DOI:10.13350/j.cjpb.220202

· 论著 ·

2株欧亚与北美谱系重排H6N8亚型禽流感病毒的遗传进化及分子特征分析*

胡鑫宇[1],李元果[1],孔云逸[1],王铁成[1],秦思源[2],周景莹[3],孟德荣[4],徐钰[2],夏咸柱[1],高玉伟[1**]
(1.中国农业科学院长春兽医研究所,吉林长春 130122;2.国家林业局野生动物疫源疫病监测总站;
3.内蒙古图牧吉国家自然保护区;4.沧州师范学院)

【摘要】 **目的** 解析监测中发现的欧亚与北美谱系重组H6N8亚型禽流感病毒的遗传进化及分子特征,为禽流感病毒跨洲际传播及基因重排研究提供支持。 **方法** 2019年秋季在图牧吉地区采集雁鸭类粪便样品,分离H6N8亚型禽流感病毒并进行全基因序列测定,分析其遗传进化及分子特征。 **结果** 共采集雁鸭类粪便及拭子样品5062份,分离到2株H6N8 LPAIV(TMJ43、TMJ120)。遗传进化分析显示,分离株病毒NA与北美的阿拉斯加地区所分离的H3N8亚型AIV的NA节片聚集在同一进化分支,HA和其它6个内部基因节片均属于欧亚进化分支,且两株禽流感病毒分别有不同的重配发生。2株H6N8亚型禽流感病毒为欧亚谱系与北美谱系基因重排毒株,其中N8基因最近一次欧亚与北美基因节片重排发生在2016年。分子特征分析显示,HA蛋白的碱性裂解位点为PQIETR↓GLF,符合低致病性禽流感病毒的特征。在NP蛋白,发生了具有增强鸡禽流感毒力的A184K突变。在TMJ43,NS1蛋白发生了能增强哺乳动物毒力的A/P42S突变。 **结论** 在我国内蒙古地区分离的2株H6N8亚型禽流感病毒为欧亚谱系和北美谱系的重排毒株,两毒株均发生了增强家禽和哺乳动物感染能力的突变。表明北美毒株通过候鸟迁徙进入我国,与欧亚谱系毒株发生重配并在野鸟中频繁出现,可为禽流感病毒的跨洲际传播研究提供信息支持。

【关键词】 H6N8;重配;低致病性禽流感病毒;跨洲际传播

【中图分类号】 R373.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2022)02-0130-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Feb;17(2):130-135.]

Genetic evolution and molecular characterization analysis of two Eurasian and North American lineage rearrangement H6N8 avian influenza viruses

HU Xin-yu[1], LI Yuan-guo[1], KONG Yun-yi[1], WANG Tie-cheng[1], QIN Si-yuan[2], ZHOU Jing-ying[3], MENG De-rong[4], XU Yu[1], XIA Xian-zhu[1], GAO Yu-wei[1] (1. *Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun* 130122, *China*; 2. *State Forestry Administration Wild Animal Epidemic Surveillances*; 3. *Tumuji National Nature Reserve*; 4. *Cangzhou Normal University*)**

【Abstract】 **Objective** Analyze the genetic evolution and molecular characteristics of the Eurasian and North American lineage recombinant H6N8 subavian influenza viruses found in surveillance, and provide support for the research on the intercontinental spread and gene rearrangement of avian influenza viruses. **Methods** In the autumn of 2019, the fecal samples of anatians were collected in the Tumuji area, and epidemiological investigations and studies were carried out through virus isolation, complete gene sequence determination and genetic evolution analysis. **Results** Two H6N8LPAIV strains (TMJ43, TMJ120) were collected in Tumuji area of Inner Mongolia. Genetic evolution analysis showed NA segments of the h6n8 and H3N8 subtype AIV, isolated from Alaska in North America were clustered in the same evolutionary branch. HA and the other 6 gene segments belonged to the Eurasian evolutionary branch, and two h6n8s had different reassortment. Analysis showed that the two isolated H6N8 subtype avian influenza viruses were genetically rearranged strains of Eurasian and North American lineages. Further analysis proved that the last rearrangement of Eurasian and North American gene segment about the N8 gene occurred in 2016. Molecular analysis showed that all HA protein cleavage sites were PQIETR↓GLF, which was consistent with the characteristics of low pathogenic avian influenza virus. In the NP protein, there was an A184K mutation that could enhances the virulence of avian influenza in chickens. In the TMJ43 NS1 protein, the A/P42S mutation that could enhance the virulence of mammals occured. **Conclusion** The two H6N8 subtype avian influenza viruses isolated in Inner Mongolia are rearranged strains of the Eurasian and North American lineages, with mu-

* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 31970502)。
** 【通讯作者】 高玉伟,E-mail:yuwei0901@outlook.com
【作者简介】 胡鑫宇(1995-),女,河南漯河人,硕士,主要从事病毒感染、传播与变异机制方面的研究。E-mail:huxinyu180@163.com

tations enhancing the ability to infect poultry and mammals. All results show that North American strains have entered my country through migratory birds, reassorted with Eurasian lineage strains and frequently appeared in wild birds. This study provides information support for the intercontinental spread of avian influenza virus.

【Key words】 H6N8; reassortment; LPAIV; intercontinental transmission

A型禽流感病毒根据表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性划分18个HA亚型(H1-H18)和11个NA亚型(N1-N11)。除H17和H18感染蝙蝠之外几乎所有亚型的A型禽流感病毒都可以从禽类体内分离到[1,2]。野生水禽被称为A型流感病毒的天然宿主[3]。

候鸟在禽流感病毒洲际间传播中扮演重要角色,其中雁形目和鸻形目是长距离迁徙的鸟类,在感染低致病性禽流感病毒后不会出现任何症状。全球共有9条候鸟迁徙路线,其中有4条途经我国,分别是:"西亚-东非迁徙通道","西太平洋迁徙通道","中亚迁徙通道",以及"东亚-澳大利亚迁徙通道。阿拉斯加是北美毒株和欧亚毒株交换的重要地区[4,5,6]。候鸟秋季迁徙通过西太平洋由阿拉斯加经过白令海峡至远东地区,并与东亚-澳大利亚迁徙通道发生交叉重叠,后途经我国东北地区/东部沿海地区至澳大利亚西部群岛[7,8]。Ramey等的监测发现候鸟迁徙促进H9N2亚型AIVs在东亚和北美之间的传播[9]。Pearce等对阿拉斯加圣劳伦斯岛的监测表明,该地区所分离的禽流感病毒发生洲际重组[10]。H6亚型禽流感病毒是普遍存在的低致病性禽流感病毒,1965年首次从美国的火鸡中被分离后,在全球许多地区被监测到[11]。我国南方地区分离到多种H6Nx及H6亚型的重配毒株[12,13,14]。Li等在安徽地区分离到欧亚与北美重组的H6N8亚型禽流感病毒[15]。Zu Dohna等研究发现,欧亚支H6禽流感病毒多次进入北美谱系[16]。

内蒙古图牧吉位于我国东北地区,是候鸟经东亚-澳大利亚迁徙通道和中亚迁徙通道途经我国的重要停歇地和栖息地之一。本研究开展了内蒙古图牧吉地区候鸟携带禽流感调查,为候鸟H6亚型禽流感病毒研究提供依据。对从候鸟粪便样品中分离的2株H6N8亚型禽流感病毒进行全基因测序、遗传进化及氨基酸突变位点分析,为野鸟AIV的监测提供数据支持。

材料与方法

1 材料

The QlAamp Viral RNA Mini Kit购于QIAGEN(中国)公司;DNA Marker(DL2000),dNTP(2.5mmol/L)和TransStart FastPfu DNA Polymerase购于北京全是金生物技术有限公司;Reverse Transcriptase XL(AMV)为美国Promega产品。

2 方法

2.1 标本采集与病毒分离 2019年,在我国内蒙古图牧吉自然保护区采集野鸟粪便及拭子标本5 062份。将粪便标本放置于保存液中(PBS、甘油、青霉素、链霉素)并低温保存运输。在充分震荡后,4 ℃、8 000 r/min(离心半径8.6 cm),离心5 min,取上清接种于9~11日龄SPF鸡胚,置恒温培养箱中于37 ℃培养72 h,收取血凝阳性的尿囊液,获得的病毒放置于-80 ℃中保存备用。

2.2 全基因组扩增与测序 使用the QlAamp Viral RNA Mini Kit从获得的尿囊液中提取病毒RNA,使用流感通用引物uni12和uni13进行反转录,根据各基因片段设计引物进行PCR。扩增产物经核酸电泳后交由吉林省库美生物有限公司进行一代测序,基因序列通过DNAStar软件进行拼接与分析。

2.3 系统发育及生物学特性分析 对获的基因片段通过NCBI blastN进行核酸比对。从NCBI和GISAID数据库中下载参考序列,应用MAGE-X软件,使用General Time Reversible model,Bootstrap值设置为1 000,采用最大似然法(ML)构建全基因组系统发育树。使用MEGA-X软件翻译核苷酸序列,获得氨基酸序列,使用IRD(Influenza Research Database)提供的ANALYZE & VISUALIZE等在线工具分析与AIVs受体、毒力、致病性、及耐药性等相关位点。

2.4 系统发育学分析与生物学特性分析 使用BEASTv1.8.4基于NA基因重建H6N8的时间分布,推断H6N8亚型AIVs在时间上的进化特点。

结 果

1 病毒分离及全基因测序

2019年从内蒙古图牧吉自然保护区所采集的5 062份野鸟粪便与拭子样品中分离到8株禽流感病毒,经过PCR扩增及一代测序后对获得基因序列通过DNAStar进行拼接、亚型分析,其中2株H6N8亚型禽流感病毒为欧亚和北美的重排毒株,分别命名为A/Ruddy Shelduck/TMJ43/2019(简称为TMJ43)和A/Ruddy Shelduck/TMJ120/2019(简称为TMJ120)。对H6N8亚型AIV的全基因组在NCBI数据库进行BlastN比对分析,结果见表1。

表1 2株H6N8全部基因的核苷酸序列与GenBank收录毒株的最大相似性

Table 1 Nucleotide identities of the highest homologs in GenBank database with two H6N8 viruses

毒株 Viru	基因 Gene	相似序列 Closest relative	相似性(%) Identity
A/Ruddy Shelduck/Inner Mongolia/TMJ43/2019	PB2	A/duck/Mongolia/380/2019(H4N6)	99.40
	PB1	A/Mallard (Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2019-61/2019(H4N6)	99.57
	PA	A/wild goose/dongting lake/121/2018(H6N2)	99.21
	HA	A/chicken/Zhejiang/1667/2017(H6N1)	98.47
	NP	A/Mallard (Anas platyrhynchos)/South Korea/KNU2019-51/2019(H5N3)	99.67
	NA	A/Muscovy duck/Vietnam/HN5257/2019(H4N8)	99.24
	M	A/duck/Bangladesh/39397/2019(H10N3)	99.29
	NS	A/duck/Guangxi/113/2012(H6N8)	99.29
A/Ruddy Shelduck/Inner Mongolia/TMJ120/2019	PB2	A/duck/Vietnam/HN5959/2019(H4N6)	99.10
	PB1	A/Eurasian_Curlew/China/CZ322(7)/2019(H3N8)	99.52
	PA	A/White-fronted Goose/South Korea/KNU18-119/2018(H7N7)	99.58
	HA	A/Green-winged teal(Anas crecca)/South Korea/KNU 2019-70/2019(H6N2)	98.59
	NP	A/common teal/Shanghai/JDS110203/2019(H12N8)	99.53
	NA	A/Muscovy duck/Vietnam/HN5257/2019(H4N8)	99.15
	M	A/duck/Bangladesh/39397/2019(H10N3)	99.29
	NS	A/common teal/Shanghai/JDS110203/2019(H12N8)	99.88

2 H6N8亚型AIV遗传进化分析

2.1 NA基因 遗传进化分析表明，2株H6N8亚型禽流感病毒的NA基因与安徽分离株H6N8、韩国及越南分离株H4N8、北美的阿拉斯加地区分离株H3N8聚集在同一进化分支(图1)。通过进一步分析NA基因的最大进化支可信度(MCC)树(图2)，本研究分离的2株H6N8亚型禽流感病毒属于欧亚谱系与北美谱系共同存在的分组中。两株病毒的预计最近共同祖先(tMRCA)在2018年。该基因发生过多次欧亚与北美基因的交换，最早的洲际基因交换可追溯到1977年，最近一次发生在2016年，表明N8基因在2016年发生欧亚与北美基因节片重排。

2.2 HA基因 TMJ43和TMJ120的HA基因均属于欧亚进化分支(图3)，与韩国、日本、孟加拉国及我国南方家禽中所分离的低致病性H6亚型禽流感病毒处于同一进化分支。其中，TMJ43与A/chicken/Zhejiang/1667/2017(H6N1)相似性较高，TMJ120与A/Green-winged teal(Anas crecca)/South Korea/KNU 2019-70/2019(H6N2)相似性较高。

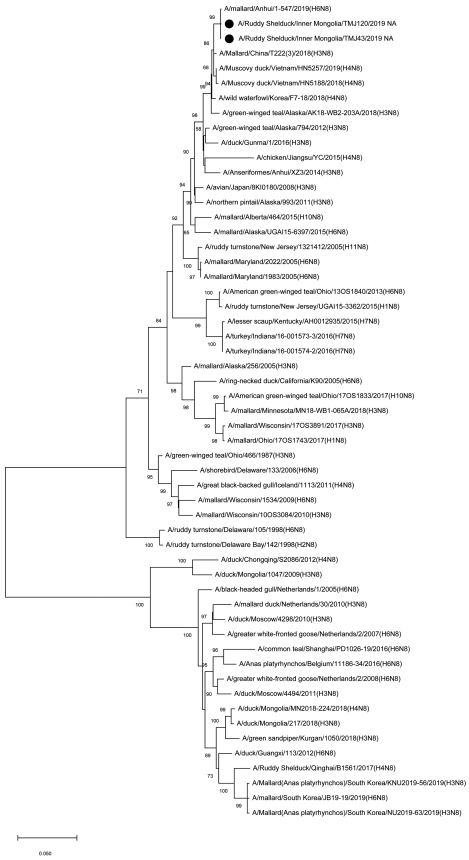

图1 NA基因遗传进化分析

Fig. 1 Phylogeneticanalysis of NA

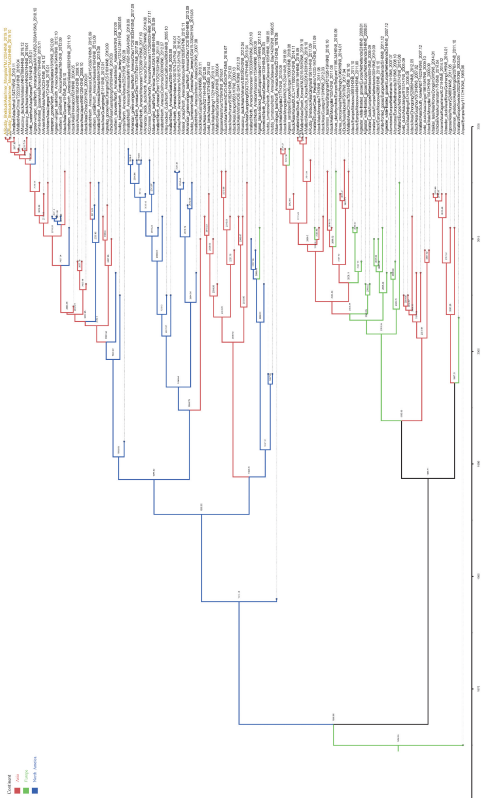

图2 NA基因贝叶斯分析最大分支可信度(MCC)树

Fig. 2 Maximum clade credibility(MCC) tree inferred from Bayesian analysis of NA

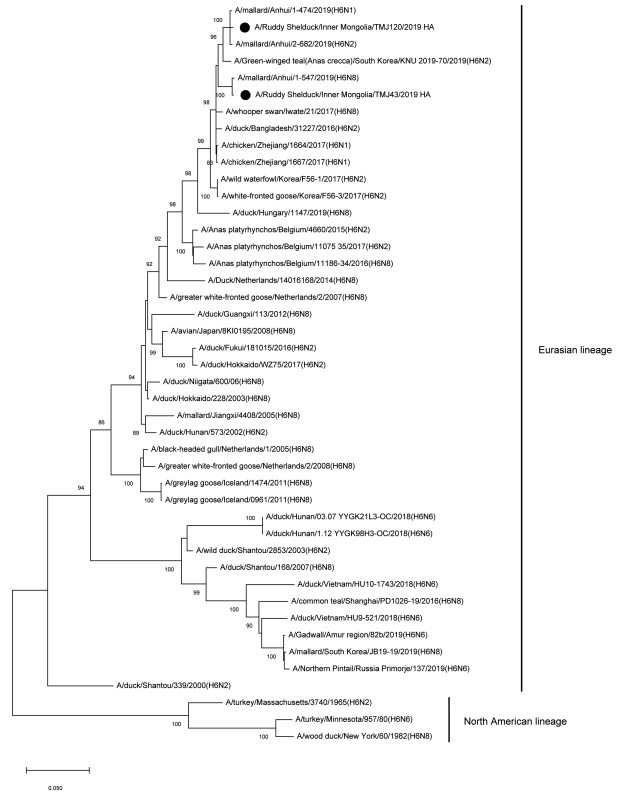

图 3 HA 基因遗传进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of HA

2.3 内部基因遗传进化情况 图 4 显示，TMJ43 和 TMJ120 的内部基因 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 均属欧亚进化分支，其中在 PB2 和 M 基因中处于同一进化分支，而在 PB1、PA、NP、NS 基因中 2 株病毒处于不同的进化分支。在 PB2 基因中，TMJ43 和 TMJ120 与韩国野鸭中分离的 H7N7、越南及蒙古国家鸭中分离的 H4N6 处于同一进化分支；在 M 基因，TMJ42 和 TMJ120 与 A/duck/Bangladesh/39397/2019(H10N3)聚集在同一进化分支；在 PB1 基因，TMJ43 与韩国分离的野鸟源 H4N6 聚集在同一进化亚支，TMJ120 与韩国分离的野鸟源 H4N3 和中国分离的野鸟源 H3N8 聚集在同一进化亚支；在 PA 基因，TMJ43 与中国分离的野鸟源 H6N2 聚集在同一进化分支，TMJ120 与中国和韩国分离的野鸟源 H7N7 聚集在一起；在 NP 基因，TMJ43 与 2019 年韩国野鸟和蒙古国鸭分离的 H5N3 聚集在一起，TMJ120 与越南野鸭分离的 H4N6 和韩国野鸭分离的 H7N7 聚集于同一进化分支。在 NS 基因，TMJ43 和 TMJ120 分别形成两个进化分支，其中 TMJ43 的 NS 基因与 A/duck/Guangxi/113/2012(H6N8)相似性较高，与蒙古国鸭分离的 H6N8、中国江西野鸟分离的 H6N8 及广西鸭分离的 H6N8 和 H1N2 聚集在同一进化分支；TMJ120 与 A/common teal/Shanghai/JDS110203/2019(H12N8)相似性较高，与上海野鸟分离的 H12N8、韩国野鸭分离的 H5N3 及比利时野鸟分离的 H12N5 聚集在同一个进化分支，表明 TMJ42 和 TMJ120 株 H6N8 禽流感病毒分别发生重配。

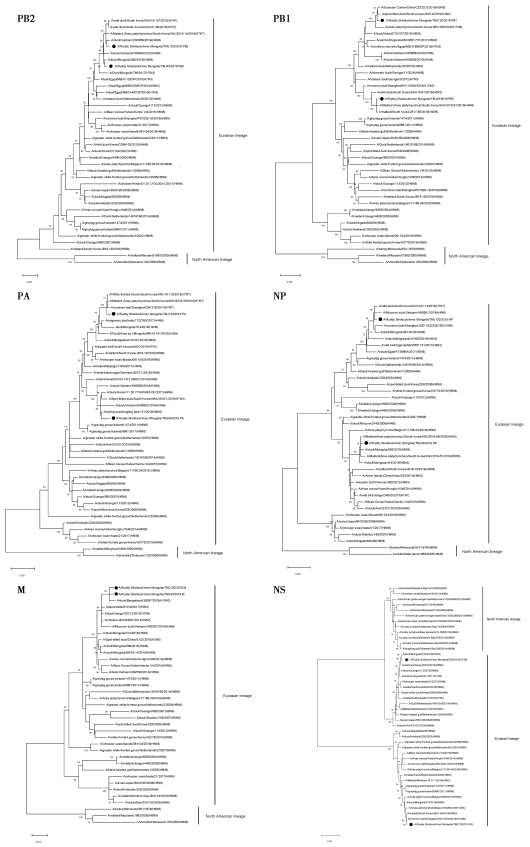

图 4 PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因片段遗传进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of PB2, PB1, PA, NP, M, NS

3 2 株 H6N8 亚型 AIV 全基因同源性比对分析

比对分析显示，2 株 H6N8AIV 间 HA 基因的核酸同源性为 97.7%，NA 基因的核酸同源性为 99.9%，PB2 基因的核酸同源性为 98.9%，PB1 基因的核酸同源性为 95.9%，PA 基因的核酸同源性为 95.5%，NP 基因的核酸同源性为 95.1%，M 基因的核酸同源性为 99.4%，NS 基因的核酸同源性为 71.4%。

4 分子特性分析

对 A/Ruddy Shelduck/TMJ43/2019 和 A/Ruddy Shelduck/TMJ120/2019 的关键氨基酸位点进行分析，两株 H6N8 AIV HA 蛋白的碱性裂解位点均为 PQIETR↓GLF，符合低致病性禽流感特征。在 HA 蛋白，A138S、Q226L、G228S 等位点的突变是禽流感病毒跨越宿主屏障，感染人能力增加的标志，本研究中的两毒株该位点均未发生突变。在 NA 蛋白，已有报道显示 NA 茎部氨基酸的缺失会增加禽流感病毒在小鼠中的毒力，本研究中的两毒株 H6N8AIV 并无 NA 茎部氨基酸的缺失。在 PB2 蛋白，能增强哺乳动物感染能力和毒力的 271、627 和 701 位点也未有突变发生。在 M2 蛋白，与金刚烷胺类和金刚烷乙胺类药物

耐药性相关的位点中，L26F、V27A、A30T、S31N、G34E、L38F 均未发生突变，表明两株 H6N8 亚型 AIV 对此类药物敏感。在 NP 蛋白，A184K 的突变会增加禽流感病毒在家鸡中毒力，本研究中的两株 H6N8 禽流感病毒该位点均发生突变。在 NS1，A/P42S 的突变能增加禽流感病毒对哺乳动物的毒力，本研究中的 A/Ruddy Shelduck/TMJ43/2019 株该位置发生突变，而 A/Ruddy Shelduck/TMJ120/2019 未发生该突变(表 2)。

表 2　2 株 H6N8 的分子特征分析
Table 2　Molecular characteristics of two H6N8 viruses

蛋白 Protein	氨基酸位点 Amino acid position/motif	病毒 Viruses		分子标志 Phenotypic consequences
		A/Ruddy Shelduck/TMJ43/2019	A/Ruddy Shelduck/TMJ120/2019	
Receptor-binding sites in HA (H3 numbers)	HA cleavage site	PQIETR↓GLF	PQIETR↓GLF	低致病性禽流感标志
	A138S	A	A	
	Q226L	Q	Q	人型受体结合能力增加
	G228S	G	G	
NA	Stake deletion	No deletion	No deletion	增加小鼠体内的毒力
PB2	T271A	T	T	在哺乳动物中的传播能力和毒力增加
	E627K	E	E	
	D701N	D	D	
M2	L26F	L	L	金刚烷胺类和金刚烷乙胺的耐药性增加
	V27A	V	V	
	A30T	A	A	
	S31N	S	S	
	G34E	G	G	
	L38F	L	L	
NP	A184K	K	K	增加鸡禽流感病毒的毒力
NS1	A/P42S	S	A	哺乳动物毒力增强，干扰素诱导的拮抗作用

讨　论

野鸟的迁徙特性对禽流感病毒的传播甚至跨洲际传播发挥重要的作用[6,7,17]。有报道表明，2014-2015 年，美国爆发与亚洲相关的 H5 亚型 HpAIV 疫情，迁徙候鸟在 H5 的传播中扮演重要角色[18]。在欧亚大陆与美洲大陆中存在候鸟的迁徙路线交叉重叠，随候鸟的迁徙流动，禽流感病毒可能存在跨大洲的基因流动[8,19]。本研究对 2019 年内蒙古图牧吉自然保护区野鸟中分离的 2 株 H6N8 亚型 AIV 进行了全基因组测序、遗传进化分析及氨基酸突变位点的分析。遗传进化分析显示，NA 基因与安徽分离的 H6N8、韩国及越南分离的 H4N8 及北美的阿拉斯加地区分离的 H3N8 聚集在同一进化分支中，最大进化支可信度(MCC)树显示该基因此前发生多次跨洲际的基因交换，而 2 株 H6N8 亚型 AIV 的其他所有基因都聚集于欧亚进化分支中。因此，候鸟的迁徙运动对 H6N8AIV 发生不同大洲之间的基因交换发挥重要作用。在 2 株 H6N8 亚型 AIV 的内部基因中，PB1、PA、NP、NS 基因分别发生了不同的重配，这表明 H6N8 亚型低致病性禽流感病毒在野鸟发生复杂的重配。此外，本研究中的 2 株 H6N8 亚型 AIV 与家禽中分离的毒株具有较高的序列相似性，从而表明 H6 亚型 AIVs 可能在野鸟和家禽之间相互传播。

H6 亚型 AIVs 在野鸟及家禽中普遍存在，其频繁的重配及氨基酸位点突变，使其存在突破物种屏障，进而发生跨宿主传播。氨基酸突变位点分析显示，2 株 H6N8 亚型 AIV 的 HA 裂解位点均符合低致病性禽流感病毒特性，且在与人受体相关的氨基酸位点均未发生突变，表明本研究中的 2 株 H6N8AIV 会优先与禽源受体结合。在 NP 蛋白中，A184K 突变会增加禽流感病毒对家鸡的毒力[20]，而 2 株 H6N8AIV 均发生了该突变，说明本研究分离的两毒株存在引起禽类感染的风险。因此，加强候鸟禽流感病毒的监测，对禽流感病毒的预警及防控具有重要意义，可为禽流感病毒跨洲际传播研究提供信息支持。

【参考文献】

[1] Tong S, Li Y, Rivailler P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(11): 4269-4274.

[2] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003657.

[3] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, et al. Global patterns of influenza a virus in wild birds[J]. Science, 2006, 312(5772): 384-388.

[4] Alerstam T, Backman J, Gudmundsson GA, et al. A polar system of intercontinental bird migration[J]. Proc Biol Sci, 2007, 274(1625): 2523-2530.

[5] Koehler AV, Pearce JM, Flint PL, et al. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (Anas acuta)[J]. Mol Ecol, 2008, 17(21): 4754-4762.

[6] Winker K, McCracken KG, Gibson DD, et al. Movements of birds and avian influenza from Asia into Alaska[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(4): 547-552.

[7] Hill NJ, Takekawa JY, Cardona CJ, et al. Cross-seasonal patterns of avian influenza virus in breeding and wintering migratory birds: a flyway perspective[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012, 12(3): 243-253.

[8] Lei J, Jia Y, Zuo A, et al. Bird Satellite Tracking Revealed Critical Protection Gaps in East Asian(-)Australasian Flyway[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(7): 130.

[9] Ramey AM, Reeves AB, Sonsthagen SA, et al. Dispersal of H9N2 influenza A viruses between East Asia and North America by wild birds[J]. Virology, 2015, 482(79-83).

[10] Pearce JM, Ramey AM, Ip HS, et al. Limited evidence of trans-hemispheric movement of avian influenza viruses among contemporary North American shorebird isolates[J]. Virus Res, 2010, 148(1-2): 44-50.

[11] Downie JC, Laver WG. Isolation of a type A influenza virus from

an Australian pelagic bird[J]. Virology, 1973, 51(2): 259-269.

[12] Hu C, Li X, Zhu C, et al. Co-circulation of multiple reassortant H6 subtype avian influenza viruses in wild birds in eastern China, 2016-2017[J]. Virol J, 2020, 17(1): 62.

[13] Huang K, Zhu H, Fan X, et al. Establishment and lineage replacement of H6 influenza viruses in domestic ducks in southern China[J]. J Virol, 2012, 86(11): 6075-6083.

[14] Li J, Quan C, Xie Y, et al. Continued reassortment of avian H6 influenza viruses from Southern China, 2014-2016[J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66(1): 592-598.

[15] Li Y, Li M, Tian J, et al. Genetic characteristics and pathogenicity of novel reassortant H6 viruses isolated from wild birds in China[J]. Vet Microbiol, 2021, 254(108978).

[16] Zu Dohna H, Li J, Cardona C J, et al. Invasions by Eurasian avian influenza virus H6 genes and replacement of the virus' North American clade[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(7): 1040-1045.

[17] Pearce JM, Reeves AB, Ramey AM, et al. Interspecific exchange of avian influenza virus genes in Alaska: the influence of transhemispheric migratory tendency and breeding ground sympatry [J]. Mol Ecol, 2011, 20(5): 1015-1025.

[18] Saito T, Tanikawa T, Uchida Y, et al. Intracontinental and intercontinental dissemination of Asian H5 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in the winter of 2014-2015 [J]. Rev Med Virol, 2015, 25(6): 388-405.

[19] Ramey AM, Pearce JM, Flint PL, et al. Intercontinental reassortment and genomic variation of low pathogenic avian influenza viruses isolated from northern pintails (Anas acuta) in Alaska: examining the evidence through space and time[J]. Virology, 2010, 401(2): 179-189.

[20] Wasilenko JL, Sarmento L, Pantin-Jackwood MJ. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens[J]. Arch Virol, 2009, 154(6): 969-979.

【收稿日期】 2021-11-29 【修回日期】 2022-02-10

(上接129页)

[13] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. N Engl J Med, 2021, 384(5): 403-416.

[14] Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, et al. Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine[J]. N Engl J Med, 2021, 384(19): 1824-1835.

[15] Xia S, Zhang Y, Wang Y, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial[J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(1): 39-51.

[16] Nogales A, Perez D R, Santos J, et al. Reverse genetics of influenza B viruses[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1602: 205-238.

[17] Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus[J]. J Virol, 2004, 78(2): 1020-1025.

[18] Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, et al. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine[J]. Vaccine, 2013, 31(52): 6239-6246.

[19] Maeda Y, Hatta M, Takada A, et al. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections[J]. J Virol, 2005, 79(11): 6674-6679.

[20] Cardenas-Garcia S, Caceres CJ, Rajao D, et al. Reverse genetics for influenza B viruses and recent advances in vaccine development[J]. Curr Opin Virol, 2020, 44: 191-202.

[21] Martina BE, van den Doel P, Koraka P, et al. A recombinant influenza A virus expressing domain III of West Nile virus induces protective immune responses against influenza and West Nile virus[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18995.

[22] Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratorytracts against SARS-CoV-2[J]. Cell, 2020, 183(1): 169-184.

[23] Koonpaew S, Kaewborisuth C, Srisutthisamphan K, et al. A single-cycle influenza A virus-based SARS-CoV-2 vaccine elicits potent immune responses in a mouse model[J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(8): 850.

【收稿日期】 2021-11-11 【修回日期】 2022-02-13