X群脑膜炎奈瑟氏菌杀菌抗体检测方法的建立及应用

赵 丹[#], 李 彬[#], 杨 越, 李茂光, 王珊珊, 徐颖华[*], 王 斌[*]

(中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 卫健委生物技术产业检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629)

摘要: 脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*, *Nm*) 特异性杀菌抗体检测方法血清体外杀菌试验 (serum bactericidal assay, SBA) 是世界卫生组织推荐的*Nm*抗体水平检测的金标准, 本文基于经典的*Nm*杀菌抗体检测方法, 优化加样体积、筛选补体、*Nm*靶菌液浓度和杀菌时间以及阳性参考血清浓度等试验因素, 建立了X群*Nm*杀菌抗体检测方法, 并对方法的特异性、重复性以及阳性参考血清稳定性进行验证。应用建立的方法对来自河南、江苏、安徽和山西省的508份5岁以下健康人群血清进行了杀菌抗体水平检测, 计算杀菌抗体几何平均滴度 (geometric mean titer, GMT), 并按照地区和年龄组别进行统计分析。结果显示, 95.7%的血清样本X群*Nm*杀菌抗体滴度低于8, GMT为2.20, 不同地区X群抗体滴度GMT差异无统计学意义 ($H = 6.688$, $P = 0.083$)。不同年龄组分析结果显示, 0～11月龄中X群*Nm*杀菌抗体滴度≥8比率为6.37%, 随着年龄的增长, 人群中杀菌抗体滴度≥8比率呈现下降趋势, 在2～5岁组人群中仅为0.49%, 不同年龄组X群杀菌抗体GMT差异无统计学意义 ($H = 4.756$, $P = 0.093$)。表明我国5岁以下健康人群血清X群*Nm*杀菌抗体滴度较低。本研究构建了特异性、稳定性、重复性良好的X群*Nm*杀菌抗体检测方法, 并以此方法获得不同地区5岁以下健康人群X群*Nm*杀菌抗体水平的背景资料, 为后续我国X群*Nm*的预防和控制提供科学指导。本试验所有血清均经河南省疾病预防控制中心伦理审查委员会 (批准号: 2019-YM-005-02)、江苏省疾病预防控制中心伦理审查委员会 (批准号: JSJK2020-A054-02) 及山西省疾病预防控制中心伦理审查委员会 (批准号: SXCDCIRBPJ2020050001) 批准。

关键词: 脑膜炎奈瑟氏菌; X群; 杀菌抗体; 参考血清; 家兔补体

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)07-2035-05

Establishment and application of the method for the detection of bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis* in Group X

ZHAO Dan[#], LI Bin[#], YANG Yue, LI Mao-guang, WANG Shan-shan, XU Ying-hua[*], WANG Bin[*]

(*State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NMPA Key Laboratory for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China*)

Abstract: The serum bactericidal assay (SBA), a gold standard recommended by the World Health Organization for detecting antibody levels against *Neisseria meningitidis* (*Nm*), was utilized in this study. Based on the classic *Nm* bactericidal antibody detection methodology, we optimized experimental parameters including sample volume, complement selection, *Nm* target bacterial concentration, bactericidal reaction time, and positive reference serum concentration to establish a serogroup X *Nm* bactericidal antibody detection protocol. The specificity, repeatability, and stability of the positive reference serum were systematically validated. The

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-06-12.

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC2308003).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13611039871, E-mail: binwang@nifdc.org.cn;

Tel: 13522715406, E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0339

established method was applied to analyze bactericidal antibody levels in 508 serum samples of healthy individuals under 5 years old from Hennan, Jiangsu, Anhui and Shanxi provinces. Geometric mean titers (GMT) were calculated and statistically analyzed by region and age group. Results demonstrated that 95.7% serum samples exhibited serogroup X *Nm* bactericidal antibody titers below 8, with an overall GMT of 2.20. No statistically significant regional differences in GMT were observed (H = 6.688, P = 0.083). Age-stratified analysis revealed that 6.37% of infants aged 0 − 11 months displayed antibody titers greater than or equal to 8. This proportion progressively declined with age, reaching 0.49% in the 2 − 5 years group. However, no significant inter-group differences in GMT were detected among age cohorts (H = 4.756, P = 0.093). The findings indicate that the serum bactericidal antibody titers against *Neisseria meningitidis* serogroup X (*Nm* X) are relatively low among healthy children under 5 years of age in China. This study has developed a reliable detection method for *Nm* X SBA with good specificity, stability, and reproducibility. Furthermore, it has provided the data on *Nm* X SBA levels among children under 5 years old from various regions, offering scientific guidance for the future prevention and control of serogroup X meningococcal disease in China. All the serum used in this experiment were approved by Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention Ethics Review Committee (approval number: 2019YM-005-02), Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention Ethics Review Committee (approval number: JSJK202-A054-02), and Shanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention Ethics Review Committee (approval number: SXCDCIRBP2020050001).

Key words: meningococcus; group X; bactericidal antibody; reference serum; rabbit complement

流行性脑脊髓膜炎 (流脑) 是由脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*, *Nm*) 或称脑膜炎球菌引起的急性化脓性中枢神经系统感染, 具有发病不确定性、起病急、进展快等特点, 全球范围内病死率超过 10%[1]。随着疫苗的广泛使用, 在不同国家和地区的流脑发病率大幅度下降[2]。但每年全世界仍有约 200 万流脑病例, 其中包括近 20 万死亡病例[3]。流行病学研究发现, 引起流脑流行的血清群也呈现由 A 和 C 群向 B、W、Y 和 X 群多元化变化趋势。在北美和欧洲, B 群 *Nm* 是婴儿中与流脑相关最常见的血清型[4]。在非洲, 2016～2017 年期间 A 群 *Nm* 感染仅占 2 897 例确诊流脑病例的 0.8%, 大多数流脑病例是由 C、W 和 X 群 *Nm* 引起[5]。值得特别注意的是由 X 群 *Nm* 引起流脑病例呈现逐渐增多趋势, 如在非洲脑膜炎加纳地区 2016 年分离 94 株 *Nm* 中仅有 1 例 X 群 *Nm* 菌株, 而在 2020 年 66 株 *Nm* 中就包含了 54 株 X 群菌株[6], 此外, 在哈萨克斯坦、波兰和土耳其等国家也出现 X 群流脑疫情[7]。为此, 国外企业开发了一种涵盖 A/C/W/Y/X 五价流脑多糖结合疫苗, III 临床试验结果证实具有良好的免疫原性和安全性[8]。在中国, X 群流脑病例报道较少, 偶尔有散发病例报道[9], 在健康人群中针对 X 群 *Nm* 的免疫保护抗体水平也不清楚。

血清杀菌抗体 (bactericidal antibody) 能够反映抗体的功能活性和疫苗的保护效果, 是流脑血清流行病学研究和疫苗保护效果评价的最重要指标之一[8,10]。为促进国内 X 群流脑疫苗研发, 本研究基于血清杀菌抗体实验建立了标准化的 X 群杀菌抗体检测体系, 并对跨省份采集的 508 份 5 岁以下健康儿童血清样本开展系统性检测分析。通过评估不同年龄组和不同地区人群抗体水平分布特征, 为疫苗研发提供了重要免疫学依据。

材料与方法

仪器和试剂 SPX-150 型 37 ℃培养箱 (中仪国科科技有限公司); HF151 型二氧化碳培养箱 (Heal Force 公司); DW-HL528G 型−80 ℃冰箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); MH-2 型微孔板振荡器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); TW20 型水浴锅 (德国 Julabo 公司); 氯化三苯四氮唑 (TTC) 琼脂培养基、无菌稀释液均来源于中国食品药品检定研究院 (简称中检院); 96 孔板 (货号 3799) 购自美国 Corning 公司。

菌株、参考血清与补体 X 群脑膜炎奈瑟氏菌 [菌株编号 CMCC (B) 29040]; A 群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清 (批号 210002-201902); C 群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清 (批号 210004-201902); Y 群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清 (批号 210005-201902); W135 群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清 (批号 210006-201902) 及 X 群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清 (批号 210009-201902) 均来源于中国医学细菌保藏管理中心; 补体及灭活补体均来源于中检院。

血清样本 508 份血清于 2020～2021 年采集自河南、江苏、安徽和山西省的 5 岁以下健康人群受试者。所有受试者经静脉采血 2 mL, 于采集当日分离血清, 置−20 ℃以下保存备用。所有血清样本均为中检院留样, 并经河南省疾病预防控制中心伦理审查委员会

(批准号: 2019-YM-005-02)、江苏省疾病预防控制中心伦理审查委员会 (批准号: JSJK2020-A054-02) 及山西省疾病预防控制中心伦理审查委员会 (批准号: SXCDCIRBPJ2020050001) 批准。

X群*Nm*靶菌液制备　取冻存的X群*Nm*划线接种于含5%羊血的哥伦比亚血琼脂平板上, 置于37 ℃、5%二氧化碳培养箱中恒温培养15～20 h, 使用无菌接种环挑取适宜单菌落以四区划线法转种至新鲜平板上进行二次传代培养4～6 h。取该靶菌用无菌稀释液稀释至适宜浓度, 备用, 应在30 min内完成后续操作。

X群*Nm*杀菌抗体检测方法　将血清样本于56 ℃恒温水浴箱内灭活30 min以去除内源补体活性。选择无自然杀菌活性的家兔血清作为补体, 以X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清作为阳性质控血清。在96孔板中预先加入25 μL无菌稀释液, 取25 μL血清样本加入首孔, 连续倍比稀释至最后一孔, 每孔终体积维持25 μL。每孔加入25 μL补体和25 μL X群*Nm*靶菌液, 于37 ℃恒温孵育25 min, 最后加入50 μL TTC琼脂培养基。将反应板置于37 ℃、5%二氧化碳培养箱中恒温孵育过夜。结果判定: 当血清样本孔内菌落数量为补体对照孔的一半以上时, 判为杀菌结果阴性; 孔内菌落数量少于补体对照孔一半时, 判为杀菌结果阳性。杀菌抗体的滴度以血清稀释度计算, 杀菌阳性的最大稀释度即为血清杀菌抗体滴度。

方法学验证

特异性　取96孔板, 于首行加入8倍稀释的X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清, 第2～7行分别加入稀释16倍的A群、C群、Y群和W135群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清, 按照上述优化条件进行检测。

批内精密度　将X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清稀释4、8和16倍, 同一实验人员每个稀释度重复检测6次。

批间精密度　取8和16倍稀释的X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清样本, 每个稀释度重复检测5次, 连续检测3天。

稳定性　将X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清稀释8和16倍后, 反复在−80 ℃冻融5次, 每个稀释度检测2次, 应用统计学软件SPSS 23中Kruskal-Wallis *H*检验评估阳性参考血清冻融前后的结果差异。

不同省份5岁以下健康人群中X群*Nm*杀菌抗体水平分析　应用X群*Nm*杀菌抗体检测方法对来自河南、江苏、安徽和山西省的508份5岁以下健康人群血清进行杀菌抗体水平检测。研究人群分为0～11月龄、12～23月龄及2～5岁3个年龄组别, 应用统计学软件SPSS 23中Kruskal-Wallis *H*检验评估不同地区和不同年龄组杀菌抗体几何平均滴度 (geometric mean titer, GMT), 以$P < 0.05$为差异有统计学意义。

结果

1　特异性

结果显示, 在所建立方法中仅X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清可呈现明显的杀菌反应, 而A群、C群、Y群和W135群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清对X群*Nm*均不杀菌, 杀菌抗体滴度均小于2, 表明所建立检测方法特异性良好。

2　精密度

2.1　批内精密度　同一实验人员将X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清稀释4、8和16倍, 杀菌抗体滴度分别为512、256和128, 表明检测方法的批内精密度良好。

2.2　批间精密度　将X群脑膜炎奈瑟氏菌参考血清稀释8和16倍后连续检测3天, 杀菌抗体滴度分别为256和128, 表明检测方法的批间精密度良好。

3　稳定性

结果显示, 8倍稀释的样本10次检测结果中血清杀菌抗体滴度仅有一次为128, 其余均为256, 而16倍稀释的样本血清杀菌抗体滴度均为128。应用统计学软件SPSS 23中Kruskal-Wallis *H*检验, 8和16倍稀释的样本杀菌抗体滴度均无显著性差异 ($H = 4.000$, $P = 0.406$和$H = 0$, $P = 1$), 表明阳性质控血清冻融稳定性良好。

4　不同省份5岁以下健康人群中X群*Nm*杀菌抗体水平分析

本研究对来自河南、江苏、安徽和山西省的508份5岁以下健康人群血清进行分析, 结果显示, 95.7%的样本X群*Nm*杀菌抗体滴度低于8, 仅4.3%样本≥8, 其中最高为64, 仅3例。全部样本X群杀菌抗体GMT为2.20, 应用统计学软件SPSS 23中Kruskal-Wallis *H*检验评估不同地区人群血清X群杀菌抗体GMT无统计学意义 ($H = 6.688$, $P = 0.083$, 表1)。

进一步按照年龄分析, 0～11月龄、12～23月龄和2～5岁3个年龄组杀菌抗体GMT为2.04～2.27, 应用统计学软件SPSS 23中Kruskal-Wallis *H*检验评估不同年龄组X群杀菌抗体GMT无统计学意义 ($H = 4.756$, $P = 0.093$, 表2)。进一步分析X群*Nm*杀菌抗体滴度≥8在0～11月龄、12～23月龄和2～5岁3个年龄组中比率分别为6.37%、3.92%和0.49% (图1)。

讨论

在脑膜炎球菌疫苗研发过程中, 无论是临床前研究还是临床试验阶段, 血清杀菌抗体测定法 (SBA) 均

Table 1 Analysis results of serogroup X *Nm* bactericidal antibodies in different regions in healthy individuals under 5 years old. GMT: Geometric mean titer; CI: Confidence interval

Group of regions	Number of people (case)	GMT	Lower limit of 95% CI	Upper limit of 95% CI	≥8 (case)
Henan	204	2.27	2.11	2.43	13
Shanxi	102	2.04	1.96	2.13	1
Jiangsu	101	2.31	2.06	2.60	6
Anhui	101	2.11	1.95	2.29	2
Total	508	2.20	2.11	2.29	22

Table 2 Analysis results of serogroup X *Nm* bactericidal antibodies in different age groups in healthy individuals under 5 years old

Group of age	Number of people (case)	GMT	Lower limit of 95% CI	Upper limit of 95% CI	≥8 (case)
0−11 month	204	2.27	2.11	2.43	13
12−23 month	202	2.21	2.06	2.37	8
2−5 year	102	2.04	1.96	2.13	1
Total	508	2.20	2.11	2.29	22

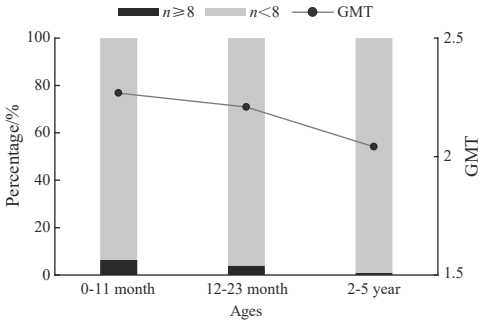


Figure 1 Analysis results of serogroup X *Nm* bactericidal antibodies in different age groups in healthy individuals under 5 years old. *n*: Bactericidal antibody titer

为评估疫苗有效性的核心方法[11]。由于不同实验室间操作流程及质控标准的差异, 建立标准化的SBA检测体系对于抗体评价的准确性和可比性至关重要。本研究基于多年进行A、C、W和Y群*Nm*杀菌抗体检测和评价工作积累, 通过优化各项试验条件和参数, 成功建立了X群流脑杀菌抗体检测方法。为后续大规模人群血清学调查及X群疫苗免疫原性评价奠定了技术基础。

应用该方法检测来自河南、江苏、安徽和山西省的508份5岁以下健康儿童血清样本, 结果表明我国不同地区X群杀菌抗体GMT较低, 且抗体GMT随年龄增长呈下降趋势。已有研究表明, 婴儿在6个月内抗体水平随年龄下降[12], 0～11月龄较高的抗体水平可能源于母传抗体的短暂保护, 而自然感染或疫苗接种诱导的主动免疫在非流行区长期缺位[13], 提示中国儿童缺乏X群*Nm*的自然暴露刺激, 导致1～5岁儿童成为免疫空白人群。结合近年来非洲X群*Nm*暴发的警示, 我国需警惕类似公共卫生威胁, 积极研制X群脑膜炎奈瑟氏菌相关疫苗以抵抗可能的感染。

作者贡献: 赵丹完成整体试验、数据分析和论文撰写; 李彬、杨越、王珊珊协助完成数据分析; 李茂光负责论文修改与指导; 徐颖华负责试验设计、论文修改和基金支持; 王斌为实验室负责人, 负责基金支持和论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

[1] Xu J, Yan DS, Xu L, et al. Global research advances in meningococcal polysaccharide conjugate vaccines [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2024, 44: 304-316.

[2] Linder KA, Malani PN. Meningococcal meningitis [J]. JAMA, 2019, 321: 1014.

[3] Global Burden of Disease Collaborative Network. Global burden of disease study 2019 (GBD 2019) results [EB/OL]. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019 (2020-01-20) [2021-06-07]. http://ghdx.healthdata.org/gbd-2019.

[4] Sadarangani M, Scheifele DW, Halperin SA, et al. Outcomes of invasive meningococcal disease in adults and children in Canada between 2002 and 2011: a prospective cohort study [J]. Clin Infect Dis, 2015, 60: e27-e35.

[5] Mustapha MM, Harrison LH. Vaccine prevention of meningococcal disease in Africa: major advances, remaining challenges [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14: 1107-1115.

[6] Azure S, Abdul-Karim A, Abubakari BB, et al. Trends in *Neisseria meningitides* serogroups amongst patients with suspected cerebrospinal meningitis in the meningitis belt of Ghana: a 5-year retrospective study [J]. BMC Infect Dis, 2023, 23: 202.

[7] Bai X, Borrow R, Bukovski S, et al. Prevention and control of meningococcal disease: updates from the Global Meningococcal Initiative in Eastern Europe [J]. J Infect, 2019, 79: 528-541.

[8] Haidara FC, Umesi A, Sow SO, et al. Meningococcal ACWYX conjugate vaccine in 2-to-29-year-olds in Mali and Gambia [J]. N Engl J Med, 2023, 388: 1942-1955.

[9] Hu YQ, Zhang LY, Li Y, et al. Pathogenic analysis of the first case of X group epidemic *Neisseria meningitid* is in Wenzhou

City [J]. Chin J Health Quarant, 2015, 25: 44-46.

[10] Wang S, Zhao D, Li B, et al. Age-specific prevalence of serum bactericidal antibody against meningococcal serogroup Y in China [J]. J Infect, 2024, 89: 106278.

[11] Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitides* serogroup A and C serum bactericidal assays [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4: 156-167.

[12] Findlow H, Tapia MD, Sow SO, et al. Kinetics of maternally-derived serogroup A, C, Y and W-specific meningococcal immunoglobulin G in Malian women and infants [J]. Vaccine, 2019, 37: 2477-2481.

[13] Borrow R, Alarcón P, Carlos J, et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection [J]. Expert Rev Vaccines, 2017, 16: 313-328.