

一株鹅源 H5N2 亚型高致病性禽流感病毒的分离鉴定及生物学特性分析

刘春国¹⁾ 刘明^{1)*} 张云²⁾ 刘大飞¹⁾ 潘蔚琦³⁾ 孙恩成⁴⁾ 杜金玲¹⁾ 李洪涛^{1,5)}

¹⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 农业部动物流感中心及国家禽流感参考实验室, 哈尔滨 150001;

²⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 禽传染病实验室, 哈尔滨 150001;

³⁾中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663; ⁴⁾黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319;

⁵⁾东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030

摘要 分离到一株鹅源 H5N2 亚型高致病性禽流感病毒, SPF 鸡静脉接种致病指数为 2.99, 但鸭子对该病毒不敏感. 病毒感染小鼠后不致病, 但能够在肺内有效复制, 表明其具有感染哺乳动物的潜在风险. 血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白裂解位点上插入有多个连续的碱性氨基酸(-RRRKKR-), 从分子上证实这是一株高致病性禽流感病毒. 核酸序列比较分析表明, 分离的流感病毒 HA 基因与 A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1)同源率达到 99.4%, 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)基因与 A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)同源率达到 99.8%; 氨基酸水平上, HA 与 2004 年分离到的 A/chicken/Hubei/489/2004(H5N1)、A/swan/Guangxi/307/2004(H5N1)、A/wildduck/Guangdong/314/2004(H5N1)和 A/chicken/Henan/210/2004(H5N1)同源率均为 99.3%, NA 与 A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)同源率为 99.6%. 进化树分析结果表明, 该流感病毒分离株可能是由 H5N1 和 H9N2 两个亚型病毒重排而来.

关键词 鹅, 禽流感病毒, H5N2 亚型, 致病性, 序列分析
学科分类号 S852.659, Q786

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00318

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科、流感病毒属的 A 型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的禽类感染或疾病综合征. 广泛流行于世界上许多国家和地区, 给养禽业造成了巨大的经济损失. 自然情况下, 流感病毒感染的宿主范围有一定的特异性, 据此可将病毒分为不同的群, 如禽流感病毒、猪流感病毒、马流感病毒等. 但是 AIV 的基因组为单股负链 RNA, 极易发生变异, 导致其可以突破种间界限, 在不同种属的动物之间传播, 尤其是近年来禽流感病毒不用通过猪而直接感染人并致人死亡事件的发生^[1], 使得禽流感的研究在公共卫生方面具有非常重大的意义.

基于流感病毒基因组本身的特点, 它们极易在动物体内发生变异和重组, 从而逃避宿主的免疫进而感染新宿主. 变异的流感病毒对缺乏抵抗力的动物极具危险性, 可能导致世界范围内流感的大流行. H5N2 亚型 AIV 既可以引起高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza, HPAI), 也可以引起低致病性禽流感(low pathogenic avian influenza,

LPAI)^[2], 而且该亚型 LPAI 病毒往往可以经过演化转变为 HPAI 病毒^[3~5]. 因此密切监视流感病毒流行与变异的新动向, 搜集对人类健康有潜在影响的动物流感病毒, 并进行其在同种和不同种宿主间传播致病的分子机制和变异规律的研究, 预测可能出现的新的变异株, 以提前对本病的预防和扑灭做好准备.

2003 年从武汉某地采集的鹅拭子中分离到一株流感病毒, 经鉴定为 H5N2 亚型, 并对该病毒血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)基因序列及生物学特性进行了研究, 现将研究结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验动物

AMV Reverse Transcriptase、Ex Taq DNA 聚合

* 通讯联系人.

Tel: 0451-85935069, E-mail: liming04@126.com

收稿日期: 2008-05-01, 接受日期: 2008-09-02

酶、dNTPs 等购自大连宝生物工程公司; Trizol Reagent、RNase Inhibitor 购自 Invitrogen 公司; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. 流感病毒 H5 标准阳性血清由哈尔滨兽医研究所国家动物流感参考实验室提供; 鸡新城疫(ND)标准阳性血清为哈尔滨兽医研究所生物技术国家重点实验室

提供; 9~11 日龄 SPF 鸡胚、6 周龄 SPF 鸡、4 周龄非免疫鸭、8 周龄雌性 Balb/c 小白鼠和负压隔离器均由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供.

1.2 病毒毒株

文中涉及到的毒株见表 1.

Table 1 Reference strains and their GenBank accession numbers

GenBank ID	The name of virus	GenBank ID	The name of virus
AY770079	A/chicken/Hubei/489/2004(H5N1)	AY950235	A/WildDuck/Guangdong/314/2004(H5N1)
AY950236	A/swan/Guangxi/307/2004(H5N1)	AA Y52593	A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)
AY684706	A/chicken/Hubei/327/2004(H5N1)	AY664705	A/chicken/HongKong/NT142/03(H9N2)
AY747617	A/swine/Fujian/F1/2001(H5N1)	DQ064425	A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)
AY866475	A/tiger/Thailand/CU-T7/2004(H5N1)	DQ064420	A/chicken/Heilongjiang/35/00(H9N2)
AY834279	A/tiger/Thailand/SPB-1/2004(H5N1)	DQ064415	A/chicken/Guangdong/56/01(H9N2)
AY737304	A/duck/Guangdong/173/04(H5N1)	DQ064423	A/chicken/Henan/43/02(H9N2)
AAX53510	A/swan/Guangxi/307/2004(H5N1)	DQ064417	A/chicken/Guangxi/10/99(H9N2)
AAX53505	A/chicken/Henan/210/2004(H5N1)	DQ064410	A/chicken/Guangdong/10/00(H9N2)
AAV48546	A/chicken/Hubei/489/2004(H5N1)	DQ064426	A/chicken/Jiangsu/1/00(H9N2)
AAX53509	A/wildduck/Guangdong/314/2004(H5N1)	DQ064413	A/chicken/Guangdong/47/01(H9N2)
AY950231	A/Chicken/Henan/210/2004(H5N1)		

1.3 病毒的分离及 HN 亚型鉴定

病料按常规方法处理, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 每胚 0.2 ml, 37°C 孵化 48 h 后, 收集鸡胚尿囊液, 测定血凝价. 将具有血凝价的鸡胚尿囊液先与 ND 标准阳性血清进行血凝抑制(HI)试验, ND HI 试验阴性的鸡胚尿囊液再与流感病毒 H5 标准阳性血清进行 HI 试验, 具体操作程序与判断标准按文献[6]进行. 将鉴定过的病毒分装, 保存于-20°C 备用.

1.4 病毒的生物学特性——动物感染试验

1.4.1 病毒对鸡的致病性试验.

自然途径感染 SPF 鸡试验: 将含有病毒的尿囊液用灭菌的 1×PBS 稀释成 5×10^5 EID50/0.1 ml, 以滴鼻点眼的方式接种 10 只 6 周龄 SPF 鸡, 每只鸡 0.2 ml, 观察记录鸡发病和死亡情况.

静脉接种致病指数(IVPI)的测定: 将含有病毒的尿囊液用灭菌的 1×PBS 做 10 倍稀释, 翅静脉接种 10 只 6 周龄 SPF 鸡, 每只鸡 0.1 ml, 每日观察记录鸡的发病和死亡情况, 连续观察 10 天, 按 OIE 提供的方法计算病毒的 IVPI^[6].

病毒对 SPF 鸡半数致死量(LD_{50})的测定: 将含有病毒的尿囊液用灭菌的 1×PBS 分别做 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍稀释, 每个稀释度分别以滴鼻点眼的方式接种 5 只 6 周龄 SPF 鸡, 每只 0.2 ml, 连续观察 10 天, 记录雏鸡发病和死亡情况. 按

Reed-Muench 法计算病毒的 LD_{50} ^[6].

1.4.2 病毒对鸭的致病性试验. 试验鸭接种前经采血检测无 H5 亚型抗体, 咽喉与泄殖腔拭子检测无流感病毒. 将含有病毒的尿囊液用灭菌的 1×PBS 稀释成 5×10^5 EID50/0.1 ml, 腿静脉接种 10 只 4 周龄鸭, 每只 0.2 ml, 观察记录鸭发病和死亡情况. 于感染后 14 天采血测定血凝抑制效价.

1.4.3 病毒对小鼠的致病性试验.

攻毒后小鼠体重的变化: 将 12 只 8 周龄雌性 Balb/c 小白鼠随机分成两组, 攻毒组 8 只, 经鼻腔途径接种稀释至 2×10^6 EID50/0.1 ml 的病毒, 每只 50 μ l, 对照组 4 只, 每只接种 50 μ l 1×PBS, 两组小鼠饲养在同一笼中, 每日定时称量小鼠体重.

攻毒后病毒在小鼠体内复制情况: 将 15 只 8 周龄雌性 Balb/c 小白鼠随机分成两组, 攻毒组 10 只, 经鼻腔途径接种稀释至 2×10^6 EID50/0.1 ml 的病毒, 每只 50 μ l, 对照组 5 只, 每只接种 50 μ l 1×PBS, 两组小鼠饲养在同一笼中. 感染后每隔 1 天剖杀两只攻毒鼠和一只对照鼠, 分别采集取脑、肺、脾、肾 4 个脏器进行病毒分离及滴定.

1.5 病毒全基因组的序列测定及遗传演化分析

1.5.1 引物设计. 根据流感数据库中禽流感病毒序列设计 HA 和 NA 基因引物. 引物由上海英俊生物公司合成, 见表 2.

Table 2 The primer's sequences for HA and NA gene of influenza virus

Designation of primers	Primer's sequences	Fragments of amplified by PCR
Ba-NA-up	5' TTGCTTGGTCGGCAAGTGC 3'	NA
Ba-NA-low	5' CCAGTCCACCCATTTGGATCC 3'	
Bm-HA-up	5' TTCGTCTCAGGGAGCAAAAAGCAGGGG 3'	HA
Bm-HA-low	5' ATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTTT 3'	
Uni-12	5' AGCAAAAAGCAGG 3'	Universal primer of RT

1.5.2 病毒 RNA 的提取与 RT-PCR. 取 500 μ l 病毒尿囊液, 加入 500 μ l Trizol Reagent RNA 提取液, 按照说明书提取病毒总 RNA. 用流感病毒反转录通用引物 Uni-12, 按照 AMV 反转录酶使用说明书进行反转录合成 cDNA, -20°C 保存备用.

用所设计的 HA 和 NA 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 将特异性 PCR 产物经胶回收纯化后送至上海英俊生物公司测序. 测得序列与流感数据库中下载的不同流感病毒的 HA 和 NA 基因序列进行比较分析, 绘制 HA 和 NA 基因遗传系统发育进化树.

2 结 果

2.1 病毒的分离及鉴定

病料接种鸡胚后收集的尿囊液能够凝集鸡红细胞, 血凝价能够达到 1:512. 新城疫阳性血清不能够对该尿囊液产生抑制作用, 而 H5 亚型禽流感标准阳性血清能够产生很高的抑制作用, 血凝抑制效价达到 1:1024, 从而表明该尿囊液含有 H5 亚型禽流感病毒.

2.2 病毒的生物学特性

2.2.1 病毒对鸡和鸭的致病性试验. 病毒通过滴鼻点眼的自然途径感染 6 周龄 SPF 鸡, 于感染后 2 天内 10 只感染鸡全部死亡. IVPI 测定中, 10 只 6 周龄 SPF 鸡在静脉接种病毒后 72 h 内全部死亡, 按公式计算 $\text{IVPI}=2.99$. LD_{50} 测定中 10^1 倍稀释组全部鸡只死亡; 10^2 倍稀释组 2 只鸡死亡; 10^3 倍稀释组 1 只鸡死亡; 其余组均不见发病和死亡, 按公式计算 $\text{LD}_{50}=10^{1.88}/0.2 \text{ ml}$. 病毒经腿静脉接种 10 只 4 周龄鸭后, 连续观察 2 周均未见可视临床症状, 感染后 2 周采血测定血凝抑制效价, 平均值达到 1:40.

2.2.2 病毒对小鼠的致病性试验.

攻毒后小鼠体重的变化: 小鼠感染后每日观察并称量, 攻毒组与对照组小鼠均没有可视临床症状出现, 体重亦未见下降. 所得的体重数据经统计学

检验差别不显著. 攻毒组小鼠每天体重的平均值与对照组每天体重的平均值变化见图 1.

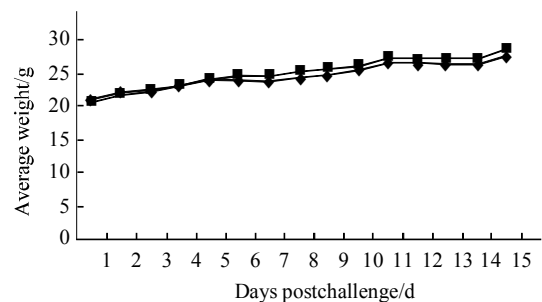


Fig. 1 Change of average weight after challenging with the isolate

◆—◆: The group of challenge; ■—■: The group of control.

攻毒后病毒在小鼠体内复制情况: 攻毒组小鼠于感染后 2 天、4 天、6 天和 8 天在肺脏中均能够分离到较高滴度的病毒, 血凝价均在 1:128 以上, 其余脏器(脑、脾和肾)均未分离到病毒. 攻毒组小鼠于感染后 10 天和 12 天以及对照组小鼠的所有 4 种脏器均未分离到病毒.

2.3 病毒基因组的序列测定及遗传演化分析

2.3.1 病毒 HA 和 NA 基因的克隆. 获得的 HA 和 NA 基因片段大小分别为 1700 bp 和 1400 bp, 与预期的大小相符, 见图 2.

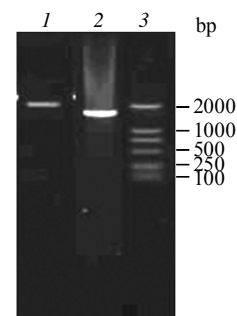


Fig. 2 PCR products of HA and NA gene

1: HA; 2: NA; 3: DL2000 marker.

2.3.2 病毒 HA 和 NA 基因的序列分析. 将测序的 HA 和 NA 基因序列经 DNASTAR 软件包中的 Seqman 软件校对正确无误后, 登陆 GenBank, 经

Blast 比较, 各基因与 GenBank 中核苷酸、氨基酸同源性最高的毒株列于表 3.

Table 3 Sequence comparisons of HA and NA gene of the isolated influenza virus with its closest genetic relatives

Gene	Virus with the highest % identity with the isolate	
	Nucleotide	Amino acid
HA	A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1) (99.4%)	A/chicken/Hubei/489/2004(H5N1) (99.3%)
		A/swan/Guangxi/307/2004(H5N1) (99.3%)
		A/wildduck/Guangdong/314/2004(H5N1) (99.3%)
		A/chicken/Henan/210/2004(H5N1) (99.3%)
NA	A/chicken/Jilin/53/01(H9N2) (99.8%)	A/chicken/Jilin/53/01 (H9N2) (99.6%)

从表 3 中可以看出, 核酸序列比较分析流感病毒分离株 HA 基因与 A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1)同源率最高, 达到 99.4%, NA 基因与 A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)同源率达到 99.8%; 氨基酸水平上, HA 与 A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1)、A / swan / Guangxi / 307 / 2004 (H5N1)、A/wildduck/Guangdong/314/2004 (H5N1)和 A/chicken/Henan/210/2004(H5N1)同源率均为 99.3%, NA 与 A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)同源率为 99.6%. 根据流感病毒通用命名法则, 将该分离株命名为 A/Goose/wuhan/02/2003(H5N2).

在 HA 蛋白水平上, 流感病毒分离株 HA 蛋白裂解位点上存在多个连续的碱性氨基酸 - PQKERRRKKR*G-, 具有高致病性禽流感的典型分子特征. 用 NetNGlyc1.0 Server 软件在线分析糖基化位点, 结果表明, 流感病毒分离株的 HA 蛋白中含有 8 个潜在的糖基化位点, 分别为位于 27 位的 NSTE, 39 位的 NVTV, 170 位的 NSTY, 181 位的 NNTN, 209 位的 NPTT, 302 位的 NSSM, 499 位的 NGTY, 558 位的 NGSL. NA 蛋白中含有 6 个潜在的糖基化位点, 分别为位于 44 位的 NSSN, 61 位的 NITE, 69 位的 NSTT, 86 位的 NWSK, 146 位的 NGTA, 234 位的 NGTC.

以 H3 亚型 HA 为模型比较流感病毒分离株 HA 受体结合位点氨基酸序列发现, 该分离株存在的可能受体结合位点分别为 98 位(K), 134~138 位(PKSSW), 153 位(Y), 155 位(G), 183 位(T), 190 位(V), 194~198 位(IHHPN)和 224~229 位(RLVPKI).

NA 蛋白颈部没有发生缺失现象. 血凝素结合位点为 366~373 位(IEKDSRSG), 399~404 位

(DSDNSS), 431~433 位(PKE).

2.3.3 HA 和 NA 基因系统发育进化树绘制. 我们选择与流感病毒分离株 HA 和 NA 基因核苷酸序列同源性比较高的流感病毒株来绘制 HA 和 NA 基因系统发育进化树. 发现, HA 基因与 2001 年分离的 A/swine/Fujian/F1/2001(H5N1)处于同一个独立的小分支上, 与 2004 年分离的 A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1)、A/chicken/Hubei/327/2004 (H5N1)、A/WildDuck/Guangdong/314/2004 (H5N1)、A/swan/Guangxi/307/2004 (H5N1) 和 A/chicken/Henan/210/2004 (H5N1) 来源于同一祖先, 并且这些毒株与 A/duck/Guangdong/173/04(H5N1)共同起源, 平行发育, 而与 2004 年从泰国两株老虎分离到的流感病毒 A/Tiger/Thailand/SPB-1/2004 (H5N1) 和 A/Tiger/Thailand/CU-T7/2004(H5N1)遗传距离较远, 见图 3.

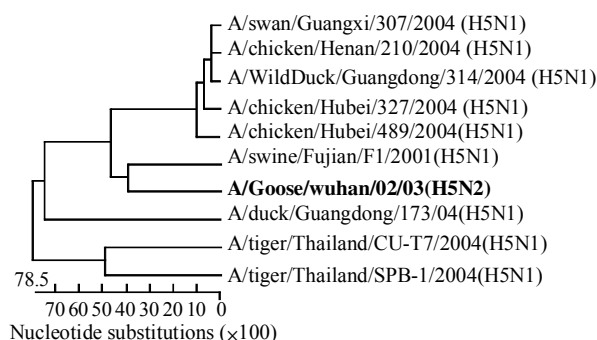


Fig. 3 Phylogenetic trees of HA gene

NA 基因与 2001 年分离的 A/chicken/Jilin/53/01(H9N2)共同演化处于同一小分支上, 这两株病毒与不同年份分离于大陆的 H9N2 亚型禽流感病毒亲缘关系非常近, 而与 A/chicken/HongKong/NT142/03(H9N2)关系较远, 见图 4.

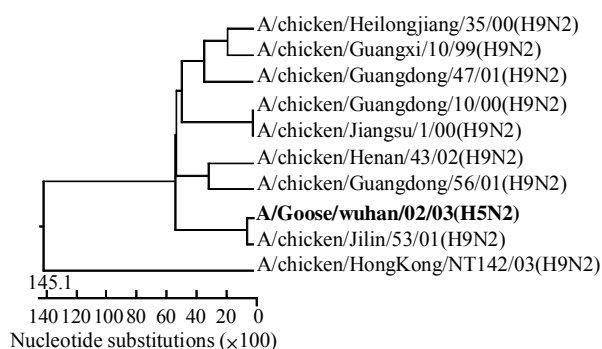


Fig. 4 Phylogenetic trees of NA gene

3 讨 论

以往的基因分析提示: 作为“基因混合容器”最为可能的动物是猪, 不同的禽类流感病毒可在猪中发生基因重配, 从而产生能够感染人类的病毒株^[7]. 然而自 1997 年香港人感染禽流感事件以来, 世界范围内多次发生的一系列 AIV 直接感染人并致人死亡的事件, 使人们重新清醒地认识到 AIV 可以不需要猪作为媒介而直接跨越种间屏障感染其他哺乳动物. 2004 年, 泰国老虎、猎豹、猫也被首次证实感染 H5N1 亚型 AIV, AIV 可以在未发生重组和基因明显突变的情况下直接传播给马、猪、海豹等哺乳动物, 并可在这些新宿主中产生流行. 越来越多的迹象表明, AIV 突破种间屏障感染哺乳动物的能力正在逐渐增强^[8,9]. 因此, 在世界范围内建立全球流感监测网络体系, 通过流行病学及分子生物学等手段密切监视流感病毒流行与变异的新动向, 研究其在同种或不同种宿主间传播致病的分子机制及变异规律, 预测可能出现的新的变异株, 为本病的预防和控制提供理论, 防患于未然.

动物致病性试验结果表明, AIV 分离株对鸡具有高致病性, 但是鸭子对该毒株不敏感, 接种后鸭子不见可视临床症状, 感染 2 周后可产生一定水平的抗体. 过去人们通常认为虽然在水禽中能够分离到所有亚型的流感病毒, 但水禽仅为流感病毒的携带者而不发病, 然而 20 世纪 90 年代中期以来, 鸭感染高致病性流感病毒发病、死亡的事实打破了人们对鸭流感的传统认识. 实际上水禽不但是禽流感病毒的巨大的贮存库, 而且已成为自然感染、高度易感和死亡率高的禽类^[10]. 不过人工感染试验结果表明, 不同禽类对不同 H5 亚型毒株的易感性还是有所差异, 鸡、鹌鹑 > 番鸭、鹅 > 鹧鸪 > 蛋鸭、肉鸭 > 鸽, 这种情况产生的原因一方面可能是宿主遗传水平上的差异而导致的宿主物种差异, 进而造

成一个重要方面的改变——免疫水平的差异, 另一方面可能是病毒本身基因特性而造成的对宿主嗜性不同, 两方面共同作用从而导致不同的禽类对流感病毒具有不同的易感性. 但其具体原因尚没有定论, 这也为我们科研工作者提供了一个新的研究方向.

小鼠是研究流感病毒对哺乳动物致病力和免疫反应的良好模型, 将病毒鼻腔接种小鼠后发现, 该病毒可以在小鼠肺内有效复制, 但只限于肺, 在脾脏、肾脏和脑中分离不到病毒. 接毒后小鼠体重与对照组相比较, 统计学上差异不显著, 由此可以看出该株病毒对小鼠不具有很强的致病力. 另外同居对照小鼠没有任何疾病症状, 组织器官中也未分离到病毒, 可见该病毒在小鼠中没有水平传播能力. 但是该病毒可以在小鼠肺内有效地复制也表明该病毒具有感染哺乳动物的潜在危险.

AIV 基因组中片段 4 编码的血凝素(HA) 为糖蛋白, 在病毒吸附及穿膜过程中起关键作用, 刺激机体产生的中和抗体可中和病毒的感染力. 另外 HA 的变异性很强, 是病毒发生抗原变异的主要原因, HA 还是病毒毒力和宿主特异性的主要决定因素.

对 AIV 分离株 HA 和 NA 序列分析表明, 该毒株 HA 基因裂解位点含有高致病性毒株所必需的连续碱性氨基酸(-RRRKKR-), 从分子水平上证实了这是一株高致病性的 AIV, 同时也证实了动物试验得出结论的正确性. 该流感病毒分离株与大多数流感病毒相似, 在 HA 蛋白上含有 8 个潜在的糖基化位点, 其中 7 个与参考毒株均相同, 只是该分离株 HA 蛋白 40 位由 N 突变为 V, 但这并没有改变其在该位点的潜在糖基化特性. 而该流感病毒分离株在 170 位上又增加了一个潜在的糖基化位点 NSTY. 潜在的糖基化位点可以通过两种方式影响 AIV 的毒力: 一是受体结合位点的糖基会影响 AIV 和宿主细胞的结合; 二是裂解位点附近的糖基可能影响到蛋白酶对 HA 前体蛋白的裂解. 而该 170 位增加的潜在糖基化位点既不在受体结合位点部位也不在裂解位点附近, 所以它的增加可能并不会影响病毒的毒力^[11].

HA 和 NA 基因系统发育进化树分析显示, 分离的流感病毒株 HA 基因与近年来大陆流行的 H5N1 亚型流感病毒 HA 基因亲缘关系较近, NA 基因与近期 H9N2 亚型禽流感病毒分离株的 NA 基因处于同一个分支. H9N2 亚型禽流感病毒属于

LPAI 病毒, 其在禽群中长期存在^[12]. 近年来, H5N1 亚型 HPAI 的频繁暴发也使得 H5N1 亚型 HPAI 病毒在自然界中普遍存在, 这就为流感病毒的重排提供了物质基础, 当两种病毒同时存在于同一宿主体内时, H9N2 亚型流感病毒的 NA 基因替换了 H5N1 亚型流感病毒的 NA 基因, 就完成了重排过程, 一个新的重排病毒 H5N2 亚型流感病毒就产生了. 这也证明了流感病毒在自然界发生重排是比较普遍的事实, 同时也提醒我们在密切关注、严格防控高致病性流感的同时, 也应该加强对低致病性流感存在潜在风险的评估.

实验结果表明, 分离到了一株高致病性 H5N2 亚型 AIV, 其 HA 和 NA 基因并非来源于同一株流感病毒, 根据实验中得到的数据分析后, 推测该流感病毒分离株可能是由 H5N1 和 H9N2 两种亚型流感病毒基因发生重排的产物.

参 考 文 献

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cases of influenza A (H5N1)—Thailand, 2004. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2004, **53**: 100~103
- Alexander D J, Allan W H, Parsons G. Characterization of influenza viruses isolated from turkeys in Great Britain during 1963~1997. *Res Vet Sci*, 1979, **26** (1): 17~201
- Eckroade R I, Silverman L A, Acland H M. Avian influenza in Pennsylvania. *Proceedings of The Thirty-third Western Poultry Disease Conference*, 1984. 1~21
- Senne D A, Rinera E, Panigahy B, *et al.* Characterization of avian influenza H5N2 isolates recovered from chicken in Mexico. *Proceedings of 45th Western Poultry Disease Conference*, Cancun, Mexico, 1996, 5~8
- Bugh M. Highly pathogenic virus recovered from chickens infected with mildly pathogenic 1986 isolates of H5N2 avian influenza virus. *Avian Disease*, 1988, **32** (4): 695~7031
- Vallat B, Allen G P. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. 5th. Paris, France: World Organisation for Animal Health (OIE), 2004. 261~263
- Scholtissek C. Pig as the "mixing vessel" for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Princ Pract*, 1990, **2**(1): 65~71
- Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, *et al.* Avian H5N1 influenza in cats. *Science*, 2004, **306**(5694): 241
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, *et al.* Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*, 2004, **10** (12): 2189~2191
- 刘超男, 刘明, 张云, 等. H5N1 亚型禽流感病毒的鸭致病性研究. *中国农业科学*, 2006, **39**(2): 412~417
- Liu C N, Liu M, Zhang Y, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, **39**(2): 412~417
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, *et al.* The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*, 1999, **73**(2): 1146~1155
- Alexander D J. *Proceeding of the fourth international symposium on avian influenza*. United States Animal Health Association, Rose Printing Company, 1997. 9~13

Identification and Molecular Analysis of H5N2 Subtype Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated From Goose

LIU Chun-Guo¹⁾, LIU Ming^{1)*}, ZHANG Yun²⁾, LIU Da-Fei¹⁾, PAN Wei-Qi³⁾,
SUN En-Cheng⁴⁾, DU Jin-Ling¹⁾, LI Hong-Tao^{1,5)}

¹⁾Animal Influenza Center of The Ministry of Agriculture and The National Avian Influenza Reference Laboratory, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences Harbin 150001, China;

²⁾Avian Infectious Disease Division, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences Harbin 150001, China;

³⁾Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, The Chinese Academy of Sciences Guangzhou 510663, China;

⁴⁾College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China;

⁵⁾College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150003, China)

Abstract A H5N2 subtype avian influenza virus isolated from goose belongs to highly pathogenic avian influenza virus, and the intravenous pathogenicity indexes (IVPI) =2.99. But ducks are not sensitive to this isolated influenza virus. The virus can infect mouse but only replicates in lung and has no pathogenicity. HA and NA gene of this isolated strain share 99.4% and 99.8% nucleotide sequence identity to the HA gene of A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1) and the NA gene of A/chicken/Jilin/53/01 (H9N2), and share 99.3% and 99.6% amino acid sequence identity to the HA protein of A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1), A/swan/Guangxi/307/2004 (H5N1), A/wild duck/ Guangdong/314/2004(H5N1), A/chicken/Henan/210/2004(H5N1) and the NA protein of A/chicken/Jilin/53/01 (H9N2). There are several continuous basic amino acids (-RRRKKR-) at the cleavage site of HA protein. Phylogenetic trees analysis of HA and NA gene suggests that the isolated influenza virus probably originated from the reassortment of H5N1 and H9N2 subtype influenza virus.

Key words goose, avian influenza virus, subtype H5N2, pathogenicity, sequence analysis

*Corresponding author.

Tel: 86-451-85935069, E-mail: liming04@126.com

Received: May 1, 2008 Accepted: September 2, 2008