

Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 60 min, tránh ánh sáng. Tiêm 0,1 ml trong da thỏ, loại có cân nặng từ 2,50 kg/con đến 3,0 kg/con, dùng 3 thỏ cho mỗi thử nghiệm. Theo dõi thỏ thử nghiệm và đo đường kính quầng đỏ trong vòng 48 h.

Cách tính hiệu giá

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu chứng chứa 1,0 ml dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn tạo phản ứng Shick với đường kính từ 12 mm đến 15 mm. Hỗn dịch nào chứa lượng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm lớn nhất tạo phản ứng Shick với đường kính 12 mm đến 15 mm tương đương với mẫu chứng chứa 1,0 ml kháng độc tố bạch hầu chuẩn sẽ có chứa 1 IU/ml.

Hiệu giá của huyết thanh kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm được tính như sau:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 1,0 \times N$$

Trong đó:

N là số lần pha loãng kháng độc tố bạch hầu thử nghiệm; 1,0 là số IU có trong dung dịch kháng độc tố bạch hầu chuẩn dùng để trung hòa 30 L⁺/30 trong thử nghiệm.

15.16 XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘC TỐ UỐN VÁN

Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván được xác định bằng cách so sánh mức độ bảo vệ giữa liều kháng độc tố uốn ván thử nghiệm và kháng độc tố uốn ván chuẩn đối với chuột nhắt trắng có cân nặng từ 16 g đến 18 g sau khi đã trung hòa một lượng cố định độc tố uốn ván.

Xác định liều độc tố uốn ván thử nghiệm (L⁺/10)

L⁺/10 là lượng độc tố uốn ván nhỏ nhất còn lại sau khi trung hòa với 0,1 IU của kháng độc tố uốn ván chuẩn đủ để gây chết 1 chuột có trọng lượng đã xác định trong thời gian 96 h.

Pha kháng độc tố uốn ván chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch kháng độc tố uốn ván chứa 0,5 IU/ml.

Pha độc tố uốn ván với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố uốn ván 3 Lf/ml đến 5 Lf/ml.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn chứa 0,5 IU/ml, một thể tích thay đổi dung dịch độc tố uốn ván (ví dụ 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml... tùy theo độc tính của độc tố uốn ván) và nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 45 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 0,5 ml dưới da lưng cho mỗi chuột nhắt, dùng 4 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong 96 h.

Cách xác định: Hỗn dịch nào có lượng độc tố thấp nhất sau khi tiêm gây chết chuột trong vòng 96 h sẽ có chứa lượng độc tố 5 L⁺/10 trong 2,5 ml hay 1 L⁺/10 trong 0,5 ml (một liều tiêm/1 chuột).

Xác định hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván

Hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván là số đơn vị quốc tế (IU) kháng độc tố uốn ván có trong 1,0 ml huyết thanh thử nghiệm.

Pha huyết thanh kháng độc tố uốn ván chuẩn với nước muối sinh lý để có dung dịch chứa 0,5 IU/ml.

Pha độc tố uốn ván với dung dịch Jensen pepton để có dung dịch độc tố uốn ván chứa 5 L⁺/10 trong 1 thể tích xác định.

Pha huyết thanh kháng độc tố uốn ván thử nghiệm với nước muối sinh lý để có các độ pha 1/2600; 1/2800; 1/3000; 1/3200; 1/3400;... tùy theo hiệu giá có thể có được của kháng độc tố uốn ván thử nghiệm.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 1 thể tích dung dịch độc tố uốn ván chứa 5L⁺/10; 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván thử nghiệm ở mỗi độ pha loãng và nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

Pha mẫu chứng: Cho vào 3 ống nghiệm lần lượt: Một thể tích dung dịch độc tố uốn ván chứa 5 L⁺/10, một trong 3 lượng 0,9 ml; 1,0 ml; 1,1 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn chứa 0,5 IU/ml và sau đó một lượng nước muối sinh lý để vừa đủ 2,5 ml trong mỗi ống nghiệm.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 45 min, tránh ánh sáng.

Tiêm 0,5 ml dưới da lưng cho mỗi chuột nhắt, dùng 4 chuột cho mỗi độ pha.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết trong 96 h.

Cách tính hiệu giá

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu chứng có chứa 0,9 ml và 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn gây chết 100 % chuột trong vòng 96 h và mẫu có chứa 1,1 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn không được gây chết chuột trong thời gian theo dõi.

Dung dịch nào có chứa lượng kháng độc tố uốn ván thử nghiệm lớn nhất không bảo vệ được chuột trong thời gian 96 h giống như mẫu chứng có chứa 1,0 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn sẽ có chứa 0,5 IU/ml.

Hiệu giá của huyết thanh kháng độc tố uốn ván được tính như sau:

$$\text{Hiệu giá (IU/ml)} = 0,5 \times N$$

Trong đó:

N là số lần pha loãng kháng độc tố uốn ván thử nghiệm; 0,5 là số IU có trong 1 ml dung dịch kháng độc tố uốn ván chuẩn dùng trong thử nghiệm.

15.17 XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ HUYẾT THANH KHÁNG ĐẠI

Hiệu giá huyết thanh kháng đại được xác định dựa trên nguyên lý của phản ứng trung hòa in vivo của một liều cố định virus đại thử thách với các độ pha loãng khác nhau của huyết thanh kháng đại. Tiến hành trên chuột nhắt trắng.

Xác định hiệu giá của virus thử thách

Chủng virus đại thử thách được dùng trong thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng đại là chủng CVS (Challenge virus strain), được giữ ở dạng hỗn dịch 20 % não chuột, bảo quản ở nhiệt độ -70 °C.

Làm tan băng nhanh ống đựng chủng virus đại thử thách dưới vòi nước chảy.

Pha loãng bậc 10 với dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 % (đã được bất hoạt 30 min ở 56 °C) để có nồng độ từ 2×10^{-2} , 2×10^{-3} ... đến 2×10^{-9} .

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml hỗn dịch virus của mỗi độ pha loãng, từ 2×10^{-4} đến 2×10^{-9} và 0,5 ml dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 %. Lắc đều các ống, để yên ở 37 °C trong 90 min.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột cho mỗi độ pha, cân nặng mỗi chuột từ 14 g đến 16 g. Các ống chủng được giữ trong nước đá trong suốt quá trình tiêm.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

Tính LD₅₀ theo Spearman - Karber.

Xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại

Pha loãng huyết thanh kháng đại chuẩn quốc tế, huyết thanh kháng đại thử nghiệm và trung hòa với virus thử thách:

Pha huyết thanh kháng đại chuẩn quốc tế với nước muối sinh lý để có dung dịch huyết thanh kháng đại chuẩn chứa 10 đơn vị quốc tế (IU)/ml.

Pha huyết thanh kháng đại thử nghiệm với nước muối sinh lý để có dung dịch huyết thanh kháng đại thử nghiệm chứa khoảng 10 IU/ml.

Pha loãng bậc 5 hai dung dịch trên với dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 % để có các độ pha 1/5; 1/25; 1/125; 1/625 và 1/3125.

Pha hỗn dịch virus thử thách đã biết hiệu giá để có 200 LD₅₀/0,03 ml.

Trong một dãy các ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml huyết thanh kháng đại ở mỗi độ pha loãng và 0,5 ml hỗn dịch virus thử thách có chứa 200 LD₅₀/0,03 ml.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 90 min.

Giữ các ống trong nước đá trong suốt quá trình tiêm.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột có cân nặng từ 14 g đến 16 g cho mỗi độ pha của kháng huyết thanh.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

Xác định số LD₅₀ của chủng virus đại trong thử nghiệm (nhóm chứng):

Từ hỗn dịch virus pha để trung hòa có chứa 200 LD₅₀/0,03 ml đã nêu ở trên, được xem là 10⁰ để từ đó pha loãng bậc 10 thành 3 độ pha 10⁻¹; 10⁻² và 10⁻³.

Trong một dãy ống nghiệm, lần lượt cho vào mỗi ống: 0,5 ml hỗn dịch virus từ mỗi độ pha và 0,5 ml dung dịch huyết thanh ngựa thường 2 %.

Lắc đều các ống nghiệm và để yên ở 37 °C trong 90 min.

Giữ các ống trong nước đá.

Tiêm 0,03 ml vào não của mỗi chuột nhất, dùng 6 chuột có cân nặng từ 14 g đến 16 g cho mỗi độ pha của hỗn dịch virus đại.

Theo dõi và ghi chép số chuột bị chết từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 20 sau khi tiêm.

Tính LD₅₀ theo bảng Spearman - Karber.

Tính kết quả

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi số LD₅₀ để trung hòa huyết thanh kháng đại là 100 LD₅₀ đến 300 LD₅₀ trong 0,03 ml.

Tính ED₅₀ của huyết thanh kháng đại theo phương pháp Spearman - Karber.

Hiệu giá của huyết thanh kháng đại được tính ra đơn vị quốc tế trong 1 ml và bằng:

Antilog(ED₅₀ huyết thanh chuẩn quốc tế: ED₅₀ huyết thanh thử nghiệm) × 2 × N

Trong đó:

2 là số IU có trong 1 ml huyết thanh kháng đại chuẩn quốc tế dùng trong thử nghiệm;

N là số lần pha loãng huyết thanh kháng đại thử nghiệm.

15.18 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ TOÀN PHẦN CỦA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM BẰNG THUỐC THỬ NESSLER

Nguyên lý

Phương pháp dựa vào tính chất của thuốc thử Nessler cho phản ứng màu với ion amoni (NH₄⁺) được tạo thành sau khi vô cơ hóa các chất protein.

Phương pháp tiến hành

a. Chuẩn bị mẫu thử

Cho 0,2 ml chế phẩm và 0,2 ml acid sulfuric (TT) vào một ống thủy tinh và đem đốt trên bếp cát. Để tăng tốc độ phản ứng, thỉnh thoảng cho vài giọt nước oxy già đậm đặc (TT) vào ống đốt sau khi làm nguội. Khi chế phẩm đã được vô cơ hóa hoàn toàn, dung dịch mất màu, cho nước cất vừa đủ b ml thu được dung dịch A.

Lấy 1 ml dung dịch A vào ống nghiệm, thêm 8,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Nessler, được mẫu thử.

b. Chuẩn bị mẫu trắng: 9,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

c. Dụng đường chuẩn

Hút dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng nitơ 0,05 mg/ml vào các ống nghiệm theo thứ tự sau: 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml và 0,7 ml. Cho nước cất vừa đủ 9,5 ml và 0,5 ml thuốc thử Nessler (TT).

Lắc đều các ống nghiệm.

Đo quang phổ ở bước sóng 420 nm.

Vẽ đường cong chuẩn.

Lượng nitơ toàn phần trong chế phẩm được tính theo công thức sau: