STUDY ON THE ESTABLISHMENT OF A SECONDARY REFERENCE STANDARD FOR THE NEUTRALIZATION ASSAY OF RABIES ANTISERUM POTENCY

Ta Nguyen Tuong Van*, Do Thi Trung Anh, Tran Ngoc Nhon, Vu Thi Thu Huong, Banh Thi Kim Thi

Institute of Vaccines and Medical Biologicals

Received 16 September 2026

Accepted 30 September 2026

Abstract: Currently, the only licensed purified equine rabies immunoglobulin in Vietnam is IVACRIG, manufactured by the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC). Potency is tested via the mouse neutralization test (MNT), which requires the international equine rabies antiserum (RAI) standard from NIBSC. Since NIBSC has discontinued this standard, IVAC established and calibrated an in-house secondary standard against the international reference to assign its specific neutralization unit. Methods: A qualified batch of rabies immunoglobulin was adjusted to the required concentration and calibrated against the international RAI standard through ten MNT assays. The geometric mean (GM) and coefficient of variation were calculated using Microsoft Excel to determine the final potency of the secondary standard. Results and Conclusion: A secondary reference standard for the rabies immunoglobulin MNT assay was successfully established with a potency of 39 IU/mL.

***Keywords**: RAI; rabies immunoglobulin reference standard.*

* Corresponding author:
E-mail address: tanguyentuongvan@gmail.com
Https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i3.276

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP MẪU CHUẨN THỨ CẤP DÙNG TRONG KIỂM ĐỊNH TRUNG HÒA HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG DẠI

Tạ Nguyễn Tường Vân*, Đỗ Thị Trung Anh, Trần Ngọc Nhơn, Vũ Thị Thu Hương, Bành Thị Kim Thi

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 16 tháng 09 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 09 năm 2026

Tóm tắt: Hiện nay, Việt Nam chỉ có huyết thanh kháng dại tinh chế (IVACRIG) được sản xuất từ ngựa do Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) sản xuất. Tại IVAC, hiệu lực huyết thanh kháng dại được thực hiện bằng phương pháp trung hòa kháng nguyên – kháng thể trên chuột nhắt (Mouse neutralization test – MNT). Để thực hiện thử nghiệm này cần sử dụng mẫu chuẩn quốc tế huyết thanh kháng dại có nguồn gốc từ ngựa (RAI) do Viện quốc gia về tiêu chuẩn và kiểm định sinh học (NIBSC) cung cấp. Tuy nhiên, NIBSC đã ngừng sản xuất và cung cấp mẫu chuẩn RAI. Do đó IVAC đã tiến hành thiết lập mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại và hiệu chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế để đưa ra đơn vị trung hòa. *Phương pháp:* Chọn lô nguyên liệu huyết thanh kháng dại đạt tiêu chuẩn, đưa về nồng độ yêu cầu, tiến hành nối chuẩn 10 lần với mẫu chuẩn quốc tế RAI để xác định đơn vị của mẫu chuẩn thứ cấp bằng phương pháp MNT. Sử dụng phần mềm Excel để tính giá trị trung bình nhân (GM), hệ số biến thiên. Tổng hợp kết quả đưa ra số đơn vị hiệu giá của mẫu chuẩn thứ cấp khi xác định bằng RAI. *Kết quả và kết luận:* Nghiên cứu đã sản xuất được mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại cho thử nghiệm MNT của huyết thanh kháng dại với đơn vị 39 IU/ml.

***Từ khóa**: RAI; mẫu chuẩn huyết thanh kháng dại.*

1. Đặt vấn đề

Huyết thanh kháng dại có nguồn gốc từ huyết thanh ngựa chứa kháng thể kháng vi rút dại được dùng để tiêm dự phòng bệnh dại nhằm mục đích tạo miễn dịch thụ động kháng vi rút dại. Hiện nay, tại Việt Nam chủ yếu chỉ có huyết thanh kháng dại tinh chế (IVACRIG) được sản xuất từ huyết thanh ngựa do Viện vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) sản xuất.

IVACRIG là globulin miễn dịch có nguồn gốc từ ngựa được sản xuất trên quy trình tinh sạch sắc ký trao đổi ion. Do đó IVACRIG là một sản phẩm có độ tinh sạch cao, độ an toàn và hiệu giá trung hoà virus dại đạt hiệu quả.

Tại IVAC, thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng dại đang được thực hiện bằng phương pháp trung hòa kháng nguyên – kháng thể trên chuột nhắt (Mouse neutralization test – MNT) theo hướng dẫn của Dược điển Việt Nam. Để thực hiện được thử nghiệm này cần sử dụng mẫu chuẩn quốc tế huyết thanh kháng dại có nguồn gốc từ ngựa (RAI) do Viện Tiêu chuẩn và Kiểm soát Sinh học Quốc gia (NIBSC) cung cấp.

Hiện nay, NIBSC đã ngừng việc sản xuất và cung cấp mẫu chuẩn RAI, do RAI đã được thay thế bằng mẫu chuẩn 19/244 và mẫu chuẩn này không công bố đơn vị dùng trong thử nghiệm MNT- Mouse Neutralization Test (chỉ có công bố đơn vị FAVN và RFFIT) trong khi MNT vẫn còn đang được áp dụng là phương pháp chính trong kiểm tra hiệu giá huyết thanh kháng dại tại đơn vị, mặt khác theo khuyến cáo của Tổ chức y tế Thế giới (WHO), các quốc gia và nhà sản xuất nên thiết lập mẫu chuẩn thứ cấp hoặc mẫu chuẩn nội bộ nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế. Do đó Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế đã tiến hành thiết lập mẫu chuẩn huyết thanh kháng dại nội bộ (mẫu chuẩn thứ cấp).

Mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại trước khi đưa vào sử dụng cho thử nghiệm xác định hiệu giá, cần phải chuẩn định lại với mẫu chuẩn, có hồ sơ truy xuất nguồn gốc theo đúng khung hướng dẫn của WHO/IVB/11.03 [4].

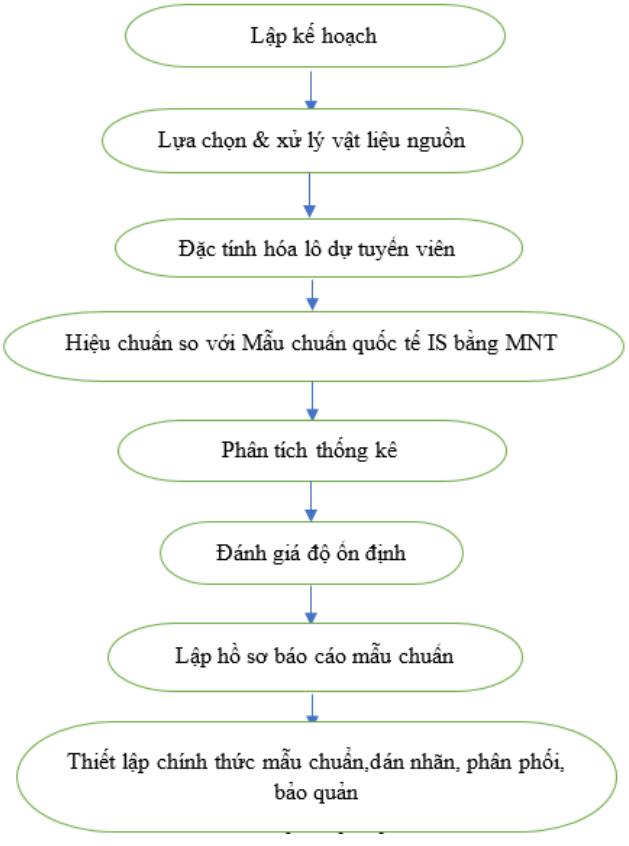
2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng Kiểm định – Viện vắc xin và Sinh phẩm y tế. Phối hợp với khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế – Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 06/2025 đến 06/2026.

2.2. Thiết kế nghiên cứu [5]



Hình 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại được sản xuất từ 1 lô huyết thanh kháng dại ngựa tinh chế ($F(ab')_2$). Tóm lược quy trình sản xuất như sau:

Gây miễn dịch trên ngựa→ Lấy máu thu huyết tương → Thủy phân bằng pepsin→ Thẩm tích TFF → Tinh sạch F(ab')2 → Thẩm tích TFF → Lọc vô trùng, hỗn hợp → Đánh giá chất lượng.

- Mẫu dự tuyển phải trải qua quá trình kiểm tra chất lượng theo các chỉ tiêu dành cho huyết thanh tinh chế (mẫu trong quy trình), lô huyết thanh được chọn làm mẫu chuẩn dự tuyển là lô đạt tiêu chuẩn chất lượng cơ sở của IVAC, có hiệu giá ước tính ổn định, có tính đại diện, đủ số lượng dự trữ dài hạn, ký hiệu là ERIG.

2.4. Các nguyên vật liệu chính sử dụng trong nghiên cứu

- Mẫu chuẩn RAI (NIBSC), hiệu giá công bố: 30 IU/ống [1].

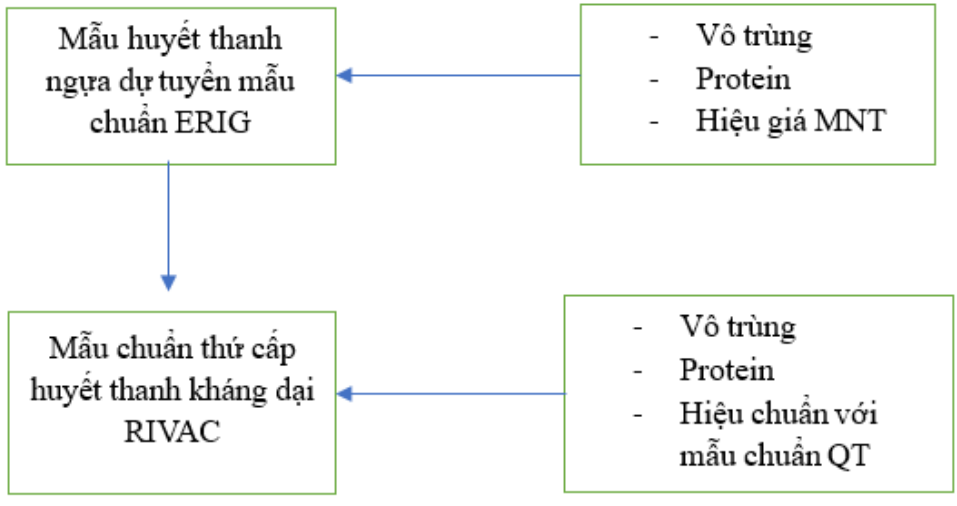
- Chủng CVS-11 (đang dùng tại IVAC), đã chuẩn độ LD_{50} và bảo quản theo SOP [3].

- Chuột nhắt trắng khoẻ mạnh giống ICR trọng lượng 14 -16g.

2.5. Phương pháp chọn mẫu

Cách chọn ống mẫu chuẩn để thực hiện thử nghiệm: Chọn ngẫu nhiên trên toàn bộ số ống sản xuất được, dự kiến 500 ống.

2.6. Các thử nghiệm đánh giá ở mỗi bước



Hình 2. Sơ đồ các thử nghiệm kiểm tra trong quá trình nghiên cứu

❖ Mỗi bước thực hiện sẽ được kiểm soát bởi các thử nghiệm kiểm định theo hướng dẫn của Dược Điển Việt Nam V về tiêu chuẩn huyết thanh kháng dại. Các thử nghiệm đánh giá chất lượng mẫu chuẩn dự tuyển sau sản xuất bao gồm: Vô trùng, protein, hiệu giá trung hòa [2].

Nguyên tắc thử nghiệm vô trùng:

Thử nghiệm kiểm tra vô trùng được thực hiện bằng cách cấy trực tiếp mẫu thử vào môi trường dinh dưỡng và ủ mẫu ở nhiệt độ thích hợp. Tiêu chuẩn: không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi.

Nguyên tắc thử nghiệm protein tổng số bằng phương pháp Lowry:

Protein có trong mẫu thử bị tủa với acid tricloacetic nóng. Xác định lượng tủa để tính ra lượng protein trong mẫu bằng cách hòa tan tủa, cho phản ứng với đồng tactrate và thuốc thử Folin trong môi trường kiềm để tạo phức màu xanh da trời, đo quang ở bước sóng 750 nm.

Tiêu chuẩn: ≤150 mg/ml.

Nguyên tắc thử nghiệm hiệu giá trung hoà trên chuột nhắt:

Mẫu chuẩn quốc tế RAI và mẫu ứng viên được pha loãng theo dãy các độ pha loãng song song (mỗi độ pha loãng được ủ với một liều cố định vi rút thử thách CVS trong điều kiện chuẩn (thời gian, nhiệt độ ủ trung hòa), sau đó tiêm vào não hoặc phúc mạc chuột theo đường dùng quy định trong SOP. Theo dõi tỷ lệ chuột sống/chết (hoặc biểu hiện bệnh dại) trong thời gian quan sát chuẩn (thường 14–21 ngày).

❖ Thử nghiệm đánh giá khi nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế: Hiệu giá trung hòa trên chuột nhắt. Lô mẫu chuẩn dự tuyển huyết thanh kháng dại RIVAC được nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế RAI – 30 IU/ống.

• Bố trí song song (parallel-line design): mẫu chuẩn IS và mẫu ứng viên trong cùng một phép thử, cùng chủng CVS, cùng lô chuột, để loại trừ sai số giữa các lần thử.

• Số lần lặp lại độc lập tối thiểu: ≥ 3 lần thử nghiệm (khuyến nghị 4–6 lần) thực hiện vào các ngày khác nhau, có thể coi mỗi lần thử tương đương một "phòng thí nghiệm ảo" trong mô hình nghiên cứu hợp tác nội bộ nếu chỉ có một đơn vị thực hiện (in-house collaborative-style calibration), để tăng độ tin cậy - phù hợp khuyến cáo của WHO/IVB/11.03 về "collaborative study".

• Mỗi lần thử: tối thiểu 4–5 độ pha loãng có tác dụng nằm trong vùng tuyến tính đáp ứng (khoảng 20–80% bảo vệ), mỗi độ pha loãng 5 chuột.

• Đối chứng: đối chứng vi rút (back-titration CVS).

• Tính ED_{50} (hoặc LD_{50} tương đương phần trăm sống sót) cho mỗi mẫu ở mỗi lần thử bằng phương pháp Spearman–Kärber theo phương pháp đã thẩm định tại IVAC.

• Tính hiệu giá tương đối (relative potency) của mẫu ứng viên so với IS ở mỗi lần thử:

Hiệu giá ứng viên (IU/ống) = Hiệu giá IS (30 IU/ống) × (Tỷ số ED_{50} IS / ED_{50} ứng viên) × hệ số pha loãng tương ứng

2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng Excel tính giá trị trung bình nhân, độ lệch chuẩn (SD) của công hiệu mẫu chuẩn, khoảng tin cậy 95%, giới hạn trên và giới hạn dưới của hiệu giá mẫu chuẩn.

• Tổng hợp kết quả các lần thử bằng trung bình nhân (geometric mean) hiệu giá, tính hệ số biến thiên hình học (%GCV) và khoảng tin cậy 95%.

• Tiêu chí chấp nhận sơ bộ: %GCV giữa các lần thử nên < 50% (theo ngưỡng SOP nội bộ) trước khi chấp nhận giá trị hiệu giá.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả thiết lập mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại

3.1.1. Kiểm tra đặc tính lô dự tuyển ERIG, trước khi tiến hành đưa vào sản xuất lô mẫu chuẩn dự tuyển [2].

Bảng 1. Kết quả kiểm định chất lượng lô huyết thanh kháng dại ERIG

Tiêu chí	Tiêu chuẩn chấp nhận (TCCS)	Kết quả
Vô trùng	Không có sự phát triển của vi sinh vật sau 14 ngày theo dõi	Đạt
Protein	≤ 150 mg/ml	30,73 mg/ml
Hiệu giá		386,47 IU/ml

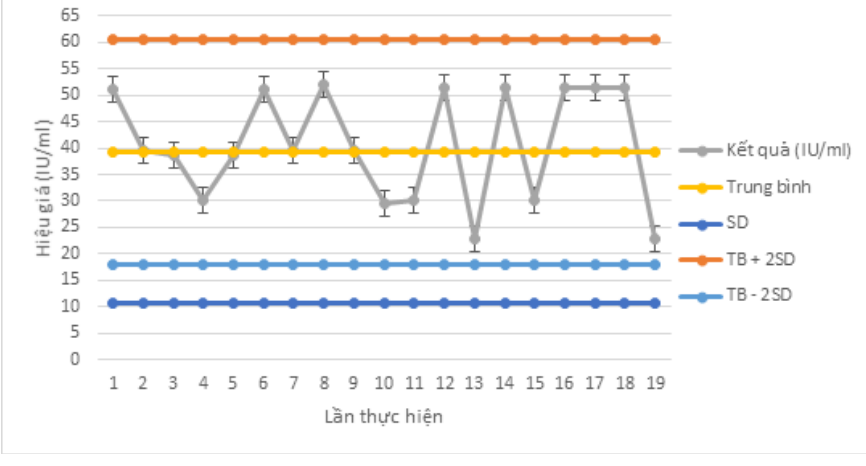
Sau khi có kết quả của lô huyết thanh kháng dại ERIG tiến hành xử lý pha loãng mẫu trong đệm glycerol 99,99% để đưa về nồng độ mẫu chuẩn dự kiến ≥ 30 IU/ml và nồng độ glycerol cuối cùng ≥ 50%.

Bảng 2. Kết quả kiểm định chất lượng mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01

Tiêu chí	Tiêu chuẩn chấp nhận (TCCS)	Kết quả
Vô trùng	Không có sự phát triển của vi sinh vật sau 14 ngày theo dõi	Đạt
Protein	≤ 150 mg/ml	2,37 mg/ml
Hiệu giá		39,18 IU/ml

***3.1.2.** Kết quả nối chuẩn với mẫu chuẩn huyết thanh kháng dại quốc tế RAI - 30 IU/ml*

Để nối chuẩn với mẫu chuẩn huyết thanh kháng dại quốc tế RAI, lô RIVAC đã được kiểm tra hiệu giá 19 lần. Thử nghiệm kiểm tra hiệu giá được thực hiện song song với mẫu chuẩn quốc tế RAI – 30 IU/ml.



Hình 3. Kết quả nối chuẩn mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01 với mẫu chuẩn WHO-RAI

19 kết quả thu được đều nằm trong giới hạn GM ± 2SD, xác định được giá trị hiệu giá trung bình của lô mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01 là 39,18 IU/ml (giới hạn trên: 60,36 IU/ml, giới hạn dưới: 17,99 IU/ml), với %CV là 27,03%.

3.2. Kết quả nghiên cứu tính ổn định hiệu giá trung hòa của mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại lô RIVAC-01 sau sản xuất 6 tháng.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu tính ổn định mẫu chuẩn dự thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01

Chỉ tiêu	T^0 01/2026	1 tháng 02/2026	2 tháng 03/2026	3 tháng 04/2026	6 tháng 07/2026
Hiệu giá (IU/ml)	39,18	39,50	29,30	30,00	39,50

Trong nghiên cứu tính ổn định chúng tôi tiến hành đánh giá lô mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01 với mẫu chuẩn huyết thanh kháng dại quốc tế RAI – 30 IU/ml. Kết quả hiệu giá trung hòa giữa các lần thực hiện trên bảng 3 cho thấy hiệu giá trung hòa của các mẫu lặp lại và giá trị trung bình đều nằm trong khoảng GM ± 2SD. Đảm bảo tính ổn định sau sản xuất 6 tháng.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã thiết lập thành công lô mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại (RIVAC-01) với số lượng 514 ống đạt hiệu giá trung bình là 39,18 IU/ml (giới hạn trên 60,36 IU/ml, giới hạn dưới 17,99 IU/ml). Sau 6 tháng bảo quản, RIVAC-01 vẫn đảm bảo độ ổn định và tính đồng nhất theo thời gian. RIVAC-01 đạt đầy đủ các tiêu chuẩn kỹ thuật về hiệu giá và độ ổn định, đủ điều kiện để sử dụng làm mẫu chuẩn thứ cấp trong kiểm định chất lượng huyết thanh kháng dại sản xuất tại IVAC.

Tính ổn định của mẫu chuẩn thứ cấp huyết thanh kháng dại RIVAC-01 được tiếp tục theo dõi theo thời gian sử dụng cho đến khi hiệu giá nằm ngoài GM ± 2SD.

Tài liệu tham khảo

[1] National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Second WHO International Standard for Anti-Rabies Immunoglobulin RAI. Poters Bar: NIBSC; [n.d.].

[2] Bộ Y tế. Dược Điển Việt Nam V. Tập 2. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2018. tr. PL368, PL377.

[3] Vân TNT. Quy trình sản xuất chủng CVS đông băng và xác định liều LD50 của chủng. Nha Trang: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC); 2024.

[4] World Health Organization. WHO Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. Geneva: World Health Organization; 2011. WHO/IVB/11.03.

[5] World Health Organization. WHO Guidelines for rabies pre- and post-exposure prophylaxis. Geneva: World Health Organization; 2007. WHO/TRS/941.