

一株重组鸭源 H5N2 亚型禽流感病毒分子进化分析

姚艳丰, 何斌, 邵志勇, 杨文海, 刘武, 陈夏冰, 叶胜强, 陈洁*

(武汉市农业科学技术研究院 畜牧兽医科学研究所, 武汉 430208)

摘要:2016 年对武汉地区家禽市场进行常规流感监测, 分离鉴定到 1 株 H5N2 亚型禽流感病毒。本研究对该株病毒进行了全基因组测序, 分子特征和遗传进化分析。结果显示该株病毒的 HA 基因属于 Clade2. 3. 4. 4 分支, HA 蛋白的裂解位点处具有多个连续碱性氨基酸, 具备高致病性禽流感病毒的典型分子特征。序列比对分析显示该株病毒各基因片段分别与 H5 不同亚型的禽流感病毒具有较高的相似性, 推测该分离株为重组病毒。继续开展对家禽市场 H5 亚类流感病毒的分子流行病学调查, 对研究高致病性流感病毒的变异和进化, 以及对禽流感的综合防控有着重要的意义。

关键词:禽流感; H5N2 亚型; 鸭; 分子进化分析

中图分类号: S852.62 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2016)05-0590-07

DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003025

高致病性禽流感病毒 H5N1 于 1996 年在亚洲首次出现, 之后传播到欧洲、中东和非洲等地区, 并在传播过程中频繁重组, 对人类健康、养殖业发展、野生鸟类及生态环境造成了巨大的危害^[1-4]。近年来, 特别是 2013 年以后 H5 亚型病毒的重组出现新的变化, H5N1 亚型流感病毒在禽类中已不处于流行的主导地位, 逐步被其它 H5 亚型病毒取代, 比如 H5N2, H5N6, 和 H5N8 等^[5-7]。目前这些亚型病毒已经在全球引起了广泛流行, 值得我们进一步的关注。

家禽市场一直被认为是流感病毒潜在的“温床”, 可为不同亚型病毒间的重组提供契机。此外, 家禽市场已经是人感染禽流感的重要来源之一。对众多感染病例回溯研究发现访问活禽市场是发现的唯一危险因素^[8-10]。可见对家禽市场进行流感监测, 不仅可以了解流感病毒流行病学状况, 而且具有重要的公共卫生意义。

本研究对武汉地区家禽市场流感病毒监测过程中, 从健康家鸭体内分离鉴定出 1 株 H5N2 禽流感病毒, 并进行了全基因组测序, 构建进化树, 探讨病毒基因组来源。本文为禽流感的防控提供了基础研究资料, 为揭示水禽中禽流感的进化状态提供一定的流行病学信息。

收稿日期: 2016-07-11; 修回日期: 2016-07-25

基金项目: 武汉市农科院创新项目(项目号: CX201609-04、CX201607); 国家自然科学基金(项目号: 31400787)

作者简介: 姚艳丰(1981-), 男, 汉族, 博士, 主要从事动物流感病原学及分子流行病学研究, Tel: +86-27-81776359, E-mail: yaoyan-feng1208@sina.com

* 通讯作者: 陈洁(1981-), 高级兽医师, 主要从事动物疫病病原学研究, Tel: +86-27-81776359, E-mail: xkschenjie@sina.com

材料与方法

1 主要试剂 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒 SuperScript First Strand Synthesis System 购自 Invitrogen 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、dNTP 及 DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司。

2 样品采集 2016 年从武汉家禽市场采集家禽肛拭子和咽拭子, 样品拭子浸入到病毒稀释液中(PBS + 青霉素(2 000 IU/ml)、链霉素(2 mg/ml)、庆大霉素(50 μg/ml)和制霉菌素(1 000 IU/ml)), 置于随身携带的手提冰箱中, 在 24h 内冷链运回实验室, -80℃ 冻存备用。

3 病毒 RNA 提取及 cDNA 的获取 将采集的拭子样品, 充分混匀, 6 000rpm 离心 10min, 取上清进行 RNA 提取。RNA 提取按照 RNeasy Mini Kit(Qiagen)说明书提取病毒 RNA, 溶于 30 μl RNase-free H₂O 中。取 8 μl 病毒 RNA, 按照 SuperScript First Strand Synthesis System(Invitrogen)说明书合成第一链 cDNA, -20℃ 保存备用。

4 病毒基因组扩增及测序 利用 Hoffman^[11] 各基因特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 阳性克隆送至武汉擎科进行测序。

5 系统进化分析 将病毒基因组序列测定结果用 DNAMAN 等软件进行序列拼接, 得到完整的基因组片段。使用 BioEdit 7.0.5.2 进行序列比对, 每个基因从起始密码子开始进行进化树分析。各基因序

列如下 PB2, 1-2280; PB1, 1-2274; PA, 1-2151; HA, 1-1704; NP, 1-1497; NA, 1-1410; M, 1-982; and NS, 1-838。将比对结果输入 Mega6 软件构建各基因系统进化树^[12]。

结 果

1 病毒分离鉴定和同源性分析

2016 年 1 月至 4 月我们对武汉家禽市场进行常规的流感监测,采集 850 份拭子,其中鸭 350 份,鸡 300 份,鸽子 82 份,其余 118 份(鹌鹑、斑鸠等)。所有的样品均采自表面健康的家禽。从鸭中分离鉴

定到 1 株 H5N2 流感病毒,命名为 A/duck/Hubei/SZY250/2016(SZY250)。将该病毒进行了全基因组测序,并且比较该病毒和 GenBank 中部分毒株之间的核酸序列相似性。结果表明该分离株 HA 基因、NA 基因与 Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)相似性最高,达到 98%。内部基因(PB2 基因除外)亦是与 Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)相似性最高,相似度可达 98%~99%。而 PB2 基因与 Baikal teal/Korea/1449/2014(H5N8)病毒株具有较高的相似性,同源性达 99%(表 1,图 1)。

表 1 H5N2 病毒各基因片段和 GenBank 中提供的核酸序列相似性比较

Table 1 Comparisons of the H5N2 virus with isolates in GenBank with the highest nucleotide sequence similarity

Gene	Nucleotide sequence		Homology (%)
	Site	Isolate with the highest homology	
HA	1-1704	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	98
NA	1-1410	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	98
PB2	1-2280	Baikal teal/Korea/1449/2014(H5N8)	99
PB1	1-2274	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	99
PA	1-2151	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	99
NP	1-1497	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	99
M	1-982	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	99
NS	1-838	Duck/Eastern China/S0131/2014(H5N2)	98

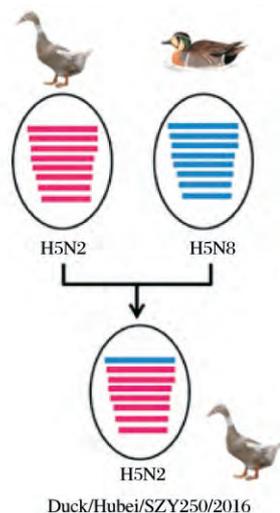


图 1 本研究中分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的基因组构成图

Figure 1 Putative genomic composition of the novel reassortant H5N2 avian influenza virus in this study

2 系统进化树分析

为了研究 H5N2 亚型流感病毒的分子流行病学特征,构建了各个基因的系统进化树。系统进化

分析表明,分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的 HA 基因属于 Clade2.3.4.4(图 2)。NA 基因系统发育树由两个亚组组成,分别为欧亚系和北美系,本研究分离到的该株病毒属于欧亚系(图 2)。对该株病毒的内部基因的系统发育树分析,该病毒是由不同亚系的病毒经基因重排产生的,其内部基因在系统发育树上均来自于欧亚基因库,但形成不同的进化分支。其中 PB2, PB1, NP 和 M 基因均同近年来流行的 Clade2.3.4.4 H5Nx 亚类聚类在一起。而 PA、NS 基因则形成一单独分支,来源于亚洲高致病性 H5N1 亚类(图 3、图 4、图 5)。

3 病毒分子特征

氨基酸序列分析 HA 在剪切位点处的氨基酸包含多个碱性氨基酸,具有典型高致病性禽流感病毒特征序列^[13]。HA 在受体结合位点处的氨基酸(A138, E190, L194, G225, Q226 和 G228; H3 排序)均未发生氨基酸的替换,表明病毒更倾向于结合 $\alpha 2,3\text{-NeuAcGal}$ 连接型禽类细胞受体^[14]。HA 蛋白有 6 个潜在的 N-糖基化位点,4 个在 HA1 蛋白上(26 或 27, 39, 181 和 302),两个在 HA2 蛋白上(499 和 558)。

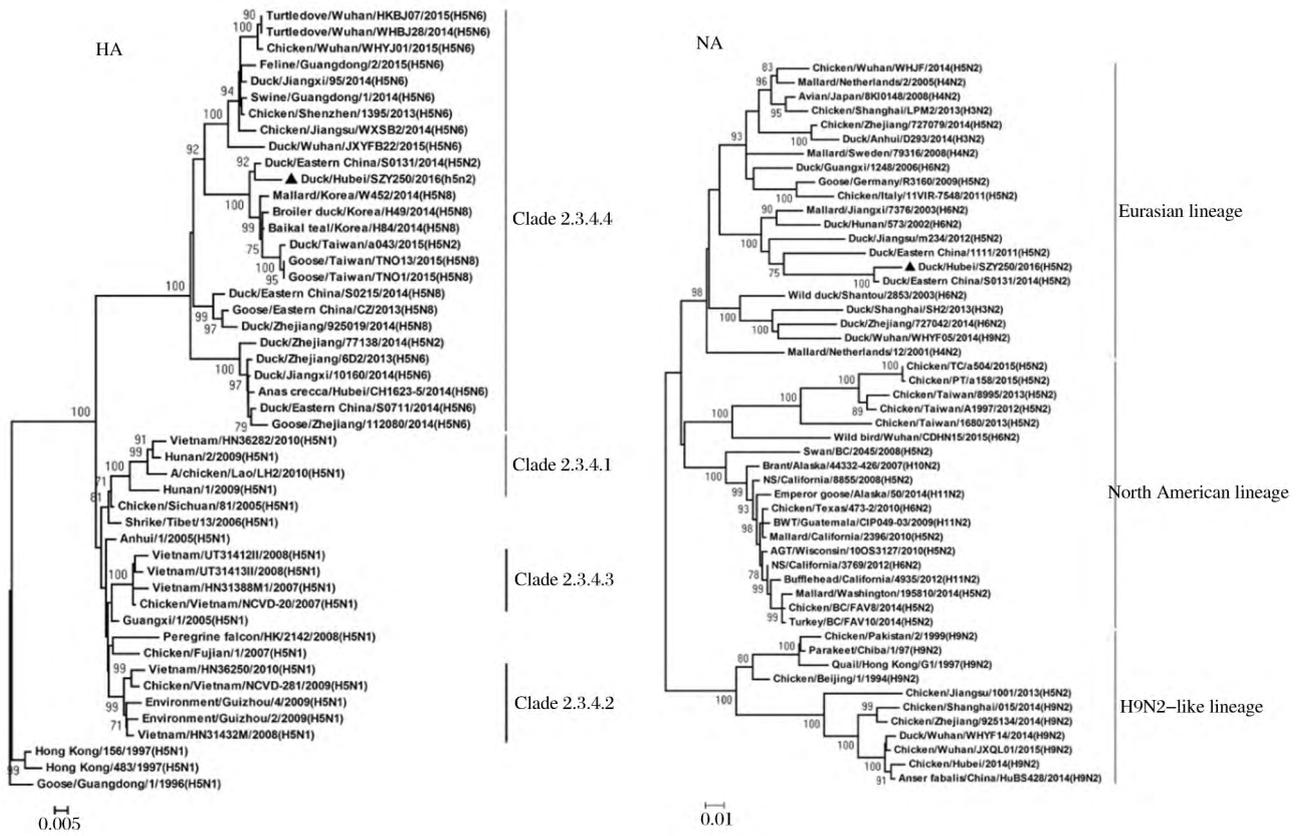


图 2 本研究中分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的 HA, NA 基因的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic trees for the HA and NA genes from the H5N2 influenza A virus isolated in the present study

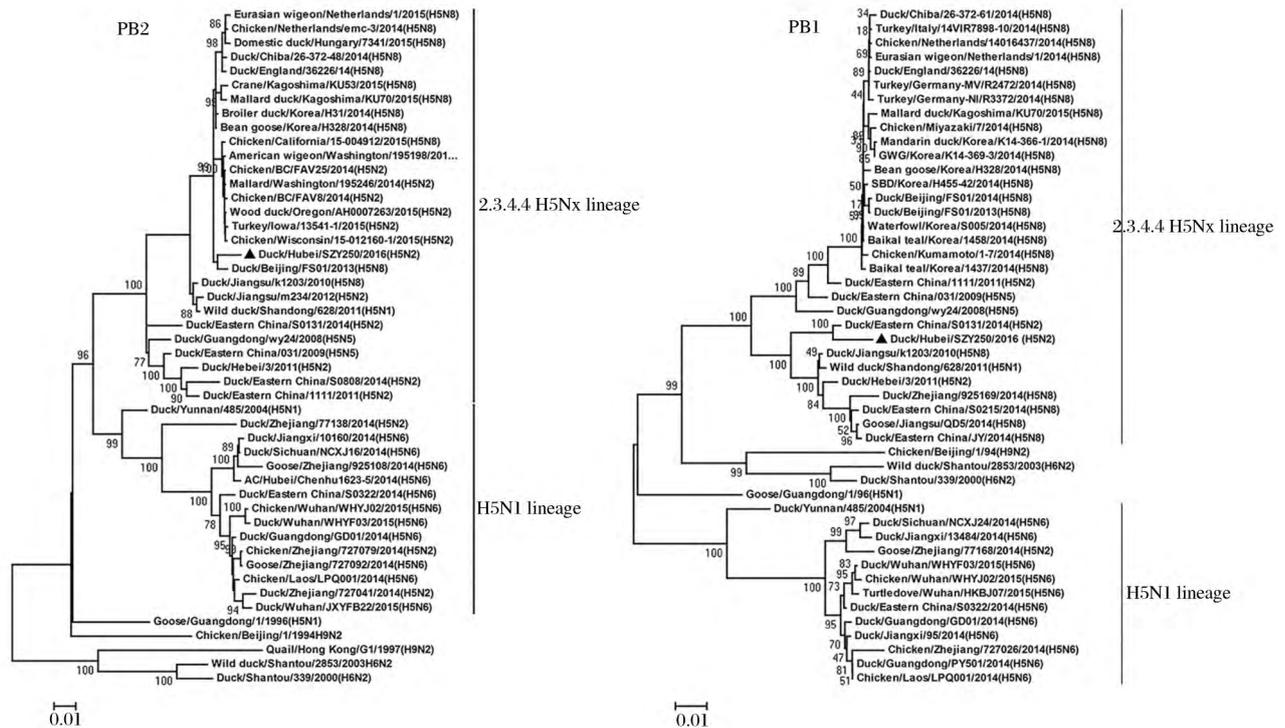


图 3 本研究中分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的 PB2, PB1 基因的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic trees for the PB2 and PB1 genes from the H5N2 influenza A virus isolated in the present study

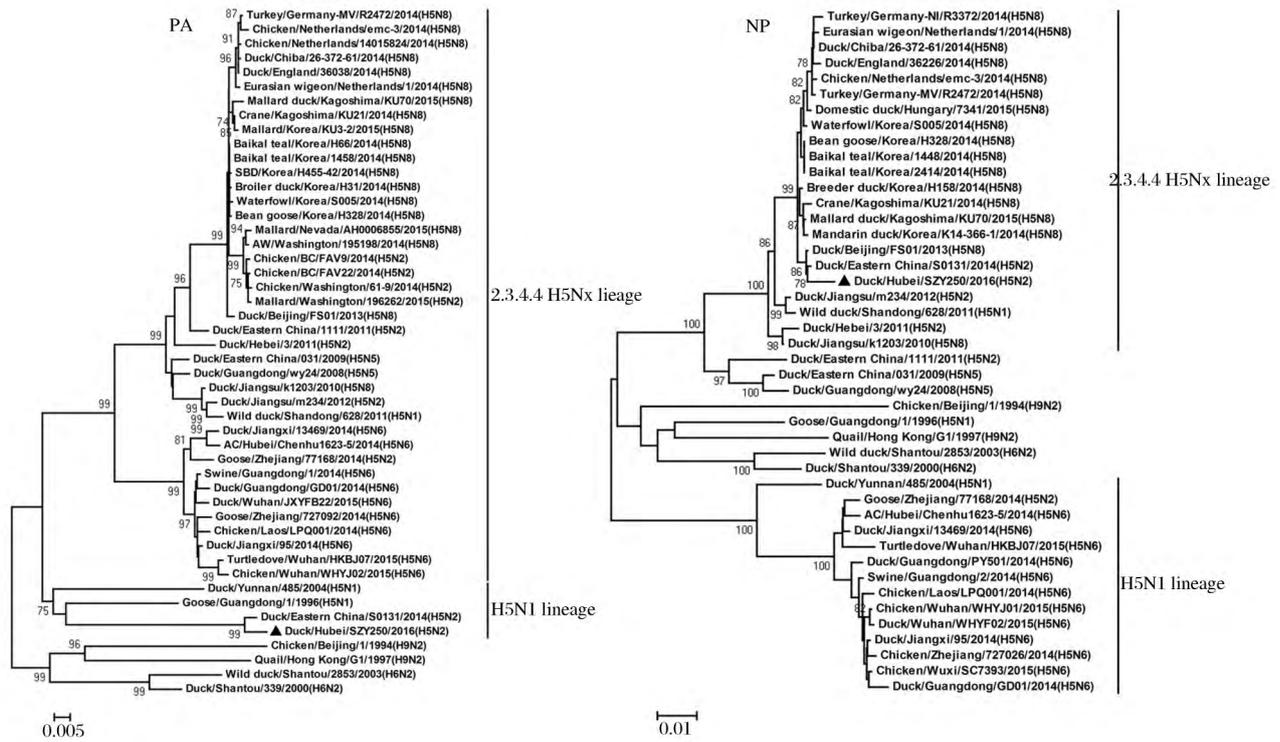


图 4 本研究中分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的 PA, NP 基因的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic trees for the PA and NP genes from the H5N2 influenza A virus isolated in the present study

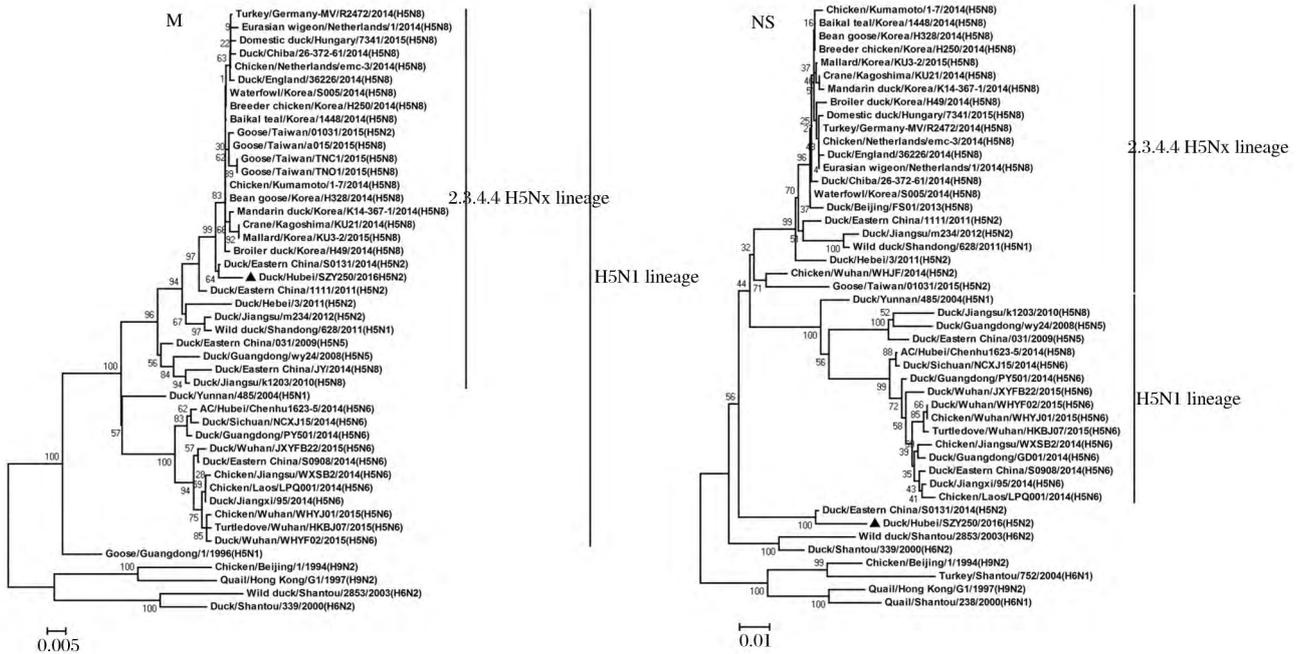


图 5 本研究中分离到的 H5N2 亚型禽流感病毒的 M, NS 基因的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic trees for the M and NS genes from the H5N2 influenza A virus isolated in the present study

本研究分离到的该株 H5N2 病毒 NA 基因编码 469 个氨基酸, NA 蛋白在保守的催化残基 (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 和

Y406; N2 排序) 和支撑框架残基 (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294 和 E425) 均未发生氨基酸的替换和缺失, 提示

本研究中的 H5N2 病毒对神经氨酸酶抑制剂敏感^[15]。NA 蛋白有 7 个潜在的 N 糖基化位点,分别在 N61,69 或 70, 86,146,200,234 和 402。

对该株 H5N2 病毒聚合酶复合体蛋白分析, PB2 蛋白上并未发生 E158G, E627K 和 D701N 的突变,这 3 个位点的氨基酸的替换,被认为可以显著增强病毒的毒力^[14,16,17]。PB1 蛋白上也没发生 Y436H 的突变, Y436H 的突变被认为可以降低病毒在宿主间的传递^[18]。PA 蛋白 T515A 的变异,可以降低病毒对自然宿主致病性,但可提高对小鼠的致病性,本研究中此病毒无此突变^[18]。

NS1 蛋白不存在 S42P 的替换, Jiao 等认为此位点出现 Ser 能增强病毒在小鼠中的致病力^[19]。NS1 蛋白的 D92E 替换,可以增强病毒对机体的抗病毒细胞因子的抵抗能力,从而增强病毒的毒力^[20]。而在本研究中的该株 H5N2 病毒没有发生此氨基酸替换。

M1 基因的 D30 和 A215 在目前已知的所有 H5N1 亚型禽流感病毒具有高度保守性。M1 基因的 D30N 和 A215T 突变能显著致弱 H5N1 高致病性禽流感病毒,本研究 H5N2 病毒未有此突变^[21]。M2 基因中的 Leu-26-Ile, Val-27-Ala, Ala-30-Ser, Ser-31-Asn 和 Gly-34-Glu 的突变均与金刚烷胺耐药性相关^[22]。本研究该病毒在 31 位存在 Ser-31-Asn 的突变,暗示其可能对金刚烷胺有抗药性。

讨 论

近年来人感染高致病性 H5 亚类禽流感病毒病例不断增加,使得禽流感病毒对人类的威胁日益严峻^[23,24]。对确诊病例的回溯研究发现,访问家禽市场是其感染的重要来源之一。因此,加强家禽市场禽流感的监测工作和开展禽流感病毒的分子生物学研究,掌握禽流感病毒的进化变异具有十分重要的意义。

本研究从武汉家禽市场采集的拭子样品中分离到一株 H5N2 亚型流感病毒,遗传进化分析显示该株病毒属于 Clade2.3.4.4 亚类,与近年来流行于我国南方地区 H5 亚类病毒具有较高的同源性。对该病毒 HA 基因氨基酸序列分析表明其具有典型的高致病性禽流感的特征,并且受体结合位点具有典型的与禽类受体结合的特征。但其对哺乳动物宿主的相关致病性研究,还需进一步进行验证。

近几年 Clade2.3.4.4 的 H5 亚类禽流感病毒

在亚洲地区的家禽中分布比较普遍,在我国南部、香港特区和日本、越南等都有病毒分离株^[7,25]。Clade2.3.4.4 亚类病毒取代 Clade2.3.2.1 亚类病毒广泛流行,表明 Clade2.3.4.4 亚类病毒更能适应宿主,利于病毒在宿主间传播。另外本研究分离的毒株与我国华东地区 Duck/Eastern China/S0131/2014 毒株具有较高的同源性,表明二者来源于共同祖先。湖北和中国华东地区同处于东亚-澳大利亚候鸟迁徙路线上,每年均有大批量的候鸟迁徙,候鸟长途迁徙可将携带的病毒传播给当地家禽。2005 年爆发于青海湖的 H5N1 病毒便是随着候鸟的迁徙而传播到欧洲和非洲等地^[26,27]。并且最近亚洲爆发的 H5N8 病毒也是通过候鸟迁徙传到了欧洲和北美^[28,29]。因此本研究的 H5N2 病毒很可能是通过候鸟迁徙从我国华东地区传播到湖北的。另外目前虽然我国已经禁止活禽交易,但个别地区仍然有零星的存在,活禽在运输或交易过程中就有可能与当地的禽鸟进行接触,进而将携带的流感病毒扩散到该地区,这也是可能的因素^[30,31]。国内 AIV 流行情况复杂,值得我们进一步研究。

尽管家禽市场爆发高致病性 H5 亚类病毒的报道很少,但从本研究可以看出家禽市场仍旧扮演 H5 亚类病毒的储存库的作用。因此及时掌握家禽市场 H5 亚类流行株的变异情况,可为进一步阐明 H5 亚型禽流感在自然界中的进化及重组机制提供了相应依据,具有重要的公共卫生学意义。

参考文献:

- [1] Lipatov A S, Evseenko V A, Yen H L, Zaykovskaya A V, Durimanov A G, Zolotykh S I, Netesov S V, Drozdov I G, Onishchenko G G, Webster R G, Shestopalov A M. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005-2006 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (4): 539-546.
- [2] Weber S, Harder T, Starick E, Beer M, Werner O, Hoffmann B, Mettenleiter T C, Mundt E. Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88 (Pt 2): 554-558.
- [3] Lai S, Qin Y, Cowling B J, Ren X, Wardrop N A, Gilbert M, Tsang T K, Wu P, Feng L, Jiang H, Peng Z, Zheng J, Liao Q, Li S, Horby P W, Farrar J J, Gao G F, Tatem A J, Yu H. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans 1997-2015: a

- systematic review of individual case data [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(7):e108-118.
- [4] Zhang J, Geng X, Ma Y, Ruan S, Xu S, Liu L, Xu H, Yang G, Wang C, Liu C, Han X, Yu Q, Cheng H, Li Z. Fatal avian influenza (H5N1) infection in Human, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(11):1799-1801.
- [5] Lee C C, Zhu H, Huang P Y, Peng L, Chang Y C, Yip C H, Li Y T, Cheung C L, Compans R, Yang C, Smith D K, Lam T T, King C C, Guan Y. Emergence and evolution of avian H5N2 influenza viruses in chickens in Taiwan [J]. *J Virol*, 2014, 88(10):5677-5686.
- [6] Mok C K, Da Guan W, Liu X Q, Lamers M M, Li X B, Wang M, Zhang T J, Zhang Q L, Li Z T, Huang J C, Lin J Y, Zhang Y H, Zhao P, Lee H H, Chen L, Li Y M, Peiris J S, Chen R C, Zhong N S, Yang Z F. Genetic Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N6) Virus, Guangdong, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(12): 2268-2271.
- [7] Zhou L C, Liu J, Pei E L, Xue W J, Lyu J M, Cai Y T, Wu D, Wu W, Liu Y Y, Jin H Y, Gao Y W, Wang Z H, Wang T H. Novel Avian Influenza A(H5N8) Viruses in Migratory Birds, China, 2013-2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(6):1121-1123.
- [8] Wang H, Feng Z, Shu Y, Yu H, Zhou L, Zu R, Huai Y, Dong J, Bao C, Wen L, Wang H, Yang P, Zhao W, Dong L, Zhou M, Liao Q, Yang H, Wang M, Lu X, Shi Z, Wang W, Gu L, Zhu F, Li Q, Yin W, Yang W, Li D, Uyeki T M, Wang Y. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China[J]. *Lancet*, 2008, 371(9622): 1427-1434.
- [9] Yuan J, Lau E H, Li K, Leung Y H, Yang Z, Xie C, Liu Y, Liu Y, Ma X, Liu J, Li X, Chen K, Luo L, Di B, Cowling B J, Tang X, Leung G M, Wang M, Peiris M. Effect of Live Poultry Market Closure on Avian Influenza A(H7N9) Virus Activity in Guangzhou, China, 2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(10):1784-1793.
- [10] Zhou L, Liao Q, Dong L, Huai Y, Bai T, Xiang N, Shu Y, Liu W, Wang S, Qin P, Wang M, Xing X, Lv J, Chen R Y, Feng Z, Yang W, Uyeki T M, Yu H. Risk factors for human illness with avian influenza A (H5N1) virus infection in China [J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(12): 1726-1734.
- [11] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R G, Perez D R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [12] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [13] Yao Y, Wang H, Chen Q, Zhang H, Zhang T, Chen J, Xu B, Wang H, Sun B, Chen Z. Characterization of low-pathogenic H6N6 avian influenza viruses in central China. *Arch Virol*, 2013, 158(2):367-377.
- [14] Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses [J]. *Science*, 2001, 293(5536): 1840-1842.
- [15] Yen H L, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto A S, Webster R G, Govorkova, E A. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses [J]. *J Virol*, 2006, 80(17):8787-8795.
- [16] Zhou B, Li Y, Halpin R, Hine E, Spiro D J, Wentworth D E. PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice [J]. *J Virol*, 2011, 85(1): 357-365.
- [17] Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster R G, Matsuoka Y, Yu K. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model [J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 12058-12064.
- [18] Hulse-Post D J, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen H L, Webby R J, Walker D, Nguyen T D, Webster R G. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks [J]. *J Virol*, 2007, 81(16): 8515-8524.
- [19] Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice [J]. *J Virol*, 2008, 82(3): 1146-1154.
- [20] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses [J]. *Virus Res*, 2004, 103(1-2): 107-113.
- [21] Fan S, Deng G, Song J, Tian G, Suo, Y, Jiang Y, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice [J]. *Virology*, 2009, 384(1): 28-32.
- [22] Suzuki H, Saito R, Masuda H, Oshitani H, Sato M, Sato I. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses; epidemiological study [J]. *J Infect Chemother*, 2003, 9(3): 195-200.

- [23] Shen Y Y, Ke C W, Li Q, Yuan R Y, Xiang D, Jia W X, Yu Y D, Liu L, Huang C, Qi W B, Sikkema R, Wu J, Koopmans M, Liao M. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N6) Viruses in Humans, Guangdong, China, 2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(8).
- [24] Yang Z F, Mok C K, Peiris J S, Zhong N S. Human Infection with a Novel Avian Influenza A(H5N6) Virus [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(5): 487-489.
- [25] Kanehira K, Uchida Y, Takemae N, Hikono H, Tsunekuni R, Saito T. Characterization of an H5N8 influenza A virus isolated from chickens during an outbreak of severe avian influenza in Japan in April 2014 [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(7):1629-1643.
- [26] Saad M D, Ahmed L S, Gamal-Eldein M A, Fouda M K, Khalil F, Yingst S L, Parker M A, Monteville M R. Possible avian influenza (H5N1) from migratory bird, Egypt [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7):1120-1121.
- [27] Salzberg S L, Kingsford C, Cattoli G, Spiro D J, Janies D A, Aly M M, Brown I H, Couacy-Hymann E, De Mia G M, Dung do H, Guercio A, Joannis T, Maken Ali A S, Osmani A, Padalino I, Saad M D, Savić V, Sengamalay N A, Yingst S, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Capua I. Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(5):713-718.
- [28] Verhagen J H, van der Jeugd H P, Nolet B A, Slaterus R, Kharitonov S P, de Vries P P, Vuong O, Major F, Kuiken T, Fouchier RA. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways [J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(12). pii: 21069.
- [29] Lee D H, Torchetti M K, Winker K, Ip H S, Song C S, Swayne D E. Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds [J]. *J Virol*, 2015, 89(12):6521-6524.
- [30] Guan Y, Smith G J. The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses [J]. *Virus Res*, 2013, 178(1):35-43.
- [31] Su S, Bi Y H, Wong G, Gray G C, Gao G F, Li S. Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China [J]. *J Virol*, 2015, 89(17):8671-8676.

Molecular Phylogenetic Analysis of a Highly Pathogenic H5N2 Avian Influenza Virus Isolated from Duck

YAO Yanfeng, HE Bin, SHAO Zhiyong, YANG Wenhai, LIU Wu,
CHEN Xiabing, YE Shengqiang, CHEN Jie*

(*Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Wuhan Academy of Agricultural
Science and Technology, Wuhan 430208, China*)

Abstract: In 2016, routine influenza virus surveillance was conducted in the live poultry markets of Wuhan, Hubei Province. An H5N2 subtype avian influenza virus (AIV) was isolated from ducks in Wuhan. The entire genome of this virus isolate was sequenced, and molecular phylogenetic analysis performed. The results indicated that the HA gene belonged to clade 2.3.4.4 and contained multiple basic amino acids at the cleavage site, which is characteristic of highly pathogenic AIV. Sequence alignment revealed that the isolate shared a high degree of homology with different H5 subtype AIVs isolated from waterfowl in southern China in recent years. This isolate was likely a natural reassortant from different subtype AIVs. This study provides epidemiological evidence of influenza evolution. Continuation of molecular epidemiology studies of H5 subtype influenza viruses in live poultry markets is important for understanding their role in the variation and evolution of highly pathogenic AIVs and their potential hazardous effects on human health. Furthermore, this information is important for strengthening comprehensive AIV surveillance and control measures.

Key words: Avian influenza virus; H5N2 subtype; Duck; Molecular phylogenetic analysis

*Corresponding author: CHEN Jie, E-mail: xkschenjie@sina.com