



RESEARCH AND DEVELOPMENT OF A PROCEDURE TO TEST THE EFFICACY OF ACELLULAR PERTUSSIS BY CHALLENGE METHOD IN MICE AT NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINES AND BIOLOGICALS

Bui Thi Kim Xuyen^{1*}, Nguyen Phuong Lien¹, Le Thi Hoang Yen¹, Vu Duy Dung¹,
Do Khanh Linh¹, Nguyen Thi Kim Ngan¹, Ngo Thi Hoa¹

¹ National Institute for Control of Vaccine and Biologicals,

Received June 5th

Accepted July 7th

Abstract

Background/Purpose: In quality control of pertussis vaccines, efficacy testing is an important test. Acellular pertussis vaccine is preferred because of its safety. However, in Vietnam, there is still no specific testing procedure for this test. So the research team proceeded to develop this test procedure using the challenge method on ICR mice.

Methods: The study applied the procedure to the potency test of pertussis acellular vaccine by the challenge method on ICR mice. The potency tests were repeated 5 independent times and were performed in parallel with the international reference standard vaccine (JN1H-3), known value potency units (34 IU/vial), and the samples pertussis acellular vaccine.

Results: Research results show that the average potency value of acellular pertussis vaccine through 05 trials is (76.72 IU/ml), and the results value of the trials is within $\pm 2SD$, which meets the requirements of WHO TRS No.979 and Vietnam Pharmacopoeia version V for pertussis acellular vaccine.

Conclusion: Developed a process to test the effectiveness of acellular pertussis vaccine by challenge method on mice ICR, acellular pertussis vaccine meeting WHO standards, and Vietnam Pharmacopoeia V.

Keywords: *Pertussis acellular vaccine, Potency of pertussis acellular*

* Corresponding author,
E-mail address: xuyenbk.nicvb@gmail.com,
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.32>

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN QUY TRÌNH KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU HO GÀ VÔ BÀO BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỬ THÁCH TRÊN CHUỘT NHẤT TẠI VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ

Bùi Thị Kim Xuyên^{1*}, Nguyễn Phương Liên¹, Lê Thị Hoàng Yến¹, Vũ Duy Dũng¹,
Đỗ Khánh Linh¹, Nguyễn Thị Kim Ngân¹, Ngô Thị Hoa¹

¹ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 5 tháng 6 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 7 tháng 7 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Trong kiểm tra chất lượng vắc xin ho gà, thử nghiệm kiểm tra công hiệu là thử nghiệm quan trọng. Vắc xin ho gà vô bào được lựa chọn sử dụng nhiều hơn vì tính an toàn của nó. Tuy nhiên, ở Việt Nam vẫn chưa có quy trình kiểm định cụ thể cho thử nghiệm này. Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình kiểm định thử nghiệm này bằng phương pháp thử thách trên chuột ICR.

Phương pháp: Nghiên cứu áp dụng quy trình kiểm định công hiệu vắc xin ho gà vô bào bằng phương pháp thử thách trên chuột nhất ICR và thẩm định thử nghiệm qua 5 lần thử nghiệm độc lập nhau. Các lần thử nghiệm được thực hiện song song với vắc xin mẫu chuẩn quốc tế (JN1H-3) đã biết trước đơn vị công hiệu (34 IU/ống) và vắc xin mẫu thử.

Kết quả: Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị công hiệu trung bình vắc xin ho gà vô bào qua 05 lần thử nghiệm là (76,72 IU/ml), các giá trị kết quả của các lần thử nghiệm đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn WHO TRS No.979 và Dược điển Việt Nam V cho vắc xin Ho gà vô bào.

Kết luận: Xây dựng được quy trình kiểm định công hiệu vắc xin ho gà vô bào bằng phương pháp thử thách trên chuột nhất ICR, vắc xin ho gà vô bào đạt tiêu chuẩn WHO và Dược điển Việt Nam V.

Từ khóa: vắc xin ho gà vô bào, công hiệu ho gà vô bào

1. Đặt vấn đề

Ho gà là bệnh truyền nhiễm khắp nơi trên thế giới vì tính chất dễ lây lan và có thể xảy ra quanh năm. Vắc xin Ho gà có vai trò rất lớn trong việc ngăn chặn bệnh ho gà [4]. Hiện nay, có hai loại vắc xin đang được sử dụng đó là vắc xin ho gà toàn tế bào và vắc xin ho gà vô bào. [4]

Cũng như các vắc xin khác, lớn hai tiêu chuẩn cơ bản nhất của vắc xin ho gà là an toàn và hiệu lực. Vắc xin có hiệu lực là vắc

xin gây được miễn dịch ở mức độ cao và tồn tại trong một thời gian dài. Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới WHO TRS No.979 và Dược điển Việt Nam V, vắc xin ho gà trước khi sử dụng phải được kiểm tra các tiêu chuẩn như: Cảm quan, nhận dạng, công hiệu, tính chất vật lý, an toàn chung, an toàn đặc hiệu ho gà, vô khuẩn...[3][9][11].

Trong kiểm tra chất lượng vắc xin ho gà, thử nghiệm kiểm tra công hiệu là thử nghiệm quan trọng. Vắc xin ho gà vô bào được lựa chọn sử dụng nhiều hơn vì tính an toàn của nó. Tuy nhiên, ở Việt Nam vẫn chưa có quy trình kiểm định cụ thể cho thử nghiệm này.

* Tác giả liên hệ.

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

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.32>

Việc kiểm định chất lượng vắc xin ho gà vô bào cũng đã được tiến hành ở rất nhiều nước như Pháp, Nhật,...[5][12]. Trên thế giới hiện nay có hai phương pháp đang được sử dụng chủ yếu là thử thách trên chuột nhắt và chuẩn độ bằng phương pháp ELISA [5][10].

Với điều kiện hiện tại của Viện, phương pháp thử thách trên chuột là phương pháp tối ưu nhất. Trước đây, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thử trên giống chuột Swiss nhưng không có đáp ứng; sau khi chuyển sang thử nghiệm trên giống chuột ICR thì nhận thấy chúng có đáp ứng khá tốt đối với thử nghiệm này. Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình kiểm định thử nghiệm này bằng phương pháp thử thách trên chuột ICR.

1. Phương pháp nghiên cứu

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

- Đối tượng nghiên cứu là quy trình kiểm tra công hiệu vắc xin ho gà vô bào

- Địa điểm: Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định vắc xin Vi khuẩn và khoa Động vật thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

- Thời gian: Từ tháng 03/2020- 12/2020.

1.2. Vật liệu, hóa chất

1.2.1. Mẫu sử dụng trong nghiên cứu

- Mẫu chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu là vắc xin mẫu chuẩn Quốc tế ho gà vô bào JN1H-3 công hiệu 34 IU/ống, số lượng 10 ống.

- Mẫu thử: vắc xin mẫu chuẩn quốc gia ho gà vô bào dự tuyển, số lượng 10 ống.

- Chủng sử dụng là chủng Bordetella pertussis 18323 đồng bằng đã được Khoa Vi khuẩn sản xuất, số lượng 05 ống.

1.2.2. Vật tư và trang thiết bị

Pipet man, hood, máy lắc, ... Dụng cụ vô khuẩn: pipet nhựa, đầu côn các loại... còn

hạn sử dụng. Các môi trường cần dùng: nước muối sinh lý (NMSL) vô khuẩn, casein 1%.

1.2.3. Động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu là chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 13-17g/con, số lượng sử dụng là 950 con.

Mỗi lần thử nghiệm sử dụng 75 con cho vắc xin chuẩn và 75 con cho vắc xin thử chia đều vào 3 độ pha (mỗi độ pha 25 con), 40 con sử dụng để kiểm chứng độc lực của chủng thử thách.

1.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm in vivo

1.4. Phương pháp nghiên cứu:

Nhóm nghiên cứu thực hiện 05 lần trên mẫu chuẩn Quốc tế và vắc xin mẫu thử. Mẫu chuẩn sử dụng là mẫu chuẩn Quốc tế đã biết trước công hiệu trên chuột nhắt là 34IU/ ống do NIBSC sản xuất, mẫu thử là vắc xin mẫu chuẩn quốc gia ho gà vô bào dự tuyển. Mẫu chuẩn quốc tế đã biết trước công hiệu và được coi là ổn định. Các lần thực hiện kiểm định cùng phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm và sử dụng cùng một thiết bị. Vắc xin mẫu chuẩn Quốc tế và mẫu thử được pha loãng bậc 5. Thực hiện 05 lần thử nghiệm (5 ngày khác nhau), thực hiện bởi các nghiên cứu viên và các kỹ thuật viên trong khoa. Dùng phần mềm Excel để thống kê và tính toán các kết quả thu được bằng phần mềm Bioassay hoặc Whoprograme. Hệ số biến thiên của các kết quả thu được phải nằm trong khoảng từ 20-50% [7].

Cách xác định công hiệu của vắc xin mẫu chuẩn ho gà vô bào dự tuyển

a. Pha loãng mẫu

Vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử sau khi hoàn nguyên được pha loãng bậc 5 theo bằng nước muối sinh lý.

Vắc xin mẫu chuẩn quốc tế được pha loãng như sau

Độ pha	Công thức pha
A	2 ống + 20ml NMSL
B	5ml A + 20ml NMSL
C	5ml B + 20ml NMSL

Vắc xin mẫu chuẩn dự tuyển được pha loãng như sau

Độ pha	Công thức pha
A	2 ống + 25ml NMSL
B	5ml A + 20ml NMSL
C	5ml B + 20ml NMSL

b. Tiêm miễn dịch

- Tiêm miễn dịch cho các chuột với liều tiêm/ đường tiêm là 0,5ml/con/ổ bụng.

- Chuột sau khi tiêm miễn dịch được nuôi và theo dõi trong 21 ngày.

c. Tiêm thử thách

- Chủng ho gà 18323 đông băng được giữ ở nồng độ 10^{10} vi khuẩn/ml.

- Chủng được pha loãng sao cho liều thử thách đạt 5.10^4 vi khuẩn/0,02ml.

- Tiêm thử thách cho chuột với liều tiêm/ đường tiêm là 0,02ml/con/não. Theo dõi và đọc kết quả sống/chết sau 14 ngày.

Kết quả được tính bằng chương trình tính toán Bioassay hoặc Whoprograme.

Thử nghiệm có giá trị khi

+ Trong suốt thời gian miễn dịch cho đến ngày thử thách số chuột trong mỗi độ pha không được chết quá 6%.

+ Liều LD_{50} của chủng thử thách phải chứa 50-400 vi khuẩn [2][8]

2. Kết quả

2.1. Kết quả kiểm tra LD_{50} của chủng ho gà 18323

Sau khi thực hiện thử nghiệm công hiệu ho gà vô bào 5 lần độc lập cùng một

loại vắc xin mẫu chuẩn và cùng một loạt vắc xin mẫu thử, các lần thực hiện kiểm định cùng một phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm, sử dụng cùng một thiết bị [5] cho kết quả như sau

Kết quả LD_{50} của chủng thử thách được tổng hợp ở bảng dưới đây:

Bảng 1: LD_{50} của chủng thử thách

Lần thử nghiệm	Ngày thực hiện	LD_{50} (vi khuẩn)
1	20/07-24/08/2020	215,34
2	27/07-31/08/2020	167,72
3	03/08-07/09/2020	264,40
4	05/08-09/09/2020	294,80
5	24/08-28/09/2020	255,73
Tiêu chuẩn		50-400

LD_{50} của chủng thử thách của các lần thử nghiệm đều chứa số vi khuẩn nằm trong khoảng cho phép là từ 50-400 vi khuẩn.

2.2. Kết quả thử nghiệm công hiệu vắc xin ho gà vô bào 05 lần thực hiện

Thực hiện 05 lần thử nghiệm, kết quả công hiệu được tổng hợp trong bảng dưới đây:

Bảng 2: Kết quả công hiệu của các lần thử nghiệm

Lần thử nghiệm	Ngày thực hiện	Công hiệu (IU)
1	20/07-24/08/2020	62,37
2	27/07-31/08/2020	64,91
3	03/08-07/09/2020	88,12
4	05/08-09/09/2020	69,24
5	24/08-28/09/2020	98,97
Trung bình		76,72
SD		16,02
CV		20,87%

Kết quả của 5 kết quả độc lập được tính toán và thống kê ở bảng trên, các kết quả thu được đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$.

4. Bàn luận

Từ các kết quả cho thấy qua 5 lần thử nghiệm độc lập, thực hiện kiểm định cùng một phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm, sử dụng cùng một thiết bị đều xác định được

Giá trị LD_{50} của chủng thử thách của các lần thử nghiệm nằm trong khoảng cho phép từ 80-400 vi khuẩn. Các thử nghiệm này đều đạt yêu cầu về điều kiện của chủng thử thách.

Trong suốt thời gian miễn dịch cho đến ngày thử thách số chuột trong mỗi độ pha không chết quá 6%.

Các thử nghiệm này đều đạt có giá trị.

Kết quả của 5 kết quả độc lập được tính toán, các kết quả thu được đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$. Hệ số biến thiên CV của các kết quả thử nghiệm là 20,87%, đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian của các kết quả thử nghiệm.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị công hiệu trung bình vắc xin ho gà vô bào qua 05 lần thử nghiệm là (76,72 IU/ml), các giá trị kết quả của các lần thử nghiệm đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn WHO TRS No.979 và Dược điển Việt Nam V cho vắc xin Ho gà vô bào.

References

[1] Bùi Thị Kim Xuyên “ Quy trình kiểm định vắc xin ho gà toàn tế bào”, Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. 2018.

[2] Bùi Thị Kim Xuyên, “ Quy trình kiểm định vắc xin ho gà vô bào”, Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. 2021.

[3] Dược điển Việt Nam V, “Vắc xin phối hợp bạch hầu, uốn ván, ho gà vô bào (DTaP) hấp phụ”, 2017, tr 1004- 1007

[4] <https://vncdc.gov.vn/can-nhan-thuc-dung-ve-hai-loai-vac-xin-quinvaxem-va-pentaxim-nd14238.html>.

[5] <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/pertussis-vaccine>

[6] <https://yte123.com/benh-ho-ga/>

[7] Nguyễn Lê Huyền Trang, “Thẩm định thử nghiệm”, Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 2015.

[8] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, “Hướng dẫn đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng tối thiểu của vắc xin và sinh phẩm y tế tại Việt Nam”, NXB ĐHQG Hà Nội, 2019, tr 425-427.

[9] WHO, Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities, Technical Report Series No. 978, Annex 2, 2010.

[10] WHO, Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, Technical Report Series No. 979, Annex 4, 2013

[11] WHO, International Recommendations, Guidelines and other matters related to the manufacture and quality control of biologicals, Technical Report Series No.979,2013, p14-15

[12] Yoshinobu Horiuchi, Quality control of Diphtheria Tetanus Acellular Pertussis Combined (DTaP) Vaccines in Japan, NIID, 2001.