

· 疫苗研究 ·

# 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗在动物体内诱导中和抗体水平及其过敏原性

赵大鹏<sup>1</sup>, 李晓波<sup>1</sup>, 郭雪<sup>1</sup>, 任琦<sup>1</sup>, 王亚军<sup>1</sup>, 支百惠<sup>1</sup>, 李晓轅<sup>2</sup>, 吴业红<sup>3</sup>, 曹宇<sup>1</sup>,  
商风云<sup>1</sup>, 张雪梅<sup>1</sup>

1. 长春生物制品研究所有限责任公司, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学第一医院呼吸科, 吉林 长春 130021;  
3. 中国科学院长春应用化学研究所高分子物理与化学国家重点实验室, 吉林 长春 130022

**摘要:** **目的** 评价甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗在动物体内诱导的中和抗体水平及其过敏原性。**方法** 将昆明小鼠随机分为 7 组, 分别经腹腔注射 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗(剂量分别为 15、30、45  $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ )、3 批季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗(剂量分别为 15、30、45  $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ )和 PBS(阴性对照), 每只 0.5 ml, 间隔 21 d 加强免疫 1 次, 分别于免疫前、初次免疫后 21 d 及加强免疫后 14 d 采血, 分离血清, 采用固定病毒-稀释血清法检测小鼠血清中和抗体滴度。将豚鼠随机分为 4 组, 分别经腹腔注射上述 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗和 PBS(阴性对照)各 0.5 ml, 隔日注射 1 次, 共 3 次, 第 1 次注射后第 14 和 21 d, 分别经静脉注射同一批号的疫苗 1.0 ml 攻击, 观察豚鼠的过敏反应。**结果** 初次免疫后 21 d, 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 15、30、45  $\mu\text{g}$  剂量组免疫小鼠血清中和抗体滴度分别为免疫前和阴性对照组的 47.9、113.5 和 319.9 倍, 且呈剂量依赖性; 加强免疫后 14 d, 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组中和抗体滴度比初次免疫后 21 d 均明显升高, 也呈剂量依赖性, 且均高于与相应剂量的季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗。甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组豚鼠均无过敏反应发生。**结论** 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗在昆明小鼠体内可诱导产生保护性中和抗体, 对豚鼠无过敏反应。

**关键词:** 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗; 中和抗体; 过敏原性

**中图分类号:** R373.1+3 R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2014)10-1240-03

## Neutralizing antibody level induced and anaphylaxis of influenza A H1N1 virus split vaccine in animals

ZHAO Da-peng<sup>\*</sup>, LI Xiao-bo, GUO Xue, REN Qi, WANG Ya-jun, ZHI Bai-hui, LI Xiao-yuan, WU Ye-hong,  
CAO Yu, SHANG Feng-yun, ZHANG Xue-mei

<sup>\*</sup>Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Changchun 130062, Jilin Province, China

Corresponding author: ZHANG Xue-mei, E-mail: tyaxuemei@126.com

**Abstract:** **Objective** To evaluate the neutralizing antibody level induced and anaphylaxis of influenza A H1N1 virus split vaccine in animals. **Methods** Kunming mice were divided randomly into seven groups, 10 for each, and injected i.p. with three batches of influenza A H1N1 virus split vaccine at dosages of 15, 30 and 45  $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ , three batches of seasonal influenza H1N1 virus split vaccine at dosages of 15, 30 and 45  $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$  and 0.5 ml PBS (negative control) respectively, and boosted 21 d later. Serum samples were collected before immunization, 21 d after primary immunization and 14 d after booster immunization respectively, and determined for neutralizing antibody titer by fixed virus-diluted serum method. Guinea pigs were divided randomly into four groups and injected i.p. with three batches of influenza A H1N1 virus split vaccine and PBS (negative control) respectively, 0.5 ml for each, every other day for 3 times, then challenged i.v. with 1.0 ml of vaccine of the same batches on days 14 and 21 after the first immunization and observed for anaphylaxis. **Results** The neutralizing antibody titers in sera of mice 21 d after primary immunization with influenza A H1N1 virus split vaccine at dosages of 15, 30 and 45  $\mu\text{g}$  were 47.9, 113.5 and 319.9 times of those before immunization and those in negative control group, which were dose-dependent. However, the neutralizing antibody titers 14 d after booster immunization with influenza A H1N1 virus split vaccine at various dosages were significantly higher

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20090953).

通讯作者: 张雪梅, E-mail: tyaxuemei@126.com

than those 21 d after primary immunization and those after booster immunization with seasonal influenza A virus split vaccine, which were also dose-dependent. No anaphylaxis was observed in guinea pigs immunized with influenza A H1N1 virus split vaccine at any dosages. **Conclusion** Influenza A H1N1 virus split vaccine induced protective neutralizing antibody, which showed no anaphylaxis in guinea pigs.

**Key words:** Influenza A H1N1 virus split vaccine; Neutralizing antibody; Anaphylaxis

自 2009 年春甲型 H1N1 流感(简称甲流)疫情暴发后,迅速在全球蔓延,对人类健康造成了严重威胁<sup>[1-3]</sup>。为控制甲流的流行,WHO 分布在全球的几个合作实验室迅速完成了甲流重配疫苗毒株的制备,有 4 株疫苗毒株可供选择,分别为 X-179A、IDCDC RG 15、NIBRG-121 和 IVR-153。为预防、控制甲流在我国的传播,减少发病率和死亡率,我国及时启动了甲流疫苗的研制和临床评价工作<sup>[4-8]</sup>。我国疫苗生产企业使用的甲流毒株主要为 NYMC X-179A,长春生物制品研究有限责任公司选用美国纽约医学院提供的该毒株,在已批准的季节性流行性感裂解疫苗生产工艺的基础上,研制出甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗。按照长春生物制品研究有限责任公司自拟的《甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗制造及检定规程》草案、国家有关技术规范和要求以及国食药监注(2009)322 号《关于印发甲型 H1N1 流感疫苗研究技术考虑要点的通知》的要求,对该疫苗进行了全面检定。本实验旨在根据《中国药典》三部(2005 版)相关规定和国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)的相关要求,检测该疫苗在动物体内诱导中和抗体的水平及其过敏原性,以评价其在动物体内的免疫原性和安全性。

## 1 材料与方法

**1.1 毒种及疫苗** 甲型 H1N1 流感病毒工作种子批毒种(批号:NYMCX-179A 20090619 E<sub>10</sub>)、季节性 H1N1 流感病毒工作种子批毒种(批号:IVR-148 20090305 E<sub>9</sub>)、甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗[批号:20090701(15 μg/0.5 ml)、20090702(30 μg/0.5 ml)和 20090703(45 μg/0.5 ml)]和 2009 年季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗[批号:JS20090601(15 μg/0.5 ml)、JS20090602(30 μg/0.5 ml)和 JS20090603(45 μg/0.5 ml)]均由长春生物制品研究有限责任公司疫苗六室制备。

**1.2 鸡胚及实验动物** 9~11 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司;SPF 级昆明小鼠[雌性,21~28 日龄,体重 18~22 g,实验动物许可证号:SCXK(J)2009-0001]和 SPF 级豚鼠[雄性,50~70 日龄,体重 250~350 g,实验动物许可

证号:SCXK(J)2009-0003]均由长春生物制品研究有限责任公司实验动物室提供。

**1.3 主要试剂** 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)、生理盐水和 1%鸡红细胞悬液均由长春生物制品研究有限责任公司疫苗六室制备。

### 1.4 中和试验

**1.4.1 动物分组及免疫** 将昆明小鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别经腹腔注射 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗、3 批季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗和 PBS(阴性对照),每只 0.5 ml,间隔 21 d 加强免疫 1 次。分别于免疫前、初次免疫后 21 d 及加强免疫后 14 d 采集眼静脉血,分离血清,于 -20 °C 保存备用。

### 1.4.2 小鼠血清中和抗体滴度的检测

**1.4.2.1 病毒鸡胚半数感染量(egg infectious dose, EID<sub>50</sub>)的测定** 取 NYMCX-179A 20090619 E<sub>10</sub> 和 IVR-148 20090305 E<sub>9</sub> 毒种,加入磷酸盐缓冲液进行 10 倍系列稀释,选择稀释度为 10<sup>-6</sup>~10<sup>-10</sup> 的病毒液接种鸡胚,每个稀释度接种 10 个鸡胚,每胚 0.2 ml,置(34±1) °C 培养箱中培养 72 h;2~8 °C 冷胚过夜,收获尿囊液,进行直接血凝试验,以使 50% 鸡胚感染的最高病毒稀释度的倒数作为病毒的 EID<sub>50</sub>,按 Reed-Muench 法计算结果<sup>[9]</sup>。

**1.4.2.2 血清中和抗体滴度的检测** 采用固定病毒-稀释血清法。将病毒稀释成 200 EID<sub>50</sub>;小鼠免疫血清置 56 °C 水浴灭活 30 min 后,倍比稀释;将不同稀释度的血清与等量病毒混合,置 4 °C 中和 2 h 后,接种鸡胚,置(34±1) °C 培养箱中培养 72 h,收获尿囊液,进行直接血凝试验。同时各组均设病毒对照、血清对照及空白对照。

**1.4.2.3 直接血凝试验** 取尿囊液 25 μl/胚,加入血凝板,以 25 μl 生理盐水作为阴性对照,再加入 25 μl 1%鸡红细胞悬液,振荡混匀后,室温放置 40 min。结果判定:红细胞均匀铺于孔上者判为阳性;红细胞于孔底形成一个小团,边缘光滑并有立体感,将板倾斜片刻,可见红细胞滑动呈泪滴状判为阴性。

**1.5 过敏性试验** 按照《中国药典》三部(2005 版)和《化学药品地方标准上升国家标准第十六册(国家食品药品监督管理局颁布 2003 年版)》有关规定进行。将豚鼠随机分为 4 组,每组 6 只,分别经腹腔注

射 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗和 PBS(阴性对照)各 0.5 ml,隔日注射 1 次,共 3 次。第 1 次注射后第 14 和 21 d,分别经静脉注射同一批号的疫苗 1.0 ml 攻击,观察豚鼠的反应。结果判定:静脉注射后 30 min 内出现竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕、咳嗽等现象中的两种以上者或抽搐、虚脱、死亡现象之一者即判为过敏反应阳性。

## 2 结果

### 2.1 免疫小鼠的血清中和抗体水平

**2.1.1 病毒的 EID<sub>50</sub>** 甲型 H1N1 流感病毒 NYMCX-179A 20090619 E<sub>10</sub> 毒种的滴度为 8.7 logEID<sub>50</sub>/ml,季节性 H1N1 流感病毒 IVR-148 20090305 E<sub>9</sub> 毒种的滴度为 8.3 logEID<sub>50</sub>/ml。

**2.1.2 血清中和抗体滴度** 检测结果显示,初次免疫后 21 d,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 15、30、45 μg 剂量组免疫小鼠血清中和抗体滴度分别为免疫前和阴性对照组的 47.9、113.5 和 319.9 倍,且呈剂量依赖性;加强免疫后 14 d,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组中和抗体滴度比初次免疫后 21 d 均明显升高,也呈剂量依赖性,且均高于与相应剂量的季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗。见表 1。

表 1 各组免疫小鼠血清的中和抗体几何平均滴度(GMT)

Tab 1. GMTs of serum neutralizing antibodies in various groups

组别	免疫前	初次免疫后 21 d	加强免疫后 14 d
甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗			
15 μg 组	< 0.7	33.50	158.5
30 μg 组	< 0.7	79.43	631.0
45 μg 组	< 0.7	223.90	891.3
季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗			
15 μg 组	< 0.7	33.50	112.2
30 μg 组	< 0.7	56.23	266.1
45 μg 组	< 0.7	56.23	446.7
阴性对照组	< 0.7	< 0.7	< 0.7

**2.2 过敏性试验结果** 试验结果表明,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组豚鼠观察期内体重均增加,静脉注射攻击后,均无过敏反应发生。

## 3 讨论

本实验结果显示,初次免疫后 21 d,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组即可诱导小鼠血清产生

较高水平的中和抗体,明显高于阴性对照组;加强免疫后 14 d,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗各剂量组血清中和抗体滴度比初次免疫后 21 d 均明显升高,且均高于相应剂量的季节性 H1N1 流感病毒裂解疫苗,且存在剂量依赖性,表明该疫苗在动物体内具有良好的免疫原性。过敏性试验结果表明,豚鼠无过敏反应发生。本实验结果表明,长春生物制品研究所有限责任公司生产的甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗在动物体内具有良好的免疫原性和安全性,为后续该疫苗的人体临床实验提供了依据。

## 参考文献

- [1] Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, *et al.* Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings [J]. *Science*, 2009, 324(5934): 1557-1561.
- [2] Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, *et al.* Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361 (7): 680-689.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A(H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, 58 (15): 400-402.
- [4] Zhu JH, Ding GQ. Review on pestilence of type A H1N1 flu [J]. *J Zhejiang Coll Trad Chin Med*, 2009, 33(3): 299-301. (in Chinese)  
朱君华,丁刚强. 甲型 H1N1 流感疫情综述 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2009, 33(3): 299-301.
- [5] Wang F, Gao L. Characteristics and prevention strategies of influenza A(H1N1)[J]. *Prog Vet Med*, 2010, 31(3): 107-111. (in Chinese)  
王锋,高岚. 甲型 H1N1 流感的特点及其防控 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31(3): 107-111.
- [6] Fang HH, Yuan LY, Li CG. Pandemic influenza and type A H1N1 influenza [J]. *Chin Pharm Affair*, 2009, 23(12): 1216-1220. (in Chinese)  
方捍华,袁力勇,李长贵. 大流行流感与甲型 H1N1 流感[J]. *中国药事*, 2009, 23(12): 1216-1220.
- [7] 赵铠. 甲型 H1N1 流感疫苗研发回顾及展望 [J]. *生物产业技术*, 2010, 4(2): 1-3.
- [8] Liu C, Liu LF, Wang B, *et al.* A review on 2009 influenza A virus [J]. *Agr Sci & Technol*, 2012, 13 (2): 424-427.
- [9] 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,1977: 109-119.