·论著·

人二倍体细胞狂犬病疫苗免疫 8 年后加强免疫效果研究

朱加宏 吴小红 李玉华 朱凤才 胡月梅

223400 涟水县预防控制中心(朱加宏);100050 北京,中国食品药品检定研究院虫媒病毒疫苗室(吴小红、李玉华);210009 南京,江苏省疾病预防控制中心(朱凤才、胡月梅)

前两位作者对本文同等贡献

通信作者:李玉华,Email:809394157@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.03.003

【摘要】 目的 揭示人二倍体细胞狂犬病疫苗(human diploid cell rabies vaccine, HDCV)免疫 8 年后加强免疫的效果。**方法** 选取参加过冻干 HDCV 临床Ⅲ期全程免疫的对象 60 例,在初次免疫 8 年后进行单剂加强免疫。观察加强免疫后的不良反应情况,在加强免疫前和加强免疫后 14 d 分别采集血清,采用快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test,RFFIT)检测狂犬病病毒中和抗体(rabies virus neutralizing antibody, RVNA)。对加强免疫前后的 RVNA 阳性率和几何均值(geometric mean titer, GMT)进行比较。**结果** 54 例受试者完成随访和 RVNA 检测。受试者在加强免疫后 30 min 及随访 15 d 期间未发生不良反应。加强免疫前和加强免疫后 RVNA 阳性率为 51.85%(28/54)、96.30%(52/54)。加强免疫前和加强免疫后 RVNA 的 GMT 为 1.42 IU/ml、30.61 IU/ml。**结论** 冻干 HDCV 免疫 8 年后单剂加强免疫效果良好。

【关键词】 狂犬病;人二倍体细胞狂犬病疫苗;快速荧光灶抑制试验;中和抗体

基金项目:江苏省疾病预防控制中心疫苗上市后再评价项目-成都康华冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)免疫 8 年效果及加强免疫效果观察(JSVCT032)

Investigation on the effects of booster immunization of human diploid cell rabies vaccine after eight years of primary vaccination

Zhu Jiahong, Wu Xiaohong, Li Yuhua, Zhu Fengcai, Hu Yuemei

Center for Disease Prevention and Control of Lianshui Country, Lianshui 223400, *China*(*Zhu JH*); *Division of Arboviral Vaccine, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 100050, *China*(*Wu XH, Li YH*); *Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing* 210009, *China*(*Zhu FC, Hu YM*)

Zhu Jiahong and Wu Xiaohong contributed equally to the article

Corresponding author: Li Yuhua, Email:809394157@qq.com

【Abstract】 Objective To disclose the effects of booster immunization of human diploid cell rabies vaccine (HDCV) after eight years of primary vaccination. **Methods** Sixty subjects who had participated the phase Ⅲ clinical trial of freeze-dried HDCV were selected and gaven booster immunization after eight years of primary vaccination. The side effects of booster immunization were observed. The serum before and after 14 days of booster immunization were collected and detected the rabies virus neutralizing antibody (RVNA) by rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). The positive rate and geometric mean titer (GMT) of RVNA before and after booster immunization were made statistical analysis. **Results** Total 54 subjects finished the follow-up and RVNA detection. No sever side-effects were observed in 30 min or 15 days of follow-up after booster immunization. The positive rate of RVNA before and after booster immunization were 51.85% (28/54) and 96.30% (52/54). The GMT of RVNA before and after booster immunization were 1.42 IU/ml and 30.61 IU/ml. **Conclusions** The freeze-dried HDCV has good immune effects with one-dose of booster immunization after eight years of primary vaccination.

【Key words】 Rabies; Human diploid cell rabies vaccine (HDCV); Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT); Neutralizing antibody

Fund programs: Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Vaccine Re-evaluation

Program after Launched-Effects of Primary Vaccination after Eight Years and Booster Immunization of Chengdu Kanghua's Human Diploid Cell Rabies Vaccine (JSVCT032)

在狂犬病暴露后预防处置(post-exposure prophylaxis, PEP)中接种狂犬病疫苗可以提供被动免疫保护。现阶段市售狂犬病疫苗根据细胞基质不同分为人二倍体细胞狂犬病疫苗(human diploid cell rabies vaccine, HDCV)和动物细胞(原代地鼠肾细胞、鸡胚细胞或传代 Vero 细胞)狂犬病疫苗。HDCV 是采用健康人胚肺成纤维细胞为基质来培养狂犬病病毒疫苗株,无潜在致瘤 DNA 残留和外源蛋白过敏风险,具有良好的安全性和免疫持久性[1]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)推荐有效狂犬病疫苗的最低效价 ≥ 2.5 IU/剂,接种狂犬病疫苗后血清狂犬病病毒中和抗体(rabies virus neutralizing antibody, RVNA) ≥ 0.5 IU/ml 被认为达到保护性水平[2]。HDCV 由美国 Wistar 研究所首创,采用人胚肺成纤维细胞 WI-38 培养狂犬病病毒 PM 疫苗株,法国采用人胚肺成纤维细胞 MRC-5 培养狂犬病病毒 PM 疫苗株,HDCV 在接种后不良反应及免疫效果方面被视为狂犬病疫苗的金标准[3]。国产 HDCV 于 2014 年上市,其临床安全性及有效性良好[4-5]。本研究采用 WHO 推荐的检测 RVNA 的标准方法快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)[6-7],对国产 HDCV 免疫 8 年后加强免疫效果进行研究,为指导 HDCV 正确免疫提供参考,报道如下。

1 对象与方法

1.1 狂犬病疫苗 冻干 HDCV,5 支/份,成都康华生物制品有限公司生产,效价 ≥ 4.0 IU/剂,批号 20160101,使用方法按照说明书进行。

1.2 观察对象 按照知情、自愿原则在江苏省淮安市涟水县疾病预防控制中心门诊共筛选 60 例参加过冻干 HDCV 临床Ⅲ期试验(五针法免疫)受试者。所有受试者自临床Ⅲ期试验全部观察结束至本临床试验筛查入组期间,未再次接种过狂犬病疫苗,也未发生过狂犬病暴露。受试者在 HDCV 初次免疫 8 年后进行加强免疫。研究获得所在单位医学伦理审查通过。

1.3 接种反应观察 单臂三角肌部位肌肉注射 1 剂进行加强免疫。现场观察并记录 60 名受试者接种 HDCV 后 30 min 内的不良反应,随访 15 d,记录随访期间不良反应情况。不良反应评定标准根据国家食品药品监督管理总局《预防用疫苗临床试验不良反应分级标准指导原则》的评价标准[8]。

1.4 RVNA 检测 受试者在 HDCV 初次免疫 8 年后,于加强免疫前(+0 d)和加强免疫后 14 d(+14 d)分别肘静脉采血 5 ml,分离血清,-20 ℃保存备用。所有血清样品委托中国食品药品检定研究院采用 RFFIT 检测 RVNA。

1.5 统计学方法 采用 Excel 表整理数据并绘制柱状图。

2 结果

2.1 加强免疫后不良反应情况 60 例受试者进行了 HDCV 加强免疫,合计接种 60 剂,疫苗加强免疫后 30 min 内未观察到局部和全身不良反应,6 例受试者失访,54 例完成 15 d 随访的受试者在随访期间未报告不良反应。

2.2 加强免疫前后 RVNA 变化情况 60 例受试者加强免疫前 RVNA 水平 0.0 IU/ml ~ 12.2 IU/ml,RVNA 的 GMT 值为 1.31 IU/ml,其中 RVNA 水平 ≥ 0.5 IU/ml 的有 28 例(46.67%, 28/60)。完成随访和 RFFIT 检测的 54 例受试者,加强免疫前 RVNA 水平 0.0 IU/ml ~ 12.2 IU/ml,RVNA 的 GMT 值为 1.42 IU/ml,其中 RVNA 水平 ≥ 0.5 IU/ml 的有 26 例(48.15%, 26/54);加强免疫后 RVNA 水平 0.1 IU/ml ~ 399.9 IU/ml,RVNA 的 GMT 值为 30.6 IU/ml,其中 RVNA 水平 ≥ 0.5 IU/ml 的有 52 例(96.30%, 52/54)。见图 1。

2.3 加强免疫后 RVNA 检测值分布 54 例受试者加强免疫后 RVNA 检测值分布情况见表 1。5.55%(3/54)受试者加强免疫后 RVNA 水平高于 100 IU/ml;85.19%(46/54)受试者加强免疫后 RVNA 水平 2.0 IU/ml ~ 100.0 IU/ml;5.55%(3/54)受试者加强免疫后 RVNA 水平 0.5 IU/ml ~ 2.0 IU/ml;3.70%(2/54)受试者加强免疫后 RVNA 水平低于 0.5 IU/ml。

2.4 个体 RVNA 改变特殊情况 54 例完成加强免疫后 RFFIT 检测者中,2 例 RVNA 水平维持 0.1 IU/ml 不变,52 例 RVNA 水平不同程度升高,其中 3 例 RVNA 水平 ≥ 100.0 IU/ml,这 3 例对加强免疫应

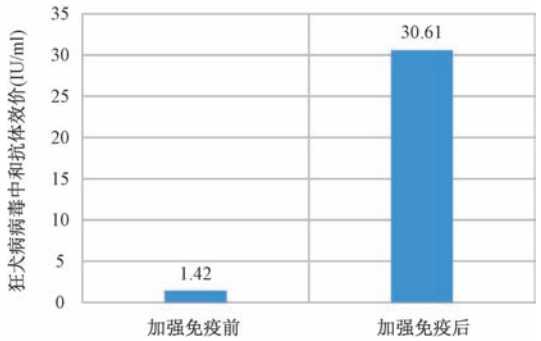

图 1 人二倍体细胞狂犬病疫苗加强免疫后狂犬病病毒中和抗体几何均值

Fig. 1 Geometric mean titer of rabies virus neutralizing antibody after booster immunization by human diploid cell rabies vaccine

答显著的个体在加强免疫前的 RVNA 水平并不是最高的。

表 1 54 例受试者人二倍体细胞狂犬病疫苗加强免疫后狂犬病病毒中和抗体检测值分布

Tab. 1 Distribution of the values of rabies virus neutralizing antibodies of 54 subjects received booster immunization of human diploid cell rabies vaccine

RVNA 检测值(IU/ml)	受试者例数	比率(%)
X < 0.5	2	3.70
0.5 ≤ X < 1.0	2	3.70
1.0 ≤ X < 2.0	1	1.85
2.0 ≤ X < 10.0	14	25.93
10.0 ≤ X < 30.0	23	42.59
30.0 ≤ X < 100.0	9	16.67
X ≥ 100.0	3	5.55

注:RVNA,狂犬病病毒中和抗体;X,狂犬病病毒中和抗体检测值

Note: RVNA, rabies virus neutralizing antibody; X, the value of rabies virus neutralizing antibody

3 讨论

钱晓华等[8]研究显示国产 Vero 细胞狂犬病疫苗五针法暴露后免疫 6 周、6 月、1 年、2 年、3 年后受试者 RVNA 阳性率为 100%、97.5%、73.9%、21.1%、20%。本研究中国产 HDCV 五针法暴露后免疫 8 年后受试者 RVNA 阳性率为 46.67%,表现出良好的免疫持久性。Rodrigues FM 等[9]研究显示 HDCV 三针法暴露前免疫 5 年后进行单剂加强免疫,所有受试者 RVNA 在第 14 天均达到保护性水平。Fayaz 等[10]研究显示 26 例观察对象在 HDCV 五针法暴露后免疫 32 年后进行单剂加强免疫,所有观察对象 RVNA 水平达到 2.6 IU/ml ~ 20 IU/ml。本研究中 54 例完成随访和 RFFIT 检测的受试者中,HDCV 单剂加强免疫后第 14 天 96.30% 受试者 RVNA 达到保护性水平。HDCV 免疫学效果肯定,在全球范围内被广泛应用[11]。

本研究中未发生和 HDCV 加强免疫相关的不良反应,证实国产 HDCV 免疫效果好,副反应发生率低。通常情况下,儿童、老年人和免疫力低下人群对狂犬病疫苗免疫应答较弱,HDCV 在儿童、老年人和免疫力低下人群中应用价值较高[12-13]。同已经报道的 100% 有效的 HDCV 加强免疫效果相比[9-10],本研究中 2 例受试者进行 HDCV 单剂加强免疫后 RVNA 未阳转,由于缺乏对这 2 例受试者深入细致的调查研究,对其 RVNA 未阳转的原因还无法解释。本研究对 HDCV 加强免疫后的 RVNA 水平进行了分段,这种划分细化了 RVNA 阳性区间分段,能够反应 HDCV 免疫后机体不同程度的免疫应答强度。对于在大量人用狂犬病疫苗免疫实践中发现的免疫应答强度极高(RVNA ≥ 100.0 IU/ml)的特殊个例,同样由于缺乏后续研究而难以解释其具体原因。

国产 HDCV 的免疫效果数据在逐步积累。2015 年发生的一起一犬伤 13 人狂犬病暴露事件,所有伤者经 HDCV 五针法暴露后免疫,并在首剂免疫后第 15 天血清 RVNA 全部阳转,随访 6 个月,所有伤者均未发生狂犬病,且血清 RVNA 仍然阳性,证实国产 HDCV 免疫效果肯定[14]。本研究进一步积累了国产 HDCV 免疫持久性和加强免疫的数据。个体狂犬病疫苗暴露后免疫 0.5 ~ 1 年内再次暴露者,应当于 0 d、3 d 各加强免疫 1 剂;1 ~ 3 年内再次暴露者,应当于 0 d、3 d、7 d 各加强免疫 1 剂[15]。本研究结果显示规定的狂犬病疫苗加强免疫方案对于绝大多数已经接受 HDCV 暴露后免疫的个体不适用,即使对于 1 剂加强免疫后无应答的 2 例个体,再加强 1 ~ 2 剂是否会起效也还有待深入研究。本研究将在后续进一步深化国产 HDCV 的相关基础和应用研究。

利益冲突:无

参考文献

[1] Vodopija R, Lafont M, Baklaic Ž, et al. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine[J]. Vaccine, 1997, 15

(5): 571-574. DOI:10.1016/S0264-410X(97)00207-7.
[2] Meslin FX, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies[M]. Geneva. WHO, 1996: 223-313, 401-416.
[3] 李岩异, 戴碧璇, 谭丽霞, 等. 狂犬疫苗的研究进展[J]. 生物产业技术, 2017, 1:100-104. DOI:10.3969/j.issn.1674-0319.2017.01.016.
[4] 蔡勇, 周蓉, 李声友, 等. 国产冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)的安全性及免疫原性观察[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5): 510-513, 517.
[5] 许婧,周蓉. 国产人二倍体细胞狂犬病疫苗用于儿童和老人的安全性观察分析[J]. 医学动物防制,2016,32(11):1234-1237. DOI:10.7629/yxdwfz201611018.
[6] 吕新军, 唐青, Bourhy H, 等. 狂犬病病毒中和抗体检测快速荧光灶抑制试验的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 439-440. DOI: 10.3760/ema.j.issn.0254-6450.2010.04.018.
[7] 吕新军, 唐青. 快速荧光灶抑制试验的应用和改进[J]. 国际病毒学杂志, 2010, 17(4): 106-109. DOI: 10.3760/cma.j.issn.16734092.2010.04.003.
[8] 钱晓华, 徐葛林, 吴志芳, 等. 国产无佐剂 Vero 细胞狂犬病疫苗接种后的不良反应及免疫持久性观察[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(10): 1467-1471. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.001912.
[9] Rodrigues FM, Mandke VB, Roumiantzeff M, et al. Persistence of rabies antibody 5 years after pre-exposure prophylaxis with human diploid cell antirabies vaccine and antibody response to a single booster dose[J]. Epidemiol Infect, 1987, 99(1):91-95.
[10] Fayaz A, Simani S, Janani A, et al. Antibody persistence, 32 years after post-exposure prophylaxis with human diploid cell rabies vaccine (HDCV) [J]. Vaccine, 2011, 29(21): 3742-3745. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.048.
[11] Hicks DJ, Fooks AR, Johnson N. Developments in rabies vaccines[J]. Clin Exp Immunol, 2012, 169(3): 199-204. DOI:10.1111/j.1365-2249.04592.x.
[12] Wang ZX. WHO position on rabies vaccine[J]. WHO Drug information, 2002,16(1):p4.
[13] 谢锦荣, 陈祖华, 黄燕萍, 等. 5423 例人用狂犬病疫苗接种后血清学抗体分析[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(1): 90-91. DOI: 10.3760/ema.j.issn.0254-6450.201 1.01.021.
[14] 李幸乐, 李凤丽, 周瑞清, 等. 一起一犬伤 13 人狂犬病暴露事件的综合处置及效果评价[J]. 河南预防医学杂志, 2017, 28(1): 4-7. DOI: 10.13515/j.cnki.hnjpm.1006-8414.2017.01.002.
[15] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 卫生部关于印发《狂犬病暴露预防处置工作规范(2009 年版)》的通知[2009-12-17][EB/OL]. http://www.nhfpc.gov.cn/mohbgt/s10695/200912/45090.shtml.

(收稿日期:2018-02-02)
(本文编辑:吕新军)

·文献速览·

评估犬狂犬病的人间负担存在的困难

Louise H. Taylor, Katie Hampson, Anna Fahrion, et al. Acta Trop, 2017, 165: 133-140. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.12.007

当前,犬狂犬病的被动监测数据,尤其是在犬狂犬病负担最高的地区,对制订适宜的有控制成效的决策是不充分的。现行立法效力不足以及国际规范贯彻不力降低了监测系统的有效性,但是另外一系列问题都关系到这样一个事实:犬狂犬病主要影响社会中非常贫困的群体,目前基本还处于不可治愈状态。这就导致未知的但是潜在的相当比例的狂犬病死亡案例发生在卫生体系以外,此类死亡案例不可能被基于卫生中心记录的监测系统所记录。本研究重点评估犬狂犬病导致的死亡人数的潜在信息来源,以及如何提高评估效能以适应全球消除犬狂犬病的目标。整合被动监测数据、地方监测数据、基于数学模型获得的地区和全球评估数据是解决问题的主要措施。

(吕新军 编译)