

不同剂量甲型肝炎减毒活疫苗免疫原性与免疫持久性观察

汪萱怡 马景臣 张勇 张英林 张玉伟 韩常全 邢占春 陈吉朝 赵守军 徐志一

【摘要】 目的 观察不同剂量的甲型肝炎(甲肝)减毒活疫苗免疫原性与免疫持久性。方法 对河北省正定县 4 个村 166 名 6~8 岁事先经血清检测抗-HAV 阴性的易感儿童,按村分成 4 组,分别给予 0.5、1、2 及 2 剂经 60℃ 3 h 灭活处理的甲肝减毒活疫苗(滴度为 $10^{6.52}$ TCID₅₀)。并于接种后 3、12、24、36 及 48 个月采集观察对象血清,采用 Abbott-IMx mEIA 试剂检测血清抗-HAV。并对接种 1 剂、2 剂活疫苗组免后 4 年部分血清检测中和抗体。结果 免后 3 个月抗体阳转率、抗体几何平均滴度(GMT)同疫苗滴度呈剂量效应关系。免疫后各组抗体水平于免疫后 3 个月达高峰后逐年下降,12 个月内下降较明显,12 个月后下降缓慢。免疫后 4 年接种 2 剂活疫苗组抗体阳性率与 GMT 均高于接种 0.5 剂及 1 剂组。接种 1、2 剂活疫苗组部分经 Abbott-IMx mEIA 试剂检测抗-HAV 阴性的血清检测中和抗体,其阳性率为 60% 及 83%。结论 甲型肝炎减毒活疫苗的免疫原性与免疫持久性同疫苗的滴度有关,滴度为 $10^{6.83}$ TCID₅₀ 的减毒活疫苗具有较理想的免疫原性及免疫持久性。减毒活疫苗接种后近期内不必予以加强免疫。

【关键词】 甲型肝炎; 疫苗, 减毒; 免疫原性; 抗体

Immunogenicity and long-term persistence of anti-HAV in groups with different attenuated and inactivated hepatitis A vaccine dosage WANG Xuanyi*, MA Jingchen, ZHANG Yong, et al.
*Department of Epidemiology, Medical Centre of Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective This study was carried out to assess the long-term persistence of antibodies against hepatitis A in different vaccine dosage groups. **Methods** One hundred and sixty-six susceptibles aged from 6 to 8 years old were selected in Zhengding county, and were divided into 4 different dose groups. Each group received $10^{6.17}$ TCID₅₀, $10^{6.52}$ TCID₅₀, $10^{6.83}$ TCID₅₀ of attenuated hepatitis A vaccine or $10^{6.83}$ TCID₅₀ of the same vaccine but treated with 60℃ for 3 hours. All subjects were bled at month 3, 12, 24, 36 and 48. All serum specimens were tested for antibodies to HAV using Abbott-IMx mEIA reagent. Part of the tested negative serum specimens were retested by neutralization assay for $10^{6.52}$ TCID₅₀ and $10^{6.83}$ TCID₅₀ dosage groups at 4 years after vaccination. **Results** The seroconversion rate and GMT 3 months after vaccination in each dosage group showed a significant dose-response relationship. Antibody levels reached the peak at month 3 in each group but declined dramatically within one year and the decline slowed down thereafter. The seroconversion rate and GMT in $10^{6.83}$ TCID₅₀ dose group 4 years after vaccination was significant higher than those of other dosage groups. Positive rates of neutralizing antibodies in B and C dosage group were 60.0% and 83.3% respectively. **Conclusion** The immunogenicity and long-term persistence were related to the attenuated hepatitis A vaccine titer. The vaccine, whose titer was $10^{6.83}$ TCID₅₀, had good immunogenicity and long-term persistence. Booster dose was not needed within short time after initial vaccination.

【Key words】 Hepatitis A; Vaccine, attenuated; Immunogenicity; Antibody

我国自行研制的甲型肝炎减毒活疫苗自 1992

年开始应用于人体。但在 1995 年以前,由于疫苗滴度偏低,其抗体阳转率约为 30%~40%,保护率为 70%~80%,效果不很理想^[1,2]。因此,我们在 1994 年对不同剂量的甲型肝炎减毒活疫苗免疫原性进行了研究,发现疫苗接种后抗体阳转率同疫苗的剂量有关^[3],疫苗滴度愈高,抗体阳转率愈高。本文报道

基金项目:国家“九五”科技攻关项目(96-906-03-01)

作者单位:200032 上海,复旦大学医学院流行病学教研室(汪萱怡、赵守军、徐志一);河北省正定县卫生防疫站(马景臣、张英林、张玉伟、韩常全、邢占春、陈吉朝);河北医科大学(张勇)

不同剂量组的抗体随时间变化情况。

对象与方法

1. 疫苗: 采用 H₂ 株, 中国医学科学院昆明医学生物学研究所生产, 每支 1 ml, 滴度为 10^{6.52}TCID₅₀。接种 2 支疫苗, 滴度相当于 10^{6.83}TCID₅₀ (2 ml × 10^{6.52}TCID₅₀/ml ≈ 10^{6.83}TCID₅₀); 接种 0.5 支滴度相当于 10^{6.17}TCID₅₀ (0.5 ml × 10^{6.52}TCID₅₀/ml ≈ 10^{6.17}TCID₅₀)。

2. 研究对象与分组: 河北省正定县 4 个村共 166 名 6~8 岁经甲肝总抗体检测为阴性的易感儿童, 为本研究观察对象。按村分成 A、B、C、D 4 个不同剂量组。A 组接种 0.5 支减毒活疫苗, B 组接种 1 支减毒活疫苗, C 组接种 2 支减毒活疫苗, D 组接种 2 支经 60℃ 3 h 灭活的减毒活疫苗。各组剂量及年龄、性别分布见表 1。

表1 甲肝减毒活疫苗免疫不同剂量组年龄、性别构成

| 项 目 | 剂 量 组 | | | |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | A | B | C | D |
| 观察人数 | 38 | 56 | 49 | 23 |
| 剂量(TCID ₅₀) | 10 ^{6.17} | 10 ^{6.52} | 10 ^{6.83} | 10 ^{6.83} |
| 性别比(M/F) | 23/15 | 30/26 | 20/29 | 11/12 |
| 平均年龄(岁, STD) | 7.7(0.6) | 6.9(0.7) | 6.8(0.6) | 7.0(0.2) |
| 失访人数* | 1 | 10 | 6 | 2 |

* 由于免疫后 2~3 年间再接种 1 剂甲肝减毒活疫苗而被视为失访

以上各组观察对象于免疫后 3、12、24、36 及 48 个月被采集血清, 观察抗体随时间变化情况。选择 B、C 两组部分免疫后 48 个月且经 Abbott-IMx mEIA 试剂检测抗-HAV 阴性的血清, 检测中和抗体。

3. 检测方法: 采用雅培公司 Abbott-IMx mEIA 试剂, 以及相应的自动检测仪, 检测甲型肝炎抗体。将荷兰红十字会提供的 WHO 标准抗体单位(100 IU/ml)倍比稀释, 做成标准曲线, 测定每毫升血中抗体毫国际单位(mIU/ml)。本研究血清中抗体阳性的判断标准为抗-HAV 滴度 ≥ 20 mIU/ml。

根据文献报道及我们研究结果, 疫苗诱导的抗体水平远低于野毒株感染引起的抗体反应, 活疫苗 1 剂免疫后抗体绝大多数在 1:10 以内, 极个别可达 1:32, 1:64^[4-6]。因此, 本研究以血清抗-HAV IgM 阳性和/或抗-HAV 滴度 > 1:100 者判断为自然感染。

4. 中和抗体检测: 采用人胚肺二倍体细胞(KMB)为感染细胞。将待检血清 300 μl 56℃ 水浴灭活, 同 300 μl 经 10 倍系列稀释后的病毒液在 37℃ 水浴中孵化 1 h 后 4℃ 过夜。然后加入生长良好的 KMB 细胞培养瓶中吸附 1 h, 并加入细胞维持液, 以后每周换维持液一次。培养至 26 d 用胰酶消化, PBS-EDTA 收集, 反复冻融, 超声裂解细胞, 10 000 r/min 离心收集上清液。用抗 HAV-IgM 试剂盒检测上清液中 HAV 抗原, 判断待检血清中和抗体的阴、阳性。实验采用甲肝病例恢复期血清(滴度 > 1:2 000)为阳性对照, 以 5~7 岁甲肝易感儿童血清为阴性对照, 以及 HAV 稀释液、正常细胞对照。

结 果

1. 免疫后不同时期抗体水平: 免疫后 3 个月抗体阳转率、抗体几何平均滴度(GMT)同疫苗滴度呈剂量效应关系, 依次为 C 组高于 B 组, B 组高于 A 组(χ²_{趋势} = 6.128, P < 0.05; F = 12.01, P < 0.05)。灭活后的 D 组抗体水平同 A 组相似, 而低于相同剂量未经灭活的 C 组(P < 0.05)。

免疫后 A、B、C、D 组抗体水平于免疫后 3 个月达高峰后逐年下降, 12 个月内下降较明显, 12 个月后下降缓慢(表 2)。免疫后 1~4 年间抗体下降不显著, 抗体阳性率无差别(P > 0.05)。

免疫后 4 年 C 组抗体阳性率与 GMT 均高于 A、B、D 组(P < 0.05)。

2. 中和抗体检测: 对 B(10^{6.52}TCID₅₀)、C(10^{6.83}TCID₅₀)两组免疫后 4 年, 经 Abbott IMx mEIA 试剂检测抗-HAV 阴性, 且血清量满足 300 μl 的标本进行中和试验, 检测中和抗体。两组中和抗体检测结果见表 3。

讨 论

甲型肝炎减毒活疫苗的免疫原性及保护效果同疫苗的滴度有关。既往, 我们观察到滴度为 10^{5.0~5.5}TCID₅₀ 的疫苗, 抗体阳转率为 30%~40%, 保护效果为 70%~80%^[1,2]; 在最近的研究中, 我们观察到规范化滴度(>10^{6.5}TCID₅₀)的疫苗, 其抗体阳转率在 90%以上, 近期保护率 95%可信限下限为 92%^[7]。本研究也观察到疫苗滴度同抗体反应呈剂量效应关系。

表2 甲肝减毒活疫苗不同剂量组免疫后抗体水平变化

| 免疫后月份 | 组别 | 观察数 | 阳性数 | 阳性率(%) | GMT (mIU/ml) | GMT 95%CI |
|-------|----|-----|-----|--------|--------------|-------------|
| 3 | A | 38 | 32 | 84.2 | 46.3 | 34.7~61.9 |
| | B | 47 | 43 | 91.5 | 75.0 | 53.5~105.3 |
| | C | 46 | 44 | 95.7 | 197.9 | 141.8~276.3 |
| | D | 23 | 17 | 73.9 | 41.3 | 26.6~64.1 |
| 12 | A | 37 | 15 | 40.5 | 21.5 | 17.4~26.5 |
| | B | 45 | 19 | 42.2 | 25.8 | 18.8~35.3 |
| | C | 42 | 37 | 88.1 | 44.9 | 34.4~58.7 |
| | D | 19 | 12 | 63.2 | 30.7 | 16.3~57.9 |
| 24 | A | 35 | 7 | 20.0 | 16.9 | 14.2~20.0 |
| | B | 46 | 10 | 21.7 | 16.2 | 12.8~20.5 |
| | C | 42 | 36 | 85.7 | 51.8 | 37.9~71.0 |
| | D | 21 | 8 | 38.1 | 19.4 | 12.5~30.0 |
| 36 | A | 35 | 6 | 17.1 | 15.1 | 12.6~18.2 |
| | B | 41 | 7 | 17.1 | 13.9 | 12.3~15.7 |
| | C | 40 | 25 | 62.5 | 36.6 | 24.2~54.5 |
| | D | 19 | 4 | 21.1 | 17.6 | 12.4~25.1 |
| 48 | A | 26 | 3 | 11.5 | 12.5 | 9.7~16.0 |
| | B | 42 | 4 | 9.5 | 11.8 | 10.4~13.5 |
| | C | 41 | 25 | 60.9 | 41.8 | 28.5~61.5 |
| | D | 15 | 3 | 20.0 | 15.7 | 10.2~24.3 |

检测抗-HAV 的 Abbott-IMx mEIA 检测系统灵敏度较 Abbott HAVAB 有较大提高。文献报道^[8]其灵敏度为 50 mIU/ml, 在检测中, 我们发现其灵敏度约为 30 mIU/ml。这与 10 mIU/ml 的保护水平仍有较多的差距。对滴度 $\geq 10^{6.5} \text{TCID}_{50}$ 两个剂量组(B 组及 C 组)免疫后 4 年经 Abbott-IMx mEIA 试剂检测抗-HAV 阴性血清检测中和抗体, 其阳性率为 60% 和 83%, 说明这些观察对象中大多数仍有抗病毒感染能力。因此, 现行用于评价规范化滴度疫苗效果的 Abbott-IMx mEIA 试剂对于血清中抗体的阳性率判断是低估的, 结合 ELISA 和中和试验结果, 似可说明规范化甲肝减毒活疫苗有较好的免疫持久性, 接种后近期内不必予以加强免疫。

参 考 文 献

- 1 江世平, 黄全诚, 陈俊民, 等. 柳州市大规模人群甲型肝炎减毒活疫苗流行病学效果考核. 中华流行病学杂志, 1995, 16: 140-142.
- 2 张勇, 马景臣, 韩常全, 等. 甲肝减毒活疫苗流行病学效果初步研究. 中国公共卫生学报, 1994, 13: 341-343.
- 3 张勇, 林曦敏, 赵守军, 等. 甲型肝炎减毒活疫苗(H₂株)的免疫原性研究. 河北医科大学学报, 1997, 18: 209-210.
- 4 Fujiyama S, Odoh K, Kuramoto I, et al. Current seroepidemiological status of hepatitis A with a comparison of antibody titers after infection and vaccination. J Hepatol, 1994, 21: 641-645.
- 5 Mao JS, Dong DX, Zhang HY, et al. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H₂ strain) in humans. J Infect Dis, 1989, 159: 621-624.
- 6 陈念良, 柴少爱, 黄海鹰, 等. 甲型肝炎减毒活疫苗 H₂ 株的免疫效果. 中华医学杂志, 1992, 72: 581-583.
- 7 徐志一, 李荣成, 孟宗达, 等. 甲型肝炎减毒活疫苗免疫原性和保护效果的初步观察. 中华医学杂志, 1998, 78: 254-256.
- 8 Rosemarie Berger, Max Just, Beat Althaus. Time course of hepatitis A antibody production after active, passive and active/passive immunization; the results are highly dependant on the antibody test system used. J Virol Methods, 1993, 43: 287-298.

(收稿日期: 2000-10-19)

表3 甲肝减毒活疫苗免疫后中和抗体检测结果

| 项 目 | B 组 | C 组 |
|---------------|------|------|
| 免疫后 4 年随访数 | 42 | 41 |
| ELISA 检测阴性标本数 | 38 | 16 |
| 检测中和抗体标本数 | 15 | 6 |
| 中和抗体检测阳性标本数 | 9 | 5 |
| 阳性率(%) | 60.0 | 83.3 |

A、B、C、D 组抗体反应于免疫后 3 个月达高峰, 1 年中抗体水平下降较为明显, 1~4 年间抗体水平下降无统计学差异。其中, 规范化滴度的 C 组免疫后 4 年抗体阳转率为 60.9%, 抗体几何平均滴度为 41.8 mIU/ml, 均明显高于其他 3 组, 说明疫苗的滴度同免疫持久性有关。中和试验是一种特异性较高的血清学方法。中和抗体在体内存在时间较长, 能较好的反映机体的抗病毒感染的免疫能力。我们用以