

流行性感冒病毒重组的研究

III. 一株温度敏感活疫苗株的选育及其反应性、免疫原性和流行病学效果

田淑芳¹⁾ 邓 钢¹⁾ 张吕先¹⁾ 兰华庚²⁾

陈春荣¹⁾ 黄镜友³⁾ 周永秀⁴⁾ 卿树鸿⁵⁾

王树声³⁾ 任贵方¹⁾ 崔君兆³⁾ 朱既明¹⁾

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

用福 R3 ts 母株与紫外线照射灭活的京科 74-5 重组后, 选育出京福 R8-1ts 株, 经各项实验室检查, 反应性与免疫性观察以及流行病学效果观察, 证明是安全有效的, 其遗传性是稳定的, 经过人体再分离的病毒未出现返祖现象。采用重组选育的方法, 可大大缩短活疫苗毒种选育的时间。本文并对选择野毒的标准及与京福 R8-1ts 株的流行病学效果有关问题进行了讨论。

在前文中我们已报告了甲型流感病毒温度敏感 (ts) 疫苗的几个母株如夏原 ts 株、福系 ts 株的选育和鉴定结果^[1], 本文着重介绍京福 R8-1 温敏疫苗株的重组选育、性状、接种人体后的反应和血清抗体升高情况, 以及流行病学效果观察结果, 并对重组选育方法中的某些问题加以讨论。

材 料 和 方 法

(一) 毒株

1. ts 母株: 福 R3[H₂(_{ss}), N₂(_{ss})]^[1]

2. 野毒株: 采用 1974 年 11 月在北京分离的京科 75-5[H₃N₂]E₄。该毒株抗原性比较特殊, 它与 1974—1975 年流行的优势代表株吉防 74-13 的抗原比为 1:3—1:4。当时选用此株的考虑是该株在人群中还未充分流行开, 人群抗体水平比较低, 接种成功率可能较高。

(二) 重组方法: 见前文^[1]

(三) 京福 R8-1ts 株的鉴定: 见前文^[1]。

(四) 疫苗的制备及鉴定

采用京福 R8-1T.E₁ 为种子, 按 1973 年“流感全胚活疫苗制检规程”制备, 并经检定合格的全胚疫苗。

(五) 疫苗接种和反应性及免疫性的观察

采用微量加敏法挑选对京科 74-5 抗原兔前血抑抗体 ≤ 30 的健康成人作为志愿者。疫苗经鼻腔喷种后, 连续 4 天, 每天测量体温, 询问症状。

疫苗接种前及接种后 3 周分别采耳垂血用微量常规法测血凝抑制抗体, 统计抗体 ≥ 4 倍升高率。

(六) 流行病学观察设计及方法

观察疫苗接种流行病学效果的方法有两种。

本文于 1979 年 5 月 28 日收到。

本项工作承湖北省卫生防疫站、湖北省沙市卫生防疫站、河北省秦皇岛市卫生防疫站大力支持, 特致谢意。

1) 中国医学科学院病毒学研究所;

2) 武汉生物制品研究所;

3) 广西壮族自治区卫生防疫站;

4) 广西桂林地区卫生防疫站;

5) 广西灌阳县卫生防疫站。

第一种是经典的方法,即按尽可能同等的条件设立免疫组和对照组,经过一次流行后按双盲法统计发病率加以比较。这种方法准确性较高,但实施上有许多困难,且对有一定传播性能的活疫苗如小儿麻痹疫苗是不适用的。第二种方法是在一个地区内大面积接种疫苗,力求达到尽可能高的接种率,与邻近条件相似的地区比较发病率而做出评价。这种方法的准确性差些,但更接近于疫苗实际使用情况,在我国具体条件下也较易于为群众所接受。此外,多年来的经验表明,在一个集体单位中,流感活疫苗的保护力强弱与接种率高低有关,说明在流感免疫中群体免疫比个体免疫更为重要。因此在设计观察疫苗效果时我们采取了第二种方法。首先将广西灌阳县九个公社划分为条件大致相似的两半,以四个半公社为疫苗接种区,另四个半公社为对照区。统计了 1973—1975 年两个地区的流感发病率,接种区为 74.39%,对照区为 75.82%,大致接近,可以大致排除因地区或人群免疫水平的不同所致的自然差别。其中对红旗公社中接种疫苗的 9 个大队及未接种疫苗的 11 个大队进行了重点观察。

(七) 流行病学效果观察方法

1. 疫苗接种: 按常规方法进行,每人经鼻腔喷雾接种 0.25—0.5 毫升,疫苗按滴度不同而稀释使含 $\text{EID}_{50} 0.0—7.0 \log/0.2$ 毫升。接种对象为 7 岁到 60 岁的健康人。7 岁以下儿童、60 岁以上老人、孕妇及有较重心肺忆性病的人不予接种。

2. 建全流感疫情报告制度: 举办赤脚医生学习班,制订出统一的流感诊断标准: 即有发高热、全身酸痛与上呼吸道症状的患者,并结合一户多发,发热病例突然增多的流行病学情况诊

断为流感。流行须经病毒分离和血清学试验予以证明。另外印发了流感病人登记表和月报表。疫苗接种和未接种地区均对流感病人进行登记,每月上报一次,遇有暴发及时上报。

3. 重点社队调查: 组织了专业队伍,于流行刚刚结束时对红旗公社免疫接种的 9 个大队和未接种疫苗的 11 个大队流感发病情况进行了复核,方法是深入到病家,对每个流感患者填写调查表。流行期间,对部分患者做病毒分离或双份血清的血凝抑制试验,以求确诊。

结 果

(一) 京福 R8-1 株选育鉴定

用福 R3[H3N2] T_1E_{25} 母株与紫外线灭活的京科 74-5[H3N2] E_4 流行株重组选育出京福 R8-1[H3N2]。该株的抗原性及 ts 性状的检查结果表明,京福 R8-1 T_1 病毒在 33℃ 和 39℃ 的 EID_{50} 相差 7 个对数,切温为 $\leq 38^\circ\text{C}$,鸡胚 33℃ 连传 6 代后仍保持 ts 性状。京科 74-5 的鸡免疫血清中和京福 R8-1,中和指数 ≥ 6.83 个对数,说明该病毒系纯株。交互血抑试验证明,京福 R8-1 的 H 抗原与其亲代流行株京科 74-5 相似。用 P5[H 马 1N2 (京科 74-5)] 免疫血清对京福 R8-1 做神经氨酸酶抑制试验,证明其 N2 抗原属甲型 N2。京福 R8-1 T_1E_3 病毒在地鼠肺中 24、48、72 小时的繁殖滴度比野毒株京科 74-5 约低 1.5 log,这也反映出该毒株的减毒性状。

表 1 京福 R8-1 温敏株的性状及纯度检查

实验项目	温敏性状 (EID_{50})		切断温度 (EID_{50})			中和试验 (EID_{50})		
	33℃	39℃	33℃	38℃	39℃	中和组	对照组	中和指数
结果判定	8.67	1.67	7.0	3.0	≤ 2.5	≤ 0.67	7.5	≥ 6.83
	ts			$\leq 38^\circ\text{C}$		属纯株		

(二) 京福 R8-1 疫苗的反应性及免疫性观察

1975 年 6 月和 9 月,先后在沙市工厂和秦皇岛部队对京福 R8-1 ts 疫苗株进行

了反应性及免疫性观察,结果见表 2。

从表 2 看出,在接种的 175 名低抗体者中,仅出现 1 名疑似强反应(体温 $> 38.6^\circ\text{C}$)。免后血清血抑抗体 ≥ 4 倍升高者按

表2 京福 R8-1 疫苗接种低抗体者的反应性免疫性与病毒分离

体温反应				血抑抗体			病毒分离		
观察人数	轻	中	强	测定人数	≥4倍升高人数	升高率 %	分离人数	阳性人数	阳性率 %
175	5	3	1	111	52	46.8	19	8	42.1

常规法统计为 52/111(46.8%);若按加敏法统计,测定的 37 名志愿者中有 29 例 ≥ 4 倍升高,升高率为 78.3%。接种后病毒分离率为 8/19(42.1%),其中 7 株分离的病毒经鉴定均为 ts 株。在秦皇岛部队观察期间,除表中的 1 名 $>38.6^{\circ}\text{C}$ 的疑似强反应外,还出现另外一例强反应。在此同时,同一连队中还发生 2 名未接种疫苗的疑似流感的高热患者。及时对接种与未接种疫苗的高热患者各一例做了病毒分离,结果均为阳性,经鉴定均为 ts⁺ 毒株;两个分离毒株之间的相原比为 1:1.2,而与疫苗株的抗原比分别为 1:3.6 和 1:4.1。经追询病史发现,未接种疫苗的流感患者发病日期早于接种疫苗的强反应者,看来后者不是疫苗所引起的强反应,而是该连队中由野毒感染引起的散发病例。另一例未做病毒分离,难以完全排除疫苗反应的可能性,故列作疑似强反应。

从以上结果初步看出,经重组获得的京福 R8-1ts 株是减毒株,具有较满意的反应性和血清学效果。该毒株经鸡胚传 6 代或人体接种后再分离仍保持 ts 性状,无返祖现象,说明其遗传性较为稳定。

(三) 京福 R8-1 疫苗的流行病学效果观察

1975 年底至 1976 年初,用京福 R8-1 疫苗在灌阳县 4 个半公社范围内共接种 64,969 人,接种率达总人口的 62.4%,占应接种人口的 80.5%。1976 年 1—4 月当地发生流感小流行,流行期间对 21 例病人做了病毒分离,13 例为阳性。分离株经鉴定为甲型 [H3N2],抗原性属京防 75-39 一

类,与前一变种的代表株穗防 74-135 抗原比为 1:2—1:3。检查了 7 例患者双份血清,4 例血抑抗体有 ≥ 4 倍升高。疫情报告统计表明,接种疫苗地区的 104,035 人口中发病 64 例,发病率为 0.06%;未接种疫苗地区的 105,409 人口中发病 3,162 例,发病率为 3%,两地区发病率之比为 1:50,保获率为 98%,对红旗公社接种疫苗与未接种疫苗大队重点复核调查的结果见表 3。从表 3 可见,接种疫苗大队的发病率远低于未接种大队,二者之比为 1:64.5,保获率为 98.5%。

表3 接种大队与未接种大队流感发病率的比较

组别	人口数				发病率 %
	实有	接种人数	接种率 %	发病	
接种疫苗大队	17,308	10,550	62.6	19*	0.11
未接种疫苗大队	18,528	—	—	1,314	7.09

* 其中接种疫苗者 5 人,未接种疫苗者 14 人。

讨 论

我们采用了重组方法选育 ts 活疫苗株,现将我们几年来的经验和存在的问题归纳为以下几点进行讨论:

一、近年来国外用人工诱变获得的 ts 株与流行株活毒重组的方法选育 ts 疫苗株,经小量人体接种观察证明安全有效^[3-5],但国外的的工作至今仍停留在小量试验阶段,尚未见到流行病学效果的报道。我们应用类似的原理获得了多株 ts 疫苗株,在方法上与国外相比不同之点有: 1. 采用了自然突变的夏原 ts 株经重组而获得 ts

母株;2. 将灭活的野毒株与活的 ts 母株进行重组;3. 重组、选育和鉴定都在鸡胚系统中进行。实践表明,用预先选好的 ts 母株与自然流行的野毒株进行重组,实验室选育时间可缩短到 21 天,时间为目前国内应用的低温传代减毒法的 $1/3-1/4$ 。

二、根据我们选育 ts 疫苗株的经验认为,在选择野毒株时应注意选择抗原性特殊,即与当时流行的优势株有所不同的毒株用于重组,人群对这种毒株的抗体水平较低。本研究所采用的京科 74-5 就是根据上述条件选择的。观察的结果表明,该毒株虽为 1974 年 11 月分离,用它作为野毒而获得的京福 R8-1 疫苗株,对 1976 年春由京防 75-39 一类新变种引起的流行仍有明显的保护效果。这可能是由于这类毒株在人群中流传不广,人群对它的抗体阳性率较低,接种成功率高,虽然在抗原结构上与 1976 年的流行株京防 75-39 一类已有相当差别,但仍有较好的交叉保护。

三、京福 R8-1 疫苗的流行病学效果达到了 98.5% 的保护率,这样高的保护效果在以前流感活疫苗从未达到过。分析其原因,我们认为可能与以下因素有关:1. 与大面积高接种率形成的群体免疫有关。在大面积高接种率的情况下,对此群体中未接种者也形成一个免疫屏障而得到保护,2. 与观察地区是农村有关。农村与城市相比人群的活动范围比较有限。此次疫苗接种对象为 7-60 岁人群,也即是活动力较强的人群,7 岁以下儿童和 60 岁以上老人虽未接种疫苗,但他们远出活动的机会少,而他们周围的人又大都接种了疫苗而具有较

高的免疫力,因此这部分没有接种过疫苗者也就由于接触不到传染源而间接地受到了保护;3. 与流行规模大小和毒株变异程度有关。1976 年 1-4 月灌阳县的流感是一次规模较小的流行,毒种变异幅度也不十分大。综合以上资料看来,京福 R8-1 疫苗在大面积高接种率的农村条件下,对变异程度和流行规模不太大的流感流行有较满意的保护效果。

四、为了进一步考核京福 R8-1 疫苗的流行病学效果,我们于 1977 年初又在广西灌阳县用京福 R8-1 (穗防 74-135 一类)和京生 75-29R2 苗(京防 75-39 一类)两种疫苗分别接种 7-60 岁人群 40,381 及 72,662 人,经同年 6-8 月流行后统计,京福 R8-1 疫苗接种组发病率为 19.3%,未接种组为 34.9%,保护率为 44.7%;京生 75-29R2 苗的接种组发病率为 8.4%,未接种组为 29.1%,保护率为 70.9% (详细资料将另文发表)。1977 年 6-8 月灌阳县流行分离株属于粤防 77-38 一类,和京防 75-39 的抗原比为 1:6.8。京福 R8-1 跨越京防 75-39 小变种再保护第二个变种粤防 77-38 的效果不佳,而京生 75-29R2 保护相邻的下一个变种粤防 77-38 效果则较为理想。

参 考 文 献

- [1] 朱既明等:微生物学报, 21(1):107, 1981。
- [2] 任贵方等:微生物学报, 20 (4):433, 1980。
- [3] Mills, J. V. and R. M. Chanock: *J. Inf. Dis.*, 123(2): 145, 1971.
- [4] Murphy, B. R. et al.: *J. Inf. Dis.*, 126(2): 170, 1972.
- [5] Murphy, B. R. et al.: *J. Inf. Dis.*, 128(4): 479, 1973.

STUDIES ON RECOMBINATION OF INFLUENZA VIRUSES

III. SELECTION OF A LIVE ATTENUATED TEMPERATURE-SENSITIVE H3N2 VACCINE STRAIN AND OBSERVATIONS ON ITS REACTOGENICITY, IMMUNOGENICITY AND EPIDEMIOLOGICAL EFFICACY IN VOLUNTEERS

Tian Shufang¹⁾ Deng Gong¹⁾ Zhang Luxian¹⁾ Lan Huageng²⁾
Chen Chunrong¹⁾ Huang Jingyou³⁾ Zhou Yongxiu⁴⁾ Qing Shuhong⁵⁾
Wang Shusheng³⁾ Ren Guifang¹⁾ Cui Junzhao³⁾ Zhu Jinin¹⁾

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

We have obtained the PFR8-1 (H3N2) live temperature-sensitive (ts) attenuated vaccine strain by recombination using infective FuR3 (H2N3) as ts master strain and UV-inactivated wild type A3/Beijing/5/74 (H2N2). PFR8-1 strain has been characterized thoroughly in the laboratory. Observations on reactogenicity, immunogenicity and epidemiological efficacy showed that this vaccine strain is safe, effective and genetically stable. Viruses reisolated from vaccinated volunteers showed no re-

version to ts⁺. The duration for the selection of live attenuated vaccine strain can be appreciably shortened by the use of the recombination technic.

1) Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing.

2) Wuhan Institute of Biologicals, Wuhan.

3) Sanitary and Anti-epidemic Station of Guangxi Autonomos Region, Nanning.

4) Sanitary and Anti-epidemic Station of Guilin District, Guilin.

5) Sanitary and Anti-epidemic Station of Guanyang County, Guangxi Guanyang.