

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株) 研究

硕士研究生: 刘艳晶

学 号: 82101182436

指 导 教 师: 田国彬 研究员

申请学位类别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物疫苗与分子免疫学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2021 年 6 月

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株) 研究

硕 士 研 究 生: 刘艳晶

学 号: 82101182436

指 导 教 师: 田国彬 研究员

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物疫苗与分子免疫学

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

**Development and Application of a Recombinant Avian
Influenza Virus(H5+H7)Trivalent Inactivated Vaccine
based on Re-11,Re-12 and H7-Re3 vaccine seeds**

Candidate: LIU Yanjing

Student ID: 82101182436

Supervisor: Professor TIAN Guobin

Degree Type: Master of Science in Agriculture

Major: Preventive Veterinary Medicine

**Research Field: Animal Vaccines and Molecular
Immunology**

**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		重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株)研究				
论文作者		刘艳晶	专业/领域	预防兽医学	研究方向	动物疫苗与分子免疫学
指导教师		田国彬		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	高玉龙	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	/
	许传田	副研究员	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	山东省农业科学院畜牧 兽医研究所	预防兽医学	
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19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他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：刘艳晶

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：刘艳晶

时间：2021年6月2日

导师签名：



时间：2021年6月2日

摘要

高致病性禽流感是 H5 亚型和 H7 亚型流感病毒引起的一种禽类高度致死性传染病，它不仅严重危害养禽业发展，而且还具有重大公共卫生意义。疫苗免疫是中国防治禽流感的重要手段之一，鉴于禽流感病毒突变率高，疫苗株应定期测评，必要时进行更新。国家禽流感参考实验室通过对禽流感监测、病毒分离鉴定及现用疫苗对流行病毒免疫效果评估表明，从 2019 年起，H7N9 变异株在我国出现，与原三价疫苗中 H7N9 H7-Re2 病毒的抗原性存在差异，攻击 H7-Re2 株疫苗免疫鸡后，免疫鸡不能获得完全保护，需要进行疫苗种毒更新；而 H5 亚型禽流感病毒流行株与疫苗株抗原性相似，现有疫苗可以起到完全保护的作用，因此不需要更新种毒。

国家禽流感参考实验室利用反向遗传操作技术进行 H7N9 禽流感疫苗种毒更新，构建出针对 H7N9 病毒抗原变异株的重组禽流感病毒疫苗候选株，命名为 H7-Re3 株。本研究首先对重组 H7N9 亚型 H7-Re3 株的生物特性、传代稳定性和免疫原性等进行了研究。结果表明，该毒株在鸡胚上能稳定传代且生长滴度高，对鸡胚和鸡均无致病性，具有良好的免疫原性，免疫鸡能抵御流行病毒的攻击，因此该毒株是理想的灭活疫苗毒株。

随后，用 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 株病毒分别接种鸡胚培养，收获感染鸡胚液，经浓缩、甲醛溶液灭活后，乳化制成 3 批三价灭活苗，并进行疫苗性状检验、对鸡的安全性、免疫效力、对流行毒株的免疫保护试验以及抗体和攻毒保护关系试验。结果显示，3 批疫苗均合格；以 2 mL/羽的剂量接种家禽，均无副作用。按建议剂量接种后，免疫后 21 d，SPF 鸡 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株、H7 亚型 H7-Re3 株平均 HI 抗体效价在 7.7 log₂ 以上，SPF 鸭 3 种毒株 HI 抗体效价在 1:124~1:148 之间，商品鹅 3 种毒株 HI 抗体效价在 1:32~1:44 之间；用 H5 亚型 2.3.4.4d 分支、2.3.2.1d 分支和 H7N9 效力检验毒株及流行株攻击免疫家禽，免疫家禽均无发病死亡且不排除。以上结果表明，3 批 H5+H7 三价灭活疫苗免疫鸡和水禽后能够对 2019 年监测到的 H7N9 抗原变异株及 H5 亚型 2.3.4.4d 分支、2.3.2.1d 分支的代表毒株攻击提供完全免疫保护。疫苗接种后 HI 抗体与攻毒保护关系的研究表明，免疫鸡 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体 $\geq 4\log_2$ 时可对 H5 和 H7 亚型相应效检毒株攻击提供完全保护；H5 亚型和 H7 亚型 3 种 HI 抗体 $\geq 1:10$ 的免疫鸭，可为同源 H5 亚型和异源 H7 亚型效检毒株提供完全保护。

最后，我们评估了重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株) 的临床应用效果，主要包括安全性和免疫效果两方面，选取山东某场白羽肉种鸡、哈尔滨某场商品蛋鸡、宁夏某场蛋种鸡和山东某场种鸭进行评估。结果显示，鸡群和鸭群按照各自程序免疫三价疫苗后，均表现正常，疫苗安全性良好，同时能够让免疫鸡和鸭产生较高水平的抗体，具有良好的免疫效力，能够保护鸡群和鸭群免受 H5 和 H7 亚型高致病性禽流感病毒的攻击。

本研究表明，重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株) 对鸡和水禽具有很好的安全性和免疫效果。该疫苗已于 2020 年 9 月开始在全国范围内应用，并取得了良好的效果，对 H5 和 H7 禽流感的防控起到了非常重要的作用。

关键词：高致病性禽流感，H5 和 H7 亚型，三价灭活疫苗，安全性，免疫效果

Abstract

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) is a lethal infectious disease caused by H5 and H7 subtypes of influenza A virus, which resulted in serious harm to the poultry industry, and posed great threat to public health. Vaccination is one of the important strategies of prevention and control of avian influenza in China. On account of the high mutation rate of avian influenza virus in nature, vaccine should be regularly evaluated and vaccine strains should be updated if necessary. The surveillance, virus analysis and evaluation of the protection efficacy evaluation were carried out by National Avian Influenza Reference laboratory. The results showed that the H7N9 viruses isolated in poultry in 2019 showed distinct antigenicity to H7N9 H7-Re2 vaccine strain which was used for trivalent vaccine production, and partial protection against the challenge of the epidemic virus was observed and the vaccine seed needs to be updated. The H5 subtype viruses isolated recently showed similar antigenicity to the H5 vaccine seed (Re-11 and Re-12 strains), and the vaccine prepared with H5N1 Re-11, Re-12 and H7-Re2 stains can provide full protection against the H5 virus challenge, so the H5 vaccine strains could be used for vaccine development.

To control the H7N9 antigenic variants in poultry, the reassortant H7N9 vaccine seed candidate was generated by using reverse genetics by National Avian Influenza Reference laboratory, and designed as H7-Re3 strain. In this study, we firstly evaluated the biological characteristics, passage stability and immunogenicity of H7-Re3 strain, and found that the H7-Re3 strain could be propagated stably in chicken embryos with high growth properties, showed nonpathogenic to chicken embryos and chickens, exhibited good immunogenicity with effective prevention against the challenge of H7N9 virus in chickens, and thereby could be an ideal inactivated avian influenza vaccine strain.

Subsequently, H5 subtype Re-11 strain, Re-12 strain and H7 subtype H7-Re3 strain were inoculated in chicken embryos, respectively, and the allantoic fluid of the infected chicken embryos were harvested for three-time concentration, inactivation by formalin, and further emulsion. Three batches of trivalent inactivated avian influenza vaccines were prepared in this study. The vaccine character, safety, immune efficacy had been tested in this study. The immune protection against epidemic strains and the relationship between HI antibody response and protection in H5 and H7 HPAI were also evaluated in this study. The results showed that the three batches of vaccines meet the vaccine quality criterion; there were no adverse reactions in poultry immunized with a high dose of 2ml of the vaccine per bird. After inoculation with the recommended dose(0.3ml), the HI antibody average titers to H5 subtype Re-11 strain, Re-12 strain and H7 subtype H7-Re3 strain in SPF chickens were above $7.7\log_2$. The HI antibody titers were between 1:124 and 1:148 at 3 weeks in SPF ducks immunized with one dose(0.5ml) of the vaccine, and the HI antibody titers to the three vaccine strains were between 1:32 and 1:44 in commercial geese at 3 weeks post immunization; After 3 weeks, the immunized birds were challenge with the H5 subtype clade 2.3.4.4d, clade 2.3.2.1d viruses and H7N9 antigenic variants for potency test, and the vaccinated birds were challenged with the prevalent strains. The results showed

that the immunized poultry survived without any clinical signs, and virus shedding were not observed in the vaccinated group after challenge with different lethal viruses, respectively, which indicated that three batches of H5+H7 trivalent inactivated vaccine could provide complete immune protection against the challenge of H7N9 antigenic variant strains detected in poultry in 2019, H5 subtype clade 2.3.4.4d and 2.3.2.1d viruses. The research on the relationship between HI antibody response and protection of the vaccine showed that the immunized chickens could be complete protected against the challenge of H5 and H7 subtype strain when HI antibody titers ($\geq 4\log_2$) to Re-11 strain, Re-12 strain and H7 subtype H7-Re3 strain were detected in the vaccinated chickens, and immunized duck could be protected against of the challenge with homologous H5 subtype and heterologous H7 subtype avian influenza viruses When the HI antibodies HI antibody titers ($\geq 1:10$) to Re-11 strain, Re-12 strain and H7 subtype H7-Re3 strain were detected in the vaccinated ducks.

Furthermore, we evaluated the application of the recombinant avian influenza virus (H5+H7) trivalent inactivated vaccine prepared by Re-11, Re-12, and H7-Re3 vaccine seeds in field poultry, mainly including its safety and immune efficacy. A white feather broiler breeder farm in Shandong, a commercial layer hen farm in Harbin, a layer breeder farm in Ningxia, and a breed duck farm in Shandong were selected for vaccine field test. The results showed that there was no adverse reaction in the vaccinated field poultry, and the high-level HI antibody titers were induced in chickens and ducks immunized with the vaccine according to the vaccination procedure, which indicated the good immunity in commercial chickens and ducks for the control of the H5 and H7 subtypes of highly pathogenic avian influenza.

This study showed that the recombinant avian influenza virus (H5+H7) trivalent inactivated vaccine based on Re-11, Re-12, and H7-Re3 vaccine seeds showed good safety and immune efficacy in chickens and waterfowl. The vaccine has been authorized for its application in China since July 2020 and has played a very important role in the prevention and control of H5 and H7 avian influenza.

Keywords: Highly pathogenic avian influenza, H5 and H7 subtypes, Trivalent inactivated vaccine, safety, Immune efficacy evaluation

目 录

第一章 绪论	1
1.1 禽流感病毒介绍	1
1.2 H5 和 H7 亚型禽流感的流行及危害	2
1.2.1 H5 亚型禽流感的流行及危害	2
1.2.2 H7 亚型禽流感的流行及危害	3
1.2.3 H7N9 亚型流感的流行和危害	3
1.3 H5、H7 亚型禽流感的防控	5
1.3.1 H5 亚型禽流感疫苗研究进展	5
1.3.2 H7N9 禽流感疫苗研究进展	5
1.3.3 禽流感综合防治措施	6
1.4 本研究的目的是和意义	7
第二章 重组禽流感病毒 H7N9 亚型 H7-RE3 株生物学特性研究	8
2.1 材料	8
2.1.1 病毒株	8
2.1.2 实验动物及试验地	8
2.1.3 标准阳性血清及抗原	8
2.1.4 疫苗	8
2.1.5 主要试剂和仪器	9
2.2 方法	9
2.2.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株在鸡胚中的增殖及其鉴定	9
2.2.2 重组禽流感病毒 H7-Re3 株的致病性试验	9
2.2.3 重组禽流感病毒 H7-Re3 株灭活疫苗的免疫效力试验	10
2.3 结果	10
2.3.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株在鸡胚中的增殖和遗传稳定性结果	10
2.3.2 致病性试验结果	11
2.3.3 重组禽流感病毒 H7-Re3 株灭活疫苗的免疫效力试验结果	12
2.4 讨论	15

第三章 重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗(H5N1 RE-11 株+RE-12 株, H7N9 H7-RE3 株)的实验室研究	17
3.1 材料.....	17
3.1.1 疫苗用毒株	17
3.1.2 效检病毒株	17
3.1.3 试验鸡胚和试验动物	18
3.1.4 HI 抗原和标准阳性血清	18
3.1.5 主要试剂和仪器	18
3.2 方法.....	18
3.2.1 活性成分抗原相容性研究	18
3.2.2 安全性检验	19
3.2.3 疫苗效力检验	19
3.2.4 3 批疫苗免疫效力试验	19
3.2.5 对流行毒株的免疫效力试验	20
3.2.6 重组禽流感 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体与攻毒保护关系研究	21
3.3 结果.....	21
3.3.1 抗原病毒液制备及浓缩结果	21
3.3.2 病毒液灭活检验结果	22
3.3.3 制备疫苗检验结果	22
3.3.4 安全性检测结果	22
3.3.5 两种不同抗原含量的三价苗分别与三种单苗免疫效力比较结果	23
3.3.6 3 批三价疫苗免疫效力试验结果	25
3.3.7 对流行毒株的免疫效力试验结果	28
3.3.8 抗体与攻毒保护关系研究结果	31
3.4 讨论.....	33
第四章 重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗(H5N1 RE-11 株+RE-12 株, H7N9 H7-RE3 株)的临床应用评估	34
4.1 材料.....	34
4.1.1 抗原及标准阳性血清	34

4.1.2 疫苗	34
4.1.3 试验动物及场地	34
4.1.4 试剂和仪器	34
4.2 方法	34
4.2.1 三价疫苗对山东某场白羽肉种鸡的安全性和免疫效果研究	34
4.2.2 三价疫苗对肇东某场商品蛋鸡的安全性和免疫效果研究	35
4.2.3 三价疫苗对宁夏某场蛋种鸡的安全性和免疫效果研究	35
4.2.4 三价疫苗对山东某场种鸭的安全性和免疫效果研究	35
4.3 结果	35
4.3.1 安全性评估结果	35
4.3.2 三价疫苗对山东某场白羽肉种鸡的免疫效果研究结果	35
4.3.3 三价疫苗对肇东某场商品蛋鸡的免疫效果研究结果	36
4.3.4 三价疫苗对宁夏某场蛋种鸡的免疫效果研究结果	37
4.3.5 三价疫苗对山东某场种鸭的免疫效果研究结果	37
4.4 讨论	38
第五章 结论	40
参考文献	41
致 谢	49
作者简历	50

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
AI	Avian influenza	禽流感
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
bp	Base Pair	碱基对
DEV	Duck enteritis virus	鸭病毒性肠炎病毒
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EDSV	Egg drop syndrome virus	减蛋综合征病毒
EID ₅₀	50% egg infective dose	鸡胚半数感染量
HA	Hemagglutinin	血凝素
HI	Hemagglutinin inhibition	血凝抑制
HPAIV	Highly pathogenic avian influenza virus	高致病性禽流感病毒
HPVI	Highly pathogenic avian influenza	高致病性禽流感
HVT	Herpesvirus of turkey	重组火鸡疱疹病毒
ILTV	Infectious laryngotracheitis virus	传染性喉气管炎病毒
IVPI	Intravenous pathogenicity index	静脉致病指数
LD ₅₀	50% lethal dose	鸡半数致死量
LPAIV	Low pathogenic avian influenza virus	低致病性禽流感病毒
LPAI	Low pathogenic avian influenza	低致病性禽流感
M	Matrix protein	基质蛋白
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
NP	Nucleoprotein	核蛋白
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
OIE	Office international des épizooties	世界动物卫生组织
PA	PolymeraseA	聚合酶 A
PB1	PolymeraseB1	聚合酶 B1
PB2	PolymeraseB2	聚合酶 B2
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
SPF	Specified-pathogens free	无特定病原体

第一章 绪论

1.1 禽流感病毒介绍

禽流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV) 是一种单负链包膜 RNA 病毒, 是引起家禽及野生鸟类禽流感 (AI) 的病原 (CHEN et al, 2003; GUAN et al, 2016)。所有的 AIV 均有 8 个独立的基因片段, 包括血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、核蛋白 (NP)、聚合酶 A (PA)、基质蛋白 (M)、聚合酶 B2 (PB2)、聚合酶 B1 (PB1) 和非结构蛋白 (NS), 各片段大小在 890bp-2341bp (LYCETT et al, 2019), 至少编码 10 种蛋白。目前流感病毒的 HA 有 18 种, NA 有 11 种 (WEBSTER et al, 1992; TONG et al, 2012; TONG et al, 2013; VERHAGEN et al, 2014), 其中 AIV 的 HA 和 NA 分别为 16 种和 9 种, 其余 2 种是从蝙蝠体内分离到 (WU et al, 2014)。AIV 除了根据抗原和遗传差异进行分类外, 还可据致病力强弱分为低致病性禽流感病毒 (Low Pathogenic Avian influenza virus, LPAIV) 和高致病性禽流感病毒 (Highly Pathogenic Avian influenza virus, HPAIV)。16 种亚型中, 除 H5 和 H7 亚型外, 其余亚型均为 LPAIV, 但并非所有 H5、H7 亚型病毒都是 HPAIV; LPAIV 的 HA 蛋白的裂解位点仅有一个碱性的精氨酸, 此氨基酸仅能被肠道和呼吸道中的类似胰蛋白酶分解, 而 HPAIV HA 裂解位点具有多个连续的碱性氨基酸, 可使 HA 蛋白被细胞内普遍存在的蛋白酶裂解。因此, 感染 LPAIV 可能引起亚临床或引起轻微的临床症状, HPAIV 在鸡和其他陆生家禽中可导致全身感染以及高死亡率 (SHIN-HEE et al, 2019; KLENK et al, 1994)。

据记载, 至少发生过 4 次全球流感大流行 (KILBOURNE et al, 2006)。野生鸟类在 AIV 的进化、维持和传播中发挥着重要作用, 被称为天然宿主 (OLSEN ET AL, 2006; CLARK et al, 2006; STALLKNECHT et al, 2007; CHEN et al, 2009; BODEWES et al, 2018)。如 2005 年, 青海 AI 疫情暴发的原因可能是由于野生鸟类将 AIV 传播到该地区 (MACHALABA et al, 2015); 2005 年下半年, 陈化兰 (2006) 等在俄罗斯和中国部分地区分离到的 H5N1 亚型 AIV 与青海湖分离的 AIV 基因具有高度的一致性, 认为该病毒可通过候鸟向别的地区传播; 2013 年 8 月中旬, 墨西哥哈利斯科州一家蛋鸡场饲养的 35 万只家禽因发生 H7N3 HPAI 疫情被全部扑杀, 感染原因是接触野生鸟类。LPAIV 多通过消化道途径使野生鸟类发生感染, 使家禽感染则主要通过呼吸系统, 而 HPAIV 的 H5 亚型可导致禽类多个器官发生炎症和坏死, H7 亚型还可通过眼结膜使人感染。

RNA 病毒的特征是突变率高, 流感病毒也不例外, 通常每年每 1000 个位点积累 2 到 8 个位点替换 (CHEN et al, 2006)。AIV 变异频繁, 它不断改变自身的抗原性, 从而逃避宿主免疫系统的攻击。抗原漂移是流感病毒突变机制之一, 指的是表面抗原编码基因 (HA 或 NA) 发生点突变引起的突变; 另一种是抗原转变, 它指的是流感病毒基因重排产生的与原病毒抗原存在差异的新毒株 (郑丽荣 等, 2019; BANKS et al, 2001; ZHANG et al, 2013)。点突变引起的抗原漂移会导致季节性流感流行, 而流感的大流行通常是抗原转变引起的。由此可见, 抗原转变导致的影响较大。新的 AIV 亚型有可能通过抗原变异改变细胞嗜性致使宿主范围扩大, 从而获得跨越物种屏障并引发流感大流行的能力 (谭伟 等, 2014)。HPAIV 对养禽业造成的损失惨重, 而且近年来, HPAIV 造成数百人感染, 死亡率超过 30% (SUTTON et al, 2018), 公共卫生意义重大, 人们非

常担心来自这些亚型的病毒可能进化并引发下一次大流行，因此我们应加强对 AI 的防控工作。监测工作和实验室鉴定是评估新出现的 H5 和 H7 亚型病毒所构成的威胁的基础，应重点了解可稳定 HA 的突变或变化。开发大流行性 AI 疫苗需要持续的研究与基础研究相结合，这两种方法都可以增强我们预测和潜在地减轻 H5 或 H7 AIV 流行的能力。

1.2 H5 和 H7 亚型禽流感的流行及危害

1.2.1 H5 亚型禽流感的流行及危害

1983 年 4 月, LPAIV H5N2 在美国东部一州的鸡群中传播, 同年, 该病毒已变异为一种 HPAIV, 导致受感染的家禽死亡率很高; 这次疫情最终得到控制, 宰杀了 1700 多万只禽鸟, 直接损失成本为 6200 万美元, 间接成本损失超过 2.5 亿美元 (FICHTNER et al, 1986)。H5N1 HPAIV 于 1996 年在广东省某一鹅场中的商品鹅群中被发现, 该病毒被认为来源于野生候鸟 (DUAN et al, 2007)。香港于 1997 年首次报告人类感染高致病性 H5N1 流感病毒 (SUBBARAO et al, 1998), 这也导致了 150 万只家禽的死亡。世界动物卫生组织 (OIE) 报道, 这种病毒随后在 2003 年和 2004 年再次出现, 并从亚洲传播到欧洲, 造成数百人死亡, 以及数亿家禽的毁灭。2006 年, H5N1 亚型 HPAI 第一次在非洲发生, 并迅速在该地区传播开来 (JOANNIS et al, 2006)。H5N1 病毒自 2007 年到 2009 年初在东南亚流行, 并已蔓延至亚欧大陆和非洲, 造成数百人死亡, 同时当地家禽种群中也暴发该病, 这进一步加剧了人们的担忧 (LYCETT et al, 2019)。

据不完全统计, 自 2014 年 1 月以来, 韩国全国已有 23 家农场发生 H5N8 亚型 HPAI 疫情, 共扑杀 240 多万只鸡鸭。截止到 2014 年 2 月越南 H5N1 亚型 HPAI 疫情累计暴发 24 起, 家禽感染数约 2 万只, 扑杀销毁数超 3 万只。2014 年年底至 2015 年年初, H5N8 亚型 HPAI 疫情在美国频繁发生。H5N2 亚型 HPAI 疫情自 2015 年 12 月在加拿大暴发后已有上万只家禽染病死亡, 销毁数约 20 万。2015 年 1 月至 3 月, 尼日利亚多个地区发生几百起 H5N1 亚型 HPAI 疫情, 近 20 万只家禽被感染, 死亡率超过 95%, 200 多万只被焚毁。2016 年 11 月至 2017 年 1 月, 伊朗发生 H5N8 亚型 HPAI 疫情, 约 30 万只家禽被感染, 上万只死亡, 近百万只被处理。2016 年 11 月至 2017 年 2 月, 200 多起家禽 H5N8 亚型 HPAI 疫情在匈牙利地区发生, 几十万只家禽被销毁处理, 而疑似感染家禽数达百万只, 损失惨重。2017 年 11 月至 2018 年 2 月, 韩国有 4 地发生 18 起家禽 H5N6 亚型 HPAI 疫情, 4446 只家禽死亡, 57 万只被销毁。2017 年 12 月至 2018 年 3 月, 沙特东部地区发生 20 多起家禽 H5N8 亚型 HPAI 疫情, 共有约 200 万只家禽被销毁。从 2018 年 6 月起, H5 亚型 HPAI 疫情在俄罗斯 15 地发生 82 起, 16.9 万只家禽感染, 死亡率达 95% 以上。从 2019 年 3 月开始, 10 起 H5N1 亚型 HPAI 疫情分别在尼泊尔不同地区暴发, 导致 2.1 万只家禽死亡, 8 万只被处死。2017 年 6 月至 2020 年 7 月, 南非报告了 100 多起 H5N8 亚型 HPAI 疫情, 46.9 万只家禽染病死亡, 扑杀数百万只。2020 年 1 月, 新疆继 2017 年 3 月之后又发生野生鸟类 H5N6 亚型 HPAI 疫情。2015 年 1 月至 2020 年 3 月, 在中国台湾省的家禽和野生鸟类中共暴发了近千起 H5N2 亚型 HPAI 疫情, 家禽感染数约有 66.3 万, 死亡数为 47.2 万只, 扑杀数高达 317.1 万。2020 年年底—2021 年年初, 法国共有 9 地发生了 385 起家禽 H5N8 亚型 HPAI 疫情, 78.3 万只家禽感染, 4.6 万只死亡, 131 万只被扑杀。

从上面的例子可以看出, H5 亚型 HPAI 在全球范围内广泛流行, 给世界养禽业造成了不可忽

视的经济损失。

1.2.2 H7 亚型禽流感的流行及危害

1878 年意大利暴发“鸡瘟”的高致病性病原在 1955 年被确定并改为高致病性 H7N7 亚型 AIV (朱闻斐 等, 2013)。20 世纪以来, H7 亚型 HPAI 频繁发生, 包括澳大利亚、英格兰、德国以及巴基斯坦等国家。意大利于二十世纪九十年代末暴发的 H7N1 AI 导致 1300 万只鸡死亡, 经济损失巨大。2003 年, 荷兰、德国和比利时约有 300 万只家禽在 H7N7 AI 疫情中死亡。2004 年, 加拿大出现 H7N3 AI 疫情, 造成上百万只鸡死亡, 同时导致了人感染, 并在人体内分离到该病毒 (TWEED et al, 2004; HIRST et al, 2004)。2005 年朝鲜政府为控制暴发的 H7N7 亚型 AI 疫情, 共扑杀并销毁 20 多万只鸡。2007 年 H7N3 亚型 HPAI 疫情在加拿大暴发, 为使疫情不再扩散, 本地区所有感染鸡都被扑杀处理 (PASICK et al, 2010)。

从 2012 年起, 墨西哥频繁发生 H7N3 亚型 HPAI, 墨西哥政府采取扑杀与免疫相结合的控制措施, 共扑杀或销毁家禽约 2230 万只, 共使用 1.4 亿支疫苗。2013 年之后, H7N3 亚型 HPAI 疫情在墨西哥地区的 60 多家农场发生, 600 多万只家禽被销毁扑杀。2013 年 8 月中旬, 意大利中北部一蛋鸡场发生 H7 亚型 HPAI 疫情, 十多万只蛋鸡感染。同日, 距离该饲养场 3.5 公里处的另一家火鸡饲养场又发现 H7N7 亚型 HPAI 疫情, 该农场剩余的 18500 只火鸡被扑杀。8 月 23 日, 意大利一火鸡饲养场发生 H7N7 亚型 HPAI 疫情, 19850 只火鸡感染, 1300 只死亡。2015 年 4 月, 墨西哥又有多个地区发生多起 H7N3 亚型 HPAI 疫情, 包括 20 多起家禽疫情和 1 起野生禽类疫情。2017 年 3 月, 美国一州发生 H7 亚型 HPAI 疫情, 700 只家禽感染死亡, 7.3 万只被销毁, 这是 2016 年以来美国首次发生家禽 H7 亚型 HPAI 疫情。2019 年 3 月, 丹麦首次发生 H7 亚型 LPAI 疫情。2019 年 4 月至 11 月, 墨西哥 9 个地区的 37 万只家禽因 H7N3 亚型 HPAI 疫情而死亡。2020 年 7 月底, 澳大利亚维多利亚州发生 3 起 H7N7 亚型 HPAI 疫情, 23.4 万只家禽被感染, 约 2000 只死亡。

研究表明, 除 H7N9 亚型病毒以外的 H7 亚型 AI 在全世界多国暴发, 给养禽业造成的经济损失同样不可低估。

1.2.3 H7N9 亚型流感的流行和危害

中国是 H7N9 亚型 AI 疫情的主要流行地区, 而且该病毒是迄今为止引起人发病和死亡最多的一种 HA 和 NA 亚型组合的 H7 亚型病毒, 因此单独进行介绍。

1.2.3.1 H7N9 亚型流感的流行传播

自 2005 年开始研究人员在西班牙部分地区发现 H7N9 亚型 AIV, 2009 年在捷克一鹅场中发生小范围的 H7N9 亚型 AIV 疫情 (荀晓琴, 2018), 2013 年 3 月中国相关部门报告了一起人感染 H7N9 亚型流感病毒的事件, 2013 年 4 月初, 中国兽医部门向 OIE 通报了 LPAIV H7N9 亚型感染鸽、鸡的情况, 认为该病毒与感染人类的病毒非常相似, 该病毒迅速在家禽中传播。2017 年 1 月, 在两例人类感染病例中第一次报告了一种新型 H7N9 亚型 HPAIV 变异, 该病毒在 HA 蛋白的裂解位点具有多个碱性氨基酸。更严重的是, 这些新型 H7N9 亚型 HPAIV 变种已在中国多个

省份的家禽养殖场中迅速传播并引发多起疫情 (SHI et al, 2017; QI et al, 2018)。该病毒的 HA 和 NA 基因与东亚野鸟中分离的 AIV 的基因高度同源, 其余 6 个基因与 G57 型 H9N2 亚型 AIV 相似 (LIU et al, 2013; ZHANG et al, 2014; LIU et al, 2020), 同时, 研究表明 H7N9 亚型病毒的出现是 G57 型 H9N2 亚型重组的结果, 并引发了严重的人类感染 (PU et al, 2017)。AIV 可通过直接接触与带毒鸟类相关的污物, 如粪便, 或者是通过污染的饲料、水、设备和人类衣物在鸟类之间传播。它们很容易通过家禽、人(特别是当鞋子和其他衣物受到污染时)、受污染的车辆、设备、饲料和笼子等的运动从一个农场传播到另一个农场。有几个因素可能导致所有 AIV 的传播, 包括: 人员和货物的流动、营销方法 (活禽市场)、耕作方式以及野生候鸟中病毒的存在。另外, 研究表明, 活禽市场对 H7N9 亚型 AI 有很大影响, 活禽市场关闭后, 人感染 H7N9 亚型 AIV 的发病率迅速下降, 可见活禽市场对 H7N9 亚型流感病毒的传播起到了非常重要的作用 (YU et al, 2014)。

1.2.3.2 H7N9 亚型流感对禽的危害

2013 年, 我国第一次发现了对禽呈低致病性的 H7N9 AIV, 该病毒在鸡场中传播并导致人感染和发病死亡 (SHI et al, 2013)。我国于 2017 年初分离到新型 H7N9 亚型 HPAIV, 该病毒迅速在我国 8 个省份的鸡群中传播并引起 9 起疫情。两个月后, 美国一州发生 2 起家禽 H7N9 亚型 HPAI 疫情, 近千只家禽感染, 十几万只被销毁。H7N9 亚型 LPAI 疫情于 2017 年 3 月 10 日在美国首次发生, 致使上万只家禽被处理。2017 年 3 月, 中国湖南部分农场的 17 万只家禽因 H7N9 亚型 AI 疫情被销毁。2017 年 3 月 24 日, 家禽感染 H7N9 亚型 AIV 的事件再次在美国发生, 据统计共有 3 起。自 2017 年 4 月起, 美国阿拉巴马州、肯塔基州、佐治亚州等 3 地发生 5 起 H7N9 亚型 LPAI 疫情, 8.5 万只家禽被销毁。2017 年 4 月, H7N9 亚型 AIV 疫情在中国河北发生, 致使 8 万余只家禽被扑杀和销毁。为更好地控制 H7N9 亚型 HPAI 疫情, 2017 年 3 月-8 月, 中国共有 100 多万只鸡因感染此类 AIV 而被扑杀销毁。2018-2019 年, 我国多地共发生 6 起 H7N9 亚型 HPAI 疫情, 17000 多只家禽发病, 死亡数超过 1 万只。

1.2.3.3 H7N9 亚型流感病毒的公共卫生意义

2013 年 3 月, 中国相关部门报告了首例新型甲型 H7N9 亚型流感人类病例 (GAO et al, 2013), 上海和安徽是最早出现该病的省份, 随后该病毒在我国多个省份迅速传播。2017 年 1 月出现了一种新型 H7N9, 该病毒 HA 蛋白的裂解位点有多个碱性氨基酸, 属于 HPAIV (WHO, 2017)。2013 年出现以来, 该病毒已造成五次连续流行, 导致 1600 多人感染, 600 多人死亡 (ZHOU et al, 2017)。大量研究显示, 大多数人感染高致病性 H7N9 亚型 AIV 前都有与活禽市场密切接触的经历 (SU et al, 2017), 因此, 家禽交易场所仍然是 AIV 在家禽以及人类中传播的主要来源。

人或动物感染 AIV 的第一步是 HA 蛋白与特异性受体结合。禽源 $\alpha 2, 3$ -半乳糖苷, 人源 $\alpha 2, 6$ -半乳糖苷是流感病毒常见的受体。而新型 H7N9 亚型 AIV 的 HA 的氨基酸位点发生了变异, 即 Q226L 变异 (SHI et al, 2013), 使病毒同时有两种受体的结合特性, 即 H7N9 亚型流感病毒与人的受体亲和力较高, 但仍然保持着与禽的受体结合的偏好性, 能造成人的严重感染。另外, 该新

型 H7N9 流感病毒还在 PB2 蛋白上发生了 E627K 和 D701N 的突变, 使它获得了在哺乳动物体内复制和传播的能力 (GAO et al, 2009; SUBBARAO et al, 1993)。

1.3 H5、H7 亚型禽流感的防控

1.3.1 H5 亚型禽流感疫苗研究进展

H5N2 亚型 (N28 株) 是 2003 年中国第一个研制成功并获得新兽药证书的疫苗, 同时也是首个获得生产文号的 AI 灭活疫苗, 它是用英国引进的自然分离的 LPAIV 作为疫苗种毒研制的。利用反向遗传操作技术构建的基因工程疫苗 H5N1 重组 AIV 灭活疫苗 (简称 Re-1 株灭活疫苗) 是世界上第一个大规模应用的基因工程 AI 灭活疫苗 (于康震 等, 2015), 利用该疫苗免疫后家禽均可获得完全保护 (TIAN et al, 2005; QIAO et al, 2006)。自此, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所利用反向遗传操作技术研制出了 H5 亚型的 Re-4 株、Re-5 株、Re-6 株、Re-7 株 Re-8 株、Re-10 株、Re-11 株和 Re-12 株系列灭活疫苗, 应用后效果明显。2006 年初, 我国批准了一种二联重组新城疫病毒 (NDV) 载体 H5 AI 活疫苗, 可同时预防 AI 和 ND, 能很好地诱导细胞免疫和黏膜免疫 (CHEN et al, 2009)。重组火鸡疱疹病毒 (HVT)-H5 HA 疫苗可提供 70%~90% 的临床保护, 以对抗 H5 亚型 AIV 的攻击 (RAUW et al, 2011; RAUW et al, 2012)。将 H5 的 HA 基因插入到鸭病毒性肠炎病毒 (DEV) 疫苗株基因组的不同位点后制备出的 DEV 载体活疫苗, 可对 H5 亚型 AIV 和 DEV 的攻击提供有效的保护, 表明该疫苗具有免疫原性 (LIU et al, 2011)。H5 HA 经传染性喉气管炎病毒 (ILTV) 载体重组后, 鸡免疫后攻击同源和异源 H5 病毒, 最后表明鸡得到了完全保护, 但该疫苗在控制 H5 亚型 AI 方面有限 (PAVLOVA et al, 2009; LI et al, 2014)。姜永萍等 (2007) 开发了一种以 pCAGGS 为载体的 DNA 疫苗, 将密码子优化后 optiHA 基因插入载体中, 机体会产生细胞免疫和体液免疫, 具有广泛应用前景。

1.3.2 H7N9 禽流感疫苗研究进展

第一个 H7N9 病毒 VLP 候选疫苗是由 Smith 等 (2013) 制备的, 该疫苗以杆状病毒为载体将 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 病毒株全长 HA、NA 基因及 A/Indonesia/05/2005 (H5N1) 病毒株 M1 基因整合后, 表达纯化, 试验结果表明该疫苗能够抵御野生型 H7N9 AIV 的攻击, 免疫效果良好。2015 年, 刘等利用 NDV 作为载体分别研究了 NDV-H7 和 NDV-H5 疫苗。它们能够诱导产生具有高 HI 效价的抗体, 鸡感染高致病性 H5 亚型或 H7N9 亚型病毒后, 可完全免受病毒攻击。NDV 载体的 H7 和 H5 疫苗都可能成为减轻鸡感染从而保护公众健康的潜在候选疫苗 (LIU et al, 2015)。2017 年胡等构建了一种 NDV 载体疫苗 (rLXHAF), HA 蛋白正确表达, 对感染 H7N9 亚型 HPAIV 的鸡提供了 80% 的免疫保护并完全保护鸡不受 NDV 的攻击 (HU et al, 2017)。蒋文明等 (2018) 将一株 H7N9 亚型 HPAIV 的 HA1 基因插入到 PR8 病毒 NS 基因的 73 位氨基酸之后, 构建嵌合的 NS (73)-H7 HA1 基因并插入到双向表达载体中, 扩增 H5N6 亚型病毒的 HA 基因稍作修饰并插入双向表达载体中, 拯救出同时表达两种 HA 蛋白的疫苗毒株, 免疫后用强毒攻击鸡, 该疫苗可以对 SPF 鸡提供 100% 的保护。胡娇等 (2019) 用 H7N9 病毒的 HA 构建了一种杆状病毒疫苗 rBac-JX148HA, 该灭活重组杆状病毒疫苗具有较高的血凝抑制抗体效价, 能完全抵御高致病

性 H7N9 病毒的攻击, 在预防和控制 H7N9 AIV 方面, 该候选疫苗具有潜在的应用价值。梁真洁等 (2019) 在 pCAGGS 载体中插入编码优化 H7N9 亚型 AI 疫苗株 HA 基因, 构建了重组质粒 pCA-SD098, 确认 HA 蛋白表达后, 用不同剂量重组质粒免疫 SPF 鸡, 7 d 后加免, 之后分别攻击同源 HPAIV 和异源 LPAIV。结果显示, 低剂量免疫鸡后能够完全保护鸡群免受高致病性 H7N9 亚型 AIV 的致死性攻击, 该研究的疫苗可作为防控 H7N9 AI 的候选疫苗。

2014 年, 陈化兰院士团队研制出了重组禽流感病毒灭活疫苗 (H7 亚型, H7N9/PR8 株), 该疫苗安全性良好, 免疫效力高并已通过农业部的新兽药评价, 但仅作为储备疫苗尚未应用。重组禽流感病毒 (H5+H7) 二价灭活疫苗 (H5N1 Re-8 株+H7N9 H7-Re1 株) 于 2017 年 9 月在全国应用后, 切断了病毒从家禽到人的传播过程, 病毒在家禽中的分离率大幅降低, 表明了家禽免疫成功后, 消除了人感染 H7N9 病毒 (ZENG et al, 2018)。该疫苗是我国防治 AI 的强有力的保障, 同时也是中国第一个大规模使用的 H7 禽流感疫苗。此外, 该实验室还开发了一系列 H5 亚型和 H7 亚型重组灭活疫苗。其中 H7-Re2 株和 H7-Re3 株的 H5+H7 三价疫苗已经分别在 2019 年 2 月和 2020 年 7 月开始应用并取得了良好的防控效果。

1.3.3 禽流感综合防治措施

目前, 对动物感染 AIV 后的主要措施是扑杀政策与免疫相结合, 免疫接种是预防 AI 的主要手段, 也是最经济实用且科学的方法。有效防控 AI 应将生物安全和疫苗免疫结合, 选择综合措施, 建立“预防为主”的观念。

1.3.3.1 加强饲养管理, 提高家禽群体免疫力

饲养条件要科学合理, 严格把控, 如: 温度、密度、通风、光照等问题。要保证饲料的全营养配给, 减少应激反应的出现, 使禽群具备良好的健康状态。农场采用全进全出制, 新引进的鸡群做好监控工作, 避免带入病原体, 有效控制疫病的发生。

1.3.3.2 严格的卫生和消毒

完善优化养殖场的消毒方法, 净化环境。选择正确的消毒剂, 定期严格对禽舍用具、场区外环境、人员以及进出车辆等进行消毒。

1.3.3.3 加强免疫工作

免疫接种是预防和控制传染病发生的有效措施 (王娟, 2011)。只有选择合适的疫苗, 采用正确的接种方法和保存条件, 才能使动物产生良好的免疫效果, 保证疫苗的有效性。制定科学合理的免疫规划, 提高禽群有效免疫密度和质量, 控制好最后一道防线。

1.3.3.4 做好疫情监测工作

对农场、活禽市场等场所加强 AI 监测, 及时把握家禽群体 AI 抗体水平与疾病流行情况。搞好区域内疫情检测和流行病学调查、分析、评价、预防工作, 随时了解当地疾病。

1.4 本研究的目的和意义

AI 是一种对全世界禽类生产具有重要经济意义的疾病，为减少该病带来的损失和危害，我们应该加强防控工作。目前对该病的主要措施是扑杀与免疫相结合，疫苗免疫是针对 AI 的主动措施，关键环节和最后防线（田国斌 等，2002）。疫苗应用后发挥了显著的作用，但是由于 AIV 的易变性，其抗原性不断发生变异，HPAIV 更是如此，因此，我们应该及时监测 AIV，掌握其流行趋势，适时进行疫苗种毒更新，研制出针对流行毒株的新疫苗，把控好最后一道防线，将各类损失降到最低。

H5 亚型 AIV 在中国存在范围较广。2013 年，我国开始出现了人 H7N9 亚型流感病例并造成多人死亡；2017 年，H7N9 亚型 HPAIV 在广东率先出现，并在多个养殖场引发疫情。2017 年 9 月，重组禽流感病毒（H5+H7）二价灭活疫苗（H5N1 Re-8 株+H7N9 H7-Re1 株）在全国正式大规模应用，H7N9 亚型 AIV 从家禽到人的传播被切断，在控制疫情方面发挥了重要作用；2019 年应用的重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株+H5N1 Re-12 株+H7N9 H7-Re2 株）更新了两个亚型 AI 疫苗株，防控效果良好。监测数据显示，H7N9 亚型病毒株分离率明显下降，但依然存在，并出现了变异株，其抗原性与 H7-Re2 株差异较大，H7-Re2 株疫苗的保护效率下降，因此 H7N9 疫苗种毒需要进行更新，而 H5 亚型虽有抗原性差异，但疫苗保护效率未下降，故不需要进行更新。

本实验室经过流行病学调查和抗原性分析筛选出一株 HPAIV A/Chicken/Inner Mongolia/SD010/2019（H7N9），以其提供 HA 和 NA 基因，成功构建了重组 H7-Re3 株疫苗株。本研究对重组 H7-Re3 株疫苗株进行系统鉴定，与之前使用的 H5 亚型 Re-11 株和 Re-12 株一起，开发出重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株+H5N1 Re-12 株+H7N9 H7-Re3 株），重点在实验室和临床应用上进行该疫苗对鸡、鸭和鹅的安全性和免疫效果等进行一系列评估，同时进行疫苗免疫后 HI 抗体与攻毒保护关系的研究，为该疫苗在全国范围内应用提供切实可靠的参考依据。

第二章 重组禽流感病毒 H7N9 亚型 H7-Re3 株生物学特性研究

2019 年,在流行病学调查中,本实验室发现了一些变异的 H7N9 亚型 AIV,经 HA 基因进化分析发现,与现有 H7-Re2 疫苗株不同,形成了一个新的单独分支,抗原性分析发现,当前 H7-Re2 疫苗株与变异病毒抗原性相差 16~32 倍,存在较大的抗原性差异,疫苗免疫保护效果可能下降,而 A/Chicken/Inner Mongolia/SD010/2019 (简称 CK/IM/SD010/2019) (H7N9) 制备的血清与近期分离的 H7N9 抗原变异株具有更好的反应性,适合作为重组疫苗株构建的候选病毒。为研制抗原性更为匹配的 H7N9 亚型防控疫苗,把流感病毒 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34, PR8) (H1N1) 的 6 个内部基因和 H7N9 病毒 CK/IM/SD010/2019 的 HA 基因和 NA 基因重组,将 HA 裂解位点的多个碱性氨基酸去掉,人工构建出 1 株 H7N9/PR8 灭活疫苗种毒(命名为 H7-Re3 株)。本章对重组 H7-Re3 疫苗株生物学特性进行了初步研究,为其作为灭活疫苗种毒提供试验依据。

2.1 材料

2.1.1 病毒株

重组 AIV H7N9 亚型 H7-Re3 株,命名为 E0 代种毒;攻毒株共 4 株 HPAIV,其中 3 株 H7N9 亚型病毒即 A/Peacock/Liaoning/SD004/2019 (简称 PCK/LN/SD004/2019)、A/Chicken/Inner Mongolia/SD010/2019 (简称 CK/IM/SD010/2019) 和 A/Chicken/Liaoning/SD025/2019 (简称 CK/LN/SD025/2019) 以及 1 株 H7N2 亚型病毒 A/Duck/Fujian/SE0195/2018 (简称 DK/FJ/SE0195/2018),由国家禽流感参考实验室分离、鉴定和保存。

2.1.2 实验动物及试验地

10 日龄 SPF (Specified-pathogens free, SPF) 鸡胚,21 日龄、28 日龄、42 日龄 SPF 鸡由国家禽类实验动物资源库提供。涉及 H7 亚型 HPAIV 的试验均在生物安全三级实验室 (ABSL-3) 进行。

2.1.3 标准阳性血清及抗原

AIV H5、H7、H9 亚型标准血清,H7 亚型 H7-Re3 株 HI 试验抗原,由国家禽流感参考实验室提供。NDV 标准血清、减蛋综合征病毒 (EDSV) 标准血清,购自中国兽医药品监察所。

HI 试验方法按现行《中国兽药典》附录方法进行。

2.1.4 疫苗

H7N9 亚型 H7-Re3 株重组禽流感病毒灭活疫苗由本实验室按照 H7 亚型禽流感灭活疫苗单价疫苗制造规程制备。

2.1.5 主要试剂和仪器

磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司)、反转录试剂 (TOYOBO 公司)、测序酶、ddH₂O、1% 鸡红细胞悬液、37°C 温箱、PCR 扩增试剂 (北京博奥龙免疫技术有限公司)、胶回收试剂 (Omega Bio-Tek 公司)、DNA Marker 2000 (北京博奥龙免疫技术有限公司)、琼脂糖、电解液、EB 核酸染色液、PCR 仪、金属浴、孵化器、离心机、-80°C 冰箱、-20°C 冰箱、注射器、照蛋器、凿蛋器、蜡烛、2 mL 和 1.5 mL 离心管、青霉素、链霉素、头孢、75% 酒精、无水乙醇、排枪、冻存管、冻存盒、移液枪、枪头、血凝板、棉签

2.2 方法

2.2.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株在鸡胚中的增殖及其鉴定

将重组 AIV H7N9 亚型 H7-Re3 株 E0 代用无菌生理盐水稀释至 10⁻⁴，以 0.1 mL 的剂量，经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚，36°C 培养 72 h。测每个鸡胚的 HA，将 HA 不低于 9log₂ 的鸡胚尿囊液收获、混匀，保存于无菌容器中。然后分管，吸取 1 mL 置于 2 mL 冻存管内，冷冻保存于 -70°C 冰箱。

将 E0 代毒种用灭菌生理盐水作 10 倍比稀释，取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 5 个稀释度，尿囊腔各接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.1 mL。36°C 培养 72 h，分别测每个鸡胚的 HA，HA 不低于 4log₂ 则感染，按 Reed-Muench 方法计算鸡胚半数感染量 (50% egg infective dose, EID₅₀)。

将 E0 代毒种用 PBS 稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释度，0.1 mL/枚，尿囊腔接种途径各接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚，置 36°C 孵育 72 h，以此法传至 13 代，收取每一代的鸡胚液，分别测 HA 效价，病毒含量、HA 和 NA 基因序列、纯净性及特异性；将 E5 和 E13 代毒种作为抗原，分别与 AIV H5、H7、H9 亚型标准阳性血清、鸡 NDV 阳性血清和 EDSV 阳性血清用微量法进行 HI 试验，病毒特异性根据现行《中国兽药典》附录进行测定。

2.2.2 重组禽流感病毒 H7-Re3 株的致病性试验

2.2.2.1 静脉内接种致病指数 (IVPI) 测定

将 E0、E5 和 E13 代毒种用 PBS 作 10 倍稀释，以静脉接种法用 0.1 mL 病毒液接种 10 只 42 日龄 SPF 鸡，观察并记录攻毒后 10 d 内发病死亡情况，计算静脉接种致病指数 (IVPI)。

2.2.2.2 鸡胚和鸡的致病性试验

将 E0、E5 和 E13 代毒种用 PBS 稀释至 10⁻⁴，0.1 mL/枚，10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚，尿囊腔内接种，36°C 培养 72 h，记录鸡胚死亡情况。。

将 E0、E5 和 E13 代毒种 0.1 mL/只 (含 10⁶EID₅₀) 滴鼻接种 28 日龄 SPF 鸡各 10 只，对照 10 只不接种，观察各组鸡的临床表现 14 d。喉头和泄殖腔拭子于攻毒后第 3 d 和第 5 d 采集，按常规方法检测其排毒情况。

2.2.3 重组禽流感病毒 H7-Re3 株灭活疫苗的免疫效力试验

2.2.3.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株免疫原性试验

将 E0、E5 和 E13 代毒种按照 AI H7 亚型单价灭活疫苗规程制成油乳剂灭活疫苗。颈部皮下接种 0.3 mL 21 日龄 SPF 鸡, 另设 10 只为对照组。免疫后 21 d, 采集每只鸡的血清, 用 H7 亚型 AI 抗原测 HI 抗体; 同时将免疫鸡和对照鸡鼻腔感染 HPAIV CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 株病毒液 0.1 mL (含 100 LD₅₀), 记录 10 d 鸡的发病和死亡情况。每只鸡的泄殖腔拭子在攻毒后第 5 d 采集, 取 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔接种, 培养 72 h, 测每枚胚的 HA, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA 效价 $\geq 4\log_2$, 则病毒分离阳性。阴性样品用鸡胚盲传一代, 若仍为阴性, 则该只家禽不排毒。

2.2.3.2 重组禽流感病毒 H7-Re3 株对流行毒株的免疫效果试验

H7N9 亚型 H7-Re3 株重组 AIV 灭活疫苗由本实验室按照 H7 亚型 AI 灭活疫苗单价疫苗制造规程制备 (制备疫苗前病毒液 HA 价为 9 log₂)。取 21 日龄 SPF 鸡共 80 只, 分为 8 组, 第 1~4 组各 10 只, 分别接种灭活疫苗, 肌肉注射, 每只 0.3 mL; 第 5~8 组各 10 只鸡, 不接种作对照。鸡免疫后 21 d 采集血清, 测 HI 抗体。免疫 21 d 后, 分别以 10⁵ EID₅₀ 剂量攻击 4 株 H7 亚型毒株: PCK/LN/SD004/2019、CK/IM/SD010/2019 和 CK/LN/SD025/2019、DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2)。攻毒后观察 14 d, 记录发病和死亡情况。每只鸡攻毒后 3 d 和 5 d 采集喉头和泄殖腔拭子, 尿囊腔接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 培养 72 h, 每胚均测 HA 效价, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA $\geq 4\log_2$, 则表明病毒分离阳性, 表明该只鸡排毒。阴性用鸡胚盲传一代, 若病毒分离仍为阴性, 则该只鸡不排毒。

2.3 结果

2.3.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株在鸡胚中的增殖和遗传稳定性结果

重组 AIV H7-Re3 株 E0 代接种鸡胚后, 72 h 内鸡胚全部存活, 测定鸡胚尿囊液的红细胞血凝价为 1:512; 病毒含量结果为 10^{8.50} EID₅₀/0.1 mL, 用 SPF 鸡胚对重组病毒传代 13 代, 结果显示, 接种鸡胚全部存活, 培养 72 h 后病毒含量均不低于 10^{8.17} EID₅₀/0.1 mL, HA 效价均在 9 log₂; HA 和 NA 基因序列均未发生突变, 具体结果如表 2-1。经鉴定各代毒株对 H7 亚型标准血清呈阳性, 对 AIV H5、H9 亚型、NDV 阳性血清和 EDSV 阳性血清均为阴性 (表 2-2)。以上结果表明, 重组 AIV H7-Re3 株在鸡胚中生长良好, 对鸡胚无致病力, 有良好的遗传稳定性, 且该毒种只与 H7 亚型 AIV 抗血清反应, 特异性高。

表 2-1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株病毒含量、HA 和基因序列鉴定

Table 2-1 Identification of virus content, hemagglutination value and gene sequence of recombinant avian influenza virus H7-Re3 strain

代次	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13
HA 效价 (log ₂)	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9	9
EID ₅₀ /0.1 mL	10 ^{8.50}	10 ^{8.17}	10 ^{8.50}	10 ^{8.38}	10 ^{8.50}	10 ^{8.63}	10 ^{8.50}	10 ^{8.63}	10 ^{8.50}	10 ^{8.38}	10 ^{8.38}	10 ^{8.50}	10 ^{8.17}	10 ^{8.17}
HA 基因序列	-PEVPKGR↓GLF-													
NA 基因序列	与表面基因供体株 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 的 NA 基因第 288 位至 727 位对应区域核苷酸序列完全一致。													

表 2-2 重组禽流感病毒 H7N9 亚型 H7-Re3 株 HI 试验结果

Table 2-2 HI test results of recombinant avian influenza virus H7N9 subtype H7-Re3 strain

血清	结果	血清	结果	血清	结果
H5	阴性	H7	阳性	H9	阴性
新城疫	阴性	减蛋综合征	阴性		

2.3.2 致病性试验结果

2.3.2.1 IVPI 测定结果

重组 AIV H7-Re3 株的 IVPI 结果表明, 接种该毒株的 SPF 鸡在为期 10 d 的观察期内, 均未出现任何不良症状, 经计算 E0、E5 和 E13 代毒株的 IVPI 均为 0。结果表明, 重组 AIV H7-Re3 是低致病性毒株。

2.3.2.2 鸡胚和鸡致病性试验结果

E0 代毒株接种鸡胚后 72 h, 鸡胚均存活; E5 和 E13 代接种鸡胚后, 有 1 枚鸡胚 24 h 内出现非特异性死亡, 其余鸡胚至 72 h 仍全部存活; 对照组接种 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 株鸡胚在 48 h 内全部死亡。该结果表明重组 AIV H7-Re3 株对鸡胚无致病性。

将 E0、E5 和 E13 代毒株以及 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 株以 10^6 EID₅₀ 的剂量鼻腔内接种 SPF 雏鸡后, 观察结果显示, 接种 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 株的对照鸡在 5 d 内全部发病死亡, 而接种重组 AIV H7-Re3 株的 E0、E5 和 E13 代毒株的所有 SPF 鸡在为期 14 d 的观察期内精神状态均良好, 采食饮水正常, 未出现死亡。采集接种后 3 d 和 5 d 的拭子, 经 HA 试验检测, 结果显示接种 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 的对照鸡的所有喉头和泄殖腔拭子均检测到病毒, 而重组 AIV H7-Re3 株的 E0、E5 和 E13 代的实验组均未检测到病毒 (表 2-3)。该结果表明, 接种重组 AIV H7-Re3 株后, 感染鸡不排毒, 不出现异常临床表现, 对雏鸡无致病性, 因此该病毒具有高度的生物安全性。

表 2-3 H7N9 亚型 AIV 分离株和不同代次重组病毒株对 SPF 鸡的致病性

Table 2-3 Pathogenicity of H7N9 subtype AIV isolates and recombinant virus strains of different generations to SPF chickens

组别	攻毒后排毒: 排毒数/总数				存活数 /总数
	3 d		5 d		
	喉头	泄殖腔	喉头	泄殖腔	
H7-Re3 E0	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
H7-Re3 E5	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
H7-Re3 E13	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
对照组	10/10	10/10	/*	/*	0/10

注: *攻毒 4 d 内全部发病死亡。

2.3.3 重组禽流感病毒 H7-Re3 株灭活疫苗的免疫效力试验结果

2.3.3.1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株免疫原性试验结果

将 E0、E5 和 E13 代病毒株制成的疫苗接种 SPF 鸡, 21 d 后, 进行 HI 抗体效价检测。免疫鸡平均抗体效价分别为 $8.0 \log_2$ 、 $8.1 \log_2$ 和 $7.8 \log_2$, 对照鸡不含抗体 (图 2-1)。攻毒后 10 d 内, 免疫鸡全部健活, 对照鸡全部死亡; 攻毒 5 d 后, 采集鸡喉头和泄殖腔拭子样品接种鸡胚, 测定 HA 效价, 有 HA 效价则含有病毒, 统计病毒分离阳性数, 结果免疫组病毒分离阳性数 0/10, 对照组 10/10 病毒分离阳性 (表 2-4)。该数据表明, 重组 AIV H7-Re3 株各代次的免疫原性良好, 制成疫苗免疫鸡后能产生良好的抗体, 并能抵抗 HPAIV 的攻击。

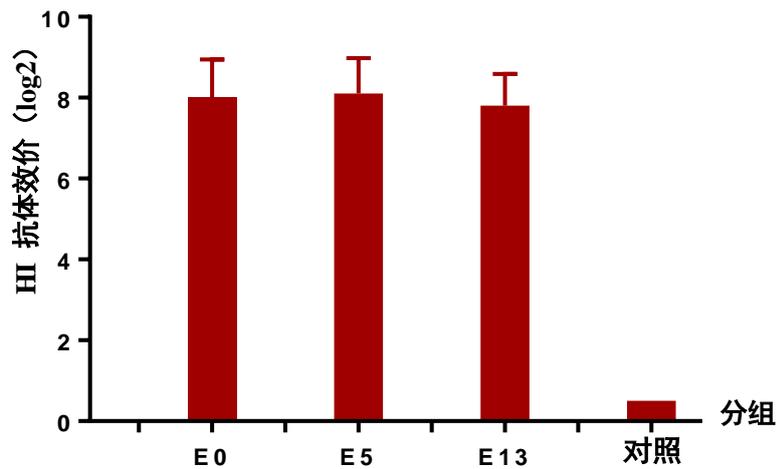


图 2-1 重组禽流感病毒 H7-Re3 株免疫原性抗体检测结果

Figure 2-1 Results of immunogenic antibody detection of recombinant avian influenza virus H7-Re3 strain

表 2-4 重组禽流感病毒 H7-Re3 株免疫原性试验攻毒结果

Table 2-4 Recombinant avian influenza virus H7-Re3 strain immunogenicity test challenge results

分组	试验鸡编号										发病死亡数 / 总数	病毒分离阳性数 / 总数	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
E0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0/10	0/10
E5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0/10	0/10
E13	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0/10	0/10
对照组	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10	10/10

注：“-”表示阴性，“+”表示阳性

2.3.3.2 重组禽流感病毒 H7-Re3 株对流行毒株的免疫效果试验结果

SPF 鸡接种重组 AIV H7-Re3 株灭活疫苗 21 d 后，每只鸡采集血样，用 H7 亚型 H7-Re3 株抗原测定 HI 抗体效价。数据表明，免疫鸡 HI 抗体平均值在 7.7 log₂~8.2 log₂，对照鸡 HI 抗体均为阴性，结果见图 2-2。

免疫鸡用 2019 年分离的 3 株 H7N9 亚型变异株 PCK/LN/SD004/2019、CK/IM/SD010/2019 和 CK/LN/SD025/2019 和 2018 年分离的 1 株 H7N2 亚型病毒 DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2) 毒株攻击后，10 d 观察期内，攻毒 5 d 后对照组鸡全部发病死亡；免疫鸡组均健活，且无任何临床症状，获得 10/10 的保护（图 2-3）。免疫鸡和对照鸡的喉头和泄殖腔拭子在攻毒后 3 d 和 5 d 各采集一次，进行病毒分离试验，结果免疫鸡未分离出病毒，而对照鸡全部有病毒（表 2-5）。表明重组 AIV H7-Re3 株能够抵御当前流行的不同 H7 亚型 AIV 的攻击。

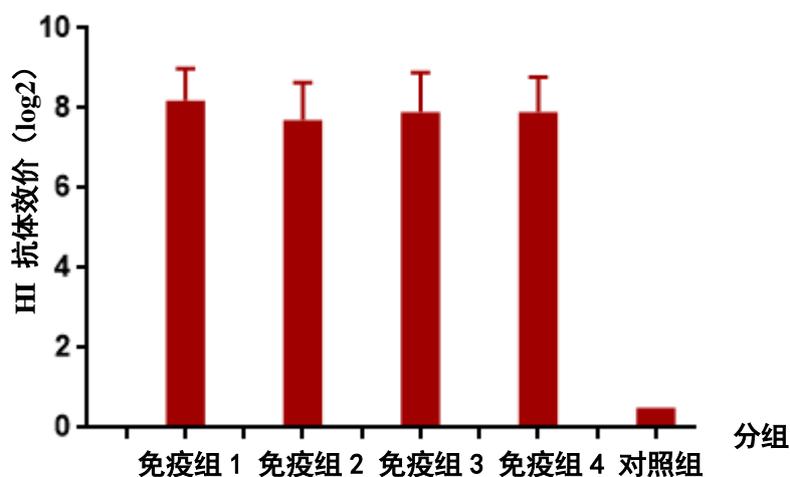


图 2-2 鸡免疫后 21 d 时 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体效价

Figure 2-2 HI antibody titer of H7 subtype H7-Re3 strain 21 days after chicken immunization

表 2-5 鸡免疫 H7-Re3 株疫苗后对 H7 亚型 AIV 流行株的攻毒保护性试验

Table 2-5 Challenge and protection test of chickens immunized with H7-Re3 strain vaccine against H7 subtype avian influenza epidemic strain

攻毒毒株	组别	攻毒后 3 d 和 5 d 排毒率				一代/盲传/总数*	保护数/存活数/ 总数
		3 d		5 d			
		喉头	泄殖腔	喉头	泄殖腔		
PCK/LN/SD004/2019	免疫组 1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10	
(H7N9)	对照组 1	10/10***	10/10	1/1***	1/1	0/0/10	
CK/IM/SD010/2019	免疫组 2	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10	
(H7N9)	对照组 2	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10	
CK/LN/SD25/2019	免疫组 2	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10	
(H7N9)	对照组 2	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10	
DK/FJ/SE0195/18	免疫组 3	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10	
(H7N2)	对照组 3	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10	

注：*一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。***表示第一代就是阳性，无需进行盲传。**表示对照鸡攻毒 5 d 后全部死亡。

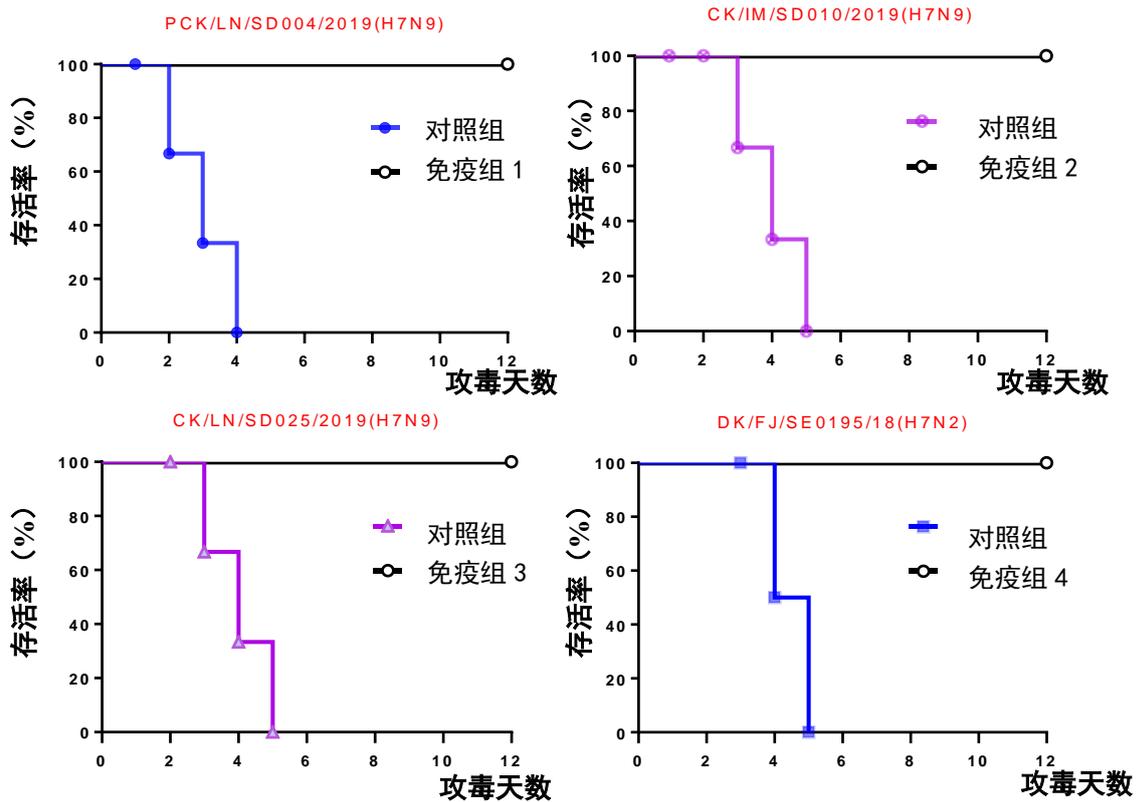


图 2-3 鸡免疫 H7-Re3 株疫苗后攻击 H7 亚型 AIV 流行株后抗死亡保护结果

Figure 2-3 Anti-death protection results of chickens immunized with H7-Re3 strain vaccine after attacking the H7 subtype avian influenza epidemic strain

2.4 讨论

自 2017 年 9 月在我国全面应用 H5 和 H7 亚型 AI 二价灭活疫苗以来, 家禽中 H7N9 亚型病毒的分离率下降了 93.3%, 而且疫苗应用后阻断了病毒从家禽到人的传播, 仅偶见个别病例 (SHI et al, 2017; ZENG et al, 2018)。2019 年初以重组 H7-Re2 株为基础开发的重组 AIV (H5+H7) 三价灭活疫苗取代了以 H7-Re1 株为基础重组 AIV (H5+H7) 二价灭活疫苗 (陈晓涵 等, 2020), 效果良好。但是由于 AIV 抗原性高度易变, 在 AI 流行病学调查和病毒监测过程中, 发现部分变异的 H7N9 亚型病毒, 为更好的预防控制 H7N9 亚型 AI, 本实验室构建了重组 AIV H7-Re3 株, 流感病毒灭活疫苗种毒株必须同时考虑到抗原针对性、生物安全性及鸡胚生长适应性三个方面 (田国彬 等, 2004)。本研究对该毒株进行系统鉴定并评估了其免疫原性, 为疫苗用毒株的建立提供试验参考。

本试验结果说明, 国家禽流感参考实验室构建的重组 AIV H7-Re3 株在鸡胚上能够稳定遗传至 13 代, 且病毒生长滴度高, 对鸡胚和鸡均无致病性, 具有良好的免疫原性、生物安全性及鸡胚生长适应性, 是 AI 灭活疫苗的理想种毒; H7N9 亚型 AIV H7-Re3 株尿囊液经灭活制备的油乳剂灭活疫苗免疫鸡后, 免疫原性良好。用常规剂量的疫苗一次免疫 21 d 后对 HPAI H7N9 抗原变异株和 H7N2 病毒攻击均能够阻止免疫鸡排毒, 免疫效果良好。

本研究充分表明灭活疫苗种毒 H7-Re3 株的良好应用前景, 表明 H7-Re3 株重组病毒可以作为

针对我国当前 H7 亚型 AIV 防控的疫苗种毒株，可以成为大规模生产 H7 亚型禽流感灭活疫苗的种子毒株。

第三章 重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗的实验室研究

2019年 国家禽流感参考实验室监测到的大多数 H5 病毒与现有 Re-11 或 Re-12 株疫苗株抗原匹配性好, Re-11 株病毒的抗原差异在个别毒株中存在, 但经免疫评估试验发现, 当时应用的三价苗能够完全抵御 H5 亚型病毒的攻击, 由此 H5 亚型不需要进行更新; 2018 年 9 月以来监测到的 H7N9 亚型 AIV 与现有 H7-Re2 株疫苗株的抗原性存在较大差异, 当前三价苗不能抵御新出现的 H7N9 亚型 AIV 的攻击, 故 H7 疫苗需更换。上一章节中, 我们对重组 AIV H7-Re3 株进行了系统鉴定并评估了其免疫效果, 发现该毒株可作为疫苗候选株, 在本节的研究中将 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株毒株制备成重组 AIV (H5+H7) 三价灭活疫苗, 并对该疫苗进行质量检验及对鸡和水禽的安全性、免疫效力及对流行株病毒的攻毒、重组 AI H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体与攻毒保护关系等研究, 为该疫苗在全国范围内应用提供有力的试验证据。

3.1 材料

3.1.1 疫苗用毒株

H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型重组 AIV H7-Re3 株疫苗种毒, 由国家禽流感参考实验室构建、鉴定和保存。

3.1.2 效检病毒株

Re-11 株疫苗株免疫效力检验用毒株为 H5 亚型 AIV A/Duck/Guizhou/S4184/2017 (H5N6) (简称 DK/GZ/S4184/2017) 株, 该毒株的鸡半数致死量 (LD_{50}) 为 $10^{5.50}/0.1$ mL, 该毒株鸭的 LD_{50} 为 $10^{4.63}/0.1$ mL、鹅的 LD_{50} 为 $10^{4.38}/0.1$ mL; Re-12 株疫苗株免疫效力检验用毒株为 A/Chicken/Liaoning/SD007/2017 (H5N1) (简称 CK/LN/SD007/2017), 该毒株的鸡半数致死量 (LD_{50}) 为 $10^{5.63}/0.1$ mL, 该毒株鸭和鹅的 LD_{50} 分别为 $10^{4.63}/0.1$ mL、 $10^{4.50}/0.1$ mL; H7-Re3 株疫苗株鸡免疫效力检验用毒株为 H7 亚型 AIV A/Chicken/Inner Mongolia/SD010/2019 (H7N9) (简称 CK/IM/SD010/2019) 株, 该毒株的鸡 LD_{50} 为 $10^{6.17}/0.1$ mL; H7-Re3 株疫苗株对鸭的免疫效力检验用毒株 A/Duck/Fujian/SE0195/2018 (H7N2) (简称 DK/FJ/SE0195/2018) 的鸭半数致死量为 $10^{4.17}/0.1$ mL (该毒株 10^6 EID₅₀ 高剂量对鹅不致死, 以 10^6 EID₅₀ 进行攻毒效力检验)。2 株 H7N9 亚型 AIV 2019 年分离株 A/Peacock/Liaoning/SD004/2019 (简称 PCK/LN/SD004/2019) 和 A/Chicken/Liaoning/SD025/2019 (简称 CK/LN/SD025/2019) 株作为 H7 亚型流行代表株, 其 EID₅₀ 为 $10^{8.50}/0.1$ mL; H7N2 亚型病毒 DK/FJ/SE0195/2018 的 EID₅₀ 为 $10^{8.38}/0.1$ mL。H5 亚型流行代表株: 3 株 H5N6 亚型 2.3.4.4d 分支病毒 A/Duck/Jiangxi/S40947/2019 (简称 DK/JX/S40947/2019)、A/Duck/Guangdong/SD10/2019 (简称 DK/GD/SD10/2019) 株和 A/Chicken/Anhui/SD07/2019 (简称 CK/AH/SD07/2019 株)(2018~2019 年全国 AI 病原学监测到的 2.3.4.4d 分支 H5N6 亚型 AIV 最多, 因此在此选择 2019 年 3 株不同抗原性差异代表株进行免疫鸡攻毒试验), 1 株 H5N1 亚型 2.3.2.1d 分支 AIV A/Chicken/Liaoning/2/2019 (简称 CK/LN/2/2019) 株 (监测到的 2.3.2.1d 分支病

毒较少,而且抗原性与 Re-12 株疫苗株较近,只选择 1 株病毒进行免疫鸡攻毒试验), EID_{50} 分别为 $10^{8.38}/0.1\text{ mL}$ 、 $10^{8.50}/0.1\text{ mL}$ 、 $10^{8.38}/0.1\text{ mL}$ 和 $10^{8.63}/0.1\text{ mL}$ 。以上毒株由国家禽流感参考实验室分离、鉴定和保存。

3.1.3 试验鸡胚和试验动物

10 日龄 SPF 鸡胚、21 日龄 SPF 鸡 SPF 鸭,由国家禽类实验动物资源库提供;11 日龄非免疫鸡胚,由哈尔滨维科生物技术有限公司提供;1 日龄商品鹅购自哈尔滨当地鹅场,饲养至 14 日龄时,进行免疫攻毒试验。

3.1.4 HI 抗原和标准阳性血清

H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 试验抗原和标准阳性血清由国家禽流感参考实验室制备。

3.1.5 主要试剂和仪器

注射器、PBS、蜡烛、血凝板、排枪、单枪、1.5 mL、2 mL 和 50 mL 离心管、75%酒精、无水乙醇、冻存盒、冻存管、温箱、照蛋器、镊子、剪刀、透析袋、聚乙二醇、甲醛溶液、0.22 μm 过滤器、0.4 mol/L NaOH 溶液、蒸馏水、摇床、白油、吐温、乳化器、无菌广口瓶、移液枪、枪头、移液管、4 $^{\circ}$ 冰箱、超净台、隔离器、水浴锅、离心机。

3.2 方法

3.2.1 活性成分抗原相容性研究

3.2.1.1 病毒液准备

用无菌 PBS 将 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株疫苗种毒稀释至 10^{-4} ,然后以每枚胚 0.1 mL 的剂量尿囊腔接种普通鸡胚,36 $^{\circ}$ C 培养 72 h,弃 24 h 死亡的胚。72 h 后测定每个鸡胚的 HA,然后将高 HA 价的鸡胚尿囊液用无菌装置收集,其中一部分用甲醛灭活后,37 $^{\circ}$ C 存放 18 h~20 h,然后将灭活的尿囊液保存于 4 $^{\circ}$ C;另一部分浓缩备用。

3.2.1.2 病毒液浓缩

将浓缩装备高压蒸汽 121 $^{\circ}$ C 灭菌 40 min,超滤膜排净水分,循环泵中用 2% 甲醛溶液循环 5~10 min 后关闭,使甲醛溶液在膜包内保持 24 h,弃掉甲醛溶液,用 PBS 反复冲洗至 pH 为中性。先取样,然后分别将病毒液在无菌条件下过滤,除去杂质。再用超滤浓缩装置,使病毒内水分渗出,完成浓缩过程。结束后,用蒸馏水冲洗超滤膜内物质,再用 0.4 mol/L NaOH 溶液循环冲洗 30 min,后用蒸馏水将其冲净,用甲醛溶液浸泡消毒。Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株 3 倍浓缩的病毒液,即三种病毒液的体积浓缩至原来 1/3,浓缩后病毒液的 HA 效价均不低于 $9\log_2(1:512)$,

然后加入甲醛灭活，置于 2°C~8°C 保存。

3.2.1.3 灭活检验

取 10 日龄 SPF 鸡胚 30 枚，经尿囊腔接种灭活的 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株病毒原液和浓缩后的病毒液各 10 枚，每枚 0.1 mL。36°C 孵育 72 h，收获鸡胚液，测 HA 效价，若为阴性，盲传 1 代，再测 HA 效价，如果还是阴性，则完全灭活。

3.2.1.4 疫苗制备

按疫苗制作步骤，分别制备出 H5 亚型重组 AIV Re-11 株灭活疫苗、重组 AIV Re-12 株灭活疫苗、H7 亚型重组 AIV H7-Re3 株灭活疫苗、浓缩 3 倍后的 3 种抗原按 1:1:1 比例混合后的浓缩三价疫苗、未浓缩的 3 种抗原原液按 1:1:1 制备的三价疫苗以及确定抗原配比后制备的 3 批三价疫苗，批号分别为 20190704、20190709 和 20190712。

3.2.2 安全性检验

将上述疫苗各接种 21 日龄 SPF 鸡、SPF 鸭、商品鹅各 10 只，每只鸡肌肉接种疫苗 2 mL，每只鸭和鹅颈部皮下接种 2 mL。14 d 观察期内，观察 SPF 鸡、SPF 鸭和商品鹅是否有任何不良反应，之后进行剖检，查看疫苗吸收情况。

3.2.3 疫苗效力检验

3.2.3.1 两种不同抗原含量的三价疫苗分别与三种单苗效力比较

以 10 只 21 日龄 SPF 鸡为实验组进行免疫试验，用以上单苗和三价疫苗给每只鸡肌肉注射 0.3 mL，对照组 10 只不接种疫苗。每只鸡在免疫 21 d 后采集血清，用现行《中国兽药典》中 HI 试验方法测定血清中 Re-11、Re-12 和 H7-Re3 HI 抗体效价。

3.2.4 3 批疫苗免疫效力试验

3.2.4.1 分组免疫

每组 30 只 21 日龄 SPF 鸡的试验组 3 个，分别用于免疫 3 批三价疫苗；对照组分 3 组，每组 10 只鸡，均不接种疫苗。三价疫苗 20190704、20190709 和 20190712 批分别接种 30 只免疫鸡，3 批疫苗分别以 0.3 mL/只皮下、肌肉和皮下接种，对照组不接种疫苗。

3 批三价疫苗分别接种 21 日龄 SPF 鸭，分 3 组，每组 10 只，每批疫苗接种一组，3 批疫苗分别以肌肉注射途径、颈部皮下注射途径和肌肉注射途径接种 0.5 mL，对照 3 组各 10 只，不接种疫苗。

因鹅数量受限，每批疫苗进行 3 种抗原 HI 抗体的检测，但每批疫苗只进行一种效力检验以及病毒的攻毒效力检验。将 3 批三价疫苗分别接种 21 日龄商品鹅，每批各 10 只，每只鹅用 0.5 mL 经肌肉或皮下接种，10 只鹅未接种为对照组。

3.2.4.2 针对 H5 亚型 Re-11 株的免疫效力试验

3 批三价疫苗免疫 21 d 后, 每批疫苗免疫 SPF 鸡、SPF 鸭和商品鹅连同对照禽采血并分离血清, 用 AI H5 亚型 (Re-11 株和 Re-12 株) 以及 H7 亚型 H7-Re3 株抗原测定 HI 抗体效价。免疫后 21 d, 3 批疫苗免疫组中的其中一组 SPF 鸡与对照组、SPF 鸭与对照组以及 20190704 批三价疫苗免疫鹅与对照组一并鼻腔感染 AI H5 亚型病毒 DK/GZ/S4184/2017 株 (H5N6) (含 100 LD₅₀)。攻毒后第 3 d、5 d, 采集每只鸡、鸭和鹅的喉头和泄殖腔拭子, 在尿囊腔内接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 培养 72 h, 测每枚胚的 HA, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA \geq 4 log₂, 则病毒分离阳性, 表明该家禽排毒。阴性用鸡胚盲传一代, 若仍为阴性, 则判定为该只鸡不排毒。

3.2.4.3 针对 H5 亚型 Re-12 株的免疫效力试验

3 批三价疫苗免疫组和对照组 SPF 鸡、SPF 鸭和 20190709 批疫苗三价疫苗免疫鹅与对照组一并鼻腔感染 AI H5 亚型病毒 CK/LN/SD007/2017 株 (H5N1) (含 100 LD₅₀), 通过与上述相同的方法测试 H5 亚型 Re-12 株抗原的效力。

3.2.4.4 针对 H7 亚型 H7-Re3 株的免疫效力试验

3 批三价疫苗免疫组和对照组以 100 LD₅₀ 一并鼻腔感染禽流感 H7 亚型 AIV CK/IM/SD010/2019(H7N9), SPF 鸭及 20190712 批疫苗免疫鹅与对照组一并鼻腔感染 AI H7 亚型病毒 DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2) (鸭含 100 LD₅₀, 商品鹅含 10⁶ EID₅₀), 同上方法进行 H7 亚型 H7-Re3 株抗原的效力检验。

3.2.5 对流行毒株的免疫效力试验

3.2.5.1 对 H5 亚型 2.3.4.4d 分支病毒流行株的免疫效力试验

将 20190704 批三价疫苗接种 30 只 21 日龄 SPF 鸡, 肌肉注射途径免疫 0.3 mL, 30 只对照不接种疫苗。接种 21 d 后, 采集鸡血清, 用 H5 亚型 Re-11 株抗原测 HI 抗体。免疫后 21 d, 分别用 H5 亚型 AIV 2.3.4.4d 分支 H5N6 亚型病毒代表毒株 DK/GD/SD10/2019、CK/AH/SD07/2019 和 DK/JX/S40947/2019 (均含 10⁵ LD₅₀), 鼻腔感染免疫鸡和对照鸡各 10 只。每只鸡在攻毒后第 3 d 和第 5 d 采集喉头和泄殖腔拭子, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 培养 72 h, 各胚均测 HA, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA \geq 4 log₂, 则病毒分离为阳性, 表明该只鸡排毒。阴性则用鸡胚盲传一代, 若仍为阴性, 则该只鸡不排毒。

3.2.5.2 对 H5 亚型 2.3.2.1d 分支病毒流行株的免疫效力试验

将 20190704 批三价疫苗免疫 10 只 21 日龄 SPF 鸡, 并设 10 只 21 日龄 SPF 鸡不免疫作为对照组。免疫后 21 d, 采血并分离血清, 用 Re-11 株抗原检测 HI 抗体。攻毒后, 使用 2.3.2.1d 分支 H5 代表毒株 CK/LN/2/2019 (H5N1) (含 10⁵ LD₅₀) 攻击 10 只免疫鸡和 10 只对照鸡, 进行对流

行株的效力评估。

3.2.5.3 对 H7 亚型禽流感病毒流行株的免疫效力试验

30 只 21 日龄 SPF 鸡接种 20190704 批三价疫苗, 并设 30 只 21 日龄 SPF 鸡不免疫作为对照组。接种 21 d 后, 采集鸡的血清, 用 H7-Re3 株抗原检测 HI 抗体。采血后, 使用 3 株 H7 亚型 AIV PCK/LN/SD004/2019 (H7N9)、CK/LN/SD25/2019 (H7N9)、DK/FJ/SE0195/18 (H7N2) 株 (均含 10^5 LD₅₀), 每个毒株攻击免疫鸡和对照鸡各 10 只, 进行对流行株的效力评估。

3.2.6 重组禽流感 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体与攻毒保护关系研究

3.2.6.1 免疫鸡 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体与攻毒保护关系研究

21 日龄 SPF 鸡接种三价灭活疫苗, 剂量分别为 10 μ l、20 μ l、50 μ l 和 100 μ l, 各剂量接种 15 只 SPF 鸡, 对照组为 5 只不接种的 SPF 鸡。免疫 21 d 时, 测 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体。检测确定相应 HI 抗体后, 根据 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 效价, 将免疫鸡分成 $\geq 6 \log_2$ 组、5 \log_2 组、4 \log_2 组、3 \log_2 组和 $\leq 2 \log_2$ 组。将 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 效价免疫鸡分成 $\geq 6 \log_2$ 组、5 \log_2 组、4 \log_2 组、3 \log_2 组和 $\leq 2 \log_2$ 组, 与对照鸡一起鼻腔感染 H7 亚型 AIV CK/IM/SD010/2019 (H7N9) (含 100 LD₅₀)。每只鸡在攻毒后第 3 d 和第 5 d 采集喉头和泄殖腔拭子, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 培养 72 h, 测各胚 HA 效价, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA $\geq 4 \log_2$, 则病毒分离为阳性, 表明该只鸡排毒。阴性时用鸡胚盲传一代, 若仍为阴性, 则判定为该只鸡不排毒。

3.2.6.2 免疫鸭 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体与攻毒保护关系研究

21 日龄 SPF 鸭用三价灭活疫苗免疫, 剂量分别为 10 μ l、20 μ l、50 μ l 和 100 μ l, 每种剂量接种 10 只 SPF 鸭。对照组为 5 只未免疫的 SPF 鸭。免疫 21 d 时, 测 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体。检测确定相应 HI 抗体后, 根据 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 效价, 将免疫鸭分成 $\geq 1:80$ 组、1:40 组、1:20 组、1:10 组、 $< 1:10$ 组。将 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 效价免疫鸭 1:80 组、1:40 组、1:20 组、1:10 组、 $< 1:10$ 组, 与对照组一起鼻腔感染 H7 亚型 AIV DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2) (含 100 LD₅₀)。每只鸭在攻毒后第 3 d 和第 5 d 采集喉头和泄殖腔拭子, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 培养 72 h, 测各胚 HA 效价, 只要有一枚鸡胚尿囊液 HA 效价 $\geq 4 \log_2$, 则病毒分离为阳性, 表明该只鸭排毒。阴性用鸡胚盲传一代, 若还为阴性, 则表明该鸭不排毒。

3.3 结果

3.3.1 抗原病毒液制备及浓缩结果

未浓缩的 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 株抗原液的 HA 价 $\geq 8 \log_2$ 。进行 3 倍浓缩后, 其 HA 价均不低于 $9 \log_2$ (见表 3-1)。

表 3-1 制备的病毒液原液和浓缩液 HA 价

Table 3-1 HA titer of prepared virus stock and concentrate

疫苗	病毒液	原液 HA 价	浓缩 3 倍 HA 价
Re-11 株单苗	Re-11	8 log ₂ (1:256)	
Re-12 株单苗	Re-12	8 log ₂ (1:256)	
H7Re3 株单苗	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	
浓缩三价疫苗 (Re11+Re-12+H7-Re3)	Re-11	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	Re-12	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
原液三价疫苗 (Re-11+Re-12+H7-Re3)	Re-11	8 log ₂ (1:256)	
	Re-12	8 log ₂ (1:256)	
	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	
20190704	Re-11	9 log ₂ (1:512)	9 log ₂ (1:512)
	Re-12	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
20190709	Re-11	8 log ₂ (1:256)	10 log ₂ (1:1024)
	Re-12	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
20190712	Re-11	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	Re-12	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)
	H7Re3	8 log ₂ (1:256)	9 log ₂ (1:512)

3.3.2 病毒液灭活检验结果

甲醛灭活后的各组浓缩液接种鸡胚后, 36 °C 孵育 72 h, 抗原液 HA 价均为 0 log₂, 鸡胚盲传一代后, 病毒液 HA 价仍然为阴性, 表明病毒液灭活完全。

3.3.3 制备疫苗检验结果

疫苗为乳白色均匀乳剂, 油包水型, 离心后管底无水析出, 稳定性好, 无菌检查和甲醛残留量检查按《中国兽药典》附录进行, 结果显示疫苗无细菌和霉菌生长, 甲醛含量均不高于 0.05%, 符合油乳剂灭活疫苗标准, 可用于常规免疫。

3.3.4 安全性检测结果

用 2 mL 剂量免疫 21 日龄 SPF 鸡、SPF 鸭和商品鹅, 观察 14 d, 结果表明, 家禽免疫部位无炎症反应, 疫苗吸收良好, 仅有少量残留, 采食、饮水和精神状况均正常, 无不正常表现, 详见表 3-2。

表 3-2 3 种单苗、浓缩三价苗、原液三价苗以及 3 批三价疫苗安全检验结果

Table 3-2 Safety inspection results of 3 single vaccines, concentrated trivalent vaccines, stock trivalent vaccines and 3 batches of trivalent vaccines

疫苗	注射部位炎症	注射部位 疫苗吸收	采食	饮水	精神 状态	临床反应
Re-11 株单苗	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
Re-12 株单苗	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
H7Re3 株单苗	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
浓缩三价疫苗 (Re11+Re-12+H7-Re3)	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
原液三价疫苗 (Re-11+Re-12+H7-Re3)	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
20190704	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
20190709	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应
20190712	30/30 无炎症反应	30/30 吸收良好,有少量残余	30/30 正常	30/30 正常	30/30 正常	30/30 无不良反应

3.3.5 两种不同抗原含量的三价苗分别与三种单苗免疫效力比较结果

5 种疫苗分别免疫 SPF 鸡 21 d 后, 采血测抗体, 结果显示, 浓缩三价疫苗和 Re-11 株单苗免疫后 21 d H5 亚型 Re-11 株 HI 抗体平均值分别为 8.0 log₂ 和 7.8 log₂, 原液三价疫苗中 Re-11 株 HI 抗体平均值为 6.8 log₂, 对照组 HI 抗体为 0 log₂, 结果见图 3-1, 上述结果说明, 三价灭活疫苗经浓缩免疫后 H5 亚型 Re-11 株免疫效力与单价疫苗相同, 三价疫苗中其它抗原成分不会干扰 H5 亚型 AIV Re-11 株 HI 抗体的产生。

浓缩三价疫苗和 Re-12 株单苗免疫后 21 d H5 亚型 Re-12 株 HI 抗体平均值均为 8.1 log₂ 和 7.9 log₂, 原液三价疫苗中 Re-12 株 HI 抗体平均值为 6.6 log₂, 对照组 HI 抗体为 0 log₂, 结果见图 3-2。以上结果表明, 浓缩的三价灭活疫苗免疫后 H5 亚型 Re-12 株免疫效力与单价疫苗免疫效力相同, 三价疫苗中其它抗原成分不干扰 H5 亚型 AIV Re-12 株 HI 抗体的产生。

H7-Re3 株 HI 抗体在三价浓缩疫苗免疫 21 d 后平均值分别为 7.9 log₂ 和 7.7 log₂, 而原液三

价疫苗中 H7-Re3 株 HI 抗体平均值为 6.5 log₂，对照组 HI 抗体为 0 log₂，结果详见图 3-3。以上结果表明，浓缩的三价灭活疫苗免疫后 H7 亚型 H7-Re3 株免疫效力与单苗相同，三价疫苗中其它抗原成分不会干扰 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体的产生。按 1:1:1 比例制备的浓缩三价疫苗免疫抗体与相应的单价疫苗无明显差异且 H5 和 H7 抗体效价均衡，因此该比例是三价疫苗适合的抗原配比，未浓缩抗原制备的三价疫苗抗体效价偏低。

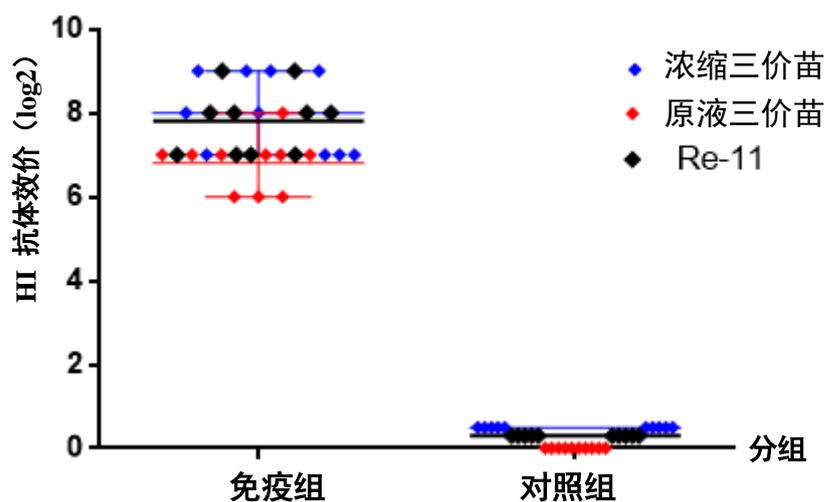


图 3-1 不同疫苗免疫后 H5 亚型 AIV Re-11 株 HI 抗体测定结果

Figure 3-1 Efficacy test H5 subtype avian influenza Re-11 strain HI antibody test results

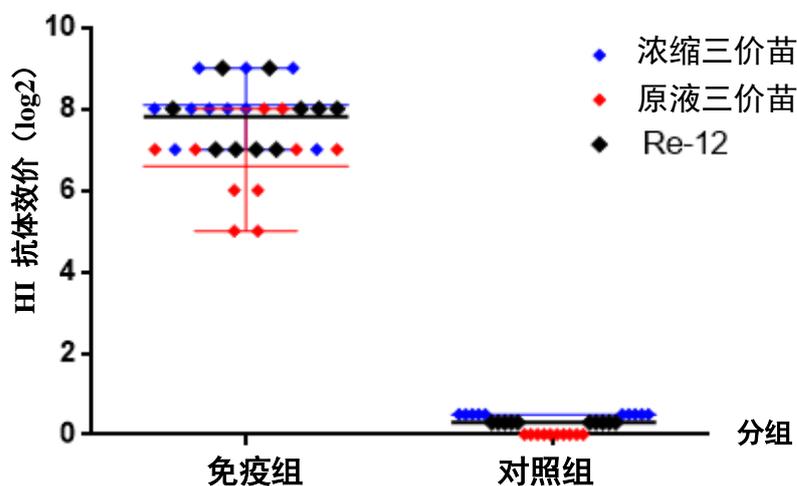


图 3-2 不同疫苗免疫后 H5 亚型 AIV Re-12 株 HI 抗体测定结果

Figure 3-2 Efficacy test H5 subtype avian influenza Re-12 strain HI antibody test results

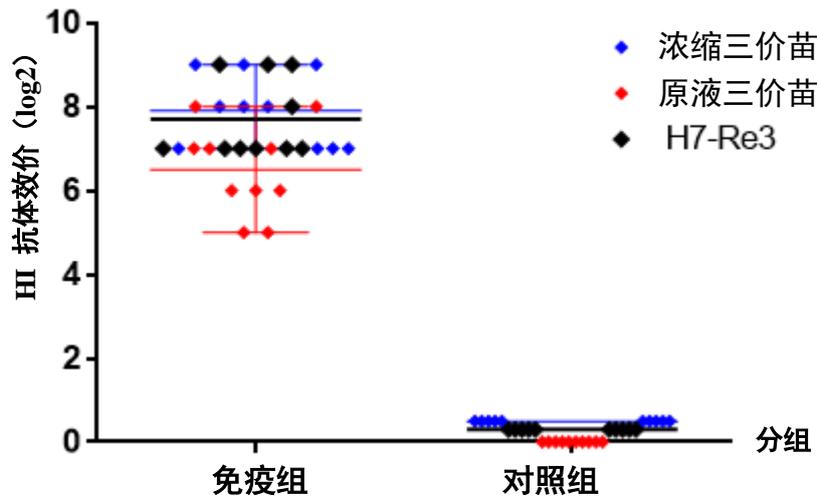


图 3-3 不同疫苗免疫后 H7 亚型 AIV HI 抗体测定结果

Figure 3-3 Efficacy test H7 subtype avian influenza HI antibody test results

3.3.6 3 批三价疫苗免疫效力试验结果

3.3.6.1 对 SPF 鸡的免疫效力试验结果

3 批三价灭活疫苗,以 0.3 mL/只剂量免疫 21 日龄 SPF 鸡,21 d 后检测针对 Re-11 株、Re-12 和 H7-Re3 株抗原的 HI 抗体,HI 抗体效价平均值为 7.7 log₂~8.1 log₂ 之间,对照组抗体为 0 log₂,因此该 3 批疫苗具有良好的免疫反应,结果如图 3-4。将 3 批疫苗免疫 SPF 鸡 21 d 后分别用 Re-11 株、Re-12 株、H7 亚型效检毒株攻毒,免疫鸡均健活,病毒分离阳性数为 0;对照组全部发病、死亡,且病毒分离阳性率为 100%,详见表 3-3。

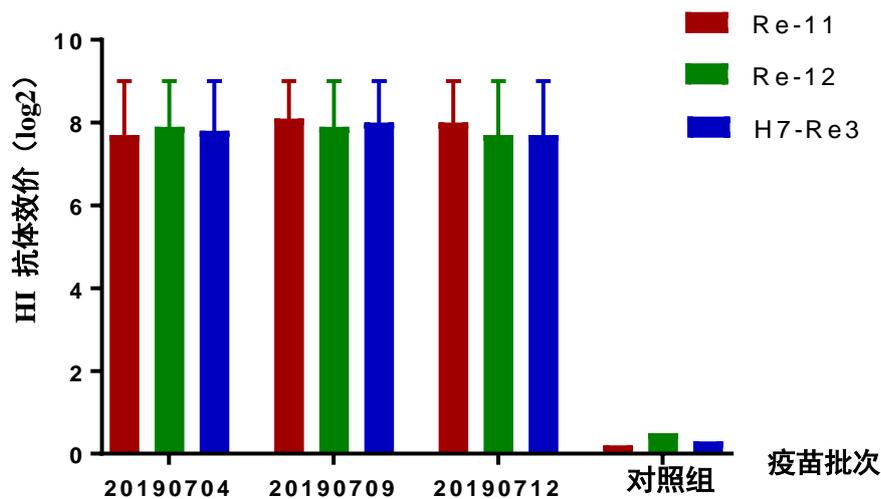


图 3-4 三价疫苗免疫鸡针对 AIV H5 亚型 Re-11、Re-12 及 H7 亚型 H7 Re-3 株 HI 抗体测定结果

Figure 3-4 Trivalent vaccine against H5 Re-11, Re-12, H7 Re-3 strain HI antibody test results

表 3-3 3 批三价疫苗免疫鸡对 AIV H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株以及 H7 亚型 H7-Re3 株效力检验用毒株的

攻毒结果

Table 3-3 Challenge results of three batches of trivalent vaccine immunized chickens against H5 subtype Re-11 strain, Re-12 strain and H7 subtype H7-Re3 strain

效检 毒株	疫苗批次 (接种途径)	攻毒后 3 d 和 5 d 排毒阳性率				保护数/存活数 /总数
		一代/盲传/总数*				
		3 d 喉头	3 d 泄殖腔	5 d 喉头	5 d 泄殖腔	
DK/GZ	20190704(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/S4184	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2017	20190712(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H5N6)	对照组	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10
CK/LN	20190704(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/SD007	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2017	20190712(皮下)	0/0/10	0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H5N1)	对照组	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10
CK/IM	20190704(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/SD010	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2019	20190712(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H7N9)	对照组	10/10	10/10	1/1	1/1	0/0/10

注：*一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。**表示所有鸡在攻击后 4 d 内死亡。

3.3.6.2 对 SPF 鸭的免疫效力试验结果

接种 21 d 后, SPF 鸭采血测抗体。数据表明, 三价疫苗免疫后 21 d H5 亚型 Re-11 株 HI 平均抗体分别为 1:136、1:124 和 1:144; Re-12 株 HI 平均抗体分别为 1: 140、1: 128 和 1: 124; H7-Re3 株 HI 平均抗体分别为 1: 132、1: 136 和 1: 148, 对照组抗体均<1:10, 结果见图 3-5。SPF 鸭于免疫后 21 d 分别用 Re-11 株、Re-12 株、H7 亚型效力检验毒株攻击, 结果为免疫鸭均健活, 病毒分离阳性数为 0; 对照组均发病、死亡, 且病毒分离阳性率 100%, 结果详见表 3-4。

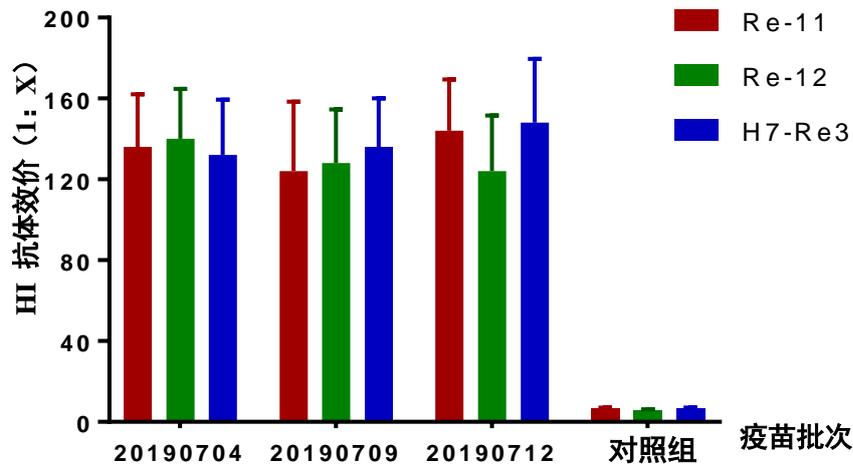


图 3-5 三价疫苗免疫鸭针对 AIV H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株及 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体

Figure 3-5 Efficacy test of HI antibody test of H5 subtype avian influenza Re-11 strain, Re-12 strain, H7 subtype H7-Re3 strain

表 3-4 三价疫苗免疫鸭对 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株及 H7 亚型疫苗株效检毒株攻毒结果

Table 3-4 The results of the trivalent vaccine immunized ducks against the H5 subtype Re-11 strain, Re-12 strain, and H7 subtype vaccine strain.

效检 毒株	疫苗批次 (接种途径)	攻毒后 3 d 和 5 d 排毒阳性率				保护数/存活 数/总数
		一代/盲传/总数*				
		3 d 喉头	3 d 泄殖腔	5 d 喉头	5 d 泄殖腔	
DK/GZ	20190704(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/S4184	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2017	20190712(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H5N6)	对照组	10/10	10/10	1/1	1/1	0/0/10
CK/LN	20190704(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/SD007	20190709(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2017	20190712(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H5N1)	对照组	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10
DK/FJ	20190704(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/SE0195	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
/2018	20190712(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
(H7N2)	对照组	10/10**	10/10**	3/3**	3/3**	0/0/10

注：*：一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数；**：对照鸭在攻毒后 3 d 全部死亡，表示第一代病毒分离阳性，无需盲传。

3.3.6.3 对鹅的免疫效力试验结果

商品鹅于接种 21 d 后采血检测抗体。结果显示, H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 HI 抗体平均值在 1:32~1:44 之间, 对照组 HI 抗体效价均 <1:10, 结果见图 3-6。用 3 株效力检验毒株攻毒, 结果显示, 免疫鹅均健活, 病毒分离阳性数为 0; 对照组全部发病、死亡, 且全部排毒, 详见表 3-5。

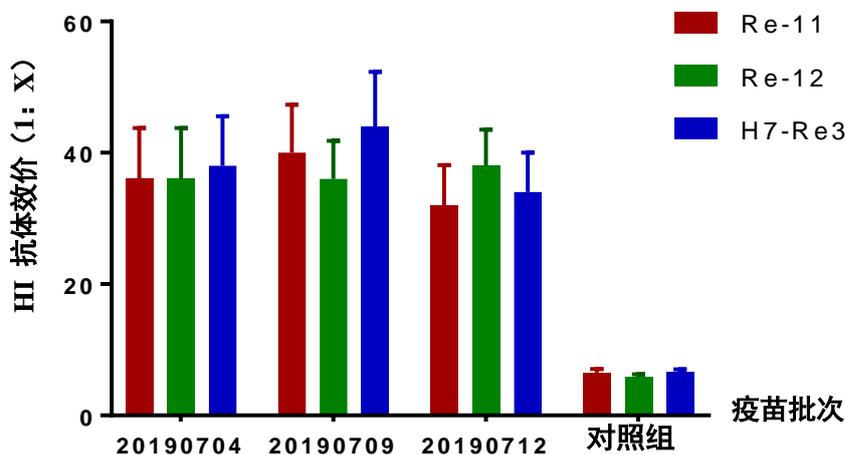


图 3-6 三价疫苗免疫鹅针对 AIV H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株及 H7 亚型 H7-Re3 株 HI 抗体

Figure 3-6 Efficacy test results of H5 and H7 subtypes of avian influenza HI antibodies

表 3-5 三价疫苗免疫鹅对 H5 亚型和 H7 亚型效检毒株攻毒结果

Table 3-5 The results of the trivalent vaccine immunized goose against the H5 subtype and H7 subtype efficacy test strains

攻毒毒株	疫苗批次 (接种途径)	攻毒后 3 d 和 5 d 排毒阳性率				保护数/存 活数/总数
		一代/盲传/总数*				
		3 d 喉头	3 d 泄殖腔	5 d 喉头	5 d 泄殖腔	
DK/GZ/S4184/2017 (H5N6)	20190704(皮下)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照	10/10**	10/10**	3/3**	2/3/3	0/0/10
CK/LN/SD007/2017 (H5N1)	20190709(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照	10/10	10/10	3/3	3/3	0/0/10
DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2)	20190712(肌肉)	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照	10/10	10/10	10/10	6/7/10	10/10/10

注: *一代是指第一代样品病毒检测阳性数, 盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。**表示第一代病毒分离阳性, 无需盲传。

3.3.7 对流行毒株的免疫效力试验结果

3.3.7.1 三价疫苗对 H5 亚型 AIV 2.3.4.4d 分支流行株的免疫效力试验结果

对 SPF 鸡接种 20190704 批次三价疫苗 21 d 时, H5 亚型 AIV Re-11 株抗原检测 HI 抗体效价平均值分别为 8.0 log₂、7.8 log₂ 和 8.2 log₂, 对照组抗体均为 0 log₂ (如图 3-7)。攻击 H5N6 亚

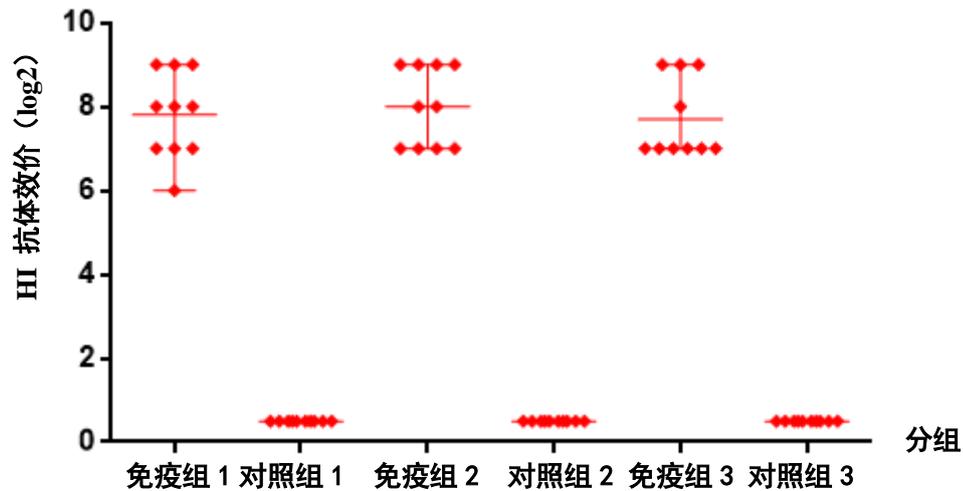


图 3-9 三价疫苗免疫鸡后用 H7 亚型 AIV H7-Re3 株抗原检测的 HI 抗体效价

Figure 3-9 Immune efficacy results of trivalent vaccine against H7 subtype epidemic strains

表 3-8 三价疫苗免疫鸡对 H7 亚型 AIV 流行株攻毒结果

Table 3-8 The results of the trivalent vaccine immunized chickens against the H7 subtype virus epidemic strain

攻毒毒株	组别	攻毒后 3 d 和 5 d 排毒率		一代/盲传/总数*		保护数 / 存活数 / 总数
		3 d 喉头	3 d 泄殖腔	5 d 喉头	5 d 泄殖腔	
PCK/LN/SD004/2019 (H7N9)	免疫组 1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照组 1	10/10	10/10	2/2	2/	0/0/10
CK/LN/SD25/2019 (H7N9)	免疫组 2	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照组 2	10/10	10/10	1/1	1/1	0/0/10
DK/FJ/SE0195/18 (H7N2)	免疫组 3	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	10/10/10
	对照组 3	10/10	10/10	/**	/**	0/0/10

注：*一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。**表示对照鸡攻毒后 5 d 内，全部发病死亡。

3.3.8 抗体与攻毒保护关系研究结果

3.3.8.1 鸡 H7 亚型 AIV HI 抗体与攻毒保护关系研究结果

攻击 H7 亚型 AIV H7-Re3 株疫苗株效力检验用毒株 CK/IM/SD010/2019 (H7N9) 后，对照组 SPF 鸡在 5 d 内全部发病、死亡，而且 100% 排毒。免疫鸡 HI 抗体 $\leq 2 \log_2$ 时，攻毒后出现发病死亡，死亡率为 4/8，排毒率为 7/8；HI 抗体在 $3 \log_2$ 时，攻毒后，免疫鸡排毒率为 2/11，未出现发病死亡；免疫鸡 HI 抗体在 $4 \log_2$ 、 $5 \log_2$ 和 $\geq 6 \log_2$ 时攻毒后不发病、不死亡、不排毒，受到完全保护，见表 3-9。

表 3-9 H7 亚型 AIV H7-Re3 株疫苗免疫鸡 HI 抗体效价与攻毒保护率之间的关系

Table 3-9 The relationship between HI antibody titer and challenge protection rate of chickens immunized with H7

组别	subtype H7-Re3 strain vaccine				排毒数/ 存活数/ 总数
	攻毒后的病毒分离：一代/盲传/总数*				
	攻毒后 3 d		攻毒后 5 d		
	喉头	泄殖腔	喉头	泄殖腔	
$\leq 2 \log_2$	7/7/8	5/6/8	6/6/7	4/4/7	7/4/8
3 \log_2	1/2/11	0/1/11	1/1/11	0/0/11	2/11/11
4 \log_2	0/0/8	0/0/8	0/0/8	0/0/8	0/8/8
5 \log_2	0/0/12	0/0/12	0/0/12	0/0/12	0/12/12
$\geq 6 \log_2$	0/0/21	0/0/21	0/0/21	0/0/21	0/21/21
对照	5/5	5/5	/**	/**	5/0/5

注：*：一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。**为鸡死亡。

3.3.8.2 鸭 H7 亚型 AIV HI 抗体与攻毒保护关系研究结果

攻击 H7 亚型 AIV H7-Re3 株鸭用效检毒株 DK/FJ/SE0195/2018 (H7N2) 后，对照组 SPF 鸭在 7 d 内全部发病、死亡，而且 100% 排毒。免疫鸭 HI 抗体 $< 1:10$ 组时，攻毒后发病死亡率为 1/9，排毒率为 3/9；HI 抗体 $\geq 1:10$ 的免疫鸭攻毒后不发病、不死亡、不排毒，获得完全保护，见表 3-10。

表 3-10 H7 亚型 AIV H7-Re3 株疫苗免疫鸭 HI 抗体效价与攻毒保护率之间的关系

Table 3-10 Relationship between HI antibody titer and challenge protection rate of ducks immunized with H7

组别	subtype H7-Re3 strain vaccine				排毒数/存活 数/总数
	攻毒后的病毒分离：一代/盲传/总数*				
	攻毒后 3 d		攻毒后 5 d		
	喉头	泄殖腔	喉头	泄殖腔	
$< 1:10$	3/3/9	1/2/9	1/1/9	0/0/9	3/8/9
1:10	0/0/7	0/0/7	0/0/7	0/0/7	0/7/7
1:20	0/0/19	0/0/19	0/19	0/0/19	0/19/19
1:40	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/3/3
1:80	0/0/2	0/0/2	0/0/2	0/0/2	0/2/2
对照	5/5	5/5	1/1	1/1	5/0/5

注：*：一代是指第一代样品病毒检测阳性数，盲传是指一代病毒阳性加上盲传后一共的病毒检测阳性数。

3.4 讨论

疫苗的全面免疫是当前防控 AI 的主要措施和关键环节(陈裕华等, 2018)。为了进一步做好 HPAI 防治工作, 确保养殖业的稳定发展和人类生命健康, 加强对疫苗免疫效果评估并选择合理的疫苗尤为重要。按时进行 AI 的流行病学监测工作、定期对疫苗进行评估, 必要时进行疫苗种毒更新, 具有重要的临床指导意义(丁爱君等, 2019), AI 疫苗作为新疫苗被批准使用, 需要测定抗体效价或攻毒来进行疫苗免疫效果评估。

为研究重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗中 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株抗原比例及相容性, 分别制成 Re-11 株单苗、Re-12 株单苗、H7-Re3 株单苗、浓缩三价疫苗、原液三价疫苗, 进行对比试验。结果表明, 将三价灭活疫苗活性成分 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株的浓缩抗原以 1:1:1 的比例混合, 免疫效力均不低于相应单苗, 对动物免疫后不会产生相互干扰, 产生抗 H5 和 H7 亚型 AIV HI 抗体效价均在 $7.7 \log_2$ 以上, 不低于相应的单价疫苗 HI 抗体效价。当 HA 效价不低于 $9 \log_2$ 时, Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株抗原可用于制备或生产三价疫苗。Re-11、Re-12 和 H7-Re3 抗原浓缩后的 HA 价均达到 $9 \log_2$, 按 1:1:1 比例制备的三价疫苗(Re-11+Re-12+H7-Re3)免疫 SPF 鸡后 HI 抗体效价均与相应的单价苗无明显差异, 且抗体均衡, 表明三价苗中 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株 3 种抗原成分相容, 未产生相互干扰; 浓缩的 Re-11、Re-12 和 H7-Re3 抗原以 1:1:1 的比例是三价疫苗适合的抗原配比。

本研究根据抗原配比及相容性试验结果, 以 Re-11 株、Re-12 株和 H7-Re3 株的浓缩抗原液为原料, 按 1:1:1 的比例制备 3 批三价 AI 灭活疫苗, 并从安全性、免疫效力和对流行株的保护效果三方面对其进行评估。结果表明, 将 3 批疫苗以 2 mL/只的剂量接种鸡后, 鸡表现正常, 无不良反应; 0.3 mL 接种 21 日龄 SPF 鸡 21 d 后, H5 和 H7 亚型 HI 平均抗体为 $7.7 \log_2 \sim 8.1 \log_2$, 免疫效果良好, 三价苗对 H5 亚型 AIV 2.3.4.4d 分支、2.3.2.1d 分支和 H7N9 亚型 AIV 效检毒株及流行株均能提供充分保护。颈部皮下和肌肉注射方式接种途径对三价疫苗的免疫效力无影响。

有研究表明, 在免疫禽类抗感染免疫中 AI 抗体发挥着重要作用, 抗体水平与保护效果之间有一定的关系(张评沅等, 2006)。因此, 抗体效价可用作评价家禽总免疫水平的指标。在生产实践中, 通过监测家禽抗体水平, 建立合理的免疫程序, 有效控制 AI 的发生。根据 HI 抗体效价, 参考之前研究结果, 抗体与家禽免疫保护关系为: 免疫鸡 HI 抗体效价 $\geq 4 \log_2$ 时, 针对 H5 和 H7 亚型效检毒株可提供全面保护; 免疫鸭 H5 和 H7 亚型 HI 抗体效价 $\geq 1:10$ 时可对 H5 亚型和异源 H7N2 亚型 AIV 效检毒株提供全面保护。

本研究表明, 重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗(H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株)能够刺激机体产生良好的免疫反应, 对当前 H5 和 H7 亚型 AIV 流行毒株有较好的免疫保护效果, 能抵御病毒攻击; 同时家禽未出现不良反应, 疫苗安全有效, 适合用于 H5 和 H7 亚型 HPAI 的防控。

第四章 重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗的临床应用评估

疫苗接种是一种有效的防控策略，可有效的控制 AI 疫情的爆发（ZENG et al, 2016; LI et al, 2021）。目前 H5 亚型 AIV Re11、Re12 株疫苗被用来防控 H5 亚型 AI（臧金凯 等，2018；陈晓涵 等，2020），能够有效的防御目前 H5 亚型分离株病毒。2017 年初，H7N9 亚型 AIV 突变为 HPAIV，并导致我国多个省份家禽出现 HPAI 疫情（SHI et al, 2017）。应用 H7 亚型 AIV 的防疫疫苗后，家禽和人疫情均得到了有效控制。由于病毒发生突变，H7-Re1 疫苗株于 2018 年 12 月更新为 H7-Re2 株疫苗株，目前 H7N9 亚型 AIV 又有新的突变株，疫苗种毒需再次更新。此前，我们已在实验室中对重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株+Re-12 株，H7N9 H7-Re3 株）进行了评估，结果表明在实验室条件下该三价疫苗安全有效，对流行毒株能够提供完全保护。为了解该疫苗的临床应用效果，我们在现地养殖场进行了疫苗的安全性和免疫效果评估，以期为防控 AI 提供更可靠的临床数据。

4.1 材料

4.1.1 抗原及标准阳性血清

H5 亚型 AIV Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 AIV H7-Re3 株 HI 试验抗原及标准阳性血清，由国家禽流感参考实验室制备。

4.1.2 疫苗

重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株+Re-12 株，H7N9 H7-Re3 株）由国家禽流感参考实验室研发，高致病性禽流感疫苗定点生产企业生产。

4.1.3 试验动物及场地

山东某养殖场白羽肉种鸡、肇东某养殖场商品蛋鸡、宁夏某养殖场蛋种鸡和山东某养殖场种鸭。

4.1.4 试剂和仪器

1%红细胞悬液，v 型反应板，0.1 mL 可调节移液枪，8 排和 12 排移液枪，枪头，磷酸盐缓冲液（PBS）。

4.2 方法

4.2.1 三价疫苗对山东某场白羽肉种鸡的安全性和免疫效果研究

山东某场白羽肉种鸡 21 日龄时，以 0.3 mL/只的剂量接种，在 63 日龄时以 0.5 mL/只的剂量

加强免疫，接种后记录鸡群的饮食、饮水和精神状况等方面的信息。接种后，在鸡群 56 日龄时随机抽取 35 只鸡、91 日龄时随机抽取 32 只鸡采血，检测血清中 H5 亚型 Re-11 株、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 株的 HI 抗体。

4.2.2 三价疫苗对肇东某场商品蛋鸡的安全性和免疫效果研究

肇东某场商品蛋鸡于 21 日龄，以胸部肌肉注射途径免疫三价苗，剂量为 0.4 mL/只，免疫后观察每只接种鸡的采食、饮水和精神状态等方面是否有异常现象。免疫 21 d 后，随机抽取 23 只鸡采集血样，用 HI 试验测血清中 H5 和 H7 亚型抗体效价。

4.2.3 三价疫苗对宁夏某场蛋种鸡的安全性和免疫效果研究

宁夏某场蛋种鸡，以 0.5 mL/只的剂量颈部皮下途径注射，于 40 日龄和 105 日龄各免疫一次三价灭活疫苗，每次免疫后观察记录鸡群的饮水、饮食和精神状况等是否有异常表现。免疫后分别在 63 日龄、91 日龄、133 日龄、140 日龄、168 日龄、210 日龄和 252 日龄随机抽取 30 只鸡采血分血清，检测血清中 H5 和 H7 亚型抗体效价。

4.2.4 三价疫苗对山东某场种鸭的安全性和免疫效果研究

山东某场种鸭分别于 14 日龄，以 0.5 mL/只免疫一次；42 日龄，以相同剂量免疫一次；84 日龄，以 0.8 mL/只的剂量免疫一次，免疫后观察并记录种鸭群的饮水、饮食和精神状况等是否有异常表现。然后分别在 112 日龄和 140 日龄随机选取 40 只和 48 只种鸭，采集血样并分离血清，用 3 种抗原进行 HI 试验，检测血清中 H5 和 H7 亚型抗体效价。

4.3 结果

4.3.1 安全性评估结果

山东某场的白羽肉种鸡、肇东某场的商品蛋鸡、宁夏某场的蛋种鸡和山东某场的种鸭接种三价灭活疫苗后，饮食、饮水、精神状态均表现正常，接种部位均未有炎症反应，免疫鸡群和鸭群没有出现不良症状。

4.3.2 三价疫苗对山东某场白羽肉种鸡的免疫效果研究结果

山东某场白羽肉种鸡于 21 日龄和 63 日龄，胸部肌肉注射途径分别以 0.3 mL/只和 0.5 mL/只的剂量免疫三价苗后，H5 亚型 Re-11、Re-12 株和 H7 亚型 H7-Re3 的 HI 抗体效价分别在 56 日龄和 91 日龄测定。56 日龄时 Re-11、Re-12、H7-Re3 抗体效价平均值分别为 $8.9\log_2$ 、 $7.9\log_2$ 、 $7.2\log_2$ ；在 63 日龄时以 0.5 mL/只的剂量加强免疫，91 日龄时测定的 3 种抗体效价的平均值分别为 $10.7\log_2$ 、 $8.6\log_2$ 、 $9\log_2$ ，如图 4-1，抗体效价明显上升，表明加强免疫后鸡群抗体水平明显上升，三价灭活疫苗具有良好的免疫效果。

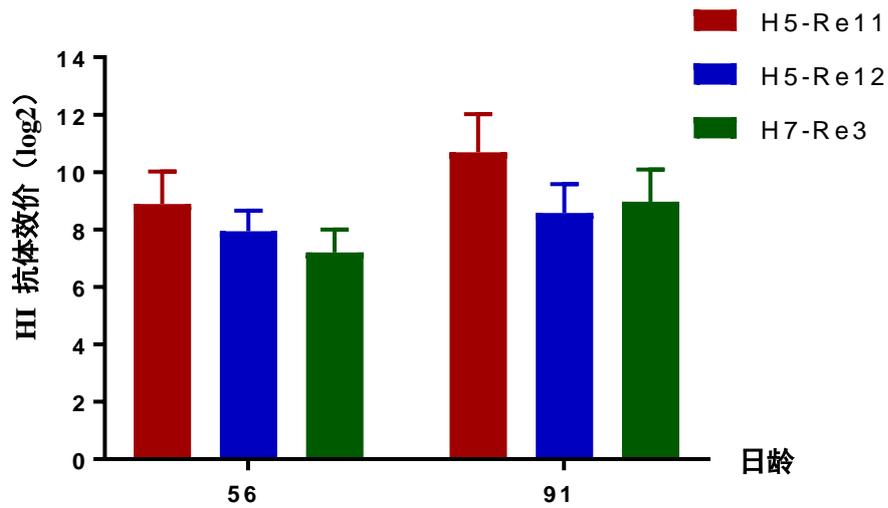


图 4-1 白羽肉种鸡免疫后 HI 抗体效价

Figure 4-1 HI antibody titers after immunization in White Feather Broiler Breeder

4.3.3 三价疫苗对肇东某场商品蛋鸡的免疫效果研究结果

肇东某场商品蛋鸡在 21 日龄时，以 0.4 mL/只的剂量胸部肌肉注射途径接种，免疫 21 d 后随机抽取 23 只鸡采血测 3 种抗原的 HI 抗体效价。H5 亚型 Re-11 HI 抗体效价最低为 5 log₂，最高为 8 log₂，平均为 7.04 log₂；H5 亚型 Re-12 HI 抗体效价最低为 6 log₂，最高为 10 log₂，平均效价是 8 log₂；H7 亚型 H7-Re3 株的 HI 抗体效价最低为 6 log₂，最高为 8 log₂，平均值是 7.4 log₂，如图 4-2，以上结果说明三价疫苗免疫后鸡群能产生较高的抗体，该疫苗具有良好的免疫效果。

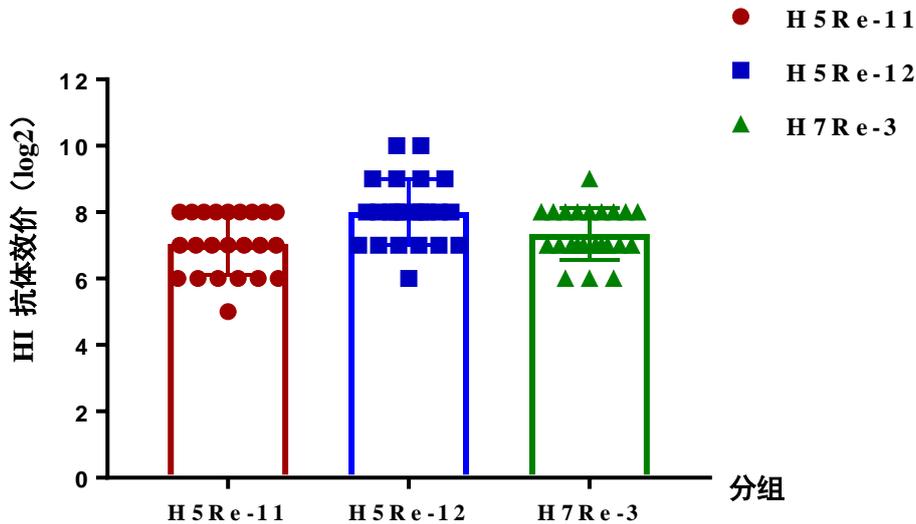


图 4-2 商品蛋鸡免疫后 HI 抗体效价

Figure 4-2 HI antibody titers after immunization of chickens

4.3.4 三价疫苗对宁夏某场蛋种鸡的免疫效果研究结果

宁夏某场蛋种鸡在 40 日龄进行初次免疫, 在 105 日龄进行加免, 分别在不同时间随机选取 30 只鸡采血分离血清, 进行 HI 试验, 测定 H5 和 H7 亚型抗体效价。结果表明, 鸡群在 40 日龄第一次免疫后, 于 63 日龄采血测定的 Re-11、Re-12、H7-Re3 3 种抗原的平均 HI 效价分别为 8.6 \log_2 、8.8 \log_2 和 8.4 \log_2 , 抗体水平较高, 在 91 日龄时测定的 3 种抗体平均效价下降至 6.7 \log_2 、6.3 \log_2 和 7.1 \log_2 。在 105 日龄时进行加强免疫后, 于 112 和 140 日龄测定的 Re-11、Re-12、H7-Re3 的平均 HI 抗体效价逐渐上升, 其中 140 日龄的 3 种 HI 抗体平均值达 9.6 \log_2 、9.3 \log_2 和 9.1 \log_2 。在 168 日龄、210 日龄和 252 日龄时, HI 抗体逐渐下降, 但仍在较高水平, 252 日龄的 Re-11、Re-12、H7-Re3 的平均 HI 抗体分别为 7.9 \log_2 、7.1 \log_2 和 7.4 \log_2 , 均在 7 \log_2 以上, 如图 4-3。以上数据表明, 该场蛋种鸡开产前 2 次免疫即可达到较高的抗体水平, 至二免后 147 d, 3 种抗原检测的 HI 抗体均在 7 \log_2 以上, 仍居于高位。

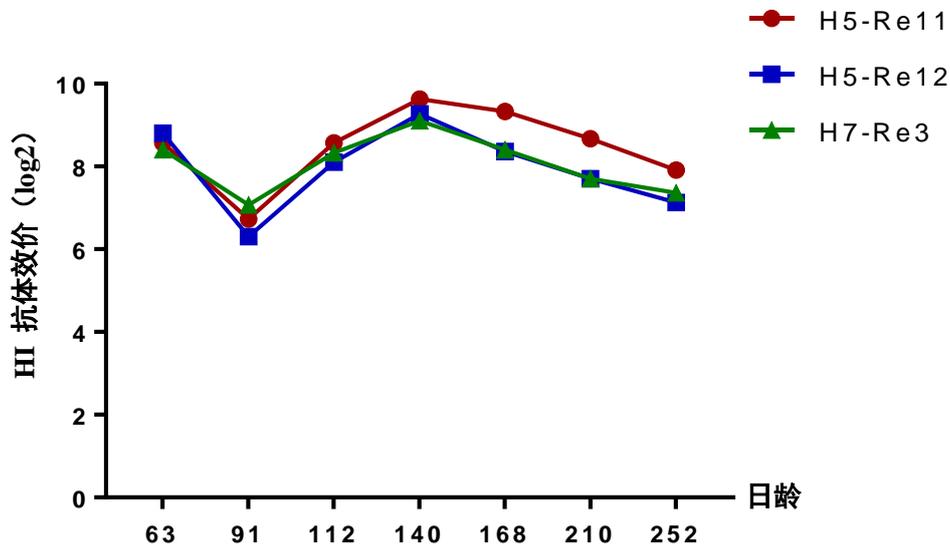


图 4-3 蛋种鸡免疫后 HI 抗体效价

Figure 4-3 HI antibody titers after immunization in layer breeder

4.3.5 三价疫苗对山东某场种鸭的免疫效果研究结果

14 日龄、42 日龄和 84 日龄山东某场种鸭接种重组 AI 三价灭活苗后, 在 112 日龄和 140 日龄分别随机选取 40 只和 48 只种鸭检测 Re-11 株、Re-12 株、H7-Re3 株的 HI 抗体效价。结果表明, 种鸭在 112 日龄时 3 种抗原的 HI 抗体效价平均值分别为: 10.83 \log_2 、10.8 \log_2 和 10.68 \log_2 , 140 日龄时, 抗体效价有所下降但也均保持在较高水平, 测定的 Re-11 株、Re-12 株、H7-Re3 株的 HI 抗体效价平均值分别为 9.10 \log_2 、8.33 \log_2 、8.96 \log_2 , 如图 4-4。以上结果表明, 种鸭接种三价灭活疫苗后, 能产生高水平抗体, 之后虽有下降但抗体水平仍较高且维持时间较长。

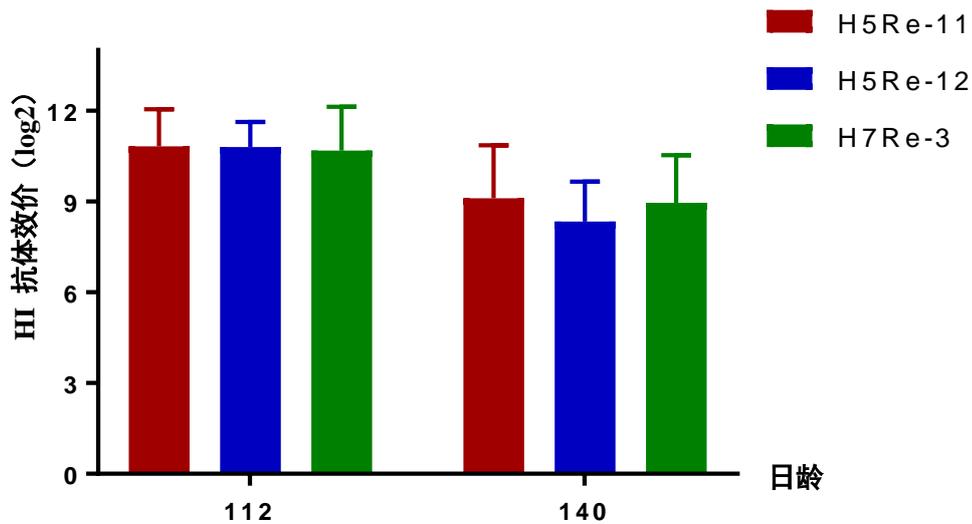


图 4-4 种鸭免疫后 HI 抗体效价

Figure 4-4 HI antibody titers after immunization of breeding ducks

4.4 讨论

AIV 具有高度变异的特性, 使 AI 防控不断面临新的挑战和问题。2013 年以前, 中国主要流行的 HPAIV 主要是 H5N1 亚型, 之后逐渐以 H5N6 亚型为主, 目前 H5N8 亚型 AIV 有进一步流行的趋势 (WU et al, 2014; GU et al, 2012; BI et al, 2020)。H7N9 亚型 AIV 于 2013 年在我国出现, 2017 年突变为对家禽能 100% 致死的 HPAV。2004 年中国开始对家禽实行 H5 亚型 AI 强制免疫, 为有效防治家禽 H7N9 疫情, 我国从 2017 年秋季开始, 在家禽免疫 H5 亚型的基础上, 启动了 H7N9 免疫接种。随着 AIV 抗原不断发生变异, 疫苗保护效果逐年下降, 因此, 疫苗种毒需要不断更新 (CARRAT et al, 2007; JIANG et al, 2010; LI et al, 2014; 董宏伟 et al, 2014)。

2013 年中国发生人 H7N9 流感, 之后此类事件频繁发生。2017 年秋季我国开始用重组禽流感病毒 (H5+H7) 二价灭活疫苗 ((H5N1 Re-8 株+H7N9 H7-Re1 株) 免疫家禽, 免疫后 H7N9 分离率显著下降, AIV 从家禽到人的传播也被阻断。2018 年 12 月重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re2 株) 在全国应用, 对防控 AI 起到十分重要的作用 (柴茂 等, 2019)。目前, 我国仍能分离到对家禽呈高致病性的 H7N9 和 H7N2 亚型 AIV, 此时, 该疫苗保护率降低, 因此国家禽流感参考实验室构建了针对流行株的 H7-Re3 疫苗。

本研究对重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗 (H5N1 Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株) 临床安全性和免疫效果进行了评价。结果, 各养殖场的家禽免疫疫苗后均无明显的不良反应, 表明该疫苗安全。山东某场白羽肉种鸡, 以 0.3 mL/只剂量于 21 日龄免疫后, 在 56 日龄检测抗体, H5 亚型 AIV Re-11、Re-12 株及 H7 亚型 H7-Re3 株抗体效价平均值在 7.2 log₂ 以上, 表明一次免疫可使鸡群产生良好抗体; 在 63 日龄时以 0.5 mL/只的剂量加强免疫, 91 日龄时测定的 3 种抗体效价的平均值在 8.57 log₂ 以上, 表明加强免疫后抗体显著提高。肇东某场商品蛋鸡以 0.4 mL/只的剂量肌肉注射途径接种疫苗后 21 d 测定的 Re-11、Re-12、H7-Re3 HI 抗体效价均能达到 7.35 log₂ 以上。宁夏某场蛋种鸡以颈部皮下途径第一次免疫三价灭活苗后 3 种抗体水平能达到 8.4 log₂

以上，加免后，抗体水平仍较高。山东某场种鸭经过三次免疫后，3种抗体水平能达到 $10 \log_2$ 以上，之后检测虽有所下降但也均保持在 $8.33 \log_2$ 以上。以上结果表明，该疫苗免疫鸡和鸭均能产生良好的免疫反应，而且颈部皮下或肌肉注射均可。

疫苗在临床应用过程中，影响抗体产生滴度以及持续时间的因素有很多。本研究中，宁夏某场蛋种鸡开产前仅进行了两次免疫就能产生较高的抗体并且持续时间较长，分析原因与鸡群的健康状态较好有关。如果鸡群有细菌性疾病、病毒性疾病，特别是免疫抑制性感染，会造成疫苗的免疫抗体低、离散度大以及抗体持续期短等诸多影响。在实验室研究中，疫苗的免疫抗体达到 $4 \log_2$ 时，免疫鸡能获得完全保护。所以在疫苗应用过程中，有条件的可以跟踪检测抗体的产生和持续情况适时补免，也可以根据本地受疫病的威胁程度、养殖场的生物安全条件以及以往或他人对禽免疫抗体结果或经验制定一个相对稳定的免疫程序。

重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株+Re-12 株，H7N9 H7-Re3 株）的临床应用评估结果表明，该三价疫苗接种家禽后，具有良好的安全性，产生的抗体水平较高，具有良好的免疫效果，可以起到保护家禽的作用。

第五章 结论

1. 重组 AIV H7 亚型 H7-Re3 株能在鸡胚上稳定传代，滴度高，对鸡胚、鸡无致病性，将其制成疫苗免疫鸡后，用 H7N9 亚型 AIV 抗原变异株和 H7N2 亚型 AIV 攻击均能够产生良好的免疫保护效果，表明该毒株可以作为针对我国当前 H7 亚型 AI 防控的疫苗种毒株。
2. 实验室研究和临床应用数据表明，重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（H5N1 Re-11 株 +Re-12 株，H7N9 H7-Re3 株）对鸡、鸭和鹅安全性高，免疫效果好，免疫禽能抵御当前流行的 H5 和 H7 亚型 AIV 的攻击，是我国当前防控 HPAI 的理想疫苗；且颈部皮下和胸部肌肉注射途径不影响免疫效果。
3. 免疫鸡的抗 H5 和 H7 亚型 AIV HI 抗体效价 $\geq 4\log_2$ 时，能够完全抵御 H5 和 H7 亚型相应效检毒株的攻击；免疫鸭的抗 H5 和 H7 亚型 AIV HI 抗体效价 $\geq 1:10$ 时，能够完全抵御同源 H5 亚型和异源 H7 亚型效检毒株的攻击。

参考文献

- 柴茂, 苑述友, 刘礼杰, 李蛟, 冉晓龙, 崔沛, 2019. 浅述高致病性禽流感国家强免疫苗的更替 今日畜牧兽医, 35(09): 38.
- 陈晓涵, 2020. 重组禽流感病毒 (H5+H7) 三价灭活疫苗研究及应用. 中国农业科学院.
- 陈晓涵, 吴姣姣, 潘舒心, 刘艳晶, 施建忠, 邓国华, 包红梅, 陈化兰, 曾显营, 田国彬, 2020. 2 株 H7N9 亚型重组禽流感病毒的生物学特性和免疫原性研究. 中国预防兽医学报, 42(09): 924-930.
- 陈裕华, 朱建翠, 沈丹, 杨建宇, 于飞, 何日文, 2018. 重组禽流感病毒 (H5+H7) 二价灭活疫苗免疫效果评估. 中国动物检疫, 35(08): 81-84.
- 丁爱君, 来庆梅, 王红岩, 郭龙宗, 李玉燕, 2019. 重组禽流感病毒 (H5+H7) 二价灭活疫苗免疫效果评估. 家禽科学, (01): 47-49.
- 董宏伟, 王彦华, 薛双, 2019. 家禽 H7N9 流感免疫效果监测与分析. 现代牧业, 3(03): 11-13.
- 苟晓琴, 黄俊琼, 2018. H7N9 禽流感病毒及其高致病性的研究进展, 海南医学, 29(23): 3372-3375.
- 蒋文明, 侯广宇, 李金平, 程善菊, 王素春, 彭程, 陈继明, 2018. 利用一种流感病毒载体同时表达 H5 和 H7N9 亚型禽流感病毒 HA 蛋白双价疫苗的构建与免疫效力试验. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会 2018 年学术年会禽病学分会第十九次学术研讨会论文集: 1.
- 梁真洁, 潘俊慧, 于晓菲, 陈普成, 曾显营, 柳金雄, 施建忠, 邓国华, 姜永萍, 陈化兰, 2019. H7N9 禽流感 DNA 疫苗的免疫保护效力研究. 中国预防兽医学报, 41(09): 935-939.
- 谭伟, 徐倩, 谢芝勋, 2019. 禽流感病毒研究概述. 基因组学与应用生物学, 33(1): 194-199.
- 田国彬, 李呈军, 李雁冰, 施建忠, 冯菊艳, 于康震, 陈化兰, 2004. 高效安全禽流感 H5N1 亚型灭活疫苗种毒株 Re1 的构建及其生物学特性和免疫原性研究. 中国畜牧兽医学会 2004 学术年会暨第五届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会论文集 (下册): 88-92.
- 田国斌, 于康震, 唐秀英, 冯菊艳, 2002. 禽流感灭活疫苗的标准化研究. 中国兽药杂志, (04): 41-44.
- 王娟, 2011. 动物疫苗免疫效果不佳的原因及对策. 中国兽医杂志, 47(08): 89-90.
- 于康震, 陈化兰, 2015. 禽流感. 北京: 中国农业出版社: 399.
- 臧金凯, 吴姣姣, 曾显营, 石文军, 刘丽玲, 包红梅, 陈晓涵, 陈化兰, 田国彬, 2018. Re-8 株 H5 亚型禽流感灭活疫苗对野鸟源 H5N8 流感病毒的免疫保护性研究. 中国预防兽医学报, 40(07): 616-620.
- 张评浒, 唐应华, 薛峰, 曹永忠, 仇旭升, 孙学辉, 刘小文, 高崧, 刘秀梵, 2006. H5N2 与 H5N1 禽流感油乳灭活疫苗免疫鹅群对 H5N1 流行株攻毒的保护效力及母源抗体对免疫效力的干扰. 中国兽医学报, (03): 268-270+274.
- 郑丽荣, 苏海龙, 张英, 石火英, 2019. 禽流感病毒抗原变异的研究进展, 中国家禽, 41(07): 47-50.
- 朱闻斐, 高荣保, 王大燕, 杨磊, 朱云, 舒跃龙. 2013. H7 亚型禽流感病毒概述, 病毒学报, 29(3): 245-249.
- BANKS J, SPEIDEL E S, MOORE E, PLOWRIGHT L, PICCIRILLO A, CAPUA I, CORDIOLI P, FIORETTI A, ALEXANDER D J, 2001. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes

- prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol*.146(5):963-973. DOI: 10.1007/s007050170128.
- BODEWES R, KUIKEN T, 2018. Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. *Advances in Virus Research*,100:279-307. DOI: 10.1016/bs.aivir.2017.10.007.
- Bi Y H, Li J, Li S Q, Fu G H, Jin T, Zhang C, Yang Y C, Ma Z H, Tian W X, Li J D, Xiao S Q, Li L Q, Yin R F, Zhang Y, Wang L X, Qin Y T, Yao Z Z, Meng F Y, Hu D F, Li D L, Wong G, Liu F, Lv N, Wang L, Fu L F, Yang Y, Peng Y, Ma J M, Sharshov K, Shestopalov A, Gulyaeva M, Gao GF, Chen J J, Shi Y, Liu W J, Chu D, Huang Y, Liu Y X, Liu L, Liu W J, Chen Q J, Shi W F,2020. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016-2019 in China. *Nat Commun*, 11(1):5909. DOI: 10.1038/s41467-020-19671-3.
- CHEN H L, LI Y B, LI Z J, SHI J Z, SHINYA K, DENG G H, QI Q L, TIAN G B, FAN S F, ZHAO H D, SUN Y X, KAWAOKA Y, 2006. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J Virol*, 80(12):5976-5983. DOI: 10.1128/JVI.00110-06.
- CHEN H L, SUBBARAO K, SWAYNE D, CHEN Q, LU X H, KATZ J, COX N, MATSUOKA Y,2003. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate, *Vaccine*, 21(17-18):1974-1979. DOI:10.1016/S0264-410X(02)00809-5.
- CHEN H L,2009. Avian influenza vaccination: the experience in China. *Rev Sci Tech*, 28(1):267-274. DOI: 10.20506/rst.28.1.1860.
- CHEN R B, HOLMES E C, 2009. Frequent inter-species transmission and geographic subdivision in avian influenza viruses from wild birds. *Virology*, 383(1): 156–161. DOI: 10.1016/j.virol.2008.10.015.
- CHEN R, HOLMES E C, 2006. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol*. 23(12):2336-2341. DOI: 10.1093/molbev/msl102.
- CLARK L, HALL J, 2006. Avian influenza in wild birds: status as reservoirs, and risks to humans and agriculture. *Ornithol. Monogr.*,60:3–29. DOI: 10.1642/0078-6594(2006)60[3:AIHWBS]2.0.CO;2
- DUAN L, CAMPITELLI L, FAN X H, LEUNG Y H, VIJAYKRISHNA D, ZHANG J X, DONATELLI I, DELOGU M, LI K S, FONI E, CHIAPPONI C, WU W L, KAI H, WEBSTER R G, SHORTRIDGE K F, PEIRIS J S M, SMITH G J D, CHEN H, GUAN Y, 2007. Characterization of low-pathogenic H5 subtype influenza viruses from Eurasia: implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. *J Virol*,81(14):7529-7539. DOI: 10.1128/JVI.00327-07.
- FICHTNER G J, 2003. The Pennsylvania/Virginia Experience in Eradication of Avian Influenza (H5N2). *Avian Dis*, 47:33–38.
- GAO R B, CAO B, HU Y W, FENG Z J, WANG D Y, HU W F, CHEN J, JIE Z J, QIU H B, XU K, XU X W, LU H Z, ZHU W F, GAO Z C, XIANG N J, SHEN Y Z, HE Z B, GU Y, ZHANG Z Y, YANG Y, ZHAO X, ZHOU L, LI X D, ZOU S M, ZHANG Y, LI X Y, YANG L, GUO J F, DONG J, LI Q, DONG L B, ZHU Y, BAI T, WANG S W, HAO P, YANG W Z, ZHANG Y P, HAN J, YU H J, LI D X,

- GAO G F, WU G Z, WANG Y, YUAN Z H, SHU Y L, 2013. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*, 368(20):1888-1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1304459.
- GAO Y W, ZHANG Y, SHINYA K, DENG G H, JIANG Y P, LI Z J, GUAN Y T, TIAN G B, LI Y B, SHI J Z, LIU L L, ZENG X Y, BU Z G, XIA X Z, KAWAOKA Y, CHEN H L, 2009. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 5(12): e1000709. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000709.
- GU M, HUANG J, CHEN Y, CHEN J, WANG X, LIU X, LIU X, 2012. Genome sequence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus from domestic mallard ducks in eastern China. *J Virol*, 86(22):12463-12464. DOI: 10.1128/JVI.02315-12.
- GUAN Y, SMITH G J. Genetic characterisation of H9N2 influenza viruses in southern China. *Hong Kong Med J*. 2016 Jun;22(3 Suppl 4):4-6.
- HIRST M, ASTELL C R, GRIFFITH M, COUGHLIN S M, MOKSA M, ZENG T, SMAILUS D E, HOLT R A, JONES S, MARRA M A, PETRIC M, KRAJDEN M, LAWRENCE D, MAK A, CHOW R, SKOWRONSKI D M, TWEED S A, GOH S, BRUNHAM R C, ROBINSON J, BOWES V, SOJONKY K, BYRNE S K, LI Y, KOBASA D, BOOTH T, PAETZEL M, 2004. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis*, 10(12):2192-2195. DOI: 10.3201/eid1012.040743.
- HU J, LIANG Y Y, HU Z L, WANG X Q, GU M, LI R M, MA C X, LIU X W, HU S L, CHEN S J, PENG D X, JIAO X N, LIU X F, 2019. Recombinant baculovirus vaccine expressing hemagglutinin of H7N9 avian influenza virus confers full protection against lethal highly pathogenic H7N9 virus infection in chickens. *Arch Virol*, 16:807-817. DOI:10.1007/s00705-018-04142-4.
- HU Z L, LIU X W, JIAO X N, LIU X F, 2017. Newcastle disease virus (NDV) recombinant expressing the hemagglutinin of H7N9 avian influenza virus protects chickens against NDV and highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus challenges. *Vaccine*, 35(48 Pt B):6585-6590. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.10.010.
- JIANG W M, LIU S, CHEN J, HOU G Y, LI J P, CAO Y F, ZHUANG Q Y, LI Y, HUANG B X, CHEN J M, 2010. Molecular epidemiological surveys of H5 subtype highly pathogenic avian influenza viruses in poultry in China during 2007-2009. *J Gen Virol*, 91(Pt 10):2491-2496. DOI: 10.1099/vir.0.023168-0.
- JIANG Y P, YU K Z, ZHANG H B, ZHANG P J, LI C J, TIAN G B, LI Y B, WANG X J, GE J Y, BU Z G, CHEN H L, 2007. Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector. *Antiviral Res*, 75(3):234-241. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.03.009.
- JOANNIS T, LOMBIN L H, DE BENEDICTIS P, CATTOLI G, CAPUA I, 2006. Confirmation of H5N1 avian influenza in Africa. *Vet Rec*, 158(9):309-310. DOI: 10.1136/vr.158.9.309-b.
- KILBOURNE E D, 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1):9-14. DOI: 10.3201/eid1201.051254.

- KIM S H, SAMAL S K, 2019. Innovation in Newcastle Disease Virus Vected Avian Influenza Vaccines. *Viruses*,11(3):300. DOI: 10.3390/v11030300.
- KLENK H D, GARTEN W, 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, 2(2):39-43. DOI: 10.1016/0966-842x(94)90123-6.
- LI C J, BU Z G, CHEN H L, 2014. Avian influenza vaccines against H5N1 'bird flu'. *Trends Biotechnol*, 32 (3):147-156. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.01.001.
- LI C J, CHEN H L, 2020. H7N9 Influenza Virus in China. *Cold Spring Harb Perspect Med*, a038349. DOI: 10.1101/cshperspect.a038349.
- LI X Y, SHI J Z, GUO J, DENG G H, ZHANG Q Y, WANG J L, HE X J, WANG K C, CHEN J M, LI Y Y, FAN J, KONG H H, GU C Y, GUAN Y T, SUZUKI Y, KAWAOKA Y, LIU L L, JIANG Y P, TIAN G B, LI Y B, BU Z G, CHEN H L, 2014. Correction: Genetics, Receptor Binding Property, and Transmissibility in Mammals of Naturally Isolated H9N2 Avian Influenza Viruses. *PLoS Pathog*,16(1): e1008284. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008284.
- LIU J X, CHEN P C, JIANG Y P, WU L L, ZENG X Y, TIAN G B, GE J Y, KAWAOKA Y, BU Z G, CHEN H L, 2011. A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks. *J Virol*, 85(21):10989-10998. DOI: 10.1128/JVI.05420-11.
- LIU Q F, MENA I, MA J J, BAWA B, KRAMMER F, LYOO Y S, LANG Y K, MOROZOV I, MAHARDIKA G N, MA W J, GARCÍA-SASTRE A, RICHT J A, 2015. Newcastle Disease Virus-Vectored H7 and H5 Live Vaccines Protect Chickens from Challenge with H7N9 or H5N1 Avian Influenza Viruses. *J Virol*, 89(14):7401-7408. DOI: 10.1128/JVI.00031-15.
- LIU S L, SUN J M, CAI J, MIAO Z P, LU M G, QIN S W, WANG X X, LV H K, YU Z, AMER S, CHAI C L, 2013. Epidemiological, clinical and viral characteristics of fatal cases of human avian influenza a (H7N9) virus in Zhejiang Province, China. *J Infection*, 67(6):595-605.
- LYCETT S J, DUCHATEL F, DIGARD P, 2019. A brief history of bird flu. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.374(1775):20180257. DOI:10.1098/rstb.2018.0257.
- MACHALABA C C, ELWOOD S E, FORCELLA S, SMITH K M, HAMILTON K, JEBARA K B, SWAYNE D E, WEBBY R J, MUMFORD E, 2015. Global avian influenza surveillance in wild birds: a strategy to capture viral diversity. *Emerging infectious diseases*, 21(4): e1-e7. DOI:10.3201/eid2104.141415.
- OLSEN B, MUNSTER V J, WALLENSTEN A, WALDENSTRÖM J, OSTERHAUS A.D.M.E, FOUCHIER R.A.M, 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*,312:384-388. DOI:10.1126/science.1122438.
- PASICK J, BERHANE Y, HISANAGA T, KEHLER H, HOOPER-MCGREYVY K, HANDEL K, NEUFELD J, ARGUE C, LEIGHTON F, 2010. Diagnostic test results and pathology associated with the 2007 Canadian H7N3 highly pathogenic avian influenza outbreak. *Avian Dis*,54(1 Suppl):213-219. DOI: 10.1637/8822-040209-Reg.1.
- PAVLOVA S P, VEITS J, METTENLEITER T C, FUCHS W, 2009. Live vaccination with an

- H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. *Vaccine*, 27(37):5085-5090. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.048.
- PU J, SUN H L, QU Y, WANG C X, GAO W H, ZHU J D, SUN Y P, BI Y H, HUANG Y H, CHANG K C, CUI J, LIU J H, 2017. M Gene Reassortment in H9N2 Influenza Virus Promotes Early Infection and Replication: Contribution to Rising Virus Prevalence in Chickens in China. *J Virol*, 91(8): e02055-16. DOI: 10.1128/JVI.02055-16.
- QI W B, JIA W X, LIU D, LI J, BI Y H, XIE S M, LI B, HU T, DU Y Y, XING L, ZHANG J H, ZHANG F C, WEI X M, EDEN J S, LI H N, TIAN H Y, LI W, SU G M, LAO G J, XU C G, XU B, LIU W J, ZHANG G H, REN T, HOLMES E C, CUI J, SHI W F, GAO G F, LIAO M, 2018. Emergence and Adaptation of a Novel Highly Pathogenic H7N9 Influenza Virus in Birds and Humans from a 2013 Human-Infecting Low-Pathogenic Ancestor. *J Virol*.92(2): e00921-17. DOI: 10.1128/JVI.00921-17.
- QIAO C L, TIAN G B, JIANG Y P, LI Y B, SHI J Z, YU K Z, CHEN H L, 2006. Vaccines developed for H5 highly pathogenic avian influenza in China. *Ann N Y Acad Sci*, 1081:182-192. DOI: 10.1196/annals.1373.022.
- RAUW F, PALYA V, GARDIN Y, TATAR-KIS T, DORSEY K M, LAMBRECHT B, VAN DEN BERG T, 2012. Efficacy of rHVT-AI vector vaccine in broilers with passive immunity against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains. *Avian Dis*, 56(4 Suppl):913-922. DOI: 10.1637/10172-041012-Reg.1.
- RAUW F, PALYA V, VAN BORM S, WELBY S, TATAR-KIS T, GARDIN Y, DORSEY K M, ALY M M, HASSAN M K, SOLIMAN M A, LAMBRECHT B, VAN DEN BERG T, 2011. Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains. *Vaccine*, 29(14):2590-2600. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.048.
- SHI J Z, DENG G H, KONG H H, GU C Y, MA S J, YIN X, ZENG X Y, CUI P F, CHEN Y, YANG H L, WAN X P, WANG X R, LIU L L, CHEN P C, JIANG Y P, LIU J X, GUAN Y T, SUZUKI Y, LI M, QU Z Y, GUAN L Z, ZANG J K, GU W L, HAN Y S, SONG Y M, HU Y Z, WANG Z, GU L L, YANG W Y, LIANG L B, BAO H M, TIAN G B, LI Y B, QIAO C L, JIANG L, LI C J, BU Z G, CHEN H L, 2017. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans. *Cell Res*, 27(12):1409-1421. DOI: 10.1038/cr.2017.129. Epub 2017 Oct 24.
- SHI J Z, DENG G H, LIU P H, ZHOU J P, GUAN L Z, LI W H, LI X Y, GUO J, WANG G J, FAN J, WANG J L, LI Y Y, JIANG Y P, LIU L L, TIAN G B, LI C J, CHEN H L, 2013. Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets--Implication of the source of current H7N9 infection in humans. *Chinese Science Bulletin*, 58(16):1857-1863. DOI: 10.1007/s11434-013-5873-4.
- SHI J Z, DENG G H, MA S J, ZENG X Y, YIN X, LI M, ZHANG B, CUI P F, CHEN Y, YANG H L, WAN X P, LIU L L, CHEN P C, JIANG Y P, GUAN Y T, LIU J X, GU W L, HAN S Y, SONG Y M,

- LIANG L B, QU Z Y, HOU Y J, WANG X R, BAO H M, TIAN G B, LI Y B, JIANG L, LI C J, CHEN H L, 2018. Rapid Evolution of H7N9 Highly Pathogenic Viruses that Emerged in China in 2017. *Cell Host Microbe*, 24(4):558-568.e7. DOI: 10.1016/j.chom.2018.08.006.
- SMITH G E, FLYER D C, RAGHUNANDAN R, LIU Y, WEI Z, WU Y, KPAMEGAN E, COURBRON D, FRIES L F 3RD, GLENN G M, 2013. Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine*, 31(40):4305-4313. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.07.043.
- STALLKNECHT D E, BROWN J D, 2007. Wild birds and the epidemiology of avian influenza. *J WILDLIFE DIS*, 43 (3): S15–20.
- SU S, GU M, LIU D, CUI J, GAO G F, ZHOU J Y, LIU X F, 2017. Epidemiology, Evolution, and Pathogenesis of H7N9 Influenza Viruses in Five Epidemic Waves since 2013 in China. *Trends Microbiol*. 25(9):713-728. DOI: 10.1016/j.tim.2017.06.008.
- SUBBARAO E K, LONDON W, MURPHY B R, 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol*, 67(4):1761-1764. DOI: 10.1128/jvi.67.4.1761-1764.1993.
- SUBBARAO K, KLIMOV A, KATZ J, REGNER Y H, LIM W, HALL H, PERDUE M, SWAYNE D, BENDER C, HUANG J, HEMPHILL M, ROWE T, SHAW M, XU X Y, FUKUDA K J, COX N, 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349):393-396. DOI: 10.1126/science.279.5349.393.
- SUTTON T C, 2018. The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. *Viruses*, 10(9):461. DOI: 10.3390/v10090461.
- TIAN G B, ZHANG S H, LI Y B, BU Z G, LIU P H, ZHOU J P, LI C J, SHI J Z, YU K Z, CHEN H L, 2005. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology*, 341(1):153-162. DOI: 10.1016/j.virol.2005.07.011.
- TONG S, LI Y, RIVAILLER P, CONRARDY C, ALVAREZ CASTILLO D A, CHEN L M, RECUENCO S, ELLISON J A, DAVIS C T, YORK I A, TURMELLE A S, MORAN D, ROGERS S, SHI M, TAO Y, WEIL M R, TANG K, ROWE L A, SAMMONS S, XU X Y, FRACE M, LINDBLADE K A, COX N J, ANDERSON L J, RUPPRECHT C E, DONIS R O, 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(11):4269-4274. DOI: 10.1073/pnas.1116200109.
- TONG S, ZHU X, LI Y, SHI M, ZHANG J, BOURGEOIS M, YANG H, CHEN X, RECUENCO S, GOMEZ J, CHEN L M, JOHNSON A, TAO Y, DREYFUS C, YU W, MCBRIDE R, CARNEY P J, GILBERT A T, CHANG J, GUO Z, DAVIS C T, PAULSON J C, STEVENS J, RUPPRECHT C E, HOLMES E C, WILSON I A, DONIS R O, 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 9(10): e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657.
- TWEED S A, SKOWRONSKI D M, DAVID S T, LARDER A, PETRIC M, LEES W, LI Y, KATZ J,

- KRAJDEN M, TELLIER R, HALPERT C, HIRST M, ASTELL C, LAWRENCE D, MAK A, 2004. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis*, 10(12):2196-2199. DOI: 10.3201/eid1012.040961.
- VERHAGEN J H, MAJOOR F, LEXMOND P, VUONG O, KASEMIR G, LUTTEROP D, OSTERHAUS A D, FOUCHIER R A, KUIKEN T, 2014. Epidemiology of influenza A virus among black-headed gulls, the Netherlands, 2006-2010. *Emerg Infect Dis*, 20(1):138-141. DOI: 10.3201/eid2001.130984.
- WEBSTER R G, BEAN W J, GORMAN O T, CHAMBERS T M, KAWAOKA Y, 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56(1):152-179.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201703_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1.
- WU H B, PENG X R, XU L H, JIN C Z, CHENG L F, LU X Y, XIE T S, YAO H P, WU N P, 2014. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. *Emerg Infect Dis*, 20(8):1315-1318. DOI: 10.3201/eid2008.140339.
- WU Y, WU Y, TEFSER B, SHI Y, GAO G F, 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 22(4):183-191. DOI: 10.1016/j.tim.2014.01.010.
- YU H J, WU J T, COWLING B J, LIAO Q H, FANG V J, ZHOU S, WU P, ZHOU H, LAU E H Y, GUO D H, NI M Y, PENG Z B, FENG L Z, JIANG H, LUO H M, LI Q, FENG Z J, WANG Y, YANG W Z, LEUNG G M, 2014. Effect of closure of live poultry markets on poultry-to-person transmission of avian influenza A H7N9 virus: an ecological study. *Lancet*, 383(9916):541-548. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61904-2.
- ZENG X Y, CHEN P C, LIU L L, DENG G H, LI Y B, SHI J Z, KONG H H, FENG H P, BAI J, LI X, SHI W J, TIAN G B, CHEN H L, 2016. Protective Efficacy of an H5N1 Inactivated Vaccine Against Challenge with Lethal H5N1, H5N2, H5N6, and H5N8 Influenza Viruses in Chickens. *Avian Dis*, 60(1 Suppl):253-255. DOI: 10.1637/11179-052015-ResNoteR.
- ZENG X Y, TIAN G B, SHI J Z, DENG G H, LI C J, CHEN H L, 2018. Vaccination of poultry successfully eliminated human infection with H7N9 virus in China. *Sci China Life Sci*, 61(12):1465-1473. DOI: 10.1007/s11427-018-9420-1.
- ZHANG L S, ZHANG Z G, WENG Z P, 2013. Rapid reassortment of internal genes in avian influenza A(H7N9) virus. *Clin Infect Dis*, 57(7):1059-1061. DOI: 10.1093/cid/cit414.
- ZHANG Y J, MAO H Y, YAN J Y, ZHANG L, SUN Y, WANG X Y, CHEN Y, LU Y Y, CHEN E F, LV H, GONG L M, LI Z, GAO J, XU C P, FENG Y, GE Q, XU B X, XU F, YANG Z N, ZHAO G Q, HAN J K, GUUS K, LI H, SHU Y L, CHEN Z P, XIA S C, 2014. Isolation and characterization of H7N9 avian influenza A virus from humans with respiratory diseases in Zhejiang, China. *Virus Research*, 189:158-164. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.05.002.
- ZHOU L, REN R Q, YANG L, BAO C J, WU J B, WANG D Y, LI C, XIANG N J, WANG Y L, LI D,

SUI H T, SHU Y L, FENG Z J, LI Q, NI D X, 2017. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016. *Western Pac Surveill Response J*, 8(1):6-14. DOI: 10.5365/WPSAR.2017.8.1.001.

致 谢

光阴似箭，岁月如歌，即将告别硕士生活，回头想想，思绪万千。学习期间，值得回忆、记忆的事情太多了，值得感谢的人太多了。现在，我们将挥手告别，开始新的旅程，我想对那些帮助过我的人，说些掏心窝的话。

感谢导师田国彬研究员，田老师为人谦逊，平易近人，做事严谨认真，总是教导我们做事要思考，合逻辑，不敷衍了事，把事情做好。上交的每一份作业您都仔细审阅、认真批改，总是为学生着想，您的教导我时刻铭记在心。

感谢曾显营副研究员，谢谢您您在实验和生活过程中对我的指导、关心及照顾，每当我有疑问时，您总是耐心的、不厌其烦地指导我，您作为老师，指点迷津，让人如沐春风；作为长辈，关怀备至，让人感触至深。谢谢包红梅老师在材料方面的全方位服务，确保实验的顺利开展。

感谢首席陈化兰老师，为我们提供如此棒的科研条件，感谢团队每一位工作者，身为这个大家庭的一员，我由衷的感到骄傲和自豪。

感谢本实验室的付永亮师兄、张岩师姐、吴姣姣师姐、陈晓涵师姐、麻琦师妹、刘润柏师弟、和新文师弟和王燕师妹以及我的同级潘舒心同学，他们对我的实验给予了莫大帮助，同时也为我的生活增添了无尽乐趣。感谢我的好朋友李岳硕士、李明慧硕士、王一涵硕士等，沮丧时给我鼓舞，失落时给我安慰，交往过程中我倍感温暖；感谢 3015 休息室的尹馨博士、侯玉杰博士、王冬雪硕士等等，你们让休息室充满幸福温暖，让我的生活丰富多彩。

最后感谢我的家人在此期间对我的理解、鼓励和帮助，焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以回报。

未来不足惧，过往不须泣。执着于理想，纯粹于当下。愿所得皆所期，所失皆无碍。

愿今后岁月如梭，愿不聚亦不散。

本研究得到了国家重点研发计划（2016YFD0501602、2017YFD0500701-3）、国家现代农业产业技术体系（CARS-41）及国际科技合作平台建设（2016YFE0203200）项目的资助，在此一并致谢！

作者简历

刘艳晶，女，1995年1月出生于山东省潍坊市。2014年9月考入山东农业大学动物科技学院动物科学专业，2015年转到动物医学专业，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攻读硕士学位，主要从事禽流感疫苗的研究。

发表文章：

刘艳晶，潘舒心，麻琦，陈晓涵，施建忠，邓国华，包红梅，曾显营，田国彬，陈化兰，2021. 重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗（细胞源，H5N1Re-11株+Re-12株，H7N9 H7-Re3株）的免疫效力研究. 中国预防兽医学报: 1-6. 已接收。

潘舒心，刘艳晶，麻琦，陈晓涵，邓国华，施建忠，田国彬，曾显营，陈化兰，2021. 禽流感（H5+H7）重组杆状病毒载体三价灭活疫苗对家禽的免疫效力研究. 中国预防兽医学报 :1-6. 已接收。

陈晓涵，吴姣姣，潘舒心，刘艳晶，施建忠，邓国华，包红梅，陈化兰，曾显营，田国彬，2020. 2株H7N9亚型重组禽流感病毒的生物学特性和免疫原性研究. 中国预防兽医学报, 42(09):924-930.