

PHỤ LỤC 15

15.1 XÁC ĐỊNH ĐỘ SỐNG CỦA VẮC XIN BCG

Kiểm tra độ sống

Các vật liệu

Dung dịch Sauton loãng 1/4 được sử dụng để pha loãng vắc xin BCG.

Môi trường nuôi cấy: Lowenstein - Jensen.

Vắc xin BCG mẫu thử và mẫu chuẩn.

Hoàn nguyên và pha loãng vắc xin

Vắc xin BCG được xác định độ sống theo phương pháp sau: Hoàn nguyên ít nhất 5 mg vắc xin BCG vào 5 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 vô khuẩn để tạo hỗn dịch cơ bản chứa 1 mg vắc xin BCG/1 ml. Sau khi hoàn nguyên, hỗn dịch này phải được giữ ở 4 °C trong thời gian tối thiểu 15 min, sau đó pha theo công thức sau:

- 1) 1 ml hỗn dịch cơ bản + 99 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/100 (I).
- 2) 1 ml hỗn dịch pha loãng I + 99 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/10.000 (II).
- 3) 4 ml hỗn dịch pha loãng II + 4 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/20.000 (III).

4) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 6 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/40.000 (IV).

5) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 14 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/80.000 (V).

6) 2 ml hỗn dịch pha loãng II + 30 ml dung dịch Sauton loãng 1/4 = 1/160.000 (VI).

Nuôi cấy

Lắc đều hỗn dịch của mỗi độ pha trong 20 s, cấy vào môi trường Lowenstein - Jensen 0,1 ml/ống theo trình tự sau:

2 độ pha đầu: Mỗi độ pha loãng cấy lên 5 ống môi trường. Độ pha thứ 3 cấy lên 10 ống môi trường.

Đối với vắc xin tươi (trước khi đông khô): Cấy lên các ống môi trường Lowenstein - Jensen huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng cuối IV, V, VI.

Đối với vắc xin BCG đông khô giữ ở 4 °C: Cấy huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng III, IV, V.

Đối với vắc xin BCG đông khô ủ ở 37 °C: Cấy huyền dịch vắc xin BCG từ 3 độ pha loãng II, III, IV.

Các ống môi trường đã được cấy huyền dịch vắc xin BCG ở các độ pha khác nhau như trên sẽ được lắc đều, để khô bề mặt và ủ ở 37 °C trong 28 ngày.

Đếm khuẩn lạc

Các ống môi trường được cấy huyền dịch BCG và ủ ở 37 °C sẽ được đưa ra đếm số khuẩn lạc mọc trên từng ống sau 21 ngày và 28 ngày.

Bảng 15.1

Điều kiện xác định	Công thức tính
1. $2\omega \geq \bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$	1. $\frac{d_1}{v} \times \frac{1}{2} \times (\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)$
2. $\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$	2. $\frac{d_2}{v} \times \frac{\omega \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_1 - (\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)}$
3. $\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq 2\bar{X}_3$	3. $\frac{d_3}{v} \times \frac{\omega \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_2 - 2\bar{X}_3}$
4. $2\bar{X}_3 \geq 2\omega$	4. $\frac{d_3}{v} \times \bar{X}_3$

Trong đó:

\bar{X}_1 là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 1;

\bar{X}_2 là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 2;

\bar{X}_3 là số khuẩn lạc trung bình mọc trên các ống môi trường Lowenstein - Jensen khi cấy huyền dịch BCG ở độ pha thứ 3;

d là độ pha loãng huyền dịch vắc xin BCG;

v là thể tích hỗn dịch cấy trên một ống môi trường Lowenstein - Jensen;

Hằng số ω tương đương với số lượng tối ưu khuẩn lạc có thể đếm được trên một ống môi trường Lowenstein-Jensen.

Tính kết quả

Số đơn vị sống trong 1 ml vắc xin được tính theo 1 trong 4 công thức ở Bảng 15.1 hoặc kết quả độ sống của mỗi loạt vắc xin BCG có thể được tính theo chương trình phần mềm Whoprogram/BCG/Biofarma.

Tại nhà sản xuất, tiến hành kiểm tra độ sống ở tất cả các loạt vắc xin thành phẩm (bao gồm cả độ sống trước đông khô, sau đông khô và sau khi ủ ổn định nhiệt).

Những loạt vắc xin BCG có độ sống không đảm bảo với giới hạn cho phép ở lần kiểm tra thứ nhất phải nhắc lại thử nghiệm:

Nếu thử nghiệm độ sống lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị (valid test), phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường Lowenstein-Jensen gấp đôi so với lần 1.

Nếu thử nghiệm độ sống lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị (invalid test) thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường bằng lần 1.

Nếu lần thử nghiệm nhắc lại, độ sống vẫn không đạt thì phải hủy bỏ loạt vắc xin BCG đó.

Kiểm tra độ sống của vắc xin BCG phải tiến hành song song với vắc xin BCG mẫu chuẩn để kiểm tra chất lượng môi trường dùng cho thử nghiệm độ sống. Độ sống của vắc xin BCG mẫu chuẩn trong mỗi thử nghiệm phải ổn định và nằm trong giới hạn giá trị trung bình ± 2SD.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Đối với vắc xin BCG phòng bệnh lao, giới hạn độ sống cho phép là từ 1 triệu đến 6 triệu đơn vị sống trong 1 mg vắc xin 1×10⁶ ĐVS/mg đến 6×10⁶ ĐVS/mg vắc xin BCG).

Kiểm tra tính ổn định nhiệt

Số đơn vị sống của vắc xin BCG sau khi ủ ở 37 °C trong 28 ngày phải đạt ít nhất là 20 % so với mẫu ủ ở 4 °C trong 28 ngày.

Các vật liệu

Dung dịch Sauton loãng 1/4 được sử dụng để pha loãng vắc xin BCG.

Môi trường nuôi cấy: Lowenstein-Jensen.

Vắc xin BCG mẫu thử và mẫu chuẩn.

Trước khi kiểm tra tính ổn định nhiệt, vắc xin BCG đông khô mẫu thử phải được ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong 28 ngày như dưới đây:

Dạng 1 mg/ống: Ủ 10 ống ở 4 °C trong 28 ngày và 10 ống ở 37 °C trong 28 ngày.

Dạng 0,5 mg/ống: Ủ 20 ống ở 4 °C trong 28 ngày và 20 ống ở 37 °C trong 28 ngày.

Tiến hành

Kiểm tra tính ổn định nhiệt của vắc xin BCG bằng cách đếm độ sống của loạt vắc xin này sau khi ủ ở 4 °C và 37 °C trong 28 ngày. Quy trình đếm độ sống được thực hiện như ở phần Kiểm tra độ sống. Tính tỷ lệ % số đơn vị sống BCG mọc ở 37 °C so với ở 4 °C, theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ \% ổn định nhiệt} = \frac{A}{B} \times 100 (\%)$$

Trong đó:

A là số ĐVS/mg vắc xin BCG ở 37 °C trong 28 ngày;

B là số ĐVS/mg vắc xin BCG ở 4 °C trong 28 ngày.

DVS là đơn vị sống.

Những loạt vắc xin BCG có tỷ lệ % ổn định nhiệt không đạt yêu cầu ở lần kiểm tra thứ nhất phải nhắc lại thử nghiệm theo yêu cầu như sau:

Nếu thử nghiệm có tỷ lệ % ổn định nhiệt lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị, phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường Lowenstein-Jensen gấp đôi so với lần 1.

Nếu thử nghiệm có tỷ lệ % ổn định nhiệt lần 1 không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số ống môi trường bằng lần 1.

Nếu lần thử nghiệm nhắc lại, tỷ lệ % ổn định nhiệt vẫn không đạt thì phải hủy bỏ loạt vắc xin BCG đó.

Kiểm tra tỷ lệ % ổn định nhiệt của vắc xin BCG phải tiến hành song song với vắc xin BCG mẫu chuẩn để kiểm tra chất lượng môi trường dùng cho thử nghiệm độ sống. Độ sống của vắc xin BCG mẫu chuẩn trong mỗi thử nghiệm phải ổn định và nằm trong giới hạn giá trị trung bình ± 2SD.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tỷ lệ % số đơn vị sống BCG mọc ở 37 °C so với ở 4 °C phải không được thấp hơn 20 %.

15.2 XÁC ĐỊNH ĐỘ CHÂN KHÔNG CỦA VẮC XIN BCG

Vắc xin BCG được đông khô và hàn kín trong điều kiện chân không (0,001 mmHg) và phải được kiểm tra độ chân không bằng thiết bị Tesla vacuum.

Kiểm tra độ chân không trong các ống vắc xin BCG đông khô không sớm hơn 2 tháng sau khi hàn ống. Khi kiểm tra chân không, được phép dùng những ống vắc xin phát ra ánh sáng màu tím nhạt đến trắng xanh và loại bỏ những ống vắc xin không phát ra ánh sáng hoặc phát ra ánh sáng màu đỏ hình tên lửa. Trước khi phân phát, vắc xin phải được kiểm tra lại về độ chân không (do đơn vị sản xuất kiểm tra). Nếu phát hiện thấy quá 5 % số ống không còn chân không thì lô vắc xin này phải lưu lại thêm 1 tháng nữa, sau đó kiểm tra chân không lại. Nếu vẫn có hơn 1 % số ống không đạt chân không thì lô vắc xin đó phải bỏ đi. Những số liệu kiểm tra này phải ghi vào hồ sơ của lô vắc xin.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Loạt vắc xin BCG đông khô được coi là đạt độ chân không khi có không ít hơn 95 % tổng số ống đạt tiêu chuẩn về độ chân không.