
DETERMINATION OF POLYSACCHARIDE CONTENT IN TYPHOID VACCINE BY ELECTROPHORESIS METHOD USING 0.1M TRIS BUFFER

Le Thi Hoang Yen, Tran Hong Tram, Vu Duy Dung, Do Linh Trang*

*National Institute of Vaccines and Medical Biologicals Accreditation

Received 21 August 2023

Accepted 25 December 2023

Abstract

The rocket column electrophoresis method is one of the methods to quantify Vi Polysaccharide content in Vi typhoid vaccine, is the official method as recommended by WHO, and is included in Vietnam Pharmacopoeia V. However, Due to WHO recommendations, the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals and manufacturers need to replace Bacbitan buffer solution with other buffer solutions because Bacbitan is a psychotropic chemical. The study to evaluate the suitability of using 0.1M Tris buffer solution in electrophoresis to determine Vi Polysaccharide content was conducted from November 2022 to April 2023 at the Department of Bacterial Vaccine Quality Control, National Institute for Control of Vaccines and Biologicals.

The results of evaluating the compliance with the accuracy criteria include repeatability $CV=1.02\%$ and intermediate accuracy $CV= 2.02\%$, meeting the requirements according to the $CV\leq 20\%$ standard. From the research results, it has been proven that 0.1M Tris buffer solution can be used in electrophoretic testing to determine Vi Polysaccharide content in the Typhoid Vi vaccine at NICVB.

Keywords: Vi polysaccharide content, electrophoresis, rocket poles.

*Corresponding author

E-mail address: linhtrangnicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.121>

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYSACCHARIDE TRONG VẮC XIN THƯƠNG HÀN VI BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI SỬ DỤNG ĐỆM TRIS 0,1M

Lê Thị Hoàng Yến, Trần Hồng Trâm, Vũ Duy Dũng, Đỗ Linh Trang*

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

Nhận ngày 21 tháng 8 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt

Phương pháp điện di tạo cột tên lửa Rocket là một trong những phương pháp định lượng hàm lượng Vi Polysaccharide trong vắc xin thương hàn Vi, là phương pháp chuẩn thức theo khuyến cáo của WHO và có trong Dược điển Việt Nam V. Tuy nhiên hiện tại do khuyến cáo của WHO các cơ quan kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm và nhà sản xuất cần phải thay thế dung dịch đệm Bacbitan sang các dung dịch đệm khác vì lý do Bacbitan là hóa chất tác dụng hướng thần. Nghiên cứu đánh giá sự phù hợp khi sử dụng dung dịch đệm Tris 0,1M trong điện di xác định hàm lượng Vi Polysaccharide được thực hiện từ 11/2022 đến 4/2023 tại Khoa kiểm định vắc xin Vi khuẩn-Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB).

Kết quả đánh giá sự phù hợp với tiêu chí độ chính xác bao gồm độ lặp lại $CV=1,02\%$ và độ chính xác trung gian $CV= 2,02\%$ đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn $CV\leq 20\%$. Từ kết quả nghiên cứu đã chứng minh có thể sử dụng dung dịch đệm Tris 0,1M trong thử nghiệm điện di xác định hàm lượng Vi Polysaccharide trong vắc xin Thương hàn Vi tại NICVB.

Từ khoá: hàm lượng Vi polysaccharide, điện di, cột tên lửa rocket.

1. Đặt vấn đề

Sốt thương hàn là một bệnh nhiễm trùng đe dọa tính mạng do vi khuẩn *Salmonella* Typhi gây ra [1]. Nó thường lây lan qua thực phẩm hoặc nước bị ô nhiễm. Sau khi vi khuẩn *Salmonella* Typhi được ăn vào, chúng sẽ nhân lên và lây lan vào máu. Các triệu chứng bao gồm sốt cao kéo dài, mệt mỏi, nhức đầu, buồn nôn, đau bụng và táo bón hoặc tiêu chảy, phát ban. Các trường hợp nghiêm trọng có thể dẫn đến các biến chứng nghiêm trọng hoặc thậm chí tử vong. Điều kiện sống được cải thiện và sự ra đời của thuốc kháng sinh đã làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc và tử vong do bệnh thương hàn ở các nước công nghiệp hóa[2, 3]. Tuy nhiên, căn bệnh này tiếp tục là một vấn đề sức khỏe cộng đồng ở nhiều khu vực đang phát triển của WHO Châu Phi, Đông Địa Trung Hải, Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương. Theo ước tính năm 2019, có 9 triệu trường hợp mắc bệnh thương hàn hàng năm, dẫn đến khoảng 110 000 ca tử vong mỗi năm. Bệnh thương hàn có thể được điều trị bằng thuốc kháng sinh[2, 3]. Kháng thuốc kháng sinh là phổ biến với khả năng cần có các lựa chọn điều trị phức tạp và tốn kém hơn ở những vùng bị ảnh hưởng nhiều nhất. Ngay cả khi các triệu chứng biến mất, mọi người vẫn có thể mang vi khuẩn thương hàn, nghĩa là họ có thể lây bệnh cho người khác thông qua việc thải

vi khuẩn vào phân của họ. Vì vậy cách duy nhất để phòng ngừa bệnh thương hàn là tiêm vắc xin Thương hàn Vi[4].

Phương pháp điện di tạo cột tên lửa rocket là phương pháp điện di trên gel agarose sử dụng một dung dịch đệm (Tris) để dẫn điện và tạo điện trường đều, bản gel agarose đóng vai trò là thể nền để phân tách các phân tử, và các chất nhuộm khác nhau để phát hiện vị trí các phân tử trên gel sau khi điện di. Kỹ thuật điện di hoạt động nhờ vào lực kéo của điện trường tác động vào các phân tử tích điện và kích thước lỗ của thể nền (gel). Các phân tử được phân tách khi di chuyển trong gel với vận tốc khác nhau nhờ vào sự khác nhau của lực của điện trường tác động lên chúng, kích thước của phân tử so với kích thước lỗ của gel và hình dạng của phân tử từ đó tạo thành các cột tên lửa (rocket).

Hàm lượng Vi có trong vắc xin Thương hàn Vi là một tiêu chí vô cùng quan trọng để đánh giá chất lượng vắc xin. Trước đây, NICVB sử dụng phương pháp điện di tạo cột tên lửa Rocket trên dung dịch đệm Bacbital, tuy nhiên loại hóa chất này có tác động ảnh hưởng tới thần kinh vì vậy đã ngừng sản xuất và thương mại. Do đó tham khảo từ các nhà sản xuất chúng tôi nghiên cứu chuyển đổi sang đệm Tris. Nhằm đánh giá sự phù hợp của dung dịch đệm với phương pháp với điều

kiện của NICVB chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Xác định hàm lượng polysaccharide trong vắc xin thương hàn vi bằng phương pháp điện sử dụng đệm tris 0,1M” với các mục tiêu đánh giá độ chính xác trung gian và độ lặp lại của thử nghiệm trên đệm Tris.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1 Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là dung dịch đệm Tris đối với phương pháp điện di tạo cột tên lửa áp dụng cho vắc xin thương hàn Vi. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Vi khuẩn, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế từ tháng 11 năm 2022 đến tháng 4 năm 2023

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

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

2.3 Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1 Mẫu thử và mẫu chuẩn

Nghiên cứu sử dụng mẫu chuẩn quốc tế Thương Hàn Vi. Mã NIBSC: 16/126-2.03mg Vi

Mẫu thử nghiệm là vắc xin thương hàn Vi DAVAC

2.3.2 Thiết bị, hóa chất và dụng cụ

- Bể điện di ngang HE 99X – 15 – 1.5 (Hofer, HE99X- 15-1.5- VK)
- Khuôn đổ gel (kích thước $10^{cm} \times 10^{cm}$): 01 khuôn VN).

- Hộp giữ ấm: 01 hộp (VN).
- Bình tam giác thủy tinh hoặc cốc thủy tinh có mỏ 250 ml: 01 chiếc (Schott Duran, 2121636 hoặc 2110636)
- Ống đong thủy tinh loại 50 ml: 01 chiếc (Schott Duran, 2139628).
- Bộ đục lỗ gel (đường kính: $\varnothing = 2-3$ mm): 01 bộ.
- Micropipet 10-100 μ l (mã MP1 002-VK)
- Micropipet 100-1000 μ l (mã MP1 001-VK)
- Micropipet 0,5-10 μ l (mã MP1 003-VK)
- Đầu cân 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (Corning Fisher).
- Máy lắc phiên Thermolyne – USA (Thermolyne, VT 08- VK).
- Máy cung cấp nguồn chạy điện di (Thermo, EP- 05-VK).
- Máy khuấy từ gia nhiệt Stuart CB 162 (MP 03- VK), que khuấy từ.
- Cân phân tích Mettler AB104 (EB 05-VK), thìa cân, đĩa cân (VN).
- Tủ ấm $37^{\circ}C$ (Sanyo, IC 13- VK).
- Nhiệt kế thủy ngân (VN)
- Huyết thanh thô kháng Vi chuẩn (inhouse): 1000 μ l/1 lần thử.
- Thạch Agarose tinh khiết (Sigma 1003123329 A4679-50)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck 108382.1000)
- Sodium azide (Sigma 102361019)
- Nước cất (NICVB).
- Dung dịch nhuộm màu (Sigma – B6529)
- Dung dịch tẩy màu (Bio-Rad, 161-0438)

- Nước muối sinh lý vô khuẩn: 100 ml/1 lần thử(NICVB).
- Hydrochloride acid (Merck).

2.4 Quy trình nghiên cứu



2.4.1 Pha dung dịch đệm

- Dung dịch 1: Tris 0,1M (6,05g Tris(hydroxymethyl) aminomethane + 0,575 Sodium azide+ nước cất vừa đủ 500ml) Đo và chỉnh pH đến 8,26 bằng dung dịch HCl 2/3
- Dung dịch 2: Agarose 0,7% (0,289 Agarose+ 40ml dung dịch Tris 0,1M

2.4.2 Quy trình

2.4.2.1 Đổ bản gel

Dùng máy khuấy từ gia nhiệt đun nóng, để thạch tan hoàn toàn.

Để nguội đến 56°C, bổ sung 1 ml kháng thể kháng Vi, lắc nhẹ theo hình tròn để hoà tan đều, tránh tạo bọt.

Đổ thạch, khoảng 20 – 30 phút sau khi thạch đã đông hoàn toàn.

Tiến hành đục lỗ gel bằng bộ đục lỗ. Các giếng trên bản gel phải cách mép bản gel ít nhất 2 cm.

2.4.2.2 Chuẩn bị kháng nguyên (đường chuẩn) và mẫu thử:

Pha loãng kháng nguyên chuẩn quốc tế theo nồng độ: 100;75;50;25;12,5 (µg/ml).

Bảng dung dịch nước tinh khiết

Pha loãng mẫu thử là vắc xin DAVAC theo độ pha loãng 1/4, 1/2, 1/1

2.4.2.2 Nạp mẫu

Dùng pipét 10 µl cho vào mỗi giếng trên bản gel 3 µl dung dịch kháng nguyên chuẩn quốc tế, mỗi giếng ứng với một nồng độ kháng nguyên chuẩn.

Cho vào 6 giếng tiếp theo, mỗi giếng 3 µl kháng nguyên chuẩn coi như mẫu thử.

2.4.2.3 Chạy điện di

Đặt bản gel vào máy điện di, đặt mẫu chạy từ cực âm (-) sang cực dương (+).

Cài đặt các thông số chạy điện di: U=90V, I=16mA, 8h .

Dùng giấy lọc (2 lớp) có kích thước 14 x 12 cm làm cầu nối dung dịch chạy điện di với bản gel ở cả 2 đầu. Nhúng một đầu giấy lọc vào dung dịch đệm và đặt áp lên mặt gel khoảng 1,5 cm, miết nhẹ cho mặt giấy lọc tiếp xúc hoàn toàn với bản gel;

đầu kia của tấm giấy lọc được nhúng ngập trong dung dịch đệm của bể điện di. Làm tương tự với cực kia của bản gel.

Bấm nút “Run” để chạy điện di.

2.4.2.4 Ngâm rửa bản gel

Sau khi chạy điện di 8h, lấy bản gel ra và cho vào hộp nhựa trong.

Ngâm, lắc bản gel trong nước muối sinh lý 1 giờ (thay nước muối sinh lý 30 phút/1 lần).

Đổ toàn bộ nước muối ra khỏi hộp, rửa lại bằng nước cất.

Ủ bản gel qua đêm trong tủ ấm 37°C, phủ trên mặt bản gel một lớp giấy lọc nhằm tránh cho bản gel bị khô không đều.

2.4.2.5 Nhuộm và tẩy bản gel

Bóc và loại bỏ lớp giấy lọc trên bề mặt bản gel.

Nhuộm bản gel bằng dung dịch nhuộm màu.

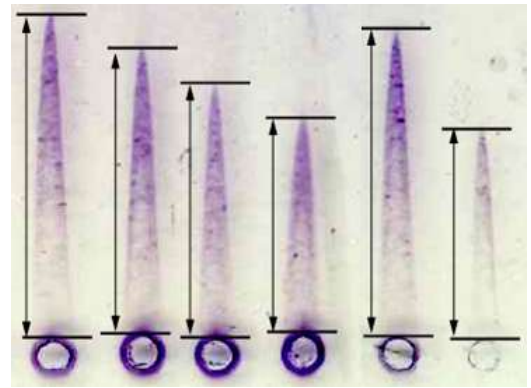
Lắc đều bằng máy lắc trong suốt thời gian nhuộm bản gel.

Hút toàn bộ dung dịch nhuộm màu bản gel cho vào chai có nút vặn kín, bảo quản trong bóng tối để có thể sử dụng lại.

Dùng dung dịch tẩy màu để tẩy màu bản gel cho đến khi nhìn rõ cột tên lửa trên bản gel.

2.4.2.6 Đọc kết quả

Dùng thước đo chuyên dụng đo chiều cao cột tên lửa, ghi lại kích thước các cột đó vào biểu mẫu.



Hình 1: Ảnh đo cột tên lửa trên thực tế.

Dựa vào chiều cao đo được của cột tên lửa ở giếng chứa mẫu chuẩn dựng đường chuẩn bằng phương trình hồi quy tuyến tính trong Excel. Từ phương trình và các giếng thử, tính được nồng độ kháng nguyên Vi polysaccharide có trong giếng thử nghiệm.

Các cột tên lửa Rocket sau khi điện di cho hình ảnh rõ ràng, sắc nét, đầu tên lửa nhọn.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi giá trị R^2 (Độ tuyến tính giữa chiều cao cột tên lửa và hàm lượng Vi): $R^2 > 0,81$ (Tương đương $|R| \geq 0,9$)

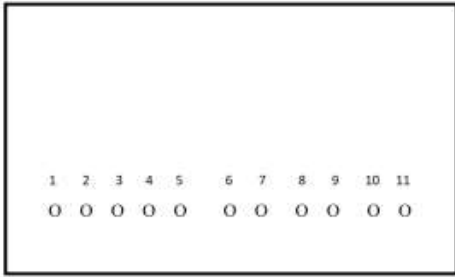
Trong đó các điều kiện của quy trình thử nghiệm (tay nghề, dụng cụ, hóa chất,...) đạt yêu cầu.

2.5 Bố trí thử nghiệm và chỉ tiêu đánh giá

2.5.1 Độ lặp lại (6 giếng mẫu cho 1 lần chạy thử nghiệm)

Bố trí thử nghiệm.

+ Quy trình cụ thể thực hiện theo các bước như đã trình bày trong mục 2.4 với mẫu chuẩn Quốc tế Thương hàn Vi với sơ đồ như sau:



Giếng 1-5: độ pha đường chuẩn (như mục 2, phần 2.4.2.2)

Giếng 6-11: mẫu thử là vắc xin không pha loãng 1/1 nhỏ 6 giếng

Phương pháp đọc kết quả chi tiết như mục 2.4.2.6

Tính giá trị trung bình của mẫu thử, SD và CV.

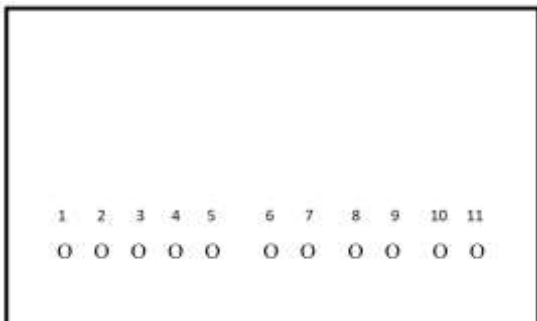
Tiêu chuẩn chấp thuận: $CV \leq 330\%$ (0.5 log).

Thống kê lại kết quả

2.5.2 Độ chính xác trung gian(lặp lại 5 lần 5 ngày khác nhau)

Bố trí thử nghiệm.

+ Quy trình cụ thể thực hiện theo các bước như đã trình bày trong mục 2.4 với mẫu chuẩn Quốc tế Thương hàn Vi với sơ đồ pha loãng mẫu vắc xin thử với tỷ lệ lần lượt 1/1, 1/2, 1/4 như sau:



Giếng 1-5: độ pha đường chuẩn(như mục 2, phần 2.4.2.2).

Giếng 6,7: Vắc xin không pha loãng 1/1

Giếng 8,9: Vắc xin pha loãng 1/2

Giếng 10,11:Vắc xin pha loãng 1/4

Phương pháp đọc kết quả chi tiết như mục 2.4.2.6

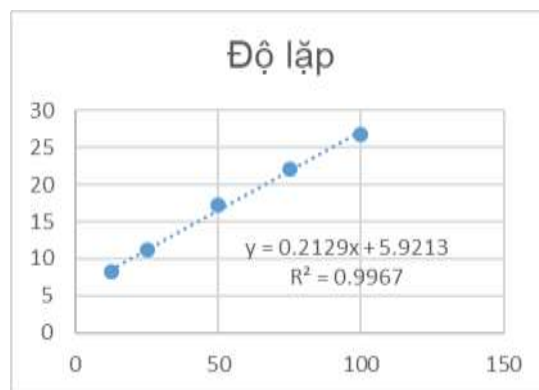
Tính giá trị trung bình của mẫu thử, SD và CV

Tiêu chuẩn chấp thuận: $CV \leq 330\%$ (0.5 log).

Thống kê lại kết quả.

3. Kết quả

Mẫu chuẩn		Mẫu vắc xin	
Hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$)	Chiều cao (mm)	Giếng	Chiều cao (mm)
100	26.8	1	16.3
75	22.1	2	16.4
50	17.2	3	16
25	11.2	4	16.1
12,5	8.2	5	16.2
		6	16.3



➤ Tính kết quả và xử lý số liệu

R^2	0,99
Giá trị trung bình	16,25
Hàm lượng Vi	48,51
Giá trị SD	0,19
Giá trị CV	1,15%

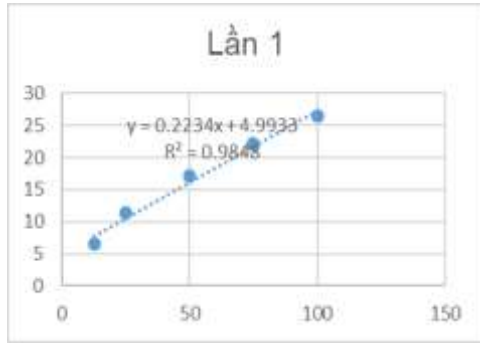
➤ Tiêu chuẩn chấp thuận $CV \leq 20\%$

Hệ số biến thiên $CV=1,15\%$ ($\leq 20\%$) đạt yêu cầu về độ lặp lại

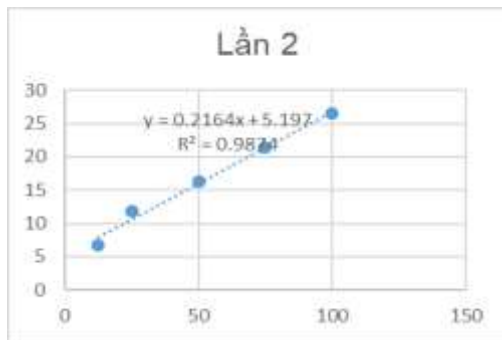
➤ Kết luận

***Độ chính xác trung gian(lặp lại 5 lần 5 ngày khác nhau)**

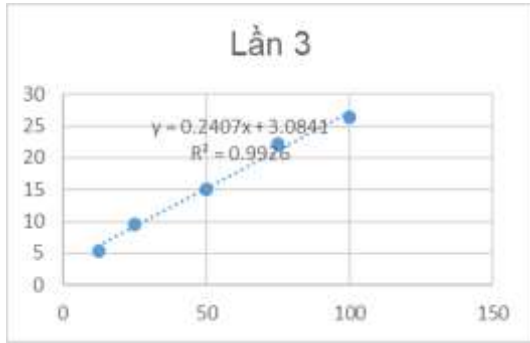
Lần	Mẫu chuẩn		Vắc xin	Chiều cao (mm)	Trung bình
1	Hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$)	Chiều cao (mm)	1/1	15,8	15,65
	100	26,5		15,5	
	75	22,2	1/2	7,6	7,8
	50	17,1		7,9	
	25	11,3			
		12,5	6,5		
			Trung bình	15,58	



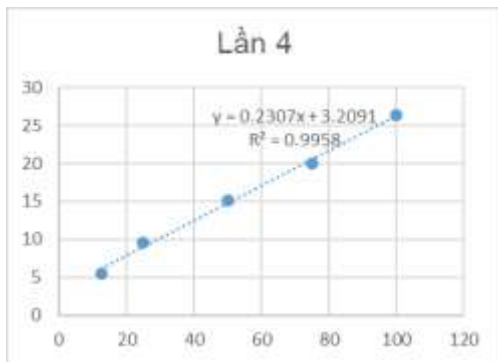
Lần	Mẫu chuẩn		Vắc xin	Chiều cao (mm)	Trung bình
2	Hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$)	Chiều cao (mm)	1/1	15,1	15,2
	100	26,5		15,2	
	75	21,5	1/2	8,1	8,2
	50	16,3		8,3	
	25	11,8			
		12,5	6,7		
			Trung bình	15,78	



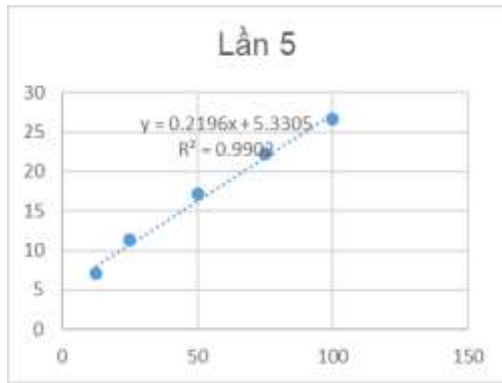
Lần	Mẫu chuẩn		Vắc xin	Chiều cao (mm)	Trung bình
3	Hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$)	Chiều cao (mm)	1/1	15,4	15,4
	100	26,4		15,3	
	75	22,1	1/2	7,4	7,2
	50	15,1		7	
	25	9,6			
		12,5	5,4		
			Trung bình	14,88	



Lần	Mẫu chuẩn		Vắc xin	Chiều cao (mm)	Trung bình
4	Hàm lượng (µg/ml)	Chiều cao (mm)	1/1	15,2	15,1
	100	26,4		14,9	
	75	20	1/2	7	7,1
	50	15,1		7,1	
	25	9,6			
		12,5	5,5		
			Trung bình	14,58	



Lần	Mẫu chuẩn		Vắc xin	Chiều cao (mm)	Trung bình
5	Hàm lượng (µg/ml)	Chiều cao (mm)	1/1	15,4	15,1
	100	26,6		14,8	
	75	22,2	1/2	8,2	8,2
	50	17,1		8,1	
	25	11,3			
		12,5	7,1		
			Trung bình	15,7	



➤ Tính kết quả và xử lý số liệu

Lần	1	2	3	4	5
Hàm lượng Vi	47,37	48,88	48,98	49,27	47,22
Giá trị trung bình	48.34				
Giá trị SD	0,97				
Giá trị CV	2,02%				

➤ Tiêu chuẩn chấp thuận $CV \leq 20\%$

➤ Kết luận:

Hệ số biến thiên $CV = 2,02\% (\leq 20\%)$ đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian

4. Bàn luận

Ở độ lặp tiến hành thực hiện 6 lần trong cùng một điều kiện (cùng 1 thời gian và môi trường đồng nhất về thạch, môi trường dung dịch điện di...) cho kết quả với mẫu chuẩn $R^2 = 0,99$ vậy tương quan giữa các giá trị mẫu chuẩn rất chặt chẽ. Hệ số biến thiên $CV = 1,15\% \leq 20\%$ đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Ở độ chính xác trung gian kết quả hệ số biến thiên $CV = 2,02\% \leq 20\%$ đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

Khi bố trí thí nghiệm đã thiết kế 3 độ pha 1/1, 1/2, và 1/4 nhưng trong quá trình tính toán thấy được kết quả độ pha cuối 1/4 gây ảnh hưởng đến kết quả tạo ra sai số lớn nên khi tính toán kết quả chúng tôi bỏ độ pha này.

Nhận thấy càng pha loãng nhiều lần thì sai số càng lớn nên khi đưa vào quy trình kiểm định hàm lượng Vi trong vắc xin thương hàn Vi, chúng tôi không pha loãng vắc xin và chỉ thực hiện ở hàm lượng nguyên mẫu.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thực hiện được đầy đủ các mục tiêu đã đề ra: Xác định được độ chính xác trung gian và độ lặp lại với tỷ lệ pha loãng vắc xin ở các nồng độ khác nhau.

Nghiên cứu đã chứng minh được quy trình xác định hàm lượng Vi trong vắc xin thương hàn Vi tại phòng thí nghiệm của NICVB là phù hợp và đáng tin cậy. Kết quả cho thấy quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác (độ lặp và độ chính xác trung gian) với $CV \leq 20\%$.

Tài liệu tham khảo

- [1] Wain, J., et al., *Typhoid fever*. Lancet, 2015. **385** (9973): p. 1136-45
- [2] AE, N., 3 Infectious Diseases Related To Travel. CDC health information for international travel 2014: the yellow book. Oup USA. ISBN 9780199948499. Archived from the original on 2015-07-02., 2014
- [3] cdc.gov, *Typhoid Fever*. May 14, 2013
- [4] *Typhoid vaccines: WHO position aper*. Wkly Epidemiol Rec, 2008. **83**(6): p. 49-59