单位代码	10445
学 号	2021318035
分类号	Q81

山东仰轮大学 硕士专业学位论文

2021-23 年东部候鸟迁徙区候鸟 LPAIV 的监测与感染能力评价研究

Study on monitoring and infection ability evaluation of LPAIV in eastern migratory bird migration area from 2021 to 2023

学 位 类 别 : 生物与医药硕士
领 域 名 称 : 生物与医药
学 习 方 式 : 全日制
研 究 生 : 李敏
指 导 教 师 : 高玉伟研究员
提 交 时 间 : 2024 年 6月

目 录

1 绪论	1
1.1 A 型流感病毒概述	1
1.2 低致病性禽流感病毒的流行	2
1.3 鸟类宿主与禽流感病毒	4
1.3.1 候鸟迁徙与跨区域传播	4
1.3.2 生态因素对禽流感病毒的影响	6
1.4 禽流感病毒感染哺乳动物的风险	6
1.4.1 禽流感病毒的跨种传播与进化	7
1.4.2 禽流感病毒的基因突变与重组	8
2 候鸟源禽流感病毒流行病学调查研究	12
2.1 材料和方法	12
2.1.1 实验用鸡胚	12
2.1.2 主要实验试剂	12
2.1.3 主要实验仪器	12
2.1.4 候鸟样品的采集、运输和储存	13
2.1.5 禽流感病毒的分离	13
2.1.6 禽流感病毒 RNA 的提取	13
2.1.7 禽流感病毒的检测和全基因组获取	14
2.1.8 实验用血清和抗原	16
2.1.9 禽流感病毒的抗体检测	16
2.1.10	17
2.2 结果	17
2.2.1 候鸟样品采集情况	17
2.2.2 候鸟源禽流感病毒毒株分离情况	21
2.2.3 候鸟源禽流感病毒的血清学调查	24
2.2.4 斑尾塍鹬、灰斑鸻等鸻形目候鸟的实时定位追踪	26
2.3 讨论	31
2.4 小结	33
3 候鸟源 LPAIV 分离株遗传进化分析和对哺乳动物感染性研究	35
3.1 材料与方法	35
3.1.1 实验用毒株	35
3.1.2 禽流感病毒的遗传进化分析	35
3.1.3 哺乳动物感染性实验	36
3.2 结果	36

3.2.1 候鸟源H1N1禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染性
3.2.2 候鸟源 H13Nx 禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染
性43
3.2.3 候鸟源 H16N3 禽流感病毒遗传进化分析和对小鼠的感染性
3.2.4 候鸟源 H10Nx 禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染
性55
3.3 讨论
3.4 小结
4 结论与展望64
4.1 结论
4.2 展望
参考文献67

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
AIV	Avian influenza viruses	禽流感病毒
CAF	The Central Asian Flyway	中亚迁飞路线
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate	2'-脱氧核糖核苷酸 5'-三磷酸盐
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	杜尔贝科改良伊格尔培养基
d	day	天
EAAF	The East Asian - Australasian Flyway	东亚-澳大利亚迁飞路线
EID50	The 50% egg infectious dose	鸡胚半数感染量
g	gram	克
h	hour	小时
HA	Hemagglutinin	血凝素
LPAIV	Low pathogenic avian influenza viruses	低致病性禽流感病毒
min	minute	分钟
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	信使核糖核酸
M1	Matrix 1	膜蛋白1
M2	Matrix 2	膜蛋白 2
mL	mililiter	毫升
NP	Nucleoprotein	核蛋白
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NEP/NS2	Nuclear export protein	出核转运蛋白
NS1	Non-structural protein 1	非结构蛋白1
PB2	Polymerase basic protein 2	碱性聚合酶蛋白 2
PB1-F2	Polymerase basic protein 1–F2	碱性聚合酶蛋白 1-F2 蛋白
PB1	Polymerase basic protein 1	碱性聚合酶蛋白1
PA	Polymerase acidic protein	酸性聚合酶蛋白
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
rpm	revolutions per minute	转数/分
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	反转录和聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
SPF	Specific pathogen free	无特征性病原体
S	second	秒
vRNP	viral ribonucleoprotein	病毒核糖核蛋白
μL	microliter	微升

摘要

流感病毒(Influenza viruses)是人兽共患病的主要病原体之一,可在多物种或群体中 流行传播。目前,已在全球 100 多种野生鸟类中分离到流感病毒,其中雁形目 (*Anseriformes*)和鸻形目(*Charadriiformes*)被认为是禽流感病毒(Avian influenza viruses, AIV)的天然宿主。多亚型低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza viruses, LPAIV)一直在候鸟种群持续流行,并不断进化和跨种传播,持续威胁人类健康、 哺乳动物、家禽和野生鸟类安全。近年来,LPAIV跨种感染哺乳动物或人类事件频发,对 公共卫生安全造成了一定威胁。因此,开展候鸟 LPAIV 的流行、进化与传播研究具有重 要意义。本研究以 LPAIV 为研究对象,对 2021-2023 年中国东部候鸟迁徙地区(东亚一澳 大利西亚迁徙路线和西太平洋迁徙路线穿越我国的区域)候鸟携带 LPAIV 开展了周期性 监测,阐释了多宿主生态系统下候鸟中 LPAIV 的流行性、多样性和宿主特异性。通过分 子生物学方法解析不同亚型 LPAIV 的遗传进化和生物学特征。同时,利用病毒分子流行 病学方法,结合鸻形目候鸟迁飞路线进行综合分析,探讨了候鸟携带病毒迁徙跨境传入 我国可能路线。

1. 中国东部候鸟迁徙地区候鸟禽流感病毒调查研究

根据候鸟迁徙特性和鸟种分布规律,在我国东部候鸟迁徙区域,选择图牧吉国家自 然保护区,东部沿海地区庄河滩涂湿地和环渤海湾滩涂湿地等候鸟重要停歇地、繁殖地 和越冬地建立监测哨点,开展了从2021-2023年的采样监测。共采集了17目29科134种 候鸟样本58,803份,分离得到LPAIV毒株124株,分离率为0.21%,包含11种HA亚型, 7种 NA 亚型的22种亚型组合,系列研究证明了候鸟种群禽流感病毒亚型流行的多样性。 所获分离毒株宿主均为鸻形目和雁形目,其中鸻形目中亚型分布为H5、H7、H10、H11、 H13、H16 亚型毒株共31株,雁形目中亚型分布为H1、H2、H3、H6、H7、H8、H10、 H11 亚型毒株共93株,其中H13、H16和H1的分离率分别为0.025%、0.005%和0.141%, 表明LPAIV的流行率和亚型分布在不同候鸟种群之间存在差异,特别是H13和H16具有 宿主特异性的特点。然而,在候鸟血清学调查结果显示候鸟中H13、H16和H1特异性抗 体的阳性率分别为 2.28%、1.65%和 0.34%,抗体阳性率远高于病原分离率,由此可见,

Ι

LPAIV在候鸟中不断循环。候鸟不断迁徙的动态运动为禽流感病毒的传播提供了条件,本 研究根据鸻形目候鸟长距离迁徙特性、AIV易感宿主等因素选取灰斑鸻、斑尾塍鹬、红嘴 鸥、黑翅长脚鹬、半蹼鹬和鸥嘴噪鸥候鸟,通过实时定位追踪的方法追踪到了它们的迁 徙路线,跨越了AIV影响的8个国家(中国、俄罗斯、蒙古、美国、澳大利亚、新西兰、 韩国、朝鲜)以及东南亚地区,其中斑尾塍鹬从我国鸭绿江出发,飞往美国最西北端的 阿拉斯加繁殖,然后直接从繁殖地斜跨太平洋到新西兰越冬,越冬结束后飞往我国鸭绿 江口,完成一周期迁徙:灰斑鸻从我国鸭绿江出发,飞往俄罗斯远东地区繁殖一个月后, 飞回鸭绿江口附近繁殖,冬季飞往我国江苏东部沿海地区越冬,部分灰斑鸻飞往东南亚 菲律宾地区越冬,来年春季往北迁飞,北迁到达上海崇明东滩停歇,继续北迁开始新一 轮迁徙: 红嘴鸥从环渤海湾滩涂湿地繁殖地出发南迁到达安徽、湖北省内湖泊越冬,春 季往北迁飞到中西伯利亚高原繁殖,夏季返回环渤海湾滩涂湿地繁殖地,开始下一轮迁 徙; 黑翅长脚鹬从环渤海湾滩涂湿地繁殖地出发一路南迁出境, 飞往泰国、缅甸等东南 亚地区越冬,来年春季飞回环渤海湾滩涂湿地;半蹼鹬从环渤海湾滩涂湿地停歇地出发, 南迁到福建省东部沿海地区越冬: 鸥嘴噪鸥从环渤海湾滩涂湿地繁殖地出发一路南迁, 停歇盐城市东部沿海地区,南迁到菲律宾地区越冬,提示 LPAIV 会随候鸟迁徙跨洲际传 播。

2. 候鸟源禽流感病毒 H1N1、H10Nx、H13Nx、H16N3 的遗传进化特征研究

系统发育分析表明,候鸟源 H1N1、H10Nx 亚型禽流感毒株为多亚型重组毒株,内部 基因来源复杂,具有基因遗传多样性。候鸟源 H13Nx 亚型分离株未发现与其他亚型发生 重组现象,H16N3 分离株内部片段与 H13Nx 亚型毒株密切相关,之间存在频繁的基因交 流。ZH1902 和 ZH186 毒株的 PB2 基因,ZH385、ZH5299、ZH987、DZ137 毒株的 NA 基 因,DZ137 毒株的 PB1 基因,DZ137 和 C701 毒株的 NP 基因片段与美洲谱系毒株遗传关 系较近,可能发生了美洲谱系毒株独立片段的引入事件。毒株进化来看,我国病毒毒株 主要与蒙古、韩国、俄罗斯亚洲地区、孟加拉国等地区毒株关系密切,与我们标记的候 鸟迁徙区域高度相似,提示已由候鸟迁徙网络形成包括我国在内的局域性相对稳定的传 播圈。

3. 候鸟源 H1N1、H13Nx、H10Nx、H16N3 毒株的哺乳动物感染性评估

Π

小鼠感染性实验结果显示候鸟源 H1N1 分离株 ZH1902、TJ141、TMJ1994、TMJ679 均能够感染小鼠肺组织,其中 TJ141 在小鼠感染第五天的肺组织中病毒滴度最高,达 6.4 log10EID₅₀/mL,除脑组织和肠道外,心脏、肝脏、肾脏、脾脏、鼻甲骨也发现病毒低水 平复制;H10N5 分离株 TMJ1098 可不经适应的情况下直接感染小鼠,且在小鼠多组织中 复制;表明候鸟源H1N1和H10N5 亚型病毒分离株可以不经适应的情况下直接感染小鼠, 表现出良好的哺乳动物适应性。H10N4 分离株 TMJ2193 和 H16N3 分离株 CZ1481 可在小鼠肺中以低水平复制,对感染哺乳动物具有一定风险。H13N6 分离株 ZH5299、H13N8 分离株 CZ949 和 H16N3 分离株 CZ1491 在心脏、肝脏、肾脏、脾脏、鼻甲骨、脑和肠道均 未检测到病毒复制,表明目前 H13Nx 和部分 H16N3 分离毒株不能在小鼠体内有效复制,还未获得直接感染哺乳动物模型的能力。

综上,本研究系统分析了途经我国东部候鸟迁徙区候鸟携带 LPAIV 的分子流行病学特征、评价了对哺乳动物模型的感染风险,对于了解病毒如何采用不同的策略使其保持在自然界中并跨越物种屏障的潜在进化机制和病毒引入新的宿主广泛传播的机制有一定参考价值。

关键词:低致病性禽流感病毒;候鸟迁徙;遗传进化;跨种传播

中国知网 https://www.cnki.net

III

Abstract

Influenza viruses are one of the main pathogens of zoonotic diseases, which can spread in many species or groups. At present, influenza viruses have been isolated from more than 100 species of wild birds in the world, among which Anseriformes and Charadriiformes are considered as natural reservoir of Avian influenza viruses (AIV). Low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) have been continuously prevalent in migratory birds, and the continuous evolution and cross-species spread of the virus continue to threaten human health, the safety of mammals, poultry and wild birds. In recent years, the cross-species infection of low pathogenic avian influenza virus to mammals or humans has occurred frequently, which poses a certain threat to public health and safety. Therefore, it is of great significance to study the prevalence, evolution and spread of low pathogenic avian influenza virus in migratory birds. In this study, AIV was taken as the research object, and the situation of migratory birds carrying AIV in the migratory areas of eastern China (the East Asia-Australasia migration flyway and the Western Pacific migration flyway pass through China's region) from 2021 to 2023 was monitored periodically, which explained the prevalence, diversity and host specificity of low pathogenic avian influenza among migratory birds in multi-host ecosystem. The genetic evolution and biological characteristics of different subtypes of LPAIV were analyzed by molecular biology methods. At the same time, using the method of virus molecular epidemiology, combined with the comprehensive analysis of the migration route of the migratory birds of Charadriiformes, the possible route of the migratory birds carrying the virus across the border into China was revealed.

1. Epidemiological investigation of avian influenza in migratory birds in eastern China

Under the background of global migratory birds migration, according to the migratory characteristics of migratory birds and the distribution law of bird species, Tumuji National Nature Reserve, Zhuanghe tidal flat wetland in the eastern coastal area, Bohai Bay tidal flat wetland and other important resting places, breeding places and wintering places were selected to set up monitoring posts, and active early warning monitoring was carried out for three years from 2021 to 2023. A total of 58,803 samples of 134 species of migratory birds belonging to 17 orders and 29 families were collected, and 124 strains of LPAIV were isolated, with a separation rate of 0.21%, including 11 subtypes of HA and 7 subtypes of NA. A series of studies proved the diversity of avian influenza virus subtypes in migratory birds. Statistical analysis showed that the hosts of the isolated strains were both *Anseriformes* and *Charadriiformes*, and 90 strains were H1, H2, H3, H6, H7, H8, H10 and H11 subtypes in *Anseriformes*. However, the serological survey of migratory

birds showed that the positive rates of H13, H16 and H1 specific antibodies were 2.28%, 1.65% and 0.34% respectively. Combined with the virus isolation, the antibody positive rate is much higher than the pathogen isolation rate, so it can be seen that the infection rate of LPAIV in migratory birds can not be fully reflected by the pathogen isolation rate, and the distribution of LPAIV and its subtypes in migratory birds should be analyzed by combining the antibody positive rate. The dynamic movement of migratory birds provides conditions for the spread of avian influenza virus. In this study, based on the long-distance migration characteristics of ostriches, AIV susceptible hosts and other factors, Black-bellied Plover, Bar-tailed Godwit, Asian Dowitcher, Black-headed Gull, Gull-billed Tern, Black-winged Stilt migratory birds were selected and tracked by real-time positioning and tracking methods. They span eight countries(China, Russia, Mongolia, the United States, Australia, New Zealand, South Korea and North Korea.) affected by AIV and Southeast Asia. It has important reference value for revealing the possible route of migratory birds carrying virus to cross-border migration and introduce into China. Gray spotted plovers set out from Yalu River in China and flew to the Russian Far East for breeding for one month, then flew back to the mouth of Yalu River to breed, and flew to the eastern coastal areas of Jiangsu Province in winter to overwinter. Some gray spotted plovers flew to the Philippines in Southeast Asia for wintering, and moved north next spring, stopping at Chongming Dongtan in Shanghai, and continuing to move north to start a new round of migration. Red-billed gull started from the breeding ground of tidal flat wetland around Bohai Bay and moved south to the lakes in Anhui and Hubei provinces for wintering. In spring, it moved north to the Central Siberian Plateau to breed, and returned to the breeding ground of tidal flat wetland around Bohai Bay in summer to start the next round of migration. The black-winged long-legged sandpiper moved southward from the breeding ground of the tidal flat wetland around Bohai Bay, flew to Southeast Asia such as Thailand and Myanmar for the winter, and flew back to the tidal flat wetland around Bohai Bay in the spring of next year. Half-webbed snipe started from the beach wetland stop in Bohai Bay and moved south to the eastern coastal area of Fujian Province for the winter. Gull-billed noise gull started from the breeding ground of tidal flat wetland in Bohai Bay and moved southward, stopping in the eastern coastal area of Yancheng City, and moved southward to the Philippines for the winter.

2. Genetic evolution of avian influenza viruses H1N1, H10Nx, H13Nx and H16N3 from migratory birds

Phylogenetic analysis showed that the H1N1 and H10Nx subtype avian influenza strains from migratory birds were multi-subtype recombinant strains with complex internal gene sources and genetic diversity. The H13Nx subtype isolate from migratory birds has not been recombined with

other subtypes. The internal fragment of H16N3 isolate is closely related to H13Nx subtype strain, and there is frequent gene exchange between them. PB2 gene of ZH1902 and ZH186 strains, NA gene of ZH385, ZH5299, ZH987 and DZ137 strains, PB1 gene of DZ137 strains, NP gene fragments of DZ137 and C701 strains are closely related to the American lineage strains, and the introduction of independent fragments of American lineage strains may have occurred. From the evolution of virus strains, the virus strains in China are closely related to those in Mongolia, South Korea, Russia, Asia, Bangladesh and other regions, which are highly similar to the migratory bird migration areas marked by us, suggesting that a relatively stable local transmission circle including China has been formed by migratory bird migration networks.

3. Evaluation of mammalian infectivity of H1N1, H13Nx, H10Nx and H16N3 strains from migratory birds

The experimental results of mice infectivity showed that H1N1 isolates ZH1902, TJ141, TMJ1994 and TMJ679 from migratory birds could infect the lung tissue of mice, among which TJ141 had the highest virus titer in the lung tissue of mice on the fifth day of infection, reaching 6.4 log10EID₅₀/ml. Besides brain tissue and intestine, low-level virus replication was also found in heart, liver, kidney, spleen and turbinate. H10N5 isolate TMJ1098 can directly infect mice without adaptation and replicate in multiple tissues of mice. The results showed that H1N1 and H10N5 virus isolates from migratory birds could directly infect mice without adaptation, showing good mammalian adaptability. H10N4 isolate TMJ2193 and H16N3 isolate CZ1481 can replicate at a low level in mouse lungs, which has a certain risk of infecting mammals. H13N6 isolate ZH5299, H13N8 isolate CZ949 and H16N3 isolate CZ1491 have not detected virus replication in heart, liver, kidney, spleen, turbinate, brain and intestine, which indicates that H13Nx and some H16N3 isolates can not be effectively replicated in mice at present, and the ability to directly infect mammalian models has not been obtained.

In conclusion, this study systematically analyzed the molecular epidemiological characteristics of LPAIV carried by migratory birds in the migratory areas of eastern China, and evaluated the infection risk of mammalian models, which has certain reference value for understanding the potential evolutionary mechanism of how to keep the virus in nature and cross the species barrier by adopting different strategies and the mechanism of introducing new hosts and spreading it widely.

Key words: Low pathogenic avian influenza virus; Migratory birds migrate; Genetic evolution; Cross-species spread

1 绪论

1.1 A 型流感病毒概述

A型流感病毒(IAV)的基因组是由 8 个单股负链 RNA 片段组成,PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M和NS蛋白质为 RNA 片段的主要编码蛋白^[1],根据其病毒表面蛋白分为亚型:血凝素(hemagglutinin,HA)和神经氨酸酶(neuroaminidase,NA)^[2]。目前有 18 种已知的 HA 亚型和 11 种已知的 NA 亚型,野生水生鸟类中存在大量抗原性多样化的 A 型流感病毒库,已鉴定出 16 种 HA 和 9 种 NA 亚型,已知 A 型流感病毒在七种不同的动物物种或群体中传播,包括人类、野生水鸟、家禽、猪、马、狗和蝙蝠^[3,4]。其已从全球各地100 多种不同种类的野生鸟类中分离出来^[5],湿地和水生环境中的 *Anseriformes* 和*Charadriiformes* 鸟类,如野鸭、天鹅、海鸥和涉禽等被认为是禽流感病毒的天然宿主^[2,6]。

流感病毒是目前存在的重要病原体之一,也是人畜共患病的主要威胁之一,A 型流感 病毒的 8 个单股负链 RNA 片段编码多种与病毒感染性、致病性、传播性相关的功能蛋白, 包括 RNA 聚合酶复合体蛋白(由 PB2、PB1 和 PA 3 种蛋白组成的负责病毒基因组的转录 和复制的复合体蛋白)、血凝素 HA(主导与宿主细胞表面糖蛋白或糖脂分子末端的唾液 酸受体结合,在酸性条件下诱导膜融合的 I 型跨膜蛋白)、核蛋白 NP(在病毒复制过程中 运输载体,具有核定位信号)、神经氨酸酶 NA (在病毒感染后期出牙释放过程中,切割 宿主细胞表面和新生病毒粒子表面的唾液酸的表面糖蛋白,是典型的Ⅱ型糖蛋白)、基质 蛋白 M1(参与 vRNP 复合体输出细胞核的过程、病毒包装和形态发生过程的病毒蛋白)、 M2 蛋白 (金刚烷类抗流感病毒药物的靶蛋白,作用于病毒粒子的包装和出芽过程)、非 结构蛋白 NS1(对抗宿主天然免疫,抑制干扰素的产生)、非结构蛋白 NEP/NS2 蛋白(调控 病毒基因组复制过程种聚合酶的活性)、PB1-F2蛋白(部分病毒的此蛋白与流感病毒在体 内的复制动力学有关,还可以增强病毒的致病性)、PA-X蛋白(病毒感染后降解宿主 mRNA,达到抑制细胞表达的目的)、其他病毒蛋白(N40、PA-N155、PA-182、M42、 NS3等可能调控病毒复制的蛋白)^[7,8]。HA蛋白在病毒宿主特异性和致病性方面发挥着重 要的作用,能否有效地结合宿主细胞成为病毒传播的关键,而 NA 蛋白与 HA 蛋白的活性 平衡有助于病毒的吸附与释放,对于病毒传播以及后续致病性至关重要^[9,10]。聚合酶蛋白

1

对于流感病毒在宿主体内的复制有着一定的调控作用,其他功能蛋白在感染宿主、宿主间传播和致病性方面也发挥着重要作用。



图 1-1 甲型流感病毒的复制和抗原分类^[3]。 Fig. 1-1 Replication and antigenic classification of influenza A viruses^[3].

1.2 低致病性禽流感病毒的流行

低致病性禽流感病毒已从多物种中分离出来,包括人类、猪、马、水貂、猫科动物、海洋哺乳动物、家禽和野生鸟类^[11],研究表明,已从 26 科的至少 105 种野生鸟类中分离出 LPAIV^[6]。对于甲型流感病毒 H1N1 亚型,已在众多不同物种宿主内形成独立循环的基因型,包括人季节性流感的存在,大多 H1N1 病毒在猪群以及人群中被发现,但在对家禽与鸟类的监测中也不时监测到禽源 H1N1 的存在。GSIAID 数据库公开序列显示,全球禽类 H1Nx 亚型毒株主要为 H1N1 毒株,占比 69.3%,其次是 H1N2 和 H1N3 亚型毒株,占比 8%左右,宿主涉及家禽和野鸟,野鸟占比 86%左右,主要 Anas platyrhynchos (绿头鸭),主要流行地区为北美洲,流行占比 46%,家禽种群检测到 H1 亚型毒株的地区主要是欧亚地区,尤其是亚洲地区,占比 50%,其中我国占比 32%,是家禽 H1Nx 主要流行地区。

已从全球不同野鸟体内监测并分离出 H10 亚型毒株,1949 年在德国的鸡中首次检测 到 H10N7 亚型病毒^[12,13]。1953 年,在北美加拿大地区首次发现欧洲以外 H10Nx 感染^[14], 禽流感 H10 病毒自 1965 年以来已在全球加拿大、韩国、瑞典、意大利、美国、南非和日 本等地区被检测到^[15-17]。1984 年瑞典的水貂(Mustela vison)爆发严重呼吸道疾病,可能 与 H10N4 亚型禽流感病毒有关,这是已知的首次在陆生哺乳动物物种中暴发的甲型禽流 感病毒感染,可能的解释是携带病毒的鸟类通过粪便将其传播给同生境的水貂^[18, 19]。 2008年,在中国湖北省的猪身上分离出一种 H10N5病毒,该毒株八个基因片段与欧亚谱 系禽流感病毒密切相关^[20]。2014年,H10N7 AIV 在欧洲海豹(Phoca vitulina)中引起暴发 和死亡,海豹 H10 病毒株的基因片段与同时在野生鸟类中传播的 H10 病毒的基因片段相 关^[21, 22]。近年来,禽源性 H10 AIV 已被证明能够感染人类,并随后构成潜在的公共卫生 威胁。2004年,在埃及发现了 H10N7 流感病毒,自此次检测以来,H10N7 AIV 还在全球 范围内引起了散发的人类感染,2010年,H10N7 亚型流感病毒导致悉尼家禽屠宰场工人 感染。2013年 12月,中国首次报道了一种新型 H10N8 流感病毒感染人类病毒。2021年、 2023年,江苏省和浙江省分别发现了人感染 H10N3 和 H10N5 病毒。以上 H10Nx 亚型 A 型流感病毒感染哺乳动物和偶发感染人事件的发生,提醒 H10Nx 亚型毒株已经对哺乳动 物及人造成了不可预估的潜在威胁,需要对其进行密切监测。

低致病性 H13 AIV 于 1977 年首次从美国的海鸥中分离出来^[23],并且很少在除 Charadriiformes 以外的鸟类物种中检测到,该病毒在海鸥和燕鸥种群中得以维持^[24]。自 1977 年首次发现以来,H13 病毒已在北美、南美、欧洲、亚洲、非洲和大洋洲被发现^[25], 我国的青海湖、山东省、辽宁省等地均监测到H13病毒^[26]。目前,H13AIV已多样化为欧 亚和北美谱系,对于H13和H16,分别至少有三个和两个不同的遗传分支是显而易见的, 由于鸟类迁徙,这些谱系之间偶尔会发生重组,发生洲际之间的基因流动,H13 和 H16 病毒鉴定出了洲际基因流事件,然而八个基因片段全部进行洲际传播的情况很少,H13 和 H16亚型病毒毒株的内部基因在遗传上密切相关^[27,28]。有研究表明海鸥宿主是鸭子和滨鸟 的病毒来源,鸭子和滨鸟可以迅速转变为病毒储存宿主,进一步对病毒进行传播,但它 们对海鸥外部持续传播 H13 和 H16 的贡献有限,同样,H13 和 H16 的宿主范围仅限于水 鸟,很少有溢出到家禽(特别是火鸡)^[29]。GSIAID 数据库公开序列显示,全球禽类 H13 亚型毒株主要为H13N6毒株,占比48.3%,其次是H13N2和H13N8亚型毒株,分别占比 17.8%和 20.2%, 主要为野生鸟类宿主, 其中红嘴鸥占上风, 仅有 1%的亚洲地区家禽偶发 感染,欧洲西北部荷兰地区是主要流行地区,其次是北美美国地区,总占比高达72%。全 球禽类 H16 亚型毒株主要流行亚型为 H16N3, 占比高达 96.5%, 还有 H16N8、H16N9 等 亚型被零星发现,欧洲荷兰地区和北美美国地区是主要流行地区,在我国及周边地区仅

3

中国知网 https://www.cnki.net

偶发,目前仅在鸟类中发现,宿主主要是红嘴鸥和灰翅鸥。虽然没有证据表明 H13、H16 亚型低致病性禽流感亚型病毒对野生鸟类或人类构成威胁,但有助于了解地区禽流感病 毒的生态学和进化,并为研究野生鸟类迁徙与病毒传播的相关性提供一定基础。

除上述低致病性禽流感病毒亚型外,还有 H3、H4、H6、H7、H9、H1 等对家禽和野 鸟有重要威胁的 LPAIV 在全球流行。

1.3 鸟类宿主与禽流感病毒

1.3.1 候鸟迁徙与跨区域传播

野鸟是禽流感病毒的天然宿主,也是 LPAIV 传播的关键宿主,大部分具有迁徙特性, 占据季节性栖息地的鸟类其迁徙范围包括短距离迁徙、长距离迁徙及跨洲际迁徙,迁徙 路线和地理距离可能是鸟类之间 AIV 基因流动的障碍之一^[30]。现己证实全球约有 9 条候 鸟迁徙路线,自西向东,有 4 条路线穿越我国,分别是西亚一东非迁徙路线、中亚迁徙路 线(CAF)、东亚一澳大利西亚迁徙路线(EAAF)和西太平洋迁徙路线。东亚一澳大利西亚迁 徙路线和西太平洋迁徙路线穿越我国的区域是我国候鸟种类和数量最多的迁徙区。沿候 鸟迁徙路线迁徙的鸟类建立了国家间的连通性^[31]。鸟类的迁飞路线构成一个复杂的动态 迁徙网络,在全球的主要的迁徙路线上,在迁徙时间和空间上,多种鸟类种群出现交汇, 且鸟类在迁徙过程中经常中途停留,许多物种聚集在中途停歇点或过冬点,导致当地鸟 类的高密度分布,野生鸟类迁徙有可能使病毒长距离传播并将它们引入新的种群,特别 是在迁徙飞行路线重叠的地方,北极和亚北极地区被认为是 IAV 洲际运动和重组的生态驱 动因素^[32, 33]。病毒传播的成功取决于易感宿主的可感染性和宿主对病毒的暴露,在迁徙 运动中,野鸟可能携带禽流感病毒,尤其是不会显著影响鸟类健康但会干扰迁徙的低致 病性禽流感病毒,轻度至中度感染鸟类可能只是飞行的轻微障碍,候鸟不断迁徙的动态 运动为禽流感病毒的传播提供了条件^[2,33,34]。

根据病毒学数据和卫星遥测研究,许多研究将候鸟迁徙与禽流感传播联系起来。 2005年4月下旬至6月期间在在我国西部青海湖的野生鸟类种群中爆发的H5N1病毒,导 致 6000多只鸟类死亡,受感染的主要受害者是斑头雁(Anser indicus)和棕头鸥(Larus brunnicephalus, Laridae),其中斑头雁占死亡数的 50%以上^[35,36]。同时段,在周边地区发 现与其相似基因型的 H5N1。青海湖是分布在中亚地区的棕头鸥、斑头雁的重要聚集地和 繁殖地,斑头雁从每年9月开始,南迁徙到缅甸,然后越过喜马拉雅山迁徙到印度,大约 在4月左右返回青海,每年需要穿越两次世界上最高大的喜马拉雅山脉,棕头鸥的飞行路 线涉及 7 个国家中国、泰国、柬埔寨、缅甸、孟加拉国、印度和越南,这些国家都受到 HPAIVH5N1 的影响,青海湖暴发的 H5N1 病毒可能通过共享栖息地、越冬地、繁殖区或 中途停留地的鸟类的飞行路线传播的[35,37]。2014年1月在韩国家禽中暴发后,H5N8亚型 (分支 2.3.4.4) 病毒在 2014-2015 年迅速传播到全球,有研究表明, HPAIVH5N8 病毒大 规模地理传播的主要途径很可能是通过受感染的迁徙野生鸟类的长途飞行,2014 年春季 迁徙期从韩国飞往北部繁殖地,然后在 2014 年秋季迁徙期繁殖地沿着迁徙路线到达北美 和欧洲的越冬地^[38]。候鸟的迁徙路径、繁殖行为、越冬和中途停留地的变化可能会导致 新的地方性动物病区的出现,并对与迁飞路线重叠的地区的家禽构成重大威胁^[39]。加强 对迁徙飞行路线重叠的野生鸟类的监测,可以为新病毒的传播提供早期预警^[33]。空间距 离和鸟类迁徙路线对于候鸟区域性传播禽流感病毒存在一定的生态障碍。研究禽流感病 原体的自然宿主的生态学,认识到野生鸟类在禽流感传播中可能起的作用,确定自然宿 主的迁移潜力对于禽流感的进一步监测有重大意义。 А



С



В

图 1-2 全球候鸟迁徙路线。A.基于滨鸟的迁徙路线。B.东亚-澳大拉西亚迁徙路线 (EAAF)站点网络,绿点表示迁徙水鸟的重要地点,红点表示迁徙路线站点网络中的 地点。(https://www.eaaflyway.net)C.中国候鸟迁徙区。(全国鸟类迁徙通道保护行动方 案 2021—2035 年)

Fig. 1-2 Global migration routes of migratory birds. A. Migratory routes based on shorebirds.B. The East Asian–Australasian Flyway (EAAF) site network, Green dots indicate important sites for migratory waterbirds and red dots indicate sites in the Flyway Site Network. C.

Migratory bird migration area in China.

1.3.2 生态因素对禽流感病毒的影响

东亚和白令陆桥是 AIV 生态的区域焦点,病毒的生态学受到气候和鸟类迁徙模式等 许多因素的驱动,病毒的长距离传播与大陆间和大陆内鸟类迁徙有关,而病毒重组的频 率增强与来自北美和亚洲的迁徙物种在白令海峡共享的繁殖栖息地有关[40]。气候变化似 乎推动了候鸟的不可预测的迁徙,气候和环境条件可以通过多种方式影响野生鸟类迁徙 路线的变化 (空间和时间)、野生鸟类和家养鸟类共享栖息地的改变 (主要在东亚),以 及病毒在环境中生存的能力,从而影响鸟类迁徙模式,进而影响全球 AIV 传播,气候变 化还可能会增加了跨物种病毒传播的风险^[41]。一般而言,候鸟的物种分布、迁徙路线和 行为高度依赖于气候条件,尤其是长途候鸟受食物供应季节性变化的影响^[39]。全球气温 上升可能会严重影响候鸟的地理分布及其携带的疾病,包括禽流感病毒,这可能为 AIV 的传播提供更大的机会,研究表明 AIV 的流行率与 NDVI(归一化植被指数)和候鸟丰度呈 正相关^[42]。环境在 LPAIV 的维持、传播和合并感染的可能性中起着重要作用,病毒在水 生生境中的持久性是 AIV 生态学的重要组成部分,目前尚不清楚湿地中传染性 AIV 的维 持如何影响传播动态, AIV 是否可以在湿地中长时间保持传染性, 在野生鸟类中迁徙季节 或在候鸟离开此地后会不会对周边家禽中造成一定影响[43]。生态因素的出现可能会增加 了禽流感流入未受影响地区的风险,凸显了加强对禽流感病毒监测的必要性。因此,加 强对更广泛的跨区域迁徙物种的 AIV 监测,有利于进一步了解洲际 AIV 基因交换的流动 以及病毒的生态学。

6

1.4 禽流感病毒感染哺乳动物的风险

1.4.1 禽流感病毒的跨种传播与进化

宿主物种的地理分离将流感基因库塑造成基本上独立进化的欧亚和美洲谱系,欧亚 大陆与北美之间的病毒基因流动可能会通过对易感宿主的竞争(核苷酸取代率和选择压 力的变化)导致了地方性禽流感病毒的替代,易感宿主的不连续分布可能会在谱系灭绝 发生之前产生竞争性病毒株的长期共循环,宿主和病毒生态学决定了野生鸟类中甲型流 感病毒传播,病毒对宿主资源的竞争、病毒与宿主的协同进化可能是疾病出现的重要机 制^[34, 44]。禽流感病毒(AIVs)可以进入新物种,但在许多其他动物物种中,如海洋哺乳 动物等,A型禽流感病毒偶发感染,在它们之间并未引起流行和传播。适应哺乳动物的 IAV 最初是由鸟类来源的跨物种传播引起的^[2]。美国已经报道了几例禽类与禽流感亚型 H7N7、H4N5、H4N6、H3N8 和 H3N3 的鸟类和海豹(Phoca vitulina)之间的种间传播^[45]。 自 2014 年 4 月以来,北欧一直在爆发海豹流感,2014 年 6 月 16 日至 8 月 13 日期间,丹 麦出现大量海豹死于严重肺炎,在两只海豹中分离出 H10N7 病毒,经分析海豹 HA 基因 与 A/mallard/Sweden/133546/2011(H10N4)(98.4%)和丹麦 A/mallard/Denmark/16109-4/2011(H10N6)(98.3%)的核苷酸相似性最高,因此此 H10N7 病毒可能来自禽类^[46]。 2008 年,我国猪分离株 H10N5 毒株经同源性和系统发育分析表明 HA、NA 基因来源于我 国家禽,内部片段源于陆生鸟类分离株^[20]。

从禽类传播到人的偶发感染,出现人际传播的可能性很低。2013年3月,中国上海或 安徽的三名城市居民出现快速进展的下呼吸道感染,并被发现感染了一种新型重组禽源 甲型流感(H7N9)病毒,检测结果显示此次感染与活禽市场家禽中的 LPAI H7N9 病毒有 关,虽然 LPAI H7N9 病毒感染通常不会在家禽中引起可观察到的疾病,这些病毒导致人 类严重疾病和死亡,测序分析显示,这三种病毒的所有基因均来自禽类,其中六个内部 基因来自甲型 H9N2 禽流感病毒^[47]。2019 年 2 月塞内加尔发生的一例 LPAI H9N2 病毒感 染一名接触后院家禽的轻症儿童病例。2020 年 2 月、香港报告一名可能间接接触后院家禽 的中度儿童感染 LPAI H9N2 病毒。同年,中国报告了 5 例 LPAI H9N2 病毒感染病例,其 中 4 名儿童和 1 名成人患有轻度疾病,并通过 ILI 监测发现。自 2013 年 12 月,中国首次 报道了一种新型 H10 流感病毒感染人类病毒以来^[48],2021 年 5 月中国又报道一例 LPAI H10N3 病毒感染在一名病危但康复的成年人中^[49]。2022 年 4 月,中国报告了首例人类感 染低致病性甲型 H3N8 禽流感病毒,经分析该毒株为家禽源流感病毒溢出感染所致,中国

7

鸡群中现己存在一种具有人畜共患潜力的新型 H3N8 病毒传播,它是由禽源 H3 和 N8 病毒与中国南方长期存在的地方性 H9N2 病毒之间的重组产生的,在家禽中的持续进化可能构成持续的大流行威胁^[50]。甲型流感病毒作为可以感染多种动物宿主宿主的病原体,受到宿主和病毒之间物种特异性相互作用的限制,而这种相互作用是病毒 RNA 基因组有效复制所必需的,当其穿过物种屏障时,它们会在病毒基因组中获得突变,从而使其能够与新的宿主因子相互作用,实现在新宿主体内复制^[51]。



图 1-3 流感病毒的生态学^[52] Fig1-3 Ecology of influenza viruses

1.4.2 禽流感病毒的基因突变与重组

流感病毒基因组具有快速变异、多样重组的特征,发生变异的主要形式有基因重组 和突变两种,流感病毒突变率约为4×10^{-3/}(位点•年),拥有高突变性的流感病毒使宿主 与病毒之间的相互作用变得更具有复杂性,随之而来的对病毒致病性、跨宿主传播性、 耐药性等方面发生改变,流感病毒作为一种不断进化的病原体^[53,54],它逃避最强免疫力 的能力使其能够对其宿主构成持续的威胁,得以生存^[12,55,56]。该病毒具有抗原变化的两 种主要机制,抗原漂移和抗原转变,抗原漂移是通过病毒基因组中 HA 蛋白的点突变将微 小变化引入关键病毒表位而使抗原性发生的过程;流感病毒的第二种抗原变化形式是抗 原转变,抗原转变不是随着抗原漂移而逐渐改变,而是导致基因片段 HA/NA 的完全变化 从而产生新的基因重组病毒,需要两种流感病毒的共同参与,因此具有广泛动物宿主的 甲型流感病毒是最有可能发生抗原性变化的病毒之一^[4]。 流感病毒 HA 蛋白受体结合特性是病毒宿主范围和致病性的重要决定因素, 禽流感病 毒表面 HA 蛋白与宿主细胞表面的唾液酸 a2,3 半乳糖苷酸受体结合^[54], HA 蛋白中 210 环 处产生的 Q226L 突变被证明可将与 a2,3 唾液酸聚糖结合转变为和 a2,6 唾液酸聚糖结合, 并可能增加病毒的空气传播能力, G228S 突变也表明对人 a2, 6 唾液酸受体的亲和力增强, 150 环上缺乏糖基化位点可能会降低对 a-2,3 禽类受体的亲和力^[57], 在 H5N1 禽流感病毒 的研究中 T160A、N182K、K193R、V214I、Q222L、G224S 等突变可以使病毒获得结合 人唾液酸 a2, 6-半乳糖苷受体^[58]。H5N1 禽流感病毒中研究中类似神经氨酸酶 (NA)残 基茎区氨基酸缺失被证实是导致病毒向呼吸道嗜性改变的原因或会增强病毒的复制性, 有研究表明,此缺失还可能与家禽的适应和传播有一定关联,病毒对受体的结合活性增 强,但若出现完全缺失,则病毒的生长会受到抑制^[59,60]。NA 蛋白的 H274Y 突变会导致 NA 蛋白与抑制剂的亲和性降低,HA 蛋白 T155A、R229I、S165I 等突变也可降低病毒对 NA 蛋白唾液酸酶活性的依赖,从而产生耐药性^[61,62]。

PB2 蛋白被认为是流感病毒致病性的重要决定因子,基因中的 E627K 取代与小鼠毒 力增加有关,可能会增强哺乳动物中禽流感病毒复制和病毒聚合酶活性,也有研究表明 其突变在 A 型流感病毒宿主范围中起决定作用^[63],PB2 蛋白的残基 Q591R 突变,研究表 明会导致哺乳动物适应性和潜在毒力增强^[64],对于 PB2 蛋白,反向遗传技术研究发现还 有众多突变可以促进病毒在哺乳动物宿主中的复制能力、影响病毒传播能力或者增强病 毒致病性,比如 M147L、E158G、D253N、T271A、I504V、D701N等位点突变^[65-67]。M2 蛋白 S31N 取代,可能使病毒对金刚烷胺类药物出现耐药性,V27A 位点突变也会产生此 耐药性,M1 蛋白的 N30D、T215A 突变可增强小鼠致病性^[68]。流感病毒的 PB1 蛋白是 RNA 聚合酶复合体的核心,444~446 位的 SDD 基序是发挥聚合酶催化作用的活性位点^[69], S622G 和 V709I 位点的突变,在很大程度上增强病毒对模型小鼠的致病性,同时反方向的 突变也能够极大地减弱病毒的致病性,两个位点同时突变作用则更加明显;也有研究表 明 PB1 S524G 突变增强了 H3N8 对哺乳动物的致病性和在其之间的传播能力。PA 蛋白 224 和 383 位氨基酸是影响病毒对家鸭致病性的关键位点,E18G、S388R、A448E 等位点在 H5N1 的研究中结果显示可增强小鼠的复制以及在体外人细胞中增强聚合酶活性^[70]。NP 蛋白是流感病毒 vRNP 复合体的重要组成部分,头部结构域的 3 个氨基酸 (204R、207W、

9

208R)是与聚合酶蛋白结合的重要位点,NP蛋白 I09T 的突变能够促进病毒 RNA 的合成, 增强 AIV 对鸡的致病力^[71-73]。NS1蛋白 S42P 突变会显著增强在小鼠中的致病力,第42位 的 S 不仅是 H5N1 病毒对抗宿主细胞干扰素诱导的关键,也是 NS1蛋白防止双链 RNA 介导 的 INF-k B 通路和 IRF-3 通路激活的关键,P42S、L98F 和 I101M 的突变均可以增加病毒 对小鼠的致病性^[74,75]。

由于流感病毒的基因组是由 8 个分开的 vRNA 片段组成,当宿主细胞同时被两种不同 的流感病毒感染时,可能会产生获得来自两个亲本病毒基因片段的新生子代重组病毒^[8], 基因重组是流感进化的重要驱动力,与积累适应性突变相比,基因动态重组后跨物种感 染显得更容易有效。禽流感病毒可能会在哺乳动物和人体内逐渐积累适应性突变而引起 大流行。流感病毒在复制过程中产生适应性突变而获得不同亚型之间是否能够发生基因 重组的决定性因素-RNP 复合体蛋白之间的兼容性,基因片段之间的相容性决定了基因重 组的效率^[4]。除 1918年 H1N1 西班牙流感外,1957年 H2N2 人流感病毒、1968年 H3N2 香 港病毒和 2009 年甲型 H1N1 流感病毒三次人流感大流行都是基因重组引起, 2009 年大流 行经历更为复杂的重组^[76,77]。2019年12月,在中国东部的禽流感常规监测中,从鸡身上 分离出两种内部基因来源于基因型 S(G57) H9N2 的新型重组 H10N3 病毒,与在人类中 引起致命感染的 H5N6、H7N9 和 H10N8 一致^[78,79],实验表明此 H10N3 分离株在鸡中可以 无症状脱落和和对哺乳动物的良好适应性[80]。2022年4月26日国家卫健委通报,河南省 发生一例人感染 H3N8 禽流感病例, 该禽流感病毒是家禽源 H3N8 和人源 H9N2 的重组毒 株,其HA、NA 基因源于 2020 年广东的家禽源 H3N8,另 6 个内部基因源于 2021 年的人 源 H9N2, 进一步分析 6 个基因起源于家禽 H9N2^[81]。2013 年 3 月中国感染禽源重组病毒 (H7N9) 病毒中发现血凝素(HA) 基因 210 环处的替换 Q226L(H3 编号), 150 环处发 现了 T160A 突变,神经氨酸酶 (NA) 残基 69-73 茎部区域的五个氨基酸发生缺失, M2 蛋白含有 S31N 取代,还发现 PB2 中的 89V 和 E627K 以及 NS1 中的 42S 突变^[47]。2021 年 人感染的 H10N3 病毒,发现 HA 蛋白 G228S 突变和 Q591K 突变^[49]。

不同的物种之间存在遗传和抗原差异,新获得的病毒只有在遗传变化积累后才会在 新物种中有效的复制和传播。当一种新型流感病毒积累足够的适应性突变以维持人与人 之间的传播时,可能会导致大流行,禽流感病毒的广泛传播增加了病毒演变成可能在人

10

与人之间传播的形式并引发未知规模的人类流感大流行的机会(H5N1、H7N9、H5N6 等 高致病性病毒表现更为明显)^[49, 52, 82]。对流感病毒进化、分布和传播的了解不断加深, 有助于明确大流行防范的途径,因此禽流感病毒的流行、进化与传播研究仍是目前流感 病毒研究领域的热点和重点之一。

2 候鸟源禽流感病毒流行病学调查研究

2.1 材料和方法

2.1.1 实验用鸡胚

9-11 日龄 SPF 鸡胚购自北京勃林格殷格翰维通生物技术公司。

2.1.2 主要实验试剂

Tab. 2-1 Main experimental reagents				
试剂名称				
生理盐水	辽宁民康制药有限公司			
PBS 磷酸盐缓冲液	Solarbio			
DMEM	gibco			
RDE	日本生研			
Agarose	北京全式金生物技术股份有限公司			
青霉素	山东中牧兽药有限公司			
链霉素	山东中牧兽药有限公司			
6×Super GelRed Prestain Loading Buffer	US RVERBRIGHT			
50×TAE 缓 冲 液	Solarbio			
DL2000/500 Marker	Takara			
TransStart FastPfu DNA Polymerase	北京全式金生物技术股份有限公司			
Hiscript II One Step RT-PCR Kit	Vazyme			
QIAamp®Viral RNA Mini Kit(250)	QIAGEN GmbH			

表 2-1 主要实验试剂 Tab. 2-1 Main experimental reage

2.1.3 主要实验仪器

1ab. 2-2 Main experimental instruments		
仪器名称 品牌(厂家)		
低温高速离心机	Eppendorf	
高速离心机	Thermo	
恒温金属浴	杭州米欧仪器有限公司	
基因扩增仪	杭州朗基	
生物安全柜	Baker	
组织研磨仪	Retsch	
恒温培养箱	SANTN	
高压蒸汽灭菌锅	SANYO	
超微量分光光度计	NanoPhotometer-NP80	
电泳仪 BAYGENE		
凝胶成像仪	Tanon	

表 2-2 主要实验仪器 Tab. 2-2 Main experimental instruments

2.1.4 候鸟样品的采集、运输和储存

2021-2023 年间,结合国家林业与草原局主动预警任务,本研究在途径我国的全球候 鸟迁徙路线辐射范围内选取多宿主生态系统区域(环渤海湾滩涂湿地、图牧吉国家自然 保护区),重要的候鸟停歇地、越冬地及繁殖地开展了候鸟样本采集,涉及到了我国东北 繁殖区、黄河流域迁徙和越冬区、长江流域迁徙和越冬区、东部沿海迁徙和越冬区、华 南一西南迁徙和越冬区等大部分候鸟的重要生态区,包括了辽宁省、黑龙江省、内蒙古 自治区、河南省、湖南省、湖北省、江西省、天津市、吉林省、福建省、广东省、上海 市、河北省、北京市、江苏省、山东省 16 个地理区域,并在重点地区大规模开展了禽流 感实时监测、死亡候鸟被动监测,主要为环渤海湾滩涂湿地、辽宁庄河滩涂湿地、图牧 吉国家自然保护区。结合候鸟迁徙,根据不同候鸟种类和个体差异,采用不同的捕获方 法,采集气管、泄殖腔拭子、血清样本和粪便等环境样本。采集的拭子样本及粪便样本 需放置于病毒保存液中。不明原因死亡鸟类采集的组织样本,需保存于-80℃超低温冰箱 中,未及时转运至实验室的样本需-20 ℃储存。以上所有样本运输过程中需要保持低温保 存,尽可能快的转运到实验室进行病毒检测与分离。

2.1.5 禽流感病毒的分离

采集的拭子及环境样本在涡旋振荡仪上震荡 30 s,充分混匀后,吸取混合液体与加有 抗生素的培养液混合,震荡后于4℃低温离心机 8000 rpm 离心 10 min。对于组织样本, 在超净台无菌条件下取1g左右放置于2mL研磨管中,加入无菌钢珠/锆珠和1mLDMEM, 将研磨管固定于匀浆仪中研磨组织,频率设置为 30 Hz/s,研磨时间 3 min,研磨完成后的 组织于4℃低温离心机 8000 rpm 离心 10 min。去上述离心后的上清液取 200 μL 接种于 9-11 日龄鸡胚,期间定期查看观察鸡胚状况,于 72 h 后收取血凝阳性鸡胚尿囊液,存于-80 ℃ 备用。

2.1.6 禽流感病毒 RNA 的提取

试剂盒 QIAamp®Viral RNA Mini Kit(250)用于病毒 RNA 的提取,具体步骤:

(1) 将 560 μL AVL Buffer 加入 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,然后加入 5.6 μLCarrier
 RNA(载体 RNA,用于辅助核酸沉淀),轻微吹打混匀后,加入 140 μL 分离得

到的病毒液(如果样品多于 140 μL,将 AVL 按比例增加),涡旋震荡 15 s,使 样品和 AVL Buffer 混合成均匀溶液,以确保样品的有效裂解;

- (2)室温条件下, 孵育 10 min (10 min 即可达到裂解效果, 无需进行过长时间的孵育); 瞬时离心, 将管壁与管盖上的液滴离下来;
- (3)将560μL无水乙醇加入上述裂解完溶液中,涡旋15s,瞬时离心(若样品超过 140μL,无水乙醇也应按比例增加);
- (4)将瞬离好的液体取 630 μL 加入柱子中,盖盖后 6000 g\8000 rpm 离心 1 min,转 移柱子到新的 2 mL 收集管中,丢弃含滤液的收集管;
- (5)重复上述过柱操作,保证所有液体均过柱;离心完成后,加 500 μL AW1 Buffer,
 6000 g\8000 rpm 离心 1 min,转移柱子到新的 2 mL 收集管中,丢弃含滤液的收集管(如果样品体积超过 140 μL,也无需增加 AW1 Buffer 的量);
- (6) 加入 500 μL AW2 Buffer, 14000 rpm 或 20000 g 全速离心 3 min;更换新的 2 mL 收集管,全速离心 1 min(此步空离,是为防止残留 Buffer 可能影响 RNA 的后 续使用);
- (7)将柱子转移到新的 1.5 mL 离心管中,丢弃含滤液收集管,加入 60 μL 洗脱液AVE,室温孵育 1 min, 6000 g 或 8000 rpm 离心;
- (8) 完成离心后,丢弃柱子,标记好离心管,将病毒 RNA 保存于-80 ℃备用。

2.1.7 禽流感病毒的检测和全基因组获取

运用动物流感检测 A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法 R 方法检测某批样本 中,是否存在阳性样本。试剂盒 QIAamp®Viral RNA mini Handbook 提取 RNA 后,使用 One Step PrimeScript[™] RT-PCR Kit(Takara)探针法(先使用特异性引物(反向)进行反 转录扩增,再以合成的 cDNA 为模板,以特异性引物(正向、反向)进行 PCR 反应)检 测,具体配制体系和程序条件如表 2-3。

Tab. 2-3 RT-PCR preparation system				
Component	Procedure			
2× One Step RT-PCR Buffer III	12.5 μl	Stage 1: 反转录反应		
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0.5 µl	Hold		
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 µl	42 °C 5 min		

表 2-3 RT-PCR 酉	己制体系
----------------	------

PCR Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	95 °C 10 s
PCR Reverse Primer $(10 \ \mu M)$	0.5 µl	Stage 2: PCR 反应
Probe	1 µl	Repeat: 40 times
Total RNA	2 µl	95 °C 5 s
RNase Free dH ₂ O	7.5 µl	60 °C 20 s
Total	25 µl	

对分离毒株的病毒 RNA 提取后进行用 AMV Reverse Transcriptase 反转录和 TransStart®FastPFu DNA Polymerase 试剂盒扩增,获得的 PCR 产物进一步纯化,琼脂糖 凝胶电泳鉴定后,进行胶回收,纯化后产物送至长春库美生物有限公司进行一代测序, 根据返回测序结果对毒株亚型进行初步鉴定。对于病毒全基因组的获取,我们采用 Sanger 测序和高通量测序相结合的方式。琼脂糖凝胶电泳、胶回收、全基因组的获取的 具体步骤如下。

琼脂糖凝胶电泳:

(1)根据扩增片段长度配制 1-2%的琼脂糖凝胶溶液(如 1%琼脂糖凝胶溶液为 7g 琼脂糖加 70 mL1×TAE 电泳缓冲液),制备回收胶;

(2)将 PCR 产物按比例与 6×Super GelRed Prestain Losding Buffer 混合;在回收胶 内依次加入相当的 DNA Maker 和混合后的样品;设置电泳程序,一般为 130 V, 30 min;

(3)结束电泳后,置于凝胶成像系统成像;如若条带大小正确,回收到收集管中进行胶回收。

胶回收(NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up 试剂盒):

(1)每100 mg 琼脂糖凝胶加入 200 μL Buffer NT1,对于≥2%琼脂糖的凝胶,加倍
 缓冲液 NTI 的体积 (200 μL NT1/100mg gel),在 50 °C 金属浴孵育样品 5-10 min;

(2)每2-3min对样品进行短暂的涡旋,直到凝胶片完全溶解;将≤700uL样品加入带有收集管的PCR离心柱中,11000g离心30s;丢弃收集管内液体,将离心柱放回收集管中(若样品大于700uL,重复此步骤);柱中加入700uLBufferNT3,11000g离心30s;丢弃收集管内液体,将离心柱放回收集管;重复上述洗涤步骤;

(3)11000g空离1min,完全去除缓冲NT3;将柱放入新的1.5mL微离心RT管,加入20uLBufferNE洗脱液,室温(15-25°C)孵育1min,11000g离心1min;回收的DNA于-20℃保存。

全基因组的获取:首先用试剂盒 QIAamp®Viral RNA mini Handbook 获得病毒 RNA, 对获得的 RNA 进行文库的构建与扩增;运用 Illumina 平台进行测序;测序完成后进行分 析,包括质量评价、比对到参考基因组、注释;对分析完成获得序列信息与公共数据库 中的序列进行进一步的比对分析;最终获得病毒全基因组信息。

Tab.2-4 Reverse transcription preparation system and program conditions					
Component Volume Procedu					
AMV Reverse Transcriptase 5× Reaction Buffer	10 µl				
10mM dNTP mix	5 µl				
RNasin®Ribonuclease Inhibitor	2 µl				
U12	1 µl				
U13	1 µl	42 °C 1h			
AMV Reverse Transcriptase	5 µl				
RNA	10 µl				
Nuclease-Free Water	16 µl				
Total	50 µl				

表 2-4	反转录配制体系和程序条件	È
15 4-7		

注: u12、u13 为流感通用引物。

表 2-5 PCR 扩增配制体系 Tab 2-5 PCR amplification preparation system

Component	Volume	PCR Procedure		
Forward Primer(10 µM)	1 µl	Number of Cycles	Temperature	Time
Reverse Primer(10 µM)	1 µl	1 cycles	95 °С	2 min
5×TransStart®FastPfu Buffer	10 µl		95 °С	20 s
2.5mM dNTPs	4 µl	30-35 cycles	Tm-5 °C	20 s
TransStart®FastPfu DNA Polymerase	1 µl		72 °C	4 kb/min
Nuclease-free Water Template	30 μl 3 μl	1 cycles	72 °C	5 min

2.1.8 实验用血清和抗原

2013-2023 年在內蒙古图牧吉国家自然保护区、环渤海湾滩涂湿地以及上海、武汉地 区采集 13 目 19 科 73 种鸟类血清样本共计 1750 份,其中內蒙古图牧吉国家自然保护区血 清样本 1040 份,主要为雁形目鸟类血清,环渤海湾滩涂湿地 689 份,主要为鸻形目鸟类 血 清,上海、武汉地区采集 21 份 雁 鸭 类 血 清 样 本。实 验 用 抗 原: A/environment/Cangzhou/CZ949/2023/H13N8、A/environment/Tumuji/TMJ679/2023/H1N1、 A/environment/Hebei/CZ1491/2023/H16N3 分离株。

2.1.9 禽流感病毒的抗体检测

为了评估H1N1、H13N8、H16N3 野鸟源低致病性禽流感在野鸟中的流行程度,采用 血清学检测的方法分析野鸟暴露于H1N1、H13N8、H16N3 病毒的情况。本研究主要对 2013-2023 年內蒙古图牧吉国家自然保护区和环渤海湾湿地沧州地区采集的 1729 份血清样本,以及上海、武汉地区采集的 21 份雁鸭类来源的血清样本进行血清学调查。按照标准操作规程的血凝抑制实验检测血清样本中的血清抗体水平。将 1 体积血清置于无菌 Eppendorf 管内,加入4体积 RDE,吹打混匀后置 37 ℃ 水浴 16~18 h 过夜,取出后置 56℃水浴 30 min 灭活,置 4 ℃保存待用。在V型红细胞凝集抑制试验板上用PBS以 1: 2 倍比稀释血清样本,每孔加入 25 µL 新配制的4 个凝集单位的抗原,轻轻弹击微量板,使抗原与抗体充分混合,室温孵育 30 min。孵育完成后每孔加入 50 µL 1%红细胞悬液,混匀,室温孵育 15-20 min。同时进行无抗原和无血清样本的对照实验。观察红细胞凝集抑制试验结果。当特定的抗体与相应的红细胞凝集抗原结合后,可以抑制病毒引起的红细胞凝集现象。红细胞凝集抑制效价是指抑制红细胞凝集出现时血清的最高稀释度的倒数。

2.1.10 鸻形目候鸟的实时定位追踪

根据长距离迁徙、中小型体等特点选择灰斑鸻、斑尾塍鹬、红嘴鸥、黑翅长脚鹬、 丘鹬、大滨鹬、半蹼鹬、反嘴鹬、鸥嘴噪鸥等鸻形目鸟类,佩戴设备重量为4-6g的背负 式追踪器,利用卫星定位技术获取经纬度、速度、航向、海拔等信息,同时配备多种传感 器采集相应参数。2019年至2023年期间,通过卫星遥测技术追踪了它们的行动,并绘制 了位置,以调查它们在禽流感病毒传播中的作用。佩戴追踪器购于湖南环球信士有限公 司。

2.2 结果

2.2.1 候鸟样品采集情况

于 2021 年至 2023 年期间,在我国东部候鸟迁徙区的繁殖地、停歇地和越冬地的候鸟 迁徙期间以及被动监测期间采集 17 目 29 科 134 种候鸟咽肛拭子、环境样本和组织样本共 58,803 份。主要监测地为图牧吉国家自然保护区、环渤海滩涂湿地和辽宁东部沿海地区庄 河湿地,具体采样区域见图 2-1。宿主涉及雁形目鸟类(斑嘴鸭、绿头鸭、黑天鹅、绿翅鸭、 针尾鸭等)、鸻形目鸟类(在我国东北地区、蒙古东部、西伯利亚和阿拉斯加繁殖,分布 于我国东部迁徙区,包括环颈鸻、红腹滨鹬、黑翅长脚鹬、反嘴鹬、弯嘴滨鹬、尖尾滨 鹬等)、雀形目、鹳形目和鸡形目(白颊噪鹛、黑冠鳽等)等多种具有迁徙特性的野生鸟 类,具体宿主见表 2-6。

目	科	中文名	 拉丁文	英文	保护级别
		鸿雁	Anser cygnoid	Swan Goose	二级
		豆雁	Anser fabalis	Bean Goose	
		灰雁	Anser anser	Graylag Goose	
		白额雁	Anser albifrons	Greater White— fronted Goose	二级
		斑头雁	Anser indicus	Bar-headed Goose	
		疣鼻天鹅	Cygnus olor	Mute Swan	二级
		小天鹅	Cygnus columbianus	Tundra Swan	二级
		大天鹅	Cygnus cygnus	Whooper Swan	二级
		黑天鹅	Cygnus atratus	Black Swan	
		翘鼻麻鸭	Tadorna tadorna	Common Shelduck	
		赤麻鸭	Tadorna ferruginea	Ruddy Shelduck	
		鸳鸯	Aix galericulata	Mandarin Duck	二级
		赤颈鸭	Mareca penelope	Eurasian Wigeon	
雁形目	鸭科	绿头鸭	Anas platyrhynchos	Mallard	
		斑嘴鸭	Anas zonorhyncha	Eastern Spot—billed Duck	
		针尾鸭	Anas acuta	Northern Pintail	
		绿翅鸭	Anas crecca	Green-winged Teal	
		红头潜鸭	Aythya ferina	Common Pochard	
		青头潜鸭	Aythya baeri	Baer's Pochard	一级
		白眼潜鸭	Aythya nyroca	Ferruginous Duck	
		凤头潜鸭	Aythya fuligula	Tufted Duck	
		灰鸭	Anas gracilis	Grey Teal	
		琵嘴鸭	Anas clypeata	Northern Shoveler	
		赤膀鸭	Anas strepera	Gadwall	
		罗纹鸭	Anas falcata	Falcated Teal	
		白秋沙鸭/斑头秋沙 鸭	Mergellus albellus	Smew	
		花脸鸭	Sibirionetta formosa	Baikal Teal	
	反嘴鹬 科	黑翅长脚鹬	Himantopus himantopus	Black—winged Stilt	
		反嘴鹬	Recurvirostra avosetta	Pied Avocet	
		灰鸻	Pluvialis squatarola	Grey Plover	
	鸻科	环颈鸻	Charadrius alexandrinus	Kentish Plover	
		金眶鸻	Charadrius dubius	Little Ringed Plover	
		铁嘴沙鸻	Charadrius leschenaultii	Greater Sand Plover	
たカゴノロ		灰斑鸻	Pluvialis squatarola	Black-bellied Plover	
鸻形目	彩鹬科	彩鹬	Rostratula benghalensis	Greater Painted Snipe	
		上鹬	Scolopax rusticola	Eurasian Woodcock	
		黑尾塍鹬	Limosa limosa	Black—tailed Godwit	
		斑尾塍鹬	Limosa lapponica	Bar—tailed Godwit	
	鹬科	大杓鹬	Numenius madagascariensis	Eastern Curlew	二级
		甲杓鹬	Numenius phaeopus	Whimbrel	
		(時間)	Tringa erythropus	Spotted Redshank	/
		日腰杓鹬	Numenius arquata	Eurasian Curlew	级
		红脚鹬	Tringa totanus	Common Redshank	

表 2-6 采集样本宿主来源 Tab.2-6 Collection sample host source

E	科	中文名	拉丁文	英文	保护级别
		泽鹬	Tringa stagnatilis	Marsh Sandpiper	
		青脚鹬	Tringa nebularia	Common Greenshank	
		矶鹬	Actitis hypoleucos	Common Sandpiper	
		翻石鹬	Arenaria interpres	Ruddy Turnstone	二级
		红腹滨鹬	Calidris canutus	Red Knot	
		弯嘴滨鹬	Calidris ferruginea	Curlew Sandpiper	
		黑腹滨鹬	Calidris alpina	Dunlin	
		尖尾滨鹬	Calidris acuminata	Sharp-tailed Sandpiper	
		红颈滨鹬	Calidris ruficollis	Red-necked Stint	
		半蹼鹬	Limnodromus semipalmatus	Asian Dowitcher	
		三趾鹬	Crocethia alba	Sanderling	
		林鹬	Tringa glareola	Wood Sandpiper	
		长趾滨鹬	Calidris subminuta	Long-toed Stint	
		阔嘴鹬	Limicola falcinellus	Broad-billed Sandpiper	
		棕头鸥	Chroicocephalus brunnicephalus	Brown—headed Gull	
		红嘴鸥	Chroicocephalus ridibundus	Black—headed Gull	
		遗鸥	Ichthyaetus relictus	Relict Gull	一级
		渔鸥	Ichthyaetus ichthyaetus	Pallas's Gull	
	鸥科	西伯利亚银鸥	Larus smithsonianus	Siberian Gull	
		白额燕鸥	Sternula albifrons	Little Tern	
		普通燕鸥	Sterna hirundo	Common Tern	
		灰翅浮鸥	Chlidonias hybrida	Whiskered Tern	
		白翅浮鸥	Chlidonias leucopterus	White—winged Tern	
		须浮鸥	Chlidonias hybrida	Whiskered Tern	
		黑尾鸥	Larus crassirostris	Black-tailed Gull	
		鸥嘴噪鸥	Gelochelidon nilotica	Gull-billed Tern	
		蓝孔雀	Pavo cristatus	Common Peafowl	
鸡形目	雉科	白额山鹧鸪	Arborophila gingica	White-browed Hill Partridge	
		红腹锦鸡	Chrysolophus pictus	Golden Pheasant	
		石鸡	Alectoris chukar	Chuckar	
		白鹇	Lophura nycthemera	silver pheasant	
䴙䴘目	脑廊科	风头䴙䴘	Podiceps cristatus	Great Crested Grebe	-
H C 400 C 14	1 1 J 10 F J 11	黑颈䴙䴘	Podiceps nigricollis	Black—necked Grebe	二级
		小鸊鷉	Tachybaptus ruficollis	Little Grebe	
	鸠鸽科	灰斑鸠	Streptopelia decaocto	Eurasian Collared Dove	
鸽形目), 1H 1H	山斑鸠	Streptopelia orientalis	Oriental Turtle Dove	
		珠颈斑鸠	Spilopelia chinensis	Spotted Dove	
	秧鸡科	白骨顶	Fulica atra	Common Coot	
	ין וידיילאן:	黑水鸡	Gallinula chloropus	Common Moorhen	
		普通秧鸡	Rallus indicus	Brown—cheeked Rail	
鹤形目	左 内 壬川	白鹤	Grus leucogeranus	Siberian Crane	一级
	街竹	白枕鹤	Grus vipio	White—naped Crane	一级
		丹顶鹤	Grus japonensis	Red—crowned Crane	一级
		灰鹤	Grus grus	Common Crane	二级
	鸨科	大鸨	Otis tarda	Great Bustard	一级

续表 2-6 采集样本宿主来源 Tab.2-6 Collection sample host source (continued)

日	科	<u>中文名</u>	拉丁文		保护级别
H	前玉	东方白鹳	Ciconia bovciana	Oriental Stork	一级
	的个	小刀 口 韵 白 鹳	Ciconia ciconia	White Stork	
鹤形日	路毛	古 時	Ardea nurnurea	Purple Heron	-12
	鸟件	————————————————————————————————————	Ardea intermedia	Vellow-billed Egret	
邮 包 日	占应 龙包 禾儿	— — — — — — — — — — — — — — — — — — —	Phalaerocorar carbo	Great Cormorant	
迚 一 」口) 与 2497年 四方毛汁	百匹) 与 如	Platalog louoovodig	Europian Secondill	477,
	权可不计	口比鸟	Fillinea leucoroala	Van Sahranak's Dittarn	一级
		栗苇鳽	Ixobrychus	Cinnamon Bittern	
		带过素师	Cinnamomeus	Vallow Bittern	
		央 风 中	Dotaumus stallaris	Furgien Dittorn	
		入林海	bolaurus stellaris	Vallary Dittam	
		與韦胸	Gorsachius	renow Bluern	
鹈形目	鹭科	黑冠鳽	melanolophus	Malayan Night-heron	
		夜鹭	Nycticorax nycticorax	Heron	
		池鹭	Ardeola bacchus	Chinese Pond Heron	
		苍鹭	Ardea cinerea	Grey Heron	
		白鹭	Egretta garzetta	Little Egret	
		绿鹭	Butorides striata	Striated Heron	
		大白鹭	Ardea alba	Great Egret	
	鹮科	朱鹮	Nipponia nippon	Crested Ibis	一级
		黑翅鸢	Elanus caeruleus	Black—winged Kite	二级
		秃鹫	Aegypius monachus	Cinereous Vulture	一级
應形日	鹰科	凤头鹰	Accipiter trivirgatus	Crested Goshawk	二级
)鸟/レロ		大鵟	Buteo hemilasius	Upland Buzzard	二级
		普通鵟	Buteo japonicus	Common Buzzard	二级
		赤腹鹰	Accipiter soloensis	Chinese Sparrowhawk	二级
	鹰科	松雀鹰	Accipiter virgatus	Besra	二级
隹形日	住利	红隼	Falco tinnunculus	Common Kestrel	二级
4/04	年件	猎隼	Falco cherrug	Saker Falcon	一级
		游隼	Falco peregrinus	Peregrine Falcon	二级
夜鹰目	夜鹰科	普通夜鹰	Caprimulgus indicus	Jungle Nightjar	
	鹀科	黄喉鹀	Emberiza elegans	Yellow—throated Bunting	
		小鹀	Emberiza pusilla	Little Bunting	
	鹟科	北红尾鸲	Phoenicurus auroreus	Daurian Redstart	
盗形日	鹎科	白头鹎	Pycnonotus sinensis	Light-vented Bulbul	
正 /// 日	鸦科	松鸦	Garrulus glandarius	Eurasian Jay White browed	
	噪鹛科	白颊噪鹛	Garrulax sannio	Laughingthrush	
	燕雀科	燕雀	Fringilla montifringilla	Brambling	
	椋鸟科	丝光椋鸟	Sturnus sericeus	Red-billed Starling	
		纵纹腹小鸮	Athene noctua	Little Owl	二级
		长耳鸮	Asio otus	Long—eared Owl	二级
鸮形目	鸱鸮科	日本鹰鸮	Ninox japonica	Northern Boobook	二级
		红角鸮	Otus sunia	Oriental Scops Owl	二级
		领角鸮	Otus lettia	Collared Scops Owl	二级
		 唐 	Bubo bubo	Eurasian Eagle-owl	
鹃形目	杜鹃科	杜鹃鸟	Cuculidae	Cuckoo	

续表 2-6 采集样本宿主来源 Tab.2-6 Collection sample host source (continued)



图 2-1 2021-2023 年东部地区样本采集区域图 Fig. 2-1 Regional Map of Sample Collection in Eastern China from 2021 to 2023

2.2.2 候鸟源禽流感病毒毒株分离情况

在我国东部迁徙区的候鸟繁殖地、停歇地和越冬地采集的不同类型野鸟样品共分离 得到低致病性禽流感毒株 124 株, LPAIV 分离率为 0.21%。本研究发现候鸟春秋季迁徙相 关时期 AIV 分离率一致,均为 0.22%,仅针对中国东部主动预警地区,未存在明显差异 性。相对于其他地区来说,在东亚-澳大利西亚候鸟迁徙通道区域范围内的图牧吉保护区 和环渤海湾湿地的沧州地区分离得到更多的亚型多样性的低致病性禽流感病毒,多亚型 之间发生重组的可能性高。低致病性禽流感分离株包括了 11 种 HA 亚型, 7 种 NA 亚型的 22种HA-NA 亚型组合, 亚型包括H1N1、H1N2、H2N2、H3N1、H3N2、H3N8、H4N2、 H5N3、H6N1、H6N2、H7N2、H7N3、H7Nx、H8Nx、H10N5、H10N7、H10Nx、H11N9、 H11Nx、H13N6、H13N8、H16N3 亚型毒株,体现了 AIVs 亚型的多样性。宿主为 charadriiform 的鸻鹬类优势 HA 亚型为 H13, 宿主 Anseriformes 的雁鸭类优势 HA 亚型为 H1, 优势 NA 亚型为 N1 和 N2, 优势 HA 和 NA 亚型组合随年份不同更替变化。低致病性 分离株均来自于雁鸭类和鸻鹬类候鸟,且亚型组合丰富, 雁鸭类鸟类分离得到 16 种亚型 的毒株,相对于鸻鹬类来说分离亚型更为多样性,分离的毒株中H7N2亚型同时在雁鸭类 和鸻鹬类鸟类中发现。上述分离结果表明, 雁鸭类和鸻鹬类候鸟仍是 AIV 的易感物种, 应继续将其作为东部候鸟迁徙地区监测 AIV 的重要指示物种, AIV 具有亚型多样性和宿 主特异性的特点,需要持续监测,关注其亚型流行动态以及发生重组和跨宿主传播的可

能性。

2021年,在辽宁省、吉林省、内蒙古自治区、湖南省、河南省、江苏省、河北省、 天津市、山东省9地区共采集野鸟样本23053份,分离出AIV毒株51株,分离率为0.22%, 其中LPAIV分离株31株。辽宁省庄河市采集野鸟样本10158份,分离AIV毒株18株,分 离率为0.18%;其中8株为H13N6亚型,分离自鸻鹬类;10株为H7N2亚型。河北省沧州 市采集鸻鹬类、雁鸭类样本3722份,分离AIV毒株13株,分离率为0.38%;其中H7N2亚 型9株,H1N2亚型2株,H2N2亚型1株,H3N2亚型1株,均分离自鸻鹬类。吉林省采 集鸻鹬类、雁鸭类样本3329份,未分离出AIV毒株。内蒙古自治区采集雁鸭类样本3038 份,未分离出AIV毒株。湖南省采集鸻鹬类、雁鸭类、鸮类样本1768份,分离AIV毒株2 株,分离率为0.11%;均为H5N6亚型,分离自鹰鸮、领角鸮。河南省三门峡市采集大天 鹅样本180份,分离出AIV毒株14株,分离率为7.78%;其中H5N1亚型7株,H5N8亚型 7株。江苏省连云港市采集雁鸭类组织样本48份,分离出H5N8 亚型AIV毒株3株,分离 率为6.25%。河北省唐山市采集翘鼻麻鸭样本35份,分离出AIV毒株。山东省采集雁鸭类 样本765份,未分离出AIV毒株。

2022年,在内蒙古自治区、湖南省、辽宁省、河北省4地市共采集野鸟样本17249份, 分离出AIV毒株19株,分离率为0.11%,其中LPAIV毒株14株。内蒙古自治区采集雁鸭 类样本3283份,分离AIV毒株10株,分离率为0.30%;其中H1N1亚型7株,H1N2亚型 3株。湖南省采集样本307份,共分出6株AIV毒株,其中从绿翅鸭中分离出1株H3N8亚 型AIV毒株和1株H5N1毒株,从绿头鸭分出1株H6N1毒株,从斑嘴鸭中分出1株H5N1 和1株H6N8毒株,从黑天鹅中分出1株H5N1,分离率为1.95%。河北省采集鸻鹬类、雁 鸭类样本3212份,从反嘴鹬中分离出H5N1亚型AIV毒株1株,分离率为0.03%。辽宁省 采集鸻鹬类样本10447份,分离出2株AIV毒株,分离率为0.02%;其中1株为H5N1亚 型、1株为H13N6亚型。

2023 年,在河南省、江西省、天津市、湖南省、内蒙古自治区、吉林省、黑龙江省、 福建省、广东省、上海市、河北省、辽宁省、湖北省 13 地市共采集样本 18501 份,分离出 AIV毒株 96 株,分离率为 0.52%,其中LPAIV毒株 79 株。河南省采集大天鹅样本 217 份,

22

分离出H5N1 亚型AIV毒株 6株,分离率为 2.76%。江西省采集东方白鹳样本 343 份,未分 离出AIV毒株。湖南采集雁鸭类、鸻鹬类和猛禽样本 1196 份,未分离出AIV毒株。内蒙古 自治区采集雁鸭类、鸻鹬类组织、拭子及环境样本 3090 份,从雁鸭类中分离出AIV毒株 48 株,分离率为1.32%;其中H1N1 亚型有 21 株,H6N1 亚型有 21 株,H6N2 亚型有 4 株, H7N3 亚型有 1 株,H11Nx亚型有 1 株。吉林省采集雁鸭类、白鹳、丹顶鹤样本 155 份, 未分离出AIV毒株。黑龙江省采集雁鸭类和白鹳样本 188 份,未分离出AIV毒株。福建省 采集雁鸭类和鸻鹬类样本 466 份,分离出AIV毒株 10 株,分离率为 2.15%;其中雁鸭类中 分离到H5N6 亚型 1 株、H5N1 亚型 6 株、H3N1 亚型 1 株、H6N1 亚型 1 株,鸻鹬类中分 离到H5N1 亚型 1 株。天津市采集样本 280 份,分离出 2 株H1N1 毒株,分离率为 0.71%。 广东省采集野鸟样本 164 份,未分离出AIV毒株。湖北省采集雁鸭类样本 590 份,未发现 AIV阳性毒株。上海采集雁鸭类拭子样本 50 份,未分离出AIV毒株。河北省采集雁鸭类、 鸻鹬类样本 3610 份,分离出AIV毒株 29 株,分离率为 0.80%;雁鸭类中分离出 15 株H8N6 亚型AIV,鸻鹬类中分离出 3 株H5N3 亚型AIV、5 株H13N8 亚型AIV、1 株H10N5 亚型AIV、 1 株H7Nx亚型AIV、1 株H11N1 亚型AIV、2 株H5N1 亚型AIV、1 株H16N3。辽宁省采集鸻 鹬类样本 9348 份,分离出AIV毒株 1 株H5N1,分离率为 0.01%。

Tab. 2-7 Statistics of separation rate of AIV in 2021-2023							
年份	地区	采集样本数	AIV 分离株	地区分离率%	分离率%		
	图牧吉	3038	0	0			
2021 年	沧州	3722	13	0.34	0.22		
2021 平	庄河	10158	18	0.18	0.22		
	其他地区	6135	20	0.32			
	图牧吉	3283	10	0.30			
2022年	沧州	3212	1	0.03	0.11		
2022 平	庄河	10447	2	0.02	0.11		
	其他地区	307	6	1.95			
	图牧吉 2872	2872	48	1.67			
2022 年	沧州	3610	29	0.80	0.52		
2023 平	庄河	9348	1	0.01	0.52		
	其他地区	2671	18	0.67			

表 2-7 2021-2023 年 AIV 分离率统计



图 2-2 2021-2023 年东部地区 LPAIV 分离株亚型统计 Fig. 2-2 Subtype statistics of LPAIV isolates in eastern China from 2021 to 2023

表	2-8	2021	-2023	年东部坦	也区LPA	IVs分	离株宿	主分	布

目	鸟种	亚型	
鸻形目	反嘴鹬、遗鸥、红嘴鸥		
	白腰杓鹬 黑腹鹬、中杓	H5N3 (3) H7Nx (1) H7N2(10)	
	鹬、黑翅长脚鹬、泽鹬	H10N5(1)H11Nx(1)H13N6(9)H13N8(5)H16N3(1)	
	等		
雁形目	大天鹅、豆雁、翘鼻麻	H1N1(30)H1N2(5)H2N2(1)H3N1(1)H3N2(1)H3N8(1)	
	鸭、绿翅鸭、绿头鸭、	H6N1(23)H6N2(4)H6N8(1)H7N2(9)H7N3(1)	
	斑嘴鸭等	H8N6(15) H11Nx(1)	

2.2.3 候鸟源禽流感病毒的血清学调查

通过对 2013-2023 环渤海湾滩涂湿地和图牧吉国家自然保护区主动预警同步样本的血 清样本进行血清学调查分析结果显示,候鸟中H13 特异性抗体的发生率为 2.28%,H16 特 异性抗体的发生率为 1.65%,而H1 特异性抗体的发生率仅为 0.34%,表明H13、H16 亚型 毒株在野鸟中流行比较普遍,H1 相对来说在候鸟中的循环流行率并不高。2021-2023 年监 测期间H1、H13、H16 亚型分离率分别为 0.141%、0.025%、0.005%,相比于血清阳性率 来说相对较低。H1 分离株阳性血清宿主为红头潜鸭、风头䴙䴘、尖尾滨鹬,H13 分离株阳性血清宿主为环颈鸻、纵纹腹小鸮、雕鸮、红嘴鸥、中白鹭、尖尾滨鹬、弯嘴滨鹬、 泽鹬、鸥嘴噪鸥、长趾滨鹬、绿头鸭、白骨顶、赤膀鸭、琵嘴鸭、凤头䴙䴘、通鸬鹚、 红头潜鸭,H16 分离株阳性血清宿主为环颈鸻、普通燕鸥、红嘴鸥、弯嘴滨鹬、泽鹬、尖 尾滨鹬、赤膀鸭、红头潜鸭、普通鸬鹚、凤头䴙䴘、罗纹鸭、斑嘴鸭鸟类宿主。观察到 同一鸟类同时含有多种抗体的现象,沧州地区 2015 年红嘴鸥,图牧吉地区 2020 年赤膀鸭、 2021 年和 2023 年凤头䴙䴘鸟类宿主中同时含有H13、H16 的特异性抗体;2022 年和 2023 年凤头䴙䴘鸟类宿主中同时含有H13、H1 的特异性抗体。野生鸟类中针对H1、H13、H16 病毒的血凝抑制抗体滴度主要分布在 1: 40-1: 160 之间,极少数能够达到 1: 640 以上。

目(科)	鸟种	样本数	目(科)	鸟种	样本数
	红头潜鸭	126	鸻形目	反嘴鹬	6
	青头潜鸭	3	(反嘴鹬科)	黑翅长脚鹬	1
	琵嘴鸭	14		白额燕鸥	7
	赤膀鸭	33		普通燕鸥	5
	绿头鸭	82	鸻形目(鸥科)	遗鸥	1
	绿翅鸭	3		红嘴鸥	29
	针尾鸭	9		黑尾鸥	1
	罗纹鸭	5	鸻形目(燕鸻科)	燕鸻	7
	斑嘴鸭	85		灰斑鸻	1
	花脸鸭	3	たカゴノロ(たねです)	环颈鸻	131
惟形目(鸭科)	白秋沙鸭	1	鸻形目(鸻科)	金眶鸻	30
	翘鼻麻鸭	1		铁嘴沙鸻	3
	豆雁	1	鹤形目(鹤科)	白鹤	1
	灰雁	68		白骨顶	412
	白额雁	3	鹤形日(秧鸡科)	黑水鸡	2
	疣鼻天鹅	2	鹤形目(鸨科)	大鸨	1
	小天鹅	1	鲣鸟目(鸬鹚科)	普通鸬鹚	45
	大天鹅	1		凤头鸊鷉	142
	黑天鹅	1	䴙䴘目(䴙䴘科)	黑颈鸊鷉	36
	鸳鸯	1		小鸊鷉	16
	半蹼鹬	3		草鹭	2
	三趾滨鹬	1	鹳形目(鹭科)	中白鹭	1
	尖尾滨鹬	140		草鹭	1
	红脚鹬	3	鹳形目 (鹳科)	东方白鹳	1
們形目(矶鹬	20	· · · · · · ·	苍鹭	5
	林鹬	17	쓰슬 국가 터 기타 가지 주지 \	大麻鳽	4
	红腹滨鹬	7	鸦形目(鹭科)	夜鹭	1
	翘嘴鹬	2		大白鹭	3

表 2-9 实验用血清统计 Tab. 2-9 Experimental serum statistics

泽鹬 88 鹈形目(鹮科) 白琵鹭 3 丘鹬 1 野形目(鸱鸮科) 27 青脚鹬 2 鸡形目(始科) 4000000000000000000000000000000000000
丘鹬 1 雕鸮 27 青脚鹬 2 鸡形目(鸱鸮科) 纵纹腹小鸮 1 长趾滨鹬 2 鸡形目(雉科) 白额山鹧鸪 2
青脚鹬 2 5000 (1934) 纵纹腹小鸮 1 长趾滨鹬 2 鸡形目(雉科) 白额山鹧鸪 2
长趾滨鹬 2 鸡形目(雉科) 白额山鹧鸪 2
阔嘴鹬 1 鸥形目(鸥科) 鸥嘴噪鸥 5
红颈滨鹬 42 隼形目(隼科) 红隼 2
大滨鹬 1 鹰形目(鹰科) 秃鹫 3
弯嘴滨鹬 37 房內日(截胜利) 截胜 1
黑腹滨鹬 1 黑腹注鹬 1

山东师范大学硕士学位论文

表 2-10 血清阳性率、阳性宿主及各亚型分离率

Tab. 2-10 Serum positive rate, positive host and isolation rate of subtypes

亚型	目	鸟种	血清阳性率	分离率
	雁形目	红头潜鸭	0.67 (3/443)	
H1	鸻形目	尖尾滨鹬	0.17 (1/590)	0.141
	䴙䴘目	凤头䴙䴘	1.03 (2/194)	
	雁形目	绿头鸭、赤膀鸭、琵嘴鸭、红头潜鸭	0.90(4/443)	
H13	鸻形目	尖尾滨鹬、弯嘴滨鹬、泽鹬、鸥嘴噪鸥、长趾滨 鹬、环颈鸻、红嘴鸥	2.2(13/590)	
	鸮形目	雕鸮、纵纹腹小鸮	7.1(2/28)	0.005
	鹳形目	中白鹭	20(1/5)	0.025
	鹤形目	白骨顶	0.48(2/416)	
	䴙䴘目	凤头䴙䴘	6.18(12/194)	
	鲣鸟目	普通鸬鹚	2.2(1/45)	
	雁形目	赤膀鸭、红头潜鸭、罗纹鸭	1.12(5/443)	
H16	鸻形目	环颈鸻、普通燕鸥、红嘴鸥、弯嘴滨鹬、泽鹬、 尖尾滨鹬	1.86(11/590)	0.005
	鲣鸟目	普通鸬鹚	2.2(1/45)	
	䴙䴘目	凤头䴙䴘	1.54(3/194)	

注: 鸟种为血清阳性宿主; 分离率为 2021-2023 年间各亚型毒株分离率。

2.2.4 斑尾塍鹬、灰斑鸻等鸻形目候鸟的实时定位追踪

基于卫星跟踪和系统发育分析的组合方法,去探索关于迁徙鸻形目鸟类在禽流感病 毒传播中的作用的信息,去解释禽流感随候鸟迁徙的跨洲域传播-禽流感病毒跨境传入动 态与候鸟迁徙活动在时间和空间上是否有着高度一致的规律。

经迁徙路线分析,我们所追踪到的斑尾塍鹬为新西兰亚种,三只灰斑鸻呈现了三种 不同的轨迹路线,其中一只斑尾塍鹬、一只黑翅长脚鹬、一只红嘴鸥和两只灰斑鸻完成 了它们的迁徙周期,跨越了受禽流感病毒影响的8个国家(中国、俄罗斯、蒙古、美国、 澳大利亚、新西兰、韩国、朝鲜)以及东南亚地区。以下是追踪候鸟的详细迁徙路线。

斑尾塍鹬 HQP3638 在 2021 年 4 月 30 号我国丹东地区出发,途经我国东北东部,俄 罗斯东南地区,于 2021 年 6 月 25 日到达美国阿拉斯加地区繁殖地,九月份开始横跨太平
洋,途径澳大利亚地区,最终到达新西兰越冬地,2022年3月份从新西兰出发,一路北迁途径韩国、朝鲜地区,到达我国环渤海与环黄海地区交界处丹东鸭绿江口湿地附近,完成一轮迁徙。

灰斑鸻 HQP3480 于 2021 年 4 月 2 号佩戴追踪器,在我国丹东地区停留一个月后,开始北迁,途径东北地区,5 月底出境到达俄罗斯境内,经过俄罗斯东部沿海最终到达远东地区北部亚北极地区,同年 7 月开始往南迁飞,途径俄罗斯亚洲东部、我国东北边境、朝鲜,到达庄河地区附近,丹东和庄河地区附近区域活动到同年 11 月 26 号后南迁到江苏连云港市东部沿海,2022 年 4 月 8 号离开,往北迁飞到丹东地区,同年 5 月底经朝鲜飞往俄罗斯,在俄罗斯北部停留,8 月 12 开始往南迁飞途径俄罗斯亚洲东部、日本海地区,9 月初横穿韩国,往西北方向迁飞,经我国黄海北部,到达庄河地区附近,停歇一个月后,往南迁飞,途径山东,到达江苏连云港市东部沿海,一直小范围活动,直到 2023 年 1 月 20 号卫星信号消失。

灰斑鸻 HQP3490 于 2021 年 4 月 2 号在辽宁省丹东绑定卫星追踪器,5 月 26 号开始沿 鸭绿江往迁徙,6 月 1 号到达俄罗斯远东地区北部,停歇 1 个月后,7 月 28 号开始往南迁 徙,7 月 30 号到达蒙古境内,转向往东南方向迁徙,8 月 4 号从我国锡林郭勒盟入境,途 径内蒙古东部地区,5 号到达环渤海湾滩涂湿地辽东湾附近,停留两个月后,同年 10 月 7 号横跨渤海往山东半岛南迁,在烟台进入山东地区后,又往东南方向迁飞,最终卫星信 号消失在日照沿海地区。

灰斑鸻 HQP3599 于 2021 年 5 月 5 号在辽宁丹东进行卫星追踪器的绑定,卫星信号显示在丹东地区鸭绿江湿地附近停留 1 个月后于 5 月底沿我国东北地区东部往北迁飞,途径俄罗斯滨海边疆区,到达俄罗斯远东地区北部繁殖,8 月初往南迁飞,飞往越冬地,途径蒙古,由内蒙古进入我国境内,继续南飞回到丹东地区,停留将近 1 个月,8 月底往南横跨黄海、东海一路南下到达东南亚菲律宾地区越冬,2022 年 4 月初开始北迁,途径朝鲜,抵达丹东地区,同年 9 月初一路南迁抵达菲律宾地区,2023 年 4 月初北迁途径我国台湾、舟山,到达上海崇明东滩,停歇一周左右,继续北迁,途径山东半岛,在丹东停歇 1 个月,5 月底北迁经吉林、黑龙江、俄罗斯东北部沿海地区,迁往俄罗斯远东地区北部。至此HQP3599 开始了新一轮的迁徙。

半蹼鹬 HQP1126 于 2020 年 8 月 30 号在黄骅港绑定卫星追踪器,在河北地区停歇觅 食,9月17号南迁经山东、安徽、江苏、江西、福建地区,最终留在福建境内越冬,直至 2021 年 10 月 24 日信号消失,未发生迁徙活动。 红嘴鸥 HQP1127 于 2020 年 8 月 12 号开始环渤海湾滩涂湿地沧州地区留三个月后南 迁经山东、江苏、河南、安徽到达湖北武汉,一周内在湖北境内众多湖泊和淮南市陡涧 河往返一次后,2021 年 1 月 18 日-2021 年 3 月 25 日在陡涧河、洪泽湖停留,随后北迁到 达宿迁骆马湖,停歇半个月后,继续北迁,经山东、渤海,于 4 月 20 号到达唐山沿海地 区,天津滨海新区,5 月 5 号北迁经蒙古东部,5 月 20 号到达俄罗斯中部地区,7 月 9 号 开始南迁,11 号由黑龙江入境,经呼伦湖、蒙古到达环渤海湾湿地,停歇四个月,11 月 16 号往南迁飞,抵达湖北,在洪湖、大坡湖、网湖、牛山湖、保安湖、梁子湖区域栖息, 2022 年 3 月 12 号往东北方向迁飞,经江苏沿海,转向往西北方向飞往洪泽湖,停歇半个 月,经山东、环渤海湾、内蒙哈素海,内蒙东北部北迁,2022 年 5 月 17 号到 2022 年 8 月 2 号在俄罗斯中南部地区活动,南迁最终到环渤海地区。

鸥嘴噪鸥 HQP1125于 2020年8月11号佩戴追踪器,在环渤海湾滩涂湿地黄骅港、海兴县附近停留两个月左右,开始南迁,经山东半岛,到达盐城东部沿海,停歇十天左右,继续沿东部沿海地区迁徙,途径台湾,最终信号消失在菲律宾附近。

黑翅长脚鹬 HQP1121 于 2019 年 5 月 26 号开始在沧州地区停留繁殖,10 月 5 号开始 经山东、河南、湖北、湖南、广西壮族自治区方向迁飞,信号消失于我国与越南地理交界 地区。

黑翅长脚鹬 HQP1123 于 2019 年 5 月 26 日无棣县绑定追踪器,在黄骅南大港湿地繁 殖地活动三个月左右,8 月中旬南迁,经山东、河南、湖北、湖南、江西、广东,在广西 壮族自治区出境,穿过越南、老挝,9 月 22 号抵达泰国,12 月 17 号往北迁飞到达缅甸越 冬地,2020 年 5 月 3 号往东北方向迁飞,由我国西双版纳傣族自治州入境,经贵阳、湖 南、湖北、河南、山东,回到河北南大港湿地,停留三个月后,8 月 7 号开始南迁,至此 开始了新一轮的迁徙。





图 2-3 斑尾塍鹬 HQP3638 迁徙路线 Fig. 2-3 Migration Route of Limosa lapponica HQP3638

图 2-4 灰斑鸻 HQP3480、HQP3490、HQP3599 迁徙路线

Fig. 2-4 Migration Route of Pluvialis squatarola HQP3480, HQP3490 and HQP3599



图 2-5 半蹼鹬 HQP1126 迁徙路线

Fig. 2-5 Migration Route of Limnodromus semipalmatus HQP1126



图 2-6 红嘴鸥 HQP1127 迁徙路线





图 2-7 鸥嘴噪鸥 HQP1125 迁徙路线





图 2-8 黑翅长脚鹬HQP1121、HQP1123 迁徙路线

Fig. 2-8 Migration Route of Gelochelidon nilotica HQP1121 and HQP1123



图 2-9 追踪候鸟迁入我国的主要方向图。黑色图标为候鸟繁殖地、越冬地和停歇地。紫色

为黑翅长脚鹬迁入方向,蓝色为红嘴鸥、灰斑鸻迁入方向,绿色为斑尾塍鹬、灰斑鸻迁 入方向。

Fig. 2-9 Track the main direction map of migratory birds moving into China. The black icons show the breeding grounds, wintering grounds and stopping places of migratory birds. Purple is the migration direction of Black—winged Stilt, blue is the migration direction of Black—headed

Gull and Black-bellied Plover, and green is the migration direction of Bar-tailed Godwit and

Black-bellied Plover.

2.3 讨论

现已证实全球约有9条候鸟迁徙路线,自西向东,有4条路线穿越我国,我国地处4 条国际候鸟迁徙路线(西亚一东非迁徙路线、中亚迁徙路线、东亚一澳大利西亚迁徙路 线和西太平洋迁徙路线)的中间地段,南北地理跨度大,形成东部、中部和西部3个候鸟 迁徙区。东部迁徙区包括东亚一澳大利西亚迁徙路线和西太平洋迁徙路线穿越我国的区 域,拥有在我国黄河和长江流域及以南地区越冬的白鹤、东方白鹳、鸿雁、豆雁、苍鹭、 花脸鸭、苍鹰、红嘴鸥、长耳鸮等鸟类,以及前往朝鲜半岛及日本越冬的丹顶鹤、白头 鹤、白枕鹤等鸟类,是我国候鸟种类和数量最多的迁徙区。中部候鸟迁徙区,包括中亚 迁徙路线和东亚一澳大利西亚中段西部区域,该迁徙区的候鸟主要有大天鹅、赤麻鸭和 灰雁等雁鸭类,以及普通鸬鹚、黑颈鹤、斑头雁及渔鸥等高原鸟类,它们在我国青藏高 原的南部和云贵高原,以及印度和尼泊尔等地区越冬。西部候鸟迁徙区,包括了西亚--东非迁徙路线的中段偏东地带,部分与中亚迁徙路线的中段西部重叠,覆盖了我国内蒙 和甘肃西部及新疆大部。陕北红碱淖繁殖的遗鸥向东沿同纬度迁徙至我国渤海沿岸越冬, 是少数沿东西方向迁徙候鸟之一。现有环志和迁徙研究数据表明,我国与 30 多个国家存 在候鸟迁徙交流,东亚一澳大利西亚迁徙路线的90%左右的鸻形目鸟类迁徙途经我国东部 沿海,我国不仅有许多候鸟繁殖或越冬,还是北极及远东地区繁殖的众多候鸟无可替代 的迁徙停歇地。因此,对于我国的候鸟的持续性监测以及保护成效直接影响全球候鸟种 群的多样性,对其持续性禽流感病毒监测对于我们更好的掌控病原体的传播,遗传变异 进化可能的发展趋势,提升预警和防控水平有着重要的意义。

我们监测地区主要是我国东部候鸟迁徙区,采样地涉及我国大部分候鸟的重要功能 区。我国黄渤海滨海湿地区域(长江中下游地区、江苏东部沿海、黄河三角洲、渤海湾 北部和鸭绿江口等)广泛存在的潮间带滩涂栖息地为阿拉斯加和俄罗斯东北部延伸至澳 大利亚和新西兰, 横跨 20 多个国家和地区的 EAAF 迁徙路线的野生鸟类(主要是鸻鹬类) 提供了重要的迁徙中转站(临时休息地和能量补给地),其中上海崇明东滩鸟类自然保护区 是长距离迁徙的鸻鹬类飞越太平洋到达亚洲大陆后的第一个主要停歇地,支持着鸻鹬类 的迁徒和越冬。本节在全球候鸟迁徙的背景下在我国多宿主生态系统环渤海湾滩涂湿地 和图牧吉国家自然保护区,候鸟重要停歇地庄河滩涂湿地开展了3年的主动监测,在我国 图牧吉国家自然保护区、上海崇明东滩、河南三门峡黄河湿地、天津北大港湿地、黄骅 市大兴堡、黄骅歧口海滩、黄骅张臣河、海兴县青先盐田、庄河沿海地区、福州闽江河 口国家湿地公园等重要的候鸟迁徙停歇地、繁殖地、越冬地采集野鸟样品,运用高通量 测序、病毒基因组数据库等技术获得阳性样本病毒基因组,并确定毒株亚型。初步鉴定 后,进一步分析以上地区的主要亚型分布,病毒感染的高风险鸟种以及易发生感染的高 风险地区。从统计的采集样本宿主来源来看,我们的样本采集更倾向于作为禽流感病毒 天然宿主的鸻形目及雁形目鸟类,所以未对不同鸟种的分离率做更多的评价。地区样本 采集数量的不均衡,主要的采集动机不同,之间的分离率比较也不具备意义,但地区之 间分离病毒株可能会存在某种联系,将病毒、地理、宿主因素联系起来,可能会发现病 毒的流动传播大致趋向,有助于突发禽流感的时确定风险地区,进一步有效的控制扩张 性的传播。考虑到捕捉以及对鸟类造成的影响,我们大部分样本为野生鸟类环境样本, 为宿主鉴定带来了一定的困难,此外粪便样本病毒含量相对较低。合理的监测策略、抽 样方法和相对科学的统计分析有助于对候鸟禽流感监测,我们应该对于结果进行适当改 变策略。考虑上述病毒、地理及宿主的某种联系,针对特定物种,用 GPS 追踪的方式确 定鸟类宿主的迁徙动态,将病原生态学和鸟类宿主生态学联系起来。

自上世纪 80 年代以来,随着人造卫星技术的发展,通过分析信号发生器发射的信号 确定实时定位追踪对象所在的地理位置、海拔高度温度等信息,从而实现对野生鸟类的 整个迁徙过程实时动态监测的 GPS 追踪系统被广泛应用于大型和中型鸻鹬类的迁徙研究, 确定候鸟的迁徙路线和迁徙中转站对于制定有效的候鸟保护策略是必要的,GPS 追踪法 的缺点是受鸟类体型的限制,极少应用于体重 200 克以下的鸻鹬类。通过卫星遥测技术, 可以高精度地说明候鸟的飞行路线,以确定禽类位置与禽流感暴发地理区域之间的联系。 资料显示,斑尾塍鹬是一种长距离迁徙的水鸟,有澳大利亚亚种和新西兰亚种,澳大利 亚亚种越冬地为澳大利亚西北部的布鲁姆,每年 3 月中旬左右,它们从澳大利亚起飞,途 经中国前往西伯利亚繁殖,然后 9 月左右开始启程返回澳大利亚;新西兰亚种从新西兰出 发,中转中国鸭绿江,然后飞往美国最西北端的阿拉斯加繁殖,最后直接从繁殖地斜跨

太平洋回到新西兰越冬。半蹼鹬在我国繁殖于内蒙古东北部和黑龙江地区,迁徙期间途 径吉林、河北、长江中下游地区,一直到广州、福建和香港,偶尔经过台湾,国外繁殖 于贝加尔湖南岸、西西伯利亚、远东和蒙古,越冬于印度,泰国、中南半岛和马来半岛。 黑翅长脚鹬春季 4 月初至 5 月初迁至我国北方繁殖,秋季 9、10 月间往南迁徙。我们对斑 尾塍鹬、灰斑鸻、半蹼鹬、红嘴鸥和黑翅长脚鹬进行实时定位追踪,获得了途径我国几 种候鸟的完整迁徙路线,其中包括了东亚-澳大利亚迁飞区最为典型的类群-鸻科,对于后 续分析病毒来源可提供可能性参考。大多数分离株的监测到的时间与当地鸟类迁徙期或 繁殖期大量聚集相符合。我们在候鸟追踪期内,对候鸟停歇地,繁殖地和越冬地进行了 监测, 2021 年 4 月在斑尾塍鹬、灰斑鸻种群停歇期间, 我们分离到了鸻鹬类宿主的多株 H13N6 毒株: 2021 年 4 月底,在红嘴鸥种群迁徙途径内蒙期间,在鄂尔多斯遗鸥宿主内 分离到了 H11N9 毒株,可能为候鸟宿主携带病毒迁徙传播而来。下节系统发育分析发现 我国病毒毒株主要与蒙古、韩国、俄罗斯亚洲地区、孟加拉国等地区毒株关系密切,与 我们标记的候鸟迁徙区域高度相似,可能已由候鸟迁徙网络形成包括我国在内的局域性 动态稳定传播圈。迁徙距离、无症状感染持续时间和病毒脱落持续时间的空间分析有力 地支持了候鸟对禽流感传播的潜在作用。考虑到与气候变化和其他生态因素有关的问题, 必须获得关于可能发生变化的鸟类迁徙路线的最新数据,为确定宿主的迁徙行为和地理 来源提供依据,进一步预测风险鸟种可能携带禽流感病毒传播的可能性,更好的对禽流 感进行监测, 识别和评估新出现的病毒病原体的风险。

2.4 小结

1.2021年至2023年的主动预警监测过程中,在我国东部候鸟迁飞区共采集了16地区 17目29科134种候鸟样本58,803份,分离出LPAIV毒株124株,LPAIV分离率为0.21%, 2021年、2022年和2023年分离率分别为0.22%、0.11%和0.52%,主要采集地区图牧吉地 区、沧州地区和庄河地区平均分离率为0.65%、0.39%和0.07%。LPAIV分离株包括了11 种HA亚型,7种NA亚型的22种基因型组合。毒株H1、H6、H7、H13亚型为LPAIV优 势流行株,H3、H8等毒株也广泛流行。统计分析发现,所获分离毒株宿主均为鸻形目和 雁形目,其中鸻形目中亚型分布为H5、H7、H10、H11、H13、H16亚型毒株共31株,雁 形目中亚型分布为H1、H2、H3、H6、H7、H8、H10、H11亚型毒株共93株。以上结果 表明了LPAIV亚型多样性、宿主特异性和在时间及地域上存在一定差异性,LPAIV的流 行率和亚型分布在不同候鸟种群之间也存在差异。 2. 血清学调查结果显示,环渤海湾滩涂湿地和图牧吉地区的候鸟中H13、H16、H1特 异性抗体的阳性率分别为 2.28%、1.65%、0.34%,H1、H13 和 H16 在候鸟中的流行都较 为普遍。候鸟中 H13、H16 和 H1 的分离率分别为 0.025%、0.005%和 0.141%,它们的分 离率均明显低于抗体阳性率,由此可见,LPAIV在候鸟中不断循环。除众所周知的鸻形目 宿主外,H13 与 H16 也可能发生对鸭科、鹭科等动物的感染。H13、H16、H1 均可感染红 头潜鸭、凤头䴙䴘、尖尾滨鹬鸟类宿主。血凝抑制抗体滴度主要分布在 1:40-1:160 之 间。

3. 基于卫星实时定位跟踪方法,我们追踪到了鸻形目候鸟斑尾塍鹬、灰斑鸻、半蹼鹬、 鸥嘴噪鸥、红嘴鸥和黑翅长脚鹬的迁徙路线,其中斑尾塍鹬、灰斑鸻和黑翅长脚鹬完成 了迁徙周期。它们的迁徙跨越了受禽流感病毒影响的 8 个国家(中国、俄罗斯、蒙古、美 国、澳大利亚、新西兰、韩国、朝鲜)以及东南亚地区。

3 候鸟源 LPAIV 分离株遗传进化分析和对哺乳动物感染性研究

3.1 材料与方法

3.1.1 实验用毒株

表 3-1 实验用毒株信息

Tab. 3-1 Experimental str	rain information
---------------------------	------------------

毒株名称	亚型	简称	采集时间 Acquisition	采集地区 Collection
Viruses Name	Suptype	Abbreviation	time	location
A/environment/Dalian/ZH1902/2020/H1N1	H1N1	ZH1902	2020.04.08	辽宁
A/environment/Tumuji/TMJ2168/2022/H1N1	H1N1	TMJ2168	2022.1	内蒙古
A/environment/Tumuji/TMJ1994/2022/H1N1	H1N1	TMJ1994	2022.1	内蒙古
A/environment/Tumuji/TMJ50/2023/H1N1	H1N1	TMJ50	2023.04	内蒙古
A/environment/Tumuji/TMJ93/2023/H1N1	H1N1	TMJ93	2023.04	内蒙古
A/environment/Tumuji/TMJ493/2023/H1N1	H1N1	TMJ493	2023.04	内蒙古
A/environment/Tumuji/TMJ679/2023/H1N1	H1N1	TMJ679	2023.04	内蒙古
A/environment/Tianjin/TJ141/2023/H1N1	H1N1	TJ141	2023.03.25	天津
A/environment/Inner Mongolia/TMJ1098/2018/H10N5	H10N5	TMJ1098	2018.6.12	内蒙古
A/Mallard/Inner Mongolia/TMJ28/2019/H10N4	H10N4	TMJ28	2019.07.22	内蒙古
A/Anatidae/Inner Mongolia/TMJ2193/2020/H10N4	H10N4	TMJ2193	2020.10.14	内蒙古
A/environment/Qihai/QH82/2022/H10N7	H10N7	QH82	2022.07.24	青海
A/environment/Hebei/CZ1753/2023/H10N5	H10N5	CZ1753	2023.11.04	河北
A/mallard/Dalian/DZ-137/2013/H13N6	H13N6	DZ-137	2013.10.01	辽宁
A/Eurasian curlew/Liaoning/ZH-385/2014/H13N8	H13N8	ZH-385	2014.10.18	辽宁
A/Eurasian curlew/Liaoning/ZH-186/2014/H13N6	H13N6	ZH-186	2014.10.18	辽宁
A/environment/Dalian/ZH2943/2020/H13N8	H13N8	ZH2943	2020.05.16	辽宁
A/environment/Dalian/ZH987/2021/H13N6	H13N6	ZH987	2021.04	辽宁
A/environment/Dalian/ZH5299/2022/H13N6	H13N6	ZH5299	2022.10.17	辽宁
A/environment/Cangzhou/CZ949/2023/H13N8	H13N8	CZ949	2023.09.05	河北
A/environment/Hebei/CZ1503/2023/H13N8	H13N8	CZ1503	2023.09.17	河北
A/environment/Fujian/FJ124/2024/H13N6	H13N6	FJ124	2024.01	福建
A/Black-headed gull/Hebei/c701/2017/H13N6	H13N6	C701Y	2017.08.01	河北
A/environment/Hebei/CZ1451/2020/H16N3	H16N3	CZ1451	2020.10.06	河北
A/environment/Hebei/CZ1481/2020/H16N3	H16N3	CZ1481	2020.10.06	河北
A/environment/Hebei/CZ1491/2023/H16N3	H16N3	CZ1491	2020.10.06	河北

3.1.2 禽流感病毒的遗传进化分析

在全球共享流感数据库(GISAID)的EPIFLU[™]数据库、NCBI数据库中选择可供分析 的序列,使用ClustalW程序进行研究病毒与其相关联的蛋白质或核苷酸序列的多重序列比 对,并用MEGA等软件构建描述它们关系的进化树,iTOL、FigTree等工具可视化。

3.1.3 哺乳动物感染性实验

病毒鸡胚半数感染量(EID₅₀)的测定:将分离纯化的病毒用PBS连续 10 倍倍比稀释, 10⁻⁶-10⁻¹⁰病毒稀释液接种 9-10 日龄SPF鸡胚,每个稀释度接种 3 枚鸡胚, 37 ℃培养箱培养 48 h后收取鸡胚尿囊液并测定其血凝效价,根据Reed-Muench方法计算病毒的EID₅₀。

以BALB/c小鼠作为动物模型,通过小鼠感染性实验评估分离得到的候鸟源H1N1 和 H13 毒株在哺乳动物中的病毒生长复制情况和感染特征。选取 4-6 周龄大的BALB/c雌性小 鼠(n=11/组),经异氟烷吸入麻醉后,用鼻内接种的方式感染 50 µL 稀释到 10⁶EID₅₀/50µL 的待测病毒,对照组小鼠(n=5/组)以相同方式接种相同剂量的PBS,连续观察对照组及 实验组小鼠体重及存活情况 14 d,并记录变化。滴定感染 3 d和 5 d后剖杀实验组小鼠 (n=3/组),无菌条件下采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和脑等组织器官,经处理后 接种 9-11 日龄鸡胚进行病毒滴定,检测病毒在各组织中的复制情况。

3.2 结果

3.2.1 候鸟源 H1N1 禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染性

3.2.1.1 分离株 H1N1 的遗传进化分析

为了了解野鸟源H1N1 亚型禽流感的遗传进化情况,本研究对分离得到来自鸻形目和 雁形目野生鸟类的H1N1 亚型病毒毒株的基因组进行了系统发育分析。系统发育分析表明, 禽源H1N1的血凝素(HA)基因被分为三个组,I组为欧亚谱系,II组包括欧亚和极少数北 美毒株,III组为美洲谱系,分离毒株HA基因在核苷酸水平上具有 97.5-99.8%的相似性, 在系统发育树中,聚集在同一分支上,属于欧亚谱系,与A/duck/Bangladesh/CEIRS-56497/2023/H1N7、A/mallard/Korea/KNU-25/2023/H1N1、A/bean goose/Korea/KNU-14/2023/H1N1、A/spot billed duck/Korea/KNU-39/2022/H1N1等亚洲毒株遗传关系较近。神 经氨酸酶(NA)基因在核苷酸水平上具有 97.4-99.8%的相似性,TMJ50、TMJ93、 TMJ493、TMJ679、TMJ1994、TMJ2168、TJ141 毒株聚集在同一分支,与韩国、俄罗斯 毒株遗传关系较近。

在核苷酸水平上,分离到的H1N1 亚型病毒内部片段PB2、PB1、PA、NP、M、NS基因的基因组具有 83.1-99.9%、94.7-99.9%、92.3-100% 、95.8-100% 、98.4-99.9%、70.8-99.9%的相似性。H1N1 分离株的碱性聚合酶 2 (PB2) 基因在系统发育树中被分在两个不

同的进化分支中,形成两个不同的组,TMJ50、TMJ93、TMJ493、TMJ679、TMJ1994、 TMJ2168、TJ141 毒株聚集在同一簇,TMJ50、TMJ1994 分别与俄罗斯毒株A/Common Teal/Buryatia/89i/2019/H1N1、A/mallard/Russia Primorje/166T/2020/H1N1 聚集在同一分支, 和TJ141 分 别 与 韩 玉 畫 株A/Goose/Korea/H277/2022/H5N3、 TMJ2168 A/Em/Korea/22WF191-23P/2022/H5N1 聚集在一起, TMJ93、TMJ493、TMJ679 与韩国、 日本和最近新发人感染H10N5 毒株亲缘关系较近,属于欧亚谱系, ZH1902 单独聚集在一 个分支中,与A/gull/South Korea/GNU54/2021/H13N6 聚类同一分支,属于北美谱系,此分 支中存在少数欧亚毒株,说明欧亚谱系与北美谱系间存在基因交流,且ZH1902 与H13 和 H16 亚型毒株聚集在一起, 意味着不同亚型之间可能发生了基因片段的交换。八株野鸟源 H1N1 禽流感毒株片段PB1 聚集在同一分支,属于欧亚谱系,与毒株A/teal/Russia Primorje/390/2016/H1N1、A/Anser albifrons/South Korea/163-5/2022/H10N7、A/Wild duck/South Korea/KNU2020-29/2020/H1N1、A/common teal/ShanghaiJDS110215/2020/ H9N2、A/Bean Goose(Anser fabalis)/South Korea/KNU2021-42/2021/H1N1、A/chicken/Laos/ M-FA01243/2022/H5N1 等亚洲地区毒株聚在同一分支上,亲缘关系较近,同一分支内存 在多种亚型,说明PB1 基因片段具有遗传多样性,不同的亚型之间存在复杂的基因交流。 对于酸性聚合酶PA基因的系统发育分析,发现其八个病毒株均聚集在欧亚谱系大分支, 其中TMJ93、TMJ493、TMJ679、TJ141聚集在同一分支上,与韩国毒株A/Spot-billed duck(Anas poecilohyncha)/South Korea/KNU2021-51/2021/H8N4 亲缘关系较近, TMJ50 和 与A/mallard/Yakutia/47/2020/H7N7、A/duck/Okayama/22D2T/2022/H5N1、 TMJ1994 A/duck/Mongolia/345/2018/H4N6 等亚洲毒株聚集在一起, TMJ2168 与欧洲毒株 A/duck/Moscow/5743/2019/H1N1、A/Anas platyrhynchos/Belgium/00358 0006/2023/H1N1 聚 集在一块, ZH1902 与韩国毒株A/Mallard(Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2019-54/2019/H5N3 聚集在同一簇。核蛋白NP、非结构蛋白NS基因在系统发育树中形成了两个 分支,均属于欧亚谱系,TMJ93、TMJ493、TMJ679的NP基因与我国家禽和野鸟中流行 的H6N1、H1N1 等毒株,以及 2023 年偶发感染人H10N5 毒株和俄罗斯、韩国等国家低致 病性流感毒株聚集在一起; TMJ50、TMJ1994、TMJ2168、TJ141 和ZH1902 的NP基因聚 集在同一分支上,与亚洲地区毒株A/Northern Pintail/Russia Primorje/298/2019/H3N8、

A/chicken/Korea/H124/2022/H5N1、A/Bean goose/Korea/22WC059/2022/H5N1 等聚在一起; TMJ50和TMJ1994毒株的NS基因聚集在一块,与毒株A/chicken/Kagawa/22A2T/2022/ H5N1、A/whooper swan/Shanxi/SX126/2020/H9N2、A/common teal/Shanghai/JDS110203/ 2019/H12N8、A/duck/Mongolia/419/2019/H5N3、A/mallard/Yakutia/47/2020/H7N7 等毒株同 源性较高;其他毒株NS聚在一个分支上,与欧亚H1N1、H6N1 等亚型毒株亲缘性较近。 基质蛋白M基因均聚集在同一分支上,隶属欧亚谱系,TMJ50、ZH1902、TJ141、TMJ93、 TMJ493、TMJ679、TMJ1994、TMJ2168分别与毒株A/duck/Mongolia/314/2018/H3N6、 A/kentish plover/Liaoning/DD646/2020/H10N9、A/wild duck/Korea/H296/2020/H7N9、 A/common teal/Shanghai/NH110923/2019/H1N1、A/Mallard (Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2019-65/2019/H4N6聚在一簇。通过对H1N1亚型毒株系统发育分析,在PB2系 统发育树中观察到了核苷酸较大的差异性,其中ZH1902的PB2片段与美洲谱系聚集在一 起,与其他毒株基因片段聚集在欧亚谱系中不同,分离得到的野鸟源H1N1 亚型毒株具有 基因组多样性,存在与不同亚型复杂重组现象,可能会进一步加速其进化。



图 3-1 基于 HA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,紫色分支为分离株,蓝色分支为欧亚

毒株。

Fig.3-1 Phylogenetic tree of HA gene of H1 influenza virus. The green branch is American strain, the purple branch is isolated strain, and the blue branch is Eurasian strain.



图 3-2 基于 NA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,紫色分支为分离株,蓝色分支为欧亚 毒株。

Fig.3-2 Phylogenetic tree of NA gene of N1 influenza virus. The green branch is American strain, the purple branch is isolated strain, and the blue branch is Eurasian strain





图 3-3 基于 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚毒株。

Fig.3-3 Genetic phylogenetic tree based on PB2, PB1, PA, NP, M and NS genes. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian



图 3-4 野鸟源 H1N1 亚型低致病性禽流感病毒八个基因片段核苷酸相似性。A) HA 基因、B) NA 基因、C) PB2 基因、D) PB1 基因、E) PA 基因 F) NP 基因、G) M 基因、H) NS 基因核苷酸相似性。

Fig.3-4 Nucleotide Similarity of Eight Gene Fragments of Low Pathogenicity Avian Influenza Virus of H1N1 Subtype from Wild Birds.A) HA gene, B) NA gene, C) PB2 gene, D)

PB1 gene、E) PA gene、F) NP gene、G) M gene、H) NS gene nucleotide similarity 3.2.1.2 分离株 H1N1 的分子特征

为了进一步了解野鸟源 H1N1 的遗传变异情况,对病毒的编码蛋白进行了特殊位点氨基酸分析。氨基酸序列分析显示,H1N1 亚型分离株 HA 蛋白的碱性裂解位点处氨基酸序列均为 PSIQSR ↓ GLF,不存在多个连续的碱性氨基酸,符合 LPAIV 的分子特征。该亚型病毒分离株 HA 蛋白在受体结合位点相关的氨基酸位点显示为 226Q 和 228G(H3 Numbering),均为禽源受体结合位点特征,未发生倾向于结合人样受体的相关突变。分

析的所有 H1N1 亚型分离株在 NA 茎部区域均未发现氨基酸缺失,但发现 NA 蛋白最常见 出现的耐药性突变位点 H274Y,可能对奥赛米韦类药物产生耐药性。对分离株内部基因 片段分析其是否发生哺乳动物适应性氨基酸突变产生和致病性是否可能发生变化,发现 碱性聚合酶 2、碱性聚合酶 1、非结构蛋白 NS1 和核蛋白 NP 均未发现所述可能会影响病 毒分离株生物学特性的突变;基质蛋白 M1 鉴定出了 30D、215A 氨基酸突变,可能会改 变其对小鼠的致病性。以上分子特征分析表明,候鸟源 H1 亚型分离株属于低致病性禽流 感,仍倾向于结合禽类受体。

表 3-2 候鸟源 H1 亚型禽流感的分子特征

蛋白	氨基酸 位置/序 列	TJ141	ZH1902	TMJ679	TMJ1994	表型影响
	HA 裂 解位点	³³⁹ PSIQ SR↓GL F ³⁴⁷	³³⁹ PSIQ SK↓GL FG ³⁴⁷	³³⁹ PSIQ SR↓GL F ³⁴⁷	³³⁹ PSIQS R↓GLF ³⁴⁷	插入多碱性氨基酸增强病毒致病性
НА	Q226L	Q	Q	Q	Q	受体结合位点
	G228S	G	G	G	G	
NA	Deletion in the	/	/	/	/	茎部氨基酸缺失对鼠致病性增强
	stalk					
	H274Y	Y	Y	Y	Y	耐药性位点
PB2	E158G	Е	Е	Ε	Е	增强病毒 RNA 聚合酶活性,增强病毒 的复制能力
	T271A	Т	Т	Т	Т	
	E627K	E	E	Е	Е	在宿主范围中起决定作用,增强聚合 酶活性和鼠致病性
	D701N	D	D	D	D	增强聚合酶活性和鼠致病性
PB1	S622G	G	G	G	G	对鼠致病性增强
	V709I	V	V	V	V	
PA	T157A	Т	Т	Т	Т	影响病毒的复制能力
	H510A	Н	Н	Н	Н	降低病毒 mRNA 的转录

Tab.3-2 Molecular characteristics of H1 subtype avian influenza from migratory bird

山小师花八于欧工于丛化文

NP	I ¹⁰⁹ T	Ι	Ι	Ι	Ι	促进病毒 RNA 的合成,增强 AIV 对鸡的致病力
M1	N ³⁰ D	D	D	D	D	对鼠致病性增强
	T ²¹⁵ A	А	А	А	А	
NS1	S ⁴² P	S	S	S	А	对小鼠致病性增强
	L ⁹⁸ F	М	М	М	Ι	对小鼠致病性增强
	I ¹⁰¹ M	D	D	D	Е	

注: /表示没有发生缺失; -表示缺失;HA Subtype Numbering Conversion (https://www.bv-brc.org)

3.2.1.3 分离株 H1N1 对小鼠的感染性

本研究在 BALB/c 雌性小鼠上进行了禽流感病毒的感染性实验,为进一步评估野鸟源 H1N1 亚型感染哺乳动物风险提供基础。实验结果表明,感染 2020-2023 年间不同时间地 点分离得的 H1N1 病毒株 ZH1902、TJ141、TMJ1994、TMJ679 的小鼠没有明显的临床症 状,所有小鼠在连续 14 天的观察期内均未出现死亡情况。感染组小鼠的肺脏中的复制滴 度较高,除 ZH1902 外,第五天肺的病毒复制滴度均高于第三天,4 株毒株第三天肺中病 毒复制滴度分别能达到 4.6、5.4、4.75、5.4log10EIDso/ml,第五天肺中病毒复制滴度分别是 4、6.4、6、5.8log10EID₅₀/ml,均能够在小鼠心脏、肝脏中以较低滴度复制,TMJ1994 第五 天的心脏复制滴度能达到 3.75log10EID₅₀/ml,均不能在小鼠的脑和肠道中复制。其中 ZH1902、TMJ1994 能以较低的滴度在肾脏中复制。在两周的观察期内,4 株 H1N1 病毒 感染的小鼠具有不同程度的体重下降。相对来说,病毒分离株 TJ141、TMJ1994、 TMJ679 较 ZH1902 体重下降较为明显。结果表明不同时间,不同地点分离得到 4 株野鸟 源 H1N1 毒株均可以不经适应的情况下直接感染小鼠,但体重减轻,并未出现死亡情况, 整体感染性不强呈现低致病性,不会引起明显的疾病。

中国知网 https://www.cnki.net



图 3-4 小鼠感染病毒后组织病毒复制情况 Fig.3-4 Replication of tissue virus in mice infected with avian influenza virus



Days of post infection

图 3-5 小鼠感染病毒后体重变化百分比 Fig.3-5 Weight changes of mice post inoculation

3.2.2 候鸟源 H13Nx 禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染性

3.2.2.1 分离株H13 亚型的遗传进化分析

目前,H13 亚型低致病性禽流感病毒仅在野鸟中形成了较为稳定的流行,众多研究表

明其因鹬类、鸥类野鸟得以维持遗传进化,以及后续传播。对在主动监测地环渤海湾滩 涂湿地多年间分到的H13N6 和H13N8,以及最近在东部沿海环境样本中分到的H13N6 进 行了遗传进化研究。系统发育分析表明,H13 亚型的HA基因被分成了 3 个聚类分支,组I 和组III均为欧亚大陆和美洲大陆分离的毒株,组II为纯美洲大陆分离毒株,从系统发育树 上看,组I和组II的遗传关系更为密切,除ZH385 分离株在组I,其余分离株均聚集在组III, 未发现十分明确的与北美毒株交际,但组I和组III分支表明了欧亚大陆H13 毒株与美洲大 陆发生了洲际传播。对于NA基因,我们分离得到了N6 和N8 基因,通过分析发现部分N6 和N8 基因与美洲毒株有联系,像ZH385、ZH5299、ZH987、DZ137 毒株与智利和阿拉斯 加地区分离毒株聚类一起。PB2 基因被分为三组, DZ137、ZH385 分别被独立为一组, DZ137与蒙古和俄罗斯远东地区H13 毒株聚类在一起, ZH385 与欧洲地区荷兰、格鲁吉亚 H13 毒株聚类一起;其余八株H13 毒株与少数欧亚毒株聚集在美洲毒株聚类的分支中,其 中ZH186 与A/glaucous-winged gull/Southcentral Alaska/15MB01429/2015/H13N6聚集在一块, 可能发生了欧亚大陆与北美洲之间的跨洲际传播。PB1 基因的系统发育分析发现, DZ137PB1 片段为美洲支系,CZ949、ZH987 等毒株所在欧亚谱系分支中存在两株阿拉斯 加地区毒株,且与分离得到的毒株亲缘较近。除DZ137和ZH385毒株聚集在欧亚谱系分支 中外,其他分离株PA基因均聚集在欧亚大陆和美洲大陆分离毒株同时存在的分支中,且 与北美分离毒株之间亲缘关系较近。NP基因进化树显示, DZ137、C701 分别与北美毒株 A/glaucous-winged gull/Alaska/545/2013/H13N2 和A/Glaucous-Winged Gull/Alaska/20MB02 182/2020/H13N6 聚类一起,其他分离株与欧亚野鸟分离毒株聚集。C701、CZ949、 ZH5299、CZ1503 毒株的M1 基因与A/Glaucous-Winged Gull/Alaska/20MB02182/2020/ H13N6聚集。H13亚型分离株的NS基因属于欧亚谱系。相比于H1、H10和H16亚型的跨 区域性传播,H13的跨洲际传播更为频繁,欧亚谱系与美洲谱系基因交流现象更显著,分 离株内部片段均发现与美洲毒株基因聚类在同一分支的现象。

中国知网 https://www.cnki.net



图 3-6 基于 HA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚 毒株。

Fig.3-6 Phylogenetic tree of HA gene of H13 influenza virus. The green branch is American strain, the red

branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.



图 3-7 基于 NA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑 色分支为欧亚毒株。





strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.

图 3-8 基于 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚毒株。

Fig.3-8 Phylogenetic tree of NA gene of PB2、PB1、PA、NP、M、NS influenza virus. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.

3.2.2.2 分离株H13 的分子特征

氨基酸序列分析显示,H13 亚型分离株HA蛋白的碱性裂解位点处氨基酸序列均为

PAISNR↓GLF,不存在多个连续的碱性氨基酸,符合LPAIV的分子特征。与受体结合位 点相关的氨基酸序列分析发现,该亚型病毒分离株HA蛋白受体结合位点显示为 226Q和 228S(H3 Numbering),226 位点为禽源受体结合位点特征,而 228 位点突变表明它们可能 对人样受体具有亲和力。对NA蛋白序列的分析表明,所有H13 亚型分离株在NA茎部区域 均未发现氨基酸缺失,并未发现NA蛋白最常见出现的耐药性突变位点。通过对分离株内 部基因片段分析表明,碱性聚合酶 2 未出现宿主适应性突变和可能导致致病性的突变;碱 性聚合酶 1、基质蛋白M1 分别鉴定出了 622G、30D氨基酸,可能会改变其对小鼠的致病 性;非结构蛋白NS1 和核蛋白NP未发现所述可能会影响病毒分离株生物学特性的突变。 以上分子特征分析表明,野鸟源H13 AIV分离株属于低致病性禽流感,HA、PB1 和M1 片 段存在突变,可能会对人的受体结合具有亲和力,以及对小鼠致病性增强。

表 3-3 候鸟源H13 亚型禽流感的分子特征

Tab.3-3 Molecular characteristics of H13 subtype avian influenza from migratory bird

蛋	氨基酸位									
白	置	ZH987	ZH2943	ZH385	DZ137	ZH5299	ZH186	CZ949	2017C701	FJ124
	/序列									
	HA裂解位	³²⁴ PAISNR↓	³²⁴ PAISNR↓	³²⁴ PAISNR↓GL	³²⁴ PAISNR↓G	³²⁴ PAISNR↓G				
TTA	点	GLF ³³²	GLF^{332}	F^{332}	F^{332}	F^{332}	F^{332}	F^{332}	LF^{332}	LF^{332}
ПА	$Q^{226}L$	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	$G^{228}S$	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Deletion									
NA	in the	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	stalk									
	H274Y	Q	G	G	Q	R	Q	G	Ν	Q
	$E^{158}G$	Е	E	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е
	$T^{271}A$	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т
PB2	E ⁶²⁷ K	Е	E	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е
	$D^{701}N$	D	D	D	D	D	D	D	D	D
DD 1	$S^{622}G$	G	G	G	G	G	G	G	G	G
5R1	$V^{709}I$	V	V	V	V	V	V	V	V	V
PA	$T^{157}A$	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т

山东师范大学硕士学位论文

	$\mathrm{H}^{\mathrm{510}}\mathrm{A}$	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н
NP	$I^{109}T$	V	V	V	V	V	V	V	V	V
M1	N ³⁰ D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
IVI 1	$T^{215}A$	А	А	А	А	А	А	А	А	А
	$S^{42}P$	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NS1	L ⁹⁸ F	М	М	М	М	М	М	М	М	М
	$I^{101}M$	D	D	D	D	D	Е	D	D	D

注: /表示没有发生缺失; - 表示缺失; HA Subtype Numbering Conversion (https://www.bv-brc.org); 表型影响见表 3-2。

3.2.2.3 分离株 H13 亚型对小鼠的感染性

通过运用 BALB/c 小鼠哺乳动物感染模型,研究了近期分离到的 H13 亚型毒株对哺 乳动物感染的可能性。实验结果如图 3-9 所示,ZH5299 和 CZ949 均不能够在小鼠的鼻 甲、肺脏、脾脏、肾脏、脑、心脏、肝脏、肠道 8 个组织器官中复制。在连续的 14 天观 察期内,感染组小鼠没有出现明显的临床症状,且均存活。感染组小鼠在感染毒株 ZH5299 和 CZ949 后体重均出现短暂下降,随后体重缓慢增长,逐渐平稳。结果表明,最 近分离到的 H13 亚型毒株在不经适应情况下不能够直接感染小鼠,还未获得感染哺乳动 物的能力。



图 3-9 小鼠感染病毒后组织病毒复制情况 Fig.3-9 Replication of tissue virus in mice infected with avian influenza virus



图 3-10 小鼠感染病毒后体重变化百分比 Fig.3-10 Weight changes of mice post inoculation

3.2.3 候鸟源 H16N3 禽流感病毒遗传进化分析和对小鼠的感染性

3.2.3.1 分离株H16N3 的遗传进化分析和分子特征

血清学结果显示 H16 亚型毒株在野鸟中持续循坏,流行比较普遍,但在我国目前发现较少,为了了解 H16 亚型的遗传进化情况,对最近发现的 H16N3 毒株序列进行了一系

列的研究分析。系统发育分析表明,H16N3 亚型毒株来源于欧亚谱系的欧洲地区分离毒 株,H16 亚型毒株 HA 基因被分成两个组,一组为部分欧洲毒株,一组是欧亚毒株与北美 毒株聚集而成的分支,分离株 CZ1451、CZ1481 和 CZ1491 聚集在一起,与荷兰毒株聚类 在同一分支。NA 基因与我国分离株 A/great black-headed gull/Ningxia/1/2018/H16N3、 A/gull/Shandong/W1359/2021/H16N3,以及欧亚部分毒株聚类在一起,属于欧亚谱系。 PB2 的系统发育分析表明 CZ1491 与我国毒株 A/gull/Shandong/W1359/2021/H16N3、俄罗 斯毒株 A/european herring gull/Leningrad region/RII-WD646S/2023/H13N2 和 A/european herring gull/Leningrad region/RII-WD561/2023/H13N6 聚集在同一分支, 分离株 CZ1451、 CZ1481 与毒株 A/Chroicocephalus ridibundus/Belgium/13464/2020/H13N8、A/gull/South Korea/GNU54/2021/H13N6,以及与 CZ1491 聚集的毒株,聚类在一起,遗传关系较近。 PB1 的系统发育分析发现三株分离株聚集在一块,与欧亚地区分离 H16N3、H13N6、 H13N2等毒株聚类在一起。分离株 PA 基因与欧亚分离株 H13N8、H13N6、H13N2、H5N1 亚型分离株聚集在一起,与不同亚型之间进行了基因交换。分离株 NS 基因与欧洲 2023 年 和 2022 年 H5N1 毒株,以及毒株 A/Chroicocephalus ridibundus/Belgium/13464/2020/H13N8 和 A/gull/Shandong/W1359/2021/H16N3 聚类同一分支。分离株 CZ1491 的 M 基因与 region/RII-WD561/2023/H13N6 A/european herring gull/Leningrad 和 A/gull/Shandong/W1359/2021/H16N3 遗传关系较近, CZ1451 和 CZ1481 与 A/black-headed gull/Netherlands/5/2014 H13N6 聚类同一分支。分离株的 NP 基因与我国毒株 A/great blackgull/Ningxia/1/2018/H16N3、A/Eurasian curlew/Liaoning/ZH-186/2014/H13N6、 headed A/swan/East China/SD588/2015/H13N8 聚集在一块,具有较近的遗传距离。对我们分离株 与数据库中同源性较高毒株以及目前 H16 流行株系统发育分析结果显示流行的 H16 亚型 毒株的内部基因 PB2 基因、PB1 基因、NS 基因、NP 基因、M 基因、PA 基因均与 H13 亚 型存在基因交流,我们分离株均属于欧亚谱系,但从系统发育进化树看,欧亚与北美毒 株之间存在部分基因交流, PA 基因和 NS 基因聚集分支中发现 H5N1 亚型毒株, 可能是高 致病性 H5N1 毒株重组了低致病性 H13 或 H16 亚型毒株片段。

对分离株的氨基酸序列分析发现,分离株 HA 蛋白的碱性裂解位点处氨基酸序列均为 PSIVER↓GLF,受体结合位点为 226Q 和 228S,226 位点为禽源受体结合位点特征,而

228 位点突变表明它们可能对人样受体具有亲和力。在 NA 茎部区域均未发现氨基酸缺失, 并未发现 NA 蛋白最常见出现的耐药性突变位点。分离株内部基因片段分析表明, PB2 片 段的 627 位点为 E, 未出现宿主适应性突变,可能导致致病性的 158 位点、701 位点未发 生突变, CZ1481 的 271 位点为 A,可能增强病毒 RNA 聚合酶活性,增强病毒的复制能力; CZ1491 的 M1 蛋白鉴定出了 30D 和 215A 氨基酸突变,可能会改变其对小鼠的致病性; PA、PB1、NS1 和 NP 未发现所述可能会影响病毒分离株生物学特性的突变。以上分子特 征分析表明,野鸟源 H16 AIV 分离株属于低致病性禽流感,部分分离株 PB2 和 M1 片段存 在突变,可能会对小鼠致病性增强。



图 3-11 基于 HA 基因绘制的遗传进化树。蓝色为美洲毒株,绿色为欧亚毒株,紫色为分离株。 Fig.3-11 Phylogenetic tree of HA gene of H16 influenza virus. Blue is American strain, green is Eurasian strain, and purple is isolated strain.



图 3-12 基于 NA 基因绘制的遗传进化树。蓝色为美洲毒株,橘色为欧亚毒株,紫色为分离株。







图 3-13 基于 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚毒株。

Fig.3-13 Phylogenetic tree of NA gene of PB2、PB1、PA、NP、M、NS influenza. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.
3.2.3.2 分离株 H16N3 对小鼠的感染性

通过 BALB/c 小鼠哺乳动物感染模型,评估了分离到的候鸟源 H16N3 毒株对哺乳动物的感染风险。实验结果如图 3-14 所示,分离株 CZ1481 在感染组小鼠肺中低水平复制,在鼻甲、肺脏、脾脏、肾脏、脑、心脏、肝脏、肠道其余 7 个组织器官中未发现病毒复制;分离株 CZ1491 未能感染小鼠。在连续的 14 天观察期内,感染组小鼠没有出现明显的临床症状,在感染毒株 CZ481 后体重出现短暂下降,随后体重缓慢增长,逐渐平稳;感染 CZ1491 的小鼠体重未出现明显下降。结果表明,分离到的 H16N3 亚型毒株在不经适应情况下部分毒株可以直接感染小鼠,但感染性较低,仅在肺中发现低水平复制,部分毒株还未获得直接感染哺乳动物的能力。

中国知网 https://www.cnki.net



图 3-14 小鼠感染病毒后组织病毒复制情况 Fig.3-14 Replication of tissue virus in mice infected with avian influenza virus



Fig.3-15 Weight changes of mice post inoculation

3.2.4 候鸟源 H10Nx 禽流感病毒的遗传进化分析和对小鼠的感染性

3.2.4.1 分离株H10Nx的遗传进化分析

2024年1月,国家疾控局通报浙江省发现一例 H3N2 与 H10N5 混合感染人的病例, 使得 H10 低致病性禽流感再次引起高度关注。过去的研究表明 H10N3 和 H10N8 亚型毒株 已对家禽和人类健康构成了威胁。对历年野鸟主动预警数据 H10Nx 亚型低致病性禽流感 病毒毒株基因序列进行了遗传进化研究。系统发育分析表明,H10Nx 亚型的 HA 基因被分 在两个大的分支里,TMJ2193、TMJ28、CZ1753 和 QH82 所在分支与北美谱系毒株遗传距 离相对于 TMJ1098 所在分支较近一些,其中 TMJ2193 与人感染 H10N5 毒株 A/Zhejiang/ZJU01/2023/H10N5 以及亚洲地区发现的野鸟毒株聚类在一块,其他毒株与亚 洲地区野鸟中的 H10 毒株具有较近的亲缘关系;TMJ1098 毒株与 A/mallard/Korea/H276-1/2018/H10N1 遗传距离最近,与我国家禽中的 H10 毒株聚集在一块,这一分支表明野鸟 和家禽之间可能发生了溢出现象。分别对分离得到的 N4、N5、N7基因进行系统发育树构 建,从发育树中可看出,TMJ2193、TMJ28 毒株均属于欧亚谱系,分别与我国毒株 A/eurasiancoot/Shandong/W4446/2020/H10N4 和 韩 国 毒 株 A/Mallard(Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2021-52/2021/H8N4 遗传距离较近,TMJ28NA 基因可能来 源于野鸟源 H8N4,发生了基因重组;TMJ1098 与亚洲地区家禽、野鸟 H6N5、H12N5、 H10N5 聚集一起,其中和毒株 A/mallard/Korea/H206/2018/H10N5 遗传距离最近;而 CZ1753 的 NA 基因与其遗传距离最近的 A/Zhejiang/ZJU01/2023/H10N5 毒株共同聚类在欧 亚大陆分离株簇中,这一分支主要是野鸟源 H12N5 与 H5N5 分离株;QH82 的 NA 基因为 欧亚谱系,可能来源于韩国野鸟毒株 H7N7。

PB2 基因系统发育树显示, 分离株 PB2 属于欧亚谱系, CZ1753 与 A/environment/Kagoshima/KU-J5/2022/H3N8 聚集在一起,QH82 与 A/mallard/Omsk Region/63/2019/A / H3N8 聚集, TMJ2193 与 A/duck/Bangladesh/41653/2019/H4N2 聚集, TMJ1098 与 A/mallard/Korea/H276-1/2018/ H10N1 聚集。PB1 基因的系统发育分析表明, 分离株被分为三组,但处于同一分支,TMJ1098 与俄罗斯野鸟中的 H11N9 毒株、韩国家 禽 H5N2 毒株,以及我国东部家禽 H7N4 毒株和野鸟 H5N3 毒株聚类在一块。系统发育分 析表明,分离株的 PA 基因处于两个分支中,TMJ2193、QH82、TMJ28 在同一分支,分别 与 A/duck/Bangladesh/37525/2019/H8N4、A/bean goose/Korea/KNU-16/2022/H1N1 A/Mallard(Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2021-23/2021/H8N4 聚类一起; CZ1753 和 TMJ1098 毒株, 与韩国野鸟 H6N1、H7N7 毒株, 我国东部野鸟 H1N1、H12N5 毒株, 孟 加拉国家禽H6N7毒株,蒙古家禽H10N2毒株聚集在一起。M基因的系统发育分析显示, 五株 H10 毒株被分在两个分支中, QH82、TMJ28、TMJ2193 和 TMJ1098 聚集在同一分支, 其中 TMJ2193 与 TMJ1098 和毒株 A/Wild Duck/South Korea/KNU2020-101/2020/H9N2、 A/Wild Bird/South Korea/KNU2020-77/2020/H3N8, A/spot-billed duck/South Korea/JB32-105/2019/H4N2、A/duck/Bangladesh/43273/2020/H10N7 聚类在一起; QH82 与俄罗斯毒株 A/common teal/Sakhalin/110c/2020/H3N8、 日本 毒株 A/environment/Kagoshima/KU-I6/2021/H4N6 聚类一分支; TMJ28 与西西伯利亚地区毒株 A/mallard/Chany Lake/18/2018/H1N3 和 A/teal/Novosibirsk region/824/2018/H3N8 聚集在一块; CZ1753 与蒙 古毒株 A/duck/Mongolia/575/2018/H3N1, 以及俄罗斯毒株 A/Common Teal/Amur region/31b/2019/H3N6聚类在同一分支中。NP基因系统发育进化树中看,野鸟源H10毒株 分布在三个主要分支中, 其中 TMJ2193 与 QH82 单独聚类在一分支, 分别与韩国毒株 A/spot-billed duck/South Korea/JB15-4/2019/H4N3、蒙古毒株 A/Duck/Mongolia/2021-

MG02/2021/H3N8 聚集一起;其余三株分离株与 A/mallard/Korea/H276-1/2018/H10N1、 A/Eurasian wigeon/Kagoshima/KU-D45/2018/H6N2、A/environment/Kagoshima/KU-E1/2018/H4N2 聚类在一起。病毒 NS 基因聚类在同一分支,与韩国以及我国东部沿海地区 低致病性禽流感病毒毒株具有较近的亲缘关系。野鸟源 H10 亚型低致病性禽流感病毒系 统发育分析结果表明,分离株八个基因片段均为欧亚谱系,与亚洲其他地区存在区域性 基因交流,内部片段源于与不同亚型毒株的基因重组,具有复杂的遗传多样性,在野鸟 中有稳定的进化,但较为容易的基因重组,可能会造成跨宿主感染。



图 3-16 基于 HA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚 毒株。

Fig.3-16 Phylogenetic tree of HA gene of H10 influenza virus. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.



图 3-15 基于 NA 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚毒株。

Fig.3-15 Phylogenetic tree of NA gene of N4、N5、N7 influenza virus. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.



图 3-16 基于 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因绘制的遗传进化树。绿色分支为美洲毒株,红色分支为分离株,黑色分支为欧亚毒株。

Fig 3-16 Phylogenetic tree of NA gene of PB2、PB1、PA、NP、M、NS influenza virus. The green branch is American strain, the red branch is isolated strain, and the black branch is Eurasian strain.

通过对 H10 亚型分离株的氨基酸序列分析显示,分离株 TMJ28、TMJ2193、QH82、 CZ1753 HA 蛋白的碱性裂解位点处氨基酸序列为 PEVVQGR↓GLF,分离株 TMJ1098HA 蛋白的碱性裂解位点处氨基酸序列为 PELMQGR↓GLF,不存在多个连续的碱性氨基酸, 均符合 LPAIV 的分子特征。该 HA 亚型病毒分离株 HA 蛋白在受体结合位点相关的氨基 酸位点显示为 226Q 和 228G(H3 Numbering),均为禽源受体结合位点特征,未发生倾向 于结合人样受体的相关突变。NA 蛋白茎部长度对流感病毒的致病性很重要,分析的所有 H10 亚型分离株在 NA 茎部区域均未发现氨基酸缺失,未发现 NA 蛋白最常见出现的耐药 性突变位点 H274Y,可能对奥赛米韦类药物不产生耐药性。对分离株内部基因片段分析 其是否发生哺乳动物适应性氨基酸突变产生和致病性是否可能发生变化,发现碱性聚合 酶 2、非结构蛋白 NS1 和核蛋白 NP 均未发现所述可能会影响病毒分离株生物学特性的突 变;基质蛋白 M1 鉴定出了 30D、215A 氨基酸突变,碱性聚合酶 1 发现 622G 突变,可能 会改变其对小鼠的致病性。以上分子特征分析表明,野鸟源 H1 AIV 分离株属于低致病性 禽流感,仍倾向于结合禽类受体,NA、PB1、M1 蛋白发生了可能与小鼠致病性相关的特 殊位点突变。

Tab.3-4 Molecular characteristics of H10 subtype avian influenza from migratory bird									
	氨基酸								
蛋日	位置	TMJ	TMJ	TMJ	QH	CZ	表型影响		
		1098	28	2193	82	1753			
	/)予列								
		³²⁴ PEL	³²⁴ PEV	³²⁴ PEV	³²⁴ PEV	³²⁴ PEV			
	HA 裂解	MQGR	VQGR	VQGR	VQGR	VQGR	插入多碱性氨基酸增		
	位点	↓GLF	↓GLF	↓GLF	↓GLF	↓GLF	强病毒致病性		
		332	332	332	332	332			
TT A	Q ²²⁶ L	Q	Q	Q	Q	Q	两体结合位占		
HA	$G^{228}S$	G	G	G	G	G	文仲纪百世点		
	Deletion						茎部氨基酸缺失对鼠		
	in the	/	/	/	/	/	致病性增强		
NA	stalk								
	H274Y	Т	Т	Т	Т	Т	耐药性位点		
	$E^{158}G$	Е	Е	Е	Е	Е	增强病毒聚合酶活性,		
002	T ²⁷¹ A	Т	Т	Т	Т	Т	增强病毒复制能力		
PB2	E627V	(27	Б		T	Б	在宿主范围中起决定		
	E., V	E	E	E	E	E	作用,增强聚合酶活性		

表 3-4 候鸟源 H10 亚型禽流感的分子特征

							和鼠致病性
	D ⁷⁰¹ N	D	D	D	D	D	增强聚合酶活性和鼠 致病性
DD 1	S ⁶²² G	G	G	G	G	G	对鼠孙定性描码
PBI	$V^{709}I$	V	V	V	V	V	M 跟我的工作死,
	T ¹⁵⁷ A	Т	Т	Т	Т	Т	影响病毒的复制能力
PA	510						降低病毒 mRNA 的转
	H ⁵¹⁰ A	Н	Н	Н	Н	Н	录
							促进病毒 RNA 的合成,
NP	I ¹⁰⁹ T	Ι	Ι	Ι	Ι	Ι	增强 AIV 对鸡的致病
							力
M1	N ³⁰ D	D	D	D	D	D	对鼠孙病性脑碍
IVI I	T ²¹⁵ A	А	А	А	А	А	刘 既 玖 讷 庄 垣 班
	S ⁴² P	S	S	S	S	S	增强小鼠致病性
NS1	L ⁹⁸ F	М	М	М	М	М	摘起小兒欢定州
	$I^{101}M$	D	D	D	D	D	⁻ 垍加小風 我 两 任

山东师范大学硕士学位论文

注: /表示没有发生缺失; -表示缺失;HA Subtype Numbering Conversion (https://www.bv-brc.org)

3.2.4.2 分离株 H10Nx 对小鼠的感染性

通过 BALB/c 小鼠哺乳动物感染模型,评估了分离到的候鸟源 H0N4(TMJ2193)和 H10N5(TMJ1098)亚型毒株对哺乳动物的感染风险。实验结果如图 3-19 所示,分离株 TMJ2193 在感染组小鼠肺中低水平复制,在鼻甲、肺脏、脾脏、肾脏、脑、心脏、肝 脏、肠道其余 7 个组织器官中未发现病毒复制;分离株 TMJ1098 在鼻甲、肺脏、肾脏、 心脏、肝脏、肠道 6 个组织器官均发现病毒复制,且在肺中复制水平较高,未能在脑和脾 脏中复制。在连续的 14 天观察期内,感染组小鼠没有出现明显的临床症状,在感染毒株 TMJ2193 后体重出现短暂下降,随后体重缓慢增长,逐渐平稳;感染 TMJ1098 的小鼠体 重未出现明显下降,比较平稳。结果表明,分离到的 H10N5 亚型毒株在不经适应情况下 可以直接感染小鼠,且在多组织中复制,对哺乳动物表现出良好的适应性;H10N4 毒株 也可以在不经适应情况下直接感染小鼠,但感染能力较低。

中国知网 https://www.cnki.net



图 3-19 小鼠感染病毒后组织病毒复制情况 Fig.3-19 Replication of tissue virus in mice infected with avian influenza virus



3.3 讨论

禽流感病毒谱系被分为欧亚和美洲谱系两大分支,通过对野鸟源低致病性禽流感代 表毒株的系统发育分析,进一步验证了这一点。分离的得到H1 亚型毒株为欧亚谱系与亚 洲地区分离毒株遗传关系接近,为亚洲区域流行传播毒株,内部片段来源于多种低致病 性亚型毒株,基因组成复杂,具有明显的遗传多样性。其中ZH1902 的PB2 片段与美洲毒 株关系密切,可能是重组于同生境条件下存在的美洲来源的H13 毒株,且同年同一时间段, 在同地区也发现了与美洲毒株遗传关系较近的H13N6 毒株。毒株符合低致病性禽流感特 征,也未发生受体结合偏好改变的相关突变,M1 蛋白发现了表征鼠致病性增强的突变, 但此突变未在H1 亚型上验证,仅作为理论参考。分离株H1N1 毒株均可以不经适应直接感 染小鼠,且在小鼠肺脏中滴度较高,除脑组织和肠道外,其他组织具有不同程度感染, 说明H1N1 病毒已经获得了在哺乳动物宿主中复制的能力,我们不能忽略它们最终会通过 重组或突变的积累进化为在哺乳动物具有有效传播性的病毒的可能性,因此野鸟源H1N1

毒株对于哺乳动物存在较大威胁。H10病毒株已经在我国发生了三起感染人事件,且每次 均为不同的重组毒株,不禁让我们对其引起重视。对野鸟源的H10 亚型毒株分析发现, TMJ2193的HA基因与CZ1753的NA基因与 2023年人感染H10N5 毒株有较近的亲缘关系, 表明人源H10N5 可能由野鸟溢出而来,分离株均属于欧亚谱系,内部基因有着较为复杂 的毒株来源,为不同亚型重组毒株。研究表明大部分感染人低致病性亚型毒株与重组家 禽H9N2 毒株有关,TMJ2193 与TMJ1098 的M基因可能来源韩国野鸟H9N2 毒株,但分离 株暂未与家禽H9N2 产生关联, 茎部区域均发现不同程度的氨基酸缺失, 可能会增加病毒 的致病性。有研究表明野鸟源H10亚型病毒毒株在没有事先适应的情况下在小鼠中复制, 并且呼吸系统中的病毒复制水平高于其他器官,表现出良好的哺乳动物适应性,对公众 健康构成威胁^[83]。经评估,分离株TMJ1098 对哺乳动物具有良好的感染能力,说明了候 鸟源H10N5亚型对哺乳动物构成一定威胁。H13亚型病毒分析发现欧亚谱系和美洲谱系存 在较为频繁的基因交流,跨洲际传播的迹象更为明显,但是多个独立的引入事件,而不 是持续的地方性循环,分离株对小鼠不具备感染性,可能还未获得直接感染哺乳动物的 能力。H16N3 亚型毒株在我国目前较少被分离出,但与H1 和H10 不同的是,它与欧洲毒 株关系更为密切,也可能是因为亚洲地区缺少关于H16亚型毒株的数据的原因。对我国东 部地区分离株H1、H10、H13 和H16 亚型毒株的分析发现,这些亚型毒株目前未在我国野 鸟中形成地方性循环禽流感病毒毒株。

3.4 小结

1.候鸟源H1N1 禽流感毒株为多亚型重组毒株,内部基因来源复杂,具有遗传多样性, 毒株ZH1902 的PB2 基因与美洲毒株关系密切,可能发生了美洲谱系毒株独立片段的引入 事件。哺乳动物感染性实验表明,H1N1 毒株可不经适应直接感染小鼠,且在多脏器内复 制,表现出良好的哺乳动物适应性。

2. 候鸟源H13Nx亚型分离株未发现与其他亚型发生重组现象,发现跨洲际多个独立的 基因交流事件,ZH385、ZH5299、ZH987、DZ137 毒株的NA基因,ZH186 的PB2 基因, DZ137 的PB1 基因,DZ137、C701 的NP基因片段与美洲谱系毒株遗传关系较近。候鸟源 H16N3 分离株属于欧亚谱系,极大可能由欧洲毒株跨区域传播而来,其内部片段与H13 亚 型毒株密切相关,之间存在频繁的基因交流。哺乳动物感染性实验表明,近期分离到的
H13 亚型毒株ZH5299 和CZ949 还未获得直接感染哺乳动物的能力;分离到的H16N3 亚型 毒株CZ1481 在小鼠肺中出现低水平复制,对感染哺乳动物具有一定的风险性。

3. 候鸟源H10Nx毒株均为欧亚谱系,内部基因具有明显的遗传多样性,与不同亚型 LPAIV毒株之间存在基因片段交流,部分基因片段与家禽中发现毒株遗传关系较近。分离 株H10N4 和H10N5 亚型毒株均可以在不经适应直接感染小鼠,H10N5 毒株对哺乳动物模 型的感染能力更强一些。

5. 系统发育分析发现我国病毒毒株主要与蒙古、韩国、俄罗斯亚洲地区、孟加拉国等 地区毒株关系密切,与我们标记的候鸟迁徙区域高度相似,已由候鸟迁徙网络形成包括 我国在内的局域性相对稳定的传播圈。

4 结论与展望

4.1 结论

1. 2021-2023 年为期 3 年的周期性监测期间,在 16 个地区的 17 目 29 科 134 种候鸟 58,803 份样本中分离获得 124 株 22 种亚型 LPAIV 毒株,分离率为 0.21%,所发现 LPAIV 分离株主要来源于雁鸭类和鸻鹬类,揭示了我国东部候鸟迁徙区中 LPAIV 流行性、多样性和宿主特异性。结果表明,雁鸭类和鸻鹬类候鸟是 AIV 的易感物种,可将其作为东部候鸟迁徙地区监测 AIV 的重要指示物种。同时揭示了途径我国迁徙候鸟中 AIVs 具有亚型多样性、宿主特异性的特点。血清学调查发现抗体阳性率高于病原分离率,证明 LPAIV 长期在野鸟中循环。

2. 候鸟源 H1N1 和 H10N5 亚型毒株可不经适应直接感染小鼠,并可在小鼠多组织中 复制,H1N1各分离株之间差异性不显著。H10N4和部分H16N3分离株仅在小鼠肺中出现 低水平复制。系列结果表明,候鸟源 H1N1 和 H10N5 具备了良好的哺乳动物适应性,警 示 H1N1和 H10N5 对跨种传播哺乳动物存在极大的可能性;候鸟源 H10N4和 H16N3 对感 染哺乳动物存在一定的风险,正在获得直接感染哺乳动物的能力。

3. 途径我国候鸟中 H13N6、H13N8 和部分 H16N3 分离株不能够感染小鼠,且未引起 任何临床表征。系列研究结果表明,所获候鸟源 H13Nx 毒株和部分 H16N3 毒株尚不具备 直接感染模式动物小鼠的能力。结合 H1N1 和 H10Nx 结果分析,表明 LPAIV 各亚型之间 的跨种感染能力存在明显差异性,部分 LPAIV 已经获得了感染哺乳动物的能力。

4. 通过鸻形目候鸟的迁飞活动的实时追踪,发现了途径我国候鸟与俄罗斯(亚洲地区)、蒙古、韩国、东南亚地区、新西兰以及阿拉斯加地区之间的必然联系。结合 LPAIV 分离株各基因片段系统发育分析,发现途径我国候鸟中 LPAIV 呈现出丰富的亚型组合,各亚型之间存在复杂的基因重组,存在跨区域或洲际间交流传播现象,所获分离株与上述地区遗传关系较为密切。系列研究结果表明,LPAIV通过候鸟迁徙形成了较为稳定的局域性传播圈。

64

4.2 展望

禽流感病毒一直在候鸟种群持续流行,并不断进化和跨种传播,持续威胁人类健康、 哺乳动物、家禽和野生鸟类安全。近年来,LPAIV跨种感染哺乳动物或人类事件频发,对 公共卫生安全造成了一定威胁。因此,继续开展候鸟源禽流感病毒的的流行、进化与传 播研究具有重要意义。对于我国的候鸟的持续性监测以及保护成效直接影响全球候鸟种 群的多样性,对其持续性禽流感病毒监测对于我们更好的掌控病原体的传播,遗传变异 进化可能的发展趋势,提升预警和防控水平有着重要的意义。

生态退化,气温升高和极端天气事件可能会加剧病毒对人类健康的威胁,生态因素 的出现可能会增加了禽流感流入未受影响地区的风险,凸显了加强对禽流感病毒监测的 必要性。气候变化是目前正在进行的全球环境变化之一,预计将从影响病毒传播方面对 人类病毒性疾病暴发产生广泛影响。全球气候变化可以通过多种途径影响病毒的存活和 传播、宿主易感性,以及人类社会行为和生态环境等要素,不仅会增加疾病的传播风险, 还会导致疾病的流行范围和时空分布发生变化。由于气候,自然和人类活动之间相互作 用的复杂性,很难预测未来的气候变化将如何影响病毒感染的传播。揭示气候变化与病 毒感染之间的复杂关联,并阐明气候环境要素影响病毒感染发生与流行的潜在作用机制, 对于制定有效的病毒预防和应对策略具有重要的科学意义。

宿主和病毒生态学决定了野生鸟类中甲型流感病毒传播,病毒对宿主资源的竞争、 病毒与宿主的协同进化可能是疾病出现的重要机制。研究禽流感病原体的自然宿主的生 态学,认识到野生鸟类在禽流感传播中可能起的作用,确定自然宿主的迁移潜力对于禽 流感的进一步监测有重大意义。加强对更广泛的跨区域迁徙物种的 AIV 监测,有利于进 一步了解洲际 AIV 基因交换的流动以及病毒的生态学。

65

本研究由山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MC119)H13 亚型禽流感病毒哺乳 动物复制能力分子基础研究;国家自然科学基金(31970502)候鸟禽流感病毒多样性、 时空动态及分子流行病学研究;国家林业和草原局野生动物疫源疫病监测项目,重点野 生动物疫病主动监测预警与应急处置资助完成。

参考文献

- [1] MOSTAFA A, ABDELWHAB E, METTENLEITER T, et al. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview [J]. Viruses, 2018, 10(9).
- [2] WEBSTER R G, BEAN W J, GORMAN O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiol Rev, 1992, 56(1): 152-79.
- [3] MEDINA R A, GARCÍA-SASTRE A. Influenza A viruses: new research developments [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(8): 590-603.
- [4] WHITE M C, LOWEN A C. Implications of segment mismatch for influenza A virus evolution[J]. Journal of General Virology, 2018, 99(1): 3-16.
- [5] CAUSEY D, EDWARDS S V. Ecology of avian influenza virus in birds [J]. J Infect Dis, 2008, 197 Suppl 1(Suppl 1): S29-33.
- [6] OLSEN B, MUNSTER V J, WALLENSTEN A, et al. Global patterns of influenza a virus in wild birds [J]. Science, 2006, 312(5772): 384-8.
- [7] VASIN A V, TEMKINA O A, EGOROV V V, et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins [J]. Virus Res, 2014, 185: 53-63.
- [8] KRAMMER F, SMITH G J D, FOUCHIER R A M, et al. Influenza [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1).
- [9] WAGNER R, MATROSOVICH M, KLENK H D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections [J]. Rev Med Virol, 2002, 12(3): 159-66.
- [10] MITNAUL L J, MATROSOVICH M N, CASTRUCCI M R, et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus [J]. Journal of virology, 2000, 74(13): 6015-20.
- [11] ABDELWHAB E M, METTENLEITER T C. Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts [J]. Viruses, 2023, 15(4).

[12]ENGLUND L, HARD AF SEGERSTAD C. Two avian H10 influenza A virus strains with

different pathogenicity for mink (Mustela vison) [J]. Arch Virol, 1998, 143(4): 653-66.

- [13]FELDMANN H, KRETZSCHMAR E, KLINGEBORN B, et al. The structure of serotype H10 hemagglutinin of influenza A virus: comparison of an apathogenic avian and a mammalian strain pathogenic for mink [J]. Virology, 1988, 165(2): 428-37.
- [14] EVEREST H, BILLINGTON E, DAINES R, et al. The Emergence and Zoonotic Transmission of H10Nx Avian Influenza Virus Infections [J]. mBio, 2021, 12(5): e0178521.
- [15]KARUNAKARAN D, HINSHAW V, POSS P, et al. Influenza A outbreaks in Minnesota turkeys due to subtype H10N7 and possible transmission by waterfowl [J]. Avian Dis, 1983, 27(2): 357-66.
- [16] SENNE D A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia [J]. Avian Dis, 2003, 47(3 Suppl): 798-805.
- [17] ABOLNIK C, GERDES G H, SINCLAIR M, et al. Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H6N8, H1N8, H4N2, H9N2, H10N7) isolated from wild birds, ducks, and ostriches in South Africa from 2007 to 2009 [J]. Avian Dis, 2010, 54(1 Suppl): 313-22.
- [18]KLINGEBORN B, ENGLUND L, ROTT R, et al. An avian influenza A virus killing a mammalian species--the mink. Brief report [J]. Arch Virol, 1985, 86(3-4): 347-51.
- [19]ENGLUND L. Studies on influenza viruses H10N4 and H10N7 of avian origin in mink [J].Vet Microbiol, 2000, 74(1-2): 101-7.
- [20] WANG N, ZOU W, YANG Y, et al. Complete Genome Sequence of an H10N5 Avian Influenza Virus Isolated from Pigs in Central China [J]. Journal of virology, 2012, 86(24): 13865-6.
- [21]KROG J S, HANSEN M S, HOLM E, et al. Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(4): 684-7.
- [22]ZOHARI S, NEIMANIS A, HARKONEN T, et al. Avian influenza A(H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (Phoca vitulina) in Sweden, March through October 2014 [J]. Euro Surveill, 2014, 19(46).
- [23] HINSHAW V S, AIR G M, GIBBS A J, et al. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls [J]. Journal of virology, 1982, 42(3):

865-72.

- [24]KAWAOKA Y, MUNSTER V J, BAAS C, et al. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds [J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(5).
- [25] VERHAGEN J H, POEN M, STALLKNECHT D E, et al. Phylogeography and Antigenic Diversity of Low-Pathogenic Avian Influenza H13 and H16 Viruses [J]. Journal of virology, 2020, 94(13).
- [26]DONG J, BO H, ZHANG Y, et al. Characteristics of influenza H13N8 subtype virus firstly isolated from Qinghai Lake Region, China [J]. Virology Journal, 2017, 14(1).
- [27]FOUCHIER R A M, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls [J]. Journal of virology, 2005, 79(5): 2814-22.
- [28] VERHAGEN J H, POEN M, STALLKNECHT D E, et al. Phylogeography and Antigenic Diversity of Low-Pathogenic Avian Influenza H13 and H16 Viruses [J]. Journal of virology, 2020, 94(13).
- [29]MURCIA P R, HILL N J, BISHOP M A, et al. Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread [J]. PLOS Pathogens, 2022, 18(5).
- [30]LAM T T, IP H S, GHEDIN E, et al. Migratory flyway and geographical distance are barriers to the gene flow of influenza virus among North American birds [J]. Ecol Lett, 2012, 15(1): 24-33.
- [31]GUILHERME J L, JONES V R, CATRY I, et al. Connectivity between countries established by landbirds and raptors migrating along the African–Eurasian flyway [J]. Conservation Biology, 2022, 37(1).
- [32]GASS J D, JR., DUSEK R J, HALL J S, et al. Global dissemination of influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones [J]. Mol Ecol, 2023, 32(1): 198-213.
- [33]RUSSELL C A. Sick birds don't fly...or do they? [J]. Science, 2016, 354(6309): 174-5.[34]VAN DIJK J G, VERHAGEN J H, WILLE M, et al. Host and virus ecology as determinants

of influenza A virus transmission in wild birds [J]. Curr Opin Virol, 2018, 28: 26-36.

- [35]CHEN H, SMITH G J D, ZHANG S Y, et al. H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl [J]. Nature, 2005, 436(7048): 191-2.
- [36]CHEN H, LI Y, LI Z, et al. Properties and Dissemination of H5N1 Viruses Isolated during an Influenza Outbreak in Migratory Waterfowl in Western China [J]. Journal of virology, 2006, 80(12): 5976-83.
- [37]GUAN Y, RATANAKORN P, WIRATSUDAKUL A, et al. Satellite Tracking on the Flyways of Brown-Headed Gulls and Their Potential Role in the Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus [J]. PLoS ONE, 2012, 7(11).
- [38]H5N8 T G C F, VIRUSES R I. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8 [J]. Science, 2016, 354(6309): 213-7.
- [39]GILBERT M, SLINGENBERGH J, XIAO X. Climate change and avian influenza [J]. Rev Sci Tech, 2008, 27(2): 459-66.
- [40] MORIN C W, STONER-DUNCAN B, WINKER K, et al. Avian influenza virus ecology and evolution through a climatic lens [J]. Environ Int, 2018, 119: 241-9.
- [41]CARLSON C J, ALBERY G F, MEROW C, et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk [J]. Nature, 2022, 607(7919): 555-62.
- [42]RUIZ S, GALDAMES P, BAUMBERGER C, et al. Remote Sensing and Ecological Variables Related to Influenza A Prevalence and Subtype Diversity in Wild Birds in the Lluta Wetland of Northern Chile [J]. Viruses, 2023, 15(6).
- [43]RAMEY A M, DELIBERTO T J, BERHANE Y, et al. Lessons learned from research and surveillance directed at highly pathogenic influenza A viruses in wild birds inhabiting North America [J]. Virology, 2018, 518: 55-63.
- [44]BAHL J, VIJAYKRISHNA D, HOLMES E C, et al. Gene flow and competitive exclusion of avian influenza A virus in natural reservoir hosts [J]. Virology, 2009, 390(2): 289-97.
- [45] WHITE V C. A review of influenza viruses in seals and the implications for public health [J]. US Army Med Dep J, 2013: 45-50.

- [46]KROG J S, HANSEN M S, HOLM E, et al. Influenza A(H10N7) Virus in Dead Harbor Seals, Denmark [J]. Emerging Infectious Diseases, 2015, 21(4): 684-7.
- [47]GAO R, CAO B, HU Y, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9)Virus [J]. New England Journal of Medicine, 2013, 368(20): 1888-97.
- [48] WANG M, ZHANG W, QI J, et al. Structural basis for preferential avian receptor binding by the human-infecting H10N8 avian influenza virus [J]. Nature Communications, 2015, 6(1).
- [49]QI X, QIU H, HAO S, et al. Human Infection with an Avian-Origin Influenza A (H10N3)Virus [J]. N Engl J Med, 2022, 386(11): 1087-8.
- [50]CHEN P, JIN Z, PENG L, et al. Characterization of an Emergent Chicken H3N8 Influenza Virus in Southern China: a Potential Threat to Public Health [J]. Journal of virology, 2023, 97(6): e0043423.
- [51]GILBERTSON B, DUNCAN M, SUBBARAO K. Role of the viral polymerase during adaptation of influenza A viruses to new hosts [J]. Current Opinion in Virology, 2023, 62.
- [52]LONG J S, MISTRY B, HASLAM S M, et al. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 17(2): 67-81.
- [53] WILLE M, HOLMES E C. The Ecology and Evolution of Influenza Viruses [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020, 10(7).
- [54]ZHANG M, LIU M, BAI S, et al. Influenza A Virus-Host Specificity: An Ongoing Cross-Talk Between Viral and Host Factors [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 777885.
- [55] FRANCIS M, KING M, KELVIN A. Back to the Future for Influenza Preimmunity—Looking Back at Influenza Virus History to Infer the Outcome of Future Infections [J]. Viruses, 2019, 11(2).
- [56] EVEREST H, HILL S C, DAINES R, et al. The Evolution, Spread and Global Threat of H6Nx Avian Influenza Viruses [J]. Viruses, 2020, 12(6).
- [57]ZHANG Y, ZHU J, LI Y, et al. Glycosylation on hemagglutinin affects the virulence and pathogenicity of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61397.

- [58]HERFST S, SCHRAUWEN E J, LINSTER M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets [J]. Science, 2012, 336(6088): 1534-41.
- [59]CASTRUCCI M R, KAWAOKA Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus [J]. Journal of virology, 1993, 67(2): 759-64.
- [60]LI K S, GUAN Y, WANG J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia [J]. Nature, 2004, 430(6996): 209-13.
- [61]KROL E, RYCHLOWSKA M, SZEWCZYK B. Antivirals--current trends in fighting influenza [J]. Acta Biochim Pol, 2014, 61(3): 495-504.
- [62] RENAUD C, KUYPERS J, ENGLUND J A. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1 [J]. J Clin Virol, 2011, 52(2): 70-8.
- [63]LABADIE K, DOS SANTOS AFONSO E, RAMEIX-WELTI M A, et al. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells [J]. Virology, 2007, 362(2): 271-82.
- [64]HERFST S, CHUTINIMITKUL S, YE J, et al. Introduction of virulence markers in PB2 of pandemic swine-origin influenza virus does not result in enhanced virulence or transmission [J]. Journal of virology, 2010, 84(8): 3752-8.
- [65]NILSSON B E, TE VELTHUIS A J W, FODOR E. Role of the PB2 627 Domain in Influenza A Virus Polymerase Function [J]. Journal of virology, 2017, 91(7).
- [66] SEDIRI H, SCHWALM F, GABRIEL G, et al. Adaptive mutation PB2 D701N promotes nuclear import of influenza vRNPs in mammalian cells [J]. Eur J Cell Biol, 2015, 94(7-9): 368-74.
- [67]BUSSEY K A, BOUSSE T L, DESMET E A, et al. PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells [J]. Journal of virology, 2010, 84(9): 4395-406.
- [68] FAN S, DENG G, SONG J, et al. 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.

- [69]BISWAS S K, NAYAK D P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1 [J]. Journal of virology, 1994, 68(3): 1819-26.
- [70] ARAI Y, KAWASHITA N, ELGENDY E M, et al. PA Mutations Inherited during Viral Evolution Act Cooperatively To Increase Replication of Contemporary H5N1 Influenza Virus with an Expanded Host Range [J]. Journal of virology, 2020, 95(1).
- [71]BISWAS S K, BOUTZ P L, NAYAK D P. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins [J]. Journal of virology, 1998, 72(7): 5493-501.
- [72]POOLE E, ELTON D, MEDCALF L, et al. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites [J]. Virology, 2004, 321(1): 120-33.
- [73]MARKLUND J K, YE Q, DONG J, et al. Sequence in the influenza A virus nucleoprotein required for viral polymerase binding and RNA synthesis [J]. Journal of virology, 2012, 86(13): 7292-7.
- [74] JIAO P, TIAN G, LI Y, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice [J]. Journal of virology, 2008, 82(3): 1146-54.
- [75]KUO R L, KRUG R M. Influenza a virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells [J]. Journal of virology, 2009, 83(4): 1611-6.
- [76]ZIMMER S M, BURKE D S. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses [J]. N Engl J Med, 2009, 361(3): 279-85.
- [77] SCHRAUWEN E J, FOUCHIER R A. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals [J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3(2): e9.
- [78]LAM T T, WANG J, SHEN Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China [J]. Nature, 2013, 502(7470): 241-4.
- [79]CHEN H, YUAN H, GAO R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study [J]. Lancet, 2014, 383(9918): 714-21.
- [80] LIU K, DING P, PEI Y, et al. Emergence of a novel reassortant avian influenza virus (H10N3)

in Eastern China with high pathogenicity and respiratory droplet transmissibility to mammals [J]. Sci China Life Sci, 2022, 65(5): 1024-35.

- [81] YANG J, ZHANG Y, YANG L, et al. Evolution of Avian Influenza Virus (H3) with Spillover into Humans, China [J]. Emerg Infect Dis, 2023, 29(6): 1191-201.
- [82]FERGUSON N M, FRASER C, DONNELLY C A, et al. Public health. Public health risk from the avian H5N1 influenza epidemic [J]. Science, 2004, 304(5673): 968-9.
- [83] LV X, TIAN J, LI X, et al. H10Nx avian influenza viruses detected in wild birds in China pose potential threat to mammals [J]. One Health, 2023, 16: 100515.