

李鑫鑫, 翟晓凤, 粟硕. 一株 H3N8 亚型犬流感病毒的分离鉴定及其对小鼠致病性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 69-76.

LI X X, ZHAI X F, SU S. Isolation, identification, and pathogenicity in mice of an H3N8 subtype canine influenza virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 69-76.

一株 H3N8 亚型犬流感病毒的分离鉴定及其对小鼠致病性研究

李鑫鑫¹, 翟晓凤², 粟硕^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 南京农业大学前沿交叉研究院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了解我国广州地区犬流感病毒 (canine influenza virus, CIV) 的流行特征及其潜在的公共卫生风险, 本研究采集具有流感样症状的宠物犬鼻拭子, 利用犬肾细胞 (MDCK) 培养分离病毒, 并采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 对分离株进行鉴定; 试验动物为 4 周龄 BALB/c 小鼠, 分为对照组和感染组, 分别滴鼻接种相同剂量的 DMEM 液和甲型流感病毒 (IAV) 病毒液, 观察其临床症状并检测各脏器病毒载量, 同时通过温度敏感性试验测定病毒的体外复制特性。结果: 成功分离到一株 H3N8 亚型犬流感病毒 (命名为 IAV-2022-GZ), 小鼠感染后表现为行动迟缓、被毛粗乱、体重降低, 对照组 (经 DMEM 处理) 体重增长正常; 感染组的小鼠肺脏和气管中病毒载量较高, 提示该分离株在小鼠肺脏中可有效复制并对小鼠产生一定的致病潜力; 细胞敏感性试验显示, 该毒株对温度敏感, 符合热敏感性毒株特征。综上, 本研究对 H3N8 亚型犬流感病毒的部分生物学特性进行探究, 为流感病毒跨物种传播风险评估及综合防控提供了参考数据。

关键词: 流感病毒; 病毒分离鉴定; H3N8; BALB/c 小鼠

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)06-0069-08

Isolation, identification, and pathogenicity in mice of an H3N8 subtype canine influenza virus

LI Xinxin¹, ZHAI Xiaofeng², SU Shuo^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To investigate the epidemiological characteristics and potential public health risks of canine influenza virus (CIV) in Guangzhou area of China, this study systematically examined pet dogs with influenza-like symptoms in Guangzhou City, Guangdong Province. Nasal swabs were collected from the dogs for virus isolation using MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cell culture, followed by identification of isolated strains via reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The virus was intranasally inoculated into 4-week-old BALB/c mice, which were divided into the control group and the infection group. The same dose of DMEM and influenza A virus (IAV) venom was intranasally inoculated respectively. Temperature sensitivity experiments were also conducted to determine viral replication characteristics *in vitro*. The results demonstrated successful isolation of an H3N8 subtype canine influenza virus strain (designated as IAV-2022-GZ). The infected mice exhibited clinical manifestations including sluggish movement, ruffled fur, and weight loss, while the DMEM-treated control group maintained normal weight gain. The viral loads in the lungs and trachea of the infected mice were higher than those in the controls, indicating efficient viral replication in the murine lungs and suggesting a potential pathogenic capacity. The temperature sensitivity assays revealed thermosensitive characteristics of this strain. In conclusion, this study elucidated key biological features of the H3N8 subtype CIV, providing critical reference data for risk assessment of cross-species transmission and for comprehensive prevention strategies against influenza viruses.

Keywords: influenza virus; virus isolation and identification; H3N8; BALB/c mice

甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 属于正

黏病毒科 (Orthomyxoviridae), 是一种单股、负链、分节段的 RNA 病毒, 具有 8 个基因片段。根据表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA), IAV 分为 18 个 H 亚型和 11 个 N 亚型^[1]。流感病毒作为全球性流行病原体, 其跨物种传播特性已造成显著的社会经济负担^[2]。该病毒具有广泛的宿主适应性^[3],

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2025-04-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2604203)

第一作者: 李鑫鑫, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 粟硕, 教授, 主要从事于动物病毒性疫病的流行病

学及致病机制的研究, E-mail: shuosu@njau.edu.cn。

其中犬类同时表达 $\alpha 2, 3$ 和 $\alpha 2, 6$ 唾液酸受体^[4-5], 与猪类似^[6], 展现出独特的病毒易感性。流行病学监测数据显示, 犬可以感染马源 H3N8^[7]、禽源 H3N2^[8]、禽源 H5N1^[9]、猪源 H1N1^[10-11]、禽源 H5N2^[12]、禽源 H9N2^[13]、禽源 H3N1^[14]、禽源 H6N1^[15] 等多种亚型的流感病毒。在亚洲多地检出的多种亚型更凸显出其作为潜在病毒储存库的风险, 包括泰国的 H5N1^[9]、中国广东的 H3N2^[16]、中国台湾的 H6N1^[15]、中国广西的 H9N2^[13]。目前尚未发现犬流感病毒向人类直接传播的证据, 但人与宠物犬的密切接触, 可能增加跨物种传播的风险。值得注意的是, 人类可以感染动物源病毒 (如 H5N1 禽流感)^[17], 人类季节性流感病毒也可传播给猫^[18], 尽管存在种间传播障碍, 但一些亚型可能通过基因突变或者重配适应新的宿主, 获得感染哺乳动物的能力^[19]。

本研究采集广州市宠物犬鼻拭子样品, 利用犬肾细胞 (MDCK) 系成功分离鉴定一株 H3N8 亚型流感病毒, 随后利用 BALB/c 小鼠建立 H3N8 犬流感病毒的感染模型, 并对其部分生物学特性及体内致病性进行了分析, 为疫苗研发与防控策略的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 生物材料及实验动物

犬鼻拭子样品, 来自广州地区具有流感样症状的宠物犬, 由本实验室保存; 23 只 4 周龄的 BALB/c 小鼠购自南京君科生物工程有限公司。

1.2 主要试剂

TRIzol Reagent、HiScript III RT SuperMix for qPCR Kit、2×Taq Plus Master Mix、Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase、SYBR Green qPCR Master Mix、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (DC301) 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, pMD18-T Vector 和 TaKaRa DL2000 DNA Marker 均购自宝日生物技术 (北京) 有限公司, OMEGA 质粒提取试剂盒和 Plasmid Mini Kit I D6943 购自广州飞扬生物工程有限公司, DH5 α Competent Cell 感受态细胞购自北京全式金生物技术股份有限公司, 胎牛血清、DMEM 培养基均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 胰酶购自 Sigma 公司, 细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司, 0.22 μm 滤器购自 Millipore 公司, 细胞板和细胞培养皿购自 BIOFIL 公司, 异氟烷购自江苏恒丰强生物技术有限公司。

1.3 病毒分离培养

取鼻拭子样品, 加入 1 mL 无菌 PBS 充分涡旋振荡, 5 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 用 0.22 μm 滤器过滤。将滤液 100 μL 接种于生长状态良好的 MDCK, 加入含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶, MDCK 需用无菌 PBS 洗 2 次, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 , 培养箱中吸附 1 h, 同时设置空白对照。1 h 后弃掉接种液, 用无菌 PBS 清洗细胞 1 次后, 补加等量的含胰酶的 DMEM, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 每日观察细胞病变效应 (CPE)。若出现 CPE, 细胞反复冻融 1 次, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 50 μL 继续传代培养, 同时设置空白对照。如果培养 72 h 后未出现 CPE, 收集细胞上清液在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融 1 次后继续进行盲传, 连续传代 3 次, 无病变, 停止分离。

1.4 分离株的空斑纯化

将生长状态良好的 MDCK, 弃掉上清液, 加入 500 μL 病毒液, 充分混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 , 培养箱中吸附 2 h。取 1 mL 2×DMEM, 1 mL 甲基纤维素, 和 2 μL 的 1 mg/mL 胰酶, 配制成含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶的混合液。将感染 2 h 的细胞取出, 弃上清液, 用 DMEM 清洗 3 次, 弃上清液, 将 1 mL 混合液加入到细胞皿中, 振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48~72 h。弃掉上清液, 用 PBS 清洗 3 次, 再用结晶紫染色 30 min, 直接观察空斑。确定稀释度和培养时间后, 进行流感病毒的纯化, 接毒 48 h 使用无菌枪头挑取单个空斑并接种到新的 MDCK, 出现明显的病变时收样。随后继续进行 2 次连续的空斑纯化。将纯化 3 次得到的病毒液反复冻融 3 次并分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。将 MDCK 铺于 96 孔板中, 生长成单层细胞后, 弃去 96 孔板的细胞培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 用含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶的 DMEM 培养液 10 倍连续稀释 P3 代病毒, 96 孔板中接种不同稀释度的病毒液 (100 μL /孔), 每个稀释度 4 个重复, 同时设置阴性对照。置于细胞培养箱内, 2~3 d 后观察产生 CPE 的孔, 并按 Reed-Muench 法计算病毒组织半数感染量 (TCID_{50}) 值。

1.5 分离株的 RT-PCR 鉴定

将收集的病毒液 200 μL 使用 TRIzol 试剂提取核酸后, 进行逆转录反应, 在无 RNA 酶的 PCR 管中配制下列体系: Template RNA total RNA 1 μg 、Oligo (dT) 23VN (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or Random hexamers (50 ng/ μL) 1 μL 、4 × gDNA wiper Mix 4 μL 、无酶水加至 16 μL 。混匀后将总体积为 16 μL 的反应体系于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 2 min 后, 加入 10 × RT Mix 2 μL 和 HiScript II Enzyme Mix 2 μL , 充分混匀后在 PCR 仪里进行如下程序反应: 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 反

应 2 min。反转录为 cDNA 后, 用 $2\times Taq$ Plus Master Mix 进行检测, 反应体系: $2\times Taq$ Plus Master Mix 预混液 10 μL , 上下游引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH_2O 7 μL 。反应在 PCR 仪进行: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s、52 $^\circ\text{C}$ 退火 15 s、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 25 s, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。所用引物有 IAV、乙型流感病毒 (IBV)、丙型流感病毒 (ICV)、丁型流感病毒 (IDV), 具体信息见表 1。将各 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 判定检测结果。

表 1 引物信息

| 引物名称 | 引物序列 (5'→3') | 引物大小/bp |
|-------|---------------------------|---------|
| IAV-F | CAGRTACTGGGCHATAAGRAC | 330 |
| IAV-R | GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG | |
| IBV-F | GATGGGARGGMAAAGCAGA | 305 |
| IBV-R | CCYTCTGTATYTCAAATGCYTC | |
| ICV-F | ATGGGRCCAATGGCDATGAAATGGT | 257 |
| ICV-R | TCCCATCTGCCRAGYACAAAACC | |
| IDV-F | GTGGTGCACATATGCCTGAG | 488 |
| IDV-R | CCATTGCTCTTGAYCCATAYGC | |

1.6 生长曲线的测定

将生长状态良好的 MDCK 铺于 12 板内, 置于 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中, 待细胞密度在 80% 左右, 取病毒滴度为 $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL 的病毒液, 以感染复数 (MOI) = 0.01 接种病毒液, 以测定其在 MDCK 上的生长曲线。在细胞培养箱中吸附 1 h 后用 PBS 清洗 1 次, 弃去上清液, 补加 2 mL 含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶的 DMEM 继续培养, 分别在接毒 12、24、48、60、72 h 吸取上清液 100 μL 并补加等体积的培养液, 每个时间点 3 个重复, 按 Reed - Muench 法计算病毒 TCID₅₀ 值。

1.7 病毒温度敏感性分析

热稳定性试验所用病毒液从 -80 $^\circ\text{C}$ 取出, 均与冰上融化后, 置于相应的温度下进行预处理。试验 1 将分装的 100 μL 病毒液分别置于 33、37、41、50 和 56 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中作用 30 min; 试验 2 将 100 μL 病毒液, 在 56 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中分别处理 1、5、10 和 30 min; 试验 3 将 100 μL 病毒液置于 65 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中处理 1、5 和 10 min。将处理好的病毒全部按照 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 进行倍比稀释, 每孔 100 μL , 每个稀释度 4 个重复, 添加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰酶, 接种于状态良好的 96 孔板 MDCK, 置于 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 吸附 1 h 后, 弃去病毒残液, 每孔补加 100 μL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶含量的 DMEM 培养基, 2~3 d 后观察产生 CPE 的孔, 并按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

1.8 小鼠感染性试验

4 周龄的 BALB/c 小鼠, 对照组 (11 只) 和感染组 (12 只), 经过异氟烷麻醉后, 分别滴鼻接种 50 μL 的 DMEM、50 μL 的 IAV 病毒液 (TCID₅₀ = $10^{7.8}$), 感染后 14 d 内每日观察小鼠的临床症状, 早晚 10 点持续记录小鼠的体重变化。感染 72 h 后随机在感染组和对照组中各取 5 只剖杀, 取小鼠心、肝、脾、肺、肾、气管、脑等组织进行称重, 加入 PBS 进行研磨使组织浓度为 1 $\text{mg}/\mu\text{L}$ 。在超低温离心机 4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min 离心 5 min; 吸取 10 μL 上清液置于无菌 1.5 mL 离心管, 按照 TRIzol 法提取 RNA, 加入 10 μL RNase free water, 充分溶解 RNA, 将溶解后的 RNA 全部用于反转录, 反转录为 20 μL cDNA (程序详见 1.5)。按照诺唯赞 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒说明书, 取 2 μL cDNA 进行荧光定量 PCR。根据建立的荧光定量 PCR 方法检测该病毒在不同组织中的病毒载量。

1.9 荧光定量 PCR 检测方法的建立

针对流感分离株进行荧光定量引物设计, 所用引物信息如下: IAV-F: 5'-ACATTAATAGATGCCATGCTT-3', IAV-R: 5'-CATAATCCGGCACATCGT-3', 进行 PCR 产物的扩增; PCR 产物使用诺唯赞回收试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (DC301) 进行清洁回收。

连接回收后的 PCR 产物连接到 pMD18-T Vector, 反应体系 pMD18-T Vector 1 μL , 加入 DNA 100 ng、Solution 1 5 μL 、 ddH_2O 3 μL , 移液器轻轻吹打混合, 置于 16 $^\circ\text{C}$ 金属浴中 1 h。将上一步中 10 μL 连接产物加入 50 μL 的商品化的 DH5 α 感受态细胞中, 轻弹混匀后置于冰水中 30 min。立即放入 42 $^\circ\text{C}$ 的水浴锅中热激 60 s 后, 冰浴 2 min。转化结束后在转化产物的反应管里加入 300 μL 无抗的 LB 细菌培养液, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床上以 220 r/min 的速度摇菌 1 h。1 h 后将反应管取出置于高速离心机中以 5 000 r/min 的速度离心 5 min。弃掉上清液至管内约剩 180 μL , 轻轻吹打混匀后将其涂抹到氨苄抗性的 LB 平板上, 倒置培养于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中 12 h 左右。

菌液 PCR 鉴定: 在氨苄抗性的 LB 平板上出现单个白色菌落时, 挑取 5 个单菌落, 加入 1 mL 的氨苄抗性的液体 LB 培养基后置于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床上以 220 r/min 的速度摇菌 3~5 h, 至菌液变浑浊方可进行菌液 PCR 验证。反应结束后, 取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并记录检测结果, 并将结果为阳性的菌液送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 DNA 测序。经测序验证序列正确的菌液, 扩增培养阳性菌液, 质粒的提取使用 OMEGA 质粒提取试剂

盒, 具体操作参考说明。

1.10 质粒标准品的制备

测量上一步收集到的重组质粒原液的质量浓度, 测量仪器为赛默飞 Nano Drop 浓度测量仪, 测量多次取 3 次正常值的平均值。根据下列公式计算质粒原液的拷贝数浓度, 按照 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^1$ copies / μL 稀释质粒, 分装后于 -20°C 保存。

拷贝数浓度 / (copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) = $6.02 \times 10^{23} \times (\text{浓度} \times 10^{-9}) / (\text{质粒全长} \times 660)$ 。

1.11 标准曲线的建立

以稀释制备完成的 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ copies / μL 质粒标准品作为模板, 染料法进行病原荧光定量 PCR 反应, 根据检测结果的 C_q 值制备标准曲线。反应体系: $2 \times \text{AceQ qPCR SYBR Green Master Mix } 10 \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 、质粒标准品 $1 \mu\text{L}$ 、无酶水 $1 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 10 s、 59°C 退火 10 s、 72°C 延伸 25 s, 40 个循环; 最后设置溶解曲线 95°C 15 s、 60°C 60 s、 95°C 15 s。反应在罗氏 96 荧光定量仪中进行, 根据得到的数据, 计算得到相关系数 R^2 , 比较扩增效率, 验证倍比稀释质粒

标准品是否准确。

1.12 数据统计与分析

所有数据使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析, 数据均以“平均值 \pm 标准差”表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, 采用 Adobe Illustrator 进行图片编辑。

2 结果

2.1 病毒分离鉴定及纯化

将拭子样本接种于 MDCK 细胞, 在 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 培养箱中培养, 接种 3 d 左右观察到 MDCK 出现细胞肿胀变圆, 随着时间的推移, 出现细胞间隙增大, 细胞核固缩或破裂, 严重时细胞部分或全部脱落 (图 1A); 对照组未出现 CPE, 细胞形态正常 (图 1B)。经纯化后检测该病毒滴度为 $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL。将该毒株命名为 A/Canine/Guangzhou/IAV-2022-GZ/2022 (H3N8), 缩写为 IAV-2022-GZ。对纯化后的病毒液 (图 1C) 进行 RT-PCR 鉴定, 结果如图 1E 所示, 纯化后病毒液为 IAV 阳性, 且条带大小与预期大小相符, 其他病原检测为阴性。

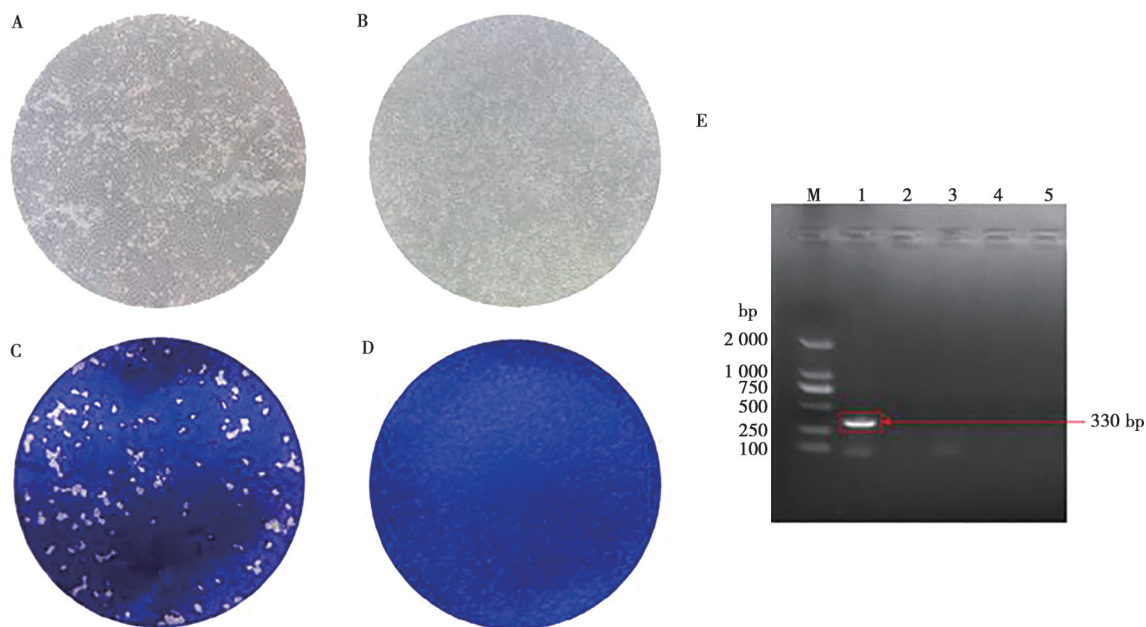


图 1 IAV-2022-GZ 病毒分离及空斑纯化
A. 阳性样品感染的 MDCK (40 \times); B. 对照组的 MDCK (40 \times); C. 空斑纯化感染组 (40 \times); D. 空斑纯化对照组 (40 \times); E. IAV-2022-GZ 分离毒株的 RT-PCR 鉴定, M 为 Marker, 1 为毒株 IAV-2022-GZ, 2 为 IBV, 3 为 ICV, 4 为 IDV, 5 为阴性对照。

图 1 IAV-2022-GZ 病毒分离及空斑纯化

2.2 分离株生长曲线的测定

接毒 24 h 后细胞开始出现 CPE，细胞膜融合，随着时间的增加，病毒滴度也逐渐增加，36 h 时细胞完全病变，48 h 大部分细胞脱落，在 72 h 病毒滴度为峰值滴度（图 2）。

2.3 分离株温度敏感性分析

病毒经 4、33、37、41、50 和 56 °C 等不同温度水浴锅中作用 30 min，结果显示 IAV-2022-GZ 在 50 °C 之前，病毒滴度变化不大，在 56 °C 中作用 30 min 后全部失活，56 °C 对病毒灭活极显著 ($P < 0.0001$)（图 3A）。在 56 °C 水浴锅中作用 1、5、10、30 min，显示 1 min 后病毒滴度下降 1 个滴度，作用 5~10 min 后下降 2 个滴度，作用 30 min 几乎全部失活（图 3B），说明本研究分离的犬流感病毒为热

敏感性毒株。为进一步探究更高温度的病毒存活情况，继续选择了 65 °C 作用 1、5 和 10 min，发现病毒在 5 min 后即可完全失活（图 3C）。

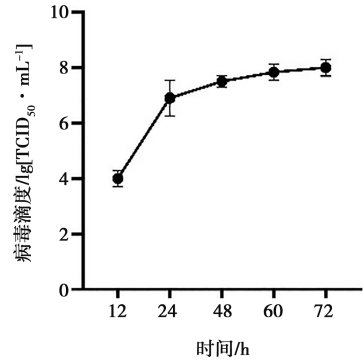
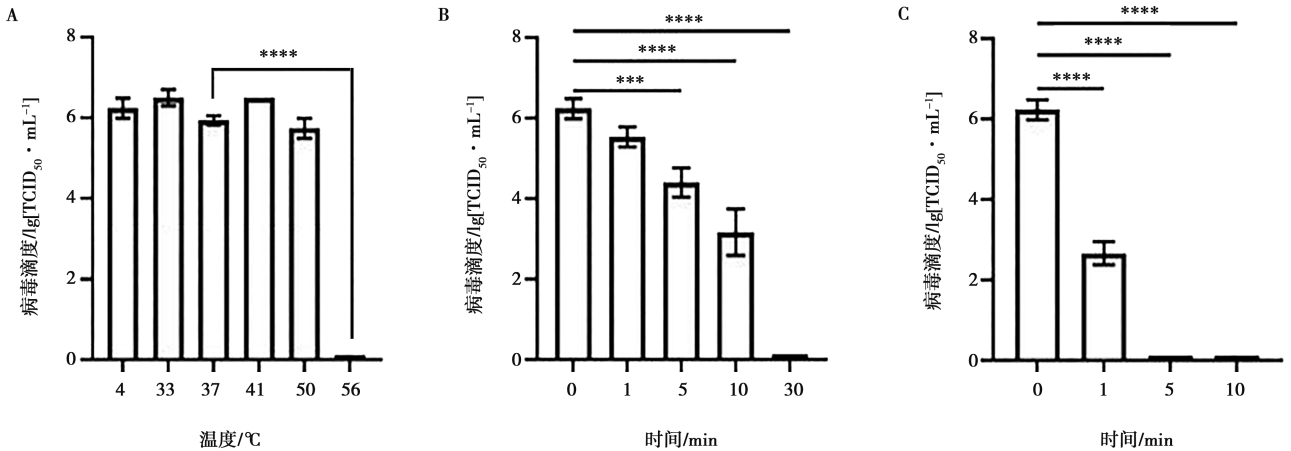


图 2 IAV-2022-GZ 分离毒株的生长曲线



A. 不同温度下作用 30 min; B. 56 °C 作用不同时间; C. 65 °C 作用不同时间。

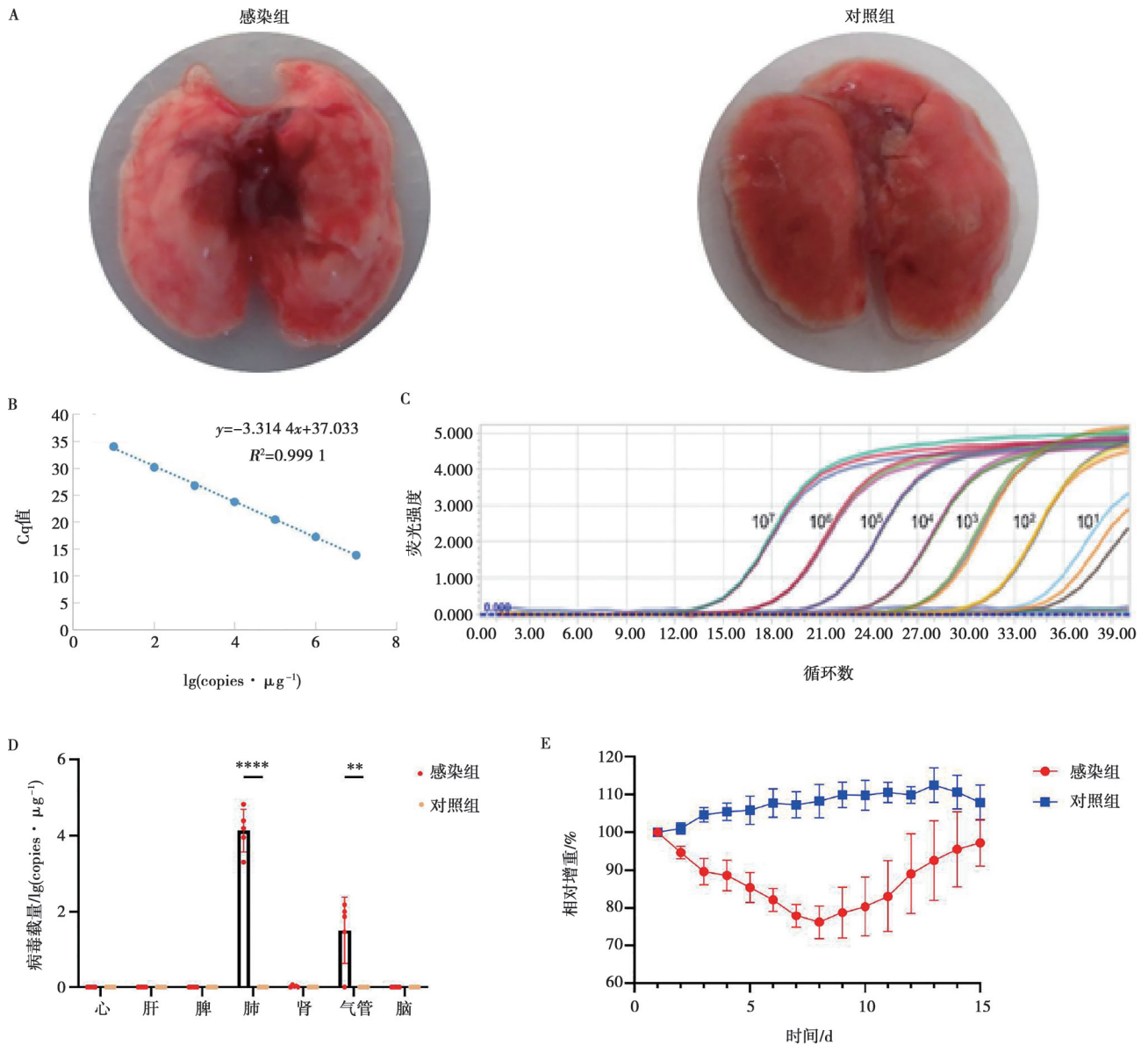
*** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。下同。

图 3 IAV-2022-GZ 对不同温度作用的敏感性

2.4 分离株对小鼠的致病性试验

将 IAV-2023-GZ 分离株感染 BALB/c 小鼠，并在感染后 72 h 后进行剖检。结果显示，感染组小鼠的肺脏出现病变，肺组织呈暗红色至紫红色，提示可能存在充血或出血；对照组肺组织无明显变化，呈均匀淡粉色（图 4A）。为了量化病毒载量，构建了 pMD-HA 质粒，以此为标准品建立了标准曲线（图 4B）。通过荧光定量 PCR 检测小鼠心、肝、脾、肺、

肾、气管、脑等脏器中的病毒含量，将各个脏器的 Cq 值代入标准曲线公式： $y = -3.3144x + 37.033$ ，计算出每个脏器中的病毒拷贝数。结果显示，肺脏、气管的病毒载量较高（图 4C），对照组小鼠均未检测到病毒。连续观察至 15 d，小鼠未出现死亡，感染组小鼠出现被毛粗乱、伴随精神沉郁，体重在 2~8 d 出现下降，第 8 天后体重逐渐回升。对照组小鼠未出现异常，体重呈正常生长趋势（图 4D）。



A. 肺组织病变; B. 标准曲线; C. 扩增曲线; D. 脏器的病毒载量, **表示 $P < 0.01$; E. 小鼠感染 IAV-2022-GZ 后体重变化。

图 4 分离株对小鼠的致病性

3 讨论

动物源性流感病毒的跨物种传播已经成为重大公共卫生问题，数据显示，猪源 H1N1^[20]，禽源 H3N2^[21] 等病毒已经引发多起人类流感大流行。近年来，人类感染动物源病毒时有发生，例如 H5N1 禽流感病毒^[22-23]、H7N9 禽流感^[24]。动物源流感病毒到人类的溢出已成为重要的公共卫生问题，流感病毒的多样性及其跨越物种传播的能力一直引发人类的广泛关注^[25]。值得关注的是，流感病毒通过基因片段之间的重配实现快速进化^[26]，H3 亚型流感病毒拥有最广泛的宿主范围，是引起大流行的仅有的 3 种亚型之一，最有可能感染哺乳动物^[27-28]。宿主共感染机制

研究揭示，单个宿主同时感染多种流感病毒时，会促进病毒重配，为病毒获得跨物种传播能力提供进化动力^[29]。

犬可以感染多种流感病毒，但只有马源 H3N8 和禽源 H3N2 在犬中建立了谱系。2004 年美国赛犬群体中暴发流感疫情，证实该 H3N8 亚型流感病毒从马跨物种传播至犬并实现稳定传播^[7]；禽源 H3N2 流感病毒自 2006 年起在亚洲犬群中流行，可能与活禽市场接触有关^[30]。犬是重要的伴侣动物，一旦犬出现新的病毒感染，人类感染的机会就很高。2022 年河南省和湖南省分别报道了 H3N8 亚型流感病毒感染人类的病例^[31-32]，但未形成人际传播，但此亚型流感病毒的流行潜力不容忽视。

小鼠是用于研究流感病毒对哺乳动物致病性最常用的动物模型, 既往研究表明, 不同亚型的流感病毒在小鼠中表现出不同的致病性。H3N2 亚型犬流感病毒在小鼠的肺组织中病毒滴度最高, 在脑组织也检测到病毒的复制^[33]。H1N1 亚型猪流感病毒 AV1522 和 AV1523 在小鼠上引起了肺炎和脑膜炎症状, 并导致死亡^[34]。相比之下, IAV-2022-GZ 毒株接种小鼠后, 只在呼吸系统中检测到有效复制, 脑组织中并未检测到, 感染后表现为短暂的体重下降, 未导致死亡, 无神经系统的症状, 可能与其 HA 蛋白受体的结合特性相关。有研究表明, H3N8 亚型流感病毒具有结合 $\alpha 2, 6$ 唾液酸的能力^[35], 这可能对人类健康具有潜在的威胁, 建议持续监测以评估其公共卫生风险。

我国宠物群体庞大, 猫、犬等宠物与人类日常接触密切。在此背景下, 流感病毒对于宠物群体的威胁不容忽视, 为更有效地防控流感病毒, 建议广泛监测动物群体中的流感病毒流行情况, 采取措施减少疾病传播的风险。

参考文献:

- [1] SHAO W, LI X, GORAYA M U, et al. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8): 1650.
- [2] BRESEE J, FITZNER J, CAMPBELL H, et al. Progress and remaining gaps in estimating the global disease burden of influenza [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24 (7): 1173-1177.
- [3] LONG J S, MISTRY B, HASLAM S M, et al. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17 (2): 67-81.
- [4] WASIK B R, BARNARD K N, OSSIBOFF R J, et al. Distribution of o-acetylated sialic acids among target host tissues for influenza virus [J]. *mSphere*, 2017, 2 (5): e00379-16.
- [5] NING Z Y, WU X T, CHENG Y F, et al. Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs [J]. *J Vet Sci*, 2012, 13 (3): 219-222.
- [6] MENA I, NELSON M I, QUEZADA-MONROY F, et al. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico [J]. *eLife*, 2016, 5: e16777.
- [7] CRAWFORD P C, DUBOVI E J, CASTLEMAN W L, et al. Transmission of equine influenza virus to dogs [J]. *Science*, 2005, 310 (5747): 482-485.
- [8] JEOUNG H Y, LIM S I, SHIN B H, et al. A novel canine influenza H3N2 virus isolated from cats in an animal shelter [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 165 (3/4): 281-286.
- [9] SONGSERM T, AMONSIN A, JAM-ON R, et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12 (11): 1744-1747.
- [10] SUN Y, SHEN Y, ZHANG X, et al. A serological survey of canine H3N2, pandemic H1N1/09 and human seasonal H3N2 influenza viruses in dogs in China [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 168 (1): 193-196.
- [11] RAMIREZ-MARTINEZ L A, CONTRERAS-LUNA M, DE LA LUZ J, et al. Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7 (6): 1292-1296.
- [12] ZHAN G J, LING Z S, ZHU Y L, et al. Genetic characterization of a novel influenza A virus H5N2 isolated from a dog in China [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155 (2/4): 409-416.
- [13] SUN X, XU X, LIU Q, et al. Evidence of avian-like H9N2 influenza A virus among dogs in Guangxi, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 20: 471-475.
- [14] SONG D, MOON H J, AN D J, et al. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93 (Pt 3): 551-554.
- [15] LIN H T, WANG C H, CHUEH L L, et al. Influenza A (H6N1) virus in dogs, Taiwan [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21 (12): 2154-2157.
- [16] SU S, CAO N, CHEN J, et al. Complete genome sequence of an avian-origin H3N2 canine influenza A virus isolated in farmed dogs in southern China [J]. *J Virol*, 2012, 86 (18): 10238.
- [17] PEIRIS J S, DE JONG M D, GUAN Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20 (2): 243-267.
- [18] UMAR S, KIM S, GAO D, et al. Evidence of reverse zoonotic transmission of human seasonal influenza A virus (H1N1, H3N2) among cats [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2024, 18 (4): e13296.
- [19] KANG M, WANG L F, SUN B W, et al. Zoonotic infections by avian influenza virus: changing global epidemiology, investigation, and control [J]. *Lancet Infect Dis*, 2024, 24 (8): e522-e531.
- [20] Novel Swine - Origin Influenza A Virus Investigation Team, DAWOOD F S, JAIN S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (25): 2605-2615.
- [21] DELAHOY M J, MORTENSON L, BAUMAN L, et al. Influenza A (H3N2) outbreak on a university campus-michigan, October-November 2021 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70 (49): 1712-1714.
- [22] SUBBARAO K, KLIMOV A, KATZ J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness [J]. *Science*, 1998, 279 (5349): 393-396.
- [23] GUAN Y, POON L L, CHEUNG C Y, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (21): 8156-8161.
- [24] IMAI M, WATANABE T, KISO M, et al. A highly pathogenic avian H7N9 influenza virus isolated from a human is lethal in some ferrets infected via respiratory droplets [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 22 (5): 615-626.
- [25] ABDELWHAB E M, METTENLEITER T C. Zoonotic animal influenza virus and potential mixing vessel hosts [J]. *Viruses*, 2023, 15 (4): 980.
- [26] GANTI K, BAGGA A, CARNACCINI S, et al. Influenza A virus reassortment in mammals gives rise to genetically distinct within-host

subpopulations [J]. Nat Commun, 2022, 13 (1): 6846.

[27] BAO P, LIU Y, ZHANG X, et al. Human infection with a reassortment avian influenza A H3N8 virus; an epidemiological investigation study [J]. Nat Commun, 2022, 13 (1): 6817.

[28] PARRISH C R, MURCIA P R, HOLMES E C. Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans [J]. J Virol, 2015, 89 (6): 2990-2994.

[29] FERRANDO V A, FRIEDRICH M E, GANDHI S, et al. Cell-intrinsic genomic reassortment of pandemic H1N1 2009 and Eurasian avian-like swine influenza viruses results in potentially zoonotic variants [J]. Emerg Microbes Infect, 2023, 12 (1): 2212809.

[30] CHEN M, LYU Y, WU F, et al. Increased public health threat of avian-origin H3N2 influenza virus caused by its evolution in dogs [J]. eLife, 2023, 12: e83470.

[31] CHENG D, DONG Y, WEN S, et al. A child with acute respiratory distress syndrome caused by avian influenza H3N8 virus [J]. J Infect, 2022, 85 (2): 174-211.

[32] YANG R, SUN H, GAO F, et al. Human infection of avian influenza A H3N8 virus and the viral origins: a descriptive study [J]. Lancet Microbe, 2022, 3 (11): e824-e834.

[33] XIE X, NA W, KANG A, et al. Comparison of the virulence of three H3N2 canine influenza virus isolates from Korea and China in mouse and guinea pig models [J]. BMC Vet Res, 2018, 14 (1): 149.

[34] SONG Y, ZHANG Y, ZHANG B, et al. Identification, genetic analysis, and pathogenicity of classical swine H1N1 and human-swine reassortant H1N1 influenza viruses from pigs in China [J]. Viruses, 2020, 12 (1): 55.

[35] ZHANG X, LI Y, JIN S, et al. PB1 S524G mutation of wild bird-origin H3N8 influenza A virus enhances virulence and fitness for transmission in mammals [J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10 (1): 1038-1051.

· 信息 ·

21 种畜牧、兽医科学类中国科技核心期刊中《畜牧与兽医》综合评价总分排名第九位

《2024 年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》以《中国科技论文与引文数据库》（CSTPCD）为基础，采用科学客观的研究方法与评价方式，遴选中国自然科学领域各学科分类重要期刊作为统计来源期刊。2024 年版引证报告共收录了在中国（不含港澳台地区）正式出版的 1 998 种中文期刊和 167 种英文期刊，其中畜牧、兽医科学类期刊共收录 21 种，包括 19 本中文期刊和 2 本英文期刊，《畜牧与兽医》综合评价总分排名第九位。21 种期刊主要指标详见附表。

附表 2023 年畜牧、兽医科学类期刊主要指标

| 序号 | 刊名 | 核心总被引频次 | | | 核心影响因子 | | | 综合评价总分 | | 学科扩 散指标 | 学科影 响指标 | 红点 指标 |
|-----------|---|---------|----|-------|--------|----|-------|--------|----|------------|------------|----------|
| | | 数值 | 排名 | 离均差率 | 数值 | 排名 | 离均差率 | 数值 | 排名 | | | |
| 1 | ANIMAL NUTRITION | 951 | 15 | -0.49 | 1.612 | 2 | 0.65 | 51.9 | 2 | 6.52 | 0.81 | 0.25 |
| 2 | JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY | 1 123 | 13 | -0.40 | 1.403 | 4 | 0.44 | 46.8 | 4 | 6.48 | 0.81 | 0.08 |
| 3 | 蚕业科学 | 627 | 19 | -0.66 | 0.660 | 16 | -0.32 | 34.3 | 13 | 7.19 | 0.43 | 0.25 |
| 4 | 动物医学进展 | 1 522 | 9 | -0.19 | 0.670 | 15 | -0.31 | 41.7 | 8 | 16.05 | 0.90 | 0.52 |
| 5 | 动物营养学报 | 7 671 | 1 | 3.11 | 1.990 | 1 | 1.04 | 78.4 | 1 | 16.33 | 1.00 | 0.82 |
| 6 | 家畜生态学报 | 1 158 | 12 | -0.38 | 0.643 | 17 | -0.34 | 34.6 | 12 | 8.90 | 0.95 | 0.54 |
| 7 | 经济动物学报 | 215 | 21 | -0.88 | 0.510 | 20 | -0.48 | 26.6 | 19 | 3.71 | 0.71 | 0.53 |
| 8 | 粮食与饲料工业 | 807 | 16 | -0.57 | 0.618 | 19 | -0.37 | 28.3 | 18 | 7.81 | 0.57 | 0.22 |
| 9 | 饲料工业 | 2 549 | 6 | 0.36 | 1.529 | 3 | 0.57 | 45.6 | 5 | 11.00 | 0.90 | 0.73 |
| 10 | 饲料研究 | 3 500 | 3 | 0.87 | 1.202 | 6 | 0.23 | 32.2 | 16 | 13.43 | 0.95 | 0.70 |
| 11 | 畜牧兽医学报 | 2 563 | 5 | 0.37 | 1.060 | 8 | 0.09 | 44.1 | 7 | 12.14 | 0.95 | 0.59 |
| 12 | 畜牧与兽医 | 1 484 | 11 | -0.21 | 0.730 | 14 | -0.25 | 39.1 | 9 | 9.48 | 0.86 | 0.57 |
| 13 | 畜牧与饲料科学 | 797 | 17 | -0.57 | 0.620 | 18 | -0.37 | 36.8 | 11 | 8.14 | 0.86 | 0.47 |
| 14 | 中国动物传染病学报 | 648 | 18 | -0.65 | 0.821 | 11 | -0.16 | 24.7 | 20 | 5.33 | 0.76 | 0.56 |
| 15 | 中国家禽 | 1 966 | 7 | 0.05 | 0.911 | 10 | -0.07 | 33.6 | 15 | 7.71 | 0.95 | 0.56 |
| 16 | 中国兽药杂志 | 572 | 20 | -0.69 | 0.462 | 21 | -0.53 | 23.6 | 21 | 7.95 | 0.76 | 0.25 |
| 17 | 中国兽医科学 | 1 102 | 14 | -0.41 | 0.772 | 12 | -0.21 | 33.8 | 14 | 8.05 | 0.86 | 0.57 |
| 18 | 中国兽医学报 | 1 808 | 8 | -0.03 | 0.761 | 13 | -0.22 | 37.4 | 10 | 11.38 | 0.95 | 0.56 |
| 19 | 中国畜牧兽医 | 3 121 | 4 | 0.67 | 1.004 | 9 | 0.03 | 45.3 | 6 | 15.29 | 0.95 | 0.65 |
| 20 | 中国畜牧杂志 | 3 551 | 2 | 0.90 | 1.189 | 7 | 0.22 | 47.4 | 3 | 12.95 | 1.00 | 0.63 |
| 21 | 中国预防兽医学报 | 1 484 | 10 | -0.21 | 1.338 | 5 | 0.37 | 31.0 | 17 | 6.52 | 0.81 | 0.47 |
| 21 种期刊平均值 | | 1 868 | | | 0.976 | | | | | | | |

注：数据来自中国科学技术信息研究所《2024 年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》。