

Đánh giá mô hình hỗn hợp vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào (DTaP) tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nguyễn Thị Thu Hoa*, Nguyễn Xuân Khánh Hà, Dương Khánh Minh, Nguyễn Thị Lan Phương, Dương Hữu Thái

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 9 Pasteur, phường Xương Huân, TP Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/4/2025; ngày chuyển phản biện 15/4/2025; ngày nhận phản biện 12/5/2025; ngày chấp nhận đăng 19/5/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá mô hình hỗn hợp giữa các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế) hấp phụ trên nhôm hydroxide với các kháng nguyên ho gà vô bào hấp phụ riêng lẻ (rPT, FHA) từ Bionet (Thái Lan) để tạo thành vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào (DTaP). Mô hình hỗn hợp vắc xin DTaP được đánh giá dựa trên việc xác định các đặc điểm vật lý, độ hấp phụ và cường độ hấp phụ của các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván hấp phụ đơn lẻ hay đồng thời và vắc xin DTaP bằng cách sử dụng thiết bị đo Nano Particle Analyzer SZ-100, Flow Cytometer và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Nghiên cứu đã lựa chọn được tá chất alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch) cũng như xác định pH 6,2 và thời gian hấp phụ 120 phút là tối ưu đối với mô hình hấp phụ kháng nguyên bạch hầu, uốn ván. Sau hỗn hợp, vắc xin DTaP bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C duy trì được sự ổn định về các đặc tính vật lý và độ hấp phụ trong thời gian khảo sát. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để xây dựng công nghệ hỗn hợp vắc xin phối hợp nhiều kháng nguyên tại Việt Nam, mở ra hướng phát triển các vắc xin 5, 6 thành phần dựa trên nền tảng vắc xin DTaP.

Từ khóa: ho gà vô bào, mô hình hỗn hợp, vắc xin DTaP.

Chỉ số phân loại: 3.1, 3.3

Evaluation of Diphtheria-Tetanus-Acellular pertussis (DTaP) vaccine combination model at Institute of Vaccines and Medical Biologicals

Thi Thu Hoa Nguyen*, Xuan Khanh Ha Nguyen, Khanh Minh Duong, Thi Lan Phuong Nguyen, Huu Thai Duong

Institute of Vaccines and Medical Biologicals, 9 Pasteur Street, Xuong Huan Ward, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Vietnam

Received 14 April 2025; revised 12 May 2025; accepted 19 May 2025

Abstract:

This study aimed to evaluate a combined formulation model of diphtheria and tetanus antigens (Institute of Vaccines and Medical Biologicals) adsorbed on aluminium hydroxide with individually adsorbed acellular pertussis antigens (rPT, FHA) from Bionet (Thailand) to develop a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine. The DTaP vaccine combination model was assessed based on the characterisation of physical properties, adsorption rate and adsorption capacity of the diphtheria, tetanus antigens either individually or simultaneously adsorbed and of the final DTaP vaccine by using a Nano Particle Analyser SZ-100, flow cytometer and transmission electron microscope (TEM). The study identified alhydrogel 1.3% (Croda, Denmark) as optimal adjuvant with adsorption conditions optimised at pH 6.2 and a 120-minute incubation time for diphtheria and tetanus antigens. Following the combination, the DTaP vaccine remained physically stable and retained its antigen adsorption characteristics when stored at 2-8°C over an observation period. The research results provide a foundation for establishing combination vaccine technology involving multiple antigens in Vietnam, paving the way for the development of pentavalent and hexavalent vaccines based on the DTaP vaccine platform.

Keywords: acellular pertussis, combination model, DTaP vaccine.

Classification numbers: 3.1, 3.3

*Tác giả liên hệ: Email: thuhoa1907@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tiêm chủng là một trong những biện pháp chính để phòng ngừa và kiểm soát các bệnh truyền nhiễm ở người. Do khả năng sinh miễn dịch của một số kháng nguyên ở mức thấp nên thông thường người ta kết hợp với tá chất để cải thiện mức độ và thời gian bảo vệ do vắc xin tạo ra [1]. Năm 1926, các nhà khoa học lần đầu tiên chứng minh rằng kết tủa muối nhôm không hòa tan có thể tăng cường khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố bạch hầu [2]. Vắc xin bạch hầu-uốn ván-ho gà toàn tế bào (DTwP) là vắc xin phối hợp và hấp phụ với tá chất nhôm sử dụng cho người đầu tiên được cấp phép năm 1948 [3]. Từ đó đến nay, tá chất nhôm, thường là nhôm hydroxide hoặc nhôm phosphate đã được sử dụng phổ biến trong nhiều loại vắc xin khác nhau do hồ sơ an toàn, chi phí sản xuất tương đối thấp và khả năng liên kết với nhiều loại kháng nguyên [4]. Các tá chất có thể cải thiện hiệu quả và kéo dài thời gian bảo vệ của vắc xin [5]. Ngoài ra, tá chất có thể làm giảm lượng kháng nguyên cần thiết, giảm chi phí sản xuất [6] và giảm số lượng mũi tiêm chủng cần thiết.

Mức độ hấp phụ kháng nguyên là một thông số quan trọng cần kiểm soát và là chỉ số về tính nhất quán của các công thức vắc xin và các quy trình sản xuất tương ứng. Nguyên tắc cơ bản để phát triển quy trình sản xuất vắc xin phối hợp nhiều thành phần kháng nguyên hấp phụ tá chất nhôm, ngoài việc xác định công thức và tính tương thích giữa các thành phần trong vắc xin thì việc chọn lựa mô hình hỗn hợp thích hợp là một trong những yếu tố đóng vai trò quan trọng để tạo được một vắc xin an toàn và hiệu quả. D. Laera và cs (2023) [7] đã chỉ ra rằng, cách tiếp cận mô hình hấp phụ tuần tự và cạnh tranh các kháng nguyên cho kết quả tương tự về tính đồng nhất của sự phân bố kháng nguyên trên các hạt nhôm, trong khi đó mô hình hấp phụ riêng lẻ các kháng nguyên ban đầu có độ phân tán đa dạng cao hơn, sau đó đạt độ ổn định theo thời gian. Sự phân bố kháng nguyên trên các hạt nhôm là một tính năng động lực phát triển theo thời gian, ban đầu bị ảnh hưởng bởi cách tiếp cận mô hình hấp phụ cụ thể, nhưng cuối cùng dẫn đến sản phẩm đồng nhất [7]. Tuy nhiên, xét về các quy trình lai giữa nhiều mô hình hấp phụ cũng như các nghiên cứu tương tác ở cấp độ phân tử giữa tá chất nhôm và các kháng nguyên protein tương ứng, các nghiên cứu đặc thù và chuyên sâu vẫn còn khan hiếm.

Vắc xin DTaP do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế phát triển là sản phẩm sử dụng hai kháng nguyên bạch hầu, uốn ván có nguồn gốc các giải độc tố tinh chế được sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, trong khi đó hai kháng nguyên ho gà vô bào là độc tố ho gà giải độc gen (rPT) và kháng nguyên ngưng kết hồng cầu dạng sợi (FHA) đã được hấp phụ sẵn với tá chất nhôm có nguồn gốc từ Công ty Bionet (Thái Lan). Do đó, để hỗn hợp bốn thành phần kháng nguyên này với nhau, chúng tôi tiến hành hấp phụ các giải độc tố bạch hầu và uốn ván với tá chất nhôm trước, sau đó phối trộn với hai thành phần rPT và FHA đã hấp phụ sẵn nhôm hydroxide. Đây có thể được coi là mô hình lai giữa hấp phụ riêng lẻ đối với hai kháng nguyên ho gà vô bào nhập từ Bionet và mô hình hấp phụ đồng thời đối với hai kháng nguyên bạch hầu, uốn ván của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá mô hình hỗn hợp vắc xin DTaP hấp phụ phù

hợp với các điều kiện sẵn có tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế nhằm xây dựng công nghệ hỗn hợp vắc xin phối hợp nhiều kháng nguyên tại Việt Nam, mở ra hướng phát triển các vắc xin 5, 6 thành phần dựa trên nền tảng vắc xin DTaP.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 5/2022 đến tháng 10/2023 tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.

2.2. Kháng nguyên và tá chất

Kháng nguyên bạch hầu (D) lô số PD.0819 và kháng nguyên uốn ván (T) lô số PT.0519 có nguồn gốc từ Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. 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 Bionet, Thái Lan. Hai kháng nguyên ho gà rPT và FHA đều đã được hấp phụ với tá chất nhôm hydroxide với hàm lượng 0,7 mg Al^{3+} /ml. Tá chất alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch) với hàm lượng 6,1 mg Al^{3+} /ml, lô số 5621. Tá chất nhôm hydroxide với lô số 0122, có hàm lượng 5,9 mg Al^{3+} /ml do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế sản xuất.

2.3. Chuẩn bị các kháng nguyên đơn bạch hầu, uốn ván hấp phụ và vắc xin bạch hầu và uốn ván (DT), vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào (DTaP) hấp phụ

Các kháng nguyên đơn thành phần (D, T) hấp phụ, vắc xin DT và DTaP hấp phụ được chuẩn bị mỗi loại 3 lô (100 ml/lô) với hàm lượng trong 1 ml như sau: kháng nguyên bạch hầu hấp phụ chứa 45 Lf (D) và 0,6 mg Al^{3+} , kháng nguyên uốn ván hấp phụ chứa 20 Lf (T) và 0,6 mg Al^{3+} , vắc xin DT hấp phụ chứa 45 Lf (D), 20 Lf (T) và 0,6 mg Al^{3+} , vắc xin DTaP chứa 45 Lf (D), 20 Lf (T), 10 μ g rPT, 20 μ g FHA và 0,6 mg Al^{3+} .

2.4. Phương pháp phân tích

Các tá chất dùng trong nghiên cứu được xác định kích thước hạt, chỉ số phân bố hạt (PDI), điện thế Zeta trên thiết bị Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba, Nhật Bản). Các mẫu kháng nguyên hấp phụ đơn thành phần và vắc xin hấp phụ được đo áp suất thẩm thấu trên thiết bị Osmomat (Gonotech, Đức). Áp suất thẩm thấu đạt yêu cầu khi mẫu đo có giá trị 300 ± 60 mOsmol/kg [8]. Phương pháp TEM dùng phân tích cấu trúc, hình thái của tá chất và kháng nguyên đơn sau khi hấp phụ và vắc xin DT, DTaP được thực hiện tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương trên kính hiển vi điện tử truyền qua JEM1010, với hệ số phóng đại x50-x600.000, độ phân giải $3A^{\circ}$, điện áp gia tốc 40-100 kV. Mẫu được cố định, hút nước và polyme hóa trước khi cắt mỏng, sau đó đưa lên lưới đồng đã được phủ màng đỡ bằng collodion, nhuộm âm bản với uranyl acetate trước khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử.

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, T xác định bằng phương pháp lên bông [8], rPT, FHA xác định bằng phương pháp ELISA (phát triển bởi Bionet, Thái Lan), 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). Cường độ hấp phụ của kháng nguyên được xác định bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang, sử dụng máy Flow Cytometer BD Accuri™ C6 plus, Singapore để đo số tín hiệu huỳnh quang trên tổng số lượng hạt có trong mẫu của vùng được chọn có tín hiệu dương tính. Một tín hiệu huỳnh quang dương tính được quy định khi một phân tử kháng nguyên đã hấp phụ được gắn với một phân tử kháng thể đặc hiệu và phát tín hiệu sau khi kết hợp với kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm GraphPad Prism version 10 để xử lý số liệu. Tất cả kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. So sánh giữa hai nhóm được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều, $p < 0,05$ được xác định là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

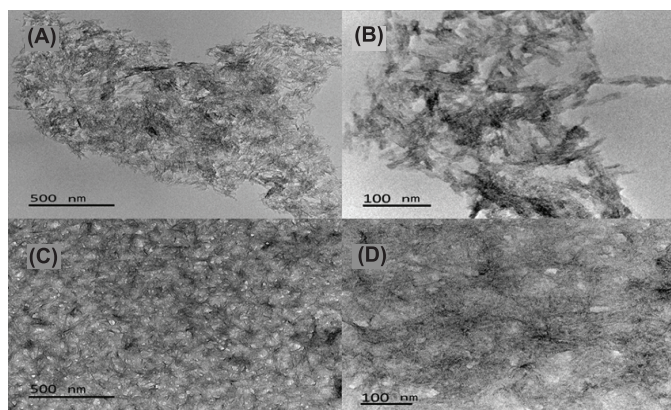
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm của tá chất nhôm hydroxide thương mại alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch) và nhôm hydroxide (AH) do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế sản xuất

Trong nghiên cứu này, kết quả xác định được kích thước hạt trung bình của alhydrogel 1,3% (1548,7 nm) nhỏ hơn so với kích thước hạt trung bình AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Bảng 1. Các đặc tính vật lý của tá chất nhôm thương mại alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch) và nhôm hydroxide do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế sản xuất.

Loại	pH	Kích thước hạt (nm)	Phân bố hạt (PDI)	Điện thế Zeta (mV)
Alhydrogel 1,3% (n=3)	6,79 $\pm$ 0,1	1548,7 $\pm$ 135,1	0,24 $\pm$ 0,01	28,5 $\pm$ 1,2
AH (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế) (n=3)	6,61 $\pm$ 0,1	1854,3 $\pm$ 144,9	0,55 $\pm$ 0,01	22,4 $\pm$ 1,3



Hình 1. Cấu trúc tá chất alhydrogel 1,3% Croda, Đan Mạch (A, B) và nhôm hydroxide của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (C, D) chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua với thanh tỷ lệ 500 nm (A, C) và 100 nm (B, D).

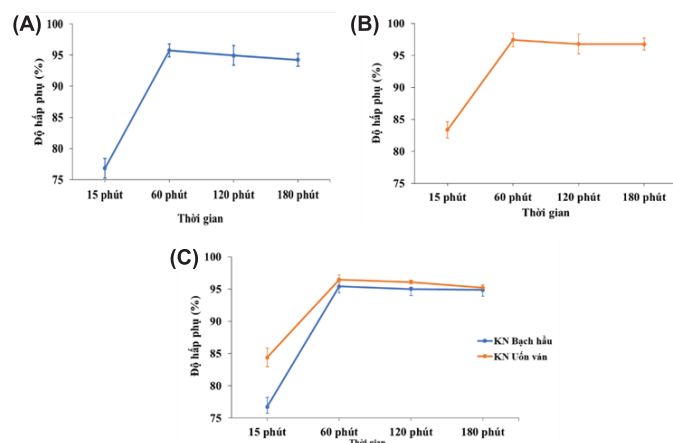
(1854,3 nm), trong khi đó chỉ số phân bố hạt (PDI) của alhydrogel 1,3% đạt 0,24 và AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là 0,55. Điện thế Zeta của alhydrogel 1,3% đo được là +28,5 mV ở pH 6,79 và AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là +22,4 ở pH 6,61 (bảng 1). Cấu trúc tá chất alhydrogel 1,3% (Croda) và AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế được ghi nhận dựa trên các kết quả chụp bằng kỹ thuật TEM (hình 1) cho thấy, hai loại tá chất nghiên cứu đều có cấu trúc dạng sợi tập hợp thành từng đám xấp xỉ của nhôm hydroxide tương tự như mô tả của C.T. Johnston và cs (2002) [9].

Mỗi một loại tá chất nhôm hydroxide khác nhau về cấu trúc, các chỉ số vật lý tùy thuộc vào phương pháp điều chế của từng nhà sản xuất nhưng nhìn chung nhôm hydroxide có cấu trúc dạng sợi với kích thước hạt sơ cấp là $4,5 \times 2,2 \times 10$ nm [9]. Tuy nhiên, các hạt sơ cấp không tồn tại dưới dạng đơn lẻ mà tạo thành các tập hợp xấp xỉ có kích thước 1-10 μ m, thậm chí lên đến 20 μ m tùy thuộc vào phương pháp điều chế, phương pháp đo và các điều kiện thí nghiệm [10, 11]. Kích thước hạt của hai loại tá chất nghiên cứu đều nằm trong giới hạn, tương tự các nghiên cứu đã được J.R. Burdman và cs (1995) [12] công bố và sự khác biệt về kích thước hạt trung bình của hai loại tá chất không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,056$. Tuy nhiên, chỉ số phân bố hạt (PDI) của alhydrogel 1,3% và AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,00001$. Kết quả chỉ ra rằng, PDI của alhydrogel 1,3% thấp và xấp xỉ bằng 1/2 so với PDI của AH (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế), nghĩa là độ đồng nhất các hạt của alhydrogel 1,3% tốt hơn so với AH (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế). Chỉ số PDI càng thấp, độ đồng nhất giữa các hạt càng cao và điều này giúp cho khả năng hấp phụ của kháng nguyên trên bề mặt hạt nhôm tốt hơn [13]. Ở pH trung tính, bề mặt các hạt nhôm hydroxide mang điện tích dương [14], trong khi đó điện tích bề mặt của hai kháng nguyên bạch hầu và uốn ván đều mang điện tích âm [14, 15]. Do đó, tá chất có điện thế Zeta càng dương thì khả năng tương tác tĩnh điện giữa tá chất và kháng nguyên càng lớn. Điện thế Zeta của alhydrogel 1,3% là +28,5 mV khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,0044$ so với điện thế Zeta của AH (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế) là +22,4 mV. Các kết quả đánh giá về kích thước hạt, phân bố hạt và điện thế Zeta kết hợp với hình ảnh cấu trúc của hai loại tá chất ghi nhận được cho thấy, alhydrogel 1,3% của Croda có khả năng cung cấp môi trường phù hợp cho việc hấp phụ hai kháng nguyên bạch hầu và uốn ván hơn so với tá chất AH của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.

3.2. Độ hấp phụ và cường độ hấp phụ kháng nguyên bạch hầu, uốn ván trên tá chất alhydrogel 1,3%

Hai kháng nguyên rPT và FHA đã được hấp phụ trước đó từ nhà sản xuất Bionet, Thái Lan nên việc đánh giá độ hấp phụ và cường độ hấp phụ chỉ thực hiện đối với hai kháng nguyên bạch hầu và uốn ván. Kết quả chỉ ra rằng, khi sử dụng tá chất alhydrogel 1,3% trong cùng điều kiện pH 6,2, quá trình hấp phụ kháng nguyên bạch hầu hoặc uốn ván riêng lẻ hay hấp phụ đồng thời hỗn hợp hai kháng nguyên bạch hầu - uốn ván đều xảy ra tương tự như nhau, được thể hiện thông qua kết quả độ hấp phụ của từng kháng nguyên đều đạt mức trên 90% trong khoảng thời gian 60-180 phút (hình 2). Theo Dược điển Việt Nam V (2018) [8], vắc xin kết hợp

có sử dụng tá chất nhôm hydroxide thì độ hấp phụ của các kháng nguyên phải đạt ít nhất 80%. Theo P. Marrack và cs (2009) [16], tỷ lệ hấp phụ kháng nguyên cao như vậy cho phép kháng nguyên duy trì tại vị trí tiêm, tạo ra “hiệu ứng kho dự trữ” nhằm kích thích hệ thống miễn dịch kéo dài và hiệu quả.

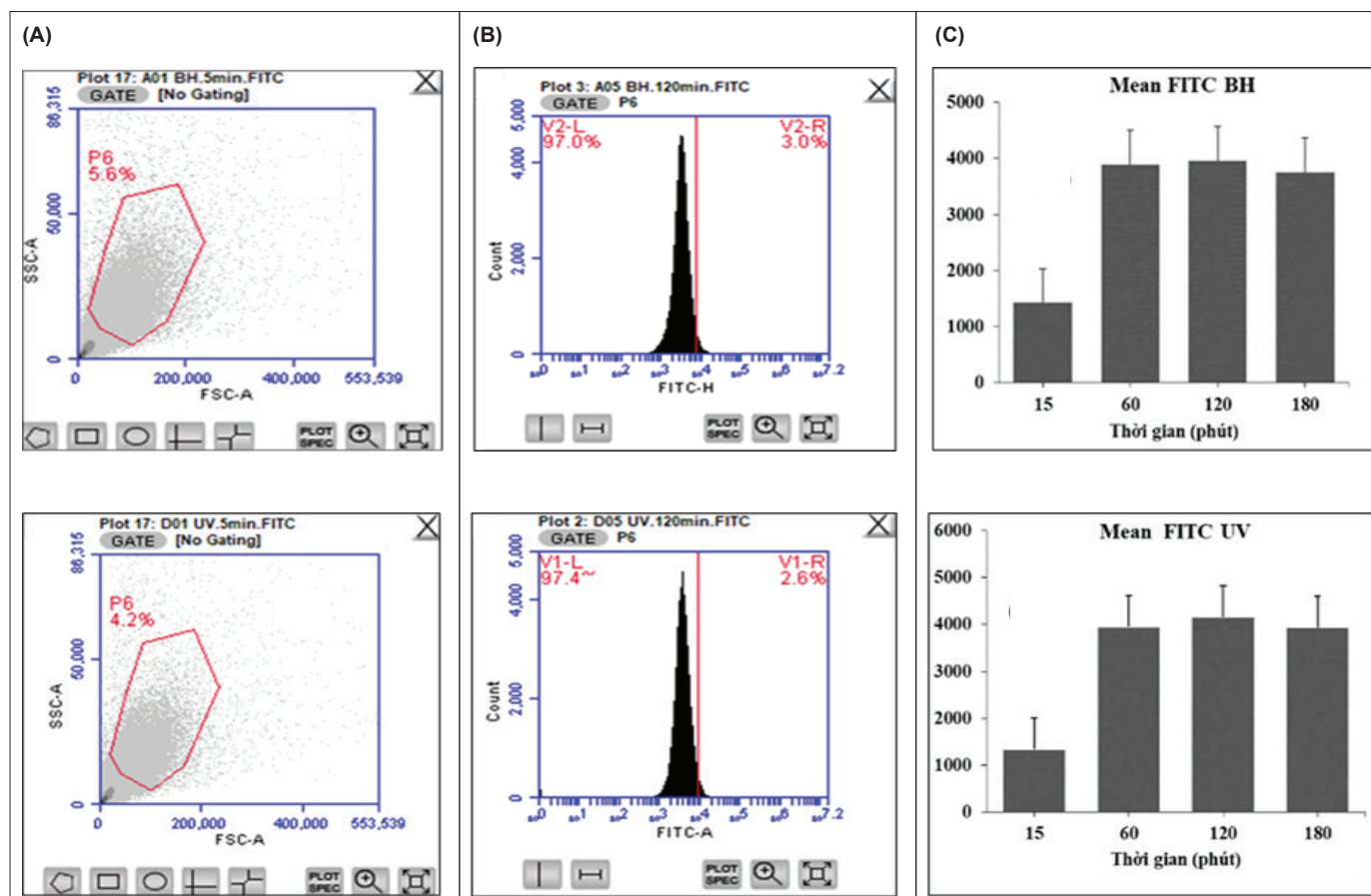


Hình 2. Độ hấp phụ của kháng nguyên bạch hầu, uốn ván ở pH 6,2 (n=3) trên tá chất alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch). (A) Kháng nguyên bạch hầu hấp phụ đơn; (B) Kháng nguyên uốn ván hấp phụ đơn; (C) Kháng nguyên bạch hầu và uốn ván hấp phụ đồng thời.

Đánh giá cường độ hấp phụ của hai kháng nguyên bạch hầu, uốn ván khi hấp phụ đồng thời trên tá chất alhydrogel 1,3% tại pH 6,2 cho thấy, cường độ huỳnh quang của kháng nguyên bạch hầu và uốn ván đều đạt mức cao nhất tương ứng với thời gian hấp phụ 60-120 phút và duy trì ở mức độ cao cho đến 180 phút. Như vậy, cường độ hấp phụ và độ hấp phụ của các kháng nguyên D và T đạt cao nhất đều được ghi nhận ở khoảng thời gian hấp phụ 60-180 phút ở pH 6,2 (hình 3C).

3.3. Đặc điểm vật lý của các sản phẩm sau hấp phụ riêng lẻ, hấp phụ đồng thời và phối trộn vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào

Các kết quả đo kích thước hạt, phân bố hạt, điện thế Zeta và áp suất thẩm thấu của các sản phẩm kháng nguyên bạch hầu, uốn ván hấp phụ riêng lẻ và đồng thời cũng như vắc xin DTaP cho thấy, khi duy trì pH trong khoảng 6,51-6,85, điện thế Zeta của các sản phẩm hấp phụ và vắc xin DTaP có xu hướng tăng dần nhưng vẫn ở mức âm nhẹ từ -1,6 đến -2,3 mV khi so sánh với các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván tinh chế có điện thế Zeta lần lượt là -4,8 và -2,5 mV. Chỉ số kích thước hạt của các sản phẩm hấp phụ và vắc xin



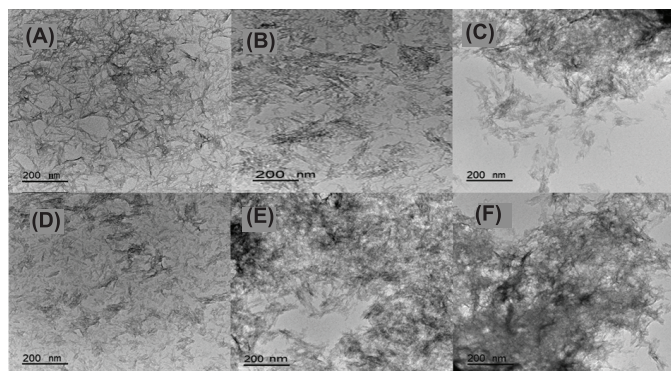
Hình 3. Cường độ huỳnh quang của kháng nguyên bạch hầu (BH) và kháng nguyên uốn ván (UV) khi hấp phụ đồng thời trên alhydrogel 1,3% tại pH 6,2. (A) Vùng được chọn; (B) Cường độ huỳnh quang trung bình của kháng nguyên bạch hầu hoặc uốn ván sau hấp phụ 120 phút; (C) Cường độ huỳnh quang trung bình của kháng nguyên bạch hầu hoặc uốn ván ở các khoảng thời gian khác nhau.

DTaP đều có xu hướng tăng lên, dao động trong khoảng 6716,3 đến 8348,6 nm so với 1547 nm của alhydrogel, cùng với đó sự phân bố hạt của các sản phẩm hấp phụ cũng tăng lên từ 0,24 (alhydrogel 1,3%) đến 0,51 (D_hp), 0,63 (T_hp) và 0,64 (DT_hp) so với hạt tá chất cơ sở (bảng 2). Áp suất thẩm thấu của các sản phẩm hấp phụ riêng lẻ hay hấp phụ đồng thời và vắc xin DTap duy trì ở mức 282-296 mOsmol/kg, đạt yêu cầu về áp suất thẩm thấu và nằm trong khoảng tiêu chuẩn 300 ± 60 mOsmol/kg đối với một sản phẩm tiêm dùng cho người theo yêu cầu của Dược điển Việt Nam V (2018) [8].

Bảng 2. Tính chất vật lý của các sản phẩm sau hấp phụ và phối trộn.

Sản phẩm	pH	Điện thế Zeta (mV)	Kích thước hạt (nm)	Phân bố hạt	Áp suất thẩm thấu (mOsmol/kg)
D_hp (n=3)	6,51±0,1	-2,1±0,2	7282,3±1132	0,51±0,2	282±30
T_hp (n=3)	6,63±0,1	-2,3±0,2	6716,3±1047	0,625±0,2	287±30
DT_hp (n=3)	6,67±0,1	-1,8±0,2	8348,6±1168	0,64±0,2	296±30
DTaP (n=3)	6,85±0,1	-1,6±0,2	7373,3±1152	NA	285±30

Kết quả trên TEM ghi nhận hình ảnh cấu trúc của các kháng nguyên sau hấp phụ hay vắc xin DTap đều cho thấy, hình ảnh các đám xốp gồm các sợi kết tụ lại với nhau tương tự như tá chất nhôm hydroxide mặc dù có những khác biệt về mật độ, hình thái của đám xốp tùy thuộc theo đó là các sản phẩm hấp phụ đơn lẻ (D_hp, T_hp, rPT, FHA), hấp phụ đồng thời (DT_hp) hay vắc xin DTap (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua với thanh tỷ lệ 200 nm của các kháng nguyên hấp phụ trên tá chất alhydrogel 1,3% và vắc xin DTap. (A, B, C, D) Kháng nguyên bạch hầu, uốn ván, rPT, FHA, hấp phụ đơn thành phần; (E) Kháng nguyên bạch hầu - uốn ván hấp phụ đồng thời; (F) Vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào.

3.4. Đánh giá sự ổn định về tính chất vật lý và độ hấp phụ của vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào

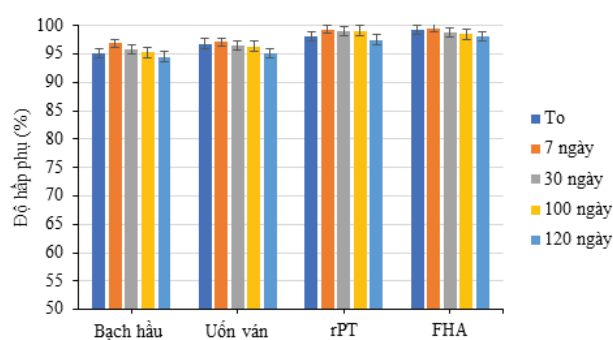
Mức độ ổn định của quy trình hỗn hợp vắc xin DTap được đánh giá thông qua việc theo dõi các đặc điểm vật lý của hỗn dịch vắc xin và độ hấp phụ của các kháng nguyên thành phần trong 120 ngày ở 2-8°C.

Đặc tính vật lý của hỗn dịch vắc xin cho thấy, vắc xin đạt yêu cầu về cảm quan theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam V (2018) [8] đối với vắc xin dạng hỗn dịch tiêm. Khi ở trạng thái lắng, vắc xin chia thành 2 lớp, phần dung dịch ở trên trong suốt, không màu, phần lắng cặn ở dưới có màu trắng xám. Sau khi lắc, vắc xin tạo thành hỗn dịch đồng nhất, màu trắng đục, không lẫn tiểu phần lạ. Các chỉ tiêu về pH, áp suất thẩm thấu, kích thước hạt của hỗn dịch vắc xin không có sự thay đổi đáng kể khi bảo quản ở 2-8°C trong 120 ngày sau khi phối trộn. Riêng về điện thế Zeta, sau 7 ngày phối trộn điện thế có khuynh hướng giảm dần và giảm mạnh sau 30 ngày (đạt -3,7 mV), sau đó tăng trở lại và duy trì ổn định ở mức -2,1 đến -2,3 mV sau 100-120 ngày. Điều đó chứng tỏ vắc xin DTap đạt đến trạng thái ổn định (bảng 3).

Bảng 3. Đặc tính vật lý của vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào bảo quản ở điều kiện 2-8°C trong khoảng thời gian 3 tháng.

Chỉ tiêu kiểm tra (n=3)	Thời gian bảo quản ở 2-8°C				
	T0	7 ngày	30 ngày	100 ngày	120 ngày
Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	6,85±0,1	6,83±0,1	6,87±0,1	6,89±0,1	6,88±0,1
Độ thẩm thấu (mOsmol/kg)	281±30	273±30	289±30	283±30	278±30
Điện thế Zeta (mV)	-1,7±0,2	-2,4±0,2	-3,7±0,2	-2,3±0,2	-2,1±0,2
Kích thước hạt (nm)	7085,6±1211	6978,6±1095	6752,6±1103	6865,3±1086	6917,5±1125

Kết quả độ hấp phụ cho thấy, tất cả các kháng nguyên thành phần bạch hầu, uốn ván, rPT, FHA trong vắc xin DTap đều đạt ở mức cao trên 90% trong thời gian bảo quản 120 ngày ở 2-8°C (hình 5) so với tiêu chuẩn quy định $\geq 80\%$ đối với vắc xin kết hợp trong Dược điển Việt Nam V (2018) [8].



Hình 5. Độ hấp phụ của các kháng nguyên thành phần trong vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào ở điều kiện bảo quản 2-8°C trong thời gian 120 ngày.

Những kết quả ban đầu cho thấy, quy trình hỗn hợp vắc xin DTap tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế được thực hiện với việc bổ sung lần lượt 2 kháng nguyên rPT và FHA đã hấp phụ sẵn vào hỗn dịch kháng nguyên bạch hầu, uốn

ván hấp phụ đồng thời với tá chất alhydrogel 1,3% trong thời gian 120-180 phút trước đó đã tạo được sản phẩm vắc xin DTaP ở dạng hỗn dịch tiêm duy trì các đặc tính vật lý ổn định trong thời gian khảo sát 120 ngày ở 2-8°C. Các nghiên cứu toàn diện về tính ổn định của vắc xin DTaP đã cho thấy, vắc xin đạt yêu cầu về tất cả các chỉ tiêu chất lượng cho đến hết hạn dùng dự kiến là 24 tháng (kết quả không bao gồm trong nghiên cứu này) càng khẳng định mô hình hỗn hợp vắc xin DTaP của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là hoàn toàn phù hợp.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tá chất alhydrogel 1,3% (Croda, Đan Mạch) là phù hợp cho hỗn hợp vắc xin DTaP với kháng nguyên bạch hầu, uốn ván (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, Việt Nam) và kháng nguyên ho gà vô bào từ Bionet (Thái Lan). Các thông số tối ưu của quá trình hấp phụ kháng nguyên bạch hầu, uốn ván đã được xác định ở pH 6,2 và thời gian hấp phụ là 120 phút. Vắc xin DTaP ở nhiệt độ bảo quản 2-8°C duy trì được sự ổn định về các đặc tính vật lý và độ hấp phụ trong khoảng thời gian khảo sát 120 ngày. Đây là cơ sở khẳng định mô hình hỗn hợp vắc xin DTaP của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là phù hợp. Tiếp theo nghiên cứu này, chúng tôi sẽ đánh giá tính an toàn và hiệu quả bảo vệ của vắc xin DTaP trên các mô hình động vật nhằm cung cấp đầy đủ các bằng chứng cho việc cấp phép thử nghiệm lâm sàng vắc xin trên người. Thành công của nghiên cứu sẽ mở ra hướng phát triển các vắc xin 5, 6 thành phần dựa trên nền tảng mô hình hỗn hợp vắc xin DTaP của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G.L. Morefield (2011), "A rational, systematic approach for the development of vaccine formulations", *AAPS J.*, **13**(2), pp.191-200, DOI: 10.1208/s12248-011-9261-1.

[2] N. Petrovsky (2006), "Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity", *Vaccine*, **24**(2), DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.107.

[3] N.P. Klein (2014), "Licensed pertussis vaccines in the United States. History and current state", *Hum. Vaccin. Immunother.*, **10**(9), pp.2684-2690, DOI: 10.4161/hv.29576.

[4] H. HogenEsch (2013), "Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants", *Front. Immunol.*, **3**(406), DOI: 10.3389/fimmu.2012.00406.

[5] W. Zhang, X. Zheng, N. Cheng, et al. (2016), "Isatis indigotica root polysaccharides as adjuvants for an inactivated rabies virus vaccine", *Int. J. Biol. Macromol.*, **87**, pp.7-15, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.023.

[6] R. Bastola, J.E. Seo, T. Keum, et al. (2019), "Preparation of squalene oil-based emulsion adjuvants employing a self-emulsifying drug delivery system and assessment of mycoplasma hyopneumoniae-specific antibody titers in BALB/c mice", *Pharmaceutics*, **11**(12), DOI: 10.3390/pharmaceutics11120667.

[7] D. Laera, C. Scarpellini, S. Tavarini, et al. (2023), "Maturation of aluminium adsorbed antigens contributes to the creation of homogeneous vaccine formulations", *Vaccines*, **11**(1), DOI: 10.3390/vaccines11010155.

[8] Ministry of Health (2018), *Vietnamese Pharmacopoeia V* (in Vietnamese), 2200pp.

[9] C.T. Johnston, S.L. Wang, S.L. Hem (2002), "Measuring the surface area of aluminum hydroxide adjuvant", *J. Pharm. Sci.*, **91**(7), pp.1702-1706, DOI: 10.1002/jps.10166.

[10] G.L. Morefield, H. HogenEsch, J.P. Robinson, et al. (2004), "Distribution of adsorbed antigen in mono-valent and combination vaccines", *Vaccine*, **22**(15-16), pp.1973-1984, DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.10.040.

[11] H. HogenEsch, D.T. O'Hagan, C.B. Fox (2018), "Optimizing the utilisation of aluminum adjuvants in vaccines: You might just get what you want", *NPJ Vaccines*, **3**, DOI: 10.1038/s41541-018-0089-x.

[12] J.R. Burdman, M.F. Powell, M.J. Newman (1995), *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Springer, pp.229-276, DOI: 10.1007/978-1-4615-1823-5.

[13] G. Guerrini, A. Vivi, S. Gioria, et al. (2021), "Physicochemical characterisation cascade of nanoadjuvant-antigen systems for improving vaccines", *Vaccines (Basel)*, **9**(6), DOI: 10.3390/vaccines9060544.

[14] G. Sam, S. Chen, K. Plain, et al. (2024), "Diphtheria toxoid particles as Q fever vaccine", *Adv. Funct. Mater.*, **34**, DOI: 10.1002/adfm.202309256.

[15] K. Rani, A.K.J. Raval, D. Kaushik, et al. (2020), "Formulation and evaluation of tetanus toxoid-loaded nanostructured lipid particles", *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, **7**(3), pp.462-469.

[16] P. Marrack, A.S. McKee, M.W. Munks (2009), "Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium", *Nat. Rev. Immunol.*, **9**(4), pp.287-293, DOI: 10.1038/nri2510.