

云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS 基因进化分析

肖雪 张文东 段博芳 赵焕云 刘庆亮 胡挺松 邱薇
冯子良 郑颖 范泉水 张应国 张富强

【摘要】 目的 阐明云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS1、NS2 基因变异特征及遗传进化关系。方法 在云南边境地区采集境外家禽和野生鸟类棉拭子样品,经 H5N1 亚型特异性多重 RT-PCR 检测,阳性样品对病毒 NS 基因进行扩增,克隆至 pMD18-T 载体测序,获得 NS1、NS2 基因序列,并与已知参考毒株序列进行序列比对及系统发育分析。结果 自 1240 份样品中检出 H5N1 亚型阳性样品 71 份,阳性率为 5.72%;30 份代表性阳性样品病毒 NS 基因测序获得 17 种序列,存在 3 个不同进化(亚)分支(I-1、I-2、II);NS1/NS2 基因与病毒血凝素(HA)基因呈现不同进化关系;NS1 蛋白涉及核定位信号区、RNA 结合区、效应区及其他致病性相关的关键性氨基酸位点存在替代或突变。结论 云南边境地区 H5N1 亚型病毒 NS1/NS2 基因具有遗传差异,2010 年以来 NS 基因进化分支 I-2、II 已成为当地流行的优势毒株。

【关键词】 禽流感病毒; H5N1 亚型; 非结构蛋白 1; 非结构蛋白 2 或核输出蛋白; 遗传分析

Genetic evolution of non-structural gene among avian influenza H5N1 viruses isolated from the boundary of Yunnan province XIAO Xue^{1,2}, ZHANG Wen-dong¹, DUAN Bo-fang², ZHAO Huan-yun², LIU Qing-liang^{1,2}, HU Ting-song³, QIU Wei³, FENG Zi-liang³, ZHENG Ying³, FAN Quan-shui³, ZHANG Ying-guo², ZHANG Fu-qiang². 1 Yunnan Agriculture University, Kunming 650223, China; 2 Yunnan Provincial Centre for Animal Disease Control and Prevention; 3 Chengdu Military Regional Centre for Disease Control and Prevention

This work was supported by grants from the Science and Technology Projects in Yunnan Province (No. 2012CH002) and the National Nonprofit Scientific Research Industry-Special Fund (No. 201103008).

Corresponding author: ZHANG Fu-qiang, Email: zfq1968@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To elucidate the characteristics of variation and the genetic evolution of non-structural protein (NS1, NS2) genes related to avian influenza subtype H5N1 viruses isolated from the boundary region of Yunnan province. **Methods** Swab samples were collected from foreign poultry and wild birds in the boundary regions of Yunnan province and screened by H5/N1 subtype-specific multiplex RT-PCR. The NS segment of H5N1 virus from the positive samples were amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T vectors for sequencing. The alignment and phylogenetic analysis on those available NS1, NS2 genes were performed with sequences of the known reference strains. **Results** 71 positive samples were identified from 1240 samples, with the positive rate as 5.72%. Fourteen different NS segment sequences were obtained from 30 representative positive samples and could be divided into 3 distinct clades or sub-clades (I-1, I-2 and II), by phylogenetic analysis. The NS1/NS2 genes and Hemagglutinin (HA) genes of H5N1 viruses from the boundary regions of Yunnan province showed different relationships regarding the characteristics on genetic evolution. The substitution or mutation of key amino acids sites had been noticed in the nuclear location signal domains, effect domain, and other pathogenicity markers. **Conclusion** NS genes of H5N1 subtype viruses in boundary region of Yunnan province showed genetic divergence and the virus of clade I-2 and II had become dominant epidemic strains in this region since 2010.

【Key words】 Avian influenza virus; H5N1 subtype; Non-structural protein 1; Non-structural protein 2 or Nuclear export protein; Genetic analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.018

基金项目: 云南省科技计划(2012CH002); 国家公益性行业科研专项(201103008)

作者单位: 650223 昆明, 云南农业大学(肖雪、刘庆亮); 云南省动物疫病预防控制中心(肖雪、张文东、段博芳、赵焕云、刘庆亮、张应国); 成都军区疾病预防控制中心(胡挺松、邱薇、冯子良、郑颖、范泉水、张富强)

通信作者: 张富强, Email: zfq1968@yahoo.com.cn

与我国云南省接壤或相邻的东南亚及南亚国家已成为全球高致病性禽流感流行的主要区域,并逐渐显现地方流行态势^[1-5]。禽流感病毒(AIV)属正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒成员,其基因序列第 8 节段分别指导翻译两种非结构蛋白(NS)即 NS1、NS2。NS1 包含 230~237 个氨基酸,在流感病毒复制中发挥重要作用,干扰或抑制宿主细胞 mRNA 拼接、蛋白翻译及蛋白激酶活性,对细胞凋亡呈现负调控,同时能拮抗 I 型干扰素的抗病毒感染作用;NS2 或 NEP 由 121 个氨基酸组成,与病毒基质蛋白 1(M1)、细胞输出因子(CEF)共同介导子代病毒核糖核蛋白复合物(vRNP)的输出^[6,7]。本研究对云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS1、NS2 基因进行克隆、测序、序列比对及系统发育分析,以探讨 2008—2012 年该地区 H5N1 亚型流感病毒 NS1、NS2 基因变异特征及遗传进化关系。

材料与方法

1. 样品:2003—2012 年采自云南边境地区家禽和野禽喉气管组织棉拭子样品 1240 份,置总 RNA 裂解液中灭活后,低温运送至实验室;大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室制备、保存;pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。

2. 主要试剂:DL2000 DNA Marker、总 RNA 提取液(TaKaRa RNAiso Reagent)、病毒 RNA/DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Viral DNA/RNA Extraction Kit Ver.3.0)、TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)、Premix Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、小量柱式质粒纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;感受态细胞制备试剂购自北京博大泰克生物基因公司;氯仿、异丙醇采用分析纯试剂。

3. 研究方法:

(1)RT-PCR 及多重 RT-PCR:按照试剂盒操作手册,自棉拭子样品病毒裂解液中提取总 RNA,采用本课题组已建立的 H5/N1 亚型特异性 RT-PCR 及多重 RT-PCR 进行检测^[8]。

(2)NS 基因的扩增、纯化:参照文献设计引物^[9], BM-NS-1:5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TG-3', BM-NS-890R:5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3',引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。自多重 RT-PCR 阳性核酸样品中扩增病毒 NS 全基因。对 RT-PCR 产物进行凝胶切割纯化,电泳分析

定量后稀释至 50 ng/ μ l。

(3)重组质粒构建和鉴定:取 1 μ l 纯化产物与 1 μ l pMD18-T 载体(50 ng/ μ l)进行连接反应,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,孵育后,涂布于 Ampicilin 抗性平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,经 PCR 对单个菌落进行鉴定。阳性菌落接种 5 ml 含 Ampicilin 的 LB 营养液中培养增殖,提取质粒,经电泳分析确认后,送北京三博科技有限公司测序。

(4)序列比对、同源性及系统发育分析:采用 DNAMAN 等分子生物学软件进行序列比对、同源性及系统发育分析。

结 果

1. RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测:采用 H5/N1 亚型特异性 RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测 1240 份棉拭子样品,H5N1 阳性 71 份,阳性率为 5.72%。选择时间、地点、宿主不同的阳性样品 17 份,对病毒 NS 基因进行克隆、测序。

2. NS 基因测序及 NS1、NS2 基因拼接:基于 NS 基因测序结果,截取 27~704 nt、27~56 nt/514~849 nt 拼接 NS1、NS2 基因,分析发现 2003—2012 年云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS1、NS2 基因具有遗传差异,17 份样品 NS1、NS2 基因测序结果存在 17 种不同序列,分别对应 Adkyn1192003、Ackkm404、Agsyn331505、Ackwenshan0206、Adkws2012050109、Ackkm1711750409、Ackkm06100109、Adkls91950409、Adkbn81850109、Ackyx020610、Ackyx040610、Ackcgyx10311、Ackhtyx10211、Ackankm10311、Adkzt66700111、Ackbs450412、Adkws40412 共 17 份代表性样品。

3. NS 基因系统发育分析:基于 17 份代表性样品中病毒 NS 基因测序数据,与 GenBank 的国内外代表毒株序列进行系统发育分析。结果发现云南边境地区 17 份阳性样品中 H5N1 亚型病毒 NS 基因属于 3 个不同进化(亚)分支(I-1、I-2、II),NS 进化分支 I-1 包含 2003—2009 年及 1 份 2012 年(Adkws40412)云南边境地区 H5N1 亚型阳性样品,与 2005 年安徽(Aanhui105)、福建(Adkfj73495)、2009 年贵州(Agz109)、湖南(Ahun209)毒株遗传关系密切;NS 的 I-2 包含 2011 年 3 份阳性样品,与 2009 年中国广西(Agx109)、2011 年越南(Amdcvietlbm6611)毒株遗传关系密切;NS II 包含大部分 2010—2012 年阳性样品,与 2011 年中国湖南(Aenvhunan32011)、2010 年老挝(Adklao47110)、

2011年印度(Ackindca030111)、2012年越南(Adcvietlbm14012)毒株遗传关系密切。与已发表的HA基因系统发育分析结果对比分析^[10-13], NS I-1包含包含HA基因进化分支1、2.4、7及部分2.3.2(2006、2009年)、2.3.4(2005、2009、2012年)毒株或阳性样品, I-2包含部分2011年HA 2.3.2、2.3.4毒株或阳性样品, II包含大部分2010-2012年HA 2.3.2毒株或阳性样品(图1和表1)。

4. NS1氨基酸序列比对分析:基于云南边境地区17份阳性样品中病毒NS1基因序列,推导其编码的氨基酸序列,并与代表毒株NS1氨基酸序列进行比对分析。结果发现,与原型毒株(1996年广东鹅H5N1亚型分离毒株,Agsgd196)比较,2003-2012年云南边境地区H5N1亚型病毒阳性样品NS1 aa80~aa84位氨基酸均存在缺失;NS进化分支I-2、II毒株或阳性样品NS1 aa70(E→D)、aa107(A→V)存在氨基酸替代;NS I-2 2011年毒株或阳性样品NS1 aa73(S→P)、aa87(D→E)、aa193(I/L→V)、aa217(M→L)、aa220(T→A)存在氨基酸替代;

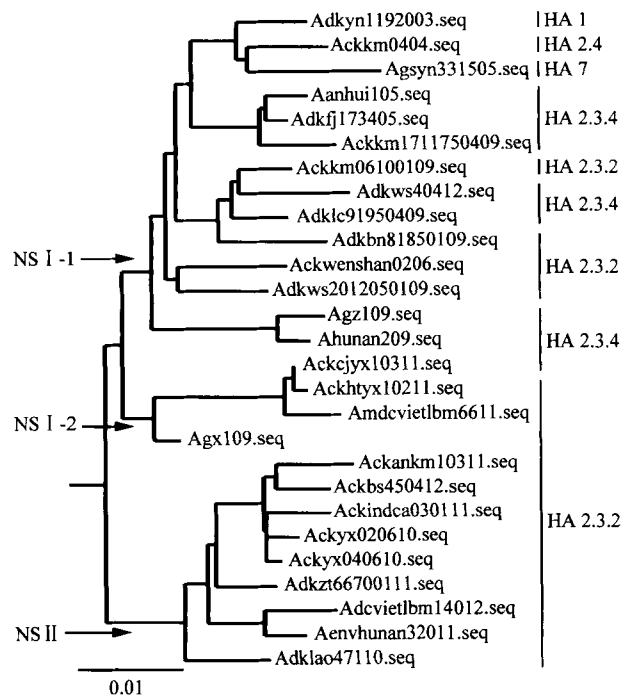


图1 云南省边境地区禽流感H5N1亚型病毒NS1基因系统发育分析

表1 H5N1病毒NS1蛋白氨基酸替代位点比对分析

病毒株	进化分支	进化分支	氨基酸残基位点																
			70	73	81	87	107	118	123	166	189	193	200	204	208	210	212	217	220
Adkyn1192003	I-1	1	E	S	A	D	A	I	I	G	V	I	S	D	P	P	N	M	T
Ackkm0404		2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Agsyn331505		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Aanhui105		2.3.4	-	-	T	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	L	-	-	-
Adkfj173405			-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
Ackkm1711750409			-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
Ackkm06100109		2.3.2	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-
Adkws40412		2.3.4	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-
Adkic91950409			-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-
Adkbn81850109		2.3.2	-	-	T	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ackwenshan0206			-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-
Adkws2012050109			-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agz109		2.3.4	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Ahunan209			-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	G	-	-	-	-	-
Ackejyx10311	I-2		D	P	T	E	V	-	-	-	-	V	N	G	-	-	-	L	A
Ackhtyx10211		2.3.2	D	P	T	E	V	-	-	-	-	V	N	G	-	-	-	L	A
Amdcvietlbm6611			D	P	T	E	V	-	-	-	-	V	-	S	-	-	-	L	A
Agx109			D	P	T	-	V	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
Ackankm10311	II		D	-	T	-	V	M	V	S	I	-	-	S	-	-	R	-	A
Ackbs450412			D	-	T	-	V	M	V	S	I	-	-	G	-	-	H	-	-
Ackindca030111			D	-	T	-	V	M	V	S	I	-	-	G	-	-	H	-	-
Ackyx020610			D	-	T	-	V	M	V	S	N	-	-	G	-	-	H	-	-
Ackyx040610			D	-	T	-	V	M	V	S	I	-	-	G	-	-	H	-	-
Adkzt66700111			D	-	T	-	V	M	V	S	I	-	-	G	-	-	-	-	-
Adcvietlbm14012			D	-	T	-	V	M	V	R	I	-	-	G	-	-	-	-	-
Aenvhunan32011			D	-	T	-	V	M	V	R	I	-	-	G	-	-	N	-	-
Adklao47110			D	-	I	-	V	M	V	S	-	-	-	G	-	-	N	-	-

NS II 毒株或阳性样品 NS1 aa118(I→M)、aa123(I→V)、aa166(G→S/R)、aa189(V→I)、aa212(N→R/H) (部分)存在氨基酸替代。氨基酸位点多样性呈现一定的进化(亚)分支特异性。部分毒株或阳性样品 NS1 aa193、aa200、aa208、aa210 也存在氨基酸多样性(表1)。

5. NS2 氨基酸序列比对分析:云南边境地区 17 份阳性样品中病毒 NS2 基因推导的氨基酸序列比对分析发现,NS 进化分支 I -2 中部分毒株或阳性样品 NS2 aa48(A→T)、aa64(K→N)存在氨基酸多样性; NS II 毒株或阳性样品 NS2 aa35(F→L)存在氨基酸多样性,其部分毒株或阳性样品 NS2 aa22(A→E)、aa59(Q→H)存在氨基酸多样性;2012 年阳性样品 (Adkws40412、Ackbs50412)在 aa115、aa116 间插入了一个氨基酸残基(F)。见表2。

讨 论

2003—2012 年云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS 基因存在遗传差异,有 3 个进化分支 (I -1、

I -2、II)。NS 进化分支 I -1 毒株 NS 基因来源于 2003、2004 年云南边境及我国部分省区禽流感 H5N1 亚型病毒;进化分支 I -2、II 毒株 NS 基因来源于 2009 年以后我国及东南亚地区 H5N1 亚型分离毒株。云南边境地区 2010 年以后与 2009 年以前 H5N1 亚型病毒 NS 基因来源不同^[14,15],进化分支 I -1 毒株 NS 基因和 HA 基因进化不同步。进化分支 I -1 毒株 HA 基因来源于不同 HA 进化分支(1、2.4、2.3.2、2.3.4、7);进化分支 I -2、II 毒株 NS 基因和 HA 基因呈现同步进化,可能分别来源于 2 个不同的原代毒株。研究表明 2003—2012 年云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒不同毒株间 HA 基因、NS 基因存在基因重排或基因重配,呈现病原生物多样性。

NS1 含有 2 个核定位信号区,分别位于 aa34 ~ aa38、aa203 ~ aa237^[6,7]。云南边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒 NS1 aa34 ~ aa38 核定位信号区非常保守,而 aa203 ~ aa225 核定位信号区变异较大,其 aa204、aa208、aa210、aa212、aa217、aa220 位点存在氨基酸多

表2 H5N1 病毒 NS2 蛋白氨基酸替代位点比对分析

病毒株	进化分支	进化分支	氨基酸残基位点												
			7	22	35	36	44	48	52	56	58	59	64	115	116
Adkyn1192003	I -1	1	L	A	F	E	S	A	M	H	L	Q	K	A	-
Ackkm0404		2.4	S	E	-	-	-	-	V	-	-	-	-	T	-
Agsyn331505		7	S	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Aanhui105		2.3.4	S	-	-	G	A	-	-	-	F	-	-	-	-
Adkfj173405			S	-	-	G	T	-	-	-	F	-	-	-	-
Ackkm1711750409			S	-	-	G	T	-	-	-	F	-	-	-	-
Ackkm06100109		2.3.2	-	-	-	G	-	-	-	Y	-	-	-	T	-
Adkws40412		2.3.4	-	-	-	G	-	-	-	Y	-	-	-	T	F
Adkic91950409			S	-	-	R	-	-	-	Y	-	-	-	-	-
Adkbn81850109		2.3.2	S	-	-	G	-	-	-	Y	-	-	-	-	-
Ackwenshan0206		-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	T	-	
Adkws2012050109		-	-	-	G	-	-	-	Y	-	-	-	T	-	
Agz109	2.3.4	S	-	-	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
Ahunan209		S	-	-	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
Ackcyjx10311	I -2		S	-	-	G	-	T	V	-	-	-	N	T	-
Ackhtyx10211		2.3.2	S	-	-	G	-	T	V	-	-	-	N	-	-
Amdcvietlbn6611			S	-	-	G	-	-	V	-	-	-	N	-	-
Agx109		S	-	-	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
Ackankm10311	II		-	E	L	G	-	-	V	-	-	H	-	T	-
Ackbs450412			S	E	L	G	-	-	V	-	-	H	-	T	F
Ackindca030111			S	E	L	G	-	-	V	-	-	H	-	-	-
Ackyx020610			S	E	L	G	-	-	V	-	-	H	-	-	-
Ackyx040610			S	E	L	G	-	-	V	-	-	H	-	T	-
Adkzt66700111			-	-	L	G	-	-	V	-	-	-	-	T	-
Adevietlbn14012			S	-	L	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Aenvhunan32011			S	-	L	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Adklao47110			S	-	L	G	-	-	V	-	-	-	-	-	-

样性,尤其是aa212及aa217、aa220位点的氨基酸多样性,呈现一定的进化分支特异性。NS1 aa1~aa73构成RNA结合区,aa73~aa225构成效应区^[6,7],云南边境地区禽流感H5N1亚型病毒RNA结合区关键性氨基酸位点均未发生替代或突变。NS1 PDZ结构域序列ESEV,具有禽源毒株氨基酸结构特征^[6,7]。NS进化分支I-2毒株NS2 aa48、aa64,II毒株NS2 aa22、aa35、aa59位点发生的氨基酸多样性,有一定的分支特异性。氨基酸多样性对病毒增殖特性、宿主适应性、致病性及毒力的影响还有待进一步研究。

NS基因系统发育分析及NS1、NS2氨基酸序列比对结果表明,2010—2012年在云南边境地区分布、流行的禽流感H5N1亚型毒株,不是2009年以前毒株的延续或再现,而是由基因重排或基因重配产生的新型毒株^[14,15],对其产生的自然因素和社会因素,及其对禽流感发生、分布、流行的影响还有待系统研究和科学评估。

参 考 文 献

- [1] Guan Y, Smith GJ, Webby R, et al. Molecular epidemiology of H5N1 avian influenza. *Rev Sci Tech*, 2009, 28(1): 39-47.
- [2] Lvov DK, Shchelkanov MY, Prilipov AG, et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005-2008). *Avian Dis*, 2010, 54(1 Suppl): 483-495.
- [3] Neumann G, Green MA, Macken CA. Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 8): 1984-1995.
- [4] Eagles D, Siregar ES, Dung DH, et al. H5N1 highly pathogenic avian influenza in Southeast Asia. *Rev Sci Tech*, 2009, 28(1): 341-348.
- [5] Chairul AN, Shinya Y, Reviany VN, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. *Virus Genes*, 2012, 44: 459-465.
- [6] Alexander CK, Wu WL, Lau SY, et al. Two-dimensional antigenic dendrogram and phylogenetic tree of avian influenza virus H5N1. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 64: 205-211.
- [7] Olga VC, Vitaliy MS, Kulyaisan TS, et al. Molecular and genetic analysis of NS gene from high pathogenic strains of the avian influenza (H5N1) virus isolated in Kazakhstan. *Gene*, 2011, 476: 15-19.
- [8] Zhang YG, Song JL, Hu YY, et al. Development of RT-PCR and multiplex RT-PCR for detecting avian influenza virus. *Chin J Vet Sci Technol*, 2005, 35(8): 600-604. (in Chinese)
张应国, 宋建领, 胡媛媛, 等. 禽流感病毒 RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测技术的建立. *中国兽医科技*, 2005, 35(8): 600-604.
- [9] Hoffmann H, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set of the full-length amplification of all influenza A virus. *Arch Virol*, 2001, 146: 2275-2289.
- [10] Ye CH, Zhang WD, Song JL, et al. Evolutionary characteristics of hemagglutinin genes of H5N1 subtype avian influenza viruses from boundary region of Yunnan province. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(6): 1216-1218, 1247. (in Chinese)
叶丛华, 张文东, 宋建领, 等. 云南边境禽流感H5N1亚型病毒血凝素基因进化特征分析. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(6): 1216-1218, 1247.
- [11] Ye CH, Zhang WD, Song JL, et al. Molecular characteristics of the hemagglutinin genes of avian influenza virus subtype H5N1 in the boundary region of Yunnan province. *Chin J Zoonoses*, 2010, 26(2): 101-106. (in Chinese)
叶丛华, 张文东, 宋建领, 等. 云南边境禽流感H5N1亚型病毒血凝素基因分子结构特征分析. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(2): 101-106.
- [12] Zhang WL, Zhang WD, Zhao HY, et al. Variation characterization of HA gene of avian influenza H5N1 virus in boundary of Yunnan province. *Chin J Prev Med*, 2012, 46(2): 177-181. (in Chinese)
张武林, 张文东, 赵焕云, 等. 云南省边境地区禽流感H5N1亚型病毒血凝素基因变异特征分析. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(2): 177-181.
- [13] Zhang WL, Zhang WD, Zhao HY, et al. Genetic diversification of avian influenza H5N1 virus in boundary areas of Yunnan province. *Chin J Epidemiol*, 2012, 33(3): 323-327. (in Chinese)
张武林, 张文东, 赵焕云, 等. 云南省边境禽流感H5N1亚型病毒遗传多样性分析. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(3): 323-327.
- [14] Hu X, Liu D, Wang M, et al. Clade 2.3.2 avian influenza virus (H5N1), Qinghai Lake region, China, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(3): 560-562.
- [15] Li Y, Liu L, Zhang Y, et al. New avian influenza virus (H5N1) in wild birds, Qinghai, China. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(2): 265-267.

(收稿日期:2012-12-24)

(本文编辑:张林东)