

ESTABLISHING A STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR DETERMINING THE POTENCY OF IPV COMPONENT IN SINGLE-ANTIGEN AND COMBINATION VACCINES MANUFACTURED BY SANOFI PASTEUR

Lê Thị Hải Yên*, Đào Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Hà

* *The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

Received 19 September 2023

Accepted 8 December 2023

Abstract

Currently, there are three IPV component - containing vaccines available in Vietnam manufactured by Sanofi Pasteur: Imovax Polio (the single-antigen vaccine), Tetraxim and Hexaxim (the combination vaccines). Due to the differences between registration durations of various vaccines, the Department of Viral Vaccines of NICVB is attempting to find out an unified method for quality control of these vaccines. Sanofi Pasteur's IPV vaccines are derived from the following strains: Mahoney type 1, MEF type 2 and Saukett type 3. All of them are inactivated vaccines. In this study, ELISA was used to determine the potency of IPV component. The virus antigen was diluted into appropriate dilutions and coated into a 96-well ELISA plate, then primary monovalent antibodies which are specific for each polio type were added. After that, secondary IgG antibodies compatible with the primary antibodies were used and then we read the results through the fluorescence signal. The results are calculated according to the acquired OD signals and the reference standard of known antigen concentrations. The procedure for determination of potency of IPV component was established. The testing results were expected to meet 6 evaluation criteria, in the scope of this article we would like to focus on three of them: trueness, accuracy (reproducibility) and robustness. Evaluation criteria: trueness t (type 1, type 2 and type 3) $< t_{\alpha}(4,303)$; accuracy (reproducibility) CV (type 1, type 2 and type 3) $\leq 20\%$ and intermediate accuracy CV ≤ 20 ; robustness meets requirements.

Keywords: IPV type 1, type 2, type 3, ELISA, potency, accuracy

* Corresponding author

E-mail address: haiyenleth@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.120>

THIẾT LẬP QUI TRÌNH CHUẨN TRONG KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN IPV TRONG VẮC XIN ĐƠN VÀ PHỐI HỢP CỦA NHÀ SẢN XUẤT SANOFI PASTEUR

(bài 1)

Lê Thị Hải Yến*, Đào Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Hà
*Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 19 tháng 9 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 8 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt

Hiện nay, tại Việt Nam đang lưu hành 3 loại vắc xin chứa thành phần IPV của nhà sản xuất Sanofi Pasteur là vắc xin đơn Imovax Polio, vắc xin phối hợp Tetraxim, Petaxim, Hexaxim. Thời gian đăng ký của các vắc xin là khác nhau nên thống nhất phương pháp dùng để kiểm định chất lượng vắc xin của cùng một nhà sản xuất là kỹ thuật khoa kiểm định vắc xin Vi rút hướng tới.

Vắc xin IPV của Sanofi Pasteur được sản xuất từ các chủng Mahoney týp 1, chủng MEF týp 2, chủng Saukett týp 3. Đây là vắc xin bất hoạt. Phương pháp sử dụng để tính hiệu giá là phương pháp ELISA. Kháng nguyên được pha loãng ở dãy độ pha thích hợp đưa vào phiên 96 giếng ELISA, sau đó dùng kháng thể đặc hiệu cho từng týp gắn vào. Gắn kháng thể bậc 2 IgG tương thích với kháng thể bậc 1 rồi đọc kết quả thông qua tín hiệu huỳnh quang, kết quả được tính toán theo tín hiệu OD và hàm lượng mẫu chuẩn đã biết.

Quy trình được thiết lập và thẩm định đạt kết quả trên 6 tiêu chí về thẩm định. Trong khuôn khổ bài báo chúng tôi chia làm 2 bài. Ở bài viết này chúng tôi chọn 3 tiêu chí để trình bày là độ đúng, độ chính xác, độ mạnh.

Độ đúng t (týp 1, týp 2 và týp 3) $< t_{\alpha}(4,303)$. Độ chính xác (độ tái lập) CV (týp 1, týp 2 và týp 3) $\leq 20\%$, độ chính xác trung gian CV $\leq 20\%$ và Độ mạnh đạt yêu cầu.

Từ khoá: IPV týp 1- týp 2- týp 3, ELISA, hiệu giá, độ chính xác...

1. Đặt vấn đề

Mỗi năm có từ 10-20 lô vắc xin bại liệt tiêm được nhập khẩu về Việt Nam. Vắc xin từ các nhà sản xuất khác nhau. Vắc xin bại liệt tiêm có 2 dạng là vắc xin đơn và vắc xin phối hợp (4 thành phần – Tetraxim, 5 thành phần Pentaxim, 6 thành phần – Hexaxim).

Vắc xin bại liệt tiêm (IPV) có loại vắc xin đơn và vắc xin phối hợp các thành phần khác bao gồm bạch hầu, ho gà, uốn ván, Hib, viêm gan B...

Có 2 phương pháp dùng để kiểm tra công hiệu của vắc xin IPV là phương pháp *In vivo* và *In vitro*. Phương pháp *In vivo* dựa trên việc đánh giá đơn vị kháng nguyên D (D-Ag). Đơn vị D-Ag được sử dụng làm thước đo hiệu lực khi kháng thể được sinh miễn dịch từ kháng nguyên IPV. Phương pháp để định lượng ra đơn vị kháng nguyên D là phương pháp ELISA gián tiếp.

Đánh giá công hiệu IPV *In vitro* dựa trên dựa trên việc đánh giá số lượng đơn vị Kháng nguyên D (D-Ag) trong IPV. Đơn vị D-Ag được sử dụng làm thước đo hiệu lực vì nó phần lớn được biểu hiện trên các virion truyền nhiễm tự nhiên và là chất sinh miễn dịch bảo vệ.

Thử nghiệm *In vitro* được sử dụng phổ biến nhất là ELISA gián tiếp được sử dụng để đảm bảo tính nhất quán trong suốt quá trình sản xuất. [5]

Theo hướng dẫn của tổ chức y tế thế giới, kiểm định chất lượng vắc xin IPV được thực hiện thông qua thử nghiệm định lượng kháng nguyên hoặc định lượng kháng thể. Theo được điển Châu Âu định lượng hàm lượng kháng nguyên D theo từng týp riêng biệt. Thử nghiệm này có thể định lượng kháng thể bằng phương pháp *invivo*. [1, 8]

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp *In vitro* thực hiện tại phòng thí nghiệm, định lượng trực tiếp kháng nguyên theo kỹ thuật ELISA. Phương pháp ELISA được tiến hành như sau: Kháng thể được gắn vào các giá thể trên phiến 96 giếng. Sau đó rửa phiến loại bỏ các kháng thể tự do, dùng hóa chất thích hợp là BSA hoặc Skill milk để phủ kín các lỗ trống trên giếng. Kháng nguyên được pha loãng để giảm bớt sự ức chế của tá được kết hợp với các kháng thể đặc hiệu tương ứng. Sau đó ủ để phản ứng kháng nguyên kháng thể xảy ra. Khi kháng nguyên kháng thể bắt cặp thì thêm kháng thể cộng hợp có cơ chất. Cuối cùng đo OD ở bước sóng thích hợp. [10].

Sau khi thiết lập phương pháp thành công chúng tôi tiến hành thẩm định phương pháp. Thẩm định qui trình là xác nhận qui trình phân tích được sử dụng là phù hợp. Kết quả được đánh giá qua các tiêu chí từ độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, độ tuyến tính.....[3]

Để đáp ứng nhu cầu chủ động trong việc đánh giá chất lượng vắc xin này, khoa kiểm định vắc xin vi rút tiến hành “Thiết lập qui trình chuẩn trong kiểm định công hiệu thành phần IPV trong vắc xin đơn và vắc xin phối hợp của Sanofi bằng phương pháp ELISA”.

Mục tiêu nghiên cứu của thẩm định phương pháp này: Xác định độ đúng, độ chính xác, độ mạnh.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Qui trình xác định công hiệu vắc xin IPV đơn và phối hợp của Sanofi bằng phương pháp ELISA.
- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Kiểm định Vắc xin Vi rút, NICVB;
- Thời gian nghiên cứu từ 04/2020 - 12/2020.

2.2 Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp mô tả, hồi cứu & tiến cứu.

2.3 Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1 Vật liệu và hóa chất

Vắc xin mẫu chuẩn lô 11.07.07 –Sanofi: Típ 1: 1149 DU/ml, Típ 2:249 DU/ml, Típ 3: 1016 DU/ml, vắc xin chuẩn nội kiểm lô J1731-Sanofi, Kháng thể típ 1 mã 437517-Sanofi, Kháng thể típ 2 mã 934952-Sanofi, Kháng thể típ 3 mã 405115-Sanofi, Kháng thể phát hiện típ 1 mã 123,95-Sanofi, Kháng thể phát hiện típ 2 mã 3495-

Sanofi, Kháng thể phát hiện típ 3 mã 355-94-Sanofi. Hóa chất : PBS (không có Ca Mg): NICVB VR02-24, Tween 20 : Merk, code: 8,22184,0050, Na₂CO₃: Sigma, NaHCO₃: Sigma, Skim milk: Difco. ABTS tablets: Roche, code: 17114000, ABTS buffer: Roche, code: 1120450, SDS: GE, code: 17131301.

2.3.2 Mẫu thử

Trong thiết kế thí nghiệm này chúng tôi chọn 1 vắc xin đại diện của hãng Sanofi là vắc xin Tetraxim lô R3D36 hạn dùng 31/01/2021.

2.3.2 Thiết bị và vật tư tiêu hao

Pipetman đơn 5000 µl, Pipetman đơn 1000 µl, Pipetman đơn 200µl, Pipetman đơn 100µl, Pipet aid (Eppendorf). Máy lắc (Maxi mix II), dàn máy ELISA (Human), bể ổn nhiệt (Shel-lab), Tủ mát (Sanyo), tủ ấm (Sanyo).

2.4 Thiết kế nghiên cứu

Qui trình được thiết kế độ đúng như sau: Vắc xin mẫu chuẩn: pha loãng vắc xin chuẩn ra các độ pha từ 1/35, 1/70, 1/140, 1/280 1/560, 1/1120, 1/2240, Thực hiện pha cùng độ pha trên với 3 típ. Mỗi nồng độ lặp lại 3 lần vào 3 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn của độ đúng t (típ 1, típ 2 và típ 3) < t_α(4,303). Độ chính xác. Độ chính xác gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Bố trí thí nghiệm thí nghiệm độ lặp: Vắc xin mẫu thử Tetraxim được thực hiện 6 lần trong

cùng một ngày cùng một nhóm thử nghiệm với hóa chất, các trang thiết bị giống nhau, (Thực hiện riêng rẽ từng títpe). Tiêu chuẩn CV $\leq 20\%$. Bố trí thí nghiệm độ chính xác trung gian : Vắc xin mẫu thử

Tetraxim được thực hiện trong 5 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn CV $\leq 20\%$. Độ mạnh: Chia hai nhóm thực hiện, Thực hiện 5 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn độ mạnh đạt yêu cầu.

2.5. Quy trình thí nghiệm [10]

Ngày 1: Pha loãng kháng thể gắn phiến.

Bảng 1. Pha loãng kháng thể

	Nồng độ gốc	Nồng độ sử dụng	Thể tích kháng thể	Thể tích bufer
Títpe 1	1/10	1/1000	100 μ l	9,9 ml
Títpe 2	1/10	1/400	200 μ l	7,8 ml
Títpe 3	1/10	1/1000	100 μ l	9,9 ml

- Mỗi títpe kháng thể gắn 9 cột kháng thể (cột 2 đến cột 10). Trừ 2 giếng trắng (hàng F cột 1, 2). Nhỏ 50 μ l mỗi giếng, vỗ nhẹ trước khi phủ với miếng dán. Dán kín phiến. Cát tủ lạnh (2-8⁰C) qua đêm.
- Ngày 2: Rửa phiến bằng PBS 1X Tween (0,025%) milk 2%, nhỏ vào

mỗi giếng 200 μ l, rửa 4 lần. Đập phiến trên giấy thấm cho khô. Để lần rửa cuối cùng các phiến ít nhất 30 phút ở nhiệt độ phòng. Pha vắc xin chuẩn, pha loãng bằng dung dịch PBS 1X+ milk 2% (tiến hành pha loãng trong thời gian ủ).

Bảng 2. Pha loãng vắc xin chuẩn

Độ pha loãng	Títpe 1 (DU/ml)	Títpe 2 (DU/ml)	Títpe 3 (DU/ml)
1/35	32,8	7,68	29,0
1/70	16,4	3,84	14,5
1/140	8,2	1,92	7,25
1/280	4,1	0,96	3,63
1/560	2,05	0,48	1,81
1/1120	1,03	0,24	0,91
1/2240	0,52	0,12	0,46

- Pha loãng vắc xin thử và chuẩn nội kiểm. Pha loãng bậc 2 từ độ pha 1/2 đến 1/64. Nhỏ 80 µl vắc xin vào mỗi giếng ở hàng A cột 1 đến 9. Trộn đi trộn lại 4 lần, hút 80 µl hỗn dịch từ hàng A xuống hàng B. Lặp lại các hàng tiếp theo đến hàng cuối cùng.
- Nhỏ 50 µl vắc xin chuẩn vào 3 cột 2 đến 4. Nhỏ 50 µl chuẩn nội kiểm vào cột 5 đến cột 7. Nhỏ 50 µl vắc xin vào cột 8 đến 10. Dán kín phiến, ủ 1h trong $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Pha loãng kháng thể phát hiện bằng dung dịch PBS milk 2%

Bảng 3. Pha loãng kháng thể phát hiện

	Nồng độ gốc	Nồng độ sử dụng	Thể tích kháng thể	Thể tích bufer
Týp 1	1/200	1/20000	100 µl	9,9 ml
Týp 2	1/10	1/10000	10 µl	10 ml
Týp 3	1/200	1/10000	200 µl	9,8 ml

- Rửa phiến 3 lần, mỗi giếng 200 µl bằng PBS 1X Tween (0,025%) milk 2%. Nhỏ 50 µl kháng thể đã pha loãng vào mỗi giếng. Dán kín phiến, ủ 1h trong $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pha loãng enzyme cộng hợp bằng dung dịch PBS 1X Tween (0,025%) milk 2%, pha loãng 1000 lần cho mỗi týp. Rửa 3 lần bằng PBS 1X Tween (0,025%) milk 2%(200 µl mỗi giếng). Nhỏ 50 µl enzyme cộng hợp đã pha loãng vào mỗi giếng. Dán kín phiến, ủ 1h trong $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pha ABTS tablet 1 viên trong 5 ml ABTS buffer, tránh ánh sáng. Rửa 3 lần bằng PBS 1X Tween (0,025%) milk 2%(200 µl mỗi giếng) Thêm 50 µl dung dịch ABTS buffer mỗi giếng. Ủ 10 phút cho týp 1, 15 phút cho týp 2 và 3 trong tối ở $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Thêm 25 µl SDS 1% mỗi giếng. Đọc kết quả ở bước sóng đôi

405nm-630nm. Tính kết quả bằng Parallel.

Đánh giá thử nghiệm:

Thử nghiệm được coi là có giá trị nếu:

+ Độ pha của vắc xin chuẩn và vắc xin thử phải tuyến tính và song song với nhau. Sử dụng chương trình “Parallel Line Assay”, $R^2 \geq 95\%$.

+ Trong bản phân tích kết quả: giá trị đường song song (Parallelism) và giá trị tuyến tính (Linearity) không được có dấu sao (*).

+ Độ lệch từ tính đồng nhất của phương sai (Deviation from homogeneity of variance) nếu có thì phải không có ý nghĩa thống kê (Not significant).

+ Giá trị OD trong một lần thử nghiệm giữa các giếng lặp lại không sai khác quá 20%.

+ Giá trị OD chứng âm (blank) nhỏ hơn giá trị OD mẫu thử.

- + Kết quả mẫu chuẩn nội kiểm phải nằm trong khoảng giá trị công bố của nhà sản xuất.
- + OD blank = Mean + 3SD: Sử dụng dung dịch pha loãng làm chứng âm, thực hiện trên 3 giếng.
- + Dương tính: OD mẫu > OD blank và dung dịch đổi màu xanh.

Tiêu chuẩn thử nghiệm: Tít I: 20-43 DU/liều, Tít II: 5-9 DU/liều, Tít III: 17-36 DU/liều.

3. Kết quả
Độ đúng

Bảng 7. Độ đúng

Ngày thực hiện	Hàm lượng kháng nguyên DU/liều		
	Tít 1	Tít 2	Tít 3
1	36,47	7,83	28,69
2	35,87	7,11	29,26
3	31,08	6,97	33,98
Xtb	34,47	7,30	30,64
s	2,96	0,46	2,90
Xmc	33,7	7,7	31
Xtb-xmc	0,77	0,40	0,36
$s/\sqrt{3}$	1,73	0,27	1,68
t	0,45	1,50	0,21

Chú thích: Xtb: Giá trị trung bình, s: Độ lệch chuẩn, Xmc: Giá trị mẫu chuẩn.

Nhận xét: Theo kết quả bảng 7. Độ đúng: **Độ chính xác**

Độ đúng Tít 1 với $t = 0,45 < t_{\alpha}(4,303)$. Độ **Độ lặp lại:**

đúng Tít 2 với $t = 1,50 < t_{\alpha}(4,303)$. Độ

đúng Tít 3 với $t = 0,21 < t_{\alpha}(4,303)$.

Bảng 8. Độ lặp lại

Lần thực hiện	Hàm lượng kháng nguyên DU/liều		
	Tít 1	Tít 2	Tít 3
1	36,35	8,25	32,49
2	35,50	8,29	30,44
3	34,61	8,19	30,50
4	35,41	8,08	31,32

5	32,55	8,23	30,95
6	34,36	8,02	30,57
Mean	34,80	8,18	31,05
SD	1,31	0,11	0,78
CV	3,76	1,30	2,52

Chú thích: Mean : Giá trị trung bình, SD: Độ lệch chuẩn, CV: Độ lệch chuẩn tương đối

Nhận xét: Theo kết quả bảng 8. Độ lặp lại: Độ lặp lại tít 2 với CV = 1,30 < 20%. Quy trình đạt độ lặp lại tít 2.
 Độ lặp lại tít 1 với CV = 3,76 < 20%. Quy trình đạt độ lặp lại tít 1.
 Độ lặp lại tít 3 với CV = 2,52 < 20%. Quy trình đạt độ lặp lại tít 3.

4.4.2.2 Độ chính xác trung gian

Bảng 9. Độ chính xác trung gian

Ngày thực hiện	Hàm lượng kháng nguyên DU/liều		
	Tít 1	Tít 2	Tít 3
1	36,35	8,25	32,49
2	35,17	8,24	30,24
3	34,16	8,43	31,38
4	33,90	7,96	31,96
5	34,31	8,38	30,11
Mean	36,00	8,40	30,95
SD	1,00	0,18	1,05
CV	2,78	2,17	3,39

Chú thích: Mean: Giá trị trung bình. SD: Độ lệch chuẩn. CV: Độ lệch chuẩn tương đối

Nhận xét: Theo kết quả bảng 9. Độ chính xác trung gian: tít 2 với CV = 2,17 < 20%. Quy trình đạt độ chính xác trung gian tít 2. Độ chính xác trung gian tít 3 với CV = 3,39 < 20%. Quy trình đạt độ chính xác trung gian tít 3.
 Độ chính xác trung gian tít 1 với CV = 2,78 < 20%. Quy trình đạt độ chính xác trung gian tít 1. Độ chính xác trung gian

Độ mạnh

Bảng 10. Kết quả độ mạnh Típ 1

Ngày thực hiện	Hàm lượng kháng nguyên DU/liều	
	Nhóm 1	Nhóm 2
Ngày 1	36,00	36,35
Ngày 2	34,90	35,17
Ngày 3	35,17	34,16
Ngày 4	34,01	33,90
Ngày 5	32,55	34,31
Mean	34,53	34,78
SD	1,31	1,00
%CV	3,80	2,87

F-Test Two-Sample for Variances			t-Test: Paired Two Sample for Means		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	34,5263	34,7789	Mean	34,5263	34,7789
Variance	1,7232798	0,998501	Variance	1,7232798	0,998501
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4	4	Pearson		
F	1,7258675		Correlation	0,6539208	
P(F<=f) one-tail	0,3050041		Hypothesized		
F Critical one-tail	6,3882329		Mean Difference	0	
			df	4	
			t Stat	-0,563084	
			P(T<=t) one-tail	0,3017216	
			t Critical one-tail	2,1318468	
			P(T<=t) two-tail	0,6034431	
			t Critical two-tail	2,7764451	

Nhận xét: Theo bảng 10. Kết quả độ mạnh Típ 1: Giá trị $F = 1,73 < F_{\text{critical one-tail}} (6,39)$, phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Giá trị $t_{\text{Stat}} = -0,56 < t_{\text{Critical two-tail}} (2,78)$: kết quả công hiệu típ 1 làm giữa hai nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 11. Kết quả độ mạnh Tít 2

Ngày thực hiện	<i>Hàm lượng kháng nguyên DU/liều</i>	
	Nhóm 1	Nhóm 2
Ngày 1	8,40	8,25
Ngày 2	8,20	8,24
Ngày 3	7,56	8,43
Ngày 4	8,45	7,96
Ngày 5	8,02	8,38
Mean	8,13	8,25
SD	0,36	0,18
%CV	4,42	2,20

F-Test Two-Sample for Variances

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	8,1259	8,2524
Variance	0,1289138	0,033062
Observations	5	5
df	4	4
F	3,899103	
P(F<=f) one-tail	0,1079846	
F Critical one-tail	6,3882329	

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	8,1259	8,2524
Variance	0,1289138	0,033062
Observations	5	5
Pearson Correlation	-0,810613	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-0,546582	
P(T<=t) one-tail	0,3068628	
t Critical one-tail	2,1318468	
P(T<=t) two-tail	0,6137256	
t Critical two-tail	2,7764451	

Bảng 12. Kết quả độ mạnh Tít 3

Nhận xét: Theo bảng 11. Kết quả độ mạnh tít 2: Giá trị $F = 3,90 < F_{critical\ one-tail} (6,39)$, phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Giá trị $t_{Stat} (-0,55) < t_{Critical\ two-tail} (2,78)$: kết quả công hiệu tít 2 làm giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Ngày thực hiện	Hàm lượng kháng nguyên DU/liều	
	Nhóm 1	Nhóm 2
Ngày 1	30,95	32,49
Ngày 2	30,55	30,24
Ngày 3	30,15	31,38
Ngày 4	30,03	31,96
Ngày 5	32,78	30,11
Mean	30,89	31,24
SD	1,12	1,05
%CV	3,61	3,36

F-Test Two-Sample for Variances

	Variable 1	Variable 2
Mean	30,89218	31,2373
Variance	1,2436374	1,09836
Observations	5	5
df	4	4
F	1,1322678	
P(F<=f) one-tail	0,453536	
F Critical one-tail	6,3882329	

t-Test: Paired Two Sample for Means

	Variable 1	Variable 2
Mean	30,89218	31,2373
Variance	1,2436374	1,09836
Observations	5	5
Pearson Correlation	-0,526426	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-0,40829	
P(T<=t) one-tail	0,351986	
t Critical one-tail	2,1318468	
P(T<=t) two-tail	0,703972	
t Critical two-tail	2,7764451	

Kết quả: Theo bảng 12. Kết quả độ mạnh Típ 3: Giá trị $F = 1,13 < F_{critical\ one-tail} (6,39)$, phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

4. Bàn luận

Hiện nay qui trình kiểm định IPV của các nhà sản xuất đã được thiết lập nhưng tại cơ quan kiểm định của các quốc gia vẫn cần thực hiện thẩm định qui trình vì qui trình này thực hiện về điều kiện của các phòng thí nghiệm là khác nhau về thiết bị và hóa

Giá trị $t_{Stat} = -0,40 < t_{Critical\ two-tail} (2,78)$: kết quả công hiệu típ 3 làm giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

chất thương mại. Và mỗi phòng thí nghiệm sẽ thiết lập các tiêu chuẩn độc lập với nhau.

Có nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra phương pháp không tạo ra giá trị nhất quán khi so sánh với nhau. [2, 4, 6, 7]. Tại kiểm định Quốc gia Việt Nam chúng tôi chưa có

điều kiện đánh giá để so sánh liên labo của phương pháp ELISA này nên chúng tôi thẩm định qui trình độc lập tại Việt Nam để đảm bảo tính chính xác của qui trình. Khi tiến hành chúng tôi xác định đây là qui trình chưa được thẩm định nên xác định đánh giá đầy đủ tất cả các tiêu chí. Trong khuôn khổ của bài báo này chúng tôi chỉ xác định 3 tiêu chí như đã trình bày ở trên. Để chứng minh qui trình được thiết lập chặt chẽ độ đúng thực hiện trên mẫu chuẩn vào 3 ngày khác nhau. Các tít được thực hiện độc lập. Kết quả được đánh giá là so sánh giá trị của mẫu chuẩn thu được và giá trị mẫu chuẩn lý thuyết tại mỗi độ pha bằng tính t. So sánh giá trị t_{α} của bảng phân bố student tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ với độ tin cậy 95%.

$$t = \frac{xtb - xmc}{s/\sqrt{n}}$$
 trong đó s là độ lệch chuẩn, n là số lần thử nghiệm. Tiêu chuẩn chấp thuận $t < t_{\alpha}$. Qua bảng 7 cho thấy độ đúng : t (tít 1= 0,45; tít 2 = 1,5, tít 3=0,21) $< t_{\alpha}$ (4,303). Qui trình đạt yêu cầu về độ đúng với cả 3 tít.

Độ chính xác được đánh giá qua 2 tiêu chí. Độ tái lập và độ chính xác trung gian. Độ tái lập được thực hiện 6 lần trong cùng một ngày với các điều kiện giống nhau về thử nghiệm. Tiêu chuẩn chấp thuận là $CV \leq 20\%$. [9]. Qua kết quả ở bảng 8 ta thu được CV của các tít 1, 2, 3 lần lượt cho các giá trị: 3,76 %; 1,3%; 2,52%. Các giá trị này đều $\leq 20\%$. Qui trình đạt độ tái lập với cả 3

tít. Tiêu chí thứ 2 đánh giá độ chính xác là tiêu chí độ chính xác trung gian. Tiêu chuẩn đánh giá là $CV \leq 20\%$. [9]. Qua kết quả bảng 9 cho thấy CV tít 1: 2,78%, CV tít 2: 2,17%; CV tít 3: 3,39%. Qui trình đạt độ chính xác trung gian của từng tít.

Độ mạnh được thực hiện trên 2 nhóm vào 5 ngày khác nhau. Sử dụng test F so sánh phương sai của 2 nhóm. So sánh với giá trị F của bảng phân phối Fisher để đưa ra kết luận về phương sai của 2 nhóm. Sử dụng phần mềm Excel, hàm t-TEST. t_{test} . Khi $t_{test} \leq t_{bảng}$ tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức với độ tin cậy 95%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với 2 nhóm thực hiện. Theo bảng 10 Kết quả độ mạnh Tít 1: Giá trị $F = 1,73 < F_{critical one-tail} (6,39)$, phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Giá trị $t_{Stat} = -0,56 < t_{Critical two-tail} (2,78)$: kết quả công hiệu tít 1 làm giữa hai nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Quy trình đạt yêu cầu độ mạnh tít 1. Theo bảng 11. Kết quả độ mạnh tít 2: Giá trị $F = 3,90 < F_{critical one-tail} (6,39)$, phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Giá trị $t_{Stat} (-0,55) < t_{Critical two-tail} (2,78)$: kết quả công hiệu tít 2 làm giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Quy trình đạt yêu cầu độ mạnh tít 2. Theo bảng 12. Kết quả độ mạnh Tít 3: Giá trị $F = 1,13 < F_{critical one-tail}$

(6,39), phương sai hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Giá trị $t_{Stat} = -0,40 < t_{Critical\ two-tail}$ (2,78): kết quả công hiệu tít 3 làm giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Quy trình đạt yêu cầu độ mạnh tít 3.

Theo bảng 10, bảng 11, bảng 12: t_{Stat} (tít 1, tít 2 và tít 3) $< t_{Critical\ two-tail}$, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm thực hiện.

Quy trình đạt yêu cầu độ mạnh tít 1, tít 2 và tít 3.

5. Kết luận

Quy trình công hiệu Quy trình kiểm tra công hiệu vắc xin IPV đơn và phối hợp của Sanofi bằng phương pháp ELISA thực hiện tại khoa KĐVX Vi rút có độ tin cậy cao đạt theo tiêu chuẩn đánh giá: về độ đúng, độ chính xác, độ mạnh .

Tài liệu tham khảo

- [1] Dược điển Châu Âu 10. Vắc xin IPV
- [2] Ferguson M, Wood DJ, Minor PD. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccine. Journal of general virology. 1973; 74 (4):685-90 ;
- [3] ICH, Q2, European Medicines Agency
- [4] TanoY, Shimizu H, Martin J, Nishimura, SimizuB, Miyamura T. Antigenic characterization of formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from

live-attenuated Sabin strain. Vaccine. 2007; 25 (41): 7041-6

[5] Thomas Wilton. Method for the quality for control of inactivated Poliovirus vaccine, 2016

[6] Rezapkin G, MartinJ, Chumakov K. Analysis of antigenic profiles of activated poliovirus vaccine and vaccine-derived poliovirus bay block-ELISA method. Biologicals 2005; 33 (1)299-303 ;

[7] Westdijk J, Brugmans D, Martin J, van't Oever A, Bakker WAM, Levels L, et al. Characterization and standardization os Sabin based inactivated polio vaccine; proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccine. Vaccine 2011; 29(18):3390-7;

[8] WHO-TRS 993, Annex3

[9] SOP KĐQG -34 Thẩm định quy trình 10. Báo cáo sản xuất vắc xin mẫu chuẩn IPV.

[10] SOP kiểm tra công hiệu của nhà sản xuất Sanofi Pasteur