

Nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn vi rút Rota cho kiểm định vắc xin Rotavin-M1

Lê Thị Luân^{1*}, Nguyễn Đăng Hiền¹, Trần Bích Hạnh¹
Nguyễn Thúy Hương¹, Lê Thu Nga¹, Nguyễn Thị Tươi¹, Nguyễn Thanh Huế¹
Nguyễn Thị Dáng Hương², Nguyễn Thị Lý³, Nguyễn Thị Yến³

¹Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế
²Bộ Y tế

³Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Ngày nhận bài 24.4.2015, ngày chuyển phản biện 4.5.2015, ngày nhận phản biện 5.6.2015, ngày chấp nhận đăng 8.6.2015

Qua nghiên cứu, Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã thiết lập được 987 ampul mẫu chuẩn nội bộ công hiệu vắc xin Rota với ký hiệu RR0213, 0,8 ml/ampul với hiệu giá 7,41 lg PFU/ml. Mẫu chuẩn sử dụng trong vòng 20-30 năm và được bảo quản ở -70°C. Loạt vắc xin mẫu chuẩn này có ý nghĩa thiết thực phục vụ cho công tác kiểm định vắc xin tại Trung tâm.

Từ khóa: vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin Rota, vi rút Rota.

Chỉ số phân loại 3.3

RESEARCH INTO PRODUCING A STANDARD VACCINE FOR ROTAVIN-M1 QUALITY CONTROL

Summary

A Rota vaccine reference RR0213 has been established by Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals with 987 ampuls, 0.8 ml/ampul with the titer of 7.41 lg PFU/ml. They are kept at -70°C and can be usable in 20-30 years. This important standard vaccine is served for control quality of vaccines at the Center.

Keywords: Rota vaccine, Rotavin-M1, standard vaccine.

Classification number 3.3

Đặt vấn đề

Vắc xin mẫu chuẩn đóng vai trò không thể thiếu để thực hiện các thử nghiệm kiểm định theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO). Ở Việt Nam, nhu cầu sử dụng vắc xin mẫu chuẩn rất lớn. Mỗi năm, các phòng thử nghiệm vắc xin cần sử dụng hàng trăm lọ mẫu chuẩn cho một sản phẩm, trong khi đó Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là cơ quan có thẩm quyền duy nhất được WHO cung cấp mẫu chuẩn với số lượng rất hạn chế, tối đa 5 lọ/năm. Các mẫu chuẩn này phải trải qua nhiều thủ tục nhập khẩu phức tạp, tốn kém, ngoài ra chất lượng mẫu chuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình vận chuyển và bảo quản không đúng quy định khi lưu kho hải quan. Do đó, việc xây dựng mẫu chuẩn quốc gia là vô cùng cấp thiết. Tuy nhiên, mẫu chuẩn quốc gia hiện nay chưa có, do vậy việc nghiên cứu quy trình tạo mẫu chuẩn địa phương là vô cùng quan trọng và cấp bách. Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã sản xuất được vắc xin Rotavin-M1, do vậy mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập mẫu chuẩn công hiệu nội bộ vắc xin Rota phục vụ cho kiểm định vắc xin tại Trung tâm.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Sử dụng chủng G1P [1], tế bào vero, các loại môi trường đủ cho sản xuất 3 loạt vi rút, 3 loạt này bảo quản ở -60°C. 3

*Tác giả chính

loạt được kiểm tra vô trùng, hiệu giá vi rút, pH và cảm quan, nếu kết quả đạt theo yêu cầu sẽ được chọn làm ứng cử viên mẫu chuẩn công hiệu, ứng cử viên này sẽ được kiểm tra 15 lần hiệu giá, mỗi lần 5 mẫu để xác định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn. Sau đó, ứng cử viên được đóng vào vào ampul với dung tích 0,8 ml/ampul, tổng ampul tối thiểu là 900 cho mỗi ứng cử viên. Các ứng cử viên được bảo quản ở -60°C và được lấy mẫu ngẫu nhiên, kiểm tra 15 ampul ngẫu nhiên (>1%), thực hiện 3 lần, mỗi lần 5 ampul khác nhau, kiểm tra cùng một thời điểm với các thông số như hiệu giá vi rút, vô trùng, pH, cảm quan. Ứng cử viên được lựa chọn làm mẫu chuẩn khi đủ các điều kiện: không nhiễm vi khuẩn, nấm và Mycoplasma; pH: 6,5-8,5; dung dịch có màu hồng trong suốt; hàm lượng vi rút Rota trong ứng cử viên mẫu chuẩn $\geq 10^6$ PFU/ml với độ lệch chuẩn (SD), khoảng dao động $\pm 2SD$ và lựa chọn ứng cử viên làm mẫu chuẩn nếu $SD \leq 0,25$. Sau khi mẫu chuẩn đã được xác định, dùng mẫu chuẩn trong kiểm định vắc xin và phân tích các kết quả thu được.

Kết quả

Kết quả kiểm tra các ứng cử viên mẫu chuẩn được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: kết quả kiểm tra các ứng cử viên mẫu chuẩn

Tên ứng cử viên mẫu chuẩn	Số lượng ampul	Kết quả			
		Hiệu giá lg PFU/ml	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
RR0113	1219	6,68	Âm tính	7,39	Đạt
RR0213	987	7,41	Âm tính	7,22	Đạt
RR0313	1125	6,21	Âm tính	7,20	Đạt

Bảng 1 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113, RR0213 và RR0313 đều đạt các chỉ số quy định về vi khuẩn, nấm, pH, cảm quan và hiệu giá. Không có mẫu nào nhiễm vi khuẩn hoặc nấm; pH cả 3 ứng cử viên trong dải từ 7,20 tới 7,39; hiệu giá vi rút từ 6,21 đến 7,41 lg PFU/ml.

Hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: xác định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	6,79±0,11	Âm tính	7,37	Đạt
2	6,79±0,10	Âm tính	7,35	Đạt
3	6,72±0,16	Âm tính	7,40	Đạt
4	6,63±0,17	Âm tính	7,35	Đạt
5	6,62±0,18	Âm tính	7,31	Đạt
6	6,57±0,17	Âm tính	7,40	Đạt
7	6,54±0,19	Âm tính	7,32	Đạt
8	6,63±0,16	Âm tính	7,37	Đạt
9	6,84±0,11	Âm tính	7,33	Đạt
10	6,67±0,14	Âm tính	7,35	Đạt
11	6,65±0,15	Âm tính	7,39	Đạt
12	6,58±0,13	Âm tính	7,32	Đạt
13	6,65±0,16	Âm tính	7,40	Đạt
14	6,64±0,14	Âm tính	7,38	Đạt
15	6,66±0,14	Âm tính	7,36	Đạt
16	6,82±0,15	Âm tính	7,34	Đạt
TB	6,68±0,09 (6,49-6,87)			

Bảng 2 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,31-7,40; nồng độ vi rút từ 6,54±0,19 đến 6,84±0,11 lg PFU/ml, SD đều <0,25; nồng độ vi rút trung bình 6,68±0,09 lg PFU/ml. Ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn khi thử nghiệm xác định tính đồng nhất khi hiệu giá dao động từ 6,49-6,87 lg PFU/ml.

Kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0113 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0113

Lần thử nghiệm	Ampul									
	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)
1	1	6,62	2	6,7	3	6,74	4	6,68	5	6,76
2	6	6,68	7	6,85	8	6,73	9	6,85	10	7,01
3	11	7,11	12	6,99	13	6,91	14	6,85	15	6,9

Bảng 3 là kết quả thử nghiệm xác định tính đồng nhất trong các ampul vắc xin mẫu chuẩn. Thử nghiệm

này được tiến hành 3 lần, mỗi lần 5 ampul ngẫu nhiên trong 1219 ampul vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 (1,3%), kết quả cho thấy, ở lần thử nghiệm thứ nhất cả 5 ampul đều đạt hiệu giá trong khoảng 6,49-6,87 lg PFU/ml. Nhưng tới lần 2, 1/5 ampul hiệu giá không trong giới hạn cho phép. Đặc biệt ở lần 3, 4/5 ampul hiệu giá nằm ra ngoài giới hạn cho phép. Điều này chứng tỏ vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 không đồng nhất trong các ampul, không được sử dụng làm mẫu chuẩn cho thử nghiệm công hiệu vắc xin.

Kết quả thử nghiệm về tính ổn định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213 được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: kết quả xác định tính ổn định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	7,40±0,05	Âm tính	7,23	Đạt
2	7,40±0,05	Âm tính	7,22	Đạt
3	7,30±0,12	Âm tính	7,22	Đạt
4	7,26±0,13	Âm tính	7,24	Đạt
5	7,36±0,11	Âm tính	7,25	Đạt
6	7,35±0,16	Âm tính	7,23	Đạt
7	7,42±0,11	Âm tính	7,21	Đạt
8	7,33±0,12	Âm tính	7,20	Đạt
9	7,45±0,14	Âm tính	7,20	Đạt
10	7,52±0,11	Âm tính	7,24	Đạt
11	7,48±0,13	Âm tính	7,26	Đạt
12	7,40±0,09	Âm tính	7,23	Đạt
13	7,48±0,13	Âm tính	7,25	Đạt
14	7,49±0,16	Âm tính	7,24	Đạt
15	7,48±0,08	Âm tính	7,21	Đạt
16	7,49±0,11	Âm tính	7,22	Đạt
TB	7,41±0,08 (7,25-7,57)			

Bảng 4 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0213 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,20-7,26; nồng độ vi rút từ 7,30±0,12 đến 7,52±0,11 lg PFU/ml, SD đều nhỏ hơn 0,25; nồng độ vi rút trung bình 7,41±0,08 lg PFU/ml. Với kết quả này, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0213 được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn khi thử nghiệm xác định tính đồng nhất khi hiệu giá dao động từ 7,25-7,57 lg PFU/ml.

Kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213 được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5: kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213

Lần thử nghiệm	Ampul									
	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)
1	1	7,48	2	7,37	3	7,42	4	7,36	5	7,47
2	6	7,36	7	7,34	8	7,49	9	7,46	10	7,43
3	11	7,44	12	7,38	13	7,43	14	7,4	15	7,41

Thử nghiệm xác định tính đồng nhất trong các ampul vắc xin mẫu chuẩn được tiến hành 3 lần, mỗi lần 5 ampul ngẫu nhiên trong 987 ampul vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 (1,5%), kết quả cho thấy cả 3 lần thử nghiệm 15/15 ampul đều đạt hiệu giá trong khoảng 7,25-7,57 lg PFU/ml. Điều này chứng tỏ vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0213 đồng nhất trong các ampul, được sử dụng làm mẫu chuẩn cho thử nghiệm công hiệu vắc xin Rota. Khi sử dụng mẫu chuẩn trong thử nghiệm công hiệu của vắc xin Rotavin-M1 hoặc các thử nghiệm liên quan đến hiệu giá vắc xin Rota, nếu vắc xin mẫu chuẩn có hiệu giá từ 7,25-7,57 lg PFU/ml thì kết quả của mẫu thử nghiệm được chấp nhận.



Hình 1: hiệu giá mẫu chuẩn RR0213 sử dụng trong kiểm định vắc xin

Hình 1 cho thấy, sử dụng vắc xin mẫu chuẩn RR0213 trong 14 lần kiểm tra hiệu giá vắc xin Rotavin-M1, vắc xin được chấp nhận hiệu giá vì mẫu chuẩn nằm trong giới hạn quy định 7,25-7,57 lg PFU/ml.

Kết quả xác định hiệu giá ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0311 được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: kết quả xác định hiệu giá ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0311

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	6,13±0,26	Âm tính	7,20	Đạt
2	6,00±0,22	Âm tính	7,18	Đạt
3	6,15±0,13	Âm tính	7,20	Đạt
4	6,13±0,16	Âm tính	7,21	Đạt
5	6,26±0,16	Âm tính	7,19	Đạt
6	6,06±0,15	Âm tính	7,19	Đạt
7	6,26±0,13	Âm tính	7,21	Đạt
8	5,71±0,27	Âm tính	7,20	Đạt
9	6,33±0,06	Âm tính	7,22	Đạt
10	6,53±0,17	Âm tính	7,18	Đạt
11	6,19±0,24	Âm tính	7,21	Đạt
12	6,32±0,09	Âm tính	7,22	Đạt
13	6,31±0,18	Âm tính	7,23	Đạt
14	6,25±0,10	Âm tính	7,17	Đạt
15	6,50±0,13	Âm tính	7,18	Đạt
16	6,26±0,16	Âm tính	7,18	Đạt
TB	6,21±0,19 (6,02-6,40)			

Bảng 6 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0313 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,17-7,23; nồng độ vi rút từ 5,71±0,27 đến 6,53±0,17 lg PFU/ml nhưng 2/15 lần thử nghiệm SD cao hơn 0,25 nên ứng cử viên này không được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn.

Bàn luận

Theo hướng dẫn của WHO về xây dựng các sinh phẩm chuẩn [1-4], Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã thiết lập được một số mẫu chuẩn [5-7], trong đó có mẫu chuẩn nội bộ về công hiệu vắc xin Rota với ký hiệu RR0213 từ 3 ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113, RR0213 và RR0313.

Bản chất, nguồn gốc và bảo quản mẫu chuẩn nội bộ RR0213: thành phần của vật liệu sử dụng làm mẫu chuẩn nội bộ giống thành phần của mẫu thử. Mẫu chuẩn có độ ổn định cao, có hoạt tính đặc hiệu phù hợp và tính đồng nhất. Với lượng mẫu chuẩn 987 ampul bảo quản tại nhiệt độ -70°C, lượng mẫu chuẩn này có thể đủ sử dụng trong 20-30 năm. RR0213 đạt được những tiêu chuẩn phù hợp cho mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn được lấy một phần mẽ bán thành phẩm được trộn thật kỹ nên đạt được tính đồng nhất. Lượng mẫu chuẩn trong một ampul có thể thực hiện được ít nhất 2 lần

thử nghiệm. Mẫu chuẩn ở dạng dung dịch và được bảo quản tại nhiệt độ -70°C nên có độ ổn định cao. Ampul đựng mẫu có độ bền vững để chịu được các điều kiện bảo quản nhiệt độ dưới -70°C nên không ảnh hưởng đến sản phẩm trong quá trình bảo quản lâu dài. Mẫu chuẩn RR0213 đều đạt tất cả các yêu cầu của một mẫu chuẩn [1-4].

RR0213 là mẫu chuẩn công hiệu vắc xin Rota duy nhất tại nước ta, hiện nay Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm cũng chưa được cung cấp mẫu chuẩn quốc tế cho hiệu chuẩn mẫu chuẩn quốc gia và nội bộ. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã dựa vào công hiệu của chủng sản xuất vắc xin Rotavin-M1 để hiệu chỉnh mẫu chuẩn nội này. Mẫu chuẩn này có hiệu giá 7,41 lg PFU/ml, khi sử dụng mẫu chuẩn tại các phòng thí nghiệm khác, kết quả mẫu thử được xác định khi hiệu giá mẫu chuẩn trong thử nghiệm đạt 7,41±0,5 lg PFU/ml.

Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập được loạt vắc xin mẫu chuẩn RR0213 từ 3 ứng cử viên: RR0113, RR0213 và RR0313. Mẫu chuẩn RR0213 đạt tất cả các chỉ tiêu về vắc xin mẫu chuẩn. Hiệu giá vắc xin mẫu chuẩn này là 7,41.

Tài liệu tham khảo

- [1] WHO Consultation on Recommendation for the Preparation (2004), *Characterization, and Establishment of WHO International Standards and Other Biological Reference Material*, Geneva, World Health Organization, 2004 (QSB/IVB/WHO).
- [2] WHO Expert Committee on Biological Standardization: TRS 962.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization: TRS 963.
- [4] WHO Technical Report Series (revised 2004), *Recommendation for the preparation, characterization, and establishment of International and other biological reference standards*, Annex 2, No 932.2006, pp.74-127.
- [5] Viện Vắc xin và Các chế phẩm sinh học (1999), *Nghiên cứu sản xuất vắc xin mẫu chuẩn quốc gia bạch hầu, ho gà, uốn ván*.
- [6] Lê Thu Nga, Lê Thị Luân, Nguyễn Đăng Hiền, Ngô Thu Hường, Ngô Thị Thanh Hương (2013), “Chất lượng mẫu chuẩn vắc xin sởi dự tuyển sản xuất tại POLYVAC”, *Tạp chí Y học dự phòng*, **12(148)**, tr.97-102.
- [7] Hoàng Thị Liên (2000), “Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn hiệu lực cho mẫu chuẩn quốc gia vắc xin uống phòng bệnh bại liệt”, *Luận án Tiến sĩ Y học*.