

Kiểm tra chủng sản xuất vắc xin tả trên thạch TCBS: Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tả, nhỏ 0,1 ml canh khuẩn vào đĩa thạch TCBS, dùng que cấy cấy ria trên đĩa thạch. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc và sự chuyển màu của môi trường nuôi cấy tại thời điểm 24 h và 48 h. Đọc kết quả sau 48 h. Tiêu chuẩn chấp thuận: Khuẩn lạc trong, môi trường TCBS từ màu xanh lá cây chuyển màu vàng.

Kiểm tra tính chất sinh vật hóa học của chủng sản xuất: Lắc đều tuýp (ống) chứa canh khuẩn tả, cấy 0,1 ml canh khuẩn vào từng ống môi trường (arabinose, mannose, saccharose). Ủ các ống môi trường ở nhiệt độ $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ trong 48 h, theo dõi sự chuyển màu của môi trường. Đọc kết quả sau 48 h.

Dương tính (+): Môi trường chuyển sang màu vàng.

Âm tính (-): Môi trường giữ nguyên màu ban đầu.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Tính chất sinh vật hóa học của tất cả các chủng sản xuất vắc xin tả: arabinose (-), mannose (+), saccharose (+).

Sản xuất

Vi khuẩn tả được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Kết thúc nuôi cấy, canh khuẩn được kiểm tra đậm độ vi khuẩn. Vi khuẩn tả được bất hoạt bằng formaldehyd hoặc nhiệt độ tùy từng chủng. Sau bất hoạt, vi khuẩn tả được thu bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc tiếp tuyến (TFF).

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm

Vô trùng

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

Kiểm tra sau bất hoạt

Phương pháp tiến hành: Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tả sau bất hoạt, cấy 0,5 ml canh khuẩn tả vào đĩa thạch máu ngựa 15 %, lóng nhẹ, đều. Mỗi mẫu thử cấy trên 02 đĩa thạch máu. Ủ các đĩa thạch máu trên vào tủ ấm $(35 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn tả tại thời điểm 24 h và 48 h.

Tiêu chuẩn: Không thấy sự phát triển của vi khuẩn tả trên đĩa thạch máu ngựa.

Đo đậm độ vi khuẩn bằng bộ so độ đục chuẩn

Phương pháp tiến hành: Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ so độ đục.

Ví dụ: Trộn kỹ mẫu nước cốt tả trên máy trộn. Dùng pipetman hút 100 μl mẫu thử cho vào ống thử của bộ soi độ đục, cho dần dần xml dung dịch pha loãng (PBS 0,01 M có pH 7,2 hoặc nước muối sinh lý) vào cho đến khi độ đục của ống thử bằng với độ đục của ống chuẩn số 10. Đậm độ vi khuẩn tả được tính như sau:

Quy đổi thành 1 ml ta có: $(0,1 \text{ ml nước cốt} + x \text{ ml dung dịch pha loãng}) \times 10 = X \text{ ml}$

Đậm độ của mẫu cần đo = $X \text{ ml} \times (a \times 10^9 \text{ vi khuẩn/ml})$ (trong đó $a \times 10^9$ là chỉ số được cung cấp bởi hãng của ống số 10 trong bộ so độ đục chuẩn tương đương).

Định lượng LPS

Sử dụng phương pháp ELISA để định lượng hàm lượng của từng LPS có trong bán thành phẩm.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vô trùng

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

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Cảm quan

Mẫu kiểm định của mỗi loạt vắc xin thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Sau khi lắc đều, vắc xin tạo thành huyền dịch đồng nhất, màu nâu nhạt.

Vô trùng

Phải đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

pH

Nằm trong khoảng từ 6,8 - 7,4 (Phụ lục 15.33).

Protein toàn phần

Không được quá 5 % (Phụ lục 15.32).

Formaldehyd

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

Thimerosal

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.29).

Thử nghiệm công hiệu

Nồng độ của từng kháng nguyên được xác định bởi một xét nghiệm miễn dịch, phù hợp với nồng độ của các kháng nguyên đã được cơ quan quản lý phê duyệt

Đóng gói, bảo quản

Đóng trong lọ thủy tinh trung tính và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C , không được để đông băng.

Hạn dùng

Hạn dùng của vắc xin được nghiên cứu dựa trên tính ổn định của công hiệu trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm riêng biệt).

Vắc xin tả uống bất hoạt có hạn dùng không quá 2 năm kể từ sau ngày sản xuất.

Nhãn

Ghi rõ những thông tin cần có đối với nhãn theo quy định hiện hành.

Chỉ định, liều dùng

Vắc xin tả uống bất hoạt chỉ dùng đường uống.

Liều dùng: 1,5 ml/người.

Lịch dùng: 2 liều, mỗi liều cách nhau 14 ngày.

VẮC XIN THƯƠNG HÀN UỐNG

Vaccinum febris typhoidi perorale vivum

Vắc xin thương hàn uống, sống, giảm độc lực là một chế phẩm đông khô được chứa trong viên bọc gelatin; điều chế từ chủng *Salmonella typhi* Ty 21a, đã được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Trong mỗi viên chứa 1.10^9 đến 5.10^9 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a.

Sản xuất

Chủng sản xuất

Chủng đột biến *S. typhi* Ty 21a đã cho thấy đạt tính an toàn và có hiệu lực trên người. Đặc điểm chính của chủng này là thiếu hụt enzym uridin diphosphat-galactose-4-epimerase. Hoạt tính của galactopermease, galactokinaes và galactose-1-phosphat uridyl-transferase đã bị giảm 50 % đến 90 %. Ở bất kể môi trường nuôi cấy nào, chủng vi khuẩn này cũng không chứa kháng nguyên Vi. Chủng này chỉ ngưng kết với kháng huyết thanh kháng O:9 nếu phát triển trên môi trường có chứa galactose. Chủng có chứa kháng nguyên H:d và không sinh hydrogen sulfid trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt. Chủng không độc với chuột nhắt trắng. Chủng Ty 21a sẽ gây dung giải nếu phát triển trên môi trường có chứa 1 % galactose.

Dùng hệ thống chủng gốc để sản xuất vắc xin.

Sản xuất chủng gốc: Từ một khuẩn lạc đơn sẽ được nuôi cấy trên môi trường thích hợp (canh thang BHI phù hợp với mục đích này) không có galactose và ủ ở nhiệt độ thích hợp cho phát triển tối ưu. Khi nuôi cấy đã đạt đến pha ổn định, canh khuẩn sẽ được gặt, ly tâm tách cạn và cho vào ống. Sau đó pha chế thành huyền dịch có đậm độ thích hợp và tiến hành đông khô, sao cho mỗi ống có chứa ít nhất 10^9 đơn vị sống của chủng. Các ống chủng gốc sau khi đông khô được bảo quản ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Sản xuất chủng làm việc: Chủng làm việc được sản xuất từ một ống chủng gốc. Quá trình nuôi cấy, gặt, ly tâm lấy cạn, pha chế và đông khô cũng theo trình tự như đối với chủng gốc. Mỗi ống chủng làm việc đông khô phải chứa ít nhất 10^9 đơn vị sống của chủng. Các ống chủng làm việc sau khi đông khô được bảo quản ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Kiểm tra chủng sản xuất

Nhận dạng và tính thuần khiết:

Xác định chỉ có vi khuẩn Ty 21a, là trực khuẩn Gram âm, di động.

Nuôi cấy qua 3 lần chuyển chủng trên môi trường có hoặc không có galactose, ngưng kết với kháng huyết thanh H:d, không ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Ngược lại chỉ những khuẩn lạc phát triển trên môi trường có chứa galactose (1 g/L) mới ngưng kết với kháng huyết thanh O:9.

Khi nuôi cấy trên môi trường thạch Endo và ủ ở 37°C trong 7 ngày, mọc khuẩn lạc có màu môi trường, có hiện tượng ly giải và dần dần trở nên trong suốt. Các khuẩn lạc lên men galactose sẽ không xuất hiện tại bất kỳ thời điểm nào trong 7 ngày ủ ở 37°C .

Trên môi trường nuôi cấy chỉ thị có chứa galactose ủ ở 37°C trong 48 h, xuất hiện khuẩn lạc lõm ở giữa, viền có màu xanh xám và giữa có màu sẫm cho đến khi chết và ly giải giống như chủng Ty 21a trên môi trường thạch có chứa galactose.

Nuôi cấy trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt, khuẩn lạc không đen, chứng tỏ không sinh hydrogen sulfid.

Gây ly giải vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy có galactose: Nuôi cấy lặn trên môi trường BHI (với hàm lượng galactose 100 g/L môi trường) ở 37°C , vi khuẩn bị ly giải trong vòng 1 h.

Kiểm tra độc tính trên chuột nhắt trắng:

Chủng vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường BHI và ủ ở 37°C trong 6 h, được tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có khối lượng từ 18 g đến 22 g. Huyền dịch vi khuẩn có chứa ít nhất 5×10^7 vi khuẩn sẽ không giết chết chuột trong vòng 7 ngày theo dõi.

Xác định các enzym (bao gồm cả các enzym trong quá trình lên men galactose):

Thử nghiệm cho thấy vi khuẩn Ty 21a có hoạt tính enzym thấp hơn so với chủng Ty 2. Khi so sánh hoạt tính của chủng Ty 2 (coi là 100 %) thì hoạt tính của chủng Ty 21a là 0 % epimerase, 5 % đến 20 % galactokinase, 25 % đến 50 % galactose-1-phosphat-uridyltransferase và 40 % đến 50 % galactose-permease.

Sự hấp thu và phân bố nội tế bào của galactose ^{14}C :

Sau 7 h nuôi cấy ở 30°C , ít nhất 90 % galactose trong môi trường (1 g/lít) bị mất do chủng vi khuẩn (bằng cách đo ^{14}C trên tế bào). Phương pháp thử nghiệm cũng cho thấy có khoảng 75 % galactose có trên vách tế bào vi khuẩn.

Đặc tính của lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid chiết xuất từ vách tế bào của chủng vi khuẩn thương hàn Ty 21a được nuôi cấy trong môi trường BHI có chứa galactose ^{14}C (1 g/L), ủ ở 30°C trong 7 h, sẽ bị thủy phân trong dung dịch acid acetic 1 % và được kiểm tra polysaccharid. Sử dụng phương pháp sắc ký gel, dùng Sephadex G50; những vi khuẩn thương hàn của cả loại khuẩn lạc nhẵn và xù xì đều có chứa LPS, theo tỷ lệ tương đương đối với chủng độc *S. typhi* Ty 2. Hơn nữa, sự phân bố của các đường keto-deoxy-octonat (KDO), galactose, glucose và rhamnose của LPS đạt tỷ lệ tương đương giữa chủng Ty 2 và Ty 21a.

Yêu cầu trong quy trình sản xuất

Môi trường nuôi cấy chủng sản xuất không được gây ra phản ứng độc hại hay dị ứng cho người.

Chủng sản xuất được nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ thích hợp trong khoảng thời gian đủ để đạt tới pha ổn định sớm thì tiến hành gặt. Số lần cấy chuyển từ chủng làm việc cho đến khi lên men cuối cùng không được vượt quá 4 lần.

Trước khi ly tâm sản phẩm lên men: Cần lấy mẫu kiểm tra nhận dạng của chủng Ty 21a, kiểm tra độ sống trên môi trường thạch BHI và ủ ở 37°C trong 36 h.

Sau ly tâm, lấy sinh khối của các mẻ gặt đơn pha thành huyền dịch ổn định (hoặc vials để riêng các mẻ gặt đơn) và giữ trong đông băng cho đến khi đông khô.

Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng

Nhận dạng

Các mẫu thử dạng bột sẽ được hoàn nguyên và kiểm tra nhận dạng như trong mục "Nhận dạng và tính thuần khiết".

Độ sống

Xác định độ sống theo khối lượng. Kết quả độ sống của quá trình đông khô tối thiểu phải đạt được 10 % so với các mẻ gặt đơn trước khi đông khô.

Tiêu chuẩn độ sống: Không ít hơn 40×10^9 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a.

Độ ẩm tồn dư (Phụ lục 15.35)

Bán thành phẩm cuối cùng sẽ phải được kiểm tra độ ẩm tồn dư và giá trị này không được vượt quá giới hạn quy định của cơ quan kiểm định quốc gia.

Có 2 phương pháp phổ biến được áp dụng cho thử nghiệm này. Khi sử dụng phương pháp Karl Fischer (Phụ lục 10.3) để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong bán thành phẩm cuối cùng phải dưới 3 %. Nếu sử dụng phương pháp semi-micro để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong mẫu bán thành phẩm cuối cùng phải nằm trong khoảng 1,5 % đến 4,0 %.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Từ bán thành phẩm cuối cùng đông khô, đã được làm đồng nhất hoàn toàn và đếm số lượng đơn vị sống; nếu không ít hơn $2 - 5 \times 10^9$ đơn vị sống, sẽ đóng vào 1 viên bọc gelatin; để đảm bảo khi đóng viên, mỗi viên là một liều cho người và chứa tối thiểu 2×10^9 đơn vị sống vắc xin.

Mẫu kiểm định thành phẩm sẽ được lấy từ mỗi viên vắc xin và làm các thử nghiệm dưới đây:

Nhận dạng

Kiểm tra nhận dạng với 3 viên cho mỗi mẫu thử theo phương pháp như mô tả ở phần “Nhận dạng và tính thuần khiết”.

Độ sống

Kiểm tra độ sống với 5 viên cho mỗi mẫu thử. Kết quả độ sống của mẫu thử được coi như công hiệu của loạt vắc xin thương hàn uống sống giảm độc lực Ty 21a.

Thử nghiệm độ sống của mỗi loạt vắc xin sẽ phải được kiểm tra trên 2 mẫu song song và kết quả là giá trị trung bình độ sống của 2 mẫu này.

Quy trình kiểm tra độ sống cho mỗi mẫu thử: Cho toàn bộ bột vắc xin của 5 viên vào mỗi bình có chứa bi thủy tinh đã được sấy vô trùng, cho tiếp 20 ml nước muối sinh lý (NMSL) vô khuẩn vào mỗi bình trên. Lắc các bình mẫu trên bằng máy lắc rung 200 r/min và đặt trong buồng lạnh 4 °C trong 30 min. Dùng huyền dịch vắc xin trên, pha loãng bằng NMSL và tùy theo số đơn vị sống có trong mỗi viên vắc xin mà mức độ pha loãng đến đâu sẽ dừng lại cho thích hợp. Nhỏ huyền dịch vắc xin pha loãng ở độ pha thích hợp vào ít nhất 5 đĩa thạch BHI, với thể tích 0,1 ml/dĩa và ủ ở 35 °C đến 37 °C trong 30 h đến 36 h hoặc lâu hơn. Đếm số lượng khuẩn lạc trong các đĩa môi trường và tính số lượng khuẩn lạc trung bình của mỗi mẫu thử. Từ kết quả này sẽ tính được số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử kiểm tra song song.

Ví dụ: Huyền dịch vắc xin sau khi đã được lắc rung trong buồng lạnh theo quy trình như trên sẽ được pha loãng bậc

10 bằng NMSL vô khuẩn đến 10^{-6} . Cây huyền dịch vắc xin ở độ pha loãng 10^{-6} vào tối thiểu 5 đĩa thạch BHI với thể tích 0,1 ml/ đĩa; áp dụng công thức sau để tính độ sống trung bình của dung dịch gốc:

$$X = C \times 20 \times 10^6$$

Trong đó:

X là đơn vị sống

C là số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử.

Từ kết quả trên, tính ra số đơn vị sống (Y) trong viên vắc xin thương hàn uống Ty 21a theo công thức sau:

$$Y = \frac{X}{5}$$

Tiêu chuẩn: Độ sống phải từ 2×10^9 đến 5×10^9 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin.

Độ tạp nhiễm

Sử dụng ít nhất 3 viên vắc xin cho một mẫu thử nghiệm. Lựa chọn môi trường thích hợp để có thể kiểm tra, phát hiện sự có mặt của các vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella* (trừ Ty 21a), *Shigella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Vibrio parahaemolyticus*.

Tiêu chuẩn: Vắc xin đạt yêu cầu khi không có mặt của các yếu tố gây bệnh nêu trên. Số lượng đơn vị sống tạp nhiễm không gây bệnh trong một liều vắc xin uống cho người (1 viên) không được vượt quá 2×10^2 vi khuẩn và 20 nấm.

An toàn không đặc hiệu

Mỗi loạt thành phẩm vắc xin thương hàn uống Ty 21a phải được kiểm tra an toàn không đặc hiệu bằng cách tiêm 0,01 liều vắc xin cho người vào ổ bụng cho mỗi trong số 5 chuột nhất trắng khối lượng từ 18 g/con đến 22 g/con; và cho uống 1 liều vắc xin cho người cho mỗi trong số 3 chuột lang (khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con).

Chuột nhất được theo dõi trong vòng 7 ngày sau khi tiêm, chuột lang được theo dõi trong 14 ngày sau khi uống vắc xin.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không có chuột nào có biểu hiện nhiễm bệnh trong khoảng thời gian theo dõi.

Tính ổn định

Vắc xin ở dạng thành phẩm sẽ phải được kiểm tra tính ổn định bằng phương pháp được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận. Thông thường tính ổn định của vắc xin này được đánh giá bằng kết quả độ sống.

Tiêu chuẩn: Độ sống không được thấp hơn 2×10^9 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin trong suốt thời hạn sử dụng mà nhà sản xuất đã đề trình.

Cầm quan

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

Đóng gói, bảo quản, hạn dùng

Đóng gói và dán nhãn:

Nhãn trên vi, trên hộp và tờ hướng dẫn sử dụng cần ghi đầy đủ các thông tin theo quy định hiện hành và đặc biệt