

STUDY ON APPLICATION OF KINETIC CHROMOGENIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ENDOTOXIN IN VACCINES AND MEDICAL BIOLOGICALS

Ta Nguyen Tuong Van*, Luu Nguyen Nam Khuong, Le Phuong Lien, Tran Ngoc Nhon,
Vu Thi Thu Huong, Pham Thi Lan Anh, Nguyen Thi Thu Hoa.

Institute of Vaccines and Medical Biologicals

Received 03 July 2024

Accepted 09 December 2024

Abstract: Endotoxin residue in vaccines and medical biologicals is an ingredient that needs to be determined by its allowable limits. Currently, the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC) is using the Gel Clot, a semi-quantitative method, it may not be suitable for products that need to determine the amount of endotoxin accurately. Therefore, the research team applied the Kinetic Chromogenic method to determine the endotoxin content in our vaccines to enhance the level of endotoxin control for these products. The study uses the Kinetic-QCL kit (Lonza) in combination with the BioTek Elx808LBS plate reader/incubator (Lonza) and WinKQCLTM software (version 5.3.3) to perform the reaction according to the manufacturer. We are performing the test with 3 samples of each product type, repeating 3 times for each technician to confirm the calibration criteria, precision and recovery, repeatability, and robustness of the test method. Recovery (PPC%) and coefficient of variation (CV%) values were calculated by each criterion. The Kinetic Chromogenic method has been validated and the criteria required by the manufacturer, in which the absolute value of the r coefficient of the standard curve reaches 0.999, precision and recovery range from 103 to 125%, repeatability and robustness have CV% <10%. The study has also discovered the sample preparation suitable for each product, which is heat treatment for influenza vaccine and combining both heat treatment and dilution in MgCl₂ solution for the serum sample. Good preparation helps eliminate inhibition and enhancement factors to LAL reaction.

Keywords: endotoxin, LAL, kinetic chromogenic.

* Corresponding author

E-mail address: tanguyentuongvan@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i4.193>

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SO MÀU ĐỘNG HỌC (KINETIC CHROMOGENIC) XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NỘI ĐỘC TỔ TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Tạ Nguyễn Tường Vân*, Lưu Nguyễn Nam Khương, Lê Phương Liên, Trần Ngọc Nhơn,
Vũ Thị Thu Hương, Phạm Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Thu Hoa.

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 03 tháng 07 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 09 tháng 12 năm 2024

Tóm tắt: Nội độc tố tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm là thành phần cần phải được xác định mức giới hạn cho phép trong các sản phẩm. Hiện nay, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) sử dụng phương pháp thường quy Gel clot - đây là phương pháp bán định lượng nên có thể không phù hợp đối với các sản phẩm cần xác định chính xác lượng endotoxin trong mẫu. Do đó nhóm nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp so màu động học (Kinetic Chromogenic) để xác định hàm lượng endotoxin trong vắc xin cúm mùa và huyết thanh tinh chế cô đặc để tăng cường mức độ kiểm soát endotoxin đối với các sản phẩm này. Về phương pháp thực hiện, nhóm nghiên cứu đã sử dụng bộ kit Kinetic-QCL (Lonza) kết hợp với máy đọc/ ủ phiên BioTek ELx808LBS (Lonza) và phần mềm WinKQCL™ phiên bản 5.3.3 để thực hiện phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhóm đã thực hiện thử nghiệm với 3 mẫu (3 lô) của mỗi loại sản phẩm, lặp lại 3 lần đối với mỗi kỹ thuật viên để xác nhận các tiêu chí đường chuẩn, độ đúng và độ hồi phục, độ lặp lại và độ mạnh của phương pháp. Kết quả cho thấy phương pháp so màu động học đã được xác nhận và đáp ứng các tiêu chí theo yêu cầu của nhà sản xuất, trong đó giá trị tuyệt đối hệ số r của đường chuẩn đạt 0.999; độ đúng và độ hồi phục trong khoảng từ 103-125%, độ lặp lại và độ mạnh đều có giá trị CV < 10%. Nghiên cứu đã xác định được phương pháp xử lý mẫu phù hợp đối với vắc xin cúm mùa là sử dụng nhiệt 70°C; và đối với huyết thanh tinh chế cô đặc cần áp dụng cả hai phương pháp là xử lý nhiệt và pha loãng mẫu trong dung dịch MgCl₂ 10 mM trước khi thực hiện thử nghiệm để loại bỏ các yếu tố ức chế hay tăng cường phản ứng LAL.

Từ khóa: endotoxin, LAL, so màu động học.

1. Đặt vấn đề

Nội độc tố (endotoxin) tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm là thành phần không mong muốn và cần phải được xác định mức giới hạn cho phép của nó trong các sản phẩm này. Để xác định nội độc tố có nhiều phương pháp từ cổ điển như phản ứng đông tụ gel trong ống nghiệm (Gel clot) đến các phương pháp hiện đại như đo độ đục hay so màu động học, các phương pháp này cần đến các thiết bị đo phù hợp đi kèm [1].

Tại IVAC hiện nay đang sử dụng phương pháp cổ điển Gel clot. Đây là phương pháp bán định lượng nên có thể không phù hợp đối với các sản phẩm cần xác định chính xác lượng endotoxin trong mẫu. Do đó nhóm nghiên cứu ứng dụng phương pháp so màu động học xác định hàm lượng endotoxin trong vắc xin cúm và các loại huyết thanh tinh chế cô đặc với các điều kiện hiện có tại đơn vị là hệ thống đầu đọc BioTek ELx808LBS kết hợp với phần mềm WinKQCL™ phiên bản 5.3.3 và bộ kit Kinetic-QCL (Lonza). Phương pháp so màu động học được phát triển vào cuối những năm 80, đầu những năm 90 khi mà các nhà khoa học phát hiện ra rằng dịch ly giải tế bào máu của sam biển có khả năng thủy phân các chuỗi acid amin có chứa nhóm mang màu pNA (*p*-nitroaniline). Chất màu pNA được giải phóng ra từ một cơ chất mang màu phản

ứng với endotoxin trong mẫu - do hoạt hóa một chuỗi các phản ứng enzym trong lysate - sẽ được đo liên tục trong quá trình ủ mẫu với LAL ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ tại bước sóng 405 nm. Căn cứ vào mối tương quan giữa nồng độ endotoxin chuẩn và thời gian phản ứng sẽ xây dựng được đường chuẩn, từ đó tính được hàm lượng endotoxin có trong mẫu thử [2, 3].

2. Phương pháp nghiên cứu

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

- Đối tượng nghiên cứu: Phương pháp so màu động học (Kinetic Chromogenic) xác định endotoxin trong vắc xin cúm mùa IVACFLU-S và sinh phẩm huyết thanh tinh chế cô đặc.
- Địa điểm: Nghiên cứu được tiến hành tại phòng Kiểm định, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.
- Thời gian: Từ tháng 03/2022 đến tháng 09/2023.

2.2. Vật liệu, hoá chất

2.2.1. Mẫu sử dụng trong nghiên cứu

- Huyết thanh kháng độc tố uốn ván tinh chế cô đặc lô số: 13-14.23/AT, 27-28.22/AT, 29-30.22/AT.
- Huyết thanh kháng đại tinh chế cô đặc lô số: 06-07.22/AR, 01-03.22/AR, 04-05.22/AR.

- Huyết thanh kháng nọc rắn lục tre tinh chế cô đặc lô số: 01-02.23/AV-Tri, 01-02.22/AV-Tri, 03-04.22/AV-Tri.

- Vắc xin cúm mùa IVACFLU-S lô số: 039, 040, 041.

2.2.2. Sinh phẩm - Hóa chất

- Bộ kit Kinetic-QCL (Lonza) bao gồm thuốc thử Kinetic-QCL, LAL, Endotoxin và nước hồi chỉnh LAL (LAL Reagent Water).

- Mẫu chuẩn endotoxin tham chiếu (RSE: Reference Standard Endotoxin) (Lonza; mã số: E700; lô: 0001221037).

- Dung dịch $MgCl_2$ 10 mM (Lonza; mã số: S50-641).

- Mẫu chuẩn endotoxin kiểm soát (CSE: Control Standard Endotoxin).

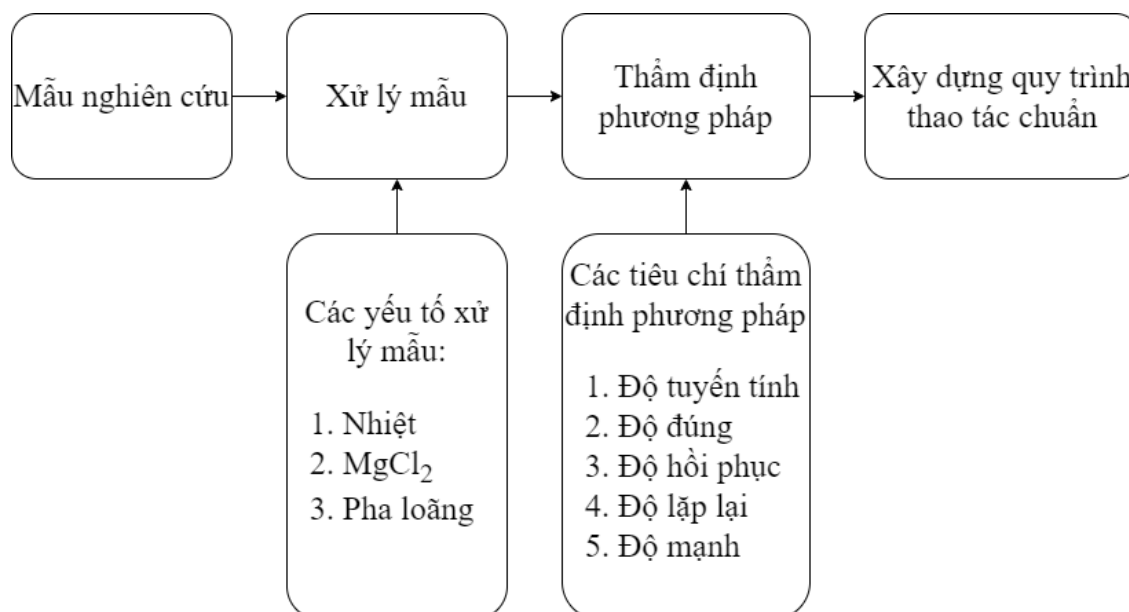
- Mẫu kiểm soát (PPC: Product Positive Control).

2.2.3. Vật tư và trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt, máy vortex, máy ly tâm, máy đọc ELISA BioTek ELx808LBS (Lonza).

- Máng đựng hoá chất, tube thủy tinh, máng nhựa, pipet, đầu côn các loại,... không có endotoxin và còn hạn sử dụng.

2.3. Thiết kế nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp so màu động học định lượng endotoxin [3, 4]

Nguyên tắc: Phương pháp được thực hiện dựa trên bộ kit Kinetic-QCL (Lonza). Mẫu chuẩn và mẫu thử được ủ 10 phút ở $37 \pm 1^\circ C$ trước khi bắt đầu đo quang. Sau

khi thêm Lysate (LAL) của bộ kit, chất màu pNA (màu vàng) được giải phóng khi có nội độc tố. Hỗn hợp phản ứng sẽ được đo tự động sau mỗi 30 giây ở bước sóng 405 nm trên máy BioTek ELx808LBS (Lonza) kết hợp với phần mềm WinKQCL™ phiên bản 5.3.3 (Lonza) cho

đến khi mẫu chuẩn có nồng độ thấp nhất (0.005 EU/ mL) không cho thấy sự thay đổi về độ hấp thụ (delta OD không đổi). Nồng độ endotoxin trong mẫu được tính từ thời gian phản ứng bằng cách so sánh với đường chuẩn. Độ nhạy của phương pháp này là 0.005 EU/ml, ứng với nồng độ chuẩn thấp nhất.

2.4.2. Phương pháp xử lý mẫu thử

❖ Xử lý nhiệt:

- Các nền mẫu khảo sát là huyết thanh tinh chế cô đặc (AT/AR/AV), vắc xin cúm mùa thành phẩm đều chứa hàm lượng protein nhất định có thể ảnh hưởng đến phản ứng giữa endotoxin và LAL. Do đó phương pháp xử lý mẫu với nhiệt để kết tủa protein là cách xử lý mẫu được khảo sát trước tiên [4, 5].

- Cách thực hiện: mẫu được xử lý ở nhiệt độ 70°C trong 10 phút, sau đó ly tâm 4000 vòng/ 10 phút thu lấy nước nổi. Sau khi thu nước nổi tiến hành pha loãng mẫu với nước cất tiêu chuẩn của bộ kit.

❖ Pha loãng mẫu:

- Các nền mẫu nếu không có các yếu tố gây cản trở như trên thì biện pháp pha loãng mẫu với nước cất tiêu chuẩn là cách tốt nhất để giảm thiểu các yếu tố ảnh hưởng đến thử nghiệm. Hệ số pha loãng mẫu được tính theo giá trị MVD [4, 5]:

$$MVD = \frac{ERL}{\text{Lamda}}$$

- Trong đó:

- MVD (Maximum Valid

Dilution): Giá trị pha loãng tối đa

- ERL (Endotoxin Release Limit): Tiêu chuẩn cho phép tối đa của endotoxin (EU/mL) của từng loại mẫu

- Lamda: Nồng độ chuẩn thấp nhất của đường chuẩn

❖ Xử lý với MgCl₂

- Các nền mẫu sau khi xử lý với nhiệt để loại bỏ ảnh hưởng của protein nếu còn hiện tượng ức chế sẽ phải thực hiện bước xử lý tiếp theo bằng dung dịch MgCl₂ 10mM để ức chế các cation trong mẫu có thể ảnh hưởng đến phản ứng của lysate [4, 5].

- Mẫu sẽ được pha loãng theo bậc 10 trong đệm MgCl₂ 10mM tới hệ số pha loãng mẫu.

2.4.3. Xác nhận phương pháp so màu động học định lượng endotoxin trong huyết thanh tinh chế và vắc xin cúm mùa IVACFLU-S, sử dụng bộ kit Kinetic-QCL (Lonza)

❖ Đánh giá độ tuyến tính và độ tái lập của đường chuẩn [5, 6]:

- Thực hiện thử nghiệm 10 lần với mẫu chuẩn RSE được pha loãng thành 5 điểm tương ứng với các nồng độ 50; 5; 0.5; 0.05; 0.005 EU/ ml.

- Tiêu chuẩn chấp nhận:

- $|r| \geq 0.980$ ở tất cả các đường chuẩn.

- CV% trị tuyệt đối của hệ số tương quan $|r| < 10\%$.
 - CV% trị tuyệt đối độ dốc Slope $< 10\%$.
 - CV% điểm chặn Y $< 10\%$.
 - ❖ Đánh giá độ đúng và độ hồi phục của phương pháp [7]:
 - Đánh giá độ đúng hay độ hồi phục của phương pháp nhằm để xác nhận độ pha loãng phù hợp cho từng mẫu thử, giảm thiểu các yếu tố cản trở, tránh hiện tượng ức chế hoặc tăng cường endotoxin.
 - Đánh giá độ đúng hay độ hồi phục của phương pháp bằng cách sử dụng endotoxin chuẩn kiểm soát CSE (Control Standard Endotoxin) ở nồng độ 5 EU/ mL và endotoxin chuẩn tham chiếu RSE (Reference Standard Endotoxin) ở nồng độ 5 EU/ mL cho vào các nền mẫu khác nhau (nồng độ cuối cùng 0,5 EU/ mL). Thực hiện phản ứng và so sánh giá trị đo được với giá trị lý thuyết (endotoxin của mẫu + spike). Mỗi nền mẫu được thực hiện 6 lần lặp lại. Kết quả là số trung bình của các lần thực hiện và độ hồi phục PPC % của CSE/ RSE.
- Độ hồi phục PPC% = $\frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100\%$
- C_{m+c} : Nồng độ endotoxin trong mẫu thêm chuẩn
 - C_m : Nồng độ endotoxin trong mẫu thử
 - C_c : Nồng độ chuẩn lý thuyết thêm vào
- Tiêu chuẩn chấp nhận: PPC% từ 50-200%.
 - ❖ Đánh giá độ lặp lại [7]:
 - Đối với mỗi loại sản phẩm (vắc xin cúm mùa, AT, AR và AV) thực hiện thử nghiệm lặp lại 3 lần vào 3 ngày liên tục, mỗi lần 3 lô. Tính kết quả Endotoxin trung bình của các lần thực hiện và xác định hệ số phân tán CV% giữa các lần thử nghiệm.
 - Tiêu chuẩn chấp nhận: CV% $\leq 10\%$.
 - ❖ Đánh giá độ mạnh của phương pháp [7]:
 - Thực hiện tương tự như đánh giá độ lặp lại, tuy nhiên thử nghiệm được thực hiện bởi 2 phân tích viên trong 3 ngày liên tục (tổng cộng 9 lần/ lô mẫu/ người x 2 người).
 - So sánh 2 nhóm kết quả, sử dụng thống kê kiểm định T-test Student.
 - Tiêu chuẩn chấp nhận:
 - CV% $\leq 10\%$ (của cả 2 phân tích viên).
 - t-test $\leq t$ tra bảng ($\alpha = 0.05$).

3. Kết quả

3.1. Kết quả xử lý mẫu loại bỏ các yếu tố gây nhiễu

3.1.1. Đối với nền mẫu huyết thanh tinh chế cô đặc

Bảng 1. Hàm lượng endotoxin trong nền mẫu huyết thanh tinh chế sau xử lý

Nền mẫu	Nhiệt		MgCl ₂		Nhiệt + MgCl ₂	
	Endotoxin (EU/ml)	PPC (%)	Endotoxin (EU/ml)	PPC (%)	Endotoxin (EU/ml)	PPC (%)
13-14.23/AT	3.83 ± 1.08	43	5.35 ± 1.23	74	5.38 ± 0.33	102
06-07.22/AR	2.68 ± 0.74	45	4.25 ± 0.44	64	3.73 ± 0.34	99
01-02.23/AV-Tri	5.00 ± 0.68	50	4.68 ± 1.09	77	5.21 ± 0.42	99

Nếu các mẫu huyết thanh chỉ xử lý nhiệt thì độ hồi phục chỉ đạt 44-50%, với 2/3 mẫu không đạt tiêu chuẩn về độ hồi phục (TC: 50-200%). Độ hồi phục ở mẫu huyết thanh xử lý nhiệt và MgCl₂ đạt từ 99-102% (TC: 50-200%), trong khi đó nếu chỉ xử lý MgCl₂ độ hồi phục PPC% đạt từ 64-77%, mặc dù vẫn đạt tiêu chuẩn nhưng không

hiệu quả so với phương pháp xử lý nhiệt và MgCl₂.

3.1.2. Đối với nền mẫu vắc xin cúm IVACFLU-S

Vắc xin cúm có hàm lượng protein thấp sử dụng phương pháp xử lý nhiệt trước khi thực hiện phản ứng. Hàm lượng endotoxin được đo song song với các mẫu không xử lý nhiệt. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng endotoxin trong nền mẫu vắc xin cúm IVACFLU-S được xử lý nhiệt và không được xử lý nhiệt

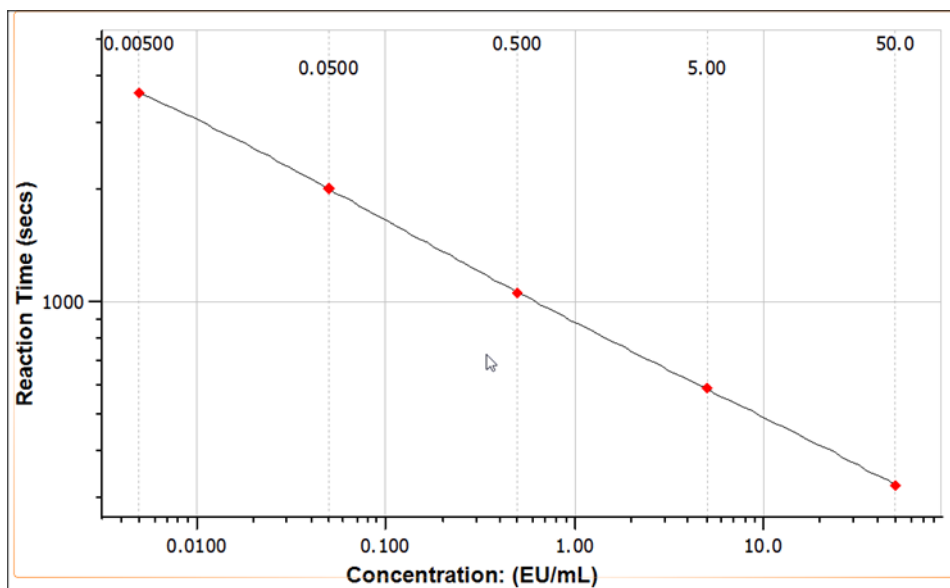
Lần thực hiện	Mẫu: IVACFLU-S-039-01-23-F/S			
	Không xử lý nhiệt		Xử lý nhiệt	
	Endotoxin (EU/mL)	PPC%	Endotoxin (EU/mL)	PPC%
1	0.623	62	0.758	111
2	0.605	64	0.774	112
3	0.778	74	0.917	95
4	0.513	58	0.799	89
5	0.489	58	0.826	98
6	0.533	72	0.855	100
Trung bình	0.590	65	0.822	101
CV (%)	18	11	7	9

Hàm lượng endotoxin trung bình ở mẫu không xử lý nhiệt đo được là $0,59 \pm 0,11$ EU/ ml, trong khi đó ở mẫu xử lý nhiệt hàm lượng endotoxin trung bình là $0,822 \pm 0,06$ EU/ ml, cao hơn đáng kể so với khi chưa được xử lý nhiệt. Độ hồi phục trung bình của mẫu xử lý nhiệt đạt 101%, trong khi đó ở mẫu không xử lý chỉ đạt 65%. Đồng thời các hệ số phân tán (CV%) ở mẫu xử lý nhiệt thấp hơn (<10%) so với các mẫu chưa xử lý (>10%). Như vậy phương pháp xử lý mẫu vắc xin cúm bằng nhiệt là phương pháp hiệu quả giúp loại bỏ ảnh hưởng của protein đến phản ứng LAL, thu được các kết quả có độ đúng và độ lặp lại cao.

3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.2 Kết quả đánh giá độ tuyến tính và độ tái lập của đường chuẩn

Sau 10 phản ứng giá trị trung bình của hệ số tương quan $|r|$ của đường chuẩn từ 0.998 đến 1.000, trung bình là 0.999 (TC: $|r| \geq 0,98$). Trị tuyệt đối của độ dốc (slope) đạt từ 0.236 đến 0.262, trung bình là 0.241. Tất cả các hệ số phân tán của slope và hệ số chặn Y đều <10% (TC: $CV\% \leq 10\%$). Như vậy đường chuẩn của phản ứng được xây dựng với 6 nồng độ endotoxin từ 0.005 EU/ml đến 50 EU/ml có độ tuyến tính cao và độ tái lập tốt (Hình 2).



Hình 2. Đồ thị đường chuẩn của phản ứng so màu động học xác định endotoxin trên phản mêm WinKQCL™ (Lonza)

3.2.3 Kết quả đánh giá độ đúng và độ hồi phục của phương pháp

Sử dụng CSE cho vào các nền mẫu là huyết thanh tinh chế cô đặc kháng uốn ván (AT), kháng dại (AR), kháng nọc rắn

lục tre (AV-Tri) và vắc xin cúm IVACFLU-S được nồng độ cuối là 0.5 EU/ mL trong giếng; cho thấy độ hồi phục của endotoxin đo được trong khoảng 102-106% so với giá trị lý thuyết, như vậy độ

đúng của phương pháp đạt yêu cầu từ 50-200%.

Kết quả đo endotoxin của các nền mẫu huyết thanh và vắc xin cúm sau khi được thêm RSE để nồng độ cuối là 0.5 EU/mL trong giếng đều nằm trong khoảng 103-125% so với giá trị lý thuyết, giá trị này nằm trong khoảng thu hồi tiêu chuẩn của phương pháp là 50-200%. Từ kết quả đánh giá độ hồi phục cho thấy các mẫu huyết thanh và vắc xin cúm qua xử lý đã loại bỏ được các yếu tố gây nhiễu dẫn đến mức thu hồi của RSE cao hơn so với giá trị

thực của nó từ 3-25%.

3.2.4 Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ mạnh của phương pháp

Để đánh giá về độ lặp lại và độ mạnh của phương pháp sử dụng 4 lô huyết thanh đại diện cho các loại sản phẩm huyết thanh tinh chế kháng độc tố uốn ván (AT), kháng dại (AR), kháng nọc rắn lục tre (AV-Tri), kháng nọc rắn hổ đất (AV-Naja) và vắc xin cúm IVACFLU-S, trong đó mỗi lô sản phẩm được thực hiện lặp lại 9 lần bởi 2 kỹ thuật viên.

Bảng 3. Nồng độ endotoxin trung bình (tb) trong các mẫu huyết thanh tinh chế và vắc xin cúm và hệ số phân tán của 9 lần thực hiện bởi hai kỹ thuật viên

Mẫu thử (n=9)	Kỹ thuật viên 1		Kỹ thuật viên 2		T test
	Endotoxin tb (EU/ml)	CV%	Endotoxin tb (EU/ml)	CV%	
13-14.23/AT	5.24	6.00	5.14	5.00	1.03
06-07.22/AR	3.72	8.00	4.00	6.00	1.98
01-02.23/AV-Tri	5.39	8.00	5.36	5.00	0.30
01-02.22/AV-Naja	4.83	8.00	4.39	4.00	-0.73
IVACFLU-S-039-01-23	0.81	6.00	0.80	5.00	1.04

Kết quả chuẩn độ endotoxin của từng loại mẫu cho thấy thử nghiệm có độ lặp lại tốt, thể hiện qua giá trị CV% đều đạt yêu cầu < 10% (Bảng 3). Đối với độ mạnh của phương pháp cho thấy hàm lượng endotoxin của tất cả các mẫu được thực hiện bởi hai kỹ thuật viên có giá trị

tương đồng, sự khác biệt là không có ý nghĩa thống kê với các giá trị Ttest < T tra bảng (với mức $\alpha=0.05$, T tra bảng có giá trị là 2,31) (Bảng 3).

3.2.5 Ứng dụng phương pháp so màu kiểm tra endotoxin trong huyết thanh và vắc xin cúm

Bảng 4. Kết quả kiểm tra endotoxin của một số mẫu huyết thanh tinh chế và vắc xin cúm bằng 2 phương pháp Gel clot và Kinetic chromogenic

Mẫu thử	Phương pháp	
	Gel-clot (EU/ml)	Kinetic (EU/ml)
22.23/AR	5.00 – 20.00	5.65
SAR TC 23.23/AR	5.00 – 20.00	9.61
SAT TC 21.23/AT	10.00 – 20.00	12.4
SAT TC 22.23/AT	5.00 – 10.00	7.99
SAV TC 02.23/AV	10.00 – 40.00	15.20
IVACFLU-S-042	0.63 – 2.50	0.92

Khi so sánh hàm lượng endotoxin của cùng một mẫu được đo bằng 2 phương pháp Gel clot và Kinetic chromogenic cho thấy chúng có kết quả tương đồng nhau, tuy nhiên đối với phương pháp bán định lượng Gel clot kết quả endotoxin nằm trong khoảng từ 0,5λ - 2λ, trong khi đó nếu sử dụng phương pháp so màu động học, nồng độ endotoxin được xác định bằng 1 giá trị duy nhất nằm giữa khoảng 0,5λ - 2λ mà phương pháp Gel clot đã xác định được.

4. Bàn luận

Phương pháp so màu động học dựa trên bộ kit Kinetic-QCL cùng với hệ thống thiết bị BioTek ELx808LBS và phần mềm WinKQCL™ phiên bản 5.3.3 của hãng Lonza cho phép định lượng nồng độ endotoxin trong các sản phẩm thuốc tiêm (bao gồm vắc xin và sinh phẩm cho người) [3, 6]. Theo FDA, trừ khi mẫu thử là nước tinh khiết, một trong những công việc tốn thời gian nhất đối với thử nghiệm xác định

nội độc tố sử dụng Limulus Amebocyte Lysate (LAL) là việc xử lý mẫu để khắc phục tình trạng ức chế hay tăng cường phản ứng enzym giữa nội độc tố trong mẫu thử và LAL dẫn đến hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả [4, 5]. Trong nghiên cứu này dựa trên các kết quả thu được cho thấy việc xử lý mẫu đối với sản phẩm có hàm lượng protein thấp (< 600 μg protein tổng số/ mL) như vắc xin cúm mùa IVACFLU-S, phương pháp xử lý nhiệt là phù hợp. Ngược lại đối với các sản phẩm có hàm lượng protein cao như huyết thanh tinh chế cô đặc (khoảng 150 mg protein tổng số/ mL) phương pháp xử lý nhiệt không hiệu quả. Trong trường hợp này phải bổ sung dung dịch MgCl₂ vào mẫu vừa có tác dụng để pha loãng mẫu làm giảm các yếu tố ức chế đồng thời ion Mg²⁺ trong dung dịch đệm MgCl₂ có vai trò hạn chế ảnh hưởng của các chất chống đông như EDTA hay các ion Ca²⁺ trong huyết thanh lên phản ứng enzym giữa LAL và

endotoxin, giúp phản ứng xảy ra bình thường và tránh hiện tượng âm tính giả [4, 5]. Song song với việc xử lý mẫu, phương pháp so màu động học đã thực hiện đầy đủ xác nhận các tiêu chí về đường chuẩn, độ đúng, độ hồi phục, độ lặp lại và độ mạnh của phương pháp theo hướng dẫn của nhà sản xuất và EMA [5-7]. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng phương pháp so màu động học xác định endotoxin trong các sản phẩm huyết thanh tinh chế và vắc xin cúm mùa đã đáp ứng yêu cầu của nhà sản xuất về tất cả các tiêu chí xác nhận phương pháp, đảm bảo kết quả có độ chính xác cao và đáng tin cậy.

5. Kết luận

Phương pháp so màu động học định lượng endotoxin trong huyết thanh tinh chế và vắc xin cúm mùa sử dụng bộ kit Kinetic-QCL trên hệ thống thiết bị BioTek ELx808LBS và phần mềm WinKQCL™ phiên bản 5.3.3 của hãng Lonza đã được xác nhận và đáp ứng các tiêu chí theo yêu cầu của nhà sản xuất, trong đó trị tuyệt đối hệ số r của đường chuẩn đạt 0.999, độ đúng và độ hồi phục trong khoảng từ 103-125%, độ lặp lại và độ mạnh đều có giá trị $CV < 10\%$. Nghiên cứu đã xác định được phương pháp xử lý mẫu phù hợp đối vắc xin cúm mùa là sử dụng nhiệt 70°C và đối với huyết thanh tinh chế cô đặc cần áp dụng cả hai phương pháp xử lý nhiệt và pha loãng mẫu trong dung dịch MgCl_2

10mM trước khi thực hiện thử nghiệm để loại bỏ các yếu tố ức chế hay tăng cường phản ứng LAL.

Tài liệu tham khảo

- [1] Luis A. Brito, Manmohan Singh (2011), Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During Preclinical Research. Journal of pharmaceutical sciences, Vol.100, No.1, page: 34-37.
- [2] McCulloch, K.C. and Weider-Loeven, C. (1992), "Variability in the LAL test: comparison of three kinetic methods for the testing of pharmaceutical products", Journal of Parenteral Science and Technology, 46(93), pp. 69 – 72.
- [3] Berzofsky, R.N. (1994), "Kinetic Assay for Endotoxin Using Limulus Amebocyte Lysate and Chromogenic Substrate", United States Patent.
- [4] Pharma&Biotech, Lonza (2012), "Overcoming Assay Inhibition or Enhancement: Technical Tips", Scientific support, U.S.
- [5] Pharma&Biotech, Lonza (2012), Serum/Plasma Testing with YROGENT™-5000 and Kinetic-QCL™ Assays, Technical tips, Scientific support, U.S.
- [6] Lonza, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL, Catalog Number: 50-650U, 50-650NV, 50-650H.
- [7] CPMP/ICH/381/95(1995), "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology".