

SUITABILITY VALUATION OF BCG VACCINE STERILITY TESTING PROCEDURE BY DIRECT INOCULATION METHOD

Nguyen Thi Thu Thuy*, Nguyen Thi Van Quynh, Nguyen Khanh Ly

National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

Received 08 November 2024

Accepted 24 March 2025

Abstract: The live BCG (Bacille Calmette-Guérin) tuberculosis vaccine that derived from the Calmette-Guérin strain, is a product of the Institute of Vaccine and Medical Biologicals (IVAC). The sterility test is one of the essential tests recommended by the World Health Organization (WHO) to ensure the quality control of vaccines and biologicals by detecting foreign agents, including live microorganisms contaminating the product. At the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB), we conducted a study to evaluate the suitability of the BCG vaccines sterility testing procedure using the direct inoculation method. The study was performed on three batches of BCG vaccine. The results showed that the negative control, positive control, and sterility test of three batches of BCG vaccine met the required evaluation standards. All three time of trials showed the obvious growth of bacteria and fungi after inoculating the challenge microorganisms in the tubes containing the test samples. The study confirms that the procedure is capable of detecting microorganisms in the test samples at a concentration of <100 CFU. Therefore, the presence of the vaccine does not affect the growth of the strain. The sterility testing procedure using the direct inoculation method for BCG vaccine is suitable for application at NICVB.

Keywords: BCG, sterility testing, negative control, positive control.

* Corresponding author:

E-mail address: thuxthuy17@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v5i1.200>

ĐÁNH GIÁ SỰ PHÙ HỢP CỦA QUY TRÌNH KIỂM TRA VÔ TRÙNG VẮC XIN BCG BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY TRỰC TIẾP

Nguyễn Thị Thu Thủy*, Nguyễn Thị Vân Quỳnh, Nguyễn Khánh Ly

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 08 tháng 11 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 03 năm 2025

Tóm tắt: Vắc xin phòng lao BCG (Bacille Calmette-Guerin) sống có nguồn gốc từ chủng Calmette- Guérin là sản phẩm thuộc Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC). Thử nghiệm kiểm tra tính vô trùng là một trong những thử nghiệm quan trọng được Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo để kiểm soát chất lượng vắc xin và sinh phẩm y tế, nhằm phát hiện tác nhân ngoại lai là các vi sinh vật sống nhiễm vào sản phẩm. Tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB), chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá sự phù hợp của quy trình kiểm tra vô trùng vắc xin BCG bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp. Nghiên cứu thực hiện trên 03 loạt vắc xin BCG. Kết quả cho thấy chứng âm, chứng dương và thử nghiệm vô trùng 03 loạt vắc xin BCG đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn đánh giá. Cả 03 lần thực hiện đều có sự phát triển rõ rệt của vi khuẩn và nấm sau khi cấy vi sinh vật thử thách trong các ống môi trường có chứa mẫu thử. Nghiên cứu chứng tỏ quy trình có khả năng phát hiện vi sinh vật trong mẫu thử với số lượng <math>< 100</math> CFU. Do đó, sự có mặt của vắc xin không ảnh hưởng đến sự phát triển của chủng. Quy trình kiểm tra vô trùng bằng phương pháp trực tiếp đối với vắc xin BCG sản xuất tại IVAC là phù hợp để thực hiện tại NICVB.

Từ khoá: BCG, kiểm tra vô trùng, chứng âm, chứng dương.

1. Đặt vấn đề

Bệnh lao, đặc biệt là lao phổi, luôn là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, là mối lo ngại lớn

đối với sức khỏe cộng đồng. Đặc biệt, trẻ sơ sinh – nhóm đối tượng chưa có hệ miễn dịch hoàn thiện, có nguy cơ cao mắc lao do không có khả năng

miễn dịch bảo vệ tự nhiên. Miễn dịch với lao là miễn dịch đặc hiệu qua trung gian tế bào nhưng hiệu lực bảo vệ không mạnh và không bền. Miễn dịch với lao là miễn dịch thu được, không truyền từ mẹ sang con cho nên cần phải tạo miễn dịch cho trẻ bằng cách tiêm phòng lao (vắc xin BCG) sau khi trẻ sinh ra [2].

Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo tiêm chủng vắc xin BCG càng sớm càng tốt sau khi sinh đối với trẻ sinh ra bình thường, sức khỏe ổn định hoặc tiêm vào bất cứ thời gian nào sau đó [3,4]. Vắc xin phòng lao được sử dụng phổ biến hiện nay ở nước ta là sản phẩm thuộc Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) được chỉ định cho trẻ sơ sinh, trẻ dưới 1 tuổi, và trẻ lớn trên 1 tuổi chưa được tiêm phòng [1,2]. Vắc xin phòng lao BCG (Bacille Calmette-Guerin) sống- đông khô là loại vắc xin dạng bột, được sản xuất từ chủng vi khuẩn Pasteur Paris 1173 P2 Lot C có nguồn gốc từ chủng Calmette-Guérin.

Thử nghiệm vô trùng là một trong những thử nghiệm quan trọng được Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo

để kiểm soát chất lượng vắc xin và sinh phẩm y tế. Thử nghiệm vô trùng nhằm phát hiện tác nhân ngoại lai là các vi sinh vật sống nhiễm vào mẫu thử, phải có giá trị và độ tin cậy cao. Đánh giá sự phù hợp của quy trình kiểm tra vô trùng vắc xin, sinh phẩm y tế nhằm mục đích phát hiện trường hợp âm tính giả là cần thiết. Bên cạnh thử nghiệm đánh giá tính phù hợp của quy trình, chúng tôi đồng thời thực hiện các thử nghiệm nhằm đánh giá giá trị của thử nghiệm thẩm định. Trong đó thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh là chứng dương nhằm chứng tỏ môi trường vẫn có đủ dinh dưỡng để vi sinh vật phát triển được; chứng âm để kiểm tra thao tác thực hiện quy trình và thử nghiệm kiểm tra tính vô trùng là một chứng âm nhằm chứng tỏ vắc xin không chứa vi khuẩn, nấm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Quy trình kiểm tra vô trùng vắc xin BCG bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 04/2023 đến 04/01/2024.

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Môi trường Thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.3. Vật liệu, hoá chất phục vụ

nghiên cứu

2.3.1 Mẫu thử

Vắc xin BCG do Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) sản xuất.

Số lượng: 03 loại vắc xin phòng lao BCG [14].

Bảng 1. Mô tả mẫu thử

STT	Loại	Hạn sử dụng	Số lượng	Tài liệu tham khảo
1	573-10-22	23/9/2025	40 ống	[14,15]
2	574-10-22	23/9/2025	40 ống	
3	575-10-22	24/9/2025	40 ống	

2.3.2 Nguyên vật liệu

a. Môi trường, hóa chất

- Môi trường lỏng thioglycolate loại F/29/23; HSD: 02/01/2024

- Môi trường canh thang tryptic soy: loại T/29/23; HSD: 02/01/2024

- Thạch TSA; TSC; dung dịch nước muối sinh lý 0,9%: Pha tại NICVB

- Môi trường FTM và TSB sử dụng phải đạt tiêu chuẩn về các tiêu chí: Cảm quan, Vô khuẩn, Hóa lý (thể tích, pH), tính tăng sinh khi đưa vào nghiên cứu [6]

b. Chủng vi sinh vật thử thách [8-

10]

Bảng 2. Chủng vi sinh vật

Tên và ký hiệu	Mã chủng
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	ATCC 6633-F2
<i>Kocurina rhizophila</i> ATCC 9341	ATCC 9341-F3
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 114367	NICVB 0115

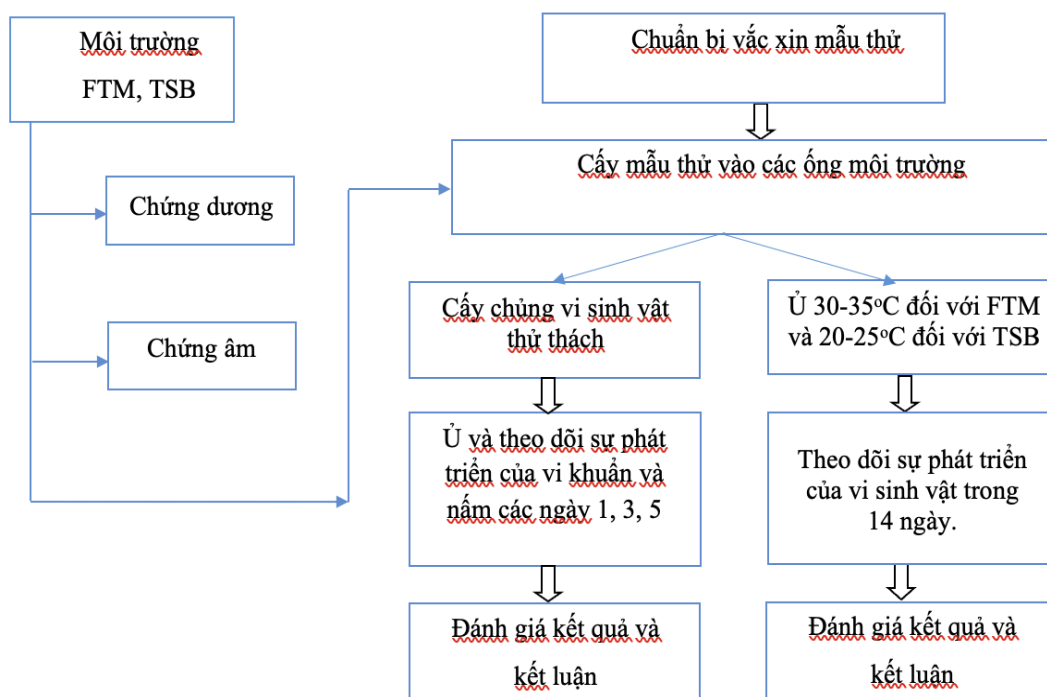
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	NICVB 0215
------------------------------------	------------

c. *Dụng cụ và trang thiết bị*
Hệ thống tủ cấy vô trùng, tủ ẩm, tủ mát, tủ lạnh, cân phân tích, máy đếm hạt bụi, máy đếm vi khuẩn và nấm

trong không khí và pipetman 50-200 μ l đã được hiệu chuẩn hàng năm theo ISO/IEC 17025.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

Hình 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu [5]



2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Thử nghiệm vô trùng

Cấy mẫu thử vào các ống môi trường, ủ các ống môi trường ở 2 nhiệt độ 30-35°C và 20-25°C. Theo

dõi sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong 14 ngày.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Không có sự phát triển của vi sinh vật trong tất cả các ống môi trường trong 14 ngày theo dõi (cả 2 loại môi trường đều trong, không bị vẩn đục. Môi trường

FTM không bị mất lớp chỉ thị màu phía trên) [5].

2.5.2. Thử nghiệm đánh giá sự phù hợp

Thực hiện thử nghiệm lặp lại 03 lần đối với mỗi loại vắc xin

- Hoàn nguyên và cấy mẫu thử vào các ống môi trường dinh dưỡng.

- Pha loãng chủng vi sinh vật *Bacillus spizizenii*, *Kocurina rhizophila*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* bằng nước muối sinh lý để đạt nồng độ 10-100 CFU.

- Cấy chủng vi sinh vật vào các ống môi trường có chứa mẫu thử: Hút 0,1ml chủng thử thách đã pha loãng cấy vào các ống môi trường có chứa mẫu thử (riêng chủng *Clostridium sporogenes* cấy 1ml).

- Cấy chủng thử thách với lượng tương đương vào thạch: Nhỏ 0,1ml huyền dịch mỗi chủng vi sinh vật đã pha loãng vào các đĩa thạch TSA x 2 đĩa để kiểm chứng số lượng chủng vi sinh vật. Chủng *Clostridium sporogenes* cấy vào ống môi trường TSC x 2 ống.

Bảng 4: Số lượng ống môi trường của mỗi chủng thử thách của mỗi lần thực hiện

Chủng	FTM	TSB
<i>Bacillus spizizenii</i>	5 ống	7 ống
<i>Kocurina rhizophila</i>	5 ống	7 ống
<i>Candida albicans</i>	5 ống	6 ống
<i>Clostridium sporogenes</i> A	5 ống	-

- Ủ các ống môi trường ở nhiệt độ thích hợp 30-35°C đối với FTM, 20-25°C đối với TSB. Đánh giá kết quả sau 3 ngày đối với vi khuẩn *Bacillus spizizenii*, *Kocurina rhizophila*, *Clostridium sporogenes* và 5 ngày đối với nấm *Candida albicans*.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Có sự phát triển của vi khuẩn, nấm trong tất cả các ống môi trường có chứa mẫu thử (ống môi trường bị vẩn đục/lắng cặn ở đáy ống/ bị mất màu chất chỉ thị đối với FTM) trong cả 3 lần thực hiện.

2.5.3. Chứng dương

Thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh của hai môi trường FTM và TSB:

- Cấy 10-100CFU chủng thử thách vào các ống môi trường FTM và TSB.

- Cấy chủng thử thách với lượng tương đương vào môi trường thạch (TSA, TSC) để kiểm tra số lượng CFU của mỗi chủng.

- Theo dõi trong vòng 3 ngày đối với vi khuẩn, 5 ngày đối với nấm và đọc kết quả.

Tiêu chuẩn chấp thuận với chứng dương: Có sự phát triển rõ rệt của vi khuẩn trong vòng 3 ngày và nấm trong vòng 5 ngày sau khi cấy vi sinh vật thử thách. Số khuẩn lạc trung bình đếm được trên các đĩa thạch đối với mỗi chủng trong khoảng 10 – 100 CFU [10,11].

2.5.4. Chứng âm

Chứng âm 1 (chứng môi trường sử dụng): Ủ 5 ống môi trường FTM ở nhiệt độ 30-35⁰C và 5 ống môi trường TSB ở nhiệt độ 20-25⁰C. Theo dõi trong vòng 14 ngày.

Chứng âm 2 (kiểm tra thao tác thực hiện quy trình thử nghiệm): Dùng pipet hút 1ml nước muối sinh lý vô

trùng vào 1 ống x 20 ống môi trường FTM và 1ml nước muối sinh lý vô trùng vào 1 ống x 20 ống môi trường TSB. Ủ các ống môi trường FTM ở nhiệt độ 30-35⁰C và các ống môi trường TSB ở nhiệt độ 20-25⁰C. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong vòng 14 ngày.

Chứng pipet: Dùng pipet hút môi trường trong một ống FTM rồi nhỏ xuống, làm tương tự với TSB. Ủ 1 ống môi trường FTM ở nhiệt độ 30-35⁰C và 1 ống môi trường TSB ở nhiệt độ 20-25⁰C. Theo dõi trong vòng 14 ngày.

Chứng giám sát môi trường trong khi thực hiện thử nghiệm: Trong quá trình thực hiện thử nghiệm vô trùng, tiến hành giám sát môi trường trong khi thực hiện thử nghiệm, bao gồm đếm số lượng hạt bụi không khí, đếm số lượng vi khuẩn và nấm trong không khí, giám sát gắng của người thực hiện, kiểm tra bề mặt tủ cấy (gồm 2 đĩa thạch mở nắp TSA và 2 đĩa thạch tiếp xúc TSA, tiến hành kiểm tra tại 2 vị trí bên trái và bên phải hood)[13].

Tiêu chuẩn chấp thuận của chứng âm: Không có sự phát triển của vi sinh vật trong tất cả các ống môi

trường trong 14 ngày theo dõi (cả 2 loại môi trường đều trong, không bị vẩn đục. Môi trường FTM không bị mất lớp chỉ thị màu phía trên).

Tiêu chuẩn chứng âm giám sát môi trường trong khi thực hiện thử nghiệm thỏa mãn tất cả các tiêu chuẩn trong bảng sau [13].

Bảng 5: Tiêu chuẩn cho phép đối với việc giám sát môi trường phòng sạch.

Thông tin	Tiêu chuẩn vi sinh				Tiêu chuẩn hạt bụi
	Thạch mở nắp (CFU/đĩa)	Lấy mẫu không khí chủ động (CFU/m ³ không khí)	Thạch tiếp xúc (CFU/đĩa)	Kiểm tra găng (CFU/đĩa)	Hạt có kích thước $\geq 0,5$ và $\geq 5\mu\text{m}$ (Số hạt/m ³ không khí)
Tiêu chuẩn cho phép	<1	<1	<1	<1	$\leq 3.520/20$

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thử nghiệm vô khuẩn

Bảng 6. Kết quả kiểm tra thử nghiệm vô khuẩn

STT	Mẫu thử	Số loạt	Kết quả	Tiêu chuẩn [10]
1.	Vắc xin BCG	573-10-22	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong 14 ngày	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong các ống môi trường
2.		574-10-22		
3.		575-10-22		

3.2. Thử nghiệm đánh giá sự phù hợp

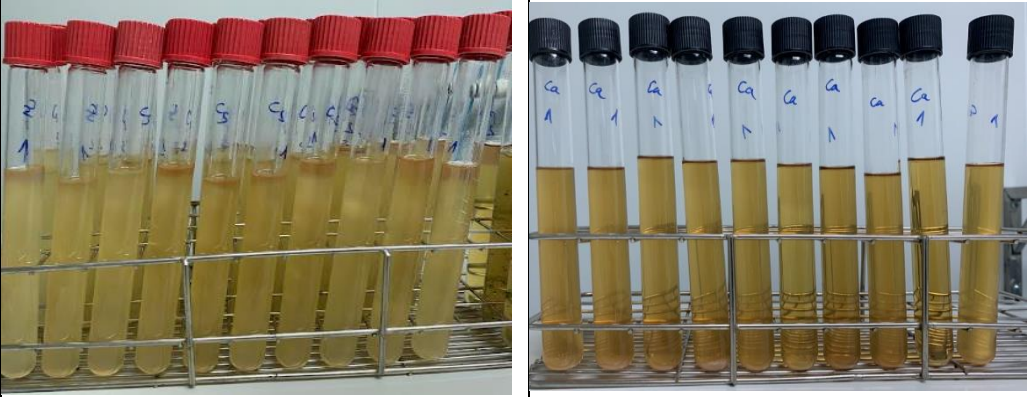
3.2.1. Kết quả cấy đếm vi sinh vật trên môi trường đặc

Bảng 7. Số lượng khuẩn lạc trên các đĩa thạch (CFU)

Chủng làm việc	Đĩa 1	Đĩa 2	Trung bình	Tiêu chuẩn [10]
<i>Bacillus subtilis</i>	45	57	51	<100
<i>Candida albicans</i>	78	93	85,5	<100
<i>Kocuria rhizophila</i>	44	45	44,5	<100
<i>Clostridium sporogenes</i>	47	52	49,5	<100

Các đĩa thạch mọc với số lượng từ 44 -93 CFU/đĩa. Số lượng CFU cấy vào mỗi chứng dương, mẫu thử thêm chủng <100 CFU.

3.2.2. Kết quả nghiên cứu trên môi trường lỏng



Mẫu thử	3 loại Vắc xin BCG	
Môi trường	FTM	TSB
Chủng VSV	<i>Bacillus spizizenii</i> ; <i>Kocurina rhizophila</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Clostridium sporogenes</i> A	<i>Bacillus spizizenii</i> ; <i>Kocurina rhizophila</i> ; <i>Candida albicans</i>
Kết quả		
	Có sự phát triển rõ rệt của vi khuẩn trong 3 ngày và nấm trong 5 ngày ở tất cả các ống môi trường sau khi cấy mẫu thử và chủng vi sinh vật thử thách	

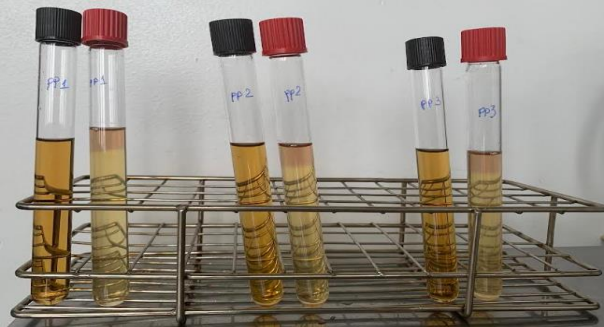
3.3. Chứng dương

Thử nghiệm kiểm tra tính tăng sinh của môi trường sử dụng: Có sự phát triển rõ rệt của vi sinh vật trong các ống cấy vi khuẩn trong vòng 3 ngày, các ống

cấy nấm trong vòng 5 ngày sau khi cấy chủng vi sinh vật thử thách với số lượng <100CFU.

3.4. Chứng âm

STT	Chứng âm	Môi trường	Mẫu thử	Kết quả
1	Kiểm tra vô khuẩn môi trường	FTM (Loại: F/29/23) và TSB (Loại: T/29/23)		 <p>Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong tất cả các ống môi trường trong 14 ngày</p>
2	Kiểm tra thao tác trong quy trình thử nghiệm		Nước muối sinh lý (loạt 256)	 <p>Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong tất cả các ống môi trường trong 14 ngày</p>

3	Chứng pipet		 <p data-bbox="714 584 1336 676">Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong tất cả các ống môi trường trong 14 ngày</p>
---	-------------	--	---

4. Bàn luận

Cả 3 lần thực hiện đều có sự phát triển rõ rệt của vi khuẩn trong vòng 3 ngày và nấm trong vòng 5 ngày sau khi cấy <100 CFU vi sinh vật thử thách trong các ống môi trường có chứa mẫu thử. Chứng tỏ quy trình có khả năng phát hiện nếu trong sản phẩm có chứa vi sinh vật (vi khuẩn/nấm) trong cả 3 loạt mẫu thử [11].

Mẫu thử không thêm chủng: 3 lô vắc xin trong nghiên cứu đạt yêu cầu về vô trùng (Thử nghiệm vô trùng cho kết quả âm tính với vi sinh vật)

Nghiên cứu chứng tỏ quy trình kiểm tra vô trùng vắc xin BCG bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp có khả năng phát hiện vi sinh vật trong mẫu thử. Do đó sự có mặt của vắc xin không ảnh hưởng đến sự phát triển của chủng.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu là đáng tin cậy. Quy trình kiểm tra vô trùng bằng phương pháp trực tiếp đối với vắc xin BCG sản xuất tại IVAC là phù hợp để thực hiện tại Viện.

Tài liệu tham khảo

[1] Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế - Hướng dẫn sử dụng vắc xin phòng lao (BCG).

[2] Cục Quản lý Dược – Bộ Y tế, 2017 “Báo cáo đánh giá đối với vắc xin ngừa lao (BCG 10 liều/ống).

[3] World Health Organization (2016), Global tuberculosis report 2015, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

[4] Tổ chức Y tế Thế giới. Tờ Thông tin Theo dõi tỷ lệ phản ứng vắc

xin. Vắc xin BCG (Bacille Calmette-Guerin). Tháng Tư năm 2012.

[5] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2023), SOP MT 01-01: Kiểm tra vô trùng vắc xin - sinh phẩm bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp.

[6] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2023), SOP MT 01-26: Thẩm định thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin, sinh phẩm bằng phương pháp cấy trực tiếp.

[7] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2023), SOP MT 02-43: Kiểm tra chất lượng môi trường.

[8] Council of Europe European, European Direction for the quality of medicine (COE-EDQM), *European*

for sterile pharmaceutical products. Geneva: WHO TRS 961, annex 6. Page 268

[14] Therapeutic Goods Administration guidelines for sterility testing of therapeutic goods September 2006, page 7-11.

[15] World Health Organization (1973). *General requirements for the*

pharmacopoeia 10th, 2.6.1. Sterility pp. 191-200.

[9] The Council of Experts and its Expert committees of the United States Pharmacopoeial convention 71 (2023), “Sterility test”, *USP 37*, pp.71-75.

[10] Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V (2017), PL15.7, trang PL-368-PL370.

[11] Pharmaceutical inspection convention/ pharmaceutical inspection co-operation scheme (September 2007), Recommendation on sterility testing”, pp.8-11.

[12] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (2023), SOP KĐQG-34: Thẩm định quy trình.

[13] World Health Organization (2011). *Good manufacturing practices sterility of biological substances*.

Technical Report Series, No. 530, Annex 4, Page 49

