

重组人禽流感 H7N9 疫苗株在 Vero 细胞上的 适应性和传代稳定性研究

崔兆海, 赵卫忠, 马 磊, 高菁霞, 朱文勇, 李卫东, 廖国阳*

(中国医学科学院北京协和医学院医学微生物学研究所, 昆明 650018)

摘 要: 本文主要研究重组人感染高致病性禽流感 H7N9 株作为主工作种子批在 Vero 细胞连续传代中的高产特性和传代稳定性, 为疫苗开发提供前期研究。将重组获得的 H7N9 流感病毒 Vero 细胞适应株 (A/Anhui/1/2013Va) 按照病毒感染复数 (MOI) 0.01 的病毒量接种于 Vero 细胞, 并连续传 15 代。血凝试验检测每代病毒血凝效价, 并绘制病毒在 Vero 细胞上的生长曲线; 每代病毒用 MDCK 细胞检测病毒的感染性滴度; 通过单向免疫扩散试验对重组病毒 H7N9 的第 1 及第 16 代进行型别鉴定; 取第 1、5 及 16 代病毒, 用鸡胚半数感染量及致死量检测病毒在传代过程中毒力变化; 分别提取第 1 和 16 代 H7N9 流感病毒的 RNA, 反转录及克隆后测序, 对比病毒在连续传代过程中血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 基因的变化。试验结果表明: 在连续传代过程中, 病毒效价越来越趋于稳定, 血凝效价稳定维持在 384 ~ 448; 病毒感染性滴度维持在 7 Log₁₀TCID₅₀/mL 左右; 病毒在传代过程中毒力未发生显著变化; HA 和 NA 在连续传代过程中并未出现因基因变异导致的编码氨基酸改变的状况。H7N9 安徽株病毒在 Vero 细胞传代过程中不仅产量稳定, 其毒力和基因也很稳定, 可以将其作为 H7N9 流感疫苗候选株。

关键词: H7N9 Vero 细胞适应株; 病毒滴度; 生长曲线; HA 及 NA 序列

中图分类号: R373.1⁺3

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2020.03.011

A Study on the Adaptability and Stability of Recombinant Human Avian Influenza H7N9 Vaccine Strains on Vero Cells

CUI Zhaohai, ZHAO Weizhong, MA Lei, GAO Jingxia, ZHU Wenyong, LI Weidong, LIAO Guoyang*

(Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of

Medical Sciences, Kunming 650018, China)

Abstract: This paper mainly studies the high-yield characteristics and passage stability of recombinant human infection with highly pathogenic avian influenza H7N9 strain as the main working seed batch in the continuous passage of Vero cells, providing preliminary research for vaccine development. The H7N9 influenza virus Vero cell adaptation group (A/Anhui/1/2013Va) was inoculated into Vero cells at MOI = 0.01, and passaged for 15 consecutive generations. Hemagglutination test was used to detect the hemagglutination titer of each generation of virus and conducted the virus

收稿日期: 2020-01-14; 修回日期: 2020-02-26。

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目 (2016-I2M-3-026); 云南省应用基础研究计划项目 (2017FB039); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31500011)。

作者简介: 崔兆海, 硕士研究生。

* 通讯作者: 廖国阳, 研究员, 主要从事病毒学疫苗的开发研究。E-mail: mybelieve@126.com。

growth curve on Vero cells was drawn; MDCK cells are used for each generation of virus to detect the infectious titer of the virus; type identification of recombinant viruses H7N9 passage 1 and passage 16 was done by single radial immunodiffusion; take the 1st, 5th and 16th generation viruses were taken, and half the amount of infection and lethality of chicken embryos to detect the virulence of the virus during the passage; RNA from H7N9 influenza viruses of the 1st and 16th generation were extracted, reverse-transcribed and sequenced after cloning to compare changes in hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of the virus during successive passages. The test results showed that the virus titer became more and more stable during successive passages, and the titer remained stable at 384 ~ 448; the infectious titer of the virus was maintained at 7 Log₁₀TCID₅₀/mL; virus virulence did not change significantly during the passaging process; hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) did not show changes in the encoded amino acids due to gene mutations during continuous passaging. The H7N9 Anhui strain virus has not only a stable yield during the passage of Vero cells, but also its virulence and genes are stable. It can be used as a candidate strain of H7N9 influenza vaccine.

Key words: H7N9 Vero cell adaptive strain; virus titer; growth curve; HA and NA sequences

甲型 H7N9 禽流感是一种人畜共患病,且死亡率高^[1]。2013 年在中国首次报道流感病毒 H7N9 感染人,随后 H7N9 流感病毒共引起 5 波流感爆发^[2-4]。据相关报道,截止 2018 年 6 月,一共有 1 567 人感染 H7N9 禽流感病毒,其中死亡 615 人^[5]。2013 年在中国发现的 33 例感染者中就有 9 人死亡^[6]。流感病毒是 RNA 病毒,易出现变异,近年高致病的 H7N9 毒株的出现,可能会给人类带来更大的危害^[7]。

目前,应对流感大爆发最有效的手段仍然是疫苗的接种^[8,9]。而流感疫苗的生产除了对宿主有一定的要求外,对疫苗株的传代稳定性也有要求^[10]。本文将 H7N9 Vero 细胞适应株(A/Anhui/1/2013Va)在 Vero 细胞上连续传代,并在病毒分子水平和细胞水平进行研究,以确定该毒株是否可以作为 Vero 细胞生产 H7N9 流感疫苗的种子,以期开发细胞流感疫苗提供前期研究。

1 材料与方 法

1.1 细胞及毒株

第 145 代 Vero 细胞购自美国 ATCC;甲型流感病毒 Vero 细胞适应株 A/Anhui/1/2013Va(H7N9)为本实验室构建及保存,毒株的构建在成都军区疾病预防控制中心 P3 实验室中完成;MDCK 细胞(P18)购自中国科学院昆明动物所细胞库(KBC2006105YJ),应用时代次为第 30 代。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12 (Lot8119213)、MEM 培养基均购自 Gibco 公司;TPCK 胰酶(Lot39B19083)购自 Worthington 公司;牛血清白蛋白(Lot. No. 913Z0517)购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 病毒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;H7N9 抗原标准品

(NIBRG-268)和 H7 抗血清标准品(Sheep SH644)均购自 NIBSC。

1.3 病毒传代稳定性

Vero 细胞按照 1:4 传代,显微镜下观察细胞长成致密单层时,将病毒从 -70 °C 取出,流水融化后按照病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01 的病毒量接种 H7N9 病毒,35 °C 吸附 2 h 后将吸附液弃掉,用 PBS 洗细胞面 2 次,再加病毒维持液 10 mL 继续置于 35 °C 培养箱中培养 72 h,72 h 时细胞完全被病毒裂解,收取病毒液。病毒连续传代 15 次,每次试验做 2 次重复。

1.4 血凝试验

将新鲜的鸡血红细胞用生理盐水配成 1% 的体积浓度,在 96 孔板的 U 形板的 A1 ~ H12 孔中各加入 50 μL 生理盐水,具体方法参照郭元吉等^[11]。在血凝板的第一行(A1 ~ H1)孔中依次加入待检测流感病毒样品 50 μL,用 8 道移液器将第一列的生理盐水或样品吹打混匀后,取 50 μL 到第二列,更换枪尖,再按照同样的操作依次将样品进行倍比稀释,到最后最后一个稀释度时,弃掉 50 μL 液体。同时设立阴性对照孔,在各孔加入新鲜配置的 1% 鸡红细胞悬液 50 μL,轻轻拍打 U 形板外壁,室温静置 30 min 后观察并记录结果。

1.5 各代病毒收获液 TCID₅₀ 的检测

MDCK 细胞长成致密单层后,用 0.125% 的 EDTA-胰酶消化后计数,按照每孔 2×10^4 个细胞的量接种到 96 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养约 24 h。用病毒维持液将病毒从 10^{-4} 稀释到 10^{-9} ,每个稀释度接种 8 孔,每孔接种 100 μL 病毒,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 72 h,血凝试验检测病毒效价,Reed-Muench 法^[12]计算病毒的组织培养半数感染量(50%

tissue culture infection dose, $TCID_{50}$)。每块96孔板做1次重复。

1.6 病毒生长曲线

将第16代的病毒按照MOI为0.01的病毒量接种于Vero细胞。在24、36、48、60、72 h分别取病毒上清,血凝试验检测不同时间段的病毒效价,试验重复3次。观察细胞接毒后不同时间段的病变状况。

1.7 单向免疫扩散试验

在琼脂糖凝胶中混入抗血清标准品,将其铺好并在上面打孔。孔中加入标准抗原和待检样品(第1和16代病毒),室温进行免疫扩散。若待检样品和标准样品型别一致,则会形成抗原抗体复合物,考马斯亮蓝染色后形成肉眼可见的扩散环。

1.8 不同代次重配H7N9病毒的鸡胚半数感染量试验

将第1、5、16代的病毒用0.01 mol/L的PBS按照对数稀释法从 10^{-1} 稀释至 10^{-9} ,每个稀释度接种9日龄鸡胚4枚,每枚接种病毒液200 μ L;35 $^{\circ}$ C、65%湿度的孵箱培养3 d后取尿囊液进行血凝试验检测病毒的效价,计算病毒的鸡胚半数感染量(egg 50% infectious dose, EID_{50})。

1.9 测定H7N9重配病毒鸡胚半数致死量

将第1、5、16代的病毒用0.01 mol/L的PBS按照对数稀释法稀释,以 10^7 、 10^6 、 10^5 EID_{50} 分别接种9日龄鸡胚,每个稀释度接种鸡胚6枚,每枚接种0.2 mL,接种12 h时,检查鸡胚生长状态,弃掉死胚,继续培养72 h,统计鸡胚死亡数量。

1.10 重配毒株HA和NA基因稳定性的研究

为了检测病毒在Vero细胞上连续传代后血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)基因是否发生变异,我们将培养的第1代和第16代病毒的HA和NA基因分别克隆到pLB载体上,并将构建好的质粒送往生工测序。测序结果通过NCBI网站及DNA STAR软件分析,确定病毒的HA和NA基因在Vero细胞连续传代过程中是否发生变异。

2 结果与分析

2.1 病毒连续传代每代效价及感染性滴度

重配病毒从第2代在Vero细胞上连续传至第16代。每代病毒收获液的血凝效价变化如图1a所示:

从图中可以看出,从第8代病毒开始,病毒在Vero细胞上的病毒效价基本趋于稳定,而且随着病毒代次的增高,病毒的效价稳定维持在384~448;病毒的感染性滴度从第2代开始均在 $1 \times 10^{6.75}$ $TCID_{50}/mL$ 以上,且随着病毒代次的增高,病毒感染性滴度维持在 1×10^7 $TCID_{50}/mL$ 左右。

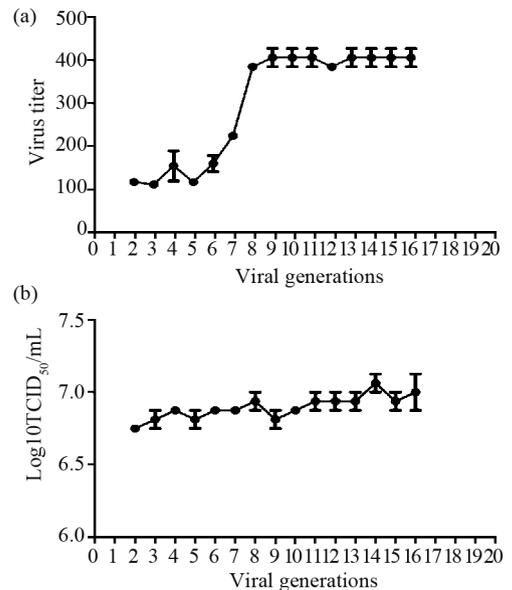


图1 各代病毒的效价及感染性滴度

Fig. 1 Viral titer and infectious titer of each generation of virus

2.2 病毒在Vero细胞的生长曲线

病毒接种Vero细胞后在不同时间段的产量不同,从图2a可以看出病毒在各个时间段病毒效价的差异。在24 h内取病毒维持液上清,血凝试验结果为阴性。随着培养时间的推移,病毒产量逐渐增高,直至细胞完全病变,病毒效价达到最高。显微镜下观察接种病毒后不同时间段的Vero细胞,如图2b所示的是病毒接种24 h的细胞,细胞的形态正常;到48 h时病毒的增殖使得部分细胞裂解,细胞形成网状结构(图2c);72 h时细胞完全裂解,这时病毒效价达到最高,为448(图2d)。流感病毒为胞外毒,通过对细胞裂解状态的观察及病毒在不同时间段效价的高低可以确定具体的收毒时间。

2.3 单向免疫扩散结果

如图3所示:其中1和4是H7N9抗原标准品;2和5是第16代病毒;3和6是第1代病毒。重配病毒H7N9与NIBSC的标准抗H7N9抗血清反应后出

现抗原抗体免疫复合物扩散环,虽然与标准 H7N9 抗原形成的环大小有差异,但是足以说明重配病毒 H7N9 血清型表型属于 H7 型。

量存在差异,但是差异不显著。 10^7 、 10^6 、 10^5 EID₅₀ 分别接种 9 日龄鸡胚孵育 72 h, 检蛋后并未发现死胚的存在, 说明病毒在传代过程中, 其毒力并未发生改变。

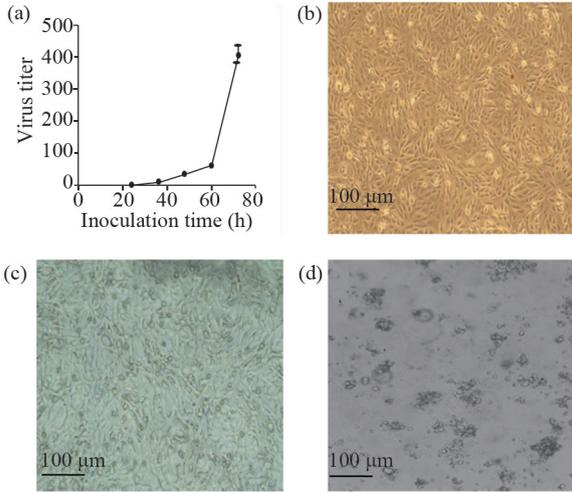


图2 病毒生长曲线及病毒感染后不同时间段细胞状态

Fig. 2 Virus growth curve and cell status at different time periods after virus infection

(a) 病毒在 Vero 细胞的生长曲线;

(b) 接种病毒 24 h 时 Vero 细胞的状态;

(c) 病毒接种 Vero 细胞 48 h 时细胞状态;

(d) 病毒接种 Vero 细胞 72 h 时细胞状态

(a) The growth curve of the virus in Vero cells;

(b) The state of Vero cells at 24 hours after virus inoculation;

(c) Cell status of Vero cells inoculated with virus at 48 h;

(d) Cell status of Vero cells inoculated with virus at 72 h



图3 单向免疫扩散型鉴别结果图

Fig. 3 Identification results of unidirectional immune diffusion type

1 和 4: 标准抗原; 2 和 5: 第 16 代病毒; 3 和 6: 第 1 代病毒

1 and 4: Standard antigen; 2 and 5: The 16th generation virus;

3 and 6: The first generation virus

2.4 病毒鸡胚半数感染量及致死量

第 1、5、16 代病毒在 9 日龄鸡胚半数感染量结果如表 1 所示。其中第 1 代病毒的 EID₅₀ 是 $10^6/0.2$ mL, 第 5 代病毒的 EID₅₀ 是 $10^{6.25}/0.2$ mL, 第 16 代病毒的 EID₅₀ 是 $10^{6.25}/0.2$ mL。从以下结果可以看出病毒在传代的过程中, 不同代次的病毒虽然鸡胚半数感染

表 1 不同代次的病毒鸡胚半数感染量

Tab. 1 Half infection of viral chicken embryos in different generations

Viral generations	Dilution	Number of positive chicken embryos	Percentage of positive chicken embryos
1	10^{-1}	4	4/4
	10^{-2}	4	4/4
	10^{-3}	4	4/4
	10^{-4}	4	4/4
	10^{-5}	3	3/4
	10^{-6}	1	1/4
	10^{-7}	2	2/4
	10^{-8}	0	0
	10^{-9}	0	0
5	10^{-1}	4	4/4
	10^{-2}	4	4/4
	10^{-3}	4	4/4
	10^{-4}	4	4/4
	10^{-5}	2	2/4
	10^{-6}	3	3/4
	10^{-7}	2	2/4
	10^{-8}	0	0
	10^{-9}	0	0
16	10^{-1}	4	4/4
	10^{-2}	4	4/4
	10^{-3}	4	4/4
	10^{-4}	4	4/4
	10^{-5}	4	4/4
	10^{-6}	3	3/4
	10^{-7}	0	0
	10^{-8}	0	0
	10^{-9}	0	0

2.5 病毒连续传代的 HA 和 NA 基因稳定性

提取第 1 代和第 16 代 H7N9 病毒的基因,阳性克隆 PCR 结果如图 4 所示。*HA* 和 *NA* 核苷酸大约在 1 500 bp 左右,挑选出阳性克隆菌落,通过测序结果分析发现,病毒在 Vero 细胞上连续传代过程中,第 1 代病毒中 *NA* 的核苷酸序列与第 16 代病毒

的一致,并未出现基因位点的改变。序列对比如图 4e 所示,*HA* 的核苷酸序列编码框内 A12G 发生了同义突变,但并未造成编码氨基酸的改变。从基因序列水平上验证病毒的型别并未发生改变,这进一步说明病毒在 Vero 细胞上传代后基因是相对稳定的。

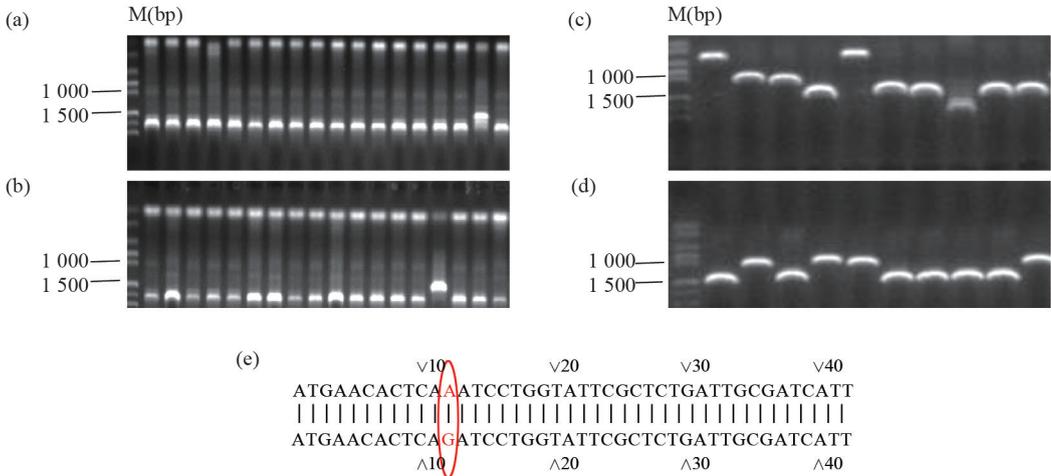


图 4 第 1 和第 16 代 H7N9 阳性克隆 PCR 鉴定及序列对比

Fig. 4 PCR identification and sequence comparison of P1 and P16 generation H7N9 positive clones

(a) 第 1 代病毒 *HA*; (b) 第 16 代病毒 *HA*; (c) 第 1 代病毒 *NA*; (d) 第 16 代病毒 *NA*; (e) *HA* 对比序列。红色圆内是同义突变位点
(a) The *HA* gene of the first generation virus; (b) The *HA* gene of the 16th generation virus; (c) The *NA* gene of the first generation virus;
(d) The *NA* gene of the 16th generation virus (e) *HA* alignment sequence. Synonymous mutation sites are inside the red circle

3 讨论

虽然流感病毒对鸡胚较敏感,但是鸡胚作为生产流感病毒的基质,不仅存在流感流行时鸡胚供不应求的问题,且在疫苗生产过程中,存在鸡胚易污染、病毒在鸡胚中增殖时 *HA* 基因易变异等问题^[13]。以 MDCK 细胞作为基质生产的流感疫苗虽然已有产品上市,但是 MDCK 致癌性问题一直存在争议。现有多项研究表明 Vero 细胞可以作为流感疫苗的生产基质^[14-16]。

流感病毒感染早期奥司他韦等药物可控制病情,奥司他韦主要通过抑制流感病毒的神经氨酸酶进而抑制病毒的增殖。但是近年相关研究报道 *NA* 的 R294K 的突变使得 *NA* 阻断剂的效果降低^[17]。基质蛋白 2 (matrix protein, M2) S31N 的突变使得病毒对金刚烷胺不敏感^[18]。耐药株的出现使得免疫保护策略显得尤为重要。目前 H7N9 禽流感疫苗的

免疫效果及安全性研究仍处于临床试验阶段,未有成品上市^[19,20],这也意味着 H7N9 Vero 细胞适应疫苗株地开发仍有着重要意义。

本研究将重配病毒在 Vero 细胞上连续传 15 代,从第 8 代开始病毒的血凝效价趋于稳定,血凝效价维持在 384 ~ 448。病毒的感染性滴度 Log₁₀ TCID₅₀/mL 维持在 7 左右,均达药典要求。从第 7 代到第 8 代,病毒血凝效价有一个上升峰,可能是由于除 *HA* 和 *NA* 基因,病毒外内部 6 个基因中某些位点的改变使得病毒在 Vero 细胞上的适应性进一步增强,病毒产量从而升高的结果。通过对第 1 和 16 代的病毒基因测序分析发现,病毒在传代过程中型别均未发生改变,基因编码的 *HA* 和 *NA* 蛋白氨基酸序列也未发生改变。以上试验结果证明,该重配病毒不仅在 Vero 细胞上高产,其在传代过程中 *HA* 和 *NA* 抗原基因序列也是稳定的。通过病毒生长曲线的绘制及细胞接种病毒后不同时间段细胞病变的状况得知,最佳收

毒时间为72 h左右。总之,本研究证明该 H7N9 毒株具备疫苗供体株生产疫苗的能力,为 H7N9 疫苗的开发及 H7N9 流感的防控奠定了物质及技术基础。

参考文献 (References):

- [1] CHEN Y, YANG Y, CHENG J, *et al.* Platelet count and mortality of H7N9 infected patients in Guangdong, China [J]. *Platelets*, 2019, 31(2): 1-4.
- [2] TANIKAWA T, UCHIDA Y, TAKEMAE N, *et al.* Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks [J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(2): 535-545.
- [3] LI Y, WANG Y, SHEN C, *et al.* Closure of live bird markets leads to the spread of H7N9 influenza in China [J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208884.
- [4] SHEN Y, LU H. Global concern regarding the fifth epidemic of human infection with avian influenza A (H7N9) virus in China [J]. *Bioscience Trends*, 2017, 11(1): 120-121.
- [5] JIANG W, HOU G, LI J, *et al.* Prevalence of H7N9 subtype avian influenza viruses in poultry in China, 2013-2018 [J]. *Transboundary Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1758-1761.
- [6] KAGEYAMA T, FUJISAKI S, TAKASHITA E, *et al.* Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 [J]. *European Communicable Disease Bulletin*, 2013, 18(15): 20453.
- [7] 董晓春. 高致病性 H7N9 禽流感病毒研究进展 [J]. *天津医药*, 2019, 47(8): 874-879.
DONG Xiaochun. Research progress on highly pathogenic H7N9 avian influenza virus [J]. *Tianjin Medical Journal*, 2019, 47(8): 874-879.
- [8] ZENG X, TIAN G, SHI J, *et al.* Vaccination of poultry successfully eliminated human infection with H7N9 virus in China [J]. *Science China (Life Sciences)*, 2018, 61(12): 1465-1473.
- [9] NACHBAGAUER R, KRAMMER F. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017, 23(4): 222-228.
- [10] 寸怡娜, 宋绍辉, 周健, 等. 乙型流感病毒 Vero 细胞高产适应株传代稳定性研究 [J]. *病毒学报*, 2019, 35(2): 220-224.
CUN Yina, SONG Shaohui, ZHOU Jian, *et al.* Passage stability of high yield adaptive strains of influenza B virus cells [J]. *Journal of Virology*, 2019, 35(2): 220-224.
- [11] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 100-106.
GUO Yuanji, CHENG Xiaowen. *Influenza virus and its experimental technology* [M]. Beijing: China Three Gorges Press, 1997: 100-106.
- [12] REED L, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *The American Journal of Hygiene*, 1938, 27(3): 493-497.
- [13] 吴雪伶, 冯建平, 樊金萍, 等. 流感疫苗生产用新型细胞基质 MDCK 细胞的质量控制研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2013, 33(12): 943-949.
WU Xueling, FENG Jianping, FAN Jinping, *et al.* Quality control of a novel cell matrix MDCK cell for influenza vaccine production [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2013, 33(12): 943-949.
- [14] 吴少慧, 舒跃龙. Vero 细胞流感疫苗应用前景 [J]. *病毒学报*, 2006, 22(1): 70-73.
WU Shaohui, SHU Yuelong. Application prospects of Vero cell influenza vaccine [J]. *Journal of Virology*, 2006, 22(1): 70-73.
- [15] 何春艳, 陈则, 吴书军, 等. Vero 细胞流感病毒的大规模培养和纯化 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(11): 20-24.
HE Chunyan, CHEN Ze, WU Shujun, *et al.* Large-scale culture and purification of Vero cell influenza virus [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 28(11): 20-24.
- [16] 殷建文, 焦龙, 甄祖刚, 等. Vero 细胞制备流感病毒疫苗 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(10): 48-51.
YIN Jianwen, JIAO Long, ZHEN Zugang, *et al.* Preparation of influenza virus vaccine by Vero cells [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2009, 22(10): 48-51.
- [17] 叶文佳, 陈溥, 丁亚红, 等. 甲型 H7N9 流感疫苗的临床研究进展 [J]. *激光生物学报*, 2017, 26(3): 198-204.
YE Wenjia, CHEN Yi, DING Yahong, *et al.* Progress in clinical research of H7N9 influenza vaccine [J]. *Chinese Journal of Laser Biology*, 2017, 26(3): 198-204.
- [18] QI Y, FAN H, QI X, *et al.* A novel pyrosequencing assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistance-conferring mutations among clinical isolates of avian H7N9 influenza virus [J]. *Virus Research*, 2014, 179(1): 119-124.
- [19] 伍小雪, 苟晓琴, 石渝, 等. 人用 H7N9 禽流感灭活疫苗免疫效果评价的 Meta 分析 [J]. *预防医学*, 2019, 31(3): 54-59.
WU Xiaoxue, GOU Xiaoqin, SHI Yu, *et al.* Meta-analysis of evaluation of immune effect of human H7N9 avian influenza inactivated vaccine [J]. *Preventive Medicine*, 2019, 31(3): 54-59.
- [20] 郭琦. 人用 H7N9 禽流感疫苗的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(2): 104-108.
GUO Qi. Research progress on human H7N9 avian influenza vaccine [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2017, 30(2): 104-108.