
Research Paper

Application of toxin neutralization on albino mice for potency control test of serum containing specific anti-tetanus antibody

Vu Thi Thu Huong*, Nguyen Thi Tuong An, Hoang Thi Tam,

Tran Thi Trang Huyen, Vu Thi Phuong, Cao Thi Van

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals, No 1 Nghiem Xuan Yem, Hoang Mai, Ha Noi

Received 2/3/2022

Accepted 3/3/2022

Abstract

Background/Purpose: Intravenous Globulin (IV. Globulin), one of biological products, is used to provide passive immune protection by increasing the concentration of specific antibodies and neutralizing pathogenic microorganisms or virulent factors of pathogenic microorganisms. This study aimed to evaluate the suitability of the toxin neutralization technique in white mice for quality control of immunoglobulins containing antitoxin against tetanus bacteria.

Methods: descriptive laboratory study. We explored precision (repeatability and intermediate precision) of the toxin neutralization technique in white mice for quality control of immunoglobulins containing antitoxin against tetanus bacteria at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals, Vietnam.

Results: Potency of IV. Globulin was 21.40IU/ml with CV of 2.56% and 21.67 IU/ml with CV of 2.38% when we performed experiments for intermediate precision and repeatability, respectively. The results demonstrate that the toxin neutralization technique in white mice meets the requirements for accuracy and precision to control the quality of immunoglobulins containing antibody against tetanus toxin.

Conclusion: We successfully applied toxin neutralization technique using white mice model to determine the potency for quality control of tetanus antitoxin serum with high precision CV <5%.

Keywords: Tetanus antitoxin serum, toxin neutralization technique in white mice, potency, protective effect

Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng để kiểm định công hiệu huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván

Vũ Thị Thu Hương*, Nguyễn Thị Tường An, Hoàng Thị Tâm,

Trần Thị Trang Huyền, Vũ Thị Phương, Cao Thị Vân

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Số 1 Nghiêm Xuân Yêm, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội

Nhận ngày 2 tháng 3 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 3 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Sinh phẩm Globulin miễn dịch (IV. Globulin) là sản phẩm được sử dụng nhằm cung cấp miễn dịch thụ động, làm tăng nồng độ kháng thể đặc hiệu của cá thể, giúp trung hoà vi sinh vật gây bệnh hoặc các yếu tố độc lực của vi sinh vật gây bệnh. Nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá sự phù hợp của kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng để kiểm định chất lượng Globulin miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván.

Phương pháp: Mô tả thực nghiệm tại phòng thí nghiệm

Kết quả: Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván trong sinh phẩm IV. Globulin khi thực hiện độ chính xác trung gian là 21, 40IU/ml với CV là 2,56% và độ lặp lại là 21,67 IU/ml với CV là 2,38%. Các kết quả nghiên cứu chứng minh kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhắt trắng đạt yêu cầu về độ chính xác để kiểm định chất lượng Globulin miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván.

Kết luận: Nghiên cứu áp dụng thành công kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng để kiểm định công hiệu huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván (huyết thanh kháng độc tố uốn ván) với độ chính xác cao CV<5%.

Từ khóa: Huyết thanh kháng độc tố uốn ván; kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng; hiệu lực bảo vệ.

1. Đặt vấn đề

Sinh phẩm Globulin miễn dịch (IV. Globulin) là sản phẩm được sử dụng nhằm cung cấp miễn dịch thụ động, làm tăng nồng độ kháng thể đặc hiệu của cá thể, giúp trung hoà vi sinh vật gây bệnh hoặc các yếu tố độc lực của vi sinh vật gây bệnh như globulin miễn dịch viêm gan B, uốn ván, sởi. Một trong những tiêu chí quan trọng để đánh giá sinh phẩm IV. Globulin là xác định hiệu giá kháng thể trung hoà kháng độc tố vi khuẩn trong đó có kháng độc tố vi khuẩn uốn ván. Có nhiều kỹ thuật để xác định hiệu giá của kháng thể kháng độc tố vi khuẩn uốn ván trong sinh phẩm như kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA), miễn dịch gắn men (ELISA), và toxin binding inhibition test (TOBI). Tuy các kỹ thuật invitro đơn giản hơn, nhanh, khá nhạy và rẻ nhưng lại ít đặc hiệu hơn so với kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng (thử nghiệm trung hoà in vivo). Vì vậy, kỹ thuật trung hoà in vivo vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng cho xác

*Tác giả liên hệ.

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

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.15>

định hiệu giá kháng thể trung hoà đặc hiệu kháng uốn ván [1]. Nghiên cứu này thực hiện nhằm **“Đánh giá sự phù hợp của kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng để kiểm định chất lượng Globulin miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván”**.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu là kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế và khoa Động vật thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế trong khoảng thời gian từ tháng 3 năm 2021 đến tháng 12 năm 2021.

2.2. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm tại phòng thí nghiệm.

2.3. Vật liệu nghiên cứu

2.3.1. Mẫu chuẩn: Huyết thanh kháng độc tố chuẩn quốc tế có nguồn gốc từ người (Tetanus Immunoglobulin Human), mã TE-3 do NIBSC sản xuất có nồng độ gốc 120 IU/ml được pha loãng thành nồng độ 12 IU/ml.

2.3.2. Mẫu thử nghiệm: Sinh phẩm IV. Globulin SN inj. do Green Cross- Hàn Quốc, loại: 352C19051 có hạn sử dụng: 11/1/2022

2.3.3. Độc tố uốn ván: Độc tố uốn ván loại: Tetox Vn 0117 do IVAC sản xuất có hạn sử dụng: 9/2022

2.3.4. Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 16-18 gam có nguồn gốc: NICVB

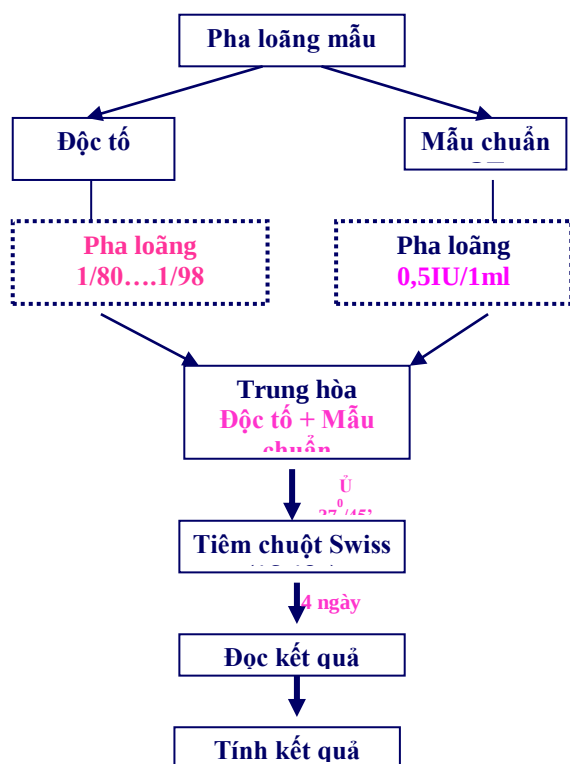
2.4. Phương pháp và quy trình thực hiện thử nghiệm

2.4.1. Phương pháp: Thực hiện phản ứng trung hòa kháng nguyên- kháng thể giữa độc tố uốn ván và huyết thanh kháng độc tố uốn ván, sau đó tiêm vào động vật thí nghiệm để xác định được hiệu giá của mẫu thử nghiệm. Sau khi có kết quả sử dụng phần mềm Microsoft Excel để tính toán và xử lý số liệu.

2.4.2. Quy trình thực hiện thử nghiệm

2.4.2.1. Quy trình xác định liều độc tố uốn ván thử nghiệm (L+/10)

Hình 1. Sơ đồ qui trình xác định liều độc tố uốn ván thử nghiệm (L+/10)



Chi tiết các bước thực hiện

a) *Chuẩn bị động vật thí nghiệm*: Chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 16-18 gam được đánh dấu và chia nhóm gồm 4 chuột vào 1 lồng, sau đó ghi nhãn rõ ràng cho mỗi lồng chuột bao gồm các thông tin: Tên sản phẩm, loạt số, độ pha, ngày tiêm, ngày kết thúc, dấu chuột.

b) *Chuẩn bị độc tố uốn ván*: Độc tố uốn ván dạng nước của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) loạt số Tetanox 0117 sản xuất 9/2017, hạn sử dụng 9/2022. Mẫu độc tố uốn ván được pha loãng để có nhiều độ pha khác nhau như sau: Độ pha loãng độc tố đầu tiên là 1/10:

1 ml độc tố gốc + 9 ml Jensen pepton (sau đây gọi là dung dịch A). Sau đó pha loãng thành nhiều độ pha khác nhau. Ví dụ : 1/80 = 1 ml (A) + 7,0 ml Jensen pepton, 1/82 = 1 ml (A) + 7,2 ml Jensen pepton, 1/84 = 1 ml (A) + 7,4 ml Jensen pepton, 1/86 = 1 ml (A) + 7,6 ml Jensen pepton, 1/88 = 1 ml (A) + 7,8 ml Jensen pepton, 1/90 = 1 ml (A) + 8,0 ml Jensen pepton, 1/92 = 1 ml (A) + 8,2 ml Jensen pepton, 1/94 = 1 ml (A) + 8,4 ml Jensen pepton, 1/96 = 1 ml (A) + 8,6 ml Jensen pepton, 1/98 = 1 ml (A) + 8,8 ml Jensen pepton.

c) *Pha mẫu huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn quốc tế có nguồn gốc từ người*

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn quốc tế có nguồn gốc từ người sau khi hoàn nguyên có nồng độ gốc là 120 IU/ml được pha ra nồng độ 12IU/ml. Khi đưa vào thử nghiệm sử dụng mẫu chuẩn có nồng độ 12 IU/ml và pha thành 0,5 IU/ml. Quy trình pha bao gồm hoàn nguyên ống huyết thanh chuẩn bằng 1ml dung dịch nước cất để được nồng độ 120IU/ml. Từ huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn quốc tế có nồng độ ban đầu là 120 IU/ống/ ml pha loãng

thành 12 IU/ml (1 ml huyết thanh chuẩn + 9 ml glycerol 66%) và từ nồng độ 12IU/ml pha loãng ra nồng độ 0,5 IU/ml (0,2 ml huyết thanh chuẩn + 4,6 ml NMSL)

d) *Trung hòa*: 1 ml huyết thanh chuẩn 0,5 IU/ml + 1 ml độc tố mỗi độ uốn ván ở các độ pha + 0,5 ml NMSL.

Ví dụ theo bảng sau:

Bảng 1: Bảng trung hòa huyết thanh chuẩn với độc tố uốn ván

Ống	Độc tố		Huyết thanh chuẩn 0,5 IU/ml	NMSL (ml)
	Độ pha	ml		
1	1//80	1	1	0,5
2	1/82	1	1	0,5
3	1/84	1	1	0,5
4	1/86	1	1	0,5
5	1/88	1	1	0,5
6	1/90	1	1	0,5
7	1/92	1	1	0,5
8	1/94	1	1	0,5
9	1/96	1	1	0,5
10	1/98	1	1	0,5

- Ủ ở 370C trong thời gian 45 phút. Tránh ánh sáng.

- Tiêm chuột: Mỗi độ pha tiêm 04 chuột, liều tiêm 0,5 ml/chuột/dưới da lưng

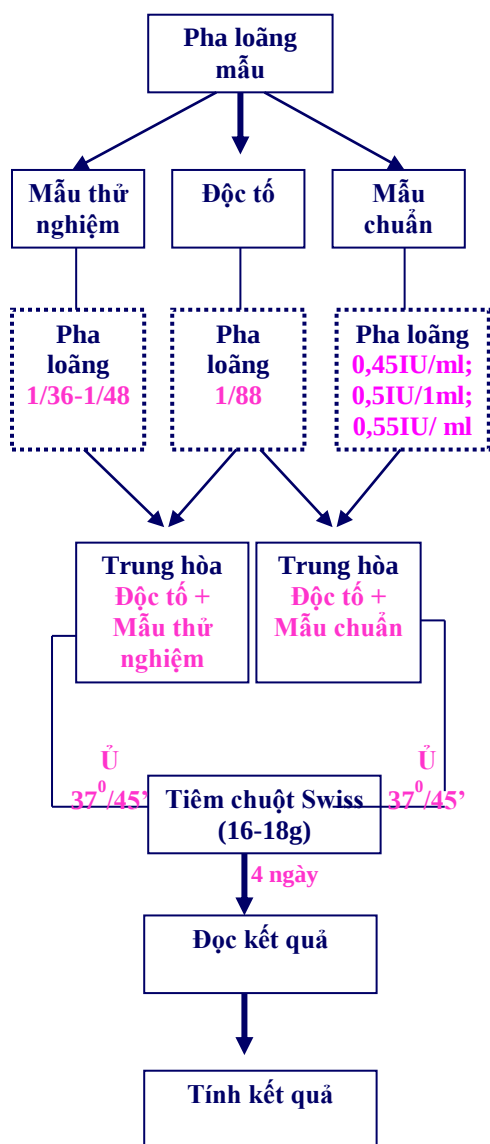
- Theo dõi chuột hàng ngày trong vòng 96 giờ

Kết quả: Liều L+/10 được xác định ở độ pha loãng độc tố cao nhất có số chuột chết 100% trong vòng 96 giờ.

2.4.2.2. Quy trình xác định hiệu giá của huyết thanh kháng độc tố uốn ván

Sau khi xác định được liều L+/10 của độc tố uốn ván, tiến hành xác định hiệu giá của huyết thanh mẫu thử nghiệm. Quy trình xác định hiệu giá được thực hiện theo các bước theo sơ đồ sau:

Hình 2. Sơ đồ quy trình xác định hiệu giá của huyết thanh kháng uốn ván.



Chi tiết các bước thực hiện

a) Chuẩn bị động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 16-18 gam
- Đánh dấu và chia 4 chuột vào 1 lồng
- Ghi nhãn rõ ràng cho mỗi lồng chuột bao gồm các thông tin: Tên sản phẩm, loạt số, độ pha, ngày tiêm, ngày kết thúc, dấu chuột

b) Pha mẫu

- *Pha mẫu chuẩn*: Huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn quốc tế có nguồn gốc từ người sau khi hoàn nguyên có nồng độ gốc là 120 IU/ml được pha ra nồng độ 12IU/ml. Khi đưa vào thử nghiệm sử dụng mẫu chuẩn có nồng độ 12 IU/ml và pha thành 0,5 IU/ml.

Ví dụ: pha loãng 0,2 ml mẫu chuẩn có nồng độ 12 IU/ml + 4,6 ml nước muối sinh lý

- *Pha mẫu thử nghiệm*: Mẫu thử nghiệm được pha loãng để có độ pha đưa vào thử nghiệm khoảng 0,5 IU/ml

Ví dụ: mẫu thử nghiệm có thể pha với các độ pha như sau:

1/36 = 0,5 ml huyết thanh thử + 8,5 ml nước muối sinh lý

1/38 = 0,5 ml huyết thanh thử + 9,0 ml nước muối sinh lý

1/40 = 0,5 ml huyết thanh thử + 9,5 ml nước muối sinh lý

1/42 = 0,5 ml huyết thanh thử + 10,0 ml nước muối sinh lý

1/44 = 0,5 ml huyết thanh thử + 10,5 ml nước muối sinh lý

1/46 = 0,5 ml huyết thanh thử + 11,0 ml nước muối sinh lý

1/48 = 0,5 ml huyết thanh thử + 11,5 ml nước muối sinh lý

c) *Pha độc tố uốn ván L+/10*

Pha độc tố uốn ván dựa vào L+/10 của độc tố uốn ván đã được xác định.

Ví dụ: L+/10 = 1/88 được pha loãng như sau: 1 ml độc tố + 87 ml Jensen pepton

d) *Trung hòa*

- *Mẫu thử nghiệm*: 1 ml mỗi độ pha mẫu thử nghiệm + 1 ml độc tố uốn ván L+/10 + 0,5 ml nước muối sinh lý

- *Mẫu chuẩn*: Dùng 03 ống nghiệm có chứa huyết thanh chuẩn với các thể tích lần lượt là 0,9 ml; 1ml và 1,1 ml tương ứng với 03 nồng độ: 0,45; 0,50 và 0,55 IU/ml đơn vị kháng độc tố uốn ván chuẩn để kiểm tra liều độc tố trung hòa:

C1: 0,9 ml huyết thanh chuẩn + 1 ml độc tố uốn ván L+/10 + 0,6 ml nước muối sinh lý

C2: 1,0 ml huyết thanh chuẩn + 1 ml độc tố uốn ván L+/10 + 0,5 ml nước muối sinh lý

C3: 1,1 ml huyết thanh chuẩn + 1 ml độc tố uốn ván L+/10 + 0,4 ml nước muối sinh lý

Ví dụ: Mẫu thử và mẫu chuẩn được trung hòa theo bảng sau:

Bảng 2: Pha huyết thanh chuẩn và huyết thanh cần thử nghiệm với độc tố uốn ván

	Ống	Huyết thanh		Độc tố L+/10 (ml)	NMSL (ml)
		Độ pha/nồng độ	ml		
Mẫu thử nghiệm	1	1/36	1,0	1,0	0,5
	2	1/38	1,0	1,0	0,5
	3	1/40	1,0	1,0	0,5
	4	1/42	1,0	1,0	0,5
	5	1/44	1,0	1,0	0,5
	6	1/46	1,0	1,0	0,5
	7	1/48	1,0	1,0	0,5
Mẫu chuẩn	C1	0,45 IU/ml	0,9	1,0	0,6
	C2	0,50 IU/ml	1,0	1,0	0,5
	C3	0,55 IU/ml	1,1	1,0	0,4

- Ủ ở nhiệt độ 37°C trong vòng 45 phút, tránh ánh sáng.

- Tiêm mỗi độ pha 04 con, liều tiêm 0,5 ml/chuột/dưới da lưng.

- Theo dõi số chuột sống chết hàng ngày trong vòng 96 giờ.

e) Đánh giá thử nghiệm

- Thử nghiệm được coi là có giá trị khi tuân thủ đúng quy trình (các yếu tố, điều kiện của quá trình thực hiện là đảm bảo, không ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm).
- Chuột chứng ở các độ pha C1, C2 có chứa lần lượt là 0,45 IU/ml và 0,5 IU/ml phải chết 100% trong thời gian theo dõi. Trong đó chuột ở độ pha C1 phải chết trước chuột ở độ pha C2.
- Chuột chứng ở độ pha C3 có chứa 0,55 IU/ml không được chết trong thời gian theo dõi.
- Chuột ở độ pha loãng mẫu thử cao nhất phải chết 100%, chuột ở độ pha loãng mẫu thử thấp nhất phải sống 100%.

f) Tính kết quả

Kết quả hiệu giá của huyết thanh kháng uốn ván thử nghiệm được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 0,5 \times N$$

Trong đó:

- N là số lần pha loãng kháng độc tố uốn ván thử nghiệm lớn nhất (độ pha loãng lớn nhất có chuột chết 100% trong thời gian theo dõi).
- 0,5 là số IU có trong 1ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn dùng trong thử nghiệm.

2.5. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhất trắng

2.5.1. Độ chính xác trung gian

Tiến hành thực hiện thử nghiệm lặp lại 5 lần vào các ngày khác nhau, do một nhóm kỹ thuật thực hiện, cùng bộ thiết bị, cùng phòng thí nghiệm. Cụ thể các bước thực hiện như sau:

- Pha loãng mẫu chuẩn quốc tế huyết thanh kháng độc tố uốn ván có nguồn gốc từ người với nồng độ 0,45; 0,5 và 0,55 IU/ml.
- Pha loãng mẫu thử nghiệm IV. Globulin loại 325C19501 do công ty Green Cross sản xuất thành 7 nồng độ khác nhau: 1/36, 1/38, 1/40, 1/42, 1/44, 1/46 và 1/48.
- Sau khi được pha loãng thành các độ pha khác nhau, các độ pha của các mẫu chuẩn và mẫu thử được trung hòa với 1 lượng độc tố uốn ván đã biết trước nồng độ.
- Ủ các mẫu này ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút, tránh ánh sáng.
- Sau khi ủ, mỗi độ pha của mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm cho 04 con chuột
- Liều tiêm 0,5 ml/chuột/dưới da lưng.
- Theo dõi và ghi nhận số chuột sống, chết trong vòng 96 giờ sau tiêm ở từng độ pha.

Tính toán và đánh giá kết quả: tính giá trị trung bình, SD và CV. Tiêu chuẩn chấp thuận $CV < 50\%$ [2]

2.5.2. Độ lặp lại

Tiến hành thực hiện thử nghiệm lặp lại 6 lần vào cùng một ngày, do một nhóm kỹ thuật thực hiện, cùng bộ thiết bị, cùng phòng thí nghiệm. Cụ thể các bước thực hiện như sau:

- + Pha loãng mẫu chuẩn quốc tế để có nồng độ 0,5 IU/ml.
- + Pha loãng mẫu thử nghiệm IV. Globulin thành 7 độ pha: 1/36, 1/38, 1/40, 1/42, 1/44, 1/46 và 1/48 để có nồng độ dự đoán là 18, 19, 20, 21, 22, 23 và 24 IU/ml.
- Hai mẫu này được thực hiện song song và lặp lại vào cùng một ngày.

- Sau khi được pha loãng thành các độ pha khác nhau, các độ pha của các mẫu chuẩn, mẫu thử nghiệm được trung hòa với một lượng độc tố uốn ván đã biết trước nồng độ
 - Ủ các mẫu này ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút, tránh ánh sáng.
 - Sau khi ủ, mỗi độ pha của mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm cho 04 con chuột.
 - Liều tiêm 0,5 ml/chuột/dưới da lưng.
 - Theo dõi và ghi nhận số chuột sống, chết trong vòng 96 giờ sau tiêm ở từng độ pha.
- Tính toán và đánh giá kết quả: tính giá trị trung bình, SD và CV. Tiêu chuẩn chấp thuận CV<50% [2]

3. Kết quả

3.1. Độ chính xác trung gian: Kết quả hiệu giá của 5 lần thử nghiệm vào các ngày khác nhau, sử dụng phần mềm Excel tính được giá trị trung bình cộng là XTB = 21,40 IU/ml và hệ số biến thiên CV= 2,56 %.

Bảng 3. Kết quả hiệu giá của mẫu thử nghiệm IV. Globulin khi thực hiện độ chính xác

ST T	Kết quả IU/ml	Xtb	X _{tb} - 2SD	X _{tb} + 2SD	SD	CV
1	21	21,40	20,30	22,50	0,55	2,56
2	21					
3	22					
4	22					
5	21					

Bảng 4. Kết quả hiệu giá của mẫu thử nghiệm IV. Globulin khi thực hiện độ lặp lại

STT	Kết quả IU/ml	Xtb	X _{tb} - 2SD	X _{tb} + 2SD	SD	CV
1	21	21,67	19,67	23,67	0,52	2,38
2	22					
3	22					
4	22					
5	21					
6	22					

Đối chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận cho thử nghiệm in vivo thì độ chính xác trung gian của kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhắt trắng là rất cao vì giá trị CV là 2,56% là rất thấp so với các thử nghiệm trên động vật thí nghiệm

khác. Kết quả này đạt được độ chính xác cao có thể do các yếu tố bao gồm mẫu chuẩn sử dụng, sự thành thạo của kỹ thuật viên xét nghiệm, sự đồng đều của chuột nhắt trắng đưa vào thử nghiệm.

3.2. Độ lặp lại: Kết quả hiệu giá của 6 lần lặp lại thử nghiệm vào cùng một ngày, sử dụng phần mềm Excel tính được giá trị trung bình cộng của hiệu giá là $X_{TB} = 21,67$ IU/ml và hệ số biến thiên $CV = 2,38 \%$.

Đối chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận cho thử nghiệm in vivo thì độ lặp lại của kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhắt trắng là rất cao với giá trị CV là 2,36%, tương tự như giá trị CV đạt được của độ chính xác trung gian. Các số liệu này là rất thấp so với các thử nghiệm trên động vật thí nghiệm khác, CV thường dao động đến 50% [3]. Kết quả này một lần nữa minh chứng sự chuẩn hoá trong các cấu thành của thử nghiệm trung hoà bao gồm mẫu chuẩn sử dụng, sự thành thạo của kỹ thuật viên xét nghiệm, sự đồng đều của chuột nhắt trắng đưa vào thử nghiệm.

4. Bàn luận

Sinh phẩm Globulin miễn dịch (IV. Globulin) là dòng sản phẩm điều trị quan trọng, được sử dụng nhằm làm tăng nồng độ kháng thể đặc hiệu của cá thể, giúp trung hoà vi sinh vật gây bệnh hoặc các yếu tố độc lực của vi sinh vật gây bệnh như globulin miễn dịch viêm gan B, uốn ván, sởi. Công hiệu là tiêu chí chất lượng quan trọng để kiểm soát chất lượng các sinh phẩm điều trị. Có một số kỹ thuật bao gồm cả kỹ thuật in vitro và in vivo được sử dụng để xác định công hiệu của sinh phẩm IV. Globulin như kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA), miễn dịch gắn men (ELISA), và toxin binding inhibition test (TOBI). Tuy các kỹ thuật in vitro đơn giản hơn, nhanh, khá nhạy và rẻ nhưng lại ít đặc hiệu hơn so với kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhắt trắng (thử nghiệm trung hoà in vivo). Vì vậy, đối với một số dòng sản phẩm điều trị quan trọng, kỹ thuật trung hoà in vivo vẫn được sử dụng là tiêu chuẩn vàng cho xác định công hiệu sản phẩm [1].

Kỹ thuật trung hoà độc tố được thực hiện trên mô hình chuột nhắt trắng ICR 16-18g đã và đang được triển khai tại khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế nhiều năm nay cho sản phẩm kháng huyết thanh SAT có nguồn gốc từ ngựa. Đối với sản phẩm IV. Globulin có nguồn gốc từ người, chúng tôi chưa tiến hành đánh giá và xác định tính phù hợp để áp dụng kỹ thuật trung hoà cho sản phẩm IV. Globulin người. Vì vậy, nghiên cứu này được thiết kế nhằm khảo sát tính ổn định của quy trình kỹ thuật và mô hình chuột nhắt trắng ICR 16-18g cho xác định hiệu giá kháng thể trung hoà kháng độc tố vi khuẩn uốn ván của sản phẩm IV. Globulin người thông qua đánh giá tiêu chí độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván trong sinh phẩm IV. Globulin khi thực hiện độ chính xác trung gian là 21, 40IU/ml với CV là 2,56% và độ lặp lại là 21,67 IU/ml với CV là 2,38%. Các kết quả nghiên cứu chứng minh kỹ thuật trung hoà độc tố trên chuột nhắt trắng ICR 16-18g đạt yêu cầu về độ chính xác để kiểm định chất lượng Globulin miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván có nguồn gốc từ người. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy việc kiểm soát các thành tố gây ảnh hưởng đến chất lượng kiểm định bao gồm mức độ thành thạo của nhân viên kỹ thuật, độc tố vi khuẩn, mẫu chuẩn kháng huyết thanh, dòng chuột ICR 16-18g đưa vào thử nghiệm là đạt chất lượng tốt, giúp quy trình có độ chụm và độ chính xác cao khi thực hiện tại labo của chúng tôi.

Gần đây, Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo việc sử dụng các kỹ thuật in vitro thay thế dần cho các kỹ thuật in vivo trên động vật thí nghiệm vì hai lý do: một là giảm thiểu việc sử dụng động vật thí nghiệm và hai là làm giảm

các sai lệch kết quả do sự dao động sinh học của các cá thể động vật sống khi thực hiện kỹ thuật in vivo. Tuy nhiên, với các bệnh lý nhiễm trùng quan trọng và nguy hiểm như uốn ván và ho gà, tiêu chí công hiệu xác định hiệu giá kháng thể trung hòa vẫn là tiêu chuẩn vàng cho kiểm định thành phẩm vắc xin và sinh phẩm y tế và là phương pháp tiêu chuẩn để so sánh đánh giá và phát triển các phương pháp kiểm định mới. Vì vậy, tại Khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế (NICVB), chúng tôi triển khai mở rộng và duy trì kỹ thuật trung hòa trên chuột nhắt trắng để xác định công hiệu một số sinh phẩm điều trị chứa kháng độc tố uốn ván và ho gà. Nghiên cứu này cung cấp bằng chứng khoa học về sự ổn định và độ chính xác cao của kỹ thuật trung hòa trên chuột nhắt trắng cho sản phẩm IV. Globulin có nguồn gốc từ người chứa kháng độc tố uốn ván. Nghiên cứu này vừa khẳng định giá trị của kỹ thuật trung hòa này trong kiểm định công hiệu dòng sản phẩm IV. Globulin, vừa cung cấp bằng chứng khoa học cho việc sử dụng quy trình là quy trình tham chiếu cho việc thiết lập và phát triển các kỹ thuật kiểm định mới trong tương lai (4).

[4] Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals

5. Kết luận

Nghiên cứu áp dụng thành công kỹ thuật trung hòa độc tố trên chuột nhắt trắng để kiểm định công hiệu huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng độc tố vi khuẩn uốn ván (huyết thanh kháng độc tố uốn ván) với độ chính xác cao $CV < 5\%$.

References

- [1] World Health Organization, "The Immunological Basis for Immunization/ Module 3 Tetanus", WHO/EPI/GEN/93.13, (1993)
- [2] SOP KDQG-34: Quy trình thẩm định thử nghiệm
- [3] WHO in-country workshop on analytical method validation, 17 February 2014, Hanoi-Vietnam.