

# **DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM V**

## **Tập 2**

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
BỘ Y TẾ



# DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM

Lần xuất bản thứ năm

TẬP 2

*Kinh biểu*

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC  
HÀ NỘI - 2017

Hội đồng Dược điển Việt Nam, Trung tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam, Bộ Y tế giữ bản quyền Dược điển Việt Nam  
lần xuất bản thứ năm

*Trung tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam*

48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội

Điện thoại : (84-24) 38256905

Fax: : (84-24) 39343547

E-mail: [hddvn@hn.vnn.vn](mailto:hddvn@hn.vnn.vn)

# **PHARMACOPOEIA VIETNAMICA**

**EDITIO V**

**Tomus 2**

## NỘI DUNG

Trang

### TẬP 1

Lời nói đầu	xi
Lịch sử Dược điển nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam	xiii
Hội đồng Dược điển Việt Nam V	xvii
Các cộng tác viên	xix
Các cơ quan và đơn vị tham gia xây dựng Dược điển Việt Nam V	xxi
Danh mục các chuyên luận	xxiii
Danh mục chuyên luận mới so với ĐĐVN IV	xxxvii
Danh mục các chuyên luận của ĐĐVN IV không đưa vào ĐĐVN V	xliii
Qui định chung	xliv
Ký hiệu các chữ viết tắt	xlix
Các chuyên luận	
Nguyên liệu hóa dược và thành phẩm hóa dược	1
Mục lục tra cứu theo tên Việt Nam	ML-1
Mục lục tra cứu theo tên Latin	ML-21

### TẬP 2

Qui định chung	xliv
Ký hiệu các chữ viết tắt	xlix
Các chuyên luận	
Huyết thanh, sinh phẩm và vắc xin	987
Dược liệu	1061
Cao dược liệu, dầu, tinh dầu	1385
Thuốc cổ truyền	1405
Phổ hấp thụ hồng ngoại	P-1
Các phụ lục	PL-1
Mục lục tra cứu theo tên Việt Nam	ML-1
Mục lục tra cứu theo tên Latin	ML-21

## QUI ĐỊNH CHUNG

1. Tên chính của các chuyên luận là tên Việt Nam, sau tên Việt Nam là tên Latin và những tên Việt Nam thông dụng khác nếu có.

Đối với dược liệu: Có thể dùng tên qui ước của dược liệu hoặc dùng tên cây, con kèm theo bộ phận dùng làm thuốc để làm tên chuyên luận, những từ chỉ bộ phận dùng làm thuốc để trong dấu ngoặc đơn, ví dụ: (Lá), (Quả), (Thân rễ)... Tên qui ước của dược liệu là tên của vị thuốc đã được dùng trong y học cổ truyền, ví dụ: Phù bình, Bạch giới tử...

Mỗi chuyên luận của Dược điển Việt Nam V (chuyên luận riêng hay phụ lục) là một tiêu chuẩn về chất lượng thuốc hoặc phương pháp kiểm nghiệm thuốc của Việt Nam.

2. Nguyên tử lượng các nguyên tố trong Dược điển Việt Nam V là các giá trị đã được thừa nhận ghi trong Phụ lục 18. Bảng nguyên tử lượng các nguyên tố.

3. Các đơn vị đo lường dùng trong Dược điển Việt Nam V đều tuân theo Luật Đo lường ban hành ngày 11/11/2011 và Nghị định của Chính phủ số 86/2012/NĐ-CP ngày 19/10/2012 quy định chi tiết và hướng dẫn thi hành một số điều của Luật Đo lường.

4. Các đơn vị đo lường được viết tắt như sau:

Mét: m	Giờ: h
Decimét : dm	Phút: min
Centimét: cm	Giây: s
Milimét: mm	KilôPascan: kPa
Micrômét: $\mu\text{m}$	Pascan: Pa
Nanômét: nm	Pascan giây: Pa·s
Lít: l hoặc L	Ampe: A
Mililít: ml hoặc mL	Miliampe: mA
Micrôlít: $\mu\text{l}$ hoặc $\mu\text{L}$	Vôn: V
Kilôgam: kg	Milivôn: mV
Gam: g	Mol: mol
Miligam: mg	Mol trên lít: mol/l, Mol/L, M
Centigam: cg	Becoren: Bq
Micrôgam: $\mu\text{g}$	Đơn vị quốc tế: IU hoặc đvqt
Nanôgam: ng	Độ Celsius: °C
	Phần trăm: %

5. Nếu không có chỉ dẫn khác, mọi nhiệt độ được ghi trong Dược điển Việt Nam V đều được biểu thị bằng độ bách phân Celsius, ký hiệu là "°C".

6. Nhiệt độ tiêu chuẩn được qui định là 20 °C, nhiệt độ bình thường của phòng thí nghiệm (nhiệt độ phòng) được qui định là 20 °C đến 30 °C. Nếu không có chỉ dẫn gì khác, tất cả thử nghiệm đối với thuốc phải thực hiện ở nhiệt độ phòng (20 °C đến 30 °C) và những nhận xét kết quả phải thực hiện ngay sau khi thao tác. Tuy nhiên khi đánh giá kết quả một thử nghiệm bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ thì phải thực hiện ở điều kiện nhiệt độ tiêu chuẩn (20 °C).

Trong thử nghiệm "Mất khối lượng do làm khô", nếu chỉ qui định tiến hành ở một nhiệt độ nào đó, thì giới hạn cho phép về nhiệt độ được hiểu là: Nhiệt độ qui định  $\pm$  2 °C (ví dụ: 100 °C nghĩa là 100 °C  $\pm$  2 °C).

7. Nhiệt độ nước: Nước cách thủy là nước có nhiệt độ 98 °C đến 100 °C, trừ khi có chỉ dẫn khác: cụm từ "trong cách thủy" có nghĩa là dụng cụ ngâm trong nước đun sôi, "trên cách thủy" có nghĩa là dụng cụ chỉ tiếp xúc với hơi nước đun sôi.

Nước nóng: 70 °C đến 80 °C.

Nước ấm: 40 °C đến 50 °C.

Nước lạnh: 2 °C đến 10 °C.

Nước đá: 0 °C

8. Nhiệt độ nơi bảo quản:

Lạnh sâu: Dưới -10 °C.

Lạnh: 2 °C đến 10 °C.

Mát: 10 °C đến 20 °C.

Nhiệt độ phòng: 20 °C đến 30 °C (là nhiệt độ phổ biến ở nơi làm việc).

Nhiệt độ phòng có điều nhiệt: 20 °C đến 25 °C (là nhiệt độ được duy trì bằng máy điều hòa nhiệt độ).

Nóng: 35 °C đến 40 °C.

Rất nóng: Trên 40 °C.

9. Áp suất được biểu thị bằng số đơn vị kilôPascan (kPa).

1 kPa = 7,5006 Torr.

1 Torr là áp suất dưới cột thủy ngân 1 mm.

Nếu ghi "chân không" mà không có chỉ dẫn gì khác thì có nghĩa là áp suất không quá 2,0 kPa (15 mm thủy ngân).

10. Khái niệm "cân chính xác" là cân tới 0,1 mg, 0,01 mg hoặc 0,001 mg tùy theo độ nhạy của loại cân phân tích dùng để cân sao cho sai số của phép cân không quá 0,1 %.

Khối lượng cân được có độ chính xác phù hợp với độ lặp lại xác định. Độ lặp lại đó tương ứng với +5 hoặc -5 đơn vị sau chữ số có nghĩa cuối cùng đã cho; ví dụ: Lượng cân 0,25 g nghĩa là lượng cân đó nằm trong khoảng 0,245 g đến 0,255 g.

Khái niệm "cân" nghĩa là phép cân được thực hiện với sai số dưới 1 %.

Khái niệm "cân khoảng" là cân để lấy một lượng không quá ± 10 % lượng chỉ định trong chuyên luận.

Khái niệm "sấy đến khối lượng không đổi" và "nung đến khối lượng không đổi" nghĩa là hai lần cân liên tiếp không khác nhau quá 0,5 mg. Lần cân thứ hai tiến hành sau một thời gian sấy hoặc nung thêm (thường 1 h là thích hợp) tùy theo tính chất và lượng cân.

Khái niệm "đã cân trước" (đối với chén nung, bình, vại...) nghĩa là dụng cụ được xử lý đến khối lượng không đổi. Nếu trong chuyên luận có qui định phải cân một cân hay một tủa (sấy khô, nung, đun bốc hơi) trong những dụng cụ thì có nghĩa là những dụng cụ này được sấy hoặc nung đến khối lượng không đổi.

Khái niệm "cân không đáng kể" hay "cân không thể cân được" là cân không nặng quá 0,5 mg.

11. Khi đo thể tích, nếu chữ số sau dấu thập phân là 0 hoặc tận cùng bằng 0 thì thể tích đó phải đong, đo chính xác (ví dụ 10,0 ml hoặc 0,50 ml). Khái niệm "đong, đo chính xác" để lấy một thể tích dung dịch hay chất lỏng là phải đong đo bằng pipet chính xác, bình định mức hay buret chuẩn. Còn "đong, đo" được hiểu là dùng ống đong hoặc những phương tiện khác thích hợp để đo thể tích. Những thể tích cỡ micrôlít được đo bằng micropipet hay microsyringe (bơm chất lỏng siêu vi).

Để đếm giọt, dùng ống đếm giọt chuẩn. 20 giọt nước tinh khiết của ống này ở 20 °C có khối lượng từ 0,90 g đến 1,10 g.

12. "Nước" có nghĩa là nước tinh khiết. Nước tinh khiết được sử dụng trong tất cả các thử nghiệm thuốc nhưng không dùng với những chế phẩm tiêm.

13. Một dung dịch, nếu không ghi rõ dung môi sử dụng thì được hiểu là dung dịch trong nước tinh khiết hay nước cất.

14. Khái niệm "ngay" và "ngay lập tức" dùng trong thử nghiệm thuốc có nghĩa là thao tác này phải thực hiện trong vòng 30 s sau thao tác trước đó.

15. Thử định tính là phép thử cần thiết để nhận biết một dược chất hay những thành phần chính của thuốc dựa trên tính chất vật lý hay hóa học đặc trưng. Nhận biết một dược liệu hay thuốc từ dược liệu dựa trên mô tả, đặc điểm vi phẫu, bột và các phép thử vật lý hóa học đặc trưng.

Phổ hấp thụ hồng ngoại là phương pháp chuẩn xác để định tính, vì mỗi một chất chỉ cho một vùng "điểm chỉ" của phổ, không trùng lặp với phổ của những chất khác. Những đặc tính của phổ hồng ngoại có thể được dùng như là phép thử hàng đầu để định tính. Thường thì phép thử phổ hồng ngoại tự nó đã đủ tin cậy và không cần thêm phép thử nào khác. Tuy nhiên, khi một sản phẩm là một muối thì cần thiết thử thêm "ion đặc hiệu". Những phép thử định tính tiếp theo trong mỗi chuyên luận là để khẳng định lại về định tính của phổ hồng ngoại đã làm trước. Trong trường hợp cần thiết, cần tiến hành xác định thêm điểm chảy của thuốc; khi điểm chảy không có sự lặp lại đúng như nhiệt độ đã qui định thì có thể dùng một giá trị xấp xỉ, giới hạn sai số được qui định trong chuyên luận riêng.

16. Thử tinh khiết là tập hợp các phép thử nhằm phát hiện những tạp chất nhiễm vào thuốc. Để kiểm tra độ tinh khiết, phải thử xác định sự có mặt các tạp chất, số lượng và giới hạn của chúng cũng như những yêu cầu khác tùy theo mỗi chuyên luận. Những tạp chất được coi là đối tượng phải thử là những chất thường được đưa vào trong quá trình sản xuất hoặc xuất hiện trong quá trình bảo quản và những tạp chất bất thường như những kim loại nặng, arsen...Dược điển chỉ quy định kiểm tra những tạp chất thường gặp. Điều này có nghĩa là Dược điển không chấp nhận những tạp chất khác có trong thuốc mặc dù không được ghi trong Dược điển. Mỗi khi có sự thay thế chất này bằng chất khác hoặc cho thêm một chất mới trong thực hiện qui trình thì phải có thêm những phép thử tương ứng. Nồng độ của tạp chất được biểu thị bằng phần triệu của khối lượng, hoặc khi giới hạn vượt quá 500 phần triệu thì được biểu thị bằng phần trăm (%). Những giá trị này chỉ là khoảng giá trị phù hợp với những yêu cầu đã được xác định dựa trên sự thích hợp với những thử nghiệm đã cho.

17. Trong chuyên luận kháng sinh, tại mục định lượng có ghi đồng thời hai phương pháp là phương pháp vi sinh vật và phương pháp hóa học hay hóa lý; mỗi phương pháp đều có thể được sử dụng. Phương pháp định lượng vi sinh vật được coi như phương pháp được khuyến cáo áp dụng, nếu dùng phương pháp khác để định lượng thì phương pháp đó không được kém tin cậy hơn phương pháp vi sinh vật. Nếu kết quả của hai phương pháp quá chênh lệch thì lấy kết quả theo phương pháp vi sinh vật để kết luận (trừ khi có chỉ dẫn khác).

18. Phương pháp thử qui định trong Dược điển Việt Nam có thể được thay thế bằng những phương pháp khác có độ đúng và độ chính xác cao hơn. Tuy nhiên, khi có sự chênh lệch, nghi ngờ, thì chỉ kết quả thu được từ phương pháp ghi trong Dược điển là có giá trị để đưa ra kết luận cuối cùng.

19. Nếu trong chuyên luận có ghi việc xác định phải tiến hành so sánh với một chất chuẩn hay chất đối chiếu (ĐC) thì phải dùng các chất này theo qui định tại Phụ lục 2.5.

20. Khi thử nghiệm hay định lượng (trừ chỉ dẫn khác) nếu qui định mẫu thử phải so sánh với mẫu kiểm tra trắng thì phải chuẩn bị mẫu này như mẫu thử nhưng không cho chất cần thử hay cần định lượng và phải tiến hành song song cùng điều kiện như mẫu thử. Cũng tương tự như vậy khi thử nghiệm được yêu cầu tiến hành song song với mẫu đối chiếu (chứng).

21. Các kết quả định lượng được tính đến một số lẻ thập phân cần thiết nhiều hơn yêu cầu một chữ số rồi làm tròn lên hay xuống như sau:

Nếu con số cuối cùng đã tính được là 5 đến 9 thì con số đứng trước nó được tăng thêm 1.

Nếu con số cuối cùng đã tính được là dưới 5 thì con số đứng trước nó không thay đổi.

Các phép tính khác, thí dụ chuẩn hóa các dung dịch chuẩn độ cũng tiến hành tương tự.

Thí dụ: 8,2758 làm tròn số là 8,276.

1,2634 làm tròn số là 1,263.

22. Hàm lượng tiêu chuẩn: Hàm lượng tiêu chuẩn của một chất qui định trong một chuyên luận được thể hiện tính theo công thức hóa học có thể có giới hạn trên 100 % của chất đó, giới hạn trên này áp dụng với kết quả định lượng tính theo hàm lượng tương đương của công thức hóa học mà chất đó qui định. Ví dụ: Ghi chứa không ít hơn 98,5 % và không lớn hơn 102,0 % của  $C_{12}H_{22}CaO_{14}.H_2O$  nghĩa là kết quả định lượng không được ít hơn 98,5 % và không nhiều hơn 102,0 % tính theo hàm lượng tương đương của  $C_{12}H_{22}CaO_{14}.H_2O$ .

Nếu trong chuyên luận riêng không ghi giới hạn trên thì có nghĩa là giới hạn trên không quá 101,0 %.

23. Trong các chuyên luận, ở mục mô tả hoặc tính chất, thuật ngữ "trắng" có nghĩa là trắng hoặc gần như trắng; "không màu" có nghĩa là không có màu hoặc gần như không màu; "không mùi" có nghĩa là không có mùi hoặc thực tế không có mùi. Trừ khi có các chỉ dẫn khác, cách thử màu sắc hoặc mùi được tiến hành như sau:

a) Màu:

Chất rắn: Lấy 1 g chất thử cho lên trên một tờ giấy trắng hoặc mặt kính đồng hồ không màu đặt lên trên tờ giấy trắng rồi quan sát.

Chất lỏng: Cho chất thử vào trong một ống nghiệm không màu, đường kính bên trong 15 mm, đặt trước một nền trắng cách ống 30 mm, nhìn ngang ống dưới ánh sáng ban ngày.

b) Mùi:

Chất rắn: Trên một mặt kính đồng hồ, đường kính từ 6 cm đến 8 cm, lấy từ 0,5 g đến 2,0 g chất thử trải thành lớp mỏng, sau 15 min, xác định mùi bằng cảm quan.

Chất lỏng: Lấy 2 ml chất thử cho vào mặt kính đồng hồ như trên rồi xác định mùi bằng cảm quan.

24. Trong cách biểu thị nồng độ dung dịch, nếu không có chỉ dẫn gì khác, nồng độ được biểu thị là phần trăm (%) khối lượng trên thể tích (kl/tt), tính theo số gam chất hòa tan trong 100 ml dung dịch, ký hiệu là % (kl/tt) hoặc %.

Các trường hợp khác biểu thị bằng các ký hiệu và được hiểu như sau:

% (kl/kl): Số gam chất hòa tan trong 100 g dung dịch.

% (tt/tt): Số mililit chất hòa tan trong 100 ml dung dịch.

% (tt/kl): Số mililit chất hòa tan trong 100 g dung dịch.

25. Ethanol không có chỉ dẫn gì khác thì có nghĩa là ethanol tuyệt đối.

Khái niệm "alcol" không có chỉ dẫn gì có nghĩa là alcol chứa khoảng 96 % (tt/tt) ethanol ( $C_2H_6O$ ). Dung dịch ethanol trong nước ở những nồng độ khác được chỉ bằng từ ethanol kèm theo tỷ lệ phần trăm (tt/tt) hoặc (kl/kl) ethanol ( $C_2H_6O$ ) trong dung dịch đó. Nếu chỉ ghi ethanol kèm theo tỷ lệ phần trăm thì được hiểu là phần trăm theo thể tích (tt/tt), ví dụ: Ethanol 70 %.

26. Ether có nghĩa là ether ethylic.

Các ether dầu hòa: Khi viết kèm giới hạn về nhiệt độ thì giới hạn này được hiểu là khoảng sôi. Ví dụ: Ether dầu hòa (30 °C đến 40 °C) nghĩa là ether dầu hòa có khoảng sôi từ 30 °C đến 40 °C.



27. Hỗn hợp của các chất lỏng được ghi theo ký hiệu 10 : 1, hoặc 50 : 9 : 1, v.v... có nghĩa là hỗn hợp các chất đó thứ tự theo thể tích. Thí dụ: *cloroform - methanol - amoniac* (50 : 9 : 1) có nghĩa là lấy lần lượt 50 ml cloroform trộn đều với 9 ml methanol và 1 ml amoniac thành một hỗn hợp. Trong chuyên luận, tên các chất lỏng trong hỗn hợp được in nghiêng và không có chữ (TT) đi kèm sau.

28. Trong chuyên luận, tên các hóa chất, thuốc thử, dung dịch thử, chất chỉ thị, dung dịch chuẩn độ, dung dịch mẫu, dung dịch đệm được trình bày bằng chữ nghiêng và có chữ (TT) nếu có trong Phụ lục 2.1. Các thuốc thử chung; Phụ lục 2.3. Các dung dịch đệm và Phụ lục 2.4. Các dung dịch mẫu hoặc có chữ (CD) nếu có trong Phụ lục 2.2. Các dung dịch chuẩn độ.

29. Các định nghĩa về độ tan như sau:

"Tan" có nghĩa là chất thử (đã được tán nhỏ thành bột nếu là chất rắn) hòa tan được trong dung môi tạo thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử của chất thử. Xác định độ tan bằng cách cho lượng dung môi vào chất thử để ở nhiệt độ (25 ± 2) °C trong 30 min, cứ cách 5 min lại lắc 30 s.

Độ tan được biểu thị như sau:

Độ tan	Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử
Rất tan	Dưới 1
Dễ tan	Từ 1 đến 10
Tan	Trên 10 đến 30
Hơi tan	Trên 30 đến 100
Khó tan	Trên 100 đến 1 000
Rất khó tan	Trên 1 000 đến 10 000
Thực tế không tan	Trên 10 000

30. Độ acid hay độ kiềm của dung dịch, nếu không có chỉ dẫn gì khác, được xác định bằng giấy quỳ xanh hay đỏ. Muốn xác định những tính chất này chính xác hơn thì phải đo pH bằng pH kế.

31. Bình hút ẩm: Cụm từ "trong bình hút ẩm" có nghĩa là dùng một bình kín có kích thước thích hợp, bên trong chứa silica gel hoặc một chất làm khô khác để giữ cho không khí trong bình có độ ẩm thấp.

Bình hút ẩm chân không: Là bình hút ẩm chứa một chất làm khô thích hợp và có áp suất không quá 2,0 kPa (15 mm thủy ngân), nếu không có chỉ dẫn khác.

32. Danh pháp thực vật, động vật của cây, con làm thuốc gồm tên chi và tên loài, họ thực vật hay động vật.

33. Dược liệu được ghi trong Dược điển là bộ phận dùng làm thuốc có lưu hành trên thị trường, không lẫn tạp chất. Trong Dược điển, việc thu thập xử lý dược liệu tại chỗ chỉ bao hàm riêng bộ phận dùng.

34. Qui cách đặc điểm dược liệu được mô tả dựa trên dược liệu khô nói chung. Chất lượng tiêu chuẩn của dược liệu tươi cũng được qui định nếu đem dùng tươi.

35. Phần mô tả dược liệu chỉ đề cập đến bộ phận dùng làm thuốc, không mô tả toàn bộ con vật hay toàn bộ cây cung cấp dược liệu đó.

36. Việc làm khô dược liệu tại chỗ, hay làm khô trong quá trình thu hái dược liệu được hiểu như sau:

a. Thuật ngữ "làm khô", có nghĩa là có thể sấy, nướng khô, phơi dưới ánh sáng mặt trời hoặc phơi trong bóng râm (phơi âm can).

b. Thuật ngữ "làm khô ở nhiệt độ thấp" có nghĩa là phơi, sấy khô ở nhiệt độ không quá 60 °C, được dùng cho dược liệu không chịu được nhiệt độ cao.

c. Thuật ngữ "phơi âm can" có nghĩa là phơi trong bóng râm ngoài không khí, được dùng cho dược liệu không sấy, nướng, không phơi nắng được.

d. Trong một số trường hợp, dược liệu phải phơi khô trong thời gian ngắn, thuật ngữ được dùng là "phơi nhanh dưới nắng to", "phơi đúng thời gian".

e. Thuật ngữ "dược liệu khô kiệt" có nghĩa là dược liệu được điều chỉnh khối lượng bằng cách trừ đi khối lượng nước được xác định theo phương pháp sấy hoặc cất với dung môi ghi trong chuyên luận riêng.

37. Đặc điểm vi phẫu (thường là đặc điểm mặt cắt ngang dược liệu), soi bột dược liệu và những vi đặc điểm khác của một dược liệu là những đặc điểm của vật mẫu quan sát dưới kính hiển vi.

38. Các dược liệu, dược chất, tá dược và chất phụ gia dùng trong một chế phẩm phải tuân theo những qui định của Dược điển. Những điều Dược điển không qui định thì phải tuân theo qui định hiện hành của Bộ Y tế.

Tá dược, chất phụ gia đem dùng không được phương hại tới tính an toàn và tính hiệu quả của thuốc. Cần chú ý tránh làm cản trở phương pháp phân tích đã qui định trong chuyên luận Dược điển.

39. Dược liệu dùng sản xuất thuốc thành phẩm (thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền) phải đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam. Nếu có yêu cầu dùng dược liệu đã bào chế thì qui trình bào chế phải được tiến hành theo phương pháp qui định trong chuyên luận Dược điển. Trừ khi có những chỉ dẫn khác.
40. Khối lượng qui định cho mỗi thành phần trong công thức của một chế phẩm thuốc từ dược liệu được tính theo khối lượng dược liệu sạch, đã tán thành bột hoặc đã được xử lý.
41. Dược liệu sử dụng theo đường uống thường dùng dưới dạng thuốc sắc, trừ khi có những chỉ dẫn khác.
42. Liều lượng qui định dùng trong dược điển là liều dùng thông thường đối với người trưởng thành. Việc sửa đổi, điều chỉnh liều lượng tùy thuộc vào tình trạng bệnh tật của từng người bệnh cụ thể. Liều tối đa của một thuốc là liều cao nhất mà người trưởng thành có thể chịu được và không được dùng quá liều; trừ khi có những chỉ dẫn khác.
43. Nước dùng trong bào chế thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền là nước sạch, nước uống đạt theo tiêu chuẩn vệ sinh y tế.
44. Rượu dùng trong bào chế dược liệu, thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền là rượu được làm từ gạo, ngô, sắn... có hàm lượng ethanol từ 30 % đến 40 % trừ khi có qui định trong chuyên luận riêng.
45. Những yêu cầu cơ bản về bảo quản thuốc được ghi ở mục "Bảo quản". Đồ đựng là phương tiện để bảo quản thuốc, yêu cầu của đồ đựng cũng bao gồm cả những phần hợp thành như là nút hay nắp. Các đồ đựng phải kín, không được làm ảnh hưởng đến chất lượng thuốc đựng bên trong, không cho môi trường bên ngoài tác động ảnh hưởng đến chất lượng và phải đạt theo qui định của Dược điển Việt Nam.
- Về nhiệt độ nơi bảo quản phải thực hiện đúng yêu cầu qui định.
- "Tránh ánh sáng" có nghĩa là chất đựng được để trong chai lọ thủy tinh màu hổ phách, hoặc chai lọ thủy tinh màu, chai lọ thủy tinh bọc bằng giấy đen hoặc bất kỳ đồ đựng nào không bị ảnh hưởng bởi ánh sáng.
- "Đậy kín" có nghĩa là đồ đựng có thể tránh cho các chất đựng bên trong không bị bụi bẩn và các chất lạ bên ngoài nhiễm vào.
- "Hàn kín" có nghĩa là đồ đựng phải kín hơi và có thể bảo vệ chất đựng trong đó chống được hơi ẩm và các vi khuẩn.
46. Nhân thuốc phải theo đúng quy định hiện hành.

### KÝ HIỆU CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ĐDVN V:	Dược điển Việt Nam lần xuất bản thứ năm.
P.t.l:	Phần tử lượng
TT:	Thuốc thử.
TT <sub>1</sub> , TT <sub>2</sub> , TT <sub>3</sub> :	Thuốc thử 1, thuốc thử 2, thuốc thử 3...
ĐC:	Chất đối chiếu.
CD:	Chuẩn độ (Dung dịch).
BCG:	Bacillus Calmette - Guérin.
Lf/ mg PN:	Đơn vị lên bông trong 1 mg nitơ protein.
Lf/ mg N:	Đơn vị lên bông trong 1 mg nitơ toàn phần.
Kf:	Thời gian xuất hiện hiện tượng lên bông (tính theo phút) khi được theo dõi trong phản ứng lên bông.
Lf:	Lượng độc tố hoặc giải độc tố khi trộn với 1 IU kháng độc tố sẽ xuất hiện lên bông trong thời gian ngắn nhất.
L+:	Lượng độc tố tối thiểu khi kết hợp với 1 IU kháng độc tố có thể giết chết một con vật có cân nặng xác định trong bốn ngày (Liều L+ phụ thuộc vào từng loại động vật thí nghiệm).
L+/ 10:	Lượng độc tố tối thiểu khi kết hợp với 0,1 IU kháng độc tố có thể giết chết một vật thí nghiệm có cân nặng xác định trong bốn ngày.
Lr:	Lượng độc tố tối thiểu khi kết hợp với một lượng kháng độc tố cố định (thường là 0,002 IU kháng độc tố) trong thể tích 0,2 ml sẽ gây phản ứng da tại chỗ có thể nhìn thấy được (chỉ đối với bạch cầu).
LD <sub>50</sub> :	Lượng độc tố giết 50 % của một nhóm động vật trong vòng 4 ngày (LD <sub>50</sub> khác nhau tùy theo từng loại động vật thí nghiệm)
MLD:	Liều gây chết nhỏ nhất, là lượng độc tố có thể giết chết các súc vật trong vòng 4 ngày (MLD khác nhau tùy theo loại động vật thí nghiệm). Nói chung, MLD đã được thay thế bằng LD <sub>50</sub> .
ED <sub>50</sub> :	Liều vắc xin bảo vệ được 50 % động vật đã được gây miễn dịch chống lại một liều thử thách của vi khuẩn độc hoặc độc tố.
ABV:	Đơn vị kết hợp kháng độc tố (Antitoxin Binding Value), là giá trị xác định lượng độc tố thêm vào giải độc tố thành một hỗn hợp (xác định kiểm tra trên động vật thí nghiệm).
CPE:	Tác động gây bệnh tế bào (Cytopathic effect).

## QUI ĐỊNH CHUNG

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM V

MEM:	Môi trường MEM (Minimum Essential Medium).
FCS:	Huyết thanh bào thai bê (Foetal Calf Sera).
CCID <sub>50</sub> :	Lượng virus gây nhiễm 50% tế bào (Cell culture infective dose).
NMSL:	Nước muối sinh lý.
EU:	Đơn vị nội độc tố (Endotoxin Unit).
Nước BET:	Nước đề thử nội độc tố.
Me:	- CH <sub>3</sub> (methyl)
Et:	- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ethyl)
Pr <sup>i</sup> :	- CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( <i>iso</i> -propyl)
Pr <sup>n</sup> :	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ( <i>n</i> -propyl)
Bu <sup>i</sup> :	- CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( <i>iso</i> -butyl)
Bu <sup>s</sup> :	- CH (CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ( <i>sec</i> -butyl)
Bu <sup>n</sup> :	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ( <i>n</i> -butyl)
Bu <sup>t</sup> :	- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ( <i>tert</i> -butyl)
Ph:	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (phenyl)
Ac:	- COCH <sub>3</sub> (acetyl)

**Các chuyên luận**  
**HUYẾT THANH, SINH PHẨM**  
**VÀ VẮC XIN**

**HUYẾT THANH MIỄN DỊCH DÙNG CHO NGƯỜI**

***Immunosera ad usum humanum***

Huyết thanh miễn dịch dùng cho người là chế phẩm có chứa globulin miễn dịch có khả năng trung hòa kháng nguyên đặc hiệu.

**Sản xuất**

Huyết thanh miễn dịch thu được từ động vật hoặc từ người đã được gây miễn dịch. Huyết thanh miễn dịch phải được tinh chế để lượng globulin đạt theo quy định và để loại bỏ các protein không cần thiết.

Có thể cho thêm chất bảo quản vào thành phẩm.

Trong huyết thanh miễn dịch dạng đông khô, độ ẩm tồn dư không được quá 3 % (k1/k1).

Huyết thanh miễn dịch dạng lỏng phải không có màu hoặc màu vàng nhạt, không có cặn. Huyết thanh miễn dịch dạng đông khô phải dễ hòa tan thành dung dịch không màu hoặc màu vàng nhạt, có cùng đặc tính như sản phẩm ở dạng lỏng.

**Các thử nghiệm kiểm định**

**pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**Protein ngoại lai**

Chỉ có protein của loài động vật hoặc người dùng để sản xuất huyết thanh miễn dịch (Phụ lục 15.10).

**Protein tổng số**

Không quá 170 g/l (Phụ lục 15.18).

**Albumin**

Chỉ được ở dạng vết khi phát hiện bằng phương pháp điện di miễn dịch.

**Chất bảo quản**

*Thimerosal*: Không quá 0,02 % (Phụ lục 15.29).

*Phenol*: Không quá 0,25 % (Phụ lục 15.28).

**Vô khuẩn**

Có thể thực hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp hoặc kỹ thuật nuôi cấy màng lọc (Phụ lục 15.7).

*Tiêu chuẩn*: Không có vi khuẩn hoặc vi nấm mọc trên môi trường thích hợp sau thời gian 14 ngày ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C đối với kiểm tra vi khuẩn và 20 °C đến 25 °C đối với kiểm tra vi nấm.

**Công hiệu**

Kiểm tra công hiệu được thực hiện theo hướng dẫn đối với mỗi loại huyết thanh miễn dịch và được biểu thị bằng số đơn vị quốc tế (IU) trong 1 ml.

Đơn vị quốc tế: Được xác định theo quy định của Tổ chức Y tế Thế giới.

*Tiêu chuẩn*: Mỗi loại huyết thanh miễn dịch có tiêu chuẩn công hiệu riêng.

**An toàn chung**

Dùng 5 chuột nhắt trắng nặng 17 g đến 22 g mỗi con và 2 chuột lang nặng 250 g đến 350 g mỗi con.

Tiêm phúc mạc chuột lượng huyết thanh miễn dịch bằng một liều dùng cho người, nhưng không quá 1 ml cho mỗi chuột nhắt trắng và không quá 5 ml cho mỗi chuột lang (Phụ lục 15.11).

*Tiêu chuẩn*: Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, chuột không giảm cân và không có biểu hiện bệnh lý.

**Chất gây sốt**

Tiêm với liều từ 0,5 ml đến 10 ml cho 1 kg cân nặng thỏ tùy theo quy định đối với từng loại huyết thanh miễn dịch (Phụ lục 15.12).

*Tiêu chuẩn*: Thân nhiệt ban đầu phải nằm trong khoảng 38 °C đến 39,8 °C; hiệu số nhiệt giữa hai lần đo không quá 0,2 °C; thân nhiệt ban đầu giữa các thỏ chênh lệch không quá 1 °C; thân nhiệt cao nhất của thỏ đo được trong khoảng 3 h sau khi tiêm là giá trị cần xác định, giá trị này không quá 0,6 °C đối với mỗi thỏ và tổng giá trị của 3 thỏ không quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

**Bảo quản, hạn dùng**

Sinh phẩm được giữ ở điều kiện lạnh, nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Không làm đông băng huyết thanh miễn dịch dạng lỏng. Hạn dùng được tính từ khi bắt đầu kiểm tra công hiệu, tùy từng nhà sản xuất và được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Nhãn, hộp**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**GLOBULIN MIỄN DỊCH NGƯỜI**

***Immunoglobulinum humanum normale***

Globulin miễn dịch người là chế phẩm dạng lỏng hoặc đông khô có chứa các globulin miễn dịch, chủ yếu là IgG từ huyết tương người bình thường.

Globulin miễn dịch ở dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu hoặc có màu nâu-vàng nhạt.

Globulin miễn dịch đông khô là bột màu trắng hoặc vàng nhạt, có dạng khối xốp, mịn.

Globulin miễn dịch người không đặc hiệu được chỉ định dùng để điều trị phòng ngừa nhiễm viêm gan A, viêm gan B, sởi, rubella... hoặc trong các trường hợp bị thiếu hụt globulin gamma, các trường hợp đang điều trị ức chế miễn dịch, bị nhiễm trùng nhưng kháng thuốc kháng sinh.

**Sản xuất**

Globulin miễn dịch được điều chế từ huyết tương của tối thiểu 1000 người. Huyết tương nguồn có thể được chiết tách trực tiếp từ máu người hoặc từ huyết tương đông băng có chứa không ít hơn 0,1 đơn vị kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván và không ít hơn 0,25 đơn vị kháng thể kháng sởi.

Phần có chứa globulin miễn dịch lớp G được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột sao cho không làm hỏng các

cấu trúc kháng thể, đảm bảo ngăn ngừa sự lan truyền của các virus viêm gan và các vi sinh vật khác, nồng độ của globulin miễn dịch phải đạt 50 g/l với nhiều loại kháng thể khác nhau và ít nhất 2 trong số đó (một loại kháng vi khuẩn và một loại kháng virus) phải có nồng độ cao hơn tối thiểu gấp 3 lần so với nồng độ ban đầu. Các chất bảo quản kháng vi sinh vật hoặc chất ổn định có thể được sử dụng nhưng không được làm ảnh hưởng đến hiệu giá của các kháng thể.

**Nhận dạng**

*Nhận dạng Globulin miễn dịch có nguồn gốc từ huyết tương người:*

Globulin miễn dịch người được nhận dạng qua thử nghiệm kết tủa bằng cách sử dụng các kháng huyết thanh đặc hiệu đối với protein huyết tương người.

Tiêu chuẩn đánh giá: Mẫu thử nghiệm phải có phản ứng dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu đối với người và phải có phản ứng âm tính với kháng huyết thanh đặc hiệu của loài khác.

*Nhận dạng Globulin miễn dịch lớp G (IgG):*

Sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu kháng huyết thanh người để so sánh giữa huyết thanh người bình thường và mẫu thử nghiệm bằng kỹ thuật điện di miễn dịch.

Tiêu chuẩn đánh giá: Thành phần chính của mẫu thử nghiệm phải tương ứng với thành phần IgG của huyết thanh người bình thường.

**Hiệu giá**

**Hiệu giá của kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván**

Hiệu giá của kháng độc tố bạch hầu: Phụ lục 15.15.

Hiệu giá của kháng độc tố uốn ván: Phụ lục 15.16.

Tiêu chuẩn đánh giá: Hàm lượng kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván không nhỏ hơn 2 IU/ml mẫu thử nghiệm.

**Hiệu giá của kháng thể kháng sởi**

Hiệu giá của kháng thể kháng sởi của globulin miễn dịch người không đặc hiệu được xác định bằng kỹ thuật trung hòa trên tế bào Vero và tính bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

*Vật liệu:*

Mẫu thử nghiệm: Globulin miễn dịch người.

Mẫu chuẩn quốc tế.

Huyết thanh bào thai bê.

Tế bào Vero

Virus sởi giảm độc lực để trung hòa.

Môi trường 199 có chứa 2 % huyết thanh bào thai bê.

Trypsin 0,25 %.

Phiên nhựa nuôi tế bào 96 giếng, đáy bằng.

*Tiến hành:* Tiến hành đồng thời trên 2 phiên cho 1 lần thử nghiệm.

*Phiên 1:*

Pha loãng mẫu chuẩn và mẫu thử nghiệm với môi trường 199 để có dung dịch chứa 5 IU/ml.

Tiếp tục pha loãng bậc 2 liên tiếp từ dung dịch pha loãng trên của mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn để có các dung dịch  $2^{-1}$ ;  $2^{-2}$ ;  $2^{-3}$ ; ... đến  $2^{-12}$ .

Pha virus sởi trung hòa bằng môi trường 199 để có dung dịch chứa 100 CCID<sub>50</sub>/50 μl (Cell Culture Infectious Dose - Liều gây hủy hoại 50 % tế bào).

Nhỏ 50 μl từ mỗi dung dịch đã pha loãng của mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn ở các độ pha từ  $2^{-6}$  đến  $2^{-12}$  vào 7 giếng theo sơ đồ bố trí trên phiên trước.

Nhỏ 50 μl dung dịch virus trung hòa.

Đề ở từ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 60 min đến 90 min.

Chuẩn bị dung dịch tế bào Vero có nồng độ  $2 \times 10^5$ /ml.

Nhỏ 100 μl dung dịch tế bào vào mỗi giếng.

Đề ở từ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong 7 ngày đến 9 ngày.

Theo dõi sự biến đổi tế bào (CPE) của virus sởi dưới kính hiển vi.

*Phiên 2:*

Hay được gọi là phiên “chứng”, nhằm xác định số CCID<sub>50</sub>/50 μl được dùng để trung hòa trong thử nghiệm xác định hiệu giá của kháng thể kháng sởi.

Từ dung dịch virus sởi gốc lưu giữ ở âm sâu ( $\leq -35$  °C), pha để có 100 CCID<sub>50</sub>/50 μl. Dung dịch này được ký hiệu là 10°.

Tiếp tục pha loãng bậc 10 từ dung dịch 10° để có các độ pha loãng:  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$ .

Nhỏ 50 μl từ mỗi độ pha loãng virus vào một dãy giếng của phiên.

Đề ở từ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 60 min đến 90 min.

Nhỏ 100 μl dung dịch tế bào có nồng độ  $2 \times 10^5$ /ml.

Đề ở từ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong 7 ngày đến 9 ngày.

Theo dõi CPE dưới kính hiển vi.

*Tính số CCID<sub>50</sub>/50 μl để trung hòa trong thử nghiệm:*

Tính theo công thức Karber:

$\text{Log CCID}_{50} = -\log C - [(\text{Tổng số \% hủy hoại ở các nồng độ}/100 - 0,5) \times \log d]$

Trong đó:

CCID<sub>50</sub> là liều virus gây hủy hoại 50 % tế bào;

C là nồng độ virus cao nhất dùng trong thử nghiệm;

% hủy hoại là tỷ lệ giữa số giếng có sự hủy hoại tế bào và tổng số giếng của một độ pha;

d là hệ số (bậc) pha loãng.

Tiêu chuẩn đánh giá: Số CCID<sub>50</sub>/50 μl phải nằm trong khoảng dao động từ 31 đến 316.

*Tính liều bảo vệ 50 % tế bào:*

Tính theo công thức Karber hoặc Reed-Muench:

$\text{Log ED}_{50} = -\log C - [(\text{Tổng số \% bảo vệ ở các nồng độ}/100 - 0,5) \times \log d]$

Trong đó:

ED<sub>50</sub> là liều bảo vệ 50 % tế bào;

C là độ pha loãng thấp nhất của mẫu thử hoặc mẫu chuẩn quốc tế dùng trong thử nghiệm bảo vệ được 100% tế bào;

% bảo vệ là tỷ lệ giữa số giếng có tế bào được bảo vệ và tổng số giếng của một độ pha;

d là hệ số (bậc) pha loãng.

*Tính hiệu giá:*

$\text{HG (IU/ml)} = (\text{ED}_{50} \text{ của mẫu chuẩn}/\text{ED}_{50} \text{ của mẫu thử nghiệm}) \times 5 \text{ (IU)}$

Tiêu chuẩn đánh giá: Hiệu giá của kháng thể kháng sởi phải không được nhỏ hơn 5 IU/ml globulin miễn dịch người không đặc hiệu.

#### **Hàm lượng globulin miễn dịch G (IgG)**

Xác định hàm lượng IgG bằng kỹ thuật điện di (Phụ lục 5.6)

Tiêu chuẩn đánh giá: Không nhỏ hơn 90 % hàm lượng protein tổng.

#### **Tính tan**

Globulin miễn dịch người đông khô phải tan hoàn toàn trong vòng 20 min ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C sau khi được hoà nguyên theo hướng dẫn ghi trên nhãn của sản phẩm.

#### **An toàn chung**

Phụ lục 15.11.

#### **Chất gây sốt**

Phụ lục 15.12.

#### **Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### **Nitơ toàn phần**

Phụ lục 15.18.

#### **Thimerosal**

Không lớn hơn 0,012 % (Phụ lục 15.29).

#### **pH**

6,4 đến 7,2 (Phụ lục 15.33).

#### **Đóng gói, bảo quản**

Tùy theo nhà sản xuất, trong các lọ thủy tinh không màu, tránh ánh sáng.

#### **Nhãn, hộp**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

### **HUYẾT THANH KHÁNG BẠCH HẦU**

#### ***Immunoserum diphthericum***

Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu là chế phẩm chứa globulin kháng độc tố, có khả năng trung hòa đặc hiệu ngoại độc tố của *Corynebacterium diphtheriae*.

#### **Nhận dạng**

Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu trung hòa độc tố của *Corynebacterium diphtheriae* làm cho độc tố này trở nên không độc, vô hại đối với động vật cảm thụ.

#### **Các thử nghiệm kiểm định**

Huyết thanh kháng bạch hầu phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

#### **Công hiệu**

Công hiệu của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

*Tiêu chuẩn:* Không nhỏ hơn 500 IU/ml.

Xác định công hiệu của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được thực hiện bằng phương pháp trung hòa trong da thỏ hoặc bằng phương pháp trung hòa trên chuột lang có cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g (Phụ lục 15.15).

#### **Bảo quản**

Huyết thanh kháng bạch hầu cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đông băng.

#### **Nhãn**

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

### **HUYẾT THANH KHÁNG ĐẠI**

#### ***Serum antirabicum***

Huyết thanh kháng đại là chế phẩm có chứa globulin miễn dịch kháng virus đại, có khả năng trung hòa đặc hiệu virus đại.

#### **Nhận dạng**

Huyết thanh kháng đại trung hòa virus đại làm cho virus mất khả năng gây bệnh, trở nên vô hại đối với động vật cảm thụ.

#### **Các thử nghiệm kiểm định**

Huyết thanh kháng đại phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

*Protein ngoại lai:* Không được có trong thành phẩm.

#### **Công hiệu**

Công hiệu của huyết thanh kháng đại được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

*Tiêu chuẩn:* Không nhỏ hơn 150 IU/ml.

Phương pháp xác định số IU/ml của huyết thanh kháng đại được thực hiện bằng phương pháp trung hòa trên chuột nhắt (Phụ lục 15.17). Phản ứng này dựa trên sự trung hòa một liều cố định hiệu giá virus đại thử thách với các độ pha loãng khác nhau của huyết thanh.

#### **Bảo quản**

Huyết thanh kháng đại cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đông băng.

#### **Nhãn**

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung, ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

**HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẦN**

*Immunoserum contra venena*

Huyết thanh kháng nọc rắn là chế phẩm chứa các globulin miễn dịch kháng nọc rắn có khả năng trung hòa đặc hiệu nọc rắn tương ứng.

Huyết thanh kháng nọc rắn ở dạng lỏng là dung dịch không màu, trong suốt hoặc có màu vàng nhạt, hơi nhớt. Huyết thanh kháng nọc rắn có thể ở dạng đông khô kèm theo nước hồi chính.

Huyết thanh kháng nọc rắn được chỉ định dùng để điều trị bệnh nhân bị rắn cắn.

**Sản xuất**

Huyết thanh kháng nọc rắn được tinh chế sản xuất từ huyết tương ngựa khỏe mạnh, tuổi từ 4 năm đến 7 năm, cân nặng từ 200 kg trở lên, ngựa đực phải thiến, ngựa cái không được sinh sản, đã được miễn dịch với kháng nguyên nọc rắn. Huyết thanh kháng nọc rắn được tinh chế, cô đặc bằng phương pháp Pope dùng pepsin, có chất bảo quản là merthiolat 1/10000. Sau đó được lọc vô trùng qua màng lọc 0,2 µm, pha chế đến hàm lượng thích hợp và đóng ống.

**Nhận dạng**

Huyết thanh kháng nọc rắn được nhận dạng thông qua thử nghiệm xác định hiệu giá.

**Hiệu giá**

Thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng nọc rắn được thực hiện trên nguyên lý trung hòa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc rắn tương ứng. Thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng Swiss để xác định số LD<sub>50</sub> có trong 1 ml huyết thanh.

**Phương pháp tiến hành**

*Vật liệu:*

Huyết thanh kháng nọc rắn thử nghiệm.

Nọc rắn tinh chế.

Chuột nhắt trắng Swiss, cân nặng 18 g đến 20 g.

Nước muối sinh lý.

*Tiến hành:*

\*Xác định LD<sub>50</sub> của nọc rắn:

Pha dung dịch nọc rắn gốc: Pha dung dịch nọc rắn gốc có nồng độ 1000 µg/ml bằng cách cân 10 mg nọc rắn và hòa tan trong 10,0 ml nước muối sinh lý (bảo quản trong tủ lạnh từ 2 - 8 °C).

Pha dung dịch nọc rắn thử nghiệm: Từ dung dịch nọc rắn gốc pha loãng bằng nước muối sinh lý để được dung dịch có nồng độ 250 µg/ml hoặc 500 µg/ml (tùy theo độc lực của nọc rắn).

Từ dung dịch nọc rắn thử nghiệm tiến hành pha loãng cách nhau 1,1 hoặc 1,4 lần thành các độ pha liên tiếp, sao cho sau khi tiêm độ pha loãng thấp nhất chuột phải chết 100 % và độ pha loãng cao nhất chuột phải sống 100 % (sau khi pha xong lắc đều và để ở 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng).

Tiêm tĩnh mạch đuôi chuột với liều 0,5 ml/con. Mỗi độ pha tiêm 6 chuột.

Theo dõi kết quả sau 24 h đến 48 h, theo dõi số chuột sống chết trong mỗi độ pha.

Tính kết quả theo công thức Spearman-Kärber:

$$\text{Log LD}_{50} = X_0 + d/2 - d \times (\sum r_i/n)$$

Trong đó:

X<sub>0</sub> là log của nồng độ nọc rắn thấp nhất gây ra chuột chết 100%;

d là log của bậc pha loãng;

r<sub>i</sub> là số chuột chết của mỗi độ pha loãng;

n là số chuột được tiêm của mỗi độ pha loãng.

$$\text{LD}_{50} = \text{AntilogLD}_{50}$$

\* Xác định hiệu giá huyết thanh kháng nọc rắn:

Chuẩn bị dung dịch nọc rắn có chứa 20 LD<sub>50</sub>/ml: Từ dung dịch nọc rắn gốc (1000 µg/ml, giữ ở 2 - 8 °C), pha bằng nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 20 LD<sub>50</sub>/ml.

Chuẩn bị huyết thanh kháng nọc rắn thử nghiệm: Huyết thanh thử nghiệm (không pha loãng hoặc pha loãng 2 lần, 3 lần, 4 lần... trong trường hợp huyết thanh kháng nọc rắn có hiệu giá cao trên 200 LD<sub>50</sub>) được lựa chọn tối thiểu 5 độ pha có nồng độ huyết thanh cách nhau liên tiếp 1,1 hoặc 1,4 lần sao cho sau khi trung hòa với một lượng nọc rắn cố định thì mức nồng độ huyết thanh cao nhất phải bảo vệ được 100 % số chuột được tiêm và mức nồng độ huyết thanh thấp nhất gây chết 100 % số chuột được tiêm.

Trung hòa:

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:

2,5 ml dung dịch nọc rắn chứa 20 LD<sub>50</sub>.

Một thể tích thay đổi đã lựa chọn của huyết thanh thử nghiệm.

Một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 5,0 ml trong mỗi ống. Lắc nhẹ các ống nghiệm, trung hòa ở nhiệt độ 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,5 ml/chuột vào tĩnh mạch đuôi. Dùng 6 chuột cho mỗi độ pha. Theo dõi kết quả sau 24 h đến 48 h.

Tính liều bảo vệ 50 % (ED<sub>50</sub>) theo công thức Spearman-Kärber:

$$\text{Log ED}_{50} = X_0 + d/2 - d \times (\sum r_i/n)$$

Trong đó:

X<sub>0</sub> là log của nồng độ huyết thanh thử nghiệm ít nhất bảo vệ được 100 % chuột;

d là log của bậc pha loãng;

r<sub>i</sub> là số chuột sống của mỗi dung dịch trung hòa;

n là số chuột được tiêm của mỗi dung dịch trung hòa.

$$\text{ED}_{50} = \text{AntilogED}_{50}$$

\* Xác định số LD<sub>50</sub> trung hòa (nhóm chứng): Từ dung dịch nọc rắn chứa 20 LD<sub>50</sub>/ml pha loãng thành các độ pha 1/20; 1/14; 1/10; 1/7 và 1/5 (nếu xác định số LD<sub>50</sub>, sử dụng hệ số pha loãng d=1,4), hoặc 1/12,1; 1/11; 1/10; 1/9,1; 1/8,3 (nếu xác định LD<sub>50</sub> sử dụng hệ số pha loãng d=1,1) bằng nước muối sinh lý. Lắc nhẹ các ống, để ở 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,5 ml vào tĩnh mạch đuôi cho mỗi chuột. Dùng 6 chuột cho mỗi độ pha. Theo dõi kết quả sau 24 - 48 h.



Tính số LD<sub>50</sub> trung hòa (tính T) theo công thức:  

$$\log T = - [X_0 + d/2 - d_x (\sum r_i/n)]$$

Trong đó:

X<sub>0</sub> là log của nồng độ nọc rắn gây chết chuột 100%;

d là log của bậc pha loãng;

r<sub>i</sub> là số chuột chết của mỗi độ pha;

n là số chuột được tiêm của mỗi độ pha.

\* Xác định hiệu giá (hay tính số LD<sub>50</sub> có trong 1 ml huyết thanh thử nghiệm):

$$\text{Hiệu giá} = (T - 1)/ED_{50}$$

Trong đó:

T là số LD<sub>50</sub> dùng để trung hòa trong 1 liều tiêm;

ED<sub>50</sub> là liều bảo vệ 50 %.

#### Tiêu chuẩn đánh giá

Thử nghiệm xác định hiệu giá chỉ có giá trị khi T nằm trong khoảng từ 4 đến 6.

Hiệu giá của huyết thanh thử nghiệm phải không nhỏ hơn 1000 LD<sub>50</sub>/lọ.

#### An toàn chung

Huyết thanh kháng nọc rắn phải đạt yêu cầu về thử nghiệm an toàn chung (Phụ lục 15.11).

#### Chất gây sốt

Phụ lục 15.12.

#### Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### Nitơ toàn phần

Không lớn hơn 15 % (Phụ lục 15.18).

#### Thimerosal

Không lớn hơn 0,01 % (Phụ lục 15.29).

#### Natri clorid

Từ 0,85 % đến 0,9 % (Phụ lục 15.26).

#### pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

#### Đóng gói, bảo quản

Mỗi lọ đóng từ 2,0 ml đến 5,0 ml hoặc dạng đông khô, tùy theo nhà sản xuất.

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

### HUYẾT THANH KHÁNG UỐN VÁN

#### *Immunoserum tetanicum ad usum humanum*

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván là chế phẩm có chứa globulin kháng độc tố, có khả năng trung hòa đặc hiệu độc tố của *Clostridium tetani*.

#### Nhận dạng

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván trung hòa đặc hiệu ngoại độc tố của *Clostridium tetani*, làm cho độc tố này trở nên không độc, vô hại đối với động vật cảm thụ.

#### Các thử nghiệm kiểm định

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

#### Công hiệu

Công hiệu của huyết thanh kháng độc tố uốn ván được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

**Tiêu chuẩn:** Không nhỏ hơn 1000 IU/ml đối với loại dùng để phòng bệnh; không nhỏ hơn 3000 IU/ml đối với loại dùng để điều trị.

Số IU/ml huyết thanh kháng độc tố uốn ván được xác định bằng phương pháp trung hòa trên chuột nhắt (Phụ lục 15.16).

#### Bảo quản

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đông băng.

#### Nhãn, hộp

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung, được ghi trong chuyên luận chung "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

### HUYẾT THANH MIỄN DỊCH VIÊM GAN B

#### *Immunoglobulinum humanum hepatitis B*

Huyết thanh miễn dịch viêm gan B dùng cho người là chế phẩm vô trùng dạng lỏng hoặc đông khô có chứa các globulin miễn dịch, chủ yếu là globulin miễn dịch lớp G, có khả năng trung hòa đặc hiệu kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg).

#### Sản xuất

Huyết thanh miễn dịch viêm gan B dùng cho người được sản xuất từ huyết tương của người cho đã được gây miễn dịch, có nồng độ kháng thể cao chống lại HBsAg. Huyết thanh miễn dịch cần phải được tách chiết để lượng globulin đạt được hàm lượng theo quy định và loại bỏ được các protein không cần thiết. Có thể cho thêm chất bảo quản vào thành phẩm. Đối với huyết thanh miễn dịch dạng đông khô, độ ẩm tồn dư không được quá 3 % (kl/kl).

#### Tính chất

Huyết thanh miễn dịch viêm gan B ở dạng lỏng phải không có màu hoặc màu vàng nhạt, không có cặn. Có thể đục nhẹ trong quá trình bảo quản.

Huyết thanh miễn dịch viêm gan B ở dạng đông khô là bột màu trắng hoặc vàng nhạt, có dạng rắn hoặc xốp.

#### Các thử nghiệm kiểm định

#### Nhận dạng (Phụ lục 15.10)

Thử nghiệm nhận dạng huyết thanh miễn dịch viêm gan B được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch. Mục đích của thử nghiệm này là

kháng định huyết thanh miễn dịch viêm gan B chỉ chứa kháng thể kháng HBsAg và protein của người.

*Kỹ thuật khuếch tán miễn dịch:*

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý khuếch tán kép tự do của kháng nguyên và kháng thể từ các giếng riêng biệt trên gel agarose 1 % vào môi trường và tạo thành cung tủa do phản ứng đặc hiệu của chúng.

*Kỹ thuật điện di miễn dịch:*

Dưới tác động của điện trường và trong môi trường gel agarose, kháng nguyên tích điện âm từ giếng ở phía cực âm và kháng thể tích điện dương ở phía cực dương sẽ di chuyển ngược chiều nhau, khi gặp nhau sẽ hình thành đường tủa có thể nhìn thấy được.

*Tiêu chuẩn đánh giá:*

Huyết thanh miễn dịch viêm gan B được nhận dạng đúng khi xuất hiện đường tủa giữa mẫu thử nghiệm và huyết thanh chứa kháng thể người tương ứng.

**Hiệu giá**

Hiệu giá miễn dịch của huyết thanh viêm gan B được xác định bằng cách so sánh hiệu giá kháng thể của huyết thanh miễn dịch đã được kiểm tra với mẫu chứng đã được hiệu chuẩn bằng đơn vị quốc tế, sử dụng thử nghiệm miễn dịch phù hợp và được biểu thị bằng số đơn vị quốc tế (IU) trong 1 ml hoặc có thể sử dụng phương pháp khác được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận.

*Tiêu chuẩn chấp thuận:*

Đối với chế phẩm tiêm bắp: Không được thấp hơn 100 IU/ml và phải đạt từ 80 % đến 125 % lượng ghi trên nhãn (P = 0,95).

Đối với chế phẩm tiêm tĩnh mạch: Không được thấp hơn 50 IU/ml và phải đạt từ 80 % đến 125 % lượng ghi trên nhãn (P = 0,95).

**pH** (Phụ lục 15.33)

Từ 6,4 đến 7,2.

**Protein tổng số** (Phụ lục 15.34)

Protein tổng số trong huyết thanh miễn dịch viêm gan B phải đạt 100 - 180 g/l và từ 90 % đến 110 % protein tổng số ghi trên nhãn.

**Vô khuẩn** (Phụ lục 15.7)

Thực hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp hoặc kỹ thuật nuôi cấy màng lọc.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không có vi khuẩn hoặc vi nấm mọc trên môi trường thích hợp sau thời gian 14 ngày ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C đối với vi khuẩn và 20 °C đến 25 °C đối với vi nấm.

**An toàn chung** (Phụ lục 15.11)

Dùng 5 chuột nhắt trắng có cân nặng từ 17 g đến 22 g mỗi con và 2 chuột lang cân nặng từ 250 g đến 350 g mỗi con. Tiêm đường phúc mạc cho chuột với lượng huyết thanh miễn dịch bằng một liều dùng cho người, nhưng không quá 1 ml cho mỗi chuột nhắt trắng và không quá 5 ml cho mỗi chuột lang.

Tiêu chuẩn: Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, toàn bộ chuột thí nghiệm phải khỏe mạnh, tăng cân và không có biểu hiện bệnh lý.

**Chất gây sốt** (Phụ lục 15.12)

Tiêm với liều từ 0,5 ml đến 10 ml cho 1 kg cân nặng thỏ tùy theo quy định đối với từng loại huyết thanh miễn dịch. Thân nhiệt ban đầu của thỏ phải nằm trong khoảng 38 °C đến 39,8 °C; hiệu số giữa hai lần đo không quá 0,2 °C; thân nhiệt ban đầu giữa các thỏ chênh lệch không quá 1 °C; đo thân nhiệt cao nhất của thỏ đo được trong khoảng 3 h sau khi tiêm, giá trị này không quá 0,6 °C đối với mỗi thỏ và tổng giá trị của 3 thỏ không quá 1,3 °C.

Tiêu chuẩn: Không có chất gây sốt.

**Đóng gói**

Phải tuân thủ theo GMP và các quy định hiện hành.

**Bảo quản**

Đối với chế phẩm dạng lỏng, bảo quản trong lọ thủy tinh không màu, kín, tránh ánh sáng. Không làm đông băng.

Đối với chế phẩm dạng đông khô, bảo quản trong lọ thủy tinh không màu, kín, trong điều kiện chân không hoặc khí trơ, tránh ánh sáng.

Nhiệt độ bảo quản: Từ 2 °C đến 8 °C.

**Nhãn**

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn phải đáp ứng yêu cầu quy định hiện hành, đặc biệt phải ghi đầy đủ các thông tin về: Tên sản phẩm, hiệu giá, ngày sản xuất, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản.

**Hạn sử dụng**

Hạn sử dụng được tính từ khi bắt đầu kiểm tra hiệu giá lần cuối có giá trị. Các tuyên bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định và phải được cơ quan kiểm định Quốc gia chấp thuận.

## INTERFERON ALPHA 2

### *Interferoni alfa 2*

Interferon alpha 2 là sinh phẩm ở dạng lỏng hoặc đông khô có chứa interferon alpha-2 người, tái tổ hợp.

Interferon alpha 2 dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu.

Interferon alpha 2 đông khô có dạng khối xốp, trắng mịn, dễ hòa tan trong nước thành dung dịch trong suốt.

Interferon alpha 2 được dùng để kháng virus, ức chế tăng sinh tế bào ung thư và có chức năng điều hòa miễn dịch.

**Sản xuất**

Interferon alpha 2 được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN: Gen mã hoá interferon alpha 2 được tách từ tế bào lympho của người và đưa vào vector biểu hiện; Sau đó vector này được đưa vào vi khuẩn. Vi khuẩn này được nuôi cấy trong môi trường đặc biệt để thu sinh khối và sau đó dùng kỹ thuật sinh hoá tách chiết và tinh sạch interferon alpha 2. Sản phẩm được đóng ống hoặc đông

khô với hàm lượng interferon alpha 2 khác nhau tùy theo mục đích sử dụng.

#### Nhận dạng

Interferon alpha 2 được nhận dạng thông qua sự giảm hoạt tính kháng virus của nó trên tế bào nhiễm sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2.

#### Vật liệu

Interferon alpha 2 thử nghiệm.

Kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2.

Tế bào MDBK (Madin-Darby Bovin Kidney - Tế bào thận bò).

Virus gây nhiễm VSV (Vesicular Stomatitis Virus - Virus gây viêm vòm họng) đã chuẩn độ.

Môi trường MEM (Minimum Essential Medium) có chứa huyết thanh bào thai bê (Fetal Bovin Serum, FBS).

Dung dịch trypsin 0,25 %.

Phiên nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

#### Phương pháp tiến hành

##### Ngày thứ 1:

Pha kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2 với môi trường MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 200 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng 200 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha 2 ghi trên nhãn).

Trung hòa: Trộn đều 1 ml interferon alpha 2 đã pha loãng ở trên với 1 ml kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2. Ủ ở 37 °C trong 60 min.

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng. Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã pha loãng ở trên vào giếng thứ nhất của phiên (A1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (A12), loại bỏ 100 µl ở giếng A12.

Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2 vào hàng giếng thứ hai của phiên (B1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (B12), loại bỏ 100 µl ở giếng B12.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ  $6 \times 10^5$  đến  $8 \times 10^5$  tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 18 h đến 24 h.

##### Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng tế bào chứng, tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiên.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2 % FBS để có chứa 100 đến 200 CCID<sub>50</sub>/ml. Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV này vào tất cả các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 18 h đến 24 h.

##### Ngày thứ 3:

Kiểm tra sự hủy hoại của tế bào nhiễm virus dưới kính hiển vi ở các giếng nhỏ dung dịch interferon alpha 2 sau trung hòa, tỷ lệ hủy hoại tế bào phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50 µl *dung dịch tím tinh thể (TT)* vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiên bằng nước. Để phiên khô ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 50 µl *2-methoxyethanol* vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiên trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

*Tiêu chuẩn đánh giá:* So sánh độ hấp thụ giữa các giếng tương ứng của 2 loại dung dịch thử nghiệm trước và sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2: Độ hấp thụ của các giếng sau trung hòa phải nhỏ hơn.

#### Hiệu giá

Hiệu giá interferon alpha 2 được xác định bằng chuẩn độ hoạt tính kháng virus của mẫu thử nghiệm trên tế bào MDBK.

Hiệu giá của Interferon alpha 2 thử nghiệm được tính theo mẫu chuẩn quốc tế interferon alpha 2 tái tổ hợp.

#### Vật liệu

Interferon alpha 2 chuẩn quốc tế.

Interferon alpha 2 thử nghiệm.

Tế bào MDBK.

Virus gây nhiễm VSV đã chuẩn độ.

Môi trường MEM có chứa huyết thanh bào thai bê.

Phiên nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

#### Phương pháp tiến hành

##### Ngày thứ 1:

Pha loãng mẫu chuẩn quốc tế với MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 100 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng 100 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha 2 ghi trên nhãn).

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng. Nhỏ 100 µl dung dịch đã pha loãng của mẫu chuẩn quốc tế (MCQT) và mẫu thử nghiệm vào mỗi giếng trong cột thứ nhất của phiên. Đối với MCQT nhỏ 2 giếng (B1, C1) và mẫu thử nghiệm nhỏ 5 giếng (D1, E1, F1, G1, H1).

Pha loãng bậc 2 liên tiếp cho đến cột thứ 12 thì loại bỏ 100 µl.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ (6-8) × 10<sup>5</sup> tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 18 h đến 24 h.

##### Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng chứng "tế bào" (giếng A1 đến A6), tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiên.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2% FBS để có chứa 100 đến 200 CCID<sub>50</sub>/ml. Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV vào tất cả các giếng trừ giếng chứng "tế bào".

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong vòng 18 h đến 24 h.

**Ngày thứ 3:**

Kiểm tra sự hủy hoại của virus đối với tế bào dưới kính hiển vi, ở các giếng chứng "virus" (giếng A7 đến A12) tỷ lệ hủy hoại phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50  $\mu$ l dung dịch tím tinh thể (TT) vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiến bằng nước. Để phiến khô ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 50  $\mu$ l 2-methoxyethanol vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiến trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

Tính kết quả:

Tính độ hấp thụ 50 % theo công thức:

$$A_{50} = (A_c + A_v)/2$$

Trong đó:

$A_c$  là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng "tế bào";

$A_v$  là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng "virus".

Xác định hiệu quả bảo vệ 50 % tế bào của interferon alpha 2 mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn quốc tế theo công thức:

$$N = n + (A_n - A_{50}) / (A_n - A_{n+1})$$

Trong đó:

$N$  là số thứ tự của giếng có độ bảo vệ tế bào 50 %;

$n$  là số thứ tự của giếng có độ hấp thụ >50 %;

$A_n$  là độ hấp thụ của giếng thứ "n";

$A_{n+1}$  là độ hấp thụ của giếng thứ "n+1".

Tính hiệu giá theo công thức:

$$\text{Hiệu giá (\%)} = 100 \times 2^{(N_m - N_s)}$$

Trong đó:

$N_m$  là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha 2 thử nghiệm bảo vệ được 50 % tế bào;

$N_s$  là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha 2 chuẩn quốc tế bảo vệ được 50 % tế bào.

**Tiêu chuẩn đánh giá**

Mẫu interferon alpha 2 thử nghiệm chỉ đạt yêu cầu khi hiệu giá tính được phải đạt từ 70 % đến 150 % hàm lượng ghi trên nhãn.

**An toàn chung**

Với liều tiêm là 15 triệu IU/5 ml đối với 1 chuột lang và 1 triệu IU/0,5 ml đối với 1 chuột nhắt (Phụ lục 15.11).

**Chất gây sốt**

Mẫu interferon alpha 2 thử nghiệm được pha loãng với nước muối hồi chính, để có nồng độ 600 000 IU/ml (Phụ lục 15.12).

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Độ ẩm tồn dư (đối với dạng đông khô)**

Không lớn hơn 3 % (Phụ lục 15.35).

**pH**

$7,0 \pm 0,5$  (Phụ lục 15.33).

**Đóng gói, bảo quản**

Đóng gói: Hàm lượng interferon alpha 2 được đóng gói tùy theo nhà sản xuất: 3 triệu IU/lọ, 4,5 triệu IU/lọ,

6 triệu IU/lọ; 90 g/lọ, 180  $\mu$ g/lọ, kèm theo nước hồi chính. Interferon alpha 2 đông khô phải bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

**Nhãn, hộp**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu quy định hiện hành.

**TUBERCULIN PPD*****Tuberculinum derivatum proteinosum purificatum***

Tuberculin PPD là sinh phẩm chứa chất có hoạt tính gây phản ứng da đặc hiệu đối với bệnh lao, được điều chế từ canh thang nuôi cấy và ly giải của một hay nhiều chủng *Mycobacterium tuberculosis*.

Tuberculin PPD đông khô có dạng khối xốp, mịn, không teo, màu trắng ngà, không mùi, tan nhanh trong nước hồi chính tạo thành dung dịch trong suốt, không màu.

Dùng tuberculin PPD đông khô là một trong những phương pháp phát hiện các trường hợp bị nhiễm lao hoặc dùng để đánh giá phản ứng quá mẫn muộn đối với lao sau khi tiêm vắc xin BCG.

**Sản xuất**

Chủng sản xuất được nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Sau 6 tuần, chủng đã phát triển, được thu hoạch và giết chết bằng hơi nóng ở nhiệt độ 100 °C trong 60 min. Hỗn dịch chủng đó được lọc qua màng lọc để loại xác vi khuẩn. Phân đoạn có hoạt tính có trong dung dịch lọc (chủ yếu là protein) được tách chiết bằng kết tủa với amoni sulfat, được rửa và tái hòa tan trong dung dịch đệm phù hợp. Phenol được sử dụng như là chất bảo quản. Sản phẩm được đóng ống vô khuẩn và được đông khô.

**Nhận dạng**

Thử nghiệm nhận dạng được tiến hành bằng cách tiêm tuberculin thử nghiệm trong da chuột lang đã được gây mẫn cảm trước đó với vắc xin BCG.

**Phương pháp tiến hành****Vật liệu:**

Vắc xin BCG đông khô 1 mg/ml.

Chuột lang 4 con, khỏe mạnh, âm tính với tuberculin, cân nặng từ 350 g/con đến 400 g/con. Chia chuột ra làm 2 nhóm: Nhóm thử nghiệm được tiêm mẫn cảm với vắc xin BCG đông khô và nhóm chứng không tiêm.

**Gây mẫn cảm:**

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần.

**Tiêm tuberculin:**

Hoàn nguyên mẫu thử nghiệm để có dung dịch chứa 50 IU/ml. Tiêm trong da 0,1 ml (tương đương 5 IU) cho cả 2 nhóm chuột.

**Đọc kết quả:**

Sau khi tiêm tuberculin 24 h, đo đường kính phản ứng tại các vị trí tiêm.

Phản ứng được coi là dương tính nếu đường kính vết tổn thương da lớn hơn hoặc bằng 6 mm.

**Tiêu chuẩn đánh giá**

Tất cả chuột lang đã được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng dương tính với tuberculin thử nghiệm. Tất cả chuột lang không được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng âm tính với tuberculin thử nghiệm.

**Hiệu giá**

Hiệu giá của tuberculin PPD được xác định bằng cách so sánh phản ứng quá mẫn muộn trong da chuột lang đã gây mẫn cảm với vắc xin BCG sau khi tiêm các độ pha khác nhau của mẫu thử với mẫu chuẩn quốc tế.

**Phương pháp tiến hành****Vật liệu:**

Tuberculin thử nghiệm.

Tuberculin chuẩn quốc tế.

Chuột lang: 6 con, cùng giới, trọng lượng 350 g/con đến 400 g/con.

**Gây mẫn cảm chuột lang:**

Chuẩn bị 6 chuột lang có lông sáng màu, cùng giới, khỏe mạnh, có trọng lượng từ 350 g/con đến 400 g/con.

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/ một vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần để xác định hiệu giá.

**Xác định hiệu giá:**

Tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm được pha loãng với dung dịch đệm PBS ở 3 đến 4 độ pha khác nhau sao cho đường kính phản ứng da sau khi tiêm cho chuột lang đã gây mẫn cảm với liều cao nhất không lớn hơn 25 mm và với liều thấp nhất không nhỏ hơn 6 mm. Tiêm trong da 0,1 ml mỗi độ pha của tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm ở hai bên sườn chuột lang, mỗi bên 3 điểm. Vị trí nơi tiêm được lựa chọn theo phương pháp hình vuông Latin.

Sau khi tiêm 24 h, đo đường kính của phản ứng da tại các vị trí tiêm. Phản ứng được coi là dương tính nếu tại nơi tiêm tuberculin có nốt sần đỏ với đường kính lớn hơn hoặc bằng 6 mm. Phản ứng được coi là âm tính nếu tại nơi tiêm tuberculin có nốt sần đỏ với đường kính nhỏ hơn 6 mm. Hiệu giá của tuberculin thử nghiệm được tính theo chương trình Parallel line của WHO.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Hiệu giá của mẫu thử nghiệm phải nằm trong khoảng 80 % đến 125 % giá trị hiệu giá ghi trên nhãn sản phẩm.

**An toàn chung**

Đạt yêu cầu về an toàn chung (Phụ lục 15.11).

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng phenol**

Không lớn hơn 5,5 g/l (Phụ lục 15.28).

**pH**

6,5 đến 7,5 (Phụ lục 15.33).

**Cách dùng, liều lượng**

Tiêm trong da, liều 5 IU/0,1ml.

**Đóng gói, bảo quản**

Tùy theo nhà sản xuất, thường có ba dạng:

Một ống chứa 15 IU, tương đương 3 liều;

Một ống chứa 50 IU, tương đương 10 liều;

Một ống chứa 100 IU, tương đương 20 liều.

Tuberculin được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

**Nhãn, hộp**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**(CÁC) VẮC XIN DỪNG CHO NGƯỜI*****Vaccina ad usum humanum***

Vắc xin dùng cho người là những chế phẩm chứa các kháng nguyên có khả năng tạo miễn dịch chủ động và đặc hiệu để phòng bệnh do vi sinh vật gây nên. Vắc xin được sản xuất từ vi khuẩn, *Rickettsia* hoặc virus. Vắc xin dùng cho người có thể là (1) vi sinh vật đã được bất hoạt nhưng vẫn giữ được tính sinh miễn dịch; hoặc (2) vi sinh vật sống không độc; hoặc (3) các thành phần kháng nguyên của vi sinh vật.

**Sản xuất**

Các phương pháp sản xuất từng loại vắc xin sẽ được mô tả ở phần tiếp theo dưới đây hoặc trong các chuyên luận riêng. Các phương pháp này cần bảo đảm cho vắc xin có đủ tính kháng nguyên cũng như tính vô hại và không bị tạp nhiễm.

Trong quá trình sản xuất có thể dùng thêm chất phụ thích hợp nhưng không được cho thêm penicilin ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình sản xuất.

Có thể tăng khả năng sinh miễn dịch của một số loại vắc xin bằng cách cho thêm chất phụ thích hợp ghi trong các chuyên luận riêng.

Có thể dùng chất bảo quản thích hợp theo quy định cho một số vắc xin bất hoạt.

Vắc xin thành phẩm được phân bổ vào các ống (hoặc lọ) và gắn kín để tránh nhiễm khuẩn. Một số vắc xin thành phẩm được sản xuất dưới dạng đông khô. Chi hoàn nguyên vắc xin đông khô ngay trước khi sử dụng.

**Vắc xin vi khuẩn**

Vắc xin vi khuẩn được sản xuất từ các chủng vi khuẩn thích hợp, nuôi cấy trên môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp.

Vắc xin vi khuẩn bất hoạt có chứa vi khuẩn hoặc các thành phần kháng nguyên của vi khuẩn đã được bất hoạt nhưng vẫn giữ được khả năng sinh miễn dịch.

Vắc xin vi khuẩn sống được sản xuất từ chủng giảm độc nhưng vẫn có khả năng kích thích sinh miễn dịch đặc hiệu. Nồng độ của vi khuẩn bất hoạt trong vắc xin được đo bằng đơn vị độ đục quốc tế hoặc đếm tế bào trực tiếp.

Đối với vắc xin vi khuẩn sống, có thể xác định số lượng đơn vị sống.

#### **Giải độc tố vi khuẩn**

Các giải độc tố vi khuẩn được chế tạo từ độc tố đã giải độc nhưng vẫn giữ được tính sinh miễn dịch và không còn khả năng hồi độc.

Ở đáy lọ giải độc tố tinh chế, sau khi hấp phụ, có một lớp cặn màu trắng hoặc vàng nhạt; khi lắc, cặn này sẽ phân bố đều trong lọ vắc xin.

#### **Vắc xin virus**

Vắc xin virus là huyền dịch virus thu được sau khi cấy trên động vật, trứng có phôi, hoặc tế bào nuôi thích hợp. Những vắc xin này có thể ở dạng lỏng hoặc đông khô.

Vắc xin virus thường được sản xuất từ chủng virus đặc hiệu giảm độc lực. Vắc xin virus có thể có màu nếu chứa chỉ thị pH như đỏ phenol.

Vắc xin virus bất hoạt thường được xử lý bằng phương pháp hóa học hoặc lý học.

#### **Vắc xin phối hợp**

Các vắc xin phối hợp là hỗn hợp của 2 hoặc nhiều loại vắc xin khác nhau.

#### **Hàm lượng hoá chất có trong vắc xin**

##### **Phenol**

Đối với các vắc xin có chứa phenol, cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.28. Nếu phenol đã được dùng trong quá trình sản xuất thì hàm lượng cuối cùng trong vắc xin thành phẩm không được quá 2,5 g/l, trừ trường hợp đặc biệt.

##### **Formaldehyd**

Đối với các vắc xin có chứa formaldehyd, cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.25. Nếu formaldehyd đã được dùng trong quá trình sản xuất thì hàm lượng cuối cùng trong vắc xin thành phẩm không được quá 0,2 g/l formaldehyd tự do, trừ trường hợp đặc biệt.

##### **Nhôm**

Đối với các vắc xin có chứa thành phần nhôm ( $Al^{+++}$ ), cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.27. Nếu nhôm được dùng để hấp phụ vắc xin thì hàm lượng cuối cùng không được quá 1,25 mg nhôm ( $Al^{+3}$ ) cho mỗi liều đơn tiêm cho người, trừ trường hợp đặc biệt.

##### **Bảo quản**

Vắc xin phải được bảo quản tránh ánh sáng. Trừ khi có quy định riêng trong từng chuyên luận, các vắc xin phải bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C và các vắc xin lỏng không được đông băng.

#### **Hạn dùng**

Hạn dùng được tính từ khi bắt đầu thử nghiệm công hiệu hoặc hiệu giá trong những điều kiện bảo quản quy định đối với từng loại vắc xin.

Hạn dùng của vắc xin được quy định trong từng chuyên luận riêng.

#### **Nhãn, hộp**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

### **VẮC XIN BẠCH HẦU HẤP PHỤ**

#### ***Vaccinum diphtheriae adsorbatum***

Vắc xin bạch hầu hấp phụ được điều chế từ độc tố bạch hầu đã xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để mất tính độc mà vẫn còn tính sinh miễn dịch, chứa ít nhất 1500 Lf/ mg protein nitrogen và hấp phụ với một tá chất thích hợp như muối nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd trong dung dịch natri clorid 0,85 %. Có thể cho thêm chất bảo quản thích hợp.

#### **Sản xuất**

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* dùng cho sản xuất phải tuân thủ quy định về hệ thống chủng được nuôi cấy trong môi trường lỏng thích hợp. Ở cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tinh thuần khiết để loại bỏ những mẻ nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Kiểm tra giải độc tố tinh chế về độc tính đặc hiệu, tính hồi độc, độ sạch kháng nguyên trước khi dùng điều chế vắc xin thành phẩm.

#### **Giải độc tố tinh chế bán thành phẩm**

Chủng sản xuất phải có độc tính cao, biết rõ về nguồn gốc và lịch sử chủng. Môi trường nuôi cấy chứa độc tố bạch hầu cần được tách xác tế bào vi khuẩn càng sớm càng tốt. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông để giám sát tinh ổn định trong sản xuất. Giải độc tố bạch hầu được tinh chế để loại bỏ các thành phần có thể gây các phản ứng phụ cho người. Độc tố sau khi tinh chế sẽ được bất hoạt bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp sao cho không ảnh hưởng đến khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và không bị hồi độc. Tuy nhiên, có thể lựa chọn quy trình tinh chế sau khi giải độc.

Chỉ có những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

#### **Vô khuẩn**

Tiến hành kiểm tra tinh vô khuẩn của giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).



**Tính độc đặc hiệu và tính hồi độc của giải độc tố bạch hầu**

**Kiểm tra tính độc đặc hiệu:** Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế có chứa 500 Lf/ml/con cho 5 chuột lang khỏe mạnh cân nặng 250 g/con đến 350 g/con, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Theo dõi và kiểm tra cân nặng chuột trong 6 tuần. Những chuột chết sẽ phải mổ kiểm tra các dấu hiệu nhiễm độc tố bạch hầu (tuyến thượng thận sưng đỏ). Giải độc tố tinh chế đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu khi không có chuột lang nào có dấu hiệu nhiễm độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi và có ít nhất 80 % chuột sống sót trong giai đoạn thử nghiệm.

**Kiểm tra tính hồi độc của giải độc tố bạch hầu:** Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải được kiểm tra để đảm bảo không bị hồi độc. Sử dụng dung dịch đệm giống như dung dịch pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nhưng không có chất hấp phụ để pha mẫu giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm thành huyền dịch chứa 35 Lf/ml. Chia thành 2 mẫu thử, trong đó một mẫu ủ ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  trong 6 tuần và mẫu kia ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 6 tuần. Tiêm dưới da 5 ml/con, mỗi mẫu tiêm cho 5 chuột lang khỏe mạnh cân nặng 250 g/con đến 350 g/con, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi cả 2 nhóm chuột đều khỏe mạnh, không có chuột lang nào có dấu hiệu nhiễm độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi.

**Độ tinh sạch của kháng nguyên bạch hầu**

Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải được kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bằng cách kiểm tra hàm lượng kháng nguyên bằng đơn vị Lf/mg nitrogen protein. Hàm lượng kháng nguyên được kiểm tra bằng cách so sánh với mẫu chuẩn đã được hiệu chuẩn bởi giải độc tố bạch hầu mẫu chuẩn quốc tế dành cho thử nghiệm lên bông hoặc mẫu chuẩn quốc gia tương đương.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế đạt yêu cầu khi chứa không được ít hơn 1500 Lf/mg nitrogen protein.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được pha chế từ giải độc tố bạch hầu tinh chế, cho thêm nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd với hàm lượng thích hợp. Có thể cho thêm chất bảo quản. Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được phép tiếp tục sản xuất thành vắc xin thành phẩm.

**Chất bảo quản**

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin bán thành phẩm phải đạt ít nhất là 85 % và không được quá 115 % so với lượng dự kiến cho vào (Phụ lục 15.29).

**Vô khuẩn**

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của vắc xin bán thành phẩm cuối cùng với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm****Nhận dạng**

Thực hiện ít nhất trên một lọ vắc xin đã được dán nhãn.

Nhận dạng giải độc tố bạch hầu bằng thử nghiệm lên bông như mô tả trong Phụ lục 15.19.

**Vô khuẩn**

Vắc xin không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu**

Thực hiện theo Phụ lục 15.23.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Công hiệu của vắc xin bạch hầu dùng để tiêm trẻ em được coi là đạt yêu cầu khi không thấp hơn 30 IU đối với một liều đơn. Đối với các thử nghiệm sử dụng 3 độ pha loãng, giới hạn khoảng tin cậy 95 % của công hiệu phải nằm trong khoảng 50 % đến 200 % hoặc giới hạn dưới khoảng tin cậy 95 % của giá trị công hiệu phải lớn hơn 30 IU đối với một liều đơn cho người.

**An toàn chung**

Tiêm vắc xin bạch hầu với 1 liều tiêm cho người vào ổ bụng cho mỗi con trong số 5 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, cân nặng 17 g/con đến 22 g/con và chưa sử dụng với bất cứ mục đích gì trước đó; tiêm ít nhất 1 liều tiêm cho người nhưng không nhiều hơn 1 ml vào ổ bụng cho mỗi chuột trong số 2 chuột lang khỏe mạnh, cân nặng 250 g/con đến 350 g/con và chưa sử dụng với bất cứ mục đích gì trước đó. Vắc xin đạt tính an toàn chung, không có độc tính bất thường nếu toàn bộ chuột thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có biểu hiện nhiễm độc trong 7 ngày theo dõi.

**Chất bảo quản**

Hàm lượng thimerosal không ít hơn 85 % hoặc không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

**Nhôm**

Không quá 1,25 mg nhôm trong một liều đơn vắc xin cho người (Phụ lục 15.27).

**pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**Cảm quan**

Mỗi lọ vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

**Bảo quản, hạn dùng**

Khi bảo quản ở điều kiện quy định, vắc xin có thể giữ được công hiệu 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**VẮC XIN BẠCH HẦU, UỐN VÁN VÀ HO GÀ HẤP PHỤ (DTwP)*****Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis adsorbatum***

Vắc xin bạch hầu, uốn ván và ho gà là một hỗn hợp gồm các giải độc tố bạch hầu, uốn ván tinh chế hấp phụ và vắc xin ho gà toàn tế bào hấp phụ (DTwP).

**Sản xuất giải độc tố bạch hầu**

Vắc xin bạch hầu được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Corynebacterium diphtheriae* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường lỏng thích hợp. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tinh thuần khiết để loại bỏ những loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố bạch hầu (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế được kiểm tra vô khuẩn, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch của kháng nguyên trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với mẫu giải độc tố bạch hầu tinh chế: 10 ml giải độc tố bạch hầu cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

**Kiểm tra tính độc đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố bạch hầu tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi trong số 5 chuột lang khỏe mạnh, cân nặng 250 g/con đến 350 g/con chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày sau tiêm, nếu thấy bất kỳ triệu chứng nào hay bị chết do độc tố bạch hầu thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này cũng không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

**Kiểm tra tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm giống như dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tố bạch hầu tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tố tương đương như trong vắc xin thành phẩm (35 Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần. Mỗi trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tố bạch hầu bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, cân nặng 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi.

**Kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bạch hầu**

Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải đạt không ít hơn 1500 Lf/mg nitrogen protein.

**Sản xuất giải độc tố uốn ván**

Vắc xin uốn ván được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Clostridium tetani* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tinh thuần khiết để loại bỏ những loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố uốn ván (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và nhiệt độ; tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Số lượng Lf trong vắc xin uốn ván bán thành phẩm tùy thuộc vào công thức gốc của từng nhà sản xuất nhưng không được quá 25 Lf trong một liều đơn cho người nếu sử dụng nhiều hơn một liều cho phác đồ tiêm miễn dịch cơ bản.

Giải độc tố uốn ván tinh chế được kiểm tra vô khuẩn, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch của kháng nguyên trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với mẫu giải độc tố uốn ván tinh chế: 10 ml giải độc tố uốn ván tinh chế cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

**Kiểm tra tính độc đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố uốn ván tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi chuột trong số 5 chuột lang khỏe mạnh, cân nặng 250 g/con đến 350 g/con chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 21 ngày sau tiêm, nếu thấy bất kỳ triệu chứng nào hay bị chết do độc tố uốn ván thì lô giải độc tố uốn ván tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tố uốn ván tinh chế này cũng không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

**Kiểm tra tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tố uốn ván tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tố tương đương như trong vắc xin thành phẩm (12,5 Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần. Mỗi trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tố uốn ván bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, cân nặng 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tố uốn ván tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên



cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tố uốn ván trong 3 tuần theo dõi.

**Kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên uốn ván**

Giải độc tố uốn ván tinh chế phải đạt không ít hơn 1000 Lf/mg nitrogen protein.

**Sản xuất nước cốt ho gà bất hoạt**

Nước cốt ho gà được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Bordertella pertussis* dùng cho sản xuất vắc xin ho gà phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Việc lựa chọn chủng nuôi cấy, môi trường và phương pháp nuôi cấy thích hợp nhằm tạo ra vắc xin ho gà thành phẩm có được 3 ngưng kết nguyên 1; 2; 3. Từng chủng được nuôi cấy 24 h đến 72 h trong môi trường lỏng hoặc đặc. Không được dùng máu người hoặc các sản phẩm từ máu người trong bất kỳ môi trường nuôi cấy chủng ho gà nào để sản xuất vắc xin ho gà. Môi trường dùng trong giai đoạn nuôi cấy ho gà cuối cùng cũng không được phép có máu hoặc sản phẩm của máu.

Sau khi nuôi cấy, gặt và rửa sinh khối vi khuẩn ho gà để loại bỏ các chất còn tồn dư của môi trường nuôi cấy; pha thành hỗn dịch ho gà với nước muối sinh lý vô khuẩn thành hỗn dịch nước cốt ho gà cô đặc.

**Kiểm tra tính thuần khiết của các mẻ gặt đơn**

Lấy mẫu từ các mẻ gặt đơn để kiểm tra tính thuần khiết bằng phương pháp nhuộm soi kính hiển vi hoặc cấy vào môi trường nuôi cấy thích hợp. Các mẻ gặt đơn sẽ không được phép sử dụng vào việc pha chế bán thành phẩm khi phát hiện có nhiễm bất kỳ một loại gì khác vào sản phẩm.

**Kiểm tra độ đục**

Dùng bộ so độ đục chuẩn quốc tế hoặc đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 560 nm của hỗn dịch nước cốt ho gà cô đặc (không được muộn hơn hai tuần sau khi gặt và trước khi huyền dịch vi khuẩn được đưa vào bất kỳ quy trình pha chế nào tiếp theo) để xác định đậm độ của nước cốt ho gà cô đặc. Đậm độ nước cốt ho gà được sử dụng làm cơ sở để tính toán khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Thành phần ho gà trong vắc xin DTP hỗn hợp không vượt quá 20 đơn vị độ đục quốc tế (IOU) trong một liều đơn vắc xin cho người. Tỷ lệ thành phần các chủng *B. pertussis* không được thay đổi khi hỗn hợp vắc xin, phải đăng ký rõ trong hồ sơ và được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia.

**Kiểm tra độ sống sót**

Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết và giải độc bằng phương pháp được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia. Các hóa chất được sử dụng để giết chết và giải độc vi khuẩn ho gà cũng phải được sự chấp thuận bởi cơ quan kiểm định quốc gia. Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết bằng nhiệt độ trong khoảng thời gian thích hợp và được kiểm tra sự sống sót của các vi khuẩn này trên môi trường Border - Gengou. Sau khi bất hoạt, nước cốt ho gà được bảo quản ở nhiệt độ (5 ± 3) °C trong một khoảng thời gian cần thiết để giảm bớt tính độc.

Mỗi loạt nước cốt ho gà đơn sẽ không được dùng để pha chế vắc xin bán thành phẩm khi không đạt các tiêu chuẩn về vô khuẩn, khả năng bất hoạt hoàn toàn (kiểm tra độ sống sót), nhận dạng, khả năng phát triển, ngưng kết như chủng gốc *B. pertussis*.

Phương pháp sản xuất phải được thẩm định để chứng minh rằng sản phẩm khi kiểm định sẽ tuân thủ và đạt được các tiêu chuẩn như mô tả dưới đây.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm**

Vắc xin bán thành phẩm được pha chế và hỗn hợp bởi một lượng thích hợp của giải độc tố bạch hầu và giải độc tố uốn ván đã được hấp phụ bởi nhôm phosphat hydrat hoặc nhôm hydroxyd và hỗn hợp thêm một lượng thích hợp của huyền dịch *B. pertussis* đã được bất hoạt; kết quả của sự hỗn hợp này khi tiêm vào cơ thể phải phù hợp về mặt sinh lý với máu. Hàm lượng *B. pertussis* của vắc xin bán thành phẩm phải không được vượt quá 20 IOU cho một liều đơn cho người. Nếu sử dụng 2 hoặc nhiều hơn số chủng *B. pertussis* thì khi pha vắc xin bán thành phẩm phải tính toán sao cho tổng số đơn vị độ đục của các chủng ho gà đưa vào phải không thay đổi giữa các loạt vắc xin và không vượt quá 20 IOU cho một liều đơn cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin DTP hấp phụ phải không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của giải độc tố uốn ván, bạch hầu, vắc xin ho gà và không gây ra những phản ứng có hại cho người sử dụng.

Chỉ vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nào tuân thủ và đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để sản xuất thành phẩm.

**Chất bảo quản kháng khuẩn**

Xác định hàm lượng chất bảo quản kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản không được ít hơn 85 % và không được nhiều hơn 115 % của lượng chất bảo quản tiêu chuẩn cho vào vắc xin (Phụ lục 15.29).

**Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean casein. Dùng 10 ml vắc xin để kiểm tra trên mỗi môi trường (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu**

Tiến hành các thử nghiệm kiểm tra công hiệu theo Phụ lục 15.22; Phụ lục 15.23 và Phụ lục 15.24.

**Tính độc đặc hiệu**

Tính độc đặc hiệu của vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào được kiểm tra trên mẫu bán thành phẩm cuối cùng hay vắc xin thành phẩm khi cần thiết (Phụ lục 15.4).

**Đối với thành phần bạch hầu và uốn ván:**

Chọn 5 chuột lang, có cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g, tiêm dưới da một lượng vắc xin tương đương với ít nhất 5 liều đơn cho người. Theo dõi chuột hàng ngày. Vắc xin đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt uốn ván hoặc triệu chứng nhiễm độc bạch hầu và ít nhất 80 % chuột sống trong thời gian 6 tuần. Nếu có chuột chết phải mô để kiểm tra phù tạng về dấu hiệu nhiễm độc bạch hầu (tuyến thượng thận đỏ).

**Đối với thành phần ho gà:**

Dùng ít nhất 20 chuột nhất trắng, cân nặng mỗi chuột từ 14 g đến 16 g, cùng giới (nếu có cả 2 giới cần phân chia đều trong các nhóm) cho mỗi mẫu vắc xin thử và nhóm chứng. Mỗi chuột được tiêm vào ổ bụng 0,5 ml dung dịch chứa tối thiểu nửa liều đơn vắc xin cho người. Nhóm chứng được tiêm 0,5 ml nước muối sinh lý (tốt nhất chứa cùng hàm lượng chất bảo quản như có trong dung dịch tiêm cho nhóm thí nghiệm). Tổng khối lượng các nhóm chuột được xác định vào 72 h và 7 ngày sau tiêm. Vắc xin đạt yêu cầu nếu đạt cả 3 tiêu chuẩn sau:

Sau 72 h tổng khối lượng chuột không ít hơn trước tiêm.

Sau 7 ngày khối lượng trung bình mỗi chuột không ít hơn 60 % so với nhóm chứng.

Số chuột chết không quá 5 % tổng số chuột đã được tiêm.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm****Nhận dạng**

Thành phần bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào trong vắc xin DTWP hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm natri citrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) với nồng độ 5 % ở 37 °C trong 48 h. Sau đó ly tâm 2000 r/min trong 15 min. Nước nổi được dùng để nhận dạng thành phần bạch hầu và uốn ván bằng phản ứng lên bông, cặn ly tâm dùng để nhận dạng thành phần ho gà có trong vắc xin bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính với các huyết thanh kháng ho gà đặc hiệu (Phụ lục 15.19).

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**An toàn chung**

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhất trắng và chuột lang khoẻ mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhất trắng có cân nặng mỗi chuột 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con một nửa liều tiêm cho người; tiêm vào ổ bụng 2 chuột lang có cân nặng mỗi chuột 250 g đến 350 g; mỗi con một liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml/con.

Vắc xin được coi là không có độc tính bất thường nếu tất cả các động vật thí nghiệm sống khoẻ mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

**Công hiệu**

Tiến hành kiểm tra ở mẫu vắc xin DTWP thành phẩm khi chưa kiểm tra công hiệu trên vắc xin bán thành phẩm hoặc khi có chỉ định cần thiết (Phụ lục 15.22; 15.23; 15.24).

**Tính chất vật lý, hoá học****Cảm quan:**

Kiểm tra hình dạng bên ngoài của vắc xin bằng mắt thường: Huyền dịch vắc xin chia thành 2 lớp, phần dung dịch phía trên trong suốt không màu hoặc vàng nhạt; lớp lắng cặn dưới đáy lọ có màu trắng xám.

Nhanh chóng tạo huyền dịch đồng nhất sau khi lắc nhẹ, không lẫn chất lạ.

**Tính chất vật lý:**

Thể tích vắc xin mỗi lọ: Thể tích ghi trên nhãn +10 %.

**Tỷ lệ loại bỏ:**

Đối với vắc xin đa liều: Không quá 3 %.

Đối với vắc xin liều đơn: Không quá 5 %.

Không bị đông băng (tiêu chuẩn này chỉ kiểm tra sau khi bảo quản hay vận chuyển theo dây chuyền lạnh, không phải tiêu chuẩn xuất xưởng của nhà sản xuất): Lọ vắc xin mẫu thử phải có tốc độ lắng cặn chậm hơn nhiều so với lọ chứng dương và không có sự tạo hạt hay hình ảnh bông tuyết lơ lửng trong huyền dịch vắc xin hay kết thành cục sau khi lắc.

**Chất bảo quản**

Hàm lượng thimerosal cho phép là 0,005 % đến 0,02 % (Phụ lục 15.29).

**Chất hấp phụ**

Hàm lượng  $Al^{+++}$  trong vắc xin DTP hấp phụ không được quá 1,25 mg  $Al^{+++}$ /l liều tiêm cho người (Phụ lục 15.27).

**pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**Formaldehyd tồn dư**

Không quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

**Bảo quản, hạn dùng**

Ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C vắc xin có thể giữ công hiệu 2,5 năm.

Nhà sản xuất phải đưa ra khuyến cáo về điều kiện bảo quản và vận chuyển vắc xin DTWP hấp phụ để đảm bảo rằng vắc xin đạt công hiệu theo yêu cầu cho đến khi hết hạn sử dụng như đã đăng ký và ghi trên nhãn. Vắc xin DTWP hấp phụ phải được bảo quản sao cho không bị đông băng.

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận và cố định, dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin và không được quá 2,5 năm tính từ cuối thử nghiệm kiểm tra công hiệu (tính từ ngày tiêm miễn dịch trên động vật thí nghiệm).

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**VẮC XIN BẠCH HẦU, UỐN VÁN HẤP PHỤ DÙNG CHO NGƯỜI LỚN VÀ VỊ THÀNH NIÊN**

*Vaccinum diphtheriae et tetani ad usum adulti et adolescentis adsorbatum*

Vắc xin bạch hầu, uốn ván hấp phụ là vắc xin phối hợp, được điều chế từ độc tố bạch hầu và độc tố uốn ván. Các độc tố này được sinh ra trong quá trình nuôi cấy *Corynebacterium diphtheriae* hoặc *Clostridium tetani*, sau đó xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để làm mất tính độc, trở thành giải độc tố mà vẫn còn khả năng sinh miễn dịch. Các giải độc tố được hấp phụ với tá chất thích hợp như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd.

**Sản xuất****Giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm**

Chủng dùng sản xuất ra độc tố bạch hầu cần phải tuân thủ quy định về hệ thống giống chủng. Chủng *Corynebacterium diphtheriae* có tính độc cao đã biết rõ nguồn gốc và lịch sử, được nuôi cấy trong môi trường lỏng phù hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, từng mẻ nuôi cấy được kiểm tra độ sạch để loại bỏ những mẻ bị nhiễm tạp. Độc tố được chiết tách vô khuẩn để loại bỏ xác vi khuẩn. Thông qua việc xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) có thể giám sát được tính ổn định trong sản xuất.

Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại rồi giải độc và tinh chế. Quá trình tinh chế có thể thực hiện trước hoặc sau quá trình giải độc. Việc tinh chế độc tố nhằm loại bỏ các thành phần gây ra những phản ứng phụ ở người. Độc tố tinh chế được giải độc bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp (thông thường bằng nhiệt) nhằm tránh sự phá hủy khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và tránh hồi độc.

Chỉ những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Kiểm tra vô khuẩn:**

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với ít nhất một lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường.

**Kiểm tra an toàn đặc hiệu** (xác định sự không có mặt của độc tố):

Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế chứa ít nhất 500 Lf (mỗi chuột) cho 5 chuột lang khỏe mạnh có cân nặng 250 g/con đến 350 g/con, chưa dùng cho thử nghiệm nào trước đó. Theo dõi chuột trong 42 ngày, thử nghiệm đạt yêu cầu nếu như không có chuột nào chỉ ra dấu hiệu hoặc bị chết do nhiễm độc tố bạch hầu. Nếu nhiều hơn 1 con chuột lang chết không rõ nguyên nhân, thử nghiệm cần nhắc lại. Nếu trong lần thử thứ hai có nhiều hơn 1 chuột chết, giải độc tố đó không đạt yêu cầu về an toàn.

**Kiểm tra tính hồi độc của độc tố bạch hầu:**

Pha loãng giải độc tố tinh chế trong dung dịch đệm để có hàm lượng tương đương với hàm lượng giải độc tố bạch hầu trong vắc xin thành phẩm. Chia mẫu thử thành 2 phần tương đương nhau rồi giữ ở 2 nhiệt độ ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần.

Cả 2 mẫu thử được kiểm tra bằng cách tiêm dưới da 5 ml (mỗi chuột) cho 5 chuột lang có cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g. Theo dõi chuột trong 6 tuần. Giải độc tố bạch hầu đạt yêu cầu, nếu kết quả kiểm tra của các mẫu thử không chỉ ra sự có mặt của độc tố bạch hầu.

**Độ sạch kháng nguyên:** Không ít hơn 1500 Lf/mg nitơ protein

**Giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm**

Chủng dùng sản xuất ra độc tố uốn ván cần phải tuân thủ quy định về hệ thống giống chủng. Chủng *Clostridium tetani* có tính độc cao đã biết rõ về nguồn gốc và lịch sử, được nuôi cấy trong môi trường lỏng phù hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, mỗi mẻ nuôi cấy được kiểm tra độ thuần khiết để loại bỏ những mẻ bị tạp nhiễm. Môi trường

có độc tố được chiết tách vô khuẩn để loại bỏ xác vi khuẩn. Thông qua việc xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) có thể giám sát được tính ổn định trong sản xuất.

Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc và tinh chế. Quá trình tinh chế có thể thực hiện trước hoặc sau quá trình giải độc. Tinh chế độc tố nhằm loại bỏ các thành phần gây ra những phản ứng phụ ở người. Độc tố tinh chế được giải độc bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp, nhằm tránh sự phá hủy khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và tránh việc hồi phục độc lực, thông thường dùng phương pháp nhiệt.

Chỉ những giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Kiểm tra vô khuẩn:**

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với ít nhất một lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường (Phụ lục 15.7).

**Kiểm tra an toàn đặc hiệu** (xác định sự không có mặt của độc tố):

Tiêm dưới da giải độc tố tinh chế chứa ít nhất 500 Lf cho mỗi chuột trong 5 chuột lang khỏe mạnh có cân nặng 250 g/con đến 350 g/con mà chưa dùng cho thử nghiệm nào trước đó. Theo dõi chuột trong 21 ngày, thử nghiệm đạt yêu cầu nếu như không có chuột nào chỉ ra dấu hiệu liệt hoặc bị chết bởi độc tố uốn ván. Nếu nhiều hơn 1 con chuột chết không rõ nguyên nhân, thử nghiệm cần nhắc lại. Nếu trong lần thử thứ 2 có nhiều hơn 1 chuột chết hoặc liệt, giải độc tố uốn ván đó không đạt yêu cầu về an toàn.

**Kiểm tra tính hồi độc của độc tố uốn ván:**

Pha loãng giải độc tố uốn ván tinh chế trong dung dịch đệm để có hàm lượng tương đương với hàm lượng có trong vắc xin thành phẩm. Chia thể tích mẫu thành 2 phần tương đương nhau và giữ ở 2 nhiệt độ ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần.

Cả 2 mẫu thử được kiểm tra bằng việc tiêm dưới da cho 5 chuột lang, mỗi con có cân nặng 250 g đến 350 g, liều tiêm 5 ml/con. Theo dõi trong 21 ngày. Giải độc tố đạt yêu cầu nếu kết quả kiểm tra của các mẫu thử không chỉ ra sự có mặt của độc tố uốn ván.

**Độ sạch kháng nguyên:** Không ít hơn 1000 Lf/mg nitơ protein.

**Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được điều chế bằng cách cho giải độc tố tinh chế bạch hầu và giải độc tố tinh chế uốn ván hấp phụ với nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd. Cho thêm chất bảo quản, thông thường dùng thimerosal. Không sử dụng phenol là loại gây ảnh hưởng có hại cho hoạt tính kháng nguyên.

Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin thành phẩm.

**Chất bảo quản:**

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản không ít hơn 85 % và không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

**Vô khuẩn:**

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu:**

Thử nghiệm công hiệu được thực hiện giai đoạn bán thành phẩm cuối cùng hoặc thành phẩm (Phụ lục 15.22 và Phụ lục 15.23).

**An toàn đặc hiệu:**

Mỗi bán thành phẩm cuối cùng được kiểm tra an toàn đặc hiệu trong ít nhất 5 chuột lang chưa dùng thí nghiệm nào trước đó có cân nặng 250 g/con đến 350 g/con bằng cách tiêm dưới da một lượng tương đương với ít nhất 5 liều đơn tiêm cho người. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày. Chuột chết được mổ và kiểm tra các phủ tạng. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào chỉ ra dấu hiệu của tính độc đặc hiệu của độc tố uốn ván (biểu hiện liệt hoặc dấu hiệu khác của độc tố uốn ván) và ít nhất có 80 % động vật sống sót trong thời gian theo dõi.

**Vắc xin thành phẩm**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được đóng vô khuẩn vào các lọ nhỏ. Các lọ vắc xin phải được đóng kín để phòng ngừa nhiễm khuẩn.

Chỉ những loại thành phẩm thỏa mãn các yêu cầu về các thử nghiệm như Tổ chức Y tế Thế giới và Tiêu chuẩn Việt Nam khuyến cáo mới được phép xuất xưởng để sử dụng.

**Cảm quan:**

Mẫu kiểm định của mỗi loại thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Nếu kết quả kiểm tra cho thấy có sự bất thường, không theo đúng yêu cầu cần phải hủy bỏ.

**Nhận dạng:**

Nhận dạng giải độc tố bạch hầu và uốn ván bằng thử nghiệm lên bông hoặc khuếch tán miễn dịch.

**Công hiệu:**

Thành phần bạch hầu: Phương pháp tiến hành như đã mô tả trong phụ lục xác định công hiệu vắc xin bạch hầu hấp phụ. Giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được đánh giá là không ít hơn 2 IU/liều đơn cho người (Phụ lục 15.23).

Thành phần uốn ván: Phương pháp tiến hành như đã mô tả trong phụ lục xác định công hiệu vắc xin uốn ván hấp phụ. Giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được đánh giá là không ít hơn 20 IU/liều đơn cho người (Phụ lục 15.22).

**Vô khuẩn:**

Đạt yêu cầu về tính vô khuẩn, không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

**An toàn chung:** Theo Phụ lục 15.11.

**pH:** 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**Thimerosal:**

Hàm lượng chất bảo quản thimerosal không ít hơn 85% và không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

**Nhôm:**

Không quá 1,25 mg nhôm trong liều đơn vắc xin tiêm cho người (Phụ lục 15.27).

**Hàm lượng muối natri clorid:**

Phụ lục 15.26.

**Hàm lượng formaldehyd tồn dư:**

Phụ lục 15.25.

**Bảo quản, hạn dùng**

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận và cố định, dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ các bán thành phẩm riêng biệt).

Khi bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, vắc xin có hạn dùng là 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu cuối cùng. Không được để vắc xin bị đông băng.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**VẮC XIN PHỐI HỢP BẠCH HẦU, UỐN VÁN, HO GÀ VÔ BÀO (DTaP) HẤP PHỤ**

*Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum*

Vắc xin bạch hầu, ho gà vô bào, uốn ván hấp phụ là một hỗn hợp bao gồm các kháng nguyên có khả năng bảo vệ được chế tạo từ giải độc tố bạch hầu, uốn ván và từng thành phần tinh khiết có tính kháng nguyên của vi khuẩn ho gà (*Bordetella pertussis*) được hấp phụ trên muối nhôm như nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat hydrat. Khi lắc kỹ, hỗn hợp sẽ trở nên đồng nhất.

**SẢN XUẤT**

**Sản xuất giải độc tố bạch hầu và giải độc tố uốn ván**  
Theo phần "Sản xuất giải độc tố bạch hầu" và phần "Sản xuất giải độc tố uốn ván" của chuyên luận Vắc xin bạch hầu, uốn ván ho gà hấp phụ DTWP.

**Sản xuất giải độc tố ho gà****Chủng sản xuất**

Sử dụng chủng *Bordetella pertussis* pha I để sản xuất. Chủng *Bordetella pertussis* dùng để sản xuất vắc xin phải được tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc. Nếu sử dụng chủng *Bordetella pertussis* biến đổi ADN thì trình tự ADN đã biến đổi phải được mô tả rõ ràng, đầy đủ các đặc tính. Chủng sản xuất phải có các đặc tính như chủng gốc. Chủng có thể được bảo quản trong nitrogen lỏng hoặc đông khô.

Môi trường nuôi cấy: Không được dùng máu và các sản phẩm từ máu người trong bất kỳ môi trường nuôi cấy chủng ho gà nào để sản xuất vắc xin ho gà, kể cả giai đoạn cuối cùng. Môi trường nuôi cấy không được có bất kỳ tạp nhiễm nào. Thành phần kháng nguyên có tính bảo vệ được tinh chế bằng các phương pháp hóa học như: Cắt phân đoạn amoni sulfat, ly tâm theo gradient tỷ trọng của đường sucrose. Sau khi tinh chế, các kháng nguyên có tính bảo vệ này được giải độc bằng formaldehyd hoặc bằng phương pháp thích hợp khác để ức chế khả năng gây độc của chúng.

Kiểm tra sự thuần khiết của chủng vi khuẩn: Nuôi cấy các mẻ đơn trên môi trường thích hợp. Nhuộm Gram soi mẫu vi khuẩn từ tất cả các mẻ nuôi cấy đơn này. Nếu có bất kỳ tạp nhiễm nào, mẻ gạt đơn đó sẽ không được sử dụng vào việc pha chế bán thành phẩm và phải loại bỏ.

*Vô khuẩn:* Không phát hiện thấy nấm và tạp khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### **Kiểm tra đặc tính của các kháng nguyên**

Tính ổn định của các thành phần riêng lẻ phải được thẩm định trong quá trình sản xuất theo các tiêu chuẩn dưới đây. Sau khi đã được thẩm định về tính ổn định, các thử nghiệm này không đòi hỏi phải được thực hiện ở mỗi loạt sản xuất. *Adenylat cyclase:* Không được quá 500 ng/1 liều đơn cho người. *Độc tố tế bào khi quàn:* Không được quá 2 pmol/1 liều đơn cho người.

*Độc tố gây hoại tử da tồn dư:* Tiêm trong da cho 3 chuột chưa cai sữa, mỗi chuột 0,1 ml với lượng kháng nguyên tương đương với 1 liều tiêm cho người của vắc xin. Theo dõi trong 48 h. Vắc xin được coi là đạt nếu không có phản ứng hoại tử da trên chuột.

*Kiểm tra sự có mặt của độc tố ho gà (PT- pertussis toxin):* Sử dụng phương pháp *in vitro* như: Quan sát khả năng gây vón cục tế bào trứng của chuột đất vàng Trung Quốc hoặc phương pháp ngưng kết trên tế bào hồng cầu. Sử dụng các phương pháp *in vivo* như: Xác định sự hoạt động của yếu tố làm tăng lympho bào, yếu tố nhạy cảm với histamin, hoặc yếu tố làm tăng tiết insulin.

Tiêu chuẩn: Độc tố chỉ ra có hoạt tính sinh học của ADP-ribosyl khi sử dụng transducin như chất hấp phụ.

*Kiểm tra sự có mặt của yếu tố gây ngưng kết hồng cầu dạng sợi:* Sử dụng phương pháp ngưng kết trên tế bào hồng cầu hoặc phương pháp ức chế ngưng kết. Tiêu chuẩn: Ngưng kết hoặc ức chế ngưng kết với kháng thể đặc hiệu.

*Pertactin, fimbrial-2, fimbrial-3:* Sử dụng phương pháp miễn dịch thích hợp. Tiêu chuẩn: Có phản ứng với kháng thể đặc hiệu.

*Giải độc tố ho gà:* Xem xét khả năng tạo kháng thể của chuột có ức chế được khả năng gây độc của độc tố ho gà hay không. Tiêu chuẩn: Giải độc tố khi tiêm cho chuột thì chuột tạo được kháng thể có khả năng ức chế tính độc của độc tố ho gà.

#### **Độ tinh khiết của các kháng nguyên**

*Trước giải độc:* Độ tinh khiết của các kháng nguyên đơn hoặc phối hợp được xác định bằng các phương pháp thích hợp như SDS-PAGE, sắc ký lỏng hoặc bằng các phương pháp phân tích phù hợp khác. Trong trường hợp có 2 kháng nguyên trở lên cùng được tinh chế thì tỷ lệ mỗi kháng nguyên phải được xác định bằng các phương pháp thích hợp như SDS-PAGE, phương pháp sắc ký lỏng, điện di trên gel không biến tính, đo tỷ trọng... và phải chứng minh được tỷ lệ đó tạo được hiệu quả cho vắc xin trên thử nghiệm lâm sàng.

Hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 100 IU/1 liều đơn cho người. Sử dụng phương pháp tạo gel hoặc phương pháp thích hợp khác (Phụ lục 13.2).

Kiểm tra vô khuẩn: Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7). *Giải độc:* PT, FHA (Filamentous haemagglutinin), Pertactin được giải độc bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định (thường là bằng nhiệt), đảm bảo không có sự hồi độc của giải độc tố thành độc tố trong quá trình bảo quản vắc xin.

Các thành phần khác như fimbrial-2 và fimbrial-3 phải được chứng minh là không liên kết với các chất độc khác. *Sau giải độc:* Kiểm tra sự tồn dư của độc tố ho gà: Xác định lượng độc tố ho gà (PT) tồn dư bằng một số phương pháp có độ tin cậy cao như: Phương pháp quan sát khả năng gây vón cục tế bào trứng của chuột đất vàng Trung Quốc. Khi pha loãng vắc xin đến nồng độ thích hợp, tổng hàm lượng độc tố ho gà tồn dư từ tất cả các kháng nguyên của vi khuẩn ho gà không được vượt quá lượng giới hạn an toàn trong vắc xin. Giới hạn này được tìm qua các thử nghiệm lâm sàng.

*Hàm lượng kháng nguyên:* Được xác định bằng các phương pháp hóa miễn dịch, phương pháp nitơ protein (nitrogen protein) hoặc bằng các phương pháp thích hợp khác. Tiêu chuẩn: Tỷ lệ kháng nguyên/nitrogen protein nằm trong giới hạn đã được xác định cho sản phẩm.

*Vô khuẩn:* Mỗi mẻ kháng nguyên tinh chế đều phải được kiểm tra tính vô khuẩn (Phụ lục 15.7). Tiêu chuẩn: Không có nấm và vi khuẩn mọc sau 14 ngày nuôi cấy.

#### **KIỂM ĐỊNH VẮC XIN BÁN THÀNH PHẨM**

Vắc xin bán thành phẩm được pha chế và hỗn hợp bởi một lượng thích hợp của giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván và giải độc tố ho gà đã được hấp phụ với nhôm phosphat hydrat hoặc nhôm hydroxyd, thêm tá dược và chất bảo quản với hàm lượng thích hợp sao cho vắc xin đạt tính an toàn và hiệu quả.

#### **Hàm lượng chất giải độc tồn dư**

Nếu formaldehyd được sử dụng thì hàm lượng chất này không vượt quá 0,2 g/l (Phụ lục 15.25) nếu hàm lượng glutaraldehyd tồn dư không quá 0,1 g/l.

#### **Chất bảo quản**

Xác định chất bảo quản kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp hóa lý hoặc phương pháp vi sinh vật. Hàm lượng chất bảo quản không được ít hơn 85 % và không được nhiều hơn 115 % của lượng chất bảo quản tiêu chuẩn cho vào vắc xin (Phụ lục 15.29).

Nếu chất kháng sinh được sử dụng thì hàm lượng chất kháng sinh không được thấp hơn lượng nhỏ nhất có hiệu quả bảo quản và không vượt quá 115 % hàm lượng ghi trên nhãn. Xác định hàm lượng chất kháng sinh theo Phụ lục 13.9.

#### **Nhôm**

Không được quá 1,25 mg/1 liều đơn cho người (Phụ lục 15.27).

#### **Calci**

Không được quá 1,3 mg/1 liều đơn cho người.



**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu**

Tiến hành các thử nghiệm kiểm tra công hiệu bạch hầu và uốn ván theo Phụ lục 15.22 và Phụ lục 15.23.

**Xác định tính sinh miễn dịch của thành phần ho gà**

Phương pháp gây miễn dịch trên chuột nhắt sau đó chuẩn độ kháng thể bằng phương pháp ELISA. Tiêu chuẩn: Nhiều phương pháp tính toán có thể được áp dụng. Trong trường hợp sử dụng phần mềm SoftMaxPro tính toán thì hàm lượng huyết thanh kháng PT không được ít hơn 38 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng FHA không được ít hơn 125 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng PRN không được ít hơn 9400 EU/ml.

Giới hạn tin cậy (P=0,95) không dưới 50 % và không vượt quá 200 % của công hiệu tương đối với mỗi kháng nguyên của vi khuẩn ho gà.

Phân tích thống kê cho thấy độ dốc có ý nghĩa và không có độ lệch từ đường cong đáp ứng liều.

**Tính độc đặc hiệu**

Với thành phần bạch hầu và uốn ván theo Phụ lục 15.4.

**Kiểm tra hồi độc và sự tồn dư độc tố ho gà**

Kiểm tra sự nhạy cảm của độc tố ho gà với histamin. Có hai phương pháp là phương pháp tính tỷ lệ chết 24 h sau tiêm histamin và phương pháp đo nhiệt độ chuột nhắt sau tiêm histamin. Nếu sử dụng phương pháp tính tỷ lệ chết 24 h sau tiêm histamin thì khi tiêm miễn dịch với 1 liều tiêm vắc xin cho người cho 1 chuột, không có chuột chết ở liều tiêm thử thách 8 mg/ml histamin dihydroclorid hoặc 4 mg/ml histamin base. Tổng số chuột sử dụng là 10 chuột trên một mẫu. Khi sử dụng phương pháp đo nhiệt độ chuột nhắt sau tiêm histamin thì hàm lượng độc tố PT tồn dư hoặc hồi độc không được quá 0,4 HSU/ml (HSU: histamine sensitization unit = đơn vị nhạy cảm histamin của chuột nhắt).

**KIỂM ĐỊNH VẮC XIN THÀNH PHẨM****Cảm quan**

Kiểm tra hình dạng bên ngoài của vắc xin bằng mắt thường, huyền dịch vắc xin chia thành hai lớp, phần huyền dịch phía trên trong suốt, không màu hoặc vàng nhạt, lớp lắng cặn dưới đáy lọ có màu trắng xám. Nhanh chóng tạo huyền dịch đồng nhất sau khi lắc nhẹ. Không lẫn chất lạ.

**Nhận dạng**

Nhận dạng thành phần uốn ván, bạch hầu theo Phụ lục 15.19. Nhận dạng thành phần ho gà vô bảo: Phương pháp khuếch tán miễn dịch kép. Có sự ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên ho gà trong vắc xin với kháng thể ho gà chuẩn.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Nhôm**

Không được quá 1,25 mg/1 liều đơn cho người (Phụ lục 15.27).

**Canxi**

Không được quá 1,3 mg/1 liều đơn cho người.

**Thimerosal**

Từ 0,005 % đến 0,02 % (Phụ lục 15.29).

**Formaldehyd tồn dư**

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

**pH**

Từ 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**An toàn chung**

Thử nghiệm tiến hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khỏe mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có cân nặng 18 - 22 g/con. Tiêm vào ổ bụng 2 chuột lang có cân nặng 250 - 350 g/con. Tiêm mỗi chuột nhắt 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml, tiêm mỗi chuột lang tương ứng 10 liều tiêm cho người nhưng không vượt quá 5 ml. Vắc xin được coi là không có độc tính bất thường nếu tất cả động vật thí nghiệm sống khỏe mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

**Nội độc tố vi khuẩn**

Hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 100 EU/1 liều đơn cho người. Sử dụng phương pháp tạo gel hoặc phương pháp thích hợp khác (Phụ lục 13.2).

**Kiểm tra hồi độc và sự tồn dư độc tố ho gà**

Xem mục Kiểm định vắc xin bán thành phẩm.

**Công hiệu bạch hầu, uốn ván**

Tiến hành kiểm tra ở mẫu vắc xin DTaP thành phẩm khi chưa kiểm tra công hiệu trên vắc xin bán thành phẩm hoặc khi có chỉ định cần thiết (Phụ lục 15.22 và Phụ lục 15.23).

**Xác định tính sinh miễn dịch của thành phần ho gà**

Phương pháp gây miễn dịch trên chuột nhắt sau đó chuẩn độ kháng thể bằng phương pháp ELISA.

Tiêu chuẩn: Nhiều phương pháp tính toán có thể được áp dụng. Trong trường hợp sử dụng phần mềm SoftMaxPro tính toán thì hàm lượng huyết thanh kháng PT không được ít hơn 38 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng FHA không được ít hơn 125 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng PRN không được ít hơn 9400 EU/ml.

Giới hạn tin cậy (P=0,95) không dưới 50 % và không vượt quá 200 % của công hiệu tương đối với mỗi kháng nguyên của vi khuẩn ho gà.

Phân tích thống kê cho thấy độ dốc có ý nghĩa và không có độ lệch từ đường cong đáp ứng liều.

**Bảo quản, hạn dùng**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C vắc xin có thể giữ công hiệu trong ít nhất 2 năm.

Nhà sản xuất phải đưa ra khuyến cáo về điều kiện bảo quản và vận chuyển vắc xin để đảm bảo rằng vắc xin đạt công hiệu theo yêu cầu cho đến khi hết hạn sử dụng như đăng ký ghi trên nhãn. Vắc xin phải được bảo quản sao cho không bị đông băng.

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp nhận và có định dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của quy định hiện hành.

**VẮC XIN BẠCH HẦU, UỐN VÁN, HO GÀ, VIÊM GAN B VÀ Hib (DT<sub>w</sub>P - HeB - Hib)**

*Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, hepatitis B et haemophilii stirpis b coniugatum adsorbatum*

Vắc xin bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B và Hib là một hỗn hợp các kháng nguyên hấp phụ vào tá chất nhôm, gồm các giải độc tố bạch hầu, uốn ván tinh chế, vắc xin ho gà toàn tế bào, kháng nguyên bề mặt (HBsAg) virus viêm gan B tái tổ hợp và kháng nguyên Hib cộng hợp. Tá chất là nhôm.

**Sản xuất giải độc tố bạch cầu**

Vắc xin bạch hầu được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Corynebacterium diphtheriae* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường lòng Lingood. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố bạch hầu (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế được kiểm tra vô khuẩn, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch của kháng nguyên trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với 10 ml mẫu giải độc tố bạch hầu tinh chế cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

**Kiểm tra tính độc đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố bạch hầu tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi trong số 5 chuột lang khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, khỏe mạnh, chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày sau tiêm, nếu thấy chuột có những triệu chứng bất thường hay bị chết do độc tố bạch hầu thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào không phải do độc tố bạch hầu thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu

có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

**Kiểm tra tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm giống như dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tố bạch hầu tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tố tương đương như trong vắc xin thành phẩm (35 Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau (5 ± 3) °C và 37 °C trong 6 tuần. Từng mẫu trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tố bạch hầu bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột lang thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi.

**Kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bạch hầu**

Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải đạt không ít hơn 1500 Lf/mg nitrogen protein.

**Sản xuất giải độc tố uốn ván**

Vắc xin uốn ván được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Clostridium tetani* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố uốn ván (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông, xác định độc tính bằng thử nghiệm liều chết 100 % chuột (MLD). Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và nhiệt độ, tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Số lượng Lf trong vắc xin uốn ván bán thành phẩm tùy thuộc vào công thức gốc của từng nhà sản xuất nhưng không được quá 25 Lf trong một liều đơn cho người, nếu sử dụng nhiều hơn một liều cho phác đồ tiêm miễn dịch cơ bản.

Giải độc tố uốn ván tinh chế được kiểm tra vô khuẩn, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch, hàm lượng kháng nguyên (Lf/ml) trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với 10 ml mẫu giải độc tố uốn ván tinh chế cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

**Tinh độc đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố uốn ván tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi chuột trong số 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng 250 g/con đến 350 g/con chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 21 ngày sau tiêm, nếu thấy chuột có những triệu chứng bất thường hay bị chết do độc tố uốn ván thì lô

giải độc tổ uốn ván tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào không phải do độc tổ uốn ván thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tổ uốn ván tinh chế này cũng không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

#### **Tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tổ uốn ván tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tổ tương đương như trong vắc xin thành phẩm ( $\leq 20$  Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần. Từng mẫu trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tổ uốn ván bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tổ uốn ván tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột lang thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tổ uốn ván trong 3 tuần theo dõi.

#### **Độ tinh sạch của kháng nguyên uốn ván**

Giải độc tổ uốn ván tinh chế phải đạt không ít hơn 1000 Lf/mg nitrogen protein.

#### **Sản xuất nước cốt ho gà bất hoạt**

Nước cốt ho gà được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Bordetella pertussis* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Việc lựa chọn chủng nuôi cấy, môi trường và phương pháp nuôi cấy thích hợp nhằm tạo ra vắc xin ho gà thành phẩm có được 3 ngưng kết nguyên: 1; 2; 3. Từng chủng được nuôi cấy 24 h đến 72 h trong môi trường lỏng hoặc đặc. Không được dùng máu người hoặc các sản phẩm từ máu người trong bất kỳ môi trường nuôi cấy chủng ho gà nào để sản xuất vắc xin ho gà. Môi trường dùng trong giai đoạn nuôi cấy chủng ho gà cuối cùng cũng không được phép có máu hoặc sản phẩm của máu.

Sau khi nuôi cấy, gặt và rửa sinh khối vi khuẩn ho gà để loại bỏ các chất còn tồn dư của môi trường nuôi cấy; pha thành hỗn dịch ho gà với nước muối sinh lý vô khuẩn thành hỗn dịch nước cốt ho gà cô đặc.

#### **Tính thuần khiết của các mẻ gặt đơn**

Lấy mẫu từ các mẻ gặt đơn để kiểm tra tính thuần khiết bằng phương pháp nhuộm soi kính hiển vi hoặc cấy vào môi trường nuôi cấy thích hợp. Các mẻ gặt đơn sẽ không được phép sử dụng vào việc pha chế bán thành phẩm khi phát hiện có tạp nhiễm.

#### **Độ đục**

Dùng bộ so độ đục chuẩn quốc tế hoặc đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 560 nm của hỗn dịch nước cốt ho gà cô đặc (không được muộ hơn hai tuần sau khi gặt và trước khi huyền dịch vi khuẩn được đưa vào bất kỳ quy trình pha

chế nào tiếp theo) để xác định đậm độ của nước cốt ho gà cô đặc. Đậm độ nước cốt ho gà được sử dụng làm cơ sở để tính toán khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng. Thành phần ho gà trong vắc xin DT<sub>w</sub>P - HeB - Hib hỗn hợp không vượt quá 15 đơn vị độ đục quốc tế (IOU) trong một liều đơn vắc xin cho người. Tỷ lệ thành phần các chủng *B. pertussis* không được thay đổi khi hỗn hợp vắc xin, phải đăng ký rõ trong hồ sơ và được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia.

#### **Độ sống sót**

Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết và giải độc bằng phương pháp được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia. Các hóa chất được sử dụng để giết chết và giải độc vi khuẩn ho gà cũng phải được sự chấp thuận bởi cơ quan kiểm định quốc gia. Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết bằng nhiệt độ trong khoảng thời gian thích hợp và được kiểm tra sự sống sót của các vi khuẩn này trên môi trường Border-Gengou. Sau khi bất hoạt, nước cốt ho gà được bảo quản ở nhiệt độ ( $5 \pm 3$ ) °C trong một khoảng thời gian cần thiết để giảm bớt tính độc.

Mỗi loạt nước cốt ho gà đơn sẽ không được dùng để pha chế vắc xin bán thành phẩm khi không đạt các tiêu chuẩn về vô khuẩn, khả năng bất hoạt hoàn toàn (kiểm tra độ sống sót), nhận dạng, khả năng phát triển, ngưng kết như chủng gốc *B. pertussis*.

#### **Sản xuất kháng nguyên bề mặt (HBsAg) tái tổ hợp**

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được điều chế bằng cách sử dụng HBsAg tổng hợp ở tế bào nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*), tế bào trứng chuột đất vàng (CHO-Chinese hamster ovary) hoặc các dòng tế bào thích hợp khác đã được biến nạp một plasmid có chứa gen mã hóa HBsAg. HBsAg được thu từ tế bào bằng cách làm ly giải tế bào nấm men và được tinh chế nhờ các kỹ thuật sinh hóa lý.

Vắc xin tái tổ hợp có thể chứa sản phẩm của gen S (protein chủ yếu) hoặc phối hợp sản phẩm của gen S và tiền S<sub>2</sub> (protein loại trung bình) hoặc phối hợp cả sản phẩm của gen S, tiền S<sub>2</sub> và tiền S<sub>1</sub> (protein loại lớn).

#### **Hàm lượng protein**

Protein trong mẫu thử được định lượng theo phương pháp Lowry (Phụ lục 15.34).

#### **Nhận dạng và hàm lượng HBsAg**

Xác định hàm lượng HBsAg bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA), thăm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn quốc tế hoặc vắc xin mẫu chuẩn.

#### **Độ tinh khiết của kháng nguyên**

Được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng.

#### **Lipid**

Không lớn hơn 100 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.40).



**Cesi clorid**

Không lớn hơn 5 µg/20 µg protein (Phụ lục 15.41).

**Tween 20**

Không lớn hơn 50 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.6).

**Polysaccharid**

Không lớn hơn 10 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.38).

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Thimerosal**

Không được lớn hơn 0,012 % (Phụ lục 15.29).

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Sản xuất kháng nguyên Hib cộng hợp**

Vắc xin phòng *Hemophilus influenzae type b* là loại vắc xin hóa học được điều chế từ oligosaccharid tổng hợp giống với thành phần vô polysaccharid của vi khuẩn trong tự nhiên. Oligosaccharid cộng hợp với protein của giải độc tố uốn ván làm giá mang.

Trong mỗi liều đơn tiêm cho người chứa thành phần hoạt chất: Kháng nguyên PRP-T: 12 µg.

**Nhận dạng thành phần Hib**

Bằng phản ứng ngưng kết giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu trong hệ thống hạt Latex. Sử dụng bộ sinh phẩm đáp ứng được yêu cầu nhận dạng và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ sinh phẩm Latex, hoặc nhận dạng thành phần Hib bằng một phản ứng hóa miễn dịch phù hợp. Tiêu chuẩn: Có hiện tượng ngưng kết xảy ra, nhận thấy rõ ràng bằng mắt thường.

**Hàm lượng saccharid (Polyribosyl Ribitol Phosphat = PRP) tổng số**

Xác định hàm lượng PRP tổng số bằng phương pháp orcinol (Phụ lục 15.42) hoặc phương pháp sắc ký lỏng.

Tiêu chuẩn: Ít nhất phải đạt 80 % của hàm lượng saccharid tổng số ghi trên nhãn.

**Hàm lượng saccharid tự do**

Không được quá 25,0 % ( $\leq 25,0$  %).

Xác định hàm lượng saccharid tự do bằng phương pháp orcinol (Phụ lục 15.42) hoặc phương pháp sắc ký lỏng.

**Xác định hoạt tính miễn dịch Hib****Sinh vật phẩm:**

Thỏ cái F1 (1,8 kg đến 2,2 kg) được lựa chọn, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện thường.

Chúng dương vắc xin Hib.

**Chuẩn bị dung dịch:**

Dung dịch 20×PBS (20 × Phosphate Buffer Saline): Dung dịch có chứa 2,74 M natri clorid (TT), 0,054 M kali clorid (TT), 0,16 M dinatri hydrophosphat (TT) và 0,028 M kali dihydrophosphat (TT). Cân 320 g natri clorid (TT), 8 g kali clorid (TT), 46 g dinatri hydrophosphat (TT), 8 g kali dihydrophosphat (TT). Hòa tan trong 1500 ml nước cất. Điều chỉnh pH trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 bằng dung dịch acid hydrochloric 37 % (TT) hoặc dung dịch natri hydroxyd

2 M (TT). Chuyển vào bình định mức 2 L, thêm nước cất vừa đủ đến vạch. Dung dịch này có nồng độ gấp 20 lần dung dịch làm việc. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch PBS: Pha loãng 20 lần dung dịch 20×PBS bằng nước cất, cụ thể như sau: Lấy 100 ml dung dịch 20×PBS vào bình định mức 2 L, thêm nước cất đến vạch, lắc đều. Nếu cần, điều chỉnh pH trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 bằng dung dịch acid hydrochloric 37 % (TT) hoặc dung dịch natri hydroxyd 2 N (TT). Bảo quản ở 4 °C, dùng trong vòng 15 ngày.

**Tiến hành:**

Làm song song mẫu thử và mẫu chứng.

Liều vắc xin 10 µg/0,5 ml.

Gây nhiễm trên 5 thỏ mỗi mẫu với liều vắc xin 10 µg/0,5 ml. Nếu vắc xin có hàm lượng cao hơn thì phải pha loãng bằng dung dịch PBS, sử dụng các vật liệu tiệt trùng.

Nếu vắc xin có hàm lượng thấp hơn, gây nhiễm với thể tích tiêm lớn hơn để đủ 10 µg nhưng không quá 2,5 ml mỗi thỏ.

Gây nhiễm ở ngày 0 và ngày 14, bằng đường tiêm dưới da vùng bụng. Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 ngày ở vùng cách ly bảo vệ.

Tiến hành lấy máu sau liều tiêm đầu tiên 21 ngày. Lấy máu riêng từng con vào ống nghiệm nhựa 15 ml, không ít hơn 5 ml. Ly tâm 3000 r/min trong 20 min ở nhiệt độ phòng.

Tách huyết thanh cẩn thận bằng pipet (không được làm lẫn huyết thanh giữa các ống khác nhau) sang một ống nghiệm khác. Nếu chưa tiến hành định lượng kháng thể anti-Hib ngay, bảo quản các mẫu huyết thanh ở -20 °C để kiểm tra sau.

**Định lượng kháng thể trong huyết thanh sau khi ly tâm theo quy trình định lượng kháng thể kháng Hib bằng phương pháp ELISA****Thiết bị:**

Máy đọc ELISA, bước sóng 492 nm.

Tủ an toàn sinh học.

Rửa phiến nhựa ELISA.

Máy đo ELISA đa kênh.

**Vật liệu:**

Phiến nhựa 96 giếng chuẩn độ vi lượng.

Buồng âm (hộp kín bằng nhựa hoặc kim loại bên trong có lót giấy lọc thấm nước cất để tạo độ ẩm).

**Thuốc thử:**

Tween 20

BSA Fraction V

OPD

Kháng IgG thỏ cộng hợp gắn peroxidase.

Chứng âm huyết thanh anti-Hib.

Chứng dương huyết thanh thỏ anti-Hib.

Oligosaccharid của Hib cộng hợp với HSA (phù phiến) (HbO-HSA).

**Chuẩn bị dung dịch:**

Dung dịch 20×PBS: Pha như trên.

Dung dịch đệm phosphat-citrat có chứa 0,048 M *acid citric* (TT), 0,1 M *dinatri hydrophosphat* (TT).

Dung dịch rửa phiến có chứa 0,027 M *kali clorid* (TT), 0,137 M *natri clorid* (TT), 0,008 M *dinatri hydrophosphat* (TT), 0,0014 M *dikali hydrophosphat* (TT), 0,05 % Tween 20, được pha bằng cách: thêm 2,5 ml Tween 20 vào 5 L dung dịch PBS. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 7 ngày.

Tween 20 pha loãng 1/4: Để có 40 ml dung dịch, lấy 10 ml Tween 20 thêm 30 ml *nước cất*. Trộn đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch dùng phản ứng: Cân 10 g *natri metabisulfít* (TT), hòa tan trong 840 ml *nước cất*, thêm từ từ 160 ml *acid sulfuric* (TT). Khuấy đều, đặt trong chậu đá. Pha trong hốt và mang gang. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch khóa (chứa 1 % BSA): Pha trước khi dùng. Cân 0,2 g BSA, hòa tan trong 20 ml *nước cất*.

Dung dịch pha loãng cho ELISA anti-Hib: Cân 1 g BSA, 0,372 g *natri edetat* (TT), đong 1,2 ml Tween 20 pha loãng 1/4, tất cả được hoà tan trong 80 ml dung dịch PBS. Điều chỉnh pH từ 7,2 đến 7,3 bằng *dung dịch acid hydrochloric 37 %* (TT) hoặc *dung dịch natri hydroxyd 2 N* (TT) nếu cần. Thêm dung dịch PBS vừa đủ 100 ml. Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, dùng trong vòng 1 tháng.

#### Tiến hành:

Chuẩn bị chứng dương huyết thanh thỏ (anti-Hib) và chứng âm huyết thanh cho thử nghiệm ELISA theo cách sau: Pha loãng 1/50 với dung dịch pha loãng. Loại bỏ hết các vật liệu đã sử dụng. Chú ý: Tất cả phải ủ trong tủ ẩm. Sau khi rửa phiến, nếu chưa dùng ngay, để ngửa phiến trong tủ ẩm, không quá 15 min.

Pha loãng dung dịch phủ phiến HBO-HSA để được nồng độ cuối cùng là 1 µg/ml HBO-HSA trong PBS với thể tích 11 ml. Thể tích này đủ dùng cho 1 phiến 96 giếng.

Ủ phiến ở 37 °C trong 90 min hoặc qua đêm ở 4 °C.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch đệm rửa.

Thêm 100 µl dung dịch khóa vào mỗi giếng.

Ủ phiến trong 30 min ở 37 °C.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch rửa phiến.

#### Thiết kế phiến:

Thể tích của mẫu và chứng trong mỗi giếng là 100 µl.

Cho chứng dương và chứng âm ở cột 1, 2 từ hàng A đến H (lặp lại 4 lần).

Cho mẫu từ cột 3 trở đi từ hàng A đến hàng H lặp lại 2 lần.

Ủ phiến 90 min ở nhiệt độ phòng.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch rửa phiến.

Pha loãng cộng hợp kháng huyết thanh thỏ với peroxidase bằng dung dịch pha loãng theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau đó thêm 100 µl dung dịch rửa phiến vào tất cả các giếng.

Ủ phiến 1 h ở 37 °C.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch rửa phiến.

Chuẩn bị dung dịch cơ chất như sau: Cân 0,1 g OPD và hòa tan trong 25 ml dung dịch đệm phosphat - citrat trong điều kiện tránh ánh sáng. Thêm 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lắc đều và thêm 100 µl vào tất cả các giếng.

Ủ 5 min trong tối ở nhiệt độ phòng.

Dừng phản ứng bằng cách thêm 50 µl dung dịch dùng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc phiến ở bước sóng 492 nm (Multiscan).

#### Phân tích và biện luận kết quả:

Thử nghiệm được chấp thuận khi OD của chứng dương và chứng âm đều nằm trong dải đo đã thiết lập. Nếu quá nửa bị loại, lặp lại test ELISA.

Tính toán giá trị ngưỡng (cutoff) của thử nghiệm để thiết lập tiêu chuẩn quyết định mẫu âm tính hay dương tính theo công thức:

$$\text{Cutoff} = \text{trung bình OD của nền} + 2\text{SD}$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn.

Tất cả các giá trị OD lớn hơn hoặc bằng Cutoff là dương tính.

Tất cả các giá trị OD nhỏ hơn cutoff là âm tính.

Tính % có đáp ứng như sau:

$$\% \text{ đáp ứng} = \frac{\text{Tổng số thỏ có đáp ứng}}{\text{Tổng số thỏ có gây nhiễm}} \times 100$$

#### Tiêu chuẩn chấp thuận của thử nghiệm:

Thử nghiệm có giá trị khi đối với mẫu vắc xin chứng, số thỏ có đáp ứng miễn dịch không ít hơn 50 % (≥ 50 %).

#### Tiêu chuẩn chấp thuận của mẫu thử:

Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu của thử nghiệm khi số thỏ được dùng trong thử nghiệm có đáp ứng miễn dịch không ít hơn 50 % (≥ 50 %).

Phương pháp sản xuất vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib phải được thẩm định để chứng minh rằng sản phẩm khi kiểm định sẽ tuân thủ và đạt được các tiêu chuẩn như mô tả dưới đây.

#### Kiểm định vắc xin bán thành phẩm

Vắc xin bán thành phẩm được pha chế và hỗn hợp bởi một lượng thích hợp của giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, kháng nguyên viêm gan B đã được hấp phụ nhôm phosphat và hỗn hợp thêm một lượng thích hợp của huyền dịch *B. pertussis* đã được bất hoạt, sau cùng được hỗn hợp với kháng nguyên Hib đã được hấp phụ nhôm phosphat; kết quả của sự hỗn hợp này được tiêm vào cơ thể phải phù hợp về mặt sinh lý với máu. Hàm lượng của *B. pertussis* của vắc xin bán thành phẩm phải không được vượt quá 15 IOU trong một liều đơn cho người. Nếu sử dụng hai hoặc nhiều hơn số chủng *B. pertussis* thì khi pha vắc xin bán thành phẩm phải tính toán sao cho tổng số đơn vị độ độc của các chủng ho gà đưa vào phải không thay đổi giữa các loại vắc xin và không vượt quá 15 IOU trong một liều đơn cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib hấp phụ phải không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của giải độc tố uốn ván, bạch hầu, vắc xin ho gà, kháng nguyên Hib, kháng nguyên HeB và không gây ra những phản ứng có hại cho người sử dụng. Chỉ vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nào tuân thủ và đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để sử dụng sản xuất thành phẩm.

#### Chất bảo quản kháng khuẩn

Xác định hàm lượng chất bảo quản kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp thích

hợp (Phụ lục 15.29). Hàm lượng chất bảo quản từ 85 % đến 115 % của lượng chất bảo quản ghi trên nhãn.

#### **Vô khuẩn**

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein. Dùng 10 ml vắc xin để kiểm tra trên mỗi môi trường (Phụ lục 15.7).

#### **Công hiệu**

Tiến hành các thử nghiệm kiểm tra công hiệu theo Phụ lục 15.22; Phụ lục 15.23; Phụ lục 15.24.

Công hiệu vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được tiến hành song song giữa vắc xin mẫu thử với vắc xin mẫu chuẩn quốc gia; có thể được xác định bằng phương pháp thực nghiệm trên động vật thí nghiệm (công hiệu *in vivo*) để xác định hiệu giá kháng thể, hoặc phương pháp miễn dịch trong phòng thí nghiệm (công hiệu *in vitro*) để xác định hàm lượng kháng nguyên HBsAg có trong vắc xin.

#### **Thử nghiệm công hiệu *in vivo***

##### **Động vật thí nghiệm:**

Chuột nhắt trắng giống BALB/C hoặc ICR, khỏe mạnh và từ cùng một đàn, khoảng 5 tuần đến 6 tuần tuổi, tốt nhất là chuột cùng một giới.

##### **Xác định công hiệu tương quan:**

Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia và vắc xin mẫu thử được pha loãng bậc 2 thành 5 độ pha. Dung dịch để pha vắc xin là dung dịch natri clorid 0,9 % có chứa nhôm hydroxyd (hàm lượng nhôm hydroxyd không quá 500 µg/ml). Tiêm màng bụng 1 ml mỗi độ pha loãng vắc xin cho mỗi chuột. Mỗi độ pha loãng vắc xin tiêm ít nhất 15 chuột. Tất cả các chuột sau khi gây miễn dịch được nuôi từ 28 đến 32 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê và lấy máu tìm chuột. Các mẫu máu được ly tâm 3000 r/min ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C. Xác định hiệu giá kháng thể kháng HBsAg bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn men (ELISA) trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Kết quả được tính theo chương trình Probit Analysis (WHO).

##### **Thử nghiệm có giá trị khi:**

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất. Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn độ tinh cậy của công hiệu tương quan nằm trong khoảng 33 % đến 300 %.

##### **Tiêu chuẩn công hiệu trên thực nghiệm:**

Công hiệu tương quan (P = 95 %) không nhỏ hơn 1.

#### **Thử nghiệm công hiệu *in vitro***

Định lượng kháng nguyên HBsAg bằng kỹ thuật ELISA.

##### **Vật liệu:**

Phiến 96 giếng.

Kít Hepanostika HBsAg Uni-Form II (Biomerieux).

##### **Thuốc thử:**

BSA (bovin serum albumin).

Kháng nguyên bề mặt virus HBV, cộng hợp.

#### **Chuẩn bị dung dịch:**

Dung dịch PBS: Pha như trong phần xác định hoạt tính miễn dịch Hib.

Dung dịch đệm (BSA 0,2%, PBS, Tween 20 0,05 %): Hòa tan 0,2 g BSA trong 100 ml dung dịch PBS, thêm 0,2 ml Tween 20. Bảo quản ở 4 °C. Dung dịch này chỉ pha khi dùng và bỏ phần còn thừa sau khi dùng xong.

##### **Tiến hành:**

Pha loãng chuẩn và mẫu để có OD trong khoảng từ 0,8 đến 1,2. Chuẩn bị lặp lại 3 lần riêng rẽ độ pha này của chuẩn và mẫu.

Làm 4 loạt độ pha 1: 2.

Chuẩn bị lặp lại 3 lần chứng Maximum và chứng Minimum (Chú ý: Chứng Minimum còn được gọi là chứng âm và chính là đệm pha mẫu. Chứng Maximum là độ pha ban đầu cao hơn nồng độ của mẫu đối chiếu).

Để xác định hàm lượng HBsAg, làm theo quy trình đã hướng dẫn của bộ kit. Tất cả các dung dịch, chứng và thuốc thử, sinh vật phẩm dùng trong thử nghiệm đều phải tương thích với mẫu và phù hợp với kỹ thuật ELISA.

Tất cả các bước ử phải làm đúng theo mô tả trong quy trình.

Bố trí phiến tùy thuộc kỹ thuật viên và cỡ mẫu nhưng nên dự kiến trước.

Phân tích kết quả: Bằng chương trình Parlin, dùng "Logarit" để chuyển đổi với P = 95 %.

Tiêu chuẩn chấp thuận của thử nghiệm: Thử nghiệm được coi là có giá trị khi phân tích thống kê thỏa mãn các tiêu chuẩn về tuyến tính song song, hồi qui và có khác biệt giữa các liều.

Nếu thử nghiệm không có giá trị, phải làm lại.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Công hiệu tương quan (P = 95 %) không nhỏ hơn 0,65.

#### **Polysaccharid**

Không lớn hơn 10 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.38).

#### **Saccharid tổng số**

Xác định hàm lượng PRP tổng số bằng phương pháp orcinol (Phụ lục 15.42) hoặc phương pháp sắc ký lỏng.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Hàm lượng PRP tổng số ít nhất phải đạt 80 % của hàm lượng ghi trên nhãn.

#### **Saccharid tự do**

Xác định hàm lượng saccharid (PRP) tự do bằng phương pháp orcinol (Phụ lục 15.42) hoặc phương pháp sắc ký lỏng.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Hàm lượng saccharid (PRP) tự do không được lớn hơn 25 % (≤ 25 %).

**Xác định hoạt tính miễn dịch Hib** (Như ở mục Sản xuất kháng nguyên Hib)

Làm song song mẫu thử và mẫu chứng.

Gây nhiễm trên 5 thỏ mỗi mẫu với liều vắc xin 10 µg/0,5 ml.

Gây nhiễm ở ngày 0 và ngày 14, bằng đường tiêm dưới da màng bụng. Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 ngày ở vùng cách ly bảo vệ.

Tiến hành lấy máu sau liều tiêm đầu tiên 21 ngày. Lấy máu riêng từng con vào ống nhựa 15 ml, không ít hơn 5 ml.

Định lượng kháng thể kháng Hib bằng phương pháp ELISA.  
Tiêu chuẩn:  $\geq 50\%$  chuyển đổi huyết thanh miễn dịch.

#### Tính độc đặc hiệu

Tính độc đặc hiệu của vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib được kiểm tra trên mẫu bán thành phẩm cuối cùng hay vắc xin thành phẩm khi cần thiết (Phụ lục 15.4).

Đối với thành phần bạch hầu và uốn ván:

Chọn 5 chuột lang, có khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, tiêm dưới da một lượng vắc xin tương đương với ít nhất 5 liều đơn cho người. Theo dõi chuột hàng ngày. Vắc xin đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt uốn ván hoặc triệu chứng nhiễm độc bạch hầu và ít nhất 80% chuột sống trong thời gian 6 tuần. Nếu có chuột chết phải mổ để kiểm tra phù tạng về dấu hiệu nhiễm độc bạch hầu (tuyến thượng thận đỏ).

Đối với thành phần ho gà:

Dùng ít nhất 20 chuột nhắt trắng, trọng lượng 14 g đến 16 g, cùng giới (nếu có cả 2 giới cần phân chia đều trong các nhóm) cho mỗi mẫu vắc xin thử và nhóm chứng. Mỗi chuột được tiêm vào ổ bụng 0,5 ml dung dịch chứa tối thiểu nửa liều đơn vắc xin cho người. Nhóm chứng được tiêm 0,5 ml dung dịch tiêm natri clorid 0,9% (tốt nhất chứa cùng hàm lượng chất bảo quản như có trong dung dịch tiêm cho nhóm thí nghiệm). Tổng khối lượng các nhóm chuột được xác định vào 72 h và 7 ngày sau tiêm. Vắc xin đạt yêu cầu nếu đạt cả 3 tiêu chuẩn sau:

Sau 72 h tổng khối lượng chuột không ít hơn trước tiêm.

Sau 7 ngày khối lượng trung bình mỗi chuột không ít hơn 60% so với nhóm chứng.

Số chuột chết không quá 5% tổng số chuột đã được tiêm.

#### Kiểm định vắc xin thành phẩm

##### Nhận dạng thành phần bạch hầu - uốn ván - ho gà

Thành phần bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào trong vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm *natri citrat* ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) với nồng độ 5% ở 37 °C trong 48 h. Sau đó ly tâm 2000 r/min trong 15 min. Nước nổi được dùng để nhận dạng thành phần bạch hầu và uốn ván bằng phản ứng lên bông, cặn ly tâm dùng để nhận dạng thành phần ho gà có trong vắc xin bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính với các huyết thanh kháng ho gà đặc hiệu (Phụ lục 15.19).

**Nhận dạng thành phần Hib** (Như ở mục sản xuất kháng nguyên Hib)

Phương pháp: Phản ứng ngưng kết Latex hoặc một phản ứng hóa miễn dịch phù hợp.

Tiêu chuẩn: Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu.

##### Nhận dạng HBsAg

Nhận dạng HBsAg bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA), thấm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn quốc tế hoặc vắc xin mẫu chuẩn quốc gia.

#### Vô khuẩn

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### An toàn chung

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khỏe mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có khối lượng 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con một nửa liều tiêm cho người; tiêm vào ổ bụng 2 chuột lang có khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, mỗi con một liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml/con.

Vắc xin được coi là không có độc tính bất thường nếu tất cả các động vật thí nghiệm sống khỏe mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

#### Công hiệu

Tiến hành kiểm tra ở mẫu vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib thành phẩm khi chưa kiểm tra công hiệu trên vắc xin bán thành phẩm hoặc khi có chỉ định cần thiết (Phụ lục 15.22; 15.23; 15.24; 15.43).

#### Tính chất

##### Cảm quan:

Kiểm tra bằng mắt thường: Huyền dịch vắc xin chia thành 2 lớp, phần dung dịch phía trên trong suốt không màu hoặc vàng nhạt, lớp lắng cặn dưới đáy lọ có màu trắng xám.

Nhanh chóng tạo huyền dịch đồng nhất sau khi lắc nhẹ, không lẫn chất lạ.

##### Tính chất vật lý:

Thể tích vắc xin mỗi lọ: Giới hạn cho phép chênh lệch thể tích + 10% so với thể tích ghi trên nhãn.

Tỉ lệ loại bỏ:

Đối với vắc xin đa liều: không quá 3%.

Đối với vắc xin liều đơn: không quá 5%.

Không bị đông băng (tiêu chuẩn này chỉ kiểm tra sau khi bảo quản hay vận chuyển theo dây chuyền lạnh, không phải tiêu chuẩn xuất xưởng của nhà sản xuất): Lọ vắc xin mẫu thử phải có tốc độ lắng cặn chậm hơn nhiều so với lọ chứng dương và không có sự tạo hạt hay hình ảnh bông tuyết lơ lửng trong huyền dịch vắc xin hay kết thành cục sau khi lắc.

##### Chất bảo quản

Hàm lượng thimerosal cho phép là 0,005% đến 0,02% (Phụ lục 15.29).

##### Chất hấp phụ

Hàm lượng  $Al^{3+}$  trong vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib hấp phụ từ 0,55 mg/ml đến 0,77 mg/ml; Hàm lượng nhôm phosphat từ 2,5 mg/ml đến 3,5 mg/ml (Phụ lục 15.27).

##### pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

##### Formaldehyd tồn dư

Không được quá 0,02% (Phụ lục 15.25).

##### Bảo quản, hạn dùng

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C vắc xin có thể giữ công hiệu 2,5 năm.

Nhà sản xuất phải đưa ra khuyến cáo về điều kiện bảo quản và vận chuyển vắc xin DTPw - HeB - Hib hấp phụ để đảm bảo rằng vắc xin đạt công hiệu theo yêu cầu cho đến khi hết hạn sử dụng như đã đăng ký và ghi trên nhãn. Vắc xin DTPw - HeB - Hib hấp phụ phải được bảo quản sao cho không bị đông băng.

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận và cố định, dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin và không được quá 2,5 năm tính từ cuối thử nghiệm kiểm tra công hiệu (tính từ ngày tiêm miễn dịch trên động vật thí nghiệm).

#### **Đóng gói-**

Hộp 10 lọ tương đương 100 liều (mỗi lọ 5 ml chứa 10 liều). Lọ được đóng kín bằng nút cao su, ngoài nút cao su được đây kín bởi một nắp nhôm.

#### **Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của quy định hiện hành.

### **VẮC XIN UỐN VÁN HẤP PHỤ**

#### ***Vaccinum tetani adsorbatum***

Vắc xin uốn ván hấp phụ được điều chế từ độc tố uốn ván đã được xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để mất tính độc mà vẫn còn tính sinh miễn dịch, chứa ít nhất 1000 Lf/mg nitrogen protein và hấp phụ với một tá chất thích hợp như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd trong dung dịch muối đẳng trương. Có thể cho thêm chất bảo quản thích hợp.

#### **Sản xuất**

Sản xuất vắc xin phải dựa trên hệ thống chủng. Chủng *Clostridium tetani* được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những mẻ nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và nhiệt độ rồi tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Số lượng Lf trong vắc xin bán thành phẩm không vượt quá 25 Lf trong một liều đơn cho người nếu sử dụng nhiều hơn một liều cho miễn dịch cơ bản.

Hàm lượng chất bảo quản phải không gây hại đến giải độc tố và không gây ra những phản ứng ở người.

#### **Giải độc tố tinh chế bán thành phẩm**

Chủng sản xuất *Clostridium tetani* phải có độc tính cao, biết rõ về nguồn gốc và lịch sử chủng. Thu độc tố uốn ván trong môi trường nuôi cấy ở điều kiện vô trùng. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông để giám sát tính ổn định trong sản xuất. Giải độc tố uốn ván được tinh chế để loại bỏ các thành phần có thể gây các phản ứng phụ cho người. Độc tố sau khi tinh chế sẽ được bất hoạt bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp sao cho không ảnh hưởng đến khả năng sinh miễn dịch của giải

độc tố và không bị hồi độc. Tuy nhiên, có thể lựa chọn quy trình tinh chế sau khi giải độc.

Chỉ có những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

#### **Vô khuẩn**

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).

#### **Tính độc đặc hiệu và tính hồi độc**

**Kiểm tra tính độc đặc hiệu:** Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế có chứa 500 Lf/ml/con cho 5 chuột lang khoẻ mạnh (250 - 350) g/con chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Theo dõi và kiểm tra trọng lượng chuột, các dấu hiệu liệt do uốn ván hàng tuần trong vòng 3 tuần. Những chuột chết phải được mô kiểm tra. Giải độc tố uốn ván tinh chế đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu khi không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt do uốn ván hay bất kỳ triệu chứng uốn ván nào trong 3 tuần theo dõi và có ít nhất 80 % chuột sống sót trong giai đoạn thử nghiệm.

**Kiểm tra tính hồi độc của giải độc tố uốn ván:**

Giải độc tố uốn ván tinh chế phải được kiểm tra để đảm bảo không bị hồi độc. Sử dụng dung dịch đệm giống như dung dịch pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nhưng không có chất hấp phụ để pha mẫu giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm thành huyền dịch chứa 12,5 Lf/ml. Chia thành 2 mẫu thử, trong đó một mẫu ủ ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  trong 6 tuần và mẫu kia ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 6 tuần. Tiêm dưới da 5 ml/con, mỗi mẫu tiêm cho 5 chuột lang khoẻ mạnh cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi cả 2 nhóm chuột đều khoẻ mạnh, không có chuột lang nào có dấu hiệu uốn ván trong 3 tuần theo dõi.

#### **Độ tinh sạch của kháng nguyên uốn ván**

Giải độc tố uốn ván tinh chế phải được kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bằng cách kiểm tra hàm lượng kháng nguyên (Lf/mg nitrogen protein). Giá trị Lf được kiểm tra bằng cách so sánh với mẫu chuẩn đã được hiệu chuẩn bởi giải độc tố uốn ván mẫu chuẩn quốc tế dành cho thử nghiệm lên bông hoặc mẫu chuẩn quốc gia tương đương. Giải độc tố uốn ván tinh chế đạt yêu cầu khi chứa không được ít hơn 1000 Lf/mg nitrogen protein.

#### **Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được pha chế từ giải độc tố uốn ván tinh chế, cho thêm nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd với hàm lượng thích hợp. Có thể cho thêm chất kháng khuẩn thích hợp. Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được phép tiếp tục sản xuất thành vắc xin thành phẩm.

#### **Chất bảo quản**

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất kháng khuẩn trong vắc xin

bán thành phẩm phải đạt ít nhất là 85 % và không được quá 115 % so với lượng dự kiến cho vào (Phụ lục 15.29).

#### **Vô khuẩn**

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của vắc xin bán thành phẩm cuối cùng với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra. Không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

##### **Nhận dạng**

Thực hiện ít nhất trên một lọ vắc xin đã được dán nhãn. Nhận dạng giải độc tố uốn ván bằng thử nghiệm lên bông như mô tả trong Phụ lục 15.19.

##### **Vô khuẩn**

Vắc xin không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

##### **Công hiệu**

Thực hiện theo Phụ lục 15.23.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Công hiệu của vắc xin uốn ván đơn hấp phụ được coi là đạt yêu cầu khi không thấp hơn 40 IU đối với một liều đơn dùng cho người. Đối với các thử nghiệm sử dụng 3 độ pha loãng, giới hạn khoảng tin cậy 95 %, công hiệu phải nằm trong khoảng 50 % đến 200 % của công hiệu tiêu chuẩn.

##### **An toàn chung**

Phụ lục 15.11.

##### **Chất bảo quản**

Hàm lượng chất bảo quản thimerosal không ít hơn 85 % hoặc không nhiều hơn 115 % lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

##### **Hàm lượng chất hấp phụ**

Không quá 1,25 mg nhôm trong một liều đơn vắc xin cho người (Phụ lục 15.27).

##### **pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

##### **Cảm quan**

Mỗi loạt vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

##### **Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Khi bảo quản ở điều kiện quy định vắc xin có thể giữ được công hiệu 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu.

##### **Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

## **VẮC XIN BẠI LIỆT BẤT HOẠT (IPV)**

### ***Vaccinum poliomyelitis inactivatum***

Vắc xin bại liệt bất hoạt là một hỗn dịch vô khuẩn của virus bại liệt týp 1, týp 2 và týp 3 phát triển trên nuôi cấy tế bào, được cô đặc, tinh khiết, bất hoạt và dùng để gây miễn dịch chủ động, đặc hiệu cho người, phòng bệnh bại liệt do virus Polio gây nên.

#### **Sản xuất**

##### **Chủng sản xuất:**

Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng giống gốc (Master seed) của virus hoang dại hoặc virus giảm độc lực được cấy truyền không quá 2 lần bằng phương pháp đã được phê chuẩn của Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB). Chủng được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C).

##### **Tế bào sản xuất:**

Tế bào sử dụng cho sản xuất: Tế bào thận khỉ tiên phát hoặc tế bào Vero.

Tế bào sử dụng cho sản xuất phải đạt các yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới. Có thể sử dụng huyết thanh động vật trong nuôi cấy tế bào.

##### **Khi dùng cho sản xuất:**

Phải đạt các tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới và NICVB đưa ra.

##### **Qui trình sản xuất và kiểm định sản xuất:**

Qui trình sản xuất vắc xin phải theo các quy trình của Tổ chức Y tế Thế giới. Chủng virus được nhân lên trên tế bào thận khỉ tiên phát hoặc tế bào Vero và sử dụng môi trường thích hợp cho virus phát triển. Sau khi gặt, hỗn dịch virus được đông tan 3 lần, ly tâm bỏ cặn, lọc vô trùng, sau đó đưa vào qui trình cô đặc và tinh khiết kháng nguyên; bước tiếp theo là qui trình bất hoạt virus bằng formaldehyd và trung hòa formaldehyd. Sau cùng, hỗn dịch virus được chế thành vắc xin bất hoạt, tam liên. Phải thực hiện kiểm định trong suốt quá trình sản xuất ở các công đoạn: Vật liệu nguồn (tế bào, môi trường nuôi cấy,...), mẻ gặt đơn, bán thành phẩm sau khi siêu ly tâm, trước khi bất hoạt, sau khi bất hoạt,... nhằm kiểm tra tác nhân ngoại lai, xác định hiệu giá vắc xin trước khi bất hoạt, xác định kháng nguyên D, xác định độ tinh khiết của virus, xác định độ sống tồn dư của virus sau khi bất hoạt.

Chế phẩm phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin và chỉ được phép sử dụng sau khi đạt các yêu cầu sản xuất và kiểm định trong quá trình sản xuất, đồng thời đạt các tiêu chuẩn kiểm định ở phần kiểm định vắc xin thành phẩm.

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

##### **Cảm quan**

Vắc xin bại liệt bất hoạt là một dung dịch lỏng.

##### **Nhận dạng**

Được tiến hành ít nhất đối với 1 lọ vắc xin. Thử nghiệm kiểm tra hiệu giá xác định hàm lượng D-antigen được chấp nhận cho thử nghiệm nhận dạng.



**Vô khuẩn**

Vắc xin bại liệt bất hoạt phải vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**An toàn chung**

Vắc xin bại liệt bất hoạt phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**Công hiệu**

Xác định nồng độ kháng nguyên D của vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng hoang dại: 40 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 8 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3. Với vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng Sabin không có tá dược: 30 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 100 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 2; 100 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3. Với vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng Sabin có tá dược hydroxyd nhôm: 3 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 10 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 2; 10 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3.

Chấp nhận theo các đơn vị đăng ký của nhà sản xuất nếu chứng minh đảm bảo liều sử dụng có hiệu quả.

**Protein toàn phần:** Dưới 50 µg protein trên 1 liều sử dụng (Phụ lục 15.34).

**Nội độc tố vi khuẩn:** Không được quá 0,25 EU/ml.

**Formaldehyd tồn dư:** Không được quá 0,12 mg/ml (Phụ lục 15.25).

**pH**

6,8 - 8,5 (Phụ lục 15.33).

**Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin bại liệt bất hoạt được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C, tránh ánh sáng và không được đông băng.

Trong điều kiện bảo quản như trên, vắc xin bại liệt bất hoạt có hạn dùng là 12 tháng kể từ ngày kiểm tra công hiệu lần cuối cùng.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**Liều tiêm, đường tiêm**

Tiêm dưới da, sử dụng 0,5 ml/liều.

**VẮC XIN BẠI LIỆT UỐNG*****Vaccinum poliomyelitidis perorale***

Vắc xin bại liệt uống là vắc xin được sản xuất từ các chủng virus bại liệt sống, giảm độc lực (Chủng Sabin) týp 1, týp 2 và týp 3 phát triển trên tế bào nuôi thích hợp và dùng để gây miễn dịch chủ động. đặc hiệu cho người, phòng bệnh bại liệt do virus Polio gây nên. Vắc xin có thể chứa 1, hoặc 2, hoặc 3 týp virus. Vắc xin bại liệt uống là một dịch lỏng trong, màu hồng.

**Sản xuất****Chủng sản xuất**

Sản xuất phải dựa trên hệ thống chủng giống. Chủng sản xuất không được cấy truyền quá 1 lần từ chủng gốc (master seed) nếu không có qui định khác và phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng phải được bảo quản ở nhiệt độ dưới -60 °C.

**Khi và tế bào sản xuất**

Khi và tế bào dùng để sản xuất vắc xin phải đạt các yêu cầu quy định của Tổ chức Y tế Thế giới. Có thể sử dụng huyết thanh động vật trong môi trường nuôi cấy tế bào, nhưng trong môi trường để duy trì tế bào khi nhân virus không được có protein. Có thể có độ phenol và các kháng sinh phù hợp ở nồng độ cho phép trong môi trường nuôi cấy tế bào.

**Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất**

Quy trình sản xuất phải đạt tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới. Phải thực hiện các thử nghiệm kiểm định trong quá trình sản xuất ở các công đoạn: Vật liệu nguồn (khi, tế bào, môi trường nuôi cấy...); mẻ gặt đơn, bán thành phẩm trước lọc, bán thành phẩm sau lọc, vắc xin thành phẩm. Chế phẩm phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin dùng cho người và chỉ được cho phép sử dụng sau khi đạt được các yêu cầu sản xuất và kiểm định trong quá trình sản xuất, đồng thời đạt các tiêu chuẩn kiểm định ở mục dưới đây.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm****Cảm quan**

Mỗi loại vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

**Nhận dạng**

Khi được trung hòa với kháng huyết thanh bại liệt đặc hiệu, virus không có khả năng gây nhiễm tế bào cảm thụ.

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn. Không nhiễm vi khuẩn, nấm (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu**

Chuẩn độ hiệu giá bằng cách gây nhiễm virus trên tế bào cảm thụ.

**Tiêu chuẩn đánh giá:** Hiệu giá của vắc xin trong một liều uống (0,1 ml) phải đạt không ít hơn:

$10^{6,0}$  CCID<sub>50</sub> đối với týp 1.

$10^{5,0}$  CCID<sub>50</sub> đối với týp 2.

$10^{5,5}$  CCID<sub>50</sub> đối với týp 3.

Phương pháp tiến hành theo Phụ lục 15.21.

**Tính bền vững nhiệt**

Hiệu giá của vắc xin để ở 37 °C sau 48 h chỉ được phép giảm trong vòng 0,5 log<sub>10</sub> so với hiệu giá của vắc xin để ở nhiệt độ bảo quản.

**Tính chất vật lý, hóa học**

Phải đạt tiêu chuẩn quy định của Tổ chức Y tế Thế giới.

**Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin bại liệt uống phải được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C. Sau khi tan băng 1 lần, có thể bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C và dùng trong vòng 6 tháng. Tránh ánh sáng và tránh bị đông tan nhiều lần.

Hạn dùng không được quá 2 năm khi bảo quản liên tục ở -20 °C.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**VẮC XIN BCG*****Vaccinum BCG cryodessicatum***

Vắc xin BCG đông khô là chế phẩm vi khuẩn "*Calmette*" và "*Guerin*" sống dùng để tiêm trong da phòng bệnh lao. Vắc xin được sản xuất ở dạng đông khô và hoàn nguyên ngay trước khi dùng với dung dịch hồi chính thích hợp.

**Sản xuất**

Vắc xin BCG được sản xuất từ hệ thống chủng giống. Chủng được lựa chọn và bảo quản ổn định. Phương pháp sản xuất phải cho sản lượng vắc xin BCG ổn định và có khả năng gây miễn cảm đối với tuberculin cho người và bảo vệ được động vật thí nghiệm chống lại bệnh lao. Chủng sản xuất phải an toàn đối với người và động vật thí nghiệm. Vắc xin BCG được sản xuất tại Việt Nam từ chủng BCG 1173P2 - Pasteur Paris.

Chủng được nuôi trong môi trường Sauton - khoai tây, sau đó cấy chuyển sang môi trường Sauton lỏng. Sau khi gặt, vi khuẩn BCG được chế thành hỗn dịch vắc xin thuần nhất và đông khô.

Vắc xin được điều chế từ canh thang phải được tách biệt khỏi chủng gốc ban đầu bằng những lần cấy chuyển và không được cấy chuyển quá 8 lần.

**Chủng sản xuất**

Chủng gốc phải được thiết lập và duy trì để đảm bảo tính ổn định, có khả năng gây miễn cảm đối với tuberculin cho người và chuột lang, không gây bệnh cho người và động vật thí nghiệm.

Vắc xin BCG phải được bảo quản tránh ánh sáng mặt trời: Toàn bộ quy trình sản xuất phải được thiết kế sao cho từ nuôi cấy sản xuất vắc xin đến kiểm định, bảo quản đều không tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, tia cực tím.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng****Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Phát hiện *Mycobacteria* gây bệnh**

Chỉ được dùng những mẫu vắc xin BCG bán thành phẩm cuối cùng cho thử nghiệm này khi bảo quản ở 4 °C không quá 72 h sau khi gặt.

Thử nghiệm này thường được tiến hành trên mẫu bán thành phẩm và mẫu vắc xin BCG thành phẩm nếu cần thiết (Phụ lục 15.9).

**Đậm độ vi khuẩn BCG**

Có thể đo trực tiếp đậm độ vi khuẩn BCG trong huyền dịch vắc xin BCG bán thành phẩm cuối cùng bằng cách cân trọng lượng khô hoặc gián tiếp bằng cách đo mật độ quang hay độ đục của huyền dịch vi khuẩn đã được hiệu chuẩn tương ứng với trọng lượng khô.

**Độ sống:** Phụ lục 15.1.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Hình dạng bên ngoài và tốc độ tạo huyền dịch:** Bột trắng, khô, bong, không teo; nhanh chóng tạo thành huyền dịch đồng nhất sau không quá 1 min hoàn nguyên với nước muối sinh lý.

**Mật độ quang**

Không quá 0,5. Đo bằng quang phổ kế ở bước sóng 490 nm, lọc màu xanh lá cây (Phụ lục 4.1).

**Độ phân tán**

Phụ lục 15.3.

**Độ chân không**

Phụ lục 15.2.

**Độ ẩm tồn dư**

Không quá 3 % (Phụ lục 15.35).

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Nhận dạng**

Nhận dạng BCG qua kính hiển vi để khẳng định tính kháng acid của vi khuẩn và quan sát hình thái khuẩn lạc trên môi trường đặc.

**An toàn chung**

Thử nghiệm an toàn chung cho vắc xin BCG chỉ tiến hành trên chuột nhắt trắng: 5 chuột nhắt trắng cân nặng mỗi chuột từ 17 g đến 22 g. Tiêm dưới da 1 mg vắc xin BCG/1 ml cho mỗi chuột. Theo dõi và cân xác định khối lượng từng chuột trong 7 ngày. Nếu trong thời gian 7 ngày theo dõi có bất kỳ chuột nào bị giảm cân hoặc chết phải nhắc lại thí nghiệm lần 2 với số lượng chuột và mẫu gấp đôi.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Sau 7 ngày theo dõi, cả 5 chuột phải đều khoẻ mạnh, lên cân, không có biểu hiện bệnh lý.

**An toàn đặc hiệu (Phát hiện *Mycobacteria* gây bệnh)**

Thử nghiệm này thường được tiến hành trên mẫu bán thành phẩm và mẫu vắc xin BCG thành phẩm nếu cần thiết (Phụ lục 15.9).

**Kiểm tra phản ứng da**

Tiêm trong da cho ít nhất 4 chuột lang cùng giới (nếu là chuột cái thì không có thai), có phản ứng âm tính với tuberculin, cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 400 g. Tiêm cho mỗi chuột 0,1 ml vắc xin của từng đậm độ pha loãng 1/1; 1/10; 1/100 (của vắc xin thử và vắc xin mẫu chuẩn).



Theo dõi thương tồn tại chỗ tiêm hàng tuần, trong 4 tuần. Sau 4 tuần, kiểm tra phản ứng tuberculin bằng cách tiêm trong da 5 TU/0,1 ml/chuột. Đọc kết quả phản ứng sau 24 h.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Phản ứng da đối với vắc xin thử và vắc xin mẫu chuẩn phải không có sự khác biệt đáng kể.

#### **Kiểm tra độ sống**

Xác định độ sống trong vắc xin đã hoàn nguyên bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường Lowenstein-Jensen. Số lượng đơn vị sống (đvs) phải nằm trong khoảng  $1.10^6$  đến  $6.10^6$  đvs/mg BCG (Phụ lục 15.1).

#### **Tính ổn định nhiệt**

Số đơn vị sống của vắc xin BCG sau khi ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 28 ngày phải đạt ít nhất là 20 % so với ủ ở  $4^\circ\text{C}$  trong 28 ngày (Phụ lục 15.1).

#### **Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin BCG đông khô phải bảo quản trong điều kiện nhiệt độ  $2^\circ\text{C}$  đến  $8^\circ\text{C}$  và tránh ánh sáng mặt trời, hạn dùng ít nhất 24 tháng. Sau khi hoàn nguyên vắc xin phải được bảo quản tránh ánh sáng mặt trời ở điều kiện nhiệt độ  $2^\circ\text{C}$  đến  $8^\circ\text{C}$  và chỉ được sử dụng trong khoảng thời gian tối đa là 4 h.

#### **Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

### **VẮC XIN CÚM BẮT HOẠT**

#### ***Vaccinum influenzae inactivatum***

Vắc xin cúm bắt hoạt là một hỗn dịch trong suốt, vô khuẩn chứa một hoặc nhiều chủng virus cúm, typ A hoặc B hoặc hỗn hợp cả hai, đã được bắt hoạt bằng các phương pháp phù hợp.

Vắc xin cúm có thể ở 4 dạng:

- là hỗn dịch các hạt virus hoàn chỉnh được bắt hoạt theo phương pháp thích hợp.
- là hỗn dịch đã được xử lý bằng phương pháp hoá lý sao cho các hạt virus được phân rã hoàn toàn hoặc một phần.
- là hỗn dịch đã được xử lý sao cho chỉ còn chứa phần lớn các kháng nguyên haemagglutinin (HA) và neuraminidase (vắc xin tiểu đơn vị).
- là hỗn dịch của các hạt virus cúm bắt hoạt, các hạt virus đã phân rã hoặc các thành phần tiểu đơn vị với tá chất.

Sản phẩm phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây:

#### **Sản xuất**

##### ***Chủng sản xuất***

Theo khuyến cáo hàng năm của Tổ chức Y tế Thế giới và phê chuẩn của cơ quan kiểm định quốc gia. Hiện nay, người ta thường sử dụng những chủng cho sản lượng cao đối với kháng nguyên bề mặt. Nguồn gốc chủng virus và lịch sử cây chuyển chủng virus phải do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

##### ***Trứng cho sản xuất***

Nếu vắc xin được sản xuất trên trứng có phôi thì trứng phải được chọn từ những đàn gà khoẻ mạnh, không có bệnh lý và được giám sát bằng các phương pháp do các cơ quan có thẩm quyền về sức khoẻ động vật phê chuẩn.

##### ***Tế bào sản xuất***

Dòng tế bào dùng cho sản xuất vắc xin cúm phải dựa trên hệ thống ngân hàng tế bào phù hợp và được phép dùng cho việc sản xuất các chế phẩm sinh học dùng cho người. Cơ quan kiểm định quốc gia phải phê chuẩn ngân hàng tế bào gốc và thiết lập số lượng tối đa số đời cấy chuyển.

##### ***Môi trường nuôi cấy tế bào***

Huyết thanh sử dụng cho nuôi cấy tế bào phải không nhiễm vi khuẩn, nấm, *Mycoplasma* và các virus khác.

Penicilin và các beta-lactam khác không được sử dụng trong bất cứ giai đoạn sản xuất nào.

Các kháng sinh khác có thể được sử dụng nhưng phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận.

##### ***Các mẻ gặt đơn***

Đối với vắc xin sản xuất trên trứng, virus của mỗi chủng phải được phát triển trên khoang niệu của trứng gà có phôi khoẻ mạnh. Sau khi ủ ở nhiệt độ thích hợp, tiến hành gặt dịch niệu. Đối với vắc xin sản xuất từ tế bào động vật có vú, virus của mỗi chủng phải được phát triển trên những dòng tế bào đã được phê chuẩn cho sản xuất vắc xin.

Các mẻ gặt đơn của cùng một chủng virus được hỗn lại để tạo thành mẻ hỗn dịch virus đơn giá. Hỗn dịch virus đơn giá từ tế bào không được hỗn lẫn với hỗn dịch virus đơn giá từ trứng.

##### ***Độ tinh khiết của vắc xin sản xuất từ tế bào***

Để theo dõi sự ổn định về độ tinh khiết, các mẻ hỗn dịch đơn giá thu hoạch từ tế bào động vật có vú phải được kiểm tra tỷ lệ giữa hàm lượng HA và protein toàn phần. Tỷ lệ này phải nằm trong giới hạn do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

Đối với virus phát triển trên tế bào thường trực, mẻ hỗn dịch đơn giá phải được kiểm tra ADN tồn dư. Hàm lượng ADN phải nhỏ hơn 10 ng/liều ở người.

Thử nghiệm này có thể bỏ qua với sự phê chuẩn của cơ quan kiểm định quốc gia nếu quá trình sản xuất đã được thẩm định là đạt và duy trì được tiêu chuẩn này.

##### ***Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng***

Bán thành phẩm được sản xuất bằng cách trộn và pha loãng mẻ hỗn dịch đơn giá của mỗi chủng virus. Chỉ những chất bảo quản, tá chất hoặc dung dịch được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn mới được cho vào bán thành phẩm. Những chất này phải đảm bảo không ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của sản phẩm.

Vắc xin sản xuất cho đại dịch chỉ nên chứa 1 chủng virus.

##### ***Công hiệu***

Thử nghiệm này có thể bỏ qua nếu đã được tiến hành trên mỗi lô thành phẩm cuối cùng.

Nhận dạng và xác định hàm lượng kháng nguyên HA trong vắc xin cúm bằng kỹ thuật khuếch tán miễn dịch đơn (SRD, SRID).

*Nguyên lý:*

Kháng nguyên cúm khuếch tán trong thạch chứa kháng thể tương ứng, ở vùng có nồng độ kháng nguyên - kháng thể phù hợp, hình thành vòng kết tủa. Độ lớn của vòng này tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng nguyên. Căn cứ vào độ lớn của vòng kháng nguyên chuẩn được làm đồng thời, tính ra nồng độ kháng nguyên mẫu thử.

Mẫu thử nghiệm và kháng nguyên chuẩn được xử lý bằng dung dịch tẩy thích hợp, sau đó được pha loãng với PBS ở những độ pha thích hợp. Lượng mẫu và kháng nguyên chuẩn được thêm vào các giếng của tấm thạch đã chứa một lượng kháng thể thích hợp. Giữ tấm thạch này trong tủ mát ở nhiệt độ 20 °C ít nhất 18 h. Kháng nguyên khuếch tán ra xung quanh và kết hợp với kháng thể, tạo nên vùng kết tủa hình tròn. Nhuộm và đo đường kính của các vòng tròn này, so sánh với vòng đo kháng nguyên chuẩn tạo ra để tính kết quả.

*Tiến hành:*

Chuẩn bị khuôn thạch SRD: Một khuôn thạch sẽ sử dụng 13 ml thạch. Làm tan chảy đủ lượng thạch bằng lò vi sóng. Sau đó để ở 60 °C trong 15 min.

Chuẩn bị tấm kính thủy tinh, viết mã hoá lên góc trái của tấm kính. Lau bề mặt kính bằng thạch nóng chảy. Đặt khuôn lên trên tấm kính. Hàn kín cạnh bên trong khuôn thạch bằng thạch nóng chảy và để trong 5 min.

Cho một lượng kháng thể chuẩn nhất định vào thạch ở trên rồi đổ vào khuôn.

Để ở nhiệt độ phòng 30 min, sau đó tiến hành đục lỗ (đường kính 4 mm).

*Chuẩn bị kháng nguyên:*

Kháng nguyên chuẩn đông khô được hồi chính với 1 ml nước cất và để trong 5 min trước khi sử dụng.

Pha loãng kháng nguyên chuẩn với PBS (-) để đạt nồng độ cuối cùng 30 µg HA/ml theo hướng dẫn sử dụng.

Trộn lẫn 450 µl kháng nguyên chuẩn và vắc xin thử với 50 µl Zwittergent 10 % và để trong hộp âm trong 30 min ở nhiệt độ phòng.

Ví dụ, có thể pha loãng các độ pha bằng PBS (-) theo Bảng 1 dưới đây:

*Bảng 1: Các độ pha loãng bằng PBS (-)*

Nồng độ pha loãng	Thể tích (µl)	
	Kháng nguyên đã xử lý bằng Zwittergent	PBS (-)
1,0	200	0
0,75	150	50
0,5	100	100
0,25	50	150

*Kháng nguyên thử nghiệm và điều kiện ủ:*

Nhỏ 20 µl mỗi nồng độ kháng nguyên vào các giếng tương ứng.

Đặt các tấm kính trong hộp làm âm và ủ trong tủ ở nhiệt độ 20 °C ít nhất là 18 h.

*Xử lý tấm kính:*

Rửa tấm thạch (gel) dưới vòi nước, đặt các tấm giấy lọc cẩn thận trên bề mặt gel để loại bỏ tất cả các bọt.

Ép các gel này trong 30 min bằng tấm kính có khối lượng 600 g.

Làm khô gel trong tủ âm 37 °C.

Nhuộm gel bằng dung dịch coomasie blue.

Tẩy màu gel bằng dung dịch tẩy màu và làm khô.

Đo đường kính vòng tròn khuếch tán theo hai hướng vuông góc nhau và tính kết quả bằng phần mềm Paraneil chuyên dụng ("Bioassay Assit" hoặc phần mềm EDQM Combistats...). Trước hết, phải đánh giá thử nghiệm SRD phải có giá trị hay không dựa vào phân tích thống kê. Nếu thử nghiệm có giá trị thì hàm lượng HA của vắc xin được tính toán bằng cách so sánh số liệu với kháng nguyên mẫu chuẩn.

*Đánh giá kết quả:* Công hiệu của mỗi loại virus trong mẫu thử nghiệm không được thấp hơn 15 µg HA/liều.

Điều kiện để thí nghiệm có giá trị tin cậy:

Vòng kết tủa đều và rõ.

Đường kính vòng tròn kết tủa trong khoảng từ 5,0 mm đến 14 mm nếu đo bằng thước đo với mắt thường.

Khoảng dao động từ 80 % đến 120 %.

*Vô khuẩn*

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nếu chất bảo quản được thêm vào vắc xin, phải tiến hành bằng phương pháp thích hợp để ngăn chặn sự gây nhiễu đối với thử nghiệm vô khuẩn.

*Hàm lượng protein toàn phần*

Hàm lượng protein toàn phần phải không vượt quá 6 lần tổng hàm lượng HA của các chủng virus trong vắc xin. Tuy nhiên, trong bất cứ trường hợp nào cũng không được vượt quá 100 µg protein/1 chủng virus/1 liều đơn ở người và không nhiều hơn 300 µg protein/tổng số chủng virus/1 liều đơn ở người (Phụ lục 15.34).

*Ovalbumin*

Hàm lượng ovalbumin phải không vượt quá 1 µg/liều ở người. Hàm lượng ovalbumin phải được xác định bằng phương pháp thích hợp. Có thể định lượng ovalbumin dựa trên nguyên tắc của ELISA "cặp chẵn". Kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin được cố định trên phiến, mẫu thử và cộng hợp được ủ trên phiến trong cùng một thời gian. Phản ứng hiện màu khi thêm cơ chất có chứa TMB và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dừng phản ứng khi thêm acid sulfuric. Đọc phản ứng trên máy đo màu.

*Chế phẩm chuẩn:* Bộ kit Ovalbumin (Serazym).

*Mẫu thử:* Vắc xin cúm 2 ml/mẫu.

*Tiến hành:*

Bộ kit Serazym Ovalbumin ELISA sử dụng được trong vòng 2 tháng sau khi mở, bảo quản ở 4 °C đến 8 °C. Để bộ kit ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Pha loãng mẫu sao cho lượng ovalbumin nằm từ 1 ng/ml đến 20 ng/ml.

Cho 200 µl chất chuẩn, mẫu thử pha loãng vào mỗi giếng.

Cho 100 µl cộng hợp HRT vào mỗi giếng, trộn đều.  
Ủ ở nhiệt độ phòng 60 min.

Loại bỏ hết dung dịch trong các giếng.

Cho 300 µl dung dịch rửa vào tất cả các giếng, để 5 s rồi đổ hết dung dịch trong giếng, thực hiện lặp lại bước này 4 lần.

Cho 100 µl cơ chất vào tất cả các giếng, để ở nhiệt độ phòng 15 min.

Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào tất cả các giếng và đọc kết quả bằng máy ELISA ở bước sóng 450 nm.

Tính kết quả bằng phần mềm "Calculation ovalbumin".

*Điều kiện để phản ứng có ý nghĩa:*

Mẫu chuẩn 1 (20 ng/ml) có OD  $\geq 1,50$ .

Mẫu chuẩn 6 (0,625 ng/ml) có OD  $\leq 0,50$ .

Mẫu chuẩn có hệ số tương quan không được nhỏ hơn 0,99 ( $\geq 0,99$ ).

Giới hạn phương pháp: Nồng độ ovalbumin trong khoảng từ 5,0 - 10,0 ng/ml.

Giá trị OD của mẫu pha loãng nên nằm trong giới hạn của mẫu chuẩn (từ 0,625 ng/ml đến 20 ng/ml).

CV của tất cả các mẫu pha loãng không được quá 15 % ( $\leq 15$  %).

#### **Hàm lượng tá chất**

Nếu một tá chất được thêm vào vắc xin thì hàm lượng của nó phải được xác định bằng phương pháp do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn. Hàm lượng tá chất phải vừa đủ để đảm bảo hiệu lực lâm sàng cao nhất của sản phẩm. Công thức tá chất và kháng nguyên phải hằng định và ổn định trong suốt quá trình sản xuất.

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

##### **Nhận dạng**

Kiểm tra nhận dạng được thực hiện trên ít nhất 1 lọ thành phẩm từ mỗi lô thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp thích hợp do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn. Dùng kỹ thuật khuếch tán miễn dịch đơn (SRD, SRID) như sau:  
*Nguyên lý:* Một lượng mẫu thử nhất định (kháng nguyên) được thêm vào các giếng của tấm thạch SRD (đã có một lượng kháng thể cúm phù hợp). Sự hình thành vòng tròn khuếch tán đặc hiệu trong thạch cho phép nhận dạng kháng nguyên cúm tương ứng.

*Tiến hành:* Giống như thử nghiệm SRD được trình bày tại phần Công hiệu của mục Kiểm định vắc xin bán thành phẩm.

##### **Đánh giá kết quả:**

Vắc xin đạt yêu cầu nhận dạng nếu kết quả thử nghiệm có vòng tròn kết tủa.

Nếu lần thử nghiệm thứ nhất không đạt, phải làm lại lần thử hai.

Nếu lần thử nghiệm thứ 2 vẫn không thấy vòng tròn khuếch tán thì loạt vắc xin không đạt yêu cầu.

Nhận dạng kháng nguyên ngưng kết hồng cầu trong vắc xin được xác định bằng phương pháp miễn dịch như khuếch tán miễn dịch, ức chế kháng nguyên, hoặc sử dụng huyết thanh miễn dịch đặc hiệu tương ứng.

#### **Công hiệu**

Hàm lượng kháng nguyên HA được xác định theo kỹ thuật khuếch tán miễn dịch đơn như đã trình bày ở mục Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Vắc xin nên chứa ít nhất 15 µg HA/liều/mỗi chủng sản xuất.

Đối với vắc xin đại dịch, có thể chứa những hàm lượng HA khác do Tổ chức y tế thế giới khuyến cáo.

#### **An toàn chung**

Theo Phụ lục 15.11.

Tiêm vắc xin cúm với 1 liều tiêm cho người vào ổ bụng cho mỗi con trong số 5 chuột nhắt trắng khoẻ mạnh, khối lượng 17 g/con đến 22 g/con và chưa sử dụng cho bất cứ mục đích gì trước đó; tiêm 10 liều tiêm cho người vào ổ bụng cho mỗi trong số 2 chuột lang khoẻ mạnh, khối lượng 250 g/con đến 350 g/con và chưa sử dụng cho bất cứ mục đích gì trước đó.

Vắc xin đạt tinh an toàn chung, không có độc tính bất thường nếu toàn bộ chuột thử nghiệm đều khoẻ mạnh, lên cân và không có biểu hiện nhiễm độc trong 7 ngày theo dõi liên tục.

#### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### **Protein toàn phần**

Hàm lượng protein toàn phần phải không vượt quá 6 lần tổng hàm lượng HA của các chủng virus trong vắc xin. Tuy nhiên trong bất cứ trường hợp nào cũng không được vượt quá 100 µg protein/1 chủng virus/1 liều ở người và không nhiều hơn tổng số 300 µg protein/tất cả các chủng virus/1 liều ở người (Phụ lục 15.34).

#### **Nội độc tố vi khuẩn**

Không được quá 100 EU/liều ở người.

Hàm lượng nội độc tố phải được xác định bằng phương pháp thích hợp (Phụ lục 13.2).

Hàm lượng nội độc tố ở vắc xin sản xuất từ tế bào cho phép thấp hơn sản xuất từ trứng.

#### **Yêu cầu:**

Độ nhạy của chứng dương nằm trong khoảng từ 1/2 đến gấp đôi, thử nghiệm có giá trị.

Nếu độ nhạy của lysate ghi trên nhãn là 0,125 EU/ml thì độ nhạy thực tế của thí nghiệm có thể từ 0,06 - 0,25 EU/ml.

Nếu hiện tượng đông gel của lysate không rõ ràng, phải làm lại thử nghiệm.

#### **Formaldehyd**

Không được quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

#### **Chất bảo quản**

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hoá học thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin không thấp hơn hàm lượng tối thiểu có hiệu lực và không lớn hơn 115 % hàm lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

#### **Cảm quan**

Mỗi loạt vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước

khí xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường như: Có vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút không chặt và/hoặc không đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ vắc xin nào không đạt yêu cầu phải được loại bỏ.

#### **Đóng gói và bảo quản**

Vắc xin cúm bất hoạt được đóng trong lọ thủy tinh trung tính 0,5 ml/lọ hoặc 0,25 ml/lọ và phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Nếu sử dụng trong điều kiện bảo quản khác thì điều kiện bảo quản này phải được thẩm định đầy đủ và được phê chuẩn bởi cơ quan kiểm định quốc gia.

#### **Hạn dùng**

Hạn sử dụng phải được phê chuẩn bởi Cơ quan kiểm định quốc gia. Nói chung hạn sử dụng không vượt quá 1 năm tính từ ngày sản xuất, bởi vì các chủng virus có thể không phù hợp cho năm sau.

#### **Chỉ định, liều dùng**

Tiêm dưới da. Thường là vùng cơ delta.

Liều tiêm: Từ 6 tháng đến 35 tháng tuổi tiêm 0,25 ml/liều; trên 36 tháng tuổi tiêm 0,5 ml/liều.

#### **Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng theo các yêu cầu của quy định hiện hành. Cụ thể như sau:

Vắc xin được sản xuất từ virus phát triển trên phôi trứng gà hay tế bào động vật có vú;

Chủng virus cúm dùng để sản xuất.

Hàm lượng HA tính theo µg/chủng virus/liều ở người;

Tên và hàm lượng tối đa của bất cứ kháng sinh nào có mặt trong vắc xin;

Nhiệt độ khuyến cáo cho quá trình bảo quản và vận chuyển vắc xin;

Hạn sử dụng;

Chỉ rõ các liều đặc biệt (ví dụ: 2 liều) đối với vắc xin đại dịch.

### **VẮC XIN ĐẠI TẾ BÀO DỪNG CHO NGƯỜI**

#### ***Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum***

Vắc xin đại tế bào dùng cho người là một chế phẩm đông khô hoặc dạng lỏng được sản xuất từ chủng virus đại cố định phù hợp, phát triển trên nuôi cấy tế bào và được bất hoạt bằng phương pháp đã được thẩm định. Vắc xin được hồi chính ngay trước khi sử dụng như quy định ghi trên nhãn lọ để tạo ra một dung dịch trong suốt, có thể có màu sắc tùy theo chỉ thị pH có mặt trong vắc xin.

Vắc xin đại tế bào phải đáp ứng các yêu cầu chung của vắc xin dùng cho người.

#### **Sản xuất**

Sản xuất vắc xin đại tế bào dựa trên hệ thống chủng virus giống và hệ thống ngân hàng tế bào được sử dụng để virus

dại nhân lên. Quy trình sản xuất phải có được hiệu suất vắc xin ổn định, đạt các yêu cầu về tính sinh miễn dịch, tính an toàn và ổn định.

#### ***Hệ thống tế bào cho virus nhân lên***

Virus đại có thể nhân lên trên tế bào lưỡng bội người, tế bào phôi gà, tế bào Vero hoặc tế bào trứng chuột đất vàng Trung Quốc (CHO - Chinese Hamster Ovary).

#### ***Chủng virus giống gốc***

Chủng virus đại được sử dụng để sản xuất phải có hồ sơ chi tiết, trong đó ghi rõ nguồn gốc chủng và các đời cấy chuyên.

Chủng virus sản xuất được cấy chuyển không quá 5 lần từ chủng giống gốc và chỉ các loạt chủng virus sản xuất đạt các yêu cầu sau đây mới tiếp tục được sử dụng để sản xuất vắc xin.

**Nhận dạng:** Mỗi loạt chủng virus sản xuất phải được xác định là virus đại bằng kháng thể đặc hiệu với virus đại.

**Hiệu giá virus:** Nồng độ của mỗi loạt chủng virus sản xuất được xác định bằng phương pháp tiêm truyền trên não chuột hoặc bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trên nuôi cấy tế bào để đảm bảo tính ổn định của quy trình sản xuất.

**Vô khuẩn:** Loạt chủng virus sản xuất phải đạt được yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### ***Nuôi cấy virus và thu hoạch***

Toàn bộ quy trình lưu giữ ngân hàng tế bào và cấy chuyển tế bào đều phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn, không có mặt của các tế bào khác loại. Huyết thanh động vật (không được dùng huyết thanh người) được phép sử dụng trong môi trường nuôi cấy, nhưng trong môi trường cuối cùng để duy trì tế bào phát triển giúp virus nhân lên không được chứa huyết thanh động vật, môi trường này có thể chứa albumin huyết thanh người. Huyết thanh và trypsin dùng để tách tế bào và dùng trong môi trường nuôi cấy không được có mặt các tác nhân gây nhiễm ngoại lai. Môi trường nuôi cấy tế bào phải có chỉ thị pH như độ phenol và kháng sinh được phép sử dụng với nồng độ thấp nhất vẫn có được hiệu quả. Khoảng 10 % số lượng tế bào nuôi cấy dùng cho sản xuất được để lại không gây nhiễm, đây là các tế bào chứng. Hỗn dịch virus được thu hoạch một hoặc nhiều lần trong quá trình nuôi cấy. Nhiều lần thu hoạch từ cùng một loạt nuôi cấy sản xuất có thể trộn lại với nhau và được xem như một mẻ gặt đơn.

Một mẻ gặt đơn phải đạt các yêu cầu sau đây mới được sử dụng để tiến hành bước bất hoạt virus.

**Nhận dạng:** Mẻ gặt đơn có chứa virus phải được xác định là virus đại bằng kháng thể đặc hiệu.

**Hiệu giá virus:** Hiệu giá virus được xác định bằng nhiều phương pháp: Tiêm truyền trên não chuột nhắt trắng, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trên nuôi cấy tế bào hoặc bằng kỹ thuật ELISA. Hiệu giá được sử dụng như một chỉ số theo dõi tính ổn định của quy trình sản xuất.

**Tế bào chứng:** Tế bào chứng của mỗi loạt nuôi cấy tế bào sản xuất phải đạt yêu cầu về thử nghiệm nhận dạng và không có mặt các tác nhân ngoại lai.

**Tinh chế và bất hoạt**

Mề gạt virus có thể được cô đặc và tinh chế bằng các phương pháp phù hợp; mỗi mề gạt virus được bất hoạt bằng phương pháp đã được thẩm định tại một giai đoạn ấn định của quy trình sản xuất. Phương pháp bất hoạt phải đảm bảo virus đại bị bất hoạt hoàn toàn mà không làm mất đi hoạt tính sinh miễn dịch của nó. Nếu sử dụng beta-propiolacton để bất hoạt, nồng độ không được vượt quá 1:3500.

Một hỗn dịch virus sau bất hoạt phải đạt được yêu cầu sau đây mới được sử dụng để sản xuất vắc xin bán thành phẩm:  
*An toàn đặc hiệu:*

Xác định sự có mặt của các virus đại còn khả năng gây nhiễm trong các mẫu sau khi bất hoạt bằng thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột nhất trắng. Chuột phải khoẻ mạnh và tăng cân bình thường sau thời gian theo dõi 14 ngày.

Động vật thí nghiệm: Sử dụng ít nhất 10 chuột nhất trắng 4 tuần tuổi có khối lượng từ 11 g đến 13 g. Lựa chọn những chuột khoẻ mạnh, không có biểu hiện bệnh lý và tăng cân bình thường trong thời gian cách ly ít nhất là 5 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm.

Cách tiến hành: Mẫu thử nghiệm không pha loãng được tiêm vào não với liều 0,03 ml cho mỗi chuột.

Theo dõi và đọc kết quả: Toàn bộ chuột thử nghiệm phải được theo dõi và cân hàng ngày trước và sau khi tiêm. Thời gian theo dõi sau tiêm là 14 ngày. Trong suốt thời gian theo dõi, chuột phải khoẻ mạnh, tăng cân và không được có các triệu chứng bất thường.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được sản xuất từ một hay nhiều hỗn dịch virus đại bất hoạt. Chất ổn định được phép sử dụng có thể được thêm vào để duy trì hoạt tính của sản phẩm trong và sau khi đông khô.

Một loạt vắc xin bán thành phẩm cuối cùng phải đạt được các yêu cầu sau đây mới được sử dụng để sản xuất vắc xin thành phẩm.

**Hàm lượng glycoprotein**

Hàm lượng glycoprotein được xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp như thử nghiệm khuếch tán miễn dịch đơn, kỹ thuật ELISA hoặc thử nghiệm gắn kháng thể. Hàm lượng glycoprotein nằm trong giới hạn cho phép tùy thuộc vào từng nhà sản xuất.

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Vắc xin thành phẩm được đóng vào các lọ vô trùng và được đông khô để duy trì tính ổn định của vắc xin. Lọ vắc xin được đóng chặt để tránh nhiễm khuẩn và hơi ẩm.

Một loạt vắc xin thành phẩm phải đạt được các yêu cầu dưới đây mới được xuất xưởng:

**Nhận dạng**

Trong vắc xin phải chứa kháng nguyên của virus đại và được xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp với kháng thể đặc hiệu, tốt nhất là kháng thể đơn dòng.

**An toàn đặc hiệu**

Xác định sự có mặt của các virus đại còn khả năng gây nhiễm trong các mẫu sau khi bất hoạt bằng thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột nhất trắng. Trong trường hợp thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột đã được thực hiện với hỗn dịch virus bất hoạt đạt yêu cầu thì có thể không cần tiến hành lại thử nghiệm này đối với vắc xin thành phẩm.

**Vô khuẩn**

Vắc xin đại phải đạt được yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Chất gây sốt**

Vắc xin phải đạt yêu cầu về chất gây sốt. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách tiêm cho mỗi thỏ 1 liều đơn vắc xin dùng cho người và được pha loãng 10 lần (Phụ lục 15.12).

**An toàn chung**

Vắc xin phải đạt yêu cầu về an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhất. Chuột khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11)

**Độ ẩm tồn dư**

Phụ lục 15.35.

**Công hiệu**

Phải kiểm tra công hiệu đối với tất cả các lô vắc xin thành phẩm. Thực hiện theo phương pháp N.I.H. (Phụ lục 15.31).

Thử nghiệm có giá trị khi:

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất.

Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn độ tin cậy của công hiệu tương quan nằm trong khoảng 25 % đến 400 %.

*Tiêu chuẩn:* LD<sub>50</sub> của chủng thử thách (CVS - Challenge virus strain) phải nằm trong khoảng 10 - 100 LD<sub>50</sub>/0,03 ml. Công hiệu của vắc xin phải không nhỏ hơn 2,5 IU/liều tiêm cho người.

*Sản xuất chủng virus thử thách (CVS):* Tiêm chủng CVS vào não chuột nhất trắng, khối lượng từ 11 g đến 13 g, khi chuột có biểu hiện của nhiễm virus đại, nhưng trước khi chuột bị chết, tiến hành giết chuột và gạt não. Não chuột được nghiền nát và pha trong dung dịch phù hợp để có nồng độ cuối là 20 %. Chia hỗn dịch này thành các phần nhỏ trong các lọ, đậy kín và bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C).

*Chuẩn độ chủng CVS:* Làm tan băng 1 lọ chủng thử thách, pha loãng chủng ở các độ pha phù hợp. Mỗi độ pha của chủng CVS được tiêm vào não cho 10 chuột với liều 0,03 ml/chuột. Theo dõi chuột trong vòng 14 ngày sau tiêm. Tính LD<sub>50</sub> của chủng CVS theo công thức Reed - Muench dựa vào số chuột liệt hoặc chết, chỉ những chuột liệt hoặc chết sau ngày thứ 5 mới được tính.

**Chất hấp phụ**

Nếu chất hấp phụ được thêm vào vắc xin thì hàm lượng chất hấp phụ được xác định bằng phương pháp đã được phê duyệt.

*Tiêu chuẩn:* Theo qui định hiện hành.

### Chất bảo quản

Nếu chất bảo quản được thêm vào vắc xin thì hàm lượng chất bảo quản được xác định bằng phương pháp đã được phê duyệt.

*Tiêu chuẩn:* Theo qui định hiện hành.

### Đóng gói, bảo quản

Đóng gói: Bao gồm 1 lọ vắc xin đông khô và 1 lọ nước hồi chính.

Vắc xin đại tế bào được đóng dạng đông khô trong lọ thủy tinh trung tính.

Bảo quản: Vắc xin đại phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

### Nhãn

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

### Chỉ định, liều dùng

Dùng bơm tiêm hút toàn bộ nước hồi chính cho vào lọ vắc xin đông khô, lắc thật kỹ cho đến khi tan hoàn toàn. Vắc xin phải được tiêm ngay sau khi đã hồi chính, bơm kim tiêm phải được hủy bỏ ngay sau khi tiêm vắc xin.

Tiêm bắp vùng cơ delta, đối với trẻ em nên tiêm bắp đùi tốt hơn. Không tiêm vào những vùng có nhiều tổ chức lỏng lẻo dưới da.

Lịch tiêm vắc xin đại phụ thuộc vào từng đối tượng khác nhau. Có 3 nhóm đối tượng chính:

*Tiêm dự phòng các đối tượng có nguy cơ cao (tiếp xúc với virus đại):*

Tiêm 3 mũi cơ bản vào các ngày: 0, 7, 28.

Mũi tăng cường: sau 1 năm.

Cứ sau 5 năm, nhắc lại 1 lần.

Lịch tiêm vào ngày 28 có thể thay thế bằng lịch tiêm vào ngày 21.

*Tiêm điều trị các đối tượng nghi ngờ hoặc chắc chắn bị nhiễm virus đại (chó cắn):*

*Nếu đối tượng bị cắn chưa có miễn dịch với virus đại*

Liều tiêm 0,5 ml, giống nhau giữa người lớn và trẻ em.

Tiêm 5 mũi: lịch tiêm vào các ngày 0, 3, 7, 14, 28.

Trong trường hợp có nhiều vết cắn hoặc cào xước, nhiều nước bọt... thì phải tiêm thêm globulin miễn dịch đại ngay vào ngày 0 với liều lượng:

Globulin miễn dịch đại người: 20 IU/kg cân nặng.

Globulin miễn dịch đại ngựa: 40 IU/kg cân nặng.

Vắc xin nên tiêm vào các vị trí đối diện với vị trí tiêm globulin miễn dịch.

Trong các trường hợp nặng, ví dụ do vết cắn rộng hoặc vết cắn gần thần kinh trung ương, thì tùy từng trường hợp cụ thể có thể tiêm liền 2 mũi vắc xin trong cùng một ngày 0.

*Nếu đối tượng bị cắn đã có miễn dịch với virus đại:*

Trường hợp đã tiêm vắc xin trong vòng 5 năm: Tiêm tiếp 2 mũi vắc xin vào các ngày 0, 3.

Trường hợp đã tiêm vắc xin trên 5 năm hoặc tiêm nhưng không đầy đủ liệu trình: Nên áp dụng liệu trình tiêm giống như các đối tượng chưa có miễn dịch với virus đại.

## VẮC XIN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYP b CỘNG HỢP

### *Vaccinum haemophili stirpis b coniugatum*

Vắc xin *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) cộng hợp là một chế phẩm được tinh chế từ vỏ polysaccharid của vi khuẩn *H. influenzae* typ b, liên kết cộng hóa trị với protein mang (carrier protein).

Vỏ polysaccharid của Hib là một chuỗi polymer mạch thẳng gồm các đơn vị lặp lại của 3-β-D-ribofuranosyl (1→1)-D-ribitol-5-phosphat (PRP).

Protein mang là giải độc tố bạch hầu hoặc giải độc tố uốn ván hoặc độc tố bạch hầu của chủng đột biến đã mất tính độc (CRM197), hoặc phức hợp protein màng ngoài của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* nhóm B.

### Sản xuất

#### Chủng sản xuất

Chủng *H. influenzae* typ b dùng để sản xuất vắc xin *H. influenzae* typ b cộng hợp phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng sản xuất phải có vỏ polysaccharid đặc hiệu và sản sinh với sản lượng ổn định trong quá trình sản xuất, có đáp ứng miễn dịch và an toàn khi sử dụng cho người.

Chỉ có những chủng đạt các đặc tính như sau mới có thể xem xét để sản xuất vắc xin: Trong môi trường nuôi cấy thích hợp phải có hình dạng đặc trưng của *H. influenzae*: trực khuẩn nhỏ, hiếu khí, Gram âm, không di động, không sinh nha bào, không làm tan máu, lên men đường glucose, không lên men đường lactose, sucrose, manose và phản ứng dương tính với catalase và indole.

#### Hệ thống chủng

Chủng gốc phải có hồ sơ chi tiết bao gồm nguồn gốc, các đặc tính sinh lý, sinh hóa, huyết thanh học và di truyền của chủng. Các nuôi cấy từ chủng sản xuất phải có cùng đặc tính như nuôi cấy từ chủng gốc và phải đạt các tiêu chuẩn như chủng gốc.

#### Nuôi cấy và mẻ gặt đơn

Sự phát triển của chủng *H. influenzae* typ b phải có tính ổn định bằng cách giám sát mật độ phát triển của vi khuẩn, pH của môi trường nuôi cấy và sản lượng polysaccharid. *H. influenzae* typ b được nuôi cấy trên môi trường lỏng không chứa các polysaccharid có phân tử lượng cao; nếu trong môi trường nuôi cấy chứa bất kỳ sản phẩm nào của máu thì phải chứng minh rằng chúng đã được loại bỏ sau khi tinh chế.

Sự thuần khiết của vi khuẩn trước khi bắt hoạt phải được kiểm tra theo phương pháp thích hợp, bao gồm nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa phù hợp để kiểm tra đặc điểm hình thái, nhuộm Gram và ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

#### Polysaccharid tinh chế

Canh trùng nuôi cấy được bất hoạt. PRP được tách ra từ canh trùng nuôi cấy và tinh chế bằng phương pháp thích hợp. Mỗi lô polysaccharid đã tinh chế phải được kiểm tra



## DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM V

độ thuần khiết. Polysaccharid tinh chế phải đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp.

**Nhận dạng:** Dùng phương pháp huyết thanh học hoặc quang phổ cộng hưởng từ  $^1\text{H}$  (hoặc  $^{13}\text{C}$ ): phải có mặt PRP.

**Kích thước phân tử:** Sử dụng phương pháp sắc ký lọc trên gel để xác định sự phân bố theo kích thước phân tử polysaccharid. Hệ số phân bố  $K_0$  được xác định bằng cách dựa vào các pic chính của polysaccharid trên sắc ký đồ theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đã đăng ký và được phê duyệt đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

Sắc ký lỏng cũng được sử dụng để xác định sự phân bố theo kích thước phân tử polysaccharid.

**Độ âm:** Phương pháp áp dụng phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận và phải chỉ ra được tính ổn định nằm trong giới hạn chấp thuận theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

**Thành phần polysaccharid:** Được tiến hành theo phương pháp đã được phê chuẩn. Hàm lượng polysaccharid được tính thông qua hàm lượng đường ribose (sử dụng phương pháp Bial). Hàm lượng đường ribose không ít hơn 32,0 % so với khối lượng polysaccharid khô khiết.

**Hàm lượng phosphor:** Sử dụng phương pháp Chen hoặc phương pháp khác đã được thẩm định. Hàm lượng phosphor phải từ 6,8 % đến 9,0 % so với khối lượng polysaccharid khô khiết.

**Protein tạp:** Không quá 1,0 % so với khối lượng polysaccharid khô khiết (xác định bằng phương pháp Lowry).

**Acid nucleic:** Không quá 1,0 % so với khối lượng polysaccharid khô khiết, được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của acid nucleic ở bước sóng 260 nm hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Nội độc tố vi khuẩn:** Không quá 10,0 EU/ $\mu\text{g}$  polysaccharid (Phụ lục 13.2).

### **Protein mang**

Protein mang được sử dụng để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch ở tế bào B và T. Chủng sản xuất protein mang (cộng hợp) phải có hồ sơ chủng bao gồm nguồn gốc chủng, các đặc tính sinh lý, sinh hóa. Sự phát triển của chủng phải cho thấy có tính ổn định bằng cách giám sát tỷ lệ mọc của vi khuẩn, pH của môi trường nuôi cấy và sản lượng.

Protein mang được sản xuất trên chủng vi khuẩn phù hợp, độ tinh khiết của canh trùng nuôi cấy phải được kiểm tra, canh trùng nuôi cấy được bất hoạt và được tinh chế bằng phương pháp thích hợp.

Chỉ protein mang đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp.

**Giải độc tố bạch hầu và uốn ván:** Hàm lượng không nhỏ hơn 1500 Lf/mg protein.

**CRM197:** Hàm lượng protein thuần khiết không nhỏ hơn 90,0 %.

**Phức hợp protein màng ngoài của *Neisseria meningitidis* nhóm B:** Hàm lượng protein không nhiều hơn 8,0 % khối lượng lipopolysaccharid.

## VẮC XIN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYP b CỘNG HỢP

### **Chất gây sốt**

Đạt yêu cầu về chất gây sốt (Phụ lục 15.12). Tiêm tĩnh mạch tai thỏ với hàm lượng 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  khối lượng thỏ.

### **Bán thành phẩm cộng hợp**

Bán thành phẩm cộng hợp chỉ được phép pha chế thành bán thành phẩm cuối cùng khi đạt các yêu cầu dưới đây:

### **Hóa chất tồn dư**

Quy trình tinh chế sản phẩm cộng hợp cần phải loại bỏ hóa chất tồn dư, ví dụ: sản phẩm trung gian cyanid cần được tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, đạt theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Chất đánh dấu cộng hợp**

Xác định bằng số đơn vị lặp lại PRP hoặc hàm lượng PRP tổng số, đạt theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Các nhóm chức hoạt hóa tồn dư**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, đạt theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Hàm lượng PRP**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, đạt theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Hàm lượng PRP đã cộng hợp và PRP tự do**

Hàm lượng PRP tự do nhỏ hơn 40,0 %, tùy thuộc vào từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Hàm lượng protein**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định.

### **Tỉ lệ protein và PRP**

Nằm trong giới hạn chấp thuận của của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Kích thước phân tử**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, ví dụ như lọc gel sepharose CL-4B, đạt theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng loại vắc xin Hib cộng hợp.

### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

### **Độc tính đặc hiệu của protein mang trong sản phẩm cộng hợp**

Bán thành phẩm cộng hợp không có độc tính đặc hiệu của protein mang (nếu protein mang là giải độc tố uốn ván hoặc giải độc tố bạch hầu).

### **Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng**

Tá dược, chất bảo quản hoặc chất ổn định được bổ sung với một lượng thích hợp bán thành phẩm cộng hợp để được bán thành phẩm cuối cùng. Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt yêu cầu sau:

### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).



**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Chỉ vắc xin thành phẩm đạt các yêu cầu dưới đây mới được phép xuất xưởng.

**Nhận dạng**

Dùng phương pháp miễn dịch học thích hợp, sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng polysaccharid tinh khiết (khuếch tán miễn dịch kép Ouchterlony hoặc ELISA,...), cho phản ứng đặc hiệu.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng PRP**

Trong khoảng  $\pm 20,0\%$  hàm lượng PRP ghi trên nhãn. Sử dụng phương pháp so màu hoặc phương pháp sắc ký lỏng.

**Độ ẩm tồn dư**

Không được quá  $3,0\%$  (Phụ lục 15.35).

**Chất gây sốt**

Đạt yêu cầu về chất gây sốt. Tiêm tĩnh mạch tai thỏ với hàm lượng  $0,025\ \mu\text{g}$  đến  $1,0\ \mu\text{g}$  PRP/kg khối lượng thỏ (Phụ lục 15.12).

**Tá chất**

Nhôm: Không quá  $1,25\ \text{mg}$  tính trên 1 liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

Canxi: Không quá  $1,3\ \text{mg}$  tính trên 1 liều đơn dùng cho người. Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định.

**Hàm lượng chất bảo quản**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, tiêu chuẩn phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận.

**An toàn không đặc hiệu**

Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm sống sót và tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**pH**

Đối với vắc xin là chế phẩm dạng lỏng: Giá trị pH nằm trong khoảng đã cho thấy là an toàn và hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu tính ổn định (Phụ lục 15.33).

Đối với vắc xin là chế phẩm đông khô: Tiến hành đo pH sau khi hoàn nguyên với dung dịch thích hợp.

**Cảm quan**

Quan sát bằng mắt thường, vắc xin không có dấu hiệu bất thường như: lỏng nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu, nứt, vỡ, có vật thể lạ...

**Bảo quản, hạn dùng**

Nhiệt độ bảo quản từ  $2\ ^\circ\text{C}$  đến  $8\ ^\circ\text{C}$ .

Các công bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Nhãn**

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành và đặc biệt phải ghi đủ các thông tin về hàm lượng PRP; tên và hàm lượng của protein mang của 1 liều sử dụng cho người.

**VẮC XIN NÃO MÔ CẦU POLYSACCHARID CỘNG HỢP*****Vaccinum meningococcale polysaccharidum***

Vắc xin não mô cầu có thể ở dạng polysaccharid đơn thuần hoặc cộng hợp, là một vắc xin có chứa polysaccharid tinh khiết đặc hiệu nhóm A, C, Y và/hoặc W135 liên kết cộng hoá trị với một protein mang.

Vắc xin não mô cầu cộng hợp là một chế phẩm vô trùng chứa kháng nguyên polysaccharid tinh khiết đặc hiệu nhóm, điều chế từ *Neisseria meningitidis* nhóm A, C, Y hoặc W135, liên kết đồng hoá trị với một giá mang là protein (giải độc tổ uốn ván, giải độc tổ bạch hầu, protein bạch hầu CRM197).

**Tên quốc tế**

“*Vaccinum meningococcale polysaccharidum*” tiếp đến là nhóm A, C, Y hoặc W135. Tên dịch ra tiếng địa phương phải phù hợp với tên quốc tế.

**Sản xuất**

Chủng sản xuất được sản xuất dựa trên hệ thống chủng giống gốc. Đã qua thử nghiệm lâm sàng cho thấy có thể tạo ra vắc xin an toàn và hiệu quả cho người.

Phương pháp sản xuất cần được thẩm định để chứng tỏ rằng sản phẩm tạo ra nếu đem kiểm tra sẽ đáp ứng các yêu cầu về độc tính bất thường của huyết thanh miễn dịch và vắc xin dùng cho người.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Bán thành phẩm cuối cùng được điều chế bằng cách trộn bán thành phẩm cộng hợp với chất hấp phụ (nếu được sử dụng), chất bảo quản và chất làm ổn định vắc xin sao cho phù hợp với thông số kỹ thuật về an toàn và công hiệu với loại vắc xin đã được thử nghiệm trên thực địa lâm sàng.

**Cảm quan**

Mỗi loại vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất đều phải được kiểm tra bằng cảm quan đối với từng đơn vị đóng gói nhỏ nhất để đảm bảo: không có vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút phải chặt và nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, cần loại bỏ lọ vắc xin nếu thấy không đạt yêu cầu.

**Nhận dạng**

Có thể dùng thử nghiệm huyết thanh học sử dụng kháng thể đặc hiệu polysaccharid tinh khiết.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng saccharid**

Hàm lượng saccharid của vắc xin phải được định lượng và nằm trong khoảng giới hạn đã được cơ quan kiểm định quốc gia của nước cấp phép chấp thuận. Các nhà sản xuất khác nhau có công thức pha chế vắc xin cộng hợp khác nhau nên hàm lượng này cũng có thể khác nhau. Các phương pháp đặc thù sao cho sản phẩm bao gồm thử nghiệm xác định gốc phosphorus như soi màu, sắc ký, phương pháp HPAEC-PAD có thể được sử dụng. Các thử nghiệm miễn dịch như nephelometry hoặc ELISA ức chế cũng có thể được sử dụng.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Hàm lượng mỗi thành phần polysaccharid, từ 70 % đến 130 % so với lượng ghi trên nhãn.

**Hàm lượng saccharid cộng hợp và saccharid tự do**

Các phương pháp sắc ký ái nước của acid trên đá, của với kháng thể đặc hiệu protein mang, siêu ly tâm, lọc gel, siêu lọc đã được sử dụng. Hàm lượng saccharid tự do cũng có thể xác định bằng các thử nghiệm hoá học, miễn dịch học hoặc HPAEC sau khi tách.

**Phân bố kích thước phân tử**

Kích thước đặc hiệu của cộng hợp saccharid-protein thường được xác định bằng phương pháp lọc gel trên Sepharose-4B hoặc HPSEC (High Pressure Size Exclusion chromatography) với cột sắc ký phù hợp.

**Độ ẩm**

Nếu là vắc xin đông khô thì phải kiểm tra độ ẩm tồn dư theo phương pháp đã được cơ quan kiểm định quốc gia của nước cấp phép phê duyệt.

Thử nghiệm phải được tiến hành với tỷ lệ là 1/1000 lọ và không quá 10 lọ và không ít hơn 5 lọ. Độ ẩm tồn dư phải có giá trị trung bình không lớn hơn 2,5 % và không có lọ nào có độ ẩm lớn hơn hoặc bằng 3,0 % (Phụ lục 15.35).

**Chất gây sốt**

Chất gây sốt được kiểm tra bằng phương pháp tiêm đường tĩnh mạch cho thỏ. Liều tiêm như sau:

*Vắc xin đơn giá:* Tiêm 0,025 µg polysaccharid/1 ml/kg khối lượng thỏ.

*Vắc xin đa giá:*

Vắc xin chứa 2 nhóm kháng nguyên, tiêm 0,05 µg polysaccharid/1 ml/kg khối lượng thỏ;

Vắc xin chứa 3 nhóm kháng nguyên, tiêm 0,075 µg polysaccharid/1 ml/kg khối lượng thỏ;

Vắc xin chứa 4 nhóm kháng nguyên, tiêm 0,10 µg polysaccharid/1 ml/kg khối lượng thỏ.

Tổng chênh lệch nhiệt độ của 03 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

**Hàm lượng chất hấp phụ**

Nếu vắc xin có chứa chất hấp phụ thì hàm lượng chất hấp phụ phải được xác định theo phương pháp đã được cơ quan kiểm định quốc gia của nước cấp phép phê duyệt.

Nếu vắc xin có chứa chất hấp phụ là nhôm thì hàm lượng nhôm tối đa có trong vắc xin không được quá 1,25 mg/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

**Chất bảo quản**

Các nhà sản xuất khác nhau có thể sử dụng các chất bảo quản khác nhau cho vắc xin và hàm lượng chất bảo quản phải được xác định theo phương pháp đã được cơ quan kiểm định quốc gia của nước cấp phép phê duyệt.

Nếu vắc xin có chứa chất bảo quản là thimerosal thì hàm lượng thimerosal tối đa có trong vắc xin không được quá 0,012 % (Phụ lục 15.29).

**An toàn chung**

Phải đảm bảo an toàn khi kiểm tra trên chuột lang và chuột nhắt trắng. Sử dụng 02 chuột lang có khối lượng xấp xỉ 350 g/con, tiêm ổ bụng với liều 500 µg polysaccharid. Chuột phải tăng trọng bình thường và khoẻ mạnh trong 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**pH (Phụ lục 15.33)**

Nếu vắc xin ở dạng lỏng thì pH phải nằm trong khoảng giá trị của lô vắc xin đã được thử nghiệm trên thực địa lâm sàng trước đây. Nếu là vắc xin đông khô thì phải kiểm tra pH sau khi pha với nước hồi chính.

**Đóng gói vắc xin**

Tùy theo từng nhà sản xuất và phải tuân thủ theo hồ sơ đăng ký đã được cơ quan quản lý của nước cấp phép chấp thuận.

**Bảo quản**

Vắc xin ở dạng lỏng hoặc đông khô đều phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

**Hạn dùng**

Tùy theo từng nhà sản xuất và phải tuân thủ theo hồ sơ đăng ký đã được cơ quan quản lý của nước cấp phép chấp thuận.

**Nhãn**

Theo quy định hiện hành. Cần ghi rõ tên polysaccharid (A, C, Y hoặc W135) có trong vắc xin và số mg polysaccharid có trong liều đơn dùng cho người.

**VẮC XIN PHÉ CẦU*****Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum***

Vắc xin phé cầu (dạng polysaccharid) là chế phẩm gồm 23 kháng nguyên vỏ polysaccharid tinh khiết pha với tỷ lệ bằng nhau của các chủng phé cầu *S. pneumoniae* (gọi tắt là kháng nguyên phé cầu): 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17A hoặc 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. Vắc xin phé cầu là chế phẩm dạng lỏng, trong suốt và không màu.

**Sản xuất*****Chủng gốc và chủng sản xuất***

Sản xuất vắc xin phải dựa vào hệ chủng giống cho từng loại typ. Chủng *S. pneumoniae* dùng để sản xuất vắc xin phé cầu polysaccharid phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Mỗi chủng phải có khả năng sản sinh polysaccharid của từng typ huyết thanh tương ứng với sản

lượng ổn định, đủ đáp ứng miễn dịch và an toàn cho người. Mỗi chủng gốc phải có hồ sơ chủng (nguồn gốc chủng, các kết quả kiểm tra xác định các đặc tính, sinh lý, sinh hóa, huyết thanh học và di truyền của chủng...).

Canh trường nuôi cấy chủng sản xuất phải có những đặc tính giống chủng gốc: là vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh nha bào, quan sát dưới kính hiển vi có hình thái điển hình của *S. pneumoniae*, phát triển thích hợp ở 37 °C, khuẩn lạc trơn có vòng tan máu alpha; bị ly giải bởi muối mật, lên men inulin, nhạy cảm với optochin, dương tính với phản ứng Quellung.

Phương pháp sản xuất phải được thẩm định để chứng minh sản phẩm đạt yêu cầu về an toàn theo tiêu chuẩn vắc xin và huyết thanh miễn dịch dùng cho người.

#### **Nuôi cấy và gặt**

Các chủng sản xuất được nuôi cấy trên môi trường không chứa các thành phần tạo tủa khi tinh chế polysaccharid, các thành phần nhóm máu hoặc các polysaccharid có phân tử lượng lớn.

Sự thuần khiết của vi khuẩn trước khi tách chiết thu polysaccharid phải được kiểm tra theo phương pháp thích hợp. Nếu có sự nhiễm tạp, canh trường nuôi cấy bị hủy bỏ.

#### **Bán thành phẩm đơn giá**

Sau khi bất hoạt bằng phenol, các polysaccharid được tách và tinh chế bằng các phương pháp như tủa phân đoạn, thủy phân bằng enzym và siêu lọc, rửa, làm khô trong điều kiện chân không sao cho có độ ẩm thích hợp cho tính ổn định của polysaccharid và được bảo quản ở điều kiện thích hợp để tránh bị ẩm. Độ ẩm tồn dư được xác định bằng cách làm khô dưới áp suất giảm hoặc nhiệt và phải đạt yêu cầu so với mẫu đối chiếu.

Polysaccharid tinh chế phải đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cuối cùng:

**Nhận dạng:** Dùng phương pháp huyết thanh học (khuếch tán miễn dịch kép hoặc điện di miễn dịch); dương tính với từng kháng nguyên phế cầu.

**Thành phần polysaccharid:** Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Được xác định dựa trên khối lượng khô của polysaccharid hoặc phần trăm nitrogen tổng số, phosphorus, acid uronic, hexosamin, methyl pentose và nhóm O-acetyl bằng cách sử dụng các phương pháp so màu hoặc sắc ký trao đổi ion.

**Protein tạp chất:** Không được quá 3,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng phương pháp Lowry.

**Acid nucleic tạp chất:** Không được quá 2,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng cách đo độ hấp thụ của acid nucleic ở bước sóng 260 nm hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Kích thước phân tử:** Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Xác định bằng phương pháp sắc ký lọc gel hoặc sắc ký trao đổi ion. Hằng số phân bố  $K_D$  được xác định bằng cách đo sự phân bố theo kích thước phân tử của polysaccharid của đỉnh (pic) chính của đường cong phân tách.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Độ đặc hiệu:** Không có phản ứng chéo giữa từng kháng nguyên phế cầu với tất cả các kháng huyết thanh đặc hiệu kháng các kháng nguyên phế cầu còn lại có trong vắc xin phế cầu.

#### **Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng**

Bán thành phẩm cuối cùng được điều chế bằng cách trộn bột polysaccharid của các typ khác nhau trong điều kiện vô trùng. Hỗn hợp đồng nhất được hòa vào dung dịch đẳng trương thích hợp sao cho một liều dùng cho người chứa 25 µg từng typ polysaccharid. Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt yêu cầu sau:

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Nhận dạng:** Phải dương tính với từng kháng nguyên phế cầu. Sử dụng phương pháp miễn dịch học.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng polysaccharid:** Trong khoảng ± 30,0 % hàm lượng polysaccharid ghi trên nhãn. Xác định hàm lượng polysaccharid của từng kháng nguyên phế cầu và hàm lượng polysaccharid tổng số bằng phương pháp miễn dịch học hay phương pháp khác đã được thẩm định.

**Chất bảo quản:**

**Chất bảo quản kháng khuẩn:** Trong khoảng 85 % - 115 % hàm lượng ghi trên nhãn. Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định.

**Phenol:** Không được quá 2,5 g/l. Xác định bằng phương pháp thích hợp.

**Chất gây sốt:** Đạt yêu cầu về chất gây sốt (Phụ lục 15.12). Tiến hành trên thỏ với liều tiêm tĩnh mạch tai thỏ là 2,5 µg mỗi kháng nguyên phế cầu/mL/kg thỏ.

**An toàn không đặc hiệu:** Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm sống sót và tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**pH:** 4,5 - 7,4 (Phụ lục 15.33).

**Cảm quan:** Quan sát bằng mắt thường vắc xin không có dấu hiệu bất thường. Lông nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu, nứt, vỡ, có vật thể lạ...

#### **Đóng gói**

Phải tuân thủ theo GMP và các quy định hiện hành.

#### **Bảo quản, hạn dùng**

Trong bao bì kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Các tuyên bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải được cơ quan quản lý phê chuẩn.

#### **Nhãn**

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành và đặc biệt phải ghi đủ các thông tin về tên, hàm lượng của mỗi polysaccharid và hàm lượng polysaccharid tổng số.

**VẮC XIN PHÉ CẦU CỘNG HỢP HẤP PHỤ*****Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum coniugatum adsorbatum***

Vắc xin phé cầu cộng hợp hấp phụ gồm các kháng nguyên vô tinh khiết polysaccharid của các typ huyết thanh phé cầu *S. pneumoniae* (gọi tắt là kháng nguyên phé cầu), mỗi kháng nguyên phé cầu được liên kết cộng hợp riêng rẽ với một protein mang (carrier protein). Vắc xin phé cầu được hấp phụ với một chất hấp phụ hoặc tá chất phù hợp (thường được hấp phụ với nhôm phosphat). Chế phẩm ở dạng lỏng hoặc đông khô, phải đáp ứng các yêu cầu sau đây:

**Sản xuất**

Phương pháp sản xuất phải tạo ra được một vắc xin phé cầu cộng hợp đảm bảo về tinh an toàn và tính sinh miễn dịch ở người. Quy trình sản xuất polysaccharid và chất mang phải dựa trên cơ sở một hệ thống chủng giống. Phương pháp sản xuất phải được thẩm định để chứng minh sản phẩm đạt yêu cầu về an toàn theo tiêu chuẩn vắc xin và huyết thanh miễn dịch dùng cho người.

**Chủng gốc và chủng sản xuất**

Mỗi chủng gốc phải có hồ sơ chủng (nguồn gốc chủng, các kết quả kiểm tra xác định các đặc tính sinh lý, sinh hóa, huyết thanh học và di truyền của chủng,..).

Chủng *S. pneumoniae* dùng để sản xuất vắc xin phé cầu cộng hợp phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Mỗi chủng phải có khả năng sản sinh polysaccharid của từng typ huyết thanh tương ứng với sản lượng ổn định, đủ đáp ứng miễn dịch và an toàn cho người.

Canh trường nuôi cấy chủng sản xuất phải có những đặc tính giống chủng gốc: là vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh nha bào, quan sát dưới kính hiển vi có hình thái điển hình của *S. pneumoniae*, phát triển thích hợp ở 37 °C, khuẩn lạc trơn có vòng tan máu alpha; bị ly giải bởi muối mật, lên men inulin, nhạy cảm với optochin, dương tính với phản ứng Quellung.

**Nuôi cấy và gặt**

Các chủng sản xuất được nuôi cấy trên môi trường không chứa các thành phần tạo tủa khi tinh chế polysaccharid. Sự thuần khiết của vi khuẩn trước khi tách chiết thu polysaccharid phải được kiểm tra theo phương pháp thích hợp như nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa phù hợp. Nếu có sự nhiễm tạp, môi trường nuôi cấy bị hủy bỏ.

**Tinh chế polysaccharid**

Mỗi một typ huyết thanh *S. pneumoniae* được nuôi cấy riêng biệt trên môi trường lỏng không chứa polysaccharid khối lượng phân tử cao, nếu một trong các thành phần nuôi cấy có chứa thành phần các nhóm máu thì quy trình sản xuất phải được thẩm định để chứng minh rằng sau khi tinh chế sẽ loại bỏ được chất này.

Sau khi bất hoạt, polysaccharid được tách và tinh chế bằng các phương pháp như tủa phân đoạn, sắc ký, xử lý bằng enzym và siêu ly tâm.

Polysaccharid tinh chế phải đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp:

**Nhận dạng:** Phải dương tính với từng typ kháng nguyên phé cầu. Xác định bằng phương pháp huyết thanh học hoặc quang phổ cộng hưởng từ <sup>1</sup>H (hoặc <sup>13</sup>C).

**Thành phần polysaccharid:** Được xác định dựa trên khối lượng khô của polysaccharid hoặc phần trăm nitrogen tổng số, phosphorus, acid uronic, hexosamin, methyl pentose và O-acetyl nhóm bằng cách sử dụng các phương pháp so màu hoặc sắc ký trao đổi ion. Tiêu chuẩn phải được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận.

**Độ ẩm:** Nếu polysaccharid được bảo quản dưới dạng đông khô, hàm lượng ẩm phải được kiểm tra và nằm trong giới hạn tiêu chuẩn được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận.

**Protein tạp chất:** Không được quá 3,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng phương pháp Lowry.

**Acid nucleic tạp chất:** Không được quá 2,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng cách đo độ hấp thụ của acid nucleic ở bước sóng 260 nm hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Chất gây sốt:** Đạt yêu cầu về chất gây sốt (Phụ lục 15.12). Sử dụng phương pháp xác định chất gây sốt trên thỏ.

**Nội độc tố vi khuẩn:** Xác định nội độc tố theo Phụ lục 13.2. Hàm lượng nội độc tố ít hơn 0,5 EU/μg polysaccharid.

**Kích thước phân tử:** Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Sử dụng phương pháp sắc ký lọc gel hoặc sắc ký trao đổi ion. Hằng số phân bố  $K_D$  được xác định bằng cách đo sự phân bố theo kích thước phân tử của polysaccharid của đỉnh (pic) chính của đường cong phân tách.

**Hoạt hóa polysaccharid**

Polysaccharid được hoạt hóa bằng phương pháp hóa học trước khi cộng hợp.

Trước và trong quá trình hoạt hóa bằng phương pháp hóa học, các polysaccharid được chia thành các đơn phân (partially depolymerized).

Các polysaccharid được hoạt hóa đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng trong quá trình cộng hợp:

**Kích thước phân tử:** Kích thước phân tử của từng kháng nguyên phé cầu nằm trong tiêu chuẩn được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận. Xác định bằng phương pháp sắc ký lọc gel hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Protein mang**

Protein mang được sử dụng để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch ở tế bào T. Chủng sản xuất protein mang (cộng hợp) phải có hồ sơ chủng bao gồm nguồn gốc chủng, các đặc tính sinh lý, sinh hóa, tinh an toàn. Sự phát triển của chủng phải cho thấy có tính ổn định bằng cách giám sát tỷ lệ mọc của vi khuẩn, pH của nuôi cấy và sản lượng. Độ tinh khiết của canh trường nuôi cấy phải được kiểm tra, canh trường nuôi cấy được bất hoạt và được tinh chế bằng phương pháp thích hợp.

Các protein mang thường được sử dụng là: Giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, protein CRM 197, protein D - protein bề mặt tế bào của vi khuẩn không điển hình

*Haemophilus influenza.*

Protein mang đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp:

**Nhận dạng:** Phải cho phản ứng dương tính. Xác định bằng phương pháp huyết thanh học.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Nội độc tố vi khuẩn:** Không được quá 1,0 EU/ $\mu$ g protein.

**Hàm lượng protein:** Không được ít hơn 90 % hàm lượng protein tổng số. Được xác định bằng phương pháp phù hợp đã được thẩm định.

#### **Bán thành phẩm đơn giá**

Sự cộng hợp xảy ra khi có polysaccharid đã được hoạt hóa gắn với protein mang qua liên kết cộng hóa trị bằng nhiều phương pháp khác nhau, phụ thuộc vào nhà sản xuất. Quy trình tinh chế sản phẩm cộng hợp nhằm loại bỏ hóa chất tồn dư của quá trình cộng hợp bằng phương pháp thích hợp.

Chỉ bán thành phẩm đơn đạt các yêu cầu dưới đây mới được pha chế thành bán thành phẩm cuối cùng.

**Nhận dạng:** Sử dụng phương pháp huyết thanh học, phản ứng dương tính với từng kháng nguyên phé cầu.

**Hóa chất tồn dư:** Không được có hóa chất tồn dư. Xác định bằng phương pháp sắc ký khối phổ hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Tỷ lệ polysaccharid - protein:** Từ 0,3 đến 3,0 đối với từng kháng nguyên phé cầu. Thực hiện bằng cách xác định từng hàm lượng polysaccharid và hàm lượng protein hoặc xác định trực tiếp tỉ lệ này bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ cộng hưởng từ  $^1\text{H}$  hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

**Polysaccharid cộng hợp và polysaccharid tự do:** Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Xác định bằng phương pháp thích hợp đã được thẩm định.

**Hàm lượng protein:** Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng typ kháng nguyên. Xác định bằng phương pháp thích hợp đã được thẩm định như phương pháp sắc ký lỏng, sắc ký mao quản,....

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Tính độc đặc hiệu của protein mang:** Không có tính độc. Áp dụng với protein mang là giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu; tiến hành theo phương pháp đã được thẩm định.

**Nội độc tố vi khuẩn:** Không được lớn hơn 0,75 EU/ $\mu$ g polysaccharid. Sử dụng phương pháp LAL test.

#### **Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng**

Tá dược, chất bảo quản được bổ sung với một lượng thích hợp các bán thành phẩm cộng hợp của từng kháng nguyên phé cầu để được bán thành phẩm cuối cùng. Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt yêu cầu sau:

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 5.7).

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Nhận dạng:** Phải dương tính với từng kháng nguyên phé cầu. Xác định bằng phương pháp miễn dịch học.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng polysaccharid:** Trong khoảng  $\pm 30,0$  % hàm lượng polysaccharid ghi trên nhãn. Xác định hàm lượng polysaccharid của từng kháng nguyên phé cầu hoặc polysaccharid tổng số bằng phương pháp miễn dịch học hay phương pháp khác đã được thẩm định.

**Độ ẩm tồn dư:** Không được quá 2,5 % và không có lọ nào quá 3,0 % (Phụ lục 15.35). Áp dụng cho vắc xin phé cầu dạng đông khô.

**Nội độc tố vi khuẩn:** Đạt theo tiêu chuẩn đã đăng ký với cơ quan Kiểm định quốc gia. Phương pháp xác định theo Phụ lục 13.2.

**Nhóm:** Không được quá 1,25 mg trong 1 liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

**Hàm lượng chất bảo quản:** Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, tiêu chuẩn phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận.

**An toàn không đặc hiệu:** Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm sống sót và tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**pH:**

Đối với vắc xin là chế phẩm dạng lỏng: Giá trị pH nằm trong khoảng mà cho thấy là an toàn và hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu tính ổn định (Phụ lục 15.33).

Đối với vắc xin là chế phẩm đông khô: Tiến hành đo pH sau khi hoàn nguyên với dung dịch thích hợp; giá trị pH nằm trong khoảng mà cho thấy là an toàn và hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu tính ổn định (Phụ lục 15.33).

**Cảm quan:** Quan sát bằng mắt thường vắc xin không có dấu hiệu bất thường: lỏng nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu, nứt, vỡ, không có vật thể lạ...

#### **Đóng gói**

Phải tuân thủ theo GMP và các quy định hiện hành.

#### **Bảo quản, hạn dùng**

Trong bao bì kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Các tuyên bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải đệ trình lên cơ quan quản lý quốc gia phê chuẩn.

#### **Nhãn**

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành và đặc biệt phải ghi đủ các thông tin về hàm lượng của từng polysaccharid; tên và hàm lượng của protein mang của 1 liều sử dụng cho người; tên, hàm lượng của chất hấp phụ; điều kiện sử dụng, bảo quản vắc xin (lắc trước khi dùng, không được để đông băng).

## VẮC XIN PHÒNG PAPILLOMAVIRUS Ở NGƯỜI (TÁI TỔ HỢP)

*Vaccinum papillomaviri humani (ADNr)*

Vắc xin phòng papillomavirus ở người (HPV) là loại vắc xin được sản xuất từ các hạt giống như virus (virus-like particles, VLPs,) nhưng không gây nhiễm; có độ tinh khiết cao, chứa protein capsit chính (L1) của 1 hoặc nhiều typ HPV.

Các kháng nguyên HPV được điều chế theo công nghệ tái tổ hợp ADN. Tùy theo nhà sản xuất, VLPs tinh khiết có thể được hấp phụ vào tá chất dạng phối hợp nhôm hydroxyd và 3-0-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL) hoặc nhôm hydroxyphosphat sulfat.

### SẢN XUẤT

Vắc xin HPV được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa protein capsid của virus vào tế bào nấm men hoặc tế bào côn trùng/hệ thống vector biểu hiện *Baculovirus* rồi thu và tinh chế VLPs. Việc sản xuất vắc xin HPV dựa vào hệ thống ngân hàng tế bào và chủng giống gốc.

**Vắc xin mẫu chuẩn:** Vắc xin HPV chuẩn được lấy từ 1 lô vắc xin hoặc một trong các lô vắc xin đã được nghiên cứu lâm sàng và được khẳng định là có hiệu quả bảo vệ. Vắc xin mẫu chuẩn cần phải đạt yêu cầu về tính ổn định.

### Đánh giá đặc tính VLPs

Đặc tính của VLPs phải được đánh giá ngay trong quá trình sản xuất vắc xin. Các kỹ thuật thường dùng để đánh giá đặc tính của VLPs bao gồm xác định thành phần protein là kỹ thuật SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), Western Blot, hấp phụ khối, phân tích trình tự amino acid. Hình thái và mức độ kết tập của các VLPs cũng được xác định để khẳng định các epitop có mặt trong vắc xin và là yếu tố cần thiết tạo hiệu quả cho vắc xin. Bên cạnh đó, các thành phần protein, lipid, acid nucleic và carbon hydrat cũng cần được xác định trong quá trình sản xuất vắc xin.

### Ngân hàng tế bào và chủng giống gốc

#### **Sản xuất vắc xin trên tế bào nấm men**

Việc sử dụng bất kỳ dòng tế bào nào đều phải dựa vào hệ thống ngân hàng tế bào. Ngân hàng tế bào gốc và ngân hàng tế bào sản xuất phải đạt các yêu cầu về nhận dạng, độ tinh khiết, khả năng mọc và tính ổn định mới được đưa vào sản xuất. Đối với tế bào gốc và tế bào sản xuất, cần được đánh giá về tính đồng nhất gen. Đặc tính của tế bào chủ và vector biểu hiện cần được mô tả rõ. Các phương pháp vật lý được sử dụng trong quá trình sản xuất nhằm kích thích và kiểm soát sự biểu hiện của gen từ tế bào vật chủ.

Các đặc tính của chủng sản xuất tái tổ hợp (tế bào vật chủ phối hợp với hệ thống vector biểu hiện) phải được mô tả đầy đủ, chứng minh không có các yếu tố tự sinh và thông tin về tính đồng nhất gen của các ngân hàng tế bào sản xuất và ngân hàng tế bào gốc. Cần mô tả đầy đủ các đặc tính sinh học của tế bào chủ và các vector biểu hiện.

### **Sản xuất vắc xin trên tế bào côn trùng/hệ thống vector biểu hiện *Baculovirus***

**Trên tế bào côn trùng:** Ngân hàng tế bào phải đạt yêu cầu về nhận dạng, độ tinh khiết, khả năng mọc, tính ổn định, các yếu tố ngoại lai thì mới được đưa vào sản xuất. Các đặc tính này có thể được đánh giá ở các giai đoạn phù hợp trong quá trình sản xuất. Nếu các tế bào côn trùng được sử dụng để sản xuất VLPs thì việc dùng tế bào côn trùng phải dựa vào một hệ thống ngân hàng tế bào gốc. Ngoài ra, tế bào gốc, tế bào sản xuất nếu nhân lên ở số lần tới hoặc vượt quá giới hạn cho phép thì phải được kiểm tra về tính sinh khối u trên một hệ thống thử nghiệm trên động vật và kiểm tra sự có mặt của các *Retrovirus* và các virus khác trên động vật chân đốt.

***Baculovirus* tái tổ hợp:** Việc sử dụng vector *Baculovirus* tái tổ hợp là dựa vào hệ thống chủng giống gốc với số lần cấy chuyển xác định từ chủng virus ban đầu thành chủng gốc và chủng sản xuất. Vector biểu hiện *Baculovirus* tái tổ hợp chứa chuỗi mã hóa của kháng nguyên L1 của HPV. Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với một số thử nghiệm khác để xác định các phân đoạn của cấu trúc biểu hiện trong protein tái tổ hợp tinh chế và khẳng định chất lượng cũng như tính ổn định của kháng nguyên L1. *Baculovirus* tái tổ hợp phải được theo dõi trong quá trình sản xuất vắc xin bao gồm các thông tin như nguồn gốc gen, nhận dạng, cấu trúc, cấu tạo và đặc tính gen. Chủng gốc *Baculovirus* tái tổ hợp được sản xuất với số lượng lớn và được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phù hợp.

Chỉ những chủng giống gốc nào đạt yêu cầu các thử nghiệm dưới đây mới được sử dụng để nhân giống.

#### **Nhận dạng**

Nhận dạng chủng gốc và chủng làm việc bằng cách sử dụng một kỹ thuật phù hợp, ví dụ kỹ thuật khuếch đại gen.

#### **Nồng độ virus**

Nồng độ virus trong chủng virus gốc và chủng sản xuất phải đảm bảo tính đồng nhất trong quá trình sản xuất.

#### **Các yếu tố ngoại lai**

Chủng virus làm việc cũng phải tuân thủ các tiêu chuẩn như chủng virus giống gốc và tế bào chủng. Các yếu tố ngoại lai cần chú ý là *Spiroplasma* và virus sinh sản trên côn trùng đặc biệt là những virus sinh sản trên côn trùng có khả năng gây bệnh cho người (ví dụ: *Arbovirus*).

#### **Vô khuẩn**

Chủng *Baculovirus* tái tổ hợp phải được kiểm tra xem có bị nhiễm vi khuẩn, nấm và *Mycoplasma* bằng thử nghiệm thích hợp (Phụ lục 15.7).

#### ***Mycobacteria***

Chủng *Baculovirus* tái tổ hợp sẽ phải được kiểm tra về *Mycobacterium* spp.

#### **Kiểm tra các tế bào chủng dùng cho sản xuất chủng**

Xem phần kiểm tra tế bào chủng dưới đây.



**Nhân giống virus và thu hoạch**

Quá trình nuôi cấy tế bào và chủng *Baculovirus* giống gốc đều phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn hoàn toàn và không có bất cứ loại tế bào nào khác đang được nuôi cấy.

Tại khu vực dành cho sản xuất nuôi cấy tế bào/hệ thống biểu hiện *Baculovirus*, virus được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy trung gian và được kiểm tra nghiêm ngặt 5 thử nghiệm dưới đây:

**Nhận dạng**

Nhận dạng virus bằng cách nhận dạng typ HPV và sử dụng thử nghiệm miễn dịch với các kháng thể đặc hiệu hoặc các kỹ thuật sinh học phân tử như kỹ thuật khuếch đại gen.

**Vô khuẩn**

Mỗi môi trường nuôi cấy trung gian có chứa virus đều phải được kiểm tra và đạt yêu cầu về vô khuẩn. Kiểm tra với 10 ml cho mỗi môi trường (Phụ lục 15.7).

**Nồng độ virus**

Nồng độ virus trong mỗi môi trường nuôi cấy trung gian có chứa virus được xác định bằng các thử nghiệm phù hợp như thử nghiệm tạo đám/quầng hoặc khuếch đại gen, mục đích để đảm bảo tính đồng nhất trong quá trình sản xuất.

**Các yếu tố ngoại lai**

Tất cả các môi trường nuôi cấy trung gian có chứa virus đều phải đảm bảo đạt yêu cầu khi kiểm tra về yếu tố ngoại lai.

**Tế bào chứng**

Tế bào chứng được lấy ra từ các môi trường nuôi cấy trung gian chứa virus đều phải đạt yêu cầu khi tiến hành thử nghiệm nhận dạng và kiểm tra các yếu tố ngoại lai.

**Mé gặt đơn**

Một mé gặt đơn phải đạt các yêu cầu sau đây mới được sử dụng để tiến hành sản xuất kháng nguyên đơn giá tinh chế.

**Nhận dạng**

Mỗi mé gặt đơn phải được tiến hành thử nghiệm nhận dạng typ HPV, sử dụng thử nghiệm miễn dịch hoặc sinh học phân tử như PCR hoặc lai. Thử nghiệm nhận dạng có thể thay thế bằng một phần của thử nghiệm kiểm tra độ tinh khiết của kháng nguyên.

**Vô khuẩn**

Mỗi mé gặt đơn đều phải được kiểm tra và đáp ứng yêu cầu về tính vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Các yếu tố ngoại lai**

Tất cả các mé gặt đơn đều phải được kiểm tra về các yếu tố ngoại lai trong suốt quá trình cấy tế bào/sản xuất hệ thống biểu hiện *Baculovirus*. Như đã đề cập ở trên, cần đặc biệt chú ý đến những virus sinh sản trên côn trùng trong các ngân hàng tế bào và chủng virus giống gốc có khả năng gây bệnh cho người (ví dụ: *Arbovirus*).

**Tế bào chứng**

Trong quá trình cấy tế bào/sản xuất hệ thống biểu hiện *Baculovirus*, tế bào chứng phải đạt yêu cầu về nhận dạng

và yếu tố ngoại lai. Cần đặc biệt chú ý đến những virus sinh sản trên côn trùng trong các ngân hàng tế bào và trong chủng virus giống gốc có khả năng gây bệnh cho người.

**Kháng nguyên đơn giá tinh chế**

Chỉ các kháng nguyên đơn giá tinh chế đạt yêu cầu mới được đưa vào sản xuất vắc xin bán thành phẩm cuối cùng. Các thử nghiệm dưới đây có thể không yêu cầu nếu đã được thực hiện ở giai đoạn kháng nguyên đơn giá hấp phụ.

**Protein toàn phần**

Hàm lượng protein toàn phần được xác định bằng một phương pháp thử nghiệm phù hợp đã được thẩm định. Hàm lượng protein phải nằm trong tiêu chuẩn đăng ký đã được phê duyệt.

**Hàm lượng kháng nguyên và nhận dạng**

Hàm lượng và tính đặc hiệu của mỗi typ kháng nguyên HPV được xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA). Nên sử dụng kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp với các epitop kháng nguyên hoặc kỹ thuật khuếch tán đơn. Tỷ lệ kháng nguyên/protein phải đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn cho phép đã được phê duyệt.

**Độ tinh khiết kháng nguyên**

Độ tinh khiết của kháng nguyên đơn giá tinh khiết được xác định bằng các phương pháp phù hợp như kỹ thuật SDS-PAGE, giới hạn xác định là 1 % các tạp chất hoặc tốt hơn so với tổng protein. Một chế phẩm chuẩn sẽ được sử dụng để đánh giá mỗi phép thử. Độ tinh khiết của protein được tính bằng tỷ lệ giữa protein L1 với tổng protein và đơn vị tính theo phần trăm. Các typ trong vắc xin HPV phải đạt yêu cầu về độ tinh khiết kháng nguyên theo tiêu chuẩn được phê duyệt.

**Tỷ lệ monomer L1**

Thử nghiệm đánh giá độ tinh khiết của kháng nguyên cũng có mục đích đánh giá tính toàn vẹn của các monomer L1. Tỷ lệ monomer L1 là tỷ lệ giữa monomer L1 nguyên vẹn/tổng protein. Tỷ lệ này được tính theo phần trăm.

**Cấu trúc và kích cỡ của VLP**

Cấu trúc và kích cỡ của các VLP được xác định và theo dõi bằng phương pháp phù hợp như phương pháp phân bố ánh sáng động (dynamic light scattering). Kích cỡ của VLP phải nằm trong giới hạn cho phép đã được phê duyệt.

**Thành phần**

Hàm lượng các thành phần protein, lipid, acid nucleic và carbon hydrat cũng cần được xác định ở các công đoạn phù hợp.

**ADN tồn dư**

Không được quá 10 ng ADN tồn dư trong kháng nguyên tinh khiết tính trên mỗi liều đơn dùng cho người, được xác định bằng các phương pháp có độ nhạy cao.



**Protein tế bào chủ tồn dư**

Hàm lượng protein tế bào chủ tồn dư được xác định bằng các thử nghiệm phù hợp. Kết quả phải nằm trong giới hạn cho phép đã được phê duyệt.

**Các hóa chất sử dụng trong quá trình phá vỡ tế bào và tinh chế**

Các hóa chất sử dụng trong quá trình tinh chế và các giai đoạn khác của quá trình sản xuất được xác định bằng các thử nghiệm phù hợp. Hàm lượng của các hóa chất này phải nằm trong giới hạn cho phép được phê duyệt.

**Albumin**

Nếu huyết thanh động vật được dùng trong nuôi cấy tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú để sản xuất vắc xin thì hàm lượng albumin tồn dư phải được xác định.

**Vô khuẩn**

Mỗi kháng nguyên đơn giá tinh khiết đều phải được kiểm tra và đáp ứng yêu cầu vô khuẩn. Kiểm tra với 10 ml cho mỗi mẫu (Phụ lục 15.7).

**Kháng nguyên đơn giá hấp phụ**

Các kháng nguyên đơn giá tinh khiết được hấp phụ vào một chất hấp phụ phù hợp như muối nhôm. Chỉ những kháng nguyên đơn giá hấp phụ đạt yêu cầu các thử nghiệm dưới đây mới được sử dụng để sản xuất vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô khuẩn**

Mỗi kháng nguyên đơn giá hấp phụ đều phải được kiểm tra và đáp ứng yêu cầu vô khuẩn. Kiểm tra với 10 ml cho mỗi mẫu (Phụ lục 15.7).

**Nội độc tố vi khuẩn**

Mỗi kháng nguyên đơn giá hấp phụ đều phải được kiểm tra hàm lượng nội độc tố vi khuẩn (Phụ lục 13.2). Kết quả kiểm tra phải nằm trong giới hạn cho phép đã được phê duyệt.

**Hàm lượng kháng nguyên và nhận dạng**

Mỗi typ kháng nguyên HPV được nhận dạng bằng các phương pháp hóa miễn dịch phù hợp như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), kỹ thuật ELISA. Nên sử dụng kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp với epitop kháng nguyên. Tỷ lệ kháng nguyên/protein phải đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn đã đăng ký của nhà sản xuất.

**Nồng độ chất hấp phụ**

Mỗi mẫu kháng nguyên đơn giá phải được kiểm tra và xác định nồng độ chất hấp phụ. Nồng độ chất hấp phụ phải nằm trong khoảng cho phép đã được phê duyệt.

**KIỂM ĐỊNH VẮC XIN BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG**

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được sản xuất từ các kháng nguyên HPV đơn giá tinh khiết hoặc kháng nguyên HPV đơn giá hấp phụ. Chất bảo quản kháng khuẩn và tá chất dạng phối hợp nhôm hydroxyd và 3-0-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL) hoặc nhôm hydroxyphosphat sulfat có thể được thêm vào. Chỉ có

những mẫu vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt yêu cầu các thử nghiệm dưới đây mới được sử dụng để sản xuất vắc xin thành phẩm.

**Chất bảo quản kháng khuẩn**

Hàm lượng chất bảo quản kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được xác định bằng các phương pháp phù hợp. Tổng hàm lượng chất bảo quản cho phép phải từ 85 % đến 115 % hàm lượng chất bảo quản đã đăng ký của nhà sản xuất.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn. Kiểm tra với 10 ml cho mỗi mẫu (Phụ lục 15.7).

**Chất hấp phụ**

Nếu thành phần nhôm được sử dụng là chất hấp phụ thì hàm lượng nhôm phải nằm trong giới hạn cho phép đối với từng loại vắc xin (Phụ lục 15.27).

**Mức độ hấp phụ**

Mức độ hấp phụ (khả năng hấp phụ hoàn toàn) của kháng nguyên trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng phải được đánh giá. Tuy nhiên, có thể bỏ qua thử nghiệm này nếu chứng minh được tính ổn định của quy trình hoặc nếu đã tiến hành đánh giá ở vắc xin thành phẩm.

**Công hiệu (Có thể tiến hành công hiệu *in vitro* hoặc công hiệu *in vivo*)**

Công hiệu vắc xin HPV được tiến hành song song với vắc xin mẫu chuẩn và chứng (internal control). Có thể dùng phương pháp gây miễn dịch trên chuột để xác định hiệu giá kháng thể thu được (công hiệu *in vivo*) hoặc phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu thực hiện trong phòng thí nghiệm để định lượng trực tiếp hàm lượng kháng nguyên có trong vắc xin (công hiệu *in vitro*).

**KIỂM ĐỊNH VẮC XIN THÀNH PHẨM**

Chỉ những vắc xin thành phẩm đạt yêu cầu các thử nghiệm dưới đây mới được sử dụng trên người. Thử nghiệm xác định hàm lượng chất bảo quản có thể không yêu cầu nếu đã thực hiện và đạt yêu cầu đối với vắc xin bán thành phẩm cuối cùng. Bên cạnh đó, thử nghiệm công hiệu trên động vật thí nghiệm (*in vivo*) cũng có thể không yêu cầu nếu đã thực hiện và đạt yêu cầu đối với vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Thế tích đơn vị phân liều và cảm quan**

**Thế tích:** Kiểm tra ít nhất 3 đơn vị đóng ống về thế tích và độ kín, khí. Mỗi đơn vị đóng ống vắc xin phải đảm bảo có thể tích không được thấp hơn thế tích ghi trên nhãn và trong hồ sơ đăng ký; đảm bảo độ kín, khí.

**Cảm quan:** Vắc xin phải không có vật thể lạ, có hình thái và màu sắc như đã đăng ký. Quan sát bằng mắt thường về dạng sản phẩm và màu sắc.

**Nhận dạng**

Các typ HPV khác nhau trong vắc xin được nhận dạng bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp (thường bằng

phương pháp ELISA sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng thử nghiệm *in vivo*). Thử nghiệm công hiệu có thể bao gồm cả thử nghiệm nhận dạng.

### Vô khuẩn

Đáp ứng yêu cầu về tính vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

### pH

Phải nằm trong giới hạn cho phép (Phụ lục 15.33).

### Chất bảo quản kháng khuẩn

Xác định hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin thành phẩm bằng các phương pháp hóa học hoặc hóa lý phù hợp. Hàm lượng chất bảo quản không được nhỏ hơn hàm lượng tối thiểu có tác dụng bảo quản và không được lớn hơn 115 % hàm lượng ghi trên nhãn.

### Chất gây sốt (Phụ lục 15.12)

Mỗi lô vắc xin thành phẩm đều phải được kiểm tra chất gây sốt trên thỏ. Có thể tiến hành cả thử nghiệm kiểm tra nội độc tố nếu có điều kiện thích hợp.

Riêng vắc xin có sử dụng tá chất là MPL thì thử nghiệm chất gây sốt nên được kiểm tra. Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành cho đến khi chứng minh được tính an toàn và ổn định của sản xuất.

### Nội độc tố vi khuẩn (Phụ lục 13.2)

Không được quá 5 EU/liều đơn dùng cho người.

Những chế phẩm có chứa chất kích thích miễn dịch (như MPL) thường gây nhiều thử nghiệm, vì vậy phải kiểm tra chất gây sốt trên thỏ đối với các sản phẩm này.

### Chất hấp phụ (Phụ lục 15.27)

Nếu vắc xin có chứa chất hấp phụ, hàm lượng chất hấp phụ phải nằm trong giới hạn cho phép đã được phê duyệt.

### Mức độ hấp phụ

Mức độ hấp phụ của mỗi kháng nguyên cũng được đánh giá. Thử nghiệm này có thể không phải tiến hành trong kiểm định xuất xưởng thông thường nếu đã chứng minh được tính ổn định của sản phẩm.

### Tá chất (nếu sử dụng MPL)

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Từ 30 µg/liều đến 50 µg/liều.

### An toàn chung

Mỗi lô vắc xin thành phẩm phải được kiểm tra về độc tính không mong muốn (có thể được gọi là độc tính không đặc hiệu) bằng thử nghiệm an toàn chung (Phụ lục 15.11). Thử nghiệm này có thể không phải thực hiện trong kiểm định xuất xưởng thông thường nếu công hiệu của vắc xin được tiến hành theo phương pháp *in vivo*.

### Công hiệu *in vitro*

Công hiệu *in vitro* của vắc xin phòng HPV được xác định bằng kỹ thuật ELISA, theo phương pháp "sandwich" hai giai đoạn. Các kháng nguyên VLP (L1) kết hợp với kháng thể IgG kháng HPV đa dòng thỏ (hoặc các loại kháng thể

đặc hiệu typ HPV khác) đã được gắn trên các phiến nhựa (kháng thể 1). Phức hợp kháng nguyên - kháng thể 1 tiếp tục được gắn kháng thể chuột, đặc hiệu VLP (kháng thể 2) và cộng hợp. Chất hiện màu được gắn với phức hợp kháng thể 1 - kháng nguyên - kháng thể 2. Hàm lượng kháng nguyên được tính toán dựa trên mật độ màu của giếng chứa các mẫu vắc xin.

Phản ứng ELISA được thực hiện với phân nước nổi sau khi đã ly tâm của vắc xin để có được các kháng nguyên không hấp phụ. Quy trình thực hiện công hiệu *in vitro* của mỗi typ kháng nguyên HPV tương tự nhau và được thực hiện riêng rẽ.

### Thử nghiệm công hiệu và nhận dạng đối với vắc xin Cervarix:

#### Vật liệu:

Phiến nhựa mới, 96 giếng

Vắc xin phòng HPV

HPV 16 và 18 chuẩn

HPV 16 và 18 mẫu chứng

Kháng thể thỏ đa dòng kháng HPV 16 và 18 (kháng thể 1).

Kháng thể chuột đơn dòng kháng HPV 16 và 18 (kháng thể 2, "sơ cấp").

Cộng hợp kháng thể kháng chuột - Biotin (kháng thể 3),

Phức hợp Streptavidin-biotin-peroxidase.

#### Tiến hành:

Chuẩn bị phiến: Phiến trắng miễn dịch 96 giếng được gắn kháng thể thỏ đa dòng kháng HPV pha loãng trong dung dịch PBS, ủ phiến 4 °C qua đêm, rửa và được làm bão hòa bằng dung dịch PBS-casein ở 37 °C/1 h.

Kiểm định mẫu vắc xin: Vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin mẫu thử và mẫu chứng được ly tâm với tốc độ 13.000 r/min trong 10 min để tách toàn bộ phần nước nổi. Pha loãng bậc 2 phân nước nổi ở các mẫu vắc xin sao cho nồng độ kháng nguyên ở các độ pha thấp nhất đạt khoảng 250 ng/mL đối với HPV-16 và 2000 ng/mL đối với HPV-18.

Rồi pha tiếp bậc 2 ra từ  $2^0$  đến  $2^{-10}$  để làm thử nghiệm công hiệu. Thử nghiệm nhận dạng chỉ cần 1 độ pha là  $2^0$ . Các mẫu vắc xin đã pha loãng được nhỏ vào các giếng phiến, 3 giếng cho mỗi độ pha, ủ 37 °C/2 h, lắc nhẹ. Rửa phiến rồi nhỏ kháng thể chuột đơn dòng kháng HPV vào tất cả các giếng sau khi đã rửa sạch, ủ 37 °C/1 h. Rửa phiến rồi nhỏ dung dịch cộng hợp kháng thể kháng chuột - Biotin và ủ 37 °C/1 h. Rửa và nhỏ phức hợp chất hiện màu Streptavidin-biotin-peroxidase, ủ 37 °C/30 min. Rửa phiến rồi nhỏ dung dịch chất hiện màu TMB, ủ 15 min ở nhiệt độ phòng tránh ánh sáng. Nhỏ dung dịch dừng phản ứng. Đo mật độ quang học với bước sóng 450/620 nm.

#### Tiêu chuẩn cho thử nghiệm nhận dạng:

Thử nghiệm có giá trị khi OD của các giếng trống nhỏ hơn 0,2 (< 0,2).

Kháng nguyên HPV trong mẫu thử nghiệm được coi là dương tính khi giá trị trung bình OD mẫu thử lớn hơn OD tương ứng với đường tiệm cận dưới của mẫu chuẩn.

**Thử nghiệm công hiệu:**

Tính kết quả theo phần mềm Excel. Hệ số tương quan ( $R^2$ ) của mẫu chuẩn phải lớn hơn 95 %.

Hàm lượng kháng nguyên của từng typ trong mẫu thử được tính từ ít nhất 3 độ pha liên tiếp trong số 10 độ pha loãng dùng trong phản ứng.

**Tiêu chuẩn cho thử nghiệm công hiệu:**

Typ 16: Công hiệu tương quan của vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chứng phải từ 0,78 đến 1,45.

Typ 18: Công hiệu tương quan của vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chứng phải từ 0,79 đến 1,47.

**Thử nghiệm định lượng và nhận dạng kháng nguyên đối với vắc xin Gardasil:**

**Vật liệu:**

Phiên nhựa mới, 96 giếng

Vắc xin tử giá phòng HPV

Kháng thể bắt giữ (capture antibody)

Kháng thể đơn dòng đặc hiệu typ HPV-6, 11, 16, 18.

Kháng thể đơn dòng chuột - Goat anti-mouse IgG<sub>2b</sub>-HRP antibody.

Kháng thể cộng hợp - Horseradish peroxidase (HRP-conjugated antibody).

Tetramethylbenzidin (TMB).

**Tiến hành:**

Chuẩn bị phiên thử nghiệm: Phiên miễn dịch trắng, 96 giếng được gắn bản bằng kháng thể đơn dòng kháng HPV đặc hiệu, pha loãng trong dung dịch PBS. Phiên gắn bản được ủ qua đêm ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C và được cố định bằng dung dịch PBS có 1 % BSA, 0,05 % Tween 20. Để ở nhiệt độ từ 22 °C đến 28 °C trong 1 h đến 6 h.

Kiểm định mẫu vắc xin: Vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin mẫu thử được ly tâm với tốc độ 650 r/min trong 10 min để tách lấy phần nước nổi. Pha loãng nước nổi bằng dung dịch PBS có 1 % BSA và 0,05 % Tween 20 trong các phiên trắng riêng rẽ với các độ pha loãng bậc 2, sao cho nồng độ kháng nguyên của các typ HPV đạt khoảng 2 µg/mL. Pha tiếp bậc 3 từ 3<sup>0</sup> đến 3<sup>-10</sup> để làm thử nghiệm công hiệu. Thử nghiệm nhận dạng chỉ cần 1 độ pha là 3<sup>0</sup>. Toàn bộ các mẫu vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nghiệm với các độ pha loãng ở trên được chuyển tương ứng sang phiên đã gắn bản bằng kháng thể trước đó. Dung dịch đệm citrat được thêm vào các giếng ngay sau đó để một lần nữa loại trừ chất hấp phụ trong vắc xin, ủ các phiên ở nhiệt độ từ 22 °C đến 28 °C qua đêm và lắc nhẹ. Sau đó rửa phiên rồi nhỏ kháng thể đơn dòng chuột vào tất cả các giếng. Ủ 1 h ở nhiệt độ từ 22 °C đến 28 °C. Rửa phiên rồi nhỏ kháng thể cộng hợp, ủ 1 h ở nhiệt độ từ 22 °C đến 28 °C. Rửa rồi nhỏ chất hiện màu là dung dịch TMB không pha loãng. Để 5 min rồi nhỏ dung dịch dùng phản ứng. Đo mật độ quang với bước sóng 450 nm.

Tính kết quả theo chương trình SoftMax Pro hoặc phần mềm Excel.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Hàm lượng của mỗi typ phải nằm trong giới hạn nhà sản xuất đăng ký đã được phê duyệt.

Hàm lượng HPV tổng số phải không được lớn hơn 500 IU/ml ( $\leq 500$  IU/ml).

**Công hiệu in vivo (Yêu cầu đối với vắc xin nhị giá)**

**Động vật thí nghiệm:**

Chuột nhắt trắng giống BALB/C hoặc các giống chuột khác đã được thẩm định, khoẻ mạnh và từ cùng một đàn, khoảng 6 tuần đến 8 tuần tuổi, tốt nhất là chuột cùng một giới.

**Chuẩn bị vắc xin thử nghiệm:**

Vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được pha loãng bậc 2 thành 5 độ pha sao cho nồng độ kháng nguyên của mẫu pha loãng cuối cùng đạt khoảng 0,56 µg/0,5 ml. Dung dịch để pha vắc xin là nước muối sinh lý. Tiêm màng bụng 0,5 ml mỗi độ pha loãng vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu cần kiểm tra cho mỗi chuột. Mỗi độ pha loãng vắc xin tiêm ít nhất 10 chuột. Tất cả các chuột sau gây miễn dịch được nuôi từ 21 ngày đến 22 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê và lấy máu tim chuột. Các mẫu máu được ly tâm 3000 r/min trong 10 min ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C (-20 °C). Xác định hiệu giá kháng thể kháng HPV bằng kỹ thuật ELISA trên bộ sinh phẩm chẩn đoán đặc hiệu. Kết quả được tính theo chương trình Probit Analysis (WHO).

**Thử nghiệm có giá trị khi:**

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất.

Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn tin cậy (P=0,95) nằm trong giới hạn cho phép.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Công hiệu tương quan không được nhỏ hơn 0,5 ( $\geq 0,5$ ).

**Đóng gói**

Vắc xin phòng HPV được đóng trong lọ thủy tinh trung tính hoặc bơm tiêm đóng sẵn (thủy tinh loại I) với pít tông có đáy bằng cao su (cao su butyl), có hoặc không có kim tiêm. Mỗi lọ/bơm tiêm chứa 1 liều đơn 0,5 ml huyền dịch. Hộp carton có thể chứa một hoặc nhiều lọ/bơm tiêm đơn liều tùy theo từng nhà sản xuất.

**Bảo quản**

Vắc xin phòng HPV phải được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tuyệt đối không được làm vắc xin đông băng. Giữ nguyên trong hộp để tránh ánh sáng.

**Nhãn**

Thông tin trên vỏ hộp, nhãn lọ, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu theo quy định hiện hành.

**Cách dùng, liều dùng**

Đường dùng: Tiêm bắp vào vùng cơ delta.

Liều dùng, lịch tiêm: Theo hướng dẫn cụ thể đã đăng ký của nhà sản xuất.

**VẮC XIN QUAI BỊ*****Vaccinum parotitidis vivum***

Vắc xin quai bị là chế phẩm chứa virus quai bị sống, giảm độc lực, dạng đông khô; được sản xuất từ các virus phát triển trên dòng tế bào thích hợp.

Hoàn nguyên vắc xin ngay trước khi sử dụng bằng nước hồi chính như đã ghi trên nhãn, được dung dịch trong, có thể có màu nếu có chất chỉ thị pH.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây:

**Sản xuất*****Chủng sản xuất***

Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng gốc (master seed) virus giảm độc lực, được phê duyệt bởi Cơ quan Kiểm định Quốc gia. Chủng virus quai bị dùng để sản xuất vắc xin phải có hồ sơ ghi chép lịch sử chủng, bao gồm những thông tin về chủng gốc và các đời nhân lên tiếp theo của chủng này. Chủng sản xuất được bảo quản ở dạng đông khô trong điều kiện nhiệt độ dưới -20 °C; nếu không đông khô phải được bảo quản ở nhiệt độ dưới -60 °C và được giám sát chặt chẽ nhiệt độ trong quá trình bảo quản. Chủng sản xuất phải tuân thủ các điều kiện dưới đây:

***Nhận dạng:***

Các lô chủng gốc và chủng sản xuất phải được nhận dạng bằng phương pháp trung hòa với kháng huyết thanh đặc hiệu quai bị trên nuôi cấy tế bào hoặc nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR.

***Hàm lượng virus:***

Hàm lượng virus của các lô chủng gốc và chủng sản xuất phải được kiểm tra để đảm bảo tính ổn định của sản xuất.

***Các yếu tố ngoại lai:***

Lô chủng sản xuất phải tuân thủ các yêu cầu đối với các lô chủng sản xuất vắc xin, không được có các yếu tố ngoại lai.

***Độc lực:***

Lô chủng sản xuất phải tuân thủ yêu cầu về thử nghiệm độc lực của các vắc xin sống. Khi *Macaca* và *Cercopithecus* phù hợp với thử nghiệm này.

***Tế bào sản xuất***

Sử dụng ngân hàng tế bào sản xuất hoặc từ tế bào phôi có nguồn gốc từ trứng không có tác nhân gây bệnh (SPF) và được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

***Huyết thanh dùng trong môi trường nuôi cấy tế bào:***

Huyết thanh dùng để nhân tế bào dùng cho sản xuất vắc xin quai bị phải được kiểm tra và chứng minh là đạt yêu cầu vô khuẩn (không có vi khuẩn, nấm và *Mycoplasma* và chứng minh không có chứa virus). Huyết thanh người không được sử dụng trong tất cả các môi trường nuôi cấy của quá trình sản xuất vắc xin.

***Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất***

Chủng virus quai bị được phát triển trên tế bào phôi hoặc tế bào từ ngân hàng tế bào sử dụng môi trường thích hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hện, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng, đóng lọ và đông khô theo quy trình đã được

phê chuẩn. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn (trứng, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bào thai bê, trypsin tách tế bào...); tế bào sử dụng cho sản xuất, mẻ gặt đơn, loạt hỗn dịch virus hện, vắc xin bán thành phẩm trung gian, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm được kiểm tra tác nhân ngoại lai, kiểm tra hiệu giá virus, kiểm tra tính vô khuẩn...

Tất cả quá trình sản xuất ngân hàng tế bào và các nuôi cấy tế bào tiếp theo sau đó phục vụ cho quá trình sản xuất vắc xin quai bị đều phải được tiến hành trong các điều kiện vô trùng, trong khu vực không lưu giữ các dòng tế bào khác. Huyết thanh động vật có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy của quá trình sản xuất. Huyết thanh và trypsin dùng để pha chế huyền dịch tế bào và pha môi trường nuôi cấy sẽ phải cho thấy không chứa các yếu tố ngoại lai. Môi trường nuôi cấy tế bào có thể chứa một chỉ thị pH như đỏ phenol và lượng kháng sinh nhỏ nhất có tác dụng.

***Kiểm định mẻ gặt đơn***

Mỗi mẻ gặt đơn phải đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng:

***Nhận dạng:*** Mẻ gặt đơn chứa virus quai bị phải được nhận dạng virus bằng phương pháp trung hòa hoặc bằng phương pháp RT-PCR.

***Nồng độ virus:*** Nồng độ virus trong mỗi mẻ gặt đơn phải được xác định để giám sát tính ổn định của sản xuất và từ đó xác định độ pha được dùng cho vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

***Các yếu tố ngoại lai:*** Mỗi mẻ gặt đơn đều phải kiểm tra để xác định không chứa các yếu tố ngoại lai.

***Kiểm tra tế bào và trứng:*** Nếu sử dụng tế bào lưỡng bội người cho sản xuất, phải kiểm tra để nhận dạng chủng; các tế bào chúng và trứng chúng phải được kiểm tra để xác định không chứa các yếu tố ngoại lai.

Vắc xin quai bị sống giảm độc lực có thể được điều chế với chất ổn định thích hợp và đông khô ở dạng vắc xin đơn hoặc phối hợp với vắc xin sởi và rubella sống giảm độc lực.

***Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng***

Các mẻ gặt đơn vắc xin đạt các yêu cầu nêu trên sẽ được hện lại và lọc để loại bỏ tế bào. Thêm chất ổn định thích hợp và được pha thành độ pha loãng thích hợp.

Mỗi lô vắc xin bán thành phẩm cuối cùng sẽ phải đạt yêu cầu dưới đây mới được tiếp tục tiến hành các bước tiếp theo để sản xuất vắc xin thành phẩm:

***Vô khuẩn***

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng phải được kiểm tra tính vô khuẩn trên môi trường thích hợp, không có vi khuẩn, nấm và *Mycoplasma*.

***Kiểm định vắc xin thành phẩm******Nhận dạng***

Sử dụng phương pháp thích hợp đã được cơ quan kiểm định quốc gia quy định.

**Nhận dạng bằng phương pháp trung hòa vi lượng**

Dùng kháng thể đặc hiệu trung hòa vắc xin quai bị. Hỗn dịch virus quai bị - kháng thể sau khi trung hòa được gây nhiễm trên tế bào Vero một lớp. Thử nghiệm luôn có chứng âm và chứng dương đi kèm, đọc kết quả sau 2 tuần.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Vắc xin đạt yêu cầu khi tế bào Vero không bị hủy hoại ở mẫu vắc xin, giống như mẫu chứng âm.

**Cách tiến hành:**

Ngày thứ nhất: Nuôi cấy tế bào trên phiến 6 giếng hoặc 24 giếng. Lượng tế bào  $1.10^5$  -  $1,5.10^5$  tế bào/ml hỗn dịch. Ngày thứ 2: Trung hòa kháng nguyên bằng kháng thể đặc hiệu.

Pha loãng kháng thể theo các độ pha loãng khác nhau.

Hoàn nguyên vắc xin.

Kết hợp kháng nguyên, kháng thể theo tỉ lệ thể tích 1 : 1 (phản ứng trung hòa).

Ủ hỗn dịch đã trung hòa (kháng nguyên - kháng thể) và hỗn dịch không trung hòa (chỉ có vắc xin ở các nồng độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ; và chỉ có kháng thể theo độ pha phù hợp) trong chu trình nhiệt thích hợp.

**Khuyến cáo:** Có thể dùng chu trình nhiệt như sau: đặt vào bể ổn định nhiệt  $37\text{ }^\circ\text{C}/30\text{ min}$ ,  $23\text{ }^\circ\text{C}/30\text{ min}$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  trong thời gian từ 18 h trở lên ( $\geq 18\text{ h}$ ).

Ngày thứ 3:

Gây nhiễm tế bào: Nhỏ hỗn dịch đã trung hòa và không trung hòa vào các phiến tế bào. Có các giếng chứng tế bào, chứng vắc xin theo các nồng độ, chứng kháng thể theo các độ pha kèm theo.

Ủ ở tủ ẩm  $37\text{ }^\circ\text{C}$  có 5 %  $\text{CO}_2$ .

Theo dõi hàng ngày và đọc kết quả từ ngày thứ 4 cho đến ngày thứ 7.

Thử nghiệm có giá trị khi:

Giếng chứng tế bào vẫn phát triển bình thường.

Có xuất hiện hủy hoại trên tế bào Vero ở các nồng độ vắc xin pha loãng.

**Nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR**

Dùng môi đặc hiệu cho virus quai bị.

Có thông tin chi tiết về đoạn môi này.

Thử nghiệm bao gồm mẫu thử và chứng âm.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Vắc xin đạt yêu cầu khi sản phẩm RT-PCR có băng kích cỡ (size) đúng.

**Khuyến cáo:**

Có thể dùng cặp môi như sau:

Môi xuôi  $5'$ -AGT AGT GTC GAT GAT CTC AT-3'

Môi ngược  $5'$ -GCT CAA GCC TTG ATC ATT GA-3'

Kích cỡ sản phẩm: 674 bp.

Chu trình nhiệt/thời gian:

$50\text{ }^\circ\text{C}/30\text{ min}$ ;

$95\text{ }^\circ\text{C}$ /thời gian (theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR);

$94\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$

$55\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$

$72\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$

$72\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ min}$ ;

$4\text{ }^\circ\text{C}$ /đến khi điện di.

**Hiệu giá vắc xin**

Hiệu giá vắc xin quai bị được xác định bởi liều gây hủy hoại 50 % tế bào Vero ( $\text{CCID}_{50}$ ).

**Nguyên vật liệu:**

Mẫu vắc xin quai bị thử nghiệm: 3 lọ, kèm theo nước hồi chính.

Vắc xin quai bị mẫu chuẩn: 1 lọ

Hai chai tế bào Vero loại 75  $\text{cm}^2$  mọc đẹp, kín một lớp.

**Các hóa chất:**

PBS (Phosphate buffered Saline).

Trysin 0,25 % EDTA.

MEM hoặc M199 có chứa 2 % FBS (huyết thanh bào thai bê).

**Tiến hành:**

Thử nghiệm được tiến hành trong tủ cấy vô trùng BSC class II, trong khu vực vô trùng.

Tiến hành trên ít nhất 3 thử nghiệm kép cho vắc xin mẫu thử và tính kết quả bằng giá trị trung bình nhân của 3 thử nghiệm đó.

Pha loãng vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử:

Ví dụ: Tiến hành pha loãng theo Bảng 1.

*Bảng 1: Ví dụ về cách tiến hành pha loãng vắc xin*

Độ pha loãng	Thể tích môi trường (ml)	Thể tích vắc xin (ml)
$10^{-1.0}$ (A)	2,7	0,3
$10^{-1.5}$ (B)	2,16	1 (từ A)
$10^{-2.0}$ (C)	2,16	1 (từ B)
$10^{-2.5}$ (D)	2,16	1 (từ C)
$10^{-3.0}$ (E)	2,16	1 (từ D)
$10^{-3.5}$ (F)	2,16	1 (từ E)
$10^{-4.0}$ (G)	2,16	1 (từ F)
$10^{-4.5}$ (H)	2,16	1 (từ G)
$10^{-5.0}$ (K)	2,16	1 (từ H)

Tiến hành cho môi trường theo bảng trên vào các lọ thủy tinh nhỏ.

Hồi chính vắc xin, lắc kỹ rồi lấy 0,3 ml cho vào độ pha loãng đầu tiên  $10^{-1}$ , lắc kỹ rồi lấy 1 ml nhỏ vào lọ có độ pha  $10^{-1.5}$ , tiếp tục quy trình tương tự đến độ pha cuối cùng. Chú ý thay đầu côn sau mỗi độ pha.

Sau khi pha loãng xong tiến hành nhỏ vào phiến theo hàng ngang, mỗi độ pha loãng nhỏ 10 giếng, mỗi giếng 100  $\mu\text{l}$ . Nhỏ theo độ pha loãng từ thấp đến cao, nếu làm ngược lại phải thay đầu côn ở mỗi độ pha loãng.

Nhỏ vào 2 dãy giếng còn lại mỗi giếng 100  $\mu\text{l}$  môi trường. Lặp lại quy trình trên với các lọ vắc xin còn lại và vắc xin chuẩn.

Sau khi pha loãng xong, cất phiến vào ngăn mát tủ lạnh ( $2\text{ }^\circ\text{C}$  đến  $8\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Tiến hành chuẩn bị hỗn dịch tế bào, lượng tế bào cần là  $2 \times 10^5$  tế bào/ml.

Tế bào được nuôi cấy, tách, pha đủ lượng tế bào theo đậm độ nêu trên và đổ ra màng.

Lấy phiến ra và tiến hành nhỏ tế bào lên tất cả các giếng, mỗi giếng 100  $\mu\text{l}$ .

Cất vào tủ âm 36 °C có 5 % CO<sub>2</sub>.

Đọc kết quả từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 9.

*Cách đọc và tính kết quả:*

Khi tiến hành đọc kết quả thì quan sát các giếng chứng dưới kính hiển vi phản pha trước để dễ phân biệt sự hủy hoại tế bào của virus với tế bào Vero phát triển bình thường. Chỉ cần có dấu hiệu hủy hoại tế bào thì giếng đó được tính là "hủy hoại".

Tính kết quả theo công thức Karber hoặc Reed - Muench như sau:

$$\log CCID_{50} = L - d \times (S - 0,5)$$

Trong đó:

L là log bậc pha loãng thấp nhất dùng trong phản ứng;

D là log hệ số pha loãng;

S là tổng số phần trăm các giếng hủy hoại.

*Thử nghiệm có giá trị nếu:*

Các giếng chứng tế bào mọc đẹp, không bị nhiễm nấm, vi khuẩn.

Hiệu giá của vắc xin chuẩn dao động trong vòng  $0,5 \log_{10}$  so với hiệu giá vắc xin đã xác định của chuẩn.

Hiệu giá của 3 lọ vắc xin mẫu thử song song không lệch quá  $0,5 \log_{10}$ .

Kết quả hủy hoại giảm dần theo độ pha loãng tăng dần của vắc xin.

Dãy các độ pha loãng sử dụng phải bao gồm được mức độ hủy hoại tế bào từ 0 % đến 100 %.

*Tiêu chuẩn chấp thuận:*

Hiệu giá virus của vắc xin quai bị xác định được không được nhỏ hơn lượng ghi trên nhãn. Hiệu giá virus tối thiểu ghi trên nhãn không được nhỏ hơn  $10^3$  CCID<sub>50</sub> đối với một liều đơn cho người.

*Tính ổn định nhiệt*

Thử nghiệm tính ổn định của vắc xin quai bị được tiến hành trên nguyên tắc xác định hiệu giá mẫu thử khi được ủ ở 37 °C, so với mẫu được bảo quản ở (5 ± 3) °C trong 7 ngày.

Tiến hành xác định hiệu giá virus theo phương pháp tương tự như mô tả ở trên.

*Tiêu chuẩn chấp thuận:* Mẫu vắc xin đạt yêu cầu khi hiệu giá virus của mẫu ủ ở 37 °C không giảm quá 1lg so với vắc xin mẫu thử bảo quản ở (5 ± 3) °C. Hiệu giá thấp nhất phải không được nhỏ hơn  $10^3$  CCID<sub>50</sub>/0,5 ml (1 liều đơn dùng cho người).

*An toàn chung* (Phụ lục 15.11).

Vắc xin quai bị phải đạt yêu cầu về an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi.

*Vô khuẩn*

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

*Độ ẩm tồn dư*

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 15.35).

*Cảm quan*

Đạt yêu cầu theo đăng ký của nhà sản xuất.

*Mycoplasma*

Không được có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

Khuyến cáo: Có thể sử dụng phương pháp PCR để xác định sự có mặt của *Mycoplasma* trong vắc xin quai bị.

*Ovalbumin*

Nếu vắc xin được sản xuất từ phôi gà hoặc chim, hàm lượng ovalbumin phải không được quá 1 µg ovalbumin/ liều đơn cho người, xác định hàm lượng này theo phương pháp hóa miễn dịch.

*Albumin tồn dư*

Nhỏ hơn 50 ng/liều đơn dùng cho người. Xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch thích hợp.

*Bảo quản*

Vắc xin quai bị được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

*Nhãn*

Theo quy định hiện hành, và cần có các thông tin sau đây:

Tên chủng virus được sử dụng sản xuất;

Loại tế bào sử dụng cho sản xuất;

Hiệu giá thấp nhất của virus;

Lượng kháng sinh còn tồn dư trong vắc xin, các chất bảo quản và hàm lượng của chúng (nếu có);

Bảo quản vắc xin trong điều kiện tránh ánh sáng;

Các yếu tố phải tránh tiếp xúc trực tiếp với vắc xin.

*Cách dùng, liều dùng*

Tiêm dưới da, liều 0,5 ml hoặc 0,7 ml (theo quy định của nhà sản xuất).

## VẮC XIN ROTA SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC (UỐNG)

*Vaccinum rotaviri vivum perorale*

Vắc xin rota sống giảm độc lực (uống) là chế phẩm chứa virus Rota sống, giảm độc lực, dạng lỏng hoặc đông khô. Chế phẩm đông khô sau khi được hồi chỉnh với dung dịch hồi chỉnh tạo thành dung dịch cho màu khi có mặt của chỉ thị pH.

*Sản xuất*

*Chủng sản xuất*

Sản xuất phải dựa trên hệ thống chủng giống. Số đời từ chủng gốc cấy chuyển sang vắc xin thành phẩm cuối cùng phải ít hơn số đời từ chủng gốc cấy chuyển sang vắc xin thử nghiệm lâm sàng, nếu không có quy định khác và phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng phải được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C) nếu ở dạng không đông khô và dưới âm 20 °C (-20 °C) nếu ở dạng đông khô.

*Tế bào sản xuất*

Tế bào dùng cho sản xuất vắc xin phải đạt các yêu cầu quy định của Tổ chức Y tế Thế giới. Có thể sử dụng huyết thanh động vật trong môi trường nuôi cấy tế bào, nhưng



trong môi trường duy trì tế bào khi nhân virus không được có protein. Có thể có độ phenol và các kháng sinh phù hợp ở nồng độ cho phép trong môi trường nuôi cấy tế bào.

#### **Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất**

Quy trình sản xuất phải tuân thủ theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới. Phải thực hiện các thử nghiệm kiểm định trong quá trình sản xuất ở các công đoạn: Vật liệu nguồn (tế bào, môi trường nuôi cấy,...); mẻ gặt đơn, bán thành phẩm trước ly tâm, trước lọc, bán thành phẩm sau lọc, vắc xin thành phẩm. Vắc xin phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin dùng cho người và chỉ được cho phép sử dụng sau khi đạt được các yêu cầu sản xuất và kiểm định trong quá trình sản xuất, đồng thời đạt các yêu cầu dưới đây.

#### **Sự nhân virus, các mẻ gặt đơn typ**

Tế bào sử dụng và quá trình nuôi cấy thực hiện trong điều kiện vô trùng. Huyết thanh và trypsin sử dụng không được chứa các yếu tố ngoại lai. Huyết thanh động vật được sử dụng trong môi trường phát triển hoặc môi trường duy trì để nuôi cấy tế bào; trong quá trình nhân lên của virus, bắt buộc môi trường không có huyết thanh. Môi trường nuôi cấy tế bào có thể chứa một lượng nhỏ phenol và kháng sinh thích hợp. Điều kiện lý tưởng là môi trường nuôi cấy không chứa kháng sinh.

Cất giữ virus trung gian trong quá trình nuôi cấy ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (dưới - 60 °C).

Gây nhiễm virus, kiểm tra các điều kiện nhận dạng, vô khuẩn và nồng độ virus. Thu hoạch các mẻ gặt đơn typ. Các mẻ gặt đơn typ phải tuân theo các tiêu chuẩn để làm tinh sạch các mẻ gặt đơn typ. Yêu cầu kiểm tra các thử nghiệm nhận dạng, vô khuẩn, nồng độ virus và các yếu tố ngoại lai.

#### **Tinh sạch các mẻ gặt đơn, các tiêu chí kiểm tra mẻ gặt đơn**

Tinh sạch các mẻ gặt đơn từ các mẻ gặt đơn typ đã tinh sạch. Các mẻ gặt đơn typ được lọc để loại bỏ các mảnh vỡ tế bào. Chỉ những mẻ gặt đơn typ tinh sạch theo tiêu chuẩn mới được sử dụng làm bán thành phẩm vắc xin.

**Vô khuẩn:** Đáp ứng yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Nồng độ virus:** Được xác định bằng phương pháp trên tế bào gây nhiễm và phương pháp PCR.

**ADN tồn dư:** Tối đa 100 µg ADN/liều đơn dùng cho người (đối với virus nuôi cấy trên tế bào sống).

#### **Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Bán thành phẩm cuối cùng được chuẩn bị từ một hoặc nhiều mẻ gặt đơn đã tinh sạch chứa nhiều hơn 1 typ virus. Thêm chất ổn định thích hợp.

**Vô khuẩn:** Đáp ứng yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

##### **Cảm quan**

Mỗi lọ vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất đều phải được kiểm tra bằng cảm quan đối với từng đơn vị đóng gói nhỏ nhất để đảm bảo: không có vật lạ trong lọ vắc xin;

nắp hay nút phải chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, cần loại bỏ lọ vắc xin nếu thấy không đạt yêu cầu.

##### **Nhận dạng**

Virus vắc xin được đóng trong lọ vắc xin thành phẩm phải được nhận dạng là virus rota, đối với vắc xin rota đa giá thì cần nhận dạng mỗi typ virus bằng phương pháp phù hợp. Các phương pháp như trung hòa tạo đám hoại tử, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang phù hợp cho nhận dạng sự có mặt của virus rota khi sử dụng kháng huyết thanh đa dòng đặc hiệu. Kỹ thuật RT-PCR cũng có thể được sử dụng.

##### **Vô khuẩn**

Đáp ứng yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

##### **pH**

pH của loạt vắc xin thành phẩm được kiểm tra sau khi hỗn các lọ vắc xin thành phẩm đạt được giới hạn thể tích phù hợp để đo pH. Trong trường hợp là vắc xin đông khô, pH được đo sau khi hồi chính vắc xin với dung dịch hồi chính kèm theo. pH của vắc xin phải nằm trong khoảng giới hạn đã đăng ký.

##### **Độ ẩm**

Độ ẩm tồn dư của vắc xin dưới dạng đông khô không được quá 3,0 % (Phụ lục 15.35).

##### **Công hiệu**

Hiệu giá của vắc xin thành phẩm được xác định riêng biệt đối với tối thiểu 3 lọ vắc xin.

Sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang hoặc kỹ thuật tạo đám hoại tử trên tế bào MA-104, hoặc Vero hoặc những tế bào nhạy cảm khác để xác định hiệu giá. Kết quả được tính bằng FFU/liều hoặc PFU/ml. Hiệu giá của vắc xin cũng có thể được xác định bằng phương pháp vi lượng trên tế bào thích hợp, kết quả được tính theo đơn vị CCID<sub>50</sub>/liều.

Vắc xin đông khô được hồi chính với dung dịch pha loãng kèm theo để xác định hiệu giá virus.

Một giới hạn về hiệu giá đối với liều vắc xin sử dụng cần được nhà sản xuất thiết lập sau khi đã được chứng minh qua thử nghiệm lâm sàng về tính an toàn và đáp ứng miễn dịch của vắc xin trên người. Các chỉ tiêu kỹ thuật về hiệu giá tối thiểu đối với 1 liều sử dụng cần được xác định cụ thể và được sự chấp thuận của cơ quan thẩm quyền quốc gia.

Công hiệu của vắc xin phải đạt yêu cầu tối thiểu theo hàm lượng ghi trên nhãn.

Khuyến cáo: Đối với vắc xin đông khô thì hiệu giá của vắc xin phải đạt tối thiểu 10<sup>6,0</sup>CCID<sub>50</sub>/liều.

Có thể sử dụng đơn vị PFU, FFU.

##### **Thử nghiệm tính ổn định nhiệt**

Xác định hiệu giá virus trên liều sử dụng khi để vắc xin ở nhiệt độ bảo quản theo quy định và để vắc xin ở nhiệt độ tăng cường. Mức độ hiệu giá giảm tối đa cho phép trong quá trình thử nghiệm tính ổn định nhiệt được xác nhận dựa trên kinh nghiệm của nhà sản xuất đã đăng ký và được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền. Đối với vắc xin đa giá,



nếu không có sự khác biệt có ý nghĩa về hiệu giá giữa các serotype thì mức độ giảm hiệu giá có thể căn cứ vào hiệu giá tổng.

**Khuyến cáo:** Đối với vắc xin đông khô thì hiệu giá của vắc xin để ở 37 °C trong 7 ngày không được giảm quá 0,5logCCID<sub>50</sub> so với vắc xin bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, đồng thời phải đạt điều kiện hiệu giá vắc xin ổn định nhiệt phải đạt tối thiểu 10<sup>6</sup>CCID<sub>50</sub>/liều.

Có thể sử dụng đơn vị PFU, FFU.

#### **Bảo quản**

Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C.

#### **Hạn dùng**

Theo sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia.

#### **Nhãn**

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu quy định hiện hành.

#### **Nước hồi chỉnh**

Nước hồi chỉnh được sản xuất theo tiêu chuẩn GMP được cơ quan kiểm định quốc gia phê duyệt.

### **VẮC XIN RUBELLA**

#### ***Vaccinum rubellae vivum***

Vắc xin rubella là một chế phẩm chứa virus rubella sống, giảm độc lực, dạng đông khô; được sản xuất từ các virus phát triển trên dòng tế bào thích hợp.

Hoàn nguyên vắc xin ngay trước khi sử dụng bằng nước hồi chỉnh như đã ghi trên nhãn, được dung dịch trong, có thể có màu nếu có chất chỉ thị pH.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây:

#### **Sản xuất**

##### ***Chủng sản xuất***

Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng gốc virus giảm độc lực, được phê duyệt bởi Cơ quan Kiểm định quốc gia. Chủng virus rubella dùng để sản xuất vắc xin sẽ phải được xác định bằng hồ sơ ghi chép lịch sử chủng bao gồm những thông tin về chủng gốc và các đời nhân lên tiếp theo của chủng này. Chủng sản xuất được bảo quản ở dạng đông khô trong điều kiện nhiệt độ dưới âm 20 °C (-20 °C); nếu không đông khô phải được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C) và được giám sát chặt chẽ nhiệt độ trong quá trình bảo quản.

Chủng sản xuất phải tuân thủ các điều kiện dưới đây:

##### ***Nhận dạng***

Các lô chủng gốc và chủng sản xuất phải được nhận dạng virus rubella bằng phương pháp trung hòa với kháng huyết thanh đặc hiệu rubella trên nuôi cấy tế bào hoặc nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR.

##### ***Hàm lượng virus***

Hàm lượng virus của các lô chủng gốc và chủng sản xuất phải được kiểm tra để đảm bảo tính ổn định của sản xuất.

##### ***Các yếu tố ngoại lai***

Lô chủng sản xuất phải tuân thủ các yêu cầu đối với đối với các lô chủng sản xuất vắc xin, không được có các yếu tố ngoại lai.

##### ***Độc lực***

Lô chủng sản xuất phải tuân thủ yêu cầu về thử nghiệm kiểm tra độc lực của các vắc xin sống. Khi *Macaca* và *Cercopithecus* phù hợp với thử nghiệm này.

##### ***Tế bào sản xuất***

Sử dụng ngân hàng tế bào sản xuất hoặc từ tế bào phôi có nguồn gốc từ trứng không có tác nhân gây bệnh (SPF) và được Cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

##### ***Huyết thanh dùng trong môi trường nuôi cấy tế bào***

Huyết thanh dùng để nhân tế bào dùng cho sản xuất vắc xin rubella phải được kiểm tra và chứng minh là đạt yêu cầu vô khuẩn (không có vi khuẩn, nấm và *Mycoplasma* và chứng minh không chứa virus).

Huyết thanh người không được sử dụng trong tất cả các nuôi cấy của quá trình sản xuất vắc xin.

##### ***Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất***

Chủng virus rubella được phát triển trên tế bào phôi hoặc tế bào từ ngân hàng tế bào sử dụng môi trường thích hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hột, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng, đóng lọ và đông khô theo quy trình đã được phê chuẩn. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn (trứng, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bào thai bê, trypsin tách tế bào,...); tế bào sử dụng cho sản xuất, mẻ gặt đơn, loạt hỗn dịch virus hột, vắc xin bán thành phẩm trung gian, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm được kiểm tra tác nhân ngoại lai, kiểm tra hiệu giá virus, kiểm tra tính vô khuẩn... Tất cả quá trình sản xuất ngân hàng tế bào và các nuôi cấy tế bào tiếp theo sau đó phục vụ cho quá trình sản xuất vắc xin rubella đều phải được tiến hành trong các điều kiện vô trùng, trong khu vực không lưu giữ các dòng tế bào khác. Huyết thanh động vật có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy của quá trình sản xuất. Huyết thanh và trypsin dùng để pha chế huyền dịch tế bào và pha môi trường nuôi cấy sẽ phải cho thấy không chứa các yếu tố ngoại lai. Môi trường nuôi cấy tế bào có thể chứa một chỉ thị pH như đỏ phenol và lượng kháng sinh nhỏ nhất có tác dụng.

##### ***Kiểm định mẻ gặt đơn***

Mỗi mẻ gặt đơn phải đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng:

##### ***Nhận dạng***

Mẻ gặt đơn chứa virus rubella sẽ phải được nhận dạng virus bằng phương pháp trung hòa huyết thanh trên môi trường nuôi cấy có sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng phương pháp PCR.

##### ***Nồng độ virus***

Nồng độ virus trong mỗi mẻ gặt đơn phải được xác định để giám sát tính ổn định của sản xuất và từ đó xác định độ pha được dùng cho vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Các yếu tố ngoại lai**

Mỗi mẻ gặt đơn đều phải kiểm tra để xác định không chứa các yếu tố ngoại lai.

**Kiểm tra tế bào và trứng**

Nếu sử dụng tế bào lưỡng bội người cho sản xuất, phải kiểm tra tế bào chứng để nhận dạng; các tế bào chứng và trứng chứng phải được kiểm tra để xác định không chứa các yếu tố ngoại lai.

Vắc xin rubella sống giảm độc lực có thể được điều chế với chất ổn định thích hợp và đông khô ở dạng vắc xin đơn hoặc phối hợp với vắc xin sởi và quai bị sống giảm độc lực.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Các mẻ gặt đơn vắc xin đạt các yêu cầu nêu trên sẽ được hỗn lại và lọc để loại bỏ tế bào. Thêm chất ổn định thích hợp và các mẻ gặt đã được hỗn sẽ được pha thành độ pha loãng thích hợp.

Mỗi lô vắc xin bán thành phẩm cuối cùng sẽ phải đạt các yêu cầu dưới đây mới được tiếp tục tiến hành các bước tiếp theo để sản xuất vắc xin thành phẩm.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Nhận dạng**

Sử dụng phương pháp thích hợp đã được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Nhận dạng bằng phương pháp trung hòa vi lượng**

Dùng kháng thể đặc hiệu trung hòa vắc xin rubella. Hỗn dịch virus rubella - kháng thể sau phản ứng, được dùng để gây nhiễm trên tế bào RK-13 một lớp. Thử nghiệm luôn có chứng âm và chứng dương đi kèm, đọc kết quả sau 2 tuần.

**Tiến hành:**

Ngày thứ nhất:

Nuôi cấy tế bào trên phiến 6 giếng hoặc 24 giếng.

Lượng tế bào:  $1.10^5$  tế bào/ml đến  $1,5.10^5$  tế bào/ml hỗn dịch.

Ngày thứ 2:

Pha kháng thể theo các độ pha loãng khác nhau.

Hoàn nguyên vắc xin bằng nước hồi chính kèm theo.

Trộn kháng nguyên, kháng thể theo tỉ lệ thể tích 1 : 1 (phản ứng trung hòa).

Ủ hỗn dịch đã trung hòa (có kháng nguyên và kháng thể) và hỗn dịch không trung hòa (chỉ có vắc xin ở các nồng độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ; và chỉ có kháng thể theo độ pha phù hợp) trong chu trình nhiệt thích hợp.

Khuyến cáo: Có thể dùng chu trình nhiệt như sau: đặt vào bể ổn định nhiệt 37 °C/30 min, 23 °C/ 30 min, 4 °C trong 18 h trở lên ( $\geq 18$  h).

Ngày thứ 3:

Gây nhiễm trên tế bào: Nhỏ hỗn dịch đã trung hòa và không trung hòa vào các giếng trên phiến tế bào đã chuẩn bị trước. Phải có các giếng chứng tế bào, chứng vắc xin theo các nồng độ, chứng kháng thể theo các độ pha kèm theo.

Đặt vào tủ ẩm 32 °C có 5 % CO<sub>2</sub>.

Theo dõi hàng ngày và đọc kết quả từ ngày thứ 4 cho đến ngày thứ 7.

Thử nghiệm có giá trị khi ở giếng chứng âm tế bào vẫn phát triển bình thường; trong khi đó, có xuất hiện hủy hoại tế bào ở giếng chứng dương.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Vắc xin đạt yêu cầu khi tế bào RK-13 không bị hủy hoại ở giếng chứa vắc xin, giống như mẫu chứng âm.

**Nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR**

Dùng mỗi đặc hiệu cho virus rubella.

Có thông tin chi tiết về đoạn mỗi này.

Thử nghiệm bao gồm mẫu thử và chứng âm.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Vắc xin đạt yêu cầu khi sản phẩm RT-PCR có băng kích cỡ (size) đúng.

**Khuyến cáo:**

Có thể dùng cặp môi như sau:

Mỗi xuôi: 5'-CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC-3'.

Mỗi ngược: 5'-CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA-3'.

Kích thước: 185 bp.

Chu trình nhiệt/thời gian:

50 °C/30 min;

95 °C/thời gian (theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR);

94 °C/1 min

60 °C/1 min } 35 chu kỳ;

72 °C/1 min }

72 °C/10 min

4 °C/đến khi điện di.

**Hiệu giá vắc xin**

**Nguyên tắc:** Hiệu giá vắc xin rubella được xác định bởi liều gây hủy hoại 50 % tế bào RK-13 (CCID<sub>50</sub>).

**Vật liệu:**

Mẫu vắc xin rubella thử nghiệm: 3 lọ, kèm theo nước hồi chính.

Vắc xin rubella mẫu chuẩn: 1 lọ

Hai chai tế bào RK-13 loại 75 cm<sup>2</sup> mọc đẹp, kín một lớp.

**Hóa chất:**

PBS: Phosphate buffered Saline

Trysin 0,25 % EDTA

MEM 2 % đến 5 % FBS (huyết thanh bào thai bê)

**Tiến hành:**

Thử nghiệm được tiến hành trong tủ cấy vô trùng BSC class II, trong khu vực vô trùng.

Tiến hành trên ít nhất 3 thử nghiệm kép cho 3 lọ vắc xin mẫu thử riêng biệt và tính kết quả bằng giá trị trung bình nhân của 3 thử nghiệm đó.

Pha loãng vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử từ độ pha từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-5}$ ;

Ví dụ: Tiến hành pha loãng như Bảng 1.

Bảng 1: Ví dụ về cách tiến hành pha loãng vắc xin

Độ pha loãng	Thể tích môi trường (ml)	Thể tích vắc xin (ml)
10 <sup>-1.0</sup> (A)	2,7	0,3
10 <sup>-1.5</sup> (B)	2,16	1 (từ A)
10 <sup>-2.0</sup> (C)	2,16	1 (từ B)
10 <sup>-2.5</sup> (D)	2,16	1 (từ C)
10 <sup>-3.0</sup> (E)	2,16	1 (từ D)
10 <sup>-3.5</sup> (F)	2,16	1 (từ E)
10 <sup>-4.0</sup> (G)	2,16	1 (từ F)
10 <sup>-4.5</sup> (H)	2,16	1 (từ G)
10 <sup>-5.0</sup> (K)	2,16	1 (từ H)

Cho môi trường theo bảng trên vào các lọ hoặc ống thủy tinh vô khuẩn có thể tích 3 ml đến 6 ml.

Hồi chỉnh vắc xin, lắc kỹ rồi lấy 0,3 ml cho vào độ pha loãng đầu tiên 10<sup>-1</sup>.

Lắc kỹ, lấy 1 ml nhỏ vào lọ có độ pha 10<sup>-1.5</sup>.

Tiếp tục quy trình tương tự đến độ pha cuối cùng. Chú ý thay đầu côn sau mỗi độ pha.

Sau khi pha loãng xong, tiến hành nhỏ vào phiến vi chuẩn độ theo hàng ngang, mỗi độ pha loãng nhỏ 10 giếng, mỗi giếng 100 µl.

Nhỏ theo độ pha loãng từ thấp đến cao, nếu làm ngược lại phải thay đầu côn ở mỗi độ pha loãng.

Nhỏ vào 2 dãy giếng còn lại mỗi giếng 100 µl môi trường.

Mỗi lọ vắc xin thực hiện một quy trình riêng biệt như trên.

Lặp lại quy trình trên với lọ vắc xin còn lại và vắc xin chuẩn.

Cất các phiến đã nhỏ xong vào tủ lạnh (2 °C đến 8 °C).

Tiến hành chuẩn bị hỗn dịch tế bào: Lượng tế bào cần là từ 1 × 10<sup>5</sup> tế bào/ml đến 2 × 10<sup>5</sup> tế bào/ml.

Nuôi cấy, tách tế bào và pha đủ thể tích tế bào cần dùng với đậm độ thích hợp nêu trên rồi đổ ra máng.

Lấy phiến ra và tiến hành nhỏ tế bào lên tất cả các giếng, mỗi giếng 100 µl.

Ủ ở tủ ấm 32 °C trong khoảng 12 ngày.

Đọc kết quả từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 12.

**Cách đọc và tính kết quả:**

Khi tiến hành đọc kết quả thì quan sát các giếng chứng trên kính hiển vi phân pha trước để dễ phân biệt sự hủy hoại tế bào của virus với các tế bào RK-13 phát triển bình thường.

Dấu hiệu hủy hoại là tế bào co lại tạo thành tế bào không lồ đa nhân, tạo những khoảng trống trên mặt đáy phiến, chỉ cần có dấu hiệu hủy hoại tế bào thì giếng đó được tính là "hủy hoại".

Tính kết quả theo công thức Karber hoặc Reed - Muench:

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

Trong đó:  
L là log bậc pha loãng thấp nhất dùng trong phản ứng;  
d là log hệ số pha loãng;

S là tổng số phản âm các giếng hủy hoại.

**Thử nghiệm có giá trị nếu:**  
Các giếng chứng tế bào mọc đẹp, không bị nhiễm nấm, vi khuẩn.

Hiệu giá của vắc xin chuẩn dao động trong vòng 0,5log<sub>10</sub> so với hiệu giá vắc xin đã xác định của chuẩn.

Hiệu giá của 3 lọ vắc xin mẫu cần kiểm tra song song không lệch quá 0,5log<sub>10</sub>.

Kết quả hủy hoại giảm dần theo độ pha loãng tăng dần của vắc xin.

Dãy các độ pha loãng sử dụng phải bao gồm được mức độ hủy hoại tế bào từ 0 % đến 100 %.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Hiệu giá virus của vắc xin rubella cần kiểm tra không được nhỏ hơn lượng ghi trên nhãn. Hiệu giá virus tối thiểu ghi trên nhãn không được nhỏ hơn lg10<sup>3</sup> CCID<sub>50</sub> đối với một liều đơn cho người.

**Tính ổn định nhiệt**

Thử nghiệm tính ổn định của vắc xin rubella được tiến hành bằng cách so sánh hiệu giá của mẫu vắc xin cần kiểm tra được ủ ở 37 °C với mẫu được ủ ở (5 ± 3) °C, trong 7 ngày.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Tính ổn định nhiệt của vắc xin đạt yêu cầu khi hiệu giá virus của vắc xin mẫu được ủ ở 37 °C không giảm quá 1lg so với vắc xin mẫu ủ ở (5 ± 3) °C. Hiệu giá thấp nhất không được nhỏ hơn lg10<sup>3</sup> CCID<sub>50</sub>/0,5 ml (1 liều đơn dùng cho người).

**An toàn chung** (Phụ lục 15.11)

Vắc xin rubella phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Độ ẩm**

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 15.35).

**Cảm quan**

Đạt yêu cầu theo đăng ký của nhà sản xuất.

**Mycoplasma**

Không được có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

Khuyến cáo: Có thể dùng phương pháp nuôi cấy trực tiếp hoặc PCR để phát hiện *Mycoplasma* trong vắc xin.

**Albumin tồn dư**

Nhỏ hơn 50 ng/liều đơn dùng cho người. Xác định bằng phương pháp hoá miễn dịch thích hợp.

**Bảo quản**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

**Nhãn**

Theo quy định hiện hành và cần có các thông tin như sau:  
Tên chủng virus được sử dụng sản xuất.

Loại tế bào sử dụng cho sản xuất.

Nồng độ thấp nhất của virus.

Lượng kháng sinh còn tồn dư trong vắc xin, các chất bảo quản và liều lượng của chúng (nếu có).

Các yếu tố phải tránh tiếp xúc trực tiếp với vắc xin.  
 Chú ý: Vắc xin quai bị nhạy cảm với ánh sáng, vì vậy phải bảo quản tránh ánh sáng đối với vắc xin đông khô và vắc xin đã hoàn nguyên.  
 Phụ nữ mang thai và những phụ nữ sắp có thai trước hai tháng: Không nên tiêm vắc xin này.

**Cách dùng, liều dùng**

Tiêm dưới da, liều 0,5 ml.

**VẮC XIN SỞI**

*Vaccinum morbillorum vivum*

Vắc xin sởi là chế phẩm chứa virus sởi sống giảm độc lực, đông khô, được phát triển trên nuôi cấy tế bào thích hợp. Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu sau đây.

**Sản xuất**

*Chủng sản xuất:* Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng giống gốc (Master seed) virus giảm độc lực được phê chuẩn bởi Viện Kiểm định quốc gia, chủng được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C).

*Tế bào sản xuất:* Sử dụng ngân hàng tế bào sản xuất hoặc từ tế bào phôi gà có nguồn gốc từ trứng gà không có tác nhân gây bệnh (SPF). Tế bào dùng cho sản xuất vắc xin phải đạt các yêu cầu theo qui định của Tổ chức Y tế Thế giới.

*Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất:* Chủng virus sởi được phát triển trên tế bào phôi gà hoặc tế bào từ ngân hàng tế bào sử dụng môi trường phù hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hện, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng và đông khô theo qui trình đã được phê chuẩn. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn (trứng gà, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bê, trypsin tách tế bào...); tế bào sử dụng cho sản xuất, vắc xin bán thành phẩm, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm.

*Hình dạng bên ngoài:* Bao gồm 01 lọ vắc xin sởi đông khô và 01 lọ nước hồi chính vắc xin để tiêm.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Nhận dạng**

Tiến hành theo phương pháp thích hợp, như phương pháp trung hòa vi lượng hoặc miễn dịch huỳnh quang.

*Tiêu chuẩn:* Là virus sởi.

**Vô khuẩn**

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Mycoplasma**

Vắc xin sởi phải không có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

**Công hiệu và tính ổn định nhiệt**

Chuẩn độ hiệu giá và thử nghiệm tính ổn định nhiệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng trên nuôi cấy tế bào Vero hoặc phương pháp tạo đám hoại tử PFU trên tế bào vero.

*Phương pháp tạo đám hoại tử:* Gây nhiễm vắc xin đã pha loãng 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>; 10<sup>-3</sup>; ... lên tế bào vero kín 1 lớp (phiến 6 giếng), hấp phụ ở (37 ± 1) °C trong 60 min, phủ thạch lần 1 (không có đồ trung tính), nuôi ở (37 ± 1) °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong 7 ngày, phủ thạch lần 2 ở ngày thứ 7 (có đồ trung tính), nuôi ở (37 ± 1) °C, 5 % CO<sub>2</sub> trong 3 ngày, đếm đám hoại tử (PFU) không bắt màu trên nền tế bào bắt màu đỏ, tính hiệu giá/0,5 ml.

*Chuẩn độ hiệu giá trung hòa vi lượng:* Vắc xin sởi được hồi chính và pha loãng bậc 10 từ nồng độ 10<sup>-1</sup> đến 10<sup>-5</sup> bằng môi trường DMEM 2 % huyết thanh bê. Sau đó cho vào mỗi giếng 0,1 ml hỗn dịch virus đã được pha loãng, 10 giếng/1 nồng độ. Cho 0,1 ml hỗn dịch tế bào Vero (150 000 tế bào/ml) vào mỗi giếng, ủ ở 36 °C trong 9 ngày. Kết quả được tính theo công thức Karber.

Thử nghiệm đạt khi có hiệu giá 1000 CCID<sub>50</sub>/0,5 ml.

*Xác định tính ổn định nhiệt:* Vắc xin sởi được bảo quản ở nhiệt độ 37 °C trong 1 tuần, hiệu giá vắc xin không được giảm quá 1 log so với mẫu vắc xin sởi bảo quản ở 4 °C.

Thử nghiệm đạt khi mẫu ổn định nhiệt có hiệu giá >1000 CCID<sub>50</sub>/0,5ml.

**An toàn chung**

Vắc xin sởi phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi. Phụ lục 15.11.

**Độ ẩm tồn dư**

Độ ẩm tồn dư của vắc xin không được quá 3 % (Phụ lục 15.35).

Albumin tồn dư: Dưới 50 ng/ml.

**Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin sởi được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C, tránh ánh sáng.

Trong điều kiện bảo quản như trên vắc xin sởi có hạn dùng là 24 tháng kể từ ngày kiểm tra công hiệu lần cuối cùng.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**Liều tiêm, đường tiêm**

Tiêm dưới da, liều tiêm 0,5 ml/liều.

**VẮC XIN SỞI, QUAI BỊ VÀ RUBELLA (VẮC XIN MMR)**

*Vaccinum morbillorum, parotitidis et rubellae vivum*

Vắc xin phối hợp sởi, quai bị và rubella là chế phẩm đông khô được sản xuất từ chủng virus sởi, quai bị và rubella sống, giảm độc lực thích hợp.

Vắc xin được hoàn nguyên với dung dịch hồi chính ngay trước khi sử dụng tạo thành dung dịch trong suốt, đổi màu khi có mặt của chỉ thị pH.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây:

**Sản xuất****Chủng sản xuất**

Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng gốc virus giảm độc lực được phê chuẩn bởi cơ quan Kiểm định quốc gia.

**Tế bào sản xuất**

Sử dụng tế bào sản xuất từ ngân hàng tế bào có nguồn gốc từ người, động vật hay dạng khác; không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu (SPF) và được cơ quan Kiểm định quốc gia phê chuẩn. Tế bào chủng gốc và tế bào sản xuất được bảo quản ở dạng đông băng âm 70 °C (- 70 °C) hoặc trong nitrogen lỏng.

**Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất**

Chủng virus sởi, quai bị, rubella được nuôi cấy trên tế bào phôi hoặc tế bào từ ngân hàng tế bào trong môi trường thích hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hỗn, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng, đóng lọ và đông khô theo qui trình đã được phê chuẩn. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn (trứng, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bào thai bê, trypsin tách tế bào, ...); tế bào sử dụng cho sản xuất, mẻ gặt đơn, loạt hỗn dịch virus hỗn, vắc xin bán thành phẩm trung gian, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, ... được kiểm tra tác nhân ngoại lai, kiểm tra nồng độ virus, kiểm tra tính vô khuẩn.

**Các mẻ gặt đơn**

Các mẻ gặt đơn từng thành phần sởi, quai bị, rubella phải đảm bảo các yếu tố như sau:

Dịch lỏng virus phải được thu theo phương pháp thích hợp mà cơ quan kiểm định quốc gia cho phép. Từng mẻ gặt đơn được thu từ một qui trình nuôi cấy virus trên tế bào liên tục. Những mẻ gặt đơn được sử dụng một phần hoặc tất cả, được làm ổn định và cất giữ ở nhiệt độ dưới - 60 °C cho đến khi thử nghiệm được hoàn thành. Không được sử dụng chất kháng sinh trong qui trình này.

Các mẻ gặt đơn từng thành phần virus sởi, quai bị, rubella phải được kiểm tra tra tính vô khuẩn (Phụ lục 15.7), kiểm tra *Mycoplasma* bằng phương pháp đã được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn và kiểm tra nồng độ virus sống bằng phương pháp chuẩn độ trên tế bào thích hợp.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Các mẻ gặt đơn virus được hỗn lại sau khi tinh sạch và loại bỏ xác tế bào. Các chất bảo quản, tá được hoặc dung dịch pha loãng (dung dịch hồi chính) được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn mới được cho vào bán thành phẩm. Những chất bảo quản này không làm ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của sản phẩm. Thành phần các bán thành phẩm riêng rẽ của sởi, quai bị, rubella được trộn lẫn theo nồng độ nhất định và có thể pha loãng khi cần thiết. Bán thành phẩm cuối cùng được đưa vào đóng ống và đông khô. Bán thành phẩm cuối cùng đảm bảo không có chất kháng sinh.

**Vô khuẩn**

Mỗi vắc xin bán thành phẩm phải đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm cuối cùng****Nhận dạng**

Sử dụng phương pháp trung hòa vi lượng: Dùng kháng thể đặc hiệu để trung hòa với từng loại virus sởi, quai bị, rubella trong vắc xin. Thử trên tế bào Vero (đối với virus sởi, quai bị), tế bào RK-13 (đối với virus rubella). Sau khi pha loãng kháng nguyên, kháng thể đến nồng độ phù hợp và dùng qui trình thích hợp để trung hòa rồi gây nhiễm trên tế bào. Vắc xin chứa đúng virus sởi, quai bị, rubella khi không có dấu hiệu tế bào bị hủy hoại tại các giếng gây nhiễm các virus trên.

Có thể sử dụng phương pháp khác là phương pháp RT-PCR, dùng đoạn gen đặc hiệu của từng loại virus để nhận biết từng thành phần.

**Công hiệu**

Sử dụng phương pháp trung hòa vi lượng (trung hòa 2 thành phần để xác định thành phần còn lại) trên các loại tế bào xác định hoặc có thể sử dụng phương pháp khác được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Hiệu giá của vắc xin sởi  $\geq \lg 10^3 \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

Hiệu giá của vắc xin quai bị  $\geq \lg 10^{3,7} \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

Hiệu giá của vắc xin rubella  $\geq \lg 10^3 \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

(Liều vắc xin đăng ký của nhà sản xuất là 0,5 ml hoặc 0,7 ml).

Sử dụng ít nhất 3 lọ vắc xin riêng rẽ để kiểm tra công hiệu cho từng thành phần.

Thử nghiệm có giá trị khi đáp ứng yêu cầu: Sự chênh lệch hiệu giá của ít nhất 3 lọ vắc xin (hoặc nhiều hơn) được kiểm tra không được quá  $0,5 \log \text{CCID}_{50}$

(Đơn vị tính công hiệu có thể sử dụng  $\text{CCID}_{50}$ , PFU, TCID<sub>50</sub>... được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận).

**Tính ổn định nhiệt**

Vắc xin MMR được bảo quản 37 °C trong 7 ngày. Xác định hiệu giá. So sánh với mẫu vắc xin được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Vắc xin đạt yêu cầu khi có hiệu giá đạt tiêu chuẩn tối thiểu trên liều tiêm như sau:

Hiệu giá của vắc xin sởi  $\geq \lg 10^3 \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

Hiệu giá của vắc xin quai bị  $\geq \lg 10^{3,7} \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

Hiệu giá của vắc xin rubella  $\geq \lg 10^3 \text{CCID}_{50} / \text{liều}$ .

Chênh lệch hiệu giá với mẫu thử bảo quản ở 2 °C đến 8 °C không được giảm quá 1lg.

**An toàn chung**

Vắc xin MMR phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**Vô khuẩn**

Không phát hiện thấy nấm và tạp khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Độ ẩm tồn dư**

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 15.35).

**Câm quan**

Không có vật thể lạ trong vắc xin, lọ vắc xin được đóng nút kín. Sau khi hoàn nguyên vắc xin đông khô với nước hồi chính sẽ được dung dịch trong suốt với màu theo tiêu chuẩn đăng ký của nhà sản xuất.

**Mycoplasma**

Không có *Mycoplasma* mọc trên môi trường thích hợp sau thời gian nuôi cấy (Phụ lục 15.36). Có thể sử dụng phương pháp PCR.

**Ovalbumin**

Thành phần quai bị (được sản xuất từ trứng) trong vắc xin được sản xuất từ phôi gà yêu cầu: Hàm lượng ovalbumin nhỏ hơn 1 µg/liều (0,5 ml). Xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch.

**Hàm lượng BSA**

Hàm lượng BSA nhỏ hơn 50 ng/liều đơn dùng cho người. Xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch.

**Bảo quản**

Vắc xin MMR được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

**Hạn dùng**

Được chấp thuận theo phê duyệt của cơ quan kiểm định quốc gia.

**Nhãn**

Thông tin ghi trên nhãn, hộp phải theo qui định hiện hành. Thường bao gồm các thông tin như sau:  
 Tên chủng virus được sử dụng sản xuất.  
 Loại tế bào sử dụng sản xuất chủng virus.  
 Công hiệu thấp nhất của virus/liều.  
 Lượng kháng sinh còn tồn dư trong vắc xin, các chất bảo quản và liều lượng của chúng (nếu có).  
 Lượng nước hồi chính khi cho vào hoàn nguyên vắc xin theo khuyến cáo của nhà sản xuất.  
 Bảo quản vắc xin và hoàn nguyên vắc xin trong điều kiện tránh ánh sáng.  
 Khuyến cáo đối với phụ nữ mang thai và những phụ nữ sắp có thai trước hai tháng không nên tiêm vắc xin.  
 Nhà sản xuất nên đăng ký rõ thông tin thời gian để vắc xin đông khô tan hoàn toàn trong dung dịch pha tiêm và thời gian sử dụng vắc xin còn đủ hiệu lực sau khi hoàn nguyên.  
 Đăng ký rõ tiêu chuẩn cảm quan của vắc xin từ lúc vắc xin hòa tan hoàn toàn đến thời gian dài nhất mà vắc xin sử dụng vẫn còn hiệu lực.

**Liều tiêm, đường tiêm**

Tiêm dưới da, liều 0,5 ml hoặc 0,7 ml.

**Tiêu chuẩn nước hồi chính**

Nước hồi chính phải đảm bảo lớn hơn liều tiêm (0,5 ml hoặc 0,7 ml), trong, không có vật thể lạ. Có hồ sơ kèm theo được cơ quan kiểm định quốc gia phê duyệt.

**VẮC XIN TẢ UỐNG BẤT HOẠT**

***Vaccinum cholerae perorale inactivatum***

Vắc xin tả uống bất hoạt (mORCVAX) là chế phẩm sinh học được điều chế từ vi khuẩn tả toàn tế bào đã bất hoạt bằng formaldehyd hoặc nhiệt độ.

Mỗi liều 1,5 ml vắc xin tả uống gồm:

*Vibrio cholerae* O1, El Tor, Phil. 6973 (bất hoạt bằng formaldehyd): 600 E.U. LPS.

*Vibrio cholerae* O139, 4260B (bất hoạt bằng formaldehyd): 600 E.U. LPS.

*Vibrio cholerae* O1, Cairo 50 (bất hoạt bằng nhiệt độ): 300 E.U. LPS.

*Vibrio cholerae* O1, Cairo 50 (bất hoạt bằng formaldehyd): 300 E.U. LPS.

*Vibrio cholerae* O1, Cairo 48 (bất hoạt bằng nhiệt độ): 300 E.U. LPS.

Chất bảo quản: Thimerosal.

**Sản xuất**

**Chủng sản xuất**

Các chủng sản xuất *V. cholerae* typ sinh học El Tor, typ huyết thanh Inaba (chủng Phil. 6973), *V. cholerae*, O139 typ sinh học mới (chủng 4260B), *V. cholerae* typ sinh học cổ điển, typ huyết thanh Ogawa (chủng Cairo 50), *V. cholerae* typ sinh học cổ điển, typ huyết thanh Inaba (chủng Cairo 48) dùng để sản xuất vắc xin tả uống phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp nhận.

**Nhận dạng và tính thuần khiết của chủng sản xuất:** Xác định chỉ có vi khuẩn *V. cholerae* (với các typ sinh học trên), là trực khuẩn Gram âm, mảnh, hơi cong. Khuẩn lạc trên môi trường thạch máu có dạng tròn, bóng, hơi lồi. Có khuẩn lạc điển hình trên môi trường thạch TCBS. Lên men đường saccharose và mannose, không lên men đường arabinose.

**Kiểm tra chủng sản xuất bằng phản ứng ngưng kết huyết thanh:**

Đánh dấu các vị trí trên lam kính. Nhỏ 20 µl kháng huyết thanh (polyvalent, Inaba, Ogawa, O139) và nước muối sinh lý (K) vào các vị trí đã được đánh dấu trên lam kính. Nhỏ 20 µl canh khuẩn tả vào mỗi loại kháng huyết thanh trên. Trộn đều và đọc kết quả.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Chủng	Polyvalent	Inaba	Ogawa	O139	K
<i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Phil. 6973	+	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O139, 4260B	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i> O1, Cairo 48	+	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O1, Cairo 50	-	-	+	-	-



**Kiểm tra chủng sản xuất vắc xin tà trên thạch TCBS:**

Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tà, nhỏ 0,1 ml canh khuẩn vào đĩa thạch TCBS, dùng que cấy cấy rìa trên đĩa thạch. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ  $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc và sự chuyển màu của môi trường nuôi cấy tại thời điểm 24 h và 48 h. Đọc kết quả sau 48 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Khuẩn lạc trong, môi trường TCBS từ màu xanh lá cây chuyển màu vàng.

**Kiểm tra tính chất sinh vật hóa học của chủng sản xuất:**

Lắc đều tuýp (ống) chứa canh khuẩn tà, cấy 0,1 ml canh khuẩn vào từng ống môi trường (arabinose, mannose, saccharose). Ủ các ống môi trường ở nhiệt độ  $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  trong 48 h, theo dõi sự chuyển màu của môi trường. Đọc kết quả sau 48 h.

Dương tính (+): Môi trường chuyển sang màu vàng.

Âm tính (-): Môi trường giữ nguyên màu ban đầu.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Tính chất sinh vật hóa học của tất cả các chủng sản xuất vắc xin tà: arabinose (-), mannose (+), saccharose (+).

**Sản xuất**

Vi khuẩn tà được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Kết thúc nuôi cấy, canh khuẩn được kiểm tra đậm độ vi khuẩn. Vi khuẩn tà được bất hoạt bằng formaldehyd hoặc nhiệt độ tùy từng chủng. Sau bất hoạt, vi khuẩn tà được thu bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc tiếp tuyến (TFF).

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm****Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Kiểm tra sau bất hoạt**

Phương pháp tiến hành: Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tà sau bất hoạt, cấy 0,5 ml canh khuẩn tà vào đĩa thạch máu ngựa 15 %, lóng nhẹ, đều. Mỗi mẫu thử cấy trên 02 đĩa thạch máu. Ủ các đĩa thạch máu trên vào tủ ấm  $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn tà tại thời điểm 24 h và 48 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không thấy sự phát triển của vi khuẩn tà trên đĩa thạch máu ngựa.

**Đo đậm độ vi khuẩn bằng bộ so độ đục chuẩn**

Phương pháp tiến hành: Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ so độ đục.

Ví dụ: Trộn kỹ mẫu nước cốt tà trên máy trộn. Dùng pipetman hút 100  $\mu\text{l}$  mẫu thử cho vào ống thử của bộ so độ đục, cho dần dần xml dung dịch pha loãng (PBS 0,01 M có pH 7,2 hoặc nước muối sinh lý) vào cho đến khi độ đục của ống thử bằng với độ đục của ống chuẩn số 10. Đậm độ vi khuẩn tà được tính như sau:

Quy đổi thành 1 ml ta có:  $(0,1 \text{ ml nước cốt} + x \text{ ml dung dịch pha loãng}) \times 10 = X \text{ ml}$

Đậm độ của mẫu cần đo =  $X \text{ ml} \times (a \times 10^9 \text{ vi khuẩn/ml})$  (trong đó  $a \times 10^9$  là chỉ số được cung cấp bởi hãng của ống số 10 trong bộ so độ đục chuẩn tương đương).

**Định lượng LPS**

Sử dụng phương pháp ELISA để định lượng hàm lượng của từng LPS có trong bán thành phẩm.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng****Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm****Cảm quan**

Mẫu kiểm định của mỗi loạt vắc xin thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Sau khi lắc đều, vắc xin tạo thành huyền dịch đồng nhất, màu nâu nhạt.

**Vô khuẩn**

Phải đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**pH**

Nằm trong khoảng từ 6,8 - 7,4 (Phụ lục 15.33).

**Protein toàn phần**

Không được quá 5 % (Phụ lục 15.18).

**Formaldehyd**

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

**Thimerosal**

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.29).

**Thử nghiệm công hiệu**

Thử nghiệm công hiệu được tiến hành trên thỏ không có kháng thể kháng vi khuẩn tà. Mỗi loạt vắc xin tà uống cần 3 thỏ có khối lượng từ 2 kg đến 2,2 kg.

Vắc xin tà uống được pha loãng trong dung dịch PBS 0,01 M (pH 7,2) hoặc nước muối sinh lý để đạt 4 tỉ vi khuẩn/ml. Gây miễn dịch cho thỏ bằng cách tiêm vào bắp chân sau, mỗi thỏ 1 ml vắc xin đã được pha loãng như trên. Mỗi thỏ được tiêm ba mũi, mỗi mũi cách nhau 1 tuần (vào các ngày 0, 7 và 14). Sau tiêm, thỏ được chăm sóc, theo dõi hàng ngày.

Đến ngày thứ 24, thỏ được lấy máu và tách huyết thanh trong điều kiện vô khuẩn. Tiến hành phản ứng ngưng kết trong ống nghiệm giữa huyết thanh thỏ và các vi khuẩn tà mẫu. Huyết thanh của mỗi thỏ được pha loãng bậc 2 thành các độ pha: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 và 1/640.

Kháng nguyên vi khuẩn tà gồm 3 chủng: Cairo 48, Cairo 50 và El Tor (Phil. 6973) được đo đậm độ vi khuẩn và pha loãng để có 1 tỉ vi khuẩn/ml.

Tiến hành phản ứng ngưng kết từng loại kháng nguyên đặc hiệu với huyết thanh thỏ ở các bậc pha loãng khác nhau. Đọc kết quả sau 48 h.

Tính kết quả: Hiệu giá huyết thanh được tính ở độ pha loãng thấp nhất vẫn có hiện tượng ngưng kết.

Tiêu chuẩn: Công hiệu của vắc xin tà uống đạt yêu cầu khi hiệu giá trung bình từng loại kháng nguyên nhỏ hơn 1/80 ( $\leq 1/80$ ).

**Đóng gói, bảo quản**

Đóng trong lọ thủy tinh trung tính và bảo quản ở nhiệt độ từ  $2^\circ\text{C}$  đến  $8^\circ\text{C}$ , không được để đông băng.



**Hạn dùng**

Hạn dùng của vắc xin được nghiên cứu dựa trên tính ổn định của công hiệu trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm riêng biệt).

Vắc xin tả uống bất hoạt có hạn dùng không quá 2 năm kể từ sau ngày sản xuất.

**Nhãn**

Ghi rõ những thông tin cần có đối với nhãn theo qui định hiện hành.

**Chỉ định, liều dùng**

Vắc xin tả uống bất hoạt chỉ dùng đường uống.

Liều dùng: 1,5 ml/người.

Lịch dùng: 2 liều, mỗi liều cách nhau 14 ngày.

**VẮC XIN THƯƠNG HÀN UỐNG**

*Vaccinum febris typhoidi perorale vivum*

Vắc xin thương hàn uống, sống, giảm độc lực là một chế phẩm đông khô được chứa trong viên bọc gelatin; điều chế từ chủng *Salmonella typhi* Ty 21a, đã được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Trong mỗi viên chứa  $1.10^9$  đến  $5.10^9$  đơn vị sống *S.typhi* Ty 21a.

**Sản xuất**

**Chủng sản xuất**

Chủng đột biến *S. typhi* Ty 21a đã cho thấy đạt tính an toàn và có hiệu lực trên người. Đặc điểm chính của chủng này là thiếu hụt enzym uridin diphosphat-galactose-4-epimerase. Hoạt tính của galactopermease, galactokinase và galactose-1-phosphat uridyl-transferase đã bị giảm 50 % đến 90 %. Ở bất kể môi trường nuôi cấy nào, chủng vi khuẩn này cũng không chứa kháng nguyên Vi. Chủng này chỉ ngưng kết với kháng huyết thanh kháng O:9 nếu phát triển trên môi trường có chứa galactose. Chủng có chứa kháng nguyên H:d và không sinh hydrogen sulphid trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt. Chủng không độc với chuột nhắt trắng. Chủng Ty 21a sẽ gây dung giải nếu phát triển trên môi trường có chứa 1 % galactose.

Dùng hệ thống chủng gốc để sản xuất vắc xin.

**Sản xuất chủng gốc:** Từ một khuẩn lạc đơn sẽ được nuôi cấy trên môi trường thích hợp (canh thang BHI phù hợp với mục đích này) không có galactose và ủ ở nhiệt độ thích hợp cho phát triển tối ưu. Khi nuôi cấy đã đạt đến pha ổn định, canh khuẩn sẽ được gặt, ly tâm tách cạn và cho vào ống. Sau đó pha chế thành huyền dịch có đậm độ thích hợp và tiến hành đông khô, sao cho mỗi ống có chứa ít nhất  $10^9$  đơn vị sống của chủng. Các ống chủng gốc sau khi đông khô được bảo quản ở  $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Sản xuất chủng làm việc:** Chủng làm việc được sản xuất từ một ống chủng gốc. Quá trình nuôi cấy, gặt, ly tâm lấy cạn, pha chế và đông khô cũng theo trình tự như đối với chủng gốc. Mỗi ống chủng làm việc đông khô phải chứa ít nhất  $10^9$  đơn vị sống của chủng. Các ống chủng làm việc sau khi đông khô được bảo quản ở  $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Kiểm tra chủng sản xuất**

**Nhận dạng và tính thuần khiết:**

Xác định chỉ có vi khuẩn Ty 21a, là trực khuẩn Gram âm, di động.

Nuôi cấy qua 3 lần chuyển chủng trên môi trường có hoặc không có galactose, ngưng kết với kháng huyết thanh H:d, không ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Ngược lại chỉ những khuẩn lạc phát triển trên môi trường có chứa galactose (1 g/L) mới ngưng kết với kháng huyết thanh O:9. Khi nuôi cấy trên môi trường thạch Endo và ủ ở  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 7 ngày, mọc khuẩn lạc có màu môi trường, có hiện tượng ly giải và dần dần trở nên trong suốt. Các khuẩn lạc lên men galactose sẽ không xuất hiện tại bất kỳ thời điểm nào trong 7 ngày ủ ở  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Trên môi trường nuôi cấy chỉ thị có chứa galactose ủ ở  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 48 h, xuất hiện khuẩn lạc lốm ở giữa, viền có màu xanh xám và giữa có màu sẫm cho đến khi chết và ly giải giống như chủng Ty 21a trên môi trường thạch có chứa galactose.

Nuôi cấy trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt, khuẩn lạc không đen, chứng tỏ không sinh hydrogen sulphid.

Gây ly giải vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy có galactose: Nuôi cấy lắc trên môi trường BHI (với hàm lượng galactose 100 g/L môi trường) ở  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , vi khuẩn bị ly giải trong vòng 1 h.

**Kiểm tra độc tính trên chuột nhắt trắng:**

Chủng vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường BHI và ủ ở  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 6 h, được tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có khối lượng từ 18 g đến 22 g. Huyền dịch vi khuẩn có chứa ít nhất  $5 \times 10^7$  vi khuẩn sẽ không giết chết chuột trong vòng 7 ngày theo dõi.

**Xác định các enzym** (bao gồm cả các enzym trong quá trình lên men galactose):

Thử nghiệm cho thấy vi khuẩn Ty 21a có hoạt tính enzym thấp hơn so với chủng Ty 2. Khi so sánh hoạt tính của chủng Ty 2 (coi là 100 %) thì hoạt tính của chủng Ty 21a là 0 % epimerase, 5 % đến 20 % galactokinase, 25 % đến 50 % galactose-1-phosphat-uridyltransferase và 40 % đến 50 % galactose-permease.

**Sự hấp thu và phân bố nội tế bào của galactose  $^{14}\text{C}$ :**

Sau 7 h nuôi cấy ở  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , ít nhất 90 % galactose trong môi trường (1 g/lít) bị mất do chủng vi khuẩn (bằng cách đo  $^{14}\text{C}$  trên tế bào). Phương pháp thử nghiệm cũng cho thấy có khoảng 75 % galactose có trên vách tế bào vi khuẩn.

**Đặc tính của lipopolysaccharid (LPS)**

Lipopolysaccharid chiết xuất từ vách tế bào của chủng vi khuẩn thương hàn Ty 21a được nuôi cấy trong môi trường BHI có chứa galactose  $^{14}\text{C}$  (1 g/L), ủ ở  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 7 h, sẽ bị thủy phân trong dung dịch acid acetic 1 % và được kiểm tra polysaccharid. Sử dụng phương pháp sắc ký gel, dùng Sephadex G50; những vi khuẩn thương hàn của cả loại khuẩn lạc nhẵn và xù xì đều có chứa LPS, theo tỷ lệ tương đương đối với chủng độc *S. typhi* Ty 2. Hơn nữa, sự phân bố của các đường keto-deoxy-octonat (KDO), galactose, glucose và rhamnose của LPS đạt tỷ lệ tương đương giữa chủng Ty 2 và Ty 21a.

**Yêu cầu trong quy trình sản xuất**

Môi trường nuôi cấy chủng sản xuất không được gây ra phản ứng độc hại hay dị ứng cho người.

Chủng sản xuất được nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ thích hợp trong khoảng thời gian đủ để đạt tới pha ổn định sớm thì tiến hành gặt. Số lần cấy chuyển từ chủng làm việc cho đến khi lên men cuối cùng không được vượt quá 4 lần.

Trước khi ly tâm sản phẩm lên men: Cần lấy mẫu kiểm tra nhận dạng của chủng Ty 21a, kiểm tra độ sống trên môi trường thạch BHI và ủ ở 37 °C trong 36 h.

Sau ly tâm, lấy sinh khối của các mẻ gặt đơn pha thành huyền dịch ổn định (hoặc vẫn để riêng các mẻ gặt đơn) và giữ trong đông băng cho đến khi đông khô.

**Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng****Nhận dạng**

Các mẫu thử dạng bột sẽ được hoàn nguyên và kiểm tra nhận dạng như trong mục "Nhận dạng và tính thuần khiết".

**Độ sống**

Xác định độ sống theo khối lượng. Kết quả độ sống của quá trình đông khô tối thiểu phải đạt được 10 % so với các mẻ gặt đơn trước khi đông khô.

**Tiêu chuẩn độ sống:** Không ít hơn  $40 \times 10^9$  đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a.

**Độ ẩm tồn dư (Phụ lục 15.35)**

Bán thành phẩm cuối cùng sẽ phải được kiểm tra độ ẩm tồn dư và giá trị này không được vượt quá giới hạn quy định của cơ quan kiểm định quốc gia.

Có 2 phương pháp phổ biến được áp dụng cho thử nghiệm này. Khi sử dụng phương pháp Karl Fischer (Phụ lục 10.3) để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong bán thành phẩm cuối cùng phải dưới 3 %. Nếu sử dụng phương pháp semi-micro để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong mẫu bán thành phẩm cuối cùng phải nằm trong khoảng 1,5 % đến 4,0 %.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Từ bán thành phẩm cuối cùng đông khô, đã được làm đồng nhất hoàn toàn và đếm số lượng đơn vị sống; nếu không ít hơn  $2 - 5 \times 10^9$  đơn vị sống, sẽ đóng vào 1 viên bọc gelatin; để đảm bảo khi đóng viên, mỗi viên là một liều cho người và chứa tối thiểu  $2 \times 10^9$  đơn vị sống vắc xin.

Mẫu kiểm định thành phẩm sẽ được lấy từ mỗi viên vắc xin và làm các thử nghiệm dưới đây:

**Nhận dạng**

Kiểm tra nhận dạng với 3 viên cho mỗi mẫu thử theo phương pháp như mô tả ở phần "Nhận dạng và tính thuần khiết".

**Độ sống**

Kiểm tra độ sống với 5 viên cho mỗi mẫu thử. Kết quả độ sống của mẫu thử được coi như công hiệu của loạt vắc xin thương hàn uống sống giảm độc lực Ty 21a.

Thử nghiệm độ sống của mỗi loạt vắc xin sẽ phải được kiểm tra trên 2 mẫu song song và kết quả là giá trị trung bình độ sống của 2 mẫu này.

**Quy trình kiểm tra độ sống cho mỗi mẫu thử:** Cho toàn bộ bột vắc xin của 5 viên vào mỗi bình có chứa bi thủy tinh đã được sấy vô trùng, cho tiếp 20 ml nước muối sinh lý (NMSL) vô khuẩn vào mỗi bình trên. Lắc các bình mẫu trên bằng máy lắc rung 200 r/min và đặt trong buồng lạnh 4 °C trong 30 min. Dùng huyền dịch vắc xin trên, pha loãng bằng NMSL và tùy theo số đơn vị sống có trong mỗi viên vắc xin mà mức độ pha loãng đến đâu sẽ dừng lại cho thích hợp. Nhỏ huyền dịch vắc xin pha loãng ở độ pha thích hợp vào ít nhất 5 đĩa thạch BHI, với thể tích 0,1 ml/đĩa và ủ ở 35 °C đến 37 °C trong 30 h đến 36 h hoặc lâu hơn. Đếm số lượng khuẩn lạc trong các đĩa môi trường và tính số lượng khuẩn lạc trung bình của mỗi mẫu thử. Từ kết quả này sẽ tính được số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử kiểm tra song song.

Ví dụ: Huyền dịch vắc xin sau khi đã được lắc rung trong buồng lạnh theo quy trình như trên sẽ được pha loãng bậc 10 bằng NMSL vô khuẩn đến  $10^{-6}$ . Cấy huyền dịch vắc xin ở độ pha loãng  $10^{-6}$  vào tối thiểu 5 đĩa thạch BHI với thể tích 0,1 ml/đĩa; áp dụng công thức sau để tính độ sống trung bình của dung dịch gốc:

$$X = C \times 20 \times 10^6$$

Trong đó:

X là đơn vị sống

C là số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử.

Từ kết quả trên, tính ra số đơn vị sống (Y) trong viên vắc xin thương hàn uống Ty 21a theo công thức sau:

$$Y = \frac{X}{5}$$

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Độ sống phải từ  $2 \times 10^9$  đến  $5 \times 10^9$  đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin.

**Độ tạp nhiễm**

Sử dụng ít nhất 3 viên vắc xin cho một mẫu thử nghiệm. Lựa chọn môi trường thích hợp để có thể kiểm tra, phát hiện sự có mặt của các vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella* (trừ Ty21a), *Shigella*, *Escherichiacoli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Vibrio parahaemolyticus*.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Vắc xin đạt yêu cầu khi không có mặt của các yếu tố gây bệnh nêu trên. Số lượng đơn vị sống tạp nhiễm không gây bệnh trong một liều vắc xin uống cho người (1 viên) không được vượt quá  $2 \times 10^2$  vi khuẩn và 20 năm.

**An toàn không đặc hiệu**

Mỗi loạt thành phẩm vắc xin thương hàn uống Ty 21a phải được kiểm tra an toàn không đặc hiệu bằng cách tiêm 0,01 liều vắc xin cho người vào ổ bụng cho mỗi trong số 5 chuột nhất trắng khối lượng từ 18 g/con đến 22 g/con; và cho uống 1 liều vắc xin cho người cho mỗi trong số 3 chuột lang (khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con).

Chuột nhất được theo dõi trong vòng 7 ngày sau khi tiêm, chuột lang được theo dõi trong 14 ngày sau khi uống vắc xin.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Không có chuột nào có biểu hiện nhiễm bệnh trong khoảng thời gian theo dõi.

**Tính ổn định**

Vắc xin ở dạng thành phẩm sẽ phải được kiểm tra tính ổn định bằng phương pháp được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận. Thông thường tính ổn định của vắc xin này được đánh giá bằng kết quả độ sống.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Độ sống không được thấp hơn  $2 \times 10^9$  đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin trong suốt thời hạn sử dụng mà nhà sản xuất đã đệ trình.

**Cầm quan**

Mẫu kiểm định của mỗi loại thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Nếu kết quả kiểm tra cho thấy có sự bất thường không theo đúng yêu cầu cần phải hủy bỏ.

**Đóng gói, bảo quản, hạn dùng****Đóng gói và dán nhãn:**

Nhãn trên vi, trên hộp và tờ hướng dẫn sử dụng cần ghi đầy đủ các thông tin theo quy định hiện hành và đặc biệt ghi rõ: số đơn vị sống tối thiểu của một viên vắc xin và chỉ dùng để uống.

**Bảo quản:**

Nhà sản xuất sẽ đưa ra điều kiện bảo quản và vận chuyển cho sản phẩm để đảm bảo rằng các dạng vắc xin này khi được bảo quản trong điều kiện thích hợp sẽ vẫn đạt được các tiêu chuẩn cho đến hết hạn sử dụng. Thông thường, vắc xin này ở dạng viên bọc gelatin sẽ phải được bảo quản trong điều kiện khô và tối ở  $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ .

**Hạn dùng:**

Hạn sử dụng của vắc xin dạng viên bọc không được quá 18 tháng tính từ ngày sản xuất. Nếu số liệu cho thấy tính ổn định của sản phẩm dài hơn thì hạn dùng có thể kéo dài hơn.

**VẮC XIN THƯƠNG HÀN VI POLYSACCHARID*****Vaccinum Vi polysaccharidi typhoidi***

Vắc xin thương hàn Vi polysaccharid là một chế phẩm tinh chế từ vỏ Vi polysaccharid của vi khuẩn. Polysaccharid này được điều chế từ chủng *Salmonella typhi* Ty2 hoặc một chủng thích hợp khác có khả năng sản sinh ra Vi polysaccharid.

Vỏ Vi polysaccharid gồm các đơn vị lặp lại của acid N-acetyl- $\alpha$ -galactosaminuronic bằng liên kết 1-4, được acetyl hoá ở O-3.

**Sản xuất****Chủng sản xuất**

Chủng *Salmonella typhi* dùng để sản xuất vắc xin Vi polysaccharid phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng này phải cho thấy có khả năng sản sinh ra Vi polysaccharid với sản lượng ổn định, đủ đáp ứng miễn dịch và an toàn cho người.

Phương pháp sản xuất phải được thẩm định và chứng minh rằng sản phẩm (nếu được kiểm tra) sẽ hoàn toàn đạt các yêu cầu về an toàn không đặc hiệu đối với huyết thanh miễn dịch và vắc xin cho người sử dụng.

Chỉ có chủng đạt các đặc tính như sau mới được dùng để sản xuất vắc xin: Nhuộm soi sau nuôi cấy phải có hình dạng đặc trưng của *S. typhi*; trong môi trường nuôi cấy, có lên men đường glucose nhưng không sinh hơi; oxidase âm tính; huyền dịch vi khuẩn ngưng kết đặc hiệu với huyết thanh kháng Vi thích hợp hoặc khuẩn lạc có quang sáng xung quanh trên môi trường thạch đĩa có chứa kháng huyết thanh đặc hiệu.

**Sản xuất chủng gốc và chủng sản xuất**

Chủng gốc sẽ phải được ghi chép bằng hồ sơ chủng, bao gồm cả nguồn gốc chủng và các đặc tính sinh hoá, huyết thanh học. Các nuôi cấy từ chủng sản xuất sẽ phải có cùng đặc tính như nuôi cấy từ chủng gốc. Chủng sản xuất phải đạt các tiêu chuẩn như chủng gốc.

**Nuôi cấy và gặt**

Sự phát triển của chủng *S. typhi* phải cho thấy có tính ổn định bằng cách giám sát tỷ lệ mọc của vi khuẩn, pH của nuôi cấy và sản lượng của Vi polysaccharid. Thông thường nuôi cấy chủng ở  $35^\circ\text{C}$  đến  $37^\circ\text{C}$ . Chủng làm việc (chủng sản xuất, working seed) có thể nuôi cấy trên môi trường đặc, từ 12 h đến 18 h ở  $35^\circ\text{C}$  đến  $37^\circ\text{C}$ ; sau đó cấy chuyển sang môi trường lỏng (là canh khuẩn để cấy vào môi trường nuôi cấy cuối cùng). Môi trường nuôi cấy cuối cùng là môi trường bán tổng hợp, không chứa chất đã được kết tủa bởi cetrimoni bromid và không chứa các sản phẩm từ máu hoặc các polysaccharid có khối lượng phân tử cao, và ít nhất phải chứng minh rằng chúng đã được loại bỏ sau khi tinh chế.

Sự thuần khiết của vi khuẩn sau khi nuôi cấy phải được khẳng định bằng cách kiểm tra tiêu bản nhuộm soi dưới kính hiển vi (độ phóng đại ít nhất 1000 lần) và bằng nuôi cấy trong môi trường đặc thích hợp. Canh khuẩn nuôi cấy được bắt hoạt vào thời điểm bắt đầu pha ổn định bằng cách thêm formaldehyd. Các tế bào vi khuẩn phải được loại bỏ bằng cách ly tâm, polysaccharid được tủa từ môi trường nuôi cấy bằng cách thêm cetrimoni bromid (hexadecyltrimethyl-amoni bromid). Tủa polysaccharid được gặt và bảo quản ở  $-20^\circ\text{C}$  trước khi tinh chế.

**Tinh chế Vi polysaccharid**

Polysaccharid được tinh chế bằng cách tủa với phức hợp cetrimoni bromid, dùng quy trình thích hợp để loại bỏ acid nucleic, các protein và lipopolysaccharid. Polysaccharid sẽ được tủa với muối calci trong sự có mặt của *ethanol* (TT) và làm khô ở  $2^\circ\text{C}$  đến  $8^\circ\text{C}$ . Bột thu được chính là Vi polysaccharid tinh chế. Độ ẩm tồn dư phải được kiểm tra theo phương pháp phân tích khối lượng và cho thấy thấp hơn so với mẫu chuẩn.

Chỉ Vi polysaccharid tinh chế đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng:

**Protein:** Không quá 10 mg/g polysaccharid.

**Acid nucleic:** Không quá 20 mg/g polysaccharid.

**O-Acetyl:** Không thấp hơn 2 mmol/g polysaccharid.

**Kích thước phân tử:** Kiểm tra bằng sắc ký cột, dùng cột dài 0,9 m và đường kính trong 16 mm, chuẩn cột với dung

dịch natri clorid 0,2 mol/kg, pH 7,0 đến 7,5. Dùng 5 mg polysaccharid cho vào 1 ml dung dịch natri clorid 0,2 mol/kg và rót vào cột, rửa giải với tốc độ 20 ml/h. Thu thập mẫu khoảng 2,5 ml. Kiểm tra điểm đáp ứng với  $K_D = 0,25$  và làm 2 thể tích mẫu dung dịch rửa giải trước và sau điểm đáp ứng. Tiến hành xác định hàm lượng O-Acetyl của cả 2 mẫu trên. Không được thấp hơn 50 % polysaccharid được tìm thấy ở mẫu dung dịch rửa giải ra trước khi  $K_D = 0,25$ .  
*Nhận dạng:* Dùng phương pháp hóa miễn dịch thích hợp.  
*Nội độc tố vi khuẩn:* Không được quá 150 EU/ $\mu$ g polysaccharid.

### Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Bán thành phẩm cuối cùng được điều chế từ một hoặc nhiều loại đơn Vi polysaccharid tinh chế. Nếu sử dụng bán thành phẩm này để đóng lọ đa liều thì phải cho thêm chất bảo quản kháng khuẩn và được hòa tan trước trong một dung môi thích hợp, sao cho sản phẩm cuối cùng chứa 25  $\mu$ g polysaccharid/1 liều tiêm cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong bán thành phẩm cuối cùng không được gây biến tính Vi polysaccharid và các thành phần khác của vắc xin. Vắc xin bán thành phẩm được pha chế (trong điều kiện vô trùng) trong dung dịch không có chứa chất gây sốt và được lọc vô trùng qua màng lọc. Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt các yêu cầu sau:

#### Vô khuẩn

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### Thimerosal

Đạt theo Phụ lục 15.29

#### Hàm lượng Vi polysaccharid

Dùng thử nghiệm hóa miễn dịch định lượng đã được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận để xác định hàm lượng Vi polysaccharid của mẫu bán thành phẩm cuối cùng (Phụ lục 15.37).

#### Nhận dạng

Dùng thử nghiệm huyết thanh học, dựa vào sự kết tủa miễn dịch.

#### Kiểm định vắc xin thành phẩm

Các thử nghiệm dưới đây phải được tiến hành với mỗi loại vắc xin thành phẩm.

#### Cảm quan

Vắc xin dạng lỏng, trong suốt, không màu, không có vật thể lạ mắt thường có thể nhìn thấy và không có những dấu hiệu bất thường khác như: Lông nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu...

#### Nhận dạng

Thử nghiệm nhận dạng được tiến hành bằng phương pháp hóa miễn dịch thích hợp.

#### Xác định hàm lượng Vi polysaccharid

Lấy mẫu ngẫu nhiên, ít nhất 3 lọ (hoặc ống), xác định hàm lượng Vi polysaccharid bằng thử nghiệm hóa miễn dịch định lượng, so sánh với mẫu chuẩn polysaccharid (Phụ lục 15.37).

#### Vô khuẩn

Phải đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### Chất gây sốt

Mỗi loại vắc xin thành phẩm phải được kiểm tra chất gây sốt bằng cách tiêm vắc xin thương hàn Vi polysaccharid có nồng độ 25 ng/ml vào tĩnh mạch tai thỏ (1 ml/kg thể trọng thỏ) (Phụ lục 15.12).

#### An toàn không đặc hiệu

Loại vắc xin thành phẩm thương hàn Vi polysaccharid đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm đều sống sót và không bị giảm cân trong ít nhất 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

#### Chất bảo quản

*Thimerosal:* Đạt theo Phụ lục 15.29

*Phenol* (Nếu được sử dụng để điều chế vắc xin): Không được nhiều hơn 2,5 g/l (Phụ lục 15.28).

#### Độ ẩm tồn dư (Nếu vắc xin ở dạng đông khô)

Phương pháp áp dụng phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận. Thông thường sử dụng phương pháp Karl Fischer. Lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm định theo tỷ lệ 1/1000 lọ, tuy nhiên tối đa là 10 lọ và cũng không được ít hơn 5 lọ (Phụ lục 15.35).

*Tiêu chuẩn chấp thuận:* Độ ẩm tồn dư trung bình giữa các lọ không được lớn hơn 2,5 %, không được lọ nào có độ ẩm tồn dư 3 % hoặc lớn hơn.

#### pH

$7,0 \pm 0,5$  (Phụ lục 15.33).

#### Nghiên cứu tính ổn định

Nghiên cứu tính ổn định phải được tiến hành để xác định hạn dùng của vắc xin thương hàn Vi polysaccharid. Nghiên cứu này có thể dựa trên các thử nghiệm xác định hàm lượng O-Acetyl và kích thước phân tử của ít nhất là 3 loại vắc xin thành phẩm (các loại vắc xin thành phẩm này phải được sản xuất từ những bán thành phẩm Vi polysaccharid tinh chế riêng biệt). Các loại vắc xin dùng trong thời gian nghiên cứu phải được bảo quản ở điều kiện như ghi trên hướng dẫn dành cho người sử dụng.

*Tiêu chuẩn chấp thuận:* Kích thước phân tử của mỗi loại vắc xin thành phẩm phải đạt ít nhất 50 % Vi polysaccharid từ cột được rửa giải trước khi  $K_D$  đạt tới 0,25. Thử nghiệm về tính ổn định phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận.

#### Đóng gói

Việc đóng gói, dán nhãn phải tuân thủ theo GMP.

#### Bảo quản, hạn dùng

Các tuyên bố về hạn dùng và nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên những nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải đệ trình lên cơ quan kiểm định quốc gia về vắc xin và sinh phẩm.

Nhiệt độ bảo quản 2 °C đến 8 °C.

**Hạn dùng**

Hạn dùng không được quá 3 năm kể từ ngày đóng ổng thành phẩm.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**VẮC XIN THỦY ĐẬU*****Vaccinum varicella vivum***

Vắc xin thủy đậu là chế phẩm đông khô được sản xuất từ chủng virus thủy đậu sống giảm độc lực, phát triển trên tế bào lưỡng bội người. Vắc xin được hồi chính với dung dịch hồi chính ngay trước khi dùng tạo thành dung dịch trong, cho màu khi có mặt chỉ thị pH.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây.

**Sản xuất**

Sản xuất vắc xin dựa trên hệ thống chủng giống gốc virus và hệ thống ngân hàng tế bào. Phương pháp sản xuất phải cho thấy hiệu suất vắc xin thủy đậu sống giảm độc lực ổn định về tính sinh miễn dịch và tính an toàn cho người sử dụng. Virus trong vắc xin thành phẩm sẽ không được cấy chuyển trên tế bào vượt quá đời thứ 38 tính từ đời virus gốc.

**Chủng sản xuất**

Chủng virus thủy đậu sẽ được nhận dạng là chủng Oka thông qua hồ sơ bao gồm thông tin về nguồn gốc của chủng, phương pháp giảm độc lực và đời cấy chuyển đã được đánh giá trên lâm sàng là đã giảm độc và có hiệu quả. Các lô chủng phải được sản xuất trên cùng một loại tế bào sử dụng để sản xuất vắc xin thành phẩm. Chủng được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 20 °C (-20 °C) nếu ở dạng đông khô hoặc dưới âm 60 °C (-60 °C) nếu không ở dạng đông khô.

Chỉ có những lô chủng virus đạt những yêu cầu sau đây mới được sử dụng để sản xuất.

**Nhận dạng:** Lô chủng giống gốc và chủng sản xuất được nhận dạng là virus thủy đậu bởi phương pháp trung hòa huyết thanh trên tế bào, sử dụng kháng thể đặc hiệu.

**Nồng độ virus:** Nồng độ virus của lô chủng sản xuất và lô chủng giống gốc được xác định theo quy định để đảm bảo tính ổn định của sản xuất.

**Tác nhân ngoại lai:** Lô chủng sản xuất phải tuân thủ những yêu cầu đối với chủng vắc xin virus sống.

**Lựa chọn tế bào cho sản xuất**

Dòng tế bào dùng cho sản xuất vắc xin thủy đậu phải dựa trên hệ thống ngân hàng tế bào. Tế bào có nguồn gốc từ người được bảo quản ở âm 70 °C (-70 °C) hoặc trong nitrogen lỏng. Cơ quan kiểm định quốc gia phải phê chuẩn ngân hàng tế bào gốc và số lượng tối đa số đời cấy chuyển đã được thiết lập.

**Môi trường nuôi cấy tế bào**

Huyết thanh sử dụng cho nuôi cấy tế bào phải không nhiễm vi khuẩn, nấm, *Mycoplasma* và các virus, tác nhân ngoại lai khác.

Penicilin và các beta-lactam khác không được sử dụng trong bất cứ giai đoạn sản xuất nào.

Các kháng sinh khác có thể được sử dụng ở các giai đoạn sản xuất nhưng phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp nhận.

**Các mẻ gặt đơn**

Trước khi cấy lô chủng virus, tế bào phải được kiểm tra xem có bị hủy hoại do các tác nhân gây nhiễm không. Nếu có bằng chứng của bất kỳ một tác nhân ngoại lai nào thì toàn bộ nhóm tế bào liên quan sẽ không được sử dụng để sản xuất vắc xin.

Sau khi cấy virus, tế bào được ủ ở điều kiện nhiệt độ thích hợp. Nếu huyết thanh động vật được sử dụng trong môi trường phát triển hoặc môi trường duy trì để nuôi cấy tế bào thì huyết thanh phải được loại bỏ khỏi tế bào trước hoặc sau khi cấy virus nhưng phải trước khi tiến hành thu hoạch virus. Tế bào nuôi cấy phải được rửa và môi trường phát triển phải được thay thế bằng môi trường duy trì không có huyết thanh.

Các tế bào nuôi đã được gây nhiễm từ mẻ gặt đơn sẽ được làm sạch và hỗn lại. Hỗn dịch tế bào được xử lý bằng sóng siêu âm hoặc là các phương pháp thích hợp khác.

**Mê hỗn virus**

Mê hỗn virus được điều chế từ một hoặc vài mẻ gặt đơn đạt tiêu chuẩn. Mê hỗn virus phải được kiểm tra tính vô khuẩn. Những mẫu chưa kiểm tra được ngay phải bảo quản ở âm 60 °C (-60 °C).

Mê hỗn virus được tinh sạch bằng phương pháp thích hợp và loại được tối đa các mảnh vỡ tế bào.

Số lượng virus sống phải được xác định bằng phương pháp chuẩn độ trên tế bào có đối chiếu với mẫu chuẩn virus thủy đậu sống.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

Bán thành phẩm được sản xuất bằng cách trộn các mẻ hỗn dịch virus. Chỉ những chất bảo quản, tá chất hoặc dung dịch được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn mới được cho vào bán thành phẩm. Những chất này phải đảm bảo không làm ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của sản phẩm.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nếu vắc xin có chứa chất bảo quản, phải tiến hành phương pháp thích hợp để ngăn chặn các yếu tố gây nhiễu đối với thử nghiệm vô khuẩn.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm****Cảm quan**

Mỗi loạt vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu về cảm quan như: không có vật lạ trong lọ vắc xin; nắp hay nút phải chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Nếu ống hay lọ vắc xin nào không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

**Nhận dạng**

Kiểm tra nhận dạng được thực hiện trên ít nhất 1 lọ thành phẩm từ mỗi lô thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp thích hợp do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

Nhận dạng kháng nguyên trong vắc xin được xác định bằng phương pháp trung hòa huyết thanh trên tế bào với kháng thể đặc hiệu, hoặc sử dụng huyết thanh miễn dịch đặc hiệu.

**Công hiệu**

Sử dụng phương pháp có độ chính xác cao để xác định hàm lượng virus. Dùng mẫu chuẩn virus thủy đậu phù hợp để thẩm định quy trình.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Hàm lượng virus không ít hơn  $2,0 \times 10^3$  PFU/liều đơn ở người.

Đối với tính ổn định nhiệt cũng cần được cơ quan kiểm định quốc gia xem xét như một yếu tố trong việc thiết lập tính ổn định của quá trình sản xuất.

**An toàn chung**

Đạt yêu cầu về an toàn chung (Phụ lục 15.11).

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Độ ẩm**

Không được quá 2,0 % (Phụ lục 15.35).

Độ ẩm tồn dư trong mẫu phải được xác định bằng phương pháp thích hợp do cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Hàm lượng protein huyết thanh động vật tồn dư**

Nếu huyết thanh được sử dụng trong nuôi cấy tế bào thì hàm lượng albumin huyết thanh tồn dư phải ít hơn 50 ng/liều đơn ở người.

**Bảo quản**

Vắc xin thủy đậu nên đóng liều đơn ở dạng đông khô và được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C.

Nếu sử dụng trong điều kiện bảo quản khác thì phải được thẩm định đầy đủ và được phê chuẩn bởi cơ quan kiểm định quốc gia.

**Hạn dùng**

Hạn sử dụng phải được phê chuẩn của cơ quan kiểm định quốc gia.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng theo yêu cầu của các quy định hiện hành và cần có các thông tin như sau:

Chủng virus sử dụng sản xuất vắc xin;

Tên tế bào dùng sản xuất vắc xin;

Nồng độ thấp nhất của virus;

Thời gian hoàn nguyên và thời gian sử dụng vắc xin sau khi hoàn nguyên;

Khuyến cáo với phụ nữ có thai;

Tránh tiếp xúc với chất tẩy rửa.

**VẮC XIN VIÊM GAN A BẤT HOẠT, HẤP PHỤ*****Vaccinum hepatitis A inactivatum adsorbatum***

Vắc xin viêm gan A bất hoạt, hấp phụ là chế phẩm chứa một chủng virus viêm gan A nuôi cấy trên tế bào, được bất hoạt bằng một phương pháp đã được phê chuẩn và thường được hấp phụ với nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat.

**Sản xuất****Chủng virus**

Phải đạt các tiêu chuẩn sau:

Có đầy đủ hồ sơ, thông tin về nguồn gốc virus.

Đạt được các tiêu chuẩn đặt ra cho virus sử dụng để sản xuất vắc xin bất hoạt.

Đã qua thử nghiệm lâm sàng cho thấy có thể tạo ra vắc xin an toàn và hiệu quả.

Chủng sản xuất được sản xuất dựa trên hệ thống chủng giống gốc đã được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền.

Chủng sản xuất được bảo quản ở dưới âm 60 °C (-60 °C).

**Tế bào sản xuất**

Gồm tế bào lưỡng bội người, dòng tế bào thường trực hoặc tế bào tiên phát đã được mô tả đặc tính đầy đủ và được phê chuẩn bởi cơ quan kiểm định quốc gia.

**Môi trường nuôi cấy tế bào sử dụng trong sản xuất**

Phải được thẩm định để đảm bảo năng suất và hiệu quả trong sản xuất vắc xin. Tất cả các thành phần bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều phải đảm bảo vô khuẩn và an toàn (huyết thanh bê, trypsin tách tế bào, chất chỉ thị pH, kháng sinh...).

**Quá trình sản xuất**

Chủng virus viêm gan A thường được nuôi cấy trên dòng tế bào lưỡng bội người (tế bào MRC5 hoặc KMB17) hoặc dòng tế bào thường trực khác, sử dụng môi trường nuôi cấy thích hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hỗn lại, tinh sạch, bất hoạt, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng, bổ sung tá chất và đóng ống theo quy trình đã được phê duyệt. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn như: Chủng virus, tế bào sử dụng cho sản xuất, môi trường nuôi cấy, huyết thanh bê, trypsin tách tế bào, chất chỉ thị pH, kháng sinh, hóa chất bất hoạt, chất bảo quản...

Trong trường hợp sử dụng tế bào thận khi tiên phát để sản xuất thì các thử nghiệm đặc hiệu để kiểm soát virus ở khi phải được thực hiện bao gồm thử nghiệm: SIV, SV 40, virus B và lao.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm****Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Chất bảo quản**

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng một phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng



các chất bảo quản này phải nằm trong giới hạn 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

**Nhôm**

Nếu sử dụng nhôm hydroxyd hoặc nhôm hydrat phosphat làm chất hấp phụ, thì hàm lượng tối đa cho phép là 1,25 mg Al<sup>3+</sup> trong một liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

**Formaldehyd tồn dư**

Không quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Trường hợp các thử nghiệm kiểm tra hàm lượng formaldehyd tồn dư (nếu có sử dụng), hàm lượng chất bảo quản (nếu có) hay các thử nghiệm kiểm tra trên động vật mà đã kiểm tra trên vắc xin bán thành phẩm và cho kết quả đạt yêu cầu thì những thử nghiệm này có thể không cần kiểm tra trên vắc xin thành phẩm.

**Nhận dụng**

Vắc xin phải chứa kháng nguyên virus viêm gan A được nhận dạng bằng phương pháp ELISA, sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng thử nghiệm *in vivo*.

**Cảm quan**

Khi lắc vắc xin viêm gan A bất hoạt, hỗn dịch có màu trắng đục.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**pH**

Phải nằm trong giới hạn do nhà sản xuất đăng ký đã được phê duyệt (Phụ lục 15.33).

**An toàn chung**

Vắc xin viêm gan A bất hoạt hấp phụ phải đạt an toàn trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột phải khỏe mạnh, tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**Chất gây sốt**

Vắc xin viêm gan A bất hoạt hấp phụ phải đạt yêu cầu về chất gây sốt trên thỏ. Tổng nhiệt độ chênh lệch của 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

**Nội độc tố vi khuẩn**

Đạt tiêu chuẩn theo nhà sản xuất đăng ký đã được phê duyệt (Phụ lục 13.2).

**Công hiệu**

Công hiệu vắc xin viêm gan A bất hoạt, hấp phụ được tiến hành song song với vắc xin mẫu chuẩn. Có thể được xác định theo phương pháp gây miễn dịch trên chuột để xác định hiệu giá kháng thể thu được (công hiệu *in vivo*) hoặc phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu thực hiện trong phòng thí nghiệm để định lượng trực tiếp hàm lượng kháng nguyên có trong vắc xin (công hiệu *in vitro*).

**Công hiệu in vivo:**

Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng (giống chuột tùy thuộc vào quy trình của các nhà sản xuất) khỏe mạnh và từ cùng một đàn, khoảng 5 tuần tuổi, tốt nhất là cùng giới.

Xác định công hiệu tương quan: Vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được pha loãng thành ít nhất 3 độ pha. Dung dịch để pha loãng là nước muối sinh lý (dung dịch natri clorid 0,9 %) có chứa loại tá chất được sử dụng trong mẫu kiểm tra. Tiêm màng bụng 1 mL/chuột, mỗi độ pha tiêm miễn dịch ít nhất 10 chuột. Sử dụng một nhóm chuột tiêm dung dịch pha loãng làm chứng. Tất cả các chuột sau gây miễn dịch được nuôi từ 28 đến 32 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê, lấy máu tìm chuột. Các mẫu máu được ly tâm ở 3000 r/min trong 10 min ở 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh và cất riêng rẽ mẫu máu của từng chuột ở -20 °C.

Xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng virus viêm gan A bằng phương pháp (ELISA) dùng kit thương phẩm có chất lượng tốt. Kết quả được tính theo chương trình Probit Analysis (WHO).

**Thử nghiệm có giá trị khi:**

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và liều tiêm nhỏ nhất. Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn tin cậy của công hiệu tương quan nằm trong khoảng 33 % đến 300 %.

Tiêu chuẩn công hiệu *in vivo*: Công hiệu tương quan (p = 95 %) không nhỏ hơn 1 so với mẫu chuẩn.

**Hàm lượng nhôm**

Nếu sử dụng hydroxyd nhôm hoặc nhôm hydrat phosphat là chất hấp phụ thì hàm lượng tối đa cho phép là 1,25 mg Al<sup>3+</sup> trong một liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

**Formaldehyd tồn dư**

Không được quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

**Chất bảo quản**

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng một phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản này phải từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

**Hàm lượng protein**

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường là dùng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein phải nằm trong giới hạn cho phép (Phụ lục 15.34).

**Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh sáng và tránh làm vắc xin đông băng.

Các tuyên bố về hạn dùng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

**Nhãn**

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu quy định hiện hành.

**Cách dùng, liều dùng**

Theo hướng dẫn sử dụng đã được phê duyệt.

## VẮC XIN VIÊM GAN A BẤT HOẠT, VIROSOM *Vaccinum hepatitis A inactivatum virosomale*

Vắc xin viêm gan A bất hoạt, virosom là hỗn dịch của một chủng virus viêm gan A phù hợp nuôi cấy trên tế bào và được bất hoạt bằng một phương pháp đã được phê chuẩn rồi phối trộn với các virosom theo một tỷ lệ phù hợp, các phospholipid được sử dụng như là tá chất.

Các virosom là vỏ của virus cúm phù hợp với từng sản phẩm.

### Sản xuất

Phương pháp sản xuất cần được thẩm định để chứng tỏ rằng sản phẩm tạo ra nếu đem kiểm tra sẽ đáp ứng tất cả các yêu cầu về độc tính bất thường của huyết thanh miễn dịch và vắc xin dùng cho người (Phụ lục 15.11).

Quy trình sản xuất gồm 3 giai đoạn.

Giai đoạn 1: Sản xuất vắc xin viêm gan A (bất hoạt).

Quy trình sản xuất vắc xin viêm gan A bất hoạt được mô tả trong chuyên luận Vắc xin viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và phải tuân thủ tất cả các yêu cầu về sản xuất và kiểm định giống như phần Sản xuất vắc xin viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ).

Giai đoạn 2: Sản xuất các virosom.

Virosom là phần vỏ của một loại virus cúm đã được phê duyệt dùng cho sản phẩm đặc hiệu, có chứa kháng nguyên bề mặt hemagglutinin. Quy trình sản xuất các virosom này cũng giống như quy trình sản xuất vắc xin cúm bất hoạt (dạng split), gồm các bước: Chủng virus viêm gan A phù hợp được gây nhiễm vào trứng, ủ rồi thu dịch niệu; tinh sạch virus; bất hoạt; phá vỡ và thu phần vỏ virus chứa các glycoprotein của virus cúm (trong đó có kháng nguyên hemagglutinin). Sau đó được bổ sung thêm các phospholipid phù hợp như lecithin, cephalin... rồi loại bỏ các chất sử dụng trong quá trình tinh sạch, tẩy rửa bằng sắc ký hấp phụ hoặc một phương pháp phù hợp để thu được các virosom.

Quy trình sản xuất các virosom phải tuân thủ tất cả các yêu cầu về sản xuất và kiểm định giống như phần sản xuất Vắc xin cúm bất hoạt.

Giai đoạn 3: Phối trộn.

Vắc xin viêm gan A sau khi bất hoạt được trộn với các virosom theo một tỷ lệ phù hợp đã được thẩm định tạo ra bán thành phẩm cuối cùng.

Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn như: Chủng virus, tế bào gốc, tế bào sử dụng cho sản xuất, môi trường nuôi cấy, huyết thanh bê, trypsin tách tế bào, chất chỉ thị pH, kháng sinh, hóa chất bất hoạt, chất bảo quản... Vắc xin phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin dùng cho người và các yêu cầu dưới đây.

### Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

#### *Hàm lượng protein*

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường dùng phương pháp Lowry (Phụ lục 15.34). Hàm lượng protein phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

#### *Hàm lượng phospholipid*

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường dùng phương pháp hóa miễn dịch hoặc phương pháp hóa lý. Hàm lượng phospholipid phải nằm trong giới hạn được quy định cho từng sản phẩm.

#### *Nhận dạng và định lượng hàm lượng hemagglutinin*

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường là dùng phương pháp khuếch tán miễn dịch đơn (SRD). Hàm lượng hemagglutinin phải nằm trong giới hạn được phê duyệt. Thử nghiệm định lượng hàm lượng hemagglutinin được dùng như thử nghiệm nhận dạng.

#### *Nhận dạng và định lượng hàm lượng kháng nguyên HAV*

Được xác định theo phương pháp hóa miễn dịch phù hợp, thường là dùng phương pháp ELISA. Hàm lượng HAV phải nằm trong giới hạn cho phép. Thử nghiệm định lượng hàm lượng HAV được dùng như thử nghiệm nhận dạng.

#### *Tỷ lệ giữa hàm lượng kháng nguyên HAV và hemagglutinin*

Phải nằm trong giới hạn cho phép.

#### *Hàm lượng ovalbumin*

Được xác định theo phương pháp hóa miễn dịch phù hợp, thường dùng phương pháp ELISA. Hàm lượng ovalbumin không quá 1 µg/liều đơn dùng cho người.

#### *Hàm lượng BSA tồn dư*

Được xác định theo phương pháp hóa miễn dịch phù hợp, thường là dùng phương pháp ELISA. Hàm lượng BSA nằm trong giới hạn nhà sản xuất đăng kí nhưng không được quá 50 ng/ml.

#### *Vô khuẩn*

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### *Chất bảo quản*

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng một phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản này phải nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

#### *Hóa chất tồn dư*

Các hóa chất được sử dụng trong quá trình sản xuất phải được kiểm tra theo phương pháp đã được phê chuẩn. Hàm lượng hóa chất tồn dư trong phải nằm trong giới hạn cho phép.

#### *Formaldehyd tồn dư*

Lượng tối đa cho phép là 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Trường hợp các thử nghiệm kiểm tra hàm lượng formaldehyd tồn dư (nếu có sử dụng), hàm lượng chất bảo quản (nếu có), BSA tồn dư, ovalbumin tồn dư hay các thử nghiệm kiểm tra trên động vật mà đã kiểm tra trên vắc xin bán thành phẩm và cho kết quả đạt yêu cầu thì những thử nghiệm này có thể không cần kiểm tra trên vắc xin thành phẩm.

**Nhận dạng kháng nguyên HAV**

Vắc xin phải chứa kháng nguyên virus viêm gan A được nhận dạng bằng phương pháp ELISA sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng thử nghiệm *in vivo*.

**Nhận dạng và định lượng hàm lượng hemagglutinin**

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường dùng phương pháp khuếch tán miễn dịch đơn. Hàm lượng hemagglutinin phải nằm trong giới hạn từ 12 - 25 µg/ml. Thử nghiệm định lượng hàm lượng hemagglutinin bao gồm cả thử nghiệm nhận dạng.

**Cảm quan**

Đạt các yêu cầu theo tiêu chuẩn đã đăng ký.

**Mycoplasma**

Được tiến hành theo phương pháp đã được phê chuẩn. Vắc xin cần kiểm tra phải không có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**pH**

Từ 6,3 đến 7,3 (Phụ lục 15.33).

**Thể tích**

Không ít hơn thể tích ghi trên nhãn (Phụ lục 11.1).

**An toàn chung**

Phải đạt an toàn trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột phải khỏe mạnh, tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**Nội độc tố vi khuẩn**

Không quá 4 EU/ml hoặc 2 EU/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 13.2).

**Hàm lượng phospholipid**

Được xác định theo phương pháp phù hợp, thường là dùng phương pháp hóa miễn dịch hoặc phương pháp hóa lý. Hàm lượng phospholipid phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

**Formaldehyd**

Không được quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

**Kích thước của virosom**

Kích thước của virosom-HAV hoàn chỉnh phải nằm trong giới hạn đã được phê chuẩn.

**Chất bảo quản**

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc hóa lý phù hợp. Hàm lượng các chất bảo quản phải không ít hơn 85 % và không quá 115 % lượng ghi trên nhãn.

**Công hiệu**

Công hiệu vắc xin viêm gan A (bất hoạt, virosom) cần kiểm tra được tiến hành song song với vắc xin mẫu chuẩn bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp, thường sử dụng phương pháp ELISA trên bộ kit sinh phẩm chẩn đoán hoặc theo phương pháp ELISA tự gắn. Dùng kháng thể kháng

HAV để xác định hàm lượng kháng nguyên HAV trong vắc xin mẫu thử thông qua vắc xin mẫu chuẩn.

Hàm lượng kháng nguyên HAV phải nằm trong giới hạn đã được phê chuẩn.

**Bảo quản**

Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng và không được để vắc xin đông băng.

**Nhãn**

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu quy định hiện hành và cần bao gồm các thông tin sau: Nguồn gốc sinh học của tế bào dùng để sản xuất vắc xin; vỏ virus cúm được sản xuất từ trứng gà; không được để vắc xin đông băng; lặc kỹ trước khi dùng.

**VẮC XIN VIÊM GAN A SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC*****Vaccinum hepatitis A vivum***

Vắc xin viêm gan A sống, giảm độc lực là vắc xin đông khô được sản xuất từ chủng virus viêm gan A giảm độc lực phù hợp, phát triển trên tế bào lưỡng bội người.

Vắc xin được hồi chính ngay trước khi sử dụng với một dung dịch hồi chính kèm theo, tạo ra một dung dịch trong suốt, đồng nhất.

**Sản xuất****Chủng virus**

Phải đạt các tiêu chuẩn sau:

Có đầy đủ hồ sơ, thông tin về nguồn gốc virus.

Đạt được các tiêu chuẩn đặt ra cho virus sử dụng để sản xuất vắc xin sống giảm độc lực.

Đã qua thử nghiệm lâm sàng cho thấy có thể tạo ra vắc xin an toàn và hiệu quả.

Chủng sản xuất được sản xuất dựa trên hệ thống chủng giống gốc virus giảm độc lực được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền. Chủng được bảo quản ở -60 °C.

**Tế bào sản xuất**

Gồm tế bào lưỡng bội người, dòng tế bào thường trực hoặc tế bào tiên phát đã được mô tả đầy đủ các đặc tính và được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền.

**Môi trường sử dụng để sản xuất**

Phải được thẩm định để đảm bảo năng suất và hiệu quả trong sản xuất vắc xin. Tất cả các thành phần bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều phải đảm bảo vô trùng và an toàn.

**Quá trình sản xuất**

Chủng virus viêm gan A thường được nuôi cấy trên dòng tế bào lưỡng bội người, hoặc dòng tế bào thường trực khác, sử dụng môi trường nuôi cấy thích hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hỗn lại, tinh sạch, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng và đông khô theo quy trình đã được phê duyệt. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn như: Chủng virus sử dụng,

tế bào sử dụng cho sản xuất, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bê, trypsin tách tế bào, chất chỉ thị pH, kháng sinh, tá chất,...

Trong trường hợp sử dụng tế bào thận khi tiên phát để sản xuất thì các thử nghiệm đặc hiệu để kiểm soát virus ở khi phải được thực hiện bao gồm thử nghiệm: SIV, SV 40, virus viêm gan B và lao.

Vắc xin mẫu chuẩn: Phải tuân thủ và đáp ứng các tiêu chuẩn quy định chung cho mẫu chuẩn sử dụng trong các sản phẩm về sinh học và y học ứng dụng trên người.

#### **Kiểm tra mẻ găt đơn**

**Hiệu giá virus:** Được kiểm tra theo phương pháp đã được phê duyệt. Hiệu giá phải nằm trong giới hạn đã được phê duyệt.

**Vô khuẩn:** Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Mycoplasma:** Được tiến hành theo phương pháp đã được phê chuẩn. Mẻ găt đơn phải không phát hiện thấy có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

#### **Kiểm định vắc xin bán thành phẩm**

##### **Hiệu giá virus**

Được kiểm tra theo phương pháp đã được phê duyệt. Hiệu giá phải nằm trong giới hạn đã được phê duyệt.

##### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

##### **Mycoplasma**

Không có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

#### **Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

##### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7). Tiến hành thử với 10 ml vắc xin bán thành phẩm cuối cùng cho mỗi môi trường nuôi cấy.

#### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

##### **Nhận dạng**

Kiểm tra bằng phương pháp ELISA hoặc PCR. Thử nghiệm nhận dạng có thể được bao hàm trong thử nghiệm công hiệu.

##### **Cảm quan**

Phải đạt các tiêu chuẩn đã đăng ký.

##### **Độ ẩm**

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 15.35).

##### **Cloroform**

Không được quá 0,006 % hoặc không được quá 60 µg/liều đơn dùng cho người.

##### **Công hiệu và ổn định nhiệt**

Chuẩn độ hiệu giá và thử nghiệm ổn định nhiệt (vắc xin để 37 °C trong 3 ngày) được tiến hành song song bằng gây nhiễm trên tế bào lưỡng bội người (MRC5 hoặc KMB17) rồi định lượng virus bằng phương pháp ELISA. Sử dụng kit thương phẩm hoặc kit của nhà sản xuất.

Hộn đều 5 ống vắc xin rồi pha loãng bậc 10 bằng môi trường Hanks. Sau đó cho vào mỗi chai tế bào (25 cm<sup>2</sup>) 1 ml mẫu vắc xin đã pha loãng, sử dụng ít nhất 4 độ pha, mỗi độ pha gây nhiễm 4 chai tế bào. Sử dụng 4 chai tế bào làm chứng, nhỏ 1 ml môi trường Hanks/chai. Ủ 2 h ở 37 °C. Thêm từ 6 ml đến 8 ml môi trường duy trì có 2 % huyết thanh bào thai bê vào và nuôi ở nhiệt độ (36 ± 0,5) °C. Hàng tuần kiểm tra và thay môi trường. Tiến hành găt tế bào sau 25 - 28 ngày, tinh sạch virus và xác định hiệu giá virus viêm gan A của lô vắc xin bằng phương pháp ELISA. Hiệu giá virus viêm gan A của vắc xin bảo quản ở 2 - 8 °C và mẫu vắc xin ủ ổn định nhiệt phải không dưới 6,5lgCCID<sub>50</sub>/liều; đồng thời hiệu giá virus của mẫu vắc xin ủ ổn định nhiệt không được giảm quá 0,5lg so với mẫu vắc xin bảo quản ở 2 °C đến 8 °C. Mẫu ổn định nhiệt phải không dưới 6,5lgCCID<sub>50</sub>/liều đồng thời mẫu ổn định nhiệt hiệu giá không được giảm quá 0,5lg.

##### **Hàm lượng BSA tồn dư**

Kiểm tra bằng phương pháp ELISA trên kit thương phẩm. Hàm lượng BSA tồn dư trong vắc xin phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

##### **Gentamicin**

Kiểm tra bằng phương pháp ELISA trên kit thương phẩm. Hàm lượng kháng sinh gentamicin tồn dư trong vắc xin phải không quá 50 ng/liều đơn dùng cho người.

##### **Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

##### **An toàn chung**

Vắc xin viêm gan A sống giảm độc lực phải đạt an toàn trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột phải khỏe mạnh, tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

##### **Bảo quản**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

##### **Nhãn**

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu quy định hiện hành.

## **VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP**

### ***Vaccinum hepatitis B recombinatum***

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (rDNA) được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt (HBsAg) - là một protein của virus viêm gan B. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN và thường được hấp phụ với nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat hydrat.

##### **Sản xuất**

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được điều chế bằng cách sử dụng HBsAg tổng hợp ở tế bào nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*), tế bào trứng chuột đất vàng (CHO - Chinese hamster ovary) hoặc các dòng tế bào thích hợp khác đã được chuyển nạp (transformation) với một plasmid có chứa gen mã hóa

HBsAg. HBsAg được thu từ tế bào bằng cách làm ly giải hoặc phá vỡ tế bào nấm men và được tinh chế nhờ các kỹ thuật sinh hóa lý.

Vắc xin tái tổ hợp có thể chứa sản phẩm của gen S (protein loại nhỏ) hoặc phối hợp sản phẩm của gen S và tiền S2 (protein loại trung bình) hoặc phối hợp cả sản phẩm của gen S, tiền S2 và tiền S1 (protein loại lớn).

### Kiểm định vắc xin bán thành phẩm

#### Hàm lượng protein

Protein trong mẫu thử được định lượng theo phương pháp Lowry (Phụ lục 15.34).

#### Nhận dạng và hàm lượng HBsAg

Xác định hàm lượng HBsAg bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA), thấm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

#### Độ tinh khiết của kháng nguyên

Được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3) hoặc các phương pháp khác phù hợp như SDS - PAGE (Phụ lục 15.39).

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không nhỏ hơn 95 % so với hàm lượng protein toàn phần.

#### Lipid

Không lớn hơn 100 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.40).

#### Cesi (Cs)

Không lớn hơn 5 µg/20 µg protein (Phụ lục 15.41).

#### Tween 20

Không lớn hơn 50 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.42).

#### Polysaccharid

Không lớn hơn 10 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.38).

### Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

#### Thimerosal

Không được lớn hơn 0,012 % (Phụ lục 15.29).

#### Vô khuẩn

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

### Kiểm định vắc xin thành phẩm

#### Cảm quan

Sau khi lắc, vắc xin viêm gan B có màu trắng, hơi đục.

#### pH

5,4 đến 7,4 (Phụ lục 15.33).

#### Protein toàn phần

Xác định bằng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein toàn phần có trong vắc xin không được quá 40 µg/ml (Phụ lục 15.34).

#### Nhôm

Hàm lượng nhôm trong vắc xin tối đa không được quá 1,25 mg/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

#### Formaldehyd

Không được quá 0,01 % (Phụ lục 15.25).

#### Thimerosal

Không được quá 0,012 % (Phụ lục 15.29).

#### Vô khuẩn

Đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

#### An toàn chung

Vắc xin viêm gan B phải đảm bảo an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt trắng. Chuột phải khoẻ mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

#### Chất gây sốt

Vắc xin viêm gan B phải an toàn về mặt chất gây sốt khi tiêm cho thỏ. Tổng nhiệt độ chênh lệch 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

#### Công hiệu

Công hiệu vắc xin viêm gan tái tổ hợp được tiến hành song song giữa vắc xin mẫu thử với vắc xin mẫu chuẩn; có thể được xác định bằng phương pháp thực nghiệm trên động vật thí nghiệm (công hiệu *in vivo*) để xác định hiệu giá kháng thể, hoặc phương pháp miễn dịch trên phòng thí nghiệm (công hiệu *in vitro*) để xác định hàm lượng kháng nguyên HBsAg có trong vắc xin.

#### Thử nghiệm công hiệu *in vivo*

##### Động vật thí nghiệm:

Chuột nhắt trắng giống BALB/C hoặc ICR hoặc một giống chuột phù hợp khác, khoẻ mạnh và từ cùng một đàn, khoảng 5 tuần đến 6 tuần tuổi, tốt nhất là chuột cùng một giới.

##### Xác định công hiệu tương quan:

Vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được pha loãng bậc 2 thành 5 độ pha. Dung dịch đề pha vắc xin là nước muối sinh lý có chứa nhôm hydroxyd (hàm lượng nhôm hydroxyd không quá 500 µg/ml). Tiêm màng bụng 1 ml mỗi độ pha loãng vắc xin cho mỗi chuột. Mỗi độ pha loãng vắc xin tiêm ít nhất 15 chuột. Tất cả các chuột sau gây miễn dịch được nuôi từ 28 ngày đến 32 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê và lấy máu tim chuột. Các mẫu máu được ly tâm 3000 r/min ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C. Xác định hiệu giá kháng thể kháng HBsAg bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA) trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Kết quả được tính theo phân mềm thống kê chuyên dụng.

##### Thử nghiệm có giá trị khi:

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất.

Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn độ tin cậy của công hiệu tương quan nằm trong khoảng 33 % đến 300 %.

##### Tiêu chuẩn công hiệu trên thực nghiệm:

Công hiệu tương quan (P = 95 %) không nhỏ hơn 1.

**Thử nghiệm công hiệu in vitro**

Vắc xin thử nghiệm được pha loãng song song với vắc xin mẫu chuẩn bằng PBS 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) với các độ pha loãng bậc 2 phù hợp. Tiến hành thử nghiệm bằng kỹ thuật ELISA, trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Dùng kháng thể đơn dòng kháng HBsAg để xác định lượng kháng nguyên HBsAg trong vắc xin mẫu thử, so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

Kết quả được tính theo phần mềm Excel, Paraleline hoặc phần mềm chuyên dụng khác.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Theo nhà sản xuất đăng ký.

**Đóng gói**

Vắc xin viêm gan B được đóng trong lọ thủy tinh trung tính, mỗi lọ chứa 20 µg/1 ml; hoặc 10 µg/1 ml; hoặc 5 µg/1 ml tùy theo từng nhà sản xuất.

**Tính ổn định**

Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin phải được tiến hành trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm khác nhau) khi được bảo quản theo thời gian ở điều kiện như ghi trên nhãn của sản phẩm.

**Bảo quản, hạn dùng**

Vắc xin viêm gan B phải được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tuyệt đối không được làm vắc xin đông băng. Trong điều kiện bảo quản như trên, vắc xin viêm gan B tái tổ hợp có hạn dùng là 36 tháng.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

**Đường tiêm, liều tiêm**

Đường dùng: Tiêm bắp vào vùng cơ delta (đối với trẻ sơ sinh, tiêm bắp đùi là tốt hơn).

Liều dùng, lịch tiêm: Theo hướng dẫn cụ thể của nhà sản xuất.

Tiêm nhắc lại sau 5 năm đối với tất cả các lứa tuổi.

**VẮC XIN PHỐI HỢP VIÊM GAN A BẤT HOẠT, HẤP PHỤ VÀ VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP, HẤP PHỤ**

*Vaccinum hepatitis A inactivatum et hepatitis B (ADNr) adsorbatum*

Vắc xin phối hợp viêm gan A bất hoạt, hấp phụ và vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, hấp phụ là một hỗn dịch chứa một chủng virus viêm gan A phù hợp (nuôi cấy trên tế bào, được bất hoạt bằng một phương pháp đã được phê chuẩn) và vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt HBsAg là một protein của virus viêm gan B. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN) và thường được hấp phụ với nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat hydrat.

**Sản xuất**

Sản xuất độc lập từng loại vắc xin sau đó phối trộn lại để tạo vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ).

Quy trình sản xuất của hai thành phần vắc xin này được mô tả trong phần vắc xin viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ). Vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) phải tuân thủ tất cả các yêu cầu về sản xuất và kiểm định cho từng loại vắc xin.

Vắc xin mẫu chuẩn: Là mẫu phải được chứng minh bằng các kết quả nghiên cứu trên động vật và người trưởng thành khỏe mạnh; sau một liệu trình tiêm miễn dịch đầu tiên, ít nhất 95 % tạo được đáp miễn dịch bảo vệ, tương ứng với hàm lượng kháng thể trong máu Anti HAV phải đạt ít nhất 20 mIU/ml và Anti HBs phải đạt ít nhất 10 mIU/ml.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng**

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Chất bảo quản**

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản phải nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

**Hàm lượng 2-phenoxyethanol**

Kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lỏng. Hàm lượng 2-phenoxyethanol trong vắc xin phải nằm trong giới hạn cho phép.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

Trường hợp các thử nghiệm kiểm tra hàm lượng formaldehyd tồn dư (nếu có sử dụng), hàm lượng chất bảo quản (nếu có), hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do, hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ) hay các thử nghiệm kiểm tra trên động vật mà đã kiểm tra trên vắc xin bán thành phẩm và cho kết quả đạt yêu cầu thì những thử nghiệm này có thể không cần kiểm tra trên vắc xin thành phẩm.

**Nhận dạng**

Vắc xin phải chứa kháng nguyên virus viêm gan A và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg), được nhận dạng bằng phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú) sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng thử nghiệm *in vivo*.

**Cảm quan**

Dạng lỏng vẩn đục, không màu; sau khi lắc tạo hỗn dịch màu trắng đục.

**Vô khuẩn**

Đạt yêu cầu vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

**Hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ)**

Kiểm tra theo phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú).



Hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ) phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

**Hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do (không hấp phụ)**  
Kiểm tra theo phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú).  
Hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do (không hấp phụ) phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

**pH**

Từ 5,8 đến 6,6 (Phụ lục 15.33).

**Thể tích**

Không ít hơn thể tích ghi trên nhãn (Phụ lục 11.1).

**Hàm lượng nhôm**

Nếu sử dụng hydroxyd nhôm hoặc nhôm phosphat hydrat là chất hấp phụ, thì hàm lượng phải nằm trong giới hạn được phê duyệt nhưng không được quá 1,25 mg/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

**Hàm lượng nhôm tự do**

Phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

**Formaldehyd tồn dư**

Không được quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

**Chất bảo quản**

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất bảo quản được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản phải nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

**An toàn chung**

Phải đạt an toàn trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột phải khỏe mạnh, tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

**Nội độc tố vi khuẩn**

Không được quá 2 EU/liều đơn dùng cho người.

**Công hiệu**

Công hiệu vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) được tiến hành độc lập theo các phương pháp và quy trình phù hợp cho từng loại vắc xin thành phần; mỗi loại phải làm song song với vắc xin mẫu chuẩn. Thử nghiệm có thể được xác định theo phương pháp gây miễn dịch trên chuột để xác định hiệu giá kháng thể thu được (công hiệu *in vivo*) hoặc phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu thực hiện trong phòng thí nghiệm để định lượng trực tiếp hàm lượng từng loại kháng nguyên có trong vắc xin (công hiệu *in vitro*) bằng các loại kit thương phẩm hoặc kit tự gắn. Quy trình và các bước tiến hành sẽ thay đổi theo hướng dẫn của từng phương pháp, từng loại kit được sử dụng.

**Bảo quản**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh sáng và tránh làm vắc xin đông băng.

**Nhãn**

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng quy định hiện hành.

**Ghi chú:**

**Định lượng và nhận dạng thành phần HAV trong vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ).**

**Nguyên lý:**

Hàm lượng HAV trong mẫu được định lượng theo phương pháp ELISA. Mẫu thử và mẫu chuẩn được pha loãng ra nhiều nồng độ rồi được nhỏ lên phiến có gắn kháng thể kháng HAV. Phức hợp kháng thể - kháng nguyên được phát hiện nhờ enzym peroxylase gắn kháng thể kháng HAV cộng hợp. Sau đó thêm cơ chất hiện màu (TMB). Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng nguyên có trong mẫu.

**Tiến hành:**

Chuẩn bị phiến: Phiến trắng miễn dịch 96 giếng được gắn kháng thể anti-HAV IgG người pha loãng trong dung dịch PBS-Tween. Ủ phiến 25 °C qua đêm rồi rửa và làm khô phiến. Dán kín, bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, sử dụng trong 1 tuần.

Chuẩn bị mẫu vắc xin: Vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin mẫu thử và mẫu chứng (internal control) có hấp phụ nhôm được giải hấp phụ bằng cách thêm dung dịch dinatrihydrophosphat-EDTA có bổ sung Tween 20 và gelatin hoặc muối natri citrat có bổ sung BSA. Quy trình như sau: Ly tâm mẫu với tốc độ 6000 r/min, trong 10 min để tách toàn bộ phần nước nổi rồi thêm dung dịch giải hấp phụ. Lắc đều rồi ủ ở 37 °C. Ly tâm như trên, thu dịch nổi. Tinh sạch lần 2 và 3 như trên rồi tinh sạch lần 4 qua đêm. Hỗn dịch thu được sau các lần tinh sạch với PBS (không có Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup>) có bổ sung Tween 20 và gelatin. Các mẫu sau giải hấp phụ và mẫu chuẩn HAV không có hấp phụ được pha loãng thành ít nhất 6 độ pha.

Nhỏ các mẫu đã pha loãng vào phiến đã gắn kháng thể anti-HAV IgG người, 2 giếng/độ pha, nhỏ dung dịch pha loãng mẫu thành một hàng làm mẫu trắng. Ủ 90 min ở 37 °C. Thêm kháng thể HAV cộng hợp gắn peroxylase. Ủ 90 min ở 37 °C. Nhỏ TMB có dung dịch nước oxy già 30 % trong đệm acetat. Ủ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Nhỏ 50 µl dung dịch acid sulfuric 1 N để dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 450/620 nm.

**Tính kết quả:**

Kết quả được tính theo phần mềm Paralelline hoặc Excel. Hệ số tương quan (R<sup>2</sup>) đường tuyến tính của chuẩn tính trên phần mềm Excel phải lớn hơn 95 %.

Hàm lượng kháng nguyên HAV trong mẫu thử được tính từ ít nhất 3 độ pha liên tiếp trong số các độ pha loãng dùng trong thử nghiệm.

**Quy trình thử nghiệm định lượng và nhận dạng thành phần HBsAg trong vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) theo phương pháp ELISA gián tiếp.**

**Nguyên lý:**

Hàm lượng HBsAg trong vắc xin cần kiểm tra được định lượng theo phương pháp ELISA gián tiếp. Vắc xin được ủ với 1 lượng kháng thể đa dòng người. Sau đó lượng

kháng thể thừa được xác định bằng ù với HBsAg chuẩn và được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG người gắn peroxydase.

**Tiền hành:**

Mẫu vắc xin được pha loãng trong dung dịch PBS có chứa 0,1 % BSA và 0,1 % (tt/tt) Tween 20, tiếp tục được trộn với kháng thể đa dòng kháng HBsAg và ù qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó ly tâm, dịch nổi được chuyển vào phiên gắn HBsAg ù qua đêm ở 2 °C đến 8 °C cùng với HBsAg chuẩn tái tổ hợp đã được pha loãng trong *dung dịch đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6)*<sup>(\*)</sup> để xác định lượng kháng thể thừa. Lượng kháng thể thừa được xác định bằng cách sử dụng một kháng thể kháng kháng thể người gắn peroxydase. ù 37 °C trong 1 h. Rửa, rồi thêm dung dịch chất hiện màu (TMB). Cuối cùng nhỏ dung dịch dừng phản ứng (dung dịch acid sulfuric 1 N).

Đo OD ở bước sóng 450/620 nm. Mật độ màu tỷ lệ nghịch với hàm lượng HBsAg có trong mẫu.

*(\*) Pha đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6):*

Dung dịch 1: Hoà tan 2,1 g natri hydrocarbonat (TT) trong 500 ml nước.

Dung dịch 2: Hoà tan 2,65 g natri carbonat (TT) trong 500 ml nước.

Bảo quản các dung dịch trên trong lọ kín, ở 25 °C hoặc trong tủ lạnh, hạn dùng 3 tháng.

Trước khi dùng, trộn đều 70 ml Dung dịch 1 và 30 ml Dung dịch 2, được dung dịch đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6). Bảo quản hỗn hợp dung dịch đã pha trong lọ kín, ở nhiệt độ phòng, hạn dùng 1 tháng.

**Tính kết quả:**

Kết quả được tính theo phần mềm Paralelline hoặc Excel. Hệ số tương quan ( $R^2$ ) đường tuyến tính của chuẩn tính trên phần mềm Excel phải lớn hơn 95 %.

Hàm lượng kháng nguyên HBsAg trong mẫu thử được tính từ ít nhất 3 độ pha liên tiếp trong số các độ pha loãng dùng trong thử nghiệm.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:**

Hàm lượng kháng nguyên HAV phải không dưới 60 % hàm lượng ghi trên nhãn.

Hàm lượng kháng nguyên HBsAg phải từ 21 - 37 µg HBsAg/ml.

## VẮC XIN VIÊM NÃO NHẬT BẢN

### *Vaccinum encephalitis japonicae*

Vắc xin viêm não Nhật Bản là một chế phẩm vô khuẩn được điều chế từ chủng virus viêm não Nhật Bản (chủng Nakayama hoặc Beijing) sau khi đã được gây nhiễm vào não chuột nhắt trắng.

Quy trình sản xuất bao gồm các bước tinh chế bằng protamin sulfat, amoni sulfat, siêu ly tâm trong dung dịch saccharose. Virus viêm não Nhật Bản sau tinh chế phải có độ tinh khiết cao và duy trì được bản chất kháng nguyên để có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch tối ưu. Kháng nguyên tinh khiết được bất hoạt bởi formaldehyd và được bảo quản bằng thimerosal.

## Kiểm định vắc xin bán thành phẩm

### **Vô khuẩn**

Bán thành phẩm viêm não Nhật Bản phải đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

### **Hiệu giá virus**

Hiệu giá virus viêm não Nhật Bản được xác định bằng kỹ thuật ELISA. Hiệu giá được sử dụng như một chỉ số theo dõi tính ổn định của quy trình sản xuất.

## Kiểm định vắc xin thành phẩm

### **Cảm quan**

Mỗi loại vắc xin viêm não Nhật Bản thành phẩm phải được kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo các lọ vắc xin không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút đã được đậy chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn.

Vắc xin viêm não Nhật Bản ở dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu.

### **Nhận dạng**

Tiêm cho chuột lang hoặc chuột nhắt trắng, vắc xin viêm não Nhật Bản phải tạo được kháng thể trung hòa có khả năng trung hòa được virus đặc hiệu.

### **pH**

Từ 6,8 đến 7,4 (Phụ lục 15.33).

### **Hàm lượng protein**

Xác định bằng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein không được quá 80 µg/ml (Phụ lục 15.34).

### **Chất bảo quản**

Hàm lượng thimerosal không quá 0,12 mg/ml (Phụ lục 15.29).

### **Formaldehyd**

Không quá 0,1 mg/ml (Phụ lục 15.25).

### **Chất gây sốt**

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải an toàn về chất gây sốt. Khi tiêm cho thỏ, tổng số nhiệt độ tăng cho 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

### **Vô khuẩn**

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

### **An toàn chung**

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải đảm bảo an toàn khi tiêm thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt trắng. Chuột phải khoẻ mạnh và tăng trọng bình thường sau thời gian theo dõi 7 ngày (Phụ lục 15.11).

### **An toàn đặc hiệu**

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải đảm bảo an toàn khi tiêm thử nghiệm trên chuột nhắt trắng. Chuột phải khoẻ mạnh và tăng trọng bình thường sau thời gian theo dõi 14 ngày. Tính an toàn đặc hiệu của vắc xin viêm não Nhật Bản được xác định bằng cách kiểm tra sự có mặt của virus còn sống sót sau quá trình bất hoạt.

**Động vật:** Sử dụng ít nhất 10 chuột nhắt trắng 4 tuần tuổi có khối lượng khoảng 12 g đến 14 g. Lựa chọn những chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh lý và tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly ít nhất là 3 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột được chăm sóc và theo dõi trong điều kiện tiêu chuẩn.

**Cách tiến hành:** Mẫu vắc xin thử nghiệm không pha loãng đem tiêm vào não chuột với liều 0,03 ml cho mỗi chuột.

**Theo dõi và đọc kết quả:** Toàn bộ chuột thử nghiệm phải theo dõi và cân khối lượng hàng ngày trước khi tiêm và sau khi tiêm. Thời gian theo dõi chuột là 14 ngày kể từ sau ngày tiêm. Trong suốt thời gian theo dõi, chuột thử nghiệm phải khỏe mạnh, tăng trọng và không được có các triệu chứng bất thường. Nếu trong trường hợp có một chuột thử nghiệm bị liệt hoặc chết thì phải tiến hành thử nghiệm lại lần thứ hai với số vắc xin đem thử và số chuột thí nghiệm gấp 2. Nếu trong thử nghiệm lần thứ hai có một chuột bị liệt hoặc chết thì lô vắc xin thử nghiệm đó phải hủy bỏ vì không đạt yêu cầu về tính an toàn đặc hiệu.

#### **Công hiệu**

Tiến hành kiểm tra song song với vắc xin chuẩn.

Vắc xin kiểm tra và vắc xin chuẩn được pha loãng ở các độ pha 1/16, 1/32, 1/64 trong dung dịch PBS 0,75 M, pH 7,4 có chứa 0,02 % gelatin. Mỗi độ pha, tiêm 2 liều, mỗi liều 0,5 ml, đường phúc mạc, cách nhau 7 ngày cho 16 chuột nhắt trắng. Toàn bộ chuột được nuôi và theo dõi trong 2 tuần. Sau đó tiến hành lấy máu trong điều kiện vô khuẩn và để riêng máu của từng chuột, để ở 4 °C qua đêm. Tách huyết thanh và hợp huyết thanh của toàn bộ chuột (mỗi chuột 0,1 ml) của cùng một độ pha. Pha loãng huyết thanh 1/10 và bất hoạt bỏ thể ở 56 °C trong 30 min. Bảo quản huyết thanh chuột đã pha loãng và bất hoạt ở -20 °C. Tiến hành chuẩn độ hiệu giá kháng thể trung hòa trên tế bào BHK21.

Kết quả được tính toán theo công thức tính giảm 50 % đám hoại tử. Hiệu giá kháng thể trung hòa của vắc xin kiểm tra không được thấp hơn vắc xin chuẩn.

#### **Đóng gói, bảo quản, hạn dùng**

Đóng ở trong lọ thủy tinh trung tính: 5,5 ml/lọ và 1 ml/lọ. Bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng; tuyệt đối không được làm đông băng.

Trong điều kiện bảo quản ở trên, vắc xin viêm não Nhật Bản có hạn dùng là 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

#### **Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của các quy định hiện hành.

#### **Liều tiêm, đường tiêm, lịch tiêm**

Tiêm dưới da, vị trí tiêm: vào vùng cơ delta.

Dưới 36 tháng tuổi tiêm 0,5 ml/1 liều.

Trên 36 tháng tuổi tiêm 1,0 ml/1 liều.

Lịch tiêm: 2 liều cách nhau 1 tuần đến 2 tuần.

Tiêm nhắc lại: Sau 1 năm và sau đó cứ 3 năm tiêm nhắc lại một lần.