

**CAT**  
**Critically Appraised Topic**

**Optimalisatie van de pneumokokken polysacharide antistoffen test**

Author: Toon Schiemsy  
Supervisor: prof. dr. Xavier Bossuyt  
Date: 15-03-2016

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

In de diagnostiek van humorale immunodeficiënties, en in het bijzonder bij het vermoeden van Specific Polysacharide Antibody Deficiency (SPAD), kan het nuttig zijn om de B-cel functie te testen. Dit kan door de T-cel onafhankelijke immuunrespons na blootstelling aan polysacharide antigenen te meten. Momenteel wordt hiervoor Pneumovax 23 gebruikt, dat 23 verschillende kapselpolysachariden bevat. In UZ Leuven wordt momenteel de respons (concentratie van specifieke antilichamen voor en na vaccinatie) op 3 van deze 23 toegediende polysachariden getest. Dit gebeurt voor de serotypes 8, 9N en 15B. In deze CAT werd geëvalueerd of type 15B voldoende discrimineert tussen patiënten met en zonder SPAD. Omdat dit type minder immunogeen lijkt, zal onderzocht worden of dit kan vervangen worden door een ander type. De 13 kapseltypes die aanwezig zijn in het geconjugeerde vaccin Prevenar 13, dat momenteel in het basisvaccinatieschema van Kind en Gezin opgenomen is, worden bij voorkeur niet in deze test opgenomen. Uit eerdere studies is immers gebleken dat dit de resultaten van een latere diagnostische vaccinatie met een pneumokokken polysacharide vaccin kan beïnvloeden. Een mogelijk type om te includeren in deze test is serotype 10A. Dit type bleek uit gegevens van een eerdere studie goed te discrimineren tussen patiënten met en zonder SPAD. De inzetbaarheid van dit type wordt in het praktisch luik onderzocht. Verder worden ook de algemeen aanvaarde interpretatiecriteria kritisch bekeken. Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de criteria immers zeer algemeen (serotype en leeftijdsafhankelijk) worden toegepast, hoewel hier duidelijk optimalisatie mogelijk lijkt te zijn.

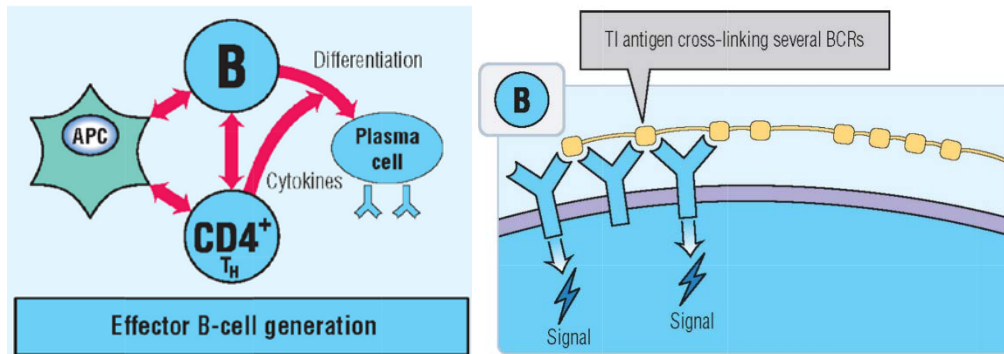
**CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

*Streptococcus pneumoniae* infecties zijn een belangrijke oorzaak van invasieve bacteriële infecties die zorgen voor morbiditeit en mortaliteit. Dit geldt vooral voor kinderen, ouderen en bij immunocompromitteerde patiënten.

Het kapsel van omkapselde pneumokokken bevat polysachariden. Dit zijn polymeren van zich herhalende units van 2 tot 5 sacharide delen. Er zijn verschillende samenstellingen van deze polymeren die de verschillende kapseltypes vormen. Specifieke antilichamen tegen deze kapseltypes zijn een belangrijk element in de bescherming van een individu tegen *S. pneumoniae* infecties.

De immuunrespons die opgewekt wordt wanneer een individu in contact komt met een polysacharide antigen is enigszins verschillend met bijvoorbeeld de respons op een proteïne antigen. Normaal gezien zal, wanneer een individu blootgesteld wordt aan een antigen, dit antigen tot in de lymfeklieren of de milt worden vervoerd door antigen presenterende cellen (APC) waarna het onder andere in contact komt met B-cellen en T-helper cellen. Door verschillende cel-cel interacties, zullen uiteindelijk effector lymfocyten gegenereerd worden. Dit zijn bijvoorbeeld plasmacellen die antistoffen produceren (Figuur 1)<sup>1</sup>. Hierdoor ontstaat immuniteit tegenover het antigen. Wanneer het immuunsysteem op deze manier reageert, spreekt men van een T-cel afhankelijke immuunrespons.



Figuur 1 Links: schematische weergave van de cel-cel interacties die leiden tot een antistof productie. Rechts: T-onafhankelijke immunerespons door een polysaccharide antigeen, zoals bijvoorbeeld aanwezig bij *Streptococcus pneumoniae*

Een gelijkaardig maar verkort proces vindt plaats wanneer het immuunsysteem in contact komt met bacteriële polysacchariden. Deze kunnen immers een T-onafhankelijke immunerespons kunnen doen ontstaan (Figuur 1). Hierbij zal het polysaccharide via receptor gemedieerde endocytose in de B-cel opgenomen worden en zullen antistoffen gemaakt worden. Er worden dus geen T-cellen ingezet bij deze immunerespons. Het voordeel van deze T-onafhankelijke immunerespons is dat de productie van antilichamen (en dus het bestrijden van de infectie) sneller kan gestart worden. Een nadeel is dat de T-cel afhankelijke processen, zoals affiniteitsmaturing (het ontwikkelen van antistoffen met hogere affiniteit tegenover het antigeen), niet zullen plaatsvinden.

Humorale immunodeficiënties zijn meestal primaire (genetisch bepaalde) immunodeficiënties waarbij de aanmaak van antilichamen gestoord is. Klinisch ziet men bij deze patiënten herhaalde ernstige (meestal respiratoire) infecties, veroorzaakt door omkapselde bacteriën (bijvoorbeeld *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). Bij herhaalde infecties kan, naast het acute risico van elke infectie, permanente schade aan de bronchi (bronchiectasieën) ontstaan.

Er zijn verschillende testen voor de diagnose van zulke primary immunodeficiency diseases (PID) beschikbaar: directe genetische analyse voor single-gene ziekten, flowcytometrie voor lymfocyt subpopulaties, kwantitatieve en kwalitatieve evaluatie van serum immunoglobulines. Deze testen geven in de meeste gevallen een diagnose.

Het evalueren van de kwaliteit van immunoglobulinen is in de context van PID zeer belangrijk maar complex. Patiënten met voldoende hoge serumconcentraties antilichamen (kwantitatief in orde) maar met onvoldoende werking tegen specifieke antigenen (kwalitatief probleem), zijn vatbaar voor infecties. In dit geval spreekt men van SPAD (Specific Polysaccharide Antibody Deficiency), dat wordt gedefinieerd als een gestoorde respons van specifieke antilichamen na vaccinatie met een niet-geconjugeerd pneumokokken polysaccharide vaccin in patiënten met normale concentratie IgG, IgA, IgM en IgG subklassen<sup>2</sup>. 5 tot 23% van de kinderen die onderzocht worden naar aanleiding van herhaalde infecties zou aan deze aandoening lijden<sup>3,4</sup>. Het opsporen van deze patiënten is belangrijk om het risico op het optreden van invasieve infecties te kunnen inschatten. Bovendien kan dit risico verminderd worden middels een immunoglobuline therapie<sup>5</sup>.

De test 'Pneumokokken polysaccharide antistoffen' wordt voornamelijk gebruikt in de diagnostiek van deze humorale immunodeficiënties. Bij deze test is het de bedoeling om de respons op een vaccinatie met polysaccharide antistoffen te beoordelen aan de hand van de concentratie van specifieke antilichamen. Dit gebeurt door het kwantificeren van anti-pneumokokken antilichamen in serum voor en 4-8 weken na vaccinatie<sup>5</sup>. Deze (diagnostische) vaccinatie gebeurt typisch met het pneumokokken polysaccharide vaccin (PPV) Pneumovax 23. Dit is een vaccin met niet-geconjugeerde kapselpolysacchariden van 23 *Streptococcus pneumoniae* stammen die samen verantwoordelijk zijn voor 90% van de pneumokokken infecties. De eindconcentratie van specifieke anti-pneumokokken antistoffen, de ratio na:voor vaccinatie (*fold increase*) en het (procentueel) aantal serotypes waarvoor een goede respons ontstaat, worden meestal beoordeeld ter interpretatie<sup>5</sup>.

Dit CAT-onderwerp is ontstaan uit het vermoeden dat één van de drie in UZ Leuven geteste specifieke antilichaam types (i.c. type 15B) van deze test minder goed zou discrimineren tussen patiënten met en zonder SPAD. Om dit te objectiveren, zal eerst een query worden uitgevoerd op het LIS (LWS) waarbij patiëntresultaten bekomen sinds de ingebruikname van type 15B geanalyseerd worden. Hierbij worden tegelijkertijd ook de andere twee types van deze test (8 en 9N) geëvalueerd. Indien nodig, zal gekeken worden welke andere types uit het 23-valent vaccin potentieel in aanmerking komen om opgenomen te worden in de test. Deze types kunnen vervolgens ook onderzocht worden op historische stalen. Tevens wordt kritisch gekeken naar de verschillende interpretatiecriteria die in de literatuur beschreven worden. Tenslotte zal gezocht worden naar eventuele andere vaccins die gebruikt kunnen worden om de humorale immuniteit op een gelijkaardige manier te evalueren.

## QUESTION(S)

---

- 1) **Wat zijn de mogelijke kapseltypes waar de vorming van antilichamen na vaccinatie met Pneumovax 23 kan gemeten worden?**
- 2) **Hoe worden gemeten concentraties van specifieke antilichamen tegen pneumokokkenkapseltypes geïnterpreteerd?**
- 3) **Zijn de pneumokokken antistof types die momenteel gebruikt worden (in het bijzonder type 15B) voldoende geschikt om een adequate of gedaalde immunrespons na vaccinatie te kunnen weergeven?**
- 4) **Zijn er andere pneumokokken polysaccharide types die in aanmerking komen om op te nemen in deze test?**
- 5) **Zijn er mogelijkheden om de pneumokokken polysaccharide antistof test te optimaliseren?**

## SEARCH TERMS

---

- 1) *Pubmed. Search terms:*
  - a. "specific antibody deficiency"
  - b. "specific polysaccharide antibody deficiency"
  - c. "SPAD"
  - d. "diagnostic vaccination"
  - e. "primary immunodeficiency"
  - f. "pneumococcal antibody ELISA"
  - g. "antibody response to pneumococcal polysaccharides"
  - h. "pneumococcal polysaccharide vaccine"
  - i. "humoral immunodeficiency"
  - j. "polysaccharide vaccine"
  - k. "streptococcus pneumoniae diagnostic vaccination"
- 2) *UpToDate Online version (2016)*

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

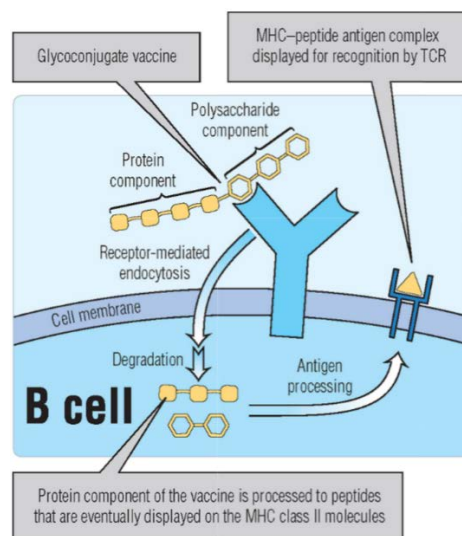
1. Nairn R, Helbert M. *Immunology for Medical Students*. 2nd ed. Mosby; 2007.
2. Ruuskanen O, Nurkka A, Helminen M, Viljanen MK, Käyhty H, Kainulainen L. Specific antibody deficiency in children with recurrent respiratory infections: A controlled study with follow-up. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(2):238-244. doi:10.1111/cei.12053.
3. Javier FC, Moore CM, Sorensen RU. Distribution of primary immunodeficiency diseases diagnosed in a pediatric tertiary hospital. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;84(1):25-30. doi:10.1016/S1081-1206(10)62736-6.
4. Jeurissen A, Moens L, Raes M, et al. Laboratory diagnosis of specific antibody deficiency to pneumococcal capsular polysaccharide antigens. *Clin Chem*. 2007;53(3):505-510. doi:10.1373/clinchem.2006.080051.
5. Orange JS, Ballou M, Stiehm ER, et al. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary

- immunodeficiency: A working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3 SUPPL.):S1-S24. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.002.
6. Algemeen schema van de aanbevolen vaccinaties.  
<http://www.kindengezin.be/img/oktober2015vaccinatieschema.pdf>. Published 2015. Accessed February 7, 2016.
  7. Schaballie H, Wuyts G, Dillaerts D, et al. Effect of previous vaccination with pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal polysaccharide vaccine antibody responses. *Clin Exp Immunol.* March 2016:1-25. doi:10.1111/cei.12784.
  8. Concepcion NF, Frasch CE. Pneumococcal Type 22F Polysaccharide Absorption Improves the Specificity of a Pneumococcal-Polysaccharide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2001;8(2):266-272. doi:10.1128/CDLI.8.2.266-272.2001.
  9. Epstein MM, Gruskay F. Selective deficiency in pneumococcal antibody response in children with recurrent infections. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1995;75(2):125-131.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648376>.
  10. Zora JA, Silk HJ, Tinkelman DG. Evaluation of postimmunization pneumococcal titers in children with recurrent infections and normal levels of immunoglobulin. *Ann Allergy.* 1993;70(4):283-288.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466092>.
  11. Ekdahl K, Braconier JH, Svanborg C. Impaired antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides and phosphorylcholine in adult patients with a history of bacteremic pneumococcal infection. *Clin Infect Dis.* 1997;25(3):654-660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314455>.
  12. Sanders LA, Rijkers GT, Kuis W, et al. Defective antipneumococcal polysaccharide antibody response in children with recurrent respiratory tract infections. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;91(1 Pt 1):110-119.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423268>.
  13. Bossuyt X, Borgers H, Moens L, Verbinnen B, Meyts I. Age- and serotype-dependent antibody response to pneumococcal polysaccharides. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(4):1079-1080.  
doi:10.1016/j.jaci.2010.12.1109.
  14. Balloch A, Licciardi P V, Russell FM, Mulholland EK, Tang MLK. Infants aged 12 months can mount adequate serotype-specific IgG responses to pneumococcal polysaccharide vaccine. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(2):395-397. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.008.
  15. Sorensen RU, Leiva LE, Javier FC, et al. Influence of age on the response to Streptococcus pneumoniae vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(2):215-221. doi:S009167499800270X [pii].
  16. Balmer P, North J, Baxter D, et al. Measurement and interpretation of pneumococcal IgG levels for clinical management. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(3):364-369. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02232.x.
  17. Roggelin L, Vinnemeier CD, Fischer-Herr J, et al. Serological response following re-vaccination with Salmonella typhi Vi-capsular polysaccharide vaccines in healthy adult travellers. *Vaccine.* 2015;33(33):4141-4145. doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.080.

**1) Wat zijn de mogelijke kapseltypes waar de vorming van antilichamen na vaccinatie met Pneumovax 23 kan gemeten worden?**

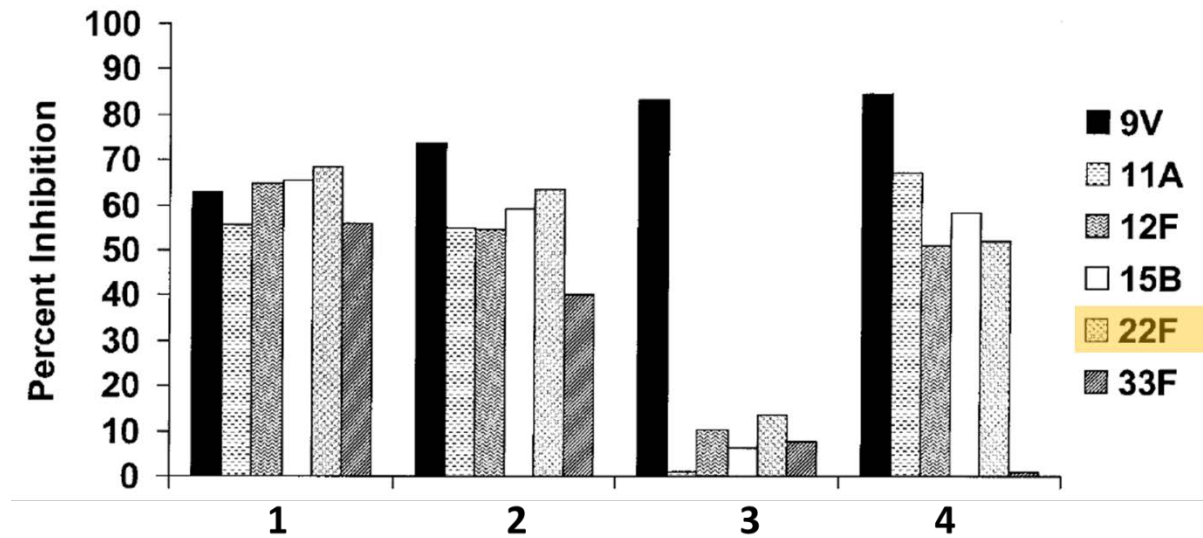
Bij het interpreteren van de pneumokokken polysaccharide antistoffen (antilichamen) test wordt gekeken naar de concentratie van specifieke antilichamen voor en na vaccinatie. Deze specifieke antilichamen kunnen in theorie elk van de 23 kapseltypes die in Pneumovax 23 vervat zitten, zijn. In de praktijk is dit echter niet zo, gezien sinds enkele jaren een geconjugerd pneumokokken vaccin (PCV) in het basis vaccinatieschema van Kind en Gezin opgenomen is<sup>6</sup>. Dit was eerst het 7-valente Prevenar 7 en momenteel het 13-valente Prevenar 13.

Geconjugeerde vaccins induceren een T-afhankelijke immuunrespons (Figuur 2). Het is nodig om geconjugeerde vaccins te maken om werkzaam te kunnen zijn bij kinderen die jonger zijn dan 18-24 maanden, omdat onder die leeftijd over het algemeen geen (goede) T-onafhankelijke immuunrespons opgewekt wordt. Wanneer kinderen echter gevaccineerd werden met een geconjugerd vaccin, kan dit de resultaten van latere (eventueel diagnostische) Pneumovax 23 vaccinatie beïnvloeden<sup>7</sup>. De types die vervat zitten in Prevenar 13 worden dus niet gebruikt om de aanmaak van antilichamen gericht tegen polysacchariden te evalueren.



Figuur 2: Geconjugeerde vaccins induceren een T-afhankelijke immuunrespons<sup>1</sup>

Uit studies blijkt dat in het serum dikwijls antilichamen aanwezig zijn die binden op de polysaccharide antigenen, maar niet specifiek zijn omdat ze gericht zijn tegen gemeenschappelijke epitopen en dus kruisresistentie vertonen<sup>8</sup>. De belangrijkste kruisreagerende stoffen kunnen verwijderd worden door het serum eerst te laten absorberen met het C-polysaccharide. Later bleek dat er nog andere kruisreagerende antilichamen aanwezig waren in belangrijke hoeveelheden (Figuur 3) en werd ook een absorptie met kapseltype 22F in de test geïnccludeerd. Hierdoor bleken de gemeten concentraties van de specifieke antilichamen tegen de verschillende kapseltypes 15 tot 84% te dalen<sup>4</sup>. Het belangrijkste voordeel is dat de bekomen resultaten specifiek zijn. Het nadeel van deze extra absorptie is dat kapseltype 22F niet meer kan worden opgenomen in de beoordeling van de immuunrespons.



**Figuur 3:** Vier niet-geïmmuniseerde volwassenen waarbij de inhibitie voor de gemeten concentratie van type 9V antilichamen werd onderzocht door absorptie met type 9V zelf en vijf andere heterologe antistoffen (kapseltype 11A, 12F, 15B, 22F en 33F). Bij patiënten 1,2 en 4 werd het signaal veroorzaakt door kruisreagerende antistoffen. Enkel patiënt 3 had type 9V-specifieke antistoffen<sup>8</sup>.

De specifieke antilichamen die theoretisch kunnen worden gebruikt om in de pneumokokken polysacharide antistof test, zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Overzicht van de kapseltypes met aanduiding welke mogelijk kunnen worden gebruikt voor de pneumokokken polysacharide antistof test. De Pneumovax 23-exclusieve kapseltypes werden in de linkse kolom opgelijst. De types die niet kunnen worden gebruikt, staan rechts.

| Mogelijk |                      | Niet mogelijk   |
|----------|----------------------|-----------------|
| 2        |                      | 1               |
| 8        | ← Momenteel gebruikt | 3               |
| 9N       | ← Momenteel gebruikt | 4               |
| 10A      |                      | 5               |
| 11A      |                      | 6A              |
| 12F      |                      | 6B              |
| 15B      | ← Momenteel gebruikt | 7F              |
| 17F      |                      | 9V              |
| 20       |                      | 14              |
| 33F      |                      | 18C             |
|          |                      | 19A             |
|          |                      | 19F             |
|          |                      | 22F             |
|          |                      | 23F             |
|          |                      | ← Absorptiestap |

## 2) Hoe worden gemeten concentraties van specifieke antilichamen tegen pneumokokkenkapseltypes geïnterpreteerd?

Er werd een literatuurstudie gedaan om in kaart te brengen hoe de resultaten van een specifieke antilichaambepaling voor en na vaccinatie met Pneumovax 23 gedaan kan worden.

In de literatuur worden zeer verschillende richtlijnen teruggevonden (samengevat in Tabel 2). De verschillende elementen waar naar gekeken wordt, zijn:

- 1) de absolute antilichaam concentratie voor een bepaald type. Over het algemeen wordt aangenomen dat een post-vaccinatie concentratie van minstens 1,3 mg/L protectief is, en een goede respons vertegenwoordigd.
- 2) De 'fold increase'. Dit wordt berekend door de post-vaccinatie concentratie te delen door de pre-vaccinatie concentratie. Hier werd soms 2 en soms 4 aangenomen als een goede respons.
- 3) Aantal serotypes met goede respons. Ook in controlepopulaties ziet men niet voor elk type een even goede concentratiestijging. Op basis van gegevens met controlepopulaties en patiënten met herhaalde infecties wordt een percentage (of aantal) vooropgesteld. Om een goede respons te vertonen, moet het individu tenminste voor dit percentage van de geteste kapseltypes een voldoende hoge post vaccinatie antistofconcentratie of een voldoende fold increase hebben. In de meeste studies wordt 70% voorgesteld voor volwassenen. Kinderen uit controlepopulaties hebben algemeen een minder uitgesproken immuunrespons en voor hen ligt het percentage van antilichamen met goede respons algemeen lager (meestal 50%).
- 4) Absolute stijging na vaccinatie. Minder frequent wordt de absolute antilichaam concentratie stijging gebruikt voor de interpretatie.

Tabel 2: Voorbeelden van enkele criteria die gebruikt worden om een goede respons aan te duiden

|                                           |                                                                            |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Post vaccinatie antistof concentratie     | > 1,3 mg/L <sup>3</sup>                                                    |
| Absolute stijging na vaccinatie           | > 0,3 mg/L <sup>9</sup>                                                    |
| Fold increase                             | 2 keer <sup>9</sup><br>4 keer <sup>3</sup>                                 |
| Aantal types die voldoen aan bovenstaande | >50% <sup>10</sup><br>>60% <sup>3</sup><br>>70% <sup>9</sup>               |
| Aantal types getest                       | 4 <sup>11</sup><br>7 <sup>12</sup><br>9 <sup>3</sup><br>12 <sup>9,10</sup> |

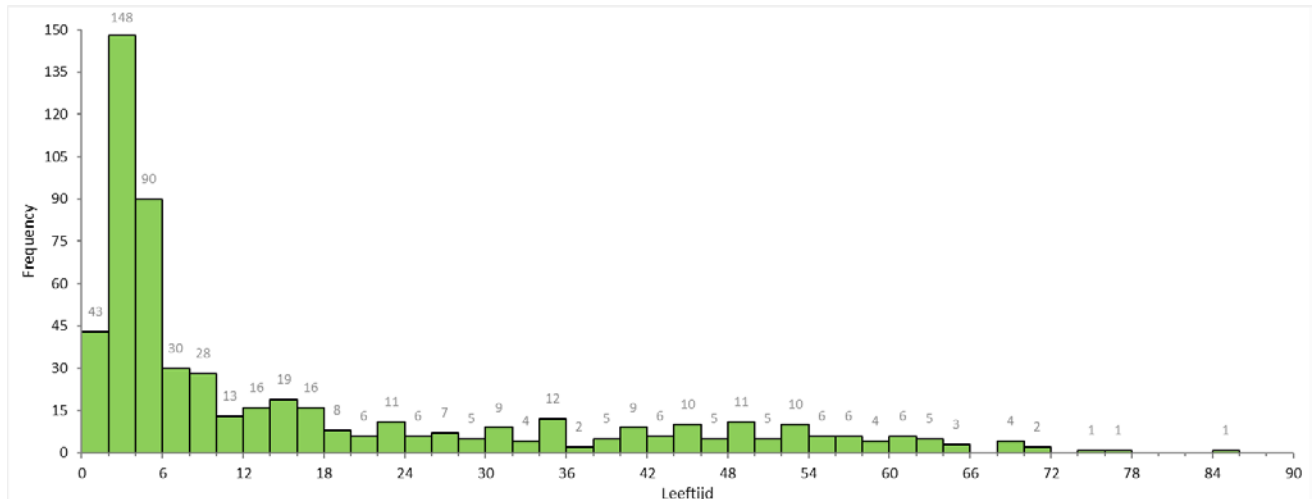
### Opmerkingen bij de aangehaalde gegevens zijn:

- Niet altijd wordt hetzelfde aantal types getest;
- Niet altijd worden dezelfde types getest;
- De populaties waarop de criteria betrekking hebben, zijn toegepast op verschillende leeftijdscategorieën;
- De vaccinatieachtergrond van populaties waarop de criteria betrekking hebben, wijzigt in de tijd (relatief recente inclusie van het geconjugerd pneumokokken vaccin in het basisvaccinatieschema);
- Er wordt niet altijd gewerkt met dezelfde assay: deze is enkele keren gewijzigd doorheen de jaren, vooral in verband met absorptie voor het verhogen van de specificiteit;
- Er wordt niet altijd gewerkt met hetzelfde platform. In praktijk zijn zowel een ELISA mogelijk als een multiplex zo als bijvoorbeeld die van Luminex (xMAP assay);
- Er is geen standaard voor handen voor al de verschillende kapseltypes.

Er zijn dus slechts zeer algemene en niet-gestandaardiseerde criteria beschikbaar. Bovendien wordt het aantal types dat kan worden getest steeds kleiner, aangezien meer kapseltypes worden opgenomen in het PCV. In wat volgt zal mede onderzocht worden of deze algemene criteria toepasbaar zijn of blijven.

**3) Zijn de pneumokokken antistof types die momenteel gebruikt worden (in het bijzonder type 15B) voldoende geschikt om een adequate of gedaalde immunrespons na vaccinatie te kunnen weergeven?**

Om deze vraag te beantwoorden, werd een query uitgevoerd in het LIS (LWS). Bij die query werden alle patiënten waar een voor en na antilichaam bepaling werd uitgevoerd voor types 8, 9N en 15B en waar met Pneumovax 23 werd gevaccineerd, weerhouden. In totaal werden 573 resultaten geïncludeerd. De leeftijdsverdeling van de patiënten is weergegeven in Figuur 4. Veruit de meeste analyses worden uitgevoerd bij kinderen tussen 2 en 6 jaar (42%). Ook bij kinderen jonger dan 2 jaar wordt deze analyse uitgevoerd (8% van alle analyses). De resultaten hiervan moeten voorzichtiger geïnterpreteerd worden gezien, de afwezigheid van een adequate T-independente immunrespons mogelijks nog fysiologisch is.



Figuur 4: Leeftijdsverdeling van alle stalen waar type 8, 9N en 15B bepaald werden, zowel voor als na een diagnostische vaccinatie met Pneumovax 23 (n=573).

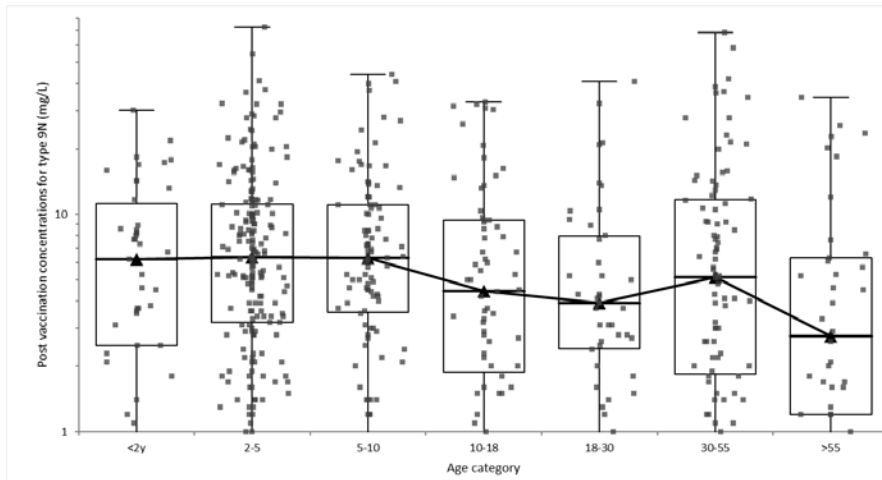
Op deze dataset werd eerst de verdeling van de concentratie (mg/L) post vaccinatie geanalyseerd (Tabel 3). Dit is immers een veel toegepast criterium voor de interpretatie. Zoals reeds vermeld, wordt in de literatuur een concentratie van >1.3 mg/L over het algemeen beschouwd als een goede respons. Deze analyse toont dat type 15B mediaan wat minder presteert, maar in het 5% percentiel gelijkaardig is met de andere types.

Tabel 3: verdeling van de concentratie post-vaccinatie voor de verschillende types (n=573)

| Percentiel | Concentratie post vaccinatie |         |          |
|------------|------------------------------|---------|----------|
|            | Type 8                       | Type 9N | Type 15B |
| 0,010      | 0.4                          | 0.5     | 0.7      |
| 0,025      | 0.6                          | 0.7     | 0.8      |
| 0,050      | 0.9                          | 0.8     | 1.1      |
| 0,250      | 2.9                          | 2.5     | 1.9      |
| 0,500      | 5.2                          | 5.3     | 3.4      |
| 0,750      | 9.1                          | 10.7    | 8.1      |
| 0,950      | 21.3                         | 29.7    | 26.4     |
| 0,975      | 25.0                         | 36.6    | 35.2     |
| 0,990      | 36.2                         | 42.1    | 50.4     |

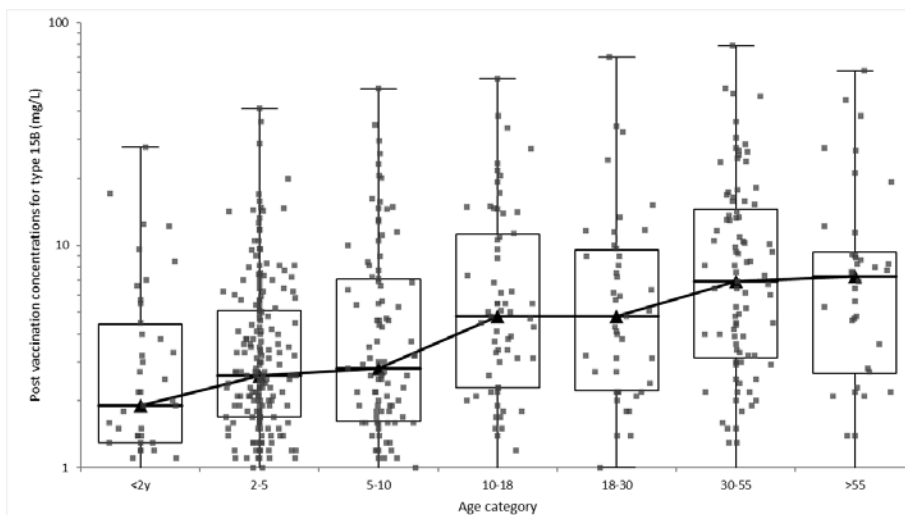
Deze data werden ook uitgezet per leeftijdscategorie. Voor type 8 en 9N, toonde dit geen zeer grote verschillen tussen de leeftijdsgroepen. De gegevens voor type 9N zijn weergegeven in Figuur 5.





Figuur 5: Mediaan (driehoek) kwartiel 1 en 3 en spreiding van de post-vaccinatie concentraties voor type 9N per leeftijdsgroep.

Voor type 15B zien we dat de jongere individuen duidelijk lagere gemiddelde en mediane post vaccinatie concentraties vertonen. Naarmate de leeftijd stijgt, komt dit wel in de buurt van type 8 en 9N.



Figuur 6: Mediaan (driehoek), gemiddelde (vierkant) en spreiding van de post-vaccinatie concentraties voor type 15B per leeftijdsgroep.

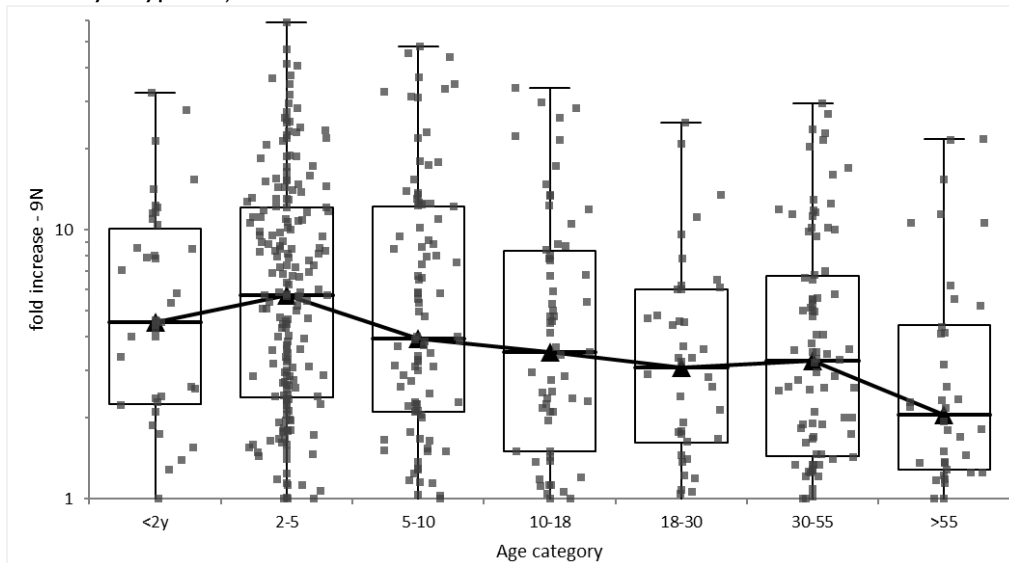
De bovenstaande gegevens suggereren dat, vooral bij jongere leeftijd, type 15B over het algemeen een lagere post-vaccinatie concentratie induceert.

Als tweede aspect werd gekeken naar de verdeling van de fold increase in de geselecteerde populatie (Tabel 4). Deze fold increase werd berekend door de antilichaam concentratie voor het type na vaccinatie te delen door dat van voor de vaccinatie.

Tabel 4: Percentielen voor de fold increase voor de drie types die momenteel getest worden (n=573)

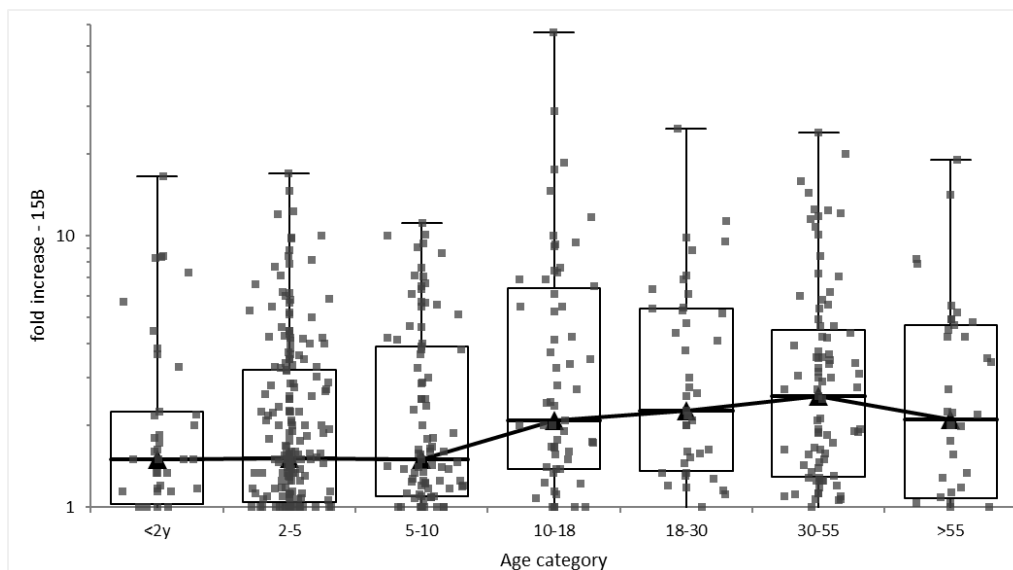
| Percentiel   | Fold increase (alle stalen) |            |            |
|--------------|-----------------------------|------------|------------|
|              | Type 8                      | Type 9N    | Type 15B   |
| <b>0,010</b> | 0,8                         | 0,8        | 0,6        |
| <b>0,025</b> | 0,9                         | 0,9        | 0,7        |
| <b>0,050</b> | 1,0                         | 1,0        | 0,8        |
| <b>0,250</b> | 2,7                         | 1,8        | 1,1        |
| <b>0,500</b> | <b>6,8</b>                  | <b>4,0</b> | <b>1,8</b> |
| <b>0,750</b> | 12,6                        | 9,9        | 4,0        |
| <b>0,950</b> | 30,6                        | 26,0       | 10,0       |
| <b>0,975</b> | 36,4                        | 33,0       | 14,2       |
| <b>0,990</b> | 47,2                        | 41,5       | 19,0       |

Deze data suggereren dat type 15B minder goed stijgt dan type 8 en 9N. Deze analyse werd verder uitgebreid en de verdeling van de fold increase per leeftijdscategorie werd geanalyseerd. Ook hier vertoonden type 8 en 9N een gelijkaardig beeld. Voor deze twee types lijkt de fold increase af te nemen met toenemende leeftijd (zie Figuur 7 voor analyse type 9N).



Figuur 7: Verdeling van de fold increase voor type 9N in de verschillende leeftijdscategorieën

De fold increase van type 15B toont een tegenovergestelde beweging (Figuur 8). Met toenemende leeftijd lijkt de fold increase hoger te worden, maar over het algemeen is de fold increase veel lager dan bij type 8 en 9N. Voor de leeftijdsgroep 2-5 jaar is de mediane fold increase in deze populatie 1,5. Bij de groep >55 jaar is dit 2,1.



Figuur 8: Verdeling van de fold increase voor type 15B in de verschillende leeftijdscategorieën

Om na te gaan wat de invloed is van 15B op (arbitaire) interpretatiecriteria, werden de stalen opgelijst waarvoor respectievelijk een post vaccinatie concentratie van minder dan 1.3 mg/L of een fold increase van minder dan 2 gezien werd voor exact één van de drie geteste types. Vervolgens werd gekeken welk type verantwoordelijk was voor deze ondermaatse respons (Tabel 5, Tabel 6).

Tabel 5: Selectie van patiënten waarbij slechts 1 type een fold increase van minder dan 2 had (n=217)

| Type | Alle (n=217) | <2 (n=22) | 2-5 (n=88) | 5-10 (n=38) | 10-18 (n=18) | 18-30 (n=14) | 30-55 (n=29) | >55 (n=8) |
|------|--------------|-----------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| 8    | 13 (6%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)     | 1 (3%)      | 2 (11%)      | 3 (21%)      | 5 (17%)      | 2 (25%)   |
| 9N   | 29 (13%)     | 1 (5%)    | 5 (6%)     | 3 (8%)      | 3 (17%)      | 5 (36%)      | 8 (28%)      | 4 (50%)   |
| 15B  | 175 (81%)    | 21 (95%)  | 83 (94%)   | 34 (89%)    | 13 (72%)     | 6 (43%)      | 16 (55%)     | 2 (25%)   |

Tabel 6: Selectie van patiënten waarbij slechts 1 type een post vaccinatie concentratie had van minder dan 1.3 mg/L (n=91).

| Type       | Alle<br>(n=91) | <2<br>(n=11) | 2-5<br>(n=34) | 5-10<br>(n=12) | 10-18<br>(n=7) | 18-30<br>(n=3) | 30-55<br>(n=16) | >55<br>(n=8) |
|------------|----------------|--------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| <b>8</b>   | 20 (22%)       | 1 (9%)       | 3 (9%)        | 2 (17%)        | 1 (14%)        | 1 (33%)        | 8 (50%)         | 4 (50%)      |
| <b>9N</b>  | 26 (29%)       | 1 (9%)       | 5 (15%)       | 2 (17%)        | 5 (71%)        | 2 (67%)        | 7 (44%)         | 4 (50%)      |
| <b>15B</b> | 45 (49%)       | 9 (82%)      | 26 (76%)      | 8 (67%)        | 1 (14%)        | 0 (0%)         | 1 (6%)          | 0 (0%)       |

Bij kinderen tot 10 jaar blijkt uit deze steekproef dat type 15B duidelijk minder stijgt post vaccinatie. Dit is zowel bij de fold increase als de absolute post vaccinatie concentratie. Deze groep is de groep waarbij deze test het meest frequent wordt aangevraagd (59% van de stalen is in de leeftijdsgroep < 10 jaar).

In de meeste criteria wordt het voorkomen van een fold increase van minder dan 2 of een post vaccinatie concentratie van minder dan 1,3 mg/L bij 1 van 3 geteste types (70% bij volwassenen, 50% bij kinderen) nog als normaal beschouwd.

In deze data is het echter overwegend type 15B dat voor deze “onvoldoende respons” zorgt. Dit suggereert dat type 15B niet goed discrimineert tussen patiënten met en zonder een gestoorde aanmaak van antilichamen na vaccinatie met het pneumokokken polysaccharidevaccin Pneumovax 23.

Beperkingen van deze analyse vloeien voort uit het feit dat er retrospectief op resultaten uit een query werd gekeken. Een interpretatie in samenhang met de klinische context en andere onderzoeken is nodig om een onderscheid te kunnen maken tussen de patiënten met en zonder humorale immuundeficiëntie. Er is echter geen gouden standaard waar de resultaten van deze test mee kunnen vergeleken worden.

**4) Zijn er andere pneumokokken polysacharide types die in aanmerking komen om op te nemen in deze test?**

Uit voorgaande bleek dat type 15B waarschijnlijk minder goed discrimineert tussen patiënten met en zonder humorale immunodeficiënties.

In dit tweede luik wordt gezocht naar mogelijke alternatieven voor type 15B.

In deel I werd reeds een overzicht gegeven van de types die theoretisch in aanmerking komen om te worden opgenomen. Bovendien bleek in deel 3 dat de respons op een specifiek polysacharide antigeen sterk leeftijdsafhankelijk kan zijn. Het is dus belangrijk te zoeken naar een type dat een goede immunorespons opwekt bij een controlepopulatie.

In het verleden werd in het Staten Serum Institute (SSI) in Denemarken reeds een preliminaire studie uitgevoerd met serumstalen uit UZ Leuven. In deze studie werd de pre- en post vaccinatie concentratie van antistoffen gericht tegen 8 verschillende pneumokokken kapseltypen bepaald bij 230 kinderen. In deze studie werd gewerkt met een Luminex gebaseerde assay. Met gegevens uit de medische dossiers werd, aan de hand van American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) criteria voor SPAD, een onderscheid gemaakt tussen patiënten met en zonder SPAD. Op die manier kan de performantie bij SPAD diagnose van de individuele types beoordeeld worden. Uit de gegevens van die studie blijkt dat de types 10A, 17F, 20 en 33F een groot discriminerend vermogen zouden kunnen hebben.

Als eerste evaluatie van de bruikbaarheid werd type 10A bepaald op 14 historische stalen van patiënten die een goede respons vertoonden voor minstens type 8 en 9N (>1,3 mg/L na vaccinatie én minstens een *fold increase* van 2). Deze stalen werden bewaard op -20°C tot de dag van analyse.

Deze analyse gebeurde aan de hand van een ELISA. Het werkingsprincipe van de test wordt hieronder kort beschreven:

- Dag 1: Coaten van platen
  - o Pneumokokken polysacharide wordt in wells van een CovaLink plaat gebracht
  - o Incubatie op overnacht 37°C
- Dag 2
  - o Blokken van de platen
    - PBS + Goat serum in elke well
    - 1 uur incubatie op 37°C
    - Wassen van de platen
  - o Op de Janus wordt voor maximaal 7 stalen, 1 QC en 1 standaard in duplo een 1/200 tot 1/6400 verdund staal toegevoegd aan de wells. Het verdunnen gebeurt met een absorptieoplossing met het C-polysacharide en type 22F.
  - o Op de BEPIII zal daarna een conjugaat toegevoegd worden en vindt ook de aflezing plaats

De resultaten van deze eerste screening waren echter niet volgens de verwachtingen (Tabel 7). Uit de geselecteerde stalen bleek over het algemeen geen duidelijk betere respons te zijn voor type 10A dan voor 15B.

Tabel 7: ruwe data van 10A (weergegeven als optische dichtheid – OD), met daarnaast de historisch bepaalde waarden voor 8, 9N en 15B (weergegeven in mg/L)

|         | 10A Voor (OD) | 10A Na (OD) | 8 Voor | 8 Na | 9N Voor | 9N Na | 15B Voor | 15B Na | Fold 10 | Fold 8 | Fold 9N | Fold 15B |
|---------|---------------|-------------|--------|------|---------|-------|----------|--------|---------|--------|---------|----------|
|         | 1,4           | 1,1         | 0,7    | 4,2  | 1,3     | 8,7   | 1,2      | 2,9    | 0,8     | 6,0    | 6,7     | 2,4      |
|         | 1,2           | 1,6         | 0,5    | 6,6  | 1,0     | 20,0  | 2,4      | 2,5    | 1,4     | 13,2   | 20,0    | 1,0      |
|         | 1,1           | 1,5         | 0,6    | 9,8  | 4,8     | 32,4  | 1,3      | 1,5    | 1,3     | 16,3   | 6,8     | 1,2      |
|         | 1,8           | 2,7         | 0,6    | 4,8  | 1,0     | 2,3   | 1,1      | 1,1    | 1,5     | 8,0    | 2,3     | 1,0      |
|         | 0,9           | 0,9         | 0,4    | 1,8  | 0,7     | 1,4   | 1,3      | 1,2    | 1,0     | 4,5    | 2,0     | 0,9      |
|         | 1,3           | 3,6         | 0,4    | 4,8  | 0,5     | 4,2   | 1,9      | 1,3    | 2,7     | 12,0   | 8,4     | 0,7      |
|         | 1,2           | 1,4         | 0,4    | 3,7  | 0,7     | 3,8   | 1,5      | 1,2    | 1,2     | 9,3    | 5,4     | 0,8      |
|         | 1,0           | 3,6         | 0,3    | 5,2  | 0,7     | 3,2   | 0,9      | 1,3    | 3,6     | 17,3   | 4,6     | 1,4      |
|         | 1,0           | 1,6         | 0,3    | 7,9  | 0,3     | 11,4  | 0,6      | 1,0    | 1,6     | 26,3   | 38,0    | 1,7      |
|         | 1,6           | 2,4         | 0,8    | 2,0  | 1,5     | 3,5   | 1,8      | 2,6    | 1,4     | 2,5    | 2,3     | 1,4      |
|         | 0,9           | 2,0         | 0,6    | 6,0  | 1,1     | 3,6   | 1,6      | 2,4    | 2,1     | 10,0   | 3,3     | 1,5      |
|         | 1,3           | 3,4         | 0,6    | 10,0 | 2,2     | 10,0  | 5,4      | 5,3    | 2,6     | 16,7   | 4,5     | 1,0      |
|         | 0,8           | 1,1         | 0,8    | 22,2 | 3,7     | 8,6   | 1,8      | 1,8    | 1,4     | 27,8   | 2,3     | 1,0      |
|         | 3,4           | 3,4         | 0,7    | 6,5  | 1,7     | 3,7   | 4,5      | 3,3    | 1,0     | 9,3    | 2,2     | 0,7      |
| Median: | 1,2           | 1,8         | 0,6    | 5,6  | 1,1     | 4,0   | 1,6      | 1,7    | 1,4     | 11,0   | 4,6     | 1,0      |

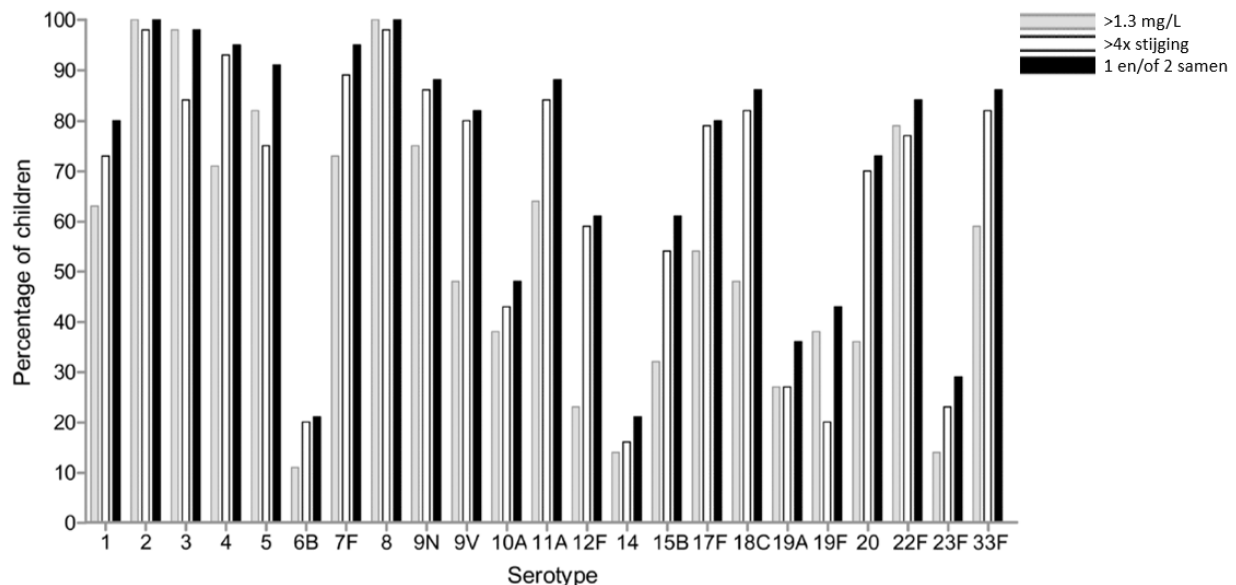
Om dit verder te onderzoeken, werden stalen die in het SSI werden uitgevoerd, opnieuw geanalyseerd. Hieruit bleek echter dat er goede correlatie was voor 10A tussen de resultaten bekomen in het SSI en deze in UZLeuven. Een mogelijke oorzaak zou kunnen zijn dat type 10A niet goed op de Covalink plaat kan gecoat worden. Om dit uit te testen, wordt een extra experiment met een Multisorb plaat uitgevoerd.

#### **Evaluatie van type 17F, 20 en 33F**

Andere mogelijke opties zijn bijvoorbeeld 17F, 20 en 33F. Deze zijn echter niet aanwezig op laboratoriumgeneeskunde en moeten eerst nog aangekocht worden indien nodig (als type 10A niet werkbaar zou zijn).

## 5) Zijn er mogelijkheden om de pneumokokken polysaccharide antistof test te optimaliseren?

Zo als uit de analyse van de data van types 8, 9N en 15B blijkt, kan de respons tussen types sterk verschillen en bovendien leeftijdsafhankelijk zijn. Ook in de literatuur wordt het verschil in immunogeniciteit tussen de verschillende leeftijdsgroepen en serotypes vermeld<sup>2,4,13-16</sup> (Figuur 9). Deze observaties stellen het gebruik van algemene interpretatiecriteria in vraag en bemoeilijkt het gebruik van criteria om een goede van een deficiënte respons te onderscheiden<sup>2</sup>.



Figuur 9: Percentage kinderen (n=56 gezonde kinderen) met een adequate respons op PPV (23 valent), twee weken na vaccinatie. Een adequate respons werd gedefinieerd als >1,3 mg/L en/of een stijging van minstens 4 keer tegenover de concentratie voor vaccinatie<sup>14</sup>.

Een mogelijke oplossing zou kunnen zijn om, per type, referentiewaarden op te stellen die gebaseerd zijn op normale antilichaamrespons post-vaccinatie. Dit moet echter gepaard gaan met de selectie van voldoende immunogene types, en er moet onderzocht worden of de referentiewaarden voor verschillende leeftijdsgroepen van toepassing zijn.

Indien het moeilijk mocht blijken om een goede vervanger te vinden voor type 15B, kan onderzocht worden of type 8 en 9N voldoende kunnen discrimineren tussen de patiënten met en zonder een stoornis in de humorale immuniteit.

In het kader van bovenstaande opmerkingen, zal nog een studie worden uitgevoerd waarbij aan de hand van het medisch dossier volgende gegevens zullen opgezocht worden:

- het aantal bovenste en onderste luchtweginfecties
- de aard van de infecties (bacterieel of viraal)
- de geïsoleerde kiemen
- de aanwezigheid van bronchiëctasieën
- de behandeling (bv. immuunglobuline substitutie)
- de aanwezigheid van andere aandoeningen (bv. auto-immuunziekte).

Daarnaast zullen volgende laboratoriumparameters bekeken worden:

- immuunglobuline dosages
- IgG subklasse dosages
- immuunfenotyperingen (aantal B-, T- en NK-cellen en bijhorende subsets)

Het doel is om zo patiënten met of zonder SPAD duidelijker van elkaar te onderscheiden om er vervolgens de respons op een PPV aan te toetsen.

6) Zijn er andere mogelijkheden om een functionele evaluatie van de humorale immuniteit uit te voeren?

In principe kan een functionele evaluatie van de humorale immuniteit ook gebeuren aan de hand van andere vaccins die een T-cel onafhankelijke immuunrespons opwekken. De literatuur hierover is echter zeer schaars. Mogelijkheden die momenteel worden onderzocht zijn bijvoorbeeld diagnostische vaccinatie met Typherix (Polysaccharide Vi van *Salmonella typhi* (stam Ty2))<sup>5</sup>.

Roggelin et al. onderzochten bijvoorbeeld de serologische respons van Typherix bij gezonde volwassenen<sup>17</sup>. In de onderzochte populatie lijkt vaccinatie met dit polysaccharide vaccin een goede respons op te wekken (Figuur 10). Dit vaccin zou in de toekomst eventueel dus ook gebruikt kunnen worden bij de evaluatie van de humorale immunofunctie. Verdere studies moeten aantonen of deze bevindingen ook geldig zijn voor verschillende leeftijdsgroepen, en of deze antistofconcentraties voldoende kunnen discrimineren tussen patiënten met een gestoorde of normale humorale immunofunctie.

Pre- and post-vaccination antibody response to *S. typhi* Vi-capsular polysaccharide vaccination stratified by number of previous Vi-capsular vaccinations.

| Number of previously administered vaccines | n  | Day 0             |               | Day 28             |               | P-value (day 0/day 28) | Mean fold-concentration increase (day 28/day 0) |
|--------------------------------------------|----|-------------------|---------------|--------------------|---------------|------------------------|-------------------------------------------------|
|                                            |    | GMC (µg/ml)       | % > 4.3 µg/ml | GMC (µg/ml)        | % > 4.3 µg/ml |                        |                                                 |
| 0 (Primary vaccination group)              | 40 | 3.40 (2.52–4.28)  | 25 (10/40)    | 11.34 (7.20–15.49) | 70 (28/40)    | <b>&lt;0.001</b>       | 3.85 (2.38–5.33)                                |
| 1 (Multiple vaccinations group)            | 36 | 5.97 (4.06–7.87)  | 44 (16/36)    | 16.10 (8.56–23.63) | 78 (28/36)    | <b>0.003</b>           | 2.93 (2.14–3.71)                                |
| P-value*                                   |    | 0.12              |               | 0.254              |               |                        | 0.280                                           |
| ≥2 (Multiple vaccinations group)           | 9  | 6.77 (3.00–10.55) | 67 (6/9)      | 8.49 (3.79–13.19)  | 78 (7/9)      | 0.075                  | 1.30 (0.96–1.65)                                |
| P-value*                                   |    | <b>0.007</b>      |               | 0.525              |               |                        | 0.106                                           |

GMC = geometric mean Vi antibody concentration, (95% CI).

\* Compared with primary vaccinations group.

Figuur 10: pre- en post vaccinatie antilichaam respons op *Salmonella typhi* Vi kapseltype vaccinatie

## To do/ACTIONS

---

- 1) Verder onderzoek naar de inzetbaarheid van type 10A, 17F, 20 en 33F
- 2) Indien een derde type niet gevonden zou worden: kan met twee types dezelfde performantie bekomen worden?
- 3) Onderzoek in de medische dossiers van de patiënten die uit deze query geselecteerd werden met als doel patiënten met SPAD om de respons van pneumokokken polysacharide antistoffen aan te toetsen