

番鸭源 H6N6 亚型禽流感病毒全基因组的分子特征

万春和,傅光华,程龙飞,施少华,陈红梅,黄瑜*

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所,福州 350013)

摘要:【目的】为了丰富水禽源禽流感病毒的分子流行病学资料,明确我国国内首次分离的番鸭源 H6N6 亚型禽流感(Avian influenza virus, AIV)病毒 A/Muscovy Duck/Fujian/FZ01/2008(H6N6)(以下简称 MD/FJ/F1/08)全基因组的分子特征,弄清该病毒的遗传进化特点。【方法】对其 8 个基因片段分别进行扩增和序列测定,并利用分子生物学软件对测序结果进行序列分析。【结果】MD/FJ/F1/08 的 HA 裂解位点附近的氨基酸序列为 PSMKVIV↓GL,为非连续的碱性氨基酸,其静脉接种指数(the intravenoys pathogenicity index, IVPI)为 0.15,推测其为一株低致病力 AIV。其 HA 基因、NP 基因、M 基因和 PB2 基因均与我国台湾分离株 A/duck/Kingmen/E322/04(H6N2)该基因的核苷酸同源性最高,分别高达 94.2%、95.7%、97.2% 和 95.6%,均处于同一遗传进化分支。其 NA 基因和我国远东分离株 A/duck/Eastern China/01/2007(H4N6)同源性最高,达 97.1%;其颈部有 11 个氨基酸的缺失(TNSTTTIINNN),为 N6 亚型神经氨酸酶基因中首次报道,在遗传进化上和 H4N6 亚型 AIV 的 NA 基因处于相同的分支。NS 基因和香港地区分离株 A/duck/Hong Kong/3600/99(H6N2)同源性最高,达 96.1%;PB1 和 PA 均与高致病性禽流感病毒株 A/duck/Hong Kong/140/1998(H5N1)同源性最高,达 95.6% 和 96.7%。且 MD/FJ/F1/08 的 8 基因与 H6N6 亚型流感病毒北美洲分离代表株均不处在同一遗传进化分支上,相互之间遗传关系较远。【结论】MD/FJ/F1/08 可能是由 H6N2、H4N6 和 H5N1 等多亚型 AIV 基因重组而成。

关键词:番鸭源禽流感病毒;H6N6 亚型;全基因;分子特征;基因重组

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1147-08

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)由 8 个独立单股负链 RNA 节段组成,其显著的生物学特征就是变异频繁,亚型众多。迄今为止,已经分离到毒力各异的 AIV 毒株,根据其病毒粒子表面的囊膜蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的抗原性的不同,可分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型,不同的 HA 和 NA 又可基因重组成亚型各异的流感病毒^[1-2]。鸭只被认为是 AIVs 巨大的基因储存库,其流感病毒由野生水禽到陆生禽类的过程传播中充当着中间媒介的作用,家鸭体内的 AIV 可以通过基因重排或直接突破种间

屏障传播到人和其他禽类,有时可能会造成很高的发病率和死亡率。目前,我国家养水禽范围广、饲养量大,广大农村主要是粗犷式混合养殖为 AIVs 的传播创造便利条件^[3-4]。因此,对鸭源禽流感病毒的流行病学监测有非常重要的流行病学意义并受到广泛重视。但是,由于种种原因,有关我国鸭 AIVs 的流行病学资料十分有限,更缺乏针对特定地区(尤其是我国南方地区)AIVs 长期的、系统的而全面的流行病学监测。仅在华东地区家鸭中的流感病毒分布情况有过初步调查,并证实该地区近年来在家鸭中至少存在 9 种 HA 亚型和 6 种 NA 亚型组成的

基金项目:国家科技支撑计划(2006BAD06A01);福建省重点项目(2009N4001);中央高校基本科研业务费专项资金(2010KLEP001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-591-87572396;E-mail: huangyu_815@163.com

作者简介:万春和(1982-),男,湖北鄂州人,研究实习员,硕士,主要从事水禽病毒分子生物学研究。E-mail: chunhewan@126.com

收稿日期: 2010-04-06; **修回日期:** 2010-04-28

13 种亚型的 AIVs: H1N1, H3N1, H3N2, H3N8, H4N6, H5N1, H5N2, H6N2, H6N8, H8N4, H9N2, H10N3, H11N2^[5-8]。

2008 年,我们从福建某地采集的 60 日龄种番鸭泄殖腔拭子中分离到一株禽流感病毒,经鉴定为 H6N6 亚型,命名为 A/Muscovy Duck/Fujian/FZ01/2008(H6N6)(以下简称 MD/FJ/F1/08),为国内首次分离报道的 H6N6 亚型 AIV。并对该病毒 8 基因序列进行了全基因分子特征分析,为丰富我国水禽流感病毒的基因库、探讨水禽中 AIVs 的进化状态提供可靠的流行病学信息。现将研究结果简报如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株:病毒株为国内首次分离报道的番鸭源 H6N6 亚型禽流感病毒 MD/FJ/F1/08,进行 3 次无

特定病原(SPF)鸡胚有限稀释克隆纯化。纯化病毒接种 SPF 鸡胚,48 h 后收获鸡胚尿囊液,测定血凝价为 2⁸,经细菌检验无污染后作为种毒贮存于 -70℃ 备用。

1.1.2 试剂:Trizol Reagent 购自 Invitrogen 上海有限责任公司,AMV 反转录酶、HPRI、TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs(2.5 mmol/L each)和 pMD18-T 载体均购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖凝胶回收小量试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞自制。

1.2 引物

参照 GenBank 中登陆的相关序列和文献 9,设计引物,其中聚合酶基因(PA、PB2 和 PB1)均分两断扩增,引物序列见表 1。

表 1 目的基因的引物序列

Table 1 The primers used to amplified the target gene

Primer up	Sequence (5'→3')	(Primer down)	Sequence (5'→3')
Bm-HA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	Bm-NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTT
Bm-N6-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGAAAATG	Bm-NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTT
Bm-M-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	Bm-M-1027R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTAGTTTTT
Bm-NP-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	Bm-NP-1565R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTATTTTT
Bm-NS-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG	Bm-NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTT
PA PA1F	AGCAAAAGCAGGTACTGAT	PA-1470R:	CAGYTGGAAAGTCATCCATGG
PA747F	CATTGAGGGCAAGCTTTC	PA-2233R	AGTAGAAAACAAGGTACCTTTTTGGAC
PB2 PB2-1F	AGCRAAAGCAGGTCAAWTAT	PB2-1250R	TCYTCYTGTCARAAAYACCAT
PB2-1105F	TAYGARGARTTCACAATGGT	PB2-2341R	AGTAGAAAACAAGGTGCTTTTTAAACTATT
PB1 PB1-1F	AAAAAGCTTGTGAATTCAAA	PB1-1262R	TTRAACATGCCCATCATCAT
PB1-1142F	ARATACCNGCAGARATGCT	PB1-2341R	GAAACAAGGCATTTTTTCATGAAGG

以上所有引物均送由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 的制备

参照文献[10],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 (5'-AGCAAAAGCAGG-3'),按照 AMV 反转录酶使用说明进行反转录合成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.4 目的基因的扩增、克隆及序列测定与分析

用所设计的 8 基因特异性引物进行 PCR 扩增后,扩增体系为 50 μ L,其中 10 \times Ex-Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μ L、2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μ L、上下游引物(20 μ m/mL)各 1 μ L、cDNA1 μ L、Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,补充灭菌去离子水至终体积 50 μ L。反应条件为 95℃ 5 min 预变性后进入循环,循环参数为 94℃ 50 s,52℃ 35 s,72℃ 2 min,35 个

循环后,72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ L,在 1.0 % 琼脂糖凝胶上电泳。将 PCR 产物经胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用 PCR 方法鉴定重组质粒,将阳性重组质粒送由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。用 Lasergene v 7.1 DNASTar 软件 SeqMan 进行序列拼接,并将拼接后的 8 基因序列向 GenBank 提交,并进行序列分析。

1.5 8 个基因的遗传进化分析

应用 Lasergene v 7.1 DNASTar 软件 MegAlign (By Clustal W Method),绘制 MD/FJ/F1/08 株 8 基因片段与同源性较高毒株相关基因、H6N6 亚型北美洲分离 AIV 代表株相应基因的系统发育基因进化树。

1.6 静脉接种指数(IVPI)的测定

参照农业部兽医局 2008 年 3 月 4 日发布的《高

致病性禽流感防治技术规范》, 计算静脉接种指数: 将收获的 SPF 鸡胚尿囊液测定血凝价 ($2^8 > 2^4$), 以灭菌生理盐水稀释 10 倍, 按 0.1 mL/羽静脉接种 10 只 5 周龄 SPF 鸡, 5 只作对照。每隔 24 小时检查鸡群一次, 共观察 10 天, 并根据接种鸡的症状以数字法进行记录。

鸡只状况判定标准: 正常鸡记为 0, 病鸡记为 1, 重病鸡记为 2, 死鸡记为 3 (病鸡和重病鸡的判断主要依据临床症状表现。一般而言, “病鸡” 表现有下述一种症状, 而“重病鸡” 则表现下述多个症状, 如呼吸症状、沉郁、腹泻、鸡冠和/或肉髯发绀、脸和/或头部肿胀、神经症状。死亡鸡在其死后的每次观察都记为 3)。

2 结果

2.1 静脉接种指数 (IVPI) 的测定

攻毒组在第 3 天、第 4 天、第 5 天均有 4 只鸡只精神沉郁, 第 6 天有 2 只精神沉郁, 第 7 天有 1 只精神沉郁, 没有观察到病重鸡和病死鸡。对照组 5 只均无“病鸡” 临床症状表现。10 天后计算所得分数 = 15。即 IVPI 指数为: $(4 + 4 + 4 + 2 + 1) \div (10 \times$

$10) = 0.15$ 。

2.2 序列测定及分析

对 MD/FJ/F1/08 的 8 个基因 PB2、PB1、PA、HA、NA、NP、M、NS 进行克隆和序列测定。利用 Lasergene v 7.1 DNASTar 中 SeqMan 进行序列拼接, 拼接后的序列进行 BLAST 分析, 同源性最高的毒株 (见表 2)。

所扩增的 HA 基因片段长为 1744 bp, 其开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 为 1701 bp, 编码 566 个氨基酸。序列分析表明 MD/FJ/F1/08 株病毒 HA 蛋白裂解位点附近序列为: -PSMKVIV ↓ GL-, 为非连续的碱性氨基酸, 符合低致病力禽流感病毒 (Low Pathogenic Avian influenza virus, LPAIV) 特征。BLAST 结果表明, 其和我国台湾 A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) 分离株同源性最高, 为 94.2%。所扩增的 NA 基因片段长为 1431 bp, 其开放阅读框为 1380 bp, 其中从第 175-207 位有连续 33 个核苷酸缺失。共编码 459 个氨基酸, 其颈部有 11 个氨基酸的缺失 (TNSTTTIINN), 为 N6 亚型 AIV 神经氨酸酶基因中首次报道。

表 2 各基因片段的氨基酸长度以及核苷酸同源性最高的毒株

Table 2 Length of each gene of AIV and virus with the greatest homology

Gene	Coding DNA sequences	Peptide	Viruses with greatest homology	Homology/%
PB2	28-2307	759	A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2)	95.6
PB1	25-2298	757	A/duck/Hong Kong/140/1998 (H5N1)	95.6
PA	25-2176	716	A/duck/Hong Kong/140/1998 (H5N1)	96.7
HA	18-1718	566	A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2)	94.2
NP	46-1542	498	A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2)	95.7
NA	19-1398	459	A/duck/Eastern China/01/2007 (H4N6)	97.1
M	26-784, 26-51 + 740-1007	349	A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2)	97.2
NS	27-680, 27-56 + 529-864	338	A/duck/Hong Kong/3600/99 (H6N2)	96.1

NP 基因片段长度为 1565 bp, 其开放阅读框为 1497 bp, 编码 498 个氨基酸。M 基因片段长度为 1027 bp, 编码有完整的 M1 和 M2 蛋白。NS 基因全长为 890 bp, 编码有完整的 NS1 蛋白和 NS2 蛋白。所扩增的聚合酶基因中, PB2 基因片段长度为 2331 bp, 编码 759 个氨基酸; PB1 长度为 2341 bp, 编码 757 个氨基酸; PA 基因片段长度为 2233 bp, 编码 716 个氨基酸 (见表 2)。

向 GenBank 提交 8 个基因序列后获得的登录号为 HM050392-HM050398、GU595163。

2.3 8 个基因的遗传进化分析

应用 Lasergene v7.1 软件 MegAlign (By Clustal W Method), 绘制 8 个基因片段系统发育基因进化树见图 1:

从图 1-HA 可以看出, HA 基因在遗传进化上和我国台湾分离株 A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) 和韩国分离株 A/spot-billed duck/Korea/619/2008 (H6N2) 处在同一遗传进化分支上, 和北美洲 H6N6 亚型 AIV 分离株的 HA 基因处在不同的进化分支上, 相互之间关系较远。

从图 1-NA 可以看出, NA 基因和在遗传进化上不属于 H6N6 亚型流感病毒遗传进化群系, 却和 H4N6 亚型流感病毒的 NA 基因遗传进化处于同一分支, 相互之间遗传进化关系较近, 推测其可能来源于 H4N6 亚型 AIV 的 NA 基因。

从图 1-M 可以看出, M 基因在遗传进化上和 A/duck/Hong Kong/140/1998 (H5N1) 处于同一进化分支, 从图 1-NS 可以看出, NS 基因在遗传进化关系上

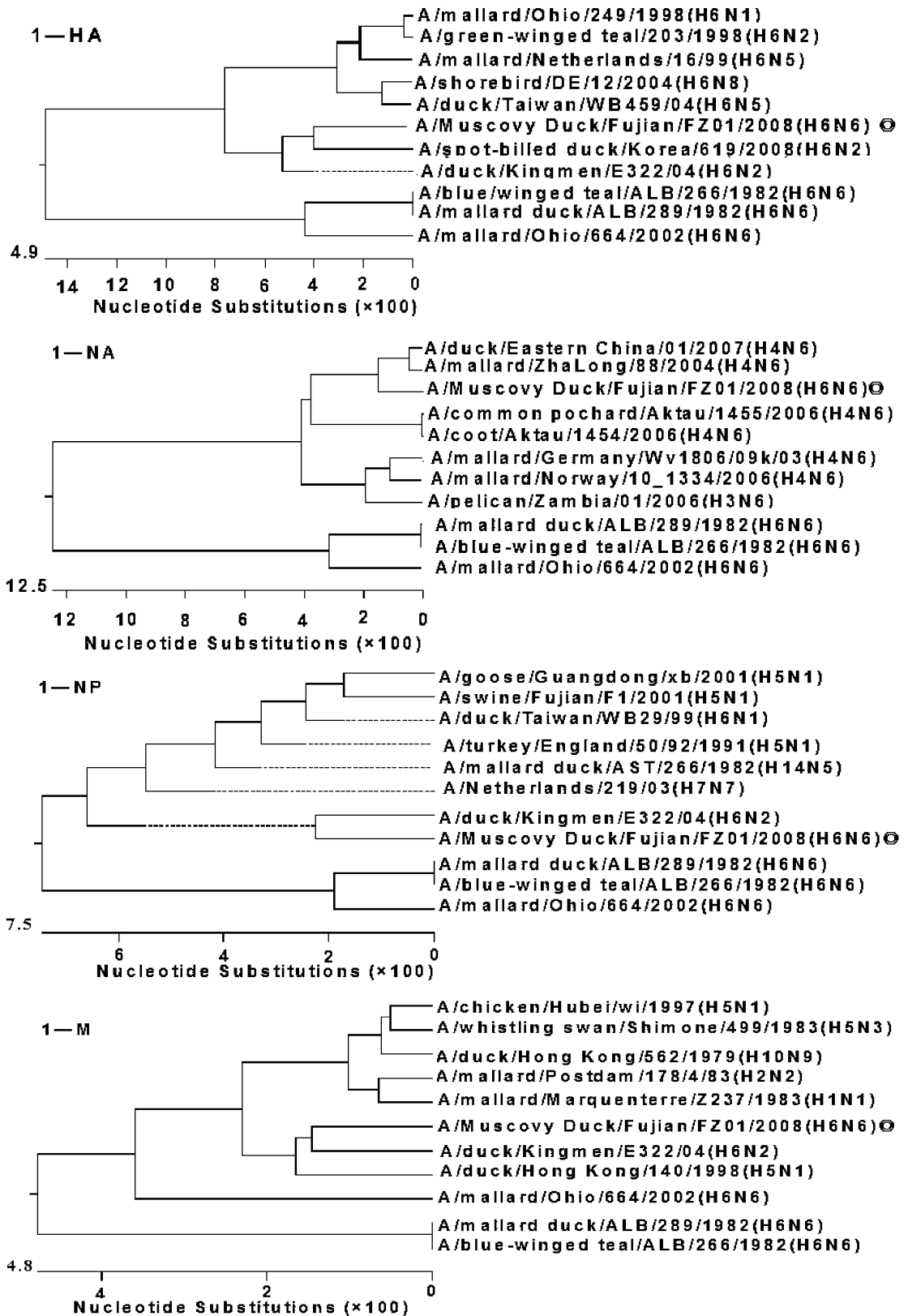


图 1 MD/FJ/F1/08 各基因片段的系统发育基因进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of MD/FJ/F1/08 gene segment.

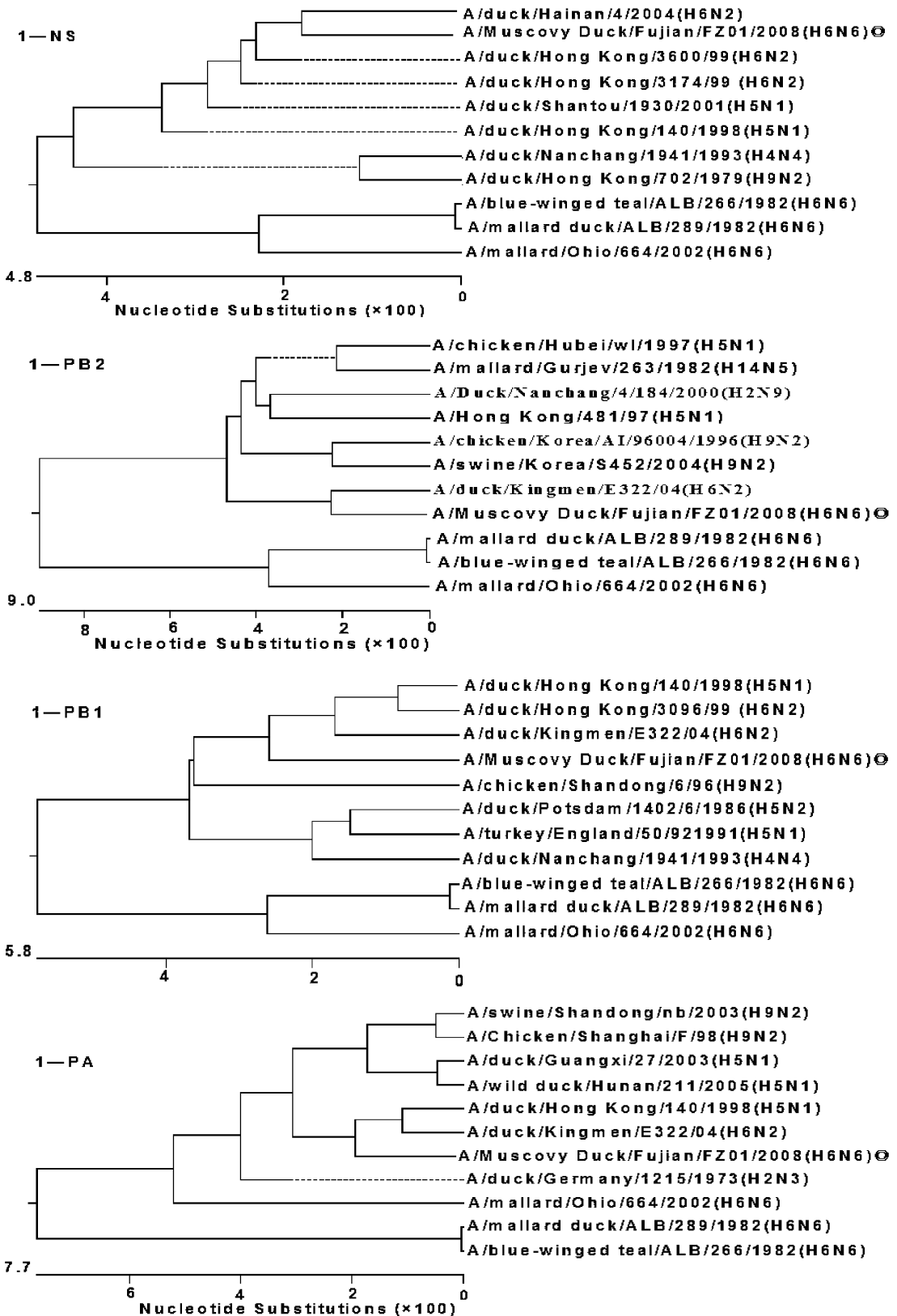


Fig. 1 Continued

和 A/duck/Hainan/4/2004(H6N2) 处于同一进化分支,其内均可能重组有 97 香港高致病性禽流感病毒的内部基因。

看出,NP 基因、PB2 基因、PB1 基因、PA 基因均和我 国台湾分离株 A/duck/Kingmen/E322/04(H6N2) 在 同一遗传进化分支上。

从图 1-NP、图 1-PB2、图 1-PB1 和图 1-PA 可以

从遗传进化关系上可见,MD/FJ/F1/08 的 8 个

基因片段系统在遗传进化关系上均和北美洲 H6N6 亚型 AIV 代表株的相互之间遗传进化关系较远,北美洲 H6N6 亚型分离株在遗传进化上均呈独立分支,提示和 MD/FJ/F1/08 分离株之间的亲缘关系较远。

3 讨论

H5 亚型 HPAIV 由于它的高发生率和高死亡率, H9 亚型 LPAIV 由于它在家禽中的广泛存在,因而受到人们的普遍关注。H6 亚型 AIV 由于为低致病性病毒,且发生率较低,一直没有引起人们重视,但近年来不断有 H6 亚型 AIV 疫情的报道,主要是 H6N1/N2 亚型^[11-14]。H6 亚型禽流感病毒多是从水禽和野鸟中分离到,对其遗传进化关系表明,该亚型病毒有可能是 H5 亚型高致病性禽流感病毒 (HPAIV) 和 H9N2 亚型禽流感病毒内部基因的供体,且已有在人体内检测到 H6 亚型 AIV 的抗体的报道^[15]。最近有研究发现 H6 亚型 AIV 还可以感染鼠和水貂^[16]。

本实验株 HA 基因序列分析表明其 HA 蛋白裂解位点附近序列为:-PSMKVIV↓GL-,为非连续的碱性氨基酸,符合低致病力禽流感病毒 (Low Pathogenic Avian influenza virus, LPAIV) 特征,同时根据其静脉接种指数为 0.15,可见 MD/FJ/F1/08 为一株低致病力 AIV。NA 基因其颈部有 11 个氨基酸的缺失 (TNSTTTIINN),为在 N6 亚型 AIV 神经氨酸酶基因中首次报道。有学者认为这种缺失可能会引起 AIVs 宿主范围的扩大,是水禽流感病毒向陆生禽类发生适应的标志。但对华东地区家鸭体内零星的分离到 H4N6 亚型 LPAIV 的 NA 研究表明,其均尚未发生 NA 茎部缺失^[17-18],推测其在当前 AIVs 疫苗广泛使用,免疫压力逐渐增大的情况下, H4N6 亚型 AIVs 的 NA 基因进化相对比较缓慢,对宿主变化适应性较弱有关。

本实验株病毒的 HA、NA、NP、M、PB2、PB1、PA 基因在遗传进化上均和我国台湾分离株 A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) 处在同一分支。对 A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) 的分析表明,其是从我国东南沿海迁徙到台湾 Kinngmen 的鸭群中分离到的^[14],和台湾地区其他 H6 亚型 AIV 分离株的遗传进化关系较远。对 A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) 的遗传进化表明其除 HA 基因外的 7 个基因均和我国香港地区 1997 年“禽流感事件”时流感病毒分离株遗传进化较近,其内还整合有能感染人

的 H5N1 亚型 AIV 内部基因。

从同源性比较和遗传进化关系看,MD/FJ/F1/08 的 8 个基因中 HA 基因可能来源于目前我国流行的 H6N2/N1 亚型,推测该亚型已逐渐成为继 H5 和 H9 亚型外的广泛流行株。NA 基因来源于 H4N6 亚型 AIV 的 NA 基因,与其他 N6 亚型 (非 H4N6 亚型 AIV) NA 基因之间的关系较远,推测该 NA 亚型已成为我国的一个优势 NA 亚型。其 6 个内部基因 (NP、M、NS、PB2、PB1 和 PA) 均可能整合有 H5N1 亚型的内部基因,推测 MD/FJ/F1/08 毒株是由 H6N2、H4N6 和 H5N1 等多亚型 AIV 基因重组而成。

自 1999 年以来, H5N1 亚型 HPAIV 引起鸭、鹅高发病率和高致死率,打破了对水禽仅为流感病毒的携带者而不发病死亡的传统认识。水禽从流感病毒的巨大贮存库,已成为对禽流感病毒高度易感自然宿主。当 AIVs 水禽这个天然贮存库溢出,进入到其它宿主 (如鸡、其他动物或人),病毒的进化就可能加速,毒力可能增强,从而可能造成流行。目前,已经有 H9N2 亚型等 LPAIV 引起禽类和人感染发病的报道^[15,19-22]。因此,我们必须在加强对 HPAIV 监测和研究的同时,也要对 LPAIV 生物遗传进化情况的研究给予足够重视。并同时必须继续加强和重视对家鸭源禽流感病毒的监测工作,特别是要加强那些已在人和家禽中引起疾病的 AIVs 的检测,以便为预防和控制禽流感提供准确的流行病学信息。

参考文献

- [1] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 2005, 79 (5):2814-2822.
- [2] 仇保丰,刘武杰,彭大新,胡顺林,刘秀梵.近年来华东地区家鸭中禽流感的亚型分布. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(10):1290-1294.
- [3] 刘秀梵.家养水禽在我国高致病性禽流感流行中的作用. *中国家禽 (China Poultry)*, 2004, 26(12):1-5.
- [4] Chen R, Holmes EC. Frequent inter-species transmission and geographic subdivision in avian influenza viruses from wild birds. *Virology*, 2009, 383 (1):156 - 161.
- [5] 仇保丰,刘武杰,唐应华,胡顺林,彭大新,刘秀梵.华东地区家鸭中 N2 亚型低致病性禽流感病毒神经氨酸酶基因的重排. *中国兽医杂志 (Chinese Journal of Veterinary Medicine)*, 2009, 45(1):3-5.

- [6] 彭宜, 薛峰, 李彦芳, 陈浩, 彭大新, 刘秀梵. 一株野鸭源 H4N6 亚型禽流感病毒 A/mallard/Yancheng/2005 的全基因组克隆和序列分析. 畜牧兽医学报 (*Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*), 2009, 40 (5):548-553.
- [7] 薛峰, 彭宜, 张小荣, 姚春峰, 龙进学, 刘秀梵. 家鸭中 H8N4 亚型禽流感病毒株 A/duck/Yangzhou/02/2005 的全基因克隆和序列分析. 病毒学报 (*Chinese Journal of Virology*), 2006, 22(6):450-455.
- [8] Liu M, He S, Walker D, Zhou N, Perez DR, Mo B, Li F, Huang X, Webster RG, Webby RJ. The influenza virus gene pool in a poultry market in south central china. *Virology*, 2003, 305(2):267-75.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146(12):2275-2289.
- [10] 万春和, 傅光华, 程龙飞, 施少华, 陈红梅, 林芳, 林建生, 黄瑜. A/Chicken/Zhejiang/HJ/2007 (H9N2) 禽流感病毒全基因组测序及遗传进化分析. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2009, 17 (5):750-757.
- [11] Cheung CL, Vijaykrishna D, Smith GJ, Fan XH, Zhang JX, Bahl J, Duan L, Huang K, Tai H, Wang J, Poon LL, Peiris JS, Chen H, Guan Y. Establishment of influenza A virus (H6N1) in minor poultry species in southern China. *Journal of Virology*, 2007, 81 (19):10402-12.
- [12] Abolnik C, Bisschop S, Gerdes T, Olivier A, Horner R. Outbreaks of avian influenza H6N2 viruses in chickens arose by a reassortment of H6N8 and H9N2 ostrich viruses. *Virus Genes*, 2007, 34(1):37-45.
- [13] Hoffmann E, Stech J, Leneva I, Krauss S, Scholtissek C, Chin PS, Peiris M, Shortridge KF, Webster RG. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China; was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *Journal of Virology*, 2000, 74 (14):6309-15.
- [14] Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Chen CL, Shieh HK. Genetic and pathogenic characterization of H6N1 avian influenza viruses isolated in Taiwan between 1972 and 2005. *Avian Disease*, 2006, 50(4):561-71.
- [15] 陈妍梅, 葛万运, 黄川, 赖振屏, 樊晓晖. 广西健康青年 H9、H6 亚型禽流感病毒血清抗体调查. 中国热带医学 (*China Tropical Medicine*), 2008, 8(6):985-986.
- [16] Gillim-Ross L, Santos C, Chen Z, Aspelund A, Yang CF, Ye D, Jin H, Kemble G, Subbarao K. Avian influenza h6 viruses productively infect and cause illness in mice and ferrets. *Journal of Virology*, 2008, 82(21):10854-63.
- [17] 仇保丰, 胡顺林, 刘武杰, 唐应华, 彭大新, 刘秀梵. 六株 H4N6 亚型水禽禽流感病毒分离株 NA 基因的进化分析. 中国家禽 (*China Poultry*), 2009, 31(15):13-20.
- [18] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, Xu X, Wang J, Ma J, Fan Y, Rakestraw KM, Webster RG, Hoffmann E, Krauss S, Zheng J, Zhang Z, Naeve CW. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, 311 (5767):1576-1580.
- [19] Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *Journal of Virology*, 2004, 78(9):4892-901.
- [20] Kim JK, Negovetich NJ, Forrest HL, Webster RG. Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2009, 3(4):121-8.
- [21] Fereidouni SR, Starick E, Beer M, et al. Highly pathogenic avian influenza virus infection of mallards with homo- and heterosubtypic immunity induced by low pathogenic avian influenza viruses. *PLoS One*, 2009, 20; 4(8):e6706.
- [22] Cardona C, Xing Z, Sandrock C, et al. Avian influenza in birds and mammals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 32(4):255-273.

Characterizations of avian influenza virus H6N6 subtype isolated from domestic Muscovy duck

Chunhe Wan, Guanghua Fu, Longfei Cheng, Shaohua Shi, Hongmei Chen, Yu Huang*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: [**Objective**] To enrich the epidemiologic data of the waterfowl origin avian influenza virus (AIV). [**Methods**] The full genome of A/Muscovy Duck/Fujian/FZ01/2008 (H6N6), which was first isolated from domestic Muscovy duck in Fujian Province in southern China at 2008, was cloned and sequenced by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). [**Results**] The motif of hemagglutinin (HA) cleavage site was PSMKVIV ↓ GL, which is a molecular characteristic of low pathogenic AIV, and the intravenoys pathogenicity index (IVPI) was 0. 15. The HA gene, NP gene, M gene and PB2 gene nucleotide sequences had similarity highest with A/duck/Kingmen/E322/04 (H6N2) at 94. 2% , 95. 7% , 97. 2% and 95. 6% , shared the same phylogenetic lineage. The neuraminidase (NA) gene had similarity highest with A/duck/Eastern China/01/2007 (H4N6) at 97. 1 per cent, and also had 11 continuous amino acids (TNSTTTIINNN) deletion in the NA gene stalk region, which was first reported had deletion 11 amino acids in N6 subtype AIV NA genes' ORF. The NA gene had familiar phylogenetic relationship with H4N6 subtype AIV. The NS gene, PB1 gene and the PA gene had genetically close relationships with the H5N1 high pathogenic AIV strains isolated in Hong Kong at 1997. The eight genes also showed any immediate ancestor with other H6N6 subtype avian influenza viruses isolated in North America. [**Conclusion**] These data showed that A/Muscovy Duck/Fujian/FZ01/2008 (H6N6) was possibly a reassortant virus derived from H6N2 subtype, H4N6 subtype and H5N1 subtype AIV.

Keywords: Muscovy duck origin avian influenza virus; H6N6 subtype; full genome; molecular characterization; gene reassortant.

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Science and Technology Development of China (2006BAD06A01), the Key Program of Fujian Province (2009N4001) and the Chinese Universities Scientific Fund (2010KLEP001)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-591-87572396; E-mail: huangyu_815@ 163. com

Received: 6 April 2010/Revised: 28 April 2010