

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hà Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH PHỐI TRỘN
VẮC XIN CÚM MÙA BỐN CHỨNG DẠNG MẢNH Ở QUY MÔ
SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Nha Trang – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hà Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH PHỐI TRỘN
VẮC XIN CÚM MÙA BỐN CHỦNG DẠNG MẢNH Ở QUY MÔ
SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

Hướng dẫn 1: TS. Dương Hữu Thái 

Hướng dẫn 2: TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh 

Nha Trang – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận văn Thạc sĩ “*Nghiên cứu quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô sản xuất thử nghiệm*” là công trình nghiên cứu của riêng cá nhân tôi và nhóm nghiên cứu, không sao chép của ai. Do tôi và nhóm nghiên cứu tự nghiên cứu, đọc, dịch tài liệu, tổng hợp và thực hiện. Nội dung lý thuyết trong luận văn tôi có sử dụng một số tài liệu tham khảo như đã trình bày trong phần tài liệu tham khảo. Các số liệu, chương trình phần mềm và những kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước Học viện Khoa học và Công nghệ nếu phát hiện bất cứ sự sai phạm hay sao chép trong đề tài này!

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Hà Thị Hoa

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp với đề tài *“Nghiên cứu quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô sản xuất thử nghiệm”*, lời đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS. Dương Hữu Thái - Viện trưởng Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã trực tiếp hướng dẫn, truyền đạt kiến thức chuyên môn, tận tình chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh - Phó Viện trưởng Viện Nghiên cứu ứng dụng và Công nghệ Nha Trang đã định hướng, dìu dắt, tận tình hướng dẫn và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi có thể hoàn thành bài luận văn của mình.

Qua đây, tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới lãnh đạo Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, lãnh đạo phòng Vắc xin Thành phẩm và lãnh đạo phòng Kiểm định tế cùng toàn thể anh chị em đồng nghiệp đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ để tôi hoàn thành chương trình cao học.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo, Khoa Công nghệ Sinh học, Thầy Cô giáo đã tận tình giảng dạy và hướng dẫn giúp tôi có thể hoàn thành luận văn và mọi thủ tục cần thiết.

Xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, những người thân đã luôn động viên và cổ vũ tinh thần cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện luận văn này.

Hiện tại, đề tài của tôi đã hoàn thành nhưng không tránh khỏi những sai sót. Kính mong nhận được sự góp ý chân thành từ quý Thầy Cô, đồng nghiệp và các bạn để luận văn được hoàn thiện tốt hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Hà Thị Hoa

MỤC LỤC

	Trang
MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	3
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	5
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	7
MỞ ĐẦU	8
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	10
1.1. TỔNG QUAN VỀ VI RÚT CÚM	10
1.1.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc	10
1.1.2. Tính chất kháng nguyên.....	12
1.2. TỔNG QUAN VỀ VẮC XIN CÚM.....	12
1.2.1. Sự phát triển của vắc xin cúm.....	12
1.2.2. Các loại vắc xin cúm mùa.....	14
1.3. CÁC CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA.....	15
1.3.1. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm mùa trên trứng gà có phôi.....	15
1.3.2. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên tế bào	16
1.3.3. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm tái tổ hợp	17
1.3.4. Một số công nghệ sản xuất vắc xin cúm mới.....	17
1.4. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA.....	18
1.4.1. Trên Thế giới.....	19
1.4.2. Tại Việt Nam.....	20
1.4.3. Tiêu chuẩn của vắc xin	23
1.4.4. Phát triển sản xuất vắc xin cúm mùa 4 chủng tại IVAC.....	24
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	26
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU	26
2.2.1. Nước cốt cúm mùa một chủng.....	26
2.2.2. Sinh phẩm chuẩn	26

2.2.3. Dung dịch và hóa chất	27
2.2.4. Động vật thí nghiệm	27
2.2.5. Máy móc thiết bị chính	27
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu.....	28
2.3.2. Phương pháp kiểm tra chất lượng sản phẩm.....	36
2.3.3. Xử lý thống kê.....	38
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	39
3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG NGUYÊN LIỆU NƯỚC CỐT CÚM ĐƠN CHỦNG	39
3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÍNH TƯƠNG THÍCH GIỮA CÁC THÀNH PHẦN KHÁNG NGUYÊN CÚM.....	44
3.3. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHỐI TRỘN.....	46
3.3.1. Đánh giá kết quả phối trộn thử nghiệm vắc xin cúm mùa bốn chủng	46
3.3.2. Xây dựng quy trình phối trộn.....	48
3.4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM.....	49
3.4.1. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng tại NICVB	50
3.4.2. Kết quả thử nghiệm trên động vật thí nghiệm tại IVAC	50
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	74
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	76

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tên đầy đủ (Tiếng Anh)	Ghi chú (Tiếng Việt)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh
ĐĐVN		Dược Điển Việt Nam
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axít Deoxyribonucleic
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm miễn dịch enzyme liên kết
EU	Endotoxin Unit	Đơn vị nội độc tố
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm, Hoa kỳ
GMP	Good manufacturing Practice	Thực hành sản xuất tốt
HA	Hemagglutinin	Kháng nguyên bề mặt vi rút cúm
HI (HAI)	Hemagglutination Inhibition	Sự ức chế ngưng kết hồng cầu
IIV	Inactivated influenza vaccine	Vắc xin cúm bất hoạt
IVAC	Institute of Vaccines and Medical Biologicals	Viện vắc xin và Sinh Phẩm Y tế
LAIV	Live attenuated influenza vaccine	Vắc xin cúm sống giảm độc lực
NA	Neuraminidase	Enzyme cắt axít neuraminic
NICVB	National Institute for Control of Vaccine and Biologicals	Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế
PBS	Phosphate Buffer Saline	Dung dịch đệm photphat

Ký hiệu	Tên đầy đủ (Tiếng Anh)	Ghi chú (Tiếng Việt)
QIV	Quadrivalent Influenza Vaccine	Vắc xin cúm mùa bốn chủng
RNA	Ribonucleic acid	Axít Ribonucleic
SRID	Single radial immune diffusion	Khuếch tán miễn dịch vòng đơn
TCCL		Tiêu chuẩn chất lượng
TCCS		Tiêu chuẩn cơ sở
TIV	Trivalent Influenza Vaccine	Vắc xin cúm mùa ba chủng
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
WHO - TRS	WHO- Technical Report Series	Tổ chức Y tế Thế giới – Báo cáo kỹ thuật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: Công thức thành phần phối trộn các cặp kháng nguyên	29
Bảng 2.2: Công thức thành phần phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng (2.000 liều/lô – 1.000 ml/lô).....	30
Bảng 2.3: Tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm vắc xin cúm mùa 4 chủng dự kiến.....	32
Bảng 2.4: Công thức thành phần phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng (10.000 liều/lô – 5.000 ml/lô).....	33
Bảng 2.5: Thiết kế nghiên cứu tính sinh miễn dịch	34
Bảng 2.6: Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin IVACFLU-4S ở điều kiện bảo quản thực $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	35
Bảng 0.7: Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin IVACFLU-4S ở điều kiện thúc đẩy nhanh $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	35
Bảng 0.8: Các chỉ tiêu và thời gian đánh giá tính ổn định trong điều kiện bảo quản thực $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	35
Bảng 0.9: Các chỉ tiêu và thời gian đánh giá tính ổn định thúc đẩy nhanh $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	36
Bảng 3.1: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm A/H1N1	39
Bảng 3.2: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm A/H3N2.....	40
Bảng 3.3: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm B/Victoria.....	41
Bảng 3.4: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm B/Yamagata.....	42
Bảng 3.5: TCCL nước cốt pha vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh.....	43
Bảng 3.6: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm A/H1N1 với cúm B/Yamagata.....	44
Bảng 3.7: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm A/H3N2 với cúm B/Yamagata.....	45
Bảng 3.8: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm B/Victoria với cúm B/Yamagata.....	45

Bảng 3.9: Kết quả đánh giá các chỉ tiêu của quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh	47
Bảng 3.10: Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng tại NICVB.....	50
Bảng 3.11: Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột nhắt của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S	51
Bảng 3.12: Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột lang của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S	52
Bảng 3.13: Kết quả đo nhiệt độ của thử thử chất gây sốt	53
Bảng 0.14: Tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể trung bình nhân (GMT) của huyết thanh chuột miễn dịch trước và sau tiêm vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU Quadrivalent	57
Bảng 3.15: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 02.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	60
Bảng 3.16: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 02.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	61
Bảng 3.17: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 03.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	62
Bảng 3.18: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 03.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	63
Bảng 3.19: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 04.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	64
Bảng 3.20: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 04.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	65
Bảng 3.21: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S lô 02.23 ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	70
Bảng 3.22: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S lô 03.23 ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	71
Bảng 3.23: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S lô 04.23 ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	72

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1: Hình thái cấu trúc vi rút cúm	10
Hình 1.2: Sơ đồ sự phát triển của vi rút cúm và vắc xin cúm.....	13
Hình 1.3: Sơ đồ quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 3 chủng tại IVAC.....	22
Hình 2.1: Sơ đồ thiết kế nghiên cứu.....	28
Hình 2.2: Sơ đồ quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dự kiến	31
Hình 3.1: Quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh	50
Hình 3.2: Sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S	51
Hình 3.3: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng A/Victoria/2570/2019 (H1N1) của chuột nhắt giữa D0, D21 và D35	55
Hình 0.4: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng A/Darwin/9/2021 (H3N2) của chuột nhắt giữa D0, D21 và D35	56
Hình 0.5: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria lineage) của chuột nhắt giữa D0, D21 và D35.....	56
Hình 0.6: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage) của chuột nhắt giữa D0, D21 và D35	57
Hình 0.7: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	67
Hình 0.8: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 03.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	67
Hình 0.9: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 04.23 ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	68
Hình 0.10: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	68
Hình 0.11: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 03.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	69
Hình 0.12: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 04.23 ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$	69

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Cúm là một bệnh hô hấp cấp tính do vi rút RNA gây ra thuộc họ *Orthomyxoviridae* và lây truyền chủ yếu qua các giọt bắn do ho và hắt hơi bởi những người bị nhiễm bệnh. Bệnh cúm rất phổ biến trong cộng đồng và phân bố rộng khắp toàn cầu, gây bệnh cho cộng đồng và có khả năng bùng phát thành đại dịch mang tính toàn cầu như đại dịch cúm Tây Ban Nha năm 1918, do vi rút cúm A/H1N1 gây tử vong khoảng 40-50 triệu người; đại dịch cúm năm 1968, do vi rút cúm A/H3N2 phát hiện ban đầu ở Hồng Kông sau đó lan rộng sang Hoa Kỳ và nhiều châu lục khác, ước tính gây tử vong khoảng một triệu người trên toàn thế giới [1]. Đặc trưng của vi rút cúm là tỷ lệ đột biến cao, dẫn đến sự xuất hiện của các biến thể kháng nguyên mới với khả năng lẩn tránh khỏi hệ thống miễn dịch được tạo ra bởi các loại vắc xin hoặc quá trình nhiễm bệnh trước đó. Vì vậy, tạo điều kiện cho vi rút cúm dễ dàng lây truyền từ người sang người [2].

Bệnh cúm có thể phòng ngừa bằng vắc xin và tiêm vắc xin trở thành chiến lược hiệu quả nhất để phòng ngừa và kiểm soát nhiễm vi rút cúm mùa, đồng thời giảm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong liên quan đến cúm [3]. Tuy nhiên, thành phần kháng nguyên được lựa chọn của vắc xin không phải lúc nào cũng phù hợp với các chủng vi rút đang lưu hành. Hiện nay, hai phân nhóm cúm A (A/H1N1 và A/H3N2) và hai dòng cúm B (B/Victoria và B/Yamagata) đã lưu hành trên toàn thế giới, trong khi vắc xin cúm thương mại ba chủng chứa hai phân nhóm A nhưng chỉ có một dòng cúm B (B/Victoria hoặc B/Yamagata). Do vậy, các vắc xin này có hạn chế về khả năng tạo đáp ứng miễn dịch.

Trong mùa cúm từ năm 2001 - 2002 và 2010 - 2011, dòng cúm B lưu hành chủ yếu là khác với dòng được chọn cho vắc xin. Do đó, hiệu quả của các chiến dịch tiêm phòng cúm mùa bị hạn chế trong việc chống lại dịch cúm B mà một tỷ lệ đáng kể bệnh do các chủng cúm B khác dòng gây ra. Năm 2012, WHO và FDA khuyến cáo cần phải có vắc xin cúm bốn chủng, chứa chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và chủng cúm B dòng B/Victoria và B/Yamagata, nhằm cải thiện khả năng bảo vệ chống lại vi rút cúm B và giảm tỷ lệ mắc bệnh cúm B. Chính vì vậy, với nền tảng công nghệ sản xuất vắc xin cúm mùa ba chủng trên trứng gà có phôi hiện có, IVAC đã triển khai nghiên

cứu phát triển sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng. Trong đó, đề tài **“Nghiên cứu quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô sản xuất thử nghiệm”** là một phần trong dự án nghiên cứu này.

Mục đích nghiên cứu

Xây dựng được quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh tại IVAC với các chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và hai chủng cúm B/Victoria và B/Yamagata.

Ứng dụng quy trình đã xây dựng vào sản xuất ở quy mô thử nghiệm và đánh giá chất lượng lô sản phẩm theo tiêu chuẩn của WHO/ ĐĐVN.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ý nghĩa khoa học: Kết quả của đề tài là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng, phát triển công nghệ đối với các vắc xin khác hiện đang được nghiên cứu tại IVAC.

Ý nghĩa thực tiễn: Kết quả nghiên cứu khẳng định sự thành công của quy trình sản xuất vắc xin cúm mùa bốn chủng, tạo tiền đề quan trọng cho IVAC tiếp tục nâng quy mô phát triển sản xuất và thương mại hóa sản phẩm.

Nội dung nghiên cứu

- Thiết lập tiêu chuẩn cho nguyên liệu nước cốt cúm mùa đơn chủng A/H1N1, chủng A/H3N2, chủng cúm B/Victoria và B/Yamagata.

- Đánh giá tính tương thích giữa các thành phần cúm A/H1N1, A/H3N2, cúm B/Victoria, B/Yamagata và khả năng tương tác chéo giữa các chủng cúm.

- Xây dựng quy trình phối trộn.

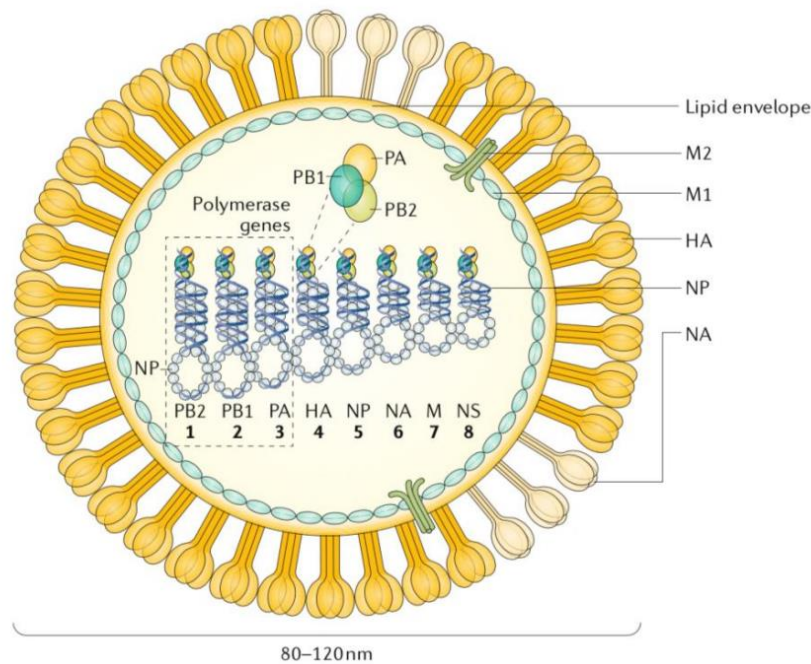
- Sản xuất thử 3 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô 10.000 liều/lô với quy trình đã xây dựng và đánh giá chất lượng sản phẩm theo tiêu chuẩn của WHO/ĐĐVN.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ VI RÚT CÚM

1.1.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc

Vi rút cúm thuộc họ *Orthomyxoviridae* trong hệ thống phân loại chung, có 3 phân nhóm huyết thanh A, B và C trong đó vi rút cúm A được chia thành nhiều phân tuýp (type) dựa trên kháng nguyên bề mặt ngưng kết hồng cầu Hemagglutinin (HA) và Neuraminidase (NA), vi rút cúm A có khả năng đột biến cao.



Hình 1.1: Hình thái cấu trúc vi rút cúm

Nguồn: doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y [4]

Vi rút cúm (virion) có hình cầu hoặc hình khối đa diện, đường kính 80 - 120 nm. Cấu tạo hạt vi rút gồm vỏ (capsid), vỏ bọc ngoài (envelope) và lõi là RNA sợi đơn âm. Trên bề mặt có các HA và NA mang bản chất kháng nguyên và khác nhau giữa các type vi rút và các chủng (subtype). Kháng thể của kháng nguyên HA là yếu tố quyết định chủ yếu sự miễn dịch đối với vi rút cúm, trong khi những kháng thể của kháng nguyên NA giới hạn sự lây truyền và góp phần làm giảm nhiễm vi rút. Bộ gen vi rút cúm A và B gồm 8 phân đoạn RNA riêng biệt được sắp xếp theo thứ tự (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M và NS) có 890 - 2341 nucleotid, mã hoá các protein cấu trúc và phi

cấu trúc (Hình 1.1). Vi rút cúm A là loại có khả năng biến đổi kháng nguyên bề mặt mạnh nhất bằng cách biến đổi cấu trúc kháng nguyên HA và NA, có 16 loại HA (từ H1 đến H16) và 9 loại NA (từ N1 đến N9) tức là có tất cả 144 tập hợp các loại vi rút cúm A. Nhờ bộ gen nhiều phân đoạn giúp vi rút có khả năng biến đổi cấu trúc kháng nguyên để tạo thành chủng vi rút cúm mới. Lệch/trượt kháng nguyên (*antigenic shift*) và trộn/trôi kháng nguyên (*antigenic drift*) là hai kiểu thay đổi kháng nguyên của vi rút cúm. Lệch/trượt kháng nguyên là sự thay đổi di truyền quan trọng do sự tái tổ hợp gen giữa các chủng khác nhau tạo ra. Trộn/trôi kháng nguyên là do đột biến ngẫu nhiên xảy ra ở gen mã hóa cho HA dẫn đến sự thay đổi một số acid amin trong protein HA [5], [6].

Vi rút cúm A có nhiều chủng gây bệnh cho người và động vật trong đó có những chủng có khả năng lây nhiễm cao, gây bệnh nặng hoặc dẫn tới tử vong như A/H1N1, A/H5N1, A/H3N2... Khác với cúm A, vi rút cúm B ít biến đổi cấu trúc kháng nguyên hoặc tương tác chéo kháng nguyên giữa hai dòng thấp nên thường gây ra các bệnh cúm thông thường, diễn biến nhẹ và tản phát, có thể gây ra các vụ dịch do bản thân nó hoặc kết hợp với các vi rút gây viêm đường hô hấp khác. Các bệnh do vi rút cúm C hiếm xảy ra [5], [6], [7].

Vi rút cúm lây truyền theo đường hô hấp, người mắc bệnh hít phải các giọt nhỏ chứa vi rút được phát tán từ đường hô hấp của người đang mắc bệnh hoặc từ gia cầm nhiễm bệnh sang người... Hiện nay, chưa có đủ cơ sở để khẳng định có sự lây truyền từ người sang người của một số chủng vi rút cúm như cúm A/H5N1 và A/H7N9, tuy nhiên điều này hoàn toàn có thể xảy ra và khi đó nguy cơ lan rộng dẫn đến đại dịch gây nguy hiểm cho cộng đồng. Bệnh cúm có khả năng lây nhiễm cao với tất cả mọi người, đặc biệt ở người lớn và trẻ em tỷ lệ có thể lên tới 90% với các chủng vi rút cúm mới. Sau khi bị bệnh, cơ thể sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chủng vi rút gây nhiễm. Thời gian miễn dịch phụ thuộc vào mức độ biến đổi kháng nguyên và số lần bị nhiễm trong quá khứ. Miễn dịch thu được sau khi khỏi bệnh không bảo vệ được khỏi mắc các biến chủng khác của vi rút cúm. Trẻ em, người già, người đang mắc các bệnh mãn tính, suy giảm miễn dịch thường dễ cảm nhiễm hơn những người khác [6], [8].

1.1.2. Tính chất kháng nguyên

Hemagglutinin và Neuraminidase là hai kháng nguyên đóng vai trò quan trọng, thể hiện độc tính của vi rút cúm.

Hemagglutinin (HA): HA là một glycoprotein gồm 1.742 - 1.778 nucleotide mã hóa cho 562 - 566 axit amin, hình nấm, nhô ra từ màng lipid của vi rút, phía ngoài có tán hình cầu. HA có khả năng gây ngưng kết hồng cầu của các động vật máu nóng. HA mang tính chất kháng nguyên có khả năng gắn vào thụ thể đặc hiệu của tế bào chủ. Protein HA có hình trụ, cấu tạo gồm 2 đơn phân (monomer) là HA1 (36 kDa) là phần tự do chứa vị trí gắn vào thụ thể thích hợp trên bề mặt màng của tế bào đích và HA2 (27 kDa) gắn vào mặt ngoài capsid. HA1 và HA2 liên kết với nhau bởi các cầu nối disulfide (-S-S-).

Trong một số nghiên cứu gần đây cho thấy, tốc độ tiến hóa ở vùng đầu của HA nhanh hơn vùng thân và vùng gốc khi nghiên cứu về sự tiến hóa của các phân đoạn HA trên cúm H1N1, H3N2 và cúm B. Kháng thể kháng vùng thân HA có khả năng tương tác chéo giữa các vi rút cúm A, kể cả tương tác chéo với vi rút cúm B [11], [12], [13].

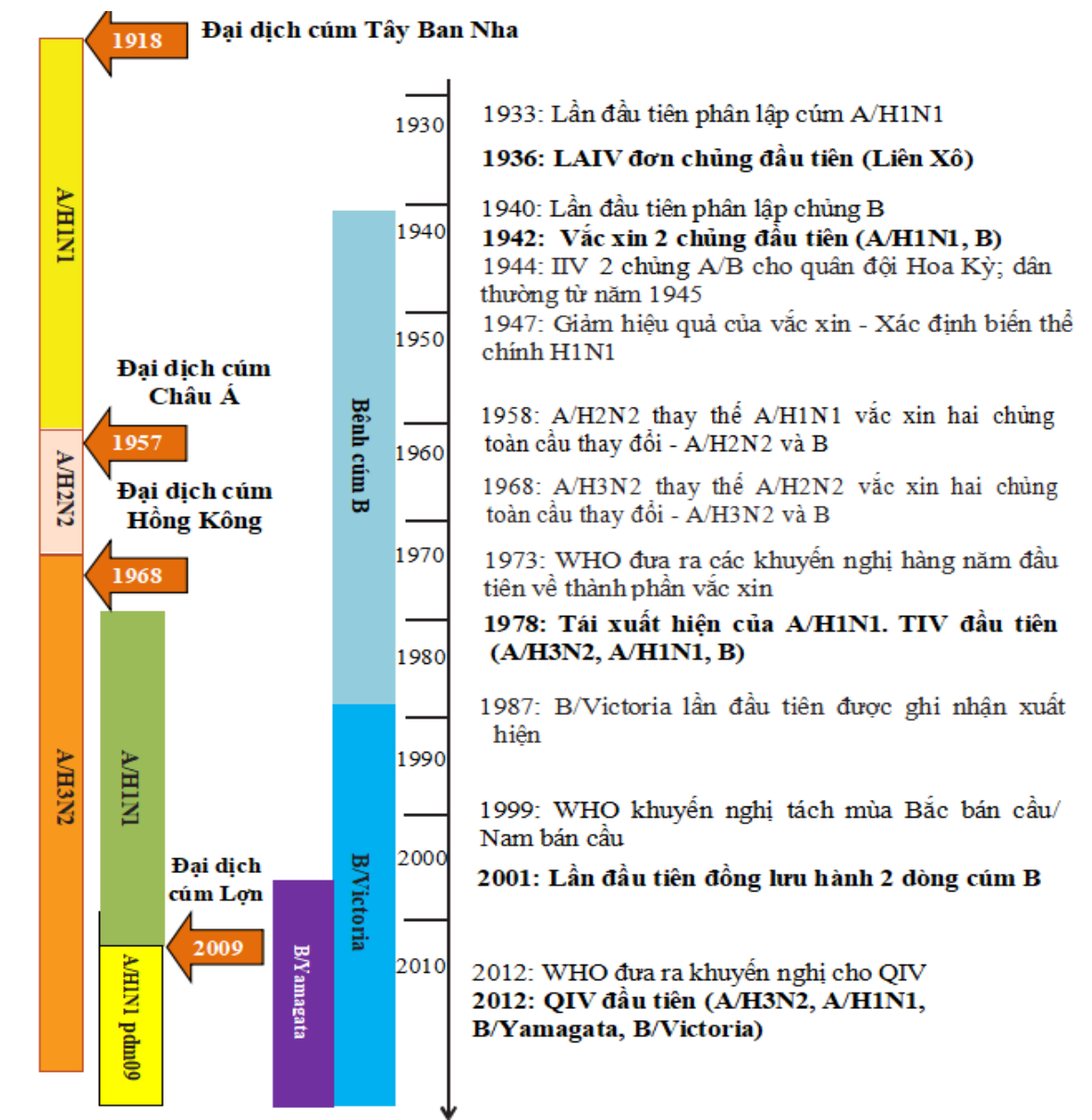
Enzyme neuraminidase (NA): NA là một glycoprotein, có dạng nút lồi hình cây trên bề mặt vỏ của vi rút cúm. NA có hai phần: phần phía ngoài gồm 4 monomer hình cầu trên cùng mặt phẳng, vùng còn lại là vùng kỵ nước gắn vào màng vi rút. NA có chức năng phân cắt axit sialic bằng cắt các liên kết glycoside nối nhóm keto với D-glactose hoặc D-glactosesamine của axit neuraminic. Phản ứng này cho phép vi rút vượt qua lớp niêm dịch để tới được các tế bào biểu mô của đường hô hấp trong quá trình nhiễm trùng. Đồng thời việc loại bỏ axit neuraminic của phân tử NA giúp các vi rút mới được tổng hợp phóng thích ra ngoài tế bào và gia tăng khả năng gây nhiễm trùng. Vi rút cúm có 9 phân tuýp NA, được kí hiệu từ N1 đến N9. Cho đến nay, các vụ dịch xảy ra ở người được xác định chỉ có N1, N2 [9], [10].

1.2. TỔNG QUAN VỀ VẮC XIN CÚM

1.2.1. Sự phát triển của vắc xin cúm

Cách đây gần 90 năm vào năm 1933, vi rút cúm lần đầu tiên được phân lập đã làm tiền đề cho sự phát triển của các loại vắc xin sau này. Đầu tiên là

vắc xin sống giảm độc lực, sau đó là vắc xin cúm bất hoạt một chủng (chủng cúm A). Năm 1942, vắc xin hai chủng được sản xuất sau khi phát hiện ra cúm B. Từ đó, con người đã phát hiện ra vi rút cúm bị biến đổi kháng nguyên do đột biến. Kể từ năm 1973, WHO đã đưa ra các khuyến nghị hàng năm về thành phần của vắc xin cúm dựa trên kết quả từ các hệ thống giám sát xác định các chủng hiện đang lưu hành. Năm 1978, vắc xin ba chủng đầu tiên bao gồm hai chủng cúm A và một chủng cúm B đã được nghiên cứu sản xuất. Từ năm 1999, WHO đưa ra các khuyến nghị riêng biệt cho mùa dịch Bắc bán cầu và Nam bán cầu. Hiện nay, có 2 dòng cúm B đang đồng lưu hành trên toàn thế giới [14], [15], [16] (Hình 1.2).



Hình 1.2: Sơ đồ sự phát triển của vi rút cúm và vắc xin cúm [14]

1.2.2. Các loại vắc xin cúm mùa

Hiện nay, có ba loại vắc xin phòng cúm mùa đang được cấp phép và lưu hành trên toàn cầu gồm vắc xin bất hoạt, vắc xin sống giảm độc lực và vắc xin tái tổ hợp. Cả ba loại vắc xin trên đều là vắc xin đa giá, thành phần kháng nguyên được lựa chọn đại diện cho vi rút cúm A và vi rút cúm B được dự đoán sẽ lưu hành trong mùa cúm tiếp theo [17].

1.2.2.1. Vắc xin bất hoạt

Vắc xin bất hoạt gồm các phân tử vi rút cúm được bất hoạt bằng hóa chất như formalin, beta-propiolactone hoặc ether. Mỗi liều vắc xin có chứa 15µg kháng nguyên HA của mỗi chủng vi rút, được dùng để tiêm bắp. Vắc xin bất hoạt gồm các loại: vắc xin toàn hạt vi rút (*Whole virion*), vắc xin dạng mảnh (*Split*) và vắc xin tiểu phần (*Subunit*). Vắc xin cúm mùa bất hoạt ba chủng (TIV) gồm chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và một dòng vi rút cúm B. Trong khi thành phần vắc xin cúm mùa bất hoạt bốn chủng (QIV) có thêm một dòng vi rút cúm B so với TIV.

Để tăng hiệu quả đáp ứng miễn dịch cho vắc xin cúm bất hoạt, hiện nay người ta thêm các tá chất trong công thức sản xuất vắc xin cúm: MF-59, hợp chất nhôm. Đây là hai loại tá chất được cấp phép sử dụng cho vắc xin cúm ở Mỹ và Châu Âu [18], [19]. Ngoài ra, một chiến lược sản xuất vắc xin mới đang phát triển bằng việc sử dụng các hạt nano. Tập đoàn Novavax đã nghiên cứu giai đoạn tiền lâm sàng cho vắc xin cúm dựa trên hạt nano. Chính vì vậy, NanoFlu sẽ sớm tiến hành nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I [20].

1.2.2.2. Vắc xin sống giảm độc lực

Vắc xin sống giảm độc lực (LAIV) được phát triển trên cơ sở kỹ thuật di truyền để tạo ra các chủng vi rút cúm có đặc tính thích ứng lạnh do đột biến, không có khả năng gây bệnh cho người, các chủng vi rút này được lai ghép gen mã hoá tổng hợp HA và NA. Chủng mới sao chép thuận lợi ở 25°C nhưng trong cơ thể người (nhiệt độ 35 - 37°C) vi rút sẽ bị nhược độc. Vắc xin LAIV hiệu quả cao, miễn dịch liều đơn 0,5 ml và chỉ sử dụng cho người từ 5 - 49 tuổi. Vắc xin được bào chế dưới dạng dung dịch nhỏ mũi hoặc dạng khí dung bơm hoặc xịt vào đường mũi họng. Sau khi sử dụng, vi rút xâm nhập cơ thể qua niêm mạc, nhân lên trong tế bào đường hô hấp và tạo được đáp ứng

miễn dịch bảo vệ tại chỗ và toàn thân cho cơ thể [21].

1.2.2.3. Vắc xin tái tổ hợp

Ngoài vắc xin cúm bất hoạt và vắc xin sống giảm độc lực thì vắc xin tái tổ hợp hiện đang được tập trung nghiên cứu và sản xuất nhằm tạo ra loại vắc xin thế hệ mới, ứng cử viên cho vắc xin cúm đa năng. Bằng việc sử dụng các kỹ thuật di truyền sinh học phân tử giúp gắn các gen mã hóa tổng hợp protein HA của vi rút cúm lên tế bào đích, sau đó thu các protein cần thiết để sử dụng sản xuất vắc xin. Hiện có 3 vắc xin tái tổ hợp đã được cấp phép là Flublok, Supemtek (Sanofi Pasteur, Pháp) và Candiflu-S (CPL Biologicals, Ấn Độ). Trong đó, Flublok là vắc xin tái tổ hợp ba chủng và bốn chủng đầu tiên được phê duyệt tại Hoa Kỳ [22].

1.3. CÁC CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA

Cả hai loại vắc xin cúm bất hoạt và sống giảm độc lực đều có thể được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy trên trứng gà có phôi và trên nuôi cấy tế bào.

1.3.1. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm mùa trên trứng gà có phôi

Cho đến nay, công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi là phương pháp sản xuất chính và lâu đời nhất. Đây là phương pháp an toàn, hiệu quả và đã được sử dụng để sản xuất vắc xin cúm với quy mô công nghiệp trong hơn 80 năm qua.

Vi rút được nuôi cấy trong dịch niệu nang của trứng gà sạch có phôi từ 9 đến 12 ngày tuổi. Các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và quá trình khử trùng trong giai đoạn ấp trứng được kiểm soát chặt chẽ nhằm giảm thiểu vi sinh vật có trên bề mặt vỏ. Sau đó, gây nhiễm vi rút vào dịch niệu nang, ủ trứng ở điều kiện thích hợp. Sau thời gian nuôi từ 2 - 4 ngày, trứng được đưa vào nhiệt độ từ 2°C đến 8°C để giết phôi và ngưng sự phát triển của vi rút. Ngày hôm sau thu hoạch dịch niệu nang và các công đoạn tiếp theo của quy trình sản xuất tinh chế kháng nguyên [23], [24].

Ưu điểm của công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi: Đây là phương pháp sản xuất truyền thống được sử dụng rộng rãi từ những năm 1941 đến nay. Với công nghệ này, hàng trăm triệu liều vắc xin cúm đã được sản xuất và được sử dụng an toàn trên toàn cầu; Những chủng vi rút

dùng trong sản xuất vắc xin cúm được nghiên cứu thích ứng phát triển tốt trên trứng; Đã có những phân tích cần thiết, chứng cứ thuyết phục và giấy phép sử dụng cho công nghệ này; Việc xây dựng nhà máy sản xuất ở qui mô vừa và nhỏ có vốn đầu tư thấp, giá thành vắc xin tương đối rẻ.

Nhược điểm của công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi: Đại dịch cúm có thể xảy ra bất cứ khi nào hoặc xảy ra dịch bệnh trên gà dẫn đến nguồn nguyên liệu trứng có thể không đủ cung cấp cho sản xuất vắc xin; Vi rút nuôi cấy trên trứng gà có phôi có thể xảy ra đột biến khi gặp các điều kiện thích hợp; Vì thời gian sản xuất kéo dài nên khi đại dịch cúm lây lan nhanh chóng thì việc cung cấp vắc xin gặp nhiều khó khăn; Cần phải có hệ thống xử lý chất thải rắn thích hợp trong quy trình sản xuất [23], [24], [25].

1.3.2. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên tế bào

Quy trình công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên tế bào trước hết đòi hỏi tế bào cần được nhân lên đủ số lượng cần thiết sau đó gây nhiễm với vi rút cúm và ủ trong tủ ấm 3-5 ngày. Các thông số như số lượng vi rút gây nhiễm, thời gian và nhiệt độ ủ cần phải được tối ưu hoá cho từng dòng tế bào và mỗi chủng vi rút khác nhau. Sau thời gian nuôi cấy vi rút cúm được thu hoạch bằng cách thu toàn bộ nước nổi trong nuôi cấy tế bào. Nước nổi được tách lọc loại bỏ DNA của tế bào vật chủ và cô đặc bằng ly tâm. Thông thường hay sử dụng các phương pháp sắc ký để loại bỏ DNA, kết hợp với việc thêm benzonase (hay các chất tương tự) để phá vỡ các mảnh DNA còn lại.

Năm 2012, FDA đã công bố phê duyệt Flucelvax là vắc xin cúm sản xuất dựa trên tế bào đầu tiên ở Mỹ. Flucelvax được phát triển bởi tập đoàn vắc xin cúm của Novartis (thuộc sở hữu của Seqirus), trong đó vi rút cúm được phát triển trong các hệ thống nuôi cấy mô sử dụng tế bào MDCK [26].

Ưu điểm của công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên tế bào là khắc phục được một số nhược điểm của phương pháp sản xuất trên trứng gà có phôi. Những thuận lợi của phương pháp này so với phương pháp sản xuất trên trứng gà có phôi bao gồm: Không cần phải dùng đến lượng trứng gà lớn. Nguồn cung cấp nguyên liệu bảo đảm và có thể dự trữ; Quy trình này có thể tăng quy mô lên nhanh chóng do sử dụng được công nghệ trong nhà máy sản xuất các vắc xin khác trên tế bào; Nâng cao khả năng vô trùng trong quá trình sản xuất.

Tránh được nguy cơ trứng có phôi nhiễm retro vi rút; Vắc xin không có thành phần trứng nên tránh được nguy cơ dị ứng cho những người có tiền sử dị ứng với protein của trứng.

Nhược điểm của công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên tế bào là chi phí sản xuất vắc xin cúm trên tế bào cao hơn so với phương pháp truyền thống; Các yêu cầu về kỹ thuật, phương pháp kiểm định phức tạp hơn và phải chuẩn thức; Cần một lượng lớn tế bào được sản xuất từ ngân hàng tế bào gốc, do đó tốn nhiều thời gian và chi phí; Các tế bào dùng để sản xuất vắc xin thường yêu cầu phải có hồ sơ mô tả toàn bộ đặc tính của tế bào và hồ sơ về ngân hàng tế bào gốc của nhà sản xuất, đồng thời được cấp sở hữu trí tuệ nên đòi hỏi phải xin giấy phép [23], [25].

1.3.3. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm tái tổ hợp

Hiện nay, các nhà khoa học đang nỗ lực nghiên cứu và sản xuất ra các loại vắc xin phòng cúm mùa dựa trên công nghệ vắc xin tái tổ hợp. Ưu điểm của công nghệ vắc xin tái tổ hợp tránh được nguy cơ tạo đột biến thích nghi với trứng hoặc tế bào trong quá trình sản xuất vì nó không sử dụng vi rút cúm sống, đồng thời rút ngắn thời gian sản xuất và tăng hiệu quả quy trình. Tuy nhiên, công nghệ này cũng gặp phải những khó khăn do nguồn kinh phí sử dụng cho xây dựng cơ sở hạ tầng, trang thiết bị tương đối lớn. Các tiêu chuẩn và điều kiện để cấp phép vắc xin còn gặp nhiều trở ngại. Ngoài ra, công nghệ này sản xuất kháng nguyên có độ tinh khiết cao nên thành phần vắc xin tái tổ hợp thường cần bổ sung thêm tá chất, tăng hàm lượng kháng nguyên hoặc phải sử dụng cấu trúc VLP (virus like particles) để tích hợp với kháng nguyên, nhằm tăng khả năng sinh miễn dịch [27], [28], [29].

1.3.4. Một số công nghệ sản xuất vắc xin cúm mới

Vắc xin dựa trên axit nucleic

Dựa vào nền tảng axit nucleic, các nhà khoa học đã thay đổi các trình tự mã hóa cho một hay nhiều kháng nguyên mục tiêu trên phân tử DNA hoặc RNA để sản xuất vắc xin. Vắc xin dựa trên axit nucleic dễ sản xuất, rút ngắn thời gian sản xuất, chất lượng cao và có khả năng mã hóa cho nhiều loại kháng nguyên. Tuy nhiên, trên mỗi nền tảng DNA hoặc RNA thì quy trình công nghệ lại có những rủi ro và thách thức khác nhau. Ngoài ra, việc phát

triển rộng rãi loại vắc xin này còn gặp nhiều khó khăn do các quy định về quyền sở hữu trí tuệ [29], [30], [31], [32].

Vắc xin dựa trên peptide

Nền tảng của vắc xin dựa trên peptide là sự tổng hợp các epitopes cụ thể từ protein cúm (thường là HA, M1/ M2 và NP) được chấp nhận bởi các tế bào B và T. Sau khi tổng hợp, peptide được tinh chế và nạp vào liposome hoặc virosome, vừa đóng vai trò là tá chất vừa để phân phối các kháng nguyên. Ưu điểm của vắc xin loại này là khả năng bảo vệ tốt hơn bằng cách nhắm mục tiêu các epitopes được bảo tồn của kháng nguyên mong muốn. Tuy nhiên, công thức của loại vắc xin này rất phức tạp, vì nó bao gồm cả peptide kháng nguyên và thành phần của liposome/virosome. Việc tối ưu hóa các thành phần tốn nhiều thời gian, chi phí và cơ sở hạ tầng để sản xuất loại vắc xin này hiện đang bị hạn chế [33], [34].

Vắc xin dựa trên vector vi rút

Flublok (hãng Protein Sciences Corporation, Mỹ) là vắc xin cúm được FDA phê duyệt đầu tiên khi sử dụng các hệ thống biểu hiện baculovirus để tinh chế protein HA tái tổ hợp. Ngoài ra, vắc xin cúm còn được sản xuất trên thực vật bằng cách cấy DNA của vi rút vào trong thực vật (hãng Microbix, Mỹ). Vắc xin này có thể được sản xuất nhanh chóng và năng xuất kháng nguyên cao. Nhưng tính sinh miễn dịch còn bị hạn chế [35], [36].

1.4. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA

Biện pháp chủ yếu để phòng bệnh cúm là sử dụng vắc xin, đây là vũ khí hiệu quả và đặc hiệu để bảo vệ cộng đồng. Nhiều loại vắc xin cúm đã được cấp phép sử dụng trong những năm qua, đặc điểm chung của các loại vắc xin cúm là tính an toàn cao và có hiệu quả phòng bệnh với tỷ lệ bảo vệ tương đối cao 70- 90%. Ở những người già, các trường hợp liên quan đến cúm sau khi đã tiêm vắc xin đã làm giảm 60% tỷ lệ mắc bệnh và 70- 80% tỷ lệ tử vong. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin cúm phụ thuộc vào tuổi tiêm và đáp ứng miễn dịch của người được tiêm vắc xin, mức độ giống nhau giữa thành phần vi rút của vắc xin và các vi rút hiện đang lưu hành. Tiêm vắc xin phòng cúm có thể làm giảm gánh nặng bệnh tật cho xã hội. Tuy nhiên, do sự đa dạng về phân nhóm vi rút và khả năng biến đổi kháng nguyên bề mặt (do tính dễ

biến dị của vi rút cúm) nên bệnh cúm có thể xảy ra đồng thời ở nhiều nơi trên thế giới, do nhiều nhóm và phân nhóm vi rút cúm khác nhau gây nên, việc sản xuất chế tạo vắc xin cúm gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, cần sản xuất vắc xin cúm chứa nhiều chủng kháng nguyên và căn cứ vào phân bố, đặc điểm di truyền và dịch tễ học của bệnh cúm ở các khu vực để dự đoán các chủng vi rút cúm mới sẽ xuất hiện trong năm tới để sản xuất vắc xin phòng ngừa đặc hiệu với chủng đó. Để có thể sản xuất được vắc xin phòng bệnh cúm một cách hiệu quả đối với cộng đồng, WHO đã hỗ trợ các nhà sản xuất ở các quốc gia sản xuất vắc xin cúm mùa, đa giá bằng cách thu thập các chủng vi rút gây bệnh cúm dựa trên các dữ liệu di truyền và dịch tễ học của bệnh hàng năm ở khu vực Bắc và Nam bán cầu. Từ đó tạo ra các chủng vi rút cúm tái tổ hợp dự tuyển sản xuất vắc xin để cung cấp cho các nhà sản xuất [37], [38].

1.4.1. Trên Thế giới

Đến năm 2019, trên thế giới có tổng cộng 31 nhà sản xuất vắc xin ở các quốc gia và đa quốc gia với 40 loại vắc cúm khác nhau, trong đó có Việt Nam. Các quốc gia có ít nhất một cơ sở sản xuất vắc xin cúm đang hoạt động là: Úc, Brazil, Canada, Trung Quốc, Pháp, Đức, Hungary, Ấn Độ, Iran, Nhật Bản, Mexico, Nicaragua, Liên bang Nga, Hàn Quốc, Hà Lan, Việt Nam, Anh, Bắc Ireland và Hoa Kỳ.

Phần lớn các loại vắc xin cúm mùa được sản xuất bằng công nghệ trứng gà có phôi, chiếm 84,5% năng lực sản xuất toàn cầu trong khi vắc xin dựa trên tế bào chiếm 15,5% công suất. Vắc xin cúm bất hoạt (IIV) chiếm 89,6% năng lực sản xuất vắc xin cúm mùa toàn cầu. Trong số 30 nhà sản xuất vắc xin cúm mùa, có mười ba nhà sản xuất chỉ sản xuất TIV và mười nhà sản xuất chỉ sản xuất QIV và bảy nhà sản xuất đang sản xuất cả TIV và QIV [39].

1.4.1.1. Vắc xin cúm mùa bốn chủng

QIV là vắc xin cúm mùa chứa thành phần kháng nguyên gồm chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và chủng cúm B dòng B/Victoria và B/Yamagata. FluMist Quadrivalent (công ty MedImmune, LLC, Hoa Kỳ) là vắc xin cúm mùa bốn chủng giảm độc lực đầu tiên trên thế giới đã được Cục Quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ chấp thuận sử dụng cho lứa tuổi từ 2 - 49 tuổi năm 2012. Đến nay, QIV đã cho thấy những tiềm năng trong việc kiểm soát

bệnh cúm mùa. Một số hãng sản xuất vắc xin cúm mùa bốn chủng đã được cấp phép trên thế giới:

- QIV bất hoạt của hãng GlaxoSmithKline (GSK) sản xuất giống hệt nhau về hàm lượng kháng nguyên nhưng được sản xuất và cấp phép riêng: *FluLaval* được sản xuất tại Quebec, Canada và *Fluarix* được sản xuất tại Dresden, Đức. Cả hai loại vắc xin đều được phê duyệt để sử dụng cho trẻ em từ 3 tuổi trở lên tại Hoa Kỳ và từ 6 tháng tuổi tại Canada và Mexico [40]. Các nhà sản xuất Sanofi Pasteur với 2 loại QIV bất hoạt được tiêm bắp *Vaxigrip Tetra* được cấp phép sử dụng cho trẻ em từ 6 tháng tuổi hoặc dưới da *Fluzone Intradermal Quadrivalent* được cấp phép cho người từ 18–64 tuổi [41]. Vắc xin sống giảm độc lực của hãng AstraZeneca là *Flumist Quadrivalent* (Hoa Kỳ, Canada) và *Fluenz Tetra* (Liên minh Châu Âu) được cấp phép sử dụng cho người từ 2 - 49 tuổi ở Hoa Kỳ [42], [43]. Hãng Abbott Laboratories (Singapore) có *Influvac Tetra* được cấp phép sử dụng cho người lớn và trẻ em trên 3 tuổi. Hãng Green Cross Corporation (Hàn Quốc) có *GCflu Quadrivalent* được cấp phép sử dụng cho người lớn và trẻ em từ 6 tháng tuổi trở lên.

1.4.1.2. Lợi ích của vắc xin cúm mùa bốn chủng

Vắc xin cúm đã được sử dụng từ năm 1936 và việc chuyển từ TIV sang QIV là sự thích nghi gần đây nhất của vắc xin cúm mùa để đáp ứng với những thay đổi trong các chủng cúm lưu hành toàn cầu. Dựa trên các bằng chứng có sẵn từ các thử nghiệm lâm sàng, nghiên cứu dịch tễ học, một số quốc gia đã dần dần đưa ra các khuyến cáo ưu tiên sử dụng QIV hơn TIV. Để giải quyết sự đồng lưu hành hoặc sự không phù hợp của vi rút dòng cúm B trong TIV, QIV đã được phát triển và có hiệu quả sử dụng vắc xin ổn định hơn qua các mùa, tạo nên sự bảo vệ rộng rãi hơn so với TIV và góp phần vào phòng chống cúm trên toàn thế giới [14]. Nghiên cứu tại 5 nước Châu Âu (Pháp, Đức, Ý, Tây Ban Nha và Anh) cho thấy, ước tính sử dụng QIV so với TIV làm giảm đáng kể gánh nặng về dịch tễ học và các chi phí liên quan tới cúm [44].

1.4.2. Tại Việt Nam

Trước năm 2005, chưa có nhà sản xuất vắc xin trong nước nào nghiên cứu phát triển vắc xin cúm, việc sử dụng vắc xin cúm hoàn toàn phụ thuộc

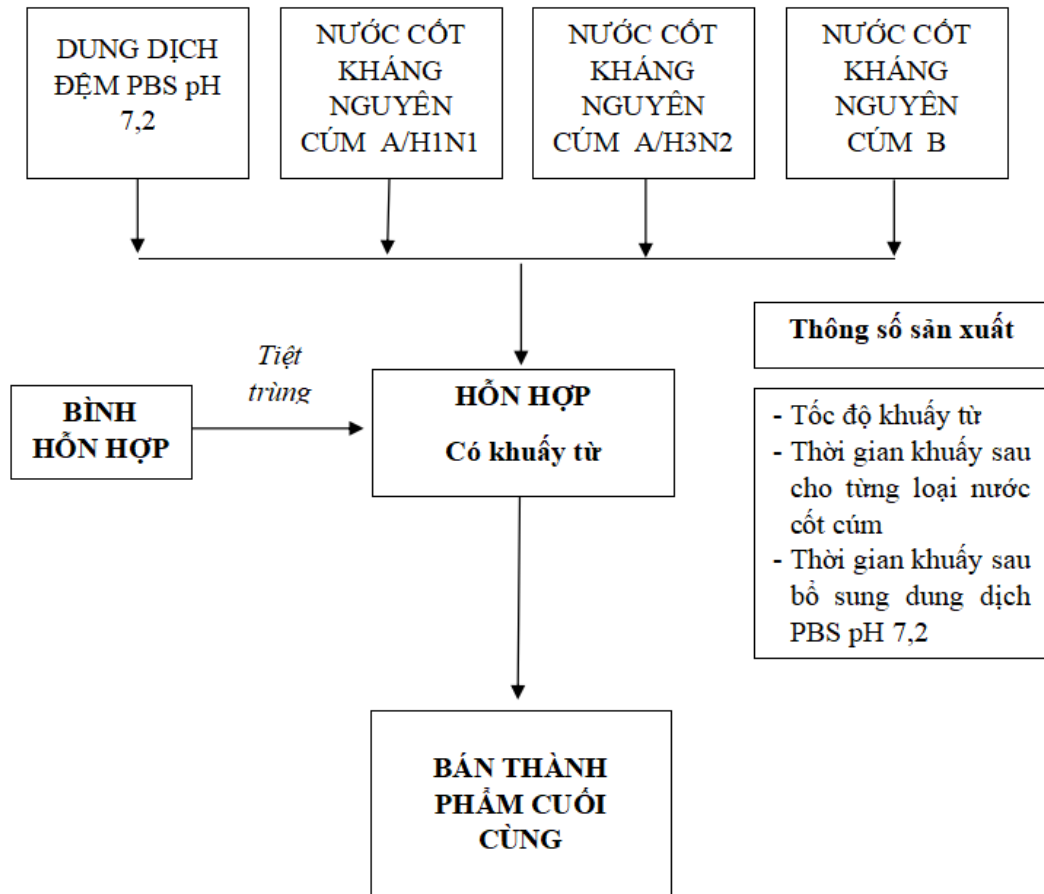
vào nguồn vắc xin ngoại nhập. Từ 2005, các cơ sở trong nước bắt đầu nghiên cứu, phát triển vắc xin cúm đại dịch theo các công nghệ khác nhau [45].

Một số nghiên cứu trong nước như sau: Vabiotech đã nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 trên tế bào thận khỉ tiên phát và đã hoàn thành thử nghiệm lâm sàng ba giai đoạn trên người vào năm 2013 [46]. Đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu quy trình sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 bất hoạt dùng cho người bằng kỹ thuật nuôi cấy trên tế bào vero và trên trứng gà có phôi” do Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh chủ trì năm 2006 đã được nghiệm thu vào tháng 6/2010 [47].

Tại IVAC cũng đã nghiên cứu sản xuất thành công vắc xin cúm A/H5N1 bất hoạt toàn hạt vi rút, theo công nghệ nuôi cấy trên trứng gà có phôi trong phòng thí nghiệm vào năm 2006. Năm 2007, IVAC là một trong sáu nhà sản xuất ở các nước đang phát triển được WHO lựa chọn để đầu tư cơ sở sản xuất và công nghệ sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 ở quy mô 3 triệu liều/năm, thuộc khuôn khổ chương trình hành động toàn cầu phòng chống bệnh cúm (GAP). Năm 2010 IVAC đã thiết lập thành công quy trình lõi sản xuất vắc xin cúm trên dây chuyền sản xuất do WHO tài trợ và tổ chức BARDA (Mỹ) hỗ trợ công nghệ. Đến nay IVAC đã phát triển được quy trình và sản xuất thành công vắc xin cúm đại dịch A/H1N1/09, A/H7N9, A/H5N1 trên quy mô lớn [48], [49], [50].

Cùng với việc phát triển vắc xin đại dịch, IVAC đã đầu tư nghiên cứu và sản xuất thành công vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh ở quy mô phòng thí nghiệm năm 2013. Đây là nền tảng quan trọng để IVAC tiến hành dự án phát triển và hoàn thiện công nghệ sản xuất trên quy mô lớn, thuộc chương trình sản phẩm quốc gia vắc xin phòng bệnh cho người [51]. Ngày 14 tháng 01 năm 2019, Bộ Y tế đã cấp giấy phép lưu hành cho sản phẩm IVACFLU-S, vắc xin phòng cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt bằng formalin và không sử dụng chất bảo quản do IVAC sản xuất. Vắc xin sử dụng cho người từ 18 đến 60 tuổi. Hiện nay tại Việt Nam, IVAC là đơn vị đầu tiên và duy nhất sở hữu dây chuyền sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi đạt chuẩn GMP-WHO, vắc xin sử dụng các chủng sản xuất do WHO khuyến cáo hàng năm cho từng mùa cúm [52].

1.4.2.1. Quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 3 chủng tại IVAC



Hình 1.3: Sơ đồ quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 3 chủng tại IVAC

Mô tả quy trình phối trộn vắc xin bán thành phẩm

- Các dụng cụ, chai chứa được sử dụng trong quá trình phối trộn vắc xin cúm mùa được vệ sinh và tiệt trùng trước đó bằng các thiết bị thích hợp.
- Quy trình phối trộn vắc xin:
 - + Bơm dung dịch đệm PBS pH 7,2 vào chai (bình) chứa bán thành phẩm vắc xin cuối cùng, khuấy từ
 - + Bơm nước cốt kháng nguyên cúm A/H1N1 vào chai (bình) chứa
 - + Duy trì khuấy từ ở cùng tốc độ trong 5 phút
 - + Bơm nước cốt kháng nguyên cúm A/H3N2 vào chai (bình) chứa
 - + Duy trì khuấy từ ở cùng tốc độ trong 5 phút
 - + Bơm nước cốt kháng nguyên cúm B vào chai (bình) chứa
 - + Duy trì khuấy từ ở cùng tốc độ trong 5 phút
 - + Bổ sung dung dịch PBS pH 7,2 vừa đủ

- + Duy trì khuấy từ ở cùng tốc độ trong 30 phút
- + Lấy mẫu kiểm tra pH vắc xin, giá trị pH yêu cầu đạt 6,5 - 7,5.

1.4.2.2. Tiêu chuẩn chất lượng vắc xin cúm mùa 3 chủng tại IVAC

Tiêu chuẩn chất lượng của vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh bất hoạt (IVACFLU-S) được xây dựng gồm 8 chỉ tiêu: Thể tích, cảm quan, vô khuẩn, pH, nhận dạng, endotoxin, an toàn chung và hàm lượng HA. Tất cả các chỉ tiêu trên đều đạt tiêu chuẩn theo khuyến cáo của WHO-TRS 927 năm 2015 và Dược điển Việt Nam V năm 2018 [53], [54].

1.4.3. Tiêu chuẩn của vắc xin [55]

Hai tiêu chuẩn quan trọng nhất của vắc xin là an toàn và hiệu quả bảo vệ.

- *An toàn*: Một vắc xin lý tưởng khi sử dụng sẽ không gây bệnh, không gây độc và không gây phản ứng nghiêm trọng. Sau khi sản xuất vắc xin phải được cơ quan kiểm định nhà nước kiểm tra chặt chẽ về mặt vô trùng, thuần khiết và không độc.

Vô khuẩn: Vắc xin sản xuất phải đảm bảo không được tạp nhiễm các vi sinh vật khác.

Thuần khiết: Trong vắc xin chứa các thành phần kháng nguyên có khả năng kích thích cơ thể tạo đáp ứng miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, các thành phần khác trong vắc xin có thể gây ra các phản ứng phụ bất lợi khi tiêm thì không được phép có trong vắc xin.

Không độc: Liều lượng vắc xin sử dụng tiêm vào cơ thể phải được nghiên cứu phù hợp nhằm đạt hiệu quả bảo vệ cao và phải nhỏ hơn rất nhiều so với liều gây độc. Một loại vắc xin được sản xuất phải đảm bảo đủ độ an toàn, tuy nhiên thực tế không thể đạt được an toàn tuyệt đối. Vì vậy, vắc xin vẫn gây ra các phản ứng phụ ở một số người sau khi tiêm.

- *Hiệu quả bảo vệ*: Vắc xin khi tiêm vào cơ thể tạo được miễn dịch ở mức độ cao và thời gian lưu lại lâu dài. Đánh giá hiệu quả gây miễn dịch của vắc xin được thực hiện trên động vật thí nghiệm và sau đó trên thực địa.

Ngoài ra, giá thành của vắc xin và sự thuận tiện trong việc tiến hành tiêm chủng cũng là những tiêu chí để lựa chọn vắc xin.

1.4.4. Phát triển sản xuất vắc xin cúm mùa 4 chủng tại IVAC

Kết quả giám sát trên người từ các điểm giám sát cúm quốc gia cho thấy, trong hai tháng đầu năm 2015 chủng vi rút cúm A/H3N2 là chủng lưu hành chủ yếu chiếm 77,8%, tiếp đó là chủng vi rút cúm A/H1N1 và cúm B cùng chiếm 11,1%, trong khi đó trong năm 2014, tỷ lệ cúm B lưu hành chủ yếu với tỷ lệ chiếm 59%, tiếp đó là cúm A/H3N2 với tỷ lệ 28%, cúm A(H1N1) với tỷ lệ 13% [56]. Tỷ lệ dương tính cao nhất ở nhóm tuổi 5-14 chiếm 29,1%. Vi rút cúm phổ biến nhất là tít B và các phân tít A/H3N2, A/H1N1 và A/H1N1, đồng lưu hành quanh năm và lần lượt thay nhau chiếm ưu thế. Cúm B có tỷ lệ dương tính nhiều nhất ở nhóm tuổi 5-14, nhưng cúm A/H1N1/2009 có tỷ lệ dương tính cao ở nhóm tuổi 15-24 [57]. Cả hai dòng cúm B B/Victoria và B/Yamagata đều đồng lưu hành. Tuy nhiên, dòng B/Victoria trở nên chiếm ưu thế vào năm 2010-2013 (84% Victoria so với 16% Yamagata) và vào năm 2018-2020 [58], [59].

Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa, thuận lợi cho dịch cúm diễn ra quanh năm. Thêm vào đó là việc di chuyển, giao lưu văn hóa - kinh tế giữa các vùng miền trên cả nước và giữa nước ta với các quốc gia trên thế giới làm gia tăng nguy cơ lây lan dịch cúm. Vì vậy, cần tiêm phòng vắc cúm mùa để tăng khả năng bảo vệ người dân trước nguy cơ bùng phát dịch bệnh.

Dựa trên nền tảng công nghệ sản xuất vắc xin cúm mùa trên trứng gà có phôi, để phát triển sản xuất vắc xin cúm mùa 4 chủng tại IVAC cần thực hiện các nội dung sau:

- Hàng năm, IVAC cập nhật chủng sản xuất theo khuyến cáo của WHO đối với khu vực Bắc bán cầu và Nam bán cầu từ hệ thống các phòng thí nghiệm cung cấp chủng do WHO quản lý.

- Sản xuất nguyên liệu nước cốt cúm mùa đơn chủng, đặc biệt là nước cốt cúm B dòng Yamagata.

- Xây dựng quy trình phối trộn.

- Thẩm định quy trình sản xuất.

- Xây dựng chỉ tiêu chất lượng vắc xin theo tiêu chuẩn của WHO/ĐĐVN.

- Đánh giá chất lượng tại IVAC và Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB).

- Đánh giá tiền lâm sàng, lâm sàng vắc xin cúm mùa 4 chủng theo hướng dẫn của WHO và của Bộ Y tế.

Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, nhóm nghiên cứu thực hiện nội dung xây dựng quy trình phối trộn và đánh giá chất lượng các lô vắc xin cúm mùa 4 chủng ở quy mô thử nghiệm tại IVAC và NICVB.

Để xây dựng quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng thành công, khi thêm thành phần chủng cúm B/Yamagata cần xác định được các nội dung quan trọng như sau:

- Các thành phần nguyên liệu phối trộn đạt các tiêu chuẩn chất lượng về độ tinh khiết, hàm lượng kháng nguyên đủ lớn để phối trộn, chỉ tiêu vô trùng, hóa lý, chất tồn dư nằm trong tiêu chuẩn cho phép.

- Đánh giá được tính tương thích giữa các thành phần kháng nguyên khi phối trộn nhằm tránh việc kháng nguyên bị tủa với nhau hoặc tương tác chéo. Được thể hiện qua quan sát cảm quan bằng mắt thường, sự thay đổi pH, thay đổi hàm lượng kháng nguyên hoặc an toàn của sản phẩm. Từ đó, lựa chọn được các bước phối trộn thích hợp.

- Thiết lập các thông số phối trộn phù hợp.

- Kiểm tra chất lượng vắc xin phải trong giới hạn an toàn và công hiệu (hay hiệu lực sinh kháng thể) theo tiêu chuẩn Dược Điển hoặc khuyến cáo của WHO. Đồng thời, phải đảm bảo độ vô trùng khi dùng cho người.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh với bốn chủng cúm: A/H1N1, A/H3N2 và hai chủng cúm B (Victoria và Yamagata).

Địa điểm nghiên cứu: Đề tài được thực hiện tại phòng Vắc xin Thành phẩm và phòng Kiểm định, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC).

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 09/2022 đến tháng 09/2023.

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.2.1. Nước cốt cúm mùa một chủng

- Nước cốt chủng cúm A/H1N1: A/Victoria/2570/2019/H1N1, mã số ống chủng IVR - 215, lô NC-A/H1N1/01
- Nước cốt chủng cúm A/H3N2: A/Darwin/9/2021/H3N2, mã số ống chủng IVR - 227, lô NC- A/H3N2/03
- Nước cốt chủng cúm B/Victoria: B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria lineage), mã số ống chủng IBR - 26, lô NC-B/Vic/02
- Nước cốt chủng cúm B/Yamagata: B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), mã số ống chủng B/Phuket/3073/2013, lô NC-B/Yam/01, NC-B/Yam/02.

2.2.2. Sinh phẩm chuẩn

STT	Sinh phẩm	Code	Hãng
1.	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H1N1)	20/234	NIBSC
2.	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H3N2)	21/324	NIBSC
3.	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (B/Victoria)	21/326	NIBSC
4.	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (B/Yamagata)	17/214	NIBSC
5.	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H1N1)	20/232	NIBSC

STT	Sinh phẩm	Code	Hãng
6.	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H3N2)	21/318	NIBSC
7.	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (B/Victoria)	21/316	NIBSC
8.	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (B/Yamagata)	21/136	NIBSC
9.	Endotoxin chuẩn	7360	Lonza

2.2.3. Dung dịch và hóa chất

- Dung dịch PBS pH 7,2
- Dung dịch NaCl 0,85% (Merck)
- Dung dịch formalin 37% (Merck)
- Môi trường các loại: Thioglycolate và Trypsoy Broth (TSB)

2.2.4. Động vật thí nghiệm

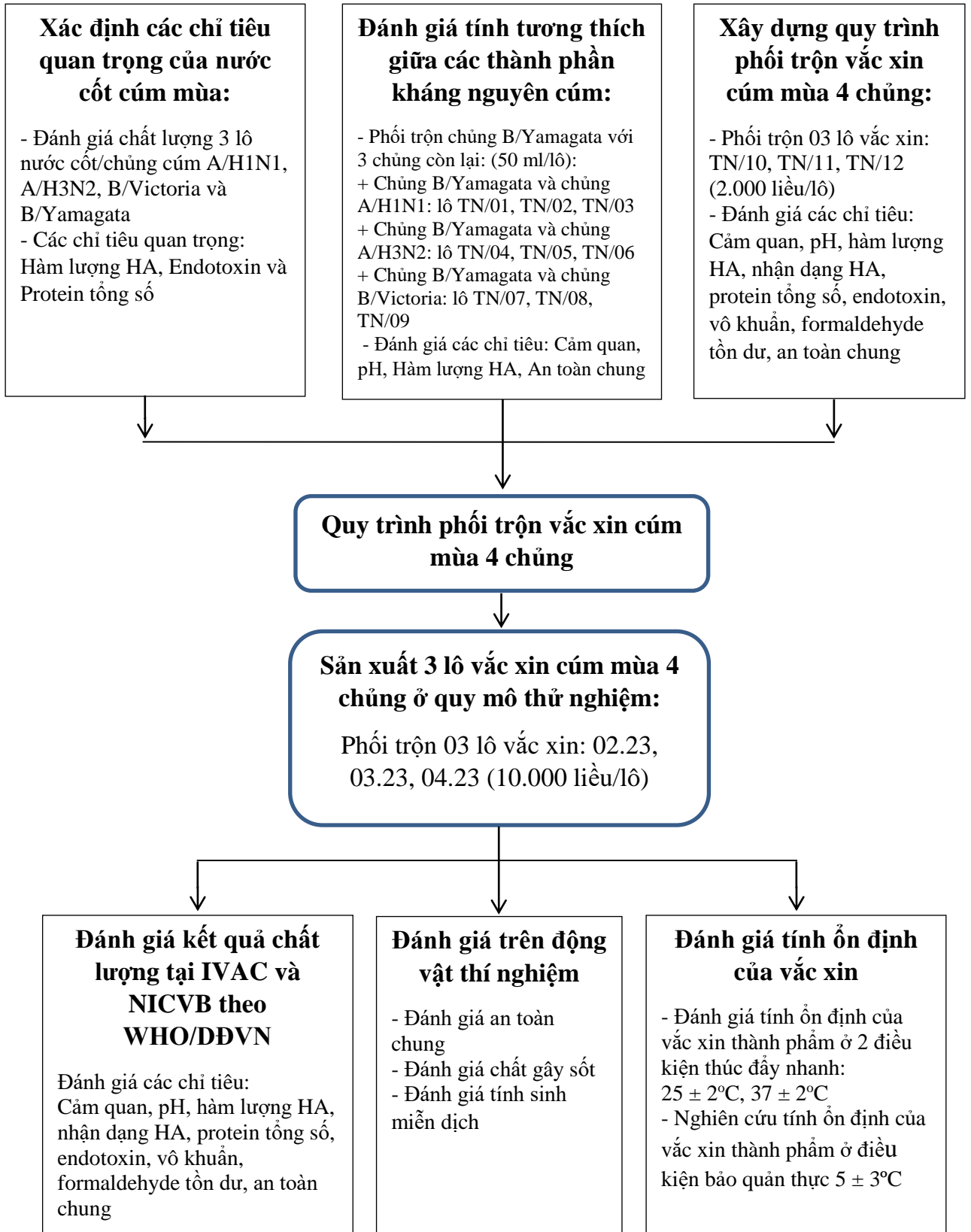
- Thỏ giống Newzealand, 1,5 - 2,5 kg/con, IVAC
- Chuột lang 250 - 350g/con, IVAC
- Chuột nhắt trắng ICR, 17 - 22g/ con, IVAC

2.2.5. Máy móc thiết bị chính

- Laminar flow SAM 24, Mỹ.
- Máy đo pH điện cực thủy tinh INOLAB 730, Đức.
- Máy khuấy từ IKA, Đức.
- Bơm nhu động 504S Watson Marlow, Anh.
- Tủ ấm 30-35°C Memmert, Đức.
- Tủ mát 20-25°C Memmert, Đức.
- Máy đọc Elisa, hãng Lonza, Thụy Sĩ.
- Máy rửa đĩa, hãng Biotek, Mỹ.
- Cân phân tích Sartorius, Đức.
- Tủ an toàn sinh học ESCO, II A, hãng Telstar.
- Phiến endotoxin, hãng Greiner-bio one.
- Đĩa 96 giếng chữ V, hãng Corning.
- Bình hỗn hợp 1 lít, 5 lít, 10 lít Duran, Đức.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu



Hình 2.1: Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3.1.1. Xác định các chỉ tiêu quan trọng của nguyên liệu nước cốt cúm mùa

Dựa trên nền TCCS chất lượng nước cốt cúm tại IVAC, ĐĐVN V-2018 và WHO - TRS 927, xác định lại các chỉ tiêu quan trọng chất lượng nước cốt cúm A/H1N1, A/H3N2 và hai chủng cúm B, đảm bảo tính khả thi khi đưa nguyên liệu vào phối trộn vắc xin. Các chỉ tiêu cần xác định gồm: Hàm lượng HA, Endotoxin và Protein tổng số. Tiêu chuẩn dự kiến như sau: Hàm lượng HA $\geq 60 \mu\text{g/ml}$, endotoxin $\leq 100 \text{ EU}/60 \mu\text{g HA}$, protein tổng số $\leq 300 \mu\text{g}/60 \mu\text{g HA}$. Các chỉ tiêu đối với nước cốt cúm mùa còn lại được áp dụng theo tiêu chuẩn tương tự như đối với nước cốt dùng để phối trộn vắc xin IVACFLU-S.

2.3.1.2. Đánh giá tính tương thích giữa các thành phần kháng nguyên và khả năng tương tác chéo giữa các chủng cúm

Dựa trên cơ sở công nghệ sản xuất vắc xin cúm mùa IVACFLU-S hiện nay tại IVAC đã cho thấy tính tương thích giữa 3 thành phần chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và B/Victoria. Để phối trộn thành công vắc xin cúm mùa bốn chủng với việc bổ sung thêm thành phần kháng nguyên chủng cúm B/Yamagata, cần thiết phải đánh giá tính tương thích của chủng B/Yamagata với 3 chủng còn lại.

Công thức phối trộn kháng nguyên chủng cúm B/Yamagata với kháng nguyên từng chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và cúm B/Victoria hàm lượng HA $30 \mu\text{gHA/ml}$, cỡ lô 50 ml/lô như sau:

Bảng 2.1: Công thức thành phần phối trộn các cặp kháng nguyên

Lô nước cốt cúm	Lô TN	Hàm lượng HA ($\mu\text{g/ml}$)	Thể tích nước cốt cúm (ml)	Thể tích PBS (ml)
NC-A/H1N1/01	TN/01	303,35	4,94	28,03
NC-B/Yam/01	TN/02	88,1	17,03	
	TN/03			
NC-A/H3N2/03	TN/04	550,1	2,73	30,25
NC-B/Yam/01	TN/05	88,1	17,03	
	TN/06			
NC-B/Vic/02	TN/07	340,6	4,40	28,57
NC-B/Yam/02	TN/08	88,1	17,03	
	TN/09			

Quy trình thực hiện gồm các bước sau:

- 1) Bổ sung dung dịch PBS pH 7,2 vào bình phối trộn.
- 2) Bổ sung nước cốt chủng cúm A/H1N1 hoặc A/H3N2 hoặc B/Victoria vào bình phối trộn, khuấy đều trong 5 phút.
- 3) Bổ sung nước cốt chủng cúm B/Yamagata vào bình phối trộn, khuấy đều trong 5 phút.
- 4) Bổ sung dung dịch PBS pH 7,2 đủ thể tích, khuấy đều trong 5 phút.
- 5) Đánh giá các chỉ tiêu: Cảm quan, pH, hàm lượng HA, an toàn chung.

Tiến hành lặp lại thử nghiệm 03 lần.

2.3.1.3. Xây dựng quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng

Dựa trên kết quả đánh giá ở phần “2.3.1.1 và 2.3.1.2” và quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 3 chủng đã được sản xuất thành công tại IVAC, tiến hành phối trộn thử nghiệm 03 lô vắc xin với công thức thành phần, thông số phối trộn và quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng dự kiến như sau:

➤ *Công thức thành phần phối trộn*

Bảng 2.2: Công thức thành phần phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng (2.000 liều/lô – 1.000 ml/lô)

Lô nước cốt cúm	Lô TN	Hàm lượng HA (µg/ml)	Thể tích nước cốt cúm (ml)	Thể tích PBS (ml)
NC-A/H1N1/01	TN/10 TN/11 TN/12	303,35	125,27	262,76
NC-A/H3N2/03		550,1	69,08	
NC-B/Vic/02		340,6	111,57	
NC-B/Yam/01		88,1	431,33	

➤ *Các thông số phối trộn dự kiến*

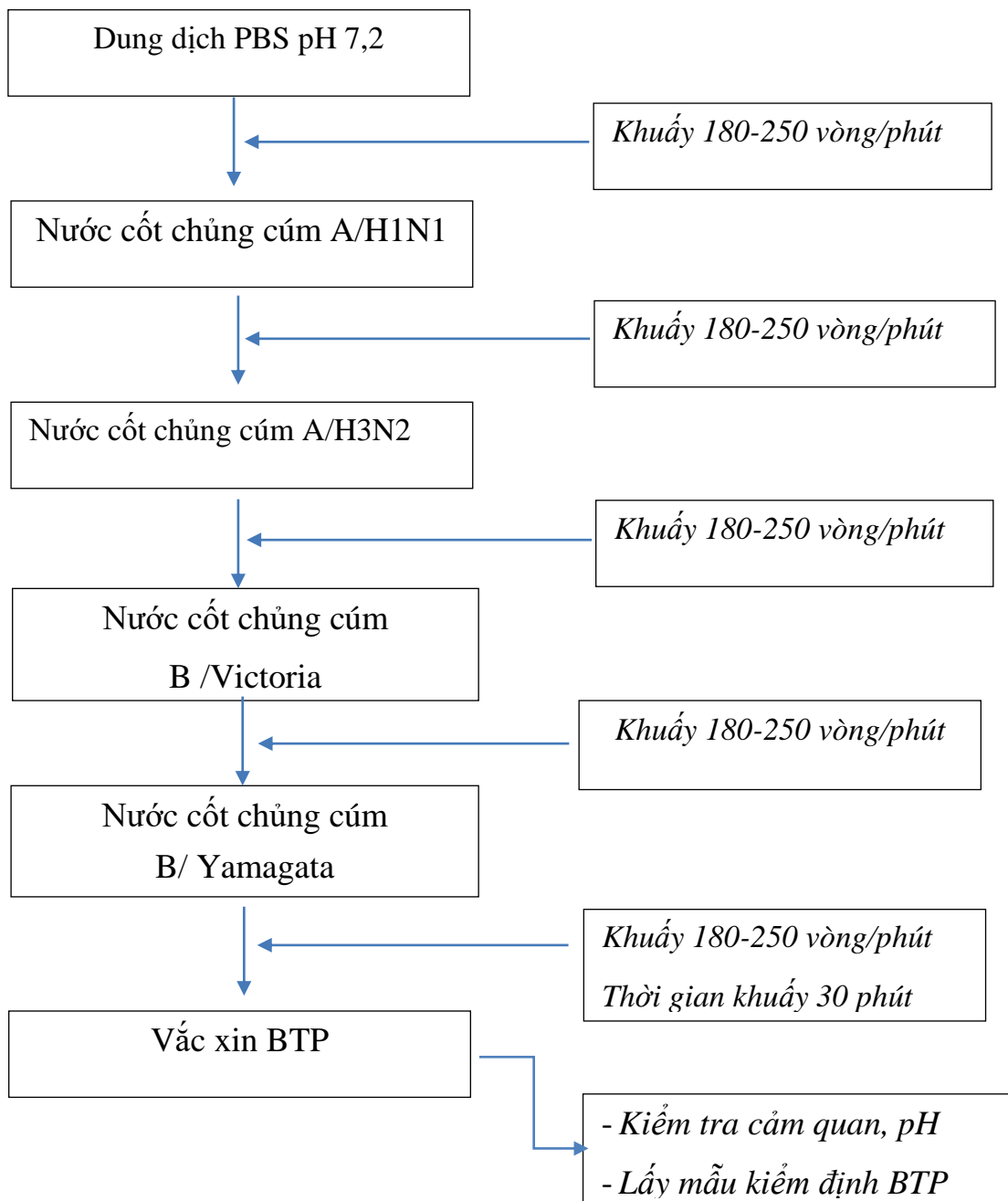
- Tốc độ khuấy trong quy trình: Duy trì cùng tốc độ khuấy từ khi bắt đầu đến khi kết thúc quá trình phối trộn vắc xin với tốc độ 180 - 250 vòng/phút.

- Thời gian khuấy sau khi cho mỗi kháng nguyên 05 phút. Thời gian khuấy sau khi bổ sung dung dịch PBS pH 7,2 vừa đủ thể tích bán thành phẩm: 30 phút.

➤ *Trình tự phối trộn 4 chủng cúm dự kiến:*

(1) Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm A/H1N1. (2) Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm A/H3N2. (3) Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm B/Victoria. (4) Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm B/Yamagata.

➤ *Xây dựng quy trình phối trộn*



Hình 2.2: Sơ đồ quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dự kiến

➤ *Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm vắc xin cúm mùa 4 chủng*

Dựa theo tiêu chuẩn của WHO - TRS 927/ ĐĐVN V và tham khảo tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm của sản phẩm vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh (IVACFLU-S) tại IVAC, đề xuất tiêu chuẩn chất lượng vắc xin cúm mùa 4 chủng bán thành phẩm như sau:

Bảng 2.3: Tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm vắc xin cúm mùa 4 chủng dự kiến

TT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Tài liệu áp dụng
1	Cảm quan	Quan sát bằng mắt	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	TCCS
2	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi sinh vật sau 14 ngày theo dõi	ĐĐVN V, 2018
3	pH	Đo điện thế điện cực	6,5 - 7,5	TCCS
4	Hàm lượng HA	SRID	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$	ĐĐVN V, 2018
5	Formaldehyde tồn dư	Đo quang với thuốc thử Acetyl acetone	$\leq 0,02 \%$	ĐĐVN V, 2018
6	Protein toàn phần	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	ĐĐVN V, 2018
7	An toàn chung	Thử nghiệm trên chuột nhắt trắng và chuột lang	Toàn bộ chuột khỏe mạnh, lên cân sau ít nhất 7 ngày thử nghiệm, không có dấu hiệu nhiễm độc	ĐĐVN V, 2018
8	Nhận dạng	SRID	Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu của từng chủng	ĐĐVN V, 2018
9	Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	TCCS

2.3.1.4. Sản xuất thử nghiệm 03 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô 10.000 liều/ lô theo quy trình đã xây dựng. Đánh giá kết quả chất lượng 03 lô vắc xin đã phối trộn tại IVAC theo WHO/ĐĐVN.

Bảng 2.4: Công thức thành phần phối trộn vắc xin cúm mùa 4 chủng (10.000 liều/lô – 5.000 ml/lô)

Lô nước cốt cúm	Lô TN	Hàm lượng HA (µg/ml)	Thể tích nước cốt cúm (ml)	Thể tích PBS (ml)
NC-A/H1N1/01	02.23 03.23 04.23	303,35	626,34	1698,04
NC-A/H3N2/03		550,1	345,39	
NC-B/Vic/02		340,6	557,84	
NC-B/Yam/02		107,2	1772,39	

➤ Đánh giá các chỉ tiêu: Cảm quan, vô khuẩn, pH, công hiệu, formadehye tồn dư, protein toàn phần, nhận dạng, endotoxin.

➤ Đánh giá trên động vật thí nghiệm:

+ *Đánh giá an toàn chung:*

Tiêm ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng (17 - 22g/con), mỗi con 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1ml/con; 2 chuột lang (250 - 350g/con) mỗi con một liều tiêm cho người nhưng không quá 5ml/con.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Toàn bộ chuột khỏe mạnh, lên cân sau 7 ngày theo dõi. (ĐDVN V - 2018 - Phụ lục 15.11 - Trang PL-372).

+ *Đánh giá chất gây sốt:*

Quy trình thực hiện thử nghiệm xác định chất gây sốt: Mỗi mẫu thử được tiêm cho 3 thỏ, đo nhiệt độ trước khi tiêm và chỉ sử dụng những thỏ có nhiệt độ chênh lệch nhau không quá 1°C, nhiệt độ ban đầu tại hai thời điểm đo chênh lệch nhau không quá 0,2°C và nằm trong khoảng từ 38,0 - 39,8°C. Tiêm 0,5 ml mẫu thử vào tĩnh mạch vành tai của mỗi thỏ. Sau đó tiến hành đo nhiệt độ của thỏ trong vòng 3 giờ. Nhiệt độ tối đa sau khi tiêm là nhiệt độ cao nhất đo được trong 3 lần đo tại các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ sau khi tiêm.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mức tăng nhiệt độ của thỏ thí nghiệm nằm trong giới hạn khuyến cáo của ĐDVN. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu trong mỗi nhóm thử (3 thỏ thí nghiệm) không có thỏ nào có mức tăng nhiệt độ hơn 0,6°C và nếu tổng mức tăng nhiệt độ của 3 thỏ $\leq 1,3^\circ\text{C}$.

+ *Đánh giá tính sinh miễn dịch:*

Nghiên cứu tính sinh miễn dịch được thực hiện Chuột nhắt trắng ICR có nguồn gốc từ trại Suối dầu (IVAC). Chuột có trọng lượng $20 \pm 1g/4 - 6$ tuần tuổi được chia 5 nhóm ngẫu nhiên, 4 nhóm mỗi nhóm 16 con và 1 nhóm 8 con. Mỗi chuột được tiêm 2 mũi, cách nhau 21 ngày, liều miễn dịch 1,5 $\mu gHA/chuột$ và 3,0 $\mu gHA/chuột$. Lấy máu, tách huyết thanh vào 3 ngày trước tiêm mũi 1 (D0), trước khi tiêm mũi 2 (D21) và 14 ngày sau khi tiêm mũi 2 (D35). Xác định hiệu giá kháng thể sau khi gây miễn dịch bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI).

Bảng 0.5: Thiết kế nghiên cứu tính sinh miễn dịch

Nhóm chuột	Số lượng chuột/nhóm	Vắc xin	Hàm lượng HA ($\mu g/chủng/100 \mu l/chuột$)	Ngày tiêm	Ngày lấy máu
1	16	IVACFLU-4S lô 02.23	3	0 và 21	D0, D21 và D35
2	16		1,5		
3	16	GCFLU Quadrivalent lô Q60222031	3		
4	16		1,5		
5	08	PBS pH 7,2 lô 010123	0		

Đánh giá kết quả: So sánh trước và sau tiêm vắc xin, nếu có sự tăng hiệu giá kháng thể cho thấy có đáp ứng miễn dịch đối với vắc xin bằng: Hiệu giá trung bình nhân GMT, tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh của từng nhóm chuột thử nghiệm giữa thời điểm D21 và D35 so với máu nền D0 và giữa D35 với D21. Tiêu chuẩn chấp thuận: hiệu giá kháng thể sau tiêm tăng ≥ 4 lần

➤ Đánh giá tính ổn định của vắc xin: Đánh giá tính ổn định của vắc xin thành phẩm IVACFLU-4S ở 2 điều kiện thúc đẩy nhanh: $25 \pm 2^\circ C$, $37 \pm 2^\circ C$ và nghiên cứu theo thời gian thực $5 \pm 3^\circ C$. Nhiệt độ đặt mẫu, tần số rút mẫu, số lượng mẫu và các tiêu chí đánh giá tính ổn định cho một lô vắc xin nghiên cứu được thể nêu ở **Error! Reference source not found.6**, Bảng 0.7, **Error! Reference source not found.8**, Bảng 0.9.

Bảng 0.6: Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin IVACFLU-4S ở điều kiện bảo quản thực $5 \pm 3^\circ C$

Thời gian	T0	1m	3m	6m	9m
Số lượng (0,5 ml/liều/lọ)	50	50	50	50	50
Tổng cộng	250 lọ + 125 lọ dự phòng = 375 lọ				

Ghi chú: T0: Thời gian bắt đầu; m: tháng

Bảng 0.7: Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin IVACFLU-4S ở điều kiện thúc đẩy nhanh $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Thời gian Nhiệt độ	Điểm lấy mẫu					
	T0	1d	3d	7d	10d	14d
$25 \pm 2^\circ\text{C}$	x	x	x	x	x	x
$37 \pm 2^\circ\text{C}$	x	x	x	x	x	x
Số lượng (lọ)	26	6	6	6	6	26
Tổng cộng	76 lọ + 50% dự phòng = 114 lọ/lô					

Ghi chú: T0: thời gian bắt đầu; d: ngày; x: thực hiện

Bảng 0.8: Các chỉ tiêu và thời gian đánh giá tính ổn định trong điều kiện bảo quản thực $5 \pm 3^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	T0	1m	3m	6m	9m
Vô khuẩn	x	x	x	x	x
Cảm quan	x	x	x	x	x
pH (6,50 - 7,50)	x	x	x	x	x
Hàm lượng HA ($\geq 15\mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$)	H1N1	x	x	x	x
	H3N2	x	x	x	x
	B/Victoria	x	x	x	x
	B/Yamagata	x	x	x	x
Protein tổng số ($\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$)	x	x	x	x	x
Endotoxin ($\leq 100 \text{EU}/\text{liều}$)	x	x	x	x	x

Ghi chú: T0: Thời gian bắt đầu; m: tháng; x: thực hiện

Bảng 0.9: Các chỉ tiêu và thời gian đánh giá tính ổn định thúc đẩy nhanh $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	T0	1d	3d	7d	10d	14d
Vô khuẩn	x					x
Cảm quan	x	x	x	x	x	x
pH	x	x	x	x	x	x
Hàm lượng HA ($\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$)	H1N1	x	x	x	x	x
	H3N2	x	x	x	x	x
	B/Victoria	x	x	x	x	x
	B/Yamagata	x	x	x	x	x
Protein tổng số ($\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$)	x	x	x	x	x	x
Endotoxin ($\leq 100 \text{EU}/\text{liều}$)	x	x	x	x	x	x

Ghi chú: T0: Thời gian bắt đầu; d: ngày, x: thực hiện

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không có sự biến đổi về cảm quan và thành phần hóa lý so với tiêu chuẩn, công hiệu của vắc xin duy trì ở mức $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$ trong điều kiện bảo quản $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

(ICH. Q1A Stability Testing Guidelines: Stability Testing of new drug substances and products. ICH step 5. CPMP/ICH/380/95, 1995 và WHO. Guidelines on Stability Evaluation of vaccines, WHO/BS/06.2049, 2006)

2.3.2. Phương pháp kiểm tra chất lượng sản phẩm

2.3.2.1. Cảm quan

Kiểm tra bằng mắt thường để phát hiện các tiểu phân lạ, đánh giá màu sắc và độ đồng nhất của sản phẩm.

Tiêu chuẩn chấp nhận: dung dịch trong, không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phân lạ (TCCL cơ sở của IVAC).

2.3.2.2. pH

Áp dụng phương pháp đo điện thế điện cực.

Tiêu chuẩn chấp nhận: 6,5 - 7,5. (ĐBVN V - 2018 - Phụ lục 15.33 - trang PL-392)

2.3.2.3. Xác định hàm lượng HA (phản ứng SRID)

Phương pháp: phản ứng khuếch tán miễn dịch vòng đơn (SRID).

Nguyên lý: Phản ứng SRID xác định hàm lượng của kháng nguyên dựa trên sự kết hợp đặc hiệu với kháng thể tương ứng trong gel thạch theo nguyên lý của phản ứng Mancini. Kháng nguyên được xử lý với chất tẩy (swittegent) đảm bảo khả năng khuếch tán hoàn toàn kháng nguyên ra xung quanh và phản ứng với kháng thể đặc hiệu tạo thành vòng kết tủa trên gel thạch. Đường kính của vòng kết tủa tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng nguyên. Từ kết quả đo các đường kính của vòng kết tủa, nồng độ kháng nguyên được tính toán dựa theo đường chuẩn hay bằng phần mềm Combistats. (ĐĐVN V - 2018, Trang PL 1017-1018)

2.3.2.4. Kiểm tra hàm lượng formaldehyde tồn dư

Phương pháp: đo quang với thuốc thử acetylaceton.

Định lượng formaldehyd bằng cách đo cường độ màu của 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin ở bước sóng 412 nm. Phức hợp này có màu vàng chanh được tạo thành do phản ứng của formaldehyd tự do trong mẫu kiểm tra với acetylaceton và amoni trong môi trường acid yếu ở nhiệt độ cao để tăng tốc độ phản ứng. Tiêu chuẩn chấp nhận: $\leq 0,02\%$. (ĐĐVN V - 2018 - Phụ lục 15.25 - Trang PL 387)

2.3.2.5. Kiểm tra endotoxin

Sử dụng phương pháp LAL (Limulus amebocyte lysate) để xác định hàm lượng endotoxin trong sản phẩm, dựa trên nguyên tắc đông tụ gel do hoạt hóa proenzym khi có sự hiện diện của endotoxin.

Enzyme procoagulase trong lysate sẽ được hoạt hóa thành coagulase, chuyển coagulagen thành coagulin khi có mặt endotoxin và làm lysate đông tụ thành dạng gel (gelation). Ủ mẫu thử và endotoxin chuẩn với lysate. Hiện tượng đông tụ gel được phát hiện ở những giếng có sự hiện diện của endotoxin. Kết quả được tính căn cứ theo nồng độ endotoxin chuẩn và được biểu thị bằng đơn vị Quốc tế (EU/ml). (ĐĐVN V - 2018 – Phụ lục 13.2).

2.3.2.6. Nhận dạng HA

Phương pháp: phản ứng khuếch tán miễn dịch vòng đơn (SRID).

Tiêu chuẩn chấp nhận: Có vòng ngưng kết đặc hiệu.

2.3.2.7. Vô khuẩn

Phương pháp: Cây trực tiếp trên 2 loại môi trường là Thioglycolate và Trypsoy Broth. Sau khi cấy mẫu, các môi trường được ủ ở 2 nhiệt độ 30°C-35°C và 22°C- 25°C trong 14 ngày sau đó đọc kết quả.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong suốt thời gian theo dõi (sau 14 ngày). (ĐDVN V - 2018 - Phụ lục 15.7 - trang PL-368).

2.3.2.8. Kiểm tra hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp đo quang.

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp đo quang. Protein có trong mẫu thử được ổn định bằng DOC (deoxycholat natri) rồi cho kết tủa với TCA (tricloacetic axit). Sau đó hòa tan tủa và định lượng theo phương pháp Lowry. Protein phản ứng với đồng tactrate và thuốc thử Folin trong môi trường kiềm tạo phức màu xanh da trời có thể đo màu ở bước sóng 750 nm. (ĐDVN V - 2018 - Phụ lục 15.34 - Trang PL - 392).

2.3.2.9. Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI)

Sử dụng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu để chuẩn độ hiệu giá kháng thể kháng HA của các mẫu huyết thanh miễn dịch. Thử nghiệm dựa trên nguyên tắc kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh miễn dịch kết hợp với kháng nguyên làm ức chế phản ứng ngưng kết hồng cầu. (Phụ lục 4).

2.3.3. Xử lý thống kê

Các phân tích mô tả được sử dụng để mô tả các giá trị trung bình về trọng lượng và phần trăm tăng trọng lượng của chuột lang, chuột nhắt thí nghiệm; mức tăng nhiệt độ của thử thí nghiệm.

Các kiểm định so sánh các giá trị trung bình giữa các nhóm động vật thí nghiệm sử dụng vắc xin và giả dược (PBS) như ANOVA và T test được thực hiện trên phần mềm SPSS 16.0.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG NGUYÊN LIỆU NƯỚC CỐT CÚM ĐƠN CHỦNG

Kết quả đánh giá các tiêu chuẩn của nguyên liệu nước cốt chủng cúm A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria và B/Yamagata bao gồm:

Bảng 3.1: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm A/H1N1

Chỉ tiêu	Lô sản xuất			Tiêu chuẩn dự kiến
	NC-A/H1N1/01	NC-A/H1N1/02	NC-A/H1N1/03	
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	7,19	7,21	7,21	6,5 - 7,5
Hàm lượng HA ($\mu\text{g/ml}$)	303,35	325,3	251,5	≥ 60
Endotoxin (EU/60 μgHA)	0,20	0,18	0,48	≤ 100
Protein tổng số ($\mu\text{g} / 60 \mu\text{gHA}$)	118,44	144,63	116,23	≤ 300
Ovalbumin ($\mu\text{g} / 60 \mu\text{gHA}$)	0,069	0,124	0,534	≤ 5
Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Formaldehyde (%)	0,00023	0,00023	0,00019	$\leq 0,02$
Triton X-100 (%)	0,03	0,03	0,02	$\leq 0,1$

Kết quả bảng 3.1 mô tả kết quả 3 lô nước cốt chủng cúm H1N1 được sản xuất từ ống chủng IVR-215, ký hiệu NC-A/H1N1/01; NC-A/H1N1/02; NC-A/H1N1/03. Hàm lượng kháng nguyên HA 3 lô ở mức trung bình từ

251,5 - 325,3 $\mu\text{gHA/ml}$, endotoxin được kiểm soát ở mức thấp 0,18 - 0,48 EU/60 μgHA so với tiêu chuẩn dự kiến ≤ 100 EU/60 μgHA . Hàm lượng protein tổng số đạt so với tiêu chuẩn dự kiến ≤ 300 $\mu\text{g}/60$ μgHA và đảm bảo hàm lượng protein khi pha vắc xin thành phẩm là ≤ 300 $\mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$. Các thành phần tồn dư khác như formaldehyde, ovalbumin và triton X-100 nằm trong giới hạn khuyến cáo.

Bảng 3.2: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm A/H3N2

Chỉ tiêu	Lô sản xuất			Tiêu chuẩn dự kiến
	NC-A/H3N2/01	NC-A/H3N2/02	NC-A/H3N2/03	
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	7,20	7,18	7,21	6,5 - 7,5
Hàm lượng HA ($\mu\text{g/ml}$)	337,4	526,9	550,1	≥ 60
Endotoxin (EU/60 μgHA)	4,45	1,14	1,09	≤ 100
Protein tổng số ($\mu\text{g}/60$ μgHA)	125,25	101,27	118,93	≤ 300
Ovalbumin ($\mu\text{g}/60$ μgHA)	0,031	0,010	0,036	≤ 5
Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Formaldehyde (%)	0,00016	0,00019	0,00018	$\leq 0,02$
Triton X-100 (%)	0,02	0,03	0,03	$\leq 0,1$

Kết quả chất lượng 3 lô nước cốt chủng cúm A/H3N2 được sản xuất từ ống chủng IVR-227 cho thấy, tất cả các chỉ tiêu chất lượng đều đạt theo tiêu chuẩn đề ra với hàm lượng HA được cô đặc ở mức cao gấp khoảng 22,5 - 36,7 lần so với liều dự kiến (15 μgHA). Các chất tồn dư và thành phần không đặc hiệu được kiểm soát trong giới hạn cho phép (Bảng 3.2).

Bảng 3.3: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm B/Victoria

Chỉ tiêu	Lô sản xuất			Tiêu chuẩn dự kiến
	NC-B/Vic/01	NC-B/Vic/02	NC-B/Vic/03	
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	7,18	7,21	7,21	6,5 - 7,5
Hàm lượng HA ($\mu\text{g/ml}$)	268,4	340,6	269,0	≥ 60
Endotoxin (EU/60 μgHA)	0,45	0,18	2,23	≤ 100
Protein tổng số ($\mu\text{g} /60 \mu\text{gHA}$)	129,31	90,69	125,34	≤ 300
Ovalbumin ($\mu\text{g} /60 \mu\text{gHA}$)	0,025	0,079	0,221	≤ 5
Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Formaldehyde (%)	0,00014	0,00021	0,00021	$\leq 0,02$
Triton X-100 (%)	0,03	0,03	0,03	$\leq 0,1$

Bảng 3.3 mô tả kết quả chất lượng 3 lô nước cốt chủng cúm B/Victoria. Được sản xuất từ ống chủng IBR-26, ký hiệu NC-B/Vic/01; NC-B/Vic/02; NC-B/Vic/03. Số liệu cho thấy tất cả các chỉ tiêu chất lượng đều đạt theo tiêu chuẩn khuyến cáo của WHO và DĐVN với hàm lượng kháng nguyên HA ở mức 268,4 - 340,6 $\mu\text{g/ml}$. Hàm lượng endotoxin được kiểm soát ở mức thấp từ 0,18 - 2,23 EU/60 μgHA và protein tổng số từ 90,69 - 129,31 $\mu\text{g}/60 \mu\text{gHA}$, các chất ngoại lai và thành phần không đặc hiệu trong giới hạn cho phép.

Bảng 3.4: Kết quả chất lượng nước cốt chủng cúm B/Yamagata

Chỉ tiêu	Lô sản xuất			Tiêu chuẩn dự kiến
	NC-B/Yam/01	NC-B/Yam/02	NC-B/Yam/03	
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	7,25	7,30	7,23	6,5 - 7,5
Hàm lượng HA ($\mu\text{g/ml}$)	88,1	107,2	75,7	≥ 60
Endotoxin (EU/60 μgHA)	102	5,3	0,7	≤ 100
Protein tổng số ($\mu\text{g} /60 \mu\text{gHA}$)	109,66	146,21	91,38	≤ 300
Ovalbumin ($\mu\text{g} /60 \mu\text{gHA}$)	0,448	0,111	0,137	≤ 5
Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Formaldehyde (%)	0,00016	0,00021	0,00018	$\leq 0,02$
Triton X-100 (%)	0,04	0,03	0,04	$\leq 0,1$

Kết quả bảng 3.4 mô tả kết quả chất lượng 3 lô nước cốt chủng cúm B/Yamagata được sản xuất từ ống chủng gốc B/Phuket/3073/2013, ký hiệu NC-B/Yam/01; NC-B/Yam/02; NC-B/Yam/03. Hàm lượng kháng nguyên HA cô đặc chỉ đạt 75,7 - 107,2 $\mu\text{g/ml}$, thấp hơn so với hàm lượng HA ở 3 chủng còn lại. Điều này có thể do chủng gốc sử dụng là chủng hoang dại, không phải chủng tái tổ hợp nên hiệu suất thu hồi HA thấp. Các chỉ tiêu còn lại đều đạt tiêu chuẩn dự kiến.

Như vậy, các lô nước cốt của cả bốn chủng cúm A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria và B/Yamagata đều đạt tiêu chuẩn về các chỉ tiêu dự

kiến đề ra theo khuyến cáo của WHO và ĐĐVN. Điều này thể hiện tính khả thi khi sử dụng các lô nước cốt này vào phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng.

Nước cốt dùng cho phối trộn vắc xin cúm mùa thành phẩm chứa bốn chủng nên khi xây dựng tiêu chuẩn dự kiến cho vắc xin cô đặc, đặc biệt là tiêu chuẩn của các chất ngoại lai và các thành phần không đặc hiệu tồn dư trong sản phẩm, chúng tôi đưa ra tiêu chuẩn từng thành phần tương ứng với hàm lượng kháng nguyên HA với cả bốn chủng là 60 µgHA/liều 0,5 ml, endotoxin ≤ 100 EU/60 µgHA, protein tổng số ≤ 300 µg protein/60 µgHA vắc xin thành phẩm và phù hợp với khuyến cáo WHO trong WHO-TRS 927, và ĐĐVN V đối với từng thành phần trong vắc xin. Các chỉ tiêu còn lại được áp dụng theo tiêu chuẩn của nước cốt đơn chủng pha vắc xin IVACFLU-S.

Bảng 3.5: TCCL nước cốt pha vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Tài liệu áp dụng
Cảm quan	Quan sát bằng mắt	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ.	TCCS
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	ĐĐVN V, 2018
pH	Đo điện thế điện cực	6,5-7,5	TCCS
Hàm lượng kháng nguyên HA	Phản ứng khuếch tán miễn dịch vòng đơn (SRID)	≥ 60 µgHA/ml	TCCS
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	≤ 100 EU/60 µg HA	TCCS

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Tài liệu áp dụng
Ovalbumin	ELISA–kit serazyme	$\leq 5 \mu\text{g}/60 \mu\text{g HA}$	TRS 927, Trang 120
Hiệu lực bất hoạt	Cấy truyền trên trứng gà có phôi.	$\geq 80\%$ trứng sống. Chuẩn độ HA âm tính sau 2 lần cấy truyền.	TRS 927, Trang 116
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/60 \mu\text{g HA}$	TCCS
Formalin	Đo quang với thuốc thử Acetylaceton	$\leq 0,02 \%$	ĐĐVN V, 2018
Triton X-100	Đo quang	$\leq 0,1\%$	TCCS

3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÍNH TƯƠNG THÍCH GIỮA CÁC THÀNH PHẦN KHÁNG NGUYÊN CÚM

Bảng 3.6: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm A/H1N1 với cúm B/Yamagata

Chỉ tiêu		Lô thử nghiệm		
		TN/01	TN/02	TN/03
Cảm quan		Sau khi lắc đều, tạo thành dung dịch đồng nhất, trắng mờ, không có cặn		
pH		7,27	7,20	7,24
An toàn chung		Đạt	Đạt	Đạt
Hàm lượng HA ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Chủng A/H1N1	14,8	15,0	15,1
	Chủng B/Yamagata	15,2	15,4	14,9

Bảng 3.7: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm A/H3N2 với cúm B/Yamagata

Chỉ tiêu		Lô thử nghiệm		
		TN/04	TN/05	TN/06
Cảm quan		Sau khi lắc đều, tạo thành dung dịch đồng nhất, trắng mờ, không có cặn		
pH		7,17	7,22	7,20
An toàn chung		Đạt	Đạt	Đạt
Hàm lượng HA ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Chủng H3N2	14,9	15,2	14,7
	Chủng B/Yamagata	15,1	15,4	14,7

Bảng 3.8: Kết quả đánh giá tính tương thích thành phần kháng nguyên cúm B/Victoria với cúm B/Yamagata

Chỉ tiêu		Lô thử nghiệm		
		TN/07	TN/08	TN/09
Cảm quan		Sau khi lắc đều, tạo thành dung dịch đồng nhất, trắng mờ, không có cặn		
pH		7,22	7,25	7,23
An toàn chung		Đạt	Đạt	Đạt
Hàm lượng HA ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Chủng B/Victoria	15,8	15,1	15,3
	Chủng B/Yamagata	15,1	14,8	15,0

Kết quả bảng 3.6, 3.7 và 3.8 cho thấy ở các lô nghiên cứu cảm quan đều giống nhau, dung dịch đồng nhất, có màu trắng mờ đặc trưng và không có hiện tượng bất thường (ví dụ như kết tủa). Đồng thời, giá trị pH ổn định giữa các lô và nằm trong tiêu chuẩn dự kiến. Hàm lượng kháng nguyên HA của mỗi chủng dao động xung quanh hàm lượng phối trộn ban đầu 15 µg/liều (30 µg/ml). Đánh giá về chỉ tiêu an toàn chung đều đạt khi phối trộn chủng B/Yamagata với 3 chủng còn lại.

Theo *Thorsten Wolff và Michael Veit, 2021* [5] thì kháng nguyên của hai chủng cúm B/Victoria và B/Yamagata có sự tương tác chéo thấp với nhau. Tuy nhiên, trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi chưa nhận thấy sự tương tác này rõ ràng, vì kết quả hàm lượng kháng nguyên của hai chủng B/Victoria và B/Yamagata rất gần với hàm lượng của công thức phối trộn (105,3 % ở chủng Victoria và 98,7 % ở chủng Yamagata). Theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, sai số cho phép đối với phương pháp định lượng hàm lượng HA là 80 % đến 120 %.

Kết luận: Đánh giá kết quả từ các lô nghiên cứu cho thấy kháng nguyên cúm B/Yamagata tương thích với các thành phần kháng nguyên cúm A/H1N1, A/H3N2 và cúm B/Victoria. Chúng tỏ rằng, các thành phần kháng nguyên trong vắc xin cúm bốn chủng dạng mảnh tương thích với nhau. Đồng thời, chưa nhận thấy sự tương tác chéo giữa các chủng cúm và đảm bảo an toàn khi phối trộn.

3.3. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHỐI TRỘN

3.3.1. Đánh giá kết quả phối trộn thử nghiệm vắc xin cúm mùa bốn chủng

Dựa trên kết quả đánh giá tại mục 3.1, 3.2 và quy trình phối trộn vắc xin IVACFLU-S đang sản xuất tại IVAC. Phối trộn thử nghiệm 03 lô TN/10, TN/11, TN/12 với các bước thực hiện và thông số phối trộn theo quy trình dự kiến (Hình 2.2) để đánh giá các chỉ tiêu nhằm xác định các bước phối trộn và thông số thích hợp cho quy trình sản xuất vắc xin cúm mùa bốn chủng, kết quả đánh giá được thể hiện ở bảng kết quả dưới đây:

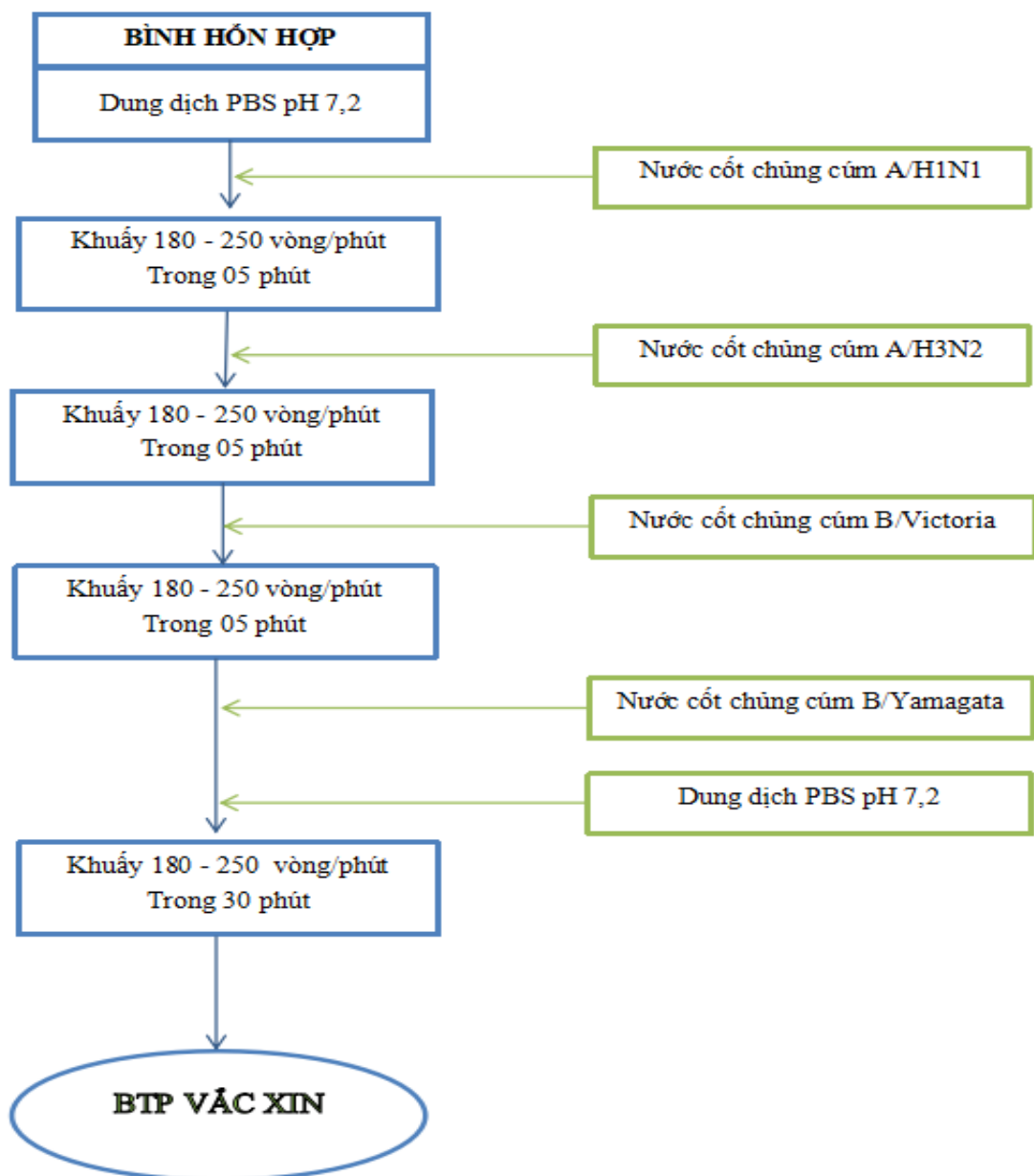
Bảng 3.9: Kết quả đánh giá các chỉ tiêu của quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh

Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn chất lượng tham khảo	Lô vắc xin BTP		
		TN/10	TN/11	TN/12
Cảm quan	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ.	Đạt	Đạt	Đạt
pH	6,5 – 7,5	7,19	7,38	7,24
Vô khuẩn	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trên cả 2 môi trường nuôi cấy	Đạt	Đạt	Đạt
Nhận dạng HA	Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu	Đạt	Đạt	Đạt
Endotoxin	≤ 100 EU/liều	40	5	10
Protein tổng số	≤ 300 μ g/liều	242,36	254,36	225,42
Hàm lượng HA	Chủng B/Victoria (≥ 15 μ g/liều)	19,0	20,0	18,8
	Chủng B/Yamagata (≥ 15 μ g/liều)	17,3	20,1	17,7
	Chủng H1N1 (≥ 15 μ g/liều)	16,4	19,7	18,0
	Chủng H3N2 (≥ 15 μ g/liều)	18,6	21,1	18,9
Formaldehyde tồn dư	$\leq 0,02\%$	0,00015	0,00010	0,00011
An toàn chung	Toàn bộ chuột sống khoẻ mạnh, lên cân sau 7 ngày	Đạt	Đạt	Đạt

Bảng 3.9 cho thấy kết quả 3 lô phối trộn thử nghiệm đều đạt yêu cầu về cảm quan, vô khuẩn, nhận dạng và an toàn chung. Các giá trị về hàm lượng kháng nguyên, protein tổng số, formaldehyde tồn dư và endotoxin đều đạt theo khuyến cáo của WHO và DĐVN.

3.3.2. Xây dựng quy trình phối trộn

Xây dựng quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh dựa trên kết quả đánh giá các chỉ tiêu 3 lô phối trộn TN/10, TN/11, TN/12 và các thông số của quy trình đã được thiết lập ở trên. Quy trình được mô tả theo sơ đồ dưới đây:



Hình 3.1: Quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh

Thuyết minh quy trình phối trộn

Công thức phối trộn

Công thức pha chế 1,0 ml vắc xin gồm:

- | | |
|---|---------------|
| - Chủng A/H1N1 (A/Victoria/2570/2019/H1N1) | ≥ 30µg HA |
| - Chủng A/H3N2 (A/Darwin/9/2021/H3N2) | ≥ 30µg HA |
| - Chủng B (B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria lineage)) | ≥ 30µg HA |
| - Chủng B (B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)) | ≥ 30µg HA |
| - Dung dịch đệm PBS pH 7,2 | vừa đủ 1,0 ml |

Công thức thành phần trong một liều vắc xin cúm mùa bốn chủng của IVAC tương tự như công thức thành phần các vắc xin cúm mùa bốn chủng hiện hành của các nước đang sản xuất trên thế giới và theo khuyến cáo của WHO và DĐVN.

Các thông số phối trộn

Các thông số phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh được xác định như sau:

- Tốc độ khuấy trong quy trình: Duy trì cùng tốc độ khuấy từ khi bắt đầu đến khi kết thúc quá trình phối trộn vắc xin với tốc độ 180 - 250 vòng/phút.

- Thời gian phối trộn trong quy trình: Thời gian khuấy sau khi cho mỗi chủng cúm 05 phút. Thời gian khuấy sau khi bổ sung dung dịch PBS pH 7,2 vừa đủ thể tích bán thành phẩm 30 phút.

- Phối trộn 4 chủng cúm mùa thực hiện theo trình tự:

1. Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm A/H1N1.
2. Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm A/H3N2.
3. Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm B/Victoria.
4. Nước cốt chứa kháng nguyên chủng cúm B/Yamagata.

Công thức phối trộn và các thông số quy trình đã được thiết lập (tốc độ khuấy, thời gian thực hiện, trình tự phối trộn các chủng cúm) trong nghiên cứu là phù hợp để phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh.

3.4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM

3.4.1. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng tại NICVB

Áp dụng quy trình phối trộn đã được xây dựng tại mục 3.3.4, tiến hành sản xuất 03 lô vắc xin phối trộn cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô thử nghiệm (10.000 liều/ lô). Kết quả đánh giá chất lượng được thể hiện ở bảng dưới đây:

Bảng 3.10: Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng tại NICVB

TT	Chỉ tiêu		Lô vắc xin IVACFLU-4S		
			02.23	03.23	04.23
1	Cảm quan		Đạt	Đạt	Đạt
2	pH		7,22	7,17	7,18
3	Vô khuẩn		Đạt	Đạt	Đạt
4	Hàm lượng HA ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	H1N1	16,58	17,16	17,18
		H3N2	16,79	17,52	17,35
		B/Victoria	17,01	17,02	17,24
		B/Yamagata	17,15	17,65	17,16
5	Nhận dạng HA		Đạt	Đạt	Đạt
6	Endotoxin (EU/liều)		< 12	< 3	< 3
7	Protein ($\mu\text{g}/\text{liều}$)		234,47	122,21	129,99
8	Formalin (%)		0,0003	0,0003	0,0002
9	An toàn chung		Đạt	Đạt	Đạt

Bảng 3.10 cho thấy kết quả kiểm tra chất lượng 3 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh do NICVB thực hiện đều đạt tiêu chuẩn chất lượng của WHO và Dược điển Việt Nam.

Sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh IVACFLU-4S tại IVAC

Sau khi được phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh, bán thành phẩm sẽ được chuyển đến công đoạn đóng lọ, bao bì đóng gói và bảo quản. Đây là giai đoạn cuối cùng trong sản xuất, sản phẩm được đóng trong lọ

trên dây chuyên đóng lọ tự động trong điều kiện phòng sạch cấp độ A. Vắc xin được đóng liều 0,5 ml trong lọ thủy tinh 2 ml, đóng nút cao su và bọc nắp nhôm flip off. Tiến hành bao bì, đóng gói và bảo quản sản phẩm ở +2°C đến +8°C.



Hình 3.2: Sản phẩm vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S

3.4.2. Kết quả thử nghiệm trên động vật thí nghiệm tại IVAC

3.4.2.1. Kết quả an toàn

➤ Kết quả an toàn chung

Thử nghiệm an toàn chung được tiến hành trên 05 chuột nhắt trắng và 02 chuột lang. Kết quả theo dõi chuột trong suốt thời gian tiến hành thử nghiệm an toàn chung được thể hiện trong bảng 3.11 và 3.12 như sau:

Bảng 3.11: Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột nhắt của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S

Lô	Trọng lượng TB của chuột nhắt (g) theo ngày			Tăng trọng trung bình so với ngày đầu tiên (%)	Kết luận
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 7		
IVACFLU-4S 02.23	17,5	20,38	23,56	34,63	Đạt
IVACFLU-4S 03.23	18,34	22,12	24,84	35,44	Đạt
IVACFLU-4S 04.23	18,86	22,24	24,94	32,24	Đạt
PBS 010123	18,74	23,08	25,18	34,36	Đạt
$p_1 > 0,05, p_2 > 0,05, p_3 > 0,05^*$					

* T-test, p_1 : PBS – IVACFLU-4S 02.23, p_2 : PBS – IVACFLU-4S 03.23
 p_3 : PBS – IVACFLU-4S 04.23

Kết quả thử nghiệm an toàn chung của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S được thực hiện trên chuột nhắt với 5 chuột nhắt/vắc xin. Kết quả cho thấy kết quả thử nghiệm của 3 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S lô 02.23, 03.23, 04.23 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột nhắt sau 7 ngày thử nghiệm dao động trong khoảng 6,06 – 6,44 g/chuột/7 ngày (32,24%-35,44%). Không có sự khác biệt giữa mức tăng trọng lượng trung bình sau 7 ngày của các chuột thử nghiệm được tiêm vắc xin IVACFLU-4S với chuột trong nhóm tiêm PBS, $p > 0,05$ (Bảng 3.11).

Bảng 3.12: Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột lang của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S

Lô	Trọng lượng TB của chuột lang (g) theo ngày			Tăng trọng trung bình so với ngày đầu tiên (%)	Kết luận
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 7		
IVACFLU-4S 02.23	297,5	320	340	14,29	Đạt
IVACFLU-4S 03.23	305,0	335	357,5	17,21	Đạt
IVACFLU-4S 04.23	302,5	332,5	352,5	16,53	Đạt
PBS010123	303,75	333,75	355	16,87	Đạt
$p_1 > 0,05, p_2 > 0,05, p_3 > 0,05^*$					

* *T-test*, p_1 : PBS – IVACFLU-4S 02.23, p_2 : PBS – IVACFLU-4S 03.23
 p_3 : PBS – IVACFLU-4S 04.23

Kết quả thử nghiệm an toàn chung của vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S được thực hiện trên chuột lang với 2 chuột lang/vắc xin. Kết quả cho thấy kết quả thử nghiệm của 3 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng IVACFLU-4S lô 02.23, 03.23, 04.23 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột nhắt sau 7 ngày thử nghiệm dao động trong khoảng 42,5-51,25 g/chuột/7 ngày (14,29-17,21%). Không có sự khác biệt giữa mức tăng trọng lượng trung bình sau 7 ngày của các chuột thử nghiệm được tiêm vắc xin IVACFLU-4S với chuột trong nhóm tiêm PBS, $p > 0,05$ (Bảng 3.12).

Kết luận: Thử an toàn chung vắc xin IVACFLU-4S lô số 02.23; 03.23; 04.23 và giả dược lô 010123 cho thấy tất cả chuột sống, khỏe mạnh, lên cân, đạt yêu cầu về an toàn chung theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, 2018.

➤ **Kết quả xác định chất gây sốt**

Bảng 3.13: Kết quả đo nhiệt độ của thử thử chất gây sốt

Mẫu thử/ thử	IVACFLU-4S 02.23			IVACFLU-4S 03.23			IVACFLU-4S 04.23			PBS 010123		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T ⁰ nền (°C)	38,9	39,1	38,8	38,9	39,1	39,0	38,8	39,0	38,9	39,0	39,1	38,8
T ⁰ tối đa (°C)	38,9	39,0	38,9	39,0	39,3	39,0	39,1	38,9	38,9	39,2	39,2	39,1
T ⁰ tăng (≤ 0,6°C)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2
Tổng chênh T ⁰ (≤ 1,3°C)	Σ= 0,1°C			Σ= 0,3°C			Σ= 0,3°C			Σ= 0,5°C		
Kết luận	Đạt			Đạt			Đạt			Đạt		

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành và đánh giá kết quả tại IVAC nhằm xác định mức độ tồn dư trong sản phẩm của các thành phần gây tăng nhiệt độ thử thí nghiệm có nguồn gốc từ vi khuẩn (endotoxin) và các thành phần gây sốt không đặc hiệu khác.

Kết luận: Theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt nam V, 2018 mẫu thử đạt yêu cầu về thử chất gây sốt nếu thỏa mãn 2 yếu tố: không có thử nào có đáp ứng tăng nhiệt độ lớn hơn 0,6°C và tổng số đáp ứng tăng nhiệt độ của 3 thử trong một nhóm ≤ 1,3°C. Chiếu theo tiêu chuẩn trên kết quả được chỉ ra ở bảng 3.13 đã cho thấy tất cả 3 lô vắc xin IVACFLU-4S và PBS lô 010123 đều đạt yêu cầu thử chất gây sốt.

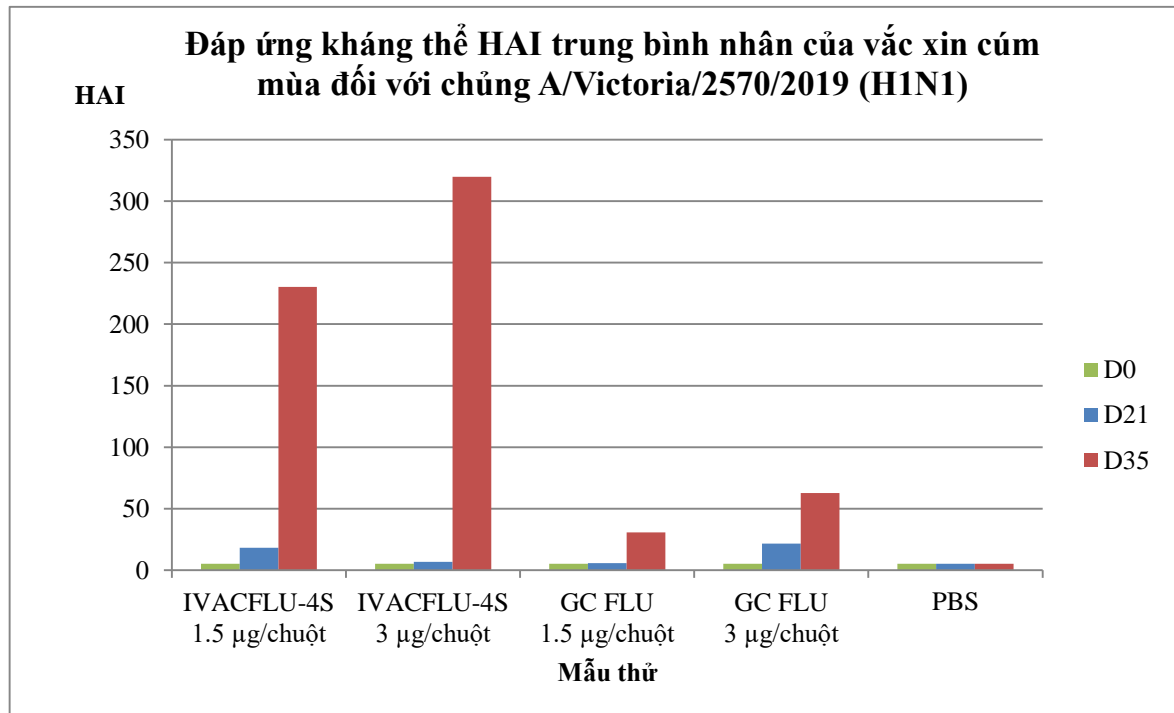
3.4.2.2. Kết quả đánh giá tính sinh miễn dịch

Tính sinh miễn dịch là một trong những tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả của một vắc xin phòng bệnh. Để tăng hiệu quả đáp ứng miễn dịch

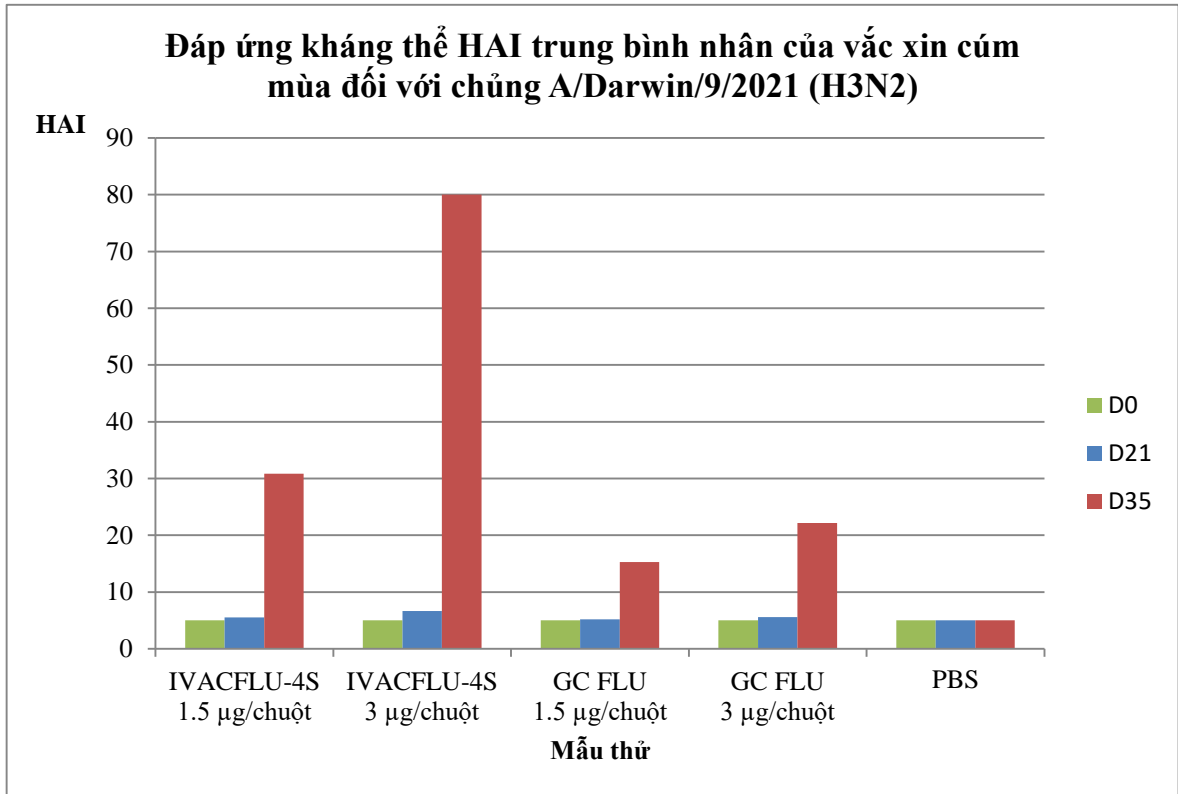
cho vắc xin cúm bất hoạt, hiện nay người ta thêm các tá chất trong công thức sản xuất vắc xin cúm [18], [19]. Tuy nhiên, việc bổ sung tá chất có thể tạo ra một số phản ứng phụ ảnh hưởng đến an toàn chung của vắc xin. Đối với vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh IVACFLU-4S do IVAC sản xuất không sử dụng tá chất trong công thức thành phần.

Để đánh giá tính sinh miễn dịch vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh IVACFLU-4S, tiến hành pha loãng vắc xin cúm mùa bốn chủng lô IVACFLU-4S 02.23 tương ứng liều kháng nguyên HA là 3,0 $\mu\text{g}/\text{liều}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{liều}$ và thử nghiệm trên chuột nhắt. Vắc xin GCFLU Quadrivalent (vắc xin cúm mùa bốn chủng thương mại - Hàn Quốc) được sử dụng là vắc xin đối chứng trong thử nghiệm này. Vắc xin đối chứng được pha loãng với tới hàm lượng kháng nguyên tương ứng là 3 $\mu\text{g}/\text{liều}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{liều}$. Mỗi loại kháng nguyên trong vắc xin cúm mùa bốn chủng A/Victoria/2570/2019 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2), B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria) và B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata) sẽ được đánh giá tính sinh miễn dịch riêng biệt.

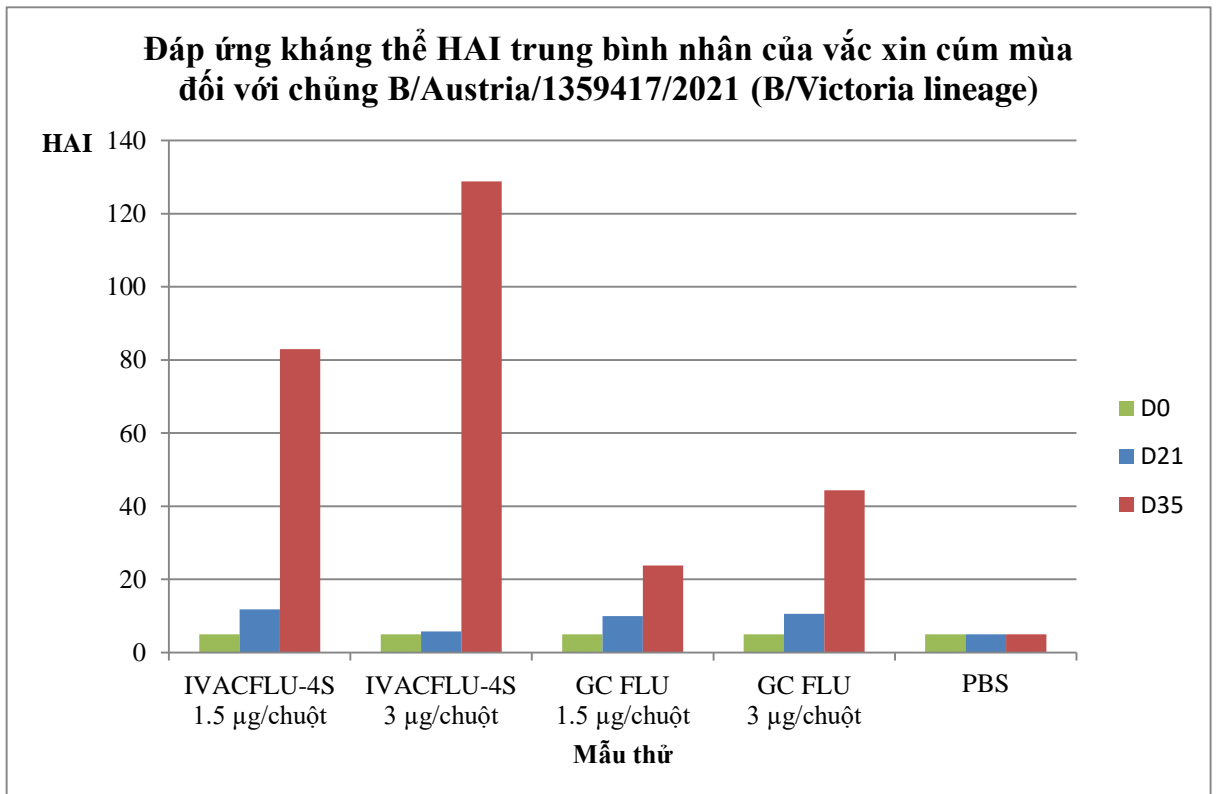
Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể HAI của huyết thanh chuột miễn dịch được chỉ ra ở Hình 0.3, Hình 0.4, Hình 0.5, Hình 0.6:



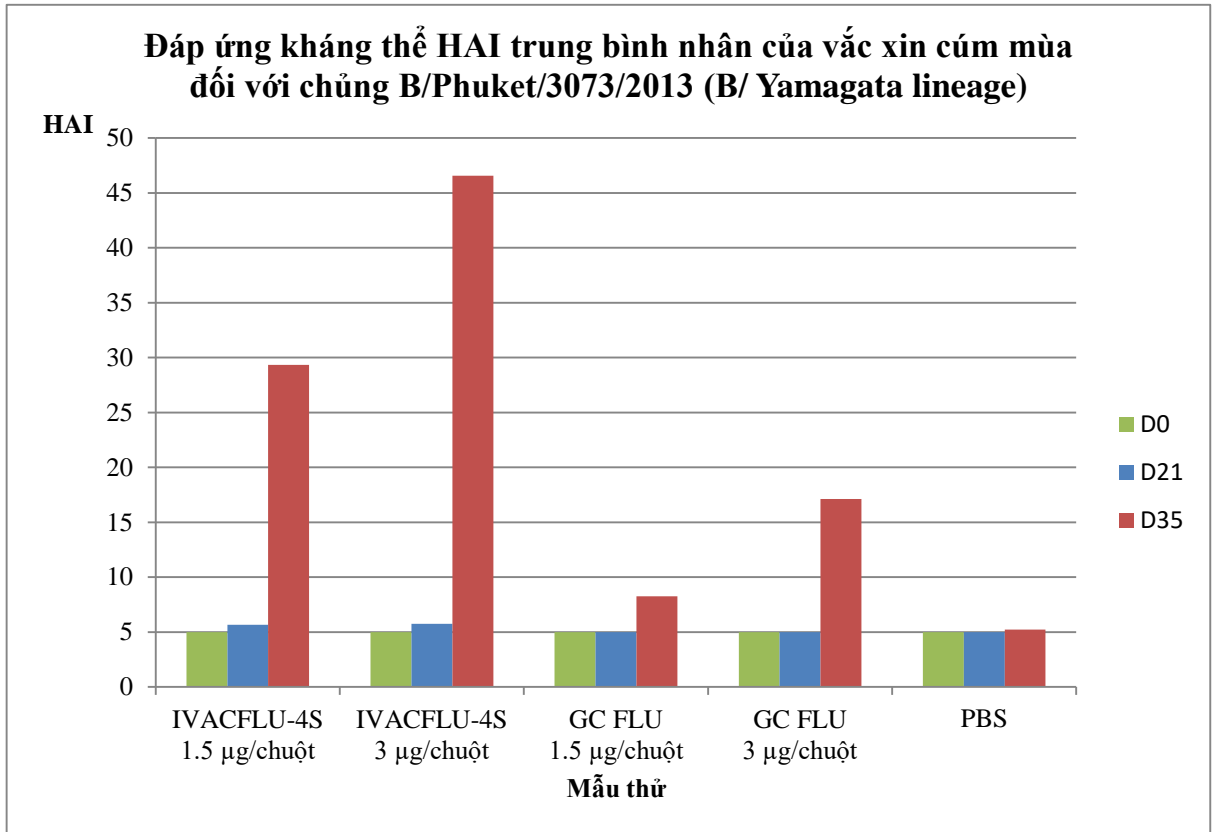
Hình 0.3: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng A/Victoria/2570/2019 (H1N1) của chuột nhắt giữa D0, D21 và D35



Hình 0.4: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng A/Darwin/9/2021 (H3N2) của chuột nhất giữa D0, D21 và D35



Hình 0.5: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng B/Austria/1359417/2021 (B/ Victoria lineage) của chuột nhất giữa D0, D21 và D35



Hình 0.6: Biểu đồ đáp ứng kháng thể kháng chủng B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage) của chuột nhất giữa D0, D21 và D35

Đáp ứng kháng thể của cúm A/H1N1 đạt cao nhất, tiếp đến là cúm B Victoria cao hơn cúm A/H3N2, và cúm B/Yamagata đạt thấp nhất đối với cả 2 loại vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU Quadrivalent. Nhìn chung, đáp ứng miễn dịch sau mũi 1 (D21) của cả 4 chủng cúm ở cả 2 nồng độ miễn dịch của 2 loại vắc xin đều tăng không đáng kể so với D0. Sau đủ 2 liều tiêm ở hàm lượng kháng nguyên cao nhất 3 µg HA/chuột, hiệu giá kháng thể trung bình nhân (GMT) của cúm A/H1N1 đạt cao nhất từ 62,77 HAI (GCFLU Quadrivalent lô Q60222031) đến 320,00 HAI (IVACFLU-4S 02.23). Trong khi đó, GMT của cúm B/Yamagata đạt thấp nhất từ 17,11 HAI (GCFLU Quadrivalent lô Q60222031) đến 46,55 HAI (IVACFLU-4S 02.23). Cũng ở liều miễn dịch kháng nguyên cao nhất 3 µg HA/chuột của 2 lô vắc xin GCFLU Quadrivalent lô Q60222031 và IVACFLU-4S 02.23, GMT của chủng cúm B/Victoria lần lượt là 44,38 HAI và 128,84 HAI; cúm A/H3N2 lần lượt là 22,19 HAI và 80,00 HAI.

Bảng 0.14: Tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể trung bình nhân (GMT) của huyết thanh chuột miễn dịch trước và sau tiêm vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU Quadrivalent

Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh	Vắc xin	IVACFLU-4S Lô 02.23		GCFLU Quadrivalent Lô Q60222031	
		Liều MD ($\mu\text{g}/\text{chuột}$)	1,5	3	1,5
Chủng H1N1	D21/D0	3,61	1,32	1,15	4,32
	D35/D0	46,09	64,00	6,11	12,55
	D35/D21	12,76	48,50	5,32	2,91
Chủng H3N2	D21/D0	1,11	1,33	1,04	1,12
	D35/D0	6,17	16,00	3,05	4,44
	D35/D21	12,03	5,56	2,95	3,95
Chủng B/ Victoria	D21/D0	2,35	1,15	4,76	8,88
	D35/D0	16,59	25,77	16,59	25,77
	D35/D21	7,05	22,43	2,38	4,19
Chủng B/ Yamagata	D21/D0	1,13	1,15	1,00	1,00
	D35/D0	5,87	9,31	1,65	3,42
	D35/D21	5,19	8,10	1,65	3,42

Kết quả xác định hiệu giá kháng thể HAI trong huyết thanh chuột miễn dịch cho thấy có sự tương đồng giữa vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU ở liều miễn dịch 1,5 $\mu\text{g}/\text{chuột}$ và 3 $\mu\text{g}/\text{chuột}$ về cả 2 tiêu chí hiệu giá trung bình nhân (GMT) và tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể trước và sau tiêm vắc xin.

Nhìn chung đáp ứng sau mũi 1 (D21) thấp. Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh sau liều 1 so với máu nền (D21/D0) đối với chủng H1N1 đạt ở mức từ 1,32 lần (IVACFLU-4S liều 3 μg) đến 4,32 lần (GCFLU - liều 3 μg); đối với chủng B/Victoria tỷ lệ D21/D0 đạt từ 1,15 lần (IVACFLU-4S liều 3 μg) đến 8,88 lần (GCFLU - liều 3 μg); đối với chủng cúm B/Yamagata và chủng H3N2 hầu như không có đáp ứng, tỷ lệ D21/D0 cao nhất với chủng H3N2 cũng chỉ đạt 1,33 lần (IVACFLU-4S liều 1,5 μg) và tỷ lệ D21/D0 cao nhất

với chủng B/Yamagata cũng chỉ đạt 1,15 lần (IVACFLU-4S liều 3 μ g) (Bảng 3.13)

Đáp ứng sau mũi 2 (D35) tăng cao cách biệt so với máu nền làm cho tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh giữa D35/D0 và D35/D21 cũng chênh lệch cách biệt.

Vắc xin IVACFLU-4S lô 02.23 với liều miễn dịch 3 μ g HA/chuột đạt yêu cầu về tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể giữa D35/D21 và D35/D0 ≥ 4 lần. Ở liều miễn dịch 1,5 μ g HA/chuột tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh ≥ 4 lần cho cả 4 chủng cúm H1N1, H3N2 và B/Victoria và B/Yamagata cũng đạt được khi so sánh D35/D0 đối với vắc xin IVACFLU-4S với tỉ lệ chuyển đổi nhỏ hơn so với liều miễn dịch 3 μ g HA/chuột.

Vắc xin GCFLU Quadrivalent lô Q60222031 có chuyển đổi hiệu giá ≥ 4 lần ở liều miễn dịch 3 μ g HA/chuột chỉ đạt được đối với 2 chủng cúm H1N1 và B/Victoria khi so sánh D35/D0.

Kết luận: Đáp ứng kháng thể trên chuột có sự tương đồng giữa vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU Quadrivalent về 2 tiêu chí: hiệu giá trung bình nhân GMT và tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể ở liều miễn dịch 3 μ g HA/chuột giữa D21/D0, D35/D0 và D35/D21. Đáp ứng kháng thể của cúm A/H1N1 đạt cao nhất, tiếp đến là cúm B/Victoria cao hơn cúm A/H3N2, và cúm B/Yamagata đạt thấp nhất đối với cả 2 loại vắc xin IVACFLU-4S và GCFLU Quadrivalent.

Vắc xin IVACFLU-4S được miễn dịch với hàm lượng kháng nguyên 3 μ gHA/chuột đạt yêu cầu về tỷ số chuyển đổi hiệu giá kháng thể giữa D35/D21 và D35/D0 (≥ 4 lần).

3.4.2.3. Kết quả nghiên cứu tính ổn định của vắc xin cúm thành phẩm

Nghiên cứu tính ổn định được thực hiện trên vắc xin cúm mùa bốn chủng thành phẩm nhằm đánh giá tính ổn định của kháng nguyên HA và các thành phần hóa lý của sản phẩm theo thời gian bảo quản và các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau. Đây là cơ sở để xác định thời hạn lưu hành và điều kiện bảo quản sản phẩm sau này.

➤ *Nghiên cứu thúc đẩy nhanh*

Đối với vắc xin cúm mùa thành phẩm bốn chủng, nghiên cứu thúc đẩy nhanh được tiến hành ở 2 nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$ bao gồm các chỉ tiêu cảm quan, pH, hàm lượng kháng nguyên HA, protein tổng số và endotoxin. Khi đặt vắc xin trong điều kiện thúc đẩy nhanh, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$ không ảnh hưởng đối với chỉ tiêu cảm quan, pH, protein tổng số và endotoxin. Cũng ở các điều kiện này, tỷ lệ (%) sụt giảm hàm lượng kháng nguyên HA, nhiều hay ít tùy thuộc vào từng chủng như trình bày ở bảng 3.15, bảng 3.16, bảng 3.17, bảng 3.18, bảng 3.19, bảng 3.20.

Bảng 3.15: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 02.23 ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,23	7,23	7,22	7,23	7,22	7,23	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	254,38	254,33	254,32	254,11	254,22	254,19	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	19,7	19,6	18,6	18,0	17,2	16,7
			H3N2	21,1	20,3	19,8	19,5	17,5	16,3
			B/Victoria	20,3	19,9	18,3	17,7	16,9	16,6
			B/Yamagata	20,1	19,4	18,3	17,3	16,8	16,6
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{EU}/\text{liều}$	5	5	5	5	5	5	

Ghi chú: NA: Không thực hiện

Bảng 3.16: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 02.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,23	7,23	7,25	7,26	7,27	7,27	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	254,38	254,1	252,11	248,4	245,3	241,4	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	19,7	19,4	18,1	17,4	16,2	16,1
			H3N2	21,1	20,0	19,5	19,0	16,7	16,1
			B/Victoria	20,3	19,8	17,8	17,4	16,6	16,3
			B/Yamagata	20,1	19,0	17,9	17,1	16,6	16,2
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	5	5	5	5	5	5	

Ghi chú: NA: Không thực hiện

Bảng 3.17: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 03.23 ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,20	7,20	7,21	7,22	7,20	7,18	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	151,26	150,88	148,95	146,33	145,02	144,11	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	22,3	21,95	21,05	20,5	19,85	19,15
			H3N2	19,1	18,8	18,45	18,0	17,7	17,30
			B/Victoria	19,5	19,15	18,75	18,15	17,7	16,80
			B/Yamagata	20,0	19,8	19,25	18,7	18,25	17,75
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	

Ghi chú: NA: Không thực hiện

Bảng 3.18: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 03.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,20	7,22	7,20	7,2	7,18	7,20	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	151,26	150,55	148,05	146,65	144,95	143,01	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	22,3	21,1	20,8	20,5	20,0	19,5
			H3N2	19,1	18,9	18,5	18,1	17,7	17,3
			B/Victoria	19,5	19,3	19,0	18,6	18,2	17,6
			B/Yamagata	20,0	19,8	19,4	18,8	18,3	17,6
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	

Ghi chú: NA: Không thực hiện

Bảng 3.19: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 04.23 ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi,	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,18	7,18	7,19	7,18	7,18	7,20	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	142,85	142,22	141,55	140,98	140,1	139,11	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	21,2	21,0	20,6	20,2	19,7	19,2
			H3N2	19,3	19,2	18,8	18,4	18,1	17,8
			B/Victoria	19,3	18,9	18,3	17,7	17,3	16,9
			B/Yamagata	20,5	20,2	19,8	19,4	19,0	18,3
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	

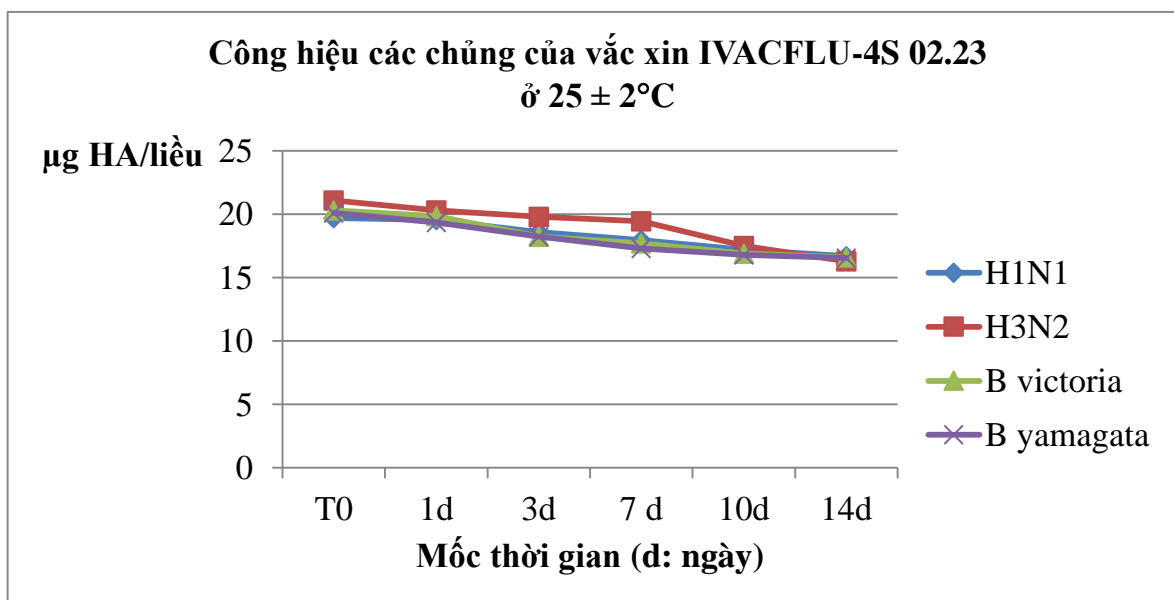
Ghi chú: NA: Không thực hiện

Bảng 3.20: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 04.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$

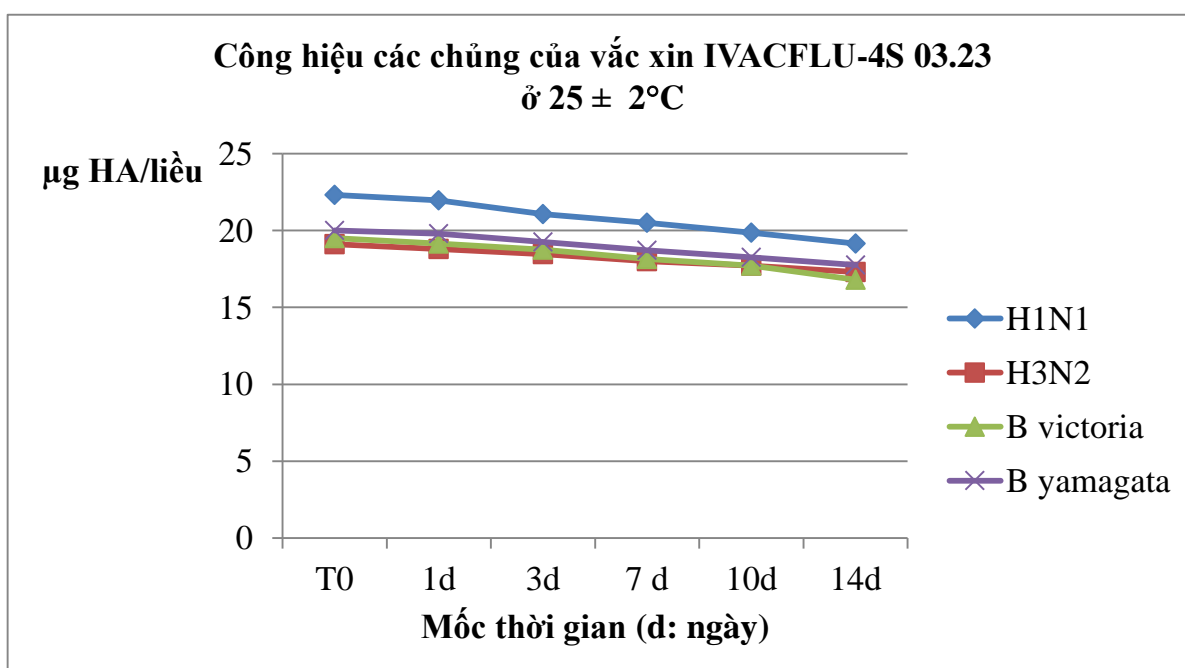
Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: ngày						
			T0	1	3	7	10	14	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	NA	NA	NA	NA	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,18	7,18	7,19	7,18	7,22	7,18	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	142,85	141,84	141,01	140,22	139,17	137,96	
Hàm lượng HA	SRID	$(\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng})$	H1N1	21,2	20,9	20,4	19,9	19,2	18,6
			H3N2	19,3	18,9	18,4	17,9	17,4	17,3
			B/Victoria	19,3	18,7	18,0	17,3	16,8	16,3
			B/Yamagata	20,5	20,0	19,4	18,9	18,4	17,7
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	

Ghi chú: NA: Không thực hiện

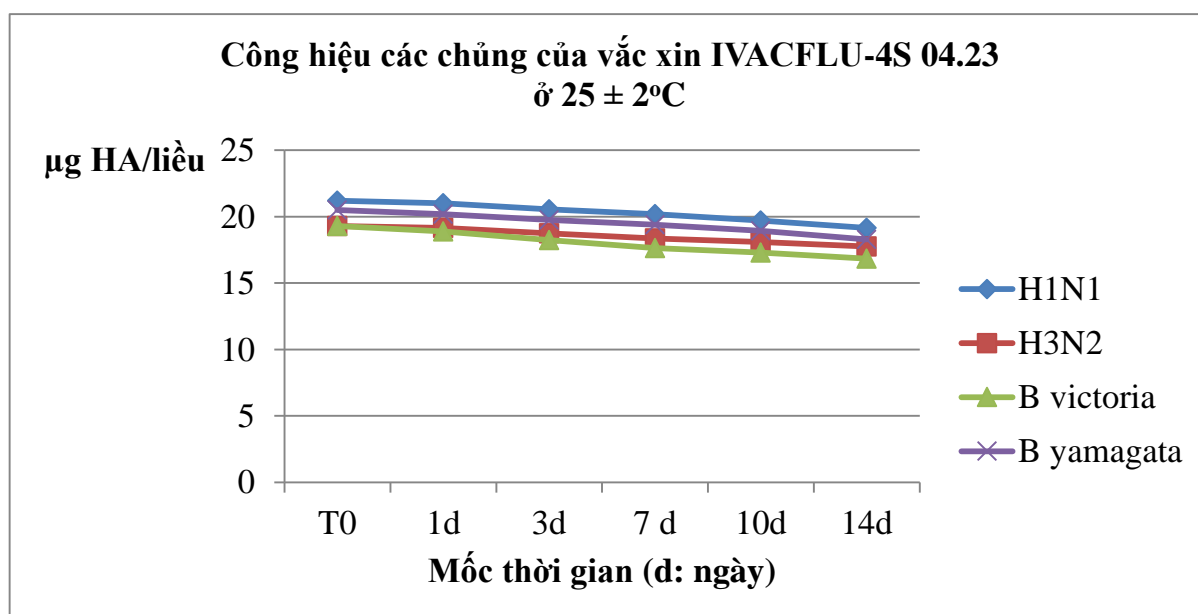
Ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sau 14 ngày, tùy theo từng chủng, công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23 còn giữ được từ 77% đến 85% so với ban đầu (T0); IVACFLU-4S lô 03.23 còn giữ được từ 86% đến 91% so với ban đầu (T0); IVACFLU-4S lô 04.23 còn giữ được từ 87% đến 92% so với ban đầu (T0) (Hình 3.7, Hình 3.8, Hình 3.9).



**Hình 0.7: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23
ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$**

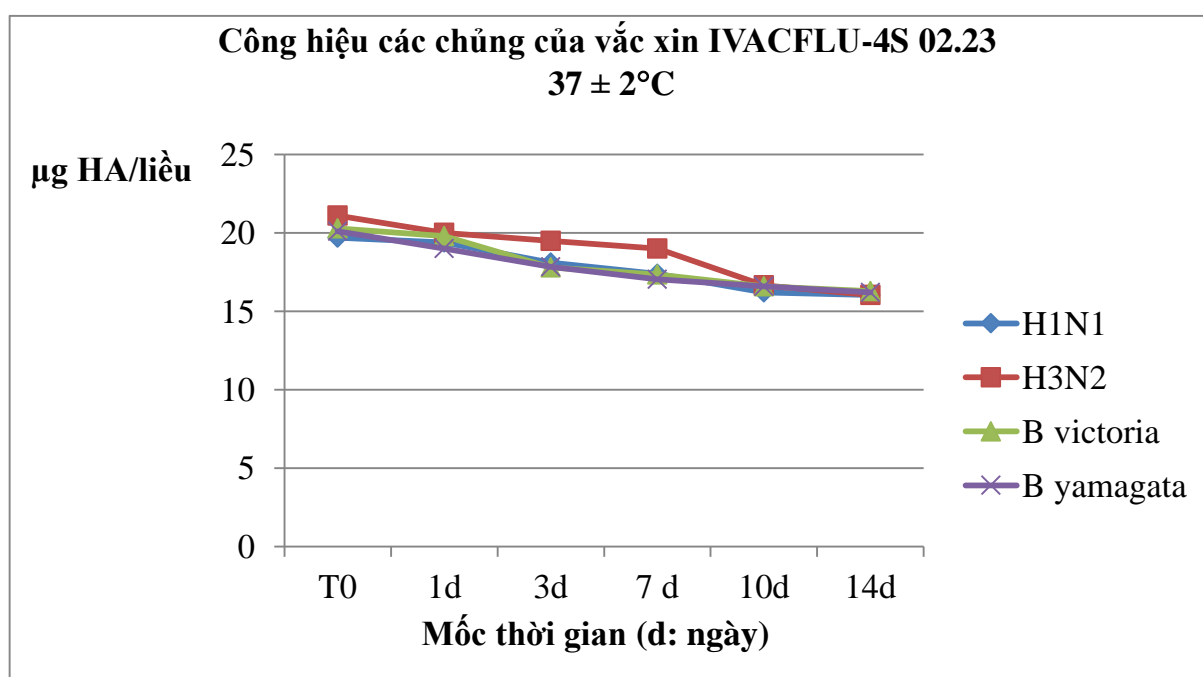


**Hình 0.8: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 03.23
ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$**

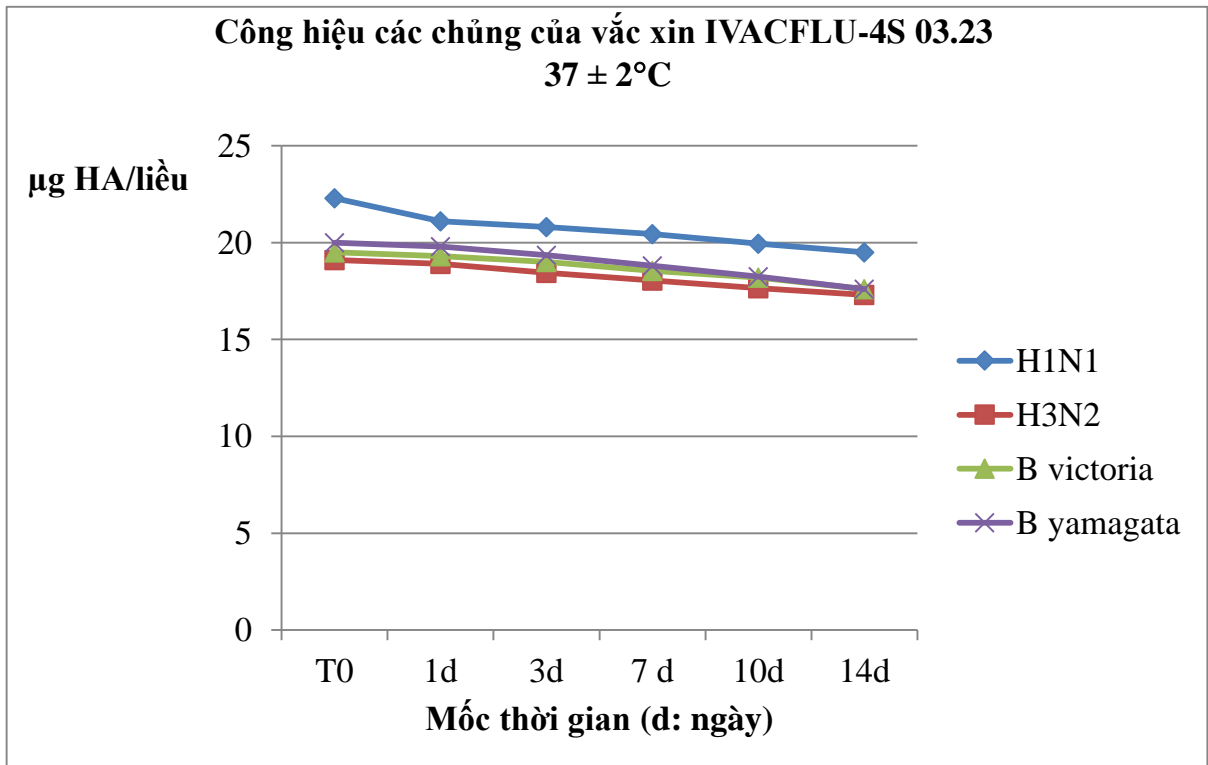


**Hình 0.9: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 04.23
ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$**

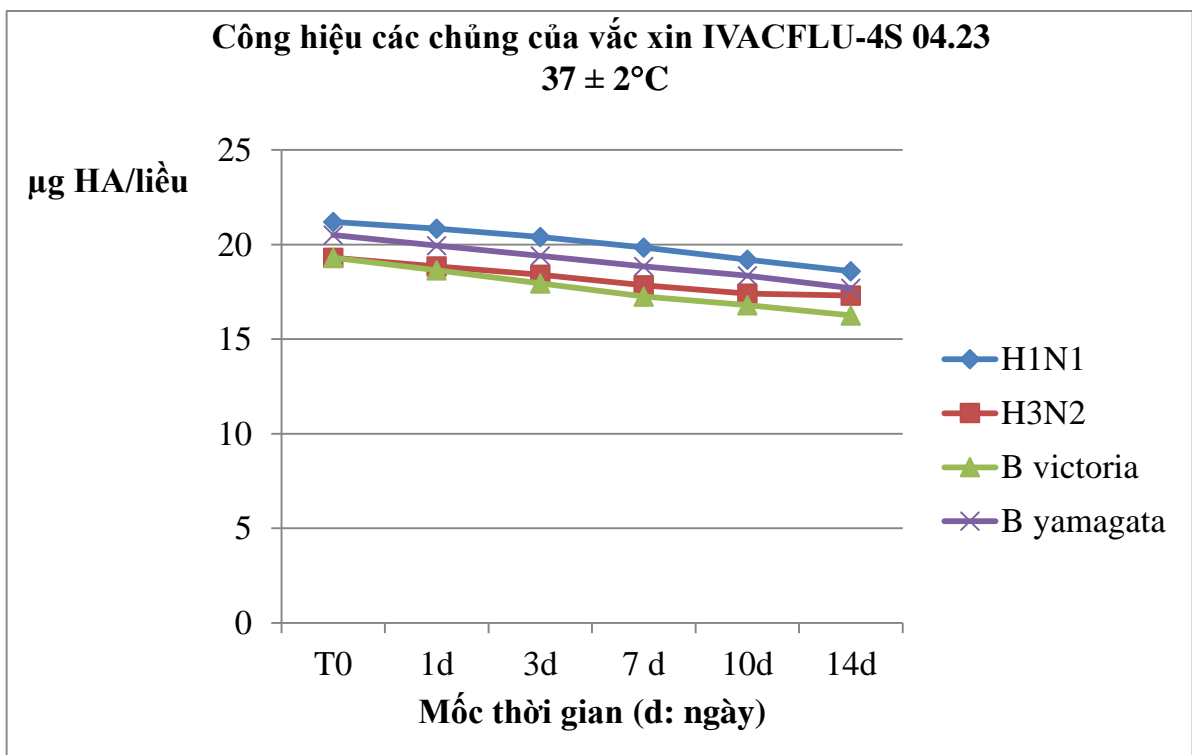
Ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$, sau 14 ngày, tùy theo từng chủng, công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23 còn giữ được từ 76 đến 81% so với công hiệu ban đầu (T0); IVACFLU-4S lô 03.23 còn giữ được từ 87% đến 91% so với ban đầu (T0); IVACFLU-4S lô 04.23 còn giữ được từ 84% đến 90% so với ban đầu (T0) (Hình 3.10, Hình 3.11, Hình 3.12).



**Hình 0.10: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô
02.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$**



Hình 0.11: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 03.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$



Hình 0.12: Công hiệu các chủng lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 04.23 ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$

➤ *Kết quả nghiên cứu theo thời gian thực*

Sau 9 tháng kể từ ngày đặt mẫu vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S lô 02.23 và 3 tháng đối với IVACFLU-4S lô 03.23 và lô 04.23 ở nhiệt độ bảo quản $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Các chỉ tiêu đánh giá gồm: cảm quan, pH, hàm lượng kháng nguyên HA, protein tổng số và endotoxin. Kết quả chỉ ra các chỉ tiêu cảm quan, pH, protein tổng số và endotoxin hầu như không thay đổi trong thời gian nghiên cứu. Hàm lượng kháng nguyên HA giảm nhẹ ở tất cả các chủng và vẫn đạt trên ngưỡng tiêu chuẩn dự kiến là $15 \mu\text{gHA/liều}$ (Bảng 3.21, Bảng 3.22, Bảng 3.23).

Bảng 3.21: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 02.23 ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ **Bảng 3.22: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 03.23 ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$**

Chỉ tiêu <i>Chỉ tiêu</i>	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu (tháng (m))					
			T0	1m	3m	6m	9m	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,23	7,22	7,23	7,25	7,22	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	254,38	254,23	254,18	251,36	249,22	
Hàm lượng HA	SRID	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$	H1N1	19,7	19,5	19,1	18,1	17,2
			H3N2	21,1	20,1	19,5	19,1	18,6
			B/Victoria	20,3	19,7	19,1	18,0	17,2
			B/Yamagata	20,1	19,8	18,7	18,1	17,2
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	5	5	5	5	5	

			T0	1m	3m	
Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi		Đạt	Đạt	Đạt
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ		Đạt	Đạt	Đạt
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5		7,20	7,21	7,23
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$		151,26	149,22	147,54
Hàm lượng HA	SRID	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$	H1N1	22,3	21,8	20,9
			H3N2	19,1	18,8	18,2
			B/Victoria	19,5	19,0	18,4
			B/Yamagata	20,0	19,6	19,2
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$		1,25	1,25	1,25

Bảng 3.23: Kết quả các chỉ tiêu nghiên cứu tính ổn định lô IVACFLU-4S 04.23 ở $5 \pm 3^\circ\text{C}$

Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Thời gian nghiên cứu: tháng (m)		
			T0	1m	3m

Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Đạt	Đạt	Đạt	
Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ	Đạt	Đạt	Đạt	
pH	Đo điện cực	6,5 - 7,5	7,18	7,20	7,19	
Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	142,85	140,35	138,14	
Hàm lượng HA	SRID	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{chủng}$	H1N1	20,9	20,1	20,9
			H3N2	19,0	18,5	18,2
			B/Victoria	18,9	18,1	18,4
			B/Yamagata	20,2	19,6	19,2
Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	1,25	1,25	1,25	

Kết luận nghiên cứu tính ổn định:

Sau thời gian nghiên cứu tính ổn định của vắc xin, các kết quả cho thấy cả ba lô IVACFLU-4S vẫn đảm bảo được yêu cầu về tính ổn định đối với các chỉ tiêu được nghiên cứu khi bảo quản ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Các nghiên cứu về tính ổn định theo thời gian thực của vắc xin vẫn đang tiếp tục được tiến hành theo đúng kế hoạch nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu tính ổn định thúc đẩy nhanh của ba lô vắc xin IVACFLU-4S cho biết vắc xin khá bền vững với nhiệt. Ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sau 14 ngày tùy theo từng chủng và từng lô sản xuất, công hiệu còn có khả năng giữ được từ 77 - 92% so với ban đầu và ở $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sau 14 ngày, tùy theo từng chủng công hiệu của vắc xin cúm mùa còn giữ được từ 76 - 91% so với công hiệu ban đầu (T0). Các chỉ tiêu về cảm quan, pH, protein tổng số và endotoxin hầu như không thay đổi khi đặt vắc xin ở các nhiệt độ tương ứng kể trên trong 14 ngày.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu của đề tài “*Nghiên cứu quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh ở quy mô sản xuất thử nghiệm*” tôi rút ra được một số kết luận sau đây:

1. Đã xây dựng được quy trình phối trộn vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh với chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và hai chủng cúm B (B/Victoria và B/Yamagata).
2. Sản xuất thành công 03 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh (IVACFLU-4S) ở quy mô thử nghiệm (10.000 liều/lô) theo quy trình đã xây dựng.
 - Kết quả kiểm định chất lượng 03 lô vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh đạt tiêu chuẩn chất lượng theo WHO và DĐVN tại IVAC và NICVB.
 - Kết quả nghiên cứu trên động vật thí nghiệm cho thấy vắc xin đạt yêu cầu về an toàn và tạo được đáp ứng miễn dịch tốt với mức chuyển đổi huyết thanh tăng trên 4 lần so với máu nền sau 2 mũi tiêm ở cả 2 hàm lượng kháng nguyên 1,5 µgHA và 3 µg HA.
 - Vắc xin cúm mùa IVACFLU-4S tỏ ra khá bền vững với nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản, công hiệu của vắc xin còn duy trì ở mức từ 77% -92% so với công hiệu ban đầu khi ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và 76% đến 91% ở nhiệt độ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 14 ngày. Ở nhiệt độ bảo quản $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, vắc xin IVACFLU-4S đạt tất cả các tiêu chuẩn chất lượng đối với vắc xin cúm mùa theo tiêu chuẩn của DĐVN V, 2018 trong thời gian nghiên cứu 9 tháng.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục theo dõi tính ổn định của vắc xin cúm mùa bốn chủng dạng mảnh được phối trộn theo quy trình đã xây dựng đến 15 tháng.
2. Nghiên cứu nâng quy mô sản xuất lên 20.000 - 50.000 liều/ lô.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Potter, C. W., 2001, A history of influenza, *Journal of applied microbiology*, 91(4), pp. 572-579. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x>
2. Barr, I. G., Russell, C., Besselaar, T. G., Cox, N. J., Daniels, R. S., Donis, R., Zhang, W., 2014, WHO recommendations for the viruses used in the 2013–2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A (H1N1) pdm09, A (H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013, *Vaccine*, 32(37), pp. 4713-4725.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.014>.
3. Petrova, V. N., Russell, C. A., 2018, The evolution of seasonal influenza viruses, *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), pp. 47-60.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
4. Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, PC., Palese, P., Shaw, ML., Treanor, J., Webster, RG., García-Sastre, A., Influenza, 2018, *Nature Reviews Microbiology*, 4(3).
<https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.
5. Wolff, T., Veit, M., 2021, Influenza B, C and D Viruses (*Orthomyxoviridae*), *Encyclopedia of Virology*, pp. 561-574.
doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21505-7.
6. Murphy BR., Webster RG., 1996, *Orthomyxoviruses*, In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds.) *Fields Virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1397-1445.
7. Nicholson KG., Wood JM., Zambon M., 2003, Influenza, *Lancet* 362(93970), pp. 1733-1745. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14854-4.
8. Cox NJ., Kawaoka Y., 1997, *Orthomyxoviruses: Influenza*, In Topley & Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., Collier L, Balows A., Sussman M., eds., Edward Arnold, London, 1, pp. 385-433.

9. Russell, C. J., Webster, R. G., 2005, The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell*, 123(3), pp. 368-371.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.019>.
10. Đặng Đức Anh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Phan Thị Ngà, 2010, *Vi rút Y học*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 28-48.
11. Kirkpatrick E., Qiu X., Wilson P. C., Bahl J., Krammer F., 2018, The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain, *Scientific reports*, 8(1), pp. 1-14. 10.1038/s41598-018-28706-1.
12. Brickley Megan B., and Simon Mays, 2019, *Chapter 15 - Metabolic Disease*, In Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition), Academic Press, San Diego, pp. 531-566.
13. Ervin Fodor and Brownlee George G., 2002, Influenza virus replication, *Perspectives in Medical Virology, Elsevier*, 7, pp. 1-29.
[https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(02\)07002-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(02)07002-7).
14. Rijū Ray, Gaël Dos Santos, Philip O. Buck, Carine Claeys, Gonçalo Matias, Bruce L. Innis and Rafik Bekkat-Berkani, 2017, A review of the value of quadrivalent influenza vaccines and their potential contribution to influenza control, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(7), pp. 1640-1652. doi:10.1080/21645515.2017.1313375
15. Hannoun C., 2013, The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines, *Expert review of vaccines*, 12(9), pp. 1085-1094.
<https://doi.org/10.1586/14760584.2013.824709>
16. McCullers, J. A., & Huber, V. C., 2012, Correlates of vaccine protection from influenza and its complications, *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(1), pp.34-44. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.18214>
17. Houser, K., & Subbarao, K., 2015, Influenza vaccines: challenges and solutions, *Cell host & microbe*, 17(3), pp. 295-300. doi:10.1016/j.chom.2015.02.012.
18. Lê Văn Hiệp, 2006, *Vắc xin học những vấn đề cơ bản*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 55 - 62.

19. Riedmann, E. M., 2014, Human vaccines & immunotherapeutics: news, *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(7), pp. 1773-1777.
<https://doi.org/10.4161/hv.36241>
20. Smith, G., Liu, Y., Flyer, D., Massare, M. J., Zhou, B., Patel, N., Glenn, G., 2017, Novel hemagglutinin nanoparticle influenza vaccine with Matrix-M™ adjuvant induces hemagglutination inhibition, neutralizing, and protective responses in ferrets against homologous and drifted A (H3N2) subtypes, *Vaccine*, 35(40), pp. 5366-5372.
doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.021.
21. Sridhar S., Brokstad KA., Cox RJ., 2015, Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines, *Vaccines*, 3(2), pp. 373-389.
<https://doi.org/10.3390/vaccines3020373>.
22. Carascal, M. B., Pavon, R. D. N., & Rivera, W. L., 2022, Recent progress in recombinant influenza vaccine development toward heterosubtypic immune response, *Frontiers in Immunology*, 13, pp. 878943.
[doi: 10.3389/fimmu.2022.878943](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878943).
23. Bộ Khoa học Công nghệ, 2006, Nghiên cứu quy trình sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 bất hoạt dùng cho người bằng kỹ thuật nuôi cấy trên tế bào vero và trên trứng gà có phôi, thuyết minh đề tài nghiên cứu cấp nhà nước, Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 2 - 24.
24. Lê Văn Hiệp, Lê Văn Bé, Nguyễn Thị Minh Hiền, Nguyễn Thị Lan Phương, Đặng Hồng Vân, 2007, Nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm A/ H5N1 cho người trên trứng gà có phôi từ chủng NIBRG-14 tại Viện Vắc xin, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Hà nội, tập XVII, 5(90), phụ bản, tr. 52 - 57.
25. Matthews, J. T., 2006, Egg-based production of influenza vaccine: 30 years of commercial experience, *The Bridge*, Washington, National Academy of engineering, 36(3), pp. 13 - 22.
26. Hegde, N.R., 2015, Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(5), pp. 1223–1234.

<https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016666>.

27. M. Roumiantzeff, J. Armand, F. Arminjon, B. Montagnon, and M. Cadoz, 1989, *New and Improved Techniques for Vaccine Production*, Progress in Vaccinology - Springer New York.
28. Rainer Ulrich, G. P. Lomonosoff, D. H. Krger, 2003, *New Developments in Viral Vaccine Technologies (Intervirolology)*.
29. Richard W. Compans, Walter A. Orenstein, 2009), *Vaccines for Pandemic Influenza*, Current Topics in Microbiology and Immunology-Springer, 333, pp. 323-343.
30. Stachyra, A. Gora-Sochacka, A. Sirko, A., 2014, DNA vaccines against influenza, *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), pp. 515–522.
31. Kramps, T., and Probst, J., 2013, Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications, *Wiley interdisciplinary reviews: RNA*, 4(6), pp. 737-749. <https://doi.org/10.1002/wrna.1189>.
32. Vogel, F. R., and Sarver, N., 1995, Nucleic acid vaccines, *Clinical microbiology reviews*, 8(3), pp. 406-410.
<https://doi.org/10.1128/CMR.8.3.406>.
33. Soema, P. C., Rosendahl Huber, S. K., Willems, G. J., Jiskoot, W., Kersten, G. F., & Amorij, J. P., 2015, Influenza T-cell epitope-loaded virosomes adjuvanted with CpG as a potential influenza vaccine, *Pharmaceutical research*, 32, pp. 1505-1515.
34. Ninomiya, A., Ogasawara, K., Kajino, K., Takada, A., and Kida, H., 2002, Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice, *Vaccine*, 20(25-26), pp. 3123-3129. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00261-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00261-X).
35. Leo Yi Yang Lee, Leonard Izzard and Aeron C. Hurt, 2018, A Review of DNA Vaccines Against Influenza, *Frontiers in immunology*, 9, pp. 1568-1568.


36. Cox, M.M., Hashimoto, Y., 2011, A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Journal of invertebrate pathology*, 107, pp. S31–S41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.003>.
37. Jessica A. Belser, Jacqueline M. Katz, and Terrence M. Tumpey, 2011, The ferret as a model organism to study influenza A virus infection, *Disease Models & Mechanisms*, 4(5), pp. 575-579. <https://doi.org/10.1242/dmm.007823>.
38. KyungDong Bea, JunYoul Choi, YangSuk Jang, Sangjeom Ahn and ByungKi Hur, 2009, Innovative vaccine production technologies: The evolution and value of vaccine production technologies, *Archives of Pharmacal Research*, 32, pp. 465-480.
39. Sparrow, E., Wood, J. G., Chadwick, C., Newall, A. T., Torvaldsen, S., Moen, A., and Torelli, G., 2021, Global production capacity of seasonal and pandemic influenza vaccines in 2019, *Vaccine*, 39(3), pp. 512-520. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.018>.
40. Bekkat-Berkani, R., Ray, R., Jain, V. K., Chandrasekaran, V., and Innis, B. L., 2016, Evidence update: GlaxoSmithKline's inactivated quadrivalent influenza vaccines, *Expert Review of Vaccines*, 15(2), pp. 201-214. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1113878>
41. Tricco, A. C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M. H., and Loeb, M., 2013, Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis, *BMC medicine*, 11(1), pp. 1-19.
42. Toback, S. L., Levin, M. J., Block, S. L., Belshe, R. B., Ambrose, C. S., and Falloon, J., 2012, Quadrivalent Ann Arbor strain live-attenuated influenza vaccine, *Expert Review of Vaccines*, 11(11), pp. 1293-1303. <https://doi.org/10.1586/erv.12.108>.
43. Block, S. L., Yi, T., Sheldon, E., Dubovsky, F., & Falloon, J., 2011, A randomized, double-blind noninferiority study of quadrivalent live attenuated influenza vaccine in adults, *Vaccine*, 29(50), pp. 9391-9397. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.109>.

44. Uhart, M., Bricout, H., Clay, E., & Largeron, N., 2016, Public health and economic impact of seasonal influenza vaccination with quadrivalent influenza vaccines compared to trivalent influenza vaccines in Europe, *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(9), pp. 2259-2268. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1180490>.
45. Center for Disease control and Prevention, Department of Health & Human services, 2009, Novel Influenza A (H1N1) candidate vaccine virus and biocontainment requirements for handling, Department of Health & Human Services, Wasinhton, USA.
46. Nguyễn Thị Thu Vân, 2007, *Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 trên tế bào thận khỉ tiên phát ở quy mô thí nghiệm*. Báo cáo tổng kết khoa học và công nghệ Bộ Khoa học công nghệ, Bộ Y tế.
47. Bộ Khoa học công nghệ, Bộ Y tế, 2010, *Kết quả nghiên cứu đề tài nghiên cứu quy trình sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 dùng cho người bằng kỹ thuật nuôi cấy trên tế bào vero và trên trứng gà có phôi*, Báo cáo tổng hợp đề tài cấp nhà nước, TP Hồ Chí Minh.
48. Bộ Y tế, 2016, *Ứng dụng công nghệ nuôi cấy trên trứng gà có phôi để sản xuất vắc xin cúm A/H7N9*, Báo cáo kết quả khoa học công nghệ đề tài cấp bộ Y tế năm 2016.
49. Dương Hữu Thái, Lê Văn Bé, Nguyễn Thị Lan Phương, Lê Kim Hoà, 2012, Sản xuất vắc xin cúm A/H1N1/09 theo công nghệ nuôi cấy trên trứng gà có phôi trên quy mô công nghiệp, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10(4A) tr. 817 - 823.
50. Dương Hữu Thái, Lê Văn Bé, Nguyễn Thị Lan Phương, Lê Kim Hoà, 2013, Ứng dụng quy trình lõi sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 theo công nghệ nuôi cấy trên trứng gà có phôi trên quy mô công nghiệp, *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập XXIII, 9(145), tr. 13- 18.
51. Bộ Khoa học công nghệ, Bộ Y tế, 2018, *Hoàn thiện quy trình sản xuất vắc xin cúm mùa ở quy mô công nghiệp*, Báo cáo tổng hợp đề tài cấp nhà nước, Thành phố Nha Trang.

52. <https://cand.com.vn/y-te/Cong-bo-giay-phep-luu-hanh-vac-xin-cum-mua-IVACFLU-S-phong-nguy-co-dai-dich-i507205/>.
(truy cập ngày 20/07/2023).
53. Bộ Y tế, 2018, *Dược điển Việt Nam V: Vắc xin cúm mùa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
54. World Health Organization, Technical Report Series, 2005, *Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated)*, 927.
55. Lê Văn Hiệp, 2009, *Bệnh cúm và vắc xin*, Nhà xuất bản Y học, Hà nội, tr. 66 - 88.
56. <https://vncdc.gov.vn/su-luu-hanh-cac-chung-vi-rut-cum-va-cong-tacgiam-sat-cum-tai-viet-nam-nd13798.html> (truy cập ngày 01/07/2022)
57. Nguyễn Thị Thu Yên, 2015, Đặc điểm dịch tễ học bệnh cúm mùa tại Việt Nam giai đoạn 2006- 2013, *Tạp chí y học dự phòng*, Tập XXV, 3(163), tr. 37.
58. Yoshihara, K., Le, M. N., Toizumi, M., Nguyen, H. A., Vo, H. M., Odagiri, T., Yoshida, L. M., 2019, Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam, *Influenza and other respiratory viruses*, 13(3), pp. 248-261.
<https://doi.org/10.1111/irv.12626>.
59. Nguyễn Trung Hiếu, Nguyễn Thu Ngọc, Phạm Thị Nhung, Nguyễn Thị Ngọc Thảo, Nguyễn Hoàng Anh, Hoàng Minh, Đặng Thanh Giang, Nguyễn Thị Thanh Thương, Cao Minh Thắng, 2022, Sự lưu hành và đặc điểm của vi rút cúm mùa tại miền Nam Việt Nam giai đoạn 2018–2020, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 32(4 Phụ bản), tr. 157-166.
<https://doi.org/10.51403/0868-2836/2022/731>.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Giấy chứng nhận chất lượng của NICVB cho vắc xin IVACFLU-4S 02.23

**VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ, BỘ Y TẾ, VIỆT NAM**
NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINE AND BIOLOGICALS, MOH, VIET NAM

Dai Kim, Hoang Mai, Ha Noi, Viet Nam
Tel: (84.4) 36553148 - (84.4) 35595236 * Fax: (84.4) 38554816 * Email: contact@nicvb.org.vn * Website: http://nicvb.org.vn

VIỆN VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ NICVB	GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤT LƯỢNG VẮC XIN, SINH PHẨM SỐ: 00323/VXVR-NC (Chứng nhận này chỉ có giá trị nghiên cứu)
FAX Số: 23 ĐẾN Ngày: 25/5/2023 Chuyên: BLD, PGS. Phươn	

- P. VXTP	Tên thương mại: IVACFLU-4S	
- P. QA	Tên chung: Vắc xin cúm mùa dạng mảnh	Mã số NICVB: 00723/NICVB-NC
- P. KH	bất hoạt	
- P. KHTE		
Xdauel	Lô số (trên lọ): 02.23	Lô số (trên vỏ hộp): 02.23
	Ngày sản xuất: 07/01/2023	Hạn dùng: 11/01/2024
	Dạng đóng gói: 0,5 ml/liều/lọ, 10 lọ/ hộp	
	Nhà sản xuất: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế	Đơn vị gửi mẫu: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Kết luận: Lô vắc xin trên đạt yêu cầu chất lượng về thử nghiệm cảm quan, thể tích, pH, hàm lượng Formaldehyde, hàm lượng protein, hàm lượng Endotoxin, an toàn chung, công hiệu, nhận dạng theo Dược điển Việt Nam V- 2017; tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất.

Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2023
KT. VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG



Phạm Văn Hùng

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KĐQG-18-F1

Lần sửa: 04

Trang .../...

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM

(Kèm theo "Giấy chứng nhận chất lượng vắc xin, sinh phẩm")

Số: 00323/VXVR-NC cấp ngày 22/05/2023)

Tên vắc xin/ sinh phẩm: IVACFLU-4S

Lô số: 02.23

Hạn dùng: 11/01/2024

Mã số NICVB: 00723/NICVB-NC

Nhà sản xuất: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Đơn vị gửi mẫu: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB	
				Kết quả thử nghiệm	Đánh giá
1	Cảm quan	Dung dịch trong, không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ.	SOP:HL01-14	Dung dịch hơi đục, không có vật thể lạ. Đạt	
2	Thể tích	$\geq 0,5$ ml	SOP:HL01-14	Lọ 1: 0,57 ml Lọ 2: 0,56 ml Lọ 3: 0,57 ml	Lọ 4: 0,58 ml Lọ 5: 0,56 ml Đạt
3	pH	6,5-7,5	SOP:HL01-09	7,22 Đạt	
4	Hàm lượng Formaldehyde	$\leq 0,02$ %	SOP:HL01-08	0,0003% Đạt	
5	Hàm lượng protein (μ g)	≤ 300 μ g/ liều	SOP: HL01-10	234,47 μ g/ liều Đạt	
6	An toàn chung	Toàn bộ chuột khỏe mạnh, lên cân sau 7 ngày theo dõi.	SOP:KĐQG-21	Trong vòng 7 ngày theo dõi toàn bộ động vật thí nghiệm sống, khỏe mạnh, tăng cân và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc Đạt	

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KĐQG-18-F1

Lần sửa: 04

Trang .../...

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB	
				Kết quả thử nghiệm	Đánh giá
7	Hàm lượng Endotoxin	≤ 100 EU/ liều	SOP:VR01-45	< 12 EU/ liều Đạt	
8	Nhận dạng	Dương tính	SOP:VR07-02	Dương tính với các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Victoria/2570/2019) 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/6/2021) 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021) 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013) Đạt	
9	Hàm lượng kháng nguyên HA	≥ 15 μ g HA/liều 0,5 ml/chủng	SOP: VR07-01	Hàm lượng kháng nguyên HA của các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Victoria/2570/2019): 16,58 μ g HA/0,5 ml 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/6/2021): 16,79 μ g HA/0,5 ml 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021): 17,01 μ g HA/0,5 ml 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013): 17,15 μ g HA/0,5 ml Đạt	


Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2023

KI. VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG



Phạm Văn Hùng

**Phụ lục 2: Giấy chứng nhận chất lượng của NICVB cho vắc xin
IVACFLU-4S lô 03.23**

 VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ, BỘ Y TẾ, VIỆT NAM NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINE AND BIOLOGICALS, MOH, VIET NAM	
Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội, Việt Nam	
Tel: (84.4) 38553148 - (84.4) 35585238 * Fax: (84.4) 38554816 * Email: contact@nicvb.org.vn * Website: http://nicvb.org.vn	
GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤT LƯỢNG VẮC XIN, SINH PHẨM SỐ: 00523/VXVR- NC (Chứng nhận này chỉ có giá trị nghiên cứu)	
VIỆN VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ FAX Số: 33 ĐỀ N Ngày: 21/7/2023 Chuyên: BkĐ Viện, PGS. Phước, KĐ, Q.A, V.M	
Tên thương mại: IVACFLU-4S	
Tên chung: Vắc xin cúm mùa dạng mảnh bất hoạt	Mã số NICVB: 01123/NICVB-NC
Lô số (trên lọ): 03.23	Lô số (trên vỏ hộp): 03.23
Ngày sản xuất: 13/06/2023	Hạn dùng: 12/06/2024
Dạng đóng gói: 0,5 ml/liều/lọ, 10 lọ/ hộp	
Nhà sản xuất: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế	Đơn vị gửi mẫu: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Kết luận: Lô vắc xin trên đạt yêu cầu chất lượng về thử nghiệm cảm quan, thể tích, pH, hàm lượng Formaldehyde, hàm lượng protein, hàm lượng Endotoxin, an toàn chung, công hiệu, nhận dạng, vô trùng theo Dược điển Việt Nam V- 2017; tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất.

Hà Nội, ngày 19 tháng 07 năm 2023

VIỆN TRƯỞNG



Đoàn Hữu Thiện

Viện Kiểm định Quốc gia Vaccine và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KDOG-18-F1

Lần sửa: 04

Trang .../...

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM
(Kèm theo "Giấy chứng nhận chất lượng vaccine, sinh phẩm"
Số: 00523/VXVR-NC cấp ngày 19/07/2023)

Tên vaccine/ sinh phẩm: IVACFLU-4S

Lô số: 03.23

Hạn dùng: 12/06/2024

Mã số NICVB: 01123/NICVB-NC

Nhà sản xuất: Viện Vaccine và Sinh phẩm Y tế

Đơn vị gửi mẫu: Viện Vaccine và Sinh phẩm Y tế

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB		Đánh giá
				Kết quả thử nghiệm		
1	Cảm quan	Dung dịch trong, không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ.	SOP:HL01-14	Dung dịch trong không màu, không có vật thể lạ.		Đạt
2	Thể tích	$\geq 0,5$ ml	SOP:HL01-14	Lọ 1: 0,58 ml Lọ 2: 0,59 ml Lọ 3: 0,59 ml	Lọ 4: 0,58 ml Lọ 5: 0,58 ml	Đạt
3	pH	6,5-7,5	SOP:HL01-09	7,17		Đạt
4	Hàm lượng Formaldehyde	$\leq 0,02$ %	SOP:HL01-08	0,0003%		Đạt
5	Hàm lượng protein (μ g)	≤ 300 μ g/ liều	SOP: HL01-10	122,21 μ g/ liều		Đạt
6	An toàn chung	Toàn bộ chuột khỏe mạnh, lên cân sau 7 ngày theo dõi.	SOP:KDOG-21	Trong vòng 7 ngày theo dõi toàn bộ động vật thí nghiệm sống, khỏe mạnh, tăng cân và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc		Đạt

Viện Kiểm định Quốc gia Vaccine và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KDOG-18-F1

Lần sửa: 04


Trang .../...

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB		Đánh giá
				Kết quả thử nghiệm		
7	Hàm lượng Endotoxin	≤ 100 EU/ liều	SOP:VR01-45	< 3 EU/ liều		Đạt
8	Nhận dạng	Dương tính	SOP:VR07-05	Dương tính với các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Sydney/5/2021) 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/9/2021) 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021) 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013)		Đạt
9	Hàm lượng kháng nguyên HA	≥ 15 μ g HA/liều 0,5 ml/chủng	SOP: VR07-05	Hàm lượng kháng nguyên HA của các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Sydney/5/2021): 17,16 μ g HA/0,5 ml 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/9/2021): 17,52 μ g HA/0,5 ml 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021): 17,02 μ g HA/0,5 ml 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013): 17,65 μ g HA/0,5 ml		Đạt
10	Vô trùng	Không có sự xuất hiện của nấm và vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi	SOP: MT 01-25	Không có sự xuất hiện của nấm và vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi		Đạt

Hà Nội, ngày 19 tháng 07 năm 2023



**Phụ lục 3: Giấy chứng nhận chất lượng của NICVB cho vắc xin IVACFLU-4S
lô 04.23**

 <p>VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ, BỘ Y TẾ, VIỆT NAM NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINE AND BIOLOGICALS, MOH, VIETNAM Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội, Việt Nam Tel: (84.24) 38553148 - (84.24) 35595236 * Fax: (84.24) 38554816 Email: contact@nicvb.org.vn * Website: http://nicvb.org.vn</p>	
<p>VIỆN VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ</p> <p>FAX Số: 3/ GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤT LƯỢNG VẮC XIN, SINH PHẨM ĐẾN Ngày: 21/7/2023 Số: 00623/VXVR-NC <i>(Chứng nhận này chỉ có giá trị nghiên cứu)</i> Chuyên: BLD Viện, PGS. Hoàng KĐ, QAT, VXTP</p>	
Tên thương mại: IVACFLU-4S	
Tên chung: Vắc xin cúm mùa dạng mảnh bất hoạt	Mã số NICVB: 01223/NICVB-NC
Lô số (trên lọ): 04.23	Lô số (trên vỏ hộp): 04.23
Ngày sản xuất: 14/06/2023	Hạn dùng: 12/06/2024
Dạng đóng gói: 0,5 ml/liều/lọ, 10 lọ/ hộp	
Nhà sản xuất: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế	Đơn vị gửi mẫu: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Kết luận: Lô vắc xin trên đạt yêu cầu chất lượng về thử nghiệm cảm quan, thể tích, pH, hàm lượng Formaldehyde, hàm lượng protein, hàm lượng Endotoxin, an toàn chung, công hiệu, nhận dạng, vô trùng theo Dược điển Việt Nam V- 2017; tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất.

Hà Nội, ngày 19 tháng 07 năm 2023



Đoàn Hữu Thiện

Viện Kiểm định Quốc gia Vaccine và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KDOG-18-F1

Lần sửa: 04

Trang .../...

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM
(Kèm theo "Giấy chứng nhận chất lượng vaccine, sinh phẩm")

Số: 00623/VXVR-NC cấp ngày 19/07/2023)

Tên vaccine/ sinh phẩm: IVACFLU-4S

Lô số: 04.23

Hạn dùng: 12/06/2024

Mã số NICVB: 01223/NICVB-NC

Nhà sản xuất: Viện Vaccine và Sinh phẩm Y tế

Đơn vị gửi mẫu: Viện Vaccine và Sinh phẩm Y tế

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB		Đánh giá
				Kết quả thử nghiệm		
1	Cảm quan	Dung dịch trong, không màu đến trắng mờ, không lắng cặn, không lẫn tiểu phần lạ.	SOP:HL01-14	Dung dịch trong không màu, không có vật thể lạ.		Đạt
2	Thể tích	≥ 0,5 ml	SOP:HL01-14	Lọ 1: 0,55 ml Lọ 2: 0,57 ml Lọ 3: 0,57 ml	Lọ 4: 0,56 ml Lọ 5: 0,56 ml	Đạt
3	pH	6,5-7,5	SOP:HL01-09	7,18		Đạt
4	Hàm lượng Formaldehyde	≤ 0,02 %	SOP:HL01-08	0,0002%		Đạt
5	Hàm lượng protein (µg)	≤ 300 µg/ liều	SOP: HL01-10	129,99 µg/ liều		Đạt
6	An toàn chung	Toàn bộ chuột khỏe mạnh, lên cân sau 7 ngày theo dõi.	SOP:KDOG-21	Trong vòng 7 ngày theo dõi toàn bộ động vật thí nghiệm sống, khỏe mạnh, tăng cân và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc		Đạt

Viện Kiểm định Quốc gia Vaccine và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

Biểu mẫu số: KDOG-18-F1

Lần sửa: 04

Trang .../...

STT	Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất	Phương pháp	Kết quả NICVB		Đánh giá
				Kết quả thử nghiệm		
7	Hàm lượng Endotoxin	≤ 100 EU/ liều	SOP:VR01-45	< 3 EU/ liều		Đạt
8	Nhận dạng	Dương tính	SOP:VR07-05	Dương tính với các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Sydney/5/2021) 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/9/2021) 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021) 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013)		Đạt
9	Hàm lượng kháng nguyên HA	≥ 15µg HA/liều 0,5 ml/chủng	SOP: VR07-05	Hàm lượng kháng nguyên HA của các chủng: 1. Cúm A/H1N1 (A/Sydney/5/2021): 17,18 µg HA/0,5 ml 2. Cúm A/H3N2 (A/Darwin/9/2021): 17,35 µg HA/0,5 ml 3. Cúm B (B/Austria/1359417/2021): 17,24 µg HA/0,5 ml 4. Cúm B (B/Phuket/3073/2013): 17,16 µg HA/0,5 ml		Đạt
10	Vô trùng	Không có sự xuất hiện của nấm và vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi	SOP: MT 01-25	Không có sự xuất hiện của nấm và vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi		Đạt

Hà Nội, ngày 19 tháng 07 năm 2023



Phụ lục 4: Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI)

(Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza (World Health Organization) 2011, Dược điển Việt Nam V, 2018).

1. Nguyên lý

Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) là phương pháp truyền thống để đánh giá sự đáp ứng miễn dịch đối với protein hemagglutinin (HA) của virus cúm. Protein HA trên bề mặt virus cúm có khả năng gây ngưng kết hồng cầu. Sự gắn kết đặc hiệu của kháng thể với các vị trí đặc hiệu kháng nguyên trên phân tử HA sẽ gây cản trở việc liên kết giữa phân tử HA với thụ thể trên tế bào hồng cầu, làm ức chế quá trình ngưng kết hồng cầu. Đây là nguyên lý cơ bản của phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu.

2. Các bước thực hiện

2.1. Yêu cầu

- **Chứng huyết thanh:** Mẫu huyết thanh chứng dương và chứng âm được chia thành nhiều thể tích nhỏ để sử dụng cho mỗi lần thực hiện phản ứng HAI được bảo quản ở nhiệt độ từ -20°C đến -70°C. Chứng dương và chứng âm huyết thanh được thực hiện trên mỗi phiến 96 giếng.
- **Chứng hồng cầu:** Chứng hồng cầu được thực hiện trên mỗi phiến 96 giếng.

2.2. Cách tiến hành

2.2.1. Pha dung dịch và sinh phẩm chuẩn:

- *Dung dịch nước muối sinh lí 0,9%:*

Công thức: 100 ml dung dịch nước muối sinh lí 0,9%

Sodium chloride (NaCl): 0,9 g

Nước cất: 100 ml

- *Dung dịch phosphate buffered saline (PBS):*

Hòa tan 1 viên PBS trong 200 ml nước cất.

- *Dung dịch PBS + 0,5% BSA:*

Công thức: 100 ml dung dịch dung dịch PBS + 0,5% BSA

Bovine serum albumin (BSA): 0,5 g

Dung dịch PBS: 100 ml

- *Dung dịch receptor destroying enzyme (RDE):*

- Hòa chính nước muối sinh lí 0,9% vào lọ RDE theo hướng dẫn nhà cung cấp (thường là 20 ml).

2.2.2. *Chuẩn bị dung dịch hồng cầu chuẩn (1%)*

- Sử dụng hồng cầu (ngựa/gà) 1% cho phản ứng HAI, các bước chuẩn bị như sau:

- + Thu thập máu ngựa/gà trong chai chứa sẵn dung dịch Alsever's (tỉ lệ 1 :1), bảo quản ở nhiệt độ 2– 8 °C

- + Cho 45 ml hỗn hợp máu-dung dịch Alsever's vào ống phancon 50 ml. ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút đối với hồng cầu ngựa và 2000 vòng/phút trong 05 phút đối với hồng cầu gà, hút bỏ dịch nổi, giữ lại lớp hồng cầu đặc ở đáy ống.

- + Thêm PBS + 0,5% BSA vào ống để thành 45 ml, ly tâm như trên, giữ lại lớp hồng cầu đặc ở đáy ống (rửa lần thứ nhất). Lặp lại các bước này thêm 2 lần nữa. Lần thứ 3 thời gian ly tâm là 20 phút đối với hồng cầu ngựa và 10 phút đối với hồng cầu gà.

- + Thêm PBS + 0,5% BSA thành dung dịch hồng cầu 1% dùng cho phản ứng HAI

2.2.3. *Xử lý huyết thanh (chứng huyết thanh và mẫu huyết thanh)*

➤ **Xử lý huyết thanh với RDE để loại bỏ các ức chế vi rút không đặc hiệu**

- Bất hoạt mẫu huyết thanh ở bể ủ 56°C trong 30 phút, để huyết thanh trở lại nhiệt độ phòng.

- Xử lý huyết thanh với dung dịch RDE theo tỉ lệ 1 thể tích huyết thanh với 3 thể tích RDE (ví dụ, 20 µl huyết thanh được xử lí với 60 µl RDE). Ủ huyết thanh ở 37°C trong 18 – 20 giờ.

- Bất hoạt RDE ở 56°C trong 30 phút. Sau đó để huyết thanh trở lại nhiệt độ phòng.

- Bổ sung thêm PBS vào mỗi mẫu huyết thanh để được huyết thanh có độ pha loãng là 1:10 (ví dụ, thêm 120 μ l PBS vào hỗn hợp huyết thanh xử lý RDE trên).

➤ **Kiểm tra sự ngưng kết không đặc hiệu**

- Chia đôi phiến chữ V bằng cách đánh dấu chia đôi giữa hàng D và hàng E. Hàng A và E sẽ là nơi cho các mẫu huyết thanh. Các mẫu huyết thanh ở hàng A sẽ được thực hiện từ hàng A đến hàng D. Các mẫu huyết thanh ở hàng E sẽ được thực hiện từ hàng E đến hàng H. Cột 12 để làm chứng hồng cầu.

- Cho 25 μ l PBS vào tất cả các giếng trừ giếng A1 đến A11 và E1 đến E11.

- Cho 50 μ l mẫu huyết thanh đã được xử lý RDE vào giếng A1 đến A11 và giếng E1 đến E11.

- Pha loãng bậc 2 mẫu huyết thanh bằng cách chuyển lần lượt 25 μ l huyết thanh từ hàng A cho đến hàng D, bỏ 25 μ l ở hàng D. Tương tự, chuyển lần lượt 25 μ l huyết thanh từ hàng E cho đến hàng H, bỏ 25 μ l ở hàng H.

- Bổ sung 25 μ l PBS vào tất cả các giếng.

- Cho 50 μ l hồng cầu ngựa/gà 1% vào tất cả các giếng, vỗ nhẹ trộn đều.

- Để hồng cầu lắng ở nhiệt độ phòng trong 1 tiếng.

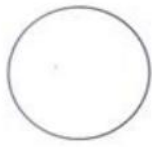
- Đọc kết quả bằng cách nghiêng phiến một góc 45 – 60° theo chiều thẳng đứng, hồng cầu ở cột 12 sẽ bắt đầu chảy xuống. Các giếng có hiện tượng ngưng kết hồng cầu sẽ không chảy xuống thành giếng. Ở các giếng không gây ngưng kết, hồng cầu sẽ chảy xuống thành giếng hình giọt nước. Đợi đến khi hồng cầu ngưng chảy, ghi nhận kết quả.

- Những mẫu huyết thanh gây ngưng kết ở độ pha loãng $\geq 1/20$ cần thực hiện bước xử lý với hồng cầu trước khi xác định hiệu giá HI. Nếu chỉ xảy ra ngưng kết ở giếng đầu tiên (độ pha loãng 1:10) thì không cần thực hiện hấp phụ.

A-Ngưng kết hoàn toàn

B-Ngưng kết một phần

C-Không ngưng kết



Hình ảnh minh họa sự ngưng kết và không ngưng kết của hồng cầu

➤ **Xử lý huyết thanh với hồng cầu ngựa/gà đậm đặc để loại bỏ sự ngưng kết không đặc hiệu**

- Thêm hồng cầu đậm đặc vào mỗi mẫu huyết thanh đã được xử lý ở trên (độ pha loãng 1/10) theo tỉ lệ 1 :10, trộn đều.

- Ủ tuýp ở 4°C trong 30 phút (mỗi 15 phút đảo nhẹ tuýp một lần).

- Ly tâm tuýp ở 2000 vòng/ phút trong 5 phút.

- Nhẹ nhàng chuyển phần huyết thanh phía trên sang tuýp mới. Lượng huyết thanh thu hồi được mong đợi sẽ tương tự lượng huyết thanh đem đi hấp phụ. Độ pha loãng huyết thanh vẫn là 1:10.

2.2.4. Chuẩn bị dung dịch kháng nguyên chuẩn

➤ **Xác định hiệu giá HA của chủng vi rút cúm bằng cách thực hiện phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)**

- Thực hiện trên phiến 96 giếng.

- Nhỏ 50µl PBS vào giếng A2 đến A12 và B2 đến B12.

- Nhỏ 100µl kháng nguyên cúm vào giếng A1 và B1 (lặp lại phản ứng).

- Pha loãng vi rút bậc 2 bằng cách chuyển lần lượt 50µl từ giếng 1 đến giếng 11. Loại bỏ 50µl ở giếng 11. Giếng 12 chỉ có PBS để làm chứng hồng cầu.

- Nhỏ 50µl dung dịch hồng cầu chuẩn 1% vào các giếng từ A1 đến B12, vỗ nhẹ trộn đều.

- Để ở nhiệt độ phòng 1 giờ.

- Đọc kết quả bằng cách nghiêng phiến một góc 45 – 60° theo chiều thẳng đứng, hồng cầu ở cột 12 sẽ bắt đầu chảy xuống. Đợi đến khi hồng cầu ngưng

chảy, ghi nhận kết quả. Hiệu giá HA của vi rút được xác định ở độ pha loãng cuối cùng mà tại đó vẫn gây ra hiện tượng ngưng kết hồng cầu.

- Hiệu giá HA ở cột A và cột B chỉ được sai khác nhau 1 bậc pha loãng. Trong trường hợp hiệu giá ở hai cột A và B khác nhau thì lựa chọn hiệu giá thấp hơn để pha loãng vi rút thành kháng nguyên chuẩn.

➤ Chuẩn bị dung dịch kháng nguyên chuẩn

- Dựa vào hiệu giá HA của vi rút, pha loãng vi rút trong PBS để được kháng nguyên chuẩn – là dung dịch chứa 8 đơn vị HA/ 50 μ l (8HAU/ 50 μ l) (ví dụ, nếu hiệu giá của vi rút là 64 thì sẽ pha loãng vi rút 8 lần với dung dịch PBS).

- Thực hiện “chuẩn độ ngược” để kiểm tra hiệu giá HA của dung dịch kháng nguyên vừa pha bằng cách thực hiện phản ứng HA. Nếu kết quả là 8 HAU/ 50 μ l thì dung dịch kháng nguyên vừa pha được gọi là kháng nguyên chuẩn cho phản ứng HAI. Nếu phản ứng HA không cho kết quả là 8 HAU/ 50 μ l thì phải điều chỉnh và kiểm tra lại cho đến khi đạt được 8 HAU/ 50 μ l. Bảo quản dung dịch kháng nguyên chuẩn ở 4°C và chỉ sử dụng trong ngày.

2.2.5. Thực hiện phản ứng HAI

- Nhỏ 25 μ l PBS vào tất cả các giếng trừ hàng A.

- Nhỏ 50 μ l huyết thanh thử đã xử lý (độ pha loãng 1:10) vào giếng A1 đến A10.

- Nhỏ 50 μ l huyết thanh chứng dương đã xử lý (độ pha loãng 1:10) vào giếng A11.

- Nhỏ 50 μ l huyết thanh chứng âm đã xử lý (độ pha loãng 1:10) vào giếng A12.

- Pha loãng huyết thanh bậc 2 bằng cách chuyển lần lượt 25 μ l huyết thanh từ hàng A tới hàng H. Loại 25 μ l ở hàng H. Riêng cột 11 và 12, pha loãng đến hàng F.

- Nhỏ 25 μ l PBS vào giếng G11, G12, H11, H12 làm chứng hồng cầu.

- Nhỏ 25 μ l kháng nguyên 8HAU/50 μ l vào tất cả các giếng, trừ giếng G11, G12, H11, H12. Lắc nhẹ trộn đều.

- Ủ ở nhiệt độ phòng (22°C đến 25°C) trong 30 phút.

- Thêm 50 μ l dung dịch hồng cầu chuẩn vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ trộn đều.

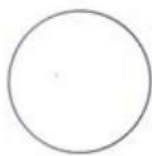
- Để phiến ở nhiệt độ phòng để hồng cầu lắng, đọc kết quả sau 1 giờ.

2.3. Đọc và tính kết quả

➤ Đọc kết quả

- Đọc hiệu giá HAI bằng cách nghiêng phiến một góc 45 – 60° theo chiều thẳng đứng, chứng hồng cầu sẽ bắt đầu chảy xuống. Đợi đến khi hồng cầu ngưng chảy, ghi nhận kết quả. Hiệu giá HAI của vi rút được xác định ở độ pha loãng cuối cùng mà tại đó vẫn gây ra hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu.

A-Ngưng kết hoàn toàn B-Ức chế ngưng kết một phần C-Ức chế ngưng kết



➤ Tiêu chuẩn chất lượng: Huyết thanh thử:

Hiệu giá HAI \leq 10:

10 < hiệu giá HAI < 40:

Hiệu giá HAI \geq 40:

➤ Yêu cầu

- Chứng hồng cầu: không ngưng kết.
- Huyết thanh chứng dương: hiệu giá HAI nằm trong khoảng từ 160 – 320.
- Huyết thanh chứng âm: không có hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu.