

地区阻碍新生儿及时全程接种乙肝疫苗的主要因素是在家分娩<sup>[10]</sup>。但此障碍很难克服,在一般农村家庭分娩率较高。如果实施产前用胶体金试纸条检测孕妇血清 HBsAg,对 HBsAg 阳性母亲的新生儿及时全程免疫,而对 HBsAg 阴性母亲的新生儿在出生后一个月开始接种,可能是新生儿乙肝疫苗免疫的最好实施办法,应认真进行探索,以提高新生儿乙肝疫苗接种率及其保护效果。

参 考 文 献

- 1 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,7(增刊):48-51.
- 2 周建军,吴维寿,孙超美,等.新生儿乙型肝炎疫苗免疫 16 年效果观察.中国计划免疫,2003,9:129-132.
- 3 马景臣,刘洪斌,张英林,等.新生儿血源乙型肝炎疫苗免疫后 14 年效果评价.中国计划免疫,2003,9:133-135.
- 4 刘崇柏,王钊,苏崇寰,等.农村贫困地区新生儿乙型肝炎疫苗扶贫工作效果分析.中国计划免疫,2003,9:136-138.

- 5 夏国良,白玉,刘克洲,等.乙型肝炎疫苗免疫后免疫回忆应答的观察.中国计划免疫,2002,8:61-64.
- 6 Shih HH,Chang MH,Hsu HY,et al. Long term immune response of universal hepatitis B vaccination in infancy : a community-based study in Taiwan. Pediatr Infect Dis J,1999,18:427-432.
- 7 陈修荣,李荣成,农艺,等.隆安县大规模普种重组酵母乙型肝炎疫苗后的血清学监测结果评价.中国计划免疫,2001,7:141-143.
- 8 孟宗达,韩秀芝,林惠芳,等.我国研制的乙型肝炎基因重组疫苗对乙型肝炎病毒母婴传播阻断效果观察.中国计划免疫,2001,7:94-95.
- 9 Lai CL, Ben JM, Wong CY, et al. Five-year follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B recombinant DNA yeast vaccine vs plasma-derived vaccine in children : immunogenicity and anamnestic responses. Hepatology,1993,18:763-767.
- 10 卫生部疾病控制司,中国预防医学科学院.1999 年全国儿童计划免疫与乙型肝炎疫苗接种率及其影响.中国计划免疫,2000,6:193-197.

(收稿日期 2004-01-05)

(本文编辑:尹廉)

# 关于乙型肝炎疫苗免疫原性的评价

李河民 梁争论 张华远

乙型肝炎(乙肝)是经血传播的危害严重的病毒性传染病。我国是高发地区之一,乙肝表面抗原(HBsAg)阳性率约 10%,乙肝病毒(HBV)感染率达 60%~70%。乙肝除爆发性肝炎以外主要危害在于感染后变为慢性病毒携带者,并进一步发展成为慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌,根据 WHO 2001 年的指南指出,90%慢性携带者为围产期感染 HBV,但随着年龄增长,感染后慢性携带率逐渐降低;1~4 岁感染时,约 30%~50%成为慢性携带状态。据报道 HBeAg 阳性母亲在围产期传染其新生儿的危险性可达 70%~90%,但 HBeAg 阴性、HBsAg 阳性母亲生的新生儿在围产期感染危险性仅为 5%~20%。我国政府正确地制定了乙肝的免疫策略,即将免疫接种纳入计划免疫程序,明确了疫苗的接种目的和对象,即主要目的为阻止慢性感染,重点免疫新生儿,其次为 1~5 岁幼儿以及其他高危人群。对乙肝疫苗免疫原性的评价是为正确选择生产和使用基因

工程疫苗类型提供科学依据。

## 一、乙肝疫苗类型

乙肝疫苗中首先出现的是血源疫苗,其后陆续研究出以不同宿主表达的基因工程疫苗。1971 年 Krugman 首次证明了乙肝患者血浆中的 22 nm 病毒表面颗粒(HBsAg)加热后接种黑猩猩可产生保护性抗体,并能抵抗 HBV 的攻击,由此开始了乙肝疫苗的研制工作。

1. 血源疫苗:从 HBsAg 者血浆中提取抗原而制备成血源疫苗,为 20 世纪 70~80 年代初的疫苗。研究此疫苗的物理化学性状、制备工艺、质量控制、免疫原性和免疫接种策略等,对发展基因工程疫苗有重要意义。但由于存在安全性隐患,同时基因工程疫苗研究成功而停止生产和使用血源疫苗。

2. 基因工程疫苗:基因工程疫苗为与血源疫苗同时发展起来的新型生物技术开发的制品。以 HBsAg 基因构成质粒载体转入各种细胞内或细胞基因整合,培养基因工程细胞表达 HBsAg,经提取后制备成疫苗。基因工程疫苗具有良好的安全性,

并可大量生产和降低成本。曾研究过病毒、原核和真核细菌以及植物为宿主表达抗原,但真正采用于大规模生产的疫苗,主要有基因工程酵母和甲基营养型酵母的乙肝疫苗,还有较小规模生产的基因工程 CHO 疫苗等。

二、不同类型乙肝疫苗抗原免疫原性和一些生物学特性

1. HBsAg 肽谱:HBsAg 由约 100 个单体多肽组成的蛋白。表 1 表明用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 HBsAg 的肽谱并将各样品分别激光扫描,计算出糖基化和无糖基化多肽的比例,酵母抗原无糖基化,CHO 抗原糖基化的比例最大。抗原糖基化影响与单克隆抗体结合的表位密度高低(表 1)。

表 1 不同种类乙肝疫苗抗原性质比较

抗原类型	Lowry/TCA-Lowry*	肽图	表位密度** (%)	ED <sub>50</sub> (μg)
酵母-HBsAg	1:1.02	P24	57±2	1.0~2.5
血源-HBsAg	1:1.82	P24 GP27	39±3	0.2~0.3
CHO-HBsAg	1:1.77	P24 GP27 GP30	42±6	0.2~0.3

\* BSA 1:1 (Lowry/TCA-Lowry 两种方法检测抗原蛋白含量比值);\* \* 亲和力的强的单克隆抗体结合表位密度

2. HBsAg 表达方式:血源乙肝抗原—HBV 从感染机体细胞中病毒直接表达;CHO 乙肝抗原—整合质粒基因转染于 CHO 细胞浆内,酵母乙肝抗原—整

合质粒基因转染于酵母细胞浆内。甲基营养型酵母乙肝抗原—HBsAg 基因经质粒与酵母染色体整合,可能表达抗原比较稳定,且产量较高的原因之一。

3. HBsAg 在 BALB/C 小鼠体内免疫应答:血源乙肝抗原诱导的抗体最高,其次为 CHO 乙肝抗原,酵母乙肝抗原诱导的抗体最低(表 1),后者在成人的抗体阳转率较儿童显著地低,甲基营养型酵母乙肝抗原诱导抗体滴度也高于酵母乙肝抗原。但酵母来源抗原在小鼠体内诱导的特异和非特异 Th1 细胞免疫较早且强(表 2、3)。HBsAg 免疫原性即诱导体液和细胞免疫与抗原结构和无糖基化有密切关系。

4. 其他:Diminsky 等对以色列基因工程 CHO 疫苗抗原与德国基因工程汉逊酵母疫苗抗原比较研究结果表明,HBsAg 共有 14 个半胱氨酸,不同表达系统产物的结构有所不同,如汉逊酵母表达的重组 HBsAg 11 个形成二硫键,而 CHO HBsAg 仅有 3 个形成二硫键。不同来源的 HBsAg 含有一定量与其来源有关的不同组织成分,如胆固醇等。抗原二硫键结构和组分可能也影响疫苗的免疫原性。

三、免疫效果

乙肝疫苗为疫苗中质量最好的制品之一。血源疫苗的副反应发生率也较低,接种发热中度反应为 1%~6%,无强反应,注射局部红肿轻微。基因工程疫苗的副反应近期观察与血源疫苗类似。

表 2 ConA 诱导不同来源免疫小鼠脾细胞的 HBsAg 体外增殖试验结果比较

HBsAg	淋巴细胞增殖指数(̄x ± s)				
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
对照	—	—	6.26 ± 1.67	8.93 ± 2.77	11.54 ± 1.70
血源	7.18 ± 3.11	25.03 ± 3.02	6.23 ± 0.87	79.53 ± 17.82	78.92 ± 33.81
CHO	15.54 ± 3.63	8.62 ± 4.24	7.33 ± 1.97	66.36 ± 27.75	25.29 ± 11.36
Merck	12.55 ± 1.48	9.28 ± 6.20	14.99 ± 5.46	37.98 ± 18.40	42.99 ± 28.54
汉逊酵母疫苗	27.90 ± 16.01	14.93 ± 8.62	11.88 ± 2.83	31.86 ± 10.99	34.95 ± 2.82
史克公司疫苗	29.62 ± 7.44	10.61 ± 9.47	28.07 ± 2.80	30.67 ± 10.99	33.06 ± 10.06

注:ConA 作为非特异性刺激剂,可诱导 T 细胞发生增殖。不同来源 HBsAg 免疫小鼠 5 d 时各组淋巴细胞增殖反应较弱,其中 SSC 和 HM-HBsAg 的淋巴细胞增殖指数(SI)值高于血源和 MSC 酵母-HBsAg(P < 0.05)。在 20 d 和 25 d 时各组 SI 值明显升高,其中血源-HBsAg 反应最高(P < 0.05),其次为 CHO-HBsAg。

表 3 LPS 诱导不同来源免疫小鼠脾细胞的 HBsAg 体外增殖试验结果比较

HBsAg	淋巴细胞增殖指数(̄x ± s)				
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
对照	—	—	7.59 ± 0.96	15.28 ± 1.70	19.18 ± 2.74
汉逊酵母疫苗	32.17 ± 17.78	20.74 ± 4.98	19.82 ± 5.74	38.56 ± 4.13	16.46 ± 1.67
史克公司疫苗	6.71 ± 2.28	17.78 ± 10.28	38.44 ± 3.42	14.55 ± 3.50	22.30 ± 7.93
血源	6.55 ± 3.06	15.31 ± 6.08	12.31 ± 2.92	59.01 ± 29.84	46.83 ± 18.92
CHO	8.95 ± 1.81	8.88 ± 5.60	31.19 ± 31.70	56.28 ± 24.22	25.15 ± 3.94
Merck	5.39 ± 0.99	17.12 ± 10.28	19.20 ± 5.64	35.15 ± 9.26	44.34 ± 16.07

注:LPS 为 B 细胞非特异性增殖剂,不同来源 HBsAg 免疫小鼠 5 d 时 HM-HBsAg 的 SI 值显著高于其他各组(P < 0.05)。免疫 20 d 时 SI 值以 CHO 和血源-HBsAg 较高,免疫 25 d 时 SI 值则以血源和 MSC 酵母-HBsAg 为高(P < 0.05)。表明血源和 CHO 抗原对 B 淋巴细胞的增殖有较强的刺激作用,与动物和人体研究中出现的高抗体滴度相符。

我国目前已完成基因工程疫苗对血源疫苗的更新换代。基因工程疫苗包括基因工程 CHO 疫苗、酵母疫苗和甲基营养型汉逊酵母疫苗共三种类型疫苗。为正确认识疫苗免疫原性质量,更好地使用疫苗,我们在规范化的条件下,对不同类疫苗进行了免疫原性评价。规范化条件即 ①按规程检定合格,特别是得到疫苗抗原含量和 BALB/C 小鼠 ED<sub>50</sub> 结果。②严格筛选接种对象:新生儿为选择怀孕期间 HBsAg 阳性且 HBeAg 阳性 A > 3 倍 Cut off 值的母亲所生的新生儿为研究对象,以 HBsAg 单阳性和健康母亲所生的新生儿作为对照。新生儿足月产,一般健康状况良好。儿童及成人为 6~12 岁小学生和 18~60 岁成人,均为健康状况良好,乙肝 3 项指标 (HBsAg、抗-HBs、抗-HBc) 阴性。③试剂:采用检定合格的国产 ELISA 或 RIA 试剂 (HBsAg、HBeAg、抗-HBs、抗-HBc) 免疫前筛选儿童和成人。免疫后复核和测定血清中 HBsAg、抗-HBs 均使用 Abbott RIA 或 EIA。④结果判断:免疫后抗-HBs 阳转率和抗体滴度计算,采用改良 Holliger 公式:  $mIU = 130.75 \times \{ \exp[0.535(S-N)/(P-N)] - 1 \}$ , 以抗体滴度 > 10 mIU/ml 为判断标准,计算抗体阳转率和 GMT。HBsAg 阳转标准以 S/N ≥ 2.1 为阳性。免疫后连续检测 HBsAg 和抗-HBs,以最后二次相同结果为准,HBsAg 阳性者判为免疫失败。

我们十多年间对不同类乙肝疫苗免疫原性和免疫效果进行实验室和临床结合研究,特别近年来对 868 名新生儿进行母婴传播阻断研究,同时对 2291 名小学生和 120 名成人进行 1~7 年的免疫追踪观察,并结合免疫效果对保护机制进行实验,得到了一些有理论和实际意义的结果:①国产乙肝酵母疫苗的母婴传播阻断率达到 80.56%~92.59%,与国外酵母疫苗效果相似,5 μg 抗原剂量小,诱导抗体较低,保护率高于糖基化抗原疫苗,与血源疫苗 30 μg 相当。国内外疫苗的免疫持久性至今基本上相似,5 年后 10 mIU/ml 以上抗体下降至 60% 左右 (表 4)。②酵母乙肝疫苗用于成人诱导抗体应答低。③综合我们研究结果说明对不同年龄组的临床观察结合实验室 ED<sub>50</sub> 和细胞免疫测定方法和指标,可较明确地评价乙肝疫苗的免疫原性 (表 5)。

#### 四、疫苗的应用

以新生儿为重点接种对象的计划免疫是控制乙肝流行的惟一有效措施。实践中已证明效果明显,如北京、上海、广西隆安、浙江等地区报告 HBsAg 携

带率下降 85%~90%,一些地区 HBsAg 阳性率已降至 1% 以下。现在农村普及免疫接种已提到实施日程。在此提出几条技术上的具体建议。

表 4 不同种类乙肝疫苗母婴传播阻断保护率比较

疫苗	批号	规格 (μg/剂)	免疫新生儿数	阳性例数	阳性率 (%)	传播阻断保护率 (%)	
酵母	9312601	5	38	3	7.89	91.23	
	9312623	5	40	7	17.50	80.56	
	9312645	5	29	4	13.79	84.68	
	9403601	5	15	1	6.67	92.59	
	95041	5	20	3	15.00	83.33	
	960602	5	9	1	11.11	87.66	
	940703	5	37	3	8.11	90.99	
	CHO	921101	10	43	13	30.23	66.41
		921102	10	30	8	26.67	70.37
		930104	14	30	4	13.33	85.19
940301		10	19	4	21.06	76.60	
进口酵母	ENG1884	10	30	2	6.67	92.59	
	225G	10	58	7	12.07	86.59	
	Y-8C	10	86	6	6.98	92.24	
	49048	5	46	4	8.70	90.33	
	血源	853-2	15	78	32	41.03	54.41
7032-1		20	22	8	36.36	59.60	
831		40	42	5	11.90	86.78	

注:酵母、CHO、进口酵母疫苗 95% CI 分别为 87.29 ± 8.29、74.64 ± 13.90、90.40 ± 4.55

表 5 对不同来源乙肝疫苗抗原的评价方法

研究类型	指 标
实验室试验	安全试验
	ED <sub>50</sub> (体液免疫)
	淋巴细胞增殖反应 + 淋巴细胞因子分泌水平 + CTL (细胞免疫)
临床研究	观察 HBeAg 阳性母亲所生新生儿单接种疫苗的保护率 6~12 岁儿童和 35~50 岁成人接种疫苗后抗-HBs 阳转率

1. HBeAg 阳性母亲的新生儿按规定接种疫苗后产生抗体,但个别儿童 3 年后变为 HBsAg 阳性,因此,有必要对此类新生儿增加抗原剂量或接种 3 针后 12 个月再增加 1 针加强免疫。

2. 在农村也需要对孕妇作乙肝感染检测,方法如何实施,应作试点后再推广。

3. 酵母乙肝疫苗用于成人诱导抗体水平低,应增加每剂抗原含量,现已改为 10 μg/剂。

4. 一般采用 0、1、6 或 0、1、3 的免疫程序,对 HBeAg 阳性母亲的婴儿第 1 针和第 2 针的时间都非常重要,间隔时间不宜过长。目前国内已开发了联合疫苗,即 Hep B + DTP, Hep B + Hep A 或 Hep B + Hib 疫苗,如何安排联合疫苗的接种是今后实际工作中应处理好的问题。出生后第 1 针只能单

注射乙肝疫苗,第 2、3 针的接种时间可参考 WHO 的指南建议,但应注意到副反应和免疫效果。

### 五、乙肝疫苗免疫中遇到的有关问题

1. 对乙肝疫苗接种无应答问题:在实际工作中经常遇到乙肝抗体低应答或无应答现象。目前解决抗体无应答转为阳转方面,不少单位经验为增加疫苗接种次数和剂量或改变接种疫苗种类,可诱导抗体的产生。但也有持续阴性的实例,可能由个体差异即“HLA 基因”差异所引起。值得注意的是因为变异的 HBsAg 而单克隆抗体试剂检测不出的免疫耐受状态。应检测其抗-HBc、HBV DNA 或更换试剂检测。是否存在体液免疫无应答而细胞免疫出现应答,值得研究。

2. 氢氧化铝对乙肝疫苗免疫原性的影响:小鼠(BALB/C)免疫的实验证明,铝佐剂辅助乙肝抗原诱导抗体应答,增高滴度,但在接种后 20 天内抑制细胞免疫产生,25 天后开始出现细胞免疫。新生儿是免疫接种重点。根据检测结果,HBsAg 阳性母亲的婴儿 20%~25% 血液中 HBsAg 阳性,所以强调出生后 24 h 内接种乙肝疫苗,即意味着暴露后免疫。在此种情况下往往观察到有时先出现 HBsAg,后出现

抗-HBs 或相反次序,此后两种标志同时存在,随时间迁移,血液中呈现单独 HBsAg 或抗-HBs 阳性。因此,应研究提高抗原免疫原性,特别细胞免疫的佐剂。

3. 对 HBsAg 变异株的免疫:许多人认为现行乙肝疫苗免疫失败原因是病毒宫内感染和 HBsAg“a”决定簇产生变异。英国著名专家 Zuckerman 教授认为,新一代乙肝疫苗应为以变异株为种子制备的疫苗。目前对 HBV 宫内感染认识仍有不同,但现有疫苗是否能预防变异株,关系到疫苗改进的方向,值得重视。目前也存在可关注的趋向,如基因工程疫苗在全世界普遍应用已有十多年,迄今未报告变异株的增加,现行疫苗按常规程序免疫失败很明显地与抗原类型和抗原量有关,增加抗原量或用某些表达系统的抗原可能提高免疫效果等。对现有疫苗是否能预防变异株,不仅决定于体液免疫,而且更重要的是细胞免疫。单个人体血液中的“a”决定簇不是单一野生株或变异株型,而是混杂或基因多态性的,但检测时往往仅查出优势株,所以有可能得出错误的结论,很有必要进一步研究。

(收稿日期 2004-02-26)

(本文编辑:尹廉)

## 北京市非新生儿乙型肝炎的疫苗预防

邢玉兰 龚晓红

我国乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染以母婴传播为主,所以乙肝疫苗预防长期以来一直以新生儿为重点。为了使绝大部分新生儿都得到乙肝疫苗接种,提高广大农村地区新生儿乙肝疫苗接种率,自 2002 年起我国已将乙肝疫苗正式纳入全国儿童计划免疫。随着新生儿乙肝疫苗策略的实施,很多地区尤其城市中儿童乙肝表面抗原(HBsAg)携带率有明显下降,但全人群 HBsAg 携带率下降不明显,急性乙肝发病率仍持续在较高水平。这表明在我国 HBV 感染除母婴传播外,确实还存在一定的水平传播,需要通过接种乙肝疫苗进行预防,北京市的情况也不例外。本文仅就非新生儿人群预防乙肝是否需要接种乙肝疫苗?哪些人需要接种乙肝疫苗?接

种乙肝疫苗后的效果如何等问题提供一些依据。

一、北京市人群 HBsAg 阳性率和 HBV 感染率的年龄分布

1992~1995 年病毒性肝炎血清流行病学调查中,北京市人群 HBsAg 阳性率和 HBV 感染率(未接种过乙肝疫苗)的年龄分布见表 1<sup>[1]</sup>。北京市人群 HBsAg 阳性率在 1 岁组中只检出 1 例阳性者,2~4 岁未检出阳性者。5 岁组以后各组 HBsAg 阳性率逐渐升高,15~和 20~岁两个年龄组呈现一个明显的高峰,25 岁以后略有下降但保持一个相对稳定的阳性率。HBV 感染率呈现随着年龄递增而缓慢升高的趋势。50 岁以上接近 60%,比 5 岁以下儿童增长了近 1 倍。提示北京市人群 HBV 感染除母婴传播外,确实还存在一定的水平传播,需要通过非新生儿人群接种乙肝疫苗进行预防。