

人用 H5N1 禽流感疫苗检定评价

朱智勇¹, 丁晓航², 朱函坪¹, 李岩金², 陈学奎², 沈吉友², 张涛², 何培江²,
姚芊芊¹, 徐芳¹, 翁景清¹, 龚华岳², 郭志宏², 苏波², 孙淑滨², 梁伟峰³

摘要:目的 选用 H5N1 禽流感毒种(R1194 和 R1203), 按设计的生产工艺, 制成的疫苗进行全面检定, 选取其中较好毒株生产的疫苗, 用于以后人用禽流感疫苗临床前研究的动物免疫。方法 利用从国外引进 2 株 H5N1 禽流感病毒, 设计生产 3 种疫苗(全病毒、裂解-1、裂解-2)的纯化工艺, 优化纯化条件, 全面检定制成的疫苗, 比较 2 毒种生产疫苗的质量。结果 2 毒株在接种滴度 10^4 EID₅₀/ml(半数鸡胚感染剂量/ml), 培养温度 34.5℃, 培养时间 3 d 的条件下, 病毒增殖滴度较高; 检定结果证明, 制成的所有疫苗中反映质量的内毒素、卵清蛋白、总蛋白、总蛋白与血凝素之比这 4 项指标, 明显优于国家标准; 3 种工艺疫苗的镜电形态完全不同; 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 全病毒疫苗和裂解-2 疫苗的蛋白条带形态相似, 但裂解-1 疫苗在 32 KD 左右的条带缺失; 毒种 R1203 株疫苗的产量明显高于 R1194 株。结论 设计的 3 种生产疫苗的纯化工艺, 均可生产出高质量的疫苗; 毒种 R1203 株的疫苗产量高于毒种 R1194 株; 可用 R1203 毒株, 按 3 种不同工艺生产的疫苗接种动物, 观察免疫效果。

关键词: 禽流感疫苗; 生产工艺; 疫苗检定; 疫苗质量

Study on avian influenza(H5N1) vaccine used in human ZHU Zhi-yong, DING Xiao-hang, ZHU Han-ping, et al. Key Lab of Vaccine against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention (Hangzhou 310009, China)

Abstract: Objective The vaccines were produced by the designed techniques with the seeds (R1194 and R1203) of avian influenza viruses and checked entirely. A better one from the two seeds was selected to immunize animals for the next research. Methods The three purified techniques of the vaccines (the whole viruses, split-1 and split-2) were designed and the vaccines were produced with the two imported virus seeds. The purified condition of the vaccines was perfected. A better one from the two seeds was chosen to immunize animals. Results The multiplication titers in the two viruses were higher at the inoculation titer of 10^4 EID₅₀/ml(0.2ml/egg) incubation temperature of 34.5℃ and incubation time of three days. The four items of endotoxin, egg-albumin, total albumin and total albumin/hemoglobin, which reflected the vaccine quality in the all produced vaccines, were better than the national standards. The form of the vaccines produced by the three techniques was totally different with electron microscopy. The albumen zone form with SDS-PAGE electrophoresis were similar in the whole virus vaccines and split-2 vaccine while the albumen zone of the split-1 vaccine could not be seen in 32KD right-and-left. The vaccine output with the seed R1203 was much more than that with the seed R1194. Conclusion The high quality vaccines can be produced by the three production techniques for purified vaccines. The vaccine output with R1203 is more than that with R1194. The vaccines produced by the three different techniques with the R1203 virus seeds can be used to immunize animals and to observe their antibody response.

Key words: avian influenza vaccine; production technique; vaccine assay; vaccine quality

在人用 H5N1 禽流感疫苗研究的第一部分中证实, 从国外引进的 R1194 和 R1203 两株毒种为减毒株, 符合目前国际用于制造人用 H5N1 亚型禽流感疫苗的标准。并按照我国对研制疫苗的要求, 设计 3 种生产疫苗的纯化工艺, 制造疫苗, 对制成的疫苗进行全面检定, 选取其中较好毒株生产的疫苗, 用于人用禽流感疫苗临床前动物免疫的研究。

1 材料与方

1.1 材料 (1) 毒种: H5N1 禽流感毒种 R1194 株和 R1203 株(英国国家生物制品检定所和美国疾病控制中心); (2) 生产疫苗胚蛋: 来源于封闭式房舍内饲养的健康鸡群; (3) 过滤器和滤膜(美国 Millipore 公司); (4) β -丙内脂(美国 Sigma 公司), 用于灭活病毒; (5) Triton N101(美国 Aldrich 公司), 用于裂解病毒; (6) 脱氧胆酸钠(上海伯奥生物科技公司进口分装), 用于裂解病毒; (7) 凝胶柱(瑞典安发玛西亚生物技术公

司), 型号: PBG 300/950; (8) 凝胶 Sephrose-4FF(瑞典安发玛西亚生物技术公司); (9) 超声波细胞粉碎机(宁波新芝公司); (10) 区带离心机(日本日立公司); (11) 电泳仪(美国伯乐公司)。

1.2 方法 (1) 总蛋白测定: 采用 Lowry 法; (2) 卵清蛋白测定: 采用对流免疫电泳法; (3) 细菌内毒素测定: 鲎试验定量法; (4) 病毒液浓缩: 先用 15 000 r/min 连续离心澄清, 再超滤膜浓缩 40~50 倍; (5) 病毒灭活验证试验: 标本接种胚蛋, 培养后, 再盲传一代, 血凝应阴性; (6) 蔗糖梯度密度离心: 待纯化的病毒液 30 000 r/min 梯度离心 3 h, 收集病毒峰, 用磷酸盐缓冲液(PBS)进行超滤清洗, 去除蔗糖; (7) 电子显微镜观察: 由浙江医学科学院电镜室协助拍摄。

2 结果

2.1 生产工艺的设计 普通流感疫苗已有 60 年的生产历史, 工艺比较成熟, 根据生产流感疫苗的经验, 设计了 3 种禽流感疫苗的生产工艺: (1) 全病毒疫苗: 毒种接种鸡胚经培养、收液、超滤浓缩、 β -丙内脂灭活、层析、区带离心等纯化程序, 病毒未经裂解处理。(2) 裂解-1 疫苗: 程序相似, 中间增加用裂解剂 Triton N101 和脱氧胆酸钠, 裂解病毒的处理。(3)

作者单位: 1. 浙江省疾病预防控制中心出血热重点实验室, 杭州 310009; 2. 浙江天元生物药业公司; 3. 浙江大学医学院附属第一医院

作者简介: 朱智勇(1933-), 男, 浙江台州人, 主任医师, 硕士, 主要从事肾综合征出血热病原和疫苗研究。

裂解-2 疫苗:仅用裂解剂 Triton N101 裂解病毒的处理。

2.2 主要技术参数(表 1) 比较 2 毒种的不同滴度接种蛋胚,经不同温度和不同时间培养结果表明,接种剂量为 10^4 EID₅₀/ml (0.2ml),培养温度 34.5℃,培养时间 3d 较好。

表 1 不同滴度和不同温度及时间接种培养效果比较

毒种	方法	32.5℃(10 ⁴)		32.5℃(10 ³)		34.5℃(10 ⁴)		34.5℃(10 ³)	
		48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
R1194	血凝滴度	1:480	1:480	1:320	1:480	1:640	1:640	1:480	1:480
	病毒滴度	10 ^{6.67}	10 ^{7.0}	10 ^{6.5}	10 ^{7.0}	10 ^{7.5}	10 ^{7.67}	10 ^{7.0}	10 ^{7.33}
R1203	血凝滴度	1:480	1:640	1:480	1:800	1:640	1:800	1:640	1:640
	病毒滴度	10 ^{6.5}	10 ^{7.0}	10 ^{6.67}	10 ^{7.67}	10 ^{7.0}	10 ^{8.67}	10 ^{7.0}	10 ^{8.33}

注:(10⁴),(10³)为接种滴度

2.3 病毒灭活 采用 1:4 000 β-丙内脂,4℃,作用 24 h,经病毒灭活验证试验证明,对 R1194 或 R1203 毒株均可灭活。

2.4 病毒裂解 经采用 Triton N101 和脱氧胆酸钠,在超声波的作用下,对 R1194 或 R1203 毒株均可裂解。

2.5 电镜观察(图 1) 从图 1 可见,3 种工艺生产的疫苗形态完全不同,全病毒疫苗的病毒形态比较完整,裂解-1 疫苗对病毒的裂解比较细,已看不见完整的病毒及碎片,裂解-2 疫苗均为不完整的病毒及病毒碎片。

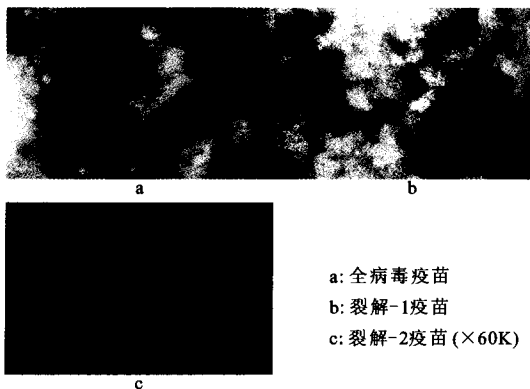
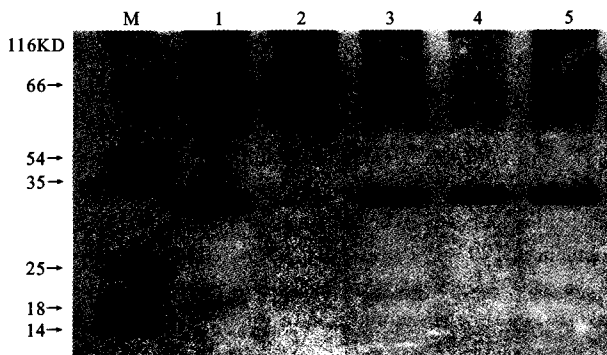


图 1 3 种工艺生产的禽流感疫苗的电镜结果

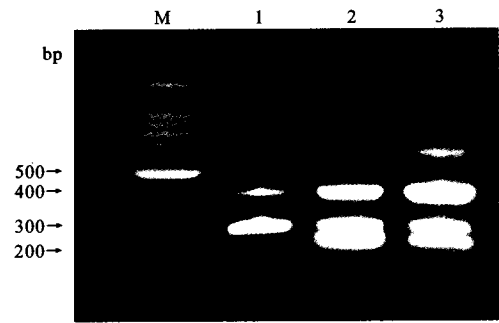
2.6 疫苗的 SDS-PAGE 的电泳结果(图 2) 从图 2 可见,全病毒疫苗和裂解-2 疫苗的形态相似,而裂解-1 疫苗,在 32KD 左右的条带已缺失。



M: mark;1:全病毒苗;2:裂解-1 疫苗;3~5:裂解-2 疫苗

图 2 3 种生产工艺疫苗的 SDS-PAGE 电泳结果

2.7 疫苗的核酸扩增(图 3) 用国家流感中心提供确诊 H5N1 禽流感病毒的引物,扩增 3 种疫苗的电泳。



M: mark;1:裂解-1 疫苗;2:裂解-2 疫苗;3:全病毒苗

图 3 H5N1 禽流感病毒引物扩增 3 种疫苗的电泳结果

从图 3 可见,3 种疫苗在 378 bp 处均有明显的条带,证明裂解后的疫苗还能扩增到禽流感病毒的基因片段。

2.8 浓缩和纯化 通过对血凝素含量的测定,了解浓缩和纯化每一环节对抗原活性成分的影响,确立最佳方法和条件,达到优化的目的,并制订相应的参数,建立稳定的浓缩纯化工艺。

2.9 原液的检定及产出比(表 2) 对浓缩和纯化后的疫苗原液进行全面检定,并计算出投入鸡蛋数与疫苗产出比。从表 2 可知,制备的 3 种疫苗原液,主要指标均明显优于国家标准,投入的鸡胚量与疫苗产出比(按每人 15 mg 2 针 30 μg 计算)R1194 毒种制的疫苗每人份需 1.63 个蛋,而 R1203 毒种制的疫苗仅需 1.07~1.22 个蛋。因而下一步的研究,用 R1203 株制成的疫苗进行动物接种,以比较 3 种不同工艺生产疫苗的免疫效果。

表 2 疫苗原液检定结果及产出比

毒种	疫苗	投入蛋数	原液量(ml)	HA(μg/ml)	内毒素(EU/ml)	卵蛋白(μg/ml)	总蛋白(μg/ml)	总蛋白比(HA)	可种人数	蛋数/人
R1194	全病毒	2500	500	92	20.4	<0.13	279.4	3.04	1533	1.63
	裂解 1	5000	1000	92	<0.3	<0.13	187.2	2.03	3067	1.63
	裂解 2	5000	1000	92	<0.3	<0.13	163.1	1.77	3067	1.63
R1203	全病毒	2500	500	140	5.10	<0.13	379.6	2.71	2333	1.07
	裂解 1	5000	1000	132	<0.3	<0.13	227.3	1.72	4400	1.14
	裂解 2	5000	1000	123	<2	<0.13	207.2	1.69	4100	1.22

3 讨论

自 1937 年流感病毒在鸡胚中获得培养成功,使鸡胚可用于大量生产流感疫苗,直至今日,世界各国提供的流感疫苗,绝大部分是用鸡胚生产的灭活疫苗。本研究获得的 R1194 和 R1203 禽流感毒株,也为鸡胚适应株,故采用鸡胚培养病毒。由于无致病菌(SPF)鸡蛋缺少且价格昂贵,无法满足疫苗生产的巨大需求,因而目前我国规定,制备疫苗毒种必须用 SPF 鸡蛋,而生产疫苗可用封闭饲养健康鸡群的蛋,由于本研究的工艺设计中有甲醛防腐(也能杀死 99.999% 病毒,即从 10^8 /ml 降至 10^3 /ml 左右)和 β-丙内脂再灭活,用封闭饲养健康鸡群的蛋,安全有保障。

为了防止儿童接种流感全病毒疫苗引起的发热反应,将病毒进行裂解,制成裂解疫苗取得很好的效果,可以在儿童中接种。一般认为,裂解疫苗的免疫效果不如全病毒疫苗。但由于裂解病毒的方法各不相同,目前国际上研制的禽流感疫苗,有全病毒的^[1,2]也有裂解的^[3,4]。故本研究设计了有全病毒和不同裂解程度的 3 种生产工艺,以比较它们的免疫效果。

希望获得免疫效果较好的禽流感疫苗。

从 3 种工艺疫苗的电镜形态观察,达到原设计的要求,即完整病毒;病毒裂解很细和不完整病毒或病毒碎片 3 种。从 SDS-PAGE 电泳的条带来分析,全病毒疫苗与裂解-2 疫苗基本相似,裂解-3 疫苗未见 32KD 左右的条带(M1 蛋白),表明它们之间存在差别,但 3 种疫苗的血凝素和核蛋白的条带均比较明显。经核酸扩增试验,均能扩增到禽流感病毒的基因片段,提示 H5N1 的核酸扩增可用于疫苗的鉴别试验。

引发流感疫苗副反应的成分主要有内毒素、卵清蛋白和其他杂蛋白。因而疫苗质量的好坏主要取决于以下 4 项指标,即内毒素、卵清蛋白、总氮、总氮与血凝素之比。国家标准^[5]规定内毒素不高于 200 EU/ml(本实验为 <2 EU/ml),卵清蛋白不高于 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (本实验为 <0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$),总氮不高于 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (本实验为 <100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),因配成 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 疫苗,原液还要稀释 4 倍,总氮与血凝素之比不高于 6(本实验为 2 左右)。比较可见,本研究设计生产的禽流感疫苗可达到进口普

通流感疫苗质量。

(参加本项工作的还有:谢荣辉,赵芝雅,金美珍,丁云龙,李枫,黎丹,袁勇等)

参考文献

- (1) John J, Treanor, M D, James D, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A(H5N1) vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(13):1343-1351.
- (2) Lin J, Zhang J, Dong X, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A(H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2006, 368(9540):991-997.
- (3) Bresson JL, Perronne C, Launay O, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004(H5N1) vaccine: phase I randomised trial[J]. *Lancet*, 2006, 367(9523):1657-1664.
- (4) 英国葛兰素史克. 禽流感疫苗临床试验成功[EB/OL]. <http://info.pharmacy.hc360.com/2006/04/07101739167.shtml>.
- (5) 国家药典委员会. 流行性感冒疫苗制造及检定规程[S]. 中国药典三部. 北京:化学工业出版社, 2005:19-23.

收稿日期: 2006-09-08

(蔡天德编校)

文章编号: 1001-0580(2007)04-0390-03 中图分类号: 392 文献标志码: A

【专题报道之一】

广东地区人禽流感 H₅N₁ 血凝素基因特征与进化*

黄平, 柯昌文, 邹丽容, 李晖, 陈秋霞

摘要: 目的 通过对广东地区人禽流感 H₅N₁ 毒株(HA)基因序列的变异分析,揭示毒株 HA 基因变异与进化。方法 对广东地区人禽流感 H₅N₁ 毒株(A/GD/01/06)HA 基因测序,同时检索全球各地人禽流感 H₅N₁ 毒株 HA 基因,采用 SPSS 11.0 和 DNASTar 5.0 软件对检索的人禽流感 H₅N₁ 毒株 HA 基因核苷酸序列进行聚类、比对和分析;并结合临床资料对变异毒株进行进化速度分析。结果 1997~2006 年,42 毒株 HA 基因序列聚类分成 3 类;HA 基因 89 氨基酸位点置换,占 15.7%(89/568);2003~2006 年 H₅N₁ 毒株通过氨基酸第 170~172 位(NST/S)位点的置换,增加一个糖基化位点。同义变异中,HA 基因 K_s 为 $1.99 \times 10^{-5} \sim 2.58 \times 10^{-5}$,生物进化线性回归方程为 $Y = 4.8 \times 10^{-9}X + 1.048 \times 10^{-5}$;同时各毒株 K_s 均大于 K_a,进化检验 K_s/K_a 值显示 HA 基因进化压力主要来自自然变异。42 株 H₅N₁ 毒株可以分 3 条进化途径,1997~1998 年毒株为 1 条,2003~2005 年东南亚毒株为第 2 条途径,2005~2006 年中国毒株为第 3 条途径。毒株 HK-213-03 氨基酸变异显示其变异的进化过度性,而 2004 年毒株 TL-L2004-04 氨基酸位点变异值得注意。结论 2003~2006 年人禽流感 H₅N₁ 毒株 HA 基因抗原性与 1997 年毒株有较大不同,人禽流感 H₅N₁ 毒株增加一个糖蛋白位点可能改变毒株致病性;少数毒株氨基酸位点变异较大,值得关注。人禽流感 H₅N₁ 毒株在自然界变异频繁,但受到鸟禽和人体的免疫压力较小;但随着 H₅N₁ 毒株自然进化, H₅N₁ 毒株具有人-人传播能力的概率较大。建议在研制人禽流感 H₅N₁ 毒株疫苗时,要充分考虑不同毒株 HA 基因抗原性。

关键词: 人禽流感;H₅N₁;毒株;血凝素(HA)基因;进化

Characteristic and evolution on HA gene of human H₅N₁ avian influenza HUANG Ping, KE Chang-wen, ZOU Li-rong, et al. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province(Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To reveal characteristic and evolution on HA gene of human H₅N₁ avian influenza by analyzing variation of the nucleotide sequence of HA gene of human H5N1 avian influenza. **Methods** HA gene of Guangdong strain was sequenced and others global HA nucleotide sequences of human H5N1 avian influenza from Internet and their variation were clustered and compared and analyzed with SPSS 11.0 and DNA Star 5.0. **Results** Forty-two HA genes of human H₅N₁ avian influenza in 1997~2006 were clustered into three groups. Eighty-nine amino acids of HA gene were substituted and accounted for 15.7%(89/568). HA gene increased one glycoprotein domain in 170~172 sites(NST/S) in 2003~2006. In the synonymous variation, K_s in HA gene was between $1.99 \times 10^{-5} \sim 2.58 \times 10^{-5}$ and the evolutionary linear regression equation was $Y = 4.84 \times 10^{-9}X + 1.048 \times 10^{-5}$. Meantime, K_s was more than K_a in same strain and K_s/K_a value showed that there was not selective pressure in HA gene evolution. H₅N₁ strain evolution was divided into three clusters, one for strains in 1997~1998, another for strains in 2003~2005 except for strains from China, third for strain from China in 2005~2006. The

*基金项目:广东省重点科技项目(2003B60127)

作者单位:广东省疾病预防控制中心,广州 510300

作者简介:黄平(1963-),男,安徽芜湖人,主任医师,博士,主要从事传染病的流行病学研究和防治。