

肠道病毒 71 型疫苗上市后疫苗保护效果和免疫原性分析

华瑞珏^{1,2} 黄瑾¹ 张小娟¹ 沈琦¹ 蔡明毅¹ 袁峰¹ 张莹³ 崔萍芳³ 李颖³
石昊昱³ 徐彪²

¹上海市静安区疾病预防控制中心 200072; ²复旦大学公共卫生学院, 上海 200032;

³中国医学科学院医学生物研究所, 昆明 650106

通信作者: 徐彪, Email: bxu@shmu.edu.cn

【摘要】 目的 分析肠道病毒 71 型(EV-A71)疫苗上市接种后的疫苗保护效果和免疫原性。方法 采用队列研究于 2017 年 10—12 月在上海市静安区招募符合纳入标准的预防接种门诊受种者为研究对象, 按 0、30 d 程序接种疫苗者纳入接种组, 不接种疫苗者纳入对照组, 随访观察 1 年, 评估疫苗保护效果和接种 2 剂次疫苗后抗体水平及阳转率。结果 共纳入 3 018 名 8~20 月龄的儿童, 接种组 1 211 人, 对照组 1 807 人, 经过 1 年随访, EV-A71 疫苗对 EV-A71 感染引起的手足口病保护率为 100.00%(95%CI: -66.99%~100.00%)。接种组中 124 人检测了中和抗体, 接种首剂疫苗后 60 d 抗体几何平均滴度(GMT)为 41.76(95%CI: 35.60~49.34), 接种后 365 d GMT 为 28.44(95%CI: 23.59~34.54)。结论 EV-A71 疫苗对于儿童有良好的免疫应答, EV-A71 感染引起的手足口病病例较少, 需进一步观察。

【关键词】 肠道病毒 71 型疫苗; 手足口病; 疫苗保护效果; 免疫原性

基金项目: 2017 年上海市静安区医学科研课题(2017GW03)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20191006-00717

Analysis on post-marketing effectiveness and immunogenicity of enterovirus-A71 vaccine

Hua Ruijue^{1,2}, Huang Jin¹, Zhang Xiaojuan¹, Shen Qi¹, Cai Mingyi¹, Yuan Feng¹, Zhang Ying³, Cui Pingfang³, Li Ying³, Shi Haoyu³, Xu Biao²

¹Jing'an District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200072, China; ²Public Health of Fudan University, Shanghai 200032, China; ³Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Kunming 650106, China

Corresponding author: Xu Biao, Email: bxu@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze the effectiveness and immunogenicity of enterovirus-A71 (EV-A71) vaccine in immunization program. **Methods** A cohort study was conducted in immunization clinics in Jing'an district in Shanghai from October to December 2017. Children who received EV-A71 vaccine based on a 2-dose schedule (on day 0 and day 30) were enrolled as vaccine group and those who received no EV-A71 vaccine were enrolled as control group. After 1-year follow-up, the effectiveness and neutralizing antibody level and the positive results of antibody immunogenicity in vaccine group were analyzed. **Results** A total of 3 018 children aged 8-20 months were enrolled, in whom 1 211 were in vaccine group and 1 807 were in control group. The vaccine effectiveness was 100% against EV-A71-associated hand, foot, and mouth disease (HFMD) indicated by 1 year follow-up (95%CI: -66.99%-100.00%). The geometric mean titer of neutralizing antibody (GMT) was 41.76 (95%CI: 35.60-49.34) at day 60 and 28.44(95%CI: 23.59-34.54) at day 365 in 124 children in vaccine group. **Conclusions** In children, EV-A71 vaccine elicited EV-A71-specific immune response. Less EV-A71-associated HFMD cases have been observed, further observation is needed.

【Key words】 EV-A71 vaccine; Hand, foot, and mouth disease; Effectiveness; Immunogenicity

Fund program: Research on Medical Science in Jing'an District of Shanghai, 2017(2017GW03)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20191006-00717

手足口病常见于<5岁儿童,由多种人肠道病毒感染引起的疾病,其中以肠道病毒 71 型(EV-A71)

和柯萨奇病毒 A 组 16(CV-A16)最多见^[1]。近年来,我国多次出现 EV-A71 引起的高致死性手足口病的

流行暴发^[2]。接种疫苗是控制EV-A71疫情的最佳策略。我国自主研发用于<5岁婴幼儿的EV-A71灭活疫苗于2016年3月获批上市使用^[3]。本研究通过对EV-A71灭活疫苗上市使用后的免疫原性和疫苗保护效果进行分析,为完善我国手足口病疫苗免疫和防控策略提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:在静安区开展EV-A71疫苗接种的社区,招募日常门诊开设时常规接种疫苗的8~20月龄儿童。纳入标准:接种组:①获得父母或其他法定监护人的书面知情同意;②儿童身体健康,未明确诊断患过手足口病及EV-A71病毒感染;③满足临床接种EV-A71疫苗条件,自主、自愿按0、30 d程序接种疫苗的儿童;对照组:①与接种对象在同一社区接种其他疫苗;②家长或其他法定监护人明确表示不接种EV-A71疫苗的8~20月龄儿童。排除标准:①已患手足口病;②之前接种过EV-A71疫苗,只接种1剂次疫苗;③根据临床试验,接种EV-A71疫苗后2周检测出抗体^[4],故排除接种EV-A71疫苗后2周内被诊断为手足口病;④常住地与接种门诊非属同一个社区或有多个常住居住地。

所有研究对象的父母或其他监护人均签署书面知情同意书。

2. 疫苗:中国医学科学院医学生物学研究所生产的EV-A71(KMBI7细胞)灭活疫苗,规格为预充式0.5 ml,批号为201707042、201706033、201708048。所有研究用疫苗均有国家食品药品监督管理局签发的生物制品批签发合格证。疫苗保存于2~8℃阴暗处,严防冻结,在冷藏条件下运输。

3. 研究方法:

(1)疫苗保护效果分析:采用前瞻性队列研究方法,于2017年10—12月在上海静安区接种门诊招募符合纳入标准的8~20月龄儿童,观察终点为EV-A71感染引起的手足口病,观察期限为1年。样本量计算:

$$N = \frac{[Z_{\alpha} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + Z_{\beta} \sqrt{(p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2))}]^2}{(p_1 - p_2)^2}, \text{ 根}$$

据2015和2016年静安区疫情报告 p_1 取0.03, p_2 根据EV-A71疫苗Ⅲ期临床实验取0.014^[5], $\alpha=0.05$, $\beta=0.20$ 。采用成组设计,考虑失访、不配合等因素,在样本量计算基础上增加20%,接种组为1200人;考虑对照组在观察期间接种疫苗,根据静安区适龄儿童EV-A71接种情况按接种率20%估计,对照组失访、不配合等比例大于接种组,故对照组以1:1.5扩

大样本含量为1800人。采集病例的肛拭子,由静安区CDC用直接荧光PCR法检测EV-A71或其他肠道病毒特异性核酸,阳性结果送上海市CDC复核。

病例诊断:参照国家卫生健康委员会发布的《手足口病预防控制指南(2009版)》对病例及重症病例进行判定。病例发现:研究对象监护人主动报告;CDC人员登录中国疾病信息系统查询;社区医生报告。随访:儿童每次前往门诊预防接种时进行随访,超过1个月未来社区接种疫苗者,社区医生电话随访。

(2)疫苗免疫原性分析:在接种组中,分别采集接种前0 d、完成2剂次接种后1个月即60 d、接种首剂1年后即365 d的手指末梢血约0.5 ml,分离血清约0.2 ml。样本量计算: $N=2P \times (1-P) \times (U_{\alpha} + U_{\beta}/2)^2/\delta^2$, P 根据EV-A71疫苗Ⅲ期临床实验^[5]取0.981, $\alpha=0.05$, $\beta=0.1$, $\delta=0.1$,免前采样数为120人。

由中国科学院生物研究所用国家食品药品监督管理局提供的标准病毒株对96孔板生长的细胞培养微量中和试验测定研究对象血清标本中和抗体。测定血清作1:4~1:128稀释,抗体滴度 $\geq 1:8$ 为阳性。基础免疫前阴性者,免后抗体试验测定滴度 $\geq 1:8$ 判为阳转;基础免疫前阳性者,免后抗体试验测定滴度较免疫前4倍及以上增长判为阳转。

4. 统计学分析:采用疫苗保护率(95%CI)描述疫苗保护效果[VE=(对照组发病密度-接种组发病密度)/对照组发病密度 $\times 100\%$];采用Kaplan-Meier生存分析法分析未感染EV-A71情况。采用阳转率(95%CI)描述抗体阳转情况,几何平均滴度(GMT)(95%CI)描述抗体水平。定量资料采用 t 检验,定性资料采用 χ^2 检验,均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用Excel 2016软件进行数据整理,R3.6.1软件进行数据统计分析。

结 果

1. 人口学特征及基础资料:辖区共有8~20月龄儿童10330人(本市7133人,外来3197人),签署知情同意书3064人(接种组1241人,对照组1823人),最终接种组纳入1211人(97.58%),对照组纳入1807人(99.12%)。随访1年,对照组观察1681人(93.03%);接种组观察1193人(98.51%)(图1)。随访开始时接种组和对照组性别、户籍、年龄差异无明显统计学意义(表1)。

2. 疫苗保护效果分析:1年观察期内共发现疑似病例73例,采集肛拭子73例,其中阴性10例;重

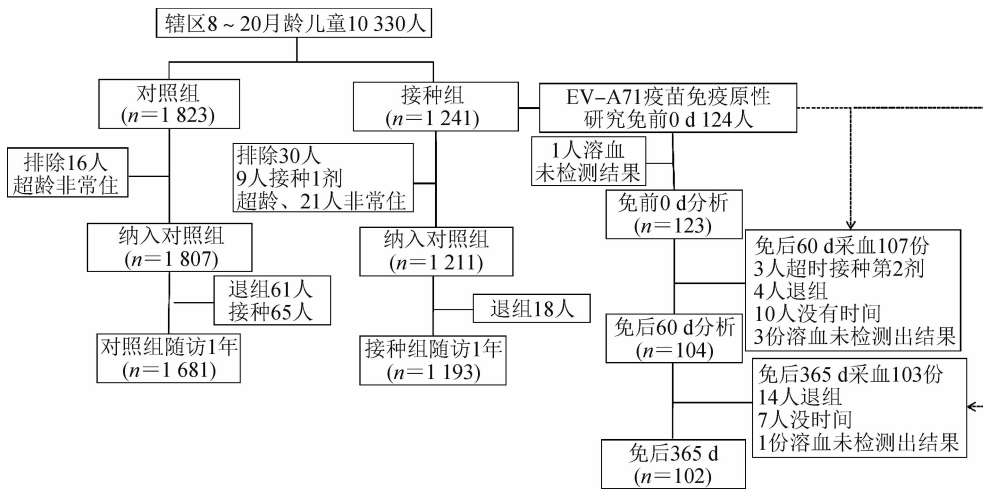


图1 EV-A71疫苗免疫原性和保护效果研究-随访流程

表1 接种组和对照组人口学特征和基本情况

| 特征 | 接种组 (1 211人) | 对照组 (1 807人) | χ^2/t 值 | P值 |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-------|
| 性别(%) | | | 0.022 | 0.883 |
| 男 | 630(50.02) | 945(52.30) | | |
| 女 | 581(49.98) | 862(47.70) | | |
| 户籍(%) | | | 0.13 | 0.715 |
| 本市 | 820(67.71) | 1 235(68.35) | | |
| 外地 | 391(32.29) | 572(31.65) | | |
| 年龄(月) | | | 0.55 | 0.585 |
| $\bar{x} \pm s$ | 13.65 ± 2.93 | 13.72 ± 3.60 | | |
| 区间 | 8.10 ~ 19.47 | 8.07 ~ 19.47 | | |

症病例1例,为其他肠道病毒。EV-A71感染3例,接种组未观察到EV-A71感染的手足口病,疫苗保护效果为100.00%(95%CI: -66.99% ~ 100.00%)(表2)。

从研究之日起在第165天(2018年4月)、第231天(5月)和第340天(9月)在对照组观察到EV-A71病例(图2)。

3. 免疫原性分析:接种组中124人进行了血清免疫学研究,年龄8.70~19.97月龄。分别在免前0 d、免后60 d、免后365 d得到有效血清学结果123份(99.19%)、104份(83.87%)和102份(82.26%)(图1)。107人(86.29%)接种了2剂疫苗,接种间隔时间为(35.07 ± 6.08)d,最短间隔28 d,最长间隔58 d(表3)。

免前0 d GMT为4.17(95%CI: 4.04 ~ 4.31),免疫60 d GMT为41.76(95%CI: 35.60 ~ 49.34),明显高于免前GMT, $t=25.97(P<0.01)$;免后365 d GMT

表2 接种组与对照组手足口病发病情况

| 发病情况 | 接种组 | | 对照组 | | RR值 (95%CI) | 疫苗保护率(%) (95%CI) | P值 |
|--------|-----|----------------|-----|----------------|-------------------|-------------------------|-------|
| | 例数 | 发病密度 (/千人年) | 例数 | 发病密度 (/千人年) | | | |
| EV-A71 | 0 | 0.00 | 3 | 1.71 | 1.00(0.00 ~ 1.67) | 100.00(-66.99 ~ 100.00) | 0.276 |
| 其他 | 21 | 17.52 | 39 | 22.27 | 0.78(0.46 ~ 1.35) | 21.32(-35.21 ~ 54.04) | 0.360 |
| 合计 | 21 | 17.52 | 42 | 23.98 | 0.73(0.43 ~ 1.24) | 26.94(-24.36 ~ 57.09) | 0.226 |

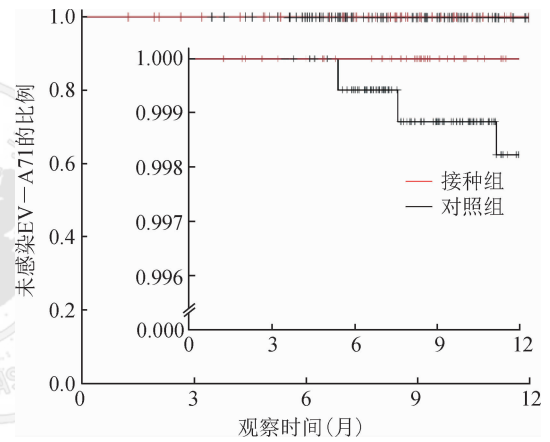


图2 未感染EV-A71风险的Kaplan-Meier生存分析

为28.44(95%CI: 23.59 ~ 34.54),明显高于免前GMT, $t=18.89(P<0.01)$ 。免前中和抗体阳转率为3.33%,免后60 d中和抗体阳转率为97.12%(95%CI: 93.80% ~ 100.40%),抗体阳转率明显高于免前 $\chi^2=195.92(P<0.01)$;免后365 d中和抗体阳转率为90.20%(95%CI: 84.30% ~ 96.10%),阳转率明显高于免前 $\chi^2=172.31(P<0.01)$ (表4)。

讨论

本研究为疫苗上市后的观察性研究,观察时间为1年。经过1个手足口病发病高峰,接种组中未观察到EV-A71病例,仅在对照组检测到3例,占所有病例的4.11%。而同期静安区手足口病病原学监测的EV-A71感染4例(3.33%),EV-A71在所有手足口病的占比明显低于研究设计时的31.79%^[6],可能是经过2年的EV-A71疫苗接种(静安区6月龄~5岁儿童EV-A71

表3 免疫原性研究对象基本情况

| 基本情况 | 免前0 d | 免后60 d | 免后365 d |
|----------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| 送检数 | 124 | 107 | 103 |
| 检出数 | 123 | 104 | 102 |
| 采样间隔($\bar{d}, \bar{x} \pm s$) | | | |
| 均值 | | 70.86 ± 9.80 | 367.40 ± 11.50 |
| 区间 | | 59 ~ 125 | 349 ~ 390 |
| 性别(%) | | | |
| 男 | 65(52.84) | 55(52.88) | 54(52.94) |
| 女 | 58(47.16) | 49(47.92) | 50(47.06) |
| 户籍(%) | | | |
| 本市 | 81(65.85) | 71(68.27) | 71(69.61) |
| 外地 | 42(34.15) | 33(32.73) | 31(30.39) |
| 年龄(月, $\bar{x} \pm s$) | 14.94 ± 3.27 | 14.95 ± 3.34 | 14.81 ± 3.30 |

表4 免前免后抗体滴度情况(例)

| 抗体滴度(I :) | 免前 | 免后60 d | 免后365 d |
|------------|-----|--------|---------|
| ≤4 | 119 | 2 | 7 |
| 8 | 1 | 6 | 11 |
| 16 | 1 | 14 | 23 |
| 32 | 1 | 29 | 20 |
| 64 | 1 | 35 | 37 |
| 128 | 0 | 17 | 0 |
| >128 | 0 | 1 | 4 |
| 合计 | 123 | 104 | 102 |

疫苗覆盖率45.30%)及之前大量易感人群已患EV-A71型手足口病,人群中EV-A71病原体携带率下降,从而减少了感染的可能^[5,7-8]。

该疫苗对CV-A16、柯萨奇病毒A组6型(CV-A6)等其他肠道病毒引起的手足口病保护率为21.32%(95%CI: -35.21% ~ 54.04%),提示EV-A71疫苗对除由EV-A71型肠道病毒以外的病毒引起的手足口病没有保护效果,结果与同时段其他研究EV-A71疫苗保护效果的报道相同^[9-10]。

在免疫原性分析中,接种前儿童的EV-A71抗体阳转率仅3.33%,GMT为4.17,均普遍偏低;接种首剂免疫后60 d和365 d GMT分别为47.16和28.44,明显高于1 : 8的抗体阈值,接种后1年对EV-A71病毒的感染仍有保护效果,但GMT值低均于国产的3个EV-A71疫苗的Ⅲ期临床试验的同年龄组儿童首剂接种后60 d与365 d的抗体值^[5,11-13]。

本研究存在一定的局限性。本研究以2015和2016年手足口病发病率预估样本含量,未考虑到接种疫苗后EV-A71感染引起的手足口病会明显下降,一年内无法观察到足够的病例,对EV-A71疫苗的保护率评估需进一步观察分析。EV-A71病毒感染除了引起手足口病外,还能引起其他感染,如疱疹性咽峡炎,本研究只对EV-A71等肠道病毒引起的手足口病进行了观察研究。另外,考虑到成本效果,本研究抗体滴度检测只做到1 : 128,且在采血过程中出现个别溶血及儿童不配合,采血量过少,无法获得检测数据;另一方面,本研究仅是观察性研究,抗体检测未设对照组,当前样本量仅满足接种前后结

果的比较,未对影响抗体水平的因素进行研究分析。

综上所述,EV-A71疫苗具有良好免疫原性,能预防EV-A71感染引起的手足口病,对疫苗保护效果分析数据依据不足,需进一步观察研究。EV-A71疫苗不能预防其他病毒引起的手足口病,在大规模推广使用EV-A71疫苗的同时,建议加快其他肠道病毒联合疫苗的研发。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢彭浦、彭浦镇、大宁、宝山、天目社区卫生服务中心的有关人员给予鼎力配合与协助;感谢江宁、曹家渡、静安寺、北站、共和新、芷江西、彭二、临汾等社区卫生服务中心的支持

参 考 文 献

- [1] WPRO WHO Western Pacific Region. Emerging disease surveillance and response [EB/OL]. (2017-02) [2019-09-30]. http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/HFMD/en/.
- [2] Zhao YY, Jin H, Zhang XF, et al. Case-fatality of hand, foot and Mouth disease associated with EV71: a systematic review and meta-analysis[J]. Epidemiol Infect. 2015, 143(14): 3094-3102. DOI: 10.1017/S095026881500028X.
- [3] Mao QY, Wang YP, Bian LL, et al. EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD)[J]. Expert Rev Vaccines, 2016, 15(5): 599-606. DOI: 10.1586/14760584.2016.1138862.
- [4] Li YP, Liang ZL, Gao Q, et al. Safety and immunogenicity of a novel human Enterovirus 71 (EV71) vaccine: a randomized, placebo-controlled, double-blind, Phase I clinical trial [J]. Vaccine, 2012, 30(22): 3295-3303. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.03.010.
- [5] Liu LD, Mo ZJ, Liang ZL, et al. Immunity and clinical efficacy of an inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy Chinese children: a report of further observations [J]. BMC Med, 2015, 13: 226. DOI: 10.1186/s12916-015-0448-7.
- [6] Li JJ, Pan H, Wang XS, et al. Epidemiological surveillance of hand, foot and mouth disease in Shanghai in 2014-2016, prior to the introduction of the enterovirus 71 vaccine [J]. Emerg Microbes Infect. 2018, 7(1): 37. DOI: 10.1038/s41426-018-0035-z.
- [7] 陈国平, 史永林, 张进, 等. 2008—2014年安徽省手足口病流行特征分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(4): 588-590, 630. Chen GP, Shi YL, Zhang J, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease in Anhui Province between 2008 and 2014 [J]. Modern Prev Med, 2016, 43(4): 588-590, 630.
- [8] Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, et al. Enterovirus 71 infection and vaccines [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2017, 6(1): 4-14. DOI: 10.7774/cevr.2017.6.1.4.
- [9] Li Y, Zhou YH, Cheng YB, et al. Effectiveness of EV-A71 vaccination in prevention of paediatric hand, foot, and mouth disease associated with EV-A71 virus infection requiring hospitalisation in Henan, China, 2017-18: a test-negative case-control study [J]. Lancet Child Adolesc Health, 2019, 3(10): 697-704. DOI: 10.1016/S2352-4642(19)30185-3.
- [10] Wang XL, An ZJ, Huo D, et al. Enterovirus A71 vaccine effectiveness in preventing enterovirus A71 infection among medically-attended hand, foot, and mouth disease cases, Beijing, China [J]. Hum Vacc Immun, 2019, 15(5): 1183-1190. DOI: 10.1080/21645515.2019.1581539.
- [11] Li RC, Liu LD, Mo ZJ, et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children [J]. N Engl J Med, 2014, 370(9): 829-837. DOI: 10.1056/NEJMoa1303224.
- [12] Zhu FC, Xu WB, Xia JL, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China [J]. N Engl J Med, 2014, 370(9): 818-828. DOI: 10.1056/NEJMoa1304923.
- [13] Zhu FC, Meng FY, Li JX, et al. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuncted enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2024-2032. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61049-1.

(收稿日期:2019-10-06)
(本文编辑:李银鸽)