

· 临床研究 ·

国产冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)的安全性及免疫原性观察

蔡勇¹, 周蓉¹, 李声友¹, 陈怀恭¹, 唐建蓉², 曹守春², 李加², 朱凤才³, 周伟忠³,
黄贵娟¹, 赵志鹏¹, 马树红¹, 张桂雪¹

1. 成都康华生物制品有限公司 四川 成都 610100; 2. 中国食品药品检定研究院 北京 100050;

3. 江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009

摘要: 目的 观察人二倍体细胞(human diploid cell, HDC)培养制备的国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)的安全性及其免疫原性。方法 选取江苏省淮安市涟水县年龄在 10 ~ 60 岁的常住高危狂犬病感染的健康人, 随机分为试验组和对照组, 每组 600 人, 按照“Essen”暴露后接种程序, 分别于第 0、3、7、14 和 28 天经上臂三角肌肌肉内各注射 1 剂疫苗, 试验组接种国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV), 对照组接种进口冻干人用狂犬病疫苗(Vero 细胞)。所有受试者在每次接种后留观 30 min, 观察即时反应, 并在第 6、24、48、72 h 观察局部和全身反应情况。在首剂免疫前和免疫后 7、14、42 d 采集全血标本, 分离血清, 采用 WHO 推荐的快速免疫荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)检测血清中和抗体, 计算抗体阳转率及几何平均滴度(GMT)。结果 所有受试者接种疫苗后反应轻微, 均未发生 Ⅰ级及 Ⅰ级以上不良反应, 所有不良反应均在 72 h 内恢复。试验组和对照组局部反应总发生率分别为 7.67% 和 6.83%, 全身反应总发生率均为 5.00%, 两组间比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。试验组和对照组首剂免疫后 7、14、42 d 的抗体阳转率分别为 28.77%、100%、100% 和 28.72%、98.96%、100%, 两组间比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。血清中和抗体 GMT 分别为 0.274 8、19.744 3、37.575 0 IU/ml 和 0.247 4、17.327 4、37.723 1 IU/ml, 两组间比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)接种反应轻微, 且具有良好的免疫原性。

关键词: 冻干人用狂犬病疫苗; 人二倍体细胞; 安全性; 免疫原性

中图分类号: R373.9 R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2015)05-0510-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.000910

Safety and immunogenicity of domestic freeze-dried rabies vaccine (human diploid cells) for human use

CAI Yong*, ZHOU Rong, LI Sheng-you, CHEN Huai-gong, TANG Jian-rong, CAO Shou-chun, LI Jia, ZHU Feng-cai,
ZHOU Wei-zhong, HUANG Gui-juan, ZHAO Zhi-peng, MA Shu-hong, ZHANG Gui-xue

*Chengdu Kanghua Biological Products Co., LTD, Chengdu 610100, Sichuan Province, China

Corresponding author: ZHANG Gui-xue, E-mail: zhangguixue@hotmail.com

Abstract: **Objective** To observe the safety and immunogenicity of domestic freeze-dried rabies vaccine (human diploid cells, HDCs) for human use, shorten as HDCV. **Methods** The residents at ages of 10 ~ 60 years in Lianshui County, Huai'an City, Jiangsu Province, China, at high risk of rabies virus infection, were divided into trial and control groups, 600 for each. The subjects in trial group were immunized i.m. with domestic freeze-dried HDCV according to Essen schedule on days 0, 3, 7, 14 and 28 respectively, while those in control group with imported freeze-dried rabies vaccine for human use (Vero cells). All the subjects were observed for immediate reaction for 30 min, and for local and systemic reactions 6, 24, 48 and 72 h after immunization. Serum samples were collected before and 7, 14, 42 d after immunization, and determined for neutralizing antibody by rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT), based on which the positive conversion rate and GMT of antibody were calculated. **Results** All the adverse reactions in subjects were mild and disappeared within 72 h, while no reactions of grade Ⅰ or above were observed. The total incidence rates of local reactions in trial and control groups were 7.67% and 6.83% respectively, while those of systemic reactions were both 5.00%, which showed no significant difference ($P > 0.05$). The antibody positive conversion rates in trial group 7, 14 and 42 d

基金项目: 国家科技部“863 计划”项目(2014AA021001)。

通讯作者: 张桂雪, E-mail: zhangguixue@hotmail.com

after the first dose were 28.77%, 100% and 100%, while those in control group were 28.72%, 98.96% and 100%, respectively, which showed no significant difference ($P > 0.05$). However, the GMTs of antibody in trial group 7, 14 and 42 d after the first dose were 0.274 8, 19.744 3 and 37.575 0 IU/ml, while those in control group were 0.247 4, 17.327 4 and 37.723 1 IU/ml, respectively, which showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Domestic freeze-dried HDCV for human use induced mild adverse reactions and showed good immunogenicity.

Key words: Freeze-dried rabies vaccine for human use; Human diploid cells; Safety; Immunogenicity

狂犬病为人畜共患急性传染病,目前仍是不可防不可治。目前全球在售的主流狂犬病疫苗依据培养病毒所需细胞基质不同可分为两类:人二倍体细胞疫苗(human diploid cell vaccine, HDCV)和动物细胞疫苗(采用原代地鼠肾细胞、鸡胚细胞或传代细胞 Vero 等制备),其中, HDCV 是采用健康人胚肺成纤维细胞为基质来培养狂犬病病毒,与动物源性细胞相比,无潜在致瘤 DNA 残留和外源蛋白过敏风险,具有更好的免疫原性和记忆性应答^[1],与狂犬病免疫球蛋白联用效果更佳^[2-4],是目前最理想的细胞培养狂犬病疫苗^[5]。自 20 世纪 70 年代开始应用以来,因其具有安全性好、副反应低、免疫原性强的特点,被 WHO 广为推荐^[5-6]。但由于其培养技术难度较大,病毒繁殖滴度相对较低,生产工艺复杂,使得疫苗成本高,价格昂贵,限制了其在发展中国家的使用,目前中国亦尚未有进口。

我国自 2004 年开始研制人二倍体细胞狂犬病疫苗,2014 年,我国首家拥有自主知识产权的冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)上市。本文对该疫苗的安全性及免疫原性进行了观察,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 试验疫苗 国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV), 5 支/人份,批号为 20060501,1 ml/剂,由成都康华生物制品有限公司生产,进口冻干人用狂犬病疫苗(Vero 细胞) 5 支/人份,批号为 B0277-1,0.5 ml/剂,由法国安万特巴斯德公司生产。

1.2 观察对象 选取江苏省淮安市涟水县年龄在 10~60 岁的常住高危狂犬病感染的健康人,既往无人用狂犬病疫苗接种史、犬伤史和疫苗接种禁忌证,在知情同意的前提下,将受试者随机分为试验组和对照组,每组 600 人,保证性别和年龄均衡。试验组和对照组中,免疫前后检测血清狂犬病病毒中和抗体浓度的人数均不得少于 250 人。

1.3 疫苗接种 按照“Essen”暴露后接种程序,分别于第 0、3、7、14、28 天经上臂三角肌内各注射 1 剂疫苗,共计 5 剂。试验组接种国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV),对照组接种进口冻干人用狂犬病疫

苗(Vero 细胞)。

1.4 接种反应观察 所有受试者在每次接种后留观 30 min,观察即时反应,并在第 6、24、48、72 h 观察局部和全身反应情况。每次接种后第 4 天起至第 4 周止,每周定期随访,同时结合受试者的主动报告对接种疫苗后的不良事件或反应发生情况进行观察并记录。结果判定按照《预防用疫苗临床前研究技术指导原则》(国食药监注[2005]493 号)中的《预防用疫苗临床试验不良反应分级标准指导原则》^[7]判定临床观察期间发生的不良反应。

1.5 免疫原性观察 随机抽取试验组和对照组各 300 名受试者,在首剂免疫前和免疫后 7、14、42 d 采集全血标本,分离血清,分成 2 份,每份至少 0.5 ml, -20℃ 保存,通过冷链运输至中国食品药品检定研究院,采用 WHO 推荐的快速免疫荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)统一检测血清中和抗体,计算抗体阳转率及几何平均滴度(GMT)。结果判定:以受试者血清中和抗体 GMT \geq 0.5 IU/ml 为达到免疫保护水平。

1.6 统计学分析 应用 SPSS Statistics 19.0 统计学软件进行统计学分析,计量数据的比较采用 t 检验,阳转率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接种反应

2.1.1 局部反应 每针次接种后 30 min 内,除个别受试者反应有注射部位疼痛外,无其他不适症状。在疫苗接种后安全性观察期内,主要局部反应有红肿、疼痛及可自行消退的硬结,试验组和对照组局部反应发生率分别为 7.67% 和 6.83%,二者差异无统计学意义($P = 0.656 0$)。大多数局部反应发生在第 1 和第 2 剂疫苗接种后,试验组局部反应主要表现为接种部位红晕(1.67%)、疼痛(4.67%)、硬结(1.33%)、肿胀(1%)、注射部位疹(0.17%)和瘙痒(0.67%)。见表 1。

2.1.2 全身反应 在疫苗接种后安全性观察期内,试验组和对照组全身反应发生率均为 5.00%,二者比较差异无统计学意义($P = 1.000 0$)。试验组全身

反应表现为体温异常(1.33%)、腹泻(0.83%)、肌肉痛(0.17%)、恶心呕吐(1.33%)、头痛(0.83%) ,无其他不适症状。试验组和对照组接种疫苗后 ,无论

局部还是全身均未发生 3 级及 3 级以上不良反应 ,所有不良反应均在 72 h 内恢复 ,见表 2。总不良反应发生率见表 3。

表 1 受试者接种冻干人用狂犬病疫苗后局部反应监测结果

Tab 1. Local adverse reactions of after immunization with freeze-dried HDCV for human use

不良反应	组别	例数	事件分级(例数)				总计	不良反应发生率(%)			组间比较 P 值
								级	级	+ 级	
红晕	试验组	600	9	1	0	0	10	1.50	0.17	1.67	0.675 0
	对照组	600	9	4	0	0	13	1.50	0.67	2.17	
疼痛	试验组	600	18	10	0	0	28	3.00	1.67	4.67	0.128 0
	对照组	600	14	3	0	0	17	2.33	0.50	2.83	
硬结	试验组	600	6	2	0	0	8	1.00	0.33	1.33	0.579 0
	对照组	600	4	1	0	0	5	0.67	0.17	0.84	
肿胀	试验组	600	3	3	0	0	6	0.50	0.50	1.00	0.234 0
	对照组	600	9	3	0	0	12	1.50	0.50	2.00	
注射部位疹	试验组	600	1	0	0	0	1	0.17	0.00	0.17	1.000 0
	对照组	600	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	
瘙痒	试验组	600	4	0	0	0	4	0.67	0.00	0.67	1.000 0
	对照组	600	5	0	0	0	5	0.83	0.00	0.83	

表 2 受试者接种冻干人用狂犬病疫苗后全身反应监测结果

Tab 2. Systemic adverse reactions after immunization with freeze-dried HDCV for human use

不良反应	组别	例数	事件分级(例数)				总计	不良反应发生率(%)			组间比较 P 值
								级	级	+ 级	
恶心呕吐	试验组	600	8	0	0	0	8	1.33	0.00	1.33	0.789 0
	对照组	600	6	0	0	0	6	1.00	0.00	1.00	
腹泻	试验组	600	5	0	0	0	5	0.83	0.00	0.83	0.579 0
	对照组	600	8	0	0	0	8	1.33	0.00	1.33	
肌肉痛	试验组	600	1	0	0	0	1	0.17	0.00	0.17	1.000 0
	对照组	600	1	0	0	0	1	0.17	0.00	0.17	
疲倦乏力	试验组	600	6	0	0	0	6	1.00	0.00	1.00	1.000 0
	对照组	600	5	0	0	0	5	0.83	0.00	0.83	
其他不适	试验组	600	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	1.000 0
	对照组	600	1	0	0	0	1	0.17	0.00	0.17	
体温异常	试验组	600	3	5	0	0	8	0.50	0.83	1.33	0.579 0
	对照组	600	5	0	0	0	5	0.83	0.00	0.83	
头痛	试验组	600	5	0	0	0	5	0.83	0.00	0.83	1.000 0
	对照组	600	6	0	0	0	6	1.00	0.00	1.00	

表 3 受试者接种冻干人用狂犬病疫苗后总不良反应监测结果

Tab 3. Total adverse reactions after immunization with freeze-dried HDCV for human use

反应部位	组别	例数	事件分级(例数)				总计	总发生率(%)	组间比较 P 值
局部	试验组	600	30	16	0	0	46	7.67	0.656 0
	对照组	600	32	9	0	0	41	6.83	
全身	试验组	600	25	5	0	0	30	5.00	1.000 0
	对照组	600	30	0	0	0	30	5.00	
合计	试验组	600	55	21	0	0	76	12.67	0.789 0
	对照组	600	62	9	0	0	71	11.83	

2.2 免疫原性

2.2.1 疫苗接种不同时间的抗体阳转率 试验组实际完成采血人数 292 人 ,首剂免疫后 7、14、42 d 的抗体阳转率分别为 28.77%、100%和 100% ;对照组实际完成采血人数 289 人 ,首剂免疫后 7、14、42 d 的抗体阳转率分别为 28.72%、98.96%和 100%。试验组与对照组抗体阳转率差异无统计学意义($P =$

0.122 4 ~ 1.000 0)。见表 4。

2.2.2 疫苗接种不同时间的抗体 GMT 水平 首剂免疫后 7、14、42 d ,试验组血清中和抗体 GMT 分别为 0.274 8、19.744 3 和 37.575 0 IU / ml ,对照组血清中和抗体 GMT 分别为 0.247 4、17.327 4 和 37.723 1 IU / ml ,两组之间差异均无统计学意义($P =$ 0.243 4 ~ 0.961 0) ,见表 5。

表 4 受试者接种冻干人用狂犬病疫苗后不同时间的血清抗体阳转率

Tab 4. Positive conversion rates of serum antibody at various time points after immunization with freeze-dried HDCV for human use

首剂免疫后时间(d)	组别	例数	达保护性水平例数	阳转率		率差(A-B)		组间比较 P 值
				百分比(%)	95% CI	百分比(%)	95% CI	
7	试验组	292	84	28.77	(23.57 ,33.96)	0.05	(-7.31 ,7.41)	1.000 0
	对照组	289	83	28.72	(23.50 ,33.94)			
14	试验组	292	292	100.00	(98.74 ,100.00)	1.04	(-0.13 ,2.21)	0.122 4
	对照组	289	286	98.96	(97.00 ,99.79)			
42	试验组	292	292	100.00	(98.74 ,100.00)	-	-	1.000 0
	对照组	289	289	100.00	(98.73 ,100.00)			

表 5 受试者接种冻干人用狂犬病疫苗后不同时间的血清中和抗体 GMT 水平

Tab 5. GMTs of serum neutralizing antibody at various time points after immunization with freeze-dried HDCV for human use

首剂免疫后时间(d)	组别	例数	血清中和抗体(IU / ml)			95% CI	组间比较 P 值
			最小值	最大值	GMT		
免疫前	试验组	292	0.05	0.14	0.072 7	(0.069 7 ,0.075 8)	0.305 8
	对照组	289	0.05	0.14	0.075 0	(0.071 9 ,0.078 3)	
7	试验组	292	0.07	5.94	0.274 8	(0.230 2 ,0.328 1)	0.403 3
	对照组	289	0.07	5.94	0.247 4	(0.208 2 ,0.294 0)	
14	试验组	292	2.29	92.59	19.744 3	(16.951 4 ,22.997 4)	0.243 4
	对照组	289	0.30	92.59	17.327 4	(14.784 2 ,20.308 2)	
42	试验组	292	4.51	160.37	37.575 0	(33.740 7 ,41.845 1)	0.961 0
	对照组	289	0.71	160.37	37.723 1	(33.591 6 ,42.362 7)	

3 讨 论

虽然我国人狂犬病疫情近几年有所下降 ,但报告病例数依然处于世界第 2 位 ,仅次于印度^[8]。同时 ,随着犬只数量的增长 ,狂犬病的防控形势不容乐观。冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)之前仅有国外公司生产 ,我国创新使用微载体在生物反应器中成功实现了规模化生产 HDCV ,目前在全球范围内尚未见报道。相对于国外同类产品采用的细胞工厂培养技术 ,微载体能提高细胞密度和培养基利用率。生物反应器的全自动化控制培养条件及全封闭管路系统 ,即使不添加抗生素 ,也能有效控制污染 ,同时还降低了批间差异 ,提高了培养规模和效率 ,更重要的是使产品质量更稳定、均一、可控。目前 ,国产 HDCV 已通过 2010 版 GMP 认证 ,并获得国家食品药品监

督管理总局的批签发合格证 ,正式上市。

本次观察的国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)接种后 ,局部反应总发生率为 7.67% ,全身反应总发生率为 5.00% ,发生反应严重程度最高为 级 ,所有不良反应均在 72 h 内恢复。与对照疫苗相比 ,各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。从每次疫苗接种第 4 天起至第 4 周止 ,均未观察到与疫苗有关的其他异常反应、偶合反应及任何有临床意义的不良事件。WHO 建议当引进新的狂犬病疫苗时 ,其免疫原性需通过待测试疫苗诱导的狂犬病中和抗体滴度与已证实免疫效力的疫苗诱导的狂犬病中和抗体滴度进行比较来评估^[9] ,并明确通过 RFFIT 检测血清最低滴度应达 0.5 IU / ml^[10]。在健康的疫苗接种人群中 ,大多数人应在暴露后免疫接种的第 14

(下转第 517 页)

法较一致,而屋尘螨点刺液的测定结果均低于 RAST 法,可能是由于商品化抗原与制品的抗原存在差异造成的,具体原因尚有待进一步实验验证。

本实验证明,以 UniCAP 法替代 RAST 法测定点刺液活性具有可行性,可缩短相关制品的检验时限,减少对操作人员及环境的危害。

参考文献

- [1] Wang QR, Zhang HY. Evaluation of CAP test system for allergen-specific IgE assay [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2007, 25 (2): 109-110. (in Chinese)
王琦瑞,张宏誉. CAP 系统检测过敏原特异性 IgE 抗体的方法学评价 [J]. 临床检验杂志, 2007, 25 (2): 109-110.
- [2] Zheng PY, Sun BQ, Huang HM, et al. Capture ELISA and FEIA assay for allergen-specific IgE antibody: a comparative analysis [J]. J Chongqing Med Univ, 2011, 36 (5): 595-598. (in Chinese)
郑佩燕,孙宝清,黄惠敏,等. 采用酶联免疫捕获法和荧光酶联免疫吸附法检测过敏原 IgE 抗体的比较分析 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36 (5): 595-598.
- [3] Mösges R, Pasch N, Schlierenkämper U, et al. Comparison of the biological activity of the most common sublingual allergen solutions made by two European manufactures [J]. Int Arch

Allergy Immunol, 2006, 139 (4): 325-329.

- [4] Wang CE, Shi JC, Wang SS, et al. Bioactivity detection method for *Dermatophagoides pteronyssinus* products [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33 (5): 775-778. (in Chinese).
王春娥,石继春,王珊珊,等. 屋尘螨变应原制品活性测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (5): 775-778.
- [5] Zhu RF, Huang N, Guo QM, et al. Bioactivity of *Dermatophagoides pteronyssinus* solution in vitro [J]. Chin Hosp Pharm J, 2011, 31 (7): 560-563. (in Chinese)
祝戎飞,黄南,郭其苗,等. 屋尘螨注射液的体外生物活性 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31 (7): 560-563.
- [6] Li W, Zhao QH, Wang XZ, et al. To detect the biological activity of mite allergen product using the ELISA assay [J]. J Mod Clin Med Bioeng, 2006, 12 (1): 35-36, 39. (in Chinese)
李文,赵绮华,王锡忠,等. 利用 ELISA 技术检测尘螨变应原的生物活性 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2006, 12 (1): 35-36, 39.
- [7] Wang RQ, Yin J. Clinical evaluation of ImmunoCAP 250TM for testing allergen specific IgE antibody [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2007, 1 (1): 67-70. (in Chinese)
王瑞琦,尹佳. ImmunoCAP 250TM 检测过敏原特异性 IgE 抗体的方法评价 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2007, 1 (1): 67-70.

收稿日期 2014-03-25 编辑 王佳凤

(上接第 513 页)

天达到该保护水平^[11]。此次临床观察结果表明,国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)采用 WHO 推荐的“Essen”方案接种,不良反应轻微,具有良好的安全性,同时,在免疫接种后 14 d 起,受试者血清中狂犬病病毒中和抗体浓度已 100%达到免疫保护要求,且抗体 GMT 高达 19.74 IU/ml 表明其免疫效果良好,可在较短时间内阻断感染,提供高效力的保护。

综上所述,国产冻干人用狂犬病疫苗(HDCV)采用人源细胞作为病毒培养基质,无潜在的致肿瘤性,临床试验显示其安全高效,是预防狂犬病的一个新选择。

参考文献

- [1] Vodopija RS, Lafont M, Baklaic Z, et al. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine [J]. Vaccine, 1997, 15 (5): 571-574.
- [2] Vodopija I, Sureau P, Smerdel S, et al. Interaction of rabies vaccine with human rabies immunoglobulin and reliability of a 2-1-1 schedule application for postexposure treatment [J]. Vaccine, 1988, 6 (3): 283-286.
- [3] Vodopija I, Sureaut P, Smerdel S, et al. Comparative study of

two human diploid rabies vaccines administered with antirabies globulin [J]. Vaccine, 1988, 6 (6): 489-490.

- [4] Lang J, Simanjuntak GH, Soerjosembodo S, et al. Suppressant effect of human or equine rabies immunoglobulins on the immunogenicity of post-exposure rabies vaccination under the 2-1-1 regimen: a field trial in Indonesia [J]. Bull World Health Organ, 1998, 76 (5): 491-495.
- [5] Wu XF, Smith TD, Rupprecht CE. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development [J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10 (11): 1597-1608.
- [6] WHO. Rabies vaccines [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2002, 77 (14): 109-119.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 预防用疫苗临床试验不良反应分级标准指导原则 [S]. 2005: 10-14.
- [8] 罗明,张茂林,涂长春. 我国狂犬病流行状况分析及防治对策 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21 (2): 188-190, 186.
- [9] WHO. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs [S]. Annex 2. 56th meeting of the Expert Committee on Biological Standardization, October 2005. Geneva, WHO.
- [10] WHO. WHO Expert Consultation on Rabies: First report [R]. Technical Report Series, 2004, 931: 1-121.
- [11] WHO. WHO position paper on rabies vaccines [J]. Weekly Epidemiological Record, 2010, 85 (32): 309-320.

收稿日期 2014-09-10 编辑 何巍