

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 từ 1/3 số chuột lang chết (kể cả được xác định chuột chết không phải do lao) thì loạt 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 nhiều hơn 2/3 số chuột sống sót cho đến hết thời gian theo dõi thì loạt 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 loạt vắc xin đó phải hủy bỏ và phải đình chỉ sản xuất các loạt 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 tủa 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.

Đề 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 tủa 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 tủa, cần loại protein không tủa 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 (AN TOÀN KHÔNG ĐẶC HIỆU)

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, khỏe 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.