

“新甲₁”型流感减毒活疫苗毒种的选育

章以浩 戚艺华 王桂秋 原明达

(卫生部生物制品研究所, 北京)

蒋兆英

(兰州生物制品研究所, 甘肃)

自1977年8月中旬至11月底,我们在实验室对“新甲₁”型病毒进行了传代、减毒、人体免疫效果的试验。以两个流行的病毒株为基础共选育出10个“新甲₁”型毒种,其中5个符合活疫苗毒种的要求。现将结果总结于下。

材 料 和 方 法

一、病毒株

1. “京生77-12”株系由卫生部生物制品研究所分离得到。

2. “辽丹77-5”株系由中国医学科学院流行病防治研究所供给。

上述两株病毒的血凝素及神经氨酸酶,经鉴定均属于H₁N₁型。

二、疫苗

(一) 经鸡胚尿囊腔传代减毒的疫苗

1. “京生77-12”E₈(28℃)疫苗: 34℃ E₁ 31℃ E₂ 28℃ E₄ 34℃ E₁^{*}, EID₅₀ 为 6.67;

2. “京生77-12”E₈(31℃)疫苗: 34℃ E₁

31℃ E₆ 34℃ E₁, EID₅₀ 为 6.67;

3. “京生77-12”E₁₂(31℃)疫苗: 34℃ E₁ 31℃ E₁₀ 34℃ E₁, EID₅₀ 为 7.0;

4. “辽丹77-5”E₈(28℃)疫苗: 34℃ E₅ 28℃ E₂ 34℃ E₁, EID₅₀ 为 6.0;

5. “辽丹77-5”E₈(34℃)疫苗: 34℃ E₈, EID₅₀ 为 7.0;

6. “辽丹77-5”E₁₂(34℃)疫苗: 34℃ E₁₂, EID₅₀ 为 6.0;

(二) 鞣酸疫苗

1. “京生77-12”E₃鞣₂E₁疫苗: EID₅₀ 为 8.77(E₃鞣₂E₁代表34℃鸡胚传3代,鞣酸处理2代,34℃鸡胚传1代,下同)。

2. “京生77-12”E₃鞣₃E₁疫苗: EID₅₀ 为 6.67;

3. “辽丹77-5”E₅鞣₂E₁疫苗: EID₅₀ 为 7.77;

4. “辽丹77-5”E₅鞣₃E₂疫苗: EID₅₀ 为 6.0。

* E代表病毒经鸡胚传递的代数,如“34℃ E₁ 31℃ E₂ 28℃ E₄ 34℃ E₁”表示病毒经34℃传第1代,31℃传2代,28℃传4代,34℃传1代共8代。

疫苗的制造方法见流感全胚活疫苗制造及检定规程。

(三) 疫苗接种及观察

1977年9、10月,在北京及石家庄两地接种20岁左右健康成年人827人,在北京接种7-13岁健康儿童155人,疫苗经1:5稀释,用喷雾法,成年人每侧鼻孔接种0.25毫升。儿童每侧鼻孔接种0.125毫升。

接种前及接种后第1—4日,每日测量体温,观察体温反应,询问自觉症状。按流感疫苗制造及检定规程的要求进行统计。

在接种前及接种后第3—4周,各采耳垂血一次,分离血清,用微量血凝抑制试验半加敏方法*,测定血凝抑制抗体,共测定成年人双份血清484对,儿童双份血清152对。用Henry报道的方法^[1],测定神经氨酸酶抑制抗体,共测定成年人双份血清28对,儿童双份血清38对。

结 果

一、“京生77-12株”及“辽丹77-5株”病毒经鸡胚尿囊腔连续传代减毒疫苗的反应性及免疫原性观察

上述两株“新甲₁”型病毒经鸡胚尿囊腔连续传代减毒共获得6系减毒疫苗,在健康成年人 and 儿童中免疫观察,结果见表1。

从表1可知,6系传代减毒活疫苗中,有4

系符合疫苗毒种要求。成人免疫后反应轻微,并能产生较好的血凝抑制抗体。京生77-12E₈(31℃)及辽丹77-5E₈(34℃)疫苗免疫后血凝抑制抗体阳转率较高,分别为60.8%和63.1%;京生77-12E₈(31℃)和京生77-12E₈(28℃)疫苗免疫后抗体阳转率居中,分别为51.0%和48.2%;辽丹77-5E₈(28℃)疫苗接近规程要求,抗体阳转率达44.0%;辽丹77-5E₁₂(34℃)疫苗较差,免疫后抗体阳转率为36.8%。

儿童接种疫苗后,全身反应较强,免疫后血凝抑制抗体增长情况较好,免疫后抗体阳转率最高可达86.3%。

挑选免疫前血凝抑制抗体<1:10者,测定了神经氨酸酶抑制抗体(简称酶抗体)。京生77-12E₈(28℃)疫苗免疫后成人抗体阳转率为1/14(7.1%),儿童为0/9;京生77-12E₈(31℃)疫苗免疫后抗体阳转率2/14(14.3%),儿童为0/5;辽丹77-5E₈(28℃)疫苗及辽丹77-5E₁₂(34℃)疫苗免疫后儿童抗体阳转率分别为3/9(33.3%)及2/15(13.3%)。

二、“京生77-12”株和“辽丹77-5”株病毒鞣酸减毒活疫苗的反应性及免疫原性观察

4系鞣酸减毒活疫苗在健康成人中免疫观

* 即在微量血凝抑制试验时抗原抗体经37℃结合2小时后,加1%鸡血球,读结果。

表1 传代减毒疫苗免疫后反应观察及抗体增长情况

疫苗名称	观察对象	观察日期	反应观察				血 抑 抗 体			神经氨酸酶抗体		
			人数	轻	中	重	免疫前<1:10人数	免疫后4倍或4倍以上增长数	增长率(%)	免疫前<1:10人数	免疫后2倍或2倍以上增长数	增长率(%)
京生77-12 E ₈ (28℃)	成 人 儿 童	77.10.12 77.10.31	168 40	1 10	1 3	0 2	56 23	27 19	48.2 82.6	14 9	1 0	7.1 0.0
京生77-12 E ₈ (31℃)	成 人 儿 童	77.10.12 77. 9.26	118 42	2 8	1 2	0 3	41 22	21 14	51.0 86.3	14 5	2 0	14.0 0.0
京生77-12 E ₁₂ (31℃)	成 人 儿 童	77.10.16 77.10.19	98 12	5 4	2 1	0 0	23 7	14 2	60.8 28.6	— —	— —	— —
辽丹77-5 E ₈ (28℃)	成 人 儿 童	77.10.12 77.10.31	89 29	3 3	1 0	0 0	25 12	11 17	44.0 58.3	— 9	— 3	— 33.3
辽丹77-5 E ₈ (34℃)	成 人	77.10.16	95	3	0	0	19	12	63.1	—	—	—
辽丹77-5 E ₁₂ (34℃)	成 人 儿 童	77.10.19 77.10.31	30 32	0 2	0 1	0 0	19 17	7 12	36.8 70.6	— 15	— 2	— 13.3

表2 羧酸疫苗免疫后反应观察及抗体增长情况

疫苗名称	观察日期	反应观察				血 抑 抗 体		
		人 数	轻	中	重	免疫前<1:10人数	免疫后4倍或4倍以上增长人数	增长率(%)
京生 77-12 E ₃ 羧 ₂ E ₁	77. 9. 21	40	1	1	1	17	10	58.8
京生 77-12 E ₃ 羧 ₃ E ₁	77. 9. 21	48	0	1	0	24	7	29.1
辽丹 77-5 E ₃ 羧 ₂ E ₁	77.10.12	29	0	0	0	12	4	33.3
辽丹 77-5 E ₃ 羧 ₃ E ₂	77.10.12	102	8	4	0	19	10	52.6

察,结果见表2。

从表2可知,经羧酸处理的4系减毒活疫苗中,辽丹77-5E₃羧₃E₂疫苗免疫后中反应未超过5%,无强反应,免疫后抗体阳转率为52.6%,符合活疫苗毒种要求。另外3系疫苗,抗体阳转率高者,反应较重;而反应较轻者,则抗体阳转率低。

讨 论

1.“新甲₁”型病毒出现以后,从8月中至11月底,我们共制备出10系减毒活疫苗。经人体接种观察,证明其中有5系符合活疫苗毒种要求,可供生产使用。我们选用“京生77-12”E₃(28℃)做为毒种,已生产“新甲₁”型减毒活疫苗,并正在进行流行病效果观察。

应该指出的是,在“新甲₁”型病毒选种期间,恰好选种单位已流行过“新甲₁”型病毒;而且从这次试验看,在同一时期用10系病毒仅仅选出5系是符合规程要求。此情况说明,我们所获得的结果是可以排除不显性自然感染的。

2.关于减毒方法问题:我们选用鸡胚尿囊腔连续传代法及羧酸处理法选育“新甲₁”型病毒毒种,结果表明,经鸡胚连续传代法减毒较为稳定。表1说明,在成年人中接种的两株病毒的6系疫苗中有3系反应轻微,免疫原性较好。另有一个疫苗接近规程要求。看来两株“新甲₁”型病毒经鸡胚连续传代的次数不多即可减毒。为了证明我们挑选的毒株不是自然界的弱毒株,我们检查了两个早代株及3个疫苗株的温度敏感性状,结果5株病毒均为非温度敏感株。

根据经验,甲₁及甲₂型病毒随着传递代数的增多,接种人体后的反应性及免疫原性呈有规

律的下降,在一定的传递代数范围内,既可使反应性降低到一定程度,又能保持较好的免疫原性。可见,鸡胚尿囊腔连续传代减毒法是获得生产用毒种的比较可靠方法之一。

“新甲₁”型病毒的减毒过程,与甲₁型病毒基本相似,经鸡胚尿囊腔传代减毒较为容易,一般传递8代左右即可达减毒目的^[2]。而与甲₂型病毒不同,甲₂型病毒经鸡胚传8代毒力仍很强,传至20代以上方能减毒。已知在低温下传递甲₁型病毒是使毒力减弱的因素之一。因此在选育“新甲₁”型毒种时,也采用了28℃和31℃两个温度的低温传代方法,但其结果与34℃传代无明显差别,而且低温下传递的代数也不多,所以难于肯定低温在减毒中的作用。

3.关于羧酸减毒问题:因试验用的几株病毒的传代数很相近,很难肯定羧酸起了多大的作用。但对较难减毒的病毒株还是值得一试的。

甲₁型流感病毒自1946年至1957年2月流行过以后,20年来再未分离到。1957年以后出生的青年人和儿童,同样未经历过甲₁型病毒的感染,为什么接种疫苗后的反应不一致,出现了儿童全身反应偏高的现象。尽管儿童的接种剂量较成人少一倍,但仍出现上述反应。就此问题,我们曾用甲₁型京生75-29R₂疫苗免疫儿童,疫苗做1:5稀释,接种0.25毫升,发生10%(8/74)的强反应;而疫苗做1:10稀释,接种0.25毫升,全身反应明显减少,强反应为2.3%(1/43),并未影响免疫后抗体阳转率。由此看来,剂量是一种原因,另外与不同年龄人群的免疫状态不同也可能有关。

为了解接种疫苗后血抑抗体和酶抗体的关

系,我们挑选免疫前血抑抗体 $<1:10$ 的双份血清 66 对,测定了酶抗体。免疫后酶抗体 2 倍以上增长的 8 份血清中,有 7 份酶抗体 4 倍以上增长;有 7 份血抑抗体 4 倍或 4 倍以上增长。从酶抑制试验的结果看,如表 1 所示,酶抗体增长率最高达 33.3%,而血凝抗体增长率最高达 86.3%,说明酶抗体增高不如血抑抗体。它与接种甲₃型京生 75-29 R₂ 疫苗后,血抑抗体和酶抗体平行增高的结果也不相符合,这可能由于接种甲₃型疫苗的人,已经历多次 N₂ 抗原的刺

激,而接种甲₁型疫苗的人,对 N₁ 抗原只是初次受到刺激的缘故。由于酶抗体在流感的免疫中尚有一定的作用,所以在选择疫苗毒种时,应挑选血抑抗体和酶抗体均有相似程度增长的毒株作为生产毒种为好。

参 考 文 献

- [1] Henry, M. A.: *Bull. WHO.*, 48(2): 199—202, 1973.
- [2] 张育琴、王桂秋、杨 敏等: *微生物学报*, 11(1): 145—147, 1965.