

2020年国产口服轮状病毒活疫苗质量一致性研究

刘艳^{1#}, 石岩^{2#}, 高加梅¹, 于晴川¹, 张永¹, 王成宝², 胡忠玉¹, 梁争论^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 兰州生物制品研究有限责任公司, 兰州 730046)

摘要 目的: 评价口服轮状病毒疫苗 (Oral Rotavirus Vaccine, ORV) 的质量一致性, 提升该疫苗的安全性和有效性, 保证婴幼儿用药安全。方法: 对2020年国产ORV的关键控制指标 (病毒滴度) 的检验结果进行趋势分析, 并与其前一年结果进行比较; 将中国食品药品检定研究院 (简称中检院) 检测结果与企业结果进行比较。结果: 2020年度该疫苗病毒滴度趋势分析结果显示未见超趋势 (Out of Trend, OOT)。2020年度和2019年度比较结果显示企业年度间具有较好的一致性。中检院与企业病毒滴度检测结果比较差异均无统计学意义 ($P=0.3263$, $P>0.05$); Bland-Altman法统计显示, 97.7%批次的检测结果在不同浓度范围内的差值位于2倍标准差 (2SD) 以内。结论: 2020年国产口服轮状病毒活疫苗质量稳定、可控, 具有良好的一致性。今后应加强趋势分析中对OOT结果的调查、反馈, 加强年度间比较分析, 以及中检院与企业不同实验室间的比对研究。

关键词: 轮状病毒; 疫苗; 质量一致性; 病毒滴度; 趋势分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)11-1220-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.11.003

Quality Consistency of Domestic Oral Rotavirus Vaccine in 2020

Liu Yan^{1#}, Shi Yan^{2#}, Gao Jiamei¹, Yu Qingchuan¹, Zhang Yong¹, Wang Chengbao², Hu Zhongyu¹, Liang Zhenglun^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Lanzhou Institute of Biological Products Co, LTD, Lanzhou 730046, China)

Abstract Objective: To evaluate the quality consistency of Oral Rotavirus Vaccine (ORV), improve the safety and efficacy of the vaccine, and ensure the safety of infants. **Methods:** The test results of the key parameter index (virus titer) of Domestic ORV in 2020 were evaluated by trend analysis and compared with the results of the previous year. The test results of National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) were compared with those of enterprises. **Results:** Trend analysis of virus titers in 2020 shows that no out of trend (OOT) results was observed. The comparison between 2019 and 2020 shows that there was a good consistency in manufacturing process. There was no statistically significant difference between the test results of virus titer detection in NIFDC and the enterprise ($P=0.3263$, $P>0.05$). According to Bland-Altman method, the difference between the test results of 97.7% batches in different concentration ranges was within 2 times of standard deviation (2SD). **Conclusion:** The quality of domestic ORV vaccine in the market of China in 2020 was stable, controllable and has good consistency. In the future, the investigation and feedback of OOT results in trend analysis the comparative analysis between years and the comparative study between different laboratories in NIFDC and enterprises should

作者简介: 刘艳, 硕士; 研究方向: 肠道病毒疫苗; Tel: (010) 53851670; E-mail: 94670465@qq.com

并列第一作者: 石岩, 学士; 研究方向: 轮状病毒疫苗; Tel: (0931) 8316657; E-mail: 1390762444@qq.com

通信作者: 梁争论, 博士; 研究方向: 肝炎和肠道病毒疫苗; E-mail: lzhenlun@126.com

be strengthened.

Keywords: Rotavirus; vaccine; quality consistency; virus titer; trend analysis

轮状病毒(Rotavirus, RV)是全球婴幼儿急性胃肠炎的主要原因,可以引起全球范围内的感染,且不受营养、卫生和经济条件的影响,各个国家的发病率没有显著性差异。在全球引入疫苗之前的几年中,RV每年导致44万人死亡,同时也带来巨大的经济负担^[1-4]。

目前,RV感染所致急性胃肠炎没有特异性抗病毒治疗药物,临床上以补液为主,疫苗是控制疾病唯一有效且经济的手段^[5]。因此,轮状病毒疫苗成为世界卫生组织(World Health Organization, WHO)疫苗发展计划中的首要任务之一。

我国兰州生物制品研究所有限责任公司(以下简称兰州所)采用G10型羊轮状病毒减毒株(LLR株)研制的口服轮状病毒活疫苗(Oral Rotavirus Vaccine, ORV)(商品名:罗特威)于2001年上市。罗特威的有效成分为兰州羊轮状病毒疫苗株。该疫苗经大量临床试验和15年的临床应用,未发现与肠套叠等严重副反应有关联,其保护效果稳定,证实该口服单价苗安全有效^[6]。疫苗上市后,企业能否规模化生产质量稳定的疫苗是保障疫苗安全、有效的关键。

趋势分析是监测和评价疫苗生产、质控一致性的重要手段,可预估、发现可能存在的潜在质量风险并及时予以纠正或干预,前置风险,更有效地保证上市疫苗安全有效^[7-8]。为此,WHO发布的《Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities》^[9](简称批签发指导原则)和我国新颁布的《生物制品批签发管理办法》中均对上市疫苗的趋势分析提出相关要求^[10]。轮状病毒疫苗作为近期上市应用于婴幼儿的预防性减毒活疫苗,病毒滴度是对疫苗接种后是否有效发挥作用的关键技术参数,也是评价质量一致性的核心指标。本文对2020年企业送检的疫苗病毒滴度进行趋势分析,并进行年度间以及实验室间比较分析,完成该疫苗质量一致性的分析评估。

1 材料与方法

1.1 样品

2020年共检测该疫苗111批,约600多万人份。

1.2 主要仪器及试剂

多功能酶标仪Eno(BioTek公司);GrahPad Prism 5软件;胎牛血清(FBS, Gibco公司)、活化用胰蛋白酶和RPMI 1640培养基(Gibco公司);细胞培养液:含FBS的RPMI1640培养液;细胞维持液:含有活化胰酶的RPMI1640;RV抗原检测试剂盒(兰州所);MA104细胞株(中检院)。

1.3 病毒滴度检测方法

1.3.1 准备细胞:取生长密度合适的MA-104细胞,消化成适宜浓度的细胞悬液,铺96孔细胞培养板,每孔加入100 μ L细胞悬液,于5% CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C培养3~4 d后使用。

1.3.2 病毒活化、稀释:每批疫苗取3~5支,每支各取1 mL混合,再取混合物1 mL,加入活化胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C活化一定时间,然后用细胞维持液将活化后样品进行10倍系列稀释。接种病毒:取预先铺好细胞的96孔板,用细胞维持液洗涤2~3次,加入活化后的样品,每孔加入100 μ L,每个稀释度样品加入4孔,同时设细胞对照孔。于5% CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C培养6 d。

1.3.3 反复冻融:培养期末,将感染培养板在-20 $^{\circ}$ C冰箱中冻融2次备用。

1.3.4 ELISA检测:RV抗原检测试剂盒和感染培养板取出室温平衡30 min。加样:分别在相应孔中加入阴阳性对照和待测样品。阴性对照3孔、阳性对照2孔,空白对照1孔。温育:用封板膜封板后,放置37 $^{\circ}$ C温育。洗板:揭去封板膜,用洗板机洗涤5遍,最后一次尽量拍干。加酶:加入酶结合物,空白对照孔除外。温育:用封板膜封板后,放置37 $^{\circ}$ C温育。洗板:操作同上。显色:每孔先后加底物A和底物B,震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色。终止:加终止液,震荡混匀。测定:用空白孔调零,于450 nm测定各孔OD值。

1.3.5 结果判定:1) 阳性对照OD值 ≥ 0.5 , 阴性对照OD值 < 0.5 , 试验成立。2) Cutoff计算公式= 阴性平均值 $\times 2.1$ (如果阴性平均值小于0.05,按0.05计算)。3) 如果样品OD值大于等于Cutoff,则为阳性。4) 如果样品OD值小于Cutoff,则为阴性。

1.3.6 根据Karber法计算病毒滴度,单位 $\lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据国家药品标准WS4-(ZB-004)-2011的要求,样品病毒滴度在 $5.5 \sim 7.0 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,结果合格。

1.4 趋势分析

以批次为横坐标,病毒滴度结果为纵坐标,从每年生产的第一批开始累积数据,收集至少含有10批不同原液得到的最初40个结果后计算平均值 \bar{X} 和标准差(SD),将每批产品中中检院以及企业质控实验室的检测结果、平均值(\bar{X})、警戒限($\bar{X} \pm 2\text{SD}$)和行动限($\bar{X} \pm 3\text{SD}$)绘于图上。观察图中检测结果的趋势线是否有较大的波动,是否超出警戒限、行动限及在均值两侧平均分布的情况。通常情况下,1批制品的检测结果超出行动限,或连续3批结果超出警戒限,或结果趋势有严重的漂移(连续10批以上结果在均值同侧),均应判定为超趋势(Out of Trend, OOT),应对造成原因进行调查分析,并根据制品的检验项目及质量标准进行讨论,明确原因^[11]。

1.5 统计学分析

采用GrahPad Prism 5软件进行统计学分析。对

中检院和企业质控实验室对口服轮状病毒活疫苗病毒滴度的检测结果配对 t 检验及Bland-Altman检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。同时,对2家结果进行Bland-Altman检验,Bland-Altman图的横坐标和纵坐标分别为2个实验室检测结果的平均值和检测结果的差值,制作Bland-Altman图。Bland-Altman图是一种衡量一致性的可视化展示方法,如果95%以上的数据在差值的2倍标准差(2SD)范围内,说明一致性良好。

2 结果

2.1 2020年口服轮状病毒疫苗病毒滴度趋势分析

中检院对111批疫苗进行了批签发资料审核和部分检验(全部批次进行无菌检查和异常毒性检查,有63批进行鉴别试验,43批进行病毒滴度检测),检测结果均合格。中检院对43批疫苗病毒滴度的检测结果进行趋势分析(见图1)。

病毒滴度结果显示:

病毒滴度平均值为 $6.4 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{SD} = 0.3$,警戒限和行动限范围分别为 $5.6 \sim 7.1 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5.3 \sim 7.5 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$;趋势分析显示,全部批次疫苗检测结果均符合质量标准。

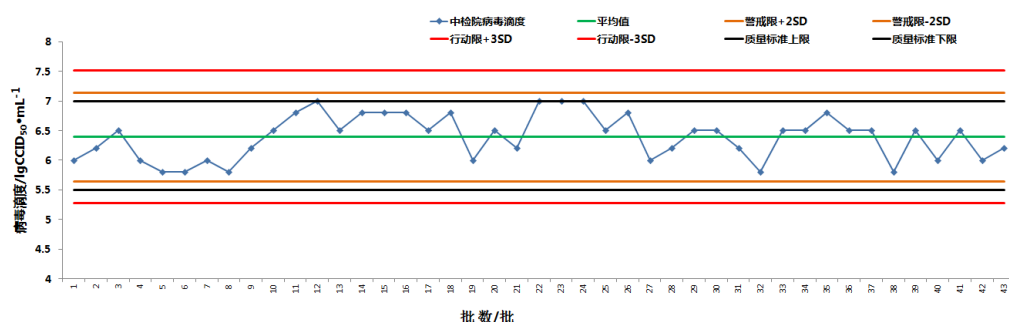


图1 2020年口服轮状病毒活疫苗病毒滴度趋势分析

2.2 2020年与2019年病毒滴度趋势分析比较

为反映中检院和企业病毒滴度指标的年度变化和差异,分别将2020年的结果与2019年相关结果进行比较分析(见图2)。

病毒滴度趋势分析结果显示:2020年ORV的

病毒滴度平均值为 $6.4 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$,2019年为 $6.2 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$,SD分别为0.3和0.4;2020年度检测结果平均值较2019年相差 $0.2 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。2019年和2020年中检院检测结果在 $5.5 \sim 7.0 \lg\text{CCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,均在警戒限内。

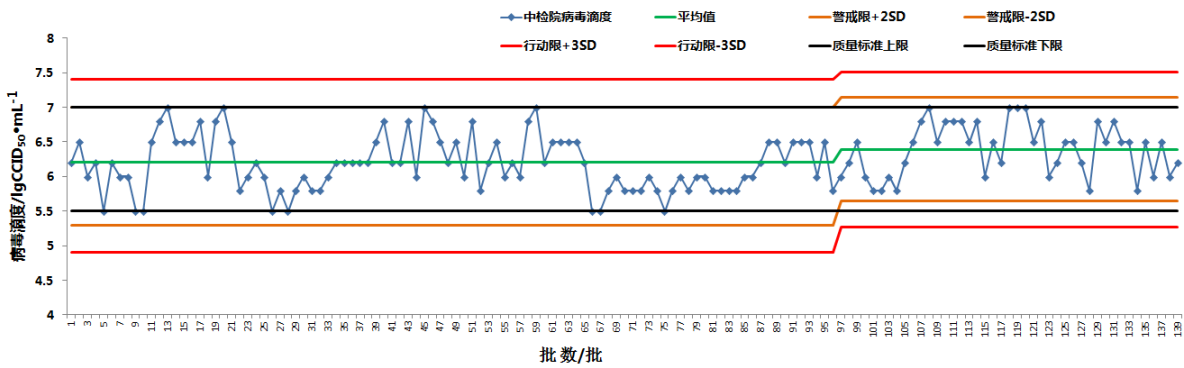
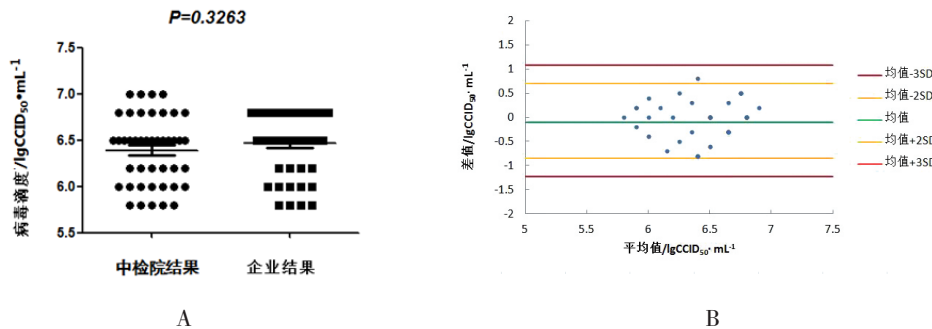


图2 口服轮状病毒活疫苗病毒滴度中检院检测结果的周期性趋势分析(2019/2020)

2.3 中检院与企业病毒滴度检测结果比较

为反映2020年生产的ORV疫苗试验时间检测差异,将2020年中检院与企业的相应批次检测结果进行比较分析(见图3)。中检院与企业的检测平均值分别为 $6.4 \text{ lgCCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $6.5 \text{ lgCCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，“变异”系数值为5.8%和5.4%。经配对 *t*

检验(图3A),中检院与企业检测结果差异均无统计学意义($P=0.3263$);经Bland-Altman统计显示(图3B),中检院与企业检测差值的平均值为 -0.1 ($\text{SD}=0.4$);42批次检测结果的差值基本位于2SD以内,仅有1个点位于2SD和3SD之间的情况(2.3%, 1/43)。



注:数据由中检院和企业的质量控制实验室提供

图3 中检院与企业病毒滴度结果的比较(2020年度)

3 讨论

生物制品质量控制趋势分析是收集连续的或一定周期内的产品质量控制参数的信息,并采用统计学方法进行处理的一种分析手段^[8]。其主要目的是发现产品质量或生产过程中发生的问题及偏差,反映生产和检定过程的稳定性,预见产品质量的趋势,证明生产批次与临床试验用批次的一致性和代表性^[8]。WHO和国家药品监督管理局均对疫苗批签发,特别是趋势分析提出了相关技术要求^[9-10]。WHO在批签发指导原则中明确要求:作为批签发的关键组成部分,生产企业和国家监管当局/国家质量控制实验室均应对所有关键质量控制参数(特别是效力)进行趋势分析^[9]。

目前,世界范围内使用的轮状病毒疫苗均为减毒活疫苗,生产工艺中涉及细胞培养、病毒接种、收获和纯化等步骤,滴度会有不同程度的损失,生物学特性也决定了其在生产、运输和保存过程中经历从放行到货架期的稳定性的考验^[12]。病毒滴度作为RV减毒活疫苗生产工艺中和疫苗评价中的关键质量控制参数,如收获液、原液和成品中关键的病毒滴度有效性指标进行趋势分析。

2020年对ORV进行部分检验,包括无菌检查、异常毒性检查、鉴别试验和病毒滴度,检测结果均合格。其中前2项的检验频率均为100%,后2项的检验频率分别为57%和39%,均大于中检院关于疫苗批签发检验项目和检验频次相关要求中规定

的100%、100%、50%和30%最低检出频率。本研究采用3种方法对上市后的ORV进行一致性评价,包括年度趋势分析、年度间趋势分析比较以及中检院与企业不同实验室结果比较:①年度趋势分析:2020年度趋势分析结果显示ORV未见OOT。②年度趋势分析比较:2019年和2020年生产的ORV病毒滴度趋势分析比较结果显示,与2019年相比,2020年的检测结果未发生大的偏移,也说明该制品的生产工艺和检测方法相对稳定。③2020年度中检院与企业的检测结果进行配对 t 检验,2个实验室结果统计学分析无显著性差异($P=0.3263$, $P>0.05$),验证了批签发资料的准确性和可靠性。Bland-Altman图显示42批疫苗(97.7%, 42/43)的数据在差值的2SD范围内,>95%,提示中检院与企业的检测结果具有较好的一致性。以上结果均表明ORV的生产工艺稳定、疫苗质量稳定可控。

通过ORV关键质量项目病毒滴度的趋势分析,不但可以监测该制品生产的批间一致性,从而间接反映生产过程的稳定性,保证每批制品应用于人体安全有效,而且也可以提示生产企业通过对连续生产批次的检测结果进行数据积累及趋势分析,进而达到质量控制和质量监测的目的,趋势分析结果还能对生产的工艺过程控制具有一定反馈作用。如果在趋势分析中发现某批制品的数据异常,超出警戒限或行动限,则应对整个生产过程进行回顾,检查环境、仪器、人员、原料、方法等相关因素,查明原因并及时进行纠正。在进行趋势分析时,有时需要考虑一些特殊情况,如重要原材料、生产工艺变更、实验方法变更以及参比品批次更换等重大改变,均需要重新累积批数来计算均值及标准差。

WHO在批签发指导原则中指出,生物制品活性成分和杂质等关键性定量试验结果都应该进行监测及趋势分析,趋势分析被很多国家作为制品是否批签发的重要依据之一,也是疫苗监管体系预认证中一个关键的评估项。其作为评价减毒活疫苗质量一致性的关键项目,在今后的批签发工作中,应加强ORV病毒滴度的年度趋势分析、中检院与企业质控实验室间的对比研究,以及长期(如5年以上)趋势分析,为疫苗上市后安全性和有效性评价提供数据支撑。

参考文献:

- [1] WHO. Rotavirus Vaccines WHO Position Paper: January 2013-Recommendations[J]. Vaccine, 2013, 31 (52): 6170-6071.
- [2] Excler J L, Privor-Dumm I, Kim J H. Supply and Delivery of Vaccines for Global Health[J]. Curr Opin Immunol, 2021, 71 (Suppl 2): 13-20.
- [3] Marinosci A, Doit C, Koehl B, et al. Gastro-ent é Rites Nosocomiales à Rotavirus: Étude R é trospéctive Dans un Service de Pédiatrie G é nérale[J]. Arch Pédiatrie. 2016, 23 (11): 1118-1123.
- [4] Troeger C, Khalil IA, Rao PC, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years[J]. JAMA Pediatr, 2019, 172 (10): 958-965.
- [5] Dennehy PH. Transmission of Rotavirus and Other Enteric Pathogens in the Home[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19 (10 ppl): S103-S105.
- [6] 司璐,魏至栋.轮状病毒疫苗的研发进展[J].中国生物制品学杂志,2018,31(2):210-214.
- [7] 刘欣玉,张洁,贾丽丽,等.乙型脑炎减毒活疫苗质量控制中趋势分析的应用[J].中国生物制品学杂志,2012,25(11):1562-1564.
- [8] 马霄,孟丽,谭亚军,等.趋势分析在疫苗产品批签发管理中的应用[J].中国药事,2014,28(7):750-753.
- [9] WHO Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities[EB/OL].(2010-10-18)[2021-04-09].http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89148/1/9789241209786_eng.pdf.2010-10-18.
- [10] 国家市场监督管理总局.生物制品批签发管理办法[EB/OL].(2020-12-11)[2021-08-15].http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/fgs/202012/t20201221_324542.html.
- [11] 高帆,卞莲莲,吴星,等.2017年国产肠道病毒71型灭活疫苗质量一致性研究[J].中国病毒病杂志,2018,8(6):456-462.
- [12] 杜加亮,刘艳,焦洋,等.进口轮状病毒疫苗RotaTeq的热稳定性[J].中国生物制品学杂志,2020,33(8):849-854.

(收稿日期 2021年7月30日 编辑 肖妍)