

Sabin IPV 疫苗在版纳小耳猪体内的免疫原性及安全性研究

寸怡娜,蔡玮,宋绍辉,周健,欧阳圣洁,胡文著,李卫东,廖国阳,马磊*

(中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所,昆明 650118)

【摘要】 目的 评价 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strain, sIPV) 在版纳小耳猪体内的免疫原性及安全性,为新型动物模型提供实验依据。**方法** 采用中国医学科学院医学生物学研究所已经上市的 sIPV 疫苗,设计 sIPV 肌肉免疫实验组与野毒株 IPV (IPV derived from wild strain, wIPV) 肌肉免疫对照组,以及生理盐水阴性对照组,按 0、1、2 月基础免疫程序,接种版纳小耳猪,于免疫接种前及每剂免疫接种后第 30 天采血,检测各组的血清中和抗体水平,评价免疫原性,并通过观察小耳猪的状态及体重情况,评价安全性。**结果** 版纳小耳猪 3 剂免疫后,sIPV 试验组与 wIPV 对照组 I、II、III 型抗体阳转率均达到了 100%,各型中和抗体几何平均滴度 (GMT) 均远高于 1:8 保护水平。版纳小耳猪接种疫苗后体重增加,结果表明 sIPV 疫苗在版纳小耳猪动物模型中具有良好的安全性。**结论** sIPV 疫苗在版纳小耳猪体内具有良好的免疫原性及安全性,版纳小耳猪可作为评价 sIPV 疫苗的新型实验动物模型。

【关键词】 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗;版纳小耳猪;安全性;免疫原性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0331-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.010

Immunogenicity and safety of Sabin IPV vaccine in Banna mini pigs

CUN Yina, CAI Wei, SONG Shaohui, ZHOU Jian, OUYANG Shengjie, HU Wenzhu, LI Weidong,
LIAO Guoyang, MA Lei*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Kunming 650118, China)

Corresponding author: MA Lei. E-mail: malei@imbcams.com.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the immunogenicity and safety of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strain (sIPV) in Banna mini pigs, and to provide experimental evidence for the new animal model. **Methods** sIPV vaccines which are listed at Institute of Medical Biology at Chinese Academy of Medical Sciences were used in this study. The groups of intramuscular sIPV and the wild strain IPV injections (IPV derived from wild strain, wIPV) were designed, and the saline group was used as a negative control group. The Banna mini pigs in various groups were immunized at 0, 1 and 2 months. Blood samples were collected before immunization and on days 30 after each immunization. Levels of neutralizing antibodies were tested for evaluating immunogenicity. The safety was evaluated by observation of the status and weight of mini pigs. **Results** After the three dose immunization schedules in the Banna mini pigs, the seroconversion rates

【基金项目】 国家国际科技合作专项项目 (No. 2014DFA32870); 协和创新团队项目 (No. 2016-I2M-3-026); 云南省国际科技合作项目 (No. 2017IB008); 云南省创新团队 (No. 2015HC027)。

Funded by National International Science and Technology Cooperation Program of China (No. 2014DFA32870), Xiehe Innovation Team Program (No. 2016-I2M-3-026), Yunnan International Science and Technology Cooperation Program (No. 2017IB008), Yunnan Innovation Team Program (No. 2015HC027).

【作者简介】 寸怡娜 (1982—) 女, 博士, 研究方向: 病毒疫苗研究。Email: cunyina@imbcams.com.cn

【通信作者】 马磊 (1983—) 男, 研究方向: 病原生物学。Email: malei@imbcams.com.cn

of type I, II and III sIPV experimental groups and wIPV group were all up to 100%. The neutralizing antibody levels in all the three types were much higher than the protective titer 1: 8. The weight of mini pigs increased after vaccination.

Conclusions The sIPV vaccine has good immunogenicity and safety in Banna mini pigs. Banna mini pigs could be a new animal model for evaluation of sIPV vaccine.

【Key words】 inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strain (sIPV); Banna mini pigs; safety; immunogenicity

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

脊髓灰质炎(以下简称“脊灰”)是由脊髓灰质炎病毒 I、II、III 型引起的传播广泛且危害极大的急性传染病^[1]。接种脊灰疫苗是控制与消灭脊灰最重要且有效的手段,国内外应用的脊灰疫苗有两种:口服脊灰减毒活疫苗(oral poliovirus vaccine, OPV)和脊灰灭活疫苗(inactivated poliovirus vaccine, IPV)。目前,全球合作消灭脊灰取得了重要进展,野毒株(WPV)仅在巴基斯坦、阿富汗两个国家流行。全球消灭脊灰后,由于口服 OPV 可引起疫苗相关病例(vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP)和疫苗衍生株病毒(vaccine-derived poliovirus, VDPV),将被停止使用,在消灭脊灰的最后阶段,只有使用 IPV 代替 OPV 才能最终根除脊髓灰质炎^[2-3]。

减毒株(Sabin 株)生产的 IPV(sIPV),因其生物安全性高,适合在全球尤其第三世界国家推广使用^[4-7]。2015 年 1 月,中国医学科学院医学生物学研究所研制的 sIPV 三价疫苗获准上市,该疫苗对于保障中国及全球实现消灭脊灰的目标具有重要的战略意义。动物体内效力试验,是疫苗有效性的质量控制指标^[8]。传统的 IPV 疫苗的肌肉注射途径效力评价是采用 Wistar 大鼠作为实验动物模型,而云南本地的版纳小耳猪属华南型猪种,体型小发育慢,6 月龄体高 40 cm 左右,体长在 60 ~ 75 cm,体重 20 ~ 30 kg,体重相当同龄大型猪的 1/4 ~ 1/5,平均日增重 120 ~ 150 g,其皮肤厚度和结构与人类更接近^[9]。本研究采用版纳小耳猪新动物模型进行 sIPV 疫苗免疫安全性和有效性的评价,为今后新型实验动物版纳小耳猪在脊灰疫苗评价中的应用积累科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

版纳小耳猪,等级:普通级,25 只,雌 13 只,雄 12 只,3 ~ 4 月龄,体重 6 ~ 10 kg,由西双版纳小型猪

饲养基地提供,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验中心饲养【SYXK(滇)K2013-0008】。

1.1.2 实验疫苗及参考品

sIPV 疫苗由中国医学科学院医学生物学研究所制备,每瓶 0.5 mL,抗原含量为 I、II、III 型 30、32、45 DU。2 ~ 8℃ 保存,严禁冻结。wIPV 疫苗由赛诺菲巴斯德制备,每瓶 0.5 mL,抗原含量为 I、II、III 型 40、8、32 DU。2 ~ 8℃ 保存,严禁冻结。

D 抗原检测多克隆抗体(牛抗、兔抗):捕获抗体(一抗),各型经纯化获得的牛抗 Sabin-Polio IgG;检测抗体(二抗),各型经纯化获得的兔抗 Sabin-Polio IgG 均由本所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及免疫

版纳小耳猪 25 只,其中 sIPV 实验组和 wIPV 对照组各 10 只,生理盐水阴性对照组 5 只。肌肉注射每只版纳小耳猪 0.5 mL。间隔 1 个月,共进行 3 次免疫。每次免疫前尾静脉采血 2 ~ 3 mL,分离血清,置 -60℃ 保存。

1.2.2 血清脊灰中和抗体检测

采用微量中和实验法^[10]。能够保护 50% 细胞不受 100 CCID₅₀ 攻击病毒液感染的血清最高稀释度就是该血清的抗体滴度。中和抗体滴度 < 1:8 记为阴性“—”。

阳转率的判定方法为:免前抗体滴度 < 1:8,免后 ≥ 1:8 判为阳转。

1.2.3 安全性评价

安全性观察实验 在疫苗免疫后连续 7 d 观察接种部位是否引起红斑或水肿等局部反应。动物分组前、给药后 1 周内每天进行称重,比较与对照组的差异。

1.3 统计学方法

用 Office Excel 和 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采用 χ^2 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫原性结果

2.1.1 血清学中和抗体阳转率结果

I 型脊灰病毒中和抗体阳转率:第 1 剂免疫后, sIPV 组阳转率达到 80%, wIPV 组的阳转率为 60%, 两组间差异无显著性($P=0.626$)。第 2 剂免疫后, sIPV 组达到了 100%, wIPV 组的阳转率为 90%, 组间差异无显著性($P=1.000$)。第 3 剂免疫后, 两组阳转率均达到了 100%。II 型脊灰病毒中和抗体阳转率:第 1 剂免疫后, sIPV 组阳转率为 80%, 与 wIPV 组一致。第 2 剂免疫后, sIPV 组阳转率为

90%, wIPV 组阳转率也为 90%。第 3 剂免疫后, 两组均达到了 100%。III 型脊灰病毒中和抗体阳转率:第 1 剂免疫后, sIPV 组阳转率为 40%, wIPV 组为 30%, 组间差异无显著性($P=1.000$)。第 2 剂免疫后, sIPV 组和 wIPV 组阳转率均为 80%。第 3 剂免疫后, 两组均达到了 100%。详细结果见表 1。

2.1.2 血清学中和抗体几何平均滴度(GMT)结果

I、II、III 型脊灰病毒中和抗体 GMT, 除 I 型病毒第 2 剂免疫后 30 d 和第 3 剂免疫后 30 天 sIPV 组 GMT 显著高于 wIPV 组外, 其余均差异无显著性, 3 剂免疫后实验组和对照组 GMT 均远高于 1:8, 结果详见表 2。

表 1 免疫接种 30 d 后版纳小耳猪后抗脊灰病毒 I、II、III 型中和抗体阳转率($n=10, \%$)
Tab.1 Seroconversion rate of the anti-polio type I, II and III antibodies after each dose immunization in the mini pigs ($n=10, \%$)

组别 Groups	I 型 Type I			II 型 Type II			III 型 Type III		
	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3
sIPV 免疫组 sIPV group	80	100	100	80	90	100	40	80	100
wIPV 免疫组 wIPV group	60	90	100	80	90	100	30	80	100

表 2 免疫接种 30 d 后版纳小耳猪后抗脊灰病毒 I、II、III 型中和抗体 GMT($n=10, 1:x$)
Tab.2 Geometric mean titers (GMT) of the anti-polio type I, II and III antibodies after each dose immunization in the mini pigs ($n=10, 1:x$)

组别 Groups	I 型 Type I			II 型 Type II			III 型 Type III		
	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3	一免 Dose 1	二免 Dose 2	三免 Dose 3
sIPV 免疫组 sIPV group	10.48	69.36	257.07	7.25	14.58	113.93	6.49	10.79	206.5
wIPV 免疫组 wIPV group	7.16	21.59	161.12	11.17	34.87	156.5	5.82	12.83	190.55

2.2 免疫后安全性观察

每针免疫后对各组小耳猪进行持续观察, 发现版纳小耳猪毛色光滑, 食欲、精神状态和活动情况均正常, 未出现体重下降、掉毛等现象。免疫后 7 d 每天进行观察及称重, 发现每组小耳猪体重稳定的增长, 并且各实验组与对照组间体重差异无显著性(见图 1)。肌肉注射观察腿部肌肉注射局部, 也未见红肿、硬结等现象。

3 讨论

早在 20 世纪 80 年代医学生物学研究所就开始研制 sIPV, 并确立了采用 Vero 细胞微载体大规模培养技术生产 sIPV 的生产工艺^[11], III 期临床试验结果表明, sIPV 具有良好的安全性和免疫原性, 肌肉

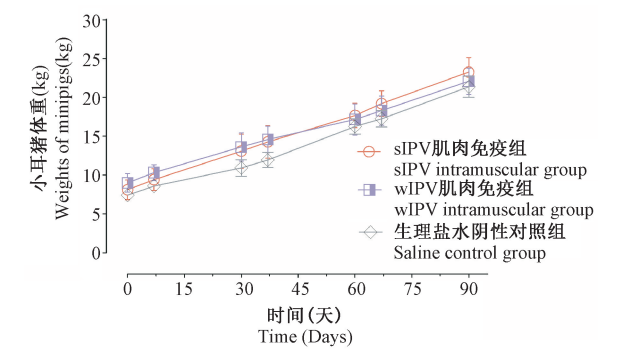


图 1 版纳小耳猪免疫后体重变化结果
Fig.1 Body weight changes of the pigs after immunization

注射剂型的 sIPV 已经于 2015 年 6 月成功获批上市^[12]。传统的 IPV 疫苗的肌肉注射途径效力评价是用 Wistar 大鼠作为实验动物模型, 本研究选用云

南本地的版纳小耳猪作为评价 IPV 安全性及有效性的新的动物模型,通过对比猪与人的皮肤厚度及结构的研究认为猪的皮肤构造和人的较为相似,并且猪在解剖、代谢等遗传特征上与人相似^[13-14],因此本研究的目的在于评价 IPV 疫苗在版纳小耳猪体内的免疫原性及安全性,为新型动物模型提供实验依据。

从版纳小耳猪的 3 剂基础免疫免疫原性结果来看,第 1 剂免疫完成后,sIPV 组和 wIPV 组阳转率各型别组间差异无显著性,且两组均显著性的高于生理盐水对照组,GMT 水平较低,仅 sIPV 组 I 型和 wIPV 组 II 型 GMT 水平高于 1:8。第 2 剂免疫后,sIPV 组和 wIPV 组各型别阳转率均达到 80% 以上,且组间差异无显著性,GMT 水平增长显著,各型别滴度均高于 1:8。第 3 剂免疫后,sIPV 组和 wIPV 组阳转率各型别均达到了 100%,I、II、III 三个型别,sIPV 组 GMT 水平分别为:257.07、113.93、206.50,wIPV 组 GMT 水平分别为:161.12、156.50、190.55,GMT 水平均远高于 1:8。结果表明,3 剂基础免疫后,sIPV 和 wIPV 疫苗免疫版纳小耳猪能够产生较好的免疫保护水平和较高的 GMT 水平。

安全性是评价新型动物模型的重要方面,在本研究中,我们从版纳小耳猪接种部位观察及体重观察评价了 sIPV 及 wIPV 疫苗的安全性,不管从版纳小耳猪的状态、体重还是注射部位情况观察,证明了 sIPV 及 wIPV 疫苗接种版纳小耳猪是安全的。

综上所述,IPV 相关版纳小耳猪新型动物模型的研究国内外还未见报道。本研究通过评价 sIPV 及 wIPV 疫苗在版纳小耳猪体内的安全性及免疫原性,证明了版纳小耳猪能够作为评价 IPV 疫苗的新型实验动物模型。此新型动物模型对今后脊灰疫苗的研究及应用将具有非常重要的意义。

参 考 文 献(References)

- [1] Neal N, Olen MK. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis deconstructed [J]. Am J Epidemiol, 2010, 172(11): 1213–1229.
- [2] Foiadelli T, Savasta S, Battistone A, et al. Nucleotide variation in Sabin type 3 poliovirus from an Albanian infant with agammaglobulinemia and vaccine associated poliomyelitis [J]. BMC Infect Dis, 2016, 16: 277.
- [3] Gomber S, Arora V, Dewan P. Vaccine associated paralytic poliomyelitis unmasking common variable immunodeficiency [J]. Indian Pediatr, 2017, 54(3): 241–242.
- [4] Sun M, Li C, Xu W, et al. Immune serum from Sabin inactivated poliovirus vaccine immunization neutralizes multiple individual wild and vaccine-derived polioviruses [J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(10): 1317–1325.
- [5] Someya Y, Ami Y, Takai-Todaka R, et al. Evaluation of the use of various rat strains for immunogenic potency tests of Sabin-derived inactivated polio vaccines [J]. Biologicals, 2018, 52: 12–17.
- [6] World Health Organization. Polio vaccines: WHO position paper, March 2016-recommendations [J]. Vaccine, 2017, 35(9): 1197–1199.
- [7] WHO (2013) Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization [C]. November 2012-conclusions and recommendations [J]. Wkly Epidemiol Rec, 88: 1–16.
- [8] Catry J, Luong-Nguyen M, Arakelian L, et al. Circumferential esophageal replacement by a tissue-engineered substitute using mesenchymal stem cells: An experimental study in mini pigs [J]. Cell Transplant, 2017, 26(12): 1831–1839.
- [9] Ferreira A, Marques P, Ribeiro B, et al. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen [J]. Environ Res, 2018, 164: 32–38.
- [10] World Health Organization. Manual for the virological investigation of polio [A]. WHO/EPI/GEN 97.01. 1997.
- [11] 姜述德, David Pye. 应用微量中和抑制法测定脊髓灰质炎灭活疫苗的抗原性 [J]. 中国医学科学院学报. 1985, 7: 309–312.
- [12] Jiang SD, Pye D. Determination of antigenicity of poliomyelitis inactivated vaccine by microneutralization inhibition [J]. J Chin Acad Med Sci, 1985, 7: 309–312.
- [13] Liao G, Li R, Li C, et al. Phase 3 trial of a Sabin strain-based inactivated poliovirus vaccine [J]. J Infect Dis, 2016, 214(11): 1728–1734.
- [14] 魏鸿. 我国小型猪研究现状 [J]. 中国实验动物学杂志. 1997, 7(4): 252–255.
- [15] Wei H. Research status of mini pigs in China [J]. Chin J Laboratory Animal Sci, 1997, 7(4): 252–255.
- [16] Klein P, Sojka M, Kucera J, et al. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm [J]. Biofouling, 2018, 34(2): 226–236.

[收稿日期] 2018–02–28