

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.

Lần thử nghiệm thứ nhất không đạt yêu cầu và có giá trị (valid test): Thử nghiệm phải được nhắc lại với số lượng mẫu và số lượng chuột gấp đôi.

Nếu trong lần thử nghiệm thứ 2 vẫn có từ 1/3 số chuột lang chết (kể cả được xác định chuột chết không phải do lao) thì loạt vắc xin BCG đó coi như không an toàn và phải xem xét lại nguồn cung cấp chuột, hoặc/và kiểm tra quy trình sản xuất với sự xác nhận của cơ quan Kiểm định Quốc gia. Nếu trong lần thử nghiệm nhắc lại 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 tính an toàn đặc hiệu.

Nếu phát hiện thấy chuột có biểu hiện của bệnh lao tiến triển thì loạt vắc xin đó phải hủy bỏ và phải đình chỉ sản xuất các loạt vắc xin tiếp theo. Toàn bộ vắc xin trong kho phải giữ lại để tiến hành thanh tra và tìm ra nguyên nhân. Việc sản xuất chỉ được tiếp tục khi có sự chấp thuận của cơ quan Kiểm định Quốc gia.

### 15.10 THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG HUYẾT THANH MIỄN DỊCH

Mục đích của thử nghiệm nhận dạng huyết thanh miễn dịch là nhằm khẳng định huyết thanh thử nghiệm chỉ chứa protein từ loài động vật đăng ký trong sản xuất. Có thể tiến hành theo 1 trong 2 kỹ thuật sau:

#### Kỹ thuật khuếch tán miễn dịch (Ouchterlony)

##### Nguyên lý

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý khuếch tán kép tự do của kháng nguyên và kháng thể từ các giếng riêng biệt được tạo trong gel agarose 1 % vào môi trường và tạo thành cung tủa do phản ứng đặc hiệu của chúng.

##### Vật liệu và thiết bị

Phiến kính.

Agarose 1 % trong đệm phosphat pH 7,4.

Hộp âm.

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm.

Huyết thanh kháng loài.

Dung dịch nhuộm: Coomassie blue 0,025 %.

Dung dịch tẩy màu: Methanol - acetic acid - nước cất (4 : 1 : 5).

##### Tiến hành

Đổ gel agarose 1 % lên phiến kính.

Dùng dụng cụ đục giếng loại có đường kính 3 mm tạo 7 giếng trên phiến kính (1 giếng ở giữa, 6 giếng cách đều xung quanh). Nhỏ huyết thanh kháng loài vào các giếng xung quanh và huyết thanh thử nghiệm vào giếng ở giữa.

Đặt phiến kính vào hộp âm từ 12 h đến 48 h.

Nhuộm gel với dung dịch nhuộm coomassie blue 0,025 %.

Tẩy màu bằng dung dịch tẩy màu, sau đó rửa bằng nước cất.

Đề khô phiến kính ở nhiệt độ phòng.

### Kỹ thuật điện di miễn dịch

##### Nguyên lý

Dưới tác động của điện trường và trong môi trường gel agarose, kháng nguyên tích điện âm từ giếng ở phía cực âm và kháng thể tích điện dương từ giếng ở phía cực dương sẽ di chuyển ngược chiều nhau, khi gặp nhau sẽ hình thành đường tủa có thể nhìn thấy được.

##### Vật liệu và thiết bị

Phiến kính.

Thạch 3 % trong nước cất.

Agarose 1,5 % trong đệm barbital pH 8,4.

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm.

Huyết thanh kháng loài.

Máy điện di, nguồn điện.

Dung dịch nhuộm, rửa, tẩy màu....

##### Tiến hành

Đổ thạch nền 3 % lên phiến kính.

Đổ agarose 1,5 % lên trên thạch nền.

Sau khi agarose đông, đục 2 giếng có đường kính 3 mm, khoảng cách giữa 2 giếng là 4 mm đến 5 mm. Nhỏ huyết thanh thử nghiệm và huyết thanh kháng loài vào mỗi giếng. Đặt phiến kính vào máy điện di.

Tiến hành điện di ở 10 V/cm từ 10 min đến 60 min tùy thử nghiệm.

Ngừng điện di, quan sát kết quả.

Để dễ quan sát đường tủa, cần loại protein không tủa bằng cách ngâm phiến kính trong đệm PBS. Phủ giấy lọc Whatman lên phiến kính và sấy ở 37 °C đến khô.

Nhuộm xanh với Coomassie blue trong 20 min.

Tẩy màu, rửa với nước cất, để khô.

#### Nhận định kết quả

Huyết thanh miễn dịch thử nghiệm được nhận dạng đúng khi xuất hiện đường tủa giữa mẫu thử nghiệm và huyết thanh kháng loài tương ứng.

### 15.11 XÁC ĐỊNH AN TOÀN CHUNG CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM (AN TOÀN KHÔNG ĐẶC HIỆU)

Xác định độc tính bất thường trong vắc xin - sinh phẩm được tiến hành trên chuột nhắt và chuột lang. Triệu chứng nhiễm độc trên chuột có thể biểu hiện như sau:

Thay đổi diện mạo bên ngoài, xù lông.

Trạng thái bất thường, giảm hoạt động.

Chuột giảm cân.

Chuột chết do nhiễm độc.

#### Trên chuột lang

Mỗi thử nghiệm dùng 2 chuột lang, cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g, chưa dùng cho thí nghiệm nào trước đó, khỏe mạnh, tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly 3 ngày đến 7 ngày.

Tiêm ổ bụng cho mỗi chuột 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 5 ml; trừ một số vắc xin, sinh phẩm đặc biệt sẽ theo chuyên luận riêng. Liều cho người được trình bày trên nhãn sản phẩm.