

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM VI VẮC XIN PHỐI HỢP VIÊM GAN A (BẤT HOẠT, HẤP PHỤ) VÀ VẮC XIN VIÊM GAN B (TÁI TỔ HỢP, HẤP PHỤ)

Các mẫu máu được ly tâm 3000 r/min ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C. Xác định hiệu giá kháng thể kháng HBsAg bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA) trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Kết quả được tính theo phần mềm thống kê chuyên dụng.

Thử nghiệm có giá trị khi:

ED₅₀ của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất.

Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

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

Tiêu chuẩn công hiệu trên thực nghiệm:

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

Thử nghiệm công hiệu in vitro

Vắc xin thử nghiệm được pha loãng song song với vắc xin mẫu chuẩn bằng PBS 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) với các độ pha loãng bậc 2 phù hợp. Tiến hành thử nghiệm bằng kỹ thuật ELISA, trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Dùng kháng thể đơn dòng kháng HBsAg để xác định lượng kháng nguyên HBsAg trong vắc xin mẫu thử, so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

Kết quả được tính theo phần mềm Excel, Paraleline hoặc phần mềm chuyên dụng khác.

Tiêu chuẩn:

Theo nhà sản xuất đăng ký.

Đóng gói

Vắc xin viêm gan B được đóng trong lọ thủy tinh trung tính, mỗi lọ chứa 20 µg/1 ml; hoặc 10 µg/1 ml; hoặc 5 µg/1 ml tùy theo từng nhà sản xuất.

Tính ổn định

Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin phải được tiến hành trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm khác nhau) khi được bảo quản theo thời gian ở điều kiện như ghi trên nhãn của sản phẩm.

Bảo quản, hạn dùng

Vắc xin viêm gan B phải được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tuyệt đối không được làm vắc xin đông băng.

Trong điều kiện bảo quản như trên, vắc xin viêm gan B tái tổ hợp có hạn dùng là 36 tháng.

Nhãn

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

Đường tiêm, liều tiêm

Đường dùng: Tiêm bắp vào vùng cơ delta (đối với trẻ sơ sinh, tiêm bắp đùi là tốt hơn).

Liều dùng, lịch tiêm: Theo hướng dẫn cụ thể của nhà sản xuất.

Tiêm nhắc lại sau 5 năm đối với tất cả các lứa tuổi.

VẮC XIN PHỐI HỢP VIÊM GAN A (BẤT HOẠT, HẤP PHỤ) VÀ VẮC XIN VIÊM GAN B (TÁI TỔ HỢP, HẤP PHỤ)

Vaccinum hepatitis A inactivatum et hepatitis B (ADNr) adsorbatum

Vắc xin phối hợp viêm gan A bất hoạt, hấp phụ và vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, hấp phụ là một hỗn dịch chứa một chủng virus viêm gan A phù hợp (nuôi cấy trên tế bào, được bất hoạt bằng một phương pháp đã được phê chuẩn) và vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt HBsAg là một protein của virus viêm gan B. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN) và thường được hấp phụ với nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat hydrat.

Sản xuất

Sản xuất độc lập từng loại vắc xin sau đó phối trộn lại để tạo vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ).

Quy trình sản xuất của hai thành phần vắc xin này được mô tả trong phần vắc xin viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ). Vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) phải tuân thủ tất cả các yêu cầu về sản xuất và kiểm định cho từng loại vắc xin.

Vắc xin mẫu chuẩn: Là mẫu phải được chứng minh bằng các kết quả nghiên cứu trên động vật và người trưởng thành khỏe mạnh; sau một liệu trình tiêm miễn dịch đầu tiên, ít nhất 95 % tạo được đáp miễn dịch bảo vệ, tương ứng với hàm lượng kháng thể trong máu Anti HAV phải đạt ít nhất 20 mIU/ml và Anti HBs phải đạt ít nhất 10 mIU/ml.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vô trùng

Đạt yêu cầu vô trùng (Phụ lục 15.7).

Chất bảo quản

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất này được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản phải nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

Hàm lượng 2-phenoxyethanol

Kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lỏng. Hàm lượng 2-phenoxyethanol trong vắc xin phải nằm trong giới hạn cho phép.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Trường hợp các thử nghiệm kiểm tra hàm lượng formaldehyd tồn dư (nếu có sử dụng), hàm lượng chất bảo quản (nếu có), hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do, hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ) hay các thử nghiệm kiểm tra trên động vật mà đã kiểm tra trên vắc xin bán thành phẩm và cho kết quả đạt yêu cầu thì những thử nghiệm này có thể không cần kiểm tra trên vắc xin thành phẩm.

Nhận dạng

Vắc xin phải chứa kháng nguyên virus viêm gan A và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg), được nhận dạng bằng phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú) sử dụng kháng thể đặc hiệu hoặc bằng thử nghiệm *in vivo*.

Cắm quan

Dạng lỏng vẩn đục, không màu; sau khi lắc tạo hỗn dịch màu trắng đục.

Vô trùng

Đạt yêu cầu vô trùng (Phụ lục 15.7).

Hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ)

Kiểm tra theo phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú). Hàm lượng kháng nguyên HAV tự do (không hấp phụ) phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

Hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do (không hấp phụ)

Kiểm tra theo phương pháp ELISA (xem phần Ghi chú). Hàm lượng kháng nguyên HBsAg tự do (không hấp phụ) phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

pH

Từ 5,8 đến 6,6 (Phụ lục 15.33).

Thể tích

Không ít hơn thể tích ghi trên nhãn (Phụ lục 11.1).

Hàm lượng nhôm

Nếu sử dụng hydroxyd nhôm hoặc nhôm phosphat hydrat là chất hấp phụ, thì hàm lượng phải nằm trong giới hạn được phê duyệt nhưng không được quá 1,25 mg/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

Hàm lượng nhôm tự do

Phải nằm trong giới hạn được phê duyệt.

Formaldehyd tồn dư

Không được quá 0,2 g/L (Phụ lục 15.25).

Chất bảo quản

Nếu quy trình sản xuất có sử dụng các chất bảo quản, thì việc xác định hàm lượng các chất bảo quản được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc hóa lý. Hàm lượng các chất bảo quản phải nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % lượng ghi trên nhãn.

An toàn chung

Phải đạt an toàn trên chuột nhắt và chuột lang. Chuột phải khỏe mạnh, tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

Nội độc tố vi khuẩn

Không được quá 2 EU/liều đơn dùng cho người.

Công hiệu

Công hiệu vắc xin phối hợp viêm gan A (bắt hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) được tiến hành độc lập theo các phương pháp và quy trình phù hợp cho từng loại vắc xin thành phần; mỗi loại phải làm song song với vắc xin mẫu chuẩn. Thử nghiệm có thể được xác định theo phương pháp gây miễn dịch trên chuột để xác định hiệu giá kháng thể thu được (công hiệu *in vivo*) hoặc phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu thực hiện trong

phòng thí nghiệm để định lượng trực tiếp hàm lượng từng loại kháng nguyên có trong vắc xin (công hiệu *in vitro*) bằng các loại kit thương phẩm hoặc kit tự gán. Quy trình và các bước tiến hành sẽ thay đổi theo hướng dẫn của từng phương pháp, từng loại kit được sử dụng.

Bảo quản

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh sáng và tránh làm vắc xin đông băng.

Nhãn

Những thông tin trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng quy định hiện hành.

Ghi chú:

Định lượng và nhận dạng thành phần HAV trong vắc xin phối hợp viêm gan A (bắt hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ).

Nguyên lý:

Hàm lượng HAV trong mẫu được định lượng theo phương pháp ELISA. Mẫu thử và mẫu chuẩn được pha loãng ra nhiều nồng độ rồi được nhỏ lên phiến có gắn kháng thể kháng HAV. Phức hợp kháng thể - kháng nguyên được phát hiện nhờ enzym peroxylase gắn kháng thể kháng HAV cộng hợp. Sau đó thêm cơ chất hiện màu (TMB). Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng nguyên có trong mẫu.

Tiến hành:

Chuẩn bị phiến: Phiến trắng miễn dịch 96 giếng được gắn kháng thể anti-HAV IgG người pha loãng trong dung dịch PBS-Tween. Ủ phiến 25 °C qua đêm rồi rửa và làm khô phiến. Dán kín, bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, sử dụng trong 1 tuần.

Chuẩn bị mẫu vắc xin: Vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin mẫu thử và mẫu chứng (internal control) có hấp phụ nhôm được giải hấp phụ bằng cách thêm dung dịch dinatrihydrophosphat-EDTA có bổ sung Tween 20 và gelatin hoặc muối natri citrat có bổ sung BSA. Quy trình như sau: Ly tâm mẫu với tốc độ 6000 r/min, trong 10 min để tách toàn bộ phần nước nổi rồi thêm dung dịch giải hấp phụ. Lắc đều rồi ủ ở 37 °C. Ly tâm như trên, thu dịch nổi. Tinh sạch lần 2 và 3 như trên rồi tinh sạch lần 4 qua đêm. Hỗn dịch thu được sau các lần tinh sạch với PBS (không có Ca²⁺ và Mg²⁺) có bổ sung Tween 20 và gelatin. Các mẫu sau giải hấp phụ và mẫu chuẩn HAV không có hấp phụ được pha loãng thành ít nhất 6 độ pha.

Nhỏ các mẫu đã pha loãng vào phiến đã gắn kháng thể anti-HAV IgG người, 2 giếng/độ pha, nhỏ dung dịch pha loãng mẫu thành một hàng làm mẫu trắng. Ủ 90 min ở 37 °C. Thêm kháng thể HAV cộng hợp gắn peroxylase. Ủ 90 min ở 37 °C. Nhỏ TMB có dung dịch nước oxy già 30 % trong đệm acetat. Ủ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Nhỏ 50 µl dung dịch acid sulfuric 1 N để dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 450/620 nm.

Tính kết quả:

Kết quả được tính theo phần mềm Paraleline hoặc Excel.

Hệ số tương quan (R^2) đường tuyến tính của chuẩn tính trên phần mềm Excel phải lớn hơn 95 %.

Hàm lượng kháng nguyên HAV trong mẫu thử được tính từ ít nhất 3 độ pha liên tiếp trong số các độ pha loãng dùng trong thử nghiệm.

Quy trình thử nghiệm định lượng và nhận dạng thành phần HBsAg trong vắc xin phối hợp viêm gan A (bất hoạt, hấp phụ) và vắc xin viêm gan B (tái tổ hợp, hấp phụ) theo phương pháp ELISA gián tiếp.

Nguyên lý:

Hàm lượng HBsAg trong vắc xin cần kiểm tra được định lượng theo phương pháp ELISA gián tiếp. Vắc xin được ủ với 1 lượng kháng thể đa dòng người. Sau đó lượng kháng thể thừa được xác định bằng ủ với HBsAg chuẩn và được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG người gắn peroxylase.

Tiến hành:

Mẫu vắc xin được pha loãng trong dung dịch PBS có chứa 0,1 % BSA và 0,1 % (tt/tt) Tween 20, tiếp tục được trộn với kháng thể đa dòng kháng HBsAg và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó ly tâm, dịch nổi được chuyển vào phiến gắn HBsAg ủ qua đêm ở 2 °C đến 8 °C cùng với HBsAg chuẩn tái tổ hợp đã được pha loãng trong dung dịch đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6)(*) để xác định lượng kháng thể thừa. Lượng kháng thể thừa được xác định bằng cách sử dụng một kháng thể kháng kháng thể người gắn peroxylase. Ủ 37 °C trong 1 h. Rửa, rồi thêm dung dịch chất hiện màu (TMB). Cuối cùng nhỏ dung dịch dừng phản ứng (dung dịch acid sulfuric 1 N).

Đo OD ở bước sóng 450/620 nm. Mật độ màu tỷ lệ nghịch với hàm lượng HBsAg có trong mẫu.

(*) Pha đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6):

Dung dịch 1: Hòa tan 2,1 g natri hydrocarbonat (TT) trong 500 ml nước.

Dung dịch 2: Hòa tan 2,65 g natri carbonat (TT) trong 500 ml nước.

Bảo quản các dung dịch trên trong lọ kín, ở 25 °C hoặc trong tủ lạnh, hạn dùng 3 tháng.

Trước khi dùng, trộn đều 70 ml dung dịch 1 và 30 ml dung dịch 2, được dung dịch đệm carbonat 0,05 M (pH 9,6). Bảo quản hỗn hợp dung dịch đã pha trong lọ kín, ở nhiệt độ phòng, hạn dùng 1 tháng.

Tính kết quả:

Kết quả được tính theo phần mềm Paraleline hoặc Excel. Hệ số tương quan (R^2) đường tuyến tính của chuẩn tính trên phần mềm Excel phải lớn hơn 95 %.

Hàm lượng kháng nguyên HBsAg trong mẫu thử được tính từ ít nhất 3 độ pha liên tiếp trong số các độ pha loãng dùng trong thử nghiệm.

Tiêu chuẩn:

Hàm lượng kháng nguyên HAV phải không dưới 60 % hàm lượng ghi trên nhãn.

Hàm lượng kháng nguyên HBsAg phải từ 21 - 37 µg HBsAg/ml.

VẮC XIN VIÊM NÃO NHẬT BẢN BẤT HOẠT SẢN XUẤT TRÊN NÃO CHUỘT

Vaccinum encephalitis japonicae inactivatum ex cerebris murinis

Vắc xin viêm não Nhật Bản là một chế phẩm vô khuẩn được điều chế từ chủng virus viêm não Nhật Bản (chủng Nakayama hoặc Beijing) sau khi đã được gây nhiễm vào não chuột nhắt trắng.

Quy trình sản xuất bao gồm các bước tinh chế bằng protamin sulfat, amoni sulfat, siêu ly tâm trong dung dịch saccharose. Virus viêm não Nhật Bản sau tinh chế phải có độ tinh khiết cao và duy trì được bản chất kháng nguyên để có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch tối ưu. Kháng nguyên tinh khiết được bất hoạt bởi formaldehyd và được bảo quản bằng thimerosal.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm

Vô trùng

Bán thành phẩm viêm não Nhật Bản phải đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

Hiệu giá virus

Hiệu giá virus viêm não Nhật Bản được xác định bằng kỹ thuật ELISA. Hiệu giá được sử dụng như một chỉ số theo dõi tính ổn định của quy trình sản xuất.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Cảm quan

Mỗi lọ vắc xin viêm não Nhật Bản thành phẩm phải được kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo các lọ vắc xin không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút đã được đậy chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn.

Vắc xin viêm não Nhật Bản ở dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu.

Nhận dạng

Tiêm cho chuột lang hoặc chuột nhắt trắng, vắc xin viêm não Nhật Bản phải tạo được kháng thể trung hòa có khả năng trung hòa được virus đặc hiệu.

pH

Từ 6,8 đến 7,4 (Phụ lục 15.33).

Hàm lượng protein

Xác định bằng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein không được quá 80 µg/ml (Phụ lục 15.34).

Chất bảo quản

Hàm lượng thimerosal không quá 0,12 mg/ml (Phụ lục 15.29).

Formaldehyd

Không quá 0,1 mg/ml (Phụ lục 15.25).

Chất gây sốt

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải an toàn về chất gây sốt. Khi tiêm cho thỏ, tổng số nhiệt độ tăng cho 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).