BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

NGUYỄN HOÀNG TÙNG

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

Chuyên ngành: Vi sinh y học
Mã số: 62 72 01 15

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Hà Nội - 2021

CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

Người hướng dẫn khoa học:

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

Phản biện 1: .....
.....
Phản biện 2: .....
.....
Phản biện 3: .....
.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
Vào hồi.. …giờ …., ngày ..…tháng ...…năm 2021.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

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

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút cúm, thuộc họ *Orthomyxoviridae*, các type vi rút gây bệnh cúm cho người chủ yếu là vi rút cúm type A và B. Bệnh cúm là một trong những bệnh truyền nhiễm không những vì tác động bất lợi về mặt sức khỏe do những vụ dịch cúm hàng năm mà nó còn có khả năng gây ra những đại dịch cúm mang tính toàn cầu với số ca tử vong lớn [90, 106].

Theo Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTG), việc tiêm phòng vắc xin cúm góp phần làm giảm khoảng 60% bệnh tật liên quan đến cúm, giảm nguy cơ tử vong do cúm lên đến đến 70-80% cũng như làm giảm nguy cơ mắc bệnh cúm cho người khoẻ mạnh 70-90%[17, 40, 72, 87, 109].

Ở Việt Nam, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) là đơn vị duy nhất có dây chuyền sản xuất theo công nghệ vắc xin cúm trên trứng gà có phôi công suất 1,5 triệu liều/năm đạt chuẩn GMP-WHO, làm cơ sở vững chắc để nghiên cứu phát triển sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá ở Việt Nam. Cùng với việc nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá, nghiên cứu đánh giá tính ổn định về chất lượng vắc xin cũng như khả năng tạo được đáp ứng miễn dịch của vắc xin là một vấn đề cần thiết, làm cơ sở đưa vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh vào thử nghiệm lâm sàng trên người. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu:

Mục tiêu nghiên cứu

1. Đánh giá tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt để đưa vắc xin vào thử nghiệm lâm sàng.
2. Đánh giá công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt, 2014 - 2017.

3. Đánh giá tính ổn định một số tính chất lý hóa của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt, 2014 - 2017

ĐIỂM MỚI VỀ KHOA HỌC VÀ GIÁ TRỊ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Kết quả đánh giá tiền lâm sàng trong luận án này đã góp phần khẳng định chất lượng của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S do IVAC sản xuất đạt tiêu chuẩn về thử nghiệm tiền lâm sàng. Là tiền đề quan trọng đảm bảo việc nghiên cứu phát triển, tiến tới sản xuất thương mại và đưa vắc xin vào phòng bệnh.

Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã cho thấy nhiệt độ bảo quản 5±3^{O}C là phù hợp để bảo quản vắc xin. Sau 15 tháng bảo quản ở nhiệt độ 5±3^{O}C, hàm lượng kháng nguyên HA của vi rút cúm trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S có xu hướng giảm nhưng vẫn đảm bảo đáp ứng theo tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất. Từ đó cho thấy thời hạn sử dụng của vắc xin trong vòng 12 tháng kể từ ngày sản xuất là hoàn toàn phù hợp.

Công nghệ sản xuất vắc xin cúm dựa trên trứng gà có phôi đã được áp dụng ở các nhà sản xuất vắc xin uy tín tại các nước phát triển trên thế giới. Kết quả nghiên cứu góp phần khẳng định kỹ thuật này hoàn toàn có thể áp dụng tại Việt Nam.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án được trình bày trên 109 trang, không kể các phần hành chính, danh mục bài báo đã xuất bản, tài liệu tham khảo và các phụ lục.

Cấu trúc chính của luận án gồm: Phần đặt vấn đề 2 trang (bao gồm cả mục tiêu); Phần tổng quan tài liệu 34 trang; Phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu 21 trang; Phần kết quả

nghiên cứu 28 trang; Phần bàn luận 20 trang; Phần kết luận 2 trang; Phần kiến nghị 1 trang.

Luận án gồm 35 bảng, 22 hình.

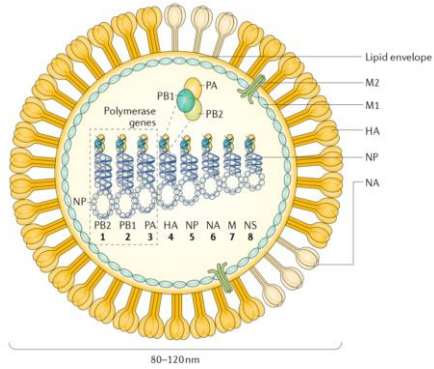
Luận án bao gồm 121 tài liệu tham khảo và 23 trang phụ lục

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. VI RÚT CÚM

1.1.1. Hình thái, cấu trúc

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



Hình 1.1. Mô hình cấu trúc vi rút cúm

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

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

Kháng nguyên virus cúm chủ yếu là kháng nguyên bề mặt bao gồm protein HA và NA. Kháng nguyên HA gồm 1.742-1.778 nucleotide mã hóa cho 562-566 axit amin, có khả năng gây

ngưng kết hồng cầu, gắn với thụ thể chứa axit sialic trên bề mặt tế bào, giúp vi rút xâm nhập vào tế bào [52, 68, 117].

Kháng nguyên NA là một protein gồm 1413 nucleotide mã hóa cho 453 axit amin, đóng vai trò như một mắt xích quan trọng trong việc giải phóng vi rút từ tế bào nhiễm và lan trải vi rút trong đường hô hấp. Miễn dịch của NA bền hơn và có thế phát triển vắc xin vạn năng cho cúm [33, 56].

1.2. Hệ thống giám sát cúm

1.2.1. Hệ thống Giám sát cúm toàn cầu

Hệ thống Giám sát và ứng phó với dịch Cúm Toàn cầu (WHO Global Influenza Surveillance and Response System - GISRS) đã thực hiện giám sát về vi rút học cúm từ năm 1952.

Hệ thống Giám sát và ứng phó với dịch Cúm Toàn cầu (GISRS) do Tổ chức y tế thế giới (WHO) điều phối nhằm cung cấp các thông tin:

- Tỷ lệ nhiễm cúm, tỷ lệ chủng vi rút cúm lưu hành, giám sát sự biến đổi kháng nguyên.
- Mô tả các đặc tính quan trọng của dịch cúm.
- Hỗ trợ lựa chọn các chủng cúm cho sản xuất vắc xin cúm.

1.2.2. Hệ thống giám sát cúm tại Việt Nam

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

trong khi chủng vi rút cúm A/H3N2 (73,9%) và B (25,1%) lại được báo cáo nhiều nhất trong năm 2007.

Trong 2 năm 2009 -2010 cùng với sự lưu hành với chủng vi rút cúm A/H3N2, dịch cúm mới nổi A/H1N1*pdm09* chiếm tỷ lệ 46,6% (2009) và 28,0% (2010). Trong năm 2011, A/H1N1*pdm09* là vi rút cúm được báo cáo nhiều nhất (74,1%), tiếp sau là vi rút cúm B (22,1%) [6].

1.3. Vắc xin cúm mùa IVACFLU-S

1.3.1.1. Chủng dùng trong sản xuất

Chủng cúm A/H1N1

- Tên chủng: NYMC X-179A A/H1N1 mã số 09/124
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩn NYMC X-179A có nguồn gốc từ chủng A/California/7/2009), ngày 17/7/2009.

Chủng cúm A/H3N2

- Tên chủng: NYMCX-223A
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩn NYMCX-223A có nguồn gốc từ chủng cúm A/Texas/50/2012, ngày 28/7/2014.

Chủng cúm B

- Tên chủng: NYMC BX-51B
- Nguồn gốc: Chủng vi rút chuẩnNYMCBX-51B có nguồn gốc từ chủng B/Massachusetts/02/2012, ngày 06/12/2013.

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

Ấp trứng: Quá trình ấp trứng tự động trong tủ ấp chuyên dụng được kiểm soát chặt chẽ các điều kiện nhiệt độ khoảng 36^0C - 38^0C, độ ẩm 70% - 80% với công suất 20.000 trứng/ mẻ.

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

Nuôi cấy: Trứng sau khi gây nhiễm được chuyển vào tủ ủ ấm nuôi cấy. Sau khi đã đủ thời gian nuôi cấy, tiến hành soi để loại

bỏ trứng không đạt sau khi ủ và chuyển tất cả các trứng đạt yêu cầu vào kho lạnh 2^0C - 8^0C trong thời gian 20 - 24 giờ.

Thu dịch niệu nang (gặt): Trứng sau khi làm lạnh chuyển sang phòng thu dịch trứng và thu dịch niệu nang trứng.

Ly tâm trong: Dịch trứng sau khi gặt được chứa vào bình chứa (tank), ly tâm trong dịch trứng.

Cô đặc: Dịch vi rút sau khi ly tâm trong hoặc lọc trong được chuyển sang hệ thống cô đặc trước khi qua giai đoạn siêu ly tâm.

Siêu ly tâm: Dịch trứng sau cô đặc chuyển sang giai đoạn siêu ly tâm.

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

Bất hoạt: Sử dụng formalin 0,01% để bất hoạt dịch vi rút.

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

Ly giải, lọc vô trùng: Dịch trứng sau khi bất hoạt được ly giải bằng hệ thống cột lọc phân tử hollow fiber hoặc cột TFF 50 kD nhằm loại sucrose, triton X-100 trong sản phẩm.

Pha chế vắc xin cúm: Tiến hành pha chế vắc xin bán thành phẩm dưới laminar (cấp độ sạch 100) trong phòng sạch cấp độ.

Đóng ống vắc xin: Sau khi có các kết quả vô trùng, an toàn, tiến hành đóng ống. Vắc xin cúm được đóng vào lọ thủy tinh dung tích 2ml chứa 1 liều đơn 0,5ml.

Bao bì, đóng gói: dán nhãn, bao bì, đóng gói.

Bảo quản: Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ 2^0C - 8^0C.

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

Bảng 1.2. Tiêu chuẩn chất lượng vắc xin IVACFLU-S

TT	Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn áp dụng
1	Cảm quan	TCCS
2	Thể tích	TCCS
3	Vô khuẩn	DĐVN IV, 2009
4	pH	TCCS
5	Nhận dạng HA	WHO- TRS 927, 2005
6	Hàm lượng HA	TCCS
7	Endotoxin	DĐ Châu Âu 2008
8	Protein tổng số	DĐ Châu Âu 2008
9	Formaldehyde tồn dư	DĐVN IV, 2009
10	An toàn chung	DĐVN IV, 2009

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu nghiên cứu

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

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

- NYMC X-179A (A/California/7/2009) (H1N1)
- NYMCX-223A (A/Texas/50/2012) (H3N2)
- NYMC BX-51B (B/Massachusetts/02/2012) (B)
- Dung dịch đệm PBS pH = 7,2

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

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

- NYMC X-179A (A/California/7/2009) (H1N1)
- NYMCX-263B (A/HongKong/4081/2014) (H3N2)
- NYMC BX-35B (B/Brisbane/60/2008) (B)
- Dung dịch đệm PBS pH = 7,2

❖ ***Công thức thành phần giả dược:***

Trong 1 liều 0,5 ml giả dược gồm có:

- NaCl 4,5 mg
- $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0,695 mg
- $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0,181 mg
- Nước cất vừa đủ

2.1.2. Sinh phẩm

STT	Sinh phẩm
1	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H1N1)
2	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (H3N2)
3	Kháng thể kháng HA cúm chuẩn (B)
4	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H1N1)
5	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (H3N2)
6	Kháng nguyên HA cúm chuẩn (B)

2.1.3. Trang thiết bị và vật tư tiêu hao

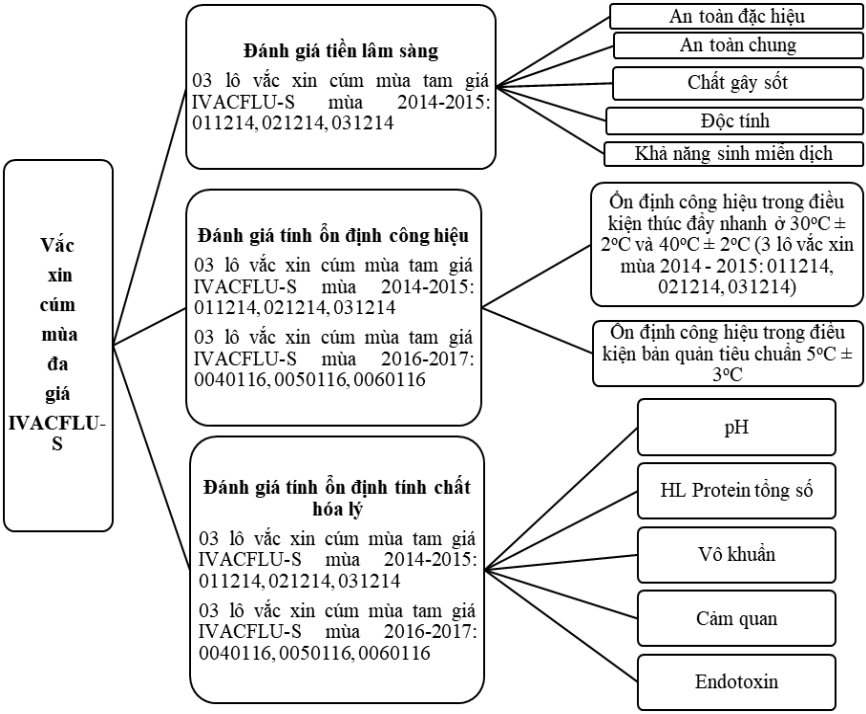
STT	Thiết bị - Dụng cụ
1	Máy đo chí nhiệt tố có độ chính xác 0.1^oC
2	Máy đo pH
3	Kính hiển vi

2.1.4. Động vật thí nghiệm

Bảng 2.1. Động vật thí nghiệm dùng trong nghiên cứu tiền lâm sàng

Loại	Giống	Giới tính	Nguồn gốc
Chuột nhắt	*Swiss*	2 giới	IVAC
Chuột lang		Đực	IVAC
Thỏ	*Newzealand*	2 giới	IVAC

2.2. Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

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

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S

3.1.1. Thử nghiệm an toàn đặc hiệu

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

3.1.2. Thử nghiệm an toàn chung

Kết quả cho thấy kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột nhắt của 3 loạt vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột sau 7 ngày thử nghiệm giao động trong khoảng 9,46 – 10,03 g/chuột/7 ngày. (Bảng 3.2).

Kết quả thử nghiệm an toàn chung trên chuột lang cho thấy kết quả thử nghiệm của 3 loạt vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đều đạt yêu cầu. Mức tăng trung bình trọng lượng chuột lang sau 7 ngày thử nghiệm dao động trong khoảng 42,1 – 64,7 g/chuột/7 ngày. (Bảng 3.3).

3.1.3. Thử nghiệm chất gât sốt

Mức tăng nhiệt độ cơ thể của thỏ sau tiêm vắc xin dao động trong khoảng 0,1 - 0,3^{o}C, đối với các thỏ tiêm giả dược mức tăng nhiệt độ cơ thể của thỏ sau tiêm dao động trong khoảng 0 - 0,1^{o}C. Tổng mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ thử nghiệm của 1 lô vắc xin dao động trong khoảng 0,4 - 0,7^{o}C, đối với các thỏ

tiêm giả dược mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ sau tiêm là 0,1^{o}C. Kết quả thử nghiệm của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 đạt yêu cầu theo hướng dẫn theo Dược điển Việt Nam IV, 2009. Mức tăng nhiệt độ cơ thể của từng thỏ sau tiêm vắc xin không quá 0,6^{o}C/thỏ, tổng mức tăng nhiệt độ cơ thể của 3 thỏ thử nghiệm không quá 1,3^{o}C/3 thỏ (Bảng 3.4).

3.1.4. Thử nghiệm độc tính

3.1.4.1. Chỉ số sinh hoá máu

Giá trị trung bình các chỉ số sinh hóa máu gồm gluocse, Creatinin, GOT, GPT của nhóm thỏ được tiêm vắc xin đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường. Không có sự khác biệt về các chỉ số sinh hóa máu được xét nghiệm ở nhóm thỏ tiêm vắc xin và tiêm giả dược, ngoại trừ chỉ số glucose ở ngày theo dõi thứ 16. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm hàm lượng glucose máu của thỏ thử nghiệm đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường (Bảng 3.5).

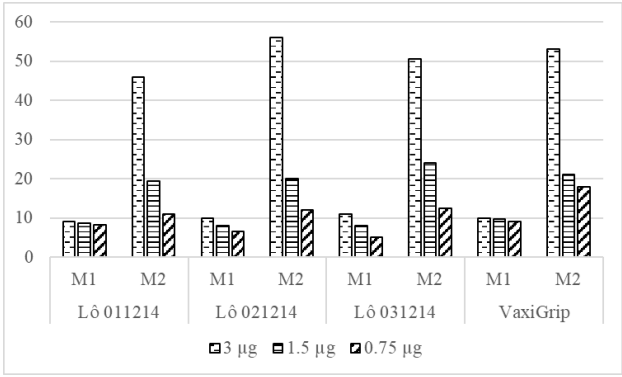
3.1.4.2. Giải phẫu bệnh và tế bào học

Trên các thỏ được tiêm 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, các kết quả điển hình tại hình 3.1 cho thấy, quan sát ở vật kính 40 có sự khác biệt trước (a) và sau (b) tiêm vắc xin của cơ vùng tiêm. Tuy nhiên, hình ảnh giải phẫu bệnh sau tiêm của các cơ vùng tiêm, các bó cơ vân xếp song song, hình thái bình thường, vài tĩnh mạch xẹp, không xung huyết. Không thấy tổn thương vi thể ở cơ vùng tiêm (Hình 3.1).

Sau 16 ngày và 28 ngày được tiêm vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, quan sát hình ảnh giải phẫu tủy xương, mô phổi, mô gan, mô lách, mô thận của thỏ được tiêm vắc xin trên vật kính 40 hình ảnh trước (a) và sau (b) tiêm có sự khác biệt. Tuy

nhiên, giải phẫu bệnh về hình thái tế bào bình thường. Các quan sát vi thể trên tất cả thỏ thí nghiệm không thấy hình ảnh sinh lý bệnh bất thường (Hình 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6)

3.1.5. Thử nghiệm khả năng sinh miễn dịch



Hình 3.7. Đáp ứng miễn dịch của chủng X-179A (H1N1) trong vắc xin cúm mùa IVACFLU-S trên chuột thử nghiệm

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

Tương tự kết quả thí nghiệm trên chủng X-179A (H1N1), kết quả thí nghiệm đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) cho thấy, sau 21 ngày tiêm mũi thứ nhất (M1), lượng kháng thể thu được dao động trong khoảng dưới 20 IU/ml. Đáp ứng miễn dịch tăng lên sau 14 ngày tiêm mũi thứ 2 (M2). (Hình 3.8).

Kết quả thí nghiệm đáp ứng miễn dịch của chủng BX-51B (B) cho thấy, sau 21 ngày tiêm mũi thứ nhất (M1), mức đáp ứng kháng thể của chủng X-179A (H1N1) trong cả 3 lô vắc xin thử nghiệm và vắc xin đối chứng đều thấp ở cả 3 liều kháng nguyên thử nghiệm (3 µg/liều, 1,5 µg/liều, 0,75 µg/liều), lượng kháng thể thu được tối đa đạt trung bình trên nhóm chuột thí nghiệm là 6,2 IU/ml. (Hình 3.9).

3.2. Kết quả đánh giá công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá, dạng mảnh, bất hoạt

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

Bảng 3.8. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015

Chủng	Lô vắc xin IVACFLU- S			p*
	011214	021214	031214	
Chủng B	24,0	23,9	24,6	>0,05
Chủng H1N1	25,6	24,4	25,3	>0,05
Chủng H3N2	27,9	28,7	27,5	>0,05

* *T-test*

Công hiệu các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 kiểm định ngay sau sản xuất, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong các lô vắc xin dao động trung bình trong khoảng 23,9 – 28,7 µg/liều (Bảng 3.8).

Bảng 3.9. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017

Chủng	Lô vắc xin IVACFLU- S			p*
	0040116	0050116	0060116	
Chủng B	17,9	17,8	19,6	>0,05
Chủng H1N1	19,7	19,7	20,4	>0,05
Chủng H3N2	20,0	19,8	18,9	>0,05

* *T-test*

Công hiệu các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 kiểm định ngay sau sản xuất, hàm lượng trung bình kháng nguyên HA của mỗi chủng trong các lô vắc xin dao động trung bình trong khoảng 17,8 – 20,4 µg/liều (Bảng 3.9).

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

Ở nhiệt độ thử thách 30^{o}C ± 2^{o}C, hàm lượng kháng nguyên HA của cả 3 lô vắc xin cúm mùa IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 đều giảm. Sau thời gian thử thách 14 ngày ở nhiệt độ 30^{o}C ± 2^{o}C, hàm lượng kháng nguyên HA của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 vẫn đạt theo tiêu chuẩn tham chiếu, với hàm lượng kháng nguyên đơn giá vẫn đạt tối thiểu ≥15 µg/liều (Hình 3.10).

Tại nhiệt độ thử thách 40^{o}C ± 2^{o}C, sau 3 ngày bảo quản tại nhiệt độ này hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S giảm với tỷ lệ trung bình giao động trong khoảng 5,04 – 7,99% so với hàm lượng kháng nguyên HA ban đầu trong vắc xin(Bảng 3.10).

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

Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 011214, 021214, 031214 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ $5^oC \pm 3^oC$. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm lượng kháng nguyên HA các chủng BX-51B (B), X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) lần lượt với lô 011214 là 36,4 µgHA/ml, 41,2 µgHA/ml, 34,4 µgHA/ml (Bảng 3.11), lô 021214 là 33,8 µgHA/ml, 38,6 µgHA/ml, 34,8 µgHA/ml (Bảng 3.12), lô 031214 là 34,4 µgHA/ml, 37,4 µgHA/ml, 34,2 µgHA/ml (Bảng 3.13).

Thử nghiệm đánh giá tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam gia mùa 2016-2017 cho kết quả tương tự. Công hiệu vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S lô 0040116, 0050116, 0060116 giảm dần theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ $5^oC \pm 3^oC$. Sau 15 tháng kể từ ngày sản xuất, hàm lượng kháng nguyên HA các chủng BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2) lô 0040116 lần lượt là 31,8 µgHA/ml, 31,6 µgHA/ml, 31,4 µgHA/ml (Bảng 3.14), lô 0050116 lần lượt là 31,2 µgHA/ml, 32,0 µgHA/ml, 31,6 µgHA/ml (Bảng 3.15), lô 0060116 lần lượt là 31,4 µgHA/ml, 31,4 µgHA/ml, 31,8 µgHA/ml (Bảng 3.16).

Sau 15 tháng kể từ ngày xuất xưởng bảo quản ở nhiệt độ $5^oC \pm 3^oC$, hàm lượng kháng nguyên HA của các đơn chủng trong vắc xin vẫn đạt tiêu chuẩn tham chiếu của nhà sản xuất, hàm lượng HA đơn chủng ≥ 15,0µgHA/liều (Hình 3.17).

3.3. Kết quả đánh giá ổn định các tính chất hóa lý của vắc xin cúm mùa IVACFLU- S

Kết quả nghiên cứu cho thấy, pH của các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và 2016-2017 ổn định

sau 15 tháng bảo quản ở nhiệt độ 5^{o}C ± 3^{o}C tính từ ngày xuất xưởng, dao động lần lượt trong khoảng 6,97 – 7,04 (Bảng 3.20) và 7,03 – 7,22 (Bảng 3.21).

Kết quả nghiên cứu 6 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 – 2015 và 2016 – 2017 cho thấy, hàm lượng protein tổng số của các lọ vắc xin thử nghiệm giảm dần theo thời gian. Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ 5^{o}C ± 3^{o}C, hàm lượng trung bình protein tổng số của các lô vắc xin 011214, 021214, 031214 lần lượt là 205,5 µg/45µgHA, 215,7 µg/45µgHA, 196,2 µg/45µgHA (Bảng 3.22), các lô vắc xin 0040116, 0050116, 0060116 lần lượt là 281,3 µg/45µgHA, 275,1 µg/45µgHA, 279,1 µg/45µgHA (Bảng 3.23).

Kết quả đánh giá tính ổn định một số tính chất hóa lý khác của vắc xin bao gồm vô khuẩn, cảm quan, nội độc tố. Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ 5^{o}C ± 3^{o}C, các lọ vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014-2015 vẫn đảm bảo được các yêu cầu về vô khuẩn, cảm quan và nội độc tố (Bảng 3.24).

Kết quả đánh giá tính ổn định một số tính chất hóa lý khác của vắc xin bao gồm vô khuẩn, cảm quan, nội độc tố. Sau 15 tháng bảo quản tại nhiệt độ 5^{o}C ± 3^{o}C, các lọ vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2016-2017 vẫn đảm bảo được các yêu cầu về vô khuẩn, cảm quan và nội độc tố (Bảng 3.25).

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Phương pháp đánh giá tiền lâm sàng và áp dụng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S tại Việt Nam

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

Mục tiêu cuối cùng của các nghiên cứu tiền lâm sàng là mô hình hóa chính xác tác dụng sinh học mong muốn của vắc xin trên động vật thí nghiệm để dự đoán hiệu quả sử dụng của vắc xin trên người [88] [2, 3, 112]. Các nghiên cứu invitro được thực hiện gồm xác định pH, cảm quan, vô khuẩn, hàm lượng kháng nguyên HA. Các thử nghiệm invivo gồm xác định độc tính, an toàn đặc hiệu, an toàn chung, tính sinh miễn dịch. Các thử nghiệm trong nghiên cứu này được thiết lập phù hợp với khuyến cáo của TCYTTG và quy định của Bộ Y tế [2, 3, 112] về đánh giá tiền lâm sàng áp dụng cho nghiên cứu và sản xuất vắc xin. Nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng đã chỉ ra sự phù hợp giữa dữ liệu tiền lâm sàngvới các kết quả thử nghiệm lâm sàng [22, 62].

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

Thử nghiệm an toàn đặc hiệu được thực hiện với nước cốt vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S nhằm xác định độc tính đặc hiệu của kháng nguyên HA trong vắc xin khi sử dụng [113]. Kết quả thử nghiệm an toàn đặc hiệu cho biết kháng nguyên HA của vi rút cúm trong sản phẩm còn khả năng nhân lên hoặc gây độc cho phôi gà hay không. Một số nghiên cứu đã chỉ ra 20 dấu ấn sinh học khác nhau cùng kháng nguyên HA có thể đặc trưng cho tính an toàn đặc hiệu của vắc xin cúm [65].

Trong nghiên cứu tiền lâm sàng, nghiên cứu an toàn chung đã sử dụng 3 lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S mùa 2014 - 2015, lô 011214, 021214 và 031214. Sau 7 ngày tiêm vắc xin, chuột thử nghiệm tăng trọng bình thường, khỏe mạnh và không có sự khác biệt về mức tăng trọng của chuột tiêm vắc xin và giả dược (Bảng 3.2, 3.3). Kết quả này phù hợp với tiêu chuẩn an toàn chung áp dụng cho vắc xin cúm mùa khi đánh giá xuất xưởng [4, 5]. Kết quả này cũng tương đồng với thử nghiệm của T. Mizukami và các cộng sự (2014) trong nghiên cứu đánh giá tiền lâm sàng của 4 loại vắc xin cúm mùa dạng mảnh [65].

Theo hướng dẫn của TCYTTG, đánh giá độc tính của vắc xin trong nghiên cứu tiền lâm sàng còn bao gồm các đánh giá tổn thương thực thể các mô, cơ quan đích liên quan đến vắc xin. Trong đó, giải phẫu mô bệnh học của bất kỳ tổn thương nào được phát hiện trong quá trình thử nghiệm tiền lâm sàng vắc xin cũng cần được báo cáo [115]. Trong nghiên cứu tiền lâm sàng đối với vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S, giải phẫu mô bệnh học của thỏ thí nghiệm được thực hiện với các cơ quan nội tạng bao gồm gan, thận, tủy, lách, phổi (Hình 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6).

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

Tính sinh miễn dịch luôn là tiêu chí hàng đầu của các nhà sản xuất để đánh giá sự thành công của một vắc xin phòng bệnh. Để vắc xin có thể sinh miễn dịch tốt không chỉ cần có một kháng nguyên đủ mạnh mà còn có sự hỗ trợ đắc lực của các tá dược [115]. Mặc dù điều đó có thể mang lại một số các vấn đề phản ứng phụ liên quan đến an toàn chung của vắc xin. Hai glycoprotein chính, rất quan trọng đối với bệnh cúm trong đó có

hemagglutinin (HA) được biểu hiện trên bề mặt của hạt vi rút cúm. Đó cũng là nguyên nhân HA được sử dụng là kháng nguyên đích cho sản xuất vắc xin cúm và khả năng sinh miễn dịch của vắc xin cúm mùa phụ thuộc vào đặc tính của kháng nguyên HA [98]. Trong đó, hàm lượng và phác đồ sử dụng sẽ quyết định khả năng đáp ứng miễn dịch của các loại kháng nguyên HA. Kháng nguyên HA ở các loài khác nhau cũng tạo ra đáp ứng miễn dịch khác nhau [57, 98]. Kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đã góp phần chứng minh lý thuyết này, Với 3 chủng vi rút cúm khác nhau X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B), khả năng đáp ứng miễn dịch của chủng X-223A (H3N2) là mạnh nhất và chủng BX-51B (B) là yếu nhất. Tuy nhiên, điều này chỉ xảy ra sau khi chuột thí nghiệm được tiêm mũi vắc xin thứ 2 và đánh giá tại thời điểm 14 ngày sau tiêm. Đồng thời, đáp ứng miễn dịch cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt ở các liều kháng nguyên khác nhau. Tại liều kháng nguyên 0,75 µgHA/liều, mức đáp ứng miễn dịch rất thấp và hầu như không có sự khác biệt giữa mũi tiêm thứ nhất và mũi tiêm thứ 2. Sự biến đổi đáp ứng miễn dịch tại mũi tiêm thứ 2 đã khác biệt khá nhiều với liều kháng nguyên HA là 1,5 µgHA/liều và 3,0 µgHA/liều. Với liều 3,0 µgHA/liều, mức đáp ứng miễn dịch của cả 3 loại kháng nguyên sau mũi tiêm thứ 2 đều cao gấp nhiều lần ở mũi tiêm thứ nhất. Kết quả này cũng gợi ý việc xây dựng phác đồ tiêm 1 liều duy nhất hay 2 liều khi vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được sản xuất và đưa vào sử dụng trong phòng bệnh (Hình 3.7, 3.8, 3.9) . Đường tiêm cũng là một yếu tố quyết định tính đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên [102]. Đối với các mầm bệnh khác nhau, xác định được đường xâm nhập và các vị trí sao chép

tiếp theo của mầm bệnh là điều cần thiết để xác định được các chiến lược lựa chọn đường tiêm chủng phù hợp [18, 24, 102]. Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá tiền lâm sàng đã xác định đường tiêm bắp là phù hợp đối với vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S.

4.2. Tính ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S sản xuất tại Việt Nam

4.2.1. Công hiệu và tính ổn định công hiệu của vắc xin IVACFLU-S bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau

Công hiệu của vắc xin

Công hiệu của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được xác định là hàm lượng kháng nguyên HA tổng số trong vắc xin. Với 3 chủng cúm mùa đơn giá được lựa chọn phù hợp với mùa 2014 – 2015 (X-179A (H1N1), X-223A (H3N2) và BX-51B (B)) và mùa 2016 – 2017 (BX-35B (B), X-179A (H1N1), X-263B (H3N2)). Công hiệu của vắc xin cần được xác định để đưa ra liều vắc xin thích hợp. Trong trường hợp của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-Snói riêng và vắc xin cúm mùa nói chung, quy trình sản xuất và các thử nghiệm đánh giá công hiệu vắc xin thường gặp khó khăn do sự biến đổi liên tục của chủng vi rút cúm [17, 121].

Về nguyên tắc, công hiệu và khả năng đáp ứng miễn dịch của vắc xin cúm mùa đều có thể được đánh giá dựa trên các mô hình thử nghiệm trên động vật. Mặc dù TCCS của vắc xin xác định hàm lượng kháng nguyên trong vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S thành phẩm là ≥ 15 µgHA/liều cho mỗi chủng vi rút. Nhưng thử nghiệm đáp ứng miễn dịch trên chuột không sử dụng đến liều này mà sử dụng các liều thấp hơn. Kết quả cho thấy mức đáp ứng miễn dịch cho thấy liều kích thích đáp ứng

miễn dịch của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S là 1,5 µgHA/liều với phác đồ 2 liều tiên cách nhau 21 ngày. Và khả năng đáp ứng miễn dịch có sự khác biệt giữa 03 chủng vi rút được sử dụng sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên các chủng cúm khác nhau của vi rút cúm H5N1 [43, 73, 78, 85].

Tính ổn định của vắc xin

Nghiên cứu độ ổn định trong thời gian thực /điều kiện thực bao gồm các nghiên cứu về các đặc tính vật lý, hóa học, sinh học, dược phẩm sinh học và vi sinh vật của vắc xin, trong và trước thời hạn sử dụng và thời gian lưu trữ dự kiến của mẫu trong điều kiện xử lý và bảo quản dự kiến. Các thông số chỉ thị độ ổn định là các chỉ số trực tiếp hoặc gián tiếp về hiệu quả hoặc tính an toàn của vắc xin được chứng minh trong các thử nghiệm lâm sàng. Chúng được sử dụng để đánh giá tính phù hợp của sản phẩm trong suốt thời hạn sử dụng.

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

Tại điều kiện bảo quản tiêu chuẩn $5^oC \pm 3^oC$, độ ổn định của vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S được đánh giá một cách toàn diện hơn với các chỉ tiêu chất lượng như hướng dẫn của TCYTTG [95]. Đồng thời, thời gian đánh giá cũng được kéo dài tới 15 tháng tính từ thời gian xuất xưởng. Thời gian này dài hơn

hạn sử dụng của vắc xin, hạn sử dụng của vắc xin là 12 tháng, có thể đem lại lợi ích nhất định cho người sử dụng khi vắc xin được sản xuất thương mại; Các đặc tính về hàm lượng protein tổng số, pH, nội độc tố (endotoxin), vô khuẩn, cảm quan không có sự khác biệt so với thời điểm xuất xưởng và đáp ứng theo TCCS của IVAC.

4.3. Một số hạn chế của nghiên cứu

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

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

dụng, số lượng lô vắc xin sẽ đủ để thực hiện đánh giá tính ổn định theo phương pháp này.

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

KẾT LUẬN

Các lô nước cốt vắc xin cúm mùa đơn giá sử dụng trong sản xuất vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-S đạt yêu cầu về kiểm định an toàn đặc hiệu, an toàn chung khi thử nghiệm trên chuột nhắt và chuột lang, thử nghiệm độc tính, thử nghiệm đáp ứng miễn dịch

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

Các lô vắc xin cúm mùa tam giá IVACFLU-Smùa 2014 – 2015 và mùa 2016 – 2017 đạt thử nghiệm ổn định công hiệu khi thử thách tại các điều kiện thúc đẩy nhanh ở nhiệt độ $30^oC \pm 2^oC$ trong 14 ngày, $40^oC \pm 2^oC$ trong 3 ngày và điều kiện bảo quản tiêu chuẩn $5^oC \pm 3^oC$ trong 15 tháng.

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

KIẾN NGHỊ

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

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