ASSESSING THE QUALITY OF THE STANDARD BATCH OF DIPHTHERIA TOXIN DiTox Vn03 USED FOR POTENCY CONTROL TEST OF DIPHTHERIA COMPONENT

Pham Thi Lan Anh*, Luong Thi Bich Trang, Ho Thi Phương, Ta Nguyen Tuong Van, Do Thi Trung Anh, Nguyen Thi Thu Hoa, Tran Ngoc Nhon, Vu Thi Thu Huong, Duong Huu Thai

Institute of Vaccines and Biologicals (IVAC)

Received 15 September 2026

Accepted 30 September 2026

Abstract: The potency of the diphtheria vaccine is determined by the guinea pig challenge method and the Vero cell neutralization assay (using mouse serum). Both methods require the use of a reference diphtheria toxin whose potency has been determined as toxic units or LD_{50} (for the challenge method) or Lm dose (for the Vero cell assay). To meet this requirement, a standard batch of diphtheria toxin DiTox Vn03 was prepared and its quality was evaluated as a secondary standard sample for diphtheria potency testing using both methods. This study aimed to assess the quality and stability of the diphtheria batch of diphtheria toxin Ditox Vn03. The LD_{50} stability of the toxin batch was estimated annually from 2020 to 2025 and monitored through back titration of the challenge toxin in the diphtheria potency test. The results showed that we produced 150 tubes of DiTox Vn03 toxin reaching an average of 2834,81LD_{50} units; the Lm/10000 dose reached 9600 Lm/ml, and the Lm/100000 dose reached 96000Lm/ml. The DiTox Vn03 toxin batch is stable after 5 years of storage at temperatures ≤ -40°C, suitable for determining the potency of the diphtheria component using both methods.

***Keywords**: diphtheria toxin; LD_{50}, Lm.*

* Corresponding author:
E-mail address: ivaclananh@gmail.com
Https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i3.275

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG LÔ ĐỘC TỐ BẠCH HẦU MẪU CHUẨN DiTox Vn03 DÙNG CHO THỬ NGHIỆM XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN BẠCH HẦU

Phạm Thị Lan Anh*, Lương Thị Bích Trang, Hồ Thị Phương, Tạ Nguyễn Tường Vân, Đỗ Thị Trung Anh, Nguyễn Thị Thu Hoa, Trần Ngọc Nhơn, Vũ Thị Thu Hương, Dương Hữu Thái

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 15 tháng 09 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 09 năm 2026

Tóm tắt: Công hiệu của vắc xin chứa thành phần bạch hầu được xác định bằng phương pháp thử thách trên chuột lang hoặc phương pháp chuẩn độ trên tế bào Vero. Cả hai phương pháp này đều yêu cầu phải sử dụng độc tố bạch hầu chuẩn đã được chuẩn độ xác định đơn vị độc lực hoặc LD_{50} (dùng cho phương pháp thử thách) hoặc Lm (dùng cho phương pháp chuẩn độ trên tế bào Vero). Để đáp ứng yêu cầu trên, lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 đã được chuẩn bị và đánh giá chất lượng như là mẫu chuẩn thứ cấp dùng cho thử nghiệm kiểm tra công hiệu bạch hầu bằng cả hai phương pháp này. Nghiên cứu nhằm mục tiêu đánh giá chất lượng và tính ổn định của lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03. Tính ổn định LD_{50} của lô độc tố được đánh giá hàng năm từ 2020 đến 2025, đồng thời được theo dõi qua chuẩn độ ngược độc tố thử thách trong thử nghiệm xác định công hiệu thành phần bạch hầu. Kết quả nghiên cứu cho thấy lô độc tố bạch hầu DiTox Vn03 có số lượng 150 ống, đạt trung bình 2834,81 đơn vị $LD_{50,}$ liều Lm/10000 đạt 9600 Lm/ml và liều Lm/100000 đạt 96000Lm/ml. Lô độc tố DiTox Vn03 ổn định sau 5 năm bảo quản ở nhiệt độ ≤ -40°C, phù hợp dùng trong thử nghiệm xác định công hiệu thành phần bạch hầu bằng cả hai phương pháp.

***Từ khóa**: độc tố bạch hầu; LD_{50}; Lm.*

1. Đặt vấn đề

Vắc xin phối hợp hấp phụ có thành phần bạch hầu là vắc xin được dùng phổ biến cho trẻ em trong các Chương trình tiêm chủng mở rộng trên toàn thế giới. Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [2] và Dược điển Việt Nam VI (2025) [1], công hiệu của vắc xin có thành phần bạch hầu được xác định bằng hai phương pháp: thử thách trên chuột lang hoặc chuẩn độ trên tế bào Vero. Cả hai phương pháp đều yêu cầu sử dụng độc tố bạch hầu chuẩn đã được xác định đơn vị độc lực, tương ứng là LD_{50} đối với phương pháp thử thách trên chuột lang và Lm đối với phương pháp chuẩn độ trên tế bào Vero. Do đó, việc chuẩn bị một lô độc tố bạch hầu ở dạng dung dịch làm việc (working solution) với đơn vị độc lực xác định, tính đồng nhất và độ ổn định phù hợp là cần thiết, nhằm đảm bảo tính chính xác, thuận tiện và sẵn sàng cho mỗi lần thực hiện thử nghiệm. Xuất phát từ nhu cầu thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Đánh giá chất lượng lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 dùng cho thử nghiệm xác định công hiệu thành phần bạch hầu", với hai

mục tiêu: Chuẩn bị và đánh giá chất lượng lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03; Đánh giá tính ổn định của lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: lô mẫu chuẩn độc tố bạch hầu DiTox Vn03 sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Từ tháng 10/2020 đến tháng 12/2025.

Địa điểm: phòng Kiểm định, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC).

2.3. Vật liệu, hóa chất

2.3.1. Độc tố bạch hầu

- Độc tố bạch hầu thô nhận từ phòng sản xuất vắc xin DTP. Lô số: 0418/D, Ngày sản xuất: 25/03/2018, Hàm lượng/nồng độ: 120 Lf/ml.
- Số lượng: 500 ml.
- Huyết thanh mẫu chuẩn bạch hầu (NIBSC code 19/236): 10 IU/ml

2.3.2. Dụng cụ, trang thiết bị

- Tủ lạnh âm (Sanyo)
- Máy khuấy từ (Tuart)
- Ống đong 500 ml (Duran)
- Chai thủy tinh 2000 ml (Duran)
- Tube nhựa 1,8 ml (Corning)
- Phiến nuôi cấy tế bào 96 giếng

2.3.3. Dung dịch đệm bảo quản [3]

- Dung dịch Glycerin 99% vô khuẩn (Sigma).

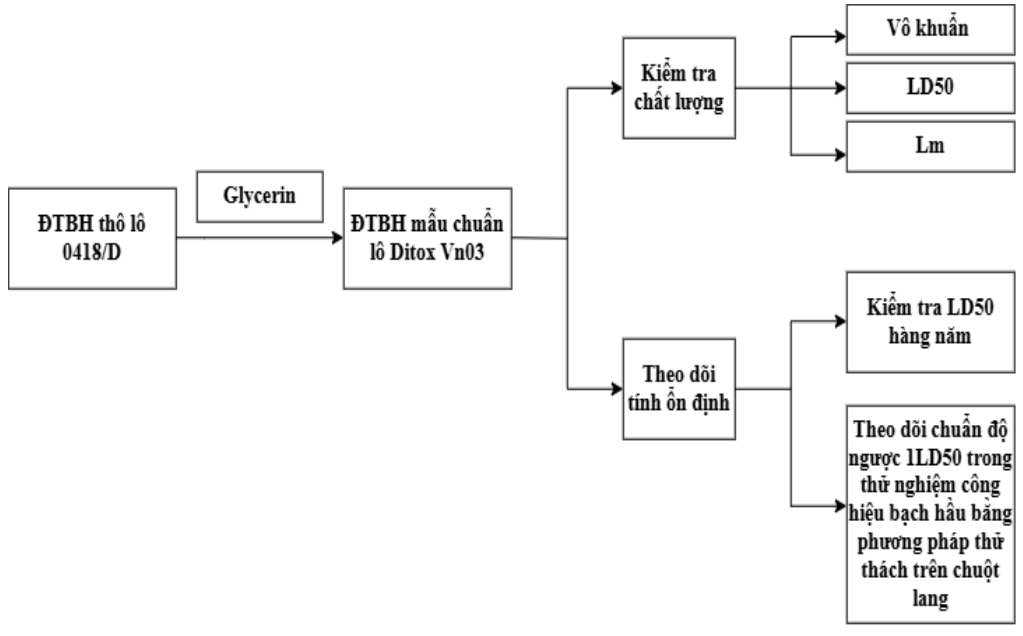
2.3.4. Môi trường

- Fluid thioglycollate medium (Thio) và Tryptic soy broth (TSB).

2.3.5. Động vật thí nghiệm

- Chuột lang, trọng lượng 250 - 350g/ con.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

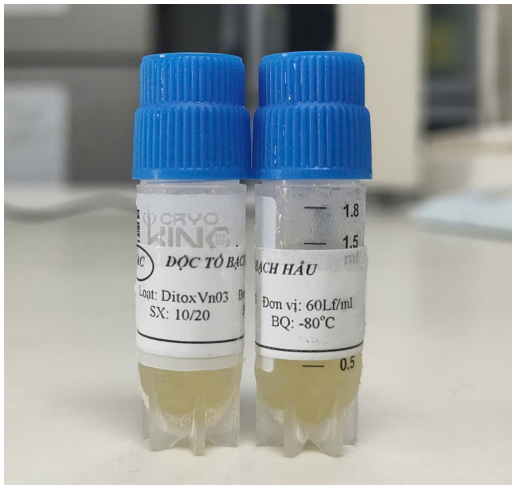


Hình 1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Chuẩn bị lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03

Lấy 93 ml độc tố bạch hầu thô lô 0418/D (120 Lf/ml) pha trong glycerin với tỷ lệ 1:1, như vậy sau khi pha trong đệm glycerin mỗi ml độc tố sẽ có 60 Lf/ml. Khuấy đều bằng máy khuấy từ trong khoảng 30 phút. Sau khuấy tiến hành chia độc tố vào các ống với thể tích 1,2ml/ống, tổng số lượng thành phẩm 150 ống. Dán nhãn lô độc tố DiTox Vn03 và bảo quản các ống độc tố trong lạnh sâu ≤-40°C. Lấy mẫu kiểm tra vô khuẩn, xác định liều LD_{50} và liều Lm.



Hình 2. Ống độc tố bạch hầu DiTox Vn03

2.5.2. Kiểm tra vô khuẩn

Lấy 26 ống độc tố bạch hầu kiểm tra vô khuẩn bằng phương pháp cấy trực tiếp trên môi trường Thio và TSB.

Tiêu chuẩn đánh giá: Sau 14 ngày không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm [7].

2.5.3. Xác định đơn vị LD_{50} của độc tố bạch hầu

LD_{50} (Lethal Dose 50) là lượng độc tố gây chết 50% động vật thí nghiệm có trọng lượng xác định trong vòng 96 giờ [1], kết quả được tính bằng phương pháp Reed-Muench.

Lấy 1 ống độc tố DiTox Vn03 pha loãng trong đệm Jensen pepton thành 1/1000 sau đó tiếp tục pha thành các độ pha 1/1400, 1/2100, 1/3200, 1/4800. Mỗi độ pha tiêm cho một nhóm gồm 8 chuột lang, mỗi con 1ml vào dưới da. Sau 96h tính số chuột chết trên tổng số chuột đã tiêm [1]. Áp dụng công thức Reed-Muench để xác định số đơn vị LD_{50} trong dung dịch độc tố [4].

2.5.4. Xác định liều Lm của độc tố bạch hầu

Liều Lm/10000 là lượng độc tố tối thiểu còn lại sau khi trung hòa với 0,0001 IU/ml đơn vị huyết thanh kháng độc tố bạch hầu đủ ức chế sự trao đổi chất của tế bào Vero trong thời gian 6 ngày.

Độc tố bạch hầu được pha thành 0,2 Lf/ml (nếu dùng Lm/10000) hoặc 0,02 Lf/ml (nếu dùng Lm/100000); tiếp tục pha loãng bậc hai, sau đó trung hòa với một lượng 0,002 IU/ml kháng độc tố (nếu dùng Lm/10000) hoặc 0,0002 IU/ml kháng độc tố (nếu dùng Lm/100000). Ở độ pha nào lượng độc tố thừa ít nhất không bị trung hòa với kháng độc tố mà vẫn còn có khả năng gây ức chế tế bào trong thời gian 6 ngày thì lượng độc tố đó được tính bằng liều độc tố Lm/10000 hoặc Lm/100000 [1].

2.5.5. Theo dõi tính ổn định của độc tố bạch hầu mẫu chuẩn

- Chuẩn độ LD_{50} của độc tố mẫu chuẩn DiTox Vn03 định kỳ sau mỗi 12 tháng.

- Theo dõi tỷ lệ chuột sống trong chuẩn độ ngược ở liều 1 LD_{50} của thử nghiệm công hiệu thành phần bạch hầu đối với các

vắc xin DPT, Td. Ở liều 1 LD_{50}, tỷ lệ sống của chuột lang phải nằm trong khoảng 25% –75% trên tổng số chuột được tiêm.

3. Kết quả

3.1. Kết quả kiểm tra lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03

Kiểm tra vô khuẩn lô độc tố mẫu chuẩn DiTox Vn03 cho thấy không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi, đạt yêu cầu về vô khuẩn theo tiêu chuẩn của DĐVN VI cho vắc xin và sinh phẩm. Kiểm tra đơn vị độc lực của lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả chuẩn độ đơn vị độc lực của độc tố bạch hầu lô DiToxVn03

Đơn vị độc lực trong 1ml độc tố bạch hầu DiToxVn03	Lần thực hiện					Trung bình
	1	2	3	4	5	
LD_{50}	3019,95	2818,38	2630,28	2754,23	2951,21	2834,81 ± 138,87
Lm/10000	9600	19200	9600	4800	4800	9600
Lm/100000	96000	96000	48000	192000	48000	96000

Sau 5 lần chuẩn độ độc lập, số đơn vị độc lực trong 1ml độc tố bạch hầu DiToxVn03 (60Lf) xác định được như sau:

Liều LD_{50} = 2834,81 ± 138,87 LD_{50} (từ 2.630,28 LD_{50} đến 3019,95 LD_{50});

Liều Lm/10000 = 9600 Lm/10000 (từ 4800 Lm/10.000 đến 19200 Lm/10000).

Liều Lm/100000 = 96000 Lm/100000 (từ 48000 Lm/100000 đến 192000 Lm/100000).

Hệ số biến thiên CV% giữa các lần chuẩn độ LD_{50} là 4,9%. Trong khi đó với chuẩn độ (trên *in vitro*) đơn vị độc lực Lm/10000 và Lm/100000 sử dụng các độ pha loãng bậc 2 từ hàng chục nghìn đến hàng trăm nghìn lần nên hệ số biến thiên giữa các lần thực hiện được tính trong khoảng chênh lệch 1 độ pha. Những kết quả trên đều cho thấy chênh lệch giữa các lần chuẩn độ Lm/10000 và Lm/100000 đều trong giới hạn cho phép, nghĩa là không quá 1 độ pha loãng bậc 2.

3.2. Kết quả tính ổn định độc lực của độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03

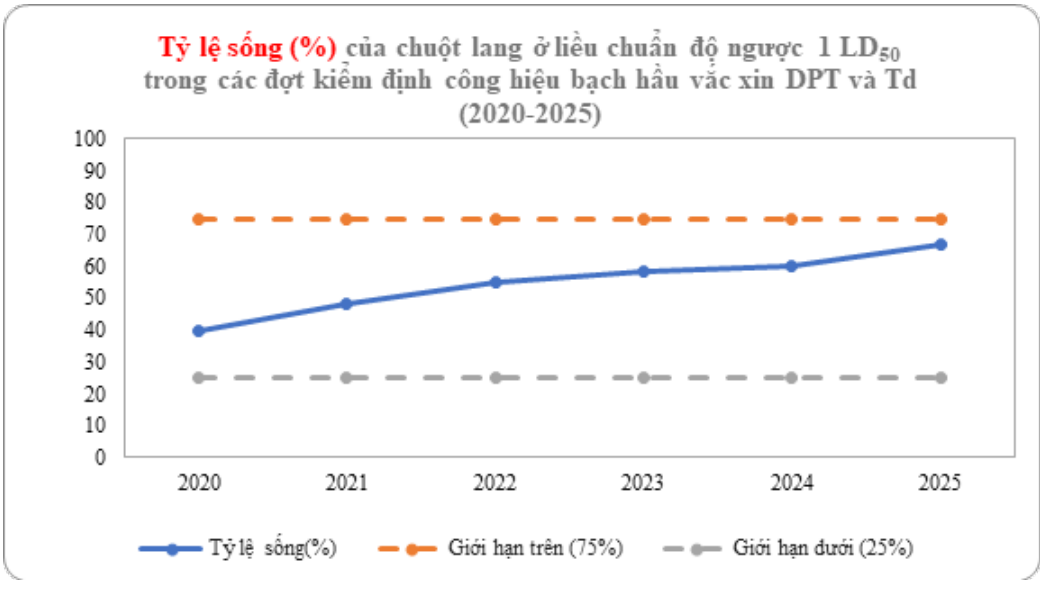
Lô độc tố DiTox Vn03 bảo quản ở ≤ -40°C được kiểm tra hàng năm về liều LD_{50} để đánh giá tính ổn định. Hiện nay tính ổn định của lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn này đã theo dõi được 5 năm. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tính ổn định độc lực (LD_{50}) của lô độc tố bạch hầu DiTox Vn03 qua 5 năm theo dõi

Thời gian / Kết quả	Thời gian chuẩn độ						Tỷ lệ (%) giảm so với T0
	T0 (10/20)	T1 (10/21)	T2 (10/22)	T3 (10/23)	T4 (10/24)	T5 (10/25)	
Số đơn vị LD_{50}	2834,81	2879,46	2773,32	2773,32	2776,09	2676,43	5,6
Số đơn vị LD_{50}/1Lf	47,25	47,99	46,22	46,22	46,27	44,61	5,6

Như vậy sau 5 năm, độc lực của lô độc tố DiTox Vn03 có tỷ lệ giảm không đáng kể khoảng 5,6% so với ban đầu, vẫn đảm bảo đủ tiêu chuẩn làm độc tố thử thách trong thử nghiệm công hiệu bạch hầu theo qui định của WHO.

Giám sát độ ổn định độc lực (LD_{50}) của lô độc tố bạch hầu DiTox Vn03 thông qua chuẩn độ ngược liều độc tố thử thách trong các thử nghiệm xác định công hiệu thành phần bạch hầu trong 5 năm từ 2020 đến 2025 cho thấy độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 vẫn ổn định qua các năm (hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ sống (%) của chuột lang ở liều chuẩn độ ngược 1 LD_{50} trong các đợt kiểm định công hiệu bạch hầu vắc xin DPT và Td (2020-2025)

Qua 5 năm sử dụng lô độc tố mẫu chuẩn DiTox Vn03 cho thử nghiệm công hiệu bạch hầu, kết quả chuẩn độ ngược $1LD_{50}$ cho thấy tỷ lệ chuột sống nằm trong khoảng 25% -75%, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của thử nghiệm. Qua đó chứng tỏ lô độc tố này có chất lượng ổn định sau 5 năm theo dõi.

4. Bàn luận

Độc tố bạch hầu có bản chất là một ngoại độc tố protein có cấu trúc dạng A-B, với tổng trọng lượng phân tử khoảng 58 - 62 kDal. Chuỗi A mang hoạt tính enzym ADP-ribosyltransferase và chuỗi B có vai trò gắn độc tố vào tế bào và hỗ trợ xâm nhập. Chuỗi A sau khi vào bào tương, sẽ bất hoạt yếu tố kéo dài EF-2 (Elongation Factor 2), từ đó ức chế hoàn toàn quá trình tổng hợp protein và gây hoại tử tế bào. Tương tự các ngoại độc tố khác, các chuỗi A và B được nối với nhau bằng một cầu nối disulfit, và cầu nối này cần được khử bên trong tế bào để chuỗi A phát huy độc tính [5, 6].

Cũng như các protein sinh học khác, khi ở dạng dung dịch, độc tố bạch hầu có thể suy giảm hoạt tính trong quá trình bảo quản nếu điều kiện không phù hợp. Nhiệt độ thấp và các chất bảo quản lạnh như glycerin thường được sử dụng để duy trì độ ổn định của độc

tố trong thời gian dài. Đối với các lô độc tố dùng làm mẫu chuẩn, việc bảo quản ở nhiệt độ lạnh sâu dưới -20°C hoặc cực lạnh như nhiệt độ đạt được với nitơ lỏng (-196°C) giúp ngăn chặn hiệu quả các phản ứng sinh hóa và đảm bảo độ ổn định của độc tố trong nhiều năm. Ngoài ra, nồng độ protein cũng cần được kiểm soát do dung dịch protein nồng độ thấp có thể bị giảm hoạt lực trong quá trình bảo quản lâu dài do hiện tượng hấp phụ lên bề mặt vật liệu chứa [3,8].

Lô độc tố bạch hầu thô 0418/D có hàm lượng protein 0,74 mg/ml và hàm lượng kháng nguyên 120 Lf/ml. Sau khi pha với glycerin theo tỷ lệ 1:1 thành lô độc tố mẫu chuẩn DiTox Vn03 có hàm lượng kháng nguyên dự kiến khoảng 60 Lf/ml. Kết quả chuẩn độ ban đầu qua 5 lần thử nghiệm độc lập cho thấy độc lực trung bình đạt 2834,81 ± 138,87 LD_{50}/ml, tương ứng 47,25 LD_{50}/Lf. Giá trị Lm/10000 trung bình đạt 9600 Lm/ml và Lm/100000 đạt 96000 Lm/ml. Các kết quả này cho thấy lô DiTox Vn03 có hoạt lực phù hợp để sử dụng làm mẫu chuẩn thứ cấp trong các thử nghiệm kiểm tra công hiệu thành phần bạch hầu.

Tính ổn định của DiTox Vn03 được đánh giá định kỳ trong thời gian 5 năm, từ tháng 10/2020 đến tháng 10/2025. Kết quả cho thấy giá trị LD_{50} giảm từ 2834,81 LD50/ml tại thời điểm T0 xuống 2676,43 LD_{50}/ml tại thời điểm T5, tương ứng mức giảm 5,6%. Giá trị LD_{50}/1 Lf giảm từ 47,25 tại T0 xuống 44,61 tại T5. Mặc dù hoạt lực có xu hướng giảm nhẹ theo thời gian, mức giảm sau 5 năm không làm thay đổi đáng kể khả năng sử dụng của lô độc tố DiTox Vn03 trong các thử nghiệm kiểm tra công hiệu.

Ngoài việc xác định LD_{50} định kỳ, độ ổn định của lô DiTox Vn03 còn được theo dõi thông qua chuẩn độ ngược ở liều 1 LD_{50} trong các đợt kiểm định công hiệu thành phần bạch hầu của vắc xin DPT và Td giai đoạn 2020–2025. Kết quả tại Hình 3 cho thấy tỷ lệ sống của chuột lang có xu hướng biến động theo thời gian nhưng vẫn nằm trong giới hạn cho phép 25–75%, đáp ứng tiêu chí chấp nhận của thử nghiệm. Kết hợp với kết quả xác định LD_{50} định kỳ, các dữ liệu này cho thấy mặc dù độc lực của lô DiTox Vn03 có xu hướng giảm nhẹ sau 5 năm sử dụng, lô độc tố vẫn duy trì được độ ổn định cần thiết trong điều kiện bảo quản ≤ -40°C và glycerin 50% v/v, đáp ứng yêu cầu sử dụng làm mẫu chuẩn thứ cấp trong kiểm định công hiệu thành phần bạch hầu. Tuy nhiên, do lô độc tố đã được sử dụng trong khoảng 5 năm và lượng còn lại rất ít nên nhóm nghiên cứu đang xây dựng kế hoạch sản xuất lô độc tố bạch hầu mới. Lô mới sẽ được đánh giá các đặc tính và kiểm định công hiệu trước khi đưa vào sử dụng, nhằm bảo đảm nguồn mẫu chuẩn thay thế và duy trì tính liên tục, ổn định, tin cậy của các phép thử.

5. Kết luận

Lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 có số lượng 150 ống (1,2 ml/ống), số đơn vị liều gây chết 50% là 2834,81LD_{50}, giá trị Lm/10000 đạt 9600 Lm/ml và Lm/100000 đạt 96000 Lm/ml.

Lô độc tố bạch hầu mẫu chuẩn DiTox Vn03 có độ ổn định độc lực trong ít nhất 5 năm khi bảo quản ở nhiệt độ ≤ -40°C, đồng thời duy trì được hoạt lực phù hợp khi sử dụng trong các thử nghiệm kiểm tra công

hiệu thành phần bạch hầu trong giai đoạn từ năm 2020 đến năm 2025.

Tài liệu tham khảo

[1] Bộ Y tế , Phụ lục 15.23: "Xác định công hiệu thành phần bạch hầu trong vắc xin hấp phụ chứa giải độc tố bạch hầu", *Dược điển Việt Nam VI*. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2025.tr. PL-479-482.

[2] World Health Organization, Manual for Quality Control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. Geneva: World Health Organization; 2013. [cited 2024 Jan 28]. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/80681

[3] World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines (adsorbed). *WHO Technical Report Series*, No. 980. Geneva: World Health Organization; 2014. p. 211-270.

[4] Reed LJ, Muench H, A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938; 27(3):493-497. doi: https://doi.org/10.1093/ oxfordjournals.aje.a118408.

[5] Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*. 2001; *39*(11), 1793-1803.

[6] Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; *181*(Supplement_1):S156-S167.

[7] Bộ Y tế (2025), Phụ lục 15.7: "Kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm", Dược điển Việt Nam VI. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2025. tr. PL-465-467.

[8] Pierce Biotechnology, Inc. Technical resource: Protein stability and storage. The Wolfson Centre for Applied Structural Biology; 2003. [cited 2026 Oct 9]. Available from: https://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/StorageProteins/PIERCE_ProteinStorage.pdf