

· 实验室研究 ·

不同人群血清对麻疹疫苗株与流行株的中和能力比较

冯燕 卢亦愚 严菊英 姜晓慧 史雯 徐昌平 李榛

【摘要】 目的 探讨不同人群血清对麻疹流行株与疫苗株中和能力的差异。方法 采集麻疹患者急性期与恢复期血清、麻疹疫苗免疫前后儿童血清以及流动人口血清,分别对疫苗株沪 191 与 2005 年麻疹流行株进行中和抗体(NT)滴度测定。同时,利用疫苗株、浙江省当地流行株制备动物免疫血清,与相应毒株进行交叉中和试验,测定各毒株之间抗原比。结果 疫苗免疫后儿童血清对疫苗株的中和抗体几何平均滴度(GMT)为 50.82,高于流行株 MV_i/ZJ/05/7(GMT 值为 27.35)1.86 倍;患者恢复期血清对流行株的中和能力(GMT 值为 386.95)显著高于疫苗株(GMT 值为 151.83);流动人口血清对流行株中和抗体 GMT 值均小于疫苗株,差异为 2.22~4.17 倍;MV_i/ZJ/99/1、MV_i/ZJ/04/1 和 MV_i/ZJ/05/7 与疫苗株间抗原比分别为 4.28、5.24 和 5.66。此外,部分患者急性期血清对疫苗株存在低滴度的中和抗体,GMT 值 1:4 左右。结论 不同人群血清对麻疹疫苗株与流行株的中和能力的差异有统计学意义,低滴度的疫苗抗体不能有效保护个体免受麻疹流行毒株的侵袭,应加强麻疹病毒变异与疫苗效果的相关研究。

【关键词】 麻疹病毒;中和抗体;抗原变异;几何平均滴度

Study on the neutralization capacity of different types of human measles virus vaccine and the epidemic strains FENG Yan, LU Yi-yu, YAN Ju-ying, JIANG Xiao-hui, SHI Wen, XU Chang-ping, LI Zhen. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 Objective To explore the neutralization capacities of different types of human serum to measles virus epidemic strains and vaccine strain. **Methods** Neutralization antibody(NT) to Shanghai 191 and measles virus isolates in 2005 were tested using acute and convalescent serum samples from diagnosed measles patients, children serum samples collected before and after vaccination and serum samples of migrant residents, from 3 different regions. Additionally, animal immune serum referring to vaccine strain and 3 epidemic strains were prepared and used to undergo crossing neutralization test with corresponding strains mentioned-above. Antigenic ratios were calculated. **Results** GMT value of NT of after-immune serum to vaccine strains was 50.82, 1.86 times higher than that to MV_i/ZJ/05/7(GMT was 27.35), whereas GMT value of convalescent serum to MV_i/ZJ/05/7(GMT was 386.95) was obviously higher than that to vaccine strain(GMT was 1:151.83), and GMT value of migrant residents' serum in 3 regions to MV_i/ZJ/05/7 were 2.22-4.17 times lower than that to vaccine strain. Meanwhile, the antigenic ratios between MV_i/ZJ/99/1, MV_i/ZJ/04/1, MV_i/ZJ/05/7 and vaccine strain were found to be 4.28, 5.24 and 5.66 respectively. Additionally, low NT titers to vaccine strain were found in patients' acute sera and GMT value was over 1:4. **Conclusion** There were obvious differences on neutralization antibody of different types of serum to measles vaccine strain and epidemic strains which indicating the antigenic diversity of epidemic strains had influenced the protective effectiveness of vaccine antibody to epidemic strains. It was of significance to carry on research projects on the antigenic diversity and effectiveness of measles vaccine.

【Key words】 Measles virus; Neutralization antibody; Antigenic difference; Geometric mean titer

麻疹是疫苗可预防疾病中严重威胁儿童生命和健康的传染病之一^[1,2]。就我国而言,随着麻疹疫苗接种率的提高,其发病率曾一度降至 1/10 万以下。但近年来,在儿童疫苗免疫接种率得到进一步提

的同时,浙江省乃至全国的麻疹发病率却很不稳定,流行与暴发时有发生。2005 年国内许多地区均出现麻疹暴发,全国麻疹发病率较 2004 年上升了 136%,浙江省大年龄人群发病率有大幅度增长^[3]。为什么在麻疹疫苗的高覆盖率、高接种率下,麻疹发病率却仍然居高不下,除了疫苗接种的薄弱环节外,

当前麻疹流行株变异所引起的抗原性变化如何,疫苗接种所产生的抗体对当前流行株的保护效果如何,这是人们普遍关注的问题。为了开展这方面的研究,我们在完成浙江省麻疹病毒基因特性分析的基础上^[4],采集麻疹疫苗免疫儿童、麻疹患者以及当地流动人群的血清,探讨麻疹流行株与疫苗株的抗原性差异,及其诱导机体产生抗体的中和能力差异,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 动物免疫血清的制备:参照 Coligan^[5] 多克隆抗体制备技术,采用麻疹疫苗株沪 191、麻疹分离株 MVi/ZJ/99/1、MVi/ZJ/04/1 和 MVi/ZJ/05/7 分别免疫家兔进行制备。

2. 血清标本:麻疹疫苗株沪 191 免疫前后儿童血清、流动人群血清、20 份麻疹患者急性期与恢复期血清标本均为浙江省各市疾病预防控制中心于 2005 年采集,麻疹患者为麻疹 IgM 抗体与麻疹 HI 抗体确诊病例。

3. 麻疹病毒株:麻疹疫苗株沪 191 由上海生物制品研究所提供;麻疹分离株 MVi/ZJ/99/1、MVi/ZJ/04/1 和 MVi/ZJ/05/7 分别为浙江省疾病预防控制中心于 1999、2004 和 2005 年麻疹疫情中分离。

4. 血清学试验:参照文献^[6]进行不同麻疹病毒与不同血清之间的交叉中和试验。麻疹中和抗体效价测定:将待测血清 56℃ 30 min 灭活,从 1:2 倍比稀释至 1:1024。在 96 孔细胞板中,25 μl 各稀释度血清分别与 25 μl 麻疹病毒液(含 100 TCID₅₀)混合,37℃ 中和 1 h,然后加入 100 μl Vero/slam 细胞,于 37℃ 5% CO₂ 培养 7 d,观察并记录细胞病变,以未出现细胞病变的血清最高稀释度的倒数为该血清对该病毒的中和抗体滴度。

各毒株之间交叉中和试验的抗原比参照郭元吉和程小雯^[7]的方法计算: $R(\text{antigen ratio}) = r_1 \times r_2$,式中 R 为抗原比, $r_1 = A$ 血清对 B 抗原的中和抗体滴度/A 血清对 A 抗原的中和抗体滴度, $r_2 = B$ 血清对 A 抗原的中和抗体滴度/B 血清对 B 抗原的中和抗体滴度。

HI 抗体测定参考《卫生部计划免疫技术规程》进行^[8],猴红细胞由浙江省疾病预防控制中心动物室提供,麻疹血凝素由中国药品生物制品检定所提供。

结果

1. 流行株与疫苗株抗原性差异分析:疫苗株沪 191 与浙江省 1999、2004 和 2005 年麻疹病毒分离株之间抗原比分别为 4.28、5.24 和 5.66,随着年份的推移不断增大;近年来不同年份流行株之间抗原比仅为 1.41~1.88(表 1)。

表1 麻疹疫苗株与浙江省流行株之间抗原比

毒株	沪 191	MVi/ZJ/99/1	MVi/ZJ/04/1	MVi/ZJ/05/7
沪 191	1.00	4.28	5.24	5.66
MVi/ZJ/99/1	-	1.00	1.81	1.88
MVi/ZJ/04/1	-	-	1.00	1.41
MVi/ZJ/05/7	-	-	-	1.00

2. 疫苗免疫前后儿童血清对疫苗株与流行株中和能力分析:22 份沪 191 疫苗免疫前儿童血清对疫苗株和流行株 MVi/ZJ/05/7 均无保护作用,同时 HI 抗体也为阴性。22 份疫苗免疫后血清 HI 抗体几何平均滴度(GMT)为 1:85.60,保持在较高水平。疫苗免疫后血清对疫苗株沪 191 的中和抗体 GMT 值为 1:50.82,而对流行株 MVi/ZJ/05/7 株的 GMT 值为 1:27.35,二者相差 1.86 倍($P < 0.05$)。上述中和试验结果证实,虽然疫苗免疫血清仍能中和麻疹疫苗株与流行株,但二者的中和能力存在相当的差异,疫苗免疫后产生的保护性抗体对流行株的保护能力显著低于疫苗株(表 2 和图 1a)。

表2 不同人群血清对麻疹疫苗株与流行株的中和抗体滴度

类 型	中和抗体 GMT(1:)		HI 抗体 GMT(1:)
	NT-沪 191	NT-MVi/ZJ/05/7	
疫苗免疫血清			
免前	<2	<2	<2
免后	50.82	27.35	85.60
麻疹患者血清			
急性期	4.24	1.14	-
恢复期	151.83	386.95	-
流动人口血清			
地区 A	42.26	13.46	5.78
地区 B	83.32	19.99	15.32
地区 C	27.26	12.28	3.44

3. 患者急性期、恢复期血清对麻疹疫苗株与流行株中和能力差异:20 份麻疹患者恢复期血清对流行株 MVi/ZJ/05/7 的中和抗体 GMT 值为 386.95,高于对沪 191 株中和抗体 GMT 值(151.83)2.5 倍。20 份麻疹患者急性期血清对麻疹疫苗株和流行株的中和抗体 GMT 值分别为 4.24 和 1.42,其中 6 份

患者急性期血清对两类毒株的中和抗体均为阴性,5 份患者急性期血清对两类毒株的中和抗体均为阳性 (>1:2);另有 9 例患者的急性期血清对麻疹疫苗株的中和抗体呈阳性而对流行株的中和抗体呈阴性,达到 45% 的比例;且在这 9 份患者急性期血清中,有 4 份对沪 191 疫苗株的中和抗体高于 1:8,提示低滴度疫苗中和抗体不能有效保护个体免受麻疹流行毒株的侵袭,具有低滴度麻疹疫苗中和抗体的人群,一旦接触麻疹流行株时,存在着发病的可能性,结果见表 2、图 1b 和图 2。

能力差异:不同地区流动人群血清中和疫苗株的抗体效价,均大大高于中和流行株的抗体效价。三个地区流动人群血清对疫苗株与流行株中和抗体的 GMT 值比例,分别为 3.14、4.17 和 2.22 倍(表 2),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这从两类毒株的中和抗体效价点图(图 3)上也可以看出。

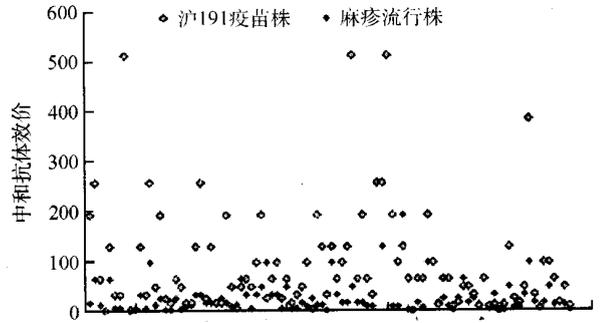


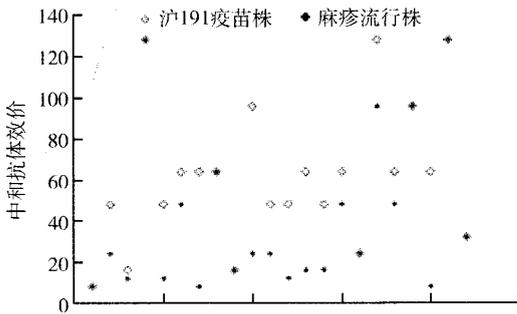
图3 三个地区流动人群对麻疹疫苗株沪 191 及麻疹流行株中和抗体

讨 论

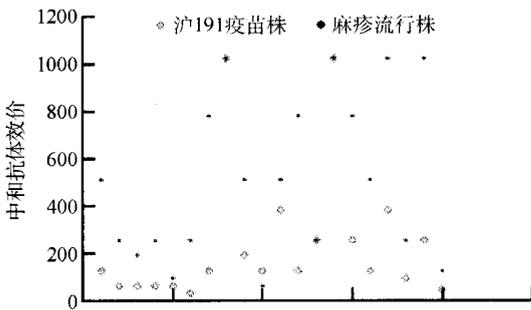
麻疹疫苗免疫接种是控制与消除麻疹的根本途径,我国麻疹疫苗株沪 191 已使用 40 多年,疫苗株(也即早年的流行株)与当前的麻疹流行株之间不断积累的基因差异^[2-4],是否已涉及到病毒的抗原性改变,从而影响到疫苗的免疫保护效果和免疫持久性,这些均受到了人们的普遍关注。

从抗原比层面分析,病毒株间的抗原比反映两者之间的抗原性差异。当抗原比 ≤ 1.5 时,两毒株间抗原性无明显差异;抗原比为 1.5~2.0 时,两毒株抗原性小有差异;抗原比值越大差异越大^[7]。浙江省 1999 年与 2004、2005 年两分离株之间抗原比分别为 1.81 和 1.88,而 2004 年与 2005 年两分离株之间抗原比仅为 1.41,说明近年来分离株之间的抗原性差异较小,仍属于同一类型毒株;而近年流行株与疫苗株间抗原比已达 4.28~5.66,提示两类毒株抗原性差异显著,且随年份的推移而不断增加。

本研究表明,疫苗免疫后儿童血清对沪 191 疫苗株的中和能力要显著高于麻疹流行株 MVi/ZJ/05/7,二者之间的 GMT 值相差 1.86 倍。据文献报道,我国疫苗免疫血清中和中国流行株的滴度低于中和 Ed 和 Chi-1 株 2~5 倍^[9];Tamin 等^[10]和 Masae 等^[11]的研究也指出近期流行株存在特殊的抗原表位,感染者的血清中和野毒株 Chi-1 株的 GMT 高于中和疫苗株的 4 倍。本研究结果与其相符,显示浙



a. 沪 191 疫苗免疫儿童血清对麻疹疫苗株与流行株的中和抗体水平



b. 麻疹患者恢复期血清对麻疹疫苗株与流行株的中和抗体水平

图1 沪 191 疫苗免疫后儿童血清

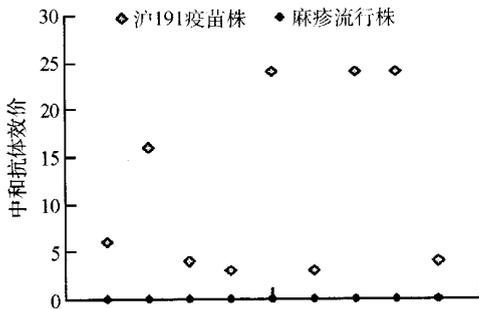


图2 9 例麻疹患者急性期血清对疫苗株与流行株的中和抗体水平

4. 流动人群血清对麻疹疫苗株与流行株的中和

江省近几年麻疹流行株虽然依然保留了与疫苗株相同的主要的中和位点,疫苗免疫血清仍能够中和与其基因型不同的中国麻疹病毒流行株(H1 基因型),但两者的中和能力已出现了显著的差异。结合基因分析结果,即浙江省 2005 年麻疹流行株与疫苗株在 H 和 N 蛋白上的差异已达到 5%^[3],提示近年麻疹流行株在基因变异的同时,伴随着病毒抗原性的改变,流行株与疫苗株在抗原性上已存在一定的差异,且有进一步累积的趋势。

本研究的 20 例麻疹患者中,有 5 份患者急性期血清对疫苗株和流行株均出现低滴度的中和抗体,分析可能与血清采集时间偏后、机体已产生保护性抗体有关,其余 15 份急性期血清均未出现对流行株中和抗体阳性而对疫苗株阴性的现象。值得关注的是,有 9 份患者急性期血清对麻疹疫苗株的中和抗体为阳性(对流行株均为阴性),GMT 值为 1:8.59,即 45% 的麻疹患者血清对沪 191 疫苗株具有低滴度的中和抗体,部分患者血清抗体效价达 1:8 以上,其中 3 份血清中和抗体效价竟高达 1:24,该现象显示人群血清中即使存在麻疹疫苗株的低滴度甚至中滴度保护性抗体,一旦暴露于当前麻疹流行株时,有相当一部分人群将无法保护自身免受麻疹流行毒株的侵袭,提示当前流行株在低滴度的疫苗免疫抗体中有产生逃逸的可能。据周剑惠等^[12]报道,一些最近流行的麻疹野病毒能够从具有 1:4 较低中和抗体血清中逃逸,免疫后低水平的抗体(1:4)不能中和一些最近的麻疹流行株。另据土耳其资料,无论流行株抗原性变异与否,疫苗保护性抗体滴度应高于或等于 1:16 才能中和不同基因型的流行株^[13]。当前我国使用的疫苗株为 A 基因型,而本地优势株为 H1 基因型,随着流行株基因变异,可能存在一些抗原表位的变化,这些保护性抗原表位改变的积累,在一定程度上确实能降低疫苗免疫血清的中和能力。2005 年浙江省大年龄人口麻疹发病率也大幅度增加,除流动人口因素外,分析可能与疫苗免疫抗体衰减后,低滴度抗体对流行株保护能力减弱有关。

综上所述,疫苗免疫血清和自然感染者血清对麻疹病毒的中和抗体水平存在显著的差异,这与当

前麻疹流行株抗原性变异具有一定关系。虽然,目前疫苗免疫血清还能够中和所有基因型别的麻疹病毒,但应该加强对麻疹流行株抗原性和人群麻疹抗体水平的监测,并通过调整麻疹疫苗的免疫策略,使人群维持较高水平的麻疹中和抗体,达到 2010 年消除麻疹的目标。

参 考 文 献

- [1] Olive JM, Aylward BR, Melgaard B. Disease eradication as a public health strategy: is measles next? *World Health Stat*, 1997, 50:185-187.
- [2] 陈志慧. 麻疹病毒流行株的基因变化与现行疫苗的免疫效果. *中国计划免疫*, 2003, 9(1):47-51.
- [3] 严菊英, 卢亦愚, 张健华, 等. 浙江省麻疹病毒分离株的基因特性与免疫原性研究. *中国病毒学*, 2006, 21(1):1-5.
- [4] 冯燕, 严菊英, 卢亦愚, 等. 浙江省 2005 年麻疹病毒流行株基因特性分析. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(5):406-408.
- [5] Coligan J. *Current protocol in immunology*. USA:1991, 1. 6. 1-1. 7. 5.
- [6] Kobune F. Improvement and standadization of neutralization test for measles virus. *Clin Virol*, 1996, 28(1):31-33.
- [7] 郭元吉, 程小雯. 流行性感胃病毒及其实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997:102-106.
- [8] Diao LD. *Measles*. Shanghai: Shanghai Science Technique Literature Press, 1998:98-101.
- [9] Xu WB, Tamin A, Rota JS, et al. New genetic group of measles virus isolated in the People's Republic of China. *Virus Research*, 1998, 54:147-156.
- [10] Tamin A, Rota PA, Wang ZD. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *J Infect Dis*, 1994, 170:795-801.
- [11] Masae I, Yoshinobu O, Hak H. Comparative analysis of titers of antibody against measles virus in sera of vaccinated and naturally infected Japanese individuals of different age groups. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(5):1733-1738.
- [12] 周剑惠, 陈超, 刘桂艳, 等. 麻疹病毒中国株和日本株的 H 蛋白及抗原性比较. *中国计划免疫*, 2003, 9(2):105-108.
- [13] Korukluoglu G, Zarakolu P. Antigenic analysis of wild-type measles viruses currently isolated in Turkey, 2006, 48(2):105-108.

(收稿日期:2007-06-21)

(本文编辑:张林东)