

流行性出血热双价灭活疫苗的安全性和免疫原性观察

柳炜 徐校平 阮玉华 翁寿清 刘文雪 周卫群 董关木 顾惠心 朱智勇 徐志一

【摘要】 目的 观察流行性出血热(EHF)沙鼠肾细胞双价灭活疫苗的安全性和免疫原性。方法 以高发疫区现场青壮年为对象,基础免疫3针,一年后加强1针。采用间接免疫荧光试验、微量细胞病变中和试验检测接种后荧光抗体和中和抗体,重点观察部分接种者免疫后72h内的全身体温反应和局部副反应。结果 基础免疫后2周,荧光抗体阳转率及几何平均滴度(GMT)分别为99.04%、 24.51 ± 2.06 ,中和抗体阳转率及平均滴度对76-118(I型)为91.30%、 18.27 ± 2.21 ,对UR(II型)为88.41%、 12.47 ± 2.16 。基础免疫后1年,荧光抗体阳转率下降为37.34%,中和抗体总阳转率近80%。加强后2周,荧光抗体和中和抗体阳转率均为100%,中和抗体滴度对I型为 37.09 ± 2.24 ,对II型为 32.61 ± 2.05 。接种后全身体温反应发生率为0.46%,局部反应发生率为1.98%,未见严重副反应发生。结论 流行性出血热双价灭活疫苗近期免疫效果良好,接种副反应率低。

【关键词】 出血热,流行性,疫苗,中和抗体,免疫原性

Safety and immunogenicity of inactivated bivalent EHF vaccine in humans LIU Wei*, XU Xiaoping, RUAN Yuhua, et al. * Department of Epidemiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective Safety and immunogenicity of inactivated bivalent EHF vaccine in humans were evaluated in the epidemic area of Zhejiang province, China. **Methods** Susceptible persons with negative anti-EHF were selected in Jiande county, Zhejiang province to receive 3 doses of inactivated bivalent EHF vaccine at 0, 7, 28 days. A booster injection was given one year after the primary immunization. Antibody responses were measured in human volunteers by IFA and MCPENT. Local and general reactions were recorded within 72 hours after each vaccination by physicians. **Results** Two weeks after the primary vaccination, 99.04% of the subjects developed significant hantavirus antibody titre measured by IFA which had a 37.34% drop one year after the primary vaccination. Seroconversion rate increased to 100% two weeks after the booster dose. Neutralising antibody titres paralleled this trend with 100% of vaccine recipients producing neutralising antibody two weeks after the primary doses. However, it dropped to 80% one year after the primary vaccination. One hundred percent of the vaccine recipients started to respond two weeks after boosting. The geometric mean titre (GMT) of neutralising antibody against 76-118 and UR were 18.27 ± 2.21 and 12.47 ± 2.16 respectively after the primary injections, but it increased to 37.09 ± 2.24 and 32.61 ± 2.05 respectively after the secondary immunization. General and local reaction rates were 0.46% and 1.98%, with no severe side effects observed in the vaccinees. **Conclusion** The vaccine was well tolerated and could induce good humoral immune response.

【Key words】 Hemorrhagic fever, epidemic; Vaccine; Neutralising antibody; Immunogenicity

免疫接种已被广泛接受为预防流行性出血热(EHF)有效而经济的方法^[1-3]。我国自80年代起已先后研制了沙鼠肾细胞培养I型灭活疫苗、地鼠肾细胞培养II型灭活疫苗和鼠脑纯化的I型灭活疫

苗,并在“八五”和“九五”期间经疫区现场效果考核,证实3种疫苗的人群保护率均在95%以上^[1,4],具有良好的保护发病效果。鉴于我国目前大多数疫区存在着两型出血热病毒的混合流行,而实际使用中尚无令人信服的资料可以证明单价灭活疫苗可以完全保护另外型别病毒的感染^[5],因此,我国于1996年首先研制出沙鼠肾细胞培养EHF双价灭活疫苗,并于1998年开始疫苗现场效果考核。现将该疫苗在浙江省建德市EHF高发疫区现场III期临床效果考核使用时的安全性和免疫学效果报道如下。

作者单位 200032 上海医科大学流行病学教研室(柳炜、阮玉华、顾惠心、徐志一);浙江省建德市卫生防疫站(徐校平、翁寿清、周卫群);浙江省卫生防疫站出血热重点实验室(朱智勇);中国药品生物制品检定所(刘文雪、董关木)

材料与amp;方法

一、疫苗

由天元生物药业有限公司生产(批号:980302、990307)。疫苗株系采用姬鼠型出血热病毒株 Z₁₀株和家鼠型病毒 Z₃₇株。病毒感染原代沙鼠肾细胞,收取培养液中的病毒,以 β-丙内脂灭活,加 0.1% 人血白蛋白为保护剂,0.5 mg/ml AK(OH)₃ 为佐剂制成。生产中先分别制成两型单价疫苗,然后以一定比例混合制成双价疫苗。

二、接种方法和剂量

基础 3 针按 0、7、28 d 程序免疫,一年后用双价疫苗加强一针。每人份一次为 1 ml,上臂三角肌肌肉注射。

三、观察对象

浙江省建德市 EHF 高发区现场,15~60 岁年龄组健康人群,无 EHF 病史、近期接种其他免疫制剂及各种接种禁忌症(发热、急性传染病、慢性肝肾疾病、慢性心血管疾病、严重过敏史)。

四、副反应观察

由经过培训的临床医生、防疫人员,于每次接种后 72 h 内分别进行全身体温反应、过敏反应、胃肠道反应和局部副反应(局部红肿、硬结、注射部位疼痛、局部淋巴结肿大)观察^[6],并将结果填入接种反应登记表。

五、免疫原性观察

于免疫前、基础免疫后 2 周、加强前(即基础免疫后 1 年)和加强后 2 周抽取静脉血,分离血清 -20℃ 保存。检测血清抗体阳转情况。

六、间接免疫荧光试验(IFA)

按常规方法进行,细胞抗原片、羊抗人 IgG 荧光抗体由浙江省卫生防疫站提供,采用 Vero 细胞为基质, Z₁₀株病毒为抗原,荧光抗体工作时以 1:8 稀释。

在 1:10 稀释时阴性的血清判为阴性, ≥ 1:10 为阳性。

七、微量细胞病变中和试验(MCPENT)

由北京中国药品生物制品检定所按文献^[6]进行。分别检测对两型标准毒株的血清抗体阳转率,在 1:5 稀释时阴性的血清判为阴性, ≥ 1:5 为阳性。

八、统计方法

所有资料由 Excel 输入数据库,采用 SPSS 统计软件包进行统计分析。

结 果

一、接种副反应观察

随机选择现场 5 个村符合要求的观察对象 657 名,在接种双价灭活疫苗的同时重点观察接种后的副反应。其中 624 人随队列观察满 1 年,退出的观察对象中,部分人是由于接种当日身体不适,其余多数人是因为外出而失访。

共有 12 人接种后出现弱、中等程度体温反应,但都于接种后 24 h 内退烧,局部反应主要为接种部位有烧灼感、局部硬结、注射部位疼痛。绝大多数局部反应均未影响接种者日常生活,而且局部反应均在接种后几天内消退(表 1)。

随接种次数的增加,未见接种局部反应有增加趋势($\chi^2 = 0.91, P = 0.34$),全身体温反应也未见随接种针次增加的趋势($\chi^2 = 3.01, P = 0.08$)。

二、荧光抗体检测

随机选择 167 人,检测免前出血热抗体均为阴性,于基础免疫后 2 周、加强前、加强后 2 周采集静脉血,采用间接免疫荧光法检测血清抗体。3 次荧光抗体阳转率分别为 99.04%(166/167)、37.34%(59/158)和 100%(158/158)。抗体几何平均滴度(GMT)分别为 24.51 ± 2.06、7.14 ± 1.86 和 35.32 ± 2.17。

表1 流行性出血热双价灭活疫苗接种副反应发生率(%)

针次	观察人数	局部反应*			合计	全身体温反应**			合计
		弱	中	强		弱	中	强	
1 针后	657	0.61(4)	0.76(5)	0.00(0)	1.37(9)	0.15(1)	0.00(0)	0.00(0)	0.15(1)
2 针后	650	0.92(6)	0.92(6)	0.15(1)	2.00(13)	0.46(3)	0.15(1)	0.00(0)	0.63(4)
3 针后	651	0.46(3)	0.46(3)	0.15(1)	1.08(7)	0.15(1)	0.15(1)	0.00(0)	0.31(2)
加强后	624	2.24(14)	0.92(6)	0.32(2)	3.53(22)	0.64(4)	0.16(1)	0.00(0)	0.80(5)
合计	2 582	1.05(27)	0.77(20)	0.15(4)	1.98(51)	0.35(9)	0.12(3)	0.00(0)	0.46(12)

* $\chi^2 = 0.91, P = 0.34$; ** $\chi^2 = 3.01, P = 0.08$ 括号内数字为接种后出现反应人数

三、中和抗体检测

基础免疫后 2 周、加强前和加强后 2 周血清中

和抗体总阳转率分别为 100%、79.66%、100% (检出 I 型或 II 型中和抗体阳转), 其中对 76-118 (I 型) 毒株的中和抗体阳转率分别为 91.30%、50.85% 和 100%。对 UR (II 型) 毒株的中和抗体阳转率分别为 88.41%、47.46% 和 100%。基础免疫后 1 年, 对两型中和抗体滴度下降较快, 但加强后中和抗体水平很快上升, 并超过基础免疫后的水平 (表 2)。

表 2 流行性出血热双价灭活疫苗免后中和抗体反应

接种针次	76-118 (I 型)		UR (II 型)	
	阳转率 (%)	GMT	阳转率 (%)	GMT
基础免疫后 2 周 (6 例)	91.30	18.27 ± 2.21	88.41	12.47 ± 2.16
加强前 (59 例)	50.85	< 5	47.46	< 5
加强后 2 周 (59 例)	100.00	37.09 ± 2.24	100.00	32.61 ± 2.05

讨 论

以往我国研制的地鼠肾、沙鼠肾和鼠脑纯化双价灭活疫苗在人体观察中均由于抗体阳转率未达标而不甚理想。其原因有: 双价灭活疫苗中的两型抗原量仅为同型单价疫苗的一半, 由于减少了抗原接种量而影响了免疫效果; 用于制备双价疫苗的两型病毒中其中一型病毒株的抗原性和免疫性较差。经不断努力, 对其中免疫原性较差的毒株进一步选育及采用浓缩纯化技术来增加双价疫苗中的抗原量, 由此生产的疫苗在小范围人群中试用时能诱导良好的抗体应答, 现已开始随机化现场试验^[7]。

我国生产的 EHF 沙鼠肾细胞培养灭活疫苗由于采用 β -丙内脂为灭活剂, 因此不破坏病毒血凝素, 而后者被证实与产生保护性的中和抗体有关^[8]。作者观察的结果表明, 双价灭活疫苗能诱导良好的两型中和抗体反应, 基础免疫后 1 年虽然抗体滴度较低, 但两型抗体总阳转率仍达 80%。加强一针后抗体阳转率上升至 100%, 抗体滴度超过基础免疫后两周的水平, 说明疫苗免疫后一年接种者仍有良好的免疫记忆。唐汉英等^[9]研究表明采用沙鼠肾 I 型灭活疫苗初免后的阳转率达 90% 左右, 但一年后降至 30%。双价灭活疫苗基础免疫后 1 年的抗体阳转率及滴度均高于单价灭活疫苗, 提示双价苗的免疫原性可能要好于单价灭活疫苗。韩国的姬鼠型 EHF 灭活疫苗 (Hantavax^R) 基础免疫间隔 30 d 免疫两针, 中和抗体阳转率为 75%, 一年后降至 14.2%, 加强一针后也仅为 50%, 这可能与其基础免疫只有

两针或者是制备疫苗的毒株的免疫性较差有关^[10]。

从我们现场观察的结果来看, 接种后局部反应总的发生率为 1.98% (51/2 582), 总的体温反应发生率为 0.46% (12/2 582), 其中弱、中、强反应率分别为 0.35%、0.12% 和 0.00%, 未见严重的副反应发生。这同以往对采用同种工艺生产的单价出血热灭活疫苗观察的结果是一致的^[11]。用于制备沙鼠肾细胞双价灭活疫苗的毒株分别分离自急性期出血热病人和疫区捕获的褐家鼠, 然后在长爪沙鼠乳鼠脑内传代, 待发病后取鼠肺分离得到原代毒种。以往认为采用这种方法生产的疫苗的一个最大的问题就是疫苗的耐受性和副反应。本研究表明, 沙鼠肾细胞 EHF 双价灭活疫苗是安全的, 人群耐受性良好。

此疫苗在浙江省建德市 EHF 疫区现场使用中表明, 近期免疫效果良好, 接种后未见严重副反应发生。以往出血热单价灭活疫苗在基础免疫和加强接种后都能获得较高的抗体阳转率和几何平均滴度, 但维持的时间均较短。因此有必要进一步观察双价灭活疫苗在更长时间内的免疫效果, 以及在各种类型疫区高危人群中保护发病效果。

参 考 文 献

- 1 陈化新, 罗兆庄, 张家驹, 等. 肾综合征出血热疫苗预防效果和免疫策略研究. 中国公共卫生, 1999, 15: 561-568.
- 2 Zhu ZY, Tang HY, Li YJ, et al. Investigation on inactivated epidemic hemorrhagic fever tissue culture vaccine in humans. Chin Med J, 1994, 107: 167-170.
- 3 Song G, Huang YC, Hang CS, et al. Preliminary trial of an inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Vaccine, 1992, 10: 214-216.
- 4 陈化新. 肾综合征出血热疫苗效果免疫 (感染) 增强和免疫策略研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8: 321-329.
- 5 董关木. 流行性出血热疫苗现状及研究课题. 中国公共卫生, 1997, 13: 451-452.
- 6 聂子林, 俞永新, 刘文雪, 等. EHFV 微量细胞病变中和试验方法的建立及其在中和抗体检测中的应用. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 14: 263-266.
- 7 徐校平, 阮玉华, 徐刚, 等. 肾综合征出血热双价灭活疫苗随机对照试验现场情况报告. 中国公共卫生, 1999, 15: 614-615.
- 8 朱智勇, 唐汉英, 李岩金, 等. 保留血凝素活性的流行性出血热灭活疫苗免疫家兔的效果. 病毒学报, 1989, 5: 225-227.
- 9 唐汉英, 陆群英, 朱智勇, 等. 肾综合征出血热沙鼠肾灭活疫苗的免疫持久性观察. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8: 285-286.
- 10 Hae-Wol Cho, Colin R Howard. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax^R). Vaccine, 1999, 17: 2569-2575.
- 11 朱智勇, 唐汉英, 李岩金, 等. 流行性出血热疫苗人体试验的反应观察. 病毒学杂志, 1990, 1: 7-11.

(收稿日期 2000-06-06)