

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Khác với các loại thuốc thông thường, vắc xin thuộc loại sinh phẩm nên có tính biến thiên, nhạy cảm với nhiệt độ. Chúng lại được sử dụng trên một số lượng rất lớn các bà mẹ và trẻ em khoẻ mạnh trên cộng đồng [1]. Vì vậy vắc xin cần được quản lý chất lượng (Quality Management: QM) một cách chặt chẽ bằng nhiều công cụ, trong đó kiểm định chất lượng (Quality control: QC) một cách nghiêm ngặt đóng vai trò then chốt.

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

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

Chất lượng vắc xin bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong quá trình sản xuất như: Con người, trang thiết bị, nguyên vật liệu, môi trường,....Việc nghiên cứu tính ổn định chất lượng các loạt vắc xin giúp đánh giá được tính ổn định của quy trình sản xuất và mức độ áp dụng hệ thống chất lượng của nhà máy, giúp nhà sản xuất dự đoán được chất lượng các loạt vắc xin trong tương lai. Điều này đặc biệt quan trọng đối với các vắc xin mới sản xuất.

Trong các yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến chất lượng vắc xin, nhiệt độ có ảnh hưởng lớn nhất đến tất cả các vắc xin và trong mọi thời điểm. Bảo quản vắc xin ở nhiệt độ không thích hợp có thể mất tác dụng bảo vệ khi vẫn còn hạn sử dụng. 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 vắc xin do họ sản xuất. Cùng một loại vắc xin nhưng mức độ ổn định của vắc xin của mỗi nhà sản

xuất có thể khác nhau do khác biệt về chủng sản xuất, môi trường nuôi cấy, quy trình sản xuất, chất ổn định,...

Khi nhà sản xuất vắc xin muốn thay đổi một công đoạn của quy trình sản xuất hoặc thay đổi một yếu tố quan trọng nào đó trong quy trình sản xuất đều phải thực hiện các nghiên cứu tính ổn định nhiệt trước và sau khi thay đổi để chứng minh sự thay đổi đó không ảnh hưởng đến tính ổn định của sản phẩm. MVVAC được tiếp nhận chuyển giao công nghệ trực tiếp từ Viện Kitasato, Nhật Bản. Do vậy, giai đoạn đầu MVVAC được sản xuất từ bán thành phẩm của Viện Kitasato. Từ năm 2009, POLYVAC tự sản xuất MVVAC từ nguyên liệu đầu để tạo ra bán thành phẩm rồi vắc xin thành phẩm. Tính ổn định nhiệt của MVVAC sản xuất từ bán thành phẩm của Viện Kitasato đã được công bố [2],[3] nhưng chưa có nghiên cứu nào về tính ổn định của MVVAC do POLYVAC sản xuất từ công đoạn đầu tiên.

Với mong muốn đánh giá được tính ổn định của vắc xin 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 thành phẩm 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 nhiệt độ bảo quản khác nhau.*

N (nucleoprotein), F (fusion protein), H (hemagglutinin protein) và M (matrix

protein). Ngoài 6 protein trên, các hạt virion cũng có thể chứa thành phần actin lấy từ tế bào chủ. Hai thụ thể đã được phát hiện trên bề mặt tế bào nhạy cảm với vi rút sởi [11]: Phân tử CD46 (complement regulator CD46) [12] và SLAM (Signaling lymphocyte activation molecule, còn gọi là CDw150) [13].

Vi rút sởi nhạy cảm với các dung môi hòa tan lipid, nhạy cảm với nhiệt độ, ánh sáng và đặc biệt là pH.

Vi rút sởi có hai kháng nguyên chính: Kháng nguyên ngưng kết hồng cầu khi H và kháng nguyên tan máu F.

Sởi là vi rút đồng nhất, không có biến dị của mọi cấu trúc vi rút. Do vậy sau khi bị nhiễm vi rút, kháng thể kháng sởi sẽ tồn tại suốt đời. Vi rút sởi được coi là vi rút có một kiểu kháng nguyên, ổn định [14].

Rất khó nuôi cấy vi rút sởi từ các bệnh phẩm lâm sàng. Nếu không có dòng tế bào thích hợp thì việc phân lập không đạt được hiệu quả [15]. Có thể sử dụng tế bào thận bào thai người, tế bào thận khỉ nguyên phát để phân lập vi rút nhưng vi rút phát triển tốt nhất trên dòng tế bào B95a [15]. Ngược lại, sau lần cấy chuyển đầu tiên, vi rút sởi thích ứng được với rất nhiều dòng tế bào khác nhau: Tế bào phôi gà, tế bào thận chó, tế bào thận bò,... dẫn đến sự thành công trong việc tạo ra các chủng vi rút sống giảm độc lực để sản xuất vắc xin.

Bộ gen dài 15894 nucleotit của chủng Edmonston cũng như bộ gen của các chủng sản xuất vắc xin có nguồn gốc từ chủng Edmonston và bộ gen của rất nhiều chủng vi rút sởi hoang dại đã được giải trình tự [16],[17],[18],[19]. Những phân tích trình tự của gen N, H, P và gen M chỉ ra rõ sự khác biệt của các chủng hoang dại. Sự thay đổi các trình tự này giúp ích cho việc giám sát đường lây truyền của vi rút sởi. Khi phân tích các số liệu về dịch tễ học phân tử cùng với những thông tin dịch tễ khác có thể khẳng định hoặc gợi ý được nguồn bùng phát dịch, có thể làm thước đo hiệu quả chương trình tiêm chủng và giám sát loại trừ bệnh sởi [20],[21],[22],[23]. Số liệu theo dõi đặc điểm di truyền của vi rút sởi hoang

dại lưu hành tại Việt Nam từ giai đoạn 1998-2009 đã chứng minh được sự thành công của TCMR tại Việt Nam khi kết luận được chủng vi rút gây dịch năm 2009 xâm nhập từ nước ngoài vào Việt Nam [20].

Vi rút sởi gồm 23 genotype dựa trên phân tích trình tự ít nhất 450 nucleotid thuộc vùng cực kỳ biến đổi đầu tận - COOH của gen N [24]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra genotype lưu hành ở Đông Nam Á chủ yếu là genotype H [25],[26],[27],[28].

Việt Nam đã có những nghiên cứu nhằm chẩn đoán xác định căn nguyên sởi [29] cũng như xác định genotype của vi rút sởi trong các vụ dịch [30]. Thời kỳ trước chiến dịch tiêm phòng sởi mũi hai, đa số các chủng vi rút sởi hoang dại lưu hành tại miền Bắc và Tây Nguyên Việt Nam là genotype H2 [15],[20]. Sau thời điểm đó, genotype H2 vẫn giữ vai trò chủ yếu trong các vụ dịch sởi ở miền Bắc, miền Trung và Tây Nguyên nhưng sự khác biệt giữa các chủng vi rút lớn hơn, có thể lên tới 3% mặc dù trong cùng một genotype, cùng một vụ dịch [31]. Năm 2005, một genotype mới xuất hiện trong các vụ dịch sởi ở miền Trung (Nha Trang, 2000) và Tây Nguyên (Đắk Lắk, 2003) đã được công bố: Genotype H1 [31]. Năm 2006, Nguyễn Hạnh Phúc và Lê Thị Kim Tuyền cũng có một kết luận tương tự [30]. Đến năm 2009, sự lưu hành của genotype H1 tại các địa phương miền Bắc mới được công bố. Genotype H1 gây nên các vụ dịch tại Lai Châu, Điện Biên, Thái Nguyên (2006) và Ninh Bình (2008) [32]. Nghiên cứu này cùng với nhiều nghiên cứu khác [33] cũng cho thấy nhóm H hoàn toàn không đồng nhất và có thể chia làm hai genotype H1 và H2. "Nghiên cứu dịch tễ học phân tử các chủng vi rút sởi lưu hành trong các vụ dịch sởi năm 2006-2013 ở miền Bắc Việt Nam" thấy chúng đều thuộc genotype H1 [34].

1.1.2. Khả năng gây bệnh, biến chứng, điều trị bệnh sởi

Sởi là bệnh truyền nhiễm mạnh nhất tấn công vào con người với tốc độ lây truyền cao. Bệnh có biểu hiện sốt; viêm long đường hô hấp, tiêu hoá, kết mạc mắt và nổi ban đặc trưng.

Bệnh sởi có rất nhiều biến chứng và thường là các biến chứng nặng. Có bốn nhóm biến chứng chính: Tai - mũi - họng, hệ hô hấp, hệ thần kinh trung ương, hệ tiêu hoá. Trẻ suy dinh dưỡng có nguy cơ biến chứng sau sởi cao gấp 4 lần so với nhóm trẻ không suy dinh dưỡng [35]. Trẻ càng nhỏ tuổi, biến chứng sau sởi càng cao [36].

Viêm não lan tỏa xơ cứng bán cấp (Subacute Sclerosing Pan-encephalitis: SSPE) là một biến chứng rất nặng; trong đó sự phá huỷ tổ chức thần kinh tiến triển không ngừng. Bệnh có đặc trưng sa sút về trí tuệ, tăng trương lực cơ, co giật và cuối cùng là tử vong. Sinh bệnh học của bệnh có liên quan đến sự thiếu hụt miễn dịch của bệnh nhân [37]. Nghiên cứu của Nguyễn Kim Thảo và Huỳnh Phương Liên cho thấy hiệu giá IgG kháng sởi rất cao trong máu của những bệnh nhân này [38].

Tử vong khi mắc sởi thường do biến chứng về hô hấp và thần kinh.

Điều trị bệnh sởi chủ yếu là điều trị triệu chứng, kết hợp chế độ vệ sinh và dinh dưỡng, điều trị biến chứng nếu có.

1.1.3. Dịch tễ học bệnh sởi

Người là ổ chứa duy nhất đối với vi rút sởi, không có trung gian truyền bệnh.

Bệnh sởi lây trực tiếp qua đường hô hấp do tiếp xúc với các giọt nước bọt và dịch tiết của mũi, họng, kết mạc của người nhiễm trùng ngay từ giai đoạn cuối thời kỳ ủ bệnh. Tất cả những người chưa có kháng thể chống lại bệnh sởi đều có khả năng mắc sởi. Trước khi có vắc xin sởi, gần 100% quần thể mắc sởi tự nhiên [39].

Hầu hết trẻ sơ sinh đều còn miễn dịch từ mẹ truyền sang trong những tháng đầu đời. Vì thế, trẻ dưới 6 tháng tuổi ít có khả năng mắc sởi. Sau 6 tháng, kháng thể của trẻ giảm dần và có thể nhiễm sởi.

1.1.4. Tình hình bệnh sởi trên thế giới và Việt Nam - Thành quả của việc sử dụng vắc xin

Sởi là bệnh có thể phòng được bằng vắc xin. Vi rút sởi chỉ có một týp huyết thanh duy nhất nên vắc xin có vai trò quyết định trong việc phòng bệnh sởi [6].

Bệnh sởi có thể thanh toán được vì nhiều lý do: Bệnh có ổ chứa duy nhất là người, không có trung gian truyền bệnh, chỉ có một týp huyết thanh và có vắc xin phòng bệnh hiệu quả.

Trước khi vắc xin sởi được đưa vào sử dụng trên thế giới năm 1963, hầu như mọi trẻ em đều mắc sởi. Trong cộng đồng dân cư cảm nhiễm hoàn toàn. Dịch sởi có tính chu kỳ 3-5 năm/lần, đa số xảy ra ở trẻ em dưới 4 tuổi. Ở Việt Nam, nghiên cứu trên trẻ em quận Ba Đình từ 1975-1979 cho thấy 88,29% số trẻ mắc sởi tập trung ở nhóm dưới 36 tháng tuổi [40].

Vắc xin sởi được đưa vào Chương trình Tiêm chủng Mở rộng trên thế giới đã góp phần thay đổi dịch tễ học bệnh sởi: Tỷ lệ mắc sởi giảm, số vụ dịch giảm, lứa tuổi mắc bệnh tăng lên [41],[42], chu kỳ dịch dài hơn. Ở những nước thực hiện triệt để việc tiêm phòng vắc xin sởi, dịch xảy ra lẻ tẻ và hoàn toàn mất tính chất chu kỳ.

Tuy nhiên, sởi vẫn là nguyên nhân gây mắc và chết hàng đầu ở trẻ nhỏ, đặc biệt ở các nước đang phát triển. Theo số liệu thống kê ở nhiều nước, tỷ lệ tiêm chủng thấp và khoảng cách tiêm giữa hai mũi khá dài là nguyên nhân dẫn đến các vụ dịch sởi [43],[44]. Trong khi đó, ở các nước đã triển khai lịch tiêm vắc xin sởi mũi hai cho trẻ em, số mắc sởi giảm mạnh thậm chí không có trường hợp sởi nào trong nhiều năm như ở các nước Châu Mỹ Latinh, Cuba,... Nhiều nước trên thế giới đang nỗ lực thanh toán bệnh sởi bằng cách tăng tỷ lệ tiêm chủng, tăng cường hệ thống giám sát bệnh sởi [45],[46].

Vắc xin sởi được đưa vào Dự án TCMR đã góp phần thay đổi dịch tễ học bệnh sởi tại Việt Nam: Tỷ lệ mắc sởi giảm, số vụ dịch giảm, lứa tuổi mắc bệnh tăng lên [47],[48],[49],[50]. Việt Nam bắt đầu thực hiện tiêm

một mũi VX sởi cho trẻ từ 9-11 tháng tuổi từ năm 1981, thực hiện trên toàn quốc vào 10-1985.

Các nghiên cứu trong thời gian sau năm 1985 cho thấy dịch sởi xảy ra chủ yếu trên đối tượng bị bỏ sót trong TCMR [51],[47]. Tình hình trên cũng gặp ở nhiều nước, nơi mà chỉ tiêm một mũi vắc xin sởi cho trẻ. Điều đó cho thấy chiến lược phòng chống sởi chỉ tiêm phòng một mũi vắc xin duy nhất cho trẻ em dưới một tuổi không đủ để phòng chống sởi có hiệu quả. Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu chỉ ra sự cần thiết phải tiêm vắc xin mũi 2 vắc xin sởi [51],[52],[53].

Năm 2002, Việt Nam triển khai tiêm mũi 2 vắc xin sởi cho hơn 15 triệu trẻ từ 9 tháng đến 10 tuổi trong cả nước [54]. Tỷ lệ mắc bệnh trong cả nước giảm rõ rệt từ 84,7 trường hợp/1.000.000 dân vào năm 2002 xuống còn 28,7/1.000.000 dân năm 2003 và tiếp tục xuống còn 2,6 trường hợp/1.000.000 dân vào năm 2004.

Giai đoạn 2006-2010, Việt Nam triển khai tiêm mũi 2 vắc xin sởi cho 1,5 triệu trẻ 6 tuổi mỗi năm trong lịch tiêm chủng thường xuyên trên toàn quốc.

Từ năm 2012, căn cứ đặc điểm vụ dịch kéo dài từ cuối năm 2008 đến 6/2010 [55], Việt Nam đã quyết định tiêm mũi 2 vắc xin sởi sớm hơn (cho trẻ 18 tháng tuổi) để tăng cường miễn dịch cho trẻ chưa được bảo vệ sau mũi 1.

Ngoài lịch tiêm chủng thường xuyên, Việt Nam cũng tiến hành nhiều chiến dịch toàn quốc, chiến dịch tiêm phòng ở các vùng nguy cơ cao để dập dịch.

Dịch sởi ở Việt Nam gián đoạn một số năm. Hai vụ dịch sởi xảy ra với quy mô toàn quốc trong thời gian gần đây mang lại cho Việt Nam những bài học đắt giá: Mỗi khi tỷ lệ tiêm vắc xin giảm xuống vì lý do nào đó, dịch sẽ xảy ra. Cụ thể:

Cuối năm 2008 - giữa năm 2010, Việt Nam đã ghi nhận vụ dịch sởi có qui mô lớn trên cả nước (63/63 tỉnh), 9.434 ca mắc. Sự thiếu vắc xin với mức

độ cao mà nguyên nhân do đầu thầu đã dẫn đến sự tăng cao tỷ lệ nhiễm bệnh từ 0,2 người /1.000.000 dân năm 2007; 4,1 người/1.000.000 dân năm 2008 lên 91,1 người/1.000.000 dân vào năm 2009. Tại miền Bắc từ 10/2008 - 10/2009 có tới 3672 trường hợp mắc sởi, trong đó có 14,62% trẻ 1-4 tuổi. Trong các trẻ này, những trẻ 1-2 tuổi mắc bệnh do chưa được tiêm mũi 1 theo đúng lịch tiêm chủng thường xuyên [56].

Năm 2014 dịch sởi diễn biến cực kỳ phức tạp: Xảy ra tản phát ở hầu hết các tỉnh/thành phố trong cả nước; Tỷ lệ mắc 16,8/100.000 dân, tăng 5,8 lần so với năm 2013; Tuổi mắc tập trung chủ yếu ở nhóm 1-4 tuổi (32,2%), nhóm trẻ dưới 1 tuổi chiếm 22,8%. Nhóm trẻ chưa đến tuổi tiêm phòng vắc xin sởi tỷ lệ mắc rất cao: Dưới 9 tháng chiếm 13,2%; từ 9-11 tháng chiếm 9,6%;

Có 148 ca tử vong do sởi sau 12 năm liên tục không có tử vong do sởi, trong đó có những ca tử vong khi trẻ chưa đến tuổi tiêm phòng;

Nguyên nhân vụ dịch được cho là do tỷ lệ tiêm mũi 2 lúc 18 tháng tuổi thấp; người dân sợ các tai biến như đã xảy ra trong thời gian trước đó nên đã trì hoãn việc tiêm [57].

chủng sản xuất vắc xin. Sự giảm độc các chủng sản xuất vắc xin là kết quả của quá trình thích nghi vi rút lên tế bào nuôi cấy, đặc biệt trên tế bào phôi gà. Hầu như tất cả các gen của vi rút sởi đều tham gia vào quá trình thích nghi này. Người ta thấy rằng, chủng sản xuất vắc xin đóng vai trò quan trọng hơn lịch tiêm trong tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh [60].

Các chủng vi rút dùng làm vắc xin khác biệt nhau rất ít mặc dù chủng gốc được phân lập từ các vùng địa lý khác nhau, thậm chí chủng Schwarz FF-8 và chủng AIK-C chỉ khác nhau 2 nucleotid trên gen P [61]. Phân tích trình tự nucleotide của các gen F, H, N, M cho thấy: Các chủng sản xuất có nguồn gốc từ chủng Edmonston khác nhau không quá 0,6% [62]. Mori cho biết, bộ gen của chủng AIK-C chỉ khác bộ gen của chủng Edmonston 56 nucleotid [63]. Các chủng không bắt nguồn từ Edmonston như CAM-70, S-191,... khác biệt lớn hơn nhưng đều cùng một genotype A. Điều đó nói lên rằng các vắc xin sởi có tính chất toàn cầu [64]. MVVAC, vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C, có tác dụng bảo vệ người dân Việt Nam không mắc bệnh sởi mặc dù chủng gốc không phân lập tại Việt Nam.

Các nghiên cứu cũng chỉ ra được các vị trí thay đổi nucleotide trong gen H dẫn đến xuất hiện một số đặc điểm sinh học của chủng Moraten so với chủng vi rút ban đầu [65]. So sánh vùng không mã hoá của các chủng Edmonston hoang dại với 5 chủng dùng làm vắc xin thì chỉ khác nhau 21 nucleotide.

Việt Nam sử dụng chủng AIK-C (A = America; I = Iran; K = The Kitasato institute; C = chick-embryo cell, chủng vi rút thích nghi trên tế bào phôi gà). Chủng này được phát triển độc lập từ chủng Edmonston hoang dại bằng cách cấy truyền nhiều lần chủng Edmonston trên các loại tế bào tạo thành chủng Edmonston-Ender. Từ chủng Edmonston-Ender, chủng AIK-C được tạo ra qua hai bước:

Bước 1: Từ chủng Edmonston-Ender, các nhà khoa học phân lập và tạo bốn biến chủng thích nghi ở nhiệt độ khác nhau nhưng đều là các nhiệt độ thấp (25⁰C, 27⁰C, 29⁰C, 33⁰C) bằng cách tạo dòng trên tế bào thận cừu. Đánh giá bốn chủng về tỷ lệ sốt và tạo đáp ứng miễn dịch.

Bảng 1.1: Tỷ lệ sốt và tạo đáp ứng miễn dịch của bốn biến chủng thích nghi ở nhiệt độ thấp [66]

Nhiệt độ thích nghi của chủng (°C)	Tỷ lệ sốt (%)	Đáp ứng miễn dịch	
		Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh (%)	Nồng độ kháng thể trung hoà (2 ⁿ)
25	0	0
27	10	70	3.2
29	40	100	5.6
33	20	100	6.5

Chọn chủng thích nghi ở 33⁰C, đặt tên chủng là AIK. Tiếp tục cấy chuyển 12 lần trên tế bào thận cừu để giảm độc lực và duy trì sự thích nghi.

Bước 2: Nhân chủng nói trên lên tế bào phôi gà, chọn chủng cho sản lượng lớn nhất. Đặt tên chủng là AIK-C và dùng làm chủng gốc để sản xuất vắc xin.

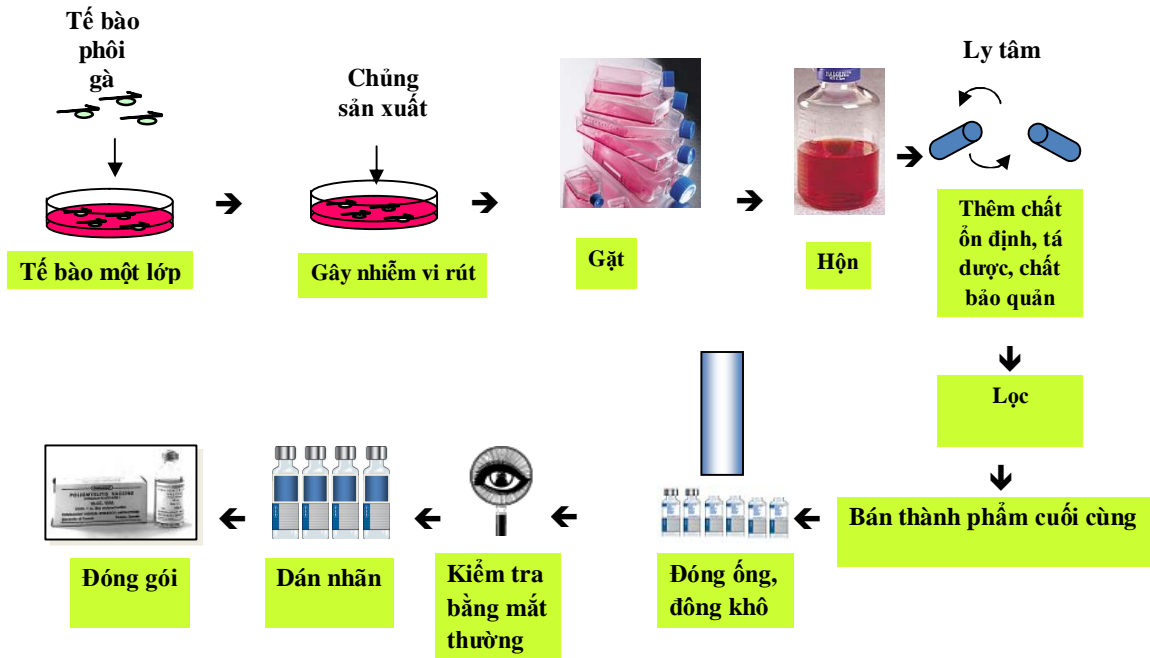
Chủng AIK-C tạo kích thước ổ hủy hoại trên tế bào nuôi nhỏ hơn so với các chủng sản xuất vắc xin khác. Đặc tính này do Leucine ở vị trí 278 của gen F quy định. So với chủng Edmonston gốc, axit amin này đã thay thế Phenine ở vị trí trên [67]. Hơn nữa, khi tiêm chủng vi rút này vào vùng đồi thị và não thất khi, các nhà nghiên cứu không thể xác định được kháng thể trung hoà trong dịch não tủy. Điều này gợi ý rằng, chủng AIK-C không nhân lên trong hệ thống thần kinh trung ương khi [66]. Từ đó có thể suy ra, khi tiêm vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C không có các tai biến liên quan đến hệ thống thần kinh như viêm não, viêm xơ chai não bán cấp. Điều này đã được

Hsiu-Yuan Tsai khẳng định thêm khi nghiên cứu về tính an toàn sau tiêm vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C tại Đài Loan [60].

Vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C đã được cấp phép sử dụng vào năm 1971 [68] tại Nhật Bản, được sử dụng rộng rãi tại Nhật Bản và nhiều nước trên thế giới.

1.2.1.2. Quy trình sản xuất

Tất cả các nhà sản xuất vắc xin sởi trên thế giới đều có chung một quy trình sản xuất. Quy trình sản xuất MVVAC do Viện Kitasato, Nhật Bản chuyển giao. Các chuyên gia của Viện Kitasato chính là những người giúp POLYVAC thiết kế nhà xưởng; triển khai quy trình; vận hành thiết bị; đào tạo tất cả các nhân viên tham gia vào quy trình sản xuất, kiểm định, thẩm định thiết bị,....



Hình 1.4: Các bước chính của quy trình sản xuất vắc xin sởi [69]

Nhà máy sản xuất MVVAC đã đạt tiêu chuẩn thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice: GMP) của WHO, một bằng chứng để tạo lập được tính ổn định của sản phẩm.

Theo tiêu chuẩn của WHO [1], tuân thủ GMP, chứng tỏ POLYVAC đã đạt được các điểm sau:

Tất cả các qui trình trong quá trình sản xuất được vạch ra một cách rõ ràng, được xem xét lại một cách hệ thống, chỉ ra được khả năng một sản phẩm được sản xuất một cách ổn định theo tiêu chuẩn đề ra.

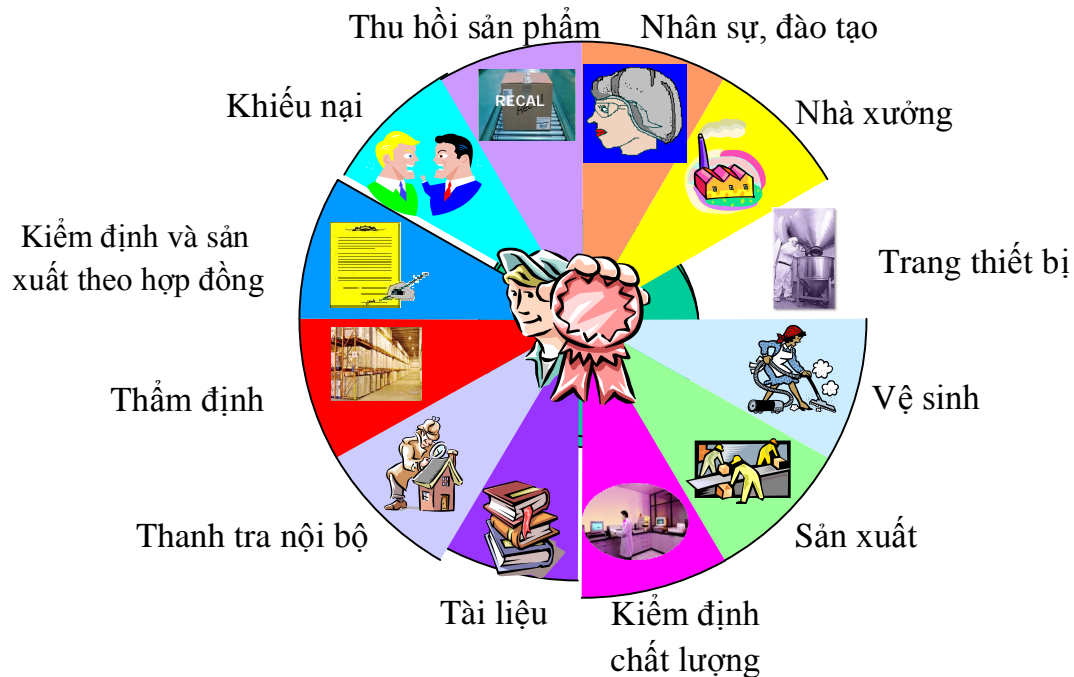
Các quá trình vận hành (processes) và các qui trình kỹ thuật (procedures) được thẩm định.

Tất cả các nguồn lực được đáp ứng, bao gồm: Nhân sự được đào tạo và được đánh giá; có nhà xưởng và không gian phù hợp để sản xuất, kiểm định; có các trang thiết bị và các dịch vụ bảo hành, sửa chữa thích hợp; có các nguyên vật liệu, chai/lọ chứa và nhãn sản phẩm thích hợp; có các qui trình kỹ thuật và các hướng dẫn vận hành đã được phê duyệt;...

Người vận hành máy móc được đào tạo để thực hiện qui trình một cách chính xác;

Việc ghi chép (bằng tay hoặc bằng máy) được thực hiện trong suốt thời gian sản xuất để chỉ ra rằng: Trên thực tế, tất cả các công đoạn đã được thực hiện theo những qui trình rõ ràng, đã được quy định; chất lượng và số lượng sản phẩm giống như mong đợi. Bất cứ một sự cố nào đều được ghi chép và điều tra đầy đủ.

Việc ghi chép được thực hiện xuyên suốt quá trình sản xuất, phân phối sản phẩm. Do đó tất cả các thông tin liên quan đến một lô vắc xin được giữ lại trong một bộ hồ sơ rõ ràng, đầy đủ, dễ hiểu, dễ tra cứu.



Hình 1.5: Các nội dung của GMP [1]

1.2.1.3. Các loại vắc xin sởi trên thế giới

Trên thế giới đã sử dụng hai loại vắc xin sởi: Vắc xin chết và vắc xin sống giảm độc lực. Vắc xin chết chỉ sử dụng trong một thời gian ngắn vì thời gian bảo vệ ngắn và có nguy cơ gây ra các ca nhiễm sởi không điển hình do kháng nguyên hoà màng đã bị phá huỷ trong quá trình bất hoạt vi rút bằng formalin. Tất cả các vắc xin sởi hiện nay đều thuộc loại vắc xin sống giảm độc lực.

Vắc xin sởi có thể ở dạng đơn hoặc được kết hợp với các vắc xin sống giảm độc lực khác như quai bị, rubella, thủy đậu.

1.2.2. Liều dùng, đường dùng, lịch tiêm, chống chỉ định với vắc xin sởi

Vắc xin sởi hiện nay được tiêm dưới da phần cơ delta cánh tay phải. Tiêm 2 liều, mỗi liều 0,5 mL. Liều 1 cho trẻ từ 9-12 tháng tuổi, liều 2 cho trẻ từ 15-18 tháng tùy tình hình dịch tễ học từng nước [70].

Các nước trong khu vực tùy thuộc vào điều kiện dịch tễ học, hệ thống giám sát, thực trạng tiêm chủng, điều kiện kinh tế,... của nước mình để xây dựng chiến lược cụ thể.

Việt Nam thực hiện tiêm một mũi vắc xin sởi cho trẻ từ 9 tháng tuổi từ năm 1981, năm 1985 thực hiện trên toàn quốc.

Trước tình hình số mắc sởi tăng ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt ở các nước chỉ tiêm chủng một liều vắc xin sởi, kết hợp với kết quả thu được ở các nước đã thực hiện tiêm bổ sung mũi hai vắc xin sởi, từ năm 2006 - 2010 Việt Nam triển khai tiêm mũi 2 vắc xin sởi cho 1,5 triệu trẻ 6 tuổi mỗi năm trong chương trình tiêm chủng thường xuyên trên toàn quốc.

Căn cứ đặc điểm vụ dịch kéo dài từ cuối năm 2008 đến 6/2010 [55], [71] Dự án TCMR đã quyết định tiêm mũi 2 vắc xin sởi sớm hơn để tăng cường miễn dịch cho trẻ chưa được bảo vệ sau mũi 1. Do đó, từ năm 2011, Việt Nam tiêm mũi 2 cho trẻ 18 tháng tuổi. Ngoài lịch tiêm chủng thường xuyên, Việt Nam còn tiến hành nhiều chiến dịch tiêm bổ sung vắc xin sởi cho các đối tượng có nguy cơ cao để dập dịch. Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu chứng minh sự cần thiết phải tiêm vắc xin mũi 2 cho trẻ để giảm tỷ lệ mắc bệnh, góp phần thanh toán bệnh sởi [52],[72],[73],[74].

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

1.2.3.1. Đáp ứng miễn dịch và phản ứng phụ sau tiêm của vắc xin sởi nói chung

Đáp ứng miễn dịch sau tiêm vắc xin sởi tương tự như sau nhiễm sởi tự nhiên nhưng nhanh hơn đáp ứng miễn dịch do mắc tự nhiên vài ngày [75].

Phản ứng phụ sau tiêm vắc xin sởi thường nhẹ: Sốt từ 39,5⁰C xảy ra ở 5-15% số người tiêm, diễn ra vào ngày thứ 7 đến ngày 12 sau tiêm và kéo dài 1-2 ngày. Phát ban xảy ra ở khoảng 5% số người tiêm, bắt đầu từ ngày thứ 7-10 sau tiêm và kéo dài 1-3 ngày. Vắc xin sởi có thể gây giảm nhẹ tiêu cầu

trong máu. Ban xuất huyết có thể xuất hiện sau tiêm 6 tuần với một tỷ lệ rất nhỏ (1/25.000 liều) khi dùng vắc xin kết hợp. Phản ứng quá mẫn sớm rất hiếm gặp, khoảng 1-3,5 trường hợp/triệu liều [9].

Nhiều loại vắc xin sởi sản xuất bằng cách nuôi cấy trên tế bào phôi gà nhưng trong nhiều năm không có số liệu nào về phản ứng dị ứng với protein trứng còn sót lại trong vắc xin. Vì vậy, trẻ em dị ứng với trứng có thể tiêm vắc xin sởi một cách an toàn mà không cần bất cứ sự theo dõi đặc biệt nào. Phản ứng quá mẫn tức thì với vắc xin chứa vi rút sởi có thể có nguyên nhân từ gelatin, một chất ổn định có trong vắc xin sởi. Các nghiên cứu bệnh chứng đã chứng minh vắc xin sởi có tác dụng bảo vệ con người khỏi mắc viêm não lan tỏa xơ cứng bán cấp. Phân tích trình tự gen vi rút sởi phân lập từ các bệnh nhân mắc viêm não lan tỏa xơ cứng bán cấp đều cho kết quả là các chủng vi rút sởi hoang dại, không phải là các chủng sản xuất vắc xin [9].

1.2.3.2. Đáp ứng miễn dịch và phản ứng phụ sau tiêm vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C

Năm 1974, Viện Kitasato, Nhật Bản đã sản xuất thành công vắc xin sởi có tỷ lệ sốt sau tiêm chỉ bằng 1/2 đến 1/3 so với các vắc xin đang sử dụng rộng rãi thời kỳ đó. Vắc xin này cũng cho đáp ứng miễn dịch cao sau tiêm [76].

AIK-C hiện nay được coi là chủng an toàn nhất trong các chủng sản xuất vắc xin sởi. Rất nhiều nghiên cứu cho thấy vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C tạo được đáp ứng miễn dịch cao và đáng chú ý hơn, rất an toàn [77], nó đặc biệt hữu hiệu trên trẻ đẻ non để có thể bảo vệ trẻ khỏi mắc sởi khi đang có dịch [78].

Nghiên cứu của V. M. Bolotovskii và cộng sự cho thấy vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C cho đáp ứng miễn dịch ở trẻ 6 tháng tuổi (trẻ còn đáp ứng miễn dịch từ mẹ) tốt hơn vắc xin sản xuất từ ba chủng Schwarz và

Edmonston-Zagreb và Leningrad-16. Kết luận của nghiên cứu này cũng giống như nghiên cứu của Nkrumah khi cho rằng vắc xin sản xuất từ chủng AIK-C thích hợp cho việc tiêm phòng sớm ở trẻ dưới 9 tháng tuổi, do đó có thể áp dụng tiêm phòng rộng rãi cho trẻ ở những vùng đang có dịch sởi xảy ra [79]. Như vậy, vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C thích hợp cho Việt Nam để tránh được hiện tượng nhiều trẻ em mắc sởi thậm chí tử vong do sởi ngay từ lúc chưa đến tuổi tiêm vắc xin giống như dịch sởi đã xảy ra ở Việt Nam trong năm 2014. Các nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi tại Việt Nam năm 2014 đều cho thấy tỷ lệ mắc sởi ở trẻ dưới 9 tháng khá cao: Cả nước 13,2% [57], Hà Nội 24,6% [80], Hà Nam 30% [81].

Vắc xin sởi chủng AIK-C đã được tiến hành thử nghiệm lâm sàng tại Liên Xô năm 1989 và Ghana 1994. Nghiên cứu được tiến hành so sánh với vắc xin sởi chủng Schwarz, chủng Edmonston-Zagreb và chủng Leningrad-16. Kết quả cho thấy chủng AIK-C cho kết quả đáp ứng miễn dịch cao hơn các chủng khác đặc biệt ở trẻ dưới 6 tháng tuổi, tỷ lệ phản ứng phụ không có sự khác biệt với các chủng khác và đặc biệt là không có phản ứng nghiêm trọng [82].

Theo số liệu giám sát tính an toàn của vắc xin sởi chủng AIK-C sau tiêm trong 10 năm (1994-2004), tỷ lệ đạt kháng thể bảo vệ sau tiêm vắc xin từ 98-100% và không có phản ứng phụ nghiêm trọng. Các phản ứng phụ thường nhẹ, không có trường hợp nào xuất hiện giảm tiểu cầu [83].

Nguyên nhân vắc xin sởi chủng AIK-C có tính an toàn cao hơn, tỷ lệ sốt thấp hơn, nồng độ kháng thể thấp hơn so với vắc xin sởi sản xuất từ các chủng khác xuất phát từ quá trình tạo chủng: Các nhà khoa học đã chọn AIK-C là những chủng thích nghi ở nhiệt độ thấp, 33⁰C (Đã trình bày trong trang 14); trong cơ thể người ở nhiệt độ 37⁰C vi rút sởi chủng AIK-C bị ức chế sự phát triển, ít gây ra các phản ứng phụ.

1.2.3.3. Đáp ứng miễn dịch và phản ứng phụ sau tiêm vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam

Loại MVVAC sản xuất đầu tiên trong giai đoạn 2009-2013 đã được đưa vào thử nghiệm lâm sàng. Kết quả thử nghiệm lâm sàng cho thấy MVVAC đạt yêu cầu về an toàn và hiệu quả phòng bệnh [84]. Tuy nhiên, để chứng minh các loại MVVAC sản xuất tiếp theo có chất lượng giống như loại đã dùng trong thử nghiệm lâm sàng hay không, có tạo được đáp ứng miễn dịch cũng như an toàn hay không phải dựa vào nghiên cứu về tính ổn định chất lượng của các loại MVVAC.

Các kết quả nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng cũng cho thấy, MVVAC có các đặc điểm chung của vắc xin sởi sản xuất từ chủng AIK-C. So với Rouvax (Vắc xin sởi sản xuất từ chủng Schwarz của hãng Sanofi-Pasteur), MVVAC có tỷ lệ sốt thấp hơn, tỷ lệ đạt nồng độ kháng thể bảo vệ và tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh cao hơn nhưng nồng độ kháng thể trung bình thấp hơn [84],[85].

1.2.4. Thành phần vắc xin sởi chủng AIK-C của Viện Kitasato (Nhật Bản) và của Việt Nam

Bảng 1.2: Thành phần vắc xin sởi chủng AIK-C của POLYVAC và Viện Kitasato [2]

Loại vắc xin	Vắc xin sởi Việt Nam (MVVAC)	Vắc xin sởi Viện Kitasato
Thành phần		
Vi rút sởi sống, giảm độc lực chủng AIK-C	Ít nhất 1000 PFU/liều	Ít nhất 5000 PFU/liều
Lactose	2%	2%
D-Sorbitol	0,72%	1,8%

Loại vắc xin Thành phần	Vắc xin sởi Việt Nam (MVVAC)	Vắc xin sởi Viện Kitasato
L-Sodium glutamate	0,4%	0,4%
Hydrolized gelatin	0,36%	
Kháng sinh (erythromycin và kanamycin)	≤ 10 mg/liều/loại kháng sinh	≤ 10 mg/liều/loại kháng sinh
Dạng trình bày	10 liều/lọ	Liều đơn

Thành phần của vắc xin sởi của Viện Kitasato và của Việt Nam tương tự nhau. Sự khác biệt lớn nhất nằm ở chỗ: Vắc xin sởi của Việt Nam có chứa gelatin, vắc xin sởi của Viện Kitasato không chứa gelatin.

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

1.3.1. Kiểm định vắc xin

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

Kiểm định vắc xin đóng vai trò then chốt trong tất cả các quyết định liên quan đến chất lượng sản phẩm.

Kiểm định vắc xin được thực hiện với mục đích khẳng định lô vắc xin thực sự an toàn và có hiệu quả phòng bệnh.

Kiểm định vắc xin là một nội dung phức tạp vì:

Thứ nhất: Kiểm định chất lượng phải thực hiện trên sản phẩm ở nhiều công đoạn khác nhau của qui trình sản xuất: Nguyên liệu đầu, sản phẩm vi khuẩn hoặc vi rút sau gặt, bán thành phẩm, bán thành phẩm cuối cùng, thành phẩm;

Thứ hai: Mỗi công đoạn thực hiện trên nhiều chỉ số khác nhau, số lượng chỉ số và loại chỉ số cần thực hiện trên mỗi vắc xin cũng khác nhau;

Thứ ba: Một số các chỉ số được thực hiện tương tự nhau đối với tất cả các vắc xin như: Vô trùng, an toàn chung, các chỉ số hoá lý (pH; hàm lượng thimerosal, formaldehyde, protein,...). Các chỉ số khác như nhận dạng, công hiệu, an toàn đặc hiệu,... mỗi vắc xin có một quy trình, mẫu chuẩn khác nhau.

Kiểm định chất lượng vắc xin gồm 3 nội dung chính: Kiểm định chất lượng chủng sản xuất, kiểm định chất lượng nguyên vật liệu đầu và kiểm định chất lượng sản phẩm. Nguyên vật liệu đầu trong quá trình sản xuất bao gồm: Tế bào dùng để nhân vi rút, huyết thanh sử dụng cho nuôi cấy tế bào, trypsin dùng để tách tế bào,... Kiểm định chất lượng sản phẩm được thực hiện cho từng loạt vắc xin, ở từng công đoạn quan trọng của quá trình sản xuất, ở bán thành phẩm và sản phẩm cuối cùng (vắc xin thành phẩm).

Có rất nhiều chỉ số kiểm định chất lượng vắc xin thành phẩm, bao gồm: Nhận dạng; công hiệu; an toàn chung; an toàn đặc hiệu; chất gây sốt; vô trùng; các chỉ số vật lý: Quan sát trạng thái, độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin trong cùng một loạt; các chỉ số hoá học: Hàm lượng chất bảo quản, hàm lượng chất bất hoạt tồn dư, hàm lượng nito toàn phần, hàm lượng nito protein,... Ngoài ra, một số vắc xin có thêm những chỉ số riêng, đặc thù, VD: Các vắc xin rút sống cần kiểm tra độ ổn định nhiệt, vắc xin ho gà cần kiểm tra tính hoạt hóa histamine.

Vô trùng là yêu cầu cơ bản nhất trong kiểm định vắc xin. Kiểm tra vô trùng vắc xin thành phẩm gồm hai nội dung: Kiểm tra xem vắc xin có

nhiễm vi khuẩn, nấm không và kiểm tra xem vắc xin có nhiễm *Mycoplasma* không. Kiểm tra vô trùng với *Mycoplasma* chỉ áp dụng cho các vắc xin mà trong quá trình sản xuất có công đoạn nuôi cấy chủng sản xuất vắc xin trên tế bào.

Thử nghiệm vô trùng được thực hiện theo một qui trình chặt chẽ, phải được chuẩn bị cũng như thực hiện để có thể loại trừ được các kết quả dương tính giả và âm tính giả. Thử nghiệm vô trùng thực hiện tương tự nhau cho tất cả các vắc xin.

Hiện nay, trên thế giới có hai phương pháp kiểm tra vô trùng VX: Phương pháp màng lọc và phương pháp cấy trực tiếp.

Phương pháp màng lọc dùng một bơm chân không hút tất cả VX trong các lọ mẫu cần kiểm tra đi qua một màng lọc có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn hoặc bằng 0,45 μm để giữ lại vi khuẩn và nấm trên màng, rửa màng lọc để loại bỏ hết các chất ức chế bằng cách cho các dung dịch rửa đi qua, sau đó nuôi cấy màng lọc trong hai môi trường thích hợp cho vi khuẩn và nấm phát triển.

Phương pháp cấy trực tiếp được thực hiện bằng cách hút một lượng VX trong mỗi lọ chứa theo một tỷ lệ nhất định rồi cấy vào các ống môi trường thích hợp cho vi khuẩn và nấm phát triển.

Thử nghiệm nhận dạng được thực hiện để xác định xem VX có chứa loại kháng nguyên đã đăng ký hay không. Thử nghiệm nhận dạng có thể được thực hiện trực tiếp bằng cách tìm kháng nguyên hoặc gián tiếp thông qua tìm kháng thể đặc hiệu. Thử nghiệm nhận dạng được thực hiện một cách chuyên biệt, mỗi VX có quy trình nhận dạng khác nhau.

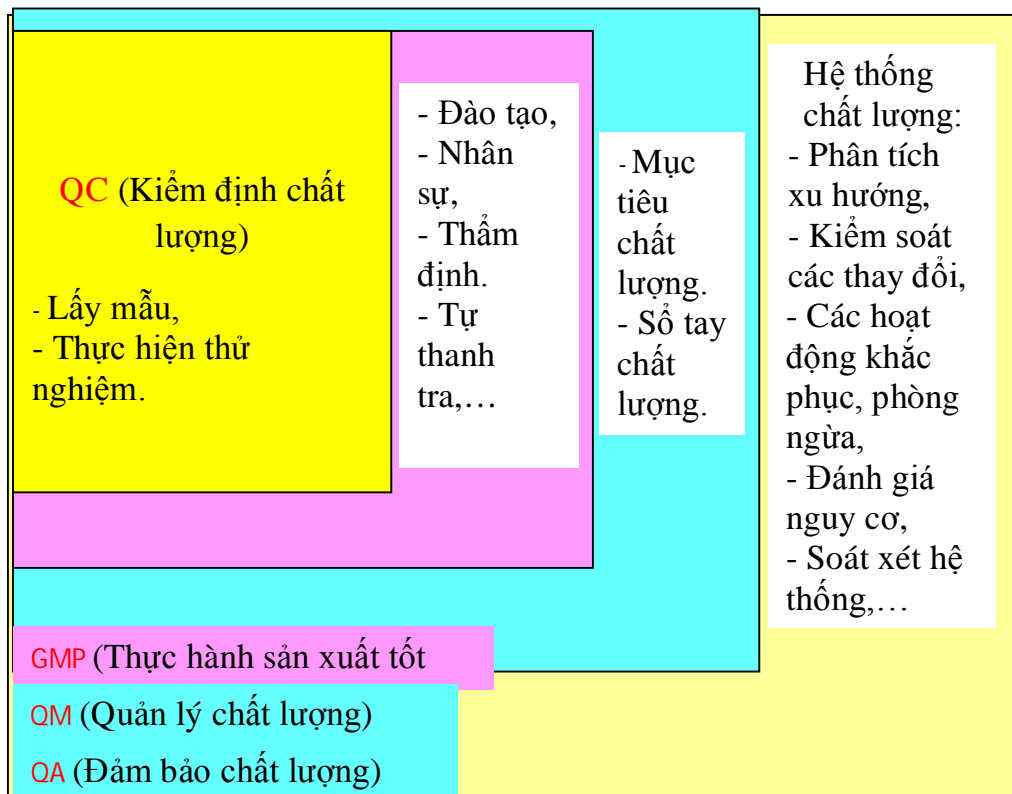
Công hiệu là tiêu chí quan trọng nhất để đánh giá chất lượng vắc xin, thước đo khả năng bảo vệ con người trước bệnh tật. Việc xác định công hiệu

của VX có thể được thực hiện trên động vật thực nghiệm hay trong phòng thí nghiệm. Tùy từng VX, công hiệu có thể xác định thông qua nồng độ vi rút hoặc vi khuẩn có trong VX; nồng độ kháng nguyên hoặc gián tiếp qua nồng độ kháng thể trên động vật thí nghiệm. Khả năng bảo vệ của VX cũng có thể được đánh giá bằng cách thử thách trên động vật thí nghiệm: Gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm bằng VX, sau đó tiêm nguồn bệnh vào động vật thí nghiệm. Tính công hiệu VX dựa vào số lượng động vật sống sót/động vật chết. Mỗi VX có qui trình xác định công hiệu riêng, đặc trưng cho VX đó. Với các vắc xin vi rút sống giảm độc lực, công hiệu thể hiện qua nồng độ vi rút trong vắc xin.

Thử nghiệm an toàn chung (còn được gọi thử nghiệm an toàn không đặc hiệu) nhằm phát hiện bất kỳ chất độc nào có mặt trong sản phẩm. Thử nghiệm xác định tính an toàn chung thực hiện giống nhau đối với tất cả các VX.

Thử nghiệm an toàn đặc hiệu nhằm kiểm tra các độc tính liên quan đến đặc điểm gây bệnh của chủng sản xuất. Chỉ có một số VX cần phải kiểm tra an toàn đặc hiệu như BCG, viêm não Nhật Bản, dại,... Mỗi VX có qui trình thử nghiệm, tiêu chí đánh giá kết quả riêng, đặc trưng cho VX đó.

Thử nghiệm kiểm tra chất gây sốt (Pyrogens) nhằm phát hiện có hay không tác nhân gây sốt trong VX. Thử nghiệm này có thể được thực hiện trên thỏ hoặc bằng thuốc thử lysat.

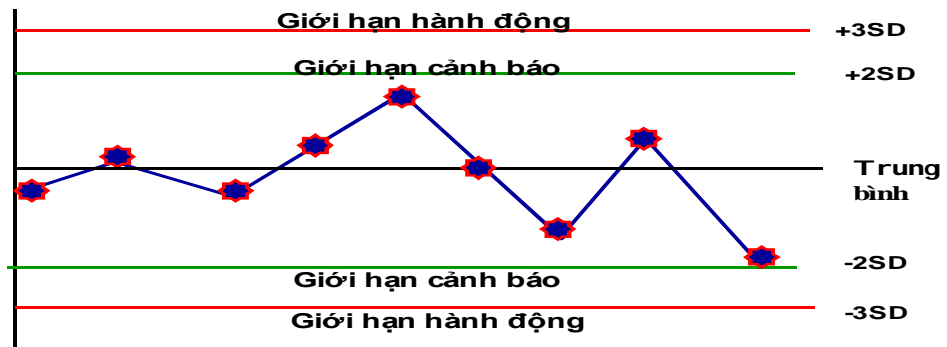


Hình 1.6: Kiểm định chất lượng và các yếu tố trong quản lý chất lượng vắc xin [1]

1.3.2. Tính ổn định chất lượng của các loạt vắc xin

Tính ổn định chất lượng của các loạt vắc xin là khái niệm nhằm đảm bảo cho sự xuất xưởng một cách liên tục các loạt vắc xin an toàn và hiệu quả.

Tính ổn định chất lượng của các loạt vắc xin được xác định bằng cách kiểm định chất lượng từng loạt vắc xin và tiến hành phân tích xu hướng (trend analysis) kết quả kiểm định.



Hình 1.7: Các mốc chính phân tích sự ổn định chất lượng vắc xin
[70],[86]

Khi phân tích xu hướng các chỉ số định lượng, WHO và nhiều nhà sản xuất cũng như cơ quan kiểm định quốc gia trên thế giới sử dụng đồ thị Shewhart đánh giá độ ổn định của một bộ số liệu kết quả kiểm định dựa vào các khoảng sau [86],[87],[88]:

Vùng ngoài khoảng trung bình (TB) ± 3 SD được gọi là vùng hành động. Nếu có một điểm (tương ứng với kết quả kiểm định một chỉ số của một loạt) nằm ngoài vùng này: Cần phải cân nhắc xem loạt vắc xin đó có được sử dụng không kể cả khi nó vẫn đạt tiêu chuẩn thông số kỹ thuật cho xuất xưởng; điều tra tất cả các yếu tố liên quan đến nguyên vật liệu đầu, qui trình sản xuất, để tìm nguyên nhân và đưa ra các biện pháp khắc phục, phòng ngừa; có thể dừng quá trình sản xuất để khắc phục nguyên nhân.

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, chúng tỏ tồn tại lỗi hệ thống hoặc xảy ra sự cố cần điều chỉnh [86].

TB \pm 2SD và TB \pm 3SD là các mốc cơ bản để đánh giá độ ổn định chất lượng của vắc xin. 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 loại vắc xin 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* [89],[90]. Hai yếu tố trên đảm bảo cho việc tạo ra các loại vắc xin liên tiếp an toàn và hiệu quả [91]. Vì vậy, việc *kiểm định chất lượng* không chỉ cho những số liệu về chất lượng từng loại vắc xin 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.

1.3.3. Tình hình nghiên cứu tính ổn định chất lượng vắc xin, tính ổn định chất lượng MVVAC

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã dùng phương pháp thống kê và đồ thị Shewhart cho phân tích tính ổn định chất lượng của vắc xin để khẳng định sự ổn định của quy trình sản xuất và hệ thống quản lý chất lượng [92],[93],[87]. Mặt khác, phương pháp này cũng được sử dụng để đánh giá độ dao động của chất lượng sản phẩm khi thay đổi các yếu tố trong quá trình sản xuất [91],[94],[95],[96],[88].

Việt Nam đã có một số nghiên cứu về tính ổn định chất lượng các loại của một số vắc xin [97],[98],[99]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Linh [97] đã đánh giá tính đồng đều về chất lượng của các loại BCG sản xuất tại Nha trang trong 5 năm từ 2001-2005. Nghiên cứu của Chế Đoàn Quang, Nguyễn Thành Tín và cộng sự về tính đồng đều của vắc xin này trong 9 năm (2004-2012) cũng đã được công bố [98]. Năm 2013, quy trình sản xuất giải

độc tố uốn ván tinh chế dùng trong vắc xin TT và hỗn hợp vắc xin DPT giai đoạn 2008 - 2012 đã được đánh giá thông qua việc đánh giá tính ổn định về thành phần uốn ván trong vắc xin [99]. Ba nghiên cứu này đã phân tích thống kê kết quả kiểm định chất lượng vắc xin, dựa trên mốc $TB \pm 2SD$ để đánh giá tính ổn định của chúng. Các kết quả nghiên cứu cho thấy BCG và vắc xin TT, thành phần uốn ván trong vắc xin DPT có chất lượng ổn định.

Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về tính ổn định chất lượng của các loại MVVAC. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên các loại vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013 với mục tiêu xác định tính đồng đều về chất lượng của các loại vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam, từ đó rút ra được kết luận về tính ổn định của quy trình sản xuất vắc xin sởi tại Việt Nam và mức độ áp dụng hệ thống chất lượng trong nhà máy sản xuất vắc xin MVVAC.

1.4. Tính ổn định nhiệt của vắc xin [100]

Hầu hết vắc xin là một tổ hợp các phân tử phức hợp và có kích thước lớn. Các phân tử này thường nhạy cảm cao với các yếu tố môi trường.

Vắc xin gồm hai phần chính:

Các thành phần có hoạt tính bao gồm hỗn hợp của protein, cacbonhydrate, lipid, vi sinh vật bất hoạt, vi sinh vật sống giảm độc lực;

Các thành phần khác: Chất ổn định, tá chất, chất bảo quản,... Các chất này có ảnh hưởng chung lên hiệu quả bảo vệ và tính an toàn của vắc xin.

Trong số các yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến chất lượng vắc xin, yếu tố duy nhất ảnh hưởng đến đặc điểm của tất cả các vắc xin trong mọi thời điểm là nhiệt độ. Khái niệm “tính ổn định nhiệt” được dùng để chỉ tính ổn định của vắc xin khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau.

1.4.1. Mục đích của nghiên cứu tính ổn định nhiệt

Các nghiên cứu tính ổn định nhiệt nhằm các mục đích:

- Chứng minh vắc xin 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;
- Xác định thời gian bảo quản cho vắc xin bán thành phẩm;
- Xác định hạn sử dụng, điều kiện bảo quản của vắc xin thành phẩm, hỗ trợ cho việc cấp phép;
- Giám sát tính ổn định của vắc xin sau cấp phép;

Sau cấp phép, 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 nổi lên men, địa điểm sản xuất, nguyên vật liệu đầu,...các nghiên cứu tính ổn định trước và sau khi thay đổi giúp chứng minh sự thay đổi đó không ảnh hưởng đến tính ổn định của sản phẩm.

Theo WHO, tính ổn định nhiệt được phân tích thống kê dựa trên sự giảm công hiệu của vắc xin theo thời gian bảo quản [101]. Công hiệu là chỉ số quan trọng nhất để đánh giá chất lượng vắc xin, thước đo khả năng bảo vệ con người trước nguồn bệnh. Nghiên cứu tính ổn định đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo chất lượng vắc xin ở tất cả các thời điểm từ khi sản xuất đến khi hết hạn sử dụng. Trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển mỗi vắc xin, nghiên cứu tính ổn định nhằm chứng minh chất lượng của vắc xin và thu thập số liệu cho việc cấp phép sử dụng. Sau khi cấp phép, việc nghiên cứu tính ổn định tiếp tục được thực hiện để cung cấp bằng chứng về mối liên hệ giữa chất lượng vắc xin đã dùng trong thử nghiệm lâm sàng (được thực hiện trước khi cấp phép) và chất lượng vắc xin dùng trên thị trường (sau cấp phép) [100],[102].

WHO khuyến cáo mỗi nhà sản xuất phải thực hiện các nghiên cứu tính ổn định để tự xác định hạn sử dụng thực tế cho từng vắc xin do họ sản xuất. Cùng một vắc xin nhưng mức độ ổn định của vắc xin do các nhà sản xuất có thể khác nhau do khác nhau về chủng sản xuất, môi trường nuôi cấy, qui trình sản xuất,...

1.4.2. Phân loại nghiên cứu về tính ổn định nhiệt

Nghiên cứu tính ổn định nhiệt gồm nhiều loại.

Theo nhiệt độ bảo quản, tính ổn định bao gồm hai loại:

- Nghiên cứu tính ổn định ở nhiệt độ khuyến cáo bảo quản vắc xin (Real-time, real-condition stability studies: Nghiên cứu tính ổn định ở điều kiện bảo quản thực, theo thời gian thực), thường ở 2-8⁰C là các nghiên cứu về các đặc điểm vật lý, hoá học, sinh học, vi sinh của vắc xin trong suốt thời gian vắc xin vẫn còn hạn sử dụng ở điều kiện bảo quản ghi trên nhãn.
- Nghiên cứu tính ổn định ở các dải nhiệt độ cao hơn nhiệt độ khuyến cáo bảo quản, còn gọi nghiên cứu thúc đẩy nhiệt (Accelerated stability testing: AST) hay thử nghiệm cưỡng bức (stress testing), các nhiệt độ mà vắc xin có thể được bảo quản trong thực tế vận chuyển, sử dụng,... Ví dụ: 20-25⁰C, 37⁰C, 41⁰C. Việc giám sát hiệu quả bảo vệ của vắc xin không chỉ đánh giá hiệu quả bảo vệ ngay sau khi sản xuất hay ở điều kiện bảo quản tiêu chuẩn mà còn phải tính đến các điều kiện và tình huống xấu có thể xảy ra trong quá trình vận chuyển, bảo quản vắc xin, do thiên tai, điều kiện khó khăn, các vùng khí hậu nhiệt đới,... Do vậy, cần có các nghiên cứu đánh giá chất lượng của vắc xin khi bảo quản ở các nhiệt độ cao hơn nhiệt độ khuyến cáo trong các khoảng thời gian nhất định.

Nghiên cứu thúc đẩy nhiệt được thiết kế nhằm tăng nhanh tốc độ phân huỷ vật lý hoặc hoá học của các thành phần trong vắc xin để xác định tỷ lệ

thay đổi các đặc tính của vắc xin theo thời gian ở các nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản thông thường, như 25°C và/hoặc 37°C.

Các số liệu thu được từ nghiên cứu thúc đẩy nhiệt được dùng để thiết lập các tiêu chuẩn xuất xưởng vắc xin. Đối với các sản phẩm mới hoặc các sản phẩm có sự thay đổi trong quá trình sản xuất, chưa thể có ngay đầy đủ số liệu đánh giá tính ổn định theo thời gian thực, việc cấp phép sẽ căn cứ vào hạn sử dụng của vắc xin được ngoại suy từ các số liệu của nghiên cứu thúc đẩy nhiệt mặc dù nó không chính xác bằng các số liệu tính ổn định theo thời gian thực.

Với các vắc xin đông khô, phải thực hiện các nghiên cứu tính ổn định của vắc xin sau khi hồi chỉnh bánh vắc xin đông khô với nước hồi chỉnh theo thời gian để đưa ra được hạn sử dụng của vắc xin sau hồi chỉnh.

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

Việc lựa chọn các chỉ số để đánh giá tính ổn định phụ thuộc vào nhiều yếu tố: Bản chất kháng nguyên, các thành phần khác có trong vắc xin, quy trình sản xuất,... Đối với hầu hết các vắc xin, 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 vắc xin.

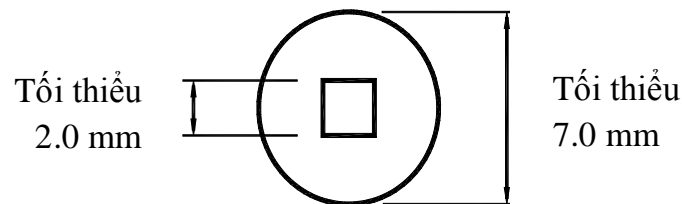
Đối với các vắc xin sống giảm độc lực, công hiệu được tính bằng nồng độ vi rút có trong vắc xin. Các chỉ số khác cũng được cân nhắc do chúng chỉ ra sự thay đổi đến tính an toàn và hiệu quả bảo vệ của vắc xin với các ảnh hưởng không thể biết hết được. Các chỉ số này có thể là pH, tính an toàn chung, độc tính đặc hiệu, nồng độ kháng sinh, vô trùng,...

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

Có nhiều loại công cụ dùng để giám sát sự phơi nhiễm của vắc xin với nhiệt độ cao, bao gồm:

Các loại nhiệt kế, các chỉ thị nhiệt có đèn cảnh báo, máy đo đôi nhiệt độ có bút ghi: Các dụng cụ này chỉ cho biết nhiệt độ cả một thùng vắc xin tại thời điểm người nhận mở thùng đựng hoặc trong một thời gian ngắn, vài ngày đến vài chục ngày; không thể biết được nhiệt độ ở các thời điểm trước đó, đặc biệt trong trường hợp nếu các lọ vắc xin trước đó được đựng trong các thùng khác nhau.

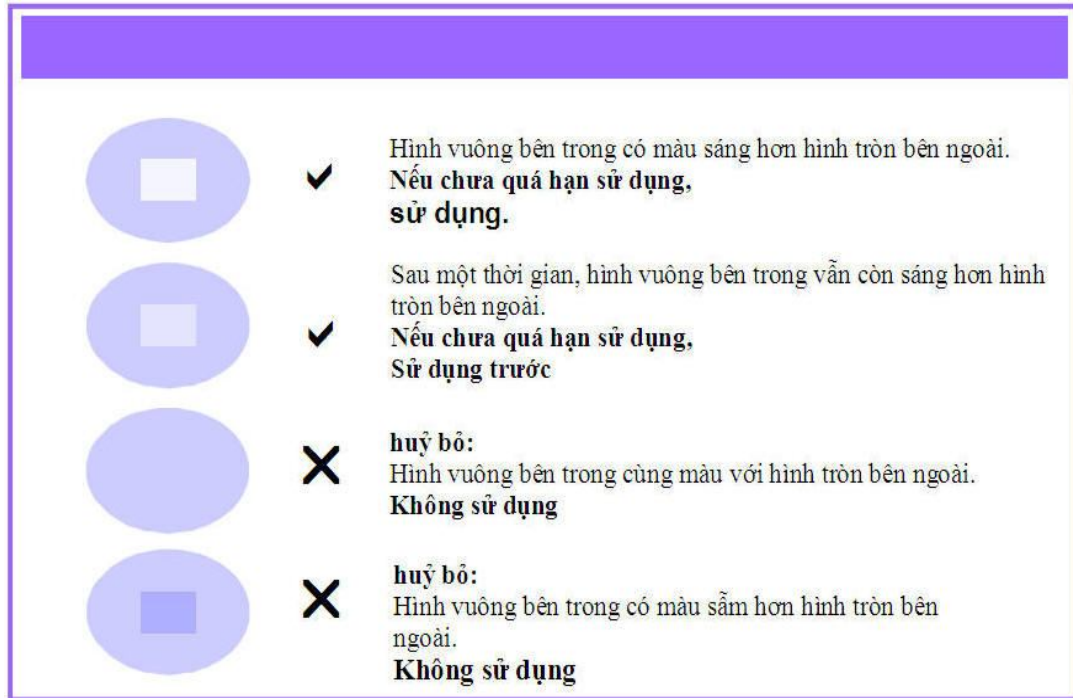
Chỉ thị nhiệt lọ vắc xin (Vaccine Vial Monitor: VVM): VVM là một nhãn dán trên từng lọ vắc xin để biểu thị sự phơi nhiễm tích lũy của vắc xin với nhiệt độ môi trường.



Hình 1.8: Hình dạng, kích thước VVM [103]

VVM có hình tròn, đường kính tối thiểu 7 mm, chính giữa hình tròn chứa hình vuông có cạnh 2 mm. Bề mặt hình tròn chứa một chất nền, không biến đổi màu. Hình vuông chứa hoạt chất, thay đổi màu sắc dần dần từ màu sáng đến màu tối. Lúc đầu, màu của hình vuông sáng hơn màu của hình tròn bên ngoài. Khi lọ vắc xin tiếp xúc với nhiệt độ cao, quá trình polyme hoá diacetylene sẽ làm cho màu sắc của hình vuông đậm dần. Đến một lúc nào đó màu của hình vuông sẽ bằng với màu của hình tròn thậm chí đậm hơn màu của hình tròn. Sự thay đổi màu sắc này: Diễn ra từ từ, có thể dự đoán được, tích lũy theo nhiệt độ và thời gian tiếp xúc với nhiệt độ, quan trọng nhất: Nó không thể đảo ngược và dễ nhận biết bằng mắt thường.

Nếu màu của hình vuông đã đậm hơn thì dù có để vào tủ lạnh màu đó vẫn không sáng lại như trước.



Hình 1.9: Cách đọc VVM [103]

Tính ưu việt của VVM nằm ở chỗ nó đánh giá mức độ phơi nhiễm với nhiệt độ:

Của từng lọ vắc xin;

Trong suốt quá trình từ khi sản xuất, bảo quản, vận chuyển, sử dụng;

Dễ đọc (Mọi nhân viên y tế và người dân đều có thể đánh giá được tình trạng của VVM nếu được hướng dẫn);

Gọn nhẹ, tiện lợi do gắn lên lọ vắc xin.

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

Theo nghiên cứu của Viện Kiểm định Quốc gia và Mẫu chuẩn Anh (The National Institute for Biological Standards and Control: NIBSC), VVM

được chia làm 4 loại: VVM2, VVM7, VVM14, VVM30 bằng cách xác định công hiệu của vắc xin khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau do công hiệu vắc xin và VVM đã được chứng minh là có mối tương quan chặt chẽ [104],[105]. Vào tháng 3 năm 1998, D. J. Wood, làm việc tại NIBSC đã báo cáo tại hội nghị của WHO kết quả nghiên cứu liên phòng thí nghiệm về VVM và công hiệu vắc xin bại liệt uống. Nghiên cứu được thực hiện bởi bốn phòng thí nghiệm do WHO chỉ định. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có mối liên quan rõ ràng giữa công hiệu vắc xin và sự đổi màu của VVM.

Bảng 1.3: Phân loại và cách xác định VVM [103],[106]

Loại VVM	Mức độ ổn định của vắc xin	Hạn dùng ở 37⁰C (ngày)	Hạn dùng ở 25⁰C (ngày)	Hạn dùng ở 2 – 8⁰C
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

1.4.6. Tính ổn định nhiệt của vắc xin nói chung

Tính ổn định nhiệt của vắc xin là tổng hoà của nhiều yếu tố như bản chất vắc xin, tính ổn định nhiệt của chủng sản xuất, chất ổn định có trong vắc xin, tá chất [107],...Để thực hiện được các nghiên cứu tính ổn định của vắc xin cần rất nhiều thời gian, công sức và chi phí cho nguyên vật liệu. Ở các nước phát triển, nghiên cứu tính ổn định của vắc xin đã được thực hiện từ nhiều năm nay và tương đối đầy đủ các nhiệt độ cần nghiên cứu. Thậm chí, mỗi lần thay đổi một chi tiết quan trọng nào đó trong quy trình sản xuất như: Địa điểm đóng ống, thể tích nôi lên men, thời gian đông khô, chất liệu của lọ

vắc xin, loại nút cao su,...nhà sản xuất lại thực hiện nghiên cứu để chứng minh sự thay đổi đó không ảnh hưởng đến tính ổn định của vắc xin theo đúng yêu cầu của WHO [108],[109]. Đối với vắc xin nhiều thành phần như PENTAXIM (gồm các thành phần bạch hầu, ho gà, uốn ván, bại liệt tiêm, Hib), TETRAXIM (gồm các thành phần bạch hầu, ho gà, uốn ván, bại liệt tiêm), ADACEL (gồm bạch hầu, ho gà, uốn ván), ... các nhà sản xuất này còn xác định tính ổn định cho từng vắc xin thành phần [108],[109],[110],[111].

Cũng vì nghiên cứu tính ổn định mất rất nhiều thời gian, công sức và ngân sách nên ở các nước đang phát triển, nghiên cứu này mới thực hiện rải rác một số vắc xin và không đầy đủ các nhiệt độ cần thiết, đặc biệt là các vắc xin sử dụng trong nước.

Tại Việt Nam, từ năm 1995 tác giả Huỳnh Phương Liên đã có nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin Viêm não Nhật Bản sản xuất từ não chuột do Công ty TNHH một thành viên Vắc xin và Sinh phẩm số 1 (VABIOTECH), thực hiện ở nhiệt độ 4⁰C. Cũng trong năm này, tác giả Lê Thị Luân đã có nghiên cứu đầy đủ ở các nhiệt độ về tính ổn định của OPV do Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC) sản xuất. Tới tận năm 2003, nghiên cứu về tính ổn định của vaxin BCG sống đông khô do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) mới được công bố. Năm 2010, tác giả Huỳnh Phương Liên tiếp tục công bố nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin viêm não Nhật Bản sản xuất trên tế bào Vero, ở đầy đủ các nhiệt độ.

Bảng 1.4: Kết quả nghiên cứu tính ổn định một số vắc xin

Tên vắc xin	Hạn dùng ở -20 ⁰ C	Hạn dùng ở 2-8 ⁰ C	Hạn dùng ở 25 ⁰ C	Hạn dùng ở 37 ⁰ C	Hạn dùng ở 45 ⁰ C	Hạn dùng sau hồi chỉnh
Act-HIB [112] (Sanofi Pasteur S.A)	Không thực hiện	36 tháng	6 tháng	2 tháng	Không thực hiện	6 h ở 2-8 ⁰ C
BCG (IVAC) [113]	Không thực hiện	36 tháng/4 ⁰ C	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
Cúm một thành phần (A/H1N1/09) [114]	Không thực hiện	Công hiệu giảm 17,5% sau 18 tháng	2 tuần	Không thực hiện	3 ngày/40 ⁰ C	Không áp dụng với vắc xin dạng dung dịch
Hbvaccine [115] (VABIOTECH)	Không thực hiện	42 tháng/4 ⁰ C	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện	
OPV [116] (POLYVAC)	24 tháng	8 tháng	12 ngày	4 ngày	Không áp dụng	
Shanvac-B [117] (Shantha)	Không thực hiện	42 tháng	193 ngày	35 ngày	7 ngày	
Viêm não Nhật Bản sản xuất trên não chuột [118] (VABIOTECH)	Không áp dụng do không được để ở nhiệt độ đông băng	15 tháng	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện	
Viêm não Nhật Bản sản xuất trên tế bào Vero [119]		24 tháng	3 tháng	0 ngày	Không áp dụng	

Tên vắc xin	Hạn sử dụng ở -20 ⁰ C	Hạn sử dụng ở 2-8 ⁰ C	Hạn sử dụng ở 25 ⁰ C	Hạn sử dụng ở 37 ⁰ C	Hạn sử dụng ở 45 ⁰ C	Hạn sử dụng sau hồi chỉnh
Thành phần Hib (Haemophilus influenzae týp b) trong vắc xin PENTAXIM[120]	Không thực hiện	Không thực hiện	6 tháng	3 tháng	Không thực hiện	8 h ở 2-8 ⁰ C, 6 h ở 25 ⁰ C
Thành phần uốn ván trong vắc xin TETRAXIM [109]	Không áp dụng	36 tháng	3 tháng	15 ngày	Không thực hiện	Không áp dụng
Thành phần ho gà trong vắc xin TETRAXIM [109]	Không áp dụng	48 tháng	3 tháng	15 ngày	Không thực hiện	Không áp dụng
Thành phần bạch hầu trong vắc xin TETRAXIM [109]	Không áp dụng	36 tháng	3 tháng	15 ngày	Không thực hiện	Không áp dụng
Thành phần bại liệt trong vắc xin TETRAXIM [109]	Không áp dụng	36 tháng	3 tháng	15 ngày	Không thực hiện	Không áp dụng
ADACEL [108]	Không áp dụng	36 tháng	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện	Không áp dụng
HEXAXIM (vắc xin viêm gan B tái tổ hợp) [121]	Không thực hiện	36 tháng	6 tháng	3 tháng	Không thực hiện	Không áp dụng

1.4.7. Tính ổn định nhiệt của các vắc xin sởi/chứa sởi trên thế giới

Vắc xin sởi có thể ở dạng đơn như ROUVAX, MVVAC hoặc phối hợp với các thành phần khác (quai bị, rubella) như TRIVIVAX, MMR,...

Trên thế giới, vắc xin sởi đã được sản xuất từ thập kỷ 60 của thế kỷ XX, các nghiên cứu tính ổn định của chúng cũng đã được thực hiện và công bố.

Bảng 1.5: Kết quả nghiên cứu tính ổn định của một số vắc xin sởi

Tên vắc xin	Hạn dùng ở 2-8 ⁰ C	Hạn dùng ở 25 ⁰ C	Hạn dùng ở 37 ⁰ C	Hạn dùng sau hồi chỉnh ở 2-8 ⁰ C
M-M-R II [122]	24 tháng	28 ngày/25 ⁰ C (0, 28, 56, 84 ngày)	Không thực hiện	24h
ROUVAX [123]	36 tháng	4 tháng/22 ⁰ C (Chỉ nghiên cứu đến 4 tháng)	14 ngày (Nghiên cứu đến 3 tuần)	7 ngày
TRIVIVAC [111]	18 tháng (Chỉ làm đến 18 tháng)	4 tháng/22 ⁰ C (chỉ nghiên cứu đến 4 tháng)	Không thực hiện	Không thực hiện
MMR [110]	2 năm (Nghiên cứu đến 36 tháng, sởi đạt ở 36 tháng)	4 tháng (22 ⁰ C) (chỉ làm đến 4 tháng)	1 tuần (Nghiên cứu đến 4 tuần, sởi đạt)	7 ngày
Rimevax [124]	Không thực hiện	10 tuần	5 tuần	Không thực hiện

Vắc xin sởi cực kỳ ổn định ở -70°C và -20°C . Ngược lại, vắc xin sởi dễ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao. Tuy nhiên, từ năm 1979, người ta đã sản xuất các vắc xin có tính ổn định cao hơn đối với nhiệt độ làm việc thông thường. Điều này đặc biệt quan trọng đối với các nước đang phát triển. WHO yêu cầu: Vắc xin sởi vẫn phải chứa ít nhất 1000 đơn vị vi rút sống/liều tiêm khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C sau một tuần và lượng giảm đi không quá 1 lg PFU/liều tiêm.

Việc sản xuất MVVAC chia ra làm 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 (ấp trứng, tạo tế bào phôi gà một lớp, gây nhiễm vi rút lên tế bào,...) để tạo ra bán thành phẩm rồi vắc xin thành phẩm.

Như vậy, quá trình sản xuất MVVAC đã có một sự thay đổi lớn và sự thay đổi này cần phải chứng minh không ảnh hưởng đến tính ổn định của vắc xin.

MVVAC sản xuất từ bán thành phẩm nhập khẩu của Viện Kitasato đã được lấy mẫu đánh giá tính ổn định theo thời gian thực, được tiến hành thử nghiệm lâm sàng để đánh giá tính an toàn và hiệu quả bảo vệ của vắc xin. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Nữ Anh Thu và Nguyễn Đăng Hiền trên MVVAC sản xuất từ bán thành phẩm nhập khẩu của Viện Kitasato cho thấy vắc xin này đạt yêu cầu của Tổ Chức Y tế Thế giới khi bảo quản ở 37°C trong 7 ngày. Các nghiên cứu này cũng đã đưa ra được hạn sử dụng của vắc xin khi bảo quản ở $2-8^{\circ}\text{C}$ (Nghiên cứu tính ổn định ở điều kiện thực, theo thời gian thực) [2],[3]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu thúc đẩy nhiệt, chưa có nghiên cứu đánh giá tính ổn định của vắc xin sau hồi chỉnh. MVVAC chứa 10 liều/lọ, nên sau khi hồi chỉnh không thể sử dụng vắc xin hết ngay lập tức mà sẽ bảo quản ở nhiệt

độ 2-8⁰C và tiêm dần khi có thêm trẻ mới hoặc người tiêm mới. WHO khuyến cáo, cần phải thực hiện nghiên cứu tính ổn định của từng vắc xin bao gồm cả tính ổn định sau khi hồi chỉnh cho các vắc xin đông khô.

Cho đến nay, cũng chưa có nghiên cứu nào về tính ổn định 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 vắc xin.

Nghiên cứu tính ổn định nhiệt của chúng tôi thực hiện trên MVVAC sản xuất ở giai đoạn 2, là bước tiếp theo để khẳng định tính ổn định của vắc xin. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện đầy đủ các nội dung: Nghiên cứu tính ổn định ở điều kiện thực, nghiên cứu thúc đẩy nhiệt, nghiên cứu đánh giá tính ổn định của vắc xin sau hồi chỉnh.

Nghiên cứu của chúng tôi còn nhằm xác định loại chỉ thị nhiệt lọ vắc xin cho MVVAC, giúp cho người sử dụng được dùng những lọ vắc xin thực sự có hiệu quả phòng bệnh. Nó còn làm tăng tỷ lệ tiếp cận với vắc xin, đặc biệt ở những vùng địa lý và kinh tế khó khăn, điều này đặc biệt quan trọng vì MVVAC được dùng với số lượng lớn trong TCMR. Mặt khác, việc xác định loại VVM còn giúp tránh lãng phí MVVAC một cách không cần thiết khi gặp các sự cố mất điện, thảm họa thiên nhiên,...

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam (MVVAC) từ năm 2009 đến năm 2013.



Hình 2.1: Lọ MVVAC và nước hồi chỉnh

Bảng 2.1: Các loại MVVAC sử dụng trong nghiên cứu

Năm SX	Số loại	Tên các loại
2009	8 loại	M-0109, M-0309, M-0409, M-0609, M-0709, M-0809, M-0909, M-1009
2010	8 loại	M-0110, M-0210, M-0310, M-0410, M-0510, M-0610, M-0710, M-0810
2011	10 loại	M-0111, M-0211, M-0311, M-0411, M-0511, M-0611, M-0711, M-0811, M-0911, M-1011
2012	4 loại	M-0112, M-0212, M-0312, M-0412
2013	12 loại	M-0113, M-0213, M-0313, M-0413, M-0513, M-0613, M-0713, M-0813, M-0913, M-1013, M-1113, M-1213
Tổng số:		42 loại

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC).

Thời gian nghiên cứu: Từ 9/2011-10/2014.

2.3. Vật liệu nghiên cứu

2.3.1. Trang thiết bị, dụng cụ

Tủ lạnh MPR-1410R, SANYO;

Tủ cấy vô trùng, cấp độ sạch A: NBCM-1602, Nikka Micron;

Máy lắ: TM-1, AS ONE;

Kính hiển vi: IX51-71PHP, OLYMPUS;

Tủ ấm CO₂: MCO175, SANYO;

Tủ ấm thường: MRI-553, SANYO;

Bê điều nhiệt: TR-2A, AS ONE;

Máy nén: JI1666, AS ONE;

Lò hấp vô trùng: HA-240MIV, Hirayama;

Máy đếm hạt trong vắc xin: KL-04, RION;

Máy đo pH: PP-15, Satorius;

Cân điện tử: LE244S, Satorius, sai số $\pm 0,1$ mg;

Tủ sấy khô chân không: DRV 220DA, Advantec;

Bơm chân không: RW 60, Hitachi;

Màng lọc 0,22 μ m: HAW04700, Millipore;

Màng lọc 0,1 μ m: VCWP0250, Millipore;

Pipet 10 mL: 7087-10, Pyrex;

Pipet Aid: 4910, corning, Mỹ;

Pipet man 10-200 μ L: F123602, Gilson;

Micropipet 100-1000 μ L: F123602, Gilson;

Micropipet 1mL-5mL: F123603, Gilson;

Tuýp thuỷ tinh đáy tròn 5 mL: mã 9820-12, Pyrex;
Phiến nuôi tế bào 6 giếng: mã 3506, Corning;
Chai thuỷ tinh 100 mL: mã 21801245, Dural;
Chai thuỷ tinh 1000 mL: mã 21801545, Dural;
Bơm tiêm chia liều: mã 1730510-Socorex;
Đĩa petries đường kính 9 cm;...



Hình 2.2: Cân sử dụng trong nghiên cứu được đặt trên bàn cát chống rung để giảm thiểu sai số, hộp bộ quả cân chuẩn (trái) và máy in kết quả (phải)

2.3.2. Mẫu chuẩn, tế bào, hoá chất, môi trường

Vắc xin mẫu chuẩn M01-07, POLYVAC, công hiệu 4,2-4,6 lg PFU/0,5 mL; do POLYVAC sản xuất theo quy trình, tiêu chuẩn của Viện Kitasato. Sử

dụng mẫu chuẩn M16-6 của Viện Kitasato để nổi chuẩn trong quá trình sản xuất và đánh giá chất lượng mẫu chuẩn M01-07.

IgG có gắn huỳnh quang (FITC-IgG): Mã 65-6111, invitrogen;

Tế bào Vero FV66, Kitasato;

Huyết thanh bào thai bê: Mã 16140-071, Gibco;

Huyết thanh ngựa: Mã 26050-088, Gibco;

Huyết thanh bò: Mã 26170-043, Gibco;

Agarose ME: Mã 50013R- Iwai;

Eagle MEM: Mã 05901- Nisui;

MEM: Mã 61100-103, Gibco;

Canh thang PPLO: Mã 255420, Difco;

Thạch PPLO: Mã 241210, Difco;

Chiết xuất men: Mã 212750, Wako;

Môi trường LM1, LM2 (POLYVAC): Pha chế từ PPLO, L-arginin, huyết thanh ngựa, chiết xuất men, glucose, đỏ phenol,...

Fluid thioglycollate medium (FTM): Mã 397-01641, Wako;

Soybean casein digest broth (SCDB): Mã 395-01321, Wako;

Bộ dung dịch pH chuẩn: pH 10: Mã 1.09409.1000, Merck; pH 7: Mã 1.09439.1000, Merck; pH 4: Mã 1.09435.1000, Merck;

Penicilline-streptomycine: Mã 15140-122, Wako;

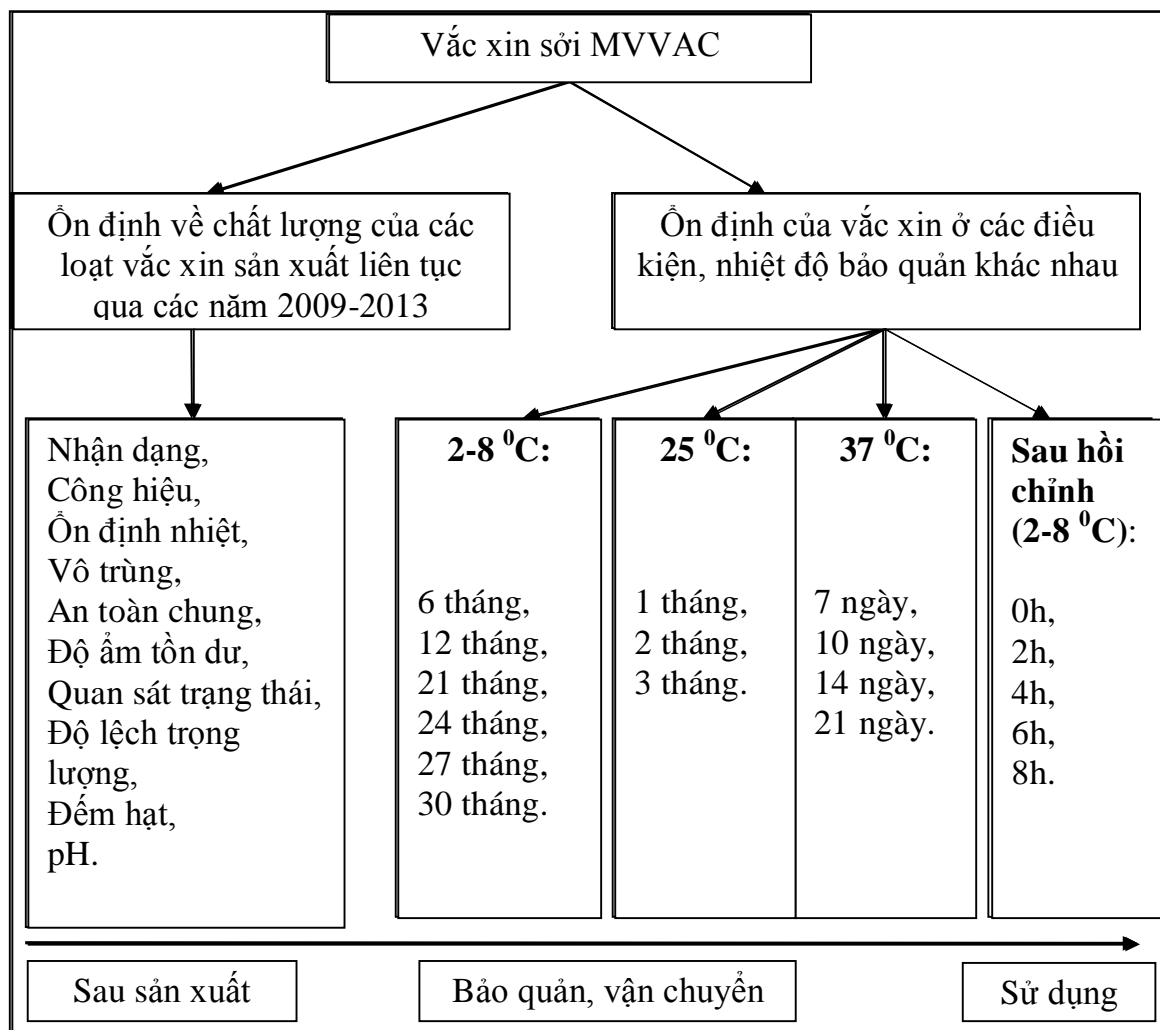
Đỏ phenol: Mã 16217361, Wako;

Glycerin: Mã 079-00614, Wako;...

Chủng thử thách để kiểm tra chất lượng môi trường: *B. subtilis* ATCC 6633, *C. sporogenes* ATCC 11437, *C. albicans* ATCC 10231, *K. rhizophila* ATCC 9341,...

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu phân tích. Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu, tiền cứu



Hình 2.3: Sơ đồ nghiên cứu tính ổn định của MVVAC

Nghiên cứu gồm hai nội dung lớn:

Nội dung 1: Nghiên cứu tính ổn định về chất lượng của các loạt MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013.

Nội dung 2: Nghiên cứu tính ổn định của MVVAC ở các điều kiện, nhiệt độ bảo quản khác nhau. Các điều kiện, nhiệt độ bảo quản được lựa chọn theo khuyến cáo của WHO (Bảng 1.3): 2 - 8⁰C; 25⁰C; 37⁰C; vắc xin sau hồi chỉnh, bảo quản ở nhiệt độ 2-8⁰C.

2.4.1. Đánh giá tính ổn định về chất lượng của các loạt MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013

* **Cỡ mẫu và cách chọn mẫu:** Tất cả các loạt vắc xin sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013 được lấy mẫu để kiểm tra chất lượng. Tổng số **42 loạt**, mỗi loạt sản xuất 30264 lọ (Từ năm 2009 đến năm 2013, POLYVAC sản xuất MVVAC với công suất tối đa: 13 giá đựng, mỗi giá 6 khay, mỗi khay 338 lọ).

Trong đề cương nghiên cứu dự kiến mỗi năm MVVAC được sản xuất từ 1-2 đợt, mỗi đợt sản xuất chọn 3 loạt vắc xin để đưa vào nghiên cứu, dự kiến 18 loạt. Tuy nhiên, theo các tài liệu của WHO, để có được sự đánh giá đúng đắn về tính ổn định của vắc xin cần có số liệu của ít nhất 20 loạt, con số lý tưởng cho việc đánh giá này là 40 loạt [86]. Vì vậy, tất cả các loạt sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013 đã được đưa vào nghiên cứu để tăng cỡ mẫu.

Loạt M-0209 không được đưa vào nghiên cứu do trong quá trình sản xuất máy đông khô gặp sự cố. Loạt M-0509 cũng không đưa vào nghiên cứu do được sản xuất từ bán thành phẩm của Viện Kitasato, nghiên cứu này thực hiện trên các loạt do POLYVAC sản xuất từ những công đoạn đầu tiên đến bán thành phẩm và thành phẩm.

* **Phương pháp thu thập số liệu và các chỉ số đánh giá:** Ngay sau khi sản xuất, mỗi loạt vắc xin lấy 60 lọ. Tiến hành các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm để đánh giá chất lượng từng loạt MVVAC để xác định độ đồng đều về chất lượng thông qua các chỉ số:

Nhận dạng kháng nguyên sợi trong vắc xin bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang,

Tính công hiệu vắc xin qua nồng độ vi rút có trong vắc xin (Công hiệu) bằng phương pháp tạo đám hủy hoại tế bào (Plaque Forming Unit: PFU),

Xác định tính ổn định nhiệt của vắc xin khi bảo quản ở 37⁰C/7 ngày,

Xác định tính vô trùng của vắc xin bằng phương pháp màng lọc,

Xác định tính an toàn trên động vật thực nghiệm,

Xác định độ ẩm tồn dư trong bánh vắc xin đông khô bằng phương pháp xác định hao hụt trọng lượng của vắc xin khi làm khô,

Quan sát trạng thái lọ vắc xin,

Tính độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin trong cùng 1 loạt (độ lệch trọng lượng),

Đếm số hạt không tan trong vắc xin (Hạt không tan),

Đo pH.

Các chỉ số nhận dạng, công hiệu, độ ổn định nhiệt, độ ẩm tồn dư, an toàn chung, vô trùng, quan sát trạng thái thực hiện theo hướng dẫn của WHO [125]. Các chỉ số độ lệch trọng lượng, hạt không tan có trong vắc xin sau hoàn nguyên, pH là các chỉ số được làm thêm theo khuyến cáo của các chuyên gia Viện Kitasato do quy trình sản xuất MVVAC mới đưa vào hoạt động, chưa đánh giá được tính ổn định trên các chỉ số này.

Phân tích số liệu:

Các chỉ số: Nhận dạng, tính vô trùng, tính an toàn chung, trạng thái vắc xin là các chỉ số định tính. Kết quả đánh giá mỗi loạt MVVAC gồm hai giá trị: Đạt hoặc không đạt.

Các chỉ số: Công hiệu, độ ổn định nhiệt, độ ẩm tồn dư, độ lệch trọng lượng, hạt không tan trong vắc xin, pH là các chỉ số định lượng. Với mỗi chỉ số này thực hiện tính toán số liệu và vẽ biểu đồ kiểm soát (biểu đồ Shewhart) theo các bước:

Bước 1: Tính toán các giá trị trung bình (TB), độ lệch chuẩn (SD), hai lần độ lệch chuẩn (2SD), ba lần độ lệch chuẩn (3SD), $TB \pm SD$, $TB \pm 2SD$,

TB \pm 3SD các lần thực hiện thử nghiệm kiểm tra chất lượng 42 loạt vắc xin.

Bước 2: Vẽ biểu đồ Shewhart theo các số liệu đã tính toán được [86].

2.4.2. Đánh giá tính ổn định của MVVAC ở các điều kiện, nhiệt độ bảo quản khác nhau

2.4.2.1. Đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 2-8⁰C

* Đánh giá công hiệu của vắc xin ở các thời điểm khác nhau

Lấy mẫu: Chọn ngẫu nhiên ba loạt vắc xin liên tiếp. Mỗi loạt lấy ngẫu nhiên 15 lọ. Bảo quản vắc xin ở nhiệt độ 2 - 8⁰C. Vắc xin được để trong tủ lạnh SANYO MPR-1410R.

Đánh giá công hiệu của các loạt vắc xin tại các thời điểm:

- + Ngay sau sản xuất,
- + Sau 6 tháng,
- + Sau 12 tháng,
- + Sau 21 tháng,
- + Sau 24 tháng,
- + Sau 27 tháng,
- + Sau 30 tháng.

* Đánh giá các chỉ số khác tại thời điểm 27 tháng

Các chỉ số đánh giá: 4 chỉ số theo yêu cầu của WHO (Bao gồm: Nhận dạng, vô trùng, an toàn, độ ẩm tồn dư), thêm các chỉ số quan sát trạng thái, pH.

Không đánh giá chỉ số công hiệu do đã được xác định trong thử nghiệm trên) của 3 loạt tại thời điểm 27 tháng

Cỡ mẫu và cách chọn mẫu: Chọn ngẫu nhiên ba loạt vắc xin liên tiếp.

Mỗi loạt lấy ngẫu nhiên 60 lọ.

Bảo quản vắc xin ở nhiệt độ 2 - 8⁰C.

Đề cương chỉ đưa ra mục tiêu xác định công hiệu của 3 loạt vắc xin tại thời điểm 27 tháng để đưa ra hạn sử dụng của vắc xin ở mức 24 tháng. Tuy

nhiên, theo hướng dẫn mới nhất của WHO, các chỉ số khác cũng nên được cân nhắc khi đưa ra hạn sử dụng dài hạn [100]. Do vậy, để có được kết luận chặt chẽ hơn, tại thời điểm 27 tháng, 3 loạt vắc xin đã được lấy mẫu để đánh giá bổ sung tất cả các chỉ số còn lại theo tiêu chí WHO (Nhận dạng, tính vô trùng, tính an toàn chung, độ ẩm tồn dư, trạng thái vắc xin). Ngoài ra, đánh giá thêm chỉ số quan sát trạng thái, pH theo khuyến cáo của các chuyên gia Viện Kitasato do vắc xin mới được sản xuất.

2.4.2.2. Đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 25⁰C

Cỡ mẫu và cách chọn mẫu: Chọn ngẫu nhiên ba loạt vắc xin liên tiếp. Mỗi loạt lấy ngẫu nhiên 20 lọ.

Bảo quản vắc xin ở 25⁰C. Vắc xin được để trong tủ SANYO MIR-533, cài đặt tủ ở nhiệt độ 25⁰C.

Đánh giá công hiệu của các loạt vắc xin đó tại các thời điểm:

- + Bắt đầu thí nghiệm: 0 tháng,
- + Sau 1 tháng,
- + Sau 2 tháng,
- + Sau 3 tháng.

2.4.2.3. Đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 37⁰C

Lấy mẫu: Chọn ngẫu nhiên ba loạt vắc xin liên tiếp. Mỗi loạt 20 lọ.

Bảo quản vắc xin ở 37⁰C. Vắc xin được để trong tủ ấm SANYO MIR-533, cài đặt tủ ở nhiệt độ 37⁰C. Đánh giá công hiệu của các loạt vắc xin đó tại thời điểm:

- + Bắt đầu ủ,
- + Sau 7 ngày,
- + Sau 10 ngày,
- + Sau 14 ngày,
- + Sau 21 ngày.

2.4.2.4. Đánh giá tính ổn định của MVVAC sau hồi chỉnh

Lấy mẫu: Chọn ngẫu nhiên ba loạt vắc xin liên tiếp. Mỗi loạt 3 lọ.

Hồi chỉnh vắc xin bằng nước hồi chỉnh. Bảo quản vắc xin ở 2-8⁰C.

Đánh giá công hiệu của các loạt vắc xin đó tại các thời điểm:

- + Ngay sau hồi chỉnh,
- + Sau hồi chỉnh 2 h,
- + Sau hồi chỉnh 4 h,
- + Sau hồi chỉnh 6 h,
- + Sau hồi chỉnh 8 h.

Các tủ lạnh, tủ ấm bảo quản vắc xin được theo dõi nhiệt độ liên tục bằng bảng hiển thị nhiệt độ và bút ghi nhiệt độ tự động. Bộ phận đo nhiệt độ của tủ đã được thẩm định và hiệu chuẩn, đảm bảo hiển thị đúng nhiệt độ tủ.



Hình 2.4: Bút ghi tự động và bảng hiển thị nhiệt độ các tủ bảo quản vắc xin.

Nhãn chuẩn định máy (màu xanh) gắn ở góc trên, bên phải

2.5. Thực hiện các thử nghiệm để thu thập số liệu

Thu thập số liệu bằng cách thực hiện các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm: Thử nghiệm nhận dạng, thử nghiệm xác định công hiệu, thử nghiệm vô trùng, thử nghiệm xác định độ ổn định nhiệt, thử nghiệm xác định độ ẩm tồn dư, thử nghiệm xác định an toàn chung, thử nghiệm quan sát trạng thái, thử nghiệm xác định độ lệch trọng lượng, thử nghiệm đếm hạt, thử nghiệm đo pH.

Các thử nghiệm nhận dạng, xác định công hiệu, vô trùng, xác định độ ổn định nhiệt, xác định độ ẩm tồn dư, an toàn chung được thực hiện theo thường quy và đánh giá theo tiêu chuẩn của WHO [125] và cũng giống tiêu chuẩn của Dược điển Nhật Bản, Viện truyền nhiễm Quốc gia Nhật Bản, Viện Kitasato. Các thử nghiệm quan sát trạng thái, xác định độ lệch trọng lượng, đếm hạt, đo pH được thực hiện theo thường quy và tiêu chuẩn của Dược điển Nhật Bản [126].

2.5.1. Nhận dạng vi rút sởi bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang, [125],[126],[127],[128]

- Lấy ngẫu nhiên 1 lọ vắc xin.

- Cách thực hiện:

+ Hồi chỉnh lọ vắc xin đông khô với nước hồi chỉnh.

+ Pha loãng ở những nồng độ thích hợp (thông thường ở nồng độ 10^{-1} , 10^{-2}).

+ Gây nhiễm lên tế bào Vero 2-3 ngày tuổi. Tế bào này đã được nuôi trên phiến 6 giếng có sẵn lam kính ở đáy giếng với nồng độ 20×10^4 tế bào/ml x 2 ml/giếng, tế bào mọc trên lam kính.

+ Nuôi cấy ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 /2-3 ngày.

+ Gắn tiêu bản:

* Lấy các lam kính ra khỏi phiến,

* Rửa lam kính bằng PBS, để khô,

* Cố định bằng dung dịch aceton trong 15 phút, để khô

* Gắn kháng thể kháng sợi: Nhỏ kháng thể sợi lên vùng có nhiều ổ hoại tử tế bào, ủ 37⁰C/40-60’.

* Rửa bằng PBS, để khô,

* Gắn IgG kháng kháng thể sợi có gắn huỳnh quang (FITC-IgG), ủ 37⁰C/40-60’

* Rửa, để khô,

+ Soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

- Thử nghiệm được tiến hành song song với mẫu chuẩn M01-07.

- Thử nghiệm đạt yêu cầu khi có các đám bắt màu xanh huỳnh quang trên vắc xin mẫu chuẩn.

- Tiêu chuẩn vắc xin: Có các đám bắt màu xanh huỳnh quang trên mẫu vắc xin thử nghiệm.

2.5.2. Xác định công hiệu của vắc xin bằng phương pháp tạo đám huỷ hoại tế bào [125],[126],[127],[128]

- Lấy ngẫu nhiên 3 lọ vắc xin.

- Cách thực hiện:

+ Hồi chỉnh lọ vắc xin đông khô với nước hồi chỉnh.

+ Pha loãng ở những nồng độ khác nhau. Mỗi lọ vắc xin sử dụng ba nồng độ thích hợp sao cho tạo được các đám huỷ hoại riêng rẽ trên phiến tế bào. Mỗi lọ vắc xin sử dụng một phiến 6 giếng.

+ Gây nhiễm lên tế bào Vero 2-3 ngày tuổi: 0,1 mL/giếng x 2 giếng/nồng độ,

+ Ủ ở điều kiện 37⁰C, 5% CO₂/60 phút để vi rút hấp phụ lên tế bào.

+ Phủ thạch.

+ Nuôi cấy ở điều kiện 37⁰C, 5% CO₂/7 ngày.

- + Phũ thạch có chứa đồ trung tính làm chỉ thị màu.
- + Tiếp tục nuôi cấy ở điều kiện 37⁰C, 5% CO₂/3 ngày
- + Đếm số lượng PFU trên mỗi giếng.

+ Tính công hiệu của từng lọ vắc xin dựa vào số lượng PFU và độ pha loãng. Công hiệu của mỗi lọ vắc xin bằng trung bình công hiệu của 3 nồng độ gây nhiễm. Công hiệu của loạt vắc xin được tính bằng công hiệu trung bình của 3 lọ vắc xin.

Công thức tính công hiệu của mỗi nồng độ pha loãng:

Công hiệu (Lg PFU) = Lg số PFU trung bình 2 giếng + Lg nồng độ pha loãng + 0,7.

Trong đó:

0,7: Lg chuyển đổi từ 0,1 mL vắc xin gây nhiễm/giếng sang 0,5 mL (1 liều)

- Thử nghiệm được tiến hành song song với mẫu chuẩn M01-07.
- Thử nghiệm đạt yêu cầu khi: Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn đạt từ 4,2 - 4,6 lg PFU/0,5 mL;
- Tiêu chuẩn đánh giá: Công hiệu của mỗi loạt vắc xin lớn hơn hoặc bằng 3 Lg PFU/liều.

2.5.3. Xác định độ ổn định nhiệt của vắc xin [125],[129]

- Lấy ngẫu nhiên 3 lọ vắc xin.
- Cách thực hiện:

Xác định công hiệu của 3 lọ vắc xin này sau khi ủ ở nhiệt độ 37⁰C trong 7 ngày. Công hiệu sau ủ phải lớn hơn hoặc bằng 3 Lg PFU/liều để có tác dụng bảo vệ và giảm không quá 1 Lg so với vắc xin ban đầu.

2.5.4. Kiểm tra vô trùng bằng phương pháp màng lọc [126],[130],[131],[132]

Điều kiện thực hiện thử nghiệm: Thử nghiệm được thực hiện trong tủ cấy vô trùng cấp độ A đặt trong phòng sạch cấp độ B. Phòng có áp lực dương, được giám sát liên tục về nhiệt độ, độ ẩm, áp suất.

2.5.4.1. Kiểm tra vi khuẩn và nấm

- Số lượng vắc xin cần cho một lần thực hiện thử nghiệm vô trùng: 20 lọ.

Số lượng vắc xin cần cho kiểm tra vô trùng của một loạt sản xuất được tính theo số lượng sản xuất của loạt đó và thể tích vắc xin có trong mỗi lọ. Số lượng này được WHO, Dược điển Châu Âu, Dược điển Mỹ qui định [130].

Cách lấy mẫu: Lấy ngẫu nhiên để đại diện cho toàn bộ loạt vắc xin và ở những thời điểm có nguy cơ lây nhiễm cao nhất, ở đầu, giữa, cuối giai đoạn đóng ống hoặc ở bất cứ thời điểm tạm ngừng làm việc nào.

Bảng 2.2: Số lọ vắc xin cần lấy từ mỗi loạt để kiểm tra vô trùng vi khuẩn, nấm [130],[131],[133]

Số lượng thành phẩm của một loạt (Lọ)	Số lượng (Lọ)	
	Lượng vắc xin trong mỗi lọ ≥ 2 mL	Lượng vắc xin trong mỗi lọ < 2 mL
< 100	10% nhưng không ít hơn 4	20% nhưng không ít hơn 8
≥ 100 và < 500	Ít nhất 10	Ít nhất 20
≥ 500	Ít nhất 20	Ít nhất 40

Từ năm 2009 đến năm 2013 POLYVAC sản xuất MVVAC với công suất mỗi loạt 30264 lọ (13 giá, mỗi giá 6 khay, mỗi khay 338 lọ), lớn hơn 500 lọ. MVVAC có thể tích mỗi lọ 5,5 mL, lớn hơn 2 mL. Theo quy định của WHO (Bảng 2.2), số lọ dùng cho kiểm tra vô trùng phát hiện vi khuẩn và nấm trong mỗi loạt ít nhất là 20 lọ.

- Quy trình thực hiện:

+ Hồi chỉnh vắc xin.

+ Dùng một bơm chân không hút tất cả vắc xin trong các lọ mẫu cần kiểm tra đi qua một màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,22 μm .

+ Rửa màng lọc để loại bỏ hết các chất ức chế bằng cách cho các dung dịch rửa đi qua.

+ Cắt đôi màng lọc. Nuôi cấy 2 nửa màng lọc trong hai ống môi trường: Một ống môi trường lỏng thioglycolat (Fluid Thioglycollate Medium: FTM) để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và vi khuẩn kỵ khí, một ống môi trường canh thang đậu tương (Soybean Casein Digest Broth: SCDB) để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm.

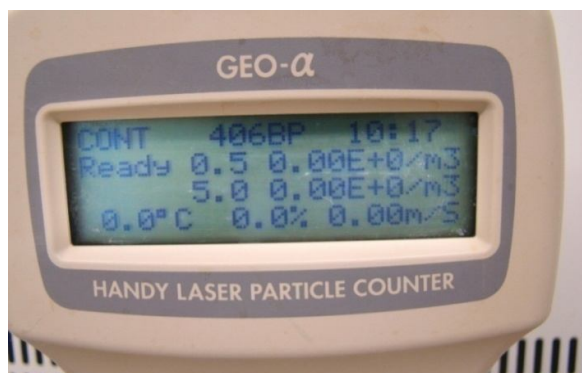
+ Ủ FTM ở nhiệt độ 30-35 $^{\circ}\text{C}$ ít nhất 14 ngày, SCDB ở nhiệt độ 20-25 $^{\circ}\text{C}$ ít nhất 14 ngày.

- Chứng âm:

+ Tính vô trùng của hai môi trường FTM và SCDB: Đánh giá bằng thử nghiệm kiểm tra vô trùng hai môi trường này.

+ Mức độ sạch của không gian nơi thực hiện thử nghiệm (Environmental monitoring): Đánh giá bằng việc giám sát môi trường theo các nội dung:

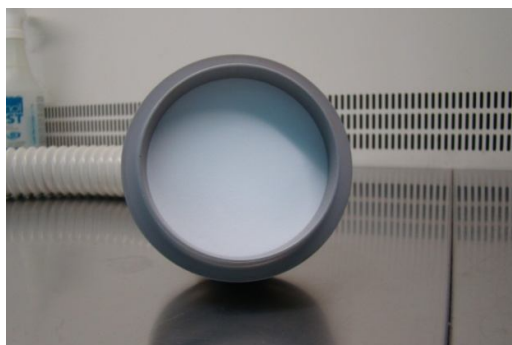
* Đếm số lượng hạt bụi trong không khí bằng máy đếm hạt bụi,



Hình 2.5: Bảng hiện thị kết quả của máy đếm hạt bụi trong không khí

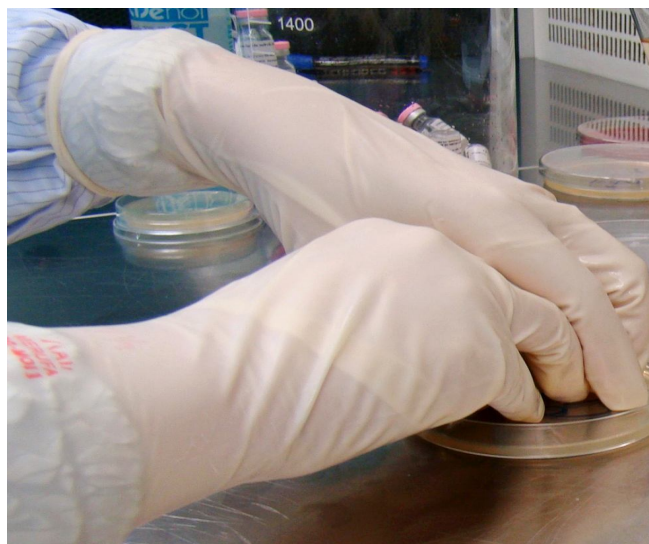
* Đếm số lượng vi khuẩn và nấm trong không khí bằng 2 phương pháp: Phương pháp thụ động bằng cách đặt các đĩa thạch ở các vị trí có khả năng lây nhiễm khác nhau trong suốt quá trình thực hiện thử nghiệm.

Phương pháp chủ động: Dùng máy lấy mẫu không khí để hút không khí qua máy. Vi khuẩn và nấm trong không khí sẽ gắn vào màng gelatin lắp sẵn trong máy. Đặt màng gelatin lên đĩa thạch. Ủ các đĩa thạch trong tủ ấm. Đếm số khuẩn lạc trên đĩa thạch. Dựa vào vận tốc lấy mẫu, thời gian lấy mẫu để tính số vi khuẩn và nấm có trong mỗi mét khối không khí.



Hình 2.6: Đầu thu mẫu máy đếm vi khuẩn và nấm trong không khí

* Giám sát vi khuẩn và nấm trên găng tay của cán bộ thực hiện thử nghiệm: Mỗi kỹ thuật viên dùng một đĩa thạch riêng biệt, in 10 đầu ngón tay của mình vào đĩa thạch theo trình tự tay phải in trước, tay trái in sau, tay phải ở giữa đĩa thạch, tay trái bao phía ngoài.



Hình 2.7: Kiểm tra găng của kỹ thuật viên

* Xác định vi khuẩn và nấm trên bề mặt nơi thực hiện thử nghiệm vô trùng: Lấy đĩa thạch tiếp xúc có đường kính 56 mm, mở nắp đĩa thạch và cho mặt thạch tiếp xúc với bề mặt cần kiểm tra trong giây lát. Đóng nắp đĩa thạch. Ủ đĩa thạch trong tủ ấm. Đếm số khuẩn lạc trên đĩa thạch.

- Chứng dương: Thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách cho từ 10-100 CFU (Colony Forming Unit: Khuẩn lạc) chủng thử thách vào mỗi ống môi trường. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30-35⁰C đối với các ống cấy vi khuẩn, 20-25⁰C đối với các ống cấy nấm. Môi trường đạt yêu cầu về khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn và nấm phát triển nếu sau 3 ngày có dấu hiệu vi khuẩn phát triển và sau 5 ngày có dấu hiệu nấm phát triển.

Đối với môi trường FTM, dùng 4 chủng *B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila* ATCC 9341, *C. albicans* ATCC 10231, *C. sporogens* ATCC 11437 (ít nhất 1 chủng hiếu khí và 1 chủng kỵ khí theo yêu cầu WHO). Đối với môi trường SDCB, dùng 3 chủng *B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila*

ATCC 9341, *C. albicans* ATCC 10231 (ít nhất 1 chủng hiếu khí và 1 chủng nấm theo yêu cầu WHO).

Kiểm tra số lượng chủng thử thách đã cấy vào mỗi ống môi trường xem có đúng từ 10-100 CFU bằng cách cấy đếm khuẩn lạc trên thạch đĩa.

- Tiêu chuẩn đánh giá thử nghiệm vô trùng vắc xin: Vắc xin đạt yêu cầu về vô trùng đối với vi khuẩn và nấm nếu không có dấu hiệu mọc của vi khuẩn và nấm trong các ống môi trường cấy màng lọc.

2.5.4.2. Phát hiện *Mycoplasma* [45],[132]

- Số lượng vắc xin cần cho một lần thực hiện thử nghiệm: 2 lọ.

- Hôi chỉnh lọ vắc xin đông khô bằng dung dịch hôi chỉnh kèm theo.

- Dùng một bơm chân không hút 6 ml vắc xin đi qua một màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,1 μm

- Rửa màng lọc để loại bỏ hết các chất ức chế.

- Cắt đôi màng lọc. Nuôi cấy màng lọc trong hai môi trường LM1, LM2.

- Nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰C.

- Cấy chuyển sang các ống môi trường mới sau 7 ngày và sau 14 ngày.

- Đọc kết quả sau 28 ngày kể từ ngày cấy đầu tiên.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Không có dấu hiệu phát triển của *Mycoplasma* trong các ống môi trường nuôi cấy, hai môi trường không bị đổi màu.

- Chứng âm: Độ vô trùng của hai môi trường nuôi cấy: Đánh giá bằng thử nghiệm kiểm tra vô trùng hai môi trường.

- Chứng dương: Thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách cho 10-100 CFU chủng *Mycoplasma* thử thách vào mỗi ống môi trường (*Mycoplasma Pneumoniae* cho môi trường LM1, *Mycoplasma Orale* cho LM2). Nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰C. Nếu sau 14 ngày môi trường LM1 chuyển từ màu đỏ thành màu vàng cam, môi trường LM2 chuyển

từ màu cam sang màu đỏ: Môi trường đạt yêu cầu về khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho *Mycoplasma* phát triển.

Kiểm tra số lượng chủng thử thách đã cấy vào mỗi ống môi trường xem có đúng từ 10-100 CFU bằng cách cấy đếm khuẩn lạc trên thạch đĩa.

2.5.5. Xác định tính an toàn [134]

2.5.5.1. Xác định tính an toàn trên chuột lang

- Lấy ngẫu nhiên 2 lọ vắc xin.
- Hồi chính lọ vắc xin đông khô với nước hồi chính.
- Tiêm vắc xin vào phúc mạc chuột lang với thể tích 5 mL/con.
- Số lượng chuột: 2 con, trọng lượng 250-350 g/con.
- Theo dõi sau tiêm: Cân trọng lượng chuột và theo dõi hàng ngày các biểu hiện bất thường như: Giảm hoạt động, rụng lông, tiêu chảy, chảy nước mũi,...trong 7 ngày sau tiêm.

- Chứng âm:

+ Dùng hai chuột cùng trọng lượng 250-350 g/con, tiêm nước muối sinh lý vào phúc mạc chuột với thể tích 5 mL/con.

+ Dùng hai chuột cùng trọng lượng 250-350 g/con, không tiêm gì.

Các chuột sử dụng làm chứng âm được nuôi cùng điều kiện với các chuột dùng cho vắc xin thử nghiệm, theo dõi và ghi chép trọng lượng cũng như các biểu hiện bất thường.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn về an toàn trên chuột lang nếu sau tiêm vắc xin tất cả chuột khoẻ mạnh, tăng cân.

2.5.5.2. Xác định tính an toàn trên chuột nhắt trắng

- Lấy ngẫu nhiên 1 lọ vắc xin.
- Hồi chính lọ vắc xin đông khô với nước hồi chính.
- Tiêm vắc xin vào phúc mạc chuột với thể tích 0,5 mL/con.
- Số lượng chuột: 5 con trọng lượng 18-20 g/con.

- Theo dõi sau tiêm: Cân trọng lượng chuột và theo dõi các biểu hiện bất thường như: Giảm hoạt động, rụng lông, tiêu chảy, chảy nước mũi,...trong 7 ngày sau tiêm.

- Chứng âm:

+ Dùng 2-5 chuột trọng lượng 18-20 g/con, tiêm nước muối sinh lý vào phúc mạc chuột với thể tích 0,5 mL/con.

+ Dùng 2-5 chuột trọng lượng 18-20 g/con, không tiêm gì.

Các chuột sử dụng làm chứng âm được nuôi cùng điều kiện với các chuột dùng cho vắc xin thử nghiệm.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn về an toàn trên chuột nhất trắng nếu sau tiêm vắc xin chuột khoẻ mạnh, tăng cân.

2.5.6. Xác định độ ẩm tồn dư [125],[135]

- Điều kiện thực hiện thử nghiệm: Phòng thực hiện độ ẩm tồn dư có nhiệt độ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm thấp dưới 45%.

- Thử nghiệm dùng các quả cân chuẩn 10 g, 20 g.

- Lấy ngẫu nhiên 5 lọ vắc xin.

- Quy trình thực hiện:

+ Rửa sạch các chén cân, sấy khô ở $60^{\circ}\text{C}/1\text{ h}$, cho vào bình hút ẩm 1h.

+ Hiệu chỉnh cân theo quả cân chuẩn.

+ Cân các chén cân.

+ Các lọ vắc xin để ở nhiệt độ phòng 5-10 phút trước khi tiến hành thử nghiệm, nghiền nhỏ bánh vắc xin đông khô, cho vắc xin từ mỗi lọ vào một chén cân.

+ Cân chén cân có chứa vắc xin.

+ Tính trọng lượng vắc xin: Bằng trọng lượng chén cân có chứa vắc xin trừ đi trọng lượng chén cân.

+ Sấy chén cân có chứa vắc xin ở 60⁰C/3 h trong máy hút chân không với áp suất 0,6 kPa.

+ Để nguội trong bình hút ẩm 2 h.

+ Cân chén cân có chứa vắc xin sau sấy.

+ Tính khối lượng vắc xin giảm sau sấy: Bằng trọng lượng chén cân có chứa vắc xin trước khi sấy trừ đi trọng lượng chén cân có chứa vắc xin sau sấy.

+ Tính độ ẩm tồn dư theo công thức:

$$D = \frac{m}{M} \times 100\%$$

Trong đó:

D (%): Độ ẩm tồn dư,

M (g): Trọng lượng vắc xin,

m (g): Trọng lượng vắc xin giảm sau sấy.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi độ ẩm tồn dư $\leq 2\%$.

2.5.7. Quan sát trạng thái [125]

2.5.7.1. Quan sát trạng thái bánh vắc xin

- Lấy ngẫu nhiên 10 lọ vắc xin.

- Cách thực hiện:

+ Gõ nhẹ đáy lọ vắc xin xuống lòng bàn tay cho bong bánh vắc xin ra khỏi đáy lọ.

+ Quan sát tất cả các mặt của bánh vắc xin về các tính chất: Màu sắc; bánh vắc xin có nguyên vẹn không, có bị nứt vỡ không; có dị vật bất thường không; có bị sùi hoặc co ngót thành miếng đặc, không thấy độ xốp của bánh vắc xin.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Tất cả 10 bánh vắc xin có màu trắng sữa, không bị vỡ làm nhiều mảnh, không có dị vật lạ, không bị sùi hoặc co ngót bất thường.

2.5.7.2. Quan sát trạng thái vắc xin sau hồi chỉnh

- Cách thực hiện:

- + Cho 5,5 mL nước hồi chỉnh cho vào mỗi lọ vắc xin, đậy nút, lắc nhẹ.
- + Sau khoảng 30 giây quan sát lọ vắc xin về các tính chất:
 - * Có tan hết không;
 - * Có tạo thành dung dịch trong suốt, không màu không;
 - * Có dị vật không tan không.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Bánh vắc xin phải tan hoàn toàn tạo thành dung dịch trong suốt, không màu, không có dị vật không tan.

2.5.8. Xác định độ lệch trọng lượng [136]

- Lấy ngẫu nhiên 5 lọ vắc xin.

- Để các lọ vắc xin ở nhiệt độ phòng 30 - 60 phút trước khi tiến hành thử nghiệm.

- Quy trình thực hiện:

- + Bóc bỏ nhãn lọ vắc xin, bỏ nắp nhôm, để lại nút cao su.
- + Làm khô bề ngoài lọ vắc xin bằng cách đặt trong bình hút ẩm.
- + Cân trọng lượng lọ vắc xin lần 1, được trọng lượng P1.
- + Loại bỏ vắc xin ra khỏi lọ.
- + Rửa lọ và nút cao su.
- + Sấy khô lọ và nút.
- + Cân trọng lượng lọ và nút cao su, được trọng lượng P2.
- + Tính trọng lượng bánh vắc xin: Trọng lượng lọ vắc xin bằng P1-P2.
- + Tính độ biến thiên của trọng lượng bánh vắc xin

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

Trong đó:

CV: Độ biến thiên trọng lượng của vắc xin trong các lọ.

S: Độ lệch chuẩn của trọng lượng vắc xin trong các lọ.

x : Trọng lượng vắc xin của từng lọ.

\bar{x} : Trọng lượng vắc xin trung bình của 5 lọ.

n: Số lọ vắc xin.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn về độ lệch trọng lượng nếu độ biến thiên trọng lượng giữa các lọ nhỏ hơn hoặc bằng 7,5%.

2.5.9. Đếm hạt trong vắc xin [137]

- Lấy ngẫu nhiên 5 lọ vắc xin.

- Hồi chỉnh các lọ vắc xin. Hút hết vắc xin trong các lọ vào một tuýp.

- Dùng máy đếm hạt đếm số hạt có trong mỗi mL vắc xin. Tính số hạt có trong mỗi lọ vắc xin.

- Tiêu chuẩn: Vắc xin đạt tiêu chuẩn nếu số hạt có kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ dưới 6000 hạt/lọ, số hạt có kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ dưới 600 hạt/lọ.

- Thử nghiệm được thực hiện song song với mẫu chứng âm.

2.5.10. Xác định pH [138]

- Lấy ngẫu nhiên 3 lọ vắc xin.

- Mẫu được để ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi đo.

- Hồi chỉnh từng lọ vắc xin, hút vắc xin ở mỗi lọ vào một cốc đo.

- Hiệu chỉnh máy đo pH bằng các dung dịch pH chuẩn: pH 4, pH 7, pH 10.

- Đo pH của từng lọ vắc xin.

- Tiêu chuẩn đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi pH của các lọ nằm trong khoảng từ 6,8 - 8,5.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu đánh giá tính ổn định chất lượng các loạt vắc xin, ổn định nhiệt được xử lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2007.

So sánh sự khác nhau về tăng trọng giữa các nhóm chuột, so sánh sự khác nhau của hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giữa các giai đoạn bằng phần mềm Stata, version 12.1.

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài được thực hiện trong phòng thí nghiệm, không thực hiện trên người.

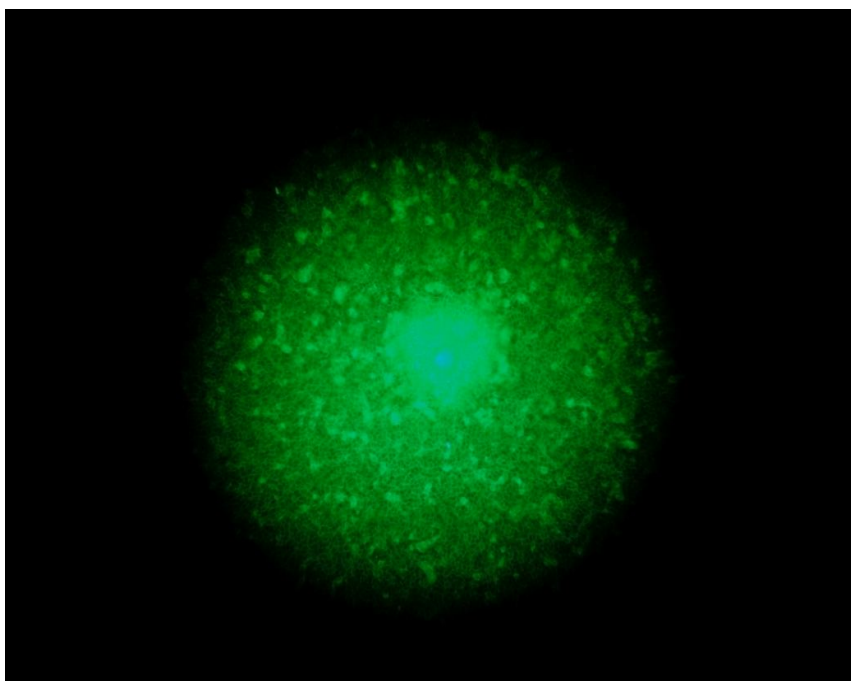
Chuột sau thí nghiệm được huỷ theo đúng quy định của WHO.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá tính ổn định về chất lượng của các loại MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013

3.1.1. Kết quả nhận dạng

Tất cả các lần thực hiện thử nghiệm nhận dạng đều có giá trị khi vắc xin mẫu chuẩn đều có hình ảnh đám bắt màu xanh huỳnh quang trên kính hiển vi huỳnh quang.



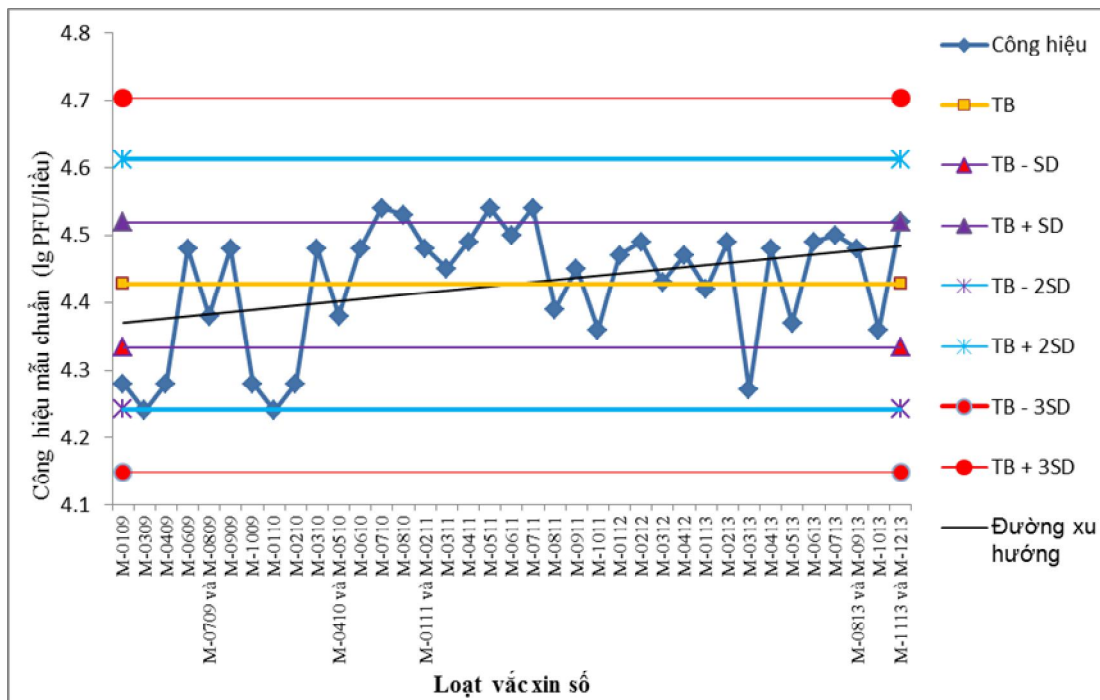
Hình 3.1: Đám hủy hoại tế bào bắt màu xanh huỳnh quang trên mẫu vắc xin thử nghiệm trong thử nghiệm nhận dạng vắc xin loại số M-0412

Kết quả kiểm tra cho thấy 100% các loại vắc xin sản xuất trong giai đoạn 2009-2013 đều có hình ảnh đám bắt màu xanh huỳnh quang chứng tỏ vắc xin mẫu thử chứa kháng nguyên vi rút sởi.

3.1.2. Kết quả kiểm tra công hiệu

Trong hai thử nghiệm kiểm tra công hiệu và thử nghiệm kiểm tra tính ổn định nhiệt, mẫu chuẩn được thực hiện song song với mẫu thử để đánh giá thử nghiệm trên mẫu thử có giá trị hay không.

Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn được thể hiện qua hình 3.2 dưới đây.



Hình 3.2: Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn trong các lần thực hiện thử nghiệm

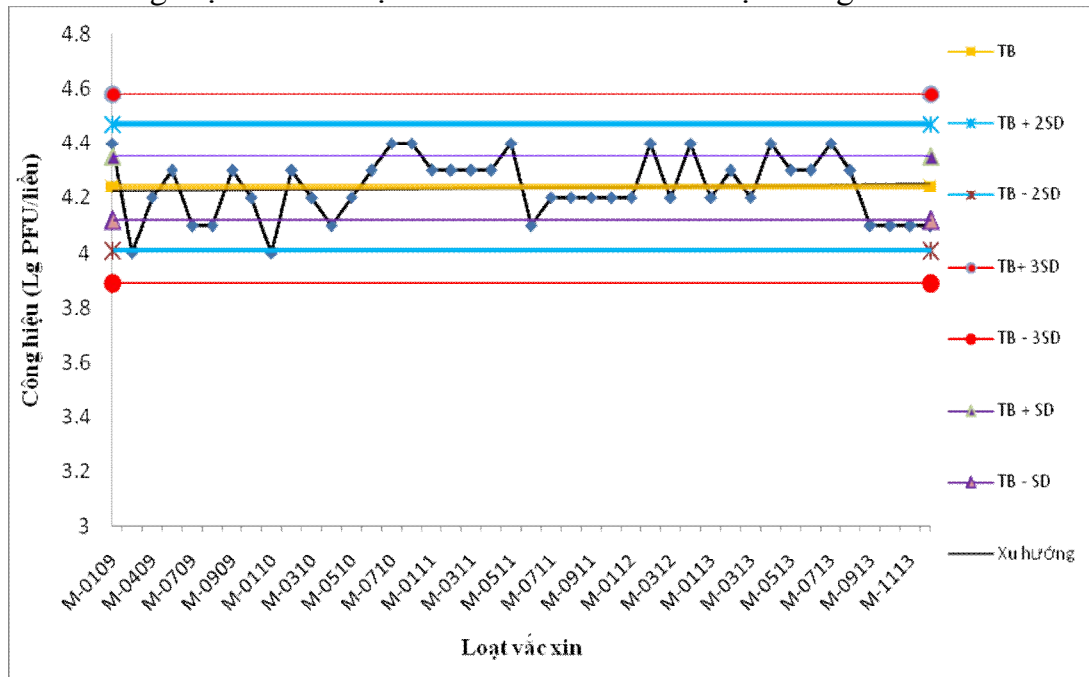
Ghi chú: Từ năm 2009 đến năm 2013 sản xuất tất cả 42 loạt vắc xin nhưng chỉ thực hiện kiểm tra công hiệu mẫu chuẩn 37 lần do có 5 lần hai loạt vắc xin sản xuất cùng một đợt được kiểm tra công hiệu cùng một lần thực hiện thử nghiệm, cùng chung mẫu chuẩn.

Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn rất ổn định thể hiện: Công hiệu tất cả các lần thử nghiệm đều nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$, tiêu chuẩn quan trọng nhất của WHO khi đánh giá độ ổn định.

Bảng 3.1: Độ ổn định của công hiệu mẫu chuẩn theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	X	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$	X	
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm liên tiếp nằm về một phía của đường trung bình		X

Công hiệu của 42 loạt vắc xin MVVAC thể hiện trong hình 3.3.



Hình 3.3: Độ ổn định công hiệu các loạt MVVAC sản xuất từ 2009-2013

Tất cả 42 lần thử nghiệm xác định công hiệu MVVAC đều có giá trị khi công hiệu vắc xin mẫu chuẩn nằm trong khoảng 4,2 - 4,6 lg PFU/0,5 mL; Hình 3.3 cho thấy:

Tất cả các loại vắc xin đều có công hiệu lớn hơn 3, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn WHO.

Công hiệu MVVAC ổn định, thể hiện: Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$, khoảng hành động; hầu hết các điểm nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$. Chỉ có hai điểm rời rạc rơi vào khoảng ($TB-2SD, TB-3SD$). Các điểm này xảy ra vào những loạt đầu của năm 2009 và 2010, khi POLYVAC mới bắt đầu sản xuất MVVAC từ những công đoạn đầu tiên.

Bảng 3.2: Độ ổn định của công hiệu MVVAC theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt	Ghi chú
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	X		
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng ($TB+2SD, TB + 3SD$) hoặc ($TB-2SD, TB - 3SD$)	X		
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$		X	Một thời điểm
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X		
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	X		

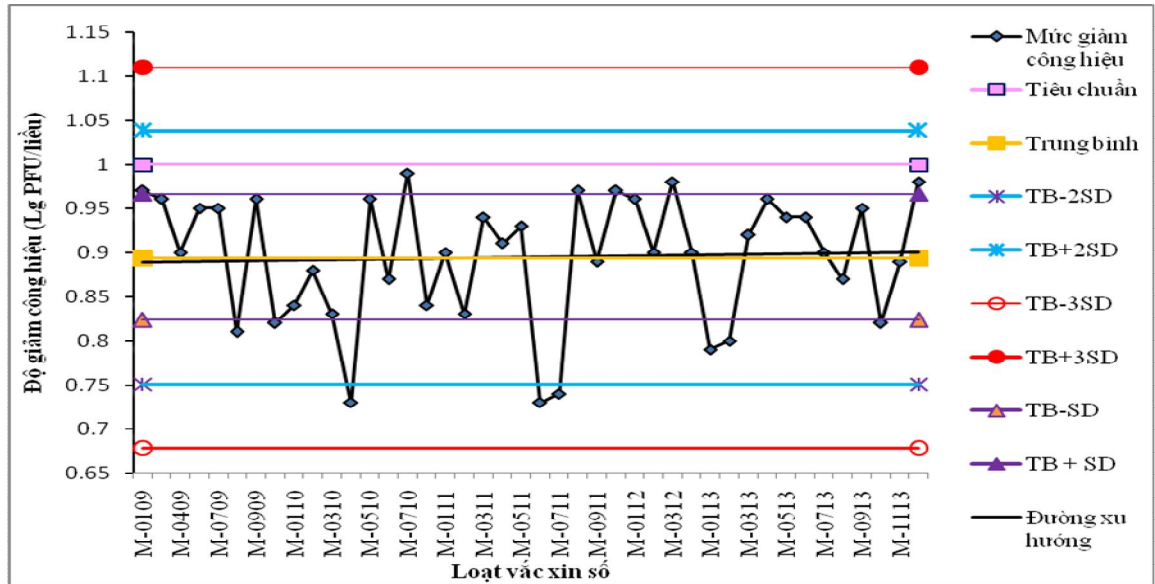


Hình 3.4: Hình ảnh các PFU trong thử nghiệm kiểm tra công hiệu MVVAC loạt số M-0312, tại các nồng độ pha loãng $10^{-2,5}$, 10^{-2} , $10^{-1,5}$.

3.1.3. Kết quả kiểm tra độ ổn định nhiệt

Độ ổn định nhiệt được đánh giá qua độ giảm công hiệu của vắc xin khi bảo quản ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày. Theo tiêu chuẩn WHO, độ giảm này không vượt quá 1 lg PFU/liều tiêm và công hiệu vắc xin sau khi ủ ở $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày vẫn phải trên 3 lg PFU/liều để đạt hiệu quả bảo vệ.

Độ giảm công hiệu các loạt MVVAC khi ủ $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày được thể hiện trên hình 3.5.



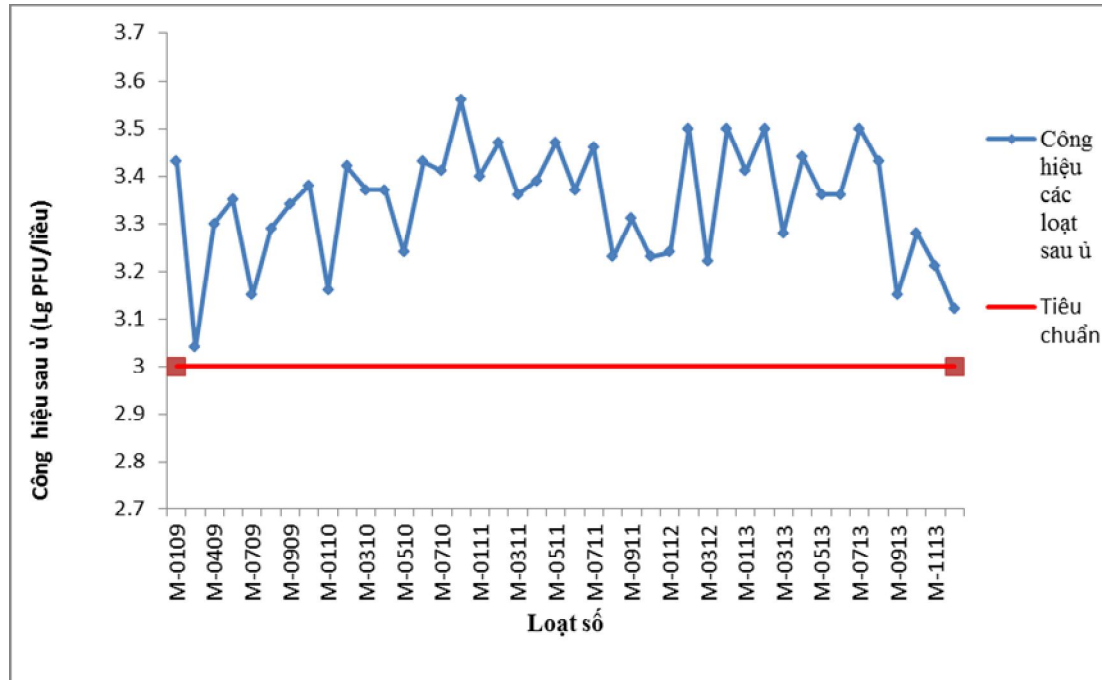
Hình 3.5: Độ giảm công hiệu các loạt MVVAC khi ủ $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày

Hình 3.5 cho thấy 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.

Bảng 3.3: Mức độ ổn định nhiệt MVVAC theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $\text{TB} \pm 3\text{SD}$	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(\text{TB}+2\text{SD}, \text{TB} + 3\text{SD})$ hoặc $(\text{TB}-2\text{SD}, \text{TB} - 3\text{SD})$		X Một thời điểm. Tuy nhiên, độ giảm công hiệu được cho là càng thấp càng tốt.
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $\text{TB} \pm \text{SD}$	X	
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	X	

Công hiệu các loạt MVVAC sau ủ $37^{\circ}\text{C}/7$ ngày được thể hiện trên hình 3.6.



Hình 3.6: Công hiệu của các loạt vắc xin sau ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C}/1$ tuần

Theo hình 3.6, tất cả 42 loạt MVVAC sau ủ ở $37^{\circ}\text{C}/1$ tuần vẫn đạt công hiệu trên 3 lg PFU/liều, còn tác dụng bảo vệ.

3.1.4. Kết quả kiểm tra vô trùng

Mẫu lấy cho kiểm tra vô trùng đại diện cho toàn bộ loạt sản phẩm và ở những thời điểm có nguy cơ lây nhiễm cao nhất, ở đầu, giữa, cuối giai đoạn đóng ống hoặc ở bất cứ thời điểm tạm ngừng làm việc nào.

Tất cả các lần thực hiện thử nghiệm kiểm tra vô trùng các loạt MVVAC đều tiến hành đồng thời đầy đủ các chứng âm, chứng dương.

Các lần thử nghiệm đều có giá trị vì tất cả các chứng âm và chứng dương đều đạt yêu cầu.

Bảng 3.4: Kết quả kiểm tra chất lượng các loạt môi trường dùng kiểm tra vi khuẩn và nấm

Thông tin Môi trường	Nội dung đánh giá		Số loạt đạt/tổng số	Tỷ lệ (%)
FTM	Vô trùng môi trường		34/34	100
	Dinh dưỡng môi trường	chủng thử thách <i>B. subtilis</i>		
		chủng thử thách <i>K. rhizophila</i>		
		chủng thử thách <i>C. albicans</i>		
		chủng thử thách <i>C. sporogens</i>		
SCDB	Vô trùng môi trường			
	Dinh dưỡng môi trường	chủng thử thách <i>B. subtilis</i>		
		chủng thử thách <i>K. rhizophila</i>		
		chủng thử thách <i>C. albicans</i>		

Các loạt FTM và SCDB đều được kiểm tra chất lượng vào thời điểm trước hoặc song song với thời điểm diễn ra thử nghiệm kiểm tra vô trùng MVVAC. Kết quả kiểm tra cho thấy tất cả các loạt môi trường FTM và SCDB đều đạt yêu cầu về vô trùng, khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho

chủng thử thách phát triển. Số lượng chủng thử thách cấy vào mỗi ống môi trường được kiểm tra bằng cách cấy và đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch.



Hình 3.7: Hình ảnh cấy đếm trên thạch đĩa để kiểm tra số lượng CFU chủng thử thách đã cho vào mỗi ống môi trường trong thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường: Khuẩn lạc K. rhizophila.

Kết quả giám sát môi trường cho thấy từ cấy thực hiện thử nghiệm kiểm tra vô trùng MVVAC đạt yêu cầu cấp độ sạch A, thể hiện trong các bảng 3.5 và 3.6.

Bảng 3.5: Kết quả giám sát vi khuẩn và nấm môi trường làm việc trong khi thực hiện thử nghiệm vô trùng

Nội dung giám sát		Tiêu chuẩn (CFU/đĩa)	Số lần đạt / tổng số	Tỷ lệ đạt (%)
Đếm số lượng vi khuẩn và nấm trong không khí	Bằng máy	< 1	42/42	100%
	Đặt thạch	< 1	42/42	100%
Giám sát vi khuẩn và nấm trên bề mặt		< 1	42/42	100%
Kiểm tra găng		< 1	42/42	100%

*Bảng 3.6: Kết quả kiểm tra hạt bụi của tủ cấy thực hiện thử nghiệm
(hạt/m³ không khí)*

Nội dung giám sát	Tiêu chuẩn	Số lần đạt yêu cầu/tổng số	Tỷ lệ đạt (%)
Hạt 0,5-5 μm	3500	42/42	100
Hạt $\geq 5 \mu\text{m}$	0	42/42	100

Kết quả kiểm tra cho thấy 100% số loại MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013 không bị nhiễm vi khuẩn, nấm.

Bảng 3.7: Kết quả kiểm tra vô trùng vi khuẩn, nấm các loại MVVAC

Tên môi trường kiểm tra	Số loại đạt/tổng số	Tỷ lệ đạt (%)
FTM	42/42	100
SCDB	42/42	100



Hình 3.8: Bảng hiển thị của máy theo dõi nhiệt độ, độ ẩm, áp suất phòng thực hiện thử nghiệm vô trùng

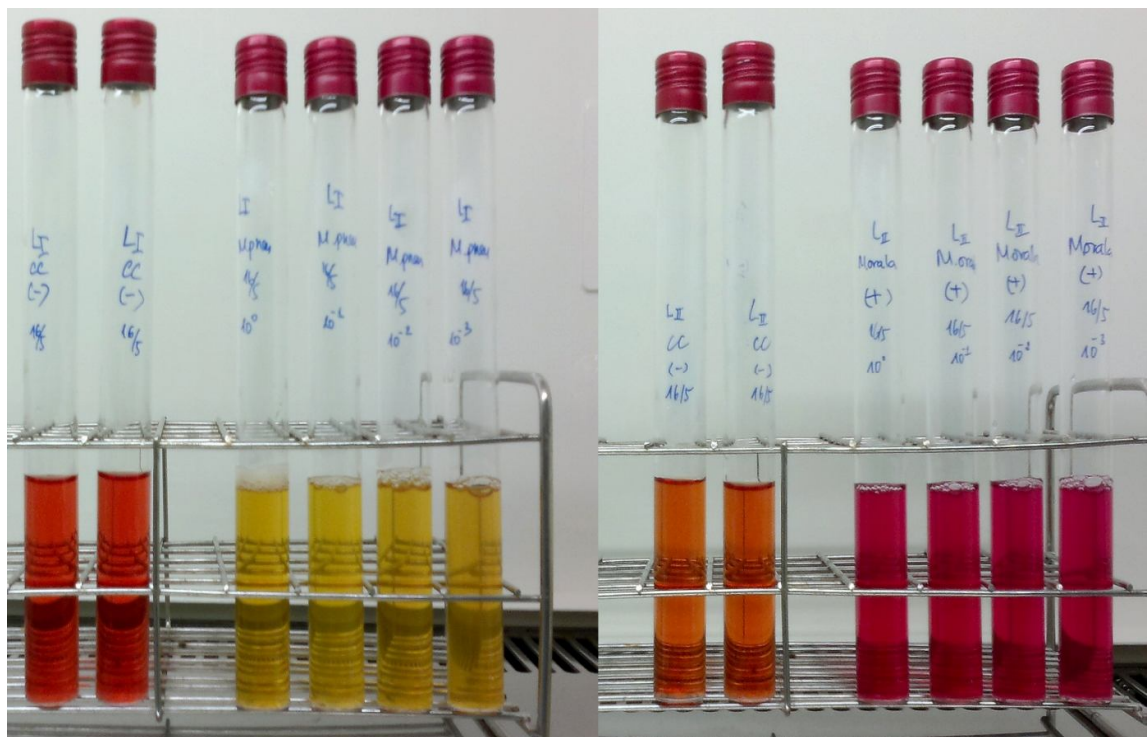
3.1.4.1. Kết quả kiểm tra vô trùng *Mycoplasma*

Kết quả kiểm tra cho thấy cả 42 loạt MVVAC sản xuất từ năm 2009 đến năm 2013 đều cho kết quả âm tính đối với *Mycoplasma*.

Bảng 3.8: Kết quả kiểm tra *Mycoplasma* các loạt MVVAC

Tên môi trường kiểm tra	Số loạt đạt/tổng số	Tỷ lệ đạt (%)
LM1	42/42	100
LM2	42/42	100

Tương tự như kiểm tra vô trùng vi khuẩn và nấm, tất cả các loạt môi trường dùng cho kiểm tra vô trùng *Mycoplasma* đều đạt yêu cầu về vô trùng và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của các chủng thử thách *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma orale*.



Chứng âm

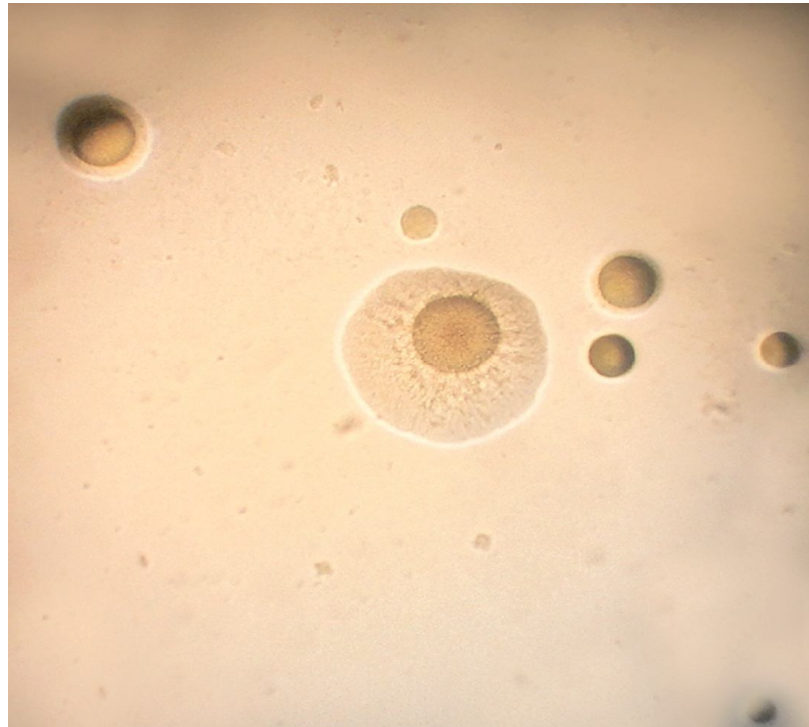
a

Chứng âm

b

Hình 3.9: a: Hình ảnh *M. pneumoniae*, b: Hình ảnh *M. orale* phát triển trong các ống môi trường làm đổi màu môi trường của thử nghiệm kiểm tra chất lượng môi trường.

Số lượng chủng thử thách cấy vào mỗi ống môi trường được kiểm tra bằng cách cấy đếm trên thạch đĩa, đều nằm trong tiêu chuẩn cho phép: 10-100 CFU.



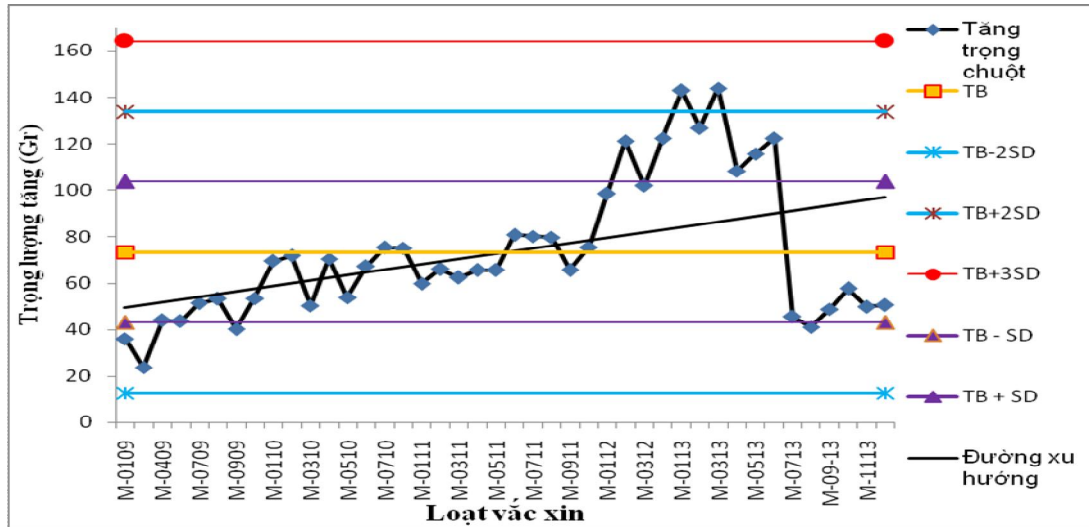
Hình 3.10: Hình ảnh khuẩn lạc M. pneumoniae.

Ảnh chụp qua kính hiển vi quang học

3.1.5. Kết quả kiểm tra tính an toàn trên động vật thực nghiệm

Trong thử nghiệm kiểm tra tính an toàn trên chuột lang và chuột nhắt trắng, các chuột sử dụng làm chứng âm (tiêm nước muối sinh lý và không tiêm gì) được nuôi cùng điều kiện với các chuột dùng cho vắc xin thử nghiệm. Trong các lần thực hiện thử nghiệm, các chuột sử dụng làm chứng âm đều khoẻ mạnh, tăng cân, không có các triệu chứng bất thường.

Chuột tiêm vắc xin thử nghiệm của các loạt cũng khoẻ mạnh; tăng cân; không có các triệu chứng bất thường như giảm hoạt động, rụng lông, tiêu chảy, chảy nước mũi,...42 loạt MVVAC đều cho kết quả đạt yêu cầu về an toàn trên chuột lang và chuột nhắt trắng theo tiêu chuẩn WHO.



Hình 3.11: Tăng trọng **chuột lang** trong thử nghiệm kiểm tra an toàn các loạt MVVAC

Trọng lượng chuột lang tăng trung bình trong các lần thử nghiệm tương đối đồng đều, đạt được các yêu cầu cơ bản của độ ổn định.

Bảng 3.9: Độ ổn định của tăng trọng **chuột lang** theo tiêu chí của WHO

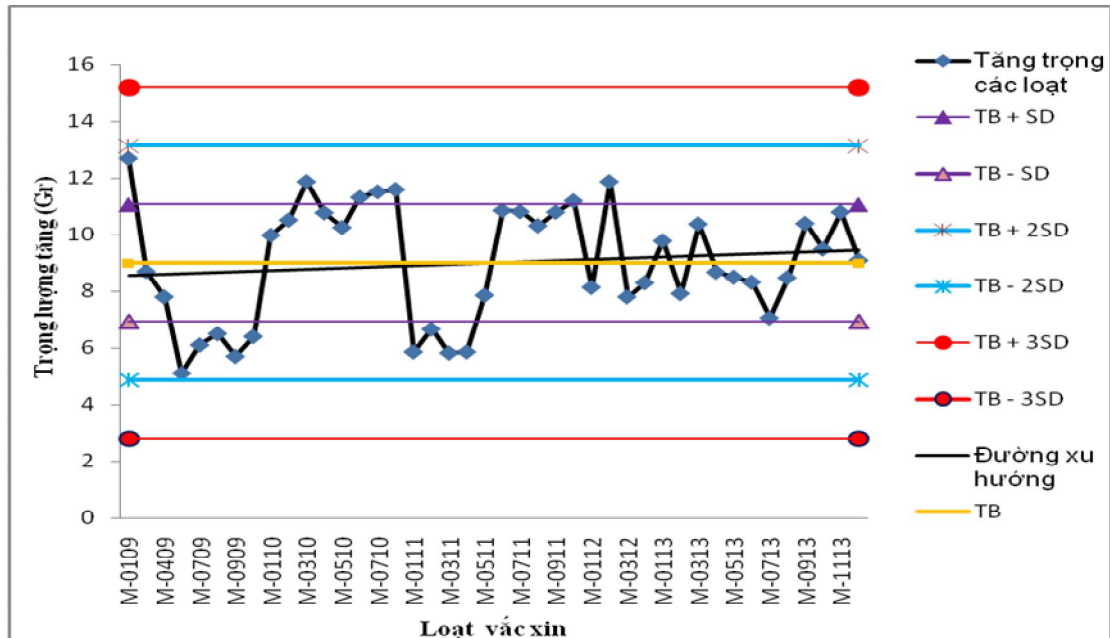
Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng TB \pm 3SD	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng (TB+2SD, TB + 3SD) hoặc (TB - 2SD, TB - 3SD)	X	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng TB \pm SD		X (Một thời điểm)
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình		X

Bảng 3.10: So sánh trọng lượng tăng trung bình (gram) của nhóm **chuột lang** tiêm vắc xin và các nhóm chuột đối chứng trong thử nghiệm kiểm tra an toàn 42 loạt MVVAC

	n	$\bar{x} \pm s$	p
Nhóm chuột tiêm vắc xin	42	73,33 ± 30,30	0,91
Nhóm chuột tiêm nước muối sinh lý	13	69,84 ± 27,82	
Nhóm chuột không tiêm gì	13	69,17 ± 23,32	

Trọng lượng tăng trung bình giữa ba nhóm chuột lang không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Mỗi đợt sản xuất, POLYVAC sản xuất nhiều loạt MVVAC. Các loạt vắc xin trong một đợt thường được kiểm tra an toàn trong cùng một lần thử nghiệm, cùng chung một nhóm chứng. Do đó, có 42 nhóm chuột lang được tiêm vắc xin nhưng chỉ có 13 nhóm chứng mỗi loại (13 nhóm chuột lang tiêm nước muối và 13 nhóm chuột lang không tiêm).



Hình 3.12: Độ ổn định về tăng trọng **chuột nhắt** trong thử nghiệm kiểm tra an toàn các loạt MVVAC

Theo hình 3.12, tăng trọng chuột nhất ổn định khi tất cả các điểm đều nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$.

*Bảng 3.11: Độ ổn định của tăng trọng **chuột nhất** theo tiêu chí của WHO*

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt	Ghi chú
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	x		
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	x		
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$		x	Một thời điểm 5 loạt liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$.
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	x		
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	x		

*Bảng 3.12: So sánh trọng lượng tăng trung bình (gram) của nhóm **chuột nhất** tiêm vắc xin và các nhóm chuột đối chứng trong thử nghiệm kiểm tra an toàn 42 loạt MVVAC*

	n	$\bar{x} \pm s$	p
Nhóm chuột tiêm vắc xin	42	9,00 \pm 2,07	0,76
Nhóm chuột tiêm nước muối sinh lý	13	9,43 \pm 2,00	
Nhóm chuột không tiêm gì	13	9,31 \pm 1,96	

Trọng lượng tăng trung bình giữa ba nhóm chuột nhắt không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

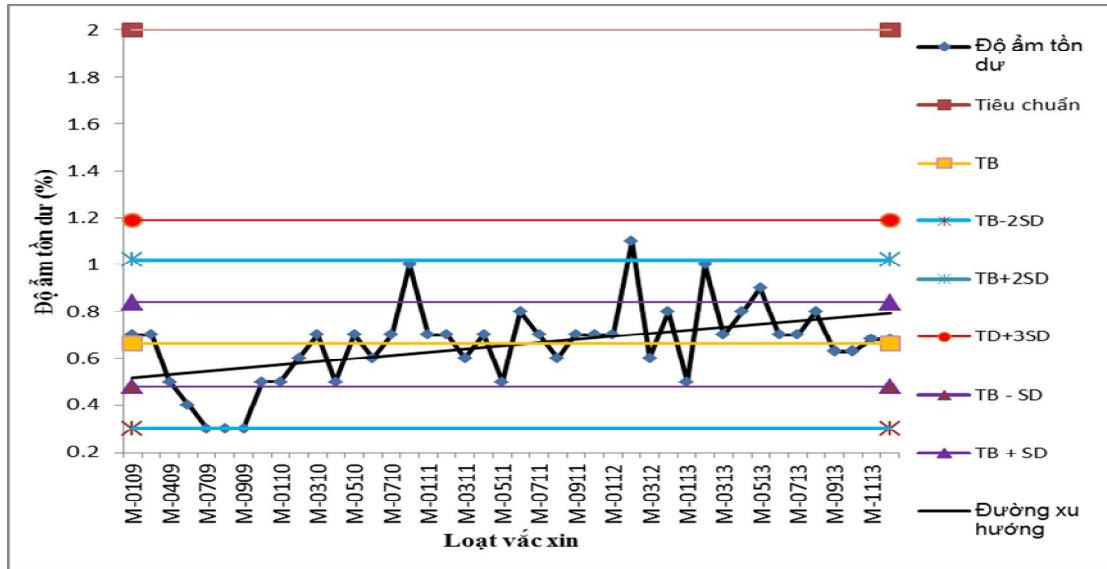
Ghi chú: Tương tự như với thử nghiệm an toàn trên chuột lang, có 42 nhóm chuột nhắt được tiêm vắc xin nhưng chỉ có 13 nhóm chứng.

3.1.6. Kết quả kiểm tra độ ẩm tồn dư

Phòng thực hiện thử nghiệm kiểm tra độ ẩm tồn dư của MVVAC được giám sát về độ ẩm. Trong quá trình thực hiện nghiên cứu, phòng luôn duy trì độ ẩm dưới 45%.



Hình 3.13: Bảng hiển thị độ ẩm phòng đo độ ẩm tồn dư



Hình 3.14: Kết quả nghiên cứu tính ổn định độ ẩm tồn dư các loạt MVVAC sản xuất 2009-2013

Hình 3.14 cho thấy không có loạt MVVAC nào có độ ẩm tồn dư vượt ra ngoài tiêu chuẩn cho phép và thậm chí còn cách rất xa tiêu chuẩn này (2%).

Đường xu hướng là một đường đi lên do giai đoạn đầu POLYVAC duy trì độ ẩm tồn dư thấp, có ba loạt độ ẩm tồn dư chỉ ở mức 0,3%. Chính nguyên nhân này mà ở giai đoạn đầu có một thời điểm có 4 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$, 8 điểm liên tiếp nằm về 1 phía của đường trung bình.

Bảng 3.13: Độ ổn định độ ẩm tồn dư theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	X	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$		X
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình		X

3.1.7. Kết quả quan sát trạng thái

Mỗi loạt vắc xin dùng 10 lọ, tổng số 420 lọ vắc xin đã được sử dụng trong thử nghiệm quan sát trạng thái. Tất cả 420 bánh vắc xin đều có màu trắng sữa, không bị vỡ, không có dị vật lạ, không bị sùi hoặc co ngót bất thường. Tất cả các bánh này tan ngay trong nước hồi chỉnh tạo thành dung dịch trong suốt, không màu, không có dị vật.

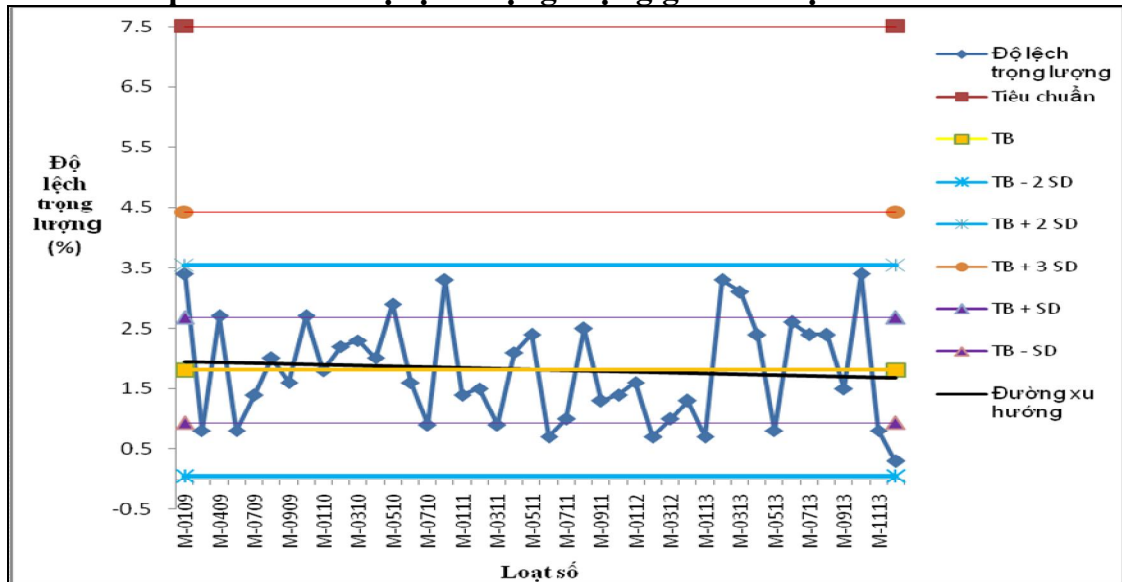


Hình 3.15: Hình ảnh bánh vắc xin sau khi gỡ, bong khỏi đáy lọ



Hình 3.16: Dung dịch vắc xin sau hồi chỉnh

3.1.8. Kết quả kiểm tra độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin



Hình 3.17: Độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin trong cùng một loạt

Theo hình 3.17: Không có loạt nào có độ lệch trọng lượng giữa các lọ vượt ra ngoài tiêu chuẩn cho phép và thậm chí còn cách rất xa tiêu chuẩn này (7,5%). Độ lệch trọng lượng giữa các loạt ổn định cao, thể hiện: Không có loạt nào vượt ra ngoài khoảng $TB \pm 2SD$. Đường xu hướng đi sát đường trung bình và có độ dốc nhẹ chứng tỏ các lọ vắc xin càng ngày càng đồng đều về trọng lượng. Điều này chứng tỏ tính ổn định của quy trình đóng ống, nó đã tạo ra các lọ vắc xin có trọng lượng đồng đều.

Bảng 3.14: Độ ổn định độ lệch trọng lượng theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	x	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	x	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$	x	
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	x	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	x	

3.1.9. Kết quả kiểm tra hạt không tan

3.1.9.1. Số lượng hạt có kích thước lớn hơn hoặc bằng $25 \mu m$

Bảng 3.15: Kết quả kiểm tra số hạt có kích thước $\geq 25 \mu m$

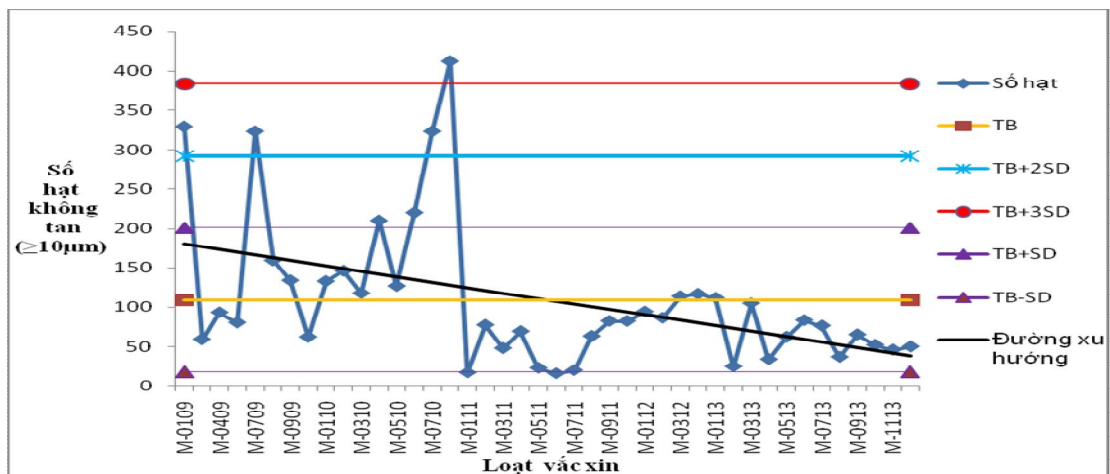
STT	Loạt số	Số hạt kích thước $\geq 25 \mu m$ (hạt/lọ)	Tiêu chuẩn (hạt/lọ)
1	M-0109	0	600
2	M-0309	0	
3	M-0409	1	
4	M-0609	1	

STT	Loại số	Số hạt kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ (hạt/lọ)	Tiêu chuẩn (hạt/lọ)
5	M-0709	0	600
6	M-0809	0	
7	M-0909	0	
8	M-1009	1	
9	M-0110	0	
10	M-0210	0	
11	M-0310	0	
12	M-0410	0	
13	M-0510	0	
14	M-0610	0	
15	M-0710	0	
16	M-0810	0	
17	M-0111	1	
18	M-0211	0	
19	M-0311	1	
20	M-0411	0	
21	M-0511	0	
22	M-0611	1	
23	M-0711	0	
24	M-0811	1	
25	M-0911	0	
26	M-1011	1	
27	M-0112	1	
28	M-0212	0	
29	M-0312	0	

STT	Loại số	Số hạt kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ (hạt/lọ)	Tiêu chuẩn (hạt/lọ)
30	M-0412	0	600
31	M-0113	1	
32	M-0213	1	
33	M-0313	1	
34	M-0413	0	
35	M-0513	0	
36	M-0613	0	
37	M-0713	0	
38	M-0813	0	
39	M-0913	0	
40	M-1013	0	
41	M-1113	0	
42	M-1213	0	

Số hạt có kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ chỉ là 0 hoặc 1 hạt/lọ, rất nhỏ so với tiêu chuẩn 600 hạt/lọ.

3.1.9.2. Số lượng hạt có kích thước lớn hơn hoặc bằng $10 \mu\text{m}$



Hình 3.18: Số lượng hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ trong các loại MVAAC

Theo hình 3.18:

Không có loạt nào có số lượng hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ vượt ra ngoài tiêu chuẩn cho phép và thậm chí còn cách rất xa tiêu chuẩn này (6000 hạt/lọ).

Đường xu hướng là một đường đi xuống với độ dốc cao, số lượng hạt ngày càng giảm.

Bảng 3.16: Độ ổn định hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giai đoạn 2009-2013 theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt	Ghi chú
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$		x	Một thời điểm.
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	x		
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$	x		
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	x		
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình		x	Một thời điểm.

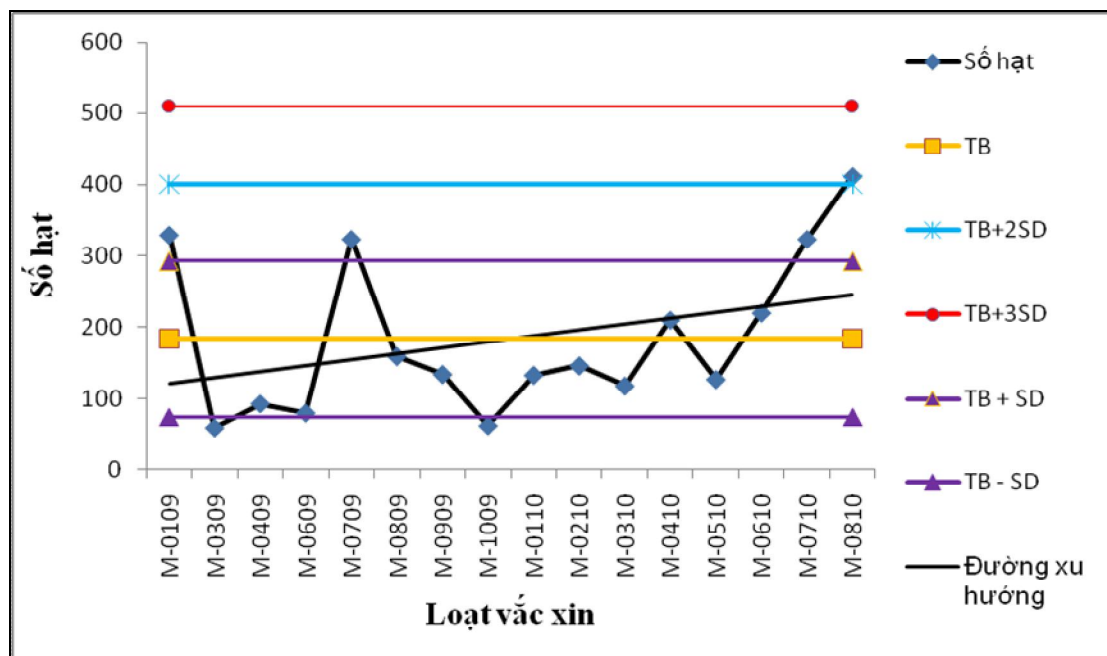
Có một điểm (loạt số M-0810) nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$ (giới hạn hành động), một thời điểm trên 8 điểm liên tục nằm ở một phía đường trung bình. Nguyên nhân của hiện tượng trên bắt nguồn từ việc số hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ chia làm hai giai đoạn rõ rệt: Giai đoạn hai năm đầu khi mới sản xuất (2009-2010) và ba năm tiếp theo (2011-2013).

Bảng 3.17: So sánh số hạt của MVVAC theo từng giai đoạn

	N	$\bar{x} \pm s$	p
Giai đoạn 2009-2010	16	183 \pm 108,9	0,0021
Giai đoạn 2011-2013	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 $P < 0,01$.

Hình biểu diễn số hạt trong từng giai đoạn được biểu diễn trong hình 3.19 và 3.20



Hình 3.19: Số hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giai đoạn 2 năm đầu (2009-2010).

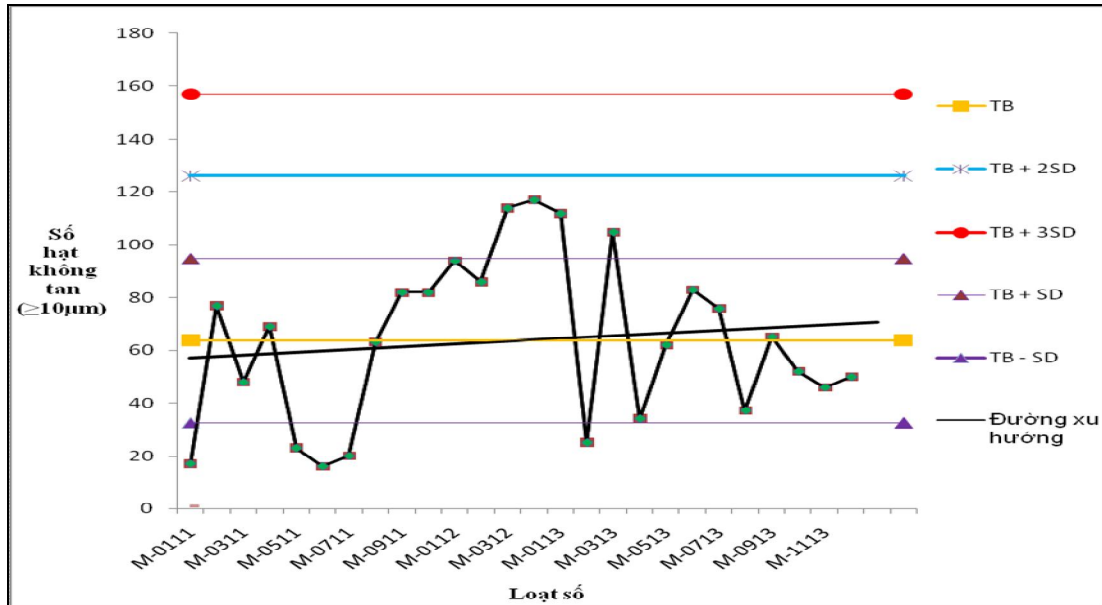
Hai năm 2009-2010 POLYVAC xuất xưởng 16 loạt MVVAC. Theo hình 3.19, số hạt không tan của các loạt MVVAC sản xuất trong giai đoạn này cách rất xa tiêu chuẩn cho phép (6000 hạt/lọ). Theo hình 3.19, loạt M-0810 vẫn nằm trong khoảng (TB + 2SD, TB + 3SD), giới hạn cảnh báo chứ không phải giới hạn hành động.

Đường xu hướng của số hạt ở giai đoạn này có đặc điểm đi lên rất rõ.

Bảng 3.18: Độ ổn định hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giai đoạn giai đoạn 2 năm đầu (2009-2010) theo tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt	Ghi chú
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	x		
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	x		
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$	x		
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	x		
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	x		

Giai đoạn này số hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ của loạt M-0810 vẫn nằm trong khoảng $TB \pm 3SD$.



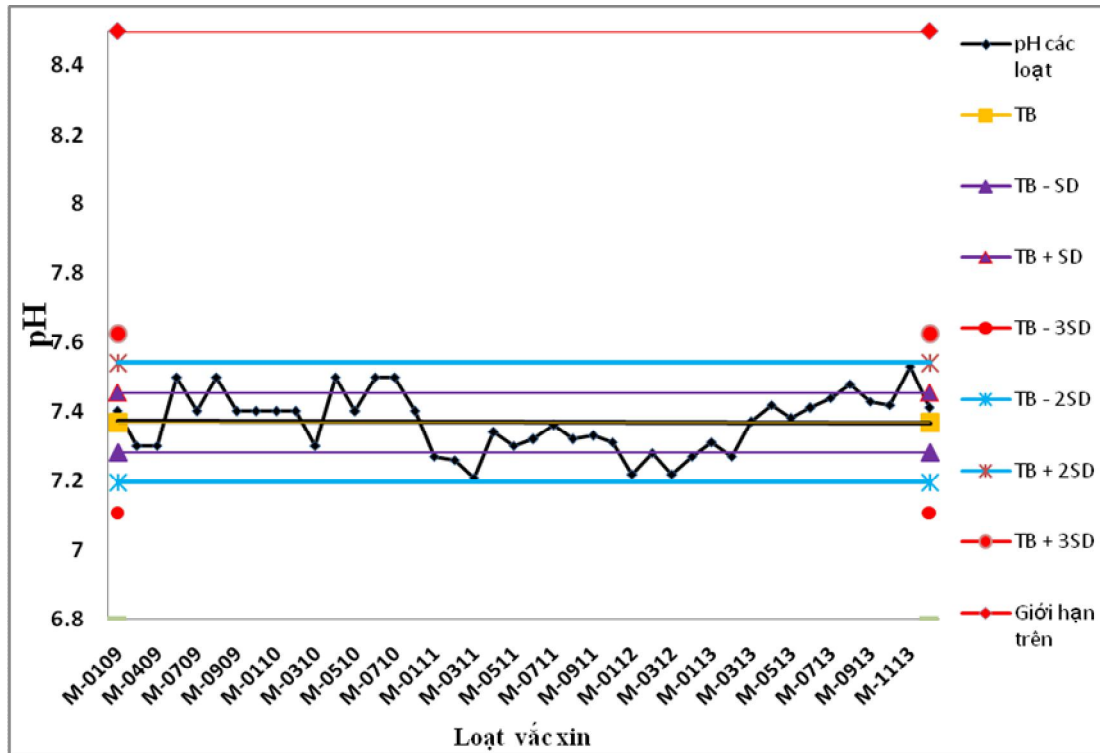
Hình 3.20: Số hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giai đoạn 2011-2013.

Trong 3 năm 2011-2013 POLYVAC xuất xưởng 26 loại MVVAC, số loại đủ lớn để phân tích xu hướng có giá trị theo tiêu chuẩn WHO (trên 20 loại). Theo hình 3.20, số hạt không tan của các loại MVVAC sản xuất trong giai đoạn này cũng cách rất xa tiêu chuẩn cho phép (6000 hạt/lọ) và ổn định.

Bảng 3.19: Độ ổn định hạt kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giai đoạn 2011-2013 theo các tiêu chí của WHO

Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	X	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm SD$	X	
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình	X	

3.1.10. Phân tích tính ổn định pH các loạt MVVAC



Hình 3.21: pH các loạt vắc xin

Các số liệu trên hình 3.21 cho thấy: pH các loạt MVVAC ổn định, đường xu hướng đi sát đường trung bình.

Bảng 3.20: Độ ổn định pH các loạt MVVAC theo các tiêu chí của WHO

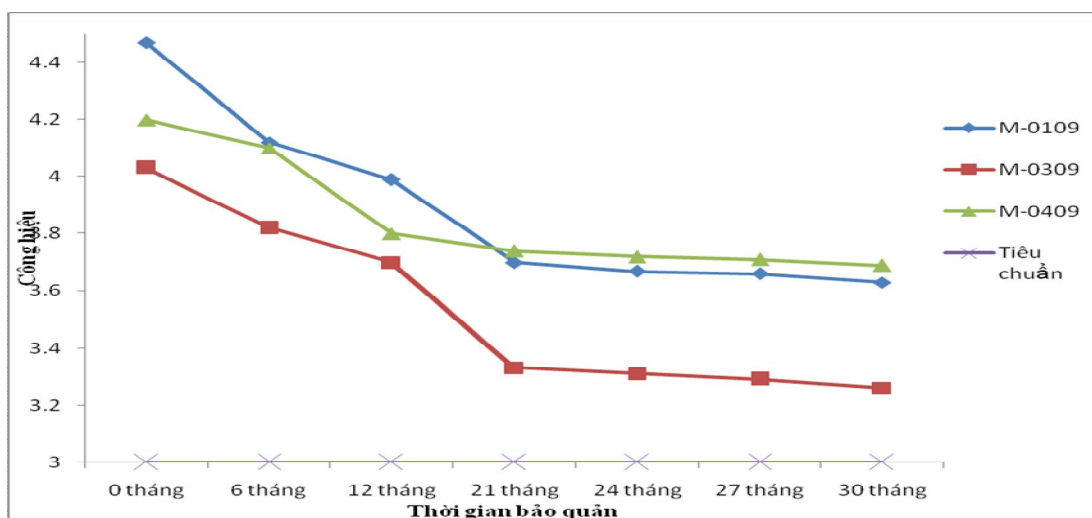
Tiêu chí đánh giá		Đạt	Không đạt
Tiêu chí cơ bản	Không có điểm nào nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$	X	
	Không có hai điểm liên tiếp nằm trong khoảng $(TB+2SD, TB + 3SD)$ hoặc $(TB-2SD, TB - 3SD)$	X	
Tiêu chí ổn định cao	Không có 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$	X	
	Không có trên 6 điểm tăng hoặc giảm liên tiếp	X	
	Không có trên 8 điểm nằm về một phía của đường trung bình		X

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 2-8⁰C

* Kết quả đánh giá công hiệu của MVVAC ở các thời điểm

3 loạt chọn ngẫu nhiên M-0109 sản xuất tháng 02 năm 2009, M-0209 sản xuất tháng 3 năm 2009, M-0409 sản xuất tháng 4 năm 2009 đã được bảo quản ở 2-8⁰C, được đánh giá công hiệu ở các thời điểm: Ngay sau sản xuất, sau 6 tháng, 12 tháng, 18 tháng, 21 tháng, 24 tháng, 27 tháng.



Hình 3.22: Công hiệu của MVVAC bảo quản ở 2-8⁰C theo thời gian

Hình 3.22 cho thấy, sau 27 tháng công hiệu của cả ba loạt vắc xin vẫn trên 3 lg PFU/liều, đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ. Do đó, nếu bảo quản MVVAC ở 2-8⁰C thì sau 2 năm vắc xin vẫn sử dụng được.

Kết quả kiểm tra tất cả các các chỉ số (trừ công hiệu đã có trong hình 3.22) của 3 loạt chọn ngẫu nhiên M-0811, M-0911, M-1011, sản xuất tháng 12 năm 2011 tại thời điểm 27 tháng được trình bày trong bảng 3.21.

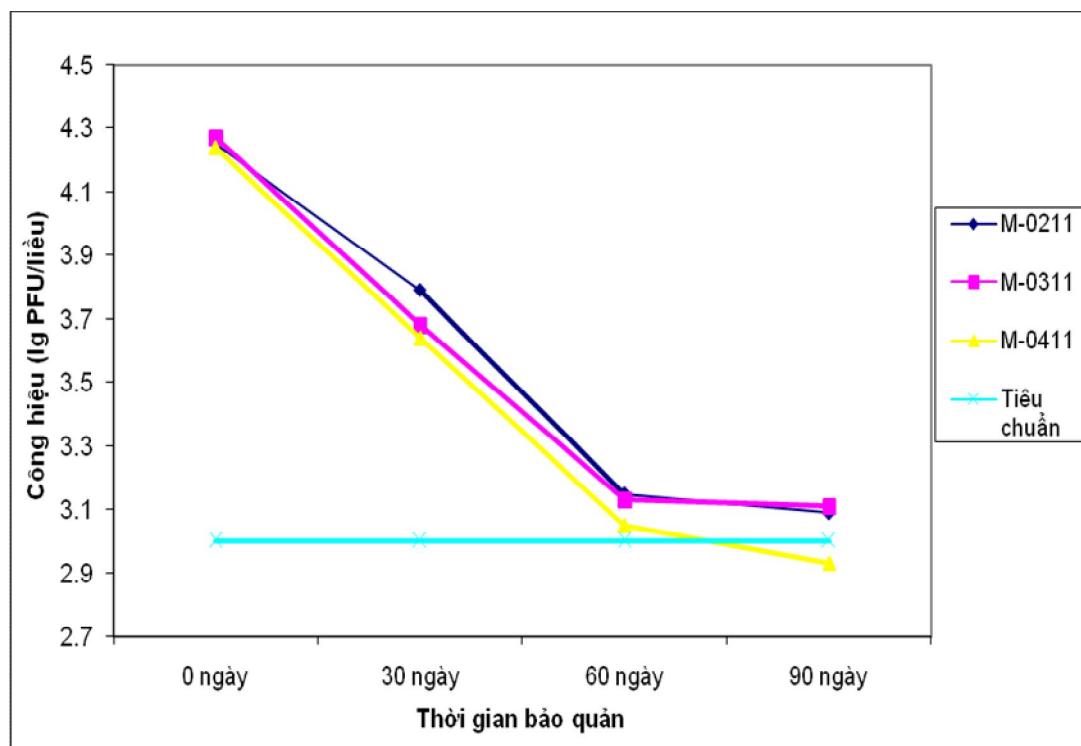
Bảng 3.21: Kết quả kiểm tra tất cả các chỉ số (trừ công hiệu) của 3 loạt tại thời điểm 27 tháng

Loạt số		M-0811		M-0911		M-1011	
Chỉ số		0 tháng	27 tháng	0 tháng	27 tháng	0 tháng	27 tháng
Nhận dạng		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Vô trùng	Vi khuẩn và nấm	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	<i>Mycoplasma</i>	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
An toàn chung	Chuột nhắt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	Chuột lang	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm tồn dư (tiêu chuẩn $\leq 2\%$)		0,60%	1,01%	0,73%	1,06%	0,67%	1,80%
Quan sát trạng thái		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH		7.32	7.30	7.33	7.34	7.31	7.33

Theo bảng 3.21, tại thời điểm 27 tháng, 3 loạt vắc xin sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tất cả các chỉ tiêu chất lượng. Như vậy, hạn sử dụng MVVAC là 2 năm sau khi sản xuất.

3.2.2. Kết quả đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 20-25⁰C

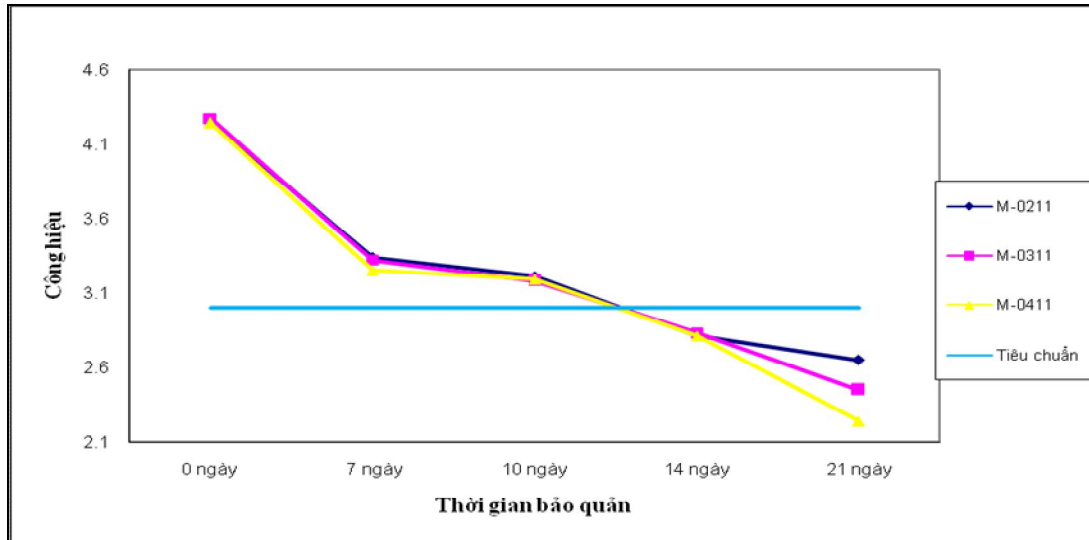
3 loạt chọn ngẫu nhiên M-0211, M-0311, M-0411 sản xuất tháng 3 năm 2011 đã được sử dụng để đánh giá tính ổn định ở 20-25⁰C, 37⁰C và sau hồi chỉnh ở 2-8⁰C.



Hình 3.23: Công hiệu của MVVAC bảo quản ở 25⁰C theo thời gian

Sau 90 ngày bảo quản ở 25⁰C, hai trong 3 loạt vắc xin vẫn có công hiệu trên 3 lg PFU/liều nhưng một loạt công hiệu chỉ còn 2,93 lg PFU/liều. Sau 60 ngày, công hiệu của cả ba loạt MVVAC duy trì công hiệu từ 3,05 lg PFU/liều đến 3,15 lg PFU/liều, đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ. Do đó, nếu bảo quản MVVAC ở 25⁰C thì vắc xin chỉ nên sử dụng trong vòng 60 ngày.

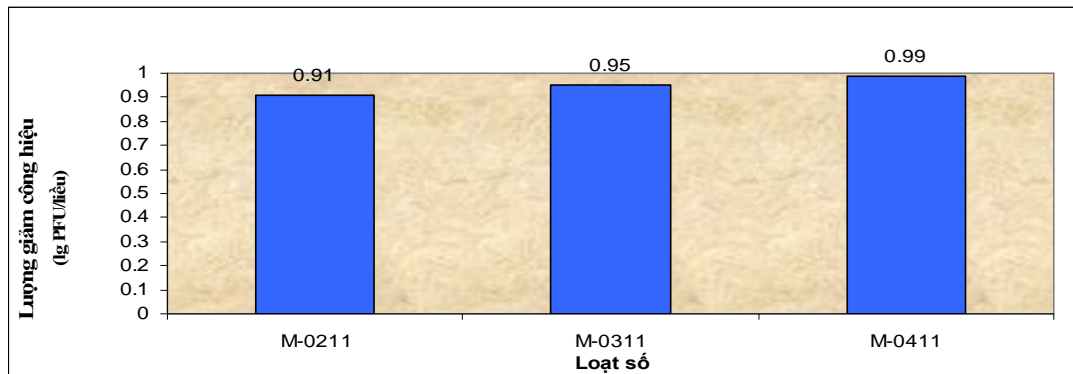
3.2.3. Kết quả đánh giá tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 37⁰C



Hình 3.24: Công hiệu của MVVAC bảo quản ở 37⁰C theo thời gian

Sau 10 ngày bảo quản ở 37⁰C, công hiệu của cả ba loạt MVVAC vẫn lớn hơn 3 lg PFU/liều, đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ. Mức giảm công hiệu của 3 loạt lần lượt là 1,04; 1,09 và 1,05 lg PFU/liều. Độ giảm công hiệu trung bình 1,06 lg PFU/liều.

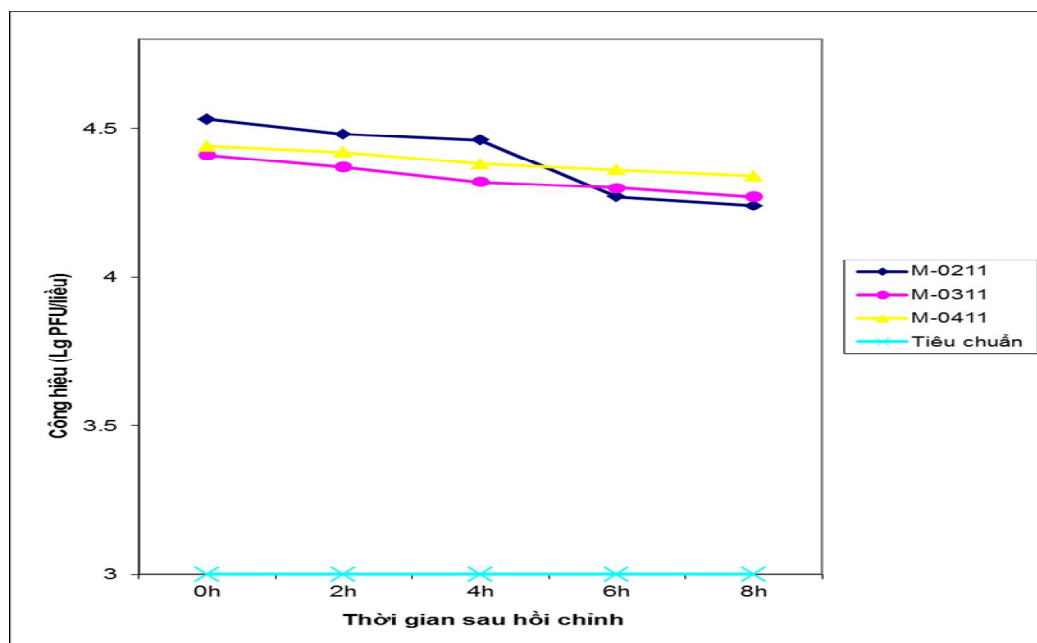
Đến ngày thứ 14, công hiệu của cả 3 loạt đều nhỏ hơn 3 lg PFU/liều. Như vậy, nếu bảo quản MVVAC ở 37⁰C thì vắc xin chỉ nên sử dụng trong vòng 10 ngày.



Hình 3.25: Mức độ giảm công hiệu sau 7 ngày bảo quản ở 37⁰C

Hình 3.25 cho thấy sau 7 ngày bảo quản ở 37⁰ C, công hiệu của cả ba loạt MVVAC giảm từ 0,91 lg PFU/liều đến 0,99 lg PFU/liều, không quá 1 lg PFU/liều, đạt yêu cầu của WHO về tính ổn định nhiệt. Mức độ giảm trung bình là 0,95 lg PFU/liều.

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



Hình 3.26: Công hiệu MVVAC sau hồi chỉnh

Sau hồi chỉnh 8h: Loạt giảm công hiệu cao nhất là 0,29 lg PFU/liều, loạt giảm thấp nhất là 0,1 lg PFU/liều; công hiệu giảm trung bình sau 8 h là 0,18 lg PFU/liều.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Sau hồi chỉnh, công hiệu ba loạt MVVAC đều giảm dần nhưng sau 8 giờ, công hiệu của cả ba loạt vẫn trên 3 lg PFU/liều, vẫn đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ.

3.2.5. Kết quả xác định VVM của MVVAC

Theo các kết quả nghiên cứu đã trình bày ở trên: Hạn sử dụng của vắc xin sởi MVVAC do POLYVAC sản xuất khi bảo quản ở nhiệt độ 37⁰C đạt mức 10 ngày, khi bảo quản ở nhiệt độ 25⁰C đạt mức 60 ngày, ở 2-8⁰C là 2 năm và sau hồi chỉnh ở 2-8⁰C là 8 giờ. Đối chiếu với bảng phân loại VVM của WHO (Bảng 1.3) rút ra kết luận: Chỉ thị nhiệt lọ vắc xin của MVVAC là VVM7.



Hình 3.27: Hình ảnh lọ MVVAC có gắn thử VVM7 trên nắp lọ

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về kết quả xác định tính ổn định chất lượng của các loại vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013

4.1.1. Tác dụng của việc nghiên cứu tính ổn định chất lượng vắc xin, phương pháp sử dụng để nghiên cứu tính ổn định chất lượng vắc xin

Nghiên cứu tính ổn định chất lượng các loại vắc xin có tác dụng cải thiện việc kiểm định chất lượng vắc xin và củng cố khái niệm 3R [89]. Hai cuộc hội thảo do Trung tâm Thẩm định các phương pháp thay thế của Châu Âu (The European Centre for Validation of Alternative Methods: ECVAM) và Hiệp hội lựa chọn các biện pháp tiến tới thay thế các thử nghiệm trên động vật thí nghiệm (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing: EPAA) đã được tổ chức. Hội thảo này đã đưa ra khái niệm về phương pháp nghiên cứu tính ổn định chất lượng và khái niệm 3R, 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).

Dược điển Châu Âu không yêu cầu thực hiện kiểm tra chỉ số an toàn trên động vật thí nghiệm đối với tất cả vắc xin nói chung cũng như vắc xin sởi nói riêng, 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.

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 vắc xin để khẳng định sự

ổn định của quy trình sản xuất và tình hình áp dụng hệ thống chất lượng của nhà máy sản xuất vắc xin sởi của Việt Nam. Phương pháp này cũng được sử dụng trong các nghiên cứu xác định tính ổn định chất lượng khác trên thế giới [87],[92],[93]. 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 [91],[88],[94],[95],[96] hoặc xác định nguyên nhân của sự thay đổi tỷ lệ mắc bệnh trên cộng đồng.

Ví dụ: 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 [88].

Tương tự như vậy, những kết quả đã trình bày trong nghiên cứu này cũng là một cơ sở khoa học quan trọng để xác định nguyên nhân tỷ lệ mắc sởi tăng vọt cuối năm 2013, đầu năm 2014 tại Việt Nam có liên quan đến chất lượng MVVAC hay không.

4.1.2. Cỡ mẫu sử dụng trong nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 42 loạt vắc xin sản xuất liên tục từ năm 2009 đến năm 2013 đã được đánh giá chất lượng. Cỡ mẫu đủ lớn, đạt yêu cầu về độ tin cậy cho nghiên cứu tính ổn định chất lượng theo hướng dẫn của WHO. Theo WHO, để có được sự đánh giá đúng đắn về tính ổn định chất lượng của mỗi vắc xin cần có số liệu của ít nhất 20 loạt, con số lý tưởng cho việc đánh giá này là 40 loạt. Nếu một vắc xin có chất lượng ổn định, từ loạt số 20 trở đi giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của mỗi chỉ số hầu như không thay đổi. Từ loạt thứ 20, người ta có thể giữ nguyên trung bình, độ lệch của chỉ số và xét các loạt tiếp theo dựa trên trung bình và độ lệch đó [86].

Số liệu của loạt M-0209 không được đưa vào phân tích trong nghiên cứu vì trong quá trình sản xuất máy đông khô gặp sự cố. Đây là loạt thứ 2 POLYVAC tự sản xuất từ các công đoạn đầu của quy trình sản xuất. Loạt này vẫn đạt được các tiêu chuẩn xuất xưởng theo qui định của WHO, Dược điển Châu Âu: Công hiệu 4,34 lg PFU/liều; độ ổn định nhiệt 0,84 lg PFU/liều; độ ẩm tồn dư 1,8%; số hạt không tan kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ 113 hạt/lo; số hạt không tan kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ 0 hạt/lo; độ lệch trọng lượng 0,2%; pH 7,2; đạt yêu cầu về các tiêu chuẩn nhận dạng, vô trùng, an toàn trên động vật thực nghiệm. Tuy nhiên, POLYVAC vẫn quyết định huỷ loạt này do lo ngại về tính an toàn của vắc xin. Khi phân tích các số liệu, có thể thấy quyết định đó của POLYVAC rất kịp thời và đúng đắn. Loạt M-0209 có độ ẩm tồn dư nằm ngoài khoảng $TB \pm 3 SD$ (Hình 3.14), cần phải huỷ loạt vắc xin này.

Loạt M-0209 là một ví dụ hết sức sinh động về sự cần thiết của nghiên cứu tính ổn định chất lượng các loạt vắc xin. Mặc dù các thử nghiệm kiểm định đã được thực hiện một cách cẩn trọng ở tất cả các công đoạn của quá trình sản xuất vắc xin: Từ nguyên vật liệu đầu, sản phẩm vi khuẩn hoặc vi rút sau gặt, bán thành phẩm, bán thành phẩm cuối cùng, thành phẩm; mỗi công

đoạn lại được thực hiện trên nhiều chỉ số khác nhau; các loạt vắc xin đã xuất xưởng đều đạt các yêu cầu của các thử nghiệm kiểm định chất lượng nhưng kiểm định chất lượng cũng không thể phản ánh đầy đủ được các khía cạnh của sản phẩm. Do đó, không thể chỉ dựa vào các thử nghiệm kiểm định để đánh giá chất lượng sản phẩm. Kiểm định chất lượng chỉ là một thành phần của hệ thống chất lượng. Vì vậy, cần thiết phải phân tích xu hướng chất lượng các loạt vắc xin để nhắm vào việc giảm các nguy cơ không thể kiểm soát được qua kiểm tra chất lượng sản phẩm [89],[90].

Số liệu của lô M-0509 cũng không được đưa vào phân tích trong nghiên cứu vì lô vắc xin này được sản xuất từ bán thành phẩm nhập khẩu của Viện Kitasato.

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 vắc xin sởi. WHO đưa ra 7 chỉ số: Nhận dạng, công hiệu, độ ổn định nhiệt, độ ẩm tồn dư, an toàn, vô trùng, quan sát trạng thái [125]. 3 chỉ số: Độ lệch trọng lượng, hạt không tan có trong vắc xin sau hoàn nguyên, pH được làm thêm trong nghiên cứu theo khuyến cáo của các chuyên gia Viện Kitasato do quy trình sản xuất MVVAC mới đưa vào hoạt động, chưa đánh giá được tính ổn định.

So với quy định của Dược điển Châu Âu, nghiên cứu cũng tiến hành phân tích nhiều hơn 5 chỉ số. Dược điển Châu Âu đưa ra 6 chỉ số: Nhận dạng, công hiệu, độ ổn định nhiệt, vô trùng, độ ẩm tồn dư và albumin tồn dư [129]. Nghiên cứu không xác định lượng albumin tồn dư cho MVVAC thành phẩm do chỉ số này đã được thực hiện ở vắc xin bán thành phẩm (theo hướng dẫn của WHO).

So với ba tài liệu: 1. Dược điển Nhật Bản, 2. “các yêu cầu tối thiểu của sinh phẩm” (Minimum requirements for biological products) của Viện các

bệnh Truyền nhiễm Quốc gia Nhật Bản (National Institute of Infectious Diseases: NIID) và 3. “yêu cầu tối thiểu của sinh phẩm” của Viện Kitasato, nghiên cứu đã thực hiện nhiều hơn 3 chỉ số: Độ ổn định nhiệt, an toàn, quan sát trạng thái. Dược điển Nhật Bản, Viện các bệnh Truyền nhiễm Quốc gia Nhật Bản, Viện Kitasato chỉ yêu cầu tối thiểu 4 chỉ số: Nhận dạng, công hiệu, độ ẩm tồn dư, vô trùng [126],[127]; không yêu cầu kiểm định độ ổn định nhiệt và an toàn như yêu cầu của WHO.

Nhật Bản không áp dụng tiêu chuẩn tính ổn định nhiệt cho vắc xin sởi vì khí hậu Nhật Bản không phải khí hậu nhiệt đới. Hơn nữa, Nhật Bản có điều kiện kinh tế, có hệ thống tiêm chủng tốt có thể đảm bảo dây chuyền lạnh cho vắc xin, kể cả các vùng xa trung tâm. Mặt khác, vắc xin sởi của Nhật Bản không chứa chất ổn định nhiệt, khó có thể đáp ứng được tiêu chuẩn ổn định nhiệt của WHO (Giảm không quá 1 Lg PFU/liều sau 1 tuần bảo quản ở 37⁰C).

Nhật Bản cũng không đưa chỉ số an toàn vào các yêu cầu kiểm tra chất lượng từng loại vắc xin sởi do Nhật Bản đã có hai nghiên cứu với cỡ mẫu rất lớn về tính an toàn của vắc xin sởi trong 10 năm sử dụng tại đất nước này. Nghiên cứu còn được thực hiện độc lập bởi hai tổ chức: Viện Kitasato và hiệp hội vắc xin sởi Nhật Bản [83].

Chất lượng của vắc xin được thể hiện bởi rất nhiều chỉ số, mỗi chỉ số phản ánh một khía cạnh khác nhau. Việc theo dõi tất cả các chỉ số sẽ không thể thực hiện được mà phải chọn các chỉ số quan trọng, phản ánh bản chất của vấn đề.

Việc xác định các chỉ số để phân tích tính ổn định chất lượng giữa các loại vắc xin tùy thuộc từng loại vắc xin, từng quy trình sản xuất và các thông số trong quá trình sản xuất, loại sản phẩm cần xác định tính ổn định là vắc xin thành phẩm hay bán thành phẩm. Ví dụ: Marcel Thalen và cộng sự khi đánh giá tính ổn định của bán thành phẩm vắc xin ho gà toàn tế bào đã dùng 4 chỉ

số: Trọng lượng khô trong một liều vắc xin, độc tố ho gà (pertussis toxin: PT), kháng nguyên ngưng kết hồng cầu dạng sợi (filamentous heameagglutinin: FHA), khả năng sinh miễn dịch trên chuột. Với bán thành phẩm cuối cùng dùng 1 chỉ số: Công hiệu trên chuột thí nghiệm [96].

So với các nghiên cứu khác về tính ổn định chất lượng giữa các loạt của một số vắc xin sản xuất tại Việt Nam, số lượng các chỉ số thực hiện trong nghiên cứu này nhiều hơn [97],[98],[99]. Các nghiên cứu khác của Việt Nam khi phân tích thống kê chỉ dựa vào một chỉ số: Công hiệu của vắc xin. Hơn nữa, các nghiên cứu đó chỉ sử dụng khoảng $TB \pm 2SD$ để đánh giá tính ổn định chất lượng vắc xin; 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 vắc xin như nghiên cứu này. Chúng tôi đã áp dụng các hướng dẫn mới nhất của WHO về đánh giá tính ổn định chất lượng của vắc xin cho nghiên cứu này.

Đề cương nghiên cứu không đưa ra mục tiêu xác định chỉ số tính ổn định nhiệt cho từng loạt vắc xin. Khi thực hiện nghiên cứu, chúng tôi thực hiện thêm chỉ số này để đánh giá mức độ ổn định nhiệt của vắc xin. Chứng minh được tính ổn định nhiệt của tất cả các loạt vắc xin sản xuất qua nhiều năm sẽ cung cấp cơ sở khoa học vững chắc cho việc sử dụng MVVAC tại Việt Nam, nước có khí hậu nhiệt đới mà lại thiếu trang thiết bị bảo quản lạnh, có nhiều vùng địa lý khó khăn.

Tính ổn định với nhiệt độ cao của MVVAC làm tăng tỷ lệ tiêm chủng trong những ngày tiêm chủng toàn quốc do tận dụng được việc sử dụng vắc xin ngoài dây chuyền lạnh theo khuyến cáo của WHO và UNICEF; vắc xin có thể đi đến các vùng núi cao, vùng sâu, vùng xa, vùng hải đảo xa xôi, vùng biệt lập, thiếu điện, thiếu tủ lạnh.

Ở các vùng biệt lập, nếu người dân không được tiêm vắc xin, số người nhiễm sởi sẽ tích lũy đến một số lượng nào đó và dịch sẽ xảy ra. Diễn hình của các vụ dịch ở các vùng biệt lập là gần như 100% dân cư đều mắc sởi trừ những người già còn sống sót từ những vụ dịch trước. Người dân ở đây cũng là nguồn lây nhiễm cho các cộng đồng khác.

Tính ổn định với nhiệt độ cao này cũng tránh được việc lãng phí do vất bỏ các lọ vắc xin không được bảo quản đúng nhiệt độ khuyến cáo trong các sự cố mất điện do thảm họa thiên nhiên như động đất, lũ lụt.

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 loại MVVAC đều theo thường quy của WHO [125], Dược điển Châu Âu [129],[131], hoặc Nhật Bản [126],[127],[128], 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.

- **Nhận dạng**

Mục đích của thử nghiệm nhận dạng là để xác định xem vắc xin có chứa loại kháng nguyên đã đăng ký hay không. Thử nghiệm nhận dạng có thể được thực hiện trực tiếp bằng cách tìm kháng nguyên hoặc gián tiếp thông qua tìm kháng thể đặc hiệu. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang sử dụng để nhận dạng kháng nguyên sởi có trong vắc xin có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, được sử dụng ở hầu hết các phòng kiểm định vắc xin sởi trên thế giới.

- **Công hiệu**

Kết quả phân tích cho thấy công hiệu MVVAC ổn định, hơn nữa công hiệu là chỉ số quan trọng nhất để đánh giá chất lượng vắc xin, nó góp phần

quan trọng nhất để kết luận MVVAC có chất lượng ổn định cao. Việc chỉ có hai loạt vào những năm 2009 và 2010, khi POLYVAC mới bắt đầu sản xuất MVVAC từ những công đoạn đầu tiên của quá trình sản xuất, rơi vào khoảng (TB-2SD, TB-3 SD) chứng tỏ chất lượng MVVAC ngày càng ổn định, POLYVAC ngày càng làm chủ được quy trình sản xuất. Giai đoạn trước, MVVAC được sản xuất từ bán thành phẩm của viện Kitasato.

Trong các tiêu chuẩn để đánh giá tính ổn định cao, có 1 tiêu chuẩn MVVAC không đạt được: Một thời điểm 4 trong 5 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$, tuy nhiên, đây là 4 loạt được sản xuất trong cùng một đợt M-0913, M-1013, M-1113, M-1213.

Công hiệu của vắc xin sợi có thể được tính theo 3 phương pháp: PFU, FFU (focus forming unit) hoặc $CCID_{50}$ (50% cell culture-infective dose: Liều gây nhiễm 50% tế bào). Phương pháp xác định công hiệu và độ ổn định nhiệt bằng tạo đám huỷ hoại tế bào để nghiên cứu tính ổn định của vắc xin sợi đã được thẩm định ở nhiều quốc gia [139]; nó cũng dễ thực hiện, dễ đánh giá kết quả và có độ chính xác cao [140].

Nghiên cứu này xác định công hiệu và độ ổn định nhiệt bằng phương pháp tạo đám huỷ hoại tế bào trên phiên 6 giếng do chủng AIK-C tạo các ô huỷ hoại nhỏ hơn so với các chủng sợi khác [67]. Trên phiên 6 giếng, kích thước mỗi giếng lớn để quan sát các PFU hơn, để đếm số lượng hơn, cho kết quả chính xác hơn.

Về mẫu chuẩn, trong thử nghiệm xác định công hiệu và tính ổn định nhiệt MVVAC, nghiên cứu sử dụng vắc xin mẫu chuẩn M01-07 do POLYVAC sản xuất theo quy trình của Viện Kitasato; dùng vắc xin mẫu chuẩn do Viện Kitasato cung cấp để đánh giá chất lượng mẫu chuẩn M01-07 dưới sự giám sát của các chuyên gia Viện Kitasato. Nghiên cứu không dùng vắc xin mẫu chuẩn quốc tế do giá thành rất đắt, việc tạo được một loạt vắc xin

mẫu chuẩn quốc tế rất tốn kém, mất thời gian, cần sự tham gia của nhiều phòng thí nghiệm kiểm định vắc xin sợi trên thế giới. Theo chính sách của WHO, vắc xin mẫu chuẩn quốc tế chỉ nên dùng để nối chuẩn trong quá trình tạo mẫu chuẩn quốc gia, không dùng vắc xin mẫu chuẩn quốc tế cho các thử nghiệm thường xuyên. Hàng năm, vắc xin mẫu chuẩn quốc tế chỉ phân phối cho Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (Viện Kiểm định Quốc gia) với số lượng hạn chế. Viện này có trách nhiệm xây dựng mẫu chuẩn quốc gia để sử dụng trong Viện cũng như phân phối cho các nhà sản xuất trong nước. Hiện nay, Việt Nam chưa có vắc xin mẫu chuẩn quốc gia sợi.

- Độ ổn định nhiệt

Theo hình 3.5 đường xu hướng là một đường nằm ngang và đi sát đường trung bình chứng tỏ tất cả các loạt MVVAC có độ giảm công hiệu đồng đều. Hơn nữa, không có loạt nào vượt ra ngoài khoảng $TB + 2SD$, chứng tỏ vắc xin có tính ổn định nhiệt cực kỳ cao.

- Vô trùng

Thử nghiệm vô trùng là thử nghiệm cơ bản nhất trong kiểm định vắc xin [141]. Qui trình phải được chuẩn bị cũng như thực hiện một cách nghiêm ngặt sao cho loại trừ được các kết quả dương tính giả và âm tính giả [142]. Trong nghiên cứu này các các chứng âm và chứng dương của thử nghiệm vô trùng đều được thực hiện để loại trừ các kết quả âm tính giả và dương tính giả.

*** Kiểm tra vô trùng vi khuẩn và nấm**

Trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin, nếu có dấu hiệu phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường: Rất khó phân biệt nhiễm này do bản thân vắc xin hay nhiễm từ ngoài vào trong quá trình thực hiện thử nghiệm. Ngược lại, nếu bỏ sót một loạt vắc xin nhiễm trùng do môi trường

nuôi cấy không đảm bảo cho vi khuẩn nấm phát triển sẽ dẫn đến hậu quả khôn lường do mỗi loạt MVVAC sẽ tiêm cho hơn 150.000 người. Vì vậy, nghiên cứu đã thực hiện đầy đủ các chứng âm (Kiểm tra tính vô trùng của môi trường nuôi cấy, giám sát môi trường phòng sạch) và chứng dương (thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường) làm tăng tính tin cậy của kết quả nghiên cứu cũng như đảm bảo an toàn cho người dân.

Nghiên cứu sử dụng hai môi trường FTM và SCDB để kiểm tra vi khuẩn và nấm trong vắc xin. Hai môi trường này có nhiều ưu điểm và được hầu hết các phòng kiểm định vắc xin trên thế giới sử dụng cho thử nghiệm vô trùng [131],[143],[144]. Yếu tố này góp phần tăng tính tin cậy của kết quả nghiên cứu.

Về phương pháp sử dụng trong nghiên cứu: Hiện nay, trên thế giới có hai phương pháp kiểm tra vô trùng vắc xin: Phương pháp màng lọc và phương pháp cấy trực tiếp. Chúng tôi sử dụng phương pháp màng lọc do phương pháp này ưu việt hơn, làm tăng tính tin cậy của kết quả nghiên cứu. Phương pháp màng lọc cũng được sử dụng rộng rãi trên thế giới, đặc biệt ở các nước phát triển [131],[143],[144].

Phương pháp màng lọc có ưu điểm: Chính xác hơn do kiểm tra được toàn bộ lượng vắc xin trong các lọ, ít bị nhiễm từ ngoài vào do sử dụng những hệ thống kín. Phương pháp này còn tiết kiệm thời gian, công sức do chỉ cần 1 lọ FTM và 1 lọ SCDB; nó đặc biệt thích hợp cho những vắc xin được đóng trong những lọ có thể tích lớn hơn 2 mL như MVVAC, những vắc xin có chứa chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn, nấm. Tuy nhiên, phương pháp màng lọc cũng có nhược điểm: Đắt tiền; không áp dụng được cho một số vắc xin, ví dụ các vắc xin chứa nhôm sẽ không đi qua được màng lọc. MVVAC không chứa nhôm nên vẫn áp dụng được phương pháp này.

Ngược lại, phương pháp cấy trực tiếp có ưu điểm: Rẻ tiền; dễ áp dụng, không đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền; áp dụng được cho hầu hết các vắc xin. Tuy nhiên nó có nhược điểm: Ít chính xác do chỉ kiểm tra được một phần vắc xin trong mỗi lọ, đặc biệt trong những trường hợp các lọ vắc xin có thể tích lớn như MVVA (chỉ lấy 2 mL trong 5 mL mỗi lọ để kiểm tra); dễ bị nhiễm từ ngoài vào do trong quá trình thực hiện thử nghiệm phải mở nút các lọ vắc xin và các ống môi trường; tốn nhiều thời gian, công sức do phải dùng rất nhiều các ống môi trường (thông thường 40 ống/loạt vắc xin), nhiều pipet (khoảng 20-40 pipet/loạt).

100% số loạt MVVAC đều đạt yêu cầu vô trùng với vi khuẩn và nấm chúng tỏ POLYVAC giám sát được môi trường sản xuất để MVVAC không bị nhiễm vi khuẩn và nấm từ môi trường bên ngoài; tất cả các nguyên vật liệu, dụng cụ, hoá chất, môi trường nuôi cấy tham gia vào quá trình sản xuất từ công đoạn sau lọc đều vô trùng.

*** Kiểm tra *Mycoplasma***

Mycoplasma là nguyên nhân gây nhiễm chủ yếu các tế bào nuôi, tỷ lệ này lên tới 15%, đặc biệt các tế bào cấy chuyển nhiều lần [145],[146]. Trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin, ngoài nội dung kiểm tra sự có mặt của nấm và vi khuẩn nói chung, các vắc xin mà trong quá trình sản xuất có công đoạn nuôi cấy tế bào còn phải được kiểm tra xem có nhiễm *Mycoplasma* hay không [147]. Trong quy trình sản xuất MVVAC, chủng vi rút sản xuất được nhân lên trên tế bào phôi gà tiên phát. Tuy vậy, cần thiết phải kiểm tra xem vắc xin này có nhiễm *Mycoplasma* hay không.

Phương pháp kiểm tra vi khuẩn và nấm nói chung (mô tả trong mục 2.5.4.1) không phát hiện được *Mycoplasma* do chúng đi qua được màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 μm . Hơn nữa, *Mycoplasma* cũng không phát triển

được trên hai môi trường FTM và SCDB nên cần có một quy trình riêng để phát hiện *Mycoplasma*.

Về phương pháp, chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy để phát hiện *Mycoplasma* trong MVVAC. WHO, Dược điển Châu Âu, Dược điển Mỹ, Dược điển Nhật Bản cũng như nhiều tài liệu khác đều coi nuôi cấy là phương pháp chính thức, lựa chọn hàng đầu cho việc phát hiện *Mycoplasma* trong vắc xin thành phẩm. Các phương pháp khuếch đại acid nucleic (Nucleic amplification technique: NAT) như PCR chỉ được sử dụng thay thế cho phương pháp trên sau khi đã được thẩm định về độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện và độ mạnh [45, 51],[55],[147].

Hơn nữa, phương pháp nuôi cấy có độ nhạy cao, phát hiện được từ 1 CFU trong vắc xin [145]. Trong khi đó, giới hạn phát hiện của phương pháp dùng chỉ thị tế bào (Còn gọi phương pháp nhuộm DNA của Hoechst) cũng như PCR là 10 CFU/mL [145],[55]. Độ đặc hiệu của phương pháp nuôi cấy cũng cao hơn PCR do PCR không thể phân biệt được DNA xác định được có phải của vi khuẩn sống hay không.

100% số loạt MVVAC đạt yêu cầu về tiêu chuẩn không bị nhiễm *Mycoplasma*. Một trong các yếu tố quan trọng để MVVAC đạt được yêu cầu của chỉ số trên xuất phát từ chất lượng trứng gà dùng để tạo tế bào phôi gà một lớp trong quá trình nhân chủng vi rút sản xuất. Các trứng được kiểm tra không chứa *Mycoplasma* mới được đưa vào quá trình sản xuất. Ngoài ra, để đạt được kết quả trên, POLYVAC còn thực hiện song song với tế bào chứng âm (ít nhất 500 ml hoặc 5% số tế bào được nuôi cấy song song để làm chứng). Các tế bào này được theo dõi ít nhất 14 ngày kể từ ngày cấy vi rút vào tế bào dùng cho sản xuất hoặc theo dõi cho đến khi kết thúc mẻ gặt cuối cùng.

- An toàn chung

Quy trình kiểm tra tính an toàn trong nghiên cứu này cũng được hầu hết các nhà kiểm định vắc xin trên thế giới sử dụng cho kiểm tra tính an toàn chung tất cả các vắc xin chứ không chỉ dùng riêng cho vắc xin sởi. Việc thực hiện theo quy trình không phức tạp, số lượng chuột không quá lớn. Cái khó của thử nghiệm nằm ở chỗ có được các động vật thí nghiệm có chất lượng ổn định. Để đạt được yêu cầu trên, chuột phải có nguồn gốc rõ ràng, lịch sử lai ghép được ghi lại, theo dõi được tình trạng sức khỏe cũng như cân nặng của động vật trước khi đưa vào thí nghiệm,... Trọng lượng chuột thí nghiệm rất đồng đều (18-20 gram đối với chuột nhắt và 200-250 gram đối với chuột lang) cũng là một khó khăn để có đủ số lượng động vật thí nghiệm trong thử nghiệm này.

Chuột trước và trong khi diễn ra thử nghiệm được nuôi và theo dõi trong hệ thống nhà xưởng kín, đã được WHO đánh giá và cấp chứng nhận đạt tiêu chuẩn GMP.

Trọng lượng chuột tăng phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố và rất khó kiểm soát. Có yếu tố bắt nguồn từ bản thân chuột như nguồn gốc lai tạo, tình trạng sức khỏe trước khi đưa vào thí nghiệm; có yếu tố do môi trường trong khi thực hiện thí nghiệm như nhiệt độ, độ ẩm, chế độ dinh dưỡng, lây bệnh từ chuột khác,...

Tuy nhiên, kết quả phân tích tăng trọng chuột nhắt đưa lại bất ngờ lớn khi tất cả các loạt đều có độ tăng trọng nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$. Việc không có loạt MVVAC nào có tăng trọng chuột lang nằm ngoài khoảng $TB \pm 3SD$, chỉ có 2 loạt rời rạc nằm trong khoảng $(TB + 2SD, TB + 3SD)$ và khoảng $(TB - 2SD, TB - 3SD)$ cũng là một thành công ngoài dự đoán.

Sự tăng trọng của nhóm chuột tiêm vắc xin và hai nhóm chuột chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê cả ở chuột lang và chuột nhắt trắng chứng tỏ MVVAC có tính an toàn cao.

- Độ ẩm tồn dư

Trên thế giới, độ ẩm tồn dư của vắc xin đông khô được xác định bởi hai phương pháp: Xác định hao hụt trọng lượng của vắc xin khi làm khô (loss on drying test) như trong nghiên cứu này và phương pháp xác định hàm lượng nước trong vắc xin bằng phương pháp Karl Fischer (water determination test). Có thể sử dụng một hoặc cả hai phương pháp trên để đánh giá chất lượng vắc xin. Tuy nhiên, nếu nghi ngờ kết quả hoặc kết quả của hai phương pháp khác nhau, chọn kết quả của phương pháp xác định hao hụt trọng lượng của vắc xin khi làm khô [135].

Cân LE 244s của hãng Satorius đã được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá độ ẩm tồn dư. Satorius là nhà cung cấp cân có uy tín hàng đầu trên thế giới, LE244s có sai số chỉ ở mức $\pm 0,1$ mg. Hơn nữa, cân được hiệu chuẩn thường kỳ mỗi năm một lần nên kết quả phân tích độ ẩm tồn dư có độ chính xác cao.

Đường xu hướng là một đường đi lên do giai đoạn đầu POLYVAC duy trì độ ẩm tồn dư thấp, có ba loạt độ ẩm tồn dư chỉ ở mức 0,3%. Cũng vì thế mà ở giai đoạn đầu có một thời điểm có 4 điểm liên tiếp nằm ngoài khoảng $TB \pm 1SD$, có 8 điểm liên tiếp nằm về 1 phía của đường trung bình. Càng về sau, độ ẩm tồn dư càng ổn định hơn chứng tỏ nhà sản xuất làm chủ tốt hơn hệ thống đông khô.

Độ ẩm tồn dư có ảnh hưởng lớn đến tính ổn định nhiệt của vắc xin đông khô. Tác giả Bùi Tấn Đợi và Lê Văn Hiệp khi nghiên cứu về mối tương quan giữa độ ẩm tồn dư và tính ổn định nhiệt của vắc xin sống, đông khô BCG đã rút ra kết luận độ ẩm tồn dư của BCG có mối tương quan tuyến tính

ngịch với độ ổn định nhiệt [148]. Độ ẩm tồn dư của MVVAC ổn định, như kết quả nghiên cứu đã chỉ ra, sẽ củng cố độ ổn định nhiệt của vắc xin này.

- Trạng thái bánh vắc xin

Quan sát trạng thái vắc xin là một thử nghiệm đơn giản nhưng cũng không kém phần quan trọng. Có những trường hợp, chưa cần làm các thử nghiệm phức tạp đã kết luận được một loạt vắc xin không đạt yêu cầu vì không đạt tiêu chuẩn trong thử nghiệm quan sát trạng thái lọ vắc xin.

Kết quả quan sát 420 lọ vắc xin cho thấy tất cả các bánh vắc xin trong các lọ này đều có hình trụ, tròn đều, không bị vỡ, không bị sùi chứng tỏ quy trình đông khô hoạt động tốt và rất ổn định. Vắc xin sau hồi chỉnh trong suốt, không hề có dị vật chứng tỏ các dung dịch đưa vào vắc xin sau giai đoạn lọc, dung dịch hồi chỉnh có độ tinh khiết cao. Quy trình sản xuất nước hồi chỉnh cũng như nguồn nước sử dụng tại POLYVAC đã được kiểm soát tốt.

- Độ lệch trọng lượng

Cân LE 244s của hãng Satorius cũng đã được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin trong cùng một loạt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin có tính ổn định rất cao chứng tỏ tính ổn định của quy trình đóng ống, nó đã tạo ra các lọ vắc xin có trọng lượng đồng đều. WHO cũng như Dược điển Châu Âu không yêu cầu xác định chỉ số này. POLYVAC thực hiện việc này để giám sát quy trình đóng ống.

- Hạt không tan trong vắc xin

Kết quả nghiên cứu cho thấy số hạt có trong vắc xin là rất nhỏ và cách rất xa tiêu chuẩn cho phép.

Đường xu hướng số hạt kích thước $\geq 10\mu\text{m}$ từ năm 2009 đến năm 2013 đi xuống với độ dốc cao, chứng tỏ số lượng hạt càng ngày càng giảm.

Từ năm 2011 số hạt này giảm so với giai đoạn trước một cách có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Cũng chính vì lý do này mà loạt M-0810 đã vượt ra ngoài khoảng $TB \pm 3SD$ trong đồ thị phân tích xu hướng hạt 5 năm 2009-2013; trong khi đó, loạt này vẫn nằm trong khoảng $TB \pm 3SD$ trong đồ thị phân tích các loạt giai đoạn 2009-2010. Nghiên cứu này cũng cho thấy, POLYVAC đã kịp thời kiểm soát số hạt tạo ra trong quá trình sản xuất.

WHO, Dược điển Châu Âu [129] cũng không bắt buộc kiểm tra số hạt không tan có trong vắc xin. Nghiên cứu này tiến hành kiểm tra số lượng hạt trong MVVAC nhằm giám sát nhiều yếu tố trong quá trình sản xuất: Độ tinh khiết của các nguyên vật liệu tham gia vào quá trình sản xuất như môi trường M-199 dùng pha loãng vắc xin trong công đoạn từ vắc xin bán thành phẩm đến vắc xin bán thành phẩm cuối cùng; giám sát nguồn nước cũng như chất lượng nước hồi chỉnh; giám sát việc tạo hạt trong quá trình đóng ống, quá trình đông khô; hạt tạo ra giữa thành phần vắc xin và thành phần của nút cao su; hạt không tan được sau khi hồi chỉnh;...Sau hai năm sản xuất MVVAC, POLYVAC kiểm soát được hạt không tan tốt hơn giai đoạn đầu. Điều này bắt nguồn từ việc POLYVAC càng ngày càng kiểm soát được các yếu tố trong quá trình sản xuất.

- pH

PH cũng là một chỉ số mà WHO không bắt buộc trong kiểm định chất lượng vắc xin sởi. Để có được pH của tất cả các loạt nằm trong khoảng $TB \pm 2SD$ chứng tỏ tất cả các nguyên vật liệu, hoá chất, môi trường, nước pha tiêm,...tham gia vào quá trình sản xuất có pH rất ổn định.

Vi rút sởi nhạy cảm cao với pH, việc pH ổn định cũng góp phần làm tăng tính ổn định của MVVAC, đặc biệt giai đoạn sau hồi chỉnh.

Tóm lại, tất cả các số liệu thu được trong nghiên cứu đã chứng tỏ chất lượng các loạt MVVAC sản xuất trong 5 năm qua có chất lượng ổn định.

Tính ổn định về chất lượng của các loại MVVAC chứng tỏ sự ổn định của quy trình sản xuất, đây cũng là điều kiện quan trọng để POLYVAC có thể xuất khẩu vắc xin.

WHO không yêu cầu thực hiện các tiêu chí độ lệch trọng lượng, pH, hạt không tan trong vắc xin 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. Độ lệch trọng lượng được thực hiện để giám sát tính ổn định của quy trình đóng ống; kiểm tra pH để giám sát các nguyên liệu tham gia vào quá trình sản xuất cũng như chất lượng nước hồi chính; đếm hạt không tan trong vắc xin để giám sát độ tinh khiết các hoá chất, môi trường...

Theo kết quả nghiên cứu, độ lệch trọng lượng, pH của MVVAC rất ổn định; từ năm 2011, POLYVAC kiểm soát tốt hơn số hạt không tan trong vắc xin; 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 nhằm giảm chi phí, thời gian mà vẫn đảm bảo chất lượng sản phẩm, tuân thủ đúng quy định của WHO.

4.1.5. Các yếu tố góp phần duy trì 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.

Chất lượng vắc xin bị ảnh hưởng bởi bốn nhóm nguyên nhân chính trong quá trình sản xuất: Con người, trang thiết bị, nguyên vật liệu, môi trường sản xuất. Quá trình sản xuất vắc xin trải qua nhiều công đoạn, các công đoạn này cũng khác nhau tùy thuộc loại vắc xin. Các nguyên vật liệu đầu, môi trường sử dụng trong quá trình nuôi cấy; các chỉ số của quá trình sản xuất như thời gian đông khô, thời gian bất hoạt,... đều ảnh hưởng đến chất lượng vắc xin. Vì vậy, để tạo ra các vắc xin có chất lượng ổn định từ loạt này

đến loạt khác là cả một quá trình phức tạp, đòi hỏi sự ổn định ở tất cả các công đoạn, các yếu tố.

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.

Tất cả nhân viên của POLYVAC đều có bằng cấp chuyên môn phù hợp; được đào tạo tỉ mỉ, cụ thể về các kỹ thuật/công việc mà họ sẽ thực hiện; được đánh giá tay nghề một cách chặt chẽ về các kỹ thuật. Quá trình đào tạo, đánh giá đều được lưu hồ sơ bằng các biểu mẫu chi tiết. Viện Kitasato, Nhật Bản, nơi chuyên giao công nghệ sản xuất MVVAC cho POLYVAC cũng chính là nơi đào tạo các cán bộ POLYVAC trước khi nhà máy sản xuất MVVAC vận hành. Khi nhà máy bắt đầu vận hành, các chuyên gia của Viện Kitasato sang tận nơi để đào tạo, đánh giá năng lực thực hiện từng công việc của các cán bộ tham gia vào quá trình sản xuất, kiểm định MVVAC.

Về nguyên vật liệu, mỗi nguyên vật liệu sử dụng trong quá trình sản xuất, kiểm định MVVAC đều có chứng chỉ phân tích chất lượng (COA: Certificate of Analysis). POLYVAC lựa chọn những nhà cung cấp nguyên vật liệu có uy tín trên thế giới, rất nhiều trong số đó là các công ty Nhật Bản như Iwai, Nisui, Wako,...

Việc sản xuất một vắc xin cần rất nhiều loại nguyên vật liệu, bao gồm: Nguyên vật liệu đầu, nguyên vật liệu trung gian, nguyên vật liệu đóng gói. Nguyên vật liệu đầu trong quá trình sản xuất MVVAC bao gồm: Chủng sản xuất, tế bào dùng để vi rút nhân lên, huyết thanh sử dụng để nuôi cấy tế bào, trypsin dùng để tách tế bào,...Nguyên vật liệu đầu là những yếu tố tạo nên thành phần của sản phẩm nên có ảnh hưởng quan trọng nhất đến chất lượng sản phẩm.

Chủng sản xuất là yếu tố quan trọng bậc nhất trong sản xuất vắc xin. Chủng AIK-C dùng trong sản xuất MVVAC do Viện Kitasato cung cấp, có hồ sơ lưu ghi rõ nguồn gốc và lịch sử cấy chuyển. Các nghiên cứu đã chỉ rõ bộ gen của các chủng vi rút dùng trong sản xuất vắc xin sởi rất ổn định sau các lần cấy chuyển, điều này góp phần duy trì tính ổn định của vắc xin [149]. Tuy nhiên, không vì thế mà cấy chuyển các chủng quá nhiều lần. WHO, Dược điển Châu Âu cũng như nhiều tài liệu khác đều quy định chủng vi rút trong vắc xin thành phẩm không được cấy chuyển quá 5 lần từ chủng mẹ (master seed lot) [129]. Từ khi bắt đầu sản xuất vào năm 2007, POLYVAC cũng không thay đổi chủng sản xuất, một yếu tố quan trọng góp phần vào tính ổn định của vắc xin.

Tế bào phôi gà dùng nhân chủng vi rút sản xuất MVVAC là dòng tế bào thích hợp nhất, hiệu quả nhất cho sản xuất vắc xin sởi sống giảm độc lực [125]. Tế bào này được nuôi cấy từ trứng gà không chứa mầm bệnh (Specific Pathogen Free: SPF) nhập khẩu của Công ty Valo, Đức. Trứng này đã được kiểm tra trên 20 tác nhân ngoại lai để loại trừ hầu hết các nguyên nhân có thể gặp như: *Mycobacterium avium*, đậu mùa gà, retrovirus gây bệnh ở chim, vi rút gây bệnh Newcastle, cúm, á cúm, viêm não, viêm thanh khí phế quản, adenovirus, *Haemophilus paragallinarum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*,...

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 cũng đã được chứng minh [150],[151]. Công ty Valo có điều kiện chuồng trại, vệ sinh, quy trình chăn nuôi, qui trình kiểm tra phát hiện tác nhân gây bệnh, điều kiện vận chuyển tốt để có thể cung cấp trứng gà với số lượng và chất lượng đảm bảo và ổn định [150], góp phần vào tính ổn định của MVVAC.

Các 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, VD: Cân phân tích của Satorius, màng lọc của Milipore, pipet của Gilson,... và rất nhiều sản phẩm của các công ty Nhật Bản sản xuất như lò hấp Hirayama, bơm chân không Hitachi,... giống như đã liệt kê trong mục 2.4. Vật liệu nghiên cứu.

Các hệ thống, 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. Khi nhà máy bắt đầu đi vào hoạt động, các chuyên gia của Viện Kitasato đã trực tiếp thẩm định, hiệu chuẩn các hệ thống, thiết bị, dụng cụ dùng trong sản xuất, kiểm định cũng như đào tạo cho các cán bộ POLYVAC thực hiện các công việc này. Sau đó, việc tái thẩm định định kỳ các hệ thống, trang thiết bị, dụng cụ,... do các cán bộ POLYVAC đảm nhiệm. Các kết quả thẩm định, hiệu chuẩn đều được lưu lại bằng các biểu mẫu chi tiết.

Môi trường sản xuất, kiểm định được chú trọng thông qua việc thiết kế nhà xưởng. 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 đó: Khu vực đóng ống hoặc thử nghiệm vô trùng được thực hiện ở cấp độ A trong phòng sạch cấp độ B; khu vực kiểm tra công hiệu, độ ổn định nhiệt được thực hiện ở tủ cấy vô trùng đặt trong phòng sạch cấp độ C. 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 như đã trình bày trong mục 2.5.4.

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 (đối với các thử nghiệm định lượng), 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: 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 vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau

Dược điển Châu Âu chỉ rõ: Số liệu của các nghiên cứu về tính ổn định là cơ sở cho việc thiết lập tiêu chuẩn nồng độ vi rút tối thiểu cho xuất xưởng từng loạt vắc xin để đảm bảo ở những thời điểm cuối của hạn sử dụng nồng độ tối thiểu này vẫn đạt yêu cầu như tiêu chuẩn ghi trên nhãn. Chỉ những loạt vắc xin đạt được cả hai tiêu chuẩn: Nồng độ vi rút tối thiểu và độ ổn định nhiệt khi bảo quản ở 37⁰C/7 ngày mới được phép xuất xưởng [129]. Mỗi nội dung trong nghiên cứu này thực hiện trên ba loạt vắc xin, đáp ứng yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới về số loạt vắc xin thử nghiệm trong nghiên cứu tính ổn định [100]. Các nghiên cứu về tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng vắc xin của các nhà sản xuất lớn trên thế giới cũng chỉ thực hiện trên 3 loạt [110],[111],[122],[124],[123].

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

*** Tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ 2-8⁰C**

Đề cương nghiên cứu chỉ đưa ra mục tiêu xác định công hiệu của ba loạt vắc xin tại các thời điểm khác nhau. Dự kiến lấy mốc 24 tháng bảo quản

ở 2-8⁰C làm hạn sử dụng của vắc xin. Để có được kết luận chặt chẽ hơn, ở thời điểm 27 tháng, ngoài việc xác định công hiệu, tất cả các thử nghiệm nhận dạng, vô trùng, độ ổn định nhiệt, an toàn chung, độ ẩm tồn dư, độ lệch trọng lượng, đếm hạt, pH đã được thực hiện. Kết quả: Cả ba loại MVVAC đều đạt tất cả các chỉ số ở thời điểm 27 tháng. Chọn mốc 24 tháng để đưa ra hạn sử dụng của vắc xin, giảm 3 tháng so với kết quả tìm được.

*** Tính ổn định của MVVAC ở nhiệt độ cao: 20-25⁰ C, 37⁰ C**

Đánh giá công hiệu ở 37⁰C và 25⁰C là nội dung của nghiên cứu đánh giá tính ổn định vắc xin ở nhiệt độ cao (accelerated stability studies) để xác định thời hạn sử dụng khi vắc xin không được bảo quản ở điều kiện tối ưu [152].

Giai đoạn đầu, MVVAC được sản xuất từ bán thành phẩm nhập khẩu của Viện Kitasato. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Nữ Anh Thu cho thấy MVVAC sản xuất từ bán thành phẩm nhập khẩu của Viện Kitasato đạt yêu cầu của Tổ Chức Y tế Thế giới khi bảo quản ở 37⁰C trong 7 ngày [3]. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên MVVAC sản xuất từ chính bán thành phẩm của POLYVAC, bước tiếp theo để khẳng định tính ổn định của vắc xin. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, chúng tôi kéo dài thời gian bảo quản lên 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày để xác định được hạn sử dụng của vắc xin ở nhiệt độ này.

So với M-M-R II, hạn sử dụng của MVVAC bảo quản ở 25⁰C dài hơn. So với ROUVAX, TRIVIVAC, MMR thì MVVAC trong nghiên cứu này có hạn sử dụng ở 37⁰C, 25⁰C ngắn hơn (Bảng 1.5).

Có ba nguyên nhân có thể ảnh hưởng đến kết quả này:

Thứ nhất: M-M-R II, ROUVAX, TRIVIVAC, MMR được thực hiện nghiên cứu ngay sau khi sản xuất, MVVAC thực hiện sau khi sản xuất 15 tháng, khoảng thời gian tương đối dài. Theo thời gian, chất lượng vắc xin đã bị giảm đi do đây là các sản phẩm sinh học.

Thứ hai: Trong nghiên cứu này, MVVAC được bảo quản ở 25⁰C, cao hơn nhiệt độ bảo quản của ROUVAX và TRIVIVAC, MMR (22⁰C).

Thứ ba: Các vắc xin này sản xuất tại các nhà sản xuất khác nhau, có nhiều yếu tố khác nhau như chủng sản xuất, thành phần chất ổn định, quy trình đông khô,... nên có tính ổn định khác nhau.

Tuy nhiên, việc đưa ra hạn sử dụng ngắn hơn có lợi cho người tiêu dùng.

So với những loạt đầu tiên trong các báo cáo của Nguyễn Đăng Hiền và Nguyễn Nữ Anh Thu [153], MVVAC ngày càng ổn định với nhiệt độ. Trong giai đoạn 2006-2007, POLYVAC tiến hành giai đoạn đầu quá trình chuyển giao công nghệ: Nhận vắc xin bán thành phẩm từ Viện Kitasato. Giai đoạn này có những loạt vắc xin giảm quá 1lg PFU sau 1 tuần bảo quản ở 37⁰C.

So với shanvac-B, Act-HIB (Bảng 1.4), hạn sử dụng của MVVAC ở 37⁰C, 25⁰C ngắn hơn rất nhiều. Điều này phù hợp với kiến thức chung vì viêm gan B là vắc xin tái tổ hợp, thuộc loại có độ ổn định nhiệt cao nhất [106]. MVVAC ổn định hơn vắc xin cúm một thành phần do IVAC sản xuất.

So với kết quả nghiên cứu về tính ổn định của OPV [116], vắc xin do chính POLYVAC sản xuất, MVVAC cũng có tính ổn định cao hơn nhiều so với OPV mặc dù OPV cũng đã được cho thêm MgCl₂. MgCl₂ chứa Ion Mg²⁺ bám vào protein của vi rút, có tác dụng bảo vệ vi rút vắc xin ở nhiệt độ cao [154]. Điều này cũng phù hợp với phân loại chung của WHO, OPV thuộc loại vắc xin nhạy cảm nhất với nhiệt độ [106]. Vắc xin sởi và OPV đều thuộc nhóm vắc xin vi rút sống, giảm độc lực nhưng nguyên nhân chủ yếu làm vắc xin sởi có tính ổn định nhiệt cao hơn OPV ở chỗ vắc xin sởi dạng đông khô, OPV dạng lỏng. Quá trình đông khô đã làm tăng tính ổn định nhiệt của vi rút. Ở dạng lỏng bảo quản ở nhiệt độ 2-8⁰C, vắc xin sởi ROUVAX của AVENTIS PASTEUR cũng như MMR của hãng SANOFI PASTEUR ổn định tối đa

trong 7 ngày trong khi ở nhiệt độ này theo nghiên cứu của tác giả Lê Thị Luân, OPV do POLYVAC sản xuất ổn định trong 8 tháng.

Về mặt lựa chọn nhiệt độ nghiên cứu, tác giả Lê Thị Luân thực hiện nghiên cứu tính ổn định nhiệt ở -20°C do đây là nhiệt độ khuyến cáo bảo quản vắc xin OPV. Với MVVAC, chúng tôi không thực hiện ở nhiệt độ này mặc dù vắc xin sởi nói chung cực kỳ ổn định ở nhiệt độ âm [9]. Vắc xin sởi có thể bảo quản ở nhiệt độ âm và $2-8^{\circ}\text{C}$, tuy nhiên WHO cho rằng không cần thiết phải bảo quản ở nhiệt độ âm. Nhiệt độ âm cũng rất khó áp dụng vào thực tế sử dụng vắc xin trong cộng đồng, đặc biệt tại các nước đang phát triển như Việt Nam, nơi mà tủ lạnh đạt tiêu chuẩn tại các tuyến huyện cũng đang thiếu trầm trọng như được nêu ra trong kế hoạch 2014 của Dự án Tiêm chủng mở rộng. Mục tiêu của nghiên cứu này chỉ nhằm xác định hạn sử dụng ở $2-8^{\circ}\text{C}$, theo nhu cầu thực tế sử dụng vắc xin tại Việt Nam, trong Dự án tiêm chủng mở rộng.

*** Tính ổn định của MVVAC sau hồi chỉnh**

Sau khi hồi chỉnh, tính ổn định của vắc xin sẽ giảm rất nhiều so với dạng đông khô. Hơn nữa, MVVAC chứa 10 liều/lọ nên mỗi lần mở một lọ vắc xin sẽ tiêm cho mười trẻ em. Mỗi lần mở lọ vắc xin sẽ không dùng hết ngay lập tức, mà phải để lọ vắc xin trong lạnh và đợi tiêm cho trẻ sau. Thời gian đợi có thể là một giờ, hai giờ, ba giờ,...

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Sau hồi chỉnh, công hiệu ba loạt MVVAC đều giảm dần nhưng sau 8 giờ, công hiệu của cả ba loạt vẫn trên 3 log PFU/liều, vẫn đạt yêu cầu của WHO về hiệu quả bảo vệ.

8 giờ chưa phải hạn sử dụng tối đa của MVVAC sau hồi chỉnh. Hình 3.27 cho thấy, sau 8 giờ công hiệu của cả ba loạt vẫn ở mức cao (Từ 4,24 đến 4,34 lg PFU/liều) so với tiêu chuẩn 3 lg PFU/liều. Kết quả này đáp ứng được nhu cầu thực tế đặt ra: Theo quy định của WHO, các lọ vắc xin đã mang ra sử

dụng trong ngày, nếu không hết đều phải huỷ bỏ, không được dùng đến ngày hôm sau [103]. Chính vì lý do đó mà mỗi lọ vắc xin chỉ mở tối đa 8 giờ, thời gian của một ngày làm việc. Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng ta có thể tin tưởng rằng, tất cả các lọ MVVAC sử dụng trong Dự án TCMR đều có hiệu quả bảo vệ miễn sao chúng được bảo quản đúng nhiệt độ đề ra.

Hãng Sanofi Pasteur cũng đưa ra con số 8 giờ cho hạn sử dụng của thành phần *Haemophilus influenzae* trong vắc xin Pentaxim sau khi hồi chỉnh, bảo quản ở 2-8⁰C [155]. Hạn sử dụng của vắc xin sởi ROUVAX sau hồi chỉnh và thành phần sởi trong vắc xin MMR sau hồi chỉnh bảo quản ở 2-8⁰C do hãng Aventis Pasteur đưa ra dài hơn rất nhiều, tới 7 ngày [156],[157]. Tuy nhiên, điều kiện của Việt Nam, đặc biệt tại các điểm tiêm chủng khó có thể áp dụng thời gian dài như vậy do lo ngại về vấn đề đảm bảo vô trùng.

Sau khi hồi chỉnh 8 giờ, công hiệu của các loạt vắc xin vẫn đạt yêu cầu bảo vệ là cơ sở khoa học để khuyến cáo sử dụng MVVAC trong Dự án TCMR cũng như tại các cơ sở tiêm vắc xin khác.

4.2.2. Các chỉ số xác định tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của vắc xin

Việc lựa chọn các chỉ số để đánh giá tính ổn định phụ thuộc vào nhiều yếu tố: Bản chất của kháng nguyên, các thành phần khác có trong vắc xin, quy trình sản xuất,... Đối với hầu hết các vắc xin, công hiệu là chỉ số đánh giá tính ổn định quan trọng nhất vì nó phản ánh mối liên hệ giữa môi trường bảo quản với khả năng bảo vệ của vắc xin.

Đối với các vắc xin sống giảm độc lực, công hiệu vắc xin thể hiện qua nồng độ vi rút nên công hiệu hiển nhiên là một chỉ số đánh giá tính ổn định và có thể nghiên cứu trực tiếp trên bán thành phẩm cũng như vắc xin thành phẩm. 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 vắc xin với các ảnh hưởng không thể

biết hết được. Các chỉ số này có thể là pH, tính an toàn chung, độc tính đặc hiệu, nồng độ kháng sinh, vô trùng,...

Nghiên cứu này cũng dùng chỉ số công hiệu để đánh giá tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của vắc xin. Riêng nội dung xác định tính ổn định nhiệt và hạn sử dụng của vắc xin ở 2-8⁰C ở thời điểm 27 tháng: Đánh giá tất cả các chỉ số với mục đích nhằm đưa ra hạn sử dụng của vắc xin ở nhiệt độ này là 24 tháng. Việc đánh giá tất cả các chỉ số sẽ làm chặt chẽ hơn hạn sử dụng, an toàn hơn cho người dùng.

Các nghiên cứu của tác giả Marcel Thalen về tính ổn định hạn sử dụng của vắc xin ho gà vô bào [96], của Hiroko Toriniwa và Tomoyoshi Komiya trên vắc xin viêm não Nhật bản sản xuất tại Nhật Bản [158], tác giả Huỳnh Phương Liên trên vắc xin viêm não Nhật bản sản xuất tại Việt Nam [119].....cũng dựa trên một chỉ số công hiệu.

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

Tính ổn định của vắc xin nói chung cũng như tính ổn định nhiệt của chúng phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm: Bản chất kháng nguyên, thành phần chất ổn định; quy cách đóng gói (Liều đơn hay đa liều), quy trình sản xuất, nguyên vật liệu đóng gói;... Đặc biệt, chất liệu lọ vắc xin (Thuỷ tinh loại I, II hay III) có vai trò quan trọng trong tính ổn định do nó tiếp xúc trực tiếp với sản phẩm. Nút cao su cũng có vai trò không kém phần quan trọng. Loại cao su grey butyl phản ứng với thimerosal, chất bảo quản phổ biến trong vắc xin sẽ tạo ra hạt màu đen. Để không xảy ra các phản ứng với thành phần vắc xin, các nhà sản xuất lớn thường chọn bromo butyl hoặc chloro butyl có tráng silicon hoặc phủ Teflon. Nút cao su của lọ MVVAC được làm từ cao su tổng hợp có tráng silicon A tránh bám dính vắc xin vào thành phần cao su, đóng góp một phần không nhỏ trong tính ổn định của vắc xin.

Ở trạng thái thông thường, vi rút sởi rất nhạy cảm với nhiệt độ: Mất một nửa hoạt tính gây nhiễm khi bảo quản ở 37°C trong hai giờ [159]. Do vậy, thêm chất ổn định nhiệt là cần thiết để đảm bảo công hiệu của vắc xin. Nhờ tác dụng của chất ổn định và quá trình đông khô, theo kết quả của nghiên cứu này, MVVAC chỉ mất không quá 1 lg PFU khi bảo quản ở 37°C trong 7 ngày, độ ổn định tăng lên rất nhiều lần.

Để có được tính ổn định cao 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,... thường được sử dụng làm chất ổn định cho vắc xin sởi do chúng 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 [160],[161].

Kissman và cộng sự đã đưa ra được số liệu chứng minh rằng tác dụng bảo vệ vi rút ở nhiệt độ cao của các chất ổn định còn phụ thuộc vào nồng độ của chất đó trong huyền dịch vi rút. Ví dụ: Gelatin ở nồng độ 5% chỉ ức chế quá trình kết dính vi rút ở mức 94%, trong khi đó nồng độ gelatin 2,5% ức chế được 98%; lactose ở nồng độ 20% chỉ bảo vệ được 69% hạt vi rút nhưng ở nồng độ 10% tác dụng bảo vệ tới 98% [161].

Nhà sản xuất phải làm nhiều nghiên cứu về tính ổn định trên nhiều chất ổn định khác nhau để xác định xem sẽ dùng chất gì, hàm lượng bao nhiêu, kết hợp những chất nào với nhau để vắc xin có tính ổn định cao nhất.

POLYVAC cùng các chuyên gia Nhật Bản đã thực hiện nghiên cứu để tìm ra công thức chất ổn định cho MVVAC tại Viện Kitasato. Nghiên cứu này thực hiện với nhiều nồng độ, thành phần và sự kết hợp chất ổn định khác nhau dựa trên các chỉ số:

Sự giảm hiệu giá trước và sau đông khô: Tiêu chuẩn dưới 1lg PFU và càng nhỏ càng tốt;

Sự giảm hiệu giá khi để ở 37⁰C/7 ngày phải nhỏ hơn 1lg PFU theo tiêu chuẩn WHO;

Hình dạng bánh đông khô: Phải thành bánh, không vỡ vụn, không teo đét; khi hồi chính bánh vắc xin đông khô tan nhanh, không vón cục.

K.Trabelsi và cộng sự trong khi xây dựng quy trình sản xuất vắc xin sởi chủng AIK-C trên tế bào MRC-5 cũng đã đánh giá tính ổn định của vắc xin với ba tổ hợp chất ổn định khác nhau:

Không chứa chất ổn định;

Tổ hợp chất ổn định gồm sucrose 5%, MgCl₂, Tris-HCl;

Tổ hợp chất ổn định gồm lactose 4%, sorbitol 2%, histidine 20%, arginine 20%, methionine 20%, alanine 20%, PBS chứa Ca và Mg.

Huyền dịch vi rút sau lọc đã được thêm các tổ hợp chất ổn định và đánh giá nồng độ vi rút theo thời gian bảo quản ở các nhiệt độ - 60⁰C, 4⁰C và 28⁰C. Kết quả nghiên cứu cho thấy tổ hợp chất ổn định gồm sucrose 5%, MgCl₂, Tris-HCl tạo được vắc xin có tính ổn định nhiệt cao nhất [162]. Những Ion hoá trị II như Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ liên kết với protein của vi rút làm tăng tính ổn định của nhiều vi rút. Với vi rút sởi, các Ion hoá trị II này kết hợp với cả protein màng và màng lipid để duy trì sự toàn vẹn của cấu trúc vi rút.

Tương tự, năm 2008, Hiroko Toriniwa và Tomoyoshi Komiya công bố kết quả nghiên cứu xây dựng phương pháp sản xuất vắc xin viêm não Nhật Bản trên tế bào Vero và kiểm tra tính ổn định của vắc xin này với các chất ổn định khác nhau. Chất ổn định được cho vào vắc xin ở hai thời điểm: Trong quá trình bất hoạt và sau khi tinh chế. Trong quy trình sản xuất này, vắc xin được bất hoạt bằng formalin trong 3 tháng ở nhiệt độ 4⁰C. Nghiên cứu thực hiện trên các tổ hợp chất ổn định khác nhau:

Không có chất ổn định;

Chỉ có glycine với hàm lượng 0,5%;

Glycine 0,5% và sorbitol 1,8%;

Glycine, sorbitol, lactose 5% và glutamate 0,4%;

Sorbitol, lactose và glutamate.

Để so sánh hiệu quả kết hợp các chất ổn định, dung dịch vi rút sau khi bất hoạt được giữ ở 4⁰C và thực hiện thử nghiệm trung hoà ở các thời điểm 0; 3; 6; 9 tháng. Kết quả nghiên cứu cho thấy glycine với hàm lượng 0,5% trong dung dịch vi rút có tác dụng tốt nhất cho việc bất hoạt vi rút để duy trì nồng độ kháng thể trung hoà cao.

Sau khi tinh chế, vắc xin viêm não Nhật Bản cũng được thử nghiệm với nhiều tổ hợp chất ổn định khác nhau: Không có chất ổn định, glycine 0,5% và sorbitol 1%; glycine 0,5% và sorbitol 1,8%; glycine 0,5%, sorbitol 1,8% và tween 0,01%. Vắc xin được giữ ở 4⁰C và 28⁰C. Để so sánh hiệu quả kết hợp các chất ổn định, thực hiện thử nghiệm trung hoà trên các loại vắc xin thử nghiệm nêu trên ở các thời điểm 0; 3; 6; 9; 12 tháng. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Vắc xin sau khi cho chất ổn định có nồng độ kháng thể trung hoà cao hơn. Khi cho chất ổn định vào giai đoạn bất hoạt có hiệu quả hơn cho vào giai đoạn sau khi tinh chế do chúng ổn định được các vị trí kháng nguyên. Sự kết hợp giữa việc cho glycine vào dung dịch vi rút trong giai đoạn bất hoạt với hàm lượng 0,5% và cho tổ hợp glycine 0,5%; sorbitol 1% trong giai đoạn sau tinh chế là tối ưu nhất cho tính ổn định của vắc xin. Với sự kết hợp này, hạn sử dụng của vắc xin ở nhiệt độ 28⁰C kéo dài tới 1 năm [158].

Công ty SmithKline Beecham Biologicals s.a (Bỉ) sử dụng lactose, manitol, sorbitol, một số axit amin làm chất ổn định trong vắc xin Rimevax [124].

Năm 1989, công ty Pasteur Merieux Sérums and Vaccines đã thay đổi tá dược đông khô trong vắc xin ROUVAX, bao gồm đường, một số acid amin, ure. Công ty này cũng đã làm nghiên cứu về độ giảm công hiệu của vắc xin khi bảo quản ở 37⁰C/7 ngày trước và sau khi thay đổi thành phần tá chất. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng: Với công thức tá chất cũ, công hiệu vắc xin giảm trung bình 0,574 lg PFU/liều; với công thức tá chất mới, độ giảm công hiệu vắc xin là 0,276 lg PFU/liều, nhỏ hơn có nghĩa thống kê với $p < 0,05$ [163]. Urea tạo ra một phân tử ổn định do có nguyên tử oxy và nhóm NH₂.

Chúng sản xuất cũng như quy trình sản xuất MVVAC đều do Viện Kitasato cung cấp. Tuy nhiên, so với vắc xin sởi của viện Kitasato, thành phần MVVAC đã có sự thay đổi để thích nghi với điều kiện tự nhiên, kinh tế Việt Nam. Sự khác nhau quan trọng nhất ở thành phần chất ổn định. Vắc xin của Viện Kitasato không chứa gelatin, MVVAC của POLYVAC chứa gelatin với lượng 0,36% (trọng lượng/thể tích).

POLYVAC đã cân nhắc rất nhiều giữa tính ổn định nhiệt của MVVAC và khả năng gây dị ứng của gelatin. Lượng gelatin đưa vào càng thấp càng tốt để giảm thiểu tỷ lệ dị ứng nhưng lại phải đảm bảo được công hiệu giảm không quá 1 lg khi bảo quản ở 37⁰C/1 tuần.

Có rất nhiều nguyên nhân khiến POLYVAC quyết định thêm gelatin vào thành phần vắc xin sởi:

Thứ nhất: Việt Nam thuộc vùng khí hậu nhiệt đới, thiếu trang thiết bị bảo quản lạnh đặc biệt ở vùng sâu, vùng xa nên cần sản xuất các vắc xin có độ ổn định nhiệt cao. Năm 2014, Dự án Tiêm chủng mở rộng ước tính trung bình mỗi huyện chỉ có 1-2 tủ lạnh đạt yêu cầu để bảo quản vắc xin [164].

Thứ hai: Để tiết kiệm chi phí, vắc xin sởi của Việt Nam chứa 10 liều/lọ. Sau khi hồi chính, vắc xin không tiêm hết ngay lập tức mà sẽ tiêm dần

cho 10 người. So với dạng đông khô, vắc xin sau khi hồi chỉnh kém ổn định hơn rất nhiều, vì vậy, thêm chất ổn định nhiệt là điều cần thiết.

Thứ ba: Việt Nam tuân thủ theo yêu cầu của WHO: Công hiệu của vắc xin sỏi giảm không quá 1 lg PFU/liều khi bảo quản ở 37⁰C/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 vắc xin.

Để giảm thiểu tác dụng gây dị ứng của gelatin, POLYVAC đã dùng gelatin thủy phân, một 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); nó cũng được khẳng định là thích hợp cho việc sử dụng làm chất ổn định trong y tế [165],[166]. 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. MVVAC đã được tiêm cho 132 trẻ từ 9-11 tháng tuổi. Nhóm đối chứng gồm 131 trẻ được tiêm Rouvax do hãng Sanofi Pasteur sản xuất. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Không có trường hợp nào xuất hiện phản ứng nghiêm trọng, không phát hiện phản ứng tại chỗ tiêm. Trong khi đó, nhóm đối chứng có tỷ lệ đỏ tại chỗ tiêm là 2,3% (3/131), sưng tại chỗ tiêm 0,8% (1/131). Tỷ lệ sốt ở vắc xin thử nghiệm và vắc xin đối chứng lần lượt là 3,1% (3/142) và 3,8% (5/131) ($p > 0,05$). Mức độ sốt vừa: 38,0-38,5⁰C; kéo dài 1-2 ngày thì tự hết. Đặc biệt, có một trường hợp ở vắc xin đối chứng phát ban vào ngày thứ 5 trong khi không có trường hợp nào tiêm MVVAC xuất hiện phát ban. Tóm lại, MVVAC không có biểu hiện phát ban [84].

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

Việc xác định được loại VVM cho MVVAC có ý nghĩa rất lớn, không những đối với Dự án TCMR, người sử dụng mà cả đối với POLYVAC.

Đối với người sử dụng, việc gắn VVM lên từng lọ vắc xin trong tương lai sẽ giúp cho người sử dụng được dùng những lọ vắc xin thực sự có hiệu quả phòng bệnh.

VVM sẽ làm giảm hao phí do vứt bỏ những lọ MVVAC tốt khi gặp các sự cố mất điện, thảm họa thiên nhiên. Nó còn giúp quản lý kho vắc xin khi căn cứ tình trạng VVM để lựa chọn những lọ MVVAC nào sử dụng trước, lọ nào để lại.

Do những lợi ích của VVM mang lại mà năm 2007 WHO và UNICEF đã công bố chính sách mới về việc sử dụng VVM, đề nghị tất cả các nước thành viên nên xem xét áp dụng các chính sách cho phép sử dụng vắc xin ngoài dây chuyền lạnh trong một số trường hợp đặc biệt: Ngày tiêm chủng toàn quốc, những khu vực địa lý khó khăn. Do vậy, VVM còn hỗ trợ tiêm chủng ngoài trạm, làm tăng tỷ lệ tiêm chủng và tỷ lệ tiếp cận với vắc xin sởi ở các vùng núi, hải đảo xa xôi, vùng địa lý khó khăn, thiếu điện, tủ lạnh. Theo các nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi khu vực miền Bắc, điểm nóng dịch sởi tập trung ở một số huyện miền núi vùng tây Bắc [53],[167]. Sáu tháng đầu năm 2013, các trường hợp sởi xác định đều thuộc hai tỉnh Lai Châu, Lào Cai; giáp biên giới Trung Quốc và Lào [168]. “Khu vực có dịch phần lớn ở những xã vùng sâu, vùng xa khó tiếp cận: Xã miền núi, xã biên giới, đặc biệt khó khăn về giao thông. Có những bản phải vài tháng mới triển khai tiêm chủng một lần. Đặc biệt, trong mùa mưa từ tháng 6 đến tháng 9, một số bản gần như không thể tiếp cận” [169]. Trong khi đó, theo báo cáo tổng kết tiêm chủng mở rộng năm 2013 của Dự án TCMR: “Chất lượng dịch

vụ tiêm chủng mở rộng tại các vùng miền núi, vùng sâu, vùng xa, vùng khó khăn tiếp tục là thách thức lớn với công tác tiêm chủng mở rộng mặc dù đã có nhiều hoạt động ưu tiên cho các vùng kể trên” [58]. Theo kế hoạch tiêm chủng mở rộng năm 2015 của Dự án này, “Viện trợ của Chính phủ Luxembourg về thiết bị và dụng cụ dây chuyền lạnh đã kết thúc trong khi nhu cầu thay thế trang thiết bị là 10%/năm. Hiện tại trung bình mỗi huyện chỉ có 1-2 tủ lạnh bảo quản vắc xin đảm bảo chất lượng theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới và trong tình trạng hoạt động tốt” [170]. Vì vậy, việc xác định và sử dụng VVM cho MVVAC sẽ đóng góp rất nhiều vào nỗ lực thanh toán bệnh sởi tại Việt Nam.

Từ năm 2010, VVM trở thành yêu cầu quan trọng đối với vắc xin đề nghị cấp chứng nhận đạt tiêu chuẩn của WHO. Vì vậy, 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, yếu tố giúp POLYVAC có thể xuất khẩu vắc xin.

4.3. Hạn chế của đề tài

Đề tài còn một số hạn chế:

Thứ nhất: Trong các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến tính ổn định của vắc xin, nghiên cứu này mới chỉ tập trung vào xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đối với MVVAC, chưa xác định ảnh hưởng của ánh sáng đối với MVVAC. Các nghiên cứu tính ổn định của vắc xin nói chung và vắc xin sởi nói riêng trên thế giới cũng hầu như chưa đi sâu nghiên cứu về ảnh hưởng của ánh sáng đến tính ổn định của vắc xin

Nghiên cứu về tính ổn định nhiệt của vắc xin sau hồi chỉnh cũng chưa thực hiện được ở các nhiệt độ cao hơn nhiệt độ yêu cầu bảo quản: 20-25⁰C, 37⁰C. Đây là nhiệt độ mà vắc xin có thể bị bảo quản sau khi hồi chỉnh. Giống như nghiên cứu ở dạng chưa hồi chỉnh, nghiên cứu về vắc xin sau hồi chỉnh ở

nhiệt độ này góp phần làm tăng tỷ lệ tiêu chủng ở các vùng địa lý khó khăn, thiếu điện, thiếu tủ lạnh. Nếu làm thêm nội dung này sẽ tạo được một nghiên cứu ổn định nhiệt hoàn chỉnh.

Thứ hai, quá trình sản xuất vắc xin trải qua nhiều công đoạn và tạo ra nhiều sản phẩm trung gian khác nhau chẳng hạn: Các mẻ gặt đơn, bán thành phẩm là kháng nguyên đã tinh khiết, bán thành phẩm là kháng nguyên đã được hấp phụ hoặc cho thêm tá chất và bán thành phẩm cuối cùng,... Các bán thành phẩm này thường không được sử dụng ngay mà được giữ trong vài năm trừ khi chúng không ổn định hoặc có nhu cầu sử dụng vắc xin trên thị trường ngay lập tức. Thời gian dự kiến bảo quản bán thành phẩm cần được thẩm định và các số liệu này phải được đệ trình trong hồ sơ xin cấp phép. Nghiên cứu này mới chỉ thực hiện trên vắc xin thành phẩm, chưa thực hiện trên các sản phẩm trung gian, bán thành phẩm cuối cùng để tìm ra thời gian bảo quản cho các sản phẩm này.

KẾT LUẬN

1. Chất lượng vắc xin sởi 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 $TB \pm 3SD$.

Tính ổn định nhiệt của vắc xin đồng đều giữa các loại thể hiện đường xu hướng nằm ngang và đi sát đường trung bình.

Độ lệch trọng lượng giữa các lọ vắc xin trong cùng một loại ổn định khi không có loại nào vượt ra ngoài khoảng $TB \pm 2SD$, đường xu hướng đi sát đường trung bình.

Độ ẩm tồn dư càng về sau càng ổn định.

Không có hạt kích thước $\geq 25 \mu\text{m}$ trong vắc xin hoặc chỉ có 1 hạt/lọ vắc xin. Giai đoạn 2011-2013 số hạt có kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ giảm so với giai đoạn 2009-2010 ($P < 0,0021$).

2. Hạn sử dụng của vắc xin sởi MVVAC do Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế sản xuất khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C là 10 ngày, bảo quản ở nhiệt độ 25°C là 60 ngày, ở $2-8^{\circ}\text{C}$ là 2 năm. Hạn sử dụng của vắc xin sởi MVVAC sau hồi chỉnh, bảo quản ở $2-8^{\circ}\text{C}$ là 8 giờ.

Loại chỉ thị nhiệt lọ vắc xin 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. Trên cơ sở nghiên cứu của đề tài đã xác định được loại VVM cho MVVAC để kiểm soát điều kiện bảo quản vắc xin trong quá trình sử dụng. Sử dụng loại VVM đã tìm được cho MVVAC. Nhà nước nên có chính sách hỗ trợ nhà sản xuất vắc xin trong nước sử dụng VVM, nên có chính sách ưu tiên sử dụng vắc xin do Việt Nam sản xuất.

3. Xác định tính ổn định sau hồi chỉnh của MVVAC ở các nhiệt độ 20-25⁰C, 37⁰C để hoàn chỉnh nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin ở nhiệt độ cao, nhiệt độ mà vắc xin có thể bị bảo quản sau khi hồi chỉnh, cơ sở khoa học cho việc tăng tỷ lệ tiêm chủng MVVAC ở các vùng địa lý khó khăn, biên giới, hải đảo, vùng thiếu điện, thiếu tủ lạnh.

4. Dựa vào kết quả của nghiên cứu này, 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 Bản.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG BỐ KẾT QUẢ
NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Đăng Hiền, Lê Thị Luân, Ngô Thu Hương, Phạm Anh Thư, Ngô Thị Thanh Hương, Phạm Thị Thuộc, Vũ Thị Hương, Cao Xuân Ngọc, Nguyễn Đình Khiêm (2013), “Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin sởi MVVAC khi bảo quản ở 37⁰C và 25⁰C”, *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII (6(142)),31-36.
2. Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Đăng Hiền, Lê Thị Luân, Ngô Thu Hương, Phạm Anh Thư, Ngô Thị Thanh Hương, Phạm Thị Thuộc, Vũ Thị Hương, Cao Xuân Ngọc, Nguyễn Đình Khiêm (2014), “Xác định tính ổn định của vắc xin sởi MVVAC bảo quản ở 2-8⁰C”, *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIV(6(155)),143-148.
3. Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Đăng Hiền, Lê Thị Luân, Ngô Thu Hương, Phạm Anh Thư, Ngô Thị Thanh Hương, Phạm Thị Thuộc, Vũ Thị Hương, Cao Xuân Ngọc, Nguyễn Đình Khiêm, Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Nguyệt (2014), “Tính ổn định chất lượng của vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam từ năm 2009 đến năm 2013”, *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIV(10(159)), 36-43.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization (2007), *Quality assurance of pharmaceuticals, volume 2: Good manufacturing practices and inspection*, Second updated edition, WHO Press, Geneva, 15-58.
2. Nguyen Dang Hien, Le Thi Luan, Nguyen Thuy Huong et al (2011), "High immunogenicity of measles AIK-C vaccine produced in Vietnam", *Eastern Journal of Medicine* 16, 199-207.
3. Nguyễn Nữ Anh Thu, Ngô Thu Hường and Nguyễn Đăng Hiền (2011), "Đánh giá công hiệu và tính ổn định nhiệt của vắc xin sởi sản xuất tại Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXI(5(123)), 65 - 69.
4. David O. white and Frank J. Fenner (1994), "Paramyxoviridae", *Medical virology*, Fourth Academic Press, London, 456-465.
5. Erling Norrby and Michael N. Oxman (1990), "Measles virus", *Virology*, second, Raven Press, New York, 1013-1044.
6. Phạm Văn Ty (2009), *Vi rút học*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Hà Nội, 215-218.
7. Nguyễn Thanh Thủy and Trần Quang Huy (2010), *Atlas vi rút gây bệnh cho người*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 115.
8. Jay A. Levy, Heinz Fraenkel-Conrat and Robert A. Owens (1994), *Virology*, third edition, Prentice-Hall, 85-90.
9. Peter M. Strebel, Mark J. Papania, Gustavo H. Dayan et al (2008), "Measles vaccine", *Vaccines*, 5th, Saunders, China, 353-379.

10. Bộ môn vi sinh vật trường Đại học Y Hà Nội (2007), *Vi sinh vật y học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 292-299.
11. William J. Bellini and Joseph P. Icenogle (2007), "Measles and rubella viruses", *Manual of clinical microbiology*, 9th, ASM press, Washington DC, 1378-1391.
12. Clifford H. D., Hayden C. M., Khoo S. K. et al (2012), "CD46 measles virus receptor polymorphisms influence receptor protein expression and primary measles vaccine responses in naive Australian children", *Clin Vaccine Immunol*, 19(5), 704-10.
13. Frecha C., Levy C., Costa C. et al (2011), "Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vector-mediated gene transfer into quiescent lymphocytes requires binding to both SLAM and CD46 entry receptors", *J Virol*, 85(12), 5975-85.
14. Bernard D. Davis, Renato Dulbecco, Herman N. Eisen et al (1990), *Microbiology*, fourth, J.B. Lippincott company, Philadelphia, 1007-1015.
15. Huỳnh Phương Liên, Rota P.A., Nguyễn Thị Thắng et al (2000), "Chẩn đoán xác định dịch sởi 1998, phân tích đặc điểm di truyền của vi rút sởi lưu hành tại miền Bắc Việt Nam", *Tuyển tập công trình 1997 - 2000 Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 49 - 62.
16. Cheng W. Y., Yang C. F., Hou Y. T. et al (2011), "Imported measles and implications for its elimination in Taiwan", *Emerg Infect Dis*, 17(8), 1523-6.
17. Santibanez S., Tischer A., Heider A. et al (2002), "Rapid replacement of endemic measles virus genotypes", *J Gen Virol*, 83(Pt 11), 2699-708.

18. Kurata T., Miyagawa H., Furutani E. et al (2009), "An outbreak of measles classified as genotype H1 in 2008 in Osaka Prefecture", *Jpn J Infect Dis*, 62(1), 76-7.
19. M. N. Mulders, Y. K. Nebie, F. Fack et al (2003), "Limited diversity of measles field isolates after a national immunization day in Burkina Faso: progress from endemic to epidemic transmission?", *J Infect Dis*, 187 Suppl 1, S277-82.
20. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Trần Hiên, Huỳnh Phương Liên et al (2010), "Theo dõi đặc điểm di truyền vi rút sởi hoang dại lưu hành tại Việt Nam giai đoạn 1998-2009", *Tạp chí Y học dự phòng*, XX(10(118)), 32-41.
21. Rota P. A., Featherstone D. A. and Bellini W. J. (2009), "Molecular epidemiology of measles virus", *Curr Top Microbiol Immunol*, 330, 129-50.
22. Baliraine F. N, Bwogi J, Bukonya H et al (2011), "Possible interruption of measles virus transmission, Uganda, 2006-2009", *Emerg Infect Dis*, 17(1), 110-3.
23. Cilla G, Montes M, Artieda J. et al (2011), "Measles genotypes D4 and G3 reintroduced by multiple foci after 15 years without measles virus circulation, Gipuzkoa, the Basque Country, Spain, March to June 2011", *Euro Surveill*, 16(43).
24. World Health Organization (2005), " New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes", *Wkly. Epidemiol. Rec.* , 80 (40), 347-351.
25. Cheng W. Y., Lee L., Rota P. A. et al (2009), "Molecular evolution of measles viruses circulated in Taiwan 1992-2008", *Virol J*, 6, 219.

26. Finsterbusch T., Wolbert A., Deitemeier I. et al (2009), "Measles viruses of genotype H1 evade recognition by vaccine-induced neutralizing antibodies targeting the linear haemagglutinin noose epitope", *J Gen Virol*, 90(Pt 11), 2739-45.
27. Yu X, Qian F., Sheng Y. et al (2007), "Clinical and genetic characterization of measles viruses isolated from adult patients in Shanghai in 2006", *J Clin Virol*, 40(2), 146-51.
28. Sun Y, Li J and Ge L (1998), "[Geneotic analysis of wild type measles viruses circulating in China during 1995-1997]", *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 19(6), 330-3.
29. Nguyễn Hạnh Phúc (2010), "Xác định ADN genom vi rút sởi bằng phương pháp RT - LAMP (Reserve Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification)", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIX(4(112)), 23-28.
30. Nguyễn Hạnh Phúc and Lê Thị Kim Tuyền (2006), "Kỹ thuật multiplex PCR trong phân tích genotyp nhóm H chủng vi rút sởi hoang dại Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, XVI(2(81)), 60-65.
31. Nguyễn Thị Thường, Huỳnh Phương Liên, Nguyễn Thị Út et al (2005), "Đặc điểm di truyền của vi rút sởi hoang dại lưu hành tại Miền bắc, Miền trung và Tây Nguyên Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, XV(5(76)), 80-85.
32. Nguyễn Hạnh Phúc, Nguyễn Thị Hiền Thanh, Nguyễn Thị Thu Thuỷ et al (2009), "Genotyp H1 vi rút sởi lưu hành trong các vụ dịch sởi năm 2006-2008 ở Miền bắc Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIX(5(104)), 50-56.

33. Kremer J. R., Nguyen D. T., Shulga S. V. et al (2007), "Genotyping of recent measles virus strains from Russia and Vietnam by nucleotide-specific multiplex PCR", *J Med Virol*, 79(7), 987-94.
34. Vũ Thị Kim Liên, Đỗ Thị Quỳnh Nga, Trần Thị Hải Âu et al (2013), "Nghiên cứu dịch tễ học phân tử các chủng vi rút Sởi lưu hành trong các vụ dịch sởi lưu hành trong các vụ dịch sởi năm 2006-2013 ở miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí y học thực hành* (886), 11, 73-76.
35. Nguyễn Ngọc Vân Phương, Mai Đào Ái Như and Trương Hữu Khanh (2005), "Một số đặc điểm dịch tễ và lâm sàng trên bệnh nhi sởi tại Bệnh viện Nhi đồng I năm 2000", *Tạp chí Y học dự phòng*, XV(6(78)), 67-70.
36. Vũ Quốc Ái, Nguyễn Thị Minh Phương and Nguyễn Ngọc Ân (2001), "Kết quả khảo sát vụ dịch sởi đầu năm 2000 tại tỉnh Đồng Tháp", *Tạp chí Y học dự phòng*, XI(1(47)), 65-67.
37. Lê Đăng Hà (2011), *Bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 717-730.
38. Nguyễn Kim Thảo and Huỳnh Phương Liên (1991), "Vi rút sởi và hội chứng não cấp", *Tạp chí Vệ sinh phòng dịch*, I(2), 67-71.
39. Cơ sở đào tạo sau đại học Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (2010), *Vi rút Y học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 66-89.
40. Lê Thị Tiệp (1989), *Góp phần tìm hiểu đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi và đánh giá kết quả giảm tỷ lệ bệnh của vắc xin sởi sống đông khô tại quận Ba Đình, Hà Nội*, Luận án phó tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội, 40.
41. A. Siedler, A. Mankertz, F. Feil et al (2011), "Closer to the goal: efforts in measles elimination in Germany 2010", *J Infect Dis*, 204 Suppl 1, S373-80.

42. H. Roggendorf, S. Santibanez, A. Mankertz et al (2012), "Two consecutive measles outbreaks with genotypes D8 and D4 in two mainly unvaccinated communities in Germany", *Med Microbiol Immunol*, 201(3), 349-55.
43. G. G. Weldegebriel, A. Gasasira, P. Harvey et al (2011), "Measles resurgence following a nationwide measles vaccination campaign in Nigeria, 2005-2008", *J Infect Dis*, 204 Suppl 1, S226-31.
44. Q. Zhang, J. T. Zhang and C. Bian (2010), "[Analysis on epidemiological characteristics of measles before and after measles vaccine supplement immunization activities in Changzhou municipal in 2007]", *Zhongguo Yi Miao He Mian Yi*, 16(1), 15-9.
45. Ministry of Health, Labour and Welfare (2011), "Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products", *Japanese pharamacopeia*, 16th, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2188 -2191.
46. G. Onishchenko, E. Ezhlova, A. Gerasimova et al (2011), "Progress toward measles elimination in the Russian Federation, 2003-2009", *J Infect Dis*, 204 Suppl 1, S366-72.
47. Viên Quang Mai, Huỳnh Phương Liên and Đinh Sỹ Hiền (2004), "Đặc điểm dịch tễ học của hai vụ dịch sởi tại Khánh Hoà", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIV(2+3(66)), 21-25.
48. Đặng Thị Thanh Huyền, Nguyễn Trần Hiền and Nguyễn Thành Trung (2011), "Đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi tại Việt Nam giai đoạn 2005-2009", *Tạp chí Y học dự phòng*, XX(5(113)), 12-17.
49. Nguyễn Văn Kính, Tạ Thị Diệu Ngân, Nguyễn Thị Liên Hà et al (2009), "Nhận xét đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng một số ca sởi người

lớn đầu vụ dịch tại Viện Các bệnh Truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia", *Y học thực hành*, 3(650), 11-14.

50. Dự án tiêm chủng mở rộng Quốc gia (2011), Báo cáo tổng kết tiêm chủng mở rộng 2010, 45.
51. US Pharmacopoeial convention (2014), "63 Mycoplasma Tests ", *The United States Pharmacopoeia 37-NF32* , Vol. 1, 67-71.
52. Trần Như Dương, Phạm Quang Thái and Nguyễn Thu Yến (2009), "Đặc điểm vụ dịch sởi tại Ninh Bình năm 2008", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIX(3(102)), 12-17.
53. Đặng Thị Thanh Huyền, Nguyễn Văn Cường, Phan trọng Lâm et al (2014), "Đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi tại khu vực miền Bắc giai đoạn 2008-2012", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIV(157), 159-165.
54. Dự án tiêm chủng mở rộng Quốc gia (2005), Tổng kết công tác tiêm chủng mở rộng năm 2004, Hà Nội, 10.
55. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (2011), "2.6.7. MYCOPLASMAS", *European pharmacopeia 7.0*, Vol. I, Druckerei C.H.Beck, 156-161.
56. Trần Như Dương, Nguyễn Thị Thu Yến and Phạm Quang Thái (2011), "Một số đặc điểm dịch sởi tại miền Bắc Việt Nam năm 2008 - 2009", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXI(5(123)), 37-45.
57. Dự án Tiêm chủng Mở rộng (2015), *Báo cáo tổng kết tiêm chủng mở rộng 2014*, tr. 22-23.
58. Dự án Tiêm chủng mở rộng (2014), Báo cáo tổng kết tiêm chủng mở rộng 2013, 14.
59. B. Bankamp, M. Takeda, Y. Zhang et al (2011), "Genetic characterization of measles vaccine strains", *J Infect Dis*, 204 Suppl 1, S533-48.

60. H. Y. Tsai, L. M. Huang, Y. T. Shih et al (1999), "Immunogenicity and safety of standard-titer AIK-C measles vaccine in nine-month-old infants", *Viral Immunol*, 12(4), 343-8.
61. C. Ito, S. Ohgimoto, S. Kato et al (2011), "Remarkable similarity in genome nucleotide sequences between the Schwarz FF-8 and AIK-C measles virus vaccine strains and apparent nucleotide differences in the phosphoprotein gene", *Microbiol Immunol*, 55(7), 518-24.
62. J. S. Rota, Z. D. Wang, P. A. Rota et al (1994), "Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains", *Virus Res*, 31(3), 317-30.
63. T. Mori, K. Sasaki, H. Hashimoto et al (1993), "Molecular cloning and complete nucleotide sequence of genomic RNA of the AIK-C strain of attenuated measles virus", *Virus Genes*, 7(1), 67-81.
64. Wen-bo Xu, Azaibi Tamin, Jennifer S. Rota et al (1998), "New genetic group of measles virus isolated in the People's Republic of China", *Virus Res*, 54(2), 147-156.
65. Lecouturier V, Fayolle J and Caballero M et al (1996), "Identify of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, Hela cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiatvaccine and wild-type", *Virology*, 70, 4200-4204.
66. S. Makino (1983), "Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report", *Rev Infect Dis*, 5(3), 504-5.
67. T. Nakayama, K. Komase, R. Uzuka et al (2001), "Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is responsible for reduced syncytium formation", *J Gen Virol*, 82(Pt 9), 2143-50.

68. S. Ueda (2009), "Development of measles vaccines in Japan", *Vaccine*, 27(24), 3230-1.
69. Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2009), tóm tắt quy trình sản xuất MVVAC.
70. WHO (2009), "Measles vaccines: WHO position paper", *Weekly epidemiological record*, 35(84), 349-360.
71. D. H. Sniadack, J. Mendoza-Aldana, Y. Jee et al (2011), "Progress and challenges for measles elimination by 2012 in the Western Pacific Region", *J Infect Dis*, 204 Suppl 1, S439-46.
72. Nguyễn Thị Thu Yên, Vũ Hải Hà, Phạm Quang Thái et al (2014), "Một số đặc điểm bệnh sởi và rubella khu vực miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2007-2011", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIV(6), 40-49.
73. Nguyễn Thị Minh Phượng, Trần Công Thành, Lê Quang Vinh et al (2007), "Lượng giá hiệu quả chiến dịch tiêm sởi mũi hai cho trẻ em từ 9 tháng đến 10 tuổi tại khu vực phía Nam, năm 2003", *Y học thực hành*, 4(569+570), 21-23.
74. Đặng Thị Thanh Huyền (2013), "Đáp ứng miễn dịch sau tiêm vắc xin sởi cho trẻ 18 tháng tuổi tại huyện Kim Bôi, tỉnh Hoà Bình, năm 2012", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XXIII(7(143)), 26-32.
75. S. Krugman, J. P. Giles, A. M. Jacobs et al (1963), "Studies with a further attenuated live measles-virus vaccine", *Pediatrics*, 31, 919-28.
76. S. Makino, K. Sasaki, N. Nakamura et al (1974), "Studies on the modification of the live AIK measles vaccine. II. Development and evaluation of the live AIK-C measles vaccine", *Kitasato Arch Exp Med*, 47(1-2), 13-21.
77. M. M. Carson, D. W. Spady, J. A. Beeler et al (2005), "Follow-up of infants given measles vaccine at 6 months of age: antibody and CMI

responses to MMR2 at 15 months of age and antibody levels at 27 months of age", *Vaccine*, 23(25), 3247-55.

78. T. Ichikawa, A. Tsuji, M. Fujino et al (2013), "Effect of early measles vaccination (AIK-C strain) for preterm infants", *Pediatr Int*, 55(2), 163-8.
79. F. K. Nkrumah, M. Osei-Kwasi, S. K. Dunyo et al (1998), "Comparison of AIK-C measles vaccine in infants at 6 months with Schwarz vaccine at 9 months: a randomized controlled trial in Ghana", *Bull World Health Organ*, 76(4), 353-9.
80. Hoàng Đức Hạnh, Trần Ngọc Hà, Đặng Đức Nhu et al (2015), "Mối liên quan giữa bệnh sởi và một số yếu tố thời tiết tại Thành phố Hà Nội giai đoạn 2008-2013", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXV(3), 58-65.
81. Trần Đức Tiến, Nguyễn Thanh Dương, Đặng Đình Thoảng et al (2015), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh sởi tại tỉnh Hà Nam, 2014", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXV(3), 52-57.
82. V. M. Bolotovskii, M. Grabowsky, C. J. Clements et al (1994), "Immunization of 6 and 9 month old infants with AIK-C, Edmonston-Zagreb, Leningrad-16 and Schwarz strains of measles vaccine", *Int J Epidemiol*, 23(5), 1069-77.
83. T. Nakayama and K. Onoda (2007), "Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004", *Vaccine*, 25(3), 570-6.
84. Đoàn Huy Hậu, Đào Xuân Vinh, Đinh Hồng Dương et al (2011), "Đánh giá tính an toàn và tính sinh miễn dịch của vắc xin sởi MVVAC do POLYVAC sản xuất từ chủng AIK-C trên người tình nguyện (Giai đoạn 1 và 3)", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XXI(4(122)), 110-117.

85. Đoàn Huy Hậu, Đào Xuân Vinh, Đinh Hồng Dương et al (2009), "Đánh giá tính an toàn và tính sinh miễn dịch của vắc xin sởi do POLYVAC sản xuất từ bán thành phẩm của Viện KITASATO, Nhật Bản (Giai đoạn 1,2 và 3)", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XIX(2(101)), 75-82.
86. World Health Organization (2014), Trend analysis, *Training course on lot release of vaccine*, WHO, Ha Noi.
87. I. A. Alekseeva, R. P. Chuprina and D. S. Davydov (2009), "Assessment of consistency of technological process using control cards on the example of analysis of information on immunogenic activity of pertussis component of DTP vaccine", *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, (6), 70-5.
88. M. Zawadka, E. Mosiej, M. Polak 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), 123-7.
89. F. De Mattia, J. M. Chapsal, J. Descamps et al (2011), "The consistency approach for quality control of vaccines - a strategy to improve quality control and implement 3Rs", *Biologicals*, 39(1), 59-65.
90. C. Hendriksen, J. L. Arciniega, L. Bruckner et al (2008), "The consistency approach for the quality control of vaccines", *Biologicals*, 36(1), 73-7.
91. J. Arciniega and L. A. Sirota (2012), "Potential application of the consistency approach for vaccine potency testing", *Dev Biol (Basel)*, 134, 135-9.
92. A. Gzyl, E. Augustynowicz, D. Rabczenko et al (2004), "Potency of pertussis component in the DTP vaccine--an overview of three decade study in Poland", *Biologicals*, 32(3), 129-37.

93. 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), 127-32.
94. A. Gzyl, G. Gniadek, E. Augustynowicz et al (2004), "[Increase in the incidence of pertussis and quality of whole-cell pertussis component of the DTP vaccine produced in Poland. Part II. Consistency of control and production]", *Przegl Epidemiol*, 58(4), 641-8.
95. A. Gzyl, G. Gniadek, E. Augustynowicz et al (2004), "[Increase in the incidence of pertussis and quality of whole-cell pertussis component of the DTP vaccine produced in Poland. Part I. Potency of DTP vaccine]", *Przegl Epidemiol*, 58(4), 629-39.
96. M. Thalen, A. van der Ark, J. van den Ijssel et al (2008), "Improving the cellular pertussis vaccine: increased potency and consistency", *Vaccine*, 26(5), 653-63.
97. Nguyễn Thị Hồng Linh (2006), "Đánh giá chất lượng vắc xin BCG sản xuất tại Viện Vắc xin Nha Trang trong 5 năm (2001-2005)", *Tạp chí Y học dự phòng*, XVI(2(81)), 35-39.
98. Chế Đoàn Quang, Nguyễn Thành Tín, Phan Thị Kim Anh et al (2013), "Chất lượng của vắc xin BCG cung cấp cho chương trình tiêm chủng mở rộng quốc gia từ năm 2004 – 2012", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII(9 (145)), 82-85.
99. Trần Thanh Hữu, Lê Văn Bé, Dương Văn Nam et al (2013), "Đánh giá tính ổn định quy trình sản xuất giải độc tố uốn ván tinh chế dùng trong hỗn hợp vắc xin DPT và TT giai đoạn 2008 – 2012", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII(9(145)), 93-97.
100. World Health Organization (2011), Guidelines on stability evaluation of vaccines, *WHO TRS 962, Annex 3*.

101. J. Shin, D. Smith, J. Southern et al (2009), "WHO/KFDA workshop on stability evaluation of vaccines, Seoul, Korea, 23-25 April 2008", *Biologicals*, 37(6), 435-44; discussion 421-3.
102. P. R. Krause (2009), "Goals of stability evaluation throughout the vaccine life cycle", *Biologicals*, 37(6), 369-78; discussion 421-3.
103. World Health Organization (2002), *Getting started with vaccine vial monitors*, Department of Vaccines and Biologicals, 1.
104. World Health Organization (1999), *Testing the correlation between vaccine vial monitor and vaccine potency*, the Department of Vaccines and Other Biologicals, 5-14.
105. S. Zipursky, L. Boualam, D. O. Cheikh et al (2011), "Assessing the potency of oral polio vaccine kept outside of the cold chain during a national immunization campaign in Chad", *Vaccine*, 29(34), 5652-6.
106. World Health Organization (2006), *Temperature sensitivity of vaccines*, WHO, Geneva.
107. T. Clapp, P. Siebert, D. Chen et al (2011), "Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability", *J Pharm Sci*, 100(2), 388-401.
108. SANOFI PASTEUR S.A (2011), *Application dossier of registration for ADACEL (DPT vaccine)*, tr.
109. SANOFI PASTEUR S.A (2012), *Application dossier of registration for TETRAXIM (DTacP-IPV vaccine)*, tr.
110. SANOFI PASTEUR SA (2010), *Applicants dossier of registration for MMR vaccine*, tr.
111. SEVAPHARMA (2009), *Applicants dossier of registration for TRIVIVAC vaccine*, tr.

112. SANOFI PASTEUR SA (2013), *Application dossier of registration for Act-HIB: Haemophilus type b conjugated vaccine*, tr.
113. Huỳnh Thị Thanh Xuân, Lê Thị Mỹ Dung and Nguyễn Công Bảy (2003), "Chất lượng và tính ổn định của vaxin BCG sống đông khô", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIII(6(63)), 25 - 28.
114. Trần Ngọc Nhơn, Nguyễn Thị Lan Phương, Tô Thị Hồng Vân et al (2013), "Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin cúm một thành phần (A/H1N1/09) sản xuất ở qui mô công nghệ", *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII(9(145)), 35-39.
115. Nguyễn Thị Thanh Hào (2006), *Bước đầu theo dõi đánh giá tính ổn định của quy trình sản xuất viêm gan B tái tổ hợp*, Luận án tiến sỹ y học, Đại học Y Hà Nội.
116. Lê Thị Luân (1997), *Tính ổn định của vắc xin bại liệt uống sản xuất tại Việt Nam từ năm 1993 đến 1996 và ảnh hưởng của nhiệt độ đối với hiệu giá vắc xin tam liên*, Luận án Tiến sỹ Y dược học, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.
117. Shantha (2014), *Application dossier of registration for Shanvac-B, India*, tr.
118. Huỳnh Phương Liên (1995), "Đánh giá tính bền vững của vắc xin viêm não Nhật Bản bảo quản ở 4 độ C", *Tạp chí Vệ sinh phòng dịch*, V(4(23)), 13 - 15.
119. Huỳnh Phương Liên, Đỗ Thủy Ngân, Nguyễn Bích Thủy et al (2010), "Đánh giá tính ổn định công hiệu của vắc xin viêm não nhật bản bất hoạt trên tế bào Vero ", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XX(10(118)), 102-108.
120. SANOFI PASTEUR S.A (2009), *Application dossier of registration for PENTAXIM*, tr.

121. SANOFI PASTEUR (2014), *Application dossier of registration for HEXAXIM*, tr.
122. Merck & Co. Inc (2009), *Applicants dossier of registration for M-M-R II vaccine*, tr.
123. AVENTIS PASTEUR SA (2010), *Applicants dossier of registration for ROUVAX vaccine* tr.
124. SmithKline Beecham Biologicals s.a (2010), *Applicants dossier of registration for Rimevax*, tr.
125. World Health Organization (1994), Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live). WHO Technical Report Series, No840, 1994, annex3, World Health Organization, WHO Geneve, 102-120.
126. Ministry of Health, Labour and Welfare (2013), "Freeze-dried live attenuated measles vaccine", *Japanese pharamacopeia*, 16, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 1065.
127. National Institute of Infectious Diseases (2006), "Freeze-dried live attenuated measles vaccine", *Minimum requirements for biological products*, National Institute of Infectious Diseases, Japan, 180-184.
128. The Kitasato insttute (2007), Minimum requirements for biological products of Japan measles vaccine (AIK-C strain).
129. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (2011), "Measles vaccine (Live)", *European pharamacopoeia 7.0*, Druckerei C.H.Beck, 800-801.
130. World Health Organization (1973), General requirements for the sterility of biological substance, WHO TRS 530 annex 4, 40-57.

131. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (2011), " Biological tests: 2.6.1. Sterility", *European pharmacopeia 7.0*, Druckerei C.H.Beck, 123-131.
132. National Institute of Infectious Diseases (2006), "*Mycoplasma* test", *Minimum requirements for biological products*, National Institute of Infectious Diseases, Japan, 305-306.
133. US Pharmacopoeial convention (2010), "71. Sterility test", *The United States Pharmacopoeia*, XXXIV, 76-90.
134. National Institute of Infectious Diseases (2006), "Test for freedom from abnormal toxicity (General safety tests)", *Minimum requirements for biological products*, 273.
135. National Institute of Infectious Diseases (2006), "Test for moisture content", *Minimum requirements for biological products*, Japan, 277.
136. National Institute of Infectious Diseases (2006), "Test for weight variation", *Minimum requirements for biological products*, 286.
137. The Kitasato institute (2009), Standard operating Procedure: Particle count in measles vaccine.
138. National Institute of Infectious Diseases (2006), "Test for pH", *Minimum requirements for biological products*, 300.
139. M. Ayala-Gonzalez (1990), "Titration and stability tests for antimeasles vaccine", *Bol Med Hosp Infant Mex*, 47(7), 512-5.
140. Lê Thị Luân, Trần Bích Hạnh and Nguyễn Đăng Hiền (2010), "Áp dụng phương pháp tạo đám hoại tử (PFU) cho chuẩn độ hiệu giá vắc xin rota sản xuất tại Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, XIX(4(112)), 19-22.
141. Daragh D. Byrne (2010), *Validation of Sterility Test Isolators*, *American pharmaceutical review*, available at

<http://americanpharmaceuticalreview.com/ViewArticle.aspx?ContentID=202>, accessed 14 October 2014.

142. Steven Richter (2008), *Pharmaceutical sterility testing*, available at <http://www.pharmainfo.net/outsourcing-articles/pharmaceutical-sterility-testing>, accessed 14 October 2014.
143. Pharmaceutical inspection convention/pharmaceutical inspection cooperation scheme (2007), *Recommendation on sterility testing*, available at <http://www.picscheme.org/publication.php?id=8>, accessed 14 October 2014.
144. Therapeutic Goods Administration-Australia (2006), *TGA guidelines for sterility testing of therapeutic goods*, available at <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/sterilit.pdf>, accessed 14th October 2014.
145. B. J. Bolton, P. Packer and A. Doyle (2002), "The quality control of cell lines and prevention, detection, and cure of contamination", *Basic cell culture*, Second, Oxford, New York, 295-322.
146. National Institute for Public health and the Environment-Holland (2001), *Sterility testing, Quality control of DTP vaccines training course*, Holland.
147. World Health Organization (1998), *General requirements for the sterility of biological substances*, TRS No 872, annex 3.
148. Bùi Tấn Đợi and Lê Văn Hiệp (2006), "Sự tương quan về độ ẩm tồn dư và tính ổn định nhiệt của vắc xin BCG sống-đông khô", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XVI(2(81) phụ bản), 82-85.
149. M. B. Borges, E. Caride, A. V. Jabor et al (2008), "Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages

- in chicken embryo fibroblasts primary cultures", *Virus Genes*, 36(1), 35-44.
150. Nguyễn Đăng Hiền (2007), "Sự nhân lên của virus sởi chủng AIK-C trên tế bào phôi gà SPF của công ty VALO, Đức", *Tạp chí Y học dự phòng*, XVII(3(88)), 30-34.
 151. Nguyễn Thanh Thủy, Trần Quang Huy, Trần Minh Hiền et al (2010), "Sự thích nghi của vi rút sởi chủng AIK-C trên tế bào nuôi cấy phôi gà quan sát trên kính hiển vi điện tử ", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(2), 234-238.
 152. T. L. Schofield (2009), "Vaccine stability study design and analysis to support product licensure", *Biologicals*, 37(6), 387-96; discussion 421-3.
 153. Nguyễn Đăng Hiền and Nguyễn Nữ Anh Thu (2007), "Xác định hiệu giá vắc xin sởi sống đông khô bằng phương pháp tạo đám hoại tử", *Tạp chí Y học dự phòng*, XVII(5(90) phụ bản), 24 - 29.
 154. I. Erk, J. C. Huet, M. Duarte et al (2003), "A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus", *J Virol*, 77(6), 3595-601.
 155. Sanofi Pasteur (2009), *Applicants dossier of registration for PENTAXIM vaccine*, tr.
 156. Aventis Pasteur (2010), *Applicants dossier of registration for ROUVAX vaccine*, tr.
 157. Aventis Pasteur (2010), *Applicants dossier of registration for MMR vaccine*, tr.
 158. Hiroko Toriniwa and Tomoyoshi Komiya (2008), "Long-term stability of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium", *Vaccine*, 26(29-30), 3680-3689.

159. Huỳnh Phương Liên (2010), "Vi rút sởi", *Vi rút y học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 66-89.
160. S. Ohtake, R. A. Martin, L. Yee et al (2010), "Heat-stable measles vaccine produced by spray drying", *Vaccine*, 28(5), 1275-84.
161. J. Kissmann, S. F. Ausar, A. Rudolph et al (2008), "Stabilization of measles virus for vaccine formulation", *Hum Vaccin*, 4(5), 350-9.
162. K. Trabelsi, S. Majoul, S. Rourou et al (2012), "Development of a measles vaccine production process in MRC-5 cells grown on Cytodex1 microcarriers and in a stirred bioreactor", *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(3), 1031-40.
163. AVENTIS PASTEUR SA (2009), *Applicants dossier of registration for ROUVAX vaccine in Vietnam*, tr.
164. Dự án Tiêm chủng mở rộng (2014), Kế hoạch tiêm chủng mở rộng 2014, 7.
165. Y. Sakai, R. Yamato, M. Onuma et al (1998), "Non-antigenic and low allergic gelatin produced by specific digestion with an enzyme-coupled matrix", *Biol Pharm Bull*, 21(4), 330-4.
166. T. Kumagai, T. Nakayama, M. Kamada et al (2000), "The lymphoproliferative response to enzymatically digested gelatin in subjects with gelatin hypersensitivity", *Clin Exp Allergy*, 30(10), 1430-5.
167. Nguyễn Phan Lê Anh, Phạm Quang Thái, Nguyễn Thị Thu Yên et al (2012), "Đặc điểm dịch tễ học khu vực miền Bắc Việt Nam năm 2011", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XXII(5(132)), 29-33.
168. Phạm Quang Thái (2013), "Tình hình dịch sởi khu vực miền Bắc 6 tháng đầu năm 2013", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XXIII(6(142)), 179-180.

169. Phạm Quang Thái, Nguyễn Thị Thu Yên, Đỗ Phương Loan et al (2013), "Một số đặc điểm dịch sởi tại Lai Châu và Lào Cai 2013", *Tạp chí Y học Dự phòng*, XXIII(11(147)), 142-147.
170. Dự án Tiêm chủng mở rộng (2015), Kế hoạch tiêm chủng mở rộng 2015, 7.

3,10,11,14,16,25,26,33,41,43,50,55-57,65-67,69-71,73-78,80-82,85,87,89-91,93-96

1-12,13,15,17-24,27-32,34-40,42,44-49,51-54,58-64,68,72,79,83,84,86,88,92,97-132