

## PHỤ LỤC 14

**HƯỚNG DẪN DÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌC *IN VIVO* THUỐC GENERIC**

Thuốc phát minh là thuốc được cấp phép lưu hành đầu tiên, trên cơ sở đã có đầy đủ các số liệu về chất lượng, an toàn và hiệu quả. Thuốc generic là một thuốc thành phẩm nhằm thay thế một thuốc phát minh được sản xuất không có giấy phép nhượng quyền của công ty phát minh và được đưa ra thị trường sau khi bằng phát minh và các bản quyền đã hết hạn. Theo quy định trong đăng ký thuốc của Việt Nam cũng như của nhiều nước khác, đối với các thuốc generic có tác dụng toàn thân mà bản thân dược chất và dạng bào chế không chứng minh được sinh khả dụng tương tự như thuốc phát minh hoặc thuốc đối chứng (đối với các trường hợp không xác định được thuốc phát minh) thì phải có các số liệu chứng minh thuốc generic có tương đương sinh học so với thuốc phát minh hoặc thuốc đối chứng. Hiện nay, Bộ Y tế ban hành thông tư (được cập nhật định kỳ) quy định danh sách các thuốc generic phải nộp hồ sơ chứng minh tương đương sinh học khi nộp hồ sơ đăng ký sản xuất, lưu hành.

Trong đánh giá Tương Đương Sinh Học (TĐSH) *in vivo* thuốc generic thì khái niệm sinh khả dụng được định nghĩa là tốc độ và mức độ hấp thu dược chất từ chế phẩm thuốc vào hệ tuần hoàn chung. Các đại lượng được sử dụng để biểu thị tốc độ và mức độ hấp thu dược chất vào hệ tuần hoàn chung được ứng dụng trong nghiên cứu TĐSH bao gồm:  $C_{max}$  (nồng độ đỉnh);  $T_{max}$  (thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến khi đạt đến nồng độ đỉnh) và AUC (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian). Hai chế phẩm thuốc được coi là tương đương sinh học nếu sinh khả dụng của chúng khác nhau không đáng kể khi dùng cùng mức liều trong cùng điều kiện thử nghiệm.

Hướng dẫn này đưa ra một số nguyên tắc cơ bản trong đánh giá tương đương sinh học để thu được kết quả tin cậy.

**Những yêu cầu cơ bản đối với phương pháp phân tích xác định nồng độ dược chất và/hoặc chất chuyển hóa có tác dụng trong mẫu sinh học**

Các phương pháp sắc ký, như sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng các detector khác nhau như quang phổ tu ngoại - khả kiến, huỳnh quang, phổ khối thường được sử dụng trong nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học để xác định nồng độ thuốc (dược chất và/hoặc chất chuyển hóa - chất cần phân tích) trong các mẫu sinh học (thường là các mẫu máu, huyết tương, huyết thanh hay nước tiểu) của người tình nguyện tham gia nghiên cứu. Những phương pháp này có tính đặc hiệu cao; có khả năng tách và định lượng trên cùng một hệ thống và cùng thời điểm. Trong

một số trường hợp, có thể sử dụng phương pháp phân tích sinh hóa và sinh học nếu phương pháp có độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu để xác định được nồng độ thuốc trong các mẫu sinh học.

Do quá trình phân tích mẫu sinh học bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như lượng mẫu ít, nồng độ thấp, lẫn nhiều tạp chất là các chất nội sinh (lipid, protein, chất nội sinh, chất chuyển hóa...) và sự khác nhau giữa các cá thể, nên phương pháp phân tích phải được thiết lập và thẩm định để đảm bảo độ tin cậy.

1. *Tính đặc hiệu*: Phải chứng minh được rằng chất xác định được là dược chất hay chất chuyển hóa có tác dụng. Sự phân tích mẫu không bị ảnh hưởng bởi các chất nội sinh và chất chuyển hóa có liên quan. Báo cáo kết quả phải bao gồm cả sắc ký đồ của mẫu trắng (dịch sinh học), mẫu chất chuẩn pha trong dịch sinh học và mẫu thử thu được sau khi dùng thuốc. Trong nghiên cứu tính đặc hiệu, phải thực hiện phương pháp thêm chất chuẩn để loại bỏ sai số do nền mẫu. Khi xác định nồng độ chất phân tích trong mẫu sinh học bằng phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ cần phải có các nghiên cứu ảnh hưởng của nền mẫu.

2. *Đường chuẩn và khoảng tuyến tính*: Mọi quan hệ giữa đáp ứng với nồng độ của chất phân tích phải được đánh giá bằng phương trình toán học phù hợp. Phương trình này phải được xác định bằng các phương pháp phân tích hồi quy phù hợp (như phương pháp bình phương nhỏ nhất). Khoảng tuyến tính là khoảng nồng độ từ thấp nhất đến cao nhất của đường chuẩn có mối quan hệ tuyến tính giữa đáp ứng (xác định bằng các thiết bị phân tích phù hợp) và nồng độ dược chất có trong mẫu. Trong khoảng này, phép phân tích phải thoả mãn các yêu cầu về độ đúng và độ chính xác theo qui định.

Đường chuẩn phải có ít nhất 6 nồng độ của chất chuẩn pha trong cùng một mẫu dịch sinh học (không bao gồm mẫu điểm 0 - mẫu có nồng độ hoạt chất cần phân tích bằng 0). Đường chuẩn hay khoảng tuyến tính phải bao gồm toàn bộ khoảng nồng độ của các mẫu cần phân tích. Không xác định nồng độ chất cần phân tích có trong mẫu thử bằng phương pháp ngoại suy.

3. *Độ đúng và độ chính xác*: Độ đúng và độ chính xác được xác định cùng lúc bằng cách sử dụng tối thiểu 3 nồng độ của mẫu chuẩn kiểm tra. 1 nồng độ gần với giá trị nhỏ nhất của đường chuẩn (LLOQ); 1 nồng độ gần với điểm giới hạn trên của đường chuẩn và 1 nồng độ ở gần điểm giữa. Mỗi nồng độ phải được xác định trên ít nhất 5 mẫu. Độ chính xác có thể được biểu thị bằng hệ số biến thiên (CV) trong ngày và giữa các ngày, được xác định trên mẫu chuẩn kiểm tra. Nói chung, CV không nên vượt quá 15 %, riêng điểm gần giới hạn định lượng dưới cho phép không vượt quá 20 %.

Độ đúng được biểu thị là khả năng tiến tới gần nồng độ thực nhất của chất phân tích trong mẫu sinh học được xác định bằng phương pháp đặc biệt. Điều đó có thể được biểu thị bằng khả năng tìm lại tương đối, và phải nằm trong khoảng 85 % đến 115 %, nhưng có thể chấp nhận 80 % đến 120 % đối với điểm gần giới hạn định lượng dưới.

4. **Giới hạn định lượng dưới:** Giới hạn định lượng là nồng độ thấp nhất của đường chuẩn có thể xác định được với độ đúng và độ chính xác cho phép. Giới hạn định lượng dưới ít nhất phải thỏa mãn khả năng phân tích nồng độ của mẫu thử lấy ở thời điểm bằng 3 đến 5 lần thời gian bán thải hoặc bằng 1/20 đến 1/10 giá trị  $C_{max}$  của chất phân tích.

5. **Độ ổn định của mẫu thử:** Độ ổn định của mẫu sinh học có chứa chất phân tích cần được khảo sát khi bảo quản ở nhiệt độ phòng, đông lạnh trong khoảng thời gian khác nhau để xác định điều kiện bảo quản và thời gian bảo quản mẫu sau khi lấy.

6. **Tỷ lệ thu hồi:** Khả năng tìm lại sau khi chiết được đánh giá với ít nhất 3 nồng độ: Cao, trung bình và thấp của đường chuẩn. Giới hạn của chỉ tiêu này có thể tham khảo những tài liệu liên quan.

7. **Mẫu chuẩn kiểm tra (QC):** Mẫu chuẩn kiểm tra được dùng để so sánh khi định lượng là những mẫu tự tạo biết trước nồng độ, chuẩn bị bằng cách pha chất chuẩn của chất cần phân tích trong mẫu sinh học trắng.

8. **Phân tích mẫu thử:** Định lượng các mẫu thử bằng phương pháp phân tích đã được thâm định. Mỗi mẫu thử có thể phân tích một lần hoặc lặp lại nếu cần. Toàn bộ các mẫu thử của mỗi người tình nguyện phải được phân tích trong cùng một điều kiện. Một lô mẫu phân tích (các mẫu phân tích trong cùng một điều kiện - trong thời gian một buổi hoặc một ngày) bao gồm toàn bộ các mẫu thử của một hoặc một số người tình nguyện; các mẫu của đường chuẩn/ khoảng tuyến tính và các mẫu QC - với tối thiểu 3 mức nồng độ tương ứng với khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao của đường chuẩn/khoảng tuyến tính và tương ứng với mỗi mức nồng độ phải có tối thiểu hai mẫu. Số lượng các mẫu QC của một lô phân tích không được ít hơn 5 % tổng số mẫu thử và cũng không được ít hơn 6 mẫu. Nồng độ chất cần phân tích trong mỗi mẫu thử và các mẫu QC được xác định dựa trên kết quả phân tích các mẫu của đường chuẩn trong lô phân tích. Chỉ chấp nhận kết quả của một lô mẫu phân tích khi: Các mẫu đường chuẩn/khoảng tuyến tính đạt yêu cầu về độ đúng, chính xác và độ lệch giữa kết quả xác định nồng độ chất cần phân tích trong các mẫu QC phải sai khác không quá  $\pm 15\%$  so với giá trị nồng độ lý thuyết tương ứng. Tiêu chuẩn chấp nhận kết quả lô phân tích được qui định bởi các hướng dẫn cụ thể của Cơ quan quản lý.

### Qui định chung đối với một nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học

#### Lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu

**Tiêu chuẩn:** Đối tượng tham gia nghiên cứu phải tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và được lựa chọn theo những tiêu chuẩn phù hợp nhất định. Trong nghiên cứu tương đương sinh học, đa số trường hợp thường chọn đối tượng tham gia nghiên cứu là nam giới khỏe mạnh. Một số trường hợp cần thiết chỉ sử dụng đối tượng là phụ nữ, khi đó cần giải thích rõ. Với thuốc dùng cho trẻ em, vẫn nên chọn người lớn để thử nghiệm. Các tiêu chuẩn cụ thể của đối tượng tham gia nghiên cứu như sau:

a. Giới tính: Nam hoặc nữ.

b. Tuổi: Thông thường từ 18 tuổi đến 55 tuổi. Trong cùng một nhóm nghiên cứu, giữa các cá thể, khác nhau không quá 10 tuổi.

c. Cân nặng, chiều cao cơ thể: Chỉ số khối lượng cơ thể (*Body mass index - BMI*) được tính bằng thương số giữa cân nặng cơ thể (đơn vị tính kg) và bình phương chiều cao cơ thể (đơn vị tính m<sup>2</sup>) của đối tượng tham gia nghiên cứu và phải nằm trong giới hạn trung bình từ 18,0 đến 25,0 (có thể mở rộng đến 30 trong một số trường hợp và do cơ quan quản lý qui định). Cân nặng cơ thể của các cá thể trong cùng nhóm nghiên cứu nên gần giống nhau.

d. Người tình nguyện phải có đủ năng lực hành vi dân sự, khỏe mạnh, không có tiền sử về bệnh tim mạch, bệnh gan, bệnh đường tiêu hóa, bệnh chuyển hóa không bình thường hoặc bệnh về hệ thần kinh.

e. Không có tiền sử về dị ứng và hạ huyết áp tư thế.

f. Không dùng các đối tượng nghiện ma túy, nghiện rượu, nghiện thuốc lá.

g. Trong quá trình thử nghiệm không được sử dụng thuốc lá, rượu và những thức uống khác có chứa cafein.

h. Không dùng thuốc có chứa được chất cùng với thuốc nghiên cứu trong vòng 2 tuần trước và trong quá trình thử nghiệm.

i. Chấp thuận tự nguyện ký vào bản cam kết tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Đối tượng tham gia nghiên cứu phải được kiểm tra sức khỏe bao gồm các chỉ tiêu: khám lâm sàng tổng quát, huyết áp, nhịp tim, chức năng gan, thận, phổi và công thức máu. Các kết quả xét nghiệm phải trong giới hạn bình thường. Khi thử những thuốc đặc biệt, có thể phải kiểm tra thêm một số chỉ tiêu khác, ví dụ như đường huyết khi thử nghiệm những thuốc có ảnh hưởng đến đường huyết hay điện tim đối với các thuốc ảnh hưởng đến hoạt động của tim... Nếu đối tượng là phụ nữ thì phải tiến hành làm các xét nghiệm và đảm bảo không mang thai trong quá trình tham gia nghiên cứu.

**Số lượng:** Số lượng người tình nguyện phải đủ theo các yêu cầu, quy định liên quan của Cơ quan quản lý và được tính theo nguyên tắc dùng với số lượng nhỏ nhất có thể được để đảm bảo yêu tố đạo đức trong các nghiên cứu y sinh học nhưng vẫn đảm bảo yêu cầu, mức độ tin cậy thống kê của phép thử. Trong nghiên cứu tương đương sinh học, số lượng người tình nguyện tham gia nghiên cứu được tính trên các dữ liệu: mức độ tin cậy thống kê của phép thử (thường  $\alpha = 0,1$ ); khoảng giới hạn tương đương sinh học yêu cầu (thường là 80 % - 125 %); mức độ dao động các thông số được động học trên đối tượng tham gia nghiên cứu và tỷ lệ trung bình thông số được động học giữa thuốc thử và thuốc đối chứng. Với mỗi nghiên cứu tương đương sinh học, cần xác định cụ thể và nêu rõ số lượng người tình nguyện trong đề cương nghiên cứu tương đương sinh học trình Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học phê duyệt theo quy định. Số lượng người tình nguyện tham gia nghiên cứu có thể thay đổi tùy từng thuốc, từng nghiên cứu và các quy định liên quan nhưng không được ít hơn 12 người.

**Thuốc nghiên cứu**

**Thuốc đối chứng:** Thuốc (chế phẩm) đối chứng dùng trong nghiên cứu tương đương sinh học phải là sản phẩm đã được cấp phép sản xuất, lưu hành dựa trên các số liệu an toàn, hiệu quả điều trị của sản phẩm và được lựa chọn theo các nguyên tắc với thứ tự ưu tiên lần lượt sau:

- Thuốc phát minh đang lưu hành tại Việt Nam;
- Thuốc danh mục thuốc đối chứng của tổ chức Y tế thế giới;
- Thuốc phát minh đang được lưu hành tại một trong các nước thành viên của Hội nghị hòa hợp quốc tế và các nước liên kết (gồm các nước thuộc EU, Mỹ, Nhật Bản, Canada, Australia, Thụy Sĩ);

- Trong trường hợp không xác định được thuốc phát minh, lựa chọn thuốc đối chứng là thuốc đã được cấp phép và đang được lưu hành tại một trong các nước thành viên của Hội nghị hòa hợp quốc tế và các nước liên kết hoặc thuốc đã được đánh giá chất lượng bởi Tổ chức Y tế Thế giới.

Quy định cụ thể thuốc đối chứng dùng trong một nghiên cứu tương đương sinh học do Bộ Y tế ban hành. Thuốc đối chứng được lựa chọn phải đạt tiêu chuẩn chất lượng và phải có nguồn gốc, xuất xứ rõ ràng mới được sử dụng trong nghiên cứu tương đương sinh học. Trong nghiên cứu tương đương sinh học nên lựa chọn thuốc đối chứng có dạng bào chế phù hợp với dạng bào chế của thuốc thử.

**Thuốc thử:** Thuốc (chế phẩm) thử trong nghiên cứu tương đương sinh học phải được nghiên cứu, sản xuất theo tiêu chuẩn thực hành tốt sản xuất thuốc (GMP) và các quy định liên quan của Cơ quan quản lý với cỡ lô phù hợp. Chỉ được sử dụng lô thuốc thử được sản xuất với cỡ lô đủ lớn, có đầy đủ hồ sơ chế biến và đạt các yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn đồng thời có hàm lượng dược chất so với hàm lượng ghi trên nhãn sai khác không quá 5 % so với lô thuốc đối chứng trong nghiên cứu tương đương sinh học.

**Thiết kế và phê duyệt đề cương nghiên cứu**

Theo quy định, tất cả các nghiên cứu tương đương sinh học đều phải xây dựng đề cương nghiên cứu. Đề cương nghiên cứu trình bày rõ mô hình/thiết kế nghiên cứu; phương pháp, nội dung nghiên cứu; phương pháp thống kê/đánh giá kết quả nghiên cứu... Đề cương nghiên cứu đều phải được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học phê duyệt chấp thuận trước khi tiến hành triển khai nghiên cứu.

**Lựa chọn mô hình nghiên cứu:** Kiểu nghiên cứu phổ biến nhất trong nghiên cứu tương đương sinh học, so sánh sinh khả dụng giữa một thuốc thử và một thuốc đối chứng là nghiên cứu đơn liều, chéo  $2 \times 2$  (2 thuốc, 2 giai đoạn, 2 trình tự thử thuốc). Để hạn chế ảnh hưởng của sự khác biệt giữa các cá thể và giai đoạn thử nghiệm, các đối tượng nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm. Một nhóm sẽ được sử dụng thuốc thử trước và thuốc chứng sau; ngược lại, nhóm kia sử dụng thuốc chứng trước và thuốc thử sau. Giữa 2 giai đoạn thử, cần có một khoảng thời gian để đảm bảo cho thuốc của lần thử trước loại hết ra khỏi cơ thể (thường từ 1 đến 2 tuần, gấp khoảng 5 - 7 lần thời gian bán thải  $t_{1/2}$  của thuốc). Đối với các thuốc có thời gian bán thải kéo dài, có thể áp dụng thiết kế nghiên cứu

song song. Trong nghiên cứu song song, đối tượng tham gia thử nghiệm được chia thành 2 nhóm, một nhóm uống thuốc thử và nhóm còn lại uống thuốc đối chứng. Ngoài mô hình nghiên cứu kể trên, trong một số trường hợp có thể áp dụng các mô hình nghiên cứu khác như: Nghiên cứu đa liều (xác định các thông số dược động học của thuốc ở trạng thái ổn định - sau khi dùng thuốc từ 5 đến 7 liều); nghiên cứu lặp lại (sử dụng thuốc thử và/hoặc thuốc đối chứng lặp lại). Nghiên cứu đa liều có thể được áp dụng trong nghiên cứu tương đương sinh học khi:

- a. Mức độ hấp thu dược chất từ dạng thuốc tương tự nhau, nhưng khác nhau về tốc độ hấp thu.
- b. Sinh khả dụng giữa các cá thể khác nhau nhiều.
- c. Sau khi uống liều đơn, nồng độ của thuốc dưới dạng tiền chất của thuốc hoặc chất chuyển hóa thấp, không thể xác định được bởi phương pháp phân tích thích hợp.
- d. Thuốc giải phóng có kiểm soát, tác dụng kéo dài.

Đối với các nghiên cứu so sánh sinh khả dụng/trương đương sinh học của 2 thuốc thử so với 1 thuốc đối chứng (trường hợp thuốc thử có nhiều hàm lượng) hoặc nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn/ đồ uống tới sinh khả dụng của thuốc thử dạng rắn dùng đường uống đồng thời đánh giá tương đương sinh học của thuốc thử so với thuốc đối chứng, người ta thường sử dụng thiết kế nghiên cứu chéo  $3 \times 3$  (3 thuốc, 3 giai đoạn, 3 hoặc 6 trình tự/phác đồ sử dụng thuốc - tùy theo mô hình nghiên cứu). Tương tự như thiết kế nghiên cứu chéo  $2 \times 2$ , giữa mỗi giai đoạn cần có thời gian nghỉ để đảm bảo cho thuốc sử dụng ở giai đoạn trước được thải trừ hết khỏi cơ thể. Thời gian nghỉ (thời gian thải trừ thuốc) giữa mỗi giai đoạn thường gấp khoảng 5 - 7 lần thời gian bán thải của thuốc. Tất cả các nghiên cứu tương đương sinh học có thiết kế nghiên cứu khác với mô hình nghiên cứu phổ biến đều phải nêu rõ lý do giải thích cho thiết kế nghiên cứu và thiết kế nghiên cứu phải được trình bày rõ ràng, chi tiết trong đề cương nghiên cứu trình Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học phê duyệt.

**Xác định liều thử:** Liều thử trong nghiên cứu tương đương sinh học phải giống với liều dùng trong lâm sàng và nên sử dụng mức liều thấp nhất có thể được mà vẫn xác định được chính xác các thông số dược động học trên đối tượng tham gia nghiên cứu khi sử dụng mức liều đó. Trong nghiên cứu tương đương sinh học tốt nhất là liều thử của thuốc thử phải giống với liều thử của thuốc chứng. Trong trường hợp phải sử dụng liều khác nhau, cần nêu rõ lý do và phải hiệu chỉnh các giá trị dược động học thu được một cách phù hợp theo tỷ lệ mức liều dùng.

**Thời điểm lấy mẫu:** Sau khi sử dụng thuốc, tiến hành lấy các mẫu sinh học (thường là mẫu máu) của mỗi người tình nguyện tại những thời điểm xác định để xác định nồng độ thuốc/dược chất có trong các mẫu. Tiến hành xác định các thông số dược động học dựa trên kết quả xác định nồng độ thuốc/dược chất có trong các mẫu. Do vậy, thiết kế thời điểm lấy mẫu trong nghiên cứu tương đương sinh học rất quan trọng để thu được kết quả nghiên cứu tin cậy. Một đường cong nồng độ thuốc trong máu người tình nguyện

theo thời gian hoàn thiện phải bao gồm cả các pha: Hấp thu, phân bố và thải trừ của thuốc.

(1) *Nghiên cứu đơn liều:* Cần phải lấy một điểm trước khi dùng thuốc (mẫu trắng, thời điểm 0) và ít nhất 11 điểm khác sau khi sử dụng thuốc bao gồm nên có ít nhất 3 - 4 điểm lấy mẫu trước khi đạt tới đỉnh của đường cong nồng độ - thời gian (pha hấp thu), khoảng 3 điểm lấy mẫu xung quanh giá trị đỉnh và không ít hơn 4 - 6 điểm sau giá trị đỉnh (pha thải trừ). Tổng số điểm lấy mẫu của đường cong nồng độ - thời gian không ít hơn 12. Thời gian lấy mẫu nên kéo dài tới khoảng 3 đến 5 lần thời gian bán thải của dược chất hoặc khi nồng độ dược chất trong mẫu máu bằng khoảng 1/10 đến 1/20 giá trị nồng độ đỉnh. Đối với các thuốc có thời gian bán thải quá dài, có thể kết thúc lấy mẫu ở thời điểm sau khi uống thuốc 72 h.

(2) *Nghiên cứu đa liều:* Sau khi người tình nguyện đã sử dụng được một số liều trong tổng số liều cần phải sử dụng trong nghiên cứu (thường là từ liều thứ 3 - 5 trong tổng số 5 - 7 liều dùng), trong một khoảng thời gian bằng 7 lần thời gian bán thải của thuốc cần phải lấy 3 mẫu tại 3 thời điểm (dự đoán có nồng độ cực tiểu) liên tiếp, xác định nồng độ thuốc có trong mỗi mẫu để đảm bảo rằng nồng độ thuốc trong máu người tình nguyện đã đạt đến trạng thái ổn định. Nên lấy mẫu máu vào cùng một thời điểm (thường là buổi sáng) của những ngày khác nhau (phù hợp nhất là lấy mẫu ngay trước khi sử dụng thuốc liều kế tiếp) để có thể so sánh được và hạn chế những ảnh hưởng của thời gian tới dược động học. Sau khi nồng độ thuốc đạt đến trạng thái ổn định, tiến hành cho người tình nguyện sử dụng liều cuối trong tổng số liều dùng của một giai đoạn nghiên cứu và tiến hành lấy các mẫu máu của người tình nguyện trong khoảng thời gian dùng liều cuối theo các thời điểm xác định. Đường cong nồng độ thuốc trong máu theo thời gian của người tình nguyện ở trạng thái ổn định ( $AUC_{0-\tau}^{ss}$ ) tương tự như đường cong nồng độ - thời gian khi sử dụng đơn liều ( $AUC_{0-t}$ ) bao gồm các thời điểm ở pha hấp thu, các điểm xung quanh giá trị đỉnh của đường cong và các thời điểm ở pha thải trừ. Khoảng thời gian từ điểm 0 (sử dụng liều cuối) đến điểm lấy mẫu cuối cùng trong suốt khoảng liều ở trạng thái ổn định bằng  $\tau$  chính là khoảng thời gian giữa các lần dùng thuốc.

Các mẫu máu (huyết tương, huyết thanh hay máu toàn phần) phải bảo quản đông lạnh ngay sau khi lấy để chờ phân tích. Khi không thể xác định được nồng độ thuốc trong huyết tương, có thể thực hiện trên một mẫu sinh học khác như nước tiểu, nhưng chất xác định được và phương pháp phân tích phải phù hợp đảm bảo kết quả xác định nồng độ thuốc trong các mẫu đúng, chính xác và tin cậy được.

### Tiến hành nghiên cứu

*Nghiên cứu đơn liều:* Người tình nguyện nhịn ăn qua đêm (ít nhất là 10 h trước khi uống thuốc). Sáng hôm sau, mỗi người sẽ được cho uống một liều thuốc thử hoặc thuốc đối chứng với 240 ml nước ấm. Người tình nguyện không được uống nước trong vòng 1 h trước và sau khi uống

thuốc, trừ lượng nước sử dụng khi uống thuốc. Đối với các nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn tới sinh khả dụng của thuốc hoặc nghiên cứu tương đương sinh học ở tình trạng no, sau khi nhịn ăn qua đêm, người tình nguyện ăn một bữa ăn tiêu chuẩn và uống thuốc với 240 ml nước ấm sau khi ăn 30 min. Bữa ăn tiêu chuẩn trước khi uống thuốc của người tình nguyện thường là bữa ăn giàu năng lượng; nhiều chất béo, tuân thủ theo đúng các quy định liên quan và phải được quy định cụ thể trong đề cương nghiên cứu. Nếu không có yêu cầu gì đặc biệt, người tình nguyện dùng bữa ăn tiêu chuẩn 4 h sau khi uống thuốc. Khẩu phần ăn được qui định giống nhau cho tất cả người tình nguyện và cho các giai đoạn của mỗi nghiên cứu. Tiến hành lấy mẫu máu tĩnh mạch theo thời điểm lấy mẫu đã thiết kế.

*Nghiên cứu đa liều:* Với các nghiên cứu có nhịp dùng thuốc là 24 h (dùng thuốc 1 lần/ngày), nên uống thuốc vào mỗi buổi sáng sau khi đã nhịn ăn ít nhất 10 h, sau đó không ăn gì trong vòng 2 h đến 4 h sau khi uống thuốc. Với các nghiên cứu có chế độ dùng thuốc 2 lần/ngày, liều thuốc đầu tiên nên cho người tình nguyện uống vào buổi sáng sau khi đã nhịn đói ít nhất 10 h, sau đó không ăn gì trong vòng 2 h đến 4 h; liều thứ 2 được uống trước hoặc sau bữa ăn 2 h và tiếp tục nhịn ăn trong vòng 2 h sau khi uống thuốc. Mỗi liều được uống với 240 ml nước ấm. Nói chung, người tình nguyện có thể uống nước sau khi uống thuốc 1 h đến 2 h. Khi thuốc đối chứng là chế phẩm qui ước, nên thử theo mức liều và cách dùng thông thường đã sử dụng trên lâm sàng, nhưng nên chọn mức liều tương đương với liều của thuốc thử dạng giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài.

Theo qui định, các mẫu sinh học (máu, huyết tương, huyết thanh) sau khi lấy sẽ được bảo quản đông lạnh ngay để chờ phân tích. Sau khi uống thuốc, người tình nguyện nên tránh các vận động phải gắng sức. Quá trình lấy các mẫu máu của người tình nguyện phải được thực hiện tại cơ sở y tế có đủ nhân viên y tế (bác sỹ, điều dưỡng); đủ điều kiện chăm sóc sức khỏe và xử lý các biến cố bất lợi, các tai biến y tế nếu xảy ra. Các biến cố bất lợi, các tác dụng phụ xảy ra cần phải xử trí và điều trị kịp thời. Trường hợp xảy ra biến cố bất lợi nghiêm trọng, cần phải ngừng ngay nghiên cứu và báo cáo các bên liên quan theo đúng quy định.

### Phân tích dược động học

Lập các bảng và hình để biểu thị các dữ liệu nồng độ thuốc trong huyết tương vào những thời điểm lấy mẫu khác nhau của từng cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Sau đó tính các thông số dược động học tương đối của mỗi cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho mỗi thông số.

*Nghiên cứu đơn liều:* Những thông số dược động học chính cần phải xác định trong nghiên cứu tương đương sinh học với thiết kế nghiên cứu đơn liều bao gồm: Nồng độ đỉnh trong máu ( $C_{max}$ ), diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian (AUC), thời gian bán thải của thuốc ( $t_{1/2}$ ) và thời điểm đạt tới nồng độ đỉnh trong máu ( $T_{max}$ ). Giá trị  $C_{max}$  và  $T_{max}$  biểu thị bằng số liệu thu được trực tiếp từ thí nghiệm, và không phải tính toán. Giá trị  $AUC_{0-t_1}$  (diện

tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm  $t$ ) được tính theo phương pháp hình thang, với  $t_n$  là thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể định lượng được. Giá trị  $AUC_{0-\infty}$  (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm 0 đến vô cùng) được tính toán theo công thức:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_n} + C_{t_n}/\lambda_z$$

Trong đó:  $C_{t_n}$  là nồng độ của thuốc tại thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể xác định được bằng phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học được sử dụng trong nghiên cứu;  $\lambda_z$  là hằng số tốc độ thải trừ.

Giá trị  $t_{1/2}$  có thể được tính bằng công thức:

$$T_{1/2} = 0,693/\lambda_z$$

Trong đó:  $\lambda_z$  là hằng số tốc độ thải trừ được tính từ độ dốc của đoạn tuyến tính trên đường biểu diễn logarit nồng độ - thời gian.

Thông thường, một nghiên cứu tương đương sinh học có thời điểm lấy mẫu phù hợp thì tỷ số:

$$(AUC_{0-t_n}/AUC_{0-\infty}) \times 100 \% \geq 80 \%$$

**Nghiên cứu đa liều:** Sau khi uống đa liều (thông thường từ 5 - 7 liều) với khoảng cách thời gian giữa các liều dùng như nhau, thì thuốc có thể đạt tới trạng thái ổn định. Tiến hành lấy mẫu máu sau khi đạt đến trạng thái liều ổn định, phân tích xác định nồng độ thuốc trong các mẫu máu và tính giá trị các thông số dược động học cơ bản của thuốc trạng thái ổn định như nồng độ  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC_{0-t}^{ss}$  hay giá trị nồng độ trung bình ở trạng thái cân bằng ( $C_{av}$ ), khoảng dao động nồng độ thuốc trong máu (DF)... Các giá trị  $C_{max}^{ss}$ ,  $T_{max}^{ss}$ ,  $AUC_{0-t}^{ss}$  ở trạng thái cân bằng được tính toán bằng phương pháp tương tự tương ứng như thử nghiệm đơn liều. Nồng độ thuốc trung bình ở trạng thái cân bằng ( $C_{av}$ ) có thể được tính như sau:

$$C_{av} = (AUC_{0-t}^{ss})/\tau$$

Trong đó:  $AUC_{0-t}^{ss}$  là diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc - thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm  $\tau$  trong suốt khoảng liều ở trạng thái ổn định và  $\tau$  là khoảng thời gian giữa các lần dùng thuốc.

Khoảng dao động của nồng độ thuốc trong máu có thể được tính theo biểu thức:

$$DF = 100 \% \times (C_{max}^{ss} - C_{min})/C_{av}$$

Trong đó:  $C_{max}^{ss}$  là nồng độ đỉnh, thu được từ các số liệu thực, sau khi dùng liều cuối cùng ở trạng thái ổn định và  $C_{min}$  là nồng độ cực tiểu ở thời điểm cuối trong khoảng thời gian dùng liều cuối cùng ở trạng thái cân bằng. Nếu thuốc đối chứng cũng là thuốc giải phóng chậm hay thuốc tác dụng kéo dài,  $DF/\tau$  của thuốc thử phải không lớn hơn 143 % giá trị của thuốc đối chứng.

Ngoài các thông số dược động học cơ bản trong nghiên cứu tương đương sinh học kể trên, tùy theo mục đích cũng như các mô hình nghiên cứu cụ thể còn có thể xác định thêm các thông số dược động học khác như giá trị  $t_{1/2}$  hấp

thu; thời gian lưu trú trung bình (*mean retention/residence time - MRT*); diện tích dưới đường cong nồng độ tích lũy - thời gian (*area under the moment curve - AUMC*)...

#### Tính toán sinh khả dụng

**Nghiên cứu đơn liều:** Sinh khả dụng  $F$  được tính toán lần lượt bằng cách sử dụng  $AUC_{0-t_n}$  và  $AUC_{0-\infty}$  của mỗi cá thể, đồng thời tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Khi liều của thuốc thử ( $T$ ) giống với liều của thuốc đối chứng ( $R$ ):

$$F = (AUC_{0-t_n})_T / (AUC_{0-t_n})_R \times 100 \%$$

$$F = (AUC_{0-\infty})_T / (AUC_{0-\infty})_R \times 100 \%$$

Khi liều thuốc thử khác với liều thuốc đối chứng và chất được phân tích đặc trưng cho được động học tuyến tính, chỉ số  $F$  có thể thay đổi phụ thuộc vào liều và được thể hiện dưới đây:

$$F = [(AUC_{0-t_n})_T \times D_R / (AUC_{0-t_n})_R \times D_T] \times 100 \%$$

$$F = [(AUC_{0-\infty})_T \times D_R / (AUC_{0-\infty})_R \times D_T] \times 100 \%$$

Trong đó:  $D_R$  và  $D_T$  là liều uống của thuốc đối chứng và thuốc thử.

**Phân tích các chất chuyển hóa:** Một vài thuốc là dạng tiền chất của thuốc không thể định lượng được trong máu vì dạng tiền chất của thuốc chuyển hóa rất nhanh trong cơ thể. Sinh khả dụng của những loại thuốc này có thể được đánh giá qua đáp ứng thích hợp của chất chuyển hóa có hoạt tính.

$$F = [(AUC_{0-t_n})_T^m \times D_R / (AUC_{0-t_n})_R^m \times D_T] \times 100 \%$$

$$F = [(AUC_{0-\infty})_T^m \times D_R / (AUC_{0-\infty})_R^m \times D_T] \times 100 \%$$

Trong đó:  $m$  là ký hiệu cho chất chuyển hóa.

Đánh giá kết quả chủ yếu dựa vào số liệu  $AUC_{0-t_n}$  và  $AUC_{0-\infty}$  được dùng như một số liệu để tham khảo.

**Nghiên cứu đa liều:** Sinh khả dụng  $F$  được tính toán dựa trên số liệu  $AUC_{0-t}^{ss}$  của mỗi cá thể. Khi liều của thuốc thử ( $T$ ) giống với liều của thuốc đối chứng ( $R$ ), sinh khả dụng ở trạng thái ổn định được xác định bằng công thức:

$$F = (AUC_{0-t}^{ss})_T / (AUC_{0-t}^{ss})_R \times 100 \%$$

Trong đó:  $AUC_{0-t}^{ss}$  là diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc - thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm  $\tau$  trong suốt khoảng liều ở trạng thái ổn định.

**Đánh giá tương đương sinh học** (phân tích thống kê các số liệu dược động học): Phân tích thống kê và đánh giá tương đương sinh học nên tập trung vào các thông số dược động học chính ( $AUC$ ,  $C_{max}$  và  $T_{max}$ ). Các giá trị  $C_{max}$  và  $AUC$  phải chuyển đổi sang giá trị thang logarit. Phân tích phương sai (ANOVA) xác định ảnh hưởng của các yếu tố như trình tự/phác đồ sử dụng thuốc, cá thể, thuốc, giai đoạn thử thuốc... tới kết quả của nghiên cứu tương đương sinh học bằng phương pháp phân tích thống kê phù hợp tương ứng với mô hình nghiên cứu đã sử dụng (nghiên cứu song song, chéo  $2 \times 2$ ; chéo  $3 \times 3$  hay nghiên cứu lặp lại...). Từ kết quả phân tích phương sai, xác định khoảng tin cậy 90 % cho tỷ lệ  $\ln C_{max}$  và khoảng tin cậy 90 % cho tỷ lệ  $\ln AUC$  giữa thuốc thử và thuốc đối chứng tương ứng

của mỗi người tình nguyện theo phương pháp thống kê phù hợp (two one-sided test với độ tin cậy  $\alpha = 0,1$ ). So sánh giá trị  $T_{max}$  của thuốc thử và thuốc đối chứng (số liệu không chuyển sang thang logarit) bằng một trong các phương pháp thống kê phi tham số *Wilcoxon signed rank test*, *Friedman test*, *Kruskal-Wallis test*, *ANCOVA* hoặc một phương pháp thống kê phi tham số khác phù hợp với mô hình nghiên cứu đã sử dụng.

Nếu giới hạn khoảng tin cậy 90% của các tỷ số  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-12h}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  (nghiên cứu đơn liều) hoặc  $C_{max}^{ss}$ ,  $AUC_{0-1}^{ss}$  (nghiên cứu đa liều) tương ứng giữa thuốc thử và thuốc đối chứng nằm trong khoảng 80,0 % đến 125,0 % và giá trị  $T_{max}$  của thuốc thử và thuốc đối chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê thì thuốc thử tương đương sinh học *in vivo* so với thuốc đối chứng.

Chấp nhận hai thuốc có giới hạn khoảng tin cậy 90 % tương ứng của các tỷ số  $C_{max}$  và AUC nằm trong khoảng 80,0 % đến 125,0 % và  $T_{max}$  khác nhau có ý nghĩa thống kê tương đương sinh học *in vivo* nếu sự khác nhau về tốc độ hấp thu (giá trị  $T_{max}$ ) của thuốc thử so với thuốc đối chứng là có chủ đích và chủ đích này được trình bày trên nhãn của sản phẩm theo đúng các quy định liên quan hoặc cung cấp thêm được bằng chứng lâm sàng phù hợp cho thấy sự khác nhau về tốc độ hấp thu của thuốc thử không ảnh hưởng đến an toàn và hiệu quả điều trị của thuốc trên lâm sàng.

Đối với một số thuốc/dược chất có khoảng điều trị hẹp, khoảng chấp nhận đối với khoảng tin cậy 90 % của tỷ số  $C_{max}$  và/hoặc AUC có thể phải thu nhỏ hơn (chỉ từ 90 % đến 110 %) so với khoảng chấp nhận thông thường từ 80 % đến 125 %. Cơ quan quản lý sẽ có quy định cụ thể trong trường hợp này. Ngoài ra, đối với các thuốc/dược chất không thuộc nhóm có khoảng điều trị hẹp, có mức độ dao động các thông số dược động học trên đối tượng sử dụng lớn, có thể xem xét mở rộng khoảng chấp nhận đối với khoảng tin cậy 90 % của tỷ số  $C_{max}$  rộng hơn so với khoảng chấp nhận thông thường 80 % - 125 %, có thể mở rộng tới 75 % - 133 % hoặc 70 % - 143 %. Cơ quan quản lý sẽ xem xét từng trường hợp và quy định cụ thể cho các trường hợp thay đổi khoảng giới hạn chấp nhận đối với khoảng tin cậy 90 % của tỷ số  $C_{max}$ .

Đối với nghiên cứu sinh khả dụng/tương đương sinh học của một thuốc thử dạng bào chế tác dụng kéo dài (phóng thích hoạt chất kéo dài) so với một thuốc đối chứng dạng bào chế quy ước, mức độ hấp thu của 2 thuốc trong nghiên cứu là tương đương sinh học với nhau nếu giá trị AUC đáp ứng được những yêu cầu của tương đương sinh học (khoảng tin cậy 90 % của tỷ số  $\ln AUC$  nằm trong giới hạn từ 80,0 % đến 125,0 %) và thuốc thử có khả năng giải phóng dược chất có kiểm soát hoặc kéo dài so với thuốc đối chứng (giá trị  $C_{max}$  giảm và  $T_{max}$  kéo dài hơn thuốc đối chứng; giá trị  $DF/\tau$  của thuốc thử phải lớn hơn 143 % giá trị của thuốc đối chứng).

**PHỤ LỤC 15**

**15.1 XÁC ĐỊNH ĐỘ SỐNG CỦA VẮC XIN BCG**

**Kiểm tra độ sống**

**Các vật liệu**

Dung dịch Sauton loãng 1/4 được sử dụng để pha loãng vắc xin BCG.

Môi trường nuôi cấy: Lowenstein - Jensen.

Vắc xin BCG mẫu thử và mẫu chuẩn.

**Hoàn nguyên và pha loãng vắc xin**

Vắc xin BCG được xác định độ sống theo phương pháp sau: Hoàn nguyên ít nhất 5 mg vắc xin BCG vào 5 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 vô khuẩn để tạo hỗn dịch cơ bản chứa 1 mg vắc xin BCG/1 ml. Sau khi hoàn nguyên, hỗn dịch này phải được giữ ở 4 °C trong thời gian tối thiểu 15 min, sau đó pha theo công thức sau:

- 1) 1 ml hỗn dịch cơ bản + 99 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/100 (I).
- 2) 1 ml hỗn dịch pha loãng I + 99 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/10 000 (II).
- 3) 4 ml hỗn dịch pha loãng II + 4 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/20 000 (III).

4) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 6 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/40 000 (IV).

5) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 14 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/80 000 (V).

6) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 30 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/160 000 (VI).

**Nuôi cấy**

Lắc đều hỗn dịch của mỗi độ pha trong 20 s, cấy vào môi trường Lowenstein - Jensen 0,1 ml/ống theo trình tự sau:

2 độ pha đầu: Mỗi độ pha loãng cấy lên 5 ống môi trường. Độ pha thứ 3 cấy lên 10 ống môi trường.

Đối với vắc xin tươi (trước khi đông khô): Cấy lên các ống môi trường Lowenstein - Jensen huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng cuối IV, V, VI.

Đối với vắc xin BCG đông khô giữ ở 4 °C: Cấy huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng III, IV, V.

Đối với vắc xin BCG đông khô ủ ở 37 °C: Cấy huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng II, III, IV.

Các ống môi trường đã được cấy huyền dịch vắc xin BCG ở các độ pha khác nhau như trên sẽ được lãg đều, để khô bề mặt và ủ ở 37 °C trong 28 ngày.

**Đếm khuẩn lạc**

Các ống môi trường được cấy huyền dịch BCG và ủ ở 37 °C sẽ được đưa ra đếm số khuẩn lạc mọc trên từng ống sau 21 ngày và 28 ngày.

Bảng 15.1

Điều kiện xác định	Công thức tính
1. $2\omega \geq \bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$	1. $\frac{d_1}{v} \times \frac{1}{2} \times (\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)$
2. $\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$	2. $\frac{d_2}{v} \times \frac{\omega \cdot \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_1 - (\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)}$
3. $\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq 2\bar{X}_3$	3. $\frac{d_3}{v} \times \frac{\omega \cdot \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_2 - 2\bar{X}_3}$
4. $2\bar{X}_3 \geq 2\omega$	4. $\frac{d_3}{v} \times \bar{X}_3$

Trong đó:

$\bar{X}_1$  là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 1;

$\bar{X}_2$  là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 2;

$\bar{X}_3$  là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 3;

d là độ pha loãng huyền dịch vắc xin BCG;

v là thể tích hỗn dịch cấy trên một ống môi trường Lowenstein - Jensen;

Hằng số  $\omega$  tương đương với số lượng tối ưu khuẩn lạc có thể đếm được trên một ống môi trường Lowenstein-Jensen.

**Tính kết quả**

Số đơn vị sống trong 1 ml vắc xin được tính theo 1 trong 4 công thức ở Bảng 15.1:

Hoặc kết quả độ sống của mỗi loạt vắc xin BCG có thể được tính theo chương trình phần mềm Whoprogram/BCG/Biofarma.

Tại nhà sản xuất, tiến hành kiểm tra độ sống ở tất cả các loạt vắc xin thành phẩm (bao gồm cả độ sống trước đông khô, sau đông khô và sau khi ủ ổn định nhiệt).

Những loạt vắc xin BCG có độ sống không đảm bảo với giới hạn cho phép ở lần kiểm tra thứ nhất phải nhắc lại thử nghiệm:

Nếu thử nghiệm độ sống lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị (valid test), phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường Lowenstein-Jensen gấp đôi so với lần 1.

Nếu thử nghiệm độ sống lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị (invalid test) thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường bằng lần 1.

Nếu lần thử nghiệm nhắc lại, độ sống vẫn không đạt thì phải hủy bỏ loạt vắc xin BCG đó.

Kiểm tra độ sống của vắc xin BCG phải tiến hành song song với vắc xin BCG mẫu chuẩn để kiểm tra chất lượng môi trường dùng cho thử nghiệm độ sống. Độ sống của vắc xin BCG mẫu chuẩn trong mỗi thử nghiệm phải ổn định và nằm trong giới hạn giá trị trung bình  $\pm 2SD$ .

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Đối với vắc xin BCG phòng bệnh lao, giới hạn độ sống cho phép là từ 1 triệu đến 6 triệu đơn vị sống trong 1 mg vắc xin ( $1 \times 10^6$  ĐVS/mg đến  $6 \times 10^6$  ĐVS/mg vắc xin BCG).

**Kiểm tra tính ổn định nhiệt**

Số đơn vị sống của vắc xin BCG sau khi ủ ở 37 °C trong 28 ngày phải đạt ít nhất là 20 % so với mẫu ủ ở 4 °C trong 28 ngày.

**Các vật liệu**

Dung dịch Sauton loãng 1/4 được sử dụng để pha loãng vắc xin BCG.

Môi trường nuôi cấy: Lowenstein-Jensen.

Vắc xin BCG mẫu thử và mẫu chuẩn.

Trước khi kiểm tra tính ổn định nhiệt, vắc xin BCG đông khô mẫu thử phải được ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong 28 ngày như dưới đây:

Dạng 1 mg/ống: Ủ 10 ống ở 4 °C trong 28 ngày và 10 ống ở 37 °C trong 28 ngày.

Dạng 0,5 mg/ống: Ủ 20 ống ở 4 °C trong 28 ngày và 20 ống ở 37 °C trong 28 ngày.

**Tiến hành**

Kiểm tra tính ổn định nhiệt của vắc xin BCG bằng cách đếm độ sống của loạt vắc xin này sau khi ủ ở 4 °C và 37 °C trong 28 ngày. Quy trình đếm độ sống được thực hiện như ở phần Kiểm tra độ sống. Tính tỷ lệ % số đơn vị sống BCG mọc ở 37 °C so với ở 4 °C, theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ \% ổn định nhiệt} = \frac{A}{B} \times 100 (\%)$$

Trong đó:

A là số ĐVS/mg vắc xin BCG ở 37 °C trong 28 ngày;

B là số ĐVS/mg vắc xin BCG ở 4 °C trong 28 ngày.

ĐVS là đơn vị sống.

Những loạt vắc xin BCG có tỷ lệ % ổn định nhiệt không đạt yêu cầu ở lần kiểm tra thứ nhất phải nhắc lại thử nghiệm theo yêu cầu như sau:

Nếu thử nghiệm có tỷ lệ % ổn định nhiệt lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị, phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường Lowenstein-Jensen gấp đôi so với lần 1.

Nếu thử nghiệm có tỷ lệ % ổn định nhiệt lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường bằng lần 1.

Nếu lần thử nghiệm nhắc lại, tỷ lệ % ổn định nhiệt vẫn không đạt thì phải hủy bỏ loạt vắc xin BCG đó.

Kiểm tra tỷ lệ % ổn định nhiệt của vắc xin BCG phải tiến hành song song với vắc xin BCG mẫu chuẩn để kiểm tra chất lượng môi trường dùng cho thử nghiệm độ sống. Độ sống của vắc xin BCG mẫu chuẩn trong mỗi thử nghiệm phải ổn định và nằm trong giới hạn giá trị trung bình  $\pm 2SD$ .

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Tỷ lệ % số đơn vị sống BCG mọc ở 37 °C so với ở 4 °C phải không được thấp hơn 20 %.

**15.2 XÁC ĐỊNH ĐỘ CHÂN KHÔNG CỦA VẮC XIN BCG**

Vắc xin BCG được đông khô và hàn kín trong điều kiện chân không (0,001 mmHg) và phải được kiểm tra độ chân không bằng thiết bị Tesla vacuum.

Kiểm tra độ chân không trong các ống vắc xin BCG đông khô không sớm hơn 2 tháng sau khi hàn ống. Khi kiểm tra chân không, được phép dùng những ống vắc xin phát ra ánh sáng màu tím nhạt đến trắng xanh và loại bỏ những ống vắc xin không phát ra ánh sáng hoặc phát ra ánh sáng màu đỏ hình tên lửa. Trước khi phân phát, vắc xin phải được kiểm tra lại về độ chân không (do đơn vị sản xuất kiểm tra). Nếu phát hiện thấy quá 5 % số ống không còn chân không thì lô vắc xin này phải lưu lại thêm 1 tháng nữa, sau đó kiểm tra chân không lại. Nếu vẫn có hơn 1 % số ống không đạt chân không thì lô vắc xin đó phải bỏ đi. Những số liệu kiểm tra này phải ghi vào hồ sơ của lô vắc xin.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Loạt vắc xin BCG đông khô được coi là đạt độ chân không khi có không ít hơn 95 % tổng số ống đạt tiêu chuẩn về độ chân không.



### 15.3 XÁC ĐỊNH ĐỘ PHÂN TÁN CỦA VẮC XIN BCG

#### Nguyên lý

Vắc xin BCG đông khô sau khi được hoàn nguyên với nước pha thuốc tiêm để kiểm tra độ phân tán của vắc xin này.

Nếu vắc xin có độ phân tán kém, tạo cụm nhiều sẽ có nguy cơ gây sưng hạch hoặc sưng hạch mù cho trẻ được tiêm vắc xin.

#### Tiến hành

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên trong nước muối sinh lý (pha từ nước để pha thuốc tiêm) để có đậm độ 1 mg/ml.

Sử dụng nước muối sinh lý dùng để hoàn nguyên vắc xin BCG làm dung dịch mẫu trắng để chuẩn máy đo.

Huyền dịch vắc xin được lắc kỹ trước khi đo mật độ quang (OD).

Do mật độ quang của hỗn dịch vắc xin ở 2 bước sóng: 434 nm và 630 nm

#### Tính kết quả

Sau khi đo được OD của huyền dịch vắc xin BCG ở 2 bước sóng nêu trên, tính kết quả theo công thức:

$$\text{Độ phân tán} = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{\lg \lambda_2 - \lg \lambda_1}$$

Trong đó:

OD<sub>1</sub> là mật độ quang của hỗn dịch vi khuẩn đo được ở bước sóng 434 nm (lọc màu xanh lam);

OD<sub>2</sub> là mật độ quang của hỗn dịch vi khuẩn đo được ở bước sóng 630 nm (lọc màu đỏ).

Ở công thức này mẫu số ( $\lg \lambda_2 - \lg \lambda_1$ ) luôn là một hằng số và bằng 0,1618.

Nếu loạt vắc xin BCG đông khô không đạt yêu cầu thì phải nhắc lại thử nghiệm theo yêu cầu như sau:

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid test) thì phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu thử nghiệm gấp đôi so với thử nghiệm lần 1.

Nếu thử nghiệm lần 1 không có giá trị (invalid test) thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu thử nghiệm bằng thử nghiệm lần 1.

Kết quả của lần thử nghiệm nhắc lại nếu không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin BCG đông khô đó coi như không đạt yêu cầu về độ phân tán và phải hủy bỏ; nếu đạt yêu cầu thì loạt vắc xin BCG đông khô đó coi như đạt yêu cầu về độ phân tán.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Độ phân tán của vắc xin BCG cho phép là  $\geq 0,9$ .

### 15.4 XÁC ĐỊNH TÍNH AN TOÀN VẮC XIN DTWP HẤP PHỤ

#### An toàn đặc hiệu

Tính an toàn đặc hiệu của vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào (DTWP) được kiểm tra trên mẫu bán thành

phẩm cuối cùng hay vắc xin thành phẩm khi cần thiết và được tiến hành như sau:

#### An toàn đặc hiệu đối với thành phần bạch hầu và uốn ván

Chọn 5 chuột lang khoẻ mạnh, cùng giới (nếu khác giới phải nhốt riêng lồng), có khối lượng 250 g đến 350 g, chưa sử dụng vào bất cứ thử nghiệm nào trước đó; tiêm dưới da cho mỗi chuột lang ít nhất 5 liều đơn vắc xin cho người (liều vắc xin như ghi trên nhãn). Theo dõi chuột hàng ngày và cân khối lượng chuột hàng tuần trong 3 tuần (đối với thành phần uốn ván) và 6 tuần (đối với thành phần bạch hầu).

Nếu có chuột chết phải mổ để kiểm tra phủ tạng về dấu hiệu nhiễm độc bạch hầu (tuyến thượng thận đỏ).

Nếu có hơn một chuột lang chết trong thử nghiệm lần 1, phải nhắc lại thử nghiệm; nếu lần thử nghiệm nhắc lại không có chuột nào có biểu hiện nhiễm độc do độc tố bạch hầu hay uốn ván và có ít nhất 2/3 số chuột thử nghiệm sống sót sau khoảng thời gian theo dõi như quy định (3 tuần đối với vắc xin uốn ván và 6 tuần đối với vắc xin bạch hầu) thì loạt vắc xin DTWP đó đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu đối với thành phần bạch hầu và uốn ván.

Nếu có hơn một chuột lang bị chết vì những nguyên nhân không đặc hiệu và thử nghiệm không có giá trị (invalid test), phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng động vật thí nghiệm và mẫu thử bằng lần 1; nếu vẫn có hơn một chuột lang chết ở lần thử nghiệm thứ 2 thì loạt vắc xin không đạt về an toàn đặc hiệu đối với thành phần bạch hầu và uốn ván, phải hủy bỏ.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị (valid test), phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu thử và số lượng chuột lang gấp đôi. Nếu thử nghiệm nhắc lại vẫn có quá 1/3 số chuột chết do bất kỳ lý do nào thì loạt vắc xin DTWP này sẽ phải hủy bỏ.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Vắc xin đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt do uốn ván hoặc triệu chứng nhiễm độc bạch hầu và ít nhất 80 % chuột sống sót, khoẻ mạnh và lên cân trong thời gian 6 tuần (đối với thành phần bạch hầu) hoặc 3 tuần (đối với thành phần uốn ván).

#### An toàn đặc hiệu đối với thành phần ho gà toàn tế bào (wP)

Dùng 20 chuột nhắt trắng có khối 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 cho nhóm chứng.

Chuột được ăn uống đầy đủ trước khi tiêm 1 h và trong suốt thời gian thí nghiệm. Tổng khối lượng của từng nhóm chuột được xác định ngay trước lúc tiêm. 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 lại vào 72 h và 7 ngày sau tiêm.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận:

Loạt vắc xin đạt yêu cầu nếu đạt cả 3 tiêu chuẩn sau:

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

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

Chuột chết không quá 5 %.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt một trong 3 tiêu chuẩn nêu trên phải nhắc lại thử nghiệm theo yêu cầu như sau:

Nếu thử nghiệm lần 1 không có giá trị (invalid test): Nhắc lại thử nghiệm với số lượng chuột và số lượng mẫu bằng lần 1.

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid test): Phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng chuột nhất bằng và số lượng mẫu gấp đôi so với lần 1.

Kết quả của lần kiểm tra nhắc lại, nếu đạt yêu cầu 3 tiêu chuẩn nêu trên và giá trị trung bình của 2 lần thử nghiệm (về % tăng khối lượng chuột của nhóm vắc xin thử nghiệm so với nhóm chứng sau 7 ngày theo dõi) đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó mới được coi là đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu ho gà. Nếu ở lần kiểm tra nhắc lại không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó không đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu thành phần ho gà và phải bị hủy bỏ.

#### **An toàn không đặc hiệu (Độc tính bất thường)**

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khoẻ mạnh không tiêm bất cứ gì trước khi thử nghiệm. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có khối lượng 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con một liều tiêm cho người; 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.

Theo dõi tình trạng sức khoẻ và cân chuột hàng ngày.

*Tiêu chuẩn chấp thuận:*

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 và không có dấu hiệu nhiễm độc.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nêu trên, phải nhắc lại thử nghiệm. Thử nghiệm nhắc lại nếu đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó được coi là đạt an toàn không đặc hiệu; nếu không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó bị coi là không đạt an toàn không đặc hiệu và phải hủy bỏ.

Đối với thử nghiệm nhắc lại:

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị: phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột gấp đôi lần 1.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị: chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột bằng lần 1.

### **15.5 XÁC ĐỊNH ĐẬM ĐỘ VI KHUẨN HO GÀ**

#### **Nguyên tắc**

Thực tế một hỗn dịch vi khuẩn ho gà có đậm độ 10 tỷ vi khuẩn/ml tương ứng với 10 IOU (đơn vị độ đục quốc tế) khi nhìn bằng mắt thường.

Có thể sử dụng bộ so độ đục chuẩn quốc tế của WHO để so bằng mắt thường hoặc chuẩn trên máy quang phổ kế khi

xác định đậm độ của hỗn dịch *B. pertussis* 18323 trong thử nghiệm công hiệu vắc xin ho gà.

#### **Cách tiến hành**

Trong quá trình sản xuất vắc xin ho gà, mỗi lần gạt sinh khối cần xác định đậm độ vi khuẩn của nước cốt ho gà. Độ đục nước cốt ho gà và nước cốt ho gà cô đặc được xác định bằng cách so sánh với ống mẫu chuẩn quốc tế hoặc quốc gia và quan sát bằng mắt thường hoặc đo trên máy quang phổ kế (không được muộn hơn hai tuần sau khi gạt và trước khi huyền dịch vi khuẩn được đưa vào bất kỳ quy trình pha chế nào tiếp theo).

Pha loãng nước cốt trong nước muối sinh lý cho đến khi soi bằng mắt thường thấy tương đương với ống chuẩn 10 IOU.

Tính độ đục của mẫu thử bằng cách nhân với số lần pha loãng.

Có thể đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn ho gà trên máy đo quang phổ ở bước sóng 560 nm. 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* 18323 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.

### **15.6 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TWEEN 20 TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**

#### **Nguyên lý**

Dựa vào phản ứng của polyethoxylat trong thành phần của Tween 20 với amoni cobaltothiocyanat tạo thành hợp chất màu xanh lơ tan trong dicloromethan.

#### **Tiến hành**

Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 100 µg/ml. Hút 1 ml mẫu thử vào ống nghiệm, thêm 5 ml ethanol 95 % (TT), ly tâm 3500 r/min trong 10 min ở 20 °C. Chuyển phần nước sang ống nghiệm khác, rửa tủa bằng 1 ml ethanol 95 % (TT), chuyển nốt nước rửa tủa vào ống nghiệm. Đun cách thủy phần nước thu được ở 80 °C cho đến khi còn lại khoảng 0,5 ml, thêm 1 ml nước cất vào ống nghiệm.

Hút dung dịch Tween 20 chuẩn 1 mg/ml vào các ống nghiệm lần lượt theo thể tích 10 µl; 25 µl; 50 µl; 75 µl; 100 µl, thêm nước cất vừa đủ 1 ml.

Mẫu trắng là 1 ml nước cất.

Thêm 2 ml dicloromethan (TT) vào mỗi ống nghiệm đựng mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử. Thêm tiếp 3 ml amoni cobaltothiocyanat, lắc kỹ, để yên ở nhiệt độ phòng trong 90 min. Hút bỏ phần nước nổi bằng máy hút chân không, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) của lớp dicloromethan màu xanh lơ phía dưới ở bước sóng 620 nm.

Dùng đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng Tween 20 trong mẫu thử.

Đơn vị tính:  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  protein.

*Cách pha các dung dịch:*

Dung dịch amoni cobaltothiocyanat: Hòa tan 6,0 g *cobalt nitrat (TT)* và 40 g *amoni thiocyanat (TT)* trong nước cất, thêm nước cất vừa đủ 200 ml, lọc qua giấy lọc.

Dung dịch Tween 20 chuẩn 10 mg/ml: Cân 1 g *Tween 20* vào bình định mức 100 ml, thêm nước cất vừa đủ, lắc đều. Pha loãng bằng nước cất 10 lần trước khi dùng.

### Tiêu chuẩn chấp thuận

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm.

Hàm lượng Tween 20 có trong bán thành phẩm viêm gan B không lớn hơn 50  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  protein.

## 15.7 KIỂM TRA VÔ TRÙNG VẮC XIN/SINH PHẨM

Việc kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Kiểm soát môi trường thử nghiệm và sử dụng mẫu đối chứng âm tính thích hợp để kiểm tra và đảm bảo điều kiện vô trùng.

### Môi trường nuôi cấy

#### Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Hai môi trường sử dụng để kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm là môi trường thioglycolat lỏng (Fluid Thioglycollate Medium: FTM) và casein đậu tương (Soybean-casein digest medium: SCDM). FTM dự định dùng để phát hiện vi khuẩn kỵ khí nhưng cũng có thể xác định được vi khuẩn hiếu khí. SCDM dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm. Khi vắc xin/sinh phẩm có chứa chất bảo quản là merthiolat, có thể dùng FTM thay thế cho SCDM trong phương pháp cấy trực tiếp khi môi trường này đạt yêu cầu trong thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh (Growth promotion test). Các môi trường tương đương khác cũng có thể được sử dụng nếu chúng đạt được yêu cầu về tính tăng sinh và được cơ quan Kiểm định Quốc gia chấp thuận. Công thức và cách pha hai môi trường trên như sau:

*Môi trường thioglycolat lỏng:*

L - Cystin	0,50 g
Natri clorid	2,50 g
Glucose monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	5,50 g
Thạch bột có độ ẩm nhỏ hơn 15 %	0,75 g
Cao nấm men (tan trong nước)	5,00 g
Casein thủy phân bằng pancreatin (men tụy)	15,00 g
Nước	1000 mL
Natri thioglycolat	0,50 g
hoặc acid thioglycolic	0,3 mL
Dung dịch natri resazurin (1 g/L) mới pha	1 mL

Trộn lẫn lượt sáu thành phần đầu như thứ tự ở trên trong nước nóng cho đến khi tan hoàn toàn. Cho thêm natri thioglycolat (hoặc acid thioglycolic), chuyển sang một bình chứa thích hợp và thêm nước vừa đủ, làm tan hoàn toàn trong một nốt cách thủy. Chính pH của dung dịch (nếu cần) bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)* sao cho

pH sau tiệt trùng (pH cuối cùng) là 7,0 đến 7,2. Nếu cần thiết phải lọc, đun nóng dung dịch (tránh đun sôi) rồi lọc qua giấy lọc ướt khi dung dịch còn đang nóng. Thêm dung dịch natri resazurin, trộn đều. Chia môi trường vào các chai/ống chứa thích hợp. Hấp tiệt trùng môi trường trong lò đã được thẩm định ở 121 °C trong 18 min đến 20 min. Vận chặt nút các chai/ống môi trường và bảo quản ở nhiệt độ 20 °C đến 30 °C.

Nếu quá 1/3 trên của chai/ống môi trường chuyển thành màu hồng thì không nên sử dụng nữa. Có thể sử dụng lại một lần nữa bằng cách đun nóng môi trường trong bể ôn nhiệt đến khi màu hồng biến mất rồi làm lạnh nhanh. Không dùng môi trường quá thời hạn sử dụng đã được thẩm định.

*Môi trường casein đậu tương lỏng:*

Casein thủy phân bởi pancreatin	17,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	3,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucose monohydrat	2,5 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Hòa tan tất cả các thành phần vào nước, đun nóng nhẹ cho tan hoàn toàn, để nguội đến nhiệt độ phòng. Chính pH của dung dịch (nếu cần) bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)* hoặc *dung dịch acid hydrochloric 1 N (TT)* sao cho pH sau tiệt trùng (pH cuối cùng) là 7,1 đến 7,5. Lọc trong nếu cần. Phân chia môi trường vào các chai/ống. Hấp tiệt trùng môi trường trong lò đã được thẩm định ở 121 °C trong 18 min đến 20 min. Bảo quản môi trường ở nhiệt độ phòng (20 °C đến 30 °C).

Không dùng môi trường quá thời hạn sử dụng đã được thẩm định.

#### Kiểm tra chất lượng môi trường

Việc kiểm tra chất lượng mỗi loại môi trường được thực hiện trước hoặc song song với kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm.

Tất cả các loại môi trường dùng trong thử nghiệm *vô trùng* vắc xin/sinh phẩm cần được kiểm tra về hai tính chất: tính vô trùng và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của vi khuẩn và nấm (*tính tăng sinh*).

*Kiểm tra tính vô trùng*

Lấy 2 % số chai/ống của mỗi loại môi trường nhưng ít nhất là 5 chai/ống. Ủ FTM ở nhiệt độ 30°C đến 35 °C ít nhất 14 ngày. Ủ SCDM (hoặc FTM khi dùng thay thế) ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C ít nhất 14 ngày.

Môi trường đạt yêu cầu về vô trùng nếu sau nuôi cấy các chai/ống môi trường trong, không có lắng cặn ở đáy; các chai/ống FTM không mất chỉ thị màu.

*Kiểm tra tính tăng sinh*

Nguyên tắc: Đánh giá khả năng phát triển của các chủng thử thách trong môi trường bằng cách cho vào mỗi chai/ống môi trường không quá 100 CFU chủng thử thách.

Bảng 1- Chủng thích hợp cho kiểm tra chất lượng môi trường

Loại vi sinh vật	Tên	Ký hiệu
Vi khuẩn hiếu khí	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
Vi khuẩn kỵ khí	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
Nấm	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ( <i>Aspergillus niger</i> )	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Có thể thay thế *Pseudomonas aeruginosa* bằng *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341. Trong trường hợp không cần vi khuẩn tạo nha bào thì có thể thay thế *Clostridium sporogenes* bằng *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482).

Các chủng này không được cấy chuyển quá 5 lần kể từ chủng gốc.

Chủng dùng kiểm tra FTM gồm *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Chủng dùng kiểm tra TSB gồm *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Các chủng thích hợp khác cũng có thể sử dụng nếu được cơ quan Kiểm định Quốc gia chấp thuận.

Môi trường đạt yêu cầu về tính tăng sinh nếu các chủng vi khuẩn trong các chai/ống môi trường mọc trong vòng 3 ngày, các chủng nấm trong các chai/ống môi trường mọc trong vòng 5 ngày.

**Mẫu kiểm tra**

Số lượng vắc xin/sinh phẩm cần cho 1 lần kiểm tra vô trùng tùy thuộc vào số lượng thành phẩm mỗi loại và dạng đóng gói của vắc xin/sinh phẩm. Cần lấy mẫu đại diện cho quá trình đóng ống lúc đầu và cuối.

Bảng 2 - Số lượng mẫu cần cho thử nghiệm vô trùng

Số lượng thành phẩm (lọ/ống)	Số lượng mẫu cần lấy (lọ/ống)	
	Lượng vắc xin/sinh phẩm trong mỗi lọ ≥ 2 ml	Lượng vắc xin/sinh phẩm trong mỗi lọ < 2 ml
<100	10% nhưng không ít hơn 4	20% nhưng không ít hơn 8
≥100 và < 500	Ít nhất 10	Ít nhất 20
≥ 500	Ít nhất 20	Ít nhất 40

Vắc xin/sinh phẩm được chia đều để cấy vào mỗi loại môi trường.

**Phương pháp thực hiện**

Tiến hành theo phương pháp màng lọc hoặc phương pháp cấy trực tiếp.

**Phương pháp màng lọc**

Sử dụng phương pháp màng lọc khi bản chất của vắc xin/sinh phẩm cho phép: các dung dịch có thể qua được màng lọc; các chế phẩm chứa cồn, dầu, các chế phẩm có thể trộn hoặc tan trong dung môi là nước hoặc dầu (các dung môi không chứa chất ức chế vi khuẩn/nấm).

Bộ lọc và màng lọc phải được tiệt trùng trước khi sử dụng. Sử dụng màng có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn hoặc bằng 0,45 µm, đường kính khoảng 47 mm. Màng cellulose nitrat dùng cho các dung dịch có dung môi là nước, dầu và các dung dịch có độ cồn thấp. Màng cellulose acetat dùng cho các dung dịch có độ cồn cao.

Thấm ướt màng lọc bằng dung dịch vô trùng thích hợp, chẳng hạn dung dịch pepton nồng độ 1 g/L, pH 7,1 ± 0,2. Cho mẫu thử trực tiếp lên màng lọc, hút mẫu qua màng lọc bằng một bơm chân không.

Nếu vắc xin/sinh phẩm có đặc tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm, rửa màng lọc ít nhất ba lần bằng dung dịch rửa. Loại dung dịch rửa và thể tích mỗi lần rửa được xác định trong thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp. Không rửa màng lọc quá 5 lần, mỗi lần 100 mL kể cả khi thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp chỉ ra rằng như thể là chưa đủ để loại bỏ ảnh hưởng của chất ức chế.

Cho môi trường vào bình chứa màng lọc của bộ lọc hoặc cắt màng lọc thành hai phần bằng nhau rồi cho mỗi phần vào một chai môi trường nuôi cấy.

Các động tác cho mẫu thử lên màng lọc, cắt màng lọc và chuyển vào môi trường nuôi cấy phải được thực hiện trong điều kiện vô trùng để tránh lây nhiễm từ bên ngoài.

**Phương pháp cấy trực tiếp**

Bảng 3 - Thể tích vắc xin/sinh phẩm cần lấy từ mỗi lọ để cấy vào mỗi loại môi trường

Thể tích có trong mỗi lọ	Thể tích tối thiểu cho mỗi loại môi trường
< 1 mL	Toàn bộ vắc xin/sinh phẩm có trong mỗi lọ
Từ 1 mL đến 20 mL	1 mL
> 20 mL và < 100 mL	5 mL
> 100 mL	10 % vắc xin/sinh phẩm có trong mỗi lọ nhưng không ít hơn 20 mL

Cây trực tiếp vác xin/sinh phẩm cần kiểm tra vào môi trường sao cho thể tích mẫu thử không quá 10 % thể tích môi trường (trừ trường hợp đặc biệt).

Nếu vác xin/sinh phẩm có tính chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm, phải loại bỏ được đặc tính ức chế này bằng cách trung hòa với một chất trung hòa thích hợp hoặc hòa loãng trong thể tích môi trường đủ lớn khi thực hiện thử nghiệm vô trùng vác xin/sinh phẩm. Nên xác định thể tích môi trường đủ lớn để loại bỏ được ảnh hưởng của chất ức chế. Mỗi lần xác định, thể tích này được sử dụng cho những lần thử nghiệm sau đó, trừ khi có thay đổi trong thành phần của vác xin/sinh phẩm.

Đối với các vác xin/sinh phẩm mà chính mẫu thử làm đục môi trường hoặc lắng cặn ở đáy ống môi trường tới mức không xác định được có hay không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm; sau 3 đến 7 ngày nuôi cấy, cây chuyển ít nhất 1 mL của mỗi ống môi trường đó sang ống môi trường mới tương ứng.

#### Ủ môi trường và theo dõi

Ủ FTM ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C ít nhất 14 ngày. Ủ SCDM (hoặc FTM khi dùng thay thế) ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C ít nhất 14 ngày. Các ống môi trường cấy chuyển ủ trong thời gian ít nhất 7 ngày. Theo dõi các ống môi trường vào những khoảng thời gian thích hợp và vào ngày cuối cùng để phát hiện sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường.

#### Đánh giá kết quả

Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vác xin/sinh phẩm, mẫu kiểm tra đạt yêu cầu về vô trùng.

Nếu có sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vác xin/sinh phẩm, mẫu kiểm tra không đạt yêu cầu về vô trùng trừ khi có thể chứng minh thử nghiệm đã thực hiện không có giá trị bằng cách thực hiện lại thử nghiệm hoặc bằng phương pháp khác.

Thử nghiệm không có giá trị khi xảy ra một trong các trường hợp sau:

Kết quả giám sát vi sinh môi trường trong khi thực hiện thử nghiệm không đạt yêu cầu;

Sau khi xem xét lại qui trình thực hiện thử nghiệm phát hiện ra sai sót;

Có vi khuẩn hoặc nấm mọc trong các chứng âm;

Chứng phân lập từ thử nghiệm được xác định chắc chắn là do nguyên vật liệu hoặc kỹ thuật trong quá trình thực hiện thử nghiệm.

#### Thử nghiệm tính phù hợp của phương pháp

Thực hiện thử nghiệm tính phù hợp của phương pháp khi:

- Kiểm tra vô trùng cho sản phẩm mới;
- Khi có thay đổi trong điều kiện thực hiện thử nghiệm vô trùng vác xin/sinh phẩm.

Thử nghiệm này nên được thực hiện để chứng tỏ thử nghiệm vô trùng có khả năng phát hiện được vi khuẩn/nấm có trong mẫu thử, nhất là khi vác xin/sinh phẩm có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm.

Thực hiện thử nghiệm giống như thực hiện thử nghiệm vô trùng vác xin/sinh phẩm, chỉ khác ở những điểm sau:

Phương pháp màng lọc: Sau khi đã cho vác xin/sinh phẩm qua màng lọc, cho thêm không quá 100 CFU chủng thử thách vào dung dịch rửa màng lọc lần cuối cùng.

Phương pháp cấy trực tiếp: Sau khi đã cấy vác xin/sinh phẩm vào môi trường, cho thêm không quá 100 CFU chủng thử thách vào mỗi ống môi trường.

Sử dụng cùng chủng thử thách với thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh. Thực hiện thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh làm chứng dương.

Ủ tất cả các ống môi trường đã cấy vác xin/sinh phẩm không quá 5 ngày.

Nếu sau 5 ngày nuôi cấy, có dấu hiệu mọc của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường chứa vác xin/sinh phẩm và không yếu hơn mức độ mọc trong các ống chứng dương thì vác xin/sinh phẩm không chứa chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm hoặc ảnh hưởng của chất ức chế đã được loại bỏ. Thử nghiệm vô trùng vác xin/sinh phẩm có thể được thực hiện mà không cần phải thay đổi.

Nếu sau 5 ngày nuôi cấy, không có dấu hiệu mọc của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vác xin/sinh phẩm hoặc yếu hơn mức độ mọc trong các ống chứng dương thì vác xin/sinh phẩm có chứa chất ức chế làm ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn/nấm. Thay đổi điều kiện thực hiện thử nghiệm vô trùng vác xin/sinh phẩm và nhắc lại thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp.

## 15.8 MÔI TRƯỜNG DÙNG ĐỂ PHÁT HIỆN VI KHUẨN HIẾU KHÍ, KỊ KHÍ VÀ NẤM

### Quy định chung

Môi trường nuôi cấy dùng để kiểm tra vô trùng phải do cơ quan Kiểm định Quốc gia quy định. Môi trường này phải bảo đảm sự phát triển tốt cho phần lớn các loại vi sinh vật hiếu khí, kỵ khí thường có trong không khí của cơ sở sản xuất.

Để kiểm tra tính vô trùng của các sinh phẩm phải dùng môi trường thioglycolat lỏng. Thành phần của môi trường được mô tả trong phần tiếp theo. Mỗi loại môi trường thioglycolat mới được điều chế phải được kiểm tra về tính vô trùng, khả năng làm cho vi sinh vật phát triển (đinh dưỡng) và tính trung hòa.

Để kiểm tra tính vô trùng của các chế phẩm không có chất bảo quản thimerosal, môi trường phải được dùng trong vòng 3 tuần kể từ ngày pha chế. Môi trường sau khi sản xuất phải bảo quản ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng.

Để kiểm tra sinh phẩm có chứa thimerosal có thể dùng môi trường thioglycolat pha mới, môi trường phải được dùng trong vòng 7 ngày đến 10 ngày, kể từ ngày sản xuất.

Thời hạn sử dụng cụ thể của môi trường thioglycolat được xác định bằng cách kiểm tra tính chất trung hòa của môi trường sau khi pha chế.

**Thành phần và cách pha chế môi trường Thioglycolat lỏng:** Xem mục Môi trường nuôi cấy của Phụ lục 15.7

### 15.9 KIỂM TRA ĐỘC TÍNH ĐẶC HIỆU (AN TOÀN ĐẶC HIỆU) TRONG VẮC XIN BCG ĐÔNG KHÔ

Thử nghiệm “Kiểm tra độc tính đặc hiệu (an toàn đặc hiệu) trong vắc xin BCG đông khô” dùng để phát hiện độc tính đặc hiệu của vắc xin BCG đông khô do Mycobacteria gây ra. Thử nghiệm này được áp dụng đối với mẫu bán thành phẩm hoặc mẫu thành phẩm vắc xin BCG.

Dùng ít nhất 6 chuột lang cùng giới (nếu là chuột cái phải không được có thai) có phản ứng âm tính với tuberculin, cân nặng mỗi chuột khoảng 250 g đến 400 g.

Tiêm dưới da cho mỗi chuột một liều vắc xin trong đờng với ít nhất 50 liều tiêm trong da cho người. Sau khi tiêm vắc xin, phải theo dõi chuột lang ít nhất là 6 tuần. Cuối thời kỳ theo dõi, tất cả chuột lang đều phải được mổ, kiểm tra đại thể các phủ tạng xem có các dấu hiệu của bệnh lao tiến triển không. Mặt khác, trong thời kỳ theo dõi nếu có chuột nào chết cũng phải mổ kiểm tra như trên. Nếu sau 6 tuần theo dõi các chuột đều khỏe mạnh, tăng cân; không có biểu hiện bệnh lao tiến triển và ít nhất có 2/3 số chuột sống sót cho đến hết thời gian theo dõi thì loại vắc xin BCG đó đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu.

Trong vòng 42 ngày theo dõi, nếu có hơn 1/3 số chuột lang thử nghiệm chết nhưng xác định không phải chết do lao thì thử nghiệm được lặp lại. Nếu:

Lần thử nghiệm thứ nhất không đạt yêu cầu và không có giá trị (invalid test): Thử nghiệm nhắc lại chỉ cần tiến hành với ít nhất 6 chuột lang khác.

Lần thử nghiệm thứ nhất không đạt yêu cầu và có giá trị (valid test): Thử nghiệm phải được nhắc lại với số lượng mẫu và số lượng chuột gấp đôi.

Nếu trong lần thử nghiệm thứ 2 vẫn có hơn 1/3 số chuột lang chết (kể cả được xác định chuột chết không phải do lao) thì loại vắc xin BCG đó coi như không an toàn và phải xem xét lại nguồn cung cấp chuột, hoặc/ và kiểm tra quy trình sản xuất với sự xác nhận của cơ quan Kiểm định Quốc gia.

Nếu trong lần thử nghiệm nhắc lại các chuột đều khỏe mạnh, tăng cân, không có biểu hiện bệnh lao tiến triển và ít nhất có 2/3 số chuột sống sót cho đến hết thời gian theo dõi thì loại vắc xin BCG đó đạt yêu cầu về tính an toàn đặc hiệu.

Nếu phát hiện thấy chuột có biểu hiện của bệnh lao tiến triển thì loại vắc xin đó phải hủy bỏ và phải đình chỉ sản xuất các loại vắc xin tiếp theo. Toàn bộ vắc xin trong kho phải giữ lại để tiến hành thanh tra và tìm ra nguyên nhân. Việc sản xuất chỉ được tiếp tục khi có sự chấp thuận của cơ quan Kiểm định Quốc gia.

### 15.10 THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG HUYẾT THANH MIỄN DỊCH

Mục đích của thử nghiệm nhận dạng huyết thanh miễn dịch là nhằm khẳng định huyết thanh thử nghiệm chỉ chứa protein từ loài động vật đăng ký trong sản xuất.

Có thể tiến hành theo 1 trong 2 kỹ thuật sau:

#### Kỹ thuật khuếch tán miễn dịch (Ouchterlony)

*Nguyên lý*

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

*Vật liệu và thiết bị*

Phiến kính.

Agarose 1 % trong đệm phosphat pH 7,4.

Hộp âm.

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm.

Huyết thanh kháng loài.

Dung dịch nhuộm: Coomassie blue 0,025 %.

Dung dịch tẩy màu: Methanol - acetic acid - nước cất (4 : 1 : 5).

*Tiến hành*

Đổ gel agarose 1 % lên phiến kính.

Dùng dụng cụ đục giếng loại có đường kính 3 mm tạo 7 giếng trên phiến kính (1 giếng ở giữa, 6 giếng cách đều xung quanh). Nhỏ huyết thanh kháng loài vào các giếng xung quanh và huyết thanh thử nghiệm vào giếng ở giữa.

Đặt phiến kính vào hộp âm từ 12 h đến 48 h.

Nhuộm gel với dung dịch nhuộm coomassie blue 0,025 %.

Tẩy màu bằng dung dịch tẩy màu, sau đó rửa bằng nước cất.

Để khô phiến kính ở nhiệt độ phòng.

#### Kỹ thuật điện di miễn dịch

*Nguyên lý*

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 từ giếng ở phía cực dương sẽ di chuyển ngược chiều nhau, khi gặp nhau sẽ hình thành đường tua có thể nhìn thấy được.

*Vật liệu và thiết bị*

Phiến kính.

Thạch 3 % trong nước cất.

Agarose 1,5 % trong đệm barbital pH 8,4.

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm.

Huyết thanh kháng loài.

Máy điện di, nguồn điện.

Dung dịch nhuộm, rửa, tẩy màu...

*Tiến hành*

Đổ thạch nền 3 % lên phiến kính.

Đổ agarose 1,5 % lên trên thạch nền.

Sau khi agarose đông, đục 2 giếng có đường kính 3 mm, khoảng cách giữa 2 giếng là 4 mm đến 5 mm. Nhỏ huyết thanh thử nghiệm và huyết thanh kháng loài vào mỗi giếng.

Đặt phiến kính vào máy điện di.

Tiến hành điện di ở 10 V/cm từ 10 min đến 60 min tùy thử nghiệm.

Ngừng điện di, quan sát kết quả.

Để dễ quan sát đường tua, cần loại protein không tua bằng cách ngâm phiến kính trong đệm PBS. Phủ giấy lọc Whatman lên phiến kính và sấy ở 37 °C đến khô.

Nhuộm xanh với Coomassie blue trong 20 min.

Tẩy màu, rửa với nước cất, để khô.

**Nhận định kết quả**

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm được nhận dạng đúng khi xuất hiện đường tủa giữa mẫu thử nghiệm và huyết thanh kháng loài tương ứng.

**15.11 XÁC ĐỊNH AN TOÀN CHUNG CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**

Xác định độc tính bất thường trong vắc xin - sinh phẩm được tiến hành trên chuột nhắt và chuột lang. Triệu chứng nhiễm độc trên chuột có thể biểu hiện như sau:

Thay đổi diện mạo bên ngoài, xù lông.

Trạng thái bất thường, giảm hoạt động.

Chuột giảm cân.

Chuột chết do nhiễm độc.

**Trên chuột lang**

Mỗi thử nghiệm dùng 2 chuột lang, cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g, chưa dùng cho thí nghiệm nào trước đó, khoẻ mạnh, tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly 3 ngày đến 7 ngày.

Tiêm ổ bụng cho mỗi chuột 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 5 ml; trừ một số vắc xin, sinh phẩm đặc biệt sẽ theo chuyên luận riêng. Liều cho người được trình bày trên nhãn sản phẩm.

Cân từng con trước khi tiêm và cân ít nhất 1 lần vào cuối giai đoạn theo dõi. Chuột phải được quan sát kỹ 2 h đầu sau tiêm và hàng ngày trong suốt 7 ngày để phát hiện dấu hiệu lâm sàng ốm do nhiễm độc.

Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu toàn bộ chuột thí nghiệm khoẻ mạnh, tăng trọng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc.

Nếu có nhiều hơn 1 chuột chết thì thử nghiệm không đạt yêu cầu (nếu thử nghiệm đó đã được xác định là có giá trị). Nếu có 1 chuột chết hoặc chỉ ra dấu hiệu ốm do nhiễm độc trong lần thử đầu tiên (thử nghiệm có giá trị), cần làm lại thử nghiệm với số lượng chuột gấp đôi và lượng mẫu thử gấp đôi. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu trong lần thử nghiệm thứ 2 không có chuột nào chết hoặc chỉ ra dấu hiệu ốm do nhiễm độc.

Nếu thử nghiệm lần đầu không có giá trị thì thử nghiệm lặp lại với số lượng mẫu và số lượng động vật thí nghiệm bằng lần đầu.

**Trên chuột nhắt**

Mỗi thử nghiệm dùng 5 chuột nhắt Swiss, cân nặng mỗi chuột từ 17 g đến 22 g, chưa dùng thí nghiệm nào trước đó, khoẻ mạnh, tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly 3 ngày.

Tiêm ổ bụng 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml, trừ một số vắc xin sinh phẩm đặc biệt sẽ theo chuyên luận riêng. Liều cho người được trình bày trên nhãn sản phẩm.

Cân từng con trước khi tiêm và cân ít nhất 1 lần vào cuối giai đoạn theo dõi. Chuột phải được quan sát kỹ 2 h đầu sau tiêm và hàng ngày trong suốt 7 ngày để phát hiện dấu hiệu lâm sàng ốm do nhiễm độc.

Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu toàn bộ chuột thí nghiệm khoẻ mạnh, tăng trọng bình thường và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc.

Nếu có nhiều hơn 1 chuột chết thì thử nghiệm không đạt yêu cầu (nếu thử nghiệm là có giá trị).

Nếu có 1 chuột chết hoặc chỉ ra dấu hiệu ốm do nhiễm độc trong lần thử đầu tiên (thử nghiệm có giá trị) cần làm lại thử nghiệm với số lượng chuột gấp đôi và lượng mẫu thử gấp đôi. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu trong lần thử nghiệm thứ 2 không có chuột nào chết hoặc chỉ ra dấu hiệu ốm do nhiễm độc.

Nếu thử nghiệm lần đầu không có giá trị thì thử nghiệm lặp lại với số lượng mẫu và số lượng động vật thí nghiệm bằng lần đầu.

**15.12 XÁC ĐỊNH CHẤT GÂY SỐT TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**

Thử nghiệm chất gây sốt là phương pháp sinh học dùng để đánh giá tính chất gây sốt của vắc xin, sinh phẩm dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm vào tĩnh mạch dung dịch mẫu thử.

**Lựa chọn động vật thí nghiệm**

Thỏ khoẻ mạnh, trưởng thành, dực hoặc cái (nhưng không được mang thai), cân nặng không ít hơn 1,5 kg, được nuôi dưỡng bằng thức ăn không chứa chất kháng sinh và không bị tụt cân trong suốt 1 tuần trước thử nghiệm.

Trong thời gian 3 ngày trước khi thí nghiệm, không sử dụng thỏ này cho những thí nghiệm tương tự khác. Cũng có thể sử dụng những thỏ trước đó 3 tuần đã làm thử nghiệm chất gây sốt nhưng kết quả lần thử trước là âm tính.

**Phòng thí nghiệm**

Thử nghiệm được tiến hành trong phòng yên tĩnh, tránh mọi tiếng động và ánh sáng làm ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm và nhiệt độ phòng không chênh lệch 3 °C so với nơi ở cũ.

Thỏ được nuôi riêng trong phòng yên tĩnh có nhiệt độ 20 °C đến 25 °C, cho ăn thức ăn tổng hợp không có chất kháng sinh. Trước ngày tiêm, để thỏ nhịn ăn qua đêm (nhưng được uống nước) cho đến khi thí nghiệm kết thúc. Không cho uống nước trong thời gian đang làm thí nghiệm.

**Thiết bị, dụng cụ**

Nhiệt kế: Để đo nhiệt độ của thỏ có thể dùng nhiệt kế hoặc thiết bị điện có độ chính xác 0,1 °C. Khi đo nhiệt độ, nhiệt kế phải đặt sâu trong trực tràng thỏ ít nhất 5 cm, phải để tối thiểu 5 min. Nếu dùng thiết bị điện, phải đặt yên trong trực tràng ít nhất 90 min trước khi tiêm và giữ nguyên vị trí đó suốt thời gian thí nghiệm.

Dụng cụ thủy tinh, bơm tiêm, kim tiêm: Tất cả phải được rửa sạch bằng nước pha tiem (WFI) và sấy khô 250 °C trong 30 min hoặc 200 °C trong 60 min, nếu dùng đồ nhựa phải không chứa chất gây sốt và phải vô trùng.

**Lồng thử chuyên dụng:**

Trước khi bắt đầu, đặt thử trong lồng chuyên dụng trong tư thế thoải mái không ít hơn 1 h và duy trì ở đó trong suốt thời gian làm thí nghiệm.

**Thử nghiệm thăm dò (preliminary test)**

1 ngày đến 3 ngày trước khi tiến hành tiêm vắc xin, sinh phẩm cần kiểm tra sơ bộ về tính nhạy cảm cho các thử nghiệm bằng cách tiêm vào tĩnh mạch 10 ml dung dịch nước muối sinh lý 0,9 % không chứa chất gây sốt đã được làm ấm lên khoảng 38,5 °C cho mỗi kilogram cân nặng thử (10 ml/kg). Ghi nhiệt độ trước tiêm và tiếp tục trong vòng 3 h sau khi tiêm dung dịch nước muối sinh lý. Nếu thử nào có nhiệt độ dao động so với nhiệt độ ban đầu > 0,6 °C sẽ bị loại, không dùng đưa vào thử nghiệm chính.

**Thử nghiệm chính (main test):** Đối với mẫu vắc xin, sinh phẩm.

Thử nghiệm là thử đạt các tiêu chuẩn trên, được để trong lồng chuyên dụng ít nhất 60 min để ổn định. Sau đó tiến hành đo nhiệt độ thử 2 lần mỗi lần cách nhau 30 min (nếu đo tay) hoặc theo chương trình cài đặt (nếu đo bằng thiết bị). Nhiệt độ ban đầu của thử là giá trị trung bình của các lần đo này. Tiêu chuẩn đưa vào thí nghiệm là những thử có nhiệt độ chênh lệch giữa các lần đo không quá 0,2 °C và nhiệt độ ban đầu nằm trong khoảng 38 °C đến 39,8 °C. Mỗi mẫu thử được tiêm cho một nhóm thử 3 con, nhiệt độ chênh lệch trong nhóm không quá 1 °C.

Dung dịch dùng để tiêm thử là vắc xin, sinh phẩm nếu ở dạng lỏng hoặc được hoàn nguyên bằng dung dịch nước hồi chính đi kèm nếu ở dạng đông khô. Trừ một số vắc xin, sinh phẩm đặc biệt sẽ theo chuyên luận riêng (có thể được pha loãng bằng dung dịch nước muối sinh lý không chứa chất gây sốt).

Tiêm chậm dung dịch vào tĩnh mạch vành tai của mỗi thử trong khoảng thời gian không kéo dài quá 4 min. Thể tích được tiêm cho mỗi thử tương ứng với 1 ml/kg cân nặng. Nên làm ấm dung dịch đến 38,5 °C trước khi tiêm. Đo nhiệt độ thử ở những khoảng thời gian tùy thuộc vào thiết bị sử dụng (nếu đo tay cứ 1 h đo 1 lần; trường hợp dùng thiết bị, nhiệt độ được đo tự động theo chương trình cài đặt) trong khoảng thời gian 3 h sau khi tiêm. Nhiệt độ tối đa là nhiệt độ cao nhất đo được trong khoảng thời gian này.

**Đánh giá kết quả**

Đáp ứng của mỗi thử là hiệu số của nhiệt độ tối đa sau khi tiêm mẫu thử và nhiệt độ ban đầu.

Đáp ứng của thử bằng 0 nếu nhiệt độ tối đa sau khi tiêm bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ ban đầu.

Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt nếu nhiệt độ chênh lệch của mỗi thử  $\leq 0,6$  °C và tổng nhiệt độ chênh lệch của 3 thử  $\leq 1,3$  °C. Nếu > 2,4 °C coi như không đạt yêu cầu.

Nếu tổng nhiệt độ chênh lệch của 3 thử nằm trong khoảng > 1,3 °C đến 2,4 °C thì thử nghiệm cần phải tiến hành thêm trên 3 thử khác. Mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất

gây sốt khi tổng nhiệt độ chênh lệch (cộng dồn) của ca 6 thử  $\leq 3$  °C. Nếu > 4,1 °C coi như không đạt yêu cầu.

Nếu tổng nhiệt độ chênh lệch (cộng dồn) của 6 thử nằm trong khoảng > 3 °C đến 4,1 °C thì cần phải làm thêm lần cuối trên 3 thử khác. Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt khi tổng nhiệt độ chênh lệch của 9 thử (cộng dồn) phải  $\leq 4,9$  °C. Nếu > 4,9 °C coi như không đạt yêu cầu và phải hủy vắc xin hay sinh phẩm thử nghiệm.

**15.14 PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ LƯU MẪU**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp lấy mẫu cho các loại vắc xin sinh phẩm sau đây:

Các loại vắc xin làm tù vi khuẩn hoặc virus, dùng để phòng bệnh cho người.

Các dung dịch dùng để hồi chính các sinh phẩm dạng đông khô.

Các sinh phẩm điều trị: SAT, SAD, ...

**PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU****Nguyên tắc**

Phải lấy mẫu ở công đoạn sản xuất, với số lượng đủ tính đại diện.

Các mẫu phải lấy trong điều kiện vô khuẩn bằng những dụng cụ đã vô khuẩn.

**Cách lấy mẫu**

Mẫu được lấy trong các giai đoạn sau:

**Lấy mẫu bán thành phẩm cuối cùng**

Trước khi lấy mẫu phải lắc kỹ chai hoặc bình chứa bán thành phẩm cuối cùng. Lấy ít nhất 10 ml cấy vào trong 2 loại môi trường thử.

**Lấy mẫu trong quá trình đóng ống**

Để kiểm tra tính vô khuẩn trong quá trình đóng ống phải lấy mẫu ít nhất tại thời điểm đầu, giữa và cuối quá trình đóng ống. Tổng số mẫu lấy tùy thuộc số lượng thành phẩm (xem Bảng 15.14).

Đối với quá trình đóng ống mà sau đó sinh phẩm phải đông khô thì sau giai đoạn đông khô cũng phải lấy mẫu để kiểm tra vô khuẩn.

**Lấy mẫu thành phẩm**

Mẫu thành phẩm cần kiểm tra phải đảm bảo đại diện cho cả loạt thành phẩm. Mẫu lấy kiểm tra phải bao gồm cả mẫu của giai đoạn đầu, giai đoạn giữa và cuối của quá trình đóng ống. Nếu loạt bán thành phẩm cùng trong bình chứa (tank), nhưng được đóng làm nhiều lần, thì mẫu lấy của mỗi lần (gọi là một loạt đóng ống) phải đại diện cho toàn bộ quá trình đóng ống của lần đó và được kiểm tra riêng về mặt vô trùng. Số lượng mẫu cần lấy để kiểm tra do cơ quan Kiểm định Quốc gia quy định.

**Số lượng mẫu lấy**

Mỗi giai đoạn phải lấy số mẫu phù hợp để kiểm định.



Bảng 15.14 - Số lượng mẫu được lấy cho thử nghiệm vô khuẩn vắc xin, sinh phẩm

Số lượng thành phẩm /loạt	Thể tích được đóng trong 1 ống hoặc lọ vắc xin, sinh phẩm																	
	0,5 ml				1 ml đến 1,5 ml				≥ 2 ml									
	Tổng số		SX		KĐDP		Tổng số		SX		KĐDP		Tổng số		SX		KĐDP	
M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	M	Ô	
Từ 501 đến 1000	16	16	2	8	2	8	6	12	3	6	3	6	12	12	6	6	6	6
Từ 1001 đến 2000	24	24	3	12	3	12	8	16	4	8	4	8	18	18	9	9	9	9
Từ 2001 đến 3000	24	24	3	12	3	12	10	20	4	10	5	10	22	22	11	11	11	11
Từ 3001 đến 4000	24	24	3	12	3	12	12	24	6	12	6	12	26	26	13	13	13	13
Từ 4001 đến 5000	32	32	4	16	4	16	14	28	7	14	7	14	28	28	14	14	14	14
Từ 5001 đến 6000	32	32	4	16	4	16	16	32	8	16	8	16	32	32	16	16	16	16
Từ 6001 đến 7000	32	32	4	16	4	16	16	32	8	16	8	16	34	34	17	17	17	17
Từ 7001 đến 8000	40	40	5	20	5	20	18	36	9	18	9	18	36	36	18	18	18	18
Từ 8001 đến 9000	40	40	5	20	5	20	20	40	10	20	10	20	38	38	19	19	19	19
Từ 9001 đến 10000	40	40	5	20	5	20	20	40	10	20	10	20	40	40	20	20	20	20
> 10.000	40	40	5	20	5	20	20	40	10	20	10	20	40	40	20	20	20	20

Ghi chú:

M: Số mẫu được lấy để kiểm định.

Ô: Số lượng lọ vắc xin, sinh phẩm lấy để kiểm tra vô khuẩn.

SX: Kiểm định sản xuất (cấp I).

KĐDP: Kiểm định địa phương (cấp II).

Công thức lấy mẫu để kiểm tra theo quy định của Tổ chức Y tế Thế giới là  $0,4\sqrt{N}$ ; trong đó N là số lượng ống, lọ của loạt thành phẩm đó.

Đối với loạt thành phẩm có ít hơn 100 ống thì phải lấy 10% số ống để kiểm tra.

Cần lưu ý: Riêng với thử nghiệm vô trùng, số lượng mẫu lấy ở mỗi giai đoạn phải đủ cho ít nhất 3 lần thử nghiệm phòng trường hợp phải nhắc lại thử nghiệm.

#### Lưu mẫu

Mỗi loạt sinh phẩm thành phẩm đều phải giữ mẫu lưu. Mẫu lưu này được giữ cho đến khi vắc xin và sinh phẩm hết hạn sử dụng. Phải ghi nhãn cẩn thận số loạt và tên sinh phẩm. Các cơ sở sản xuất cần phải lưu một lượng mẫu đủ để có thể tiến hành kiểm tra vô khuẩn lại khi cần thiết.

#### Số lần kiểm định

Thông thường, số lượng mẫu lấy phải bảo đảm cho các thử nghiệm kiểm định của 3 cấp như sau: Kiểm định sản xuất (kiểm định cấp I); Kiểm định địa phương (kiểm định cấp II) và Kiểm định Quốc gia (kiểm định cấp III).

Số lượng mẫu lấy để kiểm tra vô khuẩn của sản phẩm tối thiểu phải đủ cho kiểm định sản xuất, kiểm định địa phương và lưu mẫu. Nếu Kiểm định Quốc gia cần kiểm tra lại thử nghiệm vô khuẩn thì số lượng mẫu thử bằng số lượng mẫu mà kiểm định địa phương đã làm.

Trường hợp cần hủy một loạt sinh phẩm do không đạt tiêu chuẩn lý học (đục, tù) thì toàn bộ số ống đó phải chuyển qua kiểm định địa phương để tìm nguyên nhân.

Số lượng thành phẩm cần lấy để kiểm tra vô khuẩn sẽ tùy thuộc vào tổng số ống của mỗi loạt và thể tích sinh phẩm có trong 1 ống hoặc lọ (Bảng 15.14).

#### Xử lý mẫu

Mẫu kiểm định phải bảo quản theo những quy định phù hợp cho từng loại sinh phẩm và phải được tiến hành kiểm định ngay. Nếu chưa kiểm định được, nhất thiết phải bảo quản ở nhiệt độ quy định.

Các mẫu kiểm định phải có thông tin như sau:

- Tên sản phẩm;
- Ngày sản xuất;
- Số loạt;
- Số lượng sản phẩm;
- Yêu cầu kiểm định;
- Số lượng mẫu gửi kiểm định;
- Ngày lấy mẫu;
- Đơn vị gửi mẫu;
- Hạn dùng;
- Dạng đóng gói;
- Nhà sản xuất;
- Điều kiện bảo quản;
- Số đăng kí.

#### PHƯƠNG PHÁP LƯU MẪU

Tại cơ quan kiểm định quốc gia chỉ lưu mẫu sinh phẩm ở dạng thành phẩm cuối cùng, mẫu lưu phải được bảo quản ít nhất đến khi hết hạn sử dụng.

Mẫu lưu do phòng kiểm định cấp 2 giữ tại các cơ sở sản xuất. Các mẫu kiểm định cấp 2 được lấy cùng thời điểm với mẫu gửi cho cơ quan Kiểm định Quốc gia. Mẫu gửi Kiểm định Quốc gia cần bảo quản đúng nhiệt độ quy định trong suốt quá trình vận chuyển (trong trường hợp đơn vị sản xuất ở cách xa cơ quan kiểm định).

Các mẫu lưu của từng sinh phẩm phải được đóng gói cẩn thận, gắn xi (hoặc có băng bảo đảm) ngoài bao bì phải ghi rõ các thông tin sau:

- Tên sinh phẩm;
- Số loạt;
- Số lượng lưu mẫu;
- Ngày lưu mẫu;
- Nhiệt độ bảo quản trong thời gian lưu mẫu.

Thời gian lưu mẫu tùy thuộc vào từng loại sinh phẩm và hạn dùng của sinh phẩm đó.

### 15.15 XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘC TỔ BẠCH HẦU

Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được xác định bằng cách so sánh khả năng trung hòa một lượng cố định độc tố bạch hầu của kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm và kháng độc tố bạch hầu chuẩn thông qua thử nghiệm trung hòa độc tố trên chuột lang hoặc trong da thỏ.

#### Thử nghiệm trung hòa độc tố bạch hầu trên chuột lang

##### Xác định liều độc tố bạch hầu thử nghiệm ( $L^+$ )

$L^+$  là lượng độc tố bạch hầu nhỏ nhất còn lại sau khi trung hòa với 1 đơn vị quốc tế (IU) của kháng độc tố bạch hầu chuẩn đủ để gây chết 1 chuột lang có khối lượng đã xác định trong thời gian từ 4 ngày đến 6 ngày.

Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu chuẩn với nước muối sinh lý (0,85 %) để có dung dịch kháng độc tố chứa 3,0 IU/ml. Pha độc tố bạch hầu với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố chứa 3 Lf/ml đến 4 Lf/ml.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn chứa 3,0 IU/ml, một thể tích thay đổi dung dịch độc tố bạch hầu (ví dụ 0,6 ml; 0,7 ml; 0,8 ml; 0,9 ml; 1,0 ml;... tùy theo độc tính của độc tố bạch hầu) và nước muối sinh lý để vừa đủ 6,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 60 min, tránh ánh sáng. Tiêm 2,0 ml vào dưới da đùi cho mỗi chuột lang cân nặng từ 250 g đến 300 g, dùng 2 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong thời gian từ 4 ngày đến 6 ngày.

*Cách xác định:* Hỗn dịch nào có lượng độc tố bạch hầu nhỏ nhất sau khi tiêm gây chết 100 % chuột trong vòng 4 ngày đến 6 ngày sẽ có chứa lượng độc tố 3  $L^+$ /6ml hay 1  $L^+$ /2ml (một liều tiêm/1 chuột lang).

##### Xác định hiệu giá huyết thanh kháng độc tố bạch hầu

Là xác định số đơn vị quốc tế kháng độc tố bạch hầu có trong 1,0 ml của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm.

Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 3,0 đơn vị quốc tế /ml. Pha độc tố bạch hầu với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố chứa 3  $L^+$  trong một thể tích đã xác định. Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm với nước muối sinh lý để có các độ pha 1/300; 1/400; 1/500;

1/600; 1/700; vv... tùy theo hiệu giá có thể có được của kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm.

*Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:* Một lượng dung dịch độc tố bạch hầu chứa 3  $L^+$ ; 3,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm ở mỗi độ pha loãng và nước muối sinh lý để vừa đủ 6,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

*Pha mẫu chứng:* Cho vào 3 ống nghiệm lần lượt: Một lượng dung dịch độc tố bạch hầu có chứa 3  $L^+$ , một trong 3 lượng 0,9 ml; 1,0 ml; 1,1 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn chứa 3,0 IU/ml và sau đó một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 6,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 60 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 2,0 ml vào dưới da đùi cho mỗi chuột nhắt, dùng 2 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong thời gian từ 4 ngày đến 6 ngày.

##### Cách tính hiệu giá

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu chứng có chứa 0,9 ml và 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn gây chết 100 % chuột trong vòng 4 ngày đến 6 ngày và mẫu chứng có chứa 1,1 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn không được gây chết chuột trong thời gian theo dõi.

Dung dịch nào có chứa lượng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm lớn nhất không bảo vệ được chuột trong thời gian 4 ngày đến 6 ngày giống như mẫu chứng có chứa 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn sẽ có chứa 1,0 IU/ml.

Hiệu giá của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được tính như sau:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 1,0 \times N$$

Trong đó:

N là số lần pha loãng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm; 1,0 là số IU có trong dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn dùng để trung hòa 1  $L^+$  trong thử nghiệm.

#### Thử nghiệm trung hòa độc tố bạch hầu trong da thỏ

##### Xác định liều độc tố bạch hầu thử nghiệm ( $L^+/30$ )

$L^+/30$  là lượng độc tố bạch hầu nhỏ nhất còn lại sau khi trung hòa với 1/30 đơn vị quốc tế (IU) của kháng độc tố bạch hầu chuẩn đủ để gây phản ứng Shick trên da thỏ trong 48 h.

Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch kháng độc tố chứa 1,0 IU/ml. Pha độc tố bạch hầu với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố chứa khoảng 1,0 Lf/ml.

*Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:* 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn chứa 1,0 IU/ml, một thể tích thay đổi dung dịch độc tố bạch hầu (ví dụ 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; ... tùy theo độc tính của độc tố bạch hầu) và nước muối sinh lý để vừa đủ 3,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 60 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 0,1 ml trong da thỏ, loại có cân nặng từ 2,5 kg/con đến 3,0 kg/con.

Theo dõi thỏ thử nghiệm và đo đường kính quanh đờ trong vòng 48 h.

*Cách xác định:* Độ pha nào của độc tố bạch hầu tạo phản ứng Shick với đường kính từ 12 mm đến 15 mm sẽ có chứa 30 L<sup>+</sup>/30 trong 3,0 ml hay L<sup>+</sup>/30 trong 0,1 ml.

**Xác định hiệu giá huyết thanh kháng độc tố bạch hầu**

Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 1,0 đơn vị quốc tế /ml.

Pha độc tố bạch hầu với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố chứa 30 L<sup>+</sup>/30 trong một thể tích đã xác định.

Pha huyết thanh kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm với nước muối sinh lý để có các độ pha 1/300; 1/400; 1/500; 1/600; 1/700;... tùy theo hiệu giá có thể có được của kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm.

*Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:* Một lượng dung dịch độc tố bạch hầu chứa 30 L<sup>+</sup>/30 đã xác định; 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm ở mỗi độ pha loãng và nước muối sinh lý để vừa đủ 3,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

*Pha mẫu chứng:* Cho vào 3 ống nghiệm lần lượt: Một lượng dung dịch độc tố bạch hầu chứa 30 L<sup>+</sup>/30, một trong 3 lượng 0,9 ml; 1,0 ml; 1,1 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn chứa 1,0 IU/ml và sau đó một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 3,0 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 60 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,1 ml trong da thỏ, loại có cân nặng từ 2,50 kg/con đến 3,0 kg/con, dùng 3 thỏ cho mỗi thử nghiệm.

Theo dõi thỏ thử nghiệm và đo đường kính quanh đờ trong vòng 48 h.

**Cách tính hiệu giá**

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu chứng chứa 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn tạo phản ứng Shick với đường kính từ 12 mm đến 15 mm. Hỗn dịch nào chứa lượng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm lớn nhất tạo phản ứng Shick với đường kính 12 mm đến 15 mm tương đương với mẫu chứng chứa 1,0 ml kháng độc tố bạch hầu chuẩn sẽ có chứa 1 IU/ml.

Hiệu giá của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm được tính như sau:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 1,0 \times N$$

Trong đó:

N là số lần pha loãng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm; 1,0 là số IU có trong dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn dùng để trung hòa 30 L<sup>+</sup>/30 trong thử nghiệm

**15.16 XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘC TỐ UỐN VÁN**

Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván được xác định bằng cách so sánh mức độ bảo vệ giữa liều kháng độc tố uốn ván thử nghiệm và kháng độc tố uốn ván chuẩn đối với

chuột nhắt trắng có cân nặng từ 16 g đến 18 g sau khi đã trung hòa một lượng cố định độc tố uốn ván.

**Xác định liều độc tố uốn ván thử nghiệm (L<sup>+</sup>/10)**

L<sup>+</sup>/10 là lượng độc tố uốn ván nhỏ nhất còn lại sau khi trung hòa với 0,1 đơn vị quốc tế (IU) của kháng độc tố uốn ván chuẩn đủ để gây chết 1 chuột có trọng lượng đã xác định trong thời gian 96 h.

Pha kháng độc tố uốn ván chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch kháng độc tố uốn ván chứa 0,5 IU/ml.

Pha độc tố uốn ván với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố uốn ván 3 L<sup>+</sup>/ml đến 5 L<sup>+</sup>/ml.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn chứa 0,5 IU/ml, một thể tích thay đổi dung dịch độc tố uốn ván (ví dụ 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml... tùy theo độc tính của độc tố uốn ván) và nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 45 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 0,5 ml dưới da lưng cho mỗi chuột nhắt, dùng 4 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong 96 h.

*Cách xác định:* Hỗn dịch nào có lượng độc tố thấp nhất sau khi tiêm gây chết chuột trong vòng 96 h sẽ có chứa lượng độc tố 5 L<sup>+</sup>/10 trong 2,5 ml hay 1 L<sup>+</sup>/10 trong 0,5 ml (một liều tiêm/1 chuột).

**Xác định hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván**

Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván là số đơn vị quốc tế (IU) kháng độc tố uốn ván có trong 1,0 ml huyết thanh thử nghiệm.

Pha huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 0,5 IU/ml.

Pha độc tố uốn ván với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố uốn ván chứa 5 L<sup>+</sup>/10 trong 1 thể tích xác định.

Pha huyết thanh kháng độc tố uốn ván thử nghiệm với nước muối sinh lý để có các độ pha 1/2600; 1/2800; 1/3000; 1/3200; 1/3400;... tùy theo hiệu giá có thể có được của kháng độc tố uốn ván thử nghiệm.

*Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:* 1 thể tích dung dịch độc tố uốn ván chứa 5 L<sup>+</sup>/10; 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván thử nghiệm ở mỗi độ pha loãng và nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

*Pha mẫu chứng:* Cho vào 3 ống nghiệm lần lượt: Một thể tích dung dịch độc tố uốn ván chứa 5 L<sup>+</sup>/10, một trong 3 lượng 0,9 ml; 1,0 ml; 1,1 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn chứa 0,5 IU/ml và sau đó một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 45 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 0,5 ml dưới da lưng cho mỗi chuột nhắt, dùng 4 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong 96 h.

**Cách tính hiệu giá**

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu chứng có chứa 0,9 ml và 1,0 ml dung dịch kháng độc tổ uốn ván chuẩn gây chết 100 % chuột trong vòng 96 h và mẫu có chứa 1,1 ml dung dịch kháng độc tổ uốn ván chuẩn không được gây chết chuột trong thời gian theo dõi.

Dung dịch nào có chứa lượng kháng độc tổ uốn ván thử nghiệm lớn nhất không bảo vệ được chuột trong thời gian 96 h giống như mẫu chứng có chứa 1,0 ml dung dịch kháng độc tổ uốn ván chuẩn sẽ có chứa 0,5 IU/ml.

Hiệu giá của huyết thanh kháng độc tổ uốn ván được tính như sau:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 0,5 \times N$$

Trong đó:

N là số lần pha loãng kháng độc tổ uốn ván thử nghiệm; 0,5 là số IU có trong 1 ml dung dịch kháng độc tổ uốn ván chuẩn dùng trong thử nghiệm.

**15.17 XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG DẠI**

Hiệu giá huyết thanh kháng dại được xác định dựa trên nguyên lý của phản ứng trung hòa in vivo của một liều cố định virus dại thử thách với các độ pha loãng khác nhau của huyết thanh kháng dại.

**Xác định hiệu giá của virus thử thách**

Chủng virus dại thử thách được dùng trong thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng dại là chủng CVS (Challenge virus strain), được giữ ở dạng hỗn dịch 20 % não chuột, bảo quản ở nhiệt độ -70 °C.

Làm tan băng nhanh ống đựng chủng virus dại thử thách dưới vòi nước chảy.

Pha loãng bậc 10 với dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 % (đã được bất hoạt 30 min ở 56 °C) để có nồng độ từ  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  ... đến  $2 \times 10^{-9}$ .

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml hỗn dịch virus của mỗi độ pha loãng, từ  $2 \times 10^{-4}$  đến  $2 \times 10^{-9}$  và 0,5 ml dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 %. Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 90 min.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột cho mỗi độ pha, cân nặng mỗi chuột từ 14 g đến 16 g. Các ống chủng được giữ trong nước đá trong suốt quá trình tiêm.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

Tính LD<sub>50</sub> theo Spearman - Karber.

**Xác định hiệu giá huyết thanh kháng dại**

*Pha loãng huyết thanh kháng dại chuẩn quốc tế, huyết thanh kháng dại thử nghiệm và trung hòa với virus thử thách:*

Pha huyết thanh kháng dại chuẩn quốc tế với nước muối sinh lý để có dung dịch huyết thanh kháng dại chuẩn chứa 10 đơn vị quốc tế (IU)/ml.

Pha huyết thanh kháng dại thử nghiệm với nước muối sinh lý để có dung dịch huyết thanh kháng dại thử nghiệm chứa khoảng 10 IU/ml.

Pha loãng bậc 5 hai dung dịch trên với dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 % để có các độ pha 1/5; 1/25; 1/125; 1/625 và 1/3125.

Pha hỗn dịch virus thử thách đã biết hiệu giá để có 200 LD<sub>50</sub>/0,03 ml.

Trong một dãy các ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml huyết thanh kháng dại ở mỗi độ pha loãng và 0,5 ml hỗn dịch virus thử thách có chứa 200 LD<sub>50</sub>/0,03 ml.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 90 min.

Giữ các ống trong nước đá trong suốt quá trình tiêm.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột có cân nặng từ 14 g đến 16 g cho mỗi độ pha của kháng huyết thanh.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

*Xác định số LD<sub>50</sub> của chủng virus dại trong thử nghiệm (nhóm chứng):*

Từ hỗn dịch virus pha để trung hòa có chứa 200 LD<sub>50</sub>/0,03 ml đã nêu ở trên, được xem là 10<sup>0</sup> để từ đó pha loãng bậc 10 thành 3 độ pha 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup> và 10<sup>-3</sup>.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml hỗn dịch virus từ mỗi độ pha và 0,5 ml dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 %.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 90 min.

Giữ các ống trong nước đá.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột có cân nặng từ 14 g đến 16 g cho mỗi độ pha của hỗn dịch virus dại.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

Tính LD<sub>50</sub> theo bảng Spearman - Karber.

**Tính kết quả**

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi số LD<sub>50</sub> để trung hòa huyết thanh kháng dại là 100 LD<sub>50</sub> đến 300 LD<sub>50</sub> trong 0,03 ml.

Tính ED<sub>50</sub> của huyết thanh kháng dại theo phương pháp Spearman - Karber.

Hiệu giá của huyết thanh kháng dại được tính ra đơn vị quốc tế trong 1 ml và bằng:

Antilog(ED<sub>50</sub> huyết thanh chuẩn quốc tế: ED<sub>50</sub> huyết thanh thử nghiệm) × 2 × N

Trong đó:

2 là số IU có trong 1 ml huyết thanh kháng dại chuẩn quốc tế dùng trong thử nghiệm;

N là số lần pha loãng huyết thanh kháng dại thử nghiệm.

**15.18 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITO TOÀN PHẦN CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM BẰNG THUỐC THỬ NESSLER****Nguyên lý**

Phương pháp dựa vào tính chất của thuốc thử Nessler cho phản ứng màu với ion amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) được tạo thành sau khi vô cơ hóa các chất protein.

**Phương pháp tiến hành****a. Chuẩn bị mẫu thử**

Cho 0,2 ml chế phẩm và 0,2 ml *acid sulfuric* (TT) vào một ống thủy tinh và đem đốt trên bếp cát. Để tăng tốc độ phản ứng, thỉnh thoảng cho vài giọt *nước oxy già đậm đặc* (TT) vào ống đốt sau khi làm nguội. Khi chế phẩm đã được vô cơ hóa hoàn toàn, dung dịch mất màu, cho *nước cất* vừa đủ b ml thu được dung dịch A.

Lấy 1 ml dung dịch A vào ống nghiệm, thêm 8,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Nessler, được mẫu thử.

**b. Chuẩn bị mẫu trắng:** 9,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

**c. Dụng đường chuẩn**

Hút dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng nitơ 0,05 mg/ml vào các ống nghiệm theo thứ tự sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml và 0,7 ml. Cho nước cất vừa đủ 9,5 ml và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

Lắc đều các ống nghiệm.

Đo quang phổ ở bước sóng 420 nm.

Vẽ đường cong chuẩn.

Lượng nitơ toàn phần trong chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{a \times b \times 6,25 \times 100}{1,0 \times 0,2 \times 1000}$$

Trong đó:

a là lượng Nitơ tìm được trên đường chuẩn (mg);

b là thể tích dung dịch A (ml);

6,25 là hệ số chuyển đổi nitơ thành protein;

100 là chuyển đổi thành phần trăm;

1,0 là lượng mẫu thử sau pha loãng đem so màu (ml);

0,2 là lượng mẫu thử đem vô cơ hóa (ml);

1000 là hệ số chuyển đổi g thành mg.

*Dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng nitơ 0,05 mg/ml:*

Cân 0,2375 g amoni sulfat (đã được sấy khô trong bình hút ẩm bằng silica gel đến khối lượng không đổi), hòa tan vào vừa đủ 500 ml nước cất. Dung dịch vừa pha có hàm lượng nitơ là 0,1 mg/ml, trước khi dùng pha loãng 2 lần bằng nước cất.

**Tiêu chuẩn cho phép**

Hàm lượng nitơ toàn phần trong vắc xin và sinh phẩm tùy theo yêu cầu đối với từng loại vắc xin và sinh phẩm cụ thể.

**15.19 THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG THÀNH PHẦN BẠCH HẦU - UỐN VÁN - HO GÀ TRONG VẮC XIN DTWP HẤP PHỤ**

Các thành phần bạch hầu, uốn ván, ho gà toàn tế bào trong vắc xin DTWP hấp phụ được tiến hành kiểm tra nhận dạng theo các bước như sau:

**Giải hấp phụ**

Vắc xin Bạch hầu - Uốn ván - Ho gà (toàn tế bào) hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm *natri citrat* với nồng

độ 5 % ở 37 °C trong 48 h. Sau đó ly tâm 2000 r/min trong 15 min. Hoặc ly tâm vắc xin ở 3000 r/min. Cho dung dịch EDTA-natri phosphat vào phần kết tủa sau ly tâm với nồng độ 20 %. Đánh đều tạo dung dịch đồng nhất. Ủ ở 37 °C trong 18 h. Ly tâm 3000 r/min trong 10 min. Nước nổi được dùng làm dung dịch kiểm tra. 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.

**Nhận dạng thành phần bạch hầu và uốn ván****Phương pháp lên bông**

**Phương pháp tiến hành** (phản ứng lên bông).

Dùng 5 ống nghiệm thủy tinh có đường kính 10 mm, đánh số thứ tự từ 1 đến 5 để làm thử nghiệm kiểm tra sự có mặt của thành phần bạch hầu.

Dùng 5 ống nghiệm thủy tinh khác có đường kính 10 mm, đánh số thứ tự từ 6 đến 10 để làm thử nghiệm kiểm tra sự có mặt của thành phần uốn ván.

Huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu hoặc uốn ván được pha loãng đến nồng độ 20 IU/ml.

Cho vào dây ống nghiệm từ 1 đến 5 lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu tăng dần đều trong khoảng tương ứng với lượng kháng nguyên giải độc tố bạch hầu có trong nước nổi vắc xin. Tương tự, cho vào dây ống nghiệm từ 6 đến 10 lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố uốn ván tăng dần đều trong khoảng tương ứng với lượng kháng nguyên giải độc tố uốn ván có trong nước nổi vắc xin.

Thêm *nước muối sinh lý* vào các ống cho đủ 1 ml.

Cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml nước nổi.

Đậy các ống nghiệm bằng giấy parafin. Lắc đều và đặt vào nồi cách thủy ở nhiệt độ 45 °C. Quan sát liên tục dưới ánh đèn, ghi nhận thời gian của ống nghiệm đầu tiên xuất hiện sự lên bông và khoảng thời gian lên bông (Kf).

**Đánh giá kết quả**

Hàm lượng Lf/ml của thành phần bạch hầu hoặc uốn ván tính theo công thức:

$$Lf/ml = \frac{Vc \times a}{b}$$

Trong đó:

Vc là thể tích huyết thanh chuẩn kháng độc tố ở ống đầu tiên có sự lên bông (ml).

a là số đơn vị huyết thanh chuẩn kháng độc tố (IU/ml).

b là số ml nước nổi.

Hiện tượng lên bông xảy ra chỉ chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa giải độc tố bạch hầu hoặc uốn ván chứ không phản ánh công hiệu của giải độc tố.

**Ví dụ**

Lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu (20 IU/ml) và lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố uốn ván (20 IU/ml) được cho vào các ống như sơ đồ sau:

Ống số	Thể tích huyết thanh (ml)	Ống số	Thể tích (ml)
1	0,3	6	0,16
2	0,4	7	0,18
3	0,5	8	0,20
4	0,6	9	0,22
5	0,7	10	0,24

Ống số 3 lên bông đầu tiên tức hàm lượng Lf/ml của thành phần bạch hầu có trong 1 ml vắc xin thử là:  
 $(0,5 \text{ ml huyết thanh} \times 20 \text{ IU/ml}) / 1 \text{ ml} = 10 \text{ Lf/ml}$   
 Tương tự, nếu thấy ống số 8 lên bông đầu tiên có nghĩa là hàm lượng Lf/ml của thành phần uốn ván có trong 1 ml vắc xin thử là 4 Lf/ml.

Hiện tượng lên bông xảy ra ở ví dụ này chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa giải độc tố bạch hầu hoặc uốn ván chứ không phản ánh công hiệu của giải độc tố.

**Phương pháp khuếch tán miễn dịch kép trên thạch - Ouchterlony**

*Chuẩn bị các dung dịch:*

*Dung dịch 1: Dung dịch đệm Helena buffer*

Cân 18 g đệm Helena Buffer, hoà tan trong nước cất 3 lần, pha loãng vừa đủ 1500 ml với cùng dung môi.

*Dung dịch 2: Dung dịch EDTA 0,15 M, được pha như sau:*  
 Cân 2,8 g EDTA, hoà tan trong 40 ml nước cất, sau đó điều chỉnh pH về  $8,0 \pm 0,3$  bằng dung dịch natri hydroxyd (TT), thêm vừa đủ 50 ml dung dịch bằng nước cất. Sử dụng trong vòng 1 tháng kể từ ngày pha.

*Dung dịch 3: Dung dịch dinatri hydrophosphat 0,25 M, được pha như sau:* Cân 4,45 g dinatri hydro phosphat (TT), hoà tan hoàn toàn trong 80 ml nước cất, thêm nước cất vừa đủ 100 ml. Sử dụng trong vòng 1 tháng kể từ ngày pha.

*Dung dịch 4:* Hỗn hợp bao gồm 0,1 ml dung dịch EDTA và 4,9 ml dung dịch dinatri phosphat.

*Dung dịch 5:* Pha loãng dung dịch kháng huyết thanh uốn ván (NIBSC, 66/21, 1400 IU/ống) trong 14 ml nước cất pha tiêm để tạo thành 100 IU/ml, lấy ra mỗi tuýp ly tâm 500 µl, sau đó bảo quản ở nhiệt độ dưới -20 °C.

*Dung dịch 6:* Pha loãng giải độc tố uốn ván chuẩn (NIBSC, TEFT, 1000 Lf/ống) trong 10 ml nước cất pha tiêm để tạo thành 100 IU/ml, lấy ra mỗi tuýp ly tâm 500 µl, sau đó bảo quản ở nhiệt độ dưới -20 °C.

*Giải hấp phụ*

Ly tâm 5 ml vắc xin cần kiểm tra ở 3000 r/min trong 10 min. Lấy 1 ml Dung dịch 4 cho vào phần kết tủa sau khi ly tâm, trộn đều (bằng voltex) để tạo được dung dịch đồng nhất. Để dung dịch thu được trong tủ ấm ở  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  ít nhất 18 h. Tiếp tục ly tâm dung dịch ở 3000 r/min trong 10 min. Chuyển phần dịch nổi sang 1 ống sạch làm dung dịch kiểm tra.

*Tiến hành*

Làm tan hoàn toàn (đến khi dung dịch trong suốt) dung dịch agarose 1% trong Dung dịch 1 bằng lò vi sóng hoặc đun cách thủy, để nguội đến  $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Dùng pipet 25 ml chuyển 18 ml dung dịch agarose sang bản phim gelbond đã được cố định bằng khuôn thạch. Để mẫu cố định trong 15 min (có thể đặt vào tủ lạnh nếu cần). Đục bản gel thành các giếng có đường kính 4 mm, như chỉ dẫn ở hình sau:

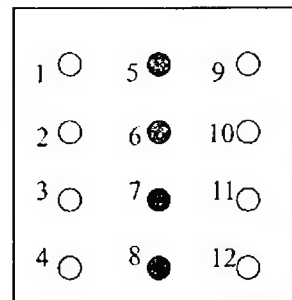
Nhỏ 10 µl antitoxin/antiserum Dung dịch 5 vào giếng 5; 6; 7; 8.

Nhỏ 20 µl Dung dịch kiểm tra (nẫu thử) vào giếng 1; 2; 3 và 10 µl vào giếng 9; 10; 11.

Nhỏ 10 µl Dung dịch 6 (chứng dương) vào giếng 4, 10µl chứng âm (dd 7) vào giếng 12.

Đặt bản gel vào buồng ẩm bão hòa hơi nước trong 48 h.

Làm khô hoàn toàn bản gel (cho đến khi bản gel trong suốt) bằng giấy thấm nước.



Nhuộm màu: Ngâm bản gel trong dung dịch Coomassie stain solution (1X) 10 min, trong quá trình ngâm lắc nhẹ bản gel bằng máy lắc ngang.

Tẩy màu: Chuyển bản gel vào bình chứa dung dịch Destain solution Coomassie R-250 (1X). Lắc nhẹ bản gel trong 5 min.

Rửa lại bản gel bằng nước cất.

Để khô, đọc kết quả.

*Đọc kết quả*

Quan sát đường tua màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin tại vị trí Dung dịch kiểm tra (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7).

*Tiêu chuẩn đánh giá*

Thử nghiệm có giá trị khi tuân thủ đúng quy trình (các yếu tố, điều kiện của quá trình thực hiện là đảm bảo không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm).

Tại chứng dương, xuất hiện đường tua của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván chuẩn.

Tại chứng âm, không xuất hiện đường tua.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi thỏa mãn cả 3 tiêu chuẩn trên. Nếu không thỏa mãn 1 trong 3 tiêu chuẩn, thử nghiệm được coi là không có giá trị.

*Đánh giá*

Vắc xin được coi là đạt tiêu chuẩn khi tại vị trí kiểm tra dung dịch (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7) xuất hiện đường tua màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin.

Nếu kết quả không đạt mà thử nghiệm không có giá trị, lặp lại thử nghiệm như lần đầu.

Nếu kết quả không đạt mà thử nghiệm có giá trị thì lặp lại thử nghiệm với số lượng mẫu gấp đôi lần đầu.

Ở lần lặp lại, vắc xin được coi là đạt tiêu chuẩn khi tại vị trí kiểm tra dung dịch (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7) xuất hiện đường tủa màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin. Vắc xin được coi là không đạt yêu cầu khi không có đường kết tủa ở các vị trí trên.

#### **Nhận dạng thành phần ho gà trong vắc xin DTWP**

Cặn của vắc xin DTP hấp phụ sau khi ly tâm được ngưng kết trên phiến kính với kháng huyết thanh ho gà đặc hiệu týp 1, 2, 3.

Hiện tượng ngưng kết xảy ra chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa vi khuẩn ho gà.

#### **Tiêu chuẩn chấp thuận**

Có hiện tượng lên bông khi làm phản ứng với huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu, uốn ván và có phản ứng ngưng kết với huyết thanh chuẩn ho gà đặc hiệu týp 1, 2, 3. Hàm lượng Lf/ml của giải độc tố bạch hầu  $\leq 30$  Lf/ml. Hàm lượng Lf/ml của giải độc tố uốn ván  $\leq 10$  Lf/ml.

### **15.20 XÁC ĐỊNH ĐỘ TỒN THẦN KINH TỒN DƯ TRONG VẮC XIN BẠI LIỆT UỐNG**

Khi dùng để thử nghiệm có cân nặng không dưới 1,5 kg. Dùng khỉ loài *Macaca* hoặc *Cercopithecus*. Hỗn dịch bán thành phẩm đã lọc phải thử song song với chế phẩm chuẩn bằng cách tiêm vào sừng trước tủy sống khỉ tại đoạn thắt lưng. Trước khi tiêm phải lấy máu khỉ và kiểm tra để chứng tỏ huyết thanh của chúng không chứa kháng thể trung hòa đối với từng týp virus bại liệt. Những tiêu bản tổ chức học khi đã đọc xong cần phải được lưu lại trong thời gian 10 năm để làm bằng chứng.

#### **Số lượng khỉ**

Vắc xin thử và mẫu chuẩn đồng týp cần thử nghiệm song song với số lượng khỉ bằng nhau. Phân chia ngẫu nhiên nhóm khỉ sẽ được tiêm vắc xin thử hoặc mẫu chuẩn. Phải đạt được ít nhất 11 khỉ dương tính cho vắc xin thử và ít nhất 11 khỉ dương tính cho mẫu chuẩn đối với týp 1 và týp 2 (khỉ dương tính là khỉ có những tổn thương thần kinh đặc hiệu do virus bại liệt ở hệ thần kinh trung ương nhưng không bị liệt). Đối với týp 3 phải có ít nhất 18 khỉ dương tính cho vắc xin thử và 18 khỉ dương tính cho mẫu chuẩn. Có thể tiêm một lúc nhiều loạt vắc xin bán thành phẩm mà chỉ cần 1 mẫu chuẩn đồng týp.

Để có thể có được 11 và 18 khỉ dương tính thường là tiêm 12 và 20 khỉ tương ứng.

Gây mê khỉ bằng ketamin hydroclorid hoặc những thuốc gây mê phù hợp khác.

#### **Hàm lượng virus của vắc xin thử và mẫu chuẩn trong liều tiêm**

Hàm lượng virus của vắc xin thử và mẫu chuẩn đồng týp tiêm cho khỉ phải càng giống nhau càng tốt và nằm trong khoảng  $10^{5,5}$  đến  $10^{6,5}$  CCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Chỉ tiêm một đậm độ.

#### **Theo dõi khỉ sau tiêm**

Theo dõi khỉ sau tiêm từ 17 ngày đến 22 ngày để phát hiện triệu chứng nghi do virus bại liệt hoặc các virus khác. Những khỉ sống qua 24 h và chết trước 11 ngày sau tiêm cần phải giải phẫu để xác định xem có phải chết do virus bại liệt hay không.

Tất cả những khỉ chết do những nguyên nhân không phải virus bại liệt thì không tính vào kết quả nhưng vẫn phải ghi vào phiếu theo dõi.

Những khỉ liệt nặng hoặc hấp hối và tất cả những khỉ sống qua giai đoạn theo dõi đều phải giải phẫu đại thể và vi thể.

#### **Số lượng các tiêu bản phải đánh giá**

\* Phải làm tiêu bản từng con khỉ để kiểm tra tổ chức học ít nhất các vùng sau:

Tủy sống: Vùng phình lưng, vùng phình cổ.

Phần trên và phần dưới của hành tủy.

Não giữa (mesocephalon).

Cầu não, tiểu não.

Đồi thị.

Vùng vận động của vỏ não.

Tiêu bản cắt mỏng 8  $\mu$ m đến 15  $\mu$ m và nhuộm galloccyanin hoặc nhuộm Nissl.

\* Số tiêu bản tối thiểu phải kiểm tra như sau:

12 tiêu bản đại diện cho vùng phình lưng.

10 tiêu bản đại diện cho vùng phình cổ.

2 tiêu bản vùng hành tủy.

1 tiêu bản vùng cầu não và tiểu não.

1 tiêu bản não giữa.

Đồi thị phải và trái, mỗi bên 1 tiêu bản.

Vỏ não bán cầu phải và trái mỗi bên 1 tiêu bản.

#### **Cho điểm hoạt tính virus trên tiêu bản**

Dùng phương pháp cho điểm theo mức độ tổn thương để đánh giá hoạt tính của virus trong từng nửa tiêu bản. Kiểu tổn thương như là thâm nhiễm tế bào hoặc phá hủy tế bào thần kinh đều quan trọng, các tổn thương được cho điểm như sau:

Điểm 1 - Chỉ có thâm nhiễm tế bào (điểm này không đủ để tính là khỉ dương tính).

Điểm 2 - Thâm nhiễm tế bào và có hủy hoại neuron tối thiểu.

Điểm 3 - Thâm nhiễm tế bào với hủy hoại nhiều neuron.

Điểm 4 - Hủy hoại nhiều neuron có hoặc không có thâm nhiễm tế bào.

Ghi điểm và báo cáo theo biểu mẫu chuẩn.

Khỉ có tổn thương neuron nhưng không có vết tiêm vẫn được coi là khỉ (+).

Khỉ có vết tiêm trên tiêu bản nhưng không có tổn thương neuron là khỉ (-).

Tiêu bản có tổn thương do tiêm nhưng không có tổn thương virus đặc hiệu thì không tính điểm.

Đọc và cho điểm từng nửa tiêu bản (NTB) của vùng thất lung (L); cổ (C); não (B).

Điểm tổn thương của từng con khi dương tính được tính như sau:

$$LS = \frac{\frac{\text{Tổng số điểm L}}{\text{Tổng số NTB}} + \frac{\text{Tổng số điểm C}}{\text{Tổng số NTB}} + \frac{\text{Tổng số điểm B}}{\text{Tổng số NTB}}}{3}$$

**Đánh giá thử nghiệm độc tính thần kinh**

Dựa trên hoạt tính ở vùng phình lưng và mức độ lan truyền lên vùng phình cổ và não, so sánh hoạt tính giữa vắc xin thử và mẫu chuẩn.

Việc xuất xương hoặc hủy bỏ vắc xin dựa trên điểm tổng thể của toàn bộ súc vật thử nghiệm. Những khi có hoạt tính cao khác thường hoặc ở vùng thất lung hoặc ở mức độ lan truyền đều phải tính đến trong đánh giá cuối cùng.

Bán thành phẩm đã lọc đạt tiêu chuẩn nếu số khi dương tính đạt yêu cầu và không có khác biệt có ý nghĩa thống kê về lâm sàng cũng như tổ chức học giữa vắc xin thử và mẫu chuẩn.

**15.21 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU CỦA VẮC XIN BẠI LIỆT UỐNG**

Xác định công hiệu (hiệu giá) của vắc xin bại liệt uống gồm 2 nội dung:

Xác định hiệu giá virus trong vắc xin bán thành phẩm (đơn týp).

Xác định hiệu giá virus trong vắc xin thành phẩm (tam liên).

**Xác định hiệu giá virus trong vắc xin bán thành phẩm (đơn týp)**

*Nguyên tắc*

Công hiệu của vắc xin phòng bại liệt uống được xác định bởi liều gây hủy hoại 50 % tế bào cảm thụ Hep-2 Cincinnati (CCID<sub>50</sub>) trong phương pháp vi lượng.

*Tiến hành*

Pha loãng bậc 10 mẫu chuẩn và vắc xin cần thử từ 10<sup>-1</sup> đến 10<sup>-8</sup> bằng môi trường duy trì tế bào.

Cho 0,1 ml các đậm độ virus vào mỗi giếng của phiến nhựa, mỗi đậm độ dùng từ 8 giếng đến 10 giếng.

Cho 0,1 ml hỗn dịch tế bào chứa 1.10<sup>4</sup> tế bào Hep-2 vào mỗi giếng.

Đậy nắp phiến nhựa và cho các phiến nhựa vào tủ 5% CO<sub>2</sub>, nhiệt độ nuôi cấy là 36 °C trong 7 ngày.

*Theo dõi*

Theo dõi sự hủy hoại của tế bào từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7.

*Tính kết quả*

Đọc kết quả cuối cùng vào ngày thứ 7 và xử lý số liệu theo phương pháp thống kê Reed-Muench hoặc Karber.

Thí nghiệm có giá trị nếu hiệu giá của vắc xin mẫu chuẩn sai số ± 0,5 so với hiệu giá đã biết (tính theo log<sub>10</sub> hiệu giá).

**Xác định hiệu giá của vắc xin bại liệt uống trong thành phẩm tam liên**

*Nguyên tắc*

Vắc xin bại liệt uống tam liên bao gồm 3 týp virus bại liệt sống giảm độc, do đó cần xác định hiệu giá của từng týp thành phần (týp 1, týp 2, týp 3) và hiệu giá tổng cả 3 týp (týp 1 + týp 2 + týp 3). Muốn chuẩn độ hiệu giá của từng týp phải dùng kháng huyết thanh (KHT) đặc hiệu để trung hoà 2 týp còn lại. Hiệu giá của vắc xin Sabin được tính bằng lượng virus Sabin gây hủy hoại 50 % tế bào cảm thụ trong 1 liều dùng cho người (số CCID<sub>50</sub>/0,1 ml) (CCID<sub>50</sub> Cell Culture Infective Dose).

*Các bước tiến hành*

Pha loãng bậc 0,5 log<sub>10</sub> vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử bằng môi trường duy trì.

Pha hỗn dịch kháng huyết thanh số 1 chứa kháng huyết thanh týp 2 và týp 3.

Pha hỗn dịch kháng huyết thanh số 2 chứa kháng huyết thanh týp 1 và týp 3.

Pha hỗn dịch kháng huyết thanh số 3 chứa kháng huyết thanh týp 1 và týp 2.

Cho 0,05 ml/giếng hỗn dịch kháng huyết thanh số 1 vào phiến số 1 (xác định hiệu giá týp 1).

Cho 0,05 ml/giếng hỗn dịch kháng huyết thanh số 2 vào phiến số 2 (xác định hiệu giá týp 2).

Cho 0,05 ml/giếng hỗn dịch kháng huyết thanh số 3 vào phiến số 3 (xác định hiệu giá týp 3).

Cho 0,05 ml/giếng môi trường duy trì vào tất cả các giếng của phiến số 4 (xác định hiệu giá tổng).

Cho 0,05 ml của từng độ pha loãng vắc xin vào các dây tương ứng của cả 4 phiến, mỗi độ pha loãng gây nhiễm 8 giếng. Bắt đầu gây nhiễm từ độ pha loãng cao nhất.

Thêm 0,05 ml môi trường duy trì vào các giếng chứng huyết thanh (SC - serum control) và chứng tế bào (CC- cell control).

Đậy nắp phiến cho vào tủ ẩm 5% CO<sub>2</sub>. Trong trường hợp để tủ ẩm thường thì gói kín trong giấy bạc hoặc trong túi nilon.

Ủ ở nhiệt độ 36 °C trong vòng 3 h để virus và kháng huyết thanh đặc hiệu kết hợp với nhau.

Chuẩn bị hỗn dịch tế bào Hep-2 nồng độ 1 - 2 × 10<sup>5</sup>/ml rồi cho 0,1 ml hỗn dịch này vào toàn bộ các giếng của cả 4 phiến. Nồng độ này thường đảm bảo tế bào sẽ mọc thành 1 lớp trên phiến trong vòng 2 ngày đến 3 ngày.

Đậy nắp phiến rồi cho vào tủ ẩm 5% CO<sub>2</sub>. Trong trường hợp để ở tủ ẩm thường thì dán kín bằng màng dán phiến (microtest film).

Ủ ở 36 °C trong 7 ngày.

*Theo dõi và tính kết quả*

Theo dõi sự hủy hoại của tế bào và tính kết quả như đã trình bày ở phần trên. Tế bào ở các giếng chứng huyết thanh và chứng tế bào phải phát triển tốt.



Vắc xin thành phẩm coi như đạt yêu cầu nếu:

Týp 1 có ít nhất  $10^{6,0}$  CCID<sub>50</sub>/0,1ml

Týp 2 có ít nhất  $10^{5,0}$  CCID<sub>50</sub>/0,1ml

Týp 3 có ít nhất  $10^{5,5}$  CCID<sub>50</sub>/0,1ml

Toàn bộ qui trình xác định công hiệu của vắc xin bại liệt uống phải được tiến hành trong điều kiện vô khuẩn

## 15.22 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN UỐN VÁN TRONG VẮC XIN HẤP PHỤ CHỨA GIẢI ĐỘC TỐ UỐN VÁN

Công hiệu của thành phần uốn ván trong vắc xin DTWP được xác định bằng phương pháp so sánh liều hữu hiệu 50 % (ED<sub>50</sub>) của vắc xin chuẩn và vắc xin thử. Kết quả được tính bằng phần mềm Probit analysis (phần mềm WHO program).

### Miễn dịch

#### Pha vắc xin

Sử dụng ít nhất 3 đến 4 độ pha loãng bậc 2 nhưng không quá 5 độ pha cho cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử trong dung dịch đệm sinh lý (dung dịch natri clorid 0,85 %).

Các độ pha vắc xin được chọn trên nguyên tắc ED<sub>50</sub> không nằm lệch ngoài khoảng giữa độ pha loãng cao nhất (liều miễn dịch thấp nhất) và độ pha loãng thấp nhất (liều miễn dịch cao nhất), có nghĩa là chọn sao cho ở độ pha loãng có thể bảo vệ được 50 % động vật thí nghiệm rơi vào giữa đường cong.

Tại mỗi phòng thí nghiệm có thể căn cứ vào các số liệu trước đó và chủng loại chuột sử dụng trong thử nghiệm để chọn độ pha phù hợp. Nếu không có các số liệu trước đó có thể tham khảo cách pha dưới đây.

Đối với vắc xin mẫu chuẩn, có thể chọn 3 độ pha bậc 2, trong đó độ pha loãng thấp nhất (độ pha đầu tiên) chứa 20 IU/ml. Các độ pha tiếp theo là 10 IU/ml và 5 IU/ml.

Đối với vắc xin thử, tùy theo hàm lượng kháng nguyên giải độc tố uốn ván chứa trong vắc xin và bản chất của loại vắc xin (hấp phụ, có hay không có thành phần ho gà) có thể chọn 1 trong 2 dải pha loãng bậc 2 với độ pha loãng đầu tiên 1/10 đến 1/15 (vắc xin TT, TD, Td) hay 1/25 đến 1/40 (vắc xin DTP, DTP-Hib – Heb...). Các độ pha tiếp theo theo bậc 2 tính từ độ pha đầu tiên.

#### Tiêm miễn dịch

Mỗi độ pha của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được tiêm dưới da ít nhất cho 16 chuột nhất trắng khỏe mạnh, 4 đến 5 tuần tuổi, có cân nặng mỗi chuột từ 14 g đến 20 g nhưng không được chênh lệch quá 4 g, liều tiêm mỗi con 0,5 ml. Dùng chuột cùng giới tính; nếu không cùng giới tính phải chia đều số chuột đực, cái vào các nhóm và nhốt riêng.

Sau tiêm miễn dịch, chăm sóc và theo dõi chuột trong 28 ngày và tiến hành tiêm thử thách.

### Tiêm thử thách

#### Xác định liều độc tố thử thách

Chỉ sử dụng độc tố có ít nhất 10000 LD<sub>50</sub>/Lf. Độc tố được pha loãng ngay trước khi sử dụng để có các độ pha như: 0,0004 Lf/ml; 0,0002 Lf/ml; 0,0001 Lf/ml và 0,00005 Lf/ml. Mỗi độ pha tiêm cho một nhóm gồm 5 con chuột nhất trắng, mỗi chuột có cân nặng  $16 \pm 0,3$  g.

Theo dõi chuột hàng ngày trong 96 h, ghi lại số chuột còn sống trong mỗi độ pha.

Độ pha loãng độc tố gây chết 50 % số chuột vào ngày thứ 4 (sau 96 h) được tính là 1 LD<sub>50</sub>.

#### Tiêm thử thách

Dựa vào kết quả LD<sub>50</sub> được xác định ở trên để độ pha dung dịch độc tố thử thách tương ứng với 100 LD<sub>50</sub>/ml trong dung dịch Jensen vô khuẩn có 1 % pepton.

Sau 28 ngày toàn bộ chuột đã miễn dịch bởi vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm dưới da 0,5 ml với liều độc tố thử thách chứa 100 LD<sub>50</sub>/ml (50 LD<sub>50</sub>/0,5 ml).

Nhóm chuột chứng: Từ dung dịch độc tố thử thách pha thành 3 độ pha 2 LD<sub>50</sub>, 1 LD<sub>50</sub>, 0,5 LD<sub>50</sub>. Mỗi độ pha tiêm cho 5 chuột nhất trắng có cân nặng  $16 \pm 0,3$  g.

#### Theo dõi chuột

Theo dõi chuột thử thách hàng ngày trong 5 ngày. Ghi lại số chuột sống, chết, liệt ở mỗi độ pha miễn dịch của cả vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn.

#### Triệu chứng liệt uốn ván:

Liệt cứng hoặc co giật kích động (sau thử thách 2 ngày).

Chuột đi nhón cao chân và chân sau liệt co cứng tiếp đến 2 chân trước. Khi nắm vào chuột cảm thấy rất cứng do các cơ bị co cứng, cổ cong vẹo về phía lưng. Khi kích thích bằng tiếng động như quẹt bút trên nắp thanh lồng chuột, những chuột này sẽ phản ứng bằng cách co cứng cơ hoặc co giật.

#### Tính kết quả

Dựa vào số chuột sống sót trong mỗi độ pha, công hiệu được xác định bằng phương pháp Probit analysis (Phần mềm WHO program).

#### Thử nghiệm có giá trị tin cậy nếu:

Liều độc tố thử thách chứng minh được chứa từ 50 đến 200 LD<sub>50</sub>.

Ở độ pha loãng thấp nhất (liều miễn dịch cao nhất) bảo vệ được trên 50 % động vật thí nghiệm.

Ở độ pha loãng cao nhất (liều miễn dịch thấp nhất) bảo vệ được ít hơn 50 % động vật thí nghiệm. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng trên chuột của cả vắc xin chuẩn và vắc xin thử phải song song và tuyến tính.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Tiêu chuẩn công hiệu của thành phần uốn ván trong vắc xin tùy theo tiêu chuẩn qui định của Tổ chức y tế thế giới cho loại vắc xin đó. Trong đó giới hạn tin cậy, công hiệu của vắc xin phải nằm trong khoảng từ 50 % đến 200 % so với công hiệu qui định và giới hạn dưới phải đạt tối thiểu bằng tiêu chuẩn công hiệu qui định của vắc xin đó.

**15.23 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN BẠCH HẦU TRONG VẮC XIN HẤP PHỤ CHỨA GIẢI ĐỘC TỔ BẠCH HẦU**

Xác định công hiệu của giải độc tố bạch hầu hoặc thành phần bạch hầu trong vắc xin phối hợp, hấp phụ được xác định bằng 1 trong 2 phương pháp: Thử thách trên chuột lang hoặc chuẩn độ huyết thanh chuột nhắt trên tế bào Vero.

**PHƯƠNG PHÁP THỬ THÁCH TRÊN CHUỘT LANG**

**Miễn dịch cho chuột**

Sử dụng ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 (nhưng không quá 5 độ pha) cho cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử. Mỗi độ pha dùng ít nhất 16 chuột lang khoẻ mạnh, 3 đến 5 tuần tuổi, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích nào trước đó. Cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g. Có thể sử dụng chuột khác giới nhưng phải phân chia đều cho các độ pha vắc xin và nhốt riêng lồng.

Các vắc xin được pha bằng nước muối sinh lý vô khuẩn và lựa chọn các độ pha sao cho ED<sub>50</sub> trung bình không nằm ngoài các độ pha loãng của vắc xin. Mỗi chuột trong các nhóm miễn dịch được tiêm dưới da 1 ml huyền dịch của độ pha vắc xin tương ứng. Thời gian miễn dịch là 28 ngày. Chọn ra 3 nhóm chuột đối chứng, mỗi nhóm 4 con đến 6 con, không tiêm gì và nuôi song song với các nhóm chuột miễn dịch bởi vắc xin.

*Ví dụ pha vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử như sau:*  
Vắc xin bạch hầu mẫu chuẩn chứa 180 IU/ống được hoàn nguyên trong 18 ml nước muối sinh lý (NMSL), pha thành ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 để có các độ pha tương ứng với 10 IU/ml; 5 IU/ml và 2,5 IU/ml như sau:

- A (1/18) = 1 ống vắc xin mẫu chuẩn + 18 ml NMSL
- B (1/36) = 9 ml A + 9 ml NMSL
- C (1/72) = 9 ml B + 9 ml NMSL

Vắc xin mẫu thử cũng được pha thành ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 bằng nước muối sinh lý vô khuẩn như sau:

- A (1/20) = 1 ml vắc xin mẫu thử + 19 ml NMSL
- B (1/40) = 9 ml A + 9 ml NMSL
- C (1/80) = 9 ml B + 9 ml NMSL

**Thử thách**

Độc tố bạch hầu dùng cho thử thách phải có ít nhất 10 000 LD<sub>50</sub>/Lf. Sau 4 tuần, toàn bộ chuột lang đã tiêm miễn dịch được tiêm thử thách dưới da 1 ml độc tố bạch hầu chứa 100 LD<sub>50</sub>/ml.

Pha loãng độc tố bạch hầu để có dung dịch chứa 1 LD<sub>50</sub>, dùng tiêm dưới da cho nhóm chuột đối chứng, mỗi con 1 ml.

Theo dõi chuột hàng ngày trong 5 ngày, ghi lại số chuột sống và chết trong mỗi độ pha miễn dịch và các nhóm chuột đối chứng.

**Tính kết quả**

Căn cứ vào số chuột sống sót trong mỗi độ pha vắc xin vào ngày thứ 5 sau khi thử thách, công hiệu vắc xin được xác định bằng phương pháp Probit analysis.

Vắc xin đạt yêu cầu về công hiệu bạch hầu nếu có không ít hơn 30 IU trong một liều đơn vắc xin cho người với điều kiện 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được nằm trong giới hạn từ 50 % đến 200 %, hoặc khi giới hạn cận dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu  $\geq 30$  IU trong một liều đơn vắc xin cho người.

*Thử nghiệm có giá trị khi:*

Liều thử thách chứng minh chứa xấp xỉ 50 - 200 LD<sub>50</sub>/ml. Giá trị ED<sub>50</sub> trung bình của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nằm trong khoảng giữa liều miễn dịch thấp nhất và cao nhất.

Thử nghiệm cần đáp ứng được tiêu chuẩn về tính tuyến tính và tính song song giữa liều miễn dịch và sự đáp ứng của chuột giữa vắc xin chuẩn và mẫu thử.

**PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ HUYẾT THANH CHUỘT NHẮT TRÊN TẾ BÀO VERO**

**Miễn dịch cho chuột**

Mỗi vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được tiến hành 4 độ pha loãng bậc 2. Các vắc xin được pha loãng bởi nước muối sinh lý vô khuẩn. Lựa chọn các độ pha vắc xin căn cứ vào hàm lượng giải độc tố bạch hầu có trong từng loại vắc xin.

Mỗi độ pha dùng ít nhất 8 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích nào trước đó. Cân nặng chuột từ 12 g/con đến 14 g/con, 3 đến 4 tuần tuổi, cùng giới (nếu khác giới phải phân đều cho các độ pha khác nhau và nhốt riêng lồng).

Mỗi chuột trong từng nhóm được tiêm dưới da 0,5 ml huyền dịch vắc xin tương ứng với từng độ pha của vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn. Thời gian miễn dịch là 5 tuần.

*Ví dụ: Pha vắc xin mẫu chuẩn và thử như sau:*

Vắc xin bạch hầu mẫu chuẩn chứa 688 IU được hoàn nguyên trong 8 ml nước muối sinh lý để có hỗn dịch (\*) chứa 88 IU/ml. Tiếp tục pha loãng bậc 2 để có 4 độ pha A - B - C - D như sau:

- A (1/2) = 8 ml (\*) + 8 ml NMSL
- B (1/4) = 8 ml A + 8 ml NMSL
- C (1/8) = 8 ml B + 8 ml NMSL
- D (1/16) = 8 ml C + 8 ml NMSL

*Ví dụ vắc xin thử pha như sau:*

- A (1/5) = 4 ml vắc xin + 16 ml NMSL
- B (1/10) = 8 ml A + 8 ml NMSL
- C (1/20) = 8 ml B + 8 ml NMSL
- D (1/40) = 8 ml C + 8 ml NMSL

**Lấy máu và thu thập huyết thanh chuột miễn dịch**

Sau khi tiêm miễn dịch 5 tuần, mỗi chuột được lấy máu riêng rẽ (lấy máu tim bằng bơm tiêm loại 1 ml vô trùng) và tách lấy huyết thanh miễn dịch. Huyết thanh được bất hoạt ở 56 °C trong 30 min. Sau đó có thể giữ các mẫu huyết thanh chuột miễn dịch ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi chuẩn độ huyết thanh trên tế bào.

**Chuẩn độ kháng thể kháng bạch hầu trên tế bào Vero**

**Chuẩn bị tế bào Vero**

*Chuẩn bị môi trường M199:*

Môi trường M199 bột khô hòa tan trong nước cất 2 lần. Điều chỉnh đến pH 7,0 - 7,2 bằng dung dịch natri bicarbonat. Môi trường nuôi cấy tế bào có chứa penicilin và streptomycin và 5 % đến 10 % huyết thanh bào thai bê.

*Nuôi tế bào Vero:*

Tế bào Vero giữ trong nitrogen lỏng được lấy ra và làm tan bằng nhanh dưới vòi nước. Ly tâm loại bỏ phần nước. Cặn được hòa trong môi trường M199 và nuôi trong chai nhựa 25 cm<sup>2</sup> ở 37 °C. Sau 4 đến 6 ngày, khi tế bào mọc kín thành một lớp, dùng dung dịch trypsin 0,25 % tách tế bào và cấy chuyển qua chai nuôi tế bào 75 cm<sup>2</sup>. Tiếp tục ở 37 °C trong 4 ngày đến 6 ngày. Khi tế bào mọc kín thành một lớp, dùng dung dịch trypsin 0,25 % tách tế bào. Pha thành hỗn dịch tế bào có đậm độ là 2,5 × 10<sup>5</sup> tế bào/ml dùng để chuẩn độ.

**Tim liều độc tổ bạch hầu ức chế tế bào Lm/10 000**

Liều độc tổ Lm/10 000 là liều độc tổ tối thiểu sau khi trung hòa với 0,0001 IU kháng độc tổ bạch hầu còn khả năng ức chế sự phát triển của tế bào Vero.

Xác định liều Lm/10 000 của độc tổ bạch hầu bằng phương pháp sau đây:

Độc tổ bạch hầu chuẩn được pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau trong môi trường M199 để có nồng độ khoảng 0,2 Lf/ml.

Pha loãng độc tổ bạch hầu 0,2 Lf/ml trên phiến chuẩn độ từ cột 1 đến 11.

Thêm huyết thanh chuẩn kháng bạch hầu có nồng độ 0,002 IU/ml vào các giếng trên.

Sau khi ủ phiến 1 h ở nhiệt độ phòng, thêm vào tất cả các giếng dung dịch tế bào vero có nồng độ 2,5 × 10<sup>5</sup> tế bào/ml. Lắc nhẹ và dán kín phiến bằng giấy dán phiến.

Ủ ở 37 °C trong 5 ngày đến 6 ngày.

Đọc kết quả và tính liều Lm/10 000 của độc tổ bạch hầu.

**Chuẩn độ kháng thể kháng bạch hầu trên tế bào Vero**

Mỗi phiến dùng để chuẩn độ 8 mẫu huyết thanh của 1 độ pha vắc xin.

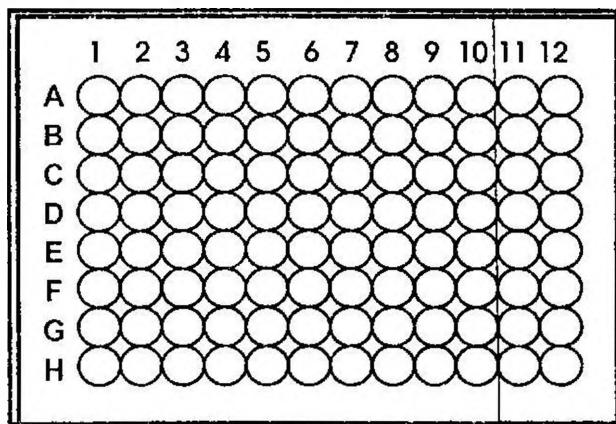
Cho 50 µl môi trường M199 vào tất cả các giếng của phiến (trừ giếng A<sub>11</sub> và A<sub>12</sub>). Riêng giếng G<sub>11</sub>, G<sub>12</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub> cho 100 µl.

Lấy 8 mẫu huyết thanh chuột đã tiêm miễn dịch của mỗi độ pha vắc xin cho lần lượt vào các giếng từ A<sub>1</sub> đến H<sub>1</sub>, mỗi giếng 50 µl. Pha loãng bậc 2 từ dãy số 1 đến dãy số 10. Huyết thanh chuẩn kháng bạch hầu có 10 IU/ml pha thành 0,008 IU/ml (\*\*).

Cho 50 µl huyết thanh (\*\*) vào các giếng A<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> và B<sub>11</sub>, B<sub>12</sub>. Từ B<sub>11</sub> và B<sub>12</sub> pha loãng bậc 2 xuống C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> và D<sub>11</sub>, D<sub>12</sub>; sau khi pha loãng và trộn đều ở các giếng D<sub>11</sub>, D<sub>12</sub> thì bỏ đi 50 µl ở mỗi giếng trong 2 giếng này.

Pha độc tổ chuẩn để có liều Lm/10000, cho 50 µl độc tổ vào tất cả các giếng trừ giếng G<sub>11</sub>, G<sub>12</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub> (chứng tế bào).

Lắc phiến và ủ 1 h ở nhiệt độ phòng. Cho thêm vào các giếng 50 µl hỗn dịch tế bào có đậm độ 2,5 × 10<sup>5</sup> tế bào/ml. Dán kín phiến bằng màng dán phiến và để ở 37 °C trong 5 ngày đến 6 ngày. Đọc kết quả.



**Cách đọc và tính kết quả**

Có thể đọc kết quả bằng cách trực tiếp soi các giếng chuẩn độ dưới kính hiển vi phản pha hoặc dựa vào việc đổi màu để phân biệt giếng “âm tính” và “dương tính”. Sự thay đổi màu từ đỏ sang vàng được coi như không có sự ức chế trao đổi chất do các độc tố đã bị trung hòa bởi các kháng thể kháng độc tố. Hiệu giá kháng thể được tính theo điểm là giếng cuối cùng vẫn còn tế bào mọc (môi trường có màu vàng).

Căn cứ vào số giếng “dương tính”, tính kết quả theo phần mềm Parallel line (phần mềm WIIO program).

*Thử nghiệm có giá trị khi:*

Giếng A<sub>11</sub> - D<sub>11</sub> và A<sub>12</sub> - D<sub>12</sub> cho thấy rõ liều Lm/10000 được pha đúng; Sau 6 ngày không xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng A<sub>11</sub> - A<sub>12</sub> và B<sub>11</sub> - B<sub>12</sub> (màu vàng). Ngược lại có xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng C<sub>11</sub> - C<sub>12</sub> và D<sub>11</sub> - D<sub>12</sub> (màu đỏ).

Sự ức chế trao đổi chất sẽ xảy ra ở giếng E<sub>11</sub> - E<sub>12</sub> và F<sub>11</sub> - F<sub>12</sub> (màu đỏ) là những giếng chứng độc tố (không có kháng huyết thanh để trung hòa độc tố nên độc tố đã gây hủy hoại tế bào).

Ở các giếng G<sub>11</sub> - G<sub>12</sub> và H<sub>11</sub> - H<sub>12</sub> các tế bào phát triển bình thường và môi trường có màu vàng, đó là những giếng chứng tế bào (không có độc tố và kháng huyết thanh bạch hầu).

Thử nghiệm phải đạt được các tiêu chuẩn đặt ra trong thử nghiệm Parallel line nghĩa là phải tạo được đường thẳng và đường song song trong mối tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng.

Trị số Yg của vắc xin chuẩn (là số các giếng dương tính trung bình ở mỗi độ pha vắc xin) sẽ phải nằm trong giá trị trung bình tích lũy ± 2SD của tất cả các thí nghiệm tiến hành trước đó.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Vắc xin đạt yêu cầu về công hiệu bạch hầu nếu có không ít hơn 30 IU trong một liều đơn vắc xin cho người với điều

kiện 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được nằm trong giới hạn từ 50 % đến 200 %, trừ khi giới hạn cận dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu  $\geq 30$  IU trong liều đơn vắc xin cho người.

Nếu kết quả không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị (valid test) thì phải nhắc lại thử nghiệm trên mẫu huyết thanh miễn dịch còn lưu và làm thử nghiệm kép. Kết quả sẽ là giá trị trung bình của 2 thử nghiệm nhắc lại. Nếu thử nghiệm nhắc lại đạt yêu cầu thì loạt vắc xin được coi là đạt công hiệu thành phần bạch hầu. Nếu thử nghiệm nhắc lại không đạt yêu cầu, loạt vắc xin bị coi là không đạt công hiệu thành phần bạch hầu và phải hủy bỏ.

Nếu kết quả không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị (invalid test) thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột bằng lần 1 (trình tự thử nghiệm lặp lại giống lần 1). Nếu ở lần thử nghiệm nhắc lại vẫn không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin bị coi là không đạt yêu cầu về công hiệu thành phần bạch hầu và phải hủy bỏ.

**15.24 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN HO GÀ TOÀN TẾ BÀO TRONG VẮC XIN PHỐI HỢP, HẤP PHỤ**

Công hiệu của vắc xin ho gà trong vắc xin được xác định bằng cách so sánh liều hữu hiệu 50 % (ED<sub>50</sub>) của vắc xin mẫu chuẩn so với vắc xin mẫu thử. Kết quả được tính bằng phương pháp Probit analysis (phần mềm WHO program).

**Pha vắc xin**

Sử dụng ít nhất 3 độ pha loãng bậc 5 nhưng không quá 5 độ pha cho cả vắc xin chuẩn và vắc xin thử. Pha vắc xin trong một loại dung dịch đệm sinh lý (dung dịch natri clorid 0,85 %). Các độ pha vắc xin được chọn dựa vào các số liệu trước đó và tùy thuộc vào chủng loại chuột thí nghiệm nhưng phải dựa trên nguyên tắc ED<sub>50</sub> không được lệch ngoài khoảng giữa độ pha loãng cao nhất và độ pha loãng thấp nhất.

Nếu không có sẵn số liệu trước đó có thể pha 3 độ pha bậc 5 của vắc xin chuẩn và vắc xin thử như ví dụ dưới đây:

**Vắc xin mẫu chuẩn**

A = 1/30 =	1 ống mẫu chuẩn	+ 30 ml NMSL
B = 1/150 =	5 ml A	+ 20 ml NMSL
C = 1/750 =	5 ml B	+ 20 ml NMSL

**Vắc xin DTwP mẫu thử**

A = 1:5 =	5 ml vắc xin mẫu thử	+ 20 ml NMSL
B = 1:25 =	5 ml dung dịch A	+ 20 ml NMSL
C = 1:125 =	5 ml dung dịch B	+ 20 ml NMSL

**Tiêm miễn dịch**

Chọn chuột nhất trắng có cân nặng từ 10 g đến 18 g, nhưng các chuột trong một thử nghiệm không được chênh lệch khối lượng quá 4 g. Dùng chuột cùng giới, nếu khác giới phải chia đều số chuột đực, cái vào các nhóm và nhốt riêng.

Chuột được tiêm miễn dịch sau khi đã được ăn uống đầy đủ 1 h. Tiêm ổ bụng 0,5 ml/chuột. Mỗi độ pha vắc xin tiêm cho một nhóm chuột, số lượng chuột trong mỗi nhóm tùy theo kết quả thăm định thử nghiệm nhưng không được ít hơn 20 chuột. Tiêm miễn dịch theo thứ tự từ độ pha loãng nhất (từ độ pha C đến A) cho cả loạt vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn.

Bốn nhóm chuột đối chứng: Mỗi nhóm 10 con, được nuôi song song với nhóm chuột miễn dịch dùng để kiểm chứng độc lực của chủng thử thách.

Trong thời gian miễn dịch (14 ngày đến 17 ngày), chuột phải khỏe và tăng trọng bình thường. Ít nhất 94 % số chuột đã được miễn dịch ở mỗi độ pha của cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nghiệm phải được sống sót và khỏe mạnh cho đến ngày thử thách.

**Tiêm thử thách**

Sau 14 ngày đến 17 ngày miễn dịch, chuột được thử thách với chủng *B. pertussis* 18323. Chủng thử thách có thể dùng chủng tươi hoặc chủng ở dạng huyền dịch đông băng (10 tỷ vi khuẩn ho gà) được bảo quản trong nitơ lỏng. Chủng thử thách được pha trong dung dịch casein 1 %. LD<sub>50</sub> của chủng thử thách phải nằm trong khoảng 100 đến 1000 vi khuẩn.

**Cách pha dung dịch casein 1 %**

Hòa tan 10 g bột casein trong 1000 ml nước cất 2 lần, cho thêm 2,3 g natri clorid. Điều chỉnh đến pH 7 - 7,2 bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrocloric loãng. Hấp 121 °C trong 30 min.

Dung dịch casein 1 % phải được kiểm tra an toàn bằng cách tiêm vào não cho 5 chuột nhất, mỗi con 0,02 ml. Theo dõi 3 ngày, toàn bộ chuột thí nghiệm phải sống. Nếu có 1 chuột chết phải pha lại dung dịch.

**Cách pha hỗn dịch vi khuẩn để kiểm tra liều LD<sub>50</sub> và để thử thách**

Chủng *B. pertussis* 18323 được cấy truyền đời 2 hoặc đời 3 trên môi trường Bordet - Gengou có chứa 15 % máu cừu hoặc ngựa, huyền dịch vi khuẩn ho gà gặt từ nuôi cấy 20 h đến 22 h được dùng để pha thành hỗn dịch thử thách hoặc sử dụng huyền dịch vi khuẩn ho gà đậm độ 10 tỷ vi khuẩn/ml đã bao quản trong nitrogen lỏng để pha dung dịch thử thách. Trong khi pha cũng như trong khi tiêm thử thách, hỗn dịch vi khuẩn ho gà phải giữ trong đá lạnh. Thời gian bắt đầu pha đến khi tiêm xong hỗn dịch vi khuẩn thử thách không được quá 150 min. Xác định đậm độ vi khuẩn ho gà bằng mắt thường khi so với ống độ đục chuẩn quốc tế 10 IOU hoặc đo OD bằng máy quang phổ kế để tính số vi khuẩn ho gà trong hỗn dịch gặt. Pha loãng huyền dịch vi khuẩn ho gà bằng casein 1 % để có nồng độ là 10 × 10<sup>9</sup> vi khuẩn/ml (\*). Nếu sử dụng chủng ho gà được bảo quản trong nitơ lỏng thì phải làm tan băng nhanh trước khi thử thách. Các độ pha loãng của chủng ho gà được pha theo sơ đồ dưới đây (Ví dụ 1) trong dung dịch casein 1 %.

**Ví dụ 1:** Sơ đồ các độ pha loãng của chủng ho gà trong dung dịch casein 1 %  
Chủng *B. pertussis* 18323 giữ trong nitrogen lỏng là  $10 \times 10^9/\text{ml}$  (\*) =  $A_0$

A1	=	1/2	=	$5 \times 10^9/\text{ml}$	-	1 ml $A_0$	+	1 ml đệm Casein 1 %
A2	=	1/4	=	$5 \times 10^9/2 \text{ ml}$	=	1 ml A1	+	1 ml đệm Casein 1 %
A3	=	1/40	=	$5 \times 10^6/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A2	+	9 ml đệm Casein 1 %
A4	=	1/400	=	$5 \times 10^5/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A3	+	9 ml đệm Casein 1 %
A5	=	1/2000	=	$100\ 000/0,02 \text{ ml}$	=	3 ml A4	+	12 ml đệm Casein 1 %
A6	=	1/20000	=	$10\ 000/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A5	+	9 ml đệm Casein 1 %
A7	=	1/100000	=	$2000/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A6	+	4 ml đệm Casein 1 %
A8	=	1/500000	=	$400/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A7	+	4 ml đệm Casein 1 %
A9	=	1/2500000	=	$80/0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A8	+	4 ml đệm Casein 1 %

### Tiêm chuột

Sau 14 ngày đến 17 ngày, toàn bộ chuột đã miễn dịch bởi vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm thử thách vào não, mỗi con nhận 0,02 ml hỗn dịch chứa 100 000 vi khuẩn (độ pha A5) bằng một bơm tiêm bán tự động Hamilton. Nhóm chuột đối chứng, mỗi nhóm 10 con được tiêm với các độ pha từ A6 đến A9 tương ứng với hỗn dịch chứa 10 000 vi khuẩn; 2000 vi khuẩn; 400 vi khuẩn và 80 vi khuẩn.

Độ pha hỗn dịch chứa 80 vi khuẩn sẽ được cấy ít nhất trên 2 đĩa thạch Bordet Gengou sau khi pha xong hỗn dịch và sau khi kết thúc tiêm thử thách. Ủ đĩa thạch ở 35 °C trong 3 ngày đến 4 ngày, đếm số khuẩn lạc mọc. Thông thường số khuẩn lạc đạt khoảng 30 %.

### Lưu ý:

Trong quá trình pha và tiêm thử thách, dung dịch chủng phải luôn giữ trong đá lạnh.

Thời gian tính từ khi bắt đầu pha chủng đến khi kết thúc thử nghiệm không được quá 2,5 h.

Tất cả vật liệu chứa chủng ho gà đều phải tiệt trùng bằng nồi hấp 121 °C trong 15 min đến 20 min hoặc luộc sôi trong 30 min trước khi rửa dụng cụ.

Những chuột chết trong 3 ngày đầu sau tiêm thử thách được coi là chuột chết không mang tính đặc hiệu của ho gà. Do đó chỉ những chuột chết từ ngày thứ 4 đến ngày 14 mới được tính kết quả.

Ngày thứ 14 sau thử thách: Tất cả những chuột chết, hay có dấu hiệu liệt rõ và sưng phồng tấy đầu đều được tính là chuột chết.

### Tính kết quả

Dựa vào số chuột sống sót trong mỗi nhóm chứng, dùng phương pháp Reed Muench để tính  $LD_{50}$  của chủng thử thách. Xem ví dụ 2.

### Ví dụ 2:

Số Vi khuẩn	Số Chuột	Số Sống	Số Chết
10 000	10	1	9
2 000 (B)	10	3	7
400 (A)	10	6	4
80	10	8	2

Theo ví dụ trên,  $LD_{50}$  nằm trong khoảng giữa 2 liều 2000 và 400 vi khuẩn, số % chuột chết tương ứng với liều sát trên 50 % là 76 %, số % chuột chết tương ứng liều sát dưới 50 % là 37 %

Tính  $LD_{50}$  công thức sau:

$$\lg LD_{50} = \lg A + \frac{50 - a}{b - a} \times \lg f$$

Trong đó:

A là liều gây chết vừa sát dưới 50 % (trong ví dụ trên là 400);

a là % chết tương ứng với A (trong ví dụ trên là 37 %);

B là liều gây chết vừa sát trên 50 % (trong ví dụ trên là 2000);

b là % chết tương ứng với B (trong ví dụ trên là 76 %);

f là hệ số pha loãng (trong thử nghiệm này là pha loãng bậc 5).

Thay bằng con số cụ thể là:

$$\lg LD_{50} = \lg 400 + \frac{50 - 37}{76 - 37} \times \lg 5$$

$LD_{50} = 680$  vi khuẩn

Dùng phần mềm Probit analysis của WHO program để tính công hiệu của vắc xin ho gà.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi:

$ED_{50}$  của vắc xin chuẩn và  $ED_{50}$  vắc xin thử nghiệm nằm giữa độ pha loãng nhất và độ pha đặc nhất của các vắc xin đó.

Trong suốt thời gian miễn dịch cho đến ngày thử thách số chuột trong mỗi độ pha không được chết quá 6 %.

Liều thử thách phải chứa 100 đến 1000  $LD_{50}$ , như vậy liều  $LD_{50}$  phải chứa 100 đến 1000 vi khuẩn.

Thử nghiệm phải đạt được tiêu chuẩn của chương trình Probit Analysis. Yêu cầu thể hiện bằng sự tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng trên chuột (tính tuyến tính) và tương quan giữa vắc xin chuẩn và vắc xin thử (tính song song).

Số tích lũy	Tổng số	% chết
1	23	95
4	17	76 (b)
10	16	37 (a)
18	20	10

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Vắc xin đạt yêu cầu nếu công hiệu không ít hơn 4 IU trong một liều đơn vắc xin cho người và giới hạn dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được không ít hơn 2 IU trong một liều đơn vắc xin cho người.

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid) và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nhưng nếu không đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì thử nghiệm đó phải được làm nhắc lại. Công hiệu vắc xin đạt tiêu chuẩn chấp thuận khi kết quả trung bình nhân của các lần thử nghiệm có giá trị không thấp hơn tiêu chuẩn chấp thuận cho phép.

Nếu lần 1 không đạt yêu cầu và thử nghiệm không có giá trị (invalid) thì phải làm lại thử nghiệm. Kết quả lần thử nghiệm đầu sẽ không được dùng để xem xét. Nếu kết quả lần thử nghiệm nhắc lại có giá trị và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì loạt vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nếu không đạt yêu cầu thì phải làm lại như ở trên.

**15.25 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG FORMALDEHYD TỒN DƯ TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM****Nguyên lý**

Có hai phương pháp xác định hàm lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm như sau:

Phương pháp 1: Dựa vào phản ứng tạo chất màu chinol dưới tác dụng của thuốc thử fuchsin và aldehyd hòa tan trong nước.

Phương pháp 2: Định lượng formaldehyd bằng cách so màu của 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin ở bước sóng 415 nm. Phức hợp tạo thành có màu vàng chanh do phản ứng của formaldehyd tự do trong mẫu thử với acetylaceton và amoni trong môi trường acid nhẹ.

**Cách tiến hành****Phương pháp 1**

Lấy 1 ml mẫu thử, cho nước cất vừa đủ 5 ml, thêm vào 1 ml thuốc thử fuchsin acid, trộn đều; đậy ống nghiệm bằng nút cao su và đợi 1 h. Đo mật độ quang học của dung dịch bằng kính lọc màu tím than (bước sóng  $400 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ).

Tiến hành làm song song trên mẫu trắng theo trình tự như trên nhưng thay 1 ml mẫu thử bằng 1 ml nước cất.

Kết quả xác định được bằng cách so màu của mẫu vắc xin thử với dung dịch chuẩn có mật độ quang học gần nhau nhất.

**Dụng cụ chuẩn:**

Lấy 1 ml dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 % thêm nước cất vừa đủ 100 ml vào (dung dịch 0,004 %).

Lấy 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml dung dịch chuẩn formaldehyd 0,004 % cho vào các ống nghiệm và cho nước cất vừa đủ 5,0 ml, thêm 1,0 ml dung dịch thuốc thử. Đợi 1 h sau đó tiến hành phân tích như đã mô tả ở trên.

**Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 %:** Trước khi pha tiến hành xác định sơ bộ hàm lượng formaldehyd có trong dung dịch formaldehyd (dung dịch phải chứa không

ít hơn 37 % formaldehyd). Cân 1 g dung dịch formaldehyd 40 % (cân chính xác, trong trường hợp dung dịch chứa ít hơn 40 % thì phải tính toán lại cho thích hợp) cho vào một bình định mức 100 ml, cho nước cất vừa đủ tới vạch (dung dịch 0,4 %). Trước khi dùng pha loãng 100 lần.

**Cách pha thuốc thử fuchsin:** Hoà tan 2 g fuchsin kiềm vào 120 ml nước cất đã đun sôi, để nguội. Hòa 2 g natri sulfit (TT) vào 20 ml nước cất và trộn vào dung dịch trên, thêm 2 ml acid hydrocloric (TT). Cho nước cất vừa đủ 200 ml và chờ ít nhất 1 h mới đem sử dụng. Dung dịch này phải luôn luôn mới.

**Phương pháp 2**

Lấy khoảng 3 ml đến 4 ml mẫu thử ly tâm 4000 r/min trong 10 min, lấy phần nước (nếu mẫu thử trong thì không cần ly tâm). Pha loãng mẫu thử nếu cần thiết.

Lấy chính xác 3 ml mẫu thử cho vào ống nghiệm.

**Dụng cụ chuẩn:** Pha loãng 10 lần dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %, từ đó pha các dung dịch formaldehyd chuẩn 0,0002 %; 0,0004 %; 0,0008 %; 0,0012 %.

Lấy chính xác 3 ml các dung dịch chuẩn đã pha loãng vào các ống nghiệm.

Mẫu trắng dùng 3 ml nước cất.

Thêm 3 ml dung dịch acetylaceton vào mỗi ống nghiệm đựng mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử.

Lắc đều, đun cách thủy  $100^\circ\text{C}$  trong 15 min.

Đề nguội ở nhiệt độ phòng.

Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 415 nm.

**Cách tính kết quả:**

$$X = na$$

Trong đó:

X là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử (%);

a là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (%);

n là độ pha loãng mẫu.

**Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %:** Cân 311 mg hexamethylentetramin hoà tan trong vừa đủ 1000 ml nước cất, dung dịch có chứa 0,04 % formaldehyd, bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng dùng trong 6 tháng.

**Cách pha dung dịch acetylaceton:** Cân 150 g amoni acetat (TT), hoà tan trong khoảng 500 ml nước cất. Thêm 3 ml acid acetic đậm đặc (TT), 2 ml acetylaceton (TT), khuấy đều, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml. Bảo quản dung dịch ở  $2^\circ\text{C}$  đến  $8^\circ\text{C}$ , dùng trong 2 tháng.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Mỗi loại vắc xin, sinh phẩm có tiêu chuẩn khác nhau. Các tiêu chuẩn này dựa theo quy định của WHO cho từng loại vắc xin và sinh phẩm. Tuy nhiên, lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin, sinh phẩm không được vượt quá 0,02 %.

### 15.26 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NATRI CLORID VỚI SỰ CÓ MẶT CỦA PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG GIÁN TIẾP (PHƯƠNG PHÁP CHARPENTIER-VOLHARD)

#### Nguyên lý

Phương pháp dựa trên phản ứng của ion  $\text{Cl}^-$  với một lượng bạc nitrat thừa.

Bạc nitrat thừa sẽ được chuẩn độ bằng dung dịch amoni sulfocyanid với chỉ thị màu phen sắt amoni.

Protein trong mẫu thử được oxy hóa bằng kali permanganat trong môi trường acid trước khi tiến hành định lượng natri clorid.

#### Phương pháp tiến hành

Hút chính xác một thể tích (V ml) mẫu thử tương ứng với khoảng 0,2 mg hoạt chất cho vào một bình nón dung tích 50 ml.

Thêm 5 ml dung dịch bạc nitrat 0,01 N.

Thêm 1 ml acid nitric đậm đặc (TT).

Thận trọng đun trên bếp cho đến khi sôi.

Thêm từng giọt dung dịch bão hòa kali permanganat cho đến khi có màu tím.

Tiếp tục đun sôi trong 5 min.

Thêm một ít đường glucose bột để khử màu.

Trên đáy bình xuất hiện tủa trắng như bông.

Làm nguội.

Thêm 0,5 ml dung dịch phen sắt amoni bão hòa.

Chuẩn độ bạc bằng dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CD) cho đến khi có màu hồng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất).

Lượng natri clorid có trong mẫu thử tính bằng mg % theo công thức:

$$X = \frac{(A-B) \times K \times 0,585 \times 100}{V}$$

Trong đó:

A là thể tích dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CD) dùng để chuẩn độ mẫu trắng (ml);

B là thể tích dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CD) dùng để chuẩn độ mẫu thử (ml);

K là hệ số điều chỉnh của dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N; 0,585 là lượng natri clorid tương ứng với 1 ml dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (mg);

V là số ml dung dịch mẫu thử đem kiểm tra;

100 là hệ số để chuyển thành %.

### 15.27 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NHÔM ( $\text{Al}^{+++}$ ) TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

#### Phương pháp 1

##### Nguyên lý:

Phương pháp dựa trên phản ứng tạo thành phức chất của một lượng thừa dung dịch muối natri của acid ethylen diamin tetra acetic (EDTA) với ion nhôm ( $\text{Al}^{+++}$ ) và sau

đó chuẩn độ lượng thừa EDTA bằng dung dịch đồng sulfat 0,01 M.

##### Phương pháp tiến hành:

Lấy 1 ml acid sulfuric (TT), 6 giọt acid nitric (TT) và 3 ml mẫu thử cho vào bình nón đun nóng cho đến khi thấy khói trắng dày đặc thoát ra.

Tiếp tục đun nóng và cho thêm vài giọt acid nitric (TT) cho đến khi dung dịch trong bình mất màu. Để nguội bình. Thận trọng thêm 10 ml nước cất. Nếu dung dịch còn đục, đun tiếp cho đến khi trong.

Thêm dung dịch natri hydroxyd 50 % vào bình cho đến khi dung dịch có màu đỏ vàng [dùng dung dịch da cam methyl (TT) làm chất chỉ thị].

Nếu dung dịch đục, hòa tan tủa bằng cách thêm dung dịch acid sulfuric 1 M, cho thêm chính xác vào bình 25 ml dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CD) và 10 ml dung dịch đệm acetat pH 4,4 [có chứa 68 g natri acetat (TT); 38,5 g amoni acetat (TT); 125 ml acid acetic (TT) và nước vừa đủ 500 ml]. Đun sôi nhẹ trong 3 min.

Thêm 1 ml dung dịch chỉ thị màu pyridylazonaphтол 0,1 % trong ethanol 95 %. Khi còn nóng chuẩn độ ngay dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat thừa bằng dung dịch đồng sulfat 0,01 M (CD) cho đến khi xuất hiện màu nâu tía, ta được A ml dung dịch đồng sulfat 0,01 M. Song song tiến hành làm mẫu trắng (thay mẫu thử bằng nước cất) được B ml dung dịch đồng sulfat 0,01 M.

1,0 ml dung dịch dinatri diethylen diamin tetraacetat 0,01 M (CD) tương đương với 0,2698 mg  $\text{Al}^{+++}$ .

Lượng nhôm X ( $\text{Al}^{+++}$  mg/ml) trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{B - A}{\text{Thể tích mẫu thử}} \times 0,2689$$

#### Phương pháp 2

##### Nguyên lý:

Hàm lượng nhôm ( $\text{Al}^{+++}$ ) có trong mẫu thử được xác định bằng cách so màu do phản ứng của nhôm với stilbazo. Nhôm hydroxyd có trong mẫu thử dưới tác dụng của acid nitric và nhiệt độ chuyển thành  $\text{Al}^{+++}$ .

##### Phương pháp tiến hành:

Trước khi kiểm tra, mẫu thử được lắc đều thành hỗn dịch đồng nhất. Thêm 0,2 ml acid nitric (TT) vào 1 ml mẫu thử. Đun sôi cách thủy trong khoảng 1 h. Pha loãng bằng nước cất đến nồng độ thích hợp (thường pha loãng 25 và 50 lần). Lấy 1 ml mẫu thử vào bình nón, thêm nước cất vừa đủ 5 ml. Thêm 10 ml dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75), 5 ml dung dịch stilbazo, 5 ml nước cất. Để ở nhiệt độ phòng 20 min, đo quang ở bước sóng 510 nm.

Song song tiến hành dựng đường chuẩn với các dung dịch nhôm chuẩn 2, 4, 6, 8, 10 microgam/ml, tương đương với 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml nhôm chuẩn 2 microgam/ml. Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng nhôm có trong mẫu thử.

Song song tiến hành làm mẫu trắng: Thay mẫu thử bằng 1 ml nước cất.

Cách pha dung dịch nhôm chuẩn 0,1 %: Cân chính xác 0,895 g nhôm clorid ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) hòa tan vào 100 ml nước cất 2 lần. Trước khi dùng pha loãng dung dịch nhôm chuẩn 0,1 % 500 lần bằng nước cất, thu được dung dịch nhôm chuẩn 2 microgam/ml.

Cách pha dung dịch stilbazo 0,035 %: Hòa tan 0,035 g stilbazo trong vừa đủ 100 ml nước cất. Lọc qua giấy lọc. Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C sử dụng được trong 1 tuần.

Cách pha dung dịch đệm acetat (pH = 5,55 - 5,75):

Dung dịch A: Hòa tan 69,05 g natri acetat (TT) vào 500 ml nước cất.

Dung dịch B: Hòa 5,72 ml acid acetic (TT) trong vừa đủ 100 ml nước cất.

Trộn dung dịch A vào dung dịch B theo tỷ lệ 9 : 1. Đo pH.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Hàm lượng  $Al^{+++}$  trong vắc xin không được vượt quá 1,25 mg  $Al^{+++}$ /liều tiêm cho người.

### 15.28 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PHENOL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

#### Phương pháp 1

##### Nguyên lý

Phương pháp dựa vào phản ứng tạo màu của thuốc thử Folin với phenol.

##### Phương pháp tiến hành

Vắc xin mẫu thử được ly tâm với vận tốc 3000 r/min trong 15 min. Bò cạn, lấy 1 ml phần nước ở phía trên cho vào bình định mức 100 ml và cho nước cất vừa đủ 100 ml, lắc đều.

Lấy 0,5 ml dung dịch trên, thêm 9 ml nước cất, 0,5 ml thuốc thử Folin (TT) pha loãng 2 lần, 2 ml dung dịch natri carbonat 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành xây dựng đường chuẩn:

Cách dựng đường chuẩn:

Hút dung dịch phenol chuẩn 1 : 1000 (TT) vào các ống nghiệm với lượng như sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml; 0,8 ml; 0,9 ml; 1,0 ml. Thêm vào các ống nghiệm trên mỗi ống một lượng nước cất vừa đủ 9,5 ml; 0,5 ml thuốc thử Folin pha loãng 2 lần; 2 ml dung dịch natri carbonat 20 % (TT). Lắc đều. Đun cách thủy cho sôi trong 1 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng.

Song song tiến hành làm mẫu trắng (dùng nước cất thay cho mẫu vắc xin thử nghiệm).

Đem so màu trên máy quang phổ với bước sóng 310 nm (cả với mẫu thử và mẫu chuẩn).

Cách tính kết quả:

$$X = \frac{a \times 2 \times 100 \times 100}{1000000} (\%)$$

Trong đó:

X là hàm lượng phenol có trong mẫu thử (%);

$a \times 2$  là hàm lượng phenol có trong 1 ml mẫu đã pha loãng tìm được trên đường chuẩn;

100 là độ pha loãng của mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm nói chung không được vượt quá 0,12 g/L, trừ những quy định cụ thể khác. Theo nguyên tắc chung, hàm lượng phenol trong vắc xin thành phẩm không được thấp hơn so với hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không được cao hơn 115 % hàm lượng đăng ký trên nhãn.

Pha dung dịch phenol chuẩn:

Cân chính xác 1 g phenol (TT) hoà tan trong vừa đủ 100 ml nước cất. Trước khi dùng pha loãng 1000 lần bằng nước cất.

Pha dung dịch natri carbonat 20 %.

Cân 20 g natri carbonat (TT) hoà tan trong vừa đủ 100 ml nước cất. Lọc vào chai đựng.

#### Phương pháp 2

Mẫu thử được trộn đều để làm thử nghiệm. Pha loãng mẫu thử bằng nước cất (nếu cần thiết) để có nồng độ phenol khoảng 15 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu phenol chuẩn theo các nồng độ 5 µg; 10 µg; 15 µg; 20 µg và 30 µg/ml.

Lấy 5 ml các dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn vào ống nghiệm, thêm 5 ml dung dịch đệm borat pH 9,0; 5 ml dung dịch aminopyrazolon và 5 ml dung dịch kali fericyanid. Lắc đều, để yên 10 min, đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 546 nm. Dựa vào đường chuẩn để tính ra hàm lượng phenol có trong mẫu thử.

Cách pha dung dịch đệm borat pH 9,0:

Dung dịch A: Hoà tan 6,18 g acid boric (TT) trong vừa đủ 1000 ml dung dịch kali clorid 0,1 M.

Dung dịch B: Dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT).

Trộn 1000 ml dung dịch A với 420 ml dung dịch B thu được dung dịch đệm pH 9,0.

Cách pha dung dịch aminopyrazolon:

Dung dịch 4-aminophenazon 1 % trong dung dịch đệm borat pH 9,0.

### 15.29 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG THIMEROSAL TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Có nhiều phương pháp để xác định hàm lượng thimerosal trong vắc xin và sinh phẩm. Tùy theo khả năng hiện có về thiết bị và hóa chất tại cơ sở để chọn 1 trong 2 phương pháp thử nghiệm sau đây: Phương pháp hóa lý và phương pháp vi sinh vật.

#### Phương pháp hóa lý

Nguyên lý:

Dựa vào phản ứng giải phóng ion thủy ngân tự do từ thimerosal, kết hợp với dithizon thành dithizon-thủy ngân, xác định bằng cách đo quang.



**Cách tiến hành:**

Làm song song 2 mẫu (mẫu vắc xin thử và mẫu chứng nước cất), lấy 0,2 ml mỗi mẫu cho vào từng bình nút mài riêng biệt có dung tích 100 ml.

Cho vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric (TT)* đã pha loãng 2 lần bằng nước cất 2 lần tinh theo (thể tích và đun nhẹ bình số 1 (chứa mẫu vắc xin thử) trong cách thủy cho đến khi tan hết. Thêm vào mỗi bình 5 ml *dung dịch kali permanganat 5 % (TT)*, lắc đều và để yên trong 1 h.

Loại bỏ *kali permanganat* thừa bằng cách thêm 1,5 ml *dung dịch hydroxylamin clorid 10 % (TT)*, thêm 35 ml *nước cất 2 lần*, 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và trộn đều. Dùng buret thêm chính xác vào mỗi bình 10 ml *dung dịch dithizon 0,001 %* và lắc 30 s.

Chuyển toàn bộ dung dịch thử của từng bình vào mỗi bình lắng gạn riêng biệt, tách lớp cloroform qua một lớp bông đã hấp và sấy khô vào các ống nghiệm. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm (Phụ lục 4.1).

Hàm lượng thimerosal (X %) có trong vắc xin thử được tính theo công thức:

$$X = \frac{a \times 100 \times 100}{0,2 \times 49,55 \times 1000000} = a \times 0,00101$$

Trong đó:

a là lượng thủy ngân ( $\mu\text{g}$ ) xác định được theo đường chuẩn;

0,2 là số ml dung dịch vắc xin thử;

49,55 là hàm lượng thủy ngân có trong 100 phần của thimerosal;

100 là 100 phần thimerosal;

100 là đổi ra phần trăm;

1 000 000 là hệ số chuyển đổi từ  $\mu\text{g}$  sang g.

**Cách dựng đường chuẩn:**

Cân chính xác 0,5 g thủy ngân, hòa vào 15 ml *acid nitric (TT)* và thêm *nước cất* vừa đủ 500 ml, được dung dịch thủy ngân có hàm lượng 1 mg/ml (DD\*). Xác định hàm lượng thủy ngân như sau: Lấy 10 ml DD\*, cho thêm 10 giọt *dung dịch phenyl sít amoni 10 %* và chuẩn độ từ từ với *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* cho đến khi xuất hiện màu da cam.

1 ml *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* tương đương với 0,001003 g thủy ngân.

Lấy 5 bình nút mài có dung tích 100 ml để tiến hành song song 5 thí nghiệm với 5 mẫu: 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml dung dịch thủy ngân chuẩn trên. Thêm vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric (TT)* đã pha loãng 2 lần bằng nước cất 2 lần và 30 ml *nước cất 2 lần*. Nếu không có *nước cất 2 lần* thì sử dụng nước xử lý dithizon như sau: Cho vào mỗi bình gạn 10 ml *dung dịch dithizon (TT)* (0,01 g/L), sau đó tách phần cloroform ra. Nếu màu của dithizon thay đổi thì làm đi làm lại vài lần cho đến khi màu của dithizon không thay đổi. Thêm 5 ml *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)* và 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và tiến hành tiếp tục như đối với mẫu kiểm tra ghi ở phần trên. Các kết quả thu được cho phép lập một đường chuẩn về thủy ngân.

**Cách pha dung dịch dithizon 0,001 %:**

Cân chính xác 10 mg *dithizon (TT)* hòa tan vào *cloroform (TT)* và thêm vừa đủ 100 ml với cùng dung môi.

Bao quản dung dịch ở chỗ tối 4 °C đến 8 °C trong vòng 1 tháng. Trước khi dùng pha loãng 10 lần.

**Phương pháp vi sinh vật****Nguyên lý:**

Phương pháp thực hiện dựa trên sự hình thành vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật được tạo bởi dung dịch thimerosal chuẩn và thimerosal có trong mẫu thử; so sánh đường kính vòng ức vô khuẩn.

**Cách tiến hành:**

Pha thạch thường, đun nóng chảy hoàn toàn và đổ thạch dày 4 mm lên một phiến kính hình chữ nhật phẳng. Để thạch nguội hoàn toàn, đục lỗ thạch (đường kính 8 mm) sao cho khoảng cách giữa các lỗ thạch ít nhất là 30 mm. Cây chùng *Staphylococcus aureus* trên thạch nghiêng, ủ ở 37 °C trong 18 h đến 24 h. Gặt và pha vi khuẩn bằng *nước muối sinh lý* vô khuẩn thành huyền dịch  $10^9$  vi khuẩn/ml. Láng đều huyền dịch vi khuẩn (0,5 ml/đĩa thạch) trên đĩa thạch đã đục lỗ. Nhỏ vào mỗi lỗ 100  $\mu\text{l}$  dung dịch thimerosal chuẩn nồng độ 1 g/L ở các độ pha loãng 1/2,5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Ủ ở 37 °C trong 24 h.

**Đọc kết quả:**

Đo đường kính các vùng ức chế vi khuẩn mọc của các đậm độ thimerosal chuẩn, xây dựng đường chuẩn. Dựa vào đường chuẩn và đường kính vùng ức chế của vắc xin mẫu thử để tính ra hàm lượng thimerosal có trong vắc xin mẫu thử.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Hàm lượng thimerosal trong mỗi vắc xin và sinh phẩm có thể khác nhau tùy theo yêu cầu cụ thể, nhưng không được thấp hơn hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không cao hơn 115 % hàm lượng thimerosal ghi trên nhãn. Yêu cầu chung cho hàm lượng thimerosal trong các vắc xin và sinh phẩm có sử dụng thimerosal làm chất bảo quản đều không được vượt quá 0,02 % trừ khi có chỉ dẫn khác.

**15.31 XÁC ĐỊNH HIỆU LỰC VẮC XIN ĐẠI THEO PHƯƠNG PHÁP NIH****Nguyên lý**

Thử nghiệm NIH (National Institute of Health - USA) được Tổ chức Y tế Thế giới chính thức công nhận để kiểm tra công hiệu vắc xin đại bất hoạt. Công hiệu vắc xin đại được xác định bằng cách so sánh liều hữu hiệu bảo vệ chuột chống lại liều gây chết của virus đại với một vắc xin đại mẫu chuẩn đã biết trước công hiệu (IU/ml). Thử nghiệm được tiến hành song song 2 vắc xin (mẫu thử và mẫu chuẩn), sau 14 ngày thử thách với cùng 1 liều chùng virus thử thách CVS.

**Phương pháp tiến hành****Pha vắc xin và gây miễn dịch:**

Pha vắc xin mẫu chuẩn bằng nước vô khuẩn để tiêm (hoặc PBS pH 7,2 - 7,4) để có được độ pha có chứa khoảng 2 IU/ml.

Phân chia vào các ống một lượng vắc xin đủ dùng cho một lần pha tiêm miễn dịch. Bảo quản ở -20 °C.

**Pha vắc xin thử:** Nếu là vắc xin đông khô phải hoàn nguyên bằng nước hồi chính cho tới nồng độ liều tiêm cho người. Dung dịch vắc xin chuẩn và dung dịch vắc xin thử đã hoàn nguyên tiếp tục được pha loãng thành ít nhất 3 độ pha trong nước muối sinh lí (hoặc PBS). Các độ pha được chọn sao cho có ED<sub>50</sub> trung bình không nằm ngoài các độ pha loãng của vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn, thường sử dụng độ pha loãng bậc 5 là 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 để pha tiêm miễn dịch.

**Gây miễn dịch:** Mỗi độ pha loãng vắc xin được gây miễn dịch cho ít nhất 16 chuột nhất trắng, 4 đến 5 tuần tuổi, 11 g đến 15 g. Mỗi chuột tiêm 0,5 ml vào phúc mạc. Tiêm 2 mũi vào ngày 0 và ngày 7.

Nhóm chuột đối chứng gồm 40 con được nuôi song song trong cùng điều kiện với nhóm chuột miễn dịch. Chuột đối chứng được dùng để chuẩn độ hiệu giá chủng virus thử thách, mỗi độ pha loãng tiêm 10 chuột.

Pha chủng CVS và thử thách.

Nhóm chuột miễn dịch được tiêm thử thách với liều trong khoảng từ 10 đến 100 LD<sub>50</sub>. Thường dùng liều thử thách có chứa 25 đến 50 LD<sub>50</sub>.

Ví dụ: sau 5 lần chuẩn độ hiệu giá chủng CVS là 10<sup>-6,81</sup>. Như vậy để có được liều 25 LD<sub>50</sub> phải dùng độ pha đậm đặc hơn 1,4 log tức là độ pha 10<sup>-5,4</sup>.

**Cách pha cụ thể:**

Dùng huyết thanh ngựa 2 % pha hỗn dịch CVS 20 % để có được hỗn dịch 10 % (hỗn dịch A). Sau đó pha tiếp:

	Độ pha loãng	Ký hiệu
0,3 ml A + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 <sup>-2</sup>	B
0,3 ml B + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 <sup>-3</sup>	C
0,3 ml C + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 <sup>-4</sup>	D
1 ml D + 24 ml huyết thanh 2 %	10 <sup>-5,4</sup>	E

Lấy độ pha E tiêm cho tất cả nhóm chuột miễn dịch, mỗi chuột tiêm 0,03 ml vào não.

Để chuẩn độ hiệu giá chủng CVS thử thách thực tế trong thử nghiệm, tiếp tục pha loãng bậc 10 từ hỗn dịch E (10<sup>-5,4</sup>) để có các độ pha 10<sup>-6,4</sup>, 10<sup>-7,4</sup>, 10<sup>-8,4</sup>. Mỗi độ pha chủng CVS tiêm vào não cho 10 chuột, mỗi chuột 0,03 ml.

**Theo dõi và đọc kết quả:**

Sau khi tiêm thử thách, theo dõi các nhóm chuột trong vòng 14 ngày. Những chuột liệt hoặc chết sau ngày thứ 5 mới được tính vào kết quả. Những chuột có dấu hiệu co giật, liệt, rối loạn vận động được coi như chết vì bệnh dại. Cần ghi chép kết quả hàng ngày. Đọc và tính kết quả cuối cùng vào ngày thứ 14 sau tiêm thử thách.

**Tính kết quả:**

Hiệu giá chủng thử thách CVS tính theo phương pháp Reed-Muench.

Công hiệu (ED<sub>50</sub>) tính theo chương trình Probit analysis của WHO.

**Tiêu chuẩn chấp thuận:** Vắc xin đại phải đạt công hiệu ≥ 2,5 IU/liều.

### 15.32 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ PROTEIN CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM BẰNG THUỐC THỬ NESSLER

**Nguyên lý**

Phương pháp dựa vào tính chất của thuốc thử Nessler cho phản ứng màu với ion amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) được tạo thành sau khi vô cơ hóa các protein.

#### Phương pháp tiến hành

**Chuẩn bị mẫu thử**

Cho 1 ml chế phẩm và 1 ml dung dịch acid trichloroacetic 20 % (TT) vào một ống ly tâm 10 ml, để ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C trong 10 h đến 12 h. Sau đó ly tâm 3500 r/min trong 1 h, loại bỏ phần nước. Rửa tủa bằng 2 ml dung dịch acid trichloroacetic 5 %, tiếp tục ly tâm 3500 r/min trong 1 h, loại bỏ phần nước. Thêm vào cặn 0,2 ml acid sulfuric (TT) đem vô cơ hóa trên bếp cát cho đến khi dung dịch mất màu. Để tăng tốc độ phản ứng thỉnh thoảng cho vài giọt dung dịch oxy già đậm đặc vào ống đót sau khi làm nguội. Khi chế phẩm đã được vô cơ hóa hoàn toàn, dung dịch mất màu, thêm nước cất 2 lần vừa đủ b ml, thu được dung dịch A.

Lấy 1 ml dung dịch A vào ống nghiệm, thêm 8,5 ml nước cất 2 lần và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT), được mẫu thử.

**Chuẩn bị mẫu trắng:** Trộn đều 9,5 ml nước cất 2 lần và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

**Dụng đường chuẩn**

Hút dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng 0,05 mg nitơ/ml vào các ống nghiệm theo thứ tự sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml. Thêm nước cất 2 lần vừa đủ 9,5 ml và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

Lắc đều các ống nghiệm.

Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 420 nm.

Vẽ đồ thị đường chuẩn.

Lượng nitơ protein trong chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$X \text{ (mg/ml)} = \frac{a \times b \times 6,25}{1,0 \times 1,0}$$

Trong đó:

a là lượng nitơ tìm được trên đường chuẩn (mg);

b là thể tích dung dịch A (ml);

1,0 là thể tích mẫu sau pha loãng đem so màu (ml);

1,0 là thể tích mẫu đem tủa rồi vô cơ hóa (ml);

6,25 là hệ số chuyển đổi protein từ nitơ.

**Cách pha dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng nitơ 0,05 mg/ml:**

Cân 0,2375 g amoni sulfat (đã được sấy khô trong bình hút ẩm bằng silica gel đến khối lượng không đổi), hòa tan vừa đủ 500 ml bằng nước cất 2 lần. Dung dịch vừa pha có hàm lượng nitơ 0,1 mg/ml, trước khi dùng pha loãng gấp đôi bằng nước cất 2 lần.

#### Tiêu chuẩn cho phép

Hàm lượng nitơ protein trong vắc xin và sinh phẩm theo qui định riêng.

**15.33 XÁC ĐỊNH pH CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM****Nguyên lý**

Trị số pH của một dung dịch vắc xin hay sinh phẩm được xác định bằng cách đo thế hiệu giữa điện cực chỉ thị nhạy cảm với ion hydrogen (thường là điện cực thủy tinh) và một điện cực so sánh (ví dụ điện cực calomel bão hòa). pH là một giá trị biểu thị quy ước nồng độ ion hydrogen của một dung dịch. pH của một dung dịch mẫu thử liên quan với pII của dung dịch mẫu chuẩn theo biểu thức sau:

$$pH = pH_s - \frac{(E - E_s)}{k}$$

Trong đó:

E là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch mẫu thử;  
E<sub>s</sub> là điện thế, tính bằng von, của pin chứa dung dịch mẫu chuẩn (đã biết);

pH<sub>s</sub> là pH của dung dịch mẫu chuẩn;

k là hệ số có giá trị thay đổi theo nhiệt độ được ghi ở bảng dưới đây:

Nhiệt độ	k (V)
15 °C	0,0572
20 °C	0,0582
25 °C	0,0592
30 °C	0,0601
35 °C	0,0611

**Phương pháp tiến hành**

pH của một dung dịch vắc xin, sinh phẩm được đo bằng máy đo pH (pH meter). Máy đo pH là một điện thế kế có trở kháng đầu vào gấp ít nhất 100 lần trở kháng của các điện cực sử dụng và thường được phân độ theo đơn vị pH và có độ nhạy để phát hiện được những thay đổi cỡ 0,05 đơn vị pH hoặc ít nhất 0,003 V. Các điện cực thủy tinh là phù hợp và các kiểu máy đo pH, kể cả máy đo pH hiện số, đều phải đáp ứng yêu cầu trên. Vận hành máy đo pH tùy theo loại máy đo pH và tùy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tất cả các phép đo đều cần phải tiến hành trong cùng một điều kiện nhiệt độ khoảng từ 20 °C đến 25 °C, trừ trường hợp có quy định khác trong chuyên luận riêng. Trước khi đo pH của mẫu thử, cần chuẩn định máy đo pH bằng dung dịch pH chuẩn do nhà sản xuất cung cấp (tối thiểu sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn mà pH của dung dịch mẫu thử phải nằm trong khoảng đó). Ví dụ: dung dịch mẫu thử cần đo pH thường nằm trong khoảng pH 4 - 7, cần sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn là pH 4 và pH 7 để chuẩn định máy đo pH; hoặc nếu dung dịch mẫu thử cần đo pH thường nằm trong khoảng pH 7 - 10, cần sử dụng 2 dung dịch pH chuẩn là pH 7 và pH 10 để chuẩn định máy đo pH trước khi đo pH của dung dịch mẫu thử.

Tráng đầu điện cực pH bằng nước cất 2 lần, dùng giấy thấm mềm chuyên dụng để thấm khô đầu điện cực và tiến hành đo pH của dung dịch mẫu thử. Số lượng mẫu thử tối thiểu dùng để kiểm tra pH là 15 ml đến 20 ml và nên để ở nhiệt độ phòng trước khi đo. Lắc đều và rót mẫu thử

vào cốc đựng mẫu, nhúng ngập đầu điện cực vào cốc mẫu thử và để cho chỉ số pH hiện trên màn hình ổn định thì xác định pH của mẫu thử. Sau khi đo pH của mẫu thử xong, cần tráng đầu điện cực bằng nước cất 2 lần, dùng giấy thấm mềm chuyên dụng để thấm khô đầu điện cực và nhúng ngập đầu điện cực của máy đo pH vào dung dịch bảo quản điện cực, ngắt điện của máy đo pH.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Tiêu chuẩn pH chấp thuận theo yêu cầu đối với từng loại mẫu thử.

**15.34 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TOÀN PHẦN TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**

Protein có trong vắc xin và sinh phẩm được xác định theo nhiều phương pháp khác nhau, tùy theo từng loại vắc xin và sinh phẩm.

**Phương pháp Lowry**

*Nguyên lý:*

Protein có trong mẫu vắc xin thử bị tủa với acid trichloroacetic nồng. Xác định lượng tủa để tính ra lượng protein có trong vắc xin, sinh phẩm.

*Phương pháp tiến hành:*

Pha loãng mẫu thử (nếu cần thiết) để chỉnh hàm lượng protein của mẫu thử trong khoảng 20 µg/ml đến 120 µg/ml. Thêm 1 ml dung dịch acid trichloroacetic 10 % vào một ống nghiệm có chứa 1 ml mẫu thử. Đun nóng ở 80 °C trong nồi cách thủy trong 15 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 3500 r/min trong 30 min, loại bỏ phần dung dịch nước.

Thêm vào phần lắng cặn 2 ml dung dịch acid trichloroacetic 5 %. Lắc kỹ trên máy lắc và ly tâm lại một lần nữa ở tốc độ 3500 r/min trong 30 min, loại bỏ phần dung dịch nước. Thêm 2,5 ml dung dịch Alkaline vào mỗi ống nghiệm nêu trên và ủ ở nhiệt độ phòng (thời gian ủ tùy từng loại mẫu thử) để hòa tan phần lắng cặn.

Thêm 2,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Folin (pha loãng 1/2), ủ ở 37 °C trong 30 min. Ly tâm với tốc độ 3500 r/min đến 6000 r/min trong 30 min (với các chế phẩm chứa chất hấp phụ nhôm). Đo mật độ quang học ở bước sóng 750 nm trên quang phổ kế.

Song song tiến hành thử nghiệm với mẫu trắng: thay vào 1 ml mẫu thử là 1 ml nước cất.

*Dụng cụ chuẩn:* Dụng cụ chuẩn với dung dịch protein chuẩn (dung dịch albumin chuẩn ở các nồng độ 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 150 µg/ml). Dựa vào hàm lượng protein tìm được trên đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

*Cách pha dung dịch Alkaline (pha ngay trước khi dùng):*

Dung dịch đồng sulfat pentahydrat 2 %: Hòa tan 2 g đồng sulfat pentahydrat vào vừa đủ 100 ml nước cất.

Dung dịch natri tartrat 4 %: Hòa tan 4 g natri tartrat trong vừa đủ 100 ml nước cất.

Trộn lẫn 2 dung dịch trên được dung dịch A.  
Hòa tan 0,8 g *natri hydroxyd* và 4 g *natri carbonat* trong vừa đủ 100 ml *nước cất* được dung dịch B.  
Trộn 50 ml dung dịch B và 1 ml dung dịch A được dung dịch Alkalina.

### Đo độ hấp thụ thực của protein ở bước sóng 280 nm

*Nguyên lý:*

Protein trong dung dịch hấp thụ tia tử ngoại ở bước sóng 280 nm, do sự có mặt các amino acid dãy thơm, chủ yếu là tyrosin và tryptophan trong cấu trúc protein.

*Phương pháp tiến hành:*

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử đến hàm lượng protein trong khoảng 0,2 mg/ml đến 2 mg/ml bằng dung dịch đệm thích hợp.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng mẫu chuẩn bằng cùng dung dịch đệm với mẫu thử và có hàm lượng protein tương ứng với mẫu thử.

Giữ dung dịch thử và chuẩn ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ các dung dịch này bằng công thạch anh ở bước sóng 280 nm (Phụ lục 4.1), dùng nước cất làm mẫu trắng.

Hàm lượng protein trong mẫu thử ( $C_U$ ) được tính bởi công thức:

$$C_U = C_S (A_U/A_S)$$

Trong đó:

$C_S$  là hàm lượng protein trong dung dịch chuẩn;

$A_U$  là độ hấp thụ của mẫu thử;

$A_S$  là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn.

### Phương pháp Bradford

*Nguyên lý:*

Dựa trên sự kết hợp giữa thuốc nhuộm Coomasie với protein trong môi trường acid.

*Phương pháp tiến hành:*

Pha loãng mẫu thử bằng nước cất đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn BSA (bovine serum albumin) có hàm lượng trong khoảng 0,1 mg/ml đến 1 mg/ml.

Dùng nước cất làm mẫu trắng.

Thêm 2,5 ml thuốc nhuộm Coomasie 20 % vào 0,05 ml mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử, lắc đều. Để yên 10 min ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 595 nm (không dùng công thạch anh do sẽ bị thuốc nhuộm gắn vào).

Hàm lượng protein trong mẫu thử được tính toán dựa vào đường chuẩn.

### Phương pháp đồng/acid bicinchoninic

*Nguyên lý:*

Dựa vào sự khử của ion  $Cu^{++}$  thành  $Cu^+$  do protein, dùng acid bicinchoninic (BCA) để xác định  $Cu^+$ .

*Phương pháp tiến hành:*

Pha loãng mẫu thử bằng *nước cất* đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Pha dung dịch chuẩn bằng *nước cất* (không ít hơn 5 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng 10  $\mu\text{g/ml}$  đến 1200  $\mu\text{g/ml}$ .

Dùng nước cất làm mẫu trắng.

Thêm 2 ml thuốc thử đồng-BCA vào 0,1 ml mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử, lắc đều. Ủ trong nồi cách thủy 37 °C trong 30 min. Làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 60 min, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 562 nm, dùng công thạch anh.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

*Pha thuốc thử BCA:* Hòa tan 10 g *dinatri bicinchoninat*, 20 g *natri carbonat monohydrat*, 1,6 g *natri tatriat*, 4 g *natri hydroxyd* và 9,5 g *natri hydrogen carbonat* vào *nước cất*. Điều chỉnh đến pH 11,25 nếu cần bằng dung dịch *natri hydroxyd* hoặc dung dịch *natri hydrogen carbonat*. Thêm *nước cất* vừa đủ 1000 ml, lắc đều.

*Pha thuốc thử đồng-BCA:* Trộn 1 ml dung dịch đồng sulfat 40 g/l với 50 ml thuốc thử BCA.

### Phương pháp biuret

*Nguyên lý:*

Dựa vào sự tương tác của ion  $Cu^{2+}$  với protein trong dung dịch alkaline, sản phẩm thu được có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 545 nm.

*Phương pháp tiến hành:*

Pha loãng mẫu thử bằng dung dịch nước muối sinh lý đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn.

Pha dung dịch chuẩn bằng dung dịch nước muối sinh lý (không ít hơn 3 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng từ 0,5 mg/ml đến 10 mg/ml.

Dùng dung dịch nước muối sinh lý làm mẫu trắng.

Lấy một thể tích dung dịch mẫu thử, thêm đồng lượng dung dịch *natri hydroxyd* 60 g/l, lắc đều. Ngay lập tức cho thuốc thử biuret với lượng bằng 0,4 lần thể tích dung dịch mẫu thử và lắc nhanh. Để yên ở nhiệt độ phòng 15 min. Trong vòng 90 min sau khi cho thuốc thử biuret, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) của mẫu thử ở bước sóng 545 nm. Song song tiến hành với mẫu trắng và mẫu chuẩn.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

*Pha thuốc thử biuret:* Hòa tan 3,46 g *đồng sulfat (TT)* trong 10 ml *nước cất* nóng, để nguội (dung dịch A). Hòa tan 34,6 g *natri citrat (TT)* và 20 g *natri carbonat khan (TT)* vào 80 ml *nước cất* nóng, để nguội (dung dịch B). Trộn dung dịch A và B, thêm *nước cất* vừa đủ 200 ml. Dùng trong 6 tháng, không dùng nếu thấy vẩn đục hoặc có tủa.

### Phương pháp quang phổ huỳnh quang

*Nguyên lý:*

Dựa vào dẫn xuất của protein với o-phthaldehyd do chất này phản ứng với các amin chính của protein (N-terminal amino acid và nhóm  $\epsilon$ -amino của lysin tồn dư).

*Phương pháp tiến hành:*

Pha loãng mẫu thử bằng *nước muối sinh lý (TT)* đến hàm lượng thích hợp trong khoảng đường chuẩn. Điều chỉnh pH từ 8 đến 10,5 trước khi thêm *thuốc thử phthaldehyd*.

Pha dung dịch chuẩn bằng *nước muối sinh lý (TT)* (không ít hơn 5 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng từ 10  $\mu\text{g/ml}$  đến 200  $\mu\text{g/ml}$ . Điều chỉnh pH từ 8 đến 10,5 trước khi thêm thuốc thử phthaldehyd.

Dùng nước muối sinh lý (TT) làm mẫu trắng.

Trộn 10 µl các dung dịch mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu trắng với 0,1 ml thuốc thử *phthaldehyd*, để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 min. Thêm 3 ml dung dịch *natri hydroxyd* 0,5 M và lắc đều. Đo cường độ huỳnh quang các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử ở bước sóng kích thích 340 nm và bước sóng phát xạ giữa 440 nm và 445 nm.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

**Pha dung dịch đệm borat:** Hòa tan 61,83 g *acid boric* trong nước cất và điều chỉnh pH 10,4 bằng dung dịch *kali hydroxyd*, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml, lắc đều.

**Pha dung dịch gốc phthaldehyd:** Hòa tan 1,20 g *o-phthaldehyd* trong 1,5 ml *methanol* (TT), thêm 100 ml dung dịch đệm borat (TT), lắc đều. Thêm 0,6 ml dung dịch *macrogol* 23 lauryl ether và lắc đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng sử dụng trong 3 tuần.

**Pha thuốc thử phthaldehyd:** Thêm 15 µl 2-mercaptoethanol vào 5 ml dung dịch gốc phthaldehyd. Chuẩn bị dung dịch này trước khi dùng 30 min. Sử dụng trong vòng 24 h.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Theo quy định trong chuyên luận riêng.

### 15.35 XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM TỒN DƯ TRONG VẮC XIN, SINH PHẨM ĐÔNG KHÔ

#### Nguyên lý

Sử dụng phương pháp Karl Fischer để xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin đông khô theo nguyên lý chung là dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong sự có mặt của alcohol và một chất base hữu cơ thích hợp.

Hiện nay có nhiều thiết bị để đo độ ẩm tồn dư trong các vắc xin, sinh phẩm đông khô, tuy nhiên nguyên tắc của các thiết bị này đều phải cấu tạo sao cho thao tác thuận tiện và tránh ẩm.

#### Phương pháp tiến hành

Tùy theo thiết bị của các hãng khác nhau nên thao tác theo hướng dẫn vận hành của hãng đó.

Phương pháp phổ biến hiện nay để đo độ ẩm tồn dư của các vắc xin và sinh phẩm đông khô là phương pháp Karl Fischer. Vận hành máy đo độ ẩm tồn dư theo hướng dẫn sử dụng. Rót dung dịch chuẩn anod và cathod vào khoang tương ứng đến đúng mức quy định. Cần lưu ý qua một thời gian nhất định, *methanol* trong dung dịch cathod có thể thấm qua màng trao đổi ion bằng cách thẩm thấu. Để giảm bớt tình trạng này không nên rót hóa chất đầy quá mức quy định.

Bật máy và cài đặt phương pháp lựa chọn. Nếu máy đo độ ẩm tồn dư không hoạt động trong vòng 3 tuần thì vẫn nên bật máy vài giờ trong khoảng thời gian này dù không tiến hành kiểm tra mẫu gì để nạp pin và đảm bảo tất cả các thông tin của chương trình vẫn được duy trì. Cần đảm bảo

trước khi nạp mẫu thử tỷ lệ % độ ẩm trên màn hình phải ổn định và ở mức độ thấp để đủ đạt được kết quả theo yêu cầu. Cân chính xác khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu.

Nhập khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu vào máy, sau đó nhập khối lượng của vật chứa mẫu. Đưa mẫu vào khoang bên ngoài qua đường bơm mẫu (nếu vận hành trong điều kiện độ ẩm cao và sáng thì nên đóng kín nắp khoang chứa mẫu thử khi vận hành).

Khi thực hiện xong thử nghiệm, máy in sẽ tự động in ra kết quả độ ẩm tồn dư của mẫu thử.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Độ ẩm tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm đông khô không được vượt quá 3 % ( $\leq 3$  %), trừ khi có qui định trong chuyên luận riêng.

### 15.36 PHÁT HIỆN MYCOPLASMA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

#### Nguyên vật liệu

Mẫu thử nghiệm: Nước nổi nuôi tế bào, hỗn dịch virus, vắc xin bán thành phẩm và thành phẩm.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường lỏng 1: LM1 (pH 7,6 đến 7,8; môi trường có màu đỏ) và môi trường lỏng 2: LM2 (pH 7,2; môi trường có màu vàng cam), dưới dạng 100 ml/chai hoặc 10 ml/ống.

Môi trường rửa lọc: Môi trường PPLO lỏng.

Môi trường đặc: Môi trường thạch PPLO.

Màng lọc 0,1 µm, xy lạnh 10 ml và dụng cụ cần thiết đủ cho tiến hành thử nghiệm.

#### Các bước tiến hành

##### Chuẩn bị môi trường

**Pha môi trường LM1 (pH 7,6 đến 7,8):** 500 ml.

Nước cất pha tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

Độ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min, sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, 6 ml glucose 25 % và 1,25 ml penicilin G. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.

**Pha môi trường LM2 (pH 7,0 đến 7,2):** 500 ml.

Nước để pha thuốc tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

L-Arginin: 1,5 g.

Độ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, và 1,25 ml penicilin G, 1 ml acid hydrocloric. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.

**Pha môi trường thạch PPLO:** 500 ml.

Thạch PPLO: 13,5 g.

Nước để pha thuốc tiêm: 375 ml.

Hấp tại 121 °C trong 15 min sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 % và 1,25 ml penicilin

G. Trộn đều, sau đó đổ thạch ra phiến 6 giếng: 8 ml/giếng, bảo quản 37 °C trước khi thử độ nhạy 1 ngày.

*Pha môi trường rửa màng lọc:*

Môi trường PPLO lỏng: 2,1 g.

Nước đề pha thuốc tiêm: 100 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min.

#### Tiến hành

Lọc mẫu: Sử dụng xylanh 10 ml hút 6 ml mẫu thử vào giá lọc 0,1 µm và bơm mẫu qua lọc cho đến hết.

Rửa lọc: Sử dụng 30 ml môi trường rửa lọc và xylanh 10 ml, bỏ kim, sau đó bơm từ từ cho đến khi môi trường rửa qua hết lọc.

Tháo lọc, lấy giấy lọc cho vào đĩa petri vô trùng, cắt đôi giấy lọc, cho mỗi nửa giấy lọc vào mỗi chai môi trường LM1 và LM2 đã chuẩn bị sẵn.

Chai môi trường sau gây nhiễm được nuôi ở 37 °C trong 28 ngày.

Cây truyền trên môi trường lỏng: sau gây nhiễm 14 ngày, lấy mẫu từ chai môi trường nuôi cấy chuyển sang ống môi trường nuôi cấy cùng loại: 0,2 ml/ống thử, 3 ống thử mỗi loại môi trường và đặt tại 37 °C trong 14 ngày.

Cây truyền trên môi trường đặc: Thạch được chuẩn bị trên phiến 6 giếng, gây nhiễm 10 µl từ ống thử nghi ngờ lên chính giữa mặt thạch, dán kín phiến và nuôi tại 37 °C trong 10 ngày.

#### Đọc kết quả

Đọc kết quả lần gây nhiễm đầu tiên: Ngày thứ 28.

Đọc kết quả lần cấy truyền: Ngày thứ 14 trên môi trường lỏng và ngày thứ 10 trên môi trường thạch;

Kết quả dương tính khi màu môi trường LM1 chuyển từ màu đỏ sang màu vàng cam; màu môi trường LM2 từ màu vàng cam sang màu đỏ ánh tím và có khuẩn lạc giống hình trứng óp lép trên môi trường thạch.

Kết quả âm tính khi màu môi trường của 2 loại môi trường lỏng không thay đổi giống như ống thử đối chứng và không có khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

### 15.37 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VI POLYSACCHARID CỦA VẮC XIN THƯƠNG HÀN VI POLYSACCHARID

#### Nguyên lý

Sử dụng phản ứng điện di miễn dịch rocket để xác định hàm lượng Vi polysaccharid trong vắc xin thương hàn Vi.

#### Phương pháp tiến hành

##### Pha dung dịch đệm và thạch agarose

*Dung dịch đệm barbital ½:* Dùng ống đong 500 ml đong 200 ml nước cất 3 lần cho vào chai thủy tinh loại 1000 ml, thêm 1,84 g acid bacbituric vào chai thủy tinh, đun trong cách thủy và lắc đều cho đến khi hoà tan hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm tiếp 10,3 g natri bacbital vào chai thủy tinh, lắc cho tan. Chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 500 ml, thêm nước cất 3 lần vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Điều chỉnh đến pH 8,6 bằng dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT) hoặc dung dịch natri hydroxyd 5 M (TT).

Bảo quản dung dịch thu được ở nhiệt độ phòng, trong chai có nút vặn kín. Sử dụng trong thời gian không quá 30 ngày kể từ ngày pha chế.

Rót dung dịch đệm barbital ½ vào bể điện di.

*Thạch agarose:* Thêm 0,5 g thạch agarose vào 40 ml dung dịch đệm barbital ½, đun cách thủy hoặc đun trên máy khuấy từ gia nhiệt cho đến khi thạch tan chảy hoàn toàn.

Đề thạch nguội đến khoảng 56 °C, cho 1 ml huyết thanh thô kháng Vi vào và lắc nhẹ tròn đều chai thạch sao cho huyết thanh thô kháng Vi hoà tan đều vào thạch nhưng không bị tạo bọt.

##### Tạo bản gel và đục lỗ thạch

Đổ thạch trên khuôn, chờ thạch nguội hoàn toàn.

Đục lỗ thạch bằng bộ đục lỗ chuyên dụng sao cho các giếng trên bản gel phải cách mép bản gel ít nhất 2 cm và cách nhau ít nhất 1 cm. Số lượng giếng trên bản gel phải được tính toán sao cho có đủ 5 giếng cho các hàm lượng kháng nguyên Vi chuẩn, 2 giếng (làm kép) cho mỗi mẫu thử.

##### Pha mẫu kháng nguyên Vi chuẩn

Pha loãng kháng nguyên Vi chuẩn bằng dung dịch PBS ở các độ pha loãng như sau: 100 µg; 50 µg; 25 µg; 12,5 µg; 6,25 µg Vi polysaccharid /ml.

Lần lượt nhỏ mẫu chuẩn ở các độ pha loãng như trên vào từng giếng trên bản gel (5 µl/giếng); cho vào 2 giếng tiếp theo mỗi giếng 5 µl vắc xin mẫu thử.

##### Chạy điện di miễn dịch Rocket

Đặt bản gel vào máy điện di theo hướng mẫu đi từ cực âm sang cực dương.

Bật nguồn, cài đặt các thông số thích hợp về hiệu điện thế, cường độ dòng điện và thời gian chạy điện di của mẫu.

Dùng giấy lọc Whatman làm cầu nối từ bể dung dịch điện di tới bản gel ở cả 2 đầu bản gel.

Bấm nút "Run" để chạy điện di.

##### Rửa bản gel

Sau khi chạy điện di xong, tắt nguồn, lấy bản gel ra khỏi máy điện di, cho vào hộp nhựa trong có nắp kín.

Cho nước muối sinh lý ngập bản gel và ngâm, lắc nhẹ bằng máy lắc trong 3 h (thay nước muối sinh lý 1 h/lần).

Hút hết nước muối sinh lý ra và thay bằng nước cất. Ngâm và lắc hộp nước cất có chứa bản gel liên tục. Sau khi ngâm được 1 h, thay nước cất 30 min/lần.

##### Ủ bản gel

Đổ toàn bộ nước cất ra khỏi hộp.

Phủ một lớp giấy lọc lên mặt bản gel để tránh cho bản gel không bị khô không đồng đều.

Ủ bản gel qua đêm trong tủ ẩm 37 °C.

##### Nhuộm và tẩy bản gel

Bóc bỏ lớp giấy lọc trên mặt bản gel.

Nhuộm bản gel bằng dung dịch nhuộm màu trong 15 min.

Trong quá trình nhuộm, lắc đều hộp dung dịch nhuộm màu có chứa bản gel bằng máy lắc.

Hút bỏ toàn bộ dung dịch nhuộm màu và bơm dung dịch tẩy màu vào hộp chứa bản gel; ngâm, lắc liên tục cho đến khi nhìn rõ những cột tên lửa trên bản gel. Nếu bản gel vẫn còn xanh đậm, có thể thay dung dịch tẩy màu mới nhằm rút ngắn thời gian tẩy màu của bản gel.

#### Đọc và tính kết quả

Bản gel được đưa ra khỏi hộp nhựa và đặt trên phiến kính trong. Dùng thước đo chuyên dụng để đo chiều cao các cột tên lửa trên bản gel, từ các giếng kháng nguyên chuẩn và mẫu thử. Dựa vào chiều cao các cột tên lửa, xây dựng được đường chuẩn và tính kết quả hàm lượng kháng nguyên Vi từ mẫu thử bằng chương trình Excell.

#### Đánh giá kết quả

Loại vắc xin thương hàn Vi polysaccharid được coi là đạt yêu cầu về chỉ số hàm lượng Vi polysaccharid khi thử nghiệm có giá trị (valid) và đạt 35  $\mu\text{g}$  đến 65  $\mu\text{g}$  polysaccharid/1,0 ml vắc xin.

Nếu thử nghiệm xác định hàm lượng Vi polysaccharid không có giá trị (invalid) vì một lý do nào đó thì phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu bằng lượng mẫu của lần kiểm tra thứ nhất.

Nếu thử nghiệm xác định hàm lượng Vi polysaccharid có giá trị (valid) nhưng không đạt yêu cầu về hàm lượng như quy định thì nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu gấp đôi. Ở lần kiểm tra thứ hai nếu hàm lượng Vi polysaccharid đạt yêu cầu (nằm trong khoảng cho phép của tiêu chuẩn chấp thuận thì loại vắc xin đó được coi là đạt yêu cầu về hàm lượng Vi polysaccharid. Nếu kết quả hàm lượng Vi polysaccharid không đạt yêu cầu thì loại vắc xin đó phải hủy bỏ, không được phép xuất xưởng đưa vào sử dụng.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

(25  $\mu\text{g}$   $\pm$  30 %) Vi polysaccharid/liều đơn vắc xin dùng cho người (0,5 ml).

### 15.38 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYSACCHARID TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

#### Nguyên lý

Polysaccharid có trong mẫu thử được chuyển thành đường đơn, sau đó phản ứng với anthron tạo thành hợp chất màu. Đo hợp chất màu này ở bước sóng 620 nm, từ đó xác định hàm lượng polysaccharid trong mẫu thử.

#### Tiến hành

Pha loãng dung dịch glucose chuẩn 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bằng nước cất thành các nồng độ 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 5,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 7,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 10,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Hút 1 ml mẫu thử và mỗi dung dịch glucose chuẩn vừa pha loãng ở trên vào ống nghiệm, thêm 4 ml dung dịch anthron 0,2 %; lắc đều, đun cách thủy 100 °C trong 15 min. Làm

nguội nhanh trong nước đá và để ở nhiệt độ phòng trong 60 min.

Đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 620 nm, dựng đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng polysaccharid trong mẫu thử.

Đơn vị tính:  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  protein.

#### Cách pha các dung dịch:

Dung dịch glucose chuẩn 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : Hòa tan 500 mg glucose bằng nước cất trong bình định mức 100 ml, thêm nước cất vừa đủ. Trước khi dùng, pha loãng 10 lần bằng nước cất.

Dung dịch anthron 0,2 %: Cân 0,2 g anthron chuyển vào bình định mức 100 ml, thêm acid sulfuric 95 % vừa đủ 100 ml.

Bảo quản dung dịch ở 2 °C đến 10 °C trong chai thủy tinh màu, sử dụng trong vòng 2 tuần sau khi pha.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm. Đối với bán thành phẩm viêm gan B, hàm lượng polysaccharid không lớn hơn 10  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  protein.

### 15.39 XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT KHÁNG NGUYÊN HBsAg

Thử nghiệm xác định độ tinh khiết kháng nguyên HBsAg được thực hiện trong giai đoạn bán thành phẩm của vắc xin viêm gan B.

Độ tinh khiết kháng nguyên HBsAg được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Dung dịch đệm PBS pH 6,8.

Cách pha dung dịch đệm PBS pH 6,8: Cân 3,48 g natri phosphat monobasic; 9,75 g natri phosphat dibasic; 23,38 g natri clorid và 0,1 g natri azid, hoà tan trong vừa đủ 1 L nước khử ion. Điều chỉnh pH bằng 6,8 bằng acid phosphoric (TT).

Lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

Điều kiện sắc ký:

Cột TKgel G3000SW, Nhật Bản.

Nhiệt độ phòng

Tốc độ dòng: 0,6 ml/min.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 280 nm.

Thể tích tiêm: 50  $\mu\text{l}$ .

Lọc mẫu thử qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$  trước khi cho mẫu vào cột.

Tiến hành sắc ký với dung dịch thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Tỷ lệ diện tích pic HBsAg so với tổng số các pic không nhỏ hơn 95 %.

### 15.40 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LIPID TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

#### Nguyên lý

Dựa trên phản ứng của lipid với vanilin trong môi trường acid sulfuric và acid phosphoric tạo thành hợp chất màu.

Đo hợp chất màu này ở bước sóng 540 nm, từ đó xác định hàm lượng lipid trong mẫu thử.

**Tiến hành**

Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 200 µg/ml.

Hút dung dịch dầu ô liu (olive oil) chuẩn 500 µg/ml vào các ống nghiệm lần lượt 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; thêm nước cất vừa đủ 1 ml.

Hút 1 ml mẫu thử vào ống nghiệm, 1 ml nước cất vào mẫu trắng. Thêm 3 ml acid sulfuric 95 % vào mỗi ống nghiệm, lắc mạnh bằng máy lắc. Đun cách thủy 100 °C trong 10 min, làm lạnh bằng nước đá trong 5 min. Thêm 13 ml dung dịch phosphovanilin (TT) vào mỗi ống nghiệm, lắc kỹ. Đun cách thủy 37 °C ± 2 °C trong 30 min, làm lạnh, để yên ở nhiệt độ phòng 30 min.

Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm, dựng đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng lipid trong mẫu thử. Đơn vị tính: µg/100 µg protein.

*Cách pha các dung dịch:*

Dung dịch dầu ô liu (olive oil) chuẩn 5000 µg/ml: Cân 0,25 g olive oil vào bình định mức 50 ml, thêm ethanol (TT) vừa đủ, lắc kỹ. Bảo quản dung dịch ở 4 °C đến 7 °C, dùng trong 1 tháng. Trước khi dùng, pha loãng 10 lần bằng nước cất.

Dung dịch vanilin 0,6 %: Hòa tan 6,0 g vanilin (TT) trong 6 ml đến 7 ml ethanol (TT), chuyển vào bình định mức 1 L, thêm nước cất đến định mức.

Dung dịch phosphovanilin: Cho 350 ml dung dịch vanilin 0,6 % và 50 ml nước cất vào cốc thủy tinh, khuấy đều. Thêm 600 ml acid phosphoric 85 % (TT) trong khi đang khuấy từ.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm.

Đối với bán thành phẩm viêm gan B, hàm lượng lipid không lớn hơn 100 µg/100 µg protein.

**15.41 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CESI TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM**

**Nguyên lý**

Cesi tồn dư trong quá trình tinh khiết HBsAg được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

**Tiến hành**

*Mẫu chuẩn:* Hút 1 ml nước khử ion vào 3 ống nghiệm, thêm lần lượt 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml dung dịch cesi chuẩn 0,001 %.

*Mẫu thử:* Hút 1 ml mẫu đã pha loãng 5 lần bằng nước khử ion vào ống nghiệm, thêm 0,4 ml dung dịch chuẩn. Lọc các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử qua màng lọc 0,22 µm. Điều kiện vận hành máy sắc ký ion: Cột IonPac Cs-12, detector đo độ dẫn điện 5 mcS đến 10 mcS, tốc độ dòng 1,0 ml/min, thể tích mẫu thử: 100 µl, nhiệt độ phòng. Dựa vào diện tích pic để tính ra hàm lượng cesi trong mẫu thử. Đơn vị tính: µg/20 µg protein.

*Cách pha các dung dịch*

Dung dịch acid hydrochloric 0,04 M (dung dịch rửa giải): Lọc 1,5 L nước khử ion qua màng lọc 0,45 µm, hút 3,3 ml acid hydrochloric (TT) pha trong vừa đủ 1 L nước khử ion vừa lọc trên.

Dung dịch tetrabutyl amoni hydroxyd (TBAOH) (dung dịch tái sinh): Hút 66,67 ml TBAOH vào ống đong 2 L, thêm nước khử ion vừa đủ 2 L, khuấy đều.

Dung dịch cesi chuẩn 0,01 %: Cân chính xác khoảng 10 mg (a) cesi clorid, chuyển vào bình định mức 100 ml, thêm nước khử ion vừa đủ, lắc đều.

Pha loãng 10 lần dung dịch cesi chuẩn 0,01 % bằng nước khử ion trước khi dùng. Hàm lượng cesi thực có trong dung dịch thu được (X) được tính bằng công thức:

$$X (\mu\text{g/ml}) = \frac{132,9}{168,4} \times \frac{a}{100} \times \frac{1}{10} \times 1000$$

Trong đó:

132,9 là phân tử lượng của Cs;

168,4 là phân tử lượng của CsCl;

10 là hệ số pha loãng dung dịch chuẩn;

1000 chuyển từ mg sang µg.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Không lớn hơn 5 µg/20 µg protein.

**15.42 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG SACCHARID TỔNG SỐ BẰNG PHƯƠNG PHÁP ORCINOL**

**Nguyên tắc**

Phương pháp cho phép định lượng polyribosylribitol phosphat (PRP), polysaccharid này được xem là thành phần hoạt động chính của vắc xin *Haemophilus influenzae typ b*. Phương pháp dựa trên sự hình thành phức hợp màu xanh và hòa tan trong nước.

**Chuẩn bị dung dịch**

Các dung dịch sau đây được pha ngay trước khi thử nghiệm. *Dung dịch chuẩn ribose:* Hoà tan 5,0 mg ribose chuẩn trong bình định mức 10 ml bằng nước cất, thêm nước cất đến vạch. Lắc đều.

*Dung dịch sắt (III) clorid trong acid hydrochloric:* Cân 1 g sắt (III) clorid (TT) và hòa tan trong 10 ml nước cất. Pha 0,25 ml dung dịch thu được với 50 ml acid hydrochloric (TT).

*Dung dịch orcinol:* Cân 230 mg orcinol (TT) và hòa tan trong 5 ml ethanol (TT), chuẩn bị xong phải chứa dung dịch trong chai thủy tinh màu.

*Dung dịch natri azid 0,02 %:* Cân 0,02 g natri azid (TT) và pha loãng với 100 ml nước cất.

*Chuẩn bị dung dịch để lập đường chuẩn:* Từ dung dịch chuẩn ribose pha về các nồng độ 1 µg/ml, 4 µg/ml, 12 µg/ml và 20 µg/ml.

*Chuẩn bị mẫu kiểm tra:*

Đối với mẫu cộng hợp (ARM): 50 µl mẫu pha loãng với 450 µl nước cất.

Nếu mẫu là sản phẩm cuối cùng thì không cần pha loãng.



**Tiến hành**

**Xác định hàm lượng saccharid tổng số**

Lấy vào mỗi ống 500 µl dung dịch chuẩn ribose đã pha (nồng độ 1, 4, 12, 20 µg/ml).

Lấy 500 µl mẫu vắc xin cần kiểm tra vào một ống khác.

Thêm nước vào tất cả các ống để được 2000 µl.

Thêm 1000 µl dung dịch sắt (III) clorid trong acid hydrochloric vào các ống.

Thêm 80 µl dung dịch orcinol vào các ống.

Giữ 80 °C trong 15 min.

Đề nguội, đo mật độ quang của các dung dịch ở 670 nm (OD 670 nm) và ở 580 nm (OD 580 nm) và tính kết quả.

**Xác định hàm lượng saccharid tự do**

Chú ý: Trước khi sử dụng ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30, phải rửa ống ly tâm lại với nước và sau đó thêm 500 µl nước cất và ly tâm trong 5 min.

Thêm 500 µl mẫu vào phần trên của ống ly tâm Centricon. Ly tâm ở 3500 r/min trong 20 min.

Sử dụng phân dịch được lọc ra (phân dịch nằm bên dưới) và tiến hành các bước theo phân xác định hàm lượng saccharid tổng số.

Rửa hệ thống ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30 bằng nước và thêm dung dịch natri azid 0,02 %.

Bảo quản ở 4 °C cho đến khi dùng trở lại.

Tính hàm lượng saccharid cuối cùng của mẫu thử (C<sub>T</sub>) theo công thức sau:

$$C_T = C_m \times 10^{-3} \times 2,45$$

Trong đó:

C<sub>m</sub> là giá trị trung bình của hàm lượng ribose trong mẫu thử; 2,45 là hệ số biểu hiện mối tương quan về khối lượng phân tử của polymer (saccharid) và D-ribose;

10<sup>-3</sup> là hệ số chuyển đổi từ đơn vị µg/ml thành mg/ml.

Kết quả được tính theo đơn vị mg/ml (mg carbonhydrat/ml mẫu cần kiểm tra).

**15.43 QUY TRÌNH THỬ NGHIỆM CÔNG HIỆU (IN VIVO) CỦA VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP**

**Sinh vật phẩm**

Chuột nhắt cái giống BALB/c thuần chủng từ cùng một đàn tùy loại 2D hoặc 2K từ 5 đến 6 tuần tuổi, cân nặng tối thiểu 16 g được lựa chọn, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện cách ly.

Vắc xin viêm gan B mẫu chuẩn quốc tế từ WHO.

Chuẩn thứ cấp (địa phương) vắc xin viêm gan B tái tổ hợp.

**Chuẩn bị dung dịch**

Dung dịch đề pha loãng mẫu: Hoà tan nhôm hydroxyd (TT) trong dung dịch natri clorid 0,9 % (TT) để được dung dịch có nồng độ 1,5 g/l.

Gel phải có nồng độ Al<sup>3+</sup> như trong mẫu vắc xin (0,5 mg Al<sup>3+</sup>/ml); 0,5 mg Al<sup>3+</sup> tương đương với 1,44 mg Al(OH)<sub>3</sub>.

Hấp diệt trùng dung dịch đã pha ở 121 °C trong 30 min. Bảo quản ở 4 °C.

**Tiến hành**

Chuẩn bị các độ pha của vắc xin:

Tiến hành trong Laminar.

Các độ pha của mẫu vắc xin hấp phụ được pha loãng bằng dung dịch pha loãng mẫu, mỗi độ pha tương ứng với một nồng độ của vắc xin. Chỉ chuẩn bị 1 lọ cho mỗi độ pha mẫu hoặc chuẩn.

Trước khi lấy đủ lượng vắc xin cần thiết (1 ml) phải lắc đều lọ để đồng nhất mẫu.

Đề chuẩn bị các độ pha vắc xin từ nồng độ kháng nguyên 20 µg/ml cần tiến hành theo hướng dẫn trong Bảng 15.43.1. Song song làm tương tự với mẫu chuẩn quốc tế của WHO hoặc chuẩn thứ cấp của phòng thí nghiệm (chuẩn quốc tế được dùng để chuẩn hóa chuẩn thứ cấp).

Sau khi chuẩn bị xong các độ pha, đẩy nút cao su và nắp đã tiệt trùng. Chuyển các lọ mẫu pha loãng đến nhà chăn nuôi súc vật thí nghiệm để gây nhiễm trên động vật.

Bảng 15.43.1: Chuẩn bị các độ pha loãng của vắc xin

Mẫu vắc xin (ml)	Dung dịch pha loãng (ml)	Độ pha loãng	HBsAg (µg/ml)
1 (vắc xin không pha loãng)	15	1/16	1,25
4 (vắc xin 1/16)	12	1/64	0,312
4 (vắc xin 1/64)	12	1/256	0,078
4 (vắc xin 1/64)	28	1/512	0,039
4 (vắc xin 1/256)	12	1/1024	0,019
Giả dược (Placebo)	12		

**Gây nhiễm trên động vật:**

Với mỗi độ pha của vắc xin gây nhiễm trên 10 chuột nhắt (1 ml/con) bằng đường tiêm màng bụng. Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 ngày ở vùng cách ly bảo vệ.

Lấy máu: Tiến hành lấy máu sau 28 ngày gây nhiễm trên chuột. Lấy máu riêng từng con vào ống nhựa, dán nhãn ghi số lô và độ pha. Có thể ly tâm ngay khi lấy máu tại nhà chuột hoặc giữ ở nhiệt độ phòng không quá 24 giờ để ly tâm sau đó.

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

Định lượng kháng thể kháng HBsAg bằng phương pháp ELISA với bộ kit của BIO-RAD.

Tính kết quả: Sau khi xác định được các mẫu huyết thanh dương tính (có chứa kháng thể), tính phần trăm số chuột có đáp ứng miễn dịch trên mỗi độ pha tức là trên tổng số chuột gây nhiễm có bao nhiêu chuột có đáp ứng miễn dịch của độ pha đó. Làm tương tự với mẫu vắc xin chuẩn.

Chú ý: Chuột có đáp ứng miễn dịch là trong huyết thanh có chứa kháng thể kháng HBsAg.

Tính phần trăm số chuột có đáp ứng miễn dịch với mỗi độ pha như sau:

$$\% \text{ chuột có đáp ứng} = \frac{N_i}{N} \times 100$$

Trong đó:

$N_i$  là số chuột có đáp ứng miễn dịch của một độ pha;

$N$  là số chuột gây nhiễm trên độ pha đó.

Sau khi tính phần trăm số chuột có đáp ứng miễn dịch, tính ED<sub>50</sub> (Liều vắc xin gây nhiễm 50 % chuột có đáp ứng miễn dịch) và công hiệu bằng chương trình Potency.

#### 15.44 MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH SỬ DỤNG TRONG KIỂM ĐỊNH VẮC XIN

##### **Giới thiệu chung**

Phương pháp miễn dịch là phương pháp dựa trên các liên kết đặc hiệu, thuận nghịch và không cộng hóa trị của kháng nguyên và kháng thể. Phương pháp này được sử dụng để phát hiện hoặc định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể có bản chất là protein, polysaccharid, virus, vi khuẩn, ADN hoặc ARN trong đó chủ yếu là protein. Sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể được phát hiện và định lượng bằng nhiều kỹ thuật.

Các kết quả của phương pháp miễn dịch phụ thuộc vào điều kiện thực nghiệm, bản chất và chất lượng của các hóa chất sử dụng. Do đó việc chuẩn hóa các thành phần của một thử nghiệm miễn dịch với chất chuẩn quốc tế là điều rất cần thiết. Hiện nay các hóa chất sử dụng cho phương pháp miễn dịch đã được thương mại hóa qua các bộ kit chuyên dụng. Trong mỗi bộ kit đã có đủ các thành phần cần thiết và hướng dẫn sử dụng đi kèm để định lượng, nhận dạng một loại kháng nguyên hoặc kháng thể nhất định. Mỗi loại kit đều có một giới hạn phát hiện, quy trình và tiêu chuẩn riêng. Do vậy, khi sử dụng kit cho mỗi thử nghiệm phải tuân thủ theo đúng hướng dẫn của kit để đảm bảo kết quả được chuẩn xác và có ý nghĩa.

Phương pháp miễn dịch có rất nhiều kỹ thuật khác nhau và sẽ cho ra các kết quả khác nhau (do mỗi kỹ thuật có một đơn vị tính riêng, tiêu chuẩn riêng...), vì thế muốn biết kết quả kiểm tra có đạt hay không, cần so sánh với tiêu chuẩn chấp nhận áp dụng cho từng kỹ thuật, từng đơn vị tính, không nên dùng kết quả của các kỹ thuật khác nhau để so sánh, đánh giá.

Hiện tại phương pháp miễn dịch chia thành 2 dạng: Dạng sử dụng kháng thể hoặc kháng nguyên có đánh dấu và không đánh dấu.

##### **Phương pháp sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể đánh dấu**

Có nhiều phương pháp miễn dịch đánh dấu khác nhau và được phân ra như sau:

Phương pháp miễn dịch phóng xạ, dùng đồng vị phóng xạ như I<sup>125</sup>. Viết tắt là RIA (Radio Immuno Assay), IRMA (Immuno Radiometric Assay).

Phương pháp miễn dịch gắn men (EIA - Enzyme Immuno Assay hay ELISA - Enzym Linked Immuno Sorbent Assay).

Phương pháp miễn dịch khác như: Miễn dịch huỳnh quang

(FIA - Fluoro Immuno Assay); phương pháp miễn dịch hóa phát quang (CLIA - Chemiluminescence Immuno Assay). Tuy nhiên trong kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế chủ yếu sử dụng phương pháp ELISA (EIA) trong thử nghiệm công hiệu, nhận dạng các vắc xin Viêm gan B, Viêm gan A, HPV (vắc xin phòng ung thư cổ tử cung), IPV (vắc xin bại liệt tiêm trong các vắc xin đơn và phối hợp 5 hoặc 6 thành phần); Nhận dạng, định lượng kháng nguyên của virus viêm não nhật bản; Thử nghiệm nhận dạng thành phần Hib trong vắc xin Hib cộng hợp uốn ván và Hib cộng hợp giải độc tổ bạch hầu (Vắc xin vi khuẩn); định lượng hàm lượng các chất tồn dư trong vắc xin có bản chất là protein: BSA, ovalbumin, gentamicin, neomycin.

##### **Phương pháp sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể không đánh dấu**

Phương pháp khuếch tán miễn dịch tự phát bao gồm:

Khuếch tán miễn dịch đơn (SRID hay còn viết là SRD - Single radial immunodiffusion).

Khuếch tán miễn dịch kép (DID - double immunodiffusion).

Phương pháp khuếch tán miễn dịch dưới ảnh hưởng của điện trường gồm:

Phương pháp điện di miễn dịch (IE - Immunoelectrophoretic method): Là sự kết hợp giữa 2 phương pháp điện di trên gel và khuếch tán miễn dịch.

Phương pháp điện di miễn dịch đối lưu (CIE - Crossed immunoelectrophoresis): Là phương pháp IE cải tiến.

Trong kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế chủ yếu sử dụng phương pháp SRD và DID. Phương pháp SRD thường sử dụng để nhận dạng, định lượng hàm lượng kháng nguyên HA, NA của virus cúm (thử nghiệm kiểm tra công hiệu, nhận dạng vắc xin cúm); Kiểm tra hàm lượng glycoprotein (kháng nguyên của virus dại) trong vắc xin dại hay thử nghiệm công hiệu vắc xin thương hàn Vi (vắc xin vi khuẩn)... Phương pháp DID chủ yếu chỉ sử dụng trong thử nghiệm nhận dạng một số vắc xin vi khuẩn như: Hib, thương hàn Vi, phế cầu...

Phương pháp IE và CIE chủ yếu sử dụng kiểm tra trong quá trình sản xuất (IPC-in process control) vắc xin dạng bán thành phẩm (bulk).

##### **Đánh giá kết quả**

##### **Tiêu chuẩn đánh giá**

Phương pháp định lượng có giá trị khi: Các kháng thể hoặc kháng nguyên của mẫu thử và mẫu chuẩn phải không có sự khác biệt đáng kể về bản chất và thành phần.

Phương pháp miễn dịch bị ảnh hưởng bởi các yếu tố gây nhiễu trong sản phẩm kiểm tra như: Protein tạp, các muối, chất bảo quản, tá dược (muối nhôm, MPL...)... đều có thể gây ảnh hưởng đến sự phân giải của protein kiểm tra. Do đó khi sử dụng phương pháp hóa miễn dịch đều phải thẩm định và chứng minh sự không ảnh hưởng của các chất gây nhiễu trong sản phẩm đến kết quả thử nghiệm.

Giới hạn định lượng của phương pháp phải nhỏ hơn giới hạn về tiêu chuẩn chấp nhận cho từng loại chỉ tiêu kiểm

tra. Ví dụ: Tiêu chuẩn về hàm lượng endotoxin cho vắc xin Gardasil (HPV) không được quá 10 EU/ml thì phương pháp sử dụng hoặc kit sử dụng phải có giới hạn phát hiện thấp hơn 10 EU/ml.

Mỗi phương pháp miễn dịch phải đưa ra được độ chính xác của phương pháp và sự thay đổi về kết quả kiểm tra giữa các lần phải đáp ứng được các yêu cầu (tiêu chuẩn) quy định cho từng loại mẫu theo chuyên luận riêng. Kết quả kiểm tra các mẫu sinh học thường phải nằm trong giới hạn GMT = 2SD.

Quá trình tiến hành thử nghiệm không được làm phát sinh lỗi hệ thống. Không nên có quá nhiều bước trung gian để tránh gây sai sót hệ thống.

#### **Phương pháp đánh giá**

Xác minh, đánh giá các tiêu chuẩn trên sẽ bao gồm các yếu tố sau:

Thử nghiệm phải được tiến hành ít nhất ba lần.

Thử nghiệm phải sử dụng ít nhất ba độ pha loãng khác nhau của mẫu kiểm tra và mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra phải được tiến hành song song trong cùng một điều kiện.

Việc bố trí thử nghiệm được phân bố ngẫu nhiên.

Thành phần, hàm lượng và bản chất của mẫu chuẩn phải tương đồng với mẫu kiểm tra. Ví dụ mẫu kiểm tra là dạng huyết thanh hay được kết hợp với thành phần khác thì mẫu chuẩn cũng phải được chuẩn bị để có thành phần tương tự. Trong thử nghiệm kiểm tra phải xác định cả tính đặc hiệu của chất phản ứng đánh dấu. Ví dụ trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng kháng nguyên HPV trong vắc xin Gardasil (có 4 typ: 6, 11, 16 và 18), nếu định lượng typ 6 gắn kháng thể đặc hiệu cho typ 6 thì vẫn phải kiểm tra sự đặc hiệu của kháng thể bằng cách nhỏ kháng nguyên khác typ (typ 11 hoặc 16 hoặc 18). Nếu đặc hiệu thì chỉ đúng typ mới cho phản ứng, khác typ không cho phản ứng.

#### **Thay thế thử nghiệm**

Thay thế thử nghiệm miễn dịch khi có yếu tố sau:

Sự kết hợp tối đa (không có sự thay đổi) được xác định; Các độ pha loãng đã bao quát được toàn bộ giới hạn phản ứng từ nồng độ có sự gắn kết tối đa đến không có sự gắn kết của cả mẫu thử và mẫu chuẩn.

#### **Tính toán thống kê**

Để tính toán kết quả, các đường cong phản ứng cho mẫu thử và mẫu chuẩn được tính toán theo các phương pháp mô tả trong Phụ lục 13.10 Phân tích thống kê các kết quả thử nghiệm sinh học.

Trường hợp thay thế thử nghiệm miễn dịch là khi kết quả thu được không có sự khác biệt đáng kể từ nồng độ cao đến nồng độ thấp của mẫu kiểm tra và mẫu chuẩn. Sự khác nhau có thể cho thấy sự ảnh hưởng của chất nền hoặc chất ức chế sự liên kết hoặc suy giảm sự nhận biết đánh dấu có chọn lọc. Ví dụ trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng endotoxin trong vắc xin HPV tiêu chuẩn không được quá 10 EU/ml, sử dụng bộ hóa chất chuẩn endotoxin có độ

nhạy là 0,0625 thì độ pha loãng tối đa cho mẫu này khoảng 160 lần. Kiểm tra mẫu từ độ pha gốc đến độ pha 160 lần mà kết quả thu được không có sự thay đổi, mẫu chứng dương đều cho kết quả âm tính thì có nghĩa là trong mẫu kiểm tra có chất gây nhiễu.

#### **15.45 XÁC ĐỊNH BSA TỒN DƯ TRONG VẮC XIN**

BSA (Bovine Serum Albumin) là một loại protein dưới dạng huyết thanh bào thai bò (FBS - Fetal Bovine Serum) hoặc huyết thanh bào thai bê (FSC - Fetal Calf Serum) được bổ sung trong quá trình nuôi cấy tế bào để sản xuất vắc xin. Theo Khuyến cáo của WHO, tất cả các dạng protein có nguồn gốc từ động vật nếu sử dụng trong sản xuất vắc xin đều phải được kiểm soát để hạn chế các phản ứng phụ.

Có thể sử dụng phương pháp điện di miễn dịch đối lưu hoặc các kit thương phẩm (hoặc tự gán) để xác định BSA tồn dư trong vắc xin.

#### **PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MIỄN DỊCH ĐỐI LƯU**

##### **Nguyên lý**

Điện di miễn dịch đối lưu là kỹ thuật dựa trên sự ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể xảy ra khi cho kháng nguyên và kháng thể ở nồng độ đủ để xảy ra phản ứng ngưng kết di chuyển trên gel agarose. Nếu kháng thể và kháng nguyên ngưng kết đặc hiệu sẽ cho cung kết tủa và ngược lại, sẽ không có cung kết tủa nếu kháng nguyên và kháng thể không ngưng kết đặc hiệu. Trong kỹ thuật này, dưới tác dụng của cường độ điện trường, kháng nguyên và kháng thể gặp nhau và kết hợp đặc hiệu với nhau nhanh hơn trên gel agarose.

##### **Thiết bị, dụng cụ**

Buồng điện di nằm ngang.

Tấm thủy tinh (85 × 85) mm.

Bàn cân bằng với dụng cụ đo giọt nước.

Ampe kế.

Dụng cụ thạch đường kính 3 mm.

Khay giữ ẩm.

Khay thủy tinh dùng để nhuộm và rửa tiêu bản.

Giấy Whatman No.1 và No.3.

Vải gạc lọc Agarose.

##### **Hóa chất, dung dịch thử**

Agarose.

Dung dịch đệm barbital 0,1 M pH 8,6.

Dung dịch natri clorid 0,85 % hoặc đệm PBS pH 7,2.

Dung dịch nhuộm màu Amido Black 10B 0,1 % hoặc dung dịch thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250.

Dung dịch tẩy màu: Dung dịch acid acetic 2 % hoặc hỗn hợp ethanol/acid acetic (gồm 100 ml ethanol, 70 ml acid acetic và nước cất vừa đủ 1000 ml).

Huyết thanh thô kháng BSA (Anti-Bovine Albumin antibody produced in rabbit) đặc hiệu.

Chứng dương (BSA) gồm 3 nồng độ: 0,005 %; 0,0005 % và 0,0001 %.

**Cách tiến hành**

**Chuẩn bị tiêu bản**

Hòa tan 1,5 g agarose trong 100 ml dung dịch đệm barbital 0,1 M, pH 8,6. Đun sôi nhẹ cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Lọc dung dịch trên bằng miếng vải gạc, tính lượng dung dịch vừa đủ, dùng pipet đổ thạch lên tấm thủy tinh (85 × 85) mm với thể tích khoảng (12 – 14) ml/l tấm kính. Để 30 min cho agarose đông cứng.

Dùng dụng cụ đục thạch thành 2 dãy và số lượng giếng tùy theo mẫu kiểm tra. Khoảng cách giữa các giếng khoảng 10 mm.

**Cho mẫu vào tiêu bản**

Hút 16 µl đến 18 µl mẫu vắc xin cần kiểm tra cho vào dãy lỗ cột thứ nhất.

Dãy lỗ cột thứ 2 đối diện cho huyết thanh thử kháng BSA với lượng tương đương.

Chứng dương cho tương tự.

**Chạy điện di**

Đặt tiêu bản đã có vắc xin cần kiểm tra và huyết thanh thử kháng BSA trên vào buồng điện di nằm ngang có chứa dung dịch chạy điện di (dung dịch đệm barbital 0,1 M pH 8,6). Dây có vắc xin nằm về phía cực dương, dây có huyết thanh thử kháng BSA nằm về phía cực âm.

Dùng 2 miếng giấy Whatman thấm nối tiếp giữa bề mặt tiêu bản với dung dịch chạy điện di ở 2 cạnh bên của tiêu bản.

Cho dòng điện chạy vào với dòng điện có hiệu điện thế là 125 V (có thể 140 hoặc 170 V) và cường độ không vượt quá 90 mA. Thời gian chạy từ 30 - 60 min.

**Rửa và nhuộm tiêu bản**

Sau khi kết thúc chạy điện di, tiêu bản được lấy ra và ngâm trong dung dịch PBS pH 7,2 hoặc dung dịch natri clorid 0,85 % từ 16 h đến 24 h. Trong giai đoạn này, nên thay dung dịch 3 lần.

Rửa tiêu bản lại bằng nước cất và ngâm tiêu bản trong nước cất khoảng 30 min.

Đặt tiêu bản vào khay giữ ẩm.

Làm khô tiêu bản: Làm khô tự nhiên hoặc có thể bằng thổi hơi.

Rửa lại tiêu bản bằng nước cất và đặt tiêu bản vào khay có chứa dung dịch nhuộm Amido Black từ 5 đến 10 min.

Đổ thuốc nhuộm đi và tẩy màu tiêu bản bằng dung dịch acid acetic 2 %. Cứ như vậy, nhuộm và tẩy màu 3 lần.

Nếu dùng thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue thì cũng nhuộm và tẩy màu tương tự nhưng dùng dung dịch tẩy màu là hỗn hợp ethanol/acid acetic.

Để tiêu bản khô tự nhiên.

Đề tiêu bản khô tự nhiên.

**Đọc kết quả**

Trên tiêu bản, giữa hai dãy giếng cột 1 và 2 sẽ xuất hiện đường tua màu xanh. Đường tua to và đậm tỷ lệ thuận với lượng BSA có trong mẫu thử.

Giếng mẫu vắc xin phải không tạo đường tua với huyết thanh thử kháng BSA đặc hiệu hoặc đường tua rất nhạt,

nhỏ hơn đường tua chuẩn có nồng độ 0,0001 % bovine albumin. Điều này được cho là lượng BSA trong vắc xin thấp hơn 50 ng trong 1 liều vắc xin.

Giếng chứng dương có nồng độ có đường tua từ đậm đến rất nhạt (vết) theo nồng độ tương ứng 0,005 %; 0,0005 % và 0,0001 % BSA.

**PHƯƠNG PHÁP DÙNG KIT THƯƠNG PHẨM**

*Yêu cầu thử nghiệm:* Phải tuân thủ đầy đủ các bước cơ bản của quy trình thực hiện theo hướng dẫn sử dụng, đánh giá thử nghiệm của từng bộ kit.

Mẫu kiểm tra cần được lặp lại ít nhất 2 giếng/độ pha.

*Tính kết quả:* Theo phần mềm chuyên dụng.

*Ghi chú:* Nếu hàm lượng BSA trong mẫu cần kiểm tra tính được lớn hơn giới hạn phát hiện trên của kit thì phải tiếp tục pha loãng tiếp mẫu và làm lại thử nghiệm. Trường hợp pha loãng mẫu quá nhiều cũng dẫn tới kết quả âm tính hoặc cho giá trị nhỏ hơn giới hạn phát hiện của kit, cần phải tính toán lại độ pha (thậm chí không pha loãng) mẫu rồi làm lại thử nghiệm.

**TIÊU CHUẨN CHẤP THUẬN**

Hàm lượng BSA tồn dư trong mẫu phải nằm trong giới hạn cho phép đối với từng vắc xin hoặc nằm trong giới hạn nhà sản xuất đăng ký.

**15.46 CÁC KỸ THUẬT ELISA (PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH GẮN MEN, PHƯƠNG PHÁP ELISA)**

**Nguyên tắc**

*Nguyên tắc chung:* Các kỹ thuật ELISA đôi khi còn được gọi là ELA rất đa dạng và đặc điểm chung là dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzym. Khi cho thêm cơ chất thích hợp (thường là nitrophenol phosphat, TMB, ABTS) enzym sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu hoặc tín hiệu của chất phát quang chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên và thông qua đậm độ màu và cường độ sáng phát ra mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện. Các kỹ thuật ELISA có độ nhạy khá cao và đơn giản, cho phép ta xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở một nồng độ rất thấp (khoảng 0,1 ng/ml). So với kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA) thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo độ chính xác như nhau. ELISA được dùng để phát hiện và định lượng nhiều tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, nấm, kí sinh và các chất có bản chất là peptid, protein, kháng thể, hormon... và được sử dụng rất nhiều trong kiểm tra công hiệu, nhận dạng vắc xin và sinh phẩm; định lượng hàm lượng các chất tồn dư trong vắc xin có bản chất là protein như: BSA, ovalbumin, gentamicin, neomycin...

Kỹ thuật ELISA gồm ba thành phần tham gia phản ứng là kháng nguyên, kháng thể và chất tạo màu, phản ứng cần có hoạt tính xúc tác của enzym; thực hiện qua hai bước:

**Phản ứng miễn dịch học:** Là sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể.

**Phản ứng hóa học:** Thông qua hoạt tính xúc tác của enzym làm giải phóng oxy nguyên tử (oxygen) từ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> để oxy hóa cơ chất chỉ thị màu, do đó làm thay đổi màu của hỗn hợp trong dung dịch thử nghiệm.

*Nguyên tắc thực hiện thử nghiệm:*

Sử dụng kit ELISA chuyên dụng: Phải tuân thủ đầy đủ các bước cơ bản của quy trình theo hướng dẫn sử dụng, đánh giá thử nghiệm của từng bộ kit;

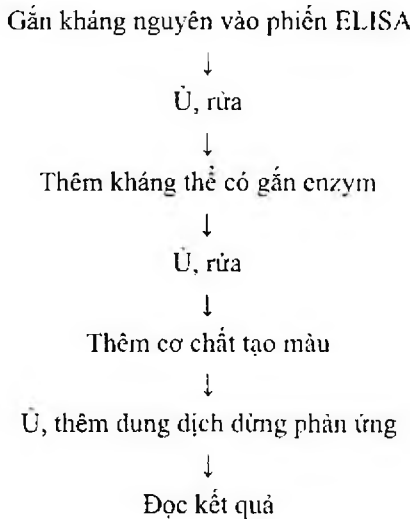
Quy trình ELISA tự gắn kit: Theo Quy trình thao tác chuẩn. Các bước cơ bản bao gồm: Pha hóa chất (kháng thể hoặc kháng nguyên) để gắn phiến; Nhỏ lên phiến chuyên dụng; Ủ phiến; Xử lý phiến sau gắn rồi cũng pha mẫu và làm các bước tương tự như quy trình của kit thương mại. Tuy nhiên kit tự gắn thì bước rửa nên rửa bằng tay để hạn chế sự bong tróc các kháng nguyên/kháng thể đã gắn trên giếng.

Tính kết quả: Theo phần mềm chuyên dụng được công nhận.

**Các kỹ thuật ELISA**

**ELISA trực tiếp**

Đây là dạng đơn giản nhất trong các kỹ thuật ELISA. Trong đó, kháng nguyên cần phát hiện sẽ được gắn trực tiếp lên bề mặt phiến và sẽ được phát hiện bằng một kháng thể duy nhất (kháng thể này đã được gắn enzym). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.1. Chi tiết xem QUY TRÌNH I.



Sơ đồ 15.46.1 - Các bước thực hiện trong kỹ thuật ELISA trực tiếp

*Ưu điểm:* Đơn giản (chỉ cần kháng thể gắn enzym, cơ chất và dung dịch dừng phản ứng); Nhanh (chỉ vài bước đã có kết quả); Hạn chế xảy ra phản ứng chéo vì chỉ sử dụng một loại kháng thể duy nhất.

*Nhược điểm:*

Độ đặc hiệu bị giới hạn vì thông thường kháng nguyên có ít nhất là 2 epitope (vị trí trình diện kháng nguyên) mà phương pháp này chỉ sử dụng một kháng thể gắn vào một epitope.

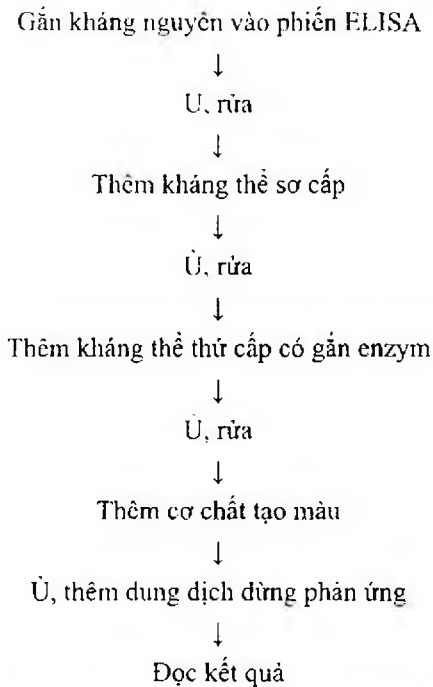
Phản ứng miễn dịch của kháng thể sơ cấp bị hạn chế bởi có gắn với enzym đánh dấu hoặc các đuôi.

Phai đánh dấu cho từng kháng thể chuyên biệt với từng đối tượng nên mất thời gian và tốn kém... Không phù hợp cho các vắc xin đa týp.

Từ những ưu và nhược điểm trên nên phương pháp này thường được dùng để phát hiện nhanh kháng nguyên trong mẫu xét nghiệm và rất ít được lựa chọn trong việc định lượng.

**ELISA gián tiếp**

Trong kỹ thuật này kháng thể kết hợp kháng nguyên không được gắn enzym mà nó là mục tiêu gắn đặc hiệu của một kháng thể khác (kháng thể này mới là kháng thể được gắn với enzym). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.2. Chi tiết xem QUY TRÌNH II.



Sơ đồ 15.46.2 - Tiến trình thực hiện phản ứng ELISA gián tiếp

*Ưu điểm:*

Kháng thể gắn enzym có thể sử dụng để đánh dấu cho nhiều loại kháng nguyên (nhất là các vắc xin đa týp) nên tiện lợi và kinh tế hơn, dễ dàng thương mại hóa.

Phản ứng miễn dịch của kháng thể sơ cấp không bị hạn chế bởi nó không gắn với enzym đánh dấu hoặc các đuôi. Độ nhạy/độ đặc hiệu được tăng lên vì mỗi kháng thể sơ cấp có chứa một số epitope có thể gắn với kháng thể thứ cấp được đánh dấu enzym.

*Nhược điểm:*

Độ đặc hiệu của từng kháng thể là khác nhau. Điều này dẫn đến kết quả khác nhau giữa các thử nghiệm và do đó cần phải thử nghiệm với nhiều kháng thể khác nhau để kết quả có thể tin tưởng được.

Phản ứng chéo có thể diễn ra với kháng thể thứ cấp tạo phản ứng không đặc hiệu (đương tính giả cao).

Quy trình kéo dài thêm 1 bước ù.

Từ những ưu-nhược điểm trên nên phương pháp này thường được dùng để phát hiện (nhanh) kháng nguyên trong mẫu xét nghiệm và rất ít được lựa chọn trong việc định lượng. Nếu định lượng nên sử dụng ELISA sandwich.

**ELISA Sandwich**

Đây là một dạng ELISA được sử dụng phổ biến nhất trong thực tiễn do nó cho phản ứng mạnh và nhạy. Được gọi là “sandwich” là do kết quả thử nghiệm được đánh giá thông qua sự kết hợp của hai loại kháng thể là kháng thể bắt giữ (capture antibodies) và kháng thể phát hiện (detection antibodies). Kỹ thuật này cũng được phân làm hai dạng là ELISA sandwich trực tiếp (DAS-ELISA) và ELISA sandwich gián tiếp (TAS-ELISA).

**1) ELISA Sandwich trực tiếp (DAS-ELISA)**

DAS ELISA gồm sự dính thụ động của kháng thể vào pha rắn (đáy giếng). Sau ù, rửa, các giếng được bổ sung dung dịch bão hòa phiến (blocking buffer hay saturation) thích hợp để phủ kín các vị trí còn trống trên giếng sau khi gắn kháng thể. Dung dịch bão hòa phiến thường là PBS 10 mM - 1 % BSA - 0,05 % tween 20; hoặc PBS 10 mM - 1 % Casein - 0,05 % tween 20; hoặc PBS 10 mM - 0,025% Tween 20 - 2 % skim milk; hoặc PBS 10 mM - 0,05 % Tween 20 - 2 % gelatin cá. Những thành phần của dung dịch bão hòa phiến không được chứa bất kỳ kháng nguyên nào có thể kết hợp với kháng thể bắt giữ. Sau đó, cho mẫu thử chứa kháng nguyên vào và để phản ứng kháng nguyên-kháng thể xảy ra. Những kháng nguyên được pha loãng trong dung dịch bão hòa phiến nhằm ngăn sự dính không chuyên biệt của chúng vào pha rắn. Sau khi ù và rửa, chỉ còn phức hợp kháng nguyên - kháng thể dính vào pha rắn. Kháng thể bắt giữ có gắn enzym sau đó được thêm vào sẽ kết hợp trực tiếp với kháng nguyên đích. Kháng thể thứ hai này có thể giống kháng thể thứ nhất (kháng thể phát hiện) hoặc khác về nguồn động vật hay loài động vật sản xuất kháng thể. Sau khi ù, rửa, thêm cơ chất vào và đọc kết quả trên máy đo quang phổ.

*Chú ý:* Nếu sử dụng kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện giống nhau có thể dẫn đến vấn đề nếu có sự giới hạn vị trí kết hợp sẵn có để phát hiện. Mọi quan hệ về kích thước và vị trí không gian của các epitope cũng có ảnh hưởng đến thử nghiệm. Chi tiết xem QUY TRÌNH III A và III B.

Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.3.

Gắn kháng thể thứ I vào phiến ELISA

↓  
Ù, rửa

↓  
Thêm kháng nguyên

↓  
Ù, rửa

↓  
Thêm kháng thể có gắn enzym

↓  
Ù, rửa

↓  
Thêm cơ chất tạo màu

↓  
Ù, thêm dung dịch dừng phản ứng

↓  
Đọc kết quả

*Sơ đồ 15.46.3 - Các bước thực hiện ELISA Sandwich trực tiếp*  
Trong sơ đồ 15.46.3, có thể thay kháng thể bằng kháng nguyên, lúc đó sẽ sử dụng kháng thể gắn enzym. Biotine được sử dụng như một kháng thể chống lại kháng nguyên đích. Lúc đó để phát hiện Biotin thường dùng streptavidin hoặc avidin gắn enzym tạo phức hợp: Kháng thể-Biotinylate-Streptavidin-Enzym. Phương pháp này được áp dụng trong sản xuất các kit chẩn đoán HIV, HCV... Một số loại kit thương phẩm để rút ngắn thời gian, sau bước nhỏ kháng nguyên sẽ nhỏ luôn kháng thể có gắn enzym vào rồi ù. Như vậy sẽ giảm bớt được một bước ù. Phương pháp này được ứng dụng trong sản xuất các kit thương phẩm để định lượng BSA, Ovalbumin tồn dư trong vắc xin hay trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng HBsAg trong các vắc xin viêm gan B (thử nghiệm kiểm tra công hiệu, nhận dạng *in vitro*).

*Ưu điểm:* Có thể phát hiện sự khác biệt nhỏ giữa các kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể bắt và kháng thể phát hiện khác nhau.

*Nhược điểm:* Vì sử dụng một kháng thể gắn kết với enzym nên hệ thống bị giới hạn về tính chuyên biệt và những thành phần gắn liền với kháng thể chuyên biệt. Điều này giới hạn sự linh hoạt của phương pháp, ví dụ như mỗi kháng thể được sử dụng phải được đánh dấu riêng (cho những kháng nguyên khác nhau). Theo cách này, DAS-ELISA bị giới hạn về sự chuẩn bị kháng thể. Hệ thống cũng bị giới hạn ở chỗ kháng nguyên phải có ít nhất hai epitope vì cả hai kháng thể bắt giữ và phát hiện đều kết hợp trực tiếp với kháng nguyên.

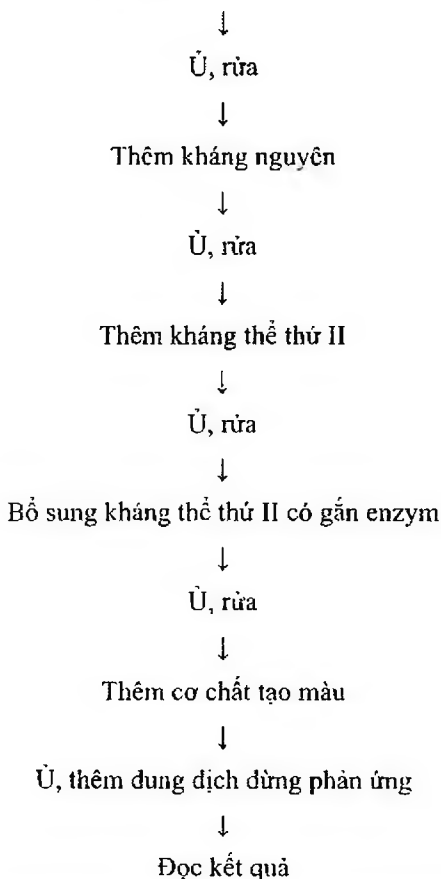
Kháng thể bắt giữ trên pha rắn và kháng thể phát hiện có thể chống lại những epitope khác nhau trên phức hợp kháng nguyên. Do đó, thuận lợi khi khảo sát sự khác biệt nhỏ giữa những kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể phát hiện và kháng thể bắt giữ khác nhau.

2) *ELISA Sandwich gián tiếp*: Ứng dụng trong thử nghiệm kiểm tra vắc xin đa týp như vắc xin phòng papillomavirus (Gardasil, Cervarix), IPV (bại liệt bất hoạt). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.4.

Biotin được sử dụng như một kháng kháng thể thứ II. Kháng kháng thể thứ hai này có vai trò bắt giữ không cho kháng thể thứ II có gắn enzym bị rửa trôi. Để phát hiện các protein được biotinylated người ta thường sử dụng streptavidin hoặc avidin là hai loại protein có phản ứng tạo ái lực cao với các phân tử protein được biotinylated hóa. Enzym HRP thường được gắn cộng hợp với streptavidin hoặc avidin. Việc sử dụng biotin như một kháng kháng thể thứ II chung cho các vắc xin/chủng virus, vi khuẩn đa týp có nhiều lợi ích là giảm kinh phí và thời gian cho việc tạo liên kết giữa enzym với từng kháng thể II chuyên biệt. Ngoài ra phương pháp này chuyên biệt hơn ELISA sanwich trực tiếp do kháng thể được gắn enzym không phản ứng với kháng thể bắt kháng nguyên.

Phương pháp này có ưu điểm hơn hẳn những phương pháp khác nên thường được chọn để định tính các týp trong các vắc xin đa giá hoặc bệnh virus, vi khuẩn đang nghiên cứu (chưa rõ týp nào).

Gắn kháng thể thứ I vào phiến ELISA

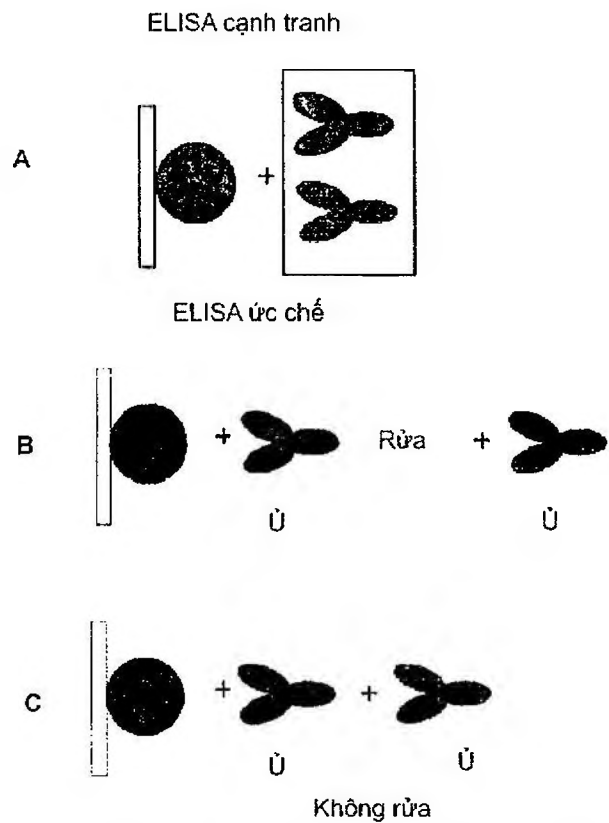


Sơ đồ 15.46.4 - Các bước thực hiện ELISA Sandwich gián tiếp

*ELISA ức chế hoặc cạnh tranh*

ELISA cạnh tranh (competition ELISA) là thử nghiệm ELISA, trong đó hai chất tham gia phản ứng cùng ái lực bắt cặp với chất thứ ba. Trong phép thử ELISA cạnh tranh (phản ứng cạnh tranh) thì hai chất cạnh tranh phải được đưa vào đồng thời.

Sự khác biệt giữa ức chế và cạnh tranh: Cả hai phản ứng đều có sự tham gia của hai kháng thể phản ứng với kháng nguyên. Nếu một kháng thể được ủ trước phản ứng đó được gọi là ức chế (blocking/ inhibition assays). Phản ứng cạnh tranh mang nghĩa cả hai kháng thể được thêm vào đồng thời với nhau (Hình 15.46.1).



Hình 15.46.1 - Sự khác biệt giữa ức chế và cạnh tranh

1) *ELISA cạnh tranh trực tiếp (Direct C-Elisa) kiểm tra kháng nguyên*

Trong hệ thống trực tiếp, lượng kháng nguyên trên bề mặt phiến và lượng kháng thể gắn enzym đã được chuẩn độ để tối ưu. Kháng nguyên và kháng thể gắn enzym được thêm vào phiến cùng một lúc để tạo ưu thế cạnh tranh.

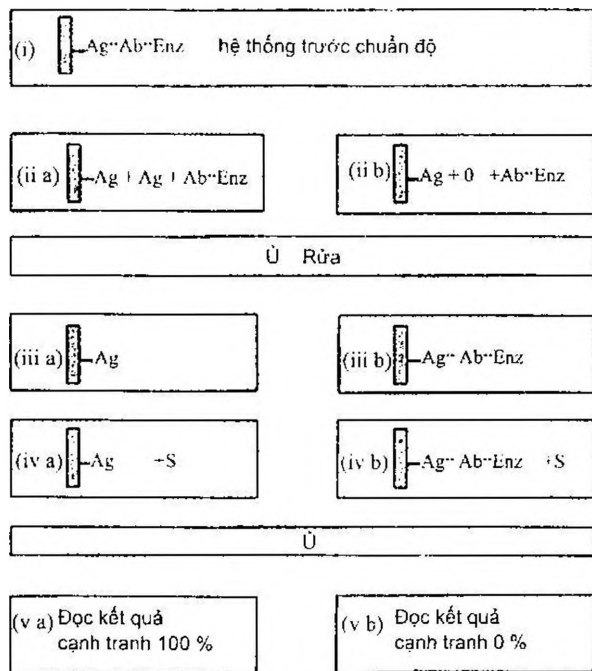
Nếu kháng nguyên tương tự hoặc cùng loại như kháng nguyên đã được gắn trên phiến thì kháng thể gắn enzym sẽ gắn lên kháng nguyên này. Khi nồng độ của kháng nguyên cạnh tranh cao sẽ ngăn cản bất kỳ sự kết hợp của kháng thể gắn enzym với kháng nguyên trên bề mặt phiến (cạnh tranh 100%). Nếu nồng độ kháng nguyên cạnh tranh giảm (ví dụ do pha loãng) sự cạnh tranh sẽ giảm. Như vậy nồng độ kháng nguyên cạnh tranh càng cao thì độ hấp thu màu càng giảm.

Kháng nguyên cạnh tranh có thể được thêm trực tiếp vào đĩa nếu nó được pha loãng trong dung dịch bão hòa phiên trước khi thêm kháng thể gắn enzym.

Mức độ cạnh tranh theo thời gian phụ thuộc vào môi trường quan của nồng độ phân tử cần kiểm tra và kháng nguyên trên bề mặt phiên (và mức độ tương đồng của kháng nguyên).

Sau khi ủ và rửa, lượng kháng thể có đánh dấu được định lượng sau khi thêm cơ chất. Khi không có kháng nguyên trong mẫu kiểm tra hay không có sự tương đồng của kháng nguyên thì không có sự gắn kết với kháng thể được đánh dấu và không có sự cạnh tranh với kháng nguyên này. Kết quả là mẫu có chứa kháng nguyên thì sự cạnh tranh làm giảm cường độ màu còn đối chứng âm thì không.

ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng nguyên được mô tả ở Sơ đồ 15.46.5.



Ag: kháng nguyên; Ab: kháng thể; \*\*Enz: Enzym gắn cộng hợp; S: cơ chất

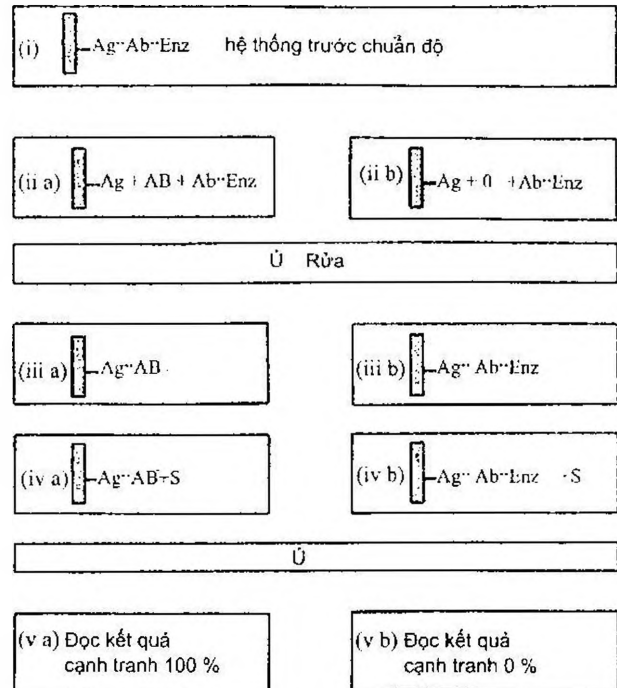
Sơ đồ 15.46.5 - ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng nguyên

2) ELISA cạnh tranh trực tiếp (Direct C-Elisa) kiểm tra kháng thể

Direct C-ELISA kiểm tra kháng thể tương tự với Direct C-ELISA kiểm tra kháng nguyên. Sự cạnh tranh ở đây là giữa kháng thể trong mẫu và kháng thể được đánh dấu với các vị trí trên kháng nguyên gắn sẵn trên phiên. Mẫu và kháng thể đánh dấu được trộn với nhau trước khi thêm vào phiên.

Phương pháp này được ứng dụng trong sản xuất các kit thương phẩm định lượng hàm lượng kháng thể của vi rút viêm gan A, viêm gan B trong huyết thanh. Sử dụng nhiều trong kiểm tra công hiệu vắc xin viêm gan A, B theo phương pháp *in vivo*.

Direct C-ELISA kiểm tra kháng thể được mô tả chi tiết ở sơ đồ 15.46.6.



Ag: kháng nguyên; Ab: kháng thể; AB: kháng thể khác loại hoặc khác nguồn gốc với Ab; \*\*Enz: Enzym gắn cộng hợp; S: cơ chất

Sơ đồ 15.46.6 - ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng thể

3) ELISA cạnh tranh gián tiếp (Indirect C-ELISA)

Nguyên lý: Đầu tiên gắn một lượng kháng nguyên trùng với kháng nguyên cần kiểm tra lên phiên. Sau đó thêm kháng nguyên cần kiểm tra (pha ra một số nồng độ) và kháng thể đặc hiệu. Kháng nguyên cần kiểm tra sẽ phản ứng cạnh tranh với kháng nguyên đã gắn trên phiên. Sau đó thêm kháng thể thứ hai có gắn enzym, ủ, rửa và thêm cơ chất. Thêm dung dịch dừng phản ứng vào và đọc kết quả OD. Lúc đó giá trị OD sẽ tỷ lệ nghịch với hàm lượng kháng nguyên có trong mẫu tức mẫu có nồng độ kháng nguyên cao sẽ cho giá trị OD thấp và ngược lại vì thường thì phản ứng giữa kháng nguyên tự do với kháng thể xảy ra trước rồi mới đến phản ứng giữa kháng nguyên gắn bản với kháng thể.

Phương pháp này được áp dụng trong quy trình xác định công hiệu thành phần HBsAg của vắc xin viêm gan A-B phối hợp; Một số kit thương phẩm trong định lượng hàm lượng kháng sinh tồn dư trong vắc xin như gentamicin, neomycin...



**HƯỚNG DẪN XỬ TRÍ CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP TRONG THỬ NGHIỆM ELISA (xem Bảng 15.46.1)**

*Bảng 15.46.1 - Các vấn đề thường gặp, nguyên nhân và hướng dẫn xử trí*

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
1	Tín hiệu nền cao hoặc quá cao (đương tình giả)	Rửa phiến chưa đạt	- Xem lại bước rửa. - Bổ sung chất tẩy rửa (Tween 20 hoặc Triton X-100) vào đệm rửa; - Tăng số lần rửa; - Thêm 5 min để ngâm giữa các lần rửa. - Thêm các protein bảo hòa vào dung dịch rửa.
		Hàm lượng enzym cộng hợp quá cao	Kiểm tra lại khâu pha loãng, chuẩn định lại nếu cần
		Giai đoạn bão hòa phiến chưa đủ	Tăng hàm lượng protein bảo hòa; Thay loại protein bảo hòa khác; Tăng thời gian bão hòa.
		Thời gian ủ quá lâu	Giảm thời gian ủ
		Có chất gây nhiễu trong mẫu kiểm tra	- Thêm mẫu chứng (control) - Tiến hành thử nghiệm thu hồi (recovery assay) để xác định mức độ ảnh hưởng của yếu tố gây nhiễu. - Thay phương pháp khác phù hợp hơn nếu cần (phương pháp <i>in vivo</i> ...)
		Các đệm sử dụng bị nhiễm (đệm gắn phiến, đệm bão hòa, đệm rửa và đệm pha loãng...)	Pha lại các đệm
Giấy dán phiến hoặc các hóa chất sử dụng bị nhiễm	- Sử dụng giấy dán phiến riêng biệt ở từng bước ủ; - Kiểm tra lại hóa chất và pha lại hoặc thay loại đảm bảo chất lượng.		
2	Không có tín hiệu hoặc tín hiệu quá thấp	Các hóa chất thêm vào không đúng với yêu cầu hoặc pha sai	- Nhắc lại thử nghiệm; - Tính toán lại và pha mới các hóa chất (các đệm, chất chuẩn, mẫu) sử dụng trong thử nghiệm.
		Enzym bị nhiễm chất ức chế (azid của HRP hay phosphat của PA)	Pha lại hóa chất
		Kháng thể sử dụng không đủ lượng	- Tăng hàm lượng; - Kiểm tra lại chuẩn; - Sử dụng mẫu mới.
		Kháng thể gắn phiến (hoặc chất phân tích) gắn lên quá ít hoặc không gắn lên phiến	- Kiểm tra lại điều kiện chuẩn/ phù hợp cho gắn phiến; - Tăng hàm lượng kháng thể/ chất phân tích khi gắn phiến; - Pha kháng thể/ chất phân tích trong đệm phosphat để đảm bảo không bị nhiễm protein tạp; - Thay đổi loại phiến gắn tốt hơn; - Thử sử dụng các phiến gắn dạng liên kết cộng hóa trị. - Tăng thời gian gắn phiến.
		Các đệm bị nhiễm	Pha lại
		Mẫu kiểm tra hoặc chuẩn có chất ức chế (các tá chất $Al^{3+}$ , ion kim loại nặng,...)	- Xử lý chất gây nhiễu bằng phương pháp phù hợp; - Thay đổi phương pháp khác ( <i>in vivo</i> ) hoặc một phương pháp hóa miễn dịch phù hợp hơn.
		Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần	Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.
		Thời gian ủ cơ chất không đủ	Tăng thời gian ủ cơ chất
		Phiến sau gắn bảo quản bị hỏng	- Gắn lại; - Ngâm phiến trong dung dịch đường sucrose 2 % từ 5 min đến 10 min trước khi làm khô phiến.
Nhiệt độ ủ không đảm bảo	- Các hóa chất trước khi làm phải được đưa về nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ủ trước khi thêm vào giếng. - Sử dụng các thiết bị kiểm soát nhiệt độ ủ chuyên dụng trong các bước ủ (máy ủ phiến; tủ ấm, tủ lạnh, tủ mát).		

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
3	Đường chuẩn lên nhưng lại có sự sai khác giữa các điểm (các độ pha cho kết quả không tuyến tính hoặc không tạo độ tuyến tính)	<p>Nồng độ enzym cộng hợp không đủ</p> <p>Kháng thể gắn phiến hoặc chất phân tích gắn lên không đều</p> <p>Kháng thể phát hiện không đủ</p> <p>Thời gian cho enzym phân hủy cơ chất không đủ</p> <p>Quy trình làm bị sai</p> <p>Tính và xây dựng đường chuẩn của chuẩn sai</p>	<p>Kiểm tra lại cách pha, chuẩn định lại nếu cần</p> <p>- Pha kháng thể/chất phân tích trong đệm phosphat để đảm bảo không bị nhiễm protein tạp;</p> <p>- Thay đổi loại phiến gắn tốt hơn.</p> <p>Kiểm tra lại cách pha, chuẩn định lại nếu cần</p> <p>Tăng thời gian ủ.</p> <p>Kiểm tra lại và chuẩn thức hóa lại.</p> <p>Tính lại và dựng đường chuẩn mới.</p>
4	Sai số về giá trị OD của các giếng lặp lại quá lớn	<p>Rửa phiến chưa đạt</p> <p>Lớp kháng thể (hoặc chất phân tích) gắn không đồng đều do quy trình làm bị lỗi hoặc phiến gắn không tốt</p> <p>Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần</p> <p>Các đệm sử dụng bị nhiễm</p>	<p>- Xem lại quy trình rửa.</p> <p>- Nếu rửa bằng máy thì kiểm tra lại hệ thống rửa (thông rửa các đường ống hút/nhả);</p> <p>- Thêm 5 min để ngâm giữa các lần rửa.</p> <p>- Pha lại kháng thể gắn trong đệm không lẫn protein tạp;</p> <p>- Kiểm tra các đệm pha gắn phiến tại các pH khác nhau;</p> <p>- Kiểm tra lại thể tích, thời gian, phương pháp gắn; bão hòa của các hóa chất sử dụng đã phù hợp chưa.</p> <p>- Chọn thời gian ủ phiến gắn qua đêm;</p> <p>- Tăng thời gian bão hòa phiến;</p> <p>- Sử dụng các phiến, dụng cụ làm ELISA chuyên dụng.</p> <p>- Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.</p> <p>Pha lại.</p>
5	Độ lặp lại kết quả giữa các lần làm thử nghiệm quá thấp	<p>Rửa phiến chưa đạt</p> <p>Thay đổi trong nhiệt độ ủ</p> <p>Do thay đổi quy trình</p> <p>Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần</p> <p>Tính toán sai đường cong chuẩn</p>	<p>- Xem lại quy trình rửa.</p> <p>- Nếu rửa bằng máy thì kiểm tra lại hệ thống rửa (thông rửa các đường ống hút/nhả);</p> <p>- Ngâm thêm 5 min giữa các lần rửa.</p> <p>- Các hóa chất trước khi làm phải được đưa về nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ủ trước khi thêm vào giếng.</p> <p>- Sử dụng các thiết bị kiểm soát nhiệt độ ủ chuyên dụng trong các bước ủ (máy ủ phiến; tủ ấm, tủ lạnh, tủ mát).</p> <p>Đảm bảo tuân thủ theo đúng quy trình chuẩn</p> <p>Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.</p> <p>- Tính lại;</p> <p>- Xây dựng đường chuẩn mới;</p> <p>- Sử dụng mẫu chứng nội bộ (internal control) để kiểm tra lại quy trình và chất chuẩn</p>
6	Không có tín hiệu ở những mẫu mong đợi nhưng chuẩn vẫn tốt	<p>Chất phân tích không có trong mẫu; hoặc hàm lượng quá thấp hoặc có chất ức chế hoặc mẫu phân tích và chuẩn không tương thích. Hoặc chất nền của mẫu làm che đi sự phát hiện.</p>	<p>- Kiểm tra lại sự phù hợp của chuẩn và mẫu;</p> <p>- Tính lại hàm lượng chất phân tích trong mẫu và pha lại;</p> <p>- Kiểm soát kỹ lại quy trình và lặp lại thử nghiệm ;</p> <p>- Tìm và xử lý chất ức chế;</p> <p>- Thay đổi phương pháp khác.</p> <p>- Xem lại “recovery assay” để xác định yếu tố che phủ.</p>

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
7	Không có sự thay đổi về kết quả (OD không thay đổi giữa các độ pha)	Hàm lượng chất phân tích quá cao Hàm lượng chất gây nhiễu quá cao	Pha lại mẫu và làm lại. Tính toán và pha lại.
8	Màu lên nhưng đọc bị thấp	Chọn sai bước sóng	- Kiểm tra lại dải bước sóng tối đa phù hợp với từng loại cơ chất sử dụng (*). - Kiểm tra lại filter đọc
9	Kết quả bị ngược hoặc sai	Độc quá thời gian quy định Độc sai bước sóng Ủ cơ chất quá lâu	- Làm lại và kiểm tra lại thời gian đọc phù hợp - Kiểm tra lại dải bước sóng tối đa phù hợp với từng loại cơ chất sử dụng (*). - Làm lại và kiểm tra lại thời gian ủ phù hợp - Kiểm tra lại cơ chất và thời gian ủ.

(\*): Các loại cơ chất và bước sóng phù hợp:

Cơ chất	pNPP (p-nitrophenol phosphat)	BluePhos/BCIP	ABTS (acid 2,2-Azino-di (3-ethyl-benzathiazolin) sulphonic)	SureBlue/TMB (3,5,3',5'-Tetramethyl benzidin)	SureBlue Reserve™
Enzym	AP (Alkaline-phosphat)	AP	HRP (Horseradish Peroxidase)	HRP	HRP
Màu trước khi cho dung dịch dừng phản ứng	Vàng	Xanh	Xanh lá cây	Xanh	Xanh
Bước sóng hấp thụ tối đa trước khi cho dung dịch dừng phản ứng	(405 - 410) nm	(595 - 650) nm	(405 - 410) nm	650 nm	650 nm
Hóa chất dừng phản ứng	5 % EDTA	Dung dịch BluePhos STOP	Dung dịch ABTS STOP	Dung dịch TMB STOP	Dung dịch TMB STOP
Màu sau khi cho dung dịch dừng phản ứng	Vàng	Xanh tím	Xanh lá cây	Vàng	Vàng
Bước sóng hấp thụ tối đa sau khi cho dung dịch dừng phản ứng	(405 - 410) nm	(595 - 650) nm	(405 - 410) nm	450 nm	450 nm

Ngoài ra để đảm bảo kết quả ELISA được chuẩn xác và ít bị nhiễu thì cần phải đặc biệt chú ý đến các vấn đề về dụng cụ, thiết bị, thao tác trong thử nghiệm.

#### **Yêu cầu đối với dụng cụ, thiết bị sử dụng trong thử nghiệm ELISA**

Dàn máy ELISA phải được hiệu chuẩn, bảo dưỡng định kỳ. Dụng cụ làm ELISA có rất nhiều, trong đó đặc biệt chú ý là Pipetman (các loại đơn và đa kênh) phải được hiệu chuẩn định kỳ. Cách hiệu chuẩn như sau: Mỗi loại pipetman, chọn 3 khoảng thể tích để hiệu chuẩn (thấp nhất, ở giữa và cao nhất), ví dụ pipet loại (10 - 100) µl thì sẽ chọn thể tích để chuẩn định ở 10 µl, 50 µl và 100 µl. Tại mỗi thể tích sẽ đo 10 lần rồi tính độ lệch chuẩn CV (%). Tiêu chuẩn cho

pipet được phép sử dụng làm ELISA: tại độ tin cậy 95 %, CV < (2 - 3) %. Ngoài khoảng này không được phép sử dụng. Với pipet đa kênh việc hiệu chuẩn cũng tiến hành tương tự trên từng kênh. Pipet đa kênh chỉ được sử dụng khi tất cả các kênh đều đạt yêu cầu về độ lệch chuẩn quy định (tại độ tin cậy 95%, CV < 2 - 3 %).

Các dụng cụ đựng hóa chất (chai lọ, tuýp pha loãng hoặc các máng nhựa...): Phải được đánh dấu và tách riêng một bộ.

#### **Cách thao tác khi hút mẫu sử dụng pipetman (Ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả thử nghiệm)**

Gắn thật chặt các đầu côn vào pipet. Nên sử dụng pipet và đầu côn đúng chủng loại, tránh tình trạng đầu đầu côn của một hãng, pipet của một hãng khác...

Tráng đầu côn vài lần bằng cách hút lên xuống để tránh sai số do sức căng bề mặt của nước.

Hút 2 kỳ, nhả 1 kỳ. Hút phải từ từ để chất lỏng lên đều đạt trạng thái cân bằng về thể tích và không tạo bọt khí ở giữa. Nhả từ từ về 1 kỳ. Khi nhả nghiêng đầu đầu côn về vị trí của giếng, không chạm sát dung dịch có sẵn trong giếng hoặc đáy giếng để tránh lượng chất lỏng có trong giếng bám vào bên ngoài đầu côn gây sai số.

Thay đổi đầu côn khi thay đổi độ pha hoặc hóa chất.

Sử dụng pipet trong giới hạn khuyến cáo. Ví dụ: giới hạn của pipet là (10 - 100)  $\mu\text{l}$  thì không sử dụng để hút các thể tích < 10  $\mu\text{l}$  hoặc > 100  $\mu\text{l}$ .

Nếu hóa chất có độ nhớt thì hút từ từ để thể tích về trạng thái cân bằng mới nhả ra khỏi dịch lỏng.

Trong khi hút nếu thấy có bọt khí thì phải hút lại. Hút lại vài lần vẫn còn bọt khí thì phải thay đầu côn mới.

### Cách pha loãng mẫu để giảm sai số

Tránh pha loãng nhiều bước.

Ví dụ, nếu pha 1/1000 chỉ nên pha 2 bước:

Bước 1: Pha 1/100 (1 ml mẫu + 99 ml dung dịch pha loãng);

Bước 2: Lấy 1 ml của độ pha 1/100 + 9 ml dung dịch pha loãng.

Tránh sử dụng thể tích mẫu quá ít khi pha loãng mẫu.

Mẫu phân tích nếu có hàm lượng không quá cao ở mức nguyên chất hoặc đậm đặc; mẫu có nhiều thành phần tá chất, tá được, chất bảo quản, protein tạp khác như vắc xin, sinh phẩm thì nên sử dụng lượng thể tích theo đơn vị ml.

Ví dụ: Mẫu cần pha 1/100 thì không nên pha: 1 ml mẫu + 99 ml dung dịch pha loãng mà nên pha lượng thể tích nhiều hơn: 5 ml mẫu + 495 ml dung dịch pha loãng.

Các mẫu có độ tinh sạch và nồng độ đậm đặc cao, hàm lượng hàng trăm đến hàng nghìn  $\mu\text{g/ml}$ : Nồng độ mẫu cần dùng chỉ 1  $\mu\text{g/ml}$  thì khi pha không nên lấy thể tích dưới 2  $\mu\text{l}$  ( $\leq 2 \mu\text{l}$ ), nên lấy từ 10  $\mu\text{l}$  trở lên.

Pha loãng mẫu trên tuýp nhựa hoặc tuýp thủy tinh: Dụng cụ pha phải thật sạch; trộn, lắc kỹ trước khi hút; thay đầu côn khi chuyển độ pha hoặc hóa chất...

Pha loãng mẫu trên phiến 96 giếng: Phải sử dụng pipet đa kênh đạt chuẩn. Thao tác như sau: Trộn mẫu bằng hút lên xuống vài lần (4 đến 5 lần) rồi hút lượng hóa chất cần lấy và chuyển sang độ pha loãng cao hơn kế tiếp.

### Lưu ý

Thao tác đều tay, tránh bọt khí, tránh thể tích không đều giữa các kênh và không đồng đều về số lần trộn... dẫn đến sai số hệ thống hoặc sai số ở một hoặc một số độ pha.

Trong thời gian trộn có thể xảy ra: hoặc phản ứng giữa kháng nguyên, kháng thể; hoặc phản ứng hấp phụ lên phiến pha mẫu dẫn đến làm mất (thiếu) đi một lượng chất phản ứng nhất định. Để tránh điều này nên sử dụng các dụng cụ pha loãng có khả năng hấp phụ kém như polypropylen hoặc thủy tinh hoặc khi chuyển độ pha thì hút đồng thời vào phiến thử nghiệm luôn. Ví dụ: Cân pha loãng bậc 5 ra 10 độ pha, khi pha mẫu từ độ pha  $5^{-1}$  sang  $5^{-2}$  mà độ pha  $5^{-1}$  cũng sử dụng trong thử nghiệm thì khi hút mẫu từ  $5^{-1}$  sẽ hút luôn cả mẫu vào phiến thử nghiệm. Cách làm sẽ tương tự trong suốt quy trình pha loãng...

## Ví dụ về một số quy trình thực hiện kỹ thuật ELISA

### Nguyên vật liệu, dụng cụ và thiết bị

Kháng nguyên.

Kháng thể cộng hợp gắn enzym.

Dung dịch đệm pha loãng kháng nguyên.

Dung dịch block (có định) phiến.

Dung dịch rửa.

Dung dịch cơ chất.

Dung dịch dừng phản ứng.

Giàn máy ELISA.

Pipetman các loại.

Đầu côn các loại từ 10  $\mu\text{l}$  đến 1000  $\mu\text{l}$ .

Máng nhựa.

Phiến ELISA chuyên dụng;

Phiến 96 giếng đáy tròn (độ pha loãng mẫu).

Tuýp effendorf 1,5 ml đến 2 ml.

Chai thủy tinh các loại 100 ml đến 1000 ml.

Giấy dán phiến.

Tủ lạnh.

Tủ ấm 37 °C.

### Các quy trình

QUY TRÌNH I: *ELISA trực tiếp (Direct ELISA Representative Protocol)*, quy trình tự gắn phiến

#### I. Gắn phiến

Nhỏ 100  $\mu\text{l}$  kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1  $\mu\text{g/ml}$  đến 20  $\mu\text{g/ml}$ ) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

#### II. Cố định phiến sau gắn

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300  $\mu\text{l}$  dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500  $\mu\text{l}$ /giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

#### III. Thêm kháng thể cộng hợp gắn enzym

Thêm 100  $\mu\text{l}$  kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h (tốt nhất ủ ở 37 °C). Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500  $\mu\text{l}$ /giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

#### IV. Thêm cơ chất

Nhỏ 100  $\mu\text{l}$  dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 10 min đến 20 min.

Thêm 100  $\mu\text{l}$  dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH: *ELISA gián tiếp (Indirect ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến*

*I. Gắn phiến*

Nhỏ 100 µl kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 20 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

*II. Cố định phiến sau gắn*

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*III. Thêm kháng thể 1 (primary antibody).*

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp không gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*IV. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn enzym*

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1h (tốt nhất ủ ở 37 °C). Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*V. Thêm cơ chất*

Nhỏ 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH III A: *ELISA Sandwich trực tiếp (direct sandwich/capture ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến.*

*I. Gắn phiến*

Nhỏ 100 µl kháng thể 1 (capture antibody) đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 15 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

*II. Cố định phiến sau gắn*

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 6 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min đến 60 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*III. Thêm kháng nguyên của mẫu*

Thêm 100 µl kháng nguyên của mẫu thử vào tất cả các giếng. Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*IV. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn Enzym.*

Thêm 100 µl kháng thể 2 vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*V. Thêm cơ chất*

Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng. Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH III B: *ELISA Sandwich gián tiếp (indirect sandwich/capture ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến*

*I. Gắn phiến*

Nhỏ 100 µl kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 20 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

*II. Cố định phiến sau gắn*

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 6 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 - 60 min. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

*III. Thêm kháng nguyên của mẫu*

Thêm 100 µl kháng nguyên của mẫu thử vào tất cả các giếng. Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

**IV. Thêm kháng thể sơ cấp**

Thêm 100 µl kháng thể 2 vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

**V. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn enzym**

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

**VI. Thêm cơ chất**

Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

### 15.47 KIỂM TRA MYCOPLASMA TRONG VẮC XIN/ SINH PHẨM (Phương pháp nuôi cấy hoặc dùng chỉ thị tế bào)

Chi *Mycoplasma* có hơn 120 loài, chúng là một nhóm các vi khuẩn có kích thước nhỏ, không có thành tế bào, có kích thước và hình dạng khác nhau, không bắt màu Gram.

*Mycoplasma* thường gây ra các nhiễm trùng nặng cho tế bào và mô. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi trong một thời gian dài mà không hề có biểu hiện tổn thương bên ngoài tế bào, nó ảnh hưởng tới chuyên hoá và sự phát triển bình thường của tế bào. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi thường không gây đục môi trường.

Kiểm tra *Mycoplasma* là một phần của kiểm tra các tác nhân ngoại lai có nguồn gốc từ chủng virus sản xuất vắc xin/sinh phẩm mà trong quá trình sản xuất sử dụng tế bào nuôi.

**Phạm vi áp dụng**

Áp dụng để kiểm tra:

Tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chủng;

Mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm mà theo Tổ chức Y tế Thế giới cần phải kiểm tra *Mycoplasma*.

**Các phương pháp**

Thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin/sinh phẩm có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau:

*Phương pháp nuôi cấy* trong môi trường lỏng và môi trường đặc.

*Phương pháp dùng chỉ thị tế bào.*

Cả hai phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào đều được sử dụng để kiểm tra *Mycoplasma* trong tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chủng.

Khi kiểm tra *Mycoplasma* trong mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm hoặc vắc xin bán thành phẩm cuối cùng thì sử dụng phương pháp nuôi cấy. Phương pháp dùng chỉ thị tế bào có thể cũng được sử dụng.

Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic (Nucleic acid amplification techniques: NAT) có thể dùng để thay thế một trong hai phương pháp trên. Tuy nhiên, nên thẩm định trước khi dùng về ít nhất hai chỉ số: Độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện.

Phương pháp dựa trên hoạt động của enzym cũng có thể sử dụng nhưng phải thẩm định để chứng tỏ nó có khả năng phát hiện *Mycoplasma* tương đương như phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào. Các phương pháp khác có thể được sử dụng nếu cơ quan Kiểm định Quốc gia đã chấp thuận.

**Phương pháp nuôi cấy**

**Môi trường sử dụng:** Sử dụng cả hai loại môi trường đặc và môi trường lỏng với số lượng đủ lớn để đảm bảo phát hiện được số lượng nhỏ *Mycoplasma* có thể có trong vắc xin/sinh phẩm. Mỗi loại môi trường (lỏng, đặc) nên sử dụng ít nhất hai môi trường, một để đánh giá tính chất lên men glucose, một để đánh giá tính chất thủy phân arginin. Môi trường lỏng cần chứa d-phenol.

**Kiểm tra dinh dưỡng môi trường:** Cần kiểm tra khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho chủng phát triển (kiểm tra dinh dưỡng) của từng loại môi trường.

Các loài *Mycoplasma* sử dụng cho kiểm tra dinh dưỡng môi trường như sau:

*Acholeplasma laidlawii* (nếu trong quá trình sản xuất vắc xin/sinh phẩm có sử dụng kháng sinh); *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae* (hoặc những loài *Mycoplasma* có lên men D-glucose khác).

Nên sử dụng ít nhất hai chủng: Một chủng lên men glucose, một chủng thủy phân arginin. Các chủng này không được cấy chuyển quá 15 lần.

**Quy trình thực hiện:**

Cấy chủng vào môi trường theo tỷ lệ không quá 100 CFU cho một đĩa đường kính 60 mm có chứa 9 ml môi trường đặc hoặc một chai chứa 100 ml môi trường lỏng.

Ủ các chai và đĩa môi trường này ở nhiệt độ tương tự như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*.

Lấy 0,2 ml từ mỗi chai môi trường lỏng, cấy chuyển sang môi trường đặc ở các thời điểm giống như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*. Môi trường lỏng đạt yêu cầu về dinh dưỡng nếu mỗi chủng đều có khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch của ít nhất một lần cấy chuyển. Môi trường đặc đạt yêu cầu về dinh dưỡng nếu

mỗi chủng có số lượng khuẩn lạc tính trung bình trên các đĩa ít hơn không quá 1/5 số lượng đưa vào.

#### **Kiểm tra ảnh hưởng của chất ức chế (thử nghiệm ức chế)**

Thử nghiệm này nhằm xác định trong sản phẩm có chứa chất ức chế mà ảnh hưởng đến sự phát triển của *Mycoplasma* hay không. Nếu có, cần phải loại bỏ ảnh hưởng của chất ức chế trước khi kiểm tra *Mycoplasma* trên vắc xin/sinh phẩm bằng cách thích hợp như trung hoà, pha loãng hoặc cấy chuyên không dùng chất ức chế,...

Thực hiện lại *thử nghiệm ức chế* sau khi đã sử dụng các biện pháp trên. Nếu sử dụng biện pháp pha loãng, phải sử dụng thể tích lớn môi trường hoặc chia vắc xin/sinh phẩm vào nhiều chai môi trường dung tích 100 ml.

*Nguyên lý:* Thử nghiệm ức chế được thực hiện bằng cách cho sản phẩm cần kiểm tra vào môi trường với lượng giống như thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong sản phẩm, sau đó cấy chúng thử thách vào môi trường với lượng giống như thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường. Thực hiện thử nghiệm kiểm tra dinh dưỡng môi trường để làm chứng dương cho thử nghiệm này.

*Đánh giá kết quả:* Chất ức chế ảnh hưởng đến sự phát triển của *Mycoplasma* nếu có ít nhất một trong hai trường hợp sau:

Môi trường lỏng: Một chủng thử thách trong các chai môi trường có vắc xin/sinh phẩm mọc chậm hơn các ống không có vắc xin-sinh phẩm từ hai lần cấy chuyên trở lên.

Môi trường đặc: Một chủng thử thách có số lượng khuẩn lạc ở các đĩa chứa vắc xin/sinh phẩm ít hơn số lượng khuẩn lạc ở các đĩa không có vắc xin/sinh phẩm từ 1/5 số lượng khuẩn lạc của các đĩa không có vắc xin/sinh phẩm trở lên. Mỗi sản phẩm nên thực hiện *thử nghiệm ức chế* một lần trước khi thực hiện thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong sản phẩm. Chỉ phải làm lại *thử nghiệm ức chế* khi thay đổi phương pháp sản xuất làm ảnh hưởng tới việc xác định *Mycoplasma*.

#### **Kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin/sinh phẩm**

##### *Cấy lần đầu:*

Môi trường lỏng: Mỗi loại môi trường cấy ít nhất 10 ml vắc xin/sinh phẩm vào một chai 100 ml. Nếu có sự đổi màu của môi trường sau cấy vắc xin/sinh phẩm, chỉnh pHi của môi trường về pH ban đầu bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrochloric.

Môi trường đặc: Cấy 0,2 ml vắc xin/sinh phẩm vào mỗi đĩa, mỗi loại môi trường dùng ít nhất hai đĩa.

##### *Cấy chuyên:*

Thời điểm cấy chuyên như sau (kể từ ngày cấy đầu tiên):

Lần 1: Vào khoảng từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4.

Lần 2: Vào khoảng từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 8.

Lần 3: Vào khoảng từ ngày thứ 13 đến ngày thứ 15.

Lần 4: Vào khoảng từ ngày thứ 19 đến ngày thứ 21.

Cách cấy chuyên: Từ mỗi chai môi trường cấy chuyên 0,2 ml/đĩa, mỗi loại môi trường đặc cấy ít nhất một đĩa.

Ủ, theo dõi môi trường sau cấy:

Nhiệt độ ủ: 35 °C đến 38 °C.

Thời gian ủ: Các chai môi trường ủ 20 - 21 ngày. Các đĩa môi trường ủ ít nhất 14 ngày, riêng các đĩa cấy chuyên vào ngày thứ 19 - 21 theo dõi 7 ngày.

Ủ đồng thời một chai 100 ml mỗi loại môi trường không cấy vắc xin/sinh phẩm và một đĩa thạch không cấy vắc xin/sinh phẩm cùng loạt với đĩa thạch cấy chuyên để làm chứng âm.

Kết quả kiểm tra dinh dưỡng môi trường làm chứng dương. Điều kiện nuôi cấy: Một nửa các chai và đĩa ủ ở điều kiện vi hiếu khí (khí trường chứa 5 - 10 % CO<sub>2</sub> và độ ẩm thích hợp), một nửa ở điều kiện kỵ khí (khí trường chứa nitrogen, 5 - 10 % CO<sub>2</sub> và độ ẩm thích hợp).

Theo dõi các chai môi trường 2 - 3 ngày/lần. Nếu có sự đổi màu của môi trường, cấy chuyên sang môi trường đặc (xem phần *Cấy chuyên* ở trên).

Theo dõi các đĩa môi trường 7 ngày/lần bằng kính hiển vi quang học để kiểm tra xem có khuẩn lạc *Mycoplasma* hay không.

Khuẩn lạc được cho là của *Mycoplasma* nếu có hình dạng điển hình như sau: Trung tâm khuẩn lạc tối và dày, mọc lẫn xuống thạch; rìa khuẩn lạc mỏng, bẹt. Khuẩn lạc có dạng trứng ôp mà trung tâm khuẩn lạc là phần lòng đỏ để nguyên.

##### *Đánh giá kết quả:*

– Vắc xin/sinh phẩm đạt yêu cầu về vô trùng đối với *Mycoplasma* nếu sau nuôi cấy không có dấu hiệu phát triển của *Mycoplasma* trong các đĩa môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm.

– Vắc xin/sinh phẩm không đạt yêu cầu về vô trùng đối với vắc xin/sinh phẩm nếu sau nuôi cấy có dấu hiệu phát triển của *Mycoplasma* trong các đĩa môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm.

– Thử nghiệm không có giá trị nếu có một hoặc nhiều hơn các trường hợp sau xảy ra:

Môi trường sử dụng không đạt yêu cầu của thử nghiệm Kiểm tra dinh dưỡng.

Có dấu hiệu mọc của *Mycoplasma* trong chứng âm.

Có sự phát triển của vi khuẩn khác hoặc nấm trong các chai môi trường,

Vỡ ít nhất hai đĩa môi trường,

Có ít nhất hai đĩa môi trường nhiễm vi khuẩn khác và nấm.

Trường hợp sau nuôi cấy trên 7 ngày mà chỉ có một đĩa môi trường nhiễm vi khuẩn/nấm hoặc chỉ vỡ một đĩa môi trường thì các đĩa này có thể bỏ qua khi không có dấu hiệu mọc của *Mycoplasma*.

– Các trường hợp thử nghiệm không có giá trị: Nhắc lại thử nghiệm với số mẫu như lần 1. Đánh giá kết quả của lần thử nghiệm lại cũng giống như đánh giá lần đầu.

– Các trường hợp thử nghiệm có giá trị, có sự xuất hiện của *Mycoplasma* nhắc lại thử nghiệm với số mẫu và môi trường gấp đôi lần 1. Đánh giá kết quả thử nghiệm lại cũng giống như đánh giá lần đầu.

#### **Phương pháp dùng chỉ thị tế bào**

*Nguyên lý:* Tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm huỳnh quang. Nếu bị nhiễm *Mycoplasma*, trên bề mặt tế bào sẽ có các hạt hoặc các sợi đặc trưng. Các hạt, sợi đặc trưng

này thậm chí còn có cả ở vùng gian bào nếu bị nhiễm nặng. Tế bào sử dụng: Vero hoặc tế bào khác có hiệu quả tương đương trong việc xác định *Mycoplasma*. VD: Các dòng tế bào sản xuất.

Kiểm tra chất lượng của tế bào bằng cách áp dụng qui trình giống như qui trình kiểm tra vắc xin/sinh phẩm, sau đó cấy vào tế bào không quá 100 CFU các chủng thích hợp của *M. hyorhinitis* và *M. orale*. Tế bào đạt yêu cầu nếu cả hai chủng trên đều mọc được.

Cần cấy chuyển tế bào mà không dùng kháng sinh trước khi sử dụng vào thử nghiệm.

#### Pha các dung dịch

Dung dịch kali dihydrophosphat 2 M: Hoà tan 13,61 g kali dihydrophosphat khan (TT) trong 50 ml nước.

Dung dịch kali hydrophosphat 2 M: Hoà tan 17,42 g kali hydrophosphat khan (TT) trong 50 ml nước.

Dung dịch đệm phosphat (pH 7,4): Trộn đều 3,6 ml dung dịch kali dihydrophosphat 2 M; 14,6 ml dung dịch kali hydrophosphat 2 M; 8 g natri clorid với 1 L nước. Điều chỉnh pH nếu cần bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrocloric.

Dung dịch bisbenzimid gốc: Hoà tan 5 mg bisbenzimid (TT) trong một ít nước, thêm nước vừa đủ 100 ml, bảo quản tránh ánh sáng.

Dung dịch làm việc bisbenzimid: Pha loãng 100 µL dung dịch bisbenzimid gốc bằng dung dịch đệm phosphat (pH 7,4) để được 100 ml hỗn hợp dung dịch.

Dung dịch natri hydrophosphat: Hoà tan 28,4 g natri hydrophosphat khan (TT) trong 1 L nước.

Dung dịch acid citric: Hoà tan 21 g acid citric (TT) trong 1 L nước.

Dung dịch đệm phosphat-citrat (pH 5,5): Trộn đều 56,85 ml dung dịch natri hydrophosphat và 43,15 ml dung dịch acid citric.

#### Phương pháp thực hiện

Nuôi tế bào ở nồng độ thích hợp (Khoảng  $2 \cdot 10^4$  -  $2 \cdot 10^5$  tế bào/ml,  $4 \cdot 10^3$  -  $2,5 \cdot 10^4$  tế bào/cm<sup>2</sup>).

Cấy 1 ml vắc xin/sinh phẩm vào chai tế bào.

Ủ ở nhiệt độ 35 °C đến 38 °C.

Sau ít nhất 3 ngày, cấy chuyển lên một lá kính. Tế bào được nuôi ở mật độ thấp để chỉ phủ kín khoảng 50 % bề mặt sau (3 – 5) ngày. Tế bào phủ kín hoàn toàn làm khó quan sát *Mycoplasma* sau khi nhuộm.

Bỏ môi trường, rửa tế bào bằng đệm phosphat, cố định tế bào [có thể sử dụng hỗn hợp dung dịch acid acetic băng : methanol (1 :3)]

Bỏ dung dịch cố định, rửa tế bào bằng nước vô trùng, để khô. Phủ tế bào bằng dung dịch làm việc bisbenzimid hoặc thuốc nhuộm thích hợp khác. Để trong khoảng 10 min.

Bỏ thuốc nhuộm và rửa tế bào bằng nước vô trùng.

Phủ mỗi lá kính bằng một giọt hỗn hợp của glycerol và dung dịch đệm phosphat-citrat với lượng bằng nhau.

Soi dưới kính hiển vi huỳnh quang vật kính có độ phóng đại từ 400 lần trở lên.

1 âm song song với chứng âm và chứng dương.

#### Đánh giá kết quả

Vắc xin/sinh phẩm đạt yêu cầu nếu không có hình dạng điển hình của *Mycoplasma* (Các hạt hoặc sợi đặc trưng dưới kính hiển vi huỳnh quang khắp bề mặt tế bào hoặc ở khoảng gian bào).

Thử nghiệm không có giá trị nếu xảy ra một trong hai trường hợp sau:

Chứng dương không có hình dạng điển hình của *Mycoplasma*.

Chứng âm có hình dạng điển hình của *Mycoplasma*.