

鸭源 H8N4 亚型禽流感病毒的遗传演化及其部分生物学特性分析

缪葭皓, 崔鹏飞, 颜成, 王丛丛, 王燕, 陈源, 陈鹏, 施建忠, 邓国华[✉], 陈化兰

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所/动物疫病防控全国重点实验室/国家禽类实验动物资源库, 哈尔滨 150069

摘要:【目的】通过对新分离的 H8N4 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 的生物学特性分析, 为禽流感疫情监测和综合防控提供依据。【方法】对 2 株分离自湖南省养鸭场的 H8N4 亚型禽流感病毒 DK/HuN/S11158/2024 (简称 DK/S11158) 和 DK/HuN/S11301/2025 (简称 DK/S11301) 株进行全基因组序列测定, 并从 GISAID 数据库中下载与各片段同源性最高的参考毒株序列, 利用 MEGA7.0 软件构建分离病毒株及参考毒株各基因片段的进化树, 同时分析 2 株 H8N4 亚型 AIV 不同编码蛋白的关键氨基酸位点的变异。通过生物膜干涉技术评估病毒的受体结合特性差异, 然后以 10^6 EID₅₀ 的病毒剂量分别感染 SPF 鸡和 BALB/c 小鼠, 评估 2 株 H8N4 亚型病毒对家禽及哺乳动物的感染及致病能力。【结果】BLAST 比对结果显示 DK/S11158 株的 PB1、PA 和 NA 基因片段与韩国水禽来源的 AIV 相应基因片段具有核苷酸同源性最高, PB2、HA 和 NS 基因片段与日本野鸟来源的 AIV 相应基因片段具有核苷酸同源性最高, M 基因片段与伊朗鸭源 AIV 相应基因片段具有核苷酸同源性最高, NP 基因片段则与我国野鸟来源的 AIV 核苷酸同源性最高。DK/S11301 株的 PB2、PB1、PA、NP、NS 基因片段与日本野鸟及水禽来源的 AIV 相应基因片段具有核苷酸同源性最高, HA 和 NA 基因片段与北美水禽来源的 AIV 相应基因片段具有核苷酸同源性最高, M 基因片段与韩国野鸟来源的 AIV 具有核苷酸同源性最高。2 株 H8N4 亚型 AIV 的 HA 蛋白裂解位点氨基酸序列均为 PSIEPK↓GLF, 仅含有 1 个碱性氨基酸, 符合低致病性禽流感病毒 (LPAIV) 的分子特征; PB2 蛋白出现 89V、358E、389R, PB1 蛋白出现 3V、622G, PA 蛋白出现 37A、409S, NS1 蛋白出现 42S、106M 等多个哺乳动物适应性突变位点。利用生物膜干涉技术评估病毒受体结合特性差异, 结果显示 2 株病毒均可结合 α -2, 3-唾液酸和 α -2, 6-唾液酸受体, 表现出双受体结合能力。病毒对鸡的感染性试验结果表明, DK/S11158 和 DK/S11301 的感染组鸡的各个脏器及咽喉拭子和泄殖腔拭子中均未检测到病毒存在, 接触传播组鸡的咽喉拭子和泄殖腔拭子中也未检测到病毒。14 d 后对感染组和传播组鸡血清进行抗体水平检测, 仅 DK/S11158 感染组的 1 只鸡出现血清抗体转阳。将 2 株病毒以 10^6 EID₅₀/50 μ L 剂量滴鼻感染 BALB/c 小鼠后, DK/S11158 组小鼠鼻甲和肺脏病毒滴度分别为 $5.58 \log_{10}$ EID₅₀/mL 和 $2.75 \log_{10}$ EID₅₀/mL; DK/S11301 组小鼠鼻甲和肺脏的病毒滴度分别为 $6.25 \log_{10}$ EID₅₀/mL 和 $4.08 \log_{10}$ EID₅₀/mL, 并伴随一定程度的体重下降。【结论】2 株 H8N4 亚型 AIV 为新型重组病毒, 具有明显的遗传多样性, 存在感染哺乳动物和人类的潜在风险, 研究为禽流感的监测和综合防控提供了重要的数据支持。

关键词: 禽流感病毒; H8N4; 感染性; 受体结合特异性; 遗传进化

Genetic and Biological Characterization of Two H8N4 Subtype Avian Influenza Viruses Isolated from Duck

MIAO JiaHao, CUI PengFei, YAN Cheng, WANG CongCong, WANG Yan, CHEN Yuan, CHEN Peng, SHI JianZhong, DENG GuoHua[✉], CHEN HuaLan

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Lab of Animal Disease Control and Prevention/National Poultry Laboratory Animal Resource Center, Harbin 150069

Abstract: 【Objective】This study aimed to analyze the biological characteristics of the newly isolated H8N4 subtype avian influenza

收稿日期: 2025-10-19; 接受日期: 2025-12-17

基金项目: “十四五”国家重点研发计划 (2021YFD1800201)

联系方式: 缪葭皓, E-mail: 1648772666@qq.com. 通信作者邓国华, E-mail: dengguohua01@caas.cn

virus (AIV), so as to provide the basis for avian influenza surveillance and comprehensive prevention and control. 【Method】 The whole-genome sequencing of two strains of H8N4 subtype avian influenza virus DK/HuN/S11158/2024 (DK/S11158) and DK/HuN/S11301/2025 (DK/S11301) isolated from duck farms in Hunan Province were determined. Reference strain sequences with the highest homology to each segment were downloaded from the GISAID database. The phylogenetic trees for each gene segment of the isolated strains and reference strains were constructed using MEGA 7.0 software. The key amino acid residue variations in different encoded proteins of the two H8N4 subtype AIVs were analyzed. The differences in viral receptor-binding characteristics were assessed using bio-layer interferometry. SPF chickens and BALB/c mice were infected with a virus dose of 10^6 EID₅₀ to evaluate the infection and pathogenicity of the two H8N4 subtype viruses in poultry and mammals. 【Result】 BLAST comparison results showed that for the DK/S11158 strain, the PB1, PA, and NA gene segments had the highest nucleotide homology with corresponding segments from AIVs of South Korean waterfowl origin; the PB2, HA, and NS gene segments had the highest homology with those from Japanese wild bird-origin AIVs; the M gene segment had the highest homology with a duck-origin AIV from Iran; the NP gene segment had the highest homology with a wild bird-origin AIV from China. For the DK/S11301 strain, the PB2, PB1, PA, NP, and NS gene segments showed the highest nucleotide homology with corresponding segments from Japanese wild bird and waterfowl-origin AIVs; the HA and NA gene segments had the highest homology with those from North American waterfowl-origin AIVs; the M gene segment had the highest homology with a South Korean wild bird-origin AIV. The amino acid sequence at the HA protein cleavage site of both H8N4 subtype AIVs was PSIEPK ↓ GLF, containing only a single basic amino acid, which was consistent with the molecular characteristics of low pathogenic avian influenza virus (LPAIV). Several mammalian adaptation mutation sites were identified, including 89V, 358E, 389R in the PB2 protein, 3V, 622G in the PB1 protein, 37A, 409S in the PA protein, and 42S, 106M in the NS1 protein. Assessment of viral receptor-binding characteristics using bio-layer interferometry revealed that both viruses could bind to both α -2,3-sialic acid and α -2,6-sialic acid receptors, demonstrating dual receptor-binding capability. Results from the infectivity experiment in chickens showed that no virus was detected in any organs, oropharyngeal swabs, or cloacal swabs of chickens in the DK/S11158 and DK/S11301 infection groups. No virus was detected in the oropharyngeal or cloacal swabs of chickens in the contact transmission groups either. Serological antibody level testing 14 days post-infection showed seroconversion in only one chicken from the DK/S11158 infection group. After intranasal infection of BALB/c mice with 10^6 EID₅₀/50 μ L of virus, the viral titer in the nasal turbinates and lungs of the DK/S11158 group were 5.58 log₁₀EID₅₀/mL and 2.75 log₁₀EID₅₀/mL, respectively. The viral titers in the nasal turbinates and lungs of the DK/S11301 group were 6.25 log₁₀EID₅₀/mL and 4.08 log₁₀EID₅₀/mL, respectively, accompanied by a certain degree of weight loss. 【Conclusion】 The above results indicate that the two H8N4 subtype AIVs were novel recombinant viruses with significant genetic diversity and posed a potential risk of infecting mammals and humans. This study provided important data support for the surveillance and comprehensive prevention and control of avian influenza.

Key words: avian influenza virus; H8N4; infectivity; receptor-binding specificity; genetic evolution

0 引言

【研究意义】根据血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 的遗传性和抗原性差异可以将 A 型流感病毒分成 19 种 HA 亚型和 11 种 NA 亚型, 其中在禽类中检测到的 HA 和 NA 亚型有 H1—H16、H19 以及 N1—N9^[1-3], 除部分 H5 和 H7 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 为高致病性禽流感病毒 (highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) 外, 其余均为低致病性禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)^[4-5]。野生水禽是 AIV 的重要自然宿主, 且具有在繁殖地与越冬地之间规律性迁徙的特征, AIV 可在野生水禽和家禽之间频繁发生跨宿主传播^[6-7]。某些地区普遍采用开放水

体或稻田养殖水禽 (主要为家鸭) 的模式, 为野生水禽与水禽 (家鸭) 之间的 AIV 基因交换提供了便利条件。AIV 的不同片段发生基因交换时可能会产生新的重组病毒, 这些新型重组病毒能够对禽类或人类造成不同程度的感染, 如 1997 年出现的 H5N1 病毒、2013 年出现的 H7N9 病毒^[8-9]及 H10N8 病毒^[10]、2016 年出现的 H5N6 病毒及 2021 年和 2024 年出现的 H10N3 病毒^[11]。此类病毒重排不仅改变了 AIV 的生物学特性, 而且还可增加病毒跨物种的传播能力, 对人类和动物健康构成潜在威胁。因此, 持续开展 AIV 的监测及其生物学特性研究具有重要意义。【前人研究进展】H8 亚型 AIV 属于 LPAIV, 其优势亚型为 H8N4 亚型, 主要在野鸟中流行, 在家禽中极少被分离到, 目前并未出现 H8 亚型 AIV 感染哺乳动物或人类的相关报

道^[12-13]。H8N4 病毒于 1967 年首次 in 加拿大的火鸡中被分离到, 至今在 GISAID 上记录的病毒仅 300 余株。2003 年至今我国仅分离到 5 株 H8N4 病毒, 此前 TANG 等在上海的绿翅鸭中分离到 1 株 H8N4 病毒, 发现它是由 H9N2、H5N7、H3N8、H1N2、H4N6 及 H1N1 亚型 AIV 重组产生的^[14], 但该病毒在动物模型中的感染效果尚不明确。2022 年张虹等对全球 H8 亚型病毒进行时空分布分析, 并对优势亚型 H8N4 病毒进行系统进化研究, 同时对在山东地区新分离的野鸟 H8N4 病毒进行遗传进化分析和动物试验, 结果表明该病毒能在鸭体内有效复制, 并且不需要提前适应就能够在小鼠体内直接复制^[15]。【本研究切入点】本研究在家禽样品中分离到 2 株 H8N4 亚型 AIV, 但是其遗传进化特征、对家禽和哺乳动物的感染和致病风险尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究拟通过对湖南地区分离到的 2 株 H8N4 亚型 AIV 进行全基因组测序及遗传演化分析, 并评估其对家禽和哺乳动物的感染和致病风险, 旨在为 H8N4 亚型禽流感的防控提供科学依据。

1 材料与方法

研究于 2023—2025 年在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所生物安全二级实验室 (ABSL-2) 完成。本研究所有的动物试验程序均按照中国科技部规定的动物保护和福利准则进行, 并获得中国农业科学院哈尔滨兽医研究所科技伦理委员会的批准 (250708-04-GJ)。

1.1 主要试验材料

本研究中的 2 株 H8N4 亚型 AIV: DK/HuN/S11158/2024 (简称 DK/S11158) 和 DK/HuN/S11301/2025 (简称 DK/S11301) 均由国家禽流感参考实验室分离、鉴定并保存; 10 日龄 SPF 鸡胚和 SPF 鸡均购自国家禽类实验动物资源库; 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; VAMNE Virus DNA/RNA Extraction Kit 3.0 和 DL2000 plus DNA Marker 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase 购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司; 2×Taq Master Mix 购自北京康为世纪生物技术有限公司; PCR 产物纯化磁珠购自精序 (深圳) 生物技术有限公司。

1.2 H8N4 亚型 AIV 的分离和鉴定

将采集的家禽咽喉植绒拭子及泄殖腔植绒拭子保存至含有甘油的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 充分震荡后离心, 用注射器吸取 0.2 mL 上清液接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 37 °C 孵化 48 h 后收取尿囊液。通过血凝

抑制和 Sanger 测序方法确定病毒的 HA 和 NA 亚型^[16]。

1.3 H8N4 亚型 AIV 的纯化和全基因组序列的测定

将 1.2 中收获的鸡胚尿囊液在 PBS 中进行 10 倍倍比稀释, 各个稀释度病毒以 0.1 mL/枚接种 10 日龄 SPF 鸡胚。37 °C 孵化 48 h 后测定鸡胚尿囊液的血凝价, 收集最高稀释度血凝价最高的鸡胚尿囊液。反复进行 3 次纯化后对病毒进行无菌检验, 确定无菌之后将其分装置于 -70 °C 冰箱中保存^[17]。

使用 VAMNE Virus DNA/RNA Extraction Kit 3.0 进行病毒 RNA 的提取; 使用 M-MLV Reverse Transcriptase 将病毒 RNA 反转录为 cDNA, 反转录程序及体系如下: 28 μL RNA 中加入 2 μL 12 bp 通用引物 (5'-AGCAAAAGCAGG-3'), 置于金属浴中 70 °C 热变性 5 min, 冰浴骤冷后加入 5 μL 反应缓冲液、1 μL 反转录酶、0.5 μL RNA 酶抑制剂及 1 μL dNTP (10 mmol), 37 °C 反应 1.5 h; 以 cDNA 为模板 PCR 扩增病毒的全基因组, PCR 体系为: 2×Taq Master Mix 25 μL、ddH₂O 22 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、cDNA 1 μL, 共 50 μL; 反应程序为: 95 °C 变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 终末延伸 10 min 后反应结束。将扩增产物利用磁珠纯化后, 参照 Big Dye Terminator 3.1 测序反应说明书, 进行测序反应, 反应完成后利用磁珠将测序反应产物纯化, 纯化后的产物在测序仪上进行基因序列的测定并利用 DNA-Star 软件拼接病毒各基因片段序列。

1.4 H8N4 亚型 AIV 的遗传进化分析

通过 BLAST 检索 GISAID 数据库 (<https://gisaid.org/>) 中与 DK/S11158 和 DK/S11301 各基因片段同源性最高的病毒, 下载参考病毒各基因片段序列。采用 MegAlign 软件分析 2 株 H8N4 亚型 AIV 各基因片段与数据库中下载的相应参考序列的同源性; 利用 MEGA7.0 软件中的邻接法 (bootstrap 参数设置为 1 000) 绘制 H8N4 亚型 AIV 全基因组中各基因节段的进化树^[18]。

1.5 H8N4 亚型 AIV 的受体结合特性试验

首先, 将 DK/S11158 和 DK/S11301 株接种至 10 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔进行病毒的增殖, 收集病毒尿囊液后用 β-丙内酯按照 1 : 2 000 的比例对病毒进行灭活处理。48 h 后接种鸡胚验证是否灭活。灭活后的病毒液经 30% 蔗糖溶液密度梯度超速离心 (28 000 r/min, 4 °C, 2 h) 浓缩病毒, 弃上清后倒置离心管除去残余液体, 用适量 20% 甘油溶液 (PBS 稀释) 对病毒沉淀

进行重悬，测定血凝效价后，分装保存在-70℃冰箱。

然后通过生物膜干涉技术（BLI）检测病毒的受体结合特性：用1×HBS溶液（内含NA抑制剂，浓度为10 nmol·L⁻¹）将浓缩抗原进行稀释，配制8单位抗原；将原始浓度为10 mg·mL⁻¹ α-2,3-及 α-2,6-唾液酸糖链分别稀释至1和2.5 mg·mL⁻¹，在96孔板各列依次加入200 μL HBS溶液、α-2,3-或 α-2,6-唾液酸糖链、HBS溶液（内含NA抑制剂）、HBS溶液和8单位抗原，将传感器置于相应孔内预湿10 min。完成预湿将96孔板转移至ForteBio Octet分子相互作用仪，使用Data Analysis9.0软件设置参数运行程序，完成实验后在该软件中下载原始数据并进行处理，经GraphPad Prism 9.0软件进行分析，计算糖链结合亲和力。

1.6 H8N4 亚型 AIV 对 SPF 鸡的感染性试验

将DK/S11158和DK/S11301株稀释至10⁶ EID₅₀/100 μL后分别鼻腔感染11只4周龄SPF鸡，感染剂量为100 μL/只，感染1d后，在笼内放入2只SPF鸡，作为接触传播组，检测病毒在鸡群中的接触传播能力。在感染后的第3、5、7、9天采集感染组和接触组鸡的咽喉拭子和泄殖腔拭子；感染后第4天干冰麻醉后颈部放血随机安乐3只感染组鸡，采集咽喉拭子并取其脑、气管、胸腺、肺脏、肾脏、脾脏、胰腺、心脏、肝脏、法氏囊和盲肠，将各脏器研磨后用PBS进行10

倍倍比稀释，每个稀释度接种3枚鸡胚，每枚鸡胚接种0.1 mL，37℃孵化48 h后，测定鸡胚尿囊液血凝性，根据Reed-Muench法计算鸡各脏器中的病毒复制滴度。感染后第14天测定感染组和接触传播组鸡血清转阳情况。

1.7 H8N4 亚型 AIV 对 BALB/c 小鼠的感染性试验

将DK/S11158和DK/S11301株稀释至10⁶ EID₅₀/50 μL，使用阿弗汀（avertin）麻醉小鼠，每株病毒经鼻腔感染8只6周龄的BALB/c雌性小鼠，感染剂量为50 μL/只；同时，按照相同操作以PBS接种5只小鼠作为阴性对照。感染后第3天随机挑选3只感染组小鼠进行安乐死并解剖，取其脑、鼻甲、脾脏、肾脏、肺脏，将各脏器进行研磨后用PBS进行10倍倍比稀释，每个稀释度接种3枚鸡胚，每枚鸡胚接种0.1 mL，37℃孵化48 h后，测定鸡胚尿囊液血凝性，根据Reed-Muench法计算每组小鼠脏器病毒复制滴度。同时对每组剩余5只小鼠进行14 d持续的体重监测和记录。

2 结果

2.1 H8N4 亚型 AIV 全基因组序列测定及 BLAST 分析

按照1.3的试验步骤得到2株H8N4亚型AIV的全基因组序列，并在GISAID数据库经BLAST检索获得与2株病毒各基因片段同源性最高的毒株（表1）。

表 1 与 2 株 H8N4 亚型 AIV 各基因片段同源性最高的病毒株
Table 1 Viruses showing the highest homology to each segment of the two H8N4 subtype AIVs

病毒 Virus	基因 Gene	与 GISAID 数据库中同源性最高的病毒 The highest homologous strains in the GISAID database	同源性 Identity	登录号 Segment-ID
DK/HuN/S11158/ 2024(H8N4)	PB2	A/environment/Japan/KU-4h/2021(H3N8)	99.4%	EPI2596070
	PB1	A/Spot-billed duck/South Korea/KNU2022-73/2022(H4N6)	99.3%	EPI19109827
	PA	A/duck/Korea/H678/2022(H5N1)	99.4%	EPI19453475
	HA	A/bird/Japan/NIES-0000009/2022(H8N4)	98.4%	EPI2628718
	NP	A/wild bird/Guangdong/ZJ476/2022(H4N6)	98.9%	EPI4313854
	NA	A/mallard/Korea/KNU-8/2023(H10N4)	99.3%	EPI2873264
	M	A/duck/Ilan/15WB3315-46-50/2015 (H6N1)	99.0%	EPI3407222
	NS	A/environment/Kagoshima/KU-24-G12/2024(H4N6)	99.4%	EPI4323141
DK/HuN/S11301/ 2025(H8N4)	PB2	A/Eastern buzzard/Fukushima/0703A001/2025(H5N1)	99.1%	EPI4264867
	PB1	A/chicken/Niigata/22A10C/2022(H5N1)	99.2%	EPI2751889
	PA	A/Hooded crane/Kagoshima/KU-24-24/2024(H5N1)	99.5%	EPI3872674
	HA	A/mallard/Alaska/AH0176804/2021(H8N4)	97.3%	EPI1933012
	NP	A/environment/Kagoshima/KU-G5/2022(H5N1)	99.1%	EPI2789439
	NA	A/Mallard/Ohio/19OS0172/2019(H10N4)	97.5%	EPI1778889
	M	A/A/Wild bird/South Korea/Q23-324-4/2023(H3N8)	99.8%	EPI3040266
	NS	A/goose/Tottori/NK2F2/2022(H1N8)	99.2%	EPI3327150

结果显示 DK/S11158 株的 PB1、PA、和 NA 基因片段与韩国水禽 H4N6、H5N1 和 H10N4 亚型 AIV 的相应基因片段的核苷酸同源性最高,分别为 99.3%、99.4% 和 99.3%; PB2、HA 和 NS 基因片段与日本地区分离到的 H3N8、H8N4 及 H4N6 亚型 AIV 的相应基因片段核苷酸同源性最高,分别为 99.4%、98.4%和 99.4%; M 基因与伊朗的鸭源 H6N1 亚型 AIV 的核苷酸同源性最高为 99.0%; NP 基因与我国野鸟 H4N6 亚型 AIV 的核苷酸同源性最高为 98.9%; DK/S11301 株的 PB2、PB1、PA、NP、NS 基因片段与日本野鸟及水禽 H5N1、H1N8 亚型 AIV 的相应基因片段的核苷酸同源性最高,分别为 99.1%、99.2%、99.5%、99.1%和 99.2%; HA 和 NA 基因片段与北美水禽 H8N4 和 H10N4 亚型 AIV 的相应基因片段的核苷酸同源性最高,分别为 97.3%和 97.5%; M 基因片段与韩国野鸟的 H6N5 亚型 AIV 的核苷酸同源性最高为 99.8%。上述结果表明 2 株 H8N4 亚型 AIV 具有明显的遗传多样性,可能是由多种野鸟源和鸭源的 LPAIV 和 H5N1 AIV 重组产生的。

2.2 H8N4 亚型 AIV 全基因组序列的遗传演化分析

为进一步探究 2 株 H8N4 亚型 AIV 的遗传演化关系,将 DK/S11158 和 DK/S11301 株的全基因组序列在 GISAID 网站上进行 BLAST 分析,下载同源性最高的毒株序列和全球 H8N4 亚型 AIV 代表毒株序列,并分别利用 MEGA 和 MegAlign 软件绘制进化树和分析 2 株病毒全基因组核苷酸同源性。HA 基因进化树显示: DK/S11158 和 DK/S11301 株的 HA 基因遗传距离较远,位于两个不同的进化分支,核苷酸同源性为 84.7%, DK/S11158 株的 HA 基因与我国及日本韩国野鸟源 H8N4 亚型 AIV 的 HA 基因遗传距离较近(图 1), DK/S11301 株的 HA 基因与北美鸭源 H8N4 亚型 AIV 的 HA 基因遗传距离较近。NA 基因的进化树显示 DK/S11158 和 DK/S11301 株的 NA 基因遗传距离较远,位于两个不同的进化分支,核苷酸同源性为 83.2%, DK/S11158 株的 NA 基因与我国及韩国野鸟源、鸭源 AIV 的 NA 基因遗传距离较近, DK/S11301 株的 NA 基因与北美鸭源 AIV 的 NA 基因遗传距离较近(图 1)。

DK/S11158 和 DK/S11301 株各内部基因(PB2、PB1、PA、NP、M、NS)同源性分别为 94.2%、95.7%、92.3%、96.3%、97.4%、98.4%。内部基因进化树显示(图 2): DK/S11158 株的 PB2 基因与我国和韩国野鸟源的 H3N8、H4N6 亚型 AIV 位于同一个进化分支;

PB1 基因与我国和韩国鸭源和野鸟源的 H3N8、H4N6 亚型 AIV 位于同一个进化分支; PA 基因与韩国鸭源性 H5N1 亚型 AIV 位于同一个进化分支; NP 基因与日本鸭源性的 H7N7 亚型 AIV 位于同一个进化分支; M 基因与伊朗鸭源 H4N6 亚型 AIV 位于同一进化分支; NS 基因日本 H4N6、H3N8 亚型 AIV 位于同一进化分支。

DK/S11301 株的 PB2 基因与日本野鸟源的 H5N1 亚型 AIV 位于同一个进化分支; PB1 基因与日本鸡源性的 H5N1 亚型 AIV 位于同一个进化分支; PA 基因与日本野鸟源性 H5N1 亚型 AIV 位于同一个进化分支; NP 基因与我国和韩国野鸟源性的 H8N4 和 H3N8 亚型 AIV 位于同一个进化分支; M 基因与韩国野鸟源 H6N5 和 H3N8 亚型 AIV 位于同一进化分支; NS 基因与日本分离的 H1N8 和 H4N6 亚型 AIV 位于同一进化分支。

2.3 H8N4 亚型 AIV 全基因组各基因片段关键氨基酸位点分析

2 株 H8N4 亚型 AIV 各基因片段关键氨基酸位点分析结果表明, DK/S11158 和 DK/S11301 的 HA 蛋白裂解位点处氨基酸序列为 PSIEPK↓GLF,不存在连续的碱性氨基酸,符合 LPAIV 的分子特征。2 株病毒的 HA 蛋白都具有 226Q 和 228G 的结合禽型受体的分子特征,同时也存在 138V、155T 和 160A 的结合人型受体的分子特征,结果表明这 2 株病毒可能具有双受体结合特性。

2 株病毒内部基因编码的氨基酸序列分析结果显示内部蛋白存在增强哺乳动物适应性氨基酸位点的变异特征: PB2 蛋白出现 89V、309D、358E、389R; PB1 蛋白出现 3V、622G; PA 蛋白出现 37A、409S; NS1 蛋白出现 42S、106M 的突变,除此之外 DK/S11301 的 PB2 蛋白还存在 292V 的突变。提示 2 株 H8N4 亚型 AIV 对哺乳动物可能存在一定的感染性。

2.4 H8N4 亚型 AIV 的受体结合特性试验

本研究采用生物膜干涉技术评估 2 株 H8N4 亚型 AIV 的受体结合特性,结果显示(图 3)对照组 A/chicken/CQ/SD001/2021(H5N6)株仅结合 α -2,3-唾液酸受体、A/Kansas/14/2017(H3N2)株仅结合 α -2,6-唾液酸受体。DK/S11158 和 DK/S11301 均能结合 α -2,3-唾液酸和 α -2,6-唾液酸受体,具有双受体结合特性,且结合禽型受体能力更强。结果表明 DK/S11158 和 DK/S11301 都具有结合人型受体的能力,具有感染人类的潜在风险。

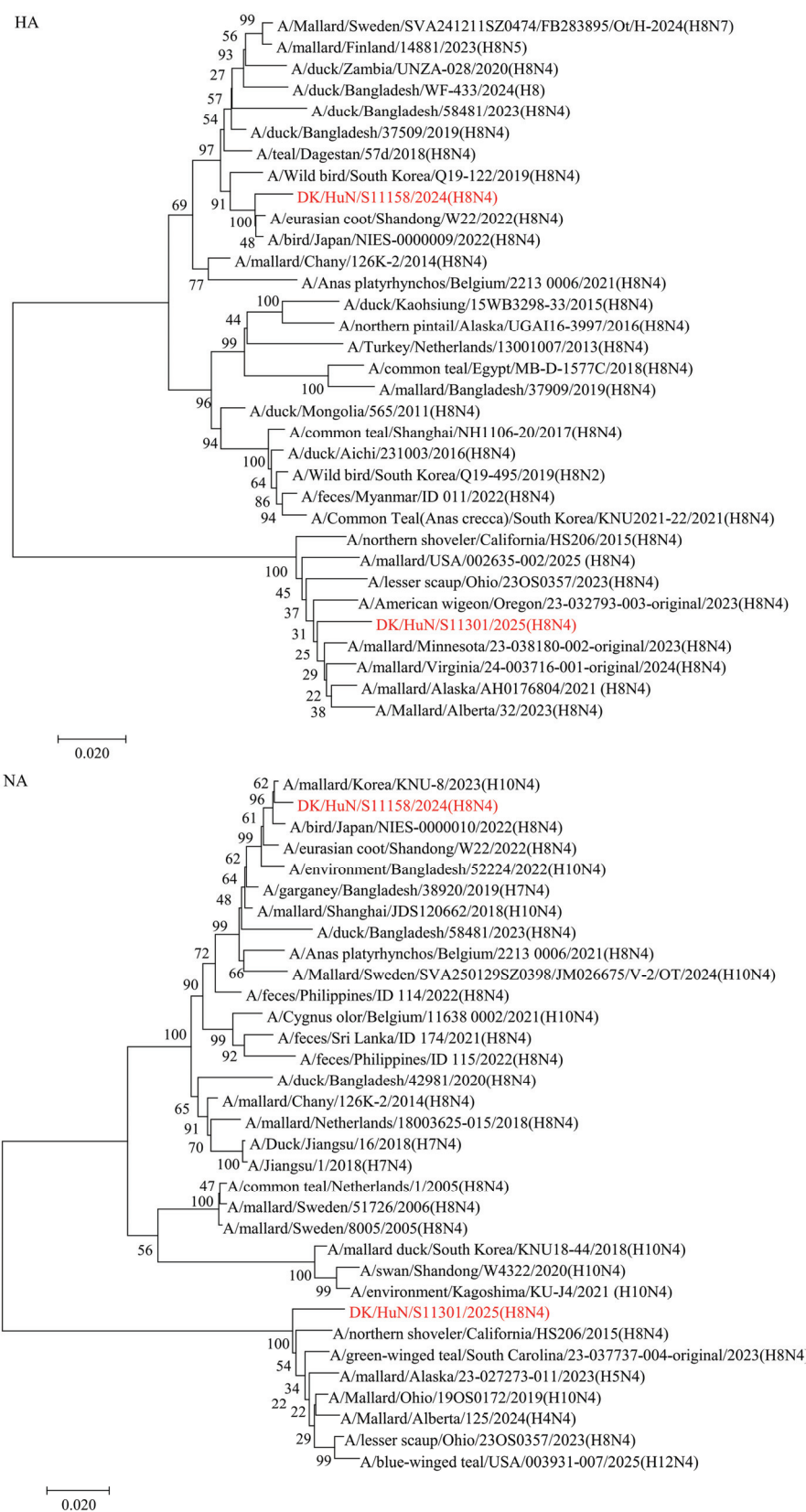


图 1 2 株 H8N4 亚型 AIV 的 HA 和 NA 基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of the two H8N4 subtype AIVs based on HA and NA gene

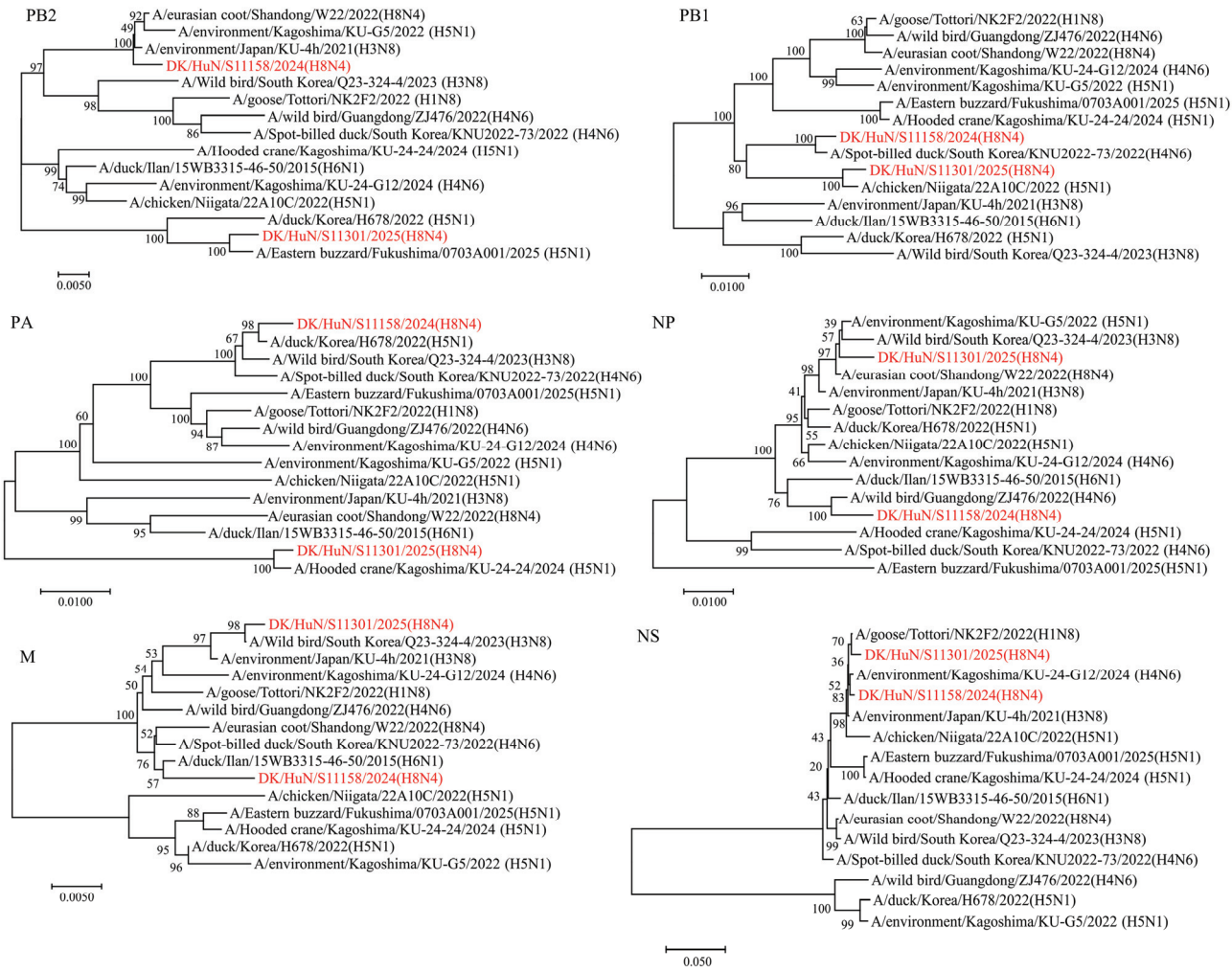


图 2 2 株 H8N4 亚型 AIV 内部基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees of the two H8N4 subtype AIVs based on internal genes

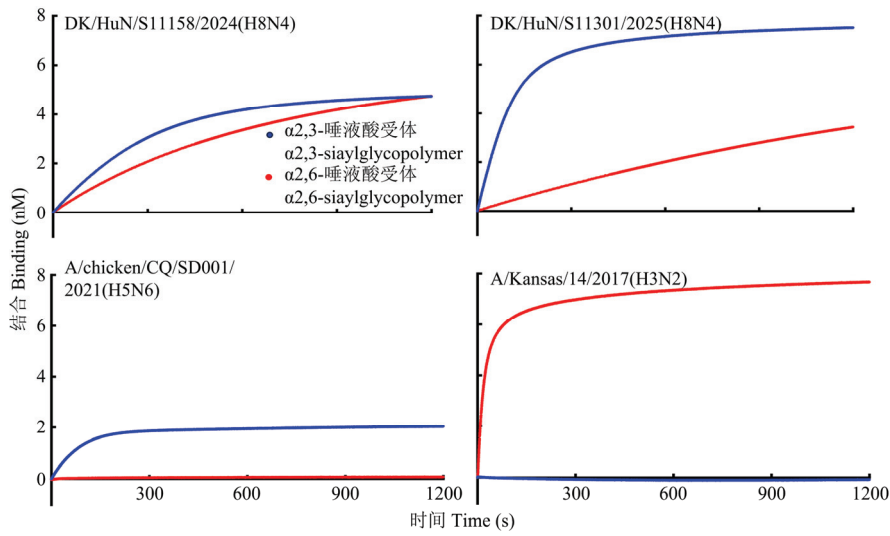


图 3 2 株 H8N4 亚型 AIV 受体结合特性

Fig. 3 Receptor-binding properties of the two H8N4 subtype AIVs

2.5 H8N4 亚型 AIV 对 SPF 鸡的感染性试验

为了探究 2 株 H8N4 亚型 AIV 对鸡的感染能力，以 10^6 EID₅₀/100 μ L 剂量鼻腔感染 SPF 鸡。结果显示（表 2 及表 3）感染 DK/S11158 和 DK/S11301 株的感染组鸡的各个脏器及咽喉拭子和泄殖腔拭子中均未检测到

病毒的滴度，传播组鸡的咽喉拭子和泄殖腔拭子中也未检测到病毒。感染 14 d 后对感染鸡的血清进行检测，仅 DK/S11158 感染组的 1 只鸡出现血清转阳。表明分离的 2 株 H8N4 亚型 AIV 对鸡的适应性差，在鸡体内的复制能力差，且不能够通过泄殖腔或咽喉排毒。

表 2 2 株 H8N4 亚型 AIV 感染 SPF 鸡后脏器复制情况

Table 2 The viral replication in organs of SPF chickens infected with two H8N4 subtype AIVs

病毒名称 Virus name	病毒感染 SPF 鸡复制情况（阳性数/总数） Replication of viral infection in SPF chickens (positive number/total number)										
	脑 Brain	气管 Trachea	胸腺 Thymus	肺脏 Lung	肾脏 Kidney	脾脏 Spleen	胰腺 Pancreas	心脏 Heart	肝脏 Liver	法氏囊 Bursa of Fabricius	盲肠 Cecum
DK/S11158	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
DK/S11301	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

表 3 感染 SPF 鸡后在特定时间采集咽喉拭子及泄殖腔拭子的病毒复制情况

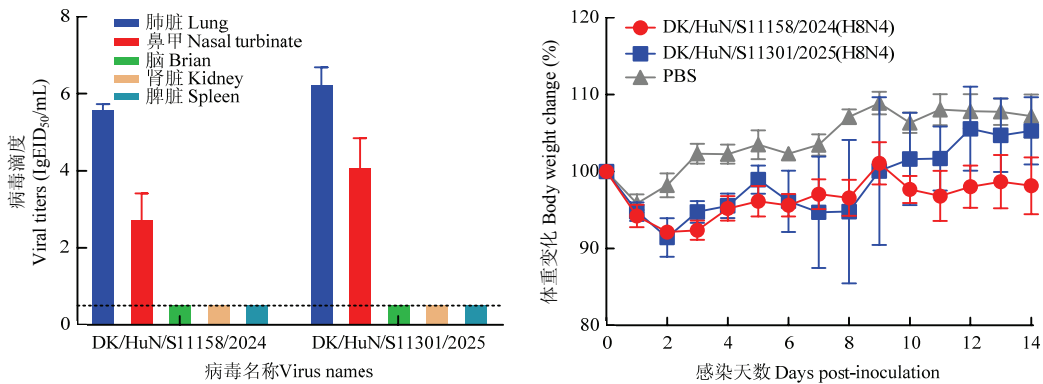
Table 3 Oropharyngeal and cloacal swab viral shedding in SPF chickens at specified time points post-infection

病毒名称 Virus name	感染组 Inoculated group									接触组 Contact group								
	咽喉拭子（阳性数/总数）				泄殖腔拭子				血清转阳	咽喉拭子（阳性数/总数）				泄殖腔拭子				血清转阳
	Oropharyngeal swab				（阳性数/总数）				Seroconversion	Oropharyngeal swab				（阳性数/总数）				Seroconversion
	(positive number/total				Cloacal swab (positive					(positive number/total				Cloacal swab (positive				
	number)				number/total number)					number)				number/total number)				
3d	5d	7d	9d	3d	5d	7d	9d		3d	5d	7d	9d	3d	5d	7d	9d		
DK/S11158	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DK/S11301	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

2.6 H8N4 亚型 AIV 对 BALB/c 小鼠的感染性试验

将 2 株病毒 DK/S11158 和 DK/S11301 经鼻腔分别感染 8 只 6 周龄的 BALB/c 雌鼠。感染第 3 天随机挑选 3 只感染组小鼠安乐死，取其脑、鼻甲、脾脏、

肾脏和肺脏置于内含头孢的 PBS 后进行研磨离心，取上清液 10 倍倍比稀释后接胚，37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后根据 Reed-Muench 法计算小鼠的不同脏器病毒滴度。结果显示（图 4）DK/S11158 和 DK/S11301 在小鼠的鼻甲



A: 感染第 3 天小鼠脏器鸡胚滴定结果; B: 感染后 14 天小鼠体重变化情况
A: Titration results of mice organs in chicken embryos on the third day of infection; B: Changes in mice body weight 14 days after infection.

图 4 小鼠脏器滴定结果及体重变化
Fig. 4 Organ viral titers and body weight changes in mice

和肺脏中都能够高效复制,感染 DK/S11158 组小鼠鼻甲和肺脏的病毒滴度分别为 $5.58 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 、 $2.75 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$,感染 DK/S11301 组小鼠鼻甲和肺脏的病毒滴度分别为 $6.25 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 、 $4.08 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$;小鼠的脾脏、肾脏和脑中均未检测到病毒存在。对剩余 5 只小鼠进行连续 14 d 的体重变化监测发现小鼠的体重呈现出一过性变化,接种病毒 4d 内体重分别下降 7.9%和 8.6%,随后随着时间的推移体重逐渐增加。对照组小鼠体重在 14 d 内稳步上升。结果表明 2 株 H8N4 亚型 AIV 能够在小鼠的呼吸道高效复制并引起体重一定程度下降,具有感染哺乳动物的风险。

3 讨论

3.1 H8N4 亚型禽流感病毒在全球鸟类中广泛流行

AIV 主要感染野鸟和家禽两大类禽鸟^[19],其中野鸟种类多、数量大、活动范围广,普遍对 AIV 易感^[20]。在野鸟中,候鸟每年随着季节变化在繁殖地与越冬地之间迁徙,能频繁地与当地禽类进行病毒间基因交换^[21]。水禽(主要是家鸭)多在开放水域中饲养,这种环境会增加与迁徙候鸟接触机会;同时,成年水禽(鸭)对 AIV 具有较强的耐受性,感染后往往不表现出临床症状,但仍可携带并传播多种亚型的 AIV,进而增加病毒向其他禽类(如鸡、鹌鹑)传播的风险^[22]。

H8 亚型 AIV 主要在野鸟中流行,在家禽中很少被检测到。截止到 2025 年 7 月,在 GISAID 网站共检索到 H8 亚型 AIV 的全基因组序列或部分序列共计 350 株,其中,H8N4 亚型病毒在全球鸟类中广泛流行,占有鉴定 H8 亚型病毒的 95%,并且 77.9%的病毒分离自野鸭。自 2005 年以来我国仅报道 5 株 H8N4 病毒。已有研究指出,H8 亚型病毒的 HA 基因已经进化成欧亚和北美两个不同的谱系,我国分离到的 H8 亚型病毒均属于欧亚谱系,且与分布在东亚-澳大利亚迁徙路线上的日本、韩国和孟加拉国的病毒具有较高的遗传相似性^[15]。

3.2 H8N4 亚型 AIV 表现出明显的遗传多样性

湖南省地形多样,水域辽阔,位于全球候鸟迁徙的重要交汇区域;且养禽业发达。这些自然与社会因素共同增加了家禽与候鸟接触的可能性,为 AIV 传播和新型重组病毒的产生提供了有利条件^[23-24]。本研究分离的病毒 DK/S11158 和 DK/S11301 均来源于湖南省养鸭场,进化分析结果显示这 2 株病毒的全基因组基因片段中有 6 个(HA、NA、PB2、PB1、PA 和

NP)分别归属于不同的进化分支,其来源各异,它们与 GISAID 数据库中不同亚型 AIV(如 H4N6、H8N4、H3N8、H5N1、H10N4 等)的多个基因片段具有较高的核苷酸同源性,而这些病毒大多来源于野鸟。其中,DK/S11158 的 HA 和 NA 基因与 ZHANG 等人于 2022 年在山东分离的 H8N4 亚型病毒高度相似,且均属于欧亚谱系;而 DK/S11301 的表面基因与其同源性则相对较低,仅为 80.7%—84.7%。因此,这两株 H8N4 亚型 AIV 的起源不同,可能是由来自不同迁徙路线的野鸟源病毒与我国本地野鸟病毒重组产生,在国内进一步演化并循环传播的结果。

3.3 H8N4 亚型 AIV 对公共卫生安全构成潜在威胁

氨基酸序列分析结果显示,DK/S11158 和 DK/S11301 株的 HA 蛋白裂解位点仅含有一个碱性氨基酸,符合 LPAIV 的分子特征,鸡感染性试验表明,2 株 H8N4 亚型 AIV 对鸡的感染性较差^[25],可能是由于这 2 株 H8N4 病毒的基因组尚未获得 NP 105V 和 109T 等增强鸡的适应性突变。对 HA 蛋白受体结合位点进行分析发现其具有 138V、155T 和 160A 等结合人型唾液酸受体的分子特征^[26-28]。传统的流感病毒受体结合特异性检测方法有红细胞吸附试验和固相结合 ELISA 试验,近年来 BLI 方法在流感病毒受体结合特异性检测过程中得到广泛应用,与传统方法相比,BLI 可以实时监测分子结合的整个过程、提供动力学参数,同时无需对病毒或受体进行荧光标记,避免了标记过程可能会改变分子天然结构和活性的风险^[29]。本研究利用 BLI 方法对 H8N4 亚型 AIV 的受体结合特异性进行检测,结果显示 2 株病毒对禽型和人型受体均有较强的结合能力,表现出双受体结合特性。进一步对其他蛋白的氨基酸位点进行分析,发现存在多个哺乳动物适应性相关的突变位点,表明这 2 株 H8N4 亚型 AIV 对哺乳动物具有一定的感染性。小鼠感染性试验结果显示,病毒能在小鼠的呼吸系统进行高效复制,并且引起小鼠一定程度的体重下降。

4 结论

本研究系统分析了 2024—2025 年在湖南省某养鸭场分离到的 2 株 H8N4 亚型 AIV 的生物学特性,结果表明这 2 株 H8N4 亚型 AIV 为新型重组病毒,可能是在与中国周边国家野鸟及家禽携带的 AIV 发生基因交换后形成的。这 2 株病毒具有禽型和人型双受体结合特性,在鸡群中复制较弱,但可在小鼠体内有效复制,显示出潜在的跨物种感染人类的能力,对公共卫

生构成一定威胁。因此, 建议相关行业部门应该加强水禽养殖场的日常管理和定期监测, 避免家禽与野鸟间频繁的接触, 切断病毒传播链。

参考文献 References

- [1] KARAKUS U, MENA I, KOTTUR J, EL ZAHED S S, SEOANE R, YILDIZ S, CHEN L, PLANCARTE M, LINDSAY L, HALPIN R, *et al.* H19 influenza A virus exhibits species-specific MHC class II receptor usage. *Cell Host & Microbe*, 2024, 32(7): 1089-1102.e10.
- [2] WU Y, WU Y, TEFSER B, SHI Y, GAO G F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(4): 183-191.
- [3] 赵晴晴, 李群辉, 朱杰, 钟蕾, 刘晶晶, 顾敏, 王晓泉, 刘文博, 刘秀梵. 一株鸭源 H4N8 亚型禽流感病毒的全基因测序及遗传进化分析. *中国农业科学*, 2015, 48(15): 3040-3049. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2015.15.014.
- ZHAO Q Q, LI Q H, ZHU J, ZHONG L, LIU J J, GU M, WANG X Q, LIU W B, LIU X F. Genome sequencing and genetic analysis of H4N8 Subtype avian influenza virus isolated from duck. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(15): 3040-3049. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2015.15.014. (in Chinese)
- [4] SHI J Z, ZENG X Y, CUI P F, YAN C, CHEN H L. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(1): 2155072.
- [5] CUI P F, SHI J Z, WANG C C, ZHANG Y C, XING X, KONG H H, YAN C, ZENG X Y, LIU L L, TIAN G B, *et al.* Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1693-1704.
- [6] FERRO P J, KHAN O, PETERSON M J, BATCHULUUN D, REDDY S M, LUPIANI B. Avian influenza virus surveillance in hunter-harvested waterfowl, Texas coast, September 2009-January 2010. *Avian Diseases*, 2012, 56(4 Suppl.): 1006-1009.
- [7] TONG S X, ZHU X Y, LI Y, SHI M, ZHANG J, BOURGEOIS M, YANG H, CHEN X F, RECUENCO S, GOMEZ J, *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): e1003657.
- [8] GAO R B, CAO B, HU Y W, FENG Z J, WANG D Y, HU W F, CHEN J, JIE Z J, QIU H B, XU K, *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368(20): 1888-1897.
- [9] LI Q, ZHOU L, ZHOU M H, CHEN Z P, LI F R, WU H Y, XIANG N J, CHEN E F, TANG F Y, WANG D Y, *et al.* Epidemiology of human infections with avian influenza a(H7N9) virus in China. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370(6): 520-532.
- [10] CHEN H Y, YUAN H, GAO R B, ZHANG J X, WANG D Y, XIONG Y, FAN G Y, YANG F, LI X D, ZHOU J F, *et al.* Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: A descriptive study. *Lancet*, 2014, 383(9918): 714-721.
- [11] QI X, QIU H B, HAO S X, ZHU F C, HUANG Y Z, XU K, YU H Y, WANG D W, ZHOU L, DAI Q G, *et al.* Human infection with an avian-origin influenza a (H10N3) virus. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 386(11): 1087-1088.
- [12] BUSQUETS N, ALBA A, NAPP S, SÁNCHEZ A, SERRANO E, RIVAS R, NÚÑEZ J I, MAJÓ N. Influenza A virus subtypes in wild birds in North-Eastern Spain (Catalonia). *Virus Research*, 2010, 149(1): 10-18.
- [13] MUZYKA D, PANTIN-JACKWOOD M, SPACKMAN E, SMITH D, RULA O, MUZYKA N, STEGNIY B. Isolation and genetic characterization of avian influenza viruses isolated from wild birds in the azov-black sea region of Ukraine (2001–2012). *Avian Diseases*, 2016, 60(1, Suppl.): 365-377.
- [14] TANG W, LI X, HU C H, ZHU C, LI Z, WU D, WANG T, HE G. Isolation of H8N4 avian influenza virus from wild birds in Shanghai, China. *Acta Virologica*, 2019, 63(1): 121-125.
- [15] ZHANG H, GUO J, PENG P, WANG M J, SHEN J Y, SUN X H, GUAN M D, CUI P F, DENG G H, CHU D, LI X Y. Evolution and biological characteristics of the circulated H8N4 avian influenza viruses. *Journal of Integrative Agriculture*, 2025, 24(6): 2342-2355.
- [16] 王晶, 张芳, 卢坤鹏, 关立峥, 肖丽, 彭志, 邓国华, 陈化兰. 一株鸭源 H8N4 亚型禽流感病毒分离株的全基因组序列分析及致病性的研究. *中国预防兽医学报*, 2014(12): 922-925.
- WANG J, ZHANG F, LU K P, GUAN L Z, XIAO L, PENG Z, DENG G H, CHEN H L. Sequence analysis and pathogenicity of a H8N4 subtype avian influenza virus isolated from duck. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014(12): 922-925. (in Chinese)
- [17] 陈源, 崔鹏飞, 施建忠, 邓国华, 陈化兰. 5 株 H6N3 亚型禽流感病毒的分子特征及遗传演化分析. *中国家禽*, 2024(11): 70-77.
- CHEN Y, CUI P F, SHI J Z, DENG G H, CHEN H L. Molecular characterization and phylogenetic analysis of 5 strains of H6N3 subtype avian influenza virus. *China Poultry*, 2024(11): 70-77. (in Chinese)
- [18] 崔鹏飞, 颜成, 林维鹏, 王丛丛, 王燕, 陈源, 缪葭皓, 朱春成, 施建忠, 邓国华, 陈化兰. 一株鸭源 H1N4 亚型禽流感病毒的遗传演化分析及其对小鼠的感染性研究. *中国预防兽医学报*, 2024(12):

- 1215-1221.
- CUI P F, YAN C, LIN W P, WANG C C, WANG Y, CHEN Y, MIAO J H, ZHU C C, SHI J Z, DENG G H, CHEN H L. Phylogenetic analysis of an H1N4 subtype avian influenza virus isolated from duck and its infectivity to mice. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024(12): 1215-1221. (in Chinese)
- [19] FOUCHIER R A M, MUNSTER V, WALLENSTEN A, BESTEBROER T M, HERFST S, SMITH D, RIMMELZWAAN G F, OLSEN B, OSTERHAUS A D M E. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [20] REN H G, JIN Y, HU M D, ZHOU J, SONG T, HUANG Z S, LI B P, LI K W, ZHOU W, DAI H M, SHI W F, YUE J J, LIANG L. Ecological dynamics of influenza A viruses: Cross-species transmission and global migration. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36839.
- [21] KIDA H, YANAGAWA R, MATSUOKA Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infection and Immunity*, 1980, 30(2): 547-553.
- [22] VERHAGEN J H, HÖFLE U, VAN AMERONGEN G, VAN DE BILDT M, MAJOR F, FOUCHIER R A M, KUIKEN T. Long-term effect of serial infections with H13 and H16 low-pathogenic avian influenza viruses in black-headed gulls. *Journal of Virology*, 2015, 89(22): 11507-11522.
- [23] 彭志. 2014~2015 年环洞庭湖与鄱阳湖散养鸭群禽流感病毒感染情况调查[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- PENG Z. Investigation of infection of avian influenza in domestic duck in Dongting Lake and Pouang Lake from 2014 to 2015 [D]. changsha: Hunan Agricultural University, 2016. (Chinese)
- [24] DENG G H, TAN D, SHI J Z, CUI P F, JIANG Y P, LIU L L, TIAN G B, KAWAOKA Y, LI C J, CHEN H L. Complex reassortment of multiple subtypes of avian influenza viruses in domestic ducks at the Dongting Lake Region of China. *Journal of Virology*, 2013, 87(17): 9452-9462.
- [25] SUTTIE A, DENG Y M, GREENHILL A R, DUSSART P, HORWOOD P F, KARLSSON E A. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses. *Virus Genes*, 2019, 55(6): 739-768.
- [26] NAUGHTIN M, DYASON J C, MARDY S, SORN S, VON ITZSTEIN M, BUCHY P. Neuraminidase inhibitor sensitivity and receptor-binding specificity of Cambodian clade 1 highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(5): 2004-2010.
- [27] WATANABE Y, IBRAHIM M S, ELLAKANY H F, KAWASHITA N, MIZUIKE R, HIRAMATSU H, SRIWILAIJAROEN N, TAKAGI T, SUZUKI Y, IKUTA K. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(5): e1002068.
- [28] WANG W J, LU B, ZHOU H, SUGUITAN A L Jr, CHENG X, SUBBARAO K, KEMBLE G, JIN H. Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *Journal of Virology*, 2010, 84(13): 6570-6577.
- [29] SHI J Z, KONG H H, CUI P F, DENG G H, ZENG X Y, JIANG Y P, HE X J, ZHANG X F, CHEN L, ZHUANG Y C, *et al.* H5N1 virus invades the mammary glands of dairy cattle through 'mouth-to-teat' transmission. *National Science Review*, 2025, 12(9): 1-12.

(责任编辑 林鉴非)