

云南地区蜱中副流感病毒 5 型毒株的分离鉴定及感染特性分析

张越^{1,2#}, 李楠^{3#}, 吴长城², 邹小辉², 王冬梅⁴, 王亚伟², 李兆卿^{1,2},
刘士元², 刘冠雅², 黄保英², 王静林^{3,5*}, 谭文杰^{1,2*}

- 1 内蒙古科技大学包头医学院 公共卫生学院, 内蒙古 包头
- 2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 国家卫生健康委员会生物安全重点实验室, 北京
- 3 云南省畜牧兽医科学院兽医所, 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明
- 4 江城哈尼族彝族自治县动物疫病预防控制中心, 云南 江城
- 5 昆明医科大学 公共卫生学院, 云南省跨境传染病防控与新药创制重点实验室, 云南 昆明

张越, 李楠, 吴长城, 邹小辉, 王冬梅, 王亚伟, 李兆卿, 刘士元, 刘冠雅, 黄保英, 王静林, 谭文杰. 云南地区蜱中副流感病毒 5 型毒株的分离鉴定及感染特性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4008-4029.

ZHANG Yue, LI Nan, WU Changcheng, ZOU Xiaohui, WANG Dongmei, WANG Yawei, LI Zhaoqing, LIU Shiyuan, LIU Guanya, HUANG Baoying, WANG Jinglin, TAN Wenjie. Isolation, identification, and infection characterization of a tick-borne parainfluenza virus type 5 in Yunnan[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4008-4029.

摘要:【目的】系统阐明近期分离自云南省的蜱源副流感病毒 5 型(parainfluenza virus type 5, PIV5) JC12 株的全基因组进化特征, 并深入探讨其在体内外模型中的感染及复制特性。【方法】通过显微镜病变观察、电镜负染及间接免疫荧光对 PIV5-JC12 株进行分离与初步鉴定; 通过比较 33 °C 与 37 °C 条件下的病毒增殖效率确定其最适培养温度; 采用极大似然法(maximum likelihood method, ML)构建全基因组系统发育树, 阐明该毒株的分子演化特征。随后, 通过感染不同来源的 6 种代表性细胞系(Vero, MDCK, HeLa, Huh7.5, MRC-5, BHK-21), 结合细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)、实时定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)及病毒半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀)测定, 评价 PIV5-JC12 株的跨物种感染能力及体外复制动力学特征。最后, 选用昆明(KM)和 C57BL/6J 2 种品系小鼠, 设置高、低 2 个剂量(2×10^7 TCID₅₀ 和 2×10^6 TCID₅₀)滴鼻感染, 通过体重、存活率及感染后 1、4、7、10 d 各脏器病毒载量和肺部病理变化分析 PIV5-JC12 的体内致病性。【结果】

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA1201003); 云南省重大科技专项(202502AE090007)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA1201003) and the Yunnan Provincial Major Science and Technology Project (202502AE090007).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: WANG Jinglin, wangjl107@163.com; TAN Wenjie, tanwj@ivdc.chinacdc.cn

Received: 2026-02-15; Accepted: 2026-04-08; Published online: 2026-04-17

PIV5-JC12 株感染 Vero 细胞后可导致细胞变圆脱落, 电镜下可观察到直径约 50–200 nm 的不规则球形颗粒, 免疫荧光可检测到特异性 P 蛋白表达。本研究蜱源分离株 PIV5-JC12 与前期报道的虎源 PIV5 (OQ236149.1) 同源性最高。PIV5-JC12 感染 Vero 细胞后, 37 °C 条件下的病毒增殖效率优于 33 °C, 且可感染人、鼠、猴、犬等来源的 6 种细胞系; 其中 Vero、MDCK 及 BHK-21 细胞的 CPE 较为明显, 且在 Vero、MDCK 及 HeLa 3 种细胞中的核酸增殖效率更高。体内感染特性结果表明, KM 与 C57BL/6J 小鼠对 PIV5-JC12 株的敏感性不同, 仅 C57BL/6J 高剂量组在感染后 10 d 体重下降 5% 左右; 2 种品系小鼠感染后 1、4、7、10 d 肺部病毒载量均可达 10^4 – 10^5 copies/g, 但均未检测到感染性病毒; 感染早期(4 d)与晚期(10 d)肺组织未观察到明显病理损伤。【结论】从云南蜱虫样本中分离获得 PIV5-JC12 株, 该病毒具有较广的易感细胞谱, 但对小鼠致病性低, 为进一步研究 PIV5 感染特性及疫苗载体应用提供依据。

关键词: 副流感病毒 5 型; 细胞病变效应; 复制动力学; 体内致病性

Isolation, identification, and infection characterization of a tick-borne parainfluenza virus type 5 in Yunnan

ZHANG Yue^{1,2#}, LI Nan^{3#}, WU Changcheng², ZOU Xiaohui², WANG Dongmei⁴, WANG Yawei², LI Zhaoqing^{1,2}, LIU Shiyuan², LIU Guanya², HUANG Baoying², WANG Jinglin^{3,5*}, TAN Wenjie^{1,2*}

1 School of Public Health, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia, China

2 National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, NHC Key Laboratory of Biosafety, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

3 Yunnan Tropical and Subtropical Animal Viral Diseases Key Laboratory, Institute of Veterinary Medicine, Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming, Yunnan, China

4 Jiangcheng Hani and Yi Autonomous County Animal Disease Prevention and Control Center, Jiangcheng, Yunnan, China

5 Yunnan Provincial Key Laboratory of Cross-Border Infectious Disease Control and New Drug Development, School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China

Abstract: [Objective] To investigate the genomic phylogeny as well as the *in vivo* and *in vitro* infection and replication characteristics of the tick-borne parainfluenza virus type 5 (strain PIV5-JC12) recently isolated from Yunnan Province. **[Methods]** The strain PIV5-JC12 was identified through cytopathic effect (CPE) observation, negative staining electron microscopy, and an indirect immunofluorescence assay (IFA) based on the P protein. We determined its optimal culture temperature by comparing viral proliferation efficiency at 33 °C and 37 °C in Vero cells. A phylogenetic tree based on the whole genome was constructed *via* the maximum likelihood method to elucidate the molecular evolutionary characteristics of this strain. After infection of six representative cell lines of different origins (Vero, MDCK, HeLa, Huh7.5, MRC-5, and BHK-21),

CPE observation, RT-qPCR, and tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) assays were employed to evaluate the virus replication kinetics. The *in vivo* pathogenicity of PIV5-JC12 was evaluated in Kunming (KM) and C57BL/6J mice. Mice were infected intranasally with high and low doses (2×10^7 TCID₅₀ and 2×10^6 TCID₅₀) and monitored for body weight and survival rate. The viral loads in various tissue and organ samples were measured at the time points of 1, 4, 7, and 10 days post-infection (dpi), and histopathological changes were examined. **[Results]** PIV5-JC12 induced CPEs, as manifested by the rounding and detachment of Vero cells. Irregular spherical particles with diameters of 50–200 nm were observed, and the specific P protein was identified by immunofluorescence. The tick-borne strain PIV5-JC12 showed the highest sequence identity with the tiger-borne strain PIV5 (OQ236149.1). Viral replication and proliferation in Vero cells were more efficient at 37 °C than at 33 °C. PIV5-JC12 infected all the six cell lines of human, murine, simian, and canine origins. However, the CPEs varied among the cell lines, being more pronounced in Vero, MDCK and BHK-21 cells. Higher RNA replication efficiency was observed in Vero, MDCK, and HeLa cells. *In vivo* infection studies revealed differential susceptibility of KM and C57BL/6J mice to PIV5-JC12. The body weight loss (5%) was only observed in the high-dose infected C57BL/6J mice at 10 dpi. Lung viral loads in both mouse lines reached 10^4 – 10^5 copies/g, while no infectious virus was detected in the lung tissue at any of the time points examined. Histopathological staining analysis of lung tissue at the early stage (4 dpi) and late stage (10 dpi) of infection showed no significant pathological damage. **[Conclusion]** PIV5-JC12 isolated from tick samples from Yunnan Province shows broad cellular tropism and low pathogenicity in mice. The findings provide a basis for research on the pathogenic characteristics of PIV5 and its potential application as a vaccine vector.

Keywords: parainfluenza virus type 5; cytopathic effect; replication kinetics; *in vivo* pathogenicity

副流感病毒 5 型(parainfluenza virus type 5, PIV5)于 1956 年首次从猴肾细胞中分离获得^[1], 属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)正腮红病毒属(Orthorubulavirus)^[2]。副粘病毒不仅能引发呼吸系统疾病, 还具有侵袭中枢神经系统导致脑炎的风险, 是一种重要的人畜共患病原体, 对公共卫生和畜牧安全均构成威胁^[3-4]。

PIV5 是一种有包膜的单股负链 RNA 病毒, 基因组全长 15 246 nt^[5]。其基因组包含 7 个基因, 共编码 8 种蛋白, 基因排列顺序依次为 3'-NP-V/P-M-F-SH-HN-L-5'^[6], 基因组两侧为位于末端的 3'端前导序列和 5'端尾随序列。从 3'端起, 基因组依次编码核衣壳蛋白(nucleocapsid, NP)、V 蛋白(V protein, V)、磷蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(matrix protein, M)、融合蛋白

(fusion protein, F)、小疏水蛋白(small hydrophobic protein, SH)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein, HN)和聚合酶大蛋白(large polymerase, L)^[7]。

副粘病毒宿主范围广泛, 目前已从人、犬、猪、猫及啮齿类等多种哺乳动物中分离获得^[8]。近年来, 该病毒的流行范围与宿主类型呈扩大趋势, 且具有跨物种传播潜力^[9]。2013 年, 韩国猪群中检测到 PIV5, 血清阳性率高达 93.8%^[10]; 2015 年, 吉林省从犊牛肺组织中分离到牛源 PIV5, 提示 PIV5 可能与犊牛呼吸道疾病相关^[11]; 2017–2018 年, 广州动物园从出现呼吸道症状的东北虎、华南虎及小熊猫中分离到多株 PIV5^[6]; 2024 年, 一种新型 PIV5 毒株(命名为 SR)从一只具有临床症状的西伯利亚虎中分

离出来^[12]；同年，PIV5-YN01 毒株从鹅组织样本中分离获得，这是该病毒首次突破哺乳动物界限感染鸟类的报道^[13]。

尽管 PIV5 感染范围广，但在人体内通常不引起明显的临床症状^[13]。该病毒作为犬舍咳疫苗已应用多年，安全性良好，是备受关注的疫苗载体平台^[14-16]，并已被用于开发针对多种呼吸道病毒及细菌的疫苗，在动物模型中展现出强效免疫应答能力^[17]。临床前研究显示，基于 PIV5 的流感病毒^[18]、呼吸道合胞病毒^[19]、狂犬病病毒^[20]及结核分枝杆菌^[21]载体疫苗均能诱导强效保护应答，且预存的 PIV5 抗体并未明显影响疫苗的免疫效果。

值得注意的是，蜱虫等节肢动物在副粘病毒的生态循环中扮演着中间宿主或传播媒介的重要角色^[22]。2022 年，我国学者首次从黑龙江全沟硬蜱中分离出 HLJ/Tick/2019 株，该病毒与 2.2.6 亚支系高度同源，是我国犬类、猪及野生动物群体中的优势流行毒株；经口、鼻、眼等途径接种后可导致雪貂中度呼吸窘迫伴发肺炎，并观察到炎症引发的神经组织损伤。然而，目前关于节肢动物携带 PIV5 及其对不同物种致病机制的研究仍十分有限。

本研究从云南省采集的蜱虫样本中分离获得一株 PIV5-JC12 株，通过全基因组序列分析、体外培养温度适宜性探索、感染细胞谱鉴定以及小鼠体内致病力研究，旨在明确 PIV5-JC12 株的感染特性，为理解 PIV5 的跨物种传播机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒分离

六种细胞(Vero、MDCK、HeLa、Huh7.5、MRC-5 和 BHK-21)均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心保存。使用含 10% 胎牛血清(Omega 公司)的 DMEM 培养基(Gibco 公司)，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2023 年 5 月，从云南省普洱市江城县一个养牛场的黄牛身上采集寄生蜱虫 60 只，经形态学鉴定均为微小牛蜱。每 5 只蜱虫为一组进行研磨，4 °C、3 000 r/min 离心 5 min 后取上清接种 Vero 细胞，连续传 3 代，其中一组(编号为 JC12)在接种后 5 d 出现规律性细胞病变。随后，从细胞上清中提取核酸，送广东美格基因科技有限公司进行二代测序，利用 Illumina NovaSeq 平台^[23]进行宏基因组测序。原始数据质量控制合格后，使用 SPAdes v3.15.3 软件进行 *de novo* 组装以获取病毒基因组序列^[24]；通过 MAFFT v7.505 算法将目标序列与参考序列进行多重比对^[25]，利用 IQ-TREE v2.3.6 基于极大似然法(maximum likelihood method, ML)构建系统发育树^[26]；由 ModelFinder 自动筛选最优进化模型^[27]，并执行 1 000 次自展检验(bootstrap)评估分支可靠性；最后，使用 FigTree 软件对系统发育树进行可视化修饰与标注。结果显示，该毒株与华南虎样本分离的 PIV5 毒株序列(NCBI 登录号为 OQ236149.1)一致性最高，达 99.74%，鉴定为副流感病毒 5 型。病毒保存于云南省畜牧兽医科学院云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室和中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心，该毒株已通过国家病毒资源保藏中心(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所)备案(编号为 CHPC2.4.6.YNJC/23/001.00)。

1.2 PIV5-JC12 株感染细胞

将 Vero、MDCK、Huh7.5、BHK-21 及 HeLa 以 1×10^5 个/孔、MRC-5 以 2×10^5 个/孔铺于 24 孔板，500 μ L/孔，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。待细胞汇合度达 80%–90% 时弃去培养基，以 0.01 感染复数(multiplicity of infection, MOI)的病毒剂量接种单层细胞，37 °C 吸附 2 h 后弃去病毒液，换为 500 μ L 含 2% FBS 的培养基，于 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养。将病毒吸附 2 h 后定为 0 h，分别于 0、24、48、72、96、120 h 在显微镜下拍照记录细胞病变效应

(cytopathic effect, CPE) (比例尺为 50 μm), 并收获细胞与上清样本, 冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 测定病毒生长曲线。

于倒置显微镜 (Olympus 公司) 下观察 PIV5-JC12 株感染组与未感染组细胞, 若细胞出现皱缩、变圆、堆积、脱落则判定为 CPE。

1.3 PIV5-JC12 病毒电镜观察

当 PIV5-JC12 株感染 Vero 细胞出现明显 CPE 时, 将培养物置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融 1 次, 收取病毒上清及细胞碎片。随后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀取上清。将病毒液与 4% 多聚甲醛固定液按 1:1 比例加入无菌管中, 室温灭活 30 min。充分灭活与固定后, 将负染标本置于透射电镜下观察并采集图像。

1.4 间接免疫荧光 (indirect immunofluorescence, IFA) 鉴定

病毒感染 Vero 细胞 48 h 后, 弃上清, 用 PBS 轻洗细胞 1 次; 加入 100 μL 4% 多聚甲醛固定液 (北京索莱宝科技有限公司), 室温固定 30 min; 弃固定液, 加入 200 μL PBS, 置于摇床振荡洗涤细胞, 每次 5 min, 重复 3 次; 向每孔中加入 100 μL 含 0.1% Triton X-100 的 PBS, 室温透膜处理 10 min; 弃透膜液, 加入 200 μL PBS, 置于摇床振荡洗涤细胞, 每次 5 min, 重复 3 次; 每孔加入 200 μL 3% 山羊血清, 室温封闭 30 min。一抗孵育: 弃去封闭液, 加入 100 μL 一抗稀释液 (PIV5 P 蛋白单克隆抗鼠抗体, 1:1 000 稀释, 武汉艾必赛生物科技有限公司), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 洗涤后, 每孔加入 100 μL 稀释好的荧光二抗 (FITC 标记的抗鼠抗体, 1:1 000 稀释, Amresco 公司), 室温避光孵育 45 min; 洗涤后加入 50 μL 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI (ThermoFisher Scientific 公司) 进行细胞核染色 10 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加抗荧光衰减封片剂 (北京索莱宝科技有限公司) 以防止荧光猝灭, 最后使用共聚焦荧光显微镜 (Leica SP8) 采集图像。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸

采用全自动核酸提取仪 (西安天隆科技有限公司) 提取病毒 RNA。随后, 使用荧光定量 RT-qPCR 测定病毒核酸含量^[28], 检测靶标为 L 基因, 引物序列为 F (5'-GACCAGAAAATTATTGAAT-3') 和 R (5'-TACCAGGCACATGTGGGGTT-3'), 探针序列为 5'-FAM-TACTGAGTCGGGCAAGTAGC-MGB-3', 上述引物及探针均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

按照 M-MLV One-Step RT-qPCR (Probe) Kit (北京博迈德基因技术有限公司) 说明书配制反应体系。PCR 反应条件: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $54.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。于 $54.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸时收集荧光信号, 报告基因为 FAM。每个样本设 3 个复孔, 通过标准曲线 $Y=-3.514X+41$ 计算核酸拷贝数, 每组实验重复 3 次。

1.6 半数组织培养感染剂量测定

将 Vero 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 100 μL /孔, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养至汇合度达 80%–90%。将病毒样本冻融 1 次后, 使用无血清 DMEM 以 1:10 为起始稀释度进行 10 倍比梯度稀释, 共设 8 个稀释度。100 μL /孔接种至 96 孔板, 每个稀释度设 6 个复孔, 并设 100 μL 无血清 DMEM 作为阴性对照, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。每日观察细胞病变效应, 于感染后第 5 天记录出现 CPE 的孔数, 根据 Spearman-Kärber 法计算半数组织培养感染剂量 (tissue culture infections dose 50%, TCID_{50}), 每组实验重复 3 次, 计算如公式 (1) 所示。

$$\log_{10} \text{TCID}_{50} = L - d(s - 0.5) \quad (1)$$

式中: L 为最高稀释度的对数值, d 为稀释度对数值之差, s 为阳性孔比率总和。

1.7 动物实验

6 周龄雌性昆明 (KM) 与 C57BL/6J 小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于中国疾病预防控制中心实验动物中心。本研

究所有动物实验获得中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所实验动物伦理委员会审核批准, 编号为 bdb20260114004。

将上述 2 种品系小鼠分为对照组(PBS)、低剂量组(2×10^6 TCID₅₀)和高剂量组(2×10^7 TCID₅₀), 每组 12 只, 采用滴鼻方式感染, 体积为 50 μ L。滴鼻感染当天记为 0 d, 于 1、4、7、10 d 取肝、脾、肺、肾等组织进行病毒载量测定及肺部病理检测, 并每日监测体重。

1.8 组织病毒滴度测定

称取小鼠组织后加入 4 倍体积的无菌 PBS 进行研磨, 参数为: 4 $^{\circ}$ C, 45 s, 6.5 m/s, 循环 3 次。随后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 100 μ L 进行梯度稀释, 将组织匀浆原液进行 10 倍比梯度稀释至 10^{-8} 。按照 1.6 节方法进行病毒 TCID₅₀ 测定。接种组织稀释液后第 5 天, 在显微镜下观察并记录各稀释度出现 CPE 的孔数, 根据 Spearman-Kärber 公式计算组织 TCID₅₀ 滴度。

1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10 软件进行数据绘图和统计学分析。多组间比较采用方差分析 (analysis of variance, ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验, 相关性分析采用简单线性回归拟合。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 蜱来源分离株 PIV5-JC12 的初步鉴定

将蜱虫样本匀浆后离心, 取上清接种 Vero 细胞, 编号为 JC12 的样本感染 Vero 细胞后出现 CPE。经二代测序分析, 确认分离获得 PIV5 病毒, 命名为 PIV5-JC12。细胞病变、病毒粒子形态与蛋白表达鉴定结果显示, PIV5-JC12 感染 Vero 细胞后主要表现为细胞圆缩, 从贴壁细胞底部脱落且表现出更强的折光性(图 1A); 电镜

负染观察到不规则圆形或多边形的病毒颗粒, 直径为 50–200 nm (图 1B); PIV5-JC12 感染组可在细胞质中观察到绿色荧光信号, 而对照组未见绿色荧光信号, 证实了 PIV5 特异性 P 蛋白的表达(图 1C)。

2.2 蜱来源分离株 PIV5-JC12 的进化特征

全基因组测序结果表明, PIV5-JC12 基因组全长 15 246 nt, 包含 7 个基因, 共编码 8 种蛋白(图 2A)。为阐明其遗传进化特征, 本研究分别基于 PIV5-JC12 的全基因组序列(图 2B)、NP 基因(图 2C)及 F 基因(图 2D)构建了系统发育树。结果显示, 3 个系统发育树呈现高度一致的拓扑结构。此外, 为更准确地反映研究对象间的进化关系并提供定根参考, 本研究引入了外群序列(MK593539.1 和 NC003443.1), 并在绘图中对外群分支进行了缩放(实际进化距离为 0.7)。

全基因组进化分析涵盖了源自蜱、猪、犬、人、虎、牛及穿山甲等多种宿主的代表性毒株。PIV5-JC12 (图 2B 红色字体)与一株华南虎源 PIV5 (NCBI 登录号为 OQ236149.1)聚类于同一独立分支, 遗传距离最近。NP 与 F 基因的系统发育分析结果与全基因组高度吻合, 进一步确认了两者在分子水平上的紧密亲缘关系(图 2C、2D)。值得注意的是, 尽管同为蜱来源分离株, PIV5-JC12 与黑龙江株(HLJ/Tick/2019, 图 2 中红色三角形标识)的亲缘关系较远。

序列一致性比较表明, PIV5-JC12 与虎源分离株(PMV/GD/ZAK2044)的全基因组核苷酸一致性高达 99.74%, 而与 HLJ/Tick/2019 株的一致性为 98.85%。在氨基酸水平上, PIV5-JC12 与虎源分离株 PMV/GD/ZAK2044 的一致性同样最高, 其中 SH 蛋白氨基酸序列完全一致(100%), L 蛋白一致性达 99.33%。相比之下, PIV5-JC12 与 HLJ/Tick/2019 株的 SH 蛋白一致性仅为 87.18% (表 1)。上述结果与系统发育树的拓扑结构相互印证。

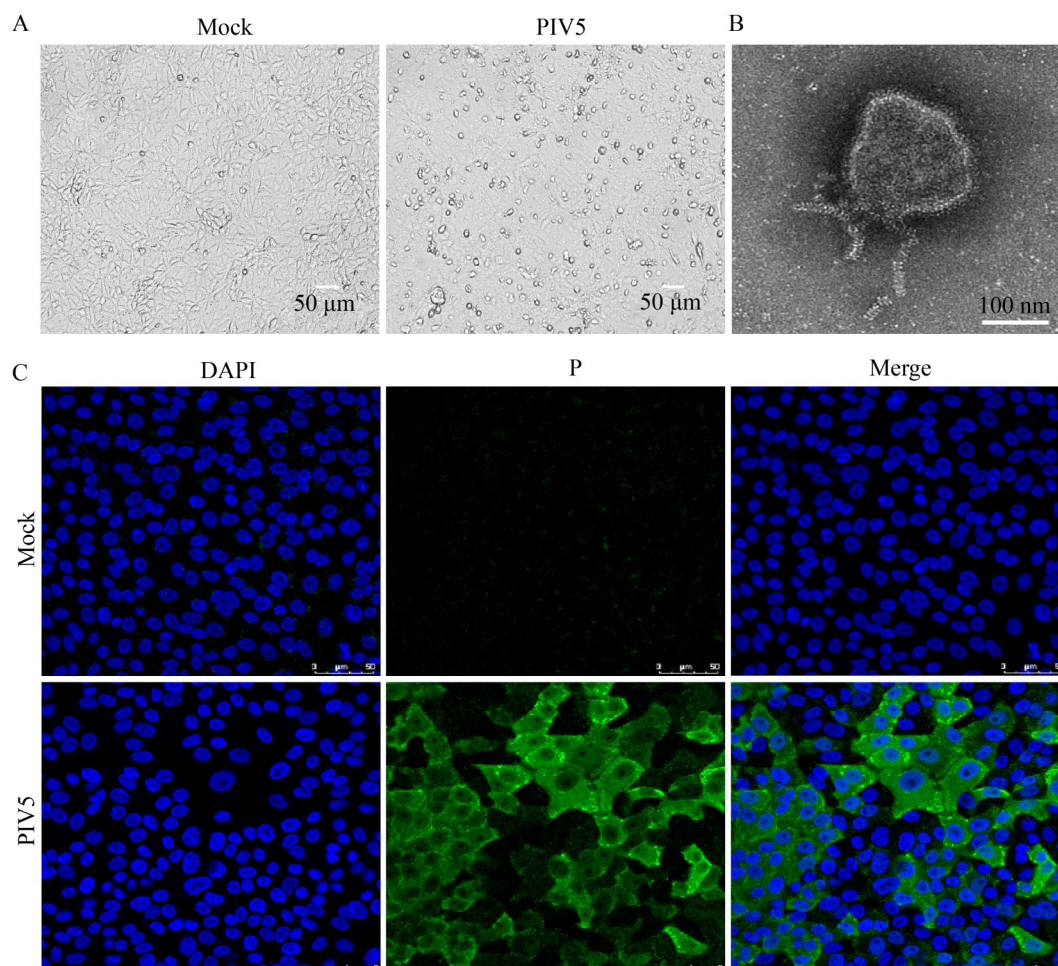


图1 PIV5-JC12分离株的初步鉴定

Figure 1 Identification of the PIV5-JC12 isolate. A: Cytopathic effect induced by the PIV5-JC12 strain; B: Electron micrograph of PIV5-JC12 virus particles; C: Indirect immunofluorescence assay of the PIV5-JC12 strain.

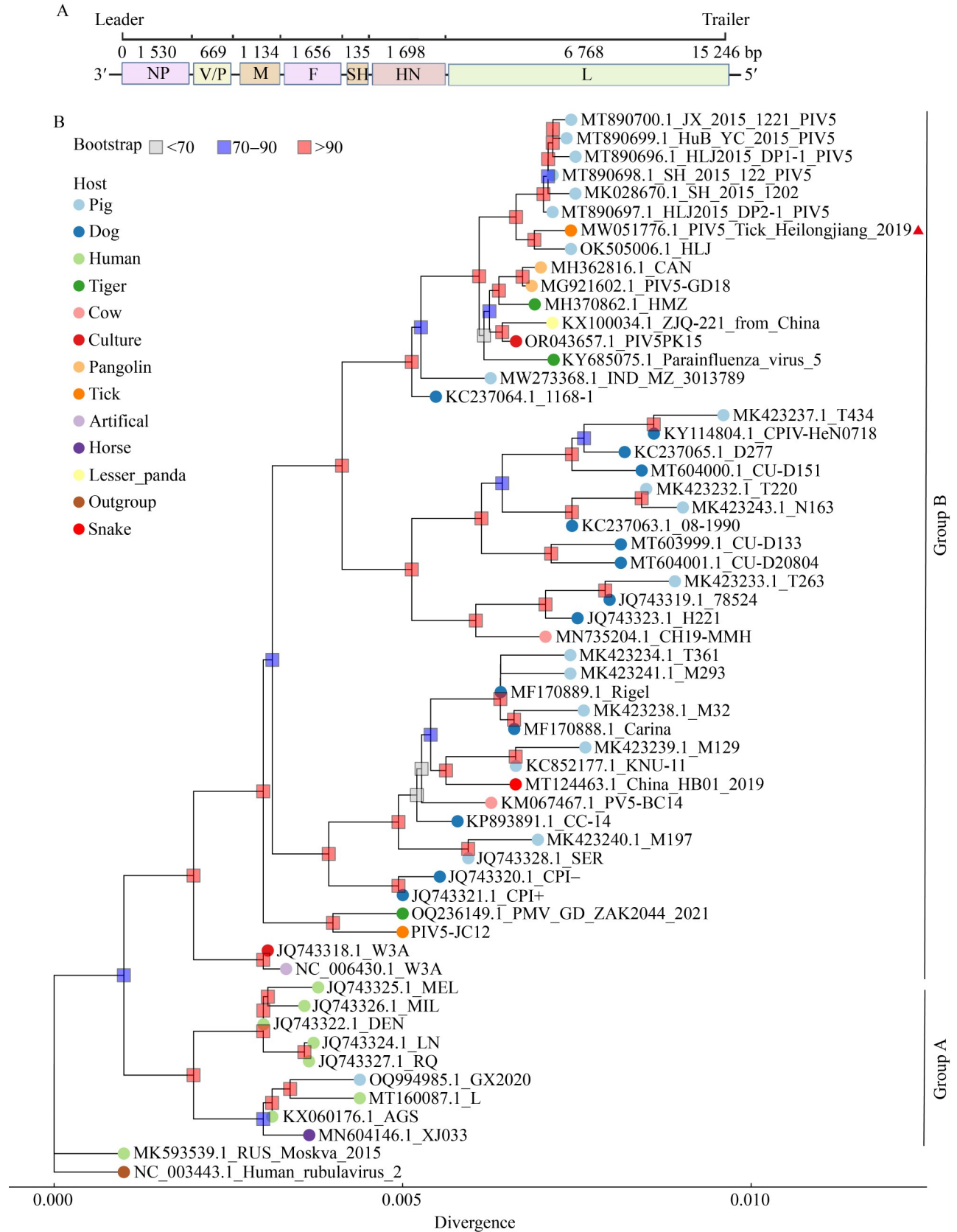
为明确 PIV5-JC12 株的关键变异特征，本研究比对了其与虎来源株(PMV/GD/ZAK2044)及黑龙江蜚来源分离株(HLJ/Tick/2019)主要蛋白的氨基酸序列(图 3)。结果表明，PIV5-JC12 与虎源株高度保守，SH 蛋白序列完全一致，V/P 与 F 蛋白仅存在极少量的末端或单点突变(如 F 蛋白仅第 528 位不同)；两者的主要差异仅局限于 NP 蛋白的个别位点及 L 蛋白 C 末端(JC12 缺乏虎源株特有的 2 229–2 239 位 V-S-D 连续突变)。

相比之下，PIV5-JC12 与同为蜚来源的黑龙江株差异显著：两者在 V/P、F 和 HN 等关键蛋

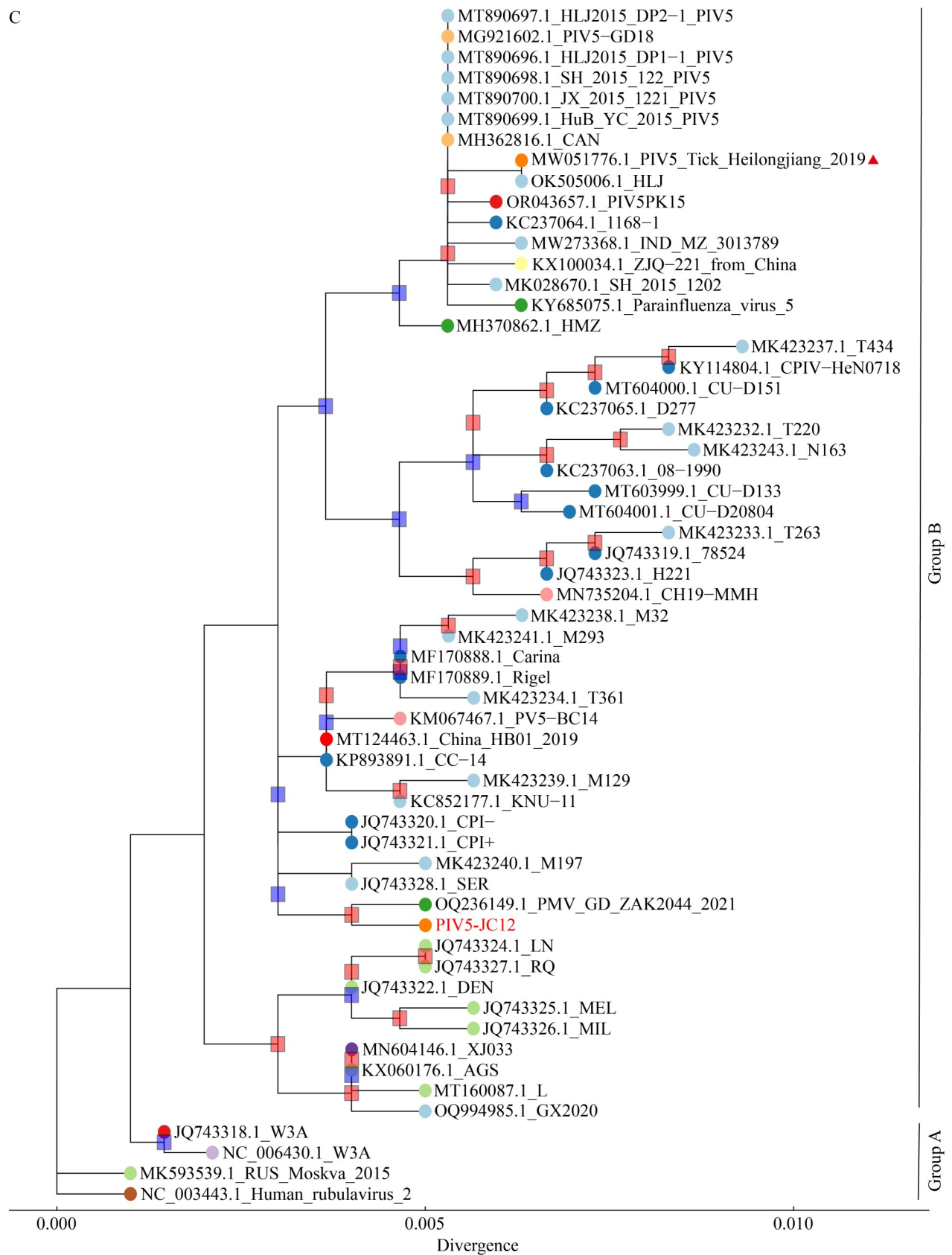
白上存在密集的氨基酸替换(如 V/P 蛋白存在超过 10 处突变，F 蛋白至少 8 处突变)。综上所述，尽管 PIV5-JC12 分离自蜚虫，但其核心蛋白序列特征与虎源株更为接近，而与同宿主来源的黑龙江蜚源分离株存在明显的遗传差异(图 3)。

2.3 33 °C和 37 °C条件下 PIV5-JC12 在 Vero 细胞中感染复制特征比较

为探究温度对 PIV5-JC12 株复制的影响，本研究以 0.01 MOI 剂量的 PIV5-JC12 感染 Vero 细胞，分别于 33 °C和 37 °C条件下培养。CPE



C



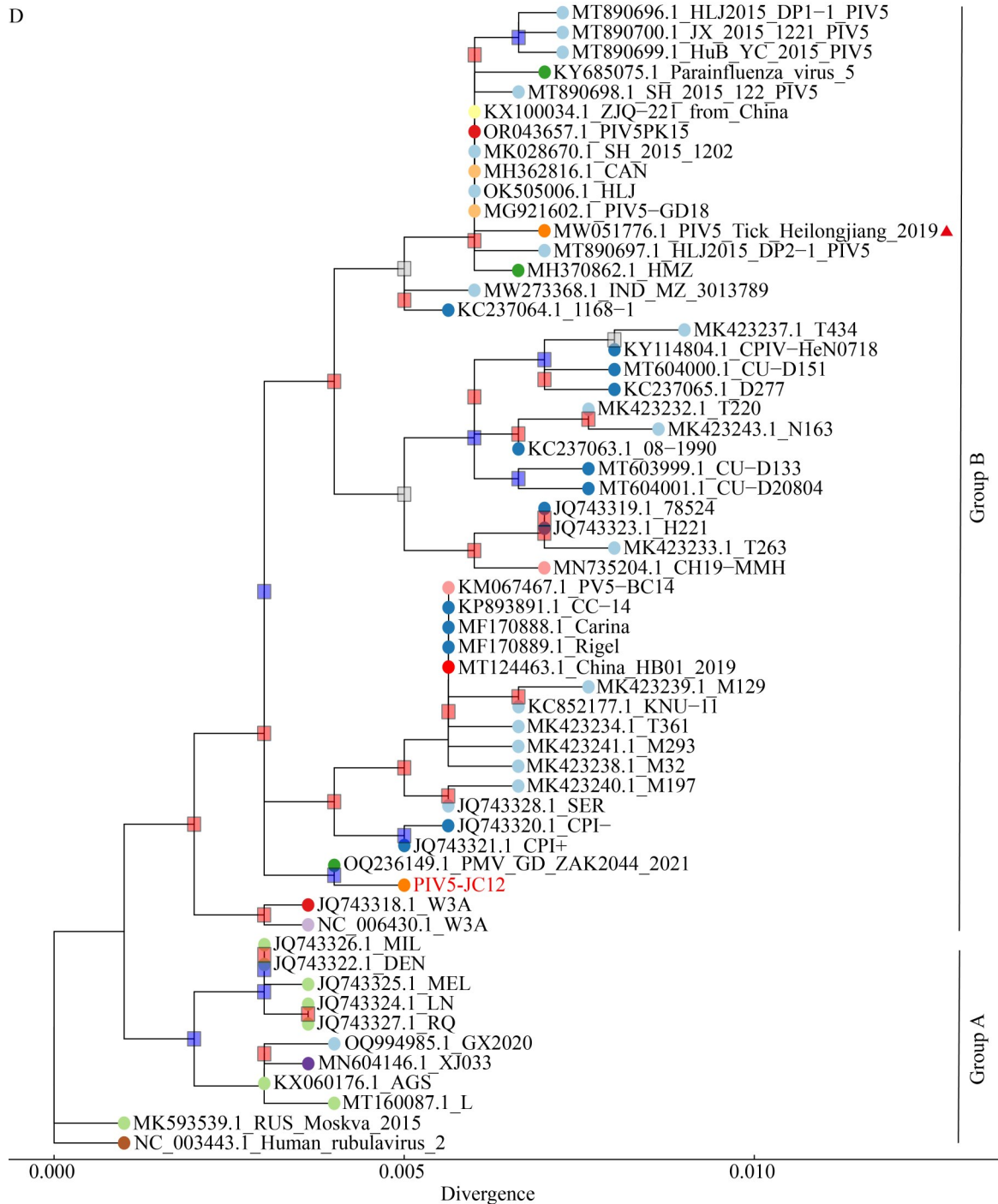


图2 PIV5-JC12蜱来源分离株基因组结构及进化特征

Figure 2 Genomic structure and evolutionary characteristics of the tick-borne PIV5-JC12 isolate. A: Genomic structure and encoded proteins of the PIV5-JC12 strain; B: Phylogenetic tree based on the complete genome of the PIV5-JC12 strain; C: Phylogenetic tree based on the *NP* gene of the PIV5-JC12 strain; D: Phylogenetic tree based on the *F* gene of the PIV5-JC12 strain. Each sequence in the phylogenetic tree is annotated sequentially with accession number and strain name; Accession numbers are from the NCBI database.

表1 PIV5-JC12、虎来源PMV/GD/ZAK2044及蜱来源HLJ/Tick/2019序列比较

Table 1 Sequence comparison of PIV5-JC12, tiger-origin PMV/GD/ZAK2044, and tick-origin HLJ/Tick/2019

Region	PIV5-JC12 length/nt	PMV/GD/ZAK2044		HLJ/Tick/2019	
		Length/nt	aa/%	Length/nt	aa/%
Whole genome	15 246	15 204	99.74	15 246	98.85
NP	1 530	1 530	99.40	1 530	99.01
V	669	669	99.09	669	97.70
P	1 179	1 179	99.49	1 179	97.64
M	1 134	1 134	99.47	1 134	98.38
F	1 656	1 656	99.81	1 656	98.46
SH	135	135	100.00	135	87.18
HN	1 698	1 698	99.82	1 698	98.01
L	6 768	6 768	99.33	6 768	99.33

观察结果显示, 37 °C条件下 Vero 细胞于感染后 72 h 开始出现明显的变圆、皱缩及脱落等现象, 至 120 h 进一步加剧; 而 33 °C条件下, 直至感染后 120 h 仍未观察到明显的细胞病变(图 4A)。病毒复制动力学检测结果显示(图 4B、4C), 37 °C条件下 PIV5-JC12 增殖迅速, 病毒 RNA 拷贝数和病毒滴度均迅速上升, 并于 96–120 h 达到峰值, RNA 拷贝数可达 10^{11} copies/mL, 感染性病毒滴度可达 10^8 TCID₅₀/mL。相比之下, 33 °C条件下, 病毒复制增殖较为缓慢, 复制高峰的滴度均较低(约 10^{10} copies/mL 和 10^5 TCID₅₀/mL)。综上所述, 37 °C比 33 °C更适于 PIV5-JC12 在 Vero 细胞中的增殖。

2.4 PIV5-JC12 株在 6 种细胞中的易感性分析

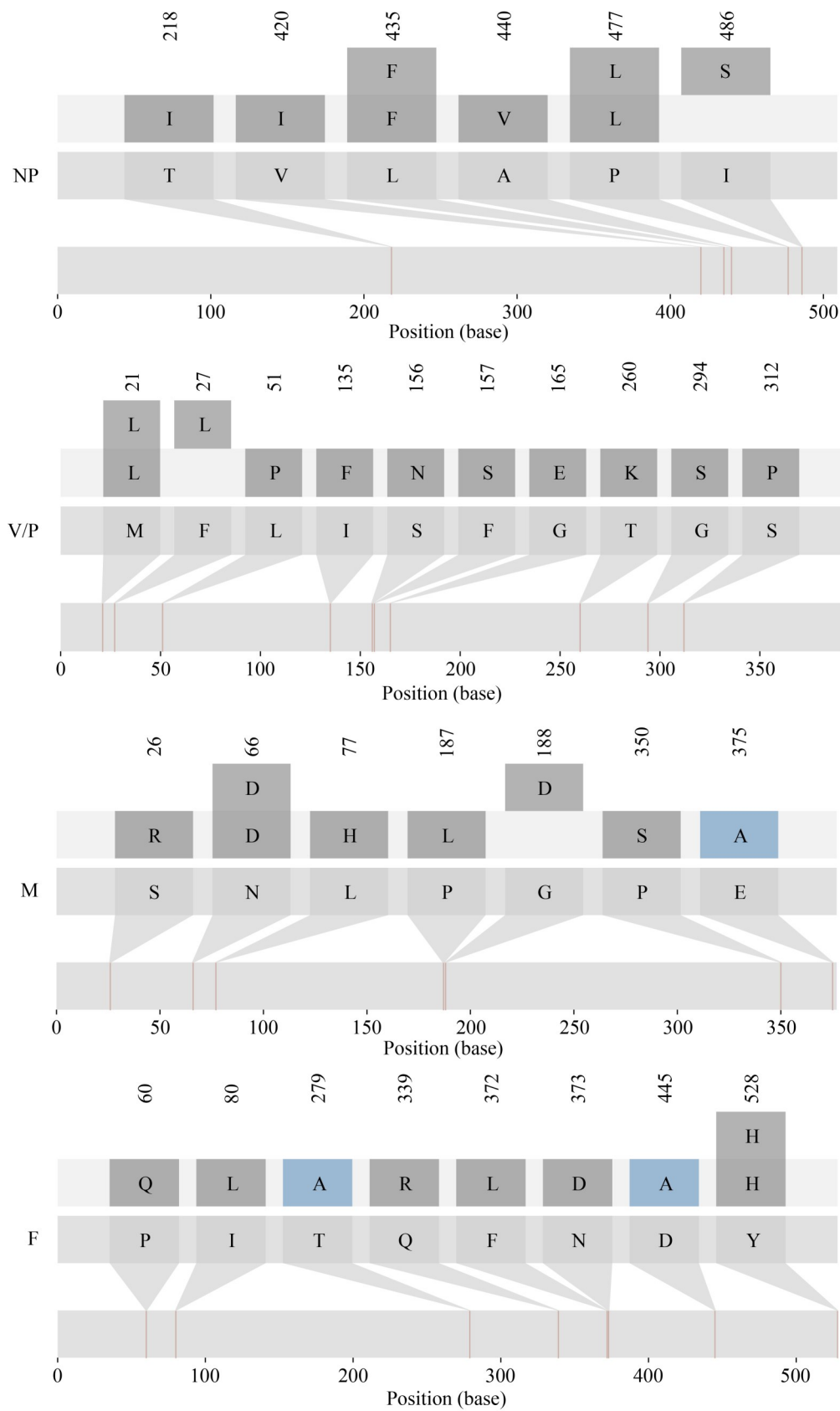
为探讨 PIV5-JC12 株在 6 种细胞系中的增殖特性, 以 0.01 MOI 分别感染 Vero、MDCK、HeLa、Huh7.5、BHK-21 和 MRC-5 细胞, 通过 CPE 观察其细胞病变特征, 并通过 RT-qPCR 和 TCID₅₀ 测定病毒复制动力学, 同时比较了其在 6 种细胞中的快速增殖时间、复制高峰时间与病毒载量。

CPE 结果显示(图 5A), PIV5-JC12 对不同细胞系的致病力存在差异。Vero、MDCK 和 BHK-21 细胞感染 PIV5-JC12 株 72 h 后即可观

察到细胞脱落变圆, 并于 120 h 加剧; 而 HeLa、Huh7.5 及 MRC-5 细胞的 CPE 不明显, 与 Mock 对照组难以区分, 其中 BHK-21 细胞仅出现轻微病变。

RT-qPCR 结果显示(图 5B、表 2), PIV5-JC12 株在 6 种细胞系中均表现出较强的早期增殖能力, Vero、MDCK、Huh7.5 及 HeLa 感染后 24–48 h 病毒核酸水平快速上升, 随后进入平台期。其中, Vero、Huh7.5 及 HeLa 细胞的病毒 RNA 水平在 48 h 内迅速增加, 并于 72 h 达到高峰(4.16×10^9 、 20×10^9 、 9.34×10^9 copies/mL)。随后, Vero 细胞中的病毒核酸载量趋于稳定, 而 HeLa 和 Huh7.5 感染组略有下降(图 5B)。MDCK 细胞于 96 h 达到复制高峰(9.43×10^8 copies/mL), 此后基本维持稳定。此外, BHK-21 及 MRC-5 细胞增殖最慢, 感染后 120 h 才达到复制高峰(2.46×10^9 copies/mL 及 8.3×10^7 copies/mL); 其中 BHK-21 在 48 h 后才进入快速复制期, MRC-5 全程复制相对缓慢, 但呈持续上升趋势。

TCID₅₀ 结果进一步证实了病毒在不同细胞系间的敏感性差异(图 5C、表 2)。PIV5-JC12 株感染 Vero、MDCK、HeLa 及 MRC-5 细胞可获得较高滴度的病毒, 其中 Vero 细胞在 120 h 可达 2.82×10^7 TCID₅₀/mL, MDCK 及 HeLa 均在 48 h 后显著升高并趋于稳定, MDCK 于 48 h 达



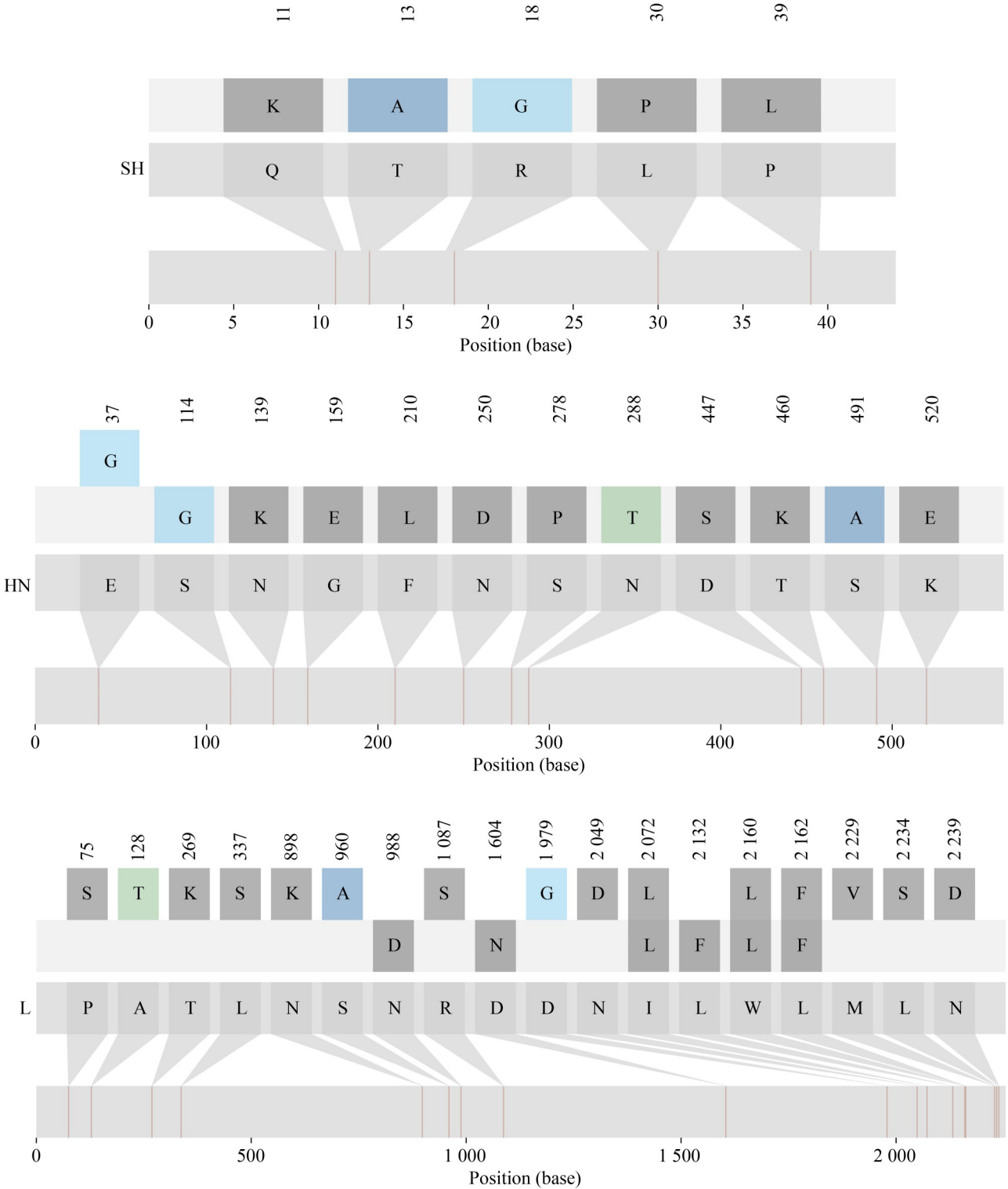


图3 PIV5-JC12与PMV/GD/ZAK2044及HLJ/Tick/2019关键变异位点
Figure 3 Key mutation sites of PIV5-JC12, PMV/GD/ZAK2044, and HLJ/Tick/2019. The amino acid mutation sites are arranged as PMV/GD/ZAK2044, HLJ/Tick/2019, and PIV5-JC12 from top to bottom.

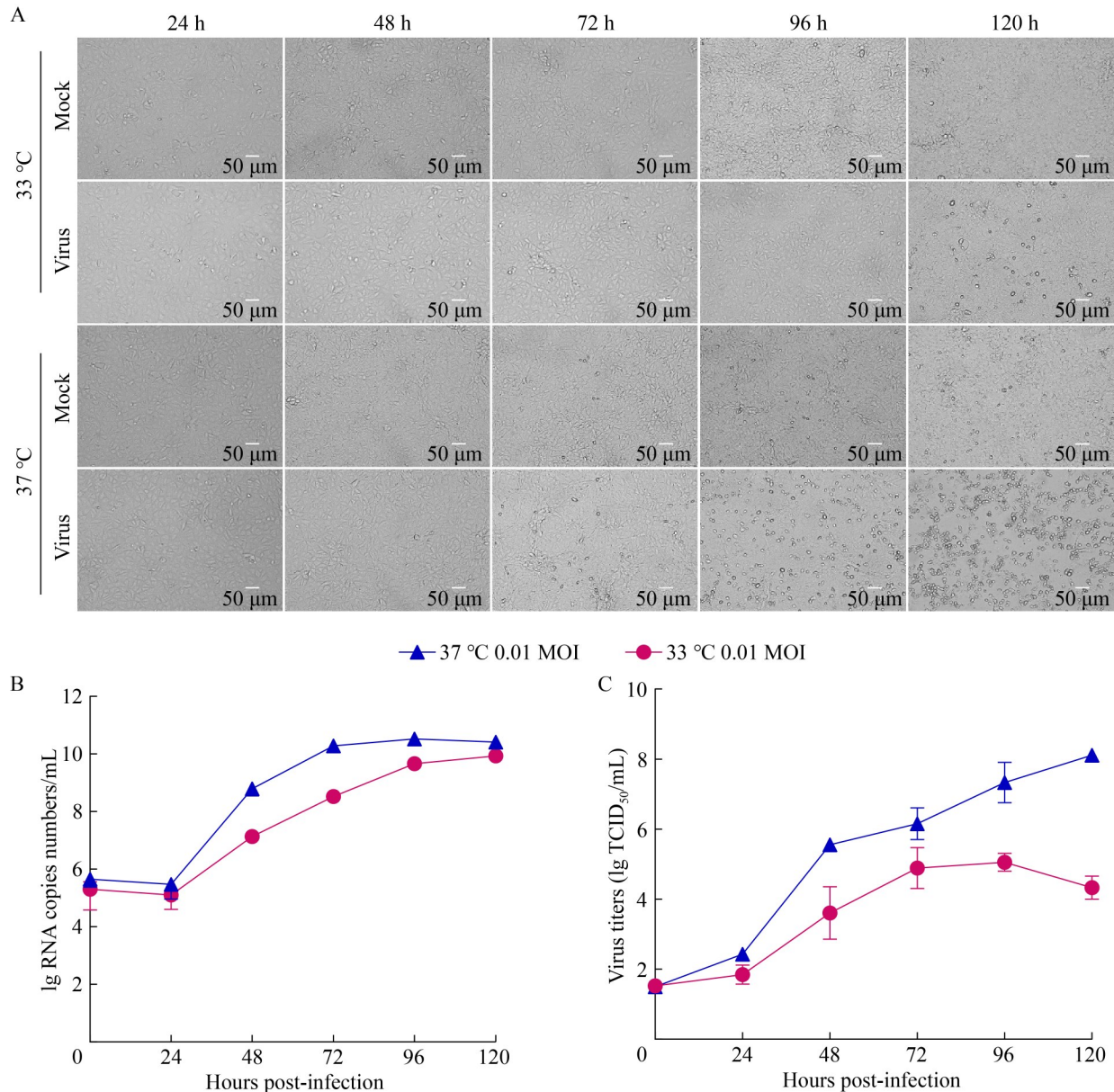


图4 33 °C和37 °C条件下0.01 MOI的PIV5-JC12感染Vero细胞的复制特征

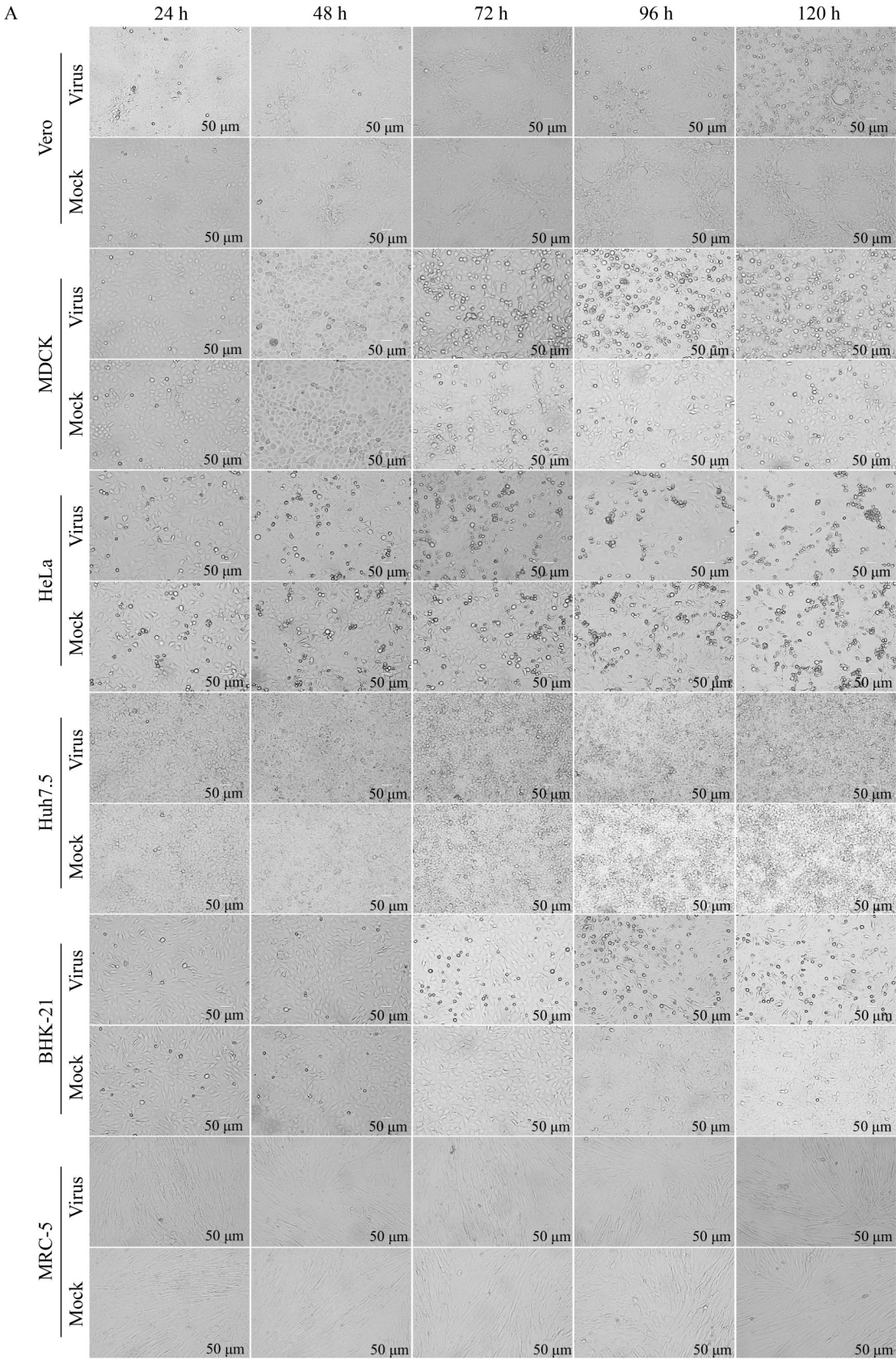
Figure 4 Characteristics of PIV5-JC12 infected Vero cells with MOI of 0.01 under 33 °C or 37 °C. A: Cytopathic effect; B: Changes in nucleic acid copy number; C: Viral titer changes.

到峰值(1.84×10^6 TCID₅₀/mL), HeLa 于 120 h 达到峰值(2.82×10^6 TCID₅₀/mL), MRC-5 于 24 h 进入快速增长期, 96 h 达到峰值(2.82×10^6 TCID₅₀/mL)。相较于上述 4 种细胞, Huh7.5 及 BHK-21 细胞的病毒滴度相对较低: Huh7.5 于 24 h 开始快速增长, 120 h 达到峰值 (6.3×10^5 TCID₅₀/mL);

BHK-21 易感性较差, 滴度增长缓慢, 高峰期滴度仅为 1.85×10^4 TCID₅₀/mL。

2.5 PIV5-JC12 株体内生物学鉴定

为探究 PIV5-JC12 株的体内致病性, 滴鼻感染 KM 及 C57BL/6J 2 种品系小鼠, 设置高剂量组 (2×10^7 TCID₅₀)、低剂量组 (2×10^6 TCID₅₀) 及



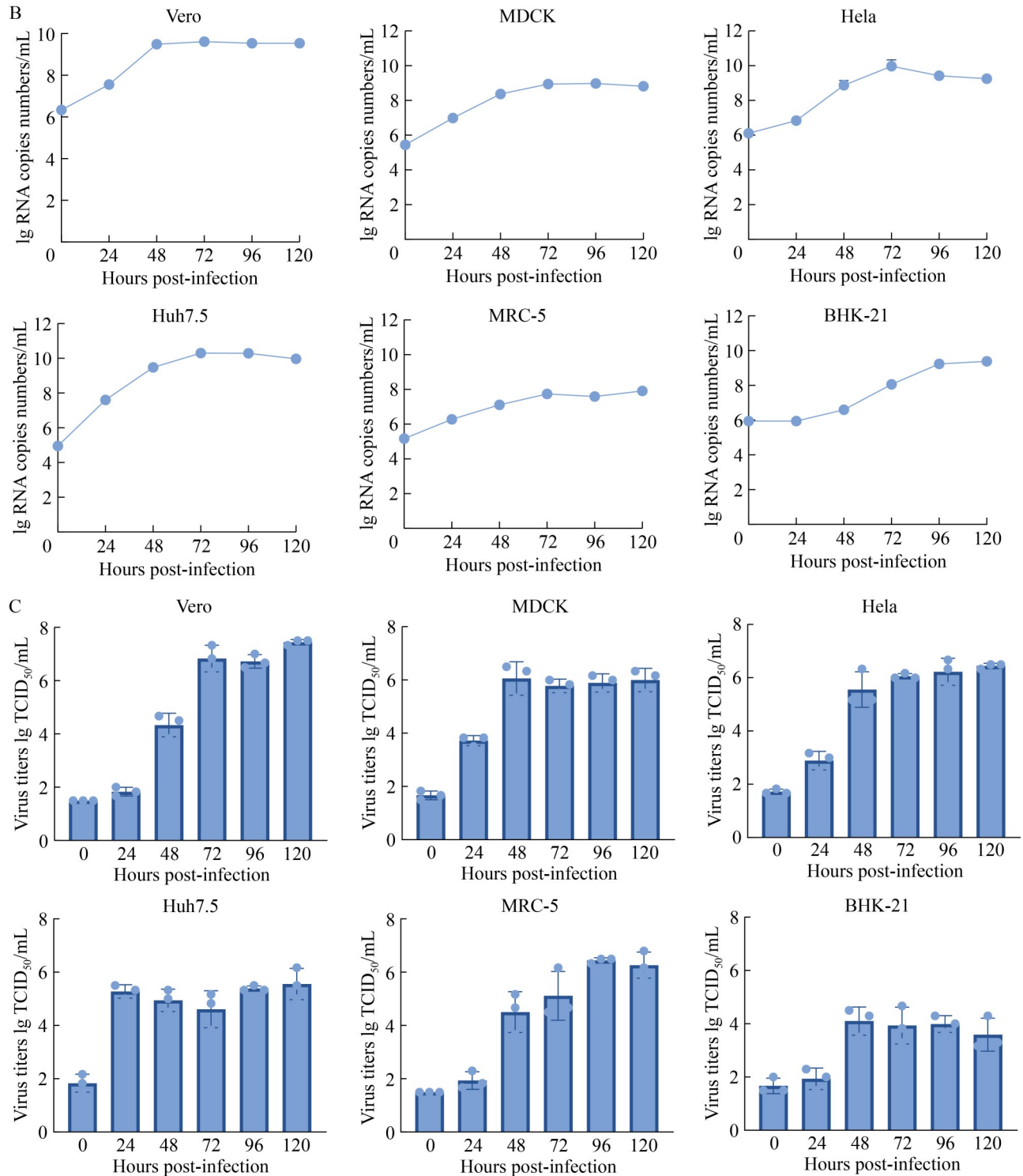


图5 0.01 MOI剂量PIV5-JC12感染6种细胞的细胞病变效应及复制动力学

Figure 5 Cytopathic effects and replication kinetics of PIV5-JC12 infected six cell lines with MOI of 0.01. A: Cytopathic effect; B: Virus replication kinetics according to nucleic acid; C: Virus replication kinetics according to TCID₅₀ titer.

表2 PIV5-JC12株在6株细胞系中的感染特征

Table 2 Characteristics of PIV5-JC12 strain infected six cell lines

Cell lines	Source	Morphology	RNA		TCID ₅₀		CPE
			Peak/ (copies/mL)	t/h	Peak/ (TCID ₅₀ /mL)	t/h	
Vero	African monkey kidney cell	Epithelial like	4.16×10 ⁹	72	2.82×10 ⁷	120	Rounding, shrinking, sloughing
MDCK	Canine kidney epithelial cells	Epithelial like	9.43×10 ⁸	96	1.84×10 ⁶	48	Rounding clumping, sloughing
HeLa	Human cervical cancer cells	Epithelial like	9.34×10 ⁹	72	2.82×10 ⁶	120	Not obvious
Huh7.5	Human hepatoma cells	Epithelial like	20.00×10 ⁹	72	6.30×10 ⁵	120	Not obvious
BHK-21	Baby hamster syrian kidney	Fibroblast like	2.46×10 ⁹	120	1.85×10 ⁴	72	Rounding
MRC-5	Human embryo lung cell	Fibroblast like	8.30×10 ⁷	120	2.82×10 ⁶	96	Not obvious

PBS 对照组；每日监测小鼠体重、记录存活率，并于感染后第 1、4、7、10 天取肝、脾、肺、肾等组织进行病毒载量测定及肺组织病理染色(图 6A)。

存活率观察结果表明，PIV5-JC12 株对 2 种品系小鼠均不具致死性，各组小鼠存活率均为 100%。体重监测结果显示(图 6B)，KM 小鼠各组体重随时间延长呈增长趋势；C57BL/6J 小鼠高剂量感染组自接种后第 8 天起体重持续下降，直至第 10 天(降幅约 5%)，并维持在该水平，而低剂量组与 PBS 组体重保持相对稳定。

肺部病毒载量结果显示(图 6C)，KM 小鼠各时间点病毒载量均维持在 10⁴ copies/g，未见下降趋势；C57BL/6J 小鼠肺部病毒载量随时间延长呈下降趋势(从 10⁵ copies/g 降至 10⁴ copies/g)。2 种品系小鼠高剂量组病毒载量均高于低剂量组，但肺组织 TCID₅₀ 测定结果均为阴性(图 6C)。此外，2 种品系小鼠的肝、脾、肾等器官中均未检出病毒核酸(结果未展示)。感染早期(4 d)与晚期(10 d)肺组织 H&E 染色结果显示(图 7)，感染组肺部未见明显病理损伤。

3 讨论与结论

PIV5 广泛分布于犬、猪、灵长类等多种哺乳动物中，且近年来野生动物及节肢动物媒介携带病毒报道日益增多^[12]。该病毒可感染人但不引起明显临床症状，同时因其基因组结构

简单且易于操作，常被用作疫苗载体。本研究通过对云南蜱虫中分离的 PIV5-JC12 株的进化特征及体内外感染特性进行系统分析，明确了其适宜培养温度及细胞嗜性，可为跨物种传播风险评估及疫苗载体开发提供数据支持。本研究在云南地区蜱虫样本中分离到 PIV5，通过全基因组系统进化分析和重要蛋白氨基酸比对，揭示了云南蜱来源分离株 PIV5-JC12 与我国目前唯一已报道的黑龙江蜱源分离株 HLJ/Tick/2019 的遗传距离较远，且在多个蛋白中存在氨基酸差异，该发现丰富了 PIV5 病毒的宿主谱系及序列多样性。

从不同地区、年代及宿主中分离获得的 PIV5 基因组存在差异，病毒关键蛋白的氨基酸突变可能影响病毒生命周期、发病机制、进化特征，并在物种间的传播中扮演重要角色^[29]。已有研究提示，F 融合肽(G3A)及 F 跨膜结构域(S443P)的突变可增强病毒融合活性及对抗体介导中和作用的敏感性^[30]；此外，研究者还发现对人副流感病毒 2 型(hPIV2)核衣壳蛋白(NP) RNA 结构域第 202 位谷氨酰胺进行点突变，可使聚合酶活性增强约 30 倍^[31]。本研究对 PIV5-JC12 的系统进化分析发现，从云南分离获得的蜱源分离株 PIV5-JC12 与虎源分离株 PIV5 (NCBI 登录号为 OQ236149.1)一致性较高，而与黑龙江蜱源分离株 HLJ/Tick/2019 进化距离较远。氨基酸一致性结果显示，PIV5-JC12 与

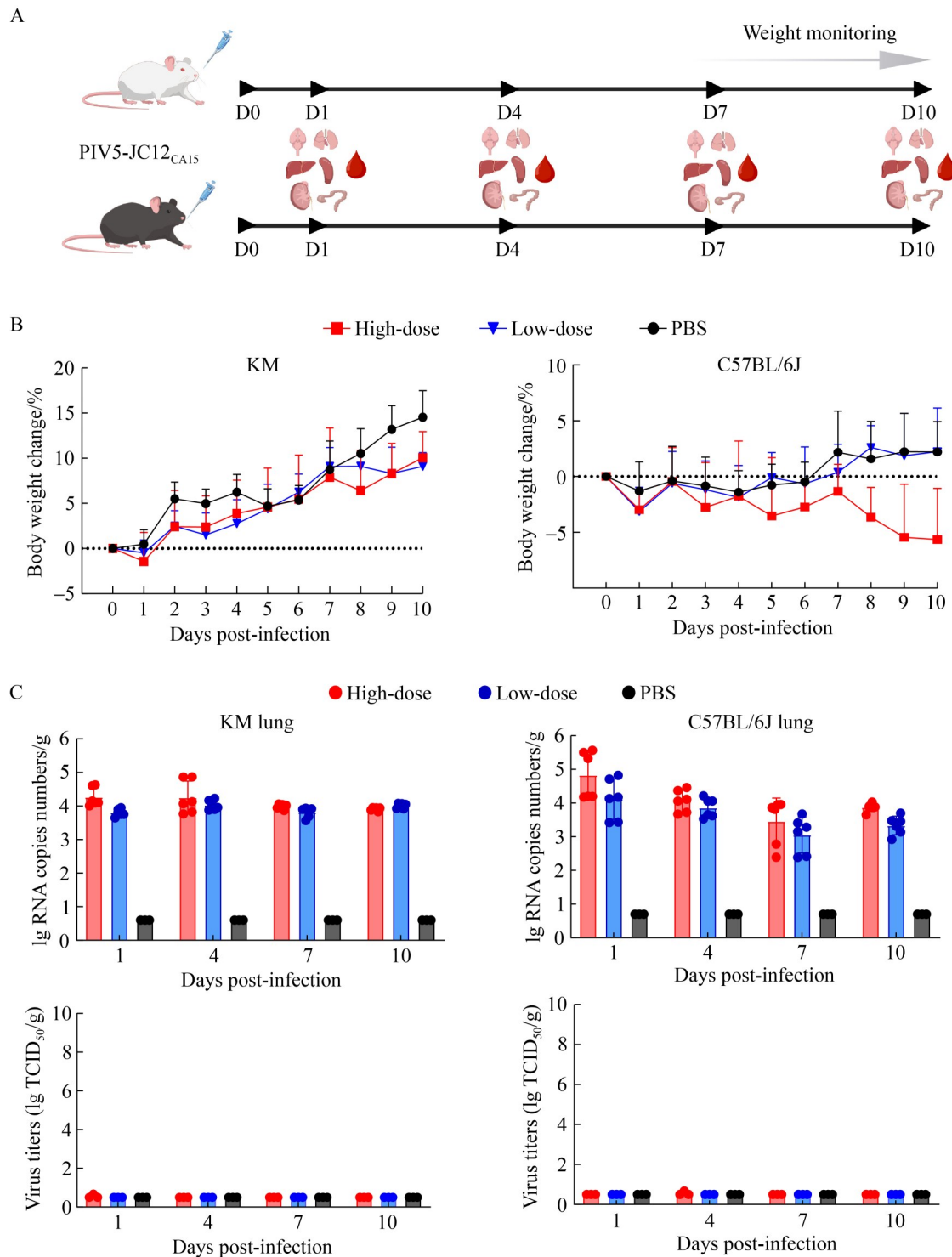


图6 PIV5-JC12株体内生物学鉴定

Figure 6 *In vivo* biological characterization of PIV5-JC12. A: Schematic diagram of the group and experimental procedure for the PIV5-JC12 *in vivo* infection model; B: Body weight changes in mice following infection with the PIV5-JC12 strain; C: Viral load and infectious virus titration in lung tissues.

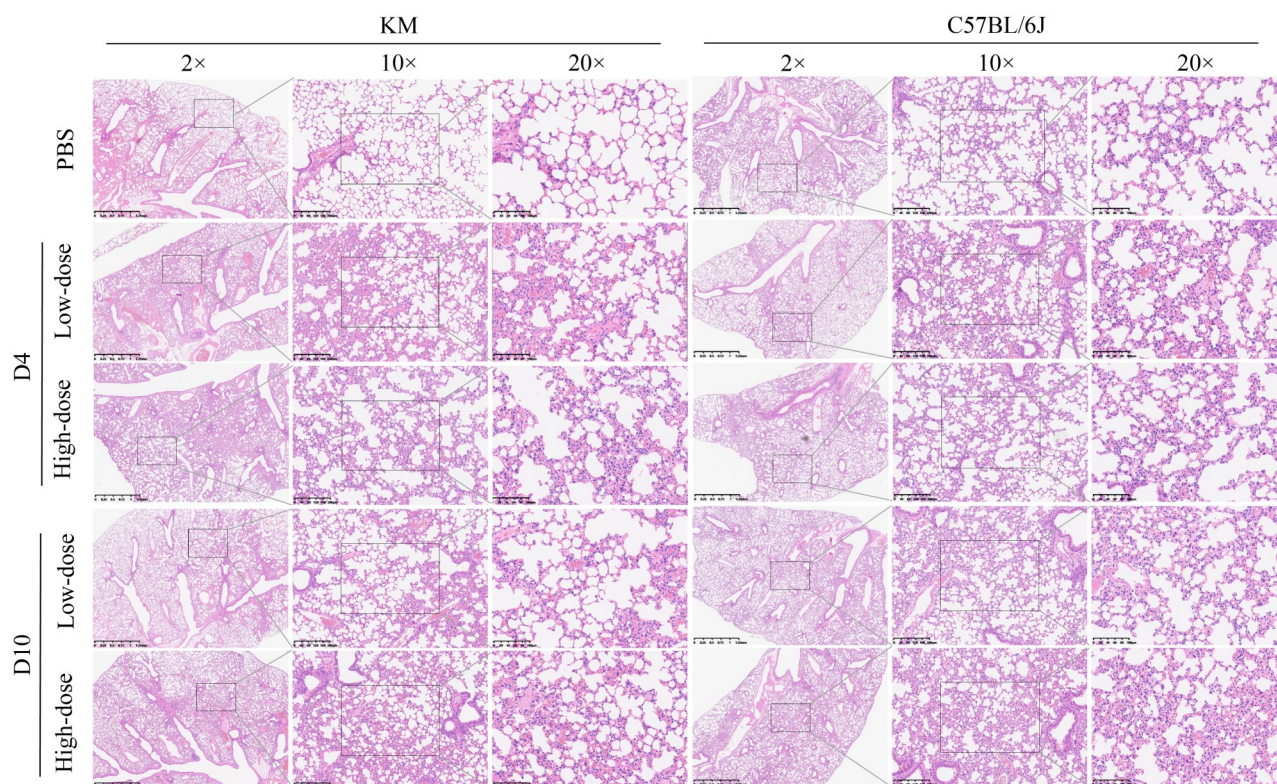


图7 PIV5-JC12株感染小鼠肺部H&E染色病理结果

Figure 7 Histopathological findings of H&E staining in the lungs of the PIV5-JC12 strain infected mice.

HLJ/Tick/2019 株在 SH 蛋白上的一致性最低，而与虎源分离株的一致性达 100%，提示该毒株可能具有感染哺乳动物的潜力，或与虎源分离株具有共同的进化祖先。后续可通过构建 PIV5-JC12 株的全长感染性克隆，利用反向遗传学技术对其 NP、V/P 或 L 等关键蛋白进行点突变置换，评估上述基因及突变位点对病毒复制能力、膜融合活性及免疫逃逸功能的影响。

不同培养温度与细胞系均可影响病毒的有效复制。已有研究表明，从人群中分离的 PIV5 可感染多种哺乳动物细胞^[32]；Chen 等^[18]在血清样本中检测到犬源 PIV5 中和抗体，提示其可能曾接触过 PIV5 阳性犬。然而，猪源 PIV5 细胞嗜性研究显示，从猪肺分离的 PIV5 仅能感染猪源细胞系^[10]，但也有研究表明猪源 PIV5 能够感染包括猪、人、灵长类、牛、犬、猫、兔、仓鼠和小鼠来源在内的多种哺乳动物细胞系^[3]。

本研究发现 37 °C 是 PIV5-JC12 在 Vero 细胞中高效复制的适宜温度，且通过其在人源(HeLa、MRC-5、Huh7.5)、猴源(Vero)、犬源(MDCK)及鼠源(BHK-21) 6 种细胞系中的感染与复制特性验证了该毒株具备较广的细胞感染谱，与已有研究结果一致。

本研究观察到不同细胞系在细胞病变效应的表现形式和病毒复制高峰期载量上存在差异，为后续根据具体需要选择不同细胞系开展研究提供了实验依据。值得注意的是，PIV5-JC12 在 BHK-21 (鼠源)和 Huh7.5 (肝癌)细胞中的增殖效率相对较低，且 CPE 不明显，这与某些猪源 PIV5 能够快速引起多类细胞合胞体形成的特性有所不同^[3]，需在多物种中进一步验证其感染致病特性。

此外，细胞对病毒的敏感性需通过细胞病变、病毒复制动力学、感染滴度等系列指标综

合评估。病毒滴度反映病毒产生子代病毒的增殖能力, 而 CPE 反映宿主细胞对病毒损伤的敏感性。本研究中, PIV5-JC12 感染 Vero、MDCK 细胞后可观察到细胞脱落变圆, 且病毒滴度可从 24 h 的 10^2 TCID₅₀/mL 和 10^4 TCID₅₀/mL 增长至 120 h 的 10^7 TCID₅₀/mL 和 10^6 TCID₅₀/mL, 表明 Vero、MDCK 对病毒感染较为敏感。考虑到 Vero 细胞是常用的疫苗生产细胞系, 可获得较高的病毒产量, 也为 PIV5-JC12 进一步用于疫苗载体研究提供了实验依据。同时, 本研究还发现, 虽然 PIV5 感染 Huh7.5 细胞 24 h 后可达 10^5 TCID₅₀/mL 左右, 但随时间延长未见明显增长。考虑到 Huh7.5 为 Huh7 细胞系的衍生株, 其 RIG-I 基因突变导致先天免疫信号通路严重受损, 理论上更有利于病毒复制, 本研究中观察到 PIV5-JC12 感染 Huh7.5 细胞后 24 h 即表现出较高滴度, 可能与其 I 型干扰素产生能力缺陷有关^[33]。

在动物致病性评估方面, 以往研究将虎源、猪源及穿山甲源 PIV5 接种 4–6 周龄 SPF 级 KM 小鼠后, 可在肺部检测到明显的病毒复制, 并引起一定程度的间质性肺炎, 甚至在脑组织中检测到病毒(神经嗜性)^[34–37]。本研究获得的 PIV5-JC12 在 KM 及 C57BL/6J 小鼠中均表现出低致病性特征, 提示其可能具备病毒载体平台的潜能, 值得深入研究。此外, 本研究选择感染后第 4 天和第 10 天作为病理学评估时间点, 主要基于以下考虑: 第 4 天对应病毒复制的早期至高峰期, 可评估病毒感染初期引起的急性炎症反应; 第 10 天对应病毒清除期或感染后期, 可评估炎症消退情况、组织修复或潜在的慢性病理改变。上述 2 个时间点覆盖了病毒感染的关键阶段, 可对病毒引起的肺部病理损伤特征及动态变化作出基本判断。因此, 本研究结合已报道文献^[38–39]对上述 2 个时间点的样本进行了病理与病原学分析。结果发现, 无论感染早期还是晚期均未观察到明显的肺部病理

损伤, 也未检测到肺部病毒的明显增殖, 与已有研究一致。然而, 未来仍需在敏感动物模型中采用更多时间点, 结合更精细的病理盲法评分及炎症细胞定量/免疫染色, 以进一步支持该病毒致病力的研究。

本研究仍存在一定的局限性, 未来应继续探索其他不同细胞系(如牛源及蜱源细胞系)对病毒复制的影响, 以更全面地评估病毒的自然宿主适应性及病毒与蜱媒的生物学关系; 目前尚无法证明病毒能够在蜱体内复制或通过蜱传播。本研究采用 MOI 为 0.01 的感染剂量开展了 PIV5-JC12 株感染复制特征的研究, 尚需更多不同感染剂量下的细胞病变与复制动力学研究与比较; 体内感染模型也应选择不同品系小鼠或其他已报道的实验动物(如猪、雪貂等), 探索更高剂量对小鼠致病性的影响。此外, 本研究样本采集局限于单一牛场和单一时间点, 后续仍需开展更大规模的野外样本采集和感染模型研究以明确 PIV5 在自然界中的传播模式。

综上所述, 本研究初步揭示了 PIV5-JC12 的基因进化特征、体外感染特性及其在小鼠模型中的致病性特征。该病毒表现出小鼠低致病性、广泛的细胞易感性以及在疫苗生产细胞系(Vero)中的高效增殖特性, 使其具有成为理想减毒活疫苗载体的潜力, 上述研究为理解该病毒的感染特性及开发其应用价值奠定了基础。

作者贡献声明

张越: 方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作、图片绘制; 李楠: 病毒分离; 吴长城: 图片绘制, 初稿写作, 数据整理; 邹小辉: 提供资源, 数据整理; 王冬梅: 样本采集; 王亚伟: 实验操作, 初稿写作; 李兆卿: 实验操作; 刘士元: 实验操作, 提供材料; 刘冠雅: 提供材料; 黄保英: 方案设计、数据管理、提供资源、审查和写作; 王静林: 提供资源, 审查和写作; 谭文杰: 方案设计、项目管理、提供资源、监督指导、基金资助、审查和编辑写作。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Hull RN, Minner JR, Smith JW. New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1956, 63(2): 204-215.
- [2] Choppin PW. Multiplication of a myxovirus (SV5) with minimal cytopathic effects and without interference[J]. *Virology*, 1964, 23(2): 224-233.
- [3] Ibrahim YM, Zhang WL, Werid GM, Zhang H, Pan Y, Zhang L, Xu YF, Li CW, Chen HY, Wang Y. Characterization of parainfluenza virus 5 from diarrhetic piglet highlights its zoonotic potential[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(5): e1510-25.
- [4] Zhang SW, Cheng Q, Luo CX, Qin YL, Chen MZ. Human parainfluenza virus type 3 matrix protein reduces viral RNA synthesis of HPIV3 by regulating inclusion body formation[J]. *Viruses*, 2018, 10(3): 125.
- [5] Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(2): 891-899.
- [6] Zhai JQ, Zhai SL, Lin T, Liu JK, Wang HX, Li B, Zhang H, Zou SZ, Zhou X, Wu MF, Chen W, Luo ML. First complete genome sequence of parainfluenza virus 5 isolated from lesser *Panda*[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(5): 1413-1418.
- [7] Rima BK, Gatherer D, Young DF, Norsted H, Randall RE, Davison AJ. Stability of the parainfluenza virus 5 genome revealed by deep sequencing of strains isolated from different hosts and following passage in cell culture[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(7): 3826-3836.
- [8] Chatziandreou N, Stock N, Young D, Andrejeva J, Hagmaier K, McGeoch DJ, Randall RE. Relationships and host range of human, canine, Simian and porcine isolates of Simian virus 5 (parainfluenza virus 5)[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(10): 3007-3016.
- [9] Field HE, Breed AC, Shield J, Hedlefs RM, Pittard K, Pott B, Summers PM. Epidemiological perspectives on Hendra virus infection in horses and flying foxes[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2007, 85(7): 268-270.
- [10] Lee YN, Park CK, Kim SH, Lee DS, Shin JH, Lee C. Characterization *in vitro* and *in vivo* of a novel porcine parainfluenza virus 5 isolate in Korea[J]. *Virus Research*, 2013, 178(2): 423-429.
- [11] Liu Y, Li N, Zhang SF, Zhang F, Lian H, Hu RL. Parainfluenza virus 5 as possible cause of severe respiratory disease in calves, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2242-2244.
- [12] Zhou N, Chen L, Wang C, Lv MN, Shan F, Li WP, Wu YJ, Du XQ, Fan JL, Liu MT, Shi MH, Cao JJ, Zhai JQ, Chen W. Isolation, genome analysis and comparison of a novel parainfluenza virus 5 from a Siberian tiger (*Panthera tigris*)[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 11: 1356378.
- [13] Huang MZ, Tao L, Zha BQ, Zeng QH, Hu Y, Guo XQ, Liu P, Gao XN, Wu HS. First isolation and phylogenetic analysis of parainfluenza virus 5 from geese[J]. *Poultry Science*, 2025, 104(7): 105177.
- [14] Beavis AC, Li Z, Briggs K, Gingerich MC, Wrobel ER, Najera M, An D, Orr-Burks N, Murray J, Patil P, Huang JC, Mousa J, Hao LH, Hsiang TY, Gale M Jr, Harvey SB, Tompkins SM, Hogan RJ, Lafontaine ER, Jin H, He B. Efficacy of parainfluenza virus 5 (PIV5)-vectored intranasal COVID-19 vaccine as a single dose primer and booster against SARS-CoV-2 variants[J]. *Journal of Virology*, 2025, 99(4): e0198924.
- [15] Spearman P, Jin H, Xiao P, Knopp K, Radziejewicz H, Tellier M, Larsen SE, Berube BJ, Song X, Kidd J, Singh K, Li Z, Gingerich MC, Wu S, John SP, Branche A, Falsey AR, Coler R, Villinger FJ, He B. Safety and immunogenicity of intranasal parainfluenza virus type 5 (PIV5)-vectored COVID-19 vaccine in adults and teens in an open-label phase 1 trial[J]. *Science Advances*, 2025, 11(27): eadw0896.
- [16] Spearman P, Jin H, Knopp K, Xiao P, Gingerich MC, Kidd J, Singh K, Tellier M, Radziejewicz H, Wu S, McGregor M, Freda B, Wang ZT, John SP, Villinger FJ, He B. Intranasal parainfluenza virus type 5 (PIV5)-vectored RSV vaccine is safe and immunogenic in healthy adults in a phase 1 clinical study[J]. *Science Advances*, 2023, 9(43): eadj7611.
- [17] 张越, 黄保英, 吴长城, 谭文杰. 副流感病毒5型反向遗传学技术及其应用进展[J]. *生物工程学报*, 2026, 42(2): 515-532.
Zhang Y, Huang BY, Wu CC, Tan WJ. Current progress in reverse genetics technology of parainfluenza virus type 5 and its applications[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2026, 42(2): 515-532 (in Chinese).
- [18] Chen ZH, Xu P, Salyards GW, Harvey SB, Rada B, Fu ZF, He B. Evaluating a parainfluenza virus 5-based vaccine in a host with pre-existing immunity against parainfluenza virus 5[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50144.
- [19] Huertas-Díaz MC, Phan S, Elson A, Nuñez I, Wei HL, Sakamoto K, He B. Parainfluenza virus 5 (PIV5) amplifying virus-like particles expressing respiratory syncytial virus (RSV) antigens protect mice against RSV infection[J]. *Vaccine*, 2019, 37(22): 2925-2934.
- [20] Chen ZH, Zhou M, Gao XD, Zhang GQ, Ren GP, Gnanadurai CW, Fu ZF, He B. A novel rabies vaccine based on a recombinant parainfluenza virus 5 expressing rabies virus glycoprotein[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(6): 2986-2993.
- [21] Chen ZH, Gupta T, Xu P, Phan S, Pickar A, Yau W, Karls RK, Quinn FD, Sakamoto K, He B. Efficacy of parainfluenza virus 5 (PIV5)-based tuberculosis vaccines in mice[J]. *Vaccine*, 2015, 33(51): 7217-7224.
- [22] Yang MF, Ma YY, Jiang Q, Song MX, Kang HT, Liu JS, Qu LD. Isolation, identification and pathogenic characteristics of tick-derived parainfluenza virus 5 in Northeast China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(6): 3300-3316.
- [23] Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The illumina

- sequencing protocol and the NovaSeq 6000 system[M]// Mengoni A, Bacci G, Fondi M. Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols. New York: Springer US, 2021: 15-42.
- [24] Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes *de novo* assembler[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 70: e102.
- [25] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772-780.
- [26] Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. Molecular Biology and Evolution, 2020, 37(5): 1530-1534.
- [27] Tinh NH, Vinh LS. An efficient deep learning method for amino acid substitution model selection[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2025, 38(1): 129-139.
- [28] 吴华伟, 秦义娴, 陈晓春, 高金源, 邓永, 刘丹, 苏佳, 薛青红, 陈延飞. 副流感病毒5型荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(9): 1-7.
- Wu HW, Qin YX, Chen XC, Gao JY, Deng Y, Liu D, Su J, Xue QH, Chen YF. Development of fluorescence quantitative RT-PCR for the detection of parainfluenza virus 5 (PIV5)[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(9): 1-7 (in Chinese).
- [29] Parkhe P, Verma S. Evolution, interspecies transmission, and zoonotic significance of animal coronaviruses[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 719834.
- [30] Johnson JB, Schmitt AP, Parks GD. Point mutations in the paramyxovirus F protein that enhance fusion activity shift the mechanism of complement-mediated virus neutralization[J]. Journal of Virology, 2013, 87(16): 9250-9259.
- [31] Matsumoto Y, Ohta K, Kolakofsky D, Nishio M. A point mutation in the RNA-binding domain of human parainfluenza virus type 2 nucleoprotein elicits abnormally enhanced polymerase activity[J]. Journal of Virology, 2017, 91(9): e02203-16.
- [32] Arimilli S, Alexander-Miller MA, Parks GD. A Simian virus 5 (SV5) P/V mutant is less cytopathic than wild-type SV5 in human dendritic cells and is a more effective activator of dendritic cell maturation and function[J]. Journal of Virology, 2006, 80(7): 3416-3427.
- [33] Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I[J]. Journal of Virology, 2005, 79(5): 2689-2699.
- [34] Burke CW, Mason JN, Surman SL, Jones BG, Dalloneau E, Hurwitz JL, Russell CJ. Illumination of parainfluenza virus infection and transmission in living animals reveals a tissue-specific dichotomy[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(7): e1002134.
- [35] Liu CH, Li XD, Zhang JP, Yang LX, Li F, Deng JH, Tan FF, Sun M, Liu YX, Tian KG. Isolation and genomic characterization of a canine parainfluenza virus type 5 strain in China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(8): 2337-2344.
- [36] 翟俊琼. 副流感病毒5型的全基因序列分析及对小鼠的致病性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- Zhai JQ. Whole gene sequence analysis of parainfluenza virus 5 from different sources and its pathogenicity to mice[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [37] 陈安妮. 虎源、穿山甲源副流感病毒5型的分离测序及对小鼠致病性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- Chen AN. Isolation and sequencing of the parainfluenza virus 5 from tiger and pangolin and its pathogenicity in mice[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [38] Li K, Li Z, Wohlford-Lenane C, Meyerholz DK, Channappanavar R, An D, Perlman S, McCray PB Jr, He B. Single-dose, intranasal immunization with recombinant parainfluenza virus 5 expressing middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) spike protein protects mice from fatal MERS-CoV infection[J]. mBio, 2020, 11(2): e00554-20.
- [39] Clark KM, Johnson JB, Kock ND, Mizel SB, Parks GD. Parainfluenza virus 5-based vaccine vectors expressing vaccinia virus (VACV) antigens provide long-term protection in mice from lethal intranasal VACV challenge[J]. Virology, 2011, 419(2): 97-106.