
CALIBRATION OF NATIONAL RABIES STANDARDS VACCINE LOT RRAB01-01

Nguyen Thi Ly*, Nguyen Kim Bach¹, Pham Minh Tung¹, Nguyen Thi Hoa¹, Nguyen Thi Kieu¹, Le Thi Hai Yen¹, Nguyen Thi Thu Hang², Nguyen Tuan Hai², Nguyen Binh Minh²,
Doan Huu Thien¹

¹National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

²Duc Minh Medical Joint Stock Company

Received 29 February 2024

Accepted 28 March 2024

Abstract: In 2003, National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB) established a national standard vaccine (MCQG) for rabies lot RRab01-01 with 2500 freeze-dried vials, potency of 11.0 IU/vial and stored at -70°C at the Reference Standard Department. By 2023, there will still be 2,320 vials remain. To ensure that this national standard vaccine still meets specifications, periodic calibration is very important and urgent, especially when there are changes in mouse strains in the routine testing. Therefore, in 2023, the Department of Viral Vaccines will re-calibrate the national standard vaccine model according to the NIH method, the study is carried out 6 times on 6 different days, by the same group with the same chemical conditions, materials, equipment, ICR mouse line and use international standard lot 07/162 of NIBSC for calibration. The results showed that the average potency value of lot RRab01-01 was 9.3 IU/vial (15.1% reduction) with coefficient of variation CV = 10.4%. Thus, the national rabies standard vaccine lot RRab01-01 still meets the requirements with the set standards ≥ 5 IU/tube and is guaranteed to be used for routine testing at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB).

Keywords: National rabies standard vaccine, calibration, NIH method, RRab01-01.

* Corresponding author

E-mail address: ly.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/>

CHUẨN ĐỊNH LẠI VẮC XIN MẪU CHUẨN QUỐC GIA ĐẠI LÔ RRAB01-01

Nguyễn Thị Lý^{1*}, Nguyễn Kim Bách¹, Phạm Minh Tùng¹, Nguyễn Thị Hòa¹, Nguyễn Thị
Kiều¹, Lê Thị Hải Yên¹, Nguyễn Thị Thu Hằng², Nguyễn Tuấn Hải², Nguyễn Bình Minh²,
Đoàn Hữu Thiện¹

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

²Công ty CP y tế Đức Minh

Nhận ngày 05 tháng 03 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2024

Tóm tắt: Năm 2003 Viện kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB) đã thiết lập vắc xin mẫu chuẩn quốc gia (MCQG) đại lô RRab01-01 với 2500 ống đông khô, công hiệu 11,0 IU/ống và được bảo quản ở -70°C tại Khoa Mẫu chuẩn. Đến năm 2023 số lượng vẫn còn 2320 ống. Việc chuẩn định lại MCQG đại được thực hiện lần 1 vào năm 2010, vì vậy việc chuẩn định lại MCQG là rất quan trọng và cấp thiết, đặc biệt là khi có sự thay đổi dòng chuột trong quy trình thường quy. Vì vậy năm 2023, Khoa KĐVX vi rút tiến hành chuẩn định lại vắc xin mẫu chuẩn quốc gia theo phương pháp NIH, nghiên cứu thực hiện 6 lần vào 6 ngày khác nhau, do cùng một nhóm thực hiện với cùng một điều kiện hóa chất, vật tư, trang thiết bị, dòng chuột ICR và sử dụng vắc xin mẫu chuẩn quốc tế đại lô 07/162 của NIBSC để chuẩn định. Kết quả cho thấy, giá trị trung bình công hiệu của lô RRab01-01 là 9,3 IU/ống (giảm 15,1%) với hệ số biến thiên CV = 10,4%. Như vậy, vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại lô RRab01-01 vẫn đạt yêu cầu với tiêu chuẩn đề ra ≥ 5 IU/ống và đảm bảo để sử dụng cho thử nghiệm thường quy tại viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

Từ khóa: Mẫu chuẩn quốc gia đại, chuẩn định, phương pháp NIH, RRab01-01.

1. Đặt vấn đề

Theo ước tính trên thế giới có khoảng 2,5 tỷ người đang sống trong vùng có nguy cơ bị bệnh dại, và hàng năm có khoảng 50.000 - 70.000 người đã chết do bệnh dại, hơn 90% số người lên cơn dại là do không tiêm phòng

vắc xin và khi đã lên cơn dại tỷ lệ tử vong là 100%. Theo Tổ chức y tế thế giới mỗi năm trên phạm vi toàn thế giới có hàng triệu người cần tiêm phòng vắc xin và có hàng trăm triệu liều vắc xin đại các loại đã được tiêu thụ. Ở

Việt Nam, bệnh đại lưu hành ở tất cả các tỉnh, thành phố và nhu cầu sử dụng vắc xin phòng bệnh đại trong cả nước khoảng 3,5 triệu liều mỗi năm[1].

Để nâng cao an toàn và hiệu quả bảo vệ của vắc xin thì việc kiểm soát tốt chất lượng của vắc xin (đặc biệt thử nghiệm công hiệu) trước khi đưa vào sử dụng là điều rất cần thiết. Để thực hiện công hiệu, bắt buộc phải có vắc xin mẫu chuẩn. Vì vậy từ những năm 2003 Viện kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB) đã thiết lập vắc xin MCQG đại lô RRab01-01 với 2500 ống đông khô, hiệu giá 11,0 IU/ống và được bảo quản ở -70°C tại Khoa Mẫu chuẩn. Năm 2009 lô vắc xin MCQG này đã được chuẩn định lại, và đưa ra hiệu giá mới là 10,8 IU/ống. Từ đó đến nay (14 năm) chưa tiến hành chuẩn định lại. Từ 2017 giám sát ED50 cũng cho thấy có

sự giảm từ 34,69 mIU xuống còn 20,9 mIU; Năm 2018 NICVB có thay dòng chuột từ Swiss sang ICR cũng cần thiết phải nghiên cứu đánh giá lại. Lượng vắc xin MCQG đại còn 2320 ống vì vậy việc nghiên cứu đánh giá lại giá trị công hiệu cho lô MCQG này là cần thiết [2]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ trình bày các kết quả chuẩn định lại mẫu chuẩn quốc gia Đại lô RRab01-01 sau 20 năm sản xuất và bảo quản ở -70°C tại NICVB theo phương pháp NIH.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia đại lô RRab01-01; Số lượng: 12 ống.
- Cách chọn mẫu: Lấy ngẫu nhiên theo từng ô vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại trong tủ bảo quản -70°C.



Hình 1. Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại RRab01-01 & MCQT lô 07/162

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: từ tháng 05/2023 đến tháng 1/2024

- Địa điểm: Phòng thí nghiệm khoa Kiểm định vắc xin Vi rút và khoa Động vật thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB)

2.3. Vật liệu, hóa chất

- Mẫu chuẩn: Vắc xin mẫu chuẩn quốc tế của NIBSC lô 07/162: 6 ống.

- Nguyên liệu khác:

+ Chủng CVS (P3) đông băng năm 2004: 6 ống.

+ Động vật thí nghiệm sử dụng: 1200 con chuột ICR trọng lượng 11-15g.

+ Huyết thanh ngựa 2%; Nước muối sinh lý (NMSL).

+ Xylanh tiêm não, Xylanh vô trùng (3ml), găng tay, khẩu trang, quần áo blue...

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả cắt ngang tại phòng thí nghiệm và hồi cứu, tiến cứu kết quả. Thực hiện 06 lần vào 06 ngày khác nhau và do cùng một nhóm thực hiện, trong cùng một điều kiện vật tư, hóa chất, trang thiết bị giống nhau. Mỗi lần thực hiện với 02 ống vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại và 1 ống MCQT lô 07/162 theo quy trình chuẩn của NICVB (SOP VR04-01). [2-6]

Phương pháp thu thập số liệu: Thực nghiệm phòng thí nghiệm;

Phương pháp xử lý số liệu: Phần mềm Probit analysis; Excel & phần mềm dự đoán hạn dùng JMP Pro17.

Phương pháp NIH được sử dụng để đánh giá kết quả giá trị công hiệu vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại lô RRab01-01. Các bước thực hiện cho 1 lần thử nghiệm bao gồm:

2.4.1 Tiêm miễn dịch trên chuột nhắt trắng

- Lựa chọn 200 con chuột nhắt trắng ICR khỏe mạnh, trọng lượng 11-15 gam, chia 3 nhóm: Vắc xin thử và chuẩn 16 con/độ pha; chuột chứng 10 con/độ pha.

- Hoàn nguyên vắc xin thử (vắc xin MCQG) & vắc xin mẫu chuẩn quốc tế đại bằng nước hồi chính về nồng độ khoảng 2-2,5 IU/ml. Từ dung dịch này tiến hành pha loãng bậc 5 với ít nhất 4 độ pha (1/5, 1/25, 1/125, 1/625), pha trong dung dịch nước muối sinh lý (NMSL).

- Tiến hành tiêm 0,5 ml/ ổ bụng/ chuột với 2 mũi, mỗi mũi cách nhau 7 ngày.

2.4.2 Tiêm thử thách

- Sau khi tiêm mũi thứ 2 bảy ngày, tiêm thử thách. chủng thử thách CVS pha sao cho độ lực tương đương nằm trong khoảng từ 10LD₅₀-100LD₅₀/ 0,03ml (10⁰), thường dùng liều thử thách có chứa 50LD₅₀ tiêm cho chuột đã được gây miễn dịch với vắc xin thử và vắc xin mẫu chuẩn; Chuột chứng cũng được tiêm song song từ 10⁰- 10⁻³, 10 chuột/độ pha.

- Chuột sau tiêm thử thách được theo dõi hằng ngày trong 14 ngày. Chuột chết từ ngày thứ 5 được ghi vào phiếu theo dõi (chết trước ngày thứ 5 được coi là không đặc hiệu, không tính vào kết quả). Kết quả công hiệu của MCQG Đại tính theo chương trình Probit analysis của WHO; Hiệu giá tính chủng thử thách CVS tính theo phương pháp Reed- Muench.

2.4.3 Đánh giá thử nghiệm

Thử nghiệm được coi là có giá trị nếu:

- Liều thử thách nằm trong khoảng 10LD₅₀-100LD₅₀/0,03ml não chuột.
- Khoảng tin cậy 95% của thí nghiệm nằm trong giới hạn: 25%- 400%.

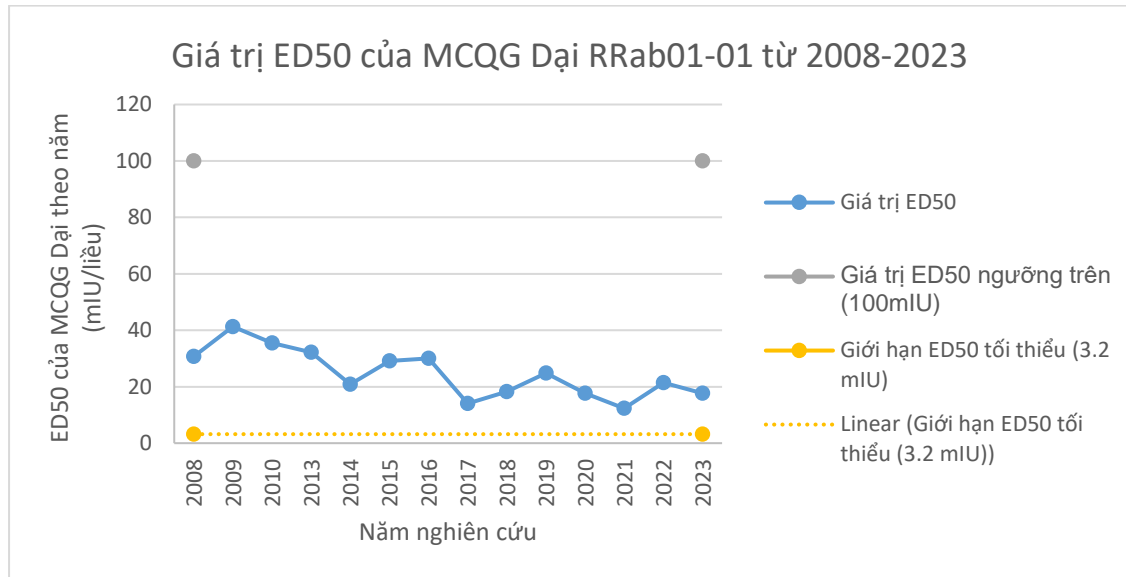
Tiêu chuẩn đánh giá: Công hiệu của vắc xin MCQG $\geq 2,5$ IU/0,5 ml [3,4,5].

3. Kết quả

3.1. Kết quả hồi cứu ED₅₀ của lô MCQG vắc xin Đại RRab01-01

Bảng 1. Liều miễn dịch ED₅₀ của lô MCQG RRab01-01 từ năm 2008 đến 2023

Chuột	Năm	ED ₅₀ (mIU/liều)	GMT
Swiss	2008	30,75	27,93
	2009	41,31	
	2010	35,43	
	2013	32,20	
	2014	20,83	
	2015	29,09	
	2016	30,00	
	2017	14,04	
ICR	2018	18,30	18,31
	2019	24,84	
	2020	17,68	
	2021	12,33	
	2022	21,48	
	2023	17,68	
Liều ED ₅₀		3,2-100 mIU	-



Hình 1. Giá trị ED50 của MCQG Dại RRab01-01 từ năm 2008-2023

Như vậy, ED50 của lô MCQG Dại RRab01-01 từ 2008 đến 2023 vẫn nằm trong liều miễn dịch cho phép (3,2-100 mIU) nhưng đã có sự thay đổi theo hướng giảm, cụ thể: theo thống kê số liệu từ năm 2008 đến 2017 (dùng chuột Swiss), liều ED50 của 27 lô trung bình là 27,93 mIU, còn từ năm 2018 chuyển sang dùng chuột ICR kết quả đã có sự thay đổi rõ. Đến hết năm 2023, liều ED50 của 19 lô trung bình là 18,31 mIU.

3.2. Kết quả chuẩn định lại công hiệu MCQG vắc xin Dại RRab01-01

Cả 6 lần làm, chuột sau tiêm miễn dịch 14 ngày, tiêm chủng thử thách CVS bắt đầu có dấu hiệu đại đặc trưng: liệt, mù, bại hông và chết từ ngày thứ 5 sau tiêm. Kết quả được tổng hợp chi tiết trong bảng 2:

Bảng 2: Kết quả tổng kết chuột còn sống tại từng độ pha sau 6 lần thử nghiệm

Độ pha vắc xin	MCQT (số chuột sống/tổng 16 chuột)						MCQG RRab01-01(số chuột sống/tổng 16 chuột)					
	Lần	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6
A:1/5	15	15	15	15	16	15	15	16	14	16	15	16
B:1/25	7	11	11	9	9	8	8	11	12	8	13	7
C:1/125	5	5	7	5	5	4	4	4	5	4	3	3
D:1/625	1	2	2	1	1	1	0	2	2	0	0	0



Hình 2. Chuột sau tiêm chủng thử thách 5 ngày

Từ kết quả thu được đưa vào phần mềm Probit analysis tính ra được: Liều thử thách tính ra đều nằm trong khoảng 10LD₅₀-100LD₅₀/0,03ml não chuột; Khoảng tin cậy

95% của thí nghiệm nằm trong giới hạn: 25%-400%. Như vậy cả 6 lần đều có giá trị. Kết quả giá trị công hiệu của các lần thực hiện với

vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại được tóm tắt

ở bảng 3 dưới đây:

Bảng 3. Kết quả đánh giá giá trị công hiệu của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại RRab01-01

Lần thực hiện	Giá trị công hiệu RRAB01-01 (IU/ống)	% công hiệu còn so với giá trị sau sản xuất (11IU/ống)	% công hiệu còn so với giá trị chuẩn định lại năm 2009 (10,8 IU/ống)
1	9,19	83,56	85,11
2	11,01	100,07	101,93
3	8,5	77,31	78,74
4	8,74	79,42	80,89
5	9,94	90,40	92,07
6	8,66	78,76	80,22
GM	9,3	84,92	86,49
SD	0,986	-	-
GM-2SD	11,24	-	-
GM+2SD	7,52	-	-
CV	10,4	-	-

Từ kết quả bảng 3 cho thấy, 6 kết quả thu được đều nằm trong giới hạn $GM \pm 2SD$. Giá

trị cao nhất là 11 IU/ống; giá trị thấp nhất là 8,5 IU/ống; CV = 10,4 % cho thấy kết quả thu

được khi đánh giá công hiệu mẫu chuẩn QG Đại rất đồng đều.

Giá trị trung bình của vắc xin mẫu chuẩn Quốc gia Đại sau 20 năm bảo quản ở nhiệt độ -70°C là 9,3 IU/ống hay 9,3 IU/ml (tức đã giảm 1,7 IU/ống tương đương 15,1%) nhưng vẫn đáp ứng yêu cầu (≥ 5 IU/ống).

4. Bàn luận

Công hiệu của vắc xin đại có thể được xác định theo 3 phương pháp: NIH, ELISA và SRD [5, 6, 7, 8, 9]. Trong nghiên cứu này, phương pháp NIH được lựa chọn để xác định công hiệu và nghiên cứu tính ổn định nhiệt của MCQG đại RRab01-01 vì đây là một phương pháp tiêu chuẩn, đã được thẩm định ở nhiều quốc gia, được tổ chức y tế thế giới (WHO) cũng như Dược điển Châu Âu, Dược điển Việt Nam khuyến cáo để tính toán giá trị công hiệu cho vắc xin Đại bắt hoạt từ đầu những năm 2000 đến nay. Ngoài ra, đến hiện tại tất cả các nhà sản xuất vắc xin đại nhập vào Việt Nam (Sanofi Pasteur, Ấn Độ, Trung Quốc...) cũng đều đăng ký công hiệu theo phương pháp này. Quy trình này tại NICVB cũng được thẩm định và đăng ký ISO từ 2007 đến nay.

Mẫu chuẩn dùng để tham chiếu, nói chuẩn trong đề tài là mẫu chuẩn quốc tế đại lần thứ 6 của NIBSC, lô 07/162, công hiệu theo phương pháp NIH là 8,0 IU/ống. Lô

chuẩn này được nối chuẩn với các lô chuẩn lần thứ 5. Lô mẫu chuẩn quốc tế vắc xin đại lần thứ 5 lại nối chuẩn với lô mẫu chuẩn quốc tế đại lần thứ 4 (lô PISRAV)- chính là lô mẫu chuẩn được sử dụng để nối chuẩn khi sản xuất vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại mã RRab01-01 năm 2003.

Chuột sử dụng là dòng ICR mua của Thái Lan có hồ sơ đầy đủ và cũng là dòng dùng phổ biến cho thử nghiệm công hiệu đại hiện nay. Dù vậy theo khuyến cáo của WHO (WHO/VSQ/97.02 & WHO technical Report Series, No. 823) cần thiết phải đánh giá lại để khẳng định tính phù hợp của dòng chuột cũng như đưa ra giá trị công hiệu mới cho mẫu chuẩn khi thay đổi nguyên liệu chính[10].

Phân tích kết quả nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế cho thấy công hiệu của MCQG đại loạt RRab01-01 (sản xuất năm 2003) ổn định giữa các lần làm hay các lọ. Toàn bộ 6 kết quả thu được đều nằm trong giới hạn $GM \pm 2SD$. Đơn vị đề xuất: 9,3 IU/ml hay 9,3 IU/ống. Độ lệch chuẩn $SD = 0,986$ chứng tỏ tính đồng nhất của loạt RRab01-01 rất cao. Tuy nhiên so với thời điểm sản xuất thì sau 20 năm bảo quản ở nhiệt độ -70°C công hiệu đã giảm 1,7 IU/ống tương đương 15,1%. Vậy sự giảm này do sự lão hóa tự nhiên theo thời gian hay do thay đổi dòng chuột mới?

Theo kết quả ở bảng 1, MCQG Đại RRab01-01 từ khi thiết lập đến hiện tại được giám sát chặt chẽ hàng năm theo giá trị ED50 và đều nằm trong giới hạn 3,2-100 mIU/liều. Nhưng theo kết quả giám sát liều ED50 của mẫu chuẩn này ta thấy trước 2018 đều dùng dòng chuột Swiss liều miễn dịch ED50 của vắc xin MCQG này luôn quanh 30 mIU, trung bình là 27,93 mIU. Tuy nhiên năm 2017 đã cho kết quả ED50 bị tụt xuống 14 mIU và từ 2018 đến nay khi chuyển sang chuột ICR thì kết quả ED50 vẫn theo xu hướng giảm và giá trị trung bình còn khoảng 18,31 mIU. Điều đó cho thấy bản thân mẫu chuẩn cũng bắt đầu có sự giảm, sự thay đổi dòng chuột ít nhiều cũng có ảnh hưởng đến giá trị công hiệu của MCQG và chỉ có chuẩn định lại với MCQT mới biết chính xác là giảm bao nhiêu và còn bao nhiêu, có đáp ứng yêu cầu tối thiểu cho thử nghiệm yêu cầu không? Với kết quả thu được ta hoàn toàn yên tâm MCQG đại lô RRab01-01 dù giảm nhưng vẫn đáp ứng yêu cầu của MCQG đại theo phương pháp NIH.

5. Kết luận

Giá trị trung bình công hiệu của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Đại RRab01-01 kiểm định năm 2023 là 9,3 IU/ống, đạt yêu cầu và tiêu chuẩn đề ra (≥ 5 IU/ống). Đề nghị Khoa mẫu chuẩn xem xét trình Lãnh đạo Viện ban hành lại hướng dẫn sử dụng, cập nhật giá trị

công hiệu mới của lô MCQG đại lô RRab01-01.

Tài liệu tham khảo

- [1] Fooks, Anthony R.; Jackson, Alan C. biên tập (2020). *Rabies: Scientific Basis of the Disease and its Management* (ấn bản 4). Elsevier.
- [2] World Health Organization, "WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccine", WHO/IVB/11.03, 2011.
- [3] SOP VR04-01: Quy trình thử nghiệm công hiệu vắc xin đại theo phương pháp NIH.
- [4] Dược điển Việt Nam V (2017), trang 1020.
- [5] WHO TRS 941, annex 2, 2007. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs.
- [6] Laboratory techniques in rabies, volume 1 & 2, 5th ed, 2018.
- [7] Jallet C, Tordo N. In Vitro ELISA Test to Evaluate Rabies Vaccine Potency. Journal of Visualized Experiments. 2020 May 11;(159). doi: 10.3791/59641.
- [8] ZejunWang, YanSun, XianfuWu, Darin, S.Carroll, WenliLv LeiYou, YaqiJi, JinrongShi JiaxinYan, GelinXu, ShengliMeng. Development of a relative potency test using ELISA for human rabies

vaccines. Biologicals, Volume 55, September 2018, Pages 59-62.

[9] Richard Gibert¹, Monique Alberti, Bertrand Poirier, Corinne Jallet, Noël Tordo, Sylvie Morgeaux. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. ELSEVIER. Vaccine (2013), <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.019>.

[10] WHO/VSQ/97.02 & WHO technical Report Series, No. 823. Validation of analytical assays.