

# 肺炎球菌结合疫苗两种免疫效果评价方法的比较分析

李江姣, 杜慧竞, 陈驰, 石继春, 徐苗, 叶强\*

中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050

**摘要:** **目的** 研究肺炎球菌结合疫苗诱导的功能抗体滴度与总抗体浓度的相关性。

**方法** 采用调理吞噬实验 (Opsonophagocytic assay, OPA) 和酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 对 13 价肺炎球菌结合疫苗免疫后血清样本进行 OPA 滴度和抗体浓度检测, 并就两种检测结果进行比较, 分析二者相关性。**结果** 血清型 1, 3, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A 和 23F 两种检测结果的相关系数较高, 为 0.71~0.88。19F 和 4 型的相关系数相对略低, 分别为 0.66 和 0.52。**结论** OPA 法与 ELISA 法测定的血清抗体效价的相关性较高, 二者结果具有良好的一致性。

**关键词:** 肺炎球菌; 疫苗; 调理吞噬试验; ELISA

## Comparison of Antibody Titers Measured by Two Evaluation

### Methods

LI Jiang-jiao DU Hui-jing CHEN Chi SHI Ji-chun XU Miao YE Qiang\*

Key Laboratory for Standardization of Methods for Quality Control of Biotechnical Products, Ministry of Health, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China Corresponding author: YE Qiang, E-mail: qiangyee@nicpbp.org.cn

**Abstract:** **Objective** To compare and analyze the correlation of opsonophagocytic antibody titers and the antibody concentrations of sera samples obtained after 13-

---

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (编号: 2012AA02A402); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金 (编号: 2012B15)

作者简介: 李江姣 (1982-), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事细菌类疫苗检验工作。

\*通讯作者: 叶强, E-mail: qiangyee@nicpbp.org.cn 李江姣, E-mail: lijiaojiao@126.com

valent pneumococcal conjugate vaccine immunization. **Methods** The opsonophagocytic titers of sera against 13 pneumococcal serotypes were determined using opsonophagocytic assay (OPA) and compared with the corresponding ELISA titers, between which the relationship was analyzed for each pneumococcal serotype. **Results** The correlation coefficients were high for serotypes 1, 3, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A and 23F, ranged from 0.71 to 0.88. The correlation coefficients were relatively low for serotype 19F and 4, were 0.66 and 0.52 respectively. **Conclusion** The relationship between the opsonophagocytic activity and antibody concentration for 13-valent Pneumococcal conjugate vaccine shows a good correlation.

**Key words:** Pneumococcus; Vaccine; Opsonophagocytic assay (OPA); ELISA

肺炎球菌疫苗是预防肺炎球菌感染的重要手段。目前市场上有两种类型的肺炎球菌疫苗：一种是荚膜多糖疫苗（如 23 价肺炎球菌多糖疫苗 PPV23），另一种是多糖-蛋白结合疫苗（如 7 价肺炎球菌结合疫苗 PCV7 和 13 价肺炎球菌结合疫苗 PCV13）。无论何种类型的肺炎球菌疫苗，上市前必须经过临床研究以考察其安全性、免疫原性和有效性，因此选择准确有效的肺炎球菌疫苗检测手段，对正确开展疫苗的临床评价至关重要。

疫苗诱导的免疫效力通常通过 ELISA 方法检测抗体浓度来进行评估<sup>[1]</sup>；但该方法只能通过抗原抗体相互作用单纯反应抗体总量，而无法排除其中无功能抗体的干扰。近年来多项研究指出,通过直接检测抗体的调理能力来评估疫苗效力更为可靠，因为抗体是通过促进吞噬细胞对肺炎球菌的调理吞噬作用来提供保护力的<sup>[2]</sup>。体外调理吞噬实验是基于上述原理对功能性抗体水平进行检测的

方法，其结果能更加真实地反映疫苗的保护效力。美国阿拉巴马大学研发的多重调理吞噬实验技术（Multiplexed opsonophagocytic killing assay, MOPA）实现了 OPA 技术的通量化，并对实验流程加以简化，促进了该项技术的推广应用<sup>[3]</sup>。目前，WHO 已经建议在肺炎球菌疫苗的临床免疫效力评价中使用 OPA 法进行功能性抗体水平检测<sup>[4,5]</sup>。

为了研究功能抗体滴度与抗体浓度的相关性，本研究利用我们已经建立的 MOPA 技术进行了 13 价肺炎球菌结合疫苗 12 份免疫血清的 OPA 滴度检测，并将 OPA 结果与 ELISA 结果进行了比较分析。

## 1. 材料与方法

### 1.1 材料

HL-60 细胞系购自美国 ATCC（CCL-240）；13 个血清型的肺炎链球菌菌株（带有特定抗生素抗性）来源于美国阿拉巴马大学伯明翰分校 Moon H Nahm 实验室；12 份血清样本来源于接种了 13 价肺炎球菌结合疫苗（PCV13，美国惠氏公司）第一针免疫的 12 个健康婴儿；补体来源于 SPF 级新西兰 3~4 周龄乳兔，为本实验室制备；标准血清 007sp 来源于美国 FDA。

### 1.2 主要试剂及仪器

Todd-Hewitt 肉汤培养基、酵母提取物购自 Becton Dickinson 公司；二甲基甲酰胺（DMF）、2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑（TTC）购自 Amresco 公司；抗生素 Optochin、Spectinomycin、Trimethoprim 和 Streptomycin 购于 Sigma 公司。菌落计数器 ProtoCOL 3 购自 Synbiosis 公司；软件 Opsotiter3 来自美国阿拉巴马大学伯明翰分校 Moon H Nahm 实验室。

### 1.3 OPA 检测

OPA 检测采用可同时检测 4 种血清型的多重调理吞噬实验方法。血清样本 56℃放置 30min 后，在 96 孔板中 3 倍系列稀释为 8 个梯度，每孔 20μl；血清稀释板中加入 10μl 按一定比例混合的带特定抗生素抗性的各型肺炎球菌，每次混合 4 种血清型的肺炎球菌；置于振荡器上室温孵育 30min；加入 10μl 补体；加入 40μl 用 DMF 诱导分化了 5 天的 HL-60 细胞；置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中振荡孵育 45min；将 96 孔板冰上放置 20min；各孔取 10μl 反应液分别点到 4 个含 THY 琼脂培养基的方形平皿内，室温吸收 20min 后分别覆盖 4 种不同的上层培养基（分别含 4 种不同抗生素及 TTC）；37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养后，利用菌落计数器计数各平板上的菌落数；用软件 Opsotiter3 计算样本的 OPA 滴度。详细的操作步骤见参考文献[6]。

#### 1.4 ELISA 检测

采用双吸附酶联免疫法：血清样本用肺炎链球菌细胞壁 C 多糖和 22F 型荚膜多糖进行吸附，吸附后的血清加入到包被有肺炎链球菌各型荚膜多糖的微孔板中进行结合和洗涤，加入碱性磷酸酶标记的二抗进行结合和洗涤，加入底物对硝基苯磷酸二钠进行显色反应，用酶标仪进行吸光度检测。使用标准血清 007sp 作为定量标准品。具体操作步骤见参考文献[7]。

#### 1.5 结果分析

1.5.1 象限分布分析：以 ELISA 结果为横坐标，OPA 结果为纵坐标，并以 OPA 滴度的最低检测限阈值 8 以及 ELISA 结果中抗体浓度的有效性阈值 0.35μg/ml 为分界线，对所测样本针对各血清型的抗体产生情况做象限分布分析。

1.5.2 相关系数计算：将 OPA 结果与 ELISA 结果均转换为以 2 为底的对数，进

行线性回归分析，计算相关系数。

## 2 结果

### 2.1 PCV13 免疫血清样本的 OPA 结果及 ELISA 结果

对 PCV13 免疫后的 12 份血清样本进行 OPA 滴度检测和利用 ELISA 进行 IgG 抗体浓度检测。检测结果的象限分布分析见图 1。左下象限表示 OPA 结果与 ELISA 结果均为阴性，即代表两种方法的结果均表明抗体无保护力；右上表示 OPA 结果与 ELISA 结果均为阳性，即代表两种方法的结果均表明抗体具有保护力；左上表示 OPA 结果阳性而 ELISA 结果为阴性；右下表示 OPA 结果阴性而 ELISA 结果为阳性。

由图1可见，血清型4，6A，6B，9V，14，18C，19F和23F所测的样本均为双阳性，即抗体浓度均大于0.35μg/ml，OPA滴度均大于8。1型和3型中的各6个样本，5型的4个样本及19A型的1个样本为双阴性，即抗体浓度均小于0.35μg/ml，OPA滴度均小于8。7F型中有5份血清样本的抗体浓度低于0.35μg/ml，而OPA滴度大于8。5型中有1份血清样本，19A型有2份样本的抗体浓度高于0.35μg/ml，但OPA滴度却小于8。

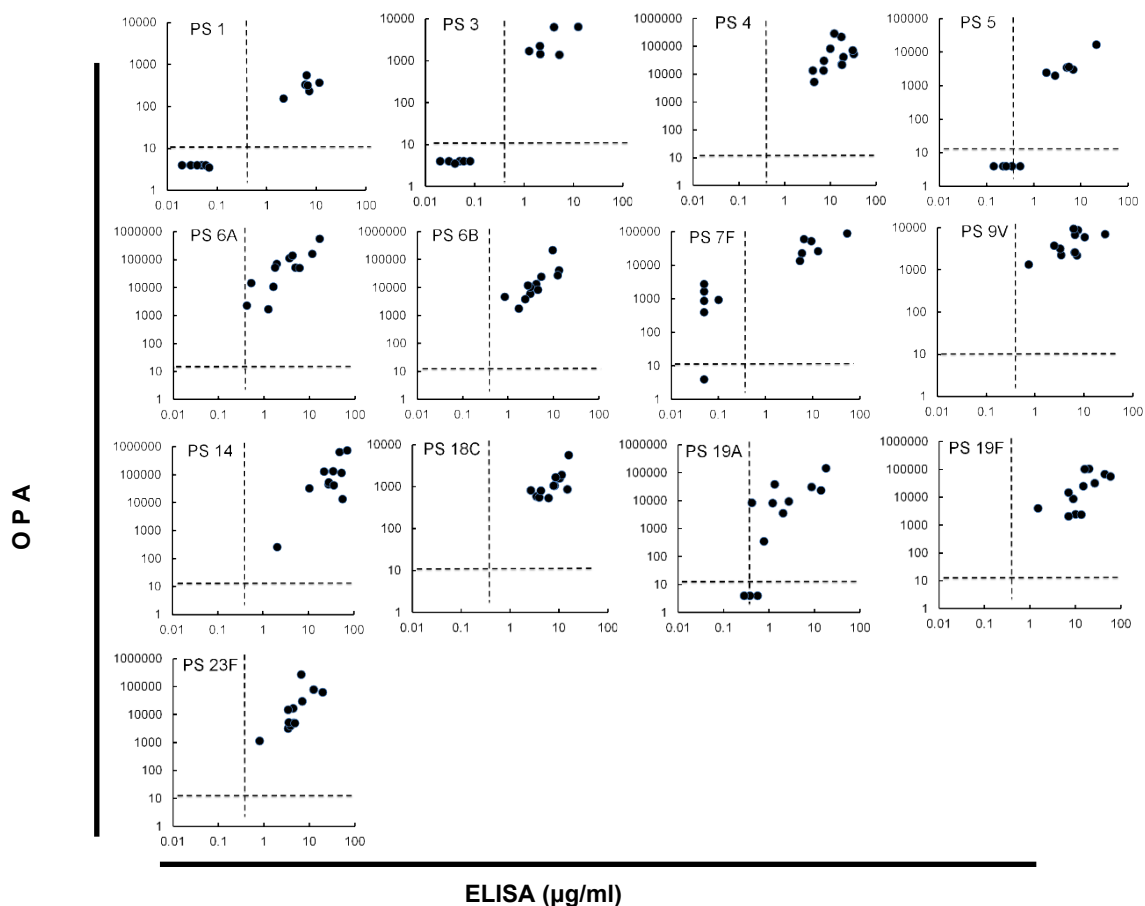


图1 13个血清型（1，3，4，5，6A，6B，7F，9V，14，18C，19A，19F和23F）的OPA滴度与ELISA抗体浓度的分布图。（图中横向虚线表示OPA滴度的检测限阈值8；纵向虚线表示抗体浓度的有效性阈值0.35 $\mu\text{g/ml}$ 。）

## 2.2 OPA 结果与 ELISA 结果的相关性

12份血清样本的OPA结果与ELISA结果的相关系数统计结果见表1。

表1 OPA 结果与 ELISA 结果的相关系数

血清型	相关系数 (r)
1	0.83
3	0.78
4	0.52
5	0.88
6A	0.83
6B	0.8
7F	0.74
9V	0.71
14	0.83
18C	0.72
19A	0.76
19F	0.66

### 3 讨论

本研究中, 我们利用OPA技术对13价肺炎球菌结合疫苗(PCV13)免疫后的12份血清样本进行了OPA滴度检测, 并分析了OPA结果与ELISA结果的相关性。ELISA检测中, 采用国际标准血清007sp作为定量参考品, 定量测定抗体的浓度值。根据相关研究数据, 在ELISA方法中将 $0.35\mu\text{g/ml}$ 作为判断抗体是否有保护力的最低浓度界限值; 在OPA方法中, 采用调理滴度8作为判断抗体是否具有杀菌调理活性的最低滴度值<sup>[5]</sup>。

我们的研究结果显示血清型 1, 3, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A 和 23F 的相关系数较高, 为 0.71~0.88。19F 和 4 型的相关系数略低, 分别为 0.66 和 0.52。研究结果还显示, 在 7F 型中, 5 份血清样本经 ELISA 检测抗体浓度低于  $0.35\mu\text{g/ml}$ , 而 OPA 滴度均大于 8, 表明这些血清样本虽然抗体浓度水平低, 但却具有调理杀菌活性。5 型的 1 份血清样本和 19A 的 2 份样本经 ELISA 检测抗体浓度高于  $0.35\mu\text{g/ml}$ , 但 OPA 滴度却小于 8, 提示这些人群虽然在 ELISA 结果中被界定为抗体阳性群体, 但实际上这些人群的抗体是没有保护力的。

类似的情况在之前的PCV7的研究中也有报道, Isabelle Henckaerts等对PCV7免疫后的140份血清样本进行OPA滴度检测并与ELISA结果进行比较, 结果显示在6B和23F型中, 分别有13份和8份样本的抗体浓度低于阳性界限值, 但OPA滴度均大于8, 即有调理吞噬活性。在19F和18C型中, 分别有16份和3份样本的抗体浓度值高于阳性界限值, 但OPA滴度均小于8, 即没有OPA调理活性<sup>[8]</sup>。Hyunju Lee等对PCV7免疫后的31份血清样本的OPA与ELISA比较结果显示, 血清型4, 6B, 9V, 18C和19F的相关系数 $r$ 为0.65~0.75, 14型与23F型的相关系

数 $r$ 分别为0.35和0.58<sup>[9]</sup>。Sylvia H. Yeh等对PCV13免疫后的100份血清样本进行分析, 结果显示13个血清型的OPA及ELISA结果的整体相关性较好<sup>[10]</sup>, 但该研究中没有针对各个血清型的具体相关系数分析。

综上所述, 我们的研究表明 PCV13 所含血清型的抗体浓度与调理活性之间有着良好的相关性。

## 参考文献

- [1] Wernette CM, Frasch CE, Madore D, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003,10(4):514 –519.
- [2] Schuerman L, Wysocki J, Tejedor JC, et al. Prediction of Pneumococcal Conjugate Vaccine Effectiveness against Invasive Pneumococcal Disease Using Opsonophagocytic Activity and Antibody Concentrations Determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with 22F Adsorption [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011,18(12):2161-2167.
- [3] Burton RL, Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13 (9) : 1004-1009.
- [4] WHO. Meeting Report: WHO Workshop on Standardization of Pneumococcal Opsonophagocytic Assay [S]. Geneva: WHO, 2007.
- [5] World Health Organization. Recommendations for the Production and Control of Pneumococcal Conjugate Vaccines. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005, WHO technical report series No. 927.



- [6] Nahm MH, Burton RL. Protocol for multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) for antibodies against *Streptococcus pneumoniae* (Version D.05, August 2013) [OL]. (2013-08-01) [2014-03-26]  
<http://www.vaccine.uab.edu>.
- [7] Concepcion NY, Frasch CE. Pneumococcal type 22F polysaccharide absorption improves the specificity of a pneumococcal polysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8(2):266–272.
- [8] Henckaerts I, Durant N, De Grave D, et al. Validation of a routine opsonophagocytosis assay to predict invasive pneumococcal disease efficacy of conjugate vaccine in children [J]. *Vaccine*, 2007, 25(13):2518–2527.
- [9] Lee H, Nahm MH, Burton R, Kim KH. Immune Response in Infants to the Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine against Vaccine-Related Serotypes 6A and 19A. *Clin Vaccine Immunol*. 2009, 16(3):376-381.
- [10] Yeh SH, Gurtman A, Hurley DC, et al. Immunogenicity and Safety of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Infants and Toddlers [J]. *Pediatrics*, 2010, 126(3):e493-505.