

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,

dưới tác dụng của cường độ điện trường, kháng nguyên và kháng thể gặp nhau và kết hợp đặc hiệu với nhau nhanh hơn trên gel agarose.

Thiết bị, dụng cụ

Buồng điện di nằm ngang.
Tấm thủy tinh (85 × 85) mm.
Bàn cân bằng với dụng cụ đo giọt nước.
Ampe kế.
Đục giếng thạch đường kính 3 mm.
Khay giữ ẩm.
Khay thủy tinh dùng để nhuộm và rửa tiêu bản.
Giấy Whatman No.1 và No.3.
Vải gạc lọc Agarose.

Hóa chất, dung dịch thử

Agarose.
Dung dịch đệm barbitol 0,1 M pH 8,6.
Dung dịch natri clorid 0,85 % hoặc đệm PBS pH 7,2.
Dung dịch nhuộm màu Amido Black 10B 0,1 % hoặc dung dịch thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250.
Dung dịch tẩy màu: Dung dịch acid acetic 2 % hoặc hỗn hợp ethanol/acid acetic (gồm 100 ml ethanol, 70 ml acid acetic và nước cất vừa đủ 1000 ml).
Huyết thanh thỏ kháng BSA (Anti-Bovine Albumin antibody produced in rabbit) đặc hiệu.
Chứng dương (BSA) gồm 3 nồng độ: 0,005 %; 0,0005 % và 0,0001 %.

Cách tiến hành

Chuẩn bị tiêu bản

Hòa tan 1,5 g agarose trong 100 ml dung dịch đệm barbitol 0,1 M, pH 8,6. Đun sôi nhẹ cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Lọc dung dịch trên bằng miếng vải gạc, tính lượng dùng vừa đủ, dùng pipet đổ thạch lên tấm thủy tinh (85 × 85) mm với thể tích khoảng (12 – 14) ml/1 tấm kính. Để 30 min cho agarose đông cứng.
Dùng dụng cụ đục thạch thành 2 dãy và số lượng giếng tùy theo mẫu kiểm tra. Khoảng cách giữa các giếng khoảng 10 mm.

Cho mẫu vào tiêu bản

Hút 16 µl đến 18 µl mẫu vắc xin cần kiểm tra cho vào dãy lỗ cột thứ nhất.
Đầy lỗ cột thứ 2 đối diện cho huyết thanh thỏ kháng BSA với lượng tương đương.
Chứng dương cho tương tự.

Chạy điện di

Đặt tiêu bản đã có vắc xin cần kiểm tra và huyết thanh thỏ kháng BSA trên vào buồng điện di nằm ngang có chứa dung dịch chạy điện di (dung dịch đệm barbitol 0,1 M pH 8,6). Dây có vắc xin nằm về phía cực dương, dây có huyết thanh thỏ kháng BSA nằm về phía cực âm.
Dùng 2 miếng giấy Whatman thấm nối tiếp giữa bề mặt tiêu bản với dung dịch chạy điện di ở 2 cạnh bên của tiêu bản.

Cho dòng điện chạy vào với dòng điện có hiệu điện thế là 125 V (có thể 140 hoặc 170 V) và cường độ không vượt quá 90 mA. Thời gian chạy từ 30 - 60 min.

Rửa và nhuộm tiêu bản

Sau khi kết thúc chạy điện di, tiêu bản được lấy ra và ngâm trong dung dịch PBS pH 7,2 hoặc dung dịch natri clorid 0,85 % từ 16 h đến 24 h. Trong giai đoạn này, nên thay dung dịch 3 lần.

Rửa tiêu bản lại bằng nước cất và ngâm tiêu bản trong nước cất khoảng 30 min.

Đặt tiêu bản vào khay giữ ẩm.

Làm khô tiêu bản: Làm khô tự nhiên hoặc có thể bằng thổi hơi.
Rửa lại tiêu bản bằng nước cất và đặt tiêu bản vào khay có chứa dung dịch nhuộm Amido Black từ 5 đến 10 min.
Đổ thuốc nhuộm đi và tẩy màu tiêu bản bằng dung dịch acid acetic 2 %. Cứ như vậy, nhuộm và tẩy màu 3 lần.
Nếu dùng thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue thì cũng nhuộm và tẩy màu tương tự nhưng dùng dung dịch tẩy màu là hỗn hợp ethanol/acid acetic.

Để tiêu bản khô tự nhiên.

Đọc kết quả

Trên tiêu bản, giữa hai dãy giếng cột 1 và 2 sẽ xuất hiện đường tua màu xanh. Đường tua to và đậm tỷ lệ thuận với lượng BSA có trong mẫu thử.

Giếng mẫu vắc xin phải không tạo đường tua với huyết thanh thỏ kháng BSA đặc hiệu hoặc đường tua rất nhạt, nhỏ hơn đường tua chuẩn có nồng độ 0,0001 % bovine albumin. Điều này được cho là lượng BSA trong vắc xin thấp hơn 50 ng trong 1 liều vắc xin.

Giếng chứng dương có nồng độ có đường tua từ đậm đến rất nhạt (vết) theo nồng độ tương ứng 0,005 %; 0,0005 % và 0,0001 % BSA.

PHƯƠNG PHÁP DÙNG KIT THƯƠNG PHẨM

Yêu cầu thử nghiệm: Phải tuân thủ đầy đủ các bước cơ bản của quy trình thực hiện theo hướng dẫn sử dụng, đánh giá thử nghiệm của từng bộ kit.

Mẫu kiểm tra cần được lặp lại ít nhất 2 giếng/độ pha.

Tính kết quả: Theo phần mềm chuyên dụng.

Ghi chú: Nếu hàm lượng BSA trong mẫu cần kiểm tra tính được lớn hơn giới hạn phát hiện trên của kit thì phải tiếp tục pha loãng tiếp mẫu và làm lại thử nghiệm. Trường hợp pha loãng mẫu quá nhiều cũng dẫn tới kết quả âm tính hoặc cho giá trị nhỏ hơn giới hạn phát hiện của kit, cần phải tính toán lại độ pha (thậm chí không pha loãng) mẫu rồi làm lại thử nghiệm.

TIÊU CHUẨN CHẤP THUẬN

Hàm lượng BSA tồn dư trong mẫu phải nằm trong giới hạn cho phép đối với từng vắc xin hoặc nằm trong giới hạn nhà sản xuất đăng ký.