

人感染新型 H10N3 禽流感病毒分子溯源

王慎骄, 祁贤*, 余慧燕, 邓斐, 黄浩颀, 许可, 鲍倡俊

江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009

王慎骄, 祁贤, 余慧燕, 邓斐, 黄浩颀, 许可, 鲍倡俊. 人感染新型 H10N3 禽流感病毒分子溯源[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1231-1244.

WANG Shenjiao, QI Xian, YU Huiyan, DENG Fei, HUANG Haodi, XU Ke, BAO Changjun. Molecular origin of human infection with a novel avian influenza A H10N3 virus in China, 2021[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1231-1244.

摘要:【背景】1997 年香港发生人感染禽流感事件以来, 禽流感病毒成为持续威胁人类健康和公共卫生的重要病原体。【目的】对一例人感染新型 H10N3 禽流感病毒病例开展分子溯源研究。【方法】流感病毒分型检测采用 RT-qPCR 法, 在下一代测序平台上完成病毒基因组测序, 序列和系统进化分析采用 BLAST 和 MEGA 6.1 等生物信息学软件。【结果】2021 年 4 月从严重呼吸道疾病患者体内分离到一株病毒, 经核酸检测和序列分析, 结果表明其为 H10N3 亚型禽流感病毒。从患者居所附近的农贸市场分离到一株基因高度同源的 H10N3 亚型禽流感病毒。分离株是一种新的基因重配 H10N3 禽流感病毒, 其血凝素 hemagglutinin (HA) 和神经氨酸酶 neuraminidase (NA) 组合最早在 2019 年华东地区的家禽中检测到, 6 个内部基因来源于近年来中国南方家禽中流行的 H9N2 病毒。病毒的 HA 蛋白的裂解位点含有 1 个碱性氨基酸 R, 未插入多个碱性氨基酸, 理论上不属于高致病性禽流感病毒。HA 蛋白受体结合位点 228 位氨基酸残基由 G 突变为 S, 理论上增强了对人 SA α 2,6 受体的亲和力。另外, 未发现 PB2 蛋白 E627K 突变, 但 591 位氨基酸残基由 Q 突变为 K, 理论上增强了对人体的适应力和致病性。【结论】本研究报道了一例人感染 H10N3 禽流感病毒病例的分子流行病学特征, 揭示了活禽市场在禽流感病毒基因重配和机会性外溢感染人过程中起重要作用。

关键词: 禽流感病毒; H10N3 亚型; 人感染

资助项目: 江苏省重大科技示范项目(BE2017749)

This work was supported by the Science and Technology Demonstration Project of Jiangsu Province (BE2017749).

*Corresponding author. E-mail: qixiansyc@163.com

Received: 2022-05-25; Accepted: 2022-07-19; Published online: 2022-09-06

Molecular origin of human infection with a novel avian influenza A H10N3 virus in China, 2021

WANG Shenjiao, QI Xian^{*}, YU Huiyan, DENG Fei, HUANG Haodi, XU Ke, BAO Changjun

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

Abstract: [Background] Since the human infection with avian influenza that occurred in Hong Kong in 1997, avian influenza virus has become a major threat to human health and public health. [Objective] To perform the molecular epidemiological study on a human infection with H10N3 avian influenza. [Methods] Influenza virus subtyping was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method. The virus genome sequencing was completed on the next-generation sequencing platform. Bioinformatics software such as Blasts and Mega 6.1 was used for sequence and phylogenetic analysis. [Results] In April 2021, a virus was isolated from patients with severe respiratory diseases, which was confirmed as H10N3 subtype avian influenza virus by nucleic acid detection and sequence analysis. A H10N3 subtype avian influenza virus was isolated from the farm product market near the patient's residence, which was highly homologous with the human isolate. The human isolate was a new gene recombinant H10N3 avian influenza virus, and its HA and NA combination first appeared in poultry in East China in 2019. However, its six internal genes came from H9N2 virus prevalent in poultry in southern China in recent years. The HA cleavage site of the virus contained one basic amino acid R, without insertion of multiple basic amino acids. In theory, it did not belong to highly pathogenic avian influenza virus. The amino acid residue at 228 of HA receptor binding site mutated from G to S, which theoretically enhanced the affinity with human SA- α -2,6 receptor. No E627K mutation of PB2 protein was found, but the amino acid residue at site 591 mutated from Q to K, which theoretically enhanced the adaptability to human body and the pathogenicity. [Conclusion] This paper reported the molecular epidemiological characteristics of a case of human infection with H10N3 avian influenza virus, and revealed that live poultry market played an important role in gene recombination of avian influenza virus and opportunistic infection.

Keywords: avian influenza A virus; H10N3 subtype; human infection

禽流感病毒属于正粘病毒科甲型流感病毒属,是危害人类和动物健康的重要病原体^[1]。目前已在雁形目和鸽形目等野生水禽中发现了16种血凝素(hemagglutinin, HA)亚型和9种神经氨酸酶(neuraminidase, NA)亚型^[1-2]。1949年在德国的发病鸡只中分离到首株 H10 亚型禽流感病毒 [A/chicken/German/N/1949 (H10N7), ck/GM/49]^[3]。之后不同 NA 亚型的 H10 病毒(包括 H10N1,

H10N3, H10N7 和 H10N4)在全球许多地方的家禽(鸡、火鸡和鸭)和野禽中检测到^[3-10],其中一些病毒能引起禽类呼吸道疾病暴发甚至死亡。病原学和血清学证据表明, H10 病毒也能外溢跨种感染多种哺乳动物,包括水貂(1984, H10N4)^[11]、海豹(2013–2016, H10N7)^[12]、猪(2008, H10N5)^[13-14]和犬(H10N8)^[15]等,并引起水貂和海豹的严重疾病和高死亡率。虽然 H5Ny ($\nu=1, 6$)、H9N2 和

H7Ny ($\nu=2, 3, 7, 9$)是人感染禽流感病毒的主要亚型^[2,16],但进入 21 世纪以来,已经报道了 3 起人感染 H10 禽流感病毒事件^[17-20]。2004 年从埃及的 2 位发热咳嗽的儿童体内分离到 H10N7 病毒,这是人类感染 H10 病毒的首次报道^[17]。2010 年澳大利亚某家禽屠宰场的 7 名工人发生 H10N7 病毒感染,造成结膜炎和轻微上呼吸道症状^[17-18]。2013-2014 年,我国南方地区出现 3 例人感染 H10N8 病毒的重症病例,其中 2 例死亡^[19-20]。

2021 年 5 月,江苏出现 1 例人感染 H10N3 禽流感病例。本文在病毒分离和基因组序列分析的基础上对病毒的分子特征和进化起源进行了分析。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器

流感病毒核酸分型检测试剂盒,江苏硕士生物技术有限公司; Viral DNA & RNA Kit, 天隆生物技术有限公司; QIAamp Viral RNA Kit, Qiagen 公司; SuperScript® III First-Strand Synthesis System 和 High Pure PCR Product Purification Kit, Invitrogen 公司; Nextera XT DNA Sample Preparation Kit, Illumina 公司。Illumina MiSeq Platform, Illumina 公司; 荧光定量 PCR 仪 VIIA7 型, ABI 公司。

1.2 标本

某 41 岁男性患者,2021 年 4 月 22 日表现发热(38.9 °C)、乏力,4 月 26 日和 28 日采集患者咽拭子和肺部灌洗液。5 月 25 日-28 日从患者工作生活场所和附件的农贸市场采集外环境和禽类样本 2 次共 63 份;同时采集患者密切接触者(包括家属、工友和医护人员等)咽拭子 34 人份和活禽市场职业暴露人群咽拭子 23 人份。

1.3 病毒核酸检测

采用 RT-qPCR 法对标本进行流感病毒核酸分型检测(包括 A 型、B 型、H1-H16、N1-N9-),具

体操作按照说明书,参见文献[21]。

1.4 病毒分离

将患者咽拭子标本分别接种 MDCK 细胞和 9-11 日龄的 specific pathogen-free (SPF)鸡胚尿囊腔。鸡鸭咽拭子和肛拭子标本接种 9-11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔。每个鸡胚接种 200 μ L, 37 °C 培养 72 h, 每天观察鸡胚生长情况。所有操作在江苏省疾控中心生物安全三级实验室里进行。

1.5 病毒基因组测序

具体实验程序参见文献[21]。简述之,根据 Qiagen QiaAmp Viral RNA Kit 说明书提取基因组 RNA。使用 SuperScript® III First-Strand Synthesis System, 通过引物 U12 (5'-AGCAAAGCAGG-3')反转录引物生成单链 cDNA。通过甲型流感病毒通用引物一步法扩增病毒基因组 8 个节段, PCR 产物根据 High Pure PCR Product Purification Kit 说明书纯化。通过 Qubit2.0 荧光计将纯化的 PCR 产物准确定量后,稀释成 0.2 ng/ μ L 作为测序模板,按照 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 说明书构建测序文库。主要步骤包括 DNA 的 Tagmentation、PCR 扩增、纯化、文库标化及混合。取 800 μ L 混合样用 Illumina MiSeq Platform 进行全基因序列测定,序列读取以 A/Anhui/1/2013 (H7N9)作为参考序列 (GISAID, accessions EPI439503-EPI439510)。采用 CLC Genomics workbench (CLC Bio)对测序结果进行拼接整理。

1.6 进化分析

在 GenBank 和 GISAID 网站通过 BLASTn 软件分析测序获得的序列,初步确定毒株亚型及各片段最大核苷酸相似毒株,并下载参考病毒核苷酸序列进行系统进化分析。用 MegAlign Program (DNASTAR)软件进行核苷酸和氨基酸序列比对。采用 MEGA 6.0 软件的邻近法构建病毒基因组进化树,序列比对采用 ClustalX 1.83 法^[22]。

2 结果与分析

2.1 标本检测结果

通过 RT-qPCR 对患咽拭子标本进行检测, 结果表明流感病毒 A 型-M、H10-HA 和 N3-NA 基因核酸阳性, 而 B 型-M 和其他 A 型 HA 亚型和 NA 亚型核酸检测阴性, 初步判定为标本中的病毒为 A 型 H10N3 亚型流感病毒。在农贸市场共采集到 63 份, 其中 33 份甲型流感病毒 M 基因检测阳性, 3 份 H10N3 阳性, 24 份 H10/H5 或 H10/H9 混合阳性, 3 份 H9 阳性。患者所有密切接触者和活禽市场职业暴露人群咽拭子甲型流感病毒核酸检测都为阴性。

2.2 病毒分离结果

将患者标本和农贸市场 H10 亚型标本接种 SPF 鸡胚, 结果从人标本中分离出一株病毒, 命名为 A/Jiangsu/428/2021 (H10N3), 简称为 JS/428; 从农贸市场活禽销售摊位的环境标本中分离出一株病毒, 命名为 A/Environment/Jiangsu/04940/2021 (H10N3), 简称为 EN/JS/04940。

2.3 基因组测序和进化树分析结果

利用 Illumina MiSeq 对人和环境分离株进行测序, 病毒基因组序列在 GISAID 数据库的序列号分别为: A/Jiangsu/428/2021, EPI1868390-EPI1868397; A/Environment/Jiangsu/04940/2021, EPI1885159-EPI1885166。在 GISAID 网站通过 BLASTn 软件在线分析, 确定 2 株 H10N3 流感病毒的 8 基因片段都来源于欧亚禽流感病毒。2 株病毒的 HA 和 NA 基因核苷酸序列相似度为 99.8%–100%, 内部基因相似度分别为 PB2 (95.0%)、PB1 (97.5%)、PA (99.3%)、NP (99.6%)、M (99.7%) 和 NS (98.3%)。值得注意的是, 人分离株和环境分离株的 PB2、PB1 和 NS 基因的相似度分别仅为 95%、97.5% 和 98.3%, 说明两株 H10N3 病毒存在内部基因多样性。以 JS428 为例, HA 基因与参考株 A/Chicken/Jiangsu/0104/

2019 (H10N3) 和 A/Chicken/Jiangsu/0110/2019 (H10N3) 核苷酸相似度最高(98.5%), NA 基因与参考株 A/Chicken/Jiangsu/0104/2019 (H10N3) 和 A/Chicken/Jiangsu/0110/2019 (H10N3) 的序列相似度高达 98.5%, 其他 6 个内部基因(PB2、PB1、PA、NP、M 和 NS) 与近年来流行的 H9N2 流感病毒相应基因片段的最高核苷酸相似度高达 97.3%–99.0%。

为了进一步探究病毒的基因起源, 使用 MEGA 6.0 软件邻近法构建病毒的基因系统进化树。世界范围内, 依据当下全球可使用的流感病毒基因序列数据库, H10-HA 基因和 N3-NA 基因的系统进化都可分为两大谱系: 欧亚禽谱系和美洲禽谱系。HA 基因进化树(图 1) 上, 2 株 H10N3 分离株属于欧亚禽大谱系, 与近年来中国家禽中流行的 H10 亚型病毒有遗传进化相关性, 特别与 2013–2019 年华东地区流行的 H10 病毒处于一个独立的进化分支上, 提示有共同的进化起源。相比之下, 2013–2014 年中国江西 3 例人感染 H10N8 病毒与本研究中的 2 株 H10N3 分离株处于不同的进化分支上, 提示遗传距离较远。与 HA 基因相似, NA 基因进化树(图 2) 上, 2 株 H10N3 分离株也属于欧亚禽大谱系, 与近年来中国华东地区家禽中流行的 N3 亚型病毒处于一个进化分支上, 提示具有共同的遗传起源。其他 6 个内部基因进化树(图 3) 表明, 2 株病毒的内部基因都来源于近年来中国南方家禽中流行的 H9N2 病毒。除了 PB2 和 NS 基因外, 二者的 PB1、PA、NP 和 M 基因遗传距离较近, 都处于同一进化分支上; 相比之下, PB2 和 NS 基因则处在不同的进化分支上, 表明不同的基因起源。上述分析表明, 2 株病毒是一种新的基因重配 H10N3 禽流感病毒, 进一步表明内部基因有一定的遗传多样性。本研究中 H10N3 亚型病毒的 HA 和 NA 基因组合最早在 2019 年中国华东地区的家禽中发现, 推测由流行于中国南方家禽中 H10 亚型和 N3 亚型病毒重配而来^[23]。

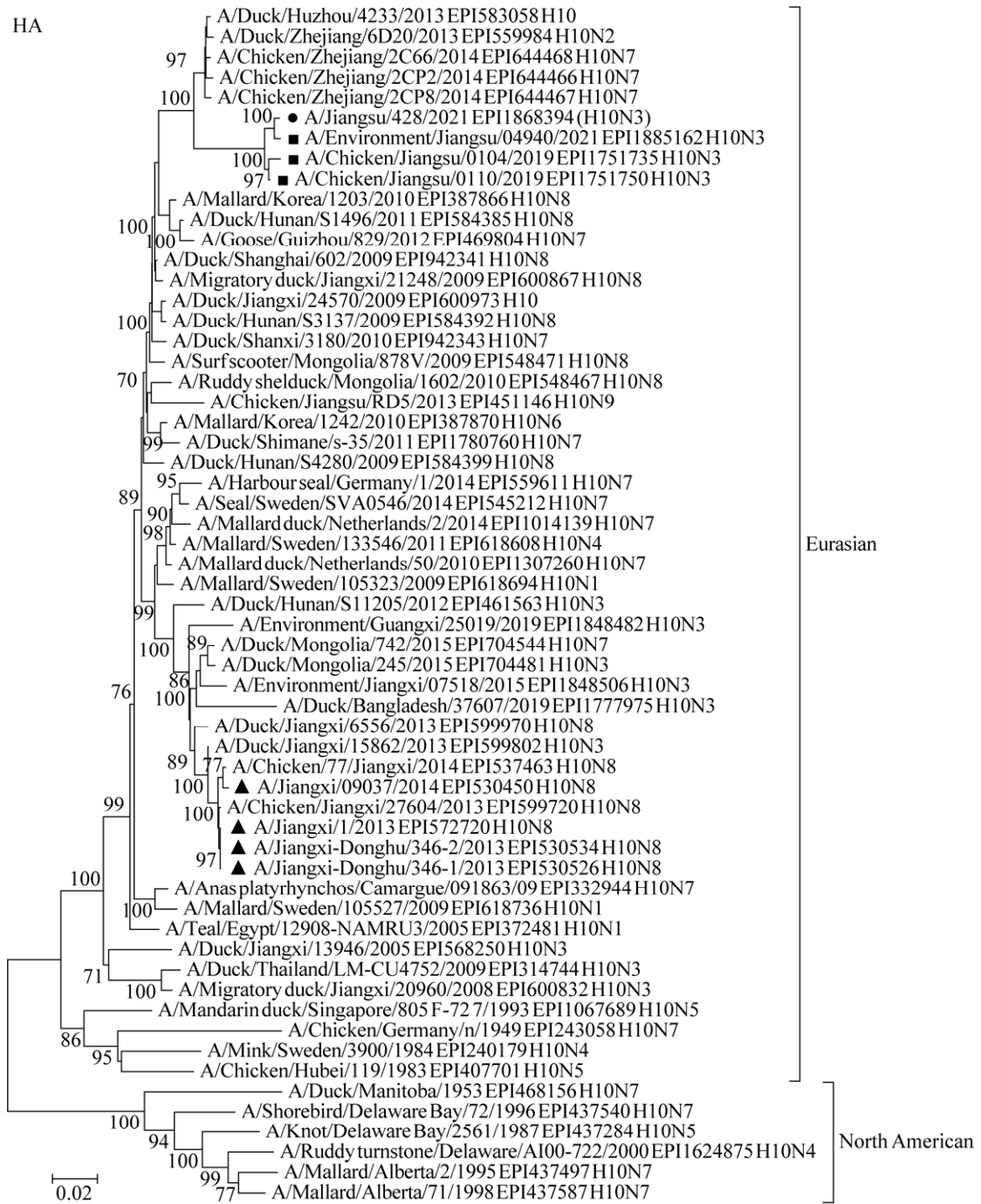


图 1 HA 基因进化树 每个毒株名称后面的数字是 GISAID 上的序列号. 分支上显示的是大于 70% 的自举值. 标尺显示 0.02 的核苷酸替代. ●: H10N3 人分离株; ■: H10N3 禽类和环境分离株; ▲: H10N8 人分离株

Figure 1 Phylogenetic analysis of HA genes of H10N3 viruses. Number after each isolate virus is the sequence accession No. in GISAID. Bootstrap values are shown for selected nodes (only for those with a frequency greater than 70%). Bar indicates 0.02 sequence divergence. H10N3 human and avian/environment isolates are indicated by black circle ● and square ■, respectively; H10N8 human isolates are indicated by triangle ▲.

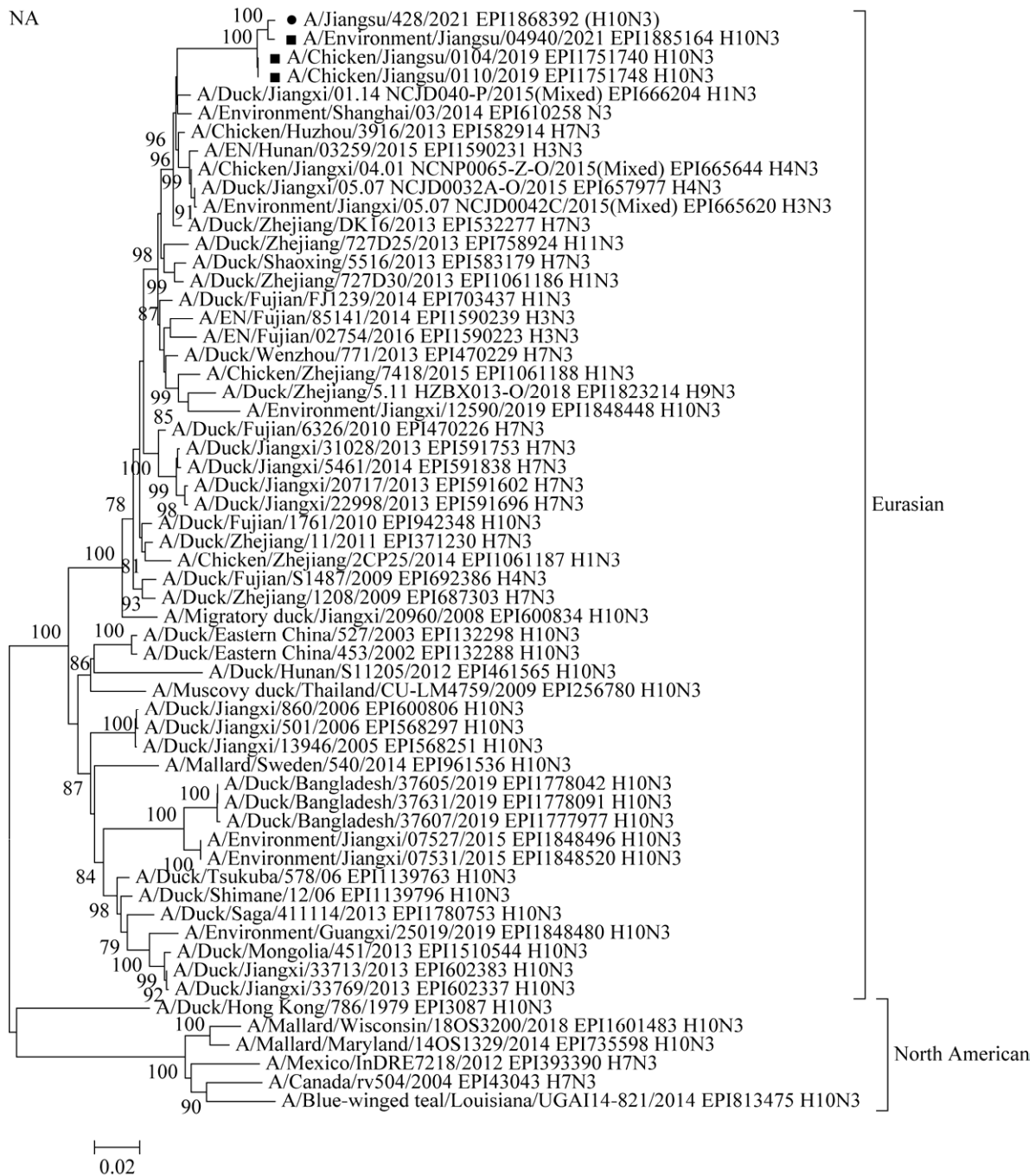


图 2 H10N3 病毒 NA 基因进化树 每个毒株名称后面的数字是 GISAID 上的序列号. 分支上显示的是大于 70% 的自举值. 标尺显示 0.02 的核苷酸替代. ●: H10N3 人分离株; ■: H10N3 禽类和环境分离株

Figure 2 Phylogenetic analysis of NA genes of H10N3 viruses. Number after each isolate virus is the sequence accession No. in GISAID. Bootstrap values are shown for selected nodes (only for those with a frequency greater than 70%). Bar indicates 0.02 sequence divergence. H10N3 human and avian/environment isolates are indicated by black circle ● and square ■, respectively.



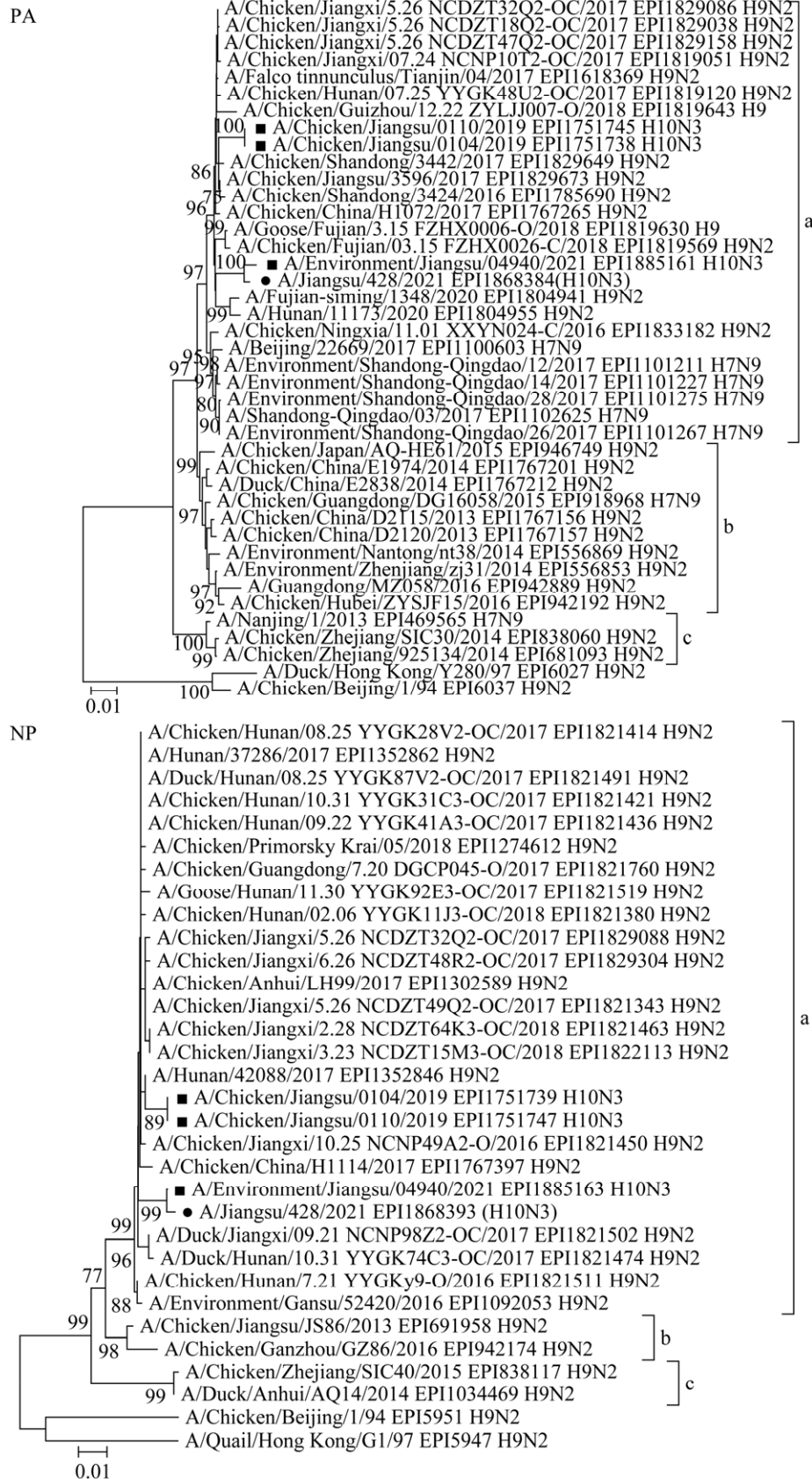




图 3 H10N3 病毒内部基因(PB2、PB1、PA、NP、M 和 NS)进化树 每个毒株名称后面的数字是 GISAID 上的序列号. 分支上显示的是大于 70%的自举值. 标尺显示 0.02 的核苷酸替代. ●: H10N3 人分离株; ■: H10N3 禽类和环境分离株

Figure 3 Phylogenetic analysis of six internal genes (PB2, PB1, PA, NP, M and NS) of three H10N3 viruses. Number after each isolate virus is the sequence accession No. in GISAID. Bootstrap values are shown for selected nodes (only for those with a frequency greater than 70%). Bar indicates 0.02 sequence divergence. H10N3 human and avian/environment isolates are indicated by black circle ● and square ■, respectively.

2.4 分离株的分子特征

H10N3 病毒的人和环境分离株及参考株病毒编码蛋白的氨基酸位点分析见表 1。病毒 HA 蛋白的裂解位点含有 1 个碱性氨基酸 R, 未插入多个碱性氨基酸, 理论上不属于高致病性禽流感病毒^[1]。HA 蛋白受体结合位点 228 位氨基酸残基由 G 突变为 S, 理论上增强了对人 SA α 2,6 受体的亲和力^[24]。另外, 未发现 PB2 蛋白 E627K

和 D701N 突变, 但 591 位氨基酸残基由 Q 突变为 K, 理论上增强了对人体的适应力和致病性^[25-26]。M2 蛋白发生 S31N 突变, 表明病毒对金刚烷胺类药物有抗性。N3 亚型流感病毒神经氨酸酶基因相关耐药位点(包括 E119V、Q136K、I222M、R292K、R371K 等)未发生突变, 表明对神经氨酸酶抑制剂敏感^[27-28]。PB1 蛋白的 I368V 位点和 PA 蛋白的 S409N、V100A, 以及 NS1 蛋白的 P42S、

表 1 两株 H10N3 病毒编码蛋白关键氨基酸位点分析

Table 1 Key functional amino acid sites of viral proteins of two H10N3 influenza viruses in Jiangsu

蛋白 Protein	生物学功能 Biological function	突变位点 Mutation	毒株 Virus		
			Human H10N3 JS428	Environment H10N3 EN/JS04940	Human H10N8 JX-346
HA	受体结合位点 Receptor binding sites (H3 number)	Q226L	Q	Q	Q
		G228S	S	S	G
		R229I	I	R	R
	裂解位点 Cleavage site		PEIIQGR↓G	PEIIQGR↓G	PELIQGR↓G
NA	茎区 Stalk region	Deletion	No	No	No
	药物抗性 Antiviral resistance	E119V	E	E	E
		Q136K	Q	Q	Q
		I222M	I	I	I
		R292K	R	R	R
		R371K	R	R	R
PB2	增强哺乳动物适应性 Mammalian adaptation	Q591K	K	Q	Q
		E627K	E	E	E
		D701N	D	D	D
PB1	增强雪貂间传播力 Increased transmission in ferret	I368V	V	V	V
PB1-F2	增强对哺乳动物致病性 Increased virulence in mammalian	87-90 aa	90 aa	90 aa	52 aa
PA	宿主信号 Host signature	V100A	V	V	V
		S409N	N	N	N
M2	药物抗性 Antiviral resistance	S31N	N	N	N
NS1	C-末端 PED 基序 C-terminal PED motif	227-300 aa	Runcated (217 aa)	Runcated (217 aa)	ESEV
	增强对小鼠的致病性 Increased virulence in mice	D92E	D	D	E
		P42S	S	S	S

毒株名称缩写, JS428 (H10N3): A/Jiangsu/428/2021 (H10N3); EN/JS04940 (H10N3): A/Environment/Jiangsu/04940/2021 (H10N3); JX-346 (H10N8): A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)

JS428 (H10N3): A/Jiangsu/428/2021 (H10N3); EN/JS04940 (H10N3): A/Environment/Jiangsu/04940/2021 (H10N3); JX-346 (H10N8): A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8).

D92E 位点均未发生哺乳动物适应性突变, 尚保留禽流感病毒特征。此外, PB1-F2 蛋白和 NS 蛋白 C-terminal PED 基序均未发生缺失, 保留了禽流感病毒完整的蛋白功能。

3 讨论与结论

2003 年以来, 全球各地频繁报道人感染禽流感病毒, 主要涉及 H5、H9N2 和 H7 等亚型^[2,16]。本研究从一例患严重呼吸道疾病的病人呼吸道标本中分离到一株病毒, 对原始标本和病毒分离物进行 Real-time PCR 分析检测和基因组序列解析, 结果证实为人感染 H10N3 亚型禽流感病例。从患者住处附近的农贸市场活禽摊位采集的标本中分离到一株病毒, 经病毒全基因测序和比对分析, 与患者病毒基因组片段的核苷酸序列相似度高达 95.0%–100%。基因系统发生分析也显示 2 株病毒遗传关系较近, 有共同的遗传起源, 结合流行病学调查, 判断这是一起禽流感病毒通过机会性外溢而跨越宿主屏障感染人的事件。目前, 全球报道的人感染 H10 病毒主要包括 H10N7 和 H10N8 两种亚型^[17-20], 本研究首次报道了由 H10N3 亚型禽流感病毒感染人并引致严重疾病。

禽流感病毒跨种感染人并可能引起人际间传播, 涉及病毒多个基因的哺乳动物适应性进化^[25,29-30]。HA 蛋白的受体结合特性和稳定性及多聚酶蛋白的活性, 在病毒的跨种进化中最为关键^[24]。Herfst 以雪貂为模型^[31], 发现 HA1 蛋白 G226L、T244I 和 HA2 蛋白 E74D 3 个位点的突变, 能够导致禽 H10N7 病毒在雪貂中通过气溶胶和飞沫进行水平传播; G226L 突变在病毒 HA 蛋白增强对人受体 SA α 2-6Gal 的亲合力中起主要作用, 特别在 G228S 同时突变情况下亲合力进一步增强; T244I (HA1) 和 E74D (HA2) 的突变主要增强了 HA 蛋白在低 pH 环境和低温度中的稳定性。本研究中, 未发现人分离株 JS428 在

G226L、T244I 和 E74D3 位点的突变; 然而 228 位氨基酸残基由 G 突变为 S, 由此推测分离株 JS428 有增强人 SA α 2,6 受体亲和力的趋势, 但尚未发生 SA α 2-3Gal 受体亲和力向 SA α 2-6Gal 受体亲和力的完全转变。此外, 大量研究表明, PB2 蛋白 E627K 的突变能够提高禽流感病毒 RNA 聚合酶在人体内的复制活性, 增强病毒对人体的适应性和致病性^[26,29]。本研究中, JS428 虽然未发生 PB2 蛋白 E627K 的突变, 但 591 位氨基酸残基由 Q 突变为 K, 理论上是对 E627 位点未发生突变的补偿, 据此推测 JS428 增强了对人体的适应力。本研究相关职业暴露人员和密切接触者的核酸和血清学检测(资料未显示)中未发现新的感染, 结果提示病毒虽有了一定感染和适应人体的分子特征, 但尚不具备人际间持续传播的能力。

东亚是全球家禽养殖数量最多、密度最大的地区, 客观上为禽流感病毒提供了大量的易感宿主^[21]。特别在中国, 农贸市场和流动摊位的活禽交易是禽肉消费的重要模式^[32]。自 1997 年中国香港特别行政区居民感染 H5N1 禽流感事件以来, 大量的研究表明, 消费终端的活禽交易在禽流感跨物种感染人的过程中发挥了重要的桥梁作用, 活禽市场也成为病毒发生基因重配的重要场所^[33]。为了提高人感染禽流感的预测预警和处置能力, 从 2013 年开始, 本实验室依托江苏省流感监测网络, 建立了覆盖全省的 15 个活禽市场禽流感病毒监测点, 在此基础上, 我们已在江苏省发现一系列人感染不同亚型禽流感的病例, 病毒亚型包括 H7N9、H7N4、H5N6 和 H9N2 等^[21,34-35]。监测数据表明, 自 2018 年以来, 江苏活禽市场流行的病毒主要是 H9N2 和 H5N6 亚型^[36]。1994 年在广东家禽中发现 H9N2 病毒, 之后该亚型病毒在我国家禽和活禽市场中的长期流行和进化, 并为不断出现的新亚型禽流感病

毒提供了内部基因,包括 H7N9、H5N6 和 H10N8 等^[33,37]。本研究中, H10N3 分离株的 6 个内部基因都来源于近年来在华东地区流行的 H9N2 病毒,进一步显示 H9N2 病毒的重要病毒生态学 and 公共卫生意义,需要继续加强监测工作。

在禽流感的自然生态中,野生水禽是病毒的自然贮存池,候鸟的活动对家禽中病毒的多样性和进化起重要作用^[38]。中国华东地区气候温润、地表水资源丰富、养禽业发达,是全球东亚-澳大利亚路线候鸟迁徙路线的重要区域。近年来,我国华东地区家禽中出现的 H7N9、H5N6、H5N8、H7N4 和 H10N8 等,均由该路线候鸟提供了 HA 和/或 NA 基因^[21,33]。本研究中,根据进化分析推断,与 H10N3 分离株遗传亲缘关系相近的 HA 和 NA 基因多年来在中国南方的家禽中低水平流行,其最初起源都可以追溯到野生水禽。本研究报道的人感染 H10N3 禽流感病毒事件,进一步突显了候鸟活动和活禽市场对人禽流感发生的重要影响。全球范围内,野生水禽流感病毒基因组监测数据在时间和空间上有很多盲区,这是目前禽流感监测工作的一个难点,未来需要建立包括野禽和家禽在内的完整禽流感监测体系^[39],以利于在禽流感防治中发挥更大作用。

REFERENCES

- [1] WEBSTER RG, BEAN WJ, GORMAN OT, CHAMBERS TM, KAWAOKA Y. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(1): 152-179.
- [2] GEORGE F, Gao, . From “a”IV to “Z”IKV: attacks from emerging and re-emerging pathogens[J]. Cell, 2018, 172(6): 1157-1159.
- [3] FELDMANN H, KRETZSCHMAR E, KLINGEBORN B, ROTT R, KLENK HD, GARTEN W. 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): 428-437.
- [4] WOOLCOCK PR, SHIVAPRASAD HL, de ROSA M. Isolation of avian influenza virus (H10N7) from an emu (*Dromaius novaehollandiae*) with conjunctivitis and respiratory disease[J]. Avian Diseases, 2000, 44(3): 737-744.
- [5] GRONESOVA P, FICOVA M, MIZAKOVA A, KABAT P, TRNKA A, BETAKOVA T. Prevalence of avian influenza viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia, 2006[J]. Avian Pathology, 2008, 37(5): 537-543.
- [6] WISEDCHANWET T, WONGPATCHARACHAI M, BOONYAPISITSOPA S, BUNPAPONG N, JAIRAK W, KITIKOON P, SASIPREEYAJUN J, AMONSIN A. Influenza A virus surveillance in live-bird markets: first report of influenza A virus subtype H4N6, H4N9, and H10N3 in Thailand[J]. Avian Diseases, 2011, 55(4): 593-602.
- [7] KIM HR, LEE YJ, OEM JK, BAE YC, KANG MS, KANG HM, CHOI JG, PARK CK, KWON YK. Characterization of H10 subtype avian influenza viruses isolated from wild birds in Korea[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 161(1/2): 222-228.
- [8] MA C, LAM TTY, CHAI YJ, WANG J, FAN XH, HONG WS, ZHANG Y, LI LF, LIU YM, SMITH DK, WEBBY RJ, PEIRIS JSM, ZHU HC, GUAN Y. Emergence and evolution of H10 subtype influenza viruses in poultry in China[J]. Journal of Virology, 2015, 89(7): 3534-3541.
- [9] ZHANG MM, ZHANG XX, XU KD, TENG QY, LIU QF, LI XS, YANG JM, XU JQ, CHEN HJ, ZHANG XY, LI ZJ. Erratum: characterization of the pathogenesis of H10N3, H10N7, and H10N8 subtype avian influenza viruses circulating in ducks[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44343.
- [10] WU HB, YANG F, LIU FM, PENG XM, CHEN B, CHENG LF, LU XY, YAO HP, WU NP. Molecular characterization of H10 subtype avian influenza viruses isolated from poultry in Eastern China[J]. Archives of Virology, 2019, 164(1): 159-179.
- [11] KLINGEBORN B, ENGLUND L, ROTT R, JUNTTI N, ROCKBORN G. An avian influenza A virus killing a mammalian species—the mink[J]. Archives of Virology, 1985, 86(3): 347-351.
- [12] BODEWES R, BESTEBROER TM, van der VRIES E, VERHAGEN JH, HERFST S, KOOPMANS MP, FOUCHIER RAM, PFANKUCHE VM, WOHLSEIN P,

- SIEBERT U, BAUMGÄRTNER W, OSTERHAUS ADME. Avian Influenza a(H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 720-722.
- [13] WANG N, ZOU W, YANG Y, GUO XB, HUA YF, ZHANG Q, ZHAO ZZ, JIN ML. Complete genome sequence of an H10N5 avian influenza virus isolated from pigs in central China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13865-13866.
- [14] FU XL, HUANG YM, FANG B, LIU YX, CAI MK, ZHONG RT, HUANG JM, QI WB, TIAN YB, ZHANG GH. Evidence of H10N8 influenza virus infection among swine in Southern China and its infectivity and transmissibility in swine[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 88-94.
- [15] SU S, QI WB, ZHOU P, XIAO CC, YAN ZS, CUI J, JIA K, ZHANG GH, GRAY GC, LIAO M, LI SJ. First evidence of H10N8 avian influenza virus infections among feral dogs in live poultry markets in Guangdong Province, China[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, 59(5): 748-750.
- [16] JIANG H, LAI SJ, QIN Y, ZHANG ZJ, FENG LZ, YU HJ. A review of global human infection with avian influenza and epidemiological characteristics[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(19): 2104-2115.
- [17] ARZEY GG, KIRKLAND PD, ARZEY KE, FROST M, MAYWOOD P, CONATY S, HURT AC, DENG YM, IANNELLO P, BARR I, DWYER DE, RATNAMOHAN M, McPHIE K, SELLECK P. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(5): 814-816.
- [18] VIJAYKRISHNA D, DENG YM, SU YCF, FOURMENT M, IANNELLO P, ARZEY GG, HANSBRO PM, ARZEY KE, KIRKLAND PD, WARNER S, O'RILEY K, BARR IG, SMITH GJD, HURT AC. The recent establishment of North American H10 lineage influenza viruses in Australian wild waterfowl and the evolution of Australian avian influenza viruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(18): 10182-10189.
- [19] CHEN HY, YUAN H, GAO RB, ZHANG JX, WANG DY, XIONG Y, FAN GY, YANG F, LI XD, ZHOU JF, ZOU SM, YANG L, CHEN T, DONG LB, BO H, ZHAO X, ZHANG Y, LAN Y, BAI T, DONG J, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study[J]. *Lancet (London, England)*, 2014, 383(9918): 714-721.
- [20] LIU MB, LI XD, YUAN H, ZHOU JF, WU JW, BO H, XIA W, XIONG Y, YANG L, GAO RB, GUO JF, HUANG WJ, ZHANG Y, ZHAO X, ZOU XH, CHEN T, WANG DY, LI Q, WANG SW, CHEN SG, et al. Genetic diversity of avian influenza A (H10N8) virus in live poultry markets and its association with human infections in China[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7632.
- [21] 邓斐, 彭杰夫, 崔仑标, 祁贤, 王慎骄, 余慧燕, 许可, 霍翔, 鲍倡俊. 1 例人感染 H7N4 禽流感病毒分子溯源研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(9): 665-672.
- DENG F, PENG JF, CUI LB, QI X, WANG SJ, YU HY, XU K, HUO X, BAO CJ. Genetic origin of avian influenza A H7N4 virus causing a case of human infection in China, 2018[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2018, 38(9): 665-672 (in Chinese).
- [22] DRUMMOND AJ, RAMBAUT A. BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7(1): 214.
- [23] GAO RY, ZHENG HF, LIU KT, JI ZX, CAI M, GU M, HU J, LIU XW, HU SL, WANG XQ, LIU XF. Genesis, evolution and host species distribution of influenza A (H10N3) virus in China[J]. *The Journal of Infection*, 2021, 83(5): 607-635.
- [24] SHI Y, WU Y, ZHANG W, QI JX, GAO GF. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 822-831.
- [25] CAULDWELL AV, LONG JS, MONCORGÉ O, BARCLAY WS. Viral determinants of influenza A virus host range[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(6): 1193-1210.
- [26] MASSIN P, van der WERF S, NAFFAKH N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(11): 5398-5404.
- [27] SONG MS, MARATHE BM, KUMAR G, WONG SS, RUBRUM A, ZANIN M, CHOI YK, WEBSTER RG, GOVORKOVA EA, WEBBY RJ. Unique determinants of neuraminidase inhibitor resistance among N3, N7, and N9 avian influenza viruses[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(21): 10891-10900.
- [28] LI Q, QI JX, WU Y, KIYOTA H, TANAKA K, SUHARA Y, OHRUI H, SUZUKI Y, VAVRICKA CJ, GAO GF. Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N3 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance[J]. *Journal of*

- Virology, 2013, 87(18): 10016-10024.
- [29] LONG JS, MISTRY B, HASLAM SM, BARCLAY WS. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(2): 67-81.
- [30] LIPSITCH M, BARCLAY W, RAMAN R, RUSSELL CJ, BELSER JA, COBEY S, KASSON PM, LLOYD-SMITH JO, MAURER-STROH S, RILEY S, BEAUCHEMIN CA, BEDFORD T, FRIEDRICH TC, HANDEL A, HERFST S, MURCIA PR, ROCHE B, WILKE CO, RUSSELL CA. Viral factors in influenza pandemic risk assessment[J]. *eLife*, 2016, 5: e18491.
- [31] HERFST S, ZHANG J, RICHARD M, McBRIDE R, LEXMOND P, BESTEBROER TM, SPRONKEN MIJ, de MEULDER D, van den BRAND JM, ROSU ME, MARTIN SR, GAMBLIN SJ, XIONG XL, PENG WJ, BODEWES R, van der VRIES E, OSTERHAUS ADME, PAULSON JC, SKEHEL JJ, FOUCHIER RAM. Hemagglutinin traits determine transmission of avian A/H10N7 influenza virus between mammals[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(4): 602-613.e7.
- [32] GAO GF. Influenza and the live poultry trade[J]. *Science*, 2014, 344(6181): 235.
- [33] LIU WJ, WU Y, BI YH, SHI WF, WANG DY, SHI Y, GAO GF. Emerging H_xNy influenza A viruses[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2022, 12(2): a038406.
- [34] 王慎骄, 余慧燕, 祁贤, 邓斐, 许可, 黄昊嶝, 鲍倡俊. 我国长三角地区首例人感染 H5N6 禽流感病毒的分离、鉴定与进化特征[J]. *江苏预防医学*, 2021, 32(2): 145-149.
- WANG SJ, YU HY, QI X, DENG F, XU K, HUANG HD, BAO CJ. Isolation, identification and evolutionary characteristics of the first human infection with H5N6 avian influenza virus in the Yangtze River Delta region of China[J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2021, 32(2): 145-149 (in Chinese).
- [35] 邓斐, 祁贤, 余慧燕, 王慎骄, 许可, 黄昊嶝, 鲍倡俊. 江苏省首例人感染 H9N2 禽流感病毒分子溯源研究[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(10): 1057-1061.
- DENG F, QI X, YU HY, WANG SJ, XU K, HUANG HD, BAO CJ. Genetic origin of human infection with avian influenza A H9N2 virus in Jiangsu Province[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2021, 34(10): 1057-1061 (in Chinese).
- [36] 邓斐, 祁贤, 余慧燕, 王慎骄, 黄昊嶝, 许可, 鲍倡俊. 2017-2019 年我国南方地区高致病性 H5N6 亚型禽流感病毒血凝素蛋白分子特征分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 516-523.
- DENG F, QI X, YU HY, WANG SJ, HUANG HD, XU K, BAO CJ. Molecular characteristic of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza A H5N6 viruses in live-poultry market, 2017-2019, Southern China[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 516-523 (in Chinese).
- [37] LI C, WANG SG, BING GX, CARTER RA, WANG ZJ, WANG JL, WANG CX, WANG L, WU G, WEBSTER RG, WANG YQ, SUN HL, SUN YP, LIU JH, PU J. Genetic evolution of influenza H9N2 viruses isolated from various hosts in China from 1994 to 2013[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(11): e106.
- [38] OLSEN B, MUNSTER VJ, WALLENSTEN A, WALDENSTRÖM J, OSTERHAUS ADME, FOUCHIER RAM. Global patterns of influenza a virus in wild birds[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 384-388.
- [39] 祁贤. 公共卫生视角下的流感病毒研究[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(12): 1233-1236.
- QI X. Influenza viruses: public health perspective[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2018, 31(12): 1233-1236 (in Chinese).