

伤寒 Vi 多糖疫苗细菌内毒素检测

梁昊宇, 蔡彤, 裴宇盛, 曾明, 王斌^{*} (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 **目的:** 建立动态浊度法检测伤寒 Vi 多糖疫苗的细菌内毒素。**方法:** 参考《中国药典》三部 (2010 版), 采用动态浊度法对伤寒 Vi 多糖疫苗中细菌内毒素进行检测, 并对标准曲线的可靠性和干扰试验进行验证。**结果:** 本次试验内毒素浓度在 $0.03125 \sim 1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r = -0.9972$, 具有良好线性关系。干扰试验样品回收率在 $50\% \sim 200\%$ 。伤寒 Vi 疫苗细菌内毒素限值确定为 $600 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。样品的内毒素值从低于检测限到 $125.7 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:** 采用动态浊度法监控伤寒 Vi 多糖疫苗中的细菌内毒素是可行的。

关键词: 伤寒 Vi 疫苗; 细菌内毒素; 动态浊度法; 疫苗质量控制

中图分类号: Q539; R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)07-0780-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.07.012

Determination of Bacterial Endotoxin in Typhoid Vi Polysaccharide Vaccine

Liang Haoyu, Cai Tong, Pei Yusheng, Zeng Ming, Wang Bin^{*} (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract **Objective:** To establish a method for determination of bacterial endotoxin in typhoid Vi polysaccharide vaccine. **Methods:** A dynamic turbidimetric method for determination of bacterial endotoxin in the typhoid Vi polysaccharide vaccine was developed according to the requirements in appendix XIIE of *Chinese Pharmacopoeia* (Volume III, 2010 edition). Moreover, the reliability of standard curve and interference test was verified. **Results:** There was good linear relationship within the bacterial endotoxin concentration range of $0.03125 \sim 1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = -0.9972$). The recovery rate of samples in the interference test was $50\% \sim 200\%$. The bacterial endotoxin limit in typhoid Vi polysaccharide vaccine was $600 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. The endotoxin content in samples ranged from being below detection limit to $125.7 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion:** It is feasible to control bacterial endotoxin in typhoid Vi polysaccharide vaccine using the dynamic turbidimetric method.

Keywords: typhoid Vi polysaccharide vaccine; bacterial endotoxin; dynamic turbidimetric method; vaccine quality control

目前, 国际上的伤寒疫苗主要有伤寒 Vi 多糖疫苗和口服伤寒减毒活疫苗, 其中以伤寒 Vi 多糖疫苗的应用占绝大多数^[1], 我国仅有伤寒 Vi 多糖疫苗上市, 该疫苗是提取纯化伤寒沙门菌 Ty2 株的荚膜多

糖制成的亚单位疫苗^[2]。与伤寒全菌体灭活疫苗相比, 伤寒 Vi 多糖疫苗具有安全性好、副反应低、使用方便 (单次免疫即可)、稳定性好等优点, 且免疫保护效果相似^[3]。我国伤寒 Vi 多糖疫苗原有的质

作者简介: 梁昊宇, 助理研究员; 研究方向: 微生物学; E-mail: lianghaoyu@nifdc.org.cn

通信作者: 王斌, 研究员; 研究方向: 微生物学; E-mail: binwang@nifdc.org.cn

量标准控制仅采用热原检查法,与WHO规程一致,而欧洲药典在原液和成品中都增加了细菌内毒素的控制指标。本试验确定了伤寒Vi疫苗的内毒素检查限值并研究对其使用细菌内毒素检查法的可行性,为质量标准提高并在《中国药典》三部(2015年版)中增加对该疫苗进行细菌内毒素检查的要求提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

细菌内毒素测定仪,型号BET-72(天津市天大天发科技有限公司);鲎试剂(TAL,中国食品药品检定研究院,批号:150603-201003,规格:每支2.2 mL);细菌内毒素检查用水(BET水,中国食品药品检定研究院,内毒素含量 $<0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,规格:每支10 mL);细菌内毒素国家标准品(NSE,中国食品药品检定研究院,批号:150600-200707,每支10000 EU);伤寒Vi疫苗A产品,规格:每剂0.5 mL,批号:20140601、20140602、20140603;B产品,规格:每剂0.5 mL,批号:20140201、20140302、20140303、20140404、20140508、20140509、20140510。其他材料:漩涡振荡器(scientific industries),试管,移液管,试管架。试管等玻璃器皿严格按照《中国药典》2010年版三部通则“细菌内毒素检查法”中的相关要求经过浸泡、冲洗、干烤除细菌内毒素^[4]。

1.2 方法

1.2.1 供试品细菌内毒素限值(L)的确定

《中国药典》中细菌内毒素限值计算公式为 $L=K/M$ ^[4],其中K为按规定的给药途径,临床无任何不良反应的内毒素阈值剂量,即人用每公斤体重每小时可最大接受的内毒素剂量,一般注射剂量为 $5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$;M为人用每公斤体重每小时最大剂量,依据药品使用说明书,0.5 mL疫苗肌肉注射,中国人平均体重按60 kg计,则M为 $0.5 \text{ mL} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 。 $L=5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1} \div 0.5 \text{ mL} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{h})^{-1}=600 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 标准曲线的可靠性试验

标准曲线系列溶液的制备:用细菌内毒素检查用水稀释内毒素国家标准品,最终细菌内毒素浓度分别为1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 稀释系列,即 $\lambda=0.03125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。阴性对照:使用的内毒素检查用水即为阴性对照液。各

取0.1 mL分别加到预先加有0.1 mL TAL试剂反应管内,混合均匀后插入BET-72细菌内毒素测定仪内进行自动检测,每一个浓度重复3管,每个批号的鲎试剂进行一次可靠性试验。

1.2.3 样品最大有效稀释倍数(MVD)计算^[3]

公式为 $MVD=L \cdot C/\lambda$ 。其中L为伤寒Vi疫苗内毒素限值,即 $L=100 \text{ EU/剂}$;C为0.5 mL/剂; λ 为标准曲线的最低内毒素浓度,即 $0.03125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$;计算得伤寒Vi疫苗MVD。

1.2.4 干扰试验预试验

样品系列溶液的制备:将伤寒Vi疫苗用内毒素检查用水依次稀释为10、100、1000倍溶液,记为A液。样品阳性对照溶液制备:将伤寒Vi疫苗用内毒素检查用水依次稀释为含有标准内毒素 $\lambda_m=0.1 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的10、100、1000倍样品溶液,作为样品添加内毒素阳性对照管,记为B液。标准曲线系列溶液的制备:用细菌内毒素检查用水将内毒素国家标准品稀释成浓度为1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,即 $\lambda=0.03125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 记为C液。阴性对照:内毒素检查用水即为阴性对照液,记为D液。分别取上述各液0.1 mL,加入预先加有0.1 mL TAL试剂的反应管内,混匀,立即插入BET-72细菌内毒素测定仪内进行检测,每个浓度重复2管,用C液结果进行线性拟合,计算回收率。回收率(%)=(B液内毒素值-A液内毒素值) $\times \lambda_m \times 100\%$ 。

1.2.5 干扰试验

按照预试验的稀释倍数进行干扰试验。样品系列溶液的制备:伤寒Vi疫苗用内毒素检查用水进行稀释,记为A液。样品阳性对照溶液的制备:将伤寒Vi疫苗用内毒素检查用水依次稀释为含有标准内毒素 $\lambda_m=0.1 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的100倍或1000倍样品溶液,作为样品添加内毒素阳性对照管,记为B液。标准曲线系列溶液的制备:用细菌内毒素检查用水将内毒素国家标准品稀释成浓度为1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,即 $\lambda=0.03125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 记为C液。阴性对照:内毒素检查用水即为阴性对照液,记为D液。分别取上述各液0.1 mL,加入预先加有0.1 mL TAL试剂的反应管内,混匀,立即插入BET-72细菌内毒素测定仪内进行检测,每个浓度重复2管,用C液结果进行线性拟合,计算回收率。

2 结果

2.1 标准曲线的可靠性试验

标准曲线的可靠性试验符合规定, 详见表 1。

2.2 样品最大有效稀释倍数 (MVD)

计算结果为 1600 倍。

2.3 干扰试验预试验

标准曲线: $\text{LgT}=2.7559-0.2863\text{LgC}$, $r=-0.9972$ 。阴性对照结果符合规定。批号为 20140601 的样品 (产品 A) 在稀释至 10 倍时, 回收率小于 50%, 存在抑制干扰作用, 稀释至 100 倍后的内毒素回收率

为 88%, 回收率在 50% ~ 200%, 已排除干扰作用, 符合《中国药典》2010 年版规定。批号为 20140506 的样品 (产品 B) 在稀释至 10 倍和 100 倍时, 回收率均小于 50%, 存在抑制干扰作用, 稀释至 1000 倍后的内毒素回收率为 104%, 回收率均在 50% ~ 200%, 已排除干扰作用, 符合《中国药典》2010 年版规定。初步表明 2 个厂家的样品分别在 100 倍和 1000 倍稀释后对内毒素与鲎试剂的反应无干扰影响。见表 2。

表 1 鲎试剂 (批号 201003) 标准曲线的可靠性试验结果 ($n=3$)

回归方程	相关系数	阴性对照
$\text{LgT}=2.7708-0.3693\text{LgC}$	-0.9972	阴性对照反应时间大于标准曲线最低浓度反应时间

表 2 伤寒 Vi 多糖疫苗的干扰试验预试验回收率试验结果 ($n=2$)

稀释倍数	批号 20140601	批号 20140506	%
10	-71	-1775	
100	88	-132	
1000	-	104	

2.4 干扰试验及样品内毒素检测

标准曲线: $\text{LgT}=2.7708-0.3693\text{LgC}$, $r=-0.9972$ 。阴性对照结果符合规定。样品的内毒素回收率均在 50% ~ 200%, 符合《中国药典》2010 年版规定, 初步表明经过稀释后的样品溶液对内毒素与鲎试剂的反应无干扰影响。样品干扰试验结果以及内毒素检测结果见表 3 和表 4。

2.5 结论

伤寒 Vi 多糖疫苗在稀释 1000 倍后对鲎试剂不存在干扰作用, 可以使用动态浊度法对细菌内毒素进行测定。

3 讨论

细菌内毒素检查法相比传统的家兔法检测热原物质的优点本文不再赘述。在世界各国药典中内毒素检查法已成为大部分注射剂热原物质检查的重要方法^[5], 我国的伤寒 Vi 多糖疫苗质量标准与 WHO 规程一致, 在 2000 年版《中国生物制品规程》及《中国药典》2005 年版和 2010 年版中, 均没有细菌内毒素检查项, 化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则^[6]中建议, 对于生产工艺易污染细菌内毒素

的肌肉注射用注射剂, 应考虑设细菌内毒素检查项。为加强该疫苗质量控制, 国家药典委员会决定在《中国药典》2015 年版中增加该疫苗的细菌内毒素检查项, 为此笔者建立了伤寒 Vi 多糖疫苗的细菌内毒素检测方法, 并进行了验证。本研究采取细菌内毒素检测中常用的动态浊度法, 其在干扰试验方面更为科学和准确。根据细菌内毒素限值公式: $L=K/M$, 计算出了伤寒 Vi 多糖疫苗的限值为 $600 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。伤寒 Vi 疫苗关于内毒素检查法的干扰试验结果表明, 伤寒 Vi 疫苗在稀释 1000 倍后对内毒素和鲎试剂的反应不存在干扰作用, 可以用于日常检验和质量控制。本试验的 10 批次伤寒 Vi 疫苗内毒素含量均小于 $200 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 低于限值, 内毒素含量符合规定。2 个厂家的产品均为伤寒 Vi 多糖疫苗, 但其分别在 100 倍和 1000 倍稀释后对内毒素与鲎试剂的反应无干扰影响, 分析原因: 本次试验采用的方法为动态浊度法, 此方法为经典方法, 在《中国药典》以及很多国家的药典中均有收载, 因此, 笔者分析造成差异的不是方法而是产品本身, 内毒素与鲎试剂的反应本质上是酶催化反应, 因此

其中的干扰是多种因素导致的, 2 种产品主要成分一致, 但 2 个厂家生产中所用到的工艺、原料和辅料以及产品中所含杂质均有微小差异, 从而导致试验结果的不同。

早在上世 90 年代中期就有外国学者对注射伤寒 Vi 多糖疫苗后的不良反应进行过研究, 发热是其最

主要的表现^[7]。还有研究表明伤寒 Vi 多糖疫苗中的 LPS 对于疫苗的免疫效果有一定的促进作用^[3]。伤寒 Vi 多糖疫苗的生产工艺决定了想要完全去除 LPS 几乎是不可能的, 但是笔者相信随着《中国药典》2015 年版的实施和生产厂家工艺的不断改进, 伤寒 Vi 多糖疫苗细菌内毒素检测的标准还将进一步提高。

表 3 伤寒 Vi 多糖疫苗干扰试验及内毒素检测结果 (产品 A)

管号	样品名称	批号	稀释 倍数	外加内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	变异系数 / %	回收率 / %	实测内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	原液含量 / (EU · mL ⁻¹)
1	阴性对照	-	-	-	-	-	-	<检测限
2	阴性对照	-	-	-	-	-	-	<检测限
3	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140601	100	0	-	106	<检测限	<检测限
4	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140601	100	0	-		<检测限	<检测限
5	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140601	100	0.1	10.45		0.107	
6	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140601	100	0.1				
7	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140602	100	0	-	110	<检测限	<检测限
8	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140602	100	0	-		<检测限	<检测限
9	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140602	100	0.1	1.96		0.1101	
10	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140602	100	0.1				
11	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140603	100	0	-	99	<检测限	<检测限
12	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140603	100	0	-		<检测限	<检测限
13	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140603	100	0.1	0.97		0.0991	
14	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140603	100	0.1				

表 4 伤寒 Vi 多糖疫苗干扰试验及内毒素检测结果 (产品 B)

管号	样品名称	批号	稀释 倍数	外加内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	变异系数 / %	回收率 / %	实测内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	原液含量 / (EU · mL ⁻¹)
1	阴性对照	-	-	-	-	-	-	<检测限
2	阴性对照	-	-	-	-	-	-	<检测限
3	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140201	1000	0	0.69	102	0.0295	29.5
4	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140201	1000	0				
5	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140201	1000	0.1	4.20		0.132	
6	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140201	1000	0.1				
7	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140302	1000	0	3.21	100	0.0374	37.4
8	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140302	1000	0				
9	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140302	1000	0.1	1.85		0.1383	
10	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140302	1000	0.1				

续表 4

管号	样品名称	批号	稀释 倍数	外加内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	变异系数 / %	回收率 / %	实测内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	原液含量 / (EU · mL ⁻¹)
11	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140303	1000	0	1.70	88	0.047	47.0
12	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140303	1000	0				
13	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140303	1000	0.1	3.38		0.1351	
14	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140303	1000	0.1				
15	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140404	1000	0	0.54	105	0.0557	55.7
16	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140404	1000	0				
17	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140404	1000	0.1	1.77		0.1608	
18	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140404	1000	0.1				
19	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140508	1000	0	1.89	100	0.1257	125.7
20	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140508	1000	0				
21	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140508	1000	0.1	1.59		0.2261	
22	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140508	1000	0.1				
23	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140509	1000	0	4.19	91	0.0686	68.6
24	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140509	1000	0				
25	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140509	1000	0.1	1.77		0.1601	
26	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140509	1000	0.1				
27	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140510	1000	0	5.35	89	0.063	63.0
28	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140510	1000	0				
29	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140510	1000	0.1	1.08		0.1527	
30	伤寒 Vi 多糖疫苗	20140510	1000	0.1				

参考文献:

- [1] Crump JA, Mintz ED. Global Trends in Typhoid and Paratyphoid Fever[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50 (2) : 241-246.
- [2] 沈玉霖, 计国欣, 王秉瑞, 等. 伤寒 Vi 荚膜多糖菌苗的研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1991, 4 (1) : 5-7.
- [3] Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, et al. Vaccines Against Typhoid Fever[J]. Vaccine, 2006, 24 (18) : 3804-3811.
- [4] 中国药典: 三部[S]. 2010: 附录95-98.
- [5] 裴宇盛, 蔡彤, 高华. 细菌内毒素检查新方法进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (3) : 392-395.
- [6] 中国药典: 二部[S]. 2010: 附录212-215.
- [7] 王志高, 周伟忠, 程信超, 等. 伤寒 Vi 多糖菌苗人体接种反应与血清学观察[J]. 江苏预防医学, 1996, (4) : 10-12.

(收稿日期 2016 年 12 月 8 日 编辑 邹宇玲)