

## VALIDATION OF IDENTIFICATION ASSAY OF THE VARICELLA COMPONENT IN PRIORIX-TETRA VACCINE BY SERONEUTRALIZATION METHOD

Dao Thi Thuy\*, Le Thi Hai Yen, Nguyen Thi Thu Huong

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

*Received 10 February 2022*

*Accepted 3 March 2023*

**Abstract:** Priorix-tetra is a freeze-dried vaccine that consists of 04 live-attenuated viral strains of measles, mumps, rubella and varicella. Each strain of virus was produced separately in chicken embryo cells for mumps and measles components, in human diploid cell (MRC5) for the rubella and chickenpox components. Process validation is essential to ensure the quality and reliability of analytical results when testing vaccines circulated in Vietnam. Since the identification assay plays a critical role in confirming the presence of viral antigen(s) in the vaccines, in this study we managed to develop the procedure for identification of Varicella component in Priorix-Tetra vaccines in accordance with the manufacturer's instructions. Partial validation of procedure was carried out by determining the specificity. The results showed the presence of chickenpox component in Priorix-Tetra vaccine and the reference standard, whilst there was no chickenpox component detected in the negative control. The procedure for identification of varicella component in Priorix-Tetra vaccine by seroneutralization method had high reliability according to the specificity evaluation criteria that was suitable for NICVB's laboratory conditions.

*Keywords: Identity, vaccine, Priorix-Tetra, seroneutralization.*

---

\* Corresponding author

*E-mail address: daothuy1201@gmail.com*

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.81>

## **THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH NHẬN DẠNG THÀNH PHẦN THỦY ĐẬU TRONG VẮC XIN PRIORIX-TETRA BẰNG PHƯƠNG PHÁP TRUNG HÒA KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU**

**Đào Thị Thủy\*, Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Thu Hương**

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

*Nhận ngày 10 tháng 2 năm 2023*

*Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 3 năm 2023*

**Tóm tắt:** Priorix-Tetra là vắc xin đông khô chứa bốn chủng vi rút sống giảm độc lực sởi, quai bị, rubella và thủy đậu. Mỗi chủng vi rút được sản xuất riêng biệt trong các tế bào phôi gà đối với thành phần quai bị, sởi, tế bào lưỡng bội người (MRC5) đối với thành phần rubella và thủy đậu. Thẩm định quy trình rất quan trọng và cần thiết nhằm đảm bảo chất lượng, độ tin cậy của kết quả thử nghiệm khi kiểm định vắc xin lưu hành tại Việt Nam. Nhận dạng là một trong những thử nghiệm quan trọng nhằm khẳng định sự có mặt của kháng nguyên thủy đậu trong vắc xin. Vì vậy quy trình nhận dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra được nhóm nguyên cứu xây dựng, thiết kế quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tiêu chí thẩm định là thẩm định một phần (độ đặc hiệu). Quy trình khẳng định sự có mặt của thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra, mẫu chuẩn và không có thành phần thủy đậu trong mẫu chứng âm. Quy trình nhận dạng thành phần Thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra bằng phương pháp trung hòa kháng thể đặc hiệu có độ tin cậy cao theo tiêu chuẩn đánh giá độ đặc hiệu phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

*Từ khoá: Nhận dạng, vắc xin, Priorix-Tetra, trung hòa kháng thể.*

### **1. Đặt vấn đề**

Vắc xin thủy đậu là vắc xin sống giảm độc lực ngăn ngừa bệnh thủy đậu do vi rút Varicella zoster gây ra. Những năm 1970 tại Nhật Bản đã phát triển vắc xin thủy đậu sống, giảm độc lực. Michiaki Takahashi đã phân lập vi rút từ chất lỏng mụn nước của một đứa trẻ khỏe mạnh mắc thủy đậu. Năm 1988, vắc xin thủy đậu được cấp phép tại Hàn Quốc và Nhật Bản, tại Mỹ năm 1995, tại Việt Nam năm 2012 và được lưu hành ở nhiều nước trên thế giới[1,2]. Priorix-Tetra là một chế phẩm hỗn hợp đông khô vô trùng có chứa chủng vi rút sởi Schwarz giảm độc lực, chủng vi rút quai bị RIT 4385 (có nguồn gốc từ chủng Jeryl Lynn), chủng vi rút rubella Wistar RA 27/3

và chủng OKA của vi rút varicella-zoster. Mỗi chủng được tạo ra riêng biệt trên các loại tế bào khác nhau. Mỗi liều 0,5 ml vắc xin đã hoàn nguyên chứa không ít hơn 3 log CCID<sub>50</sub> của chủng vi rút sởi Schwarz, không ít hơn 4,4 log CCID<sub>50</sub> của chủng vi rút quai bị RIT 4385, không ít hơn 3 log CCID<sub>50</sub> của chủng vi rút Wistar RA 27 / 3 rubella và không ít hơn 3,3 log PFU của các chủng vi rút varicella-zoster OKA[3].

Trong tiêu chuẩn chất lượng vắc xin, nhận dạng là một tiêu chí quan trọng nhằm khẳng định sự có mặt của kháng nguyên vi rút trong sản phẩm vắc xin. Các phương pháp thường sử dụng để kiểm tra nhận dạng vi rút thủy đậu như: Trung hòa kháng thể đặc hiệu trên tế bào, Elisa, PCR, FAMA (kháng thể huỳnh

quang gắn với kháng nguyên màng)...[1] Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, được điển Châu Âu và được điển Việt Nam V phương pháp sử dụng để nhận dạng kháng nguyên thủy đậu là trung hòa huyết thanh trên tế bào với kháng thể đặc hiệu [4-6].

Quy trình nhận dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra được thực hiện trên phương pháp trung hòa kháng thể đặc hiệu, đây là phương pháp được đề cập trong Tổ chức Y tế Thế giới, được điển Châu Âu và được điển Việt Nam V. Vì vậy, nhóm nghiên cứu thẩm định một phần quy trình nhận dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra với tiêu chí độ đặc hiệu[7].

## 2. Đối tượng nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mẫu chuẩn thủy đậu CWN0726A02 (GSK) và vắc xin Priorix-Tetra (GSK) lô A71CB309A, hạn dùng 06/2021. Mẫu đối chứng: MMR II lô S041004, hạn dùng 18/12/2021. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Vắc xin Vi rút, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế từ tháng 01 năm 2021 đến tháng 12 năm 2021.

**2.2 Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

### 2.3. Vật liệu phục vụ nghiên cứu

#### 2.3.1. Vật liệu và hóa chất

Tế bào MRC5 (NICVB) mọc kín một lớp. Môi trường MEM 2% FBS (NICVB), Fetal bovine serum (Gibco), Formaldehyde 10% (Merck), PBS (NICVB), Tween 20 (Merck), DAB (Merck), Neutralizing antiserum anti-Varicella (GSK), Antiserum anti-varicella (GSK), Antiserum anti-rabbit conjugated to

peroxidase (GSK), nước cất (NICVB).

#### 2.3.2. Thiết bị và vật tư tiêu hao

Bể ổn nhiệt (Shellabmáy lắc (IKA), tủ ẩm CO<sub>2</sub> (Sanyo), pipet đơn kênh (Eppendorf), tủ an toàn sinh học cấp II các loại đã được hiệu chuẩn hàng năm theo ISO/IEC 17025.

Chai nuôi tế bào 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> (Corning), tuýp nhựa (Eppendorf), giá lạnh, đầu côn 1000µl, 200µl vô trùng (Eppendorf).

### 2.4. Tóm tắt quy trình thử nghiệm nhận dạng

Hoàn nguyên hai lọ vắc xin với 0,6 ml nước hồi chính, đánh dấu dán nhãn (lọ 1-anti và lọ 2-FBS). Lọ 1: Thêm 50 µl neutralizing antiserum anti-varicella. Lọ 2: thêm 50µl FBS. Ủ 2 lọ 30 phút ở 37±1°C. Pha loãng ¼ lọ anti-varicella serum và độ pha loãng tương ứng với lọ pha FBS. Ủ 1h nhiệt độ phòng trong tối, mỗi mẫu thực hiện trên 3 chai. Thêm 10 ml môi trường MEM 2% + 30 µl antiserum hoặc FBS vào các chai tương ứng. Ủ 7 ngày 35±1°C, 3%CO<sub>2</sub>.

Sau 7 ngày ủ ở 35±1°C, 3% CO<sub>2</sub> tế bào được cố định với 2 ml/chai formaldehyde 10%, trong 3-5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó được rửa 2 lần với 5 ml PBS (không Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>3+</sup>) -Tween 20, 0,1%. Thêm 1ml Varicella antiserum 1/400, ủ 30 phút 37±1°C. Rửa 2 lần với 5 ml PBS (không Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>3+</sup>) -Tween 20, 0,1%.

Thêm 1 ml chromogenic DAB/chai và cho phản ứng ở nhiệt độ phòng cho đến khi phát hiện màu (10 phút). Đổ dung dịch và rửa hai lần với 5 ml nước cất. Đọc bằng mắt thường số đám hoại tử hiện màu. Đếm số đám hoại tử, tính Log PFU/liều trung bình trên 3 chai.

Thử nghiệm có giá trị khi mẫu chứng âm tế bào mọc đẹp, không xuất hiện hủy hoại, không nhiễm nấm, vi khuẩn. Tiêu

chuẩn thử nghiệm theo tiêu chuẩn nhà sản xuất: sự khác biệt về hiệu giá giữa mẫu không được trung hòa và mẫu được trung hòa lớn  $\geq 1,2$  log PFU thì thử nghiệm nhận dạng được coi là dương tính.

**2.5. Xác định độ đặc hiệu quy trình**

Thực hiện thử nghiệm 6 lần trong 6 ngày khác nhau trên cùng một nhóm thử nghiệm với hóa chất, các trang thiết bị giống nhau.

Độ đặc hiệu quy trình đạt yêu cầu khi quy trình thực hiện xuất hiện đám hoại tử đặc trưng với vắc xin mẫu chuẩn, thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra và không xuất hiện đám hoại tử trong mẫu trung hòa, mẫu chứng âm (không chứa thành phần thủy đậu). Sau 6 lần thực hiện cho kết quả dương tính với mẫu thử.

Quy trình thẩm định được thiết kế như sau:

**Bảng 1: Thiết kế quy trình thẩm định**

Mẫu thử		Mẫu thử trung hòa		Mẫu chứng âm	
Mẫu chuẩn	Vắc xin Priorix-Tetra	Mẫu chuẩn	Vắc xin Priorix-Tetra	Môi trường nuôi cấy	Vắc xin MMR
Gây nhiễm độ pha ¼ vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>	Gây nhiễm độ pha ¼ vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>	Gây nhiễm độ pha ¼ vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>	Gây nhiễm độ pha ¼ vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>	Không gây nhiễm, bổ sung môi trường nuôi vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>	Gây nhiễm độ pha ¼ vào 3 chai 25cm <sup>2</sup>

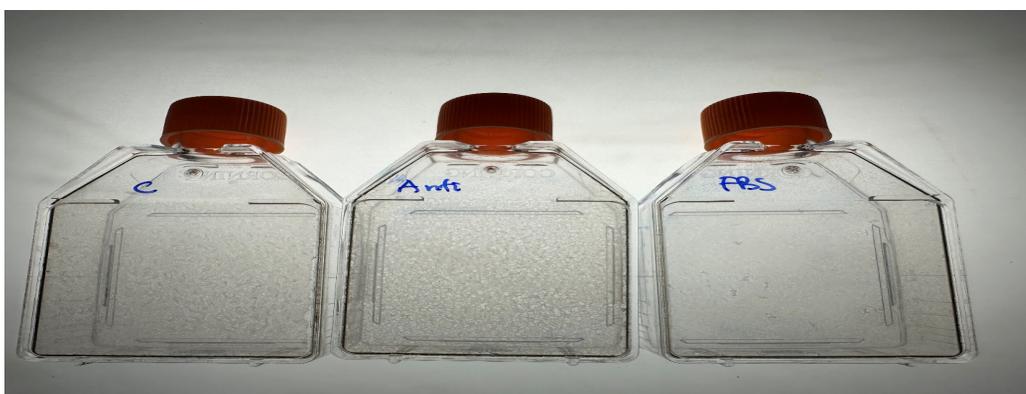
**3. Kết quả**

Sau 6 lần thực hiện trên mẫu thử (mẫu chuẩn và Priorix tetra), mẫu thử trung hòa

(mẫu chuẩn và Priorix tetra) và mẫu chứng âm (môi trường nuôi cấy, MMR) cho kết quả số đám hoại tử trung bình như sau:

**Bảng 2: Kết quả số đám hoại tử trung bình 6 lần thực hiện trên các mẫu thử**

	Số đám hoại tử trung bình					
	Mẫu thử		Mẫu thử trung hòa		Chứng âm	
	Mẫu chuẩn	Priorix-Tetra	Mẫu chuẩn	Priorix-Tetra	Môi trường nuôi cấy	Vắc xin MMR
Ngày 1 (06/05/2021)	59	24	0	0	0	0
Ngày 2 (07/05/2021)	56	25	0	0	0	0
Ngày 3 (09/05/2021)	54	21	0	0	0	0
Ngày 4 (11/05/2021)	60	26	0	0	0	0
Ngày 5 (17/05/2021)	62	26	0	0	0	0
Ngày 6 (19/05/2021)	52	26	0	0	0	0



**Hình 1: Hình ảnh trên tế bào chứng (C), tế bào được gây nhiễm mẫu trung hòa (Anti) và đám hoại tử trên tế bào được gây nhiễm mẫu thử (FBS)**

Tiêu chí độ đặc hiệu của quy trình nhận đến 19/05/2021 qua 6 lần thực hiện có kết dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin quả như sau:

Priorix tetra được thực hiện từ 06/05/2021

	Log PFU/liều					
	Mẫu thử		Mẫu thử trung hòa		Chứng âm	
	Mẫu chuẩn	Priorix-Tetra	Mẫu chuẩn	Priorix-Tetra	Môi trường nuôi cấy	Vắc xin MMR
Ngày 1 (06/05/2021)	3,37	2,98	0	0	0	0
Ngày 2 (07/05/2021)	3,35	3,01	0	0	0	0
Ngày 3 (09/05/2021)	3,34	2,92	0	0	0	0
Ngày 4 (11/05/2021)	3,38	3,02	0	0	0	0
Ngày 5 (17/05/2021)	3,39	3,01	0	0	0	0
Ngày 6 (19/05/2021)	3,32	3,02	0	0	0	0
<b>GM</b>	3,36	2,99	/	/	/	/
<b>SD</b>	0,03	0,04	/	/	/	/
<b>GM ± 2SD</b>	3,31 - 3,41	2,92 – 3,07	/	/	/	/
<b>CV</b>	0,79	1,30	/	/	/	/

**Bảng 3. Kết quả mẫu thử qua 6 lần thực hiện**

**Bảng 4. Kết quả độ đặc hiệu quy trình thẩm định trong 6 ngày**

	<b>Tiêu chuẩn thử nghiệm nhận dạng <math>\geq 1,2 \log</math> PFU</b>	<b>Kết luận</b>
	Kết quả hiệu giá chênh lệch vi rút thủy đậu sau khi trung hòa với kháng thể đặc hiệu	
Ngày 1 (06/05/2021)	2,98	Dương tính
Ngày 2 (07/05/2021)	3,01	Dương tính
Ngày 3 (09/05/2021)	2,92	Dương tính
Ngày 4 (11/05/2021)	3,02	Dương tính
Ngày 5 (17/05/2021)	3,01	Dương tính
Ngày 6 (19/05/2021)	3,02	Dương tính

#### 4. Bàn luận

Priorix-tetra là một vắc xin phối hợp đông khô màu trắng chứa chủng vi rút sởi giảm độc lực sởi-quai bị-rubella-thủy đậu. Việc nhận dạng từng thành phần có mặt trong vắc xin là tiêu chí quan trọng trong kiểm tra chất lượng sản phẩm. Trong các phương pháp được sử dụng nhận dạng vi rút thủy đậu (ELISA, PCR, FAMA, trung hòa kháng thể đặc hiệu) thì phương pháp trung hòa kháng thể đặc hiệu là phương pháp được Tổ chức Y tế Thế giới, được điển Châu Âu, được điển Việt Nam khuyến cáo sử dụng trong thử nghiệm nhận dạng cho vắc xin thủy đậu. Phương pháp này không chỉ khẳng định sự có mặt của vi rút thủy đậu mà còn giúp chứng minh tính kháng nguyên của vi rút.

Thẩm định quy trình phân tích là một trong những bước quan trọng đánh giá sự phù, đảm bảo độ tin cậy kết quả thử nghiệm trong đó tiêu chí độ đặc hiệu là một tiêu

chí quan trọng đảm bảo quy trình phân tích đặc hiệu với vi rút thủy đậu khi có mặt các thành phần sởi, quai bị và rubella trong mẫu vắc xin Priorix-Tetra.

Phương pháp sử dụng cho quy trình thẩm định này là phương pháp trung hòa kháng thể đặc hiệu. Phản ứng trung hòa chỉ xảy ra với kháng nguyên-kháng thể đặc hiệu vi rút thủy đậu khi mẫu thử có mặt nhiều loại vi rút khác nhau (sởi, quai bị, rubella). Thể hiện trên kết quả bảng 2 với 6 lần thực hiện 6 ngày khác nhau cho thấy kết quả phân biệt rõ giữa mẫu có chứa vi rút thủy đậu và mẫu không chứa vi rút thủy đậu. Đám hoại tử xuất hiện trên mẫu chuẩn, mẫu vắc xin Priorix-Tetra và không xuất hiện đám hoại tử với mẫu đã trung hòa, mẫu chứng âm.

Sự khác biệt log PFU/liều giữa mẫu thử và mẫu thử trung hòa cho kết quả được trình bày ở bảng 3 và bảng 4 thể hiện sự chênh lệch log PFU của mẫu thử Priorix-Tetra so với mẫu Priorix-Tetra đã trung hòa từ 2,92

log PFU đến 3,02 log PFU, cho thấy sự đồng đều hàm lượng kháng nguyên trong mẫu vắc xin và sự ổn định qua các lần thực hiện với CV=1,30% (thấp hơn so với tiêu chuẩn CV<30%). Điều này cho thấy quy trình nhận dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix-Tetra bằng phương pháp trung hòa kháng thể đặc hiệu có độ tin cậy và độ đặc hiệu cao. Tuy vậy phương pháp vẫn có nhược điểm đòi hỏi thời gian thực hiện kéo dài (nuôi cấy tế bào, gây nhiễm theo dõi thử nghiệm dài ngày, thực hiện nghiêm ngặt trong phòng thí nghiệm sạch cấp 2) và cần hóa chất kháng thể đặc thù của nhà sản xuất.

## 5. Kết luận

Quy trình nhận dạng thành phần thủy đậu trong vắc xin Priorix- Tetra thực hiện tại khoa kiểm định vắc xin Vi rút có độ tin cậy cao đạt theo tiêu chuẩn đánh giá độ đặc hiệu sau 6 lần thực hiện và phù hợp với điều kiện tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

## Tài liệu tham khảo

- [1] [Internet] CDC. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/varicella.html>. 20 September 2021.
- [2] [Internet] Cục Quản lý Dược. Quyết định về việc ban hành danh mục 63 vắc xin, sinh phẩm y tế được cấp số đăng ký lưu hành tại Việt Nam – Đợt 19. [Available from: <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Quyết-dinh-283-QĐ-QLD-Danh-muc-63-vac-xin-sinh-pham-y-te-duoc-cap-so-dang-ky-150776.aspx>. Ngày 19 tháng 10 năm 2012.
- [3] [Internet] GSK. PRIORIX TETRA. Available from: [https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/en\\_NA/PI/Priorix-Tetra-GDS13.pdf](https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/en_NA/PI/Priorix-Tetra-GDS13.pdf). 13 March 2018
- [4] European Pharmacopoeia 10. Varicella vaccine (Live); 2020. p.1048-1049.
- [5] Dược điển Việt Nam V. Vắc xin Thủy đậu; 2017. p.1050.
- [6] [Internet] WHO. Annex 1 Requirements for Varicella vaccine (live). [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/924120848>
- [7] NICVB. Thảm định quy trình. SOP KĐQG 34.
- [8] [Internet] WHO. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. [Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64465/WHO\\_VSQ\\_97.02.pdf;jsessionid=56EC1F334486C07D2885C2E6FF27C599?sequence=2](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64465/WHO_VSQ_97.02.pdf;jsessionid=56EC1F334486C07D2885C2E6FF27C599?sequence=2)
- [9] [Internet] EMA. ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures. [Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf). 31 March 2022
- [10] GSK. Titration and identity of varicella virus. SOP No 9000003121; 2019. p.1-14.