

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:

$$X(\%) = \frac{a \times b \times 100}{1,0 \times 0,2 \times 1000}$$

Trong đó:

- a là lượng nitơ tìm được trên đường chuẩn (mg);
- b là thể tích dung dịch A (ml);
- 100 là chuyển đổi thành phần trăm;
- 1,0 là lượng mẫu thử sau pha loãng đem so màu (ml);
- 0,2 là lượng mẫu thử đem vô cơ hóa (ml);
- 1000 là hệ số chuyển đổi g thành mg.

Dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng nitơ 0,05 mg/ml: Cân 0,2375 g amoni sulfat (đã được sấy khô trong bình hút ẩm bằng silica gel đến khối lượng không đổi), hòa tan vào vừa đủ 500 ml nước cất. Dung dịch vừa pha có hàm lượng nitơ là 0,1 mg/ml, trước khi dùng pha loãng 2 lần bằng nước cất.

Tiêu chuẩn cho phép

Hàm lượng nitơ toàn phần trong vắc xin và sinh phẩm tùy theo yêu cầu đối với từng loại vắc xin và sinh phẩm cụ thể.

15.19 THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG THÀNH PHẦN BẠCH HẦU - UỐN VÁN - HO GÀ TRONG VẮC XIN DTWP HẤP PHỤ

Các thành phần bạch hầu, uốn ván, ho gà toàn tế bào trong vắc xin DTWP hấp phụ được tiến hành kiểm tra nhận dạng theo các bước như sau:

Giải hấp phụ

Vắc xin Bạch hầu - Uốn ván - Ho gà (toàn tế bào) hấp phụ được tách gel bằng cách cho thêm natri citrat với nồng độ 5 % ở 37 °C trong 48 h. Sau đó ly tâm 2000 rpm trong 15 min. Hoặc ly tâm vắc xin ở 3000 rpm. Cho dung dịch EDTA-natri phosphat vào phần kết tủa sau ly tâm với nồng độ 20 %. Đánh đều tạo dung dịch đồng nhất. Ủ ở 37 °C trong 18 h. Ly tâm 3000 rpm trong 10 min. Nước nổi được dùng làm dung dịch kiểm tra. 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.

Nhận dạng thành phần bạch hầu và uốn ván

Phương pháp lên bông

Phương pháp tiến hành (phản ứng lên bông).

Dùng 5 ống nghiệm thủy tinh có đường kính 10 mm, đánh số thứ tự từ 1 đến 5 để làm thử nghiệm kiểm tra sự có mặt của thành phần bạch hầu.

Dùng 5 ống nghiệm thủy tinh khác có đường kính 10 mm, đánh số thứ tự từ 6 đến 10 để làm thử nghiệm kiểm tra sự có mặt của thành phần uốn ván.

Huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu hoặc uốn ván được pha loãng đến nồng độ 20 IU/ml.

Cho vào dãy ống nghiệm từ 1 đến 5 lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu tăng dần đều trong khoảng tương ứng với lượng kháng nguyên giải độc tố bạch hầu có trong nước nổi vắc xin. Tương tự, cho vào dãy ống nghiệm từ 6 đến 10 lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố uốn ván tăng dần đều trong khoảng tương ứng với lượng kháng nguyên giải độc tố uốn ván có trong nước nổi vắc xin.

Thêm nước muối sinh lý vào các ống cho đủ 1 ml.

Cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml nước nổi.

Đậy các ống nghiệm bằng giấy parafin. Lắc đều và đặt vào nồi cách thủy ở nhiệt độ 45 °C. Quan sát liên tục dưới ánh đèn, ghi nhận thời gian của ống nghiệm đầu tiên xuất hiện sự lên bông và khoảng thời gian lên bông (Kf).

Đánh giá kết quả

Hàm lượng Lf/ml của thành phần bạch hầu hoặc uốn ván tính theo công thức:

$$Lf/ml = \frac{V_c \times a}{b}$$

Trong đó:

V_c là thể tích huyết thanh chuẩn kháng độc tố ở ống đầu tiên có sự lên bông (ml).

a là số đơn vị huyết thanh chuẩn kháng độc tố (IU/ml).

b là số ml nước nổi.

Hiện tượng lên bông xảy ra chỉ chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa giải độc tố bạch hầu hoặc uốn ván chứ không phản ánh công hiệu của giải độc tố.

Ví dụ

Lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu (20 IU/ml) và lượng huyết thanh chuẩn kháng độc tố uốn ván (20 IU/ml) được cho vào các ống như sơ đồ sau:

Ống số	Thể tích huyết thanh (ml)	Ống số	Thể tích (ml)
1	0,3	6	0,16
2	0,4	7	0,18
3	0,5	8	0,20
4	0,6	9	0,22
5	0,7	10	0,24

Ống số 3 lên bông đầu tiên tức hàm lượng Lf/ml của thành phần bạch hầu có trong 1 ml vắc xin thử là:

$$(0,5 \text{ ml huyết thanh} \times 20 \text{ IU/ml}) / 1 \text{ ml} = 10 \text{ Lf/ml}$$

Tương tự, nếu thấy ống số 8 lên bông đầu tiên có nghĩa là hàm lượng Lf/ml của thành phần uốn ván có trong 1 ml vắc xin thử là 4 Lf/ml.

Hiện tượng lên bông xảy ra ở ví dụ này chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa giải độc tố bạch hầu hoặc uốn ván chứ không phản ánh công hiệu của giải độc tố.

Phương pháp khuếch tán miễn dịch kép trên thạch - Ouchterlony

Chuẩn bị các dung dịch:

Dung dịch 1: Dung dịch đệm Helena buffer