

Ủ bán gel

Đổ toàn bộ nước cất ra khỏi hộp.

Phủ một lớp giấy lọc lên mặt bán gel để tránh cho bán gel không bị khô không đồng đều.

Ủ bán gel qua đêm trong tủ ẩm 37 °C.

Nhuộm và tẩy bán gel

Bóc bỏ lớp giấy lọc trên mặt bán gel.

Nhuộm bán gel bằng dung dịch nhuộm màu trong 15 min.

Trong quá trình nhuộm, lắc đều hộp dung dịch nhuộm màu có chứa bán gel bằng máy lắc.

Hút bỏ toàn bộ dung dịch nhuộm màu và bơm dung dịch tẩy màu vào hộp chứa bán gel; ngâm, lắc liên tục cho đến khi nhìn rõ những cột tên lửa trên bán gel. Nếu bán gel vẫn còn xanh đậm, có thể thay dung dịch tẩy màu mới nhằm rút ngắn thời gian tẩy màu của bán gel.

Đọc và tính kết quả

Bán 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 bán 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 Excel.

Đánh giá kết quả

Loạt 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 µg đến 65 µg 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 loạt 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 loạt vắc xin đó phải hủy bỏ, không được phép xuất xưởng đưa vào sử dụng.

Tiêu chuẩn chấp thuận

(25 µg ± 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 µg/ml bằng nước cất thành các nồng độ 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10,0 µg/ml; 12,5 µg/ml. Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 200 µg/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: µg/100 µg protein.

Cách pha các dung dịch:

Dung dịch glucose chuẩn 500 µg/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 µg/100 µg 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 µm.

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 µl.

Lọc mẫu thử qua màng lọc 0,45 µm 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 %.