

Ewa Augustynowicz, Anna Lutyńska

WYKRYWANIE ZANIECZYSZCZEŃ CZYNNIKAMI ZEWNĄTRZPOCHODNYMI W OCENIE BEZPIECZEŃSTWA SZCZEPIONEK

DETECTION OF THE ADVENTITIOUS AGENTS IN THE EVALUATION OF VACCINE SAFETY

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego
Zakładu Higieny w Warszawie

STRESZCZENIE

W pracy omówiono obowiązujące zalecenia Farmakopei Europejskiej i Europejskiej Agencji Leków dotyczące ograniczania zanieczyszczeń czynnikami zewnątrzpochoďnymi tj. wirusami pochodzącymi z materiałów biologicznych, stosowanych w procesie wytwarzania szczepionek. Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami, w celu potwierdzenia nieobecności w szczepionkach wirusowych potencjalnych zanieczyszczeń wykorzystywane są badania obecności wirusów metodami *in vivo* oraz *in vitro*, PCR oraz z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Zakres obowiązujących badań bezpieczeństwa szczepionek zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, może jednak nie być wystarczający we wszystkich przypadkach. Poprawę możliwości wykrywania potencjalnych czynników zewnątrzpochoďnych, zwłaszcza wirusowych można uzyskać przez zastosowanie nowoczesnych i zwalidowanych metod badawczych, takich jak analizy metagenomu szczepionek, sekwencjonowanie nowej generacji, analizy na mikrośnikach DNA, PCR w czasie rzeczywistym i masowej spektrometrii elektronowej. Dotychczas zastosowanie nowoczesnych narzędzi badawczych tj. sekwencjonowanie DNA umożliwiło wykrycie nieoczekiwanej obecności cirkowirusów PCV 1 i PCV 2 w szczepionkach przeciw rotawirusom. Rutynowe wprowadzenie rozszerzonych badań bezpieczeństwa szczepionek przez wykrywanie potencjalnych i wcześniej niewykrywanych zanieczyszczeń wirusowych zależeć będzie w najbliższym czasie od decyzji instytucji do tego celu upoważnionych.

SŁOWA KLUCZOWE: *szczepionka, bezpieczeństwo, czynniki zewnątrzpochoďne, cirkowirus PCV1, PCV2*

ABSTRACT

In the study current recommendations of the European Pharmacopeia and European Medicines Agency on vaccine safety evaluation in respect to adventitious contaminating agents, eg, viral originating from biological substances used for vaccine manufacturing were presented and discussed. According current recommendations, adventitious contaminating agents testing include viral identification by *in vivo* and *in vitro* infectivity, PCR, and electron transmission microscopy. The scope of safety tests might be however not sufficient in some cases. Improvement of adventitious testing, mostly viral, might be achieved by application of newly developed and validated analyses of vaccine metagenome, and/or introduction of next generation sequencing methods, DNA microarrays, real-time PCR or mass-spectrometry. Currently, the new generation tools were found useful in the practical detection of PCV1 and PCV2 circoviruses specific DNA sequences in the content of rotaviruses vaccines. Routine application of the widen safety measures for adventitious content agents testing will rely on their approval by competent authorities.

KEY WORDS: *vaccine, safety, adventitious agents, circovirus PCV1, PCV2*

WSTĘP

O bezpieczeństwie stosowanych szczepionek decydują m. in. badania prowadzone już w trakcie produkcji, tzn. kontrola na różnych etapach wytwarzania, zwalnianie serii do stosowania po sprawdzeniu zgodności z wymogami przez wytwórców i instytucje do tego celu upoważnione i wreszcie monitorowanie bezpieczeństwa po wprowadzeniu do obrotu (1). Badania bezpieczeństwa szczepionek wirusowych obejmują m.in. ocenę obecności tzw. czynników zewnątrzpochoźnych, czyli potencjalnych zanieczyszczeń drobnoustrojami, które z różnych względów nie zostały skutecznie wyeliminowane z materiałów pochodzenia biologicznego, stosowanych w procesie wytwarzania lub które pochodzą z przypadkowych zanieczyszczeń w przebiegu tego procesu (2, 3). Źródłem mikrobiologicznych zanieczyszczeń szczepionek związanych ze stosowaniem materiałów pochodzenia biologicznego mogą być szczepy szczepionkowe wirusów, których serie siewne zostały przygotowane w liniach komórek, względnie linie komórek lub materiały stosowane jako składniki podłoża hodowlanych np. surowica bydłęca, świńska lub trypsina. Zakres prowadzonych badań czynników zewnątrzpochoźnych w tym przypadku obejmuje pochodzenie stosowanych w procesie wytwarzania linii komórek, a w przypadku szczepionek weterynaryjnych dodatkowo gatunek zwierzęcia, dla którego przeznaczona jest szczepionka (4). Wybór metod i zakresu badań czynników zewnątrzpochoźnych w obecnie stosowanych szczepionkach jest ściśle związany z aktualną wiedzą o poznanych, a wcześniej niezidentyfikowanych drobnoustrojach, które mogą być potencjalnie zakaźne dla linii komórek stosowanych w procesie wytwarzania szczepionki. Na zakres tych badań wpływają także zmiany dokonywane w procesie wytwarzania szczepionek, takie jak np. wprowadzenie do namnażania wirusa grypy ciągłych linii komórek pochodzących od ssaków, tj. linii komórek nerki psa MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) oraz linii Vero, nerki afrykańskiej małpy zielonej, zamiast załęzonych jaj kur. Podobnie, w przypadkach nowo opracowywanych szczepionek, do wytwarzania których używane są wcześniej niestosowane powszechnie linie komórek np. ssaków lub owadów, zakres tych badań musi być odpowiednio szeroki oraz zgodny z aktualnym stanem wiedzy (5).

Przy omawianiu roli potencjalnych zanieczyszczeń wirusowych w aspekcie bezpieczeństwa szczepionek należy nadmienić, że do potencjalnych niewirusowych zanieczyszczeń zalicza się grzyby i bakterie, w tym mykoplazmy, spiroplazmy, prątki, riketsje, a nawet przedstawiciele pierwotniaków i innych pasożytów. Do zanieczyszczeń zalicza się także białka prionowe

powodujące pasażowalne encefalopatie gąbczaste TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*) (2, 6, 7). Procesy wytwarzania szczepionek są na obecnym etapie na tyle zoptymalizowane, że w/w czynniki nie stanowią zasadniczego problemu, ponieważ ich obecność jest skutecznie eliminowana na odpowiednich etapach procesu wytwarzania, co znajduje potwierdzenie na wielu etapach kontroli jakości (2).

Wobec różnorodności drobnoustrojów potencjalnie nadkaźających szczepionki oraz postępu wiedzy na temat występowania wielu nieznanych jeszcze wirusów, które mogą stanowić potencjalne ich zanieczyszczenie, trudno jest jednoznacznie zdefiniować wystarczający zakres badań, który zapewniłby bezpieczeństwo substancji biologicznych zastosowanych do wytwarzania szczepionek. Z szacowanej liczby 150 000 istniejących wirusów, jak dotąd zidentyfikowano jedynie ok. 2300 i liczby te mogą ulegać zmianie (8). Z tych względów analiza bezpieczeństwa szczepionek pod względem potwierdzenia braku obecności czynników zewnątrzpochoźnych czy zanieczyszczeń biologicznych praktycznie uwzględnia oznaczenie jedynie potencjalnego ryzyka. Tak więc zakres badań powinien być na bieżąco modyfikowany zgodnie z aktualnym stanem wiedzy na temat tzw. nowo zidentyfikowanych wirusów lub czynników potencjalnie zakaźających (8, 9).

Zanieczyszczeniem wirusowym potencjalnie stanowiącym czynnik zewnątrzpochoźny mogą być: cząstki wirusów, białek lub materiału genetycznego innego niż wirus szczepionkowy. Z tych względów wirusowe czynniki zewnątrzpochoźne zostały podzielone na trzy kategorie;

- „known known” – znane wirusy, których obecności możemy oczekiwać w określonym materiale biologicznym, jak np. wirus wirusowej biegunki bydłęcej BVDV (*Bovine Viral Diarrhea Virus*), który potencjalnie może być obecny w surowicy uzyskanej od bydła pochodzącego z obszarów endemicznych,
- „known unknown” – nieznanne wirusy, które można wykryć metodami konwencjonalnymi,
- „unknown unknown”- nowo wykryte wirusy, których nie można wykryć konwencjonalnymi metodami badawczymi, np. opisany ostatnio bydłęcy wirus polyoma i wirus Torque Teno (10, 11).

Skutki zanieczyszczeń czynnikami zewnątrzpochoźnymi w szczepionkach mogą być uzależnione od patogenności czynnika zakaźnego, wielkości samego zanieczyszczenia (np. miana wirusa stanowiącego czynnik zewnątrzpochoźny) lub stopnia jego inaktywacji. U ludzi lub zwierząt zaszczepionych szczepionką zanieczyszczoną wirusowym czynnikiem zewnątrzpochoźnym może dojść do zakażenia bezobjawowego lub zakażenia z różnie nasilonymi objawami (2, 3).

RYS HISTORYCZNY BADAŃ NAD ZEWNĄTRZPOCHODNYMI CZYNNIKAMI ZANIECZYSZCZEŃ

Badania oceny bezpieczeństwa szczepionek pod względem zanieczyszczeń wirusami rozpoczęto wraz z wprowadzeniem linii komórek stosowanych do namnażania wirusów w procesach wytwarzania szczepionek. Już w latach 50-tych zidentyfikowano wirusy, które mogły zakażać niektóre linie komórek, jak np. wirus „foamy virus” (*Spumaretrovirinae*) powodujący niszczenie zastosowanych pierwotnych linii komórek nerki małpy, czy też kaliciwirus, który niszczył linie komórek nerki chomika CHO (*Chinese Hamster Ovary*) (2, 12).

Jedno z pierwszych doniesień o negatywnym wpływie zanieczyszczeń czynnikami zewnętrznymi szczepionek na zdrowie osób dotyczyło zanieczyszczenia wirusem zapalenia wątroby typu B szczepionki przeciw żółtej gorączce, podawanej w 1942 r. żołnierzom amerykańskim (12). Nie tak groźne konsekwencje miało zastosowanie szczepionki przeciw żółtej gorączce, przygotowanej z użyciem zarodków kurzych, zakażonych cząstkami wirusa białaczek ptasich ALV (*Avian Leucosis Virus*) i endogennym wirusem ptasim AEV (*Avian Endogenous Virus*). Badania osób zaszczepionych tą szczepionką nie potwierdziły serokonwersji wobec wirusów zanieczyszczających ani ich patogenności dla człowieka (12).

Pierwsze komercyjnie dostępne i stosowane w latach 50-tych szczepionki przeciw poliomyelitis przygotowane w pierwotnych liniach komórek pochodzących od nerki małpy *Rhesus*, były zakażone wirusem małpy SV40 (*Simian Virus 40*). Fakt ten opisano dopiero w 1959 r., po tym jak analizy jakościowe serii szczepionek przeciw poliomyelitis wyprodukowanych w latach 1954-1963 potwierdziły obecność tego zanieczyszczenia. Ocenia się, że w tym okresie w Stanach Zjednoczonych szczepionki potencjalnie zanieczyszczone wirusem SV40 podano ponad 100 mln osób. Mimo, że do dzisiaj nie potwierdzono onkogennych właściwości wirusa SV40 u ludzi (12, 13), w 1961 r. do zakresu obowiązkowych badań bezpieczeństwa każdej serii szczepionki przeciw poliomyelitis wprowadzono badanie jego obecności w linii komórek stosowanej do namnażania wirusów polio. Ze względu na wysokie ryzyko występowania nadkażeń pierwotnych linii komórek nerki małpy *Rhesus* wirusem SV40 oraz innymi wirusami małpimi, w 1963 r. do namnażania wirusów polio w procesie wytwarzania szczepionek wprowadzono pierwotną linię komórek nerki małpy *Cercopithecus*, wolną od wirusa SV40. Obecnie szczepionki produkowane z użyciem w/w linii komórek małpy są obligatoryjnie poddawane rozszerzonym wówczas badaniom kontroli. Potencjalne ryzyko zanieczyszczenia

związane z materiałem siewnym lub linią komórek zostało także ograniczone przez wprowadzenie do procesu wytwarzania zwalidowanego systemu serii siewnych oraz banków komórek (7, 14).

AKTUALNE WYMAGANIA DOTYCZĄCE KONTROLI CZYNNIKÓW ZEWNĄTRZPOCHODNYCH

Stwierdzenie zanieczyszczeń w różnych szczepionkach spowodowało, że zespoły naukowe wytwórców oraz instytucji upoważnionych do kontroli opracowały szczegółowe wymagania rozszerzonej oceny bezpieczeństwa szczepionek, które uwzględniały również prawdopodobne zanieczyszczenia czynnikami wirusowymi. Podstawą obowiązujących regulacji dotyczących bezpieczeństwa produktów leczniczych stosowanych u ludzi i zwierząt, jest stosowanie w procesie wytwarzania szczepionek zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania GMP (*Good Manufacture Practice*). Wymagania Farmakopei Europejskiej oraz zalecenia Europejskiej Agencji Leków EMA (*European Medical Agency*) określają niezbędny zakres badań wykonywanych w ramach oceny jakości produktów leczniczych immunologicznych, w tym badań czynników zewnętrznopochodnych na wszystkich etapach wytwarzania, ze szczególnym naciskiem na etapy badania materiałów wyjściowych, linii komórek oraz serii siewnych (7, 14).

Zgodnie z aktualnymi wymaganiami, substraty pochodzenia zwierzęcego używane w procesie wytwarzania szczepionek, takie jak np. linie komórek diploidalnych i ciągłych, muszą być wolne od zewnętrznopochodnych czynników zakaźnych. Badania obecności tych czynników powinny być wykonywane już na etapach procesu wytwarzania produktów pośrednich szczepionki, tj. serii siewnej wirusa i zbioru wirusa, oraz macierzystego lub roboczych banków komórek, włącznie z etapami badania komórek osiagających maksymalny lub wyższy poziom podwajania swojej liczby (15).

Badania prowadzone rutynowo obejmują wykluczenie obecności bakterii, grzybów, mykoplazm, spiroplazm (w liniach komórek owadów dodatkowo z użyciem mikroskopii elektronowej), badania czynników zewnętrznopochodnych w hodowlach komórek metodą współhodowli, z użyciem zwierząt, oraz swoiste badania możliwości zanieczyszczeń zależnych od pochodzenia komórek i badania w kierunku retrowirusów zdolnych do replikacji (7). Kurczęta, zarodki i hodowle komórek używane do produkcji lub kontroli jakości szczepionek muszą pochodzić z jaj od kur wolnych od określonych patogenów SPF (*Specific Pathogen Free*).

Dodatkowe zalecenia dotyczą konieczności wykonywania badań dla najczęściej stosowanych materiałów

wyjściowych np. surowicy bydłowej lub trypsiny (16). Z kolei w liniach komórek pochodzących od owadów powinny być wykonywane badania w kierunku obecności wirusów swoistych dla gatunku owada, z którego pochodzi linia komórek oraz w kierunku obecności arbowirusów (5).

Wymagania Europejskiej Agencji Leków w zakresie listy czynników zewnątrzpochodnych, których wykrywanie na aktualnym etapie wiedzy uznano za konieczne, są uzupełniane wraz z rozwojem technologii oraz odkrywaniem nowych wirusów (5). Obecnie konsultowana jest konieczność zalecenia badań obecności 69 wirusów bydłowych (przedstawiciele 21 rodzin) i 52 wirusów świńskich (przedstawiciele 17 rodzin), w szczepionkach stosowanych u ludzi, ze względu na możliwość ich namnażania się w organizmie człowieka. W/w wirusy obecnie podlegają kontroli w procesie wytwarzania szczepionek weterynaryjnych (5).

Wraz z rozwojem wiedzy obowiązujące wytyczne dopuszczają wykorzystywanie w kontroli czynników zewnątrzpochodnych najnowszych technologii, przy czym oczekuje się międzynarodowej harmonizacji w zakresie ich stosowania (7).

METODY BADANIA OBECNOŚCI CZYNNIKÓW ZEWNĄTRZPOCHODNYCH

Obecnie stosowane metody wykrywania zanieczyszczeń drobnoustrojami obejmują badanie zanieczyszczeń bakteryjnych i grzybiczych, obecności mykoplazm oraz wirusów. W celu wykrycia wirusów wykonuje się oznaczenia zakaźności na zwierzętach lub zależonych jajach kur (*in vivo*) oraz liniach komórek (*in vitro*) metodami biochemicznymi, PCR lub z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM (*Transmission Electron Microscopy*). W celu ograniczenia ryzyka przeniesienia TSE stosowane są dodatkowe strategie badań oraz oceny (7).

Nieswoiste badania *in vivo* z użyciem zwierząt, w zależności od rodzaju szczepionki, obejmują zakażanie zwierząt różnych gatunków, tj. myszy (w tym osesków), świnek, królików lub zależonych jaj kur. Po zakażeniu zwierzęta poddawane są obserwacji pod kątem wystąpienia objawów zakażeń wirusowych, a w przypadku stwierdzenia ich obecności zapoczątkowują dalsze badania mające na celu swoistą identyfikację czynnika wywołującego chorobę (2, 3, 7).

Badania *in vivo* obejmują również wykrywanie obecności przeciwciał w surowicach uzyskanych od zakażanych lub immunizowanych zwierząt (np. przez podanie lizatów komórek linii czy nadsączy hodowli komórek po zneutralizowaniu wirusa szczepionkowego) prowadzone z użyciem zwierząt SPF, najczęściej gryzoni, lub kurcząt. Możliwe są również badania obecności

wirusów hemaglutynujących po zneutralizowaniu wirusa szczepionkowego w jamie omoczeni w zależonych jajach kur SPF (14, 15).

Wirusy można wykrywać stosując nieswoiste badania *in vitro* z użyciem linii komórek, dzięki którym można identyfikować wirusy wywołujące efekt cytopatyczny oraz wirusy hemadsorbujące i hemaglutynujące. Wybór linii komórek do badań nad wykrywaniem czynników zewnątrzpochodnych zależy od czynników, których możemy się potencjalnie spodziewać w linii komórek, a to z kolei jest uzależnione od gatunku jej dawcy. W tym wypadku można użyć jedynie linii komórek permissywnych, ale wiele wirusów w tych liniach nie replikuje się (7, 9).

Metody *in vivo* pozwalają na wykrywanie efektu cytopatycznego, hemaglutynacji lub hemadsorpcji dla szerokiego zakresu wirusów patogennych dla człowieka lub dla gatunku docelowego zwierząt. Oznaczanie zakaźności w badaniach na myszach pozwala wykryć obecność m.in: wirusów coxackie A i B, pikornawirusów (poliowirusy i echowirusy), alfawirusów, bunyawirusów (phlebowirusy, nairowirusy), arenawirusów, flaviwirusów, wirusa wścieklizny, herpeswirusów, wirusa limfatycznego zapalenia opon i spłotów naczyniowych lub wirusów mysich. Badania zakaźności w zależonych jajach kur, po neutralizacji wirusa szczepionkowego, pozwalają wykryć efekt hemaglutynacji, który może być wywołany przez: ortomyksowirusy, paramyksowirusy, alfawirusy, wesciculowirusy, herpeswirusy, poxwirusy, rhabdowirusy (3).

Słabym punktem metod *in vivo* wykrywania czynników zewnątrzpochodnych jest ich niedostateczna czułość. Trudności tych badań wynikają z faktu, że wiele wirusów patogennych dla człowieka nie zakaża i nie replikuje się w organizmach gryzoni ani w jajach kur. Stosowanie inwazyjnych procedur badań u zwierząt (np. domózgowe zakażenie myszy), trwających często stosunkowo długi okres czasu (od 14 dni do 4 tygodni) powinno być zgodnie z wytycznymi „Europejskiej konwencji o ochronie kręgowców używanych do badań doświadczalnych i innych celów naukowych” ograniczane przez zastosowanie alternatywnych, metod *in vitro* (3, 7, 14).

Metoda transmisyjnej mikroskopii elektronowej stosowana np. do badań linii komórek owadów, pozwala wykrywać cząstki wirusów, w tym endogenne retrowirusy, z czułością ok. 10^6 cząstek wirusów/ml, jednocześnie umożliwiając różnicowanie endogennych i latentnych retrowirusów (17).

Aktualne wymagania, poza wymienionymi metodami, umożliwiają stosowanie przez wytwórcę czy też instytucję do tego celu upoważnioną metod alternatywnych pod warunkiem, że wykazana zostanie ich zgodność z metodami konwencjonalnymi w zakresie osiągniętej czułości i swoistości (9). Od końca lat 90-tych

podejmowane są starania aby zastępować dotychczasowe metody konwencjonalne nowymi, w tym głównie PCR i od niedawna PCR w czasie rzeczywistym. Warunkiem stosowania tych metod jest uzyskanie zgody ze strony instytucji do tego celu upoważnionej (9, 14, 18). Metody alternatywne nie wymagają użycia zwierząt ani linii komórek, i jeżeli są odpowiednio zwalidowane: są szybsze i czulsze w porównaniu do metod konwencjonalnych. Walidację metod i precyzyjne określenie powtarzalności zapewnia użycie referencyjnych materiałów odniesienia o znanej najmniejszej zawartości kwasu nukleinowego. Ze względu na fakt, że w zaleceniach Farmakopei Europejskiej nie zaleca się stosowania konkretnych starterów, metoda PCR w zależności od ich wyboru, może charakteryzować się różną czułością oraz swoistością wykrywania czynników zewnątrzpochoodnych (7, 14). Metoda PCR została skutecznie zaadoptowana i jest aktualnie wykorzystywana przez wytwórców i instytucje do tego celu upoważnione do wykrywania m.in. wirusa choroby Newcastle NDV (*Newcastle Disease Virus*), wirusa ARV (*AIDS Related Virus*), wirusa grypy ptaków AIV (*Avian Influenza Virus*), wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur IBV (*Avian Infectious Bronchitis Virus*) (9). Do pośrednich analiz umożliwiających wykazanie braku czynników zanieczyszczających stosowana jest również analiza kwasu nukleinowego linii komórek metodą fingerprint (7).

Z kolei obecność retrowirusów badana jest metodą oznaczania aktywności odwrotnej transkryptazy PERT (*Product-Enhanced Reverse Transcriptase Assay*) (7). Najnowszą odmianą badania w kierunku retrowirusów jest ilościowe oznaczanie testem PERT stosowane do potwierdzania ekspresji niezakaźnych cząstek endogenego retrowirusa w różnych substratach komórek np. w zależonych jajach, linii komórek CHO (17).

NOWE METODY BADANIA POTENCJALNYCH CZYNNIKÓW ZEWNĄTRZPOCHODNYCH

Szansą poprawy bezpieczeństwa produkowanych szczepionek jest opracowanie nowych układów identyfikacji wirusów, dla których nie są dostępne komercyjne lub konwencjonalne systemy wykrywania. Dotyczy to głównie opracowania i walidacji metod wykrywania kwasów nukleinowych opartych na amplifikacji do wykrywania wirusów RNA i DNA. Zastosowanie takich badań jest uzależnione od dostępności danych umożliwiających wykonanie analiz homologii sekwencji w dostępnych bazach danych pozwalających na wybór swoistych starterów, ponadto od optymalizacji samej reakcji PCR i potwierdzenia swoistości i czułości metody np. metodą hybrydyzacji (na matrycy DNA/

RNA szczepów szczepionkowych, dzikich szczepów wirusa, pokrewnych wirusów) oraz od potwierdzenia identyfikacji metodą sekwencjonowania (9, 18, 19).

Innego podejścia wymagają badania możliwych zanieczyszczeń przy zastosowaniu technik amplifikacji kwasów nukleinowych NAT (*Nucleic Acid Amplification Techniques*) z lub bez wcześniejszego namnażania czynników zanieczyszczających w liniach komórek. Badania tej grupy są przeznaczone zwłaszcza do wykrywania tych zanieczyszczeń, o których wiadomo, że powodują latentne zakażenia gatunków, od których pochodzi hodowla np. małpi wirus SV40 lub wirus *Flock house* w komórkach owadów. W tym wypadku techniki NAT mogą być wymiennie stosowane z technikami immunoenzymatycznymi, metodą seroneutralizacji czy badaniami wytwarzania swoistych przeciwciał u wrażliwych zwierząt (7).

Wielkie nadzieje optymalizacji badań nad czynnikami zewnątrzpochoodnymi zanieczyszczającymi szczepionki związane są z możliwościami identyfikacji całego metagenomu składowych szczepionki przez identyfikację całego materiału genetycznego zawartego w próbce, w tym potencjalnych czynników zakaźnych. Instytucje do tego celu upoważnione, takie jak Europejska Agencja Leków ocenia przydatność nowych metod takich jak: równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów DNA (*Massively Parallel Sequencing*), badania na mikronośnikach DNA, PCR w czasie rzeczywistym oraz spektrometria masowa. Uzupełnienie dotychczas zalecanych metod zapewne zaowocuje nowymi ustaleniami regulacyjnymi (14, 18, 19).

Zastosowanie analiz metagenomu oraz transkryptomu szczepionek wirusowych, w tym analiz na mikronośnikach DNA, pirosekwencjonowania oraz spektrometrii masowej pozwoliły zidentyfikować sekwencje wirusa nie będące sekwencjami wirusa szczepionkowego. Matrycą do badań był przesącz szczepionki, trawiony nukleazą, poddany amplifikacji, a następnie analizie podobieństwa sekwencji wirusowych (18, 20). W taki sposób wykryto m.in. endogenne sekwencje retrowirusów czy wirusa białaczki ptasiej w substratach zależonych jaj kur. Z kolei badania transkryptomu w nadsączach substratów komórek lub szczepionkowych seriach siewnych wirusów pozwoliły na wykrycie nieznanymi wcześniej parwowirusów bydłecy 2 i 3 oraz bydłecy wirusa 2 związanego z adenowirusem (*Bovine Adeno Associated Virus 2*). Wskazano, że źródłem zanieczyszczenia tymi wirusami była stosowana w procesie wytwarzania szczepionki surowica bydłeca (19). Wykrywanie aktywności odwrotnej transkryptazy RT metodą PERT w szczepionce przeciw odrze pozwoliło na identyfikację endogenego retrowirusa ptaków, którego obecność łączono ze stosowaniem do namnażania wirusa odrzy, zależonych jaj kur. Wykrycie tego wirusa, podobnie jak wykrycie obecności endo-

gennego retrowirusa kotów RD-114 w szczepionkach weterynaryjnych, zostało wszechstronnie przeanalizowane i instytucje do tego upoważnione zdecydowały o utrzymaniu tych szczepionek na rynku (17, 21).

Zastosowanie najnowszej generacji sekwencjonowania tzw. metody pirosekwencjonowania pozwoliło wykryć fragmenty sekwencji cirkowirusa PCV1 (*Porcine Circovirus*) w żywej atenuowanej szczepionce przeciw rotawirusom Rotarix (20). Badania wykonane w 2010 r. przez wytwórcę tej szczepionki potwierdziły obecność wirusów PCV 1 i PCV2 w macierzystych bankach komórek linii Vero i seriach siewnych rotawirusa. Identyfikację fragmentów materiału genetycznego wirusa PCV 1 i PCV 2 wykonaną metodą PCR potwierdzono metodą sekwencjonowania (20, 22). Wstępne doniesienia dotyczące wykrycia DNA wirusa PCV1 na poziomie $>10^5$ w dwóch seriach szczepionki, były związane ze stwierdzeniem pozostałości DNA wirusa spowodowanych niedostateczną inaktywacją trypsyny (20). Kolejne badania potwierdziły obecność genomu wirusa PCV1, cząstek wirusa w badanych próbkach oraz ich zakaźność w liniach nerki świni (PK-15), HEK 293 oraz Vero (23). Badania większej liczby próbek serii szczepionek przeciw rotawirusom dostępnych na rynku potwierdziły obecność cząstek wirusa PCV1 w szczepionce Rotarix w liczbie 10^5 - 10^6 cząstek oraz $6\text{-}7\log_{10}$ kopii DNA/dawkę szczepionki, czyli nawet wyższym niż to wykazane w badaniach *Victoria* i wsp. oraz *McLenahan* i wsp. (20, 23). Najbardziej prawdopodobnym źródłem zakażenia była trypsyna pochodzenia świńskiego używana jako dodatek do podłoża hodowlanych przy pasażowaniu linii komórek Vero. Podobne zanieczyszczenia pochodzące z linii komórek Vero wykryto w seriach szczepionki przeciw poliomyelitis tego samego wytwórcy. Z kolei fragmenty DNA wirusa PCV1 wykryto również w szczepionce Rotateq (23). Cirkowirus PCV1 jest nieosłonkowym wirusem DNA, i podobnie jak wirus PCV 2 wywołuje zakażenia u świń. Oba wirusy są przenoszone między osobnikami świń drogą pokarmową. Dotychczas nie potwierdzono ich zdolności do replikacji w organizmie człowieka, nie wykazano efektu cytopatycznego w linii komórek Vero, czy też komórkach ludzkich, a także serokonwersji u lekarzy weterynarii lub hodowców zwierząt (22, 24).

Szczepionki przeciw rotawirusom są od kilku lat z powodzeniem stosowane w profilaktyce biegunek rotawirusowych u noworodków i niemowląt. Bezpieczeństwo tych szczepionek potwierdzono w badaniach klinicznych i w trakcie ich oceny porejestacyjnej obejmującej ocenę niepożądanych odczynów poszczepiennych (NOP). Wykrycie sekwencji DNA wirusów PCV1 oraz PCV2 w tych szczepionkach wzbudziło niepokój i spowodowało podjęcie badań mających na celu potwierdzenie czy tego rodzaju zanieczyszczenie może występować w innych szczepionkach. Dotych-

czasowe wyniki wykazują brak dowodów na to, że obecność DNA wirusów PCV lub ich cząstek wpływa na zdrowie osób zaszczepionych. Na nadzwyczajnych posiedzeniach Europejskiej Agencji Leków oraz Amerykańskiego Urzędu ds. Żywności i Leków FDA (*Food and Drug Administration*) w maju 2010 r. w wyniku szczegółowego dochodzenia uznano, że obecność niechorobotwórczego cirkowirusa świń PCV 1 w seriach produkcyjnych szczepionki Rotarix oraz fragmentów DNA tego wirusa w szczepionce Rotateq nie stanowi zagrożenia dla zaszczepionych dzieci. Zobowiązano jednak wytwórców do wprowadzenia dodatkowych środków zaradczych, które zapewnią ochronę przed zanieczyszczeniem tymi wirusami kolejnych serii wytwarzanych szczepionek (25).

Wykrycie sekwencji i cząstek zakaźnego wirusa PCV1 oraz sekwencji wirusa PCV2 było przyczyną podjęcia szerokiej dyskusji nad koniecznością ponownego uaktualnienia listy wirusów, które powinny być badane jako czynniki zewnątrzpochodne w procesie wytwarzania szczepionek, w związku z tym można oczekiwać, że zostanie wprowadzone do zakresu badań kontrolnych w banku komórek oznaczanie nieosłonkowych wirusów ssRNA (Enterowirusów, wirusów *encefalomyocarditis*, nieosłonkowych wirusów ssDNA (TTV- *Torque Teno virus*), Hokowirusa, parwowirusa bydłowego (*Bocavirus*) oraz metody pirosekwencjonowania do kontroli materiałów wyjściowych szczepionek (3).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Obecne wymagania i zalecenia dotyczące oceny bezpieczeństwa szczepionek w aspekcie kontroli obecności czynników zewnątrzpochodnych nie eliminują całkowicie ryzyka ich zanieczyszczeń. Wykrywane w ostatnich latach przypadki zanieczyszczeń czynnikami zewnątrzpochodnymi serii szczepionek stosowanych u ludzi i zwierząt przyczyniły się do uaktywnienia działań instytucji do tego celu upoważnionych oraz wytwórców w celu wprowadzenia dodatkowych środków bezpieczeństwa szczepionek wirusowych, np. poprzez wykrywanie sekwencji lub zakaźnych cząstek obcych wirusów. Działalność ta wiąże się z określeniem poszerzonego zakresu badań kontroli czynników zewnątrzpochodnych z uwzględnieniem badań m.in. metagenomu szczepionek, walidacji nowo wprowadzanych metod kontrolnych oraz rozszerzenia panelu wykrywanych czynników wirusowych. W celu poprawy poziomu oceny zanieczyszczeń czynnikami zewnątrzpochodnymi konieczna jest bieżąca aktualizacja wytycznych zgodna z aktualnym stanem wiedzy.

PIŚMIENICTWO

1. Janaszek-Seydlitz W. Bepieczeństwo szczepionek w Wakcynologia Red. W. Magdzik, D. Naruszewicz-Le-siuk, A. Zieliński. Bielsko-Biała: α-medicapress 2007, 110-5.
2. Pastoret P-P. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals* 2010; 38: 332-4.
3. Sheets R, Loewer J, Raychaudhuri G, i in. Adventitious agents, new technology, and risk assessment, 19-20 May 2011, Baltimore, MD. *Biologicals* 2012; 40: 162-7.
4. Bruckner L. Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines: Rationale for requirements, the European approach. *Biologicals* 2010; 38:338-9.
5. Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, i in. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals* 2011; 39: 359-69.
6. European Pharmacopoeia. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines, method 5.2.2. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe. 2011; 645-8.
7. European Pharmacopoeia. Cell substrates for the production of vaccines for human use, method 5.2.3. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2011; 648-51.
8. International Taxonomy of Viruses (ICTV). <http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>;2009.
9. Motitschke A, Ottinger HP, Jungback C. Evaluation of the sensitivity of PCR methods for the detection of extraneous agents and comparison with *in vivo* testing. *Biologicals* 2010; 38: 389-92.
10. Kappeler A, Lutz-Wallace C, Saoo T, i in. Detection of bovine polyomavirus contamination in fetal bovine sera and modified live viral vaccines using polymerase chain reaction. *Biologicals* 1996; 24: 131-5.
11. Krakowska S, Ringler SS, Arumugam P, i in. Evaluation of *Mycoplasma hypopneumoniae* bacterins for porcine Torque Teno virus DNAs. *Am J Vet Res* 2008; 69: 1601-741.
12. Cutrone R, Ladnicky J, Dunn G, i in. Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961. *Cancer Res* 2005; 65: 10273-9.
13. Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, i in. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59: 587-635.
14. Hess RD, Weber F, Watson K, i in. Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. *Vaccine* 2012; 30: 2715-27.
15. European Pharmacopoeia. Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use, method 2.6.16. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2011; 266-7.
16. Concept paper for a guideline on the quality of porcine trypsin used in the manufacture of human biological products. EMA/CHMP/BWP/367751/2011.
17. Miyazawa T. Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines. *Biologicals* 2010; 38: 371-6.
18. Onions D, Cote C, Love B, i in. Ensuring the safety of vaccine cell substrates by massively parallel sequencing of the transcriptome. *Vaccine* 2011; 29: 7117-21.
19. Onions D, Kolman J. Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents. *Biologicals* 2010; 38: 377-80.
20. Victoria JG, Wang Ch, Jones M S, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol* 2010; 84: 6033-40.
21. Feline endogenous retrovirus RD114 in some live attenuated vaccines commercially available in the EU for use in animals. CVMP assessment report. Procedure no: EMEA/V/A/058. September 2010.
22. Baylis S A, Finsterbusch T, Banner N, i in. Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine* 2011; 29: 690-97.
23. McClenahan SD, Krause PR, Uhlenhaut Ch. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine* 2011; 29: 4745-53.
24. Li L, Kapoor A, Slikas O, i in. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee faces. *J Virol* 2010; 84: 1674-82.
25. Questions and answers on the review of Rotarix (rotavirus vaccine, live). Outcome of a procedure under Article 20 of Regulation (EC) No 726/2004. EMA/CVMP/460465/2010.

Otrzymano: 16.04.2012 r.

Zaakceptowano do druku: 29.08.2012 r.

Adres do korespondencji:

Dr hab. Ewa Augustynowicz

Zakład Badania Surowic i Szczepionek

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy

Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Tel. 22 54 21 213, e-mail: eaugustynowicz@pzh.gov.pl