

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 - Immunoelectrophoretic 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

thử nghiệm công hiệu vắc xin thương hàn Vi (vắc xin vi khuẩn)... Phương pháp DID chủ yếu chỉ sử dụng trong thử nghiệm nhận dạng một số vắc xin vi khuẩn như: Hib, thương hàn Vi, phế cầu...

Phương pháp IE và CIE chủ yếu sử dụng kiểm tra trong quá trình sản xuất (IPC-in process control) vắc xin dạng bán thành phẩm (bulk).

Đánh giá kết quả

Tiêu chuẩn đánh giá

Phương pháp định lượng có giá trị khi: Các kháng thể hoặc kháng nguyên của mẫu thử và mẫu chuẩn phải không có sự khác biệt đáng kể về bản chất và thành phần.

Phương pháp miễn dịch bị ảnh hưởng bởi các yếu tố gây nhiễu trong sản phẩm kiểm tra như: Protein tạp, các muối, chất bảo quản, tá dược (muối nhôm, MPL...)... đều có thể gây ảnh hưởng đến sự phân giải của protein kiểm tra. Do đó khi sử dụng phương pháp hóa miễn dịch đều phải thẩm định và chứng minh sự không ảnh hưởng của các chất gây nhiễu trong sản phẩm đến kết quả thử nghiệm.

Giới hạn định lượng của phương pháp phải nhỏ hơn giới hạn về tiêu chuẩn chấp nhận cho từng loại chỉ tiêu kiểm tra. Ví dụ: Tiêu chuẩn về hàm lượng nội độc tố cho vắc xin Gardasil (HPV) không được quá 10 EU/ml thì phương pháp sử dụng hoặc kit sử dụng phải có giới hạn phát hiện thấp hơn 10 EU/ml.

Mỗi phương pháp miễn dịch phải đưa ra được độ chính xác của phương pháp và sự thay đổi về kết quả kiểm tra giữa các lần phải đáp ứng được các yêu cầu (tiêu chuẩn) quy định cho từng loại mẫu theo chuyên luận riêng. Kết quả kiểm tra các mẫu sinh học thường phải nằm trong giới hạn $GMT \pm 2SD$.

Quá trình tiến hành thử nghiệm không được làm phát sinh lỗi hệ thống. Không nên có quá nhiều bước trung gian để tránh gây sai sót hệ thống.

Phương pháp đánh giá

Xác minh, đánh giá các tiêu chuẩn trên sẽ bao gồm các yếu tố sau:

Thử nghiệm phải được tiến hành ít nhất ba lần.

Thử nghiệm phải sử dụng ít nhất ba độ pha loãng khác nhau của mẫu kiểm tra và mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra phải được tiến hành song song trong cùng một điều kiện.

Việc bố trí thử nghiệm được phân bố ngẫu nhiên.

Thành phần, hàm lượng và bản chất của mẫu chuẩn phải tương đồng với mẫu kiểm tra. Ví dụ mẫu kiểm tra là dạng huyết thanh hay được kết hợp với thành phần khác thì mẫu chuẩn cũng phải được chuẩn bị để có thành phần tương tự. Trong thử nghiệm kiểm tra phải xác định cả tính đặc hiệu của chất phản ứng đánh dấu. Ví dụ trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng kháng nguyên HPV trong vắc xin Gardasil (có 4 typ: 6, 11, 16 và 18), nếu định lượng typ 6 gắn kháng

thể đặc hiệu cho typ 6 thì vẫn phải kiểm tra sự đặc hiệu của kháng thể bằng cách nhỏ kháng nguyên khác typ (typ 11 hoặc 16 hoặc 18). Nếu đặc hiệu thì chỉ đúng typ mới cho phản ứng, khác typ không cho phản ứng.

Thay thế thử nghiệm

Thay thế thử nghiệm miễn dịch khi có yếu tố sau:

Sự kết hợp tối đa (không có sự thay đổi) được xác định; Các độ pha loãng đã bao quát được toàn bộ giới hạn phản ứng từ nồng độ có sự gắn kết tối đa đến không có sự gắn kết của cả mẫu thử và mẫu chuẩn.

Tính toán thống kê

Để tính toán kết quả, các đường cong phản ứng cho mẫu thử và mẫu chuẩn được tính toán theo các phương pháp mô tả trong Phụ lục 13.10 Phân tích thống kê các kết quả thử nghiệm sinh học.

Trường hợp thay thế thử nghiệm miễn dịch là khi kết quả thu được không có sự khác biệt đáng kể từ nồng độ cao đến nồng độ thấp của mẫu kiểm tra và mẫu chuẩn. Sự khác nhau có thể cho thấy sự ảnh hưởng của chất nền hoặc chất ức chế sự liên kết hoặc suy giảm sự nhận biết đánh dấu có chọn lọc. Ví dụ trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng endotoxin trong vắc xin HPV tiêu chuẩn không được quá 10 EU/ml, sử dụng bộ hóa chất chuẩn endotoxin có độ nhạy là 0,0625 thì độ pha loãng tối đa cho mẫu này khoảng 160 lần. Kiểm tra mẫu từ độ pha gốc đến độ pha 160 lần mà kết quả thu được không có sự thay đổi, mẫu chứng dương đều cho kết quả âm tính thì có nghĩa là trong mẫu kiểm tra có chất gây nhiễu.

15.45 XÁC ĐỊNH BSA TỒN DƯ TRONG VẮC XIN

BSA (Bovine Serum Albumin) là một loại protein dưới dạng huyết thanh bào thai bò (FBS - Fetal Bovine Serum) hoặc huyết thanh bào thai bê (FSC - Fetal Calf Serum) được bổ sung trong quá trình nuôi cấy tế bào để sản xuất vắc xin. Theo Khuyến cáo của WHO, tất cả các dạng protein có nguồn gốc từ động vật nếu sử dụng trong sản xuất vắc xin đều phải được kiểm soát để hạn chế các phản ứng phụ.

Có thể sử dụng phương pháp điện di miễn dịch đôi lưu hoặc các kit thương phẩm (hoặc tự gắn) để xác định BSA tồn dư trong vắc xin.

PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MIỄN DỊCH ĐÔI LƯU

Nguyên lý

Điện di miễn dịch đôi lưu là kỹ thuật dựa trên sự ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể xảy ra khi cho kháng nguyên và kháng thể ở nồng độ đủ để xảy ra phản ứng ngưng kết di chuyển trên gel agarose. Nếu kháng thể và kháng nguyên ngưng kết đặc hiệu sẽ cho cung kết tủa và ngược lại, sẽ không có cung kết tủa nếu kháng nguyên và kháng thể không ngưng kết đặc hiệu. Trong kỹ thuật này,