

So sánh hai phương pháp tạo đám hoại tử (PFU) và liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy (CCID₅₀) trong xác định hiệu giá vắc xin sởi dự tuyển mẫu chuẩn quốc gia

Comparison two methods- plaque forming unit (PFU) and cell culture infectious dose 50% (CCID₅₀) for potency assay of the national standard measles vaccine

Nguyễn Thị Mai Hương^{1*}, Phạm Văn Hùng¹,
Nguyễn Thị Thường², Nguyễn Thị Lý¹

¹: Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

²: Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Nguyen Thi Mai Huong^{1*}, Pham Van Hung¹,
Nguyen Thi Thuong², Nguyen Thi Ly¹

¹: National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

²: National Institute Of Hygiene and Epidemiology, Hanoi

TÓM TẮT

Nghiên cứu so sánh hai phương pháp PFU (Plaque Forming Units) và CCID₅₀ (Cell Culture Infectious Dose 50%) để xác định hiệu giá vắc xin sởi dự tuyển mẫu chuẩn quốc gia được thực hiện tại Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB). Hai phương pháp cùng thực hiện trên các nhóm mẫu vắc xin Sởi dự tuyển có sản xuất từ chủng AIK-C được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau: -70°C, 4°C/7 ngày, 37°C/7 ngày. Kết quả cho thấy mặc dù có sự khác biệt nhưng có mối tương quan chặt chẽ giữa hai phương pháp CCID₅₀ và PFU với R² = 0,886, r = 0,94, hệ số PFU/CCID₅₀ = 1,28 tương đương với tỉ lệ PFU:CCID₅₀ = 1:0,78.

Từ khóa: PFU, CCID₅₀, Hiệu giá vắc xin Sởi, Mẫu chuẩn quốc gia vắc xin Sởi.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện tại có 2 phương pháp được sử dụng phổ biến để kiểm tra hiệu giá của vắc xin sởi là PFU và CCID₅₀. Tổ chức y tế thế giới (TCYTTG) khuyến cáo có thể dùng một trong hai phương pháp tùy thuộc theo điều kiện thực tế của các cơ quan kiểm định quốc gia [1]. Thực hiện xác định hiệu giá vắc

ABSTRACT

A comparative study of two methods (PFU and CCID₅₀) for potency determination for the national standard candidate measles vaccine was organized at the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB). Two methods are performed on the groups of candidate measles vaccine derived from AIK-C strain stored at different temperatures: -70°C, 4°C/7 days, 37°C/7 days. The results show that although there is a difference, strong correlation exists between the two methods CCID₅₀ and PFU with R² = 0.886, r = 0.94, coefficient PFU/CCID₅₀ = 1.28 equivalent to the ratio PFU:CCID₅₀ = 1:0.78.

I. INTRODUCTION

At present, PFU and CCID₅₀ are the methods that are widely used to determine the potency of the measles vaccine. Following the advice from World Health Organization (WHO), either method can use depending on the actual situation of each country. To determine the potency of measles by PFU method by plaque on Vero

*Tác giả: Nguyễn Thị Mai Hương

ĐC: Số 1 Nghiêm Xuân Yêm, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội

Điện thoại: 0902589289

Email: maihuong@nicvb.org.vn

*Corresponding Investigator: Nguyen Thi Mai Huong

Address: No. 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim,

Hoang Mai, Hanoi

Phone: 0902589289

xin sởi bằng phương pháp PFU là phương pháp tạo đám hoại tử trên tế bào Vero được nuôi cấy bằng môi trường MEM 10% FBS. Chuẩn bị tế bào gây nhiễm 1 lớp trên phiên 6 giếng. Vi rút được tiếp xúc với tế bào và cố định bằng thạch, sau đó để nuôi cấy 7-10 ngày trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Đọc kết quả bằng mắt thường, đếm số plaque màu trắng trên nền thuốc nhuộm màu đỏ trung tính [2]. Phương pháp CCID₅₀ áp dụng xác định hiệu giá vắc xin sởi là phương pháp xác định liều gây nhiễm 50% tế bào Vero. Tế bào được chuẩn bị trước khi gây nhiễm với vi rút từ 0-4 h trên phiên 96 giếng. Đọc kết quả sau 9 ngày nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂ bằng kính hiển vi phân pha. Số liệu được tính bằng công thức Kaber hoặc Reed-Muench [3]. Do điều kiện thực tế tại Việt Nam có nhiều loại vắc xin sởi từ các nhà sản xuất khác nhau trên thế giới và Việt Nam, các vắc xin từ các quốc gia Bỉ (GSK), Mỹ (MSD), Ấn độ...thường sử dụng đơn vị CCID₅₀ trong khi vắc xin từ Nhật Bản hay nhận chuyển giao công nghệ từ Nhật Bản lại sử dụng đơn vị PFU. Vì vậy hiện tại Viện Kiểm định Quốc gia chúng tôi đang thực hiện cả hai phương pháp trên, áp dụng theo từng nhà sản xuất khác nhau. Do đó để mẫu chuẩn quốc gia phù hợp với các sản phẩm khác nhau trong công tác kiểm định cần có đủ cả hai cách tính CCID₅₀ và PFU, tuy nhiên chuẩn định bằng cả hai phương pháp sẽ mất nhiều thời gian và chi phí, ngoài ra không có mẫu chuẩn nổi chuẩn cho phương pháp PFU. Việc tìm mối tương quan giữa 2 phương pháp sẽ giúp cho việc xác định đơn vị PFU của mẫu chuẩn quốc gia. Từ nhu cầu thực tiễn trên chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “So sánh giá trị hiệu giá giữa hai phương pháp tạo đám hoại tử PFU và liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi (CCID₅₀) của vắc xin sởi dự tuyển mẫu chuẩn Quốc gia” với mục tiêu nghiên cứu sau:

So sánh hiệu giá mẫu chuẩn dự tuyển sử dụng hai phương pháp PFU và CCID₅₀ ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau -70°C, 4°C/7 ngày, 37°C/7 ngày.

Xác định hệ số tương quan về hiệu giá giữa 2 phương pháp PFU và CCID₅₀.

cells and cell culture using MEM 10% FBS medium. Preparing monolayer infected cells in six wells plate. The cells are inoculated and overlay infected cells with agarose, after that it is cultured in 7- 10 days at 37°C, 5% CO₂ condition. Using the naked eye to observe, count the white plaque on red dyes. The CCID₅₀ method is the method that determines 50% of infected Vero cells. The cells were prepared before testing 0-4 h in 96 wells plate. Read the result after 9 days cell culture at 37°C, 5% CO₂ using a phase-contrast microscope. Data were processed by Kaber or Reed-Muench equation. Due to the actual situation in Vietnam, there are many types of measles vaccine from various manufacturers in the world and in Vietnam, the vaccine from Belgium (GSK), USA (MSD), India, etc. using CCID₅₀ method, however the vaccine from Japan or receiving technology transfer from Japan using PFU. For that reason, at the National Institute for Control of Vaccine and Biologicals, we use both methods depending on each manufacturer. Therefore, for the national standard sample to be suitable for different products, it is necessary to have both CCID₅₀ and PFU calculation methods, however using both methods will take a lot of time and cost, and there is no standard sample correlative to the PFU method. Finding the correlation between the two methods will help determine the PFU unit of the national standard sample. From the above practical needs, we conduct research: “Comparison two methods-plaque-forming unit (PFU) and cell culture infectious dose 50% (CCID₅₀) for potency assay of the national standard measles vaccine” with our goals:

Goals:

Comparing the potency of standard sample candidates using CCID₅₀ and PFU at different stored temperatures -70°C, 4°C/7 days, 37°C/7 days.

Determine the correlation coefficients of the potency between two methods CCID₅₀ and PFU.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Vắc xin sởi dự tuyển mẫu chuẩn quốc gia: Lô số RM0107

1.2 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 6 năm 2016 đến tháng 12/2017.

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Kiểm định vắc xin Vi rút - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

1.3 Thiết kế nghiên cứu:

Vắc xin mẫu chuẩn dự tuyển sẽ được bảo quản trong các điều kiện khác nhau -70°C , $4^{\circ}\text{C}/7$ ngày, $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày, thực hiện thử nghiệm vào các ngày khác nhau và cùng một nhóm kỹ thuật thực hiện.

Mẫu vắc xin bảo quản ở mỗi điều kiện nhiệt độ khác nhau sẽ được tiến hành thực hiện vào 3 ngày khác nhau, mỗi ngày lặp lại 6 lần cho đồng thời cả 2 phương pháp.

1.4 Cỡ mẫu nghiên cứu:

Vắc xin sởi dự tuyển Mẫu chuẩn quốc gia: 54 lọ vắc xin dự tuyển.

Vắc xin sởi mẫu chuẩn quốc tế NIBSC mã số 92/648: 03 lọ.

Tế bào Vero: Được cấy chuyển 6 đời trước khi đưa vào thử nghiệm.

1.5 Phân tích và xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm excel để tính kết quả hiệu giá của vắc xin sởi.

- Tính giá trị hiệu giá trung bình, hệ số biến thiên, độ lệch chuẩn của từng phương pháp, tính hệ số tương quan r giữa 2 phương pháp.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 So sánh hiệu giá mẫu chuẩn dự tuyển giữa hai phương pháp PFU và CCID₅₀

3.1.1 Kết quả hiệu giá PFU và CCID₅₀ của mẫu thử nghiệm bảo quản -70°C

Mẫu thử được bảo quản trong điều kiện -70°C ngay sau khi sản xuất cho đến khi đánh giá.

Kết quả hiệu giá vắc xin dự tuyển bảo quản -70°C bằng phương pháp PFU là $4,41 \log_{10}$ PFU/0,5ml, với khoảng giá trị tin cậy 95% (4,33-4,50), độ biến

II. METHOD

1.1 Objective

Objective: Measles vaccine candidate for a national standard. Lot number RM0107

1.2 Place and time perform

Times of implantation: from July 2016 to December 2017

Place of implantation: Department of Virus Vaccine- National Institute for Control of Vaccine and Biologicals.

1.3 Methodology

The sample will be stored at different conditions – 70°C , $4^{\circ}\text{C}/7$ days, $37^{\circ}\text{C}/7$ days, perform the experiments on different days with the same technical team.

The sample stored at different conditions will be carried out on three different days, six times a day for both methods.

1.4 Sample size

Measles vaccine candidate for national standard: 54 vials

Measles vaccine international standard NIBSC code number 92/648: 03 vials

Vero cells: The cell was subcultured six generations before experiment.

1.5 Data processing and analysis

Using Excel to calculator the data for the potency of the measles vaccine.

Calculate the mean, coefficient of variation, standard deviation of each method, the correlation coefficient r between the two methods

III. RESULTS

3.1 Comparison of the potency of candidate standard sample between two methods PFU and CCID₅₀

3.1.1 Results of the potency of the sample stored at -70°C

The samples were stored at -70°C immediately after production until evaluation.

The results of the potency of vaccine candidate stored at -70°C used PFU method were $4,41 \log_{10}$ PFU/0,5 ml, 95% confident interval (4,33-4,50), coefficient

Bảng 3.1.1 Kết quả mẫu thử nghiệm bảo quản -70°C
Table 3.1.1 Results of samples stored at -70°C

STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀	STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀
1	4,42	3,44	1,28	13	4,50	3,29	1,36
2	4,35	3,54	1,22	14	4,46	3,34	1,33
3	4,41	3,49	1,26	15	4,49	3,29	1,36
4	4,41	3,64	1,21	16	4,39	3,64	1,20
5	4,42	3,54	1,24	17	4,44	3,69	1,20
6	4,37	3,54	1,23	18	4,42	3,59	1,23
7	4,38	3,34	1,31	GM	4,41	3,48	1,26
8	4,40	3,39	1,29	SD	0,04	0,11	0,05
9	4,34	3,49	1,24	GM+2SD	4,50	3,72	1,37
10	4,44	3,44	1,29	GM-2SD	4,32	3,24	1,16
11	4,46	3,49	1,27	CV	0,98	3,44	4,02
12	4,40	3,54	1,24	CI	4,33-4,50	3,24-3,72	1,16-1,37

thiên CV= 0,98%. Trong khi đó kết quả hiệu giá của phương pháp CCID₅₀ là 3,48 log₁₀ CCID₅₀/0,5ml, với khoảng giá trị tin cậy 95% (3,24-3,72), độ biến thiên CV = 3,44%. Hệ số chênh lệch PFU/CCID = 1,26 với khoảng tin cậy 95% CI (1,16-1,37).

3.1.2 Kết quả hiệu giá PFU và CCID₅₀ của mẫu thử nghiệm bảo quản 4°C/ 7 ngày

of variation CV= 0,98%. Meanwhile the results of CCID₅₀ method were 3,48 log₁₀ CCID₅₀/0,5ml, 95% confident interval (3,24-3,72), coefficient of variation CV = 3,44%. Coefficient PFU/CCID = 1,26 with 95% confident interval CI (1,16-1,37).

3.1.2. Results of the potency of the sample stored at 4°C/ 7 days

Bảng 3.1.2 Kết quả mẫu thử nghiệm bảo quản 4°C/ 7 ngày
Table 3.1.2 Results of samples stored at 4°C/ 7 days

STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀	STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀
1	4,39	3,39	1,29	13	4,34	3,44	1,26
2	4,33	3,29	1,31	14	4,28	3,49	1,22
3	4,31	3,34	1,29	15	4,32	3,39	1,27
4	4,28	3,39	1,26	16	4,25	3,44	1,23
5	4,36	3,24	1,34	17	4,38	3,34	1,31
6	4,35	3,19	1,36	18	4,39	3,34	1,31
7	4,39	3,49	1,25	GM	4,32	3,38	1,27
8	4,40	3,39	1,29	SD	0,05	0,09	0,04
9	4,26	3,29	1,29	GM+2SD	4,42	3,56	1,36
10	4,27	3,54	1,20	GM-2SD	4,22	3,19	1,19
11	4,28	3,49	1,22	CV	1,17	2,74	3,29
12	4,29	3,39	1,26	CI	4,22-4,42	3,19-3,56	1,19-1,36

Kết quả hiệu giá vắc xin dự tuyển bảo quản 4°C bằng phương pháp PFU là $4,32 \log_{10}$ PFU/0,5ml, với khoảng giá trị tin cậy 95% (4,22-4,42), độ biến thiên CV= 1,17%. Trong khi kết quả hiệu giá của phương pháp CCID₅₀ là $3,38 \log_{10}$ CCID₅₀/0,5ml, với khoảng giá trị tin cậy 95% (3,19-3,56), độ biến thiên CV= 2,74%. Hệ số chênh lệch PFU/CCID = 1,27 với khoảng tin cậy 95% CI (1,19-1,36).

3.1.3 Kết quả hiệu giá PFU và CCID₅₀ của mẫu thử nghiệm bảo quản 37°C/7 ngày

The results of the potency of vaccine candidate stored at 4°C used PFU method were $4,32 \log_{10}$ PFU/0,5 ml, 95% confident interval (4,22-4,42), coefficient of variation CV= 1,17%. Meanwhile the results of CCID₅₀ method were $3,38 \log_{10}$ CCID₅₀/0,5ml, 95% confident interval (3,19-3,56), coefficient of variation CV = 2,74%. Coefficient PFU/CCID = 1,27 with 95% confident interval CI (1,19-1,36).

3.1.3. Results of the potency of the sample stored at 37°C/ 7 days

Bảng 3.1.3 Kết quả mẫu thử nghiệm bảo quản 37°C/ 7 ngày
Table 3.1.3 Results of samples stored at 37°C/ 7 days

STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀
1	3,62	2,79	1,29
2	3,64	2,74	1,32
3	3,59	2,89	1,24
4	3,59	2,74	1,31
5	3,63	2,69	1,34
6	3,60	2,69	1,33
7	3,53	2,79	1,26
8	3,64	2,89	1,25
9	3,53	2,74	1,28
10	3,65	2,89	1,26
11	3,65	2,74	1,33
12	3,62	2,74	1,32

STT	PFU	CCID ₅₀	PFU/ CCID ₅₀
13	3,66	2,84	1,28
14	3,64	2,79	1,30
15	3,67	2,79	1,31
16	3,65	2,74	1,33
17	3,61	2,84	1,27
18	3,67	2,79	1,31
GM	3,62	2,78	1,30
SD	0,04	0,06	0,03
GM+2SD	3,70	2,91	1,36
GM-2SD	3,53	2,65	1,23
CV	1,14	2,29	2,39
CI	3,54-3,70	2,65-2,91	1,23-1,36

Kết quả hiệu giá vắc xin dự tuyển bảo quản 37°C bằng phương pháp PFU là $3,62 \log_{10}$ PFU/0,5ml, với khoảng giá trị tin cậy 95% (3,54-3,70), độ biến thiên CV=1,14%. Trong khi kết quả hiệu giá của phương pháp CCID₅₀ là $2,78 \log_{10}$ CCID₅₀/0,5 ml với khoảng giá trị tin cậy 95% (2,65-2,91), độ biến thiên CV= 2,29%. Hệ số chênh lệch PFU/CCID= 1,30 với khoảng tin cậy 95% CI (1,23-1,36).

3.2 Mối tương quan giữa 2 phương pháp PFU và CCID₅₀

Lập đồ thị tương quan hiệu giá trung bình của 2 phương pháp ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau.

Nhìn vào đồ thị cho ta thấy rõ mối tương quan

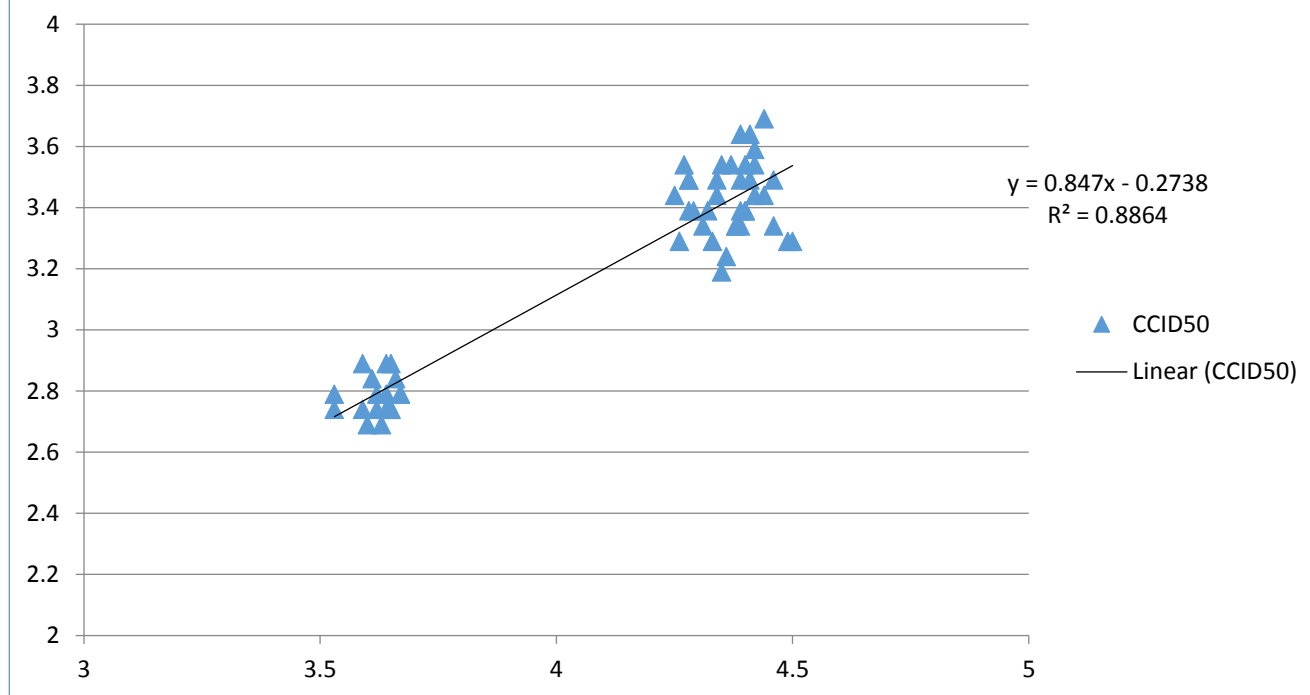
The results of the potency of vaccine candidate stored at 37°C used PFU method were $3,62 \log_{10}$ PFU/0,5 ml, 95% confident interval (3,54-3,70), coefficient of variation CV= 1,14%. Meanwhile the results of CCID₅₀ method were $2,78 \log_{10}$ CCID₅₀/0,5ml, 95% confident interval (2,65-2,91), coefficient of variation CV = 2,29%. Coefficient PFU/CCID = 1,30 with 95% confident interval CI (1,23-1,36).

3.2 Correlation between two methods PFU and CCID₅₀

Graphing the mean of the potency between two methods at different stored temperature.

The figure shows the linearly correlated

Mối tương quan giữa PFU và CCID₅₀



Hình 3.2 Đồ thị tương quan tuyến tính giữa PFU và CCID₅₀ Figure 3.2 Correlation between PFU and CCID₅₀

Bảng 3.2. Hệ số tương quan giữa 2 phương pháp ở các điều kiện khác nhau
Table 3.2. The correlation between two methods at different conditions

STT	PFU/CCID ₅₀		
1	-70°C	4°C	37°C
2	1,28	1,29	1,29
3	1,22	1,31	1,32
4	1,26	1,29	1,24
5	1,21	1,26	1,31
6	1,24	1,34	1,34
7	1,23	1,36	1,33
8	1,31	1,25	1,26
9	1,29	1,29	1,25
10	1,24	1,29	1,28

STT	PFU/CCID ₅₀		
11	1,29	1,20	1,26
12	1,27	1,22	1,33
13	1,24	1,26	1,32
14	1,36	1,26	1,28
15	1,33	1,22	1,30
16	1,36	1,27	1,31
17	1,20	1,23	1,33
18	1,20	1,31	1,27
GM	1,23	1,31	1,31
	1,28		

giữa 2 phương pháp với phương trình tuyến tính $y = 0,847x - 0,273$ và có hệ số tương quan $r = 0,94$.

Kết quả nghiên cứu hệ số trung bình giữa PFU/CCID₅₀ = 1,28 ở các điều kiện khác nhau. Kết quả so sánh các nhóm mẫu khác nhau bằng kiểm định Anova cho thấy kết quả giữa các nhóm không có sự khác biệt với $p = 0,323$.

between two methods with the linear equation $y = 0,847x - 0,273$ with a correlation coefficient $r = 0,94$.

As the result, the mean of PFU/CCID₅₀ = 1,28 at different conditions. The comparison of different sample groups by Anova shows the same results with $p = 0,323$.

IV. BÀN LUẬN

4.1 So sánh kết quả hiệu giá vắc xin Sởi dự tuyển giữa hai phương pháp PFU và CCID₅₀

Thử nghiệm xác định hiệu giá vắc xin Sởi được thực hiện song song cùng mẫu chuẩn chuẩn quốc tế từ NIBSC, giữa các lần thực hiện giá trị của mẫu chuẩn quốc tế luôn được xác định và nằm trong khoảng giới hạn tiêu chuẩn cho phép ($10^{4.3} \log_{10} \text{CCID}_{50} \pm 0,5$), điều này khẳng định các lần thực hiện nghiên cứu có giá trị và kết quả nghiên cứu có độ tin cậy cao. Các kết quả thu được theo bảng 1, 2, 3 cho thấy các giá trị đều nằm trong khoảng $\pm 2\text{SD}$, hệ số biến thiên cũng nằm trong giới hạn cho phép $< 12\%$. Hiệu giá vắc xin Sởi giữa 2 phương pháp CCID₅₀ và PFU khác biệt nhau ở tất cả các nhóm mẫu.

Kết quả so sánh 2 giá trị trung bình của 2 phương pháp ở mẫu bảo quản -70°C bằng kiểm định T-test có giá trị $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 27,427 > t$ bảng (2,109). Mẫu bảo quản $4^{\circ}\text{C}/7$ ngày có giá trị $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 33,990 > t$ bảng (2,109). Mẫu bảo quản $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày có giá trị $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 56,468 > t$ bảng (2,109). Những so sánh trên khẳng định có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp và tương tự với kết luận của nghiên cứu đã được công bố của Nhật Bản [4].

4.2 Mối tương quan giữa hai phương pháp

Kết quả nghiên cứu trung bình của hai phương pháp ở các dải nhiệt độ được trình bày trong bảng 3 và hình 3.1 trong nghiên cứu này cho thấy rằng có mối tương quan đồng biến chặt chẽ giữa hai phương pháp với $R^2 = 0,886$, $r = 0,94$. Khi nồng độ vi rút giảm do yếu tố nhiệt độ bảo quản và được xác định bằng phương pháp PFU giảm thì nồng độ vi rút được xác định bằng phương pháp CCID₅₀ cũng giảm. Tuy nhiên không có sự khác biệt về khoảng cách chênh lệch giữa 2 phương pháp. Theo kết quả đã trình bày ở bảng 4 hệ số trung bình giữa PFU/CCID₅₀ = 1,28 tương đương với tỉ lệ PFU:CCID₅₀=1: 0,78 ở các điều kiện khác nhau, với độ biến thiên CV: 1,07%. Kết quả so sánh các nhóm mẫu khác nhau bằng kiểm định Anova cho thấy kết quả giữa các nhóm không có sự khác biệt với $p = 0,323 (> 0,05)$. Kết quả nghiên cứu mối tương quan giữa 2 phương pháp PFU/CCID₅₀ cũng

DISCUSSION

4.1 Comparison the potency of measles vaccine candidate between two methods PFU and CCID₅₀

The experiments to determine the potency of measles vaccine is carried out in parallel with an international standard sample from NIBSC, the value of the international standard sample always determined and within the allowable standard range ($10^{4.3} \log_{10} \text{CCID}_{50} \pm 0,5$) of all times, confirm the value of the experiments and the results are highly reliable. The results from table 1, 2, 3 show that all values of standard deviation are within $\pm 2\text{SD}$, the coefficient of variation is also within the allowable limit $< 12\%$. The potency of the measles vaccine between the two methods CCID₅₀ and PFU is different in all sample groups.

The result of comparing the mean value of the two methods of the sample stored at -70°C by T-test has $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 27,427 > t$ table (2,109). The sample stored at $4^{\circ}\text{C}/7$ days have $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 33,990 > t$ table (2,109). The sample stored at $37^{\circ}\text{C}/7$ days have $p < 0,05$, $t_{\alpha} = 56,468 > t$ table (2,109). The comparisons confirm that there is a statistically significant difference between the two methods and the result is similar to a published study from Japan.

4.2 The correlation between two methods

The results from figure 3.2 and table 3.2 demonstrate the covariate correlation between the two methods with an $R^2 = 0,886$, $r = 0,94$. When the virus concentration reduces by the stored temperature determined by the PFU method, the result from CCID₅₀ method is also the same. However, there is no difference in the difference coefficient between the two methods. As the results in table 4, the coefficient PFU/CCID₅₀ = 1,28 is similar to the ratio PFU:CCID₅₀=1: 0,78 in different conditions, and the coefficient of variant CV: 1,07%. Comparing results of different sample groups by the Anova test shows that there are

cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu của TTCYTGG đã công bố và hướng dẫn đối với vắc xin sởi sống giảm độc lực trước đó [5] [6].

Mối tương quan giữa hai phương pháp tương đương với giá trị lý thuyết (1:0,69) khi phương pháp CCID₅₀ cho vi rút hấp phụ với hỗn dịch tế bào còn phương pháp PFU thì được thực hiện trên tế bào 1 lớp, Kenny và Schell đã báo cáo rằng phương pháp PFU nhạy cảm hơn gấp 10 lần khi thực hiện nghiên cứu tương tự đối với chủng Schawrs [7]. Trong các nghiên cứu của các nhà khoa học Nhật Bản khi thực hiện so sánh trên vắc xin từ chủng CAM-Biken chỉ ra rằng nồng độ vi rút giữa hai phương pháp có tỉ lệ PFU/10 [6]. Mann đã tìm thấy rằng 1 CCID₅₀ tương đương với 0,60 PFU khi thử nghiệm trên chủng Moraten trên tế bào Vero [8]. Abrecht đã thực hiện gây nhiễm trên tế bào 1 lớp ở cả hai phương pháp và chỉ ra rằng cả hai phương pháp tương đương nhau đối với chủng EZ. Ông cũng tìm thấy phương pháp CCID₅₀ nhạy cảm hơn PFU khoảng 0,4 log₁₀ trên chủng Schawrs [9]. Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến mối tương quan giữa 2 phương pháp xác định hiệu giá vắc xin bao gồm: phương pháp hấp phụ vi rút, loại tế bào và nồng độ tế bào sử dụng trong thử nghiệm, ảnh hưởng của phương pháp cố định và nhuộm màu trong phương pháp PFU, thiết kế thử nghiệm, ảnh hưởng của phiên nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, nhiệt độ, độ ẩm [10]. Do đó trong điều kiện nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chủng vắc xin AIK-C có nguồn gốc từ chủng Edmonston với các điều kiện nuôi cấy tương đồng về nhiệt độ, nồng độ CO₂ 5%, cùng nồng độ tế bào Vero, chúng tôi khẳng định mối tương quan giữa hai phương pháp chặt chẽ với hệ số PFU/CCID₅₀: 1,28 tương đương với tỉ lệ PFU: CCID₅₀ = 1:0,78.

KẾT LUẬN

Giữa hai phương pháp PFU và CCID₅₀ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê và có mối tương quan đồng biến chặt chẽ với Hệ số tương quan (r) hiệu giá giữa 2 phương pháp PFU và CCID₅₀ là 0,94 và tỉ lệ PFU/CCID₅₀ = 1,28, PFU: CCID₅₀ = 1:0,78.

no differences between sample groups with a $p = 0,323 (>0,05)$. The correlation between the two methods PFU/CCID₅₀ also shows the same results with other studies from WHO published and guidelines for live measles vaccine.

The correlation between the two methods is the same with theory (1:0,69) while used CCID₅₀ the method for virus absorption with cell mixture, otherwise, the PFU method performed in a cell monolayer, Kenny and Schell reported that, the PFU was 10 times more sensitive when performing the same study on strain Schawrs. In the research of Japanese scientists, when comparing vaccines from CAM-Biken strain, they show that the virus concentrate between two methods has a ratio PFU/10. Mann was found that 1 CCID₅₀ equal to 0,60 PFU when they study in Moraten strain in Vero cell. Abrecht inoculated a cell monolayer on both methods and shows that both methods were the same in the EZ strain. He also found the method CCID₅₀ was more sensitive than PFU about 0,4 log₁₀ in Schawrs strain. There are many factors that affective the correlation between the two methods to determine the potency of the vaccine including virus adsorption method, type of cell and the concentration of the cell, the affective of stabling and staining method in PFU, design of the experiments, affective of the plate, medium, temperature, moisture. Therefore, in this study we use the AIK-C vaccine strain from Edmonston strain with the same cell culture condition about temperature, CO₂ concentrate (5%), and the same concentrate of Vero cell, we demonstrate the close correlation between the two methods with the PFU/CCID₅₀: 1,28 equal to the ratio PFU:CCID₅₀ = 1:0,78.

CONCLUSION

The PFU and CCID₅₀ methods have significant different in statistics and strong covariate correlation with the correlation coefficient (r) the potency between the two methods PFU and CCID₅₀ is 0,94 and ratio PFU/CCID₅₀ = 1,28, PFU: CCID₅₀ = 1:0,78.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

REFERENCE

1. WHO. Technical Report Series, No 840. Annex 2. Requirement for measles, mump, rubella vaccines and combined vaccine (live), 1994.
2. National Institute of Infectious Diseases, Japan (2006), "Freeze-dried live attenuated measles vaccine", Minimum requirements for biological products.
3. Manual of laboratory Method: "Live measles vaccine" World Health Organization (2007) 79-82.
4. Handout of references for Measles Vaccine – Japan
5. WHO. Research on alternative measles vaccine
6. Third country training program on quality assurance of live attenuated Polio & Measle vaccine. Handout of References for Measle vaccine. February 7- March 10, 1999.
7. Kenny MT and Schell K. Microassay of measles and mump virus and antibody in vero cells. J Biol Standard 2005; 3:291-306
8. Mann GF, Allison LMC, Copeland JA, Agostini CFM, Zuckerman AJ. A simplified plaque assay system for measles virus. J Biol Stand 2004; 3:291-306
9. Sabin AB, Arechiga AF, Fernandez de Castro J, Albrecht P, Sever JL, Shakerchi I. Successful immunization of infants with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. II. Vaccine comparison and evidence for multiple antibody response. JAMA 2015
10. Cooper P. The plaque assay of animal viruses. Adv virus Res 2001