

**Nhôm**

Không được quá 1,25 mg/liều đơn cho người (Phụ lục 15.27).

**Calci**

Không được quá 1,3 mg/liều đơn cho người.

**Thimerosal**

Từ 0,005 % đến 0,02 % (Phụ lục 15.29).

**Formaldehyd tồn dư**

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

**pH**

Từ 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**An toàn chung**

Thử nghiệm tiền hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khỏe mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có cân nặng 18 - 22 g/con. Tiêm vào ổ bụng 2 chuột lang có cân nặng 250 - 350 g/con. Tiêm mỗi chuột nhắt 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml, tiêm mỗi chuột lang tương ứng 10 liều tiêm cho người nhưng không vượt quá 5 ml. Vắc xin được coi là không có độc tính bất thường nếu tất cả động vật thí nghiệm sống khỏe mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

**Nội độc tố vi khuẩn**

Hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 100 EU/liều đơn cho người. Sử dụng phương pháp tạo gel hoặc phương pháp thích hợp khác (Phụ lục 13.2).

**Hồi độc và sự tồn dư độc tố ho gà**

Xem mục Kiểm định vắc xin bán thành phẩm.

**Công hiệu bạch hầu, uốn ván**

Tiến hành kiểm tra ở mẫu vắc xin DTaP thành phẩm khi chưa kiểm tra công hiệu trên vắc xin bán thành phẩm hoặc khi có chỉ định cần thiết (Phụ lục 15.22 và Phụ lục 15.23).

**Xác định tính sinh miễn dịch của thành phần ho gà**

Phương pháp gây miễn dịch trên chuột nhắt sau đó chuẩn độ kháng thể bằng phương pháp ELISA.

Tiêu chuẩn: Nhiều phương pháp tính toán có thể được áp dụng. Trong trường hợp sử dụng phần mềm SoftMaxPro tính toán thì hàm lượng huyết thanh kháng PT không được ít hơn 38 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng FHA không được ít hơn 125 EU/ml, hàm lượng huyết thanh kháng PRN không được ít hơn 9400 EU/ml.

Giới hạn tin cậy (P = 0,95) không dưới 50 % và không vượt quá 200 % của công hiệu tương đối với mỗi kháng nguyên của vi khuẩn ho gà.

Phân tích thống kê cho thấy độ dốc có ý nghĩa và không có độ lệch từ đường cong đáp ứng liều.

Công hiệu của vắc xin ho gà vô bào được coi là đạt yêu cầu khi công hiệu không thấp hơn 4 IU đối với một liều đơn cho người và giới hạn dưới của khoảng tin cậy 95 % không thấp hơn 2 IU đối với một liều đơn cho người.

**Bảo quản, hạn dùng**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C vắc xin có thể giữ công hiệu trong ít nhất 2 năm.

Nhà sản xuất phải đưa ra khuyến cáo về điều kiện bảo quản và vận chuyển vắc xin để đảm bảo rằng vắc xin đạt công hiệu theo yêu cầu cho đến khi hết hạn sử dụng như đăng ký ghi trên nhãn. Vắc xin phải được bảo quản sao cho không bị đông băng.

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp nhận và cố định dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng những yêu cầu của quy định hiện hành.

**VẮC XIN BẠCH HẦU, UỐN VÁN, HO GÀ, VIÊM GAN B VÀ Hib (DTwP - HeB - Hib)**

***Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, hepatitis B et haemophili stirpis b coniugatum adsorbatum***

Vắc xin bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B và Hib là một hỗn hợp các kháng nguyên hấp phụ vào tá chất nhôm, gồm các giải độc tố bạch hầu, uốn ván tinh chế, vắc xin ho gà toàn tế bào, kháng nguyên bề mặt (HBsAg) virus viêm gan B tái tổ hợp và kháng nguyên Hib cộng hợp. Tá chất là nhôm.

**Sản xuất giải độc tố bạch cầu**

Vắc xin bạch hầu được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Corynebacterium diphtheriae* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường lòng Lingood. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những loạt nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố bạch hầu (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế được kiểm tra vô trùng, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch của kháng nguyên trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

**Vô trùng**

Tiến hành thử nghiệm vô trùng trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với 10 ml mẫu giải độc tố bạch hầu tinh chế cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

**An toàn đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố bạch hầu tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi trong số 5 chuột lang khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, khỏe mạnh, chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày sau tiêm, nếu thấy chuột có những triệu chứng bất thường hay bị chết do độc tố bạch hầu thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này không đạt về tính an toàn

đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào không phải do độc tố bạch hầu thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tố bạch hầu tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

#### **Tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm giống như dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tố bạch hầu tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tố tương đương như trong vắc xin thành phẩm (35 Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần. Từng mẫu trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tố bạch hầu bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột lang thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi.

#### **Độ tinh sạch của kháng nguyên bạch hầu**

Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải đạt không ít hơn 1500 Lf/mg nitrogen protein.

#### **Sản xuất giải độc tố uốn ván**

Vắc xin uốn ván được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Clostridium tetani* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những loạt nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố uốn ván (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông, xác định độc tính bằng thử nghiệm liều chết 100 % chuột (MLD). Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và nhiệt độ, tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Số lượng Lf trong vắc xin uốn ván bán thành phẩm tùy thuộc vào công thức gốc của từng nhà sản xuất nhưng không được quá 25 Lf trong một liều đơn cho người, nếu sử dụng nhiều hơn một liều cho phác đồ tiêm miễn dịch cơ bản.

Giải độc tố uốn ván tinh chế được kiểm tra vô trùng, tính độc đặc hiệu, tính hồi độc, độ tinh sạch, hàm lượng kháng nguyên (Lf/ml) trước khi pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

#### **Vô trùng**

Tiến hành thử nghiệm vô trùng trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein với 10 ml mẫu giải độc tố uốn ván tinh chế cho mỗi môi trường.

Cách tiến hành và tiêu chuẩn chấp thuận theo Phụ lục 15.7.

#### **An toàn đặc hiệu**

Tiêm dưới da ít nhất 500 Lf của giải độc tố uốn ván tinh chế chứa trong thể tích 1 ml vào mỗi chuột trong số 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng 250 g/con đến 350 g/con chưa

sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 21 ngày sau tiêm, nếu thấy chuột có những triệu chứng bất thường hay bị chết do độc tố uốn ván thì lô giải độc tố uốn ván tinh chế này không đạt về tính an toàn đặc hiệu. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong thời gian theo dõi vì bất kỳ nguyên nhân nào không phải do độc tố uốn ván thì phải nhắc lại thử nghiệm. Nếu có hơn một chuột lang thử nghiệm bị chết trong lần thử nghiệm thứ hai thì lô giải độc tố uốn ván tinh chế này cũng không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

#### **Tính hồi độc**

Sử dụng dung dịch đệm dùng để pha vắc xin thành phẩm nhưng không có chất hấp phụ để pha loãng giải độc tố uốn ván tinh chế sao cho có chứa hàm lượng giải độc tố tương đương như trong vắc xin thành phẩm ( $\leq 20$  Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau ( $5 \pm 3$ ) °C và 37 °C trong 6 tuần. Từng mẫu trong 2 mẫu thử sau khi ủ được đưa ra kiểm tra tính hồi độc của độc tố uốn ván bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang khỏe mạnh, khối lượng từ 250 g/con đến 350 g/con.

Giải độc tố uốn ván tinh chế đạt yêu cầu về thử nghiệm tính hồi độc khi các chuột lang thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có chuột nào có dấu hiệu về phản ứng do độc tố uốn ván trong 3 tuần theo dõi.

#### **Độ tinh sạch của kháng nguyên uốn ván**

Giải độc tố uốn ván tinh chế phải đạt không ít hơn 1000 Lf/mg nitrogen protein.

#### **Sản xuất nước cốt ho gà bất hoạt**

Nước cốt ho gà được sản xuất dựa vào hệ thống chủng gốc. Chủng *Bordetella pertussis* dùng cho sản xuất phải tuân thủ theo quy định về hệ thống chủng gốc và được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Việc lựa chọn chủng nuôi cấy, môi trường và phương pháp nuôi cấy thích hợp nhằm tạo ra vắc xin ho gà thành phẩm có được 3 ngưng kết nguyên: 1; 2; 3. Từng chủng được nuôi cấy 24 h đến 72 h trong môi trường lỏng hoặc đặc. Không được dùng máu người hoặc các sản phẩm từ máu người trong bất kỳ môi trường nuôi cấy chủng ho gà nào để sản xuất vắc xin ho gà. Môi trường dùng trong giai đoạn nuôi cấy chủng ho gà cuối cùng cũng không được phép có máu hoặc sản phẩm của máu.

Sau khi nuôi cấy, gặt và rửa sinh khối vi khuẩn ho gà để loại bỏ các chất còn tồn dư của môi trường nuôi cấy; pha thành hỗn dịch ho gà với nước muối sinh lý vô khuẩn thành hỗn dịch nước cốt ho gà cô đặc.

#### **Tính thuần khiết của các mẻ gặt đơn**

Lấy mẫu từ các mẻ gặt đơn để kiểm tra tính thuần khiết bằng phương pháp nhuộm soi kính hiển vi hoặc cấy vào môi trường nuôi cấy thích hợp. Các mẻ gặt đơn sẽ không được phép sử dụng vào việc pha chế bán thành phẩm khi phát hiện có tạp nhiễm.

#### **Độ đục**

Dùng bộ so độ đục chuẩn quốc tế hoặc đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 560 nm của hỗn dịch nước cốt ho gà cô

đặc (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) để xác định đậm độ của nước cốt ho gà cô đặc. 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<sub>W</sub> - HeB - Hib hỗn hợp không vượt quá 15 đơn vị độ đục quốc tế (IOU) trong một liều đơn vắc xin cho người. Tỷ lệ thành phần các chủng *B. pertussis* không được thay đổi khi hỗn hợp vắc xin, phải đăng ký rõ trong hồ sơ và được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia.

#### **Độ sống sót**

Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết và giải độc bằng phương pháp được sự chấp thuận của cơ quan kiểm định quốc gia. Các hóa chất được sử dụng để giết chết và giải độc vi khuẩn ho gà cũng phải được sự chấp thuận bởi cơ quan kiểm định quốc gia. Hỗn dịch vi khuẩn ho gà được giết chết bằng nhiệt độ trong khoảng thời gian thích hợp và được kiểm tra sự sống sót của các vi khuẩn này trên môi trường Border-Gengou. Sau khi bất hoạt, nước cốt ho gà được bảo quản ở nhiệt độ ( $5 \pm 3$ ) °C trong một khoảng thời gian cần thiết để giảm bớt tính độc.

Mỗi loạt nước cốt ho gà đơn sẽ không được dùng để pha chế vắc xin bán thành phẩm khi không đạt các tiêu chuẩn về vô trùng, khả năng bất hoạt hoàn toàn (kiểm tra độ sống sót), nhận dạng, khả năng phát triển, ngưng kết như chủng gốc *B. pertussis*.

#### **Sản xuất kháng nguyên bề mặt (HBsAg) tái tổ hợp**

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được điều chế bằng cách sử dụng HBsAg tổng hợp ở tế bào nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*), tế bào trứng chuột đất vàng (CHO-Chinese hamster ovary) hoặc các dòng tế bào thích hợp khác đã được biến nạp một plasmid có chứa gen mã hóa HBsAg. HBsAg được thu từ tế bào bằng cách làm ly giải tế bào nấm men và được tinh chế nhờ các kỹ thuật sinh hóa lý.

Vắc xin tái tổ hợp có thể chứa sản phẩm của gen S (protein chủ yếu) hoặc phối hợp sản phẩm của gen S và tiền S<sub>2</sub> (protein loại trung bình) hoặc phối hợp cả sản phẩm của gen S, tiền S<sub>2</sub> và tiền S<sub>1</sub> (protein loại lớn).

#### **Hàm lượng protein**

Protein trong mẫu thử được định lượng theo phương pháp Lowry (Phụ lục 15.34).

#### **Nhận dạng và hàm lượng HBsAg**

Xác định hàm lượng HBsAg bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA), thấm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn quốc tế hoặc vắc xin mẫu chuẩn.

#### **Độ tinh khiết của kháng nguyên**

Được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng.

#### **Lipid**

Không lớn hơn 100 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.40).

#### **Cesi clorid**

Không lớn hơn 5 µg/20 µg protein (Phụ lục 15.41).

#### **Tween 20**

Không lớn hơn 50 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.6).

#### **Polysaccharid**

Không lớn hơn 10 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.38).

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

#### **Thimerosal**

Không được lớn hơn 0,012 % (Phụ lục 15.29).

#### **Vô trùng**

Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

#### **Sản xuất kháng nguyên Hib cộng hợp**

Vắc xin phòng *Hemophilus influenzae* týp b là loại vắc xin hóa học được điều chế từ oligosaccharid tổng hợp giống với thành phần vỏ polysaccharid của vi khuẩn trong tự nhiên. Oligosaccharid cộng hợp với protein của giải độc tố uốn ván làm giá mang.

Trong mỗi liều đơn tiêm cho người chứa thành phần hoạt chất: Kháng nguyên PRP-T: 12 µg.

#### **Nhận dạng thành phần Hib**

Bằng phản ứng ngưng kết giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu trong hệ thống hạt Latex. Sử dụng bộ sinh phẩm đáp ứng được yêu cầu nhận dạng và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ sinh phẩm Latex, hoặc nhận dạng thành phần Hib bằng một phản ứng hóa miễn dịch phù hợp.

Tiêu chuẩn: Có hiện tượng ngưng kết xảy ra, nhận thấy rõ ràng bằng mắt thường.

#### **Hàm lượng PRP (Polyribosyl Ribitol Phosphat = PRP) tổng số**

Xác định hàm lượng PRP tổng số bằng phương pháp sắc ký lỏng cột trao đổi ion (Phụ lục 5.3).

Tiêu chuẩn: Ít nhất phải đạt 80 % của hàm lượng PRP tổng số ghi trên nhãn.

#### **Hàm lượng PRP tự do**

Không được quá 25,0 % ( $\leq 25,0$  %).

Xác định hàm lượng PRP tự do bằng phương pháp sắc ký lỏng, cột trao đổi ion (phụ lục 5.3).

#### **Xác định hoạt tính miễn dịch Hib**

*Sinh vật phẩm:*

Thỏ cái F1 (1,8 kg đến 2,2 kg) được lựa chọn, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện thường.

Chúng dương vắc xin Hib.

*Chuẩn bị dung dịch:*

Dung dịch 20×PBS (20 × Phosphate Buffer Saline): Dung dịch có chứa 2,74 M natri clorid (TT), 0,054 M kali clorid (TT), 0,16 M dinatri hydrophosphat (TT) và 0,028 M kali dihydrophosphat (TT). Cân 320 g natri clorid (TT), 8 g kali clorid (TT), 46 g dinatri hydrophosphat (TT), 8 g kali dihydrophosphat (TT). Hòa tan trong 1500 ml nước cất.

Điều chỉnh pH trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 bằng *dung dịch acid hydrochloric 37 % (TT)* hoặc *dung dịch natri hydroxyd 2 M (TT)*. Chuyển vào bình định mức 2 L, thêm *nước cất* vừa đủ đến vạch. Dung dịch này có nồng độ gấp 20 lần dung dịch làm việc. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch PBS: Pha loãng 20 lần dung dịch 20×PBS bằng *nước cất*, cụ thể như sau: Lấy 100 ml dung dịch 20×PBS vào bình định mức 2 L, thêm *nước cất* đến vạch, lắc đều. Nếu cần, điều chỉnh pH trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 bằng *dung dịch acid hydrochloric 37 % (TT)* hoặc *dung dịch natri hydroxyd 2 N (TT)*. Bảo quản ở 4 °C, dùng trong vòng 15 ngày.

#### Tiến hành:

Làm song song mẫu thử và mẫu chứng. Liều vắc xin 10 µg/0,5 ml.

Gây nhiễm trên 5 thỏ mỗi mẫu với liều vắc xin 10 µg/0,5 ml. Nếu vắc xin có hàm lượng cao hơn thì phải pha loãng bằng dung dịch PBS, sử dụng các vật liệu tiệt trùng.

Nếu vắc xin có hàm lượng thấp hơn, gây nhiễm với thể tích tiêm lớn hơn để đủ 10 µg nhưng không quá 2,5 ml mỗi thỏ.

Gây nhiễm ở ngày 0 và ngày 14, bằng đường tiêm dưới da vùng bụng. Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 ngày ở vùng cách ly bảo vệ.

Tiến hành lấy máu mẫu tiêm đầu tiên 21 ngày. Lấy máu riêng từng con vào ống nghiệm nhựa 15 ml, không ít hơn 5 ml. Ly tâm 3000 r/min trong 20 min ở nhiệt độ phòng. Tách huyết thanh cẩn thận bằng pipet (không được làm lẫn huyết thanh giữa các ống khác nhau) sang một ống nghiệm khác. Nếu chưa tiến hành định lượng kháng thể anti-Hib ngay, bảo quản các mẫu huyết thanh ở -20 °C để kiểm tra sau.

#### **Định lượng kháng thể trong huyết thanh sau khi ly tâm theo quy trình định lượng kháng thể kháng Hib bằng phương pháp ELISA**

##### Thiết bị:

Máy đọc ELISA, bước sóng 492 nm.

Tủ an toàn sinh học.

Rửa phiến nhựa ELISA.

Máy đo ELISA đa kênh.

##### Vật liệu:

Phiến nhựa 96 giếng chuẩn độ vi lượng.

Buồng âm (hộp kín bằng nhựa hoặc kim loại bên trong có lót giấy lọc thấm nước cất để tạo độ ẩm).

##### Thuốc thử:

Tween 20.

BSA Fraction V.

OPD.

Kháng IgG thỏ cộng hợp gắn peroxidase.

Chứng âm huyết thanh anti-Hib.

Chứng dương huyết thanh thỏ anti-Hib.

Oligosaccharid của Hib cộng hợp với HSA (phủ phiến) (HbO-HSA).

#### Chuẩn bị dung dịch:

Dung dịch 20×PBS: Pha như trên.

Dung dịch đệm phosphat-citrat có chứa 0,048 M *acid citric (TT)*, 0,1 M *dinatri hydrophosphat (TT)*.

Dung dịch rửa phiến có chứa 0,027 M *kali clorid (TT)*, 0,137 M *natri clorid (TT)*, 0,008 M *dinatri hydrophosphat (TT)*, 0,0014 M *dikali hydrophosphat (TT)*, 0,05 % Tween 20, được pha bằng cách: thêm 2,5 ml Tween 20 vào 5 L dung dịch PBS. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 7 ngày.

Tween 20 pha loãng 1/4: Để có 40 ml dung dịch, lấy 10 ml Tween 20 thêm 30 ml *nước cất*. Trộn đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng, dùng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch dừng phản ứng: Cân 10 g *natri metabisulfit (TT)*, hòa tan trong 840 ml *nước cất*, thêm từ từ 160 ml *acid sulfuric (TT)*. Khuấy đều, đặt trong chậu đá. Pha trong hốt và mang găng. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch khóa (chứa 1 % BSA): Pha trước khi dùng. Cân 0,2 g BSA, hòa tan trong 20 ml *nước cất*.

Dung dịch pha loãng cho ELISA anti-Hib: Cân 1 g BSA, 0,372 g *natri edetat (TT)*, đong 1,2 ml Tween 20 pha loãng 1/4, tất cả được hòa tan trong 80 ml dung dịch PBS. Điều chỉnh pH từ 7,2 đến 7,3 bằng *dung dịch acid hydrochloric 37 % (TT)* hoặc *dung dịch natri hydroxyd 2 N (TT)* nếu cần. Thêm dung dịch PBS vừa đủ 100 ml. Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, dùng trong vòng 1 tháng.

##### Tiến hành:

Chuẩn bị chứng dương huyết thanh thỏ (anti-Hib) và chứng âm huyết thanh cho thử nghiệm ELISA theo cách sau: Pha loãng 1/50 với dung dịch pha loãng. Loại bỏ hết các vật liệu đã sử dụng. Chú ý: Tất cả phải ủ trong tủ ẩm. Sau khi rửa phiến, nếu chưa dùng ngay, để giữa phiến trong tủ ẩm, không quá 15 min.

Pha loãng dung dịch phủ phiến HBO-HSA để được nồng độ cuối cùng là 1 µg/ml HBO-HSA trong PBS với thể tích 11 ml. Thể tích này đủ dùng cho 1 phiến 96 giếng.

Ủ phiến ở 37 °C trong 90 min hoặc qua đêm ở 4 °C.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch đệm rửa.

Thêm 100 µl dung dịch khóa vào mỗi giếng.

Ủ phiến trong 30 min ở 37 °C.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch rửa phiến.

##### Thiết kế phiến:

Thể tích của mẫu và chứng trong mỗi giếng là 100 µl.

Cho chứng dương và chứng âm ở cột 1, 2 từ hàng A đến H (lặp lại 4 lần).

Cho mẫu từ cột 3 trở đi từ hàng A đến hàng H lặp lại 2 lần.

Ủ phiến 90 min ở nhiệt độ phòng.

Rửa phiến 3 lần với dung dịch rửa phiến.

Pha loãng cộng hợp kháng huyết thanh thỏ với peroxidase bằng dung dịch pha loãng theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau đó thêm 100 µl dung dịch vừa pha vào tất cả các giếng.

Ủ phiến 1 h ở 37 °C.

Rửa phiên 3 lần với dung dịch rửa phiên.

Chuẩn bị dung dịch cơ chất như sau: Cân 0,1 g OPD và hòa tan trong 25 ml dung dịch đệm phosphat - citrat trong điều kiện tránh ánh sáng. Thêm 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lắc đều và thêm 100 µl vào tất cả các giếng.

Ủ 5 min trong tối ở nhiệt độ phòng.

Dừng phản ứng bằng cách thêm 50 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc phiên ở bước sóng 492 nm (Multiscan).

*Phân tích và biện luận kết quả:*

Thử nghiệm được chấp thuận khi OD của chứng dương và chứng âm đều nằm trong dải đo đã thiết lập. Nếu quá nửa bị loại, lặp lại test ELISA.

Tính toán giá trị ngưỡng (cutoff) của thử nghiệm để thiết lập tiêu chuẩn quyết định mẫu âm tính hay dương tính theo công thức:

$$\text{Cutoff} = \text{trung bình OD của nền} + 2\text{SD}$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn.

Tất cả các giá trị OD lớn hơn hoặc bằng Cutoff là dương tính. Tất cả các giá trị OD nhỏ hơn cutoff là âm tính.

Tính % có đáp ứng như sau:

$$\% \text{ đáp ứng} = \frac{\text{Tổng số thỏ có đáp ứng}}{\text{Tổng số thỏ có gây nhiễm}} \times 100$$

*Tiêu chuẩn chấp thuận của thử nghiệm:*

Thử nghiệm có giá trị khi đối với mẫu vắc xin chứng, số thỏ có đáp ứng miễn dịch không ít hơn 50% (≥ 50 %).

*Tiêu chuẩn chấp thuận của mẫu thử:*

Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu của thử nghiệm khi số thỏ được dùng trong thử nghiệm có đáp ứng miễn dịch không ít hơn 50 % (≥ 50 %).

Phương pháp sản xuất vắc xin DTwP - HeB - Hib phải được thẩm định để chứng minh rằng sản phẩm khi kiểm định sẽ tuân thủ và đạt được các tiêu chuẩn như mô tả dưới đây.

**Kiểm định vắc xin bán thành phẩm**

Vắc xin bán thành phẩm được pha chế và hỗn hợp bởi một lượng thích hợp của giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, kháng nguyên viêm gan B đã được hấp phụ nhôm phosphat và hỗn hợp thêm một lượng thích hợp của huyền dịch *B. pertussis* đã được bất hoạt, sau cùng được hỗn hợp với kháng nguyên Hib đã được hấp phụ nhôm phosphat; kết quả của sự hỗn hợp này được tiêm vào cơ thể phải phù hợp về mặt sinh lý với máu. Hàm lượng của *B. pertussis* của vắc xin bán thành phẩm phải không được vượt quá 15 IOU trong một liều đơn cho người. Nếu sử dụng hai hoặc nhiều hơn số chủng *B. pertussis* thì khi pha vắc xin bán thành phẩm phải tính toán sao cho tổng số đơn vị độ đục của các chủng ho gà đưa vào phải không thay đổi giữa các loại vắc xin và không vượt quá 15 IOU trong một liều đơn cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin DTwP - HeB - Hib hấp phụ phải không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của giải độc tố uốn ván, bạch hầu,

vắc xin ho gà, kháng nguyên Hib, kháng nguyên HeB và không gây ra những phản ứng có hại cho người sử dụng. Chỉ vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nào tuân thủ và đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để sử dụng sản xuất thành phẩm.

**Chất bảo quản kháng khuẩn**

Xác định hàm lượng chất bảo quản kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm cuối cùng bằng phương pháp thích hợp (Phụ lục 15.29). Hàm lượng chất bảo quản từ 85 % đến 115 % của lượng chất bảo quản ghi trên nhãn.

**Vô trùng**

Tiến hành thử nghiệm vô trùng trên môi trường canh thang Thioglycolat và Soybean Casein. Dùng 10 ml vắc xin để kiểm tra trên mỗi môi trường (Phụ lục 15.7).

**Công hiệu**

Tiến hành các thử nghiệm kiểm tra công hiệu theo Phụ lục 15.22; Phụ lục 15.23; Phụ lục 15.24.

Công hiệu vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được tiến hành song song giữa vắc xin mẫu thử với vắc xin mẫu chuẩn; có thể được xác định bằng phương pháp thực nghiệm trên động vật thí nghiệm (công hiệu *in vivo*) để xác định hiệu giá kháng thể, hoặc phương pháp miễn dịch trong phòng thí nghiệm (công hiệu *in vitro*) để xác định hàm lượng kháng nguyên HBsAg có trong vắc xin.

**Thử nghiệm công hiệu in vivo**

*Động vật thí nghiệm:*

Chuột nhắt trắng giống BALB/C hoặc ICR, khỏe mạnh và từ cùng một đàn, khoảng 5 tuần đến 6 tuần tuổi, tốt nhất là chuột cùng một giới.

*Xác định công hiệu tương quan:*

Vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được pha loãng bậc 2 thành 5 độ pha. Dung dịch đề pha vắc xin là dung dịch natri clorid 0,9 % có chứa nhôm hydroxyd (hàm lượng nhôm hydroxyd không quá 500 µg/ml). Tiêm màng bụng 1 ml mỗi độ pha loãng vắc xin cho mỗi chuột. Mỗi độ pha loãng vắc xin tiêm ít nhất 15 chuột. Tất cả các chuột sau khi gây miễn dịch được nuôi từ 28 đến 32 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê và lấy máu tim chuột. Các mẫu máu được ly tâm 3000 r/min ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C, tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C. Xác định hiệu giá kháng thể kháng HBsAg bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gián tiếp (ELISA) trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Kết quả được tính theo chương trình Probit Analysis.

*Thử nghiệm có giá trị khi:*

ED<sub>50</sub> của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử đều nằm trong khoảng giữa liều tiêm lớn nhất và nhỏ nhất. Phân tích thống kê cho thấy đạt yêu cầu về tuyến tính và song song.

Giới hạn độ tin cậy của công hiệu tương quan nằm trong khoảng 33 % đến 300 %.

*Tiêu chuẩn công hiệu trên thực nghiệm:*

Công hiệu tương quan (P = 95 %) không nhỏ hơn 1.

### **Thử nghiệm công hiệu in vitro**

Định lượng kháng nguyên HBsAg bằng kỹ thuật ELISA. Tham khảo Mục công hiệu *in vitro* của chuyên luận Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi phân tích thống kê thỏa mãn các tiêu chuẩn về tuyến tính song song, hồi quy và có khác biệt giữa các liều.

Nếu thử nghiệm không có giá trị, phải làm lại.

**Tiêu chuẩn:** Theo tiêu chuẩn đã được cơ quan quản lý phê duyệt.

### **PRP tổng số**

Xác định hàm lượng PRP tổng số bằng phương pháp sắc ký lỏng cột trao đổi ion (Phụ lục 5.3).

**Tiêu chuẩn:** Hàm lượng PRP tổng số ít nhất phải đạt 80 % của hàm lượng ghi trên nhãn.

### **PRP tự do**

Xác định hàm lượng PRP tự do bằng phương pháp sắc ký lỏng cột trao đổi ion (Phụ lục 5.3).

**Tiêu chuẩn:** Hàm lượng PRP tự do không được lớn hơn 35 % ( $\leq 35\%$ ).

**Xác định hoạt tính miễn dịch Hib** (Như ở mục Sản xuất kháng nguyên Hib)

Làm song song mẫu thử và mẫu chứng.

Gây nhiễm trên 5 thỏ mỗi mẫu với liều vắc xin 10  $\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$ . Gây nhiễm ở ngày 0 và ngày 14, bằng đường tiêm dưới da màng bụng. Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28 ngày ở vùng cách ly bảo vệ.

Tiến hành lấy máu sau liều tiêm đầu tiên 21 ngày. Lấy máu riêng từng con vào ống nhựa 15 ml, không ít hơn 5 ml.

Định lượng kháng thể kháng Hib bằng phương pháp ELISA.

**Tiêu chuẩn:**  $\geq 50\%$  chuyển đổi huyết thanh miễn dịch.

### **An toàn đặc hiệu**

Tính độc đặc hiệu của vắc xin DTP<sub>w</sub> - HeB - Hib được kiểm tra trên mẫu bán thành phẩm cuối cùng hay vắc xin thành phẩm khi cần thiết (Phụ lục 15.4).

**Đối với thành phần bạch hầu và uốn ván:**

Chọn 5 chuột lang, có khối lượng 250 g/con đến 350 g/con, tiêm dưới da một lượng vắc xin tương đương với ít nhất 5 liều đơn cho người. Theo dõi chuột hàng ngày. Vắc xin đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt uốn ván hoặc triệu chứng nhiễm độc bạch hầu và ít nhất 80 % chuột sống trong thời gian 6 tuần. Nếu có chuột chết phải mổ để kiểm tra phù tạng về dấu hiệu nhiễm độc bạch hầu (tuyến thượng thận đỏ).

**Đối với thành phần ho gà:**

Dùng ít nhất 20 chuột nhắt trắng, trọng lượng 14 g đến 16 g, cùng giới (nếu có cả 2 giới cần phân chia đều trong các nhóm) cho mỗi mẫu vắc xin thử và nhóm chứng. Mỗi chuột được tiêm vào ổ bụng 0,5 ml dung dịch chứa tối thiểu nửa liều đơn vắc xin cho người. Nhóm chứng được tiêm 0,5 ml dung dịch tiêm natri clorid 0,9 % (tốt nhất chứa cùng hàm lượng chất bảo quản như có trong dung

dịch tiêm cho nhóm thí nghiệm). Tổng khối lượng các nhóm chuột được xác định vào 72 h và 7 ngày sau tiêm. Vắc xin đạt yêu cầu nếu đạt cả 3 tiêu chuẩn sau:

Sau 72 h tổng khối lượng chuột không ít hơn trước tiêm. Sau 7 ngày khối lượng trung bình mỗi chuột không ít hơn 60 % so với nhóm chứng.

Số chuột chết không quá 5 % tổng số chuột đã được tiêm.

### **Kiểm định vắc xin thành phẩm**

#### **Nhận dạng thành phần bạch hầu - uốn ván - ho gà**

Thành phần bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào trong vắc xin DTwP - HeB - Hib hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm *natri citrat* ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) với nồng độ 5 % ở 37 °C trong 48 h. Sau đó ly tâm 2000 r/min trong 15 min. Nước nổi được dùng để nhận dạng thành phần bạch hầu và uốn ván bằng phản ứng lên bông, cặn ly tâm dùng để nhận dạng thành phần ho gà có trong vắc xin bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính với các huyết thanh kháng ho gà đặc hiệu (Phụ lục 15.19).

**Nhận dạng thành phần Hib** (Như ở mục sản xuất kháng nguyên Hib)

Phương pháp: Phản ứng ngưng kết Latex hoặc một phản ứng hóa miễn dịch phù hợp.

**Tiêu chuẩn:** Dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu.

#### **Nhận dạng HBsAg**

Nhận dạng HBsAg bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch phù hợp, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA), thẩm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

#### **Vô trùng**

Đạt yêu cầu vô trùng (Phụ lục 15.7).

#### **An toàn chung**

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khỏe mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có khối lượng 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con tiêm ít nhất một liều tiêm cho người nhưng không quá 1 ml; tiêm vào ổ bụng 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.

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 thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

#### **Công hiệu**

Công hiệu cho từng thành phần phải tuân theo khuyến cáo cho từng vắc xin riêng.

Quy trình thực hiện: Xem phần kiểm tra trên vắc xin bán thành phẩm.

Tiêu chuẩn đối với Vắc xin Viêm gan B:

Công hiệu *in vivo*: Công hiệu tương quan ( $P = 95\%$ ) không được nhỏ hơn 1.

Công hiệu *in vitro*: Theo tiêu chuẩn đã được cơ quan có thẩm quyền phê duyệt.

**Tính chất**

**Cảm quan:**

Kiểm tra bằng mắt thường: Huyền dịch vắc xin chia thành 2 lớp, phần dung dịch phía trên trong suốt không màu hoặc vàng nhạt, lớp lắng cặn dưới đáy lọ có màu trắng xám. Nhanh chóng tạo huyền dịch đồng nhất sau khi lắc nhẹ, không lẫn chất lạ.

**Tính chất vật lý:**

Thể tích vắc xin mỗi lọ: Không được nhỏ hơn thể tích ghi trên nhãn.

Ti lệ loại bỏ: Không quá 3 % đối với vắc xin đa liều và không quá 5 % đối với vắc xin liều đơn.

Không bị đông băng (tiêu chuẩn này chỉ kiểm tra sau khi bảo quản hay vận chuyển theo dây chuyền lạnh, không phải tiêu chuẩn xuất xưởng của nhà sản xuất): Lọ vắc xin mẫu thử phải có tốc độ lắng cặn chậm hơn nhiều so với lọ chứng dương và không có sự tạo hạt hay hình ảnh bông tuyết lơ lửng trong huyền dịch vắc xin hay kết thành cục sau khi lắc.

**Chất bảo quản**

Hàm lượng thimerosal cho phép là 0,005 % đến 0,02 % (Phụ lục 15.29).

**Chất hấp phụ**

Hàm lượng  $Al^{+3}$  trong vắc xin DTwP - HeB - Hib hấp phụ không lớn hơn 2,5 mg/ml.

**pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

**Formaldehyd tồn dư**

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

**Bảo quản, hạn dùng**

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C vắc xin có thể giữ công hiệu 2,5 năm.

Nhà sản xuất phải đưa ra khuyến cáo về điều kiện bảo quản và vận chuyển vắc xin DTwP - HeB - Hib hấp phụ để đảm bảo rằng vắc xin đạt công hiệu theo yêu cầu cho đến khi hết hạn sử dụng như đã đăng ký và ghi trên nhãn. Vắc xin DTwP - HeB - Hib hấp phụ phải được bảo quản sao cho không bị đông băng.

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận, dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin và không được quá 2,5 năm tính từ cuối thử nghiệm kiểm tra công hiệu (tính từ ngày tiêm miễn dịch trên động vật thí nghiệm).

**Đóng gói**

Hộp 10 lọ tương đương 100 liều (mỗi lọ 5 ml chứa 10 liều). Lọ được đóng kín bằng nút cao su, ngoài nút cao su được đậy kín bởi một nắp nhôm.

**Nhãn**

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng quy định hiện hành.

**VẮC XIN BẠI LIỆT BẤT HOẠT (IPV)**

***Vaccinum poliomyelitidis inactivatum***

Vắc xin bại liệt bất hoạt là một hỗn dịch vô khuẩn của virus bại liệt týp 1, týp 2 và týp 3 phát triển trên nuôi cấy tế bào, được cô đặc, tinh khiết, bất hoạt và dùng để gây miễn dịch chủ động, đặc hiệu cho người, phòng bệnh bại liệt do virus Polio gây nên.

**Sản xuất**

**Chủng sản xuất:**

Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng giống gốc (Master seed) của virus hoang dại hoặc virus giảm độc lực. Số lần cấy truyền và phương pháp cấy truyền được cơ quan quản lý phê duyệt. Chủng được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C).

**Tế bào sản xuất:**

Tế bào sử dụng cho sản xuất: Tế bào thận khi tiên phát hoặc tế bào Vero.

Tế bào sử dụng cho sản xuất phải đạt các yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới. Có thể sử dụng huyết thanh động vật trong nuôi cấy tế bào.

**Khi dùng cho sản xuất:**

Phải đạt các tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới và NICVB đưa ra.

**Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất:**

Quy trình sản xuất vắc xin phải theo các quy trình của Tổ chức Y tế Thế giới. Chủng virus được nhân lên trên tế bào thận khi tiên phát hoặc tế bào Vero và sử dụng môi trường thích hợp cho virus phát triển. Sau khi gặt, hỗn dịch virus được đông tan 3 lần, ly tâm bỏ cặn, lọc vô trùng, sau đó đưa vào quy trình cô đặc và tinh khiết kháng nguyên; bước tiếp theo là quy trình bất hoạt virus bằng formaldehyd và trung hòa formaldehyd. Sau cùng, hỗn dịch virus được chế thành vắc xin bất hoạt, tam liên. Phải thực hiện kiểm định trong suốt quá trình sản xuất ở các công đoạn: Vật liệu nguồn (tế bào, môi trường nuôi cấy,...), mẻ gặt đơn, bán thành phẩm sau khi siêu ly tâm, trước khi bất hoạt, sau khi bất hoạt,... nhằm kiểm tra tác nhân ngoại lai, xác định hiệu giá vắc xin trước khi bất hoạt, xác định kháng nguyên D, xác định độ tinh khiết của virus, xác định độ sống tồn dư của virus sau khi bất hoạt.

Chế phẩm phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin và chỉ được phép sử dụng sau khi đạt các yêu cầu sản xuất và kiểm định trong quá trình sản xuất, đồng thời đạt các tiêu chuẩn kiểm định ở phần kiểm định vắc xin thành phẩm.

**Kiểm định vắc xin thành phẩm**

**Cảm quan**

Vắc xin bại liệt bất hoạt là một dung dịch lỏng.

**Nhận dạng**

Được tiến hành ít nhất đối với 1 lọ vắc xin. Thử nghiệm kiểm tra hiệu giá xác định hàm lượng D-antigen được chấp nhận cho thử nghiệm nhận dạng.