

Research Paper

Stability Study of the 1st National Standard for Haemophilus Influenzae Vaccine

Nguyen Thi Kieu*, Doan Huu Thien, Duong Thi Cam Le, Canh Huyen Trang,
Dam Thi Lieu

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

Received 3/2/2022

Accepted 3/3/2022

Abstract

Background/Purpose: The National Institute for control of Vaccines and Biologicals had calibrated the 1st National Standard lot for Haemophilus influenzae vaccine, namely MCQG.Hib.01, its shelf life is to be determined. With the purpose of giving an expected shelf life of the standard lot, we conduct “ Stability study of the 1st national standard for Haemophilus influenzae vaccine”.

Methods: Thermal accelerated degradation

Results: The self life of MCQG.Hib.01 is 40 years with a content of 5,181063 mg Polyribosyl Ribitol Phosphat per vial.

Conclusion: National Standard lot for Haemophilus influenzae vaccine MCQG.Hib.01 has an expected shelf life of 40 years.

Keywords: National reference standard of Hib vaccine; self life; MCQG.Hib.01.

* Corresponding author.

E-mail address: kieu@nicvb.org.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.22>

Đánh giá tính ổn định nhiệt vắc xin Mũi chuẩn Quốc Gia *Heamophilus Influenzae* tuýp B lần thứ nhất

Nguyễn Thị Kiều*, Đoàn Hữu Thiên, Đường Thị Cẩm Lệ, Cảnh Huyền Trang,
Đàm Thị Liễu

*Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Hà Nội, Việt Nam, số 1 Ngâm Xuân Yên,
Hoàng Mai, Hà Nội*

Nhận ngày 3 tháng 2 năm 2022
Chấp nhận đăng ngày 3 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã thiết lập loạt vắc xin mũi chuẩn quốc gia *Heamophilus influenzae* tuýp B với mã số MCQG.Hib.01 nhưng chưa đưa ra hạn sử dụng cho loạt mũi chuẩn. Với mục tiêu đưa ra được hạn sử dụng dự kiến, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu “đánh giá tính ổn định nhiệt vắc xin mũi chuẩn quốc gia *Heamophilus influenzae* tuýp B lần thứ nhất”.

Phương pháp: Thúc đẩy nhiệt.

Kết quả: Sau 40 năm, loạt mũi chuẩn MCQG.Hib.01 vẫn đạt yêu cầu với hàm lượng 5,181063 mg/lọ mg Polyribosyl Ribitol Phosphat trong 1 lọ.

Kết luận: Loạt vắc xin mũi chuẩn quốc gia MCQG.Hib.01 có hạn sử dụng dự kiến 40 năm.

Từ khóa: Vắc xin mũi chuẩn quốc gia Hib, hạn sử dụng, MCQG.Hib.01

1. Đặt vấn đề

Hàng năm, nhiều lô vắc xin (VX) có thành phần Hib như: ComBFive (Biological E.Limited, Ấn Độ), Tetract-Hib, Hexaxim (Sanofi pasteur, Pháp), Infanrix hexa (GSK, Bỉ),... được kiểm định chất lượng tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB). Khả năng bảo vệ của VX Hib được xác định thông qua hàm lượng Polyribosyl Ribitol Phosphat (PRP), cần thực hiện song song với VX mũi chuẩn [1].

Năm 2021, NICVB đã thiết lập loạt mũi chuẩn quốc gia vắc xin *Heamophilus influenzae* tuýp b lần thứ nhất với mã số MCQG.Hib.01. Sau khi sản xuất, loạt mũi

chuẩn MCQG.Hib.01 đã được đánh giá chất lượng, nổi chuẩn với mũi chuẩn quốc tế để xác định được hàm lượng PRP.

Việc thiết lập 1 loạt VX mũi chuẩn quốc gia tốn kém nhiều thời gian, kinh phí, cần có nhà máy với trang thiết bị sản xuất chuyên dụng,... Vì vậy, mỗi loạt mũi chuẩn quốc gia phải sản xuất với số lượng lớn, đủ dùng trong nhiều năm, dự kiến ít nhất trong 10 năm. Tuy nhiên, chất lượng loạt mũi chuẩn MCQG.Hib.01 kéo dài được bao lâu chưa được xác định. Hơn nữa, độ ẩm tồn dư của MCQG.Hib.01, một chỉ số ảnh hưởng đến hạn dùng của các sản phẩm đông khô cũng chưa đánh giá được do hàm lượng PRP trong mỗi lọ mũi chuẩn quá nhỏ.

*Tác giả liên hệ.

E-mail address: kieu@nicvb.org.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.22>

Xuất phát từ nhu cầu trên, chúng tôi thực hiện đề tài “đánh giá tính ổn định nhiệt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia *Heamophilus influenzae* tuýp B lần thứ nhất” với mục tiêu

1. Đánh giá được tính ổn định của loạt mẫu chuẩn MCQG.Hib.01 khi bảo quản ở ít nhất 3 nhiệt độ khác nhau.

2. Đưa ra được hạn dùng dự kiến của loạt mẫu chuẩn.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Loạt VX mẫu chuẩn quốc gia Hib lần thứ nhất MCQG.Hib.01.



Hình 1. Loạt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Hib lần thứ nhất.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại NICVB.

Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2020 đến năm 2021.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

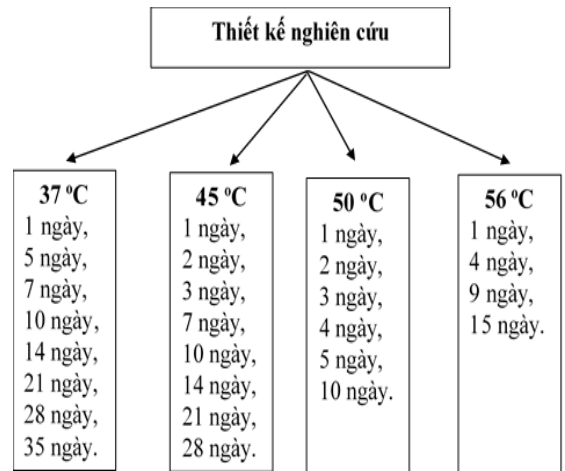
Sử dụng phương pháp thúc đẩy nhiệt (accelerated stability testing study, accelerated degradation study) [2-5] để đánh giá tính ổn định nhiệt, dự đoán hạn dùng của loạt mẫu chuẩn.

Xác định hàm lượng PRP của loạt mẫu chuẩn ở ít nhất 3 nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản dự kiến, mỗi nhiệt độ thực hiện tại ít nhất 3 thời điểm, mỗi thời điểm lặp lại 3 lần.

Sử dụng VX mẫu chuẩn quốc tế để thực hiện song song trong quá trình xác định hàm lượng PRP của VX mẫu chuẩn quốc gia, xác định hàm lượng PRP của mẫu chuẩn

quốc gia tại mỗi thời điểm thông qua hàm lượng mẫu chuẩn quốc tế.

Sử dụng phương pháp sắc ký ion để xác định hàm lượng PRP của mẫu chuẩn [1].



Hình 2. Nhiệt độ và thời điểm nghiên cứu

Trang thiết bị, dụng cụ: Máy sắc ký ion, cột phân tích MA1, cột bảo vệ (Dionex), máy lắc gia nhiệt (Eppendorf), máy ly tâm lạnh (Sigma), micropipette (Gilson),...

Vật liệu, hóa chất, môi trường, mẫu chuẩn: VX mẫu chuẩn quốc tế Hib lần thứ 2, mã số 12/306 (National Institute for Biological Standard and Control –NIBSC, Anh), hàm lượng PRP $4,904 \pm 0,185$ mg/ống.

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu

Cỡ mẫu được xác định theo hướng dẫn của WHO cho thử nghiệm xác định hàm lượng PRP trong VX Hib [1]: Sử dụng 1 lọ VX mẫu chuẩn quốc gia và 1 lọ VX mẫu chuẩn quốc tế trong mỗi lần thực hiện thử nghiệm xác định hàm lượng PRP.

2.5. Phương pháp chọn mẫu

Các lọ VX dùng trong nghiên cứu được chọn ngẫu nhiên.

2.6. Chỉ số đánh giá

Xác định hàm lượng PRP: Đánh giá tính ổn định và dự kiến hạn dùng thông qua sự giảm hàm lượng PRP trong mẫu chuẩn [2-7].

2.7. Phương pháp thu thập thông tin

Thu thập số liệu bằng cách thực hiện các

thử nghiệm xác định hàm lượng PRP của loạt mẫu chuẩn khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau, các thời điểm khác nhau.

2.8. Xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm JMP Pro13, phần mềm chuyên dụng để dự đoán hạn dùng VX, sinh phẩm dựa trên phương trình

3. Kết quả

3.1. Kết quả đánh giá tính ổn định nhiệt

Mẫu chuẩn Hib đã được đánh giá tính ổn định ở 4 nhiệt độ 37⁰C, 45⁰C, 50⁰C và 56⁰C.

Hàm lượng PRP của vắc xin mẫu chuẩn ở các thời điểm được thể hiện trên các bảng sau:

Bảng 1: Hàm lượng PRP của MCQG.Hib.01 khi bảo quản ở 37⁰C

Đơn vị tính: mg/lọ

Thời gian (ngày) \ Kết quả	1	5	7	10	14	21	28	35
1	5,10	5,08	5,21	5,12	5,17	5,06	5,18	5,10
2	4,99	4,95	5,10	5,11	5,08	5,20	5,22	5,17
3	5,04	5,12	5,19	5,21	5,02	5,23	5,10	5,15
Trung bình	5,04	5,05	5,17	5,15	5,09	5,16	5,17	5,14

Bảng 2: Hàm lượng PRP của MCQG.Hib.01 khi bảo quản ở 45⁰C

Đơn vị tính: mg/lọ

Thời gian (ngày) \ Kết quả	1	2	3	7	10	14	21	28
1	5,19	5,03	4,72	4,63	4,92	4,85	4,80	4,81
2	4,94	5,12	4,66	4,53	4,81	4,83	4,84	4,83
3	5,22	5,03	4,89	4,47	4,81	4,73	4,88	4,89
Trung bình	5,12	5,06	4,76	4,54	4,85	4,80	4,84	4,84

Bảng 3: Hàm lượng PRP của MCQG.Hib.01 khi bảo quản ở 50⁰C

Đơn vị tính: mg/lọ

Thời gian (ngày) Kết quả	1	2	3	4	5	10
1	5,05	5,05	5,05	4,88	4,93	4,86
2	5,28	5,20	4,95	4,99	4,85	4,92
3	5,21	4,94	4,88	4,88	4,95	4,96
Trung bình	5,18	5,06	4,96	4,92	4,91	4,91

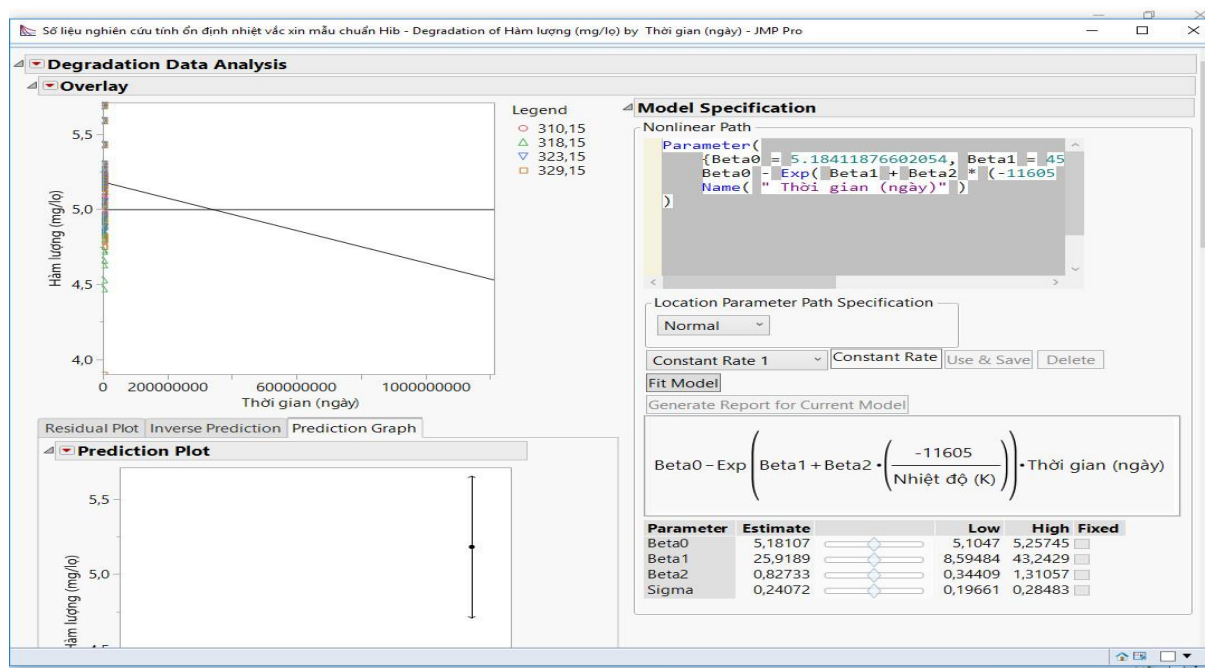
Bảng 4: Hàm lượng PRP của MCQG.Hib.01 khi bảo quản ở 56 °C

Đơn vị tính: mg/lọ

Thời gian (ngày) Kết quả	1	4	9	12	15
1	4,80	4,79	4,75	4,80	4,83
2	3,90	4,92	4,97	4,85	4,75
3	4,95	4,82	4,91	4,92	4,89
Trung bình	4,55	4,84	4,88	4,86	4,82

3.2. Kết quả dự kiến hạn dùng

Sử dụng phần mềm JMP Pro13 để xử lý số liệu.



Hình 3. Đồ thị dự đoán hàm lượng PRP mẫu chuẩn

Sau 10 năm bảo quản ở -70°C , MCQG Hib vẫn đảm bảo yêu cầu hàm lượng PRP ≥ 5 mg/l với hàm lượng dự đoán 5,181069 (95% CI: 4,709268 – 5,652870) mg/l. Sau 40 năm bảo quản ở -70°C , MCQG Hib cũng vẫn đảm bảo yêu cầu với hàm lượng PRP 5,181063 mg/l (95%CI: 4,709262 – 5,652864).

	Nhiệt độ (K)	Prediction	Lower Bound	Upper Bound
1	310,15	-18,51664529	-18,98844604	-18,04484455
2	318,15	-46,43287699	-46,90467773	-45,96107624
3	323,15	-77,14834689	-77,62014764	-76,67654614
4	329,15	-136,3227398	-136,7945406	-135,8509391
5	203,15	5,1810695552	4,7092688099	5,6528703006

Hình 4. Dự đoán hàm lượng PRP mẫu chuẩn sau 10 năm

	Nhiệt độ (K)	Prediction	Lower Bound	Upper Bound
1	310,15	-89,62277368	-90,09457443	-89,15097293
2	318,15	-201,3029886	-201,7747894	-200,8311879
3	323,15	-324,1816894	-324,6534902	-323,7098887
4	329,15	-560,9116678	-561,3834686	-560,4398671
5	203,15	5,1810636564	4,7092629111	5,6528644018

Hình 5. Dự đoán hàm lượng PRP mẫu chuẩn sau 40 năm

4. Bàn luận

4.1. Tính ổn định nhiệt của MCQG.Hib.01

Hàm lượng PRP đã được sử dụng làm chỉ số đánh giá tính ổn định nhiệt của VX mẫu chuẩn Hib, phù hợp với khuyến cáo của WHO, tính ổn định nhiệt được phân tích thống kê dựa trên sự giảm công hiệu của vắc xin theo thời gian bảo quản [4], [6] do công hiệu là chỉ số quan trọng nhất để đánh giá chất lượng vắc xin, thước đo khả năng bảo vệ con người trước nguồn bệnh [7]. Với VX Hib, công hiệu được xác định thông qua hàm lượng PRP.

Về phương pháp xác định hàm lượng PRP, theo khuyến cáo của WHO, có thể dùng 3 phương pháp xác định hàm lượng PRP trong vắc xin Hib: Đo mật độ quang bằng máy quang phổ hoặc phép thử so màu, sắc ký và miễn dịch học [1]. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký trao đổi ion được lựa chọn để xác định công hiệu của VX mẫu chuẩn quốc gia Hib do đã được thẩm định ở nhiều quốc gia và được xem như một phương pháp thay thế phương pháp orcinol với độ nhạy cao hơn [8].

Nghiên cứu đã lựa chọn 4 dải nhiệt độ khác nhau để đánh giá tính ổn định mẫu chuẩn Hib, nhiều hơn so với yêu cầu tối thiểu 1 nhiệt độ. Mẫu chuẩn quốc tế Hib lần

thứ 2 cũng được đánh giá ở 4 nhiệt độ khác nhau. Có 2 nhiệt độ chúng tôi chọn giống nghiên cứu trên mẫu chuẩn quốc tế: 37 °C và 56 °C. Hai nhiệt độ còn lại chúng tôi chọn nhiệt độ giữa 37 °C và 56 °C (45 °C và 50 °C) trong khi nghiên cứu trên mẫu chuẩn quốc tế chọn hai nhiệt độ thấp hơn: 4 °C và 20 °C. Fatme Mawas và cộng sự khi đánh giá tính ổn định nhiệt VX mẫu chuẩn quốc tế Hib lần thứ 2 thấy mẫu bảo quản ở nhiệt độ 20 °C hầu như không thay đổi so với mẫu bảo quản ở - 20 °C và 4 °C trong 12 tháng, sự giảm nhẹ hàm lượng PRP bắt đầu thấy ở mẫu bảo quản ở 37 °C, rõ rệt hơn khi bảo quản ở 56 °C [9]. Chúng tôi chọn các nhiệt độ bảo quản làm giảm nhanh nồng độ PRP để giảm thời gian nghiên cứu, để vẽ được đồ thị liên quan giữa nồng độ PRP và thời gian bảo quản, để đưa ra hạn dùng dự kiến.

Về thời gian, mỗi nhiệt độ bảo quản trong nghiên cứu này chỉ theo dõi tối đa 35 ngày do ở các thời điểm đó số liệu đã cho thấy có sự giảm về hàm lượng PRP, có số liệu để ước đoán hạn dùng trong khi mẫu chuẩn quốc tế thực hiện ở các thời điểm sau bảo quản 1; 2; 4; 6 và 12 tháng.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã chọn nghiên cứu thúc đẩy nhiệt để dự đoán hạn dùng của loạt MCQG.Hib.01.

Các nghiên cứu đánh giá tính ổn định nhiệt gồm ba loại: Nghiên cứu tính thúc đẩy nhiệt và nghiên cứu tính ổn định theo thời gian thực (long term stability, real time – real condition stability). Phương pháp thúc đẩy nhiệt nhằm nghiên cứu tính ổn định của sản phẩm ở các dải nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản dự kiến, còn gọi là nghiên cứu lão hóa cấp tốc. Nghiên cứu này được thiết kế nhằm tăng nhanh tốc độ phân hủy vật lý hoặc hóa học của các thành phần trong VX để xác định tỷ lệ thay đổi các đặc tính của mẫu theo thời gian ở các nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản thông thường. Nghiên cứu thúc đẩy nhiệt có ưu điểm trong việc dự đoán sớm hạn dùng của VX mẫu chuẩn, ở giai đoạn đầu của sản phẩm.

Nghiên cứu tính ổn định theo thời gian thực hay còn gọi nghiên cứu tính ổn định dài hạn có ưu điểm xác định chính xác hạn dùng của sản phẩm, tuy nhiên, không thể có ngay hạn dùng của sản phẩm ở giai đoạn đầu của nghiên cứu, cần rất nhiều thời gian để thực hiện.

Các sản phẩm đông khô còn được thực hiện nghiên cứu tính ổn định sau hồi chỉnh.

Tính ổn định của VX mẫu chuẩn quốc tế Hib lần thứ 2 đã được nghiên cứu theo cả 3 phương pháp: Thúc đẩy nhiệt, theo thời gian thực và sau hồi chỉnh. Báo cáo này mới thực hiện nghiên cứu thúc đẩy nhiệt, nghiên cứu hạn dùng theo thời gian thực được thực hiện định kỳ hàng năm cũng như tính ổn định sau hồi chỉnh sẽ được báo cáo ở các nghiên cứu tiếp theo.

4.2. Về hạn dùng dự kiến

Bên cạnh công hiệu, độ ẩm tồn dư có vai trò quan trọng trong việc quyết định hạn sử dụng của các sản phẩm dạng đông khô. Theo WHO, Độ ẩm tồn dư cho phép trong các mẫu chuẩn quốc gia không quá 3% [3]. Tuy nhiên, do khối lượng PRP trong mỗi lọ mẫu chuẩn quá nhỏ, rất khó để làm khô và xác định khối lượng hao hụt sau khi làm khô, nên NICVB và các phòng thí nghiệm

tại Việt Nam không thể xác định được độ ẩm tồn dư của loạt MCQG.Hib.01. Vì vậy, việc dự đoán hạn dùng của loạt MCQG.Hib.01 có ý nghĩa rất lớn để có kế hoạch sử dụng loạt mẫu chuẩn này cũng như kế hoạch sản xuất loạt mẫu chuẩn tiếp theo do việc sản xuất 1 loạt mẫu chuẩn quốc gia mất rất nhiều thời gian cho sản xuất, nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế,...

Theo dự kiến, mẫu chuẩn quốc gia Hib MCQG.Hib.01 có tính ổn định cao do sản phẩm ở dạng đông khô (ổn định hơn dạng lỏng) và có bản chất hóa học (Ổn định hơn dạng sinh học). Mẫu chuẩn quốc tế Hib, mã số 12/306 có tốc độ phân hủy trung bình 0,016%/năm khi bảo quản ở - 20 °C [10]. Với tốc độ phân hủy này, 1 lần làm thử nghiệm tại NICVB chỉ cần 0,15 mg, hạn dùng của mẫu chuẩn MCQG.Hib.01 dự kiến rất dài. Hơn nữa, loạt MCQG.Hib.01 được bảo quản ở nhiệt độ dưới -70 °C để tăng hạn sử dụng cho mẫu chuẩn.

JMP Pro13, phần mềm chuyên dụng đã được sử dụng để xử lý số liệu dự kiến hạn dùng. Trong quá trình xử lý, chúng tôi cài đặt nhiệt độ phân mềm theo độ K do nhiệt độ bảo quản thực tế ở nhiệt độ âm độ C (-70 °C).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tốc độ phân hủy của PRP trong nghiên cứu này cũng rất thấp, hàm lượng PRP sau 10 năm và sau 40 năm hầu như không thay đổi, chỉ thay đổi ở chữ số thứ 6 sau dấu phẩy.

Viện kiểm định quốc gia và mẫu chuẩn Anh (National Institute for Biological Standard and Control –NIBSC), cơ quan được WHO chỉ định đầu mối thiết lập và phân phối mẫu chuẩn quốc tế, không đưa ra hạn dùng cho VX mẫu chuẩn quốc tế Hib lần thứ 2, mẫu chuẩn này có giá trị sử dụng cho đến khi có thông báo thu hồi [10], tuy nhiên, các mẫu chuẩn này vẫn được theo dõi hàng năm bằng các nghiên cứu bổ sung đánh giá tính ổn định theo thời gian thực.

5. Kết luận

Loạt VX mẫu chuẩn quốc gia MCQG.Hib.01 có hạn sử dụng dự kiến 40 năm.

References

- [1] World Health Organization, "Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine", WHO TRS 897, annex 1, (2000).
- [2] World Health Organization, "Recommendation for preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, WHO TRS 932, annex 2," 2006.
- [3] World Health Organization, "Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines", WHO/IVB/11.03, (2011).
- [4] World Health Organization, "Guidelines on stability evaluation of vaccine, WHO TRS 962, Annex 3," 2011.
- [5] J. Shin, D. Smith, J. Southern et al (2009), "WHO/KFDA workshop on stability evaluation of vaccines, Seoul, Korea, 23-25 April 2008", Biologicals, 37(6), 435-44; discussion 421-3.
- [6] P. R. Krause (2009), "Goals of stability evaluation throughout the vaccine life cycle", Biologicals, 37(6), 369-78; discussion 421-3.
- [7] World Health Organization (2006), Temperature sensitivity of vaccines, WHO, Geneva.
- [8] P F He, J Tang, Yanqiao no Li, M G Li Q Ye, "Determination of polysaccharide content in Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector," Chinese Journal of Biologicals , vol. 26(7), pp. 1002-1005+1009, July 2013.
- [9] Fatme Mawas, Karena Burkin, Thomas Dougall et al, International collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for the WHO 1st International Standard for Haemophilus influenzae type b polysaccharide," World Health Organization press WHO/BS/2014.2239, Geneva 2014.
- [10] National Institute for Biological Standard and Control, Instructions for use (Version 10.0, Dated 08/11/2019) WHO 2nd International Standard for Haemophilus influenzae polysaccharide Polyribosyl Ribitol Phosphate (PRP) NIBSC code: 12/306.