

# ESTABLISHING A PROCEDURE FOR DETERMINING RABIES ANTIBODY TITER USING NEUTRALIZATION METHOD ON BHK21 CELLS

Nguyen Thi Mai Huong<sup>1\*</sup>, Vu Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Tuong An<sup>1</sup>, Pham Thi Hong Thuy<sup>1</sup>, Cao Thi Van<sup>1</sup>, Nguyen Kim Hung<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

<sup>2</sup> Ha Noi University of Pharmacy

*Received 01 August 2024*

*Accepted 14 October 2024*

**Abstract:** The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB) currently uses the mouse neutralizing antibody test (MNT) to evaluate anti-rabies serum potency, but it has many disadvantages. Since 2018, the World Health Organization (WHO) has recommended alternative methods for determining rabies virus neutralizing antibody titers on BHK-21 cells (FAVN). Hence, this study was conducted to establish a procedure for determining rabies antibody titers using the neutralization method on BHK-21 cells and validate assay based on criteria such as accuracy, repeatability and intermediate precision. This research pointed out that  $5 \times 10^5$  cells per mL is the most optimal concentration of cells. The average titer value of the international anti-rabies standard sample code NIBSC 19/244 is 167.52 IU, with R% recovery of 102.14% compared to the number indicated on the label, meeting the accuracy requirement. Additionally, the method guarantees repeatability and intermediate precision with a coefficient of variation (CV) less than 20%, which is suitable for evaluating anti-rabies serum in NICVB.

*Keywords:* BHK -21, rabies virus, anti rabies serum, FAVN...

---

\* Corresponding author

E-mail address: maihuong221210@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i4.187>

# NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG ĐẠI BẰNG PHƯƠNG PHÁP TRUNG HÒA TRÊN TẾ BÀO BHK21

Vũ Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mai Hương<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Tường An<sup>1</sup>, Phạm Thị Hồng Thủy<sup>1</sup>, Cao Thị Vân<sup>1</sup> Nguyễn Kim Hùng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế,

<sup>2</sup> Trường đại học Dược Hà Nội

Nhận ngày 01 tháng 08 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 10 năm 2024

**Tóm tắt:** Hiện nay Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB) đang thực hiện thử nghiệm xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại bằng phương pháp trung hòa kháng thể trên chuột nhắt trắng (MNT), tuy nhiên phương pháp này còn có nhiều hạn chế. Từ năm 2018, phương pháp xác định hiệu giá kháng thể trung hòa trên tế bào BHK 21 (FAVN) được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) khuyến cáo áp dụng thay thế cho phương pháp MNT. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình xác định hiệu giá kháng huyết thanh đại trên sinh phẩm sản xuất từ huyết thanh ngựa bằng phương pháp trung hòa trên tế bào BHK 21 và thẩm định một phần quy trình dựa trên các tiêu chí độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Đề tài đã xây dựng quy trình với nồng độ tế bào tối ưu đưa vào thử nghiệm là  $5 \times 10^5$  tế bào/ml. Quy trình thực hiện đảm bảo độ tin cậy với tính đúng của hiệu giá trung bình mẫu chuẩn kháng đại quốc tế mã NIBSC 19/244 là 167,52IU, có độ thu hồi R% là 102,14% so với giá trị hiệu giá của mẫu chuẩn đã công bố. Hệ số biến thiên (CV) trên các tiêu chí độ lặp lại và độ chính xác trung gian nhỏ hơn 20%, hoàn toàn phù hợp cho áp dụng thực tiễn trong công tác kiểm định huyết thanh kháng đại tại NICVB.

*Từ khoá:* BKH21, virus đại, huyết thanh kháng đại, FAVN...

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh đại là một bệnh do virus đại *Rabies lyssavirus*, gây tử vong nhưng có thể phòng ngừa được. Bệnh này có thể lây sang người và vật nuôi nếu bị động vật mắc bệnh đại cắn

hoặc cào. Tại Hoa Kỳ, bệnh đại chủ yếu được tìm thấy ở động vật hoang dã như dơi, gấu trúc, chồn hôi và cáo. Tuy nhiên, ở nhiều quốc gia khác, chó vẫn mang mầm bệnh đại

và hầu hết các trường hợp tử vong do bệnh dại ở người trên khắp thế giới là do chó cắn. Có thể ngăn ngừa bệnh dại cho người bằng cách tiêm vắc xin phòng dại và huyết thanh kháng dại sau khi bị phơi nhiễm.

Hiện tại khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế đang thực hiện nhiệm vụ xác định hiệu giá huyết thanh kháng dại bằng phương pháp trung hòa kháng thể trên chuột nhắt trắng (MNT). Phương pháp này có độ dao động kết quả lớn, đòi hỏi thời gian thực hiện dài và thao tác kỹ thuật trên động vật thí nghiệm.

Năm 2018 Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) khuyến cáo có thể áp dụng phương pháp xác định hiệu giá kháng thể trung hòa trên tế bào BHK21 (FAVN) cho đánh giá vắc xin và huyết thanh kháng dại, phương pháp này rút ngắn thời gian thực hiện và không phải sử dụng trên động vật thí nghiệm, hơn nữa độ dao động của phương pháp không nhiều, có độ tin cậy lớn. Dược điển Châu Âu cũng có chuyên luận xác định hiệu giá của huyết thanh kháng dại từ người bằng phương pháp này. Tuy nhiên đây là một phương pháp mới chưa từng thực hiện trên đối tượng huyết thanh kháng dại sản xuất từ huyết thanh ngựa tinh chế tại Việt Nam. Việc xây dựng được quy trình thực hiện trên đối tượng huyết thanh

kháng dại sản xuất bằng huyết thanh ngựa sẽ giúp triển khai thực hiện phương pháp này trong kiểm định sinh phẩm kháng huyết thanh dại tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế và nhà sản xuất trong nước.

## **2. Phương pháp nghiên cứu**

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

- Đối tượng nghiên cứu: Quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng dại trên tế bào BHK21.

- Thời gian thực hiện: 07/2023 đến 06/2024

- Địa điểm: Thực hiện tại labo khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế- Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và Sinh phẩm y tế.

### **2.2. Vật liệu, hoá chất**

#### *2.2.1 Hoá chất, sinh phẩm*

Chủng CVS -22

Tế bào BHK21 ATCC

Huyết thanh kháng dại chuẩn quốc tế, Anti-rabies Immunoglobulin 19/244

Huyết thanh kháng dại SAR do IVAC sản xuất

Môi trường DMEM 10% FBS, DMEM 2%FBS,

Dung dịch PBS 1X

Tripsin- EDTA

Dung dịch nhuộm huỳnh quang FITC 800-092 Fujirebio

### 2.2.2 Vật tư, trang thiết bị

Tủ cấy vô trùng SafeFAST classic 218  
Kính hiển vi huỳnh quang Olympus BX53F  
Kính hiển vi phản pha Olympus  
Bể ổn nhiệt  
Tủ âm CO<sub>2</sub> SANYO MCO – 17AC  
Máy lắc tuýp IKA  
Phiến 96 giếng đáy bằng, Máng nhựa vô trùng  
Pipetman các cỡ 5000 µl, 2000 µl, 200 µl, 100 µl,..  
Pipet nhựa vô trùng 2ml, 5ml, 10ml,..

### 2.3 Thiết kế nghiên cứu

Chọn lựa mẫu thực hiện: lựa chọn 03 lô huyết thanh kháng đại tinh chế SAR lô 118,119,122 do IVAC sản xuất trong năm 2023.

- Xây dựng quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại bằng phương pháp trung hòa trên tế bào BHK21 bao gồm nội dung sau:
  - + Tối ưu nồng độ tế bào để thử thách với chủng CVS sau khi trung hòa với kháng huyết thanh: Thực hiện 03 lần/ nồng độ với các nồng độ sau: 10<sup>5</sup> tế bào/ml; 5x10<sup>5</sup> tế bào/ml; 10<sup>6</sup> tế bào/ml. Lựa chọn nồng độ tế bào cho kết quả không có hiện tượng tế bào bong rách, các hình ảnh vi rút bắt màu huỳnh quang rõ ràng ở tất cả các nồng

độ.

+ Thực hiện xác định hiệu giá kháng thể huyết thanh đại trên 3 lô SAR, mỗi lô lặp lại 3 lần trên quy trình nghiên cứu.

- Thẩm định quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại bằng phương pháp trung hòa trên tế bào BHK21.

Sau khi xây dựng và tối ưu quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại trên tế bào BHK21, nhóm nghiên cứu tiến hành thẩm định một phần với các tiêu chí cụ thể như sau:

+ Độ đúng: Thực hiện đánh giá trên mẫu chuẩn quốc tế, 03 lần mỗi ngày, lặp lại 03 ngày khác nhau. Phân tích số liệu thu được, tính giá trị trung bình X<sub>tb</sub> và tính %R (độ thu hồi). Tiêu chuẩn: 80-120%.

+ Độ lặp lại: Thực hiện 06 lần trên 01 lô SAR 118 trong cùng 01 ngày. Tính giá trị trung bình của mẫu thử, SD và CV. Tiêu chuẩn chấp thuận: CV ≤ 20 %.

+ Độ chính xác trung gian: Thực hiện 5 lần trên 01 lô SAR vào các ngày khác nhau. Tính giá trị trung bình, SD và CV. Tiêu chuẩn chấp thuận: CV ≤ 20%.

#### \* Quy trình xác định hiệu giá kháng huyết thanh trên tế bào BHK21 (FAVN)

Thực hiện xác định hiệu giá kháng huyết thanh trên tế bào BHK21 trên quy trình nhóm nghiên cứu xây dựng cho một lần

thực hiện gồm các bước tóm tắt như sau:

- *Chuẩn bị chủng CVS*: Chọn độ pha loãng chủng CVS có 100 TCID<sub>50</sub> qua kết quả chuẩn độ hiệu giá chủng để trung hòa với kháng huyết thanh.

- *Pha loãng huyết thanh*: Pha loãng huyết thanh thử và huyết thanh chuẩn ra thành dung dịch chứa khoảng 2 IU/ml. Sau đó huyết thanh chuẩn (HTC) và huyết thanh thử (HTT) được pha loãng ra các độ pha: 1, 1/5; 1/25; 1/125

- *Trung hòa huyết thanh – vi rút*: Trung hòa các độ pha của mẫu HTC và HTT với chủng CVS đã được pha loãng có 100TCID<sub>50</sub> ở trên với tỉ lệ 1:1. Lắc đều các ống trung hòa, ủ 37<sup>0</sup>C/90 phút, tránh ánh sáng.

- *Gây nhiễm trên tế bào*:

+ Chuyển 50 µl hỗn dịch vi rút – huyết thanh vào phiến 96 giếng đáy bằng. Mỗi nồng độ lặp lại 10 giếng. Mẫu HTC gây nhiễm vào các giếng từ hàng A-D, mẫu HTT gây nhiễm vào các giếng từ hàng E-H.

+ Chủng tế bào: Cột thứ 11 từ hàng A-H

+ Chủng huyết thanh: Chuyển 50 µl huyết thanh chuẩn ở độ pha 1 vào cột 12 từ hàng A-D; 50 µl huyết thanh thử ở độ pha 1 vào cột 12 từ hàng E-H.

+ Chủng vi rút: Cây chủng CVS có từ nồng độ 30-300TCID<sub>50</sub> trên phiến 96 giếng khác. Mỗi nồng độ lặp lại 10 giếng.

+ Cho hỗn dịch tế bào ở nồng độ tối ưu vào tất cả các giếng.

+ Cho 150 µl môi trường DMEM 10% vào cột giếng chủng tế bào và 100 µl vào cột chủng huyết thanh từ hàng A-H.

+ Ủ 37<sup>0</sup>C, trong tủ ẩm 5% CO<sub>2</sub> trong 48 giờ.

- *Đọc kết quả*:

+ Sau 48 giờ, soi kính kiểm tra tế bào trước khi nhuộm, hút bỏ dịch nổi.

+ Nhỏ 100 µl formaldehyde 6%/ giếng.

+ Ủ phiến thử nghiệm 15 phút, rửa bằng PBS (-) 2 lần.

+ Nhỏ 50µl triton 1% / giếng.

+ Ủ 15 phút, rửa bằng PBS (-) 2 lần.

+ Trong khi ủ, pha kháng thể kháng đại gắn FITC, bọc giấy bạc để ngăn mát tủ lạnh chờ nhuộm.

+ Nhỏ 20 µl kháng thể kháng vi rút đại – FITC/ giếng, ủ 30 phút ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C

+ Đọc kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang vật kính 10X, quan sát toàn bộ vi trường, nếu vi trường có tế bào bắt màu huỳnh quang giống chủng dương vi rút đọc (+), không có huỳnh quang đọc (-).

+ Các giếng chứng tế bào và chứng huyết thanh không có dấu hiệu bắt màu huỳnh quang.

+ Các giếng chứng vi rút có bắt màu huỳnh quang và có giá trị trong khoảng 30-300 TCID<sub>50</sub>.

+ Không có dấu hiệu tế bào bị nhiễm vi sinh vật ở tất cả các giếng.

+ Xác định ED<sub>50</sub> cho mẫu HTC, HTT bằng công thức Speaman Karber.

+ Tính kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa theo công thức [7]:

**Hiệu giá (IU/ml) = Antilog (Log<sub>10</sub>ED<sub>50</sub> HTC – Log<sub>10</sub>ED<sub>50</sub> HTT) x Đơn vị HTC x độ pha loãng HTT**

### 2.3 Xử lý và phân tích số liệu

- Phân tích số liệu trên phần mềm excel.

### 2.4 Đạo đức nghiên cứu

Đề tài được thực hiện trong phòng thí nghiệm invitro, không thực hiện trên người và động vật thí nghiệm.

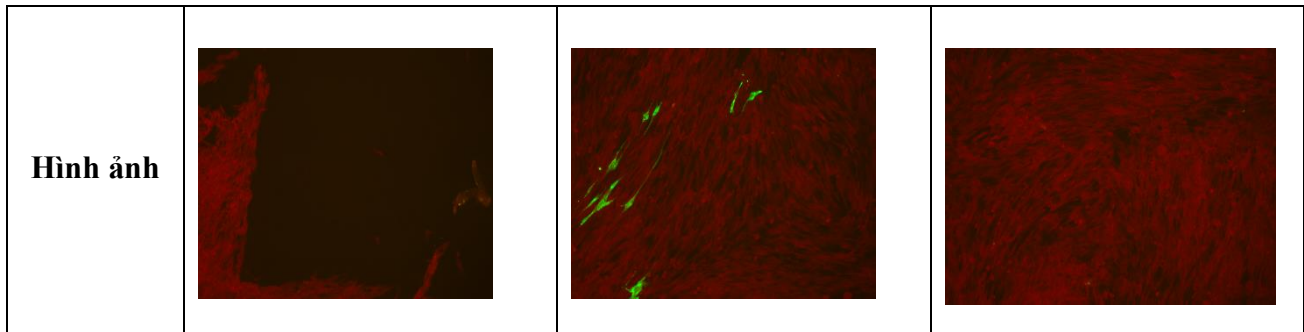
## 3. Kết quả nghiên cứu

### 3.1 Tối ưu nồng độ tế bào

Thực hiện 03 lần/ nồng độ với các nồng độ 10<sup>5</sup> tế bào/ml; 5x10<sup>5</sup> tế bào/ml; 10<sup>6</sup> tế bào/ml.

**Bảng 1. Kết quả tối ưu nồng độ tế bào**

Số thử nghiệm	Nồng độ 10 <sup>5</sup> tb/ml	Nồng độ 5x10 <sup>5</sup> tb/ml	Nồng độ 10 <sup>6</sup> tb/ml
<b>Lần 1</b>	100% các giếng tế bào thừa, bong rách sau khi rửa nhuộm. Hình ảnh vi rút khó phát hiện giữa các độ pha.	100% các giếng tế bào kín đều 1 lớp, không có giếng nào bị bong sau khi rửa. Hình ảnh vi rút rõ ràng ở tất cả các độ pha.	100% các giếng tế bào dày kín, tế bào nhỏ, mọc nhiều lớp. Hình ảnh vi rút khó phát hiện ở các độ pha thấp.
<b>Lần 2</b>	100% các giếng tế bào thừa, bong rách sau khi rửa nhuộm. Hình ảnh vi rút khó phát hiện giữa các độ pha.	100% các giếng tế bào kín đều 1 lớp, không có giếng bị bong sau khi rửa. Hình ảnh vi rút rõ ràng ở tất cả các độ pha.	100% các giếng tế bào dày kín, tế bào nhỏ, mọc nhiều lớp. Hình ảnh vi rút khó phát hiện ở các độ pha thấp.
<b>Lần 3</b>	100% các giếng tế bào thừa, bong rách sau khi rửa nhuộm. Hình ảnh vi rút khó phát hiện giữa các độ pha.	100% các giếng tế bào kín đều 1 lớp, không có giếng bị bong sau khi rửa. Hình ảnh vi rút rõ ràng ở tất cả các độ pha.	100% các giếng tế bào dày kín, tế bào nhỏ, mọc nhiều lớp. Hình ảnh vi rút khó phát hiện ở các độ pha thấp.



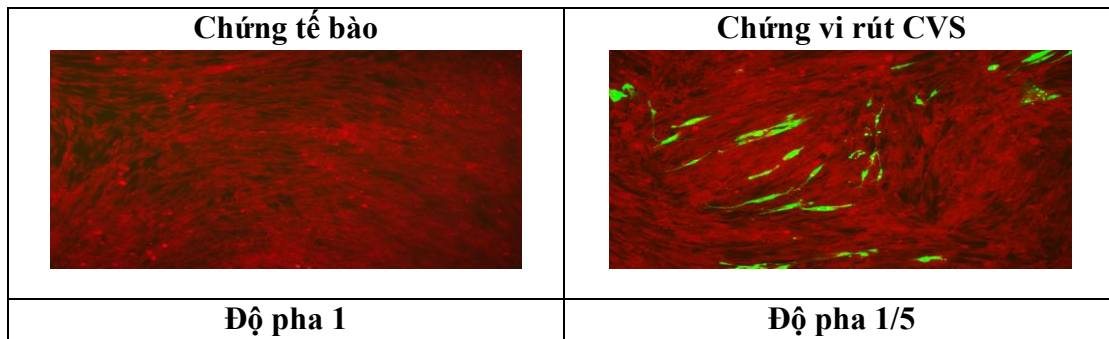
### 3.2 Hiệu giá huyết thanh kháng dại

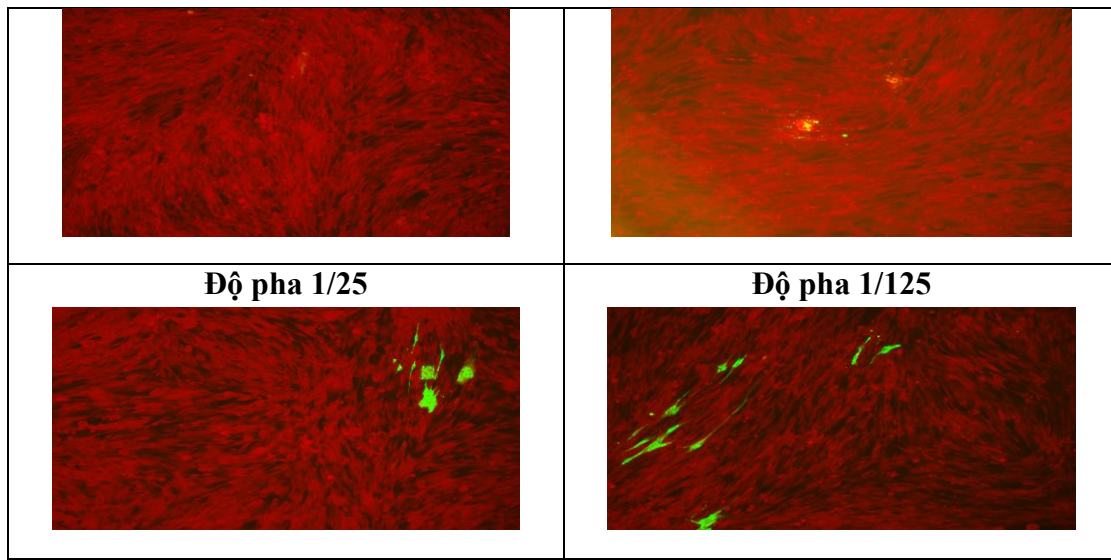
Thực hiện xác định hiệu giá kháng thể huyết thanh dại trên 3 lô SAR bằng quy trình nghiên cứu với nồng độ tế bào đã

chọn lựa tối ưu và nồng độ vi rút thử thách đã xác định ở phần trước đó. Bao gồm các loạt số: 118, 119, 122. Mỗi lô lặp lại 3 lần trên quy trình nghiên cứu

**Bảng 2. Kết quả xác định hiệu giá kháng huyết thanh dại trên 03 lô SAR**

	<b>Hiệu giá lô 118 (IU/ml)</b>	<b>Hiệu giá lô 119 (IU/ml)</b>	<b>Hiệu giá lô 122 (IU/ml)</b>
Lần 1	324	324	235
Lần 2	276	325	276
Lần 3	235	276	200
<b>GM</b>	<b>275,96</b>	<b>307,45</b>	<b>234,96</b>
<b>SD</b>	<b>44,55</b>	<b>28,01</b>	<b>38,04</b>
<b>CV (%)</b>	<b>16,14</b>	<b>9,11</b>	<b>16,19</b>





**Hình 1. Hình ảnh trung hòa chủng CVS ở các độ pha**

### 3.3 Thẩm định quy trình

#### 3.3.1 Xác định độ đúng

Thực hiện đánh giá trên mẫu chuẩn quốc tế, 03 lần mỗi ngày, lặp lại 03 ngày khác nhau.

**Bảng 3. Kết quả độ đúng**

	Hiệu giá thực hiện (IU/ml)	Xtb (IU/ml)	Hiệu giá MC công bố (IU/ml)
<b>Ngày 1</b>	160,00	<b>167,52</b>	<b>164</b>
	187,98		
	160,00		
<b>Ngày 2</b>	187,98		
	160,00		
	187,98		
<b>Ngày 3</b>	187,98		
	139,58		
	136,18		
<b>%R</b>	<b>102,14%</b>		

#### 3.3.2 Xác định độ lặp lại

Thực hiện 06 lần lặp lại trên 01 lô SAR-118 để đánh giá độ lặp lại qua giá trị của CV



**Bảng 4. Kết quả độ lặp lại**

	<b>Hiệu giá lô SAR 118 (IU/ml)</b>
Lần 1	324,6
Lần 2	381,09
Lần 3	276,08
Lần 4	324,36
Lần 5	381,09
Lần 6	276,08
<b>GM</b>	<b>324,36</b>
<b>SD</b>	<b>47,01</b>
<b>GM±2SD</b>	<b>(230,34 – 418,39)</b>
<b>CV (%)</b>	<b>14,49</b>

### 3.3.3 Xác định độ chính xác trung gian

Thực hiện đánh giá độ chính xác trung gian trên lô SAR loạt số 122 mỗi ngày 1 lần và thực hiện trong 5 ngày khác nhau.

**Bảng 5. Kết quả độ chính xác trung gian**

<b>Thời gian thực hiện</b>	<b>Hiệu giá lô SAR 122 (IU/ml)</b>
Ngày 1 (08/11/2023)	234,98
Ngày 2 (10/11/2023)	276,07
Ngày 3 (17/11/2023)	234,98
Ngày 4 (27/11/2023)	276,07
Ngày 5 (11/12/2023)	234,98
<b>GM</b>	<b>250,62</b>
<b>SD</b>	<b>22,50</b>
<b>GM±2SD</b>	<b>(205,62 – 295,62)</b>
<b>CV (%)</b>	<b>8,98</b>

## 4. Bàn luận

### 4.1 Tối ưu nồng độ tế bào

Trong quá trình thực hiện nghiên cứu xác định hiệu giá chủng CVS chúng tôi dễ dàng phát hiện dấu hiệu bắt màu huỳnh quang của chủng CVS ở nồng độ thử thách vi rút với nồng độ tế bào cảm thụ là  $10^5$  tế bào/ml. Tuy nhiên khi thực hiện xác định hiệu giá kháng huyết thanh đại, chúng tôi thấy khó khăn hơn trong việc phát hiện hình ảnh bắt màu huỳnh quang của vi rút sau khi trung hòa với kháng thể. Do đó nhóm nghiên cứu đã tiến hành thực hiện thử thách trên 3 nồng độ tế bào cảm thụ khác nhau, bao gồm các nồng độ  $10^5$  tế bào/ml;  $5 \times 10^5$  tế bào/ml và  $10^6$  tế bào/ml. Mỗi nồng độ lặp lại 3 lần trên 3 phiên thử nghiệm khác nhau. Kết quả tối ưu nồng độ tế bào ở bảng 1 cho thấy ở các lần thực hiện trên nồng độ  $10^5$  tế bào/ml đều có hiện tượng tế bào bị bong rách, khó phát hiện vi rút ở các độ pha thấp. Với nồng độ  $5 \times 10^5$  tế bào/ml không có hiện tượng tế bào bong rách, các hình ảnh vi rút bắt màu huỳnh quang cũng rõ ràng ở tất cả các độ pha. Trên hình ảnh tế bào của nồng độ  $10^6$  tế bào/ml quan sát thấy tế bào dày nhiều lớp, khó phát hiện hình ảnh vi rút ở các độ pha thấp. Vì thế chúng tôi lựa chọn nồng độ

tế bào tối ưu đưa vào quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại là nồng độ  $5 \times 10^5$  tế bào/ml. Nồng độ này cũng hoàn toàn giống với nồng độ tế bào được trình bày trong dược điển Châu Âu khi thực hiện xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại có nguồn gốc từ người trên tế bào bằng phương pháp RFFIT [3] và trong hướng dẫn chung của WHO cho xác định hiệu giá kháng huyết thanh sau tiêm miễn dịch bằng phương pháp FAVN có nồng độ tế bào là  $4 \times 10^5$  tế bào/ml [5].

### 4.2 Hiệu giá kháng huyết thanh đại

Sau khi xác định được liều gây nhiễm TCID<sub>50</sub> của chủng CVS và có nồng độ tế bào tối ưu, chúng tôi tiến hành thực hiện xác định hiệu giá kháng huyết thanh đại trên 3 lô mẫu SAR 118, 119 và 122, mỗi lô lặp lại 3 lần. Các kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy CV các lô đều có giá trị  $CV < 20\%$ , cụ thể lô 118 là 16,14%, lô 119 là 9,11% và lô 122 là 16,19%. Hình ảnh tế bào ở các độ pha loãng kháng huyết thanh đều rõ ràng và có sự tương quan giữa mật độ virus và các độ pha của kháng huyết thanh (Hình 1).

### 4.3 Thẩm định quy trình

Phương pháp FAVN đã được nhiều đơn vị đưa vào thực hiện trên đối tượng huyết thanh của người và vật nuôi sau khi

tiêm phòng vắc xin dại và có hướng dẫn của WHO [5], cùng với điều kiện hiện có của NICVB và phạm vi nghiên cứu của đề tài, vì vậy nhóm nghiên cứu tiến hành thẩm định quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng dại trên tế bào với hai tiêu chí là độ đúng và độ chính xác. Trong đó độ chính xác gồm có: độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Nhóm nghiên cứu đánh giá tiêu chí độ đúng của thử nghiệm trên đối tượng là huyết thanh kháng dại chuẩn quốc tế loạt số 19/244 của NIBSC với hiệu giá được thiết lập trên tế bào bằng cả hai phương pháp RFFIT và FAVN là 164 IU. Chúng tôi đã thực hiện lặp lại 9 lần trong 3 ngày, mỗi ngày 3 lần. Các kết quả thể hiện trong bảng 3 cho thấy các số liệu đều nằm trong khoảng 80-120% so với giá trị công bố, giá trị trung bình  $\bar{X}_{tb}$  là 167,52 và độ hồi phục R% là 102,14%. Thử nghiệm đạt yêu cầu cho tiêu chí độ đúng với tiêu chuẩn %R trong khoảng 80-120%.

Độ lặp lại được thể hiện qua kết quả lặp lại 6 lần cho lô mẫu SAR 118 có giá trị CV= 14,49% như trong bảng 4 đã trình bày hoàn toàn đáp ứng tiêu chí đánh giá độ lặp lại với CV <20%. Các số liệu nằm trong khoảng  $GM \pm 2SD$  có giá trị từ (230,34 – 418,39IU/ml). Kết quả độ

chính xác trung gian trên lô SAR 122 ở bảng 5 cũng đáp ứng yêu cầu của tiêu chí đánh giá độ chính xác trung gian với giá trị CV= 8,98%. Các số liệu nằm trong khoảng  $GM \pm 2SD$  có giá trị từ (205,62 – 295,62IU/ml). Quy trình thử nghiệm này đảm bảo độ tin cậy với giá trị CV của các tiêu chí < 20%, hoàn toàn phù hợp với yêu cầu CV của thử nghiệm thực hiện đánh giá trên tế bào.

## 5. Kết luận

Quy trình xác định hiệu giá huyết thanh kháng dại trên tế bào BHK21 đã xây dựng thực hiện trên mẫu huyết thanh kháng dại sản xuất từ huyết thanh ngựa tinh chế đảm bảo độ tin cậy với tính đúng các giá trị hiệu giá nằm trong khoảng 80-120% và tính chính xác với CV < 20%.

## Tài liệu tham khảo

- [1] F Cliquet<sup>1</sup>, M Aubert, L Sagné, “Development of a fluorescent antibody vi rútvi rút neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody”, PMID: 9671155; DOI: 10.1016/s0022-1759(97)00212-3
- [2] Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by Direct Fluorescent Antibody Testing. CDC
- [3] European Pharmacopoeia, volume II, phiên bản 10, năm 2020.

- [4] Bộ Y Tế (2018), *Dược điển Việt Nam 5*, Nhà Xuất bản Y Học.
- [5] World Health Organization, Rupprecht C.E., Fooks A.R., Abela-Ridder B. (2018), *Laboratory techniques in rabies, volume 1*, 5th ed, World Health Organization, Geneva.
- [6] L. T. Webster J.R.D. (1935), "Early Diagnosis of Rabies by Mouse Inoculation. Measurement of Humoral Immunity to Rabies by Mouse Protection Test".
- [7] World Health Organization (2005), "WHO Expert Consultation on rabies," *World Health Organ Tech Rep Ser*, 931, pp. 1-88, back cover.
- [8] The World Organisation for Animal Health (2023), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, ed. 2023, twelfth edition.
- [9] Louie R.E., Dobkin M.B., Meyer P., Chin B., *et al.* (1975), "Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test (MNT) with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)", *J Biol Stand*, 3(4), pp. 365-373.
- [10] Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M. (1996), "A rapid reproducible test for determining rabies neutralising antibody", *Laboratory Techniques in Rabies, 4th edn.*, p. p. 181.
- [11] Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M. (1973), "A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody", *Bull World Health Organ*, 48(5), pp. 535-541.
- [12] Cliquet F., Aubert M., Sagne L. (1998), "Development of a fluorescent antibody vi rút vi rút neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody", *J Immunol Methods*, 212(1), pp. 79-87.