

各种类型流行性出血热灭活疫苗的 免疫性比较研究

俞永新 董关木 姚小剑 刘文雪
安琪 李正平

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

提 要

本文对三种不同类型的出血热疫苗的免疫性进行了比较研究, 其中沙鼠肾细胞疫苗由 β -丙内酯灭活不加任何佐剂, 地鼠肾细胞和鼠脑提纯疫苗由福尔马林灭活加氢氧化铝佐剂。

三种疫苗经抗原量测定结果只有沙鼠肾细胞疫苗能测出较高的血凝素。家兔经三种疫苗免疫二针后只有沙鼠肾细胞疫苗能测出血抑抗体。中和抗体测定的结果亦以该疫苗的抗体反应最好, 全部阳转, 滴度也最高(1:20- \geq 320)。

对家兔和长爪沙鼠免疫后用野鼠型病毒攻击结果, 三种疫苗均有一定的保护作用, 但仍以沙鼠肾细胞疫苗的保护力最强。

关键词: 流行性出血热病毒 灭活疫苗 免疫性

流行性出血热在我国流行甚广^[1], 对人民的健康和安全危害甚大, 近年来还有逐步扩大的趋势, 目前尚无有效的预防办法, 因此研制疫苗进行人群的预防接种是当务之急。

目前我国已有三个单位或协作组进行不同类型的灭活疫苗试验研究, 取得显著进展, 并要求进行人体接种观察, 为了解这些疫苗的免疫原性, 我们对各单位选送的疫苗成品进行了抗原测定、动物试验和免疫原性比较, 现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

1. 疫苗: 由长春生物制品研究所提供疫苗二批, 批号 8701 为 A9 (野鼠型) L99 (家鼠型) 株制备的混合疫苗, 88-1 批为 A3 (野鼠型) 和 L99 株混合疫苗, 疫苗生产基质为地鼠肾细胞培养, 经福尔马林灭活, 并加氢氧化铝佐剂制成^[2]。

由兰州生物制品研究所提供疫苗二批, 批号为 870B-16、870B-17 均为 LR₁ 株(野鼠型)制备的小白鼠脑提纯疫苗, 经福尔马林灭活, 并加氢氧化铝佐剂制成。

由浙江省卫生防疫站提供疫苗二批, 批号为 88-1、88-2 均为 Z₁₀ 株(野鼠型)生产的, 生

本文于1989年2月12日收到。

产基质为长爪沙鼠肾细胞培养, 经 β -丙内酯灭活, 其中88-2批经超滤浓缩8倍, 不加任何佐剂。^[3]

2. 抗原量测定: 酶联免疫法 (ELISA)^[4]、反向被动血凝法 (RPHA)^[5]和血球凝集法 (HA)^[6], 按文献报道。

3. 动物免疫和抗体测定: 每批疫苗免疫2公斤左右家兔4只, 二次, 每次肌肉注射1毫升, 间隔7天, 第一次免疫后四周采血分离血清。

抗体测定分别按 ELISA 竞争法, 反向被动血凝抑制 (RPHI)^[6]、血凝抑制 (HI)^[6], 和空斑减少中和试验 (PRNT)^[7,8]等方法进行。

4. 疫苗保护力试验:

(1) 家兔保护力试验: 按上法免疫后35天用 Z₅ 株 (野鼠型) 腹腔感染攻击, 每只0.5毫升。8天后杀死动物, 取肺、脾组织作冷冻切片, 以直接荧光法检查出血热病毒抗原, 二种组织切片荧光均为阴性则判定疫苗有保护作用。

(2) 沙鼠保护力试验: 将疫苗作5倍连续稀释, 每稀释度疫苗免疫4只一月龄长爪沙鼠, 每只皮下注射0.5ml、二次, 间隔一周, 免疫后35天用 Z₅ 株腹腔攻击, 每只0.5毫升, 攻击后的检查和判定方法与家兔法相同。

结 果

1. 疫苗内抗原含量测定

三种方法测定的疫苗含量见表1, 结果可见, 除用沙鼠肾细胞生产丙内酯灭活的二批疫苗有较高的血凝素抗原外, 其余二种疫苗均未测出血凝素。但用 ELISA 和 RPHA 测定时则以鼠脑提纯疫苗的抗原含量最高, 达256以上, 其余二种疫苗则明显低些。

表1 不同类型出血热, 疫苗的抗原含量测定

Table 1. Determination of viral antigens in various types of EHF vaccines

Types of vaccines*	Batches	Titers of antigen content		
		ELISA	RPHA	HA
1	870B-16	320**	256	<10
	870B-17	1280	256	<10
2	8701	20-40	16	<10
	88-1	80-160	2	<10
3	01	80	128	160
	02	640	64	1280

*类型1 纯化鼠脑疫苗

*Type 1 Purified mouse brain vaccine

*类型2 地鼠肾细胞疫苗

Type 2 Hamster kidney cell culture vaccine

*类型3 沙鼠肾细胞疫苗

Type 3 M. Gerbil kidney cell culture vaccine

**最高疫苗稀释度的倒数

2. 疫苗的抗体应答

(1) 中和抗体结果: 三种疫苗免疫后的家兔血清以 76—118 株为病毒测定中和抗体时, 沙鼠肾细胞疫苗全部转阳, 抗体滴度亦较高, GMT 为 56—63, 地鼠肾细胞疫苗的抗体阳转率为 25~75%, 但抗体滴度低不超过 10, 鼠脑提纯苗则无抗体反应 (见表 2)。

表2 不同类型出血热疫苗免疫家兔后的中和抗体结果

Table 2. Results of neutralizing antibodies in rabbits after immunization with various types of EHF vaccines

Types of Vaccines	Batches	Rates of seroconversion		GMT
			%	
1	870B-16	0	(0/4) ⁺	—
	870B-17	0	(0/4)	—
2	8701	25	(1/4)	10
	88-1	75	(3/4)	10
3	01	100	(3/3)	63
	02	100	(4/4)	56

* 用 PRNT 法测定以 76—118 株为试验用病毒

* 76—118 virus strain used for testing by PRNT

+ 阳性数 (>10) / 试验数

+ No. positive (Z10) / No. tested

(2) 其他抗体反应结果: 当用 ELISA 和 RPHI 测定抗体时, 鼠脑提纯苗的抗体水平最高, 二批疫苗均为 100% 阳转, GMT 亦较高, 其它二种疫苗的抗体反应较低。但三种疫苗只有以沙鼠肾细胞为基质丙内脂灭活的疫苗有 HI 抗体反应见表 3。

表3 出血热疫苗免疫家兔后的 ELISA、RPHI 和 HI 抗体结果

Table 3. Results of ELISA RPHI and HI antibodies in rabbits vaccinated with EHF vaccines

Types of vaccines	Batches	Rates of seroconversion by					
		ELISA		RPHI*		HI	
		%	GMT	%	GMT	%	GMP
1	870B-16	100(4/4)	135	100(4/4)	47	0(0/3)	—
	870B-17	100(3/3)	20	100(3/3)	20	ND	—
2	8701	100(4/4)	79	100(4/4)	56	ND	—
	88-1	75(3/4)	10	75(3/4)	16	0(0/4)	—
3	01	100(3/3)	16	33(1/3)	20	100(3/3)	16.0
	02	75(3/4)	13	25(1/4)	10	ND	—

* 反向被动血凝抑制

* Reverse Passive Hemagglutination Inhibition

+ 阳性数/试验数

+ No. positive/No. tested

3. 疫苗的免疫保护作用: 以未稀释的疫苗免疫家兔二次后, 以 316 ID₅₀ 的 Z₂ 株 (野鼠型) 腹腔攻击, 结果以沙鼠肾细胞苗的保护性最好, 4 只动物均完全被保护,

地鼠肾细胞苗次之，而鼠脑提纯苗只有 1/4 动物被保护，见表 4。

表4 出血热疫苗对家兔的保护力效果

Table 4. Results of protective effect of vaccines in rabbits

Types of vaccines	Batches	No. of animal protected	Protection rates %
1	870B-17	1/4	25
2	8701	3/4	75
3	02	4/4	100
unvaccinated	—	0/4	0

以 Z-株 316 ID₅₀ 病毒量攻击
Challenge virus was 316 ID₅₀ of Z₅ strain

以不同稀释度疫苗免疫沙鼠二针后的攻击结果可见疫苗随着稀释度倍数增加而保护力逐渐减弱，稀释度至 125 倍时三种疫苗均无保护力，但仍以沙鼠肾细胞苗的保护力较强，而鼠脑提纯苗较弱，见表 5。

表5 出血热疫苗对长爪沙鼠的保护力效果

Table 5. Results of protective effect of vaccines in M. Gerbils

Types of vaccines	Batches	Protection rates in vaccine dilutions (%)				
		Undil.	1/5	1/25	1/125	unvaccinated
1	870B-17	ND	67	0	0	0
2	8701	100	50	33	0	
3	02	100	67	67	0	

以 Z₅ 株 355 ID₅₀ 病毒量攻击
Challenge virus was 355 ID₅₀ of Z₅ strain

讨 论

本文比较了出血热三种灭活疫苗的抗原量和免疫原性，这三种疫苗除生产用基质不同外（鼠脑、沙鼠肾细胞，地鼠肾细胞），主要差别还有生产用毒株，地鼠肾细胞苗为二种型混合、其它二种为野鼠型。灭活剂、除沙鼠肾用 β -丙内脂外、均用福尔马林（除沙鼠肾细胞苗外均加佐剂）。

试验表明鼠脑疫苗用 ELISA 和 RPHA 测的的抗原量相当高，免疫后生产的 ELISA 和 RPHA 抗体亦相当高，但中和抗体和血凝抑制抗体则测不出来。其原因可能由于鼠脑疫苗的生产工艺复杂、在提纯过程中产生 N 和 HI 抗体的病毒表面抗原成分^[9]被破坏，而病毒核蛋白分被保留下来。

二种细胞培养疫苗免疫动物后虽然 ELISA 和 RPHA 抗体不高，但有中和抗体产生，尤以沙鼠肾疫苗的中和抗体反应较强。

从动物保护力试验结果看,沙鼠肾细胞疫苗的保护效果最好,与中和抗体水平较高的结果相一致,鼠脑疫苗的ELISA和RPHI抗体滴度虽高但保护力差亦说明这些抗体无重要保护作用,因此提示对疫苗效价的判定,仍应以疫苗免疫后中和抗体水平或对动物的保护力为依据。鼠脑疫苗免疫后,虽不产生中和抗体,但仍有一定的弱保护力,提示除中和抗体外是否存在其他免疫因素。

沙鼠肾疫苗含有血凝素抗原并能产生血抑抗体,其原因是否为所用毒株不同或细胞基质和生产方法不同尚待进一步研究^[9],但据文献报道^[8]福尔马林灭活出血热病毒有破坏血凝素抗原的作用而 β -丙内脂则不然,因此血凝素抗原的破坏而测不出血抑抗体可能与鼠脑疫苗和地鼠肾疫苗经福尔马林灭活有关。但是血抑抗体的保护作用究竟如何尚待进一步研究。

沙鼠肾细胞疫苗有较好的免疫性,无论从中和抗体水平或抗出血热病毒感染的动物保护作用上均不次于日本的鼠脑提纯佐剂疫苗^[10]对人体的免疫预期较好的效果。

参 考 文 献

- [1] 陈化新, 1983, 全国流行性出血热防治工作座谈会资料汇编, 23-26
- [2] 黄永成等, 1988, 实验和临床病毒学杂志 2: 1
- [3] 朱智勇等, 1988, 病毒学报, 4: 107
- [4] 廖化新等, 1985, 中华传染病杂志, 3: 110
- [5] 董关木等, 1989, 病毒学杂志, 1: 100
- [6] Tsai T.F. et al, 1984, *J. Infect. Dis.*, 156: 895
- [7] 俞永新等, 1988, 病毒学报, 4: 162
- [8] 姚小剑等, 1988, 病毒学报, 4: 347
- [9] Dantas, J.R. et al., 1986 *Virology* 151: 397
- [10] Yamanish K. et al, 1988 *Vaccine* 6: 279

Comparative Studies on the Immunogenicity of Different Types of HFRS Inactivated Vaccine

Yu Yong-xin Yiao Xiao-jan Dong Guan-mu
Liu wen-xue An Qi Li Zheng-ping

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

The immunogenicity was studied for three types of experimental inactivated haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) vaccine, two tissue culture vaccines made from Mongolian Gerbil kidney and hamster kidney and one purified mouse brain vaccine. The M₁ Gerbil kidney cell vaccine was made with Z₁₀ virus strain (Apodemus type) and inactivated by β -propiolactone,

The mouse brain vaccine made with LR1 virus strain (Apodemus type) and the hamster kidney cell vaccine made with a combination of Apodemus type virus (A3 or A9) and Rattus type virus (L99) were inactivated by formalin and mixed with aluminium hydroxide adjuvants.

The virus antigens tested by ELISA or RPHA methods were detected in all the three types of vaccines, however except the M. Gerbil kidney cell vaccine, no HA antigen could be detected in the two others. The neutralizing antibody (Nab) was induced with rather high titer ($1:20-1: \geq 320$) in rabbits injected twice with M. Gerbil kidney cell vaccine, but with low titer ($1:10$) by the hamster kidney cell vaccine. Although high titers of ELISA ($1:320-1:1280$) and RPHA ($1:256$) antigens were detected in the mouse brain vaccine, no Nab could be detected in rabbits after two doses of immunization with it. The vaccine induced higher Nab also afforded stronger protective effect against HFRS virus infection in rabbits and M. Gerbils.

It seems there is no correlation between contents of ELISA or RPHA antigen in vaccines and the capacity of inducing Nab in animals vaccinated with the vaccine, but it does seem the HA antigen is related somewhat with the immunogenicity. However, the key factors that influence the immunogenicity of the HFRS vaccine remain to be further studied.

Key words: Haemorrhagic fever with renal syndrome viruses Inactivated vaccine Immunogenicity