

江苏首例甲型 H1N1(2009)流感病毒分离 及其血凝素分子遗传特征分析

祁贤 崔仑标 李亮 汤奋扬* 郭喜玲 焦永军 单军 吴斌 祖荣强
邓斐 付建光 秦圆方 王慎骄 霍翔 许可 朱凤才 史智扬 羊海涛 汪华

(江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009)

摘要: 2009年6月12日, 江苏确诊首例甲型 H1N1(2009)病例。通过细胞和鸡胚分离系统, 我们分离到一株具有较高血凝活性的病毒, 命名为 A/Jiangsu/1/2009。为了跟踪病毒的变异情况, 我们开展了病毒的全基因组测序工作, 在此基础上对其血凝素基因(Haemagglutinin, HA)的遗传特性进行了详细研究。分离株 HA 蛋白不具有多碱基 HA 裂解位点, 具有低致病性流感病毒特点。与参考株 A/California/04/2009 相比, 分离株 A/Jiangsu/1/2009 HA 蛋白的有 4 个氨基酸发生了突变, 但都不在已知的抗原位点上。分离株有 5 个潜在糖基化位点, 这与近年来古典猪 H1N1 和北美三源重配猪 H1 病毒完全一致, 保留了古典猪 H1 的特点。与禽流感 H1 病毒相比, 分离株 HA 蛋白受体结合位点上的 E190D 和 G225D 发生突变, 这可能成为新甲型 H1N1(2009)在人际间传播的一个重要分子基础。此外, 其它受体结合位点上相关氨基酸同时具有人和猪流感病毒的特点。本研究首次对早期流行的甲型 H1N1(2009)流感病毒的 HA 蛋白的分子遗传特征进行了详细研究, 对进一步监测病原变异具有重要指导意义。

关键词: 甲型流感病毒, H1N1, 病毒分离, 血凝素, 分子特征, 低致病性

Isolation and Genetic Characterization of Haemagglutinin of the First Influenza A H1N1(2009) Viruses from Jiangsu Province

QI Xian CUI Lun-Biao LI Liang TANG Fen-Yang* GUO Xi-Ling JIAO Yong-Jun
SHAN Jun WU Bin ZU Rong-Qiang DENG Fei FU Jian-Guang QIN Yuan-Fang
WANG Shen-Jiao HUO Xiang XU Ke ZHU Feng-Cai SHI Zhi-Yang
YANG Hai-Tao WANG Hua

(Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: On June 12, 2009, the first case of novel influenza A H1N1(2009) virus infection was confirmed in Jiangsu Province. A virus with hemagglutination activity was isolated from the clinical sam-

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK2009434); 国家自然科学基金项目(No. 30901285)

* 通讯作者: Tel: 86-25-83759509; E: tfyepi@jscdc.cn

收稿日期: 2009-11-10; 接受日期: 2009-12-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

ples derived from the patient using both MDCK cells and embryonic eggs, which was designated as A/Jiangsu/1/2009(H1N1). In order to monitor evolution of the virus, we carried out whole-genome sequencing, and analyzed the genetic characteristic of hemagglutinin (HA) of the isolate in detail. The results showed that HA did not contained the multibasic amino acid motif at cleavage sites, which is a characteristic of low pathogenic influenza viruses. Compared to reference virus A/California/04/2009, the HA protein of the isolate had four amino acid mutation, which were not located on the known antigenic sites. Consistent with the triple-reassortant swine H1 viruses from Northern America in recent years, the isolate contained five potential glycosylation sites, which also was the feature of classical swine H1N1 viruses. Compared with avian H1 viruses, two amino acid (E190D and G225D) were changed on receptor binding sites, which may be an important molecular mechanism of human-to-human transmission for the novel viruses. In this study, for the first time, we studied the molecular characteristics of the HA protein of the novel influenza A H1N1(2009) viruses in detail, which have an important guiding significance for further monitoring of virus mutation.

Keywords: Influenza A virus, H1N1, Virus isolation, Haemagglutinin, Genetic characterization, Low pathogenicity

甲型流感病毒属于正粘病毒科, 宿主分布广泛, 可感染禽、人、猪、马、狗、猫、海洋哺乳动物(海豹、鲸等)等^[1-2]。在整个甲型流感病毒的生态分布中, 野生水禽是主要的自然贮存宿主和基因库, 目前发现的所有甲型流感病毒亚型(16个H亚型和9个N亚型)都存在于野生水禽中, 而猪被认为是禽、人流感病毒的中间宿主和不同来源流感病毒的基因“混合器”^[2]。20世纪人类经历了3次流感大流行, 分别是1918年西班牙流感(H1N1)、1957年亚洲流感(H3N2)和1968年香港流感(H3N2)^[2]。甲型流感有两种主要的变异方式, 即表面蛋白HA和NA点突变积累引起的抗原漂移(Antigenic drift)和异源HA和NA重配引起的抗原转移(Antigenic shift), 而后者往往引起人类流感新的大流行。甲型流感病毒的基因组由8个RNA节段组成, 血凝素(Hemagglutinin, HA)由节段4编码, 是宿主免疫系统作用的主要靶蛋白之一, 在体液免疫中起重要作用。此外, HA在病毒吸附细胞, 完成其生命周期以及决定宿主特异性方面也起重要作用^[2-3]。

自2009年3月份, 源于北美的流感疫情向全球迅速扩散, 最终演变为1968年以来新世纪首次流感大流行。此次大流行的病原属于新甲型H1N1流感病毒, 在遗传特性和抗原性等方面都有别于人群中流行多年的季节性H1N1流感病毒, 人群普遍易感。分子遗传进化分析表明, 新甲型H1N1流感病毒是欧洲猪流感病毒(提供NA和M基因)和北美三源基因重配的猪H1流感病毒(提供PB2、PB1、PA、HA、

NP和NS基因片段)通过基因重配的产物, 从基因的最初来源看含有人、禽和猪流感病毒的基因; 该病毒可能早在2008年12月到2009年1月间就在猪群中出现^[4], 目前已经成为全球甲型流感病毒优势流行株。新甲型H1N1病毒的显著特点是在人群中传播速度快, 绝大多数病情温和。随着北半球秋冬季的来临, 病毒向易感人群第二波大规模的传播已不可避免。病毒在进一步的传播过程中如何变异? 致病性是否增强? 是否会与其它流感病毒进行基因重配? 这些变异具有何等的临床和流行病学意义? 这些问题的解决有赖于流感监测和病毒的基因组解析工作, 这对于制定科学有效的防控策略具有重大意义。

江苏省自2009年6月12日发现首例输入型病例以来, 甲型H1N1(2009)病例逐渐增多, 到目前已经成为江苏流感病毒优势流行株。为了跟踪病毒的变异情况, 及时发现具有流行病学意义的变异株, 我们进行了病毒分离和基因组解析工作。本研究对江苏首例甲型H1N1(2009)流感进行病毒分离, 并完成了全基因组测序工作, 在此基础上对其血凝素基因的遗传特性进行了详细研究。

1 材料与方法

1.1 病毒分离与鉴定

江苏首例甲型H1N1(2009)患者来自日本, 于6月11日发病, 随即采集疑似病例的鼻咽拭子, 经Real-time PCR检测核酸阳性。6月12对标本进行病

毒分离, 分离按常规方法进行, 分离系统包括 MDCK 细胞和 9–10 日龄 SPF 鸡胚。所有操作在生物安全三级实验室里进行。

1.2 基因组测序

提取阳性标本或病毒分离物的 RNA (Virus RNA Extraction Kit, G1AGEN), 通过 RT-PCR 方法扩增具有重叠区的基因片段, 采用 WHO 提供的测序引物, 测序仪为 ABI 3730。其中 HA 序列扩增自阳性标本, 其它 7 个基因节段序列来自细胞病毒分离物。

1.3 序列分析

序列拼接分析和进化树构建采用 DNASTAR 软件包(Madison, WI, USA)。用 BLASTn 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 确定相关的参考株, 参考株序列来自于 GenBank。A/California/04/2009(H1N1)是首个完成基因组测序的新甲型 H1N1 毒株; 以 A/South Carolina/1/18(H1N1)作为 1918 年西班牙流感代表毒株; A/Brisbane/59/2007(H1N1)是 WHO 推荐的 2009–2010 年度季度季节性 H1N1 流感疫苗株; 以 A/Swine /Indiana/9K035/1999(H1N2)、A/Swine/Hong Kong/5190/1999(H3N2)和 A/Swine/England/WVL7/1992(H1N1)作为新甲型 H1N1 母源病毒的代表株。

2 结果

2.1 病毒分离

标本接种 MDCK 细胞 24 h 细胞出现病变, 表现为细胞聚集, 拉网, 细胞融合等, 病变达到 90%时收获(图 1)。细胞病变使用 1%人 O 型红细胞进行血凝试验, 分离物第 1 代血凝价为 16, 第 2 代达到 256; 对病毒分离物进行 Real-time PCR 检测, 结果甲型 H1N1(2009)病毒核酸阳性, 表明病毒分离成功。分离株命名为 A/Jiangsu/1/2009(H1N1)。将分离的病毒置于–70℃ 冰箱备用。

2.2 测序和进化分析

分离株 A/Jiangsu/1/2009(H1N1)的 HA 序列扩增自咽拭子标本, 其它 7 个基因序列来自的第一代细胞培养物。序列提交 GenBank, 序列号分别为: ACS34705、ACU00159-ACU00166。分离株的 8 基因片段核苷酸和推导氨基酸序列与其他新甲型 H1N1 参考株的同源性在 99%以上, 说明来源于同一祖先。进化树分析也表明, 分离株属于新甲型 H1N1 病毒(图 2)。

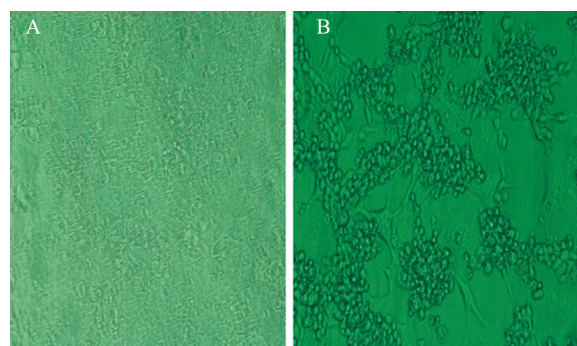


图 1 分离株 A/Jiangsu/1/2009(H1N1)引起 MDCK 细胞病变

Fig. 1 Virus-induced cytopathic effect by the isolate A/Jiangsu/1/2009(H1N1) at post-incubation 48 h

注: A: 正常细胞; B: 接种 48 h 后细胞病变。

Note: A: Mock-infected MDCK cell; B: Post-incubation 48 h with A/Jiangsu/1/2009(H1N1).

2.3 分离株血凝素分子特性分析

分离毒 A/Jiangsu/1/2009 的 HA 核苷酸和氨基酸与疫苗株 A/California/04/2009 的核苷酸和氨基酸同源性为 99.6%和 98.9%。分离株的 HA 基因编码区全长 1701 bp, 共编码 566 个 aa, 包括 N-末端 17 个 aa 的信号肽。HA 蛋白由 HA1(326 aa)和 HA2 (223 aa)两部分组成, 二者由一个碱性氨基酸 R 连接, 裂解位点 aa 序列为 IQSR↓G, 与高致病性禽流感病毒含多个碱性氨基酸裂解位点相比, 是典型的低致病性流感病毒特征之一。

参考株 A/California/04/2009 与 A/Swine/Indiana/9K035/1999 (北美三源基因重配猪 H1 病毒)相比, HA 核苷酸和推导的氨基酸相似性分别是 95.1%和 94.9%, 整个 HA 蛋白共有 27 个氨基酸差异, 20 个位于 HA1 蛋白上, 其中 6 个差异分布在 3 个抗原位点上(Ca 2 个、Cb 1 个、Sa 3 个)。相比之下, A/California/04/2009 与 A/Brisbane/59/2007 的 HA 核苷酸和推导的氨基酸相似性分别是 72.2 %和 81.3%, 整个 HA 蛋白共有 108 个氨基酸差异, 90 个位于 HA1 蛋白上, 其中 23 个差异分布在 4 个抗原位点上(Ca 7 个、Cb 5 个、Sa 1 个、Sb 8 个)。与参考株 A/California/04/2009 相比, 分离株 A/Jiangsu/1/2009 HA 蛋白的有 4 个氨基酸发生了突变, 分别位于 88、200、324 和 513 位点上(按照 H3 亚型 HA 氨基酸排序), 但都不在已知的抗原位点上, 因此这些突变还不会影响抗原性的改变, 新甲型 H1N1(2009)抗原漂移尚未启动。

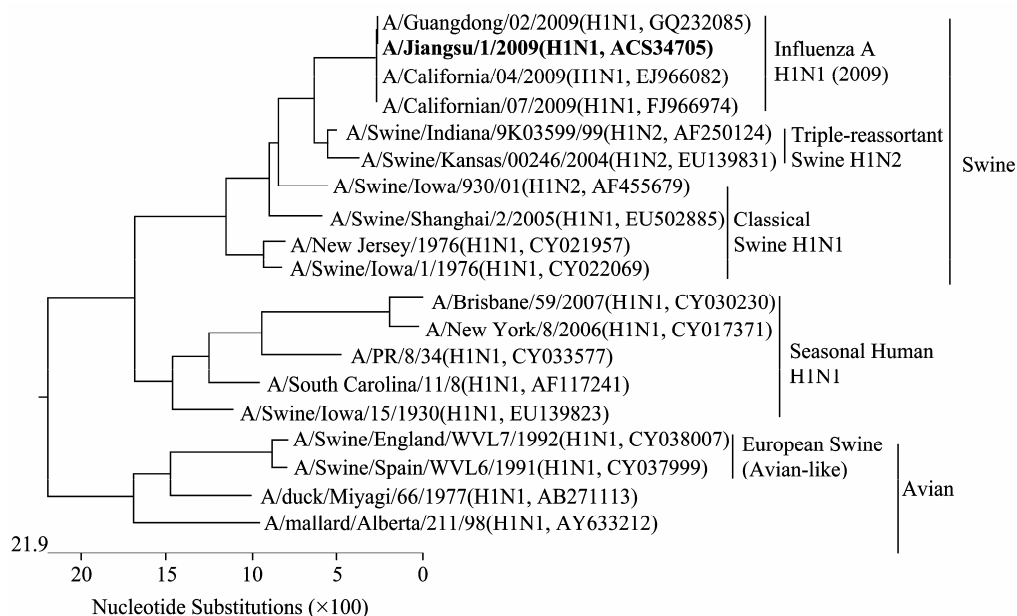


图 2 分离株 A/Jiangsu/1/2009 HA 基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees for the HA for A/Jiangsu/1/2009(H1N1)

注: 采用DNASTAR软件中的MegAlign程序构建系统进化树。

Note: The tree was constructed by MegAlign software (DNASTAR). Horizontal distances are proportional to genetic distance. Vertical lines are for spacing branches and labels. A/Jiangsu/1/2009(H1N1) is underlined. All the isolates were listed name, subtype and GenBank accession. The bold words indicate the virus host lineages.

分离株 A/Jiangsu/1/2009 和参考株 A/California/04/2009 都有 5 个潜在糖基化位点, 与禽流感 H1 病毒、A/South Carolina/1/18 和 A/Swine/Iowa/1/1930(都有保守的 4 个糖基化位点)相比, 在 278 位增加了一个糖基化位点(NTT), 这与近年来古典猪 H1N1 和三源重配猪 H1 病毒完全一致。A/Brisbane/59/2007 在 63、129、163 位增加了 3 个, 达到 7 个糖基化位点。可见在糖基化方面, 分离株和 A/California/04/2009 HA 蛋白也保留了古典猪 H1 的特点。

对受体结合位点(Receptor-binding site, RBS)的氨基酸分析发现, 分离株和 A/California/04/2009 HA 蛋白 190 和 225 位氨基酸都是 D, 这也是北美三源重配猪 H1 病毒(以 A/swine/Indiana/9K035/99 为例)和大多数 H1 病毒(以 A/Brisbane/59/2007 为例)的特征(表 1)。分离株 HA 蛋白的 155 和 159 位氨基酸分别是 V 和 N, 是典型的猪流感病毒特征。与禽 H1 病毒一样, 大多数古典和类禽猪 H1 以及近年来(约 2000 年以来)人 H1 在 186 位氨基酸是 P, 而分离株和 A/swine/Indiana/9K035/99 则为 S, 在约 1999 年以前人季节性 H1 的 186 也主要是 S。总之, 分离株和 A/California/04/2009 的 HA 蛋白 RBS 位点的氨基酸同时具有人和猪流感病毒的特点, 这些特点已经

存在于 1999 年产生的北美三源重配猪 H1 病毒中。

3 讨论

HA 蛋白是流感病毒的主要表面抗原之一, 遗传进化最为活跃。与 HA2 蛋白相比, HA1 蛋白位于 HA 蛋白的球部, 承受着更大的免疫选择压力, 因此更易发生变异^[2]。早期研究表明 H1 亚型 HA1 蛋白上的 44 个氨基酸是宿主免疫系统作用的靶点, 其变异直接影响病毒的抗原漂移^[5]。抗原漂移是流感病毒逃避宿主免疫压力的一种重要变异方式, 特别对于人季节性流感病毒。新甲型 H1N1 病毒在抗原性和基因特性方面对人群而言是全新的, 人群几乎处于免疫空白。随着病毒的进一步传播, 特别是疫苗接种计划的实施, 人群的免疫屏障逐步建立, 病毒发生抗原漂移的可能性加大。一般认为流感病毒在发生抗原漂移产生变异株的过程中, HA 变异至少要涉及 4 个氨基酸的变化, 且要分布在 2 个以上的抗原位点上。本研究中, 江苏首次分离株属于输入性, 与参考株 A/California/04/2009 相比, 核苷酸和氨基酸高度同源, 没有太多的变异。此外, 分离株 A/Nanjing/1/2009 HA 蛋白的有 4 个氨基酸发生了突变, 虽然这些突变不在重要的抗原位点上, 但其变

表 1 A/Jiangsu/1/2009 与参考株 HA 受体结合位点氨基酸比较
Table 1 Amino acid residues on receptor-binding sites of HA proteins of A/Jiangsu/1/2009 and the reference viruses

Virus		Residues on the receptor-binding sites of HA proteins*								Lineage
		71	138	155	159	186	190	194	225	
A/California/04/2009(H1N1)										
A/Jiangsu/1/2009(H1N1)	E	A	V	N	S	D	L	D		Tripe-reassortant Swine, North America
A/swine/Indiana/9K035/99(H1N2)	E	A	V	N	S	D	L	D		Tripe-reassortant Swine, North America
A/swine/Iowa/930/01(H1N2)	E	A	V	N	S	D	L	D		Tripe-reassortant Swine, North America
A/swine/Iowa/1/1976(H1N1)	E	A	V	N	P	D	L	D		Tripe-reassortant Swine, North America
A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	E	A	V #	N	P	D	L	G		Classical Swine
A/duck/Miyagi/66/1977(H1N1)	E	A	T #	G #	P	D	L	D		Seasonal human
A/swine/England/WVL7/1992(H1N1)	D #	A #	T #	T #	P #	E #	L #	G #		Avian
A/South Carolina/1/18(H1N1)	D	A	V	N	P	D	L	G		Avian-like swine, Europe
A/California/04/2009(H1N1)	D	A	T #	S #	P	D #	L	D		Spain pandemic, 1918

注: *: 按照 H3 HA 氨基酸排序; #: 在该宿主中保守。

Note: *: Residues numbering is aligned to the H3 virus HA; #: Amino acid is conserved in all sequences in this host.

异趋势值得关注。病毒在进化中也会获得新的糖基化位点, 这些新积累的糖基化位点可能会掩盖抗原位点, 成为病毒逃避宿主免疫压力的另一种方式^[6]。因此, 新甲型 H1N1(2009)病毒 HA 蛋白糖基化位点的变化也值得关注。

流感病毒 HA 蛋白与宿主细胞表面受体的结合是感染发生的关键一步^[2], HA 蛋白的受体结合特性也是流感病毒宿主限制性的一个重要决定因素^[2,7-8]。所有流感病毒都来源于野生水禽, 在流感病毒跨物种感染并适应新宿主(人和猪)的过程中, 受体结合特性的转变至关重要。研究发现, 一些 RBS 上的氨基酸在所有禽流感病毒中都是保守的, 而在哺乳动物中适应后就发生了变化, 具有了宿主特异性^[7-8]。对于 H1 亚型流感病毒而言, 8 个与受体结合相关的氨基酸在禽 H1 HA 中都是保守的, 但进入人或猪群中适应后则发生了变化(表 1)。研究表明, E190D 和 G225E/D 这两个位点氨基酸的转变, 在禽 H1 病毒增强 SA α 2-6Gal 亲和性, 同时减弱对 SA α 2-3Gal 亲和性中起关键作用^[7-8]。纯粹的古典猪 H1N1 (即没有发生基因重配)和大多数欧洲类禽 H1N1 (只有两株早期的流行株除外, 这两株 225 位是 E)在 190 和 225 位氨基酸分别是 D(哺乳类特征)和 G(禽类特征), 这可能也是猪流感病毒能够结合两种受体的分子机制之一^[7]。三源重配 A/Swine/Indiana/9K035/1999

的 HA 来源于古典 H1N1 病毒, 其中一个重要的变化是 225 位氨基酸由 G 转变为 D。这就意味着与母源古典猪 H1N1 病毒相比, 北美重配的 H1 病毒已经大大增强了对 SA α 2-6Gal 受体的结合能力, 而这种特征在分离株和 A/California/04/2009 中也得到了保留, 这可能是新甲型 H1N1(2009)病毒在人际间传播的重要分子基础。一个疑问是, 虽然北美三源重配猪 H1 病毒也同样具有 E190D 和 G225D 突变, 近年来也报道了多起该类病毒感染人的案例, 但为何其始终没有获得在人群中的传播能力? 可见 HA 受体结合特性的转变只是病毒获得在人际间传播的必要条件, 病毒各基因的优化组合和蛋白功能的协调作用对于病毒的复制和毒力也有重要影响^[1-2]。与三源重配猪 H1 病毒相比, 新甲型 H1N1 病毒从欧洲猪流感病毒中获得了 NA 和 M 基因片段, 这种新的基因组无疑对病毒适应新宿主起到了重要作用, 但这种基因组合是如何影响病毒的传播力和致病力的, 还有待于深入研究。此外, 相对于禽 H1 而言, T155V/I 和 T159N/S 的转变是古典猪 H1 和类禽猪 H1 病毒的特征, 而人 H1 病毒的 155 位没有变化, 但 159 位由 T 转为 G^[8], 分离株这些氨基酸的变化对受体结合特性的影响还不清楚, 这种变化可能与宿主适应性有关。

本研究在江苏分离株基因组测序分析的基础

上,对新甲型 H1N1 病毒的 HA 基因的分子特性进行了详细分析。分离株 HA 蛋白遗传特性首次表现为低致病性的分子特点。HA 多碱性氨基酸裂解位点是区分高致病性和低致病性流感病毒的一个重要分子指标^[1],分离株不具有多碱性 HA 裂解位点,从 HA 的分子特性上属于低致病性流感病毒,这一结果也与实际病毒流行情况相符,此外其它病毒蛋白分子遗传特性分析也表现出低致病性特点(另文报道)。但最近的动物实验表明,与季节性 H1N1 病毒相比,新甲流 H1N1 病毒可以在雪貂和小鼠的下呼吸道复制,有更强的致病性^[10-11]。这一现象在人群中也有发现,其详细的分子机制尚不清楚。研究显示人上呼吸道细胞主要表达 SA α 2-6Gal 受体,而下呼吸道细胞主要表达 SA α 2-3Gal 受体^[12-15],古典猪流感病毒的特点之一是对两种受体都能够有效地结合^[16]。新甲型 H1N1 病毒 HA 蛋白保留了许多猪流感病毒的受体结合特点(表 1),这可能是其能在人下呼吸道复制的一个原因。此外,分离株的 HA 蛋白具有明显的猪流感病毒分子遗传特点。研究表明,古典猪 H1N1 和人季节性 H1N1 流感病毒都来源于 1918 年西班牙流感大流行 H1N1 病毒^[7,17-18]。从这个意义讲,新甲型 H1N1(2009)流感病毒(其 HA、NP 和 NS 来源于古典猪 H1N1 病毒)也是人季节性 H1N1 病毒的远亲。HA 基因进入猪群后长期独立进化,与人季节性 H1N1 病毒的同源基因相比,发生了很大的变化。本研究分离株的 HA 蛋白在抗原性、糖基化、受体结合特性等方面都保留了古典猪 H1N1 病毒的特点。随着该病毒在人群中的进一步传播和持续存在,在人体免疫系统的作用下,HA 蛋白的这些猪流感的分子特征将逐渐消失,而这些分子特征的改变将如何影响病毒的传播力和致病性,值得进一步密切关注。

参 考 文 献

- [1] Peiris JS, de J, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*, 2007, **20**(2): 243-267.
- [2] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, **56**(1): 152-179.
- [3] Basler CF, Aguilar PV. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res*, 2008, **79**(3): 166-178.
- [4] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, **459**(7250): 1122-1125.
- [5] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*, 1982, **31**(2 Pt 1): 417-427.
- [6] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis*, 1997, **176**(Suppl 1): S24-S28.
- [7] Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, et al. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(4): 1651-1656.
- [8] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 2000, **74**(18): 8502-8512.
- [9] Tumpey TM, Maines TR, Van HN, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 2007, **315**(5812): 655-659.
- [10] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*, 2009, **325**(5939): 484-487.
- [11] Munster VJ, de WE, van den Brand JM, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*, 2009, **325**(5939): 481-483.
- [12] Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med*, 2007, **13**(2): 147-149.
- [13] van RD, Munster VJ, de WE, et al. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science*, 2006, **312**(5772): 399.
- [14] van RD, Munster VJ, de WE, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol*, 2007, **171**(4): 1215-1223.
- [15] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, **440**(7083): 435-436.
- [16] Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine. *Virology*, 1997, **232**(2): 345-350.
- [17] Taubenberger JK. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc*, 2006, **150**(1): 86-112.
- [18] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*, 2006, **12**(1): 15-22.