

新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量检测能力验证

徐康维¹, 郭君贞², 高晓明¹, 鲁旭¹, 权娅茹¹, 项新华¹, 李长贵^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要:目的 开展新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量检测能力验证,对参加实验室检测能力进行评价。方法 对能力验证用新型冠状病毒灭活疫苗样品进行均匀性和稳定性检验,采用冷链运输方式将新型冠状病毒灭活疫苗样品、参考品及检测试剂盒分发至各参加实验室。考察鉴别试验、抗原含量检测和实验室内变异3项指标。结果 能力验证样品的均匀性和稳定性符合要求,共有14家实验室参加本次能力验证并按要求报告结果,各实验室3项指标考核结果均为满意。结论 参加本次能力验证的我国省级药检机构及灭活疫苗生产企业具有较好的新型冠状病毒灭活疫苗检测能力和质控水平。

关键词:新型冠状病毒灭活疫苗;酶联免疫吸附试验;能力验证

doi:10.11669/cpj.2024.06.012 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)06-0555-04

Laboratory Proficiency Testing for Antigen Content of Inactivated COVID-19 Vaccines

XU Kangwei¹, GUO Junzhen², GAO Xiaoming¹, LU Xu¹, QUAN Yaru¹, XIANG Xinhua¹, LI Changgui^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the capacity of laboratories which participate in the proficiency testing of antigen content inactivated COVID-19 vaccines. **METHODS** Samples of inactivated COVID-19 vaccines for proficiency testing were tested for uniformity and stability, and was distributed together with reference and test kits to participating laboratories by cold chain transportation. Three indexes were evaluated; differential test, antigen content detection and laboratory variation. **RESULTS** The uniformity and stability of the proficiency test samples met the requirements. A total of 14 laboratories participated in this proficiency test and reported the results as required, and the assessment results of three indicators by each laboratory all satisfactory. **CONCLUSION** China's provincial drug testing institutions and inactivated vaccine manufacturers participating in this proficiency test have good detection capabilities and quality control levels for inactivated COVID-19 vaccines.

KEY WORDS: inactivated COVID-19 vaccine; ELISA; proficiency testing

接种疫苗是传染病防控最为经济有效的手段,我国具备全部疫苗品种的完善供应体系,目前有46家疫苗生产企业,能够生产超过60种疫苗用以预防34种疾病,年产能超过10亿剂^[1-2]。我国实行生物制品批签发制度对获得上市许可的疫苗通过资料审核、样品检验等方式进行监管,中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)承担了疫苗的批签发检验工作。由于疫苗行业的快速发展,为缩短批签发时间,保证疫苗的供应,我国加快省级药检机构的建设,以增加批签发授权机构,建立以中检院作为核心,省级批签发机构作为支持的批签发网络实验室^[3]。在新型冠状病毒疫情的应对中,新型冠状病毒灭活疫苗在我国接种人数最多,且通过了世界卫生组织(WHO)的认

证并列入紧急使用清单,在全球多个国家和地区广泛应用。2021年中检院对我国多家省级药检机构进行了新型冠状病毒疫苗检验相关培训,并进行了能力考核。北京市药品检验研究院、上海市食品药品检验研究院、湖北药品监督检验研究院等多家省级药检机构通过了国家药品监督管理局考核并获得批签发授权^[2]。为了增加各批签发授权机构的技术交流,提高检测质量水平,中检院开展新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量检测能力验证计划(NIFDC-PT-396)。本能力验证计划是国家药品监督管理局负责的项目,依据能力验证体系文件的要求及人用药品技术要求国际协调理事会(The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for

基金项目:国家科技重大专项资助(2018ZX09738-005,2018ZX09737-003);北京市自然科学基金项目资助(L192009)

作者简介:徐康维,男,博士,副研究员 研究方向:病毒性疫苗的质量控制及相关研究 * **通讯作者:**李长贵,男,研究员 研究方向:病毒性疫苗的质量控制及相关研究 Tel: (010) 53852132

Human Use, ICH)《M10:生物分析方法验证及样品分析》指导原则进行运作实施^[4-8]。

1 材料与方法

1.1 能力验证样品与试剂

能力验证使用的样品、参考品及检验试剂盒(北京科兴中维生物技术有限公司惠赠)。样品一套5支,包含以下样品各1支:编号末尾为A的为高剂量样品;编号末尾为B、C、D的为中剂量样品,其中C、D同为X批次样品,考察实验室内变异;编号末尾为E的为阴性样品(铝佐剂)。各参加实验室分发样品5套,参考品5支和检验试剂盒5个,由中检院委托上海生生物流有限公司冷链运输至各参加实验室。

1.2 检验方法

采用分发的新冠疫苗抗原含量参考品及检测试剂盒,并按照试剂盒说明书采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法对样品进行检测,报告抗原含量与标示量比值。每实验室报告3次样品检测结果和平均结果。参加实验室在收到样品后10个工作日内完成实验,并在能力验证网络平台上提交结果报告。

1.3 均匀性检验

分别从A、B、C、E 4批次样品中随机取样10支,每支样品进行2次抗原含量检测,对同一批次样品的测定结果进行单因子方差分析(F 检验),显著性水平取0.05。如样品之间无显著性差异,则表明样品均匀。

1.4 稳定性检验

将A、B、C/D 3批次阳性样品委托上海生生物流有限公司,从北京以2~8℃冷链运输至济南或沈阳后,返回中检院,将实验室正常保存样品和冷链运输返回后样品均按照新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量检测方法进行测定,正常保存的样品和运输至济南或沈阳后返回的样品各检测3支,每支样品测定2次。对结果进行 t 检验,显著性水平取0.05。如正常保存和运输后样品之间抗原含量无显著性差异,则表明样品稳定。

1.5 统计分析方法及评价原则

按照《能力验证的选择核查与利用指南》(CNAS-GL40)、《能力验证结果的统计处理和评价指南》(CNAS-GL02)和ICH《M10:生物分析方法验证及样品分析》指导原则等文件的要求对参加实验室结果进行评价,评价项目包括以下3项:

1.5.1 鉴别试验 A、B、C/D样品为阳性样品,应可检出新型冠状病毒抗原,E样品为阴性样品,应未检出新型冠状病毒抗原。满足上述条件,结果为“满

意”,任一样品不满足上述条件,结果为“不满意”。

1.5.2 抗原含量检测 A、B、C/D样品选用参加者确定的中位值作为指定值(X),参照ICH《M10:生物分析方法验证与样品分析》指导原则中关于配体结合分析试验要求,以指定值的20%(20% X)作为差值 D 的限度($D = x - X$,其中 x 为参加者结果; X 为指定值)。 $|D| \leq 20\% X$ 结果为“满意”, $|D| > 20\% X$ 结果为“不满意”。所有样品结果均为“满意”判定为“满意”。

1.5.3 实验室内变异 C、D两样品为同一批次样品,计算同一参加单位两样品检测结果的变异系数 $CV(\%)$ 。 $CV(\%) \leq 15$ 结果为“满意”, $15 < CV(\%) \leq 20$ 结果为“可疑”, $CV(\%) > 20$ 结果“不满意”。

1.6 统计学分析软件

使用SPSS 20和Excel 2016软件对结果进行统计分析。

2 结果

2.1 均匀性检验结果

每批次样品随机抽取10支,每支进行两次抗原含量检测。采用单因子方差分析(F 检验)对样品抗原含量的20个结果进行均匀性评价,A批次 $F(2.80) < F_{\text{临界值}}(3.02)$,B批次 $F(1.90) < F_{\text{临界值}}(3.02)$,C/D批次 $F(0.10) < F_{\text{临界值}}(3.02)$,三个批次 P 值均大于0.05,无显著性差异。而E批次样品结果均为“未检出”。上述结果表明样品均匀性满足能力验证的要求。

2.2 稳定性检验结果

对正常保存样品和冷链运输后样品抗原含量进行比较。对于A样品,以2~8℃冷链运输至济南或沈阳后返回中检院样品抗原含量平均为正常保存样品的95.60%和102.87%, P 值分别为0.270和0.362。对于B样品,以2~8℃冷链运输至济南或沈阳后返回中检院样品抗原含量平均为正常保存样品的100.40%和97.62%, P 值分别为0.854和0.194。对于C/D样品,以2~8℃冷链运输至济南或沈阳后返回中检院样品抗原含量平均为正常保存样品的103.72%和102.81%, P 值分别为0.353和0.521。样品在运输前后抗原含量均无显著性差异,表明样品稳定性可以满足能力验证的要求。

2.3 能力验证结果

本次能力验证共有14家实验室参加,包括12家省级药检机构和2家新冠灭活疫苗生产企业。全

部参加验证的实验室均进行了结果反馈。

2.3.1 鉴别试验结果

如表 1 所示,所有实验室 A、B、C/D 样品均检测出新型冠状病毒抗原, E 样品均未检出新型冠状病毒抗原。评价结果均为满意。

表 1 各参加实验室新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量报告结果

实验室 代码	结果(抗原含量与标示量比/%)					(样品 C/D) /%
	样品 A	样品 B	样品 C	样品 D	样品 E	
301	96	99	99	99	未检出	0.00
216	86	88	92	94	未检出	1.52
369	96	99	95	96	未检出	0.74
754	97	105	106	104	未检出	1.35
759	104	107	112	110	未检出	1.27
138	102	101	101	103	未检出	1.39
561	102	108	107	106	未检出	0.66
629	100	102	100	100	未检出	0.00
258	82	95	94	101	未检出	5.08
112	108	112	107	104	未检出	2.01
084	96	104	103	105	未检出	1.36
484	99	100	100	104	未检出	2.77
502	92	102	98	103	未检出	3.52
587	94	99	94	101	未检出	5.08

2.3.2 抗原含量结果

对各实验室报告结果进行汇总分析,样品 A、B 单独分析,样品 C/D 实际为同一批样品,检测结果进行合并分析,汇总计量结果见表 2。样品 A 检测结果频数分布见图 1A,呈单峰,近正态分布。各实验室检测结果均值与中位值均为 97,以中位值 97 作为指定值,差值 D 限度为 19。样品 B 检测结果频数分布见图 1B,呈单峰,近正态分布。各实验室检测结果均值与中位值均为 102,以

中位值 102 作为指定值,差值 D 限度为 20。样品 C/D 检测结果频数分布见图 1C/D,呈单峰,近正态分布。各实验室检测结果均值与中位值均为 101,以中位值 101 作为指定值,差值 D 限度为 20。各实验室评价结果均为满意。

2.3.3 实验室内变异

结果见表 1,各实验室检测 C/D 两样品平均结果间 CV 最大为 5.08%,最小为 0,均小于 15%,评价结果均为满意。

表 2 各参加实验室新型冠状病毒灭活疫苗抗原含量检测结果汇总计量

样品	样本量	均值	中位值(指定值)	差值 D 限度	标准差	CV/%	最小值	最大值
A	14	97	97	19	6.88	7.11	82	108
B	14	102	102	20	5.87	5.78	88	112
C/D	28	101	101	20	5.03	4.97	92	112

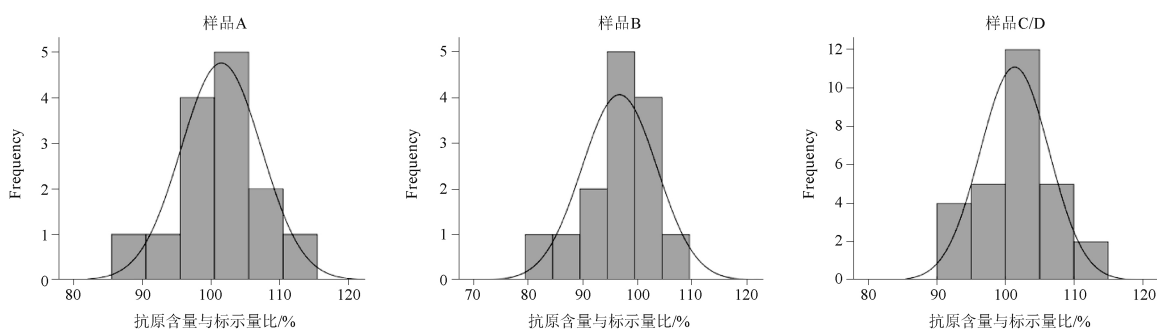


图 1 各参加实验室抗原含量检测结果频数分布图

3 讨论

ELISA 是经典的免疫学检测方法,检测灵敏度

高,特异性好,具有较高的检测通量且无需复杂昂贵的仪器设备,在疫苗的抗原含量检测中广泛应

用^[9-11]。我国多家企业生产的新冠灭活疫苗,也采用 ELISA 方法进行抗原含量的检测^[12-13]。本次能力验证对参加实验室的 ELISA 方法检测能力进行了考核。由于疫苗产品多样且检测方法具有很高的特异性,各种检测方法间的可比性难以评价。为此本次能力验证统一采用的北京科兴中维生物技术有限公司建立的抗原含量检测 ELISA 方法。中检院为各参加实验室提供了参考品、检验试剂盒及作业指导书(方法操作指南),来保证检测方法的一致性。

各个实验室均发放 A、B、C/D、E 5 个批次样品,用以考察鉴别试验、抗原含量和实验室内变异 3 项指标,参加本次能力验证的 12 家省级药检机构和 2 家新冠灭活疫苗生产企业实验室 3 项考核均为满意,表明我国批签发网络实验室质量管理体系的建设工作卓有成效。

同时,此次能力验证也是对该抗原含量检测方法的一次实验室间验证。向每个参加实验室发放的 C、D 两编号样品实际为同一批号样品,考察实验室内精密度,各实验室 CV 最大为 5.08%,最小为 0.3 批样品各实验室间检测结果 CV 分别为 7.11%、5.78%、4.97%。实验室内和实验室间变异均小于 ICH M10 的上限 20%,表明本方法具有良好的精密度。

REFERENCES

[1] LIU Y D, XIANG X H, HUANG W J, *et al.* Results and discussion on national vaccine proficiency testing schemes in 2020 [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2021, 56(13):1099-

1103.

- [2] GAO X M, XIANG X H, CHEN G Q, *et al.* Construction of a quality system of vaccine lot release network laboratory [J]. *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2021, 35(8):908-914.
- [3] XUE J, HUANG Q Q, ZHANG J. Impact of the Newly-revised "Regulations for lot release of biological products" on some inspection processes and countermeasures [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2021, 35(8):871-876.
- [4] CNAS-RL02: 2018, Rules for Proficiency Testing [S]. 2018.
- [5] GB/T 27043-2012/ISO IEC17043: 2010, Conformity assessment: General requirements for proficiency testing [S]. 2010.
- [6] CNAS-GL29: 2011, Reference materials-General and statistical principles for certification[S]. 2011.
- [7] CNAS-GL032: 2018, Guidance on the Selection, Review and Use of Proficiency Testing [S]. 2018.
- [8] ICH HARMONISED GUIDELINE: 2022 Bioanalytical Method Validation And Study Sample Analysis M10 [S]. 2022.
- [9] XU K W, GU Q, SHAO M, *et al.* Development and application of a double antibody sandwich ELISA for detection of neuraminidase contents in 2009 pandemic H1N1 influenza vaccine [J]. *Prog Microbiol Immunol* (微生物学免疫学进展), 2016, 44(6):1-4.
- [10] XU KW, ZHU W H, SONG Y L, *et al.* Development of a detection method for the D antigen content of Sabin strains inactivated poliovirus vaccines [J]. *Prog Microbiol Immunol* (微生物学免疫学进展), 2022, 50(2):17-22.
- [11] AN C Q, LIU D, BIAN L L, *et al.* Development of uniform antigen content detection kit for recombinant SARS-CoV-2 protein vaccines [J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2023, 36(4):411-418.
- [12] DONG Y, ZHAO Y X, ZHUGE X L, *et al.* Analysis of S protein cross-interference in three different corona virus strains [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2022, 31(21):2136-2143.
- [13] SHI J R, SHEN Y L, DENG T, *et al.* Effect of various dissociation buffers and dissociation conditions on dissociation of aluminum adjuvant in inactivated SARS-CoV-2 vaccine [J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2022, 35(11):1287-1292.

(收稿日期:2023-05-04)