

鸭源 H5 亚型禽流感全禽源分子标记 疫苗候选株的构建

张文俊¹, 薛涛¹, 吴小伟¹, 唐应华², 彭大新¹, 刘秀梵^{1*}

(1. 扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009; 2. 江苏省农业科学院
国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

摘要: 为了开发用于南方水禽且适合血清学监测的 H5 亚型禽流感疫苗, 作者通过反向遗传技术, 删除 A/mallard/Huadong/S/2005(H5N1, S 株) 病毒 HA 编码多碱性氨基酸序列, 使之成为低致病特征, 分别与 A/duck/England/1/1956(H11N6, E 株) 和 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2, F 株) 的 NA 组合, 再以本室禽源高产病毒 F 株的 6 个内部片段为骨架, 构建全部基因都来自禽流感的疫苗株。成功拯救出 2 株重组病毒, 分别命名为 rH5N6/F 和 rH5N2/F, 并引入分子标记 N6 和 N2。重组病毒在鸡胚和 MDCK 细胞上均具有较好的繁殖能力, 且 rH5N6/F 更适合在鸡胚中生产, 对 SPF 鸡和鸡胚无致病性。重组病毒在 clade 2.3.4 毒株中具有很好的抗原代表性, 引入的分子标记有利于血清学监测的区分, 为防控水禽 H5 亚型禽流感提供了良好的疫苗候选株。

关键词: 禽流感病毒; 反向遗传; H5; DIVA 疫苗

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)05-0685-07

Generation of Duck Origin H5 Subtype Avian Influenza Vaccine Candidate with Heterogenous NA Gene

ZHANG Wen-jun¹, XUE Tao¹, WU Xiao-wei¹, TANG Ying-hua², PENG Da-xin¹, LIU Xiu-fan^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Infectious Diseases, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014, China)

Abstract: The aim of this study was to develop H5 subtype avian influenza vaccine with all genes from avian origin influenza viruses, and provide a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. Sequences encode several basic amino acids of HA gene from A/mallard/Huadong/S/2005(H5N1, S strain) were deleted. Using reverse genetics system, we rescued two reassortant viruses (rH5N6/F and rH5N2/F) that contained NA genes from A/duck/England/1/1956(H11N6, E strain) or A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2, F strain) and internal genes from F strain. The two vaccine viruses were avirulent to SPF chickens and embryonated chicken eggs, replicating well in eggs and MDCK cells, while rH5N6/F showed better growth in eggs. The results indicate that the reassortant viruses are suitable for vaccine manufacturing and being used as reference vaccine virus against the H5N1 clade 2.3.4 viruses in China.

Key words: avian influenza virus; reverse genetics; H5; DIVA vaccine

禽流感病毒(AIV)属于正黏病毒科 A 型流感病毒属, 表面糖蛋白 HA 和 NA 分别有 16 种和 9 种^[1]。其中, 高致病禽流感(H5 和 H7 亚型)在世界

范围内给养禽业造成了巨大的经济损失。近年来, 在禽流感控制过程中, 疫苗接种仍是主要的措施之一。而疫苗免疫主要采用全病毒灭活佐剂疫苗。合

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-41-G07); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB505003)

作者简介: 张文俊(1983-), 男, 江苏阜宁人, 博士生, 主要从事禽流感分子生物学及疫苗研究, E-mail: wenjunzhang597@139.com

* 通讯作者: 刘秀梵, Tel: +86-514-87991416, Fax: +86-514-87972591, E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

适的疫苗接种可以减少或预防临床症状,减少感染禽类的排毒,并增强对感染的抵抗能力。

家养水禽在禽流感从野鸟向其它宿主(包括家禽和哺乳动物)的传播过程中起中间宿主的作用。而 H5N1 亚型禽流感在东南亚的家养水禽中已经存在了很多年^[2]。水禽常常携带对鸡高致病的病毒,但自身不表现任何症状^[2]。从以往的情况来看,灭活疫苗的缺点之一就是不能用常规的诊断方法从血清学上区分疫苗接种和自然感染禽群,给水禽流感的监测带来困难,因此,开发有效的分子标记疫苗解决流感检测过程中的问题具有重要意义。本研究病毒 A/mallard/Huadong/S/2005 (H5N1, S 株)对麻鸭具有高致病性,与目前我国南方优势的 clade 2.3.4 属同一分支^[3]。采用反向遗传操作,对 S 株 HA 片段致弱,并克隆 A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2, F 株)的 N2 及 A/duck/England/1/1956 (H11N6)的 N6 片段,结合本室禽源高产病毒 F 株的 6 个内部片段,同时引入了 NA 的分子标记,构建全部基因都来自禽流感的疫苗株 rH5N6/F 和 rH5N2/F,以期为防制水禽流感提供候选疫苗毒株。

1 材料与方法

1.1 病毒、质粒和细胞

病毒 A/mallard/Huadong/S/2005 (H5N1, S 株)分离自华东地区发病麻鸭;A/duck/England/1/1956 (H11N6, E 株)由中国农业大学动物医学院刘金华教授惠赠。A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2, F 株)真核表达质粒粒 pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M 和 pHW208-NS 本室构建保存^[4]。COS-1 和 MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养。SPF 鸡胚购自山东省 SPF 实验种鸡场。

1.2 试剂

1% 鸡红细胞按常规方法制备^[5]。AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司; Expand High Fidelity PCR System 购自 Roche 公司; pCR2.1 vector 和 LipofectamineTM 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; Plasmid Mini Kit 和 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; BsmB I 和 Bsa I 等内切酶购自 NEB 公司。TPCK-胰酶(Worthington 公司)。pHW2000 转录/表达载体由美国 St. Jude

儿童医院 Webster 博士惠赠^[6]。

1.3 构建 NA 和致弱 HA 转录/表达质粒

以 RNeasy Mini Kit 直接从 S 株和 E 株病毒的尿囊液中提取总 RNA,用通用引物 12uni(5'-AG-CAAAAGCAGG-3')反转录得到总 cDNA。分 2 段扩增 S 株 HA 基因,去除 HA 裂解位点 3 个碱性氨基酸,使其中的个别碱性氨基酸突变为非碱性氨基酸(表 1)。上游片段扩增引物: Bm-HA-1 (5'-TAT-TCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGG-3')和 H A-M-2 (5'-AGTCCTCTTCCTTCTCTTAGAGGAC TATTTC-3'),下游片段扩增引物: HA-M-1 (5'-TAA-GAGAAGGAAGAGGACTATTTGGAGC-3')和 Bm-HA-2 (5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAA-CAAGGGTGT TTTT-3')^[7]。用 Overlap-PCR 将这 2 段连成全长 S-HAm 片段,测序确定正确后,经 BsmB I 酶切,再与转录/表达载体 pHW2000 连接成真核表达质粒 pHWS-HAm。E 株 NA 片段(N6)按 Hoffmann 等设计扩增 N6 基因的通用引物直接扩增,以 Bsa I 酶切,与 pHW2000 连接成表达质粒 pHWE-N6^[7]。

表 1 删除 A/mallard/Huadong/S/2005 株 HA 片段裂解位点氨基酸

Table 1 Deletion of the virulence-inducing cleavage motif in HA of A/mallard/Huadong/S/2005

HA 基因	裂解位点区氨基酸序列
HA gene	Amino acid sequence at cleavage site
A/mallard/Huadong/S/2005	P L R E R R R K ↓ R G L F
S-HAm	P L R E G • • ↓ R G L F

↓. 碱性裂解位点; •. 被删除的氨基酸; _ . 突变的氨基酸
 ↓. Proteolytic cleavage site; •. Denotes deleted amino acids; _ . Amino acid with mutant

1.4 重组病毒的拯救

分为 2 个质粒组合进行重组病毒的拯救:第 1 组为 rH5N6/F,外部基因质粒为 pHWS-HAm 和 pHWE-NA,内部 6 基因质粒来自 F 株。第 2 组为 rH5N2/F,HA 质粒为 pHWS-HAm,其余 7 个质粒均来自 F 株。以没有 pHWS-HAm 的 7 个质粒组合作为阴性对照,以 F 株的 8 个质粒作为阳性对照^[8]。COS-1 细胞置于 35mm dish 中长至 70%~80% 丰度,按 LipofectamineTM 2000 操作指南进行转染^[6]。6 h 后,向转染 dish 中添加 TPCK-胰酶。48 h 后,取出转染 dish 置 -70 °C,冻融 1 次,吹匀,取

悬液接种 10 日龄鸡胚, 0.2 mL·胚⁻¹。

1.5 拯救病毒的传代及基因测序鉴定

获救病毒在鸡胚上传代, 尿囊液进行 HA 和 HI 试验, 并扩增 HA、NA 和 NS 基因用于测序验证。

1.6 重组病毒在鸡胚和 MDCK 细胞的复制能力

鸡胚中病毒复制: 用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 对鉴定为阳性的获救病毒 (rH5N6 和 rH5N2) 第 1 代尿囊液进行稀释。分别以相同的 HA 单位病毒稀释液接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 置 35 °C 培养 3 d 后取出, 测定 HA 效价, 收集尿囊液冻存于 -70 °C, 用于 EID₅₀ 的测定, 计算方法参考 Reed-Muench 法^[9]。

MDCK 细胞中病毒复制: MDCK 细胞在 10% DMEM 中长至 90%~100% 时进行病毒接种。以无抗生素无血清 DMEM 稀释尿囊液, 用相同 HA 单位病毒稀释液接种 MDCK 细胞单层, 添加终浓度 2 μg·mL⁻¹ TPCK-胰酶, 35 °C 培养 3 d 后取出, 测定 HA 效价, 并收集上清冻存于 -70 °C, 用于 TCID₅₀ 的测定^[9]。

1.7 重组病毒对鸡胚和鸡的致病力

对已知 EID₅₀ 滴度的病毒尿囊液进行 10 倍比稀释, 注射 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚接种 0.1 mL。接种后 48 h 记录鸡胚死亡情况, 以 Reed-Muench 法计算导致 50% 鸡胚死亡的终点稀释度^[9], 获得鸡胚半数致死剂量 (ELD₅₀)。另每组 10 只 SPF 鸡用于静脉致病指数 (IVPI) 的测定, 重组毒 rH5N6/F、rH5N2/F 和野毒 S 株稀释后分别以相同标准剂量 (10⁶ EID₅₀) 静脉接种, 以无菌 PBS 注射组作为阴性对照, 观察 10 d, 每天记录发病和死亡情况, 计算 IVPI^[10]。

1.8 抗原性及免疫保护分析

40 只 7 日龄 H5 禽流感血清阴性的麻鸭均分为 4 组。第 1、2 组肌肉注射 0.5 mL PBS, 而第 3、4 组肌肉注射 0.5 mL 灭活油乳剂疫苗 (Oil-rH5N6/F 和 Oil-rH5N2/F), 约 5 μg HA 蛋白。第 2~4 组的鸭在免疫后 3 周, 分别采集血液样本分离血清, 用于 HI 试验, 并以 10⁷ EID₅₀ 剂量的 A/mallard/Huadong/S/2005(S) 毒株滴鼻点眼途径攻毒。第 1 组鸭注射 0.5 mL PBS 作为阴性对照。观察发病和死亡情况, 至攻毒后 14 d。

同时以免疫后 3 周抗 rH5N6/F 和 rH5N2/F 的鸭血清与 2003—2009 年 H5 亚型禽流感分离株及疫苗参考株进行 HI 试验, 分析重组病毒的抗原性。

2 结果

2.1 病毒遗传及抗原性分析

高致病性禽流感 (HPAIV) H5N1 病毒快速进化, 已经导致多种 clade 型 H5N1 病毒在我国出现。遗传分析显示, S 株 HA 与其它 clade 2.3.4 病毒遗传关系相近, 表明其在 clade 2.3.4 病毒中具有很好的遗传代表性 (图 1)。以 S 病毒灭活作为免疫原制备的鸭血清, 对 2003 年至 2009 年分离的不同禽源 H5N1 病毒均有明显的血凝抑制效果, 与 clade 2.3.4 毒株及 RE-5 抗原反应 HI 效价较高, 在 7 log₂ 以上; 与 clade 7 毒株及 RE-4 抗原反应 HI 效价较低, 在 5 log₂ 以下。结果显示 S 株在 clade 2.3.4 毒株中具有很好的抗原代表性 (表 2)。

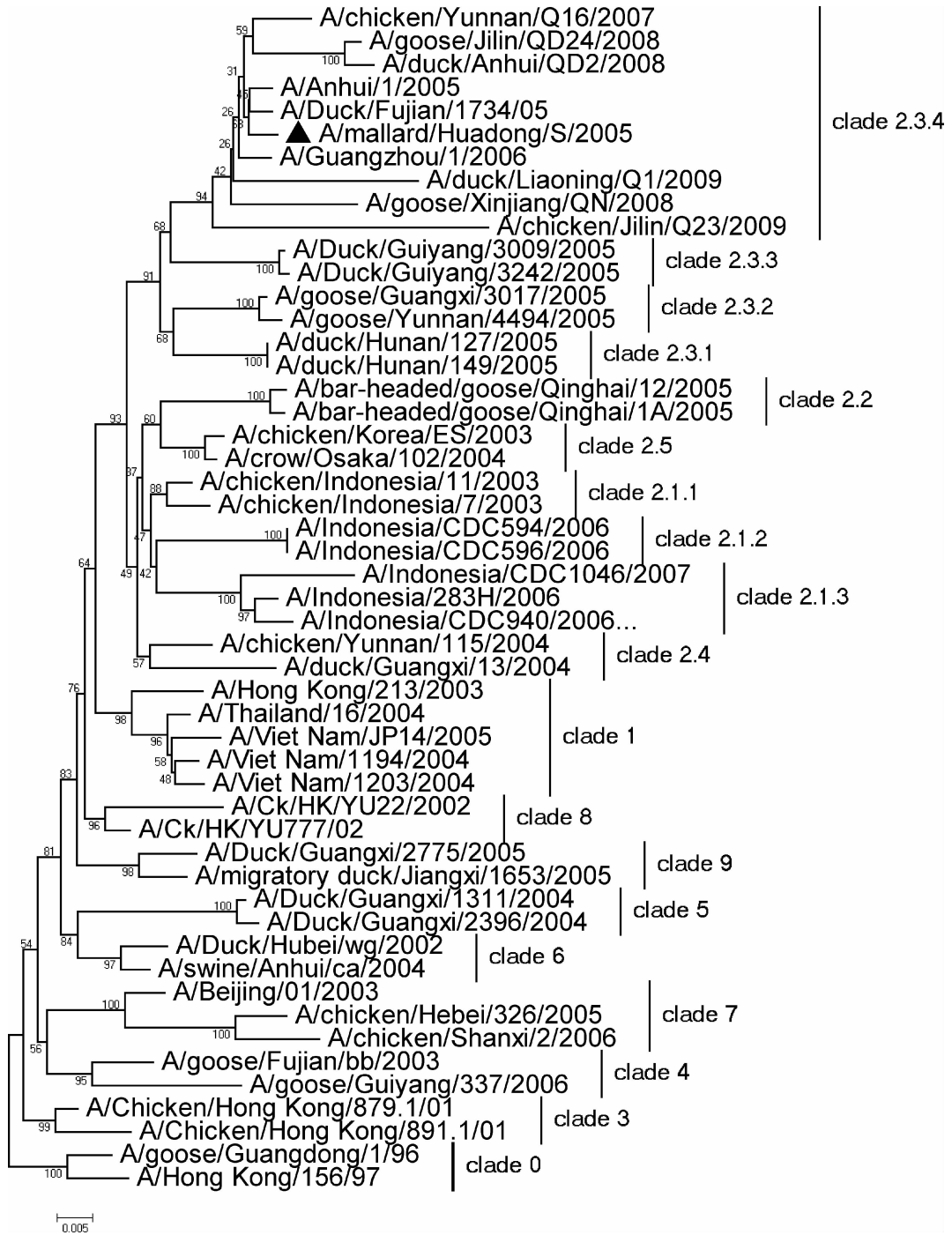
表 2 S 株及重组病毒的血凝抑制试验

Table 2 Hemagglutination inhibition of S and reassortant viruses

抗原 ^a	抗血清 Antisera		
	Anti-S	Anti-rH5N6/F	Anti-rH5N2/F
A/mallard/Huadong/S/2005	8	8	8
rH5N6/F	8	8	8
rH5N2/F	7	8	8
A/Duck/Anhui/1/2006 (RE-5)	8	8	8
A/mallard/Huadong/lk/2005	8	8	8
017-4	7	7	7
0301	8	7	7
1209	8	8	8
0909	7	7	7
A/chicken/Shanxi/2/2006 (RE-4)	5	5	4
A/chicken/Huadong/4/2008	3	3	3

a. RE-4 和 RE-5 为疫苗参考株灭活抗原; rH5N6/F 和 rH5N2/F 为重组疫苗毒株; A/chicken/Shanxi/2/2006 和 A/chicken/Huadong/4/2008 属于 clade 7; 其余 6 株为 2003—2009 年分离株, 与 A/Duck/Anhui/1/2006 均属 clade 2.3.4

a. RE-4 and RE-5 were inactivated antigens of reference vaccines; rH5N6/F and rH5N2/F were reassortant viruses; A/chicken/Shanxi/2/2006 and A/chicken/Huadong/4/2008 belong to clade 7; another 6 strains which isolated from 2003 to 2009 and A/Duck/Anhui/1/2006 belong to clade 2.3.4



黑色三角形(▲)表示用于构建疫苗株的供体野毒株。遗传发生树的是通过 MEGA4 中 Neighbor-joining 中的 p-distance 模式建立的^[11]

Closed triangle (▲) represents our isolated strain that used for constructing vaccine viruses. The phylogeny were produced by Neighbor-joining analysis using the p-distance model in MEGA 4^[11]

图 1 A/Mallard/Huadong/S/2005 与其它 H5N1 毒株 HA 基因构建的遗传进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree indicating the relationships of A/Mallard/Huadong/S/2005 HA gene to other H5N1 viruses

2.2 pHWS-HAm 和 pHWE-N6 表达载体的构建

S 病毒的 HA 裂解位点多个连续碱性氨基酸被删除,单个碱性氨基酸 R 突变为 G(表 1)。E 株的 N6 片段经 PCR 并测序鉴定正确。成功构建质粒

pHWS-HAm 和 pHWE-N6。

2.3 全禽源重组流感病毒的产生

转染上清接种 SPF 鸡胚,rH5N6/F 和 rH5N2/F 尿囊液 HA 效价分别为 9 log₂ 和 8 log₂,HI 试验

呈 H5 亚型阳性(效价均为 $7 \log_2$), H1、H3 和 H9 亚型阴性。F/H9N2 8 质粒阳性对照产生预期 H9N2 亚型病毒, 7 质粒阴性对照未检测到病毒产生。rH5N6/F 和 rH5N2/F 阳性尿囊液在 SPF 鸡胚中连续传 10 代, HA 效价稳定。对 2 株重组病毒第 10 代 HA、NA 和 NS 测序结果显示, 全长基因均未发生变化, 来自预期供体病毒。

2.4 重组病毒在鸡胚和 MDCK 细胞中的繁殖滴度

用不同的方法确定了重组病毒 rH5N6/F 和

rH5N2/F 在 SPF 鸡胚和 MDCK 细胞上的繁殖滴度(表 2)。2 株重组病毒在鸡胚中均获得了较高的 HA 效价和感染(EID_{50})滴度。 EID_{50} 的结果表明, rH5N6/F 在鸡胚中的繁殖能力明显高于 rH5N2/F, 已经达到鸡胚工业化生产的要求。在添加 TPCK-胰酶的条件下, 2 株病毒均能够在 MDCK 细胞中繁殖, 但 HA 效价比鸡胚中低。HA 效价和 $TCID_{50}$ 结果均表明, 2 株病毒在 MDCK 细胞上的繁殖能力相似(表 3)。

表 3 重组病毒的血凝(HA)和感染滴度

Table 3 Hemagglutination and infectivity of reassortant viruses

病毒 Virus	传代史 Passage history ^a	鸡胚 Eggs ^b		MDCK 细胞 MDCK cells ^b	
		HA (\log_2)	\log_{10} $EID_{50}/mL \pm s$	HA (\log_2)	\log_{10} $TCID_{50}/mL \pm s$
rH5N6/F	C1E2	9	8.53 ± 0.15^c	7	7.43 ± 0.21^d
rH5N2/F	C1E2	8	7.7 ± 0.1^c	7	7.36 ± 0.45^d

^a C1E2: 重组病毒通过 COS-1 细胞拯救并在鸡胚上传 2 代; ^b 用于病毒滴度测定的底物; ^c $P < 0.01$ 表示 2 株病毒的 EID_{50} 滴度差异极显著; ^d 表示 2 株病毒 $TCID_{50}$ 滴度差异不显著

^a C1E2: yielded by transfection in COS-1 cells and two passages in eggs; ^b Substrate used for titration; ^c $P < 0.01$ compared with corresponding EID_{50} titers of reassortant viruses; ^d $P > 0.05$ compared with corresponding $TCID_{50}$ titers of reassortant viruses

2.5 疫苗毒株对鸡胚和 SPF 鸡的致病性

高致病禽流感病毒通常可在 24~48 h 内致死鸡胚。野生型病毒 S 株和 2 株重组病毒以不同稀释度接种鸡胚后, 显示在 48 h 内, S 株可使全部鸡胚死亡, 而重组病毒接种的鸡胚均未死亡。 ELD_{50} 结果见表 4。

在 IVPI 试验中, 野生型病毒 S 株组鸡在 2 d 内全部发病死亡, 而 2 株重组病毒组鸡在 10 d 观察期内未见明显发病, 无鸡死亡(表 4)。结果均表明 2 株重组病毒相对于野生型 S 株毒力已经明显下降, 对 SPF 鸡不致病。

2.6 重组病毒的抗原性及免疫保护效果

由于野生型 S 株对麻鸭是高致病性的^[12], 作者评价了以 S 株作为 HA 供体的重组病毒 rH5N6/F 和 rH5N2/F 在鸭体内的免疫保护效果。在免疫后 21 d, 2 种灭活疫苗免疫组鸭均显示了较高的抗体滴度(表 4)。

在攻毒后的 14 d 观察期内, 免疫组鸭均存活, 并未显示明显发病症状, 但攻毒组鸭在 4~5 d 全部

死亡(表 5)。以上结果显示, 2 株重组毒灭活疫苗在麻鸭体内均有较好的免疫保护效果。

表 4 病毒对鸡胚和 SPF 鸡的致病力

Table 4 Virulence assessment of viruses in embryonated chicken eggs and chickens

病毒 Virus	ELD_{50} ($\log_{10} EID_{50}/mL$)	IVPI
A/mallard/Huadong/S/2005	< -1.7	3.0
rH5N6/F	> 6.7	0
rH5N2/F	> 5.8	0

以重组病毒 rH5N6/F 和 rH5N2/F 为免疫原制备的鸭血清, 对 2003 至 2009 年 H5 分离株进行血凝抑制试验, 显示重组病毒与 clade 2.3.4 及 RE-5 的反应滴度较高, 在 $7 \log_2$ 以上; 与 clade 7 毒株及 RE-4 的反应滴度较低, 不高于 $5 \log_2$ (表 2)。结果表明, 2 株重组病毒在 clade 2.3.4 毒株中具有很好的抗原代表性。

表 5 重组病毒灭活疫苗在鸭体内的免疫保护效果

Table 5 Protective efficacy of reassortant viruses vaccine in ducks

分组 ^a	HI 滴度 ($\log_2 \pm s$) ^b	存活数/总数 (dpc) ^c
Group	HI titer against S ($\log_2 \pm s$)	Survival/total(dpc)
Oil- rH5N6/F-C	6.6 ± 0.84	10/10
Oil- rH5N2/F-C	6.3 ± 0.48	10/10
PBS-C	0	0/10 (4-5)

^a C: A/mallard/Huadong/S/2005 (H5N1, S, clade2.3.4) 毒株以 10^7 EID₅₀ 的剂量攻毒; ^b 免疫后 3 周, 以 S 株为抗原, 采集每组 10 只鸭的血清用于 HI 检测; ^c dpc: 攻毒后时间(d)

^a C: challenged with 10^7 EID₅₀ A/mallard/Huadong/S/2005 (H5N1, S, clade2.3.4); ^b Sera were collected from 10 ducks at 3 weeks p. v. for HI antibody detection; ^c dpc: days post-challenge

3 讨论

H5N1 亚型禽流感在世界范围内对养禽业造成了重大经济损失。病毒在不同地区向不同方向进化, 在我国家养和野生禽类中存在多种 clade 型的 H5N1 亚型禽流感^[13-14], 而南方地区流行的 H5 亚型流感病毒主要为 clade2.3.4^[15]。因为遗传关系的变化常常与病毒的抗原变化相关^[16], 所以遗传进化分析对于疫苗株的选择是很关键的。本研究选择的 HA 供体毒株 S 株在 clade 2.3.4 H5N1 流感病毒中具有很好的遗传和抗原代表性, 保证了构建的重组病毒灭活疫苗与 clade 2.3.4 H5N1 流感病毒具有很好的抗原匹配性。

免疫使用的疫苗株 rH5N2 和 rH5N6 与流行的野毒株 HA 同源, 但 NA 亚型不同。血清学监测时若发现与疫苗株 NA 亚型不同, 可证明为自然感染。16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型可以通过血清学方法区别。理论上, HA 和 NA 可以发生任意形式的组合, 最多可达 144 种, 但是有一些偏好性的组合发生的频率比其它组合(如 H5N2 或 H5N6)高。虽然 HA 和 NA 的抗体都具有保护作用, 但是 HA 的抗体是最重要的。疫苗仅有与野毒株同源的 HA 就具有保护作用。因此, 含有异源 NA 的标准灭活佐剂疫苗也有效。例如, 免疫 rH5N6 疫苗, 血清学监测到 N6 的抗体, 就证明禽群是经过免疫接种了, 若监测到 N1 的抗体就说明感染了野毒株。目前, 反向遗传技术是一种产生此种 NA 分子标记疫苗株的有效方法, 可以方便快捷地产生与野毒株 HA 相同但 NA 不同的重组病毒。引入 NA 分子标记的 DI-VA(Differentiating Infected from Vaccinated Animals)疫苗也有缺点, 其中主要的问题是日前针对

NA 的血清学试验以胎球蛋白(Fetuin)作底物^[17], 还不够敏感。但最近改进的神经氨酸酶抑制(NI)试验以 2'-(4-甲基伞形酮)- α -D-N-乙酰神经氨酸(MUNANA)(Sigma, St. Louis, Mo.)作为底物, 可以提高 NI 试验的敏感性^[18]。

疫苗毒株在生产系统中的繁殖性能决定了最终有效抗原蛋白的产量, 因此, 疫苗株应具有良好的繁殖能力。2 株重组病毒 rH5N6 和 rH5N2 在鸡胚和 MDCK 细胞均获得了较高的滴度, 具有应用于鸡胚或 MDCK 细胞病毒生产系统的潜力。rH5N6 的在 SPF 鸡胚中的滴度高于 rH5N2。所以, rH5N6 具有更好的市场应用价值。有报道指出流感病毒 HA 和 NA 功能的平衡性决定了其在鸡胚中的繁殖能力^[19], 推测在重组病毒中, 致弱的 S-HA_m 与 E-N6 的功能平衡性比 F-N2 更好, 获得了更高的鸡胚繁殖滴度。

相对于母本野毒株, 疫苗候选株需要对动物具有减毒的特征。作者对重组病毒的 HA 基因进行了裂解位点的修饰, 缺失了病毒系统性复制所必需的 4 个碱性氨基酸, 使其裂解位点呈低致病性禽流感的特征。鸡胚致病力试验显示, 若不以较高的病毒剂量注射鸡胚, 重组病毒并不致死鸡胚。根据 OIE 的标准, 重组病毒对 SPF 鸡的致病力(IVPI)为 0。以上结果均表明, 2 株重组病毒均符合低致病性禽流感病毒的分类标准。

重组病毒 rH5N6 和 rH5N2 在免疫鸭后采集的抗血清与母本 S 株和重组病毒的 HI 滴度相似, 表明, 重组病毒保留了母本病毒的抗原性。此外, 针对重组病毒的抗血清同样可以很好地中和其它 clade2.3.4 H5N1 亚型禽流感病毒(表 2), 显示了重组病毒具有很好的抗原代表性。

散养水禽与野鸟、陆生家禽以及哺乳动物的接

触机会较多。因此,水禽在从野鸟向陆生家禽和哺乳动物传播病毒的过程中发挥了重要的作用。我国的水禽饲养量很大,H5N1 流感病毒也已经在我国南方的健康鸭体内存在了多年^[2]。有报道指出,近年来分离的许多 H5N1 毒株对鸭有致死性^[20]。因此,对家养水禽的免疫接种对于控制并消除 H5N1 禽流感在动物和人类中的传播均有重要意义。在鸭体内的免疫保护试验显示,经灭活重组病毒疫苗免疫的鸭,能够完全抵抗高致病野毒株的攻击,为防控 H5N1 亚型水禽流感提供疫苗候选株。

参考文献:

- [1] WEBSTER R G, BEAN W J, GORMAN O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1992, 56(1):152-179.
- [2] CHEN H, DENG G, LI Z, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(28): 10452-10457.
- [3] 唐应华, 吴培培, 彭大新, 等. 对麻鸭不同致病力 H5N1 亚型禽流感病毒的鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2008, (03):12-13.
- [4] 石火英, 卢建红, 陈素娟, 等. 利用 8 质粒系统拯救 A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2) 株禽流感病毒 [J]. *微生物学报*, 2005, (03):373-376.
- [5] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京:中国三峡出版社, 1997.
- [6] HOFFMANN E, NEUMANN G, KAWAOKA Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11):6108.
- [7] HOFFMANN E, STECH J, GUAN Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [8] 卢建红, 龙进学, 邵卫星, 等. 用反向遗传操作技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒[J]. *微生物学报*, 2005(01):53-57.
- [9] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27:493-497.
- [10] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2. 3. 4[M]. 2008 [http://www. Oie. Int/eng/normes/mmanual/a _ summy. Htm]
- [11] TAMURA K D J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
- [12] 唐应华, 吴培培, 彭大新, 等. 4 株野鸭源 H5N1 亚型禽流感病毒的全基因组鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(11):1006-1008.
- [13] WHO/OIE/FAO. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(7):e1.
- [14] JIANG W M, LIU S, CHEN J, et al. Molecular epidemiological surveys of H5 subtype highly pathogenic avian influenza viruses in poultry in China in 2007-2009 [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(10):2491-2496.
- [15] LI Y, SHI J, ZHONG G, et al. Continued evolution of H5N1 influenza viruses in wild birds, domestic poultry, and humans in China from 2004 to 2009 [J]. *J Virol*, 2010, 84(17):8389-8397.
- [16] COUCH R, KASEL J, GLEZEN W, et al. Influenza: its control in persons and populations [J]. *J Infect Dis*, 1986, 153(3):431-440.
- [17] AMINOFF D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids [J]. *Biochem J*, 1961, 81(2):384-392.
- [18] GUBAREVA L, WEBSTER R, HAYDEN F. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3403-3408.
- [19] WAGNER R, MATROSOVICH M, KLENK H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections [J]. *Rev Med Virol*, 2002, 12(3):159-166.
- [20] STURM-RAMIREZ K, ELLIS T, BOUSFIELD B, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks [J]. *J Virol*, 2004, 78(9):4892.

(编辑 白永平)