

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 2009, Việt Nam đã tự sản xuất được vắc xin (VX) sởi với tên MVVAC tại Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất VX và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC) theo công nghệ và tiêu chuẩn Nhật Bản.

Tính ổn định của VX có ảnh hưởng quan trọng đến sự thành công của chương trình tiêm chủng trên toàn thế giới. Tính ổn định này gồm hai loại: Tính ổn định (đồng đều) về chất lượng của các loạt VX (lot-to-lot consistency) và tính ổn định ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau (Thermostability hay stability: Ổn định nhiệt).

Với mong muốn đánh giá được tính ổn định của VX sởi MVVAC trong suốt quá trình từ ngay sau khi sản xuất, trong thời gian bảo quản đến khi sử dụng chúng tôi tiến hành đề tài “Đánh giá tính ổn định của vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013” với hai mục tiêu:

1. Đánh giá tính ổn định về chất lượng của các loạt vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013,
2. Đánh giá tính ổn định của vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau.

### NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Nghiên cứu đã đánh giá được tính ổn định của VX sởi sản xuất tại Việt Nam MVVAC trong suốt quá trình từ ngay sau khi sản xuất, trong thời gian bảo quản đến khi sử dụng.

1. Khẳng định được các loạt MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013 có chất lượng ổn định, từ đó khẳng định được sự ổn định của cả *qui trình sản xuất* và *hệ thống chất lượng* của nhà máy. Việc khẳng định được các loạt MVVAC có chất lượng ổn định cũng chứng minh được các loạt MVVAC sản xuất tiếp theo có chất lượng giống như ba loạt đầu tiên đã dùng trong thử nghiệm lâm sàng, chúng tạo được đáp ứng miễn dịch cũng như an toàn như loạt đã dùng trong thử nghiệm lâm sàng.

2. Nghiên cứu đã đánh giá được tính ổn định của MVVAC ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau 37 °C; 25 °C; 2-8 °C và tính ổn định của VX sau hồi chỉnh, bảo quản ở 2-8 °C.

Nghiên cứu đã xác định được loại chỉ thị nhiệt độ VX (Vaccine Vial Monitor: VVM) của MVVAC là VVM 7. Việc gắn VVM7 lên từng lọ MVVAC sẽ giúp cho người sử dụng được dùng những lọ VX thực sự có hiệu quả phòng bệnh; tránh lãng phí MVVAC một cách không cần thiết khi gặp các sự cố mất điện, thảm họa thiên nhiên; giúp quản lý kho VX khi căn cứ tình trạng VVM để lựa chọn những lọ MVVAC sử dụng trước. Dựa vào chính sách sử dụng VX ngoài dây chuyền lạnh trong một số trường hợp đặc biệt của WHO và UNICEF, VVM còn làm tăng tỷ lệ tiêm VX sởi ở vùng địa lý và kinh tế khó khăn, khắc phục được tình trạng thiếu tủ lạnh bảo quản VX trên diện rộng tại các huyện như hiện nay. Việc xác định và sử dụng VVM cho MVVAC cũng là một điều kiện quan trọng để MVVAC được đề nghị cấp giấy chứng nhận đạt tiêu chuẩn WHO, giúp POLYVAC có thể xuất khẩu VX.

### BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án gồm 132 trang: Đặt vấn đề 2 trang; tổng quan 38 trang; đối tượng và phương pháp nghiên cứu 24 trang; kết quả 32 trang; bàn luận 34 trang; kết luận 1 trang, kiến nghị 1 trang. Luận án có 42 hình; 30 bảng; 170 tài liệu tham khảo trong đó có 53 tài liệu tiếng Việt, 117 tài liệu tiếng Anh. Phụ lục bao gồm các biểu mẫu ghi chép quá trình thực hiện các thử nghiệm.

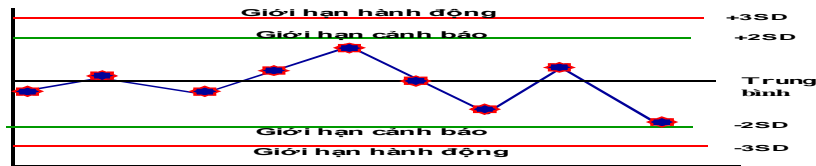
### Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Vi rút sởi

Vi rút sởi thuộc chi *Morbilivirus*, họ *paramyxoviridae*; chỉ có một typ huyết thanh, không có typ phụ.

Bệnh sởi là bệnh truyền nhiễm mạnh nhất tấn công vào con người. Bệnh có thể phòng được bằng VX và có thể thanh

toán được vì có ổ chứa duy nhất là người, không có trung gian truyền bệnh, chỉ có một tuyp huyết thanh và có VX phòng bệnh



Nhật Bản chuyên giao.

### 1.2.2. Đáp ứng miễn dịch và phản ứng phụ sau tiêm chủng vắc xin sởi

Đáp ứng miễn dịch sau tiêm VX sởi tương tự như sau nhiễm sởi tự nhiên nhưng nhanh hơn đáp ứng miễn dịch do mắc tự nhiên vài ngày. Chủng AIK-C tạo được đáp ứng miễn dịch cao và được coi là chủng an toàn nhất trong các chủng sản xuất VX sởi hiện nay. Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên các loạt MVVAC sản xuất đầu tiên trong giai đoạn 2009-2013 cho thấy MVVAC đạt yêu cầu về an toàn và hiệu quả phòng bệnh. Tuy nhiên, để chứng minh các loạt MVVAC sản xuất tiếp theo có chất lượng giống như loạt đã dùng trong thử nghiệm lâm sàng hay không, phải dựa vào nghiên cứu về tính ổn định chất lượng của các loạt MVVAC.

### 1.3. Kiểm định vắc xin, tính ổn định chất lượng của các loạt vắc xin

Kiểm định VX liên quan đến việc lấy mẫu, thực hiện thử nghiệm, hồ sơ hoá tài liệu để đảm bảo: Các thử nghiệm cần thiết đã được thực hiện chính xác; các nguyên vật liệu, VX chưa được phép sử dụng đến khi chất lượng của chúng được đánh giá đạt tiêu chuẩn.

Tính ổn định chất lượng của các loạt VX là khái niệm nhằm vào việc đảm bảo cho sự xuất xưởng một cách liên tục các loạt VX an toàn và hiệu quả, được xác định bằng cách kiểm

định chất lượng từng loạt VX và tiến hành phân tích xu hướng (trend analysis) kết quả kiểm định.

Hình 1.1: Các mốc chính phân tích sự ổn định chất lượng VX

Khi phân tích xu hướng các chỉ số định lượng, WHO sử dụng đồ thị Shewhart để đánh giá độ ổn định của một bộ số liệu kết quả kiểm định dựa vào các khoảng sau:

Trung bình (TB)  $\pm$  2 độ lệch chuẩn (SD) và TB  $\pm$  3SD là các mốc cơ bản: Vùng ngoài khoảng TB  $\pm$  3SD được gọi là vùng hành động. Nếu có một điểm nằm ngoài vùng này: Cần phải cân nhắc xem loạt VX đó có được sử dụng không kể cả khi nó vẫn đạt tiêu chuẩn xuất xưởng. Khoảng (TB-2SD, TB-3SD) và (TB+2SD, TB+3SD) là vùng cảnh báo. Nếu có điểm rơi vào vùng này cũng phải tìm nguyên nhân để phòng ngừa. Nếu có các hiện tượng trên xảy ra, chứng tỏ tồn tại lỗi hệ thống hoặc xảy ra sự cố cần điều chỉnh.

Ngoài ra, bộ số liệu được gọi là ổn định cao nếu không có: Hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng (TB-2SD, TB-3SD) hoặc (TB+2SD, TB+3SD); 4 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng TB  $\pm$  1SD; trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp; trên 8 điểm liên tục nằm ở một phía đường trung bình.

Dựa trên nguyên lý: Chất lượng ổn định của các loạt VX là kết quả của việc áp dụng một cách nghiêm ngặt hệ thống chất lượng cộng với sự ổn định của qui trình sản xuất. Hai yếu tố trên đảm bảo cho việc tạo ra các loạt VX liên tiếp an toàn và hiệu quả. Vì vậy, việc kiểm định chất lượng không chỉ cho những số liệu về chất lượng từng loạt VX cụ thể mà còn cho

biết mức độ ổn định của cả *qui trình sản xuất, hệ thống chất lượng* thông qua việc phân tích xu hướng các số liệu thu được.

Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về tính ổn định chất lượng của các loại MVVAC.

#### 1.4. Tính ổn định nhiệt của vắc xin

##### 1.4.1. Mục đích của nghiên cứu tính ổn định nhiệt

Các nghiên cứu tính ổn định nhiệt nhằm mục đích chứng minh VX sử dụng trên thị trường vẫn duy trì được tính an toàn, hiệu quả bảo vệ và các tiêu chuẩn kỹ thuật khác của nó đến thời điểm cuối cùng của hạn sử dụng. Khi nhà sản xuất thay đổi qui trình sản xuất hoặc một yếu tố quan trọng nào đó trong quá trình sản xuất như: Thẻ tích nôi lên men, địa điểm sản xuất, nguyên vật liệu đầu,... các nghiên cứu tính ổn định nhiệt trước và sau khi thay đổi giúp chứng minh sự thay đổi đó không ảnh hưởng đến tính ổn định của sản phẩm. WHO khuyến cáo mỗi nhà sản xuất phải thực hiện các nghiên cứu tính ổn định nhiệt để tự xác định hạn sử dụng thực tế cho từng VX do họ sản xuất.

##### 1.4.2. Các chỉ số đánh giá tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của vắc xin

Theo WHO, tính ổn định nhiệt được phân tích thống kê dựa trên sự giảm công hiệu của VX theo thời gian bảo quản. Công hiệu là chỉ số quan trọng nhất để đánh giá chất lượng VX, thước đo khả năng bảo vệ con người trước bệnh tật. Đối với các VX vi rút sống giảm độc lực, công hiệu được tính bằng nồng độ vi rút có trong VX. Các chỉ số khác cũng có thể được cân nhắc.

##### 1.4.3. Công cụ giám sát sự phơi nhiễm của vắc xin với nhiệt độ

Có nhiều loại công cụ dùng giám sát sự phơi nhiễm của VX với nhiệt độ cao, tuy nhiên, chỉ có VVM đánh giá được mức độ phơi nhiễm với nhiệt độ của từng lọ VX; trong suốt quá trình từ khi sản xuất, bảo quản, vận chuyển đến khi sử dụng; dễ đọc, gọn nhẹ, tiện lợi do nó được gắn lên từng lọ VX. VVM biểu thị sự phơi nhiễm tích lũy của VX với nhiệt độ môi trường.

#### 1.4.4. Phân loại và cách xác định chỉ thị nhiệt lọ vắc xin

VVM được chia làm 4 loại bằng cách xác định công hiệu của VX khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau.

**Bảng 1.1: Phân loại và cách xác định VVM**

Loại VVM	Mức độ ổn định của VX	Hạn dùng ở 37 <sup>0</sup> C (ngày)	Hạn dùng ở 25 <sup>0</sup> C (ngày)	Hạn dùng ở 2-8 <sup>0</sup> C
2	Thấp	2	Không xác định	225 ngày
7	Vừa	7	45	> 2 năm
14	Trung bình	14	90	> 3 năm
30	Cao	30	193	> 4 năm

#### 1.4.5. Tình hình nghiên cứu tính ổn định nhiệt của MVVAC

MVVAC đã được sản xuất theo hai giai đoạn: **Giai đoạn 1:** Năm 2007, MVVAC được sản xuất từ bán thành phẩm của Viện Kitasato, Nhật Bản. **Giai đoạn 2:** Từ năm 2009, POLYVAC tự sản xuất MVVAC từ những công đoạn đầu tiên để tạo ra bán thành phẩm rồi VX thành phẩm.

MVVAC sản xuất từ bán thành phẩm của Viện Kitasato đã được đánh giá tính ổn định nhiệt nhưng chưa có nghiên cứu nào về tính ổn định nhiệt của MVVAC do POLYVAC sản xuất trong giai đoạn 2 để chứng minh sự thay đổi đó trong quá trình sản xuất không ảnh hưởng đến tính ổn định của VX.

## CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu:** VX sởi sản xuất tại Việt Nam (MVVAC) từ năm 2009 đến năm 2013.

**2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:** Từ 9/2011-10/2014 tại POLYVAC.

### 2.3. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.3.1. Trang thiết bị, dụng cụ

Các phòng thí nghiệm, trang thiết bị, dụng cụ chuyên dụng phục vụ kiểm định chất lượng VX như: Phòng sạch các cấp độ, tủ cấy vô trùng, tủ ẩm, máy đếm hạt, máy đo pH,...

2.3.2. (Mẫu chính), tế bào, hoá chất, môi trường bằng phương pháp M<sup>2</sup>ngiêu, chuẩn M<sup>2</sup>in H<sup>2</sup>an BOM Y<sup>2</sup>VA Công và dùng V<sup>2</sup>chiếm (chuẩn) 1, X<sup>2</sup>6 định độ cảm K<sup>2</sup>oà sử dụng để tính và định độ cảm V<sup>2</sup> bằng phương pháp này và định hao hụt trọng lượng của VX khi làm khô. Phương pháp nghiên cứu tính độ lệch trọng lượng giữa các Ng<sup>2</sup>M<sup>2</sup> trong hàm dịch. Thiết (độ lệch trọng H<sup>2</sup>oàng), đếm số hạt không tan trong VX (Hạt không tan) độH.

Tiêu chuẩn đánh giá: Theo tiêu chuẩn của WHO, tại tài liệu WHO TRS840, annex 3 cũng như tiêu chuẩn Dược điển Nhật Bản.

2.4.2. Đánh giá tính ổn định nhiệt

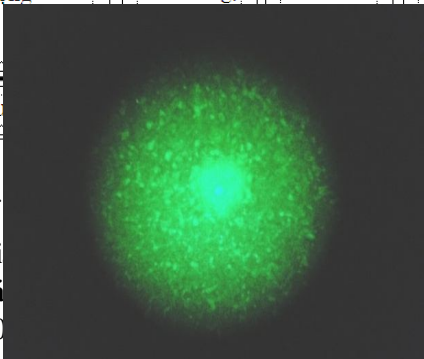
Mỗi nhiệt độ chọn ngẫu nhiên 3 loạt VX liên tiếp, đánh giá ổn định của 3 loạt để các thời điểm như sau: 0 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày, 8 ngày, 10 ngày, 12 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng, 8 tháng, 14 ngày, 21 ngày, 27 tháng.

**CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Kết quả đánh giá tính ổn định chất lượng**

**3.1.1. Kết quả nhận dạng**

- Ổn định nhiệt,	- 0h,
- An toàn chung,	- 2h,
- Độ lệch trọng lượng,	- 4h,
- Đếm hạt,	- 6h,
	- 8h.

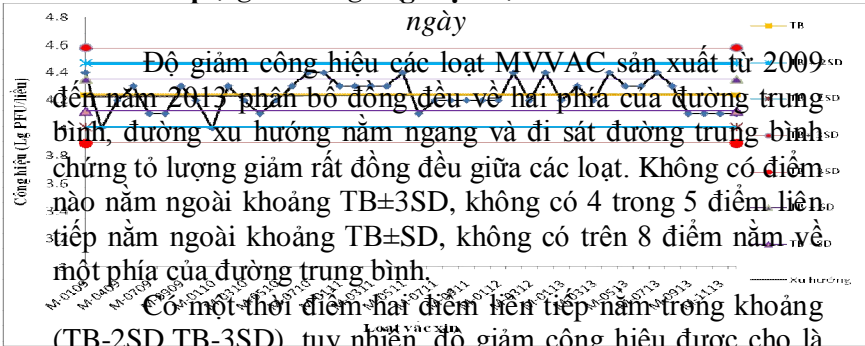


Hình 2.1: Mẫu chính MVVAC

2.4.1. Đánh giá ổn định nhiệt  
Cỡ mẫu và các điều kiện thử nghiệm: MVVAC sản xuất từ năm 2009.

Phương pháp thu thập số liệu: Xác định chất lượng của từng loạt VX bằng cách tiến hành tế bào hạt nhân và kháng nguyên sợi trong VX bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang (H<sup>2</sup>oàng) loại VX không biết VX giai đoạn 2009-2013 đồng hồ và không nghiệm) bằng phương pháp này để định độ cảm, xác định tính ổn định nhiệt của VX khi bảo quản ở 37<sup>0</sup>C/7

**3.1.2/ Kết quả kiểm tra công hiệu loạt MVVAC khi ủ 37<sup>0</sup>C/7 ngày**

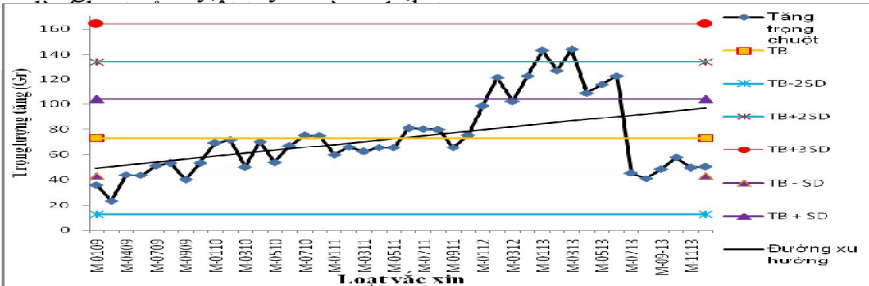


Độ giảm công hiệu các loạt MVVAC sản xuất từ 2009 đến năm 2013 phân bố đồng đều về hai phía của đường trung bình, đường xu hướng nằm ngang và đi sát đường trung bình chứng tỏ lượng giảm rất đồng đều giữa các loạt. Không có điểm nào nằm ngoài khoảng TB±3SD, không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng TB±SD, không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình.

Có một thời điểm hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng (TB-2SD, TB-3SD), tuy nhiên, độ giảm công hiệu được cho là càng thấp càng tốt.

**3.1.4. Kết quả kiểm tra vô trùng**  
 Công hiệu MVVAC ổn định, thể hiện: Không có điểm nào nằm ngoài khoảng TB±3SD, hầu hết các điểm nằm trong khoảng TB±2SD. Chỉ có hai điểm rơi rớt vào khoảng (TB-3SD, TB-3SD), đây là 2 loạt của năm 2009 và 2010, khi POE VVAC mới bắt đầu sản xuất MVVAC từ những công đoạn đầu tiên.

**3.1.5. Kết quả kiểm tra thử an toàn trên đồng vật thực nghiệm**  
 Chuột thử VX của 42 loạt đều khỏe mạnh, tăng cân, không có các triệu chứng bất thường như giảm hoạt động, rụng lông, tiêu chảy, chảy nước mũi,...



**Hình 3.4: Tăng trọng chuột lang của các loạt MVVAC**  
 Trọng lượng chuột lang tăng trung bình trong các lần thử nghiệm đạt được các yêu cầu cơ bản của độ ổn định.

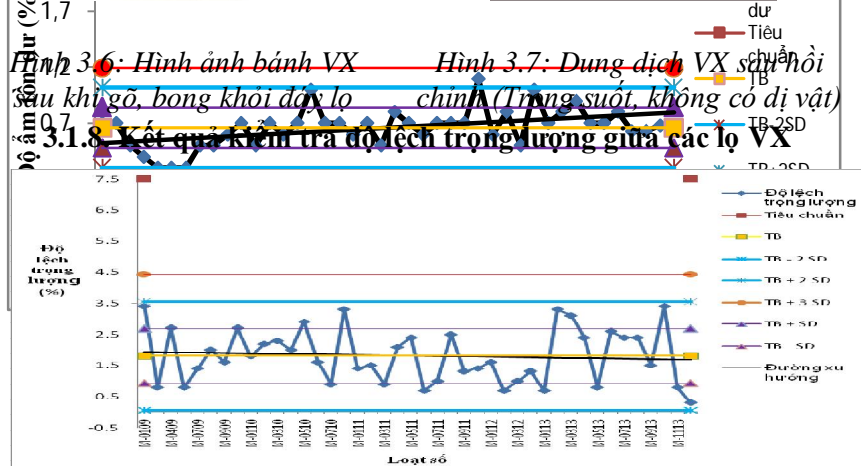
**Bảng 3.1: Tăng trọng các nhóm chuột lang trong thử nghiệm kiểm tra an toàn 42 loạt VX**

	n	$\bar{x} \pm s$ (gram)	p
--	---	------------------------	---

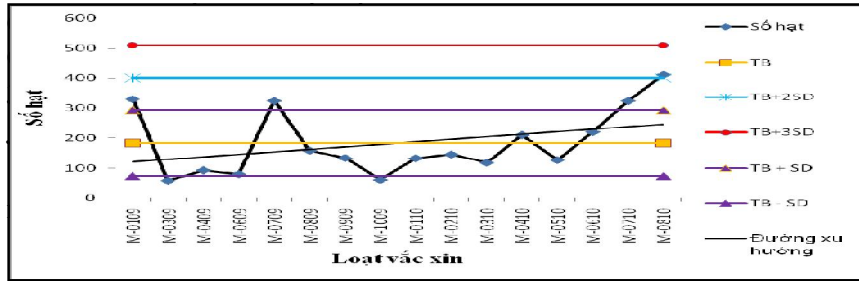
<b>Chỉ số kiểm tra chất lượng sản phẩm</b>	42	73,33 ± 30,30	
Nhóm chuột tiêm 20 ban nước tiểu đều có màu trắng. Số chuột bị 0,01		69,81 ± 27,82	
Nhóm chuột không tiêm bị sùi hoặc có nốt bất thường. Tất cả		69,81 ± 27,82	

Trong lượng gây trung bình giữa hai nhóm chuột dạng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

tra độ ẩm tồn c  
 ng trọng chuột n  
 MVVAC ổn địn  
 B ± 2SD. Trọng  
 không có sự khá  
 kê

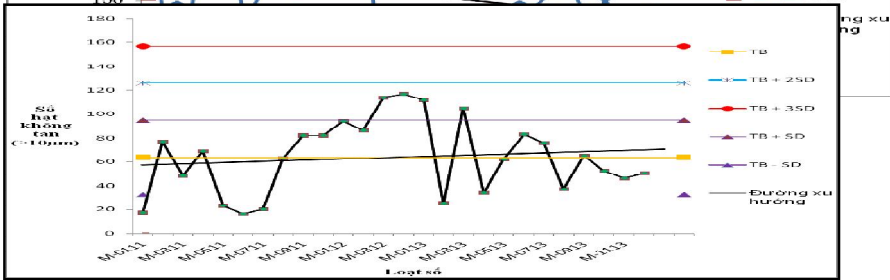


đoạn đầu tiên một độ lệch trọng lượng có 4 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng không 1SD, 2 điểm liên tiếp nằm ngoài phía của đường trung bình ± 2SD. Đường xu hướng đi sát đường trung bình và có độ dốc nhẹ chứng tỏ các lọ VX càng ngày càng đồng đều về trọng lượng. Đạt tất cả các tiêu chuẩn đánh giá độ ổn định cao: Không



Hình 3.10: Số hạt kích thước  $\geq 10 \mu\text{m}$  giai đoạn 2009-2010

Giai đoạn 2009-2010, loạt M-0810 vẫn nằm trong khoảng  $(\text{TB}+2\text{SD}, \text{TB}+3\text{SD})$ , giới hạn cảnh báo chứ không phải giới hạn hành động. Đường xu hướng có đặc điểm đi lên rất rõ.



nằm ở một phía đường trung bình. Nguyên nhân của hiện tượng trên bắt nguồn từ việc số hạt kích thước  $\geq 10 \mu\text{m}$  của sản phẩm giảm dần trong giai đoạn 2011-2013 cùng ổn định và cách rất xa tiêu chuẩn cho phép (8000 hạt/l) và đạt tất cả các tiêu chí tính ổn định cao.

Bảng 3.2: So sánh số hạt theo từng giai đoạn

	Số loạt VX	$\bar{x} \pm s$	p
<b>Giai đoạn 2009-2010</b>	16	$183 \pm 108,9$	0,0021
<b>Giai đoạn 2011-2013</b>	26	$63,7 \pm 31,1$	

Từ năm 2011 số hạt có kích thước  $\geq 10 \mu\text{m}$  giảm so với giai đoạn trước một cách có ý nghĩa thống kê với  $P < 0,01$ .



3.1.10 Phân tích tính ổn định pH các loại MVVAC ở 8 °C

Sau 27 tháng công hiệu của cả ba loạt VX vẫn trên 3 log PFU/liều, do đó, nếu bảo quản MVVAC ở 2-8 °C thì sau 2 năm VX vẫn sử dụng được.

Bảng 3.3: Kết quả kiểm tra tất cả các chỉ số của 3 loạt tại thời điểm 27 tháng

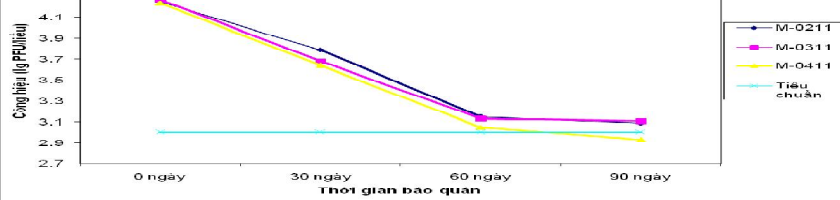
Loạt số	M-0811	M-0911	M-1011
Chỉ số	0 tháng	27 tháng	0 tháng
Nhập dạng	Đạt	Đạt	Đạt
Vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt
An toàn	Đạt	Đạt	Đạt
Độ âm tính (<= 2%)	Đạt	Đạt	Đạt
Quan sát trạng thái	Đạt	Đạt	Đạt

3.2. Kết quả đánh giá tính ổn định của MVVAC ở các điều kiện, nhiệt độ bảo quản khác nhau

3.2.1. Kết quả đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 2-8 °C

Kết quả đánh giá công hiệu của MVVAC ở các thời điểm bảo quản là 2 năm sau khi sản xuất.

3.2.2. Kết quả đánh giá tính ổn định ở nhiệt độ 20-25 °C





Hình 3.14: Công hiệu của MVVAC bảo quản ở 25 °C

Sau 90 ngày bảo quản ở 25 °C một loạt MVVAC công hiệu chỉ còn 2,93 lg PFU/liều. Sau 60 ngày, công hiệu của cả ba loạt MVVAC đều trên 3 lg PFU/liều. Do đó, nếu bảo quản MVVAC ở 25 °C thì nên sử dụng trong vòng 60 ngày.

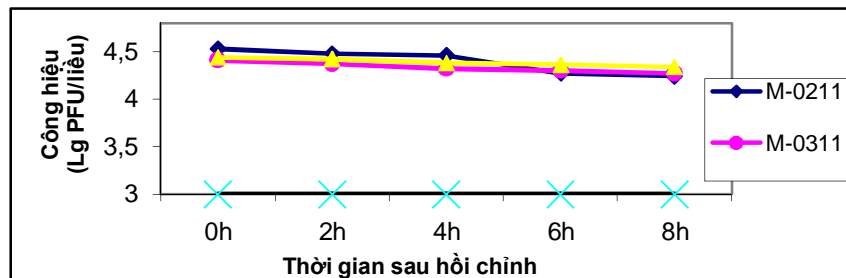
### 3.2.



Hình 3.15: Công hiệu của MVVAC bảo quản ở 37 °C

Sau 10 ngày bảo quản ở 37 °C, công hiệu của cả ba loạt MVVAC vẫn lớn hơn 3 lg PFU/liều, đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ. Đến ngày thứ 14, công hiệu của cả 3 loạt đều nhỏ hơn 3 lg PFU/liều. Như vậy, nếu bảo quản MVVAC ở 37 °C thì VX chỉ nên sử dụng trong vòng 10 ngày.

### 3.2.4. Kết quả đánh giá tính ổn định của MVVAC sau hồi chính



Hình 3.17: Công hiệu 3 loạt MVVAC sau hồi chính

Sau 8 giờ, công hiệu của cả ba loạt vẫn trên 3 lg PFU/liều, vẫn đạt hiệu quả bảo vệ.

### 3.2.5. Kết quả xác định loại VVM của MVVAC

Hình 3.16: Hình ảnh lọ MVVAC có gắn thử VVM7 trên nắp lọ

Tổng hợp kết quả nghiên cứu ở trên: Hạn sử dụng của MVVAC khi bảo quản ở 37 °C là 10 ngày, ở 25 °C là 60 ngày, ở 2-8 °C là 2 năm. Đối chiếu với bảng phân loại VVM của WHO (Bảng 1.1): Chỉ thị nhiệt độ VX của MVVAC là VVM7.

## CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

### 4.1. Bàn luận về tính ổn định về chất lượng của các loạt VX sợi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013

#### 4.1.1. Phương pháp sử dụng để phân tích tính ổn định chất lượng VX

Trong nghiên cứu này, phương pháp toán thống kê và đồ thị Shewhart đã được sử dụng cho phân tích tính ổn định chất lượng VX để khẳng định sự ổn định của quy trình sản xuất và tình hình áp dụng hệ thống chất lượng của nhà máy. Phương pháp này cũng được sử dụng trong hầu hết các nghiên cứu xác định tính ổn định chất lượng VX khác trên thế giới.

#### 4.1.2. Cỡ mẫu sử dụng trong nghiên cứu

42 loại VX đã được đánh giá chất lượng. Cỡ mẫu đủ lớn, đạt yêu cầu về tính tin cậy cho nghiên cứu tính ổn định chất lượng theo hướng dẫn của WHO (ít nhất 20 loạt).

#### 4.1.3. Các chỉ số đánh giá, các mốc đánh giá tính ổn định

Về số lượng, nghiên cứu này đã tiến hành phân tích 10 chỉ số, nhiều hơn 3 chỉ số so với yêu cầu tối thiểu của WHO cho VX sởi. So với quy định của Dược điển châu Âu, nghiên cứu cũng tiến hành phân tích nhiều hơn 5 chỉ số. So với ba tài liệu: Dược điển Nhật Bản, tài liệu “các yêu cầu tối thiểu của sinh phẩm” của Viện các bệnh Truyền nhiễm Quốc gia Nhật Bản và tài liệu “yêu cầu tối thiểu của sinh phẩm” của Viện Kitasato, nghiên cứu đã thực hiện nhiều hơn 3 chỉ số. Các chỉ số được làm thêm do quy trình sản xuất MVVAC mới đưa vào hoạt động, chưa đánh giá được tính ổn định.

Các nghiên cứu khác tại Việt Nam khi phân tích thống kê tính ổn định chất lượng giữa các loạt của một số VX tại Việt Nam chỉ dựa vào một chỉ số: Công hiệu của VX. Hơn nữa, các nghiên cứu đó chỉ sử dụng mốc  $TB \pm 2SD$  để đánh giá tính ổn định chất lượng VX; không sử dụng các mốc  $TB \pm 3SD$ ,  $TB \pm 1SD$ , đường trung bình, sự phân bố của các điểm xung quanh đường trung bình để phân tích kỹ hơn mức độ ổn định về chất lượng của các loạt VX như nghiên cứu này.

#### 4.1.4. Sự tin cậy của các phương pháp xác định các chỉ số, kết quả phân tích các chỉ số

Các phương pháp sử dụng để kiểm định từng chỉ số của từng loạt MVVAC đều theo thường quy của WHO, Dược điển châu Âu, hoặc Nhật Bản, được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Theo yêu cầu của WHO, các phương pháp này cũng đã được thẩm định tại từng phòng thí nghiệm về nhiều chỉ số như độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (đối với thử nghiệm định tính), giới hạn định lượng, độ chính xác, độ mạnh (thử nghiệm định lượng), tính tuyến tính nên có độ tin cậy cao.

WHO không yêu cầu thực hiện các chỉ số độ lệch trọng lượng, pH, hạt không tan trong MVVAC. Nhà máy sản xuất MVVAC mới đi vào hoạt động nên POLYVAC triển khai các chỉ số này để giám sát quy trình sản xuất. Theo kết quả nghiên cứu, độ lệch trọng lượng, pH của MVVAC rất ổn định, một cơ sở khoa học quan trọng để POLYVAC có thể giảm bớt các chỉ số trên khi đánh giá tiêu chuẩn xuất xưởng MVVAC mà vẫn đảm bảo chất lượng sản phẩm, tuân thủ đúng quy định của WHO.

#### 4.1.5. Các yếu tố góp phần tạo lập tính ổn định chất lượng MVVAC

Nhà máy sản xuất MVVAC đã đạt tiêu chuẩn GMP của WHO, một bằng chứng để tạo lập được tính ổn định của sản phẩm.

Để tạo được sự ổn định về chất lượng sản phẩm, POLYVAC đã kiểm soát bốn nhóm nguyên nhân ảnh hưởng đến sự biến thiên sản phẩm một cách chặt chẽ: Con người, trang thiết bị, nguyên vật liệu, môi trường sản xuất. Tất cả nhân viên của POLYVAC đều được đào tạo tỉ mỉ về các kỹ thuật/công việc mà họ sẽ thực hiện; được đánh giá tay nghề một cách chặt chẽ. Quá trình đào tạo, đánh giá đều được lưu hồ sơ bằng các biểu mẫu chi tiết. Viện Kitasato, nơi chuyển giao công nghệ sản xuất MVVAC cho POLYVAC cũng chính là nơi đào tạo các cán bộ POLYVAC.

Mỗi nguyên vật liệu sử dụng trong quá trình sản xuất, kiểm định MVVAC đều có chứng chỉ phân tích chất lượng. POLYVAC lựa chọn những nhà cung cấp nguyên vật liệu có uy tín trên thế giới như Gibco, Iwai, Nisui, Wako,...

Chủng sản xuất, yếu tố quan trọng bậc nhất trong sản xuất VX, do Viện Kitasato cung cấp, có hồ sơ lưu ghi rõ nguồn gốc và lịch sử cấy chuyển.

Sự thích hợp cho việc nhân lên của chủng vi rút dùng trong sản xuất MVVAC trên tế bào phôi gà nuôi cấy từ trứng

của công ty Valo, Đức cũng đã được chứng minh trong hai công trình nghiên cứu của tác giả Nguyễn Đăng Hiền.

Các trang thiết bị; các hệ thống phụ trợ như hệ thống cung cấp nước, hệ thống cung cấp khí; dụng cụ dùng sản xuất, kiểm định MVVAC cũng đều được lựa chọn từ các nhà cung cấp có uy tín trên thế giới.

Các hệ thống, trang thiết bị, dụng cụ có ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng sản phẩm đều được thẩm định, hiệu chỉnh bằng các thiết bị chuyên dụng. Nhà máy sản xuất MVVAC được lựa chọn vị trí xây dựng, thiết kế, sửa chữa và duy trì đảm bảo giảm thiểu nguy cơ gây lỗi, dễ dàng vệ sinh và bảo dưỡng hiệu quả nhằm tránh nguy cơ lây nhiễm chéo, giảm thiểu tích tụ bụi bẩn hoặc bất cứ nguy cơ nào cho chất lượng sản phẩm.

Mỗi công việc được thực hiện trong các phòng có cấp độ sạch khác nhau tùy thuộc tính chất của công việc. Môi trường làm việc còn được giám sát thường xuyên bằng nhiều chỉ số khác nhau: Hạt bụi; vi khuẩn và nấm trong không khí, trên bề mặt.

Các quy trình kiểm định MVVAC đều được thẩm định về tính đúng, tính chính xác, độ lặp lại giữa các lần thử nghiệm của một cán bộ và độ lặp lại giữa các cán bộ khác nhau, giới hạn phát hiện, giới hạn xác định, độ đặc hiệu,...

Quan trọng hơn, để có được các sản phẩm với chất lượng ổn định, POLYVAC đã xây dựng một hệ thống chất lượng với nhiều hoạt động như: Phân tích xu hướng, hệ thống hoạt động khắc phục và phòng ngừa, kiểm soát các thay đổi, đánh giá nguy cơ, soát xét hệ thống chất lượng,.... Các hoạt động này cũng được cải thiện liên tục nhằm hướng tới mục tiêu ổn định chất lượng sản phẩm.

## **4.2. Bàn luận về tính ổn định của VX sợi sản xuất tại Việt Nam ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau**

Mỗi nội dung trong nghiên cứu này thực hiện trên ba loạt VX, đáp ứng yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới về số loạt VX thử nghiệm trong nghiên cứu tính ổn định.

### **4.2.1. Bàn luận về kết quả xác định tính ổn định của MVVAC ở các nhiệt độ khác nhau**

So với những loạt đầu tiên trong các báo cáo của Nguyễn Đăng Hiền và Nguyễn Nữ Anh Thu, MVVAC càng ngày càng ổn định với nhiệt độ cao. Trong giai đoạn 2006-2007, POLYVAC tiến hành giai đoạn đầu quá trình chuyển giao công nghệ: Nhận VX bán thành phẩm từ Viện Kitasato để xác lập quy trình sản xuất. Giai đoạn này có những loạt VX giảm quá 1lg PFU sau 1 tuần bảo quản ở 37 °C.

Sau khi hồi chỉnh, tính ổn định của VX sẽ giảm rất nhiều so với dạng đông khô. Hơn nữa, MVVAC chứa 10 liều/lọ nên mỗi lần mở một lọ VX sẽ tiêm cho mười người. 8 giờ chưa phải hạn sử dụng tối đa của MVVAC sau hồi chỉnh. Tuy nhiên, kết quả này đáp ứng được nhu cầu thực tế đặt ra: Theo quy định của WHO, các lọ VX đã mang ra sử dụng trong ngày, nếu không hết đều phải hủy bỏ. Sau khi hồi chỉnh 8 giờ, công hiệu của các loạt VX vẫn đạt yêu cầu bảo vệ là cơ sở khoa học để khuyến cáo sử dụng MVVAC trong cộng đồng.

### **4.2.2. Các chỉ số xác định tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của VX**

Đối với hầu hết các VX, công hiệu là chỉ số đánh giá tính ổn định vì nó phản ánh mối liên hệ giữa môi trường bảo quản với khả năng bảo vệ của VX. Với VX vi rút sống giảm độc lực, công hiệu VX thể hiện qua nồng độ vi rút. Các chỉ số khác cũng nên được cân nhắc do chúng chỉ ra sự thay đổi đến tính an toàn và hiệu quả bảo vệ của VX với các ảnh hưởng không thể

biết hết được. Nghiên cứu này cũng dùng chỉ số công hiệu để đánh giá tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của VX. Riêng nội dung xác định tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của VX ở 2-8 °C ở thời điểm 27 tháng: Đánh giá tất cả các chỉ số với mục đích nhằm đưa ra hạn sử dụng của VX ở nhiệt độ này là 24 tháng, hạn sử dụng VX trên thị trường. Việc đánh giá tất cả các chỉ số sẽ làm chặt chẽ hơn hạn sử dụng, an toàn hơn cho người dùng.

#### 4.2.3. Các yếu tố tạo nên tính ổn định nhiệt của MVVAC

Nút cao su của lọ MVVAC được làm từ cao su tổng hợp có tráng silicon A tráng bám dính VX, đóng góp một phần không nhỏ trong tính ổn định của VX. Chất ổn định trong MVVAC và quá trình đông khô đã giúp MVVAC chỉ mất không quá 1 lg PFU ở 37°C/7 ngày, trong khi ở trạng thái thông thường, vi rút sợi mắt một nửa hoạt tính gây nhiễm khi bảo quản ở 37°C/2 giờ. Để có được tính ổn định như trên, POLYVAC đã đưa vào thành phần của MVVAC một loạt chất ổn định: Lactose, D-Sorbitol, L-Sodium glutamate, Hydrolized gelatin. Các loại đường như sucrose, lactose và sorbitol; các loại axit amin như glutamate, lysine, prolin,... bảo vệ vỏ bao ngoài của vi rút đồng thời có tác dụng ức chế quá trình kết dính của vi rút ở nhiệt độ cao. Gelatin có tác dụng bao quanh hạt vi rút, ức chế quá trình kết dính của hạt vi rút ở nhiệt độ cao.

So với VX sợi của viện Kitasato, thành phần MVVAC đã có sự thay đổi để thích nghi với điều kiện tự nhiên, kinh tế Việt Nam. VX của Viện Kitasato không chứa gelatin, MVVAC của POLYVAC chứa gelatin. POLYVAC thêm gelatin vào thành phần VX sợi vì nhiều lý do: **Thứ nhất:** Việt Nam có khí hậu nhiệt đới, thiếu trang thiết bị bảo quản lạnh. **Thứ hai:** VX sợi của Việt Nam chứa 10 liều/lọ. Sau khi hồi chính, VX không tiêm hết ngay lập tức mà sẽ tiêm dần cho 10 người, cần VX ổn định cao. **Thứ ba:** Theo yêu cầu của WHO: Công hiệu của VX sợi giảm không quá 1 lg PFU/liều khi bảo quản ở 37 °C/7 ngày.

Nhật Bản không thực hiện theo yêu cầu này do điều kiện tự nhiên, kinh tế có thể giúp Nhật Bản đảm bảo được dây chuyền lạnh trong bảo quản VX.

Để giảm thiểu tác dụng gây dị ứng của gelatin, POLYVAC đã dùng gelatin thủy phân, loại gelatin được tinh khiết bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao phụ thuộc kích thước phân tử. Loại gelatin này không có tính kháng nguyên và có tỷ lệ dị ứng rất thấp so với các loại gelatin thông thường (Có nguồn gốc từ collagen lợn hoặc bò được biến tính bởi nhiệt độ cao). Kết quả thử nghiệm lâm sàng MVVAC sản xuất trên bán thành phẩm của POLYVAC đã chứng minh tính an toàn của loại gelatin này.

#### 4.2.4. Ý nghĩa của việc nghiên cứu tính ổn định và xác định loại chỉ thị nhiệt lọ VX của MVVAC

Việc xác định và sử dụng VVM cho MVVAC có ý nghĩa rất lớn: Giúp cho người sử dụng được dùng những lọ VX thực sự có hiệu quả phòng bệnh; làm giảm hao phí do vứt bỏ những lọ MVVAC tốt khi gặp các sự cố mất điện, thảm họa thiên nhiên; giúp quản lý kho VX khi căn cứ tình trạng VVM để lựa chọn những lọ MVVAC sử dụng trước. Dựa vào chính sách sử dụng VX ngoài dây chuyền lạnh trong một số trường hợp đặc biệt của WHO và UNICEF, VVM còn làm tăng tỷ lệ tiêm chủng vùng địa lý khó khăn, thiếu điện, thiếu tủ lạnh. Vì vậy, việc xác định và sử dụng VVM cho MVVAC sẽ góp phần vào nỗ lực thanh toán bệnh sởi tại Việt Nam. Việc xác định và sử dụng VVM cho MVVAC cũng là một điều kiện quan trọng để MVVAC được đề nghị cấp giấy chứng nhận đạt tiêu chuẩn WHO, giúp POLYVAC có thể xuất khẩu VX.

### KẾT LUẬN

1. Chất lượng VX sợi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013 có chất lượng ổn định, thể hiện:

Cả 42 loại đạt yêu cầu về các chỉ số định tính như nhận dạng, vô trùng, an toàn, quan sát trạng thái. Các chỉ số công hiệu, ổn định nhiệt, độ ẩm tồn dư, độ lệch trọng lượng, pH ổn định với đa số các giá trị nằm trong khoảng  $TB \pm 2SD$ ; không có loại nào rơi ra ngoài khoảng  $TB \pm 3SD$ .

2. Hạn sử dụng của MVVAC khi bảo quản ở  $37^{\circ}C$  là 10 ngày; ở  $25^{\circ}C$  là 60 ngày; ở  $2-8^{\circ}C$  là 2 năm; sau hồi chỉnh, bảo quản ở  $2-8^{\circ}C$  là 8 giờ.

Loại chỉ thị nhiệt độ VX của MVVAC là VVM 7.

### KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu tính ổn định chất lượng của các loại MVVAC sản xuất trong các năm tiếp theo.
2. Sử dụng loại VVM đã tìm được cho MVVAC.
3. Nghiên cứu thêm về tính ổn định sau hồi chỉnh của MVVAC ở các nhiệt độ  $20-25^{\circ}C$ ,  $37^{\circ}C$ .
4. POLYVAC có thể bỏ các thử nghiệm độ lệch trọng lượng, đếm hạt, pH khi kiểm định xuất xưởng MVVAC mà vẫn tuân thủ các yêu cầu của WHO, Dược điển Châu Âu, Dược điển Nhật.

### BACKGROUND

In 2009, The Center for Research and Production of vaccines (VX) and Biologicals (POLYVAC) - Viet Nam manufactured measles vaccine by themselves according to the technology and specification of Japan.

The consistency and stability of VX impacts importantly to the success of Expanded Program on Immunization (EPI) all over the world. Vaccines have lot-to-lot quality consistency (consistency) and thermostability (or stability) at the different temperatures.

For the desire of evaluation of Measles vaccine - MVVAC at all stages: after the production, the storage to the

usage, we conduct the study: "Evaluation of consistency and stability of Measles vaccine manufactured in Viet Nam at the stage from 2009 to 2013" with 2 objectives:

1. Evaluation of the quality consistency of all Measles vaccine lots that manufactured in Viet Nam from 2009 to 2013.
2. Evaluation of the stability of Measles vaccine that manufactured in Viet Nam at the stored different temperatures.

### NEW CONCLUSIONS OF DOCTOR DISSERTATION:

The study evaluated the quality consistency and stability of measles vaccine MVVAC, which is produced in Vietnam, after the production process, during the storage period until to be used for vaccination.

1. It is affirmative that the MVVAC lots produced from 2009 to 2013 have lot-to-lot quality consistency, thereby confirming the consistency of *the production process* and *the quality system* of the manufacturer.

The consistency in quality of MVVAC lots produced from 2009 to 2013 prove that the next MVVAC lots will have same quality as the first three lots have been used in clinical trials, will have immunogenicity and safety as those three lots, too.

2. The study evaluated the stability of MVVAC in different storage temperature conditions:  $37^{\circ}C$ ;  $25^{\circ}C$ ;  $2-8^{\circ}C$  and the stability of the vaccine after reconstituting, stored at  $2-8^{\circ}C$ .

The research has determined the Vaccine Vial Monitor (VVM) of the MVVAC is VVM 7. Attaching VVM 7 to each MVVAC vial will firstly help users to use the vaccine with fully effective disease prevention. Secondly, it avoids unnecessary MVVAC wasting when there is any a power failure or natural disaster. It also help managing vaccine store by using VVM indicator as a basis for selecting the MVVAC vials to use first. Based on the policy of using vaccines outside the cold chain in some special cases of WHO and UNICEF, VVM also increases the rate of measles vaccination in the difficult to reach geographic and

difficult economic area. This is especially Expanded Program of Immunization; and it will help to overcome the large scale shortage of refrigerator to store the vaccines in the rural areas. The determination and use of VVM for MVVAC is also an important condition for POLYVAC to have WHO pre-qualified certification in order to export MVVAC.

#### STRUCTURE

The thesis is presented in 132 pages: background-2 pages, overview-38 pages, method-24 pages, results-32 pages, discussion-34 pages, conclusion-1 page, proposal 1 page. The thesis consists 42 pictures, 30 tables, 170 references including 53 Vietnamese references, 117 English references. The appendix contains testing working sheets.

### Chapter 1: OVERVIEW

#### 1.1. Measles virus

Measles virus belong to *Morbilivirus* genus, *paramyxovirida* family, has only 1 serotype.

Measles disease is the strongest infection disease attacking human. The disease can be prevented by vaccine immunization, and can be ended because the only host of measles virus is human, there is no vector, measles virus have only 1 serotype and measles vaccine have effective protection.

#### 1.2. Measles vaccine

##### 1.2.1. Production of measles vaccine

The strain for measles vaccine production consist of 2 main types: Derived from Edmonston strain and not derived from Edmonston strain. Viet Nam uses AIK-C strain, origin from Edmonston strain. The production process of MVVAC is transferred by Kitasato Institute.

##### 1.2.2. Immune response and adverse event following immunization of measles vaccine

Immune response after measles vaccine immunization is the same quality and effectiveness as after natural measles infection but faster few days than natural measles infection. AIK-C strain makes high immunogenicity and it is the most safety one than other measles vaccine production strain now. The clinical trial result of the measles vaccine lots manufactured at the stage 2009- 2013 shows that MVVAC meets the safety, and effectiveness. However, proving the next MVVAC lots has the same quality as the previous lot used for the clinical trial or not, we have to base on the research of the quality consistency of MVVAC lots.

#### 1.3. Quality control, quality consistency of vaccine lots

Quality control of vaccine relates to sampling, testing, and documentation to ensure that: the necessary tests have been performed accurately; materials, vaccine have not been used until their quality are met specification.

Quality consistency of VX lots is a concept to ensure a consecutive lot-release of VX that met the safety and effectiveness, it is determined by quality control of each VX lot and test results trend analysis.

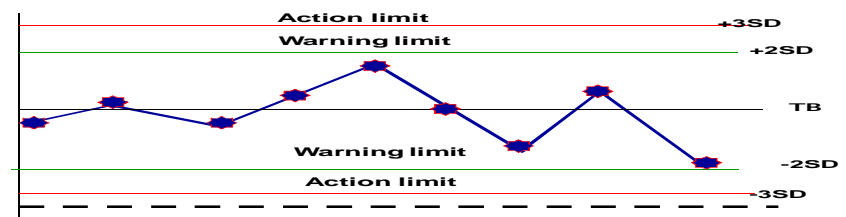


Figure 1.2: The main ranges for trend analysis of VX quality consistency

When trend analysis of quantity test results, WHO uses Shewhart chart to evaluate the consistency of test results data,

based on following ranges:

$TB \pm 2SD$  and  $TB \pm 3SD$  are set for the alert or warning limits and action limits, respectively. The range outside the  $TB \pm 3SD$  is an action one. If there is 1 result of VX outside the range of  $TB \pm 3SD$ , we need to concern whether the VX lot is used or not although the result meets the lot-release specification. The ranges ( $TB-2SD, TB-3SD$ ) and ( $TB+2SD, TB+3SD$ ) are an alert range. If there is a result inside these ranges; investigate the cause to prevent. If the things happen, it shows that: The system error exists or there is an incident happening that needs to be adjusted.

Moreover, a data has high consistency if there are no: 2 consecutive points in the ranges ( $TB-2SD, TB-3SD$ ) or ( $TB+2SD, TB+3SD$ ); more than 6 consecutive up or down points; more than 8 consecutive points at the same side of the average line.

Based on a principle: Quality consistency of VX lots is the result of both strict compliance of quality system and the production process consistency. Hence, the quality control gives not only a data of each VX lot but also the consistency of production process, the quality system by the data trend analysis.

Until now, there have been no research for a quality consistency of MVVAC lots yet.

## 1.4. Vaccine stability

### 1.4.1. Purpose of the stability research

The researches of stability prove that VX used on the market maintains its safety and protective effectiveness and the specification until the last moment of the expiry. If the manufacturer changes the production process or any important factor of the production such as: volume of the fermentor, location of production, raw-material, ... Stability research before and after changing proves that the change does not impact to the quality of product. WHO recommends that each manufacturer has to perform a research of the stability to determine the real expiry date for VX of their own.

### 1.4.2. The indicator of stability and expired-period of vaccines

According to WHO, the stability is based on statistical analysis of potency reduction of vaccine over storage time. Potency is the most important indicator to assess the quality of vaccine, a measure of the ability to protect people against illness. For the live attenuated viral vaccines, potency is measured by the concentration of virus in vaccines. Other indicators may also be considered.

### 1.4.3. Tool for monitoring of exposition of vaccine to temperature

There are many tools monitoring the exposition of vaccine to high temperature, however, there is only VVM evaluating the exposition to the temperature of each VX lot after the production process, during the storage period until to be used for vaccination because it is attached to each VX vial. VVM expresses the VX exposition to temperature accumulatively.

### 1.4.4. Classification and determination method of Vaccine Vial Monitoring

VVM consists of 4 types that is determined by potency of VX after storage at the different temperatures.



**Table 1.2: Classification and determination method of VVM**

Type of VVM	Level of VX stability	Expiry date at 37 °C (day)	Expiry date at 25 °C (day)	Expiry date at 2-8 °C
Measles vaccine - MVVAC				
The quality consistency of VX lots from 2009 to 2013		The stability at the different storage temperatures		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identity test,</li> <li>- Potency test, stability test at 37°C/7 days,</li> <li>- Sterility test,</li> <li>- Innocuity test,</li> <li>- Residual moisture,</li> <li>- Visual inspection,</li> <li>- Weight variation,</li> <li>- Particle counting test,</li> <li>- pH</li> </ul>	<b>2-8 °C:</b>	<b>25 °C:</b>	<b>37 °C:</b>	<b>After reconstitution (2-8°C):</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 months,</li> <li>- 12months,</li> <li>- 21months,</li> <li>- 24months,</li> <li>- 27months,</li> <li>- 30months</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1months,</li> <li>- 2 months,</li> <li>- 3 months</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 7 days,</li> <li>- 10 days,</li> <li>- 14 days,</li> <li>- 21 days.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0h,</li> <li>- 2h,</li> <li>- 4h,</li> <li>- 6h,</li> <li>- 8h.</li> </ul>
	After production	Storage, transportation	Usage	

2 to prove that this change of the production does not influence on the vaccine stability.

## CHAPTER II: SUBJECTS AND METHODS

**2.1. Research subjects:** Measles vaccine manufactured in Viet Nam (MVVAC) from 2009 to 2013.

**2.2. Time and location:** From September, 2011 to October, 2014 at POLYVAC.

### 2.3. Materials

#### 2.3.1. Apparatus, equipment

The laboratories, equipment, specific apparatus for vaccine quality control such as: cleanrooms with different levels, biosafety cabinets, incubator, particle counting machine, pH meter,...

#### 2.3.2. Reference standards, cells, reagents, media

Vaccine reference standard: M01-07, POLYVAC; using Vaccine reference standard M16-6 (Kitasato Institute) to calibrate; Vero cell, fetus bovine serum, ...

## 2.4. Method

Research methodology. Type of research: Retrospective study and prospective study.

Figure 2.1: Chart of the study

### 2.4.1. Evaluation of the quality consistency

**Sample size, sample choosing method:** all MVVAC lots manufactured from 2009 to 2013. Total: 42 lots.

**Data collecting method:** Quality control of each VX lot by performing test: Identity of measles antigen of vaccine by immunofluorescence method (identity test), calculate of potency by virus concentration of vaccine (potency test) by Plaque Forming Unit method, determine stability of vaccine stored at 37°C/7 days (stability test), determine sterility of VX by filtration membrane method, determine general safety on animals, determine the residual moisture of lyophilized vaccine by the loss on drying test, visual inspection of vaccine vial, calculate the weight variation between VX vials of the same lot (weight variation test), count the non-dissolve particles of VX (non-dissolve particles), measure pH.

Specification: 2.8.10. The specificity of WHO PWHONTS 840 as of TB ± SD, these 4 lots were produced at the same period of time.

3.1. Evaluation result of the quality consistency

3.1.3 The results of the stability

3.1.1. Identity result

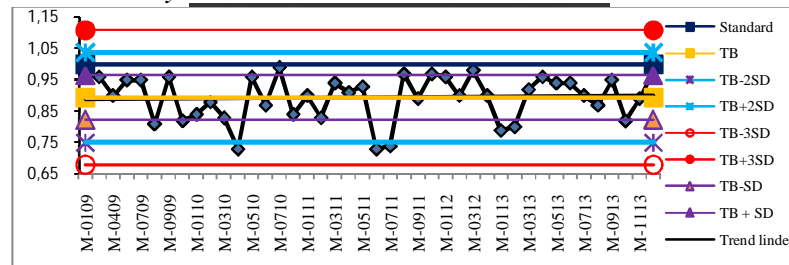


Figure 3.3: The potency decrease of MVVAC lots incubated at 37° C/7 days

The decrease of potency results of MVVAC lots manufactured from 2009 to 2013 are widely distributed around the average line. The trend line is horizontal and close to the average line, it shows that the quantity decreases equally

3.1.2 Potency result

There is no point outside the range of TB±3SD, no 4 points of 5 consecutive points outside the range of TB±SD, there are not more than 8 points at the same side of the average line.

There is 1 moment that 2 consecutive points are in the range of (TB-2SD,TB-3SD), however the decrease of potency is low as much as possible.

3.1.4 Result of sterility test

100% of MVVAC lots manufactured from 2009 to 2013 are not infected bacteria, fungi, Mycoplasma.

The potency consistency of MVVAC lots shows that: no point is outside the range of TB±3SD, almost points are in the

3.1.5 Result of innocuity test on experimental animal

Figure 3.4: The potency consistency of MVVAC lots

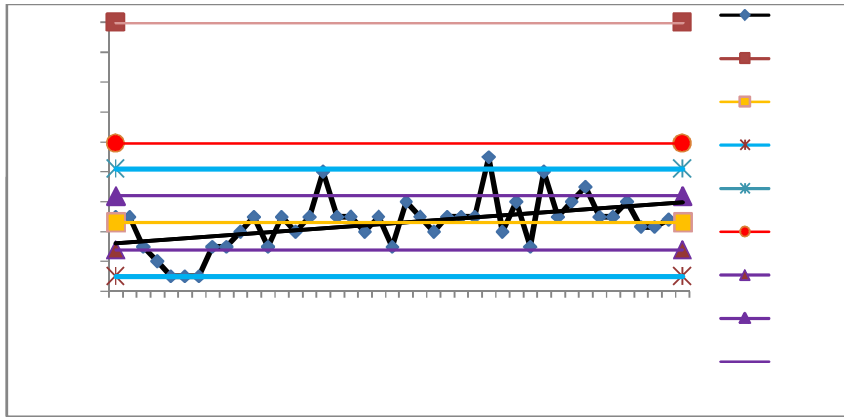


Figure 3.4: Weight gain of guinea-pig of MVVAC lots

The weight gain of guinea-pigs of all MVVAC lots meet the specification of the stability.

Table 3.1: Guinea-pig groups weight gain of the 42 vaccine lots innocuity test

	n	$\bar{x} \pm s$ (gram)	p
VX injected group	42	73.33 ± 30.30	0.91
Saline injected group	13	69.84 ± 27.82	
N <sub>1</sub> group	1	69.84 ± 27.82	

bet  
Sir  
test  
2SI

significant difference between 3 groups ( $p > 0.05$ ).  
 At gain of mice  
 All points (results  
 weight gain has  
 difference between 3 mice groups ( $p > 0.05$ ).

3.1.6. Result of the residual moisture test

Figure 3.5: Results of the residual moisture stability

The trend line goes up because at the first period, POLYVAC maintains low residual moisture. So, there are 4 consecutive points outside the range of  $TB \pm 1SD$ , 8 consecutive points at the same side of the average line.

3.1.7. Result of visual inspection

All 420 lyophilized vaccine cake are milky-white, no crack, no abnormal particle, no foam, no abnormal size. All the cakes dissolve immediately after reconstituting, making the colorless, clear solution, and no particle.



Figure 3.17: Vaccine cake after peeling off the below

Figure 3.18: Vaccine solution after reconstitution (clear, no particle)

Figure 3.9: The quantity of particle having size  $\geq 10 \mu\text{m}$

3.1.8. The quantity of particle having size  $> 10 \mu\text{m}$  is remarkably lower than the specification (6000 particles/vial).

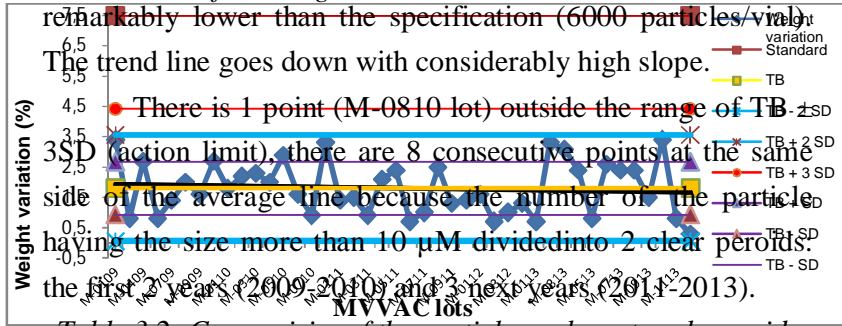


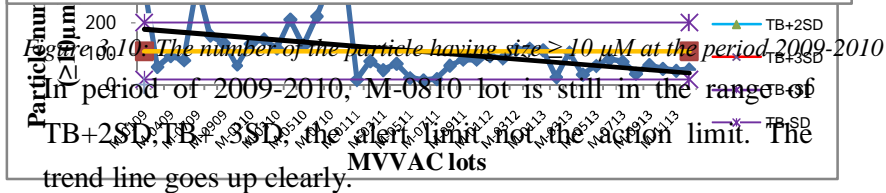
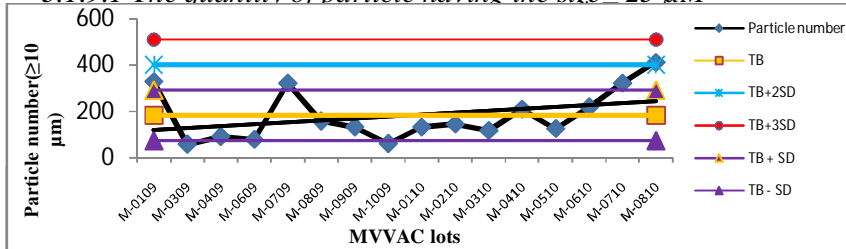
Table 3.2: Comparison of the particle number at each periods  
Figure 3.8: Weight variation between vaccine lots.

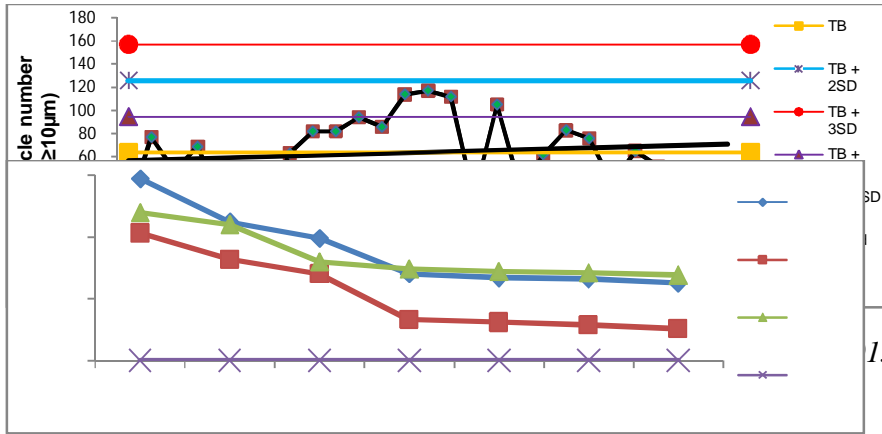
Period	Number of range	Mean	SD
2009-2010	16	483	108.9
2011-2013	26	637	131.1

No lot are outside of TB  $\pm 3SD$ . The trend line close with the average line and has a light slope. It shows that all vaccine vials are more and more weight consistency. The weight variation meets all specification for high consistency evaluation: there are no 4 points of 5 consecutive points outside the range of TB  $\pm 1SD$ , number of particle having the size  $\geq 10 \mu\text{m}$  increasing or decreasing in comparison with the previous period ( $P < 0.01$ ).

3.1.9 The result of particle counting test

3.1.9.1 The quantity of particle having the size  $> 25 \mu\text{m}$





at 2011-2013 period have high consistency criteria, much lower than the specification (6000 particles/vial).

3.1.10. pH consistency of MVVAC lots

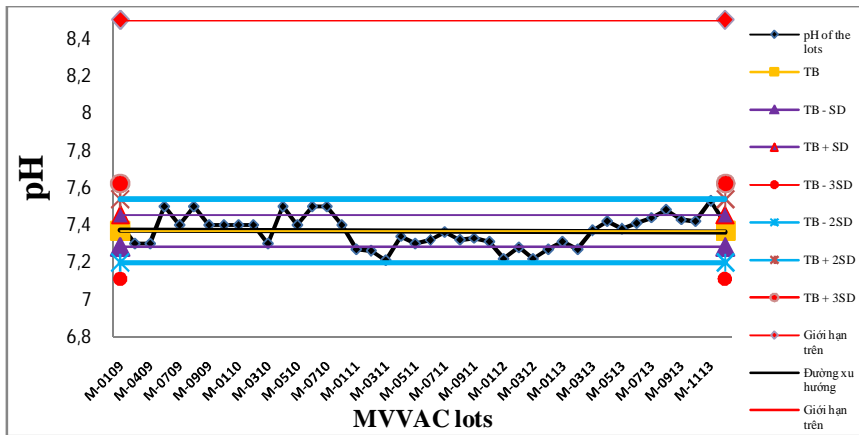


Figure 3.12: pH of vaccine lots

pH of all MVVAC lots is consistent, the trend line close with the average line. The chart meets the basic specification of the stability. For high consistent specifications, do not meet 1 specification: no 8 points are the same side of the average line.

3.2 Result determination of MVVAC stability at different temperatures and storage condition

3.2.1 Result determination of the MVVAC stability at 2-8 °C

\* Result of MVVAC potency test at the different time

Figure 3.13: Potency of MVVAC stored at 2-8 °C

After 27 months, the potency of 3 vaccine lots is more than 3 lg PFU/dose, so expiry date of MVVAC stored at 2-8 °C is more than 2 years.

Table 3.3: Result of all parameters of 3 vaccine lots at 27 months

Lot	M-0811		M-0911		M-1011	
	0 month	27 months	0 month	27 months	0 month	27 months
<b>Parameter</b>						
<b>Identity</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
<b>Sterility</b>	<b>Bacteria, fungi</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
	<b>Mycoplasma</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
<b>Innocuity</b>	<b>Mice</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
	<b>Guinea-pig</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
<b>Residual moisture (≤2 %)</b>	0.60 %	1.01 %	0.73 %	1.06 %	0.67 %	1.80 %
<b>Visual inspection</b>	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
<b>pH</b>	7.32	7.30	7.33	7.34	7.31	7.33

At 27 months storage (over 24 months), 3 vaccine lots meet all quality parameter. Then, the expiry date of MVVAC is 2 years

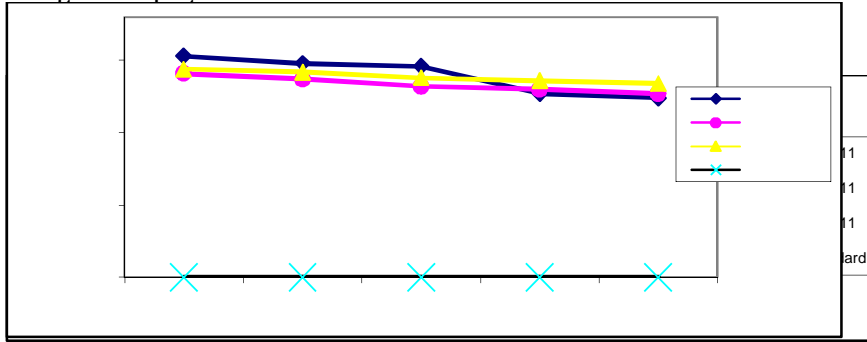


Figure 3.14: potency result of MVVAC stored at 25<sup>0</sup>C

After 90 days stored at 25<sup>0</sup>C, the potency result of 1 MVVAC lot reached 2.93 lg PFU/dose, less than 3 lg PFU/dose. After 60 days, the potency results of 3 MVVAC lots are still more than 3 lgPFU/dose. So, if MVVAC is stored at 25<sup>0</sup>C

3.2.3.



Figure 3.15: Potency of 3 MVVAC lots stored at 37<sup>0</sup>C.

After 10 days stored at 37<sup>0</sup>C, the potency results of all 3 vaccine lots are more than 3 lg PFU/dose, meet the WHO specification for effectiveness. At the 14<sup>th</sup> day, the potency results of all 3 vaccine lots are lower than 3 lg PFU/dose. So that, if MVVAC is stored at 37<sup>0</sup>C, we should use MVVAC during 10 days.

3.2.4. Result of MVVAC stability after reconstitution

Figure 3.17: Potency of 3 MVVAC lots after reconstituting

After 8 hours, the potency of all 3 vaccine lots are more than 3 lg PFU/dose, still have the protective effectiveness.

3.2.5. The result determination of VVM type of MVVAC

Figure 3.16: VVM 7 are attached to the cap of MVVAC vaccine lot

All in all, result study shows that: The expiry date of MVVAC stored at 37<sup>0</sup>C is 10 days, at 25<sup>0</sup>C is 60 days, at 2-8<sup>0</sup>C is 2 years. According to the VVM classification WHO (table 1.1): the vaccine vial monitor of MVVAC is VVM7.

**CHAPTER 4: DISCUSSION**

#### **4.1. Discuss the consistency of the measles vaccine lots quality which were produced in Vietnam from 2009 to 2013**

##### *4.1.1. The method to be used to analyze the consistency of the vaccine quality*

In this study, mathematical statistic methods and the Shewhart control chart were used to analyze the consistency of vaccine quality to confirm the consistency of the production process and *the quality system* of the manufacturer. This method is also used in most of the studies all over the world in order to identify the consistency of vaccine lots quality.

##### *4.1.2. The sample size to be used in the study*

42 vaccine lots which have been assessed the quality. The sample size is large enough, which is reliable for the study of the consistency of vaccine quality in accordance with WHO guidelines (at least 20 lots).

##### *4.1.3. The consistency indicators, benchmarks*

Quantitatively, this study analyzed 10 indicators, which are more than 3 ones when comparing with the minimum requirements of the WHO for control of measles vaccine. As stated in the provisions of the European Pharmacopoeia, the research analyzed more than 5 indicators. The research has performed more than 3 ones when comparing with three regulations: Japanese Pharmacopoeia; "the minimum requirements of biological products" document of the National Institute of Infectious Diseases and "the minimum requirements of biologicals" document of Kitasato Institute. There are more indexes due to the new production process which MVVAC has just put into operation has not been evaluated yet.

In other studies in Vietnam, the statistical analyzing of the quality consistency between lots of vaccine in Vietnam is based on only one indicator: The potency of vaccines. Moreover, these studies only use benchmark:  $TB \pm 2SD$  to evaluate the vaccines quality stable; they did not use the other

means such as  $TB \pm 3SD$  or  $TB \pm 1SD$ , the distribution of points around the average to further analyze the vaccine lots quality consistency as in this study have done.

##### *4.1.4. The reliability of the methods in determining the quality control indicators, and the result of the indicators trend analysis*

The method to be used to test each indicators of each MVVAC lot, which follows the WHO guidelines, European Pharmacopoeia, or Japan Pharmacopoeia, is widely used in the world. As requested by WHO, these methods has been validation at each laboratory on several indicators such as specificity, limit of detection (for qualitative testing), limit of quantitation, precision, strength (for quantitative testing), linearity, so it is highly reliable.

WHO does not require doing the weight deviation, pH, insoluble particles in MVVAC. POLYVAC deploys these indicators to monitor the production process because of the new MVVAC production operating. According to the study, weight deviation, the pH of MVVAC are so consistency, which is an important scientific evidence for POLYVAC to reduce the amount of the lots release evaluation criteria of MVVAC while ensuring the products quality and complying with the WHO guideline.

##### *4.1.5. Contributing factors to the establishment of the MVVAC lot consistency*

MVVAC production factory has met WHO GMP standard, which is an evidence to establish the consistency of the product.

To create the consistency of product quality, POLYVAC controlled four cause groups which closely affect the product variation: Personnel, equipment, materials, production environment. All POLYVAC staffs are meticulous trained about the techniques/jobs that they will perform; and then their workmanship will be evaluated rigorously. The



process of training and assessment are recorded to file with detailed working sheets. POLYVAC staffs are trained at Kitasato Institute, where the MVVAC production technology is transferred to POLYVAC.

Each material was used in the MVVAC manufacturing and testing process has the certification of quality analysis. POLYVAC selected materials from the prestigious suppliers such as Gibco, Iwai, Nisui, Wako,...

Producing strain, which is the most important factor in vaccine producing, was provided by Kitasato Institute with the origin and history of transplant records.

In two studies of Dr. Nguyen Dang Hien, he demonstrated that the replication of the virus strains on chicken embryo cells cultured from eggs of Valo companies in Germany is suitable for the MVVAC production

The equipment and auxiliary systems such as water supply systems, air ventilation systems; MVVAC equipments, apparatus of production and testing were also selected from reputable suppliers around the world.

The systems, equipment have direct impact on the quality of products have been validated, calibrated by the specialized equipment. MVVAC production factory was located, designed, and maintained to ensure minimizing the risk of error; eliminating the risk of cross contamination, reducing volume of dust gathering, or any risk to the quality of the product.

Each job was done in rooms with different clean room depending on the nature of the job. The working environment was monitored regularly by many different indicators: particle; bacteria and fungi in the air and on the surface.

The MVVAC quality control procedures are validated for accuracy, precision, repeatability reproducibility, linearity, limit of detection, limit of quatitation, specificity, ruggedness and robustness.

Moreover, in order to obtain the products with stable quality, POLYVAC has built a quality system with many activities such as trend analysis, operating system recovery and prevention, changes control, risk assessment, quality system review... These operations are continuously improved to archive the goal of stabling product quality.

#### **4.2. Discuss the stability of measles vaccine produced in Vietnam in different storage temperatures**

Each content in this study performed on three vaccine lots in order to meet W.H.O requirements on the amount of testing batches to be used in the study of stability

##### *4.2.1. Discuss the results of determining the stability of MVVAC at different temperatures*

Compared with the first lots in the reports of Dr. Nguyen Dang Hien and Dr. Nguyen Nu Anh Thu, MVVAC is more and more stable in high temperatures. From 2006 to 2007, POLYVAC conducted the first stage of technology transfer process: Receive semi-finished vaccines from Kitasato Institute to establish manufacturing process. In this phase, there are vaccine lots were reduced more than 1lg PFU after 1 week of storing at 37°C

After tuning, the stability of vaccine will decrease more significant than in lyophilized form. Additionally, MVVAC contains 10 doses per vial; therefore one bottle of vaccine will be enough to inject ten people. 8 hours is not the maximum expired-period of MVVAC after tuning. However, these results met the actual demand: According to W.H.O, the vaccine vials were taken out to use during the day will be removed even there is still left-over. After 8 hours of tuning, the potency of the vaccine lots is still satisfied the protection requirement, which is a scientific basis to recommend the use MVVAC for community.

##### *4.2.2. The indicators determine the stability and expiry date of vaccines*

For most vaccines, the potency is a indicator because it reflects the relationship between preservation environmental and protection capability of the vaccine. With attenuated live viral vaccine, the potency of vaccine is expressed via viral titration. Other indicators should be considered because they indicate the change of safety and protective efficacy of the vaccine with the unknown impact. This study used potency indicator to evaluate the effect of stability and expiry date of vaccine. For the thermal stability and expired-period determination of vaccine at 2-8°C which has been stored for 27 months: Review all of the indicators to conclude the expired-period of this vaccine at this temperature to 24 months; which is the normal vaccine expired-period on the market. The evaluation of all the indicators will tightent the expired-period for more secure for users.

#### 4.2.3. *The factors that contribute to the stability of MVVAC*

Rubber stopper of MVVAC vial, which is made from neoprene coated silicon anti-adhesion to the vial, contributed greatly to the stability of vaccine. The stabilizer in the MVVAC and lyophilized process helped MVVAC to lose less than 1lg PFU at 37°C over 7 days; while in the normal state, the measles virus lose half of the infectious activity when stored at 37°C for 2 hours. In order to obtain the stability as above, POLYVAC brought a series of stabilizer into the composition of MVVAC: Lactose, D-Sorbitol, Sodium L-glutamate, Hydrolyzed gelatin. Sugars such as sucrose, lactose, and sorbitol; and amino acids such as glutamate, lysine, and prolin... protect the envelope of the virus and at the same time have the effect of inhibiting the adhesion of the virus at high temperatures. Gelatin covers the envelope of the virus, and inhibits the adhesion of virus particles at high temperature.

Comparing with measles vaccine at Kitasato Institute, MVVAC components have been changed to adapt to Vietnamese natural and economic conditions. Kitasato

Institute's vaccine does not contain gelatin while there is gelatin containing in MVVAC of POLYVAC. POLYVAC adds gelatin to the measles vaccine component for some reasons: Firstly, Vietnam has a tropical climate and lack of cold storage facilities. Secondly, the Vietnamese measles vaccine contains 10 doses per vial. After reconstituting, the vaccine does not immediately injected for 10 people at once but one by one, therefore Vietnam needs vaccines with higher stability. Finally: As requested by WHO, the potency of measles vaccine fell less than 1lg PFU per dose when stored at 37°C in 7 days. Japan does not comply with this requirement due to natural conditions; the economy can help Japan to ensure the vaccine preservation in cold chain storage.

To minimize the allergenic effects of gelatin, POLYVAC used hydrolysate gelatin, this type of gelatin was purified by highly-performance liquid chromatography system in which depends on molecular size. This type of gelatin has no antigenic and very low rate of allergy compared to conventional gelatin (Derived from pig or cow collagen and denatured in high temperatures). Results of clinical trials of MVVAC, which is produced using final bulk of POLYVAC, have demonstrated the safety of this type of gelatin.

#### 4.2.4. *The significance of the study of stability and determine the vaccine vial monitor of MVVAC*

The identification and use of VVM for MVVAC have great meaning: It helps users to get the vaccine vial with effective prevention; reduce cost due to disposal of MVVAC vial as facing power failures, natural disasters; helps to manage vaccine inventory status by using VVM as a basis for selecting MVVAC vial to use first. Based on the provision of using vaccine outside the cold chain storage in some special cases of WHO and UNICEF, VVM will help to increase the immunization rates in geographically difficult area with no or limited electricity and fridge. Therefore, the identification and

use of VVM for MVVAC will contribute to the eradication of measles in Vietnam. This is also an important condition for POLYVAC to have WHO pre-qualified certification in order to export MVVAC.

### **CONCLUSION**

1. The quality of measles vaccine produced in Vietnam from 2009 to 2013 with stable quality can be seen as below:

The 42 lots met the requirements of qualitative indicators such as identity, sterility, safety, visual inspection. The potency, thermal stability, residual moisture, weight variation, pH are stable with the majority of the indicators within the  $TB \pm 2SD$ ; no lot has fallen out the  $TB \pm 3SD$ .

2. Shelf life of MVVAC (Freeze-dried, live attenuated measles vaccine) was determined to be 10 days kept at  $37^{\circ}\text{C}$ , 60 days kept at  $25^{\circ}\text{C}$ , 2 years kept at  $2-8^{\circ}\text{C}$  and 8 hours after reconstituting.

Vaccine vial monitor of MVVAC is VVM 7.

### **RECOMMENDATIONS**

1. Continue on studying the stability of the quality of MVVAC lots which will be produced in the future.

2. Use the founded VVM for MVVAC.

3. Further research on the stability of MVVAC after reconstituting at the temperature of  $20 - 25^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$ .

4. POLYVAC can skip the test weight variation, particle count, and pH when quality control for MVVAC lots release, and still comply with the requirements of WHO, European Pharmacopoeia, or Japan Pharmacopoeia.