

• 基础实验研究论著 •

流感病毒裂解疫苗儿童剂型在小鼠中的安全性及免疫原性研究*

戴宗祥, 王湘宜[#], 王 俊, 张新文, 宋绍辉, 蔡 玮, 李映波, 姜述德, 廖国阳, 高菁霞[△](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 比较本研究所制备的流感病毒裂解疫苗儿童剂型(昆明疫苗)与赛诺菲巴斯德流感裂解疫苗儿童剂型(巴斯德疫苗)在动物中的安全性和免疫效果。方法 用流感病毒裂解疫苗儿童剂型于 0 d 和 14 d, 腹腔内接种 ICR 小鼠。每天称取体质量, 免疫后 35 d, 眼眶采血分离血清, 用微量血凝抑制(HI)法测定小鼠血清中特异性抗体滴度, 计算抗体阳转率、保护率及几何平均滴度(GMT)增长倍数。结果 免疫后小鼠体质量逐渐增加, 组间无明显差异; 两组间 HI 抗体阳转率、保护率及 H1N1、H3N2 型和 B 型 HI 抗体倍数差异无显著意义。结论 两种疫苗均具有很好的安全性和免疫原性。

关键词: 流感病毒疫苗; 药物评价; 免疫原性; 剂型; 儿童

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)15-1793-02

Study of safety and immunogenicity of split influenza vaccine for children dosage form in mouse*

Dai Zongxiang, Wang Xiangyi[#], Wang Jun, Zhang Xinwen, Song Shaohui, Cai Wei, Li Yingbo,
Jiang Shude, Liao Guoyang, Gao Jingxia[△]

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Yun'nan
Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming, Yun'nan 650118, China)

Abstract: Objective To compare the safety and immunity of imported influenza vaccine and native influenza vaccine in mice.

Methods The ICR mice were inoculated with split influenza virus vaccines on 0 d and 14 d, and were weighed everyday. The serum were separated after first-dose of two vaccines on 35 d. HI method was performed to determine the specific serum antibody titers, as well as the increasing times of mean geometric titer in HI were analyzed. **Results** The statistical analysis indicated that growth of mice weight were not significantly different. Meanwhile, there was also no significant difference between two groups for seroconversion and protective level. **Conclusion** Immune effects of the two kinds of vaccines in serology might be almost as the same, and the safety and immunogenicity might be both satisfied.

Key words: influenza vaccines; drug evaluation; immunogenicity; dose forms; child

流行型感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 具有高度的传染性, 常造成不同程度的局部流行暴发, 扩散发病率极高, 历史上曾多次引起大规模的世界性大流行^[1-3]。近年来, 不断出现的新型流感病毒仍然在威胁着人类的生命安全。2009 年甲型 H1N1 流感病毒在全世界范围大暴发, 发病突然, 传染性强, 引起了较高的发病率及死亡率, 对人类健康造成了巨大威胁^[4]。由于治疗流感至今尚无特效药, 接种流感疫苗被认为是预防和控制流感大流行的最经济且行之有效的办法^[5]。世界卫生组织(WHO)专家建议各国开发生产人用流感疫苗, 目前市场上的流感疫苗主要是以鸡胚为生产基质制备的 H1N1、H3N2 和 B 型三价流感病毒裂解疫苗。

昆明医学生物学研究所用来源于 NIBCS 的 H1N1、H3N2、B 3 种型别不同的流感病毒株制备了流感病毒裂解疫苗, 本组用儿童剂型(以下简称昆明疫苗), 将其与赛诺菲巴斯德公司生产的流感疫苗儿童剂型(以下简称巴斯德疫苗)进行了小鼠安全性及免疫原性的实验研究。

1 材料与与方法

1.1 疫苗毒株 世界卫生组织(WHO)2010~2011 年度建议使用毒株: H1N1 A/California/7/2009 NYMC X-179A; H3N2 A/Victoria/210/2009 NYMC X-187; B B/Brisbane/60/2008

NYMC BX-35。

1.2 抗原标准品和抗血清 抗原: H1N1 Influenza Antigen A/California/7/2009 (H1N1)v(NYMC-179A) (Egg derived); H3N2 Influenza Antigen A/Victoria/210/09 (H3N2) (NYMC-CX-187); B Influenza Antigen B/Brisbane/60/2008 (NYMC BX-35)。抗血清: H1N1 Influenza Anti-A/California/7/2009 (H1N1) HA Serum; H3N2 Influenza Anti-A/Perth/16/2009 HA Serum; B Influenza Anti-B/Brisbane/60/2008 HA serum。

1.3 仪器与设备 微量移液器、U 型血凝板(Nunc 公司)、微量振荡器 HW-8C(绍兴市卫星医疗设备制造公司)、漩涡混合器-80A(上海琪特分析仪器有限公司)、超速离心机(BECKMEN 公司)。

1.4 疫苗与试剂

1.4.1 疫苗制备 将 H1N1、H3N2、B 3 种型别不同的流感病毒株分别接种于 SPF 鸡胚, 经培养后, 收获鸡胚尿囊液, 制备主代和工作种子批。将工作种子批病毒接种于封闭式饲养的 9~11 日龄健康海兰鸡胚进行大规模培养, 收集鸡胚尿囊液, 经过滤澄清、超滤浓缩、蔗糖密度梯度离心纯化、乙醚+TritonX100 裂解、甲醛灭活、二次纯化、除菌过滤等步骤^[6], 分别获得 3 个型别单价的裂解病毒液, 经检定合格后稀释配比、分

* 基金项目: 国家 863 资助课题(2006AA02Z409); 云南省自然科学基金资助项目(2004C0720M, 2006YX29)。 # 与第一作者贡献相同。

△ 通讯作者, E-mail: jingxiagao@imbcams.com.cn。

装制备成三价流感裂解疫苗,经中国食品药品研究院检定各项指标符合药典要求^[7]。

测试疫苗:昆明流感裂解疫苗儿童剂量型,批号:20110902,各型别血凝素含量:H1N1 型为 34.34 μg/mL;H3N2 型为 35.84 μg/mL;B 型为 35.34 μg/mL。巴斯德流感裂解疫苗,儿童剂量型,批号:20110606。所用试剂:0.01 mol/L PBS, pH7.2, PBS 液经医学生物学研究所质管处检验合格的化剂配制。

1.5 实验动物及免疫 健康 ICR 小鼠 90 只,体质量 16~18 g,由医学生物研究所实验动物室提供。将实验小鼠随机分为 3 组,分别为昆明组、巴斯德组和对对照组,每组 30 只,雌雄各半,昆明组注射本所流感裂解苗,巴斯德组注射巴斯德裂解苗,对照组注射 PBS,腹腔免疫 0.25 毫升/只。14 d 加强免疫、接种前后每天称取小鼠体质量,观察 35 d,到期比较每组小鼠的平均体质量变化,并绘制体质量增长曲线。

1.6 抗原性免疫试验 采血前 1 d 断食供水,于第 2 次免疫后 21 d 分别眼眶采血,3 000 r/min 离心 30 min,分离血清,HI 法检测各型特异性抗体效价。根据血清 HI 抗体滴度测定结果,对照组抗体滴度小于 1:5 以 1:5 计算,并作为疫苗组免疫前参照值,按以下 3 项标准统计疫苗的血清学效果:(1)统计疫苗组免疫后血清 HI 抗体滴度比对照组呈不少于 4 倍增长的阳转动物数(免疫成功),计算血清 HI 抗体阳转率;(2)统计疫苗免疫后血清 HI 抗体滴度达到保护水平阳性界值 1:40 或以上的动物数,计算疫苗的保护率;(3)统计疫苗免疫前后血清 HI 抗体几何平均滴度(GMT)的增长倍数。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 统计学软件 12.0 进行数据分析。

2 结 果

2.1 接种疫苗组小鼠安全性评价 在对疫苗组小鼠与对照组小鼠的观察中未发现显著异常反应,体质量逐日增加,表明各组流感裂解疫苗均无抑制体质量增长的不良反应,疫苗安全性好。见表 1(表中仅列出每隔 7 d 的数据)。

表 1 疫苗安全试验结果(g)*

检测时间(d)	昆明剂型	巴斯德剂型	对照组
0	16.18	16.40	16.07
7	22.00	22.00	22.76
14	25.26	24.44	26.22
21	27.11	26.79	27.97
28	28.89	28.18	29.80
35	29.91	29.91	31.34
体质量增值	13.73	13.51	15.27

*:通过方差分析, $P=0.407 > 0.05$, 各组间体重无统计学差异。

从小鼠的体质量增长长曲线(图 1)可以看出从 0~10 天,小鼠生长速度较快,体质量增加也较快,但到 10 天以后,过了小鼠生长期,小鼠体质量增加逐渐趋缓。在 35 天的观察期内,各组小鼠都全部健存,动作活泼,表现如常,每只小鼠体质量都有增加,且无异常反应。组间体质量增加差异无统计学意义($P=0.407 > 0.05$)。表明流感裂解疫苗对小鼠体重增长无不良反应,疫苗安全性好。

2.2 免疫原性结果 疫苗接种后共采集血清 90 份,检测 89 份(离心时巴斯德组有 1 份血清因离心管破裂而废弃);对照组 30 份,昆明组 30 份,巴斯德组 29 份。

2.2.1 疫苗保护率与抗体阳转率 昆明与巴斯德两种流感疫

苗免疫后 HI 的抗体阳转率对 H1N1、H3N2、B 型 HI 抗体阳转率分别为 100%、100%、87% 和 97%、97%、97%,经统计学处理,两种疫苗间差异无统计学意义($\chi^2:1.052 \sim 1.858, P:0.173 \sim 0.305$)。昆明与巴斯德两种流感裂解疫苗免疫后对小鼠的保护率 H1N1、H3N2、B 型 HI 抗体达到保护水平(抗体滴度不小于 1:40)的保护率分别为 97%、97%、64% 和 97%、97%、70%,经统计学处理,两种疫苗间差异无统计学意义($\chi^2:0.001 \sim 0.557, P:0.456 \sim 0.981$)。

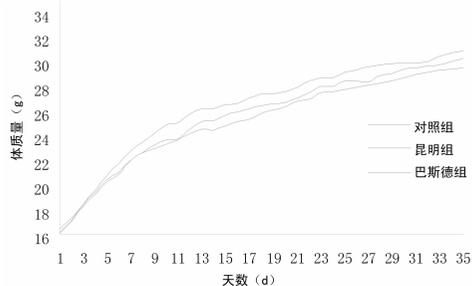


图 1 35 天小鼠体质量生长曲线图

2.2.2 昆明与巴斯德两种流感疫苗免疫后 H1N1、H3N2、B 型 HI 抗体与对照组相比,GMT 整体平均增长倍数分别为 30 倍、24 倍、8 倍和 32 倍、28 倍、8 倍,经统计学计算,两种疫苗间的 HI 抗体 GMT 增长倍数无统计学差异($P_{H1N1}=0.455, P_{H3N2}=0.390, P_B=0.950$),两疫苗组各型抗体的 GMT 增加值与对照比较均不小于 4 倍,见表 2。

表 2 流行性感冒病毒裂解疫苗免疫性研究

组别/抗体	H1N1	H3N2	B	Multiple	GMT	Growth
昆明剂型	149.29	121.26	40.63	30	24	8
巴斯德剂型	158.77	140.89	41.64	32	28	8
对照组	5	5	5	—	—	—

—:无数据。

3 讨 论

流感是由不同流感病毒引起的急性呼吸道传染病,发病率位列各传染病之首,特点是“突然暴发、迅速蔓延、发病率高、并发症重”。流感在儿童、老年人和慢性病患者中常引起较高的死亡率,并发症有肺炎、心肌炎、中耳炎、脑炎等,老年流感患者的死亡率可达 7%^[8-9]。在流感大流行期间,儿童受袭击的可能性最大,而在社区中流感病毒的早期传播集中于儿童,因此儿童可能成为疾病传播的媒介^[10]。流感有严格的季节性,中国是流感的多发区^[11],北方发病季节一般在每年的冬季,而南方有冬、夏两个季节。预防流感和应对流感措施有两项:一是接种流感疫苗;二是服用药物。而接种流感疫苗是控制流感大流行的最经济、最有效的方法,在常用的 3 种流感疫苗中,流感裂解疫苗可降低全病毒灭活疫苗的接种不良反应,并保持相对较高的免疫原性,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,所以流感灭活裂解疫苗是目前全世界最为广泛使用的流感疫苗^[12]。目前全球生产流感病毒裂解疫苗的国家有 10 多个,获准上市的大部分疫苗,在毒种使用、制造方法方面均基本相同,应用于临床后,已取得令人满意的效果^[13-15]。

依据欧盟制定的标准,流感疫苗接种后 HI 抗体滴度不小于 1:40 判为有保护性,以保护率、抗体 GMT 增长不小于 4 倍等标准综合评价流感疫苗的免疫效力。昆(下转第 1797 页)

消毒剂的使用是预防和控制医院感染的重要手段,可应用于医院不能进行高压灭菌的某些器械、导管、手术野、医务人员的手部、病房环境卫生、患者皮肤黏膜等方面的消毒。这样广泛过度使用消毒剂,促使细菌产生耐消毒剂现象。PA 是医院感染常见病原菌,由于耐药和多重耐药,对临床感染控制构成严重威胁,而 IMPRPa 具有更大的危险。在妇幼医院可用的药物更少情况下,应及时了解 IMPRPa 在医院的分布和耐药特点,以及进行耐消毒剂基因检测,为合理正确使用消毒剂提供依据。

本研究 23 株 IMPRPa 菌大多数是在同一季度出现,新生儿科病房 17 株 IMPRPa 菌均检出耐消毒剂 qacE Δ 1-sulI 基因。在临床实行定期轮换所选用的消毒剂后,IMPRPa 菌株得到了很好的控制。因此,携带耐消毒剂基因的多重耐药菌对临床使用的消毒剂是否产生了抗性应引起医院感染控制部门及医务人员的重视,亦有待进一步的研究。

参考文献

[1] 庄俊华,黄宪章,杨洁,等. 广州地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌的感染现状及耐药性检测[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(2):111-113.
 [2] 曾丽,邓文喻,曾文,等. 2010 年本院五种常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 热带医学杂志,2011,11(11):1272-1275.
 [3] Statake S, Yoneyama H, Nakae T. Role of Omp D2 and chromosomal β -lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa [J]. Antimicrob Chemother, 1991, 28(2):199-207.

[4] 黄支密,陈亚华,诸葛青云,等. 多重耐药 MRSA 耐消毒剂基因及抗生素耐药相关基因检测[J]. 中国抗生素杂志,2005,30(5):270-273.
 [5] 李翔,陈辉,伍勇,等. 铜绿假单胞菌外排泵及整合子与碳青霉烯类耐药中的关系[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(1):6-8.
 [6] Miyazaki NH, Abreu AO, Marin VA, et al. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007, 102(4):539-540.
 [7] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, et al. Distribution of the antiseptic-resistance gene qacE delta 1 in Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 165(2):295-299.
 [8] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, et al. Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacE delta 1 in gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 159(2):173-178.
 [9] 朱健铭,姜如金,吴康乐,等. 多药耐药革兰阴性杆菌 qacE Δ 1-sulI 基因检测及临床意义[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(9):1209-1211.
 [10] 王春新. 临床分离铜绿假单胞菌耐消毒剂基因 qacE Δ 1 检测[J]. 世界感染杂志,2005,5(2):140-141.
 [11] 颜英俊,糜祖煌,刘华,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药特征及耐消毒剂基因的检测分析[J]. 中国抗生素杂志,2007,32(4):249-251.
 [12] 何晓锋,刘芳,曹晋,等. 多重耐药革兰阴性杆菌耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sulI 监测[J]. 中国感染控制杂志,2011,10(2):97-99.

(收稿日期:2011-12-08)

(上接第 1794 页)

明医学生物研究所制备的流感病毒裂解疫苗(儿童剂型)通过动物实验、血清学检测结果表明,免疫后 H1N1 型、H3N2 型和 B 型 HI 抗体阳性率(抗体滴度不小于 1:40)分别为 97%、97%和 64%,HI 抗体 4 倍增长率各型分别为 30 倍、24 倍、8 倍,并且通过与巴斯德流感病毒裂解疫苗(儿童剂型)动物比较实验表明,昆明流感裂解疫苗和巴斯德流感裂解疫苗在小鼠的安全性和免疫性均达到标准要求,具有良好的安全性和免疫抗原性,为下一步开展人体临床试验研究提供了依据。

参考文献

[1] 赵铠,章以浩,李河民,等. 医学生物制品学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2007:805-816.
 [2] Mendelman PM, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live cold2adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults [J]. Vaccine, 2001, 19(17-19):2221-2226.
 [3] 徐翠玲,杨磊,温乐英,等. 1918 年流感大流行的流行病学概述[J]. 病毒学报,2009,23(增刊):23-26.
 [4] World Health Organization. Ten things you need to know about pandemic influenza[EB/DL]. [2005-10-14]. www. who. Int/csr/disease/influenza/ pandemic10th ings/en/.
 [5] World Health Organization. Influenza pandemic preparedness plan- the role of WHO and guidelines for national and regional planning[M]. Geneva:World Health Organization, 1999.

[6] 宋绍辉,李卫东,廖国阳,等. TritonX-100 裂解流感病毒的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2009,31(5):515-520.
 [7] 国家药典委员会编. 流感病毒裂解疫苗//中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:162-164.
 [8] 郭芳,陶瑞,沈云松,等. 流感病毒分离鉴定方法研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):409-411.
 [9] 沈艳华,王忠. 甲型流感重症成年人死亡患者 RBC 结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):998-999.
 [10] VuT, FarishS, Jenkins M, et al. A meta analysis of effectiveness of influenza vaccine in persons aged 10 years and over living in the community[J]. Vaccine, 2002, 20(17):1831-1836.
 [11] 曾祥兴,李康生. 流感百年:20 世纪流感大流行的回顾与启示[J]. 医学与社会,2010,23(11):4-6.
 [12] 叶红. 流感疫苗使用现状与研究进展[J]. 江苏卫生保健,2009,11(5):14-15.
 [13] 陈昌标,郑春早,顾建祥,等. 国产流行性感冒病毒裂解疫苗临床安全性和免疫原性观察[J]. 实用预防医学,2009,16(2):397-399.
 [14] WHO. Safety of pandemic vaccines[EB/OL]. [2011-04-10]. http://www. who. int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20091119/en/index. htm.
 [15] 赵艳伟,冯子健. 国产与进口流行性感冒病毒裂解疫苗安全性和免疫原性的 Meta 分析[J]. 中国疫苗和免疫,2009,15(1):19-26.

(收稿日期:2011-12-12)