

• 基础实验研究论著 •

流感病毒裂解疫苗病毒种子批的制备和培养条件的研究*

马磊, 宋绍辉, 张新文, 周健, 蔡玮, 高菁霞, 李卫东, 廖国阳[△], 杨净思

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学生物学研究所/云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118)

摘要:目的 制备流感病毒裂解疫苗的主代和工作种子批, 优化病毒培养条件提高产量, 制备高质量的流感病毒裂解疫苗。**方法** 将 H1N1、H3N2 和 B 型 3 株流感病毒分别接种 SPF 鸡胚, 收获尿囊液, 制备流感病毒裂解疫苗主代及工作种子批。流感疫苗工作种子批按不同稀释倍数、pH 值、收获时间和冷胚时间优化病毒培养条件, 制成疫苗, 进行产量、安全性和免疫原性研究。**结果** 通过优化不同型别流感病毒的培养条件, 提高了抗原的血凝滴度, 血凝滴度达到 1:1 024 及以上, 制备的疫苗具有良好的安全性和免疫原性。**结论** 制备出了高产量和高质量的流感病毒裂解疫苗。

关键词: 流感病毒裂解疫苗; 流感疫苗种子批; 抗原血凝滴度**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.003**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)20-2645-02**Preparation of strains of split influenza virus vaccine and optimization of condition for culture of influenza virus***Ma Lei, Song Shaohui, Zhang Xinwen, Zhou Jian, Cai Wei, Gao Jingxia, Li Weidong, Liao Guoyang[△], Yang Jingsi

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Yunnan Key

Laboratory of Vaccine Research/Development on Severe Infectious Diseases, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: **Objective** To prepare master strains and work strains of influenza virus. To optimize the conditions for culture of influenza and prepare a high qualitative split influenza virus vaccine. **Methods** Three strains of influenza virus (H1N1, H3N2 and B) were inoculated into Specific Pathogen Free (SPF) Eggs. The allantoic fluid was harvested for preparing master strains and work strains of influenza virus. The effects of dilution ratio of virus inoculated, cultural time and cooling time for harvest on hemagglutination (HA) titer were evaluated. The split influenza virus vaccine was Produced and tested with “the Production and Control of Split Influenza Virus Vaccine”. **Results** The results showed that the condition for culture of influenza virus was optimized as follows: 10-5~10-6 dilution ratio of virus and pH value of 7.8 were inoculated into chick embryo, and harvested in 72 h after culture by cooling for 16~18 h in 4 °C. The titer of influenza virus prepared under the optimal condition was above 1:1 024. The split influenza virus vaccine met the standard requirements. **Conclusion** The quality split influenza vaccine with high yield is prepared.

Key words: split influenza virus vaccine; strains of influenza vaccine; hemagglutination titer

人类流行性感冒(流感)是由流感病毒引起的急性高发性呼吸道传染病, 主要经空气飞沫传播; 是目前人类尚不能有效控制的世界性传染病, 每年引致相当高的发病率和死亡率, 由于病毒在传播过程中易变异或基因的重配, 因此每隔一段时间会出现流感大流行或局部暴发^[1]。2009 年甲型 H1N1 流感病毒的世界范围内的大爆发^[2-3], 对人类的健康和人类社会造成了巨大的危害和损失。因此有效和快速的应对流感大流行成为目前的研究热点^[4-5], 目前最有效的预防和控制流感流行的手段是接种流感疫苗^[6]。国内外流感疫苗厂家产业化升级和应对流感大流行的关键。

现阶段的流感灭活疫苗主要有全病毒疫苗、裂解疫苗和亚单位疫苗, 在 3 种流感疫苗中, 流感病毒裂解疫苗又是目前世界上最为广泛使用的流感疫苗, 具有更低的致热原性和更高的安全性, 不仅接种保护效果好, 而且临床不良反应极少, 适合各年龄段的人群接种。中国医学科学院医学生物学研究所(昆明所)选用鸡胚培养法, 用世界卫生组织(WHO)提供的 H1N1、H3N2、B 3 种型别的流感病毒株制备了主代和工作种子批, 利用工作种子批制备了流感病毒裂解疫苗, 现在国内厂家的流感病毒培养的尿囊收获液的血凝滴度一般达到 1:256~1:512, 很少达到 1:1 024 及以上, 疫苗一般能做到 1.5~2 个鸡胚生产一人份流感病毒裂解疫苗, 本研究目的在于提高流感病毒的滴度, 有利于降低生产成本, 有利于在应对流感大流行时

提供充足疫苗保证防控安全。因此, 优化病毒培养提高抗原产量无论是对流感疫苗生产厂家还是对社会防控流感安全都至关重要。本实验采用 SPF 鸡胚制备流感疫苗主代和工作种子批, 根据规程, 各项指标检定合格, 将检定合格的工作种子批接种健康鸡胚, 并对病毒接种量、pH 值、培养收获时间和冷胚时间进行优化, 筛选培养流感病毒的适宜条件, 提高抗原产量, 制备合格的流感病毒裂解疫苗, 作者按照所建立的病毒培养、生产工艺和检定方法制备的流感病毒裂解疫苗, 不含防腐剂, 卵清蛋白含量低, 质量符合规程要求, 具有较好的安全性和免疫原性, 且不低于进口对照疫苗。

1 材料与方法

1.1 鸡胚及流感毒株 无特定病原体鸡胚(SPF 鸡胚)来源于北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 用于制备主代和工作种子批; 健康鸡胚: 来源于云岭广大种禽饲料有限公司, 无菌, 无支原体, 无外源性禽白血病毒, 禽腺病毒 I、III 型检测合格的封闭式健康鸡群鸡胚, 用于制备疫苗。流感病毒毒株: 来源于世界卫生组织(WHO)2010~2011 年度建议北半球使用毒株, H1N1 A/California/7/2009 NYMC X-179A; H3N2 A/Victoria/210/2009 NYMC X-187; B/Brisbane/60/2008 NYMC BX-35。

1.2 检测用抗原和抗体 来源于英国生物制品标准和检定研究所(NIBSC)。标准抗原: H1N1 Influenza Antigen A/Califor-

* 基金项目: 云南省科技厅应用基础面上项目(2010CD134); 国家国际合作项目(2011DFR30420)。 作者简介: 马磊, 男, 助理研究员, 主要从事病毒疫苗研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: liaogy@imbcams.com.cn。

nia/7/2009(H1N1)v(NYMC-179A) code:09/146; H3N2 Influenza Antigen A/Victoria/210/09 (H3N2) (NYMCX-187) code:10/102; B Influenza Antigen B/Brisbane/60/2008(NYMC BX-35) code:10/106。标准抗血清: H1N1 Influenza Anti-A/California/7/2009(H1N1) HA Serum code:10/182; H3N2 Influenza Anti-A/Perth/16/2009 HA Serum code:11/110; B Influenza Anti-B/Brisbane/60/2008 HA serum code:10/146。

1.3 流感病毒主代和工作种子批的制备 将 3 个型的原始种子批分别稀释为 1:102~1:108 倍的病毒液,按 0.2 mL/胚接种于 9~11 日龄 SPF 鸡胚,置(34±1)℃培养 24~96 h,收获鸡胚尿囊液,每个鸡胚测血凝滴度,合并滴度高的尿囊液,检定合格后分装,冻存于-70℃以下作为流感病毒裂解疫苗主代种子批。将主代种子批传 1 代次后制备得到工作种子批。经检定合格后冻存于-70℃以下作为流感病毒裂解疫苗工作种子批。

1.4 流感病毒接种量的优化 用 0.01 mol/L PBS 按不同的稀释倍数稀释 3 个型别的毒种,从 1:250~1:108 倍共 8 个稀释度,每个稀释度接种 20 枚鸡胚,并设阴性对照和阳性对照各 10 枚鸡胚,接种后于(34±1)℃培养,每个型别重复试验 3 次,检测病毒的血凝滴度^[7],确定生产时的最适宜的病毒接种量。

1.5 流感病毒接种 PH 值的优化 用 pH 值分别为 7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 的 0.01 mol/L PBS 稀释流感病毒,每个 pH 条件接种 20 枚鸡胚,并设阴性对照和阳性对照各 10 枚鸡胚,(34±1)℃培养,检测病毒的血凝滴度,筛选适宜的 pH 值。

1.6 流感病毒培养时间的优化 将病毒稀释后接种 140 枚鸡胚,并设阴性和阳性对照各 10 枚,每鸡胚接种 0.2 mL,培养条件为 34±1℃,分别于感染后 24、36、48、60、72、84、96 h 各收获 20 枚鸡胚尿囊液,检测病毒的血凝滴度,筛选适宜的病毒培养时间。

1.7 鸡胚冷却时间的优化 将病毒稀释后接种 160 枚鸡胚,培养 24~96 h 后放置于 4℃冷库中,20 枚鸡胚一组,每隔 2 h 结束一组冷胚,收获计数溶血数及阳性血凝胚数,筛选适宜的冷胚时间。

1.8 规模培养病毒制备高质量流感病毒裂解疫苗及其评价 将 3 个型别的流感病毒工作种子批按上述优化条件分别接种 2 000 枚鸡胚,每个型别收获 21 L 鸡胚尿囊收获液,经过滤澄清、超滤浓缩、区带离心纯化,裂解灭活等步骤制备流感病毒裂解疫苗。根据 H1N1 型、H3N2 型和 B 型单价原液血凝素(HA)抗原含量,分别将 3 个型别的单价原液稀释至血凝素含量大于或等于 90 μg/mL,配制三价流感裂解疫苗半成品,经分包装、按规程检定合格后即为流感裂解疫苗成品。免疫小鼠,每组 20 只,雌雄各半,设对照组巴斯德组和阴性对照组,免疫 21 d 后,采血,进行疫苗安全性和免疫原性评价。

2 结 果

2.1 流感病毒主代和工作种子批的制备及检定 按照规程进行主代和工作种子批的检定,检定合格,符合疫苗生产用毒种要求,检定结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 不同种毒量对病毒产量的影响 结果显示以 1:105 或者 1:106 毒种稀释度为佳(H1N1 和 B 型 1:105, H3N2 型 1:106),血凝滴度可达到 1:1 024 及以上,结果见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 不同 PH 值对病毒产量的影响 结果显示 H1N1 和 H3N2 以 pH 值 7.8 稀释病毒, B 型以 pH 值 7.8~8.0 稀释病毒,血凝滴度最佳,可达 1:1 024 及以上。

2.4 不同培养时间对病毒产量的影响 检测结果显示在感染后 96~120 h 时,病毒的血凝滴度开始降低。病毒感染后 72~96 h,病毒的血凝滴度达峰值(1:1 024),因此选择 72 h 为流感病毒适宜的收获时间。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.5 不同冷胚时间对病毒培养的影响 接种病毒培养 72 h 的鸡胚于 4℃冷库中,结果显示以 8 h 以后的冷胚时间较为合适,考虑到规模生产时冷胚时间跟鸡胚个数有关,生产时鸡胚冷胚 16~18 h 合适。

2.6 优化培养条件对生产疫苗产量的影响 本研究通过提高抗原产量,来提高疫苗的产量,分装成人剂量抗原量分别为, H1N1 32.04 μg/mL; H3N2 30.54 μg/mL; B 30.66 μg/mL,卵清蛋白含量 6.3 ng/mL。分装支数:5 278 支,产量计算:6 000/5 278=1.1,结果显示经过培养病毒条件的优化,大幅提高了抗原产量,降低了生产成本,可以做到 1.1 个鸡胚做 1 人份的流感病毒裂解疫苗。

2.7 流感病毒裂解疫苗的安全性和免疫原性初步评价 制备的流感病毒裂解疫苗具有良好的安全性和免疫原性,在 21 d 观察期,各组小鼠全部健存,动作活泼,每只小鼠体重质量都逐日增加,表明流感裂解疫苗无明显不良反应,疫苗安全性好,其免疫效果不低于进口疫苗。昆明疫苗与巴斯德疫苗的 H1N1、H3N2 和 B 型的抗体阳转率均达到 90%, H1N1、H3N2 和 B 型抗体滴度大于或等于 1:40(保护水平)也达到 90%,各型抗体的 GMT 增加值均大于 4 倍,与进口流感疫苗 GMT 及增长差异无统计学意义,表明制备的流感病毒裂解疫苗具有良好的免疫原性。

3 讨 论

流感疫苗是目前应对流感流行的最有效的手段,现在国际上主要有流感病毒灭活疫苗和流感病毒减毒活疫苗,世界上大部分国家主要使用灭活疫苗,原苏联地区和美国允许使用减毒活疫苗。另外, DNA 疫苗正处于研制和临床试用阶段^[8-9]。现在最常用的灭活疫苗是裂解疫苗和亚单位疫苗^[10-11]。

本研究结果表明,根据不同的型别当病毒稀释倍数为 10⁻⁵ 到 10⁻⁶ 时,收获的流感病毒血凝滴度最高。根据不同的型别,稀释液在 pH 为 7.8~8.0 时,收获的流感病毒的血凝滴度较高,表明在此 pH 值时,病毒具有较高的感染力。最佳收获时间在 72 h,3 个型别的病毒的血凝滴度都达到了峰值,过了峰值病毒滴度开始下降,因此最佳收获时间为 72 h。冷胚时间在 16~18 h 时,既可以保证血凝滴度不下降又可以保证收获病毒液不溶血,使病毒收获液保持较高的质量,保证了不带入新的杂质增加后处理纯化过程的难度。

用此方法制备的流感病毒裂解疫苗检定合格,符合医学生物学研究所《流感病毒裂解疫苗制造及检定试行规程》和中国药典 2010 版《流感病毒裂解疫苗》制造及检定要求。最终制品中不含防腐剂,各株血凝素含量分别为 H1N1 32.04 μg/mL, H3N2 30.54 μg/mL, B 30.66 μg/mL,卵清蛋白含量小于 10 ng/mL,在安全性和免疫原性评价过程中, HI 抗体 GMT 各型分别为 117.12、125.53、101.96,与国外同类疫苗相比,安全性和免疫抗原性都不低于国外同类疫苗。经过培养病毒条件的优化,建立了一套提高抗原产量的方法,制备出了不含防腐剂的高产量、安全性和免疫原性较好的高质量流感病毒裂解疫苗,在今后的产业化过程中有利于降低生产成本,为今后的产业化奠定了技术基础。

参考文献

[1] 曾祥兴,李康生.流感百年:20 世纪流感大流行(下转第 2649 页)

16S rRNA 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种相应序列的相似率均达 99.9% 以上。因此,所有 SZD 菌株均鉴定为棒状乳杆菌,但棒状乳杆菌两个已知亚种的 16S rRNA 基因序列之间差异太小,仅凭 16S rRNA 这一个基因无法将 SZD 菌株鉴定至亚种水平。

MLSA 技术通过对多个基因信息进行相互比较、综合分析,可以得到一个比较全面可信的物种间的关系^[5]。作者通过综合分析编码 RNA 聚合酶 α 亚基的 rpoA 基因、编码苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 亚基的 pheS 基因^[6]、编码翻译延伸因子 Tu 的 tuf 基因以及编码热休克蛋白 60 的 hsp60 基因^[7]以对 SZD 菌株进行进一步的鉴定,这些基因较 16S rRNA 基因具有更高的分化程度,因而鉴定分辨率更高,更适于亲缘关系较近的种或亚种之间的鉴定^[8-9]。Naser 等^[9]通过分析代表 98 个种和 17 个亚种的 201 株乳酸杆菌的 pheS 及 rpoA 基因序列发现, pheS 基因的种间差异大多超过 10%,种内差异大多超过 3%; rpoA 基因的种间差异大多超过 5%,种内差异大多超过 2%。SZD 菌株的 4 个蛋白编码基因与其他乳杆菌菌种的同源性差异均大于或等于 15%,与棒状乳杆菌的同源性均差异均小于 3%,故 SZD 菌株均鉴定为棒状乳杆菌。SZD 菌株 pheS 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 100% 和 97.87%,而 rpoA 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 98.65% 和 100%; tuf 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以上,而 hsp60 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以下。以上结果表明, SZD 菌株的 4 个蛋白编码基因序列和棒状乳杆菌的两个已知亚种均不完全相符。在用 UPGMA 法构建的基于 16S rRNA、hsp60 和 tuf 基因的进化树中, SZD 菌株及棒状乳杆菌的两个已知亚种聚类在亲缘关系最近的一个分支上,但 SZD 菌株又单独形成一个分支。在基于 pheS 基因构建的进化树中,棒状乳杆菌的两个已知亚种聚类在同一个分支上,而 SZD 菌株与草乳杆菌聚类于另一个分支。SZD 菌株从系统发育上独立于棒状乳杆菌的两个已知亚种而自成一支。

综上所述, SZD 菌株鉴定为棒状乳杆菌的一个新亚种,建议命名为棒状乳杆菌陕西亚种,模式菌株为 CGMCC No. 6891。但无论是 16S rRNA 序列还是上述 4 个蛋白编码基因序列分析,都只是针对基因组的一部分序列进行分析,并非全基因组水平分析,因而具有一定的局限性^[10]。因此, SZD 菌株

的最终鉴定分类还需要全基因组水平上的鉴定技术,如 DNA 的 G+C 含量测定、DNA-DNA 杂交、限制性片段长度多态性、扩增片段长度多态性及全基因组测序等。

参考文献

- [1] Oshiro M, Shinto H, Tashiro Y, et al. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 108(5): 376-384.
- [2] 董银苹, 崔生辉, 李凤琴, 等. 乳酸杆菌及嗜热链球菌的种水平鉴定——16SrRNA 基因 PCR 扩增及序列分析[J]. 卫生研究, 2010, (4): 454-458, 465.
- [3] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [4] 刘朝军, 沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 774-776, 779.
- [5] 赵婷, 程池. MLSA 用于双歧杆菌快速鉴定研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(6): 46-50.
- [6] Naser SM, Thompson FL, Hoste B, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2141-2150.
- [7] Dumonceaux TJ, Hill JE, Briggs SA, et al. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target [J]. J Microbiol Methods, 2006, 64(1): 46-62.
- [8] Sheu SJ, Hwang WZ, Chen HC, et al. Development and use of tuf gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products [J]. J Food Prot, 2009, 72(1): 93-100.
- [9] Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, et al. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(12): 2777-2789.
- [10] 庞会利, 谈重芳, 蔡义民, 等. 乳酸菌分类鉴定方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2009, (6): 1-5.

(收稿日期: 2013-02-05)

(上接第 2646 页)

- 的回顾与启示[J]. 医学与社会, 2010, 23(11): 4-6.
- [2] World Health Organization. New influenza A / (H1N1) virus: global epidemiological situation[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.
 - [3] Duvvuri VR, Heffernan JM, Moghadas SM, et al. The role of cellular immunity in Influenza H1N1 population dynamics[J]. BMC Infect Dis, 2012, 2(1): 329.
 - [4] 范行良, 李长贵, 王大燕, 等. 甲型 H1N1 流感病毒核酸国家参制品的研制[J]. 中国生物制品学, 2009, 22(12): 1193-1195.
 - [5] Kim JI, Lee I, Park S, Park MS. Surface glycoproteins determine the feature of the 2009 pandemic H1N1 virus[J]. BMB Reports, 2012, 45(11): 653-658.
 - [6] Barra IG, McCauley J, Cox N, et al. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A (H1N1), A (H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-

- 2010 Northern Hemisphere season [J]. Vaccine, 2010, 28(5): 1156-1167.
- [7] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 中国三峡出版社, 1997: 18-22.
 - [8] Yager EJ, Stagnar C, Gopalakrishnan R, et al. Optimizing particle-mediated epidermal delivery of an influenza DNA vaccine in ferrets [J]. Methods Mol Biol, 2013, 940: 223-237.
 - [9] Wei H, Lenz SD, David H. Thompson, et al. DNA-vaccine platform development against H1N1 subtype of swine influenza A viruses[J]. Viral Immunol, 2012, 25(4): 297-305.
 - [10] 张延龄, 张晖. 疫苗学(修订本)[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1171-1185.
 - [11] 魏晓露, 廖国阳. 流感病毒及相关疫苗的研究概况[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(4): 320-321.

(收稿日期: 2013-05-05)