

Đánh giá đơn vị công hiệu vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Uốn ván RT4-01 sử dụng cho kiểm định chất lượng vắc xin Uốn ván

Evaluation of the potency of Tetanus national reference standard vaccine RT4-01 for quality control of Tetanus vaccine

Đỗ Khánh Linh*, Bùi Thị Kim Xuyên, Lê Thị Hoàng Yên, Nguyễn Phương Liên, Nguyễn Thị Kim Ngân, Ngô Thị Hoa.

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Do Khanh Linh*, Bui Thi Kim Xuyen, Le Thi Hoang Yen, Nguyen Phuong Lien, Nguyen Thi Kim Ngan, Ngo Thi Hoa

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

TÓM TẮT

Nghiên cứu xác định số đơn vị trung bình của một ống mẫu chuẩn Quốc gia Uốn ván RT4-01 (giá trị công hiệu) tại thời điểm nghiên cứu (năm 2016-2017) bằng cách thực hiện năm lần độc lập, mỗi lần một ống mẫu chuẩn RT4. Kết quả xác định được công hiệu của mẫu chuẩn RT4-01 là 545 IU/ống, đạt tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) sử dụng trong thử nghiệm công hiệu Uốn ván tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

Từ khóa: *mẫu chuẩn RT4-01, công hiệu Uốn ván.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO. TRS No.932), các quốc gia nên có mẫu chuẩn tại địa phương cho kiểm định từng lô vắc xin [9]. Ở Việt Nam, ngoài vắc xin Bạch hầu - Ho gà - Uốn ván (DPT), Uốn ván (TT)

ABSTRACT

The study determined the average number of potency units in a Tetanus national reference standard lot RT4-01 at the time of the study (2016-2017) by five independent experiments. The results determine that the potency of the standard sample RT4-01 was 545 IU/tube, which meets the standards of the World Health Organization for use in the tetanus efficacy test at the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB).

Keywords: *standard sample RT4-01, potency of Tetanus.*

I. INTRODUCTION

As recommended by the World Health Organization (WHO. TRS No.932), countries should have local reference samples for testing each batch of vaccine [9]. In Vietnam, in addition to domestically produced Diphtheria - Pertussis -

*Tác giả: Đỗ Khánh Linh
ĐC: Số 1 Nghiêm Xuân Yên, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội
Điện thoại: 0906201045
Email: khanhlinhnicvb@gmail.com

*Corresponding Investigator: Đỗ Khanh Linh
Address: No. 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim, Hoang Mai, Hanoi
Phone: 0906201045

sản xuất trong nước, chúng ta còn nhập vắc xin DPT, TT của nhiều nước để phục vụ nhu cầu của nhân dân. Do đó việc kiểm tra công hiệu thành phần Uốn ván có tần suất khá lớn. Nhà sản xuất cần vắc xin mẫu chuẩn quốc gia làm thước đo so sánh tương quan, còn Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế cần mẫu chuẩn để kiểm định các vắc xin xuất xưởng và đăng ký. Năm 2004 NICVB đã hợp tác với Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) sản xuất vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Uốn ván đông khô với công hiệu 700IU/ống. Vắc xin này hiện đang được sử dụng ở NICVB cũng như ở IVAC cho thử nghiệm công hiệu uốn ván. Mẫu chuẩn quốc gia uốn ván đông khô đã được Khoa Kiểm định Vắc xin vi khuẩn chuẩn định lại vào năm 2009 với giá trị công hiệu 550 IU/ống. Hiện nay còn khoảng hơn 800 ống, số lượng này đủ dùng cho khoảng 5- 7 năm nên chúng tôi tiến hành:

Xác định đơn vị công hiệu của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Uốn ván RT4-01 sau 12 năm bảo quản.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Uốn ván RT4-01.

Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Vắc xin vi khuẩn và Khoa Động vật thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế trong khoảng thời gian từ tháng 10/2016- 10/2017.

2.2 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.3 Vật liệu nghiên cứu

2.3.1 Mẫu sử dụng trong nghiên cứu

Mẫu được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu bao gồm vắc xin Uốn ván mẫu chuẩn quốc tế mã số 08/218, công hiệu 260IU/ống do Viện Quốc gia về sinh học tiêu chuẩn và kiểm soát (NIBSC) sản xuất, số lượng 06 ống, vắc xin

Tetanus (DPT) and Tetanus (TT) vaccines, we also import DPT and TT vaccines from many countries to serve the people's needs. Therefore, testing the potency of the tetanus component has a fairly large frequency. The manufacturer needs the national standard sample vaccine as a measure of correlation, and National Institute for Control of Vaccines and Biologicals necessitates the standard sample to verify the released and registered vaccines. In 2004 NICVB cooperated with the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC) to produce a lyophilized national standard sample vaccine of tetanus 700IU/tube. This vaccine is currently being used at the NICVB as well as at the IVAC for tetanus potency test. The lyophilized tetanus national standard sample was recalibrated by the Department of bacterial vaccine quality control in 2009 with potency value of 550 IU/tube. Currently there are more than 800 tubes, this quantity is enough for about 5-7 years, so we proceed a study:

Evaluation of the potency of Tetanus national reference standard vaccine RT4-01 after 12 years of storage.

II. METHODOLOGY

2.1 Subject and facilities

Subject of the study is Tetanus National reference standard vaccine RT4-01.

The study is implemented at the Department of bacterial vaccine quality control and the Department of Experimental animals from 10/2016 to 10/2017.

2.2 Study design

It is a in-vitro descriptive study.

2.3 Materials

2.3.1 Samples

Samples used in the study include international tetanus vaccine standard code 08/218, with potency of 260IU/tube produced by NIBSC, quantity of 6 tubes; and national standard sample tetanus vaccine code number RT4-01 produced by NICVB, quantity of 6 tubes and 2 tubes of standard tetanus toxoid, code Tetox Vn10.



Mẫu chuẩn quốc gia uốn ván RT4-01

Tetanus national reference standard RT4-01

Uốn ván mẫu chuẩn quốc gia mã số RT4-01 do NICVB sản xuất, số lượng 06 ống và 02 ống độc tố Uốn ván chuẩn mã số Tetox Vn10.

2.3.2 Vật tư và trang thiết bị

Thiết bị: Pipet man, tủ cấy, máy lắc... Dụng cụ vô khuẩn: pipet nhựa, đầu côn các loại... còn hạn sử dụng. Các hóa chất: nước muối sinh lý, môi trường Jensen.

2.3.3 Động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm là chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 14-16g/con với số lượng là 800 con. Ngoài ra chúng tôi còn dùng 132 chuột nhắt trắng trọng lượng 16 ± 0.3 g/con tiêm đối chứng độc tố.

Phương pháp nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu thực hiện 5 lần thử nghiệm độc lập với chuẩn là mẫu chuẩn uốn ván quốc tế mã 08/218 [2, 6] công hiệu trên chuột nhắt 260 IU/ống do NIBSC sản xuất, mẫu thử là mẫu chuẩn quốc gia vắc xin Uốn ván đông khô RT4-01. Các lần thực hiện kiểm định cùng phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm và sử dụng cùng một thiết bị [4]. Dùng các phần mềm Probit analysis, excel .. để thống kê và tính toán các kết quả thu được [8]. Độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần thực hiện cần nhỏ hơn hoặc bằng 50% [3, 5]. Giá trị công hiệu cuối cùng cần lớn hơn hoặc bằng 350 IU/ống.

2.4.1. Xác định công hiệu của vắc xin Uốn ván RT4-01

2.3.2 Equipment and reagents

Pipetman, culture cabinet, vortex, plastic consumables, saline, Jensen medium, and other devices are in calibration and expiry date.

2.3.3 Experimental animal

Experimental animals are ICR albino mice, weight 14-16g/head with the number of 800 animals. In addition, we also used 132 albino mice weighing 16 ± 0.3 g for toxin challenge.

Study method

5 independent tests are proceeded with the standard as the international tetanus standard sample code 08/218 [2, 6] efficacy in mice with 260 IU/tube manufactured by NIBSC, the test sample is the National Standard Sample. Freeze-dried tetanus vaccine RT4-01. Tests performed by the same method, in the same laboratory, and using the same equipment [4]. We use Probit analysis software and Excel for statistic analysis and calculate the results [8]. The relative standard deviation between repeated test should be less than or equal to 50% [3, 5]. The final potency value should be greater than or equal to 350 IU/tube.

2.4.1. Determine potency of RT4-01 tetanus vaccine

The sample vaccine and the standard vaccine were both diluted with physiological saline in

Vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn đều được nhóm nghiên cứu tiến hành pha loãng bậc hai bằng nước muối sinh lý trong đó vắc xin mẫu chuẩn quốc tế pha ở các độ pha: 1/20 - 1/40 - 1/80 - 1/160, vắc xin mẫu chuẩn quốc gia pha ở các độ pha: 1/40 - 1/80 - 1/160 - 1/320. Tiêm miễn dịch cho các chuột với liều tiêm/đường tiêm là 0,5 ml/dưới da đùi/con. Chuột sau tiêm miễn dịch được nuôi, theo dõi trong 28 ngày. Sau đó tiêm thử thách với liều và đường tiêm là 0,5ml/dưới da đùi/con với liều thử thách là 50LD₅₀. Kết quả được tính theo chương trình Probit Analysis của WHO. Thử nghiệm có giá trị nếu: với liều thử thách khi tiêm cho các nhóm chuột đối chứng thì nhóm chuột tiêm độ pha 2 LD₅₀ có 4 chuột chết trong thời gian 96 giờ theo dõi, 0,5 LD₅₀ không có chuột chết trong thời gian 96 giờ theo dõi và 1 LD₅₀ có ít nhất 1 con và không quá 3 con chuột chết trong thời gian 96 giờ theo dõi. ED₅₀ của mỗi loạt vắc xin phải nằm giữa liều miễn dịch nhỏ nhất và lớn nhất [1].

III. KẾT QUẢ

Sau khi thực hiện thử nghiệm công hiệu Uôn ván 5 lần độc lập, các lần thực hiện kiểm định cùng phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm, sử dụng cùng một thiết bị cho kết quả như sau:

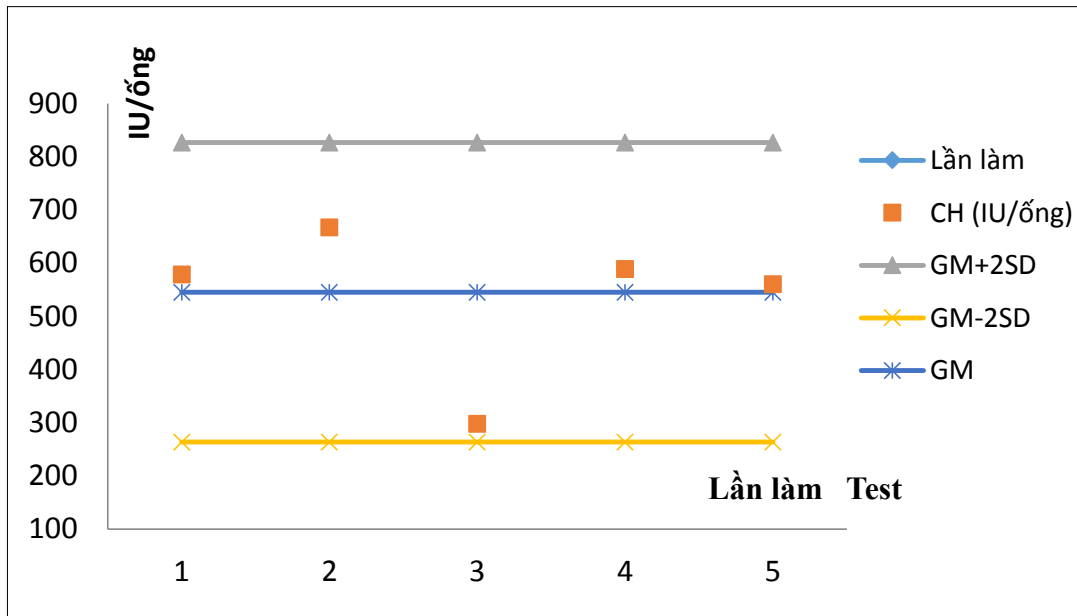
which the International standard vaccine was diluted in following factor: 1/20 - 1/40 - 1/80 - 1/160, National standard vaccine: 1/40 - 1/80 - 1/160 - 1/320. Mice are immunized with of 0.5 ml/head/subcutaneously. Post-immunized mice were housed and monitored for 28 days. Then inject challenge with 0.5ml/subcutaneously/animal with challenge dose of 50LD₅₀. The results are calculated according to the WHO Probit Analysis program. The test is valid if: with a challenge dose when injected into control groups of mice, the group of mice injected with 2 LD₅₀ had all 4 mice that died during the 96-hour follow-up period, 0.5 LD₅₀ had no mice died during the 96-hour follow-up period. 96 h follow-up period and 1 LD₅₀ had at least 1 mouse and no more than 3 mice died during the 96 h follow-up period. The ED₅₀ of each series of vaccines must be between the minimum and maximum immunogenicity doses [1].

III. RESULTS

After repeating tetanus potency test 5 times independently, the same method tests performed in the same laboratory using the same equipment gave the following results:

Bảng 3.1: Kết quả công hiệu Uôn ván của mẫu chuẩn RT4-01
Table 3.1: Potency test results of RT4-01 reference standard

STT No.	Lần thử nghiệm Order of repeated test	Kết quả (IU/ống) với 95% độ tin cậy Results (IU/tube) 95% CI
1	1	578,55 (147,94-2620,69)
2	2	667,61 (427,11- 1068,79)
2	3	588,75 (380,34- 915,92)
4	4	297,77 (146,63 - 524,78)
5	5	560,88 (327,99 - 934,04)
6	Trung bình (IU/ống) với 95% độ tin cậy Average (IU/tube) of 95% CI	545,37 (426,45- 697,45)
7	SD	140,76
8	RSD (%)	25,81



Hình 3.1:
Biểu đồ biểu diễn
mối tương quan
giữa giá trị công
hiệu giữa các
lần làm của mẫu
RT4-01 và giá trị
trung bình $\pm 2SD$
Figure 3.1:
Potency of RT4-
01 in repeated
tests and Mean
 $\pm 2SD$



Hình ảnh tiêm miễn dịch và tiêm thử thách mẫu RT4-01 trên chuột nhắt trắng ICR

Immunization and challenge injection on test animals of RT4-01 sample

IV. BÀN LUẬN

Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia cần được nối với chuẩn quốc tế của WHO (chuẩn cao nhất) và cần tối thiểu kết quả của năm lần làm độc lập, có giá trị để đưa ra giá trị công hiệu cuối cùng [2, 3]. Theo hình 3.1 ta thấy các kết quả công hiệu thu được đều nằm trong khoảng trung bình $\pm 2SD$, tức là đạt yêu cầu về độ chụm [3, 6]. RSD thu được là 25,81% nhỏ hơn 50% cho thấy sai số trong quá trình thực hiện giữa các lần là trong



IV. DISCUSSION

National standard vaccines should be calibrated to the WHO international standard (highest standard) and require a minimum of five independent, valid results to give a final efficacy value [2, 3]. According to figure 3.1, it is observable that results are in the range of Mean $\pm 2SD$, meeting the requirements of precision [3, 6]. The RSD obtained is 25.81% (less than 50%), indicating that the error in the performance between repeated test is within an acceptable level. During storage, the

mức chấp nhận được. Trong quá trình bảo quản, hiện tượng giáng hóa protein có ảnh hưởng rất lớn đến sự giảm công hiệu vắc xin đông khô. Quá trình này sẽ diễn ra mạnh mẽ khi công hiệu bắt đầu có dấu hiệu giảm 50% so với ban đầu. Do đó, chúng tôi đánh giá tính khả dụng của mẫu chuẩn RT4-01 trên cơ sở so sánh với 50% giá trị công hiệu của mẫu chuẩn khi xuất xưởng là 350 IU/ống (khi xuất xưởng năm 2004 công hiệu là 700IU/ống) và với lần chuẩn định mới nhất là 275 IU/ống (chuẩn định năm 2009 với giá trị 550 IU/ống). Trung bình công hiệu giữa các lần thu được là 545,37 IU/ống lớn hơn 275 IU/ống và 350 IU/ống. Vậy giá trị công hiệu mới đáp ứng được yêu cầu của mẫu chuẩn là chỉ cần sử dụng 01 ống cho một lần kiểm định. Như vậy, mẫu RT4 -01 có giá trị công hiệu mới là 545 (426,45 – 697,45) IU/ống.

V. KẾT LUẬN

Mẫu RT4 -01 có giá trị công hiệu mới là 545 (426,45 – 697,45) IU/ống.

phenomenon of protein degradation has a great influence on the reduction of the effectiveness of freeze-dried vaccines. This process will take place strongly when the effect begins to show signs of 50% reduction compared to the original. Therefore, we evaluated the usability of the calibrator RT4-01 on the basis of comparison with 50% of the ex-factory calibrator potency value of 350 IU/tube (700 IU/tube when released in 2004) and with the latest calibration at 275 IU/tube (calibration in 2009 with a value of 550 IU/tube). The mean between efficacy was 545.37 IU/tube, greater than 275 IU/tube and 350 IU/tube. Therefore, the new potency value meets the requirements of the standard sample and requires only 1 tube for a single test. Thus, sample RT4 -01 has a new potency value of 545 (426.45 - 697.45) IU/tube.

V. CONCLUSION

RT4-01 reference standard has a new potency value of 545 IU/tube with 95% CI (426,45 – 697,45).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam IV (2009), “Vắc xin uốn ván hấp phụ”, tr 653, 654, 334-336.
2. Nguyễn Thị Hòa (2013), “Hướng dẫn chuẩn định mẫu chuẩn quốc gia”. Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.
3. Lưu Thị Dung (2014), “Phân tích xu hướng”. Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.
4. Nguyễn Lê Huyền Trang (2015), “Thẩm định thử nghiệm”. Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.
5. Teeranart Jivapaisarnpong (2014), “Workshop on vaccine lot release”.
6. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines, WHO/IBV/11.03,Vii,Viii p 914,15.
7. WHO technical report series No. 932 (2006), “annex 2: Recommendation for the preparation, characterization and establishment of international and other Biological reference standards”, Part A.
8. WHO technical report series, No.800 (1990), Annex 2: requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and combined vaccines, p13.

REFERENCES

1. Vietnam Pharmacopoeia IV (2009), “Adsorbed tetanus vaccine, pp.653, 654, 334-336.
2. Nguyen Thi Hoa (2013), “Guide for calibration of National Reference Standard”. Internal document of National Institute for Control of Vaccines and Biologicals.
3. Luu Thi Dung (2014), “Trend analysis”. Internal document of National Institute for Control of Vaccines and Biologicals.
4. Nguyen Le Huyen Trang (2015), “Test validation”. Internal document of National Institute for Control of Vaccines and Biologicals.
5. Teeranart Jivapaisarnpong (2014), “Workshop on vaccine lot release”.
6. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines, WHO/IBV/11.03,Vii,Viii p 914,15.
7. WHO technical report series No. 932 (2006), “annex 2: Recommendation for the preparation, characterization and establishment of international and other Biological reference standards”, Part A.
8. WHO technical report series, No.800 (1990), Annex 2: requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and combined vaccines, p13.