

· 国家重点课题总结 ·

乙型肝炎疫苗预防效果和乙型肝炎病毒基因变异的研究

项目名称:乙型肝炎疫苗预防效果研究

项目来源:国家“九五”科技攻关项目(96-906-03-02)

项目负责人:夏国良(100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所)

起止时间:1996 年 1 月~2000 年 12 月

乙型肝炎(乙肝)疫苗是预防和控制乙肝病毒(HBV)感染的流行和传播最有效措施,同时也是第一个有可能预防人类癌症的疫苗。国家“七五”和“八五”科技攻关课题研究证实^[1-4]国产乙肝血源疫苗免疫新生儿后,安全性、免疫原性、近期和中期预防效果均很好,但随着免疫后年限的延长,抗-HBs 阳性率逐年下降,乙肝疫苗远期预防效果如何及是否需要加强免疫?HBV 基因变异与疫苗免疫的关系?如何进一步提高母婴阻断效果?新型乙肝基因重组疫苗(酵母、CHO)取代血源疫苗的可行性及其免疫反应性和近期预防效果?及我国长期推广乙肝疫苗的成本效益等关键技术问题,直接影响我国乙肝疫苗免疫策略的完善及乙肝疫苗的效果和效益,也影响我国预防和控制乙肝战略目标的实现。为此,国家“九五”科技攻关项目开展了乙肝血源疫苗长期保护效果和基因重组疫苗近期预防效果的研究。主要研究成果综述如下。

一、新生儿乙肝血源疫苗的长期保护效果^[5]

在国家“七五”和“八五”有关乙肝疫苗免疫策略和近、中期预防效果研究基础上,继续在湖南省湘潭市等 4 个乙肝疫苗试点区内,对 1986~1988 年出生并接种乙肝血源疫苗的新生儿,按免疫儿年龄分层随机抽样采血随访,累计随访 21 680 人次,观察免疫儿 HBsAg、抗-HBs 和抗-HBc 动态。结果显示:新生儿单纯乙肝血源疫苗全程基础免疫后,在 15 年随访中没有加强免疫的前提下,试点区免疫儿童表面抗原携带率由免疫前平均 15.9% 下降为 1.6% 以下,携带率没有随免疫后年限的延长而增加;乙肝疫苗阻断 HBV 慢性感染的效果持续在 90% 左右(95% CI: 83.1~97.2);不同免疫后年限间表面抗原携带率、HBV 感染率和保护效果差异均无显著性($P > 0.05$)。免疫儿抗-HBs 阳性率随免疫年限延长而逐年明显下降,至第 9~10 年下降为 40%~50%,之后数年内下降幅度不大,至免疫后 13~14 年抗-HBs 阳性率维持在 30%~42%,抗体滴度下降了 90%。抗-HBc 阳性率均低于 4%。免疫保护失败者 90% 以上为乙肝双阳性母亲新生儿或出生后 24 h 内未及及时免疫者,并主要出现在免疫后 3 年内,1 284 例新生儿(其中 829 例的母亲为阴性、455 例的母亲为阳性)在免疫后 3~14 年的随访中没有观察到新的表面抗原阳转者。说明新生儿单纯乙肝疫苗免疫的长期预防效果与

抗-HBs 阳性率和滴度的下降趋势不相关;对群体而言,新生儿及时完成全程免疫后,无需加强免疫可有效阻断 HBV 感染成为慢性携带者而终生受益。提高群体保护效果的关键是提高新生儿免疫接种率和全程接种率的同时,提高母婴阻断效率并尽量在出生后 24 h 内完成首剂疫苗免疫。

二、乙肝疫苗免疫后体液和细胞免疫的回忆反应^[6]

湖南湘潭和浙江杭州乙肝疫苗试点区,随机采样观察了 170 名乙肝血源疫苗免疫后 9~11 年,用每剂 5 μ g 乙肝酵母苗加强免疫的儿童的血清免疫应答,及 46 例免疫青少年外周血淋巴细胞(PBMC)对基因重组表面抗原刺激的增殖反应。结果显示:乙肝疫苗免疫后 9~11 年的儿童,完成 1 剂、2 剂和 3 剂法加强免疫后 1 年内,抗-HBs 阳性率和几何平均滴度(GMT)水平,3 组均迅速升高,3 种加强免疫组 GMT 分别比加强前提高了 6.5、9.3 和 24.2 倍,阳性率均上升至 100%,加强免疫剂量越大抗体升高越多,各组间 GMT 差异有非常显著性($P < 0.01$)。完成加强免疫后,高剂量加强组抗-HBs 阳性率比低剂量组下降缓慢,至加强后第 3 年,1 剂法抗-HBs 阳性率降为 71.2%,2 剂法降为 79.2%,而 3 剂法维持在 92.5%。乙肝血源疫苗免疫 9~11 年后的青少年 PBMC 对特异性重组 HBsAg 刺激的增殖反应强度和 INF- γ 水平明显高于对照,细胞免疫反应的强度还与机体抗体水平相关。说明乙肝疫苗免疫后机体特异性体液和细胞免疫记忆均可长期存在,回忆反应与免疫背景有关,反应强度与加强免疫的疫苗剂量正相关,机体免疫记忆可能是维持乙肝疫苗长期保护效果的重要原因之一。

三、HBV 表面抗原基因变异的检测方法研究

特异基因序列固相聚合酶链反应(SS-SPPCR)是检测 HBV 基因点突变和区分野毒株与变异株混合感染灵敏而特异的新方法。它将 PCR、DNA 杂交和酶免疫放大技术有机结合起来。应用克隆纯化的 DNA 制成不同比例基因变异株和野毒株混合物进行定性和定量分析,SS-SPPCR、直接测序、有限稀释 PCR 和克隆筛选等 4 种检测基因变异方法的灵敏性分别为:当变异株占混合物的 1%~1%₀₀时,SS-SPPCR 可有效检测出变异株的混合感染;当变异株占混合物 50% 以上时,直接测序才能检出变异株感染;有限稀释 PCR 和克隆筛选的灵敏性分别为变异株占混合物 2% 和 10% 以上。

四、HBV 表面抗原基因变异的流行状况^[7,8]

应用直接测序和 SS-SPPCR 方法,分别分析了我国 97 例单纯乙肝疫苗免疫后携带者、88 例未免疫育龄妇女和 95 例未免疫儿童携带者,HBV_s 抗原决定簇氨基酸置换的流行率。结果显示:直接测序检测的乙肝疫苗免疫后携带者氨基酸置换流行率显著高于未免疫育龄妇女和儿童携带者对照 ($P < 0.01$),流行率分别为 30.9% (30/97)、10.2% (9/88) 和 5.3% (5/95)。最常见的氨基酸置换位点是 145、126 和 133。应用更为敏感的 SS-SPPCR 法分别检测 145 和 126 位氨基酸点突变的流行率,各组间差别不明显,其中 145 位氨基酸置换的流行率分别为 39.2%、33.0% 和 32.6%。经直接测序法检测,免疫后携带者基因变异流行率高于未免疫携带者 5.41 倍。按携带者基因型和血清亚型分层分析,基因型 B 和 adw2 血清亚型携带者受免疫选择后出现基因变异的危险性显著较高,分别为 34.55 和 33.39,而基因型 C 和 adr 血清亚型携带者基因变异危险性较低,分别仅为 2.73 和 2.45。说明单纯乙肝疫苗具有免疫选择表面抗原基因变异株的作用,基因变异株在未免疫携带者中主要是弱势准种,基因变异的危险性与病毒基因型和血清亚型有关。

五、HBV 感染的分子流行病学调查^[9,10]

湖南、广西、河南和河北 4 省(区) 25 个县(市) 280 例慢性 HBV 携带者,应用 PCR 扩增和 DNA 序列分析,确定 HBV 基因型和血清亚型。结果显示:HBV 基因型 B、C 和 D 均有分布,分别占 29.3%、67.9% 和 2.9%,其中 B 和 C 为优势基因型。Adr、adw2、ayr、ayw1、ayw2 和 ayw3 等 6 种血清亚型均有分布,其中 adr 和 adw2 为优势血清亚型,分别占 64.3% 和 31.4%。南方地区基因型 B、C 及血清亚型 adr、adw2 均有分布,而北方地区基因型 B 及血清亚型 adr 呈优势分布。基因型 B 与 adw2 血清亚型,基因型 C 与 adr 血清亚型有非常密切的基因相关性。280 例 HBV 携带者表面抗原基因序列每 100 个核苷酸的平均置换频数为 2.94。基因型 B (adw2 血清亚型) 毒株核苷酸置换频数为 5.63 (5.48),而基因型 C (adr 血清亚型) 仅为 1.6 (1.51)。由此提示:HBV 基因型和血清亚型的分布均有明显的地区性;基因型 B 及相对应的 adw2 血清亚型毒株的基因可变性明显高于基因型 C 及相应的 adr 血清亚型。

六、乙肝基因重组疫苗大规模推广的近期保护效果^[11]

河北(CHO 苗)、广西和湖南(酵母苗)乙肝疫苗试点区,于 1996 年开始应用基因苗取代血源疫苗,并使新生儿基因苗接种率持续维持在 95% 以上。随机抽样选择了 2 000 多名 1996 年基因苗免疫的新生儿,分别于 1997、1998 和 2000 年采血观察基因苗免疫后抗-HBs 阳转率和近期保护效果。结果显示:国产乙肝基因重组疫苗大规模推广后安全、有效和可行,抗-HBs 阳转率和近期保护效果(3 年)与血源疫苗相当,酵母苗与 CHO 苗的免疫反应性和保护效果未观察到明显差异。

七、乙肝基因重组疫苗母婴阻断方案的研究

在广西、湖南(酵母苗)及河北(CHO 苗)等 3 个地区,对 1996 年 9 月以后出生的 HBV 双阳性母亲新生儿,应用乙肝基因重组疫苗和基因苗加 50 IU HBIG 两种母婴阻断方案免疫新生儿,连续 4 年采血随访免疫儿 HBsAg 和抗-HBs 动态。共随访单纯基因苗母婴阻断儿 289 例,基因苗加 HBIG 阻断儿 186 例。结果为单纯乙肝基因重组疫苗的母婴阻断效果是 87.8% (95% CI: 83.6~91.9),基因苗加 HBIG 的阻断效果为 91.2% (95% CI: 86.7~95.6),基因重组酵母和 CHO 疫苗间母婴阻断效果差异无显著性 ($P > 0.05$),两种母婴阻断方案间及各地免疫人群间的母婴阻断效果差异亦无显著性 ($P > 0.05$)。两种母婴阻断方案免疫新生儿间抗-HBs 的阳转率和 GMT 差异均无显著性 ($P > 0.05$)。首剂免疫后 1 年,抗-HBs 阳性率在单纯疫苗组和 HBIG 组分别为 91.1% 和 93.5%,GMT 分别为 153 mIU/ml 和 164 mIU/ml,以后逐年显著下降(趋势检验: $P < 0.001$),至免疫后第 4 年,阳性率分别降为 65.0% 和 66.6%,GMT 仅为第一年的 1/3。乙肝基因重组疫苗(酵母或 CHO)加低剂量 HBIG 的母婴阻断效果可达 90% 以上,明显优于单纯血源疫苗,国产 CHO 疫苗的保护效果可与引进国外技术生产的酵母苗效果相当,我国现行乙肝基因疫苗抗-HBs 的免疫检测技术方法有待改进。

八、我国目前推广乙肝疫苗的成本效益^[12]

根据乙肝疫苗试点区免疫推广 15 年来的保护效果,我国 HBV 感染本底及其自然史推算,若新生儿乙肝疫苗接种率达 90%,我国每年出生的 2 千万新生儿队列中,179 万乙肝病毒携带者、45 万慢性肝病和 63 万急性肝炎可被疫苗阻断。换言之,每接种 1 000 份(全程)乙肝疫苗可减少 95 个慢性携带者、24 个慢性肝病和 34 个急性肝炎。初步估计我国目前推广乙肝疫苗的成本效益至少可达 1:35。

九、小结

应用乙肝疫苗预防和控制 HBV 感染是一项长期而艰巨的任务,必将造福于整个中华民族,但面临的科学技术问题还很多。如:新生儿完成全程免疫后,能否在青壮年期有效地预防发病;HBV 表面抗原基因变异的流行趋势、抗原异质性、危害性及其防治对策;现行 HBV 检测技术方法和乙肝疫苗对基因变异株的有效性;乙肝基因疫苗抗-HBs 的免疫检测技术方法;乙肝基因重组疫苗的长期预防效果;乙肝疫苗全国推广后 HBV 感染模式和趋势的变化与免疫推广策略调整的关系等关键技术问题,对尽快实现我国乙肝控制战略均非常重要,有待深入开展研究。

合作单位及人员:

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肝炎室(夏国良);湖南省湘潭市卫生防疫站(颜天强);广西壮族自治区疾病预防控制中心(李荣成);河北省疾病预防控制中心(孟宗达);复旦大学公共卫生学院(徐志一);浙江大学医学院(章明太);卫生部长春生物制品研究所(张嘉明);深圳康泰生物制品有限公司(汪恩豪);卫生部北京生物制品研究所(赵钰)

(夏国良 整理)

参 考 文 献

- 徐志一, 刘崇柏, 颜天强, 等. 新生儿大规模乙型肝炎血源疫苗免疫的效果考核. 病毒学报, 1991, 7(增刊): 48-52.
- 沙庆洪, 刘玉霞, 刘家壁, 等. 乙型肝炎血源疫苗不同剂量阻断新生儿母婴传播的效果观察. 病毒学报, 1991, 7(增刊): 56-59.
- 夏国良, 曹惠霖, 李荣成, 等. 乙型肝炎疫苗试点区免疫儿童的保护效果及影响因素评价. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(增刊): 24-28.
- 夏国良, 刘崇柏, 颜天强, 等. 乙肝疫苗试点区免疫儿童乙型肝炎病毒标志的分布. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(增刊): 17-23.
- 夏国良, 贾志远, 颜天强, 等. 新生儿单纯乙型肝炎血源疫苗的免疫持久性和远期保护效果. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16: 111-114.
- 夏国良, 白玉, 刘克洲, 等. 乙型肝炎疫苗长期免疫后免疫回忆应答的观察. 中国计划免疫, 2002, 8: 61-64.
- 夏国良, Nainan OV, 贾志远, 等. 单纯乙型肝炎疫苗免疫后携带者表面抗原氨基酸置换的频率和特征. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15: 212-215.
- Xia Guo-Liang, Nainan OV, Jia ZY, et al. Frequency of hepatitis B surface antigen mutations among children receiving hepatitis B vaccine in China. Antiviral Therapy, 2000, 5(suppl 1): B80.
- 夏国良, Nainan OV, 贾志远, 等. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. 中华流行病学杂志, 2001, 22: 348-351.
- Xia Guo-Liang, Nainan OV, Shapiro CN, et al. Prevalence and distribution of hepatitis B virus subtypes and genotypes in China. Antiviral Therapy, 2000, 5(suppl 1): B12.
- 夏国良. 乙型肝炎疫苗预防效果研究. 医学研究通信, 2001, 30: 12-15.

(收稿日期 2001-12-19)

(本文编辑: 张林东)

· 短篇报道 ·

三亚市 2000 年流行性乙型脑炎流行情况分析

陈继锋 丁进顺

三亚市于 2000 年 4 月发生流行性乙型脑炎(乙脑)流行, 首发病例是 4 月 24 日田独镇一 8 岁女童, 历时 56 d。疫情先后波及市区及 6 个乡镇(占乡镇总数的 40%), 11 个村(居)委会, 其中城区发病 3 例, 郊区农村发病 8 例, 无死亡, 发病率为 2.26/10 万。病例中本地人口 10 例, 流动人口 1 例, 年龄最大 10 岁, 最小 2 岁; 男性 8 例, 女性 3 例, 男女比为 2.7:1, 其中 2 岁、4 岁、5 岁及 8 岁各 1 例, 3 岁 3 例, 6 岁、10 岁各 2 例, 6 岁以下年龄组占 81.82%(9 例)。

1. 主要症状体征: 发热(11 例)、嗜睡(4 例)、昏迷(3 例)、抽搐(8 例)、呕吐(6 例)、头痛(4 例)、颈强直(3 例)、巴彬斯基征阳性 2 例, 白血球总数在 $(4.2 \sim 28.7) \times 10^9/L$ 之间, 脊髓液细胞总数 $(2.2 \sim 2.6) \times 10^9/L$, 糖、蛋白、氯化物均正常, 病例经海南省卫生防疫站采用间接免疫荧光法与酶联免疫吸附试验两种方法检测 IgG, 结果血清学证实为乙脑。

2. 疫情处理: 密切注视疫情动态, 有专人负责疫情监测、个案调查、采样化验, 确诊病例。及时组织乙脑疫苗对满 1

周岁至 10 岁儿童突击普种 80 854 人, 接种率达 80% 以上。同时在疫区开展以灭蚊为主的群众性爱国卫生活动, 疫情于 6 月下旬停息。

3. 讨论: 此次乙脑流行散发流行、点多面广, 无 2 例以上发病的疫点, 郊区农村发病高于城区。发病年龄 2~10 岁儿童, 男多于女, 起病急, 经治疗愈后良好, 无后遗症。流行原因是儿童乙脑疫苗免疫接种率低, 仅为 59.10%, 患者均无乙脑疫苗免疫接种史。加强免疫接种被忽视, 基层单位把疫苗接种集中在能收费的部分小学生中, 致使疫苗的有效接种免疫保护水平低, 造成易感人群积累所致。

三亚市自 1992~1999 年 9 年间无乙脑疫情报告, 此次疫情是对临床医生诊断为“病毒性脑炎”的患者进行血清学检测、个案调查及流行病学分析后作出的诊断, 表明前几年可能有乙脑病例散发, 因临床医生误诊, 故没有疫情报告。因此, 为能及时发现乙脑疫情, 医疗单位应不断提高对乙脑的检测诊断水平, 防疫站要把临床诊断的“病毒性脑炎”病例列为“疑似乙脑”进行监测。

作者单位 572000 海南省三亚市卫生防疫站

(收稿日期 2001-10-30)

(本文编辑: 段江娟)