



EGGS  
PROGRAM

总第19期/2015年2月

## 表达 2.2 分支禽流感病毒 HA 基因的 HVT 活载体疫苗 对 H5 亚型高致病性禽流感病毒不同分离株的免疫保护

### 摘要

疫苗接种是保护家禽免受禽流感（AI）感染的重要手段。在田间应用中，绝大多数的 AI 疫苗是使用灭活全病毒制成的油乳剂疫苗。然而，因为重组载体疫苗可诱导针对不同分离株的保护，并具有克服母源抗体干扰的能力，所以该类疫苗的使用量正逐渐增加。在本研究中，我们比较了表达 2.2 进化枝 H5N1 分离株 (A/swan/Hungary/4999/2006) 血凝素（HA）基因的火鸡疱疹病毒（HVT）载体疫苗对同源 H5N1 毒株以及异源 H5N1 和 H5N2 高致病性禽流感病毒（HPAI）攻毒的保护能力。结果显示，所有接种疫苗的鸡在同源毒株攻毒后，均未出现疾病临床症状和死亡。另外，从攻毒鸡中采集的口腔和泄殖腔拭子表明，与未免疫鸡相比，接种疫苗的鸡发病率和排毒效价较低。进行异源 H5N1 和 H5N2 高致病性禽流感攻毒后，80-95% 1 日龄接种 HVT 载体 AI 疫苗的鸡只存活，而且与未免疫鸡只相比，排毒鸡只的数量较少。体外细胞毒性分析表明，HVT 载体-AI 疫苗免疫鸡的脾 T 淋巴细胞可识别感染 H5，以及 H6、H7、H9 禽流感病毒的 MHC 匹配靶细胞。综上所述，这些研究证明，使用表达 HA 的 HVT 载体疫苗可以保护家禽抵抗多个分支的 HPAI 感染，活疫苗诱导的体液免疫和细胞免疫均可能有助于提供保护效果。

### 1. 引言

20 世纪 90 年代以来，高致病性禽流感（HPAI）的爆发数量以及这些爆发中感染的鸡只数量显著增加。其中最显著的就是自 1996 年以来在中国大陆和香港开始的一系列 H5N1 高致病性禽流感疫情爆发，随后蔓延到世界各地，包括东南亚，中东，欧洲和非洲其它地区。这些 H5N1 病毒在包括中国，印尼，越南和埃及在内的数个国家中成为流行毒株。自 1996 年以来，H5N1 病毒经历了明显的抗原漂移，并按照 WHO / OIE / FAO H5N1 进化研究工作小组的要求，根据血凝素（HA）基因序列的系统发育拓扑结构将这些病毒分为不同的分支。



## EGGS PROGRAM

为了开展 AI 地方性流行国家的清除或控制方案，除了结合其他控制措施以外，如良好的生物安全和监测方案，预防接种一直被认为是合适的、功能强大的方法。如果使用得当，疫苗接种可以保护家禽避免出现临床症状和死亡，并显著降低接种鸡群的病毒排出数量，从而减少病毒传播。例如，通过提高生物安全，减少鸡群数量和使用疫苗，在越南的 H5N1 疫情爆发数量从 2003 年的 2388 例降至 2011 年的 45 例。众所周知，疫苗和野毒株之间的抗原性差异会影响疫苗功效。

虽然已经报道细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对病毒的清除至关重要，针对 AI 的免疫力主要还是基于 HA 诱导产生的中和抗体。针对特定类型病毒产生的抗体通常只能预防同源或抗原性相同的分离株。至少有一项研究表明，鸡群针对不同亚型禽流感病毒所产生的 CTL 存在交叉反应。最近，我们已经证明低致病性 (LP) AI 感染的鸡群对不同亚型的 AIV 存在广泛的细胞免疫交叉反应性。

在这里，我们检测了一种表达了最近的 2.2 进化枝 H5N1 病毒 HA 基因的火鸡疱疹病毒 (HVT) 载体 AI 疫苗，针对高致病性禽流感对鸡群致死性感染的保护作用。通过使用属于不同分支的 H5N1 病毒和墨西哥源 H5N2 病毒在内的各种高致病性禽流感病毒进行攻毒检测，来判定这种疫苗的有效性。

## 2. 材料与方法

### 2.1 病毒株和复壮

免疫攻毒试验中使用的 3 株高致病性禽流感分离株：A/Whooper Swan/Mongolia/3/2005 H5N1 (SM05)，A/chicken/WestJava Sbg/29/2007 H5N1 (CW07) 以及 A/chicken/Queretaro/14588-19/95 H5N2 (CQ95) (附表 1)。用于测定 HVT 载体-AI 疫苗免疫鸡只细胞免疫的 4 株不同亚型 LPAI 分离株包括，A/turkey/Wisconsin/68 H5N9，A/chicken/CA/203/03 H6N2，A/turkey/VA/4259/02 H7N2 和 A/chicken/NJ/12220/97 H9N2。根据标准程序，使用 9-11 日龄无特定病原 (SPF) 鸡胚对病毒进行繁殖和滴定。

### 2.2 疫苗

HVT 载体 AI 疫苗 Vectormune®AI (CEVA Animal Health, Lenexa, KS)，是通过将 2.2 分支的 H5N1 高致病性禽流感病毒 A/Swan/Hungary/4999/2006 (SH06) 的 HA 基因插入到 HVT FC-126 株的基因组中构建而成的，现简称 rHVT-Hu4999。将其 HA 基因的裂解位点改变为 LPAI 病毒株的典型裂解位点序列。试验 I 中，两种不同形态的 HVT 被用作疫苗载体，细胞结合型 (CA) 冷冻形态或无细胞 (CF) 冻干形态。在试验 III 中，将含有 A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株 HA 基因的 1 株 HVT 载体 AI 疫苗 (rHVT-Wisc68) 作为对照。Cevac®Flu-Kem H5N2 疫苗 (ih5N2) 由 CEVA 墨西哥公司 Cuernavaca 生产，是一种含有 LPAI



## EGGS PROGRAM

病毒 A/Chicken/Mexico/232/94 株 (H5N2) (CM94) 抗原的油乳剂灭活疫苗。这些疫苗的名称和插入基因总结在参考表 2 中。

### 2.3 血清学检测

根据标准方案进行血凝抑制 (HI) 测定。将同源高致病性禽流感 (H5N1) 病毒株 SM05, 异源高致病性禽流感 (H5N1) 病毒株 CW07, 以及异源高致病性禽流感 (H5N2) 病毒株 CQ95 作为抗原。

### 2.4 统计分析

使用 Prism 5 软件 (GraphPad Co., San Diego, CA) 绘制 Kaplan -Meier 生存曲线。使用 The Mantel - Cox 对数秩检验来比较两个试验组之间的生存曲线 (Prism 5)。使用 Tukey 单向 ANOVA 检验 HI 和病毒滴度的平均值和标准误差的统计差异 (Prism 5)。使用 Fisher 精确检验对试验组之间的病毒分离率进行成对比较 (SigmaStat 2.0.3, SPSS Inc., Chicago, IL)。小写字母表示比较组之间存在统计学意义的差异。所有统计检验根据  $P < 0.05$  进行。

### 2.5 动物攻毒试验

在试验 I 和 III 中, 试验动物为来自 Charles River 试验室 (威明顿, MA) 的不分性别的 SPF 白来航 (WL) 鸡。试验 II 中, 试验动物为来自东南家禽研究试验室的不分性别的 SPF 肉鸡 (White Rock)。鸡被安置在佐治亚大学家禽诊断研究中心的 BSL2 级设施中进行免疫和饲养。随后将试验鸡只转移至东南家禽研究试验室的 BSL3 设施中进行攻毒。将鸡饲养在 Horsfall 隔离设备中, 自由采食饮水。

免疫前、攻毒前和攻毒后 (dpc) 14 天通过翅静脉采集血清样品, 并储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。攻毒后 2 和 4 天 (试验 I 和 II) 或 3 和 6 天 (试验 III) 采集口咽和泄殖腔拭子样品并进行病毒分离。如前所述, 将拭子样品置于 2.0 毫升 BHI 肉汤中。攻毒后 14 天内, 连续每天两次对各组进行临床症状的监测, 对具有严重临床症状的鸡只根据标准规程进行人道处死, 并计入当天死亡鸡只。

#### 2.5.1 试验 I - 同源性攻毒保护试验

1 日龄 SPF 白来航雏鸡被分为三组。第一组接种细胞结合型 rHVT-Hu4999 (1500 pfu), 第二组接种无细胞型 rHVT-Hu4999 (1500 pfu)。最后一组仅接种疫苗稀释剂, 作为攻毒对照组。在 6 周龄时, 鸡鼻内接种 H5N1 高致病性禽流感病毒 2.2 分支的 SM05 株, 每只鸡的攻毒剂量为  $10^6$  鸡胚半数感染量 ( $\text{EID}_{50}$ ) 的病毒。对 30 只细胞结合型 rHVT-Hu4999 组鸡只, 20 只无细胞型 rHVT-Hu4999 组鸡只和 10 只攻毒对照组鸡只进行攻毒。

#### 2.5.2 试验 II - 异源性印尼源 H5N1 高致病性禽流感的临床攻毒保护试验





## EGGS PROGRAM

将 1 日龄 SPF 肉雏鸡(white rock)分为四组。第一组 1 日龄接种 rHVT-Hu4999 CA (2000 pfu)。第二组 1 日龄接种 rHVT-Hu4999 CA (2000 pfu)，随后 10 日龄免疫 iH5N2。第三组仅在 10 日龄免疫 iH5N2 疫苗。最后一组免疫 PBS 作为攻毒对照组。在 4 周龄，使用 2.1.3 分支的 H5N1 高致病性禽流感 CW07 病毒对鸡进行滴鼻攻毒，每只鸡的攻毒剂量为  $10^6 \text{EID}_{50}$ 。

### 2.5.3 试验 III-异源性墨西哥源 H5N2 高致病性禽流感临床攻毒保护试验

本研究中，将 SPF 白来航雏鸡分成三组。第一组免疫 rHVT-Hu4999 CA (1500 pfu)，第二组免疫 rHVT-Wisc68 CA (1500 pfu)，第三组仅接种疫苗稀释液，作为攻毒对照组。在 4 周龄，在每个免疫组随机选取 20 只鸡，攻毒对照组随机选取 10 只鸡，使用 H5N2 高致病性禽流感病毒 CQ95 进行鼻内攻毒，每只鸡的攻毒剂量为  $10^6 \text{EID}_{50}$ 。

### 2.6 AIV 感染的肺细胞培养物细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 分析

主要组织相容性复合体 (MHC) 明确的 B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> SPF 鸡 (惠赠自家禽肿瘤病学试验室, ARS, East Lansing, MI) 1 日龄免疫 1500 pfu 的 rHVT-Hu4999。在 4 周龄使用 Ficoll - Hypaque 纯化脾脏淋巴细胞。如前所述，从 2 周龄 B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> SPF 鸡中获得肺细胞培养物，并且作为 CTL 测定的靶细胞。测试之前 16 小时使用 2 MOI 的 H5N9、H6N2、H7N2 或 H9N2 低致病性 AI 病毒感染肺细胞。在靶细胞中加入不同比例的脾脏淋巴细胞并离心。如先前所述，使用 CytoTox96 非放射性测定法 (Promega) 对 CTL 活性进行监测。

### 2.7 HA 序列分析

从 GenBank 和流感研究数据库 (<http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>) 获得禽流感病毒 HA 的氨基酸序列。使用 MegAlign(DNA STAR Lasergene 8, Madison, WI) 软件中的 Jotun Hein 方法来比较 A/turkey/Ireland/1378/83(H5N8) 与本研究中所使用的分离株的 HA 序列的 H5 (246-260) I 类和 II 类 MHC T 细胞推测表位。

## 3. 结果

### 3.1 试验 I - 细胞结合型或无细胞型 HVT-Hu4999 疫苗对同源 H5N1 高致病性禽流感的攻毒保护效果比较

我们对 rHVT-Hu4999 疫苗针对同源 H5N1 高致病性禽流感病毒的攻毒保护效果进行了评估。用于攻毒的 2.2 分支高致病性禽流感 H5N1 病毒 SM05 与疫苗株的 HA 基因具有 100% 的序列同源性。1 日龄皮下接种 rHVT-Hu4999 的鸡只，6 周龄进行同源毒株攻毒后均幸存，而全部对照组在攻毒后 3 天内死亡 (图 1A)。免疫组没有观察到临床症状。

攻毒之前在两个 rHVT-Hu4999 免疫组中均检测到 HI 滴度的升高，CF 组的平均滴度为  $2^{5.1}$ ，CA 组的平均滴度为  $2^{6.3}$  (图 2A)。在攻毒后，CF 组的平均 HI 滴度增加到  $2^{6.4}$ ，而 CA 组的平均 HI 滴度降低到  $2^{5.6}$  (图 2B)。



## EGGS PROGRAM

rHVT-Hu4999 免疫鸡在攻毒后第 2 天和第 4 天的排毒程度很轻微。从攻毒后第 2 天的口咽拭子中，CA rHVT-Hu4999 组的病毒分离率为 4/30 (13%)，CF rHVT-Hu4999 组的病毒分离率为 3/20 (15%)，病毒滴度也很低 ( $10^1$ – $10^3$  EID<sub>50</sub> /毫升)，而全部攻毒对照组鸡只排毒数量显著 ( $10^5$ – $10^7$  EID<sub>50</sub> /ml) (图 3 和表 1)。攻毒 2 天后，从 rHVT-Hu4999 免疫鸡的泄殖腔拭子中均未分离到病毒，而所有的攻毒对照组均检测到病毒排出。

### 3.2 试验 II-对印尼源 H5N1 高致病性禽流感病毒攻毒的保护效果

本试验对 rHVT-Hu4999 疫苗对异源性印尼源 2.1.3 分支 H5N1 病毒 CW07 对 SPF 肉鸡的攻毒保护效果进行了评价。疫苗插入片段 SH06 和 CW07 病毒之间的 HA 基因序列相似性为 93%，但二者与 iH5N2 疫苗中的 CM94 分离株的同源性分别只有 87% 和 84%。因为 H5N1 高致病性禽流感对肉鸡与蛋鸡同样会造成严重影响，所以在这次试验中我们使用肉鸡作为试验动物。此外，在 4 周龄，而不是试验 I 中的 6 周龄进行攻毒，是想查看 HVT 载体 AI 疫苗能否在早于 6 周龄提供保护性免疫力。攻毒后，所有的攻毒对照组在 2 天内死亡 (图 1B)。仅免疫 rHVT-Hu4999 组的鸡 80% (16/20) 存活。在 10 日龄加强免疫 iH5N2 疫苗的 rHVT-Hu4999 免疫组的保护率提高到 90% (18/20)。仅 10 日龄免疫 iH5N2 疫苗组中只有 1 只幸存，幸存的鸡没有表现出任何 AI 临床症状。

利用同源 SM05 抗原和异源 CW07 抗原评价 HI 效价 (图 4)。当使用同源抗原时，攻毒之前，无论是否进行 iH5N2 疫苗加强免疫，rHVT-Hu4999 免疫组均可诱导  $2^5$ – $2^6$  的平均 HI 滴度。当使用异源抗原时，HI 效价会低得多，平均为  $2^1$  和  $2^2$ 。iH5N2 单独诱导的 HI 效价要低于 rHVT-Hu4999 免疫组，平均同源抗原滴度为  $2^{1.7}$ ，平均异源抗原滴度为  $2^{0.2}$ 。在攻毒后，所有组均观察到 HI 滴度显著增加。

无论是否进行 iH5N2 疫苗加强免疫，与攻毒对照组和 iH5N2 单独免疫组相比，rHVT-Hu4999 免疫组的鸡只排毒显著下降 (图 5 和补充表 3)。在攻毒 2 天后，与攻毒对照组相比，口咽拭子的病毒排出减少了 3 log<sub>10</sub>，与单独免疫 iH5N2 相比，排毒滴度减少了 1 log<sub>10</sub>。其统计学差异均显著。单独免疫 rHVT-Hu4999 组与 rHVT-Hu4999 + iH5N2 联合免疫组之间没有什么区别。

### 3.3 试验 III-对异源 H5N2 高致病性禽流感的临床保护效果

最后，我们对 rHVT-Hu4999 疫苗抵抗异源 H5N2 高致病性禽流感攻毒的效果进行了评价。SH06 插入片段和高致病性禽流感 CQ95 H5N2 病毒之间的 HA 基因同源性为 82%。在这项试验中，表达 A/turkey/Wisconsin/68 H5N9 (TW68) 株 HA 基因的 rHVT-Wisc68 疫苗也用于比较。TW68 株的 HA 基因与高致病性禽流感 H5N2 病毒 CQ95 的相似性为 91%。4 周龄进行攻毒后 6 天内攻毒对照组全部死亡。rHVT-Hu4999 免疫组中，95% 的鸡在攻毒后存活 (19/20) (图 1C)。接种 rHVT-Wisc68 的全部



## EGGS PROGRAM

鸡只存活。幸存鸡只没有表现出任何 AI 临床症状。

由于上述试验中已经显示了同源病毒攻毒后的 HI 滴度（图 2B），我们使用异源 H5N2 病毒 CQ95 作为抗原进行 HI 滴度的评价。虽然其 HI 效价不及使用同源抗原时的 HI 滴度一样高，但 rHVT-Hu4999 免疫组和 rHVT-Wisc68 免疫组在攻毒之前的 HI 效价均有所上升（图 6A）。rHVT-Wisc 免疫组的平均滴度较高，为  $2^{4.5}$ ，而 rHVT-Hu4999 组为  $2^{2.8}$ ，这可能是因为 TW68 株比 SH06 株更类似于 H5N2 CQ95 株。在攻毒之后 HI 滴度增加到  $2^8$ （图 6B）。

rHVT-Hu4999 免疫组和 rHVT-Wisc68 免疫组的攻毒病毒排毒显著减少（参考表 4）。在攻毒 3 天后，rHVT-Hu4999 组的 19 只鸡中只有 2 只的口咽拭子检测到排毒（11%），没有在 rHVT-Wisc68 组检测到排毒，而攻毒对照组的 7 只鸡中有 6 只（86 %）检测到了排毒。

### 3.4 rHVT-Hu4999 免疫鸡只的 CTL 交叉反应

为了检测 rHVT-Hu4999 疫苗诱导的细胞免疫水平，我们评估了免疫鸡只体外培养脾脏 T 细胞的 CTL 活性。结果显示，脾脏 T 细胞对 H5 禽流感病毒感染的靶细胞的裂解水平最高（图 7）。在效应细胞：靶细胞（E：T）比例为 40：1 时，67% 的感染 H5N9 禽流感病毒的靶细胞裂解。同时也观察到感染不同亚型 AIV 的靶细胞出现裂解。我们观察到感染 H6、H7 或 H9 的靶细胞的裂解下降，这表明异源病毒的特异性下降。脾脏 T 细胞不会裂解未感染病毒的靶细胞，其自发裂解的百分比 < 5%（数据未显示）。

### 3.5 H5 病毒 HA 蛋白序列（246-260）比对

由于接种活病毒可以刺激细胞免疫，我们试图将之前公布的 A/turkey/Ireland/1378/83 H5N8 病毒 HA 基因中的 MHC I 和 II 型氨基酸残基与本研究中所使用的禽流感病毒进行比对。MHC I / II 型肽，H5（<sub>246-260</sub>），与本研究中的各个 H5，H6，H7，H9 分离株的 HA 基因的同源性在 50% 到 88% 之间。不出所料，H5N1 和 H5N2 亚型病毒与 H5 病毒的同源性最高，为 88%，其 CTL 活性也对应增加（表 2）。有趣的是，有三个氨基酸残基，246 位的色氨酸（W），249 位的亮氨酸（L）和 251 位的脯氨酸（P），在所有检测病毒的 HA 基因中均保守。





## EGGS PROGRAM

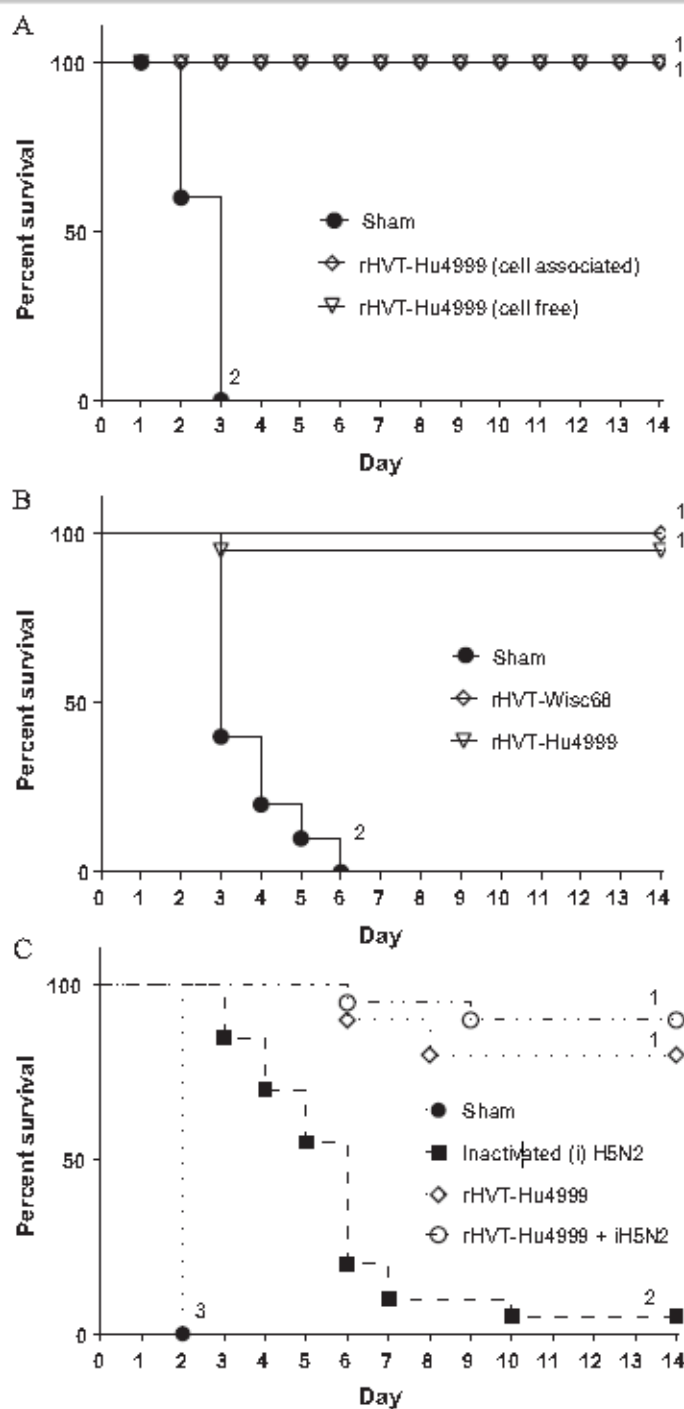


图1. 免疫鸡对于同源或异源H5亚型高致病性禽流感病毒保护效果的Kaplan-Meier生存曲线。

试验 I, 未免疫组(Sham)或1日龄免疫细胞结合型(ca)或无细胞型(cf)HVT-Hu4999疫苗组, 在6周龄进行同源HPAI H5N1攻毒后的鸡群存活情况(A)。

试验 II, 1日龄免疫 rHVT - Hu4999 组, 10日龄免疫 iH5N2 (CM94) 组或两种疫苗联合免疫组。在4周龄使用异源高致病性禽流感印尼源 H5N1 (CW07) (分支 2.1.3) 进行攻毒后的鸡群存活情况(B)。

试验 III, 1日龄免疫 rHVT - Hu4999 或 rHVT - Wisc68 组, 在4周龄使用异源墨西哥源 H5N2 (CQ94) 进行攻毒后的鸡群存活情况(C)。每个生存曲线旁边的个体图形内的不同数字表示疫苗组之间的存活曲线存在统计差异 ( $p < 0.05$ )。



## EGGS PROGRAM

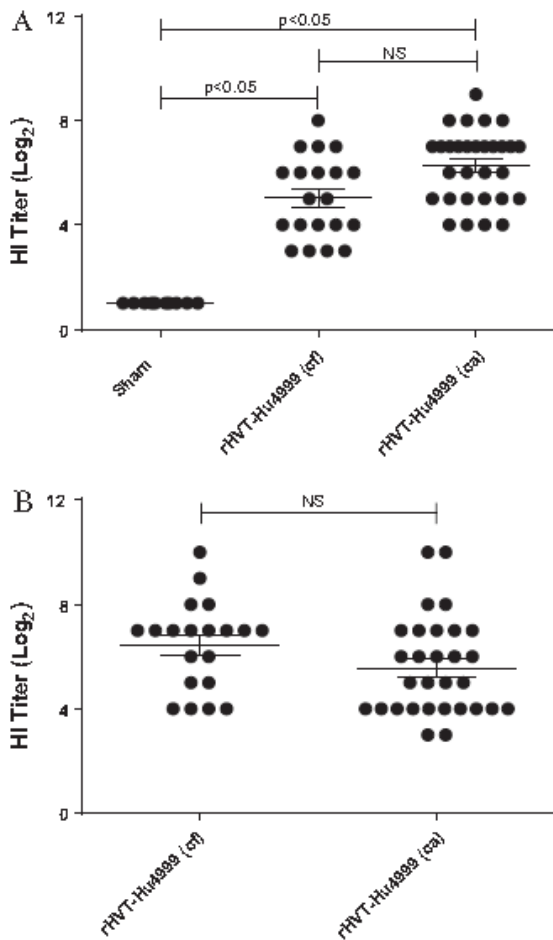


图 2

图 2. 试验 I 中各试验组的个体 HI 滴度 (log<sub>2</sub>) 和标准误差 (A) 免疫后 5 周 (攻毒前) (B) 攻毒后 2 周。使用 Tukey 多重比较检验的方差分析来比较平均滴度之间的统计学差异是否显著 (P < 0.05)。Sham: 未接种疫苗/ HAPI 攻毒组; rHVT - Hu4999 细胞结合型疫苗 (ca) 接种/ HAPI 攻毒组; rHVT - Hu4999 无细胞型疫苗 (cf) 接种/ HAPI 攻毒组。NS = 无显著差异。

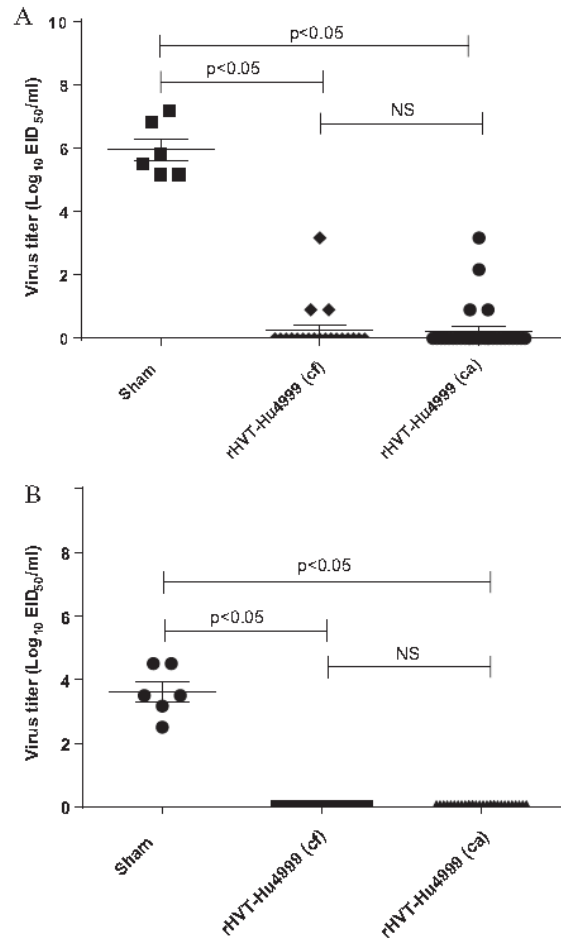


图 3

图 3 试验 I 攻毒 2 天后各组咽拭子 (A) 和泄殖腔拭子 (B) 中的病毒滴度。鸡只在 1 日龄单剂量免疫细胞结合型 (ca) 或无细胞型 (cf) rHVT - Hu4999 疫苗, 6 周龄时进行同源高致病性禽流感 H5N1 攻毒。病毒滴度表示为 log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub>/ml。检测下限是 0.9 log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub>/ml。使用 Tukey 多重比较方差分析检验各组平均滴度之间的统计差异显著性 (P < 0.05)。NS = 无显著差异。





## EGGS PROGRAM

**表 1.** 试验 I 中同源 H5N1 毒株 A/whooper swan/Mongolia/3/2005 攻毒后各组鸡只的病毒分离率。细胞结合型(ca)或无细胞型(cf)rHVT - Hu4999 疫苗免疫鸡只在攻毒后 2 和 4 天采集口腔和泄殖腔拭子样品。

组别	2dpc <sup>a</sup>		4dpc <sup>b</sup>	
	咽拭子	泄殖腔拭子	咽拭子	泄殖腔拭子
1.rHVT+Hu4999ca	4/30 <sup>a</sup>	0/30 <sup>a</sup>	0/30	0/30
2. rHVT+Hu4999cf	3/20 <sup>a</sup>	0/20 <sup>a</sup>	1/20	0/20
3.Sham 对照组	6/6 <sup>b</sup>	6/6 <sup>b</sup>	未检测	未检测

a# 攻毒后 2 天的排毒数/总数。小写字母表示采用 Fisher 精确检验，组间差异显著 ( $p < 0.05$ )。

b#攻毒后 4 天的排毒数/总数。

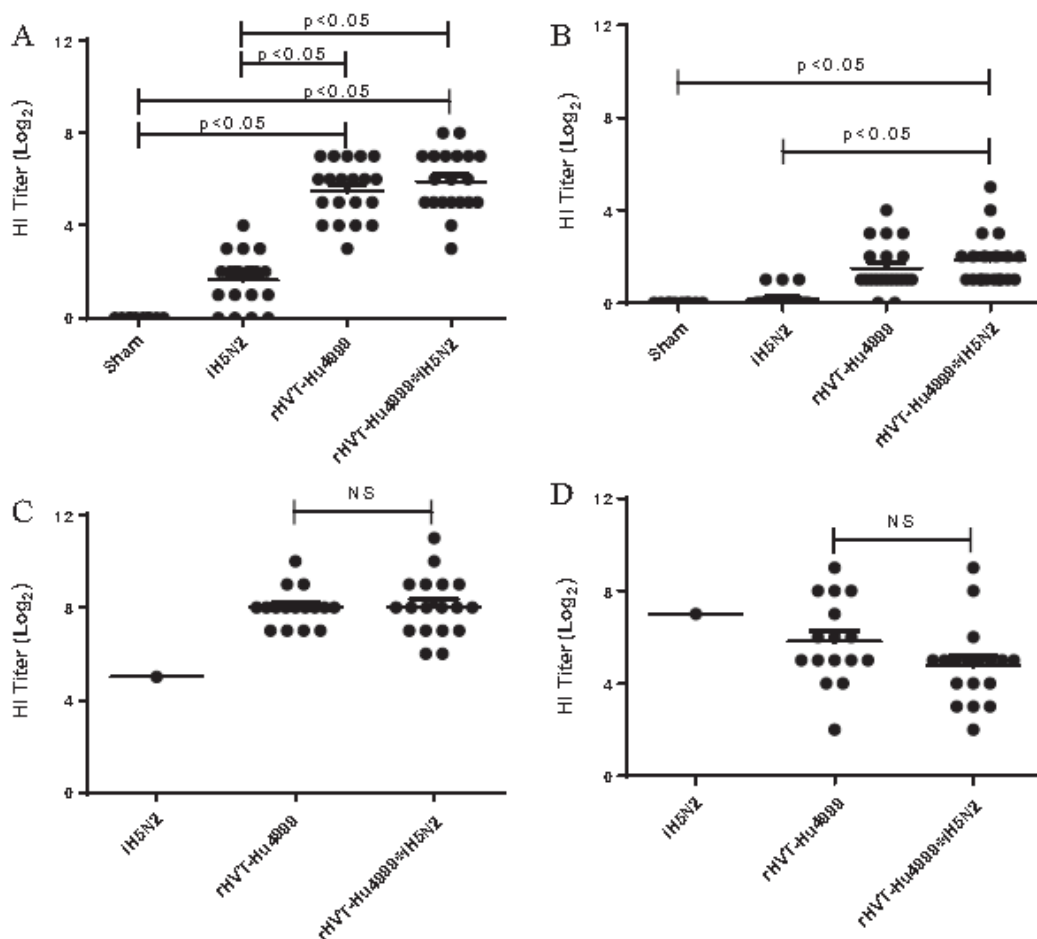


图 4. 试验 II 中各试验组的个体 HI 滴度 (log<sub>2</sub>) 和标准误差。使用同源 SM05 抗原 (A) (C) 和异源 CW07 抗原 (B) (D) 进行 HI 滴度的检测。图中显示的分别是攻毒前滴度 (A)，(B) 和攻毒 2 周后滴度 (C)，(D)。使用 Tukey 多重比较检验的方差分析来比较平均滴度之间的统计学差异是否显著 ( $P < 0.05$ )。NS = 无显著差异。



## EGGS PROGRAM

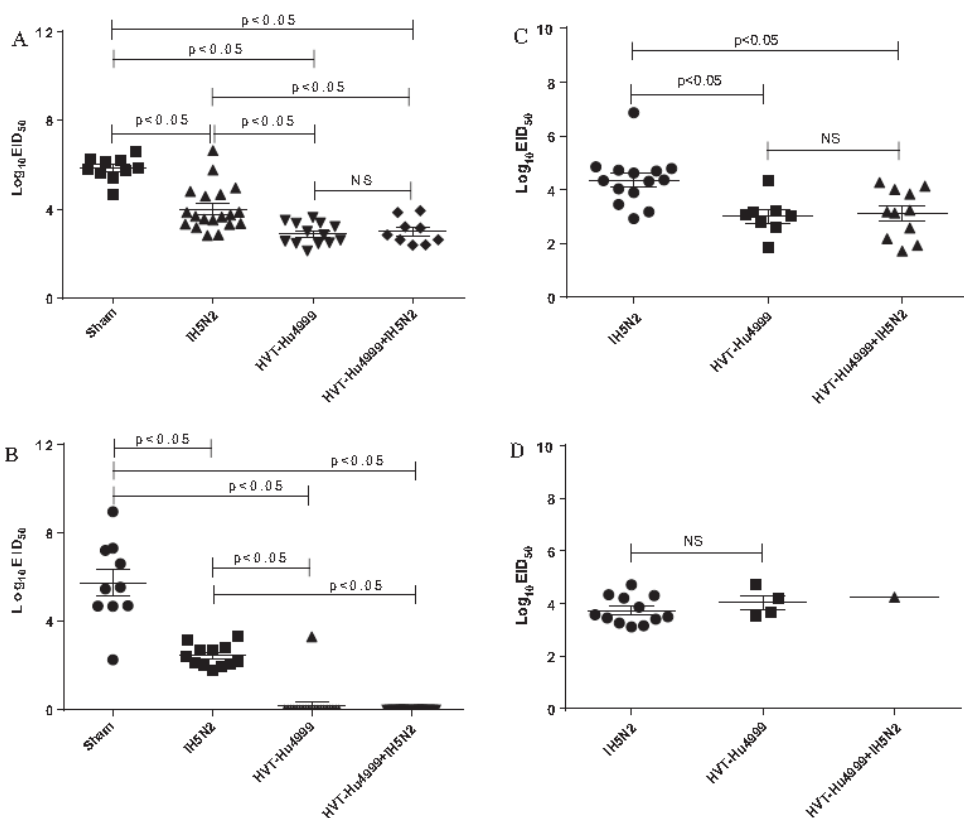


图5. 试验 II 攻毒后第 2 天 (A), (B) 和第 4 天 (C), (D) 的病毒滴度。1 日龄单独免疫单剂量 rHVT - Hu4999 组; 1 日龄免疫 rHVT - Hu4999, 然后 10 日龄免疫 iH5N2 疫苗组; 10 日龄单独免疫灭活 H5N2 疫苗组; PBS 接种组 (sham)。4 周龄使用 HPAI 印尼源 H5N1 病毒 CW07 株对鸡只进行滴鼻攻毒, 攻毒剂量为 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>。咽拭子 (A) (C) 和泄殖腔拭子 (B), (D) 中的病毒滴度表示为 log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub>/毫升。检测下限是 0.9log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub>/毫升。使用 Tukey 多重比较检验的方差分析来比较平均滴度之间的统计学差异是否显著 (P < 0.05)。NS = 无显著差异。

表 2.

A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) HA 序列已知的 MHC I 型和 II 型肽与本研究中所使用 H5 毒株的 HA 表位的序列比对。

氨基酸序列 <sup>a</sup>	毒株名称	亚型	相似性
WTILKPSDTINFESN	A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8	100
WTILKPND <sup>a</sup> INFESN	A/Swan/Hungary/4999/06	H5N1	88
WTILKPND <sup>a</sup> INFESN	A/Whooper Swan/Mongolia/3/05	H5N1	88
WTILKPND <sup>a</sup> INFESN	A/chicken/West Java Sbg/29/07	H5N1	88
WTILRPND <sup>a</sup> SINFEST <sup>a</sup>	A/chicken/Queretaro/14588-19/95	H5N2	75
WTILRPND <sup>a</sup> AI <sup>a</sup> SFESN	A/turkey/Wisconsin/68	H5N9	75
WSVLKPGETLN <sup>a</sup> VSEN	A/chicken/California/203/03	H6N2	50
WLLDPNDT <sup>a</sup> VTFTEN	A/turkey/Virginia/4259/02	H7N2	50
WSVLKPGQTL <sup>a</sup> RVRSN	A/chicken/New Jersey/12220/97	H9N2	50

a 加粗的氨基酸残基代表在所有分离株的同一位置的序列相同。氨基酸下划线表示与 A/turkey/Ireland/1378/83 序列存在差异。



## EGGS PROGRAM

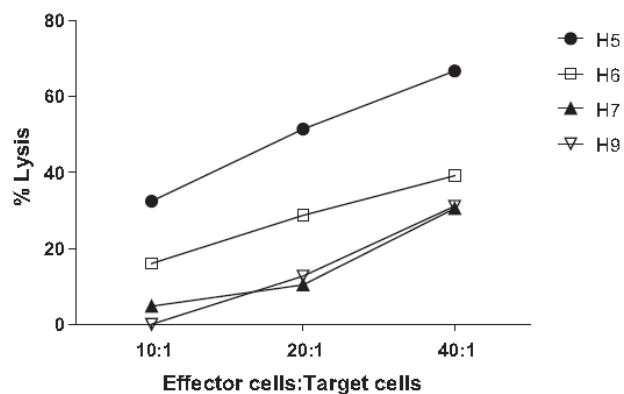
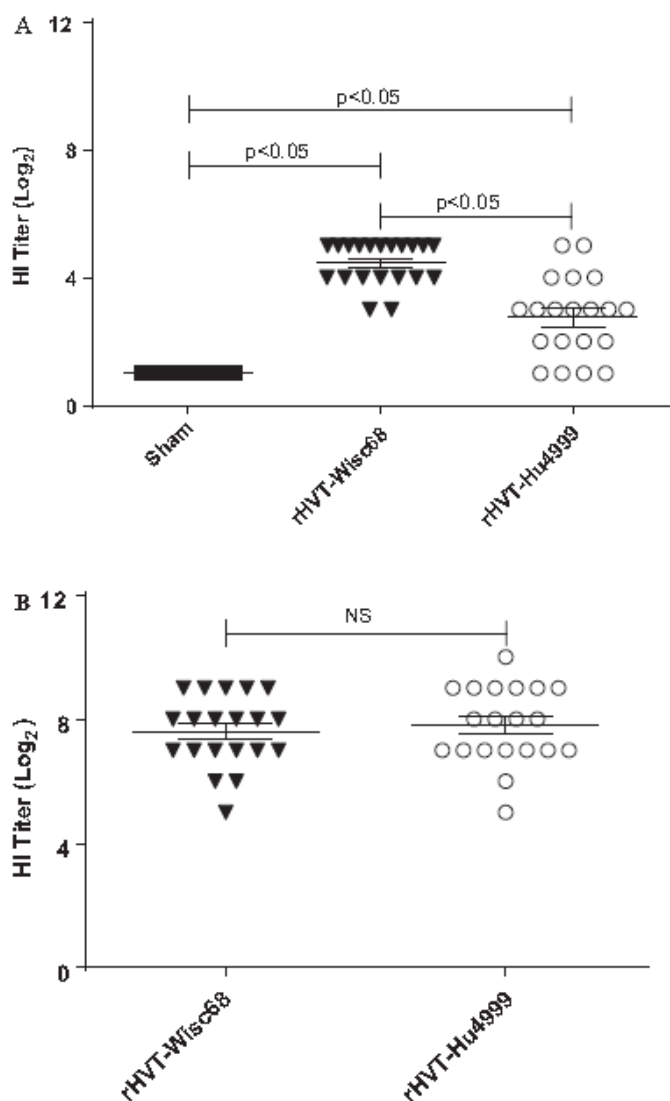


图 7. rHVT-Hu4999 免疫 B2B2 鸡只分离的脾脏淋巴细胞的细胞毒性检测。效应细胞取自免疫 4 周后的鸡只脾脏。在加入效应细胞前 16h, 使用 H5N9, H6N2, H7N2 或 H9N2 LPAI 感染 B2B2 肺脏靶细胞 (靶细胞)。通过测定裂解细胞的乳酸脱氢酶的释放来检测 CTL 活性。

图 6. 试验 II 中 (A) 免疫后 3 周 (攻毒前) 和 (B) 攻毒后 2 周 (攻毒后) 各试验组的个体 HI 滴度 ( $\text{log}_2$ ) 和标准误差。使用异源 CQ95 H5N2 病毒作为抗原。使用 Tukey 多重比较检验的方差分析来比较平均滴度之间的统计学差异是否显著 ( $P < 0.05$ )。NS = 无显著差异。





EGGS  
PROGRAM

#### 4. 讨论

禽流感始终是最重要的人畜共患病之一。自 1996 年以来，东南亚地区的 H5N1 病毒持续进化，中国最近爆发的 H7N9 病毒和意大利爆发的 H7N7 病毒均说明了这一点。尽管许多国家已经在控制禽流感病毒的过程中将禽流感全病毒灭活抗原制成的油乳剂疫苗作为一种辅助手段，但除了在疫苗与野毒株抗原性完全匹配的状态下，其控制效果并没有达到最佳状态。除此之外母源抗体的干扰也会造成灭活病毒疫苗无法发挥作用。

本研究结果表明，在 1 日龄单独免疫细胞结合型或无细胞型 rHVT - Hu4999 疫苗可以提供抵抗同源高致病性禽流感毒株攻毒的完全保护作用。与未免疫攻毒对照组相比，各免疫组的排毒均显著下降。由于感染鸡只的病毒排出是造成易感鸡之间病毒传播的主要原因，排毒的减少同样会降低病毒传播的可能性。之前的研究已经证明了该载体疫苗可以抵抗 2.2.1 分支同源性埃及源高致病性禽流感 H5N1 病毒的感染。

我们通常认为细胞结合型 HVT 疫苗比无细胞型 HVT 疫苗的免疫效果更加显著，尤其是在母源抗体存在的情况下。由于无细胞型疫苗在运输和储藏的过程中比需要液氮储存的细胞结合型疫苗更加具有优势，因此，我们在本试验中检测了这两种形式的疫苗的免疫效果。在本试验中这两种形式的疫苗均可以起到完全保护作用，两种形式的疫苗之间并不存在保护效果的差异。

我们的研究结果还表明，rHVT-Hu4999 疫苗可以为不同分支的 H5N1 以及墨西哥 H5N2 分离株提供异源保护作用。该疫苗提供的免疫保护作用还包括，与未免疫攻毒对照组相比，各组的排毒均显著降低。然而，与同源毒株攻毒组相比，异源毒株攻毒组的 HI 效价显著升高，这说明病毒在体内的复制增加。除此之外，将疫苗中的 HA 片段替换为 Wisc68HA，结果显示，它可以提供针对墨西哥源 H5N2 分离株的完全保护作用，排毒量更低。

攻毒之前 rHVT-Hu4999 疫苗可以刺激 HI 抗体的产生，当使用同源 HA 抗原进行检测时，其平均滴度介于  $2^5$  与  $2^6$  之间。然而，当使用异源 HA 抗原如 CQ95 H5N2 病毒和 CW07 H5N1 病毒制备的抗原进行检测时，rHVT-Hu4999 免疫组 HI 滴度明显降低，介于  $2^1$  到  $2^3$  之间。尽管如此，rHVT - Hu4999 仍然提供了针对异源病毒感染的良好的保护效果，说明其他免疫因子的保护作用在抵抗禽流感病毒的过程中可能比抗体所起到的贡献更大。

人们对禽流感病毒感染鸡只诱导的细胞介导免疫（CMI）知之甚少。Seo 和 Webster 表明将 H9N2 感染鸡只的 AIV 致敏 T 细胞适应性转移到雏鸡，可以使其抵抗致死性 H5N1 病毒的感染（A/Chicken/Hong Kong/97）。已知 HVT 可以诱导细胞介导的免疫，并已证明可以诱导特异性细胞介导的免疫。我们对 HA 的特异性细胞免疫观察结果与上述结果一致。



## EGGS PROGRAM

我们的研究还表明，HVT 载体疫苗可以诱导识别禽流感病毒不同亚型的交叉反应 CTL 活性。最近 Haghighi 等人从一株 H5 禽流感病毒中鉴定出一个可以被鸡 T 细胞识别的 T 细胞表位。有趣的是，此表位被确定处于 HA 蛋白上，并可被 CD4 + 和 CD8 + 鸡 T 细胞识别。对本研究中使用病毒株的 HA 序列进行氨基酸比对，清楚地证明了这一蛋白序列的存在。但是，有必要进行进一步的研究，以确认这些表位是否与观察到的 rHVT - Hu4999 疫苗诱导的 CMI 有关。

总而言之，这项研究表明，表达 A/Swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) HA 基因的 HVT 载体 AI 疫苗可以对大部分的高致病性禽流感病毒，包括 2.2 分支和 2.1.3 分支的 H5N1 病毒和一株 H5N2 病毒感染提供保护。尽管抗体滴度并不能预示其对异源毒株感染的抵抗作用，我们观察到广泛的交叉反应性细胞免疫可以显著增强对病毒感染的保护作用。结合生物安全措施和监测程序，这种疫苗可能具有控制多个分支的高致病性禽流感病毒感染的潜力。