

Nghiên cứu quy trình tinh chế poliovirus phục vụ phát triển vắc xin bại liệt bất hoạt

Establishment of Poliovirus Purification Procedure for the Development of Inactivated Polio Vaccine

**Phạm Ích Tùng^{1,2*}, Nguyễn Đăng Hiền¹, Trịnh Văn Quang¹, Đặng Mai Dung¹,
Đặng Thị Ngân Hà¹, Nguyễn Nghĩa Vũ¹, Trương Quốc Phong²**

¹Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC)

²Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Đến Tòa soạn: 07-8-2017; chấp nhận đăng: 28-3-2018

Tóm tắt

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả sản xuất poliovirus týp I, II và III để phục vụ cho nghiên cứu quy trình tinh chế và ứng dụng phát triển vắc xin bất hoạt. Kết quả cho thấy sau siêu lọc mật độ poliovirus tăng lên 80 lần, hiệu suất thu hồi trung bình đạt được của 3 týp là 93,54%. Sau siêu ly tâm hiệu suất thu hồi trung bình của 3 týp đạt được là 60,10 %. Hiệu suất thu hồi trung bình của 3 týp poliovirus sau tinh chế qua cột sắc ký đạt 91,11 %. Sau tinh chế, poliovirus được bất hoạt bằng formalin và tổng hiệu giá kháng nguyên đạt được cao nhất đối với týp III ($1,54 \times 10^5$ DU) và thấp nhất đối với týp II ($5,36 \times 10^4$ DU). Hỗn dịch poliovirus sau tinh chế và bất hoạt đã đáp ứng yêu cầu để ứng dụng sản xuất vắc xin bại liệt bất hoạt bán thành phẩm.

Từ khóa: virus bại liệt, siêu lọc, siêu ly tâm, vắc xin bại liệt bất hoạt (IPV)

Abstract

In this paper we present the results of the production of poliovirus I, II and III for studying the purification procedure and the development of inactivated vaccines. The results showed that the ultrafiltration of the poliovirus resulted in the increase of poliovirus density over 80 times; the average recovery yield of 3 types was 93.54%. After ultracentrifugation the average recovery yield of 3 types was achieved as 60.10 %. The average recovery yield of 3 poliovirus types after purification through the column chromatography was 91.11 %. Following purification, the poliovirus was inactivated by formalin and the total of antigen titer was highest for Type III (1.54×10^5 DU) and lowest for Type II (5.36×10^4 DU). The properties of post-refined and inactivated poliovirus suspension meet the requirements for producing the bulk of polio vaccines.

Keywords: Poliovirus, ultrafiltration, ultracentrifugation, inactivated polio vaccine (IPV)

1. Tổng quan tài liệu

Bại liệt là bệnh truyền nhiễm cấp tính do virus bại liệt gây ra. Tuy nhiên bệnh này có thể phòng tránh bằng việc sử dụng vắc xin. Vắc xin bại liệt sống uống, giảm độc lực (OPV) được đưa vào sử dụng từ những năm 50 của thế kỷ XX góp phần quan trọng trong việc giảm tỷ lệ mắc và tử vong do virus bại liệt ở trẻ em. Việt Nam là một trong số các quốc gia đã thanh toán được bệnh bại liệt từ năm 2000 do trên 95% trẻ em được uống vắc xin bại liệt sống giảm độc lực 3 týp tOPV [1,2].

Tuy nhiên trong quá trình sử dụng OPV là loại vắc xin sống uống, nguồn gốc từ chủng hoang dại được làm giảm độc lực do vậy khi virus nhân lên dễ quay trở lại dạng độc tính và có thể gây nên bệnh bại liệt liên quan đến sử dụng vắc xin. Ngoài ra, điều này cũng có thể sẽ gây bùng phát dịch [3].

Vắc xin bại liệt bất hoạt (inactivated polio vaccine – IPV) đã được nghiên cứu từ năm 1955 [4]. Vắc xin IPV có ưu điểm là rất an toàn, không gây ra hiện tượng bệnh bại liệt liên quan đến sử dụng vắc xin [5-7]. Trước tình hình đó tổ chức y tế thế giới đã khuyến cáo các nước đang sử dụng vắc xin OPV nên từng bước chuyển sang sử dụng vắc xin IPV (do vắc xin OPV virus vẫn còn sống giảm độc lực có khả năng quay trở lại dạng độc lực khi đào thải ra môi trường) và tiến tới sử dụng hoàn toàn bằng vắc xin này. Ở Việt Nam nghiên cứu về vắc xin polio bất hoạt còn ít, hiện nay mới có một công trình nghiên cứu về qui trình sản xuất vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng Sabin trên tế bào thận khỉ và trên tế bào vero (Đề tài KC.10-24) tuy nhiên hiệu quả còn thấp.

Yêu cầu của vắc xin IPV cần độ tinh khiết cao, không chứa các tạp chất, các protein lạ... [3,5-7]. Poliovirus tinh khiết thu được cần có hiệu giá cao, sau đó được bất hoạt bằng formaldehyde, lượng formaldehyd tồn dư không quá 0.02% thể tích bán thành phẩm thu được. Để đảm bảo tính an toàn của

* Địa chỉ liên hệ: Tel: (+84) 982649028
Email: dingtung01110@gmail.com

vắc xin thành phẩm, đạt yêu cầu theo quy định của Dược điển Việt Nam IV và theo tiêu chuẩn của WHO chúng tôi tiến hành nghiên cứu quy trình tinh chế Poliovirus phục vụ phát triển vắc xin bại liệt bất hoạt.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng poliovirus typ Is 90C, typ IIs 79A, typ IIIs 88A; kháng huyết thanh đặc hiệu poliovirus typ I, II, III (20 UI/ 0,1 ml), mẫu IPV chuẩn do Viện nghiên cứu bại liệt Nhật bản cung cấp. Gel sắc ký DEAE sepharose CL6B (GE Healthcare, Mỹ). Đệm PB ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0,1 M; PB 0,1 M trong NaCl 1,5 M; Sodium bisulfate,... do POLYVAC sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào Vero [2]

Quy trình nuôi cấy tế bào Vero được mô tả ngắn gọn như sau: Tế bào vero đời 138 được làm tan băng sau đó pha loãng và chuyển vào các chai nuôi chứa môi trường DMEM ở điều kiện 37°C trong 7 ngày (tế bào phủ kín một lớp trên mặt đáy chai). Tế bào được rửa Hank (-), sau đó được tách thu bằng trypsin. Tế bào được tiếp tục cấy vào môi trường mới với điều kiện tương tự trong 4 ngày. Quá trình nuôi cấy được thực hiện đến đời 142 được sử dụng cho lây nhiễm poliovirus.

2.2.2. Phương pháp gây nhiễm và thu nhận poliovirus [2]

Tế bào vero đời 142 sau nuôi cấy 4 ngày bám kín một lớp trên bề mặt đáy chai sẽ được gây nhiễm với poliovirus typ I, II, III với quy trình tóm tắt như sau: Tế bào được rửa Hank (-) sau đó poliovirus được bổ sung vào mỗi chai nuôi và để hấp thụ trong 1 giờ ở 33°C. Môi trường M199 được bổ sung vào mỗi chai (90-100 ml) và nuôi ở 33°C trong 72 giờ. Poliovirus được thu nhận bằng cách lọc canh trường nuôi cấy qua màng 0,22 μm khi độ hủy hoại tế bào > 90 %.

2.2.3. Phương pháp siêu lọc Poliovirus [2]

Dịch poliovirus sau khi lọc thô được tiến hành siêu lọc qua hệ thống lọc màng với các điều kiện: kích thước màng lọc 0,01 μm , tốc độ dòng 400 – 500 ml/phút, áp suất < 5 bar, nhiệt độ < 33°C. Dịch poliovirus cô đặc được xác định hiệu giá và bảo quản -80°C.

2.2.4. Phương pháp siêu ly tâm [2]

Dịch poliovirus sau siêu lọc được tiếp tục siêu ly tâm qua 2 bước như sau: (1) tốc độ 36000 vòng/phút trong 4 giờ, cặn lắng chứa poliovirus được thu nhận và hòa tan trở lại bằng đệm phosphate 0,1 M; (2) tốc

độ 15000 vòng/phút trong 30 phút, thu nhận dịch nổi chứa poliovirus.

2.2.5. Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Dịch chứa poliovirus được tinh chế qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE sepharose CL-6B. Cột gel được cân bằng bởi đệm phosphate pH7,0 ở tốc độ 10 ml/phút. Mẫu poliovirus được nạp lên cột và thu nhận đỉnh xuất hiện sau khi nạp mẫu.

2.2.6. Phương pháp bất hoạt poliovirus [8,9]

Poliovirus được bất hoạt với formaldehyde ở nồng độ 0,025 % trong 12 ngày ở 37°C. Formaldehyde tồn dư sau bất hoạt được trung hòa bằng sodium bisulfite ở nồng độ 0,044%. Hỗn dịch sau đó được lọc qua màng 0,22 μm và xác định hiệu giá.

2.2.7. Phương pháp đánh giá hiệu quả sản xuất bán thành phẩm vắc xin IPV

Xác định hiệu giá Poliovirus bằng phương pháp chuẩn độ vi lượng (CCID₅₀): Mỗi mẫu pha loãng bậc 10¹ và bậc 10^{0,5} với dải nồng độ: từ 10^{-5,5} → 10⁻⁸, nhỏ 100 μl các mẫu đã pha vào phiến nhựa 96 giếng, nhỏ 100 μl tế bào (10⁵/ml), nuôi ở 36°C sau 7 ngày đọc kết quả và tính toán CCID₅₀.

Xác định hàm lượng kháng nguyên D theo phương pháp ELISA (DU) [10].

Kiểm tra hàm lượng Protein toàn phần bằng phương pháp Bradford [11].

Kiểm tra hàm lượng Formandehyde tồn dư bằng phương pháp đo cường độ màu của 3,5 diacetyl – 1,4 dihydroluthidin ở bước sóng 415nm. Phức này được tạo thành do phản ứng của formaldehyd với acetylaceton [8, 9].

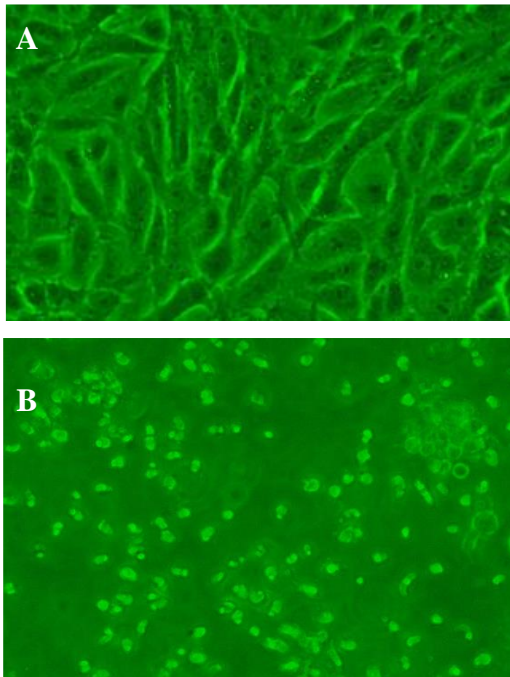
Thử nghiệm nhận dạng các typ Poliovirus trước bất hoạt dựa theo phương pháp chuẩn độ vi lượng, sau bất hoạt theo phương pháp ELISA. Các phương pháp này sử dụng các kháng huyết thanh đặc hiệu typ.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nuôi cấy tế bào Vero, gây nhiễm và thu nhận poliovirus

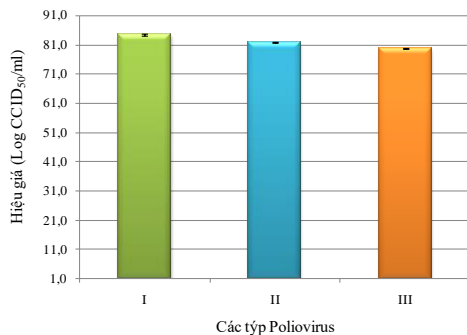
Sự phát triển của tế bào Vero nuôi cấy trong chai nhựa chuyên dụng ở 37°C được theo dõi hàng ngày dưới kính hiển vi. Kết quả cho thấy tế bào phát triển tốt và phủ kín một lớp sau 7 ngày nuôi cấy (Hình 1A). Tế bào sau đó được tách và nuôi cấy trong điều kiện tương tự từ đời 139 đến 142. Ở đời 142, tế bào sau khi phát triển kín một lớp được gây nhiễm với poliovirus. Quá trình phát triển của poliovirus được đánh giá thông qua sự hủy hoại tế bào bằng cách quan sát trên kính hiển vi. Kết quả cho thấy tế bào bị hủy hoại được thể hiện qua sự co tròn và bong khỏi bề mặt nuôi cấy và đạt >90% sau 72 giờ gây

nhễm (Hình 1B). Với kết quả đạt được, dịch canh trường nuôi cấy đã đảm bảo để thu nhận poliovirus.



Hình 1. Tế bào Vero trước gây nhiễm (A) và sau gây nhiễm bởi poliovirus (B). Tế bào bị hủy hoại được thể hiện qua sự co tròn và bong khỏi bề mặt nuôi cấy.

Dịch canh trường nuôi cấy được thu nhận bằng phương pháp lọc qua màng 0,22 µm. Kết quả thu được cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Thomassen và cộng sự 2014 [10]. Hiệu giá poliovirus thu được là cao và đáp ứng yêu cầu để thực hiện các bước tiếp theo trong quá trình phát triển vắc xin bất hoạt.



Hình 2. Thu nhận poliovirus. Ba tít poliovirus I, II, III được nuôi cấy trên tế bào Vero và thu nhận từ canh trường.

3.2. Tình chế poliovirus phục vụ phát triển vắc xin bất hoạt

3.2.1. Kết quả siêu lọc

Trong nghiên cứu này siêu lọc là quá trình lọc hỗn dịch virus qua màng lọc với kích thước lỗ màng

0,01 µm. Poliovirus có kích thước khoảng 0,03 µm [11] do đó khi được lọc qua màng lọc thì các hạt virus và các thành phần có kích thước lớn hơn lỗ màng sẽ được giữ lại trên màng, trong khi đó các phân tử nhỏ như muối, protein, axit amin, H₂O,... sẽ được loại đi. Do đó bước siêu lọc sẽ giúp loại bớt các thành phần phân tử nhỏ khỏi hỗn dịch virus. Ngoài ra, do các phân tử H₂O đi qua màng nên dịch virus cũng sẽ được cô đặc sau khi thực hiện siêu lọc.

Bảng 1. Siêu lọc hỗn dịch poliovirus.

Kháng nguyên Poliovirus	Tổng hiệu giá trước lọc (CCID ₅₀)	Tổng hiệu giá sau lọc (CCID ₅₀)	Hiệu suất (%)
Tít I	1,03 x 10 ¹⁴	9,59 x 10 ¹³	93,26
Tít II	3,65 x 10 ¹³	3,40 x 10 ¹³	93,10
Tít III	6,43 x 10 ¹³	6,06 x 10 ¹³	94,24

Kết quả cho thấy quá trình siêu lọc đã cô đặc được khoảng 80 lần (từ 38,1 lít xuống 0,46 lít). Hiệu suất thu hồi poliovirus sau siêu lọc đạt khoảng 93-94% đối với cả ba tít (Bảng 1). Hiệu suất thu hồi đạt được cho thấy poliovirus được thu hồi gần như hoàn toàn sau bước siêu lọc. Hiệu suất thu hồi trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Levintow và Darnell (1960) (80%) [11].

3.2.2. Kết quả siêu ly tâm

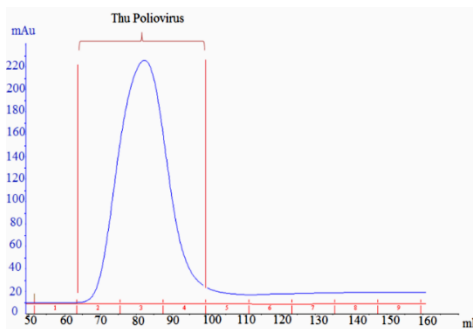
Hỗn dịch poliovirus sau siêu lọc được tiếp tục tinh chế bằng siêu ly tâm. Quá trình siêu ly tâm được thực hiện theo hai giai đoạn: (1) ly tâm tốc độ cao 36,000 vòng/phút với mục tiêu thu nhận poliovirus và các mảnh vỡ tế bào chủ có kích thước tương đương và loại bỏ các phân tử có trọng lượng nhỏ hơn poliovirus còn nằm lại ở phần nước nổi; (2) ly tâm tốc độ thấp 15.000 vòng/phút hỗn dịch virus thu được sau khi hòa tan phần cặn của giai đoạn 1 trong đệm phosphate với mục tiêu thu poliovirus trong phần dịch nổi và loại bỏ các thành phần có trọng lượng lớn như xác tế bào chủ sẽ nằm ở pha cặn. Hiệu suất thu hồi sau siêu ly tâm đạt 58-62% (Bảng 2) và cao hơn so với nghiên cứu của Levintow và Darnell (1960) (33%) [12]. Phần poliovirus bị thất thoát có thể do một tỷ lệ poliovirus không được lắng khi ly tâm ở giai đoạn 1 và không được hòa tan trở lại trước khi thực hiện ly tâm giai đoạn 2.

Bảng 2. Siêu ly tâm hỗn dịch poliovirus.

Kháng nguyên Poliovirus	Tổng hiệu giá trước siêu ly tâm (CCID ₅₀)	Tổng hiệu giá sau siêu ly tâm (CCID ₅₀)	Hiệu suất (%)
Tít I	8,52 x 10 ¹³	5,32 x 10 ¹³	62,45
Tít II	2,98 x 10 ¹³	1,77 x 10 ¹³	59,60
Tít III	5,87 x 10 ¹³	3,42 x 10 ¹³	58,24

3.2.3. Kết quả sắc ký

Hỗn dịch virus thu được sau siêu ly tâm được tiếp tục tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion. Theo nghiên cứu của Thomassen và cộng sự 2013 [13] điểm đẳng điện của poliovirus khoảng 7,2-7,4 do đó điều kiện sắc ký được lựa chọn là gel DEAE, hệ đệm phosphate pH 7,0. Với hệ đệm này thì poliovirus sẽ tích điện dương do đó khi nạp lên cột gel DEAE thì poliovirus sẽ không bám vào hạt gel mà được rửa giải ngay ra khỏi cột. Kết quả thu được cho thấy xuất hiện đỉnh tín hiệu lớn từ phút 6 đến 10 ngay sau khi nạp mẫu lên cột (Hình 3). Kết quả kiểm tra hiệu giá cho thấy phân đoạn này có chứa poliovirus. Hiệu suất thu hồi sau tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion đạt 90-92% (Bảng 3) và cao hơn so với nghiên cứu của Levintow và Darnell (1960) (40%) [12].



Hình 3. Tinh chế poliovirus bằng sắc ký trao đổi ion. Gel sắc ký là DEAE, đệm phosphate pH 7,0 và tốc độ dòng 10 ml/phút

Bảng 3. Sắc ký trao đổi ion hỗn dịch poliovirus.

Kháng nguyên	Tổng hiệu giá trước sắc ký (CCID ₅₀)	Tổng hiệu giá sau sắc ký (CCID ₅₀)	Hiệu suất (%)
Poliovirus			
Týp I	5,32 x 10 ¹³	4,89 x 10 ¹³	91,85
Týp II	1,77 x 10 ¹³	1,63 x 10 ¹³	91,79
Týp III	3,42 x 10 ¹³	3,07 x 10 ¹³	89,69

Bảng 4. Đánh giá hiệu suất tinh chế poliovirus.

Kháng nguyên D	Hiệu suất (%)			
	Siêu lọc	Siêu ly tâm	Sắc ký	Cuối cùng
Týp I	93,26	62,45	91,85	53,49
Týp II	93,10	59,60	91,79	50,93
Týp III	94,24	58,24	89,69	49,23

Quy trình tinh chế poliovirus được thiết lập gồm 3 công đoạn: (1) siêu lọc, (2) siêu ly tâm, (3) sắc ký trao đổi ion. Hiệu suất cuối cùng của quá trình tinh chế đạt được là khoảng 50 % (Bảng 4). Kết quả thu được cũng cho thấy hiệu suất thu hồi thấp nhất ở giai đoạn siêu ly tâm (khoảng 60%).

3.3. Bất hoạt poliovirus và tạo vắc xin bán thành phẩm IPV

Để phát triển vắc xin bất hoạt, poliovirus sau khi tinh chế cần được bất hoạt hoàn toàn. Hỗn dịch poliovirus sau tinh chế sẽ được lọc qua màng 0,22µm để đảm bảo tính vô trùng và xác định hiệu giá trước khi bất hoạt. Poliovirus được bất hoạt bằng formaldehyde ở nồng độ 0,01 % trong 12 ngày ở 37°C và lọc qua màng 0,22 µm để loại bỏ phần huyền phù và kết tủa được hình thành trong quá trình bất hoạt. Kết quả xác định hiệu giá trước và sau khi bất hoạt được thể hiện trong bảng 5. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi poliovirus sau bất hoạt đạt khoảng 53 - 55%. Mức độ poliovirus sống tồn dư cũng được kiểm tra và kết quả cho thấy không còn virus sống sau khi được xử lý bởi formaldehyde. Hỗn dịch poliovirus thu được sau bất hoạt, trung hòa và lọc vô trùng được sử dụng làm vắc xin IPV bán thành phẩm.

Bảng 5. Bất hoạt poliovirus.

Kháng nguyên D	Hiệu giá trước bất hoạt (DU)	Hiệu giá sau bất hoạt (DU)	Hiệu suất (%)
Týp I	1,77 x 10 ⁵	9,42 x 10 ⁴	53,35
Týp II	9,76 x 10 ⁴	5,36 x 10 ⁴	54,95
Týp III	2,91 x 10 ⁵	1,54 x 10 ⁵	52,77

3.4. Đánh giá vắc xin IPV bán thành phẩm

3.4.1. Kiểm tra vô trùng

Độ vô trùng của vắc xin bán thành phẩm được kiểm tra trên môi trường SCD để phát hiện nấm và thioglycolat để phát hiện vi khuẩn. Kết quả thử nghiệm cho thấy mẫu bán thành phẩm là hoàn toàn vô trùng với hai tác nhân nấm và vi khuẩn.

Bảng 6. Thử vô trùng

Mẫu thử	Loại môi trường	Nhiệt độ nuôi cấy	Thời gian	Kết quả
BTP	Thioglycolat	37°C	14 ngày	Âm tính
	SCD	20-25°C		Âm tính
KC	Thioglycolat	37°C	14 ngày	Âm tính
	SCD	20-25°C		Âm tính

Ghi chú: BTP: Vắc xin bán thành phẩm; KC, mẫu kiểm chứng - mẫu IPV chuẩn; SCD, môi trường Soybean Casein Digest.

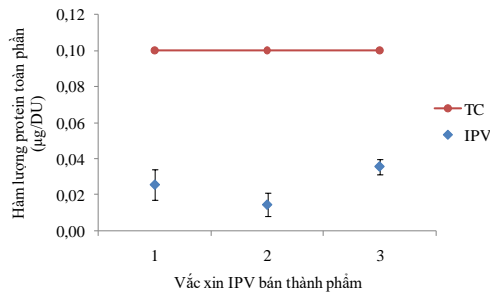
3.4.2. Thử nghiệm nhận dạng

Thử nghiệm nhận dạng là một thử nghiệm được dùng để kiểm tra xem mẫu thử có chứa loại virus mong muốn hay không. Trong nghiên cứu này poliovirus được thử nghiệm nhận dạng bằng phương pháp trung hòa vi lượng và phương pháp ELISA sử dụng kháng thể đặc hiệu týp. Kết quả thử nghiệm cho

thấy các mẫu bán thành phẩm chứa poliovirus đúng với tít đã được sử dụng để nghiên cứu.

3.4.3. Kiểm tra hàm lượng protein toàn phần

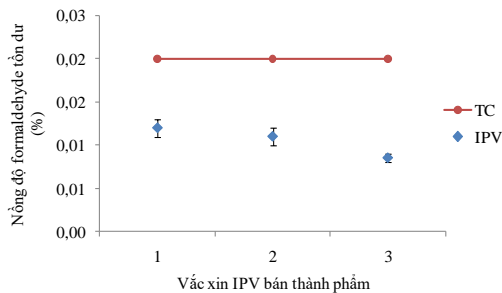
Kiểm tra protein toàn phần là phép thử nghiệm để đánh giá mức độ tồn dư của protein từ tế bào chủ sử dụng cho nuôi cấy virus. Theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV thì hàm lượng protein toàn phần trong vắc xin < 0,1 µg/DU [14]. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng protein toàn phần trong ba mẫu vắc xin IPV bán thành phẩm cao nhất là 0,036 µg/DU và thấp hơn nhiều so với tiêu chuẩn (Hình 4). Do đó có thể kết luận rằng quy trình tinh chế poliovirus là đạt yêu cầu về hàm lượng protein toàn phần trong mẫu vắc xin.



Hình 4. Hàm lượng protein toàn phần trong vắc xin IPV bán thành phẩm. TC, theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV; IPV, mẫu vắc xin IPV bán thành phẩm tít I, II, III tương ứng.

3.4.4. Kiểm tra nồng độ formaldehyde tồn dư

Tương tự, theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV thì nồng độ formaldehyde tồn dư trong vắc xin < 0,02% [14]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ formaldehyde trong các mẫu vắc xin IPV bán thành phẩm cao nhất là 0,012 % và thấp hơn so với tiêu chuẩn cho phép. Do đó, các vắc xin IPV bán thành phẩm đều đạt yêu cầu.



Hình 5. Nồng độ formaldehyde tồn dư trong vắc xin IPV bán thành phẩm. TC, theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV; IPV, mẫu vắc xin IPV bán thành phẩm tít I, II, III tương ứng.

4. Kết luận

Vắc xin IPV là dạng vắc xin an toàn được WHO khuyến cáo sử dụng thay thế vắc xin OPV. Việt Nam hiện nay đã dừng sử dụng vắc xin OPV tam liên. Việc

nuôi cấy, thu nhận, tinh chế và bất hoạt thành công cả ba tít poliovirus để tạo vắc xin bán thành phẩm trong nghiên cứu này sẽ có đóng góp lớn cho sự thành công trong việc phát triển vắc xin bại liệt thành phẩm bất hoạt.

Tài liệu tham khảo

- [1] <http://vncdc.gov.vn/vi/tin-tuc-trong-nuoc/942/bao-ve-thanh-qua-thanh-toan-benh-bai-liet-tai-viet-nam>
- [2] Lê Thị Luân, Nguyễn Đăng Hiền, Vaccin bại liệt sống uống công nghệ sản xuất và qui trình kiểm tra chất lượng, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội 2007.
- [3] H. Shimizu, Development and introduction of inactivated poliovirus from Sabin strains in Japan, Vaccine, 34(16) (2016) 1975-1985.
- [4] WHO, Polio vaccines: WHO position paper, Weekly epidemiological record 91(12) (2016) 145-168.
- [5] W.A. Bakker, Y.E. Thomassen, A.G. van't Oever, J. Westdijk, M.G. van Oijen, L.C. Sundermann, P. van't Veld, E. Sleeman, F.W. van Nimwegen, A. Hamidi, G.F. Kersten, N. van den Heuvel, J.T. Hendriks, L.A. van der Pol, Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV, Vaccine 29(41) (2011) 7188-7196.
- [6] P. Verdijk, N.Y. Rots, W.A. Bakker, Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains, Vaccine 10(5)(2011)635-644.
- [7] H. Okayasu, C. Sein, A. Hamidi, W.A. Bakker, R.W. Sutter, Development of inactivated poliovirus vaccine from Sabin strains: A progress report, Biologicals 44(6) (2016) 581-587.
- [8] J. Martin, G. Crossland, D.J. Wood, P.D. Minor, Characterization of formaldehyde-inactivated poliovirus preparations made from live-attenuated strains, J. Gen. Virol. 84 (2003) 1781-1788.
- [9] T. Wilton, G. Dunn, D. Eastwood, P.D. Minor and J. Martin, Effect of Formaldehyde Inactivation on Poliovirus, J. Virol. 88(20) (2014) 11955-11964.
- [10] Y.E. Thomassen, O. Rubingh, R.H. Wijffels, L.A. van der Pol, and W.A.M. Bakker, Improved poliovirus D-antigen yields by application of different Vero cell cultivation methods, Vaccine 32(24) (2014) 2782-2788.
- [11] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical biochemistry 72 (1976) 248-254.
- [12] J. Louten, Essential Human Virology, 1st Edition, Academic Press 2016.
- [13] L. Levintow and J.E. Darnell, A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus: characterization and amino acid analysis of type 1 poliovirus, J. Biol. Chem. 235(1) (1960) 70-73.
- [14] Y.E. Thomassen, G. van Eikenhorst, L.A. van der Pol, and W.A.M. Bakker, Isoelectric Point Determination of Live Polioviruses by Capillary Isoelectric Focusing with Whole Column Imaging Detection, Anal. Chem., 85(12) (2013) 6089-6094.
- [15] Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam IV, Nhà xuất bản Hà Nội 2009.

