

## EVALUATING THE STABILITY OF PERTUSSIS STRAIN B. PERTUSSIS 18323 IN TESTING THE EFFECTIVENESS OF PERTUSSIS VACCINE

**Bui Thi Kim Xuyen\***, Nguyen Phuong Lien, Vu Duy Dung, Le Thi Hoang Yen,  
Ngo Thi Hoa, Nguyen Thi Kim Ngan

*\*National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

*Received 3 November 2023*

*Accepted 25 December 2023*

### Abstract

The efficacy testing of the whooping cough vaccine is one of the mandatory tests recommended by the WHO and is a quality standard for vaccines in the Vietnam Pharmacopoeia 5. The principle of the efficacy test is to evaluate immune response after immunization in mice using the method of challenge with pertussis strain 18323. Therefore, assessing the quality of the challenge strain used for testing also contributes to making the testing process more accurate and reliable. The pertussis strain, after being kept in liquid nitrogen, is tested for the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) every 3 months by challenge injection into mouse brains to evaluate the stability of the challenge strain.

The research results indicate that the LD<sub>50</sub> values of the pertussis strain at different time points during the storage and preservation under liquid nitrogen at 3, 12, 24, and 36 months are (295,940; 255,737; 219,063; and 243,405 bacteria), respectively. The lowest LD<sub>50</sub> value is 175,216, and the highest LD<sub>50</sub> value is 295,940, meeting the requirements according to the standard of 50-400 bacteria. Next, these values fall within the range of  $TB \pm 2SD$ , meeting the requirements according to the corresponding standard with fluctuations within the 95% confidence interval.

The research results demonstrate that the pertussis strain 18323 remains stable under liquid nitrogen storage for a monitoring period of 36 months, meeting the quality standard when preserved under frozen conditions in liquid nitrogen for efficacy testing of pertussis strain at the National Institute for Vaccine and Biologicals (NICVB) and the manufacturer.

---

\* Corresponding author

E-mail address: [xuyenbk.nicvb@gmail.com](mailto:xuyenbk.nicvb@gmail.com)

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.125>

Key world: LD<sub>50</sub>, NICVB, Pertussis strain 18323, efficacy testing.

## NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TÍNH ỔN ĐỊNH CHỦNG HO GÀ B. PERTUSSIS 18323 SỬ DỤNG CHO KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU VẮC XIN HO GÀ

Bùi Thị Kim Xuyên\*, Nguyễn Phương Liên, Vũ Duy Dũng, Lê Thị Hoàng Yến,  
Ngô Thị Hoa, Nguyễn Thị Kim Ngân

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

Nhận ngày 3 tháng 11 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2023

### Tóm tắt

Thử nghiệm kiểm tra công hiệu của vắc xin ho gà là một trong các thử nghiệm bắt buộc theo khuyến cáo của WHO và là tiêu chuẩn chất lượng vắc xin có trong Dược điển Việt Nam 5. Nguyên lý của thử nghiệm công hiệu là sau khi gây miễn dịch trên chuột nhắt sẽ đánh giá sự đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp thử thách bằng chủng ho gà 18323. Vì vậy đánh giá chất lượng của chủng thử thách dùng cho thử nghiệm cũng góp phần làm cho quá trình thử nghiệm chính xác và tin cậy hơn. Chủng ho gà sau khi được giữ trong nito lỏng, sau mỗi 3 tháng sẽ được kiểm tra liều gây chết 50% (LD<sub>50</sub>) bằng cách tiêm thử thách trên não chuột để đánh giá sự ổn định của chủng thử thách.

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị LD<sub>50</sub> của chủng ho gà tại các mốc thời gian trong quá trình cất giữ và bảo quản ở điều kiện ni tơ lỏng sau 3; 12; 24; và 36 tháng cho kết quả LD<sub>50</sub> tương ứng là (295,940; 255,737; 219,063 và 243,405 vi khuẩn). Giá trị thấp nhất của liều LD<sub>50</sub> là 175,216, giá trị cao nhất của liều LD<sub>50</sub> là 295,940, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn từ 50-400 vi khuẩn. Tiếp đến các giá trị này đều nằm trong khoảng TB±2SD đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn tương ứng dao động trong khoảng tin cậy 95%.

Từ kết quả nghiên cứu trên đã chứng minh chủng ho gà 18323 bảo quản ở điều kiện trong nito lỏng ổn định trong thời gian theo dõi 36 tháng, đạt tiêu chuẩn chất lượng khi bảo quản ở điều kiện đông băng trong nito lỏng cho kiểm định công hiệu vắc xin ho gà tại Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB) và nhà sản xuất..

Từ khóa: Liều LD<sub>50</sub>, NICVB, Chủng ho gà 18323, thử nghiệm công hiệu.

## 1. Đặt vấn đề

Ho gà là một bệnh truyền nhiễm cấp tính do vi khuẩn *Bordetella pertussis* gây ra. Trong đó, trẻ em là nguồn bệnh chủ yếu [1]. Nhờ triển khai tiêm vắc xin phòng mà bệnh ho gà tại Việt Nam đã được khống chế. Tiêm vắc xin phòng bệnh làm giảm xuống mức thấp nhất gánh nặng bệnh tật, chi phí điều trị y tế và tỉ lệ tử vong. Tỷ lệ mắc trung bình thời kỳ 1991-1995 của cả nước là 7,5/100.000 dân. Từ năm 1993, tỷ lệ tiêm DPT được duy trì ở mức trên 90%, có năm đạt trên 95% (1997, 2000) với chất lượng tiêm chủng được cải thiện nên tỷ lệ mắc trung bình của cả nước trong thời kỳ 1996-2000 đã giảm xuống 1,8/100.000 dân. Trong 20 năm trở lại đây từ năm 2002- 2022, số trường hợp mắc ho gà có sự biến động qua các năm. Số ca mắc ho gà cao nhất là 1013 ca vào năm 2019 và thấp nhất là 20 ca năm 2022 [2, 3]. Trong việc kiểm định chất lượng chất lượng không chỉ đối với vắc xin ho gà mà với các vắc xin khác thì thử nghiệm công hiệu là thử nghiệm quan trọng nhất. Ngoài việc lựa chọn dòng chuột phù hợp có đáp ứng miễn dịch thì việc đánh giá chất lượng chủng thử thách cũng hết sức quan trọng. Sau thời gian gây miễn dịch với vắc xin ho gà, động vật thí nghiệm sẽ được tiêm thử thách với chủng gây bệnh để đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc xin đối với tác nhân gây bệnh- chủng ho gà. Đối với thử nghiệm công

hiệu ho gà vô bào, việc sử dụng chủng ngay sau khi nuôi cấy sẽ rất mất thời gian cho việc nuôi cấy; Ngoài ra tiêu chuẩn của huyền phù ho gà đưa ra cũng dao động tương đối lớn, vì vậy liều LD<sub>50</sub>- liều gây chết tối thiểu 50% động vật thí nghiệm có thể nằm ngoài khoảng cho phép. Vì vậy, chúng tôi cất giữ chủng đông băng và đánh giá sự ổn định của chủng giúp cho việc kiểm định được nhanh hơn, chủ động hơn mà không mất thời gian cho việc nuôi cấy chủng và chỉ cần dò lại liều LD<sub>50</sub> của chủng thử thách khi cần thiết.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: chủng ho gà *B. pertussis* 18323
- 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

### 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

- Chủng ho gà *B. pertussis* 18323 đông băng
- Chuột nhắt trắng 6 tuần tuổi

### 2.4 Quy trình nghiên cứu

Chủng ho gà được cất giữ tại nồng độ khoảng 10<sup>10</sup> vi khuẩn ho gà (VKHG)/ml, sau

khi cất giữ 3 tháng trong nitơ lỏng thì chủng được pha loãng và tiêm trên chuột để xác định liều gây chết tối thiểu LD<sub>50</sub> của chủng.

Sử dụng 4 độ pha A<sub>7</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, A<sub>10</sub> (Bảng 1) tiêm não cho 4 nhóm chuột nhắt trắng 6 tuần tuổi, trọng lượng từ 28-35g/chuột. Liều tiêm/đường tiêm: 0,02 ml/con/não. Theo dõi chuột 14 ngày, dựa vào số chuột còn sống, số chuột chết và tổng số của các độ pha A<sub>7</sub>,

A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, tính ra liều LD<sub>50</sub>. LD<sub>50</sub> của chủng được tính bằng phần mềm Probit Analysis. LD<sub>50</sub> của chủng thử thách phải chứa khoảng 50-400 vi khuẩn [4, 5].

Công thức pha loãng được trình bày trong bảng sau:

**Bảng 1: Công thức pha chủng thử thách**

A <sub>1</sub> :10 <sup>10</sup> VKHG/2ml	1ml chủng	+	1 ml dung dịch Casein
A <sub>2</sub> :10 <sup>9</sup> VKHG/2ml	1ml A <sub>1</sub>	+	9 ml dung dịch Casein
A <sub>3</sub> :10 <sup>8</sup> VKHG/2ml	1ml A <sub>2</sub>	+	9 ml dung dịch Casein
A <sub>4</sub> = 10 <sup>5</sup> VKHG/0,02ml	1ml A <sub>3</sub>	+	9 ml dung dịch Casein
A <sub>5</sub> : 5.10 <sup>4</sup> VKHG/0,02ml	5 ml A <sub>4</sub>	+	5 ml dung dịch Casein
A <sub>6</sub> : 5.10 <sup>3</sup> VKHG/0,02ml	1ml A <sub>5</sub>	+	9 ml dung dịch Casein
<b>A<sub>7</sub>: 500 VKHG/0,02ml</b>	<b>1ml A<sub>6</sub></b>	<b>+</b>	<b>9 ml dung dịch Casein</b>
<b>A<sub>8</sub>:100 VKHG/0,02ml</b>	<b>1ml A<sub>7</sub></b>	<b>+</b>	<b>4 ml dung dịch Casein</b>
<b>A<sub>9</sub>: 20 VKHG/0,02ml</b>	<b>1ml A<sub>8</sub></b>	<b>+</b>	<b>4 ml dung dịch Casein</b>
<b>A<sub>10</sub>: dung dịch Casein</b>			

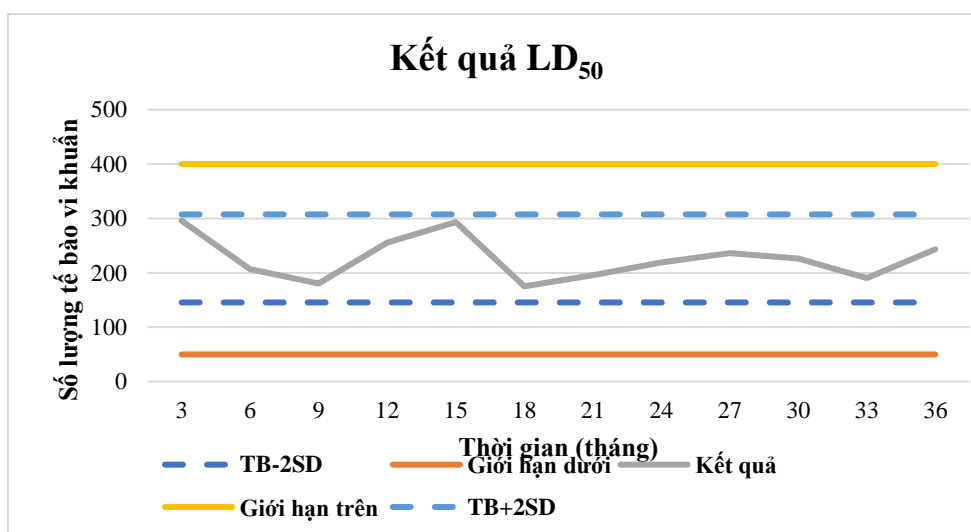
Vì chủng ho gà được cất giữ nồng độ khoảng 10<sup>10</sup> vi khuẩn/ml vì vậy mà khi dò liều LD<sub>50</sub> có thể nằm ngoài khoảng tiêu chuẩn. Vì vậy cần phải dò để xác định và điều chỉnh lại độ pha cho phù hợp để sao cho liều thử thách chứa khoảng 5.10<sup>4</sup> vi khuẩn/ml.

### 3 Kết quả

Theo dõi liều LD<sub>50</sub> của chủng thử thách để đánh giá sự ổn định của chủng theo thời gian theo dõi. Kết quả được tổng hợp ở bảng 2:

**Bảng 2: Kết quả dò liều LD<sub>50</sub> của chủng thử thách**

Mốc thời gian (tháng)	Kết quả LD <sub>50</sub>
3	295,940
6	206,515
9	180,417
12	255,737
15	293,302
18	175,216
21	195,720
24	219,063
27	236,340
30	225,966
33	190,037
36	243,405
<b>Trung bình</b>	<b>226,471</b>
<b>SD</b>	<b>40,460</b>
<b>TB-2SD</b>	<b>145,551</b>
<b>TB+2SD</b>	<b>307,392</b>



## **Biểu đồ 1: Theo dõi kết quả LD<sub>50</sub> của chủng ho gà theo thời gian bảo quản**

### **4. Bàn luận**

Theo quy trình kiểm định tại Nhật Bản, chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy sẽ được dùng để tiêm thử thách trên não chuột [6]. Sinh khối của vi khuẩn ho gà sau khi được nuôi cấy sẽ được đo mật độ quang- OD ở bước sóng 590 nm, OD nằm trong khoảng từ 0,5-0,55 tương đương với 10<sup>10</sup> vi khuẩn/ml [7]. Tuy nhiên, việc sử dụng chủng tươi như vậy sẽ mất nhiều thời gian cho việc nuôi cấy và OD của huyền dịch dao động cũng khá lớn vì vậy mà liều LD<sub>50</sub>- liều gây chết tối thiểu của chủng thử thách có thể rơi ra ngoài khoảng cho phép, dẫn đến kết quả thử nghiệm không có giá trị. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nuôi cấy, chia nhỏ ra và cất giữ chủng, đồng thời xác định được nồng độ pha loãng phù hợp với việc thử thách. Quá trình này không cần giai đoạn nuôi cấy và chỉ cần dò liều lại LD<sub>50</sub> của chủng thử thách khi cần thiết.

Chủng thử thách là chủng ho gà gây bệnh vì vậy khi cất giữ rất khó để đảm bảo số lượng vi khuẩn còn như ban đầu, vì vậy, liều LD<sub>50</sub> của chủng có thể tăng hoặc giảm vượt ra khỏi khoảng cho phép về điều kiện đặt ra của chủng. Tiêu chuẩn liều LD<sub>50</sub> của chủng thử thách đối với thử nghiệm ho gà vô bào phải nằm trong

khoảng từ 50-400 tế bào vi khuẩn [5]. Với công thức pha như trên, kết quả đánh giá cho thấy giá trị LD<sub>50</sub> không giảm dần theo thời gian mà dao động xung quanh ngưỡng cho phép. Theo kết quả đánh giá độ tin cậy của thí nghiệm như bảng 2 và biểu đồ 1, ta thấy LD<sub>50</sub> của mốc thời gian cất giữ 3 tháng là 295,940 vi khuẩn. Tiếp theo mốc 1 năm-12 tháng là 255,737 vi khuẩn. Tương tự mốc thời gian 24 tháng và 36 tháng LD<sub>50</sub> lần lượt là 219,063 và 243,405 vi khuẩn. Giá trị thấp nhất của liều LD<sub>50</sub> là 175,216, giá trị cao nhất của liều LD<sub>50</sub> là 295,940. Các giá trị này đều nằm trong khoảng cho phép TB±2SD về điều kiện đặt ra của chủng tương ứng dao động trong khoảng tin cậy 95%. Điều này cho thấy, chủng khi được giữ trong nito lỏng tại Viện ổn định qua thời gian theo dõi. Sự dao động của các kết quả này là do khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột thí nghiệm khác nhau, tuy nhiên vẫn nằm trong giới hạn yêu cầu từ 50-400 tế bào vi khuẩn.

### **5. Kết luận**

Chủng ho gà được nuôi cấy, cất giữ và bảo quản trong nito lỏng ổn định theo thời gian. Vì vậy, có thể sử dụng chủng đông băng cho thử nghiệm công hiệu thay vì sử dụng chủng tươi ngay sau khi nuôi cấy như trước đây. Các kết quả theo dõi đều nằm trong tiêu chuẩn cho phép.

### **Tài liệu tham khảo**

- [1] *Bệnh ho gà*. Cục Y tế dự phòng, 2016.
- [2] *Lịch sử hình thành và phát triển Chương trình Tiêm chủng mở rộng*. Chương trình tiêm chủng mở rộng.
- [3] WHO, *Pertussis Reported cases by country*. World Health Organization, 2023.
- [4] Xuyen, B.T.K., *Quy trình chuẩn" Thử nghiệm công hiệu thành phần ho gà vô bào"*. SOP, 2023.
- [5] Diseases, N.I.o.T., *Mnimum Requirements for Biological Products*. 2006.
- [6] Horiuchi, Y., et al., *Quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines in Japan*. Jpn J Infect Dis, 2001. **54** (5): p. 167-80.
- [7] Xuyen, B.T.K., *Quy trình chuẩn" Điều chế và bảo quản chủng ho gà 18323 trong nitơ lỏng"*. SOP, 2023.