

TÍNH TƯƠNG THÍCH VÀ TỐI ƯU HOÁ HÀM LƯỢNG KHÁNG NGUYÊN ĐỂ PHÁT TRIỂN CÔNG THỨC VẮC XIN PHỐI HỢP BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ VÔ BÀO (DTaP) CỦA VIỆN VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ

Nguyễn Thị Thu Hoa*, Nguyễn Xuân Khánh Hà, Nguyễn Văn Được, Trần Ngọc Nhơn,
Phạm Thị Lan Anh, Lương Thị Bích Trang, Nguyễn Thị Lan Phương, Dương Hữu Thái

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 9 Pasteur, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Thu Hoa <thuhoa1907@gmail.com>

(Ngày nhận bài: 28-02-2025; Hoàn thành phản biện: 26-05-2025; Ngày chấp nhận đăng: 27-05-2025)

Tóm tắt. Tính tương thích giữa các thành phần và hàm lượng kháng nguyên trong vắc xin kết hợp là những yếu tố quan trọng quyết định tính an toàn, hiệu lực và độ ổn định của vắc xin đó. Để phát triển vắc xin bạch hầu – uốn ván – ho gà vô bào (DTaP) tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC), chúng tôi đánh giá tính tương thích giữa các thành phần và tối ưu hoá hàm lượng kháng nguyên trong công thức vắc xin. Các thành phần trong công thức vắc xin DTaP bao gồm kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên bạch hầu (D), độc tố ho gà tái tổ hợp (rPT), yếu tố ngưng kết hồng cầu dạng sợi (FHA) và tá chất nhôm hydroxide được đánh giá tính tương thích bằng các phương pháp hoá lý và miễn dịch học. Phần mềm Design Expert version 12 được sử dụng để tối ưu hoá hàm lượng kháng nguyên cho công thức vắc xin DTaP. Kết quả thử nghiệm xác định đặc tính hóa lý và tính sinh miễn dịch của sản phẩm phối trộn từ các kháng nguyên này và tá chất nhôm hydroxide đã cho thấy các thành phần có sự tương thích với nhau. Chúng tôi đã xác định được công thức vắc xin tối ưu với hàm lượng các thành phần D, T, rPT, FHA và Al³⁺ lần lượt là 40 Lf/mL, 20 Lf/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL và 0,6 mg/mL tương ứng với giá trị công hiệu bạch hầu là 94,47 IU/mL; uốn ván là 107,86 IU/mL; ho gà là 9,65 IU/mL phù hợp với yêu cầu tiêu chuẩn chất lượng theo quy định của Dược điển Việt Nam V, 2018 của Bộ Y tế và Tổ chức Y tế thế giới cho vắc xin DTaP.

Từ khóa: tính tương thích, tối ưu công thức DTaP, tá chất nhôm hydroxide, IVAC

Compatibility and optimization of antigen content to develop combined acellular diphtheria-tetanus-pertussis (DTaP) vaccine at Institute of Vaccines and Medical Biologicals

Nguyen Thi Thu Hoa*, Nguyen Xuan Khanh Ha, Nguyen Van Duoc, Tran Ngoc Nhon,
Pham Thi Lan Anh, Luong Thi Bich Trang, Nguyen Thi Lan Phuong, Duong Huu Thai

Institute of Vaccines and Medical Biologicals, 9 Pasteur, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Viet Nam

* Correspondence to Nguyen Thi Thu Hoa <thuhoa1907@gmail.com>

(Received: 28 February 2025; Revised: 26 May 2025; Accepted: 27 May 2025)

Abstract. Compatibility between components and the amount of antigens in combination vaccines are important factors determining the safety, efficacy, and stability of that vaccine. To develop the diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine at the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC), we evaluated the compatibility among the components and optimized the amount of antigens in the vaccine formulation. The antigen components, including tetanus antigen (T), diphtheria antigen (D), and recombinant pertussis toxoid (rPT), together with filamentous haemagglutination factor (FHA), and aluminum hydroxide adjuvant, were evaluated for compatibility by using physicochemical and immunological methods. Design Expert version 12 software was used to optimize the amount of each antigen in the DTaP vaccine formulation. The results show that the components are compatible with each other. The optimal DTaP vaccine formula contains 40 Lf/mL D, 20 Lf/mL T, 10 µg/mL rPT, 20 µg/mL FHA, and 0.6 mg Al³⁺/mL, respectively, corresponding to the diphtheria potency of 94,47 IU/mL, tetanus potency of 107,86 IU/mL, and pertussis potency of 9,65 IU/mL. The DTaP vaccine developed by IVAC meets the standard of the Vietnamese Pharmacopoeia V, 2018 of the Ministry of Health and WHO.

Keywords: compatibility, optimized DTaP formulation, aluminum hydroxide adjuvant, IVAC

1 Mở đầu

Nhiễm trùng vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây ra các vấn đề về bệnh tật và tử vong ở trẻ dưới năm tuổi; phần lớn trong số đó có thể được phòng ngừa bằng cách tiêm chủng. Tuy nhiên, việc tiêm quá nhiều loại vắc xin cho trẻ trong những năm đầu đời làm cho cha mẹ dễ dàng bỏ quên lịch tiêm chủng của trẻ, tăng chi phí tiêm chủng và chi phí thăm khám. Vắc xin kết hợp có thể là giải pháp cho những vấn đề này khi một loại vắc xin có thể phòng ngừa được nhiều tác nhân gây bệnh [1]. Vắc xin kết hợp thành công đầu tiên bao gồm giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, vi khuẩn ho gà bất hoạt và tá chất chứa nhôm thành một sản phẩm duy nhất có tên vắc xin bạch hầu – uốn ván – ho gà (DTP), được sử dụng để tiêm chủng cho trẻ em vào năm 1948 [2]. Tuy nhiên, vắc xin này có những hạn chế nhất định do tỉ lệ phản ứng phụ khá cao mà phần lớn do thành phần ho gà toàn tế bào (wP) gây ra. Việc thay thế thành phần ho gà toàn tế bào bằng các kháng nguyên vô bào (aP) ít gây phản ứng hơn vào đầu những năm 1980 đã cải thiện đáng kể hồ sơ an toàn của loại vắc xin này, cũng như các vắc xin kết hợp 4, 5 hay 6 thành phần dựa trên nền tảng của vắc xin DTaP [3, 4].

Tại Việt Nam, các vắc xin kết hợp chứa thành phần bạch hầu, uốn ván, ho gà được sử dụng thường xuyên trong Chương trình Tiêm chủng mở rộng quốc gia cho trẻ em dưới 5 tuổi. Tuy nhiên, các vụ dịch bệnh ho gà và bạch hầu liên tiếp được báo cáo trong những năm gần đây. Điểm đặc biệt là bệnh có xu hướng xảy ra ở trẻ lớn và người lớn, tập trung ở vùng núi và cao nguyên (đối với bệnh bạch hầu) và rải rác ở tất cả các tỉnh thành trong cả nước đối với bệnh ho gà [5, 6]. Nguyên nhân có thể do sự suy giảm miễn dịch bảo vệ đối với các bệnh này do tỷ lệ bao phủ thấp các mũi tiêm nhắc lại khi trẻ từ 12–18 tháng tuổi và khi trẻ lớn hơn ở lứa tuổi bắt đầu đi học. Trong khi vắc xin kết hợp chứa thành phần ho gà toàn tế bào chỉ được sử dụng cho trẻ em dưới 48 tháng tuổi thì các vắc xin chứa thành phần ho gà vô bào được chỉ định sử dụng rộng rãi hơn, cho cả đối tượng trẻ nhỏ, trẻ lớn và người lớn. Tuy nhiên, hiện nay các vắc xin này hoàn toàn phải nhập ngoại với giá thành cao ở dạng vắc xin dùng cho trẻ nhỏ hoặc người lớn, mà chưa có vắc xin phù hợp với nhóm trẻ lớn từ 5 đến 10 tuổi. Do đó, điều cần thiết là Việt Nam phải phát triển các vắc xin kết hợp chứa thành phần bạch hầu, uốn ván và ho gà vô bào, đặc biệt là các vắc xin sử dụng trong các chiến dịch tiêm nhắc lại ở đối tượng trẻ lớn và người lớn như các vắc xin Diphtheria

Tetanus acellular Pertussis (DTaP) và Tetanus reduce diphtheria pertussis (Tdap). Để đáp ứng nhu cầu trên, Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) nhắm đến mục tiêu dài hạn là phát triển các vắc xin kết hợp chứa thành phần ho gà vô bào, trước tiên là vắc xin DTaP hướng đến việc cung cấp một loại vắc xin chất lượng cao, có giá thành hợp lý và sẵn có cho mọi đối tượng trẻ em có thể tiếp cận.

Những lợi ích của vắc xin kết hợp đã được chứng minh qua thực tế như giảm số lần tiêm, giảm số lần thăm khám, giảm chi phí việc quản lý lưu trữ vắc xin, tăng khả năng tuân thủ lịch tiêm chủng và cải thiện việc lưu giữ và theo dõi hồ sơ của trẻ được tiêm chủng [7]. Tuy vậy, việc phát triển vắc xin kết hợp mới thường gây ra những khó khăn lớn ở các giai đoạn sản xuất, thử nghiệm và tiêm chủng. Đó là nguy cơ giảm hiệu quả hoặc tính an toàn của vắc xin so với việc tiêm từng loại vắc xin riêng lẻ. Tính an toàn, hiệu quả và khả năng sinh miễn dịch của vắc xin kết hợp có thể bị ảnh hưởng do tương tác giữa các kháng nguyên với nhau, giữa kháng nguyên với các thành phần khác như tá chất, tá dược, chất ổn định và chất bảo quản. Điều quan trọng nhất là vắc xin kết hợp phải chứng minh được sự ổn định trong suốt vòng đời sản phẩm của nó [3]. Tương tác hóa học hoặc vật lý giữa các thành phần trong vắc xin kết hợp có thể dẫn đến thay đổi đáp ứng miễn dịch đối với vắc xin [8]. Tương tác miễn dịch giữa các thành phần kháng nguyên của vắc xin kết hợp có thể tạo nên tình trạng cạnh tranh kháng nguyên làm giảm hiệu lực của một hay nhiều thành phần như kháng nguyên polysaccharide cộng hợp làm giảm công hiệu của thành phần uốn ván trong vắc xin 5 trong 1. Tương tác này cũng có thể dẫn đến khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch với các thành phần riêng lẻ như xảy ra trong vắc xin ho gà toàn tế bào khi kết hợp với kháng nguyên bạch hầu và uốn ván. Thông thường, sự kết hợp nhiều vắc xin thường vô hiệu hoá lẫn nhau hoặc làm giảm đáp ứng miễn dịch của một hoặc nhiều

thành phần vắc xin [8, 9]. Các loại vắc xin DTaP từ các nhà sản xuất khác nhau có thành phần kháng nguyên tương tự nhau, nhưng điểm khác biệt chính liên quan đến số lượng các kháng nguyên ho gà tinh chế sử dụng và phương pháp giải độc các thành phần này [10]. Vắc xin DTaP của IVAC được phối trộn từ kháng nguyên độc tố ho gà tái tổ hợp giải độc gen (rPT) và kháng nguyên ngưng kết hồng cầu dạng sợi (FHA) hấp phụ có nguồn gốc từ Bionet, Thái Lan, trong khi đó thành phần bạch hầu, uốn ván được sản xuất tại IVAC và tá chất nhôm hydroxide được Croda, Đan Mạch, cung cấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích sâu về các tương tác lý hóa giữa kháng nguyên và tá chất cũng như tối ưu hóa các tương tác đó để làm nổi bật báo cáo liên quan đến tương tác kháng nguyên – tá chất và tối ưu hóa các công thức vắc xin để đạt được độ ổn định và hoạt tính sinh học của vắc xin DTaP của IVAC.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Vắc xin DTaP phối hợp từ các kháng nguyên bạch hầu (D) lô số PD.0819 và kháng nguyên uốn ván (T) lô số PT.0519 có nguồn gốc từ IVAC, Việt Nam. Các kháng nguyên ho gà vô bào hấp phụ riêng lẻ gồm kháng nguyên độc tố ho gà tái tổ hợp (rPT-recombinant Pertussis Toxin, lô số AE 8004) và kháng nguyên ngưng kết hồng cầu dạng sợi (FHA-Filamentous Haemagglutinin, lô số AF 8002) có nguồn gốc từ công ty Bionet, Thái Lan, và tá chất Alhydrogel 1,3% hãng Croda, Đan Mạch (lô số 5621).

Các vắc xin đối chứng gồm vắc xin DTaP của Bionet, Thái Lan, (lô số AN 8001) và vắc xin Tetraxim™, Sanofi, Pháp (lô số V3L951V).

2.2 Phương pháp

Xác định đặc tính của kháng nguyên và tá chất

Các tiêu chí kiểm tra bao gồm: hàm lượng kháng nguyên D và T (phương pháp lên bông giữa kháng nguyên với kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván tương ứng), hàm lượng Al^{3+} (phương pháp Complexon), độ sạch kháng nguyên T và D (tỷ lệ giữa hàm lượng kháng nguyên và protein tổng số trong 1 mg nitơ protein (N-P), hàm lượng endotoxin (phương pháp gel-clot). Tất cả các phương pháp trên đều được mô tả trong Dược điển Việt Nam V, 2018 (ĐĐVN V, 2018) [11]. Kích thước hạt, điện thế Zeta được đo trên thiết bị Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba, Nhật Bản), điểm đẳng điện (pI) được xác định dựa trên sự kết tủa của protein tại điểm đẳng điện khi tạo các pH khác nhau [12]. Độ hấp phụ được xác định dựa theo tỷ lệ phần trăm giữa hàm lượng kháng nguyên hấp phụ trên tá chất so với hàm lượng kháng nguyên tổng số. Độ hấp phụ của các kháng nguyên thành phần trong vắc xin hấp phụ nhôm hydroxide phải đạt tối thiểu 80%. Trong đó, hàm lượng D và T xác định bằng phương pháp lên bông [11], rPT và FHA xác định bằng phương pháp ELISA (do Bionet, Thái Lan, phát triển), sử dụng kháng thể thứ nhất là JN1H 12 (đối với PT) và JN1H 11 (đối với FHA) của Viện Tiêu chuẩn và Kiểm soát Sinh học Quốc gia Anh (NIBSC), kháng thể thứ 2 là cộng hợp dê kháng chuột gắn PO (Abcam).

Tính đặc hiệu kháng nguyên được xác định bằng phương pháp Western Blot [13], sử dụng màng nitrocellulose (Invitrogen, IB23002) và kháng thể thứ 2 là cộng hợp thỏ kháng ngựa (Fc)-HRP (Sigma, SAB3700152-1,5MG) đối với D và T và cộng hợp dê kháng chuột H+L (Thermo Fisher Scientific, AP124P) đối với rPT và FHA).

Chuẩn bị các vắc xin hấp phụ bạch hầu, uốn ván riêng lẻ và vắc xin DTaP

Để đánh giá độ toàn vẹn và tính tương thích giữa các kháng nguyên sau hấp phụ, chúng tôi chuẩn bị vắc xin hấp phụ DTaP, mỗi loại 3 lô (100 mL/lô) với hàm lượng tương ứng như sau: D: 40 Lf/mL, T: 20 Lf/mL, rPT: 10 μ g/mL, FHA: 20 μ g/mL và Al^{3+} : 0,6 mg/mL.

Để tối ưu hoá hàm lượng kháng nguyên trong công thức vắc xin DTaP, chúng tôi dựa vào các công thức vắc xin thương mại hiện có trên thế giới [3], khuyến cáo của hãng Bionet, Thái Lan, và sử dụng thiết kế Box-Behnken (phần mềm Design Expert version 12) với hàm lượng lý thuyết của các kháng nguyên D (30–35–40 Lf/mL), T (12–16–20 Lf/mL), rPT (10–12 μ g/mL), FHA (20–25 μ g/mL) và tá chất Alhydrogel 1,3% (0,6 mg Al^{3+} /mL) với thể tích 100 mL cho mỗi công thức. Công thức vắc xin DTaP được chọn phải thỏa mãn các điều kiện về cảm quan, an toàn chung và công hiệu của các thành phần bạch hầu, uốn ván và ho gà theo khuyến cáo của ĐĐVN V, 2018, và Tổ chức Y tế thế giới đối với vắc xin DTaP.

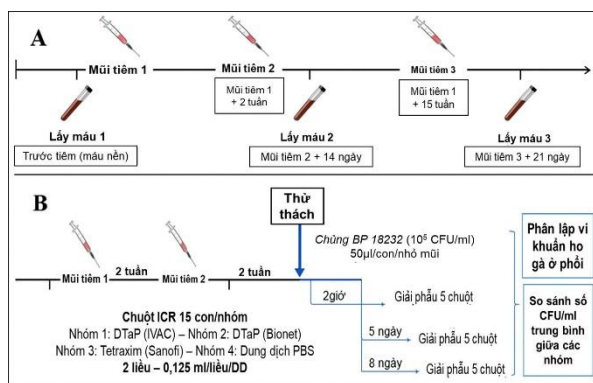
Đánh giá tính tương thích về hóa lý của các thành phần trong vắc xin DTaP

Các tiêu chí đánh giá tính tương thích về hóa lý bao gồm cảm quan, pH theo hướng dẫn của ĐĐVN V, 2018, cho vắc xin hấp phụ kết hợp và độ hấp phụ của các thành phần kháng nguyên.

Đánh giá tính sinh miễn dịch của vắc xin DTaP trên mô hình chuột nhắt

Xác định hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu (anti-D), uốn ván (anti-T), ho gà vô bào (anti-PT và anti-FHA): Gây miễn dịch trên chuột nhắt trắng *Mlac:ICR*. Mỗi cá thể chuột nhắt (*Mlac: ICR*, 4–6 tuần tuổi) trong một nhóm (10 con/nhóm) được tiêm 3 liều (0,125 mL) hoặc vắc xin DTaP (trong 1 mL có 40 Lf D, 20 Lf T, 10 μ g rPT, 20 μ g FHA, 0,6 mg Al^{3+}) hoặc vắc xin đối chứng DTaP

(Bionet, Thái Lan) hay Tetraxim™ (Sanofi, Pháp) với khoảng cách giữa các liều tương ứng là 2 tuần và 15 tuần. Huyết thanh miễn dịch tách từ máu chuột được lấy trước tiêm, sau tiêm liều thứ hai 14 ngày và liều thứ ba 21 ngày (Hình 1a). Chuẩn độ kháng thể kháng bạch hầu và uốn ván trong huyết thanh miễn dịch bằng phản ứng ức chế miễn dịch gắn men (Toxin Binding Inhibition - ToBI) [14] và kháng thể kháng PT và FHA bằng phản ứng ELISA gián tiếp [15]. Yêu cầu đáp ứng kháng thể kháng các kháng nguyên thành phần trong vắc xin DTaP không thấp hơn so với đáp ứng kháng thể của các kháng nguyên đơn hấp phụ hoặc không hấp phụ.



Hình 1. Mô hình nghiên cứu tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chống nhiễm khuẩn của vắc xin DTaP (a) Sơ đồ gây miễn dịch đánh giá đáp ứng kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván và ho gà aP của vắc xin DTaP. (b) Mô hình thử thách bằng đường niêm mạc đánh giá hiệu quả bảo vệ chống nhiễm khuẩn ho gà của vắc xin DTaP [15].

Đánh giá hiệu quả bảo vệ chống nhiễm khuẩn ho gà của vắc xin DTaP

Các nhóm chuột (*Mlac:ICR*, 3–4 tuần tuổi) được gây miễn dịch và thử thách như mô tả ở Hình 1b. Tất cả chuột được thử thách bằng đường nhỏ mũi hỗn dịch chủng vi khuẩn *B. pertussis* 18323 (50 μL/con, 10⁵ CFU/mL) vào ngày thứ 14 sau liều tiêm thứ hai. Vi khuẩn ho gà được phân lập bằng cách nuôi cấy trên môi trường thạch BG chứa 30% máu cừu tươi từ mẫu bệnh phẩm là huyền phù mô phổi của mỗi con chuột trong nhóm gồm 5 con tại các thời điểm 2 giờ, 5 ngày và 8 ngày sau thử thách. Số lượng vi khuẩn ho gà

phân lập được của mỗi con chuột được tính (CFU/phổi) và so sánh với số CFU trung bình của nhóm chứng tiêm PBS.

Xác định công hiệu của các thành phần kháng nguyên trong vắc xin DTaP

Các độ pha loãng của vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn được gây miễn dịch cho chuột lang (*Mlac:DH*, 4–6 tuần tuổi) đối với bạch hầu hoặc chuột nhắt (*Mlac:ICR*, 4–6 tuần tuổi) đối với uốn ván và ho gà vô bào. Sau thời gian miễn dịch, tất cả động vật được thử thách với độc tố bạch hầu, uốn ván hoặc chủng vi khuẩn ho gà độc lực *B. pertussis* ATCC 18323. Công hiệu được xác định dựa trên liều bảo vệ 50% (ED₅₀) của vắc xin thử so với vắc xin mẫu chuẩn và được biểu thị bằng IU/mL [12]. Công hiệu của vắc xin DTaP đạt yêu cầu khi công hiệu thành phần bạch hầu (D) ≥ 60 IU/mL (CI: 50–200%, LL ≥ 60 IU/mL); công hiệu uốn ván (T) ≥ 80 IU/mL (CI: 50–200%, LL ≥ 80 IU/mL); công hiệu ho gà (aP) ≥ 8 IU/mL (LL ≥ 4 IU/mL) [11].

Đánh giá an toàn chung của vắc xin DTaP

An toàn chung của vắc xin DTaP được thử trên hai cá thể chuột lang (*Mlac:DH*, 250–300 g/con) và năm cá thể chuột nhắt (*Mlac:ICR*, 18–22 g/con). Tiêm vắc xin DTaP vào ổ bụng của chuột với liều tiêm 0,5 mL (1 liều tiêm cho người – 1 SHD) cho mỗi cá thể chuột nhắt hoặc chuột lang. Chuột được theo dõi trong suốt 7 ngày. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi tất cả con chuột đều sống, khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh lý và tăng cân so với ngày đầu tiên.

Tất cả chuột dùng trong các thí nghiệm đều được cung cấp tại Trại Chăn nuôi Suối Dầu thuộc IVAC. Chuột có nguồn gốc từ trường Đại học Mahidol, Thái Lan.

Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Design Expert version 12 và GraphPad Prism version 10 để tối ưu hóa công thức vắc xin, xử lý số liệu và xác định mức khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm vắc xin và các nhóm đối chứng.

Tuyên bố về đạo đức

Các nghiên cứu trên động vật thí nghiệm được Hội đồng Khoa học và Đạo đức của Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế phê duyệt theo Quyết định số: 241/QĐ-VXSPYT, ngày 29/07/2022, phù hợp với quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Bộ Y tế ban hành.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đặc tính của kháng nguyên và tá chất

Các kết quả kiểm tra đặc tính kháng nguyên và tá chất nhôm hydroxide từ các nhà sản xuất khác nhau cho thấy các nguyên liệu này đáp ứng được yêu cầu để phối trộn vắc xin DTaP về hàm lượng các thành phần, pH, độ sạch kháng nguyên D và T, hàm lượng nhôm, độ hấp phụ kháng nguyên rPT và FHA và nồng độ endotoxin. Điện thế Zeta của các kháng nguyên D và T tương ứng là -4,8 và -2,3 mV và của alhydrogel là +28,8 mV. Điểm đẳng điện của các kháng nguyên D và T tương ứng là 4,3 và 4,6 (Bảng 1). Các kết quả này đều tương đồng với các công bố trước đây [16, 18]. Đây là cơ sở để lựa chọn pH phù hợp cho quá trình hấp phụ kháng nguyên D và T vào tá chất nhôm hydroxide và trình tự của quá trình phối trộn vắc xin DTaP tiếp theo.

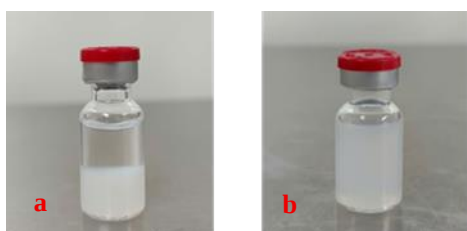
Bảng 1. Các đặc tính hóa lý/miễn dịch của nguyên liệu được kiểm tra

Đặc tính	Kháng nguyên				Alhydrogel 1,3% Lô 5621
	Bạch hầu	Uốn ván	rPT	FHA	
	Lô PD.0819	Lô PT.0519	Lô AE8004	Lô AF8002	
Hàm lượng KN	1500±20 Lf/mL	1850±20 Lf/mL	48,6±0,5 µg/mL	49,3±0,5 µg/mL	NA
Hàm lượng Al ³⁺ (mg/mL)	NA	NA	0,58 ± 0,05	0,61 ± 0,05	6,1 ± 0,05
Độ hấp phụ (%)	NA	NA	98,3 ± 1,0	99,5 ± 1,0	NA
Độ sạch (Lf/mg N-P)	1941 ± 20	1652 ± 20	NA	NA	NA
pH	7,03 ± 0,01	7,07 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,53 ± 0,01	6,73 ± 0,01
Kích thước hạt (nm)	NA	NA	NA	NA	2032 ± 100
Điện thế Zeta (mV)	-4,8 ± 0,1	-2,3 ± 0,1	-3,7 ± 0,1	-1,4 ± 0,1	28,8 ± 0,1
Điểm đẳng điện (pI)	4,3 ± 0,1	4,6 ± 0,1	NA	NA	11,4 ± 0,1
Endotoxin (EU/mL)	24 ± 2	76 ± 2	10 ± 2	6 ± 2	NA

KN: kháng nguyên, N-P: nito protein, NA: không áp dụng.

3.2 Tương thích về đặc tính hóa lý của vắc xin kết hợp DTaP

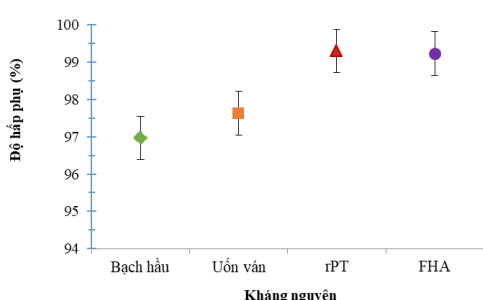
Vắc xin DTaP có đặc điểm vật lý phù hợp với mô tả trong ĐEVN, 2018, về tiêu chuẩn cảm quan cho vắc xin kết hợp hấp phụ tá chất nhôm (Hình 2). Các lô vắc xin DTaP thí nghiệm có độ pH lần lượt là 6,79, 6,85 và 6,83 (tiêu chuẩn 6,0–7,5) theo ĐEVN V, 2018.



Hình 2. Sản phẩm vắc xin DTaP thí nghiệm (D: 40 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; rPT: 10 µg/mL; FHA: 20 µg/mL, Al³⁺: 0,6 mg/mL)

(a) Sản phẩm ở trạng thái lỏng, vắc xin tách thành 2 lớp, phần trên là dịch trong, phần lắng cặn màu trắng xám. (b) Sản phẩm ở trạng thái sau khi lắc, vắc xin tạo thành huyền phù đồng nhất, màu trắng đục, không lẫn tiểu phần lạ.

Độ hấp phụ của các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván và ho gà aP (bao gồm PT và FHA) đều đạt trên 95% (khuyến cáo của WHO là ≥80%) (Hình 3).



Hình 3. Độ hấp phụ của các kháng nguyên thành phần trong vắc xin DTaP/TN

Các thanh biểu thị độ lệch chuẩn (SD) của độ hấp phụ của mỗi kháng nguyên; thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Ở pH trung tính, tá chất alhydrogel 1,3% có điện tích bề mặt dương và pI = 11,4, trong khi các kháng nguyên D và T đều mang điện tích âm ở pH này [17]. Các nghiên cứu của Gupta năm 1998 cho thấy việc hấp phụ kháng nguyên protein lên

tá chất nhôm phụ thuộc rất lớn vào lực liên kết tĩnh điện giữa chúng. Ngoài ra, còn xuất hiện các liên kết khác như liên kết kỵ nước, trao đổi phối tử hoặc lực van der Waals và liên kết hydro, nhưng các liên kết này chỉ chiếm tỷ lệ không đáng kể [19]. Chênh lệch giá trị điện thế Zeta và pI giữa kháng nguyên và tá chất càng lớn thì lực liên kết tĩnh điện giữa chúng càng mạnh [18]. Các giá trị về điện thế Zeta và pI của kháng nguyên bạch hầu, kháng nguyên uốn ván và tá chất nhôm hydroxide dùng trong công thức vắc xin DTaP tạo nên độ hấp phụ của các kháng nguyên này xảy ra trên bề mặt tá chất ở mức độ từ mạnh (đối với kháng nguyên uốn ván) đến rất mạnh (đối với kháng nguyên bạch hầu). Kết quả cho thấy các kháng nguyên D và T trong vắc xin kết hợp vẫn thể hiện khả năng hấp phụ mạnh mẽ lên tá chất, trong khi các kháng nguyên rPT và FHA trong vắc xin kết hợp vẫn bảo toàn được độ hấp phụ như với kháng nguyên hấp phụ riêng lẻ của nhà sản xuất cung cấp. Điều này chứng tỏ rằng các kháng nguyên D, T, rPT, FHA và tá chất alhydrogel 1,3% từ các nguồn gốc khác nhau đã có sự tương thích về mặt hoá lý khi được phối trộn thành vắc xin DTaP.

3.3 Tương thích về tính sinh miễn dịch của kháng nguyên hấp phụ riêng lẻ và vắc xin DTaP

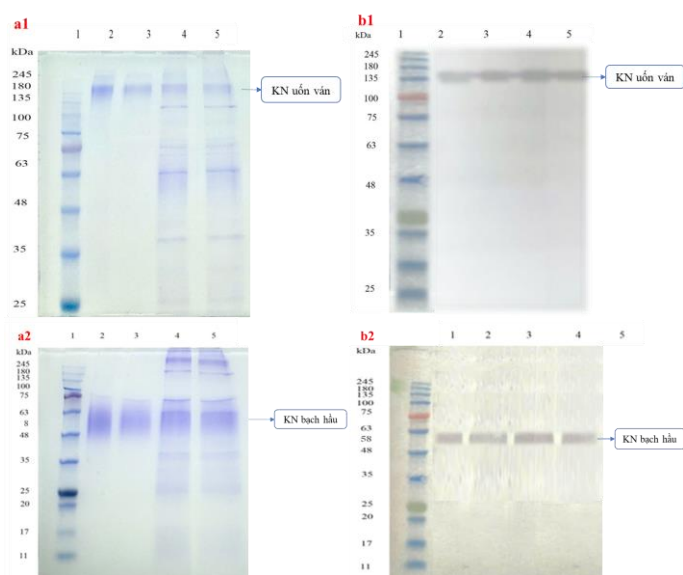
Tương thích về tính sinh miễn dịch của các thành phần kháng nguyên trong vắc xin kết hợp DTaP thể hiện ở chỗ tính toàn vẹn của kháng nguyên trong vắc xin kết hợp vẫn giữ được khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng thể tương ứng trên Western Blot; khả năng tạo đáp ứng kháng thể của mỗi kháng nguyên trong vắc xin kết hợp không bị ức chế hoặc cạnh tranh làm sụt giảm hiệu giá so với kháng nguyên không hấp phụ hoặc hấp phụ đơn lẻ.

Những kết quả thử nghiệm về đặc tính hóa lý cho thấy các kháng nguyên này là tương thích khi được phối trộn trong môi trường tá chất nhôm

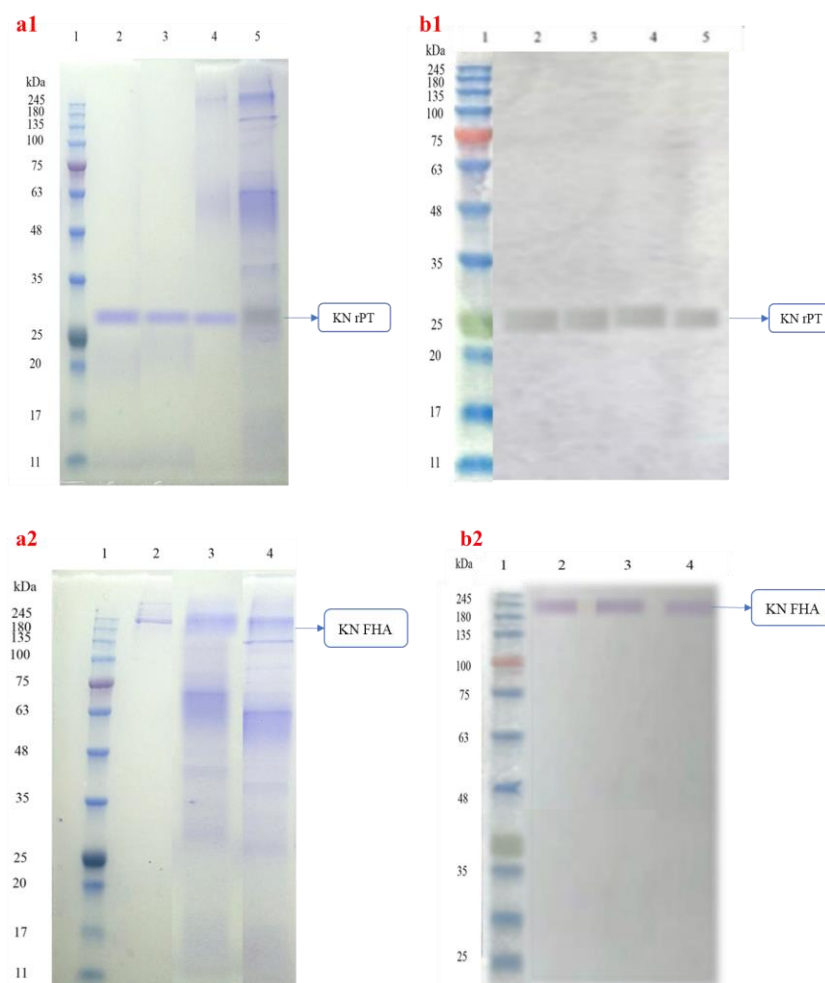
hydroxide. Về tính sinh miễn dịch, hồ sơ của 2 kháng nguyên bạch hầu và uốn ván trong sản phẩm truyền thống bạch hầu, uốn ván và ho gà toàn tế bào (DTwP) của IVAC đã được chứng minh trên lâm sàng trong hơn 30 năm qua khi sử dụng trong Chương trình Tiêm chủng mở rộng quốc gia [20]. Tuy nhiên, đối với thành phần ho gà vô bào tái tổ hợp rPT, chúng tôi chỉ được tiếp cận rất hạn chế với những thông tin về tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chống nhiễm trùng của vắc xin tại thời điểm này do quy trình bảo mật về công nghệ của nhà sản xuất Bionet, Thái Lan. Do đó, đối với thành phần ho gà vô bào, tính tương thích miễn dịch sẽ được đánh giá một cách toàn diện dựa trên khả năng tạo được hiệu quả bảo vệ chống nhiễm khuẩn ho gà và đáp ứng kháng thể kháng PT và FHA của vắc xin DTaP sau tiêm nhắc lại (18 tuần). Các kết quả dùng để đánh giá tính tương thích miễn dịch được trình bày dưới đây.

Tính đặc hiệu kháng nguyên

Các hình ảnh ghi nhận trên SDS-PAGE cho thấy ở các mẫu vắc xin DTaP đều xuất hiện các band tương ứng với TLPT của bốn kháng nguyên D, T, PT và FHA. Ngoài ra, trên SDS-PAGE còn xuất hiện một số band phụ do các kháng nguyên này được sản xuất thương mại nên độ sạch của chúng được chấp nhận dựa theo tiêu chuẩn độ sạch kháng nguyên (tỷ lệ giữa hàm lượng kháng nguyên/N-P) [11]. Các kết quả trên Western Blot cho thấy các kháng nguyên D và T ở dạng tinh chế hoặc kháng nguyên đơn thành phần được hấp phụ với tá chất hoặc kháng nguyên trong vắc xin DTaP đều xuất hiện ở vạch tương ứng với TLPT của kháng nguyên D và T lần lượt khoảng 58 kD và 150 kD, kháng nguyên rPT ở khoảng 26 kD và kháng nguyên FHA ở khoảng 220 kD (Hình 4, 5). Cường độ biểu hiện của các band trên Western Blot cho thấy không có sự khác biệt giữa kháng nguyên D và T tinh chế hoặc kháng nguyên hấp phụ đơn thành phần hoặc kháng nguyên trong vắc xin DTaP.



Hình 4. Kháng nguyên uốn ván, bạch hầu khi chạy điện di SDS-PAGE (a1, a2) và trên Western Blot (b1, b2): a1/b1. Kháng nguyên uốn ván: 1. Thang đo, 2. KN uốn ván, 3. KN uốn ván hấp phụ nhôm hydroxide, 4. Vắc xin DTaP (IVAC), 5. Vắc xin DTaP (Bionet, Thái Lan); a2/b2. Kháng nguyên bạch hầu: 1. Thang đo, 2. KN bạch hầu, 3. KN bạch hầu hấp phụ nhôm hydroxide, 4. Vắc xin DTaP (IVAC), 5. Vắc xin DTaP (Bionet, Thái Lan)

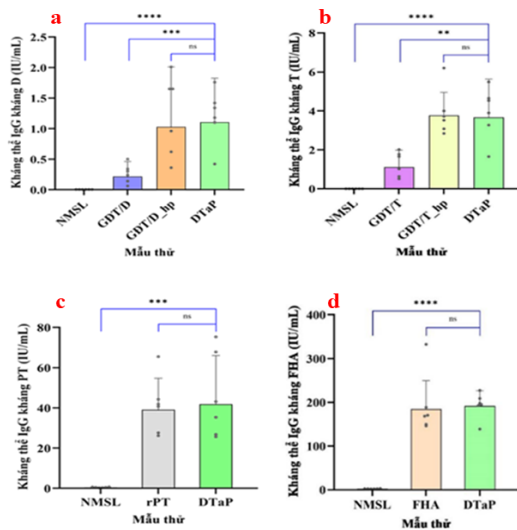


Hình 5. Kháng nguyên rPT và FHA khi chạy điện di SDS-PAGE (a1, a2) và trên Western Blot (b1, b2):
a1/b1. Kháng nguyên rPT: 1. Thang đo, 2. rPT hấp phụ nhôm hydroxide, 3. Vắc xin DTaP (IVAC), 4. Vắc xin DTaP (Bionet, Thái Lan); a2/b2. Kháng nguyên FHA: 1. Thang đo, 2. FHA hấp phụ nhôm hydroxide, 3. Vắc xin DTaP (IVAC), 4. Vắc xin DTaP (Bionet, Thái Lan)

Đáp ứng kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván và ho gà

Nồng độ kháng thể IgG kháng bạch hầu và uốn ván trong huyết thanh cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm chuột được miễn dịch với kháng nguyên tinh chế so với kháng nguyên hấp phụ đơn thành phần và trong vắc xin DTaP. Đối với kháng nguyên bạch hầu, hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu đạt trung bình 0,22 IU/mL (kháng nguyên tinh chế), 1,03 IU/mL (kháng nguyên hấp phụ tá chất nhôm hydroxide) và 1,11 IU/mL (vắc xin DTaP). Như vậy, kháng thể IgG kháng bạch hầu ở chuột miễn dịch với các

sản phẩm hấp phụ cao gấp 4,68 lần (kháng nguyên bạch hầu hấp phụ đơn lẻ) và 5,04 lần (vắc xin DTaP) so với chuột được miễn dịch với kháng nguyên tinh chế (Hình 6a). Tương tự, đối với kháng nguyên uốn ván, kháng thể IgG kháng uốn ván do vắc xin DTaP tạo ra cao gấp 5,0 lần so với kháng nguyên tinh chế (Hình 6b). Đối với 2 kháng nguyên ho gà rPT và FHA, đáp ứng kháng thể IgG kháng PT và kháng FHA của vắc xin DTaP lần lượt là 41,8 IU/mL và 191,11 IU/mL, tương đương với kháng nguyên hấp phụ đơn thành phần tương ứng (Hình 6c và 6d).



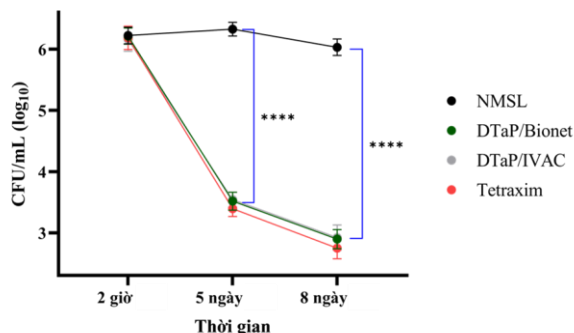
Hình 6. Đáp ứng kháng thể của các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván, rPT và FHA hấp phụ riêng lẻ và trong vắc xin DTaP: a: kháng thể kháng bạch hầu của GDT/D, GDT/D-hp và vắc xin DTaP; b: kháng thể kháng uốn ván của GDT/T, GDT/T-hp và vắc xin DTaP; c: kháng thể kháng PT của rPT và vắc xin DTaP; d: kháng thể kháng FHA của FHA và vắc xin DTaP; ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,1$; ns: not significant (không có ý nghĩa thống kê.) $p = 0,99$ và $p = 0,98$ đối với đáp ứng kháng thể kháng bạch hầu và uốn ván ở các nhóm chuột miễn dịch với kháng nguyên hấp phụ đơn lẻ tương ứng và vắc xin DTaP. $p = 0,68$ và $p = 0,98$ đối với đáp ứng kháng thể kháng rPT và FHA ở các nhóm chuột miễn dịch với kháng nguyên hấp phụ đơn lẻ tương ứng và vắc xin DTaP

Hiệu quả bảo vệ chống nhiễm khuẩn ho gà của vắc xin DTaP

Kết quả trên Hình 7 cho thấy tại thời điểm 2 giờ sau khi thử thách, số lượng vi khuẩn đếm được ở phổi của 3 nhóm chuột thử nghiệm và nhóm đối chứng tiêm nước muối sinh lý (NMSL) đều không có sự khác biệt. Tuy nhiên, sau 5 ngày và 8 ngày thử thách, cả 3 nhóm chuột tiêm vắc xin đều có sự cải thiện đáng kể về khả năng đào thải vi khuẩn. Ở nhóm đối chứng tiêm NMSL, số lượng vi khuẩn tăng nhẹ sau 5 ngày thử thách ($\log_{10}$ CFU = 6,33) so với lượng vi khuẩn gây nhiễm ban đầu ($\log_{10}$ CFU = 6,0); sau đó, do đào thải tự nhiên nên số lượng vi khuẩn giảm đi vào ngày thứ 8 ($\log_{10}$ CFU = 6,03) nhưng không khác biệt đáng kể so với lượng vi khuẩn thử thách ban đầu (sau 2 giờ). Kết quả này trái ngược hoàn toàn

so với các nhóm tiêm vắc xin khi đánh giá tốc độ đào thải vi khuẩn ở ngày thứ 5 và ngày thứ 8 sau thử thách. Ở các nhóm chuột tiêm vắc xin, số lượng CFU trong phổi ở ngày thứ 5 sau thử thách có giá trị $\log_{10}$ CFU 3,39–3,54 và không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm với các giá trị p lần lượt là 0,83 (giữa DTaP/IVAC và DTaP/Bionet) và 0,09 (DTaP của IVAC và Tetraxim/Sanofi).

Ở ngày thử thách thứ 8, số lượng CFU trong phổi của các nhóm chuột tiêm vắc xin có giá trị $\log_{10}$ CFU là 2,74–2,91 và không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm với các giá trị p lần lượt là 0,72 (giữa DTaP/IVAC và DTaP/Bionet) và 0,12 (giữa DTaP/IVAC và Tetraxim/Sanofi). Kang và cộng sự nghiên cứu khả năng đào thải vi khuẩn ho gà trên chuột nhắt trắng BALB/c, được miễn dịch với 3 liều tiêm các vắc xin Infanrix (GSK, Rixensart, Bỉ), DTaP (GC, Hàn Quốc) và DTaP với thành phần aP chứa 3 kháng nguyên PT, FHA và PRN tái tổ hợp sau đó được thử thách với vi khuẩn ho gà (ATCC 9797, 50 μ L, 5×10^6 CFU/mL và cho thấy tất cả các nhóm chuột tiêm vắc xin đều có sự cải thiện đáng kể có ý nghĩa thống kê về khả năng đào thải vi khuẩn trong thời gian quan sát sau khi gây nhiễm so với nhóm đối chứng (tiêm NMSL). Mặc dù nhóm vắc xin DTaP chứa PT tái tổ hợp cho thấy tốc độ đào thải vi khuẩn chậm hơn so với nhóm tiêm vắc xin thương mại Infanrix và DTaP của GC, Hàn Quốc, nhưng cũng cung cấp khả năng đào thải gần như hoàn toàn sau 2 tuần gây nhiễm ($\log_{10}$ CFU < 0,4). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tốc độ đào thải vi khuẩn ở các nhóm được bảo vệ bằng vắc xin tương tự như kết quả của Kang và cộng sự mặc dù về chi tiết có một số khác biệt nhỏ, có thể do sự khác nhau về nguồn gốc, số lượng kháng nguyên aP và hàm lượng của chúng trong công thức vắc xin DTaP, cũng như quy trình gây miễn dịch chuột (2 liều so với 3 liều), giống chuột, chủng thử thách và liều thử thách [21].



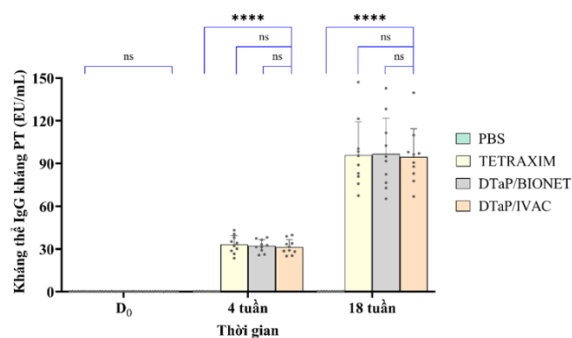
Hình 7. Khả năng thanh thải vi khuẩn ho gà ở phổi của chuột nhắt khi gây miễn dịch các nhóm vắc xin và thử thách đường mũi với vi khuẩn ho gà *B. pertussis* 18323
****: $p = 0,000018 < 0,0001$ (5 ngày) và $p = 0,000063 < 0,01$ (8 ngày): khác biệt có ý nghĩa thống kê.
NMSL: nước muối sinh lý.

Đáp ứng kháng thể kháng PT và FHA sau các liều nhắc lại vắc xin DTaP

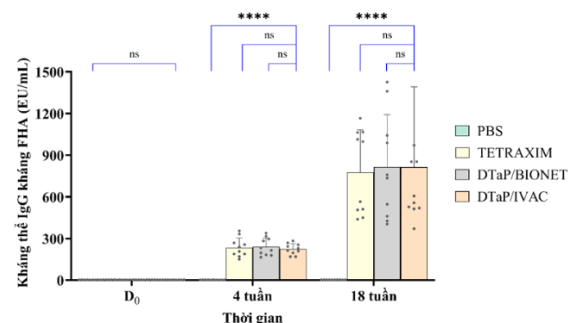
Kết quả nghiên cứu cho thấy đáp ứng miễn dịch dịch thể ở chuột nhắt tại thời điểm trước khi tiêm, nồng độ kháng thể IgG là âm tính ($<0,2$ IU/mL) ở tất cả các nhóm. Sau đó, nồng độ kháng thể IgG kháng PT tăng nhanh ở tuần thứ 4 và đạt lần lượt là 30,97 IU/mL (DTaP/IVAC), 31,89 IU/mL (DTaP/Bionet) và 32,68 IU/mL (Tetraxim, Sanofi). Ở tuần thứ 18, tương ứng với 3 tuần sau khi tiêm mũi thứ 3 vắc xin DTaP, nồng độ kháng thể tiếp tục tăng cao và đạt lần lượt là 92,97 IU/mL (DTaP/IVAC), 94,11 IU/mL (DTaP/Bionet) và 93,57 IU/mL (Tetraxim, Sanofi) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị p lần lượt là 0,90 (DTaP/IVAC và Tetraxim/Sanofi) và 0,83 (DTaP/IVAC và DTaP/Bionet). Trong khi đó, nồng độ kháng thể của nhóm chuột tiêm nước muối sinh lý hầu như không thay đổi sau các mũi tiêm (Hình 8).

Tương tự, nồng độ kháng thể IgG kháng FHA của 3 nhóm vắc xin thu được ở tuần thứ 18 tăng cao và đạt lần lượt là 702,52 IU/mL (DTaP/IVAC), 738,14 IU/mL (DTaP/Bionet) và 721,70 IU/mL (Tetraxim, Sanofi) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với giá trị p lần lượt là

0,86 (DTaP/IVAC và Tetraxim/Sanofi), 0,99 (DTaP/IVAC và DTaP/Bionet) (Hình 9). Kết quả kháng thể kháng PT và kháng FHA cho thấy vắc xin DTaP do IVAC phát triển có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch tương đương với vắc xin DTaP của Bionet và vắc xin thương mại Tetraxim, Sanofi.



Hình 8. Kháng thể IgG kháng PT trong huyết thanh chuột nhắt khi miễn dịch với vắc xin DTaP (IVAC), Bionet (Thái Lan), Tetraxim (Sanofi, Pháp)
****: $p < 0,0001$: khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: not significant (không có ý nghĩa thống kê) với $p = 0,47$ (DTaP/IVAC và Tetraxim/Sanofi); $p = 0,71$ (DTaP/IVAC và DTaP/Bionet).



Hình 9. Kháng thể IgG kháng FHA trong huyết thanh chuột nhắt khi miễn dịch với vắc xin DTaP (IVAC), Bionet (Thái Lan), Tetraxim (Sanofi, Pháp)
****: $p < 0,0001$: khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: not significant (không có ý nghĩa thống kê) với $p = 0,86$ (DTaP/IVAC và Tetraxim/Sanofi), $p = 0,99$ (DTaP/IVAC và DTaP/Bionet).

Như vậy, các thành phần kháng nguyên bao gồm kháng nguyên bạch hầu và uốn ván do IVAC sản xuất và kháng nguyên rPT và FHA của công ty Bionet, Thái Lan, và tá chất nhôm hydroxide alhydrogel 1,3% của Đan Mạch có sự tương thích về mặt hóa lý và tương thích về miễn dịch. Các kháng nguyên trong vắc xin kết hợp

đảm bảo được tính nguyên vẹn về mặt cấu trúc và không bị ức chế hay cạnh tranh về khả năng sinh miễn dịch giữa chúng.

3.4 Kết quả tối ưu hóa hàm lượng kháng nguyên trong công thức vắc xin DTaP

Thiết kế Box-Behnken (phần mềm Design Expert version 12) được sử dụng với hàm lượng

lý thuyết của các kháng nguyên D (30–35–40 Lf/mL), T (12–16–20 Lf/mL), rPT (10–12 µg/mL), FHA (20–25 µg/mL) và tá chất Alhydrogel 1,3% (0,6 mg Al³⁺/mL) với thể tích 100 mL cho mỗi công thức (Bảng 2).

Bảng 2. Các công thức vắc xin DTaP được thiết kế bằng mô hình Box-Behnken trong phần mềm Design Expert ver 12

Công thức	Kháng nguyên			
	Bạch hầu (Lf/mL)	Uốn ván (Lf/mL)	PT (µg/mL)	FHA (µg/mL)
CT 1	35	12	10	25
CT 2	35	16	10	20
CT 3	30	20	12	20
CT 4	40	20	10	20
CT 5	30	12	10	20
CT 6	30	12	12	20
CT 7	35	16	12	25
CT 8	30	16	10	25
CT 9	40	12	10	20
CT 10	35	16	12	20
CT 11	35	20	10	20
CT 12	35	12	10	20
CT 13	35	12	12	20
CT 14	40	16	10	25
CT 15	35	20	10	25
CT 16	40	16	12	20
CT 17	30	16	12	20
CT 18	30	16	10	25

Công hiệu của các thành phần của vắc xin kết hợp là một trong số các tiêu chuẩn chất lượng xuất xưởng quan trọng hàng đầu vì đó là chỉ dấu cho hiệu lực của vắc xin trên thực địa. Tổ chức Y tế thế giới đã tiêu chuẩn hóa về hàm lượng kháng nguyên và công hiệu của các thành phần đối với vắc xin DTaP dùng cho trẻ em dưới 7 tuổi. Theo đó, hàm lượng kháng nguyên và công hiệu của

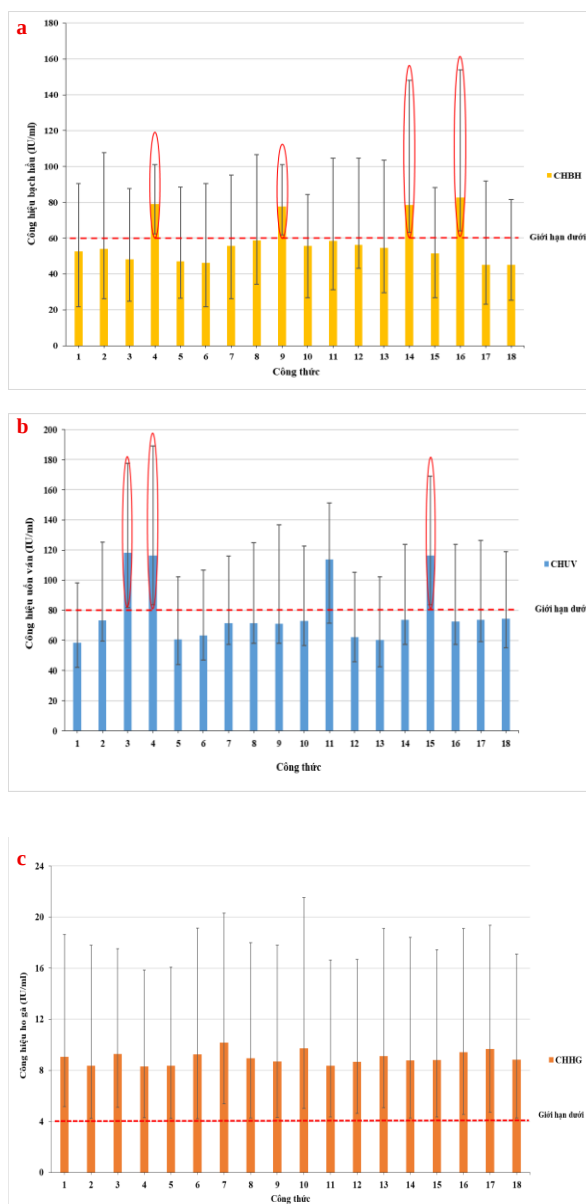
thành phần bạch hầu là <60 Lf/mL và không thấp hơn 60 IU/mL và công hiệu của thành phần uốn ván <40 Lf/mL và không thấp hơn 80 IU trong 1 mL vắc xin DTaP. Giới hạn tin cậy 95% đối với công hiệu của 2 thành phần bạch hầu và uốn ván phải nằm trong khoảng 50–200% và giới hạn dưới (LL) không thấp hơn giá trị công hiệu của thành phần đó (nghĩa là LL của công hiệu bạch hầu và

uốn ván tương ứng phải đạt lớn hơn hoặc bằng 60 IU/mL và 80 IU/mL). Riêng đối với thành phần ho gà vô bào, do công nghệ sản xuất khác nhau nên thành phần kháng nguyên đơn và hàm lượng của chúng trong công thức vắc xin DTaP của mỗi nhà sản xuất là rất khác nhau, do đó WHO khuyến cáo số lượng và hàm lượng kháng nguyên ho gà vô bào cần đủ để công hiệu của thành phần ho gà trong vắc xin DTaP không thấp hơn 8 IU/mL với giới hạn dưới (LL) của khoảng tin cậy 95% (CI 95%) không thấp hơn 4 IU/mL. Về phương diện kỹ thuật, các nhà sản xuất phải tối ưu hóa công thức vắc xin sao cho hàm lượng kháng nguyên trong vắc xin là thấp nhất nhưng vẫn đáp ứng được tiêu chuẩn kép của WHO về cả công hiệu và giới hạn tin cậy 95% đối với mỗi thành phần.

Kết quả kiểm tra công hiệu của 18 mẫu vắc xin DTaP tương ứng với 18 công thức (từ CT1 đến CT18) cho thấy đối với thành phần bạch hầu, 4/18 công thức (CT4, CT9, CT14 và CT16) đạt tiêu chuẩn về công hiệu và giới hạn dưới của khoảng tin cậy 95%; 14/18 công thức còn lại không đáp ứng tiêu chuẩn (Hình 10a). Đối với thành phần uốn ván, 3/18 (CT3, CT4 và CT15) công thức đạt tiêu chuẩn về công hiệu và khoảng tin cậy và 15/18 mẫu không đáp ứng tiêu chuẩn này (Hình 10b). Đối với công hiệu ho gà, tất cả 18/18 công thức đều đạt tiêu chuẩn về công hiệu và giới hạn dưới của khoảng tin cậy 95% (Hình 10c).

Các kết quả về công hiệu bạch hầu, uốn ván và ho gà của 18 công thức vắc xin DTaP cho thấy duy nhất công thức số 4 (CT4) thỏa mãn các yêu cầu về công hiệu của vắc xin DTaP theo tiêu chuẩn của WHO.

Như vậy, các kết quả thu được về cảm quan, an toàn chung và công hiệu của 18 công thức vắc xin DTaP khi chạy trên mô hình Box-Behnken cho thấy công thức số 4 là công thức vắc xin DTaP hoàn toàn phù hợp với việc xây dựng công thức vắc xin DTaP tại IVAC trong nghiên cứu này theo khuyến cáo của ĐĐVN V, 2018, và Tổ chức Y tế thế giới.



Hình 10. Công hiệu và giới hạn tin cậy của thành phần bạch hầu (a), uốn ván (b), ho gà vô bào (c) của 18 công thức vắc xin DTaP

CBBH: công hiệu bạch hầu; CHUV: công hiệu uốn ván;
CHHG: công hiệu ho gà.

Để xác nhận kết quả tối ưu, 3 lô vắc xin DTaP/TN có cùng hàm lượng kháng nguyên với công thức 4 được kiểm tra công hiệu và cho kết quả tương tự với công thức 4 (Bảng 3). Điều này chứng minh sự chắc chắn về hàm lượng của các thành phần trong công thức 4 đảm bảo đáp ứng tiêu chuẩn công hiệu của vắc xin DTaP khi phối trộn.

Bảng 3. Hàm lượng kháng nguyên, công hiệu và khoảng tin cậy 95% của công thức tối ưu và 3 lô vắc xin DTaP phối hợp theo công thức đã tối ưu

Hàm lượng kháng nguyên trong 1 mL vắc xin DTaP		Công hiệu (IU/mL)				
		CT tối ưu (CT04)	Lô DTaP 01	Lô DTaP 02	Lô DTaP 03	Trung bình
D	40 Lf	91,28 (81,56 – 171,63)	90,38 (81,44 – 178,23)	86,52 (82,22 – 151,63)	105,31 (87,74 – 193,17)	94,47 (74,29 – 120,13)
T	20 Lf	149,33 (85,68 – 228,65)	95,17 (83,68 – 137,27)	116,77 (84,83 – 164,85)	131,80 (91,17 – 198,56)	107,86 (90,39 – 128,71)
rPT	10 µg	10,17 (4,98 – 20,30)	9,80 (4,18 – 18,36)	9,21 (4,12 – 18,21)	10,02 (4,26 – 19,06)	9,65 (5,92 – 15,75)
FHA	20 µg					

CI: khoảng tin cậy; LL: giới hạn dưới.

4 Kết luận

Sự phát triển thành công các vắc xin kết hợp đã mang lại những lợi ích to lớn trong việc ngăn ngừa nhiều bệnh truyền nhiễm trong những năm đầu đời của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Việc xác định tính tương thích giữa các thành phần và tối ưu hóa công thức vắc xin là các tiêu chí cực kỳ quan trọng khi nghiên cứu phát triển một loại vắc xin kết hợp nhiều thành phần. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh được sự tương thích về mặt hóa lý (cảm quan, độ hấp phụ > 80%) và tương thích về miễn dịch thông qua đáp ứng kháng thể IgG kháng bạch hầu, uốn ván, rPT và FHA trong kháng nguyên hấp phụ cũng như trong vắc xin DTaP. Kết quả đánh giá khả năng đào thải vi khuẩn ho gà trên mô hình chuột thí nghiệm và phân tích kháng thể kháng rPT và FHA của thành phần ho gà vô bào trong huyết thanh của các mũi tiêm nhắc lại vắc xin DTaP cho thấy hai kháng nguyên rPT và FHA hấp phụ của Bionet tương thích với các kháng nguyên bạch hầu và uốn ván do IVAC sản xuất. Đồng thời, chúng tôi cũng đã thiết lập công thức vắc xin DTaP trong 1 mL bao gồm: kháng nguyên uốn ván 20 Lf; kháng nguyên bạch hầu 40 Lf; kháng nguyên PT tái tổ hợp 10,0 µg; kháng nguyên FHA 20,0 µg và nhôm hydroxide 1,7 mg. Vắc xin DTaP

tạo ra trong nghiên cứu đạt các chỉ tiêu về cảm quan và an toàn chung; công hiệu bạch hầu đạt trung bình 94,47 IU/mL (74,29–120,13), uốn ván đạt trung bình 107,86 IU/mL (90,39–128,71), ho gà đạt trung bình 9,65 IU/mL (5,92–15,75). Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để IVAC chủ động phát triển công nghệ sản xuất vắc xin DTaP ở quy mô thương mại.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế thông qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Viện theo Quyết định số: 179/QĐ-VXSPYT, ngày 04/05/2022.

Xung đột lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Jatana SK, Nair M. Combination Vaccines, Med J Armed Forces India. 2007;63(2):167171.
2. Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccine Vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offitt P, editors. 5th ed. USA: Saunders PA. 2008:471-528.

3. Skibinski DA, Baudner BC, Singh M, O'Hagan DT. Combination Vaccines. *J. Glob. Infect. Dis.* 2011; 3(1):63-72.
4. Obando-Pacheco P, Rivero-Calle I, Gómez-Rial J, Rodríguez-Tenreiro Sánchez C, Martín-Torres F. New perspectives for hexavalent vaccines. *Vaccine.* 2018;36(36):5485-5494.
5. Pham NT, Bui QT, Tran DM, Larsson M, Pham MP, Olson L. "Pertussis seasonal variation in Northern Vietnam: the evidence from a tertiary hospital. *BMC Public Health.* 2024;24(1):286.
6. Kitamura N, Le TTT, Le LT, Nguyen LD, Dao AT, Hoang TT, et al. Diphtheria Outbreaks in Schools in Central Highland Districts, Vietnam, 2015–2018. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(3):596-600.
7. Pichichero ME. New combination vaccines. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47(2):407-426.
8. Insel RA. Potential alterations in immunogenicity in combining or simultaneously administering vaccine components. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 754:35-47.
9. Halperin SA, King J, Law B, et al. Safety and immunogenicity of H influenza-tetanus toxoid conjugate vaccine given separately or in combination with a three component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoid and inactivated poliovirus vaccine for the first four doses. *Clin Infect Dis* 28. 1999:995-1001.
10. Weston WM, Klein NP. Kinrix: a new combination DTaP-IPV vaccine for children aged 4-6 years. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7(9):1309-1320.
11. Bộ Y tế. Dược Điển Việt Nam V, tập 1 và 2; 2018.
12. Lampson G.P, Tytell A.A. A simple method for estimating isoelectric points. *Analytical-biochemistry.* 1965;11(2):374-377.
13. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434.
14. Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Thinh ND, van der Gun J W et al. Validation of the combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam. *Bulletin of the World Health Organization.* 1996;74(3):275-282.
15. World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, WHO/TRS/No.979, 2014, annex 4.
16. Gupta RK, Rost BE. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. In: *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research protocols.* Humana Press. 2000:73-74.
17. Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine.* 2001;20(1-2):67-73.
18. Bae CS, Gwan YL, Jong SK, Byung KH. Quadrivalent Combined Vaccine, Including Diphtheria Toxoid, Tetanus Toxoid, Detoxified Whole Cell Pertussis, and Hepatitis B Surface Antigen. *J Microbiol Biotechnol.* 2003;13(3):338-343.
19. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32(3):155-172.
20. Bé LV. Nhìn lại chặng đường cung cấp vắc xin cho chương trình tiêm chủng mở rộng của Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế. *Tạp chí Y học dự phòng.* 2013;9(145):9-12.
21. Kang KR, Kim JA, Cho GW, Kang HU, Kang HM, Kang JH, et al. Comparative Evaluation of Recombinant and Acellular Pertussis Vaccines in a Murine Model. *Vaccines.* 2024;12(1):108.