

Anna Gzyl, Grzegorz Gniadek, Ewa Augustynowicz, Daniel Rabczenko, Barbara Husejnow,
Monika Zawadka, Janusz Ślusarczyk*

**WZROST ZACHOROWAŃ NA KRZTUSIEC
A WYNIKI ANALIZY JAKOŚCI KOMPONENTU KRZTUŚCOWEGO
POLSKIEJ SZCZEPIONKI DTP.
CZEŚĆ II: JEDNORODNOŚĆ BADAŃ I PRODUKCJI**

Zakład Badania Surowic i Szczepionek PZH

Kierownik: Janusz Ślusarczyk,

*Zakład Statystyki Medycznej PZH

Kierownik: Paweł Goryński

Przeprowadzone badania miały na celu identyfikację oraz określenie zakresu wahań jednorodności produkcji oraz badań kontrolnych mocy komponentu krztuścowego serii szczepionek DTP, stosowanych do masowych szczepień w Polsce w latach 1972-2001. Otrzymane wyniki wskazują na wysoką jednorodność produkcji i wyników badań kontrolnych, a co za tym idzie potwierdzają określoną jakość szczepionki DTP produkcji krajowej.

*Słowa kluczowe: krztusiec, test Kendrick, analizy jednorodności, wykresy Shewhart'a
Key words: pertussis, vaccine potency, Kendrick test, consistency analysis, Shewhart's charts*

WSTĘP

Przeprowadzenie analizy jednorodności wyników mocy pełnokomórkowego komponentu krztuścowego (wP-whole-cell pertussis) szczepionki DTwP, stosowanej do masowych szczepień w Polsce, stanowiło kolejny element próby wyjaśnienia, czy za wzrost zachorowań na krztusiec w Polsce odnotowany od 1997 roku może być odpowiedzialne obniżenie się skuteczności szczepionki DTwP. Spadek jakości szczepionki wymieniany jest jako jedna z możliwych przyczyn niespodziewanego wzrostu zachorowań w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia (1-3,7-14), przy czym analizy dotyczące jakości szczepionek DTwP stosowanych w tych krajach są nieliczne (4,15), a analizy jednorodności niedostępne.

Do zwalniania do obrotu poszczególnych serii szczepionek DTwP rutynowo stosowany jest, zalecany przez Światową Organizację Zdrowia (ŚOZ) oraz Farmakopeę Europejską (FE), czynny domózkowy test przeprowadzany na myszach białych (test Kendrick), które-

go wyniki bezpośrednio korelują ze skutecznością ocenianą w badaniach terenowych u ludzi (16,17).

Przeprowadzone badania opisane w części I miały na celu identyfikację oraz określenie zakresu wahań w wartości mocy komponentu krztuścowego serii szczepionek DTwP w zależności od zmian wprowadzanych do technologii produkcji oraz do badań kontrolnych w latach 1972-2001. W badaniach wykazano, że na wartość mocy, pomimo identycznej technologii produkcji przez dwóch krajowych producentów, miały wpływ: pochodzenie serii, skład szczepów produkcyjnych, seria oraz skład preparatów odwoławczych oraz pochodzenie szczepu zwierząt doświadczalnych. Wyższe wartości mocy komponentu krztuścowego otrzymano dla serii DTwP produkowanych począwszy od wczesnych lat 80-tych, czyli po zmianie serii preparatów odwoławczych, szczepów produkcyjnych oraz szczepu zwierząt doświadczalnych stosowanych w testach. Z kolei, analiza średnich wartości mocy dla komponentu wP serii wyprodukowanych w okresach o jednakowych parametrach produkcji oraz testów kontrolnych wykazała widoczny spadek mocy wP serii DTwP w latach 1992-1997, pozostający jednak w zakresie akceptowalnym, powiązany z obniżeniem liczby bakterii wyrażonych w jednostkach gęstości optycznej na pojedynczą dawkę ludzką.

Badania przeprowadzone i opisane poniżej miały na celu określenie jednorodności produkcji oraz jednorodności parametrów kontrolnych testu Kendrick dla poszczególnych serii szczepionki DTwP wyprodukowanych oraz stosowanych do masowych szczepień w Polsce od 1972 roku. Analizy przedstawione w pracy zostały tak dobrane, aby w przyszłości mogłyby być podstawą do zoptymalizowanego nadzoru jakości szczepionki DTwP stosowanej do masowych szczepień.

MATERIAŁ I METODY

Test Kendrick. Celem doświadczenia jest określenie, czy szczepionka DTwP jest zdolna do wywołania ochronnej odpowiedzi immunologicznej, która jest w stanie zabezpieczyć zwierzęta przed czynnym domózgowym zakażeniem *B. pertussis*. Badanie przeprowadza się zgodnie z zaleceniami FE oraz ŚOZ (16-18). Wśród wielu elementów tego testu, które powinny być w sposób jednoznaczny kontrolowane, ważnym elementem jest wymóg odnoszący się do linearności i paralelizmu dawko-zależnej odpowiedzi zwierząt na dawkę szczepionki i/lub dawkę zawiesiny zakażającej. Wartość ED_{50} (ED_{50} – jest to taka ilość szczepionki, wyrażona w jednostkach objętościowych, która chroni 50% myszy przed określoną dawką zakażającą: 100-1000 LD_{50} hodowli *B. pertussis* podanej drogą domózgową) szczepionki referencyjnej powinna znajdować się w zakresie $+2SD/-2SD$ (Standard Deviation) kumulatywnej średniej obliczonej z poprzednio przeprowadzonych badań.

Dane retrospektywne oraz analiza statystyczna. Do badań włączono oznaczenia mocy komponentu krztuścowego 254 serii szczepionki DTwP produkowanej w Polsce w latach 1972-2001, które były dostępne w archiwum Zakładu Badania Surowic i Szczepionek (ZBSS) powołanego do Państwowej Kontroli Biopreparatów. Serie szczepionki zwolnione do obrotu w latach 1973-1988 oraz 1973-2001 zostały wyprodukowane odpowiednio przez Warszawską oraz Krakowską Wytwórnę Surowic i Szczepionek (WWSS i KWSS). W dwóch okresach (1973-1977 oraz 1978-2001) komponenty krztuścowe analizowanych serii szczepionek DTwP produkowano w oparciu o dwa różne zestawy szczepów produkcyjnych (D i E). W przypadku KWSS zmiany dotyczyły objętości

Tabela I. Jednorodnie okresy produkcji oraz kontroli mocy komponentu wP w analizach jakości wyników na wykresach Shewhart'a

Table I. Periods of similar wP production and control used for Shewhart charts construction

Nr okresu	Liczba serii ogółem/K WSS	Okres	Zmienna	Wykresy Shewhart'a			
				KWSS	WWSS	ED ₅₀	(b)
I	36/24	1973-1975	D, Per9, Mysz1, SHD-1 ml	+ (24)	-(12)	+(34)	-
II	25/10	1975-1977	D, Per10, Mysz1, SHD-1 ml	-(10)	-(15)	+(25)	-
III	8/5	1977-1977	D, Per11, Mysz1, SHD-1 ml	-(5)	-(3)	-(15)	-
IV	7/6	1978-1978	E, Per11, Mysz1, SHD-1 ml	-(6)	-(1)		
V	110/76	1978-1988	E, Per11, Mysz2, SHD-1 ml	+(76)	+(34)	+(100)	-
VI	29/28	1988-1992	E, Per12, Mysz2, SHD-1 ml, A1-1	+(28)	-(1)	+(53)	+(63)
VII	37/37	1993-2001	E, Per12, Mysz2, SHD-0,5 ml, A1-2	+ (37)			

Oznaczenia:

Mysz1/2 – pochodzenie szczepu zwierząt eksperymentalnych

A1-1/A1-2 – źródło adiuwantu

pojedynczej dawki ludzkiej (SHD – Single Human Dose) (1.0 ml/0.5 ml) w 1992 roku oraz źródła adiuwantu (produkcji KWSS oraz dostępny komercyjnie) w 1993 roku.

Serie krajowego preparatu odwoławczego Per9, Per10, Per11, oraz Per12 były stosowane do oznaczeń mocy wP odpowiednio w latach 1972-1975, 1975-1977, 1977-1988, oraz 1988-2001. W latach 1972-1978 do testów Kendrick używano zwierząt szczepu Pzh:SfiS pochodzących z hodowli prywatnej, natomiast po 1978 roku myszy tego szczepu pochodziły z hodowli PZH.

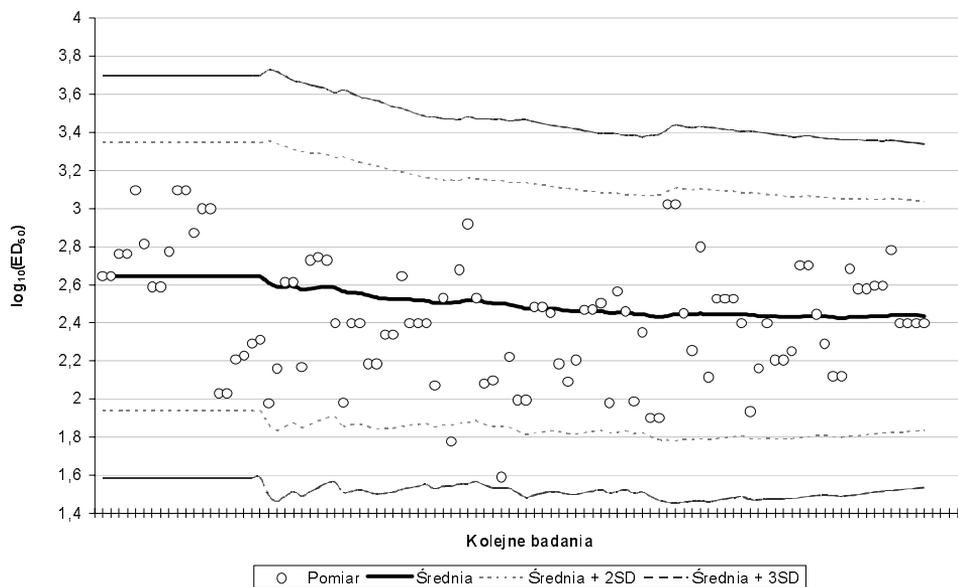
Monitorowanie jednorodności otrzymywanych wyników mocy (jednorodności produkcji komponentu wP) przeprowadzono przy wykorzystaniu kontrolnych wykresów Shewhart'a (19). Na wstępie oceniono, w których okresach jednorodnej produkcji/kontroli dostępne były wyniki co najmniej 20 wartości mocy wP, z których obliczano kumulatywną średnią oraz zakres wartości $\pm 2/3SD$ między $-2/3SD$. Tak jak pokazano w tabeli I, co najmniej 20

wyników pochodzących z tej samej populacji danych (serie wyprodukowane ze szczepów produkcyjnych o identycznym składzie oraz oceniane wobec tej samej serii preparatu odwoławczego) w przypadku KWSS uzyskano w okresach I, V, VI, i VII. W przypadku WWSS, kontrolne wykresy Shewhart'a można było wykonać tylko dla okresu V. Wynik, który znalazł się w zakresie $-2SD/+2SD$ świadczył o jednorodności każdej kolejnej wartości z poprzednimi, natomiast wynik zajmujący pozycję w zakresach $+3SD/+2SD$ oraz $-3SD/3SD$ alarmował o wystąpieniu fluktuacji.

Jednorodność wyników oznaczeń mocy komponentu wP w testach Kendrick przeprowadzonych w ZBSS, oceniono na wykresach Shewhart'a dla wyników wartości $\log_{10} ED_{50}$ oraz nachylenia krzywej wzorcowej (b). Serie szczepionki DTwP poddane analizie zróżnicowano w zależności od serii preparatu odwoławczego oraz szczepu zwierząt eksperymentalnych stosowanych do testu na pięć okresów o jednorodnych populacjach danych (tab. I). W wyznaczonych okresach kontrolne wykresy Shewhart'a wykonano dla wartości $\log_{10} ED_{50}$ testów wykonanych dla serii zwalnianych do obrotu w okresie I, II, V, VI+VII, a dla nachylenia krzywej wzorcowej (b) w okresie VI+VII.

WYNIKI

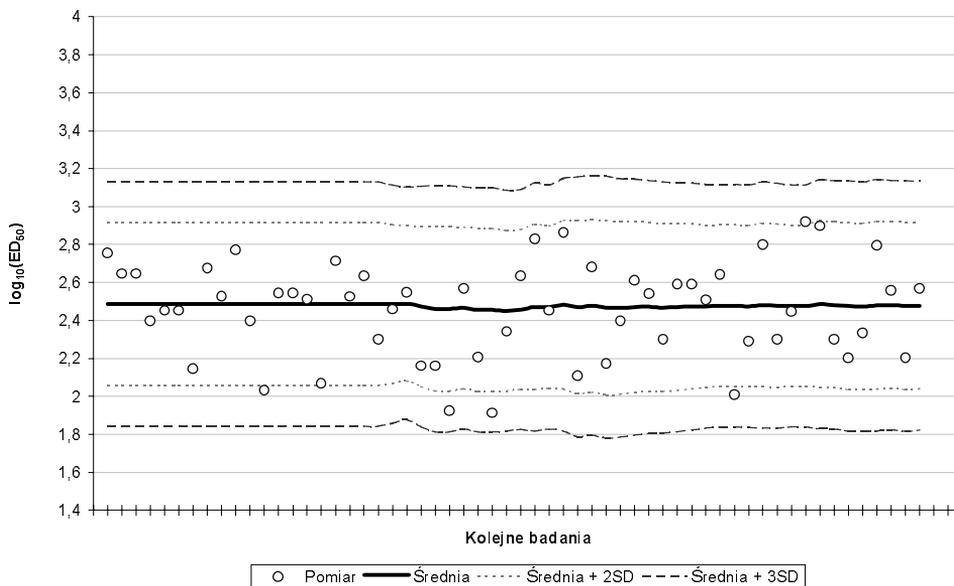
Kontrolne wykresy Shewhart'a dla $\log_{10} ED_{50}$ oraz wartości b (Per) testu Kendrick świadczą o jednorodności wykonywanych badań. Wśród czterech okresów, które ze względu na liczbę reprezentatywnych danych ED_{50} mogły być porównywane, jedynie 2 i 4 wyniki z okresów V i VI+VII znajdowały się w obszarze pomiędzy $-2SD/-3SD$, i żaden z wyników



Ryc. 1. Wykres Shewhart'a dla wartości $\log ED_{50}$ otrzymanych w testach Kendrick wykonanych dla serii szczepionek DTwP wyprodukowanych w latach 1978-1988

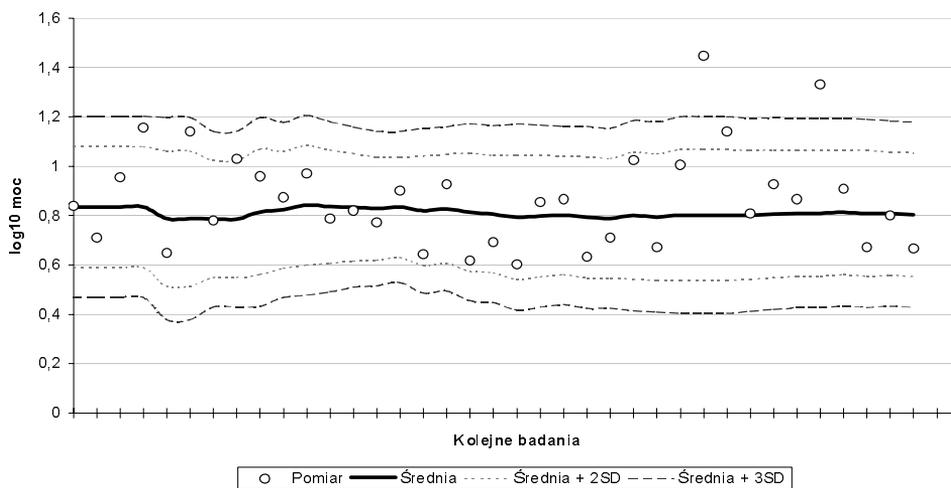
Fig. 1. Shewhart chart for $\log ED_{50}$ values in Kendrick tests performed on DTwP vaccine lots produced within 1978-1988

nie znalazł się w obszarze $+2SD/+3SD$ (ryc. 1 i 2). Wykres Shewhart'a dla nachylenia krzywej wzorcowej (b) dla okresu V zawierał tylko 2 wyniki w obszarze $-2SD/-3SD$ i 3 wyniki w obszarze $+2SD/+3SD$.



Ryc. 2. Wykres Shewhart'a dla wartości $\log ED_{50}$ otrzymanych w testach Kendrick wykonanych dla serii szczepionek DTwP wyprodukowanych w latach 1988-2001

Fig. 2. Shewhart chart for $\log ED_{50}$ values in Kendrick tests performed on DTwP vaccine lots produced within 1988-2001



Ryc. 3. Wykres Shewharfa dla wartości mocy komponentu krztuścowego poszczególnych serii DTwP otrzymanych w testach Kendrick wyprodukowanych przez KWSS w latach 1992-2001

Fig. 3. Shewhart chart for wP potency of DTwP vaccine lots produced within 1978-1988

Wartości \log_{10} mocy wP serii szczepionek DTwP KWSS wyprodukowanych w okresach I, V, VI, i VII wykazywały również jednorodność. Z wyjątkiem okresu V (dziewięć wyników) i VI (jeden wynik) nie odnotowano wartości w zakresie $-2SD/-3SD$. Porównując wykres Shewhart'a dla okresu V (1978-1988) z wykresami sporządzonymi dla innych okresów, większość wyników zlokalizowanych było poniżej wartości średniej kumulowanej. Wykres Shewhart'a dla wartości mocy otrzymanych dla serii WWSS, wykonany w okresie V, wskazuje na wysoką jednorodność wyników. Ze względu na fakt, że granice akceptowalnych wartości mocy wP dotyczą tylko dolnej wartości, pojawienie się wyniku w obszarze powyżej $+2SD$ oraz $+3SD$ może świadczyć jedynie o losowej niejednorodności (ryc. 3).

DYSKUSJA

Podstawowym testem pomiaru aktywności biologicznej komponentu krztuścowego jest test Kendrick, czyli domózgowy test czynny przeprowadzany na myszach białych. Z racji, że jego wyniki bezpośrednio korelują ze skutecznością szczepionek DTwP oznaczanych w kontrolowanych badaniach terenowych, test Kendrick jest rutynowym badaniem zalecanym z ramienia ŚOZ i FE, służącym do zwalniania poszczególnych serii do obrotu. Jego wartość oprócz przewidywania skuteczności poszczególnych serii szczepionek DTwP przeciw zachorowaniom na krztusiec, dotyczy również identyfikowania szczepionek o nieodpowiedniej jakości oraz do pomiaru jednorodności produkcji (17,20). Przy profesjonalnym utrzymywaniu warunków testu, otrzymywane wartości mocy mogą odzwierciedlać nawet minimalne wahania i zakłócenia zachodzące podczas produkcji, nawet, jeśli proces produkcji został zakwalifikowany jako wysoce jednorodny (18,21,22). Pomimo, że producenci są obligatoryjnie zobowiązani do utrzymywania wysokiej jakości oraz jednorodności produktu, poszczególne serie szczepionki DTwP mogą w rzeczywistości wykazywać różnice w zakresie akceptowalnych wymagań (23). Te niewielkie różnice mogą zostać rozpoznane poprzez monitorowanie jednorodności poziomu odpowiedzi testu mocy, porównania nachylenia krzywej preparatu odwoławczego w obrębie jej liniowej części oraz odpowiedzi mierzonej za pomocą paralelizmu krzywej, otrzymywanej dla szczepionki badanej oraz odwoławczej (24).

W pracy do analizy wykorzystano wszystkie zarchiwizowane w ZBSS wyniki testów Kendrick dla komponentu krztuścowego poszczególnych serii szczepionki DTwP wykonane w latach 1972-2001. Przeprowadzona wcześniej analiza dowiodła, że na wartości mocy wP wyprodukowanych serii szczepionki DTwP wpływały wszystkie czynniki analizowane jako zmienne, zarówno u producenta oraz w badaniach kontrolnych, z wyjątkiem zmian w objętości pojedynczej dawki ludzkiej oraz źródła adiuwantu. Jednak realność wpływu wykrytych fluktuacji na obniżoną skuteczność serii preparatu wyprodukowanych w określonym czasie, choć możliwa, jest raczej znikoma, ze względu na fakt, że minimalne wymagania mocy preparatu zostały zachowane. Przedstawione wyniki w obecnej pracy potwierdzają to założenie, gdyż wykresy Shewhart'a świadczą o zadowalającej jednorodności produktu pomimo poważnych zmian wprowadzonych do produkcji oraz kontroli wP. Analizy na wykresach Shewhart'a stanowią obecnie element rutynowej kontroli wP stosowanej prospektywnie. Retrospektywna analiza stanowiła oprócz próby określenia jednorodności produkcji oraz badań kontrolnych element retrospektywnej oceny metody Kendrick. Odnotowanie trzech kolejnych wyników poza wartością $+2SD$ lub $-2SD$ średniej

kumulatywnej wskazywać może na potrzebę przeprowadzenia dodatkowej kontroli procesu technologicznego produkcji w celu wykazania źródła niejednorodności oraz usunięcia fluktuacji.

A Gzyl, G Gniadek, E Augustynowicz, D Rabczenko, B Husejnow, M Zawadka, J Ślusarczyk

PERTUSSIS INCIDENCE INCREASE AND QUALITY OF WHOLE-CELL PERTUSSIS
COMPONENT OF THE DTP VACCINE PRODUCED IN POLAND
PART II. CONSISTENCY OF CONTROL AND PRODUCTION

SUMMARY

This study aimed to identify and to evaluate the level of potency fluctuations of the pertussis component of Polish-produced DTP vaccine lots produced within 1972-2001 due to the changes having occurred in production and potency testing procedures. Obtained results showed high consistency of the production and control tests confirming relevant quality of country-produced DTP vaccine.

PIŚMIENICTWO

1. Gangarosa EJ, Gałazka AM, Wolfe CR, i in. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet* 1998;351:356-61.
2. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, i in. Variation in The *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical Isolates in Finland. *Infect Immun* 1999;67: 3133-4.
3. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, i in. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine driven evolution. *Infect Immun* 1998;2:670-5.
4. De Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, I in. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000;6:348-57.
5. Andrews R, Herceq A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia. *Commun Dis Intel* 1997;21: 145-8.
6. Bass JW, Wittler RR. Return of epidemic pertussis in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:343-5.
7. Boursaux-Eude C, Thiberge S, Caeletti G, i in. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 1999;17:2651-60.
8. Cassidy P, Sanden G, Heuvelman K, i in. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 2000;182:1402-8.
9. Edwards KM. Acellular pertussis vaccines: a solution to the pertussis problem? *J Infect Dis* 1993; 168:15-20.
10. Fry NK, Neal S, Harrison TG, i in. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun* 2001;69:5520-8.
11. Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, i in. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine* 2000; 20:299-303.

12. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, i in. Antigenic Variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999;145:2069-75.
13. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, i in. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:174-81.
14. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, i in. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol* 2001;39:4397-403.
15. Njamkepo E, Rimlinger F, Thiberge S, i in. Thirty-five years' experience with the whole-cell pertussis vaccine in France: vaccine strains analysis and immunogenicity. *Vaccine* 2002;20: 1290-4.
16. European Pharmacopoeia, 3rd ed. 1997;p.116.,1305-06
17. Kendrick PL, Eldering G, Dixon MK, i in. Mouse protection test in the study of pertussis vaccine: a comparative series using intracerebral route of challenge. *Am J Public Health* 1947;37:803-10.
18. World Health Organization. Requirements for diphtheria, tetanus, and pertussis and combined vaccines. Technical Report Series no. 800,1990. p.87-168.
19. Shewhart WA. Economic Control of Quality of Manufactures Product/50th Anniversary Commemorative Issue. American Society for Quality, 1980.
20. Medical Research Council. Vaccination against whooping cough. Relation between protection in children and results of laboratory tests. *Brit Med J* 1956;2:454-62.
21. Dellepiane N, Griffiths E, Milstein JB. New challenges in assuring vaccine quality. *Bull World Health Organ.* 2000;78:155-60.
22. World Health Organization. Informal consultation on the control of pertussis with whole cell and acellular vaccines. Geneva: WHO/V&B/99.03.
23. Milstein JB, Gellin BG, Kane M, i in. Global DTP manufacturing capacity and capability. Status report: January 1995. *Vaccine* 1996;14:313-20.
24. World Health Organization. WHO guide to good manufacturing practice GMP requirements. Part 2. Validation. Geneva: WHO/VSQ/97.02.

Otrzymano: 18.05.2004

Adres autorów:

Anna Gzyl
Zakład Badania Surowic i Szczepionek
Państwowy Zakład Higieny,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa