

ESTABLISHING A PROCEDURE FOR DETERMINATION OF DIPHTHERIA POTENCY USING COMBINED ASSAYS OF IMMUNIZATION IN MICE AND TITRATION ON VERO CELL LINE

Nguyen Phuong Lien*, Bui Thi Kim Xuyen, Le Thi Hoang Yen,
Do Khanh Linh, Nguyen Thi Kim Ngan, Ngo Thi Hoa.

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

Received 3 November 2022

Accepted 8 February 2023

Abstract: For many years, Diphtheria vaccination in the Expanded Programme of Immunization helped eradicate the disease among Vietnamese children. It is very important to determine the efficacy of each vaccine lot to ensure the quality of products circulated onto the market. In the world, there is only one kind of Diphtheria toxoid standard based on guinea pig unit at present. However, the use of large numbers of guinea pigs as immunized animals makes the implementation process difficult. To overcome this, the Department of Bacterial Vaccines - NICVB has researched and developed a procedure for determination of Diphtheria potency on ICR mice. In this study, the immunization assay on ICR mice was conducted, followed by a titration test on Vero cells. Process validation was carried out through 05 separate assays, using the Diphtheria International Standard (NIBSC) with a known potency of 213 IU/tube in parallel with test samples to be determined. The testing results were used to assess the vaccine quality and establish a procedure for determination of Diphtheria potency.

Keywords: Diphtheria vaccine, diphtheria potency in mice

* Corresponding author
E-mail address: phuonglien510@yahoo.com
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.83>

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU BẠCH HẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH TRÊN CHUỘT NHẮT VÀ CHUẨN ĐỘ TRÊN TẾ BÀO VERO

Nguyễn Phương Liên*, Bùi Thị Kim Xuyên, Lê Thị Hoàng Yến,
Đỗ Khánh Linh, Nguyễn Thị Kim Ngân, Ngô Thị Hoa.

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

Nhận ngày 3 tháng 11 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 8 tháng 2 năm 2023

Tóm tắt: Vắc xin Bạch hầu được sử dụng trong chương trình tiêm chủng quốc gia đã góp phần thanh toán bệnh Bạch hầu cho trẻ em Việt Nam từ nhiều năm nay. Việc xác định công hiệu của vắc xin là vô cùng cần thiết để đảm bảo hiệu lực của từng lô sản phẩm được sử dụng ngoài thị trường. Hiện nay trên thế giới chỉ có mẫu chuẩn Bạch hầu tính trên đơn vị chuột lang, tuy nhiên việc sử dụng chuột lang quá nhiều gây khó khăn cho quá trình thực hiện. Khoa Vi khuẩn- Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế đã nghiên cứu và phát triển quy trình xác định công hiệu Bạch hầu trên chuột nhắt trắng, dòng chuột ICR. Nghiên cứu áp dụng quy trình kiểm định công hiệu Bạch hầu bằng phương pháp miễn dịch trên chuột nhắt, chuẩn độ trên tế bào Vero, thử nghiệm được thẩm định qua 5 lần thử nghiệm độc lập. Các lần thử nghiệm thực hiện song song với mẫu chuẩn quốc tế Bạch hầu (NIBSC) đã biết trước đơn vị công hiệu là 213 IU/ống cùng mẫu thử cần xác định giá trị. Kết quả của các lần thử nghiệm được sử dụng để đánh giá chất lượng vắc xin và thiết lập một quy trình thử nghiệm cho việc kiểm định chất lượng vắc xin bạch hầu.

Từ khoá: vắc xin Bạch hầu, công hiệu Bạch hầu trên chuột nhắt

1. Đặt vấn đề

Bạch hầu là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, việc kiểm soát bệnh Bạch hầu được các nước trên thế giới chú trọng bằng cách sử dụng vắc xin phòng bệnh. Hiện nay tại Việt Nam có rất nhiều loại vắc xin phối hợp có chứa thành phần bạch hầu được sử dụng cho trẻ từ 2 tháng tuổi. Việc kiểm định vắc xin bao gồm hai tiêu chuẩn cần đạt được là tính an toàn và tính hiệu lực. Tính an toàn thể hiện qua các thử nghiệm về cảm quan, nhận dạng, an toàn chung, an toàn đặc hiệu, tính chất hoá lý... Hiệu lực vắc xin được thực hiện qua thử nghiệm Công hiệu Bạch hầu.

Thử nghiệm công hiệu tại Việt Nam đang sử dụng 2 phương pháp: Gây miễn

dịch và thử thách trên chuột lang hoặc miễn dịch trên chuột nhắt và chuẩn độ trên tế bào vero. Do tình hình thực tế tại Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, việc sử dụng nhiều chuột lang cho thử nghiệm là không phù hợp nên cần phải phát triển quy trình kiểm định trên chuột nhắt là phù hợp và cần thiết.

2. Phương pháp nghiên cứu

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

- Đối tượng nghiên cứu là quy trình kiểm định công hiệu Bạch hầu bằng phương pháp miễn dịch trên chuột nhắt trắng.

- 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 trong khoảng thời gian từ tháng 03/2021- 12/2021.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm.

2.3. Vật liệu nghiên cứu

2.3.1. Mẫu sử dụng trong nghiên cứu

Mẫu được sử dụng trong nghiên cứu là vắc xin mẫu chuẩn Quốc tế bạch hầu công hiệu 213 IU/ống, số lượng 05 ống và vắc xin mẫu chuẩn quốc gia bạch hầu dự tuyển, số lượng 05 ống.

Độc tố sử dụng là độc tố bạch hầu đông khô RIVM hoặc độc tố tươi của IVAC

Huyết thanh chuẩn sử dụng của NIBSC

2.3.2. 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, môi trường MEM 10%.

2.3.3. Động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu là chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 12-14g/con, số lượng sử dụng là 400 con.

Mỗi lần thử nghiệm sử dụng 40 con cho vắc xin chuẩn và 40 con cho vắc xin thử, chia đều vào 4 độ pha (mỗi độ pha 10 con).

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu

- Thực hiện 05 lần trên mẫu chuẩn Quốc tế và vắc xin mẫu thử. Mẫu chuẩn được sử dụng là mẫu chuẩn Quốc tế 07/216 đã biết trước công hiệu trên chuột nhắt là 213IU/ống, mẫu thử là vắc xin chứa thành

phần bạch hầu. Mẫu chuẩn quốc tế đã biết trước công hiệu và được coi là ổn định. Vắc xin mẫu chuẩn Quốc tế và mẫu thử được pha loãng như đã trình bày ở trên.

- Thực hiện 5 lần thử nghiệm (5 ngày khác nhau), thực hiện bởi các nghiên cứu viên và kỹ thuật viên trong khoa.

Vắc xin mẫu chuẩn Quốc tế và mẫu thử được pha loãng bậc 2. Dùng phần mềm Excel để thống kê và tính toán các kết quả thu được bằng phần mềm Whoprograme. Hệ số biến thiên của các kết quả thu được phải nằm trong khoảng từ 20-50%.[2]

2.3.5. Tiến hành thử nghiệm xác định công hiệu của vắc xin mẫu chuẩn bạch hầu dự tuyển

2.3.5.1. Tiêm miễn dịch cho chuột

Pha loãng mẫu chuẩn và mẫu thử

Vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử sau khi hoàn nguyên được pha loãng bậc 2 bằng nước muối sinh lý.

Vắc xin mẫu chuẩn quốc tế được pha loãng như sau

Bảng 1: Cách pha mẫu chuẩn quốc tế

Độ pha	Công thức pha
A	1 ampoule + 20ml NMSL
B	10 ml A + 10 ml NMSL
C	10 ml B + 10 ml NMSL
D	10 ml B + 10 ml NMSL

Vắc xin mẫu chuẩn dự tuyển được pha loãng như sau

Bảng 2: Cách pha mẫu chuẩn dự tuyển

Độ pha	Công thức pha
A	1 ống + 15ml NMSL
B	7,5 ml A + 7,5 ml NMSL
C	7,5 ml B + 7,5 ml NMSL
D	7,5 ml B + 7,5 ml NMSL

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

- Chuột sau khi tiêm miễn dịch được nuôi và theo dõi trong 35 ngày.

2.3.5.2. Lấy máu chuột, tách huyết thanh và bất hoạt

- Toàn bộ chuột được lấy máu tim riêng rẽ từng con bằng bơm tiêm vô khuẩn loại 1 ml vào các tuýp eppendof đã hấp vô khuẩn, các tuýp máu phải đặt ở tư thế nghiêng đến khi đông mới cắm vào giá.

- Đặt vào tủ ấm 37°C/1 giờ (để hoạt hoá hệ thống đông máu)

- Để tủ lạnh 4°C/ 1 giờ (làm co các sợi fibrin và huyết thanh được tiết ra tối đa).

- Ly tâm ở 4°C với tốc độ 2000-4000 vòng/phút x 10 phút

- Tách huyết thanh bằng micropipet chuyển sang từng tuýp eppendof mới vô khuẩn tương ứng.

- Bất hoạt ở nhiệt độ 56°C/30 phút trong Water Bath (bất hoạt bỏ thể), (nếu tuýp huyết thanh nào vẫn còn lẫn hồng cầu thì phải ly tâm lại lần 2).

- Bảo quản huyết thanh ở - 20° C cho đến khi kiểm tra hiệu giá kháng thể.

2.3.5.3. Chuẩn độ liều độc tổ thử nghiệm Lm/ 10.000

-Liều Lm/10000 là liều độc tổ bạch hầu (ĐTBH) có thể làm giảm sự ức chế trao đổi chất với sự có mặt của 0,0001 IU kháng độc tổ bạch hầu (KĐT BH).

-Độc tổ bạch hầu đông khô RIVM chứa 1000 Lf/ống được hoàn nguyên trong 40 ml nước muối sinh lý. Đóng ống mỗi ống 1 ml cất ở 4°C dùng dần. Liều Lr/10000 này tương đương với khoảng 1/10000 Lf/50ml. Hoặc có thể sử dụng độc tổ của IVAC dùng để chuẩn độ liều Lm.

2.3.5.4. Chuẩn độ kháng thể bạch hầu

- Mỗi loạt vắc xin dùng 4 phiên đáy bằng tương ứng với 4 độ pha, ghi ký hiệu loạt vắc xin và độ pha vào mép phiên bên phải

Pha kháng độc tổ bạch hầu chuẩn

- Kháng độc tổ bạch hầu chuẩn RIVM (hoặc WHO) chứa 10 IU/ml được pha loãng trong môi trường MEM có 10% huyết thanh bào thai bê sao cho nồng độ huyết thanh mẫu chuẩn (HTMC) cuối cùng là 0,008IU/ ml.

- Cách pha như sau:

$$A_1 = 1/100 : 20 \text{ ml KĐT BH} + 1980 \text{ ml M199} = 0,1 \text{ IU/ml}$$

$$A_2 = 1/1250 : 200 \text{ ml A} + 2300 \text{ ml M199} = 0,008 \text{ IU/ml}$$

Pha độc tổ thử nghiệm

- Căn cứ vào kết quả chuẩn độ độc tổ ở trên tính liều độc tổ thử nghiệm Lm/10000.

Ví dụ liều Lm/10000 tìm được là 1/8000. Từ độc tổ gốc pha như sau:

$$B_1 = 1/100 : 20 \text{ ml ĐTBHC} + 1980 \text{ ml Môi trường}$$

$$B_2 = 1/8000 : 1 \text{ ml B}_1 + 79 \text{ ml Môi trường}$$

Các bước tiến hành chuẩn độ kháng thể

- Mỗi độ pha miễn dịch được chuẩn độ trên 1 phiên nhựa đáy bằng 96 giếng.

- Cho 50 ml môi trường vào tất cả các giếng của phiên trừ giếng A11 - 12 bỏ trống. Riêng các giếng G11- 12 và H11-12 dùng để làm chứng tế bào, cho 100 ml môi trường.

- Huyết thanh từng chuột của mỗi độ pha miễn dịch được cho vào 1 trong 8 giếng của cột thứ nhất từ A1 đến H1, mỗi giếng 50ml.

- Dùng pipét 8 kênh pha loãng bậc 2 huyết thanh từ cột 1 đến 10 rồi bỏ đi 50 ml.

- Cho 50ml kháng độc tổ chuẩn chứa nồng độ 0,008IU/ml (0,0004IU/50 ml)

(A₂) vào các giếng A11-12 và B11-12. Từ B11-12 pha loãng bậc 2 đến D11-12 rồi bỏ đi 50ml

- Cho 50ml độc tố thử nghiệm Lm/10.000 (B₂) vào tất cả các giếng của phiên trừ giếng G11-12 và H11-12.

- Đậy nắp phiên, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng 20-25°C trong 1 giờ.

- Tách tế bào

- Cho 50ml dung dịch tế bào có chứa nồng độ 2 - 2,5.10⁵ tế bào/ml vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiên. Dán giấy phủ phiên hoặc dán băng dính xung quanh nắp phiên và ủ phiên ở nhiệt 37°C/ 4 - 6 ngày rồi đọc kết quả.

2.3.5.5. Đọc kết quả

- Sau 4-6 ngày ủ ấm kết quả thử nghiệm được ghi nhận. Sự thay đổi màu từ đỏ sang vàng được coi như không có sự ức chế trao đổi chất do các độc tố đã bị trung hoà bởi các kháng thể kháng độc tố. Hiệu giá kháng thể được tính theo điểm là giếng cuối cùng vẫn còn tế bào mọc (môi trường có màu vàng).

Các bước tiến hành:

- Lấy các phiên chuẩn độ ra khỏi tủ ấm và đặt từng phiên lên 1 mặt phẳng.

- Lật bỏ giấy phủ phiên hoặc nắp phiên 1 cách cẩn thận để quan sát được dễ dàng.

- Nếu các phiên được ủ trong điều kiện có 5% CO₂ thì phải đặt chúng lên bàn làm việc trong vài phút để cho hồi lại màu.

2.3.5.6. Tính kết quả

- Công hiệu của vắc xin thử được tính dựa trên số điểm của từng độ pha trong 4 độ pha của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử, tính theo chương trình Parallel line

hoặc dựa vào đường cong đáp ứng liều thu được từ vắc xin chuẩn và vắc xin thử qua vẽ đồ thị giữa các liều vắc xin với điểm đáp ứng của hiệu giá, công hiệu của vắc xin thử được tính theo parallel line.

a. Đánh giá kết quả

Tiêu chuẩn cho một thử nghiệm có giá trị

- Giếng A₁₁- D₁₁ và A₁₂- D₁₂ cho thấy rõ liều Lm/10.000 được pha đúng. Sau 6 ngày không xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng A_{11&12} và B_{11&12} (màu vàng). Ngược lại có xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng C_{11&12} và D_{11&12} (Màu đỏ).

- Sự ức chế trao đổi chất sẽ xảy ra ở giếng E_{11&12} và F_{11&12} (màu đỏ) là những giếng chứng độc tố (không có huyết thanh để trung hoà độc tố nên độc tố huỷ hoại tế bào).

- Ở các giếng G_{11&12} và H_{11&12} các tế bào phát triển bình thường và môi trường có màu vàng đỏ là những giếng chứng tế bào (không có độc tố và huyết thanh bạch hầu)

- Thử nghiệm phải đạt được các tiêu chuẩn đặt ra trong thử nghiệm parallel line nghĩa là phải tạo được đường thẳng và đường song song trong mỗi tương quan đáp ứng liều.

a. Tiêu chuẩn công hiệu

Thử nghiệm đạt yêu cầu khi:

- Công hiệu bạch hầu của vắc xin DTP sẽ phải ³ 30 IU/liều tiêm cho người (tức là ³ 60 IU/ml vắc xin).

- Nếu kết quả thử nghiệm không đạt yêu cầu như trên thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu ở lần nhắc lại vẫn không đạt yêu cầu trên thì loạt vắc xin bị coi là không đạt yêu cầu về công hiệu thành phần bạch hầu và phải huỷ bỏ.[1][4].

3. Kết quả

3.1. Kết quả chuẩn độ

• Trong quá trình chuẩn độ đều có các mẫu chứng âm và chứng dương:

- Không xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng $A_{11\&12}$ và $B_{11\&12}$ (màu vàng). Ngược lại có xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng $C_{11\&12}$ và $D_{11\&12}$ (màu đỏ).

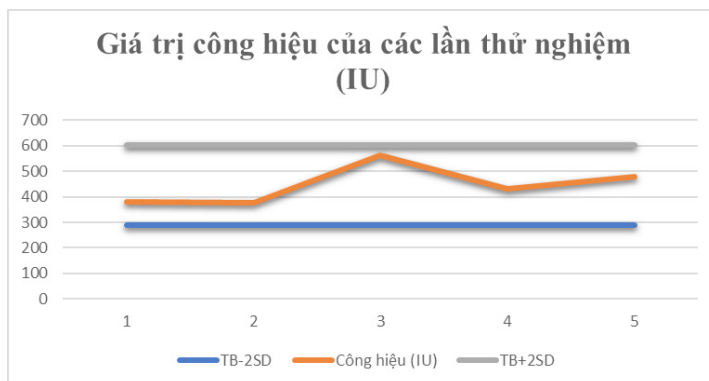
- Sự ức chế trao đổi chất sẽ xảy ra ở giếng $E_{11\&12}$ và $F_{11\&12}$ (màu đỏ) là những giếng chứng độc tố (không có huyết thanh để trung hoà độc tố nên độc tố huỷ hoại tế bào).

- Ở các giếng $G_{11\&12}$ và $H_{11\&12}$ các tế bào phát triển bình thường và môi trường có màu vàng đỏ là những giếng chứng tế bào (không có độc tố và huyết thanh bạch hầu)

• Sau khi thực hiện thử nghiệm công hiệu bạch hầu 5 lần độc lập cùng một loạt 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 cho kết quả như sau:

Bảng 3: Kết quả công hiệu

1	05/06/2019- 31/07/2019	380,982
2	22/07/2019- 04/09/2019	375,043
3	11/09/2019- 28/10/2019	563,779
4	27/09/2019-09/11/2019	431,163
5	07/10/2019-18/11/2019	479,391
Trung bình	446,072	
CV	17,53%	



4. Bàn luận

Từ các kết quả trên 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 xác định được

+ Các thử nghiệm này đều là các thử nghiệm có giá trị.

+ Hệ số biến thiên CV của các kết quả thử nghiệm là 17,53% (chuẩn chấp thuận CV nằm trong khoảng 20-50%), tuy nhiên CV càng nhỏ kết quả càng đáng tin cậy. Vì vậy các số liệu này vẫn đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian

5. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị công hiệu trung bình của vắc xin bạch hầu dự tuyển qua 5 lần thử nghiệm đều là các thử nghiệm có giá trị và công hiệu đạt 446,072 IU/ml, các giá trị này đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$.

Tài liệu tham khảo

- [1] Dược điển Việt Nam V (2017), Vắc xin bạch hầu hấp phụ, tr 998- 999.
- [2] Nguyễn Lê Huyền Trang (2015), Thẩm định quy trình, Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.
- [3] Nguyễn Phương Liên (2018), Xác định công hiệu thành phần Bạch hầu trong vắc xin DPT hấp phụ, Tài liệu lưu hành nội bộ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 2018.
- [4] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2019), 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, Công ty cổ phần in Hưng Việt, tr 304-310.
- [5] WHO technical report series No. 980 (2010), Annex 6 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT- based combined vaccines, p347-348.