

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.12.024

· 综述 ·

## H7N9 禽流感病毒疫苗及其预防控制

### Vaccine, prevention and control of H7N9 avian influenza virus

刘倩 (LIU Qian), 陈复辉 (CHEN Fu-hui)

(哈尔滨医科大学第二附属医院, 黑龙江 哈尔滨 150006)

(The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150006, China)

[关键词] H7N9; 禽流感病毒; 疫苗; 预防; 保护性抗体; 免疫原性

[中图分类号] R373.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2015)12-0865-04

禽流感病毒有 6 个内部基因来自于 H9N2, 部分血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 基因源自 H7N3 和 H1N9。禽流感病毒能够感染人类, 可能与 HA 和 NA 基因发生了 Q226L 和 E627K 关键位点突变有关, 这两个突变被认为是病毒适应人类气道上皮的表现。此外, H7N9 具有哺乳动物流感病毒的特性, 如 HA 蛋白与哺乳动物细胞器结合, PB2 蛋白基因突变等<sup>[1]</sup>。人类感染后缺乏特异性临床表现, 很难早期诊断, 患者死亡的原因多为多器官功能衰竭综合征和单纯急性呼吸衰竭。虽然临床观察认为神经氨酸酶抑制剂可能具有抑制 H7N9 病毒复制的能力, 但是目前无大规模临床资料证实其疗效确切。本文就人感染禽流感病毒疫苗及预防控制的研究作一综述。

#### 1 H7 亚型禽流感病毒暴发情况

自 1959 年起, H7 亚型禽流感病毒引发多次暴发流行<sup>[2]</sup>。2003 年荷兰禽类养殖场 86 例感染 H7N7 禽流感病毒, 其中 1 例死亡<sup>[3]</sup>。2012 年墨西哥有 2 例确诊感染 H7N3 禽流感病毒<sup>[4]</sup>, 2013—2014 年我国共有 375 例确诊感染 H7N9 禽流感病毒, 其中 115 例死亡, 据统计, 住院患者病死率为 37%<sup>[5]</sup>, 估计实际可能有 27 000 例感染。男性感染率及病死率均高于女性, 高龄及患有基础疾病是增加病死率的危险因素<sup>[6]</sup>。

#### 2 H7N9 禽流感病毒的人际传播

2.1 人际传播的可能性 H7N9 禽流感病毒感染在我国暴发。据文献<sup>[7]</sup>报道, 医务人员感染率比普通人高, 上海有 2 个家庭出现家庭成员同时被感染, 很可能由家庭成员互相传染导致, 同时, 哺乳动物可以互相感染。此外, 研究<sup>[8]</sup>发现, 新型 H7N9 禽流感病毒的 HA 与 NA 基因片段上的若干氨基酸替换后, 可以和人受体  $\alpha$ -2,6Gal 及  $\alpha$ -2,3Gal 结合, 打破了病毒跨种属感染的障碍。由于病毒变异的时间、空间及方向均不确定, 因此不能排除人感染人的可能性。

2.2 可能存在的传播途径 飞沫传播是目前研究的热点, 徐晓龙等<sup>[9]</sup>从人体分离到的病毒株感染小鼠后小鼠的体重明显减轻, 部分病毒株可以通过飞沫引起雪貂之间的传播, 而雪貂对流感病毒的易感性与人类接近。目前已经检测到关键位点 E627K 和 Q226L 的氨基酸突变, 若病毒在变异过程中出现更多关键氨基酸位点突变, 则哺乳动物之间通过飞沫传播的可能性将会大大增加<sup>[7]</sup>。但是, 目前实验证明病毒在雪貂之间传播的可能性有限<sup>[10]</sup>。研究结果显示, 小白鼠被感染后其眼睛、咽分泌物、粪便均具有感染性<sup>[11]</sup>, 其中咽分泌物的感染性最高, 提示存在飞沫传播的可能性。

2.3 危害 人际传播可能导致全球大流行, 但是疫苗的研究需数月之久, 在获得疫苗之前可能已有数

[收稿日期] 2015-05-10

[作者简介] 刘倩(1986-), 女(汉族), 河北省雄县人, 硕士研究生, 主要从事重症肺炎研究。

[通信作者] 陈复辉 E-mail: chenfuhui2006@126.com

百万人丧生<sup>[12]</sup>。

### 3 传统季节性流感裂解疫苗新用法

2010—2011 年香港老年人全病因所致病死率和肺炎所致病死率监测结果显示:接种季节性流感疫苗能显著降低病死率。该疫苗具有良好的安全性,诱导分泌的保护性抗体滴度高于欧盟标准,可以促使人体生成记忆 B 细胞,且免疫记忆可以保持若干年,再次感染后,体内能够分泌大量保护性抗体。但是,该疫苗对 H7N9 禽流感病毒的交叉免疫反应微弱,不能用于预防该病毒感染<sup>[13]</sup>。有学者尝试在季节性流感裂解疫苗中加入适量的佐剂 MF59,结果诱导分泌的抗体滴度将明显增加,62% 受试者的抗体滴度 $\geq 40$ <sup>[5]</sup>。通常认为血凝抑制抗体滴度 $\geq 40$ 有预防感染的作用。与不加佐剂相比,达到相同滴度需要接种疫苗的剂量明显减少。这种剂量减少效应说明该疫苗有潜在的保护作用。而且加入佐剂后,B 细胞和 T 细胞的数量明显提高,再次接种后能够快速分泌血凝抑制抗体<sup>[5]</sup>。已有证据<sup>[13]</sup>表明,H5N1 裂解疫苗混合 MF59 后效果增强。1997 年欧洲已经允许 MF59 作为佐剂加入季节性裂解疫苗,在此之后,全世界共有约 65 000 000 人接种,调查显示安全性良好<sup>[14]</sup>。

### 4 新型疫苗的研究现状

4.1 减毒活疫苗 即毒性亚单位结构改变,毒性减弱,活性不变,保持抗原性的一类疫苗。H7N9-LAIV 疫苗(H7N9-LAIVc),是人工合成的包含 H7N9 病毒 HA 及 NA 基因片段和 6 个 A/Ruerto/Rico/8/34 病毒基因片段的基因重组序列,即重组病毒 PR8 基因片段,是一种减毒活疫苗。H7N9-LAIVc 具有良好的免疫原性和抗原性,并且小剂量接种即可诱导生成足够的保护性抗体<sup>[1]</sup>。HA 基因氨基酸位点 N133D、G198E 突变使得基因复制大量增加,疫苗产量可增加 10 倍。研究<sup>[15-16]</sup>证明,H7N9-LAIVc 疫苗对 H7N3、H7N7 有交叉免疫原性,因此推测其对同源和异源 H7 亚型禽流感病毒均具有免疫原性,为 H7-LAIVc 的研究提供了理论基础。

4.2 正痘病毒(MVA)相关性 H7N9 禽流感病毒 DNA 疫苗(MVA-H7)和 H7HA DNA 疫苗(pH7HA)

4.2.1 MVA-H7 MVA 是一种高度减毒、有复制

缺陷、具有良好的生物学和遗传学特性的病毒,MVA 已经作为病毒载体用于大量生产天花疫苗。将包含限制位点 HPaI 和 NOtI 的 H7-sh2 基因序列克隆转化到 MVA 的载体质粒,以 *mCherry* 作为标记基因,人工合成 PMK IIIred-H7 基因重组序列,然后去除 *mCherry* 基因,获得 MVA-H7-sh2 序列,即 MVA-H7<sup>[17]</sup>。实验表明,IgA 为保护性抗体,其滴度 $\geq 40$ 。H7 亚型交叉免疫能够检测到反应性抗体,疫苗接种后呼吸道内病毒复制明显减少<sup>[17]</sup>。同类的 MVA-H5 疫苗的安全性和免疫原性可靠,已经进入 I 期临床实验阶段<sup>[18]</sup>,小剂量接种即可达到保护目的。H7-sh2 取自 A/Shanghai/2/2013 病毒 HA 基因,该核苷酸序列足够用于建立一个病毒基因库,相关技术成熟,可以支持疫苗快速批量生产。

4.2.2 pH7HA 利用密码子优化技术获得 H7HA 基因序列,在巨细胞病毒立早启动子的控制下,将 H7HA 克隆到 PGX0001 质粒,得到目的核苷酸序列,即 pH7HA 该疫苗诱导分泌的血凝抑制抗体(HAI)是主要的保护性抗体,经检测发现抗体滴度可达到保护剂量。同样方法合成的 HPV E6/E7 DNA 疫苗可以诱导生成足量抗-HPV 抗体,且其高滴度维持 6 个月不下降<sup>[19]</sup>。除了体液免疫外,pH7HA 还促使发生细胞免疫,特异性 CD8T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  和 CD-107a 较未免疫者明显增加。CD8T 细胞使被病毒感染的细胞裂解,从而将其清除,同时在 CD4T 细胞的协助下保持免疫记忆,CD4T 细胞还会帮助 B 细胞分泌抗体。从检测到病原体,到大量生产疫苗只需要数月<sup>[19]</sup>。因此 pH7HA 有望应用于预防 H7N9 禽流感病毒大流行。

4.3 病毒样颗粒疫苗(VLP 疫苗) H7N9 禽流感病毒的 HA 和 NA 基因及 H5N1 的基质蛋白(M1)基因克隆到杆状病毒载体,导入 SF9 细胞后自行组装成 H7N9 病毒样颗粒,即病毒样颗粒疫苗(H7N9-VLP)。目前起保护性的抗体尚未明确,可能是 IgG 或 IgM,也可能两者都是<sup>[20]</sup>。人类接受重组禽流感病毒疫苗 H5N1-VLP 免疫后,H5N1 感染发病率明显降低,但该疫苗对 H7N9 易感人群无保护作用,H7N3-VLP 可对同源的 H7N9 表现出交叉免疫作用。

### 5 预防和控制 H7N9 禽流感病毒

5.1 控制活禽市场 该病毒的传染源不明确,80%

的患者有直接或间接的禽类接触史,怀疑传染源和环境污染有关,如污水和禽类粪便<sup>[21]</sup>。调查<sup>[21]</sup>显示,关闭活禽市场可以降低感染率,然而在文化水平较低的地区这一举措所起作用不大。捕杀被感染的禽类和给予易感染的禽类接种疫苗也能够降低感染率。

**5.2 加强公共场所管理** 公共场所人口密集,流动性大,是呼吸道传染病传播的主要场所。必须建立健全组织规章制度,提高卫生质量,如环境卫生、饮食及饮水卫生、公共设施卫生和个人卫生等。加强消毒管理,落实消毒措施,完善卫生监督、监测管理制度,一旦发现感染患者立即向有关部分报告,同时将患者送往定点医疗机构治疗。

**5.3 规范医院管理制度** 包括对医务工作者及患者的管理。工作过程中医护人员,尤其是护士不可避免与患者近距离接触,甚至会接触到患者的分泌物,增加了感染的概率。医护工作者在进出隔离区时必须做好自身的消毒工作,按规定戴好帽子、口罩,穿脱隔离衣,避免将病毒带出隔离区。医院有义务设立专门的诊室和病区,患者和疑似感染者分室隔离,减少互相传染的机会,处理好被隔离人员的饮食住宿及家属探视问题。

**5.4 传染病相关知识的宣传教育** 相关部门需积极组织宣传传染病相关知识,让更多的人知晓其危害,主动做好自身防护,提高人们对 H7N9 的认识程度对遏制其传播有重要意义。2003 年初 SARS 突降人类时,我们对其一无所知,随着 SARS 防控知识的宣传及健康教育举措的实施,人们逐渐认识了此病,并养成了良好的个人习惯,如保持居室自然通风、不去人群密集的场所、佩戴口罩、勤洗手、增加营养和户外活动等,在切断传染途径这一环节起了重要作用。

**5.5 及时发现并治愈患者** 患者缺乏特异性临床表现,实验室和影像学检查,几乎所有入院患者的临床表现与肺炎一致,主要为疲劳、发热、咳嗽、肌肉酸痛、腹泻。重症者可能出现意识错乱、呼吸急促。某些轻症者缺乏呼吸道症状。据统计 H7N9 禽病毒感染的住院患者 53% 谷丙转氨酶 (ALT)、73% 谷草转氨酶 (AST)、47% 血糖、93% CRP 高于正常,33% 出现低血钾<sup>[22]</sup>,肺部 CT 可见磨玻璃影<sup>[23]</sup>。根据病情严重程度选择不同的给氧方式,如鼻导管法、无创呼吸机辅助呼吸、气管插管。早期静脉应用肾上腺皮质激素对治疗无好处,如 H1N1 流行期间曾经用肾上腺皮质激素控制发热和炎症反应<sup>[24]</sup>,引起

患者出现二重感染,甚至增加病死率<sup>[25]</sup>。有报道称,奥司他韦、帕拉米韦、扎那米韦抗病毒治疗有效<sup>[26]</sup>,但是其效果尚未被证实。

H7 亚型禽流感病毒一直威胁着人类的健康和生命,给社会和个人造成沉重的经济负担,截止现在其传染源尚未确定,怀疑被感染的禽类是最主要的传染源。人类目前尚无办法预测其变异方向,缺乏特异性诊断和治疗的方法。病例追踪研究显示,感染 H7N9 后痊愈的患者血清中检测出终生免疫抗体<sup>[27]</sup>,同时基于 H7N9 病毒株研究获得的部分疫苗表现出同源交叉免疫,说明人类有可能得到一种对所有 H7 亚型病毒具有免疫原性的疫苗,这种疫苗将会是一种很好的预防手段,可减少人们痛苦,减轻社会负担。

#### [参考文献]

- [1] Chen Z, Baz M, Lu J, et al. Development of a high-yield live attenuated H7N9 influenza virus vaccine that provides protection against homologous and heterologous H7 wild-type viruses in ferrets [J]. *J Virol*, 2014, 88(12): 7016 - 7023.
- [2] DeLay PD, Casey HL, Tubiash HS, et al. Comparative study of fowl plague virus and a virus isolated from man [J]. *Public Health Rep*, 1967, 82(7): 615 - 620.
- [3] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (5): 1356 - 1361.
- [4] Lopez-Martinez I, Balish A, Barrera-Badillo G. Highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus in poultry workers, Mexico, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(9): 1531 - 1534.
- [5] Mulligan MJ, Bernstein DI, Winokur P, et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2014, 312(14): 1409 - 1419.
- [6] Wu J, Zou L, Ni H, et al. Serologic screenings for H7N9 from three sources among high-risk groups in the early stage of H7N9 circulation in Guangdong Province, China [J]. *Virol J*, 2014, 11: 184.
- [7] Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice [J]. *Nature*, 2013, 501(7468): 556 - 559.
- [8] Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7 N9) virus [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 500 - 503.
- [9] Xu X, Bao H, Ma Y, et al. Simultaneous detection of novel H7N9 and other influenza A viruses in poultry by multiplex real-time RT-PCR [J]. *Virol J*, 2015, 12: 69.

- [10] Zhang Q, Shi J, Deng G, et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet [J]. *Science*, 2013, 341(6144):410-414.
- [11] Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs [J]. *Science*, 2013, 341 (6142):83-186.
- [12] Zhu W, Shu Y. Genetic tuning of avian influenza A (H7N9) virus promotes viral fitness within different species [J]. *Microbes Infect*, 2015, 17(2):118-122.
- [13] Xi X, Xu Y, Jiang L. Hospitalized adult patients with 2009 influenza A(H1N1) in Beijing, China; risk factors for hospital mortality[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10:256.
- [14] Uyeki TM, Cox NJ. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1862-1864.
- [15] Dai J, Zhou X, Dong D, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus: serial chest radiographic and CT findings [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127 (12):2206-2211.
- [16] Min JY, Vogel L, Matsuoka Y, et al. A live attenuated H7N7 candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice, ferrets, and monkeys [J]. *J Virol*, 2010, 84(22):11950-11960.
- [17] Kreijtz JH, Wiersma LC, De Gruyter HL, et al. A Single immunization with modified vaccinia virus Ankara-based influenza virus H7 vaccine affords protection in the influenza A (H7N9) pneumonia ferret model [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211 (5):791-800.
- [18] Kreijtz JH, Suezter Y, de Mutsert G, et al. MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (11):e7790.
- [19] Yan J, Villarreal DO, Racine T, et al. Protective immunity to H7N9 influenza viruses elicited by synthetic DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (24):2833-2842.
- [20] Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, et al. 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[J]. *Vaccine*, 2013, 31 (40):4305-4313.
- [21] Fuhrman C, Bonmarin I, Paty AC, et al. Severe hospitalised 2009 pandemic influenza A (H1N1) cases in France, 1 July-15 November 2009[J]. *Euro Surveill*, 2010, 15(2). pii:19463
- [22] Fuller T, Havers F, Xu C, et al. Identifying areas with a high risk of human infection with the avian influenza A (H7N9) virus in East Asia [J]. *J Infect*, 2014, 69(2):174-181.
- [23] Joseph T, McAuliffe J, Lu B, et al. A live attenuated cold adapted influenza A H7N3 virus vaccine provides protection against homologous and heterologous H7 viruses in mice and ferrets [J]. *Virology*, 2008, 378 (1):123-132.
- [24] Yang Y, Guo F, Zhao W, et al. Novel avian-origin influenza A (H7N9) in critically ill patients in China [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43 (2):339-345.
- [25] Wu J, Zou L, Ni H, et al. Serologic screenings for H7N9 from three sources among high-risk groups in the early stage of H7N9 circulation in Guangdong Province, China [J]. *Virology*, 2014, 11:184.
- [26] Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine; a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza [J]. *Lancet*, 2001, 357 (9272):1937-1943.
- [27] Cowling BJ, Jin L, Lau EH, et al. Comparative epidemiology of human infectious with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases [J]. *Lancet*, 2013, 382(9887):129-137.

(本文编辑:熊辛睿)