

## 禽流感病毒研究进展及抗 H7N9 型病毒疫苗与抗体研究

王雨潇<sup>1</sup> 李靖欣<sup>2</sup> 刘沛<sup>1</sup> 朱凤才<sup>2</sup>

<sup>1</sup>东南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系,南京 210000;<sup>2</sup>江苏省疾病预防控制中心疫苗临床评价所,南京 210000

通信作者:刘沛,Email:liupeiseu@126.com;朱凤才,Email:jszfc@vip.sina.com

**【摘要】** 禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)是一种可引起急性呼吸道传染病的人畜共患病病毒。自 2013 年我国出现了全球首例人感染 H7N9 型 AIV 病例以来,人们对该病毒产生了担忧与恐慌。AIV 在全球广泛传播,人感染不同型别 AIV 事件也持续发生,造成了巨大的经济损失。目前尚无针对该病的特异性治疗措施与药物,疫苗成为最有可能预防控制病毒传播的手段。现有针对 H7N9 型 AIV 的兽用与人用疫苗种类繁多,其中,4 类人用 H7N9 型 AIV 疫苗已经率先进入了临床试验阶段,主要包括了病毒样颗粒疫苗、减毒活疫苗、灭活疫苗及 DNA 疫苗,并显示出了良好的安全性和免疫原性。因为暂无上市的人用 AIV 疫苗,所以其真实效力不得而知。此外,现有的流感疫苗在人群中虽然具有良好的安全性和免疫原性,但对 H7N9 型 AIV 并无交叉抗体反应。本文回顾 AIV 的病原学、流行病学、职业暴露人群调查与防控策略、H7N9 型 AIV 疫苗及 H7N9 型 AIV 全人源单克隆抗体研究进展,讨论尚存的问题和挑战以及未来的发展方向,为加深对疾病的了解以及控制 AIV 在全球的蔓延提供防控策略与方针。

**【关键词】** 流感病毒; 禽流感病毒; H7N9 型; 单克隆抗体; 疫苗; 临床试验

### Progress in research of avian influenza virus and human monoclonal antibody and vaccines against H7N9 virus

Wang Yuxiao<sup>1</sup>, Li Jingxin<sup>2</sup>, Liu Pei<sup>1</sup>, Zhu Fengcai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210000, China; <sup>2</sup>Vaccine Clinical Evaluation Department, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210000, China

Corresponding authors: Liu Pei, Email:liupeiseu@126.com; Zhu Fengcai, Email:jszfc@vip.sina.com

**【Abstract】** Avian influenza virus (AIV) is a kind of zoonotic virus which can cause acute respiratory infectious diseases. Since the report of the world's first human infection case of avian influenza A (H7N9) virus in China in 2013, close attention has been paid to the virus. AIV spreads widely around the world, and human infection with different types of AIV continues to occur, causing huge economic losses. At present, there are no specific treatment and drugs against the disease, and vaccination is considered as the most promising and effective method to control the human infection with AIV. So far, there are many kinds of veterinary and human vaccines for H7N9 AIV, among which four types of human H7N9 AIV vaccines have entered the clinical trial stage, including virus-like particles vaccine, attenuated live vaccine, inactivated vaccine and DNA vaccine, which have shown good safety and immunogenicity. However, the true efficacies of the AIV vaccines remain unknown because no human vaccines are currently available in the market. In addition, although the existing influenza vaccine has good safety and immunogenicity in the human population, there is no cross-antibody response to H7N9 AIV. This paper summarizes the research progress of AIV etiology and epidemiology, the occupational exposure population investigation, the infection prevention and control strategies, and H7N9 AIV vaccine and H7N9 AIV anthropogenic monoclonal antibody, and

DOI: 10.3760/cma.j.cn 112338-20210323-00242

收稿日期 2021-03-23 本文编辑 斗智

引用本文:王雨潇,李靖欣,刘沛,等.禽流感病毒研究进展及抗 H7N9 型病毒疫苗与抗体研究[J].中华流行病学杂志,2021,42(9):1700-1708. DOI: 10.3760/cma.j.cn 112338-20210323-00242.



discuss the remained problems, challenges and future trends in the research of AVI to improve the understanding of the disease and the prevention and control of global spread of AIV.

**【Key words】** Influenza virus; Avian influenza virus; H7N9; Monoclonal antibody; Vaccine; Clinical trial

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)是 21 世纪令人关注的可引起人畜共患急性呼吸道传染病的病毒之一。早在 1997 年,中国发生的一次家禽疫情中报告了人类感染 H5N1 型 AIV 的病例。AIV 自 2003 年以来从亚洲传播到欧洲和非洲,并在部分地区的禽类中根深蒂固。由于 H7N9 型 AIV 过去只在禽类传播,从未感染过人类,因此人群对该病毒普遍没有保护性抗体。然而在 2013 年 3 月,中国出现了世界上首例人感染 H7N9 型 AIV 的病例<sup>[1]</sup>。此后共发生了 6 次 H7N9 型 AIV 流行的疫情,前 4 次(从 2013 年 3 月至 2016 年 7 月)流行的毒株是低致病性 AIV (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV),第 5 次(2016 年 8 月至 2017 年 7 月)流行的毒株中出现了高致病性 AIV (highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV),并体现为出现早、上升快、强度高、分布广的特征,这引起了社会对 AIV 疫情的高度关注<sup>[2]</sup>。根据中国 CDC 公布的数据显示,截至 2019 年 9 月,我国 H7N9 型 AIV 感染例数 1 626 例,死亡 624 例,病死率达 38%,其中有 201 名患者有明确禽类接触史<sup>[3]</sup>。2013 年我国《传染病防治法》将 AIV 列为乙类传染病并实行甲类管理<sup>[4]</sup>。

随着预防疾病意识的提升和医疗卫生条件的改善,前 5 次疫情很快被抑制住,仅有零星病例在世界各地散发,到 2017 年疫情后未见新增 H7N9 型 AIV 病例报道。然而其他型别的 AIV 疫情依然活跃于世界各地。例如在 2005 年至 2020 年期间,欧洲至少发现了 10 起 H5 型 HPAIV 入侵事件,导致了家禽和野生鸟类的大量死亡<sup>[5]</sup>。在孟加拉国, H5N1 型 HPAIV 和 H9N2 型 LPAIV 目前在家禽中流行,并有记录显示该两种病毒可感染人类<sup>[6]</sup>。根据 WHO 报道统计数据,截至 2020 年 10 月,全球 17 个国家共报道 862 例 H5N1 型 AIV 感染病例,并导致 455 例死亡病例。H5N9 型、H9N2 型和 H7N7 型 AIV 均造成了散发的人类感染。此外,在挪威及加拿大等地区还发生了人感染猪流感 H1N1 和 H1N2 型病例<sup>[7]</sup>。

AIV 在全球广泛传播并对公众健康构成了巨大威胁,本文针对 AIV 的病原学、流行病学、职业暴露人群调查与防控策略以及 H7N9 型 AIV 全人源单克隆抗体研究进展进行综述,为加深对该疾病的了解提供参考。

### 一、AIV 病原学

AIV 属于正粘病毒科甲型流感病毒属。AIV 颗粒呈多形性,其中球形直径 80~120 nm,有核心和囊膜组成。病毒基因组由两型表面糖蛋白(血细胞凝集素 HA 和神经氨酸酶 NA)、核蛋白(NP)、多聚酶蛋白(PB1、PB2、PA)、基质蛋白(M1、M2)和非结构蛋白(NS1、NS2)组成<sup>[8]</sup>。根据不同种类病毒 HA 和 NA 的结合情况,甲型流感病毒又可分类为多种

不同亚型。其中,HA 共有 18 个亚型(H1~H18),NA 则有 11 个亚型(N1~N11)<sup>[9]</sup>。目前,已知的 AIV 传染给人的亚型主要包括 H3、H5、H7、H9。依据病毒的不同致病性,又将其划分为低、中、高致病性。其中,H9N2 和 H6N8 亚型中一些毒株为中致病性,H5 和 H7 亚型中若干毒株为高致病性,其余为低致病性。

由于 AIV 包含了 8 个单股负链 RNA 片段,AIV 的复制是通过 RNA 依赖的聚合酶完成的,而聚合酶缺乏校正功能,所以 AIV 发生基因突变的频率极高。HA、NA 以及 PB2 蛋白的突变可能导致了不同的病毒学特征。因此,在 2017 年出现了新的基因型以及 H7N9 型 HPAIV<sup>[10]</sup>。目前已有研究表明 H7N9 型 AIV 正在不断变异,以便更适应对哺乳类动物的感染<sup>[6]</sup>。根据荷兰伊拉斯莫斯医学中心的研究报告显示,2009 年前欧洲地区 H5 型 HPAIV 的暴发是由 2.2 种系的病毒引起的,而从 2014 年起,则转变为 HPAIV 2.3.4.4 种系的病毒主导了暴发,大量的基因重配产生了 H5N1、H5N2、H5N3、H5N4、H5N5、H5N6 和 H5N8 亚型<sup>[5]</sup>。由此可见,不同种系的多重病毒导入、基因型重配以及持续多样化等现象创造了一个复杂的病毒学环境,这可能导致今后病毒毒性的增强、增加对新宿主的适应性,以及人畜共患疾病的大规模传播<sup>[6]</sup>。另外值得一提的是,甲型流感病毒根据宿主源也可以分类为 AIV、猪流感或其他类的动物流感病毒。除了人们熟知的 H5N1、H9N2、H7N9 均为 AIV 亚型,H1N1 和 H3N2 型则为猪流感病毒亚型。由于猪有可能感染来自多种不同宿主(如鸟类和人类)的流感病毒,它们有可能扮演“搅拌舱”作用,促进不同的流感病毒基因进行重配并产生“新型”流感病毒。虽然这些甲型动物流感病毒有别于人类流感病毒不容易在人与人之间传播,但是这种“新型”重配病毒逐渐适应哺乳动物和人类,并可能获得人际传播的能力,或导致人类罹患与原病毒相比更加严重的疾病。

### 二、AIV 流行病学

1. 传染源、传播途径及易感人群:目前,普遍认为候鸟和水禽是多数甲型流感病毒亚型的天然宿主。近年来也有临床案例证明 AIV 也可感染猪、马、海豹和鲸等各种哺乳动物及人类。而乙型和丙型流感病毒则分别多见于海豹和猪的感染。AIV 可引起禽类从呼吸系统到严重全身败血症等多种症状的病毒性流行性感。根据引起疾病严重的程度亦可以将 AIV 划分为 HPAIV 和 LPAIV。该病毒在鸟类间易于传播流行,可以通过候鸟的迁徙实现远距离传播,过去俗称“鸡瘟”,其特征主要为家禽、水禽及野禽的大面积突然死亡。

人感染 AIV 的途径主要是通过呼吸道传播,也可通过

接触带毒禽类及其排泄物、分泌物以及受其污染的环境及物品、水源等进行传播。当前 AIV 尚未发现人传人的直接证据,主要呈散发状态,大部分病例有明确的活禽接触史,少数无明确的暴露原因。在市场环境抽查中几乎全年都能检测到 H7N9 型 AIV,而病例还是以散发为主,发病人数只占暴露人群的极少数,流行病学提示人群普遍不易感。

2. 临床症状、抗病毒治疗及预防控制措施:人类感染 AIV 后的潜伏期一般为 7 d 以内,主要症状为流感样症状,如发热、咳嗽、咳痰,有时则伴有肌肉酸痛、头痛和周身不适等症状,随着病情加重可表现为高热、重症肺炎、呼吸困难,甚至急性呼吸窘迫综合征、休克、多器官功能障碍综合征等乃至死亡<sup>[11-12]</sup>。

临床上治疗人感染 AIV 的抗病毒药物主要有离子通道 M2 阻滞剂和 NA 抑制剂。离子通道 M2 阻滞剂如金刚烷胺和金刚乙胺对甲型流感病毒有作用,但对乙型流感病毒无效。目前,研究发现 AIV 对金刚烷胺和金刚乙胺已经产生了耐药性<sup>[13]</sup>。此外,该类药物都伴随着胃肠道和中枢神经系统的不良反应,例如头晕、精神不集中、焦虑、失眠、有癫痫病史的诱发癫痫等,因此不建议使用。NA 抑制剂主要包括了帕拉米韦、扎那米韦和奥司他韦等,尤其是奥司他韦,能够大幅度提高患者存活率,因此,成为治疗人感染 AIV 一线药物。它们能有效改变病毒活性位点 NA 的结构。在发病早期使用抗病毒药物如奥司他韦等,可以最大限度地降低病死率及重症病例的发生,应尽早给疑似病例服用奥司他韦(理想状况下是在症状出现后的 48 h 之内),以达到最佳疗效。但应注意 H7N9 病毒 NA 基因突变对 NA 抑制剂产生耐药性。考虑到目前与甲型 H5 和甲型 H7N9 亚型感染相关的高病死率以及这些疾病中病毒长时间复制的证据,对那些在病程较后期就诊的患者也应考虑给药。非重症患者不建议使用皮质类固醇类药物,由于该类药物具有依赖性且可能诱发并发症或者加重感染。对于甲型 H5 或甲型 H7N9 病毒严重感染的病例,临床医生可能需要考虑增加每日建议的服药剂量或延长治疗时间。

我国针对疫情实行的解决方案主要有及时扑杀病禽、大规模禽类接种流感疫苗和生物安全改进。因为当前 AIV 尚未发现人传人的直接证据,但大部分病例有明确的活禽接触史,所以控制 AIV 在家禽中流行对减少人类感染的风险是至关重要的。针对禽类的管理则从制定适宜的免疫和保健方案入手,同时定期监测种群的免疫和防控情况,可有效降低 H7N9 型 AIV 在家禽及人类中流行风险。考虑到不同亚型 AIV 的重组变异可能会形成新的基因型,因此开展基于病毒宿主及环境样品采集检测的活禽市场 AIV 监测,发现市场可能存在的高污染风险区域,同时联合卫生和农业部门开展区域之间的联合防控,对市场禽类及环境 AIV 的污染情况进行动态监测。

在人群方面,加强对不明原因肺炎的主动监测,特别是在疫情流行季节,早期发现可疑病例并服用抗病毒药物从而减少重症的发生;及时发现病毒耐药株对患者后期治疗

也尤为重要。此外,对人群进行宣传教育,提高人群对人感染 AIV 的认知程度,呼吁勤洗手,注意个人防护,尽量减少与禽类不必要的接触。

### 三、AIV 职业暴露人群调查研究进展

AIV 在家禽中普遍存在,这不仅对禽类产业链是一个巨大挑战,而且给国家经济以及公共卫生造成了负面影响<sup>[14]</sup>。由于目前我国家禽养殖总量大、密度高、种类多且已知 AIV 在养殖场和活禽市场中普遍流行,而这又是人类感染 AIV 的主要暴露场所,所以这也明显增加了养殖工人和其他工种等职业暴露人群的感染风险,并且该人群可能成为 AIV 向一般人群传播的桥梁。此外,大规模的跨区域活禽运输和交易,人为地增加了病毒重配机会,提高了产生新型流感病毒的可能性。对于 AIV,人类感染的首要危险因素似乎是直接或间接暴露于受感染活禽或病死禽类或污染环境中,例如活禽市场。屠宰感染的禽类、拔毛和处理尸体及制备供食用的禽类,尤其是在家庭环境中,也有可能成为危险因素<sup>[15]</sup>。猪作为流感病毒的混合器,其可同时感染多种 AIV 并且存在不同物种病毒混合存在的情况<sup>[16]</sup>,使得流感病毒在人、禽、猪之间跨种传播比较普遍。对于猪流感病毒,多数人间病例中报告曾近距离接近染病的猪或到达过有猪的地方,但也发生过一些有限的人际传播。因此,除了禽类职业接触者以外,职业接触猪的暴露人群也是多发人群。

1. 我国职业暴露人群 AIV 感染调查:目前多篇文献全面的分析和评价职业暴露人群感染 AIV 的发病情况和相关危险因素。有文献统计,在中国,人感染 H5N1 型 AIV 的总体血清流行率为 2.45%,而来自中国中部地区的人感染 H5N1 的血清流行率为 7.32%,高于中国其他地区<sup>[17]</sup>。职业暴露人群或者暴露于患者及病禽的人群 H5N1 型 AIV 血清学阳性率明显高于一般人群<sup>[18]</sup>。最近有学者针对 H7N9 型 AIV 的血清学调查结果进行了总结归纳,结果显示全人群的阳性率在 0.122%(95%CI:0.023%~0.275%),感染风险较低<sup>[19]</sup>。然而职业暴露人群或者暴露于患者及病禽的人群的阳性率则为 1.075%(95%CI:0.000%~4.357%)。在北方地区(北京市)对禽类从业者感染 H9N2 型 AIV 的情况进行了 4 次血清学抽样调查,结果显示 2016 年 4 月家禽从业人员抗体阳性率最高为 2.77%,2015 年 4 月普通人群阳性率最低为 0.09%,但感染 H9N2 型 AIV 的风险依然高于普通人群<sup>[20]</sup>。在南方地区(无锡市),468 名家禽从业人员的随访中,H7N9、H9N2 和 H5N1 型 AIV 的血清转化率分别为 0.43%、2.78% 和 1.50%<sup>[21]</sup>;H9N2 型 AIV 在世界范围内传播,主要在家禽中传播。它在家禽和哺乳动物中的传染性和适应性日益增强,增加了人类感染的可能性。然而,由于 H9N2 型人类病例的临床症状较轻,很难发现。另外一项研究共收集了来自中国 22 个省份职业暴露人群的 15 700 份血清样本,采用血凝抑制(HI)和微量中和(MN)检测。H9N2 型的血清阳性率在活禽市场工人、大型家禽养殖户和后院养殖户中显著高于家禽屠宰厂工人和野鸟栖息地维护人员。在华南

地区的血清阳性率显著高于北方,这可能是由于家禽密度较高造成的。血清阳性率最高的是老年人,其次是中年人,然后是年轻人,这或许是因为老年人中较长时间的家禽接触史所导致的。由此可见,人感染 H9N2 型 AIV 在我国分布广泛<sup>[22]</sup>。2014–2016 年,有研究显示 14 407 名家禽工作人员的 2 124 份血清样本中 H9N2、H7N9、H6N1、H5N1-SC29、H5N6、H5N1-SH199 和 H6N6 型 AIV 的血清抗体普遍存在<sup>[23]</sup>。

2. 国外职业暴露人群 AIV 感染调查:在其他国家,例如巴基斯坦家禽从业人员中,总体抗 H9 的抗体阳性率高达 50.3%。其中,操作间工作人员的血清阳性率最高(100.0%),兽医最低(38.5%),而接种人员、屠夫和农场工人的血清阳性率分别为 83.3%、52.4% 和 45.5%。此外,该研究还发现使用口罩者的血清阳性率(29.6%)明显低于未使用口罩者(90.6%)( $P < 0.002$ )。经常使用手套和肥皂洗手的人的血清患病率为 32.8%,而那些从不采取预防措施的人的血清患病率为 89.0%<sup>[24]</sup>。在埃及也发现禽类养殖者中 AIV 血清阳性率高于一般人群<sup>[25]</sup>。在印度尼西亚,2013 年在活禽市场工作人员中也有着较高的 H5N1 型 AIV 感染率<sup>[26]</sup>。由此可见,AIV 抗体不仅在我国家禽及职业暴露人群普遍存在,同时在世界多个禽类养殖业发达的国家中流行。在欧洲野生和家养鸟类中检测到的 H5 型 HPAIV 大部分都与秋季西南/西移和冬季当地水鸟大规模聚集相吻合<sup>[5]</sup>。此外,近年来研究发现家养猫犬及动物收养所亦可以作为 AIV 新型传播媒介,并在收养所工作人员出现无症状感染<sup>[27–28]</sup>。

现有大量针对 AIV 职业暴露人群感染的流行病学调查研究证明了家禽接触人群中 H5、H7、H9 血凝抑制抗体阳性率明显高于一般人群<sup>[29–31]</sup>。另外,职业暴露人群中还存在 H4、H5、H7、H9、H11 等多种亚型 AIV 的隐性感染<sup>[32–37]</sup>。这些结果均可用于评价 AIV 职业暴露人群感染率与发病率,评估相关环境中不同亚型 AIV 的分布情况,掌握影响职业暴露人群的危险因素,这也为将来流感病毒的预防和控制提供参考意见。由于该病毒在动物和环境中不断被发现,并且继续存在活禽兜售情况,因此预计还会发生更多人间病例。有必要对家禽工作人员进行更密切的监测和加强保护措施。WHO 建议,前往已知发生 AIV 疫情的国家旅行的人应尽可能避免接触家禽养殖场,或避免与活禽市场中的动物接触,或避免进入可能宰杀家禽的场所,或避免接触看似受到家禽或其他动物粪便污染的任何表面。旅行者还应经常用消毒剂与流动清水洗手,并应遵守良好的食品安全和饮食卫生习惯。

#### 四、H7N9 型 AIV 疫苗临床研究进展

目前因为没有针对 H7N9 型 AIV 的特效药物和治疗措施,所以从抗体入手以寻求被动免疫制剂和特效疫苗是最佳应对手段。抗 H7N9 型 AIV 疫苗依据适用对象可以分为人用疫苗及禽类疫苗。目前我国推行的家禽疫苗接种计划主要采用的疫苗是 H5 和 H7 重组双价灭活疫苗,据悉总体免疫接种率超过 80%。通过近年来持续的流行病学监测,

只有极少数样本的检测结果为 H7N9 型阳性(2017 年 12 月 8 万多份样本中有 11 份)。同时期也仅有 3 例 H7N9 型人感染病例,而在疫苗推广之前感染患者人数则超过 700 例<sup>[38]</sup>。由此可见,在禽类中推行 AIV 疫苗对保护人群免受感染的重要性及必要性。

自 2013 年人感染 H7N9 型 AIV 事件发生以来,研究者进行了大量针对人用 AIV 疫苗的研究,现有 AIV 疫苗种类繁多,主要分为传统疫苗(灭活疫苗和减毒活疫苗)、重组蛋白疫苗、病毒样颗粒(VLPs)疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗(DNA 疫苗、病毒载体疫苗及 RNA 疫苗)等,且在动物试验中取得了一定的预期结果。此外,AIV 疫苗也进入了临床试验阶段,共计 180 多项已经完成或者正在进行中。

根据临床试验注册网数据库显示,针对 H7N9 型 AIV 候选疫苗共计 26 个注册临床试验,其中主要包括了病毒样颗粒疫苗、流感病毒减毒活疫苗、流感病毒灭活疫苗及 DNA 疫苗。

1. H7N9 型 AIV 减毒活疫苗:H7N9 型 AIV 减毒活疫苗是将 AIV 经处理后保持活性不变,毒性结构改变,既保持了抗原性又达到减毒的目的。减毒活疫苗相比灭活疫苗可以更好地刺激体液、细胞和黏膜免疫应答,提供更持久的交叉免疫保护,单次剂量免疫机体即可产生免疫应答,且价格低廉。在动物模型体内表现出良好的稳定性,并且在没有佐剂的情况下也具有极强的免疫原性。在俄罗斯圣彼得堡进行的双盲随机安慰剂对照试验中,受试者每隔 28 d 鼻内给药 2 剂疫苗或安慰剂,结果显示安全性良好。第一剂疫苗后 48%(95%CI: 29.4%~67.5%)出现血清阳转,第二剂疫苗后 72%(95%CI: 52.8%~87.3%)出现中和抗体的血清转换<sup>[39]</sup>。另一种针对长江三角洲血凝素系株型的减毒活疫苗在临床试验中同样体现出了良好的免疫原性,96.6%的受试者出现了免疫应答<sup>[40]</sup>。然而,该类疫苗可能存在的缺点在于具有一定的残留毒力、毒力反复现象、产品保存运输条件高等。

2. H7N9 型 AIV 灭活疫苗:H7N9 型 AIV 灭活疫苗是采用甲醛或者其他方法灭活处理,再辅助添加佐剂制备而成的一种疫苗。该类疫苗优点在于安全性高、免疫原性好、不出现变异反应。现存多种不同的灭活疫苗,其中,中国台湾地区研发的 AT-501 灭活疫苗在临床试验中显示含 30  $\mu\text{g}$  HA 和氢氧化铝佐剂的 H7N9 型流感灭活疫苗对受试成年人具有免疫原性和安全性<sup>[41]</sup>。研究者们对另一种含 AS03 佐剂的灭活疫苗在 18–64 岁的健康成年人中进行了盲法研究。参与者被随机分组接种 4 种 AS03 佐剂疫苗(低或中剂量的血凝素与 AS03A 或 AS03B)中的 1 种,或者一种非佐剂疫苗和安慰剂对照疫苗。在接受有佐剂配方的组中,血清阳转率和血清保护率分别 $\geq 85.7\%$ 和 $\geq 91.1\%$ ,而在非佐剂疫苗组中阳转率和保护率都明显降低分别为 23.2% 和 28.6%。研究结果发现两剂 AS03 佐剂的 H7N9 型疫苗耐受良好,并在抗原保留剂量的健康成年人中产生了强大的抗体应答<sup>[42]</sup>。此外,包含 MF59 佐剂的 H7N9 型 AIV 灭活疫苗

也同样进行了 II 期随机、部分盲法试验。受试者在接种三针次疫苗后产生了中度免疫反应性,而在不同抗原剂量或两种剂量免疫计划中抗体反应没有显著差异<sup>[43]</sup>。为了探索 MF59 佐剂对于疫苗免疫原性的影响,临床试验将添加 MF59 佐剂与无佐剂的疫苗进行比较发现,包含佐剂的疫苗相比无佐剂疫苗能产生了更高的免疫应答并有着良好的耐受性<sup>[44]</sup>。因为不同佐剂的添加对于疫苗免疫原性存在影响,所以有临床研究进行了对比并发现 AS03 和 MF59 两种佐剂增强了 H7N9 型流感灭活疫苗的免疫应答,其中 AS03 佐剂诱导的滴度最高<sup>[45]</sup>。考虑到初免-加强策略在多种其他疫苗临床中能提供更多高效的免疫原性,研究者采取不同 H7N9 型 AIV 疫苗接种或相同疫苗加强免疫策略在临床试验中进行了验证,结果发现采用 DNA 疫苗初免-H7N9 型单价灭活疫苗加强的接种策略对于预防疫情大流行有着良好的效果<sup>[46]</sup>。

3. H7N9 型 AIV VLPs 疫苗:H7N9 型 AIV VLPs 疫苗是含有一个或多个 AIV 结构蛋白的不含病毒遗传物质的,在形态上类似于病毒的蛋白空心颗粒。正是因为 VLPs 不含核酸,所以其最大的优点在于不具备感染性,安全性高,并且可以有效刺激机体的抗体产生,同时生产周期短、生产成本低、可以大规模生产,因此也是现在的研究热点<sup>[47]</sup>。在临床试验中,含配伍皂素 ISCOMATRIX™ 佐剂的 VLPs 疫苗相比无佐剂疫苗能显著增强免疫原性、促进人类对 AIV 更高质量的抗体免疫应答,提高抗野生型 H7N9 病毒侵袭能力<sup>[48-49]</sup>。

4. H7N9 型 AIV DNA 疫苗:DNA 疫苗又称为核酸疫苗,是将 AIV 的保护性抗原基因克隆到真核表达载体中并直接导入动物体内,抗原蛋白诱导机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫反应。该类疫苗的主要优点是可在体内细胞中

表达抗原,诱导体液免疫和细胞免疫,安全性较高、生产成本和不受母源抗体的限制等优点。I 期临床试验中采用 DNA 初免-H7N9 型单价灭活疫苗加强的接种策略,结果显示该新型 H7 型 DNA 疫苗安全性高、耐受性好、免疫原性好,且具有更高的免疫诱导效价和中和抗体效价<sup>[50]</sup>。此外,初免-加强策略还可以增强 H5 型或其他流感疫苗的效力<sup>[51-52]</sup>。但是 DNA 疫苗的缺点也值得注意,外源基因进入宿主体内后有机会与宿主的基因组 DNA 整合从而使细胞发生癌变,另外 DNA 疫苗也容易产生免疫耐受。

以上 4 类进入临床阶段的 H7N9 型 AIV 疫苗的免疫原性和安全性数据为进一步临床开发提供了有力依据。虽然人感染 H7N9 型 AIV 仍然是小概率事件,大规模使用疫苗的可能性不大,不过在疫苗技术储备方面未来具有战略性意义。

#### 五、H7N9 型 AIV 全人源单克隆抗体研究进展

作为一种新发的具有人感染性的 AIV 亚型,2013 年发现的 H7N9 型 AIV 以其对人类的高致病性、高病死率,以及远高于 H5N1 型 AIV 的感染率而引起全球广泛关注<sup>[53-54]</sup>。一般对于病毒感染来说,中和抗体的产生往往与感染的恢复和疾病的转归有着紧密联系。但是,与普通的 H3N2 型季节性流感病毒和 2009 年流行的 H1N1 型流感病毒不同,H7N9 型 AIV 感染人体后,很难刺激机体产生较高的保护性抗体应答<sup>[55-56]</sup>。有资料显示,部分病人可以在病毒感染后 2 周左右其外周血检测到中等水平的 H7N9 中和抗体的存在。这种相对较弱的中和抗体水平可能与 H7N9 型 AIV 的致病机制有关,预示着感染的病情更重、病程更长<sup>[57]</sup>。此外,H1 和 H3 型的中和抗体与 H7N9 型 AIV 的交叉中和作用非常低,机体内的 H1 和 H3 型的中和抗体无法保护 H7N9 型 AIV 的感染<sup>[56]</sup>。因此,寻找具有中和作用的特异表位对发

表 1 代表性 H7N9 型禽流感病毒疫苗临床试验列表

疫苗类型和名称	接种策略	试验地点及阶段	开始时间	临床注册号
灭活疫苗				
HIV1 A/H7N7+HIV1 A/H7N9	初免-加强	美国 II 期	2015 年 10 月 26 日	NCT02586792
AT-501	单剂型	中国台湾地区 I 和 II 期	2015 年 5 月 7 日	NCT02436928
AS03 2017 H7N9 IIV	单剂型	美国 II 期	2017 年 10 月 17 日	NCT03312231
MF59 2017 H7N9 IIV	单剂型	美国 II 期	2018 年 9 月 24 日	NCT03682120
A/Shanghai/2/2013(H7N9)	单剂型	中国 II 期	2018 年 11 月 28 日	NCT03755427
A/Shanghai/2/2013+ AS03 2017 H7N9 IIV	初免-加强	美国 II 期	2018 年 7 月 18 日	NCT03589807
A/Shanghai/2/2017+ AS03 2017 H7N9 IIV				
减毒疫苗				
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	单剂型	美国 I 期	2014 年 10 月 24 日	NCT02274545
A/17/Hong Kong/2017/75108(H7N9)	单剂型	俄罗斯 I 期	2018 年 11 月 13 日	NCT03739229
VLPs 疫苗				
H7N9 VLPs	单剂型	澳大利亚 I 期	2013 年 7 月 12 日	NCT01897701
DNA 疫苗				
H7 DNA+ A/Shanghai/2/2013(H7N9)灭活疫苗	初免-加强	美国 I 期	2014 年 8 月 1 日	NCT02206464
H7 DNA+A/Shanghai/02/2013(H7N9)灭活疫苗	初免-加强	美国 I 期	2014 年 7 月 29 日	NCT02206464
DNA/MIV+MIV				
MIV+MIV				

展有效的疫苗和抗体等药物具有至关重要的意义。

目前尚无针对 H7N9 型 AIV 的特异性的治疗药物和疫苗上市。抗流感病毒帕拉米韦、扎那米韦和奥司他韦等神经氨酸酶抑制剂对治疗 H7N9 型 AIV 的作用褒贬不一,其治疗效果可能与用药时间及病情轻重有关,尤其是在早期使用奥司他韦可以降低病死率及重症病例的发生。然而,随着病毒基因型别的突变均不同程度地对抗病毒药物产生耐药性,导致这些药物的治疗并不能完全抑制 H7N9 型 AIV 复制。另一方面,目前全世界尚无上市的人用 H7N9 型 AIV 疫苗,然而疫苗的研发受抗原免疫原性较低、受试者接种疫苗后产生保护性免疫反应所需的时间长以及疾病散发的流行状态的影响,疫苗的保护效果和成本效益可能都不尽理想<sup>[58-59]</sup>。在这样的情况下,被动免疫可能是目前有效预防和治疗人感染 H7N9 型 AIV 的有效策略。

1. 单克隆抗体发展背景及过程:单克隆抗体是继疫苗、重组蛋白后最重要的一类生物技术产品,可用于人类疾病的诊断、暴露后的预防、患者的治疗以及免疫机制的研究。单克隆抗体是由单一 B 细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体。在过去的研究中,针对流感病毒的单克隆中和抗体在动物实验中显示出良好的治疗作用和预防保护作用<sup>[60]</sup>。单克隆抗体主要历经鼠源性、嵌合、人源化和全人源单克隆抗体 4 个阶段。最初国内外针对 H7N9 型 AIV 的单克隆中和抗体研究多为鼠源性的单克隆抗体,由于鼠源性单克隆抗体由鼠杂交瘤细胞分泌,异质性非常强,可诱导产生人抗鼠抗体。有研究从接种过 A/ZJU01/PR8/2013 的 H7N9 型灭活疫苗的免疫小鼠身上制备得到 2 株抗 LPAIV 的 HA 小鼠单克隆抗体并对其进行了鉴定。这 2 个单克隆抗体,1H10 和 2D1,已经在小鼠被动传播病毒攻击实验中被证实对毒株有治疗和预防作用<sup>[61-62]</sup>。然而,该类抗体毒副作用明显,半衰期短,因此大大限制了其临床应用<sup>[63]</sup>。基因工程技术对鼠源性的单克隆抗体进行人源化改造,即将抗体的恒定区的序列用人的序列代替构建人-鼠嵌合抗体,在一定程度上减弱了人抗鼠抗体,但仍存在一少部分鼠源成分,这直接导致抗体被迅速清除,从而降低治疗效果,其发展前景也不容乐观。

此后人源化抗体的产生减少了抗体中鼠源部分的比例,但仍有抗体可能导致抗独特型抗体的产生且存在一些局限性,例如构建方法相对复杂,操作起来费时费力;抗体的晶状体结构以及电脑模拟抗体的微细结构上都有很大的问题;降低免疫原性和保持抗原结合活性方面还有很多问题。随着单个 B 细胞的高通量分选技术和单细胞克隆技术的诞生,开拓了全人源抗体的研究时代。全人源的中和抗体来源于人体的外周血,具有更低的异质性,其三维空间结构与自然感染后获得的特异性抗体的空间结构更相似,从而具有不良反应小、半衰期长、疗效好的优点。

2. 全人源单克隆中和抗体国内外进展:依据诱导产生全人源单克隆抗体的方式可以将其分为两类,一类为接种疫苗后诱导产生的抗体,另一类为自然感染诱导产生的抗

体。目前接种疫苗后产生的抗体报道较少,在一项研究中,对 A/Anhui/1/2013(H7N9 型)候选疫苗诱导的 12 种 H7 型反应性人抗体的结合和功能特性进行了分析,结果发现中和抗体和非中和抗体都可以保护小鼠<sup>[64]</sup>。相反,自然感染产生的抗体种类繁多且大部分都具备良好的中和活性。例如,单克隆抗体 Z2B3 是从一名感染 H7N9 型 AIV 的儿童中分离得到,它与 N9 和多种 N 蛋白具有交叉反应性<sup>[65]</sup>。有研究发现中和抗体 3L11 可以在小鼠暴露前和暴露后都能充分保护抵抗致命的 H7N9 型病毒<sup>[66]</sup>。另外两种人单克隆抗体 HNIgGD5 和 HNIgGH8 均具有较高的中和活性<sup>[67]</sup>。HNIgG A6 和 HNIgG B5 这两种抗体在细胞中对 H7N9 型病毒也表现出较高的中和活性<sup>[68-70]</sup>。3 种中和保护抗体与 H7 血凝素复合体的晶体结构表明,它们能识别血凝素受体结合位点周围的重叠残基。其中一种抗体 L4A-14 与唾液酸结合位点结合,并与 2016-2017 年绝大多数 H7N9 型分离株中保存的血凝素残基接触<sup>[71]</sup>。此外,从 2017 年感染 H7N9 型的一名恢复期患者体内筛选出的人单克隆抗体 P52E03 也可对北美和欧亚血统的 H7 亚型病毒均表现出体外抑制(HI)和中和活性。不仅如此,它还能预防小鼠因感染致命的 H7N9 型病毒而导致的体重减轻和死亡,有望成为抗 H7N9 型感染抗病毒药物的候选药物<sup>[72]</sup>。现阶段发现的单克隆抗体不仅可以保护小鼠免于 H7N9 型 AIV 的感染,同时又对其他型别 AIV 具备交叉保护作用。例如 S9-1-10/5-1 抗体至少能识别检测到的 HA 可溶性抗原的 3 个亚型,它能与 18 种 HA 亚型发生反应,保护小鼠免受 H11pdm09、H3N2、H5N1 和 H7N9 型病毒的致命感染<sup>[73]</sup>。另一研究从一名急性感染 H7N9 型的儿童身上也分离出来一株单克隆抗体,对 N1 组和 N2 组 N9 型 NAs 均有抑制作用。此外,该抗体对高致病性 H5N1 型 AIV 的 N1-NAs 也具有交叉抑制作用<sup>[74]</sup>。目前大量研究通过体内外攻毒实验筛选出具有中和活性的 H7N9 型 AIV 全人源单克隆中和抗体,其中部分中和抗体还具有广谱中和活性,这些抗体有望成为对抗流感病毒的新型药物。

## 六、小结与展望

虽然 H7N9 型 AIV 大规模疫情已经宣告结束,但是该疫情对全球带来的恐慌和影响力仍然挥之不去。迄今为止,该病毒所导致的疾病范围和感染来源信息有限。它之所以受到关注,是因为患者多病情危重。过去观点认为 AIV 不能直接感染人类,然而 2013 年 3 月,在我国出现了世界上首例人感染 H7N9 型 AIV 的病例,这也说明 AIV 已经突破了种属屏障,可以直接感染人类并导致死亡。虽迄今没有迹象表明该病毒能在人际传播,但是正是因为病毒种类的多样化导致容易发生突变,今后也许会出现人传人并产生引起流感大流行的可能性。

现有针对 AIV 职业暴露人群感染的相关文献主要为横断面研究,研究时间跨度短且研究的地区并非疫情地。因此未来研究应当调查更加全面的人群范围,更加广阔的研究地区,时间跨度更加长。这将有助于评估相关环境中不

同亚型 AIV 的分布情况,掌握影响危险因素,可为将来流感病毒的预防和控制提供参考意见。考虑到在市场环境中 AIV 流行株的变动及新型 AIV 的出现,未来对于家禽养殖场和活禽交易市场中国家禽及环境仍然需要保持动态监测,探索病毒变异与遗传进化规律。另一方面,对于职业暴露人群及高风险人群也需要保持病例监测系统,对其进行血清学研究以确定职业暴露人群中 AIV 的感染率与发病率,评估不同亚型的感染情况,掌握影响职业暴露人群的危险因素,为将来 AIV 的预防和控制提供参考意见。

现有流感疫苗在人群中虽然具有良好的安全性和免疫原性,但对 H7N9 型 AIV 并无交叉抗体反应<sup>[75]</sup>。而目前 H7N9 型 AIV 疫苗仍然处于临床 I 期和 II 期试验阶段,主要目的是探索疫苗的安全性及免疫原性。暂无有效性方面数据,其在真实世界中的效力高低不得而知。因此,未来 H7N9 型 AIV 疫苗需要进行 III 期临床试验以确定疫苗的效力。现有临床试验已经证明在 H7N9 型 AIV 灭活疫苗中,佐剂对疫苗免疫原性的重要性,除了铝佐剂、ASO3、MF59 等当前正在使用的佐剂,其他佐剂的添加或者合并使用是否会有效地刺激机体产生更高的免疫原性也值得进一步探讨。除了传统疫苗,H7N9 型疫苗中 VLPs 疫苗以其独特的安全性、有效性等特征,在预防 H7N9 型 AIV 方面也有着广阔的发展前景。现阶段大部分临床试验的受试者都是年龄为 18~60 岁的健康人群,还需要考虑该疫苗是否适用于特殊人群,例如免疫缺陷病患者或免疫功能障碍者、孕妇、低龄儿童和老年人中的免疫原性效果。除此之外,现有的 H7N9 疫苗接种程序一般为间隔 2 针次,今后还需关注如何优化免疫程序并提高免疫原性。1 针次免疫接种虽然便捷,适用于暴发疫情的快速免疫需求,但是疫苗的长期保护效果会随着时间的推移而持续下降,导致保护效力的降低,而使用初免-加强策略可以诱发更持久的抗体水平。目前采用的 DNA 疫苗初免-灭活疫苗加强策略能提高免疫原性,但是其持久性结果还不得而知。加强免疫的剂型与剂量的选择以及加强针接种时间点和成本效益也有待进一步探讨。

一般认为,全人源单克隆中和抗体具有安全、高效的特征,可以快速中和人体内的相应病毒,使其失去致病能力,所以针对 H7N9 型 AIV 抗体的研究可以达到应急预防或针对性治疗的作用,具有广泛的应用前景。虽然目前全球范围筛选出了部分 H7N9 型 AIV 全人源单克隆中和抗体,其中部分中和抗体具有广谱中和活性,但是并没有真正投入制备被动免疫制剂的抗体,且人们对于 AIV 的研究也只是冰山一角,尚存大量有待研发的抗体及有待阐明的中和机制。未来对 H7N9 型 AIV 的全人源单克隆中和抗体进一步的研究不仅可有于丰富抗体族谱又可以为 AIV 疫苗或靶向药物提供科学依据和理论指导。

随着疫情的逐步平息,鉴于其未来存在潜在大流行的风险,以下亟待解决的难点需要我们重点关注:监测 AIV 流行株的变异情况,警惕 AIV 流行株产生针对疫苗的免疫逃逸,对未来可能出现的 AIV 暴发以及联动其他流感病毒感

染需要保持高度警惕并做出应对准备;对 AIV 疫苗的深入、持续研究亟待加强,研究安全、广谱、高效的 AIV 疫苗。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Salathé M, Freifeld CC, Mekaru SR, et al. Influenza a (H7N9) and the importance of digital epidemiology[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(5): 401-404. DOI: 10.1056/NEJMp1307752.
- [2] Wu XX, Xiao LL, Li LJ. Research progress on human infection with avian influenza H7N9[J]. *Front Med*, 2020, 14(1):8-20. DOI:10.1007/s11684-020-0739-z.
- [3] 崔欢,张诚,张春茂,等. H7N9 亚型禽流感病毒研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(9): 1871-1875. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2020.09.30.
- [4] Cui H, Zhang C, Zhang CM, et al. Review on research of avian H7N9 influenza virus[J]. *Chin J Vet Sci*, 2020, 40(9): 1871-1875. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2020.09.30.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 人感染高致病性禽流感[EB/OL]. (2018-10-12) [2021-02-21]. <http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/rgrgzbxqlg/>. Chinese Center for Disease Control and Prevention. Human infection with highly pathogenic avian influenza [EB/OL]. (2018-10-12) [2021-02-21]. <http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/rgrgzbxqlg/>.
- [6] Verhagen JH, Fouchier RAM, Lewis N. Highly pathogenic avian influenza viruses at the wild-domestic bird interface in europe: future directions for research and surveillance[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 212. DOI: 10.3390/v13020212.
- [7] Parvin R, Nooruzzaman M, Kabiraj CK, et al. Controlling avian influenza virus in bangladesh: challenges and recommendations[J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 751. DOI: 10.3390/v12070751.
- [8] World Health Organization. Influenza at the human-animal interface[EB/OL]. (2015-09-04) [2021-02-21]. [https://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/Influenza\\_Summary\\_IRA\\_HA\\_interface\\_04\\_September\\_2015.pdf](https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_04_September_2015.pdf).
- [9] Zhu WF, Shu YL. Genetic tuning of avian influenza A (H7N9) virus promotes viral fitness within different species[J]. *Microbes Infect*, 2015, 17(2): 118-122. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.11.010.
- [10] Tong SX, Zhu XY, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza a viruses[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10): e1003657. DOI:10.1371/journal.ppat.1003657.
- [11] Huang SW, Wang SF. The effects of genetic variation on H7N9 avian influenza virus pathogenicity[J]. *Viruses*, 2020, 12(11):1220. DOI:10.3390/v12111220.
- [12] Wu P, Peng ZB, Fang VJ, et al. Human infection with influenza A(H7N9) virus during 3 major epidemic waves, China, 2013-2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(6): 964-972. DOI:10.3201/eid2206.151752.
- [13] Xiang NJ, Iuliano AD, Zhang YP, et al. Comparison of the first three waves of avian influenza A(H7N9) virus circulation in the mainland of the People's Republic of China[J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1):734. DOI:10.1186/s12879-016-2049-2.
- [14] Bright RA, Shay DK, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza a viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States[J]. *JAMA*, 2006, 295(8):891-894. DOI:10.1001/jama.295.8.joc60020.
- [15] Liu S, Zhuang QY, Wang SC, et al. Control of avian influenza in China: strategies and lessons[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(4): 1463-1471. DOI: 10.1111/tbed.13515.
- [16] World Health Organization. Influenza (Avian and other

- zoonotic) [EB/OL]. (2018-11-13) [2021-02-21]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic)).
- [16] Yassine HM, Lee CW, Saif YM. Interspecies transmission of influenza A viruses between Swine and poultry[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 370: 227-240. DOI: 10.1007/82\_2011\_180.
- [17] Qi YP, Ni HB, Chen XL, et al. Seroprevalence of highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus infection among humans in mainland China: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(5): 1861-1871. DOI:10.1111/tbed.13564.
- [18] Chen XH, Wang W, Wang Y, et al. Serological evidence of human infections with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus: a systematic review and Meta-analysis[J]. *BMC Med*, 2020, 18(1): 377. DOI: 10.1186/s12916-020-01836-y.
- [19] Wang Q, Xu K, Xie WH, et al. Seroprevalence of H7N9 infection among humans: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Influenza Other Respi Viruses*, 2020, 14(5):587-595. DOI:10.1111/irv.12736.
- [20] Ma CN, Cui SJ, Sun Y, et al. Avian influenza A (H9N2) virus infections among poultry workers, swine workers, and the general population in Beijing, China, 2013-2016: a serological cohort study[J]. *Influenza Other Respi Viruses*, 2019, 13(4):415-425. DOI:10.1111/irv.12641.
- [21] Ma MJ, Zhao T, Chen SH, et al. Avian influenza A virus infection among workers at live poultry markets, China, 2013-2016[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(7): 1246-1256. DOI:10.3201/eid2407.172059.
- [22] Xin L, Bai T, Zhou JF, et al. A comprehensive retrospective study of the seroprevalence of H9N2 avian influenza viruses in occupationally exposed populations in China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178328. DOI: 10.1371/journal.pone.0178328.
- [23] Quan CS, Wang QL, Zhang J, et al. Avian influenza A viruses among occupationally exposed populations, China, 2014-2016[J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(12):2215-2225. DOI:10.3201/eid2512.190261.
- [24] Tahir MF, Abbas MA, Ghafoor T, et al. Seroprevalence and risk factors of avian influenza H9 virus among poultry professionals in Rawalpindi, Pakistan[J]. *J Infect Public Health*, 2020, 13(3): 414-417. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.02.030.
- [25] Gomaa MR, El Rifay AS, Zeid DA, et al. Incidence and seroprevalence of avian influenza in a cohort of backyard poultry growers, Egypt, August 2015-March 2019[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(9): 2129-2136. DOI: 10.3201/eid2609.200266.
- [26] Shimizu K, Wulandari L, Poetranto ED, et al. Seroevidence for a high prevalence of subclinical infection with avian influenza A(H5N1) virus among workers in a live-poultry market in Indonesia[J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(12): 1929-1936. DOI:10.1093/infdis/jiw478.
- [27] Poirrot E, Levine MZ, Russell K, et al. Detection of avian influenza A(H7N2) virus infection among animal shelter workers using a novel serological approach-New York city, 2016-2017[J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(11):1688-1696. DOI:10.1093/infdis/jiy595.
- [28] Saberi M, Tavakkoli H, Najmaddini A, et al. Serological prevalence of avian H9N2 influenza virus in dogs by hemagglutination inhibition assay in Kerman, southeast of Iran[J]. *Vet Res Forum*, 2019, 10(3): 249-253. DOI: 10.30466/vrf.2018.87879.2140.
- [29] Huo X, Zu RQ, Qi X, et al. Seroprevalence of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers in Jiangsu province, China: an observational study[J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1):93. DOI:10.1186/1471-2334-12-93.
- [30] Sikkema RS, Freidl GS, de Bruin E, et al. Weighing serological evidence of human exposure to animal influenza viruses—a literature review[J]. *Euro Surveill*, 2016, 21(44):30388. DOI: 10.2807/1560-7917. Es.2016.21.44.30388.
- [31] Yang P, Ma CN, Shi WX, et al. A serological survey of antibodies to H5, H7 and H9 avian influenza viruses amongst the duck-related workers in Beijing, China[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50770. DOI: 10.1371/journal.pone.0050770.
- [32] Huang R, Wang AR, Liu ZH, et al. Seroprevalence of avian influenza H9N2 among poultry workers in Shandong province, China[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32(10):1347-1351. DOI:10.1007/s10096-013-1888-7.
- [33] Kayali G, Barbour E, Dbaibo G, et al. Evidence of infection with H4 and H11 avian influenza viruses among Lebanese chicken growers[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26818. DOI: 10.1371/journal.pone.0026818.
- [34] Uyeki TM, Nguyen DC, Rowe T, et al. Seroprevalence of antibodies to avian influenza A(H5) and A(H9) viruses among market poultry workers, Hanoi, Vietnam, 2001[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43948. DOI: 10.1371/journal.pone.0043948.
- [35] Wang M, Fu CX, Zheng BJ. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(24): 2583-2584. DOI: 10.1056/NEJMc0900358.
- [36] Xiang NJ, Bai T, Kang K, et al. Sero-epidemiologic study of influenza A(H7N9) infection among exposed populations, China 2013-2014[J]. *Influenza Other Respi Viruses*, 2017, 11(2):170-176. DOI:10.1111/irv.12435.
- [37] Zhou P, Zhu WJ, Gu HL, et al. Avian influenza H9N2 seroprevalence among swine farm residents in China[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(4):597-600. DOI:10.1002/jmv.23869.
- [38] Uyeki TM. Human infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus: review of clinical issues[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 49(2):279-290. DOI:10.1086/600035.
- [39] Rudenko L, Isakova-Sivak I, Naykhin A, et al. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(3): 303-310. DOI: 10.1016/s1473-3099(15)00378-3.
- [40] Kiseleva I, Isakova-Sivak I, Stukova M, et al. A phase 1 randomized placebo-controlled study to assess the safety, immunogenicity and genetic stability of a new potential pandemic H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults[J]. *Vaccines*, 2020, 8(2):296. DOI:10.3390/vaccines8020296.
- [41] Wu UI, Hsieh SM, Lee WS, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated cell culture-derived H7N9 influenza vaccine in healthy adults: a phase I / II , prospective, randomized, open-label trial[J]. *Vaccine*, 2017, 35(33): 4099-4104. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.044.
- [42] Madan A, Segall N, Ferguson M, et al. Immunogenicity and safety of an AS03-adjuvanted H7N9 pandemic influenza vaccine in a randomized trial in healthy adults[J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(11): 1717-1727. DOI: 10.1093/infdis/jiw414.
- [43] Winokur P, El Sahly HM, Mulligan MJ, et al. Immunogenicity and safety of different dose schedules and antigen doses of an MF59-adjuvanted H7N9 vaccine in healthy adults aged 65 years and older[J]. *Vaccine*, 2021, 39(8): 1339-1348. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.11.051.
- [44] Bart SA, Hohenboken M, Cioppa GD, et al. A cell culture-derived MF59-adjuvanted pandemic A/H7N9 vaccine is immunogenic in adults[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(234):234ra55. DOI:10.1126/scitranslmed.3008761.
- [45] Jackson LA, Campbell JD, Frey SE, et al. Effect of varying doses of a monovalent H7N9 influenza vaccine with and without AS03 and MF59 adjuvants on immune response:a



- randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2015, 314(3):237-246. DOI:10.1001/jama.2015.7916.
- [46] El Sahly HM, Atmar RL, Patel SM, et al. Safety and immunogenicity of an 8 year interval heterologous prime-boost influenza A/H7N7-H7N9 vaccination[J]. *Vaccine*, 2019, 37(19):2561-2568. DOI:10.1016/j.vaccine.2019.03.071.
- [47] Pushko P, Tretyakova I. Influenza virus like particles (VLPs): opportunities for H7N9 vaccine development[J]. *Viruses*, 2020, 12(5):518. DOI:10.3390/v12050518.
- [48] Fries LF, Smith GE, Glenn GM. A recombinant viruslike particle influenza A (H7N9) vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(26):2564-2566. DOI:10.1056/NEJMc1313186.
- [49] Chung KY, Coyle EM, Jani D, et al. ISCOMATRIX™ adjuvant promotes epitope spreading and antibody affinity maturation of influenza A H7N9 virus like particle vaccine that correlate with virus neutralization in humans[J]. *Vaccine*, 2015, 33(32): 3953-3962. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.06.047.
- [50] DeZure AD, Coates EE, Hu ZH, et al. An avian influenza H7 DNA priming vaccine is safe and immunogenic in a randomized phase I clinical trial[J]. *NPJ Vaccines*, 2017, 2: 15. DOI:10.1038/s41541-017-0016-6.
- [51] Ledgerwood JE, Graham BS. DNA vaccines: a safe and efficient platform technology for responding to emerging infectious diseases[J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5(9): 623-626. DOI:10.4161/hv.8627.
- [52] Ledgerwood JE, Wei CJ, Hu ZH, et al. DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(12):916-924. DOI:10.1016/s1473-3099(11)70240-7.
- [53] Dai J, Zhou XM, Dong DJ, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus: serial chest radiographic and CT findings[J]. *Chin Med J*, 2014, 127(12):2206-2011. DOI:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20132951.
- [54] Gao RB, Cao B, Hu YW, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1888-1897. DOI:10.1056/NEJMoa1304459.
- [55] Guo L, Zhang X, Ren LL, et al. Human antibody responses to avian influenza A(H7N9) virus, 2013[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(2):192-200. DOI:10.3201/eid2002.131094.
- [56] Hu YW, Lu SH, Song ZG, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance[J]. *Lancet*, 2013, 381(9885): 2273-2279. DOI: 10.1016/s0140-6736(13)61125-3.
- [57] Huang Y, Xu K, Ren DF, et al. Probable longer incubation period for human infection with avian influenza A(H7N9) virus in Jiangsu province, China, 2013[J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(12): 2647-2653. DOI: 10.1017/s0950268814000272.
- [58] 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. DOI: 10.1001/jama.2014.12854.
- [59] Osterholm MT, Ballering KS, Kelley NS. Major challenges in providing an effective and timely pandemic vaccine for influenza A(H7N9) [J]. *JAMA*, 2013, 309(24): 2557-2558. DOI:10.1001/jama.2013.6589.
- [60] Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza a hemagglutinins[J]. *Science*, 2011, 333(6044):850-856. DOI:10.1126/science.1205669.
- [61] Yang F, Xiao YX, Liu FM, et al. Development of a monoclonal antibody-based antigen capture enzyme linked immunosorbent assay for detection of H7N9 subtype avian influenza virus[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(6): 3939-3943. DOI:10.1002/jmv.26292.
- [62] Yang F, Xiao YX, Lu RF, et al. Generation of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against H7N9 influenza virus[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):664-675. DOI:10.1080/22221751.2020.1742076.
- [63] Schmeisser F, Vasudevan A, Verma S, et al. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 hemagglutinin provide protection against H7 N9 challenge[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e0117108. DOI:10.1371/journal.pone.0117108.
- [64] Dunand CJH, Leon PE, Huang M, et al. Both neutralizing and non-neutralizing human H7N9 influenza vaccine-induced monoclonal antibodies confer protection[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(6): 800-813. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.014.
- [65] Jiang HH, Peng WY, Qi JX, et al. Structure-based modification of an anti-neuraminidase human antibody restores protection efficacy against the drifted influenza virus[J]. *mBio*, 2020, 11(5): e02315-20. DOI: 10.1128/mBio.02315-20.
- [66] Li JX, Yang Y, Wang M, et al. Rapid isolation of a potent human antibody against H7N9 influenza virus from an infected patient[J]. *Antiviral Res*, 2019, 170:104564. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104564.
- [67] Wang JM, Chen Z, Bao LL, et al. Characterization of two human monoclonal antibodies neutralizing influenza A H7N9 viruses[J]. *J Virol*, 2015, 89(17): 9115-9118. DOI: 10.1128/jvi.01295-15.
- [68] Chen Z, Wang JM, Bao LL, et al. Human monoclonal antibodies targeting the haemagglutinin glycoprotein can neutralize H7N9 influenza virus[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6714. DOI:10.1038/ncomms7714.
- [69] Chen C, Liu LG, Xiao Y, et al. Structural insight into a human neutralizing antibody against influenza virus H7N9[J]. *J Virol*, 2018, 92(5): e01850-17. DOI: 10.1128/jvi.01850-17.
- [70] Chen C, Liu ZL, Liu LG, et al. Broad neutralizing activity of a human monoclonal antibody against H7N9 strains from 2013 to 2017[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1):179. DOI:10.1038/s41426-018-0182-2.
- [71] Huang KYA, Rijal P, Jiang HH, et al. Structure-function analysis of neutralizing antibodies to H7N9 influenza from naturally infected humans[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(2):306-315. DOI:10.1038/s41564-018-0303-7.
- [72] Li MX, Chen L, Wang QG, et al. A cross-reactive human monoclonal antibody targets the conserved H7 antigenic site A from fifth wave H7N9-infected humans[J]. *Antiviral Res*, 2019, 170: 104556. DOI: 10.1016/j. antiviral. 2019. 104556.
- [73] Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, et al. A broadly reactive human anti-hemagglutinin stem monoclonal antibody that inhibits influenza a virus particle release[J]. *EBioMedicine*, 2017, 17: 182-191. DOI: 10.1016/j. ebiom. 2017.03.007.
- [74] Rijal P, Wang BB, Tan TK, et al. Broadly inhibiting antineuraminidase monoclonal antibodies induced by trivalent influenza vaccine and H7N9 infection in humans [J]. *J Virol*, 2020, 94(4): e01182-19. DOI: 10.1128/jvi. 01182-19.
- [75] 郭万申, 徐瑾, 吴俊燊, 等. 季节性流感裂解疫苗安尔来福®的安全性、免疫原性及与H7N9禽流感病毒的交叉免疫研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(8): 949-952. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.08.016.
- Guo WS, Xu J, Wu JY, et al. Safety and immunogenicity of seasonal inactivated influenza vaccine (split virion) and cross-reactive antibody responses to the H7N9 avian influenza virus[J]. *Chin J Epidemiol*, 2014, 35(8):949-952. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.08.016.