

甲型肝炎灭活疫苗体外相对效力检测方法的研究及应用

谢忠平 龙润乡 李 华 陈洪波 宋 霞 黄 锐 洪 超 杨 蓉 白惠珠

摘 要 **目的** 建立甲型肝炎灭活疫苗体外相对效力检测方法。**方法** 用双抗体夹心 ELISA 法检测试剂对甲型肝炎灭活疫苗及效力试验参比进行检测,以检测 OD 值为反应指标,用生物检定双平行线法的基本原理进行统计分析,计算待检疫苗对应于效力参比品的相对效力(R 值)。**结果** 样品 HAAg 含量与检测 OD 值之间具有高度的相关性, $R^2 \geq 0.97$,适用于建立双平行线检定方法;通过对 3 批样品 3 人次检测结果分析,验证了所建立方法的可靠性,回归、偏离平行、二次曲线、反二次曲线 4 个指标全部通过了验证;用所建立的体外相对效力试验检测方法对 32 批次甲肝灭活疫苗进行检测,结果与小鼠体内效力检测结果具有良好一致性,均能反映疫苗相对效力,两种方法检测相对效力(R 值)之间无明显差别($t = 1.0354, P = 0.3045$)。**结论** 所建立的甲型肝炎灭活疫苗体外相对效力试验是一种灵敏、特异、方便、快捷的效力测定方法,可应用于甲型肝炎灭活疫苗效力检测。

关键词 甲型肝炎病毒 甲型肝炎灭活疫苗 效力 抗原 检测

The Study of Detection Methods and Application of the Relative Potency in vitro of Inactivated Hepatitis A Vaccine. Xie Zhongping, Long Runxiang, Li Hua, Chen Hongbo, Song Xia, Huang Kai, Hong Chao, Yang Rong, Bai Huizhu. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To establish a new in vitro method to detect the relative potency of inactivated hepatitis A vaccine. **Methods** ELISA was used to test the potency of hepatitis A vaccines and the reference vaccine. After getting the OD values of ELISA as response indicators, the dual - parallel line bioassays were carried out, and the R values of the vaccines were calculated comparing with the reference vaccine. **Results** The HAAg level of the samples were consistent well with the OD values obtained by ELISA, with $R^2 \geq 0.97$, indicating that this double parallel line examination method could be established to detect the relative potency of HAV vaccine. The results of 3 lots of HAV vaccine samples tested with this method by 3 different people confirmed the reliability of it because the return, the deviation parallel, the conic section and the counter - conic section all passed the tests. Additional 32 lots of inactivated hepatitis A vaccine were examined with this method too. The results showed a good consistency with those by in vivo method in mice. Both of them could reflect the relative potency of the vaccine with similar R values, between which there was no significant difference ($t = 1.0354, P = 0.3045 > 0.05$). **Conclusion** This new in vitro method is so sensitive, specific and fast that can be applied to detect the relative potency of inactivated hepatitis A vaccine.

Key words HAV; Inactivated hepatitis A vaccine; Test; Antigen; Potency

灭活疫苗动物体内效力检测周期一般均较长,且结果受多种因素的影响,所以 WHO 及国际生物制品标准化协会推荐尽量不用动物法进行生物制品质量检定^[1],2005 年版《中国药典》三部也主张“应尽量采用准确可靠的化学方法、物理学方法或细胞学方法取代动物试验进行生物制品质量检定,以减少用动物做试验”^[2]、国家 SFDA 颁布的“生物制品临床研究技

术指导原则”^[3]中也要求在研究过程中建立体外效力检测的方法。我所甲型肝炎灭活疫苗(inactivated hepatitis A vaccine, IHAV)工艺成熟完善、产品质量稳定可控,为此,参照相关规定及原则,建立双平行线体外相对效力试验检测方法,用于甲型肝炎灭活疫苗的效力价。

材料与方法

1. 材料:甲型肝炎病毒抗原(HAAg)检测采用双抗体夹心 ELISA 法检测试剂,本所自制;甲型肝炎病毒抗体检测采用竞争法 ELISA 检测试剂,本所自制;灭活疫苗病毒解离剂:参照 2005 年版《中国药典》三部附录^[4]配制;试验参比品按国家药品标准(国药标字 S-016 号)进行制备及全面检定,合格后经标定使用。

基金项目:云南省人才基金项目(2002PY11)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:谢忠平,电子信箱:XZP218@126.com

2. 方法: (1) 病毒解裂: 精密量取待检样品 0. 1ml, 加入 0. 1ml 病毒解离剂, 混匀, 于 20 ~ 28℃ 放置 30min。 (2) 甲型肝炎病毒抗原 (HAAg) 检测: 将处理后的参考品和供试品用供试品稀释液进行 2 倍比系列稀释, 取适宜稀释度用甲肝病毒抗原检测试剂进行检测, 每个稀释度做 2 个复孔, 100 微升/孔, 湿盒中 37℃ 湿盒中保温 2h, 用洗板机洗板 4 ~ 5 次; 加酶结物 100 微升/孔, 37℃ 湿盒中保温 1h, 用洗板机洗板 4 ~ 5 次; 加显色液 100 微升/孔, 37℃ 保温避光放置 10min; 加入终止液 50 微升/孔; 酶标仪检测各孔 A 值。 (3) 样品含量与反应值的线性关系分析: 用我所甲肝病毒抗原 ELISA 检测试剂对待检样品进行检测, 对样品稀释度的对数值与相对应 OD 值及 OD 值的对数分别进行直线回归分析, 计算各自的 R^2 值。 (4) 小鼠体内相对效力检测: 将待检疫苗每批多支混合后作 2 倍系列稀释, 取 3 个合适的稀释度接种小鼠, 每个稀释度接种小鼠 10 只, 每只腹腔注射 1. 0ml; 试验同时设效力试验参比品作为对照。 4 周后采血, 分离血清, 用甲型肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒测定小鼠血清的抗 - HAV 抗体, 用 Reed - Muarch 法进行统计分析, 分别计算待检品及参比品的 ED_{50} , 再计算待检品 ED_{50} 与参比品的 ED_{50} 的比值。 (5) 体外相对效力检测方法的建立: 按照量反应双平行线测定法原理^[5~7], 建立 (4, 4) 法体外相对效力检测方法。 首先按病毒解裂方法对待检样品及效力参比品分别进行甲肝病毒抗原检测, 然后以各稀释度实测 OD 值为反应值 (参比品为 S1 ~ S4, 待检品为 T1 ~ T4), 按量反应平行线测定法计算待检样品与参比品的相对效力 (R 值)。 $R = D \times \text{antiLg} \frac{IV}{W}$, 其中: $D = \frac{dS_4}{dT_4}$, $I = \lg 2 = 0. 301$, $V = 1/4$ ($T_1 + T_2 + T_3 + T_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4$), $W = 1/20 [(T_3 - T_2 + S_3 - S_2) + 3(T_4 - T_1 + S_4 - S_1)]$ 。 (6) 双平行线检测方法的可靠性验证: 根据 2005 年版《中国药典》二部附录 X IV “生物检定统计法” 规定^[6] 及 2005 年版《中国药典》二部附录 X IX A “药品质量标准分析方法验证指导原则”^[7], 对所建立的量反应平行线测定法进行可靠性验证, 验证指标为: 回归、偏离平行、二次曲线、反二次曲线 4 项。 要求回归应非常显著 ($P < 0. 01$), 偏离平行、二次曲线、反二次曲线三项均应不显著 ($P > 0. 05$)。 双平行线 (4, 4) 2 个复孔检测法 $f = 8$, $F(1, 8)_{0. 01} = 11. 26$, $F(1, 8)_{0. 05} = 5. 32$, 即当 $F > 11. 26$ 时, $P < 0. 01$, 非常显著; $F < 5. 32$ 时, $P > 0. 05$, 不显著; 满足以上条件时验证通过。

结 果

1. 样品含量与反应值的线性关系评价: 用我所甲肝病毒抗原 ELISA 检测试剂对待检样品进行检测, 对样品稀释度 (1: 8 ~ 1: 1024) 的对数值与相对应 OD 值及 OD 值的对数分别进行直线回归分析, 所有样品均表现出良好的线性回归, 特别是样品含量与 OD 值的对数之间具有高度的相关性, R^2 均在 0. 97 以上, 平均值为 0. 990, 按生物检定的基本原则, 适用于建立双平行线检定方法。

2. 双平行线检测方法的可靠性检验: 对量反应平行线测定法进行可靠性验证, 验证指标为: 回归、偏离平行、二次曲线、反二次曲线。 用所建立的效力试验参比品分别对 3 批灭活疫苗进行检测, 通过对 3 批样品 3 人次检测共 9 个结果的分析, 验证建立方法的可靠性, 结果回归非常显著 ($P < 0. 01$), 偏离平行、二次曲线、反二次曲线各项均不显著 ($P > 0. 05$), 4 个指标全部通过了验证。

3. 体外相对效力检测的重复性: 用所建立的量反应平行线测定法分别对 3 批灭活疫苗进行检测, 其与参比品的相对效力值结果如表 1 所示。 每批样品 3 人次检测共 9 个体外相对效力试验结果的分析, 检测结果稳定、重复性较好 (表 1)。

表 1 甲肝灭活疫苗体外相对效力试验可重复性分析

试验次数	不同批号 R 值		
	301	302	303
1	1. 431	0. 897	0. 859
	0. 995	1. 029	0. 877
	1. 195	1. 063	0. 850
2	1. 245	0. 916	0. 912
	1. 082	0. 894	0. 937
	1. 137	0. 866	0. 928
3	1. 346	1. 028	0. 984
	1. 400	0. 953	0. 887
	1. 122	0. 892	0. 987
平均值	1. 217	0. 949	0. 913
S	0. 150	0. 073	0. 050
CV%	12. 32%	7. 69%	5. 48%
$\bar{x} \pm s$	1. 075 ~ 1. 383	0. 879 ~ 1. 011	0. 849 ~ 0. 965

4. 体外相对效力检测方法的应用: 用所建立的体外相对效力试验检测法对 32 批次甲肝灭活疫苗进行检测, 并与小鼠体内效力试验检测结果进行比较。 结果体外相对效力检测结果与小鼠体内效力检测结果具有良好一致性, 均能反映疫苗相对效力 (图 1), 两种方法检测结果平均 R 值之间无明显差别 ($t = 1. 0354$, $P = 0. 3045 > 0. 05$), 但体内法结果的波动比体外结果大, 结果受试验因素的影响明显 (表 2)。

表 2 体外相对效力试验与体内相对效力试验检测结果比较

检测方法	样品数	相对效力 R 值		最高/最低
		范围	平均值	
体内法	32 批	0. 82 ~ 2. 00	1. 10	2. 44
体外法	32 批	0. 85 ~ 1. 49	1. 01	1. 75

讨 论

使用动物进行疫苗效力评价有许多影响因素, 如动物的种属、窝别、年龄、体重、性别、健康状况、饲养

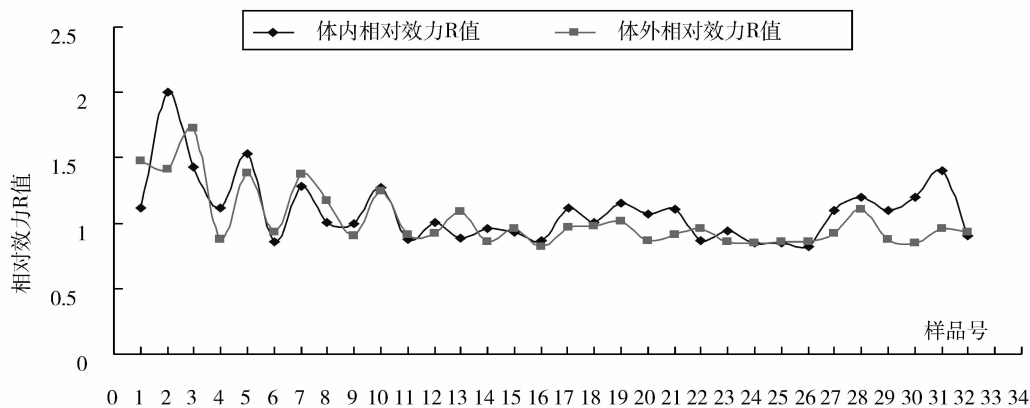


图1 甲肝灭活疫苗体内及体外相对效力R值趋势图

环境及饲料营养等诸多因素都直接影响到检测结果的准确性及可靠性^[8],为此,WHO及国际生物制品标准化协会推荐尽量减少用动物法进行生物制品质量检定^[1],强调在动物实验设计时应当贯彻“4R”方针,即替代(replacement):用体外法替代动物法;减少(reduction):减少动物的使用数目;优化(refinement):将动物主要用于药品特别是生物制品的开发研究;去掉(remove):当可能时在安全实验中可去掉动物实验。MAPREC(Mutant A nalysis by PCR application and rest fiction enzyme cleavage)试验是WHO批准可以代替猴子用于测定脊髓灰质炎病毒毒力逆转实验的体外检测方法的典型代表。当然,由于生物制品的特殊性,所以在开发和测定新的疫苗及对改变的工艺进行认证时,还应当用体内法来测定和验证。

用体外相对效力试验代替动物体内效力试验是一种新趋势,体外相对效力试验是基于生物检定的基本原理面进行的,是比较标准品(S)与待检品(T)使生物系统产生等效反应的剂量来检定药物效价的方法,如果T与S为相同物质,它们仅浓度或含量不同,且S与T的对数剂量与反应呈直线关系,则代表S与T的两条回归直线平行,两条平行线的水平距离即为检品的相对效力lgR。

样品含量与反应值之间呈直线相关是体外相对效力试验方法建立的重要前提,我们研究用双抗体夹心法ELISA检测试剂检测甲肝病毒抗原,其决定系数 R^2 达0.970以上,抗原含量与反应值(OD值)之间具有良好的线性关系,符合建立双平行线生物检定的基本条件。所建立的体外相对效力试验检测法所有结果均通过了可靠性验证、结果稳定、重复性好;检测结果与小鼠体内相对效力试验表现了高度的一致性(图1),这充分证明了体外试验结果与体内实验有效性之间的对应性,保证了体外试验所得的结果对制

品的有效性具有明确的指导意义,此点是非常重要的;此外,体外效力检测结果波动性低于小鼠体内相对效力试验(表2),可控性更好。进行体外相对效力检测时,应尽可能使参比品与待检品的含量相近,特别是使用如本研究的ELISA检测体系进行检测时,由于计算时使用的是相同的稀释度,若初始含量相差较大,同一稀释度中的含量也会有较大的差别,使得其含量不在最佳线性范围内,这样检测结果的可重复性、准确性都会受到影响。

以上的分析表明,所建立的甲型肝炎灭活疫苗体外相对效力试验是一种灵敏、特异、方便、快捷、符合发展趋势的效力测定方法,可应用于甲肝灭活疫苗效力检测,取代现行的动物试验法。该方法的应用,解决了使用动物所带来的影响因素多、重复性差、检定周期长的不利因素,缩短检测时间约30天,间接延长了疫苗的有效期,这对于进一步保证疫苗质量具有重要的现实意义。

参考文献

- 雷殿良. 国际生物制品标准化协会召开体外法代替动物法的研讨会. 中国生物制品学杂志, 1999, 112(1): 63-64
- 中国药典委员会. 中国药典(三部: 凡例). 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 关于印发《预防用疫苗临床前研究技术指导原则》等6个技术指导原则的通知. 国食药监注[2005]493号
- 中国药典委员会. 中国药典(三部: 附录X A). 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录56
- 徐端正. 生物统计在实验和临床药理学中的应用——生物检定. 北京: 科学出版社. 2007: 257-293
- 中国药典委员会. 中国药典(二部: 附录XIV). 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录114-130
- 中国药典委员会. 中国药典(二部: 附录XIX A). 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录172-173
- 严家新, 祝玉桃, 徐葛林, 等. 应采用细胞培养法取代动物试验法检定狂犬病疫苗. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(3): 192-194

(收稿: 2009-09-14)