

流行性出血热灭活疫苗人体试验的反应观察

朱智勇 唐汉英 李岩金 翁景清 付桂明

(浙江省卫生防疫站自然疫源科, 杭州 310009)

俞永新 姚小剑 董关木 安琪

(中国药品生物制品检定所疫苗一室, 北京)

曾蓉芳 陈松年 王国梅 沈伟

(上海生物制品研究所病毒研究室, 上海)

提 要

由流行性出血热(EHF)病毒浙1₀株感染沙鼠肾细胞, 经0.05%β-丙内酯灭活研制成的EHF灭活疫苗, 于4℃放置7个月后, 对10名志愿者免疫三针(0天、7天、28天各注射1ml)。结果免疫者的局部和全身均无任何副反应。首针免疫后第28天, 血清用反向被动血凝抑制试验(RPHIA)、ELISA和间接免疫荧光试验(IFA)检测EHF抗体, 分别有9人、9人和8人阳转, 第42天, 血清用三种方法检测抗体均全部阳转。空斑减少中和试验(PRNT)于第28天有4人阳转, 第42天有9人阳转。上述结果表明, 此疫苗对人体有较好的安全性和免疫原性。

关键词: 流行性出血热灭活疫苗 人体试验

我们研制的EHF灭活疫苗, 于1988年3月参加全国EHF灭活疫苗的统一考核, 经中国药品生物制品检定所的检定合格后, 获得卫生部批准, 进行了小批量的人体试验。现将此疫苗接种10人后的反应和抗体产生情况报告如下:

材 料 与 方 法

一、疫苗: 以EHF病毒Z₁₀P₁₀为毒种, 感染沙鼠肾原代细胞, 按流行性乙型脑炎的生物制品规程要求研制成的EHF灭活疫苗, 批号为88-01, 制造方法见文献^[1,2]。为去除牛血清, 用PBS冲洗二次后加Eagle氏液继续培养6天收获, 并用β-丙内酯(含量为0.05%)代替甲醛溶液灭活病毒, 于1988年1月24日制成^[3]。3月31日送中国药品生物制品检定所检定结果如下: 抗原含量ELISA法测定为1:80; 血凝素(HA)效价为1:160, 反向被动血凝(RPHIA)效价1:128。免疫的三只家兔血清经空斑减少中和法测定的中和抗体分别为1:80, 1:160, ≥1:20。8月19日获卫生部批准可供人体试验^[4]。

本文于1989年1月25日收到。

本试验特请浙江医科大学附属第一医院赵年丰副主任医师和陈亚刚研究生参加观察, 特此致谢!

二、注射对象：杭州市居民，男8人，女2人，年龄17—25岁，无EHF病史，接种前血清经间接免疫荧光（IFA）法和RPHIA检查EHF病毒抗体均阴性，血常规和一般体检均正常。

三、接种方法：根据“临床观察用EHF试验性灭活疫苗的基本要求”规定，共免疫三针，分别在1988年8月30日，9月6日和9月27日。于上臂三角肌内各注射1ml。三次注射前和末次接种后14天（10月11日）共四次，每次静脉采血7—10ml，当天分离血清，-30℃冻存，用于抗体测定。

四、反应观察：第一次接种前及每次接种后十二、二十四、四十八、七十二小时由参加人体试验的单位派人共同组成观察组检查接种对象的体温、注射部位的反应情况，并询问有关其它不适等反应。为了解疫苗的安全性，在接种疫苗后的21天内接种对象每天自行测体温一次，并作登记，如发现发热（38℃以上）立即与观察组联系，检测是否属于EHF患者。

五、抗体检查：将免疫者的四次血清，无菌分装保存在-30℃冰箱中，试验时取出同时测定：（1）RPHIA抗体，方法见文献^[5]；（2）IFA抗体，按常规法进行测定；（3）ELISA抗体，采用间接法，试剂盒由上海医科大学流行病教研组研究生李永良大夫提供，由我室博士研究生徐晓测定，阳性血清用兔抗EHF的免疫球蛋白进行阻断试验，以排除其非特异性反应；（4）空斑减少中和试验由中国药品生物制品检定所测定中和抗体，中和病毒为EHFV 76—118株，空斑减少50%为终点^[6]。

结 果

一、接种时疫苗的抗原含量：在人体接种时试验疫苗已生产了七个月，必需进行抗原含量的测定。三次接种前的血凝素滴度为1:128~1:256，与生产初期的血凝素滴度基本相同，RPHIA滴度为1:32~1:64，略有降低。

二、疫苗中β-丙内酯含量的测定：在人体试验前，用气相色谱检查疫苗中β-丙内酯的含量，结果已检测不出β-丙内酯。而β-丙内酯含量为1:2000的对照样本，在35℃室温中放置2.5小时后，再测定其含量，结果显示已明显下降，这表明β-丙内酯的水解作用的速度很快（图1—3）。

三、接种者的局部和全身反应：10人均接种三针疫苗，在每次接种后连续观察三天，除在注射部位能看到注射痕迹外，均未出现红肿及局部淋巴结肿大等炎症，也无发热、过敏及任何不适的感觉，10名注射者一致反应就象没有注射过疫苗一样。

四、抗体反应：10名志愿者免疫前后7天、14天、28天和42天的血清，于同一日期，相同实验条件下进行各种方法的抗体测定。结果在免疫前和首针免疫后7天的血清，经RPHIA、IFA、ELISA和PRNT三种方法测定EHF抗体均为阴性。而在首针免疫28天（注射二次后）和42天（三次注射后）EHF抗体阳转明显如表1所示。

从表1结果可知，首针免疫后28天血清经RPHIA、IFA和ELISA三种方法测定EHF抗体，分别有9名、8名和9名志愿者阳转。42天10人全部阳转，但PRNT法第28天仅4人阳转，至42天有9人阳转。由于中和抗体是衡量免疫效果的重要指标，滴度的高低较为重要，表2显示10名志愿者PRNT的滴度。

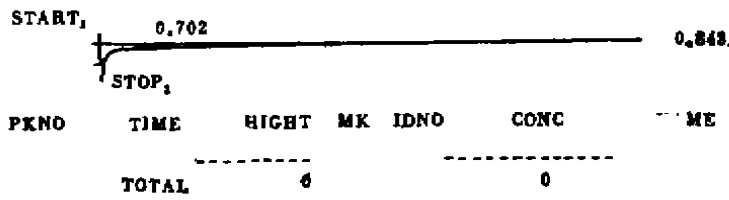
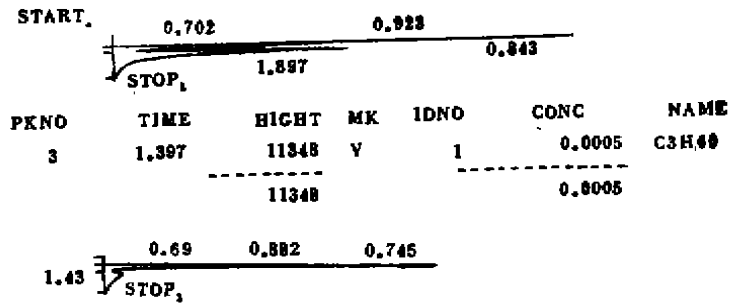


图1 1:2000β-丙内酯水溶液的气相色谱图
Fig 1 Gas chromatographic pattern of 1:2000 β-propiolactone detected immediately

图2 1:2000β-丙内酯水溶液置35°C 2.5小时后的气相色谱图
Fig 2 Gas chromatographic pattern of 1:2000 β-propiolactone detected 5 hr after incubation at 35°C.

图3 经1:2000β-丙内酯灭活后的EHF疫苗的气相色谱图
Fig 3 Gas chromatographic pattern of inactivated (with 1:2000 β-propiolactone) EHF vaccine

表1 EHF灭活疫苗免疫的10名志愿者血清抗体检测情况
Table 1 Detection of EHF antibodies in 10 volunteers immunised with inactivated EHF vaccine

志愿者 编号 Volunteer No.	首次免疫后天数 Days after first immunisation							
	28				42			
	R	F	E	P	R	F	E	P
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	-	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	+	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	-

R: RPHA ≥ 1:20 为 "+", F: IFA ≥ 1:20 为 "+", E: ELISA ≥ 1:100 为 "+",
P: PRNT ≥ 1:10 为 "+".

表 2 10名志愿者首针免疫28天和42天后中和抗体的滴度(倒数)
Table 2 Neutranization antibody titre of 10 volunteers on the 28 and 42 days after first immunization (reciprocals)

志愿者 编 号 Volunteer No.	首次免疫后天数 Days after first immunization	
	28	42
1	10	160
2	<10	160
3	<10	20
4	<10	40
5	10	80
6	<10	20
7	40	160
8	40	80
9	<10	20
10	<10	<10

9名志愿者几何平均滴度(GMT)为1:58.5

GMT 1:58.5 in 9 positive volunteers on the 42 day of postimmunization

讨 论

EHF灭活疫苗的人体试验,我国过去曾有过报道^[7],因未经卫生部批准,同时经有关单位重复未能取得良好的效果,故未被大家所接受。本人体试验是按1987年11月10日在北京召开的全国EHF灭活疫苗研制工作协调会规定的“临床观察用的EHF试验性灭活疫苗的基本要求”进行研制、检定并经卫生部药物审批办公室组织有关专家评审后获卫生部批准进行人体试验的。日本^[8]和南朝鲜^[9]虽也有研制疫苗的报道,但均属实验室研制阶段,尚未能进行有计划的人体试验。

我们研制的EHF灭活疫苗的特点表现在:(1)毒株Z₁₀在沙鼠肾原代细胞培养液中能产生高滴度的血凝素抗原;(2)乳沙鼠肾原代细胞在无牛血清的Eagle氏液中能维持6天以上;(3)采用 β -丙内酯灭活病毒,不破坏疫苗中的血凝素抗原,因而在1988年3月进行全国EHF疫苗统一考核中仅我们研制的疫苗中含有血凝素抗原,且可从此疫苗免疫家兔的血清中测定到较高滴度的中和抗体,可能与这些特点有关。

在国外 β -丙内酯已用于狂犬疫苗的灭活^[10],但在国内尚属首次使用,经研究 β -丙内酯对EHF病毒也有良好的灭活作用。由于本品极易水解,水解后产生丙酮酸,对人体无害,实属安全可靠。我们的结果表明 β -丙内酯作为灭活剂的可贵之处,除了不破坏血凝抗原外,对人体注射后的局部和全身毫无不良反应,这是目前其它疫苗所不及的。为今后其它灭活疫苗的研制提供了宝贵的经验。

从抗体反应结果来看,第28天(二针后)IFA、RPHIA和ELISA结果有8~9人阳转,而PRNT 4人阳转。但42天PRNT也有9人阳转,这表明抗体反应是好的。值得

进一步研究的是第一针注射后 7 天, 其抗体还未产生就注射第二针, 似乎仅是第一针的延续, 此时还不能出现回忆反应。因此, 第二针在第一针后一个月注射, 再过二周采血测抗体, 若能使大部分接种者的中和抗体阳转, 可减少接种次数, 便于推广。

目前我们研制的疫苗既无保护剂也无佐剂, 在 4 °C 已保存 7 月余, 经接种尚有较好的效果, 若改变工艺, 如加入血清白蛋白和 Al(OH)₃ 或经浓缩等可能还会提高疫苗的免疫效果, 对此有必要作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱智勇等, 1986, 病毒学杂志 1(2): 19
- [2] 朱智勇等, 1988, 病毒学报 4(2): 107
- [3] 浙江省卫生防疫站, EHF 沙鼠肾细胞灭活疫苗的研制(内部资料)
- [4] 中华人民共和国卫生部, 新生物制品人体观察审批件(88)制申体第05号。
- [5] 李岩金等, 1987, 浙江医学, 9(6): 9
- [6] 姚小剑等, 1988, 病毒学报 4(4): 347
- [7] 严玉辰等, 1985, 安徽医学院学报 20(2): 4
- [8] Yamanishi K. et al., 1988, Vaccine 6: 279
- [9] Lee H.W., et al., 1988, International symposium on viral diseases, p 54-9 Shanghai China
- [10] WHO, 1984, WHO Expert Committee on Rabies Seventh Report

Reactive Observation of Inactivated Epidemic Hemorrhagic Fever Vaccine in Human Test

Zhu Zhi-yong Tang Han-ying Li Yan-qin

Weng Jing-qing Fu Gui-ming

(Zhejiang Health and Anti-epidemic Station, Hangzhou 310009)

Yu Yong-xin Yao Xiao-jian Dong Guan-mu An Qi

(National Institute for the Control of pharmaceutical and Biological products, Beijing)

Zeng Rong-fang Chen Song-nian Wang Guo-mei Shen Wei

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai)

Ten volunteers had been immunized intramuscularly (1 ml) three times at the 0, 7 and 28 days with the inactivated (with 0.05% β -propiolactone) EHF *Meriones unguiculatus* kidney culture vaccine with Z₁₀ virus strain (kept at 4 °C for 7 months). The result showed that there had not been any side effects locally and generally in all of the volunteers. The EHF virus antibodies were detected in 9 and 8 volunteers with IFA and ELISA methods respectively and 9 volunteers were positive with RPHIA. And 4 volunteers turned positive on the 28th day (1 ml vaccinated twice) after the first immunization by PRNT. On

the 42th day (1 ml vaccinated three times), EHF virus antibodies were positive in all volunteers with the methods of RPHIA, IFA and ELISA, while 9 of them were positive with PRNT. The neutralization antibody GMT (geometrical mean titre) of the 9 volunteers is 1 : 58.5. The result showed that it is reliable for the human being of the inactivated EHF vaccine with its safety and immunogenicity.

Key words, Inactivated EHF vaccine Human test