

Sau 72 h tổng khối lượng chuột của mỗi nhóm không ít hơn trước tiêm.

Sau 7 ngày khối lượng trung bình mỗi chuột không ít hơn 60 % so với nhóm chứng.

Chuột chết không quá 5 %.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt một trong 3 tiêu chuẩn nêu trên phải nhắc lại thử nghiệm theo yêu cầu như sau:

Nếu thử nghiệm lần 1 không có giá trị (invalid test): Nhắc lại thử nghiệm với số lượng chuột và số lượng mẫu bằng lần 1.

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid test): Phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng chuột nhất trắng và số lượng mẫu gấp đôi so với lần 1.

Kết quả của lần kiểm tra nhắc lại, nếu đạt yêu cầu 3 tiêu chuẩn nêu trên và giá trị trung bình của 2 lần thử nghiệm (về % tăng khối lượng chuột của nhóm vắc xin thử nghiệm so với nhóm chứng sau 7 ngày theo dõi) đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó mới được coi là đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu ho gà. Nếu ở lần kiểm tra nhắc lại không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó không đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu thành phần ho gà và phải bị hủy bỏ.

An toàn không đặc hiệu (Độc tính bất thường)

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhất trắng và chuột lang khỏe mạnh không tiêm bất cứ gì trước khi thử nghiệm.

Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhất trắng có khối lượng 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con một liều tiêm cho người; 2 chuột lang có khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, mỗi con một liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml/con.

Theo dõi tình trạng sức khoẻ và cân chuột hàng ngày.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Vắc xin được coi là không có độc tính bất thường nếu tất cả các động vật thí nghiệm sống khỏe mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày và không có dấu hiệu nhiễm độc.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nêu trên, phải nhắc lại thử nghiệm. Thử nghiệm nhắc lại nếu đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó được coi là đạt an toàn không đặc hiệu; nếu không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin đó bị coi là không đạt an toàn không đặc hiệu và phải hủy bỏ.

Đối với thử nghiệm nhắc lại:

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị: phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột gấp đôi lần 1.

Nếu thử nghiệm lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị: chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột bằng lần 1.

15.5 XÁC ĐỊNH ĐẬM ĐỘ VI KHUẨN HO GÀ

Nguyên tắc

Thực tế một hỗn dịch vi khuẩn ho gà có đậm độ 10 tỷ vi khuẩn/ml tương ứng với 10 IOU (đơn vị độ đục quốc tế) khi nhìn bằng mắt thường.

Có thể sử dụng bộ so độ đục chuẩn quốc tế của WHO để so bằng mắt thường hoặc chuẩn trên máy quang phổ kế khi xác định đậm độ của hỗn dịch *B. pertussis* 18323 trong thử nghiệm công hiệu vắc xin ho gà.

Cách tiến hành

Trong quá trình sản xuất vắc xin ho gà, mỗi lần gặt sinh khối cần xác định đậm độ vi khuẩn của nước cốt ho gà. Độ đục nước cốt ho gà và nước cốt ho gà cô đặc được xác định bằng cách so sánh với ống mẫu chuẩn quốc tế hoặc quốc gia và quan sát bằng mắt thường hoặc đo trên máy quang phổ kế (không được muộn hơn hai tuần sau khi gặt và trước khi huyền dịch vi khuẩn được đưa vào bất kỳ quy trình pha chế nào tiếp theo).

Pha loãng nước cốt trong nước muối sinh lý cho đến khi soi bằng mắt thường thấy tương đương với ống chuẩn 10 IOU.

Tính độ đục của mẫu thử bằng cách nhân với số lần pha loãng.

Có thể đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn ho gà trên máy đo quang phổ ở bước sóng 560 nm. Đậm độ nước cốt ho gà được sử dụng làm cơ sở để tính toán khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Thành phần ho gà trong vắc xin DTP hỗn hợp không vượt quá 20 đơn vị độ đục quốc tế (IOU) trong một liều đơn vắc xin cho người. Tỷ lệ thành phần các chủng *B. pertussis* 18323 không được thay đổi khi phối trộn, phải đăng ký rõ trong hồ sơ và được sự chấp thuận của cơ quan Kiểm định quốc gia.

15.6 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TWEEN 20 TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Dựa vào phản ứng của polyethoxylat trong thành phần của Tween 20 với amoni cobaltothiocyanat tạo thành hợp chất màu xanh lơ tan trong dicloromethan.

Tiến hành

Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 100 µg/ml. Hút 1 ml mẫu thử vào ống nghiệm, thêm 5 ml ethanol 95 % (TT), ly tâm 3500 rpm trong 10 min ở 20 °C. Chuyển phần nước sang ống nghiệm khác, rửa tủa bằng 1 ml ethanol 95 % (TT), chuyển nốt nước rửa tủa vào ống nghiệm. Đun cách thủy phần nước thu được ở 80 °C cho đến khi còn lại khoảng 0,5 ml, thêm 1 ml nước cất vào ống nghiệm.

Hút dung dịch Tween 20 chuẩn 1 mg/ml vào các ống nghiệm lần lượt theo thể tích 10 µl; 25 µl; 50 µl; 75 µl; 100 µl, thêm nước cất vừa đủ 1 ml.

Mẫu trắng là 1 ml nước cất.

Thêm 2 ml dicloromethan (TT) vào mỗi ống nghiệm đựng mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử. Thêm tiếp 3 ml amoni cobaltothiocyanat, lắc kỹ, để yên ở nhiệt độ phòng trong 90 min. Hút bỏ phần nước nổi bằng máy hút chân không, đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) của lớp dicloromethan màu xanh lơ phía dưới ở bước sóng 620 nm.

Dung đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng Tween 20 trong mẫu thử.

Đơn vị tính: $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein.

Cách pha các dung dịch:

Dung dịch amoni cobaltothiocyanat: Hòa tan 6,0 g *cobalt nitrat (TT)* và 40 g *amoni thiocyanat (TT)* trong *nước cất*, thêm *nước cất* vừa đủ 200 ml, lọc qua giấy lọc.

Dung dịch Tween 20 chuẩn 10 mg/ml: Cân 1 g *Tween 20* vào bình định mức 100 ml, thêm *nước cất* vừa đủ, lắc đều.

Pha loãng bằng *nước cất* 10 lần trước khi dùng.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm.

Hàm lượng Tween 20 có trong bán thành phẩm viêm gan B không lớn hơn $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein.

15.7 KIỂM TRA VÔ TRÙNG VẮC XIN/SINH PHẨM

Việc kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Kiểm soát môi trường thử nghiệm và sử dụng mẫu đối chứng âm tính thích hợp để kiểm tra và đảm bảo điều kiện vô trùng.

Môi trường nuôi cấy

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Hai môi trường sử dụng để kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm là môi trường thioglycolat lỏng (Fluid Thioglycollate Medium: FTM) và casein đậu tương (Soybean-casein digest medium: SCDM). FTM dự định dùng để phát hiện vi khuẩn kỵ khí nhưng cũng có thể xác định được vi khuẩn hiếu khí. SCDM dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm. Khi vắc xin/sinh phẩm có chứa chất bảo quản là merthiolat, có thể dùng FTM thay thế cho SCDM trong phương pháp cấy trực tiếp khi môi trường này đạt yêu cầu trong thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh (Growth promotion test). Các môi trường tương đương khác cũng có thể được sử dụng nếu chúng đạt được yêu cầu về tính tăng sinh và được cơ quan Kiểm định Quốc gia chấp thuận. Công thức và cách pha hai môi trường trên như sau:

Môi trường thioglycolat lỏng:

L - Cystin	0,50 g
Natri clorid	2,50 g
Glucose monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	5,50 g
Thạch bột có độ ẩm nhỏ hơn 15 %	0,75 g
Cao nấm men (tan trong nước)	5,00 g
Casein thủy phân bằng pancreatin (men tụy)	15,00 g
Nước	1000 mL
Natri thioglycolat	0,50 g
hoặc acid thioglycolic	0,3 mL
Dung dịch natri resazurin (1 g/L) mới pha	1 mL

Trộn lẫn lượt sáu thành phần đầu như thứ tự ở trên trong nước nóng cho đến khi tan hoàn toàn. Cho thêm natri thioglycolat (hoặc acid thioglycolic), chuyển sang một bình chứa thích hợp và thêm nước vừa đủ, làm tan hoàn toàn trong một nồi cách thủy. Chính pH của dung dịch

(nếu cần) bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)* sao cho pH sau tiệt trùng (pH cuối cùng) là 7,0 đến 7,2. Nếu cần thiết phải lọc, đun nóng dung dịch (tránh đun sôi) rồi lọc qua giấy lọc ướt khi dung dịch còn đang nóng. Thêm dung dịch natri resazurin, trộn đều. Chia môi trường vào các chai/ống chứa thích hợp. Hấp tiệt trùng môi trường trong lò đã được thẩm định ở 121°C trong 18 min đến 20 min. Vặn chặt nút các chai/ống môi trường và bảo quản ở nhiệt độ 20°C đến 30°C .

Nếu quá 1/3 trên của chai/ống môi trường chuyển thành màu hồng thì không nên sử dụng nữa. Có thể sử dụng lại một lần nữa bằng cách đun nóng môi trường trong bể ổn nhiệt đến khi màu hồng biến mất rồi làm lạnh nhanh. Không dùng môi trường quá thời hạn sử dụng đã được thẩm định.

Môi trường casein đậu tương lỏng:

Casein thủy phân bởi pancreatin	17,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	3,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucose monohydrat	2,5 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Hòa tan tất cả các thành phần vào nước, đun nóng nhẹ cho tan hoàn toàn, để nguội đến nhiệt độ phòng. Chính pH của dung dịch (nếu cần) bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)* hoặc *dung dịch acid hydrochloric 1 N (TT)* sao cho pH sau tiệt trùng (pH cuối cùng) là 7,1 đến 7,5. Lọc trong nếu cần. Phân chia môi trường vào các chai/ống. Hấp tiệt trùng môi trường trong lò đã được thẩm định ở 121°C trong 18 min đến 20 min. Bảo quản môi trường ở nhiệt độ phòng (20°C đến 30°C).

Không dùng môi trường quá thời hạn sử dụng đã được thẩm định.

Kiểm tra chất lượng môi trường

Việc kiểm tra chất lượng mỗi loạt môi trường được thực hiện trước hoặc song song với kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm.

Tất cả các loạt môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm cần được kiểm tra về hai tính chất: tính vô trùng và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của vi khuẩn và nấm (*tính tăng sinh*).

Kiểm tra tính vô trùng

Lấy 2 % số chai/ống của mỗi loạt môi trường nhưng ít nhất là 5 chai/ống. Ủ FTM ở nhiệt độ 30°C đến 35°C ít nhất 14 ngày. Ủ SCDM (hoặc FTM khi dùng thay thế) ở nhiệt độ 20°C đến 25°C ít nhất 14 ngày.

Môi trường đạt yêu cầu về vô trùng nếu sau nuôi cấy các chai/ống môi trường trong, không có lắng cặn ở đáy; các chai/ống FTM không mất chỉ thị màu.

Kiểm tra tính tăng sinh

Nguyên tắc: Đánh giá khả năng phát triển của các chủng thử thách trong môi trường bằng cách cho vào mỗi chai/ống môi trường không quá 100 CFU chủng thử thách.