

CÔNG TY VẮCXIN VÀ SINH PHẨM SỐ 1

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
VẮCXIN HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B (HIB)
CỘNG HỢP Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM**

CNĐT: NGUYỄN THU VÂN

8504

HA NOI – 2010

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng số	Tên bảng	Trang
1.1.	Thành phần của một số vắc xin Hib cộng hợp hiện đang được sử dụng	14
1.2.	Hiệu quả vắc xin ước tính từ các thử nghiệm lâm sàng với vắc xin Hib	18
1.3.	Tiêu chuẩn của TCYTTG và của nhà sản xuất đối với vắc xin Hib cộng hợp	34
2.1.	Đặc điểm của các chủng Hib phân lập từ các bệnh nhân Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin Hib cộng hợp	41
2.2.	Tiêu chuẩn phân loại theo týp sinh học của các loài thuộc <i>Haemophilus influenzae</i>	48
2.3.	Hệ thống chủng giống cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp	51
3.1.	Đánh giá hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn theo thời gian và nhiệt độ nuôi cấy khác nhau trên nôi lên men	56
3.2.	Kết quả thu hoạch tủa polysaccharide Hib	60
3.3.	Kết quả kiểm tra chất lượng các polysaccharide Hib sau tinh chế	71
3.4.	Kết quả về tỷ lệ hàm lượng axit nucleic trong sản phẩm polysaccharide sau tinh chế của các chủng Hib khác nhau	72
3.5.	So sánh tỷ lệ tạo dẫn xuất sau khi sử dụng chất hoạt hóa CDAP và CNBr	77
3.6.	Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm sau cộng hợp	86
3.7.	Kết quả đáp ứng miễn dịch của sản phẩm sau cộng hợp theo các quy trình tạo dẫn xuất và cộng hợp khác nhau	88
3.8.	Kết quả đáp ứng miễn dịch trên chuột của các dạng vắc xin Hib cộng hợp có công thức pha với hàm lượng nhôm khác nhau	90
4.1.	Kết quả nuôi cấy vi khuẩn trên nôi lên men 10 lít của các loạt sản xuất thử nghiệm	95

4.2.	Kết quả thu hoạch tủa polysaccharide Hib	96
4.3.	Kết quả kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau tinh chế của các loạt sản xuất thử nghiệm	97
4.4.	Kết quả kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau khi tạo dẫn xuất với ADH của các loạt sản xuất thử nghiệm	102
4.5.	Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm sau cộng hợp của các loạt sản xuất thử nghiệm	104
4.6.	Kết quả pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm các loạt sản xuất thử nghiệm	107
4.7.	Kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm tại cơ sở của các loạt sản xuất thử nghiệm vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch (ALHIBVAX)	109
4.8.	Kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm tại cơ sở của các loạt sản xuất thử nghiệm vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô (LYOHIBVAX)	110
5.1.	Tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp (dạng lỏng)	139
6.1.	Kết quả kiểm tra tính an toàn chung của vắc xin Hib cộng hợp	148
6.2.	Kết quả kiểm tra chất gây sốt của vắc xin Hib cộng hợp	149
6.3.	Kết quả đáp ứng miễn dịch đối với cộng hợp vắc xin Hib của các giống chuột khác nhau	151
6.4.	Kết quả đáp ứng miễn dịch của các dạng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm	152

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADH	Adipic dihydranizide
BHI	Môi trường BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CDAP	1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate
CNBr	Cyanogen bromide
DTP	Vắc xin bạch hầu-uốn ván-ho gà (<i>Diphtheria-Tetanus-Pertussis</i>)
EP	Dược điển châu Âu (<i>European Pharmacopoeia</i>)
HbOC	Vắc xin Hib cộng hợp với CRM197 (đột biến không gây độc của độc tố bạch hầu)
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> type b
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HPSEC	Sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao (<i>High-performance anion-exchange chromatography</i>)
HPSEC-PAD	Sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với đầu dò xung điện (<i>High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
LAL	Thử nghiệm xác định nội độc tố theo phương pháp LAL (<i>Limulus amoebocyte lysate</i>)
NAD	Nicotinamide adenin dinucleotide
NIH	Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa Kỳ (<i>National Institute of Health</i>)
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
OMP	Protein màng ngoài (<i>Outer membrane protein</i>)
Pa	Vắc xin ho gà vô bào (<i>Acellular pertussis</i>)
PFGE	Điện di trường xung điện (<i>Pulsed Field Gel electrophoresis</i>)
PRP	Polysaccharide của Hib (<i>Polyribosyl-ribitol-phosphate</i>)
PRP-D	Vắc xin Hib cộng hợp với giải độc tố bạch hầu
PRP-OMP	Vắc xin Hib cộng hợp với phức hợp protein màng ngoài của chủng <i>Neisseria meningitidis</i> nhóm B
PRP-T	Vắc xin Hib cộng hợp với giải độc tố uốn ván

Pw	Vắcxin ho gà toàn tế bào (<i>Whole-cell pertussis</i>)
SDS-PAGE	Điện di trên gel acrylamide (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TCYTTG	Tổ chức Y tế thế giới (<i>WHO</i>)
TNBS	Axít 2,2,6-trinitrobenzenesulfonic
TT	Giải độc tố uốn ván (<i>Tetanus toxoid</i>)
VABIOTECH	Công ty Vắcxin và sinh phẩm số 1
VVSDT	Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình số	Tên hình	Trang
1.1.	Cấu trúc của các loại vắc xin Hib cộng hợp	14
1.2.	So sánh đáp ứng tạo kháng thể của 4 loại vắc xin Hib cộng hợp	16
2.1.	Quy trình sản xuất hệ chủng Hib giống gốc	43
2.2.	Quy trình sản xuất hệ chủng Hib giống sản xuất	44
2.3.	Quy trình đánh giá hệ chủng Hib giống trong thời gian bảo quản	44
2.4.	Tóm tắt quy trình xác định trình tự đoạn gen 16S rDNA của vi khuẩn	49
3.1.	Tóm tắt quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp	54
3.2.	Sơ đồ tóm tắt quy trình nuôi cấy vi khuẩn Hib	55
3.3.	So sánh hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn Hib theo thời gian và nhiệt độ khác nhau trên nền men giữa chủng 1544 và chủng 1419	57
3.4.	So sánh hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn Hib theo thời gian và nhiệt độ khác nhau trên nền men của chủng Eagan	57
3.5.	Sơ đồ tóm tắt quy trình bất hoạt và thu hoạch polysaccharide Hib	59
3.6.	Sơ đồ tóm tắt quy trình tinh chế polysaccharide Hib	62
3.7.	Sắc ký xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib của chủng 1419 và chủng 1544	73
3.8.	Sắc ký xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib của chủng 1544 và chủng Eagan	74
3.9.	Sắc ký tinh chế dẫn xuất polysaccharide Hib và ADH	78
3.10.	Sắc ký tinh chế giải độc tổ uốn ván	79
3.11.	Sắc ký tinh chế cộng hợp PRP-T	80
3.12.	Ngưng kết với các kháng huyết thanh đặc hiệu của các phân đoạn khi tinh chế cộng hợp PRP-T	81

3.13.	Hình ảnh chạy sắc ký HPLC sản phẩm cộng hợp PRP-T	87
3.14.	Hình ảnh chạy sắc ký HPLC giải độc tổ uốn ván (TT)	87
3.15.	Sơ đồ tóm tắt các quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm	89
3.16.	Sơ đồ tổng thể quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm	93
4.1.	Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0109	99
4.2.	Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0209	100
4.3.	Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0309	101
4.4.	Sắc ký tinh chế giải độc tổ uốn ván các loạt sản xuất thử nghiệm	103
4.5.	Sắc ký tinh chế cộng hợp các loạt thử nghiệm 0109, 0209 và 0309	105
4.6.	Sắc ký tinh chế cộng hợp các loạt thử nghiệm 0409, 0509 và 0609	106
6.1.	Cách thức và vị trí tiêm chuột gây miễn dịch	143
6.2.	Sơ đồ gây miễn dịch và lấy máu chuột	143

MỤC LỤC

NỘI DUNG	Trang
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1-TỔNG QUAN	5
1.1. TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC	5
1.2. VẮC XIN <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> TYPE B (HIB)	11
1.2.1. Vắc xin Hib dạng polysaccharide	11
1.2.2. Vắc xin Hib cộng hợp	12
1.3. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VẮC XIN HIB CỘNG HỢP	22
1.3.1. Tổng quan về quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp	22
1.3.2. Phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp	26
1.4. ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC, TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ SẢN XUẤT VẮC XIN <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> TYPE B (HIB) CỘNG HỢP TẠI VIỆT NAM	36
CHƯƠNG 2-XÂY DỰNG HỆ CHŨNG GIỐNG CHO SẢN XUẤT VẮC XIN HIB CỘNG HỢP	40
2.1. NGUỒN GỐC CỦA CÁC CHŨNG HIB SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU	40
2.1.1. Nguồn gốc các chủng Hib của Việt Nam	40
2.1.2. Nguồn gốc chủng Hib của NIH	41
2.2. QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH HỆ CHŨNG GIỐNG CHO SẢN XUẤT VẮC XIN HIB CỘNG HỢP	42
2.2.1. Quy trình sản xuất hệ chủng giống gốc (master seed lot)	42
2.2.2. Quy trình sản xuất hệ chủng giống sản xuất (working seed lot)	43
2.2.3. Quy trình đánh giá hệ chủng giống trong thời gian bảo quản	44
2.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHŨNG GIỐNG VI KHUẨN HIB	45

2.3.1. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc và độ thuần khiết	45
2.3.2. Kiểm tra hình thể vi khuẩn	45
2.3.3. Kiểm tra độ sống	45
2.3.4. Thử nghiệm với yếu tố X và V	46
2.3.5. Thử nghiệm định týp huyết thanh vi khuẩn	46
2.3.6. Thử nghiệm định týp sinh học <i>Haemophilus influenzae</i>	47
2.3.7. Thử nghiệm xác định vi khuẩn <i>Haemophilus influenzae</i> bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rDNA	48
2.3.8. Thử nghiệm xác định độ ẩm tồn dư trong các ống chủng sau khi đông khô	49
2.4. KẾT QUẢ XÂY DỰNG HỆ CHỨNG GIỐNG CHO SẢN XUẤT VẮCXIN HIB CỘNG HỢP	50
CHƯƠNG 3-XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮCXIN HIB CỘNG HỢP Ở QUY MÔ	52
3.1. QUY TRÌNH NUÔI CẤY VI KHUẨN	54
3.2. QUY TRÌNH BẮT HOẠT VÀ THU HOẠCH POLYSACCHARIDE HIB	59
3.3. QUY TRÌNH TINH CHẾ POLYSACCHARIDE HIB	61
3.3.1. Các thử nghiệm kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau tinh chế	62
3.3.2. Kết quả nghiên cứu quy trình tinh chế polysaccharide Hib	69
3.4. QUY TRÌNH TẠO DẪN XUẤT POLYSACCHARIDE HIB VỚI ADH	75
3.5. QUY TRÌNH TINH CHẾ VÀ CÔ ĐẶC BÁN THÀNH PHẨM GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN	78
3.6. QUY TRÌNH CỘNG HỢP POLYSACCHARIDE HIB VỚI GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN	80
3.6.1. Các thử nghiệm kiểm tra chất lượng sản phẩm sau cộng hợp	81
3.6.2. Kết quả nghiên cứu quy trình cộng hợp	85
3.7. QUY TRÌNH PHA BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG VÀ SẢN XUẤT VẮCXIN THÀNH PHẨM	89
CHƯƠNG 4 - SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM VẮCXIN HIB CỘNG HỢP Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM	94

4.1. KẾT QUẢ NUÔI CẤY CHỦNG HIB TRÊN NỒI LÊN MEN	94
4.2. KẾT QUẢ BẤT HOẠT VÀ THU HOẠCH POLYSACCHARIDE	96
4.3. KẾT QUẢ TINH CHẾ POLYSACCHARIDE HIB	96
4.4. KẾT QUẢ TẠO DẪN XUẤT POLYSACCHARIDE HIB VỚI ADH	102
4.5. KẾT QUẢ TINH CHẾ VÀ CÔ ĐẶC BÁN THÀNH PHẨM GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VẮN	102
4.6. KẾT QUẢ CỘNG HỢP POLYSACCHARIDE HIB VỚI GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VẮN	104
4.7. KẾT QUẢ PHA BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG VÀ SẢN XUẤT VẮCXIN THÀNH PHẨM	107
4.8. KẾT QUẢ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VẮCXIN THÀNH PHẨM TẠI CƠ SỞ	108
CHƯƠNG 5 - XÂY DỰNG QUY TRÌNH KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VÀ TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO VẮCXIN HIB CỘNG HỢP	112
5.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA SINH HỌC	113
5.1.1. Phương pháp kiểm tra vô khuẩn	113
5.1.2. Phương pháp kiểm tra an toàn chung	116
5.1.3. Phương pháp kiểm tra chất gây sốt	119
5.1.4. Thử nghiệm nhận dạng	121
5.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HÓA LÝ	123
5.2.1. Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng	123
5.2.2. Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô	127
5.2.3. Xác định pH trong vắc xin cộng hợp	128
5.2.4. Định lượng thimerosal trong vắc xin Hib cộng hợp	129
5.2.5. Định lượng nhôm trong vắc xin Hib cộng hợp	132
5.2.6. Xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô	134
5.2.7. Kiểm tra tính chất vật lý vắc xin Hib cộng hợp	137

5.3. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO VẮCXIN HIB CỘNG HỢP	138
CHƯƠNG 6 - ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC VẮCXIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM	140
6.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA VẮCXIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM	141
6.1.1. Các phương pháp đánh giá tính an toàn của vắc xin trên động vật thí nghiệm	141
6.1.2. Các phương pháp đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin trên chuột	141
6.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC CỦA VẮCXIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM	148
6.2.1. Tính an toàn của vắc xin Hib cộng hợp trên động vật thí nghiệm	148
6.2.2. Đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp trên động vật thí nghiệm	149
KẾT LUẬN	154
KIẾN NGHỊ	158
TÀI LIỆU THAM KHẢO	159
PHỤ LỤC	

MỞ ĐẦU

Haemophilus influenzae type b (Hib) là vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm làm ít nhất 3 triệu người mắc và 400 đến 700 nghìn người chết mỗi năm. Phần lớn số ca bệnh là viêm màng não và viêm phổi ở trẻ dưới 5 tuổi. Viêm màng não do Hib luôn là một vấn đề nghiêm trọng tại các nước đang phát triển với tỷ lệ tử vong cao và có đến 15 đến 35% các trường hợp để lại di chứng lâu dài sau khi khỏi bệnh như chậm phát triển tâm thần và điếc. Hib lây truyền qua đường hô hấp và những người mang mầm bệnh không triệu chứng là nguồn phát tán chính vi khuẩn gây bệnh. Trong nhóm trẻ chưa được tiêm vắc xin, có từ 0,5 đến 3% trẻ khỏe mạnh mang chủng Hib ở vùng mũi họng. Một mối quan ngại khác là sự bùng phát của các chủng Hib kháng kháng sinh đặc biệt là các kháng sinh thường được sử dụng trong điều trị như ampicillin, amoxicillin. Do đó, hiện vắc xin được xem là cách thức phòng bệnh Hib hữu hiệu nhất trong cộng đồng.

Vắc xin đầu tiên chống lại bệnh Hib là vắc xin chỉ có duy nhất một thành phần polysaccharide vỏ. Vắc xin polysaccharide đơn thuần cho đáp ứng miễn dịch không phụ thuộc vào tế bào lympho T. Vắc xin này không có được hiệu quả sinh đáp ứng miễn dịch ở nhóm trẻ dưới 24 tháng tuổi, nhóm có nguy cơ mắc bệnh, tử vong cao nhất và không tạo được miễn dịch trí nhớ nên đáp ứng có được không kéo dài. Do đó, các nhà khoa học đã cải tiến và tìm ra loại vắc xin Hib mới - vắc xin cộng hợp. Vắc xin cộng hợp polysaccharide đầu tiên đã có mặt trên thế giới vào đầu những năm 90. Hiện trên thế giới có 4 loại vắc xin Hib cộng hợp chính đã được cấp phép sử dụng tại nhiều nước khác nhau. Thành phần của các vắc xin này đều chứa polysaccharide vỏ của Hib được liên kết đồng hóa trị với các protein tải. Các loại vắc xin khác nhau sẽ khác nhau về độ dài của polysaccharide, bản chất của protein tải và phương

pháp để liên kết hai thành phần này với nhau. Tất cả các loại vắc xin Hib cộng hợp được sản xuất hiện nay đều gây được đáp ứng miễn dịch tốt. Kháng thể sinh ra sau khi tiêm vắc xin cộng hợp có khả năng tiêu diệt vi khuẩn mạnh hơn so với kháng thể có được sau khi tiêm vắc xin chỉ có polysaccharide đơn thuần. Các cá thể được tiêm vắc xin cộng hợp, số lượng chủng vi khuẩn Hib cư trú trong khoang mũi họng giảm đi rõ rệt do đó làm giảm khả năng lây truyền của vi khuẩn tới các nhóm chưa được tiêm phòng.

Vắc xin Hib cộng hợp hiện đã bổ sung vào danh sách các vắc xin đem lại thành công đáng kể làm thay đổi căn bản tình trạng sức khỏe trẻ em tại nhiều quốc gia trên thế giới. Trong 20 năm qua, các bệnh do Hib gây ra đã chuyển từ căn nguyên phổ biến nhất sang một bệnh gần như không còn được ghi nhận và tiến tới dần loại trừ ở các nước đã triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp rộng rãi cho trẻ em như Tây Âu, Canada, Mỹ, Úc và New Zealand, đồng thời nhiều nghiên cứu cũng cho thấy hiệu quả phòng bệnh cao của vắc xin Hib cộng hợp đối với những khu vực có tỷ lệ lưu hành bệnh cao và các nước đang phát triển. Từ năm 1998, Tổ chức Y tế Thế giới (TCYTTG) đã khuyến cáo triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp trên toàn thế giới cho trẻ dưới 5 tuổi. Tuy nhiên, do có sự khác biệt về tình hình dịch tễ học, công tác chăm sóc sức khỏe và điều kiện kinh tế, vắc xin Hib cộng hợp sẽ được triển khai vào chương trình tiêm chủng mở rộng quốc gia khác nhau với thời gian và chiến lược khác nhau. Trọng tâm của khuyến cáo này hướng đến các nước mà các bệnh do Hib gây ra đang là một vấn đề của y tế cộng đồng.

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu dịch tễ học về Hib đã được tiến hành tại các địa phương khác nhau. Tỷ lệ mắc viêm màng não do Hib là 12/100.000 trẻ dưới 5 tuổi và 26/100.000 trẻ dưới 2 tuổi. Trên quy mô toàn quốc ước tính mỗi năm có 1.005 trẻ dưới 5 tuổi phải nhập viện vì viêm màng não và 5.107 trẻ phải nhập viện vì viêm phổi do Hib. Trong số các trẻ mắc

viêm màng não do Hib, có ít nhất 100 trẻ sẽ để lại các di chứng thần kinh nghiêm trọng và 40 trường hợp sẽ chết. Việt Nam cần phải ưu tiên xây dựng hệ thống báo cáo ca bệnh đặc biệt là các ca bệnh có kết quả xét nghiệm dương tính và nhanh chóng triển khai tiêm phòng rộng rãi vắc xin Hib cộng hợp cho trẻ em.

Vắc xin Hib cộng hợp là một dạng vắc xin hóa học điều chế từ kháng nguyên của vi khuẩn. Hiện nay Việt Nam chưa có cơ sở nào sản xuất được vắc xin Hib kể cả vắc xin dạng polysaccharide đơn thuần và vắc xin cộng hợp. Công nghệ sản xuất vắc xin vi khuẩn tại Việt Nam phần lớn vẫn sử dụng các công nghệ cổ điển như nuôi cấy, thu hoạch và bất hoạt toàn tế bào vi khuẩn hoặc độc tố của vi khuẩn. Tuy nhiên, các vắc xin chứa các vi khuẩn toàn tế bào đặc biệt là các vắc xin dạng tiêm hay gây ra các phản ứng phụ, phản ứng quá mẫn mạnh ở những cá thể nhạy cảm do cơ thể ngoài các đáp ứng miễn dịch với thành phần kháng nguyên đặc hiệu còn sinh ra các kháng thể với các kháng nguyên khác có trong vi khuẩn hoặc các thành phần tồn dư trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Do vậy, việc phát triển các công nghệ sản xuất vắc xin vi khuẩn một thành phần đặc biệt là các vắc xin polysaccharide cần được áp dụng trong sản xuất vắc xin tại Việt Nam.

Cũng như các nước đang phát triển khác, với điều kiện kinh tế còn khó khăn, Việt Nam hiện khó có thể nhập được vắc xin Hib để tiêm phòng rộng rãi cho trẻ em. Giá thành của lịch trình tiêm đầy đủ 3 mũi vắc xin Hib cho trẻ gấp 7 lần tổng giá thành của 6 vắc xin hiện đang được sử dụng bắt buộc trong Chương trình tiêm chủng mở rộng là lao, sởi, bại liệt, uốn ván, bạch hầu và ho gà. Do vậy, việc phát triển và sản xuất vắc xin Hib trong nước tiến tới tự cung cấp vắc xin sử dụng trong Chương trình tiêm chủng mở rộng là giải pháp cấp bách cần được sớm triển khai. Nhờ sự hợp tác quốc tế với Viện Quốc gia về Sức khỏe trẻ em và Phát triển con người thuộc Viện Quốc gia về Sức khỏe

Hoa Kỳ (NIH), nơi có nhiều kinh nghiệm trong việc nghiên cứu và phát triển loại vắc xin Hib cộng hợp tiên tiến, cho hiệu quả phòng bệnh cao - vắc xin polysaccharide Hib cộng hợp với giải độc tố uốn ván, đồng thời với nhiều năm kinh nghiệm và thành công trong nghiên cứu, phát triển các loại vắc xin mới, đã được ứng dụng vào thực tế sản xuất và cung cấp có hiệu quả cho Chương trình Tiêm chủng mở rộng Quốc gia, Công ty Vắc xin và sinh phẩm số 1 (VABIOTECH) đưa ra các mục tiêu và nội dung nghiên cứu về vắc xin Hib cộng hợp để mong muốn sớm có sản phẩm được sản xuất tại Việt Nam. Đồng thời, từ các kết quả của nghiên cứu trong phòng thí nghiệm trong tương lai, công nghệ này sẽ được phát triển trên quy mô lớn hơn cũng như phát triển các dạng phối hợp giữa vắc xin Hib và các vắc xin khác nhằm đáp ứng đủ nhu cầu phòng bệnh Hib cho trẻ em tại Việt Nam.

Các mục tiêu nghiên cứu của Đề tài

- 1. Xây dựng được qui trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở qui mô phòng thí nghiệm.***
- 2. Xây dựng các phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin và tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp.***
- 3. Đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc xin trên động vật thực nghiệm.***

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC

Haemophilus influenzae (Hi) là một cầu khuẩn gram âm thuộc họ *Pasteurellaceae* tồn tại ở cả dạng có vỏ và không có vỏ. Các chủng có vỏ được tiếp tục phân loại dựa vào thành phần hóa học polysaccharide tạo nên vỏ vi khuẩn và có 6 týp huyết thanh khác nhau từ *a-f* đã được xác định. Hi có mặt ở niêm mạc hầu họng người từ đó lan truyền gây ra các bệnh lý tại chỗ và hệ thống như viêm màng não, viêm phổi, viêm màng hầu, viêm mô tế bào nhân cầu, viêm khớp nhiễm trùng, nhiễm khuẩn huyết, viêm xương tủy, viêm màng ngoài tim, viêm xoang và viêm tai giữa. Hi týp huyết thanh b (Hib) gây ra gần 95% các thể bệnh xâm nhiễm do Hi gây ra (thể bệnh xâm nhiễm được xác định khi phân lập Hi từ những vị trí được coi là vô khuẩn như máu hoặc dịch não tủy). Khoảng 5% trẻ tử vong khi mắc viêm màng não mủ do Hib cho dù đã được điều trị đúng và kịp thời và 20 - 40% đã phải gánh chịu các di chứng vĩnh viễn. Các hậu quả của viêm màng não mủ do Hib là mù, điếc và giảm khả năng học tập [33].

Kháng kháng sinh đối với tất cả các loại Hi tăng lên rõ rệt trong những năm gần đây đặc biệt đối với kháng sinh thường được sử dụng trong điều trị nhiễm khuẩn hô hấp ampicillin, amoxycillin.

Thể bệnh xâm nhiễm do Hib gây ra xảy ra ở mọi lứa tuổi, tuy nhiên bệnh hay gặp hơn ở trẻ nhỏ. Hiếm khi bệnh xảy ra ở trẻ dưới 3 tháng tuổi hoặc sau 6 tuổi, tỷ lệ bệnh cao nhất gặp ở trẻ từ 4 đến 18 tháng tuổi [59].

Trong kỷ nguyên tiền vắc xin tại các nước phát triển, viêm màng não chiếm gần một nửa các trường hợp bệnh xâm nhiễm do Hib. Theo như phân tích về các bệnh xâm nhiễm do Hib tại Anh, viêm màng não mủ chiếm 56%, viêm hầu họng chiếm 13% và viêm phổi chiếm 6% [60]. Các số liệu từ một số nước có hệ thống giám sát tốt cho thấy có sự khác biệt về tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ em. Như vào kỷ nguyên trước khi có vắc xin, tỷ lệ mắc các bệnh lý xâm nhập do Hib trên 100.000 trẻ dưới 5 tuổi tại Anh là từ 21 đến 44, tại Mỹ là 20 đến 50 và tại Brazil là 42 [60]. Tại Gambia, tỷ lệ mắc mới viêm màng não mủ do Hib trước những năm 90 ở trẻ dưới 5 tuổi là 60/100.000 và cao tới 200/100.000 ở trẻ nhỏ dưới 1 tuổi [8]. Tại Đông Nam châu Á, phân bố chính xác của Hib đối với các bệnh lý viêm màng não và viêm phổi còn chưa rõ ràng. Tỷ lệ viêm màng não mủ do Hib ở trẻ từ 0 đến 4 tuổi tại Hồng Kông được báo cáo hàng năm thấp dưới 1,75 trường hợp trên 100.000 và tại Đài Loan cũng là 3,22 trên 100.000 trẻ dưới 5 tuổi [42] trái với tỷ lệ bệnh Hib ở trẻ Việt Nam nhập cư tại Hồng Kông vượt quá 42 trường hợp trên 100.000 trẻ [27]. Hậu quả viêm phổi nói chung khó xác định do chỉ một tỷ lệ nhỏ các trường hợp viêm phổi do Hib có nhiễm trùng huyết. Các nghiên cứu phải kết hợp một loạt các kỹ thuật chẩn đoán khác nhau như kỹ thuật hút dịch phổi thường được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định căn nguyên viêm phổi. Điều này cho phép xác định được tỷ lệ viêm phổi do Hib ở trẻ dưới 5 tuổi tại Gambia cao đến 42% trong khi các nghiên cứu thông thường cho rằng căn nguyên viêm phổi do Hib chiếm ít nhất là 21% [60].

Trong cộng đồng, các đối tượng có nguy cơ mắc các bệnh do Hib gây ra không giống nhau. Tại Mỹ, bệnh Hib ghi nhận tỷ lệ mắc ở trẻ trai cao gấp 1,2 - 1,5 lần so với trẻ gái [13] và ở trẻ da đen dưới 5 tuổi cao gấp 2 - 4 lần so với trẻ da trắng [56]. Các cộng đồng người bản xứ như người Aborigines tại Úc và người Alaskan Eskimos, Apache, Navajo Indians tại Bắc Mỹ có nguy

cơ rất cao mắc bệnh lý xâm nhập do Hib với tỷ lệ đạt tới 408/100.000. Các nghiên cứu tại Úc cũng cho thấy ở nhóm trẻ thuộc cộng đồng di cư, tỷ lệ mắc mới chỉ là 33 - 60 trên 100.000 trẻ, trong khi ở các trẻ bản địa tỷ lệ này cao đến 500 trên 100.000 trẻ dưới 5 tuổi. Tỷ lệ thể bệnh xâm nhiễm ở Châu Âu cũng khác biệt tùy theo từng quốc gia khác nhau như tại Tây Ban Nha là 12 /100.000 và Thụy Điển là 54/100.000 trẻ dưới 5 tuổi. Tuổi có nguy cơ mắc bệnh cao nhất cũng thay đổi tùy theo các vùng địa dư khác nhau. Tại Tây Âu, 30 - 40% số ca bệnh xảy ra ở trẻ trong 5 năm đầu tiên và 60 - 80% số ca bệnh Hib gặp ở trẻ dưới 2 tuổi. Trong khi đó tại nhóm cư dân bản địa và ở các nước đang phát triển 30 - 50% số ca bệnh xảy ra khi trẻ 6 tháng tuổi và 60 - 80% số ca bệnh xảy ra ở trẻ dưới 1 tuổi. Tỷ lệ mắc rất cao này có thể là do sự kết hợp giữa yếu tố di truyền và tương tác môi trường. Yếu tố môi trường ảnh hưởng đến việc phơi nhiễm với vi khuẩn Hib như nơi chăm sóc điều dưỡng hay có mật độ dân cư cao liên quan đến khả năng làm tăng nguy cơ mắc các bệnh xâm nhiễm, đồng thời các điều kiện sẵn có như bệnh hồng cầu hình liềm, nhiễm HIV, ghép tủy xương, suy giảm miễn dịch, gia đình có nhiều con và trẻ không được bú mẹ cũng là những yếu tố nguy cơ quan trọng [56].

Tỷ lệ mang vi khuẩn vùng họng hầu ước tính cũng liên quan đến độ tuổi của cá thể có thể phản ánh quá trình chưa hoàn thiện của hệ miễn dịch ở trẻ nhỏ. Trong kỷ nguyên tiền vắc xin, khoảng 4/100 trẻ tại Anh mang vi khuẩn Hib. Một tỷ lệ tương tự cũng gặp tại Phần Lan (3,5%) [49] và Mỹ (2 - 5%) [60]. Các nghiên cứu tại Gambia cũng cho thấy có một tỷ lệ rất cao người mang vi khuẩn, thay đổi tùy theo từng địa điểm nghiên cứu khác nhau và dao động từ 12 - 33% [8].

Kháng nguyên bề mặt của vi khuẩn Hib

Bề mặt của vi khuẩn Hib là vách tế bào và vỏ polysaccharide. Theo các nghiên cứu in vitro, vỏ polysaccharide là thành phần kháng lại các cơ chế phòng bệnh quan trọng của vật chủ như thực bào và tế bào giết vi khuẩn qua trung gian tế bào. Vỏ Hib được cấu tạo bởi các chuỗi polymer ribosyl và ribitol - phosphate lặp lại từ đó hình thành nên polyribosyl - ribitol - phosphate (PRP). Các thành phần vỏ của các týp huyết thanh Hi khác chứa nhiều đường hexose hơn đường pentose và hiếm khi gây ra các bệnh xâm nhiễm cho dù hiện nay vẫn chưa rõ lý do thực sự của sự khác biệt về khả năng gây bệnh này [45]. Vi khuẩn có vỏ có thể xâm nhập qua biểu mô của vùng hầu họng vào thẳng mao mạch từ đó biểu hiện các đặc tính xâm nhiễm của Hib. Vỏ kháng thực bào ngừa tác động của hệ thống bổ thể bằng cách ức chế hoặc làm chậm các protein bổ thể trên bề mặt tế bào (đặc biệt là C3b) do vậy vi khuẩn có thể xâm nhiễm máu hoặc dịch não tủy mà không kích thích thực bào cũng như các đáp ứng viêm gây ly giải vi khuẩn qua trung gian bổ thể. Vì lý do này, kháng thể kháng vỏ có khả năng liên kết với vỏ và kích thích cả quá trình thực bào (qua tương tác Fc với tế bào khác) lẫn quá trình ly giải vi khuẩn (bằng cách cho bổ thể liên kết) từ đó bảo vệ cơ thể chống lại các vi khuẩn có vỏ [51]. Kháng thể anti - PRP được sản sinh ra khi phơi nhiễm với Hib và có khả năng bảo vệ phòng bệnh Hib [9].

Vách tế bào vi khuẩn chứa một số protein màng ngoài khác nhau (OMP), đây cũng là điểm đích của IgG ở người. Các OMP bao gồm P1, P2, P4, P5, P6, một protein màng ngoài 98kD và một protein 42kD được gọi là protein D. Kháng thể đối với P1, P4 và P6 gắn kết với các protein trên bề mặt của nhiều chủng Hi khác nhau. Mô hình trên động vật cho thấy kháng thể đối với một số protein có tác dụng bảo vệ và việc phát triển vắc xin chứa OMP Hi có khả năng ngừa viêm tai giữa. Nghiên cứu sử dụng protein D của Hi như

một chất tải cho vắc xin polysaccharide phế cầu cộng hợp đã cho thấy khả năng bảo vệ phòng ngừa cả phế cầu và viêm tai giữa do Hi [37].

Miễn dịch của Hib

Các nghiên cứu dịch tễ học về các thể bệnh xâm nhiễm do Hib kết hợp với các kết quả thực nghiệm trên động vật đã thiết lập được đặc điểm miễn dịch đối với Hib. Tính cảm nhiễm đối với các thể bệnh xâm nhiễm phụ thuộc vào lứa tuổi cho thấy có liên quan đến việc tồn tại hay không những yếu tố tiêu diệt vi khuẩn trong máu. Kháng thể kháng vỏ vi khuẩn Hib được xác định như một dấu hiệu chỉ điểm và cho thấy tác động bảo vệ đặc hiệu tít đối với các bệnh lý gây chết do Hib gây ra trên mô hình thử thực nghiệm. Các nghiên cứu tiếp theo trên người về tác động diệt khuẩn của máu xác định sự liên quan giữa tác động diệt khuẩn và hiệu giá kháng thể kháng vỏ. Đồng thời, sự có mặt của IgG anti - PRP trong máu liên quan đến việc giảm tỷ lệ mắc mới viêm màng não do Hib [5].

Tỷ lệ mắc mới Hib tương đối thấp trong một hai tháng đầu đời do kháng thể IgG đặc hiệu với PRP được truyền từ mẹ sang con qua nhau thai. Ngay sau đó khi lượng kháng thể từ mẹ truyền sang giảm xuống, tỷ lệ mắc bệnh tăng lên (đỉnh của bệnh xảy ra tại các thời điểm khác nhau ở các cộng đồng dân cư khác nhau), nhưng vào thời điểm từ 5 tuổi trở đi kể cả người lớn tỷ lệ mắc này lại giảm xuống rất thấp [60]. Giống với các polysaccharide từ vi khuẩn khác, PRP được xếp vào dạng kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức kích thích trực tiếp tế bào B mà không cần có sự hỗ trợ của tế bào T và kháng nguyên loại này gây miễn dịch yếu ở trẻ em. Do vậy, một trong những nguyên nhân làm trẻ nhỏ rất dễ mắc các thể bệnh xâm nhiễm do Hib gây ra là do trẻ không có khả năng tạo được miễn dịch mạnh với kháng nguyên polysaccharide đơn thuần trước 18 tháng tuổi.

Đáp ứng với nhiễm vi khuẩn Hib

Hib là vi khuẩn có độc lực mạnh nhất trong nhóm *Haemophilus* và 95% trẻ bị nhiễm *Haemophilus* trong máu và màng não mũ là do týp huyết thanh b. Vi khuẩn Hib có mặt ở đường hô hấp trên của người và chỉ một phần những người mang sẽ phát triển thành bệnh lý trên lâm sàng. Thời gian từ khi nhiễm vi khuẩn đến lúc xuất hiện triệu chứng vào khoảng 2 đến 10 ngày. Triệu chứng của viêm màng não mũ do Hib là đau đầu, sốt, nôn, cứng gáy, nhạy cảm với ánh sáng, đau khớp, ngủ gà, lơ mơ và hôn mê. Nếu nhiễm Hib xảy ra ở trẻ trên 24 tháng tuổi khỏe mạnh chưa được tiêm phòng thì các đáp ứng miễn dịch thường tăng lên rất mạnh. Cả đáp ứng tế bào lẫn dịch thể đều đóng vai trò quan trọng trong ngừa nhiễm Hib ở từng cá thể. Kháng thể IgG, IgM và IgA đối với Hib đều xuất hiện sau khi nhiễm cũng như sau khi tiêm phòng vắc xin. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu thường tập trung vào IgG trong huyết thanh và ít các nghiên cứu đề cập đến vai trò của kháng thể màng nhày. Đồng thời phần lớn các nghiên cứu về Hib đề cập đến đáp ứng với PRP đơn thuần và tương đối ít các nghiên cứu về đặc điểm và tầm quan trọng của đáp ứng với protein của Hib [22].

Các thực nghiệm tiêm IgG anti - PRP có hiệu giá cao trên mô hình cả ở động vật và người cho thấy nồng độ kháng thể 0,15 $\mu\text{g/ml}$ cho khả năng bảo vệ ngắn hạn ngừa các bệnh Hib xâm nhập [4]. Thực nghiệm từ các nghiên cứu thực địa vắc xin PRP cho thấy hiệu quả bảo vệ tốt có được ở những trẻ có đáp ứng ít nhất là 1 $\mu\text{g/ml}$ sau một tháng tiêm vắc xin. Trong quá trình phát triển và đánh giá vắc xin Hib cộng hợp thì ngưỡng 0,15 và 1 $\mu\text{g/ml}$ được sử dụng để xác định khả năng bảo vệ ngắn hạn và lâu dài. Tuy nhiên, không ngưỡng nào được cho là ngưỡng khác biệt về đáp ứng miễn dịch giữa vắc xin cộng hợp và vắc xin PRP đơn thuần. Trong thực tế, vắc xin Hib cộng hợp cho đáp ứng miễn dịch ký ức, do vậy sẽ cho hiệu quả bảo vệ kéo dài hơn so với

tiêm vắc xin chỉ có PRP, đặc biệt khi phơi nhiễm liên tiếp với Hib có thể sẽ duy trì hiệu giá kháng thể lưu hành.

1.2. VẮC XIN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B (HIB)

Vắc xin đầu tiên chống lại bệnh Hib là vắc xin chỉ có duy nhất một thành phần polysaccharide vỏ. Đáp ứng miễn dịch của vắc xin này là đáp ứng không phụ thuộc vào tế bào lympho T (tế bào lympho B sản sinh ra kháng thể mà không chịu tác động của tế bào lympho T). Vắc xin này không có hiệu quả sinh đáp ứng miễn dịch ở nhóm trẻ dưới 24 tháng tuổi, nhóm có nguy cơ mắc bệnh và tử vong cao nhất và không tạo được ký ức miễn dịch, nên đáp ứng miễn dịch không tồn tại lâu dài. Do đó, các nhà khoa học đã cải tiến và tìm ra loại vắc xin Hib mới - vắc xin cộng hợp. Vắc xin cộng hợp polysaccharide hiệu quả cao có mặt trên thế giới vào đầu những năm 90. Cộng hợp polysaccharide với protein tải tạo ra đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào tế bào lympho T do đó làm tăng cao tính sinh miễn dịch đặc biệt ở trẻ em.

1.2.1. Vắc xin Hib dạng polysaccharide

Vắc xin ngừa Hib đầu tiên được sản xuất vào đầu những năm 1970 và thành phần là vỏ polysaccharide tinh chế (PRP). Qua các thử nghiệm lâm sàng đã được tiến hành cho thấy hiệu quả đáp ứng của vắc xin ngắn và không có đáp ứng bảo vệ ở trẻ dưới 18 tháng tuổi do miễn dịch tế bào B không phát triển ở lứa tuổi này. Thêm vào đó, không thấy tăng hiệu giá kháng thể đối với liều tiêm nhắc lại của PRP, kháng thể được tạo ra là IgM và một lượng rất thấp IgG, vắc xin không có hiệu quả đối với người mang vi khuẩn Hib ở vùng họng hầu [7]. Các theo dõi kéo dài ở những đối tượng trên 18 tháng tuổi cho thấy hiệu quả bảo vệ là gần 90%. Sự hoàn thiện của hệ miễn dịch liên quan

đến đáp ứng đối với PRP do vậy hiệu giá kháng thể ở trẻ cũng tăng tự nhiên theo độ tuổi. Việc phơi nhiễm liên tục với Hib sẽ duy trì khả năng bảo vệ kéo dài ngừa Hib [34]. Tại Mỹ, vắc xin Hib dạng polysaccharide được cấp phép sử dụng vào năm 1985 và chỉ định tiêm cho trẻ từ 2 đến 5 tuổi. Theo dõi theo tuần cho thấy nguy cơ nhiễm bệnh tăng dần sau khi tiêm vắc xin và điều này được cho là có liên quan đến việc giảm kháng thể PRP trong huyết thanh ở người đã được tiêm vắc xin. Hiệu quả chung của vắc xin là từ 50 - 60% và vắc xin dạng này đã được sử dụng cho đến năm 1998 khi vắc xin Hib cộng hợp bắt đầu được sử dụng [22].

1.2.2. Vắc xin Hib cộng hợp

Vào năm 1920, những nghiên cứu khởi đầu của Avery và Goebel đã cho thấy tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên carbohydrate trên thỏ được tăng mạnh khi cộng hợp giữa đường và chất tải protein. Nghiên cứu này đặt nền móng cho việc phát triển các vắc xin cộng hợp sử dụng cho người, nhưng chỉ đến những năm 1970 khi vắc xin Hib cộng hợp được nghiên cứu và phát triển, vấn đề này mới thực sự được quan tâm đến. Cộng hợp hóa học PRP với kháng nguyên protein như giải độc tố bạch hầu và uốn ván là những điểm căn bản đầu tiên để phát triển vắc xin Hib cộng hợp và kháng nguyên này có khả năng tạo ra tế bào T trợ giúp từ đó chuyển tín hiệu phù hợp tới tế bào B đặc hiệu carbohydrate do vậy làm tăng cả tính sinh miễn dịch và chất lượng của đáp ứng miễn dịch đối với thành phần PRP có trong vắc xin [26].

Hiện nay trên thế giới đã có một số loại vắc xin Hib cộng hợp được phát triển, sản xuất và lưu hành. Thành phần của các vắc xin này đều chứa polysaccharide vỏ của Hib được liên kết đồng hóa trị với protein tải. Các loại vắc xin khác nhau sẽ khác nhau về độ dài của polysaccharide, bản chất của

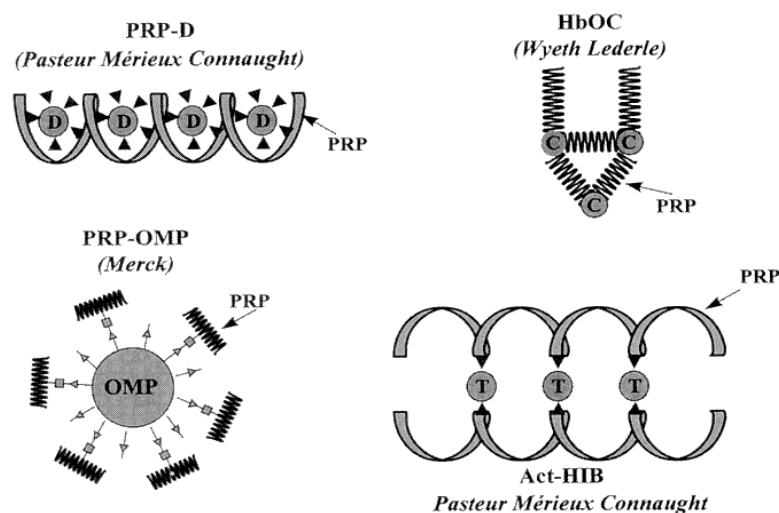
protein tải và phương pháp để liên kết hai thành phần này với nhau. Hiện có 4 loại vắc xin Hib cộng hợp được cấp phép sử dụng tại nhiều nước khác nhau:

+ PRP-D là vắc xin Hib cộng hợp đầu tiên được cấp phép sử dụng tại Mỹ vào năm 1987. PRP-D với tên thương mại ProHIBIT được phát triển bởi hãng Connaught Laboratories (hiện là Pasteur Mérieux Connaught - PMC). PRP-D chứa polysaccharide có độ dài trung bình cộng hợp với giải độc tố bạch hầu qua khoảng trống 6 carbon.

+ HbOC là vắc xin Hib cộng hợp thứ hai được cấp phép sử dụng tại Mỹ vào năm 1988. HbOC với tên thương mại HibTITER được phát triển bởi hãng Praxis Laboratories (hiện là Wyeth Laderle Pediatrics and Vaccines). HbOC chứa PRP cộng hợp với CRM197 (đây là đột biến không gây độc của độc tố bạch hầu được chiết xuất từ môi trường nuôi cấy *Corynebacterium diptheriae* C7 (beta 197)).

+ PRP-OMP là vắc xin Hib cộng hợp thứ ba được cấp phép sử dụng tại Mỹ vào năm 1989. PRP-OMP được phát triển bởi hãng Merck&Co và tên thương mại là PedvaxHIB. PRP-OMP chứa polysaccharide có độ dài trung bình cộng hợp với phức hợp protein màng ngoài của chủng *Neisseria meningitidis* nhóm B (B11) qua khoảng trống thioether.

+ PRP-T là vắc xin Hib cộng hợp thứ tư được cấp phép sử dụng tại Mỹ vào năm 1993. PRP-T được phát triển bởi Rachel Schneerson và cộng sự tại Viện Quốc gia về Sức khỏe Hoa Kỳ (NIH). Vắc xin này được sản xuất bởi PMC và phân phối trên toàn thế giới với tên sản phẩm ActHIB. Tại Mỹ, sản phẩm này được phân phối bởi hãng SmithKline Beecham (SB). PRP-T chứa chuỗi polysaccharide lớn cộng hợp với giải độc tố uốn ván qua khoảng trống 6 carbon.



Hình 1.1. Cấu trúc của các loại vắc xin Hib cộng hợp

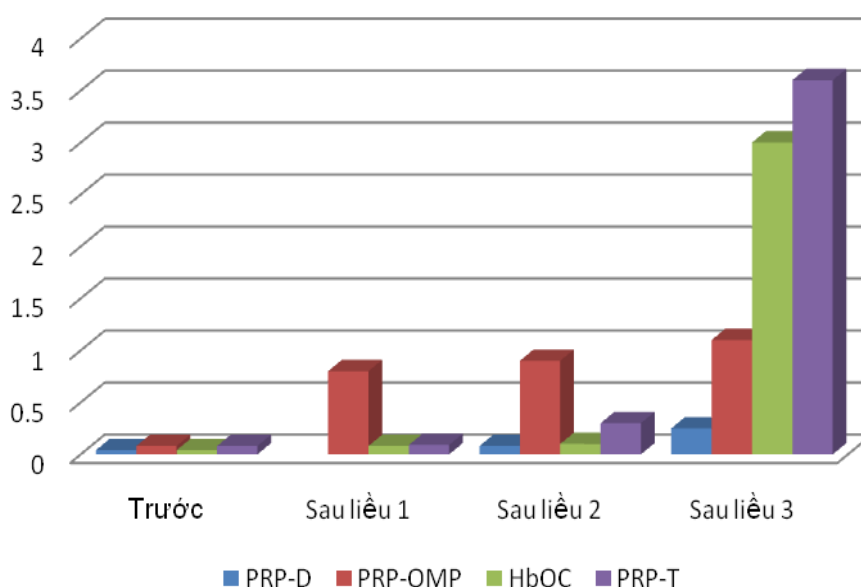
Bảng 1.1. Thành phần của một số vắc xin Hib cộng hợp hiện đang được sử dụng

Loại vắc xin	Polysaccharide của Hib	Hàm lượng polysaccharide trong 1 liều dùng cho người (µg)	Bản chất của protein tải	Hàm lượng protein trong 1 liều dùng cho người (µg)
PRP-D	Polysaccharide (giảm kích thước)	25	Giải độc tố bạch hầu	18
HbOC	Polysaccharide có trọng lượng phân tử thấp	10	Protein bạch hầu chủng CRM 197	25
PRP-OMP	Polysaccharide (giảm kích thước)	7,5	Phức hợp protein màng ngoài của <i>N.meningitidis</i>	125
PRP-T	Polysaccharide	10	Giải độc tố uốn ván	20

Dạng vắc xin Hib cộng hợp PRP-D được đưa vào thử nghiệm lâm sàng trước tiên. PRP-D cho đáp ứng miễn dịch tương đối và chỉ có khoảng 40% trẻ sau liệu trình tiêm đầu tiên có được lượng kháng thể là 1 µg/ml và 70% đạt mức 0,15 µg/ml [18]. Hiệu quả thấp và đáp ứng miễn dịch kém khi thử nghiệm trên các đối tượng có nguy cơ mắc Hib cao là người Alaskan Eskimos

do vậy cho dù đã được cấp phép tại nhiều nước, PRP-D hiện không còn được sản xuất và lưu hành sử dụng cho trẻ em dưới 18 tháng tuổi nữa [49].

Phát triển vắc xin PRP-OMP, HbOC và PRP-T được tiến hành gần như đồng thời và các nghiên cứu về tính sinh miễn dịch đầu tiên cho thấy đáp ứng kháng thể tốt trên trẻ từ 2 tháng tuổi trở lên. PRP-OMP là vắc xin duy nhất không sử dụng protein tải là bạch hầu và uốn ván. Nghiên cứu của về tính sinh miễn dịch của vắc xin này cho thấy nồng độ kháng thể anti - PRP đạt được với hiệu quả bảo vệ ngắn hạn và dài hạn lần lượt là 0,15 µg/ml và 1 µg/ml ở phần lớn các trẻ sau 1 liều tiêm đơn lẻ [17]. Do vậy, PRP-OMP là vắc xin được lựa chọn để sử dụng cho các cộng đồng có nguy cơ mắc bệnh cao trong vòng 6 tháng tuổi đầu tiên. Tuy nhiên, hiệu giá kháng thể trung bình nhân sau liệu trình tiêm đầu tiên (3 liều) thấp hơn so với liệu trình tiêm PRP-T hoặc HbOC và đáp ứng với liều nhắc lại cũng thấp hơn so với tiêm PRP-T hoặc HbOC. HbOC chứa một đoạn oligosaccharide Hi ngắn cộng hợp với độc tố đột biến (CRM197) tách ra từ vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheria*) và cho lượng kháng thể anti - PRP cao sau liệu trình tiêm 3 liều đầu tiên. PRP-T là vắc xin Hib cộng hợp cuối cùng được đánh giá và đưa vào sử dụng năm 1992. Vắc xin này chứa giải độc tố uốn ván là protein tải gắn với PRP qua liên kết 6 - carbon hoặc hóa đặc carbodimide. So sánh đáp ứng miễn dịch của 4 loại vắc xin Hib cộng hợp khác nhau sau khi tiêm theo lịch vào 2, 4 và 6 tháng tuổi được trình bày trong Hình 1.2. Qua đây có thể thấy ngoại trừ PRP-OMP, phần lớn kháng thể đối với Hib có được sau 3 liều tiêm vắc xin vào lúc 6 tháng tuổi [11].



Hình 1.2. So sánh đáp ứng tạo kháng thể của 4 loại vắc xin Hib cộng hợp

Cùng với nồng độ IgG có được bởi vắc xin cộng hợp, vắc xin này còn tạo ra trí nhớ miễn dịch đối với thành phần PRP trong vắc xin, kết quả này không hề có được sau khi tiêm vắc xin chỉ có PRP. Điều đặc biệt là vắc xin Hib cộng hợp có khả năng bảo vệ ngừa nguy cơ mang vi khuẩn Hib ở đường hầu họng. Nếu trong một cộng đồng có tỷ lệ trẻ được tiêm phòng đầy đủ, nguy cơ lây truyền Hib sẽ giảm và các cá thể không được tiêm phòng cũng được bảo vệ do giảm khả năng phơi nhiễm với tác nhân gây bệnh. Việc giảm bệnh trong nhóm không tiêm phòng ở các cộng đồng có tỷ lệ tiêm phòng cao được xem là bảo vệ gián tiếp hay “hiệu ứng cộng đồng”. Hiệu quả này thấy được qua một số thử nghiệm lâm sàng tiêm vắc xin Hib cộng hợp với các lịch tiêm khác nhau tại Mỹ, Gambia, Brazil và Anh. Thậm chí với tỷ lệ tiêm phòng chỉ đạt được từ 20 - 60%, nguy cơ mắc các bệnh xâm nhiễm do Hib gây ra đã giảm từ 56 - 73%. Điều này có một ý nghĩa quan trọng đặc biệt tại các nước đang phát triển nơi hệ thống cơ sở để có thể tiêm chủng đủ mũi còn nhiều khó khăn. Một thí dụ cụ thể cho quan điểm này đã được thấy tại Gambia, nơi vắc xin Hib được triển khai tiêm phòng từ những năm 90, nhưng

vắc xin được cung cấp không liên tục do đó tỷ lệ tiêm phòng đủ 3 mũi vắc xin chỉ đạt được từ 62 - 75%. Tuy vậy tỷ lệ mang vi khuẩn ở nhóm trẻ không tiêm phòng đã giảm từ 7,7% xuống còn 3,8% và thể bệnh xâm nhiễm do Hib đã gần như biến mất. Nhờ tác động của hiệu ứng cộng đồng, tỷ lệ mắc Hib giảm 10 lần tại Anh ở trẻ em dưới 1 tuổi chưa được tiêm phòng vắc xin vào năm 1998 so với tỷ lệ trên cùng một đối tượng trẻ trước khi triển khai tiêm phòng vắc xin. Tác động khác của hiệu ứng cộng đồng là hiệu quả việc tiêm phòng Hib ở trẻ em đối với bệnh Hib xảy ra ở người lớn. Tổng kết các trường hợp bệnh Hib ở người lớn tại 5 vùng ở Anh vào những năm 1990 và 1995 cho thấy số ca bệnh đã giảm ở 3 năm đầu so với 2 năm sau. Các theo dõi liên tục về các bệnh Hib cho thấy với 40% trẻ Navajo Indian được tiêm phòng vắc xin vào những năm 1988 đến 1992 đã làm giảm 75% số trường hợp trẻ bị mắc Hib sống trong cùng cộng đồng. Lượng kháng thể để có được tác dụng bảo vệ ngừa mang vi khuẩn đòi hỏi phải cao hơn lượng kháng thể có tác dụng ngừa bệnh xâm nhiễm. Một nghiên cứu cho thấy để có được tác dụng bảo vệ ngừa mang vi khuẩn ở vùng hầu họng, nồng độ kháng thể trong huyết thanh đòi hỏi phải là gần 5 $\mu\text{g/ml}$ [60].

Tác động tối ưu làm giảm thiểu bệnh và lây truyền Hib phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loại vắc xin, lịch tiêm phòng, đặc điểm dịch tễ của các quần thể đặc hiệu, khả năng triển khai tiêm phòng cũng như các yếu tố môi trường khác. Vắc xin Hib cộng hợp tạo đáp ứng miễn dịch ở các bệnh nhân có nguy cơ mắc các bệnh xâm nhiễm cao như bệnh hồng cầu hình liềm, ung thư máu, nhiễm HIV, cắt lách. Tính sinh miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp không giống nhau giữa các quần thể. Sự khác biệt này được thấy khi tiêm cho trẻ vắc xin Hib cộng hợp tại California (Mỹ). Đáp ứng miễn dịch thấp nhất thấy được ở trẻ da trắng và cao nhất ở trẻ em gốc Á. Cùng trong nghiên cứu này,

đáp ứng có được ở trẻ liên quan đến tuổi thai và thời gian bú mẹ cho tới 6 tháng tuổi [60].

8 thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng placebo đánh giá hiệu quả vắc xin Hib cộng hợp đã được thực hiện và bệnh lý xâm nhập được sử dụng như một tiêu chuẩn về hậu quả bệnh tật (Bảng 1.2). Tất cả các nghiên cứu và các loại vắc xin ngoại trừ PRP-D tại Alaskan Eskimo (Mỹ) đều cho thấy có hiệu quả cao.

Bảng 1.2. Hiệu quả vắc xin ước tính từ các thử nghiệm lâm sàng với vắc xin Hib

Loại vắc xin	Hiệu quả vắc xin %	95% CI	Hậu quả bệnh lý	Địa điểm nghiên cứu
PRP-T	95 100	67 - 100 55 - 100	Bệnh xâm nhiễm Viêm phổi sau 2 hoặc 3 liều	Gambia
PRP-D	95	83 - 98	Bệnh xâm nhiễm	Phân Lan
PRP-D	35	57 - 73	Bệnh xâm nhiễm	Alaska, Mỹ
PRP-T	90	50 - 99	Bệnh xâm nhiễm	Anh
PRP-T	90,2	74,5 - 100	Bệnh xâm nhiễm	Chilê
PRP-OMP	95 93	72 - 99 53 - 98	Bệnh xâm nhiễm Viêm màng não mủ	Navajo, Mỹ
HbOC	100	64 - 100	Bệnh xâm nhiễm	California, Mỹ

Vắc xin Hib cộng hợp thường được tiêm cùng thời điểm với vắc xin bạch hầu-uốn ván-ho gà (DTP) và các vắc xin dành cho trẻ em khác do vậy điều cần thiết phải phát triển dạng vắc xin phối hợp giữa các vắc xin này với nhau. Phối hợp vắc xin có những ưu điểm như làm đơn giản hóa chương trình

tiêm phòng, giảm thiểu số mũi tiêm, giảm diện tích cần cho bảo quản vắc xin và giảm lượng chất thải y tế. Tuy nhiên, tác động giữa các thành phần khác nhau của vắc xin phối hợp cần được theo dõi, đặc biệt với vắc xin có chứa kháng nguyên Hib cộng hợp và ho gà vô bào (Pa). Vắc xin Hib cộng hợp thường được phối hợp với vắc xin DTPa (4 thành phần) hoặc DTPa/viêm gan B, DTPa/bại liệt bất hoạt (5 thành phần) và DTPa/viêm gan B/bại liệt bất hoạt (6 thành phần). Một số nghiên cứu đã cho thấy đáp ứng với Hib giảm khi PRP-T được tiêm đồng thời với DTPa-bại liệt bất hoạt so với khi tiêm riêng rẽ. Việc suy giảm này một phần được cho là tác động của nhôm hydroxide đối với tính toàn vẹn của PRP-T [44]. Xu hướng phát triển các vắc xin phối hợp DTPa-Hib sử dụng nhôm phosphate đã giúp khắc phục việc suy giảm đáp ứng với Hib này [28], [53]. Gần đây, các nghiên cứu lại cho rằng một phần của việc ức chế đáp ứng miễn dịch đối với Hib là do lượng giải độc tố uốn ván quá cao gây phong tỏa các epitope của Hib. Điều này được ghi nhận đối với vắc xin phối hợp DTPw chứa thành phần ho gà toàn tế bào do vậy nhiều tác giả lại quay trở lại quan điểm liệu phải chăng đây vẫn là do tác động của chất bổ trợ có trong thành phần vắc xin gây ra. Các nghiên cứu vẫn đang được tiếp tục tiến hành đặc biệt là các bằng chứng về lâm sàng sẽ là căn cứ vững chắc nhất để lý giải cho các giả thuyết này [16].

Sau khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp vào chương trình tiêm chủng mở rộng cho trẻ em những năm 1990, bệnh Hib đã giảm rõ rệt tại các nước tây Âu, Canada, Mỹ, Úc và New Zealand. Hiệu quả vắc xin trong một số trường hợp đã vượt quá 95% ở những trẻ được tiêm đầy đủ theo lịch tiêm từ lúc 2 tháng tuổi [10]. Tuy nhiên, tại một số nước như Phần Lan, hiệu quả cao lại được công bố khi lịch tiêm vắc xin được bắt đầu muộn hơn, do vậy hiệu quả vắc xin phụ thuộc vào đặc điểm dịch tễ học của bệnh. Kết quả có được tại các nước phát triển đã cho thấy lợi ích rõ rệt của việc triển khai tiêm

phòng vắc xin Hib cộng hợp trong Chương trình tiêm chủng mở rộng [32], [57]. Tại Mỹ, trước khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp, số ca bệnh Hib xâm nhiễm ước tính hàng năm là 20.000 ca bệnh ở trẻ dưới 5 tuổi. Sau khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp cho trẻ vào năm 1987, cho đến năm 1990, tỷ lệ mắc mới bệnh Hib xâm nhiễm đã giảm trên 99%. Vắc xin Hib cộng hợp cũng có hiệu quả trong cộng đồng có tỷ lệ mắc Hib cao như người Mỹ Indian hay người Alaskan Eskimo [55]. Tại Anh, số ca bệnh Hib xâm nhiễm là 1.500 trường hợp mỗi năm trong đó có 900 ca viêm màng não mủ và có 60 ca tử vong. Từ khi bắt đầu triển khai tiêm phòng vắc xin vào năm 1992, số trường hợp mắc mới hàng năm đã giảm 90% từ 21/100.000 vào kỳ nguyên trước khi có vắc xin xuống còn 0,65/100.000 và vẫn còn tiếp tục giảm thấp trong những năm 90. Hiệu quả vắc xin ước tính vào thời điểm 7 đến 8 năm sau khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib tại Anh là 97%. Theo dõi các dữ liệu cũng khẳng định không thấy tăng rõ rệt bệnh xâm nhiễm do vi khuẩn Hib không định tít gây ra [38]. Tại các nước châu Âu khác, tỷ lệ giảm bệnh Hib cũng được thấy sau khi tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp tại Đức, Hà Lan, Bỉ, Pháp và bệnh Hib đã hoàn toàn bị loại trừ sau 3 năm triển khai tiêm phòng vắc xin tại Iceland [35]. Tại Phần Lan, vắc xin Hib cộng hợp được triển khai vào năm 1986 theo lịch tiêm 4,6 và 15 tháng tuổi đã cho thấy hiệu quả vắc xin rất cao. Tại Thụy Điển, sau khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib theo lịch 3, 5 và 12 tháng, tỷ lệ mắc mới bệnh viêm lưỡi gà do Hib giảm từ 20,9/100.000 trẻ dưới 5 tuổi vào năm 1987 xuống còn 0,9/100.000 trẻ vào năm 1996 [60]. Một số nghiên cứu tại các nước đang phát triển nơi có tỷ lệ mắc các bệnh do Hib cao còn cho thấy hiệu quả của vắc xin Hib cộng hợp cả về mặt dịch tễ học và kinh tế. Tại Chilê, số ca mắc mới các bệnh Hib xâm nhiễm đã giảm được 90% sau khi triển khai tiêm phòng rộng rãi vắc xin Hib cộng hợp vào năm 1996. Cũng theo ghi nhận, vắc xin Hib đã làm giảm đáng kể số ca viêm phổi mắc mới phải nhập viện tại Chilê. Sau khi triển khai tiêm

phòng vắc xin Hib cộng hợp, tỷ lệ mắc viêm màng não mủ hàng năm tại Gambia đã giảm từ trên 200 ca bệnh trên 100.000 trẻ dưới 1 tuổi vào những năm đầu của thập niên 90 xuống đến không còn trường hợp nào vào năm 2002 và từ 60 ca bệnh trên 100.000 trẻ xuống đến không còn trường hợp nào ở nhóm trẻ dưới 5 tuổi. Giữa những năm 2001 và 2002, sau khi triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp tại Malawi, tỷ lệ mắc mới Hib giảm 88% ở trẻ dưới 5 tuổi và 87% ở trẻ dưới 2 tuổi. Thêm vào đó, hiệu quả vắc xin phòng ngừa viêm màng não mủ do Hib ở trẻ có HIV dương tính đã đạt tới 100%. Theo các báo cáo sau 3 năm triển khai tiêm phòng vắc xin ngừa Hib cho trẻ em tại Kenya cũng cho thấy các bệnh thể xâm nhiễm do Hib giảm một cách có ý nghĩa tới 88%.

Vắc xin Hib cộng hợp hiện đã được bổ sung vào danh sách các vắc xin đem lại thành công đáng kể làm thay đổi căn bản tình trạng sức khỏe trẻ em tại nhiều quốc gia trên thế giới. 20 năm qua, các bệnh do Hib gây ra đã chuyển từ căn nguyên phổ biến nhất sang một bệnh gần như không còn được ghi nhận và tiến tới dần loại trừ ở các nước đã triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp rộng rãi cho trẻ em. Cho dù những thành công của vắc xin Hib đã được chứng minh, nhưng cho đến cuối thế kỷ 20, mới chỉ có dưới 8% khu vực lưu hành bệnh Hib trên thế giới được dự phòng bằng vắc xin và phần lớn gánh nặng bệnh tật này vẫn đặt lên các nước đang phát triển [60]. Từ năm 1998, Tổ chức Y tế Thế giới (TCYTTG) đã khuyến cáo triển khai tiêm phòng vắc xin Hib cộng hợp trên toàn thế giới cho trẻ dưới 5 tuổi. Tuy nhiên, do có sự khác biệt về tình hình dịch tễ học, công tác chăm sóc sức khỏe và điều kiện kinh tế, vắc xin Hib cộng hợp sẽ được triển khai vào chương trình tiêm chủng mở rộng quốc gia khác nhau với thời gian và chiến lược khác nhau. Trọng tâm của khuyến cáo này hướng đến các nước mà các bệnh do Hib gây ra đang là một vấn đề của y tế cộng đồng.

1.3. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VẮC XIN HIB CỘNG HỢP

Là kết quả của quá trình cộng hợp hóa học của hapten polysaccharide với protein tải, quy trình sản xuất, tinh chế, xác định đặc tính và kiểm tra chất lượng của vắc xin Hib cộng hợp phức tạp hơn nhiều so với vắc xin polysaccharide đơn thuần. Cấu trúc và kích thước của polysaccharide và protein tải thay đổi tùy theo các nhà sản xuất khác nhau. Tuy nhiên, tất cả các vắc xin Hib cộng hợp đều có chung một tiêu chí là có khả năng kích thích sản sinh kháng thể anti - PRP đặc hiệu ở trẻ em hoặc trẻ nhỏ với một lượng đạt mức độ bảo vệ ngừa bệnh Hib. Cho dù bản chất hóa học của kháng nguyên PRP từ các nhà sản xuất khác nhau là tương tự nhau nhưng kích thước của chuỗi saccharide, tính chất hóa học của cộng hợp và protein tải là khác nhau.

1.3.1. Tổng quan về quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp

Sản xuất Hib polysaccharide dựa trên hệ thống giống sản xuất. Vi khuẩn Hib phát triển trên môi trường thích hợp. Trong quá trình vi sinh vật phát triển, tỷ lệ tăng trưởng, pH và hiệu suất polysaccharide là các chỉ số cần được theo dõi. Khi đạt được mức phát triển phù hợp, quá trình nuôi cấy dừng lại và polysaccharide được thu hoạch và tinh chế. Quá trình tinh chế cần phải tiến hành trong điều kiện vô trùng và sử dụng các hóa chất có độ tinh khiết cao. PRP cần được phân tích đầy đủ và phù hợp với các tiêu chuẩn của WHO [53]. Thêm vào đó phân bố kích thước phân tử của PRP tinh chế phải được xác định [14]. Sau đó, PRP sẽ được xử lý thay đổi về mặt hóa học và tinh chế lại. PRP sau khi thay đổi sẽ được sử dụng trong phản ứng cộng hợp.

Trong công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp, phương pháp thay đổi (hay hoạt hóa) tính chất hóa học của polysaccharide đóng vai trò quan trọng

nhất. Một số phương pháp đang được áp dụng trong sản xuất vắc xin Hib cộng hợp hiện nay là:

- Polysaccharide phản ứng với cyanogen bromide làm các nhóm hoạt hóa tiếp xúc với “các phân tử khoảng trống” hoặc với protein tải. Chất phản ứng thừa được loại ra bằng siêu lọc hoặc bằng phương pháp khác tương tự. Sau khi được hoạt hóa, polysaccharide này sẽ liên kết đồng hóa trị với axit adipic.
- Polysaccharide giảm kính thước được tạo ra bởi quá trình oxy hóa cách quãng phân tử polysaccharide từ đó tạo thành các nhóm aldehyde. Sau đó các polysaccharide có trọng lượng phân tử thấp vừa được tạo ra này sẽ được tinh khiết.
- Polysaccharide giảm kích thước cũng có thể được tạo ra bởi quá trình thủy phân bằng axit có kiểm soát từ đó tạo thành đường ribose khuyết đầu. Sau khi tinh khiết, các polysaccharide có trọng lượng phân tử thấp vừa được tạo ra đều đã được amin hóa khử và chuyển thành dẫn xuất với axit adipic nhờ hoạt hóa bởi N-hydroxy-succimide.
- Polysaccharide phản ứng với carbonyldiimidazole, tiếp đó là butanediamine để tạo thành chất trung gian phản ứng với nhóm chức đầu amino. Nhóm này tiếp tục phản ứng để tạo thành dẫn xuất polysaccharide cuối cùng.

Quá trình polysaccharide tham gia vào phản ứng cộng hợp được đánh giá dựa trên số lượng của nhóm chức năng (nhóm tạo dẫn xuất) trên tổng số polysaccharide đầu vào.

Bên cạnh polysaccharide, tính sinh miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp còn ảnh hưởng bởi đặc tính và mức độ tinh khiết của protein tải. Các protein

hiện được sử dụng như các protein tải trong vắc xin Hib cộng hợp là giải độc tố bạch hầu hoặc giải độc tố uốn ván, độc tố bạch hầu ở dạng đột biến không gây độc (CRM197) và phức hợp protein màng ngoài của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* nhóm B. Các thử nghiệm hóa lý phải được tiến hành để đánh giá các protein này là không độc, đồng thời có được nồng độ và độ tinh khiết phù hợp cho cộng hợp. Quá trình hoạt hóa các protein này có thể được tiến hành với các phương pháp sau:

- Đưa giải độc tố bạch hầu vào với một nồng độ nhất định “các nhóm khoảng trống” để phản ứng với polysaccharide đã hoạt hóa.
- Thêm nhóm thiol vào phức hợp protein màng ngoài của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* nhóm B.

Phức hợp phản ứng cộng hợp sau đó sẽ được làm sạch và tinh chế để loại trừ các chất tồn dư sử dụng trong quá trình cộng hợp. Cộng hợp được cô đặc lại và lọc vô trùng. Vào thời điểm này, các thử nghiệm đối với bán thành phẩm cộng hợp sẽ được thực hiện. Chỉ có PRP liên kết đồng trị với protein tải (PRP cộng hợp) là thành phần quan trọng cho đáp ứng ứng bảo vệ ngừa bệnh Hib. Do vậy, bán thành phẩm cộng hợp sẽ được thử nghiệm về hàm lượng PRP, PRP tự do (không cộng hợp), hàm lượng protein, tỷ số PRP trên protein và phân bố kích thước phân tử. Kích thước phân tử của PRP-protein là thông số quan trọng để thiết lập độ ổn định của quy trình sản xuất và nghiên cứu tính ổn định trong quá trình bảo quản vắc xin. Các thử nghiệm vô khuẩn và đánh giá độc tính đặc hiệu cần được tiến hành. Pha chế bán thành phẩm cuối cùng và đóng lọ vắc xin.

Có 3 yếu tố cần được chú trọng để cộng hợp polysaccharide-protein có thể trở thành một vắc xin thành công và có tính sinh miễn dịch cao:

- Hai thành phần cần phải được liên kết với nhau bằng cầu nối đồng trị chứ không phải là các tác động không đồng trị.
- Hàm lượng polysaccharide không cộng hợp trong sản phẩm cuối cùng không có ý nghĩa bởi vì liều lượng vắc xin được xác định dựa trên hàm lượng polysaccharide cộng hợp. Nhiều bằng chứng đã cho thấy chính polysaccharide không cộng hợp có khả năng ức chế đáp ứng miễn dịch của thành phần cộng hợp.
- Thành phẩm vắc xin cần phải ổn định, an toàn và vô trùng.

Đề cập đến vấn đề cộng hợp của polysaccharide với một phân tử protein, những yếu tố sau đây cần được xem xét:

- Cả hai phân tử đều là các phân tử đa chức như mỗi phân tử saccharide đều có nhiều nhóm hydroxyl (và hiếm gặp hơn còn là các nhóm amino) và mỗi phân tử protein đều có nhiều nhóm amino và carbonxylate.
- Phân tử polysaccharide là đa phân bố bởi vì nằm trong một khoảng trọng lượng phân tử rộng.
- Bởi vì tính đa chức và đa phân bố này, sản phẩm cộng hợp cuối cùng là một phức hợp nhiều phân tử có trọng lượng khác nhau và phương pháp đánh giá đặc tính truyền thống sử dụng đối với protein như SDS-PAGE thường ít được ứng dụng.
- Do vậy, để một vắc xin cộng hợp được sản xuất có hiệu quả, điều chủ yếu là các kiểm tra phân tích cần được tiến hành phần lớn ở trong các bước tổng hợp.

Như đã trình bày ở trên, sản phẩm cộng hợp cuối cùng là một phức hợp nhiều phân tử có trọng lượng khác nhau do vậy việc phân tách cộng hợp ra

khỏi các chất phản ứng dựa trên sắc ký trao đổi ion hoặc kết tủa với ammonium sulfate là rất khó khăn. Phương pháp thường được áp dụng nhất để phân tách cộng hợp có trọng lượng phân tử lớn ra khỏi các chất phản ứng dựa trên trọng lượng phân tử bằng sắc ký lọc gel.

1.3.2. Phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp

Kiểm tra chất lượng của polysaccharide

Chủng Hib sẽ được sử dụng trong sản xuất cần được nhận dạng qua ghi chép và lý lịch bao gồm nguồn gốc và các thử nghiệm đã được tiến hành để xác định đặc tính của chủng. Sản xuất polysaccharide Hib cần dựa trên hệ thống chủng giống sản xuất. Nhà sản xuất nếu có thể cố gắng tránh sử dụng các nguyên vật liệu có nguồn gốc từ động vật. Tính ổn định về khả năng phát triển của vi khuẩn Hib cần được kiểm soát trong quá trình nuôi cấy. Trước khi vi khuẩn được bất hoạt, mẫu nuôi cấy cần được thử nghiệm về mức độ lây nhiễm. Độ thuần nhất của nuôi cấy được kiểm soát bằng các phương pháp như nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Quá trình bất hoạt cũng cần phải được đánh giá theo các phương pháp phù hợp nhất.

Mỗi loại polysaccharide sau khi tinh chế cần được kiểm tra về mức độ tinh khiết [31]. Mỗi nhà sản xuất cần xác định các tiêu chuẩn và giới hạn cho sản phẩm của mình. Các thử nghiệm đối với polysaccharide tinh chế bao gồm:

- Nhận dạng: polysaccharide tinh chế được xác định bằng các phương pháp miễn dịch hoặc đo mật độ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

- Phân bố kích thước phân tử: đặc tính này có thể được tiến hành theo các phương pháp khác nhau như phân tách lọc gel sử dụng agarose liên kết chéo (gel Sepharose CL-4B hoặc CL-2B) hoặc sắc ký ngoại kích thước hiệu năng cao (HPSEC). Hằng số phân bố (K_D) được xác định bằng cách đo phân bố kích thước phân tử của polysaccharide tại đỉnh chính của đường cong pha loãng [15], [39].
- Độ ẩm tồn dư (đối với vắc xin dạng đông khô): chỉ số này cần được xác định theo phương pháp thích hợp (Karl-Fisher) và cho thấy mức độ ổn định trong giới hạn yêu cầu.
- Thành phần polysaccharide: lượng polysaccharide được xác định bằng cách đo hàm lượng ribose. Hàm lượng này được xác định bằng phản ứng Bial đối với đường pentose sử dụng chuẩn D-ribose. Các phương pháp khác có thể sử dụng để định tính polysaccharide tinh khiết như sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với đầu dò xung điện (HPAEC-PAD) hoặc xác định hàm lượng phosphorus theo phương pháp Chen [53].
- Protein tạp: hàm lượng protein tạp được tính trên trọng lượng khô và xác định bằng phương pháp Lowry sử dụng chuẩn albumin huyết thanh bò hoặc một phương pháp khác thích hợp.
- Axít nucleic tạp: hàm lượng axít nucleic tạp được tính trên trọng lượng khô và xác định bằng đo độ hấp phụ ở bước sóng 260 nm hoặc một phương pháp khác thích hợp.
- Hàm lượng nội độc tố: hàm lượng nội độc tố được xác định bằng thử nghiệm *Limulus* amoebocyte lysate (LAL test) hoặc thử nghiệm chất gây sốt trên thỏ và các kết quả thu được nằm trong giới hạn yêu cầu.

Tiêu chuẩn cụ thể của polysaccharide sau tinh chế được trình bày trong Bảng 1.3.

Kiểm tra chất lượng của polysaccharide thay đổi

- Polysaccharide thay đổi: polysaccharide được sử dụng trong phản ứng cộng hợp cần được xác định số lượng nhóm chức trên số đơn vị của polysaccharide.
- Phân bố kích thước phân tử: kích thước phân tử của polysaccharide thay đổi phụ thuộc vào quy trình sản xuất. Kích thước đặc hiệu cho mỗi loại vắc xin cộng hợp và xác định bằng phương pháp thích hợp do điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của quy trình cộng hợp. Phân bố kích thước phân tử có thể được xác định bằng các phương pháp như sắc ký lọc gel hoặc HPSEC.

Kiểm tra chất lượng của protein tải

Phương pháp thử nghiệm sử dụng để xác định đặc tính protein để đảm bảo protein không độc, có độ thuần khiết và nồng độ đạt yêu cầu. Các phương pháp hóa lý có thể sử dụng để xác định đặc tính protein là SDS-PAGE, sắc ký lọc hiệu năng cao (HPLC), phân tích axit amin, xác định chuỗi axit amin, khối phổ huỳnh quang...

Protein và phương pháp tinh khiết cũng như xác định đặc tính gồm:

- Giải độc tổ bạch hầu và uốn ván: các giải độc tố này đạt các yêu cầu về chất lượng của WHO và có độ tinh khiết cao. Độ tinh khiết ít nhất là 1500 Lf/mg (Lf = giới hạn lên bông) protein nitrogen (không thể thẩm tích).

- Protein bạch hầu CRM197 là một độc tố bạch hầu đột biến không độc tách chiết từ nuôi cấy của vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*) C7/β197. Độ tinh khiết của protein cần trên 90% khi được xác định bằng HPLC.
- Protein màng ngoài vi khuẩn *Neisseria meningitidis* nhóm B tách chiết từ tế bào vi khuẩn với đệm rửa. Loại bỏ xác tế bào, cô đặc phức hợp màng và rửa với đệm có chứa chất rửa để loại bỏ thành phần tạp. Thành phần phức hợp màng ngoài tinh chế cần được xác định bằng SDS-PAGE hoặc phương pháp tương tự cho thấy tính ổn định từ loạt này sang loạt khác và trọng lượng không được chứa quá 8% lipopolysaccharide, đạt yêu cầu về thử nghiệm chất gây sốt trên thỏ.

Kiểm tra chất lượng của bán thành phẩm cộng hợp

Quy trình sản xuất và kiểm tra chất lượng được áp dụng để đảm bảo hiệu suất, độ ổn định và tính an toàn của cộng hợp cần được thiết lập ngay khi vắc xin Hib cộng hợp được phát triển cho đáp ứng miễn dịch tốt. Quá trình tạo dẫn xuất và cộng hợp cần được theo dõi bằng cách phân tích các sản phẩm phản ứng hoặc bằng các phương pháp thích hợp.

Sau khi cộng hợp được tinh chế, các thử nghiệm dưới đây cần được tiến hành để đánh giá độ ổn định của quy trình sản xuất.

- Các chất phản ứng tồn dư: tinh chế cộng hợp cần loại trừ các chất phản ứng tồn dư trong quá trình cộng hợp. Loại bỏ chất phản ứng cũng như các sản phẩm phản ứng như cyanide cần được xác định bằng phương pháp thích hợp.
- Dầu ấn cộng hợp: phản ứng cộng hợp tạo ra dầu ấn liên kết đơn nhất (một axit amin đơn nhất), mỗi mẻ cần được đánh giá chất lượng của độ

dài phản ứng đồng trị của PRP với protein tải. Tỷ số PRP-protein sau tinh chế của cộng hợp là một dấu ấn cộng hợp thích hợp.

- Nhóm chức phản ứng tồn dư: mỗi mẻ sản xuất không được chứa nhóm chức phản ứng tồn dư của polysaccharide đã thay đổi hóa học và protein.
- Hàm lượng PRP: hàm lượng PRP cần được xác định về mặt hóa học bằng các thử nghiệm thích hợp.
- PRP cộng hợp và tự do (không cộng hợp): chỉ các PRP liên kết đồng trị với protein tải như PRP đã cộng hợp mới có vai trò quan trọng về tính sinh miễn dịch về khả năng bảo vệ trên lâm sàng. Mỗi mẻ cộng hợp cần được thử nghiệm về các PRP không cộng hợp, tự do để đảm bảo hàm lượng có mặt trong bán thành phẩm tinh chế nằm trong khoảng giới hạn cho tính an toàn và hiệu quả trên lâm sàng. Tổng hàm lượng PRP đã gắn đồng trị với protein tải cần được xác định sau khi phân tách ra khỏi PRP không cộng hợp. Các phương pháp được sử dụng để phân tách gồm kết tủa, lọc gel, sắc ký trao đổi ion và kỵ nước, siêu lọc và siêu ly tâm. PRP không cộng hợp sau đó được xác định bằng các kỹ thuật HPAEC-PAD và thử nghiệm miễn dịch với kháng thể anti-PRP [29].
- Hàm lượng protein: hàm lượng protein của cộng hợp cần được xác định về mặt hóa học bằng các phương pháp thích hợp và đạt yêu cầu về giới hạn tiêu chuẩn cho sản phẩm.
- Tỷ số PRP trên protein: tỷ số PRP với protein của cộng hợp được tính toán. Đối với mỗi loại cộng hợp, tỷ số này cần phải nằm trong giới hạn cho phép.

- Phân bố kích thước phân tử: kích thước phân tử của cộng hợp PRP-protein là thông số quan trọng để thiết lập tính ổn định trong sản xuất và nghiên cứu tính ổn định hóa lý trong quá trình bảo quản [23]. Kích thước phân tử tương đối của cộng hợp cần được xác định cho mỗi mẻ bán thành phẩm sử dụng phương pháp sắc ký thích hợp với kích thước của cộng hợp được đánh giá. Các phương pháp thích hợp là sắc ký lọc gel (Sephacrose CL-4B) và phân tách kích thước [15], [36]. Các phương pháp cần phân định được cộng hợp PRP-protein với các thành phần khác có thể có như protein và polysaccharide không gắn.
- Vô khuẩn: bán thành phẩm cộng hợp tinh chế cần được thử về mức độ vô khuẩn đối với vi khuẩn và nấm. Nếu chất bảo quản được cho vào sản phẩm, phương pháp xác định thích hợp cần được tiến hành để tránh sự tương tác trong thử nghiệm.
- Độ tinh đặc hiệu của protein tải: bán thành phẩm cộng hợp cần được thử nghiệm không có độ tinh đặc hiệu của protein tải.
- Tiêu chuẩn cụ thể của bán thành phẩm cộng hợp được trình bày trong Bảng 1.3.

Kiểm tra chất lượng của bán thành phẩm cuối cùng

Bán thành phẩm cuối cùng được sản xuất bằng cách trộn chất bổ trợ, chất bảo quản hoặc chất ổn định với hàm lượng thích hợp của bán thành phẩm cộng hợp để có được loạt vắc xin đạt yêu cầu chất lượng cho hiệu quả và an toàn trên lâm sàng. Mỗi loạt bán thành phẩm cuối cùng cần được thử nghiệm về tính vô khuẩn đối với vi khuẩn và nấm.

Kiểm tra chất lượng của vắc xin thành phẩm

- Nhận dạng: thử nghiệm nhận dạng cần được tiến hành với ít nhất một lọ sản phẩm cho mỗi loạt sản xuất. Thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đặc hiệu với polysaccharide tinh khiết cần được tiến hành.
- Vô khuẩn: vắc xin thành phẩm cần được thử nghiệm về tính vô khuẩn đối với vi khuẩn và nấm.
- Hàm lượng PRP: tổng hàm lượng PRP trong thành phẩm cần được xác định và cho giá trị nằm trong giới hạn tiêu chuẩn. Vắc xin cộng hợp được sản xuất từ các nhà sản xuất khác nhau do đó sẽ có sự khác biệt về công thức pha. Các phương pháp được sử dụng để xác định hàm lượng gồm so màu, sắc ký (như HPLC) hoặc miễn dịch.
- Độ ẩm tồn dư: Nếu vắc xin đông khô, độ ẩm trung bình cần được xác định bằng phương pháp thích hợp và giá trị nằm trong giới hạn tiêu chuẩn để đảm bảo tính ổn định của vắc xin.
- Chất gây sốt: vắc xin thành phẩm cần được thử nghiệm về hoạt tính gây sốt bằng thử nghiệm tiêm tĩnh mạch thỏ hoặc bằng LAL test. Tiêu chuẩn về nội độc tố hoặc chất gây sốt cần được thiết lập. Đối với các vắc xin Hib cộng hợp hiện có, thử nghiệm chất gây sốt trên thỏ đạt yêu cầu khi tiêm cho thỏ lượng PRP nằm trong khoảng từ 0,025 đến 1 µg trên kg cân nặng tùy thuộc vào protein tải.
- Hàm lượng chất bổ trợ: nếu chất bổ trợ được cho vào vắc xin, hàm lượng này cần được xác định bằng phương pháp thích hợp. Nếu sử dụng nhôm hoặc canxi làm chất bổ trợ thì hàm lượng nhôm không được vượt quá 1,25 mg và canxi không được vượt quá 1,3 mg cho một liều tiêm ở người.

- Hàm lượng chất bảo quản: nếu chất bảo quản được cho vào vắc xin, hàm lượng này cần được xác định bằng phương pháp thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản trong một liều vắc xin không được gây các tác động làm giảm hiệu quả của kháng nguyên và tính an toàn của sản phẩm.
- An toàn chung: mỗi loại vắc xin cần được thử về độc tính không mong muốn (độc tính bất thường) bằng các thử nghiệm thích hợp.
- pH: nếu vắc xin ở dạng nước, pH của mỗi loại cần được thử và nằm trong giới hạn tiêu chuẩn. Đối với dạng đông khô, pH cần được đo sau khi hồi chỉnh bằng dung dịch pha thích hợp.
- Kiểm tra cảm quan: mỗi lọ vắc xin trong loạt sản phẩm cuối cùng cần được kiểm tra cảm quan bằng mắt để phát hiện các bất bình thường về tính toàn vẹn của lọ, các hạt và các thành phần bất thường trong vắc xin
- Tiêu chuẩn cụ thể của vắc xin thành phẩm được trình bày trong Bảng 1.3.

**Bảng 1.3. Tiêu chuẩn của TCYTTG và của nhà sản xuất
đối với vắc xin Hib cộng hợp**

Polysaccharide		
Protein	≤ 1	% (trọng lượng khô)
Axit Nucleic	≤ 1	% (trọng lượng khô)
Phosphorus	6,8 - 9,0	% (trọng lượng khô)
Ribose	≥ 32	% (trọng lượng khô)
Nội độc tố	≤ 10	IU/μg (trọng lượng khô)
Phân bố kích thước phân tử	*	
Độ ẩm tồn dư	*	% (tổng trọng lượng)
Nhận dạng	+	
Protein tải		
Độ tinh khiết	≥ 1500	Lf/mg nitrogen protein
Độc tính đặc hiệu	+	
Polysaccharide thay đổi		
Tỷ số thay đổi	*	Mol/RU
Phân bố trọng lượng phân tử	*	
Bán thành phẩm cộng hợp		
PRP	*	mg/mL
Protein	*	mg/mL
Tỷ số cộng hợp (PRP/protein)	*	mg/mg
Chất phản ứng tồn dư	*	
Nhóm chức phản ứng tồn dư	*	
Phân bố kích thước phân tử	*	
PRP tự do	≤ 10-40	%
Protein tự do	*	%
Dấu ấn cộng hợp#	*	%
Vô khuẩn	+	
Độc tính đặc hiệu (protein tải)	+	
Bán thành phẩm cuối cùng		
Vô khuẩn	+	
Thành phẩm		
PRP	± 20	% (liều lượng quy định)
Chất gây sốt	≥ 0,025-1,0	μg/kg cân nặng
Vô khuẩn	+	
An toàn chung	+	
Nhận dạng	+	
pH#	*	
Độ ẩm tồn dư#	≤ 2,5	%
Hàm lượng chất bổ trợ#	≤ 1,3	Mg (Al hoặc Ca)/liều
Hàm lượng chất bảo quản#	*	

* Tiêu chuẩn của nhà sản xuất

+Thử nghiệm đạt yêu cầu

#Nếu áp dụng

Tuy bản chất khác nhau, các loại vắc xin Hib cộng hợp được sản xuất hiện nay đều gây được đáp ứng miễn dịch tốt. Đối với mỗi loại vắc xin Hib cộng hợp, việc xem xét đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên người là một yêu cầu quan trọng nhất để cấp chứng chỉ cho lưu hành sản phẩm. Hiện nay, chưa có một thử nghiệm sinh học nào được coi như một thử nghiệm để xác định công hiệu cũng như hiệu lực của vắc xin Hib cộng hợp. Do đó, việc kiểm định chất lượng vắc xin chủ yếu dựa vào các thử nghiệm về đặc tính phân tử và độ tinh khiết của polysaccharide, protein tải và bán thành phẩm cộng hợp. Các loại vắc xin được sản xuất phải có kết quả ổn định về các thành phần này tương đương với các loại vắc xin đã được sử dụng trong thực địa lâm sàng trên người có tính an toàn và hiệu lực bảo vệ tốt [24]. Việc nghiên cứu quy trình và sản xuất vắc xin để có được các thông số và chất lượng ổn định là yêu cầu cần thiết để có thể phát triển thành công vắc xin Hib cộng hợp. Các loại sản xuất thử nghiệm sau khi chứng minh được tính an toàn và hiệu lực bảo vệ tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm sẽ được sử dụng để thử nghiệm trên thực địa lâm sàng trên người. Việc tiến hành các thử nghiệm gây miễn dịch trên động vật trong quá trình nghiên cứu phát triển vắc xin Hib cộng hợp là cần thiết nhằm đánh giá khả năng có được đáp ứng miễn dịch sau mũi tiêm nhắc lại hay không. Tuy nhiên, kết quả của các thử nghiệm trên động vật về mặt đáp ứng miễn dịch thường không tương đương với kết quả khi thử nghiệm trên người. Do đó, thử nghiệm công hiệu (gây miễn dịch) trên động vật không được sử dụng như là một thử nghiệm thường quy trong xuất xưởng vắc xin Hib cộng hợp mà các thử nghiệm về hóa lý và hóa miễn dịch mới là các tiêu chí chủ yếu hiện được áp dụng. Hiện nay, vắc xin Hib cộng hợp cũng là một thành phần trong nhiều loại vắc xin phối hợp khác nhau, nên rất khó có thể thực hiện được các thử nghiệm hóa lý đối với thành phần vắc xin Hib cộng hợp trong các vắc xin phối hợp này, do vậy các thử nghiệm miễn dịch lại được

coi là thử nghiệm để khẳng định tính sinh miễn dịch của các thành phần có trong vắc xin thành phẩm.

1.4. ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC, TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ SẢN XUẤT VẮC XIN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B (HIB) CỘNG HỢP TẠI VIỆT NAM

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu dịch tễ học về Hib đã được tiến hành tại các địa phương trên cả nước. Hib là căn nguyên của 53% các trường hợp viêm màng não nuôi cấy có vi khuẩn tại Thành phố Hồ Chí Minh. 90% số trường hợp viêm màng não mủ do Hib xảy ra ở trẻ dưới 1 tuổi [52]. Một nghiên cứu lớn dựa trên các số liệu tại cộng đồng về bệnh do Hib gây ra đã được tiến hành tại Hà Nội từ năm 2000 đến năm 2002. Trong 580 trẻ được chẩn đoán sơ bộ là viêm màng não do vi khuẩn, có 4% được khẳng định là viêm màng não mủ do Hib. Hib chiếm tới 50% số căn nguyên có kết quả xét nghiệm dương tính khi cấy hoặc PCR dịch não tủy. Tỷ lệ mắc viêm màng não mủ do Hib là 12/100.000 trẻ dưới 5 tuổi và 26/100.000 trẻ dưới 2 tuổi. Trên quy mô toàn quốc ước tính mỗi năm có 1.005 trẻ dưới 5 tuổi phải nhập viện vì viêm màng não mủ và 5.107 trẻ phải nhập viện vì viêm phổi do Hib. Trong số các trẻ mắc viêm màng não mủ do Hib, có ít nhất 100 trẻ sẽ để lại các di chứng thần kinh nghiêm trọng và 40 trường hợp sẽ chết [6]. Một điều tra tại cộng đồng trên trẻ em cũng cho thấy 39% trẻ là người mang vi khuẩn và 68% chủng Hib phân lập được đã kháng với ít nhất 1 kháng sinh [1], [52]. Từ các số liệu trên cho thấy Hib là căn nguyên gây bệnh phổ biến và nguy hiểm cho trẻ em tại Việt Nam. Việt Nam cần phải ưu tiên phát triển năng lực của các phòng thí nghiệm chuẩn thức về Hib cấp quốc gia, xây dựng hệ thống báo cáo ca bệnh đặc biệt là các ca bệnh có kết quả xét nghiệm dương tính và nhanh chóng triển khai tiêm phòng rộng rãi vắc xin Hib cộng hợp cho trẻ em.

Nhiều dự án và đề tài nghiên cứu trong nước cũng như hợp tác quốc tế đã hướng đến các biện pháp phát hiện và chẩn đoán căn nguyên các bệnh do Hib gây ra đặc biệt là viêm màng não và viêm phổi ở trẻ em. Các kỹ thuật xét nghiệm mới như PCR, điện di trường xung điện (Pulsed Field Gel electrophoresis - PFGE) cũng đã được áp dụng để tăng tỷ lệ phát hiện bệnh đặc biệt ở các trường hợp đã sử dụng kháng sinh và định loại vi khuẩn ở mức độ phân tử. Triển khai các kỹ thuật cũng như trang bị các thiết bị máy móc mới, đã góp phần tích cực vào việc giám sát, chẩn đoán và phát hiện sớm các bệnh do Hib gây ra [2].

Vắc xin Hib cộng hợp là một dạng vắc xin hóa học điều chế từ kháng nguyên của vi khuẩn. Công nghệ sản xuất vắc xin vi khuẩn tại Việt Nam hiện nay phần lớn vẫn sử dụng các công nghệ cổ điển như nuôi cấy, thu hoạch và bất hoạt vi khuẩn toàn tế bào (vắc xin tả uống, vắc xin ngừa lao BCG, vắc xin ho gà toàn tế bào) hoặc độc tố của vi khuẩn (vắc xin uốn ván và vắc xin bạch hầu). Các vắc xin ở dạng độc tố đã bất hoạt (giải độc tố) thường an toàn nếu được bất hoạt tốt do đây là các vắc xin chỉ chứa 1 thành phần kháng nguyên tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Tuy nhiên, các vắc xin chứa các vi khuẩn toàn tế bào đặc biệt là các vắc xin dạng tiêm hay gây ra các phản ứng phụ, phản ứng quá mẫn mạnh ở những cá thể nhạy cảm do cơ thể ngoài các đáp ứng miễn dịch với thành phần kháng nguyên đặc hiệu còn sinh ra các kháng thể với các kháng nguyên khác có trong vi khuẩn hoặc các thành phần tồn dư trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Các kháng thể này sẽ gây ra các đáp ứng quá mẫn ở người được tiêm. Việc tìm ra và tinh chế các thành phần kháng nguyên có tính sinh miễn dịch cao và đặc hiệu là cơ sở của các công nghệ sản xuất vắc xin vi khuẩn tiên tiến hiện nay. Công nghệ phát triển các vắc xin polysaccharide là một trong những công nghệ hiện đại được Việt Nam áp dụng trong sản xuất vắc xin. Vắc xin polysaccharide đầu tiên được phát triển

và có sản phẩm đã được cấp phép lưu hành là vắc xin thương hàn Vi do cơ sở Đà Lạt của Viện Vắc xin và các chế phẩm sinh phẩm sinh học Nha Trang sản xuất. Cũng giống với các dạng vắc xin polysaccharide đơn thuần khác, vắc xin này không có được đáp ứng miễn dịch tốt cho trẻ dưới 2 tuổi và phải tiêm nhắc lại trước mỗi vụ dịch vì không có đáp ứng miễn dịch kéo dài. Hiện nay Việt Nam chưa có cơ sở nào sản xuất được vắc xin Hib kể cả vắc xin dạng polysaccharide đơn thuần và vắc xin cộng hợp. Trước đây, Viện Vắc xin và các chế phẩm sinh phẩm sinh học Nha Trang đã tiến hành một số nghiên cứu có liên quan đến vắc xin Hib cộng hợp như nhập bán thành phẩm vắc xin Hib của hãng Chiron (loại vắc xin HbOC) kết hợp với vắc xin DTP hiện có để phát triển thành sản phẩm vắc xin kết hợp. Tuy nhiên, cho đến hiện tại vẫn chưa có được sản phẩm vắc xin Hib cộng hợp cũng như phối hợp giữa vắc xin này với các loại vắc xin khác do các cơ sở trong nước sản xuất được cấp phép lưu hành. Các loại vắc xin Hib cộng hợp hiện nay có mặt trên thị trường của Việt Nam đều là các vắc xin nhập ngoại và giá thành rất cao, do vậy không thể triển khai tiêm phòng đại trà được cho cộng đồng. Công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp được nghiên cứu và phát triển tại VABIOTECH là công nghệ cộng hợp polysaccharide với giải độc tố uốn ván (TT) (PRP-T) do Viện Quốc gia về Sức khỏe trẻ em và Phát triển con người thuộc Viện Quốc gia về Sức khỏe Hoa Kỳ (NIH) phát triển và hợp tác nghiên cứu. Dựa trên các bước chủ yếu của quy trình công nghệ này, nhóm nghiên cứu áp dụng thêm một số cải tiến để sản xuất ra vắc xin Hib cộng hợp tại Việt Nam có chất lượng, hiệu suất và tính thực tiễn cao hơn. Công nghệ này là công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp mới nhất. Đồng thời, các thử nghiệm lâm sàng cùng như các kinh nghiệm triển khai tiêm phòng rộng rãi vắc xin PRP-T trên thế giới đều cho kết quả rất tốt, hiệu giá kháng thể có được ở người tiêm cao và kéo dài. Các hãng sản xuất vắc xin lớn trên thế giới như GSK, Aventis Pasteur cũng đều áp dụng công nghệ này trong sản xuất vắc xin Hib cộng hợp. Phần lớn các sản phẩm

vắc xin Hib cộng hợp kể cả ở dạng đơn hoặc dạng phối hợp hiện đang có mặt trên thị trường Việt Nam đều là các sản phẩm vắc xin Hib cộng hợp dạng PRP-T. Thành công trong phát triển vắc xin Hib cộng hợp sẽ là tiền đề để có thể phát triển được các dạng vắc xin phối hợp giữa vắc xin Hib với các vắc xin khác sử dụng cho trẻ em trong Chương trình tiêm chủng mở rộng tại Việt Nam trong tương lai [25].

CHƯƠNG 2

XÂY DỰNG HỆ CHỦNG GIỐNG

CHO SẢN XUẤT VẮCXIN HIB CỘNG HỢP

Chủng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) sử dụng trong sản xuất vắc xin Hib cộng hợp cần phải được xác định dựa trên hồ sơ lý lịch chủng bao gồm nguồn gốc chủng và các thử nghiệm đã được tiến hành để xác định đặc tính của chủng. Chủng phải có khả năng sản sinh ra polysaccharide typ b.

Các chủng Hib được sử dụng trong sản xuất vắc xin Hib phải được sản xuất và bảo quản theo Hệ thống chủng giống bao gồm lô chủng Hib giống gốc (Master seed lot) và lô chủng Hib giống sản xuất (Working seed lot). Quá trình sản xuất polysaccharide Hib sẽ dựa trên hệ chủng giống sản xuất. Các loạt chủng giống sản xuất phải có chung đặc tính với các loạt chủng giống gốc [58].

Trong nghiên cứu xây dựng hệ chủng giống sử dụng cho nghiên cứu sản xuất vắc xin Hib cộng hợp này, chúng tôi sử dụng 2 chủng Hib đã được phân lập từ bệnh nhi viêm màng não mủ tại Việt Nam và 1 chủng Hib đã và đang được sử dụng để sản xuất vắc xin Hib cộng hợp trên thế giới do Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa Kỳ (NIH) cung cấp. Từ các chủng Hib này, sẽ tiến hành nuôi cấy và kiểm tra đặc tính của polysaccharide thu được từ đó lựa chọn ra chủng Hib tốt nhất phát triển thành hệ chủng giống gốc và chủng giống sản xuất dùng cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.

2.1. NGUỒN GỐC CỦA CÁC CHỦNG HIB SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguồn gốc các chủng Hib của Việt Nam

Các chủng đều được phân lập từ dịch não tủy của bệnh nhi viêm màng não mủ điều trị tại Viện Nhi Trung ương, sau đó được tạo dòng tại Phòng thí nghiệm vi khuẩn Hô hấp, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VVSDT). Mã số được đánh theo quy định lưu giữ chủng của Phòng Thí nghiệm vi khuẩn hô hấp VVSDT (các chủng này sau đây được gọi là chủng 1544 và chủng 1419). Các chủng đã được chuyển cho nhóm nghiên cứu của VABIOTECH theo bản thỏa thuận chuyển giao vật liệu nghiên cứu (phần Phụ lục). Đặc điểm của các chủng vi khuẩn này được trình bày trong Bảng 2.1

Bảng 2.1. Đặc điểm của các chủng Hib phân lập từ các bệnh nhân Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin Hib cộng hợp

Đặc điểm chủng	Chủng 1419	Chủng 1544
Bệnh nhân phân lập/tuổi	Dao thi Ly/12 tháng	Ly Cong Hung/8 tháng
Ngày vào viện	22/12/2003	16/06/2004
Chẩn đoán bệnh	Viêm màng não mủ	
Số hồ sơ	276154	283987
Đặc điểm dịch não tủy	Ấm khối	Trong, có vẩn màng
Thời gian phân lập và cấy chuyển	26/12/2003 đến 28/12/2003	16/06/2004 đến 18/06/2004
Số lần cấy chuyển	03 lần	
Môi trường cấy thuần	Thạch Sôcôla	
Định danh vi khuẩn	Hib có typ sinh học I	Hib có typ sinh học II
Điều kiện và nơi lưu giữ chủng	Trong môi trường Skim milk ở - 80 ⁰ C tại Phòng Thí nghiệm vi khuẩn hô hấp, VVSDT	

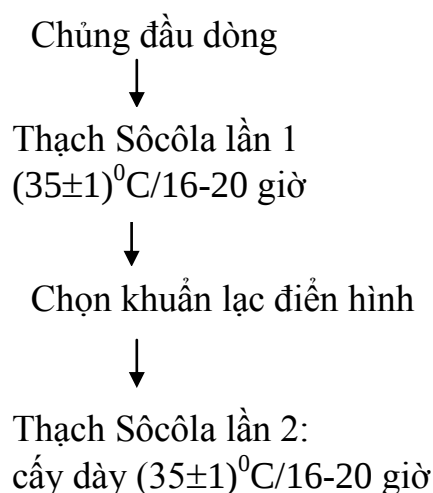
2.1.2. Nguồn gốc chủng Hib của NIH

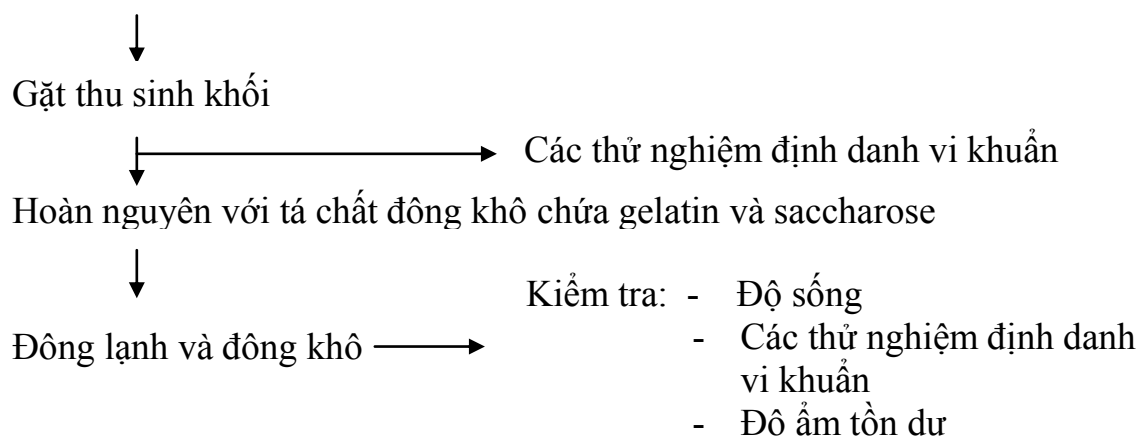
- Đây là chủng Hib 1482, Madigan (Mad) và Eagen (được cung cấp bởi Dr. Porter Anderson và Dr. David H. Smith thuộc khoa Nhi, trường đại học tổng hợp Rochester, Rochester, New York, Hoa Kỳ) sau đây được gọi là chủng Eagen. Chủng này đã được nghiên cứu để phát triển vắc xin Hib cộng hợp tại Viện Quốc gia về Sức khỏe trẻ em và Phát triển con người thuộc Viện Quốc gia về Sức khỏe Hoa Kỳ (NIH) từ những năm 80 [40].
- Chủng gốc Hib đông khô này đã được NIH chuyển sang Việt Nam và tiếp nhận vào ngày 30/06/2003 (Vận đơn đã chuyển chủng gốc và thỏa thuận chuyển giao vật liệu đính kèm trong phần phụ lục)

2.2. QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH HỆ CHŨNG GIỐNG CHO SẢN XUẤT VẮC XIN HIB CỘNG HỢP

2.2.1. Quy trình sản xuất hệ chủng giống gốc (master seed lot)

Các chủng vi khuẩn Hib nhận được từ VVSDT và NIH được coi là các chủng nguồn gốc (chủng đầu dòng). Các chủng này tiếp tục được cấy chuyển, đông khô và đánh giá đặc tính để tạo thành các loạt chủng giống gốc (master seed lot). Quy trình sản xuất hệ thống chủng giống gốc tóm tắt được trình bày trong Hình 2.1.



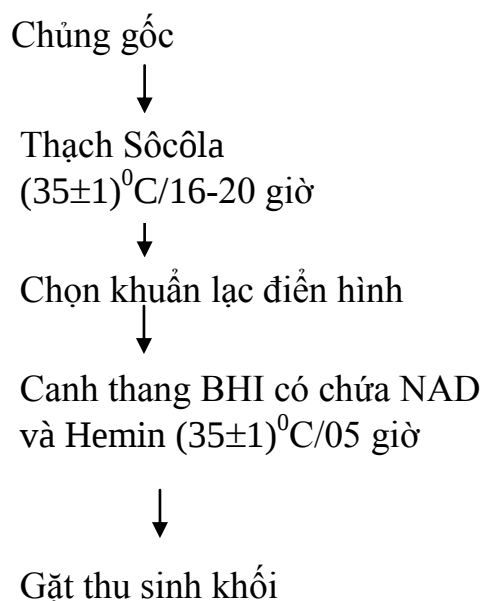


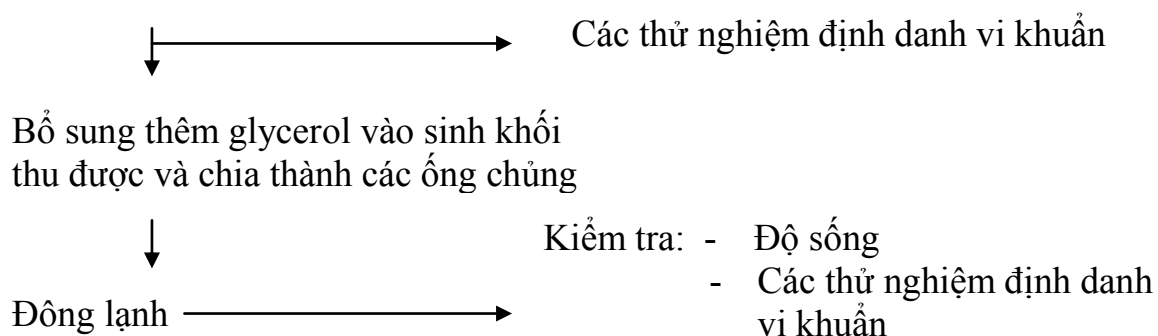
Hình 2.1. Quy trình sản xuất hệ thống chủng Hib giống gốc

Các thử nghiệm kiểm tra và định danh vi khuẩn trước và sau khi đông khô được trình bày trong Phần 2.2.3 - Các phương pháp kiểm tra chủng giống vi khuẩn Hib cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.

2.2.2. Quy trình sản xuất hệ chủng giống sản xuất (working seed lot)

Từ các chủng vi khuẩn Hib giống gốc, các chủng này tiếp tục được cấy chuyển, đông khô và đánh giá đặc tính để tạo thành các loạt chủng giống sản xuất (working seed lot). Quy trình sản xuất hệ chủng giống sản xuất tóm tắt được trình bày trong Hình 2.2.



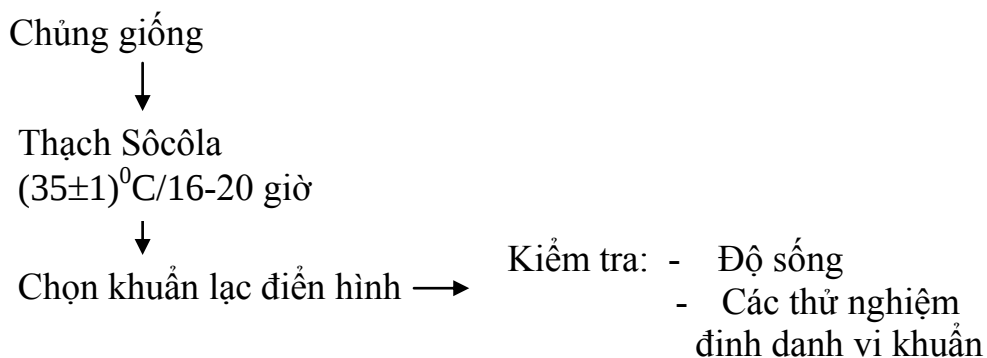


Hình 2.2. Quy trình sản xuất hệ thống chủng Hib giống sản xuất

Các thử nghiệm kiểm tra và định danh vi khuẩn trước và sau khi đông lạnh được trình bày trong Phần 2.3 - Các phương pháp kiểm tra chủng giống vi khuẩn Hib cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.

2.2.2. Quy trình đánh giá hệ chủng giống trong thời gian bảo quản

Các ống chủng giống vi khuẩn Hib được đánh giá chất lượng trong thời gian bảo quản 1 năm/lần đối chủng gốc và 6 tháng/lần đối với chủng sản xuất. Quy trình đánh giá hệ chủng giống trong thời gian bảo quản được trình bày tóm tắt trong Hình 2.3.



Hình 2.3. Quy trình đánh giá hệ chủng Hib giống trong thời gian bảo quản

Các thử nghiệm đánh giá, kiểm tra và định danh vi khuẩn được trình bày trong Phần 2.3 - Các phương pháp kiểm tra chủng giống vi khuẩn Hib cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.

2.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHỦNG GIỐNG VI KHUẨN HIB

2.3.1. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc và độ thuần khiết

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu “kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học” [3]. Cấy chủng lên đĩa thạch (thạch Sôcôla hoặc thạch BHI có bổ sung các chất dinh dưỡng phù hợp), sau đó ủ ở nhiệt độ 37⁰C/18-24 giờ trong khí trường có chứa 5% CO₂. Quan sát hình thái khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch.
- Tiêu chuẩn chấp thuận: khuẩn lạc nhỏ như giọt sương, tròn, bóng và đồng đều không lẫn các khuẩn lạc có hình thái khác.
- Thử nghiệm được áp dụng cho việc nhận dạng vi khuẩn Hib trước và sau khi đông khô hoặc bảo quản ở nhiệt độ -80⁰C.

2.3.2. Kiểm tra hình thể vi khuẩn

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu “kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học” [3]. Vi khuẩn được nhuộm Gram và quan sát hình thể dưới kính hiển vi.
- Tiêu chuẩn chấp thuận: vi khuẩn là cầu trực khuẩn đa dạng, mảnh nhỏ, bắt màu Gram âm.
- Thử nghiệm được áp dụng cho việc nhận dạng vi khuẩn Hib trước và sau khi đông khô hoặc bảo quản ở nhiệt độ -80⁰C.

2.3.3. Kiểm tra độ sống

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được trình bày trong phần 2.3.1 -Kiểm tra hình thái khuẩn lạc và độ thuần khiết. Quan sát khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch.

- Tiêu chuẩn chấp thuận: khuẩn lạc phải mọc trên 70% trường cấy. Khuẩn lạc nhỏ như giọt sương, tròn, bóng và đồng đều không lẫn các khuẩn lạc có hình thái khác.
- Thử nghiệm được áp dụng cho việc nhận dạng vi khuẩn Hib sau khi đông khô hoặc bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

2.3.4. Thử nghiệm với yếu tố X và V

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu “kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học” [3]. Thử nghiệm xác định nhu cầu phát triển cần có yếu tố X, V trên môi trường thạch Trypticase Soy.
- Tiêu chuẩn chấp thuận: Khuẩn lạc là *Haemophilus influenzae* khi khuẩn lạc mọc giữa 2 khoanh giấy có chứa X và V.
- Thử nghiệm được áp dụng cho việc nhận dạng vi khuẩn Hib trước và sau khi đông khô hoặc bảo quản âm.

2.3.5. Thử nghiệm định typ huyết thanh vi khuẩn

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu “kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học” [3] và thường quy của Phòng vi khuẩn hô hấp, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
- Nguyên lý: Thực hiện phản ứng ngưng kết trên phiến kính theo hướng dẫn của nhà sản xuất với kháng thể kháng đặc hiệu typ b của *H. influenzae* (Antiserum *H. influenzae* type b của Bio-Rad Co.,).
- Tiến hành:
 - + Cấy thuần vi khuẩn trên môi trường thạch sôcôla, ủ ở tủ ấm CO_2 ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$) trong vòng 16-18h.
 - + Tạo huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương 2 Mc Farland trong nước muối sinh lý 0,9% chứa 0,5% Formamide (để bảo đảm ATSH).

- + Nhỏ lên 2 vị trí trên phiến kính, mỗi vị trí 01 giọt huyền dịch vi khuẩn.
- + Nhỏ tiếp 01 giọt kháng huyết thanh kháng Hib vào 01 vị trí trên, 01 giọt nước muối sinh lý vào vị trí còn lại.
- + Trộn đều bằng tấm nhựa hoặc tấm tre, hoặc lắc nhẹ phiến kính.
- + Quan sát sự xuất hiện các hạt tua trong vòng 01 phút ở vị trí có hỗn hợp vi khuẩn và kháng huyết thanh (dương tính), và âm tính ở vị trí chỉ có huyền dịch vi khuẩn và nước muối sinh lý.
- Tiêu chuẩn chấp thuận: vi khuẩn tạo được ngưng kết với huyết thanh đặc hiệu kháng Hib trong thời gian trong vòng 01 phút.
- Thử nghiệm được áp dụng cho việc nhận dạng vi khuẩn Hib trước và sau khi đông khô hoặc bảo quản âm.

2.3.6. Thử nghiệm định typ sinh học *Haemophilus influenzae*

- Phương pháp: áp dụng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu “kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học” [3] và thường quy của Phòng vi khuẩn hô hấp, VVSDT. Thử nghiệm tiến hành với bộ sinh vật hoá học *Api 10s* của Bio Mérieux (Pháp) dựa vào 3 tính chất sinh học, đó là khả năng sinh *Indol*, *Urease* và *Ornithine decarboxylase*.
- Tiến hành: Quy trình bao gồm các bước sau:
 - + Hoà khuẩn lacer vi khuẩn sau khi đã cấy thuần vào 1 ml dung dịch NaCl 9⁰/₀₀ vô khuẩn để tạo huyền dịch có độ đục 1-2 Mc Farland.
 - + Dùng pippett vô khuẩn hút huyền dịch, nhỏ vào 3 ô cần làm phản ứng của bộ sinh vật hoá học *Api 10s* (bioMérieux), phủ parafin vào các giếng ODC và URE, để ở tủ ấm 35-37⁰C/18h đọc kết quả theo tiêu chuẩn của Killian (Bảng 2.2).

- Thử nghiệm được áp dụng cho việc định týp sinh học cho vi khuẩn Hib giống gốc sau khi đông khô để so sánh với kết quả về týp sinh học của các chủng Hib đầu dòng.

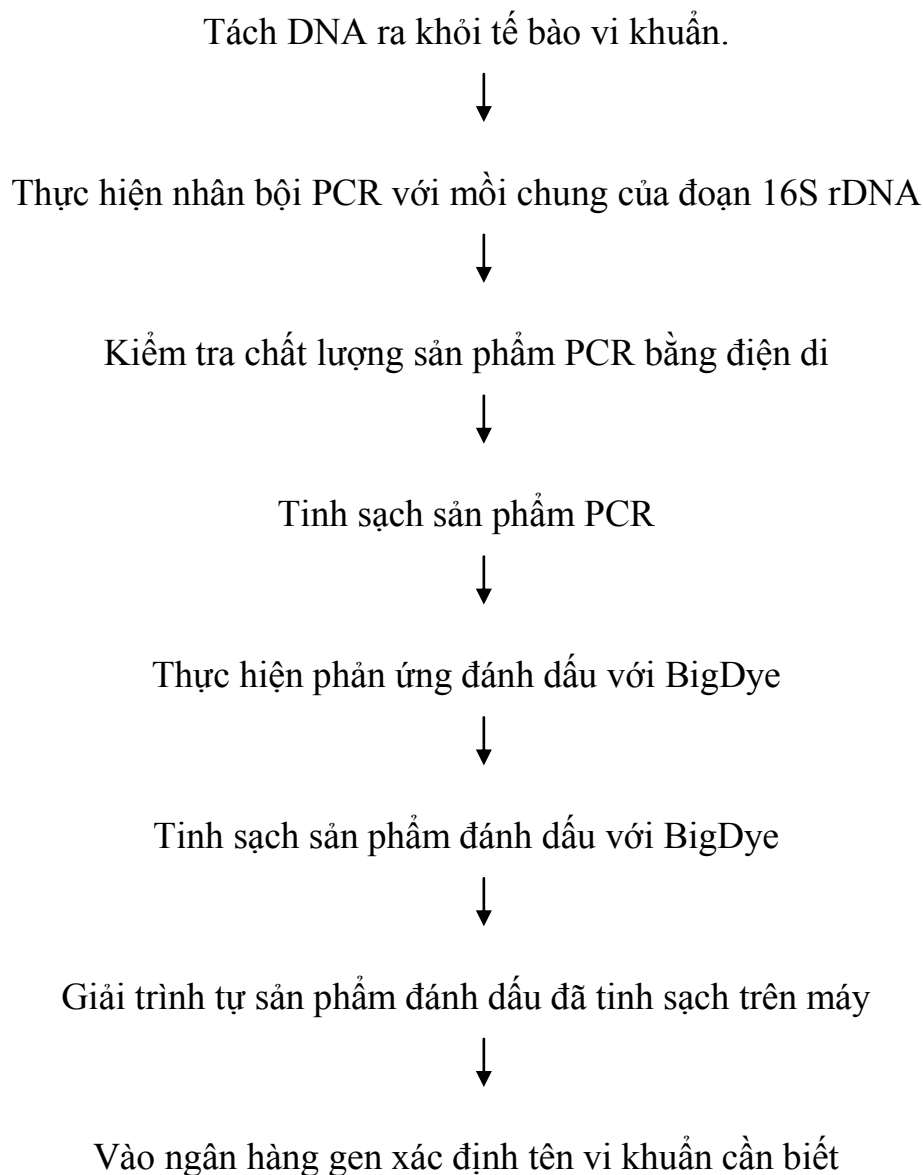
Bảng 2.2. Tiêu chuẩn phân loại theo týp sinh học của các loài thuộc *Haemophilus influenzae*

Typ SH	Các tính chất hoá học		
	Test urê	Test Indol	Ornithin decarboxylase (ODC)
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	-
IV	+	-	+
V	-	+	+
VI	-	-	+
VII	-	+	-
VIII	-	-	-

2.3.7. Thử nghiệm xác định vi khuẩn *Haemophilus influenzae* bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rDNA

- Nguyên lý : vùng 16S rDNA là vùng có đặc tính bảo tồn cao và thay đổi theo loài vi khuẩn. Do đó, dựa trên trình tự của 16S rDNA sẽ xác định được tên của vi khuẩn. Trình tự của 16S rDNA của vi khuẩn cần xác định sẽ được khuếch đại bởi PCR sử dụng mồi chung cho vi khuẩn. Căn cứ vào trình tự này, tên vi khuẩn thử nghiệm được xác định dựa trên ngân hàng gen qua trang web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

- Các bước tiến hành được tóm tắt trong Hình 2.4.



Hình 2.4. Tóm tắt quy trình xác định trình tự đoạn gen 16S rDNA của vi khuẩn

- Thử nghiệm được áp dụng cho việc xác định tính ổn định về trình tự gen của chủng vi khuẩn Hib qua quá trình cấy chuyển và lưu giữ từ chủng Hib đầu dòng, chủng Hib giống gốc và chủng Hib giống sản xuất.

2.3.8. Thử nghiệm xác định độ ẩm tồn dư trong các ống chủng sau khi đông khô (*xem phần 5.2.6 - Xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô*)

2.4. KẾT QUẢ XÂY DỰNG HỆ CHŨNG GIỐNG CHO SẢN XUẤT VẮCXIN HIB CỘNG HỢP

- Trong quá trình nghiên cứu lựa chọn chủng Hib, các chủng Hib gốc (chủng đầu dòng) được nhân lên và giữ dưới dạng có bổ sung glycerol bảo quản trong điều kiện âm. Theo kết quả nghiên cứu về các đặc tính polysaccharide của các chủng này, chủng 1419 cho kháng nguyên có đặc tính không phù hợp để sử dụng trong sản xuất vắc xin Hib cộng hợp (kết quả trình bày trong Chương 3- Xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm). Do vậy, chỉ 2 chủng Hib 1544 và Eagan tiếp tục được sử dụng để thiết lập hệ chủng giống cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.
- Hồ sơ về các chủng Hib giống gốc và giống sản xuất đã sản xuất được đính kèm trong phần Phụ lục. Hệ thống chủng giống đã được xây dựng này đảm bảo cho nhà sản xuất có thể sản xuất được vắc xin Hib cộng hợp trong một thời gian dài. Tính ổn định về chất lượng chủng giống đã được kiểm tra định kỳ trong thời gian nghiên cứu phát triển vắc xin Hib cộng hợp này. Tính ổn định này sẽ được tiếp tục nghiên cứu trong thời gian tiếp theo
- Số lượng và chất lượng của hệ thống chủng giống cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp được trình bày trong bảng 2.3.
- Kết quả nhận dạng chủng Hib giống gốc so với chủng Hib đầu dòng nhận được từ VVSDT và NIH cũng cho thấy:
 - + Có tính tương đồng về đặc tính ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu. Cả chủng 1544 và chủng Eagan đều có týp sinh học là týp II, một týp gây bệnh phổ biến tại Việt Nam (chiếm 70% số trường hợp vi khuẩn Hib phân lập được) [2].

+ Kết quả bước đầu xác định chuỗi gen của các chủng Hib giống gốc cho thấy đây đều là các vi khuẩn Hib với tính tương đồng về chuỗi gen 16S rDNA đến 99% (kết quả so sánh trình tự chuỗi gen 16S rDNA của chủng 1544 và chủng Eagan đính kèm trong phần Phụ lục). Trong thời gian tới, việc xác định tính ổn định về trình tự chuỗi gen giữa chủng Hib giống gốc và chủng Hib sản xuất sẽ tiếp tục được nghiên cứu.

Bảng 2.3. Hệ thống chủng giống cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp

Đặc tính	Chủng giống gốc		Chủng giống sản xuất	
	<i>Chủng Eagan</i>	<i>Chủng 1544</i>	<i>Chủng Eagan</i>	<i>Chủng 1544</i>
Số lượng chủng	103 ống	76 ống	200 ống	113 ống
Thử nghiệm kiểm tra hình thái khuẩn lạc và độ thuần nhất	Khuẩn lạc điển hình và thuần nhất			
Thử nghiệm kiểm tra độ sống	Khuẩn lạc mọc trên 90% trường cấy			
Thử nghiệm với yếu tố X và V	Khuẩn lạc là <i>Haemophilus influenzae</i>			
Thử nghiệm định týp huyết thanh	Khuẩn lạc là <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib)			
Thử nghiệm định týp sinh học	Týp II			
Thử nghiệm xác định trình tự gen	99% chuỗi gen có tính tương đồng với các chủng <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib)			
Độ ẩm tồn dư	1,7%	1,9%		

CHƯƠNG 3

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮCXIN HIB CỘNG HỢP Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp được nghiên cứu và phát triển tại Việt Nam là quy trình cộng hợp giữa polysaccharide tinh chế từ vi khuẩn Hib với giải độc tố uốn ván - dạng vắc xin Hib cộng hợp PRP-T. Đây là công nghệ do Robbins và cộng sự tại Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa kỳ (NIH) phát triển [40] và là công nghệ cộng hợp Hib mới nhất. Công nghệ này đã được nhiều Hãng sản xuất vắc xin lớn trên thế giới như Sanofi Pasteur, Glaxo SmithKline, Viện huyết thanh Ấn Độ áp dụng và đã cho ra nhiều sản phẩm thương mại được sử dụng tại nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. Các vắc xin Hib cộng hợp PRP-T đã chứng minh được tính an toàn và hiệu quả đáp ứng miễn dịch cao. Sau lịch tiêm miễn dịch cơ bản 3 mũi ở trẻ nhỏ, vắc xin Hib cộng hợp PRP-T cho hiệu giá đáp ứng kháng thể cao nhất trong các vắc xin Hib cộng hợp hiện có. Với hiệu giá kháng thể này, vắc xin không những cho đáp ứng miễn dịch kéo dài mà còn tạo được miễn dịch cộng đồng làm giảm tình trạng mang vi khuẩn ở người lành và giảm tỷ lệ mắc bệnh trong các nhóm không được tiêm phòng [60].

Nhóm nghiên cứu của Công ty Vắc xin và sinh phẩm số 1 (VABIOTECH) đã nhận được sự giúp đỡ và hợp tác của NIH (Mỹ) để nghiên cứu và phát triển vắc xin Hib cộng hợp dạng PRP-T. Đây là điểm mấu chốt nhất để chúng tôi có thể lựa chọn công nghệ tiên tiến này trong nghiên cứu và phát triển Hib cộng hợp tại Việt Nam. Đồng thời, với nguyên liệu để làm protein tải là giải độc tố uốn ván (TT), đây là một thành phần trong vắc xin tam liên bạch hầu - ho gà - uốn ván (DPT) mà Việt Nam đã sản xuất được và cũng dễ dàng tìm kiếm hay

nhập khẩu từ các nhà sản xuất nước ngoài. Do vậy, để sản xuất ở qui mô công nghiệp sau này sẽ dễ có được nguồn protein tải để sử dụng cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp. Các sản phẩm dạng phối hợp của vắc xin Hib PRP-T hiện đang được sử dụng trên thị trường cũng rất phổ biến và cho hiệu quả phòng bệnh cao. Do vậy, việc phát triển được vắc xin PRP-T cũng sẽ là tiền đề cho việc nghiên cứu và phát triển vắc xin dạng phối hợp giữa vắc xin Hib và các vắc xin khác tại Việt Nam trong tương lai.

Dựa trên các bước chủ yếu của quy trình công nghệ do Viện Quốc gia về Sức khỏe trẻ em và Phát triển con người thuộc Viện Quốc gia về Sức khỏe Hoa Kỳ (NIH) hướng dẫn và cung cấp, nhóm nghiên cứu đã tiến hành các thử nghiệm đối với từng bước của quy trình nhằm tìm ra các điều kiện tối ưu nhất để có các thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Đồng thời, nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu cải tiến một số bước nhằm xây dựng được một quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp tại Việt Nam có chất lượng, hiệu suất và tính thực tiễn cao hơn. Cả 3 chủng Hib gốc giống (2 của Việt Nam và 1 của NIH) đều được đưa vào nghiên cứu trong giai đoạn này, từ đó có các so sánh nhằm chọn lựa chủng có chất lượng PRP tốt nhất, hiệu suất cộng hợp cao nhất và tính đáp ứng miễn dịch cao để đưa vào sản xuất trong nội dung tiếp theo của nghiên cứu. Quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp bao gồm các bước chính sau đây (Hình 3.1):

Chuẩn bị polysaccharide cho cộng hợp:

- Nuôi cấy vi khuẩn Hib.
- Bất hoạt và thu hoạch polysaccharide Hib.
- Tinh chế polysaccharide Hib.
- Tạo dẫn xuất PRP-ADH.

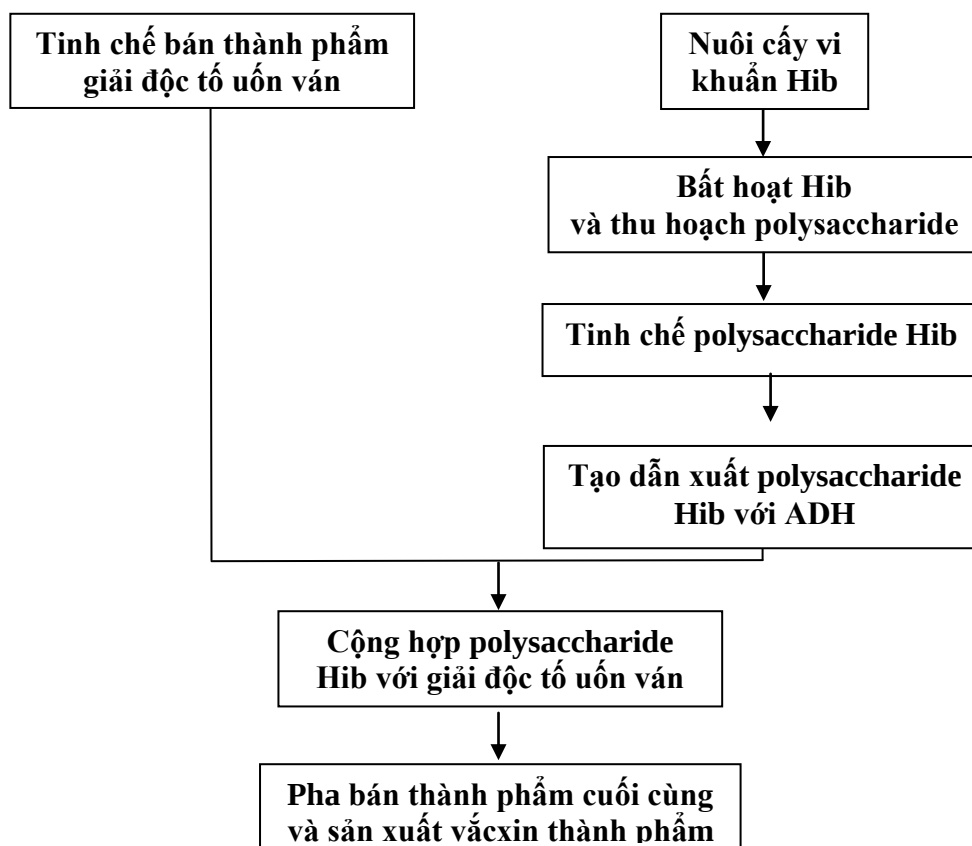
Chuẩn bị protein tải cho cộng hợp:

- Tinh chế bán thành phẩm giải độc tổ uôn ván.

Cộng hợp polysaccharide và protein tải:

- Cộng hợp PRP với giải độc tố uốn ván (TT)

Pha bán thành phẩm và sản xuất vắc xin thành phẩm



Hình 3.1. Tóm tắt quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp

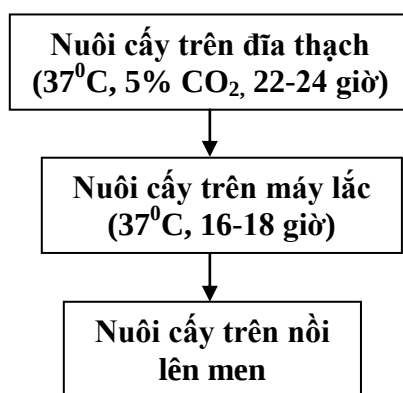
3.1. QUY TRÌNH NUÔI CẤY VI KHUẨN HIB

- Chủng Hib giống sản xuất bảo quản ở nhiệt độ -70°C được phục hồi trên thạch đĩa BHI, nuôi cấy ở tủ ấm 37°C trong thời gian 22-24 giờ. Khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được kiểm tra độ sống (trên 70% trường cấy) và độ thuần khiết (khuẩn lạc nhỏ, tròn, bóng và đồng đều không lẫn các khuẩn lạc có hình thái khác). Khuẩn lạc được nhận dạng bằng phương pháp ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

- Chọn các khuẩn lạc phát triển tốt cấy chuyển vào môi trường canh thang BHI, nuôi cấy trong các bình tam giác trên máy lắc 180-200 vòng/phút ở nhiệt độ 37⁰C trong thời gian 16-18 giờ. Khi kết thúc quá trình nuôi cấy, kiểm tra mức độ phát triển của chủng Hib nuôi cấy có đạt theo yêu cầu hay không bằng phương pháp đo độ đục (OD ở bước sóng 550nm) và nhận dạng chủng có chứa polysaccharide bằng phương pháp ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

- Tiếp tục cấy chuyển chủng Hib lên nồi lên men (10 lít) có chứa canh thang BHI cùng các chất dinh dưỡng phù hợp cho Hib phát triển. Trên các hệ thống lên men này, điều kiện phù hợp nhất cho vi khuẩn Hib phát triển được nghiên cứu. Các thông số của điều kiện nuôi cấy sẽ được đề cập là nhiệt độ và thời gian nuôi cấy (Bảng 3.1). Để đánh giá các điều kiện này, các chỉ số như pH, tốc độ phát triển của chủng nuôi cấy (bằng phương pháp đo độ đục ở bước sóng 550nm) và hiệu suất của polysaccharide thu được sẽ được theo dõi. Trong phần nuôi cấy vi khuẩn Hib, giá trị đo độ đục (OD) và pH sẽ được xem xét để đánh giá các thông số của điều kiện nuôi cấy và lựa chọn chủng. Hiệu suất và chất lượng của polysaccharide thu được sẽ được nghiên cứu trong các phần tiếp theo

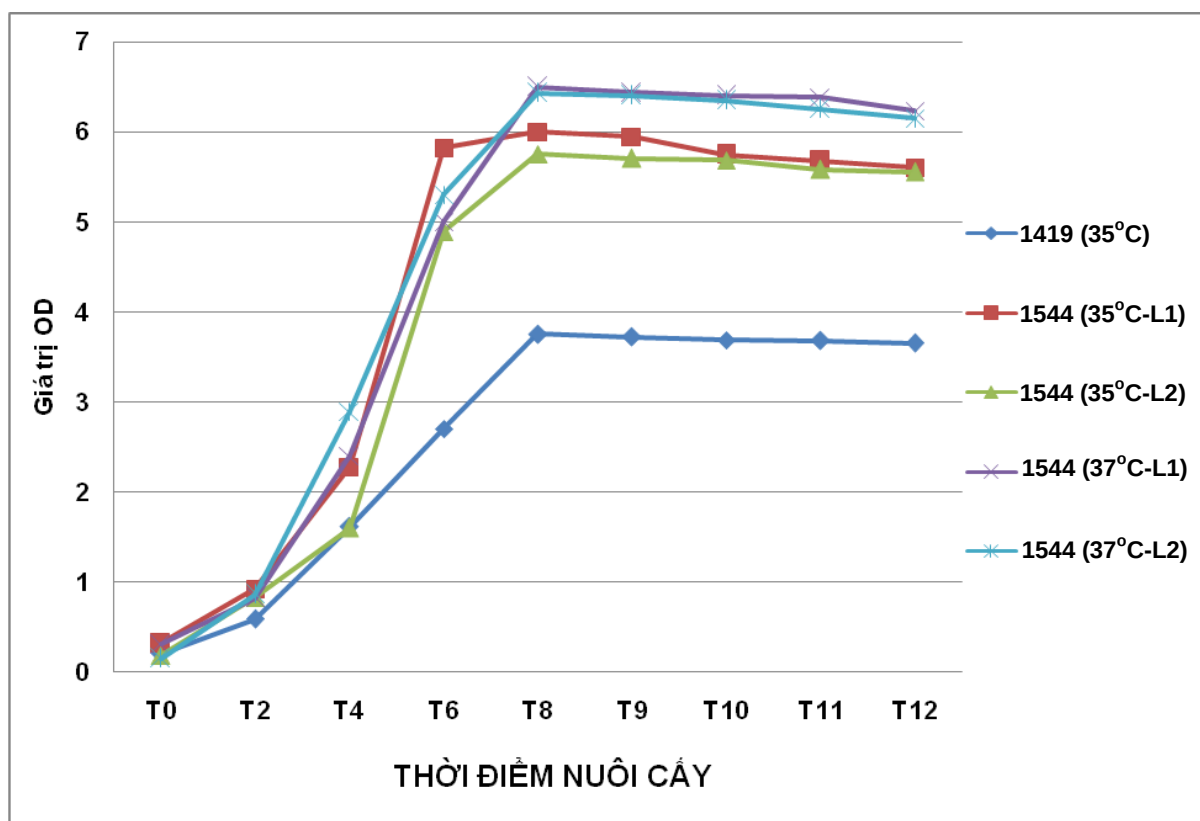
- *Phần 3.2. “Quy trình bất hoạt và thu hoạch polysaccharide” và Phần 3.3. “Quy trình tinh chế polysaccharide Hib”*. Tóm tắt quy trình nuôi cấy vi khuẩn Hib được trình bày trong Hình 3.2.



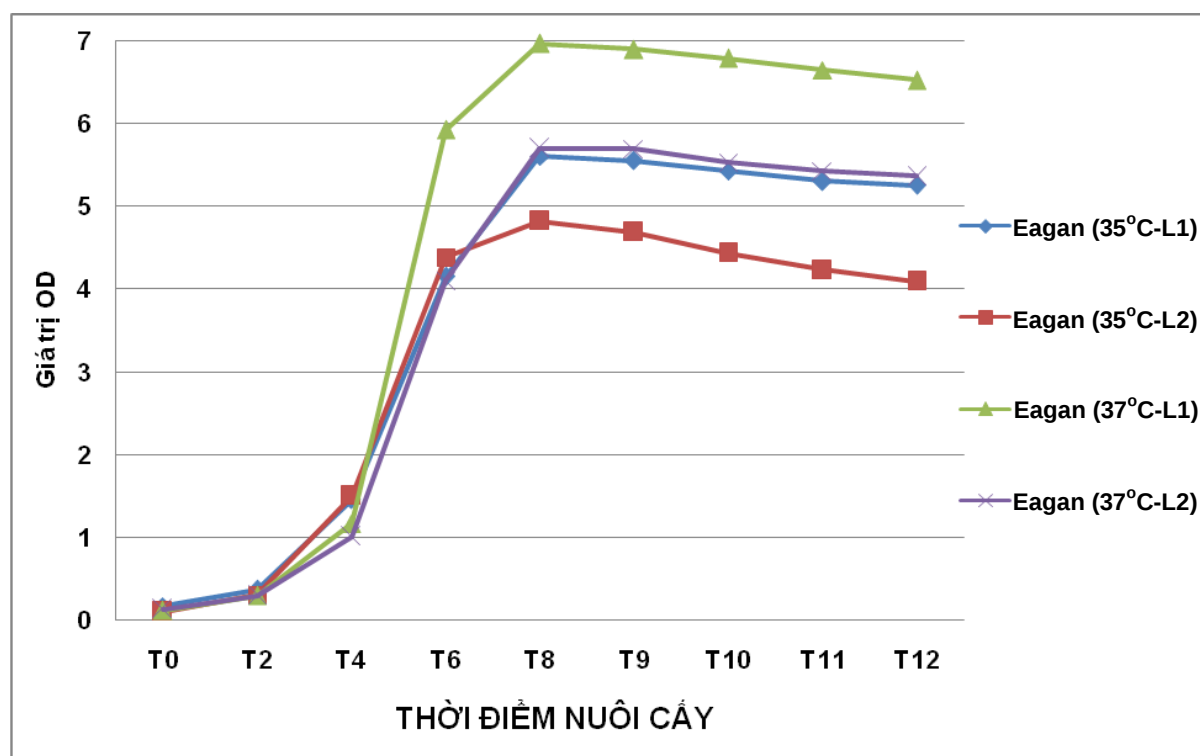
Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quy trình nuôi cấy vi khuẩn Hib

**Bảng 3.1. Đánh giá hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn theo thời gian và nhiệt độ
nuôi cấy khác nhau trên nôi lên men**

Thời gian nuôi cấy	Chỉ số theo đôi	Chủng 1419/ nuôi cấy ở 35 ⁰ C	Chủng 1544				Chủng Egan			
			Nuôi cấy ở 35 ⁰ C		Nuôi cấy ở 37 ⁰ C		Nuôi cấy ở 35 ⁰ C		Nuôi cấy ở 37 ⁰ C	
			Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2
Thời điểm bắt đầu	OD	0,200	0,314	0,180	0,300	0,143	0,171	0,108	0,121	0,138
	pH	7,54	7,25	7,63	7,69	7,57	7,52	7,46	7,63	7,60
Sau 2 giờ nuôi cấy	OD	0,582	0,920	0,823	0,815	0,856	0,375	0,305	0,300	0,302
	pH	7,17	7,22	7,59	7,58	7,42	7,47	7,43	7,56	7,54
Sau 4 giờ nuôi cấy	OD	1,610	2,276	1,594	2,400	2,890	1,456	1,503	1,170	1,015
	pH	7,18	7,20	7,55	7,53	7,41	7,44	7,42	7,50	7,50
Sau 6 giờ nuôi cấy	OD	2,700	5,819	4,890	5,000	5,300	4,150	4,380	5,920	4,100
	pH	7,18	7,12	7,52	7,38	7,33	7,40	7,30	7,46	7,46
Sau 8 giờ nuôi cấy	OD	<u>3,750</u>	5,998	5,750	<u>6,500</u>	<u>6,430</u>	5,600	4,820	<u>6,960</u>	<u>5,700</u>
	pH	7,20	6,99	7,40	6,93	7,32	7,35	7,23	7,44	7,40
Sau 9 giờ nuôi cấy	OD	3,718	5,946	5,700	6,432	6,400	5,550	4,683	6,892	5,692
	pH	7,18	6,89	7,35	6,82	7,25	7,30	7,20	7,40	7,36
Sau 10 giờ nuôi cấy	OD	3,686	5,745	5,682	6,402	6,345	5,421	4,432	6,783	5,530
	pH	7,01	6,70	7,23	6,71	7,20	7,25	7,13	7,28	7,30
Sau 11 giờ nuôi cấy	OD	3,674	5,675	5,581	6,382	6,249	5,300	4,230	6,640	5,421
	pH	6,80	6,63	7,20	6,62	7,12	7,14	7,08	7,20	7,25
Sau 12 giờ nuôi cấy	OD	3,650	5,600	5,550	6,230	6,150	5,250	4,090	6,520	5,360
	pH	6,50	6,55	7,05	6,54	7,10	7,10	7,00	7,10	7,15



Hình 3.3. So sánh hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn theo thời gian và nhiệt độ khác nhau trên nền lên men giữa chủng 1544 và chủng 1419

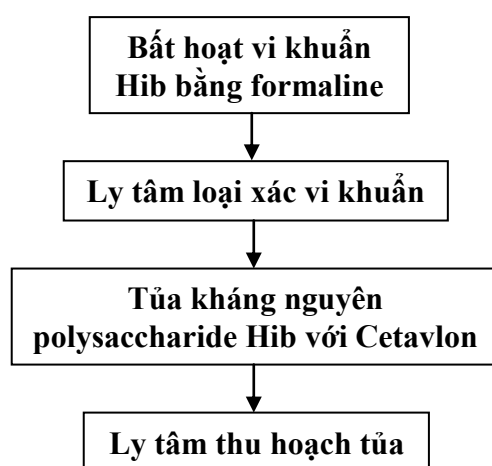


Hình 3.4. So sánh hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn theo thời gian và nhiệt độ khác nhau trên nền lên men của chủng Eagan

Theo kết quả trong Bảng 3.1, cả 3 chủng Hib dự tuyển (chủng Việt Nam 1419 và 1544, chủng Eagan của NIH) đều được đưa vào nghiên cứu. Chủng 1544 và chủng Eagan đều có hiệu suất nuôi cấy cao tương đương nhau. Đặc biệt, với điều kiện nuôi cấy ở 37°C , 2 chủng này cho hiệu suất nuôi cấy cao nhất (Hình 3.3 và Hình 3.4). Chủng 1419 cho hiệu suất nuôi cấy thấp nhất, giá trị OD vào thời điểm sau 8 giờ nuôi cấy chỉ đạt bằng một nửa so với các giá trị OD của các chủng khác (Hình 3.3). Trong hai thông số theo dõi, OD cho giá trị tăng cao rõ rệt theo thời gian và tăng thành đường thẳng trong 6 giờ đầu tiên, tuy nhiên giá trị pH thay đổi không nhiều và có xu hướng sẽ giảm dần. Nghiên cứu cũng cho thấy vào các thời điểm sau 8 giờ nuôi cấy, giá trị OD₅₅₀ gần như đạt đỉnh sau đó giảm nhẹ trong những giờ tiếp theo (Hình 3.3 và Hình 3.4). Giá trị pH cũng giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Điều này có nghĩa vi khuẩn đã phát triển đến mức độ bão hòa vào thời điểm sau 8 giờ nuôi cấy. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của nhiều tác giả khác khi nuôi cấy vi khuẩn Hib trên nồi lên men. Trong 6 giờ đầu tiên, biểu đồ phát triển vi khuẩn là 1 đường thẳng sau đó đạt mức độ bão hòa vào thời điểm 8 đến 9 giờ nuôi cấy và sau 14 giờ vi khuẩn sẽ chết dần do lượng chất dinh dưỡng trong nồi lên men như glucose giảm đi. Đồng thời, giá trị pH cũng giảm dần từ 7,5 xuống còn 5,9 [46]. Từ kết quả này, chủng 1544 và chủng Eagan đều được lựa chọn để nghiên cứu trong các quy trình tiếp theo và nhiệt độ nuôi cấy 37°C cũng như thời gian nuôi cấy 8 giờ sẽ là các chỉ số được xác định cho quy trình nuôi cấy vi khuẩn Hib trên nồi lên men 10 lít.

3.2. QUY TRÌNH BẤT HOẠT VÀ THU HOẠCH POLYSACCHARIDE HIB

- Vi khuẩn Hib sau khi nuôi cấy được bất hoạt bằng formaline: trong tất cả các loạt nghiên cứu, vi khuẩn đều bị bất hoạt toàn bộ (vi khuẩn không phát triển lại trên các môi trường nuôi cấy thông thường và đặc hiệu sau bất hoạt) với nồng độ formaline cuối cùng là 0,05% do vậy nồng độ này được lựa chọn là nồng độ bất hoạt tối ưu cho vi khuẩn Hib.
- Sau khi bất hoạt, tiến hành ly tâm loại xác vi khuẩn, nước nổi được làm tủa với cetavlon. Tủa này cũng sẽ được thu lại bằng phương pháp ly tâm. Khối lượng tủa thu được và chất lượng tủa đánh giá bằng cảm quan sẽ là các thông số để đánh giá quá trình này. Tuy nhiên, lượng PRP tinh chế được trên 1 lít hỗn dịch nuôi cấy mới là thông số chính xác nhất để đánh giá hiệu suất của quá trình nuôi cấy cũng như thu hoạch polysaccharide Hib (Bảng 3.2).
- Tóm tắt quy trình bất hoạt và thu hoạch polysaccharide của vi khuẩn Hib được trình bày trong Hình 3.5.



Hình 3.5. Sơ đồ tóm tắt quy trình bất hoạt và thu hoạch polysaccharide Hib

Bảng 3.2. Kết quả thu hoạch tủa polysaccharide Hib

Chỉ số đánh giá	Chủng 1419/ nuôi cấy ở 35°C	Chủng 1544				Chủng Eagan			
		Nuôi cấy ở 35°C		Nuôi cấy ở 37°C		Nuôi cấy ở 35°C		Nuôi cấy ở 37°C	
		Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2	Loạt 1	Loạt 2
Thể tích nuôi cấy	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít	5 lít
Khối lượng tủa thu hoạch	24 gr	20 gr	17 gr	15,3 gr	19,2 gr	22 gr	27 gr	15,8 gr	22 gr
Cảm quan về chất lượng tủa	Tủa khô xốp	Tủa dẻo và bóng				Tủa dẻo và bóng			
Hàm lượng PRP sau tinh chế (mg/lít nuôi cấy)	28,6	44,5	40	45	48	42,6	40	50	48

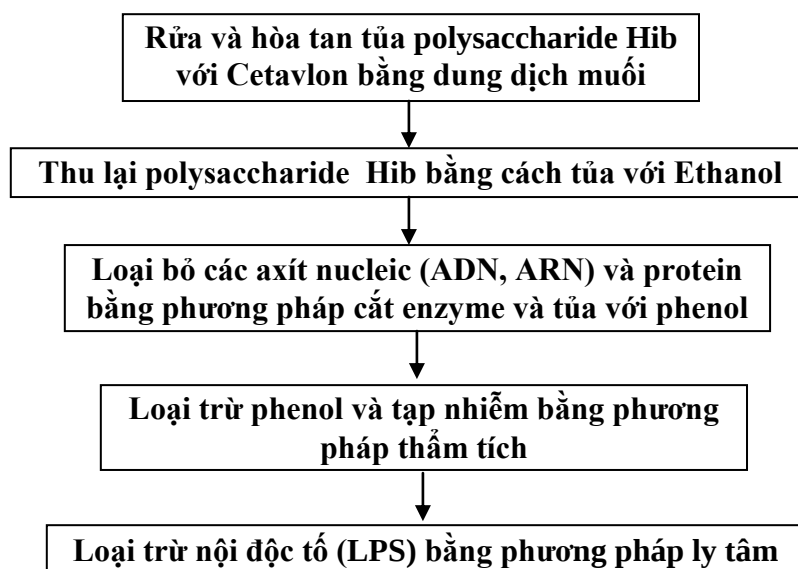
Kết quả trong Bảng 3.2 cho thấy, khối lượng tủa của PRP và cetavlon thu được qua các mẻ nuôi cấy với các chủng Hib và điều kiện nuôi cấy khác nhau thay đổi từ 15,3 gr cho đến 27 gr trong 5 lít hỗn dịch nuôi cấy. Tuy nhiên, lượng tủa này không phản ánh đúng lượng PRP thu được trong mỗi mẻ nuôi cấy. Điều này được giải thích là do lượng PRP phần lớn trong nước nổi nuôi cấy và trên vách của các vi khuẩn sống. Do vậy, với một lượng tủa lớn thường lại chứa nhiều các mảnh nhỏ xác vi khuẩn chết nên đây không phải là PRP thực sự [46]. Hàm lượng PRP thu được nhiều nhất khi nuôi cấy chủng Hib 1544 và Eagan ở 37°C. Chủng 1419 tuy thu được lượng tủa lớn (24 gr) nhưng về mặt cảm quan tủa này khô và xốp do vậy hàm lượng PRP rất thấp (28,6 mg/lít nuôi cấy). Từ kết quả này, chủng Hib 1544 và Eagan đã có được một quy trình bất hoạt và thu hoạch tủa ổn định cho hiệu suất PRP thu được cao nhất.

3.3. QUY TRÌNH TINH CHẾ POLYSACCHARIDE HIB

Sản phẩm của quy trình này là PRP tinh khiết đủ điều kiện cho phản ứng cộng hợp với protein tải, đạt các tiêu chuẩn của TCYTTG về hàm lượng, kích thước của PRP, không lẫn nhiều các tạp chất như protein, axit nucleic và nội độc tố lipopolysaccharide (LPS). Do vậy, các bước của quy trình tinh chế này đều được thực hiện với mục đích thu lại được nhiều PRP có chất lượng tốt và loại trừ được tối đa các thành phần tạp nhiễm. Các bước chính trong quy trình bao gồm (Hình 3.6):

- Rửa và hòa kết tủa của polysaccharide và cetavlon bằng dung dịch muối NaCl để loại trừ các ion tạp, cắt liên kết giữa polysaccharide và cetavlon.
- Tủa thu lại polysaccharide bằng ethanol.
- Loại bỏ ARN, ADN và protein bằng enzyme và phenol. Sau đó loại trừ các chất tồn dư bằng phương pháp thẩm tích.
- Loại bỏ nội độc tố lipopolysaccharide (LPS) bằng phương pháp ly tâm.

Sau khi tinh chế, polysaccharide Hib sẽ được kiểm tra để đánh giá chất lượng, từ đó giúp lựa chọn ra quy trình tinh chế cũng như polysaccharide có chất lượng tốt nhất, phù hợp để tiến hành các phản ứng cộng hợp. Các phương pháp kiểm tra chất lượng sau khi được xây dựng sẽ tiếp tục được áp dụng trong các bước của quy trình sản xuất sau này.



Hình 3.6. Sơ đồ tóm tắt quy trình tinh chế polysaccharide Hib

3.3.1. Các thử nghiệm kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau tinh chế

3.3.1.1. Thử nghiệm nhận dạng đặc hiệu bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch trên thạch với kháng huyết thanh anti - PRP (xem phần 5.1.4 - Thử nghiệm nhận dạng).

3.3.1.2. Thử nghiệm xác định kích thước phân tử

Nguyên lý

- Xác định kích thước phân tử bằng phương pháp sắc ký lọc gel.

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Mẫu thử

- Polysaccharide của Hib sau tinh chế.

Dụng cụ

- Hệ thống sắc ký.
- Pipét man.

- Pipét 5ml, 10ml .
- Cột gel lọc Sepharose CL-4B.
- Pipét aid.
- Tuýp 18 mm.
- Tuýp 2 ml.
- Cân phân tích.

Hoá chất và môi trường

- Nước pha tiêm.
- NaCl 0.15M.
- Blue Dextran.
- Sodium azide.

Các bước tiến hành

* Pha dung dịch chuẩn Blue dextran- Sodium azide.

- Cân 10 mg Blue dextran và 20mg Sodium azide hòa trong 1ml NaCl 0,15M.

* Tiến hành:

- Cho 1ml dung dịch chuẩn Blue dextran- Sodium azide chạy qua cột Sepharose CL-4B theo chương trình sau:
 - + Tốc độ dòng: 1ml/phút.
 - + Thể tích thu mẫu: 2ml/tuýp.
 - + Dung dịch đệm: NaCl 0,15M.
- Xác định 2 đỉnh sắc ký tương đương với các mẫu chuẩn Blue dextran (V_O) và Sodium azide (V_T).
- Chạy sắc ký với mẫu thử polysaccharide qua cột Sepharose CL-4B theo chương trình như chạy với mẫu chuẩn.

- Xác định đỉnh của mẫu thử polysaccharide bằng cách đo hàm lượng đường ribose (ước lượng thông qua phản ứng Bial đối với pentose sử dụng chuẩn D-ribose) (V_M).

Kết quả

Tính kết quả

Công thức:

$$K_D = (V_M - V_O) / (V_T - V_O)$$

K_D : Chỉ số kích thước kháng nguyên polysaccharide Hib.

V_M : Thời gian lưu của mẫu kiểm tra trên sắc ký đồ.

V_T : Thời gian lưu của Sodium azide trên sắc ký đồ.

V_O : Thời gian lưu của Blue dextran trên sắc ký đồ.

3.3.1.3. Thử nghiệm xác định thành phần polysaccharide

Bằng cách đo hàm lượng đường ribose (ước lượng thông qua phản ứng Bial đối với pentose sử dụng chuẩn D-ribose) (xem phần 5.2.1 - Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch)

3.3.1.4. Thử nghiệm xác định hàm lượng protein tạp nhiễm

Nguyên lý

Tiến hành theo phương pháp Bradford với chuẩn là albumin huyết thanh bò dựa trên sự kết hợp giữa thuốc nhuộm Coomassie với protein trong môi trường axit.

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Ống nghiệm thủy tinh 5 ml.

- Pipetman 1ml.
- Pipetman 200 ml.
- Dụng cụ chia mẫu (Handy step).
- Đầu côn 200, 1000 μ l.
- Ống Eppendorf 2 ml.
- Cồng đo .
- Falcon 50 ml.

Hóa chất

- Dung dịch BSA chuẩn 25, 50, 75, 100mg/ml.
- Hoặc dung dịch BSA chuẩn 100, 200, 300, 400mg/ml.
- Mẫu bán thành phẩm vắc xin Hib cộng hợp.
- Thuốc nhuộm Coomassie.
- Nước pha tiêm.

Trang thiết bị

- Máy đo quang .
- Máy lắc.

Các bước tiến hành

Chuẩn bị

** Các dung dịch protein chuẩn*

- Sử dụng các ống dung dịch chuẩn 25, 50, 75 và 100mg/ml (hoặc 100, 200, 300, 400mg/ml tùy theo hàm lượng mẫu thử).

** Mẫu thử*

- Điều chỉnh mẫu thử để có hàm lượng nằm trong khoảng đường chuẩn.

*** Pha dung dịch thuốc nhuộm Coomassie 20%**

- Pha thuốc nhuộm Coomassie bằng nước cất pha thêm theo tỷ lệ 1/4
- Pha ngay trước khi dùng.

Tiến hành

- Hút 50 ml các dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn cho vào các ống nghiệm tương ứng.
- Thêm 2,5 ml dung dịch thuốc nhuộm Coomassie 20% vào mỗi ống nghiệm và trộn đều.
- Để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- Đo quang phổ ở bước sóng 595 nm.

Kết quả

Tính kết quả

Công thức: $y = ax + b$

Trong đó y : hàm lượng protein của mẫu thử (mg/ml)

a, b : hệ số của phương trình đường chuẩn

x : độ hấp thụ quang đo được tương ứng với từng hàm lượng protein

3.3.1.5. Thử nghiệm xác định hàm lượng các axit nucleic tạp nhiễm

Nguyên lý

Thử nghiệm xác định nồng độ axit nucleic bằng phương pháp đo quang phổ tia cực tím ở bước sóng 260 nm.

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Mẫu thử

- Polysaccharide của Hib sau tinh chế.

Dụng cụ

- Máy đo quang phổ.
- Pipét man.
- Pipét aid.
- Cốc đong 2.000 ml.
- Cốc đong 5.000 ml.
- Cốc đong 100 ml.
- Pipét 25, 10, 5 ml.
- Ống nghiệm 2 ml
- Cống thạch anh 1ml

Hoá chất và môi trường

- Nước pha tiêm.
- NaCl 0.15M.

Kết quả

- Hàm lượng axit nuclêic (mg/ml) được tính đơn giản = giá trị OD đo được ở bước sóng A_{260} / 20.
- Giá trị OD A_{260} cho phép nằm trong khoảng 0,05 - 2 tương đương hàm lượng axit nuclêic là 2,5 – 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.1.6. Thử nghiệm xác định hàm lượng nội độc tố tụ nhiễm

Nguyên lý

Thử nghiệm theo phương pháp Gel-clot bằng Bộ sinh phẩm Endotoxin – Cambrex.

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Ống nghiệm thủy tinh đã khử chất gây sốt 10x75mm, 13x100mm.
- Đầu côn đã khử chất gây sốt loại 200 µl, 1000 µl.
- Pipetman 200 µl, 1000 µl.
- Giá để ống nghiệm.

Nguyên vật liệu

- Nước không có endotoxin - LAL reagent water (LRW).
- Endotoxin chuẩn (CSE).
- Lysate (Độ nhạy: 0,06 EU/ml).
- Mẫu thử.

Trang thiết bị

- Bình ủ ấm.
- Máy trộn.
- Đồng hồ hẹn giờ.

Các bước tiến hành

Chuẩn bị

**** Các dung dịch thử nghiệm***

- Dung dịch Endotoxin chuẩn 20EU/ml (CSE): thêm 5ml LRW vào lọ Endotoxin lắc kỹ.

**** Dung dịch Lysate***

- Thêm 5,2ml LRW vào lọ Lysate, lắc nhẹ trong 30 - 60 giây.

**** Pha chứng dương Endotoxin***

- Endotoxin 1EU/ml: pha loãng Endotoxin chuẩn 20EU/ml với nước LRW để đạt được dung dịch CSE1EU/ml.
- Endotoxin 0,125EU/ml (Chứng dương)

- Pha chứng dương + mẫu thử (PPC)

Tiến hành

- Đánh dấu các ống nghiệm : chứng dương (+), chứng âm (-), mẫu thử (2 ống nghiệm/1 mẫu).
- Hút 0,1 ml chứng dương, chứng âm (chứng âm - dùng nước không có Endotoxin) và mẫu thử mỗi loại vào 2 ống nghiệm.
- Thêm 0,1ml dung dịch Lysate vào tất cả các ống nghiệm trên. Lắc nhẹ.
- Ủ ở 37⁰C trong 1 giờ.

Kết quả

Cách đọc kết quả

- Dương tính (+): có tạo gel trong ống nghiệm, khi úp ngược ống nghiệm thì gel vẫn bám chắc vào đáy ống.
- Âm tính (-): không tạo gel trong ống nghiệm.

Giá trị của thử nghiệm: Thử nghiệm chỉ có giá trị khi:

- Chứng âm: không tạo gel.
- Chứng dương: tạo gel.
- PPC : tạo gel.

Tính kết quả

- Nếu mẫu không tạo gel: hàm lượng Endotoxin trong mẫu < 0,06 EU/ml.
- Nếu mẫu tạo gel: hàm lượng Endotoxin trong mẫu $\geq$ 0,06 EU/ml.
- Tiếp tục pha loãng mẫu và tiến hành lại thử nghiệm.

3.3.2. Kết quả nghiên cứu quy trình tinh chế polysaccharide Hib

Áp dụng quy trình tinh chế polysaccharide của vi khuẩn Hib theo hướng dẫn của NIH, nhóm nghiên cứu tiến hành các bước tinh chế và đánh giá chất

lượng của các sản phẩm sau tinh chế. Tuy nhiên, nhiều kết quả thu được đã không đạt theo yêu cầu cả về hiệu suất và chất lượng như:

- Hiệu suất của quá trình thẩm tích sử dụng màng thẩm tích đơn thuần để loại bỏ các thành phần tạp và chất phản ứng sử dụng trong quá trình tinh chế không cao. Lượng mẫu thẩm tích nhỏ và thời gian thẩm tích kéo dài.
- Các enzyme sử dụng để cắt axit nucleic (DNase và RNase) luôn cần kiểm soát nghiêm ngặt về điều kiện của phản ứng và chỉ có thể tiến hành với một thể tích nhỏ do các enzyme này rất dễ mất hoạt tính.

Do vậy, nhóm nghiên cứu đã tiến hành một số thay đổi, để làm tăng hiệu suất và chất lượng của các sản phẩm tinh chế. Thay đổi lớn nhất của quy trình tinh chế polysaccharide Hib là sử dụng màng Pellicon cassette 10 kD và hệ thống cô đặc thẩm tích của Millipore thay thế cho các màng thẩm tích thông thường và sử dụng enzyme Benzonase thay thế các enzyme DNase và RNase trong bước cắt các axit nucleic (ADN và ARN). Các tác giả khác trên thế giới cũng đã áp dụng các thay đổi tương tự như sử dụng hệ thống cô đặc thẩm tích với màng siêu lọc 50 kD, 100 kD và enzyme Benzonase trong quy trình tinh chế polysaccharide của các vi khuẩn khác nhau Hib [47], [48], não mô cầu týp C [20], [50] và phế cầu týp 23F [21]. Các thay đổi này đều cho polysaccharide có độ tinh khiết cao, đảm bảo chất lượng cho các phản ứng cộng hợp và đặc biệt có thể áp dụng tốt ở quy mô sản xuất lớn hơn [48]. Kết quả của các quy trình tinh chế polysaccharide được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra chất lượng các polysaccharide Hib sau tinh chế

Chỉ số đánh giá	Tiêu chuẩn của TCYTTG	PRP của chủng 1419	PRP của chủng 1544		PRP của chủng Egan	
			DNase, RNase	Benzonase	DNase, RNase	Benzonase
Protein	≤ 1%	0,9%	0,7%	0,86%	0,44%	0,41%
Axít Nucleic	≤ 1%	11,5%	17,3%	1,18%	3,46%	0,9%
Thử nghiệm Ribose	≥ 32%	>85%	>80%	>85%	>85%	>88%
Nội độc tố	≤ 10 IU/μg		<0,06	< 0,15	<1,92	<0,96
Phân bố kích thước phân tử	≥ 50% có $K_D \leq 0,30$	$K_D = 0,80$ ≤50% có $K_D \leq 0,30$	$K_D = 0,46 \geq 50\%$ có $K_D \leq 0,30$		$K_D = 0,4$ ≥ 50% có $K_D \leq 0,30$	
Thử nghiệm nhận dạng	Ngưng kết đặc hiệu với kháng huyết thanh Hib	Ngưng kết đặc hiệu với kháng huyết thanh Hib				

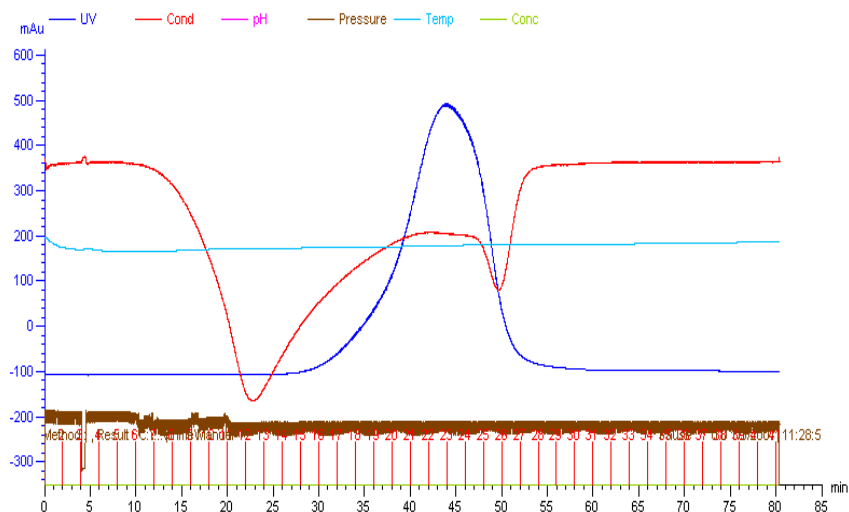
Theo Bảng 3.3, PRP sau tinh chế của chủng Egan được cắt axit nucleic bởi enzyme Benzonase cho chất lượng phù hợp nhất với tiêu chuẩn của TCYTTG. PRP của chủng 1419 có kích thước phân tử nhỏ không đạt tiêu chuẩn đối với một PRP dùng cho phản ứng cộng hợp với giải độc tố uốn ván để tạo thành vắc xin PRP-T, do vậy chủng này sẽ không được sử dụng để nghiên cứu và phát triển vắc xin Hib cộng hợp trong các giai đoạn tiếp theo (Hình 3.7). PRP của chủng 1544 có phân bố kích thước phân tử đạt tiêu chuẩn và tương đương với PRP của chủng Egan (Hình 3.8). Tuy nhiên, hàm lượng axit nucleic của PRP chủng 1544 đã vượt quá tiêu chuẩn cho phép cho dù đã áp dụng toàn bộ các cải tiến về mặt quy trình tinh chế, do vậy PRP này cũng không đủ chất

lượng cho sản xuất vắc xin Hib cộng hợp. Để khẳng định lại kết quả này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành áp dụng quy trình tinh chế PRP Hib như nhau ở nhiều loạt sản xuất đối với cả 2 chủng 1544 và Eagan để so sánh về hàm lượng axit nucleic trong sản phẩm PRP sau khi tinh chế (Bảng 3.4).

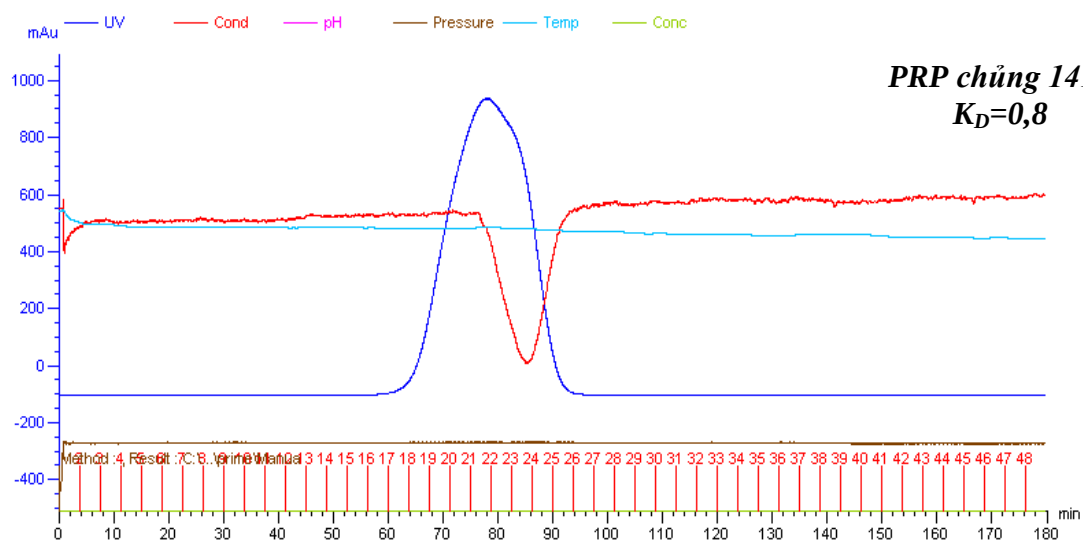
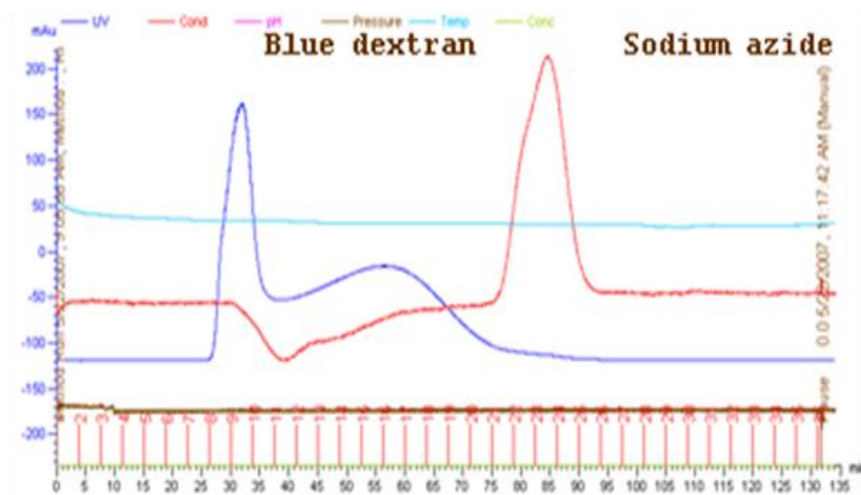
Bảng 3.4. Kết quả về tỷ lệ hàm lượng axit nucleic trong sản phẩm polysaccharide sau tinh chế của các chủng Hib khác nhau

Chủng vi khuẩn Hib	Loạt tinh chế	Tỷ lệ về hàm lượng axit nucleic	
		Kết quả	Tiêu chuẩn của TCYTTG
Chủng 1544	Loạt 1	2,2 %	$\leq 1\%$
	Loạt 2	2,5%	
	Loạt 3	1,6%	
Chủng Eagan	Loạt 1	0,52%	
	Loạt 2	0,53%	
	Loạt 3	0,60%	

Theo bảng 3.4, tỷ lệ về hàm lượng axit nucleic của PRP Hib chủng Eagan đều đạt yêu cầu và phù hợp với tiêu chuẩn của TCYTTG ở tất cả các loạt tinh chế. Do vậy, PRP chủng Eagan và quy trình tinh chế PRP sẽ được áp dụng để sản xuất ra các loạt vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm trong các giai đoạn tiếp theo.

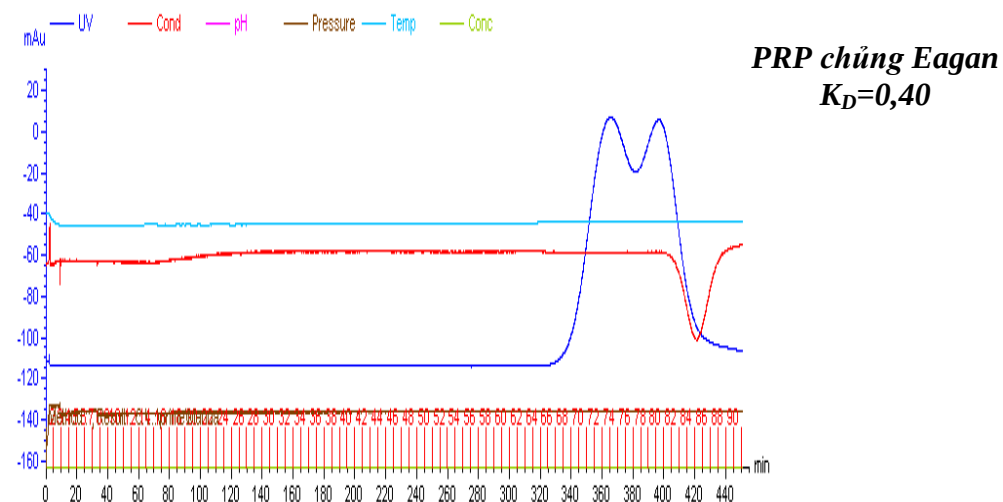
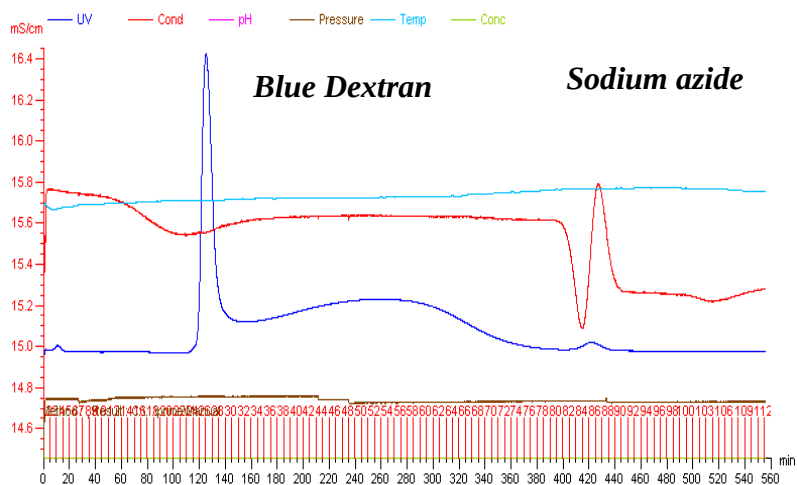
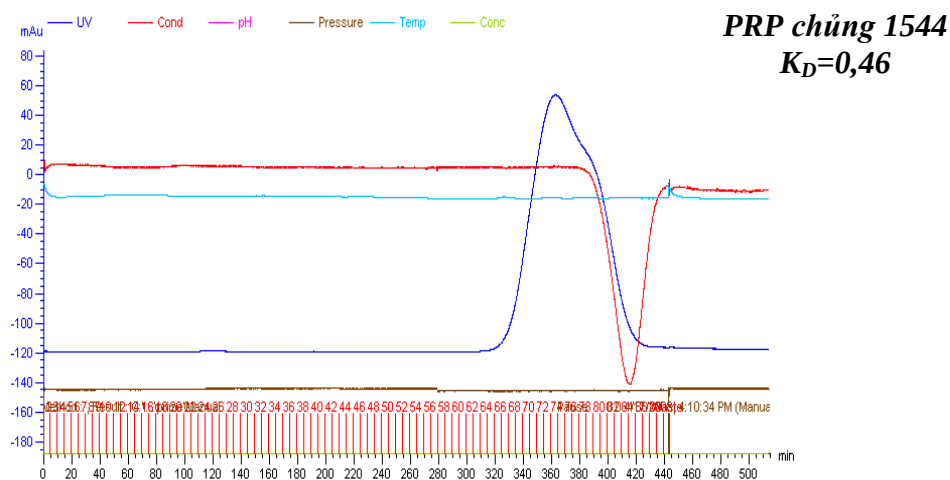


PRP chủng 1544
 $K_D=0,46$



PRP chủng 1419
 $K_D=0,8$

Hình 3.7. Sắc ký xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib của chủng 1419 và chủng 1544



Hình 3.8. Sắc ký xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib của chủng 1544 và chủng Eagan

3.4. QUY TRÌNH TẠO DẪN XUẤT POLYSACCHARIDE HIB VỚI ADH

Tạo dẫn xuất giữa polysaccharide Hib (PRP) với 1 hoá chất (ADH) chứa 6 phân tử carbon qua liên kết giữa gốc phosphate (PO_4) của phân tử polysaccharide với một nhóm carboxylic ($-\text{COOH}$) của hóa chất trung gian. Dẫn xuất PRP-ADH sau đó được tinh chế bằng cột sắc ký để loại bỏ các chất tồn dư của phản ứng và cô đặc đến nồng độ đạt yêu cầu cho cộng hợp (Hình 3.9). Theo các quy trình áp dụng trước đây, chất hoạt hóa thường được sử dụng là cyanogen bromide (CNBr), chất này độc và cho hiệu suất sản phẩm sau cộng hợp không cao. Hiện nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) như một chất hoạt hóa thay thế có hiệu quả trong các phản ứng tạo dẫn xuất. So với CNBr, CDAP dễ dàng sử dụng, có thể phản ứng trong điều kiện pH thấp hơn và ít gây các phản ứng không mong muốn. Thêm vào đó, không giống với polysaccharide đã hoạt hóa bởi CNBr, protein có thể bắt cặp trực tiếp với polysaccharide đã hoạt hóa bởi CDAP. Cộng hợp vắc xin được tạo ra từ liên kết trực tiếp của protein với polysaccharide đã hoạt hóa bởi CDAP cho hiệu giá và đáp ứng kháng thể bảo vệ cao [41]. Từ những ưu điểm của chất hoạt hóa CDAP, nghiên cứu này cũng đã tiến hành so sánh việc tạo dẫn xuất PRP Hib bằng các chất hoạt hóa CNBr và CDAP, từ đó đánh giá chất lượng của các sản phẩm được tạo ra. Hy vọng chất hoạt hóa mới sẽ là chất thay thế có hiệu quả CnBr trong quá trình tạo dẫn xuất.

Một trong những thử nghiệm quan trọng để đánh giá tỷ lệ tạo dẫn xuất giữa polysaccharide và hóa chất ADH là thử nghiệm TNBS (sử dụng axit 2,2,6-trinitrobenzenesulfonic để phát hiện gốc NH_2). Kết quả của thử nghiệm này sẽ cho biết hàm lượng của nhóm NH_2 trong mẫu thử, từ đó so sánh với hàm lượng PRP (thử nghiệm định lượng PRP bằng cách đo hàm lượng đường ribose) để xác định tỷ lệ tạo dẫn xuất của quy trình tạo dẫn xuất PRP Hib (Bảng 3.5).

Thử nghiệm xác định tỷ lệ tạo dẫn xuất giữa polysaccharide và ADH: Thử nghiệm TNBS

Mục đích

Thử nghiệm sử dụng để xác định hàm lượng nhóm NH_2 có trong bán thành phẩm sau khi tạo dẫn xuất giữa polysaccharide Hib với ADH.

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Vật liệu

- Bán thành phẩm sau tạo dẫn xuất.

Dụng cụ

- Máy đo quang phổ.
- Pipét man.
- Pipét aid.
- Tuýp 5 ml.
- Cân phân tích.
- Tuýp 2 ml.
- Đồng hồ bấm giây.

Hoá chất và môi trường

- Nước pha tiêm.
- NaCl 0.15M.
- ADH.
- Sodium tetraborat.
- TNBS 5%.

Các bước tiến hành

Pha sodium tetraborat bão hòa

- 20 g Sodium tetraborat hòa trong 50ml WFI.

Pha chuẩn

- Cân 10 mg ADH và hòa tan trong 1 ml nước pha tiêm.
- Tùy nồng độ của mẫu mà pha loãng 1:5; 1:10 ; 1: 20 hoặc cao hơn nữa.
- Pha TNBS 0,01 M: 150 µl TNBS 5% + 2400 µl nước pha tiêm.

Tiến hành

- Cho vào tất cả các tuýp 0,5 ml sodium tetraborat bão hòa.
- Cách 30 giây, thêm vào các tuýp 150 µl TNBS 0,01 M.
- Sau 5 phút, đo các mẫu tại bước sóng 500nm.

Kết quả

- Dựa vào kết quả đo mật độ quang trên máy, dựng đường chuẩn với hàm lượng ADH từ 0,4 - 4 µg/ ml.
- Tính hàm lượng nhóm NH₂ trong mẫu thử theo công thức

$$y = 2 \times (ax + b)$$

y: Hàm lượng nhóm NH₂.

x: Độ hấp thu quang đo được tương ứng với từng hàm lượng ADH chuẩn.

a, b: Hệ số của phương trình đường chuẩn.

- Tỷ lệ tạo dẫn xuất được tính theo công thức:

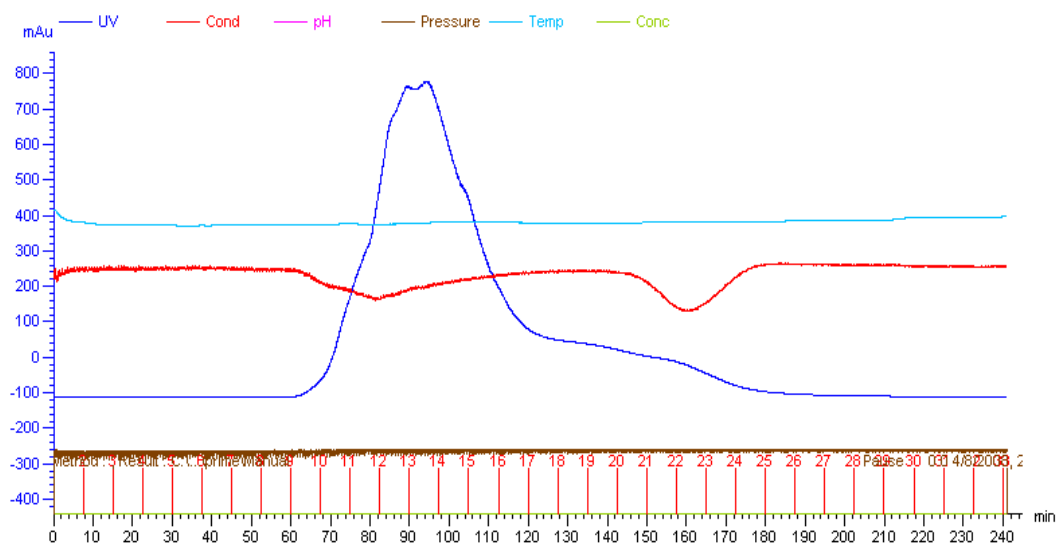
Hàm lượng nhóm NH₂/hàm lượng PRP.

Hàm lượng PRP được tính bằng thử nghiệm định lượng PRP theo phương pháp đo hàm lượng đường ribose.

**Bảng 3.5. So sánh tỷ lệ tạo dẫn xuất
sau khi sử dụng chất hoạt hóa CDAP và CNBr**

Chỉ số đánh giá	Chất hoạt hóa cho phản ứng tạo dẫn xuất	
	CDAP	CNBr
Tỷ lệ tạo dẫn xuất (ADH/PRP)	3,5%	3,93%

Hình ảnh sắc ký tinh chế dẫn xuất PRP-ADH được trình bày trong Hình 3.9.



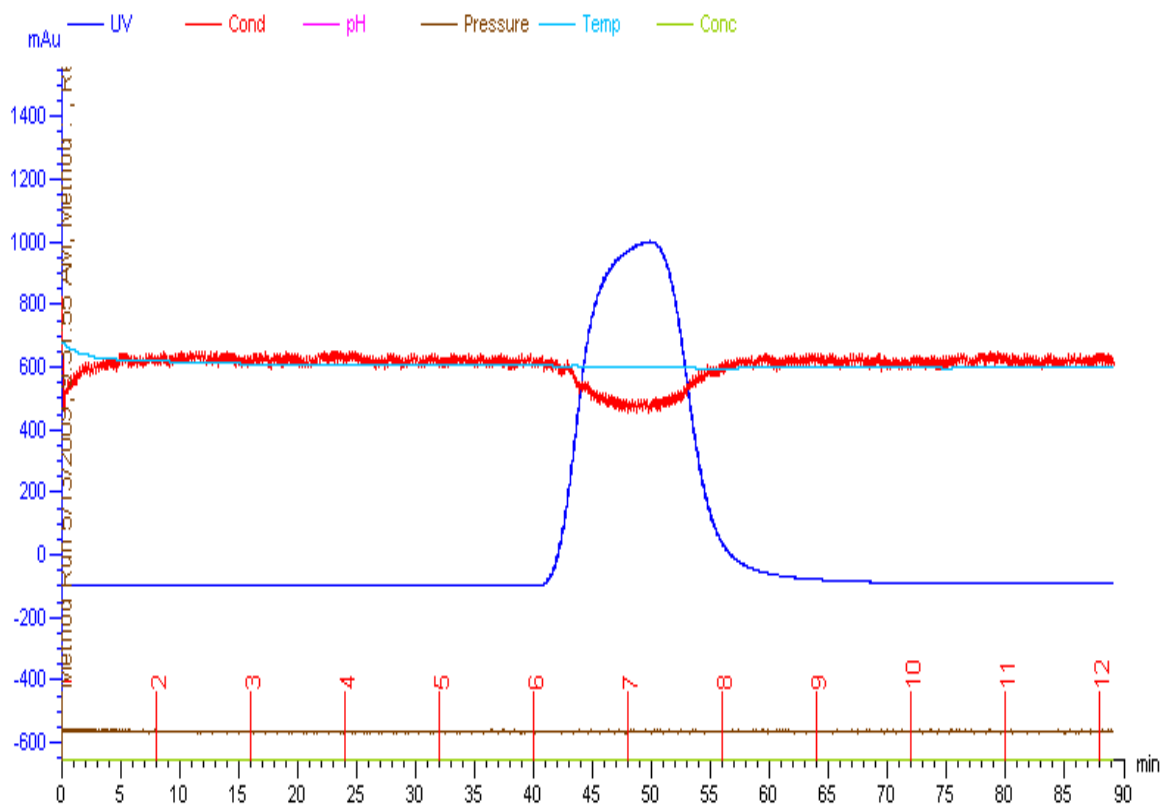
Hình 3.9. Sắc ký tinh chế dẫn xuất polysaccharide Hib và ADH

Theo Bảng 3.5, tỷ lệ tạo dẫn xuất của 2 chất hoạt hóa CDAP và CNBr là tương nhau. Tỷ lệ này nằm trong giới hạn của tỷ lệ tạo dẫn xuất có hiệu quả (từ 2% đến 9%) [41]. Các dẫn xuất sau đó sẽ được cộng hợp với giải độc tổ uốn ván và kết quả của quá trình này sẽ được đánh giá sâu thêm ở các bước sau của quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp.

3.5. QUY TRÌNH TINH CHẾ VÀ CÔ ĐẶC BÁN THÀNH PHẨM GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN

Bán thành phẩm giải độc tổ uốn ván có được từ các nhà sản xuất trong nước hoặc nước ngoài. Bán thành phẩm này phải đạt được các tiêu chuẩn chất lượng của protein tái cho sản xuất vắc xin cộng hợp [53].

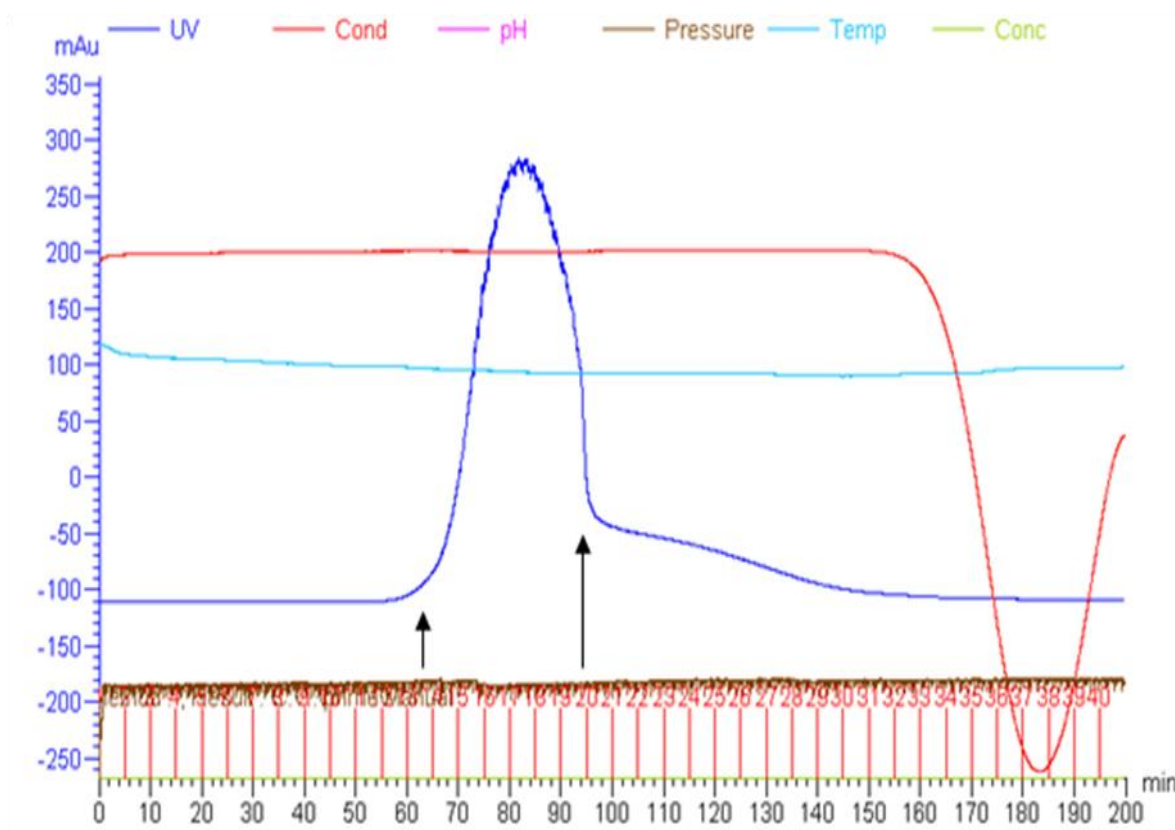
Trước tiên bán thành phẩm giải độc tố uốn ván phải được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lọc gel để có được protein tải có độ tinh khiết và đậm phù hợp cho cộng hợp (Hình 3.10). Giải độc tố uốn ván đã tinh chế sẽ tiếp tục được cô đặc để có một hàm lượng protein tải đạt được yêu cầu đối với phản ứng cộng hợp giữa giải độc tố uốn ván và PRP Hib đã liên kết ADH. Hàm lượng protein tải được xác định theo theo phương pháp Bradford với chuẩn là albumin huyết thanh bò (xem phần 3.3.1.4).



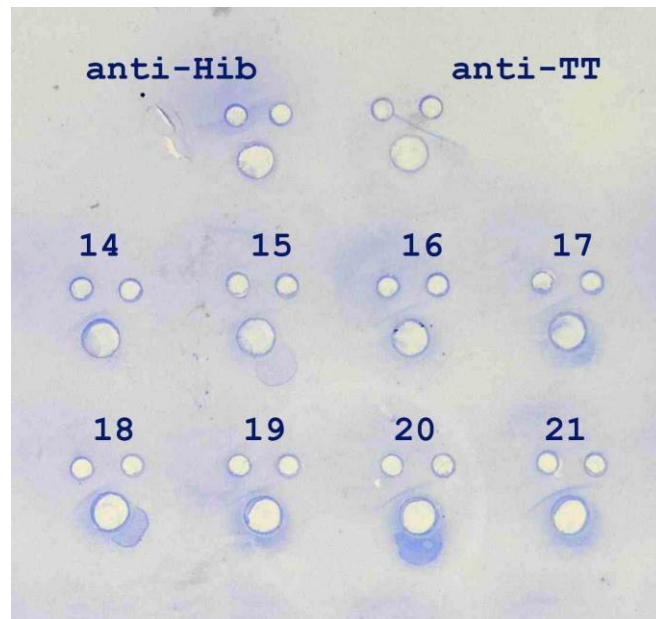
Hình 3.10. Sắc ký tinh chế giải độc tố uốn ván

3.6. QUY TRÌNH CỘNG HỢP POLYSACCHARIDE HIB VỚI GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN

Phản ứng tạo cộng hợp giữa PRP và giải độc tố uốn ván qua liên kết giữa nhóm $-COOH$ còn lại của phân tử hóa chất ADH với nhóm amino ($-NH_2$) của phân tử protein có trong giải độc tố uốn ván. Cộng hợp PRP-T sau đó được tinh chế bằng cột sắc ký Sepharose - 4B để tách PRP-T ra khỏi các thành phần không cộng hợp - PRP và protein tự do. Lựa chọn các phân đoạn có hàm lượng cộng hợp PRP-T cao dựa vào đỉnh hấp phụ ở bước sóng 280nm trên sắc ký đồ (Hình 3.11) và khẳng định bằng thử nghiệm khuếch tán miễn dịch trên thạch với kháng huyết thanh anti - PRP và kháng huyết thanh anti - TT (xem Phần 2.6.1.1 và Hình 3.12).



Hình 3.11. Sắc ký tinh chế cộng hợp PRP-T



Hình 3.12. Ngưng kết với các kháng huyết thanh đặc hiệu của các phân đoạn khi tinh chế cộng hợp PRP-T

Sau khi tinh chế, cộng hợp PRP-T sẽ được kiểm tra để đánh giá chất lượng từ đó lựa chọn ra quy trình cộng hợp phù hợp nhất. Các phương pháp kiểm tra chất lượng sau khi được xây dựng sẽ tiếp tục được áp dụng trong các bước của quy trình sản xuất sau này.

3.6.1. Các thử nghiệm kiểm tra chất lượng sản phẩm sau cộng hợp

3.6.1.1. Thử nghiệm nhận dạng đặc hiệu bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch trên thạch với kháng huyết thanh anti - PRP và kháng huyết thanh anti - TT (xem phần 5.1.4 - Thử nghiệm nhận dạng).

3.6.1.2. Thử nghiệm xác định kích thước phân tử

Nguyên lý

Xác định kích thước phân tử bằng phương pháp sắc ký phân tách gel trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Màng lọc 0,22 μ m.
- Bơm tiêm 1ml.
- Cột TSK gel G6000PW (7,8mm ID x 30cm, 13 μ m).
- Bộ lọc chân không .

Hoá chất

- Dung dịch NaCl 0,15M.
- Mẫu chuẩn: kháng nguyên giải độc tố uốn ván.
- Nước pha tiêm.
- Mẫu thử: bán thành phẩm sau cộng hợp.

Trang thiết bị

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Các bước tiến hành

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

- Lọc bán thành phẩm sau cộng hợp qua màng lọc 0,22 μ m.
- Sau khi cài đặt các điều kiện làm việc cho máy, đưa lần lượt 50 μ l dung dịch mẫu chuẩn giải độc tố uốn ván và mẫu bán thành phẩm sau cộng hợp vào hệ thống.

Kết quả

Đọc kết quả

- Dựa vào thời gian lưu của đỉnh mẫu chuẩn và mẫu thử xác định kích thước của mẫu sản phẩm sau khi cộng hợp.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Đỉnh thời gian lưu của mẫu thử phải xuất hiện trước so với mẫu chuẩn khi đó mẫu sản phẩm sau cộng hợp có kích thước lớn hơn so với mẫu giải độc tổ uốn ván đơn thuần.

3.6.1.3. Thử nghiệm xác định thành phần polysaccharide bằng cách đo hàm lượng đường ribose (ước lượng thông qua phản ứng Bial đối với pentose sử dụng chuẩn D-ribose) (xem phần 5.2.1 - Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch).

3.6.1.4. Thử nghiệm xác định hàm lượng protein theo phương pháp Bradford với chuẩn là albumin huyết thanh bò (xem phần 3.3.1.4).

3.3.1.5. Thử nghiệm xác định hàm lượng polysaccharide tự do tồn dư

Nguyên lý

- PRP tự do (free), không cộng hợp có kích thước phân tử nhỏ sẽ qua màng siêu lọc 100kD và PRP đã cộng hợp có kích thước lớn hơn sẽ được giữ lại trên màng. Do vậy, dùng màng siêu lọc 100 kD, xác định hàm lượng PRP qua màng giúp tính được hàm lượng PRP tự do

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Nguyên liệu

- Mẫu thử: bán thành phẩm cộng hợp PRP-T.
- Mẫu chuẩn: bán thành phẩm PRP tinh chế đã biết hàm lượng (100 µg).

Dụng cụ

- Máy ly tâm.
- Cột siêu lọc 100 kD (Centricon 100 kD).
- Pipét aid.
- Ống nghiệm 1,5 ml.

Hoá chất và môi trường

- Nước pha tiêm.
- NaCl 0.15M.

Các bước tiến hành

Rửa cột siêu lọc 100kD

- Cho 15 ml nước pha tiêm vào cột siêu lọc 100kD.
- Ly tâm 3500 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 20°C.
- Loại bỏ nước qua lọc.
- Rửa lại 1 lần.

Lọc mẫu thử và mẫu chuẩn

- Cho 0,5 ml mẫu vào cột siêu lọc 100kD.
- Ly tâm 3500 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 20°C.
- Thu phần dung dịch qua lọc.
- Cho thêm 0,5 ml NaCl 0,15M vào cột siêu lọc và ly tâm như trên.
- Thu tiếp phần dung dịch qua lọc.
- Hộn 2 phần dung dịch qua lọc thu được.
- Thêm NaCl 0,15M cho đủ 1 ml.

Xác định hàm lượng PRP trong các mẫu dung dịch qua lọc thu được

- Xác định theo phương pháp đo hàm lượng đường ribose (ước lượng thông qua phản ứng Bial đối với pentose sử dụng chuẩn D-ribose) (xem phần 5.2.1 - Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch)

Kết quả

Tính kết quả

- Tính hệ số thu hồi của PRP chuẩn khi sử dụng cột siêu lọc 100 kD

Hệ số thu hồi = Hàm lượng PRP thu được trong mẫu chuẩn sau khi qua lọc/

Hàm lượng PRP trong mẫu chuẩn gốc x 100%.

- Hàm lượng PRP tự do trong mẫu thử = Hàm lượng PRP thu được trong mẫu thử sau khi qua lọc / hệ số thu hồi
- % PRP tự do = Hàm lượng PRP tự do trong mẫu thử / Hàm lượng PRP trong sản phẩm cộng hợp x 100%.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- PRP tự do nằm trong khoảng từ 10 - 40 %.

3.3.1.6. Thử nghiệm vô khuẩn (xem phần 5.1.1 – Phương pháp kiểm tra vô khuẩn)

3.6.2. Kết quả nghiên cứu quy trình cộng hợp

Kết quả về chất lượng của các sản phẩm sau cộng hợp với các quy trình khác nhau được trình bày trong Bảng 3.6. Hình ảnh chạy sắc ký HPLC của sản phẩm sau cộng hợp PRP Hib và giải độc tổ uốn ván so sánh với hình ảnh chạy

sắc ký giải độc tố uốn ván đơn thuần để xác định phân bố kích thước phân tử được trình bày trong Hình 3.13 và 3.14.

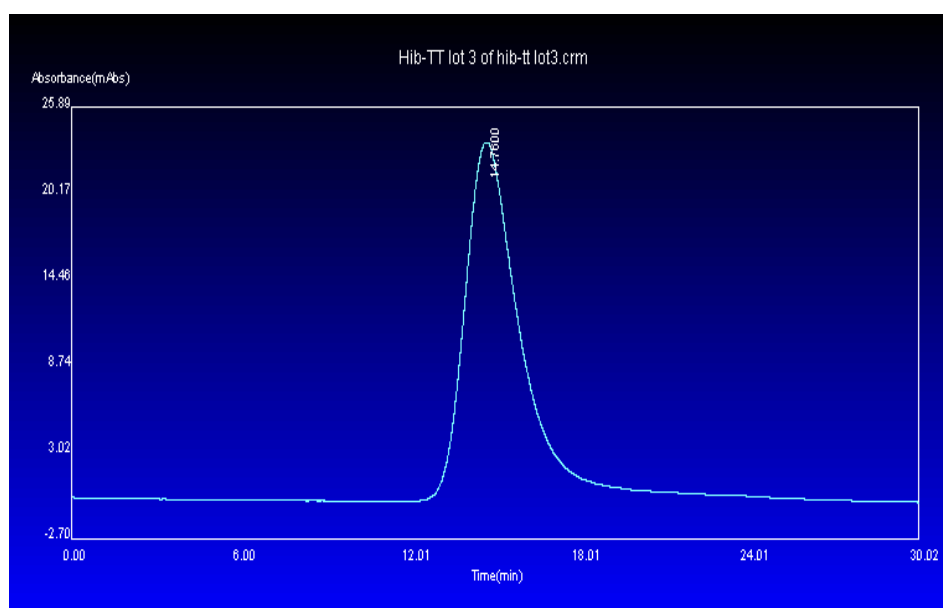
Bảng 3.6. Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm sau cộng hợp

Chỉ số đánh giá		Chất hoạt hóa	
		CDAP	CNBr
Hàm lượng các thành phần sau cộng hợp	Hàm lượng PRP (mg/ml)	0,25	0,18
	Hàm lượng protein (mg/ml)	0,30	0,29
	Tỷ lệ PRP/protein	0,96	0,62
Hiệu suất cộng hợp	PRP	32,8%	21,7%
	Protein	35,1%	34,4%
Chất lượng của sản phẩm sau cộng hợp	Ngưng kết với các kháng huyết thanh	Ngưng kết với các kháng huyết thanh đặc hiệu anti-PRP và anti-TT	
	Phân bố kích thước phân tử	Kích thước lớn trên kích thước của protein và PRP	
	PRP tự do tồn dư	4,8%	5,1%
	Vô khuẩn	Đạt yêu cầu	

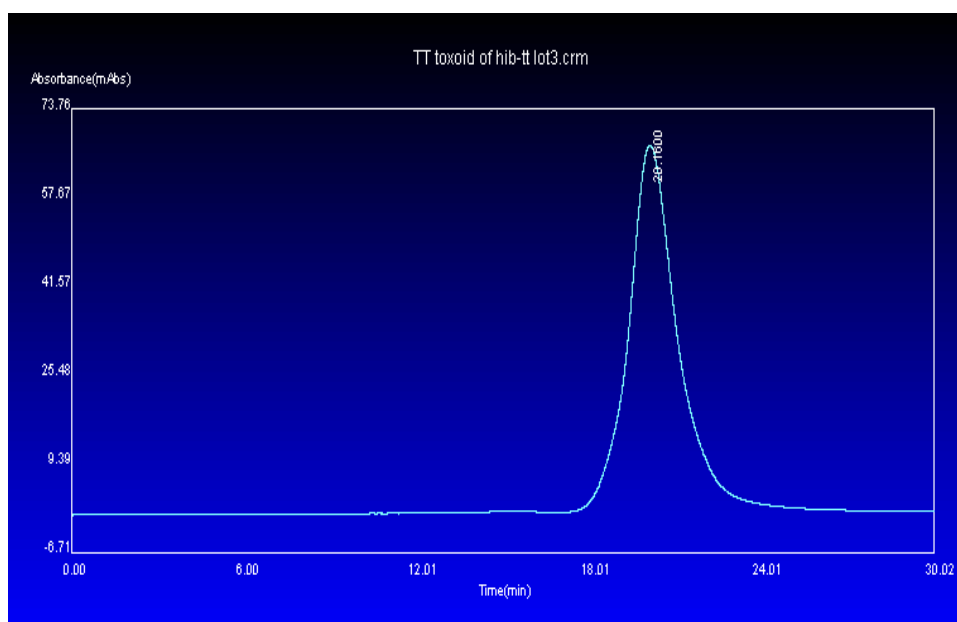
Theo Bảng 3.6, tỷ lệ PRP/protein, hiệu suất cộng hợp của PRP cũng như của protein khi sử dụng chất hoạt hóa là CDAP đều cao hơn so với khi sử dụng CNBr. Tất cả các sản phẩm sau cộng hợp đều đạt được các yêu cầu về chất lượng như hàm lượng PRP tự do tồn dư, phân bố kích thước phân tử, ngưng kết đặc hiệu với các kháng huyết thanh và vô khuẩn.

Các mẫu sau cộng hợp theo các quy trình công nghệ khác nhau được đánh giá về mức độ đáp ứng miễn dịch trên chuột để có thêm các căn cứ cho

việc lựa chọn quy trình tốt nhất sẽ áp dụng trong sản xuất sau này. Quy trình gây miễn dịch và đánh giá đáp ứng miễn dịch trên chuột được trình bày trong *Chương 5 - Đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc xin trên động vật thí nghiệm*. Kết quả đáp ứng miễn dịch trên chuột ICR sau khi tiêm các sản phẩm sau cộng hợp theo cả 2 quy trình tạo dẫn xuất và cộng hợp với các chất hoạt hóa CNBr và CDAP được trình bày trong Bảng 3.7.



Hình 3.13. Hình ảnh chạy sắc ký HPLC sản phẩm cộng hợp PRP-T



Hình 3.14. Hình ảnh chạy sắc ký HPLC giải độc tố uốn ván (TT)

Theo Hình 3.13 và Hình 3.14, đỉnh thời gian lưu của mẫu sản phẩm sau cộng hợp PRP-T xuất hiện sớm hơn so với đỉnh thời gian lưu của mẫu giải độc tổ uồn ván do đó có thể xác định rằng sản phẩm cộng hợp PRP-T có phân bố kích thước phân tử lớn hơn so với giải độc tổ uồn ván đơn thuần.

Bảng 3.7. Kết quả đáp ứng miễn dịch của sản phẩm sau cộng hợp theo các quy trình tạo dẫn xuất và cộng hợp khác nhau

Chỉ số		PRP cộng hợp		PRP không cộng hợp
		CDAP	CNBr	
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 1	Tỷ lệ*	14/15 (93,3%)	13/15 (86,7%)	0/15 (-)
	Mức độ#	1,08	1,84	0,32
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 2	Tỷ lệ*	15/15 (100%)	15/15 (100%)	0/15 (-)
	Mức độ#	5,21	5,29	0,34
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 3	Tỷ lệ*	15/15 (100%)	15/15 (100%)	-
	Mức độ#	5,48	5,37	-

* Tỷ lệ có đáp ứng miễn dịch là tỷ lệ giữa số chuột có kết quả xét nghiệm anti-PRP dương tính trên tổng số chuột được gây miễn dịch.

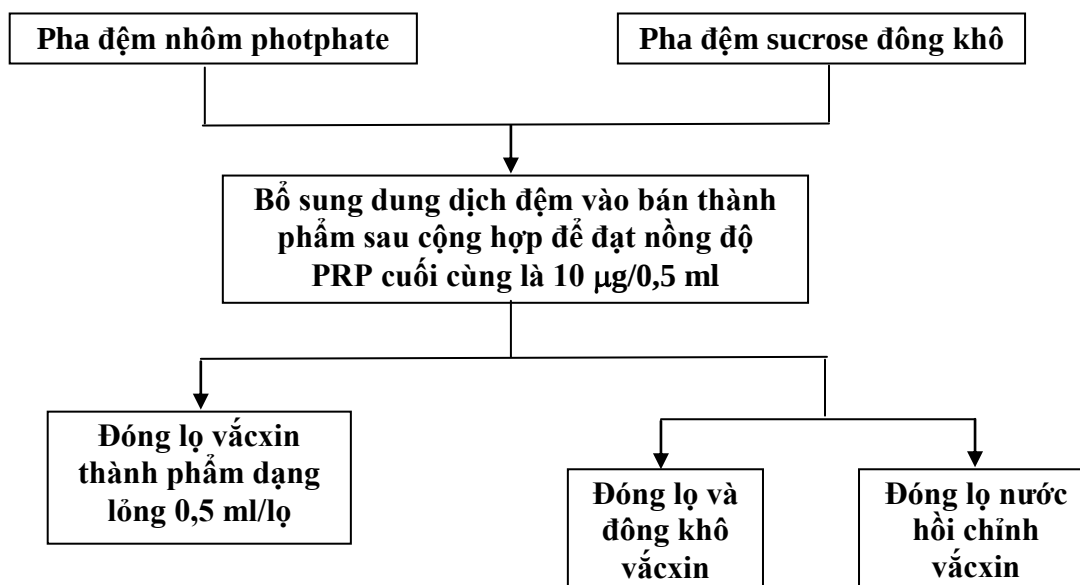
Mức độ đáp ứng miễn dịch được xác định bằng giá trị trung bình nhân (GMT) của các hiệu giá kháng thể anti-PRP tính theo đơn vị quy đổi EL.U.

Theo Bảng 3.7, đáp ứng miễn dịch trên chuột của các sản phẩm PRP đã cộng hợp có sự khác biệt rõ rệt so với sản phẩm PRP không cộng hợp. Trong khi, chuột không cho đáp ứng kháng thể với PRP đơn thuần thì toàn bộ chuột được tiêm PRP cộng hợp đều cho đáp ứng miễn dịch và đáp ứng ở các liều tiêm sau đều cao hơn so với các liều tiêm trước. Đáp ứng miễn dịch có được là tương

đương nhau đối với 2 quy trình cộng hợp khác nhau. Do vậy, quy trình cộng hợp với chất hoạt hóa là CDAP cho chất lượng sản phẩm tốt, hiệu suất cộng hợp cao đồng thời lại cho đáp ứng miễn dịch hiệu quả trên chuột sẽ được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu sản xuất các loạt sản xuất thử nghiệm.

3.7. QUY TRÌNH PHA BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG VÀ SẢN XUẤT VẮCXIN THÀNH PHẨM

Bán thành phẩm sau cộng hợp sẽ được pha thành thành phẩm vắc xin có nồng độ PRP cuối cùng đạt 10µg/liều tiêm 0,5 ml. Có 2 dạng thành phẩm vắc xin sẽ được nghiên cứu là vắc xin Hib dạng đông khô và vắc xin Hib dạng dung dịch hấp phụ với nhôm phosphate. Quy trình pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm được trình bày trong Hình 3.15.



Hình 3.15. Sơ đồ tóm tắt các quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm

Đề lựa chọn được hàm lượng nhôm hấp phụ phù hợp trong thành phẩm vắc xin dạng lỏng, bán thành phẩm sau cộng hợp sẽ được pha với đệm nhôm phosphate để có các nồng độ nhôm trong thành phẩm vắc xin từ 300 µg, 450 µg đến 900 µg Al⁺⁺⁺ trên 1 ml tương đương với 150 µg, 225 µg đến 450 µg Al⁺⁺⁺ trên 1 liều tiêm 0,5 ml. Các mẫu vắc xin Hib cộng hợp sau khi pha theo các công thức có hàm lượng nhôm khác nhau được đánh giá về mức độ đáp ứng miễn dịch trên chuột để có thêm các căn cứ cho việc lựa chọn hàm lượng nhôm pha tối ưu sẽ áp dụng trong sản xuất sau này. Quy trình gây miễn dịch và đánh giá đáp ứng miễn dịch trên chuột được trình bày trong *Chương 5 - Đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc xin trên động vật thí nghiệm*. Kết quả đáp ứng miễn dịch trên chuột ICR sau khi tiêm các sản phẩm có các công thức pha khác nhau được với so sánh với một vắc xin Hib cộng hợp đã thương mại (Act-Hib) trình bày trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả đáp ứng miễn dịch trên chuột của các dạng vắc xin Hib cộng hợp có công thức pha với hàm lượng nhôm khác nhau

Chỉ số		Hàm lượng nhôm phosphate trong vắc xin			Act-Hib
		300 µg/ml	500 µg/ml	900 µg/ml	
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 1	Tỷ lệ*	14/15 (93,3%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)
	Mức độ#	1,28	1,34	1,24	1,26
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 2	Tỷ lệ*	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)
	Mức độ#	4,20	4,47	3,20	4,18
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 3	Tỷ lệ*	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)
	Mức độ#	4,94	5,16	4,45	4,30

*Tỷ lệ có đáp ứng miễn dịch là tỷ lệ giữa số chuột có kết quả xét nghiệm anti-PRP dương tính trên tổng số chuột được gây miễn dịch.

#Mức độ đáp ứng miễn dịch được xác định bằng giá trị trung bình nhân (GMT) của các hiệu giá kháng thể anti-PRP tính theo đơn vị quy đổi EL.U.

Theo kết quả của Bảng 3.8, các loại vắc xin cộng hợp có công thức pha nhôm khác nhau đều cho đáp ứng miễn dịch tương đương nhau và tương tự với vắc xin Act-Hib. Hàm lượng nhôm trong vắc xin thành phẩm thấp nhất (300 µg/ml) vẫn cho đáp ứng miễn dịch tốt trên chuột. Do vậy hàm lượng pha nhôm này sẽ được lựa chọn để sử dụng trong các loạt sản xuất thử nghiệm vắc xin. Vắc xin dạng lỏng có hấp phụ nhôm cần được theo dõi thêm về tính ổn định của sản phẩm theo thời gian bảo quản để xác định hạn sử dụng của vắc xin này.

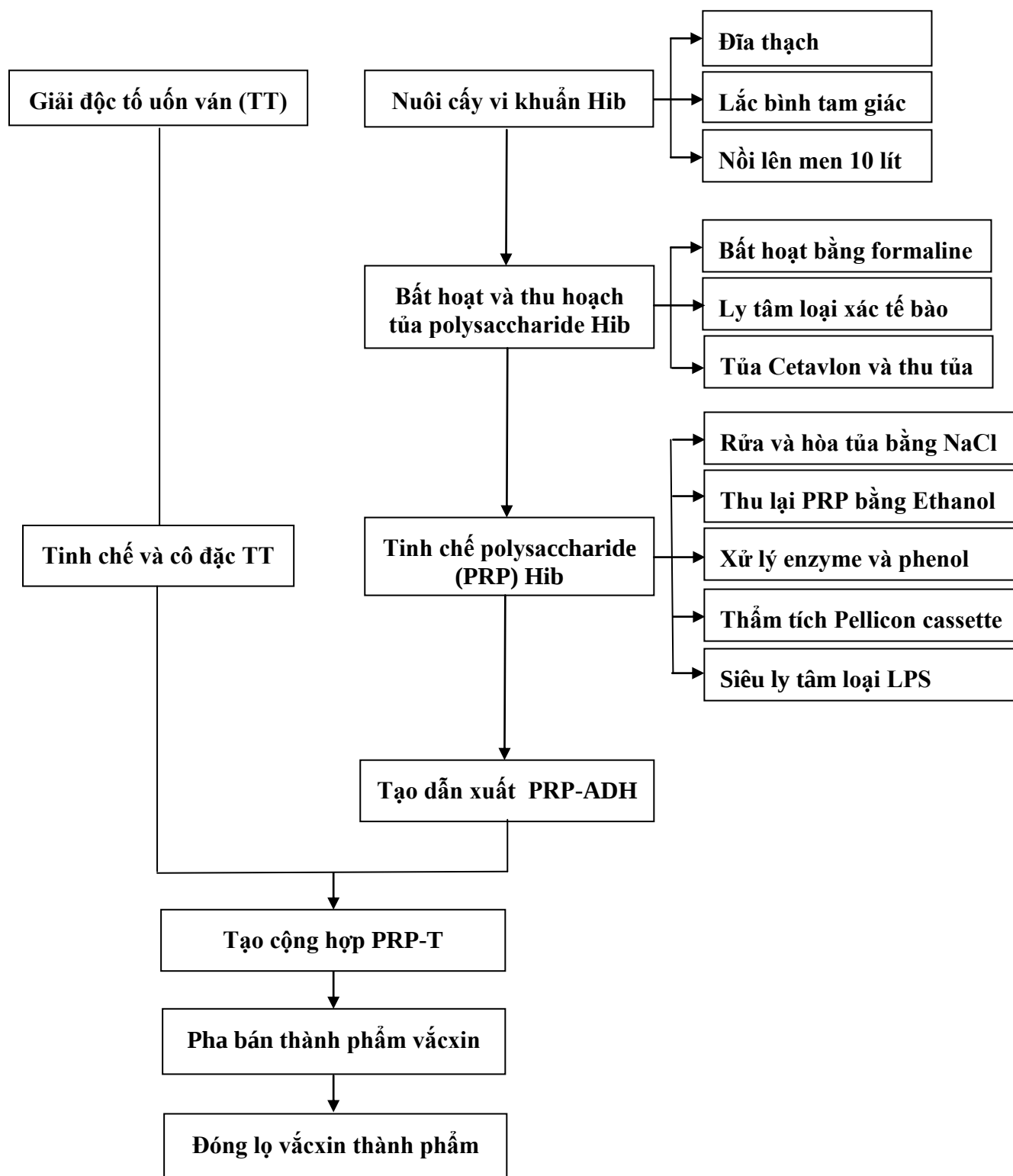
Các mẫu vắc xin Hib cộng hợp ở các dạng thành phẩm khác nhau sẽ được sử dụng để xây dựng các quy trình kiểm tra chất lượng và tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm (xem Chương 5).

Công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp được nghiên cứu và phát triển tại VABIOTECH là công nghệ cộng hợp polysaccharide với giải độc tố uốn ván (TT) (PRP-T) do Viện Quốc gia về Sức khỏe trẻ em và Phát triển con người thuộc Viện NIH phát triển và hợp tác nghiên cứu. Dựa trên các bước chủ yếu của quy trình công nghệ này, nhóm nghiên cứu áp dụng thêm một số cải tiến để sản xuất ra vắc xin Hib cộng hợp tại Việt Nam có chất lượng, hiệu suất và tính thực tiễn cao hơn như:

- Nghiên cứu sử dụng màng siêu lọc pellicon cassette thay thế túi thẩm tích thông thường và sử dụng enzyme Benzonase cắt các axit nucleic thay thế cho DNase và RNase thường hay sử dụng để dễ dàng áp dụng trong thực hành và nâng cao quy mô sản xuất quy trình tinh chế polysaccharide Hib.
- Nghiên cứu thay thế tác nhân hoạt hóa sử dụng trong phản ứng tạo dẫn xuất của quy trình cộng hợp (thay thế tác nhân thường sử dụng là cyanogen bromide (CNBr) bằng CDAP) để nâng cao hiệu suất cộng hợp của vắc xin.
- Nghiên cứu pha vắc xin thành phẩm bằng nhôm phosphate để tạo được vắc xin dạng lỏng có tính ổn định cao thay thế cho vắc xin dạng đông khô thường

được sử dụng. Đây cũng là một định hướng để sản xuất dạng phối hợp vắc xin Hib với vắc xin khác trong tương lai.

Từ các quy trình trung gian, một quy trình tổng thể của quá trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm đã được xây dựng. Quy trình bao gồm tất cả các bước để có được vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm từ nguyên vật liệu ban đầu là chủng Hib dùng cho sản xuất vắc xin cho đến sản phẩm cuối cùng là vắc xin thành phẩm Hib cộng hợp PRP-T (Hình 3.16).



Hình 3.16. Sơ đồ tổng thể quy trình sản xuất vaccine Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm

CHƯƠNG 4

SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM VẮCXIN HIB CỘNG HỢP Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Sau khi xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm, các loạt sản xuất thử nghiệm được tiến hành để sản xuất ra vắc xin Hib cộng hợp đạt yêu cầu kiểm tra về chất lượng tại cơ sở cũng như của kiểm định Quốc gia. Đối với mỗi công đoạn của quá trình sản xuất đều cần phải tiến hành ít nhất 3 loạt liên tiếp để thẩm định về chất lượng và tính ổn định của quy trình. Đồng thời, trong mỗi công đoạn đều được lấy mẫu sản phẩm để kiểm tra và đánh giá chất lượng. Các kết quả của quy trình sản xuất thử nghiệm này sẽ là căn cứ để lựa chọn quy trình sản xuất tối ưu cũng như áp dụng cho sản xuất với quy mô lớn hơn trong tương lai.

4.1. KẾT QUẢ NUÔI CẤY CHỦNG HIB TRÊN NỒI LÊN MEN

3 loạt nuôi cấy sản xuất được tiến hành

- Chủng Hib giống sản xuất Egan bảo quản ở nhiệt độ -70°C được phục hồi trên đĩa thạch BHI, nuôi cấy ở tủ ấm 37°C trong thời gian 22 - 24 giờ. Kiểm tra độ sống và nhận dạng khuẩn lạc bằng phương pháp ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

- Chọn các khuẩn lạc phát triển tốt cấy chuyển vào môi trường canh thang BHI, nuôi cấy trong các bình tam giác trên máy lắc 180 - 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16 - 18 giờ. Khi kết thúc quá trình nuôi cấy, kiểm tra mức độ phát triển của chủng Hib nuôi cấy có đạt theo yêu cầu hay không bằng phương pháp đo độ đục (OD ở bước sóng 550nm) và nhận dạng

chúng có chứa polysaccharide bằng phương pháp ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

- Tiếp tục cấy chuyển chủng Hib lên nồi lên men (10 lít) có chứa canh thang BHI cùng các chất dinh dưỡng phù hợp ở nhiệt độ 37°C. Kết quả nuôi cấy của 3 loạt sản xuất trên nồi lên men được trình bày trong Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả nuôi cấy vi khuẩn trên nồi lên men 10 lít của các loạt sản xuất thử nghiệm

Loạt nuôi cấy	Chỉ số theo dõi	Loạt 0109	Loạt 0209	Loạt 0309
Thời điểm bắt đầu	OD	0,138	0,279	0,166
	pH	7,7	7,69	7,76
Sau 2 giờ nuôi cấy	OD	0,302	0,372	0,508
	pH	7,58	7,62	7,59
Sau 4 giờ nuôi cấy	OD	0,715	0,530	2,86
	pH	7,57	7,61	7,58
Sau 6 giờ nuôi cấy	OD	4,1	2,61	4,73
	pH	7,46	7,48	7,45
Sau 8 giờ nuôi cấy	OD	5,7	5,96	4,8
	pH	7,41	7,42	7,42

Theo kết quả trong Bảng 4.1, các giá trị về độ đục và pH của cả 3 loạt nuôi cấy vi khuẩn Hib đều ổn định và tương đương nhau theo thời gian nuôi cấy. Giá trị OD vào thời điểm nuôi cấy cuối cùng (8 giờ) đạt yêu cầu đối với các loạt nuôi cấy sản xuất.

4.2. KẾT QUẢ BẤT HOẠT VÀ THU HOẠCH POLYSACCHARIDE

- Vi khuẩn Hib sau khi nuôi cấy được bất hoạt bằng formaline với nồng độ formaline cuối cùng trong hỗn dịch bất hoạt là 0,05%. Hỗn dịch sau bất hoạt được cấy lại trên thạch để kiểm tra về độ sống sót và cho kết quả vi khuẩn đã chết hoàn toàn, không xuất hiện khuẩn lạc sống trên đĩa thạch.

- Sau khi bất hoạt, tiến hành ly tâm loại xác vi khuẩn và hòa nước nổi thu được với cetavlon để tạo tủa giữa polysaccharide Hib và cetavlon. Tủa này cũng sẽ được thu lại bằng phương pháp ly tâm. Khối lượng tủa thu được và chất lượng tủa đánh giá bằng cảm quan sẽ là các thông số để đánh giá quá trình này. Kết quả thu hoạch tủa polysaccharide Hib sau bất hoạt được trình bày trong Bảng 4.2.

Bảng 4.2. Kết quả thu hoạch tủa polysaccharide Hib

Loại sản xuất	0109	0209	0309
Thể tích nuôi cấy	5 lít	5 lít	
Khối lượng tủa thu hoạch	15,8 gr	14,09	17,38
Cảm quan về chất lượng tủa	Tủa dẻo và bóng		

Kết quả trong Bảng 4.2 cho thấy khối lượng tủa thu được và cảm quan về tủa đều tương tự nhau giữa 3 loại sản xuất và đạt yêu cầu chất lượng đối với sản phẩm thu được

4.3. KẾT QUẢ TINH CHẾ POLYSACCHARIDE HIB

Quy trình tinh chế PRP Hib được tiến hành theo các bước chính như sau:

- Rửa và hòa kết tủa của polysaccharide và cetavlon bằng dung dịch muối NaCl.
- Tủa thu lại polysaccharide bằng ethanol.
- Loại bỏ ARN, ADN và protein bằng enzyme Benzonase, Protease và phenol. Sau đó loại trừ các chất tồn dư bằng phương pháp thẩm tích Pellicon cassette 10.000 kD.
- Loại bỏ lipopolysaccharide (LPS) bằng siêu ly tâm.

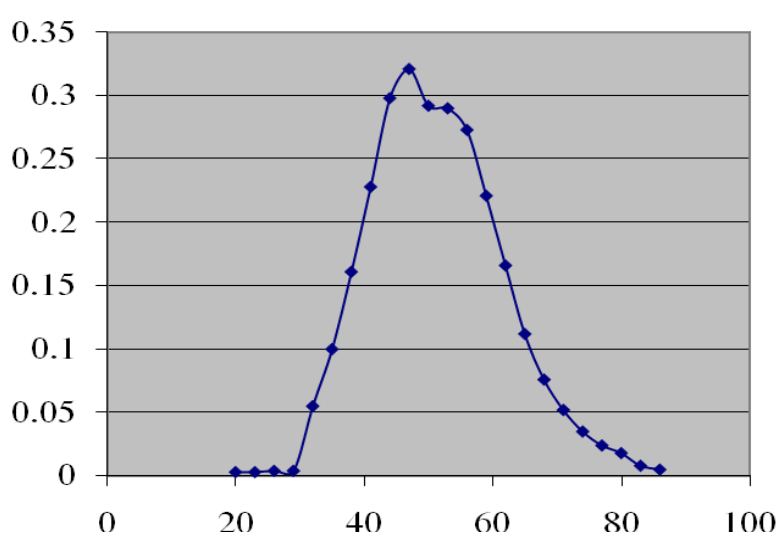
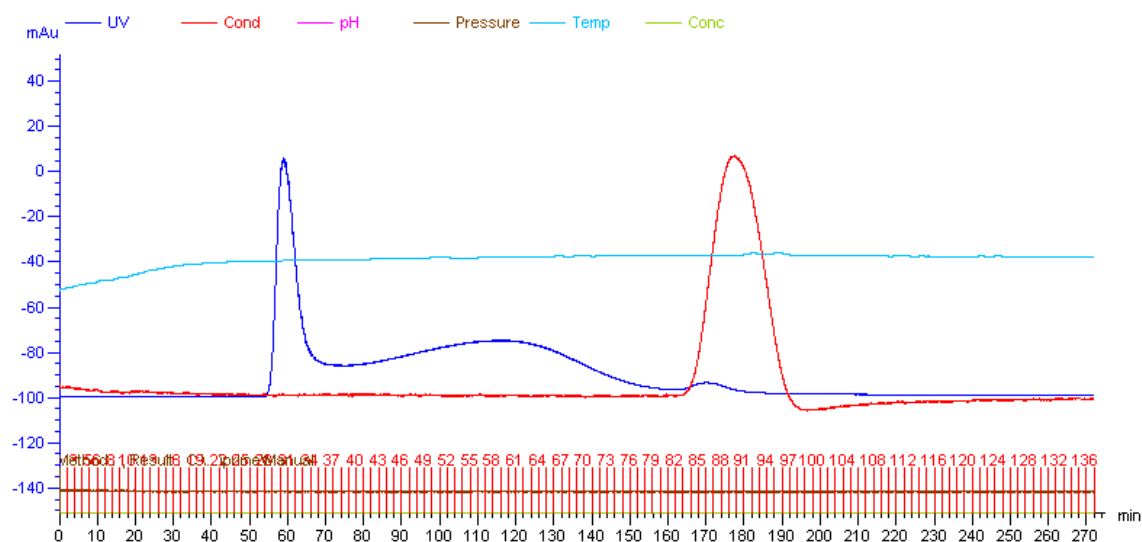
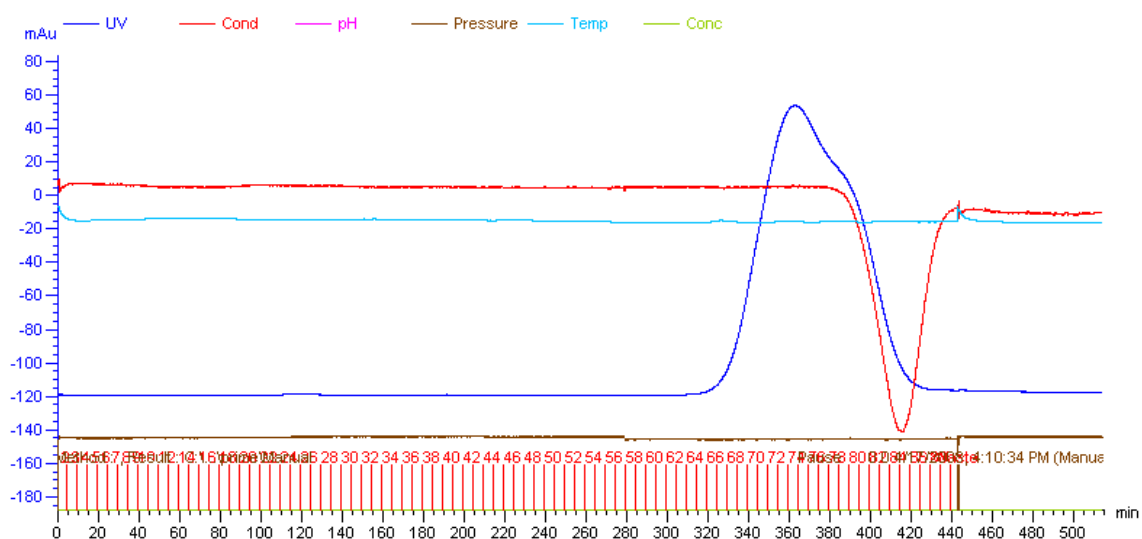
Chất lượng các sản phẩm PRP sau tinh chế của các loạt sản xuất thử nghiệm được trình bày trong Bảng 4.3.

Bảng 4.3. Kết quả kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau tinh chế của các loạt sản xuất thử nghiệm

Loạt tinh chế	0109	0209	0309
Thể tích thu được	58,5 ml	47,5 ml	52,8 ml
Hàm lượng PRP thu được (mg/ml)	3,5	4,3	3,7
Protein (%)	0,67	0,57	0,70
Axít Nucleic (%)	0,52	0,43	0,60
Thử nghiệm Ribose (%)	> 90%	> 90%	> 90%
Nội độc tố (IU/ μ g)	<0,20	<0,16	<0,22
Phân bố kích thước phân tử	$K_D=0,16, \geq 50\%$ có $K_D \leq 0,30$	$K_D=0,23, \geq 50\%$ có $K_D \leq 0,30$	$K_D=0,33, \geq 50\%$ có $K_D \leq 0,30$
Thử nghiệm nhận dạng	Ngưng kết đặc hiệu với kháng huyết thanh Hib		

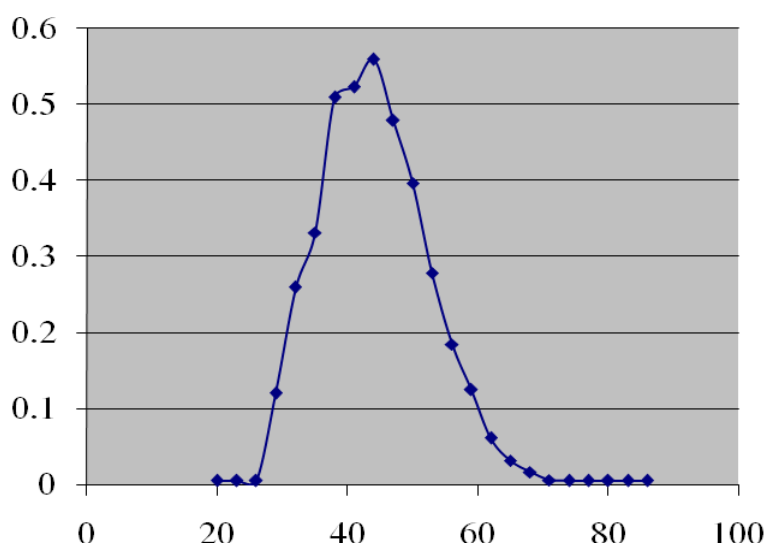
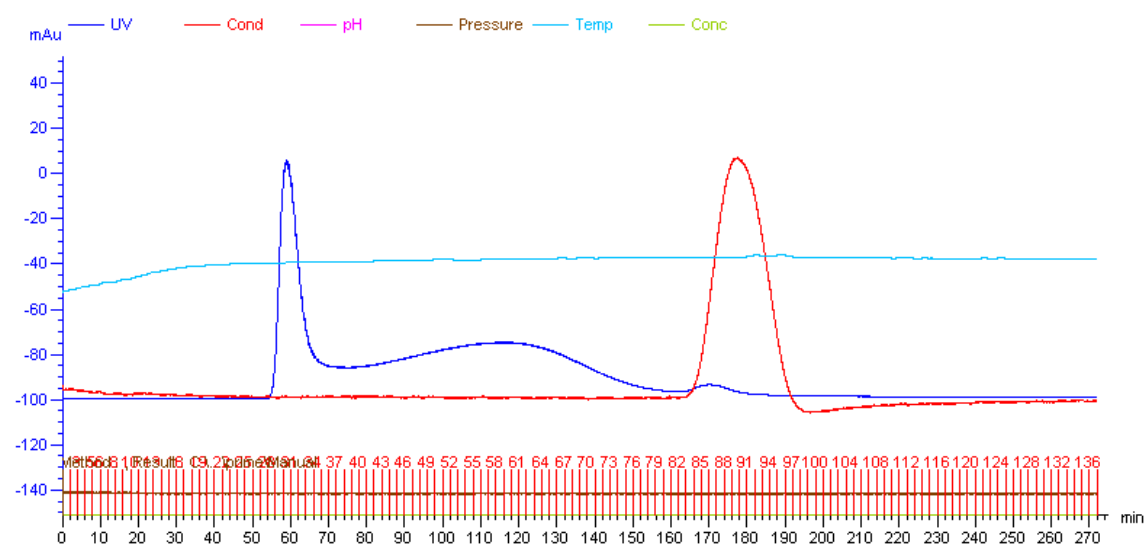
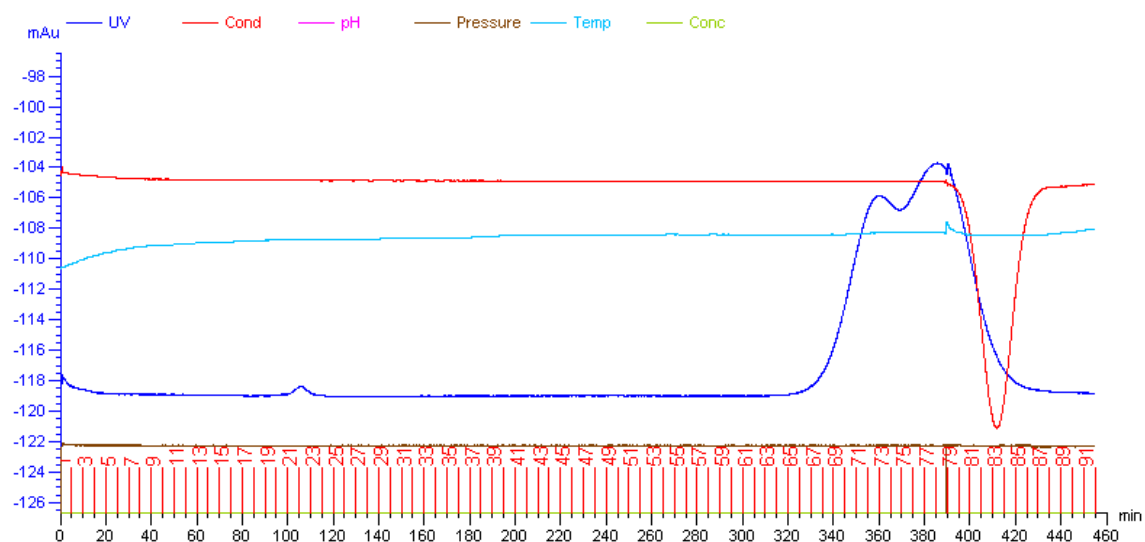
Theo Bảng 4.3, cả 3 loạt sản xuất đều cho chất lượng PRP sau tinh chế tương đương nhau. Các loạt sản phẩm này đều đạt yêu cầu chất lượng về PRP cho cộng hợp vắc xin.

Chỉ số quan trọng nhất là phân bố kích thước phân tử cũng cho thấy cả loạt này đều đạt yêu cầu. Kết quả chạy sắc ký và định lượng PRP trong các phân đoạn sau chạy sắc ký để xác định phân bố kích thước phân tử được trình bày trong Hình 4.1, 4.2 và 4.3.



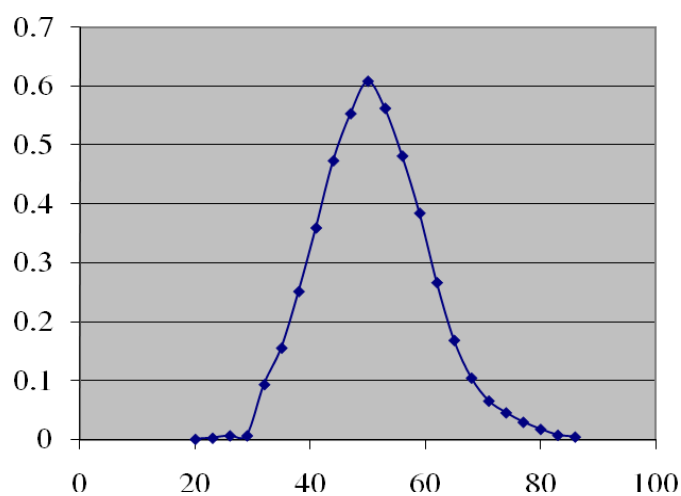
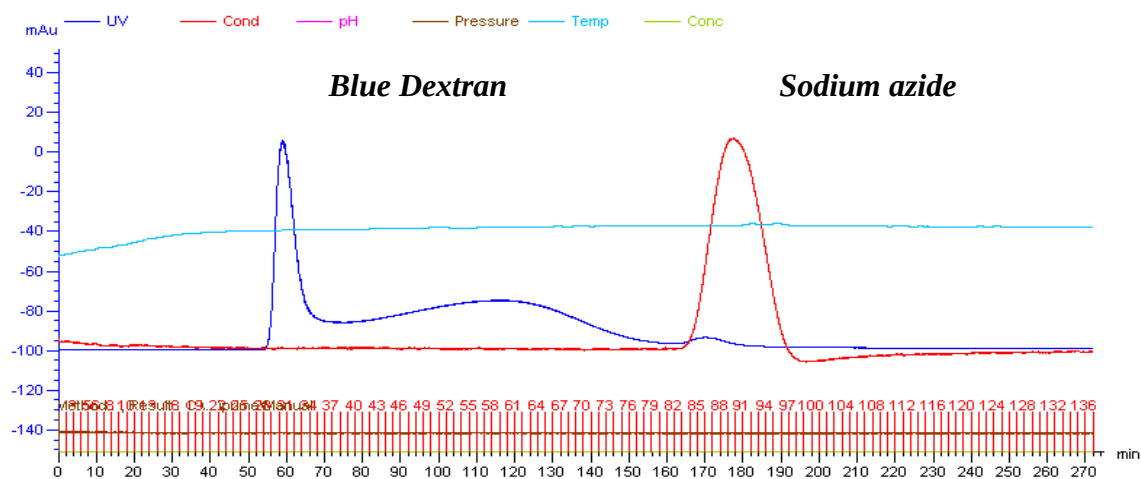
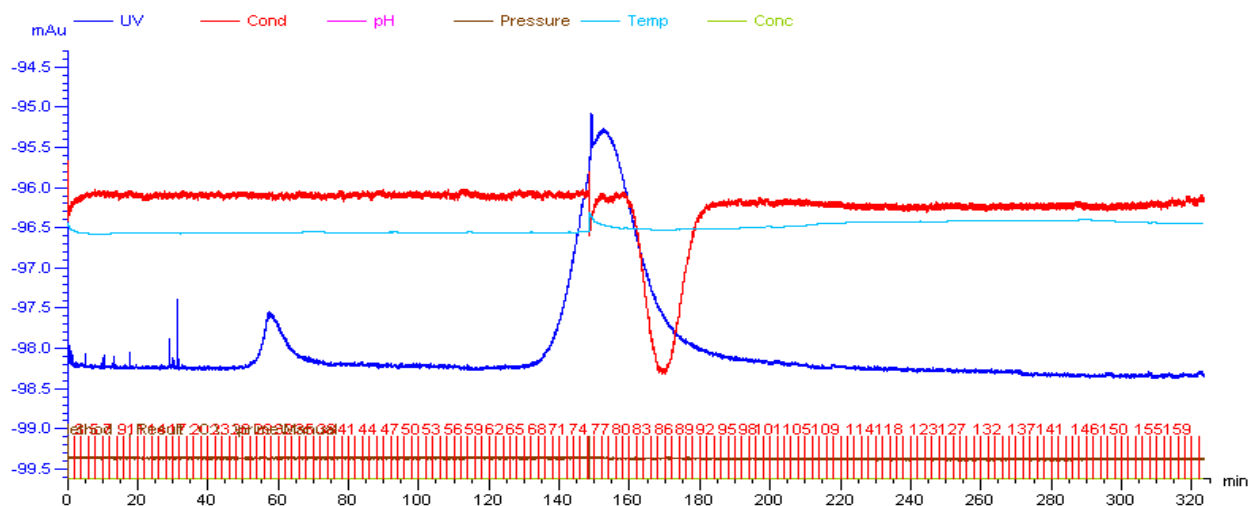
PRP loạt 0109
 $K_D=0,16$

Hình 4.1. Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0109



PRP loạt 0209
 $K_D=0,23$

Hình 4.2. Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0209



PRP lot 0309
 $K_D=0,33$

Hình 4.3. Sắc ký và định lượng PRP của các phân đoạn xác định phân bố kích thước phân tử polysaccharide Hib loạt sản xuất 0309

4.4. KẾT QUẢ TẠO DẪN XUẤT POLYSACCHARIDE HIB VỚI ADH

Tiến hành 3 loạt tạo dẫn xuất giữa polysaccharide Hib (PRP) với 1 hoá chất (ADH) bằng chất hoạt hóa CDAP. Sau đó tinh chế dẫn xuất này bằng cột sắc ký lọc gel để loại bỏ các chất tồn dư của phản ứng và cô đặc đến nồng độ đạt yêu cầu cho cộng hợp.

Kết quả của quy trình tạo dẫn xuất của các loạt sản xuất thử nghiệm được trình bày trong Bảng 4.4.

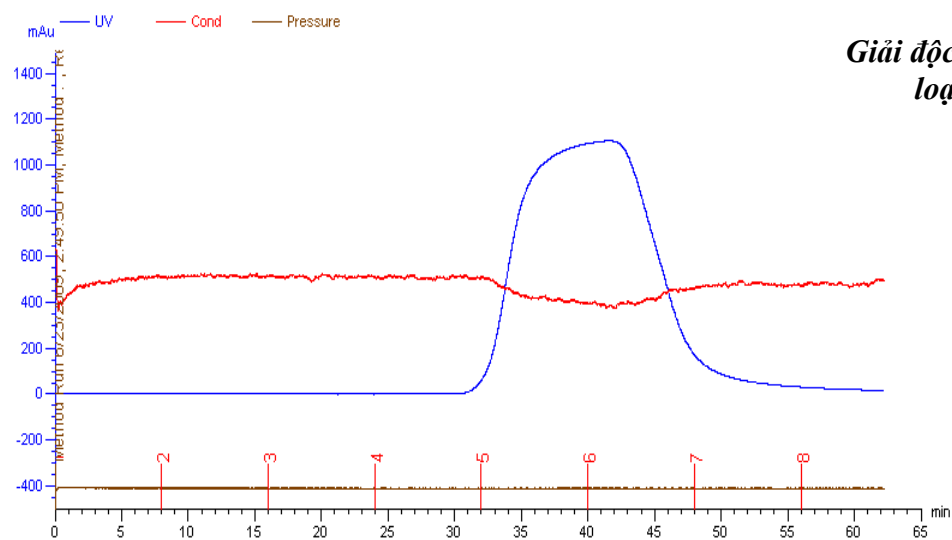
Bảng 4.4. Kết quả kiểm tra chất lượng polysaccharide Hib sau khi tạo dẫn xuất với ADH của các loạt sản xuất thử nghiệm

Loạt sản xuất	Loạt 0109	Loạt 0209	Loạt 0309
Thể tích thu được	10 ml	10 ml	10,7 ml
Hàm lượng PRP thu được (mg/ml)	9,04	10,7	11,76
Tỷ lệ tạo dẫn xuất (ADH/PRP)	8,5%	6,16%	7,32%

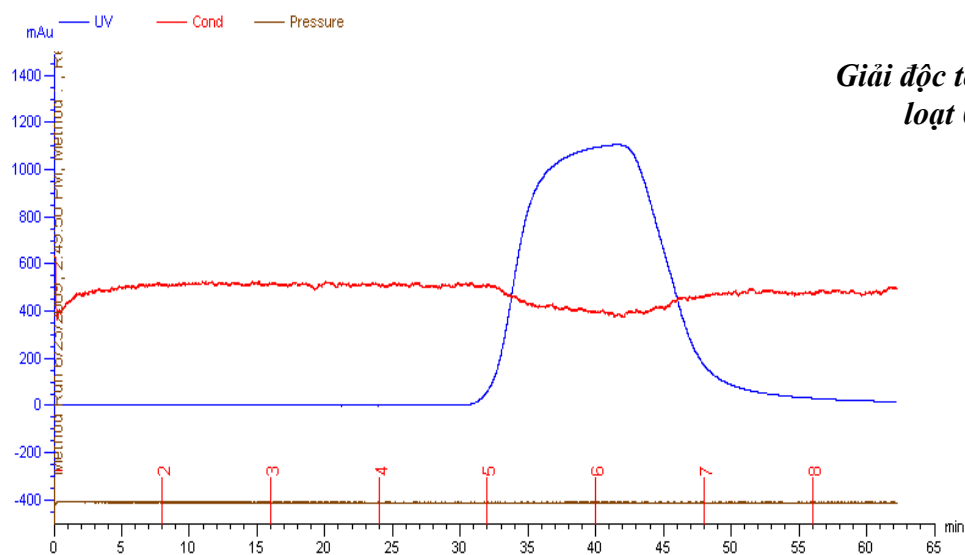
4.5. KẾT QUẢ TINH CHẾ VÀ CÔ ĐẶC BÁN THÀNH PHẨM GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN

Giải độc tổ uốn ván được tinh chế bằng cột sắc ký lọc gel (Hình 4.4) để thay đổi dung môi và loại bỏ các thành phần tạp, sau đó cô đặc bằng màng siêu lọc 10kD đến nồng độ đạt yêu cầu cho cộng hợp. Giải độc tổ uốn ván được sử dụng trong các loạt sản xuất thử nghiệm là loạt PT 128 do Viện Vắcxin Nha Trang (IVAC) cung cấp. Loạt giải độc tổ uốn ván này đạt tiêu chuẩn chất lượng của nhà sản xuất (Kết quả kiểm định giải độc tổ uốn ván tinh chế được đính kèm trong Phần phụ lục). 03 loạt giải độc tổ uốn ván đã được tinh chế và

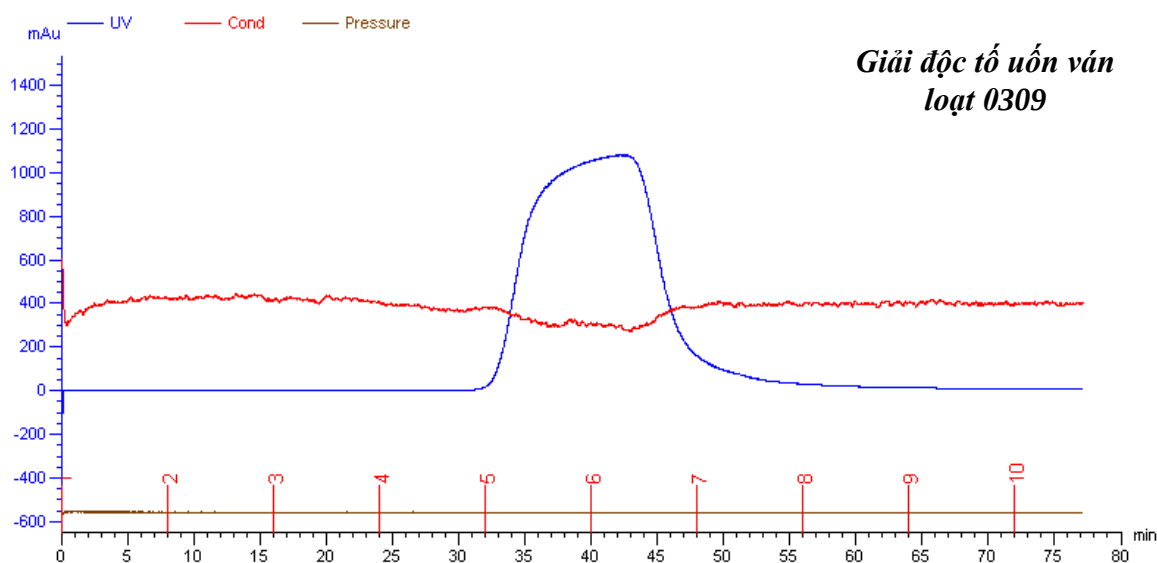
chất lượng của các loạt giải độc tố uốn ván này phù hợp với các tiêu chí về hàm lượng protein, độ tinh sạch và vô khuẩn.



***Giải độc tố uốn ván
loạt 0109***



***Giải độc tố uốn ván
loạt 0209***



***Giải độc tố uốn ván
loạt 0309***

Hình 4.4. Sắc ký tinh chế giải độc tố uốn ván các loạt sản xuất thử nghiệm

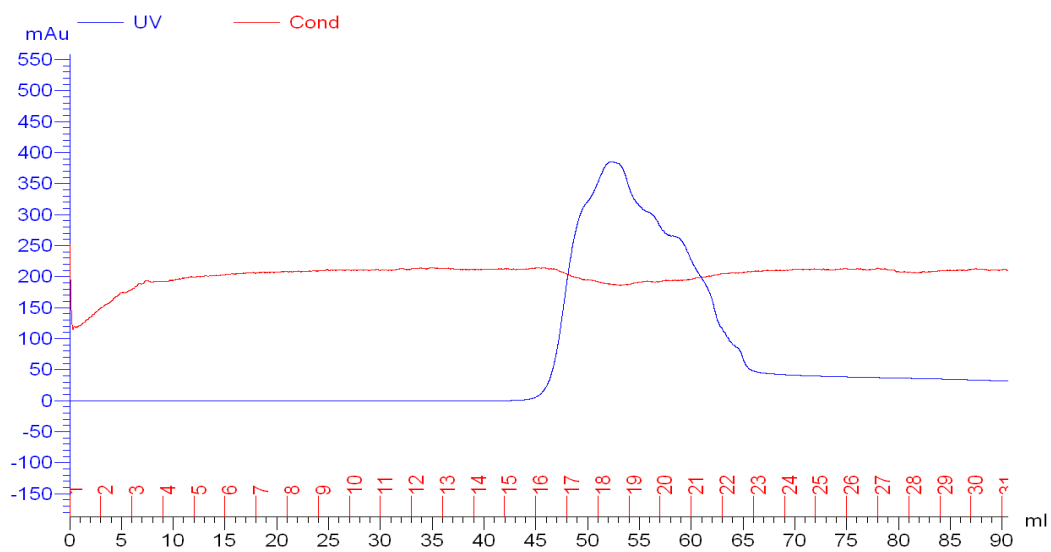
4.6. KẾT QUẢ CỘNG HỢP POLYSACCHARIDE HIB VỚI GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN

Đã tiến hành cộng hợp 6 loạt liên tiếp với mục đích thẩm định tính ổn định của quy trình cộng hợp cũng như có được đủ hàm lượng PRP cần thiết cho pha vắc xin. Sản phẩm của phản ứng cộng hợp sau đó được tinh chế bằng cột sắc ký Sepharose -4B để tách PRP-T ra khỏi các thành phần không được cộng hợp (Hình 4.5 và Hình 4.6). Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm của toàn bộ quá trình cộng hợp và tinh chế cộng hợp đối với 6 loạt sản xuất thử nghiệm được trình bày trong Bảng 4.5.

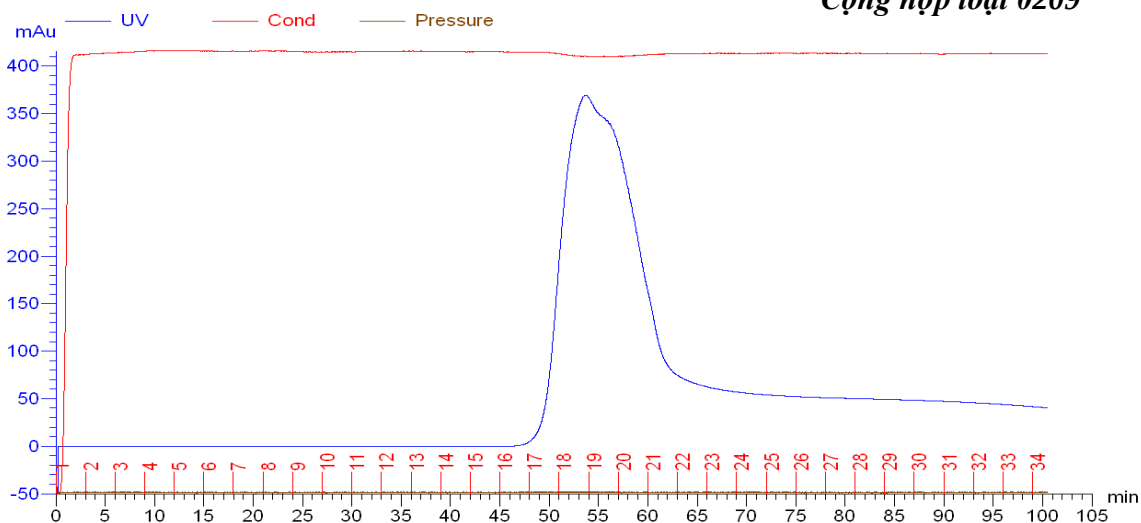
Bảng 4.5. Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm sau cộng hợp của các loạt sản xuất thử nghiệm

Thông số		0109	0209	0309	0409	0509	0609
Thể tích thu được (ml)		54	50	50	50	57	50
Hàm lượng các thành phần sau cộng hợp	Hàm lượng PRP (mg/ml)	0,275	0,236	0,215	0,240	0,255	0,220
	Hàm lượng protein (mg/ml)	0,263	0,256	0,197	0,266	0,248	0,200
	Tỷ lệ PRP/protein	1,05	0,92	1,09	0,90	1,03	1,10
Hiệu suất cộng hợp	PRP	33,7%	31,4%	34,2%	33,3%	35%	32,4%
	Protein	32,2%	29,0%	31,1%	32,4%	34%	30,0%
Chất lượng của sản phẩm sau cộng hợp	Ngưng kết với các kháng huyết thanh	Ngưng kết với các kháng huyết thanh đặc hiệu anti-PRP và SAT					
	Phân bố kích thước phân tử	Kích thước lớn hơn kích thước giải độc tổ uốn ván					
	PRP tự do tồn dư	4,4%	5,1%	5,7%	5,4%	5,2%	6,0%
	Vô khuẩn	Đạt yêu cầu					

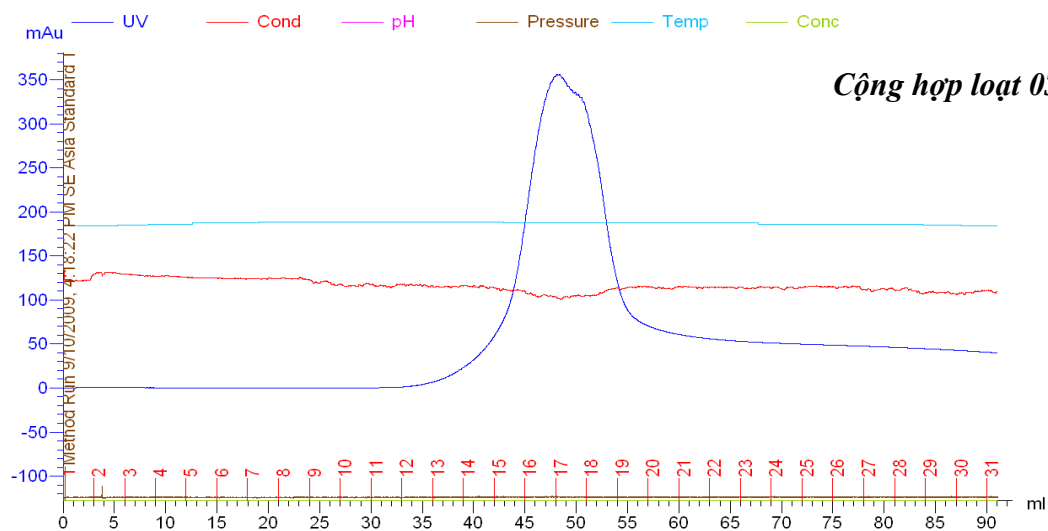
Cộng hợp loạt 0109



Cộng hợp loạt 0209

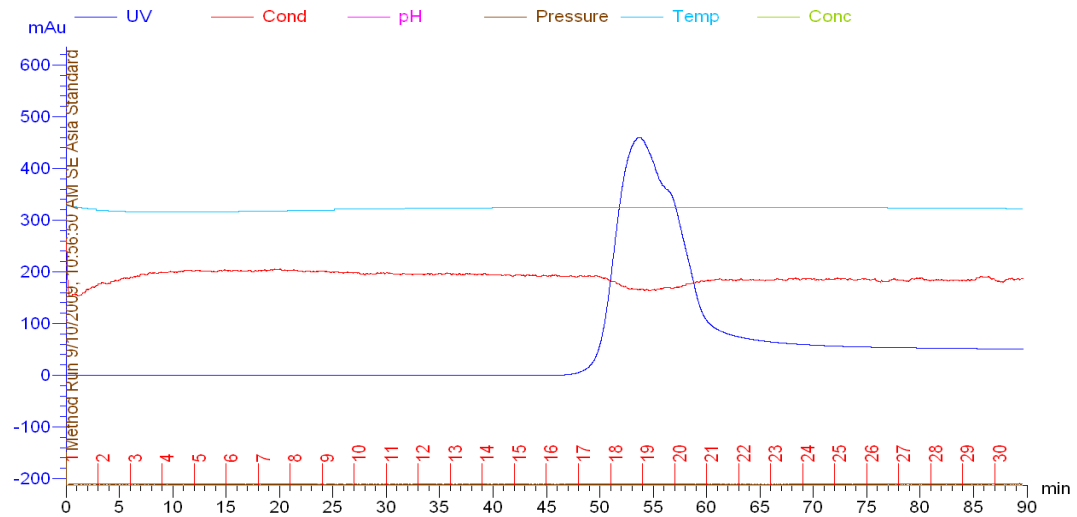


Cộng hợp loạt 0309

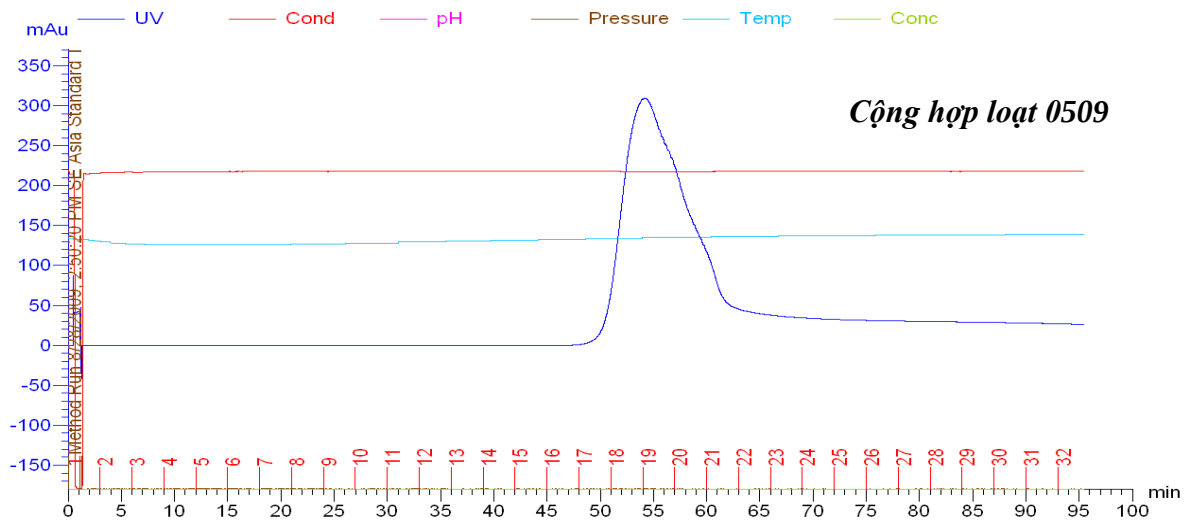


Hình 4.5. Sắc ký tinh chế cộng hợp các loạt thử nghiệm 0109, 0209 và 0309

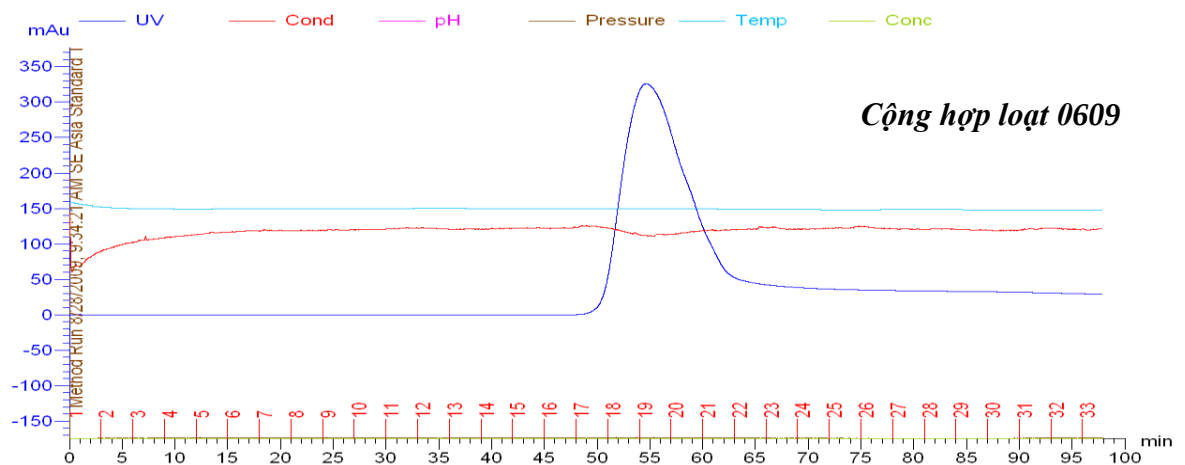
Cộng hợp loạt 0409



Cộng hợp loạt 0509



Cộng hợp loạt 0609



Hình 4.6. Sắc ký tinh chế cộng hợp các loạt thử nghiệm 0409, 0509 và 0609

Kết quả trong Bảng 4.5 và các hình ảnh trong Hình 4.5 và Hình 4.6 cho thấy cả 6 loại cộng hợp giữa PRP Hib và giải độc tố uốn ván đều ổn định về các thông số sản xuất cũng như kiểm tra chất lượng. Sản phẩm của cả 6 loại sản xuất này đều đạt yêu cầu về chất lượng đối với bán thành phẩm cộng hợp vắc xin Hib cộng hợp. Các sản phẩm này sẽ được tiếp tục sử dụng trong các công đoạn tiếp theo của quá trình sản xuất thử nghiệm.

4.7. KẾT QUẢ PHA BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG VÀ SẢN XUẤT VẮC XIN THÀNH PHẨM

Từ bán thành phẩm sau cộng hợp đạt yêu cầu về chất lượng, nhóm nghiên cứu tiến hành pha bán thành phẩm cuối cùng và đóng lọ để sản xuất vắc xin thành phẩm. Vắc xin dạng dung dịch (ALHIBVAX) là bán thành phẩm sau cộng hợp pha với nhôm phosphate và vắc xin dạng đông khô (LYOHIBVAX) là bán thành phẩm sau cộng hợp pha với tá chất đông khô (đường sucrose) và tiến hành đông khô. Trong thành phần của cả hai vắc xin này đều có thêm chất bảo quản là Thimerosal. Kết quả pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm được trình bày trong bảng 4.6.

Bảng 4.6. Kết quả pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm các loại sản xuất thử nghiệm

	ALHIBVAX (Vắc xin dạng dung dịch)			LYOHIBVAX (Vắc xin dạng đông khô)		
Loại sản xuất	0110	0210	0310	0409	0509	0609
Thể tích bán thành phẩm cuối	1169 ml	957 ml	1164 ml	160 ml	180 ml	170 ml
Số lượng lọ vắc xin thành phẩm	1940 lọ	1583 lọ	1935 lọ	305 lọ	336 lọ	327 lọ

Theo kết quả của Bảng 4.6, số lượng thành phẩm của vắc xin dạng dung

dịch, hấp phụ nhôm (ALHIBVAX) là 5458 lọ và vắc xin dạng đông khô (LYOHIBVAX) là 968 lọ. Số lượng lọ vắc xin dạng đông khô ít là do các loại vắc xin được tính theo từng mẻ đông khô với mục đích kiểm soát chất lượng của sản phẩm qua từng lần đông khô khác nhau. Tuy nhiên, chất lượng về độ ẩm tồn dư các thành phẩm vắc xin này không đạt được theo yêu cầu (Bảng 4.8), do vậy nhóm nghiên cứu quyết định không tiếp tục sản xuất vắc xin dạng đông khô với số lượng lớn hơn nữa, chỉ pha và sản xuất đủ số lượng thành phẩm cho vắc xin dạng dung dịch, hấp phụ nhôm.

4.8. KẾT QUẢ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VẮC XIN THÀNH PHẨM TẠI CƠ SỞ

Các loại thành phẩm vắc xin được kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở tại Phòng kiểm tra chất lượng sản phẩm (QC), VABIOTECH . Kết quả kiểm tra chất lượng các loại vắc xin thành phẩm này được trình bày trong Bảng 4.7 và Bảng 4.8. Mẫu vắc xin của các loại sản xuất thử nghiệm này cũng sẽ được đánh giá thêm về tính an toàn và đáp ứng miễn dịch trên động vật thí nghiệm. Kết quả được trình bày cụ thể trong *Chương 6 - Đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc xin trên động vật thí nghiệm*.

Bảng 4.7. Kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm tại cơ sở của các loại sản xuất thử nghiệm vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch (ALHIBVAX)

Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn cơ sở	Loại 0110	Loại 0210	Loại 0310
Nhận dạng	<i>H. influenza</i> type b	<i>H. influenza</i> type b		
Tính chất vật lý	Sau khi lắc, vắc xin có màu trắng hơi đục. Để lắng sau 1 giờ, vắc xin phải tách làm hai lớp, trong đó lớp nhôm phải tủa bông mịn, không vón cục.	Đạt yêu cầu		
Vô khuẩn	Không thấy nấm và vi khuẩn phát triển sau 14 ngày theo dõi.	Đạt yêu cầu		
pH	6,0 - 7,5	6,346	6,362	6,369
Hàm lượng Thimerosal (%)	≤ 0,012	0,0091	0,0099	0,0100
Hàm lượng PRP (µg/0,5 ml)	8 - 12	9,04	9,70	9,13
Hàm lượng nhôm (µg/ml)	≤ 1250	346,05	290,32	311,72
An toàn chung trên chuột lang	Chuột khỏe mạnh, tăng trọng bình thường	Đạt yêu cầu		
An toàn chung trên chuột nhắt				
Chất gây sốt	Tổng T° tăng của 3 thỏ ≤ 1,3°C. Nhiệt độ tăng của từng thỏ <0,6°C	0,1 °C - Đạt yêu cầu	0,8 °C - Đạt yêu cầu	0,2 °C - Đạt yêu cầu

Theo Bảng 4.7, tất cả 3 loại thành phẩm vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch, hấp phụ nhôm (ALHIBVAX) đều đạt được các tiêu chuẩn cơ sở về chất lượng sản phẩm. Các mẫu vắc xin của các loại sản xuất này sẽ được tiếp tục gửi

đi kiểm tra chất lượng sản phẩm tại Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Bảng 4.8. Kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm tại cơ sở của các loạt sản xuất thử nghiệm vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô (LYOHIBVAX)

Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn cơ sở	Loạt 0409	Loạt 0509	Loạt 0609
Nhận dạng	<i>H. influenza</i> type b	<i>H. influenza</i> type b		
Tính chất vật lý	Viên xộp màu trắng, khi hoà tan bằng nước hồi chính tạo thành dung dịch trong suốt, không vón cục hoặc không có chất lạ khó tan.	Không tạo viên, xẹp, dính đáy lọ		
Vô khuẩn	Không thấy nấm và vi khuẩn phát triển sau 14 ngày theo dõi.	Đạt yêu cầu		
pH	6,0 - 7,5	7,34	7,24	7,35
Hàm lượng Thimerosal (%)	≤ 0,012	0,0050	0,0052	0,0060
Hàm lượng PRP (µg/0,5 ml)	8 - 12	12	10	10,5
An toàn chung trên chuột lang	Chuột khỏe mạnh, tăng trọng bình thường	Đạt yêu cầu		
An toàn chung trên chuột nhắt				
Chất gây sốt	Tổng T° tăng của 3 thử ≤ 1,3°C. Nhiệt độ tăng của từng thử < 0,6°C	0,5 °C - Đạt yêu cầu	0,6 °C - Đạt yêu cầu	0,4 °C - Đạt yêu cầu
Độ ẩm tồn dư	≤ 3%	6,67%	7,22%	6,54%

Theo Bảng 4.8, tất cả 3 loại thành phẩm vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô (LYOHIBVAX) đều không đạt được các tiêu chuẩn cơ sở về tính chất vật lý và độ ẩm tồn dư. Do vậy, các loại vắc xin này không được gửi đi kiểm tra chất lượng sản phẩm tại Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Nhóm nghiên cứu cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện sản phẩm vắc xin dạng đông khô này.

CHƯƠNG 5

XÂY DỰNG QUY TRÌNH KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VÀ TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO VẮC XIN HIB CỘNG HỢP

Tổ Chức Y Tế Thế Giới (TCYTTG) có các qui định riêng cho từng loại vắc xin về các tiêu chuẩn tối thiểu trong sản xuất và kiểm tra chất lượng. Tuy nhiên do mỗi sản phẩm có một đặc điểm riêng trong quá trình sản xuất cũng như trong thành phần của vắc xin thành phẩm, do vậy mỗi nhà sản xuất đều phải xây dựng những yêu cầu và tiêu chuẩn riêng cho sản phẩm của mình dựa vào các khuyến cáo chung có tính nguyên tắc của TCYTTG [33], [60]. Quy trình kiểm tra chất lượng sản phẩm sẽ được tiến hành trong quá trình sản xuất và cho thành phẩm cuối cùng. Theo khuyến cáo của TCYTTG thì việc kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp bao gồm các bước chính sau đây (xem thêm phần 1.3.2 - Phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp):

- Kiểm tra chất lượng polysaccharide;
- Kiểm tra chất lượng protein tải;
- Kiểm tra chất lượng bán thành phẩm cộng hợp;
- Kiểm tra chất lượng bán thành phẩm cuối cùng;
- Kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm và;
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin thành phẩm.

Trong phần này, chủ yếu trình bày các phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm (dạng đông khô và dạng lỏng hấp phụ nhôm) và xây dựng bảng tiêu chuẩn cơ sở cho các vắc xin Hib cộng hợp này. Các phương pháp kiểm tra chất lượng sản phẩm dở dang và bán thành phẩm trong quá trình sản xuất được trình bày chi tiết tại Chương 3: “Xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm” và kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm sản xuất ở quy mô phòng thí

nghiệm được trình bày tại Chương 4: “Sản xuất thử nghiệm vắc xin Hib cộng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm”.

5.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA SINH HỌC

5.1.1. Phương pháp kiểm tra vô khuẩn

5.1.1.1. Mục đích

- Kiểm tra vô khuẩn nhằm phát hiện sự nhiễm tạp khuẩn hoặc nấm bằng phương pháp cấy trực tiếp.

5.1.1.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Tủ cấy vô trùng.
- Tủ ẩm.
- Tủ mát.
- Pipet 2ml vô trùng.
- Pipet aid.
- Đèn cồn.
- Cồn 70⁰ .
- Bông vô trùng, panh.

Mẫu thử

- Bán thành phẩm, bán thành phẩm cuối cùng và vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm:
 - + Bán thành phẩm và bán thành phẩm cuối cùng: 10ml / 1 loạt
 - + Vắc xin thành phẩm: 40 lọ

Môi trường

- *Loại môi trường:*
 - + Môi trường Thioglycolate.
 - + Môi trường Soybean (Soybean Casein Digest).

- + Thẻ tích môi trường: 20ml/ ống.
- *Số lượng ống môi trường:*
 - Bán thành phẩm và bán thành phẩm cuối cùng:
 - + Môi trường Thioglycolate: 05 ống/1 loạt mẫu thử.
 - + Môi trường Soybean: 05 ống/1 loạt mẫu thử.
 - Vắcxin thành phẩm:
 - + Môi trường Thioglycolate: 30 ống/1 loạt mẫu thử.
 - + Môi trường Soybean: 10 ống/1 loạt mẫu thử.

5.1.1.3. Các bước tiến hành

Thẻ tích cấy

- Bán thành phẩm và Bán thành phẩm cuối cùng: 1ml mẫu thử/1 ống môi trường.
- Vắcxin thành phẩm: Toàn bộ thẻ tích đóng trong lọ.

Các bước tiến hành

- Dùng pipet 2ml để lấy sinh phẩm từ trong mỗi chai (hoặc lọ), cấy trực tiếp vào môi trường bằng cách đưa sâu đầu pipet tới đáy ống. Phối hợp động tác bơm sinh phẩm và di chuyển pipet từ đáy ống môi trường lên trên mặt ống môi trường theo một đường thẳng.
- Sau khi cấy khử trùng miệng ống môi trường cẩn thận trên đèn cồn và đậy kín bằng nút bông vô trùng.
- Đối với vắcxin đông khô, phải hồi chỉnh bằng nước hồi chỉnh.
- Các thao tác cứ lặp đi lặp lại như vậy cho đến hết số chai (hoặc lọ) mẫu thử.

Nhiệt độ nuôi cấy

- Sau khi các thao tác trong phòng vô trùng được tiến hành xong, các ống môi trường sẽ được xếp vào 2 giá và giữ ở hai nhiệt độ khác nhau.

** BTP và BTP cuối cùng:*

- Môi trường Thioglycolate: $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.
- Môi trường Soybean: $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

** Vắc xin thành phẩm:*

- Môi trường Thioglycolate: 2/3 số ống môi trường: $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.
1/3 số ống môi trường: $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.
- Môi trường Soybean: $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

Thời gian nuôi cấy: 14 ngày

Theo dõi sau thử nghiệm

- Cả hai loại môi trường đều được theo dõi hàng ngày và ghi kết quả theo dõi vào phiếu theo dõi thử nghiệm vô khuẩn vào các ngày 1, 3, 5, 7, 10 và 14.

5.1.1.4. Kết quả

Cách đọc kết quả

- Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm: cả 2 loại môi trường đều trong, không bị vẩn đục. Lớp chỉ thị màu phía trên ống môi trường Thioglycolate không bị mất màu.
- Có sự phát triển của vi khuẩn và nấm: cả 2 loại môi trường đều bị vẩn đục. Lớp chỉ thị màu phía trên ống môi trường Thioglycolate bị mất màu.

Giá trị của thử nghiệm

- Loại môi trường sử dụng để kiểm tra vô khuẩn đạt yêu cầu về thử nghiệm kiểm tra chất lượng môi trường khi kiểm tra bằng thử nghiệm “tăng sinh”.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi.

Thử nghiệm nhắc lại

- Điều kiện nhắc lại

- Khi không đạt tiêu chuẩn. (mục 4.2 và 4.3).
- Nếu có ống môi trường nuôi cấy bị nhiễm khuẩn: phải tiến hành phân lập và định danh vi sinh vật.

- Thử nghiệm nhắc lại lần 1

- Thực hiện với số lượng mẫu và ống môi trường bằng lần thử đầu.
- Thử nghiệm đạt yêu cầu khi đạt mục 4.2 và 4.3.
- Nếu có sự phát triển của vi sinh vật trong bất kỳ ống môi trường nuôi cấy nào: phải phân lập và định danh vi sinh vật.
- So sánh kết quả với lần thử đầu: nếu không có sự khác biệt, sản phẩm bị coi là không đạt vô khuẩn và phải hủy bỏ. Nếu có sự khác biệt, phải tiến hành thử nghiệm nhắc lại lần 2.

- Thử nghiệm nhắc lại lần 2:

- Thực hiện với số lượng mẫu và ống môi trường gấp đôi lần thử đầu.
- Thử nghiệm đạt yêu cầu khi đạt mục 4.2 và 4.3.
- Nếu phát hiện dù chỉ 1 ống môi trường không kể bất kỳ loại vi khuẩn tạp nhiễm, loạt sản phẩm đó được kết luận là không đạt yêu cầu về tiêu chuẩn vô khuẩn, phải hủy bỏ.

5.1.2. Phương pháp kiểm tra an toàn chung

5.1.2.1. Mục đích

- Áp dụng để kiểm tra an toàn chung cho vắc xin Hib cộng hợp.

5.1.2.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Cân động vật.
- Máy trộn.

- Bơm tiêm nhựa loại 1 ml, 5 ml.
- Tube Falcon 50ml.
- Hộp đựng đá.
- Bông, cùn, găng tay, panh.

Vật liệu

- Vắc xin đóng 1ml/lọ: 20 lọ

Động vật thí nghiệm

- Chuột lang
 - Trọng lượng: 250 - 350 g.
 - Số lượng: 2 chuột / 1 loạt mẫu thử.
- Chuột nhắt trắng
 - Giống chuột Swiss.
 - Trọng lượng: 17 - 22 g.
 - Số lượng: 5 chuột / 1 loạt mẫu thử.

5.1.2.3. Các bước tiến hành

Chuẩn bị chuột trước khi tiêm

- Chuột trước khi tiêm phải được theo dõi cách ly 2 ngày (đối với chuột nhắt) và 3 ngày (đối với chuột lang). Trong thời gian cách ly chuột phải được theo dõi hàng ngày về tình trạng sức khỏe, trọng lượng và ghi vào sổ theo dõi.
- Chọn chuột
 - Chuột nhắt 17 - 22g: 5 chuột/1 mẫu thử.
 - Chuột lang 250 - 350g : 2 chuột/1 mẫu thử.

Tiêm chuột

- Chuột lang
 - Liều tiêm: 5 liều tiêm/1chuột.
 - Đường tiêm: Phức mạc.

- Chuột nhắt
 - Liều tiêm: 1 liều tiêm/1chuột.
 - Đường tiêm: Phức mạc.

Theo dõi chuột

- Thời gian theo dõi súc vật thí nghiệm là 7 ngày.
- Hàng ngày theo dõi tình trạng sức khỏe và cân trọng lượng của từng chuột.

5.1.2.4. Kết quả

Tính kết quả

- Tính % trọng lượng tăng của từng chuột

$$\% \text{ tăng trọng} = (P_7 / P_0) \times 100\%$$

Trong đó: P_7 : trọng lượng ngày thứ 7.
 P_0 : trọng lượng ngày tiêm.
- Tính % trọng lượng tăng trung bình của từng nhóm chuột.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Không có chuột nào bị chết trong thời gian theo dõi.
- 100% sống khỏe mạnh, không có dấu hiệu bệnh lý và tăng cân.

Thử nghiệm nhắc lại

- Điều kiện phải nhắc lại: thử nghiệm được nhắc lại khi không đạt tiêu chuẩn chấp thuận (mục 4.2).
- Thử nghiệm nhắc lại lần 1: với số lượng mẫu và chuột như lần thử nghiệm thứ nhất. Tiêu chuẩn chấp thuận (mục 4.2).
- Thử nghiệm nhắc lại lần 2: nếu thử nghiệm nhắc lại lần 1 không đạt yêu cầu, tiến hành thử nghiệm nhắc lại lần 2 với số lượng chuột và mẫu gấp đôi lần thử nghiệm thứ nhất. Tiêu chuẩn chấp thuận (mục 4.2).

- Nếu thử nghiệm nhắc lại lần 2 không đạt tiêu chuẩn chấp thuận (mục 4.2), loạt vắc xin đó bị huỷ bỏ vì không đạt yêu cầu về tiêu chuẩn an toàn chung.

5.1.3. Phương pháp kiểm tra chất gây sốt

5.1.3.1. Nguyên lý

- Chất gây sốt được xác định gián tiếp qua thí nghiệm đo thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm mẫu thử nghiệm.

5.1.3.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Động vật thí nghiệm

- Thỏ trưởng thành cân nặng > 1,5 kg, khoẻ mạnh, không có dấu hiệu bệnh lý.

Sử dụng 03 thỏ/mẫu thử.

Mẫu thử và môi trường

- Vắc xin Hib cộng hợp: 10 lọ.

Dụng cụ và trang thiết bị

- Bơm tiêm nhựa 3ml (dùng 1 lần).
- Bông, cồn sát trùng.
- Giá cố định thỏ.
- Máy đo chất gây sốt.
- Cân động vật.
- Nồi cách thuỷ.

5.1.3.3. Các bước tiến hành

Chuẩn bị động vật thí nghiệm và mẫu thử

**** Cách ly thỏ:***

- Thỏ được nhốt cách ly 2 ngày trước khi thử nghiệm ở điều kiện nhiệt độ 20⁰C - 25⁰C, cho ăn uống đầy đủ.

*** Chuẩn bị thỏ trước thử nghiệm:**

- Thỏ được nhốt trong phòng cách ly: không cho ăn, uống nước trong vòng 16 giờ trước thử nghiệm.

Chuẩn bị mẫu thử

- Pha loãng mẫu thử nghiệm để có 1 μg polysacharid/ml.
- Mẫu thử nghiệm được làm ấm lên trong nồi cách thủy ở nhiệt độ 37°C.

Các bước tiến hành

- Cân trọng lượng của từng thỏ.
- Cố định thỏ trong hộp cố định.
- Gắn các đầu sensor vào hậu môn thỏ.

Theo dõi nhiệt độ thỏ trước tiêm

- Theo dõi thân nhiệt thỏ bằng máy đo chất gây sốt trước tiêm 30 phút.
- Dùng thỏ có thân nhiệt ổn định để tiến hành thử nghiệm.
- Không dùng thỏ có thân nhiệt $> 39,8^{\circ}\text{C}$.

Tiêm thỏ

- Liều tiêm: 1ml mẫu thử đã pha loãng/1 kg trọng lượng thỏ.
- Đường tiêm: tĩnh mạch vành tai thỏ.

Theo dõi nhiệt độ thỏ sau tiêm

- Theo dõi thân nhiệt thỏ bằng máy đo chất gây sốt sau tiêm 180 phút.
- Kết quả theo dõi nhiệt độ thân nhiệt thỏ trước và sau tiêm được máy in ra.

5.1.3.4. Kết quả

Tính kết quả

- Nhiệt độ cao nhất (T_{max}) của thỏ thử nghiệm sau khi tiêm ghi nhận sau 3 lần đo được coi là nhiệt độ tối đa.
- Hiệu số giữa nhiệt độ tối đa (T_{max}) và nhiệt độ ban đầu (Base) được coi là phản ứng của thỏ với chất gây sốt có trong vắc xin thử nghiệm.

- Nếu hiệu số này là âm tính (≤ 0) thì phản ứng đọc là 0°C .
- Tính tổng nhiệt độ tăng của 03 thỏ sau 3 giờ theo dõi.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Tổng nhiệt độ tăng của 03 thỏ sau 3 giờ theo dõi phải $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$.
- Nhiệt độ tăng của từng thỏ phải $< 0,6^{\circ}\text{C}$.

Thử nghiệm nhắc lại

- Điều kiện phải nhắc lại thử nghiệm:
 - Tổng nhiệt độ tăng của cả 3 thỏ $< 1,4^{\circ}\text{C}$ nhưng nhiệt độ tăng của 1 trong 3 thỏ thử nghiệm tăng quá $0,6^{\circ}\text{C}$.
 - Tổng nhiệt độ tăng của cả 3 thỏ $\geq 1,4^{\circ}\text{C}$ nhưng $< 2,4^{\circ}\text{C}$.
- Thử nghiệm nhắc lại lần thứ nhất: được tiến hành trên 3 thỏ khác. Kết quả đánh giá theo tiêu chuẩn trong bảng.
- Thử nghiệm nhắc lại lần 2: được tiến hành trên 3 thỏ khác. Kết quả đánh giá theo tiêu chuẩn trong bảng.

Lần thử nghiệm	Tổng số thỏ cộng dồn	Thử nghiệm đạt nếu tổng nhiệt độ không quá ($^{\circ}\text{C}$)	Thử nghiệm không đạt nếu tổng nhiệt độ quá ($^{\circ}\text{C}$)
1	3	1,4	2,4
2	6	3,0	4,1
3	9	4,9	4,9

5.1.4. Thử nghiệm nhận dạng

5.1.4.1. Mục đích

Mô tả phương pháp xác định các kháng nguyên đặc hiệu có trong vắc xin Hib cộng hợp bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch trên thạch.

5.1.4.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Lam kính thủy tinh
- Khuôn đổ thạch
- Khuôn đục thạch
- Pipet-aid
- Pipetman 1ml
- Pipetman 5-40 μ l
- Đầu côn 1ml
- Đầu côn 200 μ l
- Pipet thủy tinh 10ml
- Hộp giữ ẩm
- Chai thủy tinh 250ml
- Cốc có mỏ loại 250ml
- Thanh từ
- Máy khuấy từ

Hoá chất

- Agarose
- Nước muối 0,15M
- Kháng huyết thanh anti - PRP (B-132)
- Kháng huyết thanh anti - tetanus (SAT)
- Mẫu thử: vắc xin Hib cộng hợp

5.1.4.3. Các bước tiến hành

Nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý ngưng kết kháng nguyên - kháng thể giữa Hib polysaccharide (PRP) với kháng huyết thanh anti - PRP và giữa giải độc tố uốn ván (TT) với kháng huyết thanh anti - TT.

Chuẩn bị thạch trên lam kính

Pha dung dịch agarose 1%:

- Cân 1g agarose, đổ vào cốc có chứa 50ml NaCl 0,15M, khuấy đều trên máy khuấy từ nhiệt.
- Đổ thạch lên lam kính thủy tinh theo khuôn.
- Đợi 10 phút cho thạch nguội.
- Đục các lỗ trên thạch.

Tiến hành

- Nhỏ các chất chuẩn và mẫu vào các giếng trên phiến thạch.
- Các chuẩn anti - PRP và anti - TT: mỗi giếng nhỏ 5µl.
- Các giếng của PRP, TT và các mẫu thử: mỗi giếng nhỏ 10µl.

1.4.4. Kết quả

- Hib polysacharid (PRP) sau khi cộng hợp với giải độc tố uốn ván (TT) sẽ ngưng kết đặc hiệu với các kháng huyết thanh có chứa anti - PRP và kháng huyết thanh anti - TT.
- Kết quả được coi là dương tính khi có các vạch ngưng kết trên thạch:
 - + Vạch ngưng kết giữa Hib polysacharid (PRP) và anti - PRP.
 - + Vạch ngưng kết giữa giải độc tố uốn ván (TT) và anti - TT.

5.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HÓA LÝ

5.2.1. Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng

5.2.1.1. Nguyên lý

Định lượng polysaccharide trong vắc xin Hib cộng hợp bằng cách xác định nhóm ribose theo phương pháp BIAL.

5.2.1.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Ống ly tâm Eppendorf loại 2ml.
- Pipetman 1ml, đầu côn 1ml.
- Pipet thuỷ tinh 10ml.
- Pipet-aid.
- Cồng đo..
- Bình tam giác 50ml.
- Ống nghiệm thuỷ tinh $\phi = 10\text{mm}$.
- Đồng hồ bấm giờ.

Trang thiết bị

- Máy đo quang phổ.
- Máy trộn.
- Bể ủ nhiệt.

Hóa chất

- D(+) ribose.
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Orcinol.
- Dung dịch HCl đặc.
- Dung dịch cồn tuyệt đối.
- Nước pha tiêm (WFI).
- Mẫu thử: vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm dạng lỏng.

5.2.1.3. Các bước tiến hành

Chuẩn bị mẫu thử

- Lắc kỹ các ống mẫu thử.
- Hút 800 μ l mẫu thử lần lượt cho vào mỗi tuýp đã đánh số trước , đậy nắp, lắc đều.

Pha các dung dịch chuẩn

Pha dung dịch ribose chuẩn 50 μ g/ml

- Hút 0,15ml dung dịch ribose chuẩn 1mg/ml cho vào ống nghiệm thủy tinh.
- Thêm 2,85ml WFI vào ống nghiệm, lắc kỹ bằng máy trộn.

Pha dung dịch orcinol 10%

- Cân 200mg orcinol cho vào ống ly tâm eppendorf.
- Thêm 2ml cồn tuyệt đối, đậy nắp, lắc đều bằng máy trộn.

Pha dung dịch $FeCl_3.6H_2O$ 10%

- Cân 100 mg $FeCl_3.6H_2O$ cho vào ống nghiệm thủy tinh.
- Thêm 1 ml HCl đậm đặc vào ống nghiệm, lắc kỹ cho tan.

Pha dung dịch phản ứng

- Hút 10ml HCl đậm đặc cho vào một bình tam giác.
- Thêm 0,05ml dung dịch $FeCl_3.6H_2O$ 10% cho vào bình, lắc đều.
- Thêm 1ml dung dịch orinol 10% cho vào bình, lắc đều.

Cách tiến hành

- Hút 50 μ l - 100 μ l - 200 μ l - 400 μ l - 600 μ l - 800 μ l dung dịch ribose chuẩn 50mg/ml vào thứ tự các ống nghiệm số 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6, đậy nắp.

- Thêm lần lượt 750µl - 700µl - 600µl - 400µl - 200µl WFI vào các ống nghiệm số 1- 2 - 3 - 4 - 5, đậy nắp, lắc đều.
- Thêm 800µl WFI vào ống nghiệm số 7, đậy nắp.
- Thêm 800µl dung dịch phản ứng lần lượt vào các ống nghiệm số 1- 2- 3 - 4- 5- 6 - 7- 8 - 9, đậy nắp, trộn đều.
- Đo trên máy quang phổ bước ở sóng 670nm. Chỉnh máy về 0 bằng WFI.

Dựng đường chuẩn

- Dựng đường chuẩn dựa vào độ hấp thụ quang học (OD) của dung dịch chuẩn ở các nồng độ khác nhau.
- Xử lý số liệu theo chương trình vẽ đồ thị Excel, xây dựng được phương trình hồi quy tuyến tính thực nghiệm (phương trình đường chuẩn $y = ax + b$). Dựa theo phương trình tính ra hàm lượng ribose trong mẫu thử.

5.2.1.4. Kết quả

Kết quả

- Công thức :

$$Y = y \times 3 \times n$$

Trong đó: Y: Hàm lượng PRP có trong mẫu thử (µg/ml).

3 : Do khối lượng phân tử ribose chiếm 1/3 phân tử PRP

n: Độ pha loãng của mẫu thử

$$y = ax + b$$

y: Hàm lượng ribose tính được trên đường chuẩn (µg).

x: Độ hấp thụ quang đo được tương ứng với từng hàm lượng ribose chuẩn.

a, b: Hệ số của phương trình đường chuẩn.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Hàm lượng PRP trong vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng phải nằm trong khoảng 8 – 12µg/0,5 ml.

5.2.2. Định lượng polysaccharide (PRP) trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô

5.2.2.1. Nguyên lý

- Định lượng polysaccharide trong vắc xin Hib cộng hợp bằng cách xác định nhóm ribose theo phương pháp BIAL.

5.2.2.2. Xử lý mẫu thử

- Mẫu thử phải được xử lý loại sucrose trước khi tiến hành định lượng.
- Sử dụng phương pháp thẩm tích đổi đệm bằng ly tâm với cột siêu lọc 10kD để rửa và loại bỏ hoàn toàn sucrose trong vắc xin, sau đó thay thế bằng dung dịch đệm mới là nước pha tiêm hoặc đệm Tris.
- Xác định hệ số thu hồi của PRP trước và sau khi thẩm tích bằng dung dịch PRP chuẩn đã biết rõ hàm lượng và tiến hành theo cùng một phương pháp. Trong kết quả tính toán cuối cùng để xác định hàm lượng của PRP trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô, giá trị định lượng của PRP trong sản phẩm sau thẩm tích phải được chia cho hệ số thu hồi này.

5.2.2.3. Các bước tiến hành

Tương tự như phần 5.2.1 - Định lượng PRP trong vắc xin Hib cộng hợp dạng dung dịch.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Hàm lượng PRP trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô phải nằm trong khoảng 8 - 12µg/0,5 ml.

5.2.3. Xác định pH trong vắc xin Hib cộng hợp

5.2.3.1. Nguyên lý

- pH của vắc xin được xác định bằng máy đo pH với điện cực thuỷ tinh

5.2.3.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Cốc có mỏ loại 50ml
- Giấy lau

Trang thiết bị

- Máy đo pH

Hóa chất

- Dung dịch pH chuẩn 7,00
- Dung dịch pH chuẩn 4,01
- Nước cất pha tiêm
- Mẫu thử: 20 lọ vắc xin Hib cộng hợp

5.2.3.3. Các bước tiến hành

Chuẩn bị mẫu

- Lắc kỹ các lọ vắc xin, trộn vào ống Falcon 50ml đã đánh dấu tên loại vắc xin, lắc đều.
- Đối với vắc xin đông khô, phải hồi chính nước trước khi đo.

Tiến hành đo

- Chuẩn lại pH của máy đo bằng các dung dịch pH chuẩn
- Nhúng điện cực vào các cốc đựng dung dịch mẫu thử. Đọc các thông số về pH hiện lên trên máy đo.
- Trước mỗi lần chuyển điện cực sang một dung dịch mới, phải rửa kỹ điện cực bằng nước cất pha tiêm và lau khô.

5.2.3.4. Kết quả

Tiêu chuẩn chấp thuận

- pH của vắc xin Hib cộng hợp phải nằm trong khoảng 6,0 - 7,5.

5.2.4. Định lượng thimerosal trong vắc xin Hib cộng hợp

5.2.4.1. Nguyên lý

- Dựa trên cơ sở thimerosal phản ứng với dithizon tạo thành hợp chất có cực đại hấp thụ ở bước sóng 480nm. Định lượng thimerosal bằng cách đo độ hấp phụ chất tạo thành ở bước sóng này.

5.2.4.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Bình định mức 100ml.
- Chia mẫu tự động.
- Cốc có mỏ loại 100ml.
- Cốc có mỏ loại 500ml.
- Bình gạn loại 100ml.
- Ống đong loại 500ml.
- Buret thủy tinh 50ml.
- Cồng đo.
- Máy hút chân không.
- Găng tay, khẩu trang.

Hóa chất

- Dung dịch thimerosal chuẩn 1%.
- Dung dịch dithizon 0,02%.
- Cacbon tetraclohid.
- Amoniac đậm đặc 32%.
- Dung dịch acid sulfuric 10%.
- WFI.

Trang thiết bị

- Máy đo quang
- Máy ly tâm
- Máy lắc

5.2.4.3. Các bước tiến hành

Mẫu thử

Lắc kỹ các lọ vắc xin, trộn vào ống Falcon đã đánh dấu tên loại vắc xin, lắc đều.

Pha dung dịch dithizon 0,002%

Hút 10ml dung dịch dithizon 0,02% vào bình định mức loại 100ml, thêm carbontetrachlorid vừa đủ tới vạch.

Pha dung dịch amoniac 60% (9N)

- Rót 180ml nước amoniac đậm đặc vào ống đong loại 500ml, thêm WFI vừa đủ 300ml, khuấy đều.

Tiến hành

- Hút 0,5ml dung dịch thimerosal chuẩn 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml lần lượt vào mỗi 2 bình nón 4 - 5, 6 - 7, 8 - 9.
- Hút 0,5ml mẫu thử vào mỗi bình nón 2 - 3.
- Thêm WFI vừa đủ 5ml vào mỗi bình nón từ 1 đến 9, lắc đều.
- Thêm 5ml dung dịch acid sulfuric 10% vào mỗi bình nón từ 1 đến 9, lắc đều.
- Dùng buret thêm 10ml dung dịch dithizon 0,002% vào mỗi bình nón từ 1 đến 9.
- Đậy nắp, lắc mạnh trong 2 phút. Để yên cho tách thành 2 lớp, hút bỏ lớp nước nổi.

- Thêm 10ml WFI vào mỗi bình, lắc mạnh. Để yên cho tách thành 2 lớp, hút bỏ lớp nước nổi.
- Thêm 10ml dung dịch amoniac 60% vào mỗi bình, lắc mạnh. Để yên cho tách thành 2 lớp, hút bỏ lớp nước nổi.
- Làm bước này 3 lần.
- Màu của cacbon tetraclohid chuyển từ xanh lá cây sang màu vàng cam.
- Thêm 10ml WFI vào mỗi bình, lắc mạnh. Để yên cho tách thành 2 lớp, hút bỏ lớp nước nổi.
- Chuyển sang bình gạn, gạn lấy lớp cacbon tetraclohid.
- Lọc qua giấy lọc, đo quang phổ bước sóng 480nm.

Dựng đường chuẩn

- Căn cứ vào độ hấp thụ của dung dịch thimerosal chuẩn và hàm lượng thimerosal tương ứng để dựng phương trình đường chuẩn. Xử lý số liệu theo chương trình vẽ đồ thị trong Excel của máy tính, xây dựng được phương trình hồi quy tuyến tính thực nghiệm (phương trình đường chuẩn) $y = ax + b$. Dựa theo phương trình tính ra hàm lượng thimerosal có trong mẫu vắc xin.

5.2.4.4. Kết quả

Tính kết quả

Công thức: $Y = y \cdot 100/1000000 = y \cdot 0,0001$

Trong đó: Y: Hàm lượng thimerosal có trong mẫu vắc xin (g%).

$$y = ax + b$$

y: Hàm lượng thimerosal ($\mu\text{g/ml}$).

x: Độ hấp thụ quang đo được tương ứng với từng hàm lượng thimerosal.

a, b: Hệ số của phương trình đường chuẩn.

100: Đổi ra g%.

1000000: Hệ số qui đổi từ μg ra g.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Hàm lượng thimerosal có trong vắc xin Hib cộng hợp $\leq 0,012\%$.

5.2.5. Định lượng nhôm trong vắc xin Hib cộng hợp

5.2.5.1. Nguyên lý

- Hàm lượng nhôm có trong vắc xin được xác định bằng cách đo màu của hợp chất tạo ra từ phản ứng của ion Al^{3+} với thuốc thử Stilbazo.

5.2.5.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Bình nón loại 100ml.
- Ống nghiệm thủy tinh $\phi = 18\text{mm}$.
- Pipetman 1ml, pipet aid, pipet thủy tinh 5 ml.
- Chia mẫu tự động
- Cốc có mỏ loại 100ml, 500ml.
- Bình định mức 25ml, 250ml.
- Cồng đo.

Trang thiết bị

- Máy đo quang phổ

Hóa chất

- Dung dịch nhôm chuẩn 0,1%
- Dung dịch Stilbazo
- Dung dịch đệm acetat
- Acid nitric đậm đặc
- Nước cất pha tiêm (WFI)

5.2.5.3. Các bước tiến hành

Pha dung dịch nhôm chuẩn 2 $\mu\text{g/ml}$

- Dùng pipet thủy tinh 1ml hút 0,5ml dung dịch nhôm chuẩn 0,1% vào trong bình định mức 250ml, thêm WFI vừa đủ tới vạch, lắc đều.

Pha loãng mẫu thử

- Mẫu thử được pha loãng 25 và 50 lần trước khi tiến hành thử nghiệm.

Tiến hành

- Hút 1ml – 2ml – 3ml – 4ml – 5ml dung dịch nhôm chuẩn 2µg/ml vào lần lượt các bình nón ký hiệu số 4 – 5 – 6 – 7 – 8.
- Hút 1ml mẫu thử pha loãng 25 lần, 50 lần vào các bình nón ký hiệu số 2-3.
- Thêm WFI vừa đủ 5ml vào các bình nón ký hiệu từ 1 đến 8, lắc đều.
- Thêm 10ml dung dịch acetat buffer vào mỗi bình nón từ 1 đến 8, lắc đều.
- Thêm 5ml dung dịch Stilbaso vào mỗi bình nón từ 1 đến 8, lắc đều.
- Thêm 5ml WFI vào mỗi bình nón từ 1 đến 8, lắc đều.
- Giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút.
- Đo quang phổ ở bước sóng 510 nm.

Dựng đường chuẩn

Căn cứ vào độ hấp thụ của dung dịch nhôm chlorid chuẩn và hàm lượng nhôm chlorid tương ứng để dựng đường chuẩn. Xử lý số liệu theo chương trình vẽ đồ thị trong Excel của máy tính, xây dựng được phương trình hồi quy tuyến tính thực nghiệm (phương trình đường chuẩn) $y=ax+ b$. Dựa theo phương trình tính ra hàm lượng nhôm trong mẫu vắc xin.

5.2.5.4. Kết quả

Tính kết quả

$$\text{Công thức: } Y = (y_{25}.25/1 + y_{50}.50/1)/2$$

Trong đó:

Y: Hàm lượng nhôm có trong mẫu vắc xin ($\mu\text{g/ml}$).

$$y = ax + b$$

y: Hàm lượng nhôm (μg).

y_{25} : Hàm lượng nhôm của mẫu thử pha loãng 25 lần.

y_{50} : Hàm lượng nhôm của mẫu thử pha loãng 50 lần.

x: Độ hấp phụ quang tương ứng với các hàm lượng nhôm.

a, b: Hệ số của phương trình đường chuẩn.

25, 50: Độ pha loãng của mẫu thử.

1: Thể tích mẫu thử (ml).

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Hàm lượng nhôm có trong vắc xin Hib cộng hợp $\leq 1250 \mu\text{g/ml}$.

5.2.6. Xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin Hib cộng hợp dạng đông khô

5.2.6.1. Nguyên lý

Dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong dung môi khan chứa một chất bazơ hữu cơ thích hợp.

5.2.6.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Ống nghiệm 15x15mm.
- Cốc có mỏ 50ml.
- Thìa cân.

Hóa chất

- Sodium L-tartrate dihydrate (tinh khiết >99%).
- Thuốc thử Karl Fischer.

Bao gồm: 1. Titrant 5.
2. Solvent.

Trang thiết bị

- Cân phân tích
- Máy chuẩn độ điện thế

5.2.6.3. Các bước tiến hành

Xác định đương lượng của thuốc thử

- Do đương lượng của thuốc thử Karl Fischer dễ bị thay đổi theo thời gian nên trước khi dùng phải xác định lại và phải đạt tối thiểu 3,5mg nước cho 1ml thuốc thử.
- Dẫn hoá chất vào máy theo đường dẫn từng loại cho Solvent, Titrant 5.
- Bơm dung môi, thuốc thử cũ ra khỏi đường ống dẫn vào chai đựng chất thải.
- Hút (Purging) vài lần để trộn đều thuốc thử.
- Bơm dung môi (Solvent) vào khoảng 1/3 cốc chuẩn độ.
- Chuẩn bị cốc và ống nghiệm để cân natri tacrat (natri tacrat đã được loại hết ẩm bằng cách sấy khô ở 60°C trong 1 giờ). Cân chính xác khoảng 0,13g natri tacrat vào ống nghiệm dựng đứng trong cốc. Sau khi đổ hết natri tacrat vào cốc chuẩn độ, đặt ống nghiệm trở lại cân, ghi lại số g hiện trên màn hình cân (giá trị âm).
- Tính đương lượng của thuốc thử (F) theo công thức sau:

$$F = \frac{2.18,02}{230,08} \frac{M}{V} = 0,15664 \frac{M}{V}$$

Trong đó:	F:	Đương lượng của thuốc thử (mg/ml)
	18,02:	Khối lượng phân tử của nước trong phân tử natri tacrat
	230,08:	Khối lượng của phân tử natri tacrat
	V:	Thể tích thuốc thử sử dụng để chuẩn độ natri

tactrat (ml)

M: Khối lượng natri tactrat (mg)

- Tiến hành xác định đương lượng của thuốc thử 2 lần, lấy kết quả trung bình ($\bar{F}$).

Tiến hành định lượng

- Chuẩn bị cân mẫu: Tùy theo từng chế phẩm đông khô, lấy khoảng 3-4 lọ vắc xin bỏ nút nhôm, đem cân, trước khi nhắc ra bấm Tare trên cân. Mở từng lọ vắc xin, lấy thìa cân nhỏ cho vào lọ làm vụn bánh đông khô, nhanh chóng đổ vào cốc chuẩn độ qua đường cho mẫu, làm lần lượt từng lọ đến hết. Đặt lại cân lọ và nút cao su, ghi lại khối lượng cân (giá trị âm).
- Tiến hành định lượng mẫu thử 2 lần, tính giá trị trung bình.

5.2.7. Kết quả

Tính kết quả

- Công thức:

$$X = \frac{V \cdot \bar{F}}{m} \cdot 100$$

Trong đó: X: Hàm lượng nước có trong mẫu thử (% kl/kl)
V: Thể tích thuốc thử sử dụng để chuẩn độ mẫu thử (ml)
 $\bar{F}$: Đương lượng trung bình của thuốc thử (mg/ml)
m: Lượng mẫu thử khi cân (mg)
100: Chuyển sang %

Và
$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}$$

Trong đó: $\bar{X}$: Hàm lượng nước trung bình có trong mẫu thử (% kl/kl)
 X_1 : Hàm lượng nước có trong mẫu thử làm lần thứ nhất (% kl/kl)

X_1 : Hàm lượng nước có trong mẫu thử làm lần thứ hai (% kl/kl)

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Độ ẩm tồn dư trong vắc xin Hib cộng hợp đông khô $\leq 3\%$.

5.2.7. Kiểm tra tính chất vật lý vắc xin Hib cộng hợp

5.2.7.1. Nguyên lý

Quan sát vắc xin Hib cộng hợp bằng mắt thường dưới ánh sáng đèn.

5.2.7.2. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Bơm tiêm 3ml
- Dụng cụ mở nắp lọ vắc xin

Hoá chất

- Mẫu vắc xin Hib cộng hợp

5.2.7.3. Các bước tiến hành

- Dạng dung dịch: Bóc nhãn từng lọ vắc xin, lau sạch lọ, quan sát bằng mắt dưới ánh sáng đèn tuýp.
- Dạng đông khô: Kiểm tra dạng đông khô trong lọ. Hồi chỉnh bằng nước hồi chỉnh, kiểm tra thời gian hoà tan hoàn toàn, sau đó quan sát lọ vắc xin như dạng dung dịch.
- Ghi chép kết quả quan sát được.

5.2.7.4. Kết quả

Kết quả

- Ghi chép lại các kết quả quan sát được.

Tiêu chuẩn chấp thuận

- Dạng dung dịch: Sau khi lắc, vắc xin có màu trắng hơi đục. Để lắng sau 1 giờ, vắc xin phải tách làm hai lớp, trong đó lớp nhôm phải tủa bông mịn, không vón cục.
- Dạng đông khô: Vắc xin Hib cộng hợp đông khô có dạng viên xốp màu trắng, khi hoà tan bằng nước hồi chính tạo thành dung dịch trong suốt, không màu, không có chất lạ khó tan.

5.3. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO VẮC XIN HIB CỘNG HỢP

Từ tiêu chuẩn chấp thuận của từng thử nghiệm kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp, bảng tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng sẽ sử dụng để làm tiêu chuẩn cho vắc xin xuất xưởng sau này đã được xây dựng. Căn cứ để đưa ra các tiêu chuẩn này đều được dựa trên các khuyến cáo của TCYTTG [58] và theo Dược điển châu Âu [19]. Các tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng được trình bày trong Bảng 5.1.

BẢNG 5.1. TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO VẮC XIN HIB CỘNG HỢP
(Dạng lỏng)

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn chấp thuận	Tài liệu tham khảo
1	Nhận dạng	<i>H. influenza</i> type b	TCYTTG, EP
2	Tính chất vật lý	Sau khi lắc, vắc xin có màu trắng hơi đục. Để lắng sau 1 giờ, vắc xin phải tách làm hai lớp, trong đó lớp nhôm phải tủa bông mịn, không vón cục.	
3	Vô khuẩn	Không phát hiện thấy nấm và vi khuẩn phát triển sau 14 ngày theo dõi.	TCYTTG, EP
4	pH	6,0 - 7,5	
5	Hàm lượng Thimerosal (%)	$\leq 0,012$	TCYTTG, EP
6	Hàm lượng PRP ($\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$)	8-12	TCYTTG
7	Hàm lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	≤ 1250	TCYTTG, EP
8	An toàn chung trên chuột lang	Chuột khỏe mạnh, tăng trọng bình thường	TCYTTG
9	An toàn chung trên chuột nhắt		
10	Chất gây sốt	Tổng T° tăng của 3 thỏ $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$ Nhiệt độ tăng của từng thỏ $< 0,6^{\circ}\text{C}$	TCYTTG, EP

CHƯƠNG 6

ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC VẮC XIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

Động vật được sử dụng trong nhiều giai đoạn của quá trình đánh giá và phát triển vắc xin. Trước tiên, mô hình động vật cho nhà nghiên cứu các thông tin về mức độ an toàn và tạo đáp ứng miễn dịch của vắc xin dự tuyển. Khi các dữ liệu này đáp ứng yêu cầu của nhà nghiên cứu, vắc xin dự tuyển sẽ được đánh giá tiếp tục trên người tình nguyện. Đối với vắc xin Hib, theo hướng dẫn của TCYTTG về thử nghiệm công hiệu hiện chưa có tiêu chuẩn cho thử nghiệm sinh học để đánh giá công hiệu của vắc xin Hib cộng hợp. Các thử nghiệm gây miễn dịch trên động vật được sử dụng chủ yếu ở các bước phát triển vắc xin để đánh giá khả năng tạo đáp ứng trí nhớ phụ thuộc tế bào T của vắc xin trên động vật. Các vắc xin có được đáp ứng miễn dịch tốt trên động vật sẽ được tiếp tục nghiên cứu và phát triển và sẽ là các vắc xin dự tuyển để sử dụng cho người. Nhiều mô hình đánh giá đáp ứng miễn dịch đối với vắc xin Hib cộng hợp trên động vật đã được các tác giả tiến hành và cho kết quả tốt như mô hình trên chuột nhắt trắng [12], [30], [40], trên chuột lang [43], trên thỏ [30]. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn mô hình động vật để đánh giá tính sinh miễn dịch là các giống chuột nhắt trắng khác nhau. Lựa chọn loài chuột cho đáp ứng miễn dịch tốt nhất với vắc xin Hib cộng hợp là việc làm cần thiết vì đây sẽ là mô hình giúp cho nhà nghiên cứu lựa chọn được dạng cộng hợp vắc xin Hib tốt nhất trong quá trình nghiên cứu phát triển cũng như để đánh giá chất lượng của vắc xin sản xuất sau này. Các sản phẩm được đánh giá tính an toàn và đáp ứng miễn dịch trong quá trình nghiên cứu và phát triển vắc xin Hib cộng hợp bao gồm các dạng bán thành phẩm vắc xin trong quá trình

ngiên cứu xây dựng quy trình sản xuất như các sản phẩm sau cộng hợp sử dụng các polysaccharide của các chủng Hib khác nhau, tiến hành theo các phương pháp cộng hợp khác nhau, có thành phần pha vắc xin khác nhau và các vắc xin thành phẩm được sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm dưới các dạng khác nhau. Các sản phẩm này đều được đánh giá so sánh về đáp ứng miễn dịch với các nhóm chứng tiêm nước muối sinh lý, tiêm polysaccharide của Hib (PRP) đơn thuần, không cộng hợp và tiêm với một vắc xin Hib cộng hợp đã được thương mại hóa (Act-Hib của Sanofi-Pasteur, Pháp).

6.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA VẮC XIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

6.1.1. Các phương pháp đánh giá tính an toàn của vắc xin trên động vật thí nghiệm

6.1.1.1. *Phương pháp kiểm tra tính an toàn chung*

Xem Phần 5.1.2.

6.1.1.2. *Phương pháp kiểm tra chất gây sốt*

Xem Phần 5.1.3.

6.1.2. Phương pháp đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin trên chuột

6.1.2.1. *Thử nghiệm gây miễn dịch trên chuột*

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Dụng cụ

- Bơm tiêm nhựa loại 1 ml.
- Hộp giữ lạnh.
- Băng, còng, găng tay, panh.

Vật liệu

- Vắc xin Hib cộng hợp thử nghiệm và vắc xin Hib cộng hợp đối chứng.
- Nước muối sinh lý làm mẫu đối chứng âm tính.

Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng.
- Trọng lượng: 13-18g.
- Số lượng: 15 con/ loạt mẫu thử.

Các bước tiến hành

Chuẩn bị chuột trước khi tiêm

- Chuột trước khi tiêm phải được theo dõi cách ly 2 ngày. Trong thời gian cách ly hàng ngày theo dõi tình trạng sức khỏe, cân trọng lượng và ghi vào sổ theo dõi.
- Chọn chuột: chuột nhắt 13-18g: 15 chuột/1 mẫu thử.
- Đánh dấu chuột, dán nhãn lên lồng chuột với các chi tiết: loại vắc xin, loạt, dấu chuột và ngày tiêm.

Tiêm chuột

- Dùng bơm tiêm loại 1ml. Sát trùng vị trí tiêm; tiêm vào vùng bụng dưới chuột (xem Hình 6.1).
- Liều tiêm:
 - + Vắc xin thử nghiệm, vắc xin đối chứng, polysacchride đơn thuần:

tiêm liều $2,5\mu\text{g}$ PRP / $0,125\text{ml}$ /1 chuột.

+ Nước muối sinh lý: tiêm $0,125\text{ ml}$ /chuột.

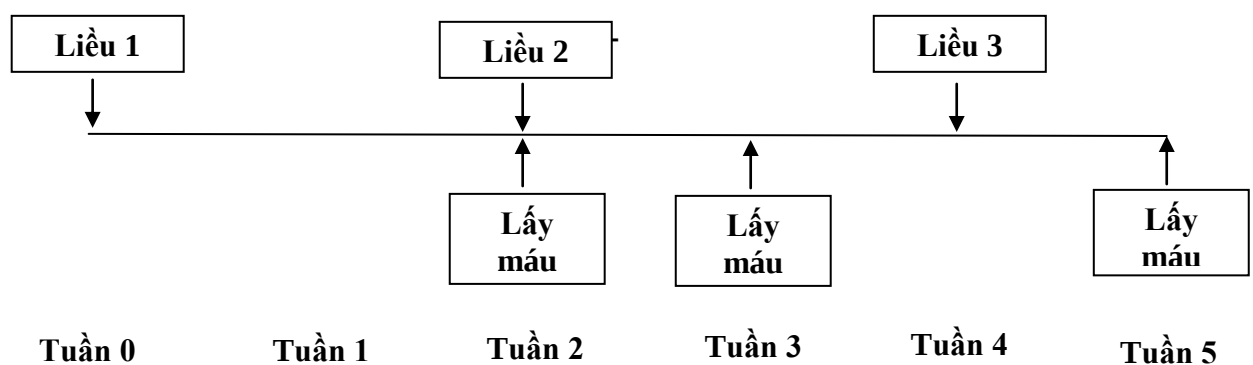
- Đường tiêm: Dưới da.



Hình 6.1. Cách thức và vị trí tiêm chuột gây miễn dịch

Lịch tiêm và lấy máu

- Chuột được tiêm 3 mũi, mỗi mũi tiêm cách nhau 2 tuần. Lấy máu cách 1 tuần sau mỗi mũi tiêm (Hình 6.2).



Hình 6.2. Sơ đồ gây miễn dịch và lấy máu cho chuột

6.1.2.2. Thử nghiệm đánh giá đáp ứng miễn dịch

Thử nghiệm để đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch của các dạng cộng hợp vắc xin Hib trên chuột là thử nghiệm ELISA phát hiện anti - PRP

Nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý ELISA nhằm xác định hiệu giá kháng thể anti - PRP của chuột thử nghiệm

Dụng cụ và trang thiết bị

- Phiến ELISA
- Phiến pha loãng mẫu
- Giấy dán phiến
- Máng đựng hóa chất
- Pipetman
- Pipet nhiều kênh
- Đầu côn 1ml
- Pipet thuỷ tinh 10ml
- Pipet-aid
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA

Vật liệu

- Máu thu được sau khi gây miễn dịch trên chuột.

Hóa chất

- Dung dịch polysaccharide Hib (PRP Hib).
- Cộng hợp dê kháng IgG chuột.
- Đệm PBS.
- Albumin huyết thanh bò (BSA).

- Chất hiện màu.
- Dung dịch đệm cơ chất.
- Dung dịch dừng phản ứng

Các bước tiến hành

Chuẩn bị mẫu

- Ly tâm máu chuột. Hút lấy huyết thanh và giữ ở - 20°C.
- Khi tiến hành xét nghiệm, các mẫu huyết thanh được lấy ra từ điều kiện bảo quản và để tan đông ở nhiệt độ phòng.
- Nếu chưa xét nghiệm ngay, giữ mẫu ở 4°C.

Pha hóa chất

- Pha dung dịch gắn bản.
- Pha dung dịch rửa phiến.
- Pha dung dịch pha loãng mẫu.
- Pha dung dịch phủ chặn.
- Pha dung dịch pha loãng cộng hợp.
- Pha loãng cộng hợp.
- Pha dung dịch hiện màu.

Tiến hành

Gắn bản bằng PRP Hib

- Pha PRP Hib trong dung dịch gắn bản với nồng độ thích hợp.
- Nhỏ dung dịch gắn bản đã được pha vào các giếng của phiến ELISA.
- Đậy phiến bằng giấy dán phiến và ủ phiến.

Phủ chặn

- Rửa phiến gắn bản, đập khô
- Nhỏ dung dịch phủ chặn vào tất cả các giếng.
- Ủ phiến.

- Rửa lại phiến và đập khô

Nhỏ mẫu huyết thanh xét nghiệm

- Lần lượt nhỏ các mẫu huyết thanh đã được pha loãng trong dung dịch pha loãng mẫu vào giếng trên phiến theo sơ đồ sau:

A1 - B1: dung dịch pha loãng mẫu (mẫu trắng - blank)

Từ giếng C1, lần lượt nhỏ các mẫu chứng âm tính (huyết thanh chuột được tiêm nước muối sinh lý) và tiếp tục là mẫu huyết thanh thử với các dạng cộng hợp vắc xin khác nhau

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- Đậy và ủ phiến .

Nhỏ cộng hợp

- Rửa phiến và đập khô.
- Cho cộng hợp dê kháng IgG chuột vào tất cả các giếng.

- Đậy phiến và ủ mẫu.

Hiện màu và dừng phản ứng

- Rửa phiến và đập khô.
- Cho dung dịch hiện màu vào tất cả các giếng.
- Giữ phiến ở chỗ tối.
- Cho dung dịch dừng phản ứng vào tất cả các giếng.

Đọc kết quả

- Đọc phiến ở máy đọc ELISA với bước sóng 450/620 nm.
- In kết quả.

Kết quả

- Tính giá trị trung bình các mẫu chứng âm tính (OD trung bình mẫu chứng âm).
- Giá trị OD ngưỡng = giá trị OD trung bình mẫu chứng âm x 5.
- Hiệu giá kháng thể anti-PRP được quy đổi theo đơn vị ELISA (EL.U) xác định bằng tỷ số giữa giá trị OD của mẫu thử trên giá trị OD ngưỡng.
- Mẫu được xem là anti - PRP dương tính khi hiệu giá kháng thể anti - PRP có giá trị trên 1 EL.U và khi đó chuột được xem là có đáp ứng miễn dịch đối với PRP của Hib.
- Tỷ lệ có đáp ứng miễn dịch là tỷ lệ giữa số chuột có kết quả xét nghiệm anti-PRP dương tính trên tổng số chuột được gây miễn dịch
- Mức độ đáp ứng miễn dịch được xác định bằng giá trị trung bình nhân (GMT) của các hiệu giá kháng thể anti-PRP tính theo đơn vị quy đổi EL.U.

6.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC CỦA VẮC XIN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

6.2.1. Tính an toàn của vắc xin Hib cộng hợp trên động vật thực nghiệm

Tính an toàn của vắc xin Hib cộng hợp được đánh giá trên các mẫu vắc xin thành phẩm bao gồm 2 dạng: vắc xin Hib cộng hợp đông khô (LYOHIBVAX) và vắc xin cộng hợp dạng dung dịch, hấp phụ nhôm (ALHIBVAX).

Kết quả về tính an toàn chung của các vắc xin Hib cộng hợp trên chuột lang và chuột nhắt trắng được trình bày trong Bảng 6.1 và kết quả kiểm tra chất gây sốt của các vắc xin Hib cộng hợp trên thỏ được trình bày trong Bảng 6.2.

Bảng 6.1. Kết quả kiểm tra tính an toàn chung của vắc xin Hib cộng hợp

Kết quả theo dõi sau 7 ngày	Chuột nhắt trắng		Chuột lang	
	LYOHIBVAX	ALHIBVAX	LYOHIBVAX	ALHIBVAX
Số chuột chết	0/5	0/5	0/2	0/2
Trung bình tăng trọng	140,8%	135,2%	120,6%	114,5%
Kết luận	Đạt yêu cầu	Đạt yêu cầu	Đạt yêu cầu	Đạt yêu cầu

Bảng 6.2. Kết quả kiểm tra chất gây sốt của vắc xin Hib cộng hợp

Sản phẩm	Nhiệt độ tăng của từng thử			Tổng nhiệt độ tăng	Kết luận
	Thử 1	Thử 2	Thử 3		
Tiêu chuẩn	<0,6 ⁰ C			<1,4 ⁰ C	Đạt yêu cầu
LYOHIBVAX	0,3 ⁰ C	0,4 ⁰ C	0,1 ⁰ C	0,8 ⁰ C	Đạt yêu cầu
ALHIBVAX	0 ⁰ C	0,1 ⁰ C	0 ⁰ C	0,1 ⁰ C	Đạt yêu cầu

Theo kết quả trong Bảng 6.1 và Bảng 6.2, vắc xin Hib cộng hợp ở cả 2 dạng đông khô và hấp phụ với nhôm phosphate đều đạt yêu cầu về tính an toàn khi kiểm tra trên động vật thực nghiệm.

6.2.2. Đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp trên động vật thí nghiệm

Đáp ứng miễn dịch đối với các sản phẩm trong quá trình nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp được trình bày trong Chương 3, các Phần 3.6 và 3.7. Trong phần này, chủ yếu trình bày các kết quả về việc lựa chọn mô hình động vật thực nghiệm thích hợp cho đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp và kết quả về đáp ứng miễn dịch của chuột đối với các dạng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm.

6.2.2.1. Lựa chọn mô hình động vật thực nghiệm thích hợp cho đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp

Mô hình động vật thực nghiệm thích hợp cho đánh giá đáp ứng miễn

dịch của các loại vắc xin cộng hợp là có được đáp ứng miễn dịch tốt đối với các dạng vắc xin Hib cộng hợp và cho đáp ứng miễn dịch trí nhớ đối với các liều tiêm nhắc lại. Nhiều mô hình động vật đã được các nhà nghiên cứu trên thế giới lựa chọn để đánh giá vắc xin Hib cộng hợp như chuột nhắt trắng [12], [30], [40], chuột lang [43] và thỏ [30]. Do thỏ và chuột lang là các động vật lớn, khó chăn nuôi nên không thể tiến hành gây miễn dịch và theo dõi với một số lượng lớn, do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi nghiên cứu trên các giống chuột nhắt trắng khác nhau để lựa chọn một mô hình động vật thích hợp cho đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp.

Kết quả về đáp ứng miễn dịch đối với vắc xin Hib cộng hợp ở các giống chuột khác nhau được trình bày Bảng 6.3. Các giống chuột được lựa chọn để đánh giá là: chuột ICR, chuột NMRI và chuột Swiss. Các chuột này đều được nuôi dưỡng, chăm sóc và theo dõi theo quy chuẩn của Phòng Chăn nuôi động vật thí nghiệm, VABIOTECH. Dạng cộng hợp được sử dụng trong thí nghiệm này là bán thành phẩm cộng hợp PRP Hib chủng 1544 với giải độc tố uốn ván. Chỉ số được sử dụng để đánh giá là giá trị OD của các mẫu thử có được từ thử nghiệm ELISA phát hiện anti - PRP trong huyết thanh chuột. Để thấy được mức độ tập trung cũng như có sự khác biệt rõ ràng hay không của các giá trị OD ở các mẫu thử khác nhau, giá trị OD trung bình, khoảng giao động của các giá trị OD đã được đề cập đến. Nghiên cứu này cũng chỉ tập trung vào đáp ứng miễn dịch sau mũi tiêm cuối cùng (liều thứ 3) đối với PRP đơn thuần và PRP Hib ở dạng cộng hợp do đáp ứng ở tất cả các chuột sau khi kết thúc toàn bộ liệu trình tiêm cơ bản này sẽ là rõ ràng nhất.

Bảng 6.3. Kết quả đáp ứng miễn dịch đối với cộng hợp vắc xin Hib của các giống chuột khác nhau

Mẫu xét nghiệm	Chỉ số	Chuột ICR	Chuột NMRI	Chuột Swiss
Mẫu chứng âm	<i>OD trung bình</i>	0,071	0,070	0,046
	<i>Khoảng giao động</i>	0,029 - 0,085	0,030 - 0,131	0,023 - 0,097
Mẫu sau tiêm PRP đơn thuần	<i>OD trung bình</i>	0,067	0,060	0,044
	<i>Khoảng giao động</i>	0,026 - 0,121	0,037 - 0,076	0,029 - 0,071
	<i>Tỷ số OD*</i>	0,948	0,853	0,954
Mẫu sau tiêm PRP dạng cộng hợp	<i>OD trung bình</i>	2,156	1,699	1,352
	<i>Khoảng giao động</i>	1,495 - 2,484	1,000 - 2,273	0,323 - 2,209
	<i>Tỷ số OD*</i>	30,58	24,31	29,32

**Tỷ số OD được tính bằng giá trị OD trung bình của mẫu thử trên giá trị OD trung bình của mẫu chứng âm.*

Trong cả 3 mô hình chuột đều cho thấy đáp ứng trên chuột Kết quả này cũng tương tự với nhiều nghiên cứu của các tác giả khác khi tiến hành trên giống chuột nhắt trắng khác nhau [12], [30], [40]. Trong 3 mô hình này chuột nhắt trắng ICR là mô hình thực nghiệm thích hợp nhất cho vắc xin Hib cộng hợp do có mức độ giao động về các giá trị OD thấp và cho sự khác biệt rõ rệt về giá trị OD của mẫu thử so với mẫu chứng âm từ đó có thể dễ dàng xác định được giá trị ngưỡng cũng như nhận định mẫu cho kết quả đáp ứng dương tính.

6.2.2.2. Kết quả đáp ứng miễn dịch của các dạng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm

Vắc xin Hib cộng hợp được sử dụng trong nghiên cứu là vắc xin được sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm tại VABIOTECH dưới hai dạng thành phẩm

khác nhau là vắc xin đông khô (LYOHIBVAX) và vắc xin hấp phụ với nhôm phosphate (ALHIBVAX). Các vắc xin này được đánh giá so sánh về đáp ứng miễn dịch với các nhóm chứng tiêm nước muối sinh lý, tiêm đơn thuần polysaccharide của Hib (PRP) không cộng hợp và tiêm một vắc xin Hib cộng hợp đã được thương mại hóa (Act-Hib của Sanofi-Pasteur, Pháp).

Bảng 6.4. Kết quả đáp ứng miễn dịch của các dạng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm

Chỉ số		LYOHIBVAX	ALHIBVAX	Act-Hib	PRP
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 1	Tỷ lệ*	3/15 (20%)	12/15 (80%)	12/15 (80%)	0/15 (-)
	Mức độ#	0,62	1,50	0,92	0,28
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 2	Tỷ lệ*	12/15 (80%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	0/15 (-)
	Mức độ#	2,76	4,83	3,06	0,32
Đáp ứng miễn dịch sau mũi 3	Tỷ lệ*	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	-
	Mức độ#	4,95	7,86	3,14	-

*Tỷ lệ có đáp ứng miễn dịch là tỷ lệ giữa số chuột có kết quả xét nghiệm anti-PRP dương tính trên tổng số chuột được gây miễn dịch

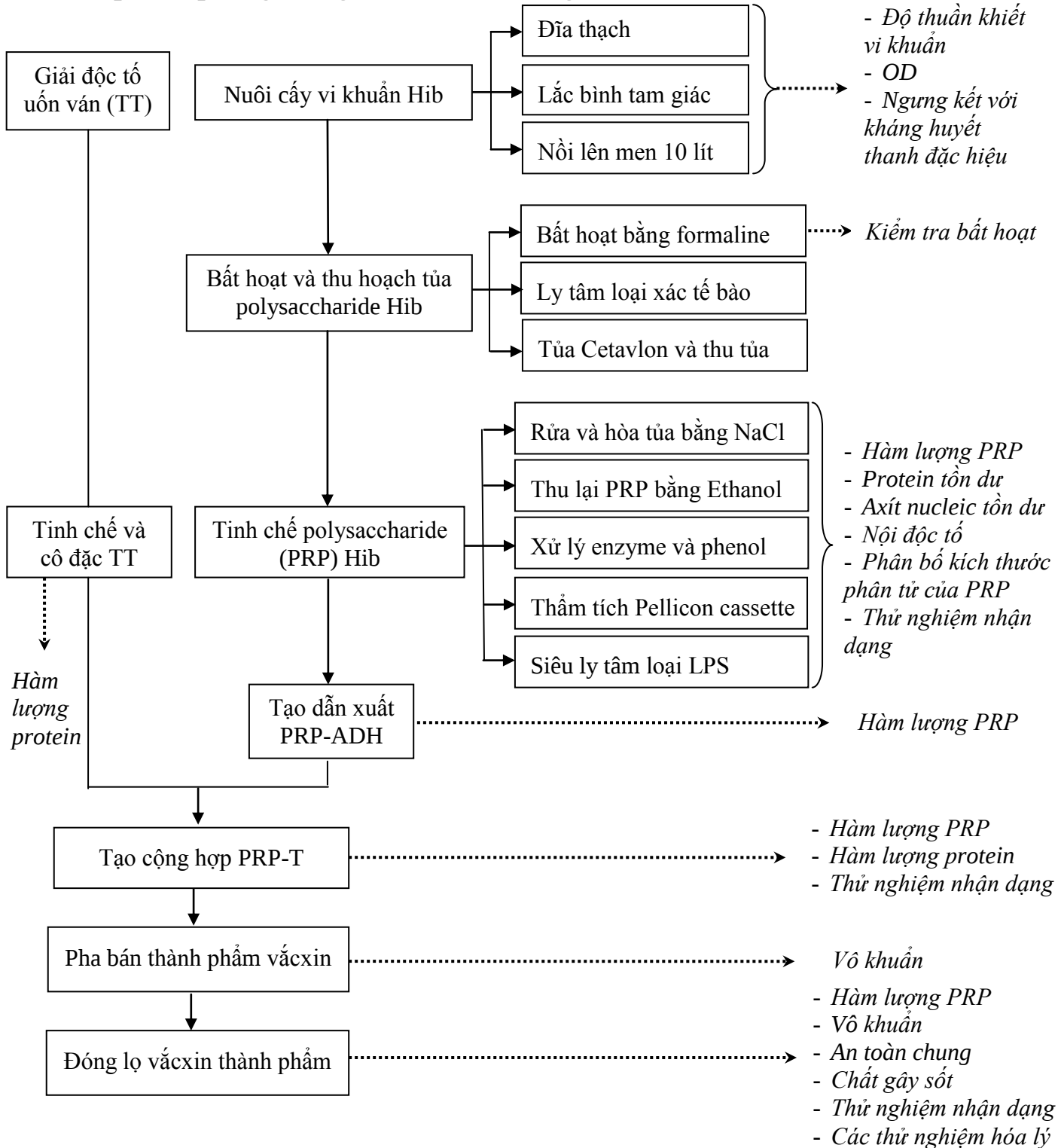
#Mức độ đáp ứng miễn dịch được xác định bằng giá trị trung bình nhân (GMT) của các hiệu giá kháng thể anti-PRP tính theo đơn vị quy đổi EL.U.

Kết quả trong Bảng 6.4 cho thấy, khi tiêm các dạng vắc xin Hib cộng hợp cho chuột đều cho đáp ứng ở liều tiêm sau cao hơn ở các so với các liều tiêm trước. Đáp ứng trên chuột này giống với đáp ứng có được ở trẻ nhỏ đặc biệt là trẻ dưới 2 tuổi, đó là không cho đáp ứng miễn dịch đối với

polysaccharide (PRP) không cộng hợp và cho đáp ứng trí nhớ đối với các liều nhắc lại của vắc xin Hib cộng hợp. Các nghiên cứu khác đã được thực hiện trên động vật thực nghiệm cũng cho những nhận định tương tự. Điều này cho thấy giá trị của mô hình động vật thực nghiệm nhằm đánh giá và lựa chọn các dạng vắc xin Hib cộng hợp cho hiệu quả tốt, phát triển thành các dạng vắc xin dự tuyển có thể sử dụng cho người [30]. Các dạng vắc xin Hib cộng hợp do VABIOTECH nghiên cứu sản xuất cho đáp ứng miễn dịch qua các liều tiêm đều tương đương hoặc cao hơn so với vắc xin đã được thương mại (Act-Hib). Đặc biệt, vắc xin dạng nước hấp phụ với nhôm phosphate cho đáp ứng miễn dịch rất cao. Điều này cho phép nghĩ đến việc phát triển vắc xin Hib cộng hợp dạng nước để có thể dễ dàng tiêm cũng như pha kết hợp với các vắc xin khác như bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B và bại liệt bất hoạt để tạo thành dạng vắc xin phối hợp tiêm phòng cho trẻ em.

KẾT LUẬN

1. Xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất vắc xin Hib cộng hợp ở qui mô phòng thí nghiệm đảm bảo tính ổn định và cho hiệu suất cao ở qui mô phòng thí nghiệm theo các công đoạn sau:



- Dựa trên quy trình công nghệ đã được xây dựng, 06 loại vắc xin Hib cộng hợp đã được sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm đạt các tiêu chuẩn chất lượng so với qui định của TCYTTG về các chỉ số : vô khuẩn , an toàn chung, chất gây sốt, hàm lượng PRP và hóa lý:
 - + Nhận dạng : đạt yêu cầu
 - + Vô khuẩn : vô khuẩn
 - + pH : đạt yêu cầu (giao động trong khoảng 6,346 - 6,369)
 - + Hàm lượng Thimerosal (%) : đạt yêu cầu (0,005 - 0,01)
 - + Hàm lượng PRP ($\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$): đạt yêu cầu (9,04 - 12).
 - + Hàm lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{ml}$) : đạt yêu cầu (290,32 - 346,05).
 - + An toàn chung trên chuột lang: đạt yêu cầu.
 - + An toàn chung trên chuột nhắt: đạt yêu cầu.
 - + Chất gây sốt: đạt yêu cầu (nhiệt độ tăng từ 0,1 - 0,8°C).

2. Xây dựng quy trình kiểm tra chất lượng và bảng tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp

2.1. *Xây dựng được các phương pháp kiểm tra chất lượng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm sau:*

- + Phương pháp kiểm tra vô khuẩn.
- + Phương pháp kiểm tra an toàn chung.
- + Phương pháp kiểm tra chất gây sốt.
- + Thử nghiệm nhận dạng.
- + Thử nghiệm định lượng polysaccharide trong vắc xin dạng lỏng và dạng đông khô.
- + Các thử nghiệm kiểm tra về hóa lý (xác định pH, thử nghiệm định lượng thimerosal, thử nghiệm định lượng nhôm trong vắc xin dạng lỏng,

thử nghiệm xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin dạng đông khô và thử nghiệm kiểm tra tính chất vật lý của vắc xin).

2.2. Xây dựng được bảng tiêu chuẩn cơ sở cho vắc xin Hib cộng hợp dạng lỏng

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn chấp thuận
1	Nhận dạng	<i>H. influenza</i> type b
2	Tính chất vật lý	Sau khi lắc, vắc xin có màu trắng hơi đục. Để lắng sau 1 giờ, vắc xin phải tách làm hai lớp, trong đó lớp nhôm phải tủa bông mịn, không vón cục.
3	Vô khuẩn	Không phát hiện thấy nấm và vi khuẩn phát triển sau 14 ngày theo dõi.
4	pH	6,0 - 7,5
5	Hàm lượng Thimerosal (%)	$\leq 0,012$
6	Hàm lượng PRP ($\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$)	8-12
7	Hàm lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	≤ 1250
8	An toàn chung trên chuột lang	Chuột khỏe mạnh, tăng trọng bình thường
9	An toàn chung trên chuột nhắt	
10	Chất gây sốt	Tổng T° tăng của 3 thử $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$ Nhiệt độ tăng của từng thử $< 0,6^{\circ}\text{C}$

3. Đánh giá tính an toàn và hiệu lực vắc xin trên động vật thí nghiệm

Kết quả đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc xin trên động vật thí nghiệm cho thấy vắc xin Hib cộng hợp sản xuất theo qui trình đã được xây dựng đều đạt yêu cầu về an toàn và công hiệu.

- + Cả hai dạng vắc xin Hib cộng hợp - dạng đông khô và dạng lỏng hấp phụ với nhôm đều đạt yêu cầu về tính an toàn khi kiểm tra trên động vật thực nghiệm.
- + Tìm ra được mô hình thực nghiệm thích hợp nhất cho việc đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin Hib cộng hợp trên chuột là chuột nhắt trắng ICR. Mô hình này được áp dụng cho việc đánh giá đáp ứng miễn dịch của cả các sản phẩm trung gian cũng như thành phẩm của quy trình sản xuất vắc xin Hib cộng hợp. Các dạng vắc xin Hib cộng hợp thành phẩm do VABIOTECH nghiên cứu sản xuất cho đáp ứng miễn dịch qua các liều tiêm đều tương đương hoặc cao hơn so với vắc xin đã được thương mại (Act-Hib). Đặc biệt, vắc xin dạng lỏng hấp phụ với nhôm cho đáp ứng miễn dịch cao.

KIẾN NGHỊ

- 1. Tiến hành thử nghiệm thực địa lâm sàng đánh giá tính an toàn và hiệu lực gây miễn dịch trên người tình nguyện**
- 2. Đánh giá tính ổn định và hiệu suất của quy trình sản xuất ở quy mô mở rộng.**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. **Đặng Đức Anh.** Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* và các vi rút hô hấp ở bệnh nhi dưới 5 tuổi viêm nhiễm đường hô hấp cấp tính. Đề tài Nghiên cứu khoa học cấp Bộ Y tế, 2003-2005.
2. **Phan Lê Thanh Hương.** Nghiên cứu vai trò gây bệnh viêm màng não mủ của *Haemophilus influenzae* type b ở trẻ em dưới 5 tuổi. Đề tài Nghiên cứu khoa học cấp Bộ Y tế, 1999-2001.
3. **Hoàng Thủy Long.** *Haemophylus influenzae*. Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học, 1991.

Tiếng Anh

4. **Akkoyunlu M., Melhus A., Capiou C., Van Opstal O., Forsgren A.** The acylated form of protein D of is more immunogenic than the nonacylated form and elicits an adjuvant effect when it is used as a carrier conjugated to polyribosyl ribitol phosphate. *Infect. Immun.*, 1997, 65, 5010-5016.
5. **Anderson P., Smith D.H.** Isolation of the capsular polysaccharide from culture supernatant of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.*, 1977, 15, 472-477.
6. **Anh DD, Kilgore PE, Kennedy WA, Nyambat B, Long HT, Jodar L, Clemens JD, Ward JI.** *Haemophilus influenzae* type b meningitis among children in Hanoi, Vietnam: epidemiology patterns and estimates of *H. influenzae* type b disease burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2006, 74(3), 509-515.

7. **Barbour M.L.** Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg. Infect. Dis.*, 1996, 2, 176-182.
8. **Bijlmer H.A., Van A.L.** A prospective, population-based study of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in The Gambia and the possible consequences. *J. Infect. Dis.*, 1992, 165 (Suppl. 1): S29-S32.
9. **CDC.** Progress toward eliminating *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children-United States, 1987-1997. *MMWR*, 1998, 47, 993-998.
10. **CDC.** Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children-United State, 1998-2000. *MMWR*, 2002, 51, 234-237.
11. **Chandran A., Watt J.P., Santosham M.** Prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease: past success and future challenges. *Expert Rev. Vaccines*, 2005, 4(6), 819-827.
12. **Chu C, Schneerson R, Robbins JB, Rastogi SC.** Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and Pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immune.*, 1983, 40(1): 245-256.
13. **Cochi S.L., Broom C.V.** Vaccine prevention of *Haemophilus influenzae* type b: past, present and future. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1986, 5, 12-19.
14. **Costantino P., Norelli F., Giannozzi A., D'Ascenzi S., Bartoloni A.** Size fraction of bacterial capsular polysaccharides for their use in conjugate vaccines. *Vaccine*, 1999, 17, 1251-1263.
15. **Cuervo M.L.C., Perez L.R., Oviedo M., Costa L., Perdomo V.** Relationship among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine. *Vaccine*, 2007, 25, 194-200.

- 16. Dagan R. et al.** Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infection and immunity*, 1998, 66, 2093-2098.
- 17. Decker M.D, Edwards K.M.** *Haemophilus influenzae* type b vaccines: history, choice and comparisons. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1998, 17: S113-S116.
- 18. Eskola J. et al.** A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 323, 1381-1387.
- 19. European Pharmacopoeia.** *Haemophilus* type b conjugate vaccine, 2001.
- 20. Goncalves V.M.M., Takagi M., Carmo T.S., Lima R.B., Albani S.M.F., Pinto J.V., Zangirolami T.C., Giordano R.C., Tanizaki M.M., Cabrera-Crespo J.** Simple and efficient method of bacterial polysaccharides purification for vaccines production using hydrolytic enzymes and tangential flow ultrafiltration. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 2007, 27, 450-457.
- 21. Goncalves V.M.M., Takagi M., Lima R.B., Massaldi H., Giordano R.C., Tanizaki M.M.** Purification of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F by a procedure suitable for scale-up. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 37, 283-287.
- 22. Heath P.T.** *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine: a review of efficacy data. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1998, 17, S117-S122.
- 23. Hennessey J.P., Bednar B., Manam V.** Molecular size analysis of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Liquid Chromatography*, 1993, 16(8), 1715-1729.

- 24. Ho M.M., Mawas F., Bolgiano B., Lemercinier X., Crane D.T., Huskisson R., Corbel M.J.** Physico-chemical and immunological examination of the thermal stability of tetanus toxoid conjugate vaccines. *Vaccine*, 2002, 20, 3509-3522.
- 25. Kanra G., Kara A., Demiralp O., Contorni M., Hilbert A.K., Spyr C., Viviani S.** Safety and immunogenicity of a new fully liquid DTPw-HepB-Hib combination vaccine in infants. *Human vaccines*, 2006, 2(4), 155-160.
- 26. Kelly D.F., Moxon E.R., Pollard A.J.** *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Immunology*, 2004, 113, 163-174.
- 27. Lau Y.L.** *Haemophilus influenzae* type b diseases in Asia. *Bull. World. Health. Org.*, 1999, 77, 867-868.
- 28. Lee C.Y. et al.** An evaluation of the safety and immunogenicity of a five-component acellular pertussis, diphtheria, and tetanus toxoid vaccine (DTaP) when combined with a *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine (PRP-T) in Taiwanese infants. *Pediatrics*, 1999, 103, 25-30.
- 29. Lei Q.P., Lamb D.H., Heller R., Pietrobon P.** Quantitation of low level unconjugated polysaccharide in tetanus toxoid-conjugate vaccine by HPAEC/PAD following rapid separation by deoxycholate/HCl. *J. Pharmaceu. Biomed. Analysis*, 2000, 21, 1087-1091.
- 30. Madore D.V., Strong N., Eby R.** Use of animal testing for evaluating glycoconjugate vaccine immunogenicity. *Dev. Biol. Stand.*, 1999, 101, 40-56.
- 31. Mawas F., Bolgiano B., Rigsby P., Crane D., Belgrave D., Corbel M.J.** Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO international standard for *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide. *Biologicals*, 2007, 35, 235-245.

- 32. Meissner H.C, Pickering L.K.** Control of disease attributable to *Haemophilus influenzae* type b and national immunization program. *Pediatr.*, 2002, 110(4), 820-823.
- 33. NVI.** International course on quality control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines, 2008.
- 34. Peltola H. et al.** Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infection with the capsular polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 1984, 310, 1561-1566.
- 35. Peltola H.** *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Europe: lessons learned. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1998, 17, S126-S132.
- 36. Plumb J.E., Yost S.E.** Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Vaccine*, 1996, 14(5), 399-404.
- 37. Prymula R. et al.** Pneumococcal capsular polysaccharide conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomized double-blind efficacy study. *Lancet*, 2006, 367, 740-748.
- 38. Ramsay M.E. et al.** Estimating *Haemophilus influenzae* type b vaccine effectiveness in England and Wales by use of screening method. *J. Infect. Dis.*, 2003, 188, 481-485.
- 39. Ravenscroft N., Averani G., Bartoloni A., Berti S., Bigio M., et al.** Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccine. *Vaccine*, 1999, 17, 2802-2816.
- 40. Schneerson R, Barrera O, Sutton A, Robbins J.** Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate. *J. Exper. Med.*, 1980, 152, 361-376.

- 41. Shafer D.E., Toll B., Schuman R.F., Nelson B.L., Mond J.J., Lees A.** Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccine and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. *Vaccine*, 2000, 18, 1273-1281.
- 42. Shao P.L. et al.** Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Taiwan, 1997 and 2000, *J. Micro. Immun. Infect.*, 2004, 37, 164-168.
- 43. Siber G.R, Anderson R, Habafy M, Gupta R.** Development of a guinea pig model to assess immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugate vaccines. *Vaccine*, 1995, 13(6), 525-531.
- 44. Sturgess A.W., Rush K., Charbonneau R.J., Lee J. I., West D.J., Sitrin R.D., Hennessey J.P.** *Haemophilus influenzae* type conjugate vaccine stability: catalytic depolymerization of PRP in the presence of aluminum hydroxide. *Vaccine*, 1999, 17, 1169-1178.
- 45. Sukupolvi-Petty S., Grass S., St Geme J.** The *Haemophilus influenzae* type b hcsA and hcsB gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. *J. Bacte.*, 2006, 188, 3870-3877.
- 46. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Baruque-Ramos J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M.** Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2003, 110, 91-100.
- 47. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M.** Improved cultivation condition for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. *J. Chem. Technol. Biotech.*, 2006, 81, 182-188.

- 48. Takagi M., Lima R.B., Albani S.M.F., Zangirolami T.C., Tanizaki M.M., Cabrera-Crespo J.** Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 26, 10-15.
- 49. Takana A.K. et al.** Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland before vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr. Infect. Dis.J.*, 1989, 8, 297-302.
- 50. Tanizaki M.M., Garcia L.R., Ramos J.B., Leite L.C.C., Hiss H., Furuta J.A., Cabrera-Crespo J., Raw I.** Purification of meningococcal group C polysaccharide by procedure suitable for scale-up. *J. Microbiol. Methods*, 1996, 27, 19-23.
- 51. Tosi M.F.** Innate immune responses to infection. *J. Aller. Clin. Immun.*, 2005, 116, 241-249.
- 52. Tran TT, Le QT, Tran TN, Nguyen NT, Pedersen FK, Schlumberger M.** The etiology of bacterial pneumonia and meningitis in Vietnam. *Pediatr Infect Dis J*, 1998, 17, S192-194.
- 53. US Patent.** Vaccine composition containing polyribosylribitol phosphate and method for making same. 2001.
- 54. Ward J.I. et al.** *Haemophilus influenzae* type b anticapsular antibody responses to PRP-pertussis and PRP-D vaccines in Alaska native infants. *J. Infect. Dis.*, 1988, 158, 719-723.
- 55. Watt J.P., Levine O.S., Santosham M.** Global reduction of Hib disease: what are the next steps? Proceedings of the meeting Scottsdale, Arizona, September 22-25, 2002. *J. Pediatr.*, 2003, 143, S163-S187.

- 56. Wenger J.D.** Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease and impact of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in the United States and Canada. *Pediatr. Infect. Dis.J.*, 1998, 17, S132-S136.
- 57. WHO.** Introduction of *Haemophilus influenzae* type b vaccine into immunization programmes. *Department of vaccines and biologicals*, 2000.
- 58. WHO.** Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *WHO technical report series*, 2000, No 897, Annex 1.
- 59. WHO.** WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 2006, 81, 445-452.
- 60. WHO.** The immunological basis for immunization series; Module 9: *Haemophilus influenzae* type b. *Department of immunization, vaccines and biologicals*, 2007.