



季节性流感疫苗免疫血清与 H7N9 禽流感病毒交叉反应

吕琦, 鲍琳琳, 许黎黎, 邓巍, 李枫棣, 袁静, 于品, 姚艳丰, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 分析接种季节性流感疫苗人群是否具有对新发 H7N9 流感病毒具有交叉保护, 并反向检测了雪貂产生 H7N9 抗血清与 H1/H3/H5 不同亚型流感病毒的免疫反应。方法 利用血凝抑制试验和微量中和实验检测疫苗免疫后人群转阳血清对 A/Anhui/1 (H7N9) 病毒中和作用及雪貂 H7N9 抗血清与 A/California/07/2009 (H1N1)、A/PR/8/34 (H1N1)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、A/Brisbane/10/2007 (H3N2)、A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1) 和 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 等不同亚型病毒的中和作用。结果 季节性流感疫苗受众者转阳血清与 H7N9 病毒反应 HI 及中和抗体反应均为阴性, 雪貂 H7N9 抗血清与 H1/H3/H5 不同亚型流感病毒反应 HI 及中和抗体反应均为阴性。结论 季节性流感疫苗接种人群不具有对新发 H7N9 流感病毒交叉保护, 并且反向验证了 H7N9 病毒抗血清与 H1/H3/H5 亚型流感病毒亦无交叉免疫反应。

【关键词】 H7N9 流感病毒; 季节性流感疫苗; 交叉免疫保护

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0059-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.014

Analysis of cross-protective immunity of neutralizing antibodies to H7N9 influenza virus raised in sera vaccinated with seasonal influenza vaccine

LV Qi, BAO Lin-lin, XU Li-li, DENG Wei, LI Feng-di, YUAN Jing, YU Pin, YAO Yan-feng, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether seasonal vaccine induces anti-virus activity against H7N9 and cross-reactive immune response against related H1/H3/H5 subtype influenza viruses. **Methods** A/Anhui/1 (H7N9) were pre-incubated with sera vaccinated with seasonal vaccine and A/California/07/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1), A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) were pre incubated with ferret sera infect with H7N9 through Micro-neutralization and HI Assay. **Results** Human sera from the donors were tested for HI and neutralization activity against influenza (H7N9) preparations remained at undetectable levels after seasonal vaccination, and ferret sera were tested for HI and neutralization activity against H1/

【基金项目】 十二五科技重大专项 (2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8); 国家自然科学基金 (31370203); 科技部 H7N9 禽流感应急防控专项 (KJYJ-2013-01-04)。

【作者简介】 吕琦 (1982 -), 女, 实习研究员。E-mail: qqmei-qiqi@163.com。

【通讯作者】 秦川。E-mail: chuanqin@cnilas.org。

H3/H5 type influenza viruses either. **Conclusion** The neutralizing antibodies raised in all donors sera vaccinated with seasonal vaccine cannot neutralize H7N9 influenza virus, and cannot cross-react to H1/H3/H5 subtype.

【Key words】 H7N9 influenza virus; Seasonal influenza vaccine; Cross-protective immunity

2013 年 3 月底在上海和安徽两地,爆发了 H7N9 亚型感染人的情况,为该亚型病毒全球首次出现。大多数病人出现呼吸道感染,重症肺炎和呼吸困难的症状,病死率高达 30%,至今尚无有效疫苗^[1-3]。一旦该病毒获得了人际间传播的能力,必将引起流感大流行。H7N9 疫苗的研制尚需时日,探讨目前使用的季节性流感疫苗是否与 H7N9 病毒存在交叉变得很有必要。

为评价季流疫苗对 H7N9 流感病毒的保护性,我们于本所内招募志愿者 20 位接种流感疫苗,体外评价疫苗对 H7N9 病毒的保护性。同时,为了得到 H7N9 流感病毒更广泛免疫反应,我们又将 H7N9 流感病毒感染雪貂制备抗血清与不同亚型病毒反应,进行了血清交叉免疫研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒

流感病毒 A/Anhui/1/2013 (H7N9),由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所提供。其他流感病毒由 WHO 惠赠, A/California/07/2009 (H1N1)、A/PR/8/34 (H1N1)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、A/Brisbane/10/2007 (H3N2)、A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1) 和 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 经无特殊病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡胚增殖后收集病毒尿囊液。-80℃ 储存备用,实验均在 ABSL-3 实验室(注册号:CNAS BL0010)中进行。

1.1.2 动物

去势雪貂 1 只,6 月龄,900 g (本所繁殖)。实验前进行血清学检查,血清反应均为阴性方可实验。

1.1.3 疫苗

季节性流感病毒裂解疫苗(2012~2013 年)购自 Glaxo SmithKline。该疫苗通过诱导针对表面抗原 HA 的中和抗体发挥保护作用。此疫苗包含两种甲型流感病毒(H1N1 和 H3N2)和一种乙型流感病毒的三价亚单位疫苗。

1.1.4 志愿者信息

招募志愿者共 20 人,年龄 25~45 岁,男女性别比 2:1,同一地区生活。

1.2 方法

1.2.1 免疫

按说明书给予志愿者免疫,间隔 14 d 后加强免疫一次,末次免疫后 14 d 静脉取血,血清 RDE 处理,用于测定对同型流感病毒 A/California/07/2009 (H1N1) 及异型流感病毒 A/Anhui/1 (H7N9) 的血凝抑制抗体效价和中和抗体效价。

1.2.1.1 血凝抑制试验(HI)

使用 0.5% 的火鸡血进行小鼠血清 HI 实验。按照 OIE (World Organization for Animal Health) 颁布的标准 HI 测定方法测定收集的血清对流感病毒血凝抑制效价。

1.2.1.2 微量中和试验(NT)

血清倍比稀释,4 个复孔,加入等体积 100 TCID₅₀ 病毒混合,37℃ 孵育 1 h 后移入 MDCK 细胞中,37℃ 孵育 72 h;火鸡血测定凝血活性,以此判定细胞是否被感染。血球下流孔为中和抗体阳性,抗体效价按照 Reed and Muench 方法计算。

1.2.2 雪貂感染 H7N9 病毒及血清采集

实验在 ABSL-3 实验室中进行。雪貂采用兽用氯胺酮 0.1 mL/kg 轻度麻醉,将 A/Anhui/1 (H7N9) 病毒株以 10⁸ TCID₅₀ 滴鼻感染,雪貂鼻孔内均匀滴入 500 μL 病毒液。独立送风隔离笼具中正常饲养。感染 14 d 后心脏取血,血清 RDE 处理,测定 H7N9 血凝抗体效价。

1.2.3 H7N9 雪貂抗血清与 H1/H3/H5 亚型流感病毒交叉免疫反应

测定雪貂 H7N9 转阳抗血清与 A/PR/8/34 (H1N1)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、A/Brisbane/10/2007 (H3N2)、A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1) 和 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 等不同亚型病毒血凝抑制抗体效价和中和抗体效价。

2 结果

2.1 免疫后人群血清对同型 H1N1 与异型 H7N9 流感病毒的血凝抗体效价和中和抗体效价

末次免疫 14d 后受众者静脉取血,血清处理后,对同型流感病毒 A/California/07/2009 (H1N1) 血凝抗体效价均在 80 以上,中和抗体效价均在 256 以上;对异型流感病毒 A/Anhui/1 (H7N9) 血凝抗体反

应均为阴性,中和抗体反应均为阴性。

2.2 雪貂抗血清 HI 抗体效价测定

A/Anhui/1 H7N9 病毒株以 10^8 TCID₅₀ 滴鼻感染雪貂,14 d 后心脏取血,血清处理测定对 H7N9 流感病毒抗体抗体效价为 640。

2.3 雪貂抗血清对 H1/H3/H5 亚型流感病毒血凝抑制抗体效价和中和抗体效价的测定

将雪貂 H7N9 抗血清与 A/California/07/2009 (H1N1)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、A/Brisbane/10/2007 (H3N2)、A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1)、A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 和 A/PR/8/34 (H1N1) 不同亚型流感病毒反应,检测 HI 抗体效价和中和抗体效价,结果显示抗体反应均为阴性。

3 讨论

H7N9 流感病毒是首次发现感染人的新亚型禽流感病毒,病死率高达 30%,至今尚无有效疫苗,人群对此病毒也缺乏免疫力,一旦病毒通过进化具有了人际传播的可能性,必将引起流感大流行^[1]。那么现有季节性流感疫苗能否防御此病毒就凸显重要。于是本研究招募志愿者接种季流疫苗,分离转阳血清,体外测定疫苗抗 H7N9 病毒作用,血凝抑制及中和试验得出受众者转阳血清中无 H7N9 中和抗体,季节性流感疫苗接种人群不具有对新发 H7N9 流感病毒交叉保护。Michał T^[4] 研究也证实这一点,季节性流感疫苗不太可能诱导异型病毒间交叉抗体产生。为了反向验证此结果并且得到 H7 亚型更广泛免疫反应,我们又将雪貂 H7N9 抗血清与不同亚型病毒作用,血凝抑制及中和试验得出 H7N9 病毒与 H1/H3/H5 亚型流感病毒亦无交叉抗体反应。当然本实验选用病毒种类数量以及受众者数量和年龄梯度有限,并不完全说明问题,还需更多实验数据加以验证。

虽然季节性流感疫苗在流感防控中起到重要作用,但由于流感病毒 HA 抗原高度变异,难以诱发甲型流感病毒不同亚型间交叉免疫保护。目前,多数学者认为,机体遭受流感病毒感染时中和抗体发挥主要作用,但在细胞免疫中 T 淋巴细胞免疫反应也至关重要^[4],Thomas PG 等^[5] 证明,细胞毒性 T

淋巴细胞缺陷小鼠在攻毒后明显恢复慢,死亡率高;Deborah MB 发现 B 淋巴细胞缺陷小鼠对 A 型流感病毒攻击时 T 细胞反应也可独立起一定的作用。与抗体应答不同,流感病毒的 NP 蛋白序列高度保守,其抗原肽能够诱导产生同型和异型病毒株的细胞毒性 T 淋巴细胞交叉免疫反应。Chang H 等^[6,7] 研究,在小鼠免疫季节性流感疫苗后,加强免疫同亚型 NP 蛋白,将完全保护小鼠抵御异型流感病毒攻击,这提示再无有效疫苗时,用此免疫方式抵御 H7N9 流感病毒,能否得到同样的效果,如果可以这将对 H7N9 流感病毒的防治策略给予重要提示意义。

参考文献:

- [1] Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans [J]. *Nature*, 2013, 501(7468): 551 - 5.
- [2] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1888 - 97.
- [3] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about [M]. *Nature*, 2013, 496(7446): 399.
- [4] Tendera M, Wojakowski W, Rużyłło W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD341CXCR41 cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(11): 1313 - 21.
- [5] Paul G Thomas, Rachael K, Diane J Hulse-Post, et al. Cell-mediated protection in influenza infection [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1): 48 - 54.
- [6] Chang H, Huang C, Wu J, et al. A single dose of DNA vaccine based on conserved H5N1 subtype proteins provides protection against lethal H5N1 challenge in mice pre-exposed to H1N1 influenza virus [J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 197.
- [7] Antrobus RD, Berthoud TK, Mullarkey CE, et al. Co-administration of seasonal influenza vaccine and MVA-NP + M1 simultaneously achieves potent humoral and cell mediated responses [J]. *Mol Ther*, 2013, Jul 8.

[修回日期] 2013-11-08