

PREDICTING THE SHELF LIFE OF NATIONAL STANDARD OF RECOMBINANT HEPATITIS B VACCINE (THE SECOND LOT)

Nguyen Thi Kieu*, Doan Huu Thien, Nguyen Thi Ly, Nguyen Kim Bach, Be Thi Tham, Nguyen Thi Hong Dinh, Phung Hai Linh

** The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

Received 15 December 2022

Accepted 3 February 2023

Abstract: The national standard of recombinant Hepatitis B vaccine, lot MCQG.HBV.02, has been used since 2019 but there has been no stability studies published. This study was carried out to predict the shelf life of the above national standard vaccine lot by accelerated stability testing method to determine HBsAg antigen content of the national standard lot at different storage temperatures: 25°C, 37°C and 45°C. The results showed that, at 25°C after 28, 56 and 84 days, the HBsAg contents of MCQG.HBV.02 lot were 28.8; 26.5 and 13.3 µg/ml respectively; at 37°C after 28, 56 and 84 days, the HBsAg contents of vaccine lot were 17.4; 12.1 and 8.7 µg/ml respectively; at 45°C after 7, 14, 28, 56 days, the HBsAg contents of vaccine lot were 15.4; 12.4; 5.8 and 3.3 µg/ml respectively. Using JMP Pro13 software based on the Arrhenius equation, the results are as follows: the shelf life of national standard vaccine lot was 1825 days (equivalent to 5.3 years); the HBsAg content is predicted to reach 20.4 µg/ml after 5 years that meets the requirement (≥ 20 µg/ml). Conclusion: Predicted shelf life of the national standard of recombinant Hepatitis B vaccine, lot MCQG.HBV.02, is 5.3 years at the storage temperature of 2-8°C.

Key words: National standard of recombinant hepatitis B vaccine, shelf life, MCQG.HBV.02

* Corresponding author
E-mail address: kieu@nicvb.org.vn
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.78>

DỰ ĐOÁN HẠN DÙNG VẮC XIN MẪU CHUẨN QUỐC GIA VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP LẦN THỨ HAI

Nguyễn Thị Kiều*, Đoàn Hữu Thiện, Nguyễn Thị Lý, Nguyễn Kim Bách,
Bế Thị Thắm, Nguyễn Thị Hồng Định, Phùng Hải Linh

**Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế*

Nhận ngày 15 tháng 12 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 3 tháng 2 năm 2023

Tóm tắt: Loạt vắc xin mẫu chuẩn viêm gan B lần thứ hai MCQG.HBV.02 được đưa vào sử dụng từ năm 2019 nhưng chưa có nghiên cứu đánh giá tính ổn định nào được công bố. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu dự đoán hạn dùng loạt vắc xin mẫu chuẩn trên bằng phương pháp thúc đẩy nhiệt để xác định hàm lượng kháng nguyên HBsAg của mẫu chuẩn ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau: 25°C, 37°C và 45°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nhiệt độ 25°C sau 28, 56, và 84 ngày hàm lượng HBsAg của loạt MCQG.HBV.02 tương ứng là 28,8; 26,5 và 13,3 µg/ml; Ở 37°C sau 28, 56 và 84 ngày hàm lượng HBsAg của loạt mẫu chuẩn lần lượt là 17,4; 12,1 và 8,7 µg/ml. Ở điều kiện 45°C sau 7, 14, 28, 56 ngày hàm lượng HBsAg của MCQG.HBV.02 theo thứ tự là 15,4; 12,4; 5,8; 3,3 µg/ml. Sử dụng phần mềm JMP Pro13 dựa trên phương trình *Arrhenius* tính được: Hạn dùng loạt mẫu chuẩn là 1825 ngày (tương đương 5,3 năm); sau 5 năm, hàm lượng HBsAg dự đoán đạt 20,4 µg HBsAg/ml, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn ≥ 20 µg/ml. Kết luận: Hạn dùng dự kiến của loạt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm gan B tái tổ hợp MCQG.HBV.02 là 5,3 năm khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C.

Từ khoá: Mẫu chuẩn viêm gan B, hạn sử dụng, MCQG.HBV.02

1. Đặt vấn đề

Hàng năm, nhiều lô vắc xin (VX) có thành phần viêm gan B, bao gồm cả VX đơn giá như: Engerix B (GSK, Bỉ), Euvax (Sanofi, Pháp) hoặc vắc xin viêm gan B phối hợp như: Twinrix (GSK, Bỉ), Infarix Hexa (GSK, Bỉ), Hexaxim (Sanofi, Pháp),...được kiểm định chất lượng tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB). Khả năng bảo vệ của VX viêm gan B được

xác định thông qua hàm lượng HBsAg và cần thực hiện song song với vắc xin mẫu chuẩn (VXMC).

Do kinh phí sản xuất, kinh phí nổi chuẩn cho một loạt VXMC rất lớn, tốn kém thời gian...nên mỗi loạt VXMC được sản xuất với số lượng lớn, đủ dùng trong ít nhất 5- 10 năm. Vì vậy, cần phải đánh giá tính ổn định của loạt mẫu chuẩn để xem loạt mẫu chuẩn này có thể sử dụng được trong thời gian dài như vậy hay không.

Theo WHO, tính ổn định của sinh phẩm được đánh giá qua tỉ lệ giảm hàm lượng kháng nguyên hoặc hoạt tính ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau [1], [2].

Năm 2017, NICVB đã thiết lập lô VX mẫu chuẩn quốc gia viêm gan B tái tổ hợp với mã số MCQG.HBV.02. Lô VXMC này đã được đánh giá chất lượng và nổi chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế (MCQT) nhưng chưa đánh giá tính ổn định nhiệt để dự đoán hạn dùng. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện đề tài “Dự đoán hạn dùng của loạt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm gan B lần thứ hai, mã số MCQG.HBV.02” với mục tiêu đưa ra được hạn dùng dự kiến của loạt mẫu chuẩn.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Lô vắc xin mẫu chuẩn quốc gia MCQG.HBV.02, lọ 1 ml có hàm lượng HBsAg sau sản xuất đạt $29,5 \pm 4,32$ mg/ml.



Hình 1: Lọ vắc xin mẫu chuẩn viêm gan B tái tổ hợp lần 2

2.2. Tiêu chuẩn đánh giá

Tiêu chuẩn hàm lượng kháng nguyên HBsAg ≥ 20 μ g/ml [1], [3].

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm: Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB);

Thời gian nghiên cứu: Năm 2017 đến Năm 2018.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

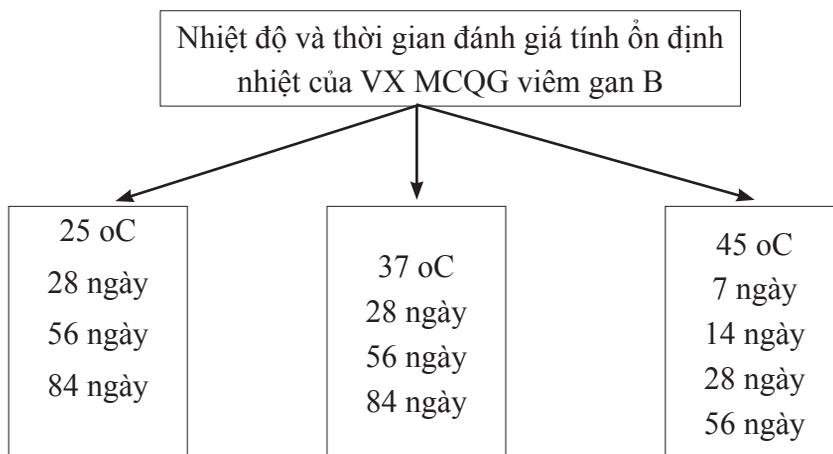
Phương pháp nghiên cứu: Sử dụng phương pháp thúc đẩy nhiệt để đánh giá tính ổn định nhiệt, dự đoán hạn dùng của loạt mẫu chuẩn [1-5].

Thiết kế nghiên cứu: Xác định hàm lượng HBsAg của loạt mẫu chuẩn ở ít nhất 3 nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản dự kiến, mỗi nhiệt độ thực hiện tại ít nhất 3 thời điểm, mỗi thời điểm lặp lại 3 lần [4,5].

Sử dụng VX mẫu chuẩn quốc tế để thực hiện song song trong quá trình xác định hàm lượng HBsAg của VX mẫu chuẩn quốc gia, xác định hàm lượng HBsAg của mẫu chuẩn thông qua hàm lượng mẫu chuẩn quốc tế.

Sử dụng phương pháp ELISA để xác định hàm lượng HBsAg của mẫu chuẩn [6].

Số liệu được xử lý bằng phần mềm JMP Pro 3 dựa trên phương trình phương trình Arrhenius.



Hình 2: Thiết kế nghiên cứu tính ổn định nhiệt của MCQG.HBV.02

2.5. Cỡ mẫu, chọn mẫu

Cách chọn mẫu: Chọn ngẫu nhiên các lọ thuộc loại mẫu chuẩn để đưa vào nghiên cứu.

Cỡ mẫu được xác định theo hướng dẫn của WHO cho thử nghiệm xác định hàm lượng HBsAg trong vắc xin viêm gan B: Sử dụng 1 lọ VX mẫu chuẩn quốc gia và 1 lọ VX mẫu chuẩn quốc tế trong mỗi lần thực hiện thử nghiệm xác định hàm lượng HBsAg [6].

2.6. Vật liệu, hóa chất và thiết bị chính

Trang thiết bị, dụng cụ: Tủ âm CO₂, dàn ELISA, máy ly tâm, máy lắc tuýp, pipet, đầu côn, phiến pha loãng...

Vật liệu, hóa chất: Vắc xin mẫu chuẩn quốc tế viêm gan B tái tổ hợp, mã W-0808-01, Công ty Công nghệ sinh học Berna đa quốc gia (Berna Biotech Korea Corp), Hàn Quốc; bộ kit HBsAg; các hóa chất thương mại dùng cho ELISA;...

2.7. Chỉ số đánh giá

Xác định hàm lượng HBsAg trong mẫu chuẩn khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau, các thời điểm khác nhau [1], [2], [3], [4].

2.8. Thu thập số liệu

Thu thập số liệu bằng cách thực hiện các thử nghiệm xác định hàm lượng HBsAg của loạt mẫu chuẩn khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau, các thời điểm khác nhau [1], [3], [6].

2.9. Xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm JMP Pro13, phần mềm chuyên dụng để dự đoán hạn dùng vắc xin, sinh phẩm dựa trên phương trình Arrhenius [1], [3].

2.10. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong phòng thí nghiệm, không thực hiện trên người hay động vật thí nghiệm.

3. Kết quả

VX mẫu chuẩn viêm gan B đã được đánh giá hàm lượng HBsAg ở 3 nhiệt độ 25 °C, 37 °C và 45°C. Hàm lượng HBsAg của vắc xin mẫu chuẩn ở các thời điểm được thể hiện trên các bảng sau:

Bảng 1: Hàm lượng HBsAg của MCGG.HBV.02 khi bảo quản ở 25 °C

Kết quả	Thời gian	28 ngày	56 ngày	84 ngày
Lần 1		28,2	26,4	13,4
Lần 2		28,4	26,6	13,4
Lần 3		30	26,6	13,2
Trung bình		28,8	26,5	13,3

Đơn vị tính: µg/ml

Bảng 1 cho thấy có sự giảm hàm lượng HBsAg của vắc xin MCQG viêm gan B tái tổ hợp, cụ thể: Khi bảo quản ở 25°C đến ngày thứ 84, hàm lượng HBsAg giảm còn 13,3 µg/ml. Tại thời điểm 28 và 56 ngày, hàm lượng HBsAg đạt 28,8 và 26,5 µg/ml, vẫn đạt tiêu chuẩn ≥ 20 µg/ml.

Bảng 2: Hàm lượng HBsAg của MCGG.HBV.02 khi bảo quản ở 37 °C

Kết quả	Thời gian	28 ngày	56 ngày	84 ngày
Lần 1		17,6	12,2	8,6
Lần 2		17,2	12,2	8,8
Lần 3		17,6	12	8,8
Trung bình		17,4	12,1	8,7

Đơn vị tính: µg/ml

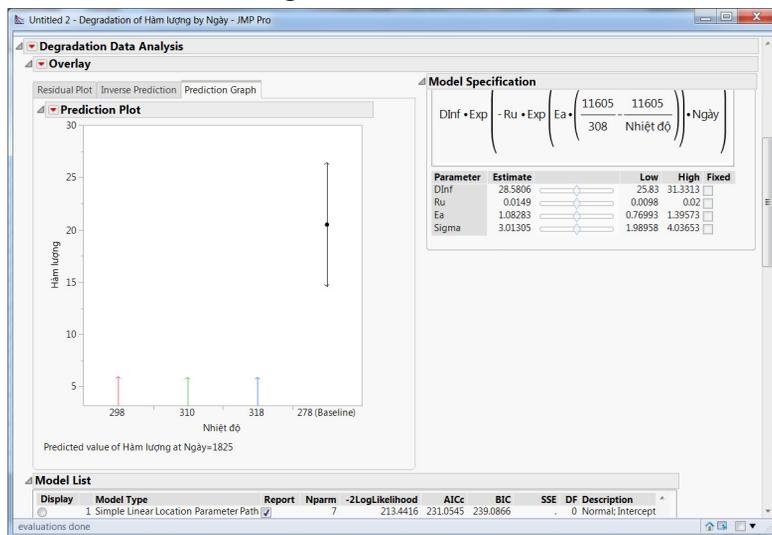
Bảng 3: Hàm lượng HBsAg của MCGG.HBV.02 khi bảo quản ở 45 °C

Kết quả	Thời gian	7 ngày	14 ngày	28 ngày	56 ngày
Lần 1		15,2	12,4	5,8	3,4
Lần 2		15,6	12,4	5,8	3,2
Lần 3		15,4	12,6	5,8	3,4
Trung bình		15,4	12,4	5,8	3,3

Đơn vị tính: µg/ml

Bảng 2 và bảng 3 cho thấy hàm lượng HBsAg giảm rõ rệt theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 37 °C và 45 °C. Ở 37 °C, sau 28 ngày hàm lượng đã giảm xuống dưới 20 µg/ml. Khi bảo quản ở 45 °C, chỉ sau 7 ngày hàm lượng HBsAg đã nhỏ hơn 20 µg/ml.

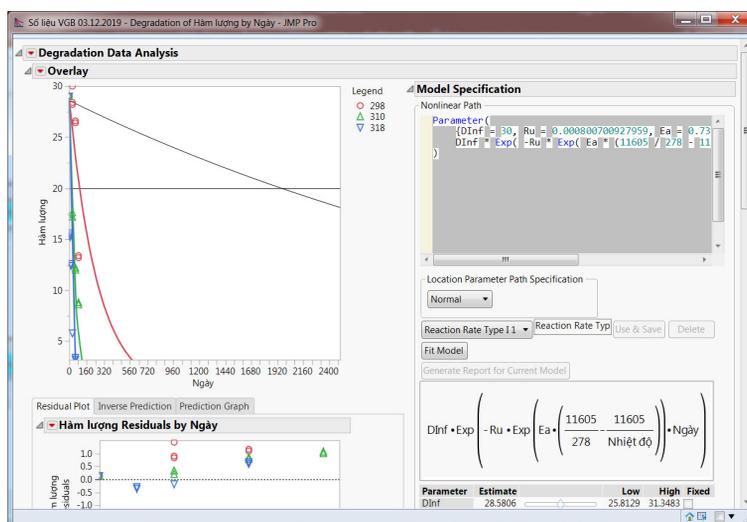
Các số liệu hàm lượng HBsAg khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau, các thời điểm khác nhau ở trên được sử dụng để dự đoán hạn dùng của loạt mẫu chuẩn. Sử dụng phần mềm JMP Pro13 để xử lý số liệu.



Hình 3: Hàm lượng HBsAg dự kiến của VXMC viêm gan B sau 1825 ngày (5 năm)

Theo số liệu thu được, sau 5 năm bảo quản ở nhiệt độ 2-8 °C MCQG viêm gan B vẫn đảm bảo hàm lượng HBsAg ≥ 20 µg/ml với hàm lượng dự đoán là 20,4 µg/ml;

Tiến hành xử lý số liệu để xác định thời điểm khi hàm lượng HBsAg ở ranh giới 20 µg/ml, thu được kết quả: Thời điểm hàm lượng HBsAg còn 20 µg/ml là 1957 ngày (5,3 năm) khi bảo quản ở 2 – 8 °C. Như vậy hạn dùng của loạt MCGG.HBV.02 là 5,3 năm.



Hình 4: Dự đoán thời điểm hàm lượng HBsAg ở mức 20 µg/ml

4. Bàn luận

4.1. Tính ổn định nhiệt của vắc xin mẫu chuẩn viêm gan B

Nhiệt độ bảo quản VX mẫu chuẩn đóng vai trò quan trọng để duy trì được hàm lượng kháng nguyên trong thời gian dài. Nhiệt độ bảo quản càng thấp, hạn sử dụng càng dài. Tuy nhiên, vắc xin MCQG viêm gan B được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C và cần tránh đông băng do có chứa hydroxyd nhôm.

Về phương pháp nghiên cứu, đánh giá tính ổn định nhiệt gồm hai loại: Nghiên cứu sự ổn định dài hạn (long term stability, real time – real condition stability) và nghiên cứu thúc đẩy nhiệt (accelerated stability testing). Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng phương pháp thúc đẩy nhiệt để đánh giá tính ổn định nhiệt của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm gan B. Phương pháp này không đưa ra hạn dùng chính xác như phương pháp nghiên cứu tính ổn định theo thời gian thực. Tuy nhiên, nó đưa ra được hạn sử dụng dự kiến ngay từ giai đoạn đầu khi mới sản xuất mẫu chuẩn mà phương pháp nghiên cứu tính ổn định theo thời gian thực không có được.

Chúng tôi lựa chọn các nhiệt độ 25 °C, 37°C và 45°C tương ứng với các điều kiện bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, điều kiện ngoài trời và điều kiện nắng nóng gay gắt. Các nhiệt độ và thời điểm được lựa chọn cũng tham khảo báo cáo của WHO trong việc đánh giá tính ổn định nhiệt của VX viêm gan B ở các dải nhiệt độ khác nhau [4], [5].

Số liệu nghiên cứu về tính ổn định nhiệt của vắc xin MCQG viêm gan B tái tổ hợp trong nghiên cứu này cho thấy, tốc

độ giảm hàm lượng HBsAg của vắc xin MCQG viêm gan B tái tổ hợp chậm hơn khi bảo quản ở 25°C. Khi bảo quản vắc xin mẫu chuẩn viêm gan B ở 25°C, sau 56 ngày hàm lượng HBsAg vẫn đạt yêu cầu ≥ 20 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này cũng tương tự số liệu của WHO về tính ổn định nhiệt của VX viêm gan B [3].

Việc dự đoán được hạn dùng giúp NICVB có kế hoạch sản xuất loạt mẫu chuẩn tiếp theo do việc sản xuất 1 loạt mẫu chuẩn mất rất nhiều thời gian, công sức, tài chính.

Kết quả nghiên cứu tính ổn định nhiệt được xử lý bằng phần mềm JMP Pro13 dựa trên phương trình *Arrhenius*, phần mềm chuyên dụng để dự đoán hạn dùng bằng phương pháp thúc đẩy nhiệt. Tiến hành xử lý số liệu trên phần mềm JMP Pro13 cho thấy: Hàm lượng HBsAg của vắc xin MCQG viêm gan B bảo quản ở 2 - 8°C sau 5 năm đạt 20,4 $\mu\text{g/ml}$; sau 5,3 năm (1957 ngày) hàm lượng HBsAg vẫn đạt tiêu chuẩn ≥ 20 $\mu\text{g/ml}$.

So với các vắc xin mẫu chuẩn quốc gia khác như vắc xin mẫu chuẩn quốc gia *Haemophilus influenzae* typ b [7], bại liệt uống [8], rota [9], viêm não Nhật bản sản xuất trên tế bào VERO [10], hạn sử dụng của MCGG.HBV.02 ngắn hơn vì hai lý do: Thứ nhất, loạt vắc xin mẫu chuẩn này chỉ được bảo quản ở 2-8°C do có chứa nhôm hydroxyd, trong khi bốn mẫu chuẩn trên được bảo quản ở -2°C hoặc -80°C. Thứ hai: Vắc xin mẫu chuẩn viêm gan B này ở dạng lỏng còn các mẫu chuẩn như *Haemophilus influenzae* typ b, viêm não Nhật bản sản xuất trên tế bào VERO ở dạng đông khô, có tính ổn định cao hơn.

Ngoài việc dự đoán hạn dùng ở thời điểm ngay sau khi sản xuất mẫu chuẩn như

trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ thực hiện giám sát, phân tích và đánh giá kết quả hàm lượng HBsAg của vắc xin MCQG viêm gan B theo thời gian thực, ở nhiệt độ bảo quản thực để có được hạn sử dụng chính xác của loạt MCQG.HBV.02.

5. Kết luận

Hạn sử dụng dự kiến của loạt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm gan B tái tổ hợp lần 2, mã số MCQG.HBV.02 là 5,3 năm.

Tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organization, “Recommendation for preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, WHO TRS 932, annex 2”, 2006.
- [2] World Health Organization, “Guidelines on stability evaluation of vaccine, WHO TRS 962, Annex 3.,” 2011.
- [3] World Health Organization, “WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccine, WHO/IVB/11.03,” 2011.
- [4] World Health Organization, “Temperature sensitivity of vaccines,” CH-1211 Geneva 27, Switzerland, 2006.
- [5] World Health Organization, “Thermostability of vaccines,” CH-1211 Geneva 27, Switzerland, 1998.
- [6] World Health Organization, “Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines, Series No.978, Annex 4,” 2013.
- [7] Nguyễn Thị Kiều, Đoàn Hữu Thiển, Đường Thị Cẩm Lệ, Cảnh Huyền Trang, Đàm Thị Liễu (2021), “Đánh giá tính ổn định nhiệt vắc xin mẫu chuẩn quốc gia *Haemophilus influenzae* tuýp b lần thứ nhất”, *Tạp chí Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm Y tế*,
- [8] Lê Thị Hải Yến, Đào Thị Thủy, Quách Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Thị Bích Hạnh, Lê Thu Nga, Nguyễn Phương Thảo, Nguyễn Thị Hòa, Đoàn Hữu Thiển (2022), “Đánh giá tính ổn định vắc xin mẫu chuẩn quốc gia IPV”, *Tạp chí Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm Y tế*, Volume 2, No2.2022, 5-12.
- [9] Nguyen Thi Kieu, Doan Huu Thien, Le Thi Hai Yen, Nguyen Thi Thu Huong, Nguyen Thi Hoa, Do Thi Phuong (2022), “Stability assessment of the first national standard for rotavirus vaccine”, *Journal of control vaccine and biologicals*, Volume 2, No3.2022, 57-62.
- [10] Nguyễn Thị Lý, Nguyễn Việt Anh, Lưu Thị Dung và cộng sự (2021), “Đánh giá chất lượng và tính ổn định của lô dự tuyển mẫu chuẩn quốc gia vắc xin viêm não Nhật Bản bất hoạt trên tế bào VERO chủng Beijing-1 tại Việt Nam