳米孔测序技术,鉴定了一株新型重组 H3N2 禽流感病毒,分析发现该病毒 PB1 基因与 H5N6 禽流感病毒亲缘关系相近,提示 H3N2 禽流感病毒与 H5N6 禽流感病毒可能发生了基因重组现象。

材料与方法

1. 标本来源:根据《广州市人禽流感监测实施方案(2018 版)》,采集广州市包括 11 个行政区在内的禽类市场环境监测标本,采样场所包括禽类生鲜市场、活禽肉菜市场、批发市场、家禽规模养殖场(户)或散养户集中地区和野生禽鸟栖息地。每月 1~2 次监测采样,标本类型包括禽类粪便、饮水、污水、笼具、刀具、地面等不同类型外环境涂抹拭子。标本于 4℃ 保存,24 h 内送至实验室于 -80℃ 保存备用。

2. 禽流感病毒的鉴定:标本冻融后置于振荡器充分震荡,使用病毒核酸提取试剂盒和禽流感病毒核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司),采用实时荧光定量 RT-PCR 方法进行通用 A 型禽流感病毒核酸检测,阳性标本进行 H5、H7、H9 亚型禽流

感病毒核酸检测,其中未分型标本进一步进行 H3、H6 亚型等其他亚型禽流感病毒核酸检测。

3. H3N2 禽流感病毒分离:经鉴定的 H3 亚型禽流感病毒阳性标本进行 10 000 g 离心 2 min 后取上清,抗生素处理后接种至 9~10 日龄 SPF 鸡胚。37℃ 培养 2~3 d 后,收获接胚尿囊液,通过血凝实验记录病毒滴度,血凝阳性毒株再一次经荧光定量 RT-PCR 检测为 A 型 H3 亚型禽流感病毒阳性, H5、H7、H9、H6 亚型禽流感病毒阴性。上述病毒分离培养与鉴定均在生物安全 2 级实验室内完成。

4. H3N2 禽流感病毒的纳米孔高通量测序:全基因组扩增:参照《全国流感监测技术指南(2017 年版)》进行流感病毒全基因组 PCR 靶向扩增^[13]。

文库制备:选择 Nanopore RBK004 建库试剂盒,通过片段酶切、添加接头→文库纯化→添加测序接头→芯片制备→文库加载等步骤完成高通量测序,测序设备为 NanoporeX5 Gridon。运行 1.5 h 后,测序数据导出后进行分析。测序结束后清洗芯片保存待用。

数据分析:使用 IPH-Nano 生物信息软件对测序数据进行处理分析。通过选择未知病原分析模块→序列分类→可视化分析→序列提取→生成一致性序列等步骤完成病毒序列组装。

5. H3N2 禽流感病毒遗传进化树构建与分子特征分析:将病毒各基因序列用 BLAST 工具进行同源性序列搜索,并下载同源性最高的前 100 条序列作为进化树构建的参考序列(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。应用 Mega 11 软件,以基因开放阅读框为基本单元进行序列比对,参数使用默认值^[14]。以邻接法(NJ)构建 H3N2 禽流感病毒全基因组遗传进化树,bootstrap 值设定为 1 000。根据 NJ 进化树结果,分析病毒不同基因片段所属进化分支特点,对位于特殊分支的 PB1 基因以最大似然

法(ML)构建遗传进化树。通过软件计算,最佳核苷酸替代模型选择 T92+G, bootstrap 值设定为 1 000,通过构建 ML 进化树对 PB1 基因系统进化树拓扑结构进行验证。

6. 蛋白位点突变分析:采用 BioEdit 软件分析突变位点,包括抗原位点、受体结合位点、糖基化位点、耐药位点以及影响病毒致病性和传播力的关键位点。

结 果

1. 样本信息与病毒分离鉴定:本研究阳性样本采自于 2021 年广州市番禺区某农副产品批发市场的水禽类交易区外环境,经鸡胚病毒培养和荧光定量 RT-PCR 鉴定为 H3 亚型禽流感病毒。

2. H3N2 禽流感病毒各基因同源性分析:经高通量测序,将各基因片段进行 BLAST 相似性分析。结果显示,各基因片段同源性最高毒株均为国内毒株,除 NP 基因与 2012 年广东流行株 A/duck/Guangdong/E1/2012(H10N8)同源性最高外, PB2 基因、PA 基因和 M 基因与 2018 年 A/duck/China/322D22/2018(H3N2)同源性最高。PB1 基因和 NA 基因与 2017 年 A/duck/Guangxi/293D21/2017(H1N2)同源性最高。HA 基因与 2015 年 A/duck/Hubei/ZYSYF4/2015(H3N6)毒株同源性最高。见表 1。

3. 全基因组遗传进化分析:基因系统发育进化树显示,本研究中毒株各基因片段均位于欧亚进化分支,宿主来源均为禽源,未出现与人源、猪源、马源、犬源、猫源 H3Nx 流感病毒重组现象。其中 HA 基因系统发育树可划分为 H3N2、H3N6 和 H3N8 三个不同进化分支,本研究毒株 HA 基因与 2015–2019 年 H3N6 流行株亲缘关系较近,位于同一进化分支。NA 基因与 2017–2020 年 H3N2 流行株亲缘关系较近,主要位于 H3N2 禽流感进化分支,且与

我国南方地区 2014–2020 不同年份的部分 H4N2、H6N2、H5N2 和 H1N2 毒株归属于共同的进化分支。PB1 基因与 2016–2022 年我国南方地区 H5N6 流行株亲缘关系较近,位于同一进化分支,而与 H3Nx 等各亚型禽流感病毒亲缘关系较远,且 ML 进化树与 NJ 进化树总体上拓扑结构一致,这也进一步验证了 PB1 基因与 H5N6 病毒较近的亲缘进化关系。其余 PB2、PA、NP、M 和 NS 等内部基因片段来源复杂,具有明显的遗传多样性。

4. 与 H5N6 禽流感病毒 PB1 基因进化关系分析:为了进一步研究 H3N2 毒株 PB1 基因与 H5N6 禽流感流行株的进化关系,以及探讨 H3N2 毒株 PB1 基因发生重组事件的基因来源。以 2014–2022 年广州市 H5N6 禽流感病毒 PB1 基因为参考序列,构建系统发育进化树,结果显示,本研究毒株 PB1 基因与 2016–2022 年广西壮族自治区、福建省 H5N6 禽流感亲缘关系较近,归属于同一进化分支,而与广州市 H5N6 禽流感流行株 PB1 基因亲缘关系较远。

5. 全基因组分子特征分析:本研究毒株 HA 蛋白裂解位点为 PEKQTR↓GLF,只有 1 个碱性氨基酸,具有典型的低致病性禽流感病毒分子特征。受体结合位点为 Q226/G228,未发生突变,提示倾向结合禽源受体。HA 蛋白共有 6 个 N-糖基化位点,分别为 22-NDS、38-NGT、54-NAT、181-NVT、301-NGS 和 499-NGT。NA 蛋白共编码 469 个氨基酸,无颈部氨基酸缺失,未发生突变。NA 抑制剂作用位点为 H274/R292,未发生突变。NA 蛋白共有 7 个 N-糖基化位点,分别为 61-NIT、69-NNT、86-NWS、146-NGT、200-NAT、234-NGT 和 402-NWS,未发生突变。PB2 蛋白在病毒毒力增强及获得感染哺乳动物能力的 627 位和 701 位未发生突变,发生了 L89V 突变。PB1 蛋白对小鼠呈现高致病性的特征位点上,本研究毒株发生 L473V 突变。PA 蛋

表 1 H3N2 禽流感病毒 8 个基因片段同源性最高毒株及核苷酸相似性

基因片段	开放阅读框(bp)	核苷酸同源性最高毒株	核苷酸相似性(%)
PB2	2 280	A/duck/China/322D22/2018(H3N2)	97.95
PB1	2 277	A/duck/Guangxi/293D21/2017(H1N2)	97.65
PA	2 151	A/duck/China/322D22/2018(H3N2)	97.94
HA	1 701	A/duck/Hubei/ZYSYF4/2015(H3N6)	95.59
NP	1 497	A/duck/Guangdong/E1/2012(H10N8)	96.87
NA	1 410	A/duck/Guangxi/293D21/2017(H1N2)	96.25
M	982	A/duck/China/322D22/2018(H3N2)	99.12
NS	838	A/chicken/Ganzhou/GZ43/2016(H3N2)	97.75

白的 100 位、356 位和 409 位致病性相关位点未发生突变。NP 蛋白影响禽流感病毒致病力和复制能力上,出现 A184K 突变。M1 蛋白中与小鼠致病性相关的氨基酸位点,发生 N30D 和 T215A 突变。M2 蛋白离子通道阻断剂作用位点上,发生 S31N 突变,提示对烷胺类药物耐药。NS1 蛋白中与增强禽流感病毒对鸡和小鼠的致病力位点上,发生 P42S 和 N205S 突变。突变位点见表 2。

表 2 H3N2 禽流感病毒全基因组分子特征

蛋白	变异情况 ^a	蛋白	变异情况 ^a
HA	-	M1	N30D
NA	-		T215A
PB2	L89V	M2	S31N
PB1	L473V	NS1	P42S
PA	-		N205S
NP	A184K		

注:^a数字表示氨基酸位点,数字前字母表示该位点未发生突变时的氨基酸,数字后字母表示该位点发生突变后的氨基酸;-:未发生变异;L、V、A、K、N、D、T、S、P 字母分别表示亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸

讨 论

研究发现,引起禽流感病毒发生跨宿主传播的 H5N1、H5N6、H7N9、H10N8 等多种亚型禽流感病毒,其内部基因常常通过与 H9N2 禽流感病毒发生重组进化而来^[15-16]。同样,H9N2 禽流感病毒也可以为 H3 亚型禽流感病毒的进化提供内部基因供体。2022 年发现 H3N8 亚型禽流感病毒“宿主外溢”导致 1 名 5 岁男童感染发病,该病毒内部基因即由 H9N2 禽流感病毒进化而来^[12]。Yang 等^[17]对中国 2009–2012 年禽类相关环境中鉴定的 188 个 H3 禽流感病毒进行高通量测序,其中 H3N2 禽流感病毒可以划分为 73 个基因型(G1~G73),G23 为主要流行基因型,表明 H3 亚型禽流感基因进化呈现多样性。

纳米孔测序是基于单分子的第三代基因测序技术,具有便于携带、实时测序、超长读长等技术优势,近年发展迅速。本研究通过纳米孔高通量测序,在广州市禽类市场禽流感病毒外环境监测中发现新型重组 H3N2 亚型禽流感病毒,其 PB1 基因来自于 H5N6 禽流感病毒。H5N6 禽流感病毒为高致病性禽流感病毒且具备发生跨宿主感染的能力,该病毒作为供体病毒与其他亚型病毒,特别是低致病性禽流感病毒之间的重组或重配,是否会导致受体

病毒致病性和传播能力的改变以及发生跨宿主传播,应给予持续关注。

进一步分析发现,该病毒 HA 蛋白呈现低致病性禽流感病毒分子特点且表现为禽源受体,提示该病毒发生跨种间传播至人的潜力较低。但由于重组事件的发生,该毒株携带有对小鼠呈现高致病性的分子突变 PB1-L473V,该突变是否影响对宿主的致病性仍需进一步研究。在进一步探讨 PB1 基因供体病毒 H5N6 禽流感病毒进化来源中,发现新型 H3N2 禽流感病毒 PB1 基因与我国广西壮族自治区、福建省等南方地区的 H5N6 病毒亲缘关系较近,而与近年来广州市本土 H5N6 禽流感病毒亲缘关系相对较远,推测重组事件可能发生在我国华南地区。

华南地区由于其独特的地理位置、生态环境和消费习惯,为禽流感病毒的进化和传播提供了有利条件^[18]。近年我国学者先后监测发现与 H6 和 H7 亚型禽流感病毒重组进化而来的新型 H3N2 禽流感病毒^[19-20]。而以 H3N2 禽流感病毒作为骨架病毒,与 H5N6 禽流感病毒发生基因重组的现象目前仍鲜有报道。鉴于禽流感病毒传播和进化的多样性和复杂性,因此开展华南地区禽流感病毒分子流行病学监测和研究有着重要的公共卫生意义。

本研究利用纳米孔高通量测序技术,联合应用病原体靶向基因 PCR 扩增,在文库制备和上机测序总过程 2~3 h 内,完成对新型重组 H3N2 禽流感病毒全基因组高通量测序鉴定,这将在禽流感病毒高通量测序、新型禽流感病毒的快速鉴定以及传播溯源上提供新的技术策略和应用前景。目前纳米孔测序技术存在一定局限性,如相对较高的错误率,有学者尝试开发基于高级计算技术的碱基读取方法及增加覆盖度以期实现更高的测序准确性^[21]。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 曹蓝、夏丹:数据整理、论文撰写;陈艺韵、周腾飞、殷尚晖、刘艳慧:实施研究、数据采集;李魁彪、狄飏:设计实验;张周斌、秦鹏哲:技术指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Alexander DJ, Brown IH. Recent zoonoses caused by influenza A viruses[J]. Rev Sci Tech, 2000, 19(1):197-225. DOI:10.20506/rst.19.1.1220.
- [2] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics[J]. J Virol, 1989, 63(11):4603-4608. DOI:10.1128/JVI.63.11.4603-4608.1989.
- [3] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and

- genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. *Science*, 2009, 325(5937):197-201. DOI:10.1126/science.1176225.
- [4] Sun TT, Guo YN, Zhao LC, et al. Evolution of the PB1 gene of human influenza A (H3N2) viruses circulating between 1968 and 2019[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4): 1824-1836. DOI:10.1111/tbed.14161.
- [5] Bean WJ, Schell M, Katz J, et al. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts[J]. *J Virol*, 1992, 66(2):1129-1138. DOI: 10.1128/JVI.66.2.1129-1138.1992.
- [6] Hollander LP, Fojtik A, Kienzie-Dean C, et al. Prevalence of influenza A viruses in ducks sampled in northwestern Minnesota and evidence for predominance of H3N8 and H4N6 subtypes in mallards, 2007-2016[J]. *Avian Dis*, 2019, 63 Suppl 1:126-130. DOI:10.1637/11851-041918-Reg.1.
- [7] Soda K, Kashiwabara M, Miura K, et al. Characterization of H3 subtype avian influenza viruses isolated from poultry in Vietnam[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(6): 712-723. DOI: 10.1007/s11262-020-01797-7.
- [8] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1):152-179. DOI:10.1128/mr.56.1.152-179.1992.
- [9] Song MS, Oh TK, Moon HJ, et al. Ecology of H3 avian influenza viruses in Korea and assessment of their pathogenic potentials[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 4): 949-957. DOI:10.1099/vir.0.83462-0.
- [10] Pu J, Liu QF, Xia YJ, et al. Genetic analysis of H3 subtype influenza viruses isolated from domestic ducks in northern China during 2004-2005[J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1):136-142. DOI:10.1007/s11262-008-0300-7.
- [11] Zhou HB, Zhang AD, Chen HC, et al. Emergence of novel reassortant H3N2 influenza viruses among ducks in China [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(6): 1045-1048. DOI: 10.1007/s00705-011-0940-0.
- [12] Yang RG, Sun HL, Gao F, et al. Human infection of avian influenza A H3N8 virus and the viral origins: a descriptive study[J]. *Lancet Microbe*, 2022, 3(11): e824-834. DOI: 10.1016/S2666-5247(22)00192-6.
- [13] 中国国家流感中心. 全国流感监测技术指南(2017 年版) [EB/OL]. (2017-09-30) [2023-01-29]. https://ivdc.chinacdc.cn/cnic/zyzx/jcfa/201709/t20170930_153976.htm.
- [14] Rizal FA, Ho KL, Omar AR, et al. Sequence analysis of the Malaysian low pathogenic avian influenza virus strain H5N2 from duck[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(10): 1973. DOI:10.3390/genes14101973.
- [15] Gao RB, Cao B, Hu YW, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1888-1897. DOI:10.1056/NEJMoa1304459.
- [16] Qi W, Zhou X, Shi W, et al. Genesis of the novel human-infecting influenza A (H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China[J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(25): 20841. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.25.20841.
- [17] Yang JY, Zhang Y, Yang L, et al. Evolution of avian influenza virus (H3) with spillover into humans, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2023, 29(6): 1191-1201. DOI: 10.3201/eid2906.221786.
- [18] Shortridge KF. Is China an influenza epicentre? [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1997, 110(8):637-641.
- [19] Li C, Yu M, Liu LT, et al. Characterization of a novel H3N2 influenza virus isolated from domestic ducks in China[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(4):568-572. DOI:10.1007/s11262-016-1323-0.
- [20] Tian J, Zhang CH, Qi WB, et al. Genome sequence of a novel reassortant H3N2 avian influenza virus in southern China[J]. *J Virol*, 2012, 86(17):9553-9554. DOI:10.1128/JVI.01523-12.
- [21] 林勤清, 周华. 纳米孔测序技术在临床感染性疾病病原诊断中的应用[J]. *现代实用医学*, 2023, 35(3):281-284. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2023.03.001.
- Lin QQ, Zhou H. Application of nanopore sequencing technology in clinical pathogen diagnosis of infectious diseases[J]. *Mod Pract Med*, 2023, 35(3): 281-284. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2023.03.001.

中华流行病学杂志第八届编辑委员会通讯编委组成人员名单

(按姓氏汉语拼音排序)

鲍倡俊	陈 曦	陈 勇	冯录召	高 培	高立冬	高文静	郭 巍	胡晓斌
黄 涛	贾存显	贾曼红	姜 海	金连梅	靳光付	荆春霞	寇长贵	李 曼
李 霓	李 希	李杏莉	林 玫	林华亮	刘 昆	刘 莉	刘 森	马 超
毛宇嵘	潘 安	彭志行	秦 天	石菊芳	孙 凤	汤奋扬	汤后林	唐雪峰
王 波	王 娜	王 鑫	王海俊	王丽萍	席 波	谢 娟	闫笑梅	严卫丽
燕 虹	杨 鹏	杨祖耀	姚应水	余灿清	喻荣彬	张 本	张茂俊	张周斌
郑 莹	郑英杰	周 蕾	朱益民					