

C 群脑膜炎奈瑟菌血清杀菌力试验的优化及其应用

徐丽 罗隆泽 朱兵清 何莉 高源 邵祝军

【摘要】 目的 优化血清杀菌力试验方法,检测和分析 A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前后人群血清对 C 群脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)的杀菌抗体水平。方法 以 C 群 *Nm* 疫苗株(C11)和中国目前 C 群 *Nm* 流行株(053442)作为靶菌,国家 *Nm* 标准品测试血清为参考血清,选用 Pel-Freez 兔补体,确定靶菌最适工作浓度。122 人接种 A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗前后分别采集血清标本,共 244 份,进行 C 群 *Nm* 杀菌抗体水平的检测。结果 菌株 C11 和 053442 均可作为靶菌用于血清杀菌力试验;靶菌的工作浓度为 A 0.35(600 nm)的菌液稀释 4×10^4 倍;A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前,122 份血清对 C11 和 053442 的杀菌抗体几何平均滴度(GMT)分别为 1:1.75 和 1:2.63,人群抗体保护率分别为 9.8% 和 17.2%,A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种后,122 份血清的杀菌抗体 GMT 和人群保护率均显著升高($P < 0.01$),对疫苗株和流行株的杀菌抗体 GMT 分别为 1:483.73 和 1:412.57,保护率分别为 100% 和 95.9%。结论 接种 A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗,能够显著提高人群对不同亚型的 C 群 *Nm* 的抵抗力,但仍需要针对不同的靶菌进行疫苗免疫效果的监测。

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌;血清杀菌力试验;抗体

Study on the bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C strains after immunization with a divalent polysaccharide (A plus C) vaccine XU Li, LUO Long-ze, ZHU Bing-qing, HE Li, GAO Yuan, SHAO Zhu-jun. "State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To optimize the serum bactericidal assay (SBA), detect and analyze the bactericidal antibody level against *Neisseria meningitidis* serogroup C strains after divalent polysaccharide (A plus C) vaccine immunization. Methods Two *Neisseria meningitidis* serogroup C strains, vaccine candidate strain (C11) and epidemic strain (053442), were selected as targets. The national *Neisseria meningitidis* standardized serum was used as reference serum. Pel-Freez infant rabbit complements was available. The optimized SBA method was used to detect bactericidal antibody against strain C11 and 053442 for 122 pairs of sera before and after immunization with a divalent polysaccharide (A and C) vaccine. Results The strain C11 and 053442 both could be used as targeted strain for SBA. The optimized concentration of targeted strain was achieved when a whole-cell suspension of 0.35 A at 600 nm was diluted 4×10^4 times. Before immunization, SBA geometric mean titers (GMT) of 122 sera against strain C11 and 053442 were 1:1.75 and 1:2.63 respectively, and the protective rates were 9.8% and 17.2% respectively. After immunization, the GMTs and the protective rates of 122 sera both rose significantly ($P < 0.01$), the GMTs against strain C11 and 053442 were 1:483.73 and 1:412.57 respectively. The protective rates against strain C11 and 053442 were 100% and 95.9% respectively. Conclusion Immunization with a divalent polysaccharide (A and C) vaccine could elevate remarkably the population SBA titer against *Neisseria meningitidis* serogroup C strains of different subtypes, but the surveillance of vaccine effect against different targeted strains remains necessary.

【Key words】 *Neisseria meningitidis*; Serum bactericidal assay; Antibody

脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)感染引起的流行性脑脊髓膜炎(流脑)在各年龄组人群中均可发生,其中 15 岁以下儿童发病数占 80% 以上^[1]。历史上,我国流脑

流行一直以 A 群 *Nm* 为主,2003 年安徽省开始出现 C 群流脑。近年来,我国部分地区 C 群流脑呈逐年上升趋势^[2,3],2007 年我国将 A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗纳入免疫规划,而疫苗免疫效果监测和评价对于免疫策略的制定具有重要指导意义。我国目前多采用 ELISA 进行脑膜炎球菌多糖疫苗免疫效果和健康人群血清 IgG 抗体水平的检测。血清杀菌力试验(serum bactericidal assays, SBA)是国际上推荐用于疫苗免疫

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.06.020

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
传染病预防控制国家重点实验室(徐丽、朱兵清、高源、邵祝军);四川
省疾病预防控制中心(罗隆泽);中国药品生物制品检定所(何莉)
通信作者:邵祝军,Email: shaozhujun@icdc.cn

效果血清学评价的金标准^[4,5],可检测血清中具有杀菌活性的功能性抗体。本研究对 SBA 的方法进行优化,检测健康人群 A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前后的血清杀菌抗体水平,评价免疫效果以及该疫苗对我国目前流行的 C 群流脑菌株的杀菌保护水平。

材料与方法

1. 研究对象:在四川省按照 2~5 岁、6~10 岁、11~14 岁年龄段随机抽取儿童及学生 122 名,采取肌肉注射接种 A+C 脑膜炎球菌多糖疫苗(兰州生物制品研究所,A 群和 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗各 50 μg),分别于接种前和接种后第 35 天采集血标本,分离血清,-70℃ 保存。靶菌为 C 群 Nm 疫苗株(C11,ST-11 型)和我国主要流行株(053442,ST-4821 型^[6]),由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所保存。

2. 主要试剂和设备: SBA 参考血清为国家 Nm 标准品测试血清(批号 20050401);幼兔补体购自美国 Pel-Freez 公司;哥伦比亚血培养基平板终浓度为 0.001% 的 TTC 显色培养基;DPBS 缓冲液(0.5 mmol/L MgCl₂, 0.9 mmol/L CaCl₂; pH 值 7.4, Oxoid) 加入葡萄糖至终浓度 0.1% 备用;2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)和葡萄糖购自 Oxoid 公司。主要仪器包括紫外分光光度计(Eppendorf Biophotometer RS-232C)和酶标板震荡器(MTS/2/4D, KIA 公司)。

3. SBA 方法:

(1) 补体灭活:将参比血清、待检血清和少量兔补体于 56℃ 放置 30 min,灭活补体。

(2) 靶菌悬液浓度优化:将菌株 C11 和 053442 接种于哥伦比亚血培养基平板,37℃ 5% CO₂ 培养 16~18 h,挑选 20 个典型菌落接种哥伦比亚血培养基平板上培养 4~6 h。刮取菌苔至悬菌缓冲液中混匀,600 nm 波长下测量吸光度(A 值)为 0.35(±0.005),用悬菌缓冲液先稀释(A 值×100 倍),再依次做 10 倍系列稀释。将以上 10 倍系列稀释的 C11 靶菌溶液与兔补体(灭活和未灭活)等体积混合,取 25 μl 混合液接种于哥伦比亚血培养基平板进行菌落计数。选择哥伦比亚血培养基平板上(25 μl 菌悬液与补体)生长的菌落数为 50~60 CFU 的菌液浓度为最优靶菌浓度。

(3) 样品检测:在 96 孔板中倍比稀释待检血清,每孔含 25 μl 已稀释血清;加入靶菌悬液和未灭活兔补体等体积混合液,每孔 25 μl;震荡 5 min,37℃ 5% CO₂ 孵育 1~1.5 h。将 96 孔板置于震荡器上,加入 TTC 显色培养基,每孔 50 μl,室温放置 5 min 至琼脂

彻底凝固,置 37℃ 5% CO₂ 培养过夜。每份待检血清均须设置抗体对照:灭活兔补体(12.5 μl)+菌液(12.5 μl)+待检血清(12.5 μl)+稀释液(12.5 μl)。每块 96 孔板均须设置参比血清对照。每批次试验还须设置补体对照[未灭活兔补体(12.5 μl)+菌液(12.5 μl)+稀释液(25 μl)]和体系对照[灭活兔补体(12.5 μl)+菌液(12.5 μl)+稀释液(25 μl)]。

(4) 结果判定:以哥伦比亚血培养基平板上生长的菌落数(50~60 CFU)为原始靶菌浓度,抗体对照、补体对照和体系对照各孔菌落数均呈现相应数量的点状红色小菌落。每批试验参考血清对照的杀菌滴度均相同。如孔内菌落的大致数量为补体对照孔的 50% 以下即判为“杀菌”,否则判为“不杀菌”,能够“杀菌”的最大血清稀释度即为待检血清的杀菌抗体滴度。血清杀菌抗体滴度 < 1:2 时,按照 1:1 计算,滴度 > 1:2048 时,按照 1:2048 计算。血清杀菌抗体滴度 ≥ 1:8,为抗体具有保护性。

结 果

1. 靶菌最适工作浓度:靶菌溶液稀释 1×10¹~1×10⁴ 倍时,哥伦比亚血培养基平板上 12.5 μl 菌悬液菌落难以计数;稀释 1×10⁵ 倍时,哥伦比亚血培养基平板上 12.5 μl 菌悬液菌落计数结果偏低。当靶菌溶液稀释 4×10⁴ 倍时,菌落计数为 50~60 CFU;因此,选择 4×10⁴ 倍稀释浓度为靶菌的最适工作浓度(表 1)。

表 1 不同稀释度靶菌溶液的菌落计数结果

重复次数	靶菌悬液稀释度						
	1×10 ³	1×10 ⁴	2×10 ⁴	4×10 ⁴	5×10 ⁴	6×10 ⁴	1×10 ⁵
1	NC	257	116	57	45	37	21
2	NC	207	98	52	42	32	16
3	NC	264	128	58	47	35	22
4	NC	205	107	55	42	30	18
5	NC	212	101	54	41	32	15

注: NC 为菌落数多,难以计数

2. A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前和接种后血清杀菌抗体滴度: A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前,122 份血清对 C 群 Nm 疫苗株(C11)的杀菌抗体滴度为 < 1:2~1:128,对 C 群 Nm 流行株(053442)杀菌抗体滴度为 < 1:2~1:512。A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种后,血清对疫苗株(C11)的杀菌抗体滴度为 1:8~1:8192,对流行株(053442)的杀菌抗体滴度为 < 1:2~1:4096。

3. 血清杀菌抗体 GMT 和保护率: A+C 群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前,血清杀菌抗体 GMT 均低于 1:4,保护率低于 25%;对于疫苗株(C11),2~5 岁年龄组血清杀菌抗体 GMT 和人群保护率显著低于另

两个年龄组($P<0.05$),而对于流行株(053442),血清杀菌抗体GMT和人群保护率在年龄组间的差异均无统计学意义。A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗接种后,血清杀菌抗体GMT和保护率均明显升高($P<0.01$)。对疫苗株C11,11~14岁年龄组血清杀菌抗体GMT显著高于2~5岁年龄组($P<0.05$),而对流行株(053442),11~14岁年龄组血清杀菌抗体GMT显著高于其他两个年龄组($P<0.01$)。各年龄组间对疫苗株(C11)和流行株(053442)的保护率的差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

4. 针对不同靶菌的人群血清杀菌抗体GMT和保护率: A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前,2~5岁年龄组对流行株的血清杀菌抗体GMT显著高于对疫苗株的抗体GMT($t=2.68, P<0.05$),其他年龄组两靶菌间GMT的差异无统计学意义($P>0.05$),各年龄组保护率在两靶菌间的差异均无统计学意义;接种后,各年龄组两靶菌间GMT和保护率的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

本研究中采用的SBA方法是参照文献[4],并在1984年我国流脑杀菌抗体测定法标准化研究协作组建立的流脑杀菌抗体检测方法基础上^[7],进行部分改进。原方法中采用的BHI-HS和GC培养基,需要特殊的添加剂马血清和Isovitalex,本试验中将BHI-HS、哥伦比亚血培养基、普通血培养基及巧克力培养基进行了比较,靶菌在哥伦比亚血培养基和BHI-HS培养基上生长状况相似,且明显优于后两种培养基,故试验中均采用哥伦比亚血培养基进行培养及菌落计数。另外,本试验在半固体培养基中添加TTC显色剂,使菌落在半固体培养基中呈现红色,便于计数,减少系统误差。

2005年以后,ST-4821型C群流脑在我国普遍流行^[6],因此本研究中除了采用C群Nm疫苗株(C11),还选用了1株ST-4821型C群菌株(053442)作为靶菌进行血清杀菌抗体检测,以观察A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗接种前后人群对C群Nm的抵抗能力。结果显示,疫苗接种前,不同年龄段的人群对C群Nm均具有一定的抵抗力,但这种保护率较低;接种疫苗1个月以后,血清杀菌抗体GMT和人群保护率均明显升高,说明接种A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗能够提高人群对不同亚型(包括ST-11

表2 不同年龄组人群接种A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗前后血清杀菌抗体GMT(1:)和保护率(%)

年龄组 (岁)	检测 人数	C11				053442			
		免疫前		免疫后		免疫前		免疫后	
		GMT	保护率	GMT	保护率	GMT	保护率	GMT	保护率
2~5	49	1.33	2.0(1)	354.41	100.0(49)	1.92	8.2(4)	235.18	91.8(45)
6~10	40	2.18	20.0(8)	469.46	100.0(40)	2.98	22.5(9)	337.83	97.5(39)
11~14	33	2.00	9.1(3)	795.79	100.0(33)	3.60	24.2(8)	1211.44	100.0(33)
合计	122	1.75	9.8(12)	483.73	100.0(122)	2.63	17.2(21)	412.57	95.9(117)
F值		3.96		2.31		1.76		8.99	
χ^2 值		-		-		1.76		-	
P值		<0.05	0.02*	>0.05	-	>0.05	>0.05	<0.05	0.22*

注:*P值为Fisher精确概率

和ST-4821)的C群Nm的抵抗力。

本研究中,通过对两种靶菌检测结果的比较,免疫前各年龄组人群对流行株的血清杀菌抗体GMT均高于疫苗株,但经统计学分析仅2~5岁年龄组差异具有统计学意义,其原因可能是样本量较少,这种差异未能在另外两个年龄组显示出。人群对流行株的血清杀菌抗体GMT高于对疫苗株,提示人群中可能存在流行株的自然感染。免疫后,122份血清对疫苗株(C11)杀菌抗体滴度均高于1:8,117份血清对流行株(053442)杀菌抗体滴度高于1:8,但3岁年龄组3份和5岁年龄组1份血清对流行株(053442)杀菌抗体滴度未达到保护力水平,提示在进行流脑血清杀菌抗体检测时宜将当地流行株作为靶菌。

目前按我国流脑疫苗免疫程序要求,A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗接种起始年龄为3岁。本研究中,8名3岁以下的儿童接种疫苗后血清杀菌抗体滴度升高均超过8倍,与相关报道差异较大^[8]。3岁以下的儿童仍为我国流脑的高发人群^[9],如何制定和实施流脑疫苗免疫策略,使用流脑A+C多糖疫苗或结合疫苗对该年龄组儿童实施流脑疫苗保护,是今后研究的方向之一。

参 考 文 献

- [1] 张延龄,张晖.疫苗学.北京:科学出版社,2004: 927-958.
- [2] 邵祝平,徐丽,高原,等.中国流行性脑脊髓膜炎流行菌群变化趋势分析.中国计划免疫,2007,13(6):541-544.
- [3] Shao ZJ, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006,367(9508):419-423.
- [4] Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(2): 156-167.
- [5] Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection: serum bactericidal antibody activity. Vaccine, 2005, 23(17/18):2222-2227.
- [6] Zhang X, Shao ZJ, Yang E, et al. Molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* isolated in China. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 9): 1224-1229.
- [7] 全国流脑杀菌抗体测定法标准化研究协作组.流脑杀菌抗体测定操作细则,1984.
- [8] 崔富林,曹俊,杨明,等. A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗的制备及其接种人体后的血清学效果.微生物学免疫学进展, 2001, 29(2):18-21.
- [9] 李芝星,罗会明,李军宏,等.中国2006/2007年度流行性脑脊髓膜炎流行病学特征分析.中国疫苗和免疫,2008,14(3):234-237.

(收稿日期:2009-02-23)
(本文编辑:张林东)