

Research Paper

Determination of in vitro potency in inactivated Japanese encephalitis vaccine by ELISA method

Nguyen Thi Ly*, Nguyen Kim Bach, Nguyen Viet Anh, Le Thi Hai Yen, Dao Thi Thuy, Do Thi Hong Anh

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: ELISA is one of the antigen quantification methods with many advantages: fast, simple, accurate, suitable for vaccine samples with high protein content and purity. In order to evaluate the suitability of the ELISA method in testing the in vitro potency of the inactivated Japanese encephalitis vaccine, from February to August 2020, at the Department of Viral Vaccine control - National Institute for control of Vaccine and biologicals, we conducted experimental studies in the laboratory to evaluate the accuracy, precision, robustness, specificity, and linearity of this procedure. The process follows the Korean commercial ELISA kit.

Methods: Empirical description research in the laboratory

Results: The results of the criteria all met the requirements of ISO/IEC 17025:2017 and WHO/VSQ/97.02 in terms of accuracy, accuracy, robustness, specificity, linearity of the procedure with linear interval (detection) from 42-663 ng/ml.

Conclusion: This study has demonstrated that the in vitro efficacy test procedure of inactivated VNNB vaccine on Vero cells, strain Beijing-1 by ELISA method at NICVB's laboratory is appropriate and reliable.

Keywords: Vaccine potency, inactivated JE vaccine, ELISA method.

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.25>

Kiểm tra công hiệu in vitro vắc xin viêm não Nhật Bản bất hoạt bằng phương pháp ELISA

Nguyễn Thị Lý*, Nguyễn Kim Bách, Nguyễn Việt Anh, Lê Thị Hải Yến, Đào Thị Thủy, Đỗ Thị Hồng Ánh

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 3 tháng 2 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 3 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: ELISA là một trong những phương pháp định lượng kháng nguyên có nhiều ưu điểm: nhanh chóng, đơn giản, chính xác, phù hợp với các mẫu có hàm lượng protein và độ tinh khiết cao. Nhằm đánh giá sự phù hợp của phương pháp ELISA trong kiểm tra công hiệu in vitro vắc xin Viêm não Nhật Bản bất hoạt, từ tháng 2 đến tháng 8 năm 2020, tại Khoa kiểm định vắc xin vi rút – Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm để đánh giá độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính của quy trình này.

Phương pháp: Mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

Kết quả: Các tiêu chí đều đạt yêu cầu của ISO/IEC 17025:2017 và WHO/VSQ/97.02 về độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính của quy trình với khoảng tuyến tính (phát hiện) từ 42-663 ng/ml.

Kết luận: Nghiên cứu này đã chứng minh quy trình thử nghiệm công hiệu in vitro vắc xin VNNB bất hoạt trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 theo phương pháp ELISA tại phòng thí nghiệm của NICVB là phù hợp và đáng tin cậy.

Từ khóa: Công hiệu vắc xin, VNNB bất hoạt, phương pháp ELISA.

1. Đặt vấn đề

Viêm não nhật bản (VNNB) thuộc nhóm bệnh truyền nhiễm cấp tính lây truyền theo đường máu, do vi rút viêm não Nhật Bản gây ra. Đây là bệnh có tỷ lệ nhiễm cao (50.000- 175.000 ca mỗi năm), tỷ lệ tử vong cao (20-30%) và gần 50% người sống sót để lại di chứng về thần kinh [1]. Hiện tại chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho VNNB,

biện pháp phòng bệnh hiệu quả vẫn nhất là tiêm vắc xin. Để đảm bảo an toàn và hiệu quả tiêm vắc xin VNNB thì kiểm soát chất lượng vắc xin - trong đó có công hiệu vắc xin trước khi đưa ra thị trường là công việc bắt buộc.

Phương pháp kiểm tra công hiệu vắc xin VNNB bất hoạt hiện nay các nước đang sử dụng là phương pháp trung hòa giảm 50% đám hoại tử (50% plaque-reduction neutralization titre, PRNT50) là phương pháp gây miễn dịch trên chuột 14 ngày, lấy máu, tách huyết thanh rồi kiểm tra hiệu giá kháng thể trung hòa trên tế bào [1]. Thử nghiệm mất nhiều thời gian (khoảng 45-60

*Tác giả liên hệ.

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

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.25>

ngày), lệ thuộc rất nhiều vào động vật thí nghiệm (chuột) và tế bào. Theo xu hướng thế giới đang giảm thiểu và thay thế các thí nghiệm trên động vật bằng các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. ELISA là một trong những phương pháp kiểm định công hiệu, nhận dạng được nhiều nước quan tâm và muốn thay thế vì có nhiều ưu điểm: nhanh chóng, đơn giản, chính xác, độ nhạy cao. Để phương pháp này được chuẩn thức và kết quả được công nhận, áp dụng ở tất cả các nước khu vực ASEAN- nhất là các nước đang sử dụng loại vắc xin này. Trong cuộc họp thường niên của các nước khu vực Châu Á Thái Bình Dương (Asia Pacific (APAC) năm 2019, các nước đã thống nhất sẽ tiến hành hợp tác liên labo khu vực Asia Pacific trong việc Đánh giá thử nghiệm công hiệu in vitro vắc xin Viêm Não Nhật Bản bất hoạt trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 bằng phương pháp ELISA và NIFDS, Korea sẽ là đầu mối, Project no: 19201MFDS257.

Việt Nam cũng là 1 trong những nước sản xuất và sử dụng vắc xin VNNB bất hoạt. Vì vậy, việc tham gia vào dự án đánh giá thử nghiệm công hiệu in vitro theo phương pháp ELISA cho loại vắc xin này là 1 điều rất quan trọng không chỉ giúp NICVB tiếp cận thêm phương pháp kiểm tra công hiệu mới còn giúp NICVB khẳng định được năng lực chuyên môn trong kiểm định công hiệu vắc xin này. Trong bài báo này, chúng tôi xin báo cáo 1 số kết quả, thông số khảo sát tính phù hợp của quy trình này về độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu, tính tuyến tính thu được khi triển khai nghiên cứu tại labo của chúng tôi trên các mẫu vắc xin, bộ kit ELISA thương phẩm đặc hiệu mà NIFDS, Korea cung cấp.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quy trình thử nghiệm công hiệu in vitro vắc xin VNNB bất hoạt trên tế bào Vero, chủng

Beijing-1 theo phương pháp ELISA (do NIFDS, Korea cung cấp).

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Khoa Kiểm định vắc xin vi rút, từ tháng 2/2020 đến tháng 8/2020.

2.3. Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

- MFDS Standard ccJE vaccine, 1st (vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Hàn Quốc của MFDS lần thứ nhất), mã số MFDS-B-16-002: 10 ống (0,7 mL/vial); Công hiệu tương quan in vitro là 2,21.

- Test sample (mẫu kiểm tra): 10 ống (0,7 mL/vial);

- Positive control (PC, mẫu chứng dương, 3rd National Standard for JE Vaccine (Inactivated) MFDS code: 14/041): 10 ống (2 mL/vial), Công hiệu tương quan in vitro là 0,971.

- Kit Sinh phẩm chuẩn: 1 bộ kit VDPro® JEV AG ELISA (10 phiên), lot: 1JEVG20012, NSX 6/2/2020, HSD 5/2/2021 do NIFDS, Korea cung cấp.

2.3.2. Thiết bị và dụng cụ

Dàn máy ELISA, tủ lạnh, micropipet các loại (đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025).

2.4. Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.4.1. Quy trình thử nghiệm công hiệu in vitro vắc xin VNNB bất hoạt trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 theo phương pháp ELISA (do NIFDS, Korea cung cấp).

- Kit và mẫu thử nghiệm cũng bỏ ra nhiệt độ phòng trước khi sử dụng ít nhất 15 phút.

- Mẫu chứng dương (PC) hoàn nguyên với 2 ml nước cất pha tiêm vô trùng rồi pha loãng 1/10.

- Vắc xin mẫu chuẩn hoàn nguyên với 0,7 ml nước cất pha tiêm vô trùng rồi pha loãng mẫu thử, mẫu chuẩn bằng đệm pha loãng mẫu trong bộ kit ELISA (Dilution buffer) ra 7 độ pha: 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 & 1/320.

- Nhỏ 100 µl mẫu/giếng, mỗi nồng độ 2 giếng; chứng dương (PC) nhỏ 2 giếng, chứng âm (NC) nhỏ 2 giếng dung dịch pha loãng mẫu.

- Dán và ủ phiến ở 37⁰C/1 giờ;
- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa.
- Thêm 100 µl dung dịch HRPO Anti-JEV Conjugate.
- Dán và ủ phiến ở 37⁰C/1 giờ.
- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa.
- Thêm 100 µl dung dịch TMB.
- Dán và ủ phiến ở nhiệt độ phòng/13 phút, tránh ánh sáng.

- Thêm 50 µl dung dịch stop.
Đọc kết quả trong 5 phút ở bước sóng 450/650 nm.

2.4.2. Thiết kế nghiên cứu

a. Xác định độ đúng [2-5]

Độ đúng của phương pháp được tiến hành theo phương pháp sử dụng mẫu chuẩn (3rd National Standard for JE Vaccine (Inactivated) MFDS code: 14/041) làm mẫu thử tại nồng độ 1/10, 1/20, 1/40.

Bố trí 1 nhóm thực hiện thử nghiệm 3 lần trong 3 ngày trên mẫu thử có làm song song với mẫu chuẩn MFDS Standard ccJE vaccine, 1st (vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Hàn Quốc của MFDS lần thứ nhất), mã số MFDS-B-16-002 theo quy trình ở mục 2.4.1.

+ Tính công hiệu tương quan in vitro của mẫu chuẩn tại mỗi độ pha đối với từng thử nghiệm

+ Tính công hiệu tương quan in vitro trung bình của mẫu chuẩn tại mỗi độ pha (Xtb).

+ So sánh kết quả thu được với giá trị đã biết trước của mẫu chuẩn tại mỗi độ pha bằng cách tính t (Ttest). Sau đó so sánh với giá trị t_{α} của bảng phân bố student tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức với độ tin cậy 95%.

- Tiêu chuẩn chấp thuận $t < t_{\alpha}$

b. Xác định độ chính xác (trung gian) [2-5]

Bố trí 1 nhóm tiến hành công hiệu in vitro trên mẫu thử (test sample), mỗi nhóm lặp lại 5 lần (trong 5 ngày) cùng loạt hóa

chất, nước cất, trang thiết bị. Tính công hiệu tương quan in vitro trong mẫu thử, hệ số biến thiên RSD/CV (%).

Công thức tính: $RSD (\%) = SD/Xtb \times 100$

Trong đó: + SD: độ lệch chuẩn tương đối của mẫu thử trên các lần thực hiện

+ Xtb: giá trị trung bình của mẫu thử trên các lần thực hiện

Tiêu chuẩn chấp thuận:

- Công hiệu tương quan in vitro của từng lần phải nằm trong khoảng giá trị trung bình $\pm 2SD$.

- $RSD \leq 20\%$ (đối với độ chính xác trung gian).

c. Xác định độ mạnh [2-5]

Bố trí 2 nhóm thực hiện thử nghiệm 5 lần trong 5 ngày khác nhau trên mẫu thử. Tính công hiệu tương quan trong mẫu thử của từng nhóm, giá trị trung bình, SD, RSD (%) của từng nhóm, hệ số F để so sánh phương sai hai nhóm và giá trị t-test.

Tiêu chuẩn chấp thuận: t-test \leq bảng (bảng tra trong bảng phân phối Student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$ tức là độ tin cậy 95%.

d. Xác định tính tuyến tính [2-5]

- Sử dụng kết quả trong phần xác định độ đúng.

- Tính giá trị trung bình, SD và %RSD của từng ngày thử nghiệm.

- Tính đường hồi quy tuyến tính R của từng ngày thử nghiệm.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

+ $0.95 \leq R^2 \leq 1.0$

+ Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó $\pm 2SD$

+ $RSD \leq 20\%$

+ Độ chệch các điểm nồng độ trong đường chuẩn $\Delta i \leq 15\%$.

e. Xác định độ đặc hiệu [2-5]

Bố trí 2 nhóm thực hiện phân tích mẫu không chứa kháng nguyên viêm não Nhật Bản (sử dụng dung dịch pha loãng PBS có trong bộ kit), mỗi nhóm lặp lại 5 lần trong 5 ngày khác nhau.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Giá trị OD <10 lần OD của PC (1/10) và không có màu với mẫu không chứa kháng nguyên viêm não Nhật Bản.

3. Kết quả

Xác định sự phù hợp của quy trình thử nghiệm công hiệu *in vitro* vắc xin VNNB bất hoạt trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 theo phương pháp ELISA

Bảng 1: Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình

Lần thử nghiệm	Công hiệu tương quan		
	Độ pha 1/10	Độ pha 1/20	Độ pha 1/40
Công hiệu tương quan lý thuyết	0.971	0.486	0.243
Lần 1	0.979	0.481	0.222
Lần 2	1.154	0.553	0.258
Lần 3	0.925	0.445	0.235
Mean (Xtb)	1.019	0.493	0.238
SD	0.120	0.055	0.018
Mean -2SD	0.780	0.383	0.202
Mean + 2SD	1.259	0.603	0.275
t	0.557	0.016	0.701
t_{α} ($\alpha = 0,05$, $p = 95\%$)	4.303		

Kết quả cho thấy công hiệu tương quan của mẫu chuẩn của các ngày/lần làm đều nằm trong khoảng Mean \pm 2SD; Từng độ pha $t < t_{\alpha}$ [2, 3, 5]. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 2: Kết quả đánh giá độ chính xác trung gian

TT	Kết quả công hiệu tương quan
Lần 1	1.06
Lần 2	0.91
Lần 3	0.98
Lần 4	1.02
Lần 5	0.97
mean	0.988
SD	0.056
Mean -2SD	0.875
Mean + 2SD	1.101
RSD (%) /CV	5.699

Kết quả cho thấy công hiệu tương quan *in vitro* của từng lần đều nằm trong khoảng giá trị trung bình \pm 2SD; **RSD (%)** khi lặp lại 5 lần vào 5 ngày khác nhau trên cùng loại mẫu thử là 5,7%, nhỏ hơn 20% [2, 3, 5]. Quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác.

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ mạnh của quy trình

Lần thực hiện	Kết quả công hiệu tương quan	
	Nhóm 1	Nhóm 2
1	1.06	1.02
2	0.91	0.92
3	0.98	0.92
4	1.02	0.98
5	0.97	0.98
Mean	0.988	0.964
SD	0.056	0.043
Mean -2SD	0.875	0.877
Mean + 2SD	1.101	1.051
RSD (%) /CV	5.699	4.498
So sánh F	F _α = 5.05 F _{bảng} = F(α;5;5) = 0.625	
So sánh T	t = 0.17 (< t _α = 2.776)	

Kết quả cho thấy giá trị trung bình mẫu thu được của 2 nhóm: F_α < F_{bảng} chứng tỏ phương sai của 2 nhóm khác nhau một cách không có ý nghĩa với độ tin cậy 95% (α = 0.05); t < t_α chứng tỏ kết quả làm của 2 nhóm không khác nhau có ý nghĩa với độ tin cậy 95% (α = 0.05) [2, 3, 5]. Quy trình đạt yêu cầu về độ mạnh.

Bảng 4: Kết quả đo OD của đường chuẩn và khoảng tuyến tính của vắc xin mẫu chuẩn qua 10 lần thử nghiệm

Lần TN	Điểm chuẩn (OD)									R ²
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	0	
1	2.030	1.431	1.122	0.621	0.333	0.180	0.104	0.101	0.012	0.999
2	2.276	1.548	1.246	0.756	0.405	0.233	0.118	0.102	0.011	0.997
3	2.033	1.420	1.204	0.620	0.328	0.183	0.106	0.105	0.014	0.993
4	2.362	1.537	1.158	0.680	0.374	0.205	0.114	0.103	0.011	0.998
5	2.031	1.425	1.113	0.620	0.330	0.181	0.105	0.099	0.01	0.996
6	2.208	1.685	1.163	0.686	0.405	0.220	0.110	0.105	0.011	0.99
7	2.032	1.422	1.109	0.620	0.329	0.182	0.105	0.102	0.013	0.995
8	2.454	1.744	1.105	0.654	0.360	0.197	0.114	0.102	0.009	0.993
9	2.032	1.424	0.911	0.620	0.330	0.182	0.105	0.100	0.012	0.997
10	2.285	1.511	1.161	0.683	0.389	0.207	0.112	0.104	0.01	0.997
Mean (X _{tb})	2.174	1.515	1.129	0.656	0.358	0.197	0.109	0.102	0.011	0.996
SD	0.163	0.117	0.089	0.045	0.033	0.019	0.005	0.002	0.001	/
Mean -2SD	1.848	1.280	0.951	0.565	0.293	0.160	0.099	0.098	0.008	/
Mean + 2SD	2.500	1.750	1.307	0.746	0.424	0.234	0.119	0.106	0.014	/
RSD (%) /CV	7.499	7.751	7.879	6.915	9.128	9.450	4.648	1.958	13.225	/

Kết quả cho thấy cả 10 lần làm với 2 nhóm độc lập trong 5 ngày khác nhau trên cùng một mẫu, điều kiện labo đều cho kết quả nằm trong khoảng Mean \pm 2SD; Hệ số tuyến tính R² đều nằm trong khoảng 0.95-1.0; RSD (%) tại mỗi điểm chuẩn đều nhỏ hơn 20%. Khoảng tuyến tính xác nhận từ độ pha 1/20-1/320 (tương ứng hàm lượng protein (kháng nguyên vi rút VNNB) từ 42-663 ng/ml).

Bảng 5: Độ chệch của từng điểm chuẩn của mẫu chuẩn 2

Lần thực hiện	Điểm chuẩn					
	1/10		1/20		1/40	
	Giá trị thực	Δ_i (%)	Giá trị thực	Δ_i (%)	Giá trị thực	Δ_i (%)
1	0.979	100.82	0.481	99.07	0.222	91.36
2	1.154	118.85	0.553	113.90	0.258	106.17
3	0.925	95.26	0.445	91.66	0.235	96.71
Mean (Xtb)	1.019	104.978	0.493	101.545	0.238	98.080
SD	0.120	12.328	0.055	11.327	0.018	7.502
Mean -2SD	0.780	80.321	0.383	78.891	0.202	83.075
Mean + 2SD	1.259	129.635	0.603	124.198	0.275	113.084
RSD (%) /CV	11.744	11.744	11.154	11.154	7.649	7.649

Kết quả phân tích cho thấy tại các điểm chuẩn, giá trị công hiệu tương quan thu được đều nằm trong khoảng TB \pm 2SD; RSD (%) tại mỗi điểm chuẩn đều nhỏ hơn 20% và độ chệch tại các điểm chuẩn (Δ_i (%)) đều nhỏ hơn 15% [2, 3, 5].

Quy trình đạt yêu cầu về tính tuyến tính với khoảng tuyến tính làm việc xác nhận từ độ pha 1/20-1/320.

Bảng 6: Kết quả OD đo được của dung dịch pha loãng (PBS)

Lần thực hiện	Giá trị OD đo được và màu OD			
	Nhóm 1		Nhóm 2	
	OD PBS	PC (1/10)	OD PBS	PC(1/10)
1	0.012 (Không màu)	0.979 (Vàng)	0.011 (Không màu)	1.202 (Vàng)
2	0.1 (Không màu)	1.154 (Vàng)	0.013 (Không màu)	1.204 (Vàng)
3	0.014 (Không màu)	0.925 (Vàng)	0.009 (Không màu)	1.122 (Vàng)
4	0.011 (Không màu)	1.134 (Vàng)	0.012 (Không màu)	1.107 (Vàng)
5	0.010 (Không màu)	1.067 (Vàng)	0.010 (Không màu)	1.122 (Vàng)

Kết quả phân tích cho thấy 2 nhóm làm độc lập trong 5 ngày khác nhau mẫu không chứa kháng nguyên vi rút Viêm não Nhật bản (dung dịch PBS) đều không cho tín hiệu phân tích (OD không lên màu và nhỏ hơn 10 lần OD của mẫu PC [2,3,5].

Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

4. Bàn luận

Toàn bộ quy trình, mẫu, kit ELISA dùng trong nghiên cứu đều là những thứ được sử dụng trong nghiên cứu hợp tác liên labo của

các nước khu vực Châu Á Thái Bình Dương (Asia Pacific (APAC), Korea được phân công làm đầu mối, Project no: 19201MFDS257 diễn ra đầu năm 2020. Nên quy trình, mẫu dùng trong nghiên cứu đều ít nhiều đã được thẩm định, đánh giá cẩn thận.

Về phía Việt Nam chúng tôi lại tiến hành khảo sát đánh giá tính phù hợp của quy trình (phương pháp) này một cách độc lập thông qua tất cả các thống số chính về thâm định thử nghiệm theo đúng hướng dẫn của WHO/VSQ/97.02 [2,3,6]. Nên kết quả đưa ra rất đáng tin cậy.

Vi rút VNNB có rất nhiều chủng nhưng lại chỉ có 1 type huyết thanh. Do đó khả năng bảo vệ chéo của kháng thể tạo ra từ các chủng vắc xin rất cao. Các phản ứng miễn dịch trên chuột trong thử nghiệm công hiệu in vivo (phương pháp trung hòa giảm 50% đám hoại tử (50% plaque-reduction neutralization titre, PRNT₅₀) đã chứng minh rất tốt điều này. Vậy với phương pháp ELISA (dựa trên phản ứng đặc hiệu kháng nguyên kháng thể đặc hiệu trực tiếp) thì như thế nào? Có chứng minh được khả năng phản ứng chéo này không?

Trong protocol mà phía Hàn Quốc gửi cũng phần nào chứng minh sự phù hợp của quy trình/phương pháp ELISA khi dùng cả 2 loại mẫu chuẩn quốc gia Hàn Quốc sản xuất trên 2 chủng vi rút VNNB với 2 công nghệ sản xuất khác nhau. Cụ thể: Mẫu chuẩn sử dụng làm Positive control (PC) hay mẫu chuẩn 2 trong đánh giá độ đúng (là 3rd National Standard for JE Vaccine (Inactivated) MFDS code: 14/041) sản xuất trên não chuột, chủng Nakayama thiết lập năm 2015; loại dùng làm đường chuẩn là MFDS Standard ccJE vaccine, 1st (vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Hàn Quốc của MFDS lần thứ nhất), mã số MFDS-B-16-002, sản xuất trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 thiết lập năm 2017 nhưng cả 2 loại mẫu chuẩn này đều được nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc gia của NIID, Nhật Bản lô 106VC-2009, sản xuất trên tế bào Vero, chủng Beijing-1. Mỗi dạng sẽ có 1 quy trình pha riêng. Đây là về kháng nguyên; còn kháng thể gắn phôi là kháng thể thu được từ chủng Beijing-1. Tuy nhiên khi khảo sát

trên cùng 1 quy trình, 1 bộ kit 2 mẫu chuẩn đều cho thấy khả năng bắt cặp tốt.

Kháng nguyên của vi rút VNNB chính là protein E, vắc xin VNNB hiện nay dùng công nghệ sản xuất được tinh chế qua rất nhiều bước nên có độ tinh sạch rất cao (hàm lượng Protein E chiếm >95% hàm lượng Protein tổng số).

Khi khảo sát tính tuyến tính của đường chuẩn của phương pháp ELISA, có thể thấy với khoảng làm việc của đường chuẩn là từ độ pha 1/20-1/320 (tương ứng hàm lượng protein (hay kháng nguyên vi rút VNNB) từ 42-663 ng/ml), phù hợp với tất cả các vắc xin VNNB bất hoạt hiện nay vì đều có hàm lượng protein từ 3 mg/ml trở lên. Với các vắc xin có hàm lượng protein cao vượt khoảng làm việc của đường chuẩn, cần pha loãng mẫu tới nồng độ thích hợp.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã chứng minh quy trình thử nghiệm công hiệu in vitro vắc xin VNNB bất hoạt trên tế bào Vero, chủng Beijing-1 theo phương pháp ELISA tại phòng thí nghiệm của NICVB là phù hợp và đáng tin cậy. Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình đạt yêu cầu về độ đúng, độ chính xác, độ mạnh, độ đặc hiệu và tính tuyến tính với khoảng làm việc theo hàm lượng kháng nguyên (protein) từ 42-663 ng/ml.

References

- [1] WHO TRS 963 for JE vaccine.
- [2] SOP KĐQG -34: Quy trình thâm định thử nghiệm.
- [3] Validation of analytical assays (WHO/VSQ/97.02)
- [4] ICH guideline (ICH –Q2A; ICH – Q2B).
- [5] WHO in- country workshop on analytical method validation, 17 February 2014, Ha Noi – Viet Nam.
- [6] Development of an in vitro antigen-detection test as an alternative method to the in vivo plaque reduction neutralization test for the quality control of Japanese encephalitis virus vaccine, Microbiol Immunol 2012; 56: 463–471, Do Keun Kim et al.