



论文

EV71 灭活疫苗(人二倍体细胞)在恒河猴婴猴模型中的免疫保护性分析

李龙[†], 刘尚允[†], 董承红, 赵红玲, 王晶晶, 张莹, 纳锐雄, 谢忠平, 崔萍芳, 王丽春, 廖芸, 唐东红, 高家红, 刘龙丁*, 李琦涵*

中国医学科学院&北京协和医学院, 医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: longdingl@gmail.com; imbcams.lq@gmail.com

收稿日期: 2011-03-06; 接受日期: 2011-05-10

国家科技重大专项课题(批准号: 2008ZX10004-014)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB504903)资助项目

摘要 肠道病毒 71 型作为引起儿童群体常见传染性手足口病(HFMD)的主要病原, 具有导致少量感染个体出现脑炎等神经系统病变以及相关心肺功能衰竭的病理学特性. 因此其预防性疫苗的研发具有重要的公共卫生意义. 在前期工作的基础上, 一种 EV71 灭活病毒疫苗(人二倍体细胞)在本研究中基于恒河猴婴猴模型进行了相应的免疫保护性分析. 以 160 EU 剂量对 2~3 月龄婴猴进行 0, 4 周免疫后, 动物在第 4 周接受了剂量为 $10^{4.5}$ CCID₅₀ 的病毒经呼吸道的攻击. 对病毒攻击后动物在 14 天内的临床症状、血液生物学、器官病原学分布以及病理学检测的动态观察表明, 经疫苗免疫的动物未出现对照动物所具有的特征性临床表现, 其血液生物学及病理学检测均无异常. 同时, 器官病原学分布亦呈阴性. 结合动物中和抗体的明确增长及对照动物的综合表现分析, 本文的工作证实了该 EV71 灭活病毒疫苗(人二倍体细胞)在恒河猴婴猴体内的免疫保护性.

关键词

肠道病毒 71 型
(Enterovirus 71, EV71)
灭活疫苗
免疫原性
恒河猴婴猴

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)是引起我国多个地区手足口病暴发流行的主要病原体^[1], 其感染低龄儿童后出现严重神经系统及心肺功能衰竭等综合症并引起较高的死亡率的临床特点^[2,3], 愈来愈引起了公共卫生领域的重视^[4], 同时也使 EV71 疫苗的研制更为迫切. 到目前为止, 针对 EV71 疫苗还没有系统全面的评价指标, 因此探讨其在动物体内诱导的免疫反应(包括体液免疫和细胞免疫反应)是否

具有安全性和免疫保护性已成 EV71 疫苗研究亟待探讨的问题. 值得注意的是, 当前研究 EV71 感染的动物模型主要为小鼠或乳鼠^[5,6], 虽然在一定程度上为疫苗的免疫保护性评价提供相应的证据, 但该模型采用非自然途径感染, 无法全面反映感染和免疫中的病理学与病原学特征, 难于满足全面评价疫苗的安全性和有效性要求, 因此, 在更接近于人类的灵长类动物模型中进行疫苗评价则显得尤为重要.

猕猴生物学的研究提示我们,其生长发育过程与人类有较大的相似性,特别是其在幼年时期的生理特点与人类儿童期尤为相似。我们在前期进行 EV71 灭活疫苗开发的工作中,较系统地探索了 EV71 病毒在猴机体中的感染特征,观察到其手足口部疱疹表现和发热等类似于人类儿童 EV71 感染的手足口病临床表现^[7];对猴进行感染后的病原学分析时,可以观察到典型的病毒血症和各器官内的特征性病毒分布和排毒^[7];再者,对猴进行的感染后病理学观察,可以明确看到病毒所引起的中枢神经系统的组织病理损伤等^[7]。这些接近人类机体感染 EV71 病理过程的初步资料为利用恒河猴(*Macaca mulatta*)猴作为 EV71 感染动物模型进行疫苗有效性和安全性评价提供了更为有意义的依据。在这一动物模型的工作基础上,我们利用 2~3 月龄猴对医学生物学研究所开发的 EV71 灭活病毒疫苗(人二倍体细胞)进行了系统的免疫保护性评价,同时对该疫苗是否具有引起免疫病理效应的可能性亦做出了相应的评估。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

Vero 细胞(来自 WHO,经检定可用于疫苗生产),于含有 5%小牛血清的 DMEM 营养液中 37℃ 培养。人胚肺成纤维细胞 KMB17 株(来自医学生物学研究所,经检定可用于疫苗生产),于含有 8%小牛血清的 DMEM 营养液中 37℃ 培养。病毒 EV71 来源于 2008 年安徽省阜阳市一名重症手足口病患者^[8],经分离并接种于 Vero 细胞增殖后进一步完成了毒种的培养制备及相关检验,毒种命名为 FY-23 株。

1.2 EV71 灭活疫苗(人二倍体细胞)制备

FY-23 株经克隆筛选并适应于人二倍体细胞 KMB-17 后,制备 EV71 灭活疫苗毒种 FY-23K-B(毒种检验号 200900929)。以 KMB-17 为细胞基质制备的 EV71 灭活病毒疫苗(160 EU/0.5 mL),含有 Al(OH)₃ 作为免疫佐剂,经中国医学科学院医学生物学研究所检定室按规程规定指标检定合格,疫苗批号为 20090903。

1.3 实验动物

选取出生 2~3 月龄恒河猴猴共 10 只,静脉取

血检测其抗 EV71 抗体。设疫苗免疫组 4 只,未免疫组 4 只及对照组 2 只。所有实验动物的使用均根据“云南省实验动物管理委员会”相关规定,经本所动物伦理委员会批准^[9]。

1.4 疫苗免疫

后腿肌肉注射 EV71 灭活疫苗,剂量 160 EU/0.5 mL/只,免疫程序为 0, 4 周,二次免疫后一个月,取血检测抗 EV71 抗体中和效价。

1.5 病毒攻击

经 EV71 灭活疫苗免疫后的猴 4 只以及未免疫猴 4 只,于第二次免疫后 4 周经鼻腔喷雾接种 EV71 病毒(FY-23 株,生长于 Vero 细胞第 3 代),剂量为 10^{4.5}CCID₅₀/只,次日开始观察动物的体温及口足无疱疹病变情况。每日静脉取血 0.5 mL, EDTA 抗凝,用于病毒载量分析,血常规检测。同时收集粪便与口咽拭子用于病毒载量分析。分别于感染后第 4, 7, 10, 14 天分别处死疫苗免疫感染组及感染对照组各一只,并取所有相应器官进行病毒载量及组织病理学分析。

1.6 中和抗体效价检测

疫苗组在第一次免疫后连续采血 4 周,在二次免疫后连续采血 4 周,留血清备用;病毒攻击后疫苗组、免疫组均连续采血 2 周,留血清备用。血清抗体检测按照标准操作进行^[10]。

1.7 Realtime PCR 检测病毒载量

血液总 RNA 提取按 TIANGEN 公司 TRNzol-A+ 全血总 RNA 提取说明操作。攻毒后第 4, 7, 10, 14 天各脏器(包括大脑、小脑、延脑、中脑、脊髓颈椎段、胸椎段、腰椎段、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胰腺、淋巴结等组织器官)取 1 g 组织用研磨棒匀浆后加入 20 mL TRNzol-A+按 TIANGEN 公司 TRNzol-A+ 组织总 RNA 提取说明操作。

定量 PCR 反应体系及反应条件按 TaKaRa 公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒说明书操作。利用 EV71 FY23 株(GenBank 登录号: EU812515)基因序列 VP1 保守区设计引物及探针。

Vp1f(2371-2390): 5'-Agcccaaaagaacttcta-3'

Vp1r(2531-2541): 5'-atccagtcgatggctgctca-3'

Probe(2411-2438): 5'-FAM-*agtgatctctgcagacgggc-accatcc-TAMRA-3'*.

同时系列稀释 EV71 核酸标准品至 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 拷贝/ μL 加入同一反应板中进行 PCR 反应.

1.8 病理学检查

在攻毒后第 4, 7, 10, 14 天, 用电击将猴处死, 分别采取大脑、小脑、延脑、中脑、脊髓颈椎段、胸椎段、腰椎段、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胰腺、淋巴结等组织器官经固定、脱水、包埋、切片、HE 染色后, 利用光学显微镜观察结果.

1.9 免疫组织化学检查

取不同时间点的大脑、小脑、延脑、中脑、脊髓颈椎段、胸椎段、腰椎段、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾、胰腺、淋巴结等组织器官的石蜡切片, 经脱蜡、水化、抗原修复、一抗、二抗结合、显色后, 利用光学显微镜观察结果.

1.10 统计学分析

实验中所有数据均采用 PRISM4.0 进行分析, 显著性差异采用 *t*-test 测算. $P < 0.05$ 具有显著性差异.

2 结果

2.1 EV71 灭活疫苗诱导猴产生免疫反应分析

在二次免疫后不同时间点及病毒攻击后所收集的动物血样进行的中和抗体分析中, 我们观察到免疫的恒河猴表现了较高的抗体水平. 在第二次免疫后第 4 周中和抗体达到了 1:128, 经活病毒攻击后在病毒攻击后的一周内, 该抗体水平得到迅速增长, 至二周时, 已达到 1:512 (图 1), 而感染对照组在病毒攻击后其中和抗体水平仅在 1:4, 至二周时, 上升至 1:8 (图 1), 这一结果提示, EV71 疫苗免疫对于猴具有中和抗体诱导能力, 在遭到病毒攻击时, 可以在 7 天内使血中的中和抗体水平迅速出现 4 倍增长, 从而能够形成有效的抗病毒免疫屏障.

2.2 免疫及攻击后的动物临床表现分析

针对经 EV71 灭活病毒疫苗(人二倍体细胞)免疫的恒河猴在 EV71 病毒攻击后次日日至第 14 天全程进行的动物临床表现观察, 包括了临床体征, 临床

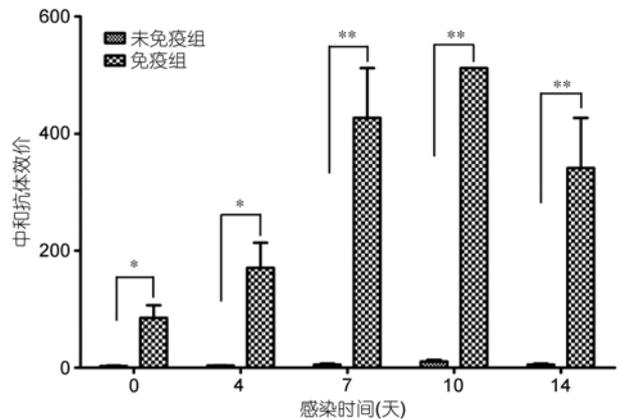


图 1 EV71 灭活疫苗所诱导的中和抗体反应

选取 4 只恒河猴, 后腿肌肉注射 EV71 灭活疫苗, 剂量为 160 EU/0.5 mL/只, 免疫程序为 0, 4 周, 同时设立 4 只恒河猴为未免疫对照组. 免疫组及未免疫组猴, 于二免后 4 周, 经鼻腔喷雾接种 EV71 病毒(FY-23 株), 剂量为 $10^{4.5}$ CCID₅₀/只. EV71 攻击后第 0, 4, 7, 10, 14 天, 收集猴血样进行中和抗体检测. *示 $P < 0.05$; **示 $P < 0.01$.

病理表现和血液学的基本指标. 在感染对照组中, 4 只猴均在感染病毒(鼻腔喷雾途径)后的 3~8 天内出现了程度不同的手足口部疱疹并在持续 3~4 天后恢复. 而疫苗免疫后的病毒感染动物均未表现任何手足口部的疱疹(图 2(A)). 同时, 感染对照组所有动物在感染后的第 4~7 天左右的体温相应的上升(图 2(B)), 而疫苗免疫组的所有动物, 在感染后的 14 天时间内, 与阴性对照一致, 体温监测均未发现任何异常(图 2(B)). 对外周血样的血常规检测表明疫苗免疫组和感染对照组在观察的 14 天期间内, 均未见明显的差异, 包括中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞, 以及嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞均无明显的变化. 但较正常动物而言, 无论是感染对照组动物还是疫苗免疫后感染动物, 淋巴细胞均在比例上有所上升(图 2(C)).

2.3 EV71 病毒攻击后猴体内病毒分布及排毒情况

在针对疫苗免疫动物和感染对照组所有动物在攻毒后临床观察的 14 天内所采取血样的病毒载量检测中, 在感染对照组动物均在感染后第 4~5 至 7~8 天的期间内, 出现病毒血症(图 3). 在疫苗免疫动物中, 均不存在未免疫动物感染后可以见到的病毒血症.

对 EV71 灭活疫苗免疫后的猴进行的淋巴系统病毒载量分析, 与未免疫的感染对照组比较可见, 疫

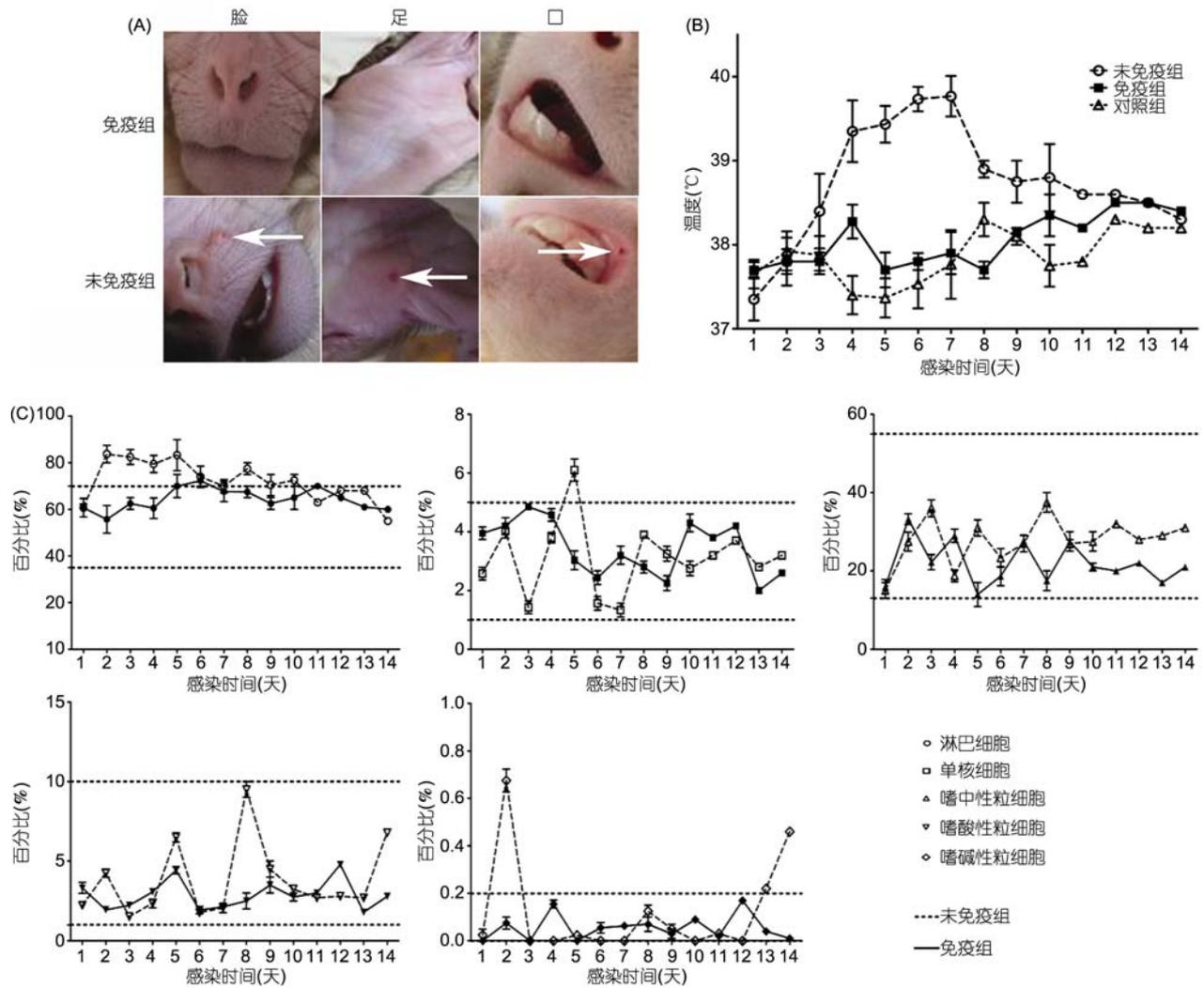


图 2 EV71 灭活疫苗免疫后攻击婴猴临床观察

(A)EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后,免疫组及未免疫组婴猴产生手足口病典型疱疹状损伤情况。(B)EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后,免疫组及未免疫组婴猴体温变化情况。攻毒后,每日上午、下午测量婴猴肛温各1次。(C)EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后,免疫组及未免疫组婴猴血常规检测情况。攻毒后,每日收集婴猴血样进行检测,检测项目包括淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的比。图中虚线区间表示正常细胞比例范围(由两只对照婴猴血样检测结果统计得出)

苗免疫动物在4个时间点上,均未见到各淋巴结显现可信限范围以上的病毒RNA阳性结果(图4(A)).而感染对照组则在感染后的第7天可见到:腋下淋巴结和腹股沟淋巴结数量值高达 $10^4 \sim 10^5$ 拷贝/100mg的病毒载量(图4(A)).在针对各主要器官的病毒载量分析表明,感染对照组在感染后第7天均可见到部分脏器内病毒载量的升高,其中,脾脏和气管的载量可达 10^{3-4} 拷贝/100mg(图4(B)).同样,在各腺体的病毒检测中,与未免疫的感染对照组相比较,疫苗免疫动物

均未见其腺体中的EV71病毒RNA阳性(图4(C)),而感染对照组感染后的第7天出现了 10^3 拷贝/100mg的载量升高(图4(C)).

EV71感染对神经系统的影响是形成手足口病重症病人的主要原因,根据我们前期的实验,对疫苗免疫后动物的神经系统的不同部位进行了病毒载量的检测,其结果表明,疫苗免疫动物神经系统的各个部分均未表现出超过可信限的病毒RNA检出阳性结果(图4(D)),而感染对照组动物则在第10天各部

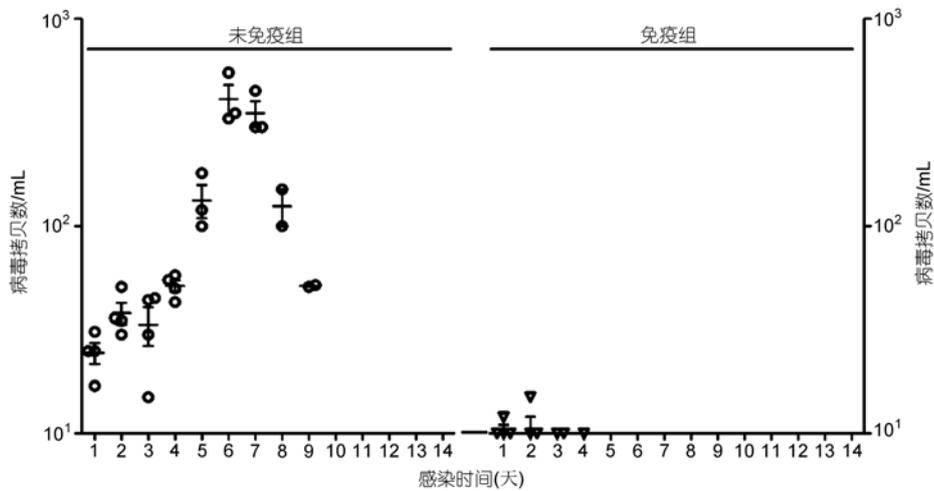


图3 疫苗保护性实验病毒血症比较分析

EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后, 每日收集婴猴血样进行检测. 使用 TRNzol-A+试剂提取全血总 RNA, 利用 EV71 FY-23 株基因序列 VP1 保守区设计的引物及探针, 进行实时定量 PCR 反应. 同时系列稀释 EV71 核酸标准品进行实时定量 PCR 反应, 绘制标准曲线, 计算病毒拷贝数

位均出现明显的阳性峰值. 其中, 延脑和桥脑的载量数值达 10^3 拷贝/100 mg(图 4(D)).

对疫苗免疫组和感染对照组在病毒攻击后的 14 天观察期内, 均对其口咽分泌物和粪便中病毒的载量进行了实时监测, 其结果表明, 疫苗免疫动物的咽拭子和粪便检测没有病毒 RNA 的检出(图 5), 而感染对照组的动物在感染后第 5~10 天期间, 可以检出数量不等的病毒 RNA 分子, 最高的病毒载量可达 10^4 拷贝/mL.

2.4 病毒攻击婴猴的主要组织病理学变化

我们在本次工作中, 首先观察了疫苗免疫动物在病毒攻击后各器官是否存在相关的病理学变化. 同时, 结合免疫组织化学的结果, 进一步检查了各器官是否存在因免疫病理而导致的损伤. 针对各淋巴结的病理观察表明, 疫苗免疫动物在感染后的各个时间点上, 其淋巴结均未见明显病理改变, 仅有个别生发中心扩大(图 6), 而感染对照组的所有动物亦未见明显病理学改变, 但均表现淋巴结生发中心的扩大(图 6). 所有脏器病理学检查结果表明, 疫苗免疫动物在病毒攻击感染后的 4 个时间点处, 均未发现主要脏器的明显病理组织学的改变, 仅在肺部及支气管见到极个别的炎细胞浸润点. 相较而言, 感染对照组动物亦仅是肺部的轻度炎症病理表现, 但其病变程度和波及范围稍重于疫苗免疫组. 同时, 对其他

脏器的检查亦提示, 在疫苗免疫动物和感染对照组中, 均未见特征性的病理学改变(图 6).

2.4 病毒攻击婴猴后中枢神经系统病理学分析

直接攻毒的婴猴第四天中枢神经系统出现了脑膜炎、脑炎、脑和脊髓均有少量的神经细胞退行性变性; 心脏、肝脏、肺有病理改变. 脾脏、淋巴结有免疫反应. 第 7 天出现了脑膜炎、较重的脑炎、脊髓灰质炎, 脑和脊髓均有少量神经细胞退行性变性; 心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、口腔黏膜有炎变. 第 10 天中枢神经系统仍然有较重的脑炎、脊髓灰质炎和少量的神经细胞退行性改变(图 7). 与直接攻毒的婴猴比较, EV71 灭活疫苗免疫后的四只婴猴内脏未见明显的病理改变. 可以看出, 经免疫后的婴猴具有保护效应.

3 讨论

EV71 灭活疫苗的研制过程中, 通过建立敏感有效的动物模型并用之于评价疫苗的安全性和有效性是该疫苗研发的关键点. 尽管乳鼠感染模型在一定程度上为疫苗的免疫保护性评价提供相应的证据^[5,6], 但这种啮齿类动物还未能提供令人信服的、可作为用于人体免疫评价研究的数据, 因此利用其进行疫苗保护性的全面评价尚显欠缺. 以往的报道和前期

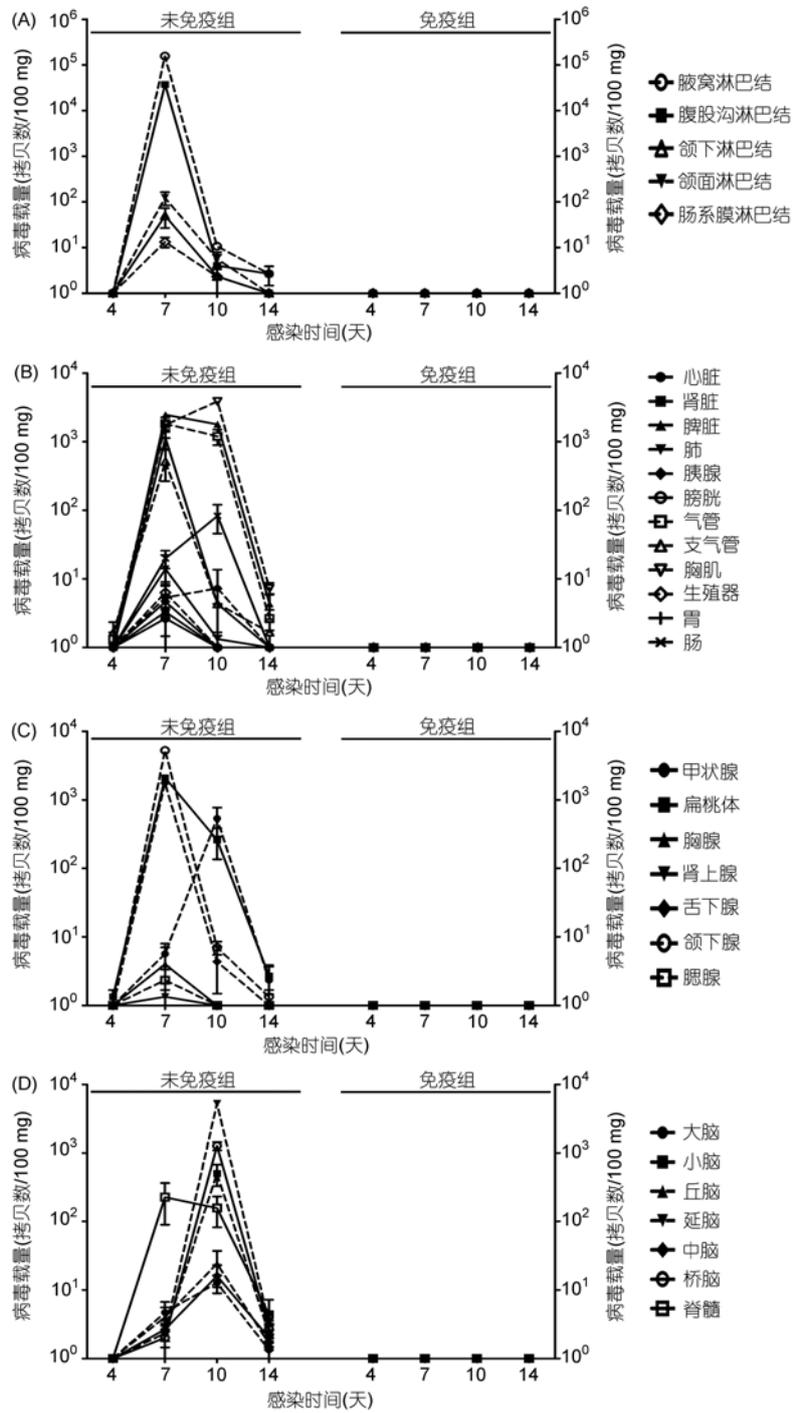


图4 婴猴保护性实验各器官病毒载量检测

(A) 免疫组和未免疫组婴猴淋巴系统中的病毒载量; (B) 免疫组和未免疫组婴猴主要组织器官中的病毒载量; (C) 免疫组和未免疫组婴猴腺体中的病毒载量; (D) 免疫组和未免疫组婴猴神经系统中的病毒载量. 免疫组和对照组婴猴经 EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后, 分别于第 4, 7, 10, 14 日处死, 取所有相应器官进行病毒载量检测. 取 1 g 组织用研磨棒匀浆后加入 20 mL TRNzol-A+试剂提取组织总 RNA, 利用 EV71 FY-23 株基因序列 VP1 保守区设计的引物及探针, 进行实时定量 PCR 反应. 同时系列稀释 EV71 核酸标准品进行实时定量 PCR 反应, 绘制标准曲线, 计算病毒拷贝数

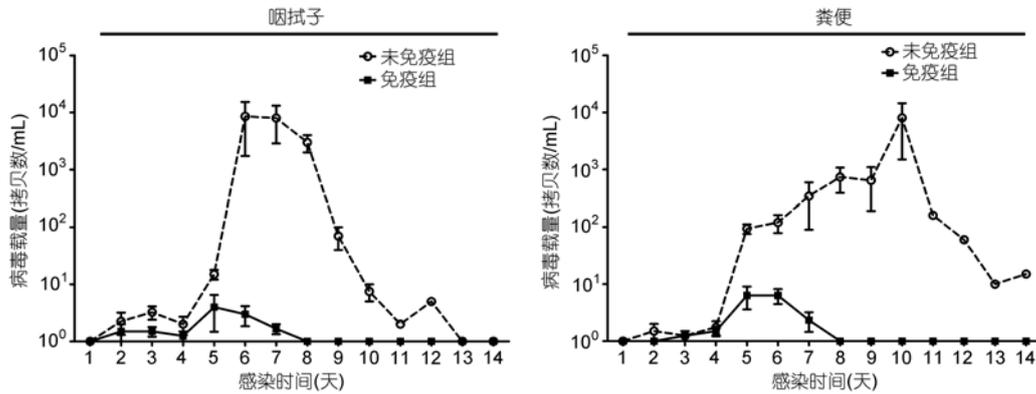


图5 婴猴保护性实验 EV71 排毒检测

EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后, 每日收集婴猴的咽拭子及粪便进行病毒载量检测. 使用 TRNzol-A+试剂提取咽拭子和粪便中总 RNA, 利用 EV71 FY-23 株基因序列 VP1 保守区设计的引物及探针, 进行实时定量 PCR 反应. 同时系列稀释 EV71 核酸标准品进行实时定量 PCR 反应, 绘制标准曲线, 计算病毒拷贝数

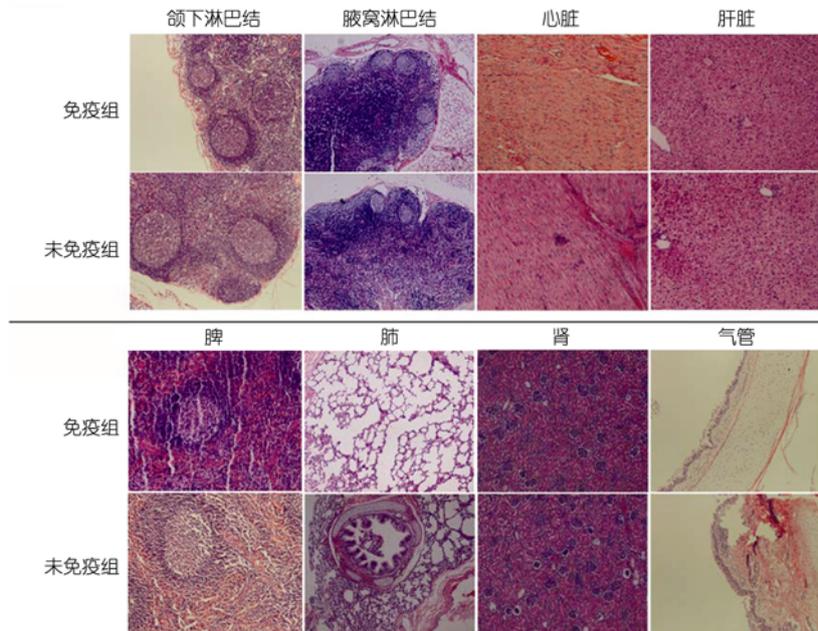


图6 病毒攻击后的婴猴各器官病理学检查

免疫组和未免疫组婴猴经 EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后, 分别于第4, 7, 10, 14日处死, 取淋巴系统和主要器官进行组织病理切片分析. 组织器官经固定、脱水、石蜡包埋、切片(4- μ m)并经 HE 染色, 在光学显微镜下观察并拍照. 图像放大倍数分别为: 颌下淋巴结($\times 200$), 腋窝淋巴结($\times 100$), 心($\times 200$), 肝($\times 100$), 脾($\times 200$), 肺($\times 200$), 肾($\times 100$)和气管($\times 100$)

有关 EV71 感染生物学的研究在大量实验工作提示我们, 采用更接近于人类的非人灵长类动物进行免疫学分析及保护性实验, 能够为这类疫苗最终在人体的应用提供较为可靠的依据, 尤其是在利用恒河猴成年猴及婴猴进行 EV71 感染机理的研究中^[7,11], 在 EV71 以 $10^{4.5}$ CCID₅₀ 的剂量感染鼻腔后, 可在中枢神经系统、

淋巴系统、肺、心等器官中检出病毒, 并伴随相应的病理组织等改变, 并可观察到典型的病毒血症表现. 这些结果为利用恒河猴婴猴作为 EV71 感染动物模型进行疫苗有效性评价的可能性提供了明确的病原学及病理学的证据, 使婴猴期恒河猴用于 EV71 灭活病毒疫苗的免疫保护性评价成为可能. 同时, 更重要的

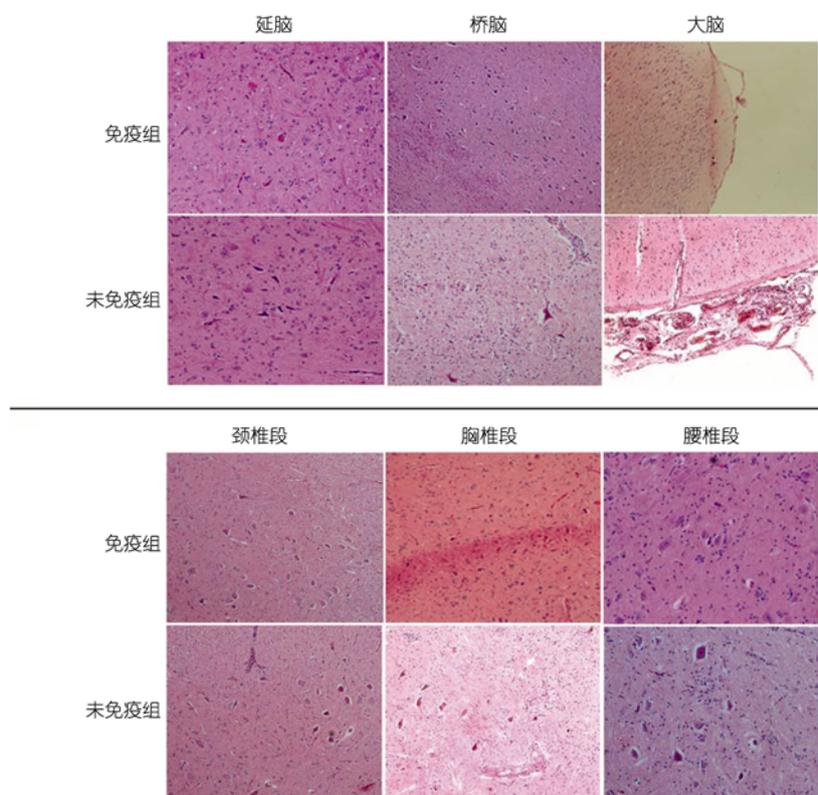


图7 病毒攻击后的婴猴 CNS 病理学检查

免疫组和未免疫组婴猴经EV71($10^{4.5}$ CCID₅₀/只)攻击后,分别于第4,7,10,14日处死,取中枢神经系统组织进行组织病理分析.组织器官经固定、脱水、石蜡包埋、切片(4- μ m)并经HE染色,在光学显微镜下观察并拍照.图像放大倍数分别为:延脑($\times 200$),桥脑($\times 200$),大脑($\times 100$),脊髓颈椎段($\times 100$),胸椎段($\times 100$)和腰椎段($\times 200$)

是,我们对这一免疫反应所可能产生的免疫病理损伤进行了细致的分析.

我们前期对EV71灭活疫苗(人二倍体细胞)的免疫学分析已表明,疫苗的两次免疫后可以诱导动物产生一定水平的中和抗体,在病毒攻击后,其抗体水平可以表现出远高于4倍的增长.在本实验中,我们的工作继续在对疫苗免疫后婴猴的免疫反应,主要是中和抗体反应检测的基础上,进一步分析了病毒攻击后婴猴抗体水平的增长情况.EV71疫苗免疫对于婴猴具有中和抗体诱导能力,在遭到病毒攻击时,可以在7天内使血中的中和抗体水平迅速出现4倍增长,从而能够形成有效的抗病毒免疫屏障,免疫组动物未出现感染后的体温改变,而未免疫动物在呼吸道感染EV71后,可出现典型的体温升高表现和淋巴细胞的增多.

在病毒感染后的体内分布分析结果中,EV71疫

苗在其对恒河猴婴猴的两次免疫后,可以产生有效的免疫保护性,从而使得EV71病毒的感染不能够在动物体内出现有效的增殖而引起相应的感染过程,而未免疫动物则可表现明显的病毒在淋巴系统,及其他脏器完成第一次增殖并引起相应的病毒血症(感染后第5~8天)的过程,并随后引起靶器官神经系统的继发感染.这一过程和我们前期在成年恒河猴及幼猴中的观察是基本一致的^[7,11].

另一方面,本实验利用恒河猴婴猴进行的免疫保护的病理学分析.在前期的研究工作中,我们的病理学观察表明,EV71病毒感染恒河猴成年及幼年猴过程中,尤其是呼吸道感染途径,可引起轻度的支气管及肺部的炎症病理改变^[7,11],但在其他脏器中未见到明显的具有特征性的病理改变.基于这些工作基础,我们在本次实验中对疫苗免疫组的婴猴所有脏器做了全面的病理学检查,尤其注意是否存在疫苗免疫动物在

病毒攻击后所出现的免疫病理损伤, 观察结果表明, 疫苗免疫动物在病毒攻击感染后的 4 个时间点处, 均未发现主要脏器的明显病理组织学的改变, 仅在肺部及支气管见到极个别的炎细胞浸润点. 这些极少量的炎细胞浸润点的病理学现象经多重分析后, 可以认为其是非特异的病理现象. 同时, 在神经系统、淋巴系统和主要腺体中均未见到特征性的病理改变, 与疫苗免

疫和随后的病毒攻击无明显关系. 为了进一步证实这一结论, 我们的实验还从免疫组化方面对此结果加以验证(资料未表明). 这些资料明确肯定了 EV71 灭活病毒疫苗(人二倍体细胞)的安全性. 综合分析可以确认, 在疫苗免疫婴猴后所形成的免疫保护效应, 是可以完全抑制病毒在动物体内的增殖, 并最终可以完全保护机体免受病毒感染所引起的病理损害.

参考文献

- 1 Ooi M H, Solomon T, Podin Y, et al. Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 1858–1866
- 2 Ho M, Chen E R, Hsu K H, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*, 1999, 341: 929–935
- 3 Prager P, Nolan M, Andrews I P, et al. Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors. *Pediatr Crit Care Med*, 2003, 4: 377–381
- 4 McMinn P C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26: 91–107
- 5 Wang Y F, Chou C T, Lei H Y, et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. *J Virol*, 2004, 78: 7916–7924
- 6 Ong K C, Badmanathan M, Devi S, et al. Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67: 532–542
- 7 Liu L, Zhao H, Zhang Y, et al. Neonatal rhesus monkey is a potential animal model for studying pathogenesis of EV71 infection. *Virology*, 2011, 412: 91–100
- 8 Ma S-h, Liu J-s, Wang J-j, et al. Genetic Analysis of the VP1 Region of Human Enterovirus 71 Strains Isolated in Fuyang, China, During 2008. *Virologica Sinica*, 2009, 24: 162–170
- 9 Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit*, 2000, 6: 171–180
- 10 WHO. 1988. Procedure for Using the Lyophilized LBM Pools for Typing Enterovirus, Geneva
- 11 Zhang Y, Cui W, Liu L, et al. Pathogenesis study of Enterovirus 71 Infection in Rhesus Monkeys. *Lab Invest*, 2011, doi: 10.1038/labinvest.2011.82

Immunoprotection of Inactivated EV71 Vaccine Against Enterovirus in Neonatal Rhesus Monkey

LI Long, LIU Shangyun, DONG Chenghong, ZHAO Hongling, WANG Jingjing, ZHANG Ying, NA Ruixiong, XIE Zhongping, CUI Pingfang, WANG Lichun, LIAO Yun, TANG Donghong, GAO Jiahong, LIU Longding & LI Qihan

Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China

Present study was conducted to evaluate the immunogenicity of one formalin-inactivated EV71 vaccine in neonatal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Groups of four monkeys were immunized with either EV71 vaccine or mock by intra-muscular (IM, using needle) routes. Following primary immunization with 160EU vaccine given IM, the monkeys were boosted after 1 month with 160EU vaccine given IM. After the booster, most of the monkeys sero-converted and developed EV71 neutralizing antibodies. Importantly however, following a sham challenge with the live virus strain FY23 given 4 weeks after immunization, the neutralizing antibody titers rose rapidly indicating a vigorous anamnestic response. Based on the neutralizing antibody response following the vaccination and the extent of anamnestic response generated in the immunized monkeys, vaccination group was superior to mock group. This study indicates that the EV71 candidate vaccine is capable of generating protective levels of EV71 neutralizing antibodies in neonatal rhesus monkeys and primes the immune system effectively against a subsequent exposure to EV71.

enterovirus 71, inactivated vaccine, immunogenicity, neonatal rhesus monkey

doi: 10.1360/052011-114