

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

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<sub>c</sub> 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*

Cân 18 g đệm Helena Buffer, hòa tan trong nước cất 3 lần, pha loãng vừa đủ 1500 ml với cùng dung môi.

**Dung dịch 2:** Dung dịch EDTA 0,15 M, được pha như sau: Cân 2,8 g EDTA, hòa tan trong 40 ml nước cất, sau đó điều chỉnh pH về  $8,0 \pm 0,3$  bằng dung dịch natri hydroxyd (TT), thêm vừa đủ 50 ml dung dịch bằng nước cất. Sử dụng trong vòng 1 tháng kể từ ngày pha.

**Dung dịch 3:** Dung dịch dinatri hydrophosphat 0,25 M, được pha như sau: Cân 4,45 g dinatri hydro phosphat (TT), hòa tan hoàn toàn trong 80 ml nước cất, thêm nước cất vừa đủ 100 ml. Sử dụng trong vòng 1 tháng kể từ ngày pha.

**Dung dịch 4:** Hỗn hợp bao gồm 0,1 ml dung dịch EDTA và 4,9 ml dung dịch dinatri phosphat.

**Dung dịch 5:** Pha loãng dung dịch kháng huyết thanh uốn ván chuẩn trong 14 ml nước cất pha tiêm để tạo thành 100 IU/ml, lấy ra mỗi tuýp ly tâm 500 µl, sau đó bảo quản ở nhiệt độ dưới  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Dung dịch 6:** Pha loãng giải độc tố uốn ván chuẩn trong 10 ml nước cất pha tiêm để tạo thành 100 IU/ml, lấy ra mỗi tuýp ly tâm 500 µl, sau đó bảo quản ở nhiệt độ dưới  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Giải hấp phụ**

Ly tâm 5 ml vắc xin cần kiểm tra ở 3000 rpm trong 10 min. Lấy 1 ml Dung dịch 4 cho vào phần kết tủa sau khi ly tâm, trộn đều (bằng vortex) để tạo được dung dịch đồng nhất. Để dung dịch thu được trong tủ ấm ở  $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  ít nhất 18 h. Tiếp tục ly tâm dung dịch ở 3000 rpm trong 10 min. Chuyển phần dịch nổi sang 1 ống sạch làm dung dịch kiểm tra.

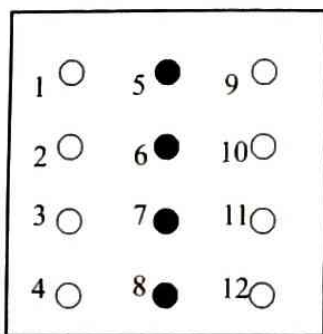
**Tiến hành**

Làm tan hoàn toàn (đến khi dung dịch trong suốt) dung dịch agarose 1 % trong Dung dịch 1, để nguội đến  $(56 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Dùng pipet 25 ml chuyển 18 ml dung dịch agarose sang bản phim gelbond đã được cố định bằng khuôn thạch.

Để mẫu cố định trong 15 min (có thể đặt vào tủ lạnh nếu cần).

Đục bản gel thành các giếng có đường kính 4 mm, như chỉ dẫn ở hình sau:



Nhỏ 10 µl antitoxin/antiserum Dung dịch 5 vào giếng 5; 6; 7; 8.

Nhỏ 20 µl Dung dịch kiểm tra (mẫu thử) vào giếng 1; 2; 3 và 10 µl vào giếng 9; 10; 11.

Nhỏ 10 µl Dung dịch 6 (chứng dương) vào giếng 4, 10 µl chứng âm vào giếng 12.

Đặt bản gel vào buồng ẩm bão hòa hơi nước trong 48 h. Làm khô hoàn toàn bản gel (cho đến khi bản gel trong suốt) bằng giấy thấm nước.

Nhuộm màu: Ngâm bản gel trong dung dịch Coomassie stain solution (1X) 10 min, trong quá trình ngâm lắc nhẹ bản gel bằng máy lắc ngang.

Tẩy màu: Chuyển bản gel vào bình chứa dung dịch Destain solution Coomassie R-250 (1X). Lắc nhẹ bản gel trong 5 min.

Rửa lại bản gel bằng nước cất.

Để khô, đọc kết quả.

**Đọc kết quả**

Quan sát đường tủa màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin tại vị trí Dung dịch kiểm tra (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7).

**Tiêu chuẩn đánh giá**

Thử nghiệm có giá trị khi tuân thủ đúng quy trình (các yếu tố, điều kiện của quá trình thực hiện là đảm bảo không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm).

Tại chứng dương, xuất hiện đường tủa của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván chuẩn.

Tại chứng âm, không xuất hiện đường tủa.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi thỏa mãn cả 3 tiêu chuẩn trên. Nếu không thỏa mãn 1 trong 3 tiêu chuẩn, thử nghiệm được coi là không có giá trị.

**Đánh giá**

Vắc xin được coi là đạt tiêu chuẩn khi tại vị trí kiểm tra dung dịch (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7) xuất hiện đường tủa màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin.

Nếu kết quả không đạt mà thử nghiệm không có giá trị, lặp lại thử nghiệm như lần đầu.

Nếu kết quả không đạt mà thử nghiệm có giá trị thì lặp lại thử nghiệm với số lượng mẫu gấp đôi lần đầu.

Ở lần lặp lại, vắc xin được coi là đạt tiêu chuẩn khi tại vị trí kiểm tra dung dịch (trong khoảng giữa giếng 1 và 9 với giếng 5, khoảng giữa giếng 2 và 10 với giếng 6, khoảng giữa giếng 3 và 11 với giếng 7) xuất hiện đường tủa màu xanh của kháng thể uốn ván chuẩn với giải độc tố uốn ván trong vắc xin. Vắc xin được coi là không đạt yêu cầu khi không có đường kết tủa ở các vị trí trên.

**Nhận dạng thành phần ho gà trong vắc xin DTWP**

Cận của vắc xin DTP hấp phụ sau khi ly tâm được ngưng kết trên phiến kính với kháng huyết thanh ho gà đặc hiệu týp 1, 2, 3.

Hiện tượng ngưng kết xảy ra chứng tỏ trong mẫu thử nghiệm có chứa vi khuẩn ho gà.

**Tiêu chuẩn chấp thuận**

Có hiện tượng lên bông khi làm phản ứng với huyết thanh chuẩn kháng độc tố bạch hầu, uốn ván và có phản ứng ngưng kết với huyết thanh chuẩn ho gà đặc hiệu týp 1, 2, 3. Hàm lượng Lf/ml của giải độc tố bạch hầu ≤ 30 Lf/ml. Hàm lượng Lf/ml của giải độc tố uốn ván ≤ 10 Lf/ml.

**15.20 XÁC ĐỊNH ĐỘC TỐ THẦN KINH TỒN DƯ TRONG VẮC XIN BẠI LIỆT UỐNG**

Khi dùng để thử nghiệm có cân nặng không dưới 1,5 kg. Dùng khi loài *Macaca* hoặc *Cercopithecus*. Hỗn dịch bán thành phẩm đã lọc phải thử song song với chế phẩm chuẩn bằng cách tiêm vào sừng trước tủy sống khi đoạn thắt lưng. Trước khi tiêm phải lấy máu khí và kiểm tra để chứng tỏ huyết thanh của chúng không chứa kháng thể trung hòa đối với từng týp virus bại liệt. Những tiêu bản tổ chức học khi đã đọc xong cần phải được lưu lại trong thời gian 10 năm để làm bằng chứng.

**Số lượng khí**

Vắc xin thử và mẫu chuẩn đồng týp cần thử nghiệm song song với số lượng khí bằng nhau. Phân chia ngẫu nhiên nhóm khí sẽ được tiêm vắc xin thử hoặc mẫu chuẩn. Phải đạt được ít nhất 11 khí dương tính cho vắc xin thử và ít nhất 11 khí dương tính cho mẫu chuẩn đối với týp 1 và týp 2 (khí dương tính là khí có những tổn thương thần kinh đặc hiệu do virus bại liệt ở hệ thần kinh trung ương nhưng không bị liệt). Đối với týp 3 phải có ít nhất 18 khí dương tính cho vắc xin thử và 18 khí dương tính cho mẫu chuẩn. Có thể tiêm một lúc nhiều loại vắc xin bán thành phẩm mà chỉ cần 1 mẫu chuẩn đồng týp.

Để có thể có được 11 và 18 khí dương tính thường là tiêm 12 và 20 khí tương ứng.

Gây mê khi bằng ketamin hydroclorid hoặc những thuốc gây mê phù hợp khác.

**Hàm lượng virus của vắc xin thử và mẫu chuẩn trong liều tiêm**

Hàm lượng virus của vắc xin thử và mẫu chuẩn đồng týp tiêm cho khí phải càng giống nhau càng tốt và nằm trong khoảng 10<sup>5.5</sup> đến 10<sup>6.5</sup> CCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Chỉ tiêm một đậm độ.

**Theo dõi khí sau tiêm**

Theo dõi khí sau tiêm từ 17 ngày đến 22 ngày để phát hiện triệu chứng nghi do virus bại liệt hoặc các virus khác. Những khí sống qua 24 h và chết trước 11 ngày sau tiêm cần phải giải phẫu để xác định xem có phải chết do virus bại liệt hay không.

Tất cả những khí chết do những nguyên nhân không phải virus bại liệt thì không tính vào kết quả nhưng vẫn phải ghi vào phiếu theo dõi.

Những khí liệt nặng hoặc hấp hối và tất cả những khí sống qua giai đoạn theo dõi đều phải giải phẫu đại thể và vi thể.

**Số lượng các tiêu bản phải đánh giá**

*Phải làm tiêu bản từng con khi để kiểm tra tổ chức học ít nhất các vùng sau:*

Tủy sống: Vùng phình lưng, vùng phình cổ.

Phần trên và phần dưới của hành tủy.

Não giữa (mesocephalon).

Cầu não, tiểu não.

Đồi thị.

Vùng vận động của vỏ não.

Tiêu bản cắt mỏng 8 μm đến 15 μm và nhuộm gallocyanin hoặc nhuộm Nissl.

*Số tiêu bản tối thiểu phải kiểm tra như sau:*

12 tiêu bản đại diện cho vùng phình lưng.

10 tiêu bản đại diện cho vùng phình cổ.

2 tiêu bản vùng hành tủy.

1 tiêu bản vùng cầu não và tiểu não.

1 tiêu bản não giữa.

Đồi thị phải và trái, mỗi bên 1 tiêu bản.

Vỏ não bán cầu phải và trái mỗi bên 1 tiêu bản.

**Cho điểm hoạt tính virus trên tiêu bản**

Dùng phương pháp cho điểm theo mức độ tổn thương để đánh giá hoạt tính của virus trong từng nửa tiêu bản. Kiểu tổn thương như là thâm nhiễm tế bào hoặc phá hủy tế bào thần kinh đều quan trọng, các tổn thương được cho điểm như sau:

Điểm 1 - Chỉ có thâm nhiễm tế bào (điểm này không đủ để tính là khí dương tính).

Điểm 2 - Thâm nhiễm tế bào và có hủy hoại neuron tối thiểu.

Điểm 3 - Thâm nhiễm tế bào với hủy hoại nhiều neuron.

Điểm 4 - Hủy hoại nhiều neuron có hoặc không có thâm nhiễm tế bào.

Ghi điểm và báo cáo theo biểu mẫu chuẩn.

Khí có tổn thương neuron nhưng không có vết tiêm vẫn được coi là khí (+).

Khí có vết tiêm trên tiêu bản nhưng không có tổn thương neuron là khí (-).

Tiêu bản có tổn thương do tiêm nhưng không có tổn thương virus đặc hiệu thì không tính điểm.

Đọc và cho điểm từng nửa tiêu bản (NTB) của vùng thắt lưng (L); cổ (C); não (B).

Điểm tổn thương của từng con khi dương tính được tính như sau:

$$LS = \frac{\frac{\text{Tổng số điểm L}}{\text{Tổng số NTB}} + \frac{\text{Tổng số điểm C}}{\text{Tổng số NTB}} + \frac{\text{Tổng số điểm B}}{\text{Tổng số NTB}}}{3}$$

**Đánh giá thử nghiệm độc tính thần kinh**

Dựa trên hoạt tính ở vùng phình lưng và mức độ lan truyền lên vùng phình cổ và não, so sánh hoạt tính giữa vắc xin thử và mẫu chuẩn.

Việc xuất xương hoặc hủy bỏ vắc xin dựa trên điểm tổng thể của toàn bộ súc vật thử nghiệm. Những khí có hoạt tính