

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiên bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

IV. Thêm kháng thể sơ cấp

Thêm 100 µl kháng thể 2 vào tất cả các giếng.

Dán phiên và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiên bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

V. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn enzym

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiên và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h (tốt nhất ủ ở 37 °C). Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiên bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

VI. Thêm cơ chất

Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

15.47 KIỂM TRA MYCOPLASMA TRONG VẮC XIN/ SINH PHẨM (Phương pháp nuôi cấy hoặc dùng chỉ thị tế bào)

Chi *Mycoplasma* có hơn 120 loài, chúng là một nhóm các vi khuẩn có kích thước nhỏ, không có thành tế bào, có kích thước và hình dạng khác nhau, không bắt màu Gram.

Mycoplasma thường gây ra các nhiễm trùng nặng cho tế bào và mô. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi trong một thời gian dài mà không hề có biểu hiện tổn thương bên ngoài tế bào, nó ảnh hưởng tới chuyển hoá và sự phát triển bình thường của tế bào. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi thường không gây đục môi trường.

Kiểm tra *Mycoplasma* là một phần của kiểm tra các tác nhân ngoại lai có nguồn gốc từ chủng virus sản xuất vắc xin/sinh phẩm mà trong quá trình sản xuất sử dụng tế bào nuôi.

Phạm vi áp dụng

Áp dụng để kiểm tra:

Tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chứng;

Mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm mà theo Tổ chức Y tế Thế giới cần phải kiểm tra *Mycoplasma*.

Các phương pháp

Thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin/sinh phẩm có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau:

Phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng và môi trường đặc.

Phương pháp dùng chỉ thị tế bào.

Cả hai phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào đều được sử dụng để kiểm tra *Mycoplasma* trong tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chứng.

Khi kiểm tra *Mycoplasma* trong mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm hoặc vắc xin thành phẩm thì sử dụng phương pháp nuôi cấy. Phương pháp dùng chỉ thị tế bào có thể cũng được sử dụng.

Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic (Nucleic acid amplification techniques: NAT) có thể dùng để thay thế một trong hai phương pháp trên. Tuy nhiên, nên thẩm định trước khi dùng về ít nhất hai chỉ số: Độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện.

Phương pháp dựa trên hoạt động của enzym cũng có thể sử dụng nhưng phải thẩm định để chứng tỏ nó có khả năng phát hiện *Mycoplasma* tương đương như phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào. Các phương pháp khác có thể được sử dụng nếu cơ quan Kiểm định Quốc gia đã chấp thuận.

Phương pháp nuôi cấy

Môi trường sử dụng: Sử dụng cả hai loại môi trường đặc và môi trường lỏng với số lượng đủ lớn để đảm bảo phát hiện được số lượng nhỏ *Mycoplasma* có thể có trong vắc xin/sinh phẩm. Nên sử dụng ít nhất hai môi trường lỏng, một để đánh giá tính chất lên men glucose, một để đánh giá tính chất thủy phân arginin.

Môi trường lỏng cần chứa đỏ phenol.

Kiểm tra dinh dưỡng môi trường: Cần kiểm tra khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho chủng phát triển (kiểm tra dinh dưỡng) của từng loạt môi trường.

Các loài *Mycoplasma* sử dụng cho kiểm tra dinh dưỡng môi trường như sau:

Acholeplasma laidlawii (nếu trong quá trình sản xuất vắc xin/sinh phẩm có sử dụng kháng sinh); *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae* (hoặc những loài *Mycoplasma* có lên men D-glucose khác).

Nên sử dụng ít nhất hai chủng: Một chủng lên men glucose, một chủng thủy phân arginin. Các chủng này không được cấy chuyển quá 15 lần.

Quy trình thực hiện:

Cấy chủng vào môi trường theo tỷ lệ không quá 100 CFU cho một đĩa đường kính 60 mm có chứa 9 ml môi trường đặc hoặc một chai chứa 100 ml môi trường lỏng.

Ủ các chai và đĩa môi trường này ở nhiệt độ tương tự như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*.

Lấy 0,2 ml từ mỗi chai môi trường lỏng, cấy chuyển sang môi trường đặc ở các thời điểm giống như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*.

Môi trường lỏng đạt yêu cầu về dinh dưỡng nếu mỗi chủng đều có khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch của ít nhất một lần cấy chuyển. Môi trường đặc đạt yêu cầu về dinh dưỡng nếu mỗi chủng có số lượng khuẩn lạc tính trung bình trên các đĩa ít hơn không quá 1/5 số lượng đưa vào.

Kiểm tra ảnh hưởng của chất ức chế (thử nghiệm ức chế)

Thử nghiệm này nhằm xác định trong sản phẩm có chứa chất ức chế mà ảnh hưởng đến sự phát triển của *Mycoplasma* hay không. Nếu có, cần phải loại bỏ ảnh hưởng của chất ức chế trước khi kiểm tra *Mycoplasma* trên vắc xin/sinh phẩm bằng cách thích hợp như trung hòa, pha loãng hoặc cấy chuyển không dùng chất ức chế,...

Thực hiện lại *thử nghiệm ức chế* sau khi đã sử dụng các biện pháp trên. Nếu sử dụng biện pháp pha loãng, phải sử dụng thể tích lớn môi trường hoặc chia vắc xin/sinh phẩm vào nhiều chai môi trường dung tích 100 ml.

Nguyên lý: Thử nghiệm ức chế được thực hiện bằng cách cho sản phẩm cần kiểm tra vào môi trường với lượng giống như thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong sản phẩm, sau đó cấy chủng thử thách vào môi trường với lượng giống như thử nghiệm *kiểm tra dinh dưỡng* môi trường. Thực hiện thử nghiệm *kiểm tra dinh dưỡng* môi trường để làm chứng dương cho thử nghiệm này.

Đánh giá kết quả: Chất ức chế ảnh hưởng đến sự phát triển của *Mycoplasma* nếu có ít nhất một trong hai trường hợp sau:

Môi trường lỏng: Một chủng thử thách trong các chai môi trường có vắc xin/sinh phẩm mọc chậm hơn các ống không có vắc xin-sinh phẩm từ hai lần cấy chuyển trở lên.

Môi trường đặc: Một chủng thử thách có số lượng khuẩn lạc ở các đĩa chứa vắc xin/sinh phẩm ít hơn số lượng khuẩn lạc ở các đĩa không có vắc xin/sinh phẩm từ 1/5 số lượng khuẩn lạc của các đĩa không có vắc xin/sinh phẩm trở lên. Mỗi sản phẩm nên thực hiện *thử nghiệm ức chế* một lần trước khi thực hiện thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong sản phẩm. Chỉ phải làm lại *thử nghiệm ức chế* khi thay đổi phương pháp sản xuất làm ảnh hưởng tới việc xác định *Mycoplasma*.

Kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin/sinh phẩm

Cấy lần đầu:

Môi trường lỏng: Mỗi loại môi trường cấy ít nhất 10 ml vắc xin/sinh phẩm vào một chai 100 ml. Nếu có sự đổi màu của môi trường sau cấy vắc xin/sinh phẩm, chỉnh pH của môi trường về pH ban đầu bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrocloric.

Môi trường đặc: Cấy 0,2 ml vắc xin/sinh phẩm vào mỗi đĩa, mỗi loại môi trường dùng ít nhất hai đĩa.

Cấy chuyển:

Thời điểm cấy chuyển như sau (kể từ ngày cấy đầu tiên):

Lần 1: Vào khoảng từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4.

Lần 2: Vào khoảng từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 8.

Lần 3: Vào khoảng từ ngày thứ 13 đến ngày thứ 15.

Lần 4: Vào khoảng từ ngày thứ 19 đến ngày thứ 21.

Cách cấy chuyển: Từ mỗi chai môi trường cấy chuyển 0,2 ml/đĩa, mỗi loại môi trường đặc cấy ít nhất một đĩa.

Ú, theo dõi môi trường sau cấy:

Nhiệt độ ủ: 35 °C đến 38 °C.

Thời gian ủ: Các chai môi trường ủ 20 - 21 ngày. Các đĩa môi trường ủ ít nhất 14 ngày, riêng các đĩa cấy chuyển vào ngày thứ 19 - 21 theo dõi 7 ngày.

Ủ đồng thời một chai 100 ml mỗi loại môi trường không cấy vắc xin/sinh phẩm và một đĩa thạch không cấy vắc xin/sinh phẩm cùng loạt với đĩa thạch cấy chuyển để làm chứng âm.

Kết quả kiểm tra dinh dưỡng môi trường làm chứng dương.

Điều kiện nuôi cấy: Nút chặt các chai môi trường, ủ ở nhiệt độ 35 °C đến 38 °C. Các đĩa môi trường ủ ở điều kiện vi hiếu khí (khí trường nitrogen, 5 - 10 % CO₂ và độ ẩm thích hợp), nhiệt độ 35 °C đến 38 °C.

Theo dõi các chai môi trường 2 - 3 ngày/lần. Nếu có sự đổi màu của môi trường, cấy chuyển sang môi trường đặc (xem phần *Cấy chuyển* ở trên).

Theo dõi các đĩa môi trường 7 ngày/lần bằng kính hiển vi quang học để kiểm tra xem có khuẩn lạc *Mycoplasma* hay không.

Khuẩn lạc được cho là của *Mycoplasma* nếu có hình dạng điển hình như sau: Trung tâm khuẩn lạc tối và dày, mọc lan xuống thạch; rìa khuẩn lạc mỏng, bết. Khuẩn lạc có dạng trứng ốp mà trung tâm khuẩn lạc là phần lòng đỏ để nguyên.

Đánh giá kết quả:

– Vắc xin/sinh phẩm đạt yêu cầu về vô trùng đối với *Mycoplasma* nếu sau nuôi cấy không có dấu hiệu phát triển của *Mycoplasma* trong các đĩa môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm.

– Vắc xin/sinh phẩm không đạt yêu cầu về vô trùng đối với vắc xin/sinh phẩm nếu sau nuôi cấy có dấu hiệu phát triển của *Mycoplasma* trong các đĩa môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm.

– Thử nghiệm không có giá trị nếu có một hoặc nhiều hơn các trường hợp sau xảy ra:

Môi trường sử dụng không đạt yêu cầu của thử nghiệm Kiểm tra dinh dưỡng.

Có dấu hiệu mọc của *Mycoplasma* trong chứng âm.

Có sự phát triển của vi khuẩn khác hoặc nấm trong các chai môi trường.

Vỡ ít nhất hai đĩa môi trường,

Có ít nhất hai đĩa môi trường nhiễm vi khuẩn khác và nấm.

Trường hợp sau nuôi cấy trên 7 ngày mà chỉ có một đĩa môi trường nhiễm vi khuẩn/nấm hoặc chỉ vỡ một đĩa môi trường thì các đĩa này có thể bỏ qua khi không có dấu hiệu mọc của *Mycoplasma*.

– Các trường hợp thử nghiệm không có giá trị: Nhắc lại thử nghiệm với số mẫu như lần 1. Đánh giá kết quả của lần thử nghiệm lại cũng giống như đánh giá lần đầu.

– Các trường hợp thử nghiệm có giá trị, có sự xuất hiện của *Mycoplasma* nhắc lại thử nghiệm với số mẫu và môi trường gấp đôi lần 1. Đánh giá kết quả thử nghiệm lại cũng giống như đánh giá lần đầu.

Phương pháp dùng chỉ thị tế bào

Nguyên lý: Tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm huỳnh quang. Nếu bị nhiễm *Mycoplasma*, trên bề mặt tế bào sẽ có các hạt hoặc các sợi đặc trưng. Các hạt, sợi đặc trưng này thậm chí còn có cả ở vùng gian bào nếu bị nhiễm nặng. Tế bào sử dụng: Vero hoặc tế bào khác có hiệu quả tương đương trong việc xác định *Mycoplasma*, VD: Các dòng tế bào sản xuất.

Kiểm tra chất lượng của tế bào bằng cách áp dụng quy trình giống như quy trình kiểm tra mẫu thử, sau đó cấy vào tế bào không quá 100 CFU các chủng thích hợp của *M. hyorhinae* và *M. orale*. Tế bào đạt yêu cầu nếu cả hai chủng trên đều mọc được.

Cần cấy chuyển tế bào mà không dùng kháng sinh trước khi sử dụng vào thử nghiệm.

Pha các dung dịch

Dung dịch kali dihydrophosphat 2 M: Hòa tan 13,61 g kali dihydrophosphat khan (TT) trong 50 ml nước.

Dung dịch kali hydrophosphat 2 M: Hòa 17,42 g kali hydrophosphat khan (TT) trong 50 ml nước.

Dung dịch đệm phosphat (pH 7,4): Trộn đều 3,6 ml dung dịch kali dihydrophosphat 2 M; 14,6 ml dung dịch kali hydrophosphat 2 M; 8 g natri clorid với 1 L nước. Điều chỉnh pH nếu cần bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrocloric.

Dung dịch bisbenzimid gốc: Hòa tan 5 mg bisbenzimid (TT) trong một ít nước, thêm nước vừa đủ 100 ml, bảo quản tránh ánh sáng.

Dung dịch làm việc bisbenzimid: Pha loãng 100 µL dung dịch bisbenzimid gốc bằng dung dịch đệm phosphat (pH 7,4) để được 100 ml hỗn hợp dung dịch.

Dung dịch natri hydrophosphat: Hòa tan 28,4 g natri hydrophosphat khan (TT) trong 1 L nước.

Dung dịch acid citric: Hòa tan 21 g acid citric (TT) trong 1 L nước.

Dung dịch đệm phosphat-citrat (pH 5,5): Trộn đều 56,85 ml dung dịch natri hydrophosphat và 43,15 ml dung dịch acid citric.

Phương pháp thực hiện

Nuôi tế bào ở nồng độ thích hợp (Khoảng $2 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^5$ tế bào/ml, $4 \cdot 10^3$ - $2,5 \cdot 10^4$ tế bào/cm²).

Cấy 1 ml mẫu thử vào chai tế bào.

Ủ ở nhiệt độ 35 °C đến 38 °C.

Sau ít nhất 3 ngày, cấy chuyển lên một lá kính. Tế bào được nuôi ở mật độ thấp để chỉ phủ kín khoảng 50 % bề mặt sau (3 – 5) ngày. Tế bào phủ kín hoàn toàn làm khó quan sát *Mycoplasma* sau khi nhuộm.

Bỏ môi trường, rửa tế bào bằng đệm phosphat, cố định tế bào [có thể sử dụng hỗn hợp dung dịch acid acetic băng : methanol (1 :3)]

Bỏ dung dịch cố định, rửa tế bào bằng nước vô trùng, để khô.

Phủ tế bào bằng dung dịch làm việc bisbenzimid hoặc thuốc nhuộm thích hợp khác. Để trong khoảng 10 min.

Bỏ thuốc nhuộm và rửa tế bào bằng nước vô trùng.

Phủ mỗi lá kính bằng một giọt hỗn hợp của glycerol và dung dịch đệm phosphat-citrat với lượng bằng nhau.

Soi dưới kính hiển vi huỳnh quang vật kính có độ phóng đại từ 400 lần trở lên.

Làm song song với chứng âm và chứng dương.

Đánh giá kết quả

Vắc xin/sinh phẩm đạt yêu cầu nếu không có hình dạng điển hình của *Mycoplasma* (Các hạt hoặc sợi đặc trưng dưới kính hiển vi huỳnh quang khắp bề mặt tế bào hoặc ở khoảng gian bào).

Thử nghiệm không có giá trị nếu xảy ra một trong hai trường hợp sau:

Chứng dương không có hình dạng điển hình của *Mycoplasma*.

Chứng âm có hình dạng điển hình của *Mycoplasma*.