

我国禽流感研究进展及成就

张毅^{1,2} 王幼明¹ 王芳² 王静静¹ 毕玉海³ 尹燕博^{4*} 丁家波^{2*}

(1. 中国动物卫生与流行病学中心 山东 青岛 266032)

(2. 中国兽医药品监察所 北京 100081)

(3. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

(4. 青岛农业大学 山东 青岛 266109)

摘要: 禽流感不仅严重危害养禽业, 而且给公共卫生造成巨大威胁。为了科学认识和积极防控禽流感, 我国科学家进行了大量且富有成效的研究, 取得了举世瞩目的成果。通过长期的监测, 基本掌握了禽流感在我国的流行情况和进化规律; 利用反向遗传操作技术和蛋白质组学技术, 发现了影响流感病毒致病力、传播力和受体结合能力的部分关键位点, 阐释了其作用机制; 通过对传统技术的改进和先进方法的应用, 不断成功建立禽流感诊断、检测技术; 新型禽流感疫苗不断涌现并逐步被推广和应用, 取得了良好的免疫效果。上述成果为我国禽流感的防控奠定了良好的基础, 也为后续研究提供了依据。但是禽流感的防控形势依然严峻, 2013年新型H7N9病毒的出现, 使禽流感的防控面临新的挑战。

关键词: 禽流感, 研究进展, 致病机制

Progress and achievements in the research on avian influenza in China

ZHANG Yi^{1,2} WANG You-Ming¹ WANG Fang² WANG Jing-Jing¹ BI Yu-Hai³
YIN Yan-Bo^{4*} DING Jia-Bo^{2*}

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

(2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(4. Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Avian influenza caused great harms to avian industry, and posed great threaten to public health. In order to scientifically control and prevent avian influenza, China scientist have finished a series of great work on basic and applied researches, and acquired wonderful spotlight achievements in world. Through long-term surveillance, characterists of epidemiology and evolution of avian in-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101302); 国家自然科学基金项目(No. 31272535); 山东省现代农业产业技术体系家禽创新团队建设项目(No. SDAIT-13-011-03)

*通讯作者: 丁家波: Tel: 86-10-62103675; ✉: dingjiabo@126.com

尹燕博: ✉: yanboyin2011@163.com

收稿日期: 2013-09-27; 接受日期: 2014-01-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-15

fluenza in China have been clarified. Using reverse genetics and protein techniques, the key amino acids contributing to pathogenicity and transmissibility were found out, and the mechanism behind was explored. Avian influenza vaccines were developed and popularized, accompanied with consistent emergence of new vaccine. These scientific researches have established firm foundation to avian influenza prevention and follow-up studies. However, avian influenza viruses, especially the novel H7N9 virus, still pose great threats to us. Therefore, in order to prevent and control avian influenza thoroughly, greater efforts on research are warranted.

Keywords: Avian influenza, Research progress, Pathogenesis

禽流感是由禽流感病毒(AIV)引起的一种禽类传染病,鸡、火鸡、鸭和鹌鹑等家禽均可感染,发病情况差别较大,有的出现急性死亡,有的无症状带毒。水禽是 AIV 的自然宿主,也是流感病毒的天然基因库,几乎所有亚型的流感病毒都可以在水禽中分离到^[1]。在世界范围内,家禽中流行的主要有 H5、H6、H7、H9 等亚型。H5 和 H7 亚型的某些毒株可以造成禽类很高的发病率和死亡率,被称为高致病性禽流感(HPAI)病毒。OIE 将高致病性禽流感列为 A 类动物疫病,我国也将其列为一类动物疫病^[2]。

高致病性禽流感不仅可对养禽业造成毁灭性打击,而且能够持续不断地跨种间传播感染人类,人感染后死亡率高达 60%。今年我国又暴发了 H7N9 亚型禽流感疫情,截至目前,已造成了 134 人感染,45 人死亡,使得人们对禽流感心存恐惧。为了科学认识和有效防控禽流感,我国科学家对禽流感做了大量的研究,并取得了举世瞩目的成就。本文对我国在禽流感流行病学、病原学、诊断技术及疫苗研制等方面的重要研究进展作一回顾,以期对后续的禽流感研究提供参考。

1 禽流感流行病学研究

由于我国幅员辽阔,水系丰富,水禽养殖量巨大,又是候鸟重要的迁徙地,因此我国的生态环境尤其是华南地区,非常适合流感病毒的贮存和传播。1975-1978 年,香港大学专家对香港本地及大陆地区出口到香港的活禽进行了持续监测,分离到 62 株 AIV,包括 H3N2、H3N6、H3N9、H6N4、H1N1 等亚型^[3]。1980 年南京农业大学的徐为燕等

从活禽屠宰场外表健康的禽类中分离到 H4、H5、H6 等亚型 AIV^[4]。1995-1999 年唐秀英等从发病的禽群中分离到 28 株低致病性禽流感病毒,其中包括 H9N2、H3N2、H1N1、H3N8、H4N6 等亚型^[5]。各种亚型 AIV 在野禽和家禽中不断被分离,体现了禽流感在我国流行的复杂性。根据兽医系统近年来的监测数据和专家学者的研究报道,目前在国家禽中主要流行 H5N1 亚型高致病性禽流感及 H9N2 亚型低致病性禽流感^[6]。

1996 年,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所从广东一个鹅场分离到 H5N1 亚型 AIV,命名为 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1),这是我国第一次分离到高致病性禽流感病毒^[5]。通过整理 OIE 官网报道的我国 H5N1 疫情数据,从 2004 年初到 2013 年 6 月,我国已发生 100 余起 H5N1 疫情。2004 年初开始大量出现,2004-2005 年我国共发生 82 起 H5N1 高致病性禽流感疫情,2006 年开始逐渐减少并趋于平稳。H5N1 亚型禽流感在流行的同时,也在不断进行着基因演化。哈尔滨兽医研究所和中国动物卫生与流行病学中心对我国流行的 H5N1 亚型 AIV 进行了长期监测,对流行毒株的遗传进化分析发现:近年来我国鸡群中流行的 H5N1 亚型 AIV 主要属于 Clade2.3.2、Clade2.3.4 和 Clade7,不同 Clade 毒株间的抗原性有一定的差异,疫苗株 Re-6 主要针对 Clade2.3.2, Re-5 主要针对 Clade2.3.4, Re-4 主要针对 Clade7^[7-8]。

1994 年,陈伯伦等首次从我国广东某鸡场发病鸡体内分离到 H9N2 亚型病毒^[9]。近几年来,在我国部分商品产蛋鸡场及养鸡专业村的 AIV 调查中发现,H9 亚型阳性鸡群占总的 AIV 抗体阳性鸡

群的 93.67%, 说明 H9 亚型 AIV 广泛存在^[10]。香港大学和哈尔滨兽医研究所等单位发表的监测数据显示, H9N2 亚型 AIV 在我国(特别是南方地区)持续流行, 且宿主范围广泛, 包括鸡、鸭、珍珠鸡、鹌鹑等^[11-14]。病毒进化分析表明, 我国禽群中主要流行 Y280-like 和 G1-like 两个分支的 H9N2 亚型 AIV。其中在我国鸡群中主要流行 Y280-like 分支病毒, 而 G1-like 分支病毒仅在鹌鹑等珍禽中流行。另外, Y439-like 和 Ty/66-like 分支病毒在我国也偶尔被分离到, 但没有形成流行^[15-16]。

H5 和 H9 亚型流感病毒在我国禽中广泛流行, 而且已形成了不同的进化谱系, 各谱系毒株之间的抗原性也存在一定的差异, 这给禽流感的预防带来了难度。在家禽养殖卫生状况调查中, 我们还发现部分养殖场在选址规划时, 鸡场和鸭场之间距离过短, 甚至在同一养殖场内混养鸡和水禽, 这就给禽流感的传播提供了条件。养殖规模较小的养禽场饲养管理水平和生物安全防护措施普遍较差, 而这种养殖场在我国养殖密度较高的地区大量存在, 这又从客观上给禽流感的防控造成了巨大的漏洞。因此可以预计在较长的一段时间里, 禽流感在我国仍会广泛流行, 并对家禽养殖业造成危害。

2 禽流感病原学研究

为了科学认识和防控禽流感, 需要了解病毒的致病性和传播性, 以及引起这些生物学特性发生改变的分子机制。为此, 我国科学家进行了大量的基础性研究, 尤其是对 H5N1、H9N2 和 H7N9 这些危害严重, 且具有重要公共卫生学意义的亚型。

在流感病毒的致病和传播机制研究方面, 哈尔滨兽医研究所和中国农业大学等单位做了出色的工作。利用反向遗传和定点突变等操作技术, 已证实 H5N1 亚型禽流感病毒 PB2 蛋白 D701N, HA 蛋白裂解位点 P6 位的丝氨酸, 以及 NS1 蛋白 P42S 均与病毒对哺乳动物的致病力增强有关^[17-19]。H5N1 亚型流感病毒 PA 蛋白 S224P 和 N383D 的双突变可以显著增强病毒对鸭的致病力^[20]。H5N1 病

毒 HA 蛋白 160 位的丙氨酸和 PB2 蛋白 701 位的天冬酰胺, 对于病毒在豚鼠间的水平传播具有关键作用^[21]。H9N2 亚型流感病毒 HA 蛋白 A316S 和 NA 蛋白颈部氨基酸的缺失, 可以增强病毒对小鼠和鸡的致病力^[22]。H9N2 亚型禽流感病毒与 H1N1/2009 病毒基因组片段之间具有很好的兼容性, H1N1/2009 病毒 PA 基因能够显著增强 H9 亚型重组病毒对小鼠的致病性^[23]。Zhang 等将具有极强传播性的 H1N1/2009 病毒和高致病性 H5N1 病毒进行重组, 研究发现重组 H1N1/2009 病毒非结构蛋白和聚合酶蛋白基因可使得 H5N1 病毒获得在豚鼠间水平传播的能力, 对 HA 蛋白部分关键氨基酸进行突变可以增强病毒结合 α -2,6 唾液酸受体的能力。由于此项研究具有极大的危险性, 研究的利与弊引起了科学界人士广泛的争论, 然而科学研究本身并没有错, 我们需要解决的只是如何控制风险, 积极的利用理论成果^[24]。这些研究均从分子角度揭示了突变或重组对禽流感病毒致病力和传播力的影响, 并解释了其作用机制。研究结果对于预测流感的大流行和毒株致病力变化, 及研发新型抗流感药物均具有重要意义。

通过结构生物学技术可以从蛋白质水平认识禽流感病毒, 中国科学院在这个方面的研究走在了国际的前列。Shi 等首次解析了 H7N9 病毒 HA 蛋白的晶体结构, 并解释了 H7N9 病毒为何会感染人类及 HA 蛋白 226 位在结合人类上呼吸道 α -2,6 唾液酸受体中所起的作用^[25]。Zhang 等解析了 H5N1 亚型哺乳动物适应株的血凝素蛋白晶体结构, 从与受体结合的角度解释了部分关键氨基酸位点的突变可以增强病毒在哺乳动物之间的传播性^[26]。Lu 等首次解析出了 H15 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的晶体结构, 并发现该亚型 HA 蛋白裂解位点处的结构与其他亚型存在巨大差异^[27]。He 和 Yuan 等首次解析 H5N1 流感病毒聚合酶蛋白复合物的晶体结构, 为抗流感药物的研发奠定了基础^[28-29]。

这些高水平基础科研成果的不断涌现, 使得我

们从各个角度更加清晰地认清了禽流感病毒,也为禽流感的诊断、预防和治疗工作,提供了有力的理论依据。H7N9 这类新型流感病毒会不断出现,因此科研的步伐不能停止,而且要比病毒变异的速度还要快,我们才能更有信心战胜禽流感。

3 禽流感诊断技术

禽流感的早期诊断对于控制疫情具有重要的意义。目前对于禽流感的诊断主要包括对病毒抗原、流感特异性血清的检测和分子生物学检测。

传统的诊断方法包括病毒的分离和鉴定、琼脂凝胶免疫扩散实验、酶联免疫吸附实验、胶体金法等免疫学诊断技术。我国学者一直尝试改进传统的诊断技术,以提高其灵敏度和特异性。目前,哈尔滨兽医研究所已经研制出 H1-H15 和 N1-N9 的标准诊断及分型抗原和血清,在此基础上进一步建立了相应的 HI 检测方法,具有较高的特异性和准确性^[30]。邓国华等利用禽流感病毒 NP 表达蛋白,建立了琼脂凝胶免疫扩散诊断方法,可以检测出 H1-H15 亚型禽流感病毒的抗血清^[31]。王传彬等利用构建的 H5N1 亚型 HA 蛋白单克隆抗体,建立了 ELISA 检测方法,灵敏度提高到能检出 0.25 个血凝单位的 H5 亚型血凝素抗原^[32]。赵思婷将原核表达的 NS1 蛋白作为抗原,建立禽流感的 NS1-ELISA 鉴别诊断方法,可快速鉴别出野毒感染鸡群而非免疫鸡群的禽流感抗体水平^[33]。

分子技术诊断方法具有高特异性、高敏感性、快速省时等优点,随着近年来分子技术的迅猛发展,禽流感诊断技术取得了很大的进展。目前我国已建立了 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 国家检测标准^[34-36],成功建立了 H1、H3、H6 等亚型流感病毒的 RT-PCR 诊断方法^[37-39]。另外,LAMP-PCR 等改进的 PCR 方法也被应用于禽流感的检测^[40-41]。快速高通量检测是目前病原检测技术的发展方向,生物芯片正好具备这个优点。王秀荣等根据 A 型流感病毒 M 基因,H5、H7、H9 亚型 HA 基因设计 DNA 探针,并将其点样于载体上制

成芯片,能对禽流感病毒进行分型及亚型分类^[42]。Han 等利用 DNA 芯片技术,设计针对 16 种不同 HA 亚型和 9 种不同 NA 亚型的核酸探针,可以一次性快速鉴别出分离株属于何种亚型^[43]。这些新型的禽流感诊断方法具备了快速和高通量的特点,其缺点是对实验室条件要求高,阻碍了其大规模的推广和应用,随着技术条件和人员操作水平的提高,这些先进的检测方法会逐渐应用到基层。

4 禽流感疫苗研究

禽流感疫苗对于我国禽流感的防控起着至关重要的作用,它是我国一次又一次打赢禽流感保卫战的有效武器。我国主要使用全病毒油乳佐剂灭活疫苗预防高致病性 H5N1 禽流感,各疫苗毒株均是以鸡胚适应株 A/PR/8/34 (H1N1)的内部基作为骨架,重组 H5N1 亚型敲除裂解位点处连续碱性氨基酸的 HA 和 NA 基因改造而成^[44]。随着 H5N1 病毒的不断变异,抗原性存在明显差异的突变株也不断出现,所以使用疫苗株也不断地更新,目前主要使用的是 Re-4 和 Re-6 系列及其联苗^[45-46]。Re-6 株 HA 基因来源于 Duck/Guangdong/S1322/2010,抗原性与目前我国主要流行的 Clade 2.3.2 分支病毒一致,而 Re-4 株 HA 基因来源于 Chicken/Shanxi/2/2006,抗原性与 2006 年以来在我国鸡群中流行的 Clade 7 分支病毒一致。对于 H9N2 禽流感,我国大部分鸡场使用的是 H9N2 全病毒灭活疫苗。目前 H9N2 亚型流感疫苗使用的疫苗株比较多,比较有代表性的是 Chicken/Shangdong/6/96 和 Chicken/Shanghai /F/98 等早期流行代表株,然而 H9N2 亚型 AIV 在广泛的疫苗选择压力之下,经过长时间的演化,已出现一些变异群的毒株^[11,15-16]。因此有必要及时评估疫苗株和流行毒株抗原性的差异,针对性的更换疫苗毒株。另外,人用高致病性 H5N1 灭活疫苗也已研制成功,该疫苗株与禽用疫苗株类似,是利用人源 H5N1 亚型 AIV (A/Viet Nam/1194/04 和 A/Viet Nam/1203/04)的表面基因和 A/PR/8/34 (H1N1)重

组而成,与禽用疫苗不同的是人用 H5N1 疫苗为裂解疫苗,而非全病毒灭活疫苗^[47]。由于禽流感灭活疫苗的安全性高,生产方法成熟,所以近些年来在养禽业中使用的绝大部分为灭活疫苗,但是其不足之处也显而易见,例如产生的免疫效果维持时间短,生产成本较高,应激反应大等。目前,对禽流感灭活疫苗的改进主要集中在生产工艺上,随着细胞培养技术的成熟,细胞将逐渐取代鸡胚成为培养病毒的载体,微载体悬浮培养和无血清培养等先进技术已应用于病毒抗原的生产^[48-49],相信我国禽流感灭活疫苗的价格将会逐渐降低,质量会更加稳定。

为了弥补灭活疫苗的种种不足,科研人员一直在尝试研发新型流感疫苗,近些年来也取得了一些成绩。Liu 等以鸭肠炎病毒为载体插入 H5 亚型 HA 基因,制成 H5 亚型病毒活载体疫苗,该疫苗可以有效保护鸭群免受 H5N1 亚型 AIV 和鸭肠炎病毒的感染,而且具有产生免疫保护早,免疫力持久等优点^[50]。Fan 等利用反向遗传操作技术,将冷适应毒株 A/Ann Arbor/6/60 的内部基因和 H5N1AIV 的表面基因重组,构建了 H5N1 病毒减毒冷适疫苗株并制成疫苗,该疫苗可以有效地保护哺乳动物免受同源及异源 H5N1 病毒的感染,同时具有接种剂量小,接种途径方便等优点^[51]。刘明等构建了杆状病毒转移载体,分别表达了 H5N1 亚型 AIV 的 HA 和 NA 基因,用这些表达产物免疫 SPF 鸡,免疫效果良好^[52]。何宏轩等构建了 H9 亚型 AIV 的 HA 基因真核表达质粒,制成 DNA 疫苗,实验证明该疫苗可诱导鸡产生免疫保护反应^[53]。VLP 疫苗是近几年研究的热点,目前 H5N1 亚型及 H9N2 亚型禽流感 VLP 已有合成的报道,并已证实这些 VLP 疫苗均可诱导接种动物产生免疫保护应答^[54]。值得一提的是,哈尔滨兽医研究所的科研人员分别以鸡痘病毒和新城疫病毒为载体插入 H5 亚型 HA 基因,制成 H5 亚型 AIV 减毒活载体疫苗,这两种疫苗已通过农业部的批准,获得新兽药证书。这些疫苗一次免疫可以预防两种疫病,而且免疫方法也比

传统灭活疫苗简单,但从目前临床反映的情况来看,免疫效果不如传统灭活疫苗稳定,因此有必要对这些疫苗进行进一步改进。目前禽流感的新型疫苗种类虽然很多,但是总体来说都不够成熟,有的疫苗在实验室试验阶段虽然取得了较好的效果,但是在田间试验和临床推广阶段遇到了许多困难,这就要求我们要把工作做细做扎实,敢于迎难而上,出更多的精品,使畜牧业生产获益。

我国的禽流感研究工作虽然已走在了世界的前列,但是目前的禽流感防控形势依然严峻,有许多重要的科学问题依然没有解决,也有一些科学研究成果还没得到应用和推广,科研人员和兽医工作者依然任重道远,但是相信我们有勇气和能力克服困难,取得更多成果,成功防控禽流感。

参 考 文 献

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(1): 152-179.
- [2] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995.
- [3] Shortridge K. Avian influenza A viruses of southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man[J]. Bulletin of the World Health Organization, 1982, 60(1): 129.
- [4] 韩冲, 徐为燕, 杜念兴. 从外观健康家鸭中分离的正粘病毒和副粘病毒[J]. 南京农业大学学报, 1982(2): 10.
- [5] 唐秀英, 于康震. 中国禽流感流行株的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1): 1-5.
- [6] 张焯, 舒跃龙. 2004-2012年我国禽流感流行情况[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(3): 239-240.
- [7] Jiang WM, Liu S, Chen J, et al. Molecular epidemiological surveys of H5 subtype highly pathogenic avian influenza viruses in poultry in China during 2007-2009[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(10): 2491-2496.
- [8] 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]. Journal of Virology, 2010, 84(17): 8389-8397.
- [9] 陈伯伦, 张泽纪. 禽流感研究: I. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [10] 付朝阳, 于康震, 唐秀英, 等. H9 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗产生期内 T 淋巴细胞表型亚类的检测与研究[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 430-433.
- [11] Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza

- viruses from domestic poultry in Mainland China[J]. *Virology*, 2005, 340(1): 70-83.
- [12] Xu K, Smith G, Bahl J, et al. The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from southern China, 2000 to 2005[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(19): 10389-10401.
- [13] Xu K, Li K, Smith G, et al. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(6): 2635-2645.
- [14] Cong YL, Pu J, Liu QF, et al. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(7): 2035-2041.
- [15] Sun Y, Pu J, Jiang Z, et al. Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 146(3): 215-225.
- [16] Zhang Y, Yin Y, Bi Y, et al. Molecular and antigenic characterization of H9N2 avian influenza virus isolates from chicken flocks between 1998 and 2007 in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(3): 285-293.
- [17] Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(18): 12058-12064.
- [18] Jiao P, Tian G, Li Y, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(3): 1146-1154.
- [19] Zhang Y, Sun Y, Sun H, et al. A single amino acid at the hemagglutinin cleavage site contributes to the pathogenicity and neurovirulence of H5N1 influenza virus in mice[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(12): 6924-6931.
- [20] Song J, Feng H, Xu J, et al. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(5): 2180-2188.
- [21] Gao Y, Zhang Y, Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(12): e1000709.
- [22] Sun Y, Tan Y, Wei K, et al. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2963-2968.
- [23] Sun Y, Qin K, Wang J, et al. High genetic compatibility and increased pathogenicity of reassortants derived from avian H9N2 and pandemic H1N1/2009 influenza viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(10): 4164-4169.
- [24] Zhang Y, Zhang Q, Kong H, et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet[J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1459-1463.
- [25] Shi Y, Zhang W, Wang F, et al. Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses[J]. *Science*, 2013, 342(6155): 243-247.
- [26] Zhang W, Shi Y, Lu X, et al. An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level[J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1463-1467.
- [27] Lu X, Shi Y, Gao F, et al. Insights into avian influenza virus pathogenicity: the hemagglutinin precursor HA0 of subtype H16 has an alpha-helix structure in its cleavage site with inefficient HA1/HA2 cleavage[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(23): 12861-12870.
- [28] Yuan P, Bartlam M, Lou Z, et al. Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site[J]. *Nature*, 2009, 458(7240): 909-913.
- [29] He X, Zhou J, Bartlam M, et al. Crystal structure of the polymerase PAC-PB1N complex from an avian influenza H5N1 virus[J]. *Nature*, 2008, 454(7208): 1123-1126.
- [30] 任淑敏, 秦东. 禽流感病原学研究现状及进展[J]. *世界感染杂志*, 2004, 4(4): 338-340.
- [31] 邓国华, 马文军. 禽流感病毒核蛋白基因在重组杆状病毒中的表达[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(2): 81-83.
- [32] 王传彬, 田新生, 曹振, 等. H5亚型禽流感病毒单抗——生物素捕获 ELISA 的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(4): 204-207.
- [33] 赵思婷. 区分禽流感野毒感染鸡群与免疫鸡群的鉴别诊断方法研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2005.
- [34] 中国国家标准. GB/T 19438.2-2004. H5亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法[S].
- [35] 中国国家标准. GB/T 19438.3-2004. H7亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法[S].
- [36] 中国国家标准. GB/T 19438.4-2004. H9亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法[S].
- [37] 陈思怀, 乔宪凤, 华文君, 等. 多重 RT-PCR 快速检测禽流感病毒的研究[J]. *湖北农业科学*, 2006, 45(1): 20-23.
- [38] 谭丹, 邓国华, 施建忠, 等. H6亚型禽流感病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(2): 142-145.
- [39] 韩雪清, 林祥梅, 侯义宏, 等. 禽流感病毒 H1, H3, H5, N2 亚型多重 RT-PCR 检测方法的初步研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(10): 993-996.
- [40] 李启明, 马学军, 高寒春, 等. 逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)在 H5N1 禽流感病毒基因检测中的应用[J]. *病毒学报*, 2008, 24(3): 178-184.
- [41] 彭宜, 谢芝勋, 刘加波, 等. H9 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(1): 19-22.
- [42] 王秀荣, 邓国华, 于康震, 等. 在 DNA 芯片平台上探测 AIV 不同亚型 cDNA[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 394-398.
- [43] Han X, Lin X, Liu B, et al. Simultaneously subtyping of all influenza A viruses using DNA microarrays[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 152(1): 117-121.
- [44] 田国彬, 李雁冰, 施建忠, 等. 禽流感灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-1 株)研究及应用[C]. *中国畜牧兽医学会禽病学分会第十二次学术研讨会论文集*, 2004: 408.
- [45] 田国彬, 曾显营, 钟功勋, 等. H5N1 亚型禽流感变异株灭活疫苗种毒 Re-4 株的生物学特性及免疫原性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(9): 717-720.

