

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

\*\*\*\*\*

**NGUYỄN HOÀNG TÙNG**

**ĐÁNH GIÁ TÍNH ỔN ĐỊNH VỀ CHẤT LƯỢNG  
VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ DẠNG MẢNH BẮT  
HOẠT (IVACFLU-S) SẢN XUẤT TẠI IVAC**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2021**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

\*\*\*\*\*

**NGUYỄN HOÀNG TÙNG**

**ĐÁNH GIÁ TÍNH ỔN ĐỊNH VỀ CHẤT LƯỢNG  
VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ DẠNG MẢNH  
BẤT HOẠT (IVACFLU-S) SẢN XUẤT TẠI IVAC**

**Chuyên ngành: Vi sinh y học**

**Mã số: 62 72 01 15**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**Cán bộ hướng dẫn:**

- 1. PGS.TS. Lê Văn Bé**
- 2. PGS.TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng**

**HÀ NỘI - 2021**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Hoàng Tùng, nghiên cứu sinh khoá 35 thuộc Viện Vệ sinh Dịch tễ TW, chuyên ngành Vi sinh y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Lê Văn Bé và PGS. TS Nguyễn Lê Khánh Hằng.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2021*

**Tác giả luận án**

**Nguyễn Hoàng Tùng**

## ***Lời cảm ơn***

- Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Lê Văn Bé, PGS. TS Nguyễn Lê Khánh Hằng những người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, học tập.
- Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Đoàn Hữu Thiển, người có ảnh hưởng lớn đối với tôi trong định hướng học tập, nghiên cứu; về sự cẩn thận, ý thức trách nhiệm trong công việc.
- Tôi xin chân thành cảm ơn:

*Ban lãnh đạo, phòng Đào tạo Sau đại học viện Vệ sinh dịch tễ TW;*

*Các thầy cô, cán bộ, Viện sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang IVAC đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.*

- Tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt tới:

*Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Khoa Quản lý chất lượng Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.*

*Cuối cùng, tôi xin bày tỏ tình cảm thân thương và lòng biết ơn đặc biệt đối với gia đình và người thân, bạn bè, đồng nghiệp vẫn luôn ở bên cạnh tôi, nâng đỡ tôi, chia sẻ, động viên, tạo điều kiện cho tôi học tập, nghiên cứu.*

*Hà Nội, ngày tháng năm 2021*

*Nguyễn Hoàng Tùng*

## MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH .....	xi
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. VI RÚT CÚM .....	3
1.2. GÁNH NẶNG BỆNH TẬT CỦA CÚM .....	9
1.3. HỆ THỐNG GIÁM SÁT CÚM.....	10
1.4. VẮC XIN CÚM.....	15
1.5. VẮC XIN CÚM MÙA IVACFLU-S.....	29
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	37
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	37
2.1.1. Mẫu nghiên cứu .....	37
2.1.2. Cỡ mẫu và thời gian.....	39
2.2.1. Sinh phẩm .....	39
2.2.2. Động vật thí nghiệm .....	40
2.3. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU.....	42
2.4. BIẾN SỐ NGHIÊN CỨU .....	43
2.5. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	44
2.6. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU .....	57
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	58
3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG VẮC XIN CÚM MÙA IVACFLU-S .....	
3.1.1. Thử nghiệm an toàn đặc hiệu .....	58
3.1.2. Thử nghiệm an toàn chung .....	59
3.1.3. Thử nghiệm chất gât sốt .....	61
3.1.4. Thử nghiệm độc tính.....	62
3.1.4.1. Chỉ số sinh hoá máu.....	62
3.1.4.2. Giải phẫu bệnh và tế bào học .....	62

3.1.5. Thử nghiệm khả năng sinh miễn dịch .....	66
3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CÔNG HIỆU VÀ TÍNH ỔN ĐỊNH CÔNG HIỆU CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ, DẠNG MẢNH, BẤT HOẠT (IVACFLU- S) .....	70
3.2.1. Công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S.....	71
3.2.2. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S ở điều kiện thúc đẩy nhanh .....	72
3.2.3. Tính ổn định công hiệu theo thời gian của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S ở điều kiện bảo quản tiêu chuẩn.....	73
3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ ỔN ĐỊNH CÁC TÍNH CHẤT HOÁ LÝ CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ, DẠNG MẢNH, BẤT HOẠT IVACFLU-S .....	82
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	86
4.1. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG VÀ ÁP DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ IVACFLU-S TẠI VIỆT NAM .....	86
4.1.1. Phương pháp và ý nghĩa của đánh giá tiền lâm sàng trong nghiên cứu và sản xuất vắc xin.....	86
4.1.2. Đánh giá an toàn và độc tính tiền lâm sàng trong nghiên cứu và sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	90
4.1.3. Đánh giá tính sinh miễn dịch trong nghiên cứu tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	94
4.2. TÍNH ỔN ĐỊNH CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ IVACFLU-S SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM.....	97
4.2.1. Tác dụng đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	
4.2.2. Công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau .....	99
4.3. MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU .....	105
KẾT LUẬN.....	107
KIẾN NGHỊ .....	109

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN	
QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	110
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	111

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products (Ủy ban về các sản phẩm y tế độc quyền)
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention (Trung tâm Kiểm soát bệnh tật)
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam
EID50	Egg Infectious Dose 50 (Liều gây nhiễm 50% trên trứng gà)
EMA	European Medicines Agency (Cơ quan quản lý thuốc châu Âu)
EU	Endotoxin Unit (Đơn vị nội độc tố)
GISRS	WHO Global Influenza Surveillance and Response System (Hệ thống Giám sát và ứng phó với dịch Cúm Toàn cầu)
GMP	Good Manufacturing Practice (Thực hành sản xuất tốt)
GMT	Geometric Mean Titer (Trung bình nhân)
GLP	Good Laboratory Practice (Thực hành phòng thí nghiệm tốt)
HA	Haemagglutinin (Protein ngưng kết hồng cầu)
HAU	Haemagglutination Unit (Đơn vị ngưng kết hồng cầu)
HI	Haemagglutination Inhibition (Ức chế ngưng kết hồng cầu)
IB	Investigator's brochure (Hồ sơ về thông tin sản phẩm dành cho nghiên cứu viên)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Tổ chức hài hòa ba bên)
IVAC	Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế



MSL	Master seed lot (Loạt chủng gốc giống)
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control (Viện Quốc gia về Tiêu chuẩn và Kiểm định Sinh học, Anh)
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)
RIV	Residual Infectious Virus (vi rút sống tồn lưu)
RNP	Phức hợp ribonucleoprotein
SOP	Standard operation procedure (Quy trình thực hành chuẩn)
SPF	Specific Pathogen Free (Không có tác nhân gây bệnh đặc biệt)
SRID	Single Radial Immuno Diffusion (Khuếch tán miễn dịch vòng đơn)
TCCS	Tiêu chuẩn cơ sở
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)
WHO-TRS	World Health Organization – Technical Report Series (Tổ chức Y tế Thế giới – Báo cáo kỹ thuật)
WSL	Working seed lot (Loạt chủng sản xuất)

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1. Các phân đoạn gen của virút cúm và chức năng .....	5
Bảng 2. 1. Chủng Cúm mùa dùng trong sản xuất vắc xin IVACFLU-S.....	37
Bảng 2. 2. Sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu .....	39
Bảng 2. 3. Động vật thí nghiệm dùng trong nghiên cứu tiền lâm sàng.....	40
Bảng 2. 4. Danh mục thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu.....	41
Bảng 2. 5. Tiêu chuẩn chất lượng vắc xin cúm mùa IVACFLU-S .....	43
Bảng 2. 6. Nghiên cứu độc tính của vắc xin cúm mùa IVACFLU-S và lô giả dược	50
Bảng 2. 7. Đánh giá tính ổn định ở nhiệt độ bảo quản của 1 lô nước cốt đơn giá....	54
Bảng 2. 8. Các tiêu chí đánh giá tính ổn định của nước cốt đơn giá.....	55
Bảng 2. 9. Đánh giá tính ổn định ở điều kiện bảo quản và điều kiện thúc đẩy của 1 lô vắc xin thành phẩm .....	55
Bảng 2. 10. Các tiêu chí đánh giá tính ổn định của vắc xin thành phẩm .....	56
Bảng 3. 1. Kết quả đánh giá an toàn đặc hiệu vắc xin cúm mùa IVACFLU-S .....	58
Bảng 3. 2. Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột nhắt củavắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	59
Bảng 3. 3. Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột lang của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	60
Bảng 3. 4. Kết quả thử nghiệm chất gây sốt trên thỏ của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	61
Bảng 3. 5. Thay đổi các trị số sinh hóa máu của nhóm chuột sau tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S .....	62
Bảng 3. 6. Kết quả nhân chủng sản xuất chủng vắc xin cúm mùa IVACFLU-S.....	70
Bảng 3. 7. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015 .....	71

Bảng 3. 8. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017 .....	71
Bảng 3. 9. Tính ổn định hàm lượng kháng nguyên HA trong 03 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 ở nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	73
Bảng 3. 10. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 011214sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	74
Bảng 3. 11. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 021214 sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	74
Bảng 3. 12. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 031214 sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	75
Bảng 3. 13. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0040116 sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	75
Bảng 3. 14. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0050116 sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	76
Bảng 3. 15. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0060116 sau 15 tháng tại nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	76
Bảng 3. 16. Đánh giá chất lượng lô bán thành phẩm sản xuất vắc xin cúm mùa IVACFLU-S.....	78
Bảng 3. 17. Thông tin chung về 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU- S mùa 2014 - 2015 .....	79
Bảng 3. 18. Thông tin chung về 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU- S mùa 2016 - 2017 .....	80
Bảng 3. 19. Đánh giá ổn định chỉ tiêu pH của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015.....	82
Bảng 3. 20. Đánh giá ổn định chỉ tiêu pH của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017.....	83

Bảng 3. 21. Đánh giá ổn định chỉ tiêu hàm lượng protein tổng số của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 .....	83
Bảng 3. 22. Đánh giá ổn định chỉ tiêu hàm lượng protein tổng số của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017 .....	84
Bảng 3. 23. Đánh giá ổn định chỉ tiêu vô khuẩn, cảm quan, chất gây sốt của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 .....	85
Bảng 3. 24. Đánh giá ổn định chỉ tiêu vô khuẩn, cảm quan, chất gây sốt của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017 .....	85

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Mô hình cấu trúc vi rút cúm.....	3
Hình 1. 2. Các typ và phân typ vi rút cúm được xác định theo từng năm tại Việt Nam, 2006–2011 .....	13
Hình 1. 3. Phân bố mẫu xét nghiệm dương tính vi rút cúm theo tháng tại Việt Nam (2006–2011) .....	13
Hình 1. 4. Tỷ lệ chung các mẫu xét nghiệm dương tính với vi rút cúm phân bố theo từng tháng tại Việt Nam (2006-2011) .....	14
Hình 1. 5. Virus cúm lưu hành tại Việt Nam, 2006-2018.....	14
Hình 1. 6. Các giai đoạn phát triển vắc xin cúm mùa, 1933-2013.....	15
Hình 1. 7. Sự thay đổi virus cúm trong thành phần vacxin cúm, 2000-2017 .....	25
Hình 1. 8. Phân bố mẫu xét nghiệm dương tính vi rút cúm theo tháng của một số nước thuộc khu vực Nam Á và Đông nam Á (2008–2011).....	26
Hình 1. 9. Quy trình phát triển, sản xuất và sử dụng vắc xin cúm mùa.....	28
Hình 1. 10. Gây nhiễm và thu hoạch dịch vi rút bằng hệ thống máy Rame- Harte bán tự động công suất 10.000 trứng/giờ .....	31
Hình 2. 1. Sơ đồ nghiên cứu.....	42
Hình 3. 1. Hình ảnh giải phẫu cơ vùng tiêm trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	63
Hình 3. 2. Hình ảnh giải phẫu tủy xương trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	63
Hình 3. 3. Hình ảnh giải phẫu mô phổi phải (a) và phổi trái (b) trên thỏ tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	64
Hình 3. 4. Hình ảnh giải phẫu mô gan trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	65

Hình 3. 5. Hình ảnh giải phẫu mô lách trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	65
Hình 3. 6. Hình ảnh giải phẫu mô thận phải (a) và thận trái (b) trên thỏ tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40) .....	66
Hình 3. 7. Đáp ứng miễn dịch của chủng X-179A (H1N1) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm.....	67
Hình 3. 8. Đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm.....	68
Hình 3. 9. Đáp ứng miễn dịch của chủng BX-51B (B) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm.....	69
Hình 3. 10. Tính ổn định hàm lượng kháng nguyên HA trong 03 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 ở nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	72
Hình 3. 11. Kết quả chung đánh giá độ ổn định công hiệu của 6 lô vắc xin cúm IVACFLU-S bảo quản ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	77

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút cúm, thuộc họ *Orthomyxoviridae*, các type vi rút gây bệnh cúm cho người chủ yếu là vi rút cúm type A và B. Bệnh cúm là một trong những bệnh truyền nhiễm không những vì tác động bất lợi về mặt sức khỏe do những vụ dịch cúm hàng năm mà nó còn có khả năng gây ra những đại dịch cúm mang tính toàn cầu như đại dịch cúm Tây Ban Nha năm 1918, lây nhiễm 1/3 dân số thế giới vào thời điểm đó (khoảng 500 triệu người) gây tử vong khoảng hơn 50-100 triệu người; đại dịch cúm khởi phát ở Hồng Kông năm 1968 lan sang Hoa Kỳ và nhiều châu lục khác, với khoảng một triệu người trên toàn cầu bị tử vong[90]. Phần lớn cá thể, khi bị nhiễm vi rút cúm bị bệnh đường hô hấp có thể tự khỏi, nhưng số còn lại có thể tử vong, đặc biệt là ở người già, trẻ em và các đối tượng suy giảm sức đề kháng khác. Một trong số biến chứng thường gặp nhất đối với bệnh cúm là bội nhiễm gây viêm phổi thứ phát làm bệnh cảnh trở nên nặng nề gây suy hô hấp cấp dẫn đến tử vong[106]. Do tính nghiêm trọng của cúm đối với nhóm trẻ nhỏ, người cao tuổi và những người đang có bệnh mắc trước đó, nên nhiều quốc gia khuyến cáo tiêm vắc xin cho những cá thể đó cũng như những người tiếp xúc trực tiếp với các đối tượng có nguy cơ cao này hàng năm [49, 53].

Vi rút cúm có khả năng đột biến, dẫn đến sự thay đổi về mặt kháng nguyên, nên nhiễm vi rút tự nhiên hoặc do tiêm vắc xin dự phòng chỉ có tác dụng bảo vệ trong khoảng một năm. Dự phòng cúm bằng vắc xin là một chiến lược hiệu quả nhằm giảm nguy cơ mắc bệnh đường hô hấp trong các nhóm tuổi có nguy cơ cao được triển khai ở hầu khắp các quốc gia phát triển như Hoa Kỳ, các nước trong Khối cộng đồng chung Châu Âu (EU)... Theo Tổ chức Y tế thế giới (TCYTGT), việc tiêm phòng vắc xin cúm góp phần làm giảm khoảng 60% bệnh tật liên quan đến cúm, giảm nguy cơ tử vong do cúm lên đến đến 70-80% cũng như làm giảm nguy cơ mắc bệnh cúm cho người khỏe mạnh 70-90% [17, 40, 72, 87, 109]. Trên thế giới, hiện nay vắc xin phòng bệnh cúm mùa đã được rất nhiều hãng sản xuất và thương

mại hóa như: Inflexal V của Crucell (Thụy Sĩ), Fluarix của GSK (Bi), Vaxigrip của (Sanofi Pasteur) Pháp, Influvac của Solvay-Fournier (Hà Lan)...

Ở Việt Nam, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) là đơn vị duy nhất có dây chuyền công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi, công suất 1,5 triệu liều/năm đạt chuẩn GMP-WHO. Đây là dây chuyền công nghệ do TCYTTG tài trợ cho IVAC trong khuôn khổ Chương trình phát triển vắc xin cúm toàn cầu, làm cơ sở vững chắc để nghiên cứu phát triển sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá ở Việt Nam. Cùng với việc nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá, nghiên cứu đánh giá tính ổn định về chất lượng vắc xin cũng như khả năng tạo được đáp ứng miễn dịch của vắc xin là một vấn đề cần thiết, làm cơ sở đưa vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh vào thử nghiệm lâm sàng trên người. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: ***“Đánh giá tính ổn định về chất lượng vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh bất hoạt (IVACFLU-S) sản xuất tại IVAC”***.

#### **Mục tiêu nghiên cứu**

1. Đánh giá tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh bất hoạt (IVACFLU-S).
2. Đánh giá công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh bất hoạt (IVACFLU-S), 2014 - 2017.
3. Đánh giá tính ổn định một số tính chất lý hóa của vắc xin cúm mùa tam giá dạng mảnh bất hoạt (IVACFLU-S), 2014 – 2017.



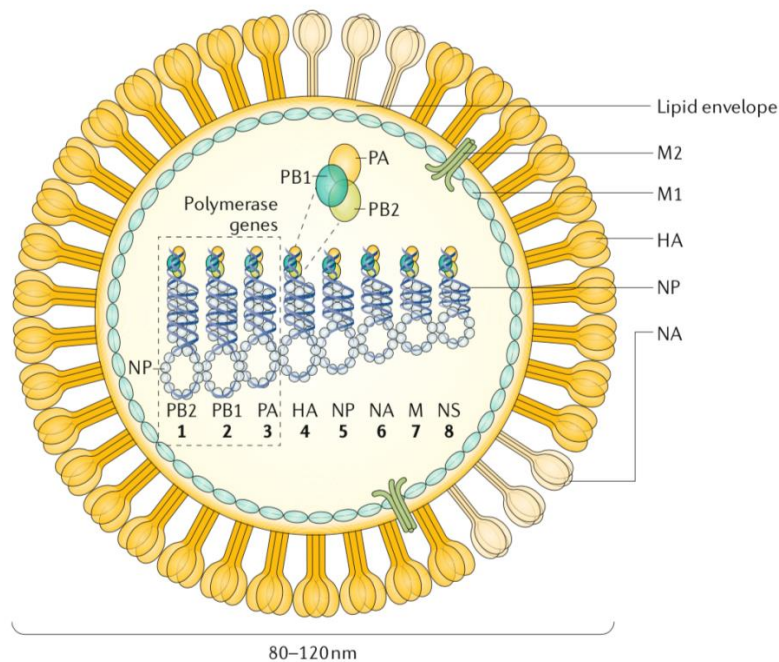
# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. VI RÚT CÚM

#### 1.1.1. Hình thái, cấu trúc

Virút cúm có hình dáng rất đa dạng: hình cầu, hình trứng hoặc đôi khi có hình sợi kéo dài tới 2000 nm, đường kính trung bình từ 80-120nm. Các hạt virút cúm A và B có vỏ ngoài bao bọc. Vỏ ngoài virút có bản chất là protein có nguồn gốc từ màng tế bào chất của vật chủ, bao gồm một số glycoprotein và một số protein dạng trần không được glycosyl hoá [1, 8].



**Hình 1. 1. Mô hình cấu trúc vi rút cúm**

\**Nguồn:* <https://www.nature.com/articles/s41572-018-0002-y>[48]

Trên bề mặt vỏ ngoài đính các gai glycoprotein, đó là các kháng nguyên haemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Vi rút cúm C chỉ có một gai glycoprotein. Protein HA gây ngưng kết hồng cầu, có vai trò quyết định trong việc

gắn virút vào tế bào chủ, protein NA có chức năng phá vỡ liên kết giữa virút và tế bào chủ để giải phóng vi rút ra khỏi tế bào nhiễm. Tỷ lệ HA/NA là 4/1 (Hình 1.1).

Nucleoprotein (NP) và 3 enzyme polymerase (PB2, PB1, PA) là thành phần của yếu tố của phức hợp ribonucleoprotein (RNP) xoắn ở bên trong của vi rút. Protein M1 nằm dưới lớp lipid kép và liên kết với RNP của lõi vi rút, là protein có nhiều nhất trong vi rút. Protein NS2 tạo thành phức hợp với protein M1, là mối liên hệ cần thiết trong chu trình sống của virút để giải phóng phức hợp RNP từ nhân.

Genome của virút cúm A, B gồm 8 phân đoạn và của virút cúm C là 7 phân đoạn ARN sợi đơn âm, có chiều dài khoảng 10 đến 15 kb. Mỗi phân đoạn mã hoá cho 1 hoặc 2 protein cấu trúc hoặc không cấu trúc: (7 protein cấu trúc: PB1, PB2, PA, HA, NA, NP và M1 và 3 protein không cấu trúc- nonstructural protein: NS1, NS2 và M2 đối với virút cúm A và NS đối với virút cúm B - chỉ thấy ở tế bào nhiễm virút) [1].

**Bảng 1. 1. Các phân đoạn gen của virút cúm và chức năng[20, 118]**

<b>Phân đoạn</b>	<b>Kích thước (nucleotide)</b>	<b>Polypeptide</b>	<b>Chức năng</b>
1	2341	PB2	Cắt cấu trúc đầu 5' của phân tử mARN tiền thân của tế bào chủ để tạo môi trường cho quá trình phiên mã.
2	2341	PB1	Khởi đầu, kéo dài ARN trong quá trình tổng hợp
3	2233	PA	Liên quan đến quá trình tổng hợp ARN; kết nối phức hệ polymerase
4	1778	HA	Gắn virus vào thụ cảm thể tế bào chủ; dung hợp vỏ virus với màng endosome
5	1565	NP	Tạo cấu trúc RNP
6	1413	NA	Giải phóng virus khỏi tế bào chủ
7	1027	M1	Tạo thành lớp màng dưới vỏ virus; vai trò trong quá trình lắp ráp virus
		M2	Kênh ion, vai trò trong quá trình cởi vỏ virus
8	890	NS1	Vai trò trong quá trình vận chuyển mARN ra tế bào chất; có thể có vai trò ức chế quá trình splicing mARN tiền thân.
		NS2	Vai trò trong quá trình vận chuyển vRNP từ nhân ra tế bào chất.

### 1.1.2. Cơ chế nhân lên của vi rút

Quá trình nhân lên của RNA vi rút cúm chỉ xảy ra trong nhân của tế bào, đây là đặc điểm khác biệt so với các vi rút khác (quá trình này xảy ra trong nguyên sinh chất), và cuối cùng là giải phóng các hạt vi rút ra khỏi tế bào nhiễm nhờ vai trò của enzyme neuraminidase. Thời gian một chu trình xâm nhiễm và giải phóng các hạt vi rút mới của vi rút cúm chỉ khoảng vài giờ (trung bình 6h). Sự tạo thành các hạt vi rút mới không phá tan tế bào nhiễm, nhưng các tế bào này bị rối loạn hệ thống tổng hợp các đại phân tử, và rơi vào quá trình chết theo chương trình (apoptosis) làm tổn thương mô của cơ thể vật chủ [110].

Sau khi được giải phóng vào trong bào tương tế bào cảm nhiễm, hệ gen của vi rút sử dụng bộ máy sinh học của tế bào tổng hợp các protein của vi rút và các RNA vận chuyển phụ thuộc RNA (RNA-dependent RNA transcription). Phức hợp protein – RNA của vi rút được vận chuyển vào trong nhân tế bào.

Trong nhân tế bào các RNA hệ gen của vi rút tổng hợp nên các sợi dương từ khuôn là sợi âm của hệ gen vi rút, từ các sợi dương này chúng tổng hợp nên RNA hệ gen của vi rút mới nhờ RNA-polymerase. Các sợi này không được Adenine hóa (gắn thêm các Adenine - *gắn mũ*) ở đầu 5'- và 3'-, chúng kết hợp với nucleoprotein (NP) tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP) hoàn chỉnh và được vận chuyển ra bào tương tế bào. Đồng thời, các RNA thông tin của vi rút cũng sao chép nhờ hệ thống enzyme ở từng phân đoạn gen của vi rút, và được enzyme PB2 gắn thêm 10 - 12 nucleotide Adenin ở đầu 5'-, sau đó được vận chuyển ra bào tương và dịch mã tại lưới nội bào có hạt để tổng hợp nên các protein của virus.

Các phân tử NA và HA của vi rút sau khi tổng hợp được vận chuyển gắn lên mặt ngoài của màng tế bào nhiễm nhờ bộ máy Golgi, gọi là hiện tượng “*nảy chồi*” của vi rút. NP sau khi tổng hợp được vận chuyển trở lại nhân tế bào để kết hợp với RNA thành RNP của vi rút. Sau cùng các RNP của vi rút được hợp nhất với vùng “*nảy chồi*”, tạo thành các “*chồi*” vi rút gắn chặt vào màng tế bào chủ bởi liên kết

giữa HA với thụ thể chứa sialic acid. Các NA phân cắt các liên kết này và giải phóng các hạt vi rút trưởng thành tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác [81].

### 1.1.3. Kháng nguyên HA và NA trong đáp ứng miễn dịch của vi rút cúm

Những nghiên cứu về hoạt động chức năng các protein của virus cúm A trong đáp ứng miễn dịch cho thấy:

Kháng nguyên virus cúm chủ yếu là kháng nguyên bề mặt bao gồm protein HA và NA. Kháng nguyên HA gồm 1.742-1.778 nucleotide mã hóa cho 562-566 axit amin, có khả năng gây ngưng kết hồng cầu, gắn với thụ thể chứa axit sialic trên bề mặt tế bào, giúp vi rút xâm nhập vào tế bào. Protein HA tồn tại dưới 2 dạng: dạng tiền thân không phân tách là HA0 hoặc dạng phân tách thành HA1 và HA2 liên kết với nhau bởi cầu nối disulfua (S-S). Sự phân tách chính là điều kiện quyết định để vi rút có khả năng gây nhiễm và do vậy, liên quan đến độc tính và khả năng lây truyền của vi rút [68, 94]. HA1 gồm 319-326 axit amin, HA2 gồm 221-222 axit amin. Tùy thuộc vào phân tít HA, số lượng các axit amin bị phân tách giữa HA1 và HA2 là từ 1 đến 6. Ngoài ra, vị trí axit amin trên gen HA có vai trò gắn với thụ thể tế bào chủ cũng đóng vai trò quan trọng trong việc lây truyền vi rút cúm. Vi rút cúm gia cầm gắn vào thụ thể trên tế bào chủ tại vị trí 2.3 (SA $\alpha$ - 2,3 Gal), vi rút cúm người gắn vào thụ thể trên tế bào chủ tại vị trí 2.6 (SA $\alpha$ - 2,6 Gal), trong khi vi rút cúm lợn gắn được cả 2 vị trí (SA $\alpha$ - 2,3 Gal) và (SA $\alpha$ - 2,6 Gal). Vị trí axit amin trên gen HA gắn thụ thể nằm ở vùng ngoại biên các tiểu đơn vị phân tử, cấu trúc có tính đồng dạng cao giữa các phân tít [52, 68, 117].

Một số nghiên cứu cho thấy chỉ một số nhỏ kháng thể kháng lại vùng đầu HA (RBD) có khả năng trung hoà chéo với các KN trong virus cùng loài (A/H1, A/H3, A/H5), trong khi kháng thể kháng vùng thân HA có khả năng tương tác chéo giữa các virus cúm A, kể cả tương tác chéo với virus cúm B [21, 31, 103]. Các nghiên cứu về cơ chế và hiệu quả tương tác của kháng thể kháng thân HA cho thấy những kháng thể này có khả năng bất hoạt chức năng màng của virus và cơ quan nội bào

do cản trở khả năng phân tách phân tử HA1 và HA2, ức chế virus nảy chồi trên bề mặt tế bào nhiễm.

Kháng nguyên NA là một protein gồm 1413 nucleotide mã hóa cho 453 axit amin. NA có bản chất là một enzyme đóng vai trò như một mắt xích quan trọng trong việc giải phóng vi rút từ tế bào nhiễm và lan truyền vi rút trong đường hô hấp. So sánh về tính miễn dịch với HA, NA có tính sinh miễn dịch yếu hơn và khả năng trôi kháng nguyên thấp hơn. Vì vậy, miễn dịch của NA bền hơn và có thể phát triển vắc xin vạn năng cho cúm. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy kháng thể do NA tạo ra có khả năng bảo vệ các virus cúm cùng phân typ, kể cả các virus cúm độc lực cao (cúm A/H1N1 người, A/H1N1 lợn). Tuy nhiên, kháng thể do NA hạn chế bảo vệ chéo với các virus cúm khác phân typ [9, 19, 96]. Rất nhiều nghiên cứu cho thấy tính miễn dịch của NA tương đương với HA, sự đáp ứng miễn dịch nổi trội của HA quan sát được có thể do sự phân bố nhiều HA trên bề mặt virus hơn NA và hiệu quả bảo vệ của kháng thể NA đã dần được công nhận [33, 56].

#### **1.1.4. Tính đa dạng di truyền và sự tiến hoá của vi rút cúm**

Vi rút cúm A (không xảy ra đối với vi rút cúm B hoặc C) có đối tượng gây nhiễm phong phú: gia cầm (gà, vịt, ngan...), thủy cầm, chim di cư, động vật có vú và người nên vật liệu di truyền ARN của vi rút luôn chịu tác động của vật chủ trong quá trình thâm nhiễm, phiên mã, nhân lên, tích hợp, nảy chồi và giải phóng thế hệ mới ra khỏi tế bào chủ. Kết quả của quá trình này là các biến đổi trong vật liệu di truyền (đột biến - mutation), hoặc có sự pha trộn các phân đoạn gen của virus cúm A khác nhau khi cùng đồng nhiễm trên một tế bào (trao đổi và tích hợp - reassortment). Hệ quả của nó là sự thay đổi kháng nguyên: *thay đổi nhỏ kháng nguyên (antigenic drift)* hoặc *thay đổi lớn kháng nguyên (antigenic shift)*. Đó chính là nguyên nhân gây ra các vụ dịch lẻ tẻ hoặc đại dịch cúm. Những thay đổi trong vật liệu di truyền của vi rút cúm A là động lực cho sự tiến hóa của nó [15, 55, 105].

Vật liệu di truyền của vi rút cúm A với các phân đoạn rời kết hợp với đặc tính không ổn định, kém bền vững đã làm cho vi rút cúm trở thành tác nhân sinh học

nguy hiểm với sức khỏe cộng đồng. Đại dịch cúm xảy ra khi xuất hiện một vi rút cúm A phân tít hoàn toàn mới, thoát khỏi sự bảo vệ của hệ thống miễn dịch đã có trong quần thể người

## **1.2. GÁNH NẶNG BỆNH TẬT CỦA CÚM**

Nhiễm vi rút cúm và tử vong do bệnh cúm được ghi nhận là mối quan ngại lớn của sức khỏe cộng ở các nước ôn đới, và gần đây cũng được ghi nhận tại các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Những đại dịch cúm xảy ra trong thế kỷ trước và gần đây nhất là đại dịch cúm năm 2009 đã tác động rất lớn đến kinh tế, xã hội và hệ thống chăm sóc sức khỏe toàn cầu[36].

Theo ước tính của TCYTTG, hàng năm bệnh cúm mùa ảnh hưởng đến 5%-10% người trưởng thành và dẫn đến tử vong từ 250.000- 500.000 người. Đặc biệt, cúm là tác nhân đứng thứ hai gây viêm đường hô hấp cấp cho 20-30% trẻ em trên toàn thế giới, vì vậy cúm được TCYTTG ghi nhận có tác động nghiêm trọng tới sức khỏe cộng đồng[70]. Bệnh cúm là căn nguyên quan trọng gắn liền với số mắc, số bệnh nhân điều trị ngoại trú, bệnh nhân nhập viện và biến chứng, tử vong. Số liệu ước tính trong 6 mùa cúm (2010-2016) tại Mỹ được ghi nhận từ 9,2 đến 35,6 triệu người có hội chứng cúm (ILI) bao gồm 140.000 đến 710.000 người điều trị tại bệnh viện[11, 26, 97].

Trong giai đoạn đại dịch 2009-2010 tại Mỹ, phụ nữ mang thai từ 18-29 tuổi bị nhiễm cúm điều trị tại bệnh viện khoảng 29%, trong số đó 16% tử vong. Trong cùng thời điểm này, số nhiễm cúm A/H1N1 của phụ nữ mang thai tại châu Âu chiếm 10%. Nhân viên y tế cũng có nguy cơ nhiễm cúm cao hơn các nhóm ngành nghề khác do phải tiếp xúc với bệnh nhân và thường làm việc cả trong thời gian ủ bệnh, vì vậy sẽ có khả năng lan truyền cúm sang các bệnh nhân khác. Gánh nặng bệnh tật liên quan đến nhiễm virus cúm tại trẻ em dưới 5 tuổi đã được chứng minh trên phạm vi toàn cầu, tỷ lệ nhiễm cúm tại trẻ em là cao nhất thường >30% trong tổng số người nhiễm cúm. Tuy nhiên, phần lớn trẻ em nhiễm cúm thường được điều trị ngoại trú và nguy cơ lây lan bệnh trong cộng đồng cao[79, 82]. Tỷ lệ nhiễm cúm

có biến chứng hoặc đồng nhiễm với các virus khác gây viêm phổi nặng tại các nước đang phát triển cao hơn các nước phát triển. Thời gian đào thải virus ở trẻ em dài hơn người trưởng thành, vì vậy trẻ em có vai trò rất quan trọng trong việc lan truyền virus trong cộng đồng và việc kiểm soát trẻ em nhiễm cúm tại cộng đồng cần được thực hiện nghiêm túc. Hiện tại có rất ít các số liệu về nhiễm cúm nặng của nhóm người cao tuổi tại các nước đang phát triển, tuy nhiên tại các nước phát triển hoặc nước công nghiệp như Mỹ, Hồng Kong và Singapore, tỷ lệ tử vong trên 100.000 dân của nhóm >65 tuổi cao hơn các nhóm tuổi khác[76, 84].

Phòng cúm bằng vắc xin hiện tại là phương pháp phòng chống cúm có hiệu quả, giúp hạn chế số người nhiễm, tử vong do nhiễm cúm hàng năm trên phạm vi toàn cầu. Mặc dù, việc tiêm phòng vắc xin phòng chống cúm đã thực hiện rộng rãi, tổn hại kinh tế do bệnh cúm được vẫn ghi nhận một cách có hệ thống, lên đến 11,2 triệu USD (từ 6,3-25,3 triệu) hàng năm, trong đó chi phí cho điều trị y tế trực tiếp khoảng 3,2 triệu USD (từ 1,5-1,7 triệu USD), chi phí gián tiếp là 8,0 triệu USD (4,8-13,6 triệu USD)[46].

### **1.3. HỆ THỐNG GIÁM SÁT CÚM**

#### **1.3.1. Hệ thống Giám sát cúm toàn cầu**

Hệ thống Giám sát và ứng phó với dịch Cúm Toàn cầu (WHO Global Influenza Surveillance and Response System - GISRS) đã thực hiện giám sát về vi rút học cúm từ năm 1952. Mạng lưới này đóng một vai trò quan trọng giúp chúng ta hiểu biết diễn biến tình hình hiện tại về virut cúm lưu hành trên toàn cầu. Mục tiêu chính của hệ thống:

- Theo dõi sự biến đổi tính kháng nguyên của vi rút cúm;
- Hướng dẫn lựa chọn các chủng cho vắc xin cúm hàng năm;
- Cung cấp chủng vi rút sử dụng trong sản xuất vắc xin.

Hệ thống Giám sát và ứng phó với dịch Cúm Toàn cầu (GISRS) do Tổ chức y tế thế giới (WHO) điều phối hiện nay bao gồm 143 Trung tâm Cúm Quốc gia



(NICs: *National Influenza Centres*) ở 113 quốc gia thành viên, 6 Trung tâm chuẩn thức Cúm (CCs: *Collaborating Centres for Influenza*), 4 phòng thí nghiệm về qui tắc thiết yếu (ERLs: *Essential Regulatory Laboratories*) và 13 phòng thí nghiệm chuẩn thức của TCYTTG về cúm H5. GISRS tiến hành các hoạt động đánh giá sự liên quan của vi rút cúm đến sức khỏe cộng đồng như các vi rút có nguy cơ gây đại dịch. Hàng năm, các Trung tâm cúm quốc gia thuộc GISRS thu thập và xét nghiệm hơn ba triệu mẫu bệnh phẩm và chia sẻ chủng vi rút cúm đại diện cho CCs của TCYTTG để phân tích chi tiết và đưa ra các khuyến cáo về thành phần vắc xin. Mạng lưới cũng đưa ra các hướng dẫn và hỗ trợ cho các quốc gia trong các hoạt động như đào tạo, đánh giá rủi ro, phản ứng với các vụ dịch bùng phát, phát triển các xét nghiệm chẩn đoán, kiểm tra tính kháng/giảm độ nhạy thuốc chống vi rút và đưa ra các giải thích khoa học về những phát hiện quan trọng trong quá trình giám sát. Điều đó cho phép các quốc gia, các nhà hoạch định chính sách hiểu rõ hơn về các yếu tố nguy cơ đối với bệnh nặng, sự biến đổi của cúm từ mùa này đến mùa khác và mối quan hệ của nó với các loại vi rút hoặc phân type cúm, gánh nặng bệnh tật liên quan đối với cúm, và các yếu tố khác liên quan đến việc ra quyết định về sức khỏe cộng đồng. Sự tích lũy dữ liệu liên quan đến cúm sẽ cho phép đánh giá, so sánh nhanh chóng của bệnh cúm mùa và các đại dịch trong tương lai trên phương diện địa phương và toàn cầu. Việc chia sẻ thường xuyên dữ liệu theo dõi và giám sát cúm trong mạng lưới giúp cung cấp thông tin về:

- Tỷ lệ nhiễm cúm, tỷ lệ chủng vi rút cúm lưu hành, giám sát sự biến đổi kháng nguyên để xác định mô hình lan truyền cúm toàn cầu.
- Mô tả các đặc tính quan trọng của dịch cúm bao gồm các nhóm nguy cơ, đặc điểm lây truyền, theo dõi các xu hướng toàn cầu trong lây truyền cúm để các nước chuẩn bị tốt hơn cho mùa cúm tiếp theo.
- Hỗ trợ việc lựa chọn các chủng cúm cho sản xuất vắc xin cúm. Các khuyến cáo được đưa ra vào tháng 2 cho mùa cúm tiếp theo ở Bắc bán cầu và vào

tháng 9 cho mùa cúm tiếp theo ở Nam bán cầu vì cần khoảng 6-8 tháng để sản xuất và phê duyệt vắc xin.

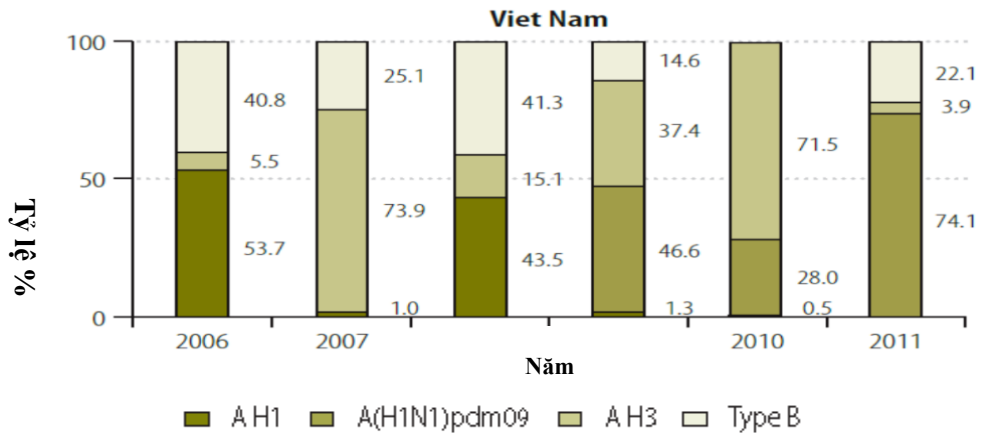
### **1.3.2. Hệ thống giám sát cúm tại Việt Nam**

Việt Nam cũng là một thành viên của mạng lưới giám sát cúm toàn cầu với 2 trung tâm cúm Quốc gia đặt tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTU) và Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh. Để chủ động giám sát sự lưu hành và biến đổi của các chủng vi rút cúm ở trong nước, Bộ Y tế đã triển khai hệ thống Giám sát cúm trọng điểm quốc gia từ năm 2006 (National Influenza Surveillance System – NISS) với sự hỗ trợ của TCYTTG và Trung tâm Kiểm soát và phòng bệnh (CDC) – Hoa Kỳ, giám sát nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng từ đầu năm 2016 và đẩy mạnh hoạt động xét nghiệm chẩn đoán tác nhân gây bệnh cúm. Các Trung tâm cúm quốc gia tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh đều có đủ năng lực xét nghiệm giám sát dịch tễ học phân tử các chủng vi rút cúm lưu hành tại Việt Nam.

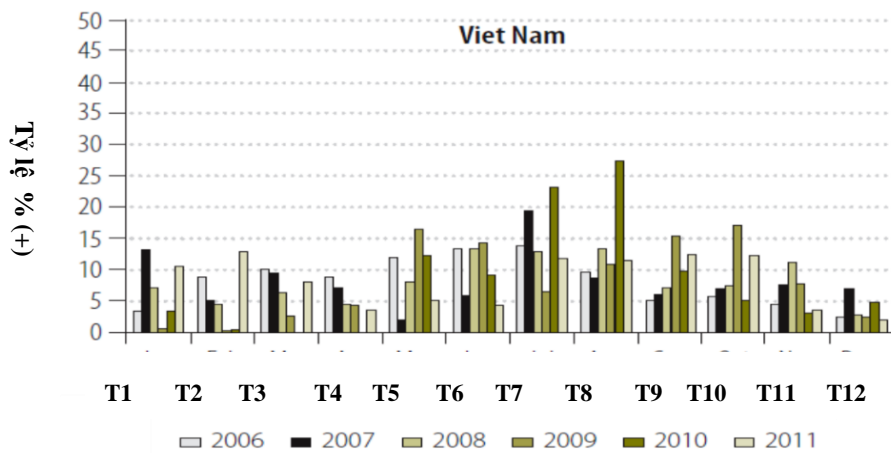
Tại Việt Nam, trong 10 năm gần đây hàng năm ghi nhận khoảng từ 1 triệu đến 1,8 triệu trường hợp mắc hội chứng cúm, nguyên nhân chủ yếu do các chủng vi rút cúm A/H3N2, cúm A/H1N1, A/H1N1pdm09 và cúm B gây nên. Theo thống kê của Chương trình giám sát cúm quốc gia, tỉ lệ dương tính với cúm trên các bệnh nhân có hội chứng cúm là từ 18- 20%.

Theo số liệu giám sát từ Trung tâm cúm Quốc gia - Viện VSDTTU từ 2006-2011 cho thấy có 17,8% các mẫu xét nghiệm dương tính với vi rút cúm. Phân tích số liệu thống kê hàng tháng cho thấy bệnh cúm lưu hành trong cả năm (Hình 1.2 và Hình 1.3), và đạt đỉnh cao từ tháng 7 đến tháng 8 (Hình 1.3 và hình 1.4). Chủng vi rút cúm A/H1N1 và chủng vi rút cúm B được báo cáo với tần suất nhiều nhất trong năm 2006 (lần lượt là 53,7% và 40,8%) và năm 2008 (lần lượt là 43,5% và 41,3%), trong khi chủng vi rút cúm A/H3N2 (73,9%) và B (25,1%) lại được báo cáo nhiều nhất trong năm 2007.

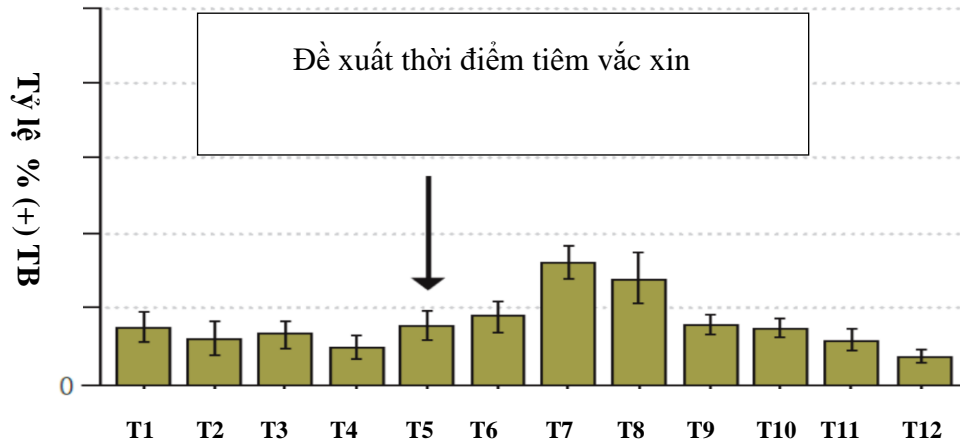
Trong 2 năm 2009 -2010 cùng với sự lưu hành với chủng vi rút cúm A/H3N2, dịch cúm mới nổi A/H1N1pdm09 chiếm tỷ lệ 46,6% (2009) và 28,0% (2010). Trong năm 2011, A/H1N1pdm09 là vi rút cúm được báo cáo nhiều nhất (74,1%), tiếp sau là vi rút cúm B (22,1%) [6].



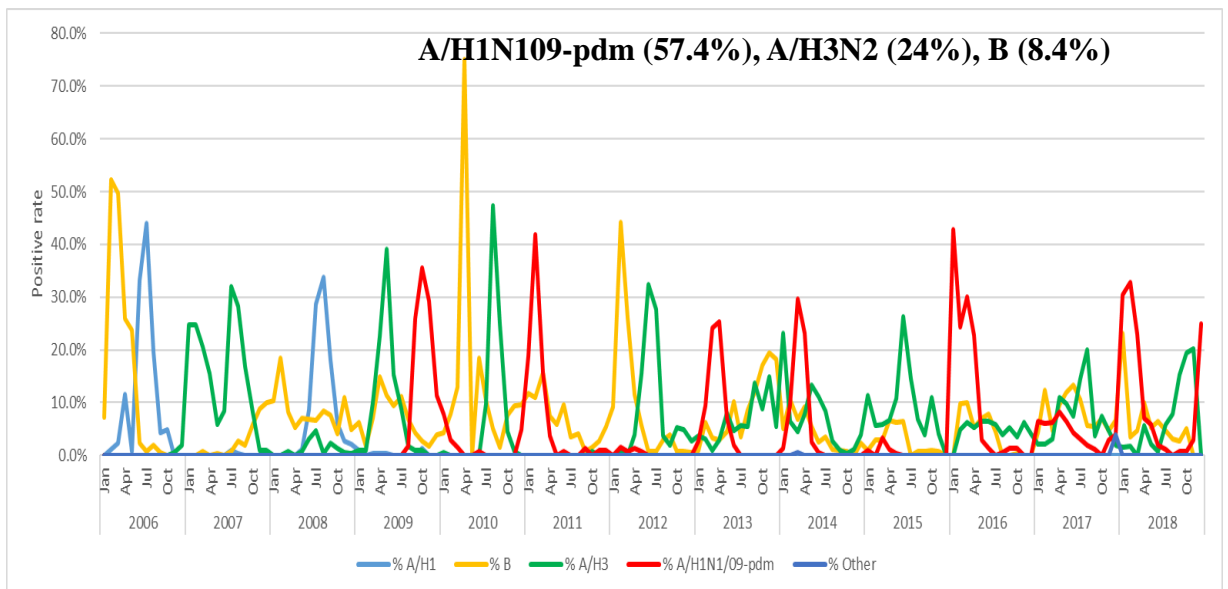
**Hình 1. 2. Các typ và phân typ vi rút cúm được xác định theo từng năm tại Việt Nam, 2006–2011[7]**



**Hình 1. 3. Phân bố mẫu xét nghiệm dương tính vi rút cúm theo tháng tại Việt Nam (2006–2011)[7]**



**Hình 1. 4. Tỷ lệ chung các mẫu xét nghiệm dương tính với vi rút cúm phân bố theo từng tháng tại Việt Nam (2006-2011)[7]**



**Hình 1. 5. Virus cúm lưu hành tại Việt Nam, 2006-2018**

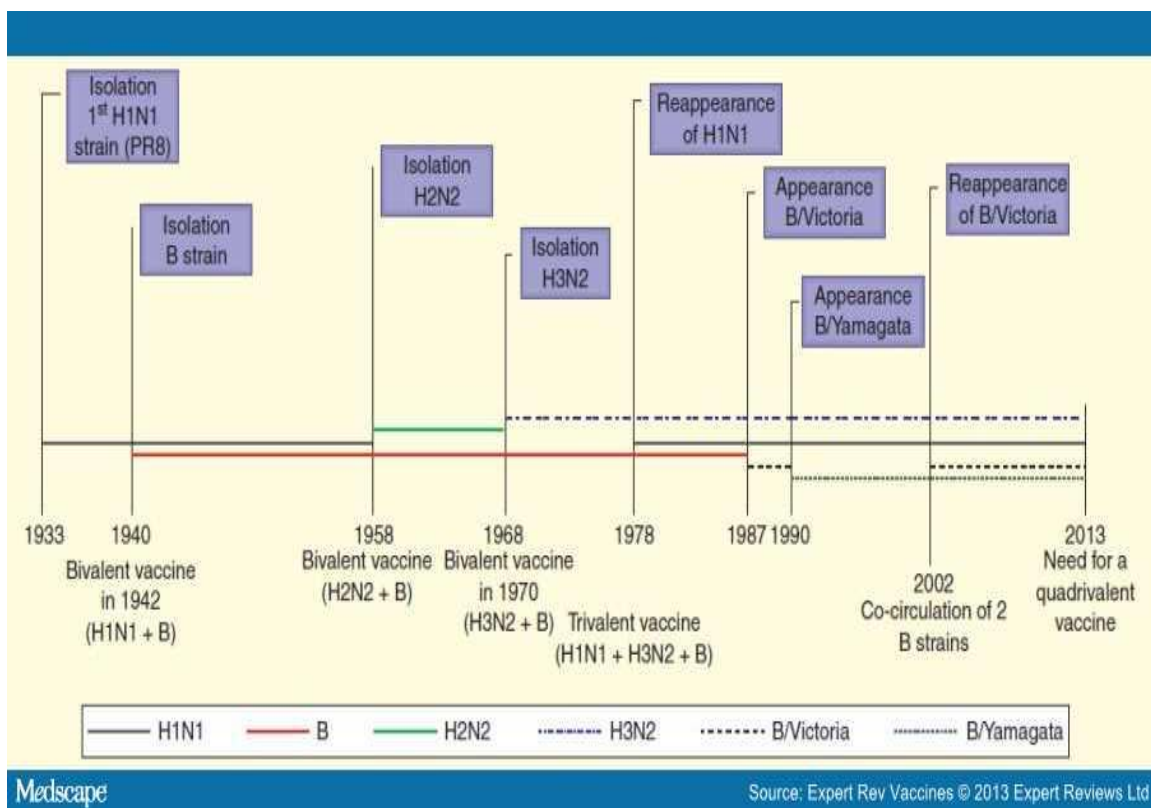
**(Trung tâm Cúm Quốc gia -Viện VSDTTW)**

Trong 13 năm giám sát (2006-2018), 3 phân typ cúm cùng lưu hành hàng năm tại Việt Nam. Trong đó, vi rút cúm A/H1N1/09pdm chiếm ưu thế vào các năm 2009, 2011, 2013, 2016 và 2018; vi rút cúm A/H3N2 năm 2010, 2012, 2013 và 2018; vi rút cúm B năm 2010, 2012, 2013, 2015, 2017 và 2018.

Phân tích đặc điểm gen trên các chủng vi rút cúm phân lập tại Việt Nam giai đoạn 2010-2018 và sự tương đồng với các chủng vắc xin khuyến cáo cho mùa dịch nhìn chung cho thấy có sự tương đồng giữa vi rút cúm lưu hành và chủng vắc xin khuyến cáo cho cả Bắc và Nam bán cầu (Theo số liệu Trung tâm cúm Quốc gia – Viện VSDTTU).

## 1.4. VẮC XIN CÚM

### 1.4.1. Lịch sử phát triển vắc xin cúm



**Hình 1. 6. Các giai đoạn phát triển vắc xin cúm mùa, 1933-2013[17]**

Cũng giống như các vắc xin khác, lịch sử phát triển vắc xin cúm gắn liền với sự hiểu biết về kháng nguyên của tác nhân gây bệnh và sự phát triển của công nghệ. Tuy nhiên, do tính chất gây bệnh và đặc điểm của các chủng vi rút cúm mùa, nên quá trình phát triển vắc xin cúm luôn luôn gắn liền với sự tiến hóa và lưu hành của các chủng vi rút cúm mùa.

Vắc xin cúm đầu tiên là sản phẩm không bất hoạt được phát triển vào giữa thập niên 30 của thế kỷ XX chỉ chứa một chủng vi rút typ A được phân lập từ phổi chuột.

Trong khoảng thời gian 1942-1945, một loại vi rút cúm mới được phát hiện, đó là loại vi rút cúm B lưu hành đồng thời với vi rút cúm A là nguyên nhân chính của dịch bệnh theo mùa. Hậu quả là hiệu lực bảo vệ của các vắc xin đang lưu hành được đánh giá là thấp vì chỉ chứa vi rút cúm A, không phù hợp chủng trên thực địa. Vắc xin cúm 2 thành phần được sản xuất từ chủng vi rút cúm A/PR8 (H1N1) và chủng cúm B được phân lập năm 1940. Năm 1942, khoảng 10 000 liều vắc xin bất hoạt 2 thành phần cúm A/PR8 và cúm B phân lập năm 1940 được thử nghiệm lâm sàng cho thấy đáp ứng kháng thể xác định bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu tăng gấp 8-9 lần cho cả 2 chủng cúm A và B. Vào những năm tiếp theo 1958, 1968 xuất hiện vi rút cúm A/H2N2 và A/H3N2, được thay thế trong thành phần vắc xin và vẫn duy trì vắc xin cúm mùa 2 thành phần (Bivalent). Mùa dịch 1978-1979 lần đầu tiên 3 chủng cúm dùng sản xuất vắc xin cúm mùa bất hoạt 3 thành phần (TIV) cho Bắc bán cầu được TCYTTG chính thức khuyến cáo[32].

Sự tiến hóa của cúm B làm xuất hiện dòng cúm B/Victoria (phân lập năm 1987) có đặc tính kháng nguyên khác với chủng cúm B phân lập năm 1940. Năm 1990 xuất hiện thêm dòng cúm B/Yamagata và đến năm 2002 lưu hành đồng thời 2 dòng cúm B/Victoria và cúm B/Yamagata. Căn cứ vào sự lưu hành nổi trội của dòng cúm B/Victoria hay cúm B/Yamagata, TCYTTG khuyến cáo sử dụng dòng cúm B là Victoria hay Yamagata cho mùa cúm từ năm 2002 đến nay. Vì vậy, những năm virus cúm B lưu hành cả 2 dòng kháng nguyên thì hiệu quả của vắc xin dự phòng là sẽ hạn chế. Mặt khác, nhiều năm đã có sự không phù hợp giữa chủng virus cúm B đang lưu hành và chủng cúm B được lựa chọn trong thành phần vắc xin hàng năm. Chính vì vậy, việc phát triển vắc xin cúm mùa bao gồm cả 2 dòng kháng nguyên B/Yamagata và B/Victoria là hết sức cần thiết. Đó là vắc xin gồm 4 thành phần virus (H1N1, H3N2, B/Yamagata và B/Victoria- Quadrivalent Influenza Vaccine/QIV). Ngày 29/2/2012, vắc xin cúm giảm độc lực QIV (*FluMist*

*Quadrivalent*) của công ty MedImmune, LLC (Hoa Kỳ) là vắc xin gồm 4 chủng virus cúm 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. Hiện nay, các công ty như Sanofi Pasteur, GlaxoSmithKline (GSK) và Novartis cũng đang nỗ lực phát triển vắc xin cúm QIV. Tuy nhiên, hiệu quả bảo vệ và giá thành vắc xin cần được tiếp tục đánh giá.

## **1.4.2. Các loại vắc xin cúm**

### **1.4.2.1. Vắc xin sống giảm độc lực (Live attenuated influenza vaccine - LAIV)**

Vắc xin sống giảm độc lực (LAIV) được nghiên cứu và phát triển trên 30 năm, đây là vắc xin dạng khí dung, miễn dịch bằng đường niêm mạc mũi. Vắc xin này được sản xuất từ chủng nhược độc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp gen sản xuất HA và NA của chủng vi rút cúm đang lưu hành với chủng vi rút dự tuyển sản xuất vắc xin. Có 2 loại chủng dự tuyển sản xuất bao gồm:

Chủng nhạy cảm nhiệt độ: chủng này phát triển kém ở nhiệt độ 37 – 39°C nên khả năng nhân lên hạn chế ở đường hô hấp dưới, có khả năng phát triển ở đường hô hấp trên; do vậy có thể kích thích hệ thống miễn dịch nhày đường hô hấp và miễn dịch toàn thân.

- Chủng thích ứng lạnh: có thể phát triển tốt ở nhiệt độ thấp (25°C) do vậy thích hợp cho phát triển ở đường hô hấp trên.

Vắc xin sống giảm độc lực được sử dụng ở Liên bang Xô Viết cũ trong nhiều năm và cũng đã được cấp phép sử dụng tại Mỹ năm 2003.

Ưu điểm của loại vắc xin này là quy trình tinh chế sau thu hoạch đơn giản, dễ thực hiện, có năng suất cao gấp 15 đến 20 lần so với vắc xin bất hoạt, không cần tiêm và tạo đáp ứng miễn dịch màng nhày niêm mạc đường hô hấp, đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào. Ngoài ra, khả năng kích thích hệ thống miễn dịch cũng mạnh hơn đối với vắc xin bất hoạt. Do vậy, hiện nay nhiều

công ty đầu tư nghiên cứu phát triển vắc xin cúm đại dịch một thành phần theo hướng này[59, 61].

#### **1.4.2.2. Vắc xin bất hoạt (Inactivated Influenza Vaccine – IIV)**

Các loại vắc xin cúm mùa hiện nay trên thế giới là vắc xin bất hoạt 3 thành phần (TIV) gồm hai chủng cúm A là A/H1N1, A/ H3N2 và một chủng vi rút cúm B. Gần đây vắc xin FluMist có 4 thành phần trong đó chứa 2 chủng vi rút cúm A (A/H1N1 và A/ H3N2) và 2 chủng vi rút cúm B (B/Yamagata và B/Victoria) lưu hành. Mỗi liều vắc xin chứa 15 $\mu$ g kháng nguyên mỗi chủng vi rút thành phần. Hầu hết các loại vắc xin cúm mùa hiện nay trên thế giới được sản xuất theo công nghệ trên trứng gà có phôi. Các vắc xin bất hoạt bao gồm: vắc xin toàn hạt vi rút là vắc xin thế hệ thứ nhất (1958), vắc xin tiểu phần vi rút hay vắc xin dạng mảnh (vắc xin split) là vắc xin thế hệ thứ hai (1968) và vắc xin kháng nguyên tinh chế là thế hệ thứ ba (1976) là vắc xin chỉ có kháng nguyên HA hoặc vắc xin kháng nguyên HA và NA được sản xuất như vắc xin tiểu phần nhưng quy trình tinh chế nghiêm ngặt hơn. Vì thế, thành phần chính là các protein HA và NA tinh chế, các thành phần khác của vi rút bị loại bỏ[58, 99].

#### **1.4.2.3. Vắc xin công nghệ gen**

Một số hạn chế trong vắc xin cúm hiện tại đó là sự phức tạp của quá trình sản xuất đặc biệt là yêu cầu rút ngắn thời gian cần thiết để vắc xin có hiệu lực nhanh nhất, hiệu quả nhất đáp ứng yêu cầu phòng chống dịch hoặc đại dịch. Để được cấp phép lưu hành trên thị trường, vắc xin cúm phải thuyết phục được về độ an toàn, hiệu quả, gây miễn dịch tốt và có khả năng phòng chống nhiễm vi rút cúm. Để đáp ứng yêu cầu trên, các nghiên cứu gần đây đã phát triển một số vắc xin mới và đã có những thành công bước đầu.

- Vắc xin sống giảm độc lực mới (Novel live attenuated vaccine).
- Vắc xin tái tổ hợp DNA Flublock



Trong tương lai, các nhà khoa học dự kiến sẽ có sự thay đổi đáng kể trong sự đa dạng của vi rút cúm, và một trong những thay đổi mong muốn đó là các loại vắc xin mới này có thể bảo vệ chống lại vi rút cúm trong phạm vi rộng[77, 104].

### **1.4.3. Công nghệ sản xuất vắc xin cúm**

Năm 1941, vắc xin cúm bất hoạt lần đầu tiên được sản trên trứng gà có phôi. Từ năm 2005, trước tình hình dịch cúm A/H5N1 bùng phát, vắc xin cúm trong đó chủ yếu là vắc xin cúm chống đại dịch còn được phát triển sản xuất trên các dòng tế bào MDCK, Vero và PER.C6...Hiện nay, một số công ty và quốc gia tiếp tục phát triển nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm theo các công nghệ tái tổ hợp, vắc xin DNA, vắc xin vector... Các công nghệ này hầu hết đều có chi phí sản xuất cao và để sản xuất một lô ở quy mô phòng thí nghiệm cho thử nghiệm lâm sàng cần nhiều thời gian hơn so với phương pháp sản xuất truyền thống trên trứng vì thời gian dài và chi phí cao để phát triển đủ lượng tế bào cho sản xuất từ ngân hàng tế bào gốc. Các quy trình kiểm định phức tạp hơn như phải phát hiện DNA của tế bào vật chủ. Để đảm bảo sử dụng an toàn các dòng tế bào, các nhà sản xuất phải tách và phân lập các dòng tế bào riêng và kiểm tra các đặc tính cần thiết trước khi dùng sản xuất vắc xin cho người. Các kỹ thuật này đòi hỏi phương tiện hiện đại và chuẩn thức. Vốn đầu tư ban đầu để xây dựng nhà máy ở quy mô công nghiệp rất cao (ước khoảng 100 triệu USD), do đó giá thành vắc xin sẽ đắt nếu sản xuất ít hơn 25 triệu liều mỗi năm. Việc cấp phép cho vắc xin cúm sản xuất trên tế bào cũng tốn thời gian và phức tạp nên hầu hết các vắc xin loại này đều đang ở giai đoạn nghiên cứu trong phòng thí nghiệm hoặc thử nghiệm lâm sàng.

#### **1.4.3.1. Công nghệ trứng gà có phôi**

Công nghệ sản xuất vắc xin cúm là một yếu tố quan trọng để các nhà sản xuất lựa chọn và áp dụng. Hiện tại, đa số các nhà sản xuất lựa chọn công nghệ sản xuất trên trứng gà có phôi 9 - 12 ngày tuổi vì đây là công nghệ truyền thống an toàn, tin cậy được thế giới áp dụng từ những năm 1950 và phổ biến hiện nay với khoảng

90% sản lượng vắc xin cúm toàn cầu đang được lưu hành được sản xuất theo công nghệ này và được sử dụng an toàn.

Ưu điểm của công nghệ này là một phương pháp sản xuất chuẩn thức được sử dụng rộng rãi trên 60 năm, chủ yếu là để sản xuất vắc xin cúm mùa. Các ưu điểm nổi bật của công nghệ sản xuất trên trứng gà có phôi có thể kể đến là:

- Chúng vi rút sản xuất vắc xin được được tối ưu hóa để phát triển tốt trên trứng gà có phôi.
- Phương pháp kiểm định đã được thiết lập, đã được chứng minh, đánh giá và có chứng cứ thuyết phục.
- Chu kỳ sản xuất quay vòng nhanh, không phức tạp.
- Các quy định trong cấp phép sử dụng đã được áp dụng.
- Vốn đầu tư ban đầu để xây dựng nhà máy sản xuất ở qui mô này thấp, phù hợp với với các cơ sở sản xuất qui mô vừa và nhỏ, dễ đầu tư công nghệ, giá thành vắc xin tương đối rẻ.

Với những ưu điểm này, hàng trăm triệu liều vắc xin cúm sản xuất theo công nghệ trên trứng gà có phôi đã được sản xuất và sử dụng an toàn, hiệu quả trên toàn thế giới, từ các công ty đa quốc gia như GSK, Novartis, Sanofi Aventis, Merck... đến các nhà sản xuất tại các quốc gia đang phát triển ở Châu Á, Châu Phi và Nam Mỹ.

Tuy nhiên công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có phôi vẫn còn những hạn chế như:

- Khó mở rộng quy mô sản xuất do dây chuyền sản xuất chuyên biệt, nếu nhu cầu vắc xin cúm đột ngột giảm xuống không tận dụng được cơ sở vật chất sẵn có để sản xuất loại vắc xin khác, vì thế phải tính toán chi tiết khi đầu tư mở rộng sản xuất.
- Phụ thuộc vào nguồn sản xuất trứng nguyên liệu, nguồn cung cấp trứng sẽ hạn chế đặc biệt khi dịch xảy ra trên gà.

- Chất thải rắn trong qui trình sản xuất chiếm 80% lượng nguyên liệu cung cấp nên cần phải có hệ thống xử lý thích hợp.

- Với các chủng vi rút cúm đại dịch tái tổ hợp từ kỹ thuật di truyền đảo ngược hiện nay như chủng sản xuất vắc xin cúm A/H5N1 chỉ tạo được năng suất khoảng 30- 40% so với các chủng vắc xin cúm mùa.

#### **1.4.3.2. Công nghệ tế bào**

Sử dụng tế bào thường trực phát triển vắc xin cúm còn có thể tránh được hiện tượng đột biến vi rút trong quá trình khuếch đại vi rút trên trứng, vì vậy vắc xin có thể sử dụng trực tiếp vi rút hoang dại và kiểm soát được sự tương đồng của vi rút vắc xin và vi rút lưu hành. Ngoài ra, công nghệ vắc xin tế bào có thể rút ngắn thời gian bất hoạt vi rút, tuy nhiên vấn đề làm tinh khiết và loại bỏ các DNA của tế bào trong vắc xin còn là thách thức trong tương lai[91].

Ưu điểm của công nghệ này là dễ phát triển quy mô sản xuất và tiết kiệm được công lao động. Tuy nhiên việc thiết lập cơ sở sản xuất đòi hỏi sự đầu tư lớn về tiền bạc và thời gian cho nên cho đến nay hầu hết các nhà sản xuất chỉ mới đang trong giai đoạn nghiên cứu phát triển. Rào cản sở hữu trí tuệ và thiếu những số liệu đầy đủ về các dòng tế bào cũng ảnh hưởng tới việc đầu tư sản xuất, làm cho vắc xin cúm sản xuất theo công nghệ này còn gặp khó khăn.

Hiện nay có một số dòng tế bào đang được dùng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm: MDCK (tế bào thận chó Madin-Darby); Vero (tế bào thận khỉ xanh châu Phi); PER.C6 (tế bào võng mạc người)[13, 41].

#### **1.4.3.3. Công nghệ gen**

Ngoài những công nghệ sản xuất thường gặp trên trứng gà có phôi và trên tế bào, hiện nay công nghệ gen đang được áp dụng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm, chủ yếu là cho vắc xin cúm đại dịch. Trong công nghệ này, thành phần protein mang bản chất kháng nguyên vi rút được tổng hợp bằng công nghệ sinh học phân tử bằng cách gắn gen mã hóa tổng hợp protein HA của vi rút cúm lên tế bào đích và

thu lại protein cần thiết mang bản chất kháng nguyên trong môi trường nuôi cấy để sản xuất vắc xin. Các hướng nghiên cứu chính gồm:

**\*Vắc xin đa năng (*universal vaccine*)**

Nhược điểm lớn nhất hiện nay của tất cả các vắc xin cúm là sự không khớp chủng do tính biến đổi kháng nguyên nhanh chóng của vi rút cúm. Vắc xin đặc hiệu với mỗi chủng gây bệnh được thay đổi hàng năm, đồng thời cần có dự báo để sẵn sàng chủng sản xuất vắc xin cho năm tiếp theo. Một vắc xin phổ rộng toàn cầu thực sự sẽ bao gồm tất cả các phân type của cúm A và 2 dòng của phân type cúm B. Tuy nhiên sự khác biệt lớn về gen và kháng nguyên giữa vi rút cúm A và B, kỳ vọng về một loại vắc xin đơn giá có khả năng bảo vệ đối với cả 2 chủng vi rút này là không thực tế. Việc tạo được miễn dịch dưới chủng khác loài (*heterosubtypic*) cho tất cả các phân type của vi rút cúm A cũng là điều không thực tế và không cần thiết. Bước tiếp cận hợp lý đầu tiên là phát triển ược một loại vắc xin có hiệu quả rộng cho một chủng so với vắc xin hiện hành mà không cần phải tiêm nhắc lại hoặc cập nhật công thức hàng năm và để đạt được mục tiêu này cần có các bước tiến lớn trong công nghệ. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, có những cấu trúc kháng nguyên có tính chất bền vững không thay đổi giữa các chủng cúm làm cơ sở cho nghiên cứu vắc xin đa năng kháng được tất cả các chủng vi rút cúm. Phần gốc (*stalk*) của phân tử HA gắn lên bề mặt của vi rút thường ổn định và bền vững, cho thấy có thể tạo ra được kháng thể đặc hiệu gắn với phần gốc của HA, đây là cơ sở cho việc đầu tư nghiên cứu loại vắc xin đa năng kháng lại vi rút cúm nói chung. Tuy nhiên để phát triển được loại vắc xin này cũng còn nhiều vấn đề phải giải quyết như chế tạo loại kháng nguyên này như thế nào trong khi chưa có vắc xin nào được tạo ra theo hướng đó và sau khi vắc xin được tạo ra vi rút có thể đột biến để thay đổi cấu trúc phần này làm mất tác dụng của vắc xin hay không. Do đó, mặc dù trên lý thuyết vắc xin đa năng là một hướng phát triển nhiều triển vọng nhưng vẫn còn nhiều vấn đề cần được đầu tư nghiên cứu[47, 67].

**\*Vắc xin DNA**

Vắc xin chứa DNA của HA và NA được tiêm trong da dưới dạng đạn bọc DNA (hãng PowderMed, Oxford -Anh). Vì DNA có thể được sản xuất nhanh chóng cho nên vắc xin này đang thu hút sự quan tâm của các nhà chuyên môn. Tuy nhiên quy trình công nghệ phức tạp và quyền sở hữu trí tuệ gây khó khăn cho việc triển khai rộng rãi loại vắc xin này.

**\* Vắc xin HA theo kiểu vector và tái tổ hợp**

Kháng nguyên HA được sản xuất bởi hệ thống vi rút *baculo* (hãng Protein Sciences Corporation, Mỹ) hoặc trong thực vật cây DNA của vi rút (hãng Microbix, Mỹ).

Ưu điểm của dạng vắc xin này là năng suất kháng nguyên cao và sản xuất nhanh, tuy nhiên khả năng đáp ứng miễn dịch bị hạn chế. Giống như việc chuyển đổi công nghệ sản xuất từ nuôi cấy trên trứng gà có phôi sang công nghệ nuôi cấy trên tế bào, sản xuất vắc xin cúm tái tổ hợp còn gặp những trở ngại do cần nguồn kinh phí đầu tư lớn. Hệ thống các quy định, hướng dẫn, tiêu chuẩn cho cấp phép chưa đầy đủ. Ngoài ra, kháng nguyên thu được có độ tinh khiết cao nên khả năng kích thích hệ thống miễn dịch thấp, nên cần phải tích hợp kháng nguyên vào cấu trúc VLP hoặc phối hợp với tá chất để tăng khả năng sinh miễn dịch. Do vậy cần có sự đầu tư và lộ trình để thực hiện trong tương lai [13, 14, 54].

**1.4.4. Lựa chọn chủng vi rút dự tuyển vắc xin, quy trình sản xuất và sử dụng vắc xin cúm mùa**

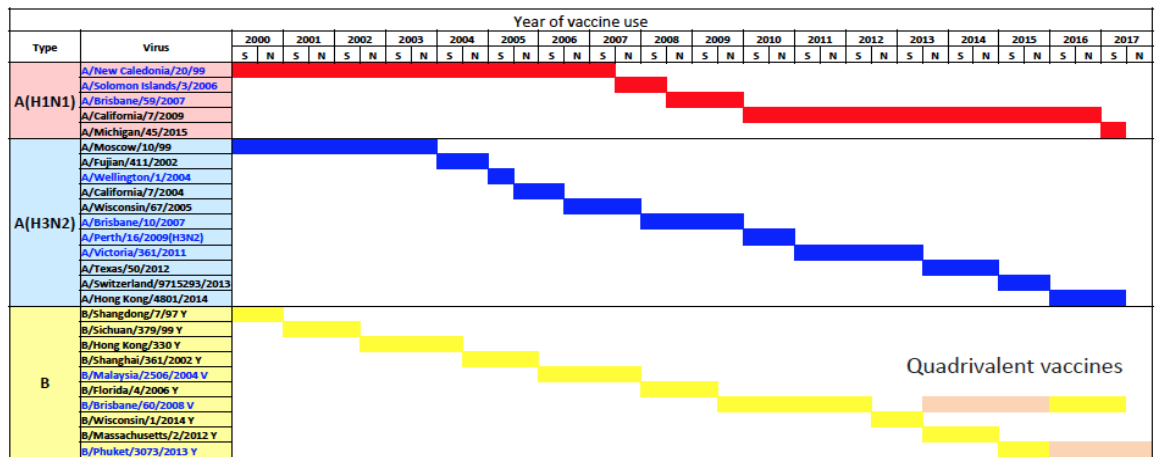
**1.4.4.1. Định hướng chủng sản xuất vắc xin cúm mùa**

Ở vùng ôn đới, chu kỳ sản xuất vắc xin cúm hàng năm khá phù hợp do cúm xuất hiện rõ rệt theo mùa ở Bắc và Nam bán cầu. Đối với các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, cúm xảy ra quanh năm, diễn biến phức tạp với nhiều đỉnh dịch xảy ra trong một mùa. Vấn đề thách thức đối với các quốc gia này đó là sử dụng công thức vắc xin dành cho Bắc bán cầu hay cho Nam bán cầu? Kết quả giám sát cho thấy thời gian tối ưu để tiêm chủng cúm theo mùa hàng năm dựa trên giai đoạn bắt đầu

hoạt động chính của mùa cúm, điều này khó có thể được xác định cho hầu hết các quốc gia ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới với hoạt động của cúm trong suốt cả năm. Sử dụng vắc xin vào thời điểm nào để đón trước đỉnh của mùa dịch? Do vậy đối với các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, khả năng áp dụng chu kỳ sản xuất vắc xin cúm mùa theo công thức khuyến cáo của TCYTTG được cho là không chắc chắn. Chương trình Cúm Toàn cầu của TCYTTG khuyến cáo cách tiếp cận thực tế đối với các quốc gia này là dựa trên bằng chứng để chia sẻ thông tin về dịch tễ học và vi rút học để quyết định khi nào nên bắt đầu chủng ngừa và liệu có nên sử dụng các công thức được khuyến cáo cho mùa cúm ở Bắc hay Nam bán cầu? Các quốc gia nên cân nhắc các chiến lược thay thế các công thức sản xuất vắc xin thích hợp dựa trên mùa dịch địa phương và xem xét thời điểm tiêm chủng nhằm tăng hiệu quả tiêm chủng.

Hoạt động giới thiệu các chủng vi rút cúm dự tuyển cho thành phần vắc xin cúm mùa đã được TCYTTG thực hiện từ những năm đầu 1970 và thành công khi phần lớn các vi rút dự tuyển được giới thiệu đều tương tự về đặc điểm vi rút học với các vi rút cúm lưu hành trong mùa dịch. Trong suốt thời gian kể từ lần đầu tiên phát triển vắc xin cúm mùa tam liên (A/H3N2; A/H1N1 và B) năm 1988 đến năm 2017-2018, tổng số 42 lần thành phần vi rút cúm được thay đổi theo khuyến cáo của TCYTTG, trong đó vi rút cúm A/H3N2 thay đổi 20 lần, vi rút cúm A/H1N1 thay đổi 8 lần và vi rút cúm B thay đổi 14 lần trong thành phần vắc xin. Tuy nhiên, cũng có một số lần sự thay đổi vi rút trong thành phần vắc xin không tương thích với vi rút cúm lưu hành vì vậy hiệu quả của vắc xin cúm không đạt cao trong mùa dịch. Hiện nay, sự khác biệt rõ rệt giữa các vùng địa lý trong hoạt động giám sát, sự phát triển của những kỹ thuật hiện đại trong phân tích đặc điểm của vi rút cúm cũng như sự xuất hiện của các vi rút cúm gia cầm có khả năng gây bệnh cho người (A/H5N1; A/H7N9; A/H9N2; A/H10N8), công tác lựa chọn vi rút cúm dự tuyển cho thành phần vắc xin cúm mùa hoặc chuẩn bị vắc xin đại dịch yêu cầu có sự phát triển và hoàn thiện nhằm đảm bảo các chủng vi rút cúm dự tuyển sản xuất vắc xin có sự tương đồng cao nhất với các vi rút cúm sẽ lưu hành trong các mùa dịch tiếp theo.

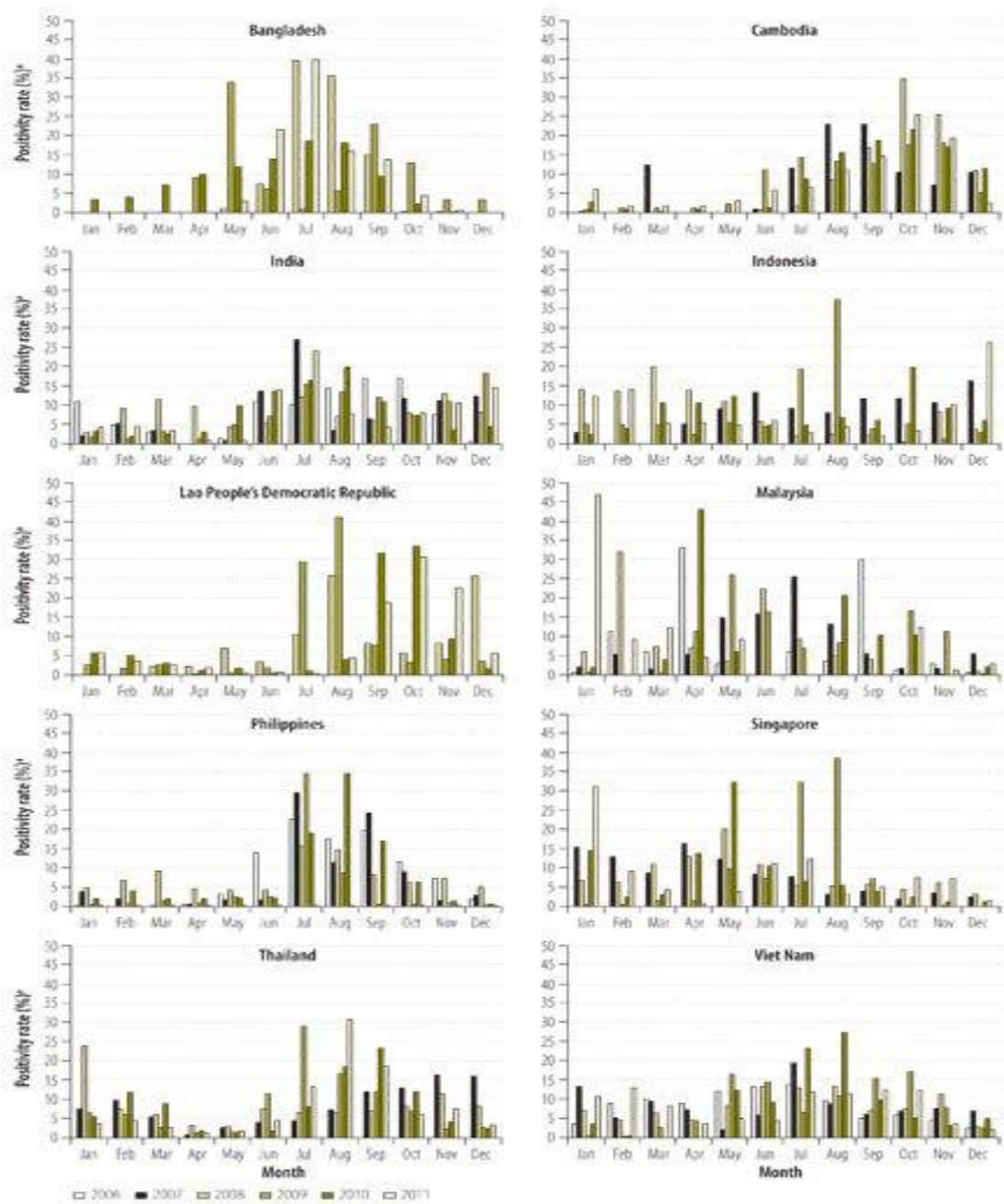
Đây là một hoạt động cần có sự phối hợp toàn cầu và các trung tâm cúm quốc gia (NICs) tại các quốc gia và vùng lãnh thổ là các cơ sở cơ bản, 2 trung tâm cúm quốc gia của Việt Nam (Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh) là thành viên của mạng lưới này.



**Hình 1. 7. Sự thay đổi virus cúm trong thành phần vaccin cúm, 2000-2017**

(Nguồn: Lancet)

Phân tích dữ liệu mẫu dương tính hàng tháng trong khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới của Nam Á và Đông nam Á cho thấy hoạt động của cúm mạnh nhất từ tháng 6 đến tháng 9 trong hầu hết các năm với đỉnh điểm vào tháng 7 và tháng 8. Dữ liệu giám sát cúm của 2 trung tâm Cúm Quốc gia cho thấy hoạt động cúm xảy ra hầu như quanh năm và dường như mùa cúm đến sớm hơn đỉnh điểm vào tháng 5 và tháng 7, 8 hàng năm (Hình 1.7).



**Hình 1. 8. Phân bố mẫu xét nghiệm dương tính vi rút cúm theo tháng của một số nước thuộc khu vực Nam Á và Đông nam Á (2008–2011)[7]**

Việt Nam thuộc nhóm các quốc gia vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới, hoạt động cúm diễn ra quanh năm với đỉnh của mùa dịch vào tháng 5 và tháng 7, 8 hàng năm. Việc chọn chủng theo khuyến cáo cho Bắc bán cầu (tháng 2 hàng năm) hay cho Nam bán cầu dường như đều phù hợp để sản xuất vắc xin đón đầu mùa dịch với điều kiện nhà sản xuất phải có chiến lược sản xuất và dự trữ các bán thành phẩm



đơn giá phù hợp. Thời gian sản xuất các bán thành phẩm đơn giá có thể thực hiện quanh năm với các chủng của cả Bắc và Nam bán cầu. Để đảm bảo sự phù hợp giữa vi rút được lựa chọn trong thành phần vắc xin và vi rút cúm đang lưu hành, vắc xin tam giá sẽ được sản xuất từ các bán thành phẩm đơn giá trong vòng 2 tháng nghĩa là vào đầu tháng 3 hàng năm phải có vắc xin để tiêm đón đầu đỉnh dịch xảy ra vào tháng 5 và tháng 8 hàng năm. Hiện nay, có 2 dòng cúm B lưu hành song song nên cần cân nhắc sản xuất vắc xin cúm 4 thành phần để đảm bảo bao phủ đủ thành phần kháng nguyên bảo vệ đối với các chủng vi rút cúm trong mùa dịch.

#### **1.4.4.2. Quy trình sản xuất và sử dụng vắc xin cúm mùa**

TCYTTG tổ chức 2 cuộc họp hàng năm để khuyến cáo các chủng vi rút cúm dự tuyển cho thành phần vắc xin cúm mùa cho các nước Bắc bán cầu (tháng 2) và Nam bán cầu (tháng 9). Tuy nhiên, việc chọn lựa chủng phù hợp cho vắc xin được đăng ký tại mỗi quốc gia tùy thuộc vào quyết định của các nhà sản xuất.

Các công ty sản xuất vắc xin sẽ nhận được các thông tin về đặc điểm vi rút cúm lưu hành thu thập từ các giám sát cúm gần nhất và các thông tin về các sinh phẩm liên quan để đánh giá chất lượng vắc xin tại các PTN chuẩn thức của TCYTTG. Công ty sản xuất vắc xin sẽ liên hệ với 1 trong 6 phòng thí nghiệm chuẩn thức của TCYTTG tại Melbourne – Úc, CDC – Trung Quốc, Tokyo-Nhật Bản, NIBSC – Anh, CDC-Hoa Kỳ và Bệnh viện nhi St Jude, Memphis, Hoa Kỳ để tiếp nhận chủng sản xuất vắc xin và mẫu chuẩn.

Quá trình bắt đầu sản xuất đến khi lưu hành vắc xin cúm sẽ được thực hiện trong 6 tháng (tháng 3 đến tháng 9 hàng năm cho khu vực Bắc bán cầu, tháng 9 đến tháng 3 năm sau cho khu vực Nam bán cầu) bao gồm:

- Nhận chuyển giao vi rút thành phần vắc xin và sinh phẩm liên quan từ các PTN chuẩn thức của TCYTTG.
- Sản xuất vắc xin, xây dựng công thức pha chế, kiểm tra chất lượng sản phẩm.

- Thử nghiệm lâm sàng.
- Xin giấy phép lưu hành.
- Đưa vắc xin ra thị trường.

Thời gian	Hoạt động
Mùa hè, mùa thu và đầu mùa đông của năm trước	Xác định các biến thể về kháng nguyên của các chủng cúm lưu hành thông qua giám sát
	Đánh giá dịch tễ học chủng lưu hành
	Các biến thể cúm được xác định trình tự gen và đặc tính miễn dịch học
Tháng 1	Chọn các chủng đặc trưng cho công thức sản xuất dựa trên mức độ khác biệt so với mùa trước đó và bằng chứng về dịch tễ học lưu hành của chủng
Tháng 2	Sử dụng kỹ thuật di truyền để tạo ra các chủng cho hiệu suất cao trên trứng và phân phối chủng cho các nhà sản xuất vắc xin
Tháng 3	Sản xuất các mẫu chuẩn để xác định đặc tính vắc xin
	Nhân truyền chủng sản xuất
Tháng 4 - tháng 7	Sản xuất các bán thành phẩm đơn giá (monobulk)
Tháng 8	Pha chế vắc xin thành phẩm, đóng ống, đóng gói
Tháng 9	Kiểm định chất lượng
Tháng 10	Phân phối vắc xin sử dụng cho mùa cúm trong năm

**Hình 1. 9. Quy trình phát triển, sản xuất và sử dụng vắc xin cúm mùa**

Toàn bộ các quy trình sản xuất, kiểm soát, kiểm định chất lượng vắc xin đều sử dụng quy trình chuẩn (SOP) của TCYTTG, cơ quan kiểm định thuốc và thực phẩm (FDA- Mỹ) và được cập nhật đánh giá hàng năm.

TCYTTG khuyến cáo và cung cấp các chủng sản xuất cùng với các mẫu chuẩn, tuy nhiên sử dụng loại chủng nào để phù hợp với loại vắc xin được nhà sản xuất đăng ký hoàn toàn do nhà sản xuất quyết định. Vắc xin cúm thay đổi theo mùa nên thường có thời hạn sử dụng trong 1 năm và cần được nhắc lại 1 liều mỗi năm vào đầu mùa dịch. Tuy nhiên các bán thành phẩm đơn giá có thể có thời gian lưu trữ lâu hơn. Sự phù hợp giữa chủng lựa chọn sản xuất vắc xin và vi rút lưu hành cũng như thời điểm sử dụng vắc xin đón đầu mùa cúm là hai yếu tố quan trọng cần được khuyến cáo cho cộng đồng để đảm bảo hiệu quả của việc sử dụng vắc xin cúm mùa hàng năm.

## **1.5. VẮC XIN CÚM MÙA IVACFLU-S**

IVACFLU-S là tên thương mại của vắc xin phòng bệnh cúm mùa do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) sản xuất. IVAC hiện nay là đơn vị duy nhất trong toàn quốc có dây chuyền công nghệ sản xuất vắc xin cúm trên trứng gà có hiệu suất 1,5 triệu liều/năm đạt chuẩn GMP-WHO. Đây là dây chuyền công nghệ do TCYTTG tài trợ cho IVAC trong khuôn khổ chương trình phát triển vắc xin cúm toàn cầu sau khi IVAC nghiên cứu thành công vắc xin cúm trên quy mô thí nghiệm. Đây là cơ sở vững chắc và là tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển vắc xin cúm tại Việt Nam, trong đó có vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt bằng formalin, và không sử dụng chất bảo quản.

### **1.5.1.1. Chủng dùng trong sản xuất**

Chủng sản xuất vắc xin cúm mùa được lựa chọn theo khuyến cáo hàng năm của TCYTTG đối với khu vực Bắc bán cầu và Nam bán cầu từ hệ thống các phòng thí nghiệm cung cấp chủng do TCYTTG quản lý. IVAC sử dụng chủng khuyến cáo cho khu vực Bắc bán cầu làm chủng dự tuyển sản xuất vắc xin cúm tại Việt Nam. Việc tạo chủng sản xuất được thiết lập dựa trên quy trình tạo chủng lõi và cập nhật đối với từng chủng cụ thể.

Các chủng sản xuất vắc xin cúm mùa năm 2014 – 2015 của IVAC được nhận từ Viện NIBSC (Anh) bao gồm hai chủng vi rút cúm A và một chủng B.

**Chủng cúm A/H1N1**

- Tên chủng: NYMC X-179A A/H1N1 mã số 09/124
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩn NYMC X-179A có nguồn gốc từ chủng A/California/7/2009), ngày 17/7/2009.
- Hệ thống chủng giống gốc MSL (*master seed lot*) và chủng sản xuất WSL (*working seed lot*) được nhân truyền trên trứng gà SPF có phôi 10 ngày tuổi. Trứng được nhập khẩu từ hãng LOHMANN TIERZUCHT, Đức.
- Từ ống chủng NYMC X-179A nhận của NIBSC cấy truyền 1 đời để được chủng MSL NYMC X-179A/MS1 lô số 090821 (đông khô ngày 21/8/2009)
- Cấy chuyển từ ống chủng MSL để tạo lô chủng WSL lô số X-179A/0112/P2 (tháng 07/2012). Số lượng 50 ống, bảo quản  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .

**Chủng cúm A/H3N2**

- Tên chủng: NYMCX-223A
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩn NYMCX-223A có nguồn gốc từ chủng cúm A/Texas/50/2012, ngày 28/7/2014.
- Hệ thống chủng WSL (*working seed lot*) được nhân truyền trực tiếp từ ống chủng NYMC X-223A trên trứng gà SPF có phôi 10 ngày tuổi, để tạo lô chủng sản xuất lô số WS 220914/P18 (tháng 9/2014). Trứng được nhập khẩu từ hãng LOHMANN TIERZUCHT, Đức).
- Số lượng chủng WSL 50 ống, bảo quản  $\leq -70^{\circ}\text{C}$

**Chủng cúm B**

- Tên chủng: NYMC BX-51B
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩn NYMCBX-51B có nguồn gốc từ chủng B/Massachusetts/02/2012, ngày 06/12/2013.
- Hệ thống chủng WSL (*working seed lot*) được nhân truyền trực tiếp từ ống chủng chuẩn NYMC BX-51B trên trứng gà SPF có phôi 10 ngày tuổi, để tạo lô chủng sản xuất lô số WS 140714/P9 (tháng 7/2014). Trứng được nhập khẩu từ hãng LOHMANN TIERZUCHT, Đức.

- Số lượng lô chủng WSL 40 ống, bảo quản ở  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .

### 1.5.1.2. Các giai đoạn sản xuất vắc xin cúm IVACFLU-S



**Hình 1. 10. Gây nhiễm và thu hoạch dịch vi rút bằng hệ thống máy Rame-Harte bán tự động công suất 10.000 trứng/giờ**

**Ấp trứng:** Trứng trước khi đưa vào ấp được kiểm tra và khử nhiễm bằng formalin, nhằm giảm thiểu vi sinh vật tồn tại trên bề mặt trứng. Quá trình ấp trứng tự động trong tủ ấp chuyên dụng được kiểm soát chặt chẽ các điều kiện nhiệt độ khoảng  $36^{\circ}\text{C}$  -  $38^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 70% - 80% với công suất 20.000 trứng/ mẻ. Sau 11 ngày tiến hành soi và chọn trứng, loại bỏ những trứng phôi không phát triển, phôi chết hoặc nứt vỡ. Những trứng đạt tiêu chuẩn sẽ được tiến hành gây nhiễm.

**Gây nhiễm:** Chủng gây nhiễm là chủng cúm NYMC X-179A (H1N1), NYMC X-223A (H3N2) và cúm B NYMC BX-51B. Tan băng ống chủng ở nhiệt

độ phòng, pha loãng bằng PBS pH 7,2 để được độ pha loãng  $10^{-4}$  đến  $10^{-6}$ , xác định đậm độ gây nhiễm tối ưu. Gây nhiễm với liều lượng  $0,2 \text{ ml} \pm 20\%/1$  trứng có phôi 11 ngày tuổi bằng máy Rame – Harte bán tự động với công suất 10.000 trứng/giờ.

**Nuôi cấy:** Trứng sau khi gây nhiễm được chuyển vào tủ ủ ấm với công suất 5.000 - 10.000 trứng/tủ đã được cài đặt các thông số như sau: nhiệt độ  $34^{\circ}\text{C}$  -  $36^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 60% - 80% trong thời gian  $60 \pm 12$  giờ để vi rút cúm phát triển. Sau khi đã đủ thời gian nuôi cấy, tiến hành soi để loại bỏ trứng không đạt sau khi ủ và chuyển tất cả các trứng đạt yêu cầu (trứng sống, phát triển mạnh, không nứt vỡ và không nhiễm khuẩn) vào kho lạnh  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 20 - 24 giờ.

**Thu dịch niệu nang (gặt):** Trứng sau khi làm lạnh chuyển sang phòng thu dịch trứng, dùng máy cắt vỏ và thu dịch niệu nang trứng Rame – Hart tự động khép kín để thu dịch niệu nang của trứng, sau đó chuyển dịch trứng sang giai đoạn ly tâm trong.

**Ly tâm trong:** Dịch trứng sau khi gặt được chứa vào bình chứa (tank), bổ sung đệm PBS 7,2 trong natri citrat 0,0125M với tỉ lệ 1/7 đến 1/5 tổng thể tích dịch trong tank, ly tâm trong dịch trứng bằng máy ly tâm liên tục Thermo với tốc độ là 5.000 – 6.000 vòng/phút, lưu lượng dòng cấp dịch vào rotor là 300 – 500 ml/phút.

**Cô đặc:** Dịch vi rút sau khi ly tâm trong hoặc lọc trong được chuyển sang hệ thống cô đặc sử dụng cột lọc 500 kD để cô đặc dịch vi rút khoảng 35 - 40 lít trước khi qua giai đoạn siêu ly tâm.

**Siêu ly tâm:** Dịch trứng sau cô đặc chuyển sang giai đoạn siêu ly tâm với máy Alfa Wassermann ở tốc độ 35.000 vòng/phút, tốc độ dịch vào rotor là 9 lít/giờ. Phân đoạn sản phẩm dựa trên sự tách phân đoạn nồng độ đường sucrose. Hạt vi rút được tách ra và lấy theo vùng có gradient nồng độ đường từ 50% - 30%.

**Split:** Sau khi siêu ly tâm, dùng Triton X-100 nồng độ 0,75% để phá vỡ hạt vi rút cúm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

**Bất hoạt:** Sử dụng formalin 0,01% để bất hoạt dịch vi rút. Tổng thời gian bất hoạt là 72 – 96 giờ trong đó có 24 giờ bất hoạt ở nhiệt độ thường 20<sup>0</sup>C - 24<sup>0</sup>C và 48 – 72 giờ bất hoạt ở 2<sup>0</sup>C - 8<sup>0</sup>C. Sử dụng dây silicon có đầu nối nhanh đã hấp tiệt trùng chuyên dịch vi rút sang khu vực phòng kiểm soát không có tác nhân gây bệnh.

**Tiền lọc:** Sử dụng lọc 5 µm để loại cặn trước khi ly giải

**Ly giải, lọc vô trùng:** Dịch trứng sau khi bất hoạt được ly giải bằng hệ thống cột lọc phân tử hollow fiber hoặc cột TFF 50 kD nhằm loại sucrose, triton X-100 trong sản phẩm. Sử dụng dung dịch PBS pH 7,2 (thành phần gồm 9g NaCl, 1,37g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 0,36g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> trong 1 lít dịch) với thể tích gấp 6 - 10 lần thể tích dịch vi rút để tiến hành ly giải. Thu dịch chứa vi rút sau ly giải còn khoảng 1.900 – 2.000 ml. Dùng lọc 0,22 µm để tiến hành lọc vô trùng. Sản phẩm thu được khoảng 2.000 – 2.500 ml.

**Pha chế vắc xin cúm:** Tiến hành pha chế vắc xin bán thành phẩm dưới laminar (cấp độ sạch 100) trong phòng sạch cấp độ C. Trong 0,5 ml vắc xin cúm IVACFLU-S gồm có:

NYMC X-179A (A/California/7/2009) (H1N1).....15µg HA

NYMC X-223A (A/Texas/50/2012) (H3N2).....15µg HA

NYMC BX-51B (B/Massachusetts/02/2012) (B).... 15µg HA

Dung dịch đệm PBS pH = 7,2 .....vừa đủ 0,5ml

**Đóng ống vắc xin:** Sau khi có các kết quả vô trùng, an toàn, tiến hành đóng ống. Đóng ống được thực hiện dưới điều kiện phòng sạch (cấp độ sạch 100). Hệ thống súc rửa lọ, sấy tiệt trùng, khử chất gây sốt lọ, đóng ống vắc xin theo một quy trình khép kín, tự động. Vắc xin cúm được đóng vào lọ thủy tinh dung tích 2ml chứa 1 liều đơn 0,5ml.

**Bao bì, đóng gói:** Vắc xin sau khi đóng ống được kiểm tra cảm quan từng lọ để loại bỏ những lọ không đạt tiêu chuẩn về thể tích, nứt vỡ, có vật lạ bên trong,... trước khi dán nhãn, bao bì, đóng gói.

**Bảo quản:** Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ 2°C - 8°C trong suốt quá trình từ sản xuất bán thành phẩm, thành phẩm và trước khi sử dụng.

### 1.5.1.3. Sản xuất và kiểm định vắc xin cúm mùa bất hoạt tại Việt Nam

#### \* Yêu cầu về nguyên liệu trong sản xuất

**Chủng sản xuất:** Chủng sản xuất vắc xin cúm mùa dựa theo khuyến cáo hàng năm của Tổ chức Y tế Thế giới và phê chuẩn của Cơ quan kiểm định quốc gia nước sản xuất. Hiện nay người ta thường sử dụng những chủng cho sản lượng cao kháng nguyên bề mặt. Nguồn gốc và lịch sử cấy chuyển chủng vi rút phải do Cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

Lô chủng sản xuất (WSL) phải đạt các yêu cầu về vô trùng, tính đặc hiệu (nhận dạng), không tạp nhiễm vi rút ngoại lai, không nhiễm *Mycoplasma spp*, có hiệu giá cao và ổn định mới được đưa vào sản xuất vắc xin.

**Trứng cho sản xuất:** Nếu vắc xin được sản xuất trên trứng có phôi thì trứng phải được chọn từ những đàn gà khỏe mạnh, không có bệnh lý. Đàn gà được giám sát về các bệnh cúm gia cầm (AI), bệnh do NDV, *Salmonella spp*, *Mycoplasma spp*...định kỳ theo kế hoạch.

Trứng được kiểm tra không tạp nhiễm vi sinh (*Salmonella spp*) trước khi ấp để tạo thành phôi trong 10-12 ngày để gây nhiễm vi rút cúm.

**Tế bào sản xuất:** Nếu vắc xin sản xuất trên tế bào, các dòng tế bào MDCK, hoặc dòng tế bào thường trực, hoặc tế bào tiên phát đã được phê chuẩn bởi Cơ quan kiểm định quốc gia nước sản xuất. Nguồn gốc tế bào và số lần cấy chuyển tối đa của dòng tế bào sử dụng trong sản xuất cần được qui định và giám sát chặt chẽ bởi cơ quan Kiểm định quốc gia.

Tế bào sản xuất phải đạt các yêu cầu về vô trùng, tính đặc hiệu (nhận dạng), không tạp nhiễm vi rút ngoại lai, không nhiễm *Mycoplasma spp*.

❖ *Môi trường nuôi cấy tế bào sử dụng trong sản xuất*



Môi trường nuôi cấy phù hợp sẽ được sử dụng và cần được kiểm tra chất lượng trước khi đưa vào sản xuất. Tất cả các thành phần bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều phải đảm bảo vô trùng và an toàn (huyết thanh bê, trypsin, chất chỉ thị pH, kháng sinh...). Penicillin và các kháng sinh beta-lactam không được sử dụng trong bất cứ giai đoạn sản xuất nào. Các kháng sinh khác có thể được sử dụng nhưng phải được Cơ quan kiểm định quốc gia mức sản xuất chấp thuận.

**\* Sản xuất và kiểm định vắc xin bán thành phẩm đơn giá**

**Lô gặt đơn (Single havert):** Chủng vi rút sản xuất vắc xin cúm của từng type (chủng) sẽ được tiêm truyền vào trứng gà có phôi hoặc gây nhiễm lên tế bào nhạy cảm. Sau thời gian ủ thích hợp để vi rút nhân lên, hỗn dịch vi rút sẽ được thu gặt, hỗn lại tạo thành các mẻ gặt đơn.

Các mẻ gặt đơn phải được kiểm tra về mức độ tạp nhiễm (Biobudent), hiệu giá kháng nguyên HA, hàm lượng kháng nguyên HA.

**Bán thành phẩm đơn giá (monobulk):** Hỗn dịch vi rút được cô đặc, tinh sạch bằng phương pháp phù hợp như siêu ly tâm phân đoạn hay lọc bằng các tổ hợp màng lọc để tạo thành hỗn dịch vi rút tinh sạch. Sản phẩm tinh sạch được bất hoạt bằng formol hoặc một chất bất hoạt phù hợp khác. Sau khi bất hoạt, tùy theo loại vắc xin là dạng toàn hạt vi rút, vắc xin dạng mảnh hay dạng tiểu phần để tiếp tục thực hiện các giai đoạn tiếp theo để trở thành bán thành phẩm đơn giá.

- **Vắc xin dạng toàn hạt vi rút bất hoạt:** Hỗn dịch vi rút tinh sạch sau bất hoạt sẽ tiếp tục thẩm tích và lọc vô khuẩn loại bỏ chất bất hoạt, các tạp chất khác và các tác nhân tạp nhiễm.
- **Vắc xin dạng mảnh hoặc vắc xin tiểu phần HA:** tùy từng dạng vắc xin phải tiến hành thêm các bước xử lý bằng hóa chất để phân rã các hạt vi rút tạo các dạng tiểu phần nhỏ hơn (vắc xin dạng mảnh) hoặc dạng chỉ chứa kháng

nguyên HA...(vắc xin tiểu phần). Sản phẩm sau xử lý được thẩm tích và lọc vô khuẩn để loại bỏ chất bất hoạt, chất phân rã hạt vi rút, các tạp chất khác và các tác nhân ngoại lai.

Bán thành phẩm đơn giá cần được kiểm tra các tiêu chuẩn về hiệu lực bất hoạt, kiểm tra tính vô khuẩn, hàm lượng kháng nguyên, nhận dạng kháng nguyên, hàm lượng protein tổng số, hàm lượng chất bất hoạt (thường sử dụng là formaldehyde), đường sucrose (nếu phương pháp tinh chế bằng siêu ly tâm gradient sucrose), hàm lượng chất phân tách mảnh (thường sử dụng là triton X-100 ), hàm lượng Ovalbumin (nếu sản xuất trên trứng).

***\*Sản xuất và kiểm định vắc xin cúm thành phẩm***

***Bán thành phẩm cuối cùng (final bulk):*** Các bán thành phẩm đơn giá được phối trộn với nhau theo một tỷ lệ thích hợp và được pha loãng trong nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm phù hợp để tạo thành bán thành phẩm cuối cùng. Một số chất bảo quản thích hợp hoặc tá chất có thể được thêm vào ở giai đoạn này.

Bán thành phẩm cuối cùng được kiểm tra về tính vô khuẩn, cảm quan, pH, công hiệu (hàm lượng kháng nguyên của từng chủng), hàm lượng chất bất hoạt, hàm lượng protein tổng số và nội độc tố. Nếu trong bán thành phẩm cuối cùng có thêm tá chất hoặc chất bảo quản phải tiến hành kiểm tra để đảm bảo hàm lượng các thành phần thêm vào này đạt yêu cầu trong giới hạn cho phép.

***Thành phẩm (final lot):*** Bán thành phẩm cuối cùng được sử dụng để đóng ống và bao bì đóng gói (dán nhãn, đóng hộp) để tạo vắc xin thành phẩm.

Bán thành phẩm cuối cùng và vắc xin cúm phải được kiểm tra về cảm quan, vô khuẩn, nhận dạng, thể tích đóng ống, nội độc tố, an toàn chung và các chỉ tiêu về công hiệu, hàm lượng protein tổng số, hàm lượng chất bất hoạt...nếu trong bán thành phẩm chưa kiểm tra.

## CHƯƠNG 2

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

##### 2.1.1. Mẫu nghiên cứu

IVACFLU-S là vắc xin phòng bệnh cúm mùa do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) sản xuất theo công nghệ nuôi cấy trên trứng gà có phôi; là vắc xin tam giá, dạng mảnh, bất hoạt bằng formalin, không sử dụng chất bảo quản. IVACFLU-S được sản xuất trên dây chuyền công nghệ hiện đại, quy mô 1,5 triệu liều/năm. Đây là dây chuyền công nghệ do TCYTTG tài trợ cho IVAC trong khuôn khổ “*Chương trình phát triển Cúm toàn cầu*” sau khi IVAC nghiên cứu thành công vắc xin cúm trên quy mô thí nghiệm.

IVAC sử dụng chủng sản xuất vắc xin cúm mùa năm 2014 - 2015 và 2016 - 2017 gồm hai chủng vi rút cúm A và một chủng cúm B do Viện NIBSC- Anh cung cấp:

**Bảng 2. 1. Chủng Cúm mùa dùng trong sản xuất vắc xin IVACFLU-S**

Tên chủng sản xuất	Nguồn gốc	Mùa dịch
NYMC-X-179A (H1N1)	A/California/7/2009	2014-2015 2016-2017
NYMC-X-223A (H3N2)	A/Texas/50/2012	2014-2015
NYMC-X-263B (H3N2)	A/HongKong/4801/2014	2016-2017
NYMC-BX-51B (B)	B/Massachusetts/02/2012	2014-2015
NYMC-BX-35 (B)	B/Brisbane/60/2008	2016-2017

**❖ Công thức thành phần vắc xin cúm IVACFLU- S mùa dịch 2014 – 2015:**

Trong 1 liều 0,5 ml vắc xin cúm mùa IVACFLU-S có chứa các thành phần kháng nguyên như sau:

- |  |              |
|--|--------------|
| - NYMC X-179A (A/California/7/2009) (H1N1)   | 15µg HA      |
| - NYMCX-223A (A/Texas/50/2012) (H3N2)        | 15µg HA      |
| - NYMC BX-51B ( B/Massachusetts/02/2012) (B) | 15µg HA      |
| - Dung dịch đệm PBS pH = 7,2                 | vừa đủ 0,5ml |

**❖ Công thức thành phần vắc xin cúm IVACFLU- S mùa dịch 2016-2017:**

Trong 1 liều 0,5 ml vắc xin cúm mùa IVACFLU-S có chứa các thành phần kháng nguyên như sau:

- |  |              |
|--|--------------|
| - NYMC X-179A (A/California/7/2009) (H1N1) | 15µg HA      |
| - NYMCX-263B (A/HongKong/4081/2014) (H3N2) | 15µg HA      |
| - NYMC BX-35B (B/Brisbane/60/2008) (B)     | 15µg HA      |
| - Dung dịch đệm PBS pH = 7,2               | vừa đủ 0,5ml |

**❖ Công thức thành phần giả dược:**

Trong 1 liều 0,5 ml giả dược gồm có:

- |   |          |
|---|----------|
| - NaCl  | 4,5 mg   |
| - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,695 mg |
| - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,181 mg |
| - Nước cất vừa đủ                                     |          |

Các lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S và giả dược sử dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng đã được Viện Quốc gia Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm (NICVB) kiểm định và cấp giấy chứng nhận kết quả chất lượng số00114/VXVR-NC, 00214/VXVR-NC, 00314/VXVR-NC và 00415/VXVR-NC.

### 2.1.2. Cỡ mẫu, thời gian, địa điểm

- 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015: 011214, 021214, 031214
- 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017: 0040116, 0050116, 0060116
- Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) và Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB)

## 2.2. VẬT LIỆU

### 2.2.1. Sinh phẩm

**Bảng 2. 2. Sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Sinh phẩm	Code	Hãng
1	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H1N1)	16/114	NIBSC
2	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H3N2)	16/100	NIBSC
3	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (B)	15/312	NIBSC
4	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H1N1)	13/164	NIBSC
5	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H3N2)	15/230	NIBSC
6	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (B)	16/118	NIBSC
7	Endotoxin chuẩn	R15006	Charles River
8	Canh thang Thioglycolate	108191	Sigma
9	Canh thang Trypsoyabeen Broth	100525	Sigma
10	Đệm PBS	14200-166	Gibco

11	Thạch Agarose	S0014	USA
12	Comasie brilliant blue R-250	115444.0025	Merck
13	A xít acetic	1.00731.1000	Merck
14	NaCl	S0817	Sigma
15	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	S7909	Sigma
16	Deoxycholat natri	30970	Sigma
17	Tricloaxetic axit	T6399	Sigma
18	Acetylaceton	100014.1000	Merck
19	Dung dịch chuẩn pH 4,01	Thermo	910104
20	Dung dịch chuẩn pH 7,00	Thermo	910107
21	Dung dịch chuẩn pH 10,01	Thermo	910110

### 2.2.2. Động vật thí nghiệm

**Bảng 2. 3. Động vật thí nghiệm dùng trong nghiên cứu tiền lâm sàng**

Loại	Giống	Giới tính	Tuổi	Trọng lượng	Nguồn gốc	Mục đích sử dụng
Chuột nhắt	<i>Swiss</i>	2 giới	5-6 tuần	20-24g	IVAC	An toàn chung & đáp ứng MD
Chuột lang		Đực	5-6 tuần	300-350g	IVAC	An toàn chung
Thỏ	<i>Newzealand</i>	2 giới	6-8	2,0-	IVAC	Chất gây sốt và Độc

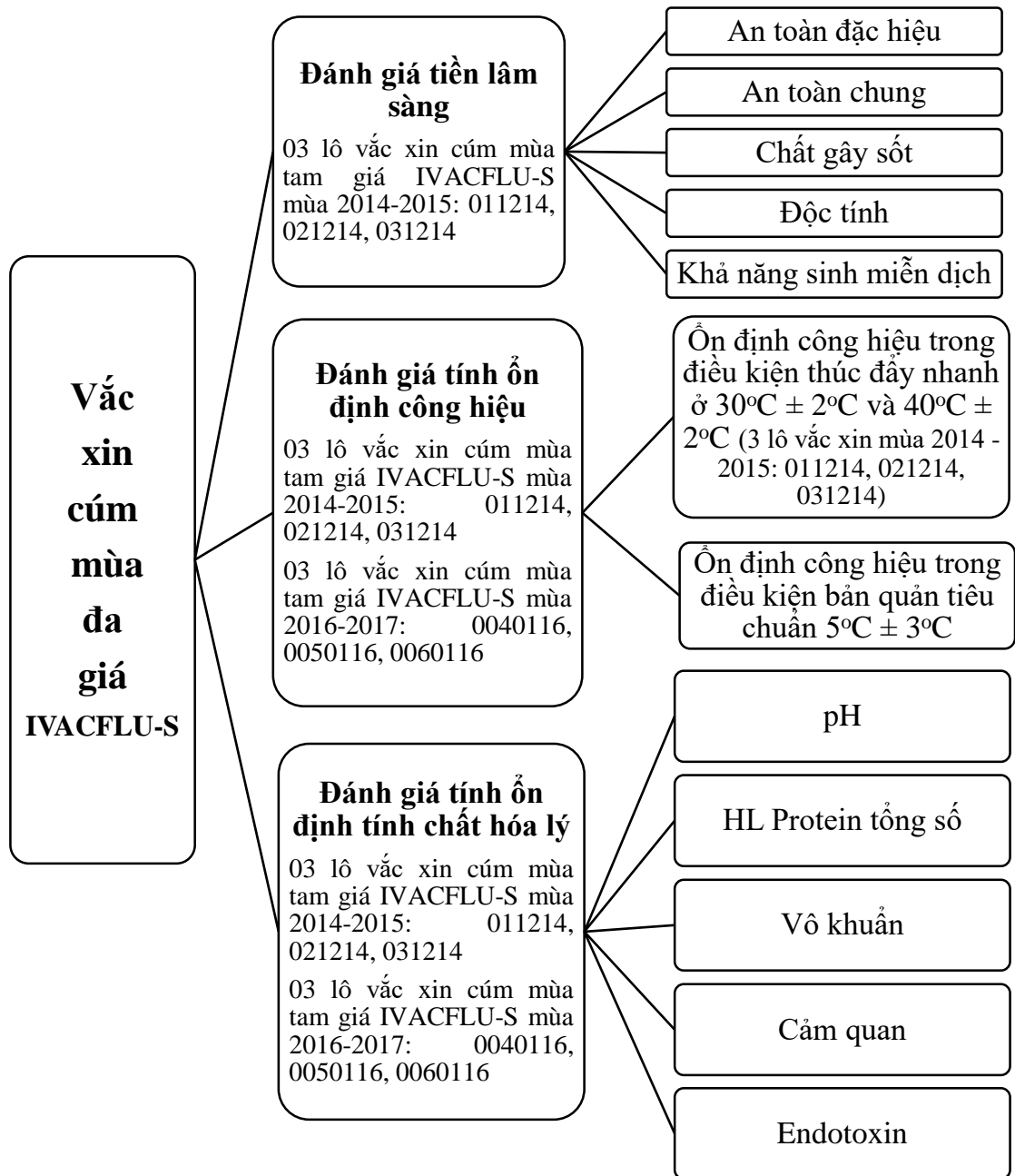
			tháng	2,7kg		tính
--	--	--	-------	-------	--	------

### 2.2.3. Trang thiết bị và vật tư tiêu hao

**Bảng 2. 4. Danh mục thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Thiết bị - Dụng cụ	Hãng sản xuất	Mã số
1	Máy đo chỉ nhiệt tố có độ chính xác 0.1°C		ATP 75991660B
2	Bể ổn nhiệt	Prolabo	WB 05-SPMD
3	Máy lắc tuýp	Stuart	VT 14-SP
4	Tủ nuôi cấy vô trùng Safe fast Classic	Faster	LH 22-SP
5	Tủ ấm 37°C	Sanyo	IC 14 VR
6	Tủ mát 20-25°C	Sanyo	CI 02 VR
7	Máy lắc JK		VT 03 VR
8	Pipet-aid	Statorius	PA002-VR
9	Máy đo pH	Thermo	pH 16-HL
10	Máy lắc	IKA	VT02-HL
11	Kính hiển vi	Nikon	Eclipse E100
12	Cân điện tử	Mettler toledo	EB23-HL
13	Micropipet các loại (1÷ 10) µl, (2÷ 20) µl , (50÷ 200) µl, (200÷ 1000)µl, (1000÷ 5000) µl...	Eppendorf	

### 2.3. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU



**Hình 2. 1. Sơ đồ nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện gồm 3 nội dung tương ứng với 3 mục tiêu nghiên cứu, bao gồm: Đánh giá tiền lâm sàng, đánh giá tính ổn định công hiệu, đánh giá tính ổn định của các tính chất hóa lý (Hình 2.1)



## 2.4. BIÊN SỐ NGHIÊN CỨU

**Bảng 2. 5. Tiêu chuẩn chất lượng vắc xin cúm mùa IVACFLU-S**

TT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn (trong 1 liều/0,5ml)	Tiêu chuẩn 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	Thể tích	Đo thể tích	$\geq$ Thể tích ghi trên nhãn	TCCS
3	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày	ĐĐVN IV, 2009
4	pH	Đo điện thế điện cực	6,5-7,5	TCCS
5	Nhận dạng HA	SIRD	Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu của từng chủng	WHO- TRS 927, 2005
6	Hàm lượng HA	SRID	$\geq 30\mu\text{g/ chủng/ml}$	TCCS
7	Endotoxin	Thử nghiệm LAL	$\leq 100$ EU	ĐĐ Châu Âu 2008
8	Protein tổng số	Lowry cải tiến	$\leq 300 \mu\text{g}$	ĐĐ Châu Âu 2008
9	Formaldehyde tồn dư	Đo quang với thuốc thử Acetylaceton	$\leq 0,02\%$	ĐĐVN IV, 2009

10	An toàn chung	Thử trên chuột nhắt trắng và chuột lang	Toàn bộ chuột sống khỏe mạnh, lên cân sau 7 ngày theo dõi	ĐĐVN IV, 2009
11	An toàn đặc hiệu	Thử trên trứng gà có phôi 10 – 11 ngày tuổi	Tỷ lệ trứng có phôi sống $\geq 80\%$ và HA dịch niệu âm tính sau hai lần cấy truyền.	WHO- TRS 927, 2005
12	Thử nghiệm xác định chất gây sốt	Thử nghiệm trên thỏ	Trong mỗi nhóm thử (3 thỏ thí nghiệm) không có thỏ nào có mức tăng nhiệt độ hơn $0,6^{\circ}\text{C}$ và nếu tổng mức tăng nhiệt độ của 3 thỏ $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$	ĐĐVN IV, 2009
13	Nghiên cứu độc tính	Thử nghiệm trên thỏ	Không có biểu hiện bệnh lý trên xét nghiệm sinh hóa, huyết học. Hình ảnh giải phẫu mô và phủ tạng bình thường	WHO- TRS 927, 2005
14	Nghiên cứu tính sinh miễn dịch	Thử nghiệm trên thỏ	Hiệu giá kháng thể sau tiêm tăng $\geq 4$ lần	WHO- TRS 927, 2005

## 2.5. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.5.1. Phương pháp đánh giá cảm quan

Kiểm tra bằng mắt thường, đánh giá màu sắc và độ đồng nhất của sản phẩm.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Sau khi lắc đều, dung dịch đồng nhất không màu hoặc màu trắng mờ, không lẫn chất lạ.

### 2.5.2. Phương pháp xác định thể tích

Xác định khối lượng riêng P của một đơn vị thể tích mẫu thử (1ml) ở nhiệt độ t. Xác định khối lượng M của mẫu thử (1 liều chứa trong lọ vắc xin) ở nhiệt độ t. Thể tích mẫu thử xác định ở nhiệt độ t:  $V = M/P$

**Tiêu chuẩn chấp nhận:**  $\geq$  Thể tích ghi trên nhãn

### 2.5.3. Phương pháp xác định tính vô khuẩn

Phương pháp cấy trực tiếp trên 2 loại môi trường Thioglycolate và Trypsoyabeen Broth (TSB). Sau khi cấy mẫu các môi trường được ủ 14 ngày ở 2 nhiệt độ 30°C- 35°C và 22 °C- 25 °C.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Kết quả đạt yêu cầu khi không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong suốt thời gian theo dõi

### 2.5.4. Phương pháp xác định pH

Xác định pH bằng phương pháp đo điện thế điện cực theo Dược điển Việt Nam IV

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** pH = 6,5- 7,5

### 2.5.5. Phương pháp nhận dạng HA

Xác định bằng phản ứng ngưng kết giữa kháng nguyên và kháng huyết thanh đặc hiệu trên thạch. Sau một thời gian ủ nhất định xuất hiện vòng ngưng kết trên thạch, phát hiện bằng mắt thường

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

### 2.5.6. Phương pháp xác định hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin cúm bằng thử nghiệm SRID (xác định công hiệu của vắc xin)

Phản ứng SRID xác định hàm lượng kháng nguyên ngưng kết hồng cầu (HA) dựa trên phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên HA và kháng thể đặc hiệu trong gel thạch. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu tạo thành vòng kết tủa trên gel thạch. Đường kính của vòng kết tủa tỷ lệ thuận với nồng độ HA, được đo tự động

bằng phần mềm SRID analysis software hay đo bằng thước đo Eye piece. Hàm lượng HA được tính bằng phần mềm Combistats dựa theo đường kính của vòng kết tủa.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:**  $\geq 30\mu\text{g/ml}$ .

### 2.5.7. Phương pháp xác định 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.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:**  $\leq 200\text{EU/ml}$ .

### 2.5.8. Phương pháp xác định Protein tổng số

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp đo quang phổ. Protein có trong mẫu thử (pha loãng nếu cần) được ổn định bằng DOC (deoxycholat natri) rồi cho kết tủa với TCA (tricloaxetic axit). Sau đó kết tủa sẽ được hòa tan 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 bằng quang phổ kế ở bước sóng 750nm.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Nước cốt đơn giá:  $\leq 300 \mu\text{g}/45\mu\text{ml}$ ; Vắc xin thành phẩm tam giá:  $\leq 300 \mu\text{g HA/}$  liều 0,5 ml.

### 2.5.9. Phương pháp xác định Formaldehyde tồn dư

Định lượng formaldehyde bằng cách đo cường độ màu của phức 3.5 diacetyl 1.1,4 dihydrothydin ở bước sóng 410 nm. Phức hợp này có màu vàng chanh được tạo thành do phản ứng của formaldehyde tự do trong mẫu với acetylaceton trong môi trường axit yếu.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:**  $\leq 0,02\%$

#### **2.5.10. Xác định tính an toàn chung ( pp được điền VN IV, 2009)**

Tính an toàn chung được đánh giá cho vắc xin và giả dược trên các lô thành phẩm để xác định sự hiện diện của các thành phần độc không đặc hiệu có thể có trong sản phẩm. Trong nghiên cứu này tính an toàn chung vắc xin cúm IVACFLU-S được thực hiện trên các lô 011214, 021214, 031214 và giả dược lô 04P1214. Phương pháp thử được thực hiện theo hướng dẫn của DĐVN IV, 2009, xác định tính an toàn chung cho các vắc xin, sinh phẩm sử dụng cho người. Thử nghiệm sử dụng 2 loại động vật thí nghiệm là chuột nhắt và chuột lang. Số lượng chuột được qui định cho một mẫu thử là 2 chuột lang và 5 chuột nhắt. Đường tiêm ổ bụng và liều tiêm tương đương với 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml đối với chuột nhắt và 5 ml đối với chuột lang. Thời gian theo dõi ít nhất 7 ngày.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Thử nghiệm đạt yêu cầu khi tất cả chuột đều sống sót, khỏe mạnh và lên cân trong suốt thời gian theo dõi.

#### **2.5.11. Tính an toàn đặc hiệu**

Thử nghiệm an toàn đặc hiệu được thực hiện trên trứng gà có phôi 10-11 ngày tuổi theo hướng dẫn của WHO-TRS 927, 2005. Nghiên cứu được thực hiện trên các lô nước cốt vắc xin cúm của 03 chủng cúm mùa 2014 - 2015 là CT-S/H1N1/01, CT-S/H3N2/04, CT-S/B/07. Đây là nguyên liệu để pha các lô vắc xin thành phẩm IVACFLU-S lô 011214, 011214 và 031214. Tính an toàn đặc hiệu được xác định theo nguyên tắc tiêm truyền nhiều đời trên trứng gà có phôi để đánh giá khả năng gây độc đặc hiệu và sống sót của vi rút sau bất hoạt.

#### **Qui trình thực hiện thử nghiệm an toàn đặc hiệu**

Mỗi mẫu nghiên cứu (nước cốt vắc xin cúm) sử dụng 10 trứng gà sạch có phôi 10-11 ngày tuổi cho 1 lần cấy truyền.

Mỗi mẫu đối chứng (chủng vi rút cúm hoặc dung dịch PBS) dùng 5 trứng gà sạch có phôi 10-11 ngày tuổi cho 1 lần cấy truyền.

Mỗi trứng được tiêm truyền 0,2ml hoặc mẫu thử hoặc mẫu đối chứng vào khoang niệu đệm. Ủ trứng 72h/ 34-35°C/ độ ẩm 65-75%.

Thu gặt dịch niệu của từng trứng, mỗi trứng 0,5ml. Hộn dịch niệu theo nhóm.

Tiêm truyền 0,2ml của dịch niệu đã hôn vào khoang niệu đệm của mỗi trứng của 1 nhóm gồm 10 trứng tương ứng với nhóm mẫu thử và 5 trứng tương ứng với nhóm mẫu đối chứng. Ủ trứng 72h/ 34-35°C/ độ ẩm 65-75%.

Thu gặt dịch niệu của từng trứng, mỗi trứng 0,5ml.

Thực hiện phản ứng ngưng kết hồng cầu với dịch niệu của từng trứng.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu khi tỷ lệ phôi sống  $\geq 80\%$  và HA dịch niệu âm tính sau hai lần cấy truyền.

#### **2.5.12. Thử nghiệm xác định chất gây sốt**

Được đánh giá trên các lô thành phẩm để xác định sự hiện diện của chất gây sốt. Quy trình thử nghiệm được thực hiện trên thỏ theo hướng dẫn của DĐVN IV, 2009, thử chất gây sốt cho các vắc xin, sinh phẩm sử dụng cho người.

#### **Quy trình thực hiện xác định chất gây sốt**

Thử nghiệm chất gây sốt là phương pháp sinh học dùng để đánh giá tính chất gây sốt của vắc xin, sinh phẩm dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm vào tĩnh mạch tai dung dịch mẫu thử.

Mỗi mẫu thử được tiêm tĩnh mạch vành tai cho 3 con thỏ. Nhóm thỏ có nhiệt độ của 2 lần đo trước khi tiêm chênh lệch nhau không quá 0,2°C và nhiệt độ ban đầu nằm trong khoảng 38,0 - 39,8°C, nhóm 3 thỏ có nhiệt độ chênh lệch nhau không quá 1°C. Mỗi thỏ được tiêm tĩnh mạch chậm với tốc độ 4-6 ml/phút trong thời gian

không quá 4 phút. Nhiệt độ tối đa sau khi tiêm là nhiệt độ cao nhất đo được trong 3 lần đo sau khi tiêm mẫu thử 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ.

Đáp ứng của mỗi thử là hiệu số của nhiệt độ tối đa sau khi tiêm mẫu thử và nhiệt độ ban đầu. Đáp ứng = 0 nếu nhiệt độ tối đa sau khi tiêm bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ ban đầu.

Nếu không có thử nào có đáp ứng lớn hơn  $0,6^{\circ}\text{C}$  và nếu tổng số đáp ứng của 3 thử  $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 2,4^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu.

Nếu 1 thử trở lên có đáp ứng  $> 0,6^{\circ}\text{C}$  và/hoặc nếu tổng số đáp ứng của 3 thử lớn hơn  $1,3^{\circ}\text{C}$  đến  $2,4^{\circ}\text{C}$  thì thử nghiệm cần phải tiến hành thêm trên 3 thử khác.

Nếu tổng số đáp ứng của 6 thử (cộng dồn)  $\leq 3^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 4,1^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu. Nếu nằm trong khoảng  $3^{\circ}\text{C}$  đến  $4,1^{\circ}\text{C}$  thì cần làm thêm lần cuối trên 3 thử khác.

Nếu tổng số đáp ứng của 9 thử (cộng dồn)  $\leq 4,9^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 4,9^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu và phải hủy vắc xin hay sinh phẩm thử nghiệm.

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Đạt các tiêu chuẩn như trên, vắc xin thử nghiệm đạt yêu cầu về chất gây sốt.

### 2.5.13. Nghiên cứu độc tính (Toxicology)

Nghiên cứu được thực hiện trên thử New Zealand trưởng thành để đánh giá sự dung nạp tại chỗ và độc tính liều lặp lại (2 liều) với giai đoạn hồi phục là 2 tuần của vắc xin cúm mùa IVACFLU-S lô số 011214 và giả dược lô số 04P1214. Vắc xin IVACFLU-S gồm 3 chủng cúm mùa 2014-2015, có hàm lượng kháng nguyên HA  $\geq 15\mu\text{g}$ /chủng/liều. Giả dược là dung dịch PBS pH 7,2, là dung dịch đệm có trong thành phần của vắc xin.

**Bảng 2. 6. Nghiên cứu độc tính của vắc xin cúm mùa IVACFLU-S và lô giả dược**

Nhóm	Mẫu nghiên cứu	Ngày tiêm	Ngày lấy máu	Ngày giải phẫu	Số thỏ /nhóm
NC chính	IVACFLU-S lô 011214	0, 14	-1, 2, 16	16	10
NC hồi phục			-1, 2, 16	28	10
NC chính	Giả dược 04P1214	0, 14	-1, 2, 16	16	10
NC hồi phục			-1, 2, 16	28	10
<b>Tổng số thỏ</b>					<b>40</b>

Các tiêu chí trong nghiên cứu cần được đánh giá bao gồm: quan sát các dấu hiệu lâm sàng, các phản ứng tại vị trí tiêm, thân nhiệt, mức tăng trọng, mức tiêu thụ thức ăn, các xét nghiệm huyết học, sinh hóa, khám nghiệm sau giải phẫu/giải phẫu bệnh.

❖ **Phương pháp thí nghiệm**

- Thỏ được chia thành 4 nhóm, 10 con/nhóm, thỏ đực và cái được phân bố đều trong các nhóm, 2 nhóm tiêm vắc xin và 2 nhóm tiêm giả dược
- Mỗi thỏ trong 1 nhóm được nhận 2 liều tiêm 0,5ml hoặc vắc xin hoặc giả dược cách nhau 14 ngày (ngày 0, ngày 14 của nghiên cứu).
- Đường tiêm và vị trí tiêm: Tiêm bắp đùi (2 chân sau, thay đổi giữa bên trái hoặc bên phải luân phiên sau mỗi lần tiêm)
- Một nhóm tiêm vắc xin và một nhóm giả dược được giải phẫu 48h sau tiêm liều cuối cùng (ngày thứ 16 của nghiên cứu). Hai nhóm còn lại được giải phẫu vào ngày thứ 28 của nghiên cứu (Bảng 2.3).



❖ **Theo dõi lâm sàng**

- Thỏ được quan sát đánh giá các biểu hiện trên lâm sàng hàng ngày cho đến khi kết thúc thí nghiệm (*SOP:KD\_Tox/038 13/01*). Quan sát bao gồm đánh giá về các tiêu chí:
  - + Tỷ lệ sống/chết của thỏ thí nghiệm.
  - + Các biểu hiện chung toàn thân, da, lông, móng, mắt, mũi, các chi, hậu môn, cơ quan sinh dục ngoài
  - + Quan sát các dấu hiệu của hệ hô hấp, tuần hoàn (ho, khó thở, tím tái...)
  - + Hệ tiêu hóa (bỏ ăn, chướng bụng, nôn ói, ỉa chảy..),
  - + Các dấu hiệu thần kinh, vận động (co giật, liệt...)
  - + Và các biểu hiện bất thường khác.

❖ **Theo dõi mức độ tiêu thụ thức ăn**

- Thỏ được theo dõi mức độ tiêu thụ thức ăn trong 3-7 ngày trước khi thí nghiệm và trong suốt thời gian thí nghiệm

❖ **Theo dõi trọng lượng cơ thể**

- Cân thỏ vào ngày nhận thỏ, ngay trước khi tiêm và hàng tuần trong suốt thời gian thí nghiệm

❖ **Theo dõi thân nhiệt**

- Khi đo thân nhiệt, thỏ được đưa vào phòng thử chất gây sốt (phòng kín, cách âm, ánh sáng êm dịu, nhiệt độ phòng 22 - 25°C, độ ẩm 53% - 67%). Mỗi thỏ được đặt nằm trong 1 ô riêng trên bàn đo, có khung giữ. Để thỏ yên tĩnh trong 15 phút trước khi đo.
- Nhiệt kế dùng để đo nhiệt độ là loại dùng trong thử nghiệm chất gây sốt (đã được thẩm định).
- Vị trí đo nhiệt độ: Lấy nhiệt độ hậu môn tương tự như cách đo nhiệt độ trong thử nghiệm chất gây sốt.

- Nhiệt độ được đo ngay trước mỗi mũi tiêm (T0), sau tiêm 24h (T24h), 48h (T48h) và vào các ngày tiếp theo ở thỏ có thân nhiệt bất thường cho đến khi thân nhiệt trở về mức bằng hoặc thấp hơn thân nhiệt nền (T0) .
- Kết quả được xác định:
  - + Bình thường khi thân nhiệt bằng hoặc thấp hơn thân nhiệt đo ở thời điểm T0.
  - + Sốt: Khi thân nhiệt  $>0,6^{\circ}\text{C}$  tại mỗi thời điểm đo T24h và T48h so với thân nhiệt nền (T0)
  - + Tăng thân nhiệt: khi thỏ có biểu hiện tăng thân nhiệt so với mức nhiệt độ nền nhưng chưa sốt.
- Đánh giá kết quả bằng so sánh tỷ lệ % số thỏ có sốt hoặc tăng thân nhiệt sau mỗi lần tiêm giữa nhóm thỏ tiêm vắc xin và nhóm thỏ tiêm giả dược.

❖ *Theo dõi phản ứng tại chỗ*

- Quan sát và đánh giá phản ứng tại vị trí tiêm của từng thỏ trước mỗi lần tiêm, sau tiêm 24h và 48h.
- Đối với những thỏ xuất hiện các biểu hiện phản ứng trên da sau mỗi mũi tiêm như: đám tụ huyết, ban đỏ, phù nề, chai cứng, sưng huyết, đỏ da, khối u hay bất cứ một dấu hiệu tổn thương nào khác tại vị trí tiêm cần được quan sát và ghi chép hàng ngày cho đến khi các biểu hiện biến mất hoàn toàn.
- Các biểu hiện phù nề/sưng tấy và ban đỏ/quầng đỏ được đánh giá và chấm điểm theo thang điểm chuẩn Draize (Draize Scoring System), như mô tả trong.

Các nốt chai cứng tại vị trí tiêm của thỏ nếu xuất hiện cũng cần được theo dõi và ghi nhận như là một biểu hiện của phản ứng tại chỗ.

**2.5.14. Nghiên cứu tính sinh miễn dịch (Immunogenicity)**

Nghiên cứu về tính sinh miễn dịch nhằm đánh giá khả năng tạo đáp ứng kháng thể kháng HA. Nghiên cứu được thực hiện với 03 lô vắc xin thành phẩm là IVACFLU-S 011214, 021214 và 031214 và 01 lô vắc xin thương mại cùng công thức chủng cúm mùa 2014-2015 với vắc xin IVACFLU-S để đối chứng (vắc xin Vaxigrip lô số: 7248-4).

***Thử nghiệm trên chuột:***

- Phân nhóm: Động vật được chia ngẫu nhiên thành 12 nhóm, mỗi nhóm 16 con và 1 nhóm 8 con (nếu có chuột của cả 2 giới phải được phân bố đều vào các nhóm).
- Thể tích tiêm: 100  $\mu$ l/liều/chuột
  - + Nhóm tiêm vắc xin (nhóm 12 con): ở các liều miễn dịch 3 $\mu$ g HA, 1,5 $\mu$ g HA và 0,75  $\mu$ g HA cho mỗi chủng.
  - + Nhóm tiêm PBS (nhóm 8 con): tiêm vào thời điểm tương tự với các nhóm tiêm vắc xin.
- Vị trí tiêm: tiêm bắp đùi của chân sau.
- Số lần tiêm và khoảng cách: 2 lần, cách nhau 21 ngày
- Lấy máu: Mỗi một chuột được lấy máu nền vào ngày 0 (M0), máu 1 sau liều tiêm thứ nhất 21 ngày (M1) và máu 2 vào ngày 35 của nghiên cứu (M2).

***Xác định hiệu giá kháng thể sau khi gây miễn dịch bằng 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.

- Huyết thanh được xử lý để làm giảm sự ức chế không đặc hiệu
- Mẫu huyết thanh được pha loãng bậc 2 và ủ với kháng nguyên của mỗi chủng đã được chuẩn độ trước (4 đơn vị HA trong 25 $\mu$ l hay 8 đơn vị HA trong 50  $\mu$ l)
- Bổ sung dung dịch hồng cầu gà tây 0,5% vào các giếng

- Phản ứng dương tính khi có sự ức chế ngưng kết hồng cầu tức là có sự hiện diện của kháng thể trong huyết thanh. Hiệu giá kháng thể là nghịch đảo của độ pha loãng huyết thanh khi tại đó xảy ra hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu

#### ***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 dựa theo 2 tiêu chí:

- Hiệu giá trung bình nhân (GMT) của mỗi lần lấy máu.

Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh (chuyển đổi hiệu giá kháng thể trung bình nhân) giữa máu 1 và máu 2 với máu nền (M1/M0 và M2/M0), giữa máu 2 và máu 1 (M2/M1).

#### **2.5.15. Phương pháp đánh giá tính ổn định**

Các nghiên cứu tính ổn định được thực hiện với 3 lô nước cốt vắc xincúm cô đặc CT-S/H1N1/01, CT-S/H3N2/04, CT-S/B/07 và 03 lô vắc xin thành phẩm IVACFLU-S 011214, 021214, 031214.

**Nước cốt vắc xin cúm:** được đánh giá tính ổn định ở nhiệt độ bảo quản ( $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) trong thời hạn 15 tháng.

**Bảng 2. 7. Đánh giá tính ổn định ở nhiệt độ bảo quản của 1 lô nước cốt đơn giá**

	<b>Khởi điểm</b>	<b>3 tháng</b>	<b>6 tháng</b>	<b>9 tháng</b>	<b>12 tháng</b>	<b>15 tháng</b>
$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	x	x	x	x	x	x
Số lượng (ml)	25	20	25	20	25	25
<b>Tổng cộng</b>	<b>140 ml + 50% dự phòng = 210 ml/ lô</b>					

**Bảng 2. 8. Các tiêu chí đánh giá tính ổn định của nước cốt đơn giá**

Tiêu chí	Khởi điểm	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	15 tháng
Vô khuẩn	X				X	
Cảm quan	X	X	X	X	X	X
pH (6,5 - 7,7)	X	X	X	X	X	X
HA ( $\geq 80\%$ của hàm lượng 15 $\mu\text{g}$ /mỗi chủng)	X	X	X	X	X	X
Protein TS ( $< 300\mu\text{g}/0,5\text{ml}$ )	X		X		X	

**Vắc xin thành phẩm đóng liều đơn** (0,5 ml) trong lọ 2ml được đánh giá tính ổn định ở điều kiện bảo quản  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 12 tháng và điều kiện thúc đẩy nhanh ( $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  và  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) trong vòng 1 tháng.

**Bảng 2. 9. Đánh giá tính ổn định công hiệu ở điều kiện bảo quản và điều kiện thúc đẩy của 1 lô vắc xin thành phẩm**

	Khởi điểm	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 tuần	2 tuần	4 tuần	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	15 tháng
$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	X						X	X	X	X	X	
$30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	X	X		X	X	X						
$40 \pm 2^{\circ}\text{C}$	X	X	X	X								
Số liều	35	40	20	40	20	20	25	25	25	25	35	
<b>Tổng</b>	<b>310 liều (lọ)/ lô + 50% dự phòng = 450 liều (lọ)/lô</b>											

**Bảng 2. 10. Các tiêu chí lý hóa đánh giá tính ổn định của vắc xin thành phẩm**

	<b>Khởi điểm</b>	<b>3tháng</b>	<b>6 tháng</b>	<b>9 tháng</b>	<b>12 tháng</b>	<b>15tháng</b>
Vô khuẩn	x				x	x
Cảm quan	x				x	x
pH (6,5 - 7,7)	x	x	x	x	x	x
Protein TS (< 300µg/0,5ml)	x	x	x	x	x	x
Endotoxin (100EU/0,5ml)	x				x	x

**2.5.16. Phương pháp giải phẫu bệnh và tế bào học**

Giải phẫu tử sẽ được thực hiện 2 lần vào ngày thứ 16 (các nhóm nghiên cứu chính) và ngày thứ 28 (các nhóm nghiên cứu phục hồi).

Ở mỗi lần giải phẫu cần thực hiện việc khám nghiệm và mô tả tất cả các bất thường nếu có.

Khám nghiệm mô bệnh học chọn lọc bao gồm xác định trọng lượng tươi, khám nghiệm và mô tả các cơ quan: não, phổi (2 bên), tim, gan và túi mật, lách, thận (2 bên), buồng trứng (2 bên), tinh hoàn (2 bên). Quan sát và miêu tả mô cơ tại vị trí tiêm.

7 loại mẫu bệnh phẩm từ tủy xương, gan và túi mật, lách, thận (2 bên), phổi (2 bên) và mô cơ tại vị trí tiêm của mỗi thỏ sẽ được lấy mẫu để làm tiêu bản nghiên cứu về mô bệnh học. Mẫu sau khi lấy được đưa vào dụng cụ giữ mẫu đặc chủng (cassette) có đánh số mã hóa và bảo quản trong dung dịch bảo quản formol trung tính trong 24 - 48 giờ. Sau đó mẫu được xử lý nhờ máy chuyên đúc

mô tự động Citadel 1000 (Thermo Shandon) trong 17,5 giờ. Sau khi vùi mẫu vào parafin, mẫu sẽ được cắt thành những lát có độ dày 3  $\mu\text{m}$ , bằng máy Microm HM 325. Dán mảnh mô lên lam kính trong, làm khô ở nhiệt độ 450- 500C trong 2 giờ, nhuộm HE (Hematoxylin Eosin) bằng máy nhuộm tự động Varistain 24-4 (Thermo Shandon) trong 1 giờ và đọc tiêu bản trên kính hiển vi quang học

## **2.6. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU**

Số liệu thí nghiệm tiền lâm sàng, tính ổn định công hiệu, ổn định các tính chất hóa lý của vắc xin được ghi chép, nhập và xử lý bằng phần mềm Access.

Phần mềm SPSS 16.0 được sử dụng để phân tích thống kê số liệu.

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 thỏ thí nghiệm; giá trị trung bình các chỉ số sinh hóa máu của thỏ thí nghiệm; công hiệu, pH, hàm lượng protein tổng số của các loại vắc xin thử 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 như ANOVA và T test được thực hiện trên phần mềm SPSS 16.0.

Kết quả số liệu phân tích được trình bày dưới dạng các bảng thống kê số liệu.

Kết quả giải phẫu bệnh động vật thí nghiệm được mô tả chi tiết và minh họa bằng hình ảnh chụp giải phẫu bệnh trên kính hiển vi quang học tại vật kính 40.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG VẮC XIN CÚM MÙA IVACFLU-S

Thử nghiệm tiền lâm sàng được thực hiện trên 3 lô nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá (CT-S/H1N1/01, CT-S/H3N2/04, CT-S/B/07) và 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 (011214, 021214, 031214). Các chỉ tiêu được đánh giá trong nghiên cứu tiền lâm sàng gồm an toàn đặc hiệu, an toàn chung, chất gây sốt, độc tính, tính sinh miễn dịch.

##### 3.1.1. Thử nghiệm an toàn đặc hiệu

**Bảng 3. 1. Kết quả đánh giá an toàn đặc hiệu vắc xin cúm mùa IVACFLU-S**

Mẫu thử	Tỷ lệ phôi trứng sống		Phản ứng HA
	Cây truyền lần 1	Cây truyền lần 2	
Vắc xin đơn giá CT-S/H1N1/01	10/10 (100 %)	10/10 (100 %)	Âm tính
<i>Chứng dương:</i> Chủng X-179A (A/California/7/2009) (H1N1)	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	Dương tính
Vắc xin đơn giá CT-S/H3N2/04	10/10 (100 %)	10/10 (100 %)	Âm tính
<i>Chứng dương:</i> Chủng X-223A (A/Texas/50/2012) (H3N2)	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	Dương tính
Vắc xin đơn giá CT-S/B/07	10/10 (100 %)	10/10 (100 %)	Âm tính
<i>Chứng dương:</i> Chủng BX-51B (B/Massachusetts/02/2012)	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	Dương tính
<i>Chứng âm:</i> dung dịch đệm PBS	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	Âm tính



Kết quả nghiên cứu cho thấy, 3 lô nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá (CT-S/H1N1/01, CT-S/H3N2/04, CT-S/B/07) sử dụng để sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đều đạt yêu cầu thử nghiệm an toàn đặc hiệu theo hướng dẫn của WHO/TRS 927, 2005. Tỷ lệ phôi trứng thử nghiệm sống sau cấy truyền lần 1 và cấy truyền lần 2 đều đạt 100% ở tất cả các các lô nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá được thử nghiệm (Bảng 3.1).

### 3.1.2. Thử nghiệm an toàn chung

**Bảng 3. 2. Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột nhắt của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S**

Lô	Trọng lượng TB của chuột nhắt (g) theo ngày			Mức tăng		Kết quả
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 7	TLTB (g)	%	
Vắc xin 011214	19,83	23,52	29,29	9,46	47,7	Đạt
Vắc xin 021214	19,58	23,02	29,61	10,03	51,2	Đạt
Vắc xin 031214	19,37	22,12	28,94	9,57	49,4	Đạt
Giả dược	19,73	23,49	29,07	9,34	47,3	Đạt
$p_1 > 0,05, p_2 > 0,05, p_3 > 0,05^*$						

\* T-test,  $p_1$ : Giả dược – 011214,  $p_2$ : Giả dược – 021214,  $p_3$ : Giả dược – 031214

Kết quả thử nghiệm an toàn chung của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thực hiện trên chuột nhắt với 5 chuột nhắt/vắc xin. Kết quả cho thấy kết quả thử nghiệm của 3 loại vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột sau 7 ngày thử nghiệm giao động trong khoảng 9,34 – 10,03 g/chuột/7 ngày (47,7%-51,2%). Không có sự khác biệt giữa mức tăng trọng lượng trung bình sau 7 ngày của các chuột thử nghiệm được tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S với chuột trong nhóm tiêm giả dược,  $p > 0,05$  (Bảng 3.2).

**Bảng 3. 3. Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột lang của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S**

Lô	Trọng lượng TB của chuột lang (g) theo ngày			Mức tăng		Kết quả
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 7	TLTB (g)	%	
Vắc xin 011214	314,6	332,2	356,7	42,1	13,3	Đạt
Vắc xin 021214	322,4	357,2	387,1	64,7	20,1	Đạt
Vắc xin 031214	329,8	347,4	374,9	45,1	13,7	Đạt
Giả dược	300,0	334,8	367,4	67,4	22,5	Đạt
$p_1 > 0,05, p_2 > 0,05, p_3 > 0,05^*$						

\* *T-test, p<sub>1</sub>: Giả dược – 011214, p<sub>2</sub>: Giả dược – 021214, p<sub>3</sub>: Giả dược – 031214*

Kết quả thử nghiệm an toàn chung của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thực hiện trên chuột lang với 2 chuột lang/vắc xin. Kết quả cho thấy kết quả thử nghiệm của 3 loại vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột lang sau 7 ngày thử nghiệm dao động trong khoảng 42,1 – 64,7 g/chuột/7 ngày (13,3%-22,5%). Không có sự khác biệt giữa mức tăng trọng lượng trung bình sau 7 ngày của các chuột thử nghiệm được tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S với chuột trong nhóm tiêm giả dược,  $p > 0,05$  (Bảng 3.3).

### 3.1.3. Thử nghiệm chất gây sốt

**Bảng 3. 4. Kết quả thử nghiệm chất gây sốt trên thỏ của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S**

Mẫu thử/ thỏ  Chỉ số	IVACFLU-S 011214			IVACFLU-S 021214			IVACFLU-S 031214			Giả dược 04P1214		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T <sup>0</sup> nền ( <sup>0</sup> C)	38,7	39,0	38,7	38,7	38,9	38,8	38,9	39,1	39,0	39,0	39,2	39,1
T <sup>0</sup> tối đa ( <sup>0</sup> C)	38,8	39,2	38,9	38,9	39,0	38,9	39,2	39,3	39,2	39,1	39,2	39,1
T <sup>0</sup> tăng (≤ 0,6 <sup>0</sup> C)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0	0
Tổng chênh T <sup>0</sup> (≤ 1,3 <sup>0</sup> C)	0,5			0,4			0,7			0,1		
Kết luận	Đạt			Đạt			Đạt			Đạt		

Thử nghiệm chất gây sốt của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thử nghiệm trên thỏ, 3 thỏ/lô vắc xin. Mức tăng nhiệt độ cơ thể của thỏ sau tiêm vắc xin dao động trong khoảng 0,1 - 0,3<sup>0</sup>C, đối với các thỏ tiêm giả dược mức tăng nhiệt độ cơ thể của thỏ sau tiêm dao động trong khoảng 0 - 0,1<sup>0</sup>C. Tổng mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ thử nghiệm của 1 lô vắc xin dao động trong khoảng 0,4 - 0,7<sup>0</sup>C, đối với các thỏ tiêm giả dược mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ sau tiêm là 0,1<sup>0</sup>C. Kết quả thử nghiệm của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đạt yêu cầu theo hướng dẫn theo Dược điển Việt Nam IV, 2009. Mức tăng nhiệt độ cơ thể của từng thỏ sau tiêm vắc xin không quá 0,6<sup>0</sup>C/thỏ, tổng mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ thử nghiệm không quá 1,3<sup>0</sup>C/3 thỏ (Bảng 3.4).

### 3.1.4. Thử nghiệm độc tính

#### 3.1.4.1. Chỉ số sinh hóa máu

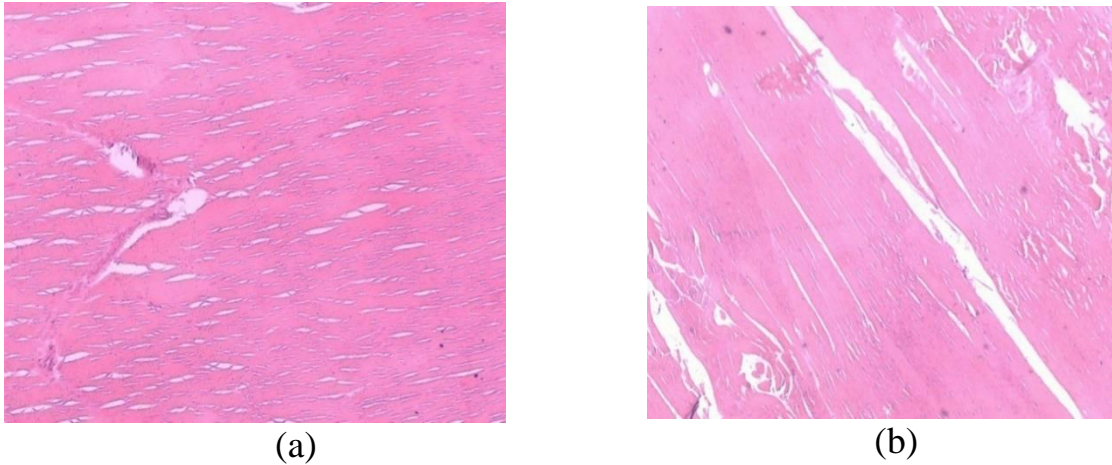
**Bảng 3. 5. Thay đổi các trị số sinh hóa máu của nhóm chuột sau tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S**

Trị số và giá trị bình thường	Máu 0			Máu 1 (sau 2 ngày)			Máu 2 (sau 16 ngày)		
	GTTB		p	GTTB		p	GTTB		p
	VX	GD		VX	GD		VX	GD	
Glucose 4,2-8,9 mmol/l	7,7	7,7	0,85	7,7	8,0	0,13	6,8	7,3	0,01
Creatinin 53-124 $\mu$ mol/l	128,2	124,1	0,23	109,5	113,5	0,51	120,6	120,8	0,53
GOT 10-98 IU/l	43,6	37,9	0,79	26,8	26,4	0,83	45,0	34,0	0,16
GPT 55 -260 IU/l	62,3	57,7	0,56	57,1	53,0	0,37	57,8	52,0	0,33

Đánh giá một số chỉ số sinh hóa máu của thử nghiệm sau 2 ngày (máu 1) và 16 ngày (máu 2) được tiêm vắc xin. Kết quả cho thấy, không thấy xuất hiện các giá trị bất thường trong sinh hóa máu của các thử được tiêm vắc xin thử nghiệm. Giá trị trung bình các chỉ số sinh hóa máu gồm glucose, Creatinin, GOT, GPT của nhóm thử được tiêm vắc xin đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường. Không có sự khác biệt về các chỉ số sinh hóa máu được xét nghiệm ở nhóm thử tiêm vắc xin và tiêm giả dược, ngoại trừ chỉ số glucose ở ngày theo dõi thứ 16. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm hàm lượng glucose máu của thử thử nghiệm đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường nên sự khác biệt giữa nhóm thử tiêm vắc xin và nhóm thử tiêm giả dược là không có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.5).

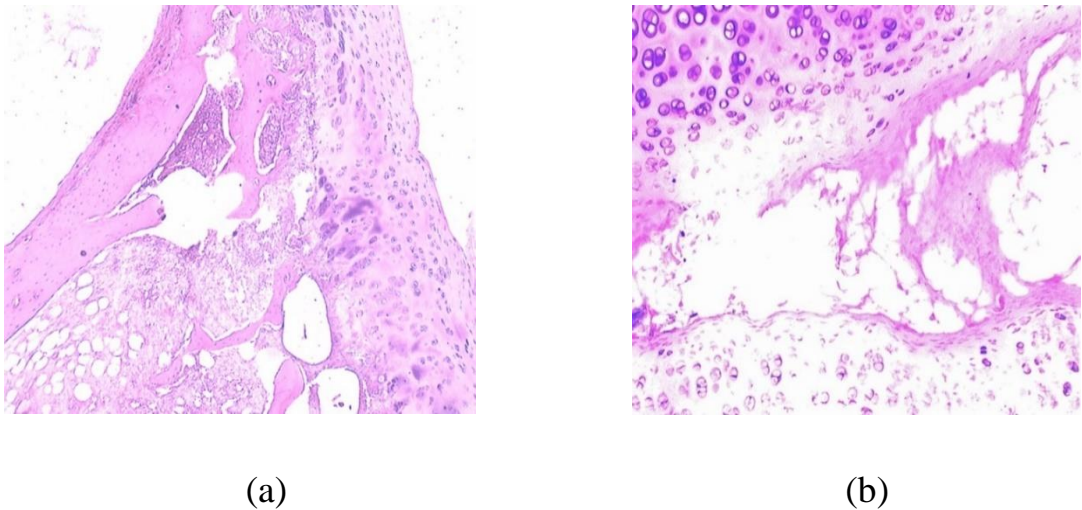
#### 3.1.4.2. Giải phẫu bệnh và tế bào học

Để đánh giá độc tính gây ảnh hưởng đến tổn thương thực thể khi tiêm vắc xin, các xét nghiệm giải phẫu bệnh và tế bào học được thực hiện trên nhóm thử sau 16 ngày và 28 ngày được tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S.



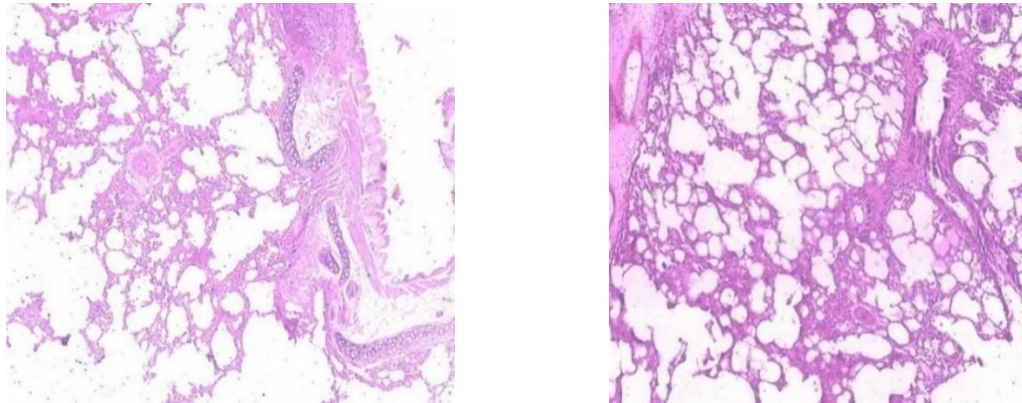
**Hình 3. 1. Hình ảnh giải phẫu cơ vùng tiêm trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

Trên các thỏ được tiêm 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, các kết quả điển hình tại hình 3.1 cho thấy có sự khác biệt trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin của cơ vùng tiêm. Tuy nhiên, hình ảnh giải phẫu bệnh sau tiêm của các cơ vùng tiêm, các bó cơ vân xếp song song, hình thái bình thường, vài tĩnh mạch xếp, không xung huyết. Không thấy tổn thương vi thể ở cơ vùng tiêm (Hình 3.1).



**Hình 3. 2. Hình ảnh giải phẫu tủy xương trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

Sau 16 ngày và 28 ngày được tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, quan sát hình ảnh giải phẫu tủy xương của thỏ được tiêm vắc xin, hình ảnh trước (a) và sau (b) tiêm có sự khác biệt. Tuy nhiên, giải phẫu bệnh về hình thái tế bào tủy và chức năng sinh tủy bình thường. Các quan sát vi thể tủy xương trên tất cả thỏ thí nghiệm không thấy hình ảnh tăng sinh dòng tế bào bất thường (Hình 3.2).



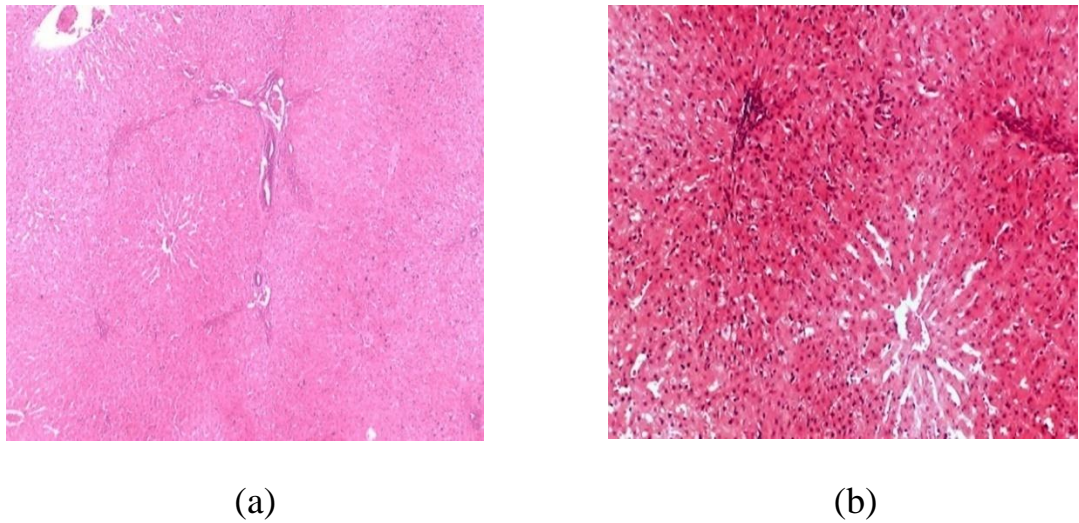
(a)

(b)

**Hình 3. 3. Hình ảnh giải phẫu mô phổi phải (a) và phổi trái (b) trên thỏ tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

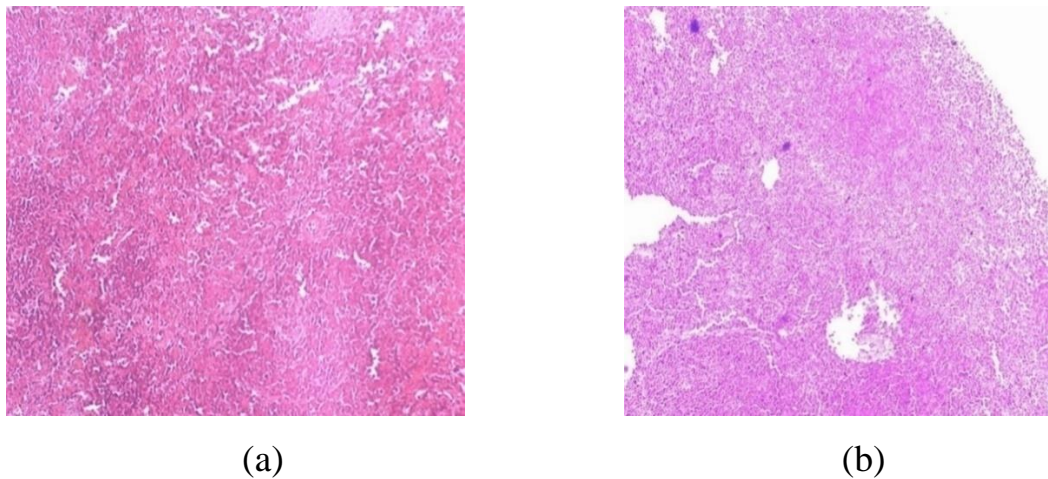
Hình ảnh giải phẫu bệnh sinh thiết mô phổi ở các thỏ sau 16 ngày và 28 ngày tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S cho thấy không có các ảnh hưởng bất thường của việc tiêm vắc xin lên phổi. Hình ảnh giải phẫu bệnh phổi phải và trái của thỏ bình thường, hình ảnh phế quản, phế nang bình thường, không có hình ảnh viêm hay chảy máu bên trong phế nang. Có xuất hiện hình ảnh xuất huyết nhẹ không đặc hiệu trong mô kẽ, không có hình ảnh viêm hay chảy máu bên trong phế nang, nguyên nhân có thể do quá trình làm chết thỏ để lấy mẫu (Hình 3.3).





**Hình 3. 4. Hình ảnh giải phẫu mô gan trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

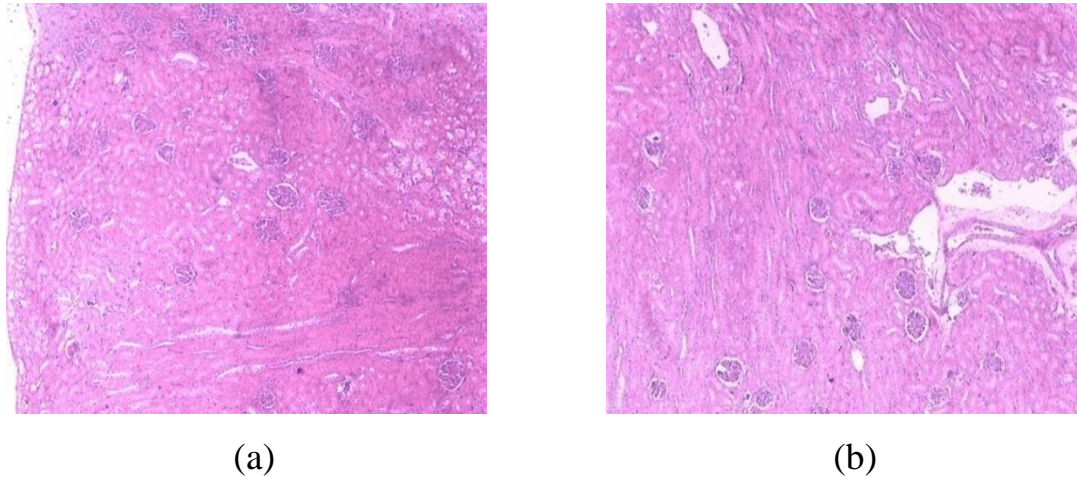
Hình ảnh giải phẫu bệnh sinh thiết mô gan ở các thỏ sau 16 ngày và 28 ngày tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S cho thấy không có các ảnh hưởng bất thường của việc tiêm vắc xin lên gan. Hình ảnh giải phẫu bệnh gan cho kết quả tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy, mao mạch nan hoa, các bè gan và tế bào gan bình thường. Không thấy nhiễm mỡ trong và ngoài tế bào gan (Hình 3.4).



**Hình 3. 5. Hình ảnh giải phẫu mô lách trên thỏ trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

Hình ảnh giải phẫu bệnh sinh thiết mô lách ở các thỏ sau 16 ngày và 28 ngày tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S cho thấy không có các ảnh hưởng bất

thường của việc tiêm vắc xin lên lách. Hình ảnh giải phẫu bệnh lách cho kết quả nhu mô lách với các vùng tủy đỏ và trắng trong giới hạn thường. Không thấy hình ảnh nhiễm mỡ (Hình 3.5).



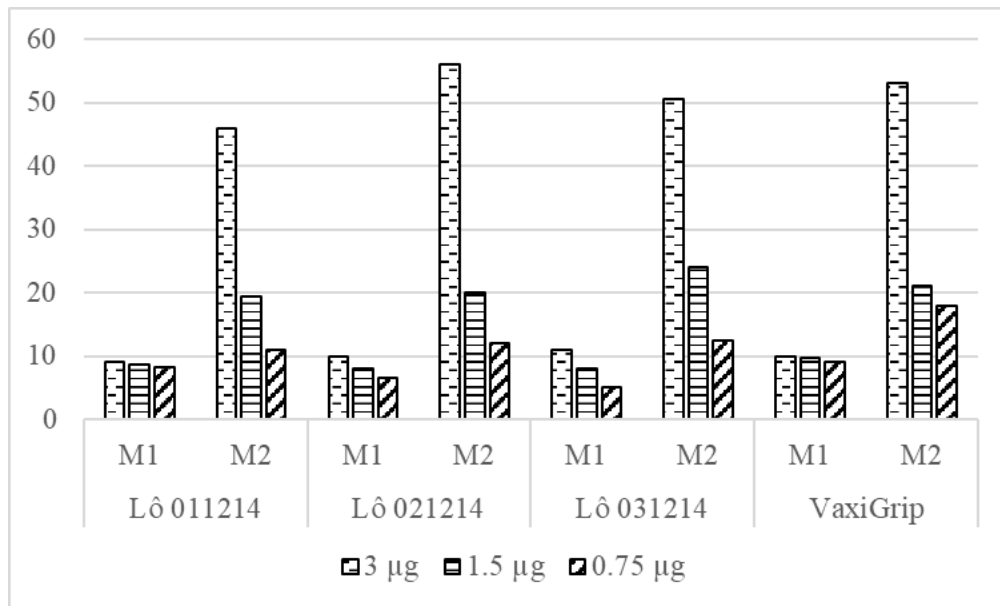
**Hình 3. 6. Hình ảnh giải phẫu mô thận phải (a) và thận trái (b) trên thỏ tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S (x40)**

Hình ảnh giải phẫu bệnh sinh thiết mô thận ở các thỏ sau 16 ngày và 28 ngày tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S cho thấy không có các ảnh hưởng bất thường của việc tiêm vắc xin lên lách. Hình ảnh giải phẫu bệnh mô thận cho kết quả Hình ảnh nhu mô thận, cầu thận, ống thận và mô kẽ của cả thận phải và thận trái đều bình thường, không thấy nhiễm mỡ và bất thường khác (Hình 3.6).

### **3.1.5. Thử nghiệm khả năng sinh miễn dịch**

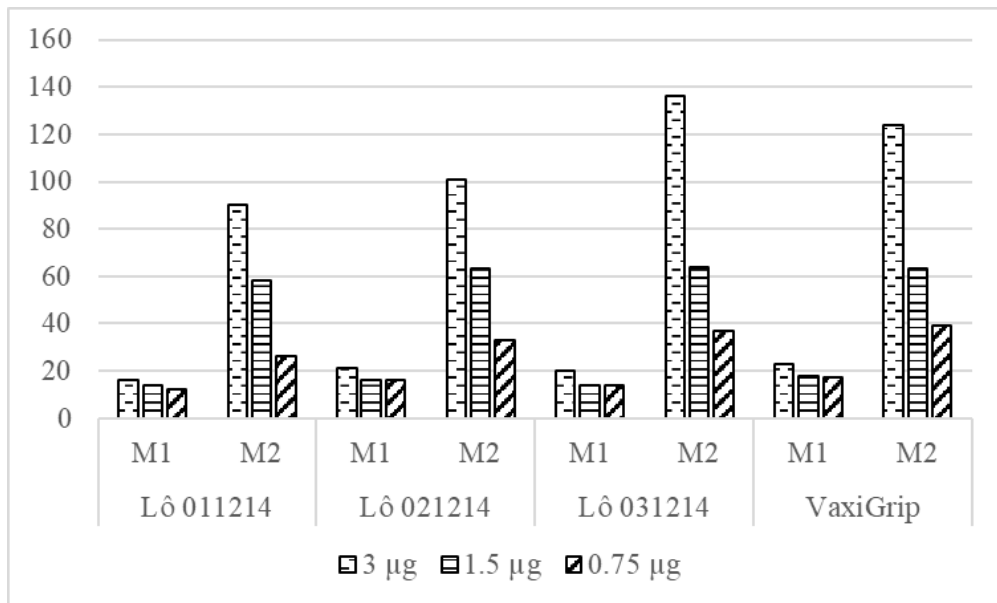
Tính sinh miễn dịch được thử nghiệm bằng cách pha loãng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S tương ứng liều kháng nguyên HA là 3  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 1,5  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 0,75  $\mu\text{g}/\text{liều}$  dựa trên kết quả đánh giá ban đầu về hàm lượng HA của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S 011214, 021214, 031214. Vắc xin đối chứng được sử dụng là vắc xin cúm mùa thương mại VaxiGrip, được pha loãng với tới hàm lượng kháng nguyên tương ứng là 3  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 1,5  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 0,75  $\mu\text{g}/\text{liều}$  dựa trên TCCS công bố của nhà sản xuất. Tính sinh miễn dịch được đánh giá riêng với từng loại kháng nguyên tương ứng trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S là X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B).





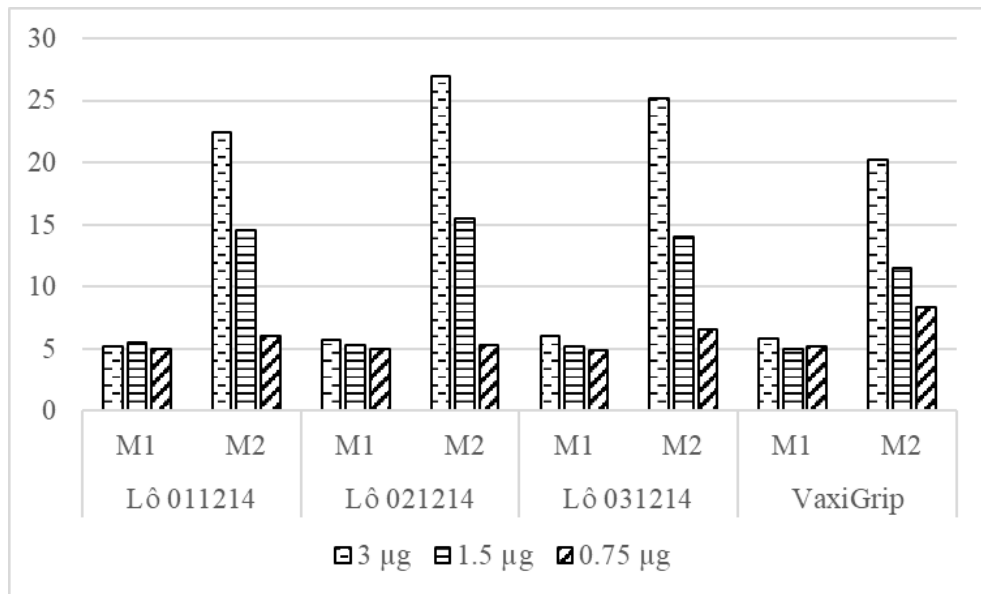
**Hình 3. 7. Đáp ứng miễn dịch của chủng X-179A (H1N1) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm**

Sau 21 ngày tiêm mũi thứ nhất (M1), mức đáp ứng miễn dịch của chủng X-179A (H1N1) trong cả 3 lô vắc xin thử nghiệm và vắc xin đối chứng đều thấp ở cả 3 liều kháng nguyên thử nghiệm (3 µg/liều, 1,5 µg/liều, 0,75 µg/liều). Mức đáp ứng miễn dịch của chủng X-179A (H1N1) trong cả 3 lô vắc xin thử nghiệm khoảng dưới 10 IU/ml. Đáp ứng miễn dịch tăng lên sau 14 ngày tiêm mũi thứ 2 (M2) với cùng hàm lượng kháng nguyên HA có trong vắc xin, với mức đáp ứng miễn dịch cao nhất ở liều kháng nguyên 3 µg/liều. Trong đó, cao nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 021214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 57,6 IU/ml, thấp nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 011214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 47,2 IU/ml. Trong khi đó, vắc xin thương mại đối chứng có mức đáp ứng miễn dịch trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 52,3 IU/ml (Hình 3.7).



**Hình 3. 8. Đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm**

Tương tự kết quả thí nghiệm trên chủng X-179A (H1N1), kết quả thí nghiệm đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) cho thấy, sau 21 ngày tiêm mũi thứ nhất (M1), mức đáp ứng kháng thể của chủng X-179A (H1N1) trong cả 3 lô vắc xin thử nghiệm và vắc xin đối chứng đều thấp ở cả 3 liều kháng nguyên thử nghiệm (3 µg/liều, 1,5 µg/liều, 0,75 µg/liều), lượng kháng thể thu được dao động trong khoảng dưới 20 IU/ml. Không có sự khác biệt nhiều về mức đáp ứng giữa các liều kháng nguyên HA khác nhau trong vắc xin. Đáp ứng miễn dịch tăng lên sau 14 ngày tiêm mũi thứ 2 (M2) với cùng hàm lượng kháng nguyên HA có trong vắc xin. Liều 3 µg/liều có mức đáp ứng miễn dịch cao nhất. Trong đó, cao nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 031214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 138,1 IU/ml, thấp nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 011214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 91,2 IU/ml. Trong khi đó, vắc xin thương mại đối chứng có mức đáp ứng miễn dịch trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 122,1 IU/ml (Hình 3.8).



**Hình 3. 9. Đáp ứng miễn dịch của chủng BX-51B (B) trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm**

Kết quả thí nghiệm đáp ứng miễn dịch của chủng BX-51B (B) cho thấy, sau 21 ngày tiêm mũi thứ nhất (M1), mức đáp ứng kháng thể của chủng X-179A (H1N1) trong cả 3 lô vắc xin thử nghiệm và vắc xin đối chứng đều thấp ở cả 3 liều kháng nguyên thử nghiệm (3 µg/liều, 1,5 µg/liều, 0,75 µg/liều), lượng kháng thể thu được tối đa đạt trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 6,2 IU/ml. Không có sự khác biệt nhiều về mức đáp ứng giữa các liều kháng nguyên HA khác nhau trong vắc xin. Đáp ứng miễn dịch tăng lên sau 14 ngày tiêm mũi thứ 2 (M2) với cùng hàm lượng kháng nguyên HA có trong vắc xin. Liều 3 µg/liều có mức đáp ứng miễn dịch cao nhất. Trong đó, cao nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 021214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 26,9 IU/ml, thấp nhất là lô vắc xin IVACFLU-S 011214 với lượng kháng thể thu được trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 23,2 IU/ml. Trong khi đó, vắc xin thương mại đối chứng có mức đáp ứng miễn dịch trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 20,2 IU/ml (Hình 3.9).

### 3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CÔNG HIỆU VÀ TÍNH ỔN ĐỊNH CÔNG HIỆU CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ, DẠNG MẢNH, BẤT HOẠT (IVACFLU-S)

**Bảng 3. 6. Kết quả nhân chủng sản xuất chủng vắc xin cúm mùa IVACFLU-S**

Chủng/lô sản xuất	Số lần cấy chuyển	Thời gian (h)	Nhiệt độ (°C)	Độ pha loãng	HA µg/ml	EID50/ml
X-179A (H1N1) Lô: X-179/0112/P2	2	72	35 ± 0,5	10 <sup>-4</sup>	320	10 <sup>8,83</sup>
X-223A (H3N2) Lô: WS 20914/P18	18	48	35 ± 0,5	10 <sup>-3</sup>	512	10 <sup>9,00</sup>
X-263B (H3N2) Lô: WS140516/P15	15	48	35 ± 0,5	10 <sup>-3</sup>	512	10 <sup>9,90</sup>
BX-51B (B) Lô: WS 140714/P9	9	56	34 ± 0,5	10 <sup>-3</sup>	64	10 <sup>8,52</sup>
BX-35 (B) Lô: WS 050616/P6	6	64	34 ± 0,5	10 <sup>-3</sup>	256	10 <sup>8,38</sup>

Nhân chủng nhằm mục đích thu được tại đời nuôi cấy chủng cúm đơn giá có hiệu giá chủng và hàm lượng kháng nguyên HA cao nhất.

Với các chủng cúm A/H1N1 lô X-179/0112/P2, nhiệt độ nuôi cấy là 35 ± 0,5°C, số lần cấy chuyển là 2, thời gian cấy là 72h, độ pha loãng chủng nhân lên tốt nhất là 10<sup>-4</sup>, hàm lượng HA là 320 HA µg/ml, hiệu giá chủng là 10<sup>8,83</sup>EID50/ml.

Chủng cúm A/H3N2 lô WS 20914/P18 nhiệt độ nuôi cấy là 35 ± 0,5°C, số lần cấy chuyển là 18, thời gian cấy là 48h, độ pha loãng chủng nhân lên tốt nhất là 10<sup>-3</sup>, hàm lượng kháng nguyên HA là 512 HA µg/ml, hiệu giá chủng là 10<sup>9,00</sup>EID50/ml. Chủng cúm A/H3N2 lô WS140516/P15 nhiệt độ nuôi cấy là 35 ± 0,5°C, số lần cấy chuyển là 15, thời gian cấy là 48h, độ pha loãng chủng nhân lên tốt nhất là 10<sup>-3</sup>, hàm lượng kháng nguyên HA là 512 HA µg/ml, hiệu giá chủng là 10<sup>9,90</sup>EID50/ml.

Chủng cúm B lô WS 140714/P9 nhiệt độ nuôi cấy là 34 ± 0,5°C, số lần cấy chuyển là 9, thời gian cấy là 56h, độ pha loãng chủng nhân lên tốt nhất là 10<sup>-3</sup>, hàm

lượng kháng nguyên HA là 64 HA  $\mu\text{g/ml}$ , hiệu giá chủng là  $10^{8,52}\text{EID}_{50}/\text{ml}$ . Chủng cúm B lô WS 050616/P6 nhiệt độ nuôi cấy là  $34 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , số lần cấy chuyển là 6, thời gian cấy là 64h, độ pha loãng chủng nhân lên tốt nhất là  $10^{-3}$ , hàm lượng kháng nguyên HA là 256 HA  $\mu\text{g/ml}$ , hiệu giá chủng là  $10^{8,38}\text{EID}_{50}/\text{ml}$  (Bảng 3.6).

### 3.2.1. Công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S

**Bảng 3. 7. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015**

Chủng	Tiêu chuẩn chất lượng tham khảo	Lô vắc xin IVACFLU- S			p*
		011214	021214	031214	
Chủng B	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	24,0	23,9	24,6	$>0,05$
Chủng H1N1	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	25,6	24,4	25,3	$>0,05$
Chủng H3N2	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	27,9	28,7	27,5	$>0,05$

\* *T-test*

Công hiệu các lô vắc xin IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 được kiểm định ngay sau sản xuất, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong các lô vắc xin dao động trung bình trong khoảng 23,9 – 28,7  $\mu\text{g}/\text{liều}$ . Trong đó, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt dao động trong khoảng 23,9 – 24,6  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 24,4 – 25,6  $\mu\text{g}/\text{liều}$  và 27,5 – 28,7  $\mu\text{g}/\text{liều}$ . Không có sự khác biệt về hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong 3 lô vắc xin IVACFLU-S mùa 2014 – 2015,  $p > 0,05$  (Bảng 3.7).

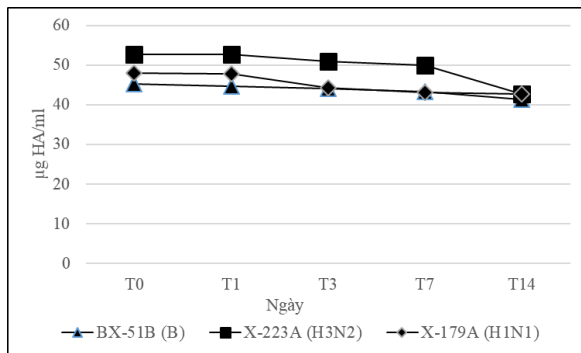
**Bảng 3. 8. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017**

Chủng	Tiêu chuẩn chất lượng tham khảo	Lô vắc xin IVACFLU- S			p*
		0040116	0050116	0060116	
Chủng B	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	17,9	17,8	19,6	$>0,05$
Chủng H1N1	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	19,7	19,7	20,4	$>0,05$
Chủng H3N2	$\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$	20,0	19,8	18,9	$>0,05$

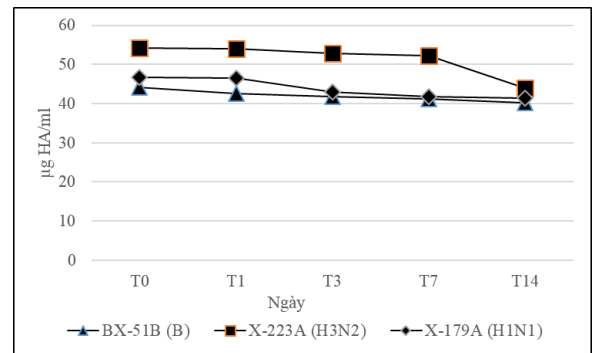
\* *T-test*

Công hiệu các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 – 2017 được kiểm định ngay sau sản xuất, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong các lô vắc xin dao động trung bình trong khoảng 17,8 – 20,4  $\mu\text{g}/\text{liều}$ . Trong đó, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt dao động trong khoảng 17,8 – 19,6  $\mu\text{g}/\text{liều}$ , 19,7 – 20,4  $\mu\text{g}/\text{liều}$  và 18,9 – 20,0  $\mu\text{g}/\text{liều}$ . Không có sự khác biệt về hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong 3 lô vắc xin IVACFLU-S mùa 2016 – 2017 (Bảng 3.8).

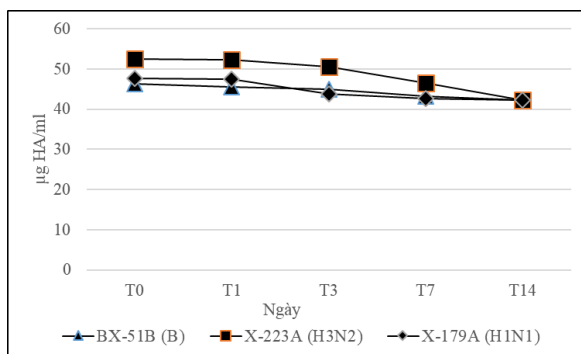
### 3.2.2. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S ở điều kiện thúc đẩy nhanh



**Lô 011214**



**Lô 021214**



**Lô 031214**

#### Ghi chú:

*T0: Sau khi sản xuất*

*T1: Sau 1 ngày bảo quản ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$*

*T3: Sau 3 ngày bảo quản ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$*

*T7: Sau 7 ngày bảo quản ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$*

*T14: Sau 14 ngày bảo quản ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$*

**Hình 3. 10. Tính ổn định hàm lượng kháng nguyên HA trong 03 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$**

Ở nhiệt độ thử thách  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , hàm lượng kháng nguyên HA của cả 3 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 đều giảm. Trong đó, mức giảm rõ rệt

nhận thấy ở ngày thứ 14 của quá trình thử thách. Mức độ giảm hàm lượng kháng nguyên HA trong các lô vắc xin có khác nhau, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Sau thời gian thử thách 14 ngày ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , hàm lượng kháng nguyên HA của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 vẫn đạt theo tiêu chuẩn tham chiếu, với hàm lượng kháng nguyên đơn giá vẫn đạt tối thiểu  $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$  (Hình 3.10).

**Bảng 3. 9. Tính ổn định hàm lượng kháng nguyên HA trong 03 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 - 2015 ở nhiệt độ  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$**

Thành phần (chủng)	Hàm lượng HA trung bình 3 lô IVACFLU-S mùa 2014-2015 ( $\mu\text{g HA/ml}$ )				Tỷ lệ giảm (%)
	T0	T1	T2	T3	
BX-51B (B)	45,33	44,03	43,13	42,33	6,61
X-223A (H3N2)	52,76	52,43	51,36	50,10	5,04
X-179A (H1N1)	48,06	46,03	44,91	44,22	7,99

T0, T1, T2, T3: Ngay sau khi sản xuất, sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày

Tại nhiệt độ thử thách  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sau 3 ngày bảo quản tại nhiệt độ này hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S giảm với tỷ lệ trung bình giao động trong khoảng 5,04 – 7,99% so với hàm lượng kháng nguyên HA ban đầu trong vắc xin. Trong đó, chủng X-179A (H1N1) có mức giảm cao nhất, chủng BX-51B (B) có mức giảm thấp nhất (Bảng 3.9).

### **3.2.3. Tính ổn định công hiệu theo thời gian của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S ở điều kiện bảo quản tiêu chuẩn**

Công hiệu của vắc xin cúm mùa được biểu thị bằng hàm lượng kháng nguyên HA của mỗi chủng có trong vắc xin cúm mùa. Theo tiêu chuẩn chất lượng cơ sở do IVAC đăng ký, hàm lượng kháng nguyên HA của mỗi chủng trong vắc xin cúm mùa không ít hơn  $15 \mu\text{g}$  trong 1 liều đơn vắc xin (0,5 ml) tương ứng  $30 \mu\text{g HA/ml}$ . Trong điều kiện bảo quản  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , công hiệu của vắc xin cần đảm bảo tiêu chuẩn

này tối thiểu 12 tháng (trong hạn sử dụng của vắc xin). Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá tính ổn định của vắc xin trong 15 tháng kể từ ngày xuất xưởng.

**Bảng 3. 10. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 011214 sau 15 tháng tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$**

Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA ( $\mu\text{gHA/ml}$ )		
	BX-51B (B)	X-179A (H1N1)	X-223A (H3N2)
T0	46,0	49,2	55,6
T3	43,8	46,2	49,2
T6	40,8	45,4	46,4
T9	39,2	44,0	42,6
T12	37,8	43,0	40,4
T15	36,4	41,2	34,4

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm lượng kháng nguyên HA các chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt là 36,4 $\mu\text{gHA/ml}$ , 41,2  $\mu\text{gHA/ml}$ , 34,4  $\mu\text{gHA/ml}$  (Bảng 3.10).

**Bảng 3. 11. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 021214 sau 15 tháng tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$**

Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA ( $\mu\text{gHA/ml}$ )		
	BX-51B (B)	X-179A (H1N1)	X-223A (H3N2)
T0	44,8	47,8	54,4
T3	42,8	44,4	49,4
T6	41,2	44,2	46,0
T9	38,8	43,0	43,0
T12	35,8	40,8	39,4
T15	33,8	38,6	34,8

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 021214 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm



lượng kháng nguyên HA các chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt là 33,8 $\mu$ gHA/ml, 38,6  $\mu$ gHA/ml, 34,8  $\mu$ gHA/ml (Bảng 3.11)

**Bảng 3. 12. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 031214 sau 15 tháng tại nhiệt độ 5°C  $\pm$  3°C**

Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA ( $\mu$ gHA/ml)		
	BX-51B (B)	X-179A (H1N1)	X-223A (H3N2)
T0	47,0	48,6	54,6
T3	43,4	45,2	48,6
T6	41,8	44,2	44,6
T9	39,6	43,0	42,0
T12	36,2	41,2	38,2
T15	34,4	37,4	34,2

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 031214 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C  $\pm$  3°C. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm lượng kháng nguyên HA các chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt là 34,4  $\mu$ gHA/ml, 37,4  $\mu$ gHA/ml, 34,2  $\mu$ gHA/ml (Bảng 3.12).

**Bảng 3. 13. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0040116 sau 15 tháng tại nhiệt độ 5°C  $\pm$  3°C**

Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA ( $\mu$ gHA/ml)		
	BX-35B (B)	X-179A (H1N1)	X- 263B (H3N2)
T0	40,4	39,2	40,6
T3	38,0	37,0	36,8
T6	37,0	36,4	36,2
T9	36,0	35,2	34,8
T12	33,6	32,4	32,8
T15	31,8	31,6	31,4

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 0040116 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C  $\pm$  3°C. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm

lượng kháng nguyên HA các chủng BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2) lần lượt là 31,8 µgHA/ml, 31,6 µgHA/ml, 31,4 µgHA/ml (Bảng 3.13).

**Bảng 3. 14. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0050116 sau 15 tháng tại nhiệt độ 5°C ± 3°C**

Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA (µgHA/ml)		
	BX-35B (B)	X-179A (H1N1)	X- 263B (H3N2)
<b>T0</b>	41,2	40,4	39,8
<b>T3</b>	37,6	38,2	38,0
<b>T6</b>	37,0	36,8	37,2
<b>T9</b>	35,4	34,2	33,6
<b>T12</b>	33,8	33,0	32,4
<b>T15</b>	31,2	32,0	31,6

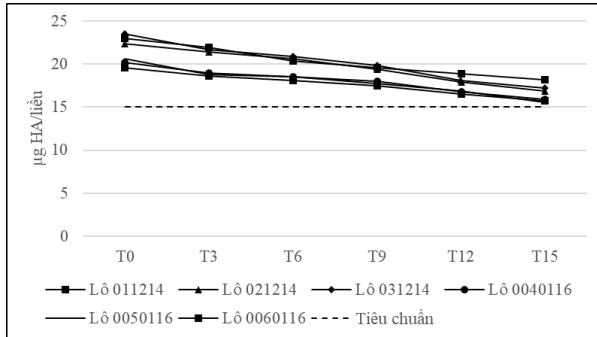
Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 0040116 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C ± 3°C. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm lượng kháng nguyên HA các chủng BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2) lần lượt là 31,2 µgHA/ml, 32,0 µgHA/ml, 31,6 µgHA/ml (Bảng 3.14).

**Bảng 3. 15. Tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô số 0060116 sau 15 tháng tại nhiệt độ 5°C ± 3°C**

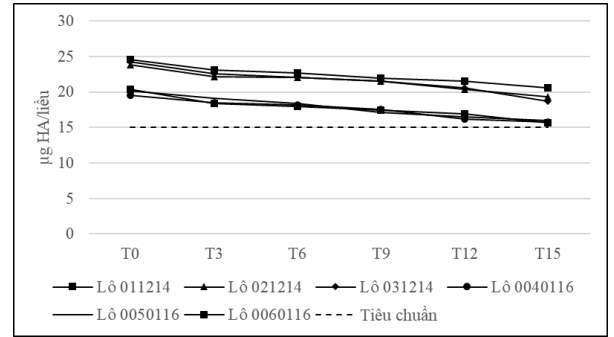
Thời điểm nghiên cứu	Hàm lượng HA (µgHA/ml)		
	BX-35B (B)	X-179A (H1N1)	X- 263B (H3N2)
<b>T0</b>	39,2	40,8	41,0
<b>T3</b>	37,2	36,8	38,8
<b>T6</b>	36,2	36,0	37,4
<b>T9</b>	35,0	35,0	34,6
<b>T12</b>	33,0	33,8	32,2
<b>T15</b>	31,4	31,4	31,8

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 0040116 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C ± 3°C. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm

lượng kháng nguyên HA các chủng BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2) lần lượt là 31,4 $\mu$ gHA/ml, 31,4 $\mu$ gHA/ml, 31,8 $\mu$ gHA/ml (Bảng 3.15).



### Chủng B



### Chủng A/H1N1

#### Ghi chú:

T0: Sau khi sản xuất

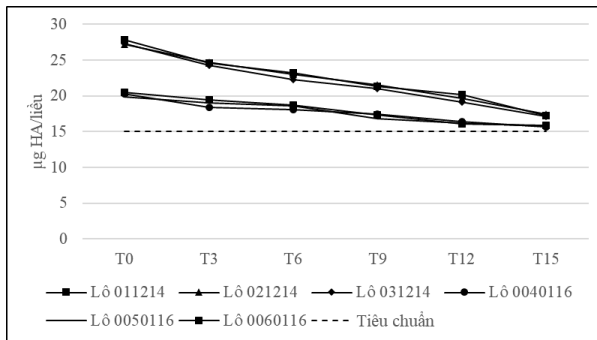
T3: Sau 3 tháng bảo quản ở 5°C ± 3°C

T6: Sau 6 tháng bảo quản ở 5°C ± 3°C

T9: Sau 9 tháng bảo quản ở 5°C ± 3°C

T12: Sau 12 tháng bảo quản ở 5°C ± 3°C

T15: Sau 15 tháng bảo quản ở 5°C ± 3°C



### Chủng A/H3N2

**Hình 3. 11. Kết quả chung đánh giá độ ổn định công hiệu của 6 lô vắc xin cúm IVACFLU-S bảo quản ở nhiệt độ 5°C ± 3°C**

Kết quả đánh giá cho thấy, 6 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được bảo quản ở nhiệt độ 5°C ± 3°C có công hiệu giảm dần theo thời gian. Tuy nhiên, sau 15 tháng kể từ ngày xuất xưởng bảo quản ở nhiệt độ 5°C ± 3°C, hàm lượng kháng nguyên HA của các đơn giá trong vắc xin vẫn đạt tiêu chuẩn tham chiếu của nhà sản xuất, hàm lượng HA đơn giá  $\geq 15,0\mu$ gHA/liều (Hình 3.11).

**Bảng 3. 16. Đánh giá chất lượng lô bán thành phẩm sản xuất vắc xin cúm mùa IVACFLU-S**

Thông số	Tiêu chuẩn cơ sở	Lô sản xuất		
		CT-S/ H1N1/01	CT-S/ H3N2/04	CT-S/ B/07
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô khuẩn	Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày theo dõi	100% Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn	100% Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn	100% Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn
pH	6,5 - 7,5	7,03	7,02	7,03
Hàm lượng HA( $\mu\text{g/ml}$ )	$\geq 45 \mu\text{gHA/ml}$	204,6	247,2	115,5
Endotoxin (EU/45 $\mu\text{gHA}$ )	$\leq 300 \text{ EU/45 } \mu\text{gHA}$	1,8	0,09	3,1
Protein tổng số ( $\mu\text{g} /45 \mu\text{gHA}$ )	$\leq 300 \mu\text{g Protein/45 } \mu\text{gHA}$	133,8	63,9	234,3
Formaldehyde (%)	$\leq 0,02\%$	0,0001	0,0002	0,0001

Vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015 được sản xuất từ 3 loại kháng nguyên đơn giá dạng mảnh lô CT-S/ H1N1/01 (A/H1N1), CT-S/ H3N2/04 (H3/N2), CT-S/ B/07 (B). Chất lượng kháng nguyên dạng mảnh được đánh giá với nhiều tiêu chí như cảm quan, vô khuẩn, pH, hàm lượng HA, chất gây sốt, protein tổng số, tồn dư formaldehyd và một số tiêu chí khác. Các lô kháng nguyên cúm mùa được sản xuất đều đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn cơ sở của IVAC áp dụng cho vắc xin cúm mùa dạng mảnh. Trong đó, hàm lượng HA tùy lô kháng nguyên được cô đặc dao động ở mức 115,5 – 247,2  $\mu\text{g/ml}$ , với tiêu chuẩn cơ sở là từ 45  $\mu\text{g/ml}$ . Hàm lượng chất gây sốt (endotoxin) dao động ở mức 0,09 – 1,8 EU/45

$\mu\text{gHA}$ , phù hợp với TCSC là  $\leq 300 \text{ EU}/45 \mu\text{gHA}$ . Hàm lượng protein tổng số dao động khoản  $63,9 - 234 \mu\text{g Protein}/45 \mu\text{gHA}$  tùy lô kháng nguyên, phù hợp TCCS  $\leq 300 \mu\text{g Protein}/45 \mu\text{gHA}$  (Bảng 3.16).

**Bảng 3. 17. Thông tin chung về 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU- S mùa 2014 - 2015**

Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn chất lượng tham khảo	Lô vắc xin IVACFLU- S		
		011214	021214	031214
Thể tích	$\geq 0,5 \text{ ml}$	0,56	0,58	0,56
Cảm quan (% đạt)	Đồng nhất, trắng mờ, không có cặn	100	100	100
pH	6,5 – 7,5	7,00	6,99	7,01
Vô khuẩn (% đạt)	Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày theo dõi	100	100	100
Công hiệu	Chủng B ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	24,0	23,9	24,6
	Chủng H1N1 ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	25,6	24,4	25,3
	Chủng H3N2 ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	27,9	28,7	27,5
Nhận dạng HA (% đạt)	Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu	100	100	100
Endotoxin	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	9,6	9,6	9,6
Protein tổng	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	171,3	156,2	161,9

số				
Formaldehy de tồn dư	$\leq 0,02\%$	0,0001	0,0001	0,0001
An toàn chung trên chuột nhắt	Toàn bộ chuột sống khoẻ mạnh, lên cân sau 7 ngày (% TBTL tăng)	113,2	108,5	110,0
An toàn chung trên chuột lang	Toàn bộ chuột sống khoẻ mạnh, lên cân sau 7 ngày(% TBTL tăng)	138,7	142,2	131,8

Ba lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 (011214, 021214, 031214) đều đạt các chỉ tiêu chất lượng khi kiểm nghiệm ngay sau khi sản xuất tại IVAC. Liều đóng gói là 0,5 ml/liều. Kết quả đánh giá công hiệu dao động tùy lô vắc xin và tùy loại kháng nguyên đơn giá được phối hợp trong vắc xin nhưng đều đảm bảo tiêu chuẩn  $\geq 15 \mu\text{gHA/liều}$  đối với mỗi loại kháng nguyên đơn giá. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kháng nguyên đơn giá chủng B, chủng A/H1N1, chủng A/H3/N2 đạt lần lượt là 23,9 – 24,6  $\mu\text{gHA/liều}$ , 24,4 – 25,6  $\mu\text{gHA/liều}$ , 27,5 – 28,7  $\mu\text{gHA/liều}$  (Bảng 3.17).

**Bảng 3. 18. Thông tin chung về 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU- S mùa 2016 - 2017**

Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn chất lượng tham khảo	Lô vắc xin IVACFLU- S		
		0040116	0050116	0060116
Thể tích	$\geq 0,5 \text{ ml}$	0,59	0,59	0,59
Cảm quan (% đạt)	Đồng nhất, trắng mờ, không có cặn	100	100	100
pH	6,5 – 7,5	7,04	7,05	7,05

Vô khuẩn (% đạt)	Không có sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày theo dõi	100	100	100
Công hiệu	Chủng B ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	17,9	17,8	19,6
	Chủng H1N1 ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	19,7	19,7	20,4
	Chủng H3N2 ( $\geq 15 \mu\text{g}/\text{liều}$ )	20,0	19,8	18,9
Nhận dạng HA (% đạt)	Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu	100	100	100
Endotoxin	$\leq 100 \text{ EU}/\text{liều}$	8	8	8
Protein tổng số	$\leq 300 \mu\text{g}/\text{liều}$	288,5	299,5	299,3
Formaldehy de tồn dư	$\leq 0,02\%$	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$
An toàn chung trên chuột nhắt	Toàn bộ chuột sống khoẻ mạnh, lên cân sau 7 ngày (% TBTL tăng)	109,8	111,2	115,6
An toàn chung trên chuột lang	Toàn bộ chuột sống khoẻ mạnh, lên cân sau 7 ngày (% TBTL tăng)	128,8	140,5	133,6

Ba lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 – 2017 (0040116, 0050116, 0060116) đều đạt các chỉ tiêu chất lượng khi kiểm nghiệm ngay sau khi sản xuất tại IVAC. Liều đóng gói là 0,5 ml/liều. Kết quả đánh giá công hiệu dao động tùy lô vắc xin và tùy loại kháng nguyên đơn giá được phối hợp trong vắc xin nhưng đều đảm bảo tiêu chuẩn  $\geq 15 \mu\text{gHA}/\text{liều}$  đối với mỗi loại kháng nguyên đơn giá. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kháng nguyên đơn giá chủng B, chủng A/H1N1,

chủng A/H3/N2 đạt lần lượt là 17,8 – 19,6 µgHA/liều, 19,7 – 20,4 µgHA/liều, 18,9 – 20,0 µgHA/liều (Bảng 3.18).

### 3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ ỔN ĐỊNH CÁC TÍNH CHẤT HOÁ LÝ CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ, DẠNG MẢNH, BẤT HOẠT IVACFLU-S

**Bảng 3. 19. Đánh giá ổn định chỉ tiêu pH của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015**

Thời điểm NC	Mùa 2014-2015			TC tham chiếu
	011214	021214	031214	
<b>T0</b>	7,04	7,03	7,04	6,5 - 7,5
<b>T3</b>	7,06	7,05	7,05	6,5 - 7,5
<b>T6</b>	6,98	6,97	6,98	6,5 - 7,5
<b>T9</b>	7,00	7,00	7,00	6,5 - 7,5
<b>T12</b>	7,00	7,00	7,02	6,5 - 7,5
<b>T15</b>	7,01	7,01	7,01	6,5 - 7,5
<b>p*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	

\* *T-test, T0-T15*

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.19 cho thấy, pH của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 ổn định, dao động trong khoảng 6,97 – 7,04. Sau 15 tháng bảo quản ở nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  tính từ ngày xuất xưởng, pH các lọ vắc xin được kiểm tra vẫn nằm trong tiêu chuẩn cho phép theo TCCS đăng ký của IVAC. Không có sự khác biệt về giá trị trung bình pH của các lọ vắc xin thuộc lô 011214, 021214, 031214 được kiểm định tại thời điểm xuất xưởng và thời điểm sau 15 tháng bảo quản,  $p > 0,05$ .



**Bảng 3. 20. Đánh giá ổn định chỉ tiêu pH của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017**

Thời điểm NC	Mùa 2016-2017			TC tham chiếu
	0040116	0050116	0060116	
<b>T0</b>	7,03	7,04	7,04	6,5 - 7,5
<b>T3</b>	7,04	7,06	7,06	6,5 - 7,5
<b>T6</b>	7,05	7,06	7,06	6,5 - 7,5
<b>T9</b>	7,07	7,07	7,08	6,5 - 7,5
<b>T12</b>	7,05	7,05	7,06	6,5 - 7,5
<b>T15</b>	7,22	7,20	7,22	6,5 - 7,5
<b>p*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	

\* *T-test, T0-T15*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, pH của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 – 2017 ổn định, dao động trong khoảng 7,03 – 7,22. Sau 15 tháng bảo quản ở nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  tính từ ngày xuất xưởng, pH các lọ vắc xin được kiểm tra vẫn nằm trong tiêu chuẩn cho phép theo TCCS đăng ký của IVAC. Không có sự khác biệt về giá trị trung bình pH của các lọ vắc xin thuộc lô 0040116, 0050116, 0060116 được kiểm định tại thời điểm xuất xưởng và thời điểm sau 15 tháng bảo quản,  $p > 0,05$  (Bảng 3.20).

**Bảng 3. 21. Đánh giá ổn định chỉ tiêu hàm lượng protein tổng số của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015**

Thời điểm NC	Hàm lượng Protein Tổng số ( $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ )			Tiêu chuẩn tham chiếu
	011214	021214	031214	
<b>T0</b>	257,8	257,8	258,1	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$
<b>T3</b>	256,4	256,6	256,9	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$
<b>T6</b>	254,4	254,4	255,0	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$
<b>T9</b>	239,4	250,0	241,7	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$
<b>T12</b>	217,4	225,6	203,7	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$
<b>T15</b>	205,5	215,7	196,2	$\leq 300\mu\text{g}/45 \mu\text{gHA}$

Kết quả nghiên cứu 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 cho thấy, hàm lượng protein tổng số của các lọ vắc xin thử nghiệm giảm dần theo thời gian. Tại thời điểm sau khi xuất xưởng, hàm lượng trung bình protein tổng số của các lô vắc xin 011214, 021214, 031214 lần lượt là 257,8  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 257,8  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$  và 258,1  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ . Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , hàm lượng trung bình protein tổng số của các lô vắc xin 011214, 021214, 031214 lần lượt là 205,5  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 215,7  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 196,2  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$  (Bảng 3.21).

**Bảng 3. 22. Đánh giá ổn định chỉ tiêu hàm lượng protein tổng số của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017**

Thời điểm NC	Hàm lượng Protein Tổng số ( $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ )		
	0040116	0050116	0060116
T0	289,5	291,6	295,8
T3	299,7	295,1	295,6
T6	295,3	294,4	297,3
T9	293,7	288,4	288,7
T12	294,2	297,6	292,3
T15	281,3	275,1	279,1

Kết quả nghiên cứu 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 – 2017 cho thấy, hàm lượng protein tổng số của các lọ vắc xin thử nghiệm giảm dần theo thời gian. Tại thời điểm sau khi xuất xưởng, hàm lượng trung bình protein tổng số của các lô vắc xin 0040116, 0050116, 0060116 lần lượt là 289,5  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 291,6  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$  và 295,8  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ . Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , hàm lượng trung bình protein tổng số của các lô vắc xin 0040116, 0050116, 0060116 lần lượt là 281,3  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 275,1  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$ , 279,1  $\mu\text{g}/45\mu\text{gHA}$  (Bảng 3.22).

**Bảng 3. 23. Đánh giá ổn định chỉ tiêu vô khuẩn, cảm quan, chất gây sốt của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015**

Tiêu chuẩn	Lô số 011214			Lô số 021214			Lô số 031214		
	T0	T12	T15	T0	T12	T15	T0	T12	T15
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Endotoxin ( $\leq 100$ EU/liều)	2,5	2,5	1,0	2,5	2,5	1,0	2,5	2,5	1,0

Kết quả đánh giá tính ổn định một số tính chất hóa lý khác của vắc xin bao gồm vô khuẩn, cảm quan, nội độc tố. Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , các lọ vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015 vẫn đảm bảo được các yêu cầu về vô khuẩn, cảm quan và nội độc tố (Bảng 3.23).

**Bảng 3. 24. Đánh giá ổn định chỉ tiêu vô khuẩn, cảm quan, chất gây sốt của 03 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016 - 2017**

Tiêu chuẩn	Lô số 0040116			Lô số 0050116			Lô số 0060116		
	T0	T12	T15	T0	T12	T15	T0	T12	T15
Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Endotoxin ( $\leq 100$ EU/liều)	2,3	2,2	1,2	2,5	2,1	1,1	2,2	1,9	1,0

Kết quả đánh giá tính ổn định một số tính chất hóa lý khác của vắc xin bao gồm vô khuẩn, cảm quan, nội độc tố. Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , các lọ vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017 vẫn đảm bảo được các yêu cầu về vô khuẩn, cảm quan và nội độc tố (Bảng 3.24).

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG VÀ ÁP DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ IVACFLU-S TẠI VIỆT NAM

##### 4.1.1. *Phương pháp và ý nghĩa của đánh giá tiền lâm sàng trong nghiên cứu và sản xuất vắc xin*

Nghiên cứu tiền lâm sàng là một trong các bước quan trọng của quy trình nghiên cứu và sản xuất vắc xin nhằm đảm bảo an toàn trước khi vắc xin được sử dụng trên người. Trong đó, mục tiêu cuối cùng của các nghiên cứu tiền lâm sàng là mô hình hóa chính xác tác dụng sinh học mong muốn của vắc xin trên động vật thí nghiệm để dự đoán hiệu quả sử dụng của vắc xin trên người [88]. Thử nghiệm tiền lâm sàng cũng giúp mô tả đặc điểm của tất cả các độc tính liên quan đến vắc xin để dự đoán các tác dụng phụ ở con người khi sử dụng chúng và có những cảnh báo phù hợp. Các yêu cầu này cũng được WHO và Bộ Y tế khuyến cáo và quy định áp dụng đối với các loại vắc xin như vắc xin cúm mùa [2, 3, 112]. Hiện nay, các nghiên cứu tiền lâm sàng thường đi sâu vào các nghiên cứu xác định các tác dụng sinh học không mong muốn từ đó thiết lập liều phù hợp của vắc xin đối với con người. Đây cũng là một trong các yêu cầu quan trọng của quá trình nghiên cứu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S.

Trong nghiên cứu này, các thử nghiệm tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thực hiện cả invitro và invivo tùy thuộc vào phương pháp kiểm định được áp dụng. Các nghiên cứu invitro được thực hiện gồm xác định pH, cảm quan, vô khuẩn, hàm lượng kháng nguyên HA. Các thử nghiệm invivo gồm xác định độc tính, an toàn đặc hiệu, an toàn chung, tính sinh miễn dịch. Các thử nghiệm trong nghiên cứu này được thiết lập phù hợp với khuyến cáo của TCYT TG

và quy định của Bộ Y tế [2, 3, 112] về đánh giá tiền lâm sàng áp dụng cho nghiên cứu và sản xuất vắc xin. Nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng đã chỉ ra sự phù hợp giữa dữ liệu tiền lâm sàng với các kết quả thử nghiệm lâm sàng. Nghiên cứu của Bugelski và cộng sự (2012) cho thấy sự phù hợp về dữ liệu tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm với các dấu hiệu lâm sàng được ghi nhận trên người bệnh của 15 loại kháng thể đơn dòng được nghiên cứu và sử dụng trong điều trị bệnh [22, 62]. Mặc dù vẫn có những khác biệt về kết quả thử nghiệm tiền lâm sàng và kết quả điều trị lâm sàng trên con người nhưng sự khác biệt này cũng được chứng minh là do sự khác biệt về di truyền học giữa chuột thí nghiệm và con người.

Trong nghiên cứu tiền lâm sàng, nghiên cứu đánh giá độc tính của vắc xin nhằm xác định bất cơ quan đích nào ở các mức độ khác nhau của độc tính nếu có từ vắc xin. Kết quả này giúp thiết lập liều lượng và cách dùng phù hợp áp dụng cho vắc xin được nghiên cứu. Các nghiên cứu độc tính thường được thực hiện trên các động vật khỏe mạnh và tuân thủ các quy định nghiêm ngặt về thực hành phòng thí nghiệm tốt [30]. Trong nghiên cứu này, vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được xác định độc tính thông qua các thử nghiệm tế bào học và sinh hóa. Các thử nghiệm này giúp xác định độc tính của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lên các cơ quan đích như gan, phổi, thận, lách, tủy và một số chức năng khác thông qua các chỉ số sinh hóa và huyết học. Các thử nghiệm tế bào học được đánh giá bởi các phòng xét nghiệm đạt chuẩn của Viện IVAC và Khoa Giải phẫu – Đại học Y dược Huế.

Một số hướng dẫn về thử nghiệm tiền lâm sàng cũng lưu ý rằng, thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm cần phân biệt với các thử nghiệm dược lý của vắc xin. Trong khuôn khổ thử nghiệm tiền lâm sàng sẽ không thực hiện đánh giá đặc tính dược lý của vắc xin. Đặc tính dược lý của vắc xin cần được thực hiện trên các thiết kế nghiêm ngặt sử dụng động vật thí nghiệm và được thực hiện trước các nghiên cứu về độc tính trong khuôn khổ nghiên cứu tiền lâm sàng [30]. Trong nghiên cứu này, các thử nghiệm độc tính được thực hiện cũng không nhằm mô tả đặc tính dược lý của vắc xin, các kết quả đánh giá chỉ nhằm mô tả các ảnh hưởng

độc không mong muốn của vắc xin trên các cơ quan đích. Các tác động bao gồm cả các ảnh hưởng cơ học tại nơi tiêm và các chuyển hóa tại các cơ quan nội tạng. Trong một khía cạnh khác về thử nghiệm độc học, một số hoạt tính dược lý cũng có thể xuất hiện trên các động vật thử nghiệm thông thường và có thể quan sát được. Các nghiên cứu gọi đó là dược lý phóng đại [34]. Tuy nhiên, các đặc tính của dược lý phóng đại không được thực hiện khi triển khai các nghiên cứu độc tính của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S trong nghiên cứu này.

Tính sinh miễn dịch của vắc xin là một trong các đặc tính quan trọng hàng đầu cần được đánh giá tiền lâm sàng. Bởi tính sinh miễn dịch cho biết hiệu quả bảo vệ đối tượng sử dụng vắc xin nhưng cũng tiềm ẩn các phản ứng phụ do tính lạ của kháng nguyên đối với cơ thể [100]. Do vậy, cần tiến hành đánh giá rủi ro đối với mọi liệu pháp sinh học đang được phát triển để tăng cường tính sinh miễn dịch, cũng như giảm thiểu mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ gây ra. Đa số các nỗ lực nghiên cứu trong thực nghiệm sản xuất vắc xin và các mô hình lý thuyết đều hướng tới việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch trong môi trường tiền lâm sàng, với mục đích dự đoán khả năng sinh miễn dịch trước khi thử nghiệm lâm sàng. Nhiều rủi ro có thể xảy ra khi đưa một kháng nguyên lạ vào cơ thể dưới các hình thức khác nhau như sốc phản vệ, hội chứng giải phóng cytokine, tương tác thuốc hoặc chức chế nội sinh [60, 93, 101]. Trong đó, liều lượng và phác đồ sử dụng là một trong các yếu tố quan trọng để hài hòa tăng đặc tính sinh miễn dịch và giảm các tác dụng phụ không mong muốn. Trong nghiên cứu tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, các liều lượng kháng nguyên HA khác nhau đã được sử dụng (0,75  $\mu\text{gHA}/\text{liều}$ , 1,5  $\mu\text{gHA}/\text{liều}$ , 3,0  $\mu\text{gHA}/\text{liều}$ ) và phác đồ hai mũi tiêm cách nhau 21 ngày đã cho thấy sự khác biệt về tính sinh miễn dịch trên nhóm động vật thử nghiệm. Sau mũi tiêm thứ 2, khả năng sinh miễn dịch của nhóm chuột thử nghiệm đã được cải thiện rõ ràng và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các liều kháng nguyên HA được sử dụng. Trong đó, sự khác biệt nhiều nhất ghi nhận ở liều lượng 3,0  $\mu\text{gHA}/\text{liều}$  (Hình 3.7, 3.8, 3.9).

Trong nghiên cứu tiền lâm sàng, các thử nghiệm trên động vật là phương pháp được sử dụng khá phổ biến. Các bằng chứng đều cho thấy có sự tương đồng về dược lực học và dược tính của vắc xin trên một số loài gặm nhấm hoặc động vật linh trưởng với con người. Kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm giúp mô hình hóa hiệu quả tác dụng của vắc xin trên con người. Các phương pháp mô hình hóa này đã được chứng minh nhiều ở các nhóm vắc xin kinh điển như vắc xin phòng lao, ho gà, sởi, bại liệt ... [63, 113, 115]. Một trong các lý do để đưa vắc xin vào các giai đoạn thử nghiệm tiếp theo là nó đã chứng minh khả năng sinh miễn dịch và đảm bảo các mức độ an toàn trên động vật thử nghiệm. Trong nghiên cứu tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, chuột nhắt trắng được lựa chọn để thử nghiệm tính sinh miễn dịch, an toàn chung; chuột lang được lựa chọn thử nghiệm an toàn chung; thỏ được lựa chọn thử nghiệm độc tính, chất gây sốt. Tuy nhiên, phương pháp thử nghiệm trên động vật không phải lúc nào cũng là ưu tiên được lựa chọn. Trong những năm gần đây, xu hướng giảm sử dụng động vật trong các thử nghiệm thuốc và vắc xin cũng đã được thảo luận và khuyến nghị áp dụng [27, 80]. Các phương pháp mới hướng tới cải tiến quy trình thử nghiệm, giảm số lượng động vật thử nghiệm được sử dụng và thay thế các phương pháp thử nghiệm sử dụng động vật bằng các phương pháp invitro hoặc mô hình hóa bằng toán học [16, 27, 119]. Một lý do khác nữa để chúng ta hướng tới các phương pháp thử nghiệm giảm sử dụng động vật thí nghiệm đó là sự khiếm khuyết về di truyền giữa động vật thí nghiệm và con người. Do vậy, các dữ liệu thử nghiệm từ các loài gặm nhấm thay thế sẽ bị hạn chế. Trong đó, có các tình huống mà mô hình động vật thử nghiệm không thể mô phỏng đúng các điều kiện hoặc phản ứng của con người. Từ đó cho thấy các kết luận về việc chỉ sử dụng các mô hình thử nghiệm trên động vật là đủ trong việc dự đoán dược lực học của vắc xin trên con người. Do vậy, khi có những loài động vật thí nghiệm gần với con người hơn các loài gặm nhấm, như các loài linh trưởng, thì cũng có những khuyến nghị nên tiếp tục thử nghiệm tiền lâm sàng trên các nhóm động vật này trước khi đưa vắc xin vào thử nghiệm lâm sàng. Vì nhiều tác giả cũng đồng tình rằng các kết quả nghiên cứu tiền

lâm sàng có thể không bao giờ đạt được hoàn toàn và đảm bảo 100% để chúng ta có thể phê duyệt một vắc xin, sinh phẩm hoặc thuốc là hiệu quả và an toàn khi sử dụng trên người tỷ lệ thành công cho việc phê duyệt thuốc mới vẫn còn thấp do không đạt hiệu quả và an toàn[45, 92].

#### ***4.1.2. Đánh giá an toàn và độc tính tiền lâm sàng trong nghiên cứu và sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S***

Tiêm chủng là một công cụ hữu ích và phổ biến để ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm. Bởi vì hầu hết các loại vắc xin có nguồn gốc từ vi rút, vi khuẩn, độc tố bất hoạt hoặc các vật liệu di truyền tái tổ hợp có khả năng kích thích cơ thể sinh miễn dịch bảo vệ. Tuy nhiên, quy trình thu gặt hoặc tinh chế các kháng nguyên để sản xuất vắc xin có nguy cơ bội nhiễm hoặc bất hoạt không hoàn toàn có thể gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng. Do vậy, quy định trong nghiên cứu sản xuất vắc xin thì tính an toàn của vắc xin luôn được đặt lên hàng đầu. Các quy định này đã được luật hóa và mỗi lô vắc xin phải được kiểm tra bởi các cơ quan kiểm định Quốc gia, sử dụng các phương pháp thử nghiệm chuẩn theo hướng dẫn của các cơ quan chuyên môn có uy tín như Dược điển Châu Âu, Dược điển Hoa Kỳ và Tổ chức Y tế Thế giới [37, 87]. Sau sự cố chủng ngừa độc tố bạch hầu ở Nhật Bản năm 1950 gây ra cái chết của 68 trẻ em và hơn 600 trẻ sơ sinh bị bệnh do nhiễm độc do bất hoạt hoàn toàn DT [50], xét nghiệm đánh giá độc tính bất thường của vắc xin đã được giới thiệu với các hướng dẫn của Nhật Bản. Các đánh giá độc tính bất thường này bao gồm cả các đánh giá về an toàn chung đối với các chất hấp phụ, các chất bất thường và cả độc tính đặc hiệu của kháng nguyên được sử dụng sản xuất vắc xin. Do vậy, trong nghiên cứu tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, các đánh giá tính an toàn cũng được thực hiện trên các lô nước cốt sản xuất vắc xin và các lô vắc xin thành phẩm.

Thử nghiệm an toàn đặc hiệu được thực hiện với nước cốt vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S nhằm xác định độc tính đặc hiệu của kháng nguyên HA trong vắc xin khi sử dụng. Thử nghiệm này được thực hiện trên trứng gà có phôi 10 - 11



ngày tuổi theo hướng dẫn của WHO/TRS 927, 2005[113]. Kết quả thử nghiệm an toàn đặc hiệu cho biết kháng nguyên HA của vi rút cúm trong sản phẩm còn khả năng nhân lên hoặc gây độc cho phôi gà hay không. Các loại nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá với 3 chủng vi rút cúm chủng X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B). Kết quả đánh giá cho thấy 100% trứng được thử nghiệm có phôi còn sống và nước gặt dịch niệu của các trứng thử nghiệm âm tính với HA. Kết quả này chứng minh rằng vi rút cúm trong các nước cốt không còn khả năng nhân lên và không gây độc cho trứng. Kháng nguyên HA là một trong các dấu ấn sinh học quan trọng nhất để xác định độc tính đặc hiệu của vắc xin cúm. Một số nghiên cứu đã chỉ ra 20 dấu ấn sinh học khác nhau cùng kháng nguyên HA có thể đặc trưng cho tính an toàn đặc hiệu của vắc xin cúm được gọi là kỹ thuật tiếp cận sinh học hệ thống[65]. Nghiên cứu của T. Mizukami và các cộng sự (2014) thực hiện trên vắc xin cúm thành phẩm của 4 nhà sản xuất nhằm xác định khả năng sử dụng các dấu ấn sinh học khác của vi rút cúm để đánh giá tính an toàn của vắc xin. Vắc xin cúm mùa là một trong những loại vắc xin thương mại được sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới để ngăn ngừa bệnh cúm theo mùa và các biến chứng của nó. Lịch sử nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm mùa ghi nhận sự tiến bộ của công nghệ sản xuất từ vắc xin vi rút cúm toàn phần được cấp phép lần đầu tại Mỹ năm 1945 [17] và vẫn được sử dụng ở một số quốc gia. Các loại vắc xin cúm mùa toàn tế bào sử dụng tất cả các thành phần vi rút và tạo ra khả năng miễn dịch mạnh mẽ ở người được tiêm chủng, nhưng tỷ lệ cao các tác dụng phụ, bao gồm các phản ứng cục bộ tại chỗ tiêm, sốt, đặc biệt là ở trẻ em đã được ghi nhận [74, 116]. Các phản ứng phụ này đã được cải thiện đáng kể khi vắc xin cúm mùa với kháng nguyên dạng mảnh ra đời. Vắc xin dạng mảnh cũng tạo tiền đề cho việc phối hợp nhiều chủng vi rút cúm trong một liều vắc xin hay còn gọi là vắc xin đa giá như vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được phát triển trong nghiên cứu này [25, 108]. Tuy nhiên, cho dù các công nghệ được nghiên cứu và phát triển ngày càng tiên tiến, hiện đại, các xét nghiệm đánh giá an toàn trong giai đoạn tiền lâm sàng và xuất xưởng lô không thay đổi ở hầu hết các quốc gia, kể cả ở Nhật Bản. Do vậy, trong nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm mùa

tam giá IVACFLU-S, thử nghiệm an toàn chung và an toàn đặc hiệu vẫn là những thử nghiệm được triển khai đầu tiên. Cách tiếp cận kỹ thuật sinh học hệ thống không chỉ được áp dụng với vắc xin cúm mùa tam giá mà còn được áp dụng với nhiều loại vắc xin khác như vắc xin tam liên bạch hầu – ho gà – uốn ván, vắc xin viêm não Nhật bản [39, 66].

Ngoài tính an toàn đặc hiệu, an toàn chung cũng là một trong các tiêu chí cần đánh giá trong nghiên cứu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S. Các công nghệ sản xuất vắc xin tiên tiến, hiện đại từ vắc xin toàn tế bào, vắc xin dạng mảnh và vắc xin tái tổ hợp. Tuy nhiên, các chất hấp phụ và/hoặc tá dược là yếu tố không thể thiếu trong công nghệ vắc xin. Các chất này thường được sử dụng trong vắc xin thành phẩm, chính vì vậy trong nghiên cứu tiền lâm sàng chúng tôi đã sử dụng 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 -2015, lô 011214, 021214 và 031214. Phương pháp thử nghiệm kinh điển trên động vật thí nghiệm được sử dụng với 2 nhóm chuột lang và chuột nhắt. Tiêu chuẩn đánh giá được sử dụng là khả năng sống sót và tăng trọng lượng của chuột sau 7 ngày theo dõi. Trong nghiên cứu này, giả dược đã được sử dụng để đối chứng với vắc xin thử nghiệm. Sau 7 ngày tiêm vắc xin, chuột thử nghiệm tăng trọng bình thường, khỏe mạnh và không có sự khác biệt về mức tăng trọng của chuột tiêm vắc xin và giả dược (Bảng 3.2, 3.3). Kết quả này phù hợp với tiêu chuẩn an toàn chung áp dụng cho vắc xin cúm mùa khi đánh giá xuất xưởng [4, 5]. Kết quả này cũng tương đồng với thử nghiệm của T. Mizukami và các cộng sự (2014) trong nghiên cứu đánh giá tiền lâm sàng của 4 loại vắc xin cúm mùa dạng mảnh [65]. Trong nghiên cứu của T. Mizukami và các cộng sự, một giá trị tham chiếu khác được sử dụng để đánh giá độc tính của vắc xin là số lượng bạch cầu. Với 4 loại vắc xin cúm mùa của 4 nhà sản xuất khác nhau đã được đánh giá an toàn xuất xưởng, không thấy có sự khác biệt đáng kể về số lượng bạch cầu của giữa các nhóm chuột sau khi tiêm vắc xin [65]. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả thử nghiệm của nghiên cứu tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S với kết quả bạch cầu trên thỏ sau khi tiêm vắc xin không có sự khác biệt với nhóm thỏ tiêm giả dược. Sự tương đồng này góp phần chứng minh tính đảm

bảo an toàn của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S thành phẩm và có thể là một bằng chứng để tiếp tục triển khai các bước thử nghiệm tiếp theo của quy trình sản xuất.

Mặc dù tính an toàn là rất quan trọng trong nghiên cứu sản xuất và đưa vắc xin vào sử dụng. Nhưng các hướng dẫn hoặc quy định hiện hành trong đánh giá tiền lâm sàng và/hoặc kiểm định lô xuất xưởng chỉ tập trung vào việc đánh giá hiệu quả và khả năng sinh miễn dịch của vắc xin trên các mô hình động vật [37, 112, 115]. Các phương pháp, mô hình kiểm tra kiểm soát chất lượng và kiểm tra độc tính trên động vật thí nghiệm [111]. Các hướng dẫn và khuyến nghị này không bao gồm nghiên cứu khoa học để xác định độc tính tiềm ẩn của vắc xin, tá dược và phụ gia là một trong các hạn chế của các đánh giá an toàn hiện nay và cũng là hạn chế của mô hình đánh giá đang áp dụng trong nghiên cứu này. Điều đó cho thấy các gợi ý tiềm năng áp dụng phương pháp tiếp cận sinh học hệ thống để có thể sử dụng nhiều hơn một dấu ấn sinh học trong đánh giá tính an toàn hoặc độc tính tiềm ẩn của vắc xin trên đối tượng sử dụng.

Theo hướng dẫn của TCYTTG, đánh giá độc tính của vắc xin trong nghiên cứu tiền lâm sàng còn bao gồm các đánh giá tổn thương thực thể các mô, cơ quan đích liên quan đến vắc xin. Trong đó, giải phẫu mô bệnh học của bất kỳ tổn thương nào được phát hiện trong quá trình thử nghiệm tiền lâm sàng vắc xin cũng cần được báo cáo [115]. Trong nghiên cứu tiền lâm sàng đối với vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, giải phẫu mô bệnh học của thử thí nghiệm được thực hiện với các cơ quan nội tạng bao gồm gan, thận, tụy, lách, phổi (Hình 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). Các kết quả đánh giá không phát hiện bất cứ bất thường nào của thử thí nghiệm sau khi sử dụng vắc xin. Đối với kết quả giải phẫu cơ vùng tiêm cho thấy một số tĩnh mạch xẹp nhưng không có tổn thương vi thể. Các tĩnh mạch xẹp này có thể do tác động cơ học của kim tiêm sử dụng khi thí nghiệm. Một số nghiên cứu trên các vắc xin cho thấy dấu hiệu tổn thương cơ vùng tiêm là khá phổ biến do việc sử dụng vắc xin khi quá lạnh hoặc thành phần chất hấp phụ trong vắc xin. Hiện tượng này xảy ra nhiều hơn ở các vắc xin sử dụng chất hấp phụ là Aluminium phosphate [57, 69].

### ***4.1.3. Đánh giá tính sinh miễn dịch trong nghiên cứu tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S***

Tính sinh miễn dịch luôn là tiêu chí hàng đầu của các nhà sản xuất để đánh giá sự thành công của một vắc xin phòng bệnh. Để vắc xin có thể sinh miễn dịch tốt không chỉ cần có một kháng nguyên đủ mạnh mà còn có sự hỗ trợ đặc lực của các tá dược [115]. Mặc dù điều đó có thể mang lại một số các vấn đề phản ứng phụ liên quan đến an toàn chung của vắc xin. Tương tự như các chỉ tiêu chất lượng khác, tính sinh miễn dịch trong nghiên cứu tiền lâm sàng của một vắc xin cũng được đánh giá thông qua các mô hình trên động vật thí nghiệm. Vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S sử dụng chuột nhắt để thực hiện mô hình nghiên cứu tính sinh miễn dịch của vắc xin.

Hai glycoprotein chính, rất quan trọng đối với bệnh cúm trong đó có hemagglutinin (HA) được biểu hiện trên bề mặt của hạt vi rút cúm. Đó cũng là nguyên nhân HA được sử dụng là kháng nguyên đích cho sản xuất vắc xin cúm và khả năng sinh miễn dịch của vắc xin cúm mùa phụ thuộc vào đặc tính của kháng nguyên HA [98]. Trong đó, hàm lượng và phác đồ sử dụng sẽ quyết định khả năng đáp ứng miễn dịch của các loại kháng nguyên HA. Kháng nguyên HA ở các loài khác nhau cũng tạo ra đáp ứng miễn dịch khác nhau [57, 98]. Kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã góp phần chứng minh lý thuyết này, Với 3 chủng vi rút cúm khác nhau X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B), khả năng đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) là mạnh nhất và chủng BX-51B (B) là yếu nhất. Tuy nhiên, điều này chỉ xảy ra sau khi chuột thí nghiệm được tiêm mũi vắc xin thứ 2 và đánh giá tại thời điểm 14 ngày sau tiêm. Đồng thời, đáp ứng miễn dịch cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt ở các liều kháng nguyên khác nhau. Tại liều kháng nguyên 0,75  $\mu\text{gHA/liều}$ , mức đáp ứng miễn dịch rất thấp và hầu như không có sự khác biệt giữa mũi tiêm thứ nhất và mũi tiêm thứ 2. Sự biến đổi đáp ứng miễn dịch tại mũi tiêm thứ 2 đã khác biệt khá nhiều với liều kháng nguyên HA là 1,5  $\mu\text{gHA/liều}$  và 3,0  $\mu\text{gHA/liều}$ . Với liều 3,0  $\mu\text{gHA/liều}$ , mức đáp ứng miễn dịch của cả 3 loại kháng nguyên sau mũi tiêm thứ 2 đều cao gấp

hiều lần ở mũi tiêm thứ nhất. Kết quả này cũng gợi ý việc xây dựng phác đồ tiêm 1 liều duy nhất hay 2 liều khi vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được sản xuất và đưa vào sử dụng trong phòng bệnh (Hình 3.7, 3.8, 3.9). Đường tiêm cũng là một yếu tố quyết định tính đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên [102]. Đối với các mầm bệnh khác nhau, xác định được đường xâm nhập và các vị trí sao chép tiếp theo của mầm bệnh là điều cần thiết để xác định được các chiến lược lựa chọn đường tiêm chủng phù hợp [18, 24, 102]. Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá tiền lâm sàng đã xác định đường tiêm bắp là phù hợp đối với vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S.

Đáp ứng miễn dịch hay còn gọi là tương quan bảo vệ là một trong các yêu cầu quan trọng của nghiên cứu sản xuất vắc xin. Trong tự nhiên, tác nhân gây bệnh ở người có tính đa dạng sinh học khá lớn và tạo ra các loại nhiễm trùng khác nhau với các mô/cơ quan đích khác nhau. Đồng thời, sự đa dạng về di truyền hay tính dễ dàng biến đổi di truyền là một trong các yếu tố gây khó khăn trong nghiên cứu sản xuất vắc xin ở nhiều loài vi rút, trong đó có cúm mùa [35]. Trong hầu hết các trường hợp, nhiễm trùng được đáp ứng bởi một phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng kịp thời sau đó dẫn đến kiểm soát và loại bỏ nhiễm trùng. Tuy nhiên, tác nhân gây bệnh thường biểu hiện một số yếu tố quyết định độc lực cho phép mầm bệnh tránh được sự phòng vệ miễn dịch, tạo điều kiện cho sự xâm nhiễm và lây truyền. Trong trường hợp của vi rút cúm, các yếu tố quyết định được mã hóa mầm bệnh liên kết với các thụ thể tế bào cụ thể cho phép xâm nhập tế bào mà không báo động phản ứng miễn dịch, sản xuất protein, enzym và microRNA ức chế cơ chế nhận dạng vật chủ-mầm bệnh và phản ứng của cơ chế tác động miễn dịch bẩm sinh [35]. Hoặc trong một số khác như *Neisseria meningitidis* sản xuất các cấu trúc như viên nang polysaccharide ức chế các tác nhân miễn dịch như bổ thể [12]. Trong các yếu tố chống lại khả năng đề kháng của cơ thể là tỷ lệ đột biến cao, đảm bảo rằng các kháng thể được kích thích trong quá trình lây nhiễm trước đó vẫn không hiệu quả, như trong trường hợp của Cúm mùa [120]. Các hiểu biết về các chiến lược thoát khỏi miễn dịch được sử dụng bởi các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm rất quan trọng

để phát triển các loại vắc-xin hiệu quả chống lại chúng. Từ các kiến thức về mầm bệnh, các nghiên cứu đánh giá về cách bộc lộ các kháng nguyên và sự hấp thụ để các tế bào miễn dịch có thể nhận diện được dễ dàng cũng là một chìa khóa quan trọng để tạo ra tính đáp ứng miễn dịch của vắc xin [51]. Quá trình bộc lộ kháng nguyên giúp tăng khả năng nhận diện của các tế bào miễn dịch chính là quá trình nghiên cứu tìm các tá dược và/hoặc các chất hấp phụ phù hợp [28, 64]. Các đánh giá này cũng có thể được sử dụng trong các nghiên cứu tiền lâm sàng với các vắc xin phòng bệnh.

Theo kiến thức kinh điển, các kháng thể được tạo ra bởi sự nhiễm trùng tự nhiên được nghiên cứu để xác định hiệu quả. Các nghiên cứu sản xuất vắc xin thường đánh giá các loại kháng nguyên phù hợp để sản xuất vắc xin, như trong trường hợp của cúm mùa lựa chọn HA mà không phải NA. Khi được lựa chọn, các kháng nguyên này có thể tiềm ẩn các độc tính tự nhiên. Do vậy, các phương pháp giải độc hoặc bất hoạt được nghiên cứu nhằm loại bỏ các độc tính này trước khi thu hoạch để sản xuất vắc xin nhưng quá trình này cũng chứa đựng các rủi ro về phá hủy cấu trúc của kháng nguyên. Đồng thời, việc giải độc/tổ/bất hoạt kháng nguyên có thể làm thay đổi bản chất của phản ứng miễn dịch. Các yếu tố đó có thể làm giảm khả năng đáp ứng miễn dịch của vắc xin. Các hạn chế trong việc sử dụng toàn bộ vi sinh vật làm kháng nguyên trong sản xuất vắc xin vì toàn bộ tế bào vi sinh vật là sự hỗn hợp phức tạp của protein, lipid và carbohydrate làm phức tạp việc sản xuất, kiểm tra chất lượng của vắc xin cuối cùng. Vì những lý do đó, vắc xin cúm cũng như nhiều loại vắc xin khác hiện nay đã chuyển sang xu hướng sử dụng các kháng nguyên cụ thể, có thể được đặc trưng ở cấp độ phân tử để sản xuất. Kháng nguyên được lựa chọn như kháng nguyên HA của vi rút cúm đảm bảo tính đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ, bền bỉ và rộng rãi. Tuy nhiên, các kháng nguyên đã được tinh chế đôi khi có thể có tính sinh miễn dịch kém, vì vậy nhiệm vụ đầu tiên là chọn một hệ thống mang kháng nguyên để tăng cường tính sinh miễn dịch và thúc đẩy phản ứng miễn dịch.

Đánh giá hiệu quả bảo vệ luôn là thách thức lớn đối với quá trình nghiên cứu và sản xuất vắc xin. Trong một số trường hợp, có thể quan sát thấy các mối tương quan rõ ràng về khả năng miễn dịch trên các mô hình động vật thí nghiệm. Như trong trường hợp của nghiên cứu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã thực hiện trong nghiên cứu này. Các nghiên cứu tiền lâm sàng như vậy là vô cùng hữu ích trước khi đưa vắc xin vào các bước thử nghiệm lâm sàng tiếp theo [71, 86]. Tiêm chủng tăng cường cho thấy rằng những người được tiêm chủng có nồng độ kháng thể huyết thanh thấp đến không thể phát hiện được vẫn có thể tạo ra phản ứng nhớ lại mạnh mẽ, cho thấy một trí nhớ miễn dịch bền bỉ và bảo vệ mặc dù phản ứng dịch thể đang suy yếu [89]. Lý thuyết này cũng rất phù hợp với sự khác biệt về kết quả thử nghiệm tiền lâm sàng ở mũi tiêm thứ nhất và mũi tiêm thứ 2 của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S. Sự hiện diện của phản ứng kháng thể sau khi tiêm chủng chứng tỏ rằng một phản ứng miễn dịch đã được tạo ra, nhưng trong trường hợp này, không có mối tương quan trực tiếp giữa mức độ của phản ứng kháng thể và mức độ bảo vệ. Hay nói cách khác, lượng kháng thể tạo ra có đủ để bảo vệ cá thể đó khỏi nhiễm trùng hay không. Kết quả thử nghiệm tiền lâm sàng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S ở mũi thứ nhất không đảm bảo hiệu lực bảo vệ của vắc xin. Tuy nhiên, với mũi tiêm thứ 2 lượng kháng thể đã tăng lên đáng kể và tăng hiệu lực bảo vệ của nó đối với bệnh cúm mùa.

## **4.2. TÍNH ỔN ĐỊNH CỦA VẮC XIN CÚM MÙA TAM GIÁ IVACFLU-S SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM**

### **4.2.1. Tác dụng đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S**

Vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S là kết quả của quá trình chủ động tiếp cận công nghệ hướng đến tự chủ sản xuất vắc xin cúm trong nước. Sản xuất thành công vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đặt nền móng cho khả năng sẵn sàng ứng phó với nguy cơ đại dịch cúm của Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu để

từng bước đưa vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S vào sản xuất, đánh giá tính ổn định giúp hoàn thiện các điều kiện sản xuất, bảo quản và nâng cao chất lượng của vắc xin. Các phương pháp thử nghiệm được áp dụng trong nghiên cứu khẳng định vai trò không thể thiếu của động vật thí nghiệm trong nghiên cứu và phát triển vắc xin. Bên cạnh đó, một số phương pháp kiểm định mới được áp dụng theo xu hướng giảm sử dụng động vật thí nghiệm trong nghiên cứu vắc xin, sinh phẩm nhằm củng cố khái niệm 3R trong nghiên cứu vắc xin và dược phẩm[27], bao gồm:

Cải tiến các quy trình thử nghiệm có sử dụng động vật thí nghiệm (Refinement of animals procedures),

Giảm số lượng động vật thí nghiệm sử dụng trong các quy trình kiểm định chất lượng vắc xin (Reduction in numbers of animals),

Thay thế các phương pháp dùng động vật thí nghiệm bằng các phương pháp khác (Replacement of laboratory animal use by non-animal methods).

Đối với nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá và 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015, các nghiên cứu tiền lâm sàng đã thực hiện đầy đủ các chỉ tiêu theo khuyến nghị của TCYTTG và quy định của Bộ Y tế [3, 113]. Trong đó bao gồm cả các nghiên cứu intro trong phòng thí nghiệm và *in vivo* trên động vật thí nghiệm. Tuy nhiên, theo Dược điển Châu Âu các lô vắc xin thành phẩm nói chung sẽ không yêu cầu thực hiện kiểm tra chỉ số an toàn trên động vật thí nghiệm. Thay vào đó, các nhà sản xuất vắc xin và các cơ quan quản lý chất lượng vắc xin sẽ thực hiện nghiên cứu tính ổn định chất lượng. Do vậy, nghiên cứu tính ổn định của vắc xin đã được triển khai thực hiện đối với các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S thành phẩm mùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017. Các thống kê toán học đã được áp dụng trong nghiên cứu này, trong đó có các kiểm định t-test, nhằm so sánh sự thay đổi của các chỉ số ổn định được đánh giá như công hiệu, pH, hàm lượng protein tổng số, hàm lượng nội độc tố. Với đặc điểm là vắc xin sản xuất thử nghiệm nên trong nghiên cứu này các phương pháp toán thống kê và đồ thị Shewhart đã không được sử dụng cho phân tích kết quả vì số lượng lô vắc xin không đủ. Phương



pháp thống kê và đồ thị Shewhart thường được sử dụng để đánh giá tính ổn định của vắc xin khi đã đưa vào sử dụng với số đủ để phân tích, khoảng 30 loạt vắc xin trở lên [29, 38]. Mặt khác, phương pháp toán thống kê và đồ thị Shewhart cũng được dùng để đánh giá độ dao động của chất lượng sản phẩm khi thay đổi các yếu tố trong quá trình sản xuất [16],,,, [107] hoặc xác định nguyên nhân của sự thay đổi tỷ lệ mắc bệnh trên cộng đồng. Tại Ba Lan, nơi mà vắc xin ho gà toàn tế bào được sử dụng từ năm 1960 cho đến nay, tuy nhiên, tỷ lệ mắc ho gà năm 2012 đã tăng gấp đôi so với các thập kỷ trước. Người ta nghi ngờ việc thay đổi chủng sản xuất làm giảm công hiệu vắc xin ho gà dẫn đến tăng tỷ lệ mắc bệnh. Việc đánh giá tính ổn định công hiệu của vắc xin và đánh giá tính ổn định của chủng sản xuất đã được thực hiện để khẳng định xem các yếu tố này có ảnh hưởng đến tỷ lệ mắc bệnh hay không. Kết quả phân tích 50 loạt vắc xin sản xuất từ năm 2001 đến năm 2013 cho thấy công hiệu vắc xin này không có sự biến động đáng kể nào khi so sánh với toàn bộ giai đoạn từ năm 1973 đến năm 2013. Từ đó có thể rút ra kết luận, công hiệu của vắc xin không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nào trong quá trình sản xuất. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu trên các chủng gốc và chủng sản xuất vắc xin cho thấy các chủng này ổn định ở cấp độ gen và cấp độ protein. Như vậy, nguyên nhân của việc tăng tỷ lệ mắc ho gà tại Ba Lan năm 2012 không phải do giảm hiệu giá vắc xin hay do thiếu ổn định trong hệ thống chủng sản xuất vắc xin.

Trong nghiên cứu này, các kết quả đánh giá ban đầu về tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã cho thấy độ ổn định của công hiệu vắc xin và một số tính chất hóa lý ở nhiệt độ bảo quản  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Ngoài ra, nghiên cứu còn đánh giá tính ổn định của công hiệu vắc xin ở các nhiệt độ thúc đẩy nhanh là  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 14 ngày và  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 3 ngày.

#### ***4.2.2. Công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau***

##### **Công hiệu của vắc xin**

Công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được xác định là hàm lượng kháng nguyên HA tổng số trong vắc xin. Với 3 chủng cúm mùa đơn giá được lựa chọn phù hợp với mùa 2014 – 2015 (X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B)) và mùa 2016 – 2017 (BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2)). Kết quả đánh giá tại thời điểm xuất xưởng cho thấy hàm lượng kháng nguyên HA trong các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017 đều đạt TCCS của nhà sản xuất. Trong đó, hàm lượng kháng nguyên HA tổng số đạt  $\geq 45$   $\mu\text{gHA/liều}$  và hàm lượng kháng nguyên HA của từng chủng cúm đơn giá trong các lô vắc xin cũng đạt  $\geq 15$   $\mu\text{gHA/liều}$ . Công hiệu của vắc xin cần được xác định để đưa ra liều vắc xin thích hợp. Trong trường hợp của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S nói riêng và vắc xin cúm mùa nói chung, quy trình sản xuất và các thử nghiệm đánh giá công hiệu vắc xin thường gặp khó khăn do sự biến đổi liên tục của chủng vi rút cúm [17, 121]. Trong các thử nghiệm kiểm định chất lượng vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, thử nghiệm công hiệu xuất xưởng là một trong các thử nghiệm không sử dụng động vật thí nghiệm. Phương pháp sử dụng phổ biến hiện nay để xác định công hiệu của vắc xin cúm là phương pháp khuếch tán miễn dịch [10]. Quá trình cải tiến kỹ thuật được thực hiện nhằm thích ứng với sự biến đổi liên tục của các chủng vi rút cúm qua các mùa. Kháng nguyên đích được lựa chọn để phát triển kỹ thuật khuếch tán miễn dịch áp dụng trong thử nghiệm công hiệu vắc xin cúm là kháng nguyên HA của vi rút cúm mùa.

Trong giai đoạn phát triển ban đầu, các loại vắc xin cúm mùa kinh điển được sản xuất từ vi rút được nuôi cấy trong trứng gà đã phôi thai. Vắc xin không sao chép, không phân chia nên kháng nguyên thu được có thể là hạt vi rút toàn phần. Ngày nay, các vắc xin cúm mùa dạng mảnh là hướng phát triển chủ yếu với hạt vi rút đã được đã loại bỏ tất cả các thành phần khác ngoài haemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Mặc dù vắc xin toàn tế bào hạt vi rút có thể tạo ra miễn dịch cao hơn nhưng nó cũng tiềm ẩn nhiều phản ứng phụ và độc tính. Lịch sử phát triển vắc xin cúm mùa ghi nhận nhiều công nghệ khác nhau sản xuất vắc xin cúm như vắc xin sống giảm độc lực, vắc xin bất hoạt, vắc xin ADN, vắc xin tái tổ hợp [23,

83, 87, 121]. Từ đặc điểm các loại vắc xin cúm đã được nghiên cứu đã đặt ra yêu cầu phát triển kỹ thuật phù hợp nhất để đánh giá công hiệu của vắc xin. Trong đó, phương pháp xác định hàm lượng kháng nguyên HA là một trong những lựa chọn ưu tiên hiện nay bởi yếu tố định lượng chính xác và việc giảm sử dụng động vật trong các thí nghiệm. Phương pháp này cũng có những hạn chế nhất định do công hiệu hay hiệu lực bảo vệ của vắc xin cần được chứng minh bằng khả năng sinh kháng thể và bảo vệ người sử dụng khỏi bệnh cúm. Tuy nhiên, dù có được đo lường trên động vật thí nghiệm hoặc thậm chí là con người thì các kết quả đo lường về hiệu lực bảo vệ của vắc xin cũng gặp nhiều khó khăn [44, 75]. Các yếu tố được đề cập dẫn đến những khó khăn như vậy là do đặc tính dễ đột biến của chủng vi rút và các yếu tố về nhân khẩu học của đối tượng sử dụng như độ tuổi. Đó cũng là lý do tại sao nghiên cứu của chúng tôi lựa chọn các chủng vi rút cúm ở hai mùa 2014 – 2015 và 2016 – 2017 có sự khác nhau. Tất nhiên, trong quá trình lựa chọn chủng vi rút để sản xuất kháng nguyên cho vắc xin nghiên cứu này cũng tham khảo khuyến nghị của TCYTTG. Một đặc điểm nữa cần đề cập đến là chưa thể khẳng định được sự đồng nhất về công hiệu vắc xin cúm mùa của các nhà sản xuất khác nhau, đặc điểm này có thể được thực hiện thông qua đánh giá hồi cứu hồ sơ thử nghiệm lâm sàng.

Về nguyên tắc, công hiệu và khả năng đáp ứng miễn dịch của vắc xin cúm mùa đều có thể được đánh giá dựa trên các mô hình thử nghiệm trên động vật. Trong nghiên cứu này, các thử nghiệm trên động vật thí nghiệm đã được thực hiện trong đánh giá tiền lâm sàng và đã được trình bày ở phần trên. Trong các đánh giá về công hiệu, tính kháng nguyên và đáp ứng miễn dịch là khác nhau. Trong đó, đáp ứng miễn dịch cần xác định lượng kháng nguyên cần thiết để kích thích miễn dịch. Mặc dù TCCS của vắc xin xác định hàm lượng kháng nguyên trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S thành phẩm là  $\geq 15 \mu\text{gHA/liều}$  cho mỗi chủng vi rút. Nhưng thử nghiệm đáp ứng miễn dịch trên chuột không sử dụng đến liều này mà sử dụng các liều thấp hơn. Kết quả cho thấy mức đáp ứng miễn dịch cho thấy liều kích thích đáp ứng miễn dịch của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S là  $1,5 \mu\text{gHA/liều}$  với phác đồ 2 liều tiên cách nhau 21 ngày. Và khả năng đáp ứng miễn

dịch có sự khác biệt giữa 03 chủng vi rút được sử dụng sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên các chủng cúm khác nhau của vi rút cúm H5N1 [43, 73, 78, 85]. Việc xem xét các chủng vi rút cúm mùa để lựa chọn sản xuất vắc xin được thực hiện hai lần một năm được chủ trì bởi TCYTTG, trong đó tháng 2 hàng năm cho Bắc bán cầu và tháng 9 cho Nam bán cầu. Việt Nam được khuyến nghị sử dụng các chủng dự tuyển cho Bắc bán cầu.

### **Tính ổn định của vắc xin**

Theo khuyến nghị của TCYTTG về sản xuất, kiểm soát và đánh giá chất lượng vắc xin, tính ổn định là một yếu tố quan trọng cần được thực hiện, đồng thời TCYTTG đã cung cấp các hướng dẫn cho việc kiểm tra độ ổn định đối với vắc xin. Tuy nhiên, cho đến năm 2006, không có tài liệu toàn diện nào cung cấp hướng dẫn cho đánh giá độ ổn định của vắc xin ở các giai đoạn khác nhau của quá trình nghiên cứu và phát triển vắc xin, cấp phép, xuất xưởng ... Các báo cáo kỹ thuật của TCYTTG cung cấp các nguyên tắc chung để đánh giá tính ổn định của vắc xin. Các khuyến nghị đều dựa trên các bằng chứng khoa học và các tiêu chí rõ ràng. Trong đó, TCYTTG nhấn mạnh tầm quan trọng của thời hạn sử dụng, điều kiện lưu trữ thực nghiệm và điều kiện thực tiễn của nhà sản xuất. Trước đây, đánh giá độ ổn định chủ yếu tập trung vào về thử nghiệm ổn định nhiệt với mục đích xuất xưởng lô và phù hợp với vắc xin sống giảm độc lực [95]. Ba khía cạnh chính được đề cập trong hướng dẫn đánh giá tính ổn định của vắc xin, bao gồm:

Tính ổn định của vắc xin là khả năng vắc xin duy trì các đặc tính hóa học, vật lý, vi sinh và sinh học trong giới hạn quy định trong suốt thời hạn sử dụng.

Nghiên cứu độ ổn định trong thời gian thực /điều kiện thực bao gồm các nghiên cứu về các đặc tính vật lý, hóa học, sinh học, dược phẩm sinh học và vi sinh vật của vắc xin, trong và trước thời hạn sử dụng và thời gian lưu trữ dự kiến của mẫu trong điều kiện xử lý và bảo quản dự kiến. Kết quả đánh giá này được sử dụng để đề xuất các điều kiện bảo quản và thiết lập thời hạn sử dụng và/hoặc thông số kỹ thuật xuất xưởng.

Các thông số chỉ thị độ ổn định là các chỉ số trực tiếp hoặc gián tiếp về hiệu quả hoặc tính an toàn của vắc xin được chứng minh trong các thử nghiệm lâm sàng. Chúng được sử dụng để đánh giá tính phù hợp của sản phẩm trong suốt thời hạn sử dụng. Việc xác định các thông số này sẽ dẫn đến định lượng các giá trị với tỷ lệ thay đổi có thể phát hiện được. Các chỉ số định tính như độ vô trùng cũng có thể được xem xét nhưng không thể được đưa vào phân tích thống kê.

Trên cơ sở các khuyến nghị này, nghiên cứu đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S với các điều kiện bảo quản thúc đẩy nhanh và điều kiện bảo quản cơ bản. Các chỉ số được đánh giá bao gồm công hiệu, hàm lượng protein tổng số, hàm lượng nội độc tố, pH, vô trùng, cảm quan. Trong đó, vô trùng và cảm quan là hai chỉ số định tính được sử dụng trong nghiên cứu này. Chỉ số công hiệu được đánh giá ở 3 điều kiện bảo quản là  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  và  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Thử nghiệm thúc đẩy nhanh áp dụng cho vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thực hiện ở 2 nhiệt độ bảo quản khác nhau là  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 14 ngày và  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 3 ngày. Mục đích của thử nghiệm này nhằm đánh giá công hiệu của vắc xin khi không được bảo quản ở điều kiện tiêu chuẩn, là một trong các chiến lược thiết kế đánh giá chất lượng vắc xin được áp dụng phổ biến [95].

Trong nghiên cứu ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , trong 14 ngày hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S giảm dần theo các thời điểm được đánh giá. Mức độ giảm kháng nguyên HA của các chủng khác nhau là khác nhau. Trong đó, chủng X-223A (H3N2) có mức độ giảm nhiều nhất, giảm gần 20% tại ngày thứ 14. Chủng BX-51B (B) giảm ít nhất, khoảng gần 9% tại ngày thứ 14. Tuy nhiên, sau 14 ngày bảo quản tại nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  hàm lượng kháng nguyên của các chủng vi rút trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S vẫn đáp ứng được tiêu chuẩn công hiệu với hàm lượng kháng nguyên HA tổng số  $\geq 45 \mu\text{gHA/liều}$ . Không có chủng vi rút cúm nào có hàm lượng kháng nguyên HA  $< 15 \mu\text{gHA/liều}$ .

Tương tự như vậy, đánh giá thúc đẩy nhanh đối với vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S ở nhiệt độ  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 3 ngày cũng cho kết quả khả quan về công hiệu. Tại ngày thứ 3 của thử nghiệm, hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin vẫn đáp ứng được yêu cầu của TCCS áp dụng với vắc xin này.

Tại điều kiện bảo quản tiêu chuẩn  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , độ ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được đánh giá một cách toàn diện hơn với các chỉ tiêu chất lượng như hướng dẫn của TCYTTG [95]. Đồng thời, thời gian đánh giá cũng được kéo dài tới 15 tháng tính từ thời gian xuất xưởng. Thời gian này dài hơn hạn sử dụng của vắc xin, hạn sử dụng của vắc xin là 12 tháng, có thể đem lại lợi ích nhất định cho người sử dụng khi vắc xin được sản xuất thương mại. Kết quả công hiệu vắc xin có giảm sau 15 tháng bảo quản nhưng vẫn đáp ứng TCCS về công hiệu của vắc xin; Các đặc tính về hàm lượng protein tổng số, pH, nội độc tố (endotoxin), vô khuẩn, cảm quan không có sự khác biệt so với thời điểm xuất xưởng và đáp ứng theo TCCS của IVAC.

Ở một cách tiếp cận khác, trên quan điểm của các nhà sản xuất vắc xin tại các nước đang phát triển [42], đánh giá tính ổn định của vắc xin cũng được xác định nhằm các mục đích:

Kiểm tra độ ổn định sử dụng nhiều cách tiếp cận khác nhau để ước tính thời hạn sử dụng của vắc xin. Trong đó, thời hạn sử dụng được xác định là khoảng thời gian cuối cùng mà tại đó sự ổn định của vắc xin được đo lường cho thấy không đạt thông số kỹ thuật quy định. Đây gọi là phương pháp tuân thủ. Cách tiếp cận này có một số hạn chế vì nó không đề phòng những trường hợp không chắc chắn như sự biến đổi của phương pháp thử hoặc các sai số. Theo cách tiếp cận khác, nhà sản xuất có thể thiết lập các thông số kỹ thuật xuất xưởng tối thiểu đảm bảo rằng lô vắc xin sẽ vẫn đảm bảo các thông số kỹ thuật trong suốt thời hạn sử dụng vắc xin. Điều này cũng được gọi là cách tiếp cận ước lượng. Mạng lưới các nhà sản xuất vắc xin tại các nước đang phát triển cho rằng phương pháp ước lượng nên được khuyến khích trong kiểm tra độ ổn định, vì nó cho phép lập hồ sơ chi tiết tính ổn định của

vắc xin. Trong đó bao gồm thử nghiệm khả năng biến đổi, tỷ lệ hao hụt và đưa ra các ước tính thực tế về thời hạn sử dụng và tỷ lệ xuống cấp của sản phẩm.

Ước tính thời gian tích lũy của bán thành phẩm được sử dụng như một cách tiếp cận trong đánh giá tính ổn định của vắc xin. Trong quá trình sản xuất vắc xin, các nguyên liệu hoặc bán thành phẩm như khối lượng kháng nguyên đã được tính chế và thu hoạch, có thể không được sử dụng ngay và được bảo quản trước khi pha chế thành thành phẩm. Hướng dẫn của TCYTTG ủng hộ vai trò của thử nghiệm độ ổn định thúc đẩy đối với các bán thành phẩm. Mạng lưới các nhà sản xuất vắc xin tại các nước đang phát triển cũng ủng hộ việc kiểm tra độ ổn định, đồng ý rằng bất kỳ chính sách nào về các bán thành phẩm cần được xây dựng riêng cho từng loại vắc xin. Các ví dụ về đánh giá tính ổn định dựa trên các bán thành phẩm được minh chứng trong các nghiên cứu đối với vắc xin ho gà và vắc xin Hib [107].

Các nghiên cứu về độ ổn định sau khi cấp phép nhằm hỗ trợ kiểm soát các thông số kỹ thuật về thời hạn sử dụng và để cải thiện thêm độ ổn định của vắc xin. Trong hội thảo về thử nghiệm độ ổn định của vắc xin đã từng có cuộc tranh luận trong TCYTTG và Cơ quan quản lý Thuốc và thực phẩm Hàn Quốc về việc sử dụng lô vắc xin sắp hết hoặc hết hạn sử dụng [114]. Trong các trường hợp như vậy, Mạng lưới các nhà sản xuất vắc xin tại các nước đang phát triển quan điểm rằng tính hợp lý và khả năng ứng dụng của nó nên được quyết định trên cơ sở từng loại vắc xin cụ thể như trong ví dụ về vắc xin Hib tái tổ hợp, vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, vắc xin ho gà, hoặc vắc xin dại.

### **4.3. MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU**

Nghiên cứu tiền lâm sàng và đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được thực hiện trong nghiên cứu này đã tuân thủ nghiêm ngặt các khuyến cáo của TCYTTG. Đồng thời, ở mỗi giai đoạn nghiên cứu đã thực hiện đầy đủ các thí nghiệm nhằm cung cấp các bằng chứng cho quá trình xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của vắc xin. Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế nhất định.

Trong nghiên cứu này, đánh giá tính ổn định của vắc xin nhằm mục đích hoàn thiện hồ sơ sản xuất theo quy định của TCYTTG và Tiêu chuẩn Việt Nam. Theo quy định về hoàn thiện hồ sơ, đánh giá tính ổn định ở giai đoạn này chỉ cần thực hiện tối thiểu trên 3 loạt vắc xin liên tiếp. Tuy nhiên, khi đánh giá tổng thể thì thấy rằng việc đánh giá tính ổn định trên 6 loạt vắc xin là một con số khiêm tốn và khó áp dụng được các phân tích thống kê sâu trong đánh giá tính ổn định của vắc xin. Mặc dù mỗi lô vắc xin được thực hiện với số lượng mẫu lớn, theo đúng hướng dẫn của TCYTTG và cơ quan kiểm định quốc gia là Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế. Nhưng số lượng 6 lô vắc xin là ít so với con số tiêu chuẩn từ 30 – 50 lô vắc xin để có thể áp dụng được mô hình toán học và đồ thị Shewhart. Chúng tôi kỳ vọng rằng khi vắc xin được cấp phép sản xuất và đưa vào sử dụng, số lượng lô vắc xin sẽ đủ để thực hiện đánh giá tính ổn định theo phương pháp này.

Tương tự như các quy trình sản xuất vắc xin khác, sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S cũng trải qua nhiều công đoạn với các sản phẩm trung gian và bán thành phẩm. Ngoài trừ đánh giá an toàn đặc hiệu thực hiện trên nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá, các sản phẩm trung gian và bán thành phẩm chưa được chọn vào nghiên cứu. Đây cũng là một hạn chế của kết quả nghiên cứu khi mô tả tính ổn định của vắc xin.



## KẾT LUẬN

### **1. Đánh giá tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt (IVACFLU-S)**

Các lô nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá sử dụng trong sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đạt yêu cầu về kiểm định an toàn đặc hiệu.

Các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 đạt yêu cầu về chỉ tiêu an toàn chung khi thử nghiệm trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột thử nghiệm lên cân và khỏe mạnh sau 7 ngày tiêm vắc xin.

Thử nghiệm độc tính thực hiện đánh giá tế bào học và một số chỉ số sinh hóa cho thấy các tổ đờc tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 không có các dấu hiệu tổn thương thực thể các cơ quan gan, lách, thận, phổi và tử.

Thử nghiệm đáp ứng miễn dịch của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 cho thấy các vắc xin bắt đầu đáp ứng miễn dịch mạnh trên chuột thí nghiệm ở liều kháng nguyên HA là 1,5  $\mu$ gHA/liều với phác đồ tiêm 2 liều cách nhau 21 ngày.

### **2. Công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt(IVACFLU-S)**

Các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017 đạt yêu cầu về công hiệu vắc xin cúm theo TCCS của IVAC.

Các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017 đạt thử nghiệm ổn định công hiệu khi thử thách tại các điều kiện thúc đẩy nhanh ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 14 ngày,  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 3 ngày và

điều kiện bảo quản tiêu chuẩn  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  trong 15 tháng. Sau thời gian thử thách, các lô vắc xin vẫn đảm bảo hàm lượng HA đạt yêu cầu theo TCCS của IVAC.

### **3. Tính ổn định các đặc tính hóa lý của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt (IVACFLU-S)**

Các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017 đạt thử nghiệm ổn định các đặc tính hóa lý bao gồm vô khuẩn, cảm quan, pH, nội độc tố, hàm lượng protein tổng số tại điều kiện bảo quản tiêu chuẩn  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  trong vòng 15 tháng.

## **KIẾN NGHỊ**

Từ những kết quả nghiên cứu trên chúng tôi đưa ra một số kiến nghị:

1. Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tính ổn định của vắc xin với số lượng lô vắc xin nhiều hơn nhằm tăng giá trị của số liệu thử nghiệm.
2. Kết quả nghiên cứu tại thời điểm 15 tháng sau khi sản xuất và bảo quản đúng điều kiện tiêu chuẩn, vắc xin vẫn đảm bảo được các tiêu chuẩn chất lượng nói chung và tiêu chuẩn công hiệu nói riêng. Do vậy, khuyến khích tiếp tục thực hiện nghiên cứu tính ổn định của vắc xin kéo dài tới 18 tháng sau sản xuất và bảo quản ở điều kiện tiêu chuẩn để đánh giá được chính xác hơn nữa tính ổn định của vắc xin.
3. Vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã được cấp phép, sản xuất và đưa vào sử dụng thương mại. Các nghiên cứu chuyên sâu về đối tượng sử dụng nên được triển khai. Trong đó, các nghiên cứu có thể ưu tiên về tác động của vắc xin trên một số nhóm đối tượng đích, ví dụ trên nhóm đối tượng có nguy cơ cao mắc cúm như độ tuổi 6 tháng – 18 tuổi và nhóm trên 60 tuổi.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Hoàng Tùng, Lê Văn Bé, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Nguyễn Văn Hùng. 2020. Kết quả đánh giá tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa đa giá IVACFLU-S do IVAC sản xuất tại Việt Nam, 2014-2017, Tạp chí Y học Dự phòng, 5 (30), tr. 134-142.
2. Nguyễn Hoàng Tùng, Nguyễn Thị Lý, Hoàng Minh Hưng. 2018. Tính ổn định của vắc xin cúm mùa IVACFLU-S 2014-2015 và 2016-2017, Tạp chí Y học Dự phòng, 11 (28), tr. 29-34.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Đặng Đức Anh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Phan Thị Ngà (2010), *Vi rút Y học*, NXB Y học, Hà Nội, 28-48.
2. Bộ Y tế (2008), “Hướng dẫn thực hành tốt thử nghiệm thuốc trên lâm sàng”, 779/QĐ-BYT, Bộ Y tế, Hà Nội.
3. Bộ Y tế (2014), *Quy định việc đăng ký thuốc*, 44/2014/TT-BYT, Bộ Y tế, chủ biên, Hà Nội.
4. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2009), *Dược điển Việt Nam IV: Vắc xin cúm mùa*, Bộ Y tế, Hà Nội.
5. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V: Vắc xin cúm mùa*, Bộ Y tế, Hà Nội.
6. Nguyễn Lê Khánh Hằng (2010), *Nghiên cứu căn nguyên của các vụ dịch cúm người đầu những năm 2000 tại miền Bắc Việt Nam*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia, Hà Nội.
7. Lê Quỳnh Mai (2019), *Virus cúm và phát triển vaccin cúm tại Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội.
8. Lê Quỳnh Mai (2020), *Vi rút Y học*, NXB Y học, Hà Nội, 65-80.
9. Lê Quỳnh Mai và các cộng sự., "Nghiên cứu quy trình chẩn đoán sớm nhiễm virút cúm A/H5N1", *Tạp chí Y học Dự phòng*. 5(76), tr. 12-16.
10. Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (2010), *Thử nghiệm công hiệu vắc xin cúm*, Hà Nội.

**Tiếng Anh**

11. C. Adlhoch et al.(2019), "Determinants of Fatal Outcome in Patients Admitted to Intensive Care Units With Influenza, European Union 2009-2017", *Open Forum Infect Dis.* 6(11), pp. ofz462.
12. S. Agarwal et al. (2014), "Inhibition of the classical pathway of complement by meningococcal capsular polysaccharides", *J Immunol.* 193(4), pp. 1855-63.
13. W. K. Ampofo et al.(2012), "Improving influenza vaccine virus selection: report of a WHO informal consultation held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 14-16 June 2010", *Influenza Other Respir Viruses.* 6(2), pp. 142-52, e1-5.
14. T. K. Andersen et al.(2017), "A DNA Vaccine That Targets Hemagglutinin to Antigen-Presenting Cells Protects Mice against H7 Influenza", *J Virol.* 91(23).
15. T. K. Anderson et al.(2015), "Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel H1 genetic clade with antigenic significance", *Virus Res.* 201, pp. 24-31.
16. J. Arciniega and L. A. Sirota (2012), "Potential application of the consistency approach for vaccine potency testing", *Dev Biol (Basel).* 134, pp. 135-9.
17. I. Barberis et al. (2016), "History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines", *Journal of preventive medicine and hygiene.* 57(3), pp. E115-E120.
18. A. E. Barry and A. Arnott (2014), "Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens", *Front Immunol.* 5, pp. 359.
19. D. J. Benton et al.(2017), "Role of Neuraminidase in Influenza A(H7N9) Virus Receptor Binding", *J Virol.* 91(11).

20. Nicole M. Bouvier and Peter Palese (2008), "The biology of influenza viruses", *Vaccine*. 26 Suppl 4(Suppl 4), pp. D49-D53.
21. Megan B. Brickley and Simon Mays (2019), "Chapter 15 - Metabolic Disease", trong Jane E. Buikstra, *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition)*, Academic Press, San Diego, pp. 531-566.
22. P. J. Bugelski and P. L. Martin (2012), "Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins: cell surface targets", *Br J Pharmacol*. 166(3), pp. 823-46.
23. Angela Choi, Adolfo García-Sastre and Michael Schotsaert (2020), "Host immune response–inspired development of the influenza vaccine", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 125(1), pp. 28-35.
24. David J. Conway (2015), "Paths to a malaria vaccine illuminated by parasite genomics", *Trends in Genetics*. 31(2), pp. 97-107.
25. R. B. Couch, W. A. Keitel and T. R. Cate (1997), "Improvement of inactivated influenza virus vaccines", *J Infect Dis*. 176 Suppl 1, pp. S38-44.
26. N. de Francisco Shapovalova et al.(2015), "A systematic review of the social and economic burden of influenza in low- and middle-income countries", *Vaccine*. 33(48), pp. 6537-44.
27. F. De Mattia et al.(2011), "The consistency approach for quality control of vaccines - a strategy to improve quality control and implement 3Rs", *Biologicals*. 39(1), pp. 59-65.
28. A. M. Didierlaurent et al.(2009), "AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity", *J Immunol*. 183(10), pp. 6186-97.

29. D. Draghici, D. Balazs and I. Pitur (1986), "Improvements in the quality and consistency of production of dried BCG vaccine (Romanian substrain)", *Dev Biol Stand.* 58 ( Pt A), pp. 127-32.
30. FDA (2010), Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies, US.
31. Ervin Fodor and George G. Brownlee (2002), "Influenza virus replication", *Perspectives in Medical Virology*, Elsevier, pp. 1-29.
32. J. P. Fox et al. (1982), "Influenzavirus infections in Seattle families, 1975-1979. I. Study design, methods and the occurrence of infections by time and age", *Am J Epidemiol.* 116(2), pp. 212-27.
33. S. J. Gamblin and J. J. Skehel (2010), "Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins", *J Biol Chem.* 285(37), pp. 28403-9.
34. H. P. Gerber and N. Ferrara (2005), "Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies", *Cancer Res.* 65(3), pp. 671-80.
35. M. U. Goraya et al.(2015), "Induction of innate immunity and its perturbation by influenza viruses", *Protein Cell.* 6(10), pp. 712-21.
36. Aubree Gordon and Arthur Reingold (2018), "The Burden of Influenza: a Complex Problem", *Current epidemiology reports.* 5(1), pp. 1-9.
37. Marion F. Gruber and Valerie B. Marshall (2018), "Regulation and Testing of Vaccines", *Plotkin's Vaccines*, pp. 1547-1565.e2.
38. A. Gzyl et al. (2004), "Potency of pertussis component in the DTP vaccine--an overview of three decade study in Poland", *Biologicals.* 32(3), pp. 129-37.



39. Isao Hamaguchi et al. (2007), "Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control", *Vaccine*. 25, pp. 3355-64.
40. A. C. Hurt et al.(2012), "Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia", *J Infect Dis*. 206(2), pp. 148-57.
41. "Influenza virus vaccine live intranasal--MedImmune vaccines: CAIV-T, influenza vaccine live intranasal" (2003), *Drugs R D*. 4(5), pp. 312-9.
42. Suresh S. Jadhav et al.(2009), "Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective", *Biologicals*. 37(6), pp. 360-363.
43. W. Keitel et al. (2010), "Dose ranging of adjuvant and antigen in a cell culture H5N1 influenza vaccine: safety and immunogenicity of a phase 1/2 clinical trial", *Vaccine*. 28(3), pp. 840-8.
44. H. Kelly and I. Steffens (2013), "Complexities in assessing the effectiveness of inactivated influenza vaccines", *Euro Surveill*. 18(7), pp. 1.
45. I. Kola and J. Landis (2004), "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?", *Nat Rev Drug Discov*. 3(8), pp. 711-5.
46. Soewarta Kosen et al. (2019), *Influenza disease burden and cost estimates in Indonesia*.
47. Florian Krammer and Peter Palese (2013), "Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines", *Current Opinion in Virology*. 3(5), pp. 521-530.
48. Florian Krammer et al. (2018), "Influenza", *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1), pp. 3.

49. Sergey Kryazhimskiy et al. (2011), "Prevalence of epistasis in the evolution of influenza A surface proteins", *PLoS genetics*. 7(2), pp. e1001301-e1001301.
50. M. Kurokawa and R. Murata (1961), "On the toxicity of the "toxoid" preparation responsible for the Kyoto catastrophe in 1948", *Jpn J Med Sci Biol*. 14, pp. 249-56.
51. H. Lal et al. (2015), "Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults", *N Engl J Med*. 372(22), pp. 2087-96.
52. Graeme Laver (2002), "Influenza virus surface glycoproteins, haemagglutinin and neuraminidase: a personal account", *Perspectives in Medical Virology*, Elsevier, pp. 31-47.
53. Q. M. Le et al. (2010), "A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza", *N Engl J Med*. 362(1), pp. 86-7.
54. 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.
55. Nicola S. Lewis et al.(2016), "The global antigenic diversity of swine influenza A viruses", *eLife*. 5, pp. e12217-e12217.
56. Y. Li et al. (2011), "High-throughput neuraminidase substrate specificity study of human and avian influenza A viruses", *Virology*. 415(1), pp. 12-9.
57. J. Lin et al. (2006), "Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial", *Lancet*. 368(9540), pp. 991-7.
58. Y. Liu et al. (2014), "Review of 10 years of clinical experience with Chinese domestic trivalent influenza vaccine Anflu®", *Hum Vaccin Immunother*. 10(1), pp. 73-82.

59. Catherine J. Luke, Seema S. Lakdawala and Kanta Subbarao (2013), "18 - Influenza vaccine—live", trong Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein and Paul A. Offit, *Vaccines (Sixth Edition)*, W.B. Saunders, London, pp. 294-311.
60. I. C. Macdougall et al.(2012), "Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis-stimulating agents: new insights", *Kidney Int.* 81(8), pp. 727-32.
61. Kathleen Maletic Neuzil and Justin R. Ortiz (2016), "Chapter 21 - Influenza Vaccines and Vaccination Strategies", trong Barry R. Bloom and Paul-Henri Lambert, *The Vaccine Book (Second Edition)*, Academic Press, pp. 423-444.
62. P. L. Martin and P. J. Bugelski (2012), "Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of monoclonal antibodies and fusion proteins: soluble targets", *Br J Pharmacol.* 166(3), pp. 806-22.
63. Helen McShane and Ann Williams (2014), "A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data", *Tuberculosis.* 94(2), pp. 105-110.
64. Z. Mikloska et al. (2000), "Monophosphoryl lipid A and QS21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell proteins 4 and 27 through IFN-gamma and IL-12 production", *J Immunol.* 164(10), pp. 5167-76.
65. T. Mizukami et al. (2014), "System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test", *PLoS One.* 9(7), pp. e101835.
66. H. Momose et al. (2010), "Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines", *Jpn J Infect Dis.* 63(1), pp. 25-30.

67. R. Nachbagauer and F. Krammer (2017), "Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies", *Clinical Microbiology and Infection*. 23(4), pp. 222-228.
68. K. Nakajima (2003), "[The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]", *Nihon Rinsho*. 61(11), pp. 1897-903.
69. T. Nakayama (2011), "[Influenza vaccine and adjuvant]", *Yakugaku Zasshi*. 131(12), pp. 1723-31.
70. S. Ng and A. Gordon (2015), "Influenza Burden and Transmission in the Tropics", *Curr Epidemiol Rep*. 2(2), pp. 89-100.
71. Patrick Nguipdop-Djomo, Sara Thomas and Paul Fine (2013), "Correlates of vaccine-induced protection: methods and implications".
72. H. T. Nguyen, A. M. Fry and L. V. Gubareva (2012), "Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods", *Antivir Ther*. 17(1 Pt B), pp. 159-73.
73. K. G. Nicholson et al.(2001), "Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza", *Lancet*. 357(9272), pp. 1937-43.
74. K. G. Nicholson et al.(1979), "Clinical studies of monovalent inactivated whole virus and subunit A/USSR/77 (H1N1) vaccine: serological responses and clinical reactions", *Journal of Biological Standardization*. 7(2), pp. 123-136.
75. A. Nicoll and M. Sprenger (2013), "Low effectiveness undermines promotion of seasonal influenza vaccine", *Lancet Infect Dis*. 13(1), pp. 7-9.
76. J. Nielsen et al. (2011), "Excess mortality related to seasonal influenza and extreme temperatures in Denmark, 1994-2010", *BMC Infect Dis*. 11, pp. 350.

77. Aitor Nogales and Luis Martínez-Sobrido (2016), "Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines", *International journal of molecular sciences*. 18(1), pp. 20.
78. T. Nolan et al. (2008), "Safety and immunogenicity of a prototype adjuvanted inactivated split-virus influenza A (H5N1) vaccine in infants and children", *Vaccine*. 26(50), pp. 6383-91.
79. B. Nunes et al. (2011), "Excess mortality associated with influenza epidemics in Portugal, 1980 to 2004", *PLoS One*. 6(6), pp. e20661.
80. Klaus Olejniczak, Peter Günzel and Rolf Bass (2001), "Preclinical Testing Strategies", *Drug Information Journal - DRUG INF J*. 35, pp. 321-336.
81. C. W. Olsen (2002), "The emergence of novel swine influenza viruses in North America", *Virus Res*. 85(2), pp. 199-210.
82. John Paget et al. (2019), "Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project", *Journal of global health*. 9(2), pp. 020421-020421.
83. Sanjay S. Patel et al.(2019), "MF59-adjuvanted seasonal trivalent inactivated influenza vaccine: Safety and immunogenicity in young children at risk of influenza complications", *International Journal of Infectious Diseases*. 85, pp. S18-S25.
84. S. Paynter et al. (2015), "Seasonal immune modulation in humans: observed patterns and potential environmental drivers", *J Infect*. 70(1), pp. 1-10.
85. E. Plennevaux et al. (2010), "Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in USA: a preliminary report of two randomised controlled phase 2 trials", *Lancet*. 375(9708), pp. 41-8.
86. S. A. Plotkin (2010), "Correlates of protection induced by vaccination", *Clin Vaccine Immunol*. 17(7), pp. 1055-65.

87. Susan L. Plotkin and Stanley A. Plotkin (2013), "1 - A short history of vaccination", trong Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein and Paul A. Offit, *Vaccines (Sixth Edition)*, W.B. Saunders, London, pp. 1-13.
88. Andrew G. Polson and Reina N. Fuji (2012), "The successes and limitations of preclinical studies in predicting the pharmacodynamics and safety of cell-surface-targeted biological agents in patients", *British journal of pharmacology*. 166(5), pp. 1600-1602.
89. Y. Poovorawan et al. (2012), "Persistence and immune memory to hepatitis B vaccine 20 years after primary vaccination of Thai infants, born to HBsAg and HBeAg positive mothers", *Hum Vaccin Immunother*. 8(7), pp. 896-904.
90. C. Potter (2001), "A history of influenza", *Journal of applied microbiology*. 91, pp. 572-9.
91. Sankarasubramanian Rajaram et al. (2020), "Influenza vaccines: the potential benefits of cell-culture isolation and manufacturing", *Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy*. 8, pp. 2515135520908121-2515135520908121.
92. J. M. Reichert and J. B. Wenger (2008), "Development trends for new cancer therapeutics and vaccines", *Drug Discov Today*. 13(1-2), pp. 30-7.
93. H. A. Sampson et al.(2006), "Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium", *J Allergy Clin Immunol*. 117(2), pp. 391-7.
94. G. C. Schild (1979), "The influenza virus: Antigenic composition and immune response", *Postgraduate medical journal*. 55(640), pp. 87-97.
95. Timothy L. Schofield (2009), "Vaccine stability study design and analysis to support product licensure", *Biologicals*. 37(6), pp. 387-396.

96. Y. A. Shtyrya, L. V. Mochalova and N. V. Bovin (2009), "Influenza virus neuraminidase: structure and function", *Acta naturae*. 1(2), pp. 26-32.
97. J. M. Simmerman and T. M. Uyeki (2008), "The burden of influenza in East and South-East Asia: a review of the English language literature", *Influenza Other Respir Viruses*. 2(3), pp. 81-92.
98. John J. Skehel and Don C. Wiley (2000), "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin", *Annual Review of Biochemistry*. 69(1), pp. 531-569.
99. Jafar Soltani and Mohamad Jamil Amjadi (2014), "Safety of a Trivalent Inactivated Influenza Vaccine in Health Care Workers in Kurdistan Province, Western Iran; A Longitudinal Follow-up Study", *Iranian journal of medical sciences*. 39(2 Suppl), pp. 218-222.
100. Philippe Stas and Ignace Lasters (2009), "Strategies for preclinical immunogenicity assessment of protein therapeutics", *IDrugs : the investigational drugs journal*. 12, pp. 169-73.
101. R. Stebbings et al. (2013), "After TGN1412: recent developments in cytokine release assays", *Journal of immunotoxicology*. 10(1), pp. 75-82.
102. J. Steitz et al. (2010), "Assessment of route of administration and dose escalation for an adenovirus-based influenza A Virus (H5N1) vaccine in chickens", *Clin Vaccine Immunol*. 17(9), pp. 1467-72.
103. Anne C. Stone and Andrew T. Ozga (2019), "Chapter 8 - Ancient DNA in the Study of Ancient Disease", trong Jane E. Buikstra, *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition)*, Academic Press, San Diego, pp. 183-210.
104. K. Subbarao and J. M. Katz (2004), "Influenza vaccines generated by reverse genetics", *Curr Top Microbiol Immunol*. 283, pp. 313-42.

105. N. Takemae et al. (2008), "Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand", *Influenza Other Respir Viruses*. 2(5), pp. 181-9.
106. M. Tashiro et al. (2009), "Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007", *Antivir Ther*. 14(6), pp. 751-61.
107. M. Thalen et al. (2008), "Improving the cellular pertussis vaccine: increased potency and consistency", *Vaccine*. 26(5), pp. 653-63.
108. Yung-Chieh Tseng et al. (2019), "Egg-based influenza split virus vaccine with monoglycosylation induces cross-strain protection against influenza virus infections", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116(10), pp. 4200.
109. Mingyang Wang et al. (2011), "Influenza A virus N5 neuraminidase has an extended 150-cavity", *Journal of virology*. 85(16), pp. 8431-8435.
110. R. G. Webster (1998), "Influenza: an emerging disease", *Emerg Infect Dis*. 4(3), pp. 436-41.
111. J. J. Wolf, C. V. Kaplanski and J. A. Lebron (2010), "Nonclinical safety assessment of vaccines and adjuvants", *Methods Mol Biol*. 626, pp. 29-40.
112. Health Organization World (1997), WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccine - 1997, Annex 1, chủ biên.
113. Health Organization World (2005), WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, chủ biên.
114. Health Organization World (2008), Meeting report of WHO/KFDA workshop on stability evaluation of vaccines, Seoul.
115. Health Organization World (2014), Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, chủ biên.



116. P. F. Wright et al. (1977), "Trials of influenza A/New Jersey/76 virus vaccine in normal children: an overview of age-related antigenicity and reactogenicity", *J Infect Dis.* 136 Suppl, pp. S731-41.
117. A. Yamada, L. E. Brown and R. G. Webster (1985), "Antigenic analysis of H2 influenza virus haemagglutinin with monoclonal antibodies", *Vaccine.* 3(3 Suppl), pp. 195-8.
118. J. Ye et al. (2013), "Mutation from arginine to lysine at the position 189 of hemagglutinin contributes to the antigenic drift in H3N2 swine influenza viruses", *Virology.* 446(1-2), pp. 225-9.
119. M. Zawadka et al. (2014), "Consistency of Bordetella pertussis vaccine seed strains and potency of whole-cell pertussis vaccine still in use in Poland", *Biologicals.* 42(2), pp. 123-7.
120. Daniel Zinder et al. (2013), "The roles of competition and mutation in shaping antigenic and genetic diversity in influenza", *PLoS pathogens.* 9(1), pp. e1003104-e1003104.
121. Hassan Zaraket et al. (2020), "Review of seasonal influenza vaccination in the Eastern Mediterranean Region: Policies, use and barriers", *Journal of Infection and Public Health.* 13(3), pp. 377-384.

**PHỤ LỤC****Phụ lục 1. BIỂU MẪU THỬ NGHIỆM CÔNG HIỆU VẮC XIN CÚM (SRD)**

Mã số: ..... Số TN:.....

Vắc xin: ..... Loạt số:

.....

Cơ sở sản xuất:.....

Hạn sử dụng.....Lần thử nghiệm:

.....

Ngày thực hiện: ..... Ngày kết thúc: .....

Số lượng mẫu thử nghiệm:.....

Phương pháp thực hiện theo Sop VR07-03.

Người thực hiện.....

Phiếu chuẩn bị dụng cụ thí nghiệm số: ...../.....

**NGUYÊN VẬT LIỆU****1.1. Kháng thể chuẩn NIBSC:**

STT	KT chuẩn NIBSC	Tên chủng virút	Code	Hàm lượng (ml/ống)
1				

**1.2. Kháng nguyên chuẩn NIBSC:**

STT	KN chuẩn NIBSC	Tên chủng virút	Code	Hàm lượng kháng nguyên ( $\mu$ g HA/ml/ống)
1				

**1.3 Chuẩn bị hóa chất:**

Hóa chất	Số loạt
1% Seakem agarose	
10% Zwittergent 3-14	
PBS (-)	
Coomasie Blue	

Dung dịch tẩy màu	
Triton X-100	

## 2. QUY TRÌNH

### 2.1. Chuẩn bị phiến thạch:

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....
- Số ml agarose 1%/ phiến:.....Số phiến.....
- Pha Agarose 1%:
  - + Cân ..... g Agarose + ..... ml PBS(-)
  - + Đun cho tan thạch., để bề ổn nhiệt 56<sup>0</sup>C 15phút: Từ ..... đến.....
  - + Rót thạch ra tít 50ml: .....ml thạch/tít. Số tít:.....
  - + Để bề ổn nhiệt 56<sup>0</sup>C trong 15phút: Từ ..... đến.....
- Lau khuôn và hàn khuôn bằng thạch nóng. 
  - Pha kháng thể chuẩn vào thạch: 
    - + ..... µl KT chuẩn ..... + ..... ml thạch/tít.
    - + Rót thạch có KT vào khuôn, để 15 phút: Từ ..... đến.....
    - Đục lỗ bằng cây đục lỗ (đk 4mm): Đục ..... lỗ thạch/phiến

### 2.2. Chuẩn bị Kháng nguyên:

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....

#### 2.2.1. Hoàn nguyên, pha loãng KN chuẩn

##### a. Kháng nguyên chuẩn

- Hoàn nguyên:
  - + Hoàn nguyên 1 ống KN chuẩn ..... + .....ml nước cất pha tiêm.
- Sau hoàn nguyên để 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Pha loãng KN chuẩn:

STT	KN chuẩn NIBSC (µl)	PBS (-) (µl)	Hàm lượng kháng nguyên sau hoàn nguyên (µg HA/ml)	Hàm lượng kháng nguyên sau pha loãng (µg HA/ml)

1				
---	--	--	--	--

**b. Pha loãng mẫu vắc xin**

- Pha loãng mẫu:

STT	Mẫu vắc xin ( $\mu$ l)	PBS (-) ( $\mu$ l)	Tỉ lệ pha loãng
1			

**2.2.2. Giải hấp phụ**

- Hút ... ml kháng nguyên chuẩn, vắc xin cúm vào tuýp 2 ml
- Thêm ...  $\mu$ l Triton X-100 vào mỗi tuýp ở trên
- Lắc tuýp trên máy khoảng ... phút ở nhiệt độ phòng
- Ly tâm thu lấy nước nổi tốc độ 6000 vòng/ phút trong 5 phút

**2.2.3 Xử lý kháng nguyên với swittergent 10%**

	STT	KN ( $\mu$ l)	Swittergent 10% ( $\mu$ l)	Đề 30 phút , nhiệt độ phòng: Từ ..... đến.....
KN chuẩn	1			
Mẫu vắc xin	1			

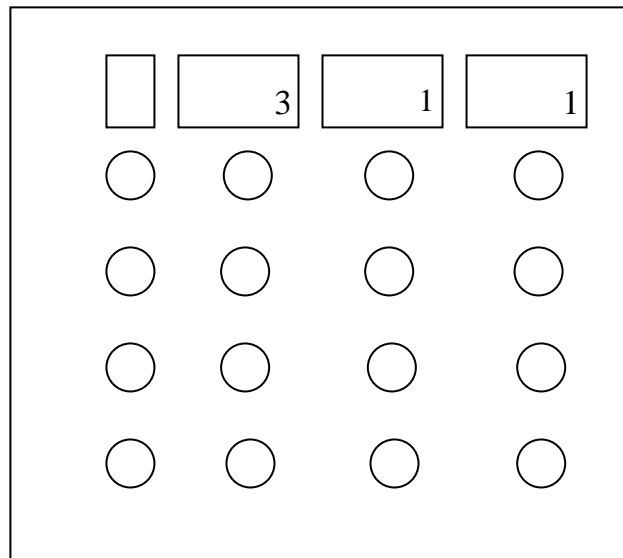
**2.2.4. Pha loãng KN (sau xử lý swittergent):** Bằng dung dịch PBS(-) để tạo các độ pha loãng 1,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  &  $\frac{1}{4}$ .

	Độ pha	KN ( $\mu$ l)	PBS (-) ( $\mu$ l)	Hàm lượng ( $\mu$ gHA/ml)
KN chuẩn	1			
	$\frac{3}{4}$			
	$\frac{1}{2}$			
	$\frac{1}{4}$			
Mẫu ktra	1			
	$\frac{3}{4}$			

	1/2			
	1/4			

**2.3 Nhỏ mẫu:**

- Nhỏ mẫu.....  $\mu\text{l}$ /giếng
- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....
- Sơ đồ nhỏ mẫu trên phiến thạch:

**Chú thích:**

Hàng 1: Nhỏ mẫu

.....

Hàng 2: Nhỏ mẫu

- Sau khi nhỏ để 10-15 phút ở nhiệt độ phòng , từ ..... đến .....
- Cát vào tủ mát 20-25°C thời gian  $\geq 18\text{h}$ , từ ..... đến .....

**2.4 Xử lý phiến thạch.**

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....
- Rửa phiến thạch bằng dd PBS(-)
- Ép phiến thạch bằng tấm kính (600g) trong 30 phút từ .....đến .....
- Làm khô phiến: Cho phiến thạch đã ép vào tủ ẩm 37°C trong 30 phút, từ .  
.....đến .....

**2.5 Nhuộm và tẩy màu phiến**

- Ngâm phiến kính ngập trong dd nhuộm 0,3% Comasie brilliant blue R-250 trong 15 phút , từ ..... đến .....

- Lấy phiến thạch ra ngâm phiến kính ngập trong dd tẩy màu methanol, nước cất, acetic acid (tỉ lệ 5:5:1) trong 5-10 phút. Làm khô phiến ở nhiệt độ phòng.

### 2.6 Đọc và tính kết quả:

Người đọc KQ.....

Người đánh giá KQ.....

#### a. Nhận dạng type kháng nguyên H5N1

	Mẫu vắc xin (H5N1)	Typ kháng nguyên chuẩn (H5N1)	Chứng âm	
			PBS (-)	Nước cất
Kết quả				

#### b. Công hiệu type kháng nguyên H5N1

			Độ pha loãng				Hàm lượng kháng nguyên ( $\mu\text{g HA/ml}$ )
Số phiến	Mẫu	Đường kính (mm)	1/1	3/4	1/2	1/4	
		1					
		2					
		1					
		2					
		1					
		2					

\* Đánh giá kết quả:

Thử nghiệm có giá trị

Không có giá trị

**3. KẾT LUẬN:**.....

**Phụ lục 2. PHIẾU THỬ NGHIỆM CẢM QUAN**

## 1. Thông tin chung

Tên mẫu thử:	
Tên cơ sở sản xuất:	
Mã NICVB:	Loại số (Vỏ hộp):
Loại số (vắc xin/sinh phẩm):	Loại số nước hồi chính (nếu có):
Ngày hết hạn vắc xin/sinh phẩm:	Ngày hết hạn nước hồi chính:
Dạng đóng ống:	
Ngày nhận mẫu:	Số lượng mẫu dùng cho thử nghiệm:
Ngày kiểm định:	Loại số chuẩn bị thử nghiệm: CBTN
Người thực hiện:	Người giám sát:

## 2. Tiến hành

*Cảm quan:* quan sát bằng mắt thường

.....  
 .....  
 .....  
 .....

*Đánh giá thử nghiệm:* Có giá trị

Không có giá trị

## 3. Kết luận

Tài liệu tham chiếu	Mức tiêu chuẩn
Hồ sơ của nhà sản xuất	
Kết luận: Cảm quan mẫu thử đạt <input type="checkbox"/> /không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn nhà sản xuất	

**PHIẾU THỬ NGHIỆM**  
**(Cảm quan, thể tích thu hồi)**

## 1. Thông tin chung

Tên mẫu thử:	
Tên cơ sở sản xuất:	
Mã NICVB:	
Loại số (Vỏ hộp):	Loại số (vắc xin/sinh phẩm):
Ngày hết hạn:	Dạng đóng ống:
Ngày nhận mẫu:	Số lượng mẫu dùng cho thử nghiệm:
Ngày kiểm định:	Loại số chuẩn bị thử nghiệm: CBTN
Người thực hiện:	Người giám sát:

## 2. Tiến hành

## 2.1. Cảm quan: quan sát bằng mắt thường

.....

.....

.....

.....

.....

## 2.2. Thể tích thu hồi

Thể tích thu hồi của mẫu được tính như sau:  $X = A/B$

Trong đó: A: khối lượng cân được của mẫu trong 1 đơn vị đóng ống

B: Khối lượng cân được của 1 ml mẫu

	Khối lượng (g)	Thể tích (ml)		Khối lượng (g)	Thể tích (ml)
Lọ 1			Lọ 4		
Lọ 2			Lọ 5		
Lọ 3			1ml mẫu =		

Đánh giá thử nghiệm: Có giá trị

Không có giá trị



## 3. Kết luận

Tài liệu tham chiếu	Mức tiêu chuẩn
Hồ sơ của nhà sản xuất	
Kết luận: Cảm quan của mẫu thử đạt <input type="checkbox"/> /không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn nhà sản xuất Thể tích thu hồi của mẫu thử đạt <input type="checkbox"/> /không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn của nhà sản xuất	

**PHIẾU THỬ NGHIỆM**  
(Cảm quan, thể tích đóng ống)

## 1. Thông tin chung

Tên mẫu thử:	
Tên cơ sở sản xuất:	
Mã NICVB:	
Loại số (vỏ hộp):	Loại số (vắc xin/sinh phẩm):
Ngày hết hạn:	Dạng đóng ống:
Ngày nhận mẫu:	Số lượng mẫu dùng cho thử nghiệm:
Ngày kiểm định:	Loại số chuẩn bị thử nghiệm: CBTN
Người thực hiện:	Người giám sát:

## 2. Tiến hành

## 2.1. Cảm quan: quan sát bằng mắt thường

.....  
 .....  
 .....

## 2.2. Thể tích đóng ống

- Thể tích đóng ống của mẫu được tính như sau:  $X = (A1 - A2)/B$

Trong đó: A1: khối lượng bao bì có chứa mẫu

A2: khối lượng bao bì không chứa mẫu

B: Khối lượng 1ml mẫu

	Khối lượng bao bì chứa mẫu	Khối lượng bao bì không chứa mẫu	Thể tích (ml)
Lọ 1			
Lọ 2			
Lọ 3			
1ml mẫu			

Đánh giá thử nghiệm: Có giá trị

Không có giá trị

## 3. Kết luận

Tài liệu tham chiếu	Mức tiêu chuẩn
Hồ sơ của nhà sản xuất	
<p>Kết luận: Cảm quan của mẫu thử đạt <input type="checkbox"/>/không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn của nhà sản xuất</p> <p>Thể tích đóng ống của mẫu thử đạt <input type="checkbox"/>/không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn của nhà sản xuất</p>	

**Phụ lục 3. PHIẾU THỬ NGHIỆM ĐO PH VẮC XIN**

## 1. Thông tin chung

Tên mẫu thử:	
Tên cơ sở sản xuất:	
Mã NICVB:	Loại số (Vỏ hộp):
Loại số dung môi/nước hồi chỉnh (nếu có):	Loại số (lọ/ống):
Ngày hết hạn (dung môi/nước hồi chỉnh):	Ngày hết hạn (lọ/ống):
Ngày hết hạn:	Dạng đóng ống:
Ngày nhận mẫu:	Số lượng mẫu dùng cho thử nghiệm:
Ngày kiểm định:	Loại số chuẩn bị thử nghiệm: CBTN
Người thực hiện:	Người giám sát:

## 2. Tiến hành đo mẫu

pH mẫu lần 1: ..... pH mẫu lần 2: ..... pH mẫu (trung bình):  
.....

Nhiệt độ của mẫu: .....

Đánh giá thử nghiệm: Có giá trị:

Không có giá trị:

## 3. Kết luận

Tài liệu tham chiếu	Mức tiêu chuẩn	Kết quả
Hồ sơ của nhà sản xuất		
Kết luận: pH mẫu thử đạt <input type="checkbox"/> /không đạt <input type="checkbox"/> theo mức tiêu chuẩn nhà sản xuất		

**Phụ lục 4. PHIẾU THỬ NGHIỆM AN TOÀN KHÔNG ĐẶC HIỆU VẮC XIN**

Tên vắc xin:..... Loại số:.....

Tên cơ sở sản xuất:..... Hạn dùng:.....

Nước hồi chính:..... Loại số:.....

Mã số NICVB:..... Mã số thử nghiệm:.....

Phiếu dự trữ ĐVTN số:..... Phiếu cung cấp ĐVTN số:.....

Phiếu chuẩn bị dụng cụ số:.....

Chuẩn bị dung dịch tiêm:

<b>Ngày pha</b>	<b>Người pha và giám sát</b> (Họ tên, chữ ký)	<b>Pha thực tế</b>
	1. .... 2. ....	

Liều và đường tiêm:...../chuyết/.....

Ngày tiêm: .....thời gian tiêm:.....Ngày kết thúc thử nghiệm:.....

Người tiêm:.....Người giám sát:.....

## KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM (Ghi rõ thời gian theo dõi)

Dấu chuột	Trọng lượng trước tiêm	Trọng lượng sau tiêm (g)							Tăng Giảm
		1	2	3	4	5	6	7	
Người theo dõi 1									
Người theo dõi 2									

Kiểm tra 2h sau tiêm:.....

Những biểu hiện bất thường (nếu có):.....

.....

Nhận xét thử nghiệm: Thử nghiệm có giá trị  Không giá trị:

Kết luận:.....

**Phụ lục 5. PHIẾU THỬ NGHIỆM CHẤT GÂY SÓT**

Mã số TN:.....

Tên vắc xin/ sinh phẩm:.....

Mã số NICVB:.....

Loại số:.....Hạn dùng:.....

Tên cơ sở sản xuất:.....

Nước hồi chính/dung dịch pha loãng:.....

Loại số:..... Hạn dùng:.....

Tên cơ sở sản xuất:.....

Phiếu dự trữ ĐVTN số: ..... Phiếu cung cấp ĐVTN số:.....

Phiếu thử nghiệm thăm dò số:.....Phiếu chuẩn bị dụng cụ số:.....

Ngày thực hiện:.....Ngày kết thúc:.....

Phương pháp:.....

**Tiến hành thử nghiệm**

Pha thực tế: .....

Liều tiêm: .....

Người tiêm: .....Người giám sát: .....

**Kết quả thử nghiệm (có bản kết quả đính kèm)**

Số thử	1	2	3
Mã số ĐVTN			
Mã số SPYT			
Trọng lượng thử (kg)			
Nhiệt độ thử ban đầu ( $^{\circ}\text{C}$ )			
Nhiệt độ thử cao nhất sau tiêm ( $^{\circ}\text{C}$ )			
Đáp ứng của mỗi thử ( $^{\circ}\text{C}$ )			
Tổng đáp ứng của 3 thử ( $^{\circ}\text{C}$ )			

**Đánh giá thử nghiệm**Có giá trị Không có giá trị **d. Bảng tổng hợp kết quả**

	Nhiệt độ	Người tổng hợp ký
Tổng đáp ứng của ... thử trong lần thử thứ 1		
Tổng đáp ứng của... thử trong lần thử thứ 2		
Tổng đáp ứng của ... thử trong lần thử thứ 3		
Tổng đáp ứng của ... thử trong lần thử thứ 4		
Kết quả tổng đáp ứng của .... thử trong ..... lần thử		

**e. Tiêu chuẩn đánh giá:**



.....  
.....  
.....  
.....

**KẾT LUẬN**

.....  
.....

**Phụ lục 6. PHIẾU THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG VẮC XIN CÚM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SRD**

Mã số: ..... Số TN:.....

Vắc xin: ..... Loạt số:

.....

Cơ sở sản xuất:.....

Hạn sử dụng.....Lần thử nghiệm:

.....

Ngày thực hiện: ..... Ngày kết thúc: .....

Số lượng mẫu thử nghiệm:.....

Phương pháp thực hiện theo SOP VR07-02

**1. CHUẨN BỊ**

**1.1 Phiếu chuẩn bị dụng cụ thí nghiệm số:** ...../.....

**1.2 Phiếu chuẩn bị hóa chất số:** ...../.....

- Kháng thể chuẩn NIBSC:

STT	KT chuẩn NIBSC	Tên chủng vi rút	Code	Hàm lượng (ml/ống)
1				
2				
3				

Kháng nguyên (KN) chuẩn NIBSC:

STT	KN chuẩn NIBSC	Tên chủng vi rút	Code	Hàm lượng KN ( $\mu\text{g}$ HA/ml/ống)
1				
2				
3				

- Chuẩn bị hóa chất:

Hóa chất	Số loạt
1% Seakem agarose	
10% Zwittergent 3-14	
PBS (-)	
Coomasie Blue	
Dung dịch tẩy màu	

## 2. QUY TRÌNH

### 2.1 Chuẩn bị phiên thạch:

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....
- Số ml agarose 1%/ phiên:.....Số phiên.....
- Pha Agarose 1%:
- + Cân ..... g Agarose + ..... ml PBS(-)

- + Đun cho tan thạch., để bề ổn nhiệt 56<sup>0</sup>C 15phút: Từ ..... đến.....
- + Rót thạch ra tếp 50ml: .....ml thạch/tếp. Số tếp:.....
- + Để bề ổn nhiệt 56<sup>0</sup>C trong 15phút: Từ ..... đến.....
- Lau khuôn và hàn khuôn bằng thạch nóng.
- Pha kháng thể chuẩn vào thạch:
- + ..... µl KT chuẩn ..... + ..... ml thạch/tếp.
- + ..... µl KT chuẩn ..... + ..... ml thạch/tếp.
- + ..... µl KT chuẩn ..... + ..... ml thạch/tếp.
- + Rót thạch có KT vào khuôn, để 15 phút: Từ ..... đến.....
- Đục lỗ bằng cây đục lỗ (đk 4mm): Đục ..... lỗ thạch/phiên

## 2.2 Chuẩn bị Kháng nguyên:

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....

### 2.2.1 Hoàn nguyên, pha loãng KN chuẩn

- Hoàn nguyên 1 ống KN chuẩn ..... + .....ml nước cất pha tiêm.
- Hoàn nguyên 1 ống KN chuẩn ..... + .....ml nước cất pha tiêm.
- Hoàn nguyên 1 ống KN chuẩn ..... + .....ml nước cất pha tiêm.
- Sau hoàn nguyên để 5 phút ở nhiệt độ phòng.

+ Pha loãng KN chuẩn:

.....µl KN..... + ..... (µl) PBS (-)

.....µl KN..... + ..... (µl) PBS (-)

.....µl KN..... + ..... (µl) PBS (-)

**2.2.2 Pha loãng mẫu bulk (nếu có):** 

STT	Tỷ lệ pha loãng	PBS (-) (μl)	Mẫu bulk (μl)
1			
2			
3			
4			

**2.2.3 Xử lý kháng nguyên với swittergent 10%**

	STT	KN (μl)	swittergent 10% (μl)	Đề 30 phút , nhiệt độ phòng: Từ ..... đến.....
KN chuẩn				
Mẫu ktra				

**2.3 Nhỏ mẫu:** ..... μl/giếng  Ngày thực

hiện:.....Người thực hiện:.....

- Mẫu kiểm tra nhỏ ..... /giếng, mỗi mẫu nhỏ 2 giếng.
- 2 giếng của chứng âm nhỏ.....
- Sau khi nhỏ đề 10-15 phút ở nhiệt độ phòng , từ ..... đến .....
- Cát vào tủ mát 20-25<sup>0</sup>C thời gian ≥18h, từ .....đến .....

**2.4 Xử lý phiến thạch.**

- Ngày thực hiện:.....Người thực hiện:.....
- Rửa phiến thạch bằng dd PBS(-)
- Ép phiến thạch bằng tấm kính (600g) trong 30 phút từ .....đến .....
- Làm khô phiến: Cho phiến thạch đã ép vào tủ ẩm 37<sup>0</sup>C trong 30 phút, từ .  
.....đến .....

**2.5 Nhuộm và tẩy màu phiến**

- Ngâm phiến kính ngập trong dd nhuộm 0,3% Comasie brilliant blue R-250 trong 15 phút , từ ..... đến .....
- Lấy phiến thạch ra ngâm phiến kính ngập trong dd tẩy màu methanol, nước cất, acetic acid (tỉ lệ 5:5:1) trong 5-10 phút. từ ..... đến .....
- Làm khô phiến ở nhiệt độ phòng.

**2.6 Đọc và tính kết quả:**

Người đọc KQ.....

Người đánh giá KQ.....

**Nhận dạng type kháng nguyên H1N1**

	KN kiểm tra	Týp kháng nguyên chuẩn (H1N1)	Chứng âm		
Kết quả					



**Phụ lục 7. GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤT LƯỢNG CÁC LÔ VẮC XIN CÚM  
MÙA IVACFLU-S**

Các lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S và giả dược sử dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng đã được Viện Quốc gia Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm (NICVB) kiểm định và cấp giấy chứng nhận kết quả chất lượng số 00114/VXVR-NC, 00214/VXVR-NC, 00314/VXVR-NC và 00415/VXVR-NC.