

河北省健康人群肾综合征出血热疫苗 免疫前后中和抗体水平研究

李琦, 魏亚梅, 韩旭, 韩占英, 蔡亚男, 张艳波, 许永刚, 齐顺祥

河北省疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050021

摘要: **目的** 了解河北省健康人群肾综合征出血热病毒(HV)隐性感染情况,观察肾综合征出血热双价灭活疫苗的免疫效果。**方法** 选择河北省滦南、北戴河、昌黎 3 个县为疫苗接种点,接种对象为 16~60 岁的健康人群(去除 HFRS 既往感染者及疫苗禁忌症者),用荧光抗体病毒中和试验(FAVN)的方法测定免疫前、免疫后中和抗体。**结果** 疫苗免疫前人群血清 HV 中和抗体阳性率为 2.92%,免疫后人群血清 HV 中和抗体阳性率(70.42%)比免疫前显著升高($P<0.05$);免疫前 HV 中和抗体阳性率在各年龄段之间差异无统计学意义($P>0.05$),免疫后各年龄组之间差异有统计学意义($P<0.05$),且各年龄段及总人群免疫后抗体阳性率均显著高于免疫前($P<0.001$);疫苗免疫后抗体滴度升高,各年龄组间抗体滴度差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 肾综合征出血热双价灭活疫苗免疫效果显著,值得推广。

关键词: 肾综合征出血热;双价肾综合征出血热灭活疫苗;中和抗体;防病效果

中图分类号: R186 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)01-0040-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.01.011

Serum neutralizing antibody levels of healthy population after immunization with HFRS vaccine in Hebei Province

LI Qi, WEI Ya-mei, HAN Xu, HAN Zhan-ying, CAI Ya-nan, ZHANG Yan-bo, XU Yong-gang, QI Shun-xiang

Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang, Hebei 050021, China

Abstract: **Objective** To investigate the inapparent infection of hantavirus (HV) in healthy population in Hebei Province, and to evaluate the immune efficacy of a bivalent vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). **Methods** Luan-nan County, Beidaihe County and Changli County were selected as the vaccination points, and the healthy people aged 16-60 years except those suffered from HFRS previously and those with contraindications served as the inoculable objects. The titers of neutralizing antibody (NA) were detected by the fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assay before and after the immune inoculation. **Results** The positive rate of neutralizing antibody in the population after vaccination was significantly higher than that before vaccination (70.42% vs. 2.92%, $P<0.05$). It was not significantly different among different age groups before vaccination ($P>0.05$), but it was after vaccination ($P<0.05$). Moreover, the positive rates of neutralizing antibody after vaccination in each age group and the total population were all significantly higher than those before ($P<0.001$). The titer of neutralizing antibody after vaccination was increased, but no statistically significant differences were found among different age groups ($P>0.05$).

Conclusions The double-titer inactivated vaccine against HFRS has obvious immune efficacy. It is worth while spreading widely.

Key words: Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS); Hemorrhagic fever with renal syndrome bivalent inactivated vaccine; Neutralizing antibody; Immunization effect

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndromes, HFRS)是由汉坦病毒(hantaviruses, HV)感染引起的一种病情重、病死率高的人畜共患急性病毒性传染病。河北省自 1981 年在唐山市首次证实有 HFRS 病例以来每年都有病例报告,是 HFRS 高发省

份之一^[1],该病严重威胁着河北省广大居民的身体健康和生命安全。为了有效地预防此病,我国成功研制了双价灭活免疫疫苗。资料表明,中和抗体是由病毒衣壳或囊膜蛋白刺激机体产生的,能够有效的中和病毒的毒力,抑制 HFRS 病毒的感染与发病^[2]。为了研究该疫苗的血清学免疫效果和河北省 HFRS 的隐性感染情况,遂对河北省肾综合征出血热疫苗免疫前后人群中中和抗体水平进行了测定。

基金项目: 河北省科技研究与发展计划项目(13277719D)

作者简介: 李琦(1967-),男,博士,主任医师,主要从事病毒性疾病预防与控制工作, E-mail: liqinew@126.com。

1 材料和方法

1.1 疫苗 浙江杭州天元生物药业公司生产的双价 HFRS 沙鼠肾灭活疫苗,批号为 20080613,按冷链要求(2℃~8℃)运输、保存,在疫苗有效期内接种。

1.2 免疫程序与接种方法 于 0(即当天)、14 d 在上臂三角肌内各注射疫苗 1 ml,并于疫苗免疫前、首针免疫后第 28 d 采静脉血,分离血清。

1.3 研究对象 根据河北省 HFRS 疫情情况,结合国家《扩大国家免疫规划实施方案》要求,选择河北省滦南、北戴河、昌黎 3 个县为疫苗接种点。在每个县选择 16~60 岁的健康人群(去除 HFRS 既往感染者及疫苗禁忌者)为研究对象,分 4 个年龄组 16~、26~、36~、46~60 岁,进行分层随机抽样,每县每个年龄组 20 名共 80 名研究对象,每名研究对象分别采集免疫前、免疫后血清标本各一份,共采集 480 份血清标本。

1.4 荧光标记 HFRS 单克隆抗体^[3] 将 HFRS 的单克隆抗体在 pH 9~9.5 碳酸盐缓冲液透析过夜,按每 mg 抗体蛋白内加入 0.05 mg FITC 称取适量 FITC,加入二甲亚砜(DMSO)使终浓度为 1 mg FITC/1 ml DM-SO,在 10 ml 小烧杯中,按上述比例将 FITC-DMSO 溶液逐滴加入透析后的抗体溶液中,磁力搅拌器室温避光搅拌 4 h,用 PBS 透析除去游离荧光素,收集结合物,测定 F/P 比值(结合比率)。

1.5 细胞 Vero-E6 细胞, HFRSV 敏感细胞非洲绿猴肾细胞株 Vero-E6 由中国疾病预防控制中心病毒所出血热实验室惠赠,按常规方法传代使用。

1.6 病毒滴定 见参考文献[4]。

1.7 中和抗体检测方法 采用荧光抗体病毒中和试验^[5](FAVN)的方法来检测中和抗体滴度,采用固定病毒稀释血清方法。待检血清先 56℃ 30 min 灭活,在 96 孔板上进行 2 倍系列稀释,每稀释度做 4 孔,每孔 100 μl,与 100TCID₅₀/100 μl 病毒液等量混合,37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱培养 1 h,然后将血清病毒混合液加入到已长成单层的 96 孔上,37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱培养 7 d 后,固定、染色,在荧光显微镜下观察特异性颗粒的荧光灶,凡有不少于 1 个荧光细胞的孔,即记为“+”,否则为“-”。参考 Karber 公式推导出以 X(完全中和,即 4 个重复孔全无荧光染色细胞的最大稀释倍数)和 Y(X 稀释倍数之后出现的无荧光染色细胞的孔数)为变量的中和滴度计算公式,由中和滴度为 10 的对照血清获得的 X_c、Y_c 变量的导出中间值,即该血清的半数中和稀释倍数 N50c=1.414 * X_c * 2^{Y_c/4},由待测血清获得的 X_t、Y_t 变量的导出中间值,即待测血清的半数中和稀释倍数 N50t=1.414 *

X_t * 2^{Y_t/4},待测血清的 HV 中和滴度 Z=10 * N50t/N50c。以 Microsoft Excel 为基础,按前述公式设定 X、Y 变量的输入格式、中间运算公式,从而得出中和滴度的最终导出值 Z。

1.8 统计学分析 用 SPSS13.0 统计软件进行数据的统计和处理。采用χ²检验和方差分析对不同人群免疫前后抗体阳性率和抗体水平进行研究,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 人群隐性感染率调查 3 个县共采集免疫前血清 240 份,用 FAVN 法对免疫前血清 HV 中和抗体进行检测,其中 7 份检出血清中和抗体,滴度在 1:10~1:20 之间,隐性感染率平均为 2.92%。

2.2 隐性感染人群的职业分布 血清中含有 HV 中和抗体的 7 人中,6 人的职业为农民,1 人为工人。

2.3 隐性感染人群的年龄分布 含有 HV 中和抗体的 7 人年龄在 16~60 岁之间,经统计分析各年龄组间阳性率差异无统计学意义(P>0.05),结果见表 1。

2.4 疫苗免疫后人群血清中和抗体阳性率 检测 3 个县的疫苗免疫后的 HFRS 血清 HV 中和抗体共 240 份,免后中和抗体阳性为 169 份,中和抗体阳性率平均为 70.42%。从年龄构成看,免疫后中和抗体阳性的对象中有 104 人年龄在 26~45 岁这一年龄段中,占中和抗体阳性总数的 61.53%。经统计分析发现,各年龄组间免疫后阳性率差异有统计学意义(P<0.05),免疫前和免疫后比较发现,免疫后比免疫前抗体阳性人群增多,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 河北省 HFRS 疫苗免疫前、后不同年龄人群血清中和抗体检测结果

年龄组 (岁)	免疫前			免疫后			χ ² 值	P 值
	检测份数	阳性份数	阳性率(%)	检测份数	阳性份数	阳性率(%)		
16~	60	1	1.67	60	34	56.67	43.93	0.00
26~	60	2	3.33	60	55	91.67	93.87	0.00
36~	60	2	3.33	60	49	81.67	75.33	0.00
46~60	60	2	3.33	60	31	51.67	35.15	0.00
合计	240	7	2.92	240	169	70.42	235.44	0.00
χ ² 值	0.441			32.22				
P 值	0.979			0.00				

2.5 疫苗免疫前后人群血清中和抗体滴度 检测 3 个县的疫苗免疫前后的 HFRS 血清 HV 中和抗体滴度见表 2。免疫后中和抗体滴度比免疫前升高,但由于免疫前抗体阳性数较少,故仅对免疫后不同年龄组间的抗体滴度水平进行比较。经统计学分析发现免疫后

各年龄组间抗体滴度水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 河北省 HFRS 疫苗免疫前、后不同年龄人群血清中和抗体滴度

年龄组 (岁)	免疫前		免疫后		F 值	P 值
	阳性 份数	抗体滴度 GM 值(\lg^{-1})	阳性 份数	抗体滴度 GM 值(\lg^{-1})		
16~	1	1.000	34	1.301±0.234	0.876	0.455
26~	2	1.151±0.213	55	1.328±0.241		
36~	2	1.151±0.213	49	1.369±0.224		
46~60	2	1.301	31	1.291±0.252		
合计	7	1.172±0.161	169	1.328±0.236		

3 讨论

以往多采用空斑减少中和试验 (PRNT 法) 来检测血清中 HV 中和抗体, 但该方法的操作难度较大, 所需要的时间较长等缺点限制了这一方法的使用。国外已经有多家研究机构将 FAVN 法用于检测狂犬病毒血清中和抗体, 本研究将 FAVN 法用于血清中 HV 中和抗体的检测。通过本研究所建立的 FAVN 法实验周期相对较短, 约需要 7~8 d (PRNT 法约需用 2 周), 且操作较简便, 不仅适合常规检测, 而且适合对大量的样本进行检测, 有利于开展大规模的流行病学调查和疫苗效果研究。FAVN 法的灵敏性优于 PRNT 法, 可能由于 PRNT 法需要用中性红作为指示剂, 容易出现假阴性; 而 FAVN 法利用的是抗原抗体特异性荧光染色, 所以较为敏感。因此, 利用荧光技术直接检测中和抗体的 FAVN 法将成为检测血清中 HV 中和抗体的主要方法。

本研究使用 FAVN 法对河北省健康人群 HFRS 双价灭活疫苗免疫前的 240 份血清 HV 中和抗体水平进行检测, 人群抗体阳性率为 2.92%, 提示河北省健康人群中仅有 2.92% 的人有 HFRS 保护性抗体, 97.08% 的人群对 HFRS 易感。结果与韩占英等^[6]研究的双价肾综合征出血热灭活疫苗免疫前河北省人群血清的中和抗体滴度水平相似。因此河北省应加强对健康人群普遍接种 HFRS 双价灭活疫苗的力度, 提高广大人群对该病的抵抗能力。

河北省 HV 隐性感染者的职业分布中以农民为主, 这可能与该职业人群的人均收入较低, 居住的环境卫生相对较差, 居住场所的鼠类活动相对比较频繁, 加之经常田间劳作, 与 HV 的主要宿主褐家鼠的接触机会相对较多等因素有关^[7-10]。不同人群的居住场所、活动范围及与鼠类接触的机会是影响 HFRS 感染率高

低的重要因素^[11], 农民这一职业人群存在着较大的发病风险。因此, 应加强对农村地区重点人群的免疫接种, 这种高危职业分布特征对考核疫苗的防病效果是非常有利的。

从年龄构成看, 河北省健康人群 HFRS 双价灭活疫苗免疫后中和抗体阳性者中有 104 人在 26~45 岁这一年龄段中, 占中和抗体阳性者的 61.53%, 说明了中青年人的中和抗体阳转率高, 疫苗对这一年龄段接种者的保护率高。

河北省健康人群 HFRS 双价灭活疫苗免疫后中和抗体的阳性率为 70.42%, 这与陈阳等^[12]报道的接种原代沙鼠肾细胞双价灭活疫苗免疫后中和抗体阳性率相似。表明 HFRS 双价灭活疫苗的抗原量和免疫原性能够使机体产生较高滴度的中和抗体, 对该病具有较好的预防效果。

河北省是以家鼠型为主的 HFRS 混合型疫区, 疫区广泛分布, 人群普遍易感^[13]。因此河北省选用 HFRS 双价疫苗对该省的重点人群进行免疫接种, HFRS 防制应采取针对家鼠型疫区的综合措施。

参考文献

[1] 韩占英, 张艳波, 魏亚梅, 等. 2007 年河北省肾综合征出血热流行特征分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2009, 20(6): 243-245.

[2] 孙茂倬, 杨光宏, 刘景福. 肾综合征出血热显性感染人群中中和抗体检测[J]. 预防医学文献信息, 1999, 5(5): 129-130.

[3] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 96-98, 162-165.

[4] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 577-559.

[5] 张守峰, 曹亮, 李青竹, 等. 狂犬病毒核蛋白单抗和荧光抗体中和试验的建立与应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 554-557.

[6] 韩占英, 齐顺祥, 张艳波, 等. 河北省肾综合征出血热高发乡镇疫苗接种效果评价[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19(6): 244-246.

[7] 张云, 朱进, 陶开华, 等. 肾综合征出血热病例对照危险因素的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(5): 387-388.

[8] 阮玉华, 柳伟, 徐校平, 等. 流行性出血热发病危险因素病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(5): 344-346.

[9] 李澄, 武贵森, 闫绍宏. 内蒙古肾综合征出血热流行地区血清流行病学调查[J]. 实用预防医学, 2015, 22(1): 77-79.

[10] 李俊荣, 周淑琴. 蓬莱市自然疫源性疾病流行状况及防控对策分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(8): 953-956.

[11] 宋干. 新中国流行性出血热防治研究的主要成就[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(5): 379-381.

[12] 陈阳, 李世清, 何似, 等. 接种肾综合征出血热双价疫苗流行病学效果初步观察[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12(1): 28-30.

[13] 韩占英, 张艳波, 许永刚, 等. 2005 年河北省肾综合征出血热监测分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006, 17(6): 489-491.