

Sản xuất kháng huyết thanh chuẩn Viêm não Nhật Bản chủng Nakayama sử dụng cho kiểm định chất lượng vắc xin

Produce Japanese Encephalitis standard antiserum of strain Nakayama for vaccine quality control

Nguyễn Thị Mai Hương*, Phạm Văn Hùng, Ngô Phi Phương, Nguyễn Thị Lý, Nguyễn Thị Hà, Trần Thị Phương
Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nguyen Thi Mai Huong*, Pham Van Hung, Ngo Phi Phuong, Nguyen Thi Ly, Nguyen Thi Ha, Tran Thi Phuong
National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

TÓM TẮT

Vắc xin Viêm não Nhật Bản (VNNB) đã góp phần đẩy lùi bệnh Viêm não Nhật Bản ở trẻ nhỏ qua chiến dịch tiêm chủng quốc gia. Để đánh giá chất lượng hiệu quả bảo vệ của vắc xin Viêm não Nhật Bản cần có kháng huyết thanh chuẩn sử dụng làm chứng dương thực hiện song song cùng mẫu thử trong thử nghiệm. Kháng huyết thanh chuẩn được sản xuất bằng cách tiêm 2 liều vắc xin mẫu chuẩn quốc gia trên chuột nhắt trắng 28 ngày tuổi, trọng lượng 11-13g. Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB). Sau khi tiêm 14 ngày lấy máu tách huyết thanh, đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ song song cùng kháng huyết thanh chuẩn quốc tế từ NIBSC và kháng huyết thanh từ VABIOTECH sản xuất. Lô kháng huyết thanh 0118 được sản xuất có hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ 1,74 đảm bảo tiêu chuẩn làm chứng dương cho thực hiện thử nghiệm xác định hiệu giá vắc xin Viêm não Nhật Bản.

Từ khóa: *Kháng huyết thanh Viêm não Nhật Bản, Chứng dương Viêm não Nhật Bản, kháng huyết thanh chuẩn.*

ABSTRACT

Japanese Encephalitis vaccine has contributed to repel Japanese Encephalitis in young children in the national vaccination campaign. To qualitatively evaluate the protective efficiency of Japanese Encephalitis vaccine, a standard antiserum used as a positive control was performed in parallel with testing samples. A study was organized at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB) as following. Anti-sera were produced by 2-dose-injection of national standard vaccine to 28-day-old white mice, weighing 11-13g. After blood collection and serum separation, the PRNT₅₀ neutralizing antibody potency was evaluated in parallel with international standard antisera from NIBSC and antisera from Vabiotech manufacturer. Antiserum lot 0118 was produced with a neutralizing antibody potency PRNT₅₀ of 1.74 to ensure criteria of a positive control standard for performing Japanese Encephalitis vaccine potency test.

Keywords: *Japanese Encephalitis antiserum, Japanese Encephalitis positive control, standard antiserum*

*Tác giả: Nguyễn Thị Mai Hương
ĐC: Số 1 Nghiêm Xuân Yêm, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội
Điện thoại: 0902589289
Email: maihuong@nicvb.org.vn

*Corresponding Investigator: Nguyen Thi Mai Huong
Address: No. 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim, Hoang Mai, Hanoi
Phone: 0902589289

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Viêm não Nhật Bản được phát hiện ở Việt Nam gần nửa thế kỷ, có ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe của trẻ em sống trong vùng lưu hành dịch. Từ khi có vắc xin Viêm não Nhật Bản số ca mắc bệnh đã giảm đáng kể [1]. Viện Kiểm định Quốc gia đánh giá chất lượng Vắc xin Viêm não Nhật Bản theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới (TCYTG), đảm bảo tính an toàn và hiệu quả cho tiêm chủng [2]. Trong đó, thử nghiệm xác định công hiệu vắc xin VNNB đặc biệt rất quan trọng, thử nghiệm này yêu cầu phải tiến hành gây miễn dịch trên động vật thí nghiệm và thử thách với chủng gây bệnh trên tế bào cảm thụ [2], [3]. Do đó, để khẳng định độ tin cậy của kết quả thực hiện thì không thể thiếu kháng huyết thanh chuẩn, trong khi đó hiện nay có rất nhiều nhà sản xuất khác nhau từ các quốc gia khác nhau, việc yêu cầu nhà sản xuất cung cấp kháng huyết thanh chuẩn sẽ mất nhiều thời gian và công việc thực hiện không chủ động được. Mẫu chuẩn quốc gia VNNB đã được sản xuất và đảm bảo độ ổn định trong nhiều năm qua. Việc sản xuất kháng huyết thanh chuẩn từ mẫu chuẩn quốc gia phục vụ cho công tác kiểm định là điều cần thiết. Vì thế chúng tôi thực hiện đề tài: “Sản xuất kháng huyết thanh chuẩn Viêm não Nhật Bản chủng Nakayama sử dụng cho kiểm định chất lượng vắc xin” với mục tiêu nghiên cứu sau:

Sản xuất 100 ống kháng huyết thanh chuẩn Viêm não Nhật Bản chủng Nakayama

Đánh giá chất lượng của kháng huyết thanh chuẩn.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu: Kháng huyết thanh chuẩn VNNB chủng Nakayama

2.2 Địa điểm và Thời gian nghiên cứu:

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Động vật thực nghiệm và khoa Kiểm định vắc xin Vi rút Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Thời gian thực hiện từ tháng 6/2017 đến tháng 12/2018

2.3 Thiết kế nghiên cứu:

I. INTRODUCTION

Japanese Encephalitis (JE) has been found in Viet Nam for almost half of century that caused a serious burden to children health. Since the presence of JE vaccine, number of infections decreased significantly [1]. JE vaccine has been evaluated at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB) according to recommendations of WHO to ensure safety and efficacy of immunization [2]. Especially, potency test of JE vaccine is very important and it is carried out by immunization on experimental animal and challenged with virulent strain on receptor cells [2],[3]. Therefore, to confirm reliability of experimental results, it is necessary to have standard antiserum, however, there are many manufacturers from different countries, it will take a lot of time to request them to send their standard antiserum. National JE standard vaccine was produced and stable for many years, therefore it is necessary to produce standard antiserum from national standard vaccine that used in quality control. We start the project “Standard Japanese Encephalitis antiserum production of Nakayama strain using in quality control” with these objectives:

Produce 100 vials of standard JE antiserum of Nakayama strain

Evaluate the quality of standard antiserum.

II. METHODOLOGY

2.1 Objectives: Standard JE antiserum of Nakayama strain

2.2 Location and duration:

Location: Experimental animal Dept. and Quality control of Viral vaccine Dept., NICVB.

Duration: 6/2017 – 12/2018

2.3 Research design:

- Produce positive JE antiserum of Nakayama strain

Dilute national standard vaccine into

- Sản xuất kháng huyết thanh chứng dương chủng Nakayama –VNNB

Pha loãng vắc xin mẫu chuẩn quốc gia theo các độ pha khác nhau, sau đó tiêm miễn dịch trên chuột nhắt trắng. Lấy máu đánh giá hiệu giá kháng thể của các độ pha trên tế bào BHK21 và chọn lựa độ pha tối ưu để gây miễn dịch. Sau đó xác định độ pha phù hợp của kháng huyết thanh sau sản xuất. Kháng huyết thanh sẽ được sản xuất theo quy trình xây dựng sau khi nghiên cứu.

- Đánh giá chất lượng của kháng huyết thanh chuẩn.

Tiến hành đánh giá chất lượng dựa trên thử nghiệm xác định tính vô khuẩn bằng phương pháp trực tiếp và hiệu giá bằng phương pháp xác định kháng thể trung hòa làm giảm đám hoại tử ($PRNT_{50}$) sau khi sản xuất, sau sản xuất 6 tháng và 12 tháng.

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

Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Viêm não Nhật Bản MCQG/01: 10 ống

Kháng huyết thanh chuẩn Viêm não Nhật Bản NIBSC 02/182: 04 ống

Kháng huyết thanh Viêm não Nhật Bản VABIOTECH lô PC-0116

Chủng thử thách Viêm não Nhật Bản Nakayama mã số WN-0115: 10 ống

Tế bào BHK21: Được cấy chuyển 5 đời trước khi đưa vào thử nghiệm.

Chuột nhắt trắng Swiss: 100 con trọng lượng 11-13g, thể trạng khỏe mạnh, nhanh nhẹn, lông sáng mượt.

2.5 Phân tích và xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm excel để tính kết quả hiệu giá của kháng huyết thanh chứng dương.

- Tính giá trị SD, $TB \pm 2SD$, CV đánh giá độ ổn định của kháng huyết thanh.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Sản xuất kháng huyết thanh chuẩn chủng Nakayama -Viêm não Nhật bản

3.1.1 Kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa của các độ pha miễn dịch

serial dilution, then inject to white mice. Collect mice's blood then evaluate antibody potency on BHK-21 cells to choose optimal dilution. After that, determine suitable dilution to produce antiserum. Antiserum will be produced following procedure after this research.

- Evaluate the quality of standard antiserum

Evaluate quality based on criteria of sterility by direct method and potency by neutralizing antibody potency ($PRNT_{50}$) method after production, 6 months and 12 months.

2.4 Materials

National standard JE vaccine lot MCQG/01: 10 vials

Standard JE antiserum NIBSC 02/182: 04 vials

JE antiserum of VABIOTECH lot PC-0116

JE Nakayama viral strain lot WN-0115: 10 vials

BHK21 cell: Passage 5 times before test.

Swiss white mice: 100 mice weighing 11-13g, healthy, smooth feather.

2.5 Data analysis

- Use excel to calculate potency of positive antiserum.

- Calculate SD, $GM \pm 2SD$, CV to evaluate the stability of antiserum.

III. RESULTS

3.1. Production of standard JE antiserum of Nakayama

3.1.1 Titer results of neutralizing antibody of immunized dilution

Procedure was constructed by determination of immunized dose. Research team immunized 3 dilutions of national standard vaccine on mice. After blood collection and serum separation, research team evaluated neutralizing antibody titer for each immunized dilution. Label serum as R1, R2, R3, and divide into 2 groups A and B.

Bảng 3.1.1 Kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa của các độ pha miễn dịch
Table 3.1.1 Result of neutralizing antibody titer for each immunized dilution

Mẫu KHT Sample	Độ pha 1 Dilution 1		Độ pha 2 Dilution 2		Độ pha 3 Dilution 3	
	R1A	R1B	R2A	R2B	R3A	R3B
1/80	2,24	2,29	2,22	2,12	1,46	1,42
1/160	2,27	2,33	2,39	2,34	1,67	1,65
Hiệu giá TB/mẫu Average titer/ sample	2,26	2,31	2,30	2,23	1,56	1,54
Hiệu giá TB/ nhóm Average titer/ group	2,29		2,27		1,55	

Xây dựng quy trình sản xuất cần xác định được cụ thể liều gây đáp ứng miễn dịch. Nhóm nghiên cứu tiến hành tiêm miễn dịch trên 3 độ pha vắc xin mẫu chuẩn quốc gia khác nhau.

Sau khi lấy máu, tách huyết thanh nhóm thực hiện đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa của các độ pha miễn dịch. Đánh mã số các mẫu huyết thanh theo thứ tự R1, R2, R3, mỗi mẫu chia 2 nhóm A, B.

Theo kết quả trên bảng 3.1.1 cho thấy hiệu giá kháng thể trung hòa với giá trị lần lượt độ pha 1: 2,29; độ pha 2: 2,27; độ pha 3: 1,55. Chúng tôi chọn lựa độ pha 2 để tiếp tục thực hiện các bước tiếp theo.

3.1.2 Kết quả xác định độ pha đóng ống của kháng huyết thanh sau sản xuất

Kháng huyết thanh ở độ pha 2 có hàm lượng hiệu giá kháng thể cao, do đó để đảm bảo số

According to Table 3.1.1, the result of neutralizing antibody titer for immunized dilution respectively 2,29; 2,27; 1,55. We chose Dilution 2 for next step.

3.1.2 Volume determination of dilution of antiserum after production

Antiserum at Dilution 2 had high antibody content, therefore to ensure to have enough volume for using and stability, dilution ratio should be determined.

Antiserum after production was diluted to 1/15; 1/20; 1/25 and titers of antibody were respectively 1,77; 1,64; 1,41 according to Table 3.1.2. We chose dilution 1/15 as dilution ratio for antiserum before filling.

Bảng 3.1.2 Kết quả hiệu giá kháng thể các độ pha đóng ống của kháng huyết thanh sản xuất
Table 3.1.2 Titer antibody result of antiserum filled dilutions

Mẫu KHT Sample	Độ pha 1/15 Dilution 1/15			Độ pha 1/20 Dilution 1/20			Độ pha 1/25 Dilution 1/25		
	Lần 1 1st time	Lần 2 1st time	Lần 3 1st time	Lần 1 1st time	Lần 2 1st time	Lần 3 1st time	Lần 1 1st time	Lần 2 1st time	Lần 3 1st time
1/80	1,88	1,84	1,66	1,69	1,58	1,64	1,28	1,30	1,28
1/160	1,75	1,68	1,87	1,60	1,62	1,69	1,57	1,46	1,56
PRNT50	1,77			1,64			1,41		

lượng cần sử dụng và có tính ổn định cần phải xác định hệ số pha loãng phù hợp.

Kháng huyết thanh sau sản xuất được pha loãng theo các độ pha sau: 1/15; 1/20; 1/25 và hiệu giá kháng thể được xác định tương ứng là: 1,77; 1,64; 1,41 theo như kết quả bảng 3.1.2. Chúng tôi chọn 1/15 làm hệ số pha loãng kháng huyết thanh trước khi đóng ống.

3.1.3 Sản xuất kháng huyết thanh chuẩn chủng Nakayama Viêm não Nhật Bản

Nhóm nghiên cứu tiến hành sản xuất kháng huyết thanh chứng dương theo quy trình tóm tắt như sau: Tiêm 2 liều miễn dịch trên 30 con chuột nhắt trắng, và sử dụng 4 lọ vắc xin mẫu chuẩn quốc gia Viêm não Nhật Bản. Sau đó pha loãng toàn bộ kháng huyết thanh thu được với dung dịch pha loãng MEM 2% FBS và đóng 140 ống kháng huyết thanh có thể tích 0,5ml, bảo quản trong điều kiện -20°C . Trong đó 40 ống sử dụng làm nghiên cứu đánh giá chất lượng còn lại 100 ống sử dụng làm ngân hàng kháng huyết thanh chuẩn phục vụ công tác kiểm định. Đặt tên lô kháng huyết thanh chuẩn sau sản xuất là “Chứng dương VNNB 0117”.

3.2 Đánh giá chất lượng của kháng huyết thanh chuẩn

3.2.1 Kết quả thử nghiệm vô trùng của kháng huyết thanh VNNB0117

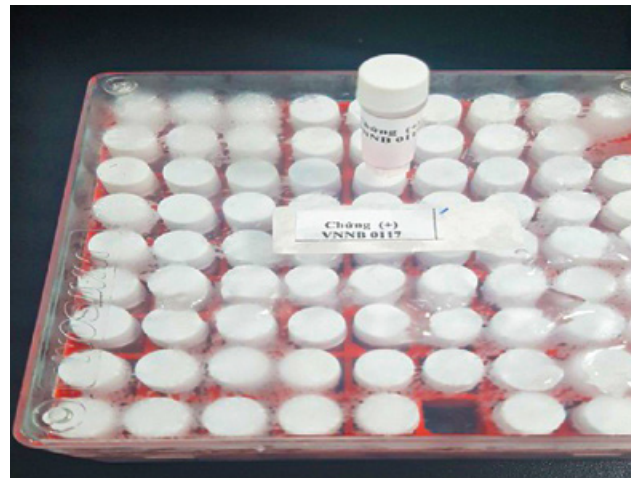
Thử nghiệm kiểm tra vô trùng thực hiện trên 2 loại môi trường Fluid Thioglycolate Medium (FTM) và Tryptic Soy Broth (TSB), kết quả được xác định sau 14 ngày nuôi cấy.

3.2.2 Kết quả thử nghiệm hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất

Kháng huyết thanh sau khi được đóng ống và tiến hành thực hiện xác định hiệu giá kháng thể trung hòa trên 3 ống riêng rẽ và thực hiện song song cùng với mẫu chuẩn quốc tế và kháng huyết thanh chứng dương của VABIOTECH.

Hiệu giá kháng thể trung hòa của mỗi ống lần lượt là 1,76; 1,74; 1,72 và có giá trị trung bình 1,74. Bên cạnh đó hiệu giá của mẫu chuẩn quốc tế: 2,63; kháng huyết thanh chứng dương của Vabiotech: 1,56.

3.1.3 Production of standard JE antiserum of Nakayama strain



Hình 3.1.3. Kháng huyết thanh chứng dương sản xuất tại NICVB

Figure 3.1.3. Positive antiserum produced at NICVB

Research team started producing positive antiserum by this below procedure: Inject 2 doses on 30 white mice and use 4 vials of national JE vaccine then dilute all antiserum with diluent MEM 2% FBS and fill 0,5 ml in each antiserum vials, store at -20°C . 40 vials were used for quality control while 100 vials were stored as standard antiserum stock for quality control. Lot of standard antiserum was called “Positive JE control VNNB 0117”.

3.2 Quality evaluation of standard antiserum

3.2.1 Sterility test of antiserum VNNB0117

Stability test was carried out in 2 types of media: Fluid Thioglycolate Medium (FTM) and Tryptic Soy Broth (TSB), result was recorded after 14 days of cultivation.

3.2.2 Results of neutralizing antibody potency PRNT₅₀ of antiserum after production

Antiserum after filling was tested to determine titer of neutralizing antibody of 3 separated vials, international standard antiserum and positive antiserum from Vabiotech.

Neutralizing antibody titer of each vial were respectively 1,76; 1,74; 1,72 and the average value

Bảng 3.2.1 Kết quả thử nghiệm vô trùng của kháng huyết thanh sản xuất tại NICVB
Table 3.2.1 Result of sterility test of antiserum production at NICVB

Tên môi trường Medium	Theo dõi mẫu thử nghiệm Sample monitoring					
	Ngày thứ 5 5th day		Ngày thứ 7 7th day		Ngày thứ 14 14th day	
	Tình trạng Statement	Đánh giá Results	Tình trạng Statement	Đánh giá Results	Tình trạng Statement	Đánh giá Results
FTM	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass
TSB	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm No presence of bacteria and fungi	Đạt Pass

3.2.3 Kết quả thử nghiệm hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất 6 tháng

Các ống kháng huyết thanh được bảo quản trong điều kiện -20°C cho đến khi thực hiện nghiên cứu tính ổn định sau sản xuất 6 tháng, thực hiện lặp lại 3 lần trên 3 ống riêng biệt và song song với kháng huyết thanh chứng dương của VABIOTECH.

was 1,74. Besides, titer of international standard antiserum was 2,63; and of positive antiserum from Vabiotech was 1,56.

3.2.3 Neutralizing antibody potency PRNT₅₀ of antiserum after 6 months

Antiserum vials were stored at -20 degree C until started experiment of stability after 6 months. The experiment was repeated 3 times

Bảng 3.2.2 Kết quả thử nghiệm hiệu giá của kháng huyết thanh sau sản xuất tại NICVB
Table 3.2.2 Result of antiserum potency after production at NICVB

	Tiêu chuẩn chấp thuận Criteria	KHT sản xuất NICVB Antiserum produced at NICVB			NIBSC	Vabiotech
		Lần 1 1st time	Lần 2 2nd time	Lần 3 3rd time		
1/80	Hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 1,5 Titer of neutralizing antibody ≥ 1,5	1,75	1,68	1,66	2,55	1,49
1/160		1,78	1,79	1,78	2,71	1,63
HG Titer		1,76	1,74	1,72	2,63	1,56
HGTB Average titer		1,74				

Theo bảng 3.2.4 có kết quả hiệu giá trung hòa giữa các lần thực hiện là 1,77; 1,74; 1,73 và giá trị hiệu giá trung bình 1,75 với CV: 1,08%, SD: 0,018 khoảng giá trị tin cậy (1,71 ÷ 1,78). Giá trị hiệu giá trung hòa của kháng huyết thanh chứng dương của VABIOTECH là 1,57.

3.2.4 Kết quả thử nghiệm hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất 12 tháng

Cũng tương tự như trên, kết quả tính ổn định sau 12 tháng được thực hiện lặp lại 3 lần trên

for 3 separated vials and positive antiserum from VABIOTECH.

According to Table 3.2.4, the result of neutralizing antibody titers were respectively 1,77; 1,74; 1,73 and average titer was 1,75 with CV: 1,08%, SD: 0,018 and CI (1,71 ÷ 1,78). The value of neutralizing antibody titer of positive antiserum from VABIOTECH was 1,57.

3.2.4 Neutralizing antibody potency PRNT₅₀ of antiserum after 12 months

Bảng 3.2.3 Kết quả tính ổn định sau 6 tháng

Table 3.2.3 Stability result after 6 months

	Tiêu chuẩn chấp thuận Criteria	KHT sản xuất NICVB Antiserum produced at NICVB			Vabiotech
		Lần 1 1st time	Lần 2 2nd time	Lần 3 3rd time	
1/80	Hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 1,5	1,78	1,61	1,74	1,49
1/160		1,75	1,88	1,72	1,64
HG Titer		1,77	1,74	1,73	1,57
HGTB Mean	1,75				
SD	0,018				
TB±2SD Mean±2SD	Titer of neutralizing antibody ≥ 1,5	1,71 1,78			
CV		1,08%			

3 ống riêng biệt và song song với kháng huyết thanh chứng dương của VABIOTECH.

Kết quả hiệu giá trung hòa giữa các lần thực hiện được trình bày trên bảng 3.2.4 là 1,70; 1,71; 1,69 và

As same as above, stability test after 12 months was repeated 3 times on 3 separated vials and positive antiserum from VABIOTECH.

Bảng 3.2.4 Kết quả tính ổn định sau 12 tháng

Table 3.2.4 Stability result after 12 months

	Tiêu chuẩn chấp thuận Criteria	KHT sản xuất tại NICVB Antiserum produced at NICVB			Vabiotech
		Lần 1 1st time	Lần 2 2nd time	Lần 3 3rd time	
1/80	Hiệu giá kháng thể trung hòa $\geq 1,5$	1,65	1,64	1,59	1,48
1/160		1,75	1,79	1,79	1,59
HG Titer		1,70	1,71	1,69	1,53
HGTB Mean	1,70				
SD	0,01				
TB $\pm$ 2SD Mean $\pm$ 2SD	1,68 1,72				
CV	0,62%				

giá trị hiệu giá trung bình 1,70 với CV: 0,62%, SD: 0,01 khoảng giá trị tin cậy ($1,68 \div 1,72$). Giá trị hiệu giá trung hòa của kháng huyết thanh chứng dương của VABIOTECH là 1,53.

IV. BÀN LUẬN

4.1 Sản xuất kháng huyết thanh chuẩn chủng Nakayama – Viêm não Nhật bản

4.1.1 Kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa của các độ pha miễn dịch

Xác định liều gây đáp ứng miễn dịch phù hợp có sự ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả sản xuất. Các độ pha loãng của liều tiêm miễn dịch vắc xin Viêm não Nhật Bản được xây dựng và thực hiện nhằm mục đích xác định được độ pha phù hợp tạo được đáp ứng miễn dịch cao, đảm bảo chất lượng với chi phí thấp.

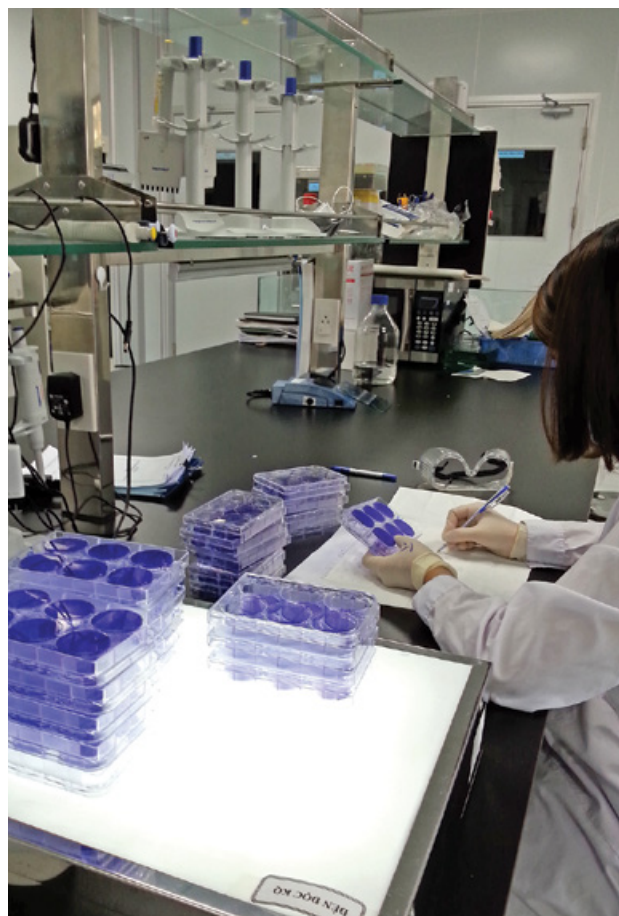
Theo kết quả bảng 3.1.1 cho thấy hiệu giá kháng thể trung hòa của các mẫu huyết thanh thu được, theo phương pháp PRNT₅₀ khi thực hiện thử thách với chủng Nakayama trên tế bào BHK 21 có giá trị đạt yêu cầu $\geq 1,5$ [3]. Tuy nhiên với kết quả của mẫu kháng huyết thanh của độ pha 1 thì sẽ cần phải sử dụng số lượng vắc xin mẫu chuẩn quốc gia lớn hơn gấp 3 lần so với độ pha 2 khi sản xuất, hơn nữa hiệu giá kháng huyết thanh thu được giữa độ pha 1 và độ pha 2 tương đương nhau. Còn độ pha 3 thì sẽ cần sử dụng số lượng chuột nhiều tương ứng với số ống muốn sản xuất, ngoài ra ở độ pha này giá trị hiệu giá gần sát với tiêu chuẩn cho phép, nó có thể sẽ bị ảnh hưởng đến độ ổn định của sản phẩm sau khi đóng ống. Vì vậy chúng tôi chọn lựa độ pha 2 với giá trị hiệu giá cao, không tốn nhiều vắc xin chuẩn quốc gia và chuột nhất trắng để thực hiện.

4.1.2 Kết quả xác định độ pha đóng ống của kháng huyết thanh sau sản xuất

Dựa trên cơ sở giá trị hiệu giá của kháng huyết thanh được tiêm miễn dịch từ độ pha được chọn > 2. Chúng tôi tiếp tục nghiên cứu xác định hệ số pha loãng của kháng huyết thanh phù hợp để có thể đóng ống với tiêu chí đảm bảo tính ổn định, số lượng và chất lượng, yêu cầu hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ $\geq 1,5$.

Vì vậy chúng tôi cân nhắc và chọn lựa pha loãng

The result of neutralizing antibody was showed in Table 3.2.4 which were 1,70; 1,71; 1,69 and the average value was 1,70 with CV: 0,62%, SD: 0,01 and CI ($1,68 \div 1,72$). The value of neutralizing antibody titer of positive antiserum from VABIOTECH là 1,53.



Hình 3.2.4. Kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀

Figure 3.2.4. Result of neutralizing antibody potency PRNT₅₀

IV. DISCUSSION

4.1 Produce standard JE antiserum of Nakayama

4.1.1 Neutralizing antibody potency of immunized dilution

Determine suitable dose for immunization had a huge affect to productivity. Serial dilution of immunized dose of JE vaccine was constructed to find an optional dilution that create high adapted immunization, quality ensurance with low cost.

According to Table 3.1.1, titer of neutralizing

mẫu theo như bảng 3.1.2, qua kết quả trên đó mẫu kháng huyết thanh được pha loãng 1/15 có hiệu giá cao nhất, tiếp đến là mẫu 1/20 và 1/25. Để đáp ứng các tiêu chí trên chúng tôi chọn lựa độ pha 1/15.

4.2 Đánh giá chất lượng của kháng huyết thanh chuẩn Viêm não Nhật Bản

Đánh giá chất lượng của kháng huyết thanh sau sản xuất rất quan trọng và tập trung chính vào 2 tiêu chí: hiệu giá trung hòa kháng thể và vô trùng.

4.2.1 Kết quả xác định tính vô trùng của kháng huyết thanh chuẩn sản xuất

Toàn bộ kháng huyết thanh chứng dương được đóng ống trong tủ cấy vô trùng. Căn cứ theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới về quy định thử nghiệm vô trùng trong sinh phẩm đối với cỡ mẫu nhỏ hơn 500 ống thì số lượng mẫu cần kiểm định ít nhất là 10 ống [4], hơn nữa do nhu cầu sử dụng nên lượng kháng huyết thanh sản xuất cũng không nhiều, vì thế chúng tôi chọn lựa ngẫu nhiên 10 ống thực hiện thử nghiệm vô trùng trên 2 môi trường FTM và TSB. Kết quả ở tất cả các ống nuôi cấy không có dấu hiệu xuất hiện vi khuẩn và nấm. Do đó có thể khẳng định kháng huyết thanh được sản xuất tại NICVB đảm bảo vô trùng.

4.2.2 Kết quả xác định hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất

Hiệu giá kháng thể trung hòa của kháng huyết thanh Viêm não Nhật Bản được xác định theo phương pháp PRNT₅₀ trên 2 độ pha 1/80 và 1/160 [5], giá trị được tính trung bình trên 3 lần lặp lại. Kết quả trên bảng 3.2.2 cho thấy giá trị hiệu giá giữa các lần thực hiện đều đạt yêu cầu $\geq 1,5$ và có phản ứng trung hòa làm giảm đám hoại tử ở cả 2 chứng dương NIBSC và VABIOTECH với hiệu giá 2,63 và 1,53. Các kết quả khẳng định thử nghiệm có giá trị và hoàn toàn tin cậy. Trên thực tế hiện nay khi xác định hiệu giá của vắc xin Viêm não Nhật bản tại NICVB vẫn đang sử dụng kháng huyết thanh chuẩn của nhà sản xuất cung cấp cho mỗi lô xuất xưởng. Các lô kháng huyết thanh từ phía nhà sản xuất VABIOTECH được sản xuất và đánh giá chất lượng ổn định, đảm bảo độ tin cậy. Do đó trong nghiên cứu của chúng tôi có sử dụng mẫu kháng huyết thanh của nhà sản xuất

antibody of antiserum by PRNT₅₀ reached to the criteria $\geq 1,5$ when they reacted with Nakayama strain on BHK-21 cell [3]. However, if we used antiserum of dilution 1, it needed triple number of national standard vaccine than dilution 2 while the titers of 2 dilution were approximately the same. For dilution 3, numbers of mice were increased corresponding to numbers of vials. More than that, titer value was close to upper limitation so it could affect to sterility after filling. Therefore, we chose dilution 2 with high potency, low numbers of national standard vaccine and mice.

4.1.2 Dilution determination of antiserum vials

Based on titer result of antiserum from selected dilution, we continued determining dilution ratio of antiserum for filling to ensure stability, quantity and quality of final antiserum vials with potency PRNT₅₀ $\geq 1,5$.

Therefore, we considered and selected dilution ratio as Table 3.1.2, and as the result, antiserum diluted with ratio 1/15 had the best potency, then were 1/20 and 1/25 samples. We chose dilution ratio 1/15 because it reached to all criteria.

4.2 Evaluate the quality of standard JE antiserum

Evaluation of quality of antiserum after production was very important and focus on 2 criteria: neutralizing antibody potency and sterility.

Sterility determination of standard produced antiserum

All positive antiserum was filled in vials in safety cabinet. According to recommendation of WHO about sterility test for biological products with quantity <500 vials, 10 vials would be used for quality control [4], moreover, due to usage demand, the quantity of produced antiserum was not much, so we used 10 vials for sterility test with 2 media FTM and TSB. There was no presence of bacteria and fungi in all vials, so antiserum produced at NICVB was sterile.

4.2.3 Potency of neutralizing antibody PRNT₅₀ of antiserum

VABIOTECH để so sánh song song khi nổi chuẩn với kháng huyết thanh quốc tế. Điều này giúp khẳng định hiệu giá kháng huyết thanh sản xuất tại NICVB có kết quả tương đương với nhà sản xuất, đảm bảo là chứng dương tin cậy trong xác định hiệu giá của vắc xin Viêm não Nhật Bản.

4.2.3 Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất 6 tháng

Trong nghiên cứu tính ổn định chúng tôi tiến hành thực hiện đánh giá song song cùng với kháng huyết thanh chuẩn của nhà sản xuất VABIOTECH, kháng huyết thanh chuẩn của nhà sản xuất có độ ổn định 3 năm và đảm bảo chất lượng để làm chứng dương trong thử nghiệm xác định hiệu giá kháng thể trung hòa giảm đám hoại tử PRNT₅₀. Trong nghiên cứu này chúng tôi không sử dụng mẫu chuẩn quốc tế do số lượng mẫu chuẩn quốc tế có hạn chế, hơn nữa trong thử nghiệm này không cần thiết phải nổi chuẩn quốc tế. Kết quả hiệu giá trung hòa giữa các lần thực hiện trên bảng 3.2.4 cho thấy hiệu giá trung hòa của các mẫu lặp lại và giá trị trung bình đều lớn hơn 1,5. Đảm bảo tính ổn định sau sản xuất 6 tháng.

4.2.4 Kết quả thử nghiệm hiệu giá kháng thể trung hòa PRNT₅₀ của kháng huyết thanh sau sản xuất 12 tháng

Kết quả hiệu giá trung hòa giữa các lần thực hiện được trình bày trên bảng 3.2.4 là 1,70; 1,71; 1,69 và giá trị hiệu giá trung bình 1,70 với CV: 0,62%, SD: 0,01 khoảng giá trị tin cậy (1,68 ÷ 1,72). Điều này khẳng định kháng huyết thanh chứng dương chủng Nakayama viêm não Nhật bản được sản xuất tại NICVB có tính ổn định hiệu giá 12 tháng trong điều kiện bảo quản -20°C.

V. KẾT LUẬN

Kháng huyết thanh chứng dương chủng Nakayama Viêm não Nhật bản được sản xuất tại NICVB đảm bảo chất lượng và có hiệu giá kháng thể trung hòa theo phương pháp PRNT₅₀ là 1,74 và có độ ổn định hiệu giá 12 tháng trong điều kiện bảo quản -20°C.

Potency of neutralizing antibody of JE antiserum was determined 3 times by PRNT50 method for 2 dilutions: 1/80 and 1/160 [5] to have average value. The result in Table 3.2.2 showed that titer value in each time was $\geq 1,5$ and reacted with positive control from NIBSC and VABIOTECH with titer of 2,63 and 1,53. The result was valid and significant. Currently, to determine JE vaccine potency at NICVB, standard antiserum from manufacturer is still used for each lot. Lots of antiserum from VABIOTECH was produced and evaluated stable quality, therefore, in our research, we used VABIOTECH antiserum to compare with international antiserum. It confirmed that titers of antiserum produced at NICVB and VABIOTECH were approximately the same, so it could be a significant positive control for JE vaccine quality control.

4.2.4 Potency of neutralizing antibody PRNT₅₀ of antiserum after 6 months production

In our stability research, we evaluated potency by PRNT₅₀ method of our antiserum in parallel with standard antiserum of VABIOTECH which had stability in 3 years as positive control. We did not use international standard sample because of limited vials. The result in Table 3.2.4 showed that the value of neutralizing antibody titer of each samples and the average titer was $>1,5$ to ensure the stability after 6 months.

4.2.4 Potency of neutralizing antibody PRNT₅₀ of antiserum after 12 months production

Potency of neutralizing antibodies showed in Table 3.2.4 were 1,70; 1,71; 1,69 and average potency was 1,70 with CV: 0,62%, SD: 0,01 and CI: 1,68 ÷ 1,72. It confirmed positive JE antiserum of Nakayama produced at NICVB had stable potency in 12 months under condition of -20°C.

V. CONCLUSION

Positive control JE antiserum against Nakayama strain produced at NICVB ensured quality and the potency was 1,74 by PRNT₅₀ method and remained stable during 12 months under the storage condition of -20°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huỳnh Phương Liên, *Vì rút viêm não Nhật Bản và vắc xin dự phòng*. Nhà xuất bản y học Hà Nội (2007)
2. WHO Technical Report Series No 963 Annex_1 “Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use” (Revised 2007)
3. Dược điển Việt Nam V, *Vắc xin Viêm não Nhật bản*, tr 1058-1059, nhà xuất bản y học (2018)
4. WHO Technical Report Series No. 530, annex 4 “General requirement for the sterility of biological substances”.
5. Viện kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế: “Quy trình thử nghiệm công hiệu vắc xin viêm não Nhật bản bất hoạt”.

REFERENCE

1. Huynh Phuong Lien, *Japanese Encephalitis Virus and vaccine*. Medical Publishing House (2007).
2. WHO Technical Report Series No 963 Annex_1 “Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use” (Revised 2007)
3. Vietnam Pharmacopoeia V, *Japanese Encephalitis vaccine*, pp.1058-1059, Medical Publishing House (2018)
4. WHO Technical Report Series No. 530, annex 4 “General requirement for the sterility of biological substances”.
5. National Institute for Control Vaccines and Biologicals (NICVB) “Protocol for potency test of Japanese Encephalitis vaccine”.