

建立 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液的鉴别方法

董洁¹ 王立萍² 秦登科¹ 张勇朝¹ 潘若文¹ (通讯作者)

1. 华兰生物疫苗股份有限公司, 河南 新乡 453000

2. 河南省药品医疗器械检验院, 河南 郑州 450018

摘要: 目的: 建立 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液中破伤风类毒素蛋白的鉴别方法, 并进行验证。方法: 通过裂解剂预处理供试品后, 采用双向免疫扩散法对 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液进行鉴别。结果: 该方法能呈现显著的免疫沉淀条带。结论: 本文建立的方法可有效准确鉴别 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液中破伤风类毒素蛋白, 同时为其他多糖-蛋白结合疫苗原液及成品的鉴别检查提供新的思路和参考。

关键词: b 型流感嗜血杆菌 (Hib); 结合疫苗; 鉴别; 裂解剂; 双向免疫扩散法

流感嗜血杆菌是革兰氏阴性菌, 主要分为包裹型和非包裹型, 其中最常见的是 b 型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae* serotype b, Hib)^[1]。Hib 主要通过呼吸道感染儿童和低免疫力的人, 是细菌性脑膜炎的主要致病因素, 同时也是 5 岁以下的儿童肺炎的重要病原体, 也是全球肺炎的主要原因^[2]。在英国引入 Hib 感染蛋白结合疫苗之前, 大多数侵袭性流感嗜血杆菌病例是由 Hib 引起的, 并影响幼儿的健康, 只有约 10% 的侵袭性 Hib 感染发生在成人中^[3]。

1998 年, WHO 建议将 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗纳入全球扩展免疫规划中。据统计目前每年约有 200, 000-700, 000 人因感染 Hib 死亡, 但全球覆盖未达到 100%^[4, 5]。研究表明接种疫苗后对 Hib 显性疾病的保护效果在 40%~100%, 对脑膜炎的保护效率为 89%~95%, 对肺炎的保护效果范围在 5%~95%^[6]。因此目前接种疫苗依然是控制流感嗜血杆菌的感染和流行的主要举措。

惠氏公司 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗是第一个获批上市的结合疫苗, 由 Hib 寡核苷酸和 CRM197 构成。有研究报告 3 个月-5 岁儿童对 Hib 普通多糖疫苗的免疫反应随年龄增长而增强^[7], 但 2 岁以下的幼儿接种后无法产生记忆性抗体, 从而无法长期保护机体。因此出现了多糖-载体蛋白结合疫苗, 可以使 2 月龄的婴儿以中度或高水平的保护性抗体激活 T 细胞依赖性免疫反应^[8], 减少接种疫苗者的 Hib 的携带, 从而阻断 Hib 的传播^[9]。华兰生物疫苗股份有限公司致力于研发 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗, 该疫苗为 b 型流感嗜血杆菌多糖和破伤风类毒素载体蛋白结合, 在按照《中国药典》2020 年版三部通则 3403^[10]免疫双扩散法进行鉴别试验时, 发现 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液 (以下简称原液) 与破伤风抗毒素国家标准品

无法形成明显的沉淀线。为了解决这一问题, 本文采用裂解剂处理原液, 结果表明在使用裂解剂处理后, 原液可与破伤风抗毒素国家标准品形成明显的沉淀线。本试验为其他多糖-蛋白结合疫苗原液及成品的鉴别检查提供新的思路和参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

综合药品稳定性试验箱 (重庆市永生仪器厂); 电子天平 (常熟市双杰测试仪器厂); PERFECTION V30 SE 扫描仪 (日本 EPSON 公司)。

1.2 试剂

b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液 (批号: EC202404006、EC202404008 和 EC202404009, 华兰生物疫苗股份有限公司); 破伤风抗毒素国家标准品 (批号: 260014-202223, 中国食品药品检定研究院); 破伤风抗原参考品 (自制, 批号: B202306004, 华兰生物疫苗股份有限公司); 健康兔血清 (自制, 批号: 2024071801, 华兰生物疫苗股份有限公司); 0.9% 氯化钠注射液 (批号: C1230333B2, 河南科伦药业有限公司); 无水乙醇、冰醋酸、考马斯亮蓝 R250、二乙醇胺、Triton X-100、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、琼脂糖均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 脱色液

量取无水乙醇 450mL, 冰醋酸 50mL, 水 500mL, 混匀即为脱色液。

2.1.2 考马斯亮蓝染色液

称取 1.5 g 考马斯亮蓝 R250, 溶解于 500mL 脱色液

中,混匀即为 0.3%考马斯亮蓝染色液。避光保存。

2.1.3 裂解剂

量取二乙醇胺 2.0mL 和水 8.0mL,混匀即得二乙醇胺溶液。量取 Triton X-100 1.0mL 和水 9.0mL,混匀即得 Triton X-100 溶液。称取氯化钠 8.850g、磷酸二氢钠 0.226g,磷酸氢二钠 1.698g,加适量水溶解,调 PH 值至 7.2,加水稀释至 1000mL,即为磷酸盐缓冲液。量取上述二乙醇胺溶液 1.25mL、Triton X-100 溶液 0.20mL 和磷酸盐缓冲液 8.55mL,混匀即为裂解剂。

2.1.4 健康兔血清

取 2.0~2.5kg 的健康新西兰兔一只,进行心脏采血并分离血清,将分离后的血清分装后,于-20℃保存备用。

2.1.5 供试品溶液

取 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液 100μL,加入 100μL 裂解剂,混匀,37℃静置 90 分钟进行裂解,即得供试品溶液。

2.1.6 标准品溶液

取 1 支破伤风抗毒素国家标准品,加 6mL 硼酸盐缓冲液溶解,即为破伤风类毒素国家标准品溶液。

2.2 鉴别试验

①铺板 将完全溶胀的 1.5%琼脂糖溶液倾倒入于水平载玻片上(每平方厘米加 0.19mL 琼脂糖),待凝固后,打方形矩阵梅花孔,孔直径 3mm,孔距 3mm。

②加样 载玻片上的中心孔加入破伤风类毒素国家标准品溶液(a孔),周边孔分别加入破伤风抗原参考品(b孔,阳性对照)、健康兔血清(d孔,阴性对照)、原液或供试品溶液(c孔或e孔),并做好标记(见图1和图2),每孔加样 20 μL。

③扩散 加样后将载玻片置水平湿盒中,37℃扩散 24h。从载玻片上取下琼脂糖凝胶,浸泡于 0.9%氯化钠注射液中 12~18h,除去未结合蛋白。

④干燥、染色及脱色 将扩散完毕的琼脂糖凝胶用滤纸吸取大量水分后,置综合药品稳定性试验箱中于 50℃干燥 60min,干燥后用考马斯亮蓝染色液染色 3min,用脱色液反复脱色至背景近无色,沉淀线呈清晰蓝色。采用扫描仪扫描保存图谱。

2.3 结果

未采用裂解剂处理的供试品鉴别试验结果见图 1。由图 1 可知,破伤风类毒素国家标准品溶液(a孔)与破伤风抗原参考品溶液(b孔,阳性对照)形成明显的沉淀线,且破伤风类毒素国家标准品溶液(a孔)与健康兔血清(d

孔,阴性对照)未形成明显的沉淀线,表明试验成立。但未经裂解剂处理的供试品溶液(即原液)(图 1A 中 c 孔:批号 EC202404006;图 1A 中 e 孔:批号 EC202404008;图 1B 中 c 孔:批号 EC202404009)并未与破伤风类毒素国家标准品溶液(a孔)形成沉淀线。

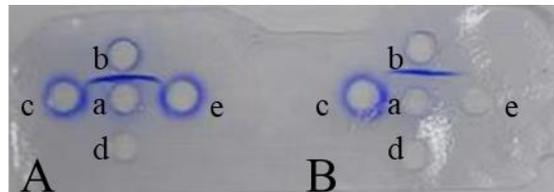


图 1 未采用裂解剂处理的原液鉴别试验图谱

经过裂解剂处理的供试品鉴别试验结果见图 2。由图 2 可知,经裂解剂处理的供试品溶液(图 1A 中 c 孔:批号 EC202404006;图 1A 中 e 孔:批号 EC202404008;图 1B 中 c 孔:批号 EC202404009)与破伤风类毒素国家标准品溶液(a孔)形成明显的沉淀线。试验结果表明,裂解剂处理后可以使 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液与破伤风类毒素国家标准品发生特异性反应,形成沉淀线,可鉴别 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液中的破伤风毒素。

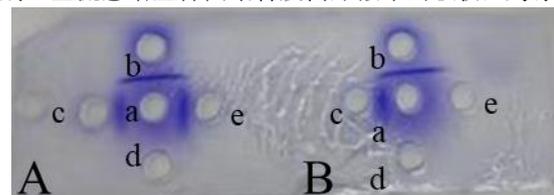


图 2 采用裂解剂处理的原液鉴别试验图谱

3 讨论

Hib 曾是细菌性脑膜炎最常见的病因,其主要致病因子是多聚核糖核糖醇磷酸酯(polyribosyl ribitol phosphate, PRP)^[11,12]。Hib 多糖结合疫苗用于预防由 b 型流感嗜血杆菌感染引起的疾病(如脑膜炎、肺炎、败血症等),在 WHO 的推荐下已被多个国家纳入免疫接种规划^[13]。在中国,虽有许多厂家生产并上市 Hib 疫苗,但尚未被纳入国家免疫规划^[14]。随着人民生活水平的提高,药品监督管理部门批准的非免疫规划疫苗的需求也随之增加。因此提升疫苗的质量,改善疫苗的检验方法是刻不容缓的。

鉴别试验是《中国药典》2020 年版三部中 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗各论下原液和成品都需进行的检验项目^[10]。姚等人^[15]对 ACYW135 群脑膜炎球菌结合疫苗进行鉴别,按照《中国药典》2020 年版三部中免疫双向扩散法进行检验,抗原与抗血清可形成明显的沉淀线;方等人^[16]对 11 批上市 Hib 结合疫苗进行稳定性考察试验,在不同的有效期点进行各项检测,结果表明抗原均能与抗血清

形成明显的沉淀线。但实际上由于各企业结合疫苗不同的生产工艺等因素,采用免疫双向扩散法进行部分品种结合疫苗的鉴别检查时,抗原与抗血清未能形成明显的沉淀线。本文通过对华兰生物疫苗股份有限公司生产的 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液在裂解剂处理前后进行鉴别试验,发现经过裂解剂处理后的 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液可与破伤风抗毒素国家标准品形成明显的沉淀线,符合《中国药典》2020 年版三部中该品种的标准要求。裂解剂处理后未改变 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液的免疫原性,仅将载体蛋白与多糖分离。

综上所述,使用裂解剂处理 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液可通过鉴别试验,证明 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液具有免疫原性。本文为优化结合疫苗的鉴别试验方法提供了理论依据和技术参考。

参考文献:

- [1]Wen S, Feng D, Chen D, *et al.* Molecular epidemiology and evolution of Haemophilus influenzae [J]. Infect Genet Evol,2020,80:104205.
- [2]Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, *et al.* Decline of Childhood Haemophilus influenzae Type b (Hib) Disease in the Hib Vaccine Era [J].JAMA,1993,269:221.
- [3]Anderson EC, Begg NT, Crawshaw SC, *et al.* Epidemiology of invasive Haemophilus influenzae infections in England and Wales in the pre-vaccination era (1990–2) [J].Epidemiol Infect,1995,115:89.
- [4]Slack MPE, Cripps AW, Grimwood K, *et al.* Invasive Haemophilus influenzae Infections after 3 Decades of Hib Protein Conjugate Vaccine Use [J].Clin Microbiol Rev,2021,34:0002821.
- [5]Santosham M, Wolff M, Reid R, *et al.* The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of Haemophilus influenzae type b polysaccharide and Neisseria meningitidis outer-membrane protein complex [J].NEJM, 1991,324:1767.
- [6]Chongmelaxme B, Hammanee M, Phooaphirak W, *et al.* Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review [J].JME,2017,20:1094.
- [7]Peltola H, Käyhty H, Virtanen M, *et al.* Prevention of Hemophilus influenzae type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine[J].NEJM,1984,310:1561.
- [8]Anderson P, Pichichero ME, Insel RA. Immunization of 2-month-old infants with protein-coupled oligosaccharides derived from the capsule of Haemophilus influenzae type b [J].J Pediatr,1985,107: 346.
- [9]Barbour mL, Booy R, Crook DW, *et al.*Haemophilus influenzae type b carriage and immunity four years after receiving the Haemophilus influenzae oligosaccharide-CRM197 (HbOC) conjugate vaccine [J].The Pediatric infectious disease journal.1993,12:478.
- [10]中国药典 2020 年版.三部[S].2020: 95.
- [11]Mäkelä PH, Takala AK, Peltola H, *et al.* Epidemiology of invasive Haemophilus influenzae type b disease [J]. JID,1992,165 Suppl1:2.
- [12]Wilfert CM. Epidemiology of Haemophilus influenzae type b infections [J].PEDIATRICS,1990,85:631.
- [13]WHO. Essential Programme on Immunization. WHO[EB/OL].<https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/essential-programme-on-immunization>. Access Date:2024.11.07
- [14]随海田,赵若颖,郭昱,等.中国 4 款未纳入国家免疫规划疫苗针对疾病负担及应用情况分析[J].中国病毒病杂志.2024,14:293.
- [15]姚永鹏,张子昌,许可,等.新型 ACYW135 群脑膜炎球菌-白喉毒素无毒变异体结合疫苗的制备及其免疫原性评价[J].中国生物制品学杂志.2024,37:795.
- [16]方国良,马波,杨丽,等.b 型流感嗜血杆菌结合疫苗的稳定评价[J].中国生物制品学杂志.2015,28:1008.

作者简介:董洁(1979—),女,汉族,河南省新乡市,本科,华兰生物疫苗股份有限公司,工程师,研究方向:疫苗质量研究和质量控制。王立萍,主任药师,研究方向:化学药品和生物制品质量分析与控制。通讯作者:潘若文,高级工程师,研究方向:疫苗研发、生产、质量研究和控制。