

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.04

我国猪用病毒类生物制品质量情况分析和建议

吴华伟,陈晓春,秦义娴,高金源,李俊平,邓永,曹明慧,高月异

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2018-09-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0019-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 对我国猪用病毒类生物制品基本现状及 2008-2017 年猪用病毒类生物制品质量情况进行总结,分析了猪用病毒类生物制品质量存在的问题,提出加强动物源性原辅材料质量控制、完善兽用生物制品标准物质、开展外源病毒检验和支原体检验等关键参数检验新方法研究以及制定全行业通用的标准操作程序等提升猪用病毒类生物制品质量的建议。

[关键词] 猪;病毒类生物制品;质量;分析;建议

Analysis and Suggestions on Quality of Swine Virus Biologics in China

WU Hua-wei, CHEN Xiao-chun, QIN Yi-xian, GAO Jin-yuan, LI Jun-ping,

DENG Yong, CAO Ming-hui, GAO Yue-yi

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: This review summarized the basic status of current swine viral biological products and the quality of swine viral biological products from 2008 to 2017. The problems existing in the quality of swine viral biological products were analyzed. Based on these, suggestions on improving the quality of swine viral biological products were proposed, which include following aspects: improving quality control of animal-derived raw and auxiliary materials, perfecting reference materials of veterinary biological products, conducting studies on development of new methods for detection of key parameters such as exogenous viruses and mycoplasma, formulating and publishing industry-wide standard operating procedures.

Key words: swine; viral biologics; quality; analysis; suggestions

我国作为世界上最大的生猪生产国和消费国,生猪产业体量巨大。据统计^[1-2],我国生猪养殖量约占世界生猪总养殖量的 60%,猪肉消费量约占世界猪肉消费量的 50%,猪肉在中国国内肉类产量和消费量占比均超过 60%,生猪饲养产值接近 1.3 万亿。随着我国生猪养殖规模的日益扩大,猪病发生

率也逐渐上升,呈现老病灭不尽,新病又发生的现状,严重威胁养猪业的健康发展。疫苗接种是预防和控制动物病毒性疾病最经济和最有效的手段,其质量的好坏事关重大动物疫病防控成效和养殖业健康发展,事关动物产品质量安全和公共卫生安全。本文对我国猪用病毒类生物制品现状及

基金项目:国家重点研发计划(2017YFF0208603)

作者简介:吴华伟,副研究员,从事兽用生物制品检验和研究工作。E-mail:wuhuawei@ivdc.org.cn

2008–2017 年猪用病毒类生物制品的质量情况进行总结,分析存在的问题,提出做好猪用病毒类制品质量控制的建议。

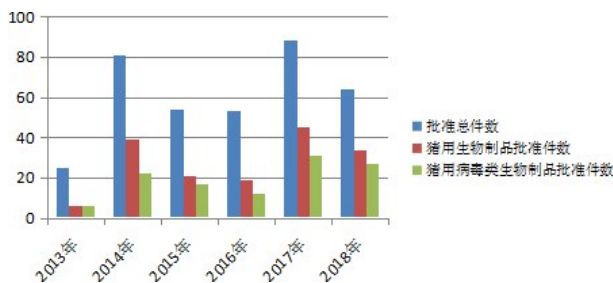
1 我国猪用病毒类生物制品基本现状

1.1 主要种类 目前,我国猪用病毒类生物制品主要有 4 类:(1)疫苗类:包括活疫苗(传统弱毒活疫苗和基因缺失活疫苗)、灭活疫苗(如全病毒灭活疫苗、亚单位疫苗、合成肽疫苗、基因缺失灭活疫苗等)以及细菌和病毒的联苗。(2)抗体类:包括卵黄抗体、高免血清、单克隆抗体类。(3)诊断制品类:抗体检测试剂或试剂盒(如 ELISA 试剂盒、琼脂扩散抗原、HI 抗原、乳胶凝集抗原等)以及抗原或核酸检测试剂或试剂盒(如 ELISA 试剂盒、胶体金试纸条、PCR 或 RT-PCR 试剂盒等)。(4)其他类:促性腺激素释放因子类似物、干扰素、猪脾转移因子等。

1.2 生产和销售情况 据中国兽药协会统计^[3],截至 2017 年年底,猪用生物制品共有有效文号 515 个,实际使用的 391 个,批准文号使用率为 75.92%,其中猪用生物制品产品文号数量较多的产品为猪瘟活疫苗、伪狂犬活疫苗、仔猪副伤寒活疫苗、猪败血性链球菌病活疫苗、仔猪大肠埃希氏菌病三价灭活疫苗和猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗。从销售额看,猪用生物制品销量为 70.46 亿头份/亿毫升,总销售为 52.64 亿元,约占兽用生物制品总销售额的 39.39%;其中猪用强制性免疫疫苗销售额为 12.89 亿元,占有强制性免疫疫苗销售额的 21.96%以及猪用生物制品总销售额的 24.49%,其中猪圆环病毒 2 型灭活疫苗、伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61 株)、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗销售额均超亿元,总销售额约 12.21 亿元。

1.3 临床试验和新兽药审批情况 从临床试验和新兽药审批的情况看,近年来猪用生物制品研究已成为热点。从临床试验批准的数据看(图 1),2013 年至 2017 年 8 月 31 日,农业农村部共批准临床试验 376 个,其中猪用生物制品 164 个,约占已批准临床试验的 43%;批准的猪用生物制品临床试验

中,猪用病毒类生物制品 115 个,约占猪用生物制品批准量的 70%。从新兽药审批的情况看(图 2),2013–2017 年农业农村部共新批准各类兽用生物制品 285 个,其中猪用生物制品为 52 个,约占总批准品种的 18%;批准的猪用生物制品中,猪用病毒类生物制品 33 个,约占猪用生物制品批准量的 64%。



数据来源于中国兽药信息网上国家兽药基础数据库,

2018 年数据截至 8 月 31 日

图 1 2013–2018 年兽用生物制品临床试验批准件数

Fig 1 The number of approved clinical trials of veterinary biologics from 2013 to 2018



数据来源于中国兽药协会网站公布的行业统计数据

图 2 2013–2017 年新批准各类兽用生物制品数量统计

Fig 2 The number of approved new veterinary biologics from 2013 to 2017

2 2008–2017 年我国猪用病毒类生物制品质量情况分析

为了了解我国猪用病毒类制品的质量情况,对 2008–2017 年中国兽医药品监察所(以下简称“中监所”)承担的所有类别(包括注册检验、复核检验和监督检验)的猪用病毒类生物制品检验情况进行了汇总,并对检测出的不合格批次及检验项目进行了统计分析。

2.1 不合格批次及主要不合格项目情况 由图 3、图 4 和图 5 可知,2008–2017 年,猪用病毒类制品共检出不合格产品 96 批,年均不合格批数约为 10 批,不合格项目涉及外源病毒检验、支原体检验、效力(效价)检验、安全检验、敏感性检验、特异性检验、总蛋白含量测定、无菌检验、甲醛含量测定和剩

余水分测定等 10 个参数,其中主要不合格项目集中在纯净性检验(外源病毒检验、支原体检验和无菌检验)、效力(效价)检验和安全检验三个方面,尤其以纯净性检验中的外源病毒检验和支原体检验项目为主要不合格项目。

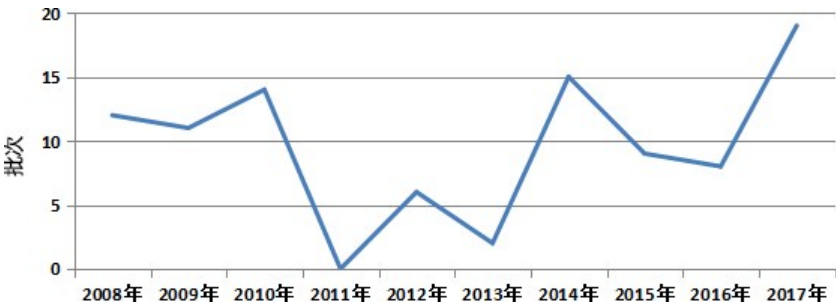


图 3 2008–2017 年猪用病毒类生物制品不合格批次逐年分布

Fig 3 The annual distribution of unqualified swine virus biologics from 2008 to 2017

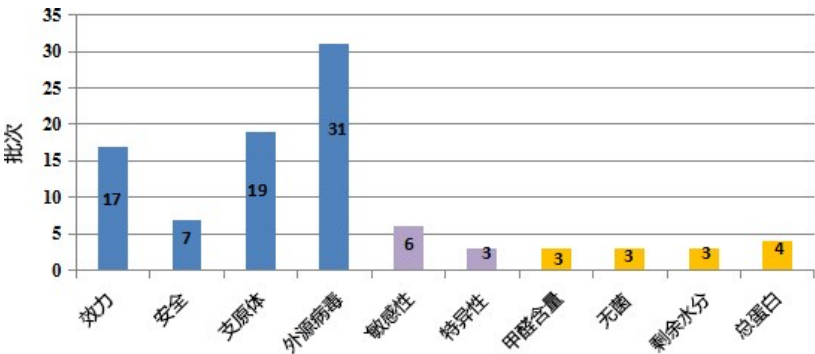


图 4 2008–2017 年各类猪用病毒类生物制品不合格批次汇总情况

Fig 4 The batches of different test parameters for unqualified swine virus biologics from 2008 to 2017

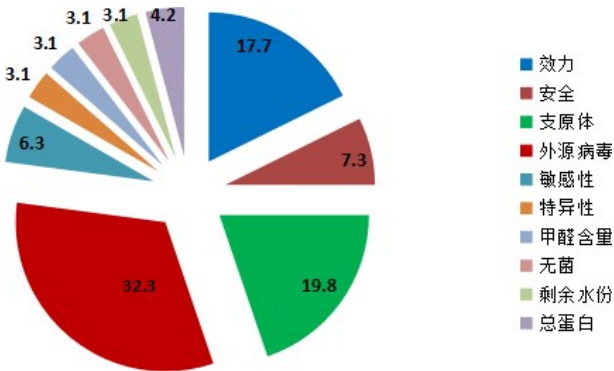


图 5 2008–2017 年各类猪用病毒类生物制品不合格项目占比情况统计

Fig 5 The percentage of different test parameters for unqualified swine virus biologics from 2008 to 2017

从不合格批次排名前 4 位的检验项目看,外源病毒检验 31 批、支原体检验 19 批、效力检验 17 批,安全检验 7 批,分别占有不合格项目的比例为 32.3%、19.8%、17.7% 和 7.3%,4 项合计占有不合格项目的比例为 77%。从该 4 项主要不合格项目逐年分布情况看(图 6),外源病毒检验不合格是目前各类检验最突出问题,其次为效力检验、支

原体检验和安全检验。敏感性检验和特异性检验作为诊断试剂制品的主要质量控制参数,2008—2017 年共检出不合格产品 9 批,约占有不合格项目的 9.4%;而总蛋白含量测定、无菌检验、甲醛含量测定和剩余水分测定等 4 个项目不合格批次基本一致,合计占有不合格项目的比例为 13.5%。

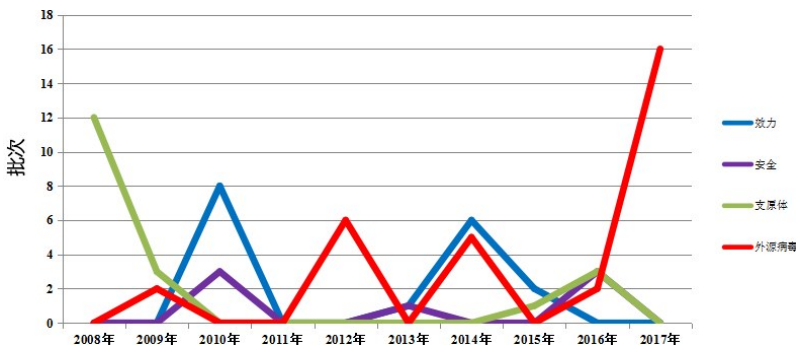


图 6 2008~2017 年猪用病毒类生物制品主要不合格项目逐年分布情况

Fig 6 The annual distribution of major unqualified parameters for unqualified swine virus biologics from 2008 to 2017

2.2 不合格风险较高产品 从不合格批次排名前 4 位的项目对应的具体产品情况看(表 1),各种病毒类活疫苗的外源病毒检验和支原体检验不合格的风险均较高,效力检验不合格产品主要集中在批签发数量较多且市场需要较大的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪圆环病毒 2 型灭活疫苗以及猪流行性腹泻类疫苗,而安全检验不合格产品主要为伪狂犬病活疫苗猪和猪细小病毒病灭活疫苗。

表 1 猪用病毒类生物制品主要不合格项目风险较高产品
Tab 1 The major risk products of unqualified parameters for swine virus biologics

主要不合格项目	不合格风险较高产品
外源病毒检验	伪狂犬病活疫苗、猪伪狂犬病活疫苗、猪瘟活疫苗、高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗等
支原体检验	伪狂犬病活疫苗、猪伪狂犬病活疫苗、高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪乙脑活疫苗等
效力检验	高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪圆环病毒 2 型灭活疫苗、猪瘟活疫苗、猪流行性腹泻类疫苗等
安全检验	伪狂犬病活疫苗、猪细小病毒病灭活疫苗等

2.3 不合格批次在各类检验中逐年分布情况 由图 7 可以看出,2008—2009 年不合格批次主要集中在监督检验方面,2010 年开始注册检验不合格批次一直持续存在且处于较高水平(2012 年、2015 年和 2017 年均为当年不合格主要因素),但从 2014 年开始文号复核试验不合格批次持续存在并与注册检验一并成为不合格批次的主要来源,而监督检验不合格批次逐年减少,呈现较稳定状态。由此可见,目前新制品注册检验和文号复核检验是猪用病毒类生物制品不合格批次的主要来源,提示必须加强新制品及文号复核样品的质量控制。

2.4 各类检验的主要质量风险点 从猪用病毒类生物制品不合格项目在各类检验中的分布情况看(图 8),外源病毒检验和效力检验是各类检验都应密切关注的主要质量风险点,支原体检验、效力检验、无菌检验、剩余水分检验和总蛋白测定(主要为口蹄疫灭活疫苗)是监督检验需重点关注的质量风险点,安全检验、甲醛含量测定以及诊断试剂类的敏感性检验和特异性检验是注册检验的主要质量

风险点。需指出的是,外源病毒检验是猪用病毒类制品各类检验不合格的主要质量风险点,也是近几年各类检验中暴露问题最集中的检验项,必要引起高度重视。

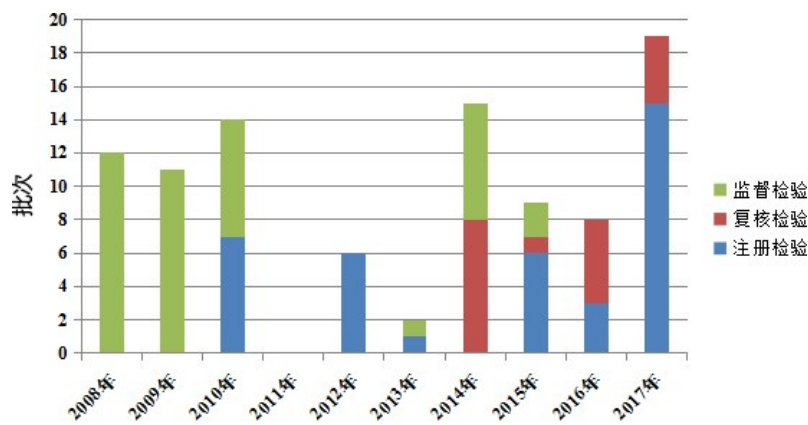


图 7 2008-2017 年猪用病毒类生物制品不合格批次在各类检验中的逐年分布情况

Fig 7 The annual distribution of unqualified items for swine virus biologics in various tests from 2008 to 2017

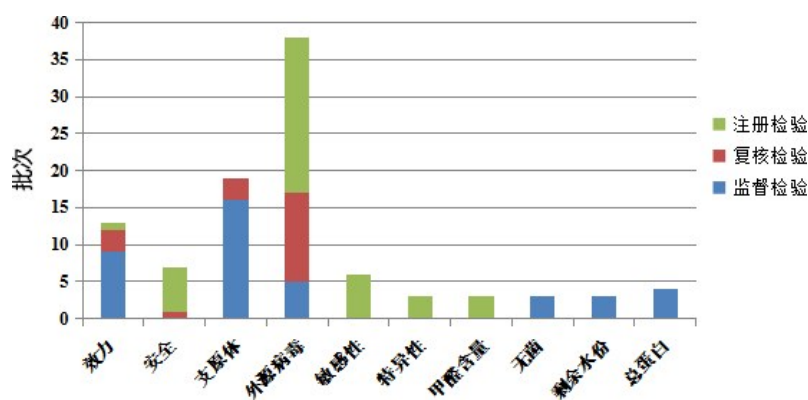


图 8 2008-2017 年猪用病毒类生物制品不合格项目在各类检验中的分布

Fig 8 The batches distribution of unqualified parameters for swine virus biologics in various tests from 2008 to 2017

3 关于做好猪用病毒类制品质量控制的建议

3.1 以动物源性原辅材料质量控制为重点,加强外源病毒检验 血清、胰酶、细胞、含有动物源性成分的培养基等原辅材料是兽用生物制品生产和检验中必不可少的基础物质,也是造成制品外源病原污染的重要来源。如牛血清中经常会污染 BVDV、呼肠孤病毒,猪源胰酶中污染 PCV1、PPV、TGEV 等^[4]。从近 10 年猪用病毒类生物制品检验结果看,外源病毒检验不合格是各类检验中存在的最突出问题,也是近年来检验不合格项目的主要风险点。目前,我国兽用生物制品中常规外源污染(如

BVDV、PPV、RHDV 等)已得到充分重视,但对于原辅材料(如牛血清、胰酶、细胞、哺乳动物细胞用培养基等)的控制尚未引起足够关注,存在较为严重的质量风险隐患。如 2015 版《中国兽药典》仅制定了牛血清、生产用细胞(细胞系)的质量标准,但缺乏使用量较大的胰酶、动物细胞用培养基以及检验用细胞的质量标准,造成相关原辅材料控制无标准可依,或者企业制定的原辅材料内控标准缺乏针对性,无法起到质控目的。需要注意的是,检验用细胞作为外源病毒检验的最重要基质,其质量情况对检验结果也有直接影响。研究表明^[5],不同来源的

相同细胞敏感性差异较大,如适应 PCV2 培养的 PK15 必须经特殊克隆筛选才能适应病毒增殖。因此,采用不同来源的细胞进行外源病毒检验,也可能造成检验结果的差异。但《中国兽药典》(2015 年版)对检验用细胞尚无质量标准,各企业在进行外源病毒检验时采用的细胞差异也较大,细胞的来源也不尽相同,甚至背景不清楚,且多数企业未对检验用细胞按规定进行系统鉴定、代次控制并建立种子批。因此,建议应尽快制定完善胰酶、动物用细胞培养基以及检验用细胞质量标准,并由中监所统一制备并供应外源病毒检验的细胞(如 MDBK、ST、Vero 细胞等),并限定其代次使用范围,以实现全行业检验结果的一致性,为提升兽用生物制品质量提供可靠保障。

3.2 以兽用生物制品标准物质研究为重点,夯实兽用生物制品检验物质基础 兽用生物制品标准物质主要用于兽用生物制品效价、活性和含量等质量检验或对其特性鉴别、检查或技术验证。猪用病毒类生物制品的标准物质主要有生产和检验用标准毒株(如生产用猪瘟兔化弱毒株以及检验用石门系猪瘟强毒株)、抗血清或单克隆抗体、参考疫苗(如 PCV2 参考疫苗)、抗原(如 PPV HI 抗原)以及诊断试剂(如 PPV 荧光抗体)等,其中特异性抗血清效价不高、特异性差是影响猪用病毒类活疫苗外源病毒检验和病毒含量测定(特别是对于多联或多价活疫苗)结果以及造成检验结果不合格的主要因素。与先进国家相比,目前我国提供的非禽源标准抗血清和诊断用试剂种类还比较少,质量参差不齐,且兽用生物制品行业使用的抗血清大都是多克隆抗体,单克隆抗体较少。这些日益成为制约我国兽用生物制品行业持续、健康发展的瓶颈,亟待进一步加大对我国兽用标准物质研制和引进力度,尽快解决困扰兽用生物制品行业的基础性物质短缺问题。建议应进一步加强对新批准兽用生物制品相关标准物质的审查力度,特别是加强对研制单位研制数据的核查机制,新制品审批时坚持制品申报资料与相应标准物质研制资料并重,复核检验时坚持

对制品及相关标准物质同时进行检验,强化制品研制单位将标准物质足量指定保存与农业农村部新兽药证书核发的关联机制,并建立标准物质强制换批要求及换批不及时惩处机制,以确保新制品上市后检验时标准物质的足量、有效供应。同时,建议国家兽药监管部门牵头,整合国内研究和生产单位现有资源,以建立我国兽用生物制品检测用单克隆抗体试剂库为切入点,指定生产单位定点生产,由中监所统一鉴定并对外供应,实现资源和利益共享,并逐步建立和完善其他检测用标准物质的生产-供应新模式^[6],不断夯实兽用生物制品物质基础。

3.3 以检验关键参数新技术和新方法研究为重点,提升兽用生物制品质量检测水平 近年来,各种检验新技术、新方法不断涌现,兽用生物制品检验也理应与与时俱进,兼收并蓄。从 2008-2017 年猪用病毒类生物制品检验不合格项目看,外源病毒检验、支原体检验和效力检验是目前猪用病毒类生物制品的主要质量风险点,可以尝试研究或引进新的检验技术或方法。

一是在外源病毒检验方面,可借鉴 OIE 国际贸易指定试验或各国的农业国家标准推荐的 PCR 方法作为现有检验方法的必要补充,特别是在取代传统方法难以检测或针对新出现的病原的检测(如非洲猪瘟病毒)。目前,我国部分兽用生物制品已经开始使用分子生物学方法(PCR 或 RT-PCR)作为非禽源外源病毒检测的补充方法,如华中农业大学和中牧实业股份有限公司的猪伪狂犬病活疫苗(HB-98 株)采用 PCR 方法检测鄂 A 野毒株污染,青岛易邦生物工程有限公司的猪脾转移因子注射液采用 RT-PCR 检测口蹄疫病毒污染。

二是在支原体检验方面,目前兽用疫苗使用的细胞(细胞系)、生产种毒以及制品支原体污染现象较为严重,而《中国兽药典》(2015 版)对于支原体的检验规定的方法仅有培养法一种方法^[7],该方法检验周期较长,易受抗生素影响,且不能检出所有的支原体污染,亟需增加新的方法进行补充和完善。实验室常用的支原体检验方法除培养法外,还

有 DNA 荧光染色法、PCR 方法、EISA(抗原)检测法、血清学方法、形态学检查(电镜检查)等^[8],其中培养法和 DNA 荧光染色法也是美国 9CFR、欧洲药典和我国药典普遍采用的方法。DNA 荧光染色法具有可以检测所有支原体污染且不受抗生素影响的优点,PCR 方法以其高敏感性、快速等特点被广泛应用于实验室支原体检验的日常控制。三种支原体检验方法的比较见表 2。建议参考美国 9CFR、欧洲药典和我国人药典的相关标准,在目前《中国兽药典》(2015 版)培养法的基础上,增加 DNA 荧光染色法作为法定方法之一,同时鼓励企业在按照《中国兽药典》规定的培养法方法进行支原体检验外,可在内控标准中增加一些快速、通用的检测方法,如 DNA 荧光染色法或 PCR 方法,将支

原体控制的关口前移,防患于未然。

三是在效力检验方面,建议引入质控参考病毒或参考疫苗概念。目前,我国已有猪圆环病毒 2 型灭活疫苗和猪支原体灭活疫苗采用参考疫苗进行效力检验,但在病毒类活疫苗病毒含量测定方面尚未设置质控参考病毒。美国兽用生物制品中心在进行病毒含量测定时,广泛应用质控参考病毒作为内参,用于试验有效性的判定指标^[9-10]。质控参考病毒一般需制备一定数量,其赋值范围为 3~5 人至少 10 次测定结果的平均值 ± 2 个标准差($\bar{x} \pm 2s$)范围内。每次检验时只有质控参考病毒在给定的质控范围内,本次试验结果才有效。该方法可有效提升检验结果的可靠性,减少每次检验时系统误差或人为操作的差异。

表 2 三种支原体检测方法的比较^[11]

比较内容	培养法	DNA 荧光染色法	PCR 法
敏感性	10~1000 CFU/mL	10~1000 CFU/mL	10~180 CFU/mL
特异性	高	中	高
检出时间	7~21 d	5~7 d	1~2 d
检出所有污染类别	不能	能	不能
种别鉴定	不能	不能	能
是否受抗生素影响	是	否	否

3.4 以制定通用的标准操作程序为重点,规范全行业兽用生物制品检测 与国外兽用生物制品发达国家相比,目前我国的兽用生物制品检验尚缺乏全行业通用的标准操作程序,在具体检验过程中,对于一些共性的检测项目(如无菌检验、支原体检验、外源病毒检验等)采用的细胞来源和代次、设备的型号和参数以及操作程序也各不相同,甚至是同一个产品的相同检验参数在不同的企业进行具体检验时检测程序也不尽相同,不利于产品质量的控制及检验结果的横向比较。特别是在目前新建兽用疫苗企业已超过 100 家且有可能继续增加的新形势下,如何尽快提升行业从业人员的检验技术和能力,如何维持好来之不易的兽用生物制品较为稳定的质量形势,是兽药监察系统必须面对和亟待破

解的难题。近年来猪用病毒类生物制品检验结果也印证了此点,不合格产品和批次较多的企业绝大多数为新建企业,其不合格项目涵盖了兽用生物制品检验的各个参数,甚至是无菌检验、支原体检验等常规检验项目。为此,可参照美国兽医服务局规章第 800.93 号的做法,在中监所目前制定的《兽用生物制品检验操作规程》基础上,尽快编制我国兽用生物制品质量检验标准操作规程,发布后印发全行业执行,做到全行业一套标准检验程序,促进兽用生物制品检验工作的标准化、程序化、规范化。同时,可定期组织行业能力比对,及时向社会通报比对结果,并考虑将能力比对结果与行业日常监管结合起来,促进生产企业自觉提高检验能力和水平。

参考文献:

- [1] 2018 年中国生猪养殖行业发展现状及发展趋势分析 [DB/OL]. [2018-09-18]. <http://www.chyxx.com/industry/201801/603323.html>.
China's pig breeding industry development status and development trend analysis in 2018 [DB/OL]. [2018-09-18]. <http://www.chyxx.com/industry/201801/603323.html>.
- [2] 中国生猪养殖数据分析 [DB/OL]. [2018-09-18]. http://www.sohu.com/a/236877678_693802.
Analysis of pig breeding data in China [DB/OL]. [2018-09-18]. http://www.sohu.com/a/236877678_693802.
- [3] 中国兽药协会. 兽药产业发展报告 [R]. 2017.
China Veterinary Drug Association. Veterinary drug industry development report [R]. 2017.
- [4] 夏业才, 陈光华, 丁家波. 兽医生物制品学 (第 2 版) [M]. 中国农业出版社, 2018: 363-369.
Xia Y C, Chen G H, Ding J B. Science of veterinary biologicals (2nd edition) [M]. China Agricultural Press, 2018: 363-369.
- [5] 陈念劬, 王念炜, 李玉峰, 等. 适合猪圆环病毒 2 型敏感复制的 PK15 细胞株的克隆与鉴定 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41 (1): 14-18.
Chen N Q, Wang N W, Li Y F, *et al.* Cloning and identification of PK15 cell lines sensitive to porcine circovirus type 2 [J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41 (1): 14-18.
- [6] 吴华伟, 郎洪武, 陈晓春, 等. 中华人民共和国兽药典. 二〇一〇年版三部非禽源细胞及其制品外源病毒检验解读 [J]. 中国兽药杂志, 2017, 47 (1): 48-52.
Wu H W, Lang H W, Chen X C, *et al.* Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Testing and interpretation of non-avian cells and their products for exogenous viruses [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 47 (1): 48-52.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部二〇一五年版 [S]. 北京: 中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Three volumes of the veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition [S]. Beijing: China Agricultural Press.
- [8] 英 聪, 刘 灿, 宁宜宝, 等. 支原体污染的实验室检测及鉴定方法 [C]. 第四届中国兽药大会—兽医微生物学、兽医生物制品学学术论文集, 2012.
Ying C, Liu C, Ning Y B, *et al.* Laboratory detection and identification methods for mycoplasma contamination [C]. The Fourth China Veterinary Drug Congress - Collected Papers on Veterinary Microbiology and Veterinary Biology, 2012.
- [9] 张万清, 蒋厚生 (译). 美国兽用生物制品质量标准 [S]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.
Zhang W Q, Jiang H S. American standards for quality of veterinary biological products [S]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1995.
- [10] 中国兽医药品监察所 (译). 美国农业部兽医服务局规章 [M]. 2002.
China Veterinary Drug Monitoring Agency. USDA Veterinary Services Bureau Regulation [M]. 2002.
- [11] 谢忠平, 李琦涵, 孙茂盛. 生物制品检定手册—生产及检定用细胞 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 143.
Xie Z P, Li Q H, Sun M S. Biological products verification manual—cells for production and verification [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 143.

(编辑: 李文平)