

Dung dịch orcinol: Cân 230 mg orcinol (TT) và hòa tan trong 5 ml ethanol (TT), chuẩn bị xong phải chứa dung dịch trong chai thủy tinh màu.

Dung dịch natri azid 0,02 %: Cân 0,02 g natri azid (TT) và pha loãng với 100 ml nước cất.

Chuẩn bị dung dịch để lập đường chuẩn: Từ dung dịch chuẩn ribose pha về các nồng độ 1 µg/ml, 4 µg/ml, 12 µg/ml và 20 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu kiểm tra:

Đối với mẫu cộng hợp (ARM): 50 µl mẫu pha loãng với 450 µl nước cất.

Nếu mẫu là sản phẩm cuối cùng thì không cần pha loãng.

Tiến hành

Xác định hàm lượng PRP tổng số

Lấy vào mỗi ống 500 µl dung dịch chuẩn ribose đã pha (nồng độ 1, 4, 12, 20 µg/ml).

Lấy 500 µl mẫu vắc xin cần kiểm tra vào một ống khác.

Thêm nước vào tất cả các ống để được 2000 µl.

Thêm 1000 µl dung dịch sắt (III) clorid trong acid hydrocloric vào các ống.

Thêm 80 µl dung dịch orcinol vào các ống.

Giữ 80 °C trong 15 min.

Để nguội, đo mật độ quang của các dung dịch ở 670 nm (OD 670 nm) và ở 580 nm (OD 580 nm) và tính kết quả.

Xác định hàm lượng PRP tự do

Chú ý: Trước khi sử dụng ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30, phải rửa ống ly tâm lại với nước và sau đó thêm 500 µl nước cất và ly tâm trong 5 min.

Thêm 500 µl mẫu vào phần trên của ống ly tâm Centricon. Ly tâm ở 3500 rpm trong 20 min.

Sử dụng phần dịch được lọc ra (phần dịch nằm bên dưới) và tiến hành các bước theo phần xác định hàm lượng saccharid tổng số.

Rửa hệ thống ống ly tâm Centricon với màng lọc Ultracel YM-30 bằng nước và thêm dung dịch natri azid 0,02 %. Bảo quản ở 4 °C cho đến khi dùng trở lại.

Tính hàm lượng saccharid cuối cùng của mẫu thử (C_f) theo công thức sau:

$$C_f = C_m \times 10^{-3} \times 2,45$$

Trong đó:

C_m là giá trị trung bình của hàm lượng ribose trong mẫu thử; 2,45 là hệ số biểu hiện mối tương quan về khối lượng phân tử của polymer (saccharid) và D-ribose;

10^{-3} là hệ số chuyển đổi từ đơn vị µg/ml thành mg/ml.

Kết quả được tính theo đơn vị mg/ml (mg carbonhydrat/ml mẫu cần kiểm tra).

15.43 KIỂM TRA CÔNG HIỆU (IN VIVO) CỦA VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP

Nguyên lý thử nghiệm: Công hiệu in vivo vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được xác định qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch bảo vệ (kháng thể kháng HBsAg) sau khi tiêm vắc xin bằng bộ sinh phẩm chẩn đoán HBsAg. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit Analysis (WHO) thông qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch trên tổng số chuột gây miễn dịch ở từng độ pha.

Nguyên vật liệu

Chuột nhắt trắng đạt yêu cầu 4 đến 6 tuần tuổi, cân nặng tối thiểu 16 g, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện cách ly. Dùng 12 - 15 con/độ pha.

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp chuẩn quốc gia hoặc mẫu chuẩn nội bộ nhà sản xuất.

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp mẫu thử.

Bộ sinh phẩm chẩn đoán HBsAg 96 giếng.

Tiến hành

Dung dịch pha loãng: Hòa tan nhôm hydroxyd (Sigma hoặc Merck hoặc hãng tương đương) trong dung dịch natri clorid 0,9 % theo tỷ lệ từ 1/4 - 1/5 (tỷ lệ này có thể thay đổi theo từng loại vắc xin). Hấp diệt trùng dung dịch đã pha ở 121 °C trong 30 min. Bảo quản ở 4 °C.

Pha loãng của vắc xin:

Tiến hành trong hốt vô trùng.

Vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn (hàm lượng khoảng 20 µg kháng nguyên/ml) được pha loãng bậc 2 bằng Dung dịch pha loãng thành các độ pha phù hợp (tính theo tỷ lệ giữa thể tích vắc xin nguyên mẫu trên tổng thể tích của vắc xin nguyên mẫu và thể tích dung dịch pha loãng), ví dụ như bảng 15.43. Tùy từng loại vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, độ pha có thể thay đổi để tạo được đường chuẩn phù hợp.

Bảng 15.43 - Pha loãng của vắc xin (ví dụ)

Mẫu vắc xin (ml)	Dung dịch pha loãng (ml)	Tỷ lệ pha loãng (độ pha)	HBsAg (µg/ml)
10 (vắc xin nguyên mẫu)	30	1/4	5
20 (vắc xin 1/4)	20	1/8	2,5
20 (vắc xin 1/8)	20	1/16	1,25
20 (vắc xin 1/16)	20	1/32	0,0625
20 (vắc xin 1/32)	20	1/64	0,0312
20 (vắc xin 1/64)	20	1/128	0,0156

Gây nhiễm trên động vật:

Với mỗi độ pha của vắc xin gây nhiễm trên ít nhất 12 chuột nhắt (1 ml/con) bằng đường tiêm ổ bụng (phức mạc). Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 - 35 ngày (tùy vắc xin).

Lấy máu: Lấy máu riêng từng chuột vào ống eppendorf, dán nhãn ghi số lô và độ pha. Để máu ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 2 h, sau đó để ở 4 °C trong 2 h hoặc qua đêm.

Ly tâm, tách huyết thanh: Ly tâm các ống eppendorf đựng máu tốc độ 4000 rpm trong 10 min ở 4 °C.

Cẩn thận tách hết phần huyết thanh trong sang một ống eppendorf khác (không được làm lẫn huyết thanh giữa các ống khác nhau). Nếu chưa tiến hành định lượng kháng thể kháng HBsAg ngay thì bảo quản các mẫu huyết thanh ở -20 °C.

Định lượng kháng thể kháng HbsAg bằng phương pháp ELISA, sử dụng bộ sinh phẩm chuẩn đoán của BIO-RAD hoặc Dia.pro hoặc bộ sinh phẩm chẩn đoán phù hợp khác.

Tính kết quả:

Tính giá trị ngưỡng ($OD_{Cut\ off}$) để xác định số chuột dương tính trong từng độ pha của cả vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn. Số chuột dương tính ở mỗi độ pha của mẫu tương đương số chuột tạo được đáp ứng miễn dịch. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit Analysis (WHO) thông qua số chuột dương tính trên tổng số chuột gây miễn dịch ở từng độ pha.

Thử nghiệm có giá trị nếu:

ED_{50} cho cả hai vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử phải nằm trong khoảng các liều đã tiêm.

Các giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được xác định cho mỗi vắc xin trong thử nghiệm phải nằm trong khoảng 33 - 300 %.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Theo quy định trong chuyên luận riêng.

15.44 MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH SỬ DỤNG TRONG KIỂM ĐỊNH VẮC XIN

Giới thiệu chung

Phương pháp miễn dịch là phương pháp dựa trên các liên kết đặc hiệu, thuận nghịch và không cộng hóa trị của kháng nguyên và kháng thể. Phương pháp này được sử dụng để phát hiện hoặc định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể có bản chất là protein, polysaccharid, virus, vi khuẩn, ADN hoặc ARN trong đó chủ yếu là protein. Sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể được phát hiện và định lượng bằng nhiều kỹ thuật.

Các kết quả của phương pháp miễn dịch phụ thuộc vào điều kiện thực nghiệm, bản chất và chất lượng của các hóa chất sử dụng. Do đó việc chuẩn hóa các thành phần của một thử nghiệm miễn dịch với chất chuẩn quốc tế là điều rất cần thiết. Hiện nay các hóa chất sử dụng cho phương pháp miễn dịch đã được thương mại hóa qua các bộ kit chuyên dụng. Trong mỗi bộ kit đã có đủ các thành phần cần thiết và hướng dẫn sử dụng đi kèm để định lượng, nhận dạng một loại kháng nguyên hoặc kháng thể nhất định. Mỗi loại kit đều có một giới hạn phát hiện, quy trình và tiêu chuẩn riêng. Do vậy, khi sử dụng kit cho mỗi thử nghiệm phải tuân thủ theo đúng hướng dẫn của kit để đảm bảo kết quả được chuẩn xác và có ý nghĩa.

Phương pháp miễn dịch có rất nhiều kỹ thuật khác nhau và sẽ cho ra các kết quả khác nhau (do mỗi kỹ thuật có một đơn vị tính riêng, tiêu chuẩn riêng...), vì thế muốn biết kết quả kiểm tra có đạt hay không, cần so sánh với tiêu chuẩn chấp nhận áp dụng cho từng kỹ thuật, từng đơn vị tính, không nên dùng kết quả của các kỹ thuật khác nhau để so sánh, đánh giá.

Hiện tại phương pháp miễn dịch chia thành 2 dạng: Dạng sử dụng kháng thể hoặc kháng nguyên có đánh dấu và không đánh dấu.

Phương pháp sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể đánh dấu

Có nhiều phương pháp miễn dịch đánh dấu khác nhau và được phân ra như sau:

Phương pháp miễn dịch phóng xạ, dùng đồng vị phóng xạ như I^{125} . Viết tắt là RIA (Radio Immuno Assay), IRMA (Immuno Radiometric Assay).

Phương pháp miễn dịch gắn men (EIA - Enzyme Immuno Assay hay ELISA - Enzym Linked Immuno Sorbent Assay). Phương pháp miễn dịch khác như: Miễn dịch huỳnh quang (FIA - Fluoro Immuno Assay); phương pháp miễn dịch hóa phát quang (CLIA - Chemiluminescence Immuno Assay). Tuy nhiên trong kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế chủ yếu sử dụng phương pháp ELISA (EIA) trong thử nghiệm công hiệu, nhận dạng các vắc xin Viêm gan B, Viêm gan A, HPV (vắc xin phòng ung thư cổ tử cung), IPV (vắc xin bại liệt tiêm trong các vắc xin đơn và phối hợp 5 hoặc 6 thành phần); Nhận dạng, định lượng kháng nguyên của virus viêm não nhật bản; Thử nghiệm nhận dạng thành phần Hib trong vắc xin Hib cộng hợp uốn ván và Hib cộng hợp giải độc tố bạch hầu (Vắc xin vi khuẩn); định lượng hàm lượng các chất tồn dư trong vắc xin có bản chất là protein: BSA, ovalbumin, gentamicin, neomycin.

Phương pháp sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể không đánh dấu

Phương pháp khuếch tán miễn dịch tự phát bao gồm:

Khuếch tán miễn dịch đơn (SRID hay còn viết là SRD - Single radial immunodiffusion).

Khuếch tán miễn dịch kép (DID - double immunodiffusion).

Phương pháp khuếch tán miễn dịch dưới ảnh hưởng của điện trường gồm:

Phương pháp điện di miễn dịch (IE - Immunelectrophoretic method): Là sự kết hợp giữa 2 phương pháp điện di trên gel và khuếch tán miễn dịch.

Phương pháp điện di miễn dịch đối lưu (CIE - Crossed immunoelectrophoresis): Là phương pháp IE cải tiến.

Trong kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế chủ yếu sử dụng phương pháp SRD và DID. Phương pháp SRD thường sử dụng để nhận dạng, định lượng hàm lượng kháng nguyên HA, NA của virus cúm (thử nghiệm kiểm tra công hiệu, nhận dạng vắc xin cúm); Kiểm tra hàm lượng glycoprotein (kháng nguyên của virus đại) trong vắc xin đại hay thử