

# 流行性感免疫的研究

## IV. 人体接种前抗体水平与流感活疫苗的 免疫效果的关系

褚菊仁 張权一 朱旣明

(长春生物制品研究所病毒研究室, 长春)

判定流行性感(以后简称流感)活疫苗质量的主要依据,是在人体鼻腔接种以后,测定其反应性、生存性与免疫原性。由于大多数成年人都经过多次的流感感染,因此必须挑选免疫力低的人作为观察对象。为此,苏联学者认为免疫前志愿者的血凝抑制抗体应不超过1:10。我们在亚洲甲型(A<sub>2</sub>)流感活疫苗选种的研究中的经验证明,按这个标准选志愿者,同一毒种几次试验的结果仍然可能不规则,其主要原因除毒种本质、剂型、保存时间等因素外,志愿者的免疫状态可能是一个重要环节<sup>[1]</sup>。为了确实证明人体免疫前的抗体水平对疫苗生存性和免疫原性的影响,我们利用鸡胚绒毛尿囊膜小块中和试验法,重复测定了一部分历年来流感活疫苗人体免疫前后血清的中和抗体,并与以前测得的生存性与免疫原性结果联系起来进行了比较分析。本文报告这项研究的结果。

### 材料和方法

**1. 疫苗毒种** 包括两株, A<sub>2</sub>#1 及 #2, 其反应性、生存性、免疫原性及测定方法已于另文中报导<sup>[1]</sup>。

**2. 血清** 上述疫苗毒种试验的人员免疫前和免疫后约1个月的血清,于-20°C冰箱中保存1—3年。人体的免疫前血清以A<sub>2</sub>张57-4株测定血凝抑制抗体,多数低于或等于1:10,但亦有部分达1:15。免疫后血清效价高低不等。

**3. 中和试验** 按 Fazekas 氏法<sup>[2-4]</sup>并加以改良。现将本法详述如下:

(1) 组织培养 国产20孔透明塑料板,使用前以清洁液处理,洗涤干净后置37°C孵箱烤干,每孔加入0.5毫升下述培养液:

NaCl	8.0 克	葡萄糖	0.3 克
KCl	0.6 克	明胶	2.0 克
CaCl <sub>2</sub>	0.8 克	酚红 0.01%	25.0 毫升
MgCl <sub>2</sub>	0.05 克	加双蒸馏水至	1 千毫升

经9磅10分钟蒸汽灭菌,使用前加入青霉素及链霉素,使最后每毫升各含100单位及100微克,以NaHCO<sub>3</sub>校正至pH7.0—7.2。用该培养液滴定B型毒株时效价过低,故测定B型时改用199液。

取11—12天的鸡胚,拭净蛋壳,剪开尖端部分,倾去鸡胚内容物,剩余的绒毛尿囊膜连同蛋壳剪成6×6毫米的小方块。每一鸡胚可剪成约50小块,在上述溶液中洗两次。选取绒毛尿囊膜完整的小块,放入塑料板小孔内,每孔1块,加入上述培养液0.5毫升。接种已稀释的病毒或病毒与血清的混合液,每一稀释度用8个孔,每孔接种0.1毫升。

(2) 病毒 以A<sub>2</sub>型1相张57-4株测定活疫苗被接种者血清中和抗体。此外,曾用B型京科58-26株在膜块上进行滴定。

(3) 血清处理及中和 同一人员的两份血清同时进行测定。血清先经霍乱滤液处理<sup>[5]</sup>, 于 2 倍连续稀释后加入等容积的稀释病毒, 使最终每 0.1 毫升中含 100—1000 个组织培养感染量 (TCID<sub>50</sub>), 于 4℃ 中和 1 小时。

(4) 培育及判定 接种材料的塑料板置在大小适合的金属架上, 每架可容塑料板 12 块, 以 4 层湿纱布包围, 外面用塑料布包住, 再用线绳将四周扎紧以防漏气。于 35℃ 孵箱内水平震荡 (每分钟 50 次) 培养 72 小时。用镊子自高倍稀释开始取出尿膜小块, 每孔加入 1% 鸡红血球 0.25 毫升, 摇匀后置室温 45 分钟观察结果, 出现血凝者判作有病毒。滴定病毒以 50% 出现血凝的最高病毒稀释度作为 TCID<sub>50</sub>。滴定血清以 50% 不出现血凝的最高血清稀释度, 作为中和效价。均按 Reed 与 Muench 法计算结果。

4. 血凝抑制试验 血清均用霍乱滤液处理。常规法系于各血清稀释度中加入 4 个血凝单位抗原后立即加入鸡血球, 方法详见<sup>[5]</sup>。加温法系于加入抗原后置 37℃ 水温箱加温 1 小时, 再加入鸡血球。由于血清与病毒混合后结合时间延长, 测得的抗体滴度比常规法高 2—8 倍。

## 结 果

### 1. 影响中和试验结果的技术因素

(1) 病毒滴定 从 A<sub>2</sub> 毒株多次试验的结果来看, 培育 48 或 72 小时, 每架放 2 块或放满 12 块塑料培养板对病毒滴度并无影响。如鸡胚绒毛尿囊膜块在感染前卷缩者病毒繁殖不良。此外, 包扎是否严密对病毒滴度有显著影响, 如严密不漏气则可保持 pH 在 7.0—7.2, 张 57-4 毒株 TCID<sub>50</sub> 一般在 5.7—7.7 (log<sub>10</sub>)/0.1 毫升之间; 如包扎不严则溶液 pH 显著上升, 结果 TCID<sub>50</sub> 下降为 5.0—5.5。从对 A<sub>2</sub> 张 57-4 株 18 次滴定的结果来看, TCID<sub>50</sub> 变动范围为 5.7—7.7 (log<sub>10</sub>)/0.1 毫升, 平均值为 6.47, 标准差为 ±0.48, 而同批病毒的 50% 鸡胚感染量 (EID<sub>50</sub>) 为 7.73 (log<sub>10</sub>)/0.2 毫升。同样对 B 京科 58—26 株 6 次滴定的结果, TCID<sub>50</sub> 变动范围为 5.23—5.50 (log<sub>10</sub>)/0.1 毫升, 平均值为 5.38, 标准差为 ±0.11, 同批病毒的 EID<sub>50</sub> 为 6.20 (log<sub>10</sub>)/0.2 毫升。

(2) 病毒剂量与中和指数的关系 取 A<sub>2</sub> 张 57-4 的鸡免疫血清对本株病毒进行中和试验, 试验时采用不同病毒剂量, 血清效价的改变如图 1, 其结果表明病毒剂量每减少 10 倍 (1 个对数), 中和指数大致升高 1.5 倍。

(3) 同一血清屡次测定的结果 为了考验中和试验结果的准确性, 在历次 A<sub>2</sub> 型试验中任意抽取 7 份免疫前血清, 同一份血清分别进行两次中和试验, 中和滴度分别为: 1:132 与 1:90; 1:27 与 1:52; 1:91 与 1:63; 1:30 与 1:52; 1:54 与 1:43; 1:32 与 1:16; 1:32 与 1:25。两次结果的最大差别不超过 1 个稀释倍数。此外, 在正式试验中, 每次均设有病毒对照 (计算 TCID<sub>50</sub>) 及免疫血清对照 (计算中和滴度)。A<sub>2</sub> 型的 18 次试验的结果张 57-4 免疫血清的中和滴度的几何平均值为 164, 其对数为 2.216 ± 0.162。

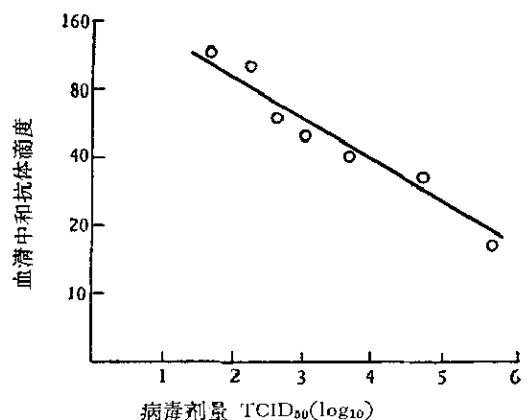


图 1 A<sub>2</sub> 型 (张 57-4 毒种) 流感用不同病毒剂量测得的中和抗体滴度

### 2. 流感活疫苗人体的中和抗体测定

表 1 结果表明, 如以免疫前血清抗体按血凝抑制常规法 ≤ 1:10; 血凝抑制加温法

$\leq 1:20$  及尿膜小块中和试验法  $\leq 1:40$  为指标。选出疫苗接种对象,则选出人数分别为 56/93(60.2%)、27/56(48.2%)、32/93(34.4%)。

表 1 人体免疫前血清按三种不同方法测得的抗体滴度分布

抗体测定方法	测定人数	抗体滴度分布(为抗体滴度的倒数)					
		$\leq 10$	11—20	21—40	41—80	81—160	161—320
血凝抑制常规法	93	56	37				
血凝抑制加温法	56	4	23	22	7		
尿膜小块中和法	93		8	24	32	23	6

表 2 A<sub>1</sub> 型疫苗的人体免疫前血清的效价与生存性及免疫原性的关系

观察项目		免疫前血清抗体分布(为抗体滴度的倒数)								
		血凝抑制(常规法)			血凝抑制(加温法)			中和试验		
		$\leq 10$	15	合计	$\leq 20$	$> 20$	合计	$\leq 40$	$> 40$	合计
试验人数		56	37	93	27	29	56	32	61	93
生存性	病毒分离阳性人数	24	4	28	13	9	22	18	10	28
	病毒分离阳性%	42.9	10.8	30.1	48.1	31.0	39.3	56.3	16.4	30.1
免疫原性	血凝抑制抗体升高人数	24	4	28	12	10	22	16	12	28
	血凝抑制抗体升高%	42.9	10.8	30.1	44.4	34.5	39.3	50.0	19.7	30.1
免疫原性	中和抗体升高人数	27	12	39	14	16	30	17	22	39
	中和抗体升高%	48.2	32.4	41.9	51.9	55.2	53.6	53.1	36.1	41.9

表 2 结果表明,如按此标准来选择低抗体的人员,则生存性试验中病毒分离阳性比例分别为 24/56(42.9%)、13/27(48.1%)及 18/32(56.3%);而相应的高抗体组(即血凝抑制常规法 1:15;加温法  $> 1:20$ ;中和法  $> 1:40$ 。)的病毒分离阳性率分别为 4/37(10.8%)、9/29(31.0%)及 10/61(16.4%)。两组相比,经  $\chi^2$  测验有显著的区别。免疫原性试验结果,抗体升高 4 倍以上人数如按血凝抑制抗体计算,与病毒分离结果基本上近似;但如以中和抗体计算,则抗体升高的人数有显著增加,尤以在高抗体组最为明显。如按常规法在血凝抑制抗体 1:15 的被接种者中,分离病毒阳性者 4 名,血凝抑制抗体升高者亦为 4 名,而中和抗体升高者则有 12 名,说明在这组中,有一部分人虽然没有分离出病毒,按血凝抑制法也测不出抗体升高,但用中和试验法则可以测出抗体升高。在其他两个高抗体组中也有类似情况。以上结果表明:1)在抗体测定方法方面,中和试验最为灵敏,血凝抑制加温法次之,而血凝抑制常规法最不灵敏。2)不论以那一种方法测定抗体,都可以将被接种者依其免疫前抗体水平分为低抗体组和高抗体组,疫苗的生存性与免疫原性在前组人员中比在后组中显著为高。3)在高抗体组人员中,有一部分分离病毒阴性,血凝抑制抗体也无明显升高,但如以较灵敏的中和试验法测定,仍然有抗体升高。

## 讨 论

鸡胚绒毛尿囊膜小块法滴定流感病毒系 1951 年由 Fulton<sup>[6]</sup> 创始,其后 Fazekas<sup>[2-4]</sup> 加

以改进,并研究了影响滴度的几个主要因素。

Fazekas 曾有意识地对 10 株流感毒种,在膜块与鸡胚中进行比较滴定,认为本法适用于各型流感毒种,但膜块法较鸡胚法滴度略低,平均低约 0.25 log。由于每一稀释度可用更多的膜块,其准确度则优于鸡胚法。同时可节省鸡胚和减少不同鸡胚对病毒的敏感性差异的因素。在我们的 18 次 A<sub>2</sub> 型试验中,病毒对照组 TCID<sub>50</sub> 变动范围为 5.7—7.7,几何平均值为 6.47,校正接种剂量的差别后较鸡胚中的 EID<sub>50</sub> 的几何平均值低 0.96。6 次 B 型试验,病毒对照组 TCID<sub>50</sub> 变动范围为 5.23—5.5,几何平均值为 5.38,校正后较 EID<sub>50</sub> 平均值低 0.52。A<sub>2</sub> 型病毒的 TCID<sub>50</sub> 变动范围较大,且不论 A<sub>2</sub> 型或 B 型膜块滴度均较 EID<sub>50</sub> 低 0.5—1 log 左右,比 Fazekas 所观察的差距要大些。至于中和试验的准确度,以上述 18 次 A<sub>2</sub> 型免疫血清的结果中看出,滴度最大,波动范围约为 4 倍,关键似乎在于每次试验中病毒滴度的波动。

前文<sup>[1]</sup>曾提到,流感活疫苗在人体鼻腔粘膜生存性和抗体反应与被接种者的免疫状态可能有一定关系。以往在进行活疫苗试验选择被接种者时,由于人羣中 A<sub>2</sub> 型的免疫已相当普遍,按常规法测定血凝抑制抗体  $\leq 1:10$  者为数不多,故将选择标准略为放宽至包括一部分滴度为 1:15 的人。从本文分析结果可见,在抗体  $\leq 1:10$  的人中,活疫苗的生存性与免疫原性比在 1:15 的被接种者中要高得多,从而在一定程度上证实了以上的推测。但实际上血凝抑制试验  $\leq 1:10$  与 1:15 的滴度之间只有 1/2 管到 1 管的差别,很难准确测定。为了求得进一步的证实,我们又采用了较为灵敏的血凝抑制加温法和尿膜块中和试验法,结果不但证明了绝大多数被接种者免疫前血清中确实都有抗体存在,而且依一定的标准将被接种者划分为低抗体与高抗体两组来比较时,活疫苗的生存性与免疫原性的差别同样显著。以上结果进一步证明了人体原来的免疫水平对测定活疫苗的生存性和免疫原性的结果有很大的影响,部分地说明了以往活疫苗试验结果不规律的原因。此外,还有一部分人虽然分离不到病毒,用血凝抑制试验也测不出抗体升高,但双份血清的中和试验却表明抗体有 4 倍以上的升高。估计产生这种情况的原因可能是由于病毒繁殖量小,或者病毒虽未繁殖而疫苗中的抗原却直接刺激了机体,从而产生了轻微的免疫反应。

根据上述试验结果,可以认为采用上述 3 种抗体测定方法虽然同样可以区分低抗体与高抗体的人,但由于血凝抑制常规法的灵敏度不够,不易划分,故最好能利用较灵敏的血凝抑制加温法或中和法来挑选被接种者。在我们的工作中,所有的 93 名被接种者免疫前的 A<sub>2</sub> 型中和抗体  $> 1:20$  者有 85 名占 91.4%,其余 8 名中和抗体在 1:11—1:20 之间;而同时测定在 1956 年时(A<sub>2</sub> 型大流行前)采取 5 个正常人的血清的 A<sub>2</sub> 型中和抗体却均为  $< 1:5$ 。由此可见,这 93 名都已经具有轻度的 A<sub>2</sub> 免疫。如果能选出中和抗体  $< 1:5$  的人来作为疫苗试验的对象,则疫苗的生存性和免疫原性表现可能更高,且更为规律。

利用中和试验挑选志愿者并测定流感活疫苗的免疫原性国内尚无资料,国外也仅有 McDonald 等<sup>[7]</sup>对 A<sub>2</sub> 型的活疫苗报导。这些作者们应用猴肾细胞血球吸附中和法来测定抗体对免疫前低抗体及高抗体两组,进行病毒生存性试验,其结果病毒分离阳性率分别占 55% 及 12%,免疫原性试验的抗体升高率分别为 64% 及 23%。以我们的结果来相比,如以免疫前中和抗体 1:40 为界线划分为低抗体及高抗体两组,A<sub>2</sub> 病毒的生存性分别为 56.3% 及 16.4%,免疫原性分别为 53.1% 及 36.1%,与 McDonald 的结果大致相仿。

## 摘 要

本文报告了应用鸡胚绒毛尿囊膜小块法测定 A<sub>2</sub> 型与 B 型病毒滴度和 A<sub>2</sub> 型的中和抗体的结果。对本法作了改进,并指出影响病毒和抗体滴度的一些因素。

采用血凝抑制常规法、血凝抑制加温法和尿膜小块中和法测定了以往流感活疫苗试验人体的免疫前血清中和抗体,并与疫苗接种后的病毒分离率(代表生存性)和抗体升高率(代表免疫原性)联系起来进行分析,证明被接种者原来的免疫水平对活疫苗的生存性和免疫原性测定结果有很大的影响。在这 3 种抗体测定方法中,中和法最灵敏,血凝抑制加温法次之,常规法最差。

## 参 考 文 献

- [1] 朱既明,郝成章,童葵塘,岩波,王鸿飞:中华医学杂志, 48:730, 1962.
- [2] Fazekas de st.—Groth S., White, D. O.: *J. Hyg.*, 56:151, 1958.
- [3] Fazekas de st.—Groth S., White, D. O.: *J. Hyg.*, 56:535, 1958.
- [4] Fazekas de st.—Groth S., Withell, T. and Lafferty, K. J.: *J. Hyg.*, 56:415, 1958.
- [5] 全国流行性感冒中心研究室编:流行性感冒手册, 79—95 页。人民卫生出版社,北京, 1958。
- [6] Fulton, F., Armitage, P.: *J. Hyg.*, 49:247, 1951.
- [7] McDonald, T. C., Zuckerman, A. J., Beare, A. S. and Tyrrell, A. J.: *Brit. Med. J.*, 5284:1036, 1962.

## STUDIES ON IMMUNITY IN INFLUENZA

### IV. INFLUENCE OF PRE-INOCULATION NEUTRALIZING ANTIBODY UPON THE IMMUNOGENICITY OF LIVE INFLUENZA VACCINE

CH'U CHU-JEN, CHANG CHUAN-YI AND CHU CHI-MING  
(Serum and Vaccine Institute, Changchun)

The present paper records the results of assay on the infectivity of A<sub>2</sub> and B viruses and the neutralizing antibody to A<sub>2</sub> virus by a modified surviving bits of allantois-on-shell technique. Factors influencing the titer of virus and antibody are denoted.

Serum neutralizing antibodies of volunteers before vaccination were tested by the routine and modified haemagglutination inhibition methods and also the surviving bits of allantois-on-shell method. When these results were analyzed in connection with the rate of virus isolation and rise of antibody titre post-vaccination, the following conclusion may be drawn: the degree of original immunity of the volunteers has much effect on the immunogenicity of live influenza vaccine, as judged by the rate of virus isolation and the rate of antibody rise, being higher among volunteers with low pre-vaccination immunity and lower among volunteers with somewhat higher pre-vaccination immunity.