

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.

Bảng 1 - Chủng thích hợp cho kiểm tra chất lượng môi trường

Loại vi sinh vật	Tên	Ký hiệu
Vi khuẩn hiếu khí	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
Vi khuẩn kỵ khí	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293
Nấm	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (<i>Aspergillus niger</i>)	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Có thể thay thế *Pseudomonas aeruginosa* bằng *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341. Trong trường hợp không cần vi khuẩn tạo nha bào thì có thể thay thế *Clostridium sporogenes* bằng *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482).

Các chủng này không được cấy chuyển quá 5 lần kể từ chủng gốc.

Chủng dùng kiểm tra FTM gồm *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Chủng dùng kiểm tra SCDM gồm *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Các chủng thích hợp khác cũng có thể sử dụng nếu được cơ quan Kiểm định Quốc gia chấp thuận.

Môi trường đạt yêu cầu về *tính tăng sinh* nếu các chủng vi khuẩn trong các chai/ống môi trường mọc trong vòng 3 ngày, các chủng nấm trong các chai/ống môi trường mọc trong vòng 5 ngày.

Mẫu kiểm tra

Số lượng vắc xin/sinh phẩm cần cho 1 lần kiểm tra vô trùng tùy thuộc vào số lượng thành phẩm mỗi loại và dạng đóng gói của vắc xin/sinh phẩm. Cần lấy mẫu đại diện cho quá trình đóng ống lúc đầu và cuối.

Bảng 2 - Số lượng mẫu cần cho thử nghiệm vô trùng

Số lượng thành phẩm (Lọ/ống)	Số lượng mẫu cần lấy (Lọ/ống)	
	Lượng vắc xin/sinh phẩm trong mỗi lọ ≥ 2 ml	Lượng vắc xin/sinh phẩm trong mỗi lọ < 2 ml
<100	10% nhưng không ít hơn 4	20% nhưng không ít hơn 8
≥100 và < 500	ít nhất 10	ít nhất 20
≥ 500	ít nhất 20	ít nhất 40

Vắc xin/sinh phẩm được chia đều để cấy vào mỗi loại môi trường.

Phương pháp thực hiện

Tiến hành theo phương pháp màng lọc hoặc phương pháp cấy trực tiếp.

Phương pháp màng lọc

Sử dụng phương pháp màng lọc khi bản chất của vắc xin/sinh phẩm cho phép: các dung dịch có thể qua được màng

lọc; các chế phẩm chứa cồn, dầu, các chế phẩm có thể trộn hoặc tan trong dung môi là nước hoặc dầu (các dung môi không chứa chất ức chế vi khuẩn/nấm).

Bộ lọc và màng lọc phải được tiệt trùng trước khi sử dụng. Sử dụng màng có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn hoặc bằng 0,45 µm, đường kính khoảng 47 mm. Màng cellulose nitrat dùng cho các dung dịch có dung môi là nước, dầu và các dung dịch có độ cồn thấp. Màng cellulose acetat dùng cho các dung dịch có độ cồn cao.

Thấm ướt màng lọc bằng dung dịch vô trùng thích hợp, chẳng hạn dung dịch pepton nồng độ 1 g/L, pH 7,1 ± 0,2. Cho mẫu thử trực tiếp lên màng lọc, hút mẫu qua màng lọc bằng một bơm chân không.

Nếu vắc xin/sinh phẩm có đặc tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm, rửa màng lọc ít nhất ba lần bằng dung dịch rửa. Loại dung dịch rửa và thể tích mỗi lần rửa được xác định trong thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp. Không rửa màng lọc quá 5 lần, mỗi lần 100 mL kể cả khi thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp chỉ ra rằng như thể là chưa đủ để loại bỏ ảnh hưởng của chất ức chế.

Cho môi trường vào bình chứa màng lọc của bộ lọc hoặc cắt màng lọc thành hai phần bằng nhau rồi cho mỗi phần vào một chai môi trường nuôi cấy.

Các động tác cho mẫu thử lên màng lọc, cắt màng lọc và chuyển vào môi trường nuôi cấy phải được thực hiện trong điều kiện vô trùng để tránh lây nhiễm từ bên ngoài.

Phương pháp cấy trực tiếp

Bảng 3 - Thể tích vắc xin/sinh phẩm cần lấy từ mỗi lọ để cấy vào mỗi loại môi trường

Thể tích có trong mỗi lọ	Thể tích tối thiểu cho mỗi loại môi trường
< 1 mL	Toàn bộ vắc xin/sinh phẩm có trong mỗi lọ
Từ 1 mL đến 20 mL	1 mL
> 20 mL và < 100 mL	5 mL
> 100 mL	10 % vắc xin/sinh phẩm có trong mỗi lọ nhưng không ít hơn 20 mL

Cấy trực tiếp vắc xin/sinh phẩm cần kiểm tra vào môi trường sao cho thể tích mẫu thử không quá 10 % thể tích môi trường (trừ trường hợp đặc biệt).

Nếu vắc xin/sinh phẩm có tính chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm, phải loại bỏ được đặc tính ức chế này bằng cách trung hòa với một chất trung hòa thích hợp hoặc hòa loãng trong thể tích môi trường đủ lớn khi thực hiện thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm. Nên xác định thể tích môi trường đủ lớn để loại bỏ được ảnh hưởng của chất ức chế. Mỗi lần xác định, thể tích này được sử dụng cho những lần thử nghiệm sau đó, trừ khi có thay đổi trong thành phần của vắc xin/sinh phẩm.

Đối với các vắc xin/sinh phẩm mà chính mẫu thử làm đục môi trường hoặc lắng cặn ở đáy ống môi trường tới mức không xác định được có hay không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm; sau 3 đến 7 ngày nuôi cấy, cấy chuyển ít nhất 1 mL của mỗi ống môi trường đó sang ống môi trường mới tương ứng.

Ủ môi trường và theo dõi

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. Các ống môi trường cấy chuyển ủ trong thời gian ít nhất 7 ngày. Theo dõi các ống môi trường vào những khoảng thời gian thích hợp và vào ngày cuối cùng để phát hiện sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường.

Đánh giá kết quả

Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm, mẫu kiểm tra đạt yêu cầu về vô trùng.

Nếu có sự phát triển của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm, mẫu kiểm tra không đạt yêu cầu về vô trùng trừ khi có thể chứng minh thử nghiệm đã thực hiện không có giá trị bằng cách thực hiện lại thử nghiệm hoặc bằng phương pháp khác.

Thử nghiệm không có giá trị khi xảy ra một trong các trường hợp sau:

Kết quả giám sát vi sinh môi trường trong khi thực hiện thử nghiệm không đạt yêu cầu;

Sau khi xem xét lại quy trình thực hiện thử nghiệm phát hiện ra sai sót;

Có vi khuẩn hoặc nấm mọc trong các chứng âm;

Chủng phân lập từ thử nghiệm được xác định chắc chắn là do nguyên vật liệu hoặc kỹ thuật trong quá trình thực hiện thử nghiệm.

Thử nghiệm tính phù hợp của phương pháp

Thực hiện thử nghiệm tính phù hợp của phương pháp khi:

- Kiểm tra vô trùng cho sản phẩm mới;

- Khi có thay đổi trong điều kiện thực hiện thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm.

Thử nghiệm này nên được thực hiện để chứng tỏ thử nghiệm vô trùng có khả năng phát hiện được vi khuẩn/nấm có trong mẫu thử, nhất là khi vắc xin/sinh phẩm có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm.

Thực hiện thử nghiệm giống như thực hiện thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm, chỉ khác ở những điểm sau:

Phương pháp màng lọc: Sau khi đã cho vắc xin/sinh phẩm qua màng lọc, cho thêm không quá 100 CFU chủng thử thách vào dung dịch rửa màng lọc lần cuối cùng.

Phương pháp cấy trực tiếp: Sau khi đã cấy vắc xin/sinh phẩm vào môi trường, cho thêm không quá 100 CFU chủng thử thách vào mỗi ống môi trường.

Sử dụng cùng chủng thử thách với thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh. Thực hiện thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh làm chứng dương.

Ủ tất cả các ống môi trường đã cấy vắc xin/sinh phẩm không quá 5 ngày.

Nếu sau 5 ngày nuôi cấy, có dấu hiệu mọc của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường chứa vắc xin/sinh phẩm và không yếu hơn mức độ mọc trong các ống chứng dương thì vắc xin/sinh phẩm không chứa chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn/nấm hoặc ảnh hưởng của chất ức chế đã được loại bỏ. Thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm có thể được thực hiện mà không cần phải thay đổi.

Nếu sau 5 ngày nuôi cấy, không có dấu hiệu mọc của vi khuẩn/nấm trong các ống môi trường cấy vắc xin/sinh phẩm hoặc yếu hơn mức độ mọc trong các ống chứng dương thì vắc xin/sinh phẩm có chứa chất ức chế làm ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn/nấm. Thay đổi điều kiện thực hiện thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm và nhắc lại thử nghiệm độ phù hợp của phương pháp.

15.9 KIỂM TRA ĐỘC TÍNH ĐẶC HIỆU (AN TOÀN ĐẶC HIỆU) TRONG VẮC XIN BCG ĐÔNG KHÔ

Thử nghiệm “Kiểm tra độc tính đặc hiệu (an toàn đặc hiệu) trong vắc xin BCG đông khô” dùng để phát hiện độc tính đặc hiệu của vắc xin BCG đông khô do Mycobacteria gây ra. Thử nghiệm này được áp dụng đối với mẫu bán thành phẩm hoặc mẫu thành phẩm vắc xin BCG.

Dùng ít nhất 6 chuột lang cùng giới (nếu là chuột cái phải không được có thai) có phản ứng âm tính với tuberculin, cân nặng mỗi chuột khoảng 250 g đến 400 g.

Tiêm dưới da cho mỗi chuột một liều vắc xin tương đương với ít nhất 50 liều tiêm trong da cho người. Sau khi tiêm vắc xin, phải theo dõi chuột lang ít nhất là 6 tuần. Cuối thời kỳ theo dõi, tất cả chuột lang đều phải được mổ, kiểm tra đại thể các phủ tạng xem có các dấu hiệu của bệnh lao tiến triển không. Mặt khác, trong thời kỳ theo dõi nếu có chuột nào chết cũng phải mổ kiểm tra như trên. Nếu sau 6 tuần theo dõi các chuột đều khỏe mạnh, tăng cân; không có biểu hiện bệnh lao tiến triển và nhiều hơn 2/3 số chuột sống sót cho đến hết thời gian theo dõi thì loạt vắc xin BCG đó đạt yêu cầu về an toàn đặc hiệu.

Trong vòng 42 ngày theo dõi, nếu có từ 1/3 số chuột lang thử nghiệm chết nhưng xác định không phải chết do lao thì thử nghiệm được lặp lại. Nếu:

Lần thử nghiệm thứ nhất không đạt yêu cầu và không có giá trị (invalid test): Thử nghiệm nhắc lại chỉ cần tiến hành với ít nhất 6 chuột lang khác.