

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.

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 khỏe 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 trắng, cân nặng mỗi chuột từ 17 g đến 22 g, chưa dùng thí nghiệm nào trước đó, khỏe mạnh trong thời gian theo dõi trước tiêm 3 ngày; số lượng chuột có thể thay đổi phù hợp theo yêu cầu đặc biệt của từng loại vắc xin, sinh phẩm.

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 khỏe 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 khỏe mạnh, trưởng thành, đực 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 iohexol (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 thỏ chuyên dụng:

Trước khi bắt đầu, đặt thỏ 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 thỏ thí 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 thỏ (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 thỏ 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.

Thỏ thí nghiệm là thỏ 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 thỏ 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 thỏ là giá trị trung bình của các lần đo này. Tiêu chuẩn đưa vào thí nghiệm là những thỏ có nhiệt độ chênh lệch giữa các lần đo không quá