

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN I-5:2017

**BỘ TIÊU CHUẨN QUỐC GIA VỀ THUỐC -
PHẦN 5: VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ
(GỒM 23 TIÊU CHUẨN)**

Set of national standards for medicines - Part 5: Vaccines and biological products

HÀ NỘI - 2017

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	4
Lời giới thiệu	5
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Tài liệu viện dẫn	7
3 Ký hiệu và chữ viết tắt	7
4 Các tiêu chuẩn	7
Huyết thanh miễn dịch dùng cho người	9
Globulin miễn dịch người	11
Huyết thanh kháng bạch hầu	15
Huyết thanh kháng dại	17
Huyết thanh kháng nọc rắn	19
Huyết thanh kháng uốn ván	23
Interferon Alpha 2	25
Tuberculin PPD	29
Các vắc xin dùng cho người	31
Vắc xin bạch hầu hấp phụ	33
Vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà hấp phụ (DTWP)	37
Vắc xin bạch hầu, uốn ván hấp phụ dùng cho người lớn và vị thành niên	43
Vắc xin bại liệt bất hoạt (IPV)	47
Vắc xin bại liệt uống	49
Vắc xin BCG	51
Vắc xin đại tể bào dùng cho người	53
Vắc xin sởi	57
Vắc xin tả uống bất hoạt	59
Vắc xin thương hàn uống	63
Vắc xin thương hàn Vi Polysaccharid	67
Vắc xin uốn ván hấp phụ	71
Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (rDNA)	75
Vắc xin viêm não Nhật Bản	79

Lời nói đầu

Lời nói đầu

Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc TCVN I:2017 thay thế bộ TCVN I:2009. Bộ TCVN I:2017 gồm 5 phần:

TCVN I-1:2017 - Phần 1: Phương pháp kiểm nghiệm thuốc và các chuyên mục;

TCVN I-2:2017 - Phần 2: Nguyên liệu hóa dược;

TCVN I-3:2017 - Phần 3: Thành phẩm hóa dược;

TCVN I-4:2017 - Phần 4: Dược liệu và thuốc từ dược liệu;

TCVN I-5:2017 - Phần 5: Vắc xin và sinh phẩm y tế.

Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc TCVN I:2017 do Hội đồng Dược điển Việt Nam biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn quốc gia về thuốc là văn bản kỹ thuật về tiêu chuẩn hoá và kiểm nghiệm chất lượng thuốc. Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc TCVN I:2017 có 1158 tiêu chuẩn, bao gồm:

Phần 1: 201 tiêu chuẩn về phương pháp kiểm nghiệm thuốc và chuyên mục;

Phần 2: 362 tiêu chuẩn về nguyên liệu hóa dược;

Phần 3: 257 tiêu chuẩn về thành phẩm hóa dược;

Phần 4: 315 tiêu chuẩn về dược liệu và thuốc từ dược liệu;

Phần 5: 23 tiêu chuẩn về vắc xin và sinh phẩm y tế.

Danh pháp, thuật ngữ trong Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc được viết theo qui định của Hội đồng Dược điển Việt Nam, Bộ Y tế. Các thuật ngữ được phẩm được viết dựa trên nguyên tắc viết hóa tên chung quốc tế Latin (DCI Latin) một cách hợp lý nhằm giữ các ký tự cho sát với thuật ngữ quốc tế. Tên hợp chất hữu cơ được viết theo danh pháp do Hiệp hội quốc tế hóa học thuần túy và ứng dụng (I.U.P.A.C) qui định. Trong một số trường hợp cá biệt, các thuật ngữ tiếng Việt đã quen dùng đối với một số nguyên tố, hóa chất hay tên dược liệu vẫn tiếp tục sử dụng.

Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc –

Phần 5: Vắc xin và sinh phẩm y tế

Set of national standards for medicines –

Part 5: Vaccines and biological products

1 Phạm vi áp dụng

Bộ tiêu chuẩn này qui định các chỉ tiêu, yêu cầu kỹ thuật, phương pháp kiểm nghiệm, bảo quản và các yêu cầu có liên quan đến chất lượng vắc xin và sinh phẩm y tế.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn có ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả sửa đổi bổ sung (nếu có).

TCVN I-1:2017, Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc - Phần 1: Phương pháp kiểm nghiệm thuốc và chuyển mục.

3 Ký hiệu và chữ viết tắt

Ký hiệu in nghiêng tên hóa chất, thuốc thử biểu thị thuốc thử đó phải đạt yêu cầu qui định tại Phụ lục 2 của TCVN I-1:2017.

Chữ viết tắt: Theo mục 2 Qui định chung và mục 3 Ký hiệu các chữ viết tắt của TCVN I-1:2017.

4 Các tiêu chuẩn

HUYẾT THANH MIỄN DỊCH DÙNG CHO NGƯỜI***Immunosera ad usum humanum*****Định nghĩa**

Huyết thanh miễn dịch dùng cho người là sinh phẩm có chứa globulin miễn dịch có khả năng trung hòa kháng nguyên đặc hiệu.

Sản xuất

Huyết thanh miễn dịch thu được từ động vật hoặc từ người đã được gây miễn dịch. Huyết thanh miễn dịch phải được tinh chế để lượng globulin đạt theo quy định và để loại bỏ các protein không cần thiết.

Có thể cho thêm chất bảo quản vào thành phẩm.

Trong huyết thanh miễn dịch dạng đông khô, độ ẩm tồn dư không được quá 3 % (k/kd).

Huyết thanh miễn dịch dạng lỏng phải không có màu hoặc màu vàng nhạt, không có cặn. Huyết thanh miễn dịch dạng đông khô phải dễ hòa tan thành dung dịch không màu hoặc màu vàng nhạt, có cùng đặc tính như sản phẩm ở dạng lỏng.

Các thử nghiệm kiểm định**pH**

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Protein ngoại lai

Chỉ có protein của loài động vật hoặc người dùng để sản xuất huyết thanh miễn dịch (Phụ lục 15.10).

Protein tổng số

Không quá 170 g/l (Phụ lục 15.18).

Albumin

Chỉ được ở dạng vết khi phát hiện bằng phương pháp điện di miễn dịch.

Chất bảo quản

Thimerosal: Không quá 0,02 % (Phụ lục 15.29).

Phenol: Không quá 0,25 % (Phụ lục 15.28).

Độ vô khuẩn

Có thể thực hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp hoặc kỹ thuật nuôi cấy màng lọc (Phụ lục 15.7).

Tiêu chuẩn: Không có vi khuẩn hoặc vi nấm mọc trên môi trường thích hợp sau thời gian 14 ngày ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C đối với kiểm tra vi khuẩn và 20 °C đến 25 °C đối với kiểm tra vi nấm.

Công hiệu

Kiểm tra công hiệu được thực hiện theo hướng dẫn đối với mỗi loại huyết thanh miễn dịch và được biểu thị bằng số đơn vị quốc tế (IU) trong 1 ml.

Đơn vị quốc tế: Được xác định theo quy định của Tổ chức Y tế Thế giới.

Tiêu chuẩn: Mỗi loại huyết thanh miễn dịch có tiêu chuẩn công hiệu riêng.

An toàn chung

Dùng 5 chuột nhắt trắng nặng 17 g đến 22 g mỗi con và 2 chuột lang nặng 250 g đến 350 g mỗi con.

Tiêm phúc mạc chuột lượng huyết thanh miễn dịch bằng một liều dùng cho người, nhưng không quá 1 ml cho mỗi chuột nhắt trắng và không quá 5 ml cho mỗi chuột lang (Phụ lục 15.11).

Tiêu chuẩn: Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, chuột không giảm cân và không có biểu hiện bệnh lý.

Chất gây sốt

Tiêm với liều từ 0,5 ml đến 10 ml cho 1 kg trọng lượng thử tùy theo quy định đối với từng loại huyết thanh miễn dịch (Phụ lục 15.12).

Tiêu chuẩn: Thân nhiệt ban đầu phải nằm trong khoảng 38 °C đến 39,8 °C; hiệu số nhiệt giữa hai lần đo không quá 0,2 °C; thân nhiệt ban đầu giữa các thỏ chênh lệch không quá 1 °C; thân nhiệt cao nhất của thỏ đo được trong khoảng 3 h sau khi tiêm là giá trị cần xác định, giá trị này không quá 0,6 °C đối với mỗi thỏ và tổng giá trị của 3 thỏ không quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

Bảo quản, hạn dùng

Sinh phẩm được giữ ở điều kiện lạnh, nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Không làm đông băng huyết thanh miễn dịch dạng lỏng.

Hạn dùng được tính từ khi bắt đầu kiểm tra công hiệu, tùy từng nhà sản xuất và được cơ quan kiểm định quốc gia phê chuẩn.

Nhãn, hộp

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

GLOBULIN MIỄN DỊCH NGƯỜI***Immunoglobulinum humanum normale*****Định nghĩa**

Globulin miễn dịch người là chế phẩm dạng lỏng hoặc đông khô có chứa các globulin miễn dịch, chủ yếu là IgG từ huyết tương người bình thường.

Globulin miễn dịch ở dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu hoặc có màu nâu-vàng nhạt.

Globulin miễn dịch đông khô là bột màu trắng hoặc vàng nhạt, có dạng khối xốp, mịn.

Globulin miễn dịch người không đặc hiệu được chỉ định dùng để điều trị phòng ngừa nhiễm viêm gan A, viêm gan B, sởi, rubella... hoặc trong các trường hợp bị thiếu hụt globulin gamma, các trường hợp đang điều trị ức chế miễn dịch, bị nhiễm trùng nhưng kháng thuốc-kháng sinh.

Sản xuất

Globulin miễn dịch được điều chế từ huyết tương của tối thiểu 1000 người. Huyết tương nguồn có thể được chiết tách trực tiếp từ máu người hoặc từ huyết tương đông băng có chứa không ít hơn 0,1 đơn vị kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván và không ít hơn 0,25 đơn vị kháng thể kháng sởi.

Phần có chứa globulin miễn dịch lớp G được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột sao cho không làm hỏng các cấu trúc kháng thể, đảm bảo ngăn ngừa sự lan truyền của các virus viêm gan và các vi sinh vật khác, nồng độ của globulin miễn dịch phải đạt 50 g/l với nhiều loại kháng thể khác nhau và ít nhất 2 trong số đó (một loại kháng vi khuẩn và một loại kháng virus) phải có nồng độ cao hơn tối thiểu gấp 3 lần so với nồng độ ban đầu. Các chất bảo quản kháng vi sinh vật hoặc chất ổn định có thể được sử dụng nhưng không được làm ảnh hưởng đến hiệu giá của các kháng thể.

Nhận dạng

Nhận dạng Globulin miễn dịch có nguồn gốc từ huyết tương người:

Globulin miễn dịch người được nhận dạng qua thử nghiệm kết tủa bằng cách sử dụng các kháng huyết thanh đặc hiệu đối với protein huyết tương người.

Tiêu chuẩn đánh giá: Mẫu thử nghiệm phải có phản ứng dương tính với kháng huyết thanh đặc hiệu đối với người và phải có phản ứng âm tính với kháng huyết thanh đặc hiệu của loài khác.

Nhận dạng Globulin miễn dịch lớp G (IgG):

Sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu kháng huyết thanh người để so sánh giữa huyết thanh người bình thường và mẫu thử nghiệm bằng kỹ thuật điện di miễn dịch.

Tiêu chuẩn đánh giá: Thành phần chính của mẫu thử nghiệm phải tương ứng với thành phần IgG của huyết thanh người bình thường.

Hiệu giá

Hiệu giá của kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván

Hiệu giá của kháng độc tố bạch hầu: Phụ lục 15.15.

Hiệu giá của kháng độc tố uốn ván: Phụ lục 15.16.

Tiêu chuẩn đánh giá: Hàm lượng kháng độc tố bạch hầu hoặc kháng độc tố uốn ván không nhỏ hơn 2 IU/ml mẫu thử nghiệm.

Hiệu giá của kháng thể kháng sởi

Hiệu giá của kháng thể kháng sởi của globulin miễn dịch người không đặc hiệu được xác định bằng kỹ thuật trung hòa trên tế bào Vero và tính bằng số đơn vị quốc tế trong 1ml (IU/ml).

Vật liệu:

Mẫu thử nghiệm: Globulin miễn dịch người.

Mẫu chuẩn quốc tế.

Huyết thanh bào thai bê.

Tế bào Vero

Virus sởi giảm độc lực để trung hòa.

Môi trường 199 có chứa 2 % huyết thanh bào thai bẽ.

Trypsin 0,25 %.

Phiến nhựa nuôi tế bào 96 giếng, đáy bằng.

Tiến hành: Tiến hành đồng thời trên 2 phiến cho 1 lần thử nghiệm.

Phiến 1:

Pha loãng mẫu chuẩn và mẫu thử nghiệm với môi trường 199 để có dung dịch chứa 5 IU/ml.

Tiếp tục pha loãng bậc 2 liên tiếp từ dung dịch pha loãng trên của mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn để có các dung dịch 2^{-1} ; 2^{-2} ; 2^{-3} ; ... đến 2^{-12}

Pha virus sởi trung hòa bằng môi trường 199 để có dung dịch chứa 100 CCID₅₀/50 µl (Cell Culture Infectious Dose-Liều gây hủy hoại 50 % tế bào).

Nhỏ 50 µl từ mỗi dung dịch đã pha loãng của mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn ở các độ pha từ 2^{-8} đến 2^{-12} vào 7 giếng theo sơ đồ bố trí trên phiến trước.

Nhỏ 50 µl dung dịch virus trung hòa.

Đề ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 60 min đến 90 min.

Chuẩn bị dung dịch tế bào Vero có nồng độ 2×10^5 /ml.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào vào mỗi giếng.

Đề ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong 7 ngày đến 9 ngày.

Theo dõi sự biến đổi tế bào (CPE) của virus sởi dưới kính hiển vi.

Phiến 2:

Hay được gọi là phiến "chứng", nhằm xác định số CCID₅₀/50 µl được dùng để trung hòa trong thử nghiệm xác định hiệu giá của kháng thể kháng sởi.

Từ dung dịch virus sởi gốc lưu giữ ở âm sâu (≤ -35 °C), pha để có 100 CCID₅₀/50 µl. Dung dịch này được ký hiệu là 10°.

Tiếp tục pha loãng bậc 10 từ dung dịch 10° để có các độ pha loãng: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} và 10^{-4} .

Nhỏ 50 µl từ mỗi độ pha loãng virus vào một dãy giếng của phiến.

Đề ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 60 min đến 90 min.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào có nồng độ 2×10^5 /ml.

Đề ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong 7 ngày đến 9 ngày.

Theo dõi CPE dưới kính hiển vi.

Tính kết quả:

Tính số CCID₅₀/50 µl để trung hòa trong thử nghiệm.

Tính theo công thức Kaber:

$$\text{Log CCID}_{50} = -\log C - [(\text{Tổng số \% hủy hoại ở các nồng độ}/100 - 0,5) \times \log d]$$

trong đó:

CCID₅₀ là liều virus gây hủy hoại 50 % tế bào;

C là nồng độ virus cao nhất dùng trong thử nghiệm;

% biến đổi là tỷ lệ giữa số giếng có sự biến đổi tế bào và tổng số giếng của một độ pha;

d là hệ số (bậc) pha loãng.

Tiêu chuẩn đánh giá: Số CCID₅₀/50 µl phải nằm trong khoảng dao động từ 31 đến 316.

Tính liều bảo vệ 50 % tế bào

Tính theo công thức Karber hoặc Reed-Muench:

$$\text{Log ED}_{50} = -\log C - [(\text{Tổng số \% hủy hoại ở các nồng độ}/100 - 0,5) \times \log d]$$

trong đó:

ED₅₀ là liều bảo vệ 50 % tế bào;

C là độ pha loãng thấp nhất của mẫu thử hoặc mẫu chuẩn quốc tế dùng trong thử nghiệm;

% bảo vệ là tỷ lệ giữa số giếng có tế bào được bảo vệ và tổng số giếng của một độ pha;

d là hệ số (bậc) pha loãng.

Tính hiệu giá

$HG \text{ (IU/ml)} = (ED_{50} \text{ của mẫu chuẩn} / ED_{50} \text{ của mẫu thử nghiệm}) \times 5 \text{ (IU)}$

Tiêu chuẩn đánh giá: Hiệu giá của kháng thể kháng sỏi phải không được nhỏ hơn 5 IU/ml globulin miễn dịch người không đặc hiệu.

Hàm lượng globulin miễn dịch G (IgG)

Xác định hàm lượng IgG bằng kỹ thuật điện di (Phụ lục 5.6)

Tiêu chuẩn đánh giá: Không nhỏ hơn 90 % hàm lượng protein tổng.

Tính tan

Globulin miễn dịch người đông khô phải tan hoàn toàn trong vòng 20 min ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C sau khi được hoàn nguyên theo hướng dẫn ghi trên nhãn của sản phẩm.

An toàn chung

Phụ lục 15.11.

Chất gây sốt

Phụ lục 15.12.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nitơ toàn phần

Phụ lục 15.18.

Thimerosal

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

pH

6,4 đến 7,2 (Phụ lục 15.33).

Đóng gói, bảo quản

Tùy theo nhà sản xuất, trong các lọ thủy tinh không màu, tránh ánh sáng.

Nhãn, hộp

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

HUYẾT THANH KHÁNG BẠCH HẦU***Immunoserum diphthericum*****Định nghĩa**

Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu là chế phẩm chứa globulin kháng độc tố, có khả năng trung hòa độc hiệu ngoại độc tố của *Corynebacterium diphtheriae*.

Nhận dạng

Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu trung hòa độc tố của *Corynebacterium diphtheriae* làm cho độc tố này trở nên không độc, vô hại đối với động vật cảm thụ.

Các thử nghiệm kiểm định

Huyết thanh kháng bạch hầu phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

Công hiệu

Công hiệu của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

Tiêu chuẩn: Không nhỏ hơn 500 IU/ml.

Xác định công hiệu của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được thực hiện bằng phương pháp trung hòa trong da thỏ hoặc bằng phương pháp trung hòa trên chuột lang (250 g/con đến 350 g/con) (Phụ lục 15.15).

Bảo quản

Huyết thanh kháng bạch hầu cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đông băng.

Nhãn

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

HUYẾT THANH KHÁNG ĐẠI***Serum antirabicum*****Định nghĩa**

Huyết thanh kháng đại là chế phẩm có chứa globulin miễn dịch kháng virus đại, có khả năng trung hòa đặc hiệu virus đại.

Nhận dạng

Huyết thanh kháng đại trung hòa virus đại làm cho virus mất khả năng gây bệnh, trở nên vô hại đối với động vật cảm thụ.

Các thử nghiệm kiểm định

Huyết thanh kháng đại phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

Protein ngoại lai: Không được có trong thành phẩm.

Công hiệu

Công hiệu của huyết thanh kháng đại được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

Tiêu chuẩn: Không nhỏ hơn 150 IU/ml.

Phương pháp xác định số IU/ml của huyết thanh kháng đại được thực hiện bằng phương pháp trung hòa trên chuột nhắt (Phụ lục 15.17). Phản ứng này dựa trên sự trung hòa một liều cố định hiệu giá virus đại thử thách với các độ pha loãng khác nhau của huyết thanh.

Bảo quản

Huyết thanh kháng đại cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đông băng.

Nhãn

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung, ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN*Immunoserum contra venena***Định nghĩa**

Huyết thanh kháng nọc rắn là chế phẩm chứa các globulin miễn dịch kháng nọc rắn có khả năng trung hòa đặc hiệu nọc rắn tương ứng.

Huyết thanh kháng nọc rắn ở dạng lỏng là dung dịch không màu, trong suốt hoặc có màu vàng nhạt, hơi nhớt. Huyết thanh kháng nọc rắn có thể ở dạng đông khô kèm theo nước hồi chỉnh.

Huyết thanh kháng nọc rắn được chỉ định dùng để điều trị bệnh nhân bị rắn cắn.

Sản xuất

Huyết thanh kháng nọc rắn được tinh chế sản xuất từ huyết tương ngựa khỏe mạnh, tuổi từ 4 năm đến 7 năm, cân nặng từ 200 kg trở lên, ngựa đực phải thiến, ngựa cái không được sinh sản, đã được miễn dịch với kháng nguyên nọc rắn, được tinh chế, cô đặc bằng phương pháp Pope dùng pepsin, có chất bảo quản là merthiolat 1/10000. Sau đó được lọc vô trùng qua màng lọc 0,2 µm, pha chế đến hàm lượng thích hợp và đóng ống.

Nhận dạng

Huyết thanh kháng nọc rắn được nhận dạng thông qua thử nghiệm xác định hiệu giá.

Hiệu giá

Thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng nọc rắn được thực hiện trên nguyên lý trung hòa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc rắn tương ứng. Thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng Swiss để xác định LD₅₀ có trong 1 ml huyết thanh.

Phương pháp tiến hành**Vật liệu**

Huyết thanh kháng nọc rắn thử nghiệm.

Nọc rắn tinh chế.

Chuột nhắt trắng Swiss, trọng lượng 18 g đến 20 g.

Nước muối sinh lý.

Tiến hành

*Xác định LD₅₀ của nọc rắn:

Pha dung dịch nọc rắn gốc: Pha dung dịch nọc rắn gốc có nồng độ 1000 µg/ml bằng cách cân 10 mg nọc rắn và hòa tan trong 10,0 ml nước muối sinh lý (bảo quản trong tủ lạnh từ 2 – 8 °C).

Pha dung dịch nọc rắn thử nghiệm: Từ dung dịch nọc rắn gốc pha loãng bằng nước muối sinh lý để được dung dịch có nồng độ 250 µg/ml hoặc 500 µg/ml (tùy theo độc lực của nọc rắn).

Từ dung dịch nọc rắn thử nghiệm tiến hành pha loãng cách nhau 1,1 hoặc 1,4 lần thành 5 độ pha liên tiếp, sao cho sau khi tiêm độ pha loãng thấp nhất chuột phải chết 100 % và độ pha loãng cao nhất chuột phải sống 100 % (sau khi pha xong lắc đều và để ở 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng).

Tiêm tĩnh mạch đuôi chuột với liều 0,5 ml/con. Mỗi độ pha tiêm 6 chuột.

Theo dõi kết quả sau 24 h đến 48 h, theo dõi số chuột sống chết trong mỗi độ pha.

Tính kết quả theo công thức Spearman- Karber:

$$\text{Log LD}_{50} = X_0 + d/2 - d \times (\sum r_i/n)$$

trong đó:

X₀ là log của nồng độ nọc rắn thấp nhất gây ra chuột chết 100%;

d là log của bậc pha loãng;

r_i là số chuột chết của mỗi độ pha loãng;

n là số chuột được tiêm của mỗi độ pha loãng.

$$LD_{50} = \text{Antilog} LD_{50}$$

* Xác định hiệu giá huyết thanh kháng nọc rắn:

Chuẩn bị dung dịch nọc rắn có chứa 20 LD_{50} /ml: Từ dung dịch nọc rắn gốc (1000 $\mu\text{g/ml}$, giữ ở 2 – 8 °C), pha bằng nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 20 LD_{50} /ml.

Chuẩn bị huyết thanh kháng nọc rắn thử nghiệm: Huyết thanh thử nghiệm (không pha loãng hoặc pha loãng 2 lần, 3 lần, 4 lần... trong trường hợp huyết thanh kháng nọc rắn có hiệu giá cao trên 200 LD_{50}) được lựa chọn tối thiểu 5 độ pha có nồng độ huyết thanh cách nhau liên tiếp 1,1 hoặc 1,4 lần sao cho sau khi trung hòa với một lượng nọc rắn cố định thì mức nồng độ thấp nhất phải bảo vệ được 100 % số chuột được tiêm và mức nồng độ cao nhất gây chết 100 % số chuột được tiêm.

Trung hòa:

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống:

2,5 ml dung dịch nọc rắn chứa 20 LD_{50}

Một thể tích thay đổi đã lựa chọn của huyết thanh thử nghiệm.

Một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 5,0 ml trong mỗi ống.

Lắc nhẹ các ống nghiệm, trung hòa ở nhiệt độ 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,5 ml/chuột vào tĩnh mạch đuôi. Dùng 6 chuột cho mỗi độ pha. Theo dõi kết quả sau 24 h đến 48 h.

Tính liều bảo vệ 50 % (ED_{50}) theo công thức Spearman- Kaber:

$$\text{Log } ED_{50} = X_0 + d/2 - d \times (\sum r_i/n)$$

trong đó:

X_0 là log của nồng độ huyết thanh thử nghiệm ít nhất bảo vệ được 100 % chuột;

d là log của bậc pha loãng;

r_i là số chuột sống của mỗi dung dịch trung hòa;

n là số chuột được tiêm của mỗi dung dịch trung hòa.

$$ED_{50} = \text{Antilog} ED_{50}$$

* Xác định số LD_{50} trung hòa (nhóm chứng): Từ dung dịch nọc rắn chứa 20 LD_{50} /ml pha loãng thành các độ pha 1/20; 1/14; 1/10; 1/7 và 1/5 (nếu xác định LD_{50} , sử dụng hệ số pha loãng $d=1,4$), hoặc 1/12,1; 1/11; 1/10; 1/9,1; 1/8,3 (nếu xác định LD_{50} sử dụng hệ số pha loãng $d=1,1$) bằng nước muối sinh lý. Lắc nhẹ các ống, để ở 37 °C trong 30 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,5 ml/chuột vào tĩnh mạch đuôi. Dùng 6 chuột cho mỗi độ pha. Theo dõi kết quả sau 24 – 48 h.

Tính số LD_{50} trung hòa (tính T) như tính LD_{50} của nọc rắn ở trên.

* Xác định hiệu giá (hay tính số LD_{50} có trong 1 ml huyết thanh thử nghiệm):

$$\text{Hiệu giá} = (T-1)/ED_{50}$$

trong đó:

T là số LD_{50} dùng để trung hòa trong 1 liều tiêm;

ED_{50} là liều bảo vệ 50 %.

Tiêu chuẩn đánh giá

Thử nghiệm xác định hiệu giá chỉ có giá trị khi T nằm trong khoảng từ 4 đến 8.

Hiệu giá của huyết thanh thử nghiệm phải không nhỏ hơn 1000 LD_{50}/lq .

An toàn chung

Huyết thanh kháng nọc rắn phải đạt yêu cầu về thử nghiệm an toàn chung (Phụ lục 15.11).

Chất gây sốt

Phụ lục 15.12.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nitơ toàn phần

Không lớn hơn 15 % (Phụ lục 15.18).

Thimerosal

Không lớn hơn 0,01 % (Phụ lục 15.29).

Natri clorid

Từ 0,85 % đến 0,9 % (Phụ lục 15.26).

pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Đóng gói, bảo quản

Mỗi lọ đóng từ 2,0 ml đến 5,0 ml hoặc dạng đông khô, tùy theo nhà sản xuất.

Bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘC TỔ UỐN VÁN*Immunoserum tetanicum ad usum humanum***Định nghĩa**

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván là chế phẩm có chứa globulin kháng độc tố, có khả năng trung hòa đặc hiệu độc tố của *Clostridium tetani*.

Nhận dạng

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván trung hòa đặc hiệu ngoại độc tố của *Clostridium tetani*, làm cho độc tố này trở nên không độc, vô hại đối với động vật cảm thụ.

Các thử nghiệm kiểm định

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván phải đáp ứng các thử nghiệm kiểm định ghi trong chuyên luận "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người" và các yêu cầu sau đây:

Công hiệu

Công hiệu của huyết thanh kháng độc tố uốn ván được thể hiện bằng số đơn vị quốc tế trong 1 ml (IU/ml).

Tiêu chuẩn: Không nhỏ hơn 1000 IU/ml đối với loại dùng để phòng bệnh; không nhỏ hơn 3000 IU/ml đối với loại dùng để điều trị.

Số IU/ml huyết thanh kháng độc tố uốn ván được xác định bằng phương pháp trung hòa trên chuột nhắt (Phụ lục 15.16).

Bảo quản

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván cần được bảo quản trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không để đóng băng.

Nhãn, hộp

Các thông tin ghi trên nhãn được tuân thủ theo quy định chung, được ghi trong chuyên luận chung "Huyết thanh miễn dịch dùng cho người".

INTERFERON ALPHA 2***Interferon alfa 2*****Định nghĩa**

Interferon alpha 2 là sinh phẩm ở dạng nước hoặc đông khô có chứa interferon alpha-2 người, tái tổ hợp.

Interferon alpha 2 dạng nước là dung dịch trong suốt, không màu.

Interferon alpha 2 đông khô có dạng khối xốp, trắng mịn, dễ hòa tan trong nước thành dung dịch trong suốt.

Interferon alpha 2 được dùng để kháng virus, ức chế tăng sinh tế bào ung thư và có chức năng điều hòa miễn dịch.

Sản xuất

Interferon alpha 2 được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN: Gen mã hoá interferon alpha 2 được tách từ tế bào lympho của người và đưa vào vector biểu hiện; Sau đó vector này được đưa vào vi khuẩn. Vi khuẩn này được nuôi cấy trong môi trường đặc biệt để thu sinh khối và sau đó dùng kỹ thuật sinh hoá tách chiết và tinh sạch interferon alpha 2. Sản phẩm được đóng ống hoặc đông khô với hàm lượng interferon alpha 2 khác nhau tùy theo mục đích sử dụng.

Nhận dạng

Interferon alpha 2 được nhận dạng thông qua sự giảm hoạt tính kháng virus của nó trên tế bào nhiễm sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2.

Vật liệu:

Interferon alpha 2 thử nghiệm.

Kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2.

Tế bào MDBK (Madin-Darby Bovin Kidney - Tế bào thận bò).

Virus gây nhiễm VSV (Vesicular Stomatitis Virus - Virus gây viêm vòm họng) đã chuẩn độ.

Môi trường MEM (Minimum Essential Medium) có chứa huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovin Serum, FBS).

Dung dịch Trypsin 0,25 %.

Phiên nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

Phương pháp tiến hành**Ngày thứ 1:**

Pha kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2 với môi trường MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 200 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng 200 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha 2 ghi trên nhãn).

Trung hòa: Trộn đều 1 ml interferon alpha 2 đã pha loãng ở trên với 1 ml kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2. Ủ ở 37 °C trong 60 min.

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng.

Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã pha loãng ở trên vào giếng thứ nhất của phiên (A1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (A12), loại bỏ 100 µl ở giếng A12.

Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2 vào hàng giếng thứ hai của phiên (B1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (B12), loại bỏ 100 µl ở giếng B12.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ 6×10^5 đến 8×10^5 tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng tế bào chứng, tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiến.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2 % FBS để có chứa 100 đến 200 CCID₅₀/ml.

Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV này vào tất cả các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiến và để ủ ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 3:

Kiểm tra sự hủy hoại của tế bào nhiễm virus dưới kính hiển vi ở các giếng nhỏ dung dịch interferon alpha 2 sau trung hòa, tỷ lệ hủy hoại tế bào phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50 µl *dung dịch tím tinh thể (TT)* vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiến bằng nước. Để phiến khô ở nhiệt độ phòng.

Nhỏ 50 µl 2-methoxyethanol vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiến trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

Tiêu chuẩn đánh giá: So sánh độ hấp thụ giữa các giếng tương ứng của 2 loại dung dịch thử nghiệm trước và sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2: Độ hấp thụ của các giếng sau trung hòa phải nhỏ hơn.

Hiệu giá

Hiệu giá interferon alpha 2 được xác định bằng chuẩn độ hoạt tính kháng virus của mẫu thử nghiệm trên tế bào MDBK.

Hiệu giá của Interferon alpha 2 thử nghiệm được tính theo mẫu chuẩn quốc tế interferon alpha 2 tái tổ hợp.

Vật liệu

Interferon alpha 2 chuẩn quốc tế

Interferon alpha 2 thử nghiệm

Tế bào MDBK.

Virus gây nhiễm VSV đã chuẩn độ.

Môi trường MEM có chứa huyết thanh bào thai bê.

Phiến nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

Phương pháp tiến hành

Ngày thứ 1:

Pha loãng mẫu chuẩn quốc tế với MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 100 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng

100 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha 2 ghi trên nhãn).

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng.

Nhỏ 100 µl dung dịch đã pha loãng của mẫu chuẩn quốc tế (MCQT) và mẫu thử nghiệm vào mỗi giếng trong cột thứ nhất của phiến. Đối với MCQT nhỏ 2 giếng (B1, C1) và mẫu thử nghiệm nhỏ 5 giếng (D1, E1, F1, G1, H1).

Pha loãng bậc 2 liên tiếp cho đến cột thứ 12 thì loại bỏ 100 µl.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ $(6-8) \times 10^5$ tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiến và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng chứng "tế bào" (giếng A1 đến A6), tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiến.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2% FBS để có chứa 100 đến 200 CCID₅₀/ml.

Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV vào tất cả các giếng trừ giếng chứng "tế bào".

Phủ giấy dán, đậy nắp phiến và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 3:

Kiểm tra sự hủy hoại của virus đối với tế bào dưới kính hiển vi, ở các giếng chứng "virus" (giếng A7 đến A12) tỷ lệ hủy hoại phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50 μ l *dung dịch tím tinh thể (TT)* vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiên bằng *nước*. Để phiên khô ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 50 μ l *2-methoxyethanol* vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiên trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

Tính kết quả:

- Tính độ hấp thụ 50 % theo công thức:

$$A_{50} = (A_c + A_v)/2$$

trong đó:

A_c là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng "tế bào";

A_v là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng "virus".

- Xác định hiệu quả bảo vệ 50 % tế bào của interferon alpha 2 mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn quốc tế theo công thức:

$$N = n + (A_n - A_{50})/(A_n - A_{n+1})$$

trong đó:

N là số thứ tự của giếng có độ bảo vệ tế bào 50 %;

n là số thứ tự của giếng có độ hấp thụ >50 %;

A_n là độ hấp thụ của giếng thứ "n";

A_{n+1} là độ hấp thụ của giếng thứ "n+1".

- Tính hiệu giá theo công thức:

$$\text{Hiệu giá (\%)} = 100 \times 2^{(N_{tn} - N_s)}$$

trong đó:

N_{tn} là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha 2 thử nghiệm bảo vệ được 50 % tế bào;

N_s là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha 2 chuẩn quốc tế bảo vệ được 50 % tế bào.

Tiêu chuẩn đánh giá

Mẫu interferon alpha 2 thử nghiệm chỉ đạt yêu cầu khi hiệu giá tính được phải đạt từ 70 % đến 150 % hàm lượng ghi trên nhãn.

An toàn chung

Với liều tiêm là 15 triệu IU/5 ml đối với 1 chuột lang và 1 triệu IU/0,5 ml đối với 1 chuột nhắt (Phụ lục 15.11).

Chất gây sốt

Mẫu interferon alpha 2 thử nghiệm được pha loãng với nước muối hồi chính, để có nồng độ 600 000 IU/ml (Phụ lục 15.12).

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Độ ẩm tồn dư (đối với dạng đông khô)

Không lớn hơn 3 % (Phụ lục 15.35).

pH

$7,0 \pm 0,5$ (Phụ lục 15.33).

Đóng gói, bảo quản

Đóng gói: Hàm lượng interferon alpha 2 được đóng gói tùy theo nhà sản xuất: 3 triệu IU/lọ, 4,5 triệu IU/lọ,

6 triệu IU/lọ; 90 µg/lọ, 180 µg /lọ, kèm theo nước hồi chính.

Interferon alpha 2 đóng khô phải bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

Nhãn, hộp

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

TUBERCULIN PPD

Tuberculin derivatum proteinosum purificatum

Định nghĩa

Tuberculin PPD là sinh phẩm chứa chất có hoạt tính gây phản ứng da đặc hiệu đối với bệnh lao, được điều chế từ canh thang nuôi cấy và ly giải của một hay nhiều chủng *Mycobacterium tuberculosis*.

Tuberculin PPD đông khô có dạng khối xốp, mịn, không teo, màu trắng ngà, không mùi, tan nhanh trong nước hồi chính tạo thành dung dịch trong suốt, không màu.

Dùng tuberculin PPD đông khô là một trong những phương pháp phát hiện các trường hợp bị nhiễm lao hoặc dùng để đánh giá phản ứng quá mẫn muộn đối với lao sau khi tiêm vắc xin BCG.

Sản xuất

Chủng sản xuất được nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Sau 6 tuần, chủng đã phát triển, được thu hoạch và giết chết bằng hơi nóng ở nhiệt độ 100 °C trong 60 min. Hỗn dịch chủng đó được lọc qua màng lọc để loại xác vi khuẩn. Phân đoạn có hoạt tính có trong dung dịch lọc (chủ yếu là protein) được tách chiết bằng kết tủa với amoni sulfate, được rửa và tái hòa tan trong dung dịch đệm phù hợp. Phenol được sử dụng như là chất bảo quản. Sản phẩm được đóng ống vô khuẩn và được đông khô.

Nhận dạng

Thử nghiệm nhận dạng được tiến hành bằng cách tiêm tuberculin thử nghiệm trong da chuột lang đã được gây mẫn cảm trước đó với vắc xin BCG.

Phương pháp tiến hành

Vật liệu

Vắc xin BCG đông khô 1 mg/ml.

Chuột lang 4 con, khỏe mạnh, âm tính với tuberculin, trọng lượng từ 350 g/con đến 400 g/con. Chia chuột ra làm 2 nhóm: Nhóm thử nghiệm được tiêm mẫn cảm với vắc xin BCG đông khô và nhóm chứng không tiêm.

Gây mẫn cảm

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần.

Tiêm tuberculin

Hoàn nguyên mẫu thử nghiệm để có dung dịch chứa 50 IU/ml. Tiêm trong da 0,1 ml (tương đương 5 IU) cho cả 2 nhóm chuột.

Đọc kết quả

Sau khi tiêm tuberculin 24 h, đo đường kính phản ứng tại các vị trí tiêm.

Phản ứng được coi là dương tính nếu đường kính vết tổn thương da lớn hơn hoặc bằng 6 mm.

Tiêu chuẩn đánh giá

Tất cả chuột lang đã được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng dương tính với tuberculin thử nghiệm.

Tất cả chuột lang không được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng âm tính với tuberculin thử nghiệm.

Hiệu giá

Hiệu giá của tuberculin PPD được xác định bằng cách so sánh phản ứng quá mẫn muộn trong da chuột lang đã gây mẫn cảm với vắc xin BCG sau khi tiêm các độ pha khác nhau của mẫu thử với mẫu chuẩn quốc tế.

Phương pháp tiến hành

Vật liệu

Tuberculin thử nghiệm.

Tuberculin chuẩn quốc tế.

Chuột lang: 6 con, cùng giới, trọng lượng 350 g/con đến 400 g/con.

Gây mẫn cảm chuột lang

Chuẩn bị 6 chuột lang có lông sáng màu, cùng giới, khỏe mạnh, có trọng lượng từ 350 g/con đến 400 g/con.

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/một vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần để xác định hiệu giá.

Xác định hiệu giá

Tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm được pha loãng với dung dịch đệm PBS ở 3 đến 4 độ pha khác nhau sao cho đường kính phản ứng da sau khi tiêm cho chuột lang đã gây mẫn cảm với liều cao nhất không lớn hơn 25 mm và với liều thấp nhất không nhỏ hơn 6 mm. Tiêm trong da 0,1 ml mỗi độ pha của tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm ở hai bên sườn chuột lang, mỗi bên 3 điểm. Vị trí nơi tiêm được lựa chọn theo phương pháp hình vuông Latin.

Sau khi tiêm 24 h, đo đường kính của phản ứng da tại các vị trí tiêm. Phản ứng được coi là dương tính nếu tại nơi tiêm tuberculin có nốt sần đỏ với đường kính lớn hơn hoặc bằng 6 mm. Phản ứng được coi là âm tính nếu tại nơi tiêm tuberculin có nốt sần đỏ với đường kính nhỏ hơn 6 mm. Hiệu giá của tuberculin thử nghiệm được tính theo chương trình Parallel line của WHO.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Hiệu giá của mẫu thử nghiệm phải nằm trong khoảng 80 % đến 125 % giá trị hiệu giá ghi trên nhãn sản phẩm.

An toàn chung

Đạt yêu cầu về an toàn chung (Phụ lục 15.11).

Vô khuẩn

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

Hàm lượng Phenol

Không lớn hơn 5,5 g/l (Phụ lục 15.28).

pH

6,5 đến 7,5 (Phụ lục 15.33).

Cách dùng, liều lượng

Tiêm trong da, liều 5 IU/0,1ml.

Đóng gói, bảo quản

Tùy theo nhà sản xuất, thường có ba dạng:

Một ống chứa 15 IU, tương đương 3 liều;

Một ống chứa 50 IU, tương đương 10 liều;

Một ống chứa 100 IU, tương đương 20 liều.

Tuberculin được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

Nhãn, hộp

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

(CÁC) VẮC XIN DÙNG CHO NGƯỜI***Vaccina ad usum humanum*****Giới thiệu**

Vắc xin dùng cho người là những chế phẩm chứa các kháng nguyên có khả năng tạo miễn dịch chủ động và đặc hiệu để phòng bệnh do vi sinh vật gây nên. Vắc xin được sản xuất từ vi khuẩn, *Rickettsia* hoặc virus. Vắc xin dùng cho người có thể là (1) vi sinh vật đã được bất hoạt nhưng vẫn giữ được tính sinh miễn dịch; hoặc (2) vi sinh vật sống không độc; hoặc (3) các thành phần kháng nguyên của vi sinh vật.

Sản xuất

Các phương pháp sản xuất từng loại vắc xin sẽ được mô tả ở phần tiếp theo dưới đây hoặc trong các chuyên luận riêng. Các phương pháp này cần bảo đảm cho vắc xin có đủ tính kháng nguyên cũng như tính vô hại và không bị tạp nhiễm.

Trong quá trình sản xuất có thể dùng thêm chất phụ thích hợp nhưng không được cho thêm penicilin ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình sản xuất.

Có thể tăng khả năng sinh miễn dịch của một số loại vắc xin bằng cách cho thêm chất phụ thích hợp ghi trong các chuyên luận riêng.

Có thể dùng chất bảo quản thích hợp theo quy định cho một số vắc xin bất hoạt.

Vắc xin thành phẩm được phân bổ vào các ống (hoặc lọ) và gắn kín để tránh nhiễm khuẩn. Một số vắc xin thành phẩm được sản xuất dưới dạng đông khô. Chỉ hoàn nguyên vắc xin đông khô ngay trước khi sử dụng.

Vắc xin vi khuẩn

Vắc xin vi khuẩn được sản xuất từ các chủng vi khuẩn thích hợp, nuôi cấy trên môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp.

Vắc xin vi khuẩn bất hoạt có chứa vi khuẩn hoặc các thành phần kháng nguyên của vi khuẩn đã được bất hoạt nhưng vẫn giữ được khả năng sinh miễn dịch.

Vắc xin vi khuẩn sống được sản xuất từ chủng giảm độc nhưng vẫn có khả năng kích thích sinh miễn dịch đặc hiệu.

Nồng độ của vi khuẩn bất hoạt trong vắc xin được đo bằng đơn vị độ đục quốc tế hoặc đếm tế bào trực tiếp.

Đối với vắc xin vi khuẩn sống, có thể xác định số lượng đơn vị sống.

Giải độc tố vi khuẩn

Các giải độc tố vi khuẩn được chế tạo từ độc tố đã giải độc nhưng vẫn giữ được tính sinh miễn dịch và không còn khả năng hồi độc.

Ở đáy lọ giải độc tố tinh chế, sau khi hấp phụ, có một lớp cặn màu trắng hoặc vàng nhạt; khi lắc, cặn này sẽ phân bố đều trong lọ vắc xin.

Vắc xin virus

Vắc xin virus là huyền dịch virus thu được sau khi cấy trên động vật, trứng có phôi, hoặc tế bào nuôi thích hợp. Những vắc xin này có thể ở dạng lỏng hoặc đông khô.

Vắc xin virus thường được sản xuất từ chủng virus đặc hiệu giảm độc lực. Vắc xin virus có thể có màu nếu chứa chỉ thị pH như đỏ phenol.

Vắc xin virus bất hoạt thường được xử lý bằng phương pháp hóa học hoặc lý học.

Vắc xin phối hợp

Các vắc xin phối hợp là hỗn hợp của 2 hoặc nhiều loại vắc xin khác nhau.

Hàm lượng hoá chất có trong vắc xin

Phenol

Đối với các vắc xin có chứa phenol, cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.28. Nếu phenol đã được dùng trong quá trình sản xuất thì hàm lượng cuối cùng trong vắc xin thành phẩm không được quá 2,5 g/l, trừ trường hợp đặc biệt.

Formaldehyd

Đối với các vắc xin có chứa formaldehyd, cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.25. Nếu formaldehyd đã được dùng trong quá trình sản xuất thì hàm lượng cuối cùng trong vắc xin thành phẩm không được quá 0,2 g/l formaldehyd tự do, trừ trường hợp đặc biệt.

Nhôm

Đối với các vắc xin có chứa thành phần nhôm (Al^{+++}), cần xác định hàm lượng theo Phụ lục 15.27. Nếu nhôm được dùng để hấp phụ vắc xin thì hàm lượng cuối cùng không được quá 1,25 mg nhôm (Al^{+3}) cho mỗi liều đơn tiêm cho người, trừ trường hợp đặc biệt.

Bảo quản

Vắc xin phải được bảo quản tránh ánh sáng. Trừ khi có quy định riêng trong từng chuyên luận, các vắc xin phải bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C và các vắc xin lỏng không được đông băng.

Hạn dùng

Hạn dùng được tính từ khi bắt đầu thử nghiệm công hiệu hoặc hiệu giá trong những điều kiện bảo quản quy định đối với từng loại vắc xin.

Hạn dùng của vắc xin được quy định trong từng chuyên luận riêng.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN BẠCH HẦU HẤP PHỤ***Vaccinum Diphtheriae adsorbatum*****Định nghĩa**

Vắc xin bạch hầu hấp phụ được điều chế từ độc tố bạch hầu đã xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để mất tính độc mà vẫn còn tính sinh miễn dịch, chứa ít nhất 1500 Lf/ mg protein nitrogen và hấp phụ với một tá chất thích hợp như muối nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd trong dung dịch natri clorid 0,85 %. Có thể cho thêm chất bảo quản thích hợp.

Sản xuất

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* dùng cho sản xuất phải tuân thủ quy định về hệ thống chủng được nuôi cấy trong môi trường lỏng thích hợp. Ở cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những mẻ nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố (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.

Kiểm tra giải độc tố tinh chế về độc tính đặc hiệu, tính hồi độc, độ sạch kháng nguyên trước khi dùng điều chế vắc xin thành phẩm.

Giải độc tố tinh chế bán thành phẩm

Chủng sản xuất phải có độc tính cao, biết rõ về nguồn gốc và lịch sử chủng. Môi trường nuôi cấy chứa độc tố bạch hầu cần được tách xác tế bào vi khuẩn càng sớm càng tốt. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông để giám sát tính ổn định trong sản xuất. Giải độc tố bạch hầu được tinh chế để loại bỏ các thành phần có thể gây các phản ứng phụ cho người. Độc tố sau khi tinh chế sẽ được bất hoạt bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp sao cho không ảnh hưởng đến khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và không bị hồi độc. Tuy nhiên, có thể lựa chọn quy trình tinh chế sau khi giải độc.

Chỉ có những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Vô khuẩn

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).

Tính độc đặc hiệu và tính hồi độc của giải độc tố bạch hầu

Kiểm tra tính độc đặc hiệu: Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế có chứa 500 Lf/ml/con cho 5 chuột lang khỏe mạnh trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Theo dõi và kiểm tra trọng lượng chuột trong 6 tuần. Những chuột chết sẽ phải mổ kiểm tra các dấu hiệu nhiễm độc tố bạch hầu (tuyến thượng thận sưng đỏ). Giải độc tố tinh chế đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu khi không có chuột lang nào có dấu hiệu nhiễm độc tố bạch hầu trong 6 tuần theo dõi và có ít nhất 80 % chuột sống sót trong giai đoạn thử nghiệm.

Kiểm tra tính hồi độc của giải độc tố bạch hầu: Giải độc tố bạch hầu tinh chế phải được kiểm tra để đảm bảo không bị hồi độc. Sử dụng dung dịch đệm giống như dung dịch pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nhưng không có chất hấp phụ để pha mẫu giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm thành huyền dịch chứa 35 Lf/ml. Chia thành 2 mẫu thử, trong đó một mẫu ủ ở $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong 6 tuần và mẫu kia ủ ở 37°C trong 6 tuần. Tiêm dưới da 5 ml/con, mỗi mẫu tiêm cho 5 chuột lang khỏe mạnh trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi cả 2 nhóm chuột đều khỏe mạnh, không có chuột lang nào có dấu hiệu nhiễm 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 được kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bằng cách kiểm tra hàm lượng kháng nguyên bằng đơn vị Lf/mg nitrogen protein. Hàm lượng kháng nguyên được kiểm tra bằng cách so sánh với mẫu chuẩn đã được hiệu chuẩn bởi giải độc tố bạch hầu mẫu chuẩn quốc tế dành cho thử nghiệm lên bông hoặc mẫu chuẩn quốc gia tương đương.

Giải độc tố bạch hầu tinh chế đạt yêu cầu khi chứa không được ít hơn 1500 Lf/mg nitrogen protein.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được pha chế từ giải độc tố bạch hầu tinh chế, cho thêm nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd với hàm lượng thích hợp. Có thể cho thêm chất bảo quản. Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được phép tiếp tục sản xuất thành vắc xin thành phẩm.

Chất bảo quản

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin bán thành phẩm phải đạt ít nhất là 85 % và không được quá 115 % so với lượng dự kiến cho vào (Phụ lục 15.29).

Vô khuẩn

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của vắc xin bán thành phẩm cuối cùng với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Nhận dạng

Thực hiện ít nhất trên một lọ vắc xin đã được dán nhãn.

Nhận dạng giải độc tố bạch hầu bằng thử nghiệm lên bông như mô tả trong Phụ lục 15.19.

Vô khuẩn

Vắc xin không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

Công hiệu

Thực hiện theo Phụ lục 15.23.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Công hiệu của vắc xin bạch hầu dùng để tiêm trẻ em được coi là đạt yêu cầu khi không thấp hơn 30 IU đối với một liều đơn. Đối với các thử nghiệm sử dụng 3 độ pha loãng, giới hạn khoảng tin cậy 95 % của công hiệu phải nằm trong khoảng 50 % đến 200 % hoặc giới hạn dưới khoảng tin cậy 95 % của giá trị công hiệu phải lớn hơn 30 IU đối với một liều đơn cho người.

An toàn chung

Tiêm vắc xin bạch hầu với 1 liều tiêm cho người vào ổ bụng cho mỗi con trong số 5 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, trọng lượng 17 g/con đến 22 g/con và chưa sử dụng với bất cứ mục đích gì trước đó; tiêm ít nhất 1 liều tiêm cho người nhưng không nhiều hơn 1 ml vào ổ bụng cho mỗi trong số 2 chuột lang khỏe mạnh, trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con và chưa sử dụng với bất cứ mục đích gì trước đó.

Vắc xin đạt tính an toàn chung, không có độc tính bất thường nếu toàn bộ chuột thử nghiệm đều khỏe mạnh, lên cân và không có biểu hiện nhiễm độc trong 7 ngày theo dõi.

Chất bảo quản

Hàm lượng thimerosal không ít hơn 85 % hoặc không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

Nhôm

Không quá 1,25 mg nhôm trong một liều đơn vắc xin cho người (Phụ lục 15.27).

pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Cảm quan

Mỗi lọet vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

Bảo quản, hạn dùng

Khi bảo quản ở điều kiện quy định, vắc xin có thể giữ được công hiệu 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN BẠCH HẦU - UỐN VÁN - HO GÀ HẤP PHỤ (DTWP)***Vaccinum diphtheriae tetani et pertussis adsorbatum*****Định nghĩa**

Vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà là một hỗn hợp gồm các giải độc tố bạch hầu, uốn ván tinh chế hấp phụ và vắc xin ho gà toàn tế bào hấp phụ (DTWP).

Sản xuất giải độc tố bạch hầu

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 lỏng thích hợp. Cuối giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố bạch hầu (Lf/ml) bằng phản ứng lên bóng. 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 khuẩn, 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 khuẩn

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

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

Kiểm tra tính độc 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 khỏe mạnh, trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con chưa sử dụng vào bất cứ mục đích gì trước đó. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày sau tiêm, nếu thấy bất kỳ triệu chứng nào 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 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 cũng không đạt về tính an toàn đặc hiệu.

Kiểm tra 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 ± 3) °C và 37 °C trong 6 tuần. Mỗi 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, trọng lượng 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 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.

Kiểm tra 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 *Clotridium 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 loại nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố uốn ván (Lf/ml) bằng phản ứng lên bóng. 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 khuẩn, 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 khuẩn

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

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

Kiểm tra tính độc 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, trọng 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 bất kỳ triệu chứng nào 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 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.

Kiểm tra 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 (12,5 Lf/ml); chia thành 2 phần tương đương nhau và ủ mỗi phần của dung dịch này ở nhiệt độ khác nhau (5 ± 3) °C và 37 °C trong 6 tuần. Mỗi 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, trọng lượng 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 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.

Kiểm tra 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 vắc xin ho gà 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 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.

Kiểm tra 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 nhiễm bất kỳ một loại gì khác vào sản phẩm.

Kiểm tra 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 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* 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.

Kiểm tra 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 $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ trong một khoảng thời gian cần thiết để giảm bớt tính độc.

Mỗi loại 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 khuẩn, khả năng bất hoạt hoàn toàn (kiểm tra độ sống sót), nhận dạng, khả năng phát triển, ngưng kết như chủng gốc *B. pertussis*.

Phương pháp sản xuất 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 và giải độc tố uốn ván đã được hấp phụ bởi nhôm phosphat hydrat hoặc nhôm hydroxyd và hỗn hợp thêm một lượng thích hợp của huyền dịch *B. pertussis* đã được bất hoạt; kết quả của sự hỗn hợp này khi tiêm vào cơ thể phải phù hợp về mặt sinh lý với máu. Hàm lượng *B. pertussis* của vắc xin bán thành phẩm phải không được vượt quá 20 IOU cho một liều đơn cho người. Nếu sử dụng 2 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 20 IOU cho một liều đơn cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong vắc xin DTP hấp phụ phải không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của giải độc tố uốn ván, bạch hầu, vắc xin ho gà 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 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. Hàm lượng chất bảo quản không được ít hơn 85 % và không được nhiều hơn 115 % của lượng chất bảo quản tiêu chuẩn cho vào vắc xin (Phụ lục 15.29).

Vô khuẩn

Tiến hành thử nghiệm vô khuẩn 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 và Phụ lục 15.24.

Tính độc đặc hiệu

Tính độc đặc hiệu của vắc xin bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào 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 trọng lượng 250 g đến 350 g, 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 phủ 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 nước muối sinh lý (tốt nhất chứa cùng hàm lượng chất bảo quản như có trong dung dịch tiêm cho nhóm thí nghiệm). Tổng trọng 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 trọng lượng chuột không ít hơn trước tiêm.

Sau 7 ngày trọng 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 toàn tế bào trong vắc xin DTWP hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm natri citrat ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 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).

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

An toàn chung

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng và chuột lang khoẻ mạnh. Tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng có trọng lượng 17 g/con đến 22 g/con, mỗi con một nửa liều tiêm cho người; tiêm vào ổ bụng 2 chuột lang có trọng lượng 250 g đến 350 g; 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 khoẻ mạnh và lên cân trong thời gian ít nhất 7 ngày thử nghiệm và không có dấu hiệu nhiễm độc.

Công hiệu

Tiến hành kiểm tra ở mẫu vắc xin DTP 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; 15.23; 15.24).

Tính chất vật lý, hoá học

Cảm quan

Kiểm tra hình dạng bên ngoài của vắc xin 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: Thể tích ghi trên nhãn +10 %.

Tỷ lệ loại bỏ:

Đối với vắc xin đa liều: Không quá 3 %.

Đối với vắc xin liều đơn: Không quá 5 %.

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 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^{+++} trong vắc xin DTP hấp phụ không được quá 1,25 mg Al^{+++} /1 liều tiêm cho người (Phụ lục 15.27).

pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Formaldehyd tồn dư

Không quá 0,02 % (Phụ lục 15.25).

Bảo quản và hạn dùng

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 DTP 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 DTP 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 và có định, 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).

Nhãn

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

VẮC XIN BẠCH HẦU, UỐN VÁN HẤP PHỤ DÙNG CHO NGƯỜI LỚN VÀ VỊ THÀNH NIÊN***Vaccinum diphtheriae et tetani ad usum adulti et adolescentis adsorbatum*****Định nghĩa**

Vắc xin bạch hầu, uốn ván hấp phụ là vắc xin phối hợp, được điều chế từ độc tố bạch hầu và độc tố uốn ván. Các độc tố này được sinh ra trong quá trình nuôi cấy *Corynebacterium diphtheriae* hoặc *Clostridium tetani*, sau đó xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để làm mất tính độc, trở thành giải độc tố mà vẫn còn khả năng sinh miễn dịch. Các giải độc tố được hấp phụ với tá chất thích hợp như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd.

Sản xuất***Giải độc tố bạch hầu tinh chế bán thành phẩm***

Chúng dùng sản xuất ra độc tố bạch hầu cần phải tuân thủ quy định về hệ thống giống chủng. Chủng *Corynebacterium diphtheriae* có tính độc cao đã biết rõ nguồn gốc và lịch sử, được nuôi cấy trong môi trường lỏng phù hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, từng mẻ nuôi cấy được kiểm tra độ sạch để loại bỏ những mẻ bị nhiễm tạp. Độc tố được chiết tách vô khuẩn để loại bỏ xác vi khuẩn. Thông qua việc xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) có thể giám sát được tính ổn định trong sản xuất.

Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại rồi giải độc và tinh chế. Quá trình tinh chế có thể thực hiện trước hoặc sau quá trình giải độc. Việc tinh chế độc tố nhằm loại bỏ các thành phần gây ra những phản ứng phụ ở người. Độc tố tinh chế được giải độc bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp (thông thường bằng nhiệt) nhằm tránh sự phá hủy khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và tránh hồi độc.

Chỉ những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Kiểm tra vô khuẩn

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với ít nhất một lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường.

Kiểm tra an toàn đặc hiệu (xác định sự không có mặt của độc tố):

Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế chứa ít nhất 500 Lf (mỗi chuột) cho 5 chuột lang khỏe mạnh có trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con, chưa dùng cho thử nghiệm nào trước đó. Theo dõi chuột trong 42 ngày, thử nghiệm đạt yêu cầu nếu như không có chuột nào chỉ ra dấu hiệu hoặc bị chết do nhiễm độc tố bạch hầu. Nếu nhiều hơn 1 con chuột lang chết không rõ nguyên nhân, thử nghiệm cần nhắc lại. Nếu trong lần thử thứ hai có nhiều hơn 1 chuột chết, giải độc tố đó không đạt yêu cầu về an toàn.

Kiểm tra tính hồi độc của độc tố bạch hầu

Pha loãng giải độc tố tinh chế trong dung dịch đệm để có hàm lượng tương đương với hàm lượng giải độc tố bạch hầu trong vắc xin thành phẩm. Chia mẫu thử thành 2 phần tương đương nhau rồi giữ ở 2 nhiệt độ (5 ± 3) °C và 37 °C trong 6 tuần.

Cả 2 mẫu thử được kiểm tra bằng cách tiêm dưới da 5 ml (mỗi chuột) cho 5 chuột lang có trọng lượng 250 g đến 350 g. Theo dõi chuột trong 6 tuần. Giải độc tố bạch hầu đạt yêu cầu, nếu kết quả kiểm tra của các mẫu thử không chỉ ra sự có mặt của độc tố bạch hầu.

Độ sạch kháng nguyên: Không ít hơn 1 500 Lf/mg nitơ protein

Giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm

Chúng dùng sản xuất ra độc tố uốn ván cần phải tuân thủ quy định về hệ thống giống chủng. Chủng *Clostridium tetani* có tính độc cao đã biết rõ về nguồn gốc và lịch sử, được nuôi cấy trong môi trường lỏng phù hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, mỗi mẻ nuôi cấy được kiểm tra độ thuần khiết để loại bỏ những mẻ bị tạp nhiễm. Môi trường có độc tố được chiết tách vô khuẩn để loại bỏ xác vi khuẩn. Thông qua việc xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) có thể giám sát được tính ổn định trong sản xuất.

Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc và tinh chế. Quá trình tinh chế có thể thực hiện trước hoặc sau quá trình giải độc. Tinh chế độc tố nhằm loại bỏ các thành phần gây ra những phản ứng phụ

ở người. Độc tố tinh chế được giải độc bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp, nhằm tránh sự phá hủy khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và tránh việc hồi phục độc lực, thông thường dùng phương pháp nhiệt.

Chỉ những giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Kiểm tra vô khuẩn

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với ít nhất một lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường (Phụ lục 15.7).

Kiểm tra an toàn đặc hiệu (xác định sự không có mặt của độc tố)

Tiêm dưới da giải độc tố tinh chế chứa ít nhất 500 Lf cho mỗi chuột trong 5 chuột lang khỏe mạnh có trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con mà chưa dùng cho thử nghiệm nào trước đó. Theo dõi chuột trong 21 ngày, thử nghiệm đạt yêu cầu nếu như không có chuột nào chỉ ra dấu hiệu liệt hoặc bị chết bởi độc tố uốn ván. Nếu nhiều hơn 1 con chuột chết không rõ nguyên nhân, thử nghiệm cần nhắc lại. Nếu trong lần thử thứ 2 có nhiều hơn 1 chuột chết hoặc liệt, giải độc tố uốn ván đó không đạt yêu cầu về an toàn.

Kiểm tra tính hồi độc của độc tố uốn ván

Pha loãng giải độc tố uốn ván tinh chế trong dung dịch đệm để có hàm lượng tương đương với hàm lượng có trong vắc xin thành phẩm. Chia thể tích mẫu thành 2 phần tương đương nhau và giữ ở 2 nhiệt độ (5 ± 3) °C và 37 °C trong 6 tuần.

Cả 2 mẫu thử được kiểm tra bằng việc tiêm dưới da cho 5 chuột lang, mỗi con có trọng lượng 250 g đến 350 g, liều tiêm 5 ml/con. Theo dõi trong 21 ngày. Giải độc tố đạt yêu cầu nếu kết quả kiểm tra của các mẫu thử không chỉ ra sự có mặt của độc tố uốn ván.

Độ sạch kháng nguyên: Không ít hơn 1000 Lf/mg nitơ protein.

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được điều chế bằng cách cho giải độc tố tinh chế bạch hầu và giải độc tố tinh chế uốn ván hấp phụ với nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd. Cho thêm chất bảo quản, thông thường dùng thimerosal. Không sử dụng phenol là loại gây ảnh hưởng có hại cho hoạt tính kháng nguyên.

Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt những tiêu chuẩn quy định mới được dùng để pha chế thành vắc xin thành phẩm.

Chất bảo quản

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất bảo quản không ít hơn 85 % và không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

Vô khuẩn

Cần tiến hành thử nghiệm vô khuẩn với lượng mẫu thử 10 ml trên mỗi loại môi trường (Phụ lục 15.7).

Công hiệu:

Thử nghiệm công hiệu được thực hiện giai đoạn bán thành phẩm cuối cùng hoặc thành phẩm (Phụ lục 15.22 và Phụ lục 15.23).

An toàn đặc hiệu

Mỗi bán thành phẩm cuối cùng được kiểm tra an toàn đặc hiệu trong ít nhất 5 chuột lang chưa dùng thí nghiệm nào trước đó có trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con bằng cách tiêm dưới da một lượng tương đương với ít nhất 5 liều đơn tiêm cho người. Theo dõi chuột trong vòng 42 ngày. Chuột chết được mổ và kiểm tra các phủ tạng. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu không có chuột lang nào chỉ ra dấu hiệu của tính độc đặc hiệu của độc tố uốn ván (biểu hiện liệt hoặc dấu hiệu khác của độc tố uốn ván) và ít nhất có 80 % động vật sống sót trong thời gian theo dõi.

Vắc xin thành phẩm

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được đóng vô khuẩn vào các lọ nhỏ. Các lọ vắc xin phải được đóng kín để phòng ngừa nhiễm khuẩn.

Chỉ những loạt thành phẩm thỏa mãn các yêu cầu về các thử nghiệm như Tổ chức Y tế Thế giới và Tiêu chuẩn Việt Nam khuyến cáo mới được phép xuất xưởng để sử dụng.

Cảm quan

Mẫu kiểm định của mỗi loạt thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Nếu kết quả kiểm tra cho thấy có sự bất thường, không theo đúng yêu cầu cần phải hủy bỏ.

Nhận dạng

Nhận dạng giải độc tố bạch hầu và uốn ván bằng thử nghiệm lên bông hoặc khuếch tán miễn dịch.

Công hiệu

Thành phần bạch hầu: Phương pháp tiến hành như đã mô tả trong phụ lục xác định công hiệu vắc xin bạch hầu hấp phụ. Giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được đánh giá là không ít hơn 2 IU/liều đơn cho người (Phụ lục 15.23).

Thành phần uốn ván: Phương pháp tiến hành như đã mô tả trong phụ lục xác định công hiệu vắc xin uốn ván hấp phụ. Giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được đánh giá là không ít hơn 20 IU/liều đơn cho người (Phụ lục 15.22).

Vô khuẩn

Đạt yêu cầu về tính vô khuẩn, không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

An toàn chung: Theo Phụ lục 15.11.

pH: 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Thimerosal

Hàm lượng chất bảo quản thimerosal không ít hơn 85% và không nhiều hơn 115 % so với lượng ghi trên nhãn sinh phẩm (Phụ lục 15.29).

Nhôm:

Không quá 1,25 mg nhôm trong liều đơn vắc xin tiêm cho người (Phụ lục 15.27).

Hàm lượng muối natri clorid

Phụ lục 15.26.

Hàm lượng formaldehyd tồn dư

Phụ lục 15.25.

Bảo quản, hạn dùng

Hạn dùng của vắc xin phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận và cố định, dựa vào các số liệu nghiên cứu tính ổn định của vắc xin trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ các bán thành phẩm riêng biệt).

Khi bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, vắc xin có hạn dùng là 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu cuối cùng. Không được để vắc xin bị đông băng.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN BẠI LIỆT BẤT HOẠT (IPV)***Vaccinum Poliomyelitis inactivatum*****Định nghĩa**

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 được cấy truyền không quá 2 lần bằng phương pháp đã được phê chuẩn của Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB). 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 khỉ 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.

Khí dùng cho sản xuất

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

Qui trình sản xuất và kiểm định sản xuất

Qui 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 khỉ 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 qui trình cô đặc và tinh khiết kháng nguyên; bước tiếp theo là qui 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.

Vô khuẩn: Vắc xin bại liệt bất hoạt phải vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

An toàn chung: Vắc xin bại liệt bất hoạt phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

Công hiệu

Xác định nồng độ kháng nguyên D của vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng hoang dại: 40 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 8 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3. Với vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng Sabin không có tá dược: 30 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 100 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 2; 100 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3. Với vắc xin bại liệt bất hoạt từ chủng Sabin có tá dược

hydroxyd nhôm: 3 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 1; 10 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 2; 10 đơn vị kháng nguyên D đối với týp 3.

Chấp nhận theo các đơn vị đăng ký của nhà sản xuất nếu chứng minh đảm bảo liều sử dụng có hiệu quả.

Protein toàn phần: dưới 50 µg protein trên 1 liều sử dụng (Phụ lục 15.34).

Nội độc tố: Không được quá 0,25 EU/ml.

Formaldehyd tồn dư: Không được quá 0,12 mg/ml (Phụ lục 15.25).

pH

6,8 – 8,5 (Phụ lục 15.33).

Bảo quản

Vắc xin bại liệt bất hoạt được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C, tránh ánh sáng và không được đông băng.

Nhãn, hộp

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

Hạn dùng

Trong điều kiện bảo quản như trên, vắc xin bại liệt bất hoạt có hạn dùng là 12 tháng kể từ ngày kiểm tra công hiệu lần cuối cùng.

Liều tiêm, đường tiêm

Tiêm dưới da, sử dụng 0,5 ml/liều.

VẮC XIN BẠI LIỆT UỐNG

Vaccinum Poliomyelitis perorale

Định nghĩa

Vắc xin bại liệt uống là vắc xin được sản xuất từ các chủng virus bại liệt sống, giảm độc lực (Chủng Sabin) týp 1, týp 2 và týp 3 phát triển trên tế bào nuôi thích hợp và dùng để gây miễn dịch chủ động, đặc hiệu cho người, phòng bệnh bại liệt do virus Polio gây nên. Vắc xin có thể chứa 1, hoặc 2, hoặc 3 týp virus. Vắc xin bại liệt uống là một dịch lỏng trong, màu hồng.

Sản xuất

Chủng sản xuất

Sản xuất phải dựa trên hệ thống chủng giống. Chủng sản xuất không được cấy truyền quá 1 lần từ chủng gốc (master seed) nếu không có qui định khác và phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng phải được bảo quản ở nhiệt độ dưới -60 °C.

Khí và tế bào sản xuất

Khí và tế bào dùng để sản xuất vắc xin phải đạt các yêu cầu quy định của Tổ chức Y tế Thế giới. Có thể sử dụng huyết thanh động vật trong môi trường nuôi cấy tế bào, nhưng trong môi trường để duy trì tế bào khi nhân virus không được có protein. Có thể có đồ phenol và các kháng sinh phù hợp ở nồng độ cho phép trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất

Quy trình sản xuất phải đạt tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới. Phải thực hiện các thử nghiệm kiểm định trong quá trình sản xuất ở các công đoạn: Vật liệu nguồn (khí, tế bào, môi trường nuôi cấy...); mẻ gặt đơn, bán thành phẩm trước lọc, bán thành phẩm sau lọc, vắc xin thành phẩm. Chế phẩm phải đạt những yêu cầu đã ghi trong chuyên luận vắc xin dùng cho người và chỉ được cho phép sử dụng sau khi đạt được các yêu cầu sản xuất và kiểm định trong quá trình sản xuất, đồng thời đạt các tiêu chuẩn kiểm định ở mục dưới đây.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Cảm quan

Mỗi lọ vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

Nhận dạng

Khi được trung hòa với kháng huyết thanh bại liệt đặc hiệu, virus không có khả năng gây nhiễm tế bào cảm thụ.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn. Không nhiễm vi khuẩn, nấm (Phụ lục 15.7).

Công hiệu

Chuẩn độ hiệu giá bằng cách gây nhiễm virus trên tế bào cảm thụ.

Tiêu chuẩn đánh giá: Hiệu giá của vắc xin trong một liều uống (0,1 ml) phải đạt không ít hơn:

$10^{6.0}$ CCID₅₀ đối với týp 1.

$10^{5.0}$ CCID₅₀ đối với týp 2.

$10^{5.5}$ CCID₅₀ đối với týp 3.

Phương pháp tiến hành theo Phụ lục 15.21.

Tính bền vững nhiệt

Hiệu giá của vắc xin để ở 37 °C sau 48 h chỉ được phép giảm trong vòng 0,5 log₁₀ so với hiệu giá của vắc xin để ở nhiệt độ bảo quản.

Tính chất vật lý, hóa học

Phải đạt tiêu chuẩn quy định của Tổ chức Y tế Thế giới.

Bảo quản

Vắc xin bại liệt uống phải được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C. Sau khi tan băng 1 lần, có thể bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C và dùng trong vòng 6 tháng. Tránh ánh sáng và tránh bị đông tan nhiều lần.

Tính ổn định và hạn dùng

Hạn dùng không được quá 2 năm khi bảo quản liên tục ở -20 °C.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN BCG***Vaccinum BCG cryodessicatum*****Định nghĩa**

Vắc xin BCG đông khô là chế phẩm vi khuẩn "*Calmette*" và "*Guerin*" sống dùng để tiêm trong da phòng bệnh lao. Vắc xin được sản xuất ở dạng đông khô và hoàn nguyên ngay trước khi dùng với dung dịch hồi chỉnh thích hợp.

Sản xuất

Vắc xin BCG được sản xuất từ hệ thống chủng giống. Chủng được lựa chọn và bảo quản ổn định. Phương pháp sản xuất phải cho sản lượng vắc xin BCG ổn định và có khả năng gây miễn cảm đối với tuberculin cho người và bảo vệ được động vật thí nghiệm chống lại bệnh lao. Chủng sản xuất phải an toàn đối với người và động vật thí nghiệm. Vắc xin BCG được sản xuất tại Việt Nam từ chủng BCG 1173P2 - Pasteur Paris.

Chủng được nuôi trong môi trường Sauton - khoai tây, sau đó cấy chuyển sang môi trường Sauton lỏng. Sau khi gặt, vi khuẩn BCG được chế thành hỗn dịch vắc xin thuần nhất và đông khô.

Vắc xin được điều chế từ canh thang phải được tách biệt khỏi chủng gốc ban đầu bằng những lần cấy chuyển và không được cấy chuyển quá 8 lần.

Chủng sản xuất

Chủng gốc phải được thiết lập và duy trì để đảm bảo tính ổn định, có khả năng gây miễn cảm đối với tuberculin cho người và chuột lang, không gây bệnh cho người và động vật thí nghiệm.

Vắc xin BCG phải được bảo quản tránh ánh sáng mặt trời: Toàn bộ quy trình sản xuất phải được thiết kế sao cho từ nuôi cấy sản xuất vắc xin đến kiểm định, bảo quản đều không tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, tia cực tím.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Phát hiện *Mycobacteria* gây bệnh

Chỉ được dùng những mẫu vắc xin BCG bán thành phẩm cuối cùng cho thử nghiệm này khi bảo quản ở 4 °C không quá 72 h sau khi gặt.

Thử nghiệm này thường được tiến hành trên mẫu bán thành phẩm và mẫu vắc xin BCG thành phẩm nếu cần thiết (Phụ lục 15.9).

Đậm độ vi khuẩn BCG

Có thể đo trực tiếp đậm độ vi khuẩn BCG trong huyền dịch vắc xin BCG bán thành phẩm cuối cùng bằng cách cân trọng lượng khô hoặc gián tiếp bằng cách đo mật độ quang của huyền dịch vi khuẩn đã được hiệu chuẩn tương ứng với trọng lượng khô.

Độ sống: Phụ lục 15.1.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Hình dạng bên ngoài và tốc độ tạo huyền dịch: Bột trắng, khô, bong, không teo; nhanh chóng tạo thành huyền dịch đồng nhất sau không quá 1 min hoàn nguyên với nước muối sinh lý.

Mật độ quang

Không quá 0,5. Đo bằng quang phổ kế ở bước sóng 490 nm, lọc màu xanh lá cây (Phụ lục 4.1).

Độ phân tán

Phụ lục 15.3.

Độ chân không

Phụ lục 15.2.

Độ ẩm tồn dư

Không quá 3 % (Phụ lục 15.35).

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nhận dạng

Nhận dạng BCG qua kính hiển vi để khẳng định tính kháng acid của vi khuẩn và quan sát hình thái khuẩn lạc trên môi trường đặc.

An toàn chung

Thử nghiệm an toàn chung cho vắc xin BCG chỉ tiến hành trên chuột nhắt trắng: 5 chuột nhắt trắng trọng lượng 17 g/con đến 22 g/con. Tiêm dưới da 1 mg vắc xin BCG/1 ml/chuột. Theo dõi và cân trọng lượng từng chuột trong 7 ngày. Nếu trong thời gian 7 ngày theo dõi có bất kỳ chuột nào bị giảm cân hoặc chết phải nhắc lại thí nghiệm lần 2 với số lượng chuột và mẫu gấp đôi.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Sau 7 ngày theo dõi, cả 5 chuột phải đều khỏe mạnh, lên cân, không có biểu hiện bệnh lý.

An toàn đặc hiệu (Phát hiện *Mycobacteria* gây bệnh)

Thử nghiệm này thường được tiến hành trên mẫu bán thành phẩm và mẫu vắc xin BCG thành phẩm nếu cần thiết (Phụ lục 15.9).

Kiểm tra phản ứng da

Tiêm trong da cho ít nhất 4 chuột lang cùng giới (nếu là chuột cái thì không có thai), có phản ứng âm tính với tuberculin, trọng lượng 250 g/con đến 400 g/con. Tiêm cho mỗi chuột 0,1 ml vắc xin của từng đậm độ pha loãng 1/1; 1/10; 1/100 (của vắc xin thử và vắc xin mẫu chuẩn). Theo dõi thương tổn tại chỗ tiêm hàng tuần, trong 4 tuần. Sau 4 tuần, kiểm tra phản ứng tuberculin bằng cách tiêm trong da 5 TU/0,1 ml/chuột. Đọc kết quả phản ứng sau 24 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Phản ứng da đối với vắc xin thử và vắc xin mẫu chuẩn phải không có sự khác biệt đáng kể.

Kiểm tra độ sống

Xác định độ sống trong vắc xin đã hoàn nguyên bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường Lowenstein-Jensen. Số lượng đơn vị sống (đvs) phải nằm trong khoảng 1.10^6 đến 6.10^6 đvs/mg BCG (Phụ lục 15.1).

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 ủ ở 4 °C trong 28 ngày (Phụ lục 15.1).

Bảo quản, hạn dùng

Vắc xin BCG đông khô phải bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 2 °C đến 8 °C và tránh ánh sáng mặt trời, hạn dùng ít nhất 24 tháng. Sau khi hoàn nguyên vắc xin phải được bảo quản tránh ánh sáng mặt trời ở điều kiện nhiệt độ 2 °C đến 8 °C và chỉ được sử dụng trong khoảng thời gian tối đa là 4 h.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN ĐẠI TẾ BÀO DỪNG CHO NGƯỜI*Vaccinum Rabiei ex cellulis ad usum humanum***Định nghĩa**

Vắc xin đại tế bào dừng cho người là một chế phẩm đông khô hoặc dạng lỏng, được sản xuất từ chủng virus đại cố định phù hợp, phát triển trên nuôi cấy tế bào và được bất hoạt bằng phương pháp đã được thẩm định. Vắc xin được hồi chính ngay trước khi sử dụng như quy định ghi trên nhãn lọ để tạo ra một dung dịch trong suốt, có thể có màu sắc tùy theo chỉ thị pH có mặt trong vắc xin.

Vắc xin đại tế bào phải tuân thủ các yêu cầu chung của một vắc xin dừng cho người.

Sản xuất

Sản xuất vắc xin đại tế bào dựa trên hệ thống chủng virus giống và hệ thống ngân hàng tế bào được sử dụng để virus đại nhân lên. Quy trình sản xuất phải có được hiệu suất vắc xin ổn định, đạt các yêu cầu về tính sinh miễn dịch, tính an toàn và ổn định.

Hệ thống tế bào cho virus nhân lên

Virus đại có thể nhân lên trên tế bào lưỡng bội người, tế bào phôi gà, tế bào Vero hoặc tế bào trứng chuột đất vàng Trung Quốc (CHO - Chinese Hamster Ovary).

Chủng virus giống gốc

Chủng virus đại được sử dụng để sản xuất phải có hồ sơ chi tiết, trong đó ghi rõ nguồn gốc chủng và các đời cấy chuyển.

Chủng virus sản xuất được cấy chuyển không quá 5 lần từ chủng giống gốc và chỉ các loại chủng virus sản xuất đạt các yêu cầu sau đây mới tiếp tục được sử dụng để sản xuất vắc xin.

Nhận dạng

Mỗi loại chủng virus sản xuất phải được xác định là virus đại bằng kháng thể đặc hiệu với virus đại.

Hiệu giá virus

Nồng độ của mỗi loại chủng virus sản xuất được xác định bằng phương pháp tiêm truyền trên não chuột hoặc bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trên nuôi cấy tế bào để đảm bảo tính ổn định của quy trình sản xuất.

Vô trùng

Loại chủng virus sản xuất phải đạt được yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Nuôi cấy virus và thu hoạch

Toàn bộ quy trình lưu giữ ngân hàng tế bào và cấy chuyển tế bào đều phải được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn, không có mặt của các tế bào khác loại. Huyết thanh động vật (không được dùng huyết thanh người) được phép sử dụng trong môi trường nuôi cấy, nhưng trong môi trường cuối cùng để duy trì tế bào phát triển giúp virus nhân lên không được chứa huyết thanh động vật, môi trường này có thể chứa albumin huyết thanh người. Huyết thanh và trypsin dùng để tách tế bào và dùng trong môi trường nuôi cấy không được có mặt các tác nhân gây nhiễm ngoại lai. Môi trường nuôi cấy tế bào phải có chỉ thị pH như đỏ phenol và kháng sinh được phép sử dụng với nồng độ thấp nhất vẫn có được hiệu quả. Khoảng 10 % số lượng tế bào nuôi cấy dùng cho sản xuất được để lại không gây nhiễm, đây là các tế bào chứng. Hỗn dịch virus được thu hoạch một hoặc nhiều lần trong quá trình nuôi cấy. Nhiều lần thu hoạch từ cùng một loại nuôi cấy sản xuất có thể trộn lại với nhau và được xem như một mẻ gặt đơn. Một mẻ gặt đơn phải đạt các yêu cầu sau đây, mới được sử dụng để tiến hành bước bất hoạt virus.

Nhận dạng

Mẻ gặt đơn có chứa virus phải được xác định là virus đại bằng kháng thể đặc hiệu.

Hiệu giá virus

Hiệu giá virus được xác định bằng nhiều phương pháp: Tiêm truyền trên não chuột nhắt trắng, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trên nuôi cấy tế bào hoặc bằng kỹ thuật ELISA. Hiệu giá được sử dụng như một chỉ số theo dõi tính ổn định của quy trình sản xuất.

Tế bào chứng

Tế bào chứng của mỗi loạt nuôi cấy tế bào sản xuất phải đạt yêu cầu về thử nghiệm nhận dạng và không có mặt các tác nhân ngoại lai.

Tinh chế và bất hoạt

Mề gặt virus có thể được cô đặc và tinh chế bằng các phương pháp phù hợp; mỗi mề gặt virus được bất hoạt bằng phương pháp đã được thẩm định tại một giai đoạn ấn định của quy trình sản xuất. Phương pháp bất hoạt phải đảm bảo virus đại bị bất hoạt hoàn toàn mà không làm mất đi hoạt tính sinh miễn dịch của nó. Nếu sử dụng beta-propiolacton để bất hoạt, nồng độ không được vượt quá 1:3500.

Một hỗn dịch virus sau bất hoạt phải đạt được yêu cầu sau đây mới được sử dụng để sản xuất vắc xin bán thành phẩm:

An toàn đặc hiệu

Xác định sự có mặt của các virus đại còn khả năng gây nhiễm trong các mẫu sau khi bất hoạt bằng thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột nhắt trắng. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau thời gian theo dõi 14 ngày.

Phương pháp xác định an toàn đặc hiệu

Động vật thí nghiệm: Sử dụng ít nhất 10 chuột nhắt trắng 4 tuần tuổi có trọng lượng 11 g đến 13 g. Lựa chọn những chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh lý và tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly ít nhất là 5 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm.

Cách tiến hành: Mẫu thử nghiệm không pha loãng được tiêm vào não với liều 0,03 ml cho mỗi chuột.

Theo dõi và đọc kết quả: Toàn bộ chuột thử nghiệm phải được theo dõi và cân trọng lượng hàng ngày trước và sau khi tiêm. Thời gian theo dõi sau tiêm là 14 ngày. Trong suốt thời gian theo dõi, chuột phải khỏe mạnh, tăng trọng và không được có các triệu chứng bất thường.

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được sản xuất từ một hay nhiều hỗn dịch virus đại bất hoạt. Chất ổn định được phép sử dụng có thể được thêm vào để duy trì hoạt tính của sản phẩm trong và sau khi đông khô.

Một loạt vắc xin bán thành phẩm cuối cùng phải đạt được các yêu cầu sau đây, mới được sử dụng để sản xuất vắc xin thành phẩm:

Hàm lượng glycoprotein

Hàm lượng glycoprotein được xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp như thử nghiệm khuếch tán miễn dịch đơn, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA) hoặc thử nghiệm gắn kháng thể. Hàm lượng glycoprotein nằm trong giới hạn cho phép tùy thuộc vào từng nhà sản xuất.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Vắc xin thành phẩm

Vắc xin thành phẩm được đóng vào các lọ vô trùng và được đông khô để duy trì tính ổn định của vắc xin. Lọ vắc xin được đóng chặt để tránh nhiễm khuẩn và hơi ẩm.

Một loạt vắc xin thành phẩm phải đạt được các yêu cầu dưới đây, mới được xuất xưởng:

Nhận dạng

Trong vắc xin phải chứa kháng nguyên của virus đại và được xác định bằng phương pháp hóa miễn dịch phù hợp với kháng thể đặc hiệu, tốt nhất là kháng thể đơn dòng.

An toàn đặc hiệu

Xác định sự có mặt của các virus đại còn khả năng gây nhiễm trong các mẫu sau khi bất hoạt bằng thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột nhắt trắng. Trong trường hợp thử nghiệm an toàn đặc hiệu trên chuột đã được thực hiện với hỗn dịch virus bất hoạt đạt yêu cầu thì có thể không cần tiến hành lại thử nghiệm này đối với vắc xin thành phẩm.

Vô khuẩn

Vắc xin đại phải đạt được yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Chất gây sốt

Vắc xin phải đạt yêu cầu về chất gây sốt. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách tiêm cho mỗi thỏ 1 liều đơn vắc xin dùng cho người, và được pha loãng 10 lần về thể tích (Phụ lục 15.12).

An toàn chung

Vắc xin phải đạt yêu cầu về an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11)

Độ ẩm tồn dư

Phụ lục 15.35.

Công hiệu

Phải kiểm tra công hiệu đối với tất cả các lô vắc xin thành phẩm.

Thực hiện theo phương pháp N.I.H. (Phụ lục 15.31).

Thử nghiệm có giá trị khi:

ED₅₀ của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia 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 25 % đến 400 %.

Tiêu chuẩn: LD₅₀ của chủng thử thách (CVS - Challenge virus strain) phải nằm trong khoảng 10 - 100 LD₅₀/0,03 ml.

Công hiệu của vắc xin phải không nhỏ hơn 2,5 IU/liều tiêm cho người.

Chất hấp phụ

Nếu chất hấp phụ được thêm vào vắc xin thì hàm lượng chất hấp phụ được xác định bằng phương pháp đã được phê duyệt.

Tiêu chuẩn: Theo qui định hiện hành.

Chất bảo quản

Nếu chất bảo quản được thêm vào vắc xin thì hàm lượng chất bảo quản được xác định bằng phương pháp đã được phê duyệt.

Tiêu chuẩn: Theo qui định hiện hành.

Sản xuất chủng virus thử thách (CVS)**Sản xuất chủng**

Tiêm chủng CVS vào não chuột nhắt trắng, trọng lượng 11 g đến 13 g, khi chuột có biểu hiện của nhiễm virus đại, nhưng trước khi chúng bị chết, tiến hành giết chuột và gặt não. Não chuột được nghiền nát và pha trong dung dịch phù hợp để có nồng độ cuối là 20 %. Chia hỗn dịch này thành các phần nhỏ trong các lọ, đậy kín và bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C.

Chuẩn độ chủng

Làm tan bằng 1 lọ chủng thử thách, pha loãng chủng ở các độ pha phù hợp. Mỗi độ pha của chủng CVS được tiêm vào não cho 10 chuột với liều 0,03 ml/1 chuột. Theo dõi chuột trong vòng 14 ngày sau tiêm. Tính LD₅₀ của chủng CVS theo công thức Reed - Muench dựa vào số chuột liệt hoặc chết, chỉ những chuột liệt hoặc chết sau ngày thứ 5 mới được tính.

Đóng gói, bảo quản

Đóng gói: Bao gồm 1 lọ vắc xin đông khô và 1 lọ nước hồi chính.

Vắc xin đại tể bào được đóng dạng đông khô trong lọ thủy tinh trung tính.

Bảo quản: Vắc xin đại phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Nhãn, hộp

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

Chỉ định, liều dùng

Dùng bơm tiêm hút toàn bộ nước hồi chính cho vào lọ vắc xin đông khô, lắc thật kỹ cho đến khi tan hoàn toàn. Vắc xin phải được tiêm ngay sau khi đã hồi chính, bơm kim tiêm phải được hủy bỏ ngay sau khi tiêm vắc xin.

Tiêm bắp vùng cơ delta, đối với trẻ em nên tiêm bắp đùi tốt hơn. Không tiêm vào những vùng có nhiều tổ chức lỏng lẻo dưới da.

Lịch tiêm vắc xin đại phụ thuộc vào từng đối tượng khác nhau. Có 3 nhóm đối tượng chính:

Tiêm dự phòng các đối tượng có nguy cơ cao (tiếp xúc với virus đại)

Tiêm 3 mũi cơ bản vào các ngày: 0, 7, 28.

Mũi tăng cường: sau 1 năm.

Cứ sau 5 năm, nhắc lại 1 lần.

Lịch tiêm vào ngày 28 có thể thay thế bằng lịch tiêm vào ngày 21.

Tiêm điều trị các đối tượng nghi ngờ hoặc chắc chắn bị nhiễm virus đại (chó cắn)

Nếu đối tượng bị cắn chưa có miễn dịch với virus đại

Liều tiêm 0,5 ml, giống nhau giữa người lớn và trẻ em.

Tiêm 5 mũi: lịch tiêm vào các ngày 0, 3, 7, 14, 28.

Trong trường hợp có nhiều vết cắn hoặc cào xước, nhiều nước bọt... thì phải tiêm thêm globulin miễn dịch đại ngay vào ngày 0 với liều lượng:

Globulin miễn dịch đại người: 20 IU/ 1 kg cân nặng.

Globulin miễn dịch đại ngựa: 40 IU/ 1kg cân nặng.

Vắc xin nên tiêm vào các vị trí đối diện với vị trí tiêm globulin miễn dịch.

Trong các trường hợp nặng, ví dụ do vết cắn rộng hoặc vết cắn gần thần kinh trung ương, thì tùy từng trường hợp cụ thể có thể tiêm liền 2 mũi vắc xin trong cùng một ngày 0.

Nếu đối tượng bị cắn đã có miễn dịch với virus đại

Trường hợp đã tiêm vắc xin trong vòng 5 năm: tiêm tiếp 2 mũi vắc xin vào các ngày 0, 3.

Trường hợp đã tiêm vắc xin trên 5 năm hoặc tiêm nhưng không đầy đủ liệu trình: Nên áp dụng liệu trình tiêm giống như các đối tượng chưa có miễn dịch với virus đại.

VẮC XIN SỞI

Vaccinum morbillorum vivum

Định nghĩa

Vắc xin sởi là một chế phẩm virus sởi sống giảm độc lực, đông khô, được phát triển trên nuôi cấy tế bào thích hợp. Chế phẩm thỏa mãn tất cả các yêu cầu dưới đây.

Sản xuất

Chủng sản xuất: Sản xuất được dựa trên hệ thống chủng giống gốc (Master seed) virus giảm độc lực được phê chuẩn bởi Viện Kiểm định quốc gia, chủng được bảo quản ở nhiệt độ dưới âm 60 °C (-60 °C).

Tế bào sản xuất: Sử dụng ngân hàng tế bào sản xuất hoặc từ tế bào phôi gà có nguồn gốc từ trứng gà không có tác nhân gây bệnh (SPF). Tế bào dùng cho sản xuất vắc xin phải đạt các yêu cầu theo qui định của Tổ chức Y tế Thế giới.

Quy trình sản xuất và kiểm định sản xuất: Chủng virus sởi được phát triển trên tế bào phôi gà hoặc tế bào từ ngân hàng tế bào sử dụng môi trường phù hợp. Hỗn dịch virus được gặt, hỗn hợp, bổ sung chất bảo quản, lọc, pha loãng và đông khô theo qui trình đã được phê chuẩn. Trong quá trình sản xuất, tất cả các khâu đều được kiểm tra từ nguyên liệu nguồn (trứng gà, môi trường sử dụng cho sản xuất, huyết thanh bê, trypsin tách tế bào...); tế bào sử dụng cho sản xuất, vắc xin bán thành phẩm, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm.

Hình dạng bên ngoài: Bao gồm 2 lọ: 01 lọ vắc xin sởi đông khô và 01 lọ nước hồi chính vắc xin để tiêm.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Nhận dạng:

Tiến hành theo phương pháp thích hợp, như phương pháp trung hòa vi lượng hoặc miễn dịch huỳnh quang.

Tiêu chuẩn: Là virus sởi.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Mycoplasma

Vắc xin sởi phải không có *Mycoplasma* (Phụ lục 15.36).

Công hiệu và tính ổn định nhiệt

Chuẩn độ hiệu giá và thử nghiệm tính ổn định nhiệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng trên nuôi cấy tế bào Vero hoặc phương pháp tạo đám hoại tử PFU trên tế bào vero.

Phương pháp tạo đám hoại tử: Gây nhiễm vắc xin đã pha loãng 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; ... lên tế bào vero kín 1 lớp (phiến 6 giếng), hấp phụ ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong 60 min, phủ thạch lần 1 (không có đồ trung tính), nuôi ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 trong 7 ngày, phủ thạch lần 2 ở ngày thứ 7 (có đồ trung tính), nuôi ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 trong 3 ngày, đếm đám hoại tử (PFU) không bắt màu trên nền tế bào bắt màu đỏ, tính hiệu giá/0,5 ml.

Chuẩn độ hiệu giá trung hòa vi lượng: Vắc xin sởi được hồi chính và pha loãng bậc 10 từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-6} bằng môi trường DMEM 2 % huyết thanh bê. Sau đó cho vào mỗi giếng 0,1 ml hỗn dịch virus đã được pha loãng, 10 giếng/1 nồng độ. Cho 0,1 ml hỗn dịch tế bào Vero (150 000 tế bào/ml) vào mỗi giếng, ủ ở 36°C trong 9 ngày. Kết quả được tính theo công thức Karber.

Thử nghiệm đạt khi có hiệu giá 1000 CCID₅₀/0,5 ml.

Xác định tính ổn định nhiệt: Vắc xin sởi được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 1 tuần, hiệu giá vắc xin không được giảm quá 1 log so với mẫu vắc xin sởi bảo quản ở 4°C .

Thử nghiệm đạt khi mẫu ổn định nhiệt có hiệu giá $>1000 \text{ CCID}_{50}/0,5\text{ml}$.

TCVN I-5:2017

An toàn chung: Vắc xin sởi phải an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi. Phụ lục 15.11.

Độ ẩm tồn dư

Độ ẩm tồn dư của vắc xin không được quá 3 % (Phụ lục 15.35).

Albumin tồn dư: Dưới 50 ng/ml.

Bảo quản

Vắc xin sởi được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C - 8 °C, tránh ánh sáng.

Nhãn, hộp

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

Hạn dùng

Trong điều kiện bảo quản như trên vắc xin sởi có hạn dùng là 24 tháng kể từ ngày kiểm tra công hiệu lần cuối cùng.

Liều tiêm, đường tiêm

Tiêm dưới da, liều tiêm 0,5 ml/liều.

VẮC XIN TẨ UỐNG BẤT HOẠT***Vaccinum cholerae perorale inactivatum***

Vắc xin tẩu uống bất hoạt (mORCVAX) là một chế phẩm sinh học được điều chế từ vi khuẩn tả toàn thể bào đã bất hoạt bằng formaldehyd hoặc nhiệt độ.

Mỗi liều 1,5 ml vắc xin tẩu uống gồm:

<i>Vibrio cholerae</i> O1, El Tor, Phil. 6973 (bất hoạt bằng formaldehyd)	600 E.U. LPS
<i>Vibrio cholerae</i> O139, 4260B (bất hoạt bằng formaldehyd)	600 E.U. LPS
<i>Vibrio cholerae</i> O1, Cairo 50 (bất hoạt bằng nhiệt độ)	300 E.U. LPS
<i>Vibrio cholerae</i> O1, Cairo 50 (bất hoạt bằng formaldehyd)	300 E.U. LPS
<i>Vibrio cholerae</i> O1, Cairo 48 (bất hoạt bằng nhiệt độ)	300 E.U. LPS

Chất bảo quản: Thimerosal.

SẢN XUẤT**Chủng sản xuất**

Các chủng sản xuất *V. cholerae* typ sinh học El Tor, typ huyết thanh Inaba (chủng Phil. 6973), *V. cholerae*, O139 typ sinh học mới (chủng 4260B), *V. cholerae* typ sinh học cổ điển, typ huyết thanh Ogawa (chủng Cairo 50), *V. cholerae* typ sinh học cổ điển, typ huyết thanh Inaba (chủng Cairo 48) dùng để sản xuất vắc xin tẩu uống phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp nhận.

Nhận dạng và tính thuần khiết của chủng sản xuất: Xác định chỉ có vi khuẩn *V. cholerae* (với các typ sinh học trên), là trực khuẩn Gram âm, mảnh, hơi cong. Khuẩn lạc trên môi trường thạch máu có dạng tròn, bóng, hơi lồi. Có khuẩn lạc điển hình trên môi trường thạch TCBS. Lên men đường saccharose và mannose, không lên men đường arabinose.

Kiểm tra chủng sản xuất bằng phản ứng ngưng kết huyết thanh:

Đánh dấu các vị trí trên lam kính. Nhỏ 20 µl kháng huyết thanh (polyvalent, Inaba, Ogawa, O139) và nước muối sinh lý (K) vào các vị trí đã được đánh dấu trên lam kính. Nhỏ 20 µl canh khuẩn tả vào mỗi loại kháng huyết thanh trên. Trộn đều và đọc kết quả.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Chủng	Polyvalent	Inaba	Ogawa	O139	K
<i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Phil. 6973	+	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O139, 4260B	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i> O1, Cairo 48	+	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O1, Cairo 50	+	-	+	-	-

Kiểm tra chủng sản xuất vắc xin tẩu trên thạch TCBS:

Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tả, nhỏ 0,1 ml canh khuẩn vào đĩa thạch TCBS, dùng que cấy cấy rìa trên đĩa thạch. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ $(35 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc và sự chuyển màu của môi trường nuôi cấy tại thời điểm 24 h và 48 h. Đọc kết quả sau 48 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Khuẩn lạc trong, môi trường TCBS từ màu xanh lá cây chuyển màu vàng.

Kiểm tra tính chất sinh vật hóa học của chủng sản xuất:

Lắc đều tuýp (ống) chứa canh khuẩn tả, cấy 0,1 ml canh khuẩn vào từng ống môi trường (arabinose, mannose, saccharose). Ủ các ống môi trường ở nhiệt độ $(35 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ trong 48 h, theo dõi sự chuyển màu của môi trường. Đọc kết quả sau 48 h.

Dương tính (+): Môi trường chuyển sang màu vàng.

Âm tính (-): Môi trường giữ nguyên màu ban đầu.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Tính chất sinh vật hóa học của tất cả các chủng sản xuất vắc xin tẩu: arabinose (-), mannose (+), saccharose (+).

Sản xuất

Vi khuẩn tả được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Kết thúc nuôi cấy, canh khuẩn được kiểm tra đậm độ vi khuẩn. Vi khuẩn tả được bất hoạt bằng formaldehyd hoặc nhiệt độ tùy từng chủng. Sau bất hoạt, vi khuẩn tả được thu bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc tiếp tuyến (TFF).

KIỂM ĐỊNH VẮC XIN BÁN THÀNH PHẨM

Thử nghiệm vô khuẩn

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

Kiểm tra sau bất hoạt

Phương pháp tiến hành: Lắc đều tuýp chứa canh khuẩn tả sau bất hoạt, cấy 0,5 ml canh khuẩn tả vào đĩa thạch máu ngựa 15 %, lóng nhẹ, đều. Mỗi mẫu thử cấy trên 02 đĩa thạch máu. Ủ các đĩa thạch máu trên vào tủ ấm ($35 \pm 1,0$) °C trong 48 h. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn tả tại thời điểm 24 h và 48 h.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không thấy sự phát triển của vi khuẩn tả trên đĩa thạch máu ngựa.

Đo đậm độ vi khuẩn bằng bộ so độ đục chuẩn

Phương pháp tiến hành: Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ so độ đục.

Ví dụ: Trộn kỹ mẫu nước cốt tả trên máy trộn. Dùng pipetman hút 100 mcl mẫu thử cho vào ống thử của bộ soi độ đục, cho dần dần xmi dung dịch pha loãng (PBS 0,01 M có pH 7,2 hoặc nước muối sinh lý) vào cho đến khi độ đục của ống thử bằng với độ đục của ống chuẩn số 10. Đậm độ vi khuẩn tả được tính như sau:

Quy đổi thành 1 ml ta có: (0,1 ml nước cốt + x ml dung dịch pha loãng) x10 = X ml

Đậm độ của mẫu cần đo = X ml x ($a \times 10^9$ vi khuẩn/ml) (trong đó $a \times 10^9$ là chỉ số được cung cấp bởi hãng của ống số 10 trong bộ so độ đục chuẩn tương đương).

Định lượng LPS

Sử dụng phương pháp ELISA để định lượng hàm lượng của từng LPS có trong bán thành phẩm.

KIỂM ĐỊNH VẮC XIN BÁN THÀNH PHẨM CUỐI CÙNG

Vô khuẩn

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

KIỂM ĐỊNH VẮC XIN THÀNH PHẨM

Cảm quan

Mẫu kiểm định của mỗi loại vắc xin thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Sau khi lắc đều, vắc xin tạo thành huyền dịch đồng nhất, màu nâu nhạt.

Vô khuẩn

Phải đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

pH

Nằm trong khoảng từ 6,8 - 7,4 (Phụ lục 15.33).

Protein toàn phần

Không được quá 5 % (Phụ lục 15.18).

Formaldehyd

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

Thimerosal

Không được quá 0,02 % (Phụ lục 15.29).

Thử nghiệm công hiệu

Thử nghiệm công hiệu được tiến hành trên thỏ không có kháng thể kháng vi khuẩn tả. Mỗi loạt vắc xin tả uống cần 3 thỏ có trọng lượng từ 2 kg đến 2,2 kg.

Vắc xin tả uống được pha loãng trong dung dịch PBS 0,01 M (pH 7,2) hoặc nước muối sinh lý để đạt 4 tỉ vi khuẩn/ml. Gây miễn dịch cho thỏ bằng cách tiêm vào bắp chân sau, mỗi thỏ 1 ml vắc xin đã được pha loãng như trên. Mỗi thỏ được tiêm ba mũi, mỗi mũi cách nhau 1 tuần (vào các ngày 0, 7 và 14). Sau tiêm, thỏ được chăm sóc, theo dõi hàng ngày.

Đến ngày thứ 24, thỏ được lấy máu và tách huyết thanh trong điều kiện vô khuẩn. Tiến hành phản ứng ngưng kết trong ống nghiệm giữa huyết thanh thỏ và các vi khuẩn tả mẫu. Huyết thanh của mỗi thỏ được pha loãng bậc 2 thành các độ pha: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 và 1/640.

Kháng nguyên vi khuẩn tả gồm 3 chủng: Cairo 48, Cairo 50 và El Tor (Phil. 6973) được đo đậm độ vi khuẩn và pha loãng để có 1 tỉ vi khuẩn/ml.

Tiến hành phản ứng ngưng kết từng loại kháng nguyên đặc hiệu với huyết thanh thỏ ở các bậc pha loãng khác nhau. Đọc kết quả sau 48 h.

Tính kết quả: Hiệu giá huyết thanh được tính ở độ pha loãng thấp nhất vẫn có hiện tượng ngưng kết.

Tiêu chuẩn: Công hiệu của vắc xin tả uống đạt yêu cầu khi hiệu giá trung bình từng loại kháng nguyên nhỏ hơn 1/80 ($\leq 1/80$).

Đóng gói và bảo quản

Đóng trong lọ thủy tinh trung tính và bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, không được để đông băng.

Hạn dùng

Hạn dùng của vắc xin được nghiên cứu dựa trên tính ổn định của công hiệu trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm riêng biệt).

Vắc xin tả uống bất hoạt có hạn dùng không quá 2 năm kể từ sau ngày sản xuất.

Nhãn, hộp

Ghi rõ những thông tin cần có đối với nhãn theo qui định hiện hành.

Chỉ định, liều dùng

Vắc xin tả uống bất hoạt chỉ dùng đường uống.

Liều dùng: 1,5 ml/người.

Lịch dùng: 2 liều, mỗi liều cách nhau 14 ngày.

VẮC XIN THƯƠNG HÀN UỐNG***Vaccinum febris typhoidi perorale vivum*****Định nghĩa**

Vắc xin thương hàn uống, sống, giảm độc lực là một chế phẩm đông khô chứa trong viên bọc gelatin; điều chế từ chủng *Salmonella typhi* Ty 21a, đã được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Trong mỗi viên chứa $1-5 \times 10^9$ đơn vị sống *S.typhi* Ty 21a.

Sản xuất**Chủng sản xuất**

Chủng đột biến *S. typhi* Ty 21a đã cho thấy đạt tính an toàn và có hiệu lực trên người. Đặc điểm chính của chủng này là thiếu hụt enzym uridin diphosphat - galactose-4-epimerase. Hoạt tính của galactopermease, galactokinaes và galactose-1-phosphat uridyl-transferase đã bị giảm 50 % đến 90 %. Ở bất kể môi trường nuôi cấy nào, chủng vi khuẩn này cũng không chứa kháng nguyên Vi. Chủng này chỉ ngưng kết với kháng huyết thanh kháng O:9 nếu phát triển trên môi trường có chứa galactose. Chủng có chứa kháng nguyên H:d và không sinh hydrogen sulphid trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt. Chủng không độc với chuột nhắt trắng. Chủng Ty 21a sẽ gây dung giải nếu phát triển trên môi trường có chứa 1 % galactose.

Dùng hệ thống chủng gốc để sản xuất vắc xin.

Sản xuất chủng gốc: Từ một khuẩn lạc đơn sẽ được nuôi cấy trên môi trường thích hợp (canh thang BHI phù hợp với mục đích này) không có galactose và ủ ở nhiệt độ thích hợp cho phát triển tối ưu. Khi nuôi cấy đã đạt đến pha ổn định, canh khuẩn sẽ được gặt, ly tâm tách cạn và cho vào ống. Sau đó pha chế thành huyền dịch có đậm độ thích hợp và tiến hành đông khô, sao cho mỗi ống có chứa ít nhất 10^9 đơn vị sống của chủng. Các ống chủng gốc sau khi đông khô được bảo quản ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Sản xuất chủng làm việc: Chủng làm việc được sản xuất từ một ống chủng gốc. Quá trình nuôi cấy, gặt, ly tâm lấy cạn, pha chế và đông khô cũng theo trình tự như đối với chủng gốc. Mỗi ống chủng làm việc đông khô phải chứa ít nhất 10^9 đơn vị sống của chủng. Các ống chủng làm việc sau khi đông khô được bảo quản ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Kiểm tra chủng sản xuất**Nhận dạng và tính thuần khiết**

Xác định chỉ có vi khuẩn Ty 21a, là trực khuẩn Gram âm, di động.

Nuôi cấy qua 3 lần chuyển chủng trên môi trường có hoặc không có galactose, ngưng kết với kháng huyết thanh H:d, không ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Ngược lại chỉ những khuẩn lạc phát triển trên môi trường có chứa galactose (1 g/lít) mới ngưng kết với kháng huyết thanh O:9.

Khi nuôi cấy trên môi trường thạch Endo và ủ ở 37°C trong 7 ngày, mọc khuẩn lạc có màu môi trường, có hiện tượng ly giải và dần dần trở nên trong suốt. Các khuẩn lạc lên men galactose sẽ không xuất hiện tại bất kỳ thời điểm nào trong 7 ngày ủ ở 37°C .

Trên môi trường nuôi cấy chỉ thị có chứa galactose ủ ở 37°C trong 48 h, xuất hiện khuẩn lạc lốm ở giữa, viền có màu xanh xám và giữa có màu sẫm cho đến khi chết và ly giải giống như chủng Ty 21a trên môi trường thạch có chứa galactose.

Nuôi cấy trên môi trường thạch Kligler có chứa sắt, khuẩn lạc không đen, chứng tỏ không sinh hydrogen sulphid.

Gây ly giải vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy có galactose:

Nuôi cấy lắc trên môi trường BHI (với hàm lượng galactose 100 g/lít môi trường) ở 37°C , vi khuẩn bị ly giải trong vòng 1 h.

Kiểm tra độc tính trên chuột nhắt trắng

Chủng vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường BHI và ủ ở 37 °C trong 6 h, được tiêm vào ổ bụng cho 5 chuột nhắt trắng (18 - 20) g. Huyền dịch vi khuẩn có chứa ít nhất 5×10^7 vi khuẩn sẽ không giết chết chuột trong vòng 7 ngày theo dõi.

Xác định các enzym (bao gồm cả các enzym trong quá trình lên men galactose):

Thử nghiệm cho thấy vi khuẩn Ty 21a có hoạt tính enzym thấp hơn so với chủng Ty 2. Khi so sánh hoạt tính của chủng Ty 2 (coi là 100 %) thì hoạt tính của chủng Ty 21a là 0 % epimerase, 5 % đến 20 % galactokinase, 25 % đến 50 % galactose-1-phosphat-uridylyltransferase và 40 % đến 50 % galactose-permease.

Sự hấp thu và phân bố nội tế bào của galactose ^{14}C :

Sau 7 h nuôi cấy ở 30 °C, ít nhất 90 % galactose trong môi trường (1g/lít) bị mất do chủng vi khuẩn (bằng cách đo ^{14}C trên tế bào). Phương pháp thử nghiệm cũng cho thấy có khoảng 75 % galactose định cư trên vách tế bào vi khuẩn.

Đặc tính của lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid chiết xuất từ vách tế bào của chủng vi khuẩn thương hàn Ty 21a được nuôi cấy trong môi trường BHI có chứa galactose ^{14}C (1 g/lít), ủ ở 30 °C trong 7 h, sẽ bị thủy phân trong dung dịch acid acetic 1 % và được kiểm tra polysaccharid. Sử dụng phương pháp sắc ký gel, dùng Sephadex G50; những vi khuẩn thương hàn của cả loại khuẩn lạc nhẵn và xù xì đều có chứa LPS, theo tỷ lệ tương đương đối với chủng độc *S. typhi* Ty 2. Hơn nữa, sự phân bố của các đường keto-deoxy-octonat (KDO), galactose, glucose và rhamnose của LPS đạt tỷ lệ tương đương giữa chủng Ty 2 và Ty 21a.

Yêu cầu trong quy trình sản xuất

Môi trường nuôi cấy chủng sản xuất không được gây ra phản ứng độc hại hay dị ứng cho người.

Chủng sản xuất được nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ thích hợp trong khoảng thời gian đủ để đạt tới pha ổn định sớm thì tiến hành gặt. Số lần cấy chuyển từ chủng làm việc cho đến khi lên men cuối cùng không được vượt quá 4 lần.

Trước khi ly tâm sản phẩm lên men: Cần lấy mẫu kiểm tra nhận dạng của chủng Ty 21a, kiểm tra độ sống trên môi trường thạch BHI và ủ ở 37 °C trong 36 h.

Sau ly tâm, lấy sinh khối của các mẻ gặt đơn pha thành huyền dịch ổn định (hoặc vắn để riêng các mẻ gặt đơn) và giữ trong đồng băng cho đến khi đông khô.

Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng

Nhận dạng: Các mẫu thử dạng bột sẽ được hoàn nguyên và kiểm tra nhận dạng như trong mục "Nhận dạng và tính thuần khiết".

Độ sống: Xác định độ sống theo trọng lượng. Kết quả độ sống của quá trình đông khô tối thiểu phải đạt được 10 % so với các mẻ gặt đơn trước khi đông khô.

Tiêu chuẩn độ sống: Không ít hơn 40×10^8 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a.

Độ ẩm tồn dư: Phụ lục 15.35

Bán thành phẩm cuối cùng sẽ phải được kiểm tra độ ẩm tồn dư và giá trị này không được vượt quá giới hạn quy định của cơ quan kiểm định quốc gia.

Có 2 phương pháp phổ biến được áp dụng cho thử nghiệm này. Khi sử dụng phương pháp Karl Fischer (Phụ lục 10.3) để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong bán thành phẩm cuối cùng phải dưới 3 %. Nếu sử dụng phương pháp semi-micro để kiểm tra thì độ ẩm tồn dư trong mẫu bán thành phẩm cuối cùng phải nằm trong khoảng 1,5 % đến 4,0 %.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Từ bán thành phẩm cuối cùng đông khô, đã được làm đồng nhất hoàn toàn và đếm số lượng đơn vị sống; nếu không ít hơn $2 - 5 \times 10^9$ đơn vị sống, sẽ đóng vào 1 viên bọc gelatin; để đảm bảo khi đóng viên, mỗi viên là một liều cho người và chứa tối thiểu 2×10^9 đơn vị sống vắc xin.

Mẫu kiểm định thành phẩm sẽ được lấy từ mỗi viên vắc xin và làm các thử nghiệm dưới đây:

Nhận dạng: Kiểm tra nhận dạng với 3 viên cho mỗi mẫu thử theo phương pháp như mô tả ở phần "Nhận dạng và tính thuần khiết"

Độ sống

Kiểm tra độ sống với 5 viên cho mỗi mẫu thử. Kết quả độ sống của mẫu thử được coi như công hiệu của loạt vắc xin thương hàn uống sống giảm độc lực Ty 21a.

Thử nghiệm độ sống của mỗi loạt vắc xin sẽ phải được kiểm tra trên 2 mẫu song song và kết quả là giá trị trung bình độ sống của 2 mẫu này.

Quy trình kiểm tra độ sống cho mỗi mẫu thử: Cho toàn bộ bột vắc xin của 5 viên vào mỗi bình có chứa bi thủy tinh đã được sấy vô trùng, cho tiếp 20 ml nước muối sinh lý (NMSL) vô khuẩn vào mỗi bình trên. Lắc các bình mẫu trên bằng máy lắc rung 200 r/min và đặt trong buồng lạnh 4°C trong 30 min. Dùng huyền dịch vắc xin trên, pha loãng bằng NMSL và tùy theo số đơn vị sống có trong mỗi viên vắc xin mà mức độ pha loãng đến đâu sẽ dừng lại cho thích hợp. Nhỏ huyền dịch vắc xin pha loãng ở độ pha thích hợp vào ít nhất 5 đĩa thạch BHI, với thể tích 0,1 ml/đĩa và ủ ở 35°C đến 37°C trong 30 h đến 36 h hoặc lâu hơn. Đếm số lượng khuẩn lạc trong các đĩa môi trường và tính số lượng khuẩn lạc trung bình của mỗi mẫu thử. Từ kết quả này sẽ tính được số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử kiểm tra song song.

Ví dụ: Huyền dịch vắc xin sau khi đã được lắc rung trong buồng lạnh theo quy trình như trên sẽ được pha loãng bậc 10 bằng NMSL vô khuẩn đến 10^{-6} . Cấy huyền dịch vắc xin ở độ pha loãng 10^{-6} vào tối thiểu 5 đĩa thạch BHI với thể tích 0,1 ml/ đĩa; áp dụng công thức sau để tính độ sống trung bình của dung dịch gốc:

$$X = C \times 20 \times 10^9$$

trong đó:

X là đơn vị sống

C là số khuẩn lạc trung bình của 2 mẫu thử.

Từ kết quả trên, tính ra số đơn vị sống (Y) trong viên vắc xin thương hàn uống Ty 21a theo công thức sau:

$$Y = \frac{X}{5}$$

Tiêu chuẩn chấp thuận: Độ sống phải từ 2×10^9 đến 5×10^9 đơn vị sống S. typhi Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin.

Độ tạp nhiễm

Sử dụng ít nhất 3 viên vắc xin cho một mẫu thử nghiệm. Lựa chọn môi trường thích hợp để có thể kiểm tra, phát hiện sự có mặt của các vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella* (trừ Ty 21a), *Shigella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Vibrio parahaemolyticus*.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Vắc xin đạt yêu cầu khi không có mặt của các yếu tố gây bệnh nêu trên. Số lượng đơn vị sống tạp nhiễm không gây bệnh trong một liều vắc xin uống cho người (1 viên) không được vượt quá 2×10^2 vi khuẩn và 20 nấm.

An toàn không đặc hiệu

Mỗi loạt thành phẩm vắc xin thương hàn uống Ty 21a phải được kiểm tra an toàn không đặc hiệu bằng cách tiêm 0,01 liều vắc xin cho người vào ổ bụng cho mỗi trong số 5 chuột nhất trắng trọng lượng

18 g/con đến 22 g/con; và cho uống 1 liều vắc xin cho người cho mỗi trong số 3 chuột lang (trọng lượng 250 g/con đến 350 g/con).

Chuột nhất được theo dõi trong vòng 7 ngày sau khi tiêm, chuột lang được theo dõi trong 14 ngày sau khi uống vắc xin.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không có chuột nào có biểu hiện nhiễm bệnh trong khoảng thời gian theo dõi.

Tính ổn định

Vắc xin ở dạng thành phẩm sẽ phải được kiểm tra tính ổn định bằng phương pháp được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận. Thông thường tính ổn định của vắc xin này được đánh giá bằng kết quả độ sống.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Độ sống không được thấp hơn 2×10^6 đơn vị sống *S. typhi* Ty 21a trong 1 viên bọc gelatin trong suốt thời hạn sử dụng mà nhà sản xuất đã đề trình.

Cầm quan

Mẫu kiểm định của mỗi loại thành phẩm sẽ phải được kiểm tra bằng mắt thường. Nếu kết quả kiểm tra cho thấy có sự bất thường không theo đúng yêu cầu cần phải hủy bỏ.

Đóng gói, bảo quản, hạn dùng

Đóng gói và dán nhãn

Do không thể dán nhãn trên viên bọc gelatin nên trên vỉ, trên hộp và tờ hướng dẫn sử dụng cần ghi đầy đủ các thông tin theo quy định chung và đặc biệt ghi rõ: số đơn vị sống tối thiểu của một viên vắc xin và chỉ dùng để uống.

Bảo quản

Nhà sản xuất sẽ đưa ra điều kiện bảo quản và vận chuyển cho sản phẩm để đảm bảo rằng các dạng vắc xin này khi được bảo quản trong điều kiện thích hợp sẽ vẫn đạt được các tiêu chuẩn cho đến hết hạn sử dụng. Thông thường, vắc xin này ở dạng viên bọc gelatin sẽ phải được bảo quản trong điều kiện khô và tối ở $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Hạn sử dụng

Hạn sử dụng của vắc xin dạng viên bọc không được quá 18 tháng tính từ ngày sản xuất. Nếu số liệu cho thấy tính ổn định của sản phẩm dài hơn thì hạn dùng có thể kéo dài hơn.

VẮC XIN THƯƠNG HÀN VI POLYSACCHARID

Vaccinum Vi polysaccharidi Typhoidi

Định nghĩa

Vắc xin thương hàn Vi polysaccharid là một chế phẩm tinh chế từ vỏ Vi polysaccharid của vi khuẩn. Polysaccharid này được điều chế từ chủng *Salmonella typhi* Ty2 hoặc một chủng thích hợp khác có khả năng sản sinh ra Vi polysaccharid.

Vỏ Vi polysaccharid gồm các đơn vị lặp lại của acid N-acetyl - α -galactosaminuronic bằng liên kết 1 - 4, được acetyl hoá ở O-3.

Sản xuất

Chủng sản xuất

Chủng *Salmonella typhi* dùng để sản xuất vắc xin Vi polysaccharid phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Chủng này phải cho thấy có khả năng sản sinh ra Vi polysaccharid với sản lượng ổn định, đủ đáp ứng miễn dịch và an toàn cho người.

Phương pháp sản xuất phải được thẩm định và chứng minh rằng sản phẩm (nếu được kiểm tra) sẽ hoàn toàn đạt các yêu cầu về an toàn không đặc hiệu đối với huyết thanh miễn dịch và vắc xin cho người sử dụng.

Chỉ có chủng đạt các đặc tính như sau mới được dùng để sản xuất vắc xin: Nhuộm soi sau nuôi cấy phải có hình dạng đặc trưng của *S. typhi*; trong môi trường nuôi cấy, có lên men đường glucose nhưng không sinh hơi; oxidase âm tính; huyền dịch vi khuẩn ngưng kết đặc hiệu với huyết thanh kháng Vi thích hợp hoặc khuẩn lạc có quang sáng xung quanh, trên môi trường thạch đĩa có chứa kháng huyết thanh đặc hiệu.

Sản xuất chủng gốc và chủng sản xuất

Chủng gốc sẽ phải được ghi chép bằng hồ sơ chủng, bao gồm cả nguồn gốc chủng, và các đặc tính sinh hoá, huyết thanh học. Các nuôi cấy từ chủng sản xuất sẽ phải có cùng đặc tính như nuôi cấy từ chủng gốc. Chủng sản xuất phải đạt các tiêu chuẩn như chủng gốc.

Nuôi cấy và gặt

Sự phát triển của chủng *S. typhi* phải cho thấy có tính ổn định bằng cách giám sát tỷ lệ mọc của vi khuẩn, pH của nuôi cấy và sản lượng của Vi polysaccharid. Thông thường nuôi cấy chủng ở 35 °C đến 37 °C. Chủng làm việc (chủng sản xuất, working seed) có thể nuôi cấy trên môi trường đặc, từ 12 h đến 18 h ở 35 °C đến 37 °C; sau đó cấy chuyển sang môi trường lỏng (là canh khuẩn để cấy vào môi trường nuôi cấy cuối cùng). Môi trường nuôi cấy cuối cùng là môi trường bán tổng hợp, không chứa chất đã được kết tủa bởi cetrimoni bromid và không chứa các sản phẩm từ máu hoặc các polysaccharid có khối lượng phân tử cao, và ít nhất phải chứng minh rằng chúng đã được loại bỏ sau khi tinh chế.

Sự thuần khiết của vi khuẩn sau khi nuôi cấy phải được khẳng định bằng cách kiểm tra tiêu bản nhuộm soi dưới kính hiển vi (độ phóng đại ít nhất 1 000 lần) và bằng nuôi cấy trong môi trường đặc thích hợp. Canh khuẩn nuôi cấy được bắt hoạt vào thời điểm bắt đầu pha ổn định bằng cách thêm formaldehyd. Các tế bào vi khuẩn phải được loại bỏ bằng cách ly tâm, polysaccharid được rửa từ môi trường nuôi cấy bằng cách thêm cetrimonium bromid (hexadecyltrimethyl-ammonium bromid). Rửa polysaccharid được gặt và bảo quản ở -20 °C trước khi tinh chế.

Tinh chế Vi polysaccharid

Polysaccharid được tinh chế bằng cách rửa với phức hợp cetrimoni bromid, dùng quy trình thích hợp để loại bỏ acid nucleic, các protein và lipopolysaccharid. Polysaccharid sẽ được rửa với muối calci trong sự có mặt của ethanol (77) và làm khô ở 2 °C đến 8 °C. Bột thu được chính là Vi polysaccharid tinh chế. Độ ẩm tồn dư phải được kiểm tra theo phương pháp phân tích trọng lượng và cho thấy thấp hơn so với mẫu chuẩn.

Chỉ Vi polysaccharid tinh chế đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha chế vắc xin bán thành phẩm cuối cùng:

Protein: Không quá 10 mg/g polysaccharid.

Acid nucleic: Không quá 20 mg/g polysaccharid.

O-Acetyl: Không thấp hơn 2 mmol/g polysaccharid.

Kích thước phân tử: Kiểm tra bằng sắc ký cột, dùng cột dài 0,9 m và đường kính lòng ống 16 mm, chuẩn cột với dung dịch natri clorid 0,2 mol/kg, pH 7,0 đến 7,5. Dùng 5 mg polysaccharid cho vào 1 ml dung dịch natri clorid 0,2 mol/kg và rót vào cột, rửa giải với tốc độ 20 ml/h. Thu thập mẫu khoảng 2,5 ml. Kiểm tra điểm đáp ứng với $K_D = 0,25$ và làm 2 thể tích mẫu dung dịch rửa giải trước và sau điểm đáp ứng. Tiến hành xác định hàm lượng O-Acetyl của cả 2 mẫu trên. Không được thấp hơn 50 % polysaccharid được tìm thấy ở mẫu dung dịch rửa giải ra trước khi $K_D = 0,25$.

Nhận dạng: Dùng phương pháp hóa miễn dịch thích hợp.

Nội độc tố vi khuẩn: Không được quá 150 IU/ μ g polysaccharid.

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Bán thành phẩm cuối cùng được điều chế từ một hoặc nhiều loạt đơn Vi polysaccharid tinh chế. Nếu sử dụng bán thành phẩm này để đóng lọ đa liều thì phải cho thêm chất bảo quản chống nhiễm trùng và được hòa tan trước trong một dung môi thích hợp, sao cho sản phẩm cuối cùng chứa 25 μ g polysaccharid/1 liều tiêm cho người. Hàm lượng chất bảo quản trong bán thành phẩm cuối cùng không được gây biến tính Vi polysaccharid và các thành phần khác của vắc xin. Vắc xin bán thành phẩm được pha chế (trong điều kiện vô trùng) trong dung dịch không có chứa chất gây sốt và được lọc vô trùng qua màng lọc.

Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt các yêu cầu sau:

Vô khuẩn: Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Thimerosal: Đạt theo Phụ lục 15.29

Hàm lượng Vi polysaccharid: Dùng thử nghiệm hóa miễn dịch định lượng đã được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận để xác định hàm lượng Vi polysaccharid của mẫu bán thành phẩm cuối cùng (Phụ lục 15.37).

Nhận dạng: Dùng thử nghiệm huyết thanh học, dựa vào sự kết tủa miễn dịch.

Đóng ống và đóng gói

Quá trình đóng ống và đóng gói phải tuân thủ GMP.

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Các thử nghiệm dưới đây phải được tiến hành với mỗi loạt vắc xin thành phẩm.

Cảm quan

Vắc xin dạng lỏng, trong suốt, không màu, không có vật thể lạ mắt thường có thể nhìn thấy và không có những dấu hiệu bất thường khác như: Lông nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu...

Nhận dạng: Thử nghiệm nhận dạng được tiến hành bằng phương pháp hóa miễn dịch thích hợp.

Xác định hàm lượng Vi polysaccharid

Lấy mẫu ngẫu nhiên, ít nhất 3 lọ (hoặc ống), xác định hàm lượng Vi polysaccharid bằng thử nghiệm hóa miễn dịch định lượng, so sánh với mẫu chuẩn polysaccharid (Phụ lục 15.37).

Vô khuẩn: Phải đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Chất gây sốt

Mỗi loạt vắc xin thành phẩm phải được kiểm tra chất gây sốt bằng cách tiêm vắc xin thương

hàn Vi polysaccharid có nồng độ 25 ng/ml vào tĩnh mạch tai thỏ (1 ml/kg thể trọng thỏ) (Phụ lục 15.12).

An toàn không đặc hiệu

Loại vắc xin thành phẩm thương hàn Vi polysaccharid đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm đều sống sót và không bị giảm cân trong ít nhất 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

Chất bảo quản

Thimerosal: Đạt theo Phụ lục 15.29

Phenol (Nếu được sử dụng để điều chế vắc xin) thì không được nhiều hơn 2,5 g/l (Phụ lục 15.28).

Độ ẩm tồn dư (Nếu vắc xin ở dạng đông khô)

Phương pháp áp dụng phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận. Thông thường sử dụng phương pháp Karl Fischer. Lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm định theo tỷ lệ 1/1000 lọ, tuy nhiên tối đa là 10 lọ và cũng không được ít hơn 5 lọ (Phụ lục 15.35).

Tiêu chuẩn chấp thuận: Độ ẩm tồn dư trung bình giữa các lọ không được lớn hơn 2,5 %, không được lọ nào có độ ẩm tồn dư 3 % hoặc lớn hơn.

pH: $7,0 \pm 0,5$ (Phụ lục 15.33).

Nghiên cứu tính ổn định

Nghiên cứu tính ổn định phải được tiến hành để xác định hạn dùng của vắc xin thương hàn Vi polysaccharid. Nghiên cứu này có thể dựa trên các thử nghiệm xác định hàm lượng O-Acetyl và kích thước phân tử của ít nhất là 3 loại vắc xin thành phẩm (các loại vắc xin thành phẩm này phải được sản xuất từ những bán thành phẩm Vi polysaccharid tinh chế riêng biệt). Các loại vắc xin dùng trong thời gian nghiên cứu phải được bảo quản ở điều kiện như ghi trên hướng dẫn dành cho người sử dụng.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Kích thước phân tử của mỗi loại vắc xin thành phẩm phải đạt ít nhất 50 % Vi polysaccharid từ cột được rửa giải trước khi K_0 đạt tới 0,25. Thử nghiệm về tính ổn định phải được cơ quan kiểm định quốc gia chấp thuận.

Đóng gói

Việc đóng gói, dán nhãn phải tuân thủ theo GMP.

Các tuyên bố về hạn dùng và nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên những nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải đệ trình lên cơ quan kiểm định quốc gia về vắc xin và sinh phẩm.

Nhãn, hộp

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

Bảo quản

Nhiệt độ bảo quản 2 °C đến 8 °C.

Hạn sử dụng

Không được quá 3 năm kể từ ngày đóng ống thành phẩm.

VẮC XIN UỐN VÁN HẤP PHỤ***Vaccinum Tetani adsorbatum*****Định nghĩa**

Vắc xin uốn ván hấp phụ được điều chế từ độc tố uốn ván đã được xử lý bằng formaldehyd và nhiệt độ để mất tính độc mà vẫn còn tính sinh miễn dịch, chứa ít nhất 1000 Lf/ mg nitrogen protein và hấp phụ với một tá chất thích hợp như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd trong dung dịch muối đẳng trương. Có thể cho thêm chất bảo quản thích hợp.

Sản xuất

Sản xuất vắc xin phải dựa trên hệ thống chủng. Chủng *Clostridium tetani* được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy, cần kiểm tra tính thuần khiết để loại bỏ những mẻ nuôi cấy đơn bị nhiễm tạp. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông. Các mẻ gặt đơn có thể hỗn hợp lại để giải độc bằng formaldehyd và nhiệt độ rồi tinh chế theo phương pháp thích hợp.

Số lượng Lf trong vắc xin bán thành phẩm không vượt quá 25 Lf trong một liều đơn cho người nếu sử dụng nhiều hơn một liều cho miễn dịch cơ bản.

Hàm lượng chất bảo quản phải không gây hại đến giải độc tố và không gây ra những phản ứng ở người.

Giải độc tố tinh chế bán thành phẩm

Chủng sản xuất *Clostridium tetani* phải có độc tính cao, biết rõ về nguồn gốc và lịch sử chủng. Thu độc tố uốn ván trong môi trường nuôi cấy ở điều kiện vô trùng. Xác định hàm lượng độc tố (Lf/ml) bằng phản ứng lên bông để giám sát tính ổn định trong sản xuất. Giải độc tố uốn ván được tinh chế để loại bỏ các thành phần có thể gây các phản ứng phụ cho người. Độc tố sau khi tinh chế sẽ được bất hoạt bằng formaldehyd theo phương pháp thích hợp sao cho không ảnh hưởng đến khả năng sinh miễn dịch của giải độc tố và không bị hồi độc. Tuy nhiên, có thể lựa chọn quy trình tinh chế sau khi giải độc. Chỉ có những giải độc tố tinh chế bán thành phẩm đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được sử dụng để pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng.

Vô khuẩn

Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra (Phụ lục 15.7).

Tính độc đặc hiệu và tính hồi độc

Kiểm tra tính độc đặc hiệu: Tiêm dưới da 1 ml giải độc tố tinh chế có chứa 500 Lf/ml/con cho 5 chuột lang khỏe mạnh (250 - 350) g/con chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Theo dõi và kiểm tra trọng lượng chuột, các dấu hiệu liệt do uốn ván hàng tuần trong vòng 3 tuần. Những chuột chết phải được mổ kiểm tra. Giải độc tố uốn ván tinh chế đạt yêu cầu an toàn đặc hiệu khi không có chuột lang nào có dấu hiệu liệt do uốn ván hay bất kỳ triệu chứng uốn ván nào trong 3 tuần theo dõi và có ít nhất 80 % chuột sống sót trong giai đoạn thử nghiệm.

Kiểm tra tính hồi độc của giải độc tố uốn ván

Giải độc tố uốn ván tinh chế phải được kiểm tra để đảm bảo không bị hồi độc. Sử dụng dung dịch đệm giống như dung dịch pha vắc xin bán thành phẩm cuối cùng nhưng không có chất hấp phụ để pha mẫu giải độc tố uốn ván tinh chế bán thành phẩm thành huyền dịch chứa 12,5 Lf/ml. Chia thành 2 mẫu thử, trong đó một mẫu ủ ở $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong 6 tuần và mẫu kia ủ ở 37°C trong 6 tuần. Tiêm dưới da 5 ml/con, mỗi mẫu tiêm cho 5 chuột lang khỏe mạnh (250 - 350) g/con chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích gì trước đó. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi cả 2 nhóm chuột đều khỏe mạnh, không có chuột lang nào có dấu hiệu uốn ván trong 3 tuần theo dõi.

Độ tinh sạch của kháng nguyên uốn ván

Giải độc tổ uốn ván tinh chế phải được kiểm tra độ tinh sạch của kháng nguyên bằng cách kiểm tra hàm lượng kháng nguyên (Lf/mg nitrogen protein). Giá trị Lf được kiểm tra bằng cách so sánh với mẫu chuẩn đã được hiệu chuẩn bởi giải độc tổ uốn ván mẫu chuẩn quốc tế dành cho thử nghiệm lên bông hoặc mẫu chuẩn quốc gia tương đương.

Giải độc tổ uốn ván tinh chế đạt yêu cầu khi chứa không được ít hơn 1000 Lf/mg nitrogen protein.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm cuối cùng

Vắc xin bán thành phẩm cuối cùng được pha chế từ giải độc tổ uốn ván tinh chế, cho thêm nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxyd với hàm lượng thích hợp. Có thể cho thêm chất kháng khuẩn thích hợp. Chỉ những vắc xin bán thành phẩm cuối cùng đạt các tiêu chuẩn dưới đây mới được phép tiếp tục sản xuất thành vắc xin thành phẩm.

Chất bảo quản

Xác định hàm lượng chất bảo quản bằng phương pháp hóa học thích hợp. Hàm lượng chất kháng khuẩn trong vắc xin bán thành phẩm phải đạt ít nhất là 85 % và không được quá 115 % so với lượng dự kiến cho vào (Phụ lục 15.29).

Vô khuẩn

Tiến hành kiểm tra tinh vô khuẩn của vắc xin bán thành phẩm cuối cùng với 10 ml mẫu cho mỗi môi trường kiểm tra. Không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Nhận dạng

Thực hiện ít nhất trên một lọ vắc xin đã được dán nhãn.

Nhận dạng giải độc tổ uốn ván bằng thử nghiệm lên bông như mô tả trong Phụ lục 15.19.

Vô khuẩn

Vắc xin không nhiễm vi khuẩn và nấm (Phụ lục 15.7).

Công hiệu

Thực hiện theo Phụ lục 15.23.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Công hiệu của vắc xin uốn ván đơn hấp phụ được coi là đạt yêu cầu khi không thấp hơn 40 IU đối với một liều đơn dùng cho người. Đối với các thử nghiệm sử dụng 3 độ pha loãng, giới hạn khoảng tin cậy 95 %, công hiệu phải nằm trong khoảng 50 % đến 200 % của công hiệu tiêu chuẩn.

An toàn chung

Phụ lục 15.11.

Chất bảo quản

Hàm lượng chất bảo quản thimerosal không ít hơn 85 % hoặc không nhiều hơn 115 % lượng ghi trên nhãn (Phụ lục 15.29).

Hàm lượng chất hấp phụ

Không quá 1,25 mg nhôm trong một liều đơn vắc xin cho người (Phụ lục 15.27).

pH

6,0 đến 7,0 (Phụ lục 15.33).

Cảm quan

Mỗi loại vắc xin thành phẩm sau khi sản xuất phải được kiểm tra bằng cảm quan để đảm bảo các lọ hay ống vắc xin trước khi xuất xưởng đều phải đạt yêu cầu, không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút chặt và đảm bảo tính nguyên vẹn. Trong quá trình kiểm tra, nếu ống hay lọ nào thấy không đạt yêu cầu cần được loại bỏ.

Bảo quản, hạn dùng

Vắc xin được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Khi bảo quản ở điều kiện quy định vắc xin có thể giữ được công hiệu 3 năm kể từ ngày chuẩn độ công hiệu.

Nhãn, hộp

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

VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP***Vaccinum Hepatitidis B recombinatum*****Định nghĩa**

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (rDNA) được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt (HBsAg) - là một protein của virus viêm gan B. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN và thường được hấp phụ với nhôm hydroxyd hoặc nhôm phosphat hydrat.

Sản xuất

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 chuyển nạp (transformation) với một plasmid có chứa gen mã hoá HBsAg. HBsAg được thu từ tế bào bằng cách làm ly giải hoặc phá vỡ 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 loại nhỏ) hoặc phối hợp sản phẩm của gen S và tiền S2 (protein loại trung bình) hoặc phối hợp cả sản phẩm của gen S, tiền S2 và tiền S1 (protein loại lớn).

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm**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), thẩm miễn dịch hoặc khuếch tán miễn dịch đơn. Vắc xin mẫu thử được so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

Độ tinh khiết của kháng nguyên

Được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3) hoặc các phương pháp khác phù hợp như SDS - PAGE (Phụ lục 15.39).

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không nhỏ hơn 95 % so với hàm lượng protein toàn phần.

Lipid

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

Cesi (Cs)

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

Tween 20

Không lớn hơn 50 µg/100 µg protein (Phụ lục 15.42).

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 khuẩn

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

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Cảm quan

Sau khi lắc, vắc xin viêm gan B có màu trắng, hơi đục.

pH

5,4 đến 7,4 (Phụ lục 15.33).

Protein toàn phần

Xác định bằng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein toàn phần có trong vắc xin không được quá 40 µg/ml (Phụ lục 15.34).

Nhôm

Hàm lượng nhôm trong vắc xin tối đa không được quá 1,25 mg/liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

Formaldehyd

Không được quá 0,01 % (Phụ lục 15.25).

Thimerosal

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

Vô khuẩn

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

An toàn chung

Vắc xin viêm gan B phải đảm bảo an toàn khi thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt trắng. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

Chất gây sốt

Vắc xin viêm gan B phải an toàn về mặt chất gây sốt khi tiêm cho thỏ. Tổng nhiệt độ chênh lệch 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

Công hiệu

Công hiệu vắc xin viêm gan 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 trên 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 hoặc một giống chuột phù hợp khác, 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 để pha vắc xin là nước muối sinh lý 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 gây miễn dịch được nuôi từ 28 ngày đến 32 ngày trong điều kiện như nhau. Tiến hành gây mê và lấy máu từ 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 -20 °C. Xác định hiệu giá kháng thể kháng HBsAg bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn men (ELISA) trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Kết quả được tính theo phần mềm thống kê chuyên dụng.

Thử nghiệm có giá trị khi

ED₅₀ của vắc xin mẫu chuẩn quốc gia 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

Vắc xin thử nghiệm được pha loãng song song với vắc xin mẫu chuẩn bằng PBS 0,1 M hoặc PBS pH 7,2 – 7,4 với các độ pha loãng bậc 2 phù hợp. Tiến hành thử nghiệm bằng kỹ thuật ELISA, trên bộ sinh phẩm chẩn đoán thương mại có sẵn. Dùng kháng thể đơn dòng kháng HBsAg để xác định lượng kháng nguyên HBsAg trong vắc xin mẫu thử, so sánh với vắc xin mẫu chuẩn.

Kết quả được tính theo phần mềm thống kê chuyên dụng.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Công hiệu tương quan ($P = 95\%$) không nhỏ hơn 0,65.

Đóng gói

Vắc xin viêm gan B được đóng trong lọ thủy tinh trung tính, mỗi lọ chứa 20 µg/1 ml; hoặc 10 µg/ 1 ml; hoặc 5 µg/1 ml tùy theo từng nhà sản xuất.

Bảo quản

Vắc xin viêm gan B phải được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, tuyệt đối không được làm vắc xin đông băng.

Tính ổn định và hạn dùng

Nghiên cứu tính ổn định của vắc xin phải được tiến hành trên ít nhất 3 loạt liên tiếp (được sản xuất từ 3 loạt bán thành phẩm khác nhau) khi được bảo quản theo thời gian ở điều kiện như ghi trên nhãn của sản phẩm.

Trong điều kiện bảo quản như trên, vắc xin viêm gan B tái tổ hợp có hạn dùng là 36 tháng.

Nhãn, hộp

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

Chỉ định, liều dùng

Đường dùng: Tiêm bắp vào vùng cơ delta (đối với trẻ sơ sinh, tiêm bắp đùi là tốt hơn).

Liều dùng, lịch tiêm: Theo hướng dẫn cụ thể của nhà sản xuất.

Tiêm nhắc lại sau 5 năm đối với tất cả các lứa tuổi.

VẮC XIN VIÊM NÃO NHẬT BẢN***Vaccinum Encephalitis japonicae*****Định nghĩa**

Vắc xin viêm não Nhật Bản là một chế phẩm vô khuẩn được điều chế từ chủng virus viêm não Nhật Bản (chủng Nakayama hoặc Bejing) sau khi đã được gây nhiễm vào não chuột nhắt trắng.

Quy trình sản xuất bao gồm các bước tinh chế bằng protamin sulfat, amoni sulfat, siêu ly tâm trong dung dịch saccharose. Virus viêm não Nhật Bản sau tinh chế phải có độ tinh khiết cao và duy trì được bản chất kháng nguyên để có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch tối ưu. Kháng nguyên tinh khiết được bất hoạt bởi formaldehyd và được bảo quản bằng thimerosal.

Kiểm định vắc xin bán thành phẩm***Vô khuẩn***

Bán thành phẩm viêm não Nhật Bản phải đạt yêu cầu về vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Hiệu giá virus

Hiệu giá virus viêm não Nhật Bản được xác định bằng kỹ thuật ELISA. Hiệu giá được sử dụng như một chỉ số theo dõi tính ổn định của quy trình sản xuất.

Kiểm định vắc xin thành phẩm***Cảm quan***

Mỗi lọat vắc xin viêm não Nhật Bản thành phẩm phải được kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo các lọ vắc xin không có dấu hiệu bất thường về cảm quan như: Vật lạ trong lọ vắc xin, nắp hay nút đã được đậy chặt và đảm bảo kín nguyên vẹn.

Vắc xin viêm não Nhật Bản ở dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu.

Nhận dạng

Tiêm cho chuột lang hoặc chuột nhắt trắng, vắc xin viêm não Nhật Bản phải tạo được kháng thể trung hòa có khả năng trung hòa được virus đặc hiệu.

pH

Từ 6,8 đến 7,4 (Phụ lục 15.33).

Hàm lượng protein

Xác định bằng phương pháp Lowry. Hàm lượng protein không được quá 80 µg/ml (Phụ lục 15.34).

Chất bảo quản

Hàm lượng thimerosal không quá 0,12 mg/ml (Phụ lục 15.29).

Formaldehyd

Không quá 0,1 mg/ml (Phụ lục 15.25).

Chất gây sốt

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải an toàn về chất gây sốt. Khi tiêm cho thỏ, tổng số nhiệt độ tăng cho 3 thỏ không được quá 1,3 °C (Phụ lục 15.12).

Vô khuẩn

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

An toàn chung

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải đảm bảo an toàn khi tiêm thử nghiệm trên chuột lang và chuột nhắt trắng. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau thời gian theo dõi 7 ngày (Phụ lục 15.11).

An toàn đặc hiệu

Vắc xin viêm não Nhật Bản phải đảm bảo an toàn khi tiêm thử nghiệm trên chuột nhắt trắng. Chuột phải khỏe mạnh và tăng trọng bình thường sau thời gian theo dõi 14 ngày.

Tính an toàn đặc hiệu của vắc xin viêm não Nhật Bản được xác định bằng cách kiểm tra sự có mặt của virus còn sống sót sau quá trình bất hoạt.

Động vật: Sử dụng ít nhất 10 chuột nhắt trắng 4 tuần tuổi có trọng lượng khoảng 12 g đến 14 g. Lựa chọn những chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh lý và tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly ít nhất là 3 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột được chăm sóc và theo dõi trong điều kiện tiêu chuẩn.

Cách tiến hành: Mẫu vắc xin thử nghiệm không pha loãng đem tiêm vào não chuột với liều 0,03 ml cho mỗi chuột.

Theo dõi và đọc kết quả: Toàn bộ chuột thử nghiệm phải theo dõi và cân trọng lượng hàng ngày trước khi tiêm và sau khi tiêm. Thời gian theo dõi chuột là 14 ngày kể từ sau ngày tiêm. Trong suốt thời gian theo dõi, chuột thử nghiệm phải khỏe mạnh, tăng trọng và không được có các triệu chứng bất thường. Nếu trong trường hợp có một chuột thử nghiệm bị liệt hoặc chết thì phải tiến hành thử nghiệm lại lần thứ hai với số vắc xin đem thử và số chuột thí nghiệm gấp 2.

Nếu trong thử nghiệm lần thứ hai có một chuột bị liệt hoặc chết thì lô vắc xin thử nghiệm đó phải hủy bỏ vì không đạt yêu cầu về tính an toàn đặc hiệu.

Công hiệu

Tiến hành kiểm tra song song với vắc xin chuẩn.

Vắc xin kiểm tra và vắc xin chuẩn được pha loãng ở các độ pha 1/16, 1/32, 1/64 trong dung dịch PBS 0,75 M, pH 7,4 có chứa 0,02 % gelatin. Mỗi độ pha, tiêm 2 liều, mỗi liều 0,5 ml, đường phúc mạc, cách nhau 7 ngày cho 16 chuột nhắt trắng. Toàn bộ chuột được nuôi và theo dõi trong 2 tuần. Sau đó tiến hành lấy máu trong điều kiện vô khuẩn và để riêng máu của từng chuột, để ở 4 °C qua đêm. Tách huyết thanh và hợp huyết thanh của toàn bộ chuột (mỗi chuột 0,1 ml) của cùng một độ pha. Pha loãng huyết thanh 1/10 và bất hoạt bổ thể ở 56 °C trong 30 min. Bảo quản huyết thanh chuột đã pha loãng và bất hoạt ở -20 °C. Tiến hành chuẩn độ hiệu giá kháng thể trung hòa trên tế bào BHK21.

Kết quả được tính toán theo công thức tính giảm 50 % đảm hoạt tử. Hiệu giá kháng thể trung hòa của vắc xin kiểm tra không được thấp hơn vắc xin chuẩn.

Đóng gói và bảo quản

Đóng ở trong lọ thủy tinh trung tính: 5,5 ml/1lọ và 1 ml/1lọ.

Bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng; tuyệt đối không được làm đông băng.

Hạn dùng

Trong điều kiện bảo quản ở 2 °C đến 8 °C, vắc xin viêm não Nhật Bản có hạn dùng là 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

Nhãn, hộp

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

Liều tiêm, đường tiêm, lịch tiêm

Tiêm dưới da, vị trí tiêm: vào vùng cơ delta.

Dưới 36 tháng tuổi tiêm 0,5 ml /1 liều.

Trên 36 tháng tuổi tiêm 1,0 ml /1 liều.

Lịch tiêm: 2 liều cách nhau 1 tuần đến 2 tuần.

Tiêm nhắc lại: Sau 1 năm và sau đó cứ 3 năm tiêm nhắc lại một lần.