

研究报告

猪流感病毒广东分离株遗传进化与致病性分析

尧建辉¹, 韩慧², 扈嘉琪¹, 严利明¹, 黄良宗^{1*}

1 佛山大学 动物科技学院, 广东 佛山 528225

2 内蒙古科迪检测有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010000

尧建辉, 韩慧, 扈嘉琪, 严利明, 黄良宗. 猪流感病毒广东分离株遗传进化与致病性分析[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 461-478.

YAO Jianhui, HAN Hui, HU Jiaqi, YAN Liming, HUANG Liangzong. Genetic evolution and pathogenicity of swine influenza viruses isolated from Guangdong Province[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 461-478.

摘要: 【背景】我国养猪业正面临猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)的严峻挑战, 流行毒株主要包括 H1N1、H3N2 和 H1N2 等, 持续威胁养猪业的健康发展。【目的】深入剖析广东地区猪流感病毒的流行毒株遗传进化特征, 并对其致病性进行系统评估。【方法】2021–2023 年间, 从广东省佛山、肇庆、清远、韶关等地级市的 21 个猪场采集疑似感染 SIV 的鼻拭子和肺脏病料样品共 536 份, 其中 45 份样品经 RT-qPCR 测定为 SIV 阳性, 采用犬肾上皮(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞分离培养病毒, 并进行全基因组测序分析。将所得序列与 GenBank 和 GISAID 收录的参考毒株序列进行比对, 并构建进化树, 揭示病毒的遗传进化特征。【结果】本研究成功分离到 4 株 SIV, 其中 2 株 EA H1N1 亚型 SIV (SWSG1/21, SWHRZ3/22), 其 HA 和 NA 基因源自 EA 分支, 其他基因片段(PB2, PA, PB1, NP, M)源自 Pdm/09 分支, NS 基因则源于 TR H1N2 分支。另分离到 2 株 H1N2 亚型重配毒株(SWLFT4/22, SWHH5/23), 其中 SWLFT4/22 由 NA H1N2 分支与 Pdm/09 H1N1 分支毒株重配而成, 而 SWHH5/23 则涉及 3 个不同分支毒株的复杂重配。致病性试验结果表明, 所有 4 株 SIV 均能导致小鼠死亡, 尤其是 SWSG1/21 和 SWLFT4/22 表现出较强的致病性, 死亡率高达 100%。【结论】本研究通过对广东地区猪群分离的 4 株 SIV 进行遗传进化和致病性分析, 揭示了当地 SIV 复杂的基因重组背景及较强的致病性, 为猪流感的防控策略制定提供了关键科学依据。**关键词:** 猪流感病毒; 遗传进化分析; 关键氨基酸位点分析; 致病性

资助项目: 广东省研究生教育创新计划(2023ALK_080)

This work was supported by the Graduate Education Innovation Project of Guangdong Province (2023ALK_080).

*Corresponding author. E-mail: liangzonghuang@fosu.edu.cn

Received: 2025-05-28; Accepted: 2025-06-27; Published online: 2025-07-22

Genetic evolution and pathogenicity of swine influenza viruses isolated from Guangdong Province

YAO Jianhui¹, HAN Hui², HU Jiaqi¹, YAN Liming¹, HUANG Liangzong^{1*}

1 School of Animal Science and Technology, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China

2 Inner Mongolia Kedi Testing Co., Ltd., Hohhot 010000, Inner Mongolia, China

Abstract: **[Background]** China's pig industry is facing severe challenges from swine influenza virus (SIV), and the epidemic strains mainly include H1N1, H3N2 and H1N2, which continue to threaten the healthy development of the pig industry. **[Objective]** The objective of this study was to analyze the genetic evolution characteristics and systematically evaluate the pathogenicity of the circulating strains of SIV in Guangdong Province. **[Methods]** From 2021 to 2023, a total of 536 nasal swabs and lung lesion samples suspected of SIV infection were collected from 21 pig farms in Foshan, Zhaoqing, Qingyuan, Shaoguan and other prefecture-level cities in Guangdong Province, of which 45 samples were tested positive for SIV by quantitative RT-qPCR. The virus strains were isolated by culture with MDCK cells and then whole genome sequencing was performed. The obtained sequences were compared with those of the reference strains in GenBank and GISAID, and a phylogenetic tree was constructed to reveal the genetic evolution characteristics of the virus. **[Results]** Two SIV strains (SWSG1/21 and SWHRZ3/22) of EA H1N1 subtype were isolated, with *HA* and *NA* genes derived from the EA clade, *PB2*, *PA*, *PB1*, *NP*, and *M* genes derived from the Pdm/09 clade, and the *NS* gene derived from the TR H1N2 clade. In addition, two H1N2 subtype reassortant strains (SWLFT4/22 and SWHH5/23) were isolated. SWLFT4/22 was reassorted from strains of the NA H1N2 clade and Pdm/09 H1N1 clade, while SWHH5/23 involved the complex reassortment of strains from three different clades. The results of the pathogenicity test showed that all the four strains of SIV caused death in mice. Particularly, SWSG1/21 and SWLFT4/22 showed strong pathogenicity, leading to a mortality rate of up to 100%. **[Conclusion]** We analyzed the genetic evolution and pathogenicity of four SIV strains isolated from pigs in Guangdong Province and revealed the complex genetic recombination background and strong pathogenicity of local SIV, which provided a scientific basis for the formulation of swine influenza prevention and control strategies.

Keywords: swine influenza virus; genetic evolution analysis; key amino acid site analysis; pathogenicity

猪流感(swine influenza, SI)是由猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)引起的一种猪急性、热性、高度接触性呼吸道传染病,发病急且传播迅速^[1]。猪的呼吸道上皮细胞因同时具有人和禽流感病毒的受体,能同时感染人流感病毒与禽流感病毒,不同来源的SIV在猪体内复制过程中可发生基因重组,产生新的SIV亚

型,从而被称为流感病毒的“混合器”^[2-3]。鉴于SIV在猪群中的广泛存在与易传播性,SIV与人流感病毒的研究紧密相连,这凸显了SI研究在公共卫生领域的重要性。

目前,全球范围内流行的SIV主要亚型为H1N1、H1N2和H3N2^[4]。1978年,日本首次在猪群中分离到H1N2亚型流感病毒^[5]。此后在

亚洲其他地区、欧洲及北美等地区都在猪群中分离到了这一亚型病毒^[6-9]。在我国,1991年首次分离出第1株经典猪流感病毒(classical swine H1N1 swine influenza virus, CS H1N1 SIV)以后^[10],我国 CS H1N1 SIV 分离率也随之逐年增加^[11]。1993年,我国学者从南方地区猪群中首次分离到类禽 H1N1 SIV,病毒8个基因片段均来源于禽流感病毒,与欧亚系禽流感样 H1N1 猪流感病毒(Eurasian Avian-like H1N1 swine influenza virus, EA H1N1 SIV)处于同一进化分支^[12],并自2001年后,EA H1N1 SIV 已逐渐成为我国的主要流行毒株^[13]。2004年开始陆续在国内的猪群中分离到不同基因节段组成的 H1N2 亚型 SIV^[14-15]。2009年,在全球范围内暴发了甲型 H1N1 大流感(2009 pandemic H1N1, Pdm/09 H1N1)的大流行并迅速传入猪群中,由此产生了多种含有 Pdm/09 H1N1 基因节段的 H1N2 亚型 SIV^[16-18]。近几年的研究发现,H1N1 毒株不仅引起上呼吸道感染,在某些情况下还会导致下呼吸道感染^[19]。另外,某些 H1N1 毒株与人类病毒株具有高度相似性,表明病毒可能在人类与动物之间传播^[20]。2009年的 H1N1 大流行还增加了孕妇的不良妊娠结局风险^[21]。

鉴于 SI 的严重危害及其在公共卫生学中的重要地位,本研究旨在调查广东省猪群中的 SIV 流行毒株的遗传进化特征,并评估其对小鼠的致病性,为制定有效的 SI 防控策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

于2021-2023年期间,从广东省佛山、肇庆、清远、韶关等地市的21个猪场采集疑似感染 SIV 的鼻拭子和肺脏病料样品共计536份。犬肾上皮(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞由佛山大学预防兽医学重点实验室保存;5周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 雌性小鼠,广东药康生物科技有限公司。动物实验严格遵循相关实验动物福利法规,并通过佛山大

学实验动物伦理审查(批准号:1198036623)。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

DMEM 高糖培养基,大连美仑生物技术有限公司。RNA 抽提试剂盒、PCR 扩增酶、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;1×DPBS,广州硕谱生物科技有限公司;多聚甲醛通用型组织固定液,合肥白鲨生物科技有限公司。全自动组织快速研磨仪,上海净信实业有限公司;二氧化碳培养箱,益世科生物有限公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司。

1.3 病毒分离鉴定

通过 RT-qPCR 检测出 SIV 阳性样品,4℃、8 000×g 离心 5 min 取阳性样品上清液接种于生长良好的 MDCK 单层细胞上,加入含 1 μg/mL 胰蛋白酶消化液的 DMEM 高糖培养基中作为细胞维持液,并在 37℃ 培养箱中孵育 1 h,弃去液体并用 1×DPBS 清洗 3 遍后加入无血清的 DMEM 高糖培养基维持培养,72 h 后收获细胞并反复冻融 3 次,通过 RT-qPCR 检测细胞液中是否含有 SIV,RT-qPCR 的检测均委托生工生物工程(广州)股份有限公司完成。

1.4 病毒 RNA 宏基因组测序与分析

使用 VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina 对提取的病毒核酸依次进行目标 RNA 提取、片段化处理、双链 cDNA 合成、接头连接、纯化分选及文库扩增,将所构建的基因组文库送至诺禾致源科技股份有限公司开展高通量测序。使用 FastP v0.21.0 软件对 clean data 进行质控,通过 Bowtie 2 软件建立猪宿主基因组的索引及序列比对,将未比对到宿主的序列使用 megahit 进行拼接。以 GenBank 病毒核苷酸数据库和病毒氨基酸数据库与 GISAID 流感数据库作为参考,将拼接获取的重叠群进行病毒序列比对注释。

1.5 分离株遗传进化分析

通过 NCBI 网站的在线 BLAST 工具对 SIV

基因进行序列比对和相似性分析。从 GenBank 和 GISAID 流感数据库中下载参考序列,使用 ClustalW 进行序列比对。基于 neighbor-joining 方法构建系统发育树,bootstrap 值设定为 1 000。

1.6 小鼠致病性试验

将 15 只 5 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠分成 5 组,每组 3 只,第 1-4 组分别滴鼻感染 4 株 SIV 病毒液(10^6 TCID₅₀/mL, 50 μ L/只);第 5 组滴鼻感染同等体积的 PBS 作为阴性对照组。从攻毒当日起,记录小鼠体质量变化及临床症状,持续至第 14 天。小鼠体质量减少若超过 25%则视为死亡,并进行安乐死。攻毒后第 3 天和第 6 天剖检观察肺脏病变并采集病料进行 RT-qPCR

检测。取部分肺脏组织放入多聚甲醛通用型组织固定液中进行固定,用以制作病理切片的样本,该病理切片制作工作委托武汉塞维尔生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 SIV 的分离与鉴定结果

通过 RT-qPCR 从 536 份样品中检测出 118 份 SIV 阳性样品,将 C_t 值低于 30 的 45 份阳性样品接种 MDCK 细胞进行病毒分离和鉴定。盲传至 3 代后,有 4 份接种阳性样品的细胞在 2 d 内局部出现细胞变圆皱缩、细胞崩解、脱落等细胞病变效应(图 1)。



图 1 猪流感病毒引起犬肾上皮细胞病变(10 \times) A: SIV 感染 24 h 后细胞病变图; B: SIV 感染 48 h 后细胞病变图; C: SIV 感染 60 h 后细胞病变图; D: 24 h 未感染 SIV 正常细胞图; E: 48 h 未感染 SIV 正常细胞图; F: 60 h 未感染 SIV 正常细胞图。

Figure 1 Swine influenza virus (SIV) cytopathic effects in Madin-Darby Canine Kidney cells (10 \times). A: Cell lesion map after 24 hours of SIV infection; B: Cell lesion map after 48 hours of SIV infection; C: Cell lesion map after 60 hours of SIV infection; D: 24 hours normal cell diagram; E: 48 hours normal cell diagram; F: 60 hours normal cell diagram.

2.2 病毒分离株全基因组序列测定与核苷酸遗传进化分析

四株病毒通过高通量测序与生物信息学分析,均拼接得到 SIV 8 个片段的近全长序列,将这 4 株 SIV 全部进行 HA 基因和 NA 基因测序,结果鉴定为 2 株 H1N1 亚型和 2 株 H1N2 亚型。将这 4 株分离株分别命名为:A/swine/Guangdong/SG1/2021(H1N1) (SWSG1/21)、A/swine/Guangdong/

HRZ3/2022(H1N1) (SWHRZ3/22)、A/swine/Guangdong/LFT4/2022(H1N2) (SWLFT4/22)、A/swine/Guangdong/HH5/2023(H1N2) (SWHH5/23)。

四株 SIV 分离株的 HA 基因遗传进化分析结果显示,SWLFT4/22 与 SWHH5/23 分离株的 HA 基因都处于 Pdm/09 H1N1 分支。SWSG1/21 与 SWHRZ3/22 分离株的 HA 基因都处于 EA H1N1 分支中(图 2)。

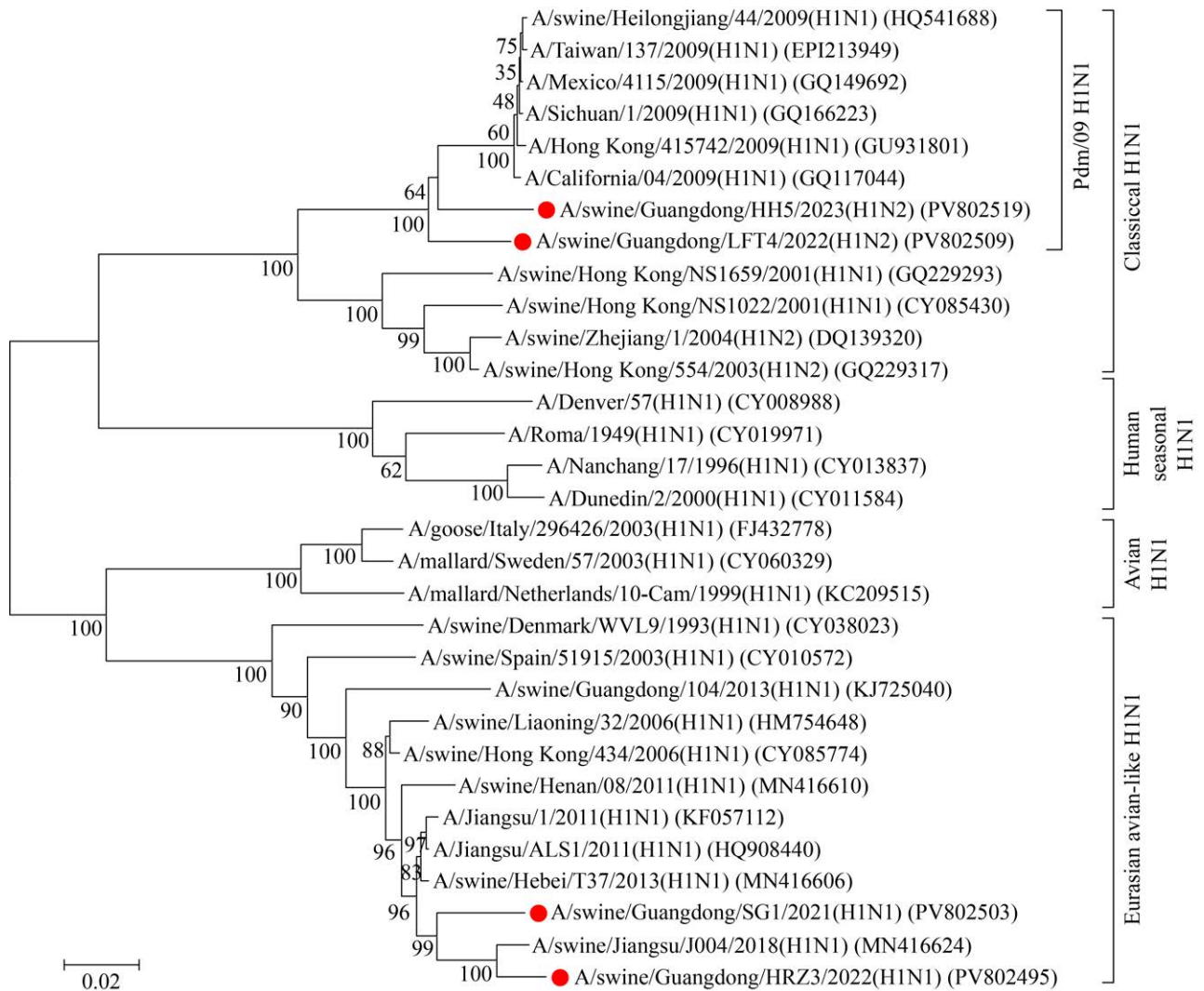


图 2 四株猪流感病毒分离株 HA 基因的系统发育树分析 分支点上数字表示通过重复 1 000 次构建进化树得出的 bootstrap 值; 参考毒株后括号内数值为 GenBank 序列号; 比例尺代表进化距离。下同。

Figure 2 Phylogenetic analysis of the HA gene of four swine influenza virus (SIV) isolates. The numbers on the branch points indicate the bootstrap values obtained by constructing the phylogenetic tree 1 000 replicates; The numbers in parentheses following the reference strains represent the GenBank accession numbers; The scale bar represents the evolutionary distance. The same below.

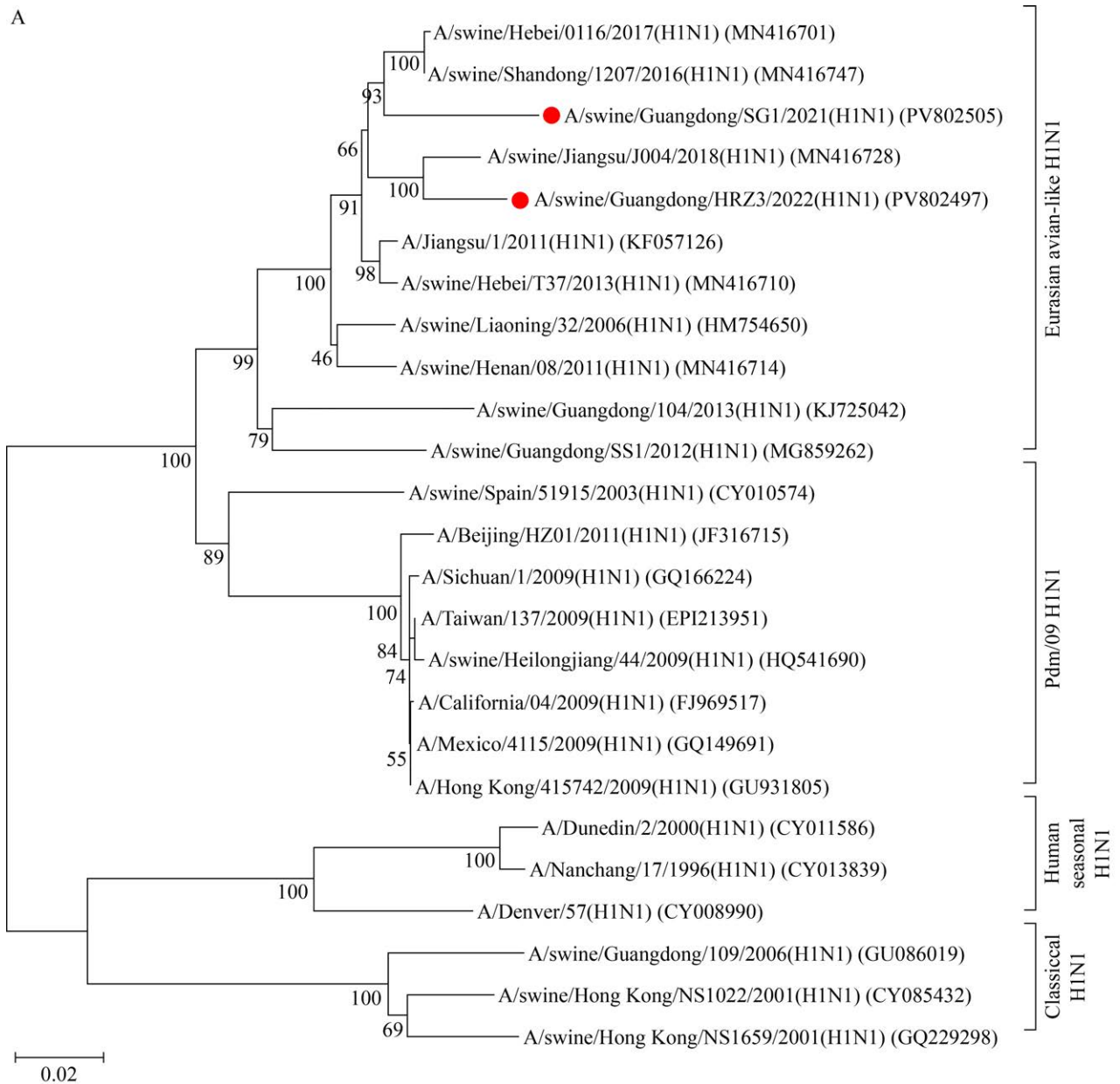
四株 SIV 分离株的 *NA* 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21 和 SWHRZ3/22 分离株的 *NA* 基因均处于 EA H1N1 分支(图 3A); SWLFT4/22 与 SWHH5/23 分离株都处于 NA H1N2 分支(图 3B), 并且 SWLFT4/22 与 SWHH5/23 分离株之间亲缘关系较近。

四株 SIV 分离株的 *PB2* 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22、LFT4/2022 和 SWHH5/23 分离株的内部基因 *PB2* 均来源于

Pdm/09 H1N1 谱系(图 4)。

四株 SIV 分离株的 *PB1* 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22、LFT4/2022 和 SWHH5/23 分离株的内部基因 *PB1* 均来源于 Pdm/09 H1N1 谱系(图 5)。

四株 SIV 分离株的 *PA* 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22、LFT4/2022 和 SWHH5/23 分离株的内部基因 *PA* 均来源于 Pdm/09 H1N1 谱系(图 6)。



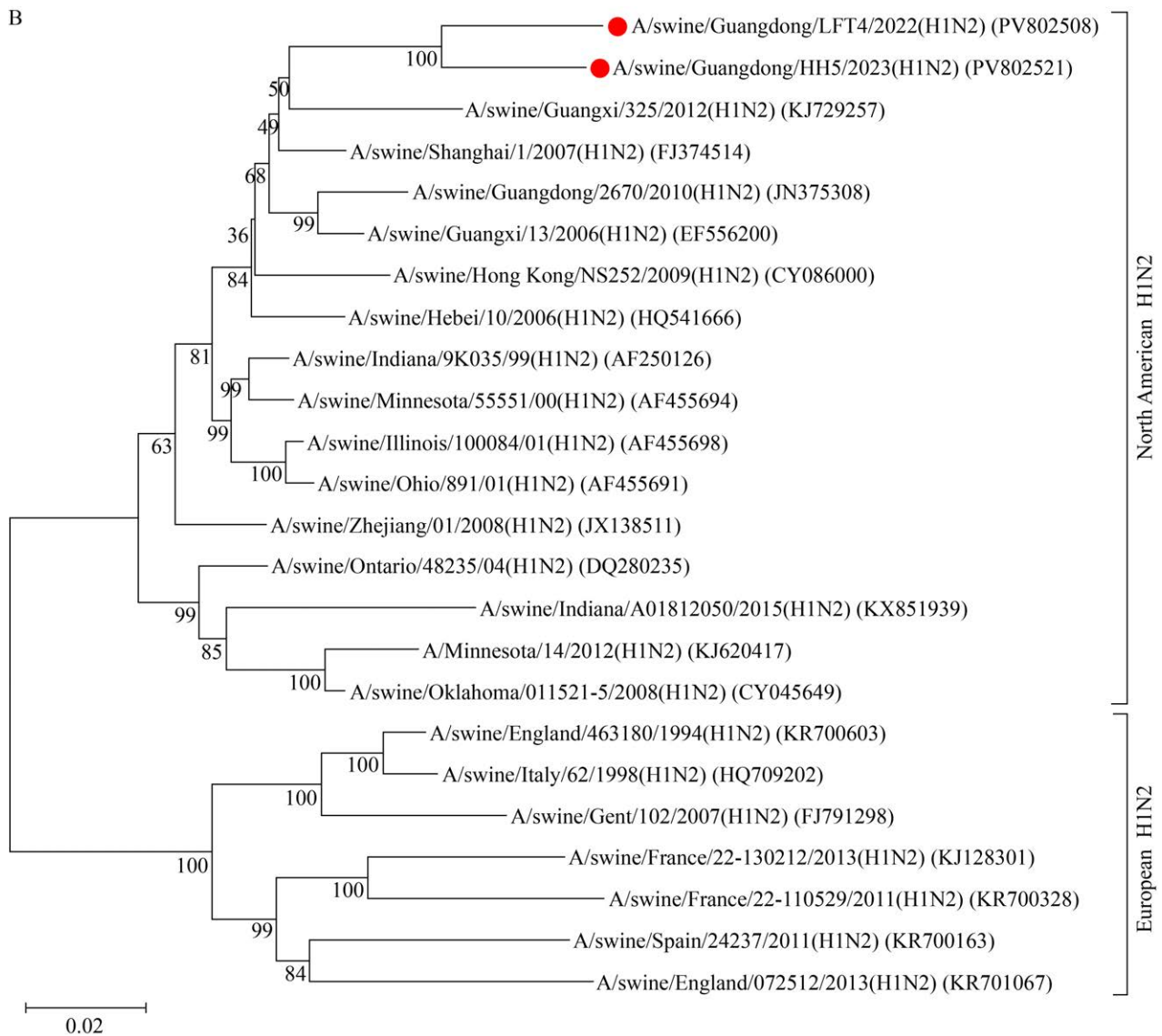


图 3 四株猪流感病毒分离株 NA 基因的系统发育树分析 A: 神经氨酸酶基因 N1 亚型; B: 神经氨酸酶基因 N2 亚型。

Figure 3 Phylogenetic analysis of the NA gene of four swine influenza virus (SIV) isolates. A: the N1 subtype of the neuraminidase gene; B: the N2 subtype of the neuraminidase gene.

四株 SIV 分离株的 NP 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22、LFT4/2022 和 SWHH5/23 分离株的内部基因 NP 均来源于 Pdm/09 H1N1 谱系(图 7)。

四株 SIV 分离株的 M 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22 和 LFT4/2022 分离株的内部基因 M 均来源于 Pdm/09 H1N1

谱系, 而 SWHH5/23 分离株的内部基因 M 来源于 EA H1N1 谱系(图 8)。

四株 SIV 分离株的 NS 基因遗传进化分析结果显示, SWSG1/21、SWHRZ3/22、LFT4/2022 和 SWHH5/23 分离株的内部基因 NS 均来源于北美三元重组 H1N2 (North American triple reassortant H1N2, TR H1N2 SIV)谱系(图 9)。

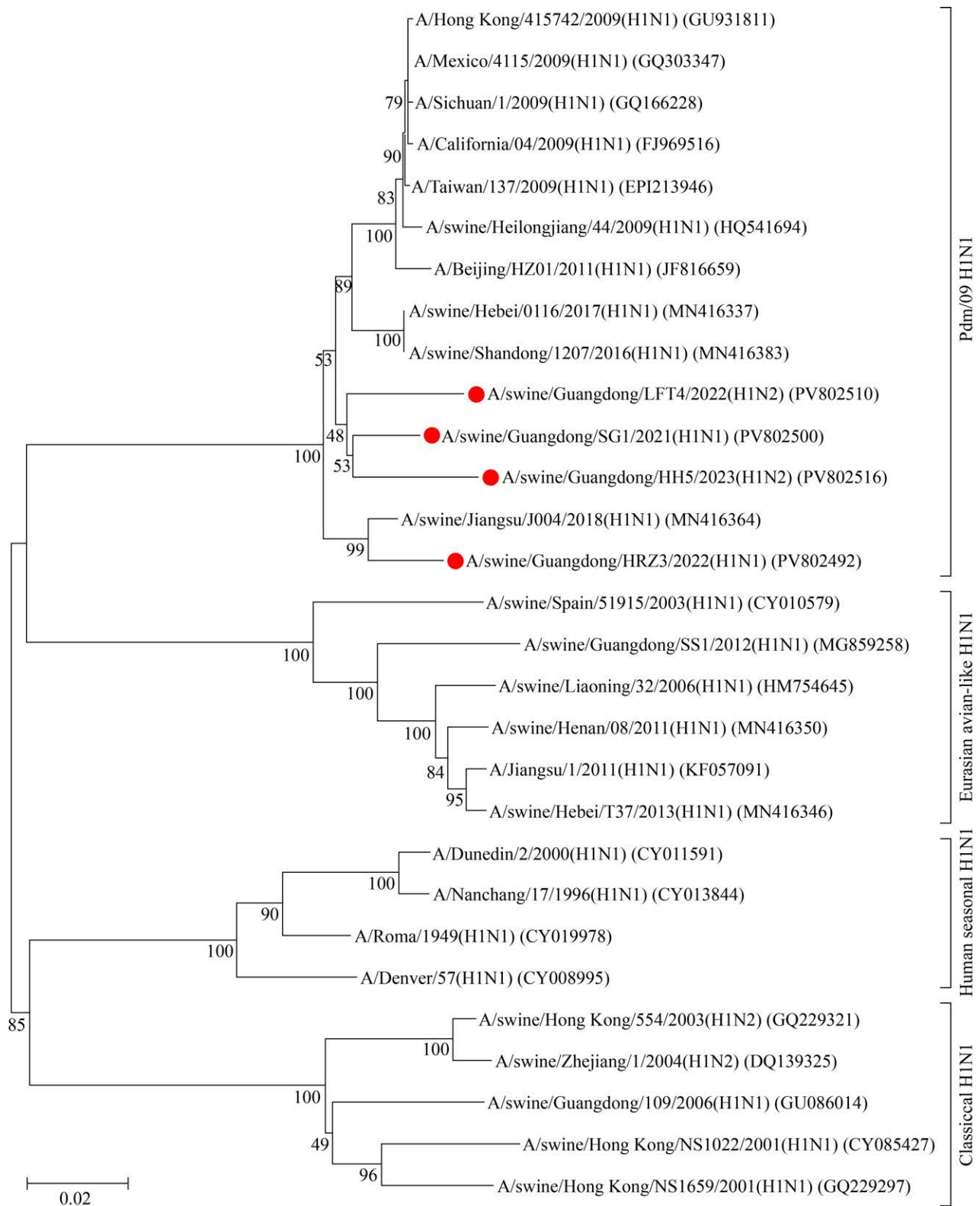


图 4 四株猪流感病毒分离株 *PB2* 基因的系统发育树分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of the *PB2* gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

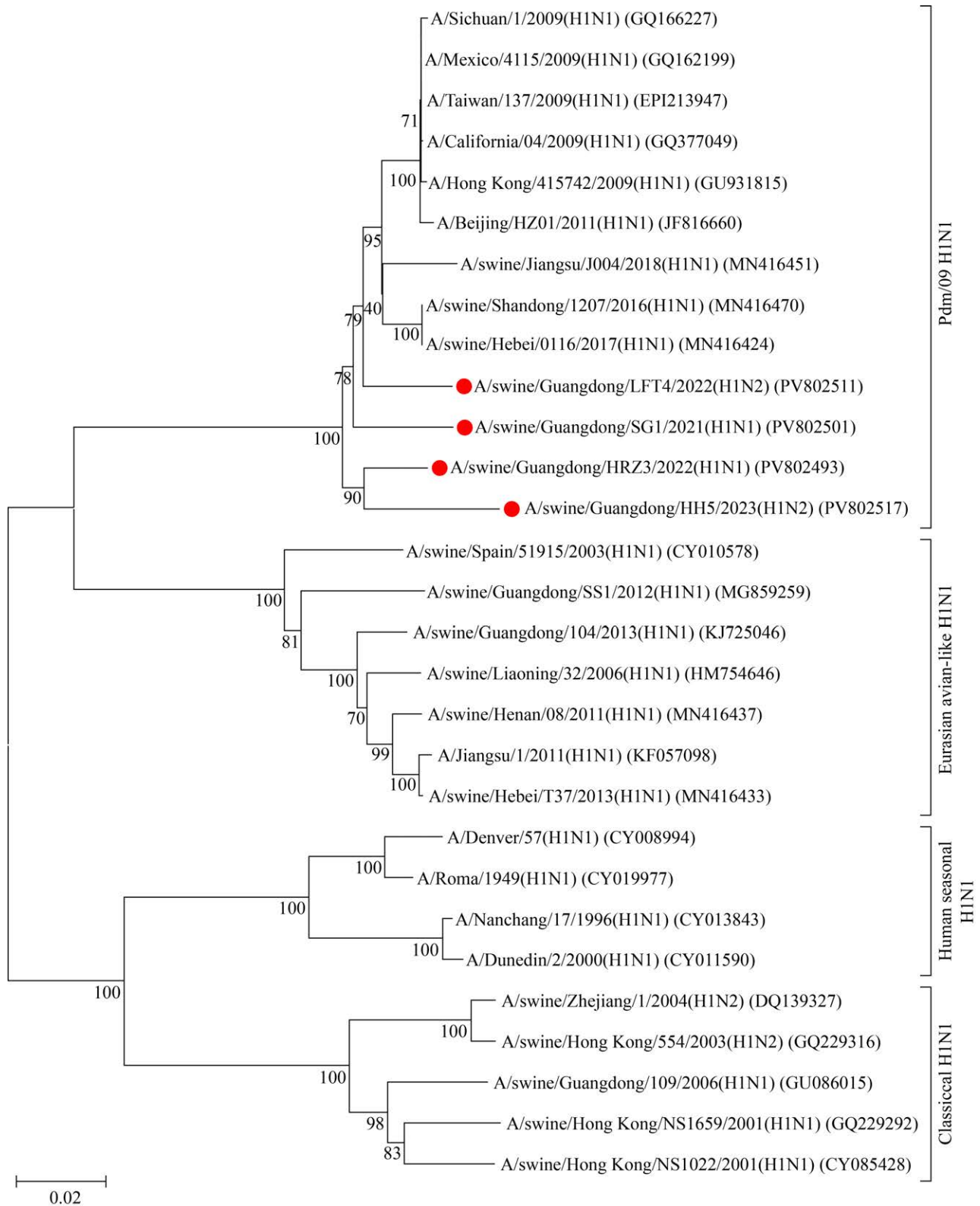


图 5 四株猪流感病毒分离株 *PB1* 基因的系统发育树分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of the *PB1* gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

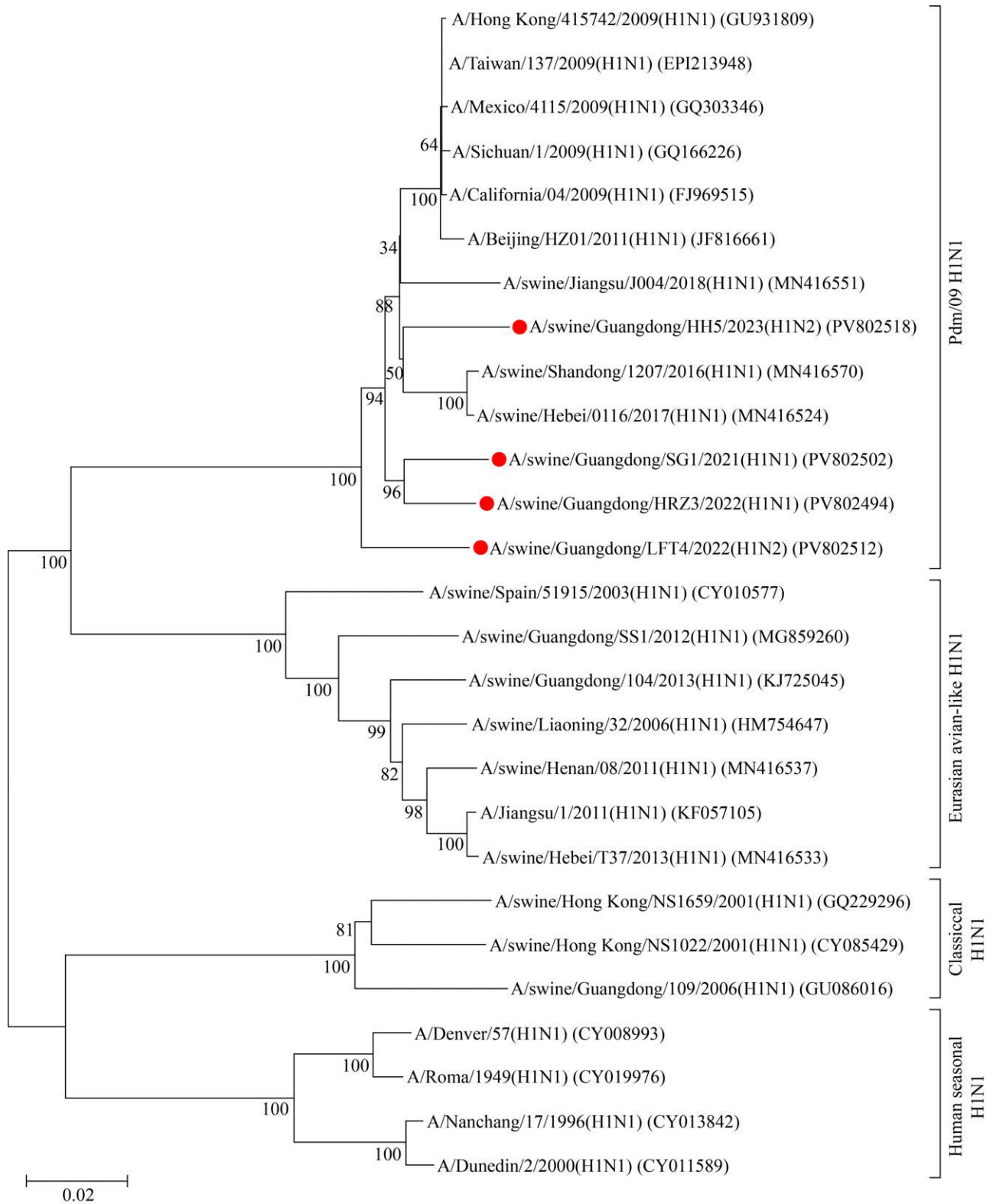


图 6 四株猪流感病毒分离株 PA 基因的系统发育树分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of the PA gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

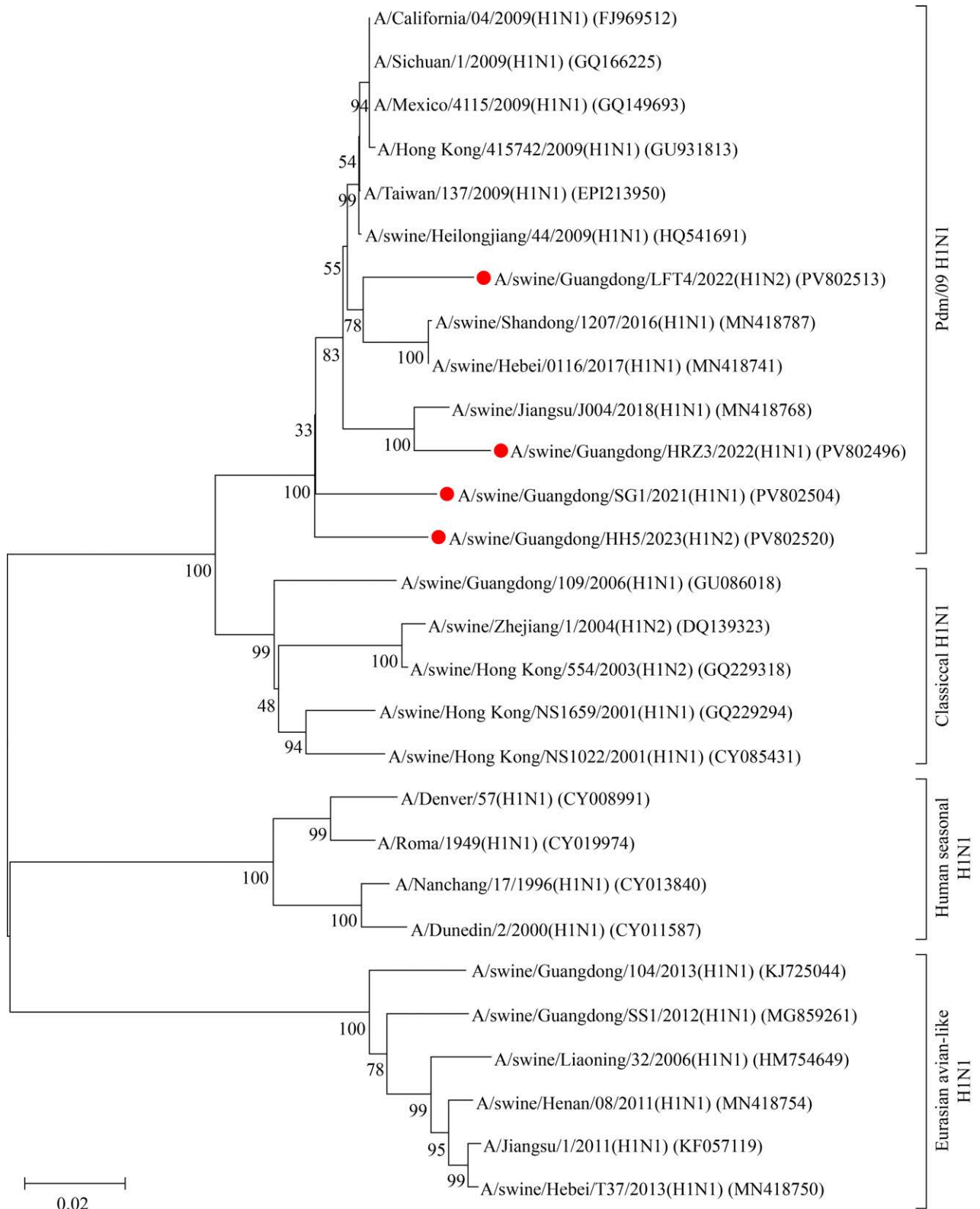


图 7 四株猪流感病毒分离株 NP 基因的系统发育树分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of the NP gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

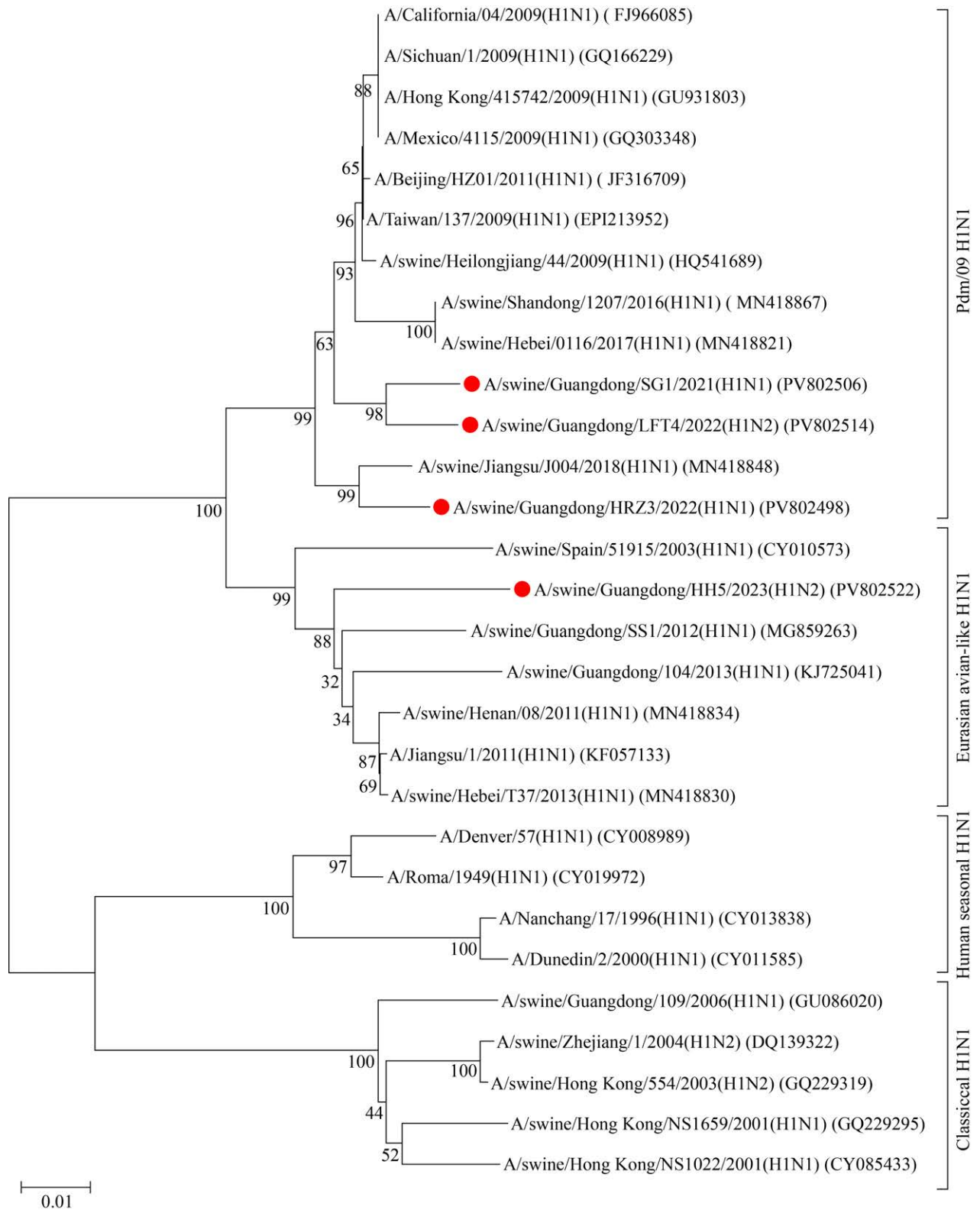


图 8 四株猪流感病毒分离株 *M* 基因的系统发育树分析

Figure 8 Phylogenetic analysis of the *M* gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

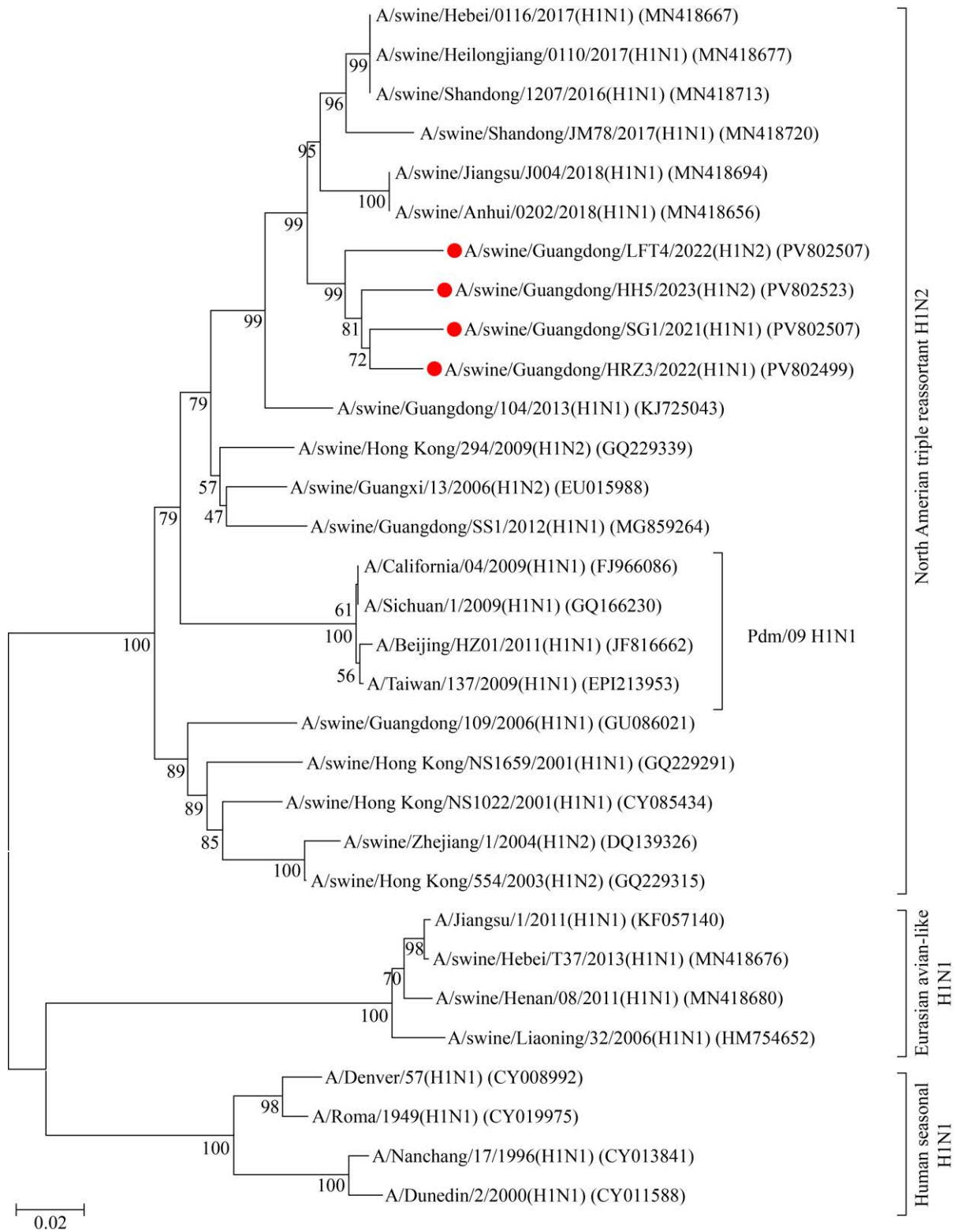


图 9 四株猪流感病毒分离株 NS 基因的系统发育树分析

Figure 9 Phylogenetic analysis of the NS gene of four swine influenza virus (SIV) isolates.

2.3 关键氨基酸位点的分析

对本研究的 4 株 SIV 的受体结合关键位点分析发现：分离株的 HA 基因裂解位点均为 PSIQSR↓GL，裂解位点仅含有一个碱性氨基酸 R，2 株 H1N1 亚型 SIV (SWSG1/21 和 SWHRZ3/22) 和 2 株 H1N2 亚型 SIV (SWHH5/23 和 SWLFT4/22) 在受体结合关键位点 190 和 225 分别为氨基酸 D 和 G。NA 基因中影响耐药性的 6 个关键氨基酸位点 119(E)、152(R)、274(H)、275(N)、293(R)、295(N) 的氨基酸残基均未发生替换。SWSG1/21 和 SWHRZ3/22 的 274 位发生了 H274Y 的替换，SWLFT4/22 与 SWHH5/23 的第 274 位为氨基酸 Q。PB2 蛋白中 4 株分离株均发生了 T271A、A590S 和 A591R 的组合替换；4 株分离株的 E627K 和 D701N 均未发生替换。PB2 蛋白中第 431 位氨基酸发生了 T431M 的替换，第 588 位氨基酸发生了 T588I 位点的替换。SWHH5/23 的 PB2 蛋白发生了 251K 的替换。4 株分离株均在 PB1 蛋白的第 436 位氨基酸位点发生 H436Y 的替换。4 株分离株均在 PA 蛋白的 P224S、L295P、A515T 氨基酸位点中发生替换。在 NP 蛋白中 K319N、Q357K 位点发生替换。M 蛋白中 V27A、A30T、D44A 位点发生替换。NS 蛋白关键氨基酸位点 I123V 未发生替换(表 1)。

2.4 SIV 对小鼠致病性试验

2.4.1 小鼠体质量与存活率

接种 4 株 SIV 的小鼠第 2 天开始出现精神萎靡，行动缓慢，活动范围和采食量明显减少，常扎堆聚集蜷缩不动，被毛蓬乱无光泽，体质量逐渐下降等症状。对照组小鼠体质量在实验期内持续平稳上升。攻毒 SWLFT4/22 病毒株的致病性最强，感染后第 2 天小鼠体质量开始减轻，第 5 天最早出现体质量减轻超过 25% 的情况，第 9 天开始逐步恢复。所有感染组小鼠的体质量减少比率在 25.4%–36.0% 之间，均出现体质量减少超过 25% 的现象。

在观察期间，依据小鼠体质量下降幅度超过 25.0% 的标准来判定其是否死亡。实验结果

显示(图 10)：对照组小鼠全部存活；SWSG1/21 和 SWLFT4/22 的攻毒小鼠在 5–8 d 内全部死亡；SWHRZ3/22 的攻毒小鼠在第 6 天时死亡 1 只；SWHH5/23 的攻毒小鼠在第 5 天和第 6 天各死亡 1 只。

2.4.2 小鼠病理组织学观察

小鼠接种 4 株 SIV 后肺脏病理变化随时间加重。第 3 天，肺脏开始出现轻度红肿、充血和出血。第 6 天，病理变化显著加剧，表现为严重充血、水肿、肺表面出血块或斑点，以及肺组织实变和硬化。其中，SWSG1/21 和 SWLFT4/22 的肺部边缘变薄，肺叶出血块严重，SWHRZ3/22 肺组织实变硬化。

从第 6 天感染组小鼠的肺脏病理切片 HE 染色显示，肺泡腔数量明显减少，肺泡间隔增宽，肺泡壁呈现均匀性增厚，肺泡腔内可见纤维素性渗出物，呈网状或团块状分布。间质内可见大量淋巴细胞、炎性细胞弥漫性浸润。肺血管周围间隙增宽，伴有炎性细胞套袖样浸润，血管通透性显著增高。在 SWLFT4/22 感染组中，这些病理变化尤为明显(图 11)。

3 讨论

目前，EA H1N1 亚型 SIV 在我国猪群中占据主导地位，H1N2 亚型也是主要流行类型之一，持续危害养猪业。2021–2023 年期间，有研究表明在我国其他地区分离到 H1N1 以及含有 Pdm/09 H1N1 基因重组的 H1N2^[22-23]。通过对分离的 4 株 SIV 进行遗传进化分析，发现 2 株 H1N1 亚型 SIV (SWSG1/21 和 SWHRZ3/22) 均属 EA H1N1 亚型，HA 和 NA 基因源自 EA 分支，PB2、PA、PB1、NP 和 M 基因均源自 Pdm/09 分支，NS 基因源于 TR H1N2 分支。而 2 株 H1N2 亚型(SWLFT4/22 和 SWHH5/23) 均是重组毒株，HA 基因均源自 Pdm/09 分支，NA 基因均源自 NA H1N2 分支：SWLFT4/22 是由 NA H1N2 分支和 Pdm/09 H1N1 分支的毒株重组形成，其内部基因 PB2、PB1、PA、NP 和 M 均来源于 Pdm/09

表 1 分离株关键氨基酸位点分析
Table 1 Analysis of key amino acid sites of isolates

Gene	Mutational site	Function	SWSG1/21	SWHRZ3/22	SWLFT4/22	SWHH5/23
<i>pb2</i>	T271A-A590S-A591R	Plays a critical role in replication and virulence in mammalian hosts	271A-590S-591R	271A-590S-591R	271A-590S-591R	271A-590S-591R
	R251K	Increase virus replication and pathogenicity of SIV	251R	251R	251R	251K
	T431M	Enhance the virulence of SIV in mice	431M	431M	431M	431M
	T588I	Enhance the virulence of the 2009/H1N1 virus	588I	588I	588I	588I
	E627K-D701N	Adaptation of mammalian hosts to avian influenza virus	627E-701D	627E-701D	627E-701D	627E-701D
<i>pbl</i>	H436Y	Enhance virulence in mice	436Y	436Y	436Y	436Y
<i>pa</i>	A70V-P224S	Enhance virulence in mice	70A-224S	70A-224S	70A-224S	70A-224S
	A515T	Enhance polymerase activity	515T	515T	515T	515T
	L295P	Enhance the pathogenicity of influenza virus to mammals	L295P	L295P	L295P	L295P
	T97I	Significant enhancement of transcription and replication activity of Pdm/2009 variants	97T	97T	97T	97T
<i>np</i>	Q357K	Enhance the pathogenicity of EA virus in mice	357K	357K	357K	357K
	E53D	Antagonistic MXA enhances toxicity	53E	53E	53E	53E
	K184A	Closely related to viral virulence and proliferation	184K	184K	184K	184K
	K319N	Enhance pathogenicity to mice	319N	319N	319N	319N
<i>m</i>	L26F-V27A-A30T	Resistance to adamantane derivatives	26L-27A-30T	26L-27A-30T	26L-27A-30T	26L-27A-30T
	D44A		44A	44A	44A	44A
<i>ns</i>	I123V	Enhance the virulence of SIV in mice	123I	123I	123I	123I

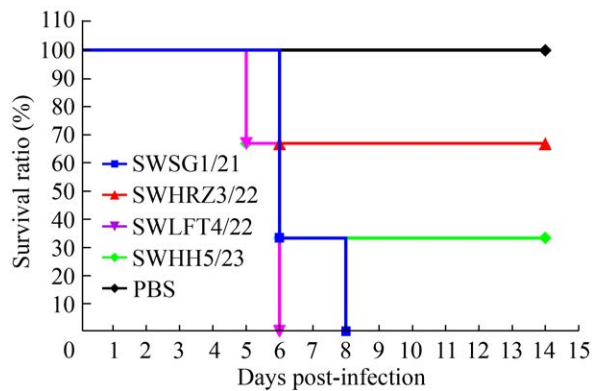


图 10 四株猪流感病毒分离株感染 BALB/c 小鼠的生存曲线

Figure 10 Survival curve of BALB/c mice infected with four swine influenza virus (SIV) isolates.

H1N1 谱系, *NS* 基因来源于 TR H1N2 谱系; SWHH5/23 是由 NA H1N2 分支、Pdm/09 H1N1 分支和 EA H1N1 分支等 3 个分支的毒株重组而来, 其内部基因 *PB2*、*PB1*、*PA*、*NP* 均来源于 Pdm/09 H1N1 谱系, 基因 *M* 来源于 EA H1N1 谱系, *NS* 基因来源于北美三元重组 H1N2 谱系, 这表明猪群中 H1N2 亚型 SIV 基因重组表现为多样性。

我国猪流感流行病学研究表明, 2009 年前, 人群中 H1N1 流感病毒可以感染猪^[24], 但其遗传进化主要通过积累突变或从其他谱系病毒获得不同的内部基因片段, 未形成稳定的遗传

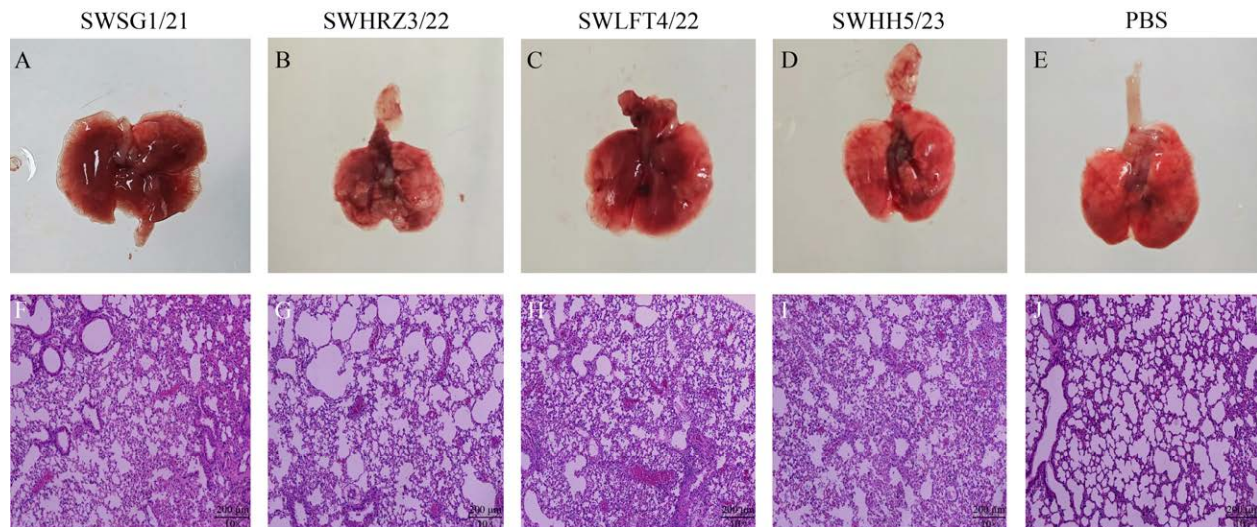


图 11 小鼠感染猪流感病毒后第 6 天肺脏的眼观病理变化与肺脏病理切片(HE 染色 100×) A: 感染分离株 SWSG1/21 的小鼠肺脏病变图(144 h); B: 感染分离株 SWHRZ3/22 的小鼠肺脏病变图(144 h); C: 感染分离株 SWLFT4/22 的小鼠肺脏病变图(144 h); D: 感染分离株 SWHH5/23 的小鼠肺脏病变图(144 h); E: 正常小鼠肺脏; F: 感染分离株 SWSG1/21 的小鼠肺脏病理切片图(144 h); G: 感染分离株 SWHRZ3/22 的小鼠肺脏病理切片图(144 h); H: 感染分离株 SWLFT4/22 的小鼠肺脏病理切片图(144 h); I: 感染分离株 SWHH5/23 的小鼠肺脏病理切片图(144 h); J: 正常小鼠肺脏病理切片图。

Figure 11 Gross pathological changes of the lungs and lung pathological sections in mice on day 6 post-inoculation with swine influenza virus (SIV) (HE staining 100×). A: Lung lesion images of mice infected with isolate SWSG1/21 (144 h); B: Lung lesion images of mice infected with isolate SWHRZ3/22 (144 h); C: Lung lesion images of mice infected with isolate SWLFT4/22 (144 h); D: Lung lesion images of mice infected with isolate SWHH5/23 (144 h); E: Normal mouse lung; F: Pathological section of the lungs of mice infected with isolate SWSG1/21 (144 h); G: Pathological section of the lungs of mice infected with isolate SWHRZ3/22 (144 h); H: Pathological section of the lungs of mice infected with isolate SWLFT4/22 (144 h); I: Pathological section of the lungs of mice infected with isolate SWHH5/23 (144 h); J: Pathological section image of normal mouse lung.

谱系^[25]。2009年后,季节性流感病毒逐渐被 Pdm/09 H1N1 病毒株取代,猪群内该病毒的基因重组现象减少^[26]。但在北美,季节性流感病毒通过基因重组在猪群中却获得了稳定遗传的能力^[27],威胁着养猪业。本研究发现,分离株 SWHH5/23 的 HA 基因与澳大利亚 2010 年期间分离的 H1N2 亚型 SIV 序列高度同源,其余 7 个节段均与我国的病毒相似性较高,其他 3 株病毒株的 8 个基因节段与国内病毒相似性也相对较高。这表明,本研究分离的 4 株 SIV 由我国流行的病毒株和 Pdm/09 H1N1 重组形成,说明广东 SIV 多为本土病毒重组,外来输入病毒重组较少。

有研究表明,由 EA H1N1 分支和 Pdm/09 H1N1 分支重组的 SIV 增强了对人感染^[28],使得感染人的可能性提高,对人类健康构成了一定隐患。因而,探究此类病毒在猪群与人群中的传播模式,在公共卫生学领域具有极其重要的研究价值。SWHH5/23 毒株由 NA H1N2 分支、Pdm/09 H1N1 分支及北美三元重组 H1N2 分支这 3 个分支的毒株重组而成,这反映出猪群中 H1N2 亚型 SIV 基因重组呈现出多样性,至于该亚型是否在猪群中存在一定的流行趋势,并可能从猪群传入人群的情况,亟待我们持续密切关注。

4 结论

本研究成功分离到 4 株 SIV,分别为 2 株 H1N1 和 2 株 H1N2。分离的 4 株 SIV 均是由我国流行的病毒株和 Pdm/09 H1N1 重组形成,对小鼠呈现一定的致病力,提示需进一步强化对 SIV 的监测工作,为 SI 的防控策略制定提供了重要科学依据。

作者贡献声明

尧建辉:撰写文章,数据分析;韩慧:数据收集与监管;扈嘉琪:执行调研;严利明:方法论;黄良宗:提出概念,提供资源,获取基金。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

REFERENCES

- [1] JANKE BH. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(2): 410-426.
- [2] MA W, LAGER KM, VINCENT AL, JANKE BH, GRAMER MR, RICHT JA. The role of swine in the generation of novel influenza viruses[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2009, 56(6/7): 326-337.
- [3] BAUDON E, PEYRE M, PEIRIS M, COWLING BJ. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179044.
- [4] SUN HL, LIU HL, ZHANG JF, QU XY, PANG ZF, XU FX, WU CR, JIANG YL, SHI M, LIU Q, LIAO M. Genome-scale evolution and phylodynamics of swine influenza A viruses in China: a genomic epidemiology study[J]. *The Lancet Microbe*, 2025, 6(6): 101020.
- [5] SUGIMURA T, YONEMOCHI H, OGAWA T, TANAKA Y, KUMAGAI T. Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan[J]. *Archives of Virology*, 1980, 66(3): 271-274.
- [6] CHOI YK, GOYAL SM, FARNHAM MW, JOO HS. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States[J]. *Virus Research*, 2002, 87(2): 173-179.
- [7] Van REETH K, BROWN IH, PENSART M. Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium[J]. *Veterinary Record*, 2000, 146(20): 588-589.
- [8] KARASIN AI, CARMAN S, OLSEN CW. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005)[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 1123-1126.
- [9] BROWN IH, CHAKRAVERTY P, HARRIS PA, ALEXANDER DJ. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype[J]. *Veterinary Record*, 1995, 136(13): 328-329.
- [10] 郭元吉, 刘凌雁, 张莎林. 我国首例猪型流感(H1N1)病毒感染[J]. *疾病监测*, 1992, 7(3): 78.
GUO YJ, LIU LY, ZHANG SL. The first case of swine influenza (H1N1) virus infection in China[J]. *Disease Surveillance*, 1992, 7(3): 78 (in Chinese).
- [11] 刘大飞, 刘明, 刘春国, 杨涛, 刘大程. H1N1 亚型猪流感病毒广东分离株全基因克隆及其遗传演化分析[J]. *病毒学报*, 2008, 24(5): 358-363.
LIU DF, LIU M, LIU CG, YANG T, LIU DC. Cloning and phylogenetic analysis of the entire gene of an H1N1 subtype swine influenza virus isolated from Guangdong Province[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24(5): 358-363 (in Chinese).
- [12] GUAN Y, SHORTRIDGE KF, KRAUSS S, LI PH, KAWAOKA Y, WEBSTER RG. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(11): 8041-8046.

- [13] FENG ZM, ZHU WF, YANG L, LIU J, ZHOU LJ, WANG DY, SHU YL. Epidemiology and genotypic diversity of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses in China[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(1): 43-51.
- [14] 陈义祥, 蒙雪琼, 刘琪, 黄夏, 黄胜斌, 刘翠权, 施开创, 郭建刚, 陈芳芳, 胡丽萍. 中国人猪禽基因重排 H1N2 亚型猪流感病毒全基因克隆及遗传进化的研究[J]. *微生物学报*, 2008, 48(4): 466-472.
CHEN YX, MENG XQ, LIU Q, HUANG X, HUANG SB, LIU CQ, SHI KC, GUO JG, CHEN FF, HU LP. Phylogenetic analysis of human/swine/avian gene reassortant H1N2 influenza A virus isolated from a pig in China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(4): 466-472 (in Chinese).
- [15] YU H, ZHANG PC, ZHOU YJ, LI GX, PAN J, YAN LP, SHI XX, LIU HL, TONG GZ. Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 386(2): 278-283.
- [16] MAMUN MA, HUDA AN. Origins and evolutionary genomics of the novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans: past and present perspectives[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131(4): 553-562.
- [17] TANG JW, SHETTY N, LAM TTY, ELLIS HON KL. Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2010, 24(3): 603-617.
- [18] NEUMANN G, NODA T, KAWAOKA Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus[J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-939.
- [19] 杨时鰻, 许程志, 许榜丰, 吴运谱, 贾云慧, 乔传玲, 陈化兰. H1N1 亚型猪流感病毒 HA 蛋白 225 位氨基酸对病毒致病性的影响[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(4): 816-824.
YANG SM, XU CZ, XU BF, WU YP, JIA YH, QIAO CL, CHEN HL. Amino acid of 225 in the HA protein affects the pathogenicities of H1N1 subtype swine influenza viruses[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(4): 816-824 (in Chinese).
- [20] HUANG CQ, YU LZ, XU Y, HUANG JM, QIN YB, GUO X, ZENG YF, QIN YF, OUYANG K, WEI ZZ, HUANG WJ, GARCÍA-SASTRE A, CHEN Y. Long-term co-circulation of multiple influenza A viruses in pigs, Guangxi, China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1): 2337673.
- [21] KABWAMA SN, WANYENZE RK, LINDGREN H, RAZAZ N, SSENKUSU JM, ALFVÉN T. Interventions to maintain HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria service delivery during public health emergencies in low- and middle-income countries: protocol for a systematic review[J]. *JMIR Research Protocols*, 2025, 14: e64316.
- [22] CUI XX, MA JH, PANG ZF, CHI LZ, MAI CS, LIU HL, LIAO M, SUN HL. The evolution, pathogenicity and transmissibility of quadruple reassortant H1N2 swine influenza virus in China: a potential threat to public health[J]. *Virologica Sinica*, 2024, 39(2): 205-217.
- [23] 黄书, 曾智勇, 梁海英, 汤德元, 王彬, 边孟婷, 柳佳佳, 张婧旭, 万娟, 潘向英, 田红利. 1 株 H1N1 亚型猪流感病毒的进化分析及分子特征研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(12): 5084-5093.
HUANG S, ZENG ZY, LIANG HY, TANG DY, WANG B, BIAN MT, LIU JJ, ZHANG JX, WAN J, PAN XY, TIAN HL. Evolutionary analysis and molecular characteristics of a H1N1 subtype swine influenza virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(12): 5084-5093 (in Chinese).
- [24] 唐续, 杨焕良, 鄢明华, 李秀丽, 陈艳, 孟沙沙, 尹航, 辛晓光, 步志高, 乔传玲, 陈化兰. 一株人源 H1N1 亚型猪流感病毒的进化分析与生物学特性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(4): 270-273, 336.
TANG X, YANG HL, YAN MH, LI XL, CHEN Y, MENG SS, YIN H, XIN XG, BU ZG, QIAO CL, CHEN HL. Evolution analysis and biological characteristics of a human origin H1N1 subtype swine influenza virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(4): 270-273, 336 (in Chinese).
- [25] YANG HL, CHEN Y, QIAO CL, HE XJ, ZHOU H, SUN Y, YIN H, MENG SS, LIU LP, ZHANG QY, KONG HH, GU CY, LI CJ, BU ZG, KAWAOKA Y, CHEN HL. Prevalence, genetics, and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(2): 392-397.
- [26] MENG F, CHEN Y, SONG ZC, ZHONG Q, ZHANG YJ, QIAO CL, YAN C, KONG HH, LIU LL, LI CJ, YANG HL, CHEN HL. Continued evolution of the Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses in China[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(2): 269-282.
- [27] 钟秋, 张丹丹, 宋祖晨, 孟飞, 陈艳, 乔传玲, 陈化兰, 曹允考, 杨焕良. 一株新型三源重配 H1N2 亚型猪流感病毒的进化分析及对小鼠的感染性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(9): 861-866.
ZHONG Q, ZHANG DD, SONG ZC, MENG F, CHEN Y, QIAO CL, CHEN HL, CAO YK, YANG HL. Phylogenetic analysis and infectivity in mice of a novel triple reassortant H1N2 Swine influenza virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(9): 861-866 (in Chinese).
- [28] ZHU JD, JIANG ZM, LIU JH. The matrix gene of pdm/09 H1N1 contributes to the pathogenicity and transmissibility of SIV in mammals[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 255: 109039.