

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

广西壮族自治区隆安县乙型肝炎疫苗
全程接种后的免疫记忆研究

李艳萍 李荣成 方孔雄 李河民 胡忠玉 何鹏 吴小音 张瑞 梁争论 庄辉

【摘要】 目的 了解接种全程乙型肝炎(乙肝)疫苗后的免疫记忆情况。方法 1987-1989 年出生时接种乙肝血源疫苗的 1201 名新生儿,以及 1996-1999 年出生时接种乙肝酵母重组疫苗的 2484 名新生儿,于 2005 年随访时检测乙肝表面抗原(HBsAg)、表面抗体(抗-HBs)和核心抗体(抗-HBc),结果 959 名 3 项乙肝病毒(HBV)标志物均阴性,其中 228 名接种乙肝血源疫苗,731 名接种乙肝酵母重组疫苗,于加强免疫 1 针乙肝酵母重组疫苗后 15 d 时检测其抗-HBs。此外,随机选择 11 名加强免疫后无应答和 22 名有应答者,应用酶免疫斑点法(ELISPOT)测定白细胞介素-2(IL-2)。有初次免疫后抗-HBs 定量检测资料者 190 名,比较其初次免疫和加强免疫后抗-HBs 水平。结果 加强免疫后,79.82% 接种乙肝血源疫苗者抗-HBs 阳转,几何平均滴度(GMT)为 325.69 mIU/ml;95.62% 接种乙肝酵母重组疫苗者抗-HBs 阳转,GMT 为 745.18 mIU/ml。加强免疫后所产生的抗-HBs 水平与初次免疫后抗体滴度有关。加强免疫后抗-HBs 阳转者的 IL-2 阳性率(40.91%)也高于无应答者($P < 0.01$)。结论 在乙肝疫苗初次免疫后,抗-HBs 转阴者中,大部分仍具有免疫记忆,仅少部分在长期随访中丧失免疫记忆。因此,在高流行地区,对丧失免疫记忆者应进行乙肝疫苗加强免疫。

【关键词】 乙型肝炎病毒;免疫记忆;加强免疫

Studies on the status of immune memory after completion of hepatitis B vaccination LI Yan-ping*, LI Rong-cheng, FANG Kong-xiong, LI He-min, HU Zhong-yu, HE Peng, WU Xiao-yin, ZHANG Rui, LIANG Zheng-lun, ZHUANG Hui. *Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China

【Abstract】 **Objective** To study the immune memory in vaccinees after the completion of a full schedule hepatitis B immunization. **Methods** One thousand and two hundred one infants born in 1987-1989 were immunized with 3 doses of plasma derived hepatitis B vaccine, while 2484 newborn babies during 1996-1999 were injected with 3 doses of the yeast recombinant hepatitis B vaccine. All of the infants under observation were tested for HBsAg, anti-HBs and anti-HBc, in 2005. Of 959 individuals negative for anti-HBs (< 10 mIU/ml), HBsAg and anti-HBc, 228 were immunized with plasma-derived vaccine and 731 with yeast recombinant vaccine after birth. All of them were detected for anti-HBs 15 days after a booster of 10 μ g yeast recombinant vaccine. In addition, interleukin-2 (IL-2) was detected in 11 non-responders and 22 responders after boosting, using an enzyme-linked immunospot (ELISPOT). The anti-HBs levels of 190 individuals (91 with plasma derived vaccine and 99 with yeast recombinant vaccine) who had had quantitative data on their antibody status after the primary hepatitis B vaccination, were compared with that after the boosting. **Results** Among the individuals who received plasma derived vaccine 16-18 years ago, 79.82% of them showed the signs of immune memory after one booster, with a geometric mean titer (GMT) of 325.69 mIU/ml. Of the individuals who received the yeast recombinant vaccine 6-9 years ago, 95.62% showed immune memory after one booster, with its GMT of 745.18 mIU/ml. Anti-HBs levels induced by the booster were associated with that after the primary immunization. The positive rate of IL-2 was 40.91% in subjects with good immune memory. However, IL-2 was not detected in non-responders after the booster ($P < 0.01$). **Conclusion** Most of the individuals who had received a completed schedule of primary hepatitis B vaccination and seroconverted from anti-HBs positive to negative, showed the signs of having immune memory after the booster. Only a small proportion of the vaccinees had lost their immune memory during the long term follow-up period, suggesting that these individuals should receive a booster of hepatitis B vaccine in the highly endemic areas of hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B virus; Immune memory; Booster immunization

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位:530021 南宁,广西壮族自治区疾病预防控制中心(李艳萍、李荣成);隆安县疾病预防控制中心(方孔雄);中国药品生物制品检定所(李河民、胡忠玉、何鹏、吴小音、张瑞、梁争论);北京大学医学部微生物学系(庄辉)

乙型肝炎(乙肝)疫苗在我国应用已 20 余年,尽管许多人认为,初次免疫成功后不需要加强免疫。但实际上,随着抗-HBs 阳性率及其水平逐年下降,少数高危儿童仍存在发生乙肝病毒(HBV)再感染的危险性。新生儿接种乙肝疫苗后,是否需要加强免疫,已成为乙肝预防工作中亟待解决的问题之一^[1]。我们自 1986 年起,在广西壮族自治区隆安县乙肝高发区进行了大规模的乙肝疫苗免疫,开展对乙肝疫苗保护效果和免疫持久性研究,以便为今后制订加强免疫策略提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:2005 年在广西隆安县 5 个乡镇,以随机抽样方法,根据免疫接种证和新生儿免疫底卡,确定对 1987-1989、1996-1999 年间出生时按 0、1、6 月程序分别接种乙肝血源疫苗(2484 名)或酵母重组疫苗(1201 名)人群进行随访。所有入选者在初次免疫后均无乙肝疫苗加强接种史。本研究经过当地医学伦理委员会批准。每个研究对象均签署知情同意书。

2. 研究方法:采取出生队列定群随访与横断面调查相结合的方法,开展对乙肝疫苗保护效果和免疫持久性研究,对出生时接种乙肝血源疫苗 16-18 年后以及接种酵母乙肝疫苗 6-9 年后,对抗-HBs 转阴者接种 1 针 10 μg 酵母乙肝疫苗,探讨其免疫记忆情况。

3. 随访方法:采集随访者的静脉血,用放射免疫法(RIA)检测抗-HBs、HBsAg 和抗-HBc。该三项标志均阴性者 959 人,其中于 1987-1989 年出生者 228 人,1996-1999 年出生者 731 人。对上述人群接种 1 针 10 μg 酵母乙肝疫苗,于接种后第 15 天采静脉血,应用 RIA 检测抗-HBs。

4. 乙肝疫苗:1987-1989 年出生的新生儿初次免疫为乙肝血源疫苗,剂量为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,由北京生物制品研究所提供;1996-1999 年出生的新生儿初次免疫为乙肝酵母重组疫苗,剂量为 5 $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$,由深圳康泰生物制品有限公司提供;2005 年加强免疫为乙肝酵母重组疫苗,剂量为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,由深圳康泰生物制品有限公司提供。

5. 血清学检测方法:随访血清样本加强免疫前后均用 RIA 检测血清抗-HBs,试剂盒由北京北方试剂公司提供,按说明书操作和判断结果,HBsAg S/N \geq 2.1 为阳性;抗-HBs \geq 10 mIU/ml 为阳性。

6. 细胞免疫测定:依据预试验结果确定乙肝酵

母纯化抗原作为刺激物;采取鲎试剂法测定细菌内毒素,结果低于 10 EU/ml(10 μg)。人淋巴细胞分离液购于 Sigma 公司;RPMI1640 完全培养基和胎牛血清购于 Hyclone 公司;酶免疫斑点法(ELISPOT)测定人 IL-2,试剂盒为美国 RD 公司产品,购于深圳晶美公司。ELISPOT 的具体检测方法:采集并分离研究对象静脉抗凝血中外周血单个核细胞(PBMC),调整细胞浓度为 $6 \times 10^6/\text{ml}$,上 24 孔板,试验分 2 组进行,试验组为效应细胞 + HBsAg 或多肽(终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$),背景对照组为效应细胞 + 培养基,同时设阴性对照(培养基)和阳性对照(试剂盒提供)。PBMC 应用抗原刺激后测定 IL-2,其余操作按照 ELISPOT 试剂盒说明书进行。应用 CTL 公司生产的 ELISPOT 斑点计数仪进行斑点形成细胞计数(SFC)。阳性样本的 SFC 应 >10 ,同时阳性样本 SFC/培养基 SFC 应 ≥ 2 者为阳性。统计时样本 SFC 为实测值减去培养基对照的 SFC。

7. 统计学分析:用 Excel 建立数据库。率的检验采用 χ^2 检验,抗-HBs 滴度采用 t 检验。

结 果

1. 乙肝疫苗免疫后的抗体阳性率和抗体水平:1987-1989 年出生人群的抗-HBs 平均阳性率为 36.89% (36.25%~38.54%), GMT 均值为 62.63 (56.68~78.96) mIU/ml, 1996-1999 年出生儿童抗-HBs 平均阳性率为 53.14% (44.04%~61.85%), GMT 均值为 80.9 (76.01~85.90) mIU/ml。

2. 加强免疫后的抗-HBs 记忆应答:对 959 名 6~9 岁和 16~18 岁人群抗-HBs 阴性者,采用 10 μg 酵母重组乙肝疫苗加强免疫,观察抗-HBs 免疫记忆应答,于接种 1 针乙肝疫苗后 15 d 采血检测抗-HBs,初次免疫用酵母重组乙肝疫苗的儿童中,95.62% (93.47%~97.16%) 产生抗-HBs 免疫记忆应答, GMT 为 745.18 mIU/ml;初次免疫用血源乙肝疫苗的人群中,加强免疫后抗-HBs 阳转率为 79.82% (77.05%~82.35%), GMT 为 325.69 mIU/ml(表 1)。

3. 初次免疫后不同抗体水平人群记忆应答的抗体水平比较:91 名初次免疫为乙肝血源疫苗、99 名初次免疫为乙肝酵母重组疫苗者于初次免疫后 6 个月内有抗-HBs 定量测定数据,对上述人群于初次免疫后、加强免疫前、后抗-HBs 水平进行分析,该两组人群加强免疫后的抗-HBs 水平与初次免疫后的抗体水平有关,初次免疫后抗-HBs 水平高者,加强免

疫后的抗体滴度也高(表 2)。

表1 隆安县乙肝血源和酵母重组疫苗初次免疫儿童加强免疫后 15 d 抗体记忆反应

疫苗	年龄(岁)	人数	抗-HBs(mIU/ml)				GMT
			<10	10~99	100~999	≥1000	
血源	16	133	26(19.55)	27(20.30)	54(40.60)	26(19.55)	281.53
	17	61	14(22.95)	11(18.03)	19(31.15)	17(27.87)	403.24
	18	34	6(17.65)	5(14.71)	14(41.18)	9(26.47)	397.16
重组	6	204	7(3.43)	16(7.84)	98(48.04)	83(40.69)	665.30
	7	141	4(2.84)	13(9.22)	56(39.72)	68(48.23)	794.67
	8	187	8(4.28)	14(7.49)	75(40.11)	90(48.13)	899.72
	9	199	13(6.53)	22(11.06)	82(41.21)	82(41.21)	668.46

注: 括号外数据为应答人数, 括号内数据为阳转率(%)

表2 隆安县两组免疫人群初次免疫和加强免疫后抗体水平比较

疫苗	初次免疫后抗-HBs水平(mIU/ml)	人数	加强免疫后抗-HBs水平(GMT)
血源	<10	18	163.51
	10~99	37	232.43
	100~999	26	521.21
	1000~	10	2576.98
重组	<10	28	98.36
	10~99	15	263.28
	100~999	34	820.54
	1000~	22	4178.25

4. 初次免疫后不同抗体水平人群记忆应答抗体阳性率比较: 初次免疫后抗-HBs水平≥1000 mIU/ml者, 加强免疫后抗体阳性率达到100%, 且其水平均在100 mIU/ml以上; 初次免疫后抗-HBs为弱阳性者于加强免疫后, 乙肝血源疫苗组的抗-HBs阳性率为59.46%, 乙肝重组疫苗组为93.33%。初次免疫后不同抗-HBs水平人群于加强免疫后的抗体应答情况见表3。加强免疫后, 无免疫记忆应答者的比例与初次免疫后抗-HBs水平有关, 初次免疫后为低应答者中, 无免疫记忆应答者的比例较高($\chi^2 = 14.5410, P < 0.01$)。

表3 隆安县两组免疫人群初次免疫后抗-HBs不同水平人群加强免疫后记忆应答情况

疫苗	初次免疫后抗-HBs(mIU/ml)	例数	加强免疫后抗-HBs(mIU/ml)			
			<10	10~99	100~999	1000~
血源	10~99	37	15(40.54)	9(24.32)	6(16.22)	7(18.92)
	100~999	26	1(3.85)	3(11.54)	11(42.31)	11(42.31)
	1000~	10	0(0)	0(0)	2(20.00)	8(80.00)
	合计	73	16(21.92)	12(16.44)	19(26.03)	26(35.61)
酵母	10~99	15	1(6.67)	2(13.33)	10(66.67)	2(13.33)
	100~999	34	0(0)	0(0)	16(47.06)	18(52.94)
	1000~	22	0(0)	0(0)	1(4.55)	21(95.45)
	合计	71	1(1.41)	2(2.82)	27(38.03)	41(57.74)

注: 括号外数据为应答人数, 括号内数据为阳转率(%)

5. 细胞免疫记忆应答: 11名于加强免疫后抗-HBs<10 mIU/ml者的PBMC中, 未测出IL-2阳性(0%), 而22例抗-HBs>10 mIU/ml者的PBMC中, 9例

IL-2阳性(40.91%), 抗体记忆应答良好者的细胞免疫应答显著高于抗体无应答者($\chi^2 = 8.39, P < 0.01$)。

讨 论

新生儿时期接种乙肝疫苗后, 抗-HBs阳性率和滴度随时间而下降; 于免疫后15年, 虽然抗-HBs阳性率已降到较低水平(36%~50%), 但免疫人群的HBsAg阳性率仍较低^[2,4], 可能与免疫记忆有关。

为了解全程接种乙肝疫苗后的免疫记忆应答, 本研究选择乙肝血源疫苗和酵母重组疫苗初次免疫后的儿童, 分别于16-18年和6-9年后加强免疫1针10 μg乙肝酵母重组疫苗。免疫后15 d时检测血清抗-HBs, 分别有79.82%和95.62%人群产生抗-HBs体液免疫记忆应答, 且加强免疫后的抗-HBs水平与初次免疫后的抗体滴度有关, 初次免疫后抗-HBs水平较高者, 加强免疫后抗体滴度也较高。初次免疫应用乙肝血源或酵母重组疫苗者均具有良好的免疫记忆应答。疫苗诱导的免疫记忆对疫苗的评价具有重要意义, 以往多通过抗体记忆应答来了解记忆B细胞的应答。近年来, 免疫记忆T细胞的作用越来越受到重视^[5]。有研究报告, 乙肝疫苗免疫11年后, 仍存在特异性体液和细胞免疫记忆^[6]。本研究表明, 乙肝血源疫苗免疫后16-18年, 78.08%免疫人群仍存在免疫记忆; 乙肝酵母重组疫苗免疫后6-9年98.59%仍存在免疫记忆。

尽管血源疫苗和酵母重组疫苗免疫后均获得较好的保护效果, 但血源疫苗免疫后16-18年, 抗-HBs阳性率降至36.89%, 酵母重组疫苗免疫后6-9年抗-HBs阳性率降至53.14%, 分别有21.92%和1.41%接种者丧失免疫记忆。因此, 在乙肝高发区, 为保持人群高的乙肝免疫屏障, 应定期进行监测, 对无免疫记忆的人群进行加强免疫。

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] Lu SN, Chen CH, Chen TM, et al. Hepatitis B virus infection in adolescents in a rural township — 15 years subsequent to mass hepatitis B vaccination in Taiwan. Vaccine, 2006, 24(6): 759-765.
- [3] Liao SS, Li RC, Li H, et al. Long-term efficacy of plasma-derived hepatitis B vaccine: a 15-year follow-up study among Chinese children. Vaccine, 1999, 17(20-21): 2661-2666.
- [4] Ni YH, Chang MH, Huang LM, et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. Ann Int Med, 2001, 135(9): 796-800.
- [5] 吴长有. 免疫记忆与疫苗研究开发. 中国免疫学杂志, 2005, 21(1): 4-7.
- [6] 夏国良, 白玉, 刘克洲, 等. 乙型肝炎疫苗免疫记忆应答的观察. 中国计划免疫, 2002, 8(2): 61-64.

(收稿日期: 2007-02-01)
(本文编辑: 尹廉)