

组分百日咳疫苗安全性检测体外替代方法的应用和初步评价

吴燕, 卫辰, 王丽婵, 晁哲, 马霄* (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 102629)

摘要 目的: 用一种组分百日咳疫苗残留毒性的体外替代检测方法, 更稳定和客观地评价疫苗成品的生产一致性。方法: 验证直接定性法和间接定量法2种中华仓鼠卵巢细胞簇集试验方法, 分别对6个国内外厂家的10种组分百日咳疫苗产品毒性进行定量和定性检测, 并使用百日咳毒素参考品将体外法与小鼠组胺致敏试验进行桥接和初步评价。结果: 体外定量试验的灵敏度为 $0.0026 \pm 0.0003 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 几何变异系数为13%, 体外定性试验的灵敏度为 $0.0067 \pm 0.0016 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 几何变异系数为24%, 组胺致敏试验的灵敏度为 $3.3 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 所有样品的体外定性结果均为阴性, 小鼠组胺致敏试验结果均合格, 体外定量结果与小鼠组胺致敏结果具有良好的相关性 ($r=0.737$, $P<0.05$)。结论: 本研究在国内首次使用CHO细胞簇集试验方法检测百日咳疫苗成品, 并进行了初步评价。该方法灵敏度高于小鼠组胺致敏试验, 可应用于百日咳疫苗毒性及毒性逆转检测。该方法需要更广泛的推广和应用和数据积累, 以达到完全替代动物实验的目标。

关键词: 组分疫苗; 百日咳; 中华仓鼠卵巢细胞簇集试验; 毒性残留; 替代方法

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)09-1047-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.09.009

Application and Preliminary Evaluation of *in Vitro* Alternative Methods for the Safety Testing of Component Pertussis Vaccine

Wu Yan, Wei Chen, Wang Lichan, Chao Zhe, Ma Xiao* (National Institutes for Food and Drug Control, Key laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To use an *in vitro* alternative detection method for residual toxicity of component pertussis vaccine, and to evaluate the consistency of production of vaccine products more stably and objectively. **Methods:** Two CHO cell clustering assays were established and validated by direct qualitative method and indirect quantitative method. The toxicity of ten component of pertussis vaccine products from six domestic and foreign manufacturers were tested quantitatively and qualitatively, the *in vitro* method and histamine sensitization test of mice were bridged and evaluated using pertussis toxin reference. **Results:** The sensitivity of *in vitro* quantitative test was $0.0026 \pm 0.0003 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, GCV was 13%, the sensitivity of *in vitro* qualitative test was $0.0067 \pm 0.0016 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, GCV was 24%, and the sensitivity of the histamine sensitization test was $3.3 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$; the qualitative

results of all samples *in vitro* were negative, the results of histamine sensitization test in mice were all qualified, and there was a good correlation between the quantitative results *in vitro* and histamine sensitization results in mice ($r=0.737$, $P<0.05$). **Conclusion:** In this study, CHO cell cluster assay was used to detect pertussis vaccine for the first time in China and conducted a preliminary evaluation. The sensitivity of this method is higher than that of histamine sensitization test in mice, and it could be used to detect the toxicity and toxicity reversal of pertussis vaccine. This method requires a wider range of applications and accumulation of data to achieve the goal of completely replacing animal experiments.

Keywords: component vaccine; whooping cough; CHO cell clustering test; toxic residue; alternative method

每年我国含有无细胞百日咳疫苗 (Acellular Pertussis, aP) 的联苗产品批签发量约7000万人份, 其中90%为国产的共纯化百日咳疫苗 (Diphtheria Tetanus and Acellular Pertussis Combined Vaccine, DTaP) 和共纯化百白破、b型流感嗜血杆菌联合疫苗DTaP-Hib, 10%为进口的组分百日咳疫苗 (Acellular Component Pertussis, acP) 为基础的五联苗DTacP/IPV-Hib^[1]。以甲醛或戊二醛脱毒的百日咳毒素 (Pertussis Toxin, PT)、丝状血凝素 (Filamentous Haemagglutinin, FHA)、黏附素 (Pertactin, PRN) 和菌毛 (Fimbriin, Fim) 分别纯化并配制的acP将逐渐成为我国未来十年内以aP为基础的多联疫苗的主流产品。

PT是鲍特氏菌属百日咳杆菌产生的一种主要毒力因子, 是一个A-B结构的致命毒素, A结构为酶活性亚基, 可以催化腺苷二磷酸 (Adenosine Diphosphate, ADP) 核糖基化, 从而中断关键的细胞信号转导途径并产生多种生物效应。B结构为结合亚基, 可以识别细胞表面糖蛋白受体并结合, 导致毒素转运至高尔基体和内质网并释放A亚基。PT具有组胺致敏活性、中华仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary Cell, CHO) 簇集作用、红细胞凝集活性、T细胞有丝分裂促进作用等多种生物学活性, 是引起百日咳众多临床症状的原因^[2-3]。

在我国, 疫苗安全性是最重要也是关键的技术指标, 而包含aP成分的联苗不良反应率占到全部疫苗不良反应的40%^[4]。现有acP是一种纯度超过95%的亚单位化学脱毒蛋白疫苗, 完全不含有脂多糖、脂寡糖、腺苷酸环化酶、气管细胞毒素等活性蛋白, acP的毒性可以说就是PT的残留毒性^[5], 因此对残留的PT毒性及其毒性是否发生逆转进行监测是评价组分百白破疫苗安全性的重要指标。

检测PT残留毒性的方法有白细胞增多法、组

胺致敏法 (Histamine Sensitisation Tests, HIST)、CHO簇集试验法、ADP-核糖基转移酶活性检测法、胎球蛋白结合法等。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 现有aP的安全性检测方法源于日本药典, 使用国家参考品进行小鼠白细胞增多、小鼠组胺致敏和疫苗热加速后小鼠组胺致敏 (毒性逆转) 3个项目的检测。PT引起白细胞增加的确切机制尚不清楚, 而且由于缺乏标准化, 实验室内存在较大的差异^[6]。小鼠体内组胺致敏是可以反映PT在体内与细胞膜结合、内化、转运和酶活性的所有活动的检测方法。在欧洲、美国等国家和地区是以小鼠死亡作为判定终点, 在日本、中国等亚洲国家则是以小鼠体温降低作为终点^[7-8], 无论是哪种方式, 都要使用大量的实验小鼠, 而且由于动物法变异系数较大, 导致实验室内和实验室间存在一定的变异性。

CHO细胞簇集试验是唯一同HIST一样可以同时反映PT在体内所有活动的体外检测方法^[9]。Hewlett等^[10]研究发现, 在加入PT后CHO细胞会发生簇集生长。Gillenius等^[11]在此基础上建立了体外检测PT活性的CHO细胞检测法。但由于百白破疫苗成品吸附了铝佐剂, 而铝佐剂的存在会影响CHO细胞生长, Isbrucker等^[12]改良了该方法, 通过稀释疫苗 (直接法) 或在佐剂和细胞之间加一半透膜 (间接法) 的方式来消除佐剂引起的细胞毒性作用。但由于HIST检测不合格的疫苗成品很难获得, 因此在待测样品中加入毒素标准品来模拟不合格产品。

现在世界各国均在大力推行通过该体外替代方法检测acP的毒性, 欧洲药典已经讨论通过CHO细胞法作为aP疫苗安全性唯一的检测方法, 中国食品药品检定研究院 (简称中检院) 前期也完成了参考品的标定和细胞实验的优化工作^[13]。本研究在国

内首次应用并评价该方法,并与《中国药典》现行方法进行比较和替代研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

培养基DMEM/F12、胎牛血清、L-谷氨酰胺、青链霉素双抗、胰酶均购自GIBCO公司;二磷酸组胺(Cat. No. H7375)购自SIGMA公司;24孔薄膜池细胞板(Costa 3413);96孔细胞培养板(eppendorf 0030730119);成像显微镜(AMG, EVOS);细胞培养箱(THERMO, 2306);肛温计(SHIBAURA TD-300)。

1.2 细胞和动物

CHO-K1细胞,源自ATCC,中检院传代18代后液氮冻存。

SPF级NIH品系小鼠[购自中检院繁育场,许可证号SCXK(京)2014-0013]。

1.3 参考品和样品

1ST WHO百日咳毒素标准品JN1H-5, H1ST致死活性和CHO细胞簇集活性均为每支10 000 IU, 62.5 μg;第一代百日咳毒素国家参考品C1, CHO细胞簇集活性每支3000 IU, 60 μg;厂家A的境外上市DTacP(PT 25 μg, FHA 25 μg, PRN 8 μg)3批; dTAcP(PT 8 μg, FHA 8 μg, PRN 2.5 μg)3批;厂家B的国内上市DTacP/IPV-Hib(PT 25 μg, FHA 25 μg)3批;境外上市的dTAcP(PT 2.5 μg,

FHA 5 μg, PRN 3 μg, Fim 5 μg)3批;厂家C、D国内申报注册的DTacP(PT 25 μg, FHA 25 μg, PRN 8 μg)各3批;厂家E、F国内申报注册的DTacP和DTacP/IPV(PT 25 μg, FHA 25 μg, PRN 8 μg)各3批。样品依次编号为1到30号。所有样品来源于中检院,4℃保存。B厂家产品在37℃保存28天作为毒性逆转测试样品。

1.4 CHO细胞百日咳疫苗毒性间接定性法

1.4.1 CHO细胞准备

将新传代的CHO细胞培养48 h,胰酶消化后进行细胞计数,将细胞稀释至浓度为 4×10^4 个·mL⁻¹。取24孔细胞板,每孔加入250 μL细胞液,即每孔 1×10^4 个细胞,37℃培养24 h。

1.4.2 样品处理

样品加标:取一支分装冻存的C1, PBS稀释至100 IU·mL⁻¹。每一个样品(包括2 mg·mL⁻¹的佐剂对照)取500 μL,加5 μL的100 IU·mL⁻¹ C1至终浓度1 IU·mL⁻¹,37℃吸附1 h。将样品和加标样品一同12000 g离心10 min,弃上清,460 μL细胞培养基重悬沉淀,将250 μL重悬样品加入半透膜池中,将半透膜池加入预先准备的细胞板中,另加入250 μL的0.1 IU·mL⁻¹的C1对照并倍比稀释7个孔,直接加入细胞孔中作为毒素灵敏度对照,每板最后一孔作为细胞对照孔,加样顺序见表1。37℃5%二氧化碳培养48 h。

表1 CHO细胞百日咳疫苗毒性间接法加样统计

孔号	1	2	3	4	5	6
A	样1	样1+C1	样5	样5+C1	0.05	0.0031
B	样2	样2+C1	样6	样6+C1	0.025	0.0016
C	样3	样3+C1	样7	样7+C1	0.0125	0.0008
D	样4	样4+C1	样8	样8+C1	0.0063	0

1.4.3 结果判定

弃掉半透膜池,直接观察细胞板,用显微成像仪记录簇集结果,孔内细胞簇团达到10个为特异性簇集阳性判断标准。

1.5 CHO细胞百日咳疫苗毒性直接定量法

1.5.1 CHO细胞准备

将新传代的CHO细胞培养48 h,胰酶消化后进

行细胞计数,将细胞稀释至浓度为 5×10^4 个·mL⁻¹。取96孔细胞板,每孔加入100 μL细胞液,即每孔5000个细胞,37℃培养24 h。

1.5.2 样品处理

稀释板全板加100 μL培养基作为稀释液,样品首孔补90 μL培养基作为稀释液,每孔加10 μL样品和加标样品,做复孔,加样顺序如表2,每板

均带毒素梯度对照和佐剂加标对照。

由上至下倍比稀释，稀释后将100 μ L导入预先铺好的细胞板，37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳孵育24 h，洗

去培养基并加入200 μ L新鲜培养基，37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳孵育24 h。

表2 CHO细胞百日咳疫苗毒性直接法加样统计

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
孔号	C1 (IU \cdot mL $^{-1}$)	样1 (稀释倍数)			样1+1	样2 (稀释倍数)			样2+1	佐剂+1		
A	0.05	40			0.025	40			0.025	0.05		
B	0.025	80			0.0125	80			0.0125	0.025		
C	0.0125	160			0.0063	160			0.0063	0.0125		
D	0.0063	320			0.0031	320			0.0031	0.0063		
E	0.0031	640			0.0016	640			0.0016	0.0031		
F	0.0016	1280			0.0008	1280			0.0008	0.0016		
G	0.0008	2560			0.0004	2560			0.0004	0.0008		
H	空白	空白			空白	空白			空白	空白		

1.5.3 结果判定

50%细胞簇集成团，为特异性簇集阳性判断标准。PT对照达到4孔以上簇集，且样品加标和佐剂加标均出现簇集孔，则试验成立。若样品直接稀释列出现簇集，以PT参考品梯度和样品稀释度计算样品簇集活性；若样品直接稀释列未簇集，以样品加标列簇集孔数通过佐剂加标梯度计算样品簇集活性，如样品加标簇集孔数低于佐剂加标1个孔以上则样品无簇集活性，孔数一致样品为1 IU \cdot mL $^{-1}$ ，样品加标簇集孔数高于佐剂加标1个孔为2 IU \cdot mL $^{-1}$ ，以此类推。

1.6 HIST试验

参照《中国药典》2015年版三部实施，每个样品及毒性逆转样品进行1次试验。

1.7 参考品桥接和试验灵敏度

参照欧洲药品和医疗保健质量管理局 (European Directorate for Quality Medicines, EDQM) 组织的合作研究^[14]，将C1和JN1H5两种PT参考品4个稀释度的梯度稀释进行HIST试验，导致小鼠死亡的最小PT浓度即为小鼠组胺致敏试验灵敏度。同时进行CHO细胞簇集定量法试验，PT参考品

的最小簇集浓度即为CHO细胞试验的灵敏度。

1.8 统计学替代方法评价

用SPSS20软件，将CHO细胞毒性直接法结果与小鼠组胺致敏活性结果进行统计学比较。

2 结果

2.1 试验灵敏度和重复性

CHO所有样品及毒逆样品共完成间接法24孔板15块，C1对照的灵敏度几何均值GM为0.0067 \pm 0.0016 IU \cdot mL $^{-1}$ ，几何变异系数 (Geometric Coefficient of Variation, GCV) 24%；完成直接法96孔板54块，C1对照的灵敏度为0.0028 \pm 0.0011 IU \cdot mL $^{-1}$ ，GCV 13%。灵敏度和GCV均达到EDQM协作标定水平 (灵敏度0.0079 IU \cdot mL $^{-1}$ ，GCV 61.7%)^[12]。

HIST试验共对PT参考品进行了3次桥接试验，以小鼠致死判定试验灵敏度，2个参考品的3次试验小鼠死亡数符合免疫剂量，JN1H5的灵敏度在4.5 IU \cdot mL $^{-1}$ ，C1的灵敏度在3.3 IU \cdot mL $^{-1}$ 。PT参考品可以在我国同时用于体内和体外法试验，CHO细胞簇集试验灵敏度是组胺致敏法致死试验的500~1000倍，结果见表3。

表3 HIST 试验灵敏度结果

样品	免疫剂量 / IU · mL ⁻¹	死亡数 / 个		
		第一次	第二次	第三次
PBS/G	n/a	0	0	0
JNIH-5	13.5	3	3	1
	4.5	0	2	0
	1.5	0	0	0
	0.5	0	0	0
C1	10	4	3	2
	3.3	1	1	1
	1.1	0	0	0
	0.3	0	0	0

2.2 CHO细胞法定性定量结果

所有样品定性结果均为阴性，细胞存活且未引发细胞簇集产生。所有样品+标结果除个别孔样品死亡、复试外，均呈细胞簇集阳性。

定量试验除5个样品外均有定量簇集活性值，重复性较好，GCV值18%，除16和19号样品外，其余样品活性在2~4 IU · mL⁻¹之间。结果见表4。

2.3 HIST结果及毒性逆转结果

DTacP的HIST结果及毒性逆转结果高低有别，结果均符合药典规定，结果见表4。

2.4 统计学分析

将样品活性结果和毒性逆转结果进行独立样本 t 检验：样品B的CHO细胞簇集活性和毒性逆转CHO细胞簇集活性有显著性差异， $P < 0.05$ ；样品B的HIST和毒性逆转HIST活性也有显著性差异， $P < 0.05$ 。毒性和毒性逆转结果2种方法均不相关。

组胺结果与细胞活性定量结果相关性 $r=0.737$ ，显著性水平 $P < 0.05$ ，2种方法具有良好的相关性。

表4 样品 HIST 及细胞活性定量 GM 结果

厂家	样品序号	组胺 HSU/mL	细胞活性定量 GM/ (IU · mL ⁻¹)	厂家	样品序号	组胺 HSU/mL	细胞活性定量 GM/ (IU · mL ⁻¹)
A	1	0.223	2.884	C	13	0.568	4.000
A	2	0.366	4.000	C	14	0.310	4.000
A	3	0.369	3.634	C	15	0.431	4.000
A	4	0.398	3.634	D	16	0.706	5.769
A	5	0.610	3.634	D	17	0.261	3.634
A	6	0.213	3.634	D	18	0.419	4.000

续表 4

厂家	样品序号	组胺 HSU/mL	细胞活性定量 GM/ (IU · mL ⁻¹)	厂家	样品序号	组胺 HSU/mL	细胞活性定量 GM/ (IU · mL ⁻¹)
B	7	0.629	4.000	E	19	0.261	1.000
B	8	0.463	4.000	E	20	0.150	0.003
B	9	0.438	4.000	E	21	0.092	0.003
B	10	0.419	4.000	E	22	0.100	0.003
B	11	0.590	3.634	E	23	0.040	0.003
B	12	0.769	4.000	E	24	0.080	0.003
B 毒逆	7	0.313	2.000	F	25	0.307	2.000
B 毒逆	8	0.298	2.000	F	26	0.681	4.000
B 毒逆	9	0.347	2.000	F	27	0.377	2.000
B 毒逆	10	0.508	3.634	F	28	0.243	2.884
B 毒逆	11	0.486	3.634	F	29	0.257	3.634
B 毒逆	12	0.367	2.000	F	30	0.155	3.634

3 讨论

自1990年开始, DTacP在欧美各国获批并大规模上市, 此后各国研究者不断进行安全性方法的研究。欧美厂家长期使用HIST致死法进行安全性检测, 标准品包括WHO的PT标准品JN1H-5、换代标准品IS2、欧盟的PT标准品BRP等^[15]。这些国际标准品均为DTacP疫苗的纯化蛋白制备, 除组胺致敏活性外还可以直接应用各种理化活性测定方法。我国现有共纯化DTacP仍在沿用百日咳菌体冻干的毒性标准品, 并不能直接用于新方法的检测。2012年以来, D Xing总结并优化了3种主要的体外替代方法, E-HPLC法、胎球蛋白结合活性法和CHO细胞簇集试验法, 3种方法都具备和HIST一样极高的灵敏度^[16]。E-HPLC方法只能检测A亚基的酶活性、胎球蛋白结合活性法只能检测B亚基的结合活性, 而只有CHO细胞法与小鼠组胺致敏法可以同时考察PTa的结合、内化、易位和酶活性全过程。早期CHO细胞法无法排除铝佐剂的干扰, 需要解吸附后检测, 存在解吸附效率和干扰等问题。2016年经过R. Isbrucker等人的优化, CHO细胞法已经不需要解

吸附, 解决了CHO细胞试验替代小鼠组胺致敏试验的最大难题^[12]。该方法获得了全球13家实验室的验证和认可, 并已纳入欧洲药典。中检院与国内多个厂家于2018年完成了国内PT参考品C1的研制和标定工作, 将试验体系灵敏度提高到50 pg以内, 为体外替代方法奠定了基础^[4]。

本研究在之前工作的基础上, 使用改良后的CHO细胞簇集试验, 首次在国内对DTacP产品用体外替代方法进行了适用性检测。检测结果与体内法一致, 并且重复性良好, 灵敏度也达到欧美国家实验室检测水平。同时使用C1参考品桥接了体外替代试验和体内试验。标准品梯度结果和佐剂加标对照结果验证CHO细胞簇集试验灵敏度远高于小鼠组胺致敏试验, 使用PT的C1参考品可以一定程度上对HIST和体外法进行桥接。直接法将样品和加标样品与参考品梯度稀释, 直至细胞毒性干扰物质稀释到不影响细胞生长和簇集的程度, 通常在80~160倍左右, 本实验灵敏度满足需要。研究结果表明, 现有不同厂家、不同抗原组成、不同佐剂含量的DTacP类产品都符合《中国药典》的HIST标

准,也可以用CHO细胞簇集试验方法进行检测,间接法样品定性结果全部为阴性,样品加标结果全部为阳性,间接法符合安全性快速检定要求。直接法定量结果和HIST结果有一定程度的相关性,CHO细胞簇集试验体外替代方法具备完全取代小鼠组胺致敏试验的可能。毒性逆转试验和毒性结果没有相关性表明我国DTacP类产品稳定性较好,不存在毒性逆转现象,结果差异属于实验误差。我国百日咳类疫苗生产已超过70年,其安全性试验控制指标一直是动物实验,该体外方法具备兼容性和适用性,替代方法的应用将对提高我国产品质量和实验室间一致性有着重要和积极意义。

参考文献:

- [1] 卫辰,王丽婵,晁哲,等. 2012~2016年组分百日咳疫苗质量趋势分析及评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(3): 225-229.
- [2] Kaslow HR, Burns DL. Pertussis Toxin and Target Eukaryotic Cells: Binding, Entry and Activation[J]. FASEB J, 1992, 6(9): 2684-2690.
- [3] Sekura RD, Fish F, Manclark CR, et al. Pertussis Toxin. Affinity Purification of a New ADP-ribosyltransferase[J]. Biol Chem, 1983, 258(23): 14647-14651.
- [4] 龙珍,卫辰,郭志谋,等. 液相色谱-串联质谱法测定百日咳和百白破疫苗中百日咳杆菌气管细胞毒素[J]. 色谱, 2019, 37(2): 155-161.
- [5] Isbrucker R, Arciniega J, McFarland R, et al. Report on the International Workshop on Alternatives to the Murine Histamine Sensitization Test (HIST) for Acellular Pertussis Vaccines: State of the Science and the Path Forward[J]. Biologicals, 2014, 42(2): 114-22.
- [6] Van Straaten-van de Kappelle I, Van der Gun JW, Marsman FR, et al. Collaborative Study on Test Systems to Assess Toxicity of Whole Cell Pertussis Vaccine[J]. Biologicals, 1997, 25(1): 41-57.
- [7] Markey K, Asokanathan C, Feavers I. Assays for Determining Pertussis Toxin Activity in Acellular Pertussis Vaccines[J]. Toxins (Basel), 2019, 11(7): 417.
- [8] Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, et al. Highly Sensitive Histamine-sensitization Test for Residual Activity of Pertussis Toxin in Acellular Pertussis Vaccine[J]. Biologicals, 2007, 35(4): 259-264.
- [9] Hoonakker ME, Verhagen LM, van der Maas L, et al. Reporter Cell Lines for Detection of Pertussis Toxin in Acellular Pertussis Vaccines as a Functional Animal-free Alternative to the *in Vivo* Histamine Sensitization Test[J]. Vaccine, 2017, 35(8): 1152-1160.
- [10] Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, et al. Induction of a Novel Morphological Response in Chinese Hamster Ovary Cells by Pertussis Toxin[J]. Infect Immun, 1983, 40(3): 1198-1203.
- [11] Gillenius P, Jäättmä E, Askelöf P, et al. The Standardization of an Assay for Pertussis Toxin and Antitoxin in Microplate Culture of Chinese Hamster Ovary Cells[J]. Biol Stand, 1985, 13(1): 61-66.
- [12] Isbrucker R, Daas A, Wagner L, et al. Transferability Study of CHO Cell Clustering Assays for Monitoring of Pertussis Toxin Activity in Acellular Pertussis Vaccines[C]. Pharmeur Bio Sci Notes, 2016, 2015: 97-114.
- [13] 卫辰,晁哲,王丽婵,等. 第1代百日咳毒素国家参考品的标定[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(8): 853-857.
- [14] 卫辰,晁哲,吴燕,等. 第2代WHO百日咳毒素国际标准品的协作标定[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1855-1860.
- [15] Wagner, L Isbrucker R, Loch C, et al. In Search of Acceptable Alternatives to the Murine Histamine Sensitisation Test (HIST): What is Possible and Practical? [C]. Pharmeur Bio Sci Notes, 2016: 151-170.
- [16] Xing D, Yuen CT, Asokanathan, C, et al. Evaluation of an *in Vitro* Assay System as a Potential Alternative to Current Histamine Sensitization Test for Acellular Pertussis Vaccines[J]. Biologicals, 2012, 40(6): 456-465.

(收稿日期 2023年1月5日 编辑 肖妍)