

• 临床检验研究论著 •

## 低抗原含量百日咳疫苗效力评价研究\*

徐颖华, 骆鹏, 王丽婵, 卫辰, 侯启明<sup>△</sup>, 张庶民

(中国食品药品检定研究院百白破疫苗和毒素室, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

**摘要:**目的 应用改良小鼠脑腔攻击试验(MICA)检测评价低抗原含量百日咳疫苗效力。方法 通过中检院和国外实验室平行应用改良小鼠脑腔攻击试验进行不同稀释度相同批次低抗原含量百日咳疫苗的效力, 并应用统计软件分析。结果 中检院与国外实验室所获得低抗原含量百日咳疫苗的 MICA 试验效力结果数据均较低( $<1.1$  IU/mL), 中检院计算出的效价均在海外实验室分析得出效价的 95% 可信区间内。结论 MICA 方法可应用于低抗原含量百日咳疫苗效力检测分析, 该研究为进一步确定中国低抗原含量百日咳疫苗的 MICA 试验检定标准奠定了基础。

**关键词:**百日咳菌苗; 效力; 改良小鼠脑腔攻击试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)21-2561-02

## Assessment of potency of low-antigen-content of pertussis vaccine\*

Xu Yinghua, Luo Peng, Wang Lichan, Wei Chen, Hou Qiming<sup>△</sup>, Zhang Shumin

(Division of DTP Vaccine and Toxins, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the potency of low-antigen-content of pertussis vaccine by modified intracerebral challenge potency. Methods The same lots of pertussis vaccines at different dilutions were detected in parallel using the MICA in NIFDC, China and foreign laboratory. All the data were analyzed using statistical software. Results The results from NIFDC and foreign laboratory showed that the MICA potency units of low-antigen-content pertussis vaccine detected was low( $<1.1$  IU/mL), and the potency units from NIFDC were in the 95% confidence interval of the results from foreign laboratory analysis. Conclusion MICA can be applied to assess the potency of low-antigen-content pertussis. These results will provide the basis of definition of MICA potency specification of low-antigen-content pertussis vaccine in China.

**Key words:** pertussis vaccine; potency; modified intracerebral challenge potency

效力试验是疫苗质量控制最重要的手段之一。无细胞百日咳疫苗效力试验检测方法主要有三种, 分别是改良脑腔攻毒法(MICA)、免疫原性检测法和鼻腔攻毒法<sup>[1-2]</sup>。MICA 最早应用于全细胞百日咳疫苗的效力检测。为能直接体现疫苗保护力的改良脑腔攻击法, 该方法是百日咳早期研究时建立的动物模型, 并用于百日咳疫苗保护能力的评价, 是最经典、历史最长、使用范围最广的方法。该法在日本、中国、印度等国家长期用于百日咳疫苗的质量控制, 经过了多年的充分验证, 流行病学数据证实经该法检测合格的疫苗可有效阻止百日咳传播, 该方法也被纳入新版 WHO 生物制品指导原则中<sup>[3]</sup>。免疫原性检测法采用定量 ELISA 方法检测各抗原在动物体内产生抗体的水平。该法主要用于检测无细胞百日咳疫苗, 目前用于欧美产品。鼻腔攻毒法是最新建立的方法, 更接近于百日咳的真实感染情况, 目前只用于部分欧洲产品的检测, 该法建立时间较短, 应用范围不及前两法。

目前现行中国免疫规划接种程序建议婴幼儿在 3、4、5 和 18 月龄各接种 1 剂百白破疫苗, 4~6 岁时仅进行百白破疫苗加强免疫。近些年, 国外生物制品生产企业在国内注册一些低百日咳抗原含量的无细胞百白破疫苗, 旨在用于中国儿童的百日咳疫苗加强免疫。按照企业提供的检定资料, 疫苗的免疫原性评价均符合规定要求, 然而在中国注册, 根据国家相关法规要求, 应采用中国药典法定的 MICA 方法对这类疫苗进行效

力评价<sup>[4]</sup>。为了确定低百日咳抗原含量的无细胞百白破疫苗中百日咳疫苗效力单位(MICA 方法测定), 笔者与国外生产企业实验室平行应用 MICA 方法来评价这类百日咳疫苗的效力(价)保护水平。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 由国外疫苗生产厂家提供的 2 批无细胞百白破联合疫苗样品, 批号分别为 A 和 D, 该疫苗中百日咳疫苗含有抗原组分包括 2.5  $\mu$ g PT, 5  $\mu$ g FHA, 5  $\mu$ g Fim2、Fim3 和 3  $\mu$ g Prn; 百日咳效力试验参考品(第 5 代, 含有 14 IU)和百日咳攻击菌 18323 来自中国食品药品检定研究院(中检院)。10~12 g 的 SPF 级 NIH 小鼠来自中检院实验动物中心。国外实验室使用的动物为 13~15 g 的雌性 OF1 小鼠, 效力试验参考品为溯源于国际效力参考品 66/303 的企业内部参考品。

**1.2 方法** 本实验设定中检院和国外实验室平行进行不同稀释度相同批次的无细胞百白破联合疫苗样品的 MICA 方法效力试验。在常规百日咳疫苗效力试验过程中, 通常将疫苗稀释成 3 个稀释度, 第一个稀释度通常将疫苗 8 倍稀释, 然后再连续 5 倍稀释; 在本研究中考考虑疫苗中含有百日咳抗原含量较少, 在进行脑腔攻击效力试验中, 降低疫苗的稀释倍数和增设样品稀释度, 将每批疫苗样品进行 2 个重复试验, 由不同实验室和不同实验人员操作, 设定不同稀释倍数的样品组, 从多方面验证 MICA 方法评价和检验低百日咳抗原含量的无细胞百

\* 基金项目:国家高技术研究发展(“863”计划)资助项目(2012AA02A402)。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail:houqiming@sina.com。

白破疫苗效力。具体疫苗样品和参考品稀释计划见表 1。百日咳疫苗脑腔效力试验方法按照 2010 版《中国药典》(三部)进行,每稀释度免疫 20 只小鼠,每只小鼠各腹腔注射 0.5 mL。运用 80 000 个百日咳攻击菌对免疫小鼠进行脑腔攻击试验,观察 14 d,按质反应平行线法计算试验样品的效力单位数。同时设立对照组进行攻击菌的 LD<sub>50</sub> 的测定,每组设定 5 个稀释

度,每稀释度攻击 10 只小鼠,攻击菌数分别为 8、80、800、8 000 和 80 000。

**1.3 统计学处理** 应用日本 Statistic 软件中 Probit 模块分析疫苗效力实验结果和 Reed-Muench 方法分析计算对照组小鼠的百日咳攻击菌 LD<sub>50</sub>。

表 1 试验样品稀释方案

实验室	组别	样品批号	动物数 (n)	稀释度				
				1	2	3	4	5
中检院	参考品组	国家效力参考品	80	14×	70×	350×	1 750×	—
	第 1 组	A	80	未稀释(原倍)	5×	25×	125×	—
	第 2 组	A	80	未稀释(原倍)	5×	25×	125×	—
	第 3 组	D	80	未稀释(原倍)	5×	25×	125×	—
	第 4 组	D	80	未稀释(原倍)	5×	25×	125×	—
国外实验室	参考品组	室内效力参考品	100	未稀释(原倍)	4×	20×	100×	500×
	第 6 组	A	100	未稀释(原倍)	4×	20×	100×	500×
	第 7 组	D	100	未稀释(原倍)	4×	20×	100×	500×

—:无数据。

2 结 果

参考品和不同组别试验样品剂量反应曲线在平行性及线性上无明显偏差(图 1),根据参考品含有的效力单位,计算各组试验样品的效力单位数及其 95%可信区间(表 2)。每批疫苗样品在不同实验组的重复结果比较一致,重复性良好;同时增设的不同稀释度第 5 组的 MICA 试验结果与前四组结果相似,这些结果表明 MICA 方法检测结果的稳定性,样品稀释度对 MICA 方法影响较少。经运用 Reed-Muench 方法计算攻击菌的 LD<sub>50</sub> 结果为 576.4,符合 2010 版《中国药典》规定范围,表明试验中所用攻击菌的有效性,同时也证实本研究获得结果的可靠性。

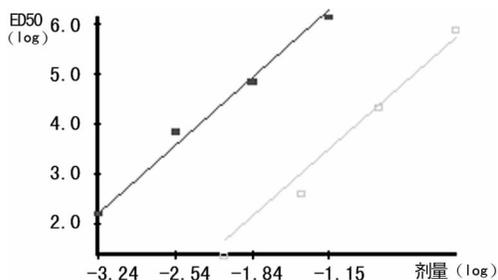


图 1 MICA 试验中参考品(深色)和试验样品(浅色)剂量反应曲线

表 2 各组试验样品 MICA 测定结果及 95%可信区间

实验组	样品批号	效价	95%可信区间(IU/mL)
第 1 组	A	0.520	0.242~1.092
第 2 组	A	0.603	0.212~1.526
第 3 组	D	0.592	0.211~1.487
第 4 组	D	0.674	0.285~1.532
第 5 组	D	0.546	0.252~1.137
第 6 组	A	1.085	0.313~3.187
第 7 组	D	1.085	0.464~2.426

国外实验室 MICA 结果显示测定 2 批次疫苗的效力单位比较一致(表 2),2 个实验室检测结果比较分析,显示中检院与国外实验室所获得的 MICA 试验结果数据均较低,中检院计算出的效价均在国外实验室分析得出效价的 95%可信区间内。

3 讨 论

通过对国内外两家实验室结果的分析比较表明,该制品 MICA 试验结果均较低,这反映疫苗中所含百日咳抗原含量与 MICA 检测实验结果呈现一定剂量相关性。经对比中检院计算出的效价均在国外实验室获得结果分析得出效价的 95%可信区间内;而两个实验室 MICA 检测结果差异部分可能与在实验中所用小鼠品种、体质量以及不同批次百日咳疫苗效力试验参考品相关,尽管两个实验室所用参考品均各自溯源于 WHO 百日咳疫苗效力参考品 66/303。

中国将百日破疫苗列入儿童计划免疫后,百日咳的发病率大幅下降,已低于 1/100 000。然而,近些年成人百日咳病例报道逐渐增加。此外,国外研究表明百日咳疫苗接种或自然免疫产生的保护性抗体会随着年龄的增大而逐渐下降,导致大龄儿童、青少年及成人因缺乏相应的免疫保护力,较容易患百日咳疾病。因此,在大龄儿童、青少年及成人中进行百日咳疫苗的加强免疫,阻断婴幼儿百日咳的传染源,对于更好地控制和预防百日咳疾病的发生有着十分重要的意义<sup>[5-6]</sup>。

由于该疫苗作为百日破加强免疫疫苗<sup>[7]</sup>,对象是 4~64 岁人群,所含百日咳组分的百日咳毒素含量(2.5 μg)及总蛋白含量(15.5 μg)较低,中检院与国外实验室 MICA 方法测定的百日咳效力单位均低于 2010 版《中国药典》中规定不低于 8 IU/mL 的要求,因此 MICA 方法对于该疫苗检测所得效价与其实际的保护水平的关联性,可能还需要随后更多研究试验的进一步验证。总之,MICA 方法可应用于低抗原含量百日咳疫苗效力检测分析,本研究结果也为进一步确定低抗原含量百日咳疫苗 MICA 试验效力质量标准的研究奠定了基础。

DD 型较 ID 型、II 型均明显降低( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 IPF 组各基因型血清 ACE 浓度比较

基因型	n	ACE 浓度( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)
DD	48	131.427 ± 25.214
ID	30	147.597 ± 26.687*
II	24	166.179 ± 20.826*

\*:  $P < 0.05$ ,与 DD 基因型比较。

### 3 讨论

ACE 是一个 20 肽单链酸性糖蛋白,是肾素-血管紧张素-醛固酮系统中的一个重要酶,能催化血管紧张素 I 转换成血管紧张素 II。ACE 存在于多种细胞,以毛细血管内皮细胞最多见,而肺具有丰富的血管床,故成为合成和释放 ACE 的主要部位。已有研究证明,特发性肺纤维化是肺泡损伤和不正常损伤修复的结果<sup>[5]</sup>,肺损伤时血清 ACE 活性显著降低<sup>[6]</sup>。Marshall<sup>[7]</sup>研究也表明肺间质损伤和急性缺氧时,ACE 活性是明显降低的。国内李丹等<sup>[8]</sup>的研究结果表明,严重急性呼吸综合征患者的血清 ACE 活性与健康对照组比较明显降低,降低程度与疾病严重程度密切相关。本研究应用 ELISA 法测定血清 ACE 浓度,结果表明,与对照组比较 IPF 患者血清 ACE 浓度显著降低( $P < 0.01$ ),这与文献报道一致。由此说明,IPF 患者存在的肺泡和肺间质损伤引起机体缺氧,从而导致血清 ACE 活性降低。

已有研究表明人类 ACE 基因具有基因多态性,它由 4 024 bp 构成,位于第 17 号染色体长臂 2 区 3 带(17q23)。ACE 基因有两类等位基因,即 490 bp 组成的插入型(等位基因 I)和 190 bp 组成的缺失型(等位基因 D);以及 3 种基因型:II 型、DD 型、ID 型。莫清江和王宏伟<sup>[9]</sup>研究了 ACE 基因多态性及血清水平与脑梗死的关系,结果显示,血清 ACE 水平与 ACE 基因型相关,DD 型 ACE 水平最高,II 型最低,而 ID 型处于二者之间。而本研究表明:血清 ACE 水平与 ACE 基因型相关,DD 型 ACE 水平最低,II 型最高,而 ID 型处于二者之间。这与上述研究结果并不完全一致。分析原因可能与研究人群不同有关,本研究以 IPF 患者作为研究对象,而 IPF 患者存在的肺泡和间质损伤直接影响了血清 ACE 浓度。由此推断,IPF 患者血清水平与 ACE 基因型相关,随着 D 等位基因数目增多,相应基因型血清 ACE 浓度依次降低。

Nadrous 等<sup>[10]</sup>对 478 例 IPF 患者进行的一项回顾性分析结果表明,血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)的应用并未改善 IPF 患者的预后,而本研究结果表明 IPF 患者血清 ACE 浓度是降低的,这在一定程度上解释了 Nadrous 等的研究结论,即

ACEI 对于 IPF 患者治疗无效的原因。由此可以认为 ACEI 并不能成为 IPF 的一种新的有效治疗手段。

总之,本研究结果表明 IPF 患者的血清 ACE 浓度与其基因多态性相关,这对于进一步探明 IPF 的发病机制,了解其肺组织完整性和损害程度具有指导意义,并可通过血清 ACE 浓度测定,指导临床医师判断患者病情变化,提示疾病转归和预后。

### 参考文献

- [1] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [2] 美国胸科学会, 欧洲呼吸学会, 日本呼吸学会, 等. 特发性肺纤维化诊治循证指南(摘译本)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(7): 486-494.
- [3] Chan KC, Tang NL, Hui DS, et al. Absence of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and development of adult respiratory distress syndrome in patients with severe acute respiratory syndrome: a case control study[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5(1): 26.
- [4] Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, et al. Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project[J]. J Hypertens, 1999, 17(11): 1569-1575.
- [5] Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy[J]. Ann Intern Med, 2001, 134(2): 136-151.
- [6] Cziraki A, Horváth IG, Papp L. Endothelial function studies in pulmonary vascular disease: determination of angiotensin converting enzyme activity in humans(review)[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(3): 317-325.
- [7] Marshall RP. The pulmonary renin-angiotensin system[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(9): 715-722.
- [8] 李丹, 敬华, 杨晋德, 等. SARS 患者血清血管紧张素转化酶活性测定的临床意义[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(4): 301.
- [9] 莫清江, 王宏伟. 血管紧张素转换酶基因多态性及血清水平与脑梗死的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 113-115.
- [10] Nadrous HF, Ryu JH, Douglas WW, et al. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on survival in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2004, 126(2): 438-446.

(收稿日期: 2012-10-08)

(上接第 2562 页)

### 参考文献

- [1] Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines[J]. Biologicals, 1999, 27(2): 61.
- [2] Corbel MJ, Xing DK. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2004, 3(1): 89-101.
- [3] Gaines-Das R, Horiuchi Y, Zhang SM, et al. Modified intra-cerebral challenge assay for acellular pertussis vaccines: comparisons among whole cell and acellular vaccines [J]. Vaccine, 2009, 27(49): 6824-6832.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 62-66.

- [5] 王晓娟, 廖雪雁, 李河民. 百日咳疫苗加强免疫的探讨[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(5): 477-479.
- [6] 中华预防医学会疫苗可预防疾病儿童百日咳临床调查协作组. 持续性咳嗽儿童百日咳临床多中心调查研究[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(10): 748-752.
- [7] Scott LJ. Tdap5 vaccine (Covaxis): a review of its use as a single-booster immunization for the prevention of tetanus, diphtheria, and pertussis in children (aged 4 years), adolescents, and adults [J]. Bio Drugs, 2010, 24(6): 387-406.

(收稿日期: 2012-01-09)