

15.43 KIỂM TRA CÔNG HIỆU (IN VIVO) CỦA VẮC XIN VIÊM GAN B TÁI TỔ HỢP

Nguyên lý thử nghiệm: Thử nghiệm công hiệu *in vivo* vắc xin viêm gan B tái tổ hợp được xác định thông qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch **bảo vệ (kháng thể kháng HbsAg)** sau khi tiêm vắc xin bằng kit sinh phẩm chẩn đoán HBsAb. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit-Analysis của WHOPROG/Bioassay Assist thông qua số chuột tạo đáp ứng miễn dịch với tổng số chuột **gây** miễn dịch ở từng độ pha.

Nguyên vật liệu

Chuột **nhất trắng đạt yêu cầu** 4 đến 6 tuần tuổi, cân nặng tối thiểu 16 g được lựa chọn, vận chuyển và chăm sóc trong điều kiện cách ly: 12-15 con/độ pha.

Vắc xin viêm gan B **tái tổ hợp** chuẩn quốc gia hoặc mẫu chuẩn nội bộ nhà sản xuất.

Vắc xin viêm gan B tái tổ hợp mẫu thử.

Bộ sinh phẩm chuẩn đoán HBsAb 96 giếng.

Tiến hành

Chuẩn bị dung dịch pha loãng

Dung dịch để pha loãng mẫu: Hoà tan **nhôm hydroxyd** (Sigma hoặc Merck hoặc hãng tương đương) trong dung dịch *natri clorid* 0,9 % theo tỷ lệ từ 1/4 -1/5 (tỷ lệ này có thể thay đổi theo từng loại vắc xin). Hấp tiệt trùng dung dịch đã pha ở 121 °C trong 30 phút. Bảo quản ở 4 °C.

Chuẩn bị các độ pha loãng của vắc xin:

Tiến hành trong hót vô trùng.

Vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn (hàm lượng khoảng 20 µg **kháng nguyên/ml**) được pha loãng bậc 2 bằng dung dịch pha loãng mẫu **thành các độ pha phù hợp**, ví dụ như bảng 15.43. Tùy từng loại vắc xin viêm gan B tái tổ hợp, độ pha loãng có thể thay đổi để tạo được đường chuẩn phù hợp.

Bảng 15.43: Chuẩn bị các độ pha loãng của vắc xin (ví dụ)

Mẫu vắc xin (ml)	Dung dịch pha loãng (ml)	Độ pha loãng	HBsAg (µg/ml)
10 (vắc xin nguyên mẫu)	30	1/4	5
20 (vắc xin 1/4)	20	1/8	2,5
20 (vắc xin 1/8)	20	1/16	1,25
20 (vắc xin 1/16)	20	1/32	0,0625
20 (vắc xin 1/32)	20	1/64	0,0312
20 (vắc xin 1/64)	20	1/128	0,0156

Gây nhiễm trên động vật:

Với mỗi độ pha của vắc xin gây nhiễm trên ít nhất 12 chuột nhắt (1 ml/con) bằng đường tiêm ổ bụng (phúc mạc). Sau khi tiêm theo dõi trong vòng 28-35 ngày (tùy vắc xin).

Lấy máu: Lấy máu riêng từng con vào ống eppendorf, dán nhãn ghi số lô và độ pha. Để máu ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 2 giờ, sau đó để ở 4°C trong 2 giờ hoặc qua đêm.

Ly tâm, tách huyết thanh: Ly tâm các tuýp eppendorf đựng máu tốc độ 4000 **rpm** trong 10 **min** ở 4 °C. Cẩn thận tách hết phần huyết thanh trong sang một ống eppendorf khác (không được làm lẫn huyết thanh giữa các ống khác nhau). Nếu chưa tiến hành định lượng **kháng thể kháng HbsAg** ngay, bảo quản các mẫu huyết thanh ở -20 °C để kiểm tra sau.

Định lượng kháng thể kháng HBsAg: bằng phương pháp ELISA với bộ kit của BIO-RAD hoặc Dia.pro hoặc 1 bộ kit sinh phẩm chẩn đoán phù hợp khác.

Tính kết quả:

Tính giá trị ngưỡng ($OD_{Cut\ off}$) để xác định số chuột dương tính trong từng độ pha của cả vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn. Số chuột dương tính ở mỗi độ pha của mẫu tương đương số chuột tạo được đáp ứng miễn dịch. Tính kết quả công hiệu tương quan theo chương trình Probit-Analysis của WHOPROG/Bioassay Assist thông qua số chuột dương tính với tổng số chuột **gây** miễn dịch ở từng độ pha.

Thử nghiệm có giá trị nếu:

ED_{50} cho cả hai vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin **mẫu thử phải nằm trong khoảng** các liều đã tiêm. Các giới hạn 95 % độ tin cậy của công hiệu được xác định cho mỗi vắc xin trong thử nghiệm phải nằm trong khoảng 33-300 %.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Theo quy định trong chuyên luận riêng.