

百白破和麻疹疫苗 同时或单独免疫小鼠的体液免疫效果及不良反应评价

武永红, 黄君华

(西安医学院临床免疫与病原检验教研室, 陕西 西安 710021)

【摘要】 目的 观察百白破疫苗和麻疹减毒活疫苗同时免疫小鼠后的抗体应答和不良反应。方法 用百白破疫苗和麻疹减毒活疫苗皮下注射免疫小鼠,于末次免疫后10 d取血清,用ELISA间接法检测特异性IgG抗体水平,比较上述两种疫苗同时免疫与单独免疫小鼠后特异性IgG的产生水平,并观察其发生不良反应的差异。结果 同时免疫两种疫苗的实验组白喉抗体效价显著低于单独免疫的实验组,而前者不良反应发生率显著高于后者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 两种疫苗同时接种与单独接种比较,抗体应答水平较低,安全性较差,最好不要同时接种。

【关键词】 麻疹疫苗;体液免疫;小鼠;ELISA

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)12-1717-03

Evaluation of humoral immunity caused by DPT and measles vaccine separately or simultaneously and observation of adverse reactions. WU Yong-hong, HUANG Jun-hua. Department of Clinical Immunology and Etiology Inspection, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the antibody response and adverse reactions of mice after they were immunized by DPT and measles vaccine. **Methods** The mice were immunized subcutaneously by DPT and measles vaccine at the same time in different parts. Serum samples were taken at 10 days after the last immunization. Specific IgG antibody levels were detected by indirect ELISA. The levels of applying the two vaccines separately and simultaneously were compared, and the differences of adverse reactions were observed. **Results** Antibody titers of applying the two vaccines simultaneously were significantly lower than those applying the two vaccines separately, and the former had significantly higher incidence of adverse reactions ($P<0.05$). **Conclusion** It is recommended to vaccinate vaccines separately, because simultaneous vaccination may cause lower level of antibody response and poor security.

【Key words】 Measles vaccine; Humoral immunity; Mice; ELISA

国产吸附无细胞百白破疫苗已在我国大规模使用,其与麻疹减毒活疫苗是否可以同一时间不同部位对婴儿群体进行免疫接种,在预防保健部门一直存在较大争议。为了解上述两类疫苗同时接种后机体的体液免疫应答^[1]和不良反应情况,本文通过动物实验对小鼠的接种情况进行了观察,现报道如下:

1 材料与方 法

1.1 材料 麻疹减毒活疫苗、吸附无细胞百白破疫苗,由北京天坛生物制品股份有限公司生产;辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG、酶标空板、四甲基联苯胺、白喉类毒素抗体及麻疹病毒抗体检测试剂盒,由西安纳博旺生物科技有限公司提供;其余试剂按常规配制;6~8周龄Balb/c雌性小鼠,体重18~20 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组、免疫接种及分离血清 将40只实验小鼠随机分成A、B、C及D四组,每组10只。采用皮下免疫注射^[2]一周一次共三次,每次每只50 μ l。A组(对照组):注入生理盐水;B组(实验组):注入百白破疫

苗;C组(实验组):注入麻疹减毒活疫苗;D组(实验组):于不同部位分别注入百白破三联疫苗和麻疹减毒活疫苗。每组末次免疫10 d后摘眼球采血,37℃放置2 h后,4℃过夜,2 500 r/min离心20 min分离血清。

1.3 ELISA间接法 将白喉类毒素用0.05 mol/L pH 9.6的CBS稀释至1:4 000后4℃过夜包被酶标板,洗涤后,用1%的BSA封闭。将每只小鼠血清按1:100稀释,羊抗鼠IgG-HRP浓度为1:20 000,按常规方法操作,反应时间分别为30 min、30 min、10 min,酶标仪450 nm检测各样本OD值^[3]。麻疹病毒抗体检测依照试剂盒说明书进行。

1.4 不良反应观察 每次免疫接种后测量每只小鼠的肛温并记录:37.5℃及以下为无反应(-);37.6℃~38℃为弱反应(+);38.1℃~38.5℃为中反应(++);38.6℃及其以上为强反应(+++)。观察小鼠免疫接种后的躁动、呆滞、厌食等症状和体征。将体温计探头插入小鼠肛门内,深度以温度计探头完全进入肛门为准,维持至少2 min,测量肛温。记录各组数据,

比较给药组及对照组中肛温的差异。

1.5 统计学方法 全部数据采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抗体效价 用 ELISA 间接法所测得的各疫苗免疫注射组小鼠血清中的特异性 IgG 水平较正常对照组差异有统计学意义($P<0.05$); 组间抗体水平比较发现, 同时注射百白破疫苗和麻疹疫苗的 D 组特异性 IgG 抗体水平较单独注射百白破疫苗的 B 组差异有统计学意义($P<0.05$), 而较单独注射麻疹疫苗的 C 组差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 实验疫苗免疫小鼠血清 IgG 抗体 490 nm 吸光值($\bar{x}\pm s$)

组别	百白破疫苗特异性 IgG	麻疹疫苗特异性 IgG
A 组	0.070±0.024	0.090±0.027
B 组	0.523±0.102 ^a	-
C 组	-	0.437±0.081 ^b
D 组	0.365±0.096	0.442±0.094

注:^a与 D 组吸光值比较, $P<0.05$; ^b与 D 组吸光值比较, $P>0.05$ 。

2.2 不良反应发生率 小鼠免疫后肛温异常升高的发生率, 只注入百白破疫苗的 B 组为 50.0%; 只注入麻疹减毒活疫苗的 C 组为 70%; 注入百白破疫苗和麻疹疫苗的 D 组为 100%, 且 D 组反应强度显著高于 B 组和 C 组, 见表 2。小鼠免疫后症状和体征不良反应发生率, 只注入百白破疫苗的 B 组为 30.0%; 只注入麻风减毒活疫苗的 C 组为 50%; 注入百白破疫苗和麻疹疫苗的 D 组为 90%, 且 D 组中有两只小鼠呆滞与厌食症状都出现, 见表 3。

表 2 四组小鼠接种后肛温异常升高发生率(只)

组别	弱反应	中反应	强反应	反应率(%)
A 组	0	0	0	0
B 组	3	2	0	50.0
C 组	2	4	1	70.0
D 组	1	4	5	100.0 ^a

注:^a与 B 组和 C 组反应率比较, P 均 <0.05 。

表 3 症状和体征不良反应发生率(只)

组别	躁动	呆滞	厌食	反应率(%)
A 组	0	0	0	0
B 组	3	0	0	30.0
C 组	4	1	0	50.0
D 组	7	2	2 ^a	90.0 ^b

注:^a出现呆滞与厌食的为相同的两只小鼠; ^b与 B 组和 C 组反应率比较, 均 $P<0.05$ 。

3 讨论

随着我国卫生保健水平的提高, 儿童计划免疫中疫苗覆盖率有了很大的提高, 且疫苗种类也逐渐增多。然而, 注射疫苗, 特别是注射联合免疫疫苗时不良反应的发生率也在不断增加, 疫苗接种后不良反应

给预防接种工作带来一些不利影响和困难, 损害公众及医生对疫苗的信任。预防保健工作者一般认为, 一种灭活疫苗与一种减毒活疫苗可以在同一天不同部位接种, 按此说法, 百白破疫苗和麻风减毒活疫苗是可以给儿童在同一时间联合免疫的。由于儿童受到感冒、腹泻、过敏等常见病的影响, 各疫苗的免疫时间经常推迟或调整, 并不固定。我们走访了几家医院的预防保健科, 也确实有上述两疫苗联合免疫的情况。

本实验表明, 两种疫苗同时接种后, 实验小鼠不良反应明显增加, 而联合免疫较单独免疫两疫苗, 白喉抗体应答水平显著下降, 提示两种疫苗不适合联合免疫接种, 原因可能是炎性介质和过敏介质产生的叠加, 以及抗体产生过程中的竞争性抑制, 包括抗体合成原料的利用竞争等。

从儿童计划免疫中单独注射这两种疫苗的不良反应强度和发生率来看, 也不提倡联合免疫。吸附无细胞百白破联合疫苗是无细胞百日咳疫苗原液与破伤风类毒素混合, 用氢氧化铝吸附制成无细胞百日咳、白喉、破伤风混合疫苗。百白破疫苗的不良反应是计划免疫长期存在的问题^[4]。在儿童计划免疫接种的疫苗中, 吸附百白破疫苗的接种反应率最高^[5]。常见的有局部出现红肿、疼痛、发痒, 全身性燥热、哭闹; 罕见的有烦躁、厌食、呕吐、精神不振、重度发热、局部硬结等。麻疹减毒活疫苗是用麻疹病毒减毒株接种原代鸡胚细胞, 经培养收获病毒液加入适宜稳定剂冻干制成, 亦属于众多儿童疫苗中不良反应发生率较高的一种, 常见的有局部出现疼痛和触痛、全身性皮疹、轻中度发热, 罕见重度发热反应。

此外, 疫苗免疫接种还应考虑儿童对疫苗敏感程度的个体差异。如有的个体对麻风减毒活疫苗非常敏感, 容易发生严重的不良反应, 此种情况更应杜绝和其他疫苗联合免疫。

联合疫苗应用当中的一些不确定性问题尚有待证实^[6], 如多种疫苗抗原在机体内同时产生一定强度的免疫应答效应, 对同时参与这些免疫应答的分子需求异常增加, 是否会对机体造成不利影响, 如免疫应答的特异性降低、免疫系统紊乱、对其他病原微生物的防御能力降低、自身免疫应答水平升高等。

综上所述, 建议在计划免疫工作中不要给儿童同时接种百白破疫苗和麻风减毒活疫苗。

参考文献

- [1] Fazilli A, Mir AA, Shah RJ, et al. Effect of second dose of measles vaccine on measles antibody status: a randomized controlled trial [J]. Indian Pediatrics, 2013, 50(5): 473-476.
- [2] Knuf M, Zepp F, Meyer CU, et al. Safety, immunogenicity and immediate pain of intramuscular versus subcutaneous administration of a measles-mumps-rubella-varicella vaccine to children aged 11-21 months [J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(8): 925-933.
- [3] 陈玉秋, 张梦霏, 何建东, 等. 以白喉毒素无毒变异体蛋白

电纺壳聚糖与聚乙烯醇纤维膜的生物相容性研究

杨 静¹,王 永²,叶 川³,张俊标¹,杨 龙¹,孙 博¹,刘 琴¹,马敏先²

(1.贵阳医学院,贵州 贵阳 550004;

2.贵阳医学院附属口腔医院,贵州 贵阳 550004;

3.贵阳医学院附属医院骨科,贵州 贵阳 550004)

【摘要】 目的 制备壳聚糖与聚乙烯醇纤维膜并研究其体外的生物相容性,为应用于临床提供一定的理论依据。**方法** 利用静电纺丝技术制备壳聚糖与聚乙烯醇纤维膜,通过扫描电子显微镜对其超微结构进行表征,采用溶血实验和细胞毒性实验评价其体外生物相容性。**结果** 通过电纺制备的壳聚糖与聚乙烯醇纤维膜,质地均匀,伴有少量的珠状结构,纤维直径在60~300 nm之间,溶血实验显示溶血率为2.80%,无溶血作用,细胞毒性实验中,纤维膜的细胞增殖度为89.96%,细胞毒性为1级,评分合格,无细胞毒性。**结论** 通过静电纺丝法可成功制备壳聚糖与聚乙烯醇纤维膜,生物相容性较好,有望应用于口腔临床中。

【关键词】 静电纺丝;壳聚糖;聚乙烯醇;生物相容性

【中图分类号】 R318 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)12—1719—03

Study on the biocompatibility of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) fiber membrane. YANG Jing¹, WANG Yong², YE Chuan³, ZHANG Jun-biao¹, YANG Long¹, SUN Bo¹, LIU Qin¹, MA Min-xian². 1. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, CHINA; 2. Stomatological Hospital Affiliated to Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, CHINA; 3. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, CHINA

【Abstract】 Objective To prepare of chitosan/poly(vinyl alcohol) fiber membrane and to explore the biocompatibility *in vitro*, in order to provide certain theoretical basis for clinical application. **Methods** The chitosan/poly(vinyl alcohol) fiber membrane was prepared by electrospinning technique. Its ultrastructure was characterized by scanning electron microscope (SEM), and its *in vitro* biocompatibility was studied with hemolysis test and cytotoxicity test. **Results** The chitosan/poly (vinyl alcohol) fiber membrane prepared was found to have a good appearance and homogeneous fibers, with a little beads and the diameter of 60~300 nm in average. The hemolysis rate was 2.8%, which means no hemolysis. The cell relative growth rate of the fiber membrane was 89.86%, with the cytotoxicity of grade I, which indicated no cytotoxicity. **Conclusion** The chitosan/poly (vinyl alcohol) fiber membrane can be prepared by the electrospinning technique successfully, with good biocompatibility, which is expected to be applied in oral clinical practice.

【Key words】 Electrospinning; Chitosan; Poly(vinyl alcohol); Biocompatibility

壳聚糖常存在于虾、蟹的甲壳中,是甲壳素的一种衍生物,也是自然界仅有的带正电荷的天然多糖,其生物相容性好,可降解吸收,具有特别的生物学活性^[1],广泛应用于皮肤的敷料、止血材料、药物缓释和组织工程支架等领域^[2]。

聚乙烯醇是一种无毒、可降解、有生物亲和性的水溶性高分子,具有成膜性好、无刺激性等优点,是一

种很好的生物医用高分子材料,单纯的壳聚糖不能单独纺丝,但是与聚乙烯醇共混以后,可以通过分子间相互的作用,削弱氨基的作用,改善壳聚糖的纺丝性能,从而可以制备较好的纤维。

静电纺丝(以下叫电纺)技术是新发展的一项技术,其制作出的纤维,直径可以达到纳米的级别,具有较高的孔隙率,极大的比表面积,与天然的细胞外基

基金项目:贵州省科技厅联合基金(编号:M2012-22)
通讯作者:马敏先。E-mail:mahe2005919@hotmail.com

CRM197和破伤风类毒素为载体的Y群脑膜炎球菌多糖结合物对小鼠的免疫原性[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(4): 442-443.
[4] Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Moreno-Fierros L, et al. Oral immunogenicity of tomato-derived sDPT polypeptide containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* exotoxin epitopes [J]. Plant Cell Res, 2011, 30(3): 417-424.

[5] 杨 洁, 何梅英, 单芙蓉, 等. 无细胞和全细胞百日破疫苗接种不良反应观察[J]. 实用预防医学, 2011, 18(7): 1225-1227.
[6] Knuf M, Zepp F, Helm K, et al. Antibody persistence for 3 years following two doses of tetravalent measles-mumps-rubella-varicella vaccine in healthy children [J]. Eur J Pediatr, 2012, 171: 463-470.

(收稿日期:2014-12-18)