



研究报告

2017–2019 年我国南方地区高致病性 H5N6 亚型禽流感病毒血凝素蛋白分子特征分析

邓斐 祁贤* 余慧燕 王慎骄 黄昊昀 许可 鲍倡俊

江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009

摘要:【背景】自 2014 年以来, H5N6 禽流感病毒在我国家禽和活禽市场持续进化, 成为人类和动物健康的重大威胁。【目的】对 2017–2019 年中国南方地区 93 株高致病性 H5N6 禽流感病毒的 HA 基因进行分子进化分析。【方法】接种 9–11 日龄鸡胚分离核酸检测阳性的 H5N6 标本, 运用下一代测序平台对病毒分离物进行全基因组测序, 从 NCBI 和 GISAID 数据库下载参考序列, 利用 BLAST、MEGA 6.1 及 ClustalX 等软件进行序列分析。【结果】2017–2019 年, 从 189 份江苏省 H5 亚型禽类/环境标本和 1 名 H5N6 患者咽拭子标本中共分离到 43 株病毒, 完成了 33 株 H5N6 病毒的全基因组测序。下载网上同时期中国其他地区流行的 H5N6 毒株序列, 对总计 93 株 H5N6 病毒的 HA 基因进行分子进化分析。93 株 H5N6 病毒中有 78 株属于 Clade 2.3.4.4h, 9 株病毒属于 Clade 2.3.4.4e, 4 株 H5N6 病毒属于 Clade 2.3.4.4b, 1 株属于 Clade 2.3.4.4f, 1 株属于 Clade 2.3.4.4g。所有 93 株病毒 HA 蛋白的裂解位点含有多个碱性氨基酸, 表明它们都属于高致病性禽流感病毒。所有 93 株病毒 HA 蛋白的 Q222 和 G224 位氨基酸没有发生突变, 保留了禽类受体 $\alpha 2-3$ 半乳糖苷唾液酸(SA $\alpha 2-3$ Gal)结合特性; 158 位点丧失糖基化, 同时 124 位出现一个新的潜在糖基化位点。【结论】2017–2019 年间中国南方地区 H5N6 病毒进化活跃, 具有明显的基因多样性, 需要加强对病毒分子进化的监测。

关键词: 禽流感病毒, H5N6 亚型, 血凝素, 分子进化

Molecular characteristic of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza A H5N6 viruses in live-poultry market, 2017–2019, Southern China

DENG Fei QI Xian* YU Huiyan WANG Shenjiao HUANG Haodi XU Ke
BAO Changjun

Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Abstract: [Background] Since 2014, H5N6 avian influenza virus has continued to evolve in domestic poultry and live-poultry markets, becoming a major threat to human and animal health. [Objective] To

Foundation items: Science and Technology Demonstration Project for Emerging Infectious Diseases Control and Prevention (BE2017749); Key Medical Discipline of Jiangsu Science and Technology Project, Epidemiology (ZDXKA2016008)

*Corresponding author: Tel: 86-25-83759337; E-mail: qixiansyc@163.com

Received: 10-05-2020; Accepted: 24-07-2020; Published online: 20-10-2020

基金项目: 江苏省重大科技示范项目新发传染病防控(BE2017749); 江苏省医学重点学科流行病学(ZDXKA2016008)

*通信作者: Tel: 025-83759337; E-mail: qixiansyc@163.com

收稿日期: 2020-05-10; 接受日期: 2020-07-24; 网络首发日期: 2020-10-20

analyze the molecular characteristic of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins of highly pathogenic avian influenza H5N6 viruses from 19 human cases. **[Methods]** Whole-genome sequences of original specimen and virus isolates were obtained by next-generation sequencing technology. Pairwise sequence alignments and phylogenetic analysis were performed by BLAST, MEGA 6.1 and ClustalX softwares. **[Results]** In 2017–2019, 43 viruses were isolated from 189 H5 subtype poultry/environmental samples and 1 H5N6 patient throat swab samples, and 33 H5N6 viruses were sequenced. Based on the sequence of H5N6 virus collected on the internet, the HA gene of 93 H5N6 viruses was analyzed. Among 93 H5N6 strains, 78 belong to 2.3.4.4h, 9 belong to 2.3.4.4e, 4 belong to 2.3.4.4b, 1 belong to 2.3.4.4f, 1 belong to 2.3.4.4g. The cleavage sites of HA proteins of all 93 strains contain several basic amino acids, indicating that they are highly pathogenic avian influenza viruses. Q222 and G224 amino acids of HA protein of all 93 viruses did not mutate, which retained the binding characteristics of avian receptor α 2-3 galactoside sialic acid (SA α 2-3Gal); 158 sites lost glycosylation, and 124 sites showed a new potential glycosylation site. **[Conclusion]** From 2017 to 2019, the evolution of H5N6 virus infection in China is active, and there is obvious genetic diversity. It is necessary to strengthen the monitoring of the evolution of H5N6 viruses in China.

Keywords: avian influenza virus, H5N6 subtype, hemagglutinin, molecular evolution

流感病毒分类上归属于正粘病毒科, 包括甲、乙、丙、丁 4 个属^[1]。与乙型、丙型和丁型流感不同, 甲型流感病毒有多个血清型, 能感染人和多种动物, 是威胁人类和动物健康的重要病原。血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)是甲型流感病毒的 2 个糖蛋白, 位于病毒粒子的囊膜上^[1-3]。HA 和 NA 是流感病毒血清型分类的主要依据, 已经在自然界中鉴定了 18 种 HA 亚型和 11 种 NA 亚型, 除了存在于蝙蝠中的 H17N10 和 H18N11 亚型外, 其他亚型(H1-16、N1-9)病毒的自然宿主主要是野生水禽(主要涉及雁形目和鸕形目)^[1-2]。自然状态下, 流感病毒通常很少外溢跨物种传播, 禽流感病毒跨种感染人的事件很少发生^[3]。1997 年香港禽流感感染人事件发生以来, 人感染禽流感病毒的病例时有发生, 禽流感病毒逐渐成为重要的人兽共患病原体^[4]。已有文献报道人感染的禽流感病毒有多个亚型, 包括 H5Ny (y=1, 6)、H9N2、H7Ny (y=2, 3, 7, 9)、H4N8、H6N1 和 H10Ny (y=7, 8)等^[5-6]。

根据禽流感病毒对鸡的健康危害程度, 学界将禽流感病毒分为 2 种致病类型, 包括低致病性禽流感病毒(Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAI)和高致病性禽流感病毒(Highly Pathogenic Avian

Influenza Virus, HPAI)^[3-4]。HPAI 病毒主要在 H5 和 H7 亚型中被发现, 是由 LPAI 病毒在 HA 蛋白裂解位点插入多个碱性氨基酸突变而来^[3]。1996 年东亚首株 HPAI H5N1 病毒在我国广东的发病鹅群中被分离到, 被命名为 A/Goose/Guangdong/1/1996 (Gs/GD)^[4]。目前 Gs/GD 后代病毒已经在全球许多地方流行, 包括欧亚、非洲和北美, 对全球的公共卫生和动物健康构成了严重威胁^[7]。通过分析 H5 亚型 Gs/GD 及其子代病毒 HA 基因在全球的分子进化, WHO/FAO/OIE 等国际组织的相关专家团队绘制了 10 个主干进化系, 包括 Clade 0 和 Clade 1–9, 其中部分主干进化系又进一步分出多个亚系^[8]。2008 年, 在我国家禽中发现 Clade 2.3.4.4 H5Ny (y=1, 2, 5, 6, 8)病毒的出现^[7]。随着病毒的持续进化, 从 2014 年开始, H5N6 亚型病毒逐渐取代 H5N1 病毒成为我国家禽和活禽市场中流行的主要病毒^[9-11]。

本研究在活禽市场禽流感监测的基础上, 对 2017–2019 年间中国南方地区 93 株 H5N6 禽流感病毒 HA 基因的分子特性进行分析, 以期在了解病毒进化规律的基础上制定合理的防控措施。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

H5N1 亚型流感病毒核酸分型检测试剂盒, 江

苏硕世生物科技股份有限公司; QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen 公司; SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System 和 High Pure PCR Product Purification Kit, Invitrogen 公司; Nextera XT DNA Sample Preparation Kit, Illumina 公司。Illumina MiSeq 平台, Illumina 公司; 荧光定量 PCR 仪, ABI 公司。

1.2 标本

2017 年 1 月–2019 年 9 月, 江苏省 13 地级市 CDC 流感监测网络实验室收集到活禽市场标本共计 17 050 份。通过荧光定量 PCR 技术对标本进行甲型流感病毒及 H5、H7 和 H9 亚型分型检测。所有甲型流感病毒核酸阳性标本送到本实验室进行复核和病毒分离。

1.3 病毒分离

将 H5 亚型阳性标本, 接种 9–11 日龄的无特定病原体(Specific Pathogen-Free, SPF)鸡胚尿囊腔。每个标本接种 3 个鸡胚, 每个鸡胚接种标本 200 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养, 每天观察鸡胚生长情况, 72 h 收获鸡胚尿囊液。病毒分离工作都在江苏省疾控中心生物安全三级实验室里完成。

1.4 病毒基因组测序

病毒基因组 RNA 的提取按照核酸提取试剂盒操作流程进行。采用以病毒 RNA 为模板扩增单链 cDNA, 反转录引物采用甲型流感病毒基因组扩增通用引物 U12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3')^[12], 反应体系采用单链合成试剂盒。以 U12 为引物、以病毒 8 个 RNA 节段为模板进行反转录 PCR 扩增, PCR 反应条件见文献[12], 采用试剂盒纯化 PCR 产物。测序文库的构建采用 Illumina 公司的试剂盒, 把 800 μ L 测序文库混合样加到测序平台的样品孔中, 按照说明书完成基因测序, 测序数据处理分析采用 CLC Genomics Workbench (CLC Bio)程序软件。

1.5 进化分析

从 NCBI 和 GISAID 网站上下载到 71 株中国其他研究团队上传的 H5N6 病毒分离株 HA 序列, 这些毒株分离自环境、禽类和人。其他参考株序列分

别来自 NCBI 和 GISAID 网站, 其中, Clade 2.3.4.4 的 7 个毒株被 WHO 列为 H5 流感病毒候选疫苗毒株, 包括 A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)、A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5N8)、A/duck/Hyogo/1/2016 (H5N6)、A/Guangdong/18SF020/2018 (H5N6)、A/chicken/Vietnam/NCVD-15A59/2015 (H5N6)、A/Fujian-Sanyuan/21099/2017 (H5N6) 和 A/Hubei/29578/2016 (H5N6)。核苷酸和氨基酸序列同源性分析采用 MegAlign Program 软件(DNAStar)进行。运用 ClustalX 1.83 法进行序列排列比对, Maximum Likelihood 法进行基因进化树分析(MEGA 6.1)^[13]。

2 结果与分析

2.1 江苏省活禽市场禽流感病毒流行情况

2017 年 1 月–2019 年 9 月, 本实验室收集到来自江苏省活禽市场甲型流感病毒核酸检测阳性标本, 通过荧光定量 PCR 进行 H5、H7 和 H9 亚型分型检测, 其中 H9 亚型 1 662 份(9.7%)、H5 亚型 189 份(1.1%)、H7 亚型 541 份(3.1%)。H7 亚型病毒的检出主要集中在 2017 年 1 月–2017 年 6 月(50 株), 2018 年 1–12 月份共检测出 15 份, 从 2019 年 2–9 月, 没有 H7 病毒检出。自 2017 年 7 月, H9 和 H5 亚型成为江苏省活禽市场流行的主要亚型病毒。此外, 2018 年江苏省发生一起长三角地区首例人感染 H5N6 死亡病例。

2.2 病毒分离和序列测定

从 189 份 H5 亚型禽类/环境标本和一名 H5N6 患者咽拭子标本中共分离到 43 株病毒。按照标本采集的时间和地点, 对其中有代表性的 33 株病毒(包括 1 株人分离株)进行全基因组测序并上传 GISAID 网站。本研究首先对 33 株病毒进行初步序列分析, 如果有些毒株序列相似性高达 99.9%–100%, 基因进化树分析遗传关系较近, 则只选择 1 个代表序列。根据这个原则, 对最终选出的 22 株序列进行 HA 分子特性分析。通过 NCBI 和 GISAID 网站的在线软件 BLASTn 对病毒的 8 个基因片段序列进行相似性分析, 结果表明 22 株

分离株与 H5 亚型的 HA 片段高度相似(99%), 初步判定属于 H5 亚型。此外, 22 株分离病毒 HA 片段的核苷酸相似性为 99.1%–99.5%。

2.3 HA 基因系统发生分析

鉴于 H5N6 病毒在全球的传播和快速进化, 2019 年 WHO 等国际组织对 2.3.4.4 H5Nx 病毒 HA 基因的分子进化进行分析, 命名了 8 个 Sub-Clade (2.3.4.4a–2.3.4.4h)。本研究对 2017–2019 年中国南方地区 93 株 H5N6 病毒(包括本实验室分离测序的 22 株)的 HA 基因进行系统进化分析(图 1), 其中 93 株 H5N6 病毒有 78 株属于 2.3.4.4h, 进一步分为 4 个亚系: h1 (1 株)、h2 (6 株)、h3 (7 株)和 h4 (64 株)。此外, 9 株病毒属于 2.3.4.4e, 4 株 H5N6 病毒属于 2.3.4.4b, 1 株分离自湖南某环境的 H5N6 病毒属于 2.3.4.4f, 1 株从江西鸵鸟体内分离的 H5N6 病毒属于 2.3.4.4g。结果表明, 2017–2019 年间, 中国流行的 H5N6 禽流感病毒主要属于 Clade 2.3.4.4h, 同时也存在其他一些亚系的散在流行。

2.4 HA 蛋白分子特征分析

多个碱性氨基酸出现在所有 93 株病毒 HA 蛋白的裂解位点处, 这是高致病性禽流感病毒的分子标记。此外, 93 株分离病毒的 HA 裂解位点氨基酸的构成表现为一定的多态性, 具有 3 种构成方式, 其中 89 株是 RERRRKR↓G, 3 株病毒(EV/Changzhou/088/2017, EV/Fujiansanyuan/08/2017 和 Fujiansanyuan/21099/2017)为 REKRRKR↓G, 2 株病毒(Quail/GX/GX-2/2017 和 EV/Guangdong/C17285051/QY/7017-1-17)为 KERRRKR↓G。目前已经鉴定出 HA 蛋白与受体结合相关的一些氨基酸突变, 能够改变病毒对人类受体唾液酸 α 2-6 半乳糖苷(SA α 2-6Gal)和禽类受体唾液酸 α 2-3 半乳糖苷(SA α 2-3Gal)的亲和力。这些氨基酸位点突变包括 S133A、T156S、Q222L、S/R223N、G224S、P235S 和 E251K 等, 特别是 Q222L 和 G224S 突变在 2 种不同受体亲和力的转变中发挥的作用最为关键^[14]。本研究中, 所有病毒 HA 蛋白的 Q222 和 G224 位氨基酸没有发生突变, 保留了禽类受体 α 2-3 半乳糖苷

唾液酸(SA α 2-3Gal)结合特性; 但 223 位有 6 种氨基酸突变, 分别为: S (69 株)、R (17 株)、G (5 株)、Q (9 株)、C (5 株)、H (1 株)。此外, 所有 93 株病毒 HA 蛋白都有 S133A 和 T156S 突变, 表明这些病毒有一定的 SA α 2-6Gal 受体结合能力。93 株分离株的 HA 蛋白 160 位氨基酸发生突变(T→A), 158N 位点失去糖基化, 有研究认为这可能增强了 HA 与人受体 SA α 2-6Gal 的结合力^[15-17]。93 株中有 75 株病毒的 HA 蛋白缺失了 126E 位氨基酸, 导致 124N 位出现一个新的潜在糖基化位点, 这是 H5N6 禽流感进化的一个新特征。2017–2019 年中国南方 H5N6 禽流感病毒 HA 蛋白关键氨基酸位点分析见表 1。

3 讨论与结论

研究表明, 自 2017 年 7 月开始, 江苏省活禽市场 H7 亚型病毒的检出率急速下降, 从 2018 年到 2019 年 1 月间, 仅有散在的 H7 阳性标本检出。从 2019 年 2 月到 2020 年 9 月没有检出 H7 亚型病毒。2017 年 7 月开始, 中国在家禽中推广使用 H7/H5 双价灭活疫苗用来预防 H7N9 和 H5 亚型禽流感。2017 年下半年以来, H7 亚型病毒在江苏活禽市场的减少乃至消失可能与上述家禽 H7/H5 疫苗免疫行动有关。与 H7 亚型不同, 虽然我国家禽业长期使用 H5 亚型疫苗且疫苗株随着流行株抗原性的改变不断更新, 但 H5N6 病毒自 2014 年以来一直在活禽市场中存在。最近 Bai 等^[18]研究发现, 2014 年以来, 广东活禽市场上的 H5N6 病毒 HA 蛋白已经发生抗原漂移, 2018 年的流行株对疫苗株 A/Chicken/Guizhou/4/2013 的抗原匹配性下降, 需要制定新的防控措施。

自 2008 年 Clade 2.3.4.4 H5Ny 禽流感病毒出现以来, H5N6 病毒逐渐取代 H5N1 病毒成为东亚地区流行的优势亚型。Lee 等根据 H5Ny (主要是 H5N6 和 H5N8 亚型)的进化情况将 HA 基因划分出 4 个进化组, 包括 Group A (Buan-Like)、Group B (Gochang-Like)、Group C 和 Group D^[7,19]。病毒在之后的传播过程中其 HA 基因快速进化, 出现了许多新的基因亚型。2019 年 WHO 等国际组织对 Clade

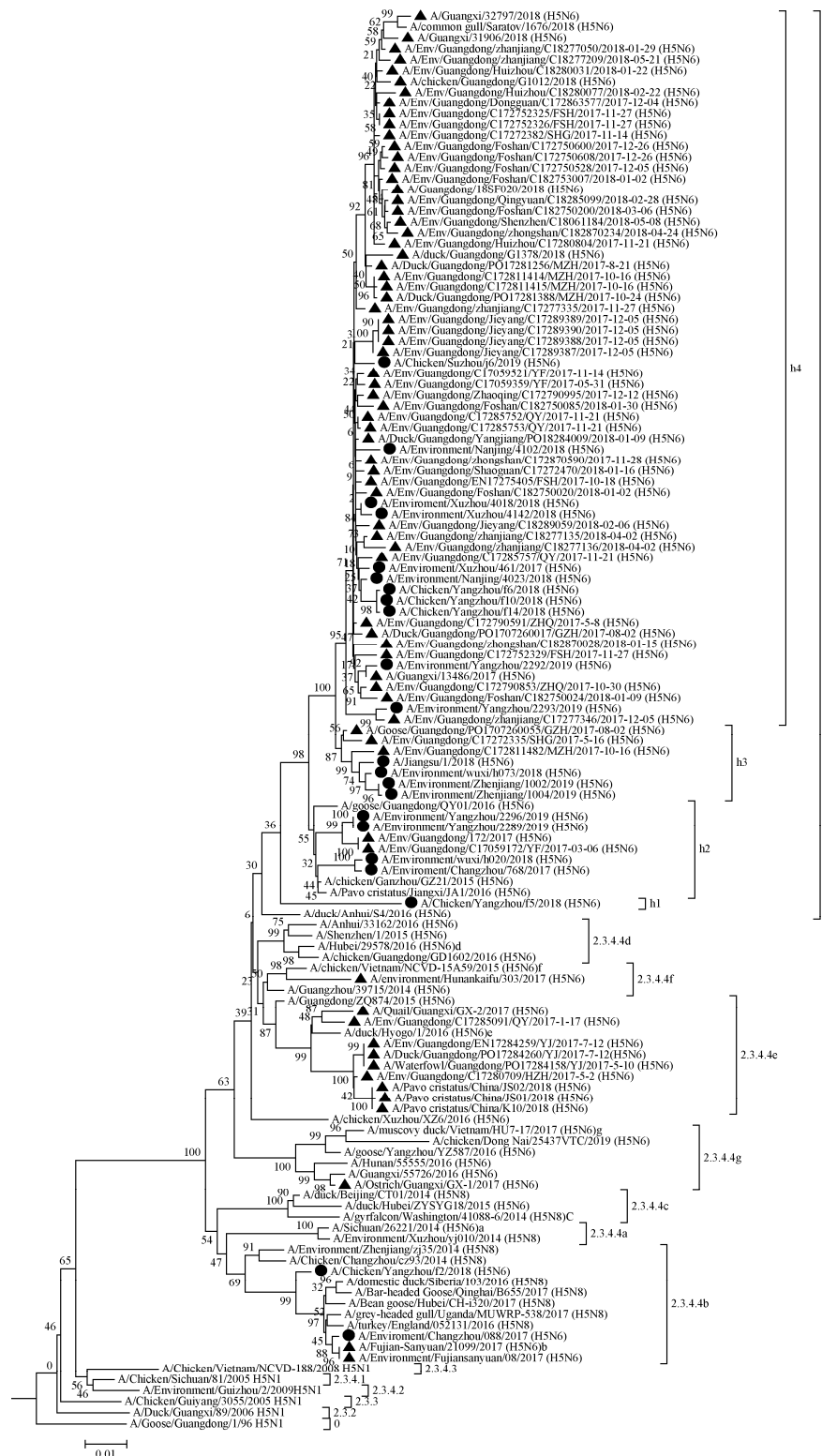


图 1 2017–2019 年中国南方 H5N6 禽流感病毒 HA 基因进化树

Figure 1 Phylogenetic analysis of HA genes of H5N6 viruses, 2017–2019, Southern China

注: ●: 2017–2019 年江苏分离株; ▲: 2017–2019 从网上下载的除江苏外的 H5N6 毒株

Note: ●: The H5N6 viruses from Jiangsu, 2017–2019; ▲: The H5N6 viruses from the other regions except for Jiangsu, 2017–2019

表 1 2017–2019 年中国南方 H5N6 禽流感病毒 HA 蛋白关键氨基酸位点分析
Table 1 Key amino acid mutations of the 93 H5N6 viruses, 2017–2019, Southern China

位点突变 Mutation	生物学功能 Biological function	93 株 H5N6 病毒位点突变(毒株数量) The HA mutation of 93 H5N6 viruses (the number of isolates)
S133A	受体结合位点: 增强病毒对人受体	A (93)
T156A	SA α 2-6Gal 的亲合力	A (93)
Q222L	Receptor-binding site: enhancing the binding	Q (31)
S/R223N	for human receptor SA α 2-6Gal	S (69), R (17), G (5), Q (9), C (5), H (1)
G224S		G (93)
P235S		P (93)
E251K		E (93)
T156A	丧失 154 位糖基化位点 Lossing 154 site glycosylation	A (93)
126E 缺失 126E deletion	获得 124 位糖基化位点 Having a novel 124 site glycosylation	Deletion (75), E (18)
HA0 裂解为 HA1 和 HA2 HA0 divided into HA1 and HA2	含有多个碱性氨基酸, 病毒对鸡高致病性 Showing multiple basic amino acids and highly pathogenic to chicken	REKRRK↓G (2), RERRRK↓G (25), REKRRKKR↓G (2), RETR↓G (2)

2.3.4.4 病毒重新分为 8 个 Sub-Clade (2.3.4.4a–2.3.4.4h)。目前, 2.3.4.4a 病毒主要在南亚的印度和孟加拉国流行。2.3.4.4b (Group B)和 2.3.4.4c (Group A)主要由 H5N8 组成, 最先于 2013 年末在中国和韩国被检出。2014 年末, 2.3.4.4c H5N8 病毒在韩国禽类中暴发, 同时传播到北美和欧洲。2.3.4.4a (Group D)最早于 2013–2014 年在中国出现, 并于 2014 年在中国四川引致首例人感染 H5N6 病例 (A/Sichuan/26221/2014); 之后, 我国大陆没有关于 2.3.4.4a 病毒的流行的报道, 但近年来在中国台湾的家禽中有检出的报道(H5N2/N5)。自 2014 年以来, 中国和东南亚家禽中流行的 H5Ny 主要是 Group C H5N6 病毒, 目前已经由 Group C 进化出 5 个 WHO 命名的 Sub-Clade (2.3.4.4d–2.3.4.4h)。本研究发现, 2017 年以来, 这 5 个 Sub-Clade 在中国大陆都有流行, 其中 Clade 2.3.4.4h 是占优势的 H5N6 基因型且该基因型有了进一步分化的趋势, 未来该类病毒的进化值得关注。2013–2014 年 2.3.4.4b H5N8 病毒首次在禽类中出现, 此后较长一段时间里没有再发现此类病毒的流行。2016 年 5–6 月, 2.3.4.4b H5N8 病毒出现在我国青海湖和跨境蒙古与俄罗斯 2 国的乌布苏湖的候鸟中, 不久此类病毒通过候鸟迁徙等途径传播到中亚国家、欧洲大陆以及北非^[7,20]。

2017 年末, HA 基因来源于 2.3.4.4b H5N8 的基因重配 H5N6 亚型禽流感病毒在欧洲、日本和韩国禽类中被检出, 而且病毒的基因组构成有一定的基因多样性特点^[21]。值得注意的是, 本研究发现 4 株 H5N6 病毒属于 2.3.4.4b, 其中 1 株病毒引起人的感染 (A/Fujian-Sanyuan/21099/2017), 这也是该基因型首次感染人的毒株。显然, 在野禽中流行的 Clade 2.3.4.4b H5N8 病毒已经通过基因重配方式在我国家禽中产生新的 H5N6 病毒。目前尚不清楚 Clade 2.3.4.4b H5N6 病毒在中国家禽和野禽中的流行情况, 未来需要进一步加强监测。

HA 蛋白在病毒感染细胞、跨种传播和宿主免疫应答中发挥重要作用^[3,14]。因此, HA 蛋白的突变在病毒的进化过程中最受关注。HA 唾液酸受体结合特性和糖基化特征是流感病毒跨种传播的关键^[14,22]。本研究中, 虽然 93 株病毒 HA 蛋白的 Q222 位和 G224 位氨基酸未发生突变, 对禽类受体 SA α 2-3Gal 结合力较强; 但同时发现有 S133A 和 T156S 突变, 表明这些病毒对人受体 SA α 2-6Gal 也有一定的结合能力, 跨种感染人的能力在增强。此外, 93 株分离株 HA 蛋白的 158 位点丧失糖基化, 同时 124 位出现一个新的潜在糖基化位点, 这一新的糖基化特征对病毒致病性和传播力的影响尚不

清楚。

截止到 2019 年,中国共发生 24 例人感染 HPAI H5N6 病例^[23]。与人感染 H5N1 (病死率 52.8%)和 H7N9 (病死率 39.2%)相比,人感染 H5N6 禽流感的病死率略高(65%)^[23-24]。H5N6 病毒在我国活禽市场中持续存在,对人类健康和公共卫生造成重大威胁,需要继续加强对禽流感病毒的监测,密切关注病毒的演化。

REFERENCES

- [1] Tong SX, Zhu XY, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen XF, Recuenco S, Gomez J, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): e1003657
- [2] Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(5): 2814-2822
- [3] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Microbiology Reviews*, 1992, 56(1): 152-179
- [4] Peiris JSM, De Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(2): 243-267
- [5] Jiang H, Lai SJ, Qin Y, Zhang ZJ, Feng LZ, Yu HJ. A review of global human infection with avian influenza and epidemiological characteristics[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(19): 2104-2115
- [6] Deng F, Peng JF, Cui LB, Qi X, Wang SJ, Yu HY, Xu K, Huo X, Bao CJ. Genetic origin of avian influenza A H7N4 virus causing a case of human infection in China, 2018[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2018, 38(9): 665-672 (in Chinese)
邓斐, 彭杰夫, 崔仑标, 祁贤, 王慎骄, 余慧燕, 许可, 霍翔, 鲍倡俊. 1 例人感染 H7N4 禽流感病毒分子溯源研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(9): 665-672
- [7] Lee DH, Bertran K, Kwon JH, Swayne D. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(S1): 269-280
- [8] WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(7): e1
- [9] Qi X, Cui LB, Yu HY, Ge YY, Tang FY. Whole-genome sequence of a reassortant H5N6 avian influenza virus isolated from a live poultry market in China, 2013[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(5): e00706-14
- [10] Bi YH, Chen QJ, Wang QL, Chen JJ, Jin T, Wong G, Quan CS, Liu J, Wu J, Yin RF, et al. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 810-821
- [11] Sun WQ, Li JX, Hu J, Jiang DX, Xing CN, Zhan TS, Liu XF. Genetic analysis and biological characteristics of different internal gene origin H5N6 reassortment avian influenza virus in China in 2016[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 219: 200-211
- [12] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Archives of Virology*, 2001, 146(12): 2275-2289
- [13] Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 214
- [14] Suttie A, Deng YM, Greenhill AR, Dussart P, Horwood PF, Karlsson EA. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(6): 739-768
- [15] Herfst S, Schrauwen EJA, Linster M, Chutinimitkul S, De Wit E, Munster VJ, Sorrell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-1541
- [16] Russell CA, Fonville JM, Brown AEX, Burke DF, Smith DL, James SL, Herfst S, Van Boheemen S, Linster M, Schrauwen EJ, et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1541-1547
- [17] Zhang W, Shi Y, Lu XS, Shu YL, Qi JX, Gao GF. An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level[J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1463-1467
- [18] Bai R, Sikkema RS, Li CR, Munnink BBO, Wu J, Zou LR, Jing Y, Lu J, Yuan RY, Liao M, et al. Antigenic variation of avian influenza A (H5N6) viruses, Guangdong province, China, 2014-2018[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(10): 1932-1935
- [19] Lee DH, Bahl J, Torchetti MK, Killian ML, Ip HS, DeLiberto TJ, Swayne DE. Highly pathogenic avian influenza viruses and generation of novel reassortants, United States, 2014-2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(7): 1283-1285
- [20] Li MX, Liu HZ, Bi YH, Sun JQ, Wong G, Liu D, Li LX, Liu JX, Chen QJ, Wang HZ, et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus in wild migratory birds, Qinghai Lake, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(4): 637-641

- [21] Poen MJ, Venkatesh D, Bestebroer TM, Vuong O, Scheuer RD, Munnink BBO, De Meulder D, Richard M, Kuiken T, Koopmans MPG, et al. Co-circulation of genetically distinct highly pathogenic avian influenza A clade 2.3.4.4 (H5N6) viruses in wild waterfowl and poultry in Europe and East Asia, 2017-18[J]. *Virus Evolution*, 2019, 5(1): vez004
- [22] Qi X, Bao CJ. Glycoylation evolution of HA protein of influenza A H1N1 pdm09 virus and its biological significance[J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2019, 30(1): 65-69 (in Chinese)
祁贤, 鲍倡俊. 甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 HA 蛋白糖基化进化及其生物学意义[J]. *江苏预防医学*, 2019, 30(1): 65-69
- [23] Gu HW, Qi X, Chen LY, Bao CJ. Molecular characteristic of the two surface glycoproteins of highly pathogenic avian influenza A H5N6 viruses from human, 2014-2018, China[J]. *Chinese Journal of Disease Control & Prevention*, 2020, 24(4): 456-461 (in Chinese)
顾宏伟, 祁贤, 陈磊垚, 鲍倡俊. 人感染高致病性 H5N6 禽流感病毒表面糖蛋白分子进化特征[J]. *中华疾病控制杂志*, 2020, 24(4): 456-461
- [24] Bi YH, Tan SG, Yang Y, Wong G, Zhao M, Zhang QC, Wang Q, Zhao XN, Li LQ, Yuan J, et al. Clinical and immunological characteristics of human infections with H5N6 avian influenza virus[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 68(7): 1100-1109

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wsxwtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

