

血清杀菌试验和酶联免疫吸附试验测定C群脑膜炎奈瑟菌血清抗体滴度比较

朱兵清 徐丽 周海健 邵祝军

【摘要】 目的 比较血清杀菌试验(SBA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)测定两种C群脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)疫苗免疫后血清抗体滴度的差异。方法 采用SBA测定75名未免疫健康成年人(40~70岁)血清、143名3~8月龄婴儿及194名3~5岁儿童*Nm* A和C群结合疫苗或A+C群多糖疫苗免疫前后血清中*Nm* 杀菌抗体水平,然后用ELISA测定相应血清的*Nm* 特异性IgG含量,并利用线性相关与回归分析两种测定结果的相关性。结果 未免疫健康成年人血清中*Nm* 杀菌抗体水平和特异性IgG含量之间的相关性较高($r=0.814\ 33, P<0.001$);3~8月龄婴儿和3~5岁儿童接种结合/多糖疫苗前,*Nm* 杀菌抗体水平和特异性IgG含量之间相关性较差(3~8月龄: $r=0.140\ 64, P>0.100/r=0.2899, P<0.05$;3~5岁: $r=0.540\ 40, P<0.05/r=0.194\ 36, P<0.05$),接种1剂结合疫苗后,杀菌抗体水平和特异性IgG含量之间的相关性较好($r=0.809\ 38, P<0.001$ 和 $r=0.837\ 23, P<0.001$);接种多糖疫苗后,杀菌抗体水平和特异性IgG含量之间的相关性较差($r<0.500\ 00$)。结论 健康成年人血清和结合疫苗免疫后的婴幼儿血清中特异性C群*Nm* IgG含量可以间接反映血清杀菌抗体水平,ELISA方法可以替代SBA。但ELISA检测方法不适用于3~8月龄婴儿多糖疫苗免疫后的效果评价。

【关键词】 C群脑膜炎奈瑟菌;血清杀菌试验;酶联免疫吸附试验

Comparison on the levels of human serum antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C measured using serum bactericidal assay and ELISA ZHU Bing-qing, XU Li, ZHOU Hai-jian, SHAO Zhu-jun. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, 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

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB504900).

【Abstract】 **Objective** To analyze the levels of human serum antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C measured by serum bactericidal assay (SBA) and ELISA. **Methods** SBA and a modified ELISA were applied to measure the serum bactericidal titer and the specific concentration of immunoglobulin G (IgG) against meningococcal serogroup C in sera samples. Seventy-five sera were from healthy adults without undertaking vaccination while another 429 and 388 pre- and post- vaccinated sera were from 143 infants and 194 young children immunized with conjugate vaccine or polysaccharide vaccine, respectively. Correlation between serum bactericidal titer and the concentration of specific IgG against meningococcal serogroup C was analyzed. **Results** The concentration of meningococcal serogroup C specific IgG in healthy adults showed a strong correlation ($r=0.814\ 33, P<0.001$) with serum bactericidal titer through linear regression analysis. Weak correlation was observed between SBA titers and IgG concentration in pre vaccinated sera of infants and children (conjugate/polysaccharide vaccine) (infants: $r=0.140\ 64, P>0.100/r=0.2899, P<0.05$; children: $r=0.540\ 40, P<0.05/r=0.194\ 36, P<0.05$). After immunization with 2-dose conjugate vaccine in infants and 1-dose in children, a strong correlation between the two panels of results was observed ($r=0.809\ 38, P<0.001$ and $r=0.837\ 23, P<0.001$ respectively). However after immunization with polysaccharide vaccine, the correlation between serum bactericidal titer and concentration of specific IgG was weak ($r<0.500\ 00$). **Conclusion** Among healthy adults and post

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.05.017

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2011CB504900)

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国家重点实验室

朱兵清,徐丽同为第一作者

通信作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

vaccinated infants or young children immunized with conjugate vaccine, the concentration of specific IgG was comparable to the serum bactericidal titer against meningococcal serogroup C. However, it was not unfavorable to use ELISA as the principal means of measuring serum antibody responses to polysaccharide vaccine for infants under 1 year old.

[Key words] *Neisseria meningitidis* group C; Serum bactericidal assay; Enzyme-linked immunosorbent assay

流行性脑脊髓膜炎(流脑)是由脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)感染引起的一种细菌性脑膜炎。2007 年我国将 A+C 群流脑疫苗纳入免疫规划,监测和评价该疫苗的免疫效果对于制定合适的免疫策略具有重要指导意义。目前用于人群血清 *Nm* 抗体水平检测的方法主要有血清杀菌试验(SBA)和酶联免疫吸附试验(ELISA),后者因受血清中复杂成分影响,不能真实反映保护抗体水平^[1,2]。SBA 检测的是血清中具有杀菌活性的功能性抗体水平,是疫苗免疫效果血清学评价的金标准^[3],但是该方法操作繁琐且技术要求高。本研究对多种来源的血清同时用这两种方法进行测定。

材料与方 法

1. 菌株和血清: SBA 所用 *Nm* 来自中国医学菌种保藏中心,菌种编号为 CMCC29026。血清样本主要来自接种 *Nm* A+C 群多糖疫苗、A 和 C 群多糖结合疫苗前后的 143 名(多糖疫苗 50 名;结合疫苗 93 名)3~8 月龄婴儿和 194 名(多糖疫苗 112 名;结合疫苗 82 名)3~5 岁儿童;75 名成年人血清样本来自未接种过流脑疫苗的 40~70 岁健康体检者。

2. 主要试剂和仪器: 补体来源于 <4 周龄的幼兔血清;脑心浸液、胰酶大豆肉汤(TSB)为美国 Difco 公司产品;脱纤维新鲜羊血、琼脂和 DPBS 缓冲液(0.5 mmol/L MgCl₂, 0.9 mmol/L CaCl₂; pH 7.4)为美国 Gibco 公司产品;2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)为分析纯级产品。检测特异性 C 群 *Nm* 多糖抗体 IgG 的 ELISA 试剂盒购自北京绿竹生物技术有限责任公司, *Nm* 多糖抗体标准血清购自英国国家生物制品检定所(NIBSC)。紫外分光光度计为 Eppendorf Biophotometer RS-232C(德国 Eppendorf 公司),酶标板震荡器为德国 KIB 公司产品。

3. SBA: 血清中杀菌抗体水平测定参照文献[4]并进行优化: 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*Nm* 悬液制备: 将 *Nm* 菌株 CMCC29026 接种于哥伦比亚血培养基, 37 ℃, 5% CO₂ 培养 16~18 h, 挑选 20 个典型菌落转种培养基平板上培养 4~6 h。刮取菌苔至缓冲液中混匀, 600 nm 波长下测量 A 值为 0.345

(0.35 ± 0.005), 用缓冲液进行 4 × 10⁴ 倍稀释。③样本检测: 每份待检血清均设置抗体对照(灭活兔补体 + 菌液 + 待检血清 + 稀释液各 12.5 μl)。每块 96 孔板均设置参比血清对照。每批次试验设置补体对照和体系对照。④结果判定: 如待检血清孔内菌落的数量 < 补体对照孔的 50%, 即判为“杀菌”, 否则判为“不杀菌”^[5]。能够杀死 ≥ 50% 菌体的最大血清稀释度即为杀菌抗体滴度。以抗体滴度 ≥ 1:8 作为判定具有抵御 *Nm* 感染能力(保护性)的标准。

4. ELISA: 血清中特异性 IgG 含量检测按照试剂盒说明书操作。待检血清的起始稀释度为 1:100, 倍比稀释至 1:800, NIBSC 标准品用稀释液稀释成 0、5、10、20、40、80、100、160 ng/ml, 与待检血清样本同时测定, 直线回归分析的线性相关系数 *r* 不低于 0.95。待检血清中特异性 C 群 *Nm* 多糖抗体的含量首次测定低于标准曲线的范围时, 减少其起始稀释度至 1:20 后再行测定; 抗体含量首次测定高于标准曲线的范围上限者, 进行更高稀释度的测定。以抗体含量 ≥ 2.0 μg/ml 作为判定具有抵御 *Nm* 感染能力(保护性)的标准。

5. 统计学分析: 将数据录入 Excel 2003 数据库, 采用 Origin 7.5 软件对“经对数转换”的杀菌抗体滴度和特异性 IgG 含量进行直线回归及相关性分析。

结 果

1. 成年人血清中 *Nm* 杀菌抗体滴度与特异性 IgG 含量的相关性: 75 份健康成年人血清样本的杀菌抗体滴度与特异性 IgG 含量之间相关性较好(*r* = 0.814 33, *P* < 0.001), 见图 1, 其中 72 份血清经两种方法检测的保护性相符, 符合率达 96% 以上。

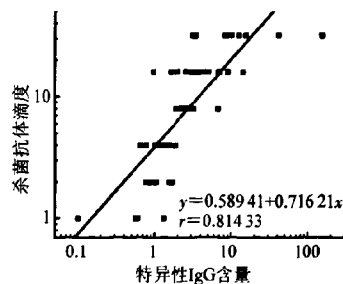


图 1 成年人血清 C 群 *Nm* 杀菌抗体滴度与特异性 IgG 含量的相关性

2. 3~8月龄婴儿及3~5岁儿童经结合疫苗免疫前后血清中Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量的相关性:

(1) 3~8月龄婴儿: 疫苗接种前, 杀菌抗体滴度与特异性IgG含量之间无相关性 ($r=0.14064, P>0.100$); 经2剂疫苗免疫后, 二者相关性显著增高

($r=0.80938, P<0.001$); 经3剂疫苗免疫后, 二者相关性有所下降 ($r=0.55061, P<0.001$) (图2)。接种疫苗前, 91.4% (85/93) 的血清样本经两种方法检测的保护性相符; 接种2剂和3剂结合疫苗后, 93份样本中分别有92份和91份血清样本经两种方法检测的保护性相符, 二者符合率达97%以上。

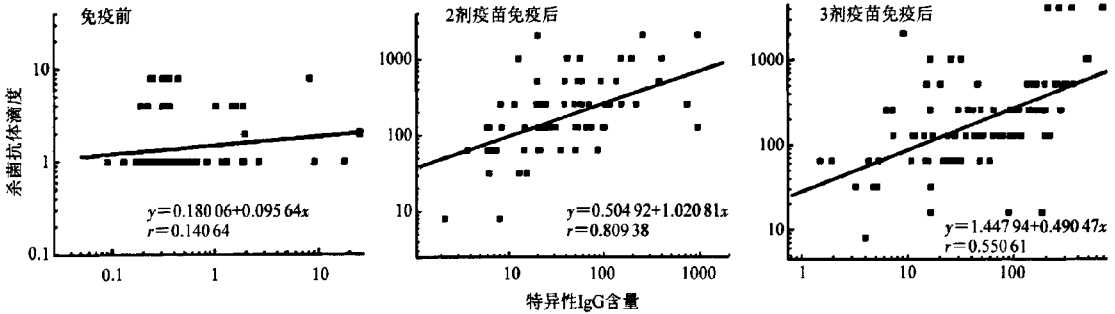


图2 3~8月龄婴儿结合疫苗免疫前后血清C群Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量之间的相关性

(2) 3~5岁儿童: 疫苗接种前, 杀菌抗体滴度与特异性IgG含量之间相关性较差 ($r=0.54040, P<0.05$); 疫苗 (10 μg) 免疫后1个月, 二者相关性较好 ($r=0.83723, P<0.001$) (图3)。接种疫苗前后, 分别有81.7% (67/82) 和100% (82/82) 的血清样本经两种方法检测的保护性相符。

($r=0.43104, P<0.005$); 经3剂疫苗免疫后, 二者之间无相关性 ($r=0.12729, P>0.100$) (图4)。接种疫苗前98.0% (49/50) 的血清样本经两种方法检测的保护性相符; 接种2剂和3剂多糖疫苗后, 50份样本中分别有31份和28份血清样本经两种方法检测的保护性相符, 二者符合率为62.0%和56.0%。

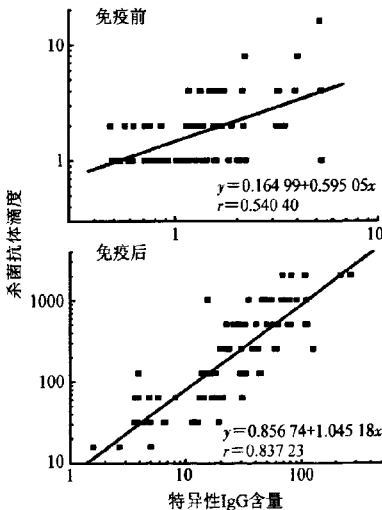


图3 3~5岁儿童结合疫苗免疫前后血清C群Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量之间的关系

3. 3~8月龄婴儿及3~5岁儿童经多糖疫苗免疫前后血清Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量的相关性:

(1) 3~8月龄婴儿: 疫苗接种前, 血清杀菌抗体滴度和特异性IgG含量之间相关性较差 ($r=0.2899, P<0.05$); 经2剂疫苗免疫后, 二者相关性仍较差

($r=0.19436, P<0.05$); 疫苗 (50 μg) 免疫后1个月, 二者相关性提高 ($r=0.53634, P<0.001$) (图5)。接种疫苗前后, 分别有61.6% (69/112) 和87.5% (98/112) 的血清样本经两种方法检测的保护性相符。

讨论

本研究结果显示, SBA与ELISA方法在测定健康成年人血清中的C群Nm抗体时结果相关性较好, 保护性的一致度也较好, 说明既往自然感染Nm的健康人群血清中存在的杀菌抗体多为IgG类型的多糖抗体。这些血清均来源于>40岁的健康人, 未接种过Nm疫苗, 因此基本代表Nm自然感染人群的抗体水平。

但是, 在检测3~8月龄婴儿和3~5岁儿童疫苗免疫前后的血清抗体时, 两种方法的检测结果有一定的差别, 其中, 接种多糖疫苗和结合疫苗后的结果又有差别。接种疫苗前, 各人群血清抗体经两种方法检测的结果相关性均不好, 但是保护性的一致度尚可 (除1组为61.6%, 余3组均>80.0%), 其中3~8月龄婴儿保护性的一致度明显高于3~5岁儿童, 这

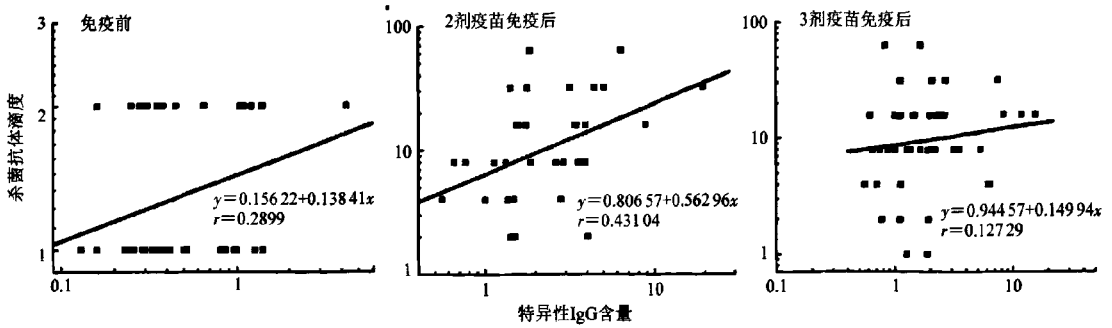


图4 3~8月龄婴儿多糖疫苗免疫前后血清C群Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量的相关性

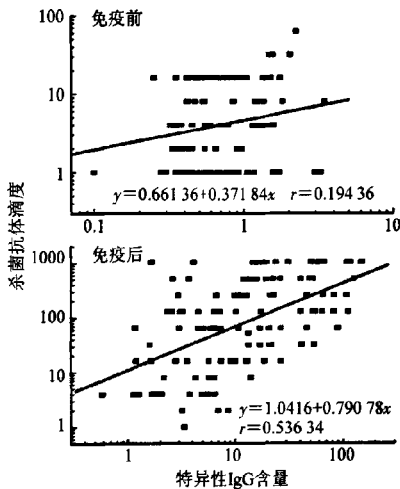


图5 3~5岁儿童多糖疫苗免疫前后血清C群Nm杀菌抗体滴度与特异性IgG含量的相关性

可能因为前者体内更多的是功能稳定的胎传抗体,而后者体内主要为自身产生的功能不够稳定的抗体。接种多糖疫苗后二者的相关性未见明显变化,这是因为婴幼儿的免疫系统正处于发育成熟阶段,对细菌多糖T细胞非依赖性抗原的反应不稳定,所产生的抗体也多属于无功能的低亲和力抗体^[6],因此采用ELISA测定的IgG抗体中包含大量的无功能性抗体,这种亲和力未成熟的抗体不具备杀菌能力。然而,接种多糖疫苗后,保护性的一致度明显变化,但是不同年龄段表现出不同的趋势(3~5岁儿童一致度升高,3~8月龄婴儿一致度降低),这可能还是因为不同年龄婴幼儿对多糖免疫应答能力不同的缘故,相对来说,年龄越小,产生功能性抗体能力越弱。相比接种结合疫苗后产生的特异性IgG含量与血清杀菌抗体的相关性较高,国外已有研究也得到类似结果^[5,7,8],另外,两种方法检测出的保护性一致度良好,可能是因为结合疫苗可以更有效地刺激婴幼儿产生功能性的抗体。

总之,对于不同年龄段人群,根据ELISA判定

个体是否具有抵御Nm感染的能力(保护性)与SBA判定的结论基本一致,因此可以替代后者用于保护性检测。成年人、婴幼儿Nm结合疫苗免疫前后血清中Nm特异性IgG含量的测定可间接反映血清杀菌抗体水平,因此ELISA可以替代SBA。但ELISA不适用于3~8月龄婴儿接受Nm多糖疫苗免疫后的效果评价。

参 考 文 献

- [1] Lv J, Liu L, Cheng JF, et al. The level of antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C in pre- and post- vaccinated sera of healthy population of Hubei province. Chin J Prev Med, 2006, 7(4):318-320. (in Chinese)
吕静, 刘力, 程均福, 等. 湖北省健康人群接种流脑A+C多糖疫苗前后血清流脑C群抗体水平变化. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4):318-320.
- [2] Gong J, Li CY, Dong BQ, et al. Effectiveness of an immunization campaign with group A and C meningococcal polysaccharide vaccine in controlling an outbreak of group C meningococcal disease. Chin J Epidemiol, 2008, 29(6):552-555. (in Chinese)
龚健, 李翠云, 董柏青, 等. A+C群脑膜炎球菌多糖疫苗在C群流脑暴发中应急接种效果的研究. 中华流行病学杂志, 2008, 29(6):552-555.
- [3] Borrow R, Miller E. Surrogates of protection. //Frosch M, Maiden MCJ. Handbook of Meningococcal Disease: Infection biology, Vaccination, Clinical management. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA press, 2006:323-341.
- [4] Xu L, Luo LZ, Zhu BQ, et al. Study on the bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C strains after immunization with a divalent polysaccharide (A plus C) vaccine. Chin J Epidemiol, 2009, 30(6):619-621. (in Chinese)
徐丽, 罗隆泽, 朱兵清, 等. C群脑膜炎奈瑟菌血清杀菌力试验的优化及其应用. 中华流行病学杂志, 2009, 30(6):619-621.
- [5] World Health Organization. Standardization and validation of serological assays for the evaluation of immo/LunC responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A/C vaccines, 1999, WHO/V&B/99.19.
- [6] Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunoluninity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J Exp Med, 1969, 129(6):1307-1326.
- [7] Backhouse JL, Gidding HF, MacIntyre CR, et al. Population-based seroprevalence of *Neisseria meningitidis* serogroup C capsular antibody before the introduction of conjugate vaccine, in Australia. Vaccine, 2007, 25(7):1310-1315.
- [8] Sikkema DJ, Friedman KE, Corsaro B, et al. Relationship between serum bactericidal activity and serogroup-specific immo/Lunoglobulin G concentration for adults, toddlers, and infants immo/Lunized with *Neisseria meningitidis* serogroup C vaccines. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(5):764-768.

(收稿日期:2011-11-09)
(本文编辑:万玉立)