

## VALIDATION OF POTENCY TEST OF THE HEPATITIS A VACCINE BY *IN VIVO* METHOD ON NMRI MOUSE LINE

**Nguyen Thi Ly\***, **Nguyen Kim Bach**, **Be Thi Tham**,  
**Nguyen Thi Hong Dinh**, **Pham Minh Tung**

*The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

*Received 3 April 2023*

*Accepted 18 May 2023*

**Abstract:** Validation of the analytical procedure is one of the important steps in assessing the suitability, stability and errors, if any, of each laboratory to ensure the reliability of the test results. Hepatitis A vaccine is one of the bio-products that have been evaluated for potency by both *in vivo* and *in vitro* methods. In this study, we focus on reporting the results of evaluating the *in vitro* potency of Hepatitis A vaccine (Havax) on NMRI mouse, using the HAV Ab ELISA diagnostic kit (Dia.Pro, Italy), code: 1120. The standard procedure for testing *in vivo* potency of Hepatitis A vaccine has been already available in the Vietnamese Pharmacopoeia, thus it was only partially validated in this study. We applied the intermediate accuracy as validation indicator: The experiment was conducted 6 times in 6 different days by the same team, under the same conditions of equipment, chemicals and materials. Acceptance criteria: Each test was valid and satisfactory; %CV of 6 trials was < 50% and the correlation potency ( $p=95\%$ ) of the test sample was not less than 1 compared to the standard vaccine. Test results: All criteria of intermediate accuracy were satisfied, given with %CV is 14.09%.

*Keywords: Evaluation, Hepatitis A vaccine, in vitro potency.*

---

\* Corresponding author  
*E-mail address:* [ly.nicvb@gmail.com](mailto:ly.nicvb@gmail.com)  
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i2.88>

## THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH CÔNG HIỆU VẮC XIN VIÊM GAN A BẰNG PHƯƠNG PHÁP *IN VIVO* TRÊN DÒNG CHUỘT NMRI

Nguyễn Thị Lý\*, Nguyễn Kim Bách, Bế Thị Thắm,  
Nguyễn Thị Hồng Định, Phạm Minh Tùng

<sup>1</sup>Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 3 tháng 4 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 5 năm 2023

**Tóm tắt:** Thẩm định quy trình phân tích là một trong những bước quan trọng đánh giá sự phù hợp, tính ổn định và các sai số của từng phòng thí nghiệm để đảm bảo độ tin cậy cho kết quả thử nghiệm. Viêm gan A là một trong các vắc xin đánh giá công hiệu theo cả 2 phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung báo cáo các kết quả thẩm định quy trình công hiệu vắc xin viêm gan A (Havax) *in vivo* trên dòng chuột NMRI, sử dụng bộ kit chuẩn đoán ELISA HAV Ab (Dia.Pro, Italy), code: 1120. Công hiệu *in vivo* của vắc xin viêm gan A là quy trình chuẩn đã có trong dược điển nên được thẩm định 1 phần, tiêu chí thẩm định sử dụng là độ chính xác trung gian: Thử nghiệm được bố trí 6 lần trong 6 ngày khác nhau bởi cùng 1 nhóm thực hiện, trong cùng điều kiện trang thiết bị, hóa chất, nguyên vật liệu. Tiêu chuẩn chấp thuận: Từng lần thử nghiệm đều đạt yêu cầu & có giá trị, %CV của 6 lần thử nghiệm <50% và công hiệu tương quan ( $p=95\%$ ) của mẫu thử không nhỏ hơn 1 so với vắc xin mẫu chuẩn. Kết quả thử nghiệm thỏa mãn tất các tiêu chí của độ chính xác trung gian đưa ra với % CV là 14,09%.

*Từ khoá:* Thẩm định, vắc xin viêm gan A, công hiệu *in vivo*.

### 1. Đặt vấn đề

Viêm gan A là bệnh do vi rút Viêm gan A gây ra. Bệnh lây truyền chủ yếu qua tiếp xúc phân - miệng. Theo ước tính trên thế giới mỗi năm có khoảng 1,4 triệu ca nhiễm mới, bệnh xảy ra phổ biến ở các nước kém và đang phát triển (chiếm 90%). Nếu nhiễm cấp tính có thể dẫn tới tử vong (năm 2015 có 11.200 ca tử vong do viêm gan A cấp tính gây lên) [1]. Bệnh chưa có thuốc chữa đặc trị, tiêm phòng vắc xin vẫn là biện pháp hiệu quả nhất. Hiện nay có rất nhiều loại vắc xin viêm gan A: Vắc xin viêm gan A sống giảm độc lực (Mevac A, Trung Quốc); vắc xin viêm gan A bất hoạt (Havax; Avaxim;

Epaxal, Havrix...). Để đảm bảo hiệu quả bảo vệ của vắc xin, kiểm tra công hiệu là một trong các thử nghiệm bắt buộc. Với vắc xin viêm gan A bất hoạt hiện có 2 phương pháp là công hiệu *in vivo* và công hiệu *in vitro*. Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung vào thử nghiệm công hiệu *in vivo* của vắc xin Viêm gan A bất hoạt. Đây là thử nghiệm rất quan trọng, cần thiết để đánh giá khả năng sinh miễn dịch của vắc xin trên động vật thí nghiệm trước khi cấp phép ra thị trường. Nên đây cũng là 1 tiêu chí xuất xưởng cho các vắc xin viêm gan A bất hoạt được khuyến cáo trong WHO TRS 858, phụ lục 2 cũng như dược điển Việt Nam và dược điển các nước [2, 3, 4].

Đây không phải là phương pháp mới nhưng để đảm bảo kết quả thử nghiệm, các labo đều phải tiến hành thẩm định một phần để đánh giá sự phù hợp của labo mình cho thử nghiệm này. Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành thẩm định một phần quy trình công hiệu vắc xin Viêm gan A với tiêu chí đánh giá độ chính xác trung gian [5, 6, 7]. Quy trình và tiêu chuẩn *in vivo* cho các vắc xin đều như nhau nên trong nghiên cứu chúng tôi chọn đại diện là vắc xin Havax.

## 2. Đối tượng nghiên cứu

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

Đối tượng nghiên cứu là mẫu chuẩn vắc xin viêm gan A (số lượng 12 lọ, lô iR/HA-02) và vắc xin Havax (Vabiotech), 120 lọ 0,5ml, hạn dùng 2022. Mẫu đối chứng: kháng thể (máu chuột) viêm gan B thu được từ 1 lô vắc xin viêm gan B.

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 9 năm 2020 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

Chuột nhắt trắng NMRI, cùng giới 5 tuần tuổi: 1080 con.

Dung dịch stock Nhôm (Sigma), code: 769460-100G; hạn dùng: 12/2022.

Bộ kit HAV Ab (Dia.Pro), code: 1120; hạn dùng: 2/2022 (12 bộ);

Nước muối sinh lý (NICVB):

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

Bình gây mê CO<sub>2</sub> (Việt Nam); Dụng cụ gây mê (Việt Nam); Dụng cụ cố định lấy máu (Việt Nam); Bơm tiêm vô trùng 3ml (Vinahankook); Bơm tiêm lấy máu (USA, code: X86829); Tuýp eppendorf 2ml (Eppendorf, code: 30120094); Tủ ấm (Sanyo, mã IC14-VR), Tủ lạnh (Panasonic, mã CI13-VR); Máy lắc (IKA, mã: VT03-VR); Dàn máy ELISA (Hurman, mã: ES08-VR); Hốt pha tiêm (TelStar, mã: LH-20); đầu côn, pipet dùng cho thử nghiệm.

### 2.4 Tóm tắt quy trình thử nghiệm (quy trình chi tiết có trong SOP VR10-01) [8]



Vắc xin mẫu thử (MT) và vắc xin mẫu chuẩn (MC) được pha loãng bậc 2 từ 1/2-1/64 bằng dung dịch stock nhôm (Al(OH)<sub>3</sub>) + dung dịch nước muối sinh lý theo tỷ lệ 1/2. Tiêm từ độ pha loãng cao nhất đến độ pha loãng thấp nhất; Mỗi độ pha tiêm ít nhất 12 con chuột; 1 ml/ổ bụng/chuột.

Sau 5 tuần lấy máu tim chuột bằng phương pháp gây mê; tách huyết thanh từng chuột riêng rẽ, ly tâm, huyết thanh được bảo quản ở -20°C cho đến khi tiến hành thử nghiệm.

Kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng bộ kit ELISA HAV Ab (Dia.Pro); Tính số chuột

cho kết quả ELISA dương tính ở mỗi độ pha của mẫu tương đương số chuột tạo được đáp ứng miễn dịch. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit-Analysis của WHOPROG.

\* Thử nghiệm có giá trị nếu [2,3,4]:

+ ED<sub>50</sub> cho cả hai vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nghiệm phải nằm trong số các liều đã tiêm.

+ Các giới hạn 95% độ tin cậy của công hiệu được xác định cho mỗi vắc xin trong thử nghiệm phải nằm trong khoảng 33-300%.

+ Các đường cong biểu diễn đáp ứng miễn dịch của chuột phải song song và được chấp thuận trong chương trình Probit-Analysis.

\* Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt yêu cầu khi công hiệu tương quan (p=95%) không nhỏ hơn 1 so với vắc xin mẫu chuẩn [2, 3, 4].

**2.5 Xác định độ chính xác trung gian [5,6,7]**

**a/ Bố trí thử nghiệm.**

- Xác định công hiệu của mẫu thử & mẫu chuẩn ở các độ pha từ 1:2-1:64 lặp lại trong 6 ngày khác nhau.

- Thử nghiệm được thực hiện bởi cùng 1 nhóm thực hiện, trong cùng điều kiện

trang thiết bị, hóa chất, nguyên vật liệu. Kết quả của từng lần thử nghiệm được ghi chép vào biểu mẫu VR10-01-F1.

**b/Phương pháp tính kết quả:**

- Dùng phần mềm Probit trong Bioassay Assist tính ra công hiệu từng lần thử nghiệm.

- Sử dụng phần mềm Excel tính SD, Mean & % CV:

+ Tính công hiệu trung bình của mẫu chuẩn

$$X_{tb} = \sum C_i/n$$

Trong đó: C<sub>i</sub>: công hiệu tương quan

n: số lần thực hiện

+ SD: độ lệch chuẩn

+ %CV = SD/X<sub>tb</sub> x100%

**c/ Tiêu chuẩn chấp thuận:** Từng lần thử nghiệm đều đạt yêu cầu & có giá trị; CV của 6 lần thử nghiệm <50% [5] và từng lần công hiệu tương quan (p=95%) của mẫu thử không nhỏ hơn 1 so với vắc xin mẫu chuẩn [2,3,4].

**3. Kết quả**

Mỗi lần làm dùng 1 bộ kit cho mẫu thử (MT) & 1 bộ kit cho mẫu chuẩn (MC), kết quả thu được như sau:

**Bảng 3a. Kết quả đánh giá thử nghiệm ELISA có giá trị qua 6 lần thực hiện (theo yêu cầu của bộ kit HAV Ab (Dia.Pro))**

Lần thử nghiệm	OD Blank < 0.100		OD Chứng âm (trung bình), NC > 0.750		OD Chứng dương (PC) < 0.300		OD Chất hiệu chỉnh (Cal) 10 mIU/ml ≥ 1.000	
	MT	MC	MT	MC	MT	MC	MT	MC
1	0.043	0.033	1.617	1.629	0.104	0.102	1.021	1.045
2	0.031	0.032	2.245	2.272	0.094	0.152	1.488	1.369
3	0.029	0.044	1.816	1.811	0.098	0.114	1.103	1.195
4	0.03	0.043	1.678	1.789	0.111	0.145	1.18	1.64
5	0.047	0.051	2.345	2.599	0.124	0.133	1.57	1.54
6	0.047	0.028	2.745	2.734	0.119	0.093	1.75	1.83
<b>Trung bình</b>	0.038	0.039	2.074	2.139	0.108	0.123	1.352	1.437
<b>SD</b>	0,0087	0,0088	0,4439	0,4633	0,0118	0,0239	0,2917	0,2909
<b>CV (%)</b>	23,068	22,925	21,399	21,662	10,901	19,373	21,579	20,251

Qua bảng 3a ta thấy tất cả các bộ kit của OD Blank, OD chứng dương, OD chứng âm và OD chất hiệu chỉnh mà bộ kit đưa ra.

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

Lần thử nghiệm	Ngày tiêm miễn dịch	Ngày làm ELISA	CH tương quan <i>in vivo</i> VGA	OD NC kit (>0.750)	OD Huyết thanh HBs (>0.750)	P 95% (ULC≥33)	P 95% (UPC≤300)
1	1/10/2020	12/11/2020	1.293	1.623	1.77	56,767	180,046
2	22/10/2020	2/12/2020	1.481	2.259	2.324	55,436	187,373
3	3/3/2021	15/4/2021	1.588	1.814	1.823	58,312	177,456
4	13/3/2021	25/4/2021	1.440	1.734	1.745	61,667	167,222
5	11/5/2021	22/6/2021	1.801	2.472	2.455	57,246	188,062
6	13/7/2021	18/8/2021	1.156	2.740	2.767	58,651	170,675
Trung bình			1.460	2.107	2.147	58,013	178,472
SD			0,225	0,451	0,429	2,127	8,510
CV (%)			14,090	21,399	19,968	3,667	4,768

Qua bảng 3b ta thấy tất cả 6 lần làm mẫu thử đều có công hiệu tương quan so với mẫu chuẩn >1,0; %CV < 50%; các cận trên và dưới (P95%) đều nằm trong giới hạn 33-300% theo yêu cầu của thử nghiệm *in vivo* đưa ra với vắc xin Viêm gan A. Đồng thời mẫu chứng âm của kit và mẫu huyết thanh chứa kháng thể HBs (không chứa HAV Ab) đều cho kết quả âm tính (có OD>0,75) chứng tỏ bộ kit HAV Ab (Dia. Pro) có độ đặc hiệu cao.

#### 4. Bàn luận

Với các thử nghiệm công hiệu *in vivo* đánh giá tính sinh miễn dịch của vắc xin qua bộ kit sinh phẩm đã được thương mại hóa như vắc xin viêm gan A là điều rất thuận lợi, vì quy trình đã được chuẩn hóa. Tuy vậy trong quá trình bảo quản, vận chuyển có thể ảnh hưởng đến chất lượng bộ sinh phẩm này. Vì vậy để đảm bảo kết quả, trước khi đánh giá mẫu thử phải đánh giá xem bộ kit có đảm bảo chất lượng hay quy trình ELISA có sai sót gì không. Mỗi kit sinh phẩm đều đưa ra các tiêu chí đánh giá riêng, với bộ kit HAV Ab (Dia.Pro), nhà sản xuất cũng

đưa ra các tiêu chí như bảng 3a và chúng tôi chọn bộ kit này vì nó có độ nhạy, độ đặc hiệu & độ chính xác đều >98%. Nhìn kết quả bảng 3a ta thấy cả 6 lần làm trên 6 bộ kit, quy trình làm đều thỏa mãn tất cả các tiêu chí nhà sản xuất đưa ra (blank, chứng âm, chứng dương, chất hiệu chỉnh (Cal)) và độ sai lệch giữa các lần (CV) đều trong tiêu chuẩn (<25%). Ngoài ra, để kiểm tra độ đặc hiệu của bộ kit HAV Ab ngoài chứng âm và chứng dương của bộ kit chúng tôi còn bố trí thêm mẫu huyết thanh HBs thu được từ vắc xin viêm gan B (như mẫu chứng âm). Kết quả cả 6 lần làm mẫu huyết thanh HBs đều cho kết quả âm tính. Chứng tỏ chất lượng bộ kit rất tốt, có độ đặc hiệu, ổn định cao do đó các kết quả mẫu thử sẽ có độ tin cậy cao.

Với mẫu thử ta thấy kết quả thu được sau 6 lần làm vào 6 thời điểm khác nhau ở bảng 3b như sau: Từng lần thử nghiệm đều đạt yêu cầu & có giá trị; CV của 6 lần thử nghiệm = 14,09% (<50%) và từng lần công hiệu tương quan (p=95%) của mẫu thử không nhỏ hơn 1 so với vắc xin mẫu chuẩn. Như vậy quy trình này thỏa mãn các

tiêu chí của độ chính xác trung gian mà tổ chức y tế thế giới đưa ra [2,3,4,5].

Thử nghiệm công hiệu có rất nhiều tiêu chí thẩm định, nhưng trong nghiên cứu này chúng tôi chọn tiêu chí đánh giá độ chính xác trung gian vì đây là một thử nghiệm trên động vật thí nghiệm, sử dụng nhiều độ pha loãng với số lượng động vật lớn và thử nghiệm tiến hành trong thời gian kéo dài (35 ngày) nên chịu ảnh hưởng nhất nhiều các yếu tố gây nhiễu về động vật, thời gian... và do đó tiêu chí độ chính xác trung gian giúp chúng ta kiểm chứng, loại trừ các sai số nếu có của phương pháp, quy trình, nguồn động vật, điều kiện chăn nuôi, môi trường, hóa chất, thiết bị, kit sinh phẩm, con người... Thử nghiệm thỏa mãn được tiêu chí này thì có thể lựa chọn để đưa quy trình này vào áp dụng thường quy. Với kết quả thu được giúp chúng ta khẳng định độ pha loãng vắc xin, dòng chuột sử dụng, bộ kit sinh phẩm sử dụng, dàn máy ELISA cùng toàn bộ các vật tư, trang thiết bị khác đều phù hợp & đảm bảo các yêu cầu quy định cho thử nghiệm công hiệu *in vivo*.

Tuy vậy phương pháp vẫn có nhược điểm đòi hỏi thời gian thực hiện kéo dài (35 ngày), có ít dòng chuột phù hợp và sử dụng 1 lượng động vật thí nghiệm lớn ... nên xu hướng hiện tại các nhà sản xuất đang cố nghiên cứu chuyển đổi sang phương pháp *in vitro* để rút ngắn thời gian và không sử dụng động vật thí nghiệm.

## 5. Kết luận

Quy trình thử nghiệm công hiệu vắc xin viêm gan A bất hoạt *in vivo* (trên dòng chuột NMRI, bộ kit HAV Ab (Dia.Pro),

code: 1120) thực hiện tại khoa Kiểm định Vắc xin Vi rút có độ tin cậy cao đạt theo tiêu chuẩn đánh giá độ chính xác trung gian 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] [https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis\\_A](https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_A).
- [2] WHO Technical Report Series, No. 858, 1995. Annex 2. Requirements for hepatitis A vaccine (inactivated)
- [3] European Pharmacopoeia 10. Hepatitis A vaccine (inactivated adsorbed); 2020. p.780-781.
- [4] Dược điển Việt Nam V. Vắc xin Viêm gan A bất hoạt hấp phụ; 2017. p.1050.
- [5] NICVB. Thẩm định quy trình. SOP KĐQG 34.
- [6] [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).
- [7] [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
- [8] Quy trình chuẩn thử nghiệm công hiệu vắc xin viêm gan A theo phương pháp *in vivo*.