

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

2013-2018 年中国 H3N2 亚型猪流感病毒 疫苗株的筛选及免疫原性研究

硕 士 研 究 生：宋祖晨

学 号：82101186281

指 导 教 师：杨焕良 研究员

申 请 学 位 类 别：兽医硕士

培 养 单 位：哈尔滨兽医研究所

研究生院

2021 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Screening and Immunogenicity of Swine Influenza Virus Vaccine Strains of H3N2 Subtype in China from 2013 to 2018

Candidate: SONG Zuchen

Student ID: 82101186281

Supervisor: Professor YANG Huanliang

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Institution: Harbin Veterinary Research Institute

Graduate School

June 2021

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		2013-2018年中国H3N2亚型猪流感病毒疫苗株的筛选及免疫原性研究					
论文作者		宋祖晨	专业/领域	兽医	研究方向	不区分研究方向	
指导教师		杨焕良 研究员		培养单位	哈尔滨兽医研究所		
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名	
评 阅 人			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			/	
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>				
答 辩 主 席		师东方	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学	预防兽医学	师东方
答 辩 委 员		朱启运	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院兰州 兽医研究所	预防兽医学	朱启运
		平继辉	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	南京农业大学	预防兽医学	平继辉
		张莹	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	沈阳农业大学	预防兽医学	张莹
		翁长江	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院哈尔 滨兽医研究所	预防兽医学	翁长江
		王秀荣	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院哈尔 滨兽医研究所	预防兽医学	王秀荣
		赵东明	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院哈尔 滨兽医研究所	预防兽医学	赵东明
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
会议记录(秘书)		曾显营 曾显营					
论文答辩时间地点		2021年5月20日, 哈尔滨兽医研究所综合楼 1046 会议室					

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：宋祖晨

时间：2021年6月2日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：宋祖晨

时间：2021年6月2日

导师签名：杨晓晨

时间：2021年6月2日

摘要

猪流感病毒 (SIV) 为正黏病毒科的 A 型流感病毒属成员, 能够引起猪的急性、热性呼吸道疾病, 传染性强。猪流感病毒虽然致死率低, 但在流感病毒的遗传进化和生态分布中占据着重要地位。一方面, 猪作为人流感病毒和禽流感病毒的共同易感宿主, 不同来源的流感病毒可以在猪体内发生重排; 另一方面, 猪流感病毒还可以与人或禽细胞的表面受体结合, 造成对人或禽的感染, 在流感病毒的适应性进化中起着重要作用。因此, 研制疫苗对猪流感进行防控不仅是养殖业的需要, 还有着深远的公共卫生学意义。

本实验室于 2013~2018 年在中国地区猪群中分离到 9 株 H3N2 猪流感病毒, 对其表面基因进行遗传演化分析发现, 9 株分离病毒 HA、NA 之间的同源性较高, 在进化关系上均属于近代人源谱系猪流感病毒。对 9 株病毒进行抗原性差异分析, 所有病毒都可以发生交叉 HI 反应, 但不同 H3 亚型病毒之间的抗原性具有一定的差异, 其中 A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2) 具有较为广谱的抗原性。

根据遗传进化分析和抗原性分析结果, 本研究采用反向遗传技术, 选取 A/swine/Guangxi/1659/2017 (H3N2) 的表面基因作为 H3N2 亚型猪流感疫苗株表面基因的供体, 以 PR8 病毒的内部基因为骨架, 成功拯救出 H3 亚型重组流感病毒 GX1659/PR8。对 GX1659/PR8 的表面基因测序, 结果显示其基因序列和亲本病毒 GX1659 完全一致。用 100 EID₅₀ 剂量的 GX1659 和 GX1659/PR8 感染鸡胚, 在不同时间测定鸡胚尿囊液的血凝效价和 EID₅₀, 并绘制其生长曲线。结果显示, GX1659 和 GX1659/PR8 分别在接种后 60 h 和 48 h 血凝效价达到峰值, GX1659/PR8 效价滴度明显高于亲本病毒 GX1659。可见与亲本病毒相比, 重组病毒 GX1659/PR8 在鸡胚上的复制能力有较大的提升。

基于 GX1659/PR8 毒株的以上特性, 本研究进一步将 GX1659/PR8 作为种子毒株制备灭活疫苗, 在小鼠和猪上评价其免疫原性和保护效力。结果显示, GX1659/PR8 疫苗株能诱导小鼠和猪体内产生针对同源病毒的高滴度的 HI 抗体、NT 抗体以及特异性 IgG 抗体。对小鼠二免后攻毒, 通过鸡胚滴定法滴定小鼠脏器中病毒含量, 结果表明该疫苗能显著的抑制同源病毒在动物机体内的复制; 但是对于异源病毒, 疫苗的保护效果并不理想, 不能很好的抵御异源病毒的感染。本研究还进行了猪的主动免疫及免疫持续期实验, 血凝抑制结果显示, 该疫苗能对猪提供大于 180 天的持久保护。

关键词: 猪流感病毒, H3N2 亚型, 生物学特性, 反向遗传技术, 灭活疫苗

Abstract

Swine influenza virus (SIV) is a member of type A influenza virus of Orthomyxoviridae, which can cause acute, febrile and highly transmitted respiratory diseases in pigs. Although the mortality rate of swine influenza virus is lower, it plays an important role in the genetic evolution and ecological distribution of influenza virus. On the one hand, pigs, act as the common susceptible host of human influenza virus and avian influenza virus, so that different sources of influenza viruses have rearranged in pigs; on the other hand, swine influenza viruses can also bind to the surface receptors of human or poultry cells, causing infection to humans or birds, which plays an important role in the adaptive evolution of influenza viruses. Therefore, the development of a vaccine to control swine influenza is not only the need of the breeding industry, but also has far-reaching public health significance.

Nine H3N2 subtype SIVs were isolated from asymptomatic pigs in China from 2013 to 2018. Based on the genetic evolution analysis of their surface genes, it was found that the HA and NA of the 9 viruses had high homology, and they all belonged to recent human lineage swine influenza virus. The antigenicity difference analysis of 9 viruses showed that all viruses could cross-react, but there were some differences in antigenicity among different H3 subtypes of viruses, among which A/swine/Guangxi/1659/2017 (H3N2) had broad-spectrum antigenicity.

According to the results of genetic evolution analysis and antigenicity analysis, using reverse genetic technique, the surface gene of A/swine/Guangxi/1659/2017 (H3N2) was selected as the donor of the surface gene of H3N2 subtype swine influenza vaccine strain, and the internal gene of PR8 virus was used as the skeleton to successfully rescue the H3 subtype recombinant influenza virus GX1659/PR8. The surface gene of GX1659/PR8 was sequenced, and the results showed that its gene sequence was identical to that of its donor strain GX1659. Chicken embryos were infected with 100EID₅₀ dose of GX1659 and GX1659/PR8. The hemagglutination titer of chicken embryo allantoic fluid was determined at different times and the growth curve was drawn by EID₅₀. The results showed that the hemagglutination titer of GX1659 and GX1659/PR8 reached the peak at 60 h and 48 h after inoculation, respectively, and the titer of GX1659/PR8 was significantly higher than that of the donor strain GX1659. Compared with GX1659, the replication ability of recombinant virus GX1659/PR8 in chicken embryos has been greatly improved.

Considering the superiority of the reassortant virus GX1659/PR8, this study further used GX1659/PR8 as a candidate strain to prepare inactivated vaccine and evaluate its immunogenicity and protective efficacy in mice and pigs. The results showed that GX1659/PR8 vaccine strain could induce animals to produce high titers of HI antibody, NT

antibody and specific IgG antibody. After the mice were immunized, the virus content in the organs of mice was titrated by chicken embryo titration. The results showed that the vaccine could significantly inhibit the replication of homologous viruses in animals. The vaccine could not provide adequate protection when challenged with the obviously different antigenicity strain isolated in earlier years. In this study, active immunity and duration of immunity of pigs were also carried out. The results of hemagglutination inhibition showed that the vaccine could provide lasting protection for pigs for more than 180 days.

Keywords: Swine influenza virus, H3N2 subtype, Biological characteristics, Reverse genetic technology, Inactivated vaccine

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 猪流感病毒概述.....	1
1.2 H3N2 亚型猪流感的流行病学.....	2
1.3 猪流感的诊断.....	3
1.3.1 病毒的分离与繁殖.....	3
1.3.2 血清学诊断.....	3
1.3.3 分子生物学诊断技术.....	5
1.4 猪流感疫苗的研究进展.....	6
1.4.1 全病毒灭活疫苗.....	6
1.4.2 减毒活疫苗.....	7
1.4.3 DNA 疫苗.....	8
1.4.4 亚单位疫苗.....	8
1.4.5 通用疫苗.....	9
1.5 研究目的和意义.....	10
第二章 H3 亚型猪流感病毒的部分生物学特性分析及疫苗株的筛选.....	11
2.1 材料.....	11
2.1.1 病毒株.....	11
2.1.2 实验动物.....	11
2.1.3 主要试剂及仪器设备.....	11
2.2 方法.....	12
2.2.1 病毒纯化.....	12
2.2.2 病毒 RNA 提取、反转录.....	12
2.2.3 PCR 扩增及目的片段的回收.....	12
2.2.4 基因组序列测定与分析.....	13

2.2.5 抗原性差异分析.....	13
2.3 结果.....	13
2.3.1 HA 基因的分析.....	13
2.3.2 NA 基因的分析.....	20
2.3.3 抗原性差异分析.....	22
2.4 讨论.....	23
第三章 重组 H3N2 亚型猪流感疫苗株的构建.....	25
3.1 材料.....	25
3.1.1 毒株与质粒.....	25
3.1.2 菌种、细胞和鸡胚.....	25
3.1.3 主要试剂及仪器设备.....	25
3.2 方法.....	25
3.2.1 重组质粒的构建.....	25
3.2.3 重组病毒的拯救.....	26
3.2.4 重组病毒 GX1659/PR8 和亲本病毒 GX1659 生长曲线的测定.....	26
3.3 结果.....	27
3.3.1 猪流感病毒 GX1659 表面基因 HA 和 NA 扩增结果.....	27
3.3.2 重组病毒表面基因重组质粒的构建.....	27
3.3.2 重组 H3N2 流感病毒 GX1659/PR8 的拯救.....	28
3.3.3 重组 H3N2 亚型猪流感病毒 GX1659/PR8 的鉴定.....	28
3.3.4 GX1659/PR8 和 GX1659 在鸡胚上的生长曲线.....	28
3.4 讨论.....	29
第四章 疫苗的免疫效力评估.....	31
4.1 材料.....	31
4.1.1 攻毒毒株和疫苗株.....	31
4.1.2 实验动物.....	31

4.1.3 主要试剂及仪器设备.....	31
4.2 方法.....	31
4.2.1 以小鼠为模型对疫苗的免疫效力评估试验.....	31
4.2.2 以猪为模型对疫苗的免疫效力评估试验.....	33
4.3 结果.....	34
4.3.1 以小鼠为模型对疫苗的免疫效力评估结果.....	34
4.3.2 以猪为模型对疫苗的免疫效力评估结果.....	38
4.4 讨论.....	41
第五章 结论.....	43
参考文献.....	44
致 谢.....	53
作者简介.....	54

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EID ₅₀	50% egg infective dose	鸡胚半数感染量
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	酶联免疫吸附测定
HA	Hemagglutinin	血凝素
HI	Hemagglutinin inhibition	血凝抑制
IFA	Immunofluorescence assay	免疫荧光技术
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IM	Intramuscular injection	肌肉注射
M	Matrix protein	基质蛋白
MDCK	Madin-Darby canine kidney	犬肾细胞系
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NP	Nucleoprotein	核蛋白
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
NT	Neutralization	中和
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PA	Polymerase acid protein	酸性聚合酶蛋白
PB1	Polymerase basic protein 1	碱性聚合酶蛋白 1
PB2	Polymerase basic protein 2	碱性聚合酶蛋白 2
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNP	Ribonucleoprotein	核糖核蛋白体
SI	Swine influenza	猪流感
SIV	Swine influenza virus	猪流感病毒
SPF	Specified-pathogens free	无特定病原体的

第一章 绪论

1.1 猪流感病毒概述

猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 属于正黏病毒科 A 型流感病毒属, 是能够引起猪的急性、热性、高度接触性传染病的一种重要的呼吸道病原, 在全球范围内广泛流行, 对人类的健康与社会的发展造成了巨大的危害。流感病毒根据病毒表面的血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 分为不同的亚型, 迄今已发现 18 种 HA、11 种 NA。我国持续从猪中分离到的流感病毒亚型包括 H1N1、H3N2 以及 H1N2。

猪流感病毒 (SIV) 是由 8 个大小不等的独立基因片段组成的单股负链 RNA 病毒, 整个基因组约 13.6 kb。在电镜下, 病毒粒子中等大小, 直径约 80~120 nm, 典型的 SIV 正常呈球形, 但病毒初代分离时常呈丝状。病毒粒子的结构自外向内包括囊膜、基质蛋白和核心三个部分。病毒囊膜表面有 3 种不同类型的纤突, 血凝素 HA、神经氨酸酶 NA、以及少量的 M2 蛋白。囊膜的内侧、核衣壳的外侧, 是基质蛋白 M1, 维持着病毒的形态和结构。NP 是组成病毒核衣壳的主要蛋白成分, 仅次于 M1。基因组中 8 个不同的基因片段都由囊膜下的核衣壳蛋白 NP 包裹, 与聚合酶复合体 (PB1、PB2、PA) 相结合, 构成各种不同的核糖核蛋白复合体 RNP, 以螺旋状的结构存在于成熟病毒粒子的内部 (LEAHY et al., 2001; PRITLOVE et al., 1999) (图 1-1)。

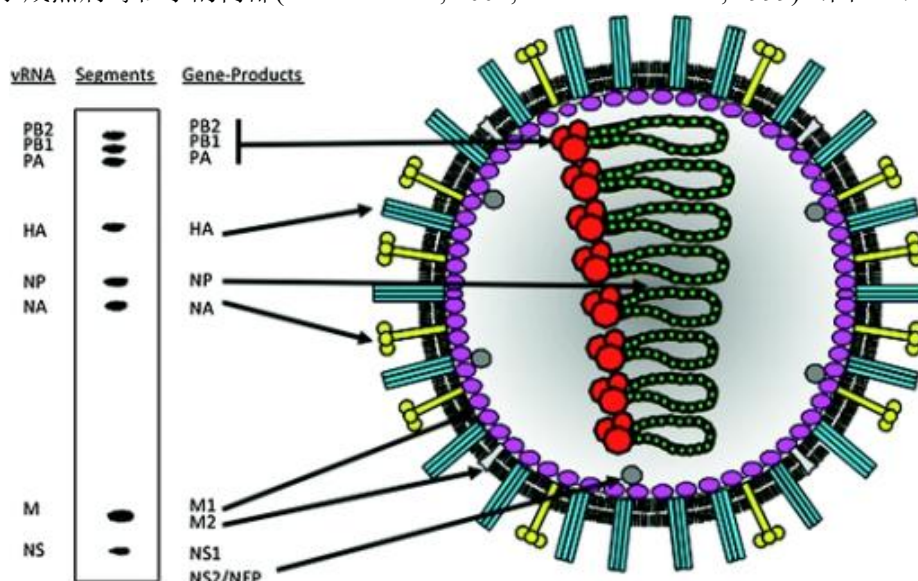


图 1-1 A 型流感病毒结构

Fig. 1-1 Structure of influenza A virus particle

(PLESCHKA, 2013)

众所周知, 虽然水禽是其他物种所有流感病毒的源头, 但猪及猪流感在流感病毒的进化中占据着重要的地位。通常情况下, 人流感病毒不能感染禽类、禽流感病毒一般也不能传播给人, 但猪的种间屏障相对较低, 具备同时被禽流感病毒和人流感病毒感染的的能力, 可以通过与人或禽类的密切接触参与跨物种传播。不同宿主来源的流感病毒可能同时感染猪, 并在猪体内不断发生基因重排, 新形成的病毒随着时间的推移可能在猪群中形成稳定的谱系。因此猪又被称为人、禽、

猪流感病毒的“混合器”，在流感病毒的遗传进化中起着重要作用。

1.2 H3N2 亚型猪流感的流行病学

猪流感于 1918 年在美国、匈牙利和中国首次发现，并于 1930 年被分离和鉴定出来。它与人类流感大流行不谋而合，在世界范围内造成至少 2000 万人死亡(BROWN, 2000)。猪最初感染的 H3N2 亚型病毒是人源 H3N2 亚型流感病毒，在香港大流行后不久，1970 年首次从猪中分离(ZHU et al., 2013)。此后人类 A 型 H3N2 流感病毒频繁地感染猪并时常在猪群中引发流行病，1968 年和 1975 年在香港、1975 年在捷克斯洛伐克、20 世纪 80 年代在意大利、法国等欧洲多个国家、1998 年在美国都有这一亚型病毒的爆发和流行(DE JONG et al., 2007)。

1970 年，第一个完全来自人源的 H3N2 病毒(Hong Kong/68-like)从台湾猪群中被分离出来后，亚洲国家的猪群中就一直接续地分离或检测出人源 H3N2 亚型猪流感病毒及其抗体。并且在接下来的几年，以 Hong Kong/68-like 为代表的最早期人源谱系 SIV 和以 Victoria/75-like 为代表的早期人源谱系 SIV 在中国猪群中被陆续分离。

病毒分离、血清学证据和序列分析表明，自 20 世纪 70 年代初，这种人源 H3N2 亚型猪流感病毒在欧洲猪群中定居后就一直保持着低水平的传播(AYMARD et al., 1985; CASTRUCCI et al., 1993; TUMOVA et al., 1980)。意大利开展的一项研究表明，1977 至 1983 年间分离的早期 H3N2 亚型 SIV 的所有 8 个 RNA 片段都与人流感病毒相似，之后病毒与欧洲猪群的类禽 H1N1 亚型 SIV 发生重组，获得了编码内部的 6 个片段(CASTRUCCI et al., 1993)。该基因重配型 H3N2 SIV 于 1984 年前后出现，并在欧洲猪群中建立了长期稳定的谱系。在血凝抑制试验(HI)中，这些流行病毒在长达 10 年的时间中保持了与 A/Port Chalmers/1/73 的相似的血清学抗原关系。然而在 20 世纪 90 年代初，荷兰和比利时流行的大部分 H3N2 亚型 SIV 发生了抗原漂移，与之前流行毒株的抗血清在血凝抑制实验中不能产生交叉反应(DE JONG et al., 1999)。这种 H3N2 二重配病毒一直在欧洲国家流行，并于 20 世纪 90 年代被引入亚洲国家(GREGORY et al., 2001)。

与此同时，与欧洲这种明显高水平的 H3N2 感染率相比，H3N2 亚型 SIV 在北美猪群中发病率很低，这表明该病毒不是源自美国的猪群，而是通过受感染的人传入猪群而发生的(BROWN, 2000)。事实上，直到 20 世纪 90 年代末，经典的 H1N1 谱系猪流感病毒一直是美国猪群中长期唯一流行的 A 型流感病毒。1998 年美国不同地域的养猪场爆发了猪流感，并分离出了多株 H3N2 亚型流感病毒。引起猪群发病的病毒除少数为人流感病毒和猪流感病毒的二重排重组病毒，其余均为含有人源流感病毒(HA、NA、PB1)、猪源流感病毒(M、NS、NP)和禽流感病毒(PA、PB2)基因片段的重组病毒，我们称其为北美三重配 H3N2 猪流感病毒。有血清学研究显示，在 1989 年至 1997 年之间，猪 H3N2 血清阳性率从 1.1% 增加到 8.0%，表明这些病毒在第一次被发现之前就已经在美国猪群中开始传播(WEBBY et al., 2000)。根据其 HA 基因序列分析，最初的北美三重配 H3N2 猪流感病毒与 1995 年代流行的人类流感病毒关系密切(ZHOU et al., 1999)。Weddy 等认为其中一种可能性是人类 H3N2 流感病毒在 1995 年左右传入猪群，并获得了猪和禽类谱系流感病毒的基因片段。之后这种病毒以极低的水平在猪群中传播，直到 1998 年，这种病毒通过突变更好地适应猪并开始在北美的猪群中迅速传播(WEBBY et al., 2000)。虽然在这些病毒中仅观察到了一定程度的抗原漂移，但通过不断传播的人类 H3N2 亚型流感病毒的持续重组，基因和抗

原多样性已经被放大(DUCATEZ et al., 2008)。这些三重组合的 H3N2 病毒与经典的 H1N1 病毒在猪体内共同传播, 并通过重新组合交换基因组片段, 产生北美三重配 H1N2 病毒(KARASIN et al., 2002)。

Gramer 等对从美国和加拿大的猪群中分离到的北美三重配 H3N2 猪流感病毒的 HA 基因序列分析, 发现其 HA 基因是从不同年份的季节性人流感病毒中引入的, 并可以被分为不同的类群(I、II、III 簇), 其中 I 簇与 1995 年人类流感病毒关系密切, 例如 A/Swine/Texas/4199-2/98; II 簇与人流感病毒 A/Sydney/97 密切相关, 例如 A/Swine/Colorado/23619/99; III 簇与 A/Wuhan/95-like H3N2 最为相似, 例如 A/Swine/Oklahoma/18089/99 和 A/Swine/Illinois/21587/99(GRAMER et al., 2007)。2005 年, III 簇在北美进一步分化为 IV 簇(OLSEN et al., 2006), 后者不断与 2009 年的大流行的猪源重组 H1N1 流感(2009/H1N1) 发生重组(KITIKOON et al., 2013)。

H3N2 SIV 除了在猪群中的持续传播以及向猪中传入新的人类 H3N2 病毒之外, H3N2 SIV 还有从猪传播回人类的持续风险。例如 2011 年, 北美三重配的 H3N2 病毒 IV 簇中的一个特定基因型获得了 2009/H1N1 的内部基因 M, 形成了新的 H3N2 变异株(H3N2v)。该病毒于 2010 年在美国猪中首次发现, 2011 年 7 月首次在人群中检测到, 在 2011 年 8 月~2012 年 11 月期间共报告 320 例(KITIKOON et al., 2013)。2016 年还出现了一种新的重组 H3N2v 病毒, HA 基因与 2010~2011 年人类季节性流感病毒密切相关, 其余基因群与 2011~2012 年主要 H3N2v 病毒相关。这一重组 H3N2v 病毒在 2016 年 7 月至 8 月期间造成 16 人感染(SUN et al., 2018)。迄今为止, 在美国的猪群中, 已鉴定出至少 10 种具有 2009/H1N1 基因的新重配 H3N2 流感病毒基因型(MA et al., 2015), 这说明猪体内基因多样的 H3N2 病毒还在不断进化和流行, 并对公共卫生安全形成新的威胁。

1.3 猪流感的诊断

1.3.1 病毒的分离与繁殖

流感病毒的分离是一种可用于抗原鉴定、致病机理研究和疫苗生产等各个方面并获得感染性病毒的过程。鸡胚接种传统上被认为是流感病毒分离和繁殖的“金标准”方法(YEOLEKAR et al., 2012)。但是鸡胚接种也具有一定的局限性, 首先有证据表明, 在鸡胚中培养的 A 型和 B 型流感病毒可能导致血凝素(HA)分子发生抗原性和结构变化的可能(KATZ et al., 1987; ROBERTSON et al., 1985; SCHILD et al., 1983); 其次, 并不是所有的流感病毒株都能在鸡胚中轻易地分离出来; 此外, 持续供应足够数量的高质量鸡蛋也是需要解决的问题。

为了从临床标本中分离流感病毒并用于病毒增殖, 人们进行了许多尝试, 以寻找合适的原代细胞和传代细胞。犬肾(MDCK)细胞便是分离、增殖 SIV 的常用细胞之一, 在鸡胚中无法成功分离病毒时, 细胞中接种病毒是另一种可行的方法(ZHANG et al., 2020)。

1.3.2 血清学诊断

1.3.2.1 血凝试验(Hemagglutination Assay, HA)和血凝抑制试验(Hemagglutination Inhibition,

HI)

猪流感病毒表面的血凝素蛋白能凝集多种动物红细胞的现象称为血凝,利用血凝现象而进行的试验叫做血凝试验。血凝试验是一种经典的诊断试验,用于筛选细胞培养液或从鸡胚中收集的尿囊液,检测分离病毒的血凝效价,但它不是一个良好的鉴定方法,因为其他类型的某些病毒和部分细菌也具有血凝特性。HA 阳性标本必须通过血凝抑制或抗原免疫分析等其他试验确认才能确定类型(KILLIAN, 2014)。

在 20 世纪 40 年代初,流感的血凝抑制试验被 McClelland 和 Hare 首次报道,这是一种定量检测流感病毒抗体的方法(SPACKMAN et al., 2020)。从那时起,HI 试验就慢慢成为检测流感的可靠的方法之一,并已应用于多种动物和人类流感病毒的鉴定之中。红细胞凝集是病毒表面存在 HA 蛋白时发生的一种自然反应,HA 可以被流感抗体特异性地抑制,而这种抗体可以在 HI 试验中测定。在诊断方面,HI 试验已用于确定抗体的亚型特异性,并鉴定在临床标本中发现的流感病毒亚型。HI 试验的优点是检测成本相对较低,且相对快速,2 小时左右即可得到结果。该法可用于检测抗体或病毒,可检测多种样品,包括血清、尿囊液,以及细胞培养上清等。但 HI 法也有一些缺点,该试验仅适用于对已知抗原亚型的判断,在使用已知 HA 亚型的抗血清对新的 HA 亚型流感的诊断和监测样本进行测试时可能会产生假阴性结果。

1.3.2.2 酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酶联免疫吸附试验在 1971 年最先由 Engvall E 和 Perlmann P 建立,这是一种基于酶标记抗体的技术,能够检测和定量固定在固体表面的蛋白质(ENGVALL et al., 1971)。它既能用于检测抗原,也能用于检测抗体,是目前应用最广的抗原抗体检测技术之一,特别适合大批量样品的检测。当下的 ELISA 包括间接、夹心、竞争、捕获和阻断等 ELISA 形式。

酶联免疫吸附试验(ELISA)可用于检测猪血清中 A 型流感病毒特异性抗体的存在。目前商品化的 ELISA 检测试剂盒包括针对 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 的单独 ELISA 检测,以及检测 A 型流感病毒抗体的酶联免疫吸附试验。此外,还有一种 ELISA 检测方法,可以检测针对流感病毒 NS1 蛋白的抗体,这种蛋白不存在于灭活疫苗的完整病毒粒子中,只在受感染的细胞中产生。因此,自然感染的猪体内会产生针对 NS1 的抗体,在接种灭活疫苗的猪中不产生这一类抗体,利用这一原理,可以区分猪的抗体是否是由于病毒感染产生的(JANKE, 2014)。

1.3.2.3 中和试验(Neutralization test, NT)

中和试验可用于测定猪血清中病毒特异性中和抗体,灵敏度高、特异性强,也是病毒鉴定中的经典方法。倍比稀释的血清和已知含量的病毒预先孵育,然后加入 MDCK 细胞以确定中和细胞病毒感染和产生细胞病变的血清的最高稀释度。血清样本中的中和抗体如果能够阻断细胞培养的病毒感染,那么病毒不能使细胞产生病变。然而,如果不存在抗体,病毒的复制就不会被阻断,并可以让接种的细胞产生病变。本试验既可以用来判定病毒的毒价或抗体的效价,也可以根据抗体的测定结果来鉴别病毒的亚型。但是试验结果需要长达 48 小时才能获得,而且可能需要实验

室提供一些额外的设备或用品，增加了检测的技术难度，中和试验重复测试时，结果可能会发生变化。此外，抗原性不同的流感病毒之间可变的血清学交叉反应要求事先了解猪群中存在的特定毒株或抗原变体，以选择适当的测试抗原，这限制了其主要应用于研究实验室而几乎不用于临床(GAUGER et al., 2020)。此外，NT 试验并不能区分受评估动物的自然感染情况和疫苗接种情况，亦不能区分适当年龄的动物是否有母源抗体存在。

1.3.2.4 神经氨酸酶抑制试验 (Neuraminidase inhibition assay, NI)

神经氨酸酶抑制 (NI) 测定法是鉴定流感病毒中神经氨酸酶 (NA) 糖蛋白亚型或针对流感病毒的抗体的 NA 亚型特异性的实验室方法，对于流感病毒的鉴定和分类也很重要，是一种实用且快速的病毒分类方法(PEDERSEN, 2014)。二十世纪 80 年代初，Van Deuson R A 等创立了微量 NI 法，该微 NI 检测是对世界卫生组织推荐的 NI 检测的改进，它减少了所需试剂的数量，并允许同时对许多分离株进行抗原分类(VAN DEUSEN et al., 1983)。微量 NI 法被 WHO 推荐用于 NA 亚型的分类。

1.3.2.5 免疫荧光技术 (Immunofluorescence assay, IFA)

抗体在被荧光素标记后能够和相应的抗原形成免疫复合物，通过荧光显微镜，可以观察到细胞内病毒抗原及其存在位置，从而对病毒抗原进行判定。与采用各种显微镜技术的免疫组织化学相比，IFA 具有出色的灵敏度和信号放大能力，且可以使用各种样本条件，既可以在培养的细胞或细胞悬浮液上进行，也可以在组织样品或整个生物体中的特定目标上进行。免疫荧光法有两种方法可用，包括直接法和间接法，具体取决于实验范围或使用的特定抗体。

在直接方法中，荧光团标记直接与目标表位反应的一抗偶联，耗费时间较短，比较方便，且由于荧光团已经与一抗结合，因此在直接方法中将物种的交叉反应性降至最低。间接方法则涉及两步孵育过程：首先，一抗结合到目标表位；然后荧光团标记的二抗识别并结合一抗。使用不同的偶联二抗的可能性赋予了间接荧光技术更大的灵活性。此外，由于二抗会与一抗结合，产生放大的信号，因此它的灵敏度更高(IM et al., 2019)。

1.3.3 分子生物学诊断技术

1.3.3.1 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

聚合酶链反应 (PCR) 于 1985 年首次被 Saiki 建立(SAIKI et al., 1985)，已被用于克隆 DNA，测序和分析基因等，通过其独特的方式识别并诊断人们的传染性和遗传性疾病。RT-PCR 的发展使得从 RNA 产生互补 DNA (cDNA) 成为可能(DETMER et al., 2013)。1992 年，实时 PCR 技术的创新也使得 PCR 技术更加强大(HIGUCHI et al., 1992)。在 21 世纪初，Spackman 等就已经开发了包括 SIV 在内的 A 型流感病毒的几种实时 PCR 检测方法(SPACMAN et al., 2002; SPACKMAN et al., 2008)。虽然病毒分离仍然是流感病毒的金标准检测，但 RT-PCR 是一种准确、快速、敏感

的技术,可以在短时间内对大量样本进行筛查。RT-PCR 的主要缺点是它只检测病毒 RNA,而不能确定病毒是否具有感染性,而且易受污染影响,导致出现假阳性结果。PCR 技术目前主要被常规用于诊断,因为可以有效地处理大量样本,而且该方法受样本质量的影响最小,无论是在单独的检测中,还是在多重 PCR 中,通常保守核蛋白或基质蛋白的基因都会被检测出来,作为筛选试验,然后进行 HA 和 NA 亚型的分析(JANKE, 2014)。

1.3.3.2 实时荧光定量 PCR 技术

荧光定量 PCR 技术是一种实时检测核酸扩增的技术,它在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的变化实现对 PCR 过程进行实时检测,以此实现对初始模板的鉴定及定量分析。首先在 PCR 反应液中加入各种类型的荧光标记物,然后在 PCR 扩增过程中,荧光信号随着 PCR 产物的增多而增强,每个 PCR 循环后,定量 PCR 仪器都会通过光学系统记录荧光信号的增加,最后软件计算出数据,用于结果分析。

荧光定量 PCR 包括有两种方法: TaqMan 探针法和染料法。探针法的探针由 5' 端荧光报告基团、与靶基因特异性结合的引物序列、3' 端淬灭基团组成。完整的探针中荧光报告基团被淬灭基团压制,检测不到荧光,而随着 PCR 的进行,探针被水解,报告基团和淬灭基团分离,荧光信号就会增强。染料法则是使用一种荧光 DNA 结合染料,可与双链 DNA 的小沟结合,与 DNA 结合的染料被激发可产生较未结合染料更强的荧光信号。相比探针法而言,染料法有其局限性,它是非特异性的结合任何双链,产生的是非特异性的信号,所以结果不如探针法精确。

近年来, Henritzi D, Hoffmann B 等开发了一种新的四重实时荧光定量 PCR 方案,可同时筛查 A、B、C 和 D 型流感病毒(HENRITZI et al., 2019)。总而言之,荧光定量技术也是一种快速、准确的诊断方法,适合对于大量样品的检测。

1.4 猪流感疫苗的研究进展

1.4.1 全病毒灭活疫苗

目前灭活疫苗是世界各国防控 SI 的首选方法,通过在鸡胚中接种疫苗种子毒株而生产的灭活疫苗,由于相对较低的生产成本和较高的安全性而在全球各地广泛使用。通常,将来自无特定病原体(SPF)的鸡胚用于疫苗病毒的繁殖,再将尿囊液中的培养衍生病毒粒子经过化学灭活,然后辅以佐剂配制成油乳剂疫苗,与人类使用的疫苗配方相比,避免了富集免疫优势包膜糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的复杂而昂贵的纯化步骤(BRUSCHKE et al., 2009)。

全病毒灭活流感疫苗最常见的接种途径是肌肉注射(Intramuscular injection, IM)。IM 疫苗可在血清和肺中诱导高水平的特异性 IgG 抗体,但该抗体对不同亚型的其他病毒株缺乏交叉保护作用。因此,灭活全病毒 SIV 疫苗能完全保护猪免受同源 SIV 攻击,但它们只能部分保护猪免受异源攻击(VINCENT et al., 2010a; VINCENT et al., 2010b)。Bikour 等用 H3N2 亚型 SIV 灭活疫苗免疫仔猪,间隔 2 周后加强免疫 1 次,并在二免后用 10^5 TCID₅₀ 的 H3N2 亚型 SIV 对猪进行气管内攻毒,结果表明疫苗诱导产生了高效价的针对 H3N2 SIV 的 HI 抗体,完全抑制了病毒在体内

的复制和所有临床症状，并减少了肺部病变，且没有引起任何继发作用(BIKOUR et al., 1996)。Vincent A L 等比较了病毒 A/SW/Oedenrode/96(H3N2)和灭活疫苗 A/Port Chalmers/1/73(H3N2) (抗原性不同于 A/SW/Oedenrode/96(H3N2)) 分别免疫猪后，用病毒 A/SW/Oedenrode/96(H3N2)对猪进行攻击产生的免疫应答，结果表明，灭活疫苗免疫猪血清 HI 抗体效价、病毒中和抗体效价和 NP 特异性 IgG 抗体效价与自然免疫猪相近或高于自然免疫猪。然而，与自然免疫的猪相比，接种疫苗的猪的鼻腔 IgA 滴度和细胞介导的免疫反应都较低。而 A/Port Chalmers/1/73 衍生疫苗对 A/SW/Oedenrode/96 攻击的保护效果不佳，表明灭活疫苗对异源毒株攻击的交叉保护作用有限(HEINEN et al., 2001)。

在欧洲开展的一项研究中，Kristien Van Reeth 等发现给猪接种灭活疫苗诱导免疫，在猪 HI 抗体滴度达到足够高时，能够对异源病毒的攻击具有部分或全部的保护作用(VAN REETH et al., 2001)。然而，Vincent 等的研究发现，灭活的 H1N1 亚型 SIV 疫苗不但不能预防异源 H1N2 感染猪，而且还增强了猪的肺炎严重程度，该结果表明，疫苗株与流行株的不匹配甚至可能加剧疾病的严重程度(VINCENT et al., 2008)。因此，疫苗株与攻毒株的 HA 抗原匹配是灭活疫苗提供保护的关键。所以灭活的商品化疫苗通常是二价或三价苗，含有几种流行毒株，以增加与感染病毒匹配的可能性。例如，Flusure XP(Pfizer, Inc., New York, NY USA)是一种针对猪的 SIV 疫苗，它包含多达四种猪流感病毒株，以提供对多谱系、多亚型流行毒株的保护(LEE et al., 2007)。然而，很难在一剂疫苗中包含所有 SIV 流行代表毒株，而且随着疫苗中毒株数量的增加，生产成本也会上升。

在接种 SIV 疫苗时遇到的另一个重大问题是仔猪体内母源抗体的干扰。抗流感血清 IgG 从母猪初乳中的母源抗体转移给仔猪。如果母猪在分娩前接种 SIV 疫苗，在 14 周龄的哺乳仔猪中可以检测到显著水平的 SIV 母源抗体(HI 抗体在 1:40 以上)(MARKOWSKA-DANIEL et al., 2011)。猪流感病毒母源抗体对保护仔猪很重要，但也可能是免疫失败的原因(WESLEY et al., 2006)。有研究表明，在异源 H1N1 亚型 SIV 攻击下，存在母源抗体的猪用二价灭活 SIV 疫苗免疫时可能会观察到肺炎症状的增强，免疫猪的 SIV 特异性体液免疫反应和细胞免疫反应在母源抗体存在的情况下均受到抑制(KITIKOON et al., 2006)。

此外，灭活疫苗还有一个关键问题，近年来流行的 H3N2 亚型病毒在最初通过鸡胚分离时，病毒在鸡胚复制能力较差，需要大量传代才能获得高滴度。此外，鸡胚中传代过多会改变 HA 的抗原性，可能会导致与流行病分离株的抗原不匹配(RAYMOND et al., 2016; WU et al., 2017; ZOST et al., 2017)，为了避免 HA 基因在鸡胚发生适应性突变，可将培养的细胞系(例如 MDCK 和 Vero 细胞)用于病毒繁殖，但是，在无血清和无动物成分的条件下，在悬浮液或生物反应器中生长的这种细胞系中的疫苗种子病毒的滴度低于鸡蛋中的滴度，导致成本高和生产率低(HEGDE, 2015)，因此，基于细胞培养的季节性灭活疫苗的使用受到限制。

1.4.2 减毒活疫苗

2003 年，美国食品药品监督管理局(FDA)批准了人类减毒活疫苗(LAIV)。尽管自 2012 年以来，四价 LAIV 已获得 FDA 许可用于人类免疫，但此类疫苗尚未进入猪或家禽的生产市场(RAHN et al., 2015)。但是在猪中使用减毒活疫苗的实验研究已反复证明，这些疫苗是安全的，并

且可以针对异源感染提供更好的保护(KAPPES et al., 2012; LOVING et al., 2012; VINCENT et al., 2007)。

具有减毒复制特性的 SIV 是通过分子生物学方法获得的, 采用截短非结构蛋白(NS1)的方法, 削弱病毒拮抗宿主 I 型干扰素抗病毒反应的能力, 实现疫苗毒株的毒力致弱(SOLORZANO et al., 2005); 聚合酶基因(PB1 和 PB2) 中的温度敏感突变, 通过降低聚合酶活性并在高温下限制病毒复制(PENA et al., 2011); 以及将 HA 切割位点修饰为对弹性蛋白酶敏感的基序, 通过 HA 内的遗传突变导致蛋白酶依赖性改变和复制受损(MASIC et al., 2009)。Masic 等通过将 H3 的 HA 胞外域与 NA 的细胞质尾部、跨膜区和茎区融合, 产生了含有两种不同 SIV HA(H1 和 H3)的八段 SIV(MASIC et al., 2013)。研究表明, 气管内接种该类型疫苗可防止猪感染 H1 和 H3 猪流感病毒亚型, 且当在鼻内接种后, 可诱导针对 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 的血清 IgG 抗体反应, 以及高滴度的针对 H1N1 和 H3N2 SIV 的中和抗体。用 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 攻击免疫猪时, 结果显示猪的肺组织中的病毒滴度显著降低(PYO et al., 2014)。

1.4.3 DNA 疫苗

编码流感病毒蛋白的重组 DNA 疫苗已被评估为猪流感的候选疫苗。1990 年, Wolff 等证明将质粒 DNA 直接接种到小鼠肌肉中可以表达蛋白质(WOLFF et al., 1990)。

在 Larsen 等的研究中发现, 猪流感的 DNA 疫苗接种猪后对猪进行病毒攻击, 可以介导发生强抗体反应(OLSEN, 2000), 在该研究中, 使用 HA 基因的 DNA 疫苗对猪进行首免, 然后采用常规灭活的全病毒疫苗进行了加强免疫, 导致了增强的免疫反应和免受攻击性感染的保护(LARSEN et al., 2001)。

Gorres(GORRES et al., 2011)等人将人 T 细胞白血病病毒 1 型 R 区与三价 HA 基因(cH1N1、H3N2 和 pH1N1)或单价 HA 基因(pH1N1)重组, 设计了 SIV DNA 疫苗。该三价疫苗可诱导体液和 IFN- γ 应答, 在被 H1N1 攻击后完全抵御了病毒在体内的复制, 在被 H3N2 攻击后也明显抑制了病毒在体内的复制。

使用 DNA 疫苗主要存在的问题是基因组整合到宿主细胞中的危险以及存在选择性标记(例如抗生素抗性基因)的危险(WANG et al., 2004)。

1.4.4 亚单位疫苗

亚单位疫苗是一种含有病毒蛋白但不含病毒核酸的免疫剂, 比灭活疫苗含有更高浓度的特定蛋白(COX et al., 2009)。猪流感亚单位疫苗的主要成分是一种或一种以上的重组 SIV 蛋白, 可通过检测亚单位疫苗中不存在的病毒结构蛋白或其抗体来区分感染动物和接种疫苗的动物。流感 HA 蛋白在亚单位流感疫苗中的表达是因为它能诱导 HI 抗体(COX et al., 2009; VANDER VEEN et al., 2009)。利用 DNA 重组技术, 流感蛋白可以在其他平台上表达, 已经开发了几个平台来表达流感亚单位, 以取代传统的以鸡蛋为基础的疫苗生产, 比如杆状病毒表达系统(COX et al., 2009)和甲病毒复制子 RNA(VANDER VEEN et al., 2009)等。

1.4.5 通用疫苗

通用疫苗是可以对不同亚型的流感病毒产生交叉免疫保护作用的疫苗,可以保护机体免受多种亚型流感病毒感染的疫苗。在由 A 型流感病毒编码的 11 种病毒蛋白中,包括 HA, M (M1 和 M2e), NP 和 NA 蛋白在内的几种蛋白被评估为通用疫苗的有希望的候选抗原(SUBBARAO et al., 2013)。

流感病毒的 HA 基因在流感病毒感染细胞的过程中起着重要的作用。病毒感染细胞后,病毒表面的 HA 与细胞膜相结合,脱去信号肽合成 HA0,在酶的作用下,酶切获得 HA1 和 HA2 两个结构域。其中 HA2 的 N 端 11 个氨基酸,称之为融合多肽,在 A 型流感病毒中其具有高度的保守性。因此, Ekiert 等针对此区域制备的单抗对致死性的 H5N1 和 H1N1 亚型流感病毒具有很好的保护作用(EKIERT et al., 2009)。此外,根据发现的位于 HA1 的 B 抗原决定簇上有能够对 A 型流感病毒的 H1、H2、H3、H5 等多种亚型产生良好交叉保护效力的抗原表位, Yoshida 等制备针对此抗原表位的单抗,经检测该单抗不仅具有中和活性和血凝抑制活性,而且还具有较好的异源毒株攻击保护效力(YOSHIDA et al., 2009)。Steel 等从免疫的策略及方法上进行改善,构建了一种新型免疫原,该免疫原包含保守的流感病毒 HA 茎结构域,并且缺少球状头部,与从全长 HA 免疫的小鼠获得的免疫血清相比,用这种无头 HA 构建体进行的小鼠免疫接种产生的免疫血清具有更广泛的反应性,这种无头 HA 疫苗在致死剂量的病毒攻击后提供了抗死亡的全面保护(STEEL et al., 2010)。

与 HA 不同的是,病毒内部蛋白包括 NP、PA、M1 和 M2 在各亚型之间高度保守,并诱导细胞免疫应答,主要是针对加工肽的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL, cytotoxic T lymphocytes)反应(HILLAIRES et al., 2011)。Boyd AC 等开发了重组核糖蛋白和基质蛋白(NP+M1)融合构建体的痘苗病毒安卡拉(MVA)和腺病毒(Ad)疫苗,经动物实验证明它们是安全且具有免疫原性的,且 NP+M1 构建体在控制病毒复制排毒方面具有保护作用(BOYD et al., 2013)。

M2 是一种小的完整的膜蛋白,起着依赖于 pH 的质子通道的作用,对于 HA 的成熟和病毒基因组释放到细胞质中是必不可少的(LAMB et al., 1985)。在早期的研究中,使用乙肝核心蛋白与 M2e 肽(M2HBc)相结合作为载体,用 M2HBc 免疫 BALB/c 小鼠,对致死剂量的 A 型流感病毒有较高水平的保护作用,并能产生抗 M2e 抗体(NEIRYNCK et al., 1999)。GCN4 蛋白是另一种使用的载体,它是一种真核转录蛋白激活剂,重组四聚体蛋白 M2e-tGCN4 模仿天然 M2 蛋白质胞外域的四级结构,该蛋白免疫小鼠后可以诱导小鼠体内产生大量的 M2e 特异性抗体,保护小鼠免受致死剂量的小鼠适应流感病毒的攻击(DE FILETTE et al., 2008)。构建在其表面显示 M2e 的重组病毒样颗粒(VLP)同样是十分有效并极具成本效益的方法(DENG et al., 2015)。由于 M2 是由二硫键连接的两个亚基组成的同源四聚体,通过共价相互作用结合在一起(NEIRYNCK et al., 1999),所以 M2e 也可以作为四聚体用于 g 重组构建体。在这种方法中, M2e 将形成紧密折叠的蛋白质,从而确保病毒颗粒的正确几何形状。已经确认创建了由五个 M2e 串联重复序列(M2e5x)组成的 VLP, M2e5x VLP 的鼻腔内免疫和肌肉注射免疫都可诱导产生交叉反应的 M2e 抗体,提供有效的交叉保护(KIM et al., 2013; LEE et al., 2018)。

1.5 研究目的和意义

SIV 在全球各地猪群中广泛存在,其中以 H1 亚型和 H3 亚型流行最为普遍,每年都能感染大批的猪群,给养殖业造成了极大的损害。SIV 还是人类面临的一大主要公共卫生威胁,因为猪在自然状态下就可以感染人 H3N2 流感病毒(BROWN, 2000),由于猪的生长周期较短,因此传播到猪上的人类流感病毒在基因上比人类同源病毒更为稳定(SHU et al., 1994)。一旦人类 H3N2 病毒传入猪群中,这些病毒面临的免疫选择压力就会降低,使这些病毒能在猪群中持久地保存下来,而相似的病毒在人和猪之间进行长期的流行导致抗原出现差异,也使得猪流感病毒能够更容易地感染人,这些病毒将来可能会传播给易感人群,引发新的流行。

近年来中国猪群中已分离到许多 H3N2 亚型 SIV 病毒(FAN et al., 2012; YU et al., 2008),这些病毒多为地方流行性,抗原性与目前美国流行的 H3N2 SIV 有较大的差异。此外, Danuta M S 的研究表明,最近的季节性三价灭活流感疫苗(TIV)并不能诱导产生高水平的针对新型 H3N2v 的血清抗体(SKOWRONSKI et al., 2012),而我国市售商品化 H3N2 亚型猪流感疫苗株(H3N2 HLJ 株)分离于 2007 年(路伟, 2019),与我国如今的 H3N2 流行毒株抗原性可能存在差异。因此,我们应该尽快构建出新的 H3N2 亚型猪流感疫苗株,以应对不断出现的抗原变异,为潜在的流行趋势做好充足的准备。

A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)株是一株具有高繁殖能力的鸡胚适应流感病毒株,也是 WHO 推荐的流感病毒疫苗株内部基因供体株。在疫苗研制过程中,常常将 PR8 的 6 个内部基因与流行株的 HA 和 NA 基因重组,这使得该重组病毒在获得内部基因供体株高繁殖力的生物学特性的同时,还保留了流行株良好的抗原性。

本实验室对 2013~2018 年间分离到的 H3N2 亚型猪流感病毒进行分析,筛选出一株具有广谱抗原性的代表毒株 GX1659 构建了重组 H3N2 亚型猪流感病毒 GX 1659/PR8 毒株,并制备了重组猪流感病毒 H3N2 亚型灭活苗。研究表明, GX1659/PR8 疫苗株生长性能良好,在小鼠和猪上可诱导产生较高的抗体滴度,在小鼠模型上可对同源病毒提供有效保护,为今后猪流感疫苗的研究初步奠定了基础。

第二章 H3 亚型猪流感病毒的部分生物学特性分析及疫苗株的筛选

2.1 材料

2.1.1 病毒株

H3N2 亚型 SIV 均分离自屠宰场中猪的鼻拭子检测样品，由本实验室鉴定并保存，具体见表 2-1:

表 2-1 本研究所用毒株

Table 2-1 Viruses of this study

毒株全称 Virus full name	毒株简称 Virus abbreviation
A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)	GD35
A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)	GX611
A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)	GX978
A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)	GX996
A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)	GX1659
A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)	HLJ546
A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)	HLJ684
A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)	LN57
A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)	LN322
A/swine/Hunan/3/2008(H3N2)	HuN3

2.1.2 实验动物

14 周龄 SPF 鸡和 9~11 日龄鸡胚均购买自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所；SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠（雌）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

2.1.3 主要试剂及仪器设备

RNA Extraction Kit 购自 TIANGEN 公司；RNA Reverse Transcription Kit 购自 TOYOBO 公司；胶回收试剂盒购自 Thermo 公司；Taq HiFi PCR 扩增酶购自北京聚合美公司；DNA Marker 购自北京博奥龙免疫技术公司；测序试剂购自 ABI 公司；RDE 受体破坏酶购自日本生研公司； β -丙内酯购自北京索莱宝公司。

实验用冰箱均购自海尔公司；37°C 恒温培养箱购于 Thermo Scientific；SDS-PAGE 电泳仪器购自 Bio-Rad；PCR 仪购自 Eppendorf；近红外成像扫描系统购于 Odyssey CLX；测序仪购自 ABI。

2.2 方法

2.2.1 病毒纯化

将病毒经含有双抗（青链霉素 2000 U/mL）的 PBS 10 倍倍比稀释，并按照每枚鸡胚 0.1 ml 的剂量分别接种 9~11 日龄 SPF 级鸡胚，接种后 37°C 孵育 48 h 后，收集最高血凝价且最高稀释度的尿囊液，为 F1 代，如此纯化三代后收集 F3 代尿囊液并分装冻存，-80 °C 冰箱保存备用。

2.2.2 病毒 RNA 提取、反转录

在 P2+实验室的生物安全柜中，取出 140 μ L 已纯化好的病毒尿囊液加入由裂解液 RL 554.4 μ L 和 Carrier RNA 5.6 μ L 组成的 560 μ L Carrier RNA 工作液中，室温孵育 10 min 使病毒核酸蛋白完全分离。无水乙醇加入 560 μ L 震荡，沉淀病毒 RNA 使其吸附在柱子上，按照试剂盒说明书将上述溶液离心过柱，并先后分别用 Buffer GD 和 Buffer RW 洗涤和去除残留在柱子上的盐离子，12000 rpm/min 空离 3~5 min。加入 RNase/Free ddH₂O 35 μ L 溶解附着于柱子上的病毒 RNA，离心采用 RNase/Free EP 管收集病毒 RNA。

将病毒 RNA 提取液放置于 65°C 金属浴中 5 min 破坏 RNA 二级结构，之后迅速置于冰板上 5 min 防止 RNA 再次形成二级结构。随后加入 3 μ L 反转录引物 12 bp 和 8 μ L 5x RT Buffer 和 2 μ L 反转录酶，混匀，瞬离后放置于金属浴中 37°C 15 min 反转录，98°C 5 min 使反转录得到的 cDNA 和 RNA 变性分开，最后得到单链的 cDNA，置于 -20°C 备用。在整个操作过程中应当小心快速，病毒 RNA 提取完成后所用试剂和耗材需要均无 RNA 酶，防止病毒 RNA 降解。

2.2.3 PCR 扩增及目的片段的回收

病毒基因扩增采用 Taq HiFi PCR 扩增酶，反应程序、反应体系如下：

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	} 35 cycles
55 °C	25 s	
72 °C	90 s	
72 °C	5 min	
4 °C	Hold	
Taq HiFi PCR Mix	25 μ L	} 50 μ L
H ₂ O	22 μ L	
Pimer-up (20pmol)	1 μ L	
Pimer-down (20pmol)	1 μ L	
cDNA	1 μ L	

按胶回收试剂盒说明书，将 PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖核酸凝胶电泳后切下与目的片段大小一致的条带，使用等体积的 CP buffer 60°C 溶胶，完全溶解后将其转移到吸附柱中离心，弃上

清加入 Wash Buffer 洗涤两次，空离 3 min，加入 40 μL RNase-Free dd H₂O 静置 3 min 离心，得到纯化后的目的片段产物。

2.2.4 基因组序列测定与分析

将胶回收的产物，按照测序反应试剂盒说明书进行测序 PCR。反应完成之后，将测序 PCR 反应产物用磁珠法纯化，具体操作步骤如下：

向 96 孔板中的测序产物中每孔加入 67 μL 磁珠和 70 μL 85%乙醇，室温静置 5 min，放在磁板上，再静置，待磁珠吸附于管壁液体澄清透亮。

弃液，加入 85%的乙醇清洗，静置 30 s 后弃液，清洗，再加入 85%乙醇，静置 30 s 弃液，将 96 孔板放置在 37°C 温箱中 5 min，直至乙醇完全挥发。

加入 ddH₂O 30 μL 反复吹打直至磁珠从管壁吹下并与水完全混匀，磁板静置吸附。

吸取 96 孔板中的上清液体至新的测序板中，避免吸到磁珠堵塞测序毛细管。将测序板置于 95°C 变性 4 min，立即置于 4°C 冷却，上样。

测序结果使用 Seqman 软件进行序列拼接，保存基因完整信息。在 Influenza Virus Database 中下载各片段基因遗传进化代表性毒株，用 MegAlign 软件进行特殊氨基酸分析，使用 MEGA 7.0 软件绘制基因的遗传进化树。

2.2.5 抗原性差异分析

病毒尿囊液中以 1:2000 的比例加入 β -丙内酯，4°C 反应 48 h~72 h 将病毒灭活。将病毒尿囊液按比例加入 Tween-80，37°C 震荡溶解，再按一定比例加入白油，放入 50 mL 离心管中使用乳化器 13000 rpm 乳化 10 min~15 min，直至将乳化后的油乳剂滴入水中聚集不散开。将乳化好疫苗每只鸡肌肉注射 1 mL，左右腿各 0.5 mL，做好标记。免疫后 21 天采血分离血清，分装标记保存。

将要检测的 H3N2 流感病毒配置成标准 4 单位抗原，进行 HI 实验。以 25 μL /孔加入 PBS，第一孔中加入 50 μL 血清，倍比稀释至最后一孔，再加入配置好的 4 单位抗原 25 μL ，静置半小时待抗原抗体结合后，每孔加入 25 μL 1% 的红细胞，静置 20 min~30 min 后读数并记录实验结果。

2.3 结果

2.3.1 HA 基因的分析

2.3.1.1 同源性分析

对本研究中 2013~2018 年分离的 9 株 H3N2 亚型 SIV 的 HA 进行同源性比较（表 2-2）可以得知，9 株病毒的 HA 核苷酸序列同源性介于 93.9%~99.8% 之间，其中 LN322 与 LN57 这两株猪流感病毒与其余病毒株之间的差异较大，同源性在 93.9%~96.6%，但这两株毒同源性很高，达 99.6%，剩余 7 株病毒同源性均在 95.7%~99.8% 之间。

表 2-2 分离毒株 HA 基因的同源性比较

Table.2-2 Sequence similarity of HA genes of isolated viruses

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Virus
1	96.5	95.9	95.9	96.1	95.9	95.8	95.9	96.1	A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)
2	95.9		98.6	98.2	99.6	98.6	98.4	94.7	A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)
3	95.7	95.8		98.2	98.2	98.6	98.8	94.7	A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)
4	96	98.9	99.0		97.9	98.2	98.1	94.4	A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)
5	95.8	99.7	98.7	98.9		98.2	98.1	94.2	A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)
6	95.8	98.7	98.8	98.9	98.6		99.5	94.7	A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)
7	95.8	98.6	98.8	98.9	98.6	99.8		94.9	A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)
8	96.5	94.0	94.4	94.2	93.9	94.2	94.4		A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)
9	96.6	94.1	94.1	94.4	94.1	94.3	94.4	99.6	A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)

注：右上为氨基酸，左下为核苷酸

Note:The upper right is amino acid, and the lower left is nucleotide.

2.3.1.2 HA 蛋白的氨基酸序列分析

对本研究的 9 株猪流感病毒进行氨基酸序列分析，9 株病毒的 HA 基因均编码 566 个氨基酸，HA 蛋白的 HA1 和 HA2 之间通过碱性氨基酸 R 相连。在 HA 碱性裂解位点处，除 HLJ546 和 HLJ684 两株毒为 PERQTRGIF，其余 7 株病毒均为 PEKQTRGIF，所有 9 株病毒在裂解位点均只含有 1~2 个不连续的碱性氨基酸，均符合低致病性流感病毒的特点。

流感病毒糖基化位点的改变可能会影响蛋白的抗原性以及对外宿主的识别，从而导致病毒的生物学特性发生变化(IGARASHI et al., 2008)。通过对潜在糖基化位点进行分析(表 2-3)，GX611、GX978、GX996、GX1659、LN57 和 LN322 均含有 38 (NGT)、79 (NCT)、142 (NWT)、262 (NST)、301 (NGS) 和 499 (NGT) 这 6 个潜在糖基化位点，而与这 6 株病毒相比，GD35 在 142 位点的潜在糖基化位点缺失，HLJ546 和 HLJ684 在 54 位点增加一个潜在糖基化位点为 NAT。

表 2-3 HA 基因潜在糖基化位点的分析

Table 2-3 The Potential N-glycosylation sites of HA gene

毒株 Viruses	潜在糖基化位点 Potential N-glycosylation sites						
	38	54	79	142	262	301	499
A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)	NGT	-	NCT	-	NST	NGS	NGT
A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)	NGT	NAT	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)	NGT	NAT	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT
A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)	NGT	-	NCT	NWT	NST	NGS	NGT

通过对其 HA 蛋白影响病毒受体结合特性和传播能力的关键氨基酸位点分析发现（表 2-4），本研究中的 9 株 H3N2 亚型 SIV 的大部分受体结合位点氨基酸均保持一致，138S、190D、225D、226I、228S，仅 GX978 190 位为 V。HA 蛋白的 226 和 228 位的氨基酸对 H3 亚型流感病毒受体结合特性和传播能力起着关键作用，本研究的 9 株病毒在 226 位氨基酸都为 I，226 位氨基酸都为 S，可能具有结合人型唾液酸受体的能力。

表2-4 HA基因受体结合位点分析

Table 2-4 The receptor-binding sites of HA gene

毒株 Strain	受体结合位点 Receptor Binding Sites											
	130-loop					190-helix			220-loop			
	133	135	136	137	138	190	193	198	225	226	227	228
A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	P	S
A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	P	S
A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	V	S	A	D	I	P	S
A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	P	S
A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	P	S
A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	L	S
A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	P	S
A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)	N	K	S	V	S	D	S	A	D	I	T	S
A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)	N	K	S	A	S	D	S	A	D	I	T	S

H3N2 亚型流感病毒的 HA1 蛋白由 A、B、C、D、E 5 个抗原决定簇组成，抗原位点处的氨基酸改变，可能会导致流感病毒的抗原性发生变化。对本研究中的 9 株 H3N2 亚型 SIV 的抗原位

点分析（表 2-5），这 9 株病毒的抗原位点大致相同，将它们与市面上广泛使用的 H3 亚型猪流感疫苗毒株 HLJ10 相比，在总计 41 个抗原位点氨基酸中，有 17 个氨基酸发生突变，占比 41.46%；与来自早期人源谱系的病毒 HuN3 相比，有 20 个氨基酸发生突变，占比 48.78%；与 WHO 2019~2020 年推荐使用的 H3N2 亚型流感疫苗株 A/Kansas/14/2017(H3N2)比较，有 12 个氨基酸发生突变，占比 29.27%。

2.3.1.3 HA 的进化分析

根据 HA 基因的进化树分析（图 2-1），本研究中的 H3 亚型流感病毒主要分为 5 个谱系：近代人源谱系、早期人源谱系、最早期人源谱系、禽源谱系和经典猪源谱系。从进化关系上看，本研究的 9 株病毒均分布于近代人源谱系，与其中的 Moscow/10/99-like 亚系同处一个分支，表明近年来分离的 H3 亚系猪流感病毒可能源于近代人源谱系 Moscow 亚系毒株。

表2-5 HA基因抗原位点分析
Table 2-5 The antigenic sites of HA gene

毒株 virus	A															B													
	133	134	135	136	137	140	141	142	143	144	145	146	156	157	158	159	160	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198
GD35	N	G	K	S	A	K	R	G	S	D	N	S	Q	L	N	Y	K	T	Y	N	D	Q	I	S	L	Y	A	Q	A
GX611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GX978	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
GX996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GX1659	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLJ546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLJ684	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
LN57	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
LN322	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
MO11	D	-	S	-	Y	R	-	-	-	V	-	-	N	-	-	-	-	-	D	K	-	-	T	K	-	-	V	-	
HLJ10	D	-	G	-	Y	-	-	-	-	V	K	-	K	S	E	N	-	-	D	-	E	-	T	-	-	-	G	-	
KS14	-	-	T	-	S	I	-	-	-	K	S	-	H	-	-	S	-	-	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	S
HuN3	-	-	G	-	S	-	-	-	P	-	-	G	K	S	G	S	T	-	D	K	E	-	-	N	-	-	V	-	

表2-5 HA基因抗原位点分析 (续表)

Table 2-5 The antigenic sites of HA gene (continued)

毒株 virus	抗原位点 Antigenic sites											
	C			D						E		
	53	54	275	278	172	173	174	207	63	71	78	83
GD35	D	S	G	N	E	K	F	K	N	L	G	K
GX611	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GX978	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GX996	N	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-
GX1659	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLJ546	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLJ684	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN57	N	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-
LN322	N	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-
MO11	N	-	D	-	D	-	-	-	-	-	D	E
HLJ10	-	-	D	Y	D	-	-	-	-	-	-	E
KS14	-	-	-	K	-	Q	-	-	-	-	-	-
HuN3	-	N	G	S	D	N	S	-	-	-	-	-

注：MO11 为美国分离的一株 H3N2v 代表株：A/Minnesota/11/2010(H3N2)；HLJ10 为中国市面上广泛使用的 H3N2 亚型猪流感疫苗毒株：A/swine/Heilongjiang/10/2007(H3N2)；KS14 为 WHO 2019~2020 年推荐使用的 H3N2 亚型流感疫苗株：A/Kansas/14/2017(H3N2)；HuN3 为 4.2.1 中攻毒毒株：A/Swine/Hunan/3/2008(H3N2)。

Note: MO11 is a representative strain of H3N2v isolated from the United States: A/Minnesota/11/2010(H3N2); HLJ10 is a H3N2 subtype swine influenza vaccine strain widely used in the China: A/swine/Heilongjiang/10/2007(H3N2); KS14 is the H3N2 subtype influenza vaccine strain recommended by WHO in 2019 ~ 2020: A/Kansas/14/2017(H3N2); HuN3 is a strain of attacking virus in 4.2.1: A/Swine/Hunan/3/2008(H3N2)



图 2-1 HA 基因进化树

Fig. 2-1 Phylogenetic tree of HA gene

2.3.2 NA 基因的分析

2.3.2.1 NA 基因的同源性

对这 9 株 H3 亚型分离毒株的 NA 进行同源性比较(表 2-6), 其中 GX611、GX996、GX1659、HLJ684 和 HLJ546 核苷酸同源性较高, 在 98.7%~99.9%之间。剩余 4 株病毒的同源性在 92.6%~99.6%之间。但前 5 株病毒与后 4 株病毒的 NA 基因相比, 同源性较低, 在 88%~89.9%之间, 说明它们并不属于同一分支, 在核苷酸序列上有一定的差异。

表 2-6 分离毒株 NA 基因的同源性比较

Table.2-6 Sequence similarity of NA genes of isolated viruses

1	2	3	4	5	6	7	8	9	virus	
1	88.5	94.0	88.7	88.1	88.9	88.9	97.0	97.7	A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)	
2	89.6		87.4	99.1	99.1	99.1	87.2	87.9	A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)	
3	94.7	89.2		87.7	87.0	87.9	92.3	93.0	A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)	
4	89.9	99.0	89.2		99.1	98.7	98.7	87.9	88.5	A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)
5	89.6	98.9	89.2	99.3		98.7	98.7	87.4	88.1	A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)
6	89.6	98.7	89.2	99.0	98.9		100.0	87.7	88.3	A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)
7	89.5	98.7	89.1	98.9	98.8	99.9		87.7	88.3	A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)
8	96.6	88.1	92.6	88.4	88.4	88.0	87.9		99.4	A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)
9	96.8	88.3	92.8	88.7	88.7	88.2	88.2	99.6		A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)

注: 右上为氨基酸, 左下为核苷酸

Note: The upper right is amino acid, and the lower left is nucleotide.

2.3.2.2 NA 的氨基酸序列分析

流感病毒与宿主之间的亲和力可能会由于 NA 蛋白上的糖基化位点改变而发生变化, 甚至对病毒颗粒的释放产生影响。对 2013~2018 年分离的 9 株 H3N2 亚型 SIV 的 NA 基因的糖基化位点分析发现(表 2-7), 其中 3 株 H3 亚型 SIV 在第 61、70、86、146 和 234 位点均有潜在糖基化位点, 但 GX978 在 86 位点糖基化位点缺失, GD35、LN57 和 LN322 在 234 位点糖基化位点缺失, GX996 在 200 位点增加一个潜在糖基化位点为 NAT。

表 2-7 NA 基因潜在糖基化位点的分析

Table 2-7 The Potential N-glycosylation sites of NA gene

毒株 Viruses	潜在糖基化位点 Potential N-glycosylation sites					
	61	70	86	146	200	234
A/swine/Guangdong/35/2013(H3N2)	NIT	NTT	NWS	NDT	-	-
A/swine/Guangxi/611/2017(H3N2)	NMT	NTT	NWS	NDT	-	NRT
A/swine/Guangxi/978/2017(H3N2)	NIT	NTT	-	NDT	-	NGT
A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)	NIT	NTT	NWS	NDT	NAT	NGT
A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)	NMT	NTT	NWS	NDT	-	NGT
A/swine/Heilongjiang/546/2017(H3N2)	NMT	NTT	NWS	NDT	-	NGT
A/swine/Heilongjiang/684/2017(H3N2)	NMT	NTT	NWS	NDT	-	NGT
A/swine/Liaoning/57/2017(H3N2)	NIT	NTT	NWS	NDT	-	-
A/swine/Liaoning/322/2018(H3N2)	NIT	NTT	NWS	NDT	-	-

2.3.2.3 NA 的进化分析

根据 NA 基因的进化树分析可知（图 2-2），本研究的 9 株 H3N2 猪流感病毒均分布于近代人源这一大的分支的 Moscow/99-like 亚系，但其中 GX611、GX996、GX1659、HLJ684 和 HLJ546 这 5 株毒株在进化关系上与 2007 年自北美的分离株 A/swine/Oklahoma/008722/2007 的 NA 基因更为接近，可能是由该毒进化而来。而 GX978、LN57、LN322 和 GD35 这 4 株病毒与 2013 年中国广西猪群中分离到的 A/swine/Guangxi/NNXD/2013 更为接近，可能是由该病毒相关病毒进化而来。

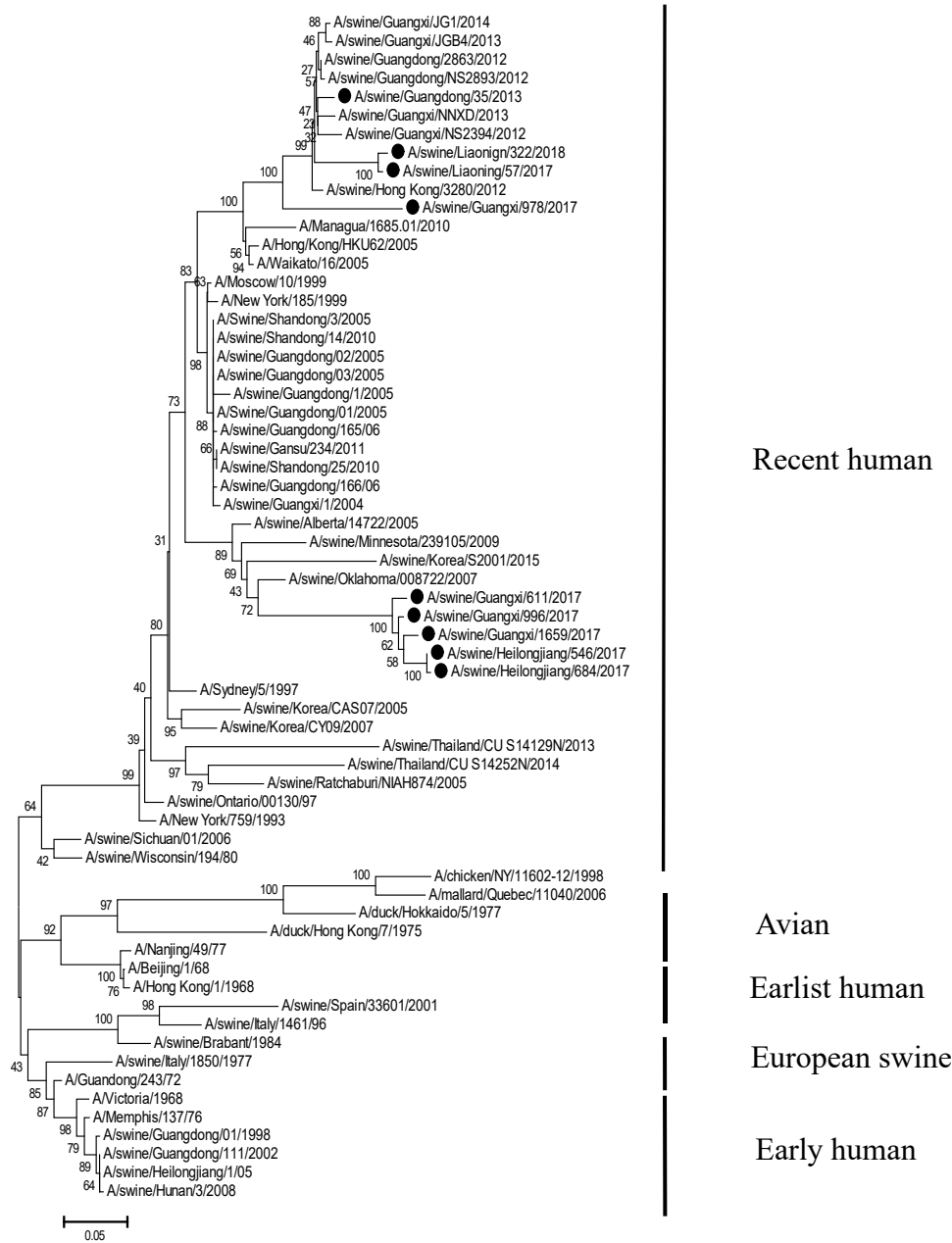


图 2-2 NA 基因进化树

Fig. 2-2 Phylogenetic tree of NA gene

2.3.3 抗原性差异分析

以 9 株毒株免疫 SPF 鸡后采集的血清进行交叉血凝抑制试验，以出现完全凝集等量红细胞的病毒最高稀释度的倒数为病毒的滴度；以出现完全抑制 4 单位抗原凝集的血清最高稀释度的倒数为 HI 抗体滴度（表 2-8）。结果显示，不同 SIV 之间的抗原性具有一定的差异。其中来自早期人源谱系的异源毒株 HuN3 与各血清均不发生交叉反应。GX1659 抗血清对其它各病毒的 HI 抗体滴度相对较高，达 1:128~1:512 之间，与 GX1659 病毒自身血凝效价达 1:1024，除分离株 GX996

和 LN57 外，其余 2013~2018 年分离株均与 GX1659 对应阳性血清血凝抑制效价最高。说明 GX1659 具有良好的免疫原性，可以用来构建 H3 亚型猪流感病毒疫苗株。

表 2-8 抗原分析结果

Table2-8 Results of antigenicity analyse

毒株	抗血清								
Virus	Antisera								
	GX1659	GD35	HLJ684	GX611	LN57	HLJ546	GX978	LN322	GX996
GX1659	1024	512	512	512	128	512	512	128	512
GD35	512	512	256	512	128	512	512	128	512
HLJ684	512	256	512	512	128	512	512	128	512
GX611	512	512	512	512	128	512	512	128	512
LN57	128	256	128	128	256	128	128	128	128
HLJ546	512	512	256	512	128	512	512	128	256
GX978	512	512	256	256	64	256	512	64	128
LN322	256	256	128	64	128	128	128	256	128
GX996	256	256	256	256	128	256	512	64	512
HuN3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.4 讨论

猪流感病毒主要感染猪，而猪作为猪流感病毒的宿主，其气管上皮细胞同时具有禽流感病毒受体和人流感病毒的受体，对人流感病毒和禽流感病毒都高度敏感，可以同时感染人流感病毒和禽流感病毒。不同宿主来源的流感病毒感染猪，并在猪体内不断发生基因重排，新形成的病毒随着时间的推移可能在猪群中形成稳定的谱系，因此猪又被称为人、禽、猪流感病毒的“混合器”。

1998 年在北美猪群中爆发的北美三重排 H3 亚型猪流感，其病毒基因片段由猪流感、禽流感和人流感病毒重组而成(WEBBY et al., 2000)。2009 年在世界范围内流行的 H1N1 甲型流感病毒，其基因片段同样由猪流感、禽流感和人流感病毒重组而成。2011 年美国人群中爆发的 H3N2 变异株则是北美三重排 H3N2 流感病毒与 2009/H1N1 流感病毒重组产生(EPPERSON et al., 2013)。这些曾经出现的流感爆发或流行，都表明了猪及猪流感病毒在流感病毒的进化中占据着重要的地位。

本研究对 2013~2018 年分离的 9 株 H3N2 SIV 的 HA 和 NA 进行同源性分析，并构建了遗传进化树。发现近年来分离的 9 株 H3N2 亚型猪流感病毒株的 HA、NA 之间的同源性较高，在进化关系上都分布于近代人源谱系，与其中的 Moscow/10/99-like 亚系同处一个分支。因此，表面基因为近代人源谱系的猪流感病毒仍然为近年来中国猪群中 H3N2 亚型 SIV 的优势流行毒株。

对 HA 氨基酸序列分析，所有病毒在 38 (NGT)、79 (NCT)、262 (NST)、301 (NGS) 和 499 (NGT) 这五个潜在糖基化位点都是保守的，除 GD35 外的其余病毒均有 142 (NWT) 潜在糖基化位点，HLJ546 和 HLJ684 还增加了新的糖基化位点 54 (NAT)，糖基化位点的改变能否会造成抗原性以及致病力的改变还需后续验证。此外，对 H3 亚型流感病毒来说，HA 蛋白的 226 位和 228 位的氨基酸，在影响 HA 蛋白受体和宿主细胞结合的特异性方面起着关键作用，本研

究的所有分离株均符合人型唾液酸受体结合类型，提示我们这 9 株病毒可能有感染人的风险。通过对抗原位点的研究发现，这 9 株病毒的抗原位点与市售商品化疫苗株病毒 HLJ10 相比，有超过 40% 的抗原位点处氨基酸发生突变，这提示我们病毒的抗原性可能发生了变异。对 2013~2018 年分离的 9 株 H3 亚型毒株进行抗原性差异分析发现，虽然这 9 株病毒均不可与来自早期人源的病毒 HuN3 发生 HI 反应，但这 9 株病毒之间都可以互相发生反应，且不同 H3 亚型病毒之间的抗原性具有一定的差异，其中 GX1659 具有较为广谱的抗原性。

本实验通过对 2013~2018 年 9 株 H3N2 SIV 的表面基因进行遗传演化分析和抗原的差异性分析，选取 GX1659 的表面基因 HA、NA 作为 H3 亚型猪流感病毒疫苗株的表面基因供体，构建重组 H3N2 亚型猪流感疫苗株。

第三章 重组 H3N2 亚型猪流感疫苗株的构建

3.1 材料

3.1.1 毒株与质粒

根据流感病毒监测和抗原性分析, 选取 A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)的表面基因作为 H3N2 亚型猪流感疫苗株表面基因的供体。A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2) (简称 GX1659), 由本实验室分离与保存; A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) 的 8 质粒系统及 pBD 载体由本实验室保存。

3.1.2 菌种、细胞和鸡胚

E.coli DH5 α 购自 TaKaRa 公司, 293T 细胞由本实验室保存, SPF 鸡胚购买于中国农科院哈尔滨兽医研究所。

3.1.3 主要试剂及仪器设备

OPTI-MEM, DMEM, TPCK-trypsin, 青链霉素混合液购自 GIBCO 公司; LTX 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 质粒中提试剂盒购自 QIAGEN 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; PrimeStar PCR 扩增酶购自 Takara 公司; DNA Marker 购自北京博奥龙免疫技术公司; 测序试剂购自 ABI 公司。

3.2 方法

3.2.1 重组质粒的构建

3.2.1.1 引物的设计和合成

本研究根据 GX1659 的测序结果, 按照其表面基因 HA、NA 以及 pBD 载体的序列, 设计 pBD 载体线性化引物以及 HA、NA 扩全长引物。引物由吉林长春库美生物技术有限公司合成。

SDS-PAGE 电泳仪器购自 Bio-Rad; PCR 仪购自 Eppendorf; 近红外成像扫描系统购于 Odyssey CLX。

3.2.1.2 病毒 RNA 的提取和反转录

具体步骤如 2.2.2

3.2.1.3 重组病毒表面基因重组质粒的构建与鉴定

以 pBD 载体和 GX1659 病毒 cDNA 为模板,利用表 3-1 中的 pBD 线性化克隆引物和 GX1659 株病毒的表面基因 HA 和 NA 扩增引物,分别扩增线性化 pBD 载体、GX1659-HA 片段和 GX1659-NA 片段,通过胶回收纯化扩增片段。按同源重组试剂说明书,将回收片段分别与线性化 pBD 载体连接,连接产物转化后挑菌,提取的重组质粒经 PCR 鉴定后进行序列测定。

表 3-1 扩增 GX1659 HA 和 NA 引物及 pBD 引物

Table3-1 Primers of GX1659 used for HA and NA gene and pBD primer

引物 Primer	引物序列 Primer Sequences(5' -3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
pBD-clone	<u>TGCTTTTGCTGCCG</u> <u>GATGGTCCCAGCCT</u>	<u>TTCTACTAATAACCCGGCGGCCCAAAATG</u>
GX1659-HA	<u>TGCCG</u> <u>GCCAGCAAAAGCAGGGGATA</u>	<u>CGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG</u>
GX1659-NA	<u>TGCCG</u> <u>GCCAGCAAAAGCAGGAGTAA</u>	<u>CGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG</u>

注:同源臂用下划线表示

Note: Homologous arms are underlined

3.2.3 重组病毒的拯救

将测序正确的阳性质粒命名为 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA,并按照 QIAGEN 中提质粒试剂盒的说明书提取阳性质粒。参照脂质体 LTX 转染试剂说明书,将分别含 GX1659 的 HA 和 NA 基因的质粒 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA 以及 A/Puerto Rico/8/34 的 6 个内部骨架质粒共转染 293T 细胞,6 h 后吸去培养液,加入含 TPCK 胰酶的无血清的 OPTI-MEM 培养基,继续培养 48h。

将收集的上清接种到 9~11 日龄 SPF 鸡胚中,37 °C 孵育 48 h,收集鸡胚尿囊液。通过 HA 试验,测定尿囊液血凝活性,收集有血凝活性的鸡胚尿囊液并进行测序鉴定。

3.2.4 重组病毒 GX1659/PR8 和亲本病毒 GX1659 生长曲线的测定

将重组病毒 GX1659/PR8 和亲本病毒 GX1659 均稀释为 100 EID₅₀/100 μL,分别接种 18 枚 9~11 日龄的 SPF 鸡胚中,在 37 °C 孵育 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 时,分别随机选取 3 枚鸡胚,收集其尿囊液并测定其血凝效价。同时,将上述不同时间收获的病毒尿囊液 10 倍倍比稀释接胚,在接胚后 48 h 测定 HA 效价,按 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。根据各时间段的 HA 效价和 EID₅₀ 分别绘制重组病毒 GX1659/PR8 与亲本病毒 GX1659 在鸡胚中的 HA 效价曲线和病毒增殖曲线。

3.3 结果

3.3.1 猪流感病毒 GX1659 表面基因 HA 和 NA 扩增结果

以猪流感病毒 GX1659 的 cDNA 为模板对其表面基因 HA 和 NA 进行扩增。PCR 产物经 10g/L 琼脂糖核酸凝胶电泳后得到约为 1700 bp 和 1400 bp 的目的条带（图 3-1）。片段大小与 HA 和 NA 基因片段大小相符。

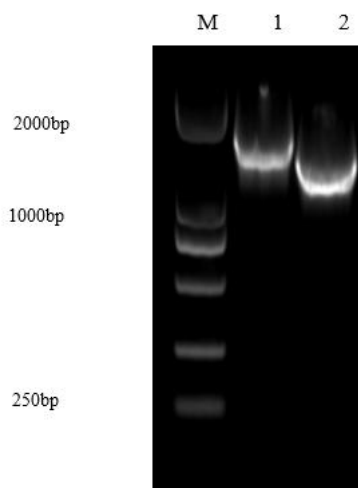


图 3-1 GX1659 表面基因 HA 和 NA 扩增结果

Fig. 3-1 PCR amplification of HA and NA Surface genes from GX1659

M: DL2000 Marker; 1: HA 扩增产物; 2: NA 扩增产物

M: DL2000 Marker; 1: RT-PCR product of HA gene; 2: RT-PCR product of NA gene

3.3.2 重组病毒表面基因重组质粒的构建

我们用同源重组的方法构建了重组质粒 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA。经核酸跑胶鉴定，获得特异性的目的条带（图 3-2），测序结果表明重组质粒的序列与预期结果一致。重组质粒 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA 构建成功。

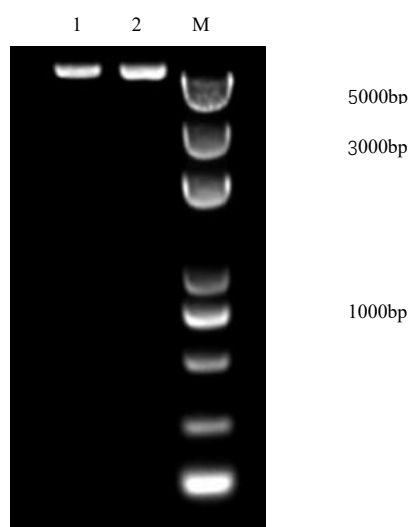


图 3-2 重组质粒 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA 的 PCR 鉴定

Fig.3-2 Amplification of pBD-GX1659-HA and pBD-GX1659-NA by PCR

M: DL5000 Marker; 1: pBD-GX1659-HA; 2: pBD-GX1659-NA

M: DL2000 Marker; 1: pBD-GX1659-HA; 2: pBD-GX1659-NA

3.3.3 重组 H3N2 流感病毒 GX1659/PR8 的拯救

将分别含 GX1659 的 HA 和 NA 基因的质粒 pBD-GX1659-HA 和 pBD-GX1659-NA 以及 A/Puerto Rico/8/34 的 6 个内部骨架质粒共转染 293T 细胞。转染 48 h 后收集上清并接胚，37 °C 孵育 48 h 后收集尿囊液，测定血凝效价达 128。将尿囊液在 SPF 鸡胚中传三代，血凝效价达到 512。

3.3.4 重组 H3N2 亚型猪流感病毒 GX1659/PR8 的鉴定

将传三代后的重组 H3N2 亚型猪流感病毒 GX1659/PR8 的 HA、NA 基因扩增并测序，结果显示拯救出的重组病毒 GX1659/PR8 与原始病毒 GX1659 的 HA 和 NA 基因片段序列相同。

3.3.5 GX1659/PR8 和 GX1659 在鸡胚上的生长曲线

亲本病毒 GX1659 和传三代后的重组病毒 GX1659/PR8 在鸡胚中的血凝效价曲线显示，在 12 h 之前，两株病毒均没有检测到血凝效价，在 24 h 之后，重组病毒 GX1659/PR8 的血凝效价明显高于亲本病毒 GX1659 (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$)，GX1659/PR8 在接种后 48 h 血凝效价达到峰值 256，GX1659 在 60 h 时可以达到峰值 128(图 3-3A)。增殖曲线结果也显示，重组病毒的病毒生长滴度 (EID₅₀) 一直高于亲本病毒，且在 24 h 时差异最显著 ($p < 0.05$) (图 3-3B)。

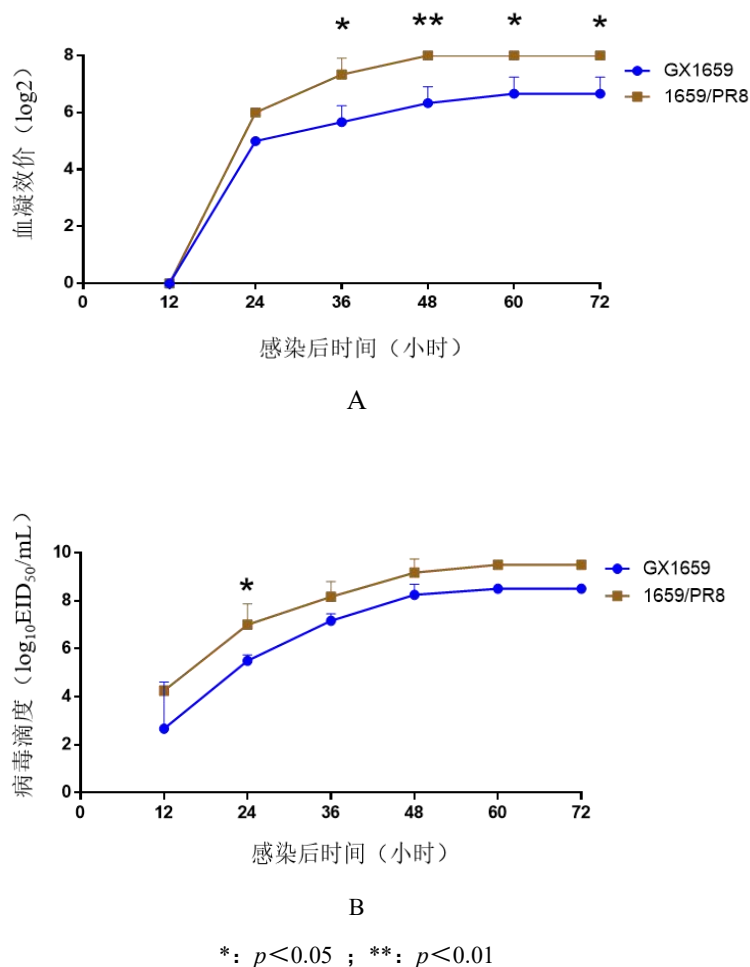


图 3-3 GX1659 与 GX1659/PR8 接种鸡胚后不同时间的血凝效价 (A) 和在鸡胚上的增殖情况 (B)

Fig.3-3 Hemagglutination titer and Proliferation curve of GX1659 and GX1659/PR8 in embryonated chicken eggs at different inoculation time

3.4 讨论

疫苗免疫被认为是控制猪流感的有效手段。1994 年,猪流感灭活疫苗在美国首先商品化并投入使用,在预防猪流感的过程中发挥了重大作用。研究表明,常规的灭活疫苗可有效诱导针对抗原相同或非常相似的流感病毒株的保护性免疫,并通过体液免疫反应产生高滴度的抗体,可以在不引起广泛炎症的情况下早期中和病毒(ROBERTSON et al., 1987)。

在大规模生产中,猪流感疫苗株除了要求与猪群中流行毒株的抗原性相匹配外,还需要具备高繁殖力的特性,然而,自然分离的流行野毒株可能并不能在鸡胚或细胞高水平的复制,因此降低了自然分离毒株直接作为大规模生产疫苗株的可能性。直到二十世纪末流感的反向遗传技术逐渐发展起来,为生产高繁殖力的流感病毒疫苗株提供了有效的技术支持。

本研究采用反向遗传技术,以高繁殖力且传代致弱的 PR8 病毒的内部基因为骨架,结合 H3 亚型猪流感流行毒株 GX1659 的表面基因 HA、NA,成功拯救出了 H3 亚型重组流感病毒 GX1659/PR8。病毒的生长曲线显示,重组病毒 GX1659/PR8 的鸡胚适应力良好,在鸡胚上的增

殖能力显著高于亲本毒株 GX1659。对 GX1659/PR8 的表面基因测序,结果显示其基因序列和亲本病毒 GX1659 完全一致,抗原性分析重组病毒 GX1659/PR8 良好的保留了亲本病毒 GX1659 的抗原性。

此外,也有研究表明,在哺乳动物细胞中繁殖的流感病毒在结构和抗原性上与天然病毒相似(DONIS et al., 2014; KATZ et al., 1990)。在许多国家,MDCK 细胞已用于临床研究和灭活流感疫苗的商业化生产。在雪貂中进行的一项研究表明,与在鸡胚中生长的疫苗相比,在 MDCK 细胞中繁殖制备的灭活流感病毒诱导机体产生的 HI 和中和抗体水平高,并具有出众的免疫保护作用(KATZ et al., 1989)。因此,可以选择 MDCK 细胞用于大规模生产基于细胞培养的流感疫苗。但是,在无血清和动物成分的条件下,使用细胞繁殖的疫苗种子病毒的滴度并不高,且证明基于细胞的疫苗生产的保护优势可能是一个非常复杂且昂贵的过程。

因此,如今在全球范围内仍然是用鸡胚广泛生产流感疫苗,但不可避免的是在疫苗生产过程中会消耗大量的鸡胚,并且流感病毒在鸡胚中的繁殖可能会导致适应鸡胚的突变,从而影响流感疫苗的抗原性和保护效力(RUAN et al., 2020)。所以,我们还应继续优化基于鸡胚的生产平台来生产流感疫苗。

第四章 疫苗的免疫效力评估

4.1 材料

4.1.1 攻毒毒株和疫苗株

本研究中所用疫苗株为上一章所述方法拯救的重组病毒 GX1659/PR8，灭活后经哈尔滨兽医研究所工艺平台加工获得油乳灭活苗。

攻毒亲本毒株 A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)、同源毒株 A/swine/Guangxi/996/2017(H3N2)、异源毒株 A/swine/Hunan/3/2008(H3N2)由本实验室分离保存。

4.1.2 实验动物

9~11 日龄 SPF 鸡胚购买于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所；SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠（雌）购自北京维通利华公司；猪购自哈尔滨某猪场，经检测为流感病毒血清学阴性猪。

4.1.3 主要试剂及仪器设备

脱脂奶粉购自 BD-Pharmingen 公司；HRP 标记的羊抗猪的 IgG 酶标二抗购自 Solarbio 公司；HRP 标记的羊抗鼠的 IgG 酶标二抗购自 Abbkine 公司；TMB 显色液购自 ABM 公司；RDE 受体破坏酶购自日本生研公司；96 孔酶标板购自 Corning 公司。

聚焦式荧光多功能分析仪购自 PE。

4.2 方法

4.2.1 以小鼠为模型对疫苗的免疫效力评估试验

4.2.1.1 免疫程序

(1) 将 18 只 6 周龄小鼠随机分为 3 组，前两组为实验组，第三组为 PBS 对照组。在第一次免疫之前，各组小鼠分别收集血清作为空白对照。

(2) GX1659/PR8 组每只小鼠免疫原为 GX1659/PR8 灭活浓缩后的病毒尿囊液（血凝效价 1024）；GX1659/PR8+adjuvant 组每只小鼠免疫原为 GX1659/PR8 灭活乳化的油乳苗（血凝效价 1024）；PBS 对照组每只小鼠免疫 200 μ L 的无菌 PBS。首免 2 周后各组以相同免疫剂量进行二免。小鼠具体免疫程序如表 4-1 所示。

表 4-1 试验组小鼠免疫程序

Table 4-1 Vaccination schedule of mice

组别	免疫剂量 (μL)	免疫次数	免疫方式
Group	Dose	Time	Method
GX1659/PR8	200 (血凝效价 1024)	2	皮下
GX1659/PR8+adjuvant	200 (血凝效价 1024)	2	皮下
PBS	200	2	皮下

(3) 在小鼠免疫后的四周内, 每周采用眼眶静脉采血的方式收集并分离一次各组别的小鼠血清, 检测疫苗免疫后血清中抗体水平的变化。本研究用 HI 检测一免后 4 周内各组小鼠血清中 HI 抗体; 用 ELISA 的方法检测一免后 4 周内各组小鼠的特异性 IgG 抗体; 同时在鸡胚上连续检测一免 4 周内各组小鼠免疫后的血清中和抗体。

4.2.1.2 小鼠血清 HI 抗体效价检测

将从小鼠眼眶中采集到的新鲜血液在 37°C 静置 1 h 后放置 4°C 过夜, 10000 rpm 离心 5 min 取上清, 收集的上清即为小鼠的血清样品。血清样品需处理, 以去除血清中的非特异性凝集素, 使用 RDE 受体破坏酶, 按 1:3 的体积混匀后, 37°C 孵育 18~20 h, 56°C 灭活 30 min。处理完成后, 即可按照《中国兽药典》方法进行 HI 抗体效价的检测。

4.2.1.3 小鼠血清中和抗体效价检测

在鸡胚上用 NT 方法检测血清中和抗体效价, 具体操作如下:

- (1) 按照常规方法检测病毒 EID_{50} , 并将病毒稀释至 $100\text{EID}_{50}/100\mu\text{L}$ 。
- (2) 将待检血清用含双抗的 PBS 先 1:10 稀释后, 按照 2 倍比稀释, 稀释 8 个梯度。
- (3) 取各稀释度的血清, 与等量的 EID_{50} 含量的病毒稀释液混合, 37°C 温箱静置 1 h, 同时设立阴阳性血清对照和病毒对照。
- (4) 鸡胚接种, 将各稀释度的血清与病毒混合液接种至 SPF 鸡胚, 每个稀释度接种 3 枚, 每枚 0.1mL。将接种后的鸡胚 37°C 温箱恒温孵育, 48h 后收集鸡胚尿囊液, 通过血凝实验判定病毒是否被中和。中和效价的计算参照 Reed-Muench 法。

4.2.1.4 小鼠血清中特异性 IgG 抗体的检测

本实验用终点稀释 ELISA 的方法检测各组别小鼠血清中抗病毒的特异性 IgG 抗体水平, 方法如下:

1. 通过鸡胚大量增殖病毒, 收集病毒液灭活后进行蔗糖梯度离心浓缩纯化病毒, 步骤如下:
 - (1) 用 PBS 配置 20%、40%、60% 蔗糖溶液, 37°C 过夜, 完全溶解后常温保存。
 - (2) 灭活后的病毒液置于高速离心机中 8000 rpm、 4°C 离心 30 min。
 - (3) 收集离心的上清液, 置于超速离心机中, 配平, 30000 rpm、 4°C 离心 2 h。

(4) 弃上清, 加 200 μL PBS, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜溶解。

(5) 用 5 mL 注射器将 3 mL 20% 蔗糖加入离心管底部, 然后将 3 mL 40% 蔗糖加入 20% 蔗糖底部, 将 3 mL 60% 蔗糖加入 40% 蔗糖底部, 最后将过夜溶解的病毒液加到最上层, 用 PBS 配平后, 置于超速离心机中, 30000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 h。

(6) 离心完成后, 将 40%~60% 之间的病毒液用枪头吸出, 用 PBS 配平后, 30000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 h。

(7) 弃去上清, 加入 1 mL PBS 溶解病毒沉淀, 用分光光度计检测纯化产物浓度, 并保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2. 通过纯化病毒采用终点稀释 ELISA 方法检测小鼠血清中的抗病毒 IgG 抗体水平, 步骤如下:

(1) 用 PH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液将纯化病毒稀释为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

(2) 弃去包被液, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 用 PBS 配置 5% 脱脂乳, 以 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入脱脂乳, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 1 h 用于封闭。

(3) 弃去封闭液, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 将血清样品以一定比例倍比稀释作为一抗, 每孔加入 100 μL 血清稀释液, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 1 h。

(4) 弃去一抗稀释液, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 将羊抗鼠 IgG 按 1:5000 稀释作为二抗, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 1 h。

(5) 弃去二抗, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 避光, 每孔加入 50 μL TMB 显色液, 静置 10 min。

(6) 每孔加入 50 μL 2M 的 H_2SO_4 终止液 (2M 的 H_2SO_4) 终止反应。

(7) 使用酶标仪在 A450nm 处检测 OD 值并参照《国家流感中心操作规程》判定结果。

4.2.1.5 攻毒保护试验

为探究疫苗株的交叉免疫保护效果, 我们将 48 只 6 周龄小鼠随机分为两组, 疫苗免疫组和 PBS 对照组。在参照表 4-1 中 GX1659/PR8+adjuvant 组的免疫程序免疫后, 进行亲本病毒 GX1659 的攻毒保护实验、同源病毒 GX996 的攻毒保护实验和异源病毒 HuN3 的攻毒保护实验。在二免二周后将小鼠使用干冰麻醉, 以 $10^6\text{EID}_{50}/50\text{uL}$ 的剂量滴鼻攻毒, 攻毒后第 3 天每组取出 3 只小鼠的鼻甲和肺脏研磨, 离心后将梯度稀释, 接种于 9~10 日龄的 SPF 鸡胚, 病毒滴定。按照 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

剩余 BALB/c 小鼠每天记录体重变化和临床症状, 直至感染后 14 d。

4.2.2 以猪为模型对疫苗的免疫效力评估试验

4.2.2.1 猪的免疫程序

(1) 将 5 周龄健康的猪 12 只, 随机分成 3 组, 前两组每组 4 只为实验组, 第三组 4 只为空白对照组。在第一次免疫之前, 各组猪分别收集血清作为阴性对照。

(2) 实验组猪的免疫原为 GX1659/PR8 灭活油乳苗, PBS 对照组猪免疫 1 mL PBS, 具体免

疫程序如表 4-2 所示。

表 4-2 试验组猪免疫程序

Table 4-2 Vaccination schedule of pigs

组别	免疫剂量 (mL)	免疫次数	免疫方式
Group	Dose	Time	Method
One-dose	1 (血凝效价 1024)	1	颈部肌肉
Two-dose	1 (血凝效价 1024)	2	颈部肌肉
PBS	1	2	颈部肌肉

(3) 在首免后 6 周内每周收集并分离一次各组猪血清, 检测疫苗免疫后猪血清中的抗体效价变化。

4.2.2.2 猪血清 HI 抗体的检测

具体步骤参照 4.2.1.2。

4.2.2.3 猪血清中和抗体效价检测

具体步骤参照 4.2.1.3。

4.2.2.4 猪血清中特异性 IgG 抗体的检测

具体步骤参照 4.2.1.4。

4.2.2.5 免疫持续期试验

在首次免疫后的不同时期对 One-dose 和 Two-dose 两组猪分别采血并分离血清, 用 RDE 受体破坏酶处理后, 检测猪血清 HI 抗体效价。

4.3 结果

4.3.1 以小鼠为模型对疫苗的免疫效力评估结果

4.3.1.1 HI 和 NT 抗体检测结果

本实验通过血凝抑制试验检测免疫后 4 周内小鼠血清 HI 和 NT 抗体水平的变化, 由图 4-1 可知, 免疫重组灭活乳化苗 GX1659/PR8+adjuvant 组在免疫过后的 4 周内, 小鼠体内产生了与亲本病毒 GX1659 反应较高水平的 HI 和 NT 抗体, 最高效价平均值分别为 1:2133.3 和 1:1760; 疫苗诱导产生与同源病毒 GX996 反应的 HI 和 NT 抗体效价相对 GX1659 较低, 分别为 1:1173.3 和 1:1280; 而针对异源病毒的 HuN3 的 HI 和中和抗体最低, 免疫后四周内的 HI 和中和抗体效价均

低于 20。与此同时，未加佐剂乳化的 GX1659/PR8 组在免疫过后的 4 周内，HI 和 NT 抗体水平也持续升高，在二免二周后达到最高，但均低于 GX1659/PR8+adjuvant 组。以上数据表明重组灭活疫苗株 GX1659/PR8 免疫小鼠后，可诱导小鼠针对同源病毒产生高水平的 HI 和 NT 抗体效价，但对于异源病毒的 HI 和 NT 抗体中和抗体滴度较低，此外，GX1659/PR8+adjuvant 组针对同源病毒产生的 HI 和 NT 抗体效价要高于 GX1659/PR8 组。

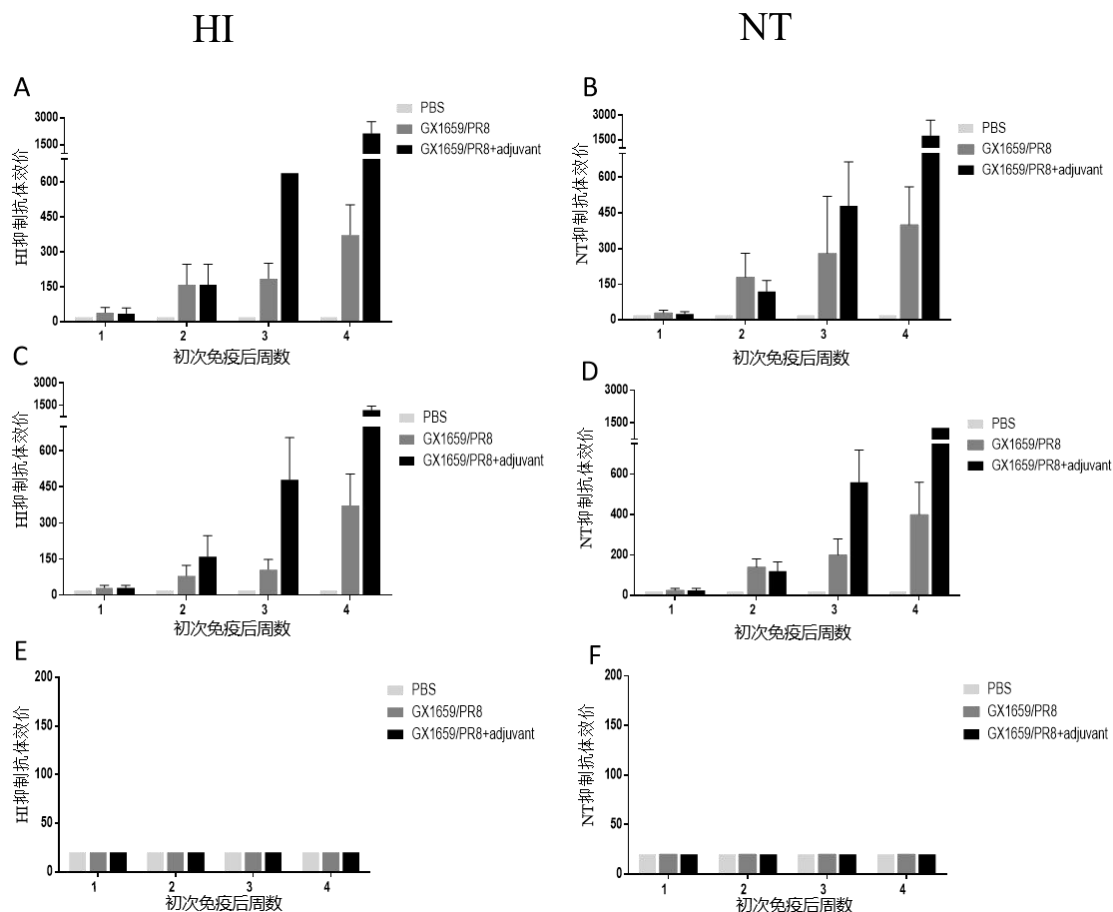


图 4-1 小鼠抗体效价检测

Fig 4-1 Detection of antibody titers of mice

A, B: 以亲本病毒 GX1659 为抗原 C, D: 以同源病毒 GX996 为抗原 E, F: 以异源病毒 HuN3 为抗原

A,B: Use parent virus GX1659 as antigen C,D: Use homologous virus GX996 as antigen E,F: Using heterologous virus HuN3 as antigen

4.3.1.2 小鼠血清中特异性 IgG 抗体检测

本实验通过终点稀释 ELISA 检测各组的小鼠在免疫后 4 周内小鼠血清中特异性 IgG 抗体效价水平。由表 4-3 可知，在首次免疫后 4 周内，免疫灭活重组病毒 GX1659/PR8 乳化苗的小鼠和仅仅免疫灭活重组病毒 GX1659/PR8 的两组小鼠血清中 IgG 抗体效价均持续升高。其中 GX1659/PR8+adjuvant 组在免疫第 4 周针对亲本病毒 GX1659 的抗体效价达 1:102400，针对同源病毒 GX996 的抗体效价达 1:76800，针对异源病毒 HuN3 的抗体效价达 1:38400。与此同时而未添加佐剂免疫的 GX1659/PR8 组在免疫后的 4 周内 IgG 抗体也逐渐升高，在免疫第 4 周针对亲本

病毒 GX1659 的抗体效价达 1:38400, 针对同源病毒 GX996 的抗体效价达 1:25600, 针对异源病毒 HuN3 的抗体效价达 1:12800。以上结果表明 GX1659/PR8 重组灭活疫苗株免疫小鼠后, 可诱导小鼠产生较高的 IgG 抗体效价, 且 GX1659/PR8+adjuvant 组的 IgG 抗体效价要高于 GX1659/PR8 组。

表 4-3 小鼠血清中 IgG 抗体效价检测
Table 4-3 detection of IgG antibody titers in serum of mice

抗原 Antigen	组别 Groups	IgG 抗体效价 IgG antibody titers			
		1	2	3	4
GX1659	GX1659/PR8+adjuvant	5600	16000	51200	102400
	GX1659/PR8	2000	5600	19200	38400
	PBS	≤200	≤200	≤200	≤200
GX996	GX1659/PR8+adjuvant	3200	6400	51200	76800
	GX1659/PR8	2000	4800	12800	25600
	PBS	≤200	≤200	≤200	≤200
HuN3	GX1659/PR8+adjuvant	800	1600	25600	38400
	GX1659/PR8	400	1600	3200	12800
	PBS	≤200	≤200	≤200	≤200

4.3.1.3 攻毒保护试验结果

为了评价 GX1659/PR8 对 H3 亚型 SIV 的保护效果, 我们对二免二周的小鼠进行了亲本病毒 GX1659、同源病毒 GX996、异源病毒 HuN3 的攻毒保护试验, 以体重变化和脏器病毒滴度来评价 GX1659/PR8 的免疫保护效果。

我们以 $10^6\text{EID}_{50}/50\mu\text{L}$ 剂量的亲本病毒 GX1659 对二免二周的小鼠进行攻击后, 免疫组小鼠体重平稳上升, 对照组小鼠体重下降 4 d 后迅速回升, 小鼠的脏器滴定结果表明, 免疫组小鼠的鼻甲和肺脏中均不能检测到病毒的复制, 而对照组小鼠的鼻甲和肺脏中则可以检测到较高滴度的病毒含量, 差异极显著 (图 4-2B, $p < 0.01$, $p < 0.01$)。由此可见, GX1659/PR8 疫苗株可以完全抵御亲本病毒 GX1659 的攻击。

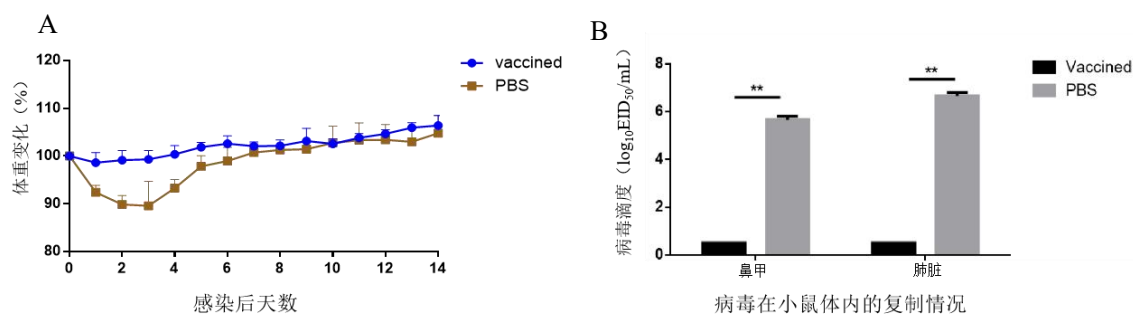


图 4-2 GX1659/PR8 在小鼠中对 GX1659 攻击的保护作用

Fig 4-2 Protective efficacy of GX1659/PR8 in mice against GX1659 challenge

A: 体重变化 B: 脏器滴定

A: Weight loss B: Virus titer in organs

我们以 $10^6\text{EID}_{50}/50\mu\text{L}$ 剂量的同源病毒 GX996 对二免二周的小鼠进行攻击后, 免疫组小鼠比较稳定, 对照组小鼠体重下降 4~5 d 后逐渐回升, 小鼠的脏器滴定结果表明, 与对照组相比, 免疫组小鼠能有效抑制病毒在脏器内的复制情况 (图 4-3B, $p < 0.01$, $p < 0.01$), 剖杀的三只小鼠, 其中两只鼻甲和肺脏均未检测到病毒, 另一只检测到较低滴度的病毒含量。结果显示, GX1659/PR8 疫苗株对同源病毒的攻击有很好的保护作用。

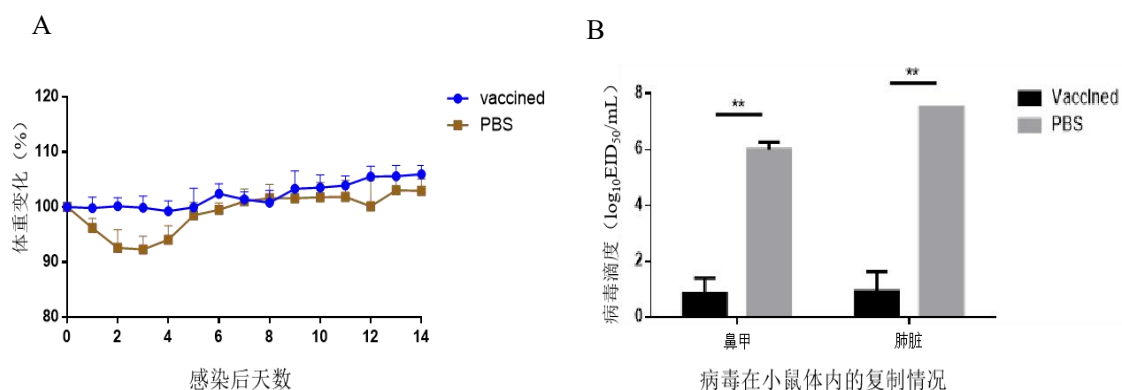


图 4-3 GX1659/PR8 在小鼠中对 GX996 攻击的保护作用

Fig 4-3 Protective efficacy of GX1659/PR8 in mice against GX996 challenge

A: 体重变化 B: 脏器滴定

A: Weight loss B: Virus titer in organs

我们以 $10^6\text{EID}_{50}/50\mu\text{L}$ 剂量的异源病毒 HuN3 对二免二周的小鼠进行攻击后, 免疫组小鼠和对照组小鼠体重均呈现明显的下降趋势; 脏器滴定结果表明, 相对于对照组小鼠, 免疫组小鼠的鼻甲中检测到的病毒含量显著降低, 但免疫组小鼠肺脏中检测到的病毒含量与对照组无明显差异 (图 4-4B, $p < 0.01$, $p > 0.05$)。

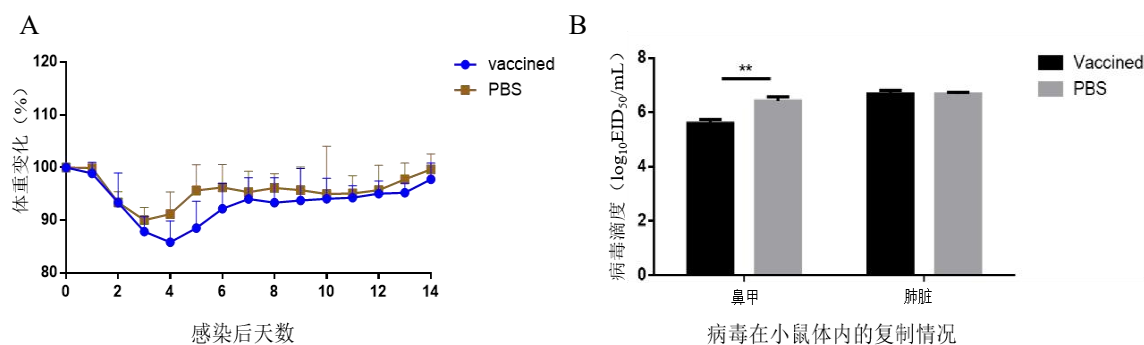


图 4-4 GX1659/PR8 在小鼠中对 HuN3 攻击的保护作用

Fig 4-4 Protective efficacy of GX1659/PR8 in mice against HuN3 challenge

A: 体重变化 B: 脏器滴定

A: Weight loss B: Virus titer in organs

4.3.2 以猪为模型对疫苗的免疫效力评估结果

4.3.2.1 猪血清 HI 抗体检测结果

以 GX1659 为检测抗原，通过血凝抑制试验检测猪在免疫后 6 周内猪体内血清的 HI 抗体水平变化。由图 4-5 可知，One-dose 免疫组和 Two-dose 免疫组在免疫后 6 周内均能产生较高水平的针对亲本病毒 GX1659 的 HI 抗体。其中，One-dose 免疫组在首次免疫 6 周内 HI 抗体效价逐渐升高并最终达到 1:560。而 Two-dose 免疫组的 HI 抗体效价水平在二免之后显著增高并在二免后 3 周达 1:2560，而 PBS 组猪血清中 HI 抗体效价始终低于 1:20。结果表明，重组灭活疫苗株 GX1659/PR8 免疫猪后，可诱导产生高水平的针对亲本病毒 GX1659 的 HI 抗体。

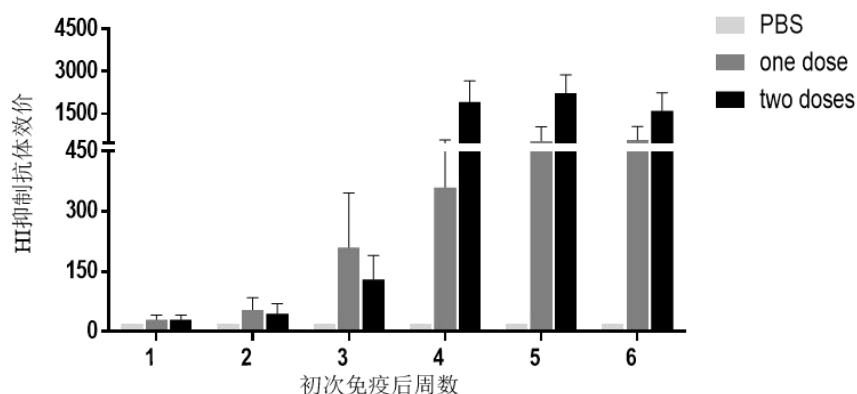


图 4-5 猪 HI 抗体效价检测

Fig 4-5 Detection of HI antibody titers of pigs

4.3.2.2 猪血清中和抗体检测

以 GX1659 为检测抗原，通过鸡胚中和实验检测猪在免疫后 6 周内 NT 抗体水平的变化。由

图 4-6 可知，免疫 One-dose 免疫组在免疫过后的 6 周内，NT 抗体水平持续升高，效价达 1:360。Two-dose 免疫组血清在二免前 NT 抗体效价与 One-dose 免疫组相似，在二免后 NT 抗体水平迅速升高，并在二免 3 周时产生的 NT 效价最高可达 1:2560。在 PBS 组中猪血清中 NT 抗体效价始终低于 1:20。结果表明，重组灭活疫苗株 GX1659/PR8 免疫猪后，可诱导产生高水平的针对亲本病毒 GX1659 的中和抗体。

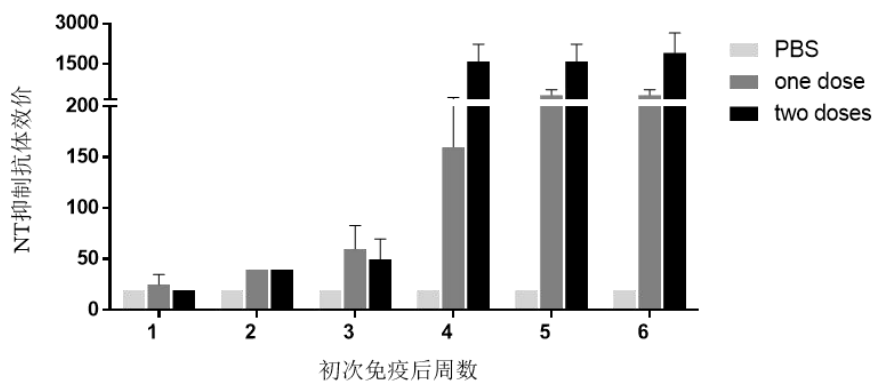


图 4-6 猪 NT 抗体效价检测

Fig 4-6 Detection of NT antibody titers of pigs

4.3.2.3 猪血清中特异性 IgG 抗体检测

以 GX1659 为抗原，通过终点稀释 ELISA 检测猪在免疫后 6 周内特异性 IgG 抗体水平变化。由表 4-4 可知，猪血清中抗 GX1659/PR8 的特异 IgG 抗体在一免 1 周后便可检测到。在首次免疫后 6 周内，One-dose 组和 Two-dose 组的两组猪血清中 IgG 抗体效价持续升高，其中相比 One-dose 组，Two-dose 组的 IgG 抗体水平在二免之后显著升高并在二免后 3 周到达峰值 1:153600。结果表明重组灭活疫苗 GX1659/PR8 免疫猪后，可诱导产生高水平的针对亲本病毒 GX1659 的 IgG 抗体。

表 4-4 猪血清中 IgG 抗体效价检测

Table 4-4 detection of IgG antibody titers in serum of pigs

组别 Groups	IgG 抗体效价 IgG antibody titers					
	1	2	3	4	5	6
One-dose	1000	2000	6000	12000	102400	102400
Two-dose	600	1600	4400	96000	128000	153600
PBS	≤200	≤200	≤200	≤200	≤200	≤200

4.3.2.4 免疫持续期试验

为探究疫苗对猪的免疫保护持续时间，我们进行了 GX1659PR8 对猪的主动免疫效力及持续期实验。在免疫一周后开始采血，血清经处理后，以 GX1659 为抗原测定其 HI 抗体，抗体检测结果表明，疫苗一免一周后即可诱导 HI 抗体产生，在免疫后 5~6 周 HI 抗体水平达最高，在免疫 180 d 后 HI 抗体滴度仍能保持在 1:40 及以上。

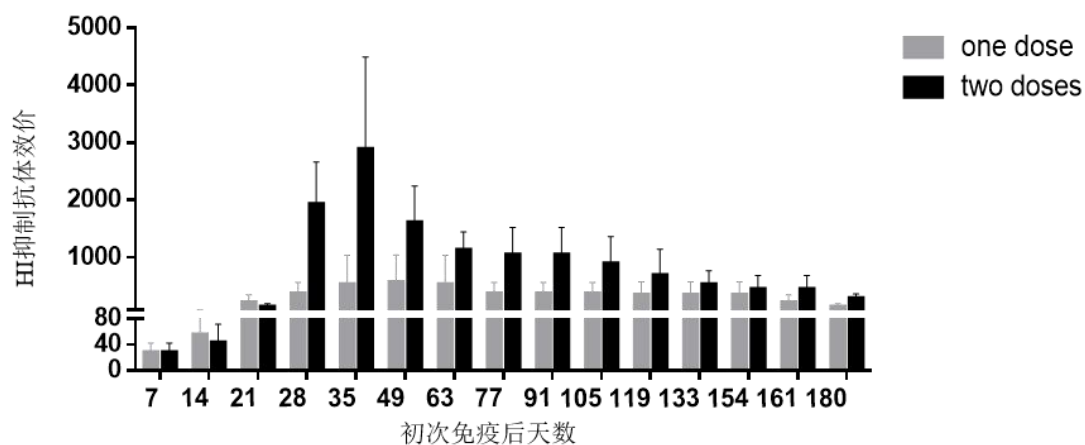


图 4-7 免疫后 HI 抗体的检测

Fig 4-7 Detection of HI antibody titer after vaccination

表 4-5 免疫持续期试验结果

Table 4-5 immune duration test results

组别	剂量	免疫次数	数量	免疫后天数	HI 抗体滴度		
					<20	20	≥40
A	1. 0ml	1	4	7	1/4	0/4	3/4
				14	0/4	1/4	3/4
				21	0/4	0/4	4/4
				28	0/4	0/4	4/4
				35	0/4	0/4	4/4
				63	0/4	0/4	4/4
				91	0/4	0/4	4/4
				126	0/4	0/4	4/4
				140	0/4	0/4	4/4
				160	0/4	0/4	4/4
B	1. 0ml	2	4	7	1/4	0/4	3/4
				14	1/4	0/4	3/4
				21	0/4	0/4	4/4
				28	0/4	0/4	4/4
				35	0/4	0/4	4/4
				63	0/4	0/4	4/4
				91	0/4	0/4	4/4
				126	0/4	0/4	4/4
				140	0/4	0/4	4/4
				160	0/4	0/4	4/4
			180	0/4	0/4	4/4	

4.4 讨论

猪的全病毒灭活疫苗虽然生产成本低,但迄今为止,已表现出良好的免疫原性和安全性,并在小鼠等动物模型中对其免疫保护效果进行了深入的评估(RUAN et al., 2018)。

本研究采用利用反向遗传学的方法构建重组 H3N2 亚型猪流感病毒 GX1659/PR8 并依据此病毒制备了灭活苗。在动物试验的过程中,该疫苗免疫后,能诱导机体产生针对亲本病毒和同源病毒的高水平 HI 抗体、NT 抗体和特异性 IgG 抗体,也能诱导针对异源病毒 HuN3 的血清 IgG 抗体,但抗体效价明显低于 GX1659 亲本病毒。同时,我们发现疫苗乳化后刺激机体产生的抗体效价高于灭活的病毒液直接免疫后产生的抗体效价;二次免疫诱导的抗体水平也比一免的抗体水平有明显的提高。

在小鼠二免后,我们通过滴鼻的方式,用亲本病毒、同源病毒和异源病毒对小鼠进行了攻毒保护实验。对于亲本病毒,免疫组小鼠被完全保护,肺脏和鼻甲均检测不到病毒的存在;对于同源病毒,免疫组的小鼠能有效抵抗病毒的感染,与对照组相比能有效抑制病毒在脏器内的复制;但是对于异源病毒,疫苗的保护效果并不理想。虽然 GX1659/PR8 疫苗株可以诱导小鼠产生与异源病毒 HuN3 结合的特异性 IgG 抗体,但它并不能保护小鼠抵抗异源病毒的感染。这与之前的报道一致,灭活疫苗针对同源病毒有效,但针对异源病毒只能提供有限的保护(QUAN et al., 2008; SOUZA et al., 2018),且当疫苗和攻击病毒属于同一亚型但抗原性不同时,甚至会增强呼吸道疾病的症状(VINCENT et al., 2008; VINCENT et al., 2012)。因为灭活疫苗是通过肌肉途径接种的,并且不能诱导足够的粘膜免疫力,而流感疫苗的交叉保护活性在很大程度上与粘膜免疫力有关。有研究表明,与通过肠胃外途径接种相比,疫苗通过鼻腔接种可以诱导更高的分泌型 IgA 产生。IgA 抗体具有比 IgG 抗体更高的亲和力,可以很容易地进入粘膜并且能够提供针对异源病毒的保护(MURAMATSU et al., 2014)。此外,通过鼻腔接种的疫苗使用有效的粘膜佐剂也可以提高疫苗效率,Milton Thomasc 等使用 Poly I:C 作为佐剂制备疫苗,可以诱导产生针对攻击病毒高水平的特异性 HI 和 IgG 抗体以及呼吸道中的 IgA 抗体,并提供针对同源和异源 SIV 攻击的保护(THOMAS et al., 2015)。

根据国内外大量研究表明,HI 抗体滴度与攻毒保护效果之间存在平行关系,当猪体内 HI 抗体滴度达到 1:40 及以上时,可对同源病毒的攻击具有保护作用(COUDEVILLE et al., 2010; DE JONG et al., 2003; HANNOUN et al., 2004)。本研究进行了猪的主动免疫及免疫持续期实验,猪在免疫后 28 d~42 d 内抗体水平达到峰值,之后抗体水平缓慢下降,但在 180 d 后抗体滴度仍在 1:40 以上。因此可以推断,该疫苗免疫猪后能为猪提供至少 180 天的保护,可以完全覆盖商品肉猪的生命周期。

综上所述,本实验构建的重组 H3N2 猪流感病毒 GX1659/PR8 具备成为 H3N2 亚型猪流感病毒灭活疫苗候选毒株的潜力,同时本研究为防控 H3N2 亚型 SIV 提供了有效的技术支持和疫苗产品储备。

第五章 结论

1. 选取 A/swine/Guangxi/1659/2017(H3N2)的表面基因 HA、NA 作为 H3 亚型猪流感病毒疫苗株的表面基因供体，以 PR8 内部基因为骨架，成功拯救出具有高繁殖力的重组猪流感病毒 GX1659/PR8。

2. GX1659/PR8 疫苗株能诱导小鼠产生针对同源病毒的高滴度 HI 抗体、NT 抗体以及特异性 IgG 抗体，能显著抑制同源 H3N2 亚型病毒在小鼠体内的复制，对同源 H3 亚型猪流感病毒的攻击能起到有效的保护作用。

3. GX1659/PR8 疫苗株能诱导猪产生针对同源病毒的高滴度 HI 抗体、NT 抗体以及特异性 IgG 抗体，猪接种疫苗后，HI 抗体滴度在免疫后 180 天仍能保持在 1:40 及以上。

参考文献

- 路伟, 猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 亚型分离鉴定及猪流感二价灭活疫苗的研制, 扬州大学, 2019.
- AYMARD M, GOURREAU J M, KAISER C, FONTAINE M, MADEC F, TILLON J P, 1985. [immunovirologic markers of the risk of influenza a h3n2 among swine]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 33(4-5): 283-291.
- BIKOUR M H, CORNAGLIA E, ELAZHARY Y, 1996. Evaluation of a protective immunity induced by an inactivated influenza h3n2 vaccine after an intratracheal challenge of pigs. *Can J Vet Res*. 60(4): 312-314.
- BOYD A C, RUIZ-HERNANDEZ R, PEROVAL M Y, CARSON C, BALKISSOON D, STAINES K, TURNER A V, HILL A V, GILBERT S C, BUTTER C, 2013. Towards a universal vaccine for avian influenza: Protective efficacy of modified vaccinia virus ankara and adenovirus vaccines expressing conserved influenza antigens in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus. *Vaccine*. 31(4): 670-675. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.047.
- BROWN I H, 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*. 74(1-2): 29-46. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00164-4.
- BRUSCHKE C J, PITTMAN M, LADDOMADA A, 2009. International regulations and standards for avian influenza, including the vaccine standards of the world organisation for animal health. *Rev Sci Tech*. 28(1): 379-389. DOI: 10.20506/rst.28.1.1852.
- CASTRUCCI M R, DONATELLI I, SIDOLI L, BARIGAZZI G, KAWAOKA Y, WEBSTER R G, 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza a viruses in italian pigs. *Virology*. 193(1): 503-506. DOI: 10.1006/viro.1993.1155.
- COUDEVILLE L, BAILLEUX F, RICHE B, MEGAS F, ANDRE P, ECOCHARD R, 2010. Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: Development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med Res Methodol*. 1018. DOI: 10.1186/1471-2288-10-18.
- COX M M, HOLLISTER J R, 2009. Flublok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*. 37(3): 182-189. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.02.014.
- DE FILETTE M, MARTENS W, ROOSE K, DEROO T, VERVALLE F, BENTAHIR M, VANDEKERCKHOVE J, FIERS W, SAELENS X, 2008. An influenza a vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem*. 283(17): 11382-11387. DOI: 10.1074/jbc.M800650200.
- DE JONG J C, PALACHE A M, BEYER W E, RIMMELZWAAN G F, BOON A C, OSTERHAUS A D, 2003. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel)*. 11563-73.
- DE JONG J C, SMITH D J, LAPEDES A S, DONATELLI I, CAMPITELLI L, BARIGAZZI G, VAN REETH K, JONES T C, RIMMELZWAAN G F, OSTERHAUS A D, FOUCHIER R A, 2007. Antigenic and genetic evolution of swine influenza a (h3n2) viruses in europe. *J Virol*. 81(8):

- 4315-4322. DOI: 10.1128/JVI.02458-06.
- DE JONG J C, VAN NIEUWSTADT A P, KIMMAN T G, LOEFFEN W L, BESTEBROER T M, BIJLSMA K, VERWEIJ C, OSTERHAUS A D, CLASS E C, 1999. Antigenic drift in swine influenza h3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine*. 17(11-12): 1321-1328. DOI: 10.1016/s0264-410x(98)00392-2.
- DENG L, CHO K J, FIERS W, SAELENS X, 2015. M2e-based universal influenza a vaccines. *Vaccines (Basel)*. 3(1): 105-136. DOI: 10.3390/vaccines3010105.
- DETMER S, GRAMER M, GOYAL S, TORREMORELL M, TORRISON J, 2013. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol*. 37085-112. DOI: 10.1007/82_2012_220.
- DONIS R O, INFLUENZA CELL CULTURE WORKING G, DAVIS C T, FOUST A, HOSSAIN M J, JOHNSON A, KLIMOV A, LOUGHLIN R, XU X, TSAI T, BLAYER S, TRUSHEIM H, COLEGATE T, FOX J, TAYLOR B, HUSSAIN A, BARR I, BAAS C, LOUWERENS J, GEUNS E, LEE M S, VENHUIZEN O, NEUMEIER E, ZIEGLER T, 2014. Performance characteristics of qualified cell lines for isolation and propagation of influenza viruses for vaccine manufacturing. *Vaccine*. 32(48): 6583-6590. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.06.045.
- DUCATEZ M F, WEBSTER R G, WEBBY R J, 2008. Animal influenza epidemiology. *Vaccine*. 26 Suppl 4D67-69. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.064.
- EKIERT D C, BHABHA G, ELSLIGER M A, FRIESEN R H, JONGENELEN M, THROSBY M, GOUDSMIT J, WILSON I A, 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*. 324(5924): 246-251. DOI: 10.1126/science.1171491.
- ENGVALL E, PERLMANN P, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). Quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*. 8(9): 871-874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.
- EPPELSON S, JHUNG M, RICHARDS S, QUINLISK P, BALL L, MOLL M, BOULTON R, HADDY L, BIGGERSTAFF M, BRAMMER L, TROCK S, BURNS E, GOMEZ T, WONG K K, KATZ J, LINDSTROM S, KLIMOV A, BRESEE J S, JERNIGAN D B, COX N, FINELLI L, INFLUENZA A V V I T, 2013. Human infections with influenza a(h3n2) variant virus in the united states, 2011-2012. *Clin Infect Dis*. 57 Suppl 1S4-S11. DOI: 10.1093/cid/cit272.
- FAN X, ZHU H, ZHOU B, SMITH D K, CHEN X, LAM T T, POON L L, PEIRIS M, GUAN Y, 2012. Emergence and dissemination of a swine h3n2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic h1n1 genes in pigs in china. *J Virol*. 86(4): 2375-2378. DOI: 10.1128/JVI.06824-11.
- GAUGER P C, VINCENT A L, 2020. Serum virus neutralization assay for detection and quantitation of serum neutralizing antibodies to influenza a virus in swine. *Methods Mol Biol*. 2123321-333. DOI: 10.1007/978-1-0716-0346-8_23.
- GORRES J P, LAGER K M, KONG W P, ROYALS M, TODD J P, VINCENT A L, WEI C J, LOVING C L, ZANELLA E L, JANKE B, KEHRLI M E, JR., NABEL G J, RAO S S, 2011. DNA vaccination elicits protective immune responses against pandemic and classic swine influenza viruses in pigs.

- Clin Vaccine Immunol. 18(11): 1987-1995. DOI: 10.1128/CVI.05171-11.
- GRAMER M R, LEE J H, CHOI Y K, GOYAL S M, JOO H S, 2007. Serologic and genetic characterization of north american h3n2 swine influenza a viruses. *Can J Vet Res.* 71(3): 201-206.
- GREGORY V, LIM W, CAMERON K, BENNETT M, MAROZIN S, KLIMOV A, HALL H, COX N, HAY A, LIN Y P, 2001. Infection of a child in hong kong by an influenza a h3n2 virus closely related to viruses circulating in european pigs. *J Gen Virol.* 82(Pt 6): 1397-1406. DOI: 10.1099/0022-1317-82-6-1397.
- HANNOUN C, MEGAS F, PIERCY J, 2004. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res.* 103(1-2): 133-138. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.02.025.
- HEGDE N R, 2015. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Hum Vaccin Immunother.* 11(5): 1223-1234. DOI: 10.1080/21645515.2015.1016666.
- HEINEN P P, VAN NIEUWSTADT A P, DE BOER-LUIJTZE E A, BIANCHI A T, 2001. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza a vaccine to challenge with an h3n2 virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 82(1-2): 39-56. DOI: 10.1016/s0165-2427(01)00342-7.
- HENRITZI D, HOFFMANN B, WACHECK S, PESCH S, HERRLER G, BEER M, HARDER T C, 2019. A newly developed tetraplex real-time rt-pcr for simultaneous screening of influenza virus types a, b, c and d. *Influenza Other Respir Viruses.* 13(1): 71-82. DOI: 10.1111/irv.12613.
- HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH P S, GRIFFITH R, 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 10(4): 413-417. DOI: 10.1038/nbt0492-413.
- HILLAIRE M L, OSTERHAUS A D, RIMMELZWAAN G F, 2011. Induction of virus-specific cytotoxic t lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J Biomed Biotechnol.* 2011939860. DOI: 10.1155/2011/939860.
- IGARASHI M, ITO K, KIDA H, TAKADA A, 2008. Genetically destined potentials for n-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology.* 376(2): 323-329. DOI: 10.1016/j.virol.2008.03.036.
- IM K, MARENINOV S, DIAZ M F P, YONG W H, 2019. An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods Mol Biol.* 1897299-311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26.
- JANKE B H, 2014. Influenza a virus infections in swine: Pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol.* 51(2): 410-426. DOI: 10.1177/0300985813513043.
- KAPPES M A, SANDBULTE M R, PLATT R, WANG C, LAGER K M, HENNINGSON J N, LORUSSO A, VINCENT A L, LOVING C L, ROTH J A, KEHRLI M E, JR., 2012. Vaccination with ns1-truncated h3n2 swine influenza virus primes t cells and confers cross-protection against an h1n1 heterosubtypic challenge in pigs. *Vaccine.* 30(2): 280-288. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.098.
- KARASIN A I, LANDGRAF J, SWENSON S, ERICKSON G, GOYAL S, WOODRUFF M,

- SCHERBA G, ANDERSON G, OLSEN C W, 2002. Genetic characterization of h1n2 influenza a viruses isolated from pigs throughout the united states. *J Clin Microbiol.* 40(3): 1073-1079. DOI: 10.1128/jcm.40.3.1073-1079.2002.
- KATZ J M, NAEVE C W, WEBSTER R G, 1987. Host cell-mediated variation in h3n2 influenza viruses. *Virology.* 156(2): 386-395. DOI: 10.1016/0042-6822(87)90418-1.
- KATZ J M, WANG M, WEBSTER R G, 1990. Direct sequencing of the ha gene of influenza (h3n2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol.* 64(4): 1808-1811. DOI: 10.1128/JVI.64.4.1808-1811.1990.
- KATZ J M, WEBSTER R G, 1989. Efficacy of inactivated influenza a virus (h3n2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs. *J Infect Dis.* 160(2): 191-198. DOI: 10.1093/infdis/160.2.191.
- KILLIAN M L, 2014. Hemagglutination assay for influenza virus. *Methods Mol Biol.* 11613-9. DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_1.
- KIM M C, SONG J M, O E, KWON Y M, LEE Y J, COMPANS R W, KANG S M, 2013. Virus-like particles containing multiple m2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Mol Ther.* 21(2): 485-492. DOI: 10.1038/mt.2012.246.
- KITIKOON P, NELSON M I, KILLIAN M L, ANDERSON T K, KOSTER L, CULHANE M R, VINCENT A L, 2013. Genotype patterns of contemporary reassorted h3n2 virus in us swine. *J Gen Virol.* 94(Pt 6): 1236-1241. DOI: 10.1099/vir.0.51839-0.
- KITIKOON P, NILUBOL D, ERICKSON B J, JANKE B H, HOOVER T C, SORNSEN S A, THACKER E L, 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous h1n1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 112(3-4): 117-128. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.02.008.
- LAMB R A, ZEBEDEE S L, RICHARDSON C D, 1985. Influenza virus m2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell.* 40(3): 627-633. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90211-9.
- LARSEN D L, KARASIN A, OLSEN C W, 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. *Vaccine.* 19(20-22): 2842-2853. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00014-7.
- LEAHY M B, PRITLOVE D C, POON L L, BROWNLEE G G, 2001. Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza a virus virion rna promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J Virol.* 75(1): 134-142. DOI: 10.1128/JVI.75.1.134-142.2001.
- LEE J H, GRAMER M R, JOO H S, 2007. Efficacy of swine influenza a virus vaccines against an h3n2 virus variant. *Can J Vet Res.* 71(3): 207-212.
- LEE Y T, KO E J, LEE Y, KIM K H, KIM M C, LEE Y N, KANG S M, 2018. Intranasal vaccination with m2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PLoS One.* 13(1): e0190868. DOI:

- 10.1371/journal.pone.0190868.
- LOVING C L, VINCENT A L, PENA L, PEREZ D R, 2012. Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. *Vaccine*. 30(40): 5830-5838. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.07.033.
- MA J, SHEN H, LIU Q, BAWA B, QI W, DUFF M, LANG Y, LEE J, YU H, BAI J, TONG G, HESSE R A, RICHT J A, MA W, 2015. Pathogenicity and transmissibility of novel reassortant h3n2 influenza viruses with 2009 pandemic h1n1 genes in pigs. *J Virol*. 89(5): 2831-2841. DOI: 10.1128/JVI.03355-14.
- MARKOWSKA-DANIEL I, POMORSKA-MOL M, PEJSAK Z, 2011. The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 142(1-2): 81-86. DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.03.019.
- MASIC A, BOOTH J S, MUTWIRI G K, BABIUK L A, ZHOU Y, 2009. Elastase-dependent live attenuated swine influenza A viruses are immunogenic and confer protection against swine influenza A virus infection in pigs. *J Virol*. 83(19): 10198-10210. DOI: 10.1128/JVI.00926-09.
- MASIC A, PYO H M, BABIUK S, ZHOU Y, 2013. An eight-segment swine influenza virus harboring h1 and h3 hemagglutinins is attenuated and protective against h1n1 and h3n2 subtypes in pigs. *J Virol*. 87(18): 10114-10125. DOI: 10.1128/JVI.01348-13.
- MURAMATSU M, YOSHIDA R, YOKOYAMA A, MIYAMOTO H, KAJIHARA M, MARUYAMA J, NAO N, MANZOOR R, TAKADA A, 2014. Comparison of antiviral activity between iga and igg specific to influenza virus hemagglutinin: Increased potential of iga for heterosubtypic immunity. *PLoS One*. 9(1): e85582. DOI: 10.1371/journal.pone.0085582.
- NEIRYNCK S, DEROO T, SAELENS X, VANLANDSCHOOT P, JOU W M, FIERS W, 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med*. 5(10): 1157-1163. DOI: 10.1038/13484.
- OLSEN C W, 2000. DNA vaccination against influenza viruses: A review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet Microbiol*. 74(1-2): 149-164. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00175-9.
- OLSEN C W, KARASIN A I, CARMAN S, LI Y, BASTIEN N, OJKIC D, ALVES D, CHARBONNEAU G, HENNING B M, LOW D E, BURTON L, BROUKHANSKI G, 2006. Triple reassortant h3n2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis*. 12(7): 1132-1135. DOI: 10.3201/eid1207.060268.
- PEDERSEN J C, 2014. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase virus subtype or neuraminidase antibody specificity. *Methods Mol Biol*. 116127-36. DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_3.
- PENA L, VINCENT A L, YE J, CIACCI-ZANELLA J R, ANGEL M, LORUSSO A, GAUGER P C, JANKE B H, LOVING C L, PEREZ D R, 2011. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009

- pandemic h1n1 viruses. *J Virol.* 85(1): 456-469. DOI: 10.1128/JVI.01503-10.
- PLESCHKA S, 2013. Overview of influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 3701-20. DOI: 10.1007/82_2012_272.
- PRITLOVE D C, POON L L, DEVENISH L J, LEAHY M B, BROWNLEE G G, 1999. A hairpin loop at the 5' end of influenza a virus virion rna is required for synthesis of poly(a)+ mrna in vitro. *J Virol.* 73(3): 2109-2114. DOI: 10.1128/JVI.73.3.2109-2114.1999.
- PYO H M, ZHOU Y, 2014. Protective efficacy of intranasally administered bivalent live influenza vaccine and immunological mechanisms underlying the protection. *Vaccine.* 32(30): 3835-3842. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.04.065.
- QUAN F S, COMPANS R W, NGUYEN H H, KANG S M, 2008. Induction of heterosubtypic immunity to influenza virus by intranasal immunization. *J Virol.* 82(3): 1350-1359. DOI: 10.1128/JVI.01615-07.
- RAHN J, HOFFMANN D, HARDER T C, BEER M, 2015. Vaccines against influenza a viruses in poultry and swine: Status and future developments. *Vaccine.* 33(21): 2414-2424. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.03.052.
- RAYMOND D D, STEWART S M, LEE J, FERDMAN J, BAJIC G, DO K T, ERNANDES M J, SUPHAPHIPHAT P, SETTEMBRE E C, DORMITZER P R, DEL GIUDICE G, FINCO O, KANG T H, IPPOLITO G C, GEORGIOU G, KEPLER T B, HAYNES B F, MOODY M A, LIAO H X, SCHMIDT A G, HARRISON S C, 2016. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med.* 22(12): 1465-1469. DOI: 10.1038/nm.4223.
- ROBERTSON J S, BOOTMAN J S, NEWMAN R, OXFORD J S, DANIELS R S, WEBSTER R G, SCHILD G C, 1987. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza a(h1n1) virus. *Virology.* 160(1): 31-37. DOI: 10.1016/0042-6822(87)90040-7.
- ROBERTSON J S, NAEVE C W, WEBSTER R G, BOOTMAN J S, NEWMAN R, SCHILD G C, 1985. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza b virus to growth in eggs. *Virology.* 143(1): 166-174. DOI: 10.1016/0042-6822(85)90105-9.
- RUAN B Y, WEN F, GONG X Q, LIU X M, WANG Q, YU L X, WANG S Y, ZHANG P, YANG H M, SHAN T L, ZHENG H, ZHOU Y J, TONG W, GAO F, TONG G Z, YU H, 2018. Protective efficacy of a high-growth reassortant h1n1 influenza virus vaccine against the european avian-like h1n1 swine influenza virus in mice and pigs. *Vet Microbiol.* 22275-84. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.07.003.
- RUAN B Y, YAO Y, WANG S Y, GONG X Q, LIU X M, WANG Q, YU L X, ZHU S Q, WANG J, SHAN T L, ZHOU Y J, TONG W, ZHENG H, LI G X, GAO F, KONG N, YU H, TONG G Z, 2020. Protective efficacy of a bivalent inactivated reassortant h1n1 influenza virus vaccine against european avian-like and classical swine influenza h1n1 viruses in mice. *Vet Microbiol.* 246108724. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108724.
- SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS K B, HORN G T, ERLICH H A, ARNHEIM N, 1985.

- Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230(4732): 1350-1354. DOI: 10.1126/science.2999980.
- SCHILD G C, OXFORD J S, DE JONG J C, WEBSTER R G, 1983. Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature*. 303(5919): 706-709. DOI: 10.1038/303706a0.
- SHU L L, LIN Y P, WRIGHT S M, SHORTRIDGE K F, WEBSTER R G, 1994. Evidence for interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs in southern China. *Virology*. 202(2): 825-833. DOI: 10.1006/viro.1994.1404.
- SKOWRONSKI D M, JANJUA N Z, DE SERRES G, PURYCH D, GILCA V, SCHEIFELE D W, DIONNE M, SABAUDUC S, GARDY J L, LI G, BASTIEN N, PETRIC M, BOIVIN G, LI Y, 2012. Cross-reactive and vaccine-induced antibody to an emerging swine-origin variant of influenza A virus subtype H3N2 (H3N2v). *J Infect Dis*. 206(12): 1852-1861. DOI: 10.1093/infdis/jis500.
- SOLORZANO A, WEBBY R J, LAGER K M, JANKE B H, GARCIA-SASTRE A, RICHT J A, 2005. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*. 79(12): 7535-7543. DOI: 10.1128/JVI.79.12.7535-7543.2005.
- SOUZA C K, RAJAO D S, SANDBULTE M R, LOPES S, LEWIS N S, LOVING C L, GAUGER P C, VINCENT A L, 2018. The type of adjuvant in whole inactivated influenza A virus vaccines impacts vaccine-associated enhanced respiratory disease. *Vaccine*. 36(41): 6103-6110. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.08.072.
- SPACKMAN E, SENNE D A, MYERS T J, BULAGA L L, GARBER L P, PERDUE M L, LOHMAN K, DAUM L T, SUAREZ D L, 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*. 40(9): 3256-3260. DOI: 10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002.
- SPACKMAN E, SITARAS I, 2020. Hemagglutination inhibition assay. *Methods Mol Biol*. 212311-28. DOI: 10.1007/978-1-0716-0346-8_2.
- SPACKMAN E, SUAREZ D L, 2008. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 43619-26. DOI: 10.1007/978-1-59745-279-3_4.
- STEEL J, LOWEN A C, WANG T T, YONDOLA M, GAO Q, HAYE K, GARCIA-SASTRE A, PALESE P, 2010. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *mBio*. 1(1). DOI: 10.1128/mBio.00018-10.
- SUBBARAO K, MATSUOKA Y, 2013. The prospects and challenges of universal vaccines for influenza. *Trends Microbiol*. 21(7): 350-358. DOI: 10.1016/j.tim.2013.04.003.
- SUN X, PULIT-PENALOZA J A, BELSER J A, PAPPAS C, PEARCE M B, BROCK N, ZENG H, CREAGER H M, ZANDERS N, JANG Y, TUMPEY T M, DAVIS C T, MAINES T R, 2018. Pathogenesis and transmission of genetically diverse swine-origin H3N2 variant influenza A viruses from multiple lineages isolated in the United States, 2011-2016. *J Virol*. 92(16). DOI: 10.1128/JVI.00665-18.
- THOMAS M, WANG Z, SREENIVASAN C C, HAUSE B M, GOURAPURA J R, LI F, FRANCIS D H,

- KAUSHIK R S, KHATRI M, 2015. Poly i:C adjuvanted inactivated swine influenza vaccine induces heterologous protective immunity in pigs. *Vaccine*. 33(4): 542-548. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.11.034.
- TUMOVA B, VEZNIKOVA D, MENSİK J, STUMPA A, 1980. Surveillance of influenza in pig herds in czechoslovakia in 1974--1979. 1. Introduction of influenza epidemic a (h3n2) viruses into pig herds. *Zentralbl Veterinarmed B*. 27(7): 517-523.
- VAN DEUSEN R A, HINSHAW V S, SENNE D A, PELLACANI D, 1983. Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza a virus neuraminidases. *Avian Dis*. 27(3): 745-750.
- VAN REETH K, LABARQUE G, DE CLERCQ S, PENSAERT M, 2001. Efficacy of vaccination of pigs with different h1n1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine*. 19(31): 4479-4486. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00206-7.
- VANDER VEEN R, KAMRUD K, MOGLER M, LOYNACHAN A T, MCVICKER J, BERGLUND P, OWENS G, TIMBERLAKE S, LEWIS W, SMITH J, HARRIS D L, 2009. Rapid development of an efficacious swine vaccine for novel h1n1. *PLoS Curr*. 1RRN1123. DOI: 10.1371/currents.rn1123.
- VINCENT A L, CIACCI-ZANELLA J R, LORUSSO A, GAUGER P C, ZANELLA E L, KEHRLI M E, JR., JANKE B H, LAGER K M, 2010a. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 a/h1n1 influenza virus in pigs. *Vaccine*. 28(15): 2782-2787. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.01.049.
- VINCENT A L, LAGER K M, FAABERG K S, HARLAND M, ZANELLA E L, CIACCI-ZANELLA J R, KEHRLI M E, JR., JANKE B H, KLIMOV A, 2010b. Experimental inoculation of pigs with pandemic h1n1 2009 virus and hi cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Respir Viruses*. 4(2): 53-60. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2009.00121.x.
- VINCENT A L, LAGER K M, JANKE B H, GRAMER M R, RICHT J A, 2008. Failure of protection and enhanced pneumonia with a us h1n2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine h1n1 vaccine. *Vet Microbiol*. 126(4): 310-323. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.011.
- VINCENT A L, MA W, LAGER K M, JANKE B H, WEBBY R J, GARCIA-SASTRE A, RICHT J A, 2007. Efficacy of intranasal administration of a truncated ns1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine*. 25(47): 7999-8009. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.019.
- VINCENT A L, MA W, LAGER K M, RICHT J A, JANKE B H, SANDBULTE M R, GAUGER P C, LOVING C L, WEBBY R J, GARCIA-SASTRE A, 2012. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol*. 86(19): 10597-10605. DOI: 10.1128/JVI.01439-12.
- WANG Z, TROILO P J, WANG X, GRIFFITHS T G, PACCHIONE S J, BARNUM A B, HARPER L B, PAULEY C J, NIU Z, DENISOVA L, FOLLMER T T, RIZZUTO G, CILIBERTO G, FATTORI E, MONICA N L, MANAM S, LEDWITH B J, 2004. Detection of integration of plasmid DNA into

- host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 11(8): 711-721. DOI: 10.1038/sj.gt.3302213.
- WEBBY R J, SWENSON S L, KRAUSS S L, GERRISH P J, GOYAL S M, WEBSTER R G, 2000. Evolution of swine h3n2 influenza viruses in the united states. *J Virol.* 74(18): 8243-8251. DOI: 10.1128/jvi.74.18.8243-8251.2000.
- WESLEY R D, LAGER K M, 2006. Overcoming maternal antibody interference by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of swine influenza virus. *Vet Microbiol.* 118(1-2): 67-75. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.014.
- WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, CHONG W, ACSADI G, JANI A, FELGNER P L, 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247(4949 Pt 1): 1465-1468. DOI: 10.1126/science.1690918.
- WU N C, ZOST S J, THOMPSON A J, OYEN D, NYCHOLAT C M, MCBRIDE R, PAULSON J C, HENSLEY S E, WILSON I A, 2017. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza h3n2 vaccine. *PLoS Pathog.* 13(10): e1006682. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006682.
- YEOLKAR L R, DHERE R M, 2012. Development and validation of an egg-based potency assay for a trivalent live attenuated influenza vaccine. *Biologicals.* 40(2): 146-150. DOI: 10.1016/j.biologicals.2011.10.002.
- YOSHIDA R, IGARASHI M, OZAKI H, KISHIDA N, TOMABECHI D, KIDA H, ITO K, TAKADA A, 2009. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site b of the hemagglutinin of influenza a viruses. *PLoS Pathog.* 5(3): e1000350. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000350.
- YU H, HUA R H, ZHANG Q, LIU T Q, LIU H L, LI G X, TONG G Z, 2008. Genetic evolution of swine influenza a (h3n2) viruses in china from 1970 to 2006. *J Clin Microbiol.* 46(3): 1067-1075. DOI: 10.1128/JCM.01257-07.
- ZHANG J, GAUGER P C, 2020. Isolation of swine influenza a virus in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods Mol Biol.* 2123281-294. DOI: 10.1007/978-1-0716-0346-8_20.
- ZHOU N N, SENNE D A, LANDGRAF J S, SWENSON S L, ERICKSON G, ROSSOW K, LIU L, YOON K, KRAUSS S, WEBSTER R G, 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza a viruses in american pigs. *J Virol.* 73(10): 8851-8856. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8851-8856.1999.
- ZHU H, WEBBY R, LAM T T, SMITH D K, PEIRIS J S, GUAN Y, 2013. History of swine influenza viruses in asia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 37057-68. DOI: 10.1007/82_2011_179.
- ZOST S J, PARKHOUSE K, GUMINA M E, KIM K, DIAZ PEREZ S, WILSON P C, TREANOR J J, SANT A J, COBEY S, HENSLEY S E, 2017. Contemporary h3n2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(47): 12578-12583. DOI: 10.1073/pnas.1712377114.

致 谢

时间匆匆逝去，三年光景一晃而过，研一度过了一段充实而又丰富的课程学习生活，研二风风火火的开始了课题研究，2020年我们全国上下齐心协力居家抗疫，在家度过了一个闲适而又焦虑的长假，转眼回所就要面临研三毕业，升学。在这人生的路口回望曾经，感觉自己所获良多，知识、能力、成长以及一群志同道合的朋友们。在此，我衷心地感谢伴随着我一起度过硕士研究生阶段的所有可爱的人。

首先要感谢我的导师杨焕良研究员，三年前的一次机会让我能有幸成为杨老师的学生，杨老师一直悉心地指导着我，您严谨的科研态度，精益求精的科研作风是我一直以来学习的榜样。每当我实验中遇到困惑时，杨老师总是细心指导；而当我实验不顺利时，杨老师也从未批评我，而是鼓励我争取做好。从杨老师身上，我学到了对待工作的执着和遇到困难时的从容，您是我一生学习的榜样。

感谢团队首席陈化兰院士，感谢您为我们提供的优秀的实验平台和良好的科研氛围。

感谢本研究创新团队所有进行猪流感病毒流行病学监测的工作人员！感谢陈艳老师、孟飞师兄、钟秋师姐、张丹丹师姐、刘雅茹师妹、王飞飞师弟以等所有人对我实验上的指导和帮助。感谢张元成博士、宋洋铭博士、赵玉博博士、侯玉杰博士、倪子欣博士、李明慧硕士、王一涵硕士、房敬真硕士、张亚萍硕士、李炯颀硕士、吴颖硕士等所有帮助过我同学们，感谢大家在我实验生活中给予的帮助和支持，你们是我这三年最大的收获。

感谢动物流感创新团队的施建忠研究员、邓国华研究员、李雁冰研究员、崔鹏飞博后等流感团队的所有老师在实验设计和实验过程中提供的帮助和支持。

感谢同窗好友范前进硕士、刘翔硕士、曹志远硕士、边海乔硕士等2018级的小伙伴们，感谢你们在我实验中给予的帮助和鼓励，每次在我需要帮助和鼓励的时候你们都在我身边，感谢这三年来我们的共同进步与成长，感谢相遇。

感谢动物流感团队班主任曾显营老师，兽医学院高友兰老师、刘益民老师、郭东春老师在生活中给予我们的关心与帮助。

最后要特别感谢养育我的父母，是你们的支持和理解让我无后顾之忧的追逐自己的梦想，拥有了前进的动力，谢谢你们。

本研究得到了国家重点研发计划(2016YFD0500201)项目的资助，在此一并感谢！

作者简介

宋祖晨，男，汉族，1996年12月出生，江苏盐城东台人，2014年考入金陵科技学院动物科学与技术学院动物医学专业学习，2018年6月毕业，获得农学学士学位。2018年9月考入中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，流感参考实验室动物流感基础与防控研究创新团队，在杨焕良研究员的指导下攻读硕士学位，以猪流感病毒的基础和应用为主要研究方向。

硕士期间发表文章：

宋祖晨, 孟飞, 张丹丹, 王飞飞, 刘雅茹, 陈艳, 乔传玲, 陈化兰, 杨焕良, 2021. 高增殖猪流感重组病毒 GX1659/PR8 的制备与鉴定. 中国预防兽医学报 (已接收)