

13 价肺炎链球菌疫苗功能抗体检测技术的准确性评估

李江姣, 李康, 黄洋, 徐潇, 杜慧竟, 叶强

中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,
国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629

摘要: **目的** 对 13 价肺炎链球菌疫苗功能抗体检测技术即多型调理吞噬技术 (multiplexed opsonophagocytic killing assay, MOPA) 进行准确性评估, 并为建立该技术的其他实验室提供参考。 **方法** 利用建立的 MOPA 方法对美国食品及药品管理局的 16 份参考血清盘进行 13 个血清型 (分别为 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型) 的调理吞噬试验 (opsonophagocytic killing assay, OPKA) 滴度检测, 将检测值与其各血清型的定值进行比较分析。 **结果** 皮尔逊相关系数统计结果显示, 各血清型的 r 值范围为 0.90~0.98, 平均为 0.94。林氏一致性相关系数分析结果显示, 13 种血清型的 r_c 值范围为 0.88~0.98, 平均为 0.92。对于所检测的 13 个血清型, 处于各型定值上下 2 倍范围内的数据比率为 75%~100%, 平均为 92%; 处于各型定值上下 3 倍范围内的数据比率为 94%~100%, 平均为 98%。16 份参考血清盘的 13 个血清型的 OPA 滴度检测结果与其各型定值具有良好的相关性和一致性。 **结论** 本研究表明该室建立的 MOPA 方法具有良好的准确性, 可用于肺炎链球菌疫苗的临床免疫原性评价。

关键词: 肺炎链球菌; 疫苗; 功能抗体; 调理吞噬试验; 准确性

中图分类号: R186 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2023)10-1176-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.10.006

Evaluation on the accuracy of functional antibody detection technology for 13 valent pneumococcal vaccine

LI Jiangjiao, LI Kang, HUANG Yang, XU Xiao, DU Huijing, YE Qiang

NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Author contributions: LI Jiangjiao and LI Kang contributed equally to this paper

Corresponding author: YE Qiang, E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn

基金项目: 国家科技资源共享服务平台资助 (国家病原微生物资源库-NPRC-32), 国家科技重大专项课题 (2018ZX0973800 6-006)

作者简介: 李江姣 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事呼吸道细菌类疫苗的质量控制工作。李江姣和李康同为第一作者。

通信作者: 叶强, E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn。

- [4] 段伟, 张书岭, 郝学安. 济宁市养老机构消毒质量调查分析[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(4): 290-292.
- [5] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. JAMA, 2020, 323(11): 1-9.
- [6] 王琪, 赖鸿皓, 丁国武, 等. 从新型冠状病毒肺炎聚集性疫情现状探讨养老机构疫情防控[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(9): 4636-4638.
- [7] 春雅丽, 赵腾龙, 张清慧. 2012—2018 年上海市松江区养老机构消毒质量监测分析[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(4): 287-289.
- [8] 湖南东展科技发展有限公司. 托幼机构室内环境质量要求: DB 43/T 2312—2022[S]. 长沙: 湖南省市场监督管理局, 2022: 2-5.
- [9] 田靓, 朱仁义, 朱秋丽, 等. 全国三省养老机构卫生消毒现况[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(6): 503-505.
- [10] 范晶晶, 沈益鸣, 吴晓松, 等. 江苏省养老机构新冠疫情防控现状调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(18): 2872-2876.
- [11] 李媛, 陈郁, 赵子耀, 等. 2020 年南通市重点机构消毒质量监测及现场卫生状况的调查[J]. 医药卫生, 2022, 12(5): 111-115.
- [12] 毛育华, 张欣, 龚刚, 等. 上海市嘉定区养老机构消毒效果质量监测[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(10): 751-753.
- [13] Montville R, Chen Y, Schaffner DW. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 73(2/3): 305-313.
- [14] 郑建东, 杨剑, 牟笛, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情前后个人手卫生状况及影响因素调查[J]. 实用预防医学, 2021, 28(6): 649-652.
- [15] Foddai AC, Grant IR, Dean M. Efficacy of instant hand sanitizers against foodborne pathogens compared with hand washing with soap and water in food preparation settings: a systematic review [J]. J Food Prot, 2016, 79(6): 1040-1054.
- [16] 赵治英, 张露丹, 张鸿, 等. 2011—2015 年上海市浦东新区养老机构消毒效果监测分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(3): 305-307, 312.
- [17] 郭绍华, 毛育华, 张欣, 等. 上海市某区养老机构护理人员手卫生管理状况调查[J]. 中国消毒学杂志, 2019, 36(9): 671-674.

收稿日期: 2023-05-30

Abstract: Objective To assess the accuracy of functional antibody detection technology, namely, multiplex opsonophagocytic killing assay (MOPA) for 13 valent pneumococcal vaccine, and to provide references for other laboratories with this technology.

Methods The established MOPA method was used to detect the opsonophagocytic killing assay (OPKA) titers of antibodies against pneumococcal serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F in 16 Food and Drug Administration (FDA) reference sera, and the detection data were compared with the consensus values of each serotype. **Results** Pearson correlation coefficient analysis revealed that r values of the 13 serotypes ranged from 0.90 to 0.98, with an average of 0.94. Lin's concordance correlation coefficient analysis displayed that r_c values of the 13 serotypes ranged from 0.88 to 0.98, with an average of 0.92. For the 13 serotypes detected, the percentages of results within ± 2 -fold of the consensus values for the 16 serum samples were 75%–100%, with an average of 92%. The percentages of results within ± 3 -fold of the consensus values were 94%–100%, with an average of 98%. The OPFA titers of antibodies against the 13 serotypes in the 16 reference sera were highly correlated and consistent with their assignments. **Conclusion** This study shows that the MOPA method established in the laboratory has good accuracy and can be used for the clinical immunogenicity evaluation of pneumococcal vaccines.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; vaccine; functional antibody; opsonophagocytic killing assay; accuracy

肺炎链球菌可引起脑膜炎、菌血症、菌血症性肺炎等严重的侵袭性疾病,也可引起急性中耳炎、鼻窦炎等其他疾病,是肺炎或呼吸道感染患儿的首位病原体,也是老年人社区获得性肺炎的重要病原体^[1-2]。肺炎链球菌性疾病是全球严重的公共卫生问题之一,被世界卫生组织列为“极高度优先”使用疫苗预防的疾病。接种疫苗是预防肺炎链球菌感染的有效手段。

近年来肺炎链球菌疫苗的研发态势迅猛,各种新型疫苗不断被国内外药企研制出来,并纷纷进入临床试验^[3-4]。这些疫苗的上市需要通过临床样本的免疫原性检测结果来评估其有效性。肺炎链球菌疫苗的免疫原性检测包括 IgG 抗体含量检测和功能抗体检测。其中,基于调理吞噬试验 (opsonophagocytic killing assay, OPKA) 的功能抗体检测技术,由于其能够直接检测具有调理吞噬功能的抗体水平,从而更加准确地反映疫苗保护效力,在肺炎链球菌疫苗的临床免疫效力评价中发挥着重要作用^[5]。Nahm 等^[6]对 OPA 方法进行优化,研究出了多型调理吞噬实验 (multiplexed opsonophagocytic killing assay, MOPA),进一步提高了 OPKA 方法的检测通量。

鉴于 MOPA 方法在肺炎链球菌疫苗临床效力评价中的优势和重要性,国际上陆续有多个实验室建立了该方法,但由于缺乏参考血清,既往所建立方法的准确性难于评估^[7-8]。为了实现 OPKA 方法的标准化,使不同实验室结果具有可比性,美国食品及药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 研制了 007sp 标准血清和 16 份 OPKA 参考血清盘,并组织 6 个国际实验室对其 13 个血清型的 OPKA 滴度进行了协作标定和赋值^[9]。标准血清 007sp 可以用来校准不同实验室间 OPKA 数据,16 份血清盘可用来对实验室建立的 OPKA 方法的准确性进行评估。

本实验室成功在国内建立了基于 MOPA 的肺炎链球菌疫苗功能抗体检测方法^[10-14]。为了实现该方法的准确性评估,本研究从美国 FDA 引进了一套 OPKA 参考血清盘,对其 16 份参考血清的 13 个肺炎链球菌血清型的 OPKA 滴度进行了检测,通过与各血清型定值的比较分析,对所建立 MOPA 方法的准确性进行全面评估,以确定其是否适用于肺炎链球菌疫苗的临床效力评价。

1 材料与方法

1.1 材料 肺炎链球菌 (13 种血清型) 来源于美国阿拉巴马大学肺炎链球菌血清学参比实验室; HL-60 细胞来源于美国模式培养物研究所 (American Type Culture Collection, ATCC) (CCL-240); 007sp 标准血清购自英国国家生物制品检定所 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC); 16 份校准血清盘来源于美国 FDA; 乳兔补体为本室制备。

1.2 主要试剂及仪器 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) (批号: BCCB1241), 二甲基甲酰胺 (N, N-dimethylformamide, DMF) (批号: BCCD4754), 链霉素 (streptomycin, 批号: 019M4821V), 奥普脱欣 (optochin, 批号: BCBV2536), 甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, 批号: BCBN2518V), 奇霉素 (spectinomycin, 批号: 122K0561) 购于 Sigma 公司。菌落计数仪 ProtoCOL 3 来自英国 Synbiosis 公司。

1.3 OPKA 滴度检测 采用 MOPA 法进行 OPKA 滴度检测, 具体操作见参考文献^[10-11]。利用建立的 MOPA 方法对美国 FDA 的 16 份参考血清盘的 13 个血清型 (分别为 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型) 的 OPKA 滴度分别进行 5 次独立重复检测, 检测结果用国际标准血清 007sp 进行校正, 计算 5 次检测滴度的几何均数 (geometric mean titer, GMT)

作为检测值。

1.4 结果计算 将 OPKA 滴度值转换为以 2 为底的对数,利用 Excel 软件计算皮尔逊相关系数 (Pearson correlation coefficient) 和林氏一致性相关系数 (Lin's concordance correlation coefficient, CCC)。皮尔逊相关系数广泛用于度量两组数据之间的线性相关程度,是最常用的一种相关系数,记为 r 值。 r 值介于 $-1 \sim 1$ 之间,绝对值越大表明相关性越强。CCC 不仅考虑两组数据是否线性相关(拟合成一条直线),同时还考虑该直线与 45 度参考线的位置关系。CCC 包含了皮尔逊相关系数的功能,同时考虑更多的因素,在评估两种方法检测结果的一致性方面具有更大的意义^[15],记为 r_c , $r_c > 0.80$ 表示一致性良好。

皮尔逊相关系数计算公式如下:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

其中: n 是样本数量; x_i, y_i 是变量 x, y 对应的 i 点观测值; \bar{x} 是 x 样本平均数, \bar{y} 是 y 样本平均数。

CCC 计算公式如下:

$$r_c = \frac{2rs_x s_y}{(\bar{x} - \bar{y})^2 + s_x^2 + s_y^2}$$

其中: r 为皮尔逊相关系数; \bar{x} 是 x 样本平均数, \bar{y}

为 y 样本平均数; s_x 是 x 样本标准差, s_y 是 y 样本标准差。

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$
$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

2 结果

2.1 相关性分析 综合所有 13 个血清型的 208 个数据,本试验检测值结果与定值之间有很好的相关性,检测点总体上位于一致线附近,斜率 $slope = 1.0, r = 0.92$,见图 1。

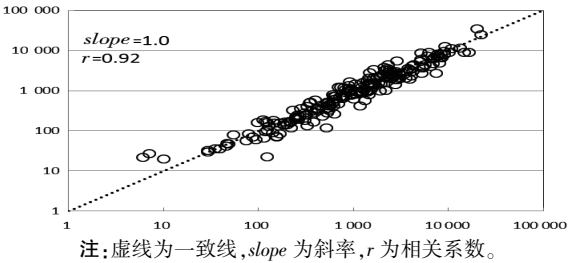


图 1 16 份血清盘 OPKA 滴度检测值与其定值的比较分析散点图

按不同血清型分别进行分析,由图 2 可以看出各血清型中检测点大部分均位于一致线附近,检测值与定值一致性均良好。

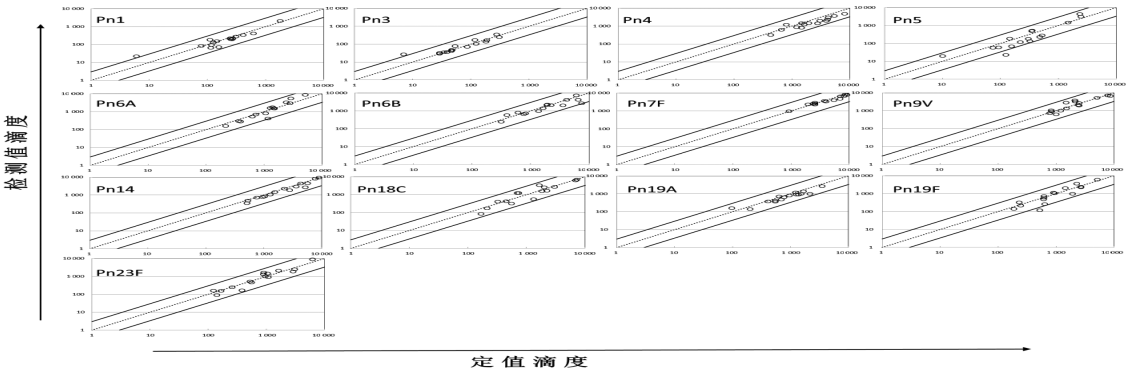


图 2 各血清型的 OPKA 滴度检测值与其各型定值的比较分析散点图

通过计算皮尔逊相关系数和 CCC,对检测结果与定值的相关性进行分析。皮尔逊相关系数统计结果显示,各血清型的 r 值范围为 $0.90 \sim 0.98$,平均为 0.94 。其中 4、6A、6B、7F、14、19A、23F 型相关性最高, r 值均在 0.95 以上。18C 型的 r 值较高,为 0.94 。1、3、5、9V 和 19F 型相比其他型的 r 值略低,为 $0.90 \sim 0.92$ 。CCC 分析结果显示,13 种血清型的 r_c 值范围为 $0.88 \sim 0.98$,平均为 0.92 。其中 1、3、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、23F 型的一致性最高, r_c 值均高于 0.90 ,4、5 和

19F 型相比其他型的 r_c 值略低,为 $0.88 \sim 0.89$,见表 1。

表 1 各血清型的 OPKA 滴度检测值与其定值的相关系数

| 血清型 | r 值 | r_c 值 | 血清型 | r 值 | r_c 值 |
|------|-------|---------|-------|-------|---------|
| 1 型 | 0.92 | 0.91 | 9V 型 | 0.92 | 0.92 |
| 3 型 | 0.92 | 0.90 | 14 型 | 0.98 | 0.97 |
| 4 型 | 0.95 | 0.89 | 18C 型 | 0.94 | 0.94 |
| 5 型 | 0.91 | 0.89 | 19A 型 | 0.96 | 0.91 |
| 6A 型 | 0.97 | 0.94 | 19F 型 | 0.90 | 0.88 |
| 6B 型 | 0.95 | 0.94 | 23F 型 | 0.96 | 0.95 |
| 7F 型 | 0.98 | 0.98 | Mean | 0.94 | 0.92 |

注: r 为皮尔逊相关系数, r_c 为 CCC。

2.2 百分比统计分析 统计 FDA 16 份血清盘中处

于各血清型的定值上下 2 倍范围及 3 倍范围内的血清数量以及比例。结果表明,对于所检测的 13 个血清型,处于各型定值上下 2 倍范围内的血清数的百分比为 75%~100%,平均为 92%;处于 3 倍范围内的百分比为 94%~100%,平均为 98%,见表 2。

表 2 各血清型的 OPKA 滴度检测值落在定值上下 2 倍及 3 倍范围内的数据统计

| 血清型 | 2 倍范围 | | 3 倍范围 | |
|-------|-------|--------|-------|--------|
| | n/N | 百分比(%) | n/N | 百分比(%) |
| 1 型 | 14/16 | 88 | 15/16 | 94 |
| 3 型 | 15/16 | 94 | 15/16 | 94 |
| 4 型 | 16/16 | 100 | 16/16 | 100 |
| 5 型 | 12/16 | 75 | 15/16 | 94 |
| 6A 型 | 15/16 | 94 | 16/16 | 100 |
| 6B 型 | 15/16 | 94 | 16/16 | 100 |
| 7F 型 | 16/16 | 100 | 16/16 | 100 |
| 9V 型 | 16/16 | 100 | 16/16 | 100 |
| 14 型 | 16/16 | 100 | 16/16 | 100 |
| 18C 型 | 13/16 | 81 | 16/16 | 100 |
| 19A 型 | 15/16 | 94 | 16/16 | 100 |
| 19F 型 | 14/16 | 88 | 15/16 | 94 |
| 23F 型 | 15/16 | 94 | 16/16 | 100 |
| 平均值 | — | 92 | — | 98 |

注:N 为检测血清总数,n 为处于各型定值上下 2 倍或 3 倍范围内的血清数量。

3 讨 论

本研究从美国 FDA 引进了一套 OPKA 参考血清盘,对其 16 份血清的 13 个血清型进行了 OPKA 滴度检测。检测结果采用 007sp 标准血清进行校准,并与 16 份血清的定值结果进行比较。通过分析各血清型中检测值与定值的相关性,以及各血清型中检测值落在定值上下 2 倍及 3 倍范围内的血清数量及比率,来对所建立 MOPA 方法的准确性进行全面分析和评估。

研究结果显示,各血清型的皮尔逊相关系数范围为 0.90~0.98,平均为 0.94;一致性相关系数范围为 0.88~0.98,平均为 0.92。本研究所检测的 13 个血清型中,检测值与定值均表现出良好的相关性和一致性。

由于 OPKA 试验属于复杂的生物活性测定试验,试验中涉及到细胞、细菌、补体等众多生物活性物质,因此试验数据存在一定程度的变异性,在进行试验间数据比较分析时经常采用定值上下 2 倍或 3 倍范围来进行评估。本研究中,对于所检测的 13 个血清型,处于各型定值上下 2 倍范围内的数据比率为 75%~100%,平均为 92%;处于各型定值上下 3 倍范围内的数据比率为 94%~100%,平均为 98%。之前 Burton 等^[9]研究中,6 个实验室对 FDA16 份血清盘的 OPKA 滴度检测结果显示,13 个血清型中处于各型定值上下 2 倍范围内的结果百分比为 75%~100%,平均为

91%;处于各型定值上下 3 倍范围的结果百分比为 87%~100%,平均为 97%。该研究结果与国际实验室结果相似,表明该实验室建立 MOPA 方法的准确性达到了国际同行水平。

综上所述,研究表明该室建立的 MOPA 方法具有良好的准确性,能够为我国肺炎链球菌疫苗的有效性评估和上市评审提供准确可靠的数据支撑,为我国肺炎链球菌疫苗的质量控制提供了保障。

参考文献

[1] 中华预防医学会,中华预防医学会疫苗与免疫分会.肺炎球菌性
疾病免疫预防专家共识(2020 版)[J].中华流行病学杂志,2020,
41(12):1945-1979.

[2] 王娟,谢良伊,张景,等.2013—2017 年某院呼吸道分离病原菌分
布及耐药性分析[J].实用预防医学,2020,27(5):584-588.

[3] 汪洋,向左云,任江伟,等.肺炎球菌结合疫苗的研究现状及前景
[J].中国生物制品学杂志,2022,35(9):1025-1033.

[4] 杨红涛,袁敏学.新一代广谱肺炎链球菌疫苗的研究进展[J].
中国生物制品学杂志,2022,35(5):608-614.

[5] Song JY, Moseley MA, Burton RL, et al. Pneumococcal vaccine and
opsonic pneumococcal antibody [J]. J Infect Chemother, 2013,
19(3):412-425.

[6] 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.

[7] Rose CE, Romero-Steiner S, Burton RL, et al. Multilaboratory comparison
of *Streptococcus pneumoniae* opsonophagocytic killing assays and their
level of agreement for the determination of functional antibody activity
in human reference sera [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011,18(1):
135-142.

[8] Romero-Steiner S, Frasch C, Concepcion N, et al. Multilaboratory
evaluation of a viability assay for measurement of opsonophagocytic
antibodies specific to the capsular polysaccharides of *Streptococcus
pneumoniae* [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003,10(6):1019-1024.

[9] Burton RL, Antonello J, Cooper D, et al. Assignment of opsonic
values to pneumococcal reference serum 007sp for use in
opsonophagocytic assays for 13 serotypes [J]. Clin Vaccine Immunol,
2017,24(2):e00457-16.

[10] 李江姣,杜慧竟,石继春,等.评价肺炎链球菌疫苗免疫效果的功
能性抗体检测方法的建立[J].中国医药导报,2014,11(20):4-8.

[11] 李江姣,杜慧竟,陈驰,等.肺炎球菌结合疫苗两种免疫效果评
价方法的比较分析[J].实用预防医学,2014,21(11):1281-
1284.

[12] 李江姣,杜慧竟,石继春,等.多重调理吞噬试验方法的重复性
和再现性研究[J].中国医药导报,2015,12(28):14-17.

[13] 黄洋,徐潇,李康,等.检测肺炎球菌疫苗功能性抗体的标准株
分子特征分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2021,35(5):
509-513.

[14] 杜慧竟,张全仓,李江姣,等.全自动移液工作站肺炎疫苗多
重调理吞噬实验中的应用[J].中国生物制品学杂志,2022,
35(2):194-199.

[15] Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility
[J]. Biometrics, 1989,45(1):255-268.