

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

乙型肝炎疫苗免疫效果影响因素
和加强免疫策略研究

梁争论 李河民 庄辉

我国“八五”、“九五”科技攻关期间,曾对不同种美国产和进口重组乙肝疫苗进行了免疫原性和免疫效果的比较,证明重组乙肝疫苗特别是乙肝酵母重组疫苗具有较高的母婴阻断保护效果^[1,2]。在此基础上,又在“十五”期间,通过建立敏感、特异的病毒变异株检测技术,规范细胞免疫检测方法,结合现场流行病学调查,对影响我国乙肝疫苗免疫效果的主要因素进行了系统研究。

1. HBV 变异和基因型与乙肝疫苗保护效果关系:

(1)HBV 变异与乙肝疫苗保护效果关系:通过构建 HBV S 区“a”决定簇 16 个位点变异株的检测芯片,检测 323 例乙肝疫苗阻断成功和 47 对阻断失败的母婴配对样本,失败组母亲和婴儿均感染变异株率与阻断成功组母亲的变异株感染率的差异无统计学意义(126A:10.7%和9.9%;126S-1:2.1%和4.3%;126S-2:2.1%和4.6%;145R:4.3%和4.0%; $P>0.05$)。现有疫苗对含“a”决定簇 126 和 145 位点突变株母亲所生婴儿仍具有预防效果,因此,目前尚不需要研制针对该 2 个突变株表位的新型乙肝疫苗。

(2)HBV 基因型与乙肝疫苗保护效果关系:我们建立了 HBV 基因型和前 C 突变株的检测方法,检测 60 对乙肝疫苗阻断失败母婴配对样本及 151 例阻断成功母亲样本的基因型,并测定 33 对疫苗阻断失败母婴标本和 33 例阻断成功母亲的病毒前 C 及基本核心启动子突变。结果阻断失败婴儿的母亲中,C 基因型比例明显高于成功组。同为 HBeAg 阳性母亲,失败组 C 基因型占 90.0%,未分型者占 10.0%。成功组 C 基因型占 47.1%,B 基因型占 29.4%,未分型者占 5.9%,B+C 混合型占 17.6%。

两者基因型构成的差异有统计学意义。提示阻断失败可能与 HBV 基因型有关,HBV C 基因型可能更易导致母婴传播阻断失败。

2. 规范化细胞免疫检测方法的建立和应用:

(1)影响酶联斑点法(ELISPOT)的因素:初步探索了各种因素对 ELISPOT 检测结果的影响。结果表明,选择适宜的刺激物,可提高细胞因子检测的灵敏度。ELISPOT 法测定细胞因子的灵敏度高于 Luminex 法,而后者操作相对较简单,所需样本量较少,适用于检测细胞因子水平高的样本。

(2)人接种乙肝疫苗和动物接种不同种类乙肝疫苗后的细胞免疫动态变化:12 名接种乙肝疫苗的成人,于免疫首针后 3、8、21、34、65 d 检测细胞免疫和体液免疫应答,结果人接种疫苗后,CD4⁺、CD8⁺ 细胞刺激产生不同细胞因子出现的趋势和强度不同:IFN- γ (CD8⁺、CD4⁺ 细胞)出现较早,且不同时间的水平较为稳定,而 CD4⁺ 细胞产生 IL-2 和 IL-4 较晚,但其升高与第 2、3 针次免疫有关;分选细胞后测定细胞因子的灵敏度优于直接测定外周血单个核细胞(PBMC);免疫后 CD4⁺ 细胞产生 IL-4 的阳转率与抗体阳转率呈显著正相关,CD4⁺ 细胞产生 IL-2、IL-4 的水平与抗体滴度也呈显著正相关。应用汉逊酵母疫苗和抗原、酿酒酵母疫苗和抗原以及 CHO 疫苗分别免疫小鼠,于免疫后 4、7、11、14、25 和 35 d 检测小鼠脾 MNC 分泌 IFN- γ 细胞数,结果不同种类疫苗和抗原均在首针免疫后 7-14 d 细胞免疫达到高峰。

(3)比较不同基因重组乙肝抗原和血源乙肝抗原的细胞免疫应答:汉逊酵母重组乙肝抗原诱导 CD4⁺、CD8⁺ 细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 应答的阳转比率和水平均高于 CHO 抗原;诱导 CD4⁺、CD8⁺ 细胞产生 IFN- γ 水平高于血源乙肝抗原。这可能与重组酵母乙肝疫苗阻断 HBV 母婴传播率高有关。

(4)应用 ELISPOT 法测定母婴阻断失败与无

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(梁争论、李河民);北京大学医学部微生物学系(庄辉)

应答、低应答及高应答人群的细胞因子:免疫成功组产生 IL-2 细胞数(55.20 ± 42.22)显著高于免疫失败组(3.75 ± 3.24)和抗体无应答组(6.75 ± 3.59)($P < 0.01$);儿童免疫乙肝疫苗后的抗-HBs 滴度与经乙肝疫苗诱导产生的特异性分泌 IL-2 的 T 细胞数量呈显著正相关($r = 0.601, P < 0.01$)。

3. 现有乙肝疫苗免疫失败、抗体无应答的比率及相关因素:

(1)现有乙肝疫苗免疫失败、抗体无应答的比率:在河南省开封市筛选 HBsAg 阴性母亲所生的婴儿(7~24 月龄)共 8093 例(初次免疫均为接种 3 针同一厂家的国产 5 μg/剂酿酒酵母重组乙肝疫苗),其中 7~10 月龄婴儿 2970 例中,56 例抗-HBs 低于 10 mIU/ml,无应答率为 1.89%;3 针基础免疫后抗-HBs 下降速度较快,7~10 月龄婴儿的抗-HBs 阳性率为 98.11%,22~24 月龄时为 84.47%,提示应提高疫苗的免疫剂量,以保证免疫的持久性。对抗-HBs 低于 10 mIU/ml 的人群进行 5 μg/剂和 10 μg/剂酵母重组乙肝疫苗 2 针和 3 针加强免疫,结果不同剂量和针次的疫苗加强免疫后,抗-HBs 阳转率均在 91% 以上;10 例加强免疫后抗-HBs 持续阴性人群 Th1 类细胞因子 IL-2 和 IFN-γ 的阳转率分别为 30% 和 20%,低于有应答人群(分别为 59.38% 和 37.04%)。

(2)乙肝疫苗免疫后的免疫记忆:对广西隆安县 228 例和 731 例分别用常规程序接种血源和酵母重组乙肝疫苗免疫,且免疫后抗-HBs 水平大于 10 mIU/ml,但于第 8 年及第 18 年时随访检测抗-HBs 为阴性者,加强免疫 1 针 10 μg/剂酵母重组乙肝疫苗,于 15 d 后检测其抗-HBs,结果两组抗-HBs 阳转率均高于 90%,表明 B 细胞体液免疫在初次免疫后 18 年和 8 年时免疫记忆良好;对 11 例加强免疫后抗-HBs 无应答和 22 例抗-HBs 有应答者测定 IL-2,结果前者均未检出 IL-2(0/11),显著低于有应答者(40.9%, 9/22, $P = 0.01$),提示存在一定比例的无 B 和 T 细胞免疫记忆的人群。

(3)疫苗免疫效果及其影响因素:对广西 6471 例 1~9 岁儿童进行了疫苗免疫效果的横断面调查,其中城市 3570 例儿童中,11 例 HBsAg 阳性(0.31%),显著低于农村儿童(1.69%, 49/2901)。对江苏省 1~7 岁 2522 例农村儿童疫苗效果的横断面研究,其中 20 例 HBsAg 阳性(0.79%)。对 HBV 感染影响因素的分析表明,疫苗保护失败与出生时

未及时接种有关,而非病毒变异所致。河南省的调查表明,城市疫苗抗-HBs 应答率高于农村,与疫苗接种管理水平的差异有关,加强疫苗接种管理可提高乙肝疫苗的保护率。

4. 高危婴幼儿的加强免疫程序:对 277 例母亲 HBsAg 阳性,但初次免疫成功的儿童进行随访,HBsAg 和 HBeAg 双阳性、HBsAg 单阳性和阴性组完成 10 年随访的人数分别为 146、53 和 21 人,在随访期间儿童 HBsAg 阳转率分别为 4.79% (7/146)、1.89% (1/53) 和 0(0/21)。HBsAg 阳转时间集中在初次免疫后 2~3 年(6/8)。

本项研究表明,现有乙肝疫苗可阻断“a”决定簇 126 和 145 位点突变株的母婴传播,目前尚不需要研制针对突变株表位的新型疫苗;疫苗阻断失败与母亲 HBV 基因型有关,阻断失败婴儿的母亲中,C 基因型比例显著高于阻断成功组;不同种类疫苗和抗原免疫动物后,其细胞免疫应答特点不同:汉逊酵母重组乙肝疫苗诱导 IFN-γ 优于汉逊抗原,酵母乙肝抗原诱导 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞产生 IFN-γ 优于血源和 CHO 抗原,这与酵母重组乙肝疫苗的母婴传播阻断率高于其他乙肝疫苗有关。我国常规应用 5 μg/剂乙肝酵母重组疫苗免疫 HBsAg 阴性母亲所生婴儿,其抗-HBs 无应答率较低(1.89%),但免疫后婴儿抗-HBs 快速下降,提示应加大新生儿免疫的乙肝疫苗剂量。这对我国广大农村尤为重要。免疫后 16~18 年抗-HBs 阴转者,于加强免疫后,90% 抗-HBs 阳转,提示接种乙肝疫苗后抗-HBs 转阴者存在免疫记忆,但也有一部分抗-HBs 转阴者已无体液免疫和细胞免疫的回忆反应,应加强免疫。HBsAg 和 HBeAg 双阳性母亲所生的儿童感染 HBV 的危险性较高,在随访过程中发现其 HBsAg 阳转,主要集中在 2~3 岁幼儿。建议对 HBsAg 和 HBeAg 双阳性母亲所生婴儿应用乙肝免疫球蛋白和乙肝疫苗联合免疫,或加大乙肝疫苗免疫剂量,或在 1~2 岁时加强 1 针乙肝疫苗免疫。

参 考 文 献

- [1] 庄辉.我国乙型肝炎疫苗免疫.基础医学与临床,2004,24(2): 136-140.
- [2] 李河民,梁争论,张华远.关于乙型肝炎疫苗免疫原性的评价.中华流行病学杂志,2004,25(5):378-381.

(收稿日期:2007-02-07)

(本文编辑:张林东)