

H5 亚型禽流感病毒 DAS-ELISA 检测方法的建立

黄璐¹ 林一¹ 王厚照¹ 王生育² 陈美玉²

1. 中国人民解放军陆军第七十三集团军医院检验科 福建 厦门 361000;

2. 厦门大学抗癌研究中心 福建 厦门 361005

摘要:目的 制备特异性和灵敏度较高的抗 H5 亚型禽流感病毒单克隆抗体,建立双抗体夹心 ELISA 方法,为进一步研究检测试剂盒提供基础。方法 以 H5 亚型禽流感病毒为抗原,免疫 BALB/c 小鼠,通过细胞融合及杂交瘤细胞筛选,获取抗 H5 亚型禽流感病毒单克隆抗体,用 Ig 亚类 ELISA 试剂盒鉴定抗体亚类,间接 ELISA 法检测抗体效价及特异性。HRP 标记单抗并建立双抗夹心 ELISA 检测方法,经方阵试验优化 ELISA 反应体系。结果 获得配对的 2 株可分泌特异性单抗的阳性细胞株 3C9、6F5,腹水抗体效价在 $1:10^5$ 以上,IgG 亚类均为 IgG2a,轻链为 κ 链。优化的双抗夹心检测体系能检测多种 H5 亚型禽流感病毒,与 H9 亚型和 H7 亚型均无交叉反应。结论 成功获得高效价的抗 H5 亚型禽流感病毒单克隆抗体,建立抗 H5 亚型禽流感病毒单克隆抗体双抗体夹心 ELISA 检测方法。

关键词: 禽流感病毒;单克隆抗体;双抗夹心 ELISA

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-7115(2020)01-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-7115.2020.01.003

Establishment of DAS-ELISA for detection of H5 subtype avian influenza virus

HUANG Lu¹ LIN Yi¹ WANG Hou-zhao¹ WANG Sheng-yu² CHEN Mei-yu^{2*}

1. Clinical laboratory, The seventy-third Army Hospital of PLA, Xiamen 361000, China;

2. Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Objective: To make the preparation of specific and highly sensitive monoclonal antibodies against H5 subtype avian influenza virus (AIV-H5), which will be used in the establishment of a sandwich ELISA method and as a basic work to develop ELISA Kit. Methods: Balb/c mice were immunized with AIV-H5 and then positive clones of monoclonal antibody (McAb) were obtained after cell fusion and hybridoma selection. The ascites titers, the subclasses type, and the specificity of McAbs were tested by Ig subtype ELISA kit and ELISA, respectively. Moreover, optimization of the sandwich enzymelinked immunosorbent assay was studied by matrix assay. Results: Two of positive hybridomas were screened out, named 3C9 and 6F5 whose ascites titers of McAbs were over $1:10^5$. It proved that the Ig subtypes of 3C9 and 6F5 McAbs were IgG2a, and the light chain was kappa. The DAS-ELISA could detect H5 AIV isolates, but not react with H9 and H7 isolates. Conclusion: Specific McAbs against H5 AIV are achieved and can be applied to the development of a double-antibody sandwich ELISA method.

Key words: avian influenza virus; monoclonal antibody; double sandwich ELISA

禽流感是一种人兽共患传染病,属于 A 类传染病,由 A 型流感病毒引起,主要威胁养禽业和人类健康安全,人类患者常伴有呼吸道感染,严重患者可危及生命^[1]。禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)感染是一类重大养禽类疫病,其病毒亚型多,变异度高,宿主广泛,各亚型之间无交叉,导致疫情频繁发生,以 H5 亚型禽流感病毒(H5 subtype avian influenza virus, AIV-H5)的致病性最高、危害性最严

重^[2]。AIV-H5 不仅常导致养禽业经济损失严重,还可跨越宿主屏障直接感染人,从而危及人类安全^[3]。因此,对 AIV-H5 的快速检测,在控制养禽业疫情及保障人类健康方面至关重要。

目前,检测 AIV 有琼脂糖扩散试验、免疫荧光试验、实时定量 RT-PCR 等多种检测方法^[4]。然而,上述方法均存在实验周期长,所需仪器复杂等不同类型的缺点,不能满足基层快速准确诊断的需求。

* 基金项目:福建省属公益类科研院所基本科研专项(2017R1036-5)。

作者简介:黄璐,女,初级技师,主要从事医学检验基础与临床研究, E-mail: 465410948@qq.com。

通讯作者:陈美玉, E-mail: meiyu508@xmu.edu.cn。

因此,研发快速、简便、准确的 AIV-H5 检测方法具有重要意义。已有研究利用酶联免疫吸附法(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)检测 H5、H7 亚型的禽流感病毒相关的检测试剂盒,但是禽流感病毒在进化和传播过程中易发生频繁且不可预测的突变,变异重组的病毒可能具有新的抗原性和致病性,可逃逸人群中已形成的免疫屏障,引起季节性或大规模的流感暴发^[5]。目前,已有的检测方法尚不能有效地识别不断出现的新毒株,因此探讨更有效的广谱的检测方法具有重要意义。本研究拟通过混合多种 AIV-H5 免疫动物,制备通用的单克隆抗体(monoclonal antibodies, McAb),在此基础上酶标抗体,筛选配对单抗,建立抗 AIV-H5 双抗体夹心 ELISA 方法(DAS-ELISA)检测方法体系,制作标准曲线,旨在为禽流感疫情防控提供一种高效检测手段,并为 H5 亚型禽流感病毒监测、后续研究提供有效工具。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 BALB/c 小鼠由厦门大学实验动物中心提供;小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞由本实验室保存;A/Environment/Yunnan/01455/2015 (H5N1)、A/Chicken/Hebei/3/2013 (H5N2)、A/Duck/Jiangsu/S1665/2015 (H5N3)、A/Environment/Jiangxi/10645/2014 (H5N8) 禽流感病毒及其他病毒的扩增与灭活由深圳出入境检验检疫局完成。弗氏佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG、HAT、HT、HRP 和 rProtein A 均为 Sigma 公司(USA)产品;胎牛血清和 DMEM 培养基为 Gibco 公司(USA)产品;其他试剂为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备 将种毒稀释 1×10^6 倍后接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 37℃ 孵育 48 h,收集尿囊液,利用 β -丙内酯灭活尿囊液,通过 28 000 r/min 超速离心 2 h 浓缩纯化病毒。沉淀的病毒使用适量的 PBS 进行稀释,浓度调整到 1 mg/mL 作为母液,分装保存于 -80℃ 冰箱备用,避免反复冻融。

1.2.2 动物免疫 选择 6~7 周龄的雌性 BALB/c 小鼠作为免疫动物,动物免疫及饲养于厦门大学实验动物中心的 ABSL-2 动物生物安全实验室中进行(实验室备案编号:20142149012)。具体操作流程如下:将 H5N1 病毒与弗氏完全佐剂乳化均匀,经皮下多点注射进行动物初免,将 H5N2、H5N3 病毒分别与弗氏不完全佐剂乳化均匀,在第 15 天和第 30 天分别进行二免和三免。尾静脉采血,用间接 ELISA 法测定血清效价,选取效价高的小鼠用于后续细胞融合。细胞融合前第 3 天,用 H5N8 病毒对小鼠进行脾脏注射加强免疫。

1.2.3 细胞融合和杂交瘤细胞株筛选 将免疫小

鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 PEG2000 的作用下进行细胞融合后,加入 HAT 培养基及饲养细胞种植于 96 孔中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度下培养。在融合后第 3 天用 HT 选择培养液换液,待克隆孔长至 1/3~1/2 时,开始进行杂交瘤细胞株筛选。筛选程序如下:首先以 H5N1 为包被抗原对克隆孔的培养上清进行大规模初次筛选,初筛获得的阳性孔继而用 H5N2、H5N3 和 H5N8 为包被抗原进行再次筛选。4 次筛选均为阳性的克隆,进行下一步的“剔除筛选”,即以 H9N2、H7N9 为包被抗原进行筛选,剔除筛选过程中保留阴性反应的克隆孔。以上综合筛选获得的克隆株用有限稀释法进行 3 次亚克隆,最终获得稳定分泌抗 H5 亚型禽流感病毒抗体(anti-AIV-H5 McAb)的杂交瘤细胞,进行再扩大培养、冻存。

1.2.4 腹水抗体的制备与纯化 取 8~10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,腹腔注射石蜡油(0.5 mL/只),致敏 1 周后腹腔注射杂交瘤细胞(1×10^6 个/只)。待小鼠腹腔明显膨大后收集腹水,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液即为小鼠腹水单克隆抗体。通过 rProteinA 纯化腹水抗体,用超滤管浓缩纯化的抗体,用紫外吸收法测定抗体浓度。

1.2.5 Anti-AIV-H5 抗体的鉴定 采用 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度,抗体亚类鉴定试剂盒测定 McAb 的 Ig 亚类,间接 ELISA 法测定抗体效价,并与 H9 和 H7 亚型(H9N2 和 H7N9)进行交叉反应试验,检测抗体的特异性。

1.2.6 单克隆抗体的酶标记 采用改良的过碘酸钠法,以辣根过氧酶标记已纯化的抗体。具体方法如下:取 10 mg HRP 溶解于 2 mL 蒸馏水,加入 0.4 mL 新配的 0.1 M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 min。利用 1 mM pH 4.4 的醋酸钠缓冲液,在 4℃ 环境下透析过夜。将溶液 pH 调到 9.0~9.5 时立即加入 5 mg anti-AIV-H5 抗体,室温避光轻轻搅拌 2 h。然后加入 0.2 mL 新配的 4 mg/mL NaBH₄ 液,混匀,置 4℃ 2 h。接着,于 0.15 M pH 7.4 PBS 中 4℃ 透析过夜,即可获得 HRP 标记的抗体溶液。检测并调整抗体溶液浓度,分装, -20℃ 保存。直接 ELISA 检测标记的抗体的效价。以 1:1 的比例加入甘油,分装后储存于 -20℃ 备用。

1.2.7 DAS-ELISA 体系抗体组合及工作浓度确定 棋盘滴定法^[6]用于筛选捕获抗体、检测抗体的最佳组合及最佳工作浓度。具体方法如下:①以 2.5、5、10、20 μ g/mL,100 μ L/well 将 3C9、6F5 于 37℃ 分别包被于酶标板上 1 h,作为捕获抗体;②用 5% BSA 于 37℃ 封闭 1 h;③加入 0.2 μ g/mL,100 μ L/well 的病毒液于 37℃ 反应 1 h;④分别以 HRP-3C9 和 HRP-6F5 作为检测抗体,从起始稀释浓度 1:2 000 做倍比稀释,OPD 显色,H₂SO₄ 终止,测 OD_{490nm}。依据反

应线性及 P/N 值, 确定最佳抗体组合、包被抗体及检测抗体工作稀释浓度。

1.2.8 DAS-ELISA 体系最佳工作条件的确定 根据抗体最佳工作浓度, 在不同反应条件下, 采用棋盘法筛选适宜的条件。包被条件: 包被液设有 0.01、0.05、0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液, 包被时间设有 4℃ 12 h、37℃ 2 h 和 37℃ 2 h + 4℃ 12 h。封闭条件: 封闭液设有 2% 明胶、5% BSA、5% 马血清和 5% 脱脂奶粉, 作用时间设有 37℃ 1 h、37℃ 2 h、4℃ 12 h。酶标二抗条件: 稀释度从 1: 2 000 做倍比稀释到 1: 10 000, 作用时间 37℃ 30 min、1 h、1.5 h、2 h。以上各组实验, 组成方阵进行 ELISA 试验, 根据 OD_{490nm} 值以及 S/N 值的分析确定最佳条件。

1.2.9 DAS-ELISA 体系检测 AIV-H5 标准曲线的建立 根据已建立好的 DAS-ELISA 体系, 对 AIV-H5 病毒液从 1 200 ng 开始做 2 倍系列稀释, 设阴性对照和空白对照孔进行检测, 反应完毕后测定 OD_{490nm} 值。以病毒稀释浓度为横坐标, OD_{490nm} 值为纵坐标绘制曲线图。

1.2.10 DAS-ELISA 体系检测 AIV-H5 特异性试验 在优化的条件下, 使用 AIV-H5 的 DAS-ELISA 系统检测 AIV-H5 病毒及相应的 2¹ ~ 2⁷ 稀释液, 同时设有多种对照组, 即交叉实验对照组: 灭活后的人的其他亚型禽流感病毒(如 AIV-H2、AIV-H7、AIV-H9 和 AIV-H13), 灭活后的症状相似的其他禽类病毒如新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)、产蛋下降综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDSV); 阳性对照组: AIV-H5 阳性免疫小鼠血清和阳性杂交瘤细胞上清; 阴性对照: SP2/0 细胞上清、未免疫的小鼠血清和 SPF 鸡胚尿囊液原液。根据结果分析评价 DAS-ELISA 系统的特异性。

1.2.11 DAS-ELISA 体系检测 AIV-H5 敏感性试验 同时用已建立的 AIV-H5 的 DAS-ELISA 系统和商品化的人禽流感(H5N1) ELISA 试剂盒对 AIV-H5 病毒鸡胚尿囊液及 SPF 鸡胚尿囊液倍比系列稀释液进行检测。敏感度以检测结果为阳性的最大稀释倍数表示。

1.2.12 阴阳性临界值的确定 用 AIV-H5 标准抗原和其他亚型病毒, 以 PBS 制成待检阴性抗原, 然后按已建立的 DAS-ELISA 系统进行检测。在符合正态分布的前提下计算 OD 值的平均数(X)和标准差(SD), 按公式计算出阴、阳性抗原的临界值 = X + 3 × SD。当 OD 值大于临界值时, 可以 99.9% 的可信度判定为阳性。

1.2.13 临床样本检测 用已建立的 AIV-H5 的 DAS-ELISA 系统对来自疫区的 30 份灭活后的禽类鸡棉拭子样品进行检测, 并与商品化 ELISA 试剂盒相比较, 对系统的敏感性、特异性和实用性进行评

价。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株筛选与 anti-AIV-H5 抗体制备

免疫小鼠尾静脉采血, 间接 ELISA 法测定血清效价, 以 P/N ≥ 2.1 的血清稀释度判定有效血清效价。结果 3 只免疫鼠血清抗体效价均达 1: 32 000 以上(图 1), 均可用于后续的细胞融合。

利用 ELISA 筛选多重筛选融合后的阳性杂交瘤细胞, 有限稀释法克隆纯化, 直到获得 McAb 的杂交瘤细胞株, 分别命名为 3C9 和 6F5。ELISA 检测杂交瘤细胞培养液上清的效价都可达 1: 10³ 以上。杂交瘤细胞腹腔注射小鼠, 制备腹水抗体, 经检测效价均达到 1: 10⁷。

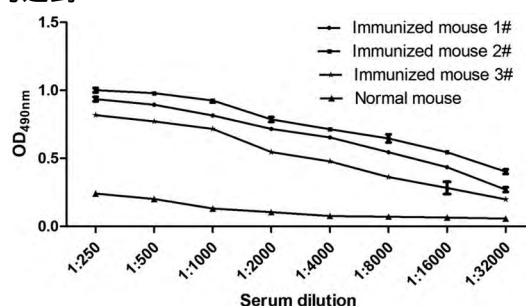
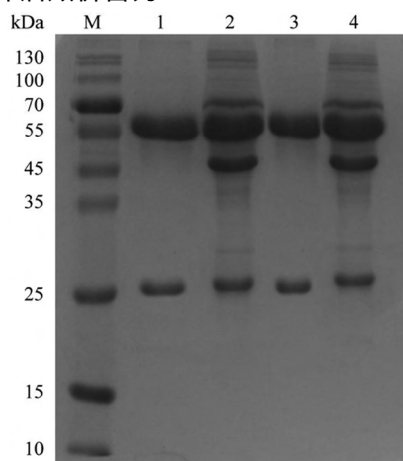


图 1 免疫小鼠血清稀释倍数抗体效价测定

2.2 抗体的纯化及抗体亚类分析

利用 rProtein A 柱纯化腹水抗体, 通过 SDS-PAGE 检测抗体纯度。蛋白凝胶结果(图 2)显示的 2 条蛋白带分别为重链(相对分子量 55 000)、轻链(相对分子量 25 000), 电泳纯度可达 95%。经超滤管浓缩后, 测量纯化抗体浓度约为 2 mg/mL。抗体亚类试剂盒测定结果显示 3C9 和 6F5 重链均为 IgG2a, 轻链均为 κ 链。ELISA 检测纯化抗体效价 3C9 和 6F5 分别为 1: 10⁷ 和 1: 10⁸, 辣根过氧化物酶标记抗体后效价皆为 1: 10⁶。



M. 蛋白质分子量标准; 1. 纯化抗体(3C9); 2. 腹水抗体(3C9); 3. 纯化抗体(6F5); 4. 腹水抗体(6F5)。

图 2 抗体 SDS-PAGE 分析

2.3 捕获抗体、检测抗体的组合

分别用浓度梯度的 3C9 和 6F5 包被酶标板, 梯度稀释的 HRP-3C9、HRP-6F5 做检测抗体。结果表明(图 3) 当包被抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抗原抗体反应呈线性, 且 2 个包被浓度线性接近。以 6F5 包被, 以 HRP-3C9 检测, 曲线斜率较好, 检测抗体 HRP-3C9 稀释度为 1: 8 000 时, P/N 值较高。确定最佳抗体组合为包被抗体 6F5、检测抗体 HRP-3C9。

2.4 DAS-ELISA 检测条件的优化

经试验, 以 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值和 P/N 值为标准, 确定最适包被条件为 $0.05 \text{ mol}/\text{L}$ 碳酸盐缓冲液 37°C 包被 1 h; 最适封闭条件为 5% 马血清 37°C 封闭 1 h; 酶标抗体的最适工作条件为 1: 8 000 反应 1 h。

将 AIV-H5 病毒标准液做 DAS-ELISA 检测, 重复 3 次, 以 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值为纵坐标, 病毒液稀释度的对数为横坐标, 做标准曲线, 曲线在 $18 \sim 1\ 200 \text{ ng}/\text{mL}$ 范围内趋近直线, 线性关系佳, $R^2 = 0.9944$ (图 4)。

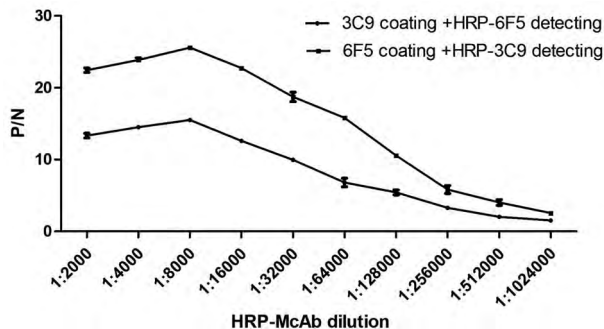


图 3 DAS-ELISA 单克隆抗体组合的确定

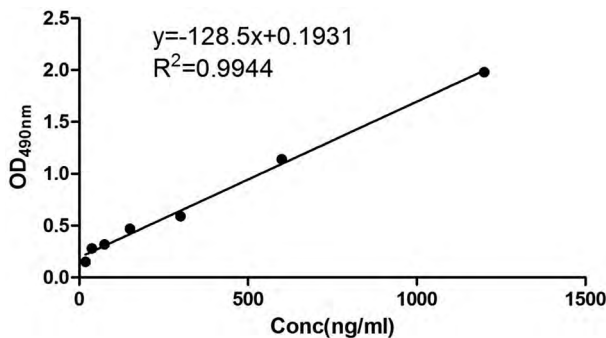


图 4 DAS-ELISA 标准曲线

2.5 DAS-ELISA 检测 AIV-H5 的特异性和敏感性

DAS-ELISA 系统特异性测定见表 1, 结果显示 AIV-H5 实验组和阳性对照组为阳性反应; 其他亚型人禽流感 AIV-H2、AIV-H7、AIV-H9、AIV-H13 和其他禽类病毒 NDV、IBV、EDSV 交叉反应实验组为阴性反应; SP2/0 细胞上清、未免疫的小鼠血清和 SPF 鸡胚尿囊液阴性对照组也为阴性反应, 说明该 DAS-ELISA 系统无法检测其他病毒, 对 AIV-H5 病毒检测具有特异性。

以 AIV-H5 鸡胚尿囊液原液及其 $1/2^1 \sim 1/2^7$ 稀

释液为样本, 利用 DAS-ELISA 系统进行检测, 结果均为阳性, 商品化人禽流感(H5N1) ELISA 试剂盒阳性反应滴度到 $1/2^5$; 以 SPF 鸡胚尿囊液原液及其 $1/2^1 \sim 1/2^8$ 稀释液为对照样本, 检测结果均为阴性。表明该 DAS-ELISA 系统检测对 AIV-H5 鸡胚尿囊液的灵敏度可达到 $1/2^7$, 且比商品化 ELISA 试剂盒高 4 倍。

制备的待检阴性抗原经检验为阴性后, 利用 DAS-ELISA 系统进行检测, 结果见图 5 20 份样本的 OD 值介于 0.037 和 0.220 之间, 平均数 (X) 和标准差 (SD) 分别为 0.110 和 0.052。根据公式计算阴性样品临界值 = $X + 3 \times \text{SD}$ 即 0.266。当 OD 值 > 0.266 时, 可在 99.9% 的可信度上判定为阳性结果, 并可作为检测结果的判定标准。

表 1 DAS-ELISA 系统特异性检测

样品	总数	阳性	阳性率 (%)
AIV-H5	20	20	100
Serum of immunized mouse	3	3	100
Positive hybridoma culture supernate	2	2	100
AIV-H2	5	0	0
AIV-H7	20	0	0
AIV-H9	20	0	0
AIV-H13	5	0	0
NDV	5	0	0
IBV	5	0	0
EDSV	5	0	0
SP2/0 culture supernate	10	0	0
Serum of normal mouse	5	0	0
SPF normal allantoic fluid	10	0	0

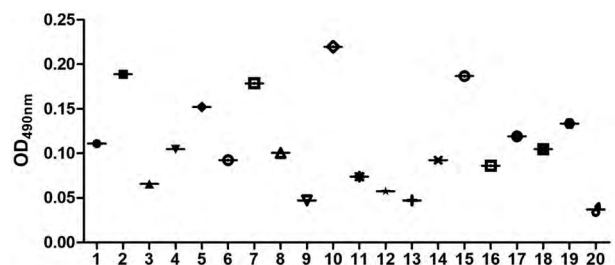


图 5 DAS-ELISA 系统对 20 份阴性样品的检测结果

2.6 临床样本的检测

检测来自疫区的禽类鸡的临床棉拭子样本 30 份, 结果显示 10 份为阴性, 20 份为阳性。同时, 使用武汉赛培生物科技有限公司提供的 H5N1 ELISA 试剂盒做平行检测, 结果与本研究 DAS-ELISA 检测系统的检测结果相一致, 证实该 DAS-ELISA 系统可应用于 AIV-H5 病毒感染检测。

3 讨论

禽流感病毒表面的抗原蛋白与流感病毒的致病

性密切相关^[7]。根据蛋白表达和存在位置不同可分为8个病毒的组成成分(HA、NA、NP、M1、M2、PB1、PB2和PA)2个非结构蛋白(NS1和NS2)^[8]。其中,HA为血凝素,NA为神经氨酸,决定了流感病毒的抗原性。与NA相比较,HA基因的突变率较高。当前研究大多数针对HA蛋白,采用基因克隆、蛋白重组等手段,来制备相应的抗体,但是该方法获取的抗体可能无法识别天然的抗原。本研究使用全病毒作为抗原并通过多重筛选,获得能够识别天然病毒的抗体,使抗体更具有应用性。

随着HA基因的不断进化和变异,HA和NA亚型组合愈加丰富,以H5亚型为例,在自然界中可分离到H5N1、H5N2、H5N3、H5N5、H5N6、H5N7、H5N8和H5N9等^[9-10]。禽流感病毒一般仅感染禽类,如果病毒在复制过程中发生基因重配,致使其结构发生改变,则获得感染人的能力,从而使得人被感染禽流感。当前能直接感染人的禽流感病毒亚型主要有:H5N1、H7N7、H7N2 > H7N3、H7N7、H9N2和H7N9等,其中H5N1的致死率最高。低致病性AIV如H5N3感染宿主后不表现出明显的临床症状,对养禽业和人类健康的威胁很容易被忽视,并且可能通过各种机制发生改变而成为高致病性AIV。已有研究证实,多种亚型的低致病性AIV具有同时结合禽型受体和人型受体的能力^[11-12]。但是,当前研究广泛的抗体均相对单一,难以覆盖所有的毒株。本研究在抗原免疫阶段首次联用多种AIV-H5毒株进行动物免疫,利用杂交瘤技术获取配对的针对AIV-H5的McAb,具有反应活性高、对AIV-H5覆盖性好的优点。即获得可同时识别多种AIV-H5的单克隆抗体anti-AIV-H5 McAb,包含高致病性和低致病性的AIV-H5。

魏泉德等^[13]的病毒分离鉴定法是现行最经典的AIV诊断方法,诊断结果准确,但该方法操作复杂,耗时费力,费用昂贵,难以在AIV疫情爆发时实现快速诊断。血清学诊断技术中的常规方法(琼脂扩散试验、血凝和血凝抑制试验)鉴定病毒,操作简单易行,但是整体敏感性较差。荧光抗体技术用于病毒鉴定快速简便、费用低,但是容易出现假阳性^[14]。RT-PCR等分子生物学诊断技术快捷、简便、灵敏,但所需的仪器昂贵^[15]。以上各种方法均不适用于现场适时诊断AIV感染样品,在现实应用过程容易受到限制。然而,ELISA具有特异性、敏感性、快速性和简易性等优点。其中,抗体的亲和力和纯度是DAS-ELISA检测方法建立的成败因素,本研究通过rProteinA纯化腹水抗体,获取高纯度的McAb,用于构建性能良好的双抗体夹心ELISA(DAS-ELISA)检测系统。

本研究建立的DAS-ELISA检测系统,在保留ELISA的特异性、敏感性的基础上,又可缩短诊断时间,结果不需要特殊仪器分析,甚至肉眼判定即可,为AIV-H5的检测以及防疫提供了一种方便、快捷、准确的方法。

参考文献:

- [1] Wood GW, Banks J, Strong I, et al. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site [J]. *Avian Pathol*, 1996, 25(4): 799-806.
- [2] 周佩娇, 邢丽, 贾伟新, 等. 4株H5N6亚型禽流感病毒毒株的分离鉴定与致病性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(1): 147-156.
- [3] Claas ECJ, Osterhaus DME, Beek RV, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus [J]. *Lancet*, 1998, 351(9101): 472-477.
- [4] 陈晨, 熊莹喆, 汪赛, 等. 禽流感病毒快速检测方法研究进展[J]. *病毒学报*, 2018, 34(4): 610-616.
- [5] 谢辛慈, 刘璐, 袁松华, 等. 广谱流感疫苗的研究进展[J]. *微生物与感染*, 2016, 11(1): 48-54.
- [6] 车莹, 李校堃, 胡培声, 等. 重组人碱性成纤维细胞生长因子单克隆抗体的制备鉴定及初步应用[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(6): 514-518.
- [7] 方钟, 罗文新, 王明桥, 等. 高致病性禽流感病毒H5N1中和抗体的单链抗体构建与活性鉴定[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(2): 292-296.
- [8] Wong SS, Yuen KY. Avian influenza A/H5N1 virus: management in humans and bird [J]. *Hong Kong Med J*, 2008, 14(4): 252-254.
- [9] Lee DH, Torchetti MK, Killian ML, et al. Reoccurrence of avian influenza A (H5N2) virus clade 2.3.4.4 in wild birds, Alaska, USA 2016 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(2): 365-367.
- [10] Lee MS, Chen LH, Chen YP, et al. Highly pathogenic avian influenza viruses H5N2, H5N3, and H5N8 in Taiwan in 2015 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 187: 50-57.
- [11] Liang LB, Deng GH, Shi JZ, et al. Genetics, receptor binding, replication, and mammalian transmission of H4 Avian influenza viruses isolated from live poultry markets in China [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 90(3): 1455-1469.
- [12] Wang GJ, Deng GH, Shi JZ, et al. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(8): 3953-3964.
- [13] 魏泉德, 谭爱军. 禽流感病毒实验检测研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 986-990.
- [14] Bao DT, Kim DTH, Park H, et al. Rapid Detection of Avian Influenza Virus by Fluorescent Diagnostic Assay using an Epitope-Derived Peptide. *Theranostics* [J]. 2017, 7(7): 1835-1846.
- [15] Liu J, Yao L, Zhai F, et al. Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9 [J]. *J Virol Methods*, 2018, 252: 49-56.

(收稿日期: 2019-09-10)