

15.22 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN UỐN VÁN TRONG VẮC XIN HẤP PHỤ CHỨA GIẢI ĐỘC TỔ UỐN VÁN

Công hiệu của thành phần uốn ván trong vắc xin DTwP được xác định bằng phương pháp so sánh liều hữu hiệu 50 % (ED₅₀) của vắc xin chuẩn và vắc xin thử. Kết quả được tính bằng phần mềm Probit analysis (phần mềm WHO program).

Miễn dịch

Pha vắc xin

Sử dụng ít nhất 3 đến 4 độ pha loãng bậc 2 nhưng không quá 5 độ pha cho cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử trong dung dịch đệm sinh lý (dung dịch natri clorid 0,85 %).

Các độ pha vắc xin được chọn trên nguyên tắc ED₅₀ không nằm lệch ngoài khoảng giữa độ pha loãng cao nhất (liều miễn dịch thấp nhất) và độ pha loãng thấp nhất (liều miễn dịch cao nhất), có nghĩa là chọn sao cho ở độ pha loãng có thể bảo vệ được 50 % động vật thí nghiệm rơi vào giữa đường cong.

Tại mỗi phòng thí nghiệm có thể căn cứ vào các số liệu trước đó và chủng loại chuột sử dụng trong thử nghiệm để chọn độ pha phù hợp. Nếu không có các số liệu trước đó có thể tham khảo cách pha dưới đây.

Đối với vắc xin mẫu chuẩn, có thể chọn 3 độ pha bậc 2, trong đó độ pha loãng thấp nhất (độ pha đầu tiên) chứa 20 IU/ml. Các độ pha tiếp theo là 10 IU/ml và 5 IU/ml.

Đối với vắc xin thử, tùy theo hàm lượng kháng nguyên giải độc tố uốn ván chứa trong vắc xin và bản chất của loại vắc xin (hấp phụ, có hay không có thành phần ho gà) có thể chọn 1 trong 2 dải pha loãng bậc 2 với độ pha loãng đầu tiên 1/10 đến 1/15 (vắc xin TT, TD, Td) hay 1/25 đến 1/40 (vắc xin DTP, DTP - Hib - Heb...). Các độ pha tiếp theo theo bậc 2 tính từ độ pha đầu tiên.

Tiêm miễn dịch

Mỗi độ pha của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được tiêm dưới da ít nhất cho 16 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, có cân nặng mỗi chuột từ 14 g đến 20 g nhưng không được chênh lệch quá 4 g, liều tiêm mỗi con 0,5 ml. Dùng chuột cùng giới tính; nếu không cùng giới tính phải chia đều số chuột đực, cái vào các nhóm và nhốt riêng. Sau tiêm miễn dịch, chăm sóc và theo dõi chuột trong 28 ngày và tiến hành tiêm thử thách.

Tiêm thử thách

Xác định liều độc tố thử thách

Cần xác định liều độc tố uốn ván (LD₅₀) trước khi thử thách.

Liều độc tố gây chết khoảng 50 % số chuột thử nghiệm vào ngày thứ 4 (sau 96 h) được xác định là 1 LD₅₀

Tiêm thử thách

Dựa vào kết quả LD₅₀ được xác định ở trên để độ pha dung

dịch độc tố thử thách tương ứng với 100 LD₅₀/ml trong dung dịch Jensen vô khuẩn có 1 % pepton.

Sau 28 ngày toàn bộ chuột đã miễn dịch bởi vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm dưới da 0,5 ml với liều độc tố thử thách chứa 100 LD₅₀/ml (50 LD₅₀/0,5 ml).

Nhóm chuột chứng: Từ dung dịch độc tố thử thách pha thành 3 độ pha 2 LD₅₀, 1 LD₅₀, 0,5 LD₅₀. Mỗi độ pha tiêm cho 5 chuột nhắt trắng có cân nặng 16 g ± 0,3 g.

Theo dõi chuột

Theo dõi chuột thử thách hàng ngày trong 5 ngày. Ghi lại số chuột sống, chết, liệt ở mỗi độ pha miễn dịch của cả vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn.

Triệu chứng liệt uốn ván:

Liệt cứng hoặc co giật kích động (sau thử thách 2 ngày).

Chuột đi nhón cao chân và chân sau liệt co cứng tiếp đến 2 chân trước. Khi nắm vào chuột cảm thấy rất cứng do các cơ bị co cứng, cổ cong vẹo về phía lưng. Khi kích thích bằng tiếng động như quét bút trên nắp thanh lồng chuột, những chuột này sẽ phản ứng bằng cách co cứng cơ hoặc co giật.

Tính kết quả

Dựa vào số chuột sống sót trong mỗi độ pha, công hiệu được xác định bằng phương pháp Probit analysis (Phần mềm WHO program).

Thử nghiệm có giá trị tin cậy nếu

Liều độc tố thử thách chứng minh được chứa từ 50 đến 200 LD₅₀.

Ở độ pha loãng thấp nhất (liều miễn dịch cao nhất) bảo vệ được trên 50 % động vật thí nghiệm.

Ở độ pha loãng cao nhất (liều miễn dịch thấp nhất) bảo vệ được ít hơn 50 % động vật thí nghiệm. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng trên chuột của cả vắc xin chuẩn và vắc xin thử phải song song và tuyến tính.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tiêu chuẩn công hiệu của thành phần uốn ván trong vắc xin tùy theo tiêu chuẩn quy định của Tổ chức y tế thế giới cho loại vắc xin đó. Trong đó giới hạn tin cậy, công hiệu của vắc xin phải nằm trong khoảng từ 50 % đến 200 % so với công hiệu quy định và giới hạn dưới phải đạt tối thiểu bằng tiêu chuẩn công hiệu quy định của vắc xin đó.

15.23 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN BẠCH HẦU TRONG VẮC XIN HẤP PHỤ CHỨA GIẢI ĐỘC TỔ BẠCH HẦU

Xác định công hiệu của giải độc tố bạch hầu hoặc thành phần bạch hầu trong vắc xin phối hợp, hấp phụ được xác định bằng 1 trong 2 phương pháp: Thử thách trên chuột lang hoặc chuẩn độ huyết thanh chuột nhắt trên tế bào Vero.

PHƯƠNG PHÁP THỬ THÁCH TRÊN CHUỘT LANG

Miễn dịch cho chuột

Sử dụng ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 (nhưng không quá 5 độ pha) cho cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử. Mỗi độ

pha dùng ít nhất 16 chuột lang khỏe mạnh, 3 đến 5 tuần tuổi, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích nào trước đó. Cân nặng mỗi chuột từ 250 g đến 350 g. Có thể sử dụng chuột khác giới nhưng phải phân chia đều cho các độ pha vắc xin và nhốt riêng lồng.

Các vắc xin được pha bằng nước muối sinh lý vô khuẩn và lựa chọn các độ pha sao cho ED₅₀ trung bình không nằm ngoài các độ pha loãng của vắc xin. Mỗi chuột trong các nhóm miễn dịch được tiêm dưới da 1 ml huyền dịch của độ pha vắc xin tương ứng. Thời gian miễn dịch là 28 ngày. Chọn ra 3 nhóm chuột đối chứng, mỗi nhóm 4 con đến 6 con, không tiêm gì và nuôi song song với các nhóm chuột miễn dịch bởi vắc xin.

Ví dụ pha vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử như sau:
Vắc xin bạch hầu mẫu chuẩn chứa 180 IU/ống được hoàn nguyên trong 18 ml nước muối sinh lý (NMSL), pha thành ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 để có các độ pha tương ứng với 10 IU/ml; 5 IU/ml và 2,5 IU/ml như sau:

A (1/18) = 1 ống vắc xin mẫu chuẩn + 18 ml NMSL

B (1/36) = 9 ml A + 9 ml NMSL

C (1/72) = 9 ml B + 9 ml NMSL

Vắc xin mẫu thử cũng được pha thành ít nhất 3 độ pha loãng bậc 2 bằng nước muối sinh lý vô khuẩn như sau:

A (1/20) = 1 ml vắc xin mẫu thử + 19 ml NMSL

B (1/40) = 9 ml A + 9 ml NMSL

C (1/80) = 9 ml B + 9 ml NMSL

Thử thách

Độc tố bạch hầu dùng cho thử thách phải có ít nhất 10.000 LD₅₀/Lf. Sau 4 tuần, toàn bộ chuột lang đã tiêm miễn dịch được tiêm thử thách dưới da 1 ml độc tố bạch hầu chứa 100 LD₅₀/ml.

Pha loãng độc tố bạch hầu để có dung dịch chứa 1 LD₅₀, dùng tiêm dưới da cho nhóm chuột đối chứng, mỗi con 1 ml.

Theo dõi chuột hàng ngày trong 5 ngày, ghi lại số chuột sống và chết trong mỗi độ pha miễn dịch và các nhóm chuột đối chứng.

Tính kết quả

Căn cứ vào số chuột sống sót trong mỗi độ pha vắc xin vào ngày thứ 5 sau khi thử thách, công hiệu vắc xin được xác định bằng phương pháp Probit analysis.

Vắc xin đạt yêu cầu về công hiệu bạch hầu nếu có không ít hơn 30 IU trong một liều đơn vắc xin cho người với điều kiện 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được nằm trong giới hạn từ 50 % đến 200 %, hoặc khi giới hạn cận dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu ≥ 30 IU trong một liều đơn vắc xin cho người.

Thử nghiệm có giá trị khi:

Liều thử thách chứng minh chứa xấp xỉ 50 - 200 LD₅₀/ml. Giá trị ED₅₀ trung bình của vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nằm trong khoảng giữa liều miễn dịch thấp nhất và cao nhất.

Thử nghiệm cần đáp ứng được tiêu chuẩn về tính tuyến tính và tính song song giữa liều miễn dịch và sự đáp ứng của chuột giữa vắc xin chuẩn và mẫu thử.

PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ HUYẾT THANH CHUỘT NHẤT TRÊN TẾ BÀO VERO

Miễn dịch cho chuột

Mỗi vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin mẫu thử được tiến hành 4 độ pha loãng bậc 2. Các vắc xin được pha loãng bởi nước muối sinh lý vô khuẩn. Lựa chọn các độ pha vắc xin căn cứ vào hàm lượng giải độc tố bạch hầu có trong từng loại vắc xin.

Mỗi độ pha dùng ít nhất 8 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, chưa sử dụng cho bất kỳ mục đích nào trước đó. Cân nặng chuột từ 12 g/con đến 14 g/con, cùng giới (nếu khác giới phải phân đều cho các độ pha khác nhau và nhốt riêng lồng).

Mỗi chuột trong từng nhóm được tiêm dưới da 0,5 ml huyền dịch vắc xin tương ứng với từng độ pha của vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn. Thời gian miễn dịch là 5 tuần.

Ví dụ: Pha vắc xin mẫu chuẩn và thử như sau:

Vắc xin bạch hầu mẫu chuẩn chứa 688 IU được hoàn nguyên trong 8 ml nước muối sinh lý để có hỗn dịch (*) chứa 86 IU/ml. Tiếp tục pha loãng bậc 2 để có 4 độ pha A - B - C - D như sau:

A (1/2) = 8 ml (*) + 8 ml NMSL

B (1/4) = 8 ml A + 8 ml NMSL

C (1/8) = 8 ml B + 8 ml NMSL

D (1/16) = 8 ml C + 8 ml NMSL

Ví dụ vắc xin thử pha như sau:

A (1/5) = 4 ml vắc xin + 16 ml NMSL

B (1/10) = 8 ml A + 8 ml NMSL

C (1/20) = 8 ml B + 8 ml NMSL

D (1/40) = 8 ml C + 8 ml NMSL

Lấy máu và thu thập huyết thanh chuột miễn dịch

Sau khi tiêm miễn dịch 5 tuần, mỗi chuột được lấy máu riêng rẽ (lấy máu tim bằng bơm tiêm loại 1 ml vô trùng) và tách lấy huyết thanh miễn dịch. Huyết thanh được bất hoạt ở 56 °C trong 30 min. Sau đó có thể giữ các mẫu huyết thanh chuột miễn dịch ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi chuẩn độ huyết thanh trên tế bào.

Chuẩn độ kháng thể kháng bạch hầu trên tế bào Vero

Chuẩn bị tế bào Vero

Chuẩn bị môi trường M199:

Môi trường M199 bột khô hòa tan trong nước cất 2 lần. Điều chỉnh đến pH 7,0 - 7,2 bằng *dung dịch natri bicarbonat*. Môi trường nuôi cấy tế bào có chứa penicilin và streptomycin và 5 % đến 10 % huyết thanh bào thai bê.

Nuôi tế bào Vero:

Tế bào Vero giữ trong nitrogen lỏng được lấy ra và làm tan bằng nhanh dưới vòi nước. Ly tâm loại bỏ phần nước. Cặn được hòa trong môi trường M199 và nuôi trong chai nhựa

25 cm² ở 37 °C. Sau 4 đến 6 ngày, khi tế bào mọc kín thành một lớp, dùng dung dịch trypsin 0,25 % tách tế bào và cấy chuyển qua chai nuôi tế bào 75 cm². Tiếp tục ở 37 °C trong 4 ngày đến 6 ngày. Khi tế bào mọc kín thành một lớp, dùng dung dịch trypsin 0,25 % tách tế bào. Pha thành hỗn dịch tế bào có đậm độ là $2,5 \times 10^5$ tế bào/ml dùng để chuẩn độ.

Tìm liều độc tố bạch hầu ức chế tế bào Lm/10.000

Liều độc tố Lm/10.000 là liều độc tố tối thiểu sau khi trung hòa với 0,0001 IU kháng độc tố bạch hầu còn khả năng ức chế sự phát triển của tế bào Vero.

Xác định liều Lm/10.000 của độc tố bạch hầu bằng phương pháp sau đây:

Độc tố bạch hầu chuẩn được pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau trong môi trường M199 để có nồng độ khoảng 0,2 Lf/ml.

Pha loãng độc tố bạch hầu 0,2 Lf/ml trên phiên chuẩn độ từ cột 1 đến 11.

Thêm huyết thanh chuẩn kháng bạch hầu có nồng độ 0,002 IU/ml vào các giếng trên.

Sau khi ủ phiên 1 h ở nhiệt độ phòng, thêm vào tất cả các giếng dung dịch tế bào vero có nồng độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/ml.

Lắc nhẹ và dán kín phiên bằng giấy dán phiên.

Ủ ở 37 °C trong 5 ngày đến 6 ngày.

Đọc kết quả và tính liều Lm/10.000 của độc tố bạch hầu.

Chuẩn độ kháng thể kháng bạch hầu trên tế bào Vero

Mỗi phiên dùng để chuẩn độ 8 mẫu huyết thanh của 1 độ pha vắc xin.

Cho 50 µl môi trường M199 vào tất cả các giếng của phiên (trừ giếng A₁₁ và A₁₂). Riêng giếng G₁₁, G₁₂, H₁₁, H₁₂ cho 100 µl.

Lấy 8 mẫu huyết thanh chuột đã tiêm miễn dịch của mỗi độ pha vắc xin cho lần lượt vào các giếng từ A₁ đến H₁, mỗi giếng 50 µl. Pha loãng bậc 2 từ dãy số 1 đến dãy số 10. Huyết thanh chuẩn kháng bạch hầu có 10 IU/ml pha thành 0,008 IU/ml (**).

Cho 50 µl huyết thanh (**) vào các giếng A₁₁, A₁₂ và B₁₁, B₁₂. Từ B₁₁ và B₁₂ pha loãng bậc 2 xuống C₁₁, C₁₂ và D₁₁, D₁₂; sau khi pha loãng và trộn đều ở các giếng D₁₁, D₁₂ thì bỏ đi 50 µl ở mỗi giếng trong 2 giếng này.

Pha độc tố chuẩn để có liều Lm/10.000, cho 50 µl độc tố vào tất cả các giếng trừ giếng G₁₁, G₁₂, H₁₁, H₁₂ (chứng tế bào).

Lắc phiên và ủ 1 h ở nhiệt độ phòng. Cho thêm vào các giếng 50 µl hỗn dịch tế bào có đậm độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/ml. Dán kín phiên bằng màng dán phiên và để ở 37 °C trong 5 ngày đến 6 ngày. Đọc kết quả.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cách đọc và tính kết quả

Có thể đọc kết quả bằng cách trực tiếp soi các giếng chuẩn độ dưới kính hiển vi phản pha hoặc dựa vào việc đổi màu để phân biệt giếng “âm tính” và “dương tính”. Sự thay đổi màu từ đỏ sang vàng được coi như không có sự ức chế trao đổi chất do các độc tố đã bị trung hòa bởi các kháng thể kháng độc tố. Hiệu giá kháng thể được tính theo điểm là giếng cuối cùng vẫn còn tế bào mọc (môi trường có màu vàng).

Căn cứ vào số giếng “dương tính”, tính kết quả theo phần mềm Parallel line (phần mềm WHO program).

Thử nghiệm có giá trị khi:

Giếng A₁₁ - D₁₁ và A₁₂ - D₁₂ cho thấy rõ liều Lm/10.000 được pha đúng: Sau 6 ngày không xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng A₁₁ - A₁₂ và B₁₁ - B₁₂ (màu vàng). Ngược lại có xảy ra sự ức chế trao đổi chất ở giếng C₁₁ - C₁₂ và D₁₁ - D₁₂ (màu đỏ).

Sự ức chế trao đổi chất sẽ xảy ra ở giếng E₁₁ - E₁₂ và F₁₁ - F₁₂ (màu đỏ) là những giếng chứng độc tố (không có kháng huyết thanh để trung hòa độc tố nên độc tố đã gây hủy hoại tế bào).

Ở các giếng G₁₁ - G₁₂ và H₁₁ - H₁₂ các tế bào phát triển bình thường và môi trường có màu vàng, đó là những giếng chứng tế bào (không có độc tố và kháng huyết thanh bạch hầu).

Thử nghiệm phải đạt được các tiêu chuẩn đặt ra trong thử nghiệm Parallel line nghĩa là phải tạo được đường thẳng và đường song song trong mỗi tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng.

Trị số Yg của vắc xin chuẩn (là số các giếng dương tính trung bình ở mỗi độ pha vắc xin) sẽ phải nằm trong giá trị trung bình tích lũy $\pm 2SD$ của tất cả các thí nghiệm tiến hành trước đó.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Vắc xin đạt yêu cầu về công hiệu bạch hầu nếu có không ít hơn 30 IU trong một liều đơn vắc xin cho người với điều kiện 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được nằm trong giới hạn từ 50 % đến 200 %, trừ khi giới hạn cận dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu ≥ 30 IU trong liều đơn vắc xin cho người.

Nếu kết quả không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm có giá trị (valid test) thì phải nhắc lại thử nghiệm trên mẫu huyết thanh miễn dịch còn lưu và làm thử nghiệm kép. Kết quả sẽ là giá trị trung bình của 2 thử nghiệm nhắc lại. Nếu thử nghiệm nhắc lại đạt yêu cầu thì loạt vắc xin được coi là đạt công hiệu thành phần bạch hầu. Nếu thử nghiệm nhắc lại không đạt yêu cầu, loạt vắc xin bị coi là không đạt công hiệu thành phần bạch hầu và phải hủy bỏ.

Nếu kết quả không đạt yêu cầu nhưng thử nghiệm không có giá trị (invalid test) thì chỉ cần nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu và số lượng chuột bằng lần 1 (trình tự thử nghiệm lặp lại giống lần 1). Nếu ở lần thử nghiệm nhắc lại vẫn không đạt yêu cầu thì loạt vắc xin bị coi là không đạt yêu cầu về công hiệu thành phần bạch hầu và phải hủy bỏ.

15.24 XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN HO GÀ TOÀN TẾ BẢO TRONG VẮC XIN PHỐI HỢP, HẤP PHỤ

Công hiệu của vắc xin ho gà trong vắc xin được xác định bằng cách so sánh liều hữu hiệu 50 % (ED₅₀) của vắc xin mẫu chuẩn so với vắc xin mẫu thử. Kết quả được tính bằng phương pháp Probit analysis (phần mềm WHO program).

Pha vắc xin

Sử dụng ít nhất 3 độ pha loãng bậc 5 nhưng không quá 5 độ pha cho cả vắc xin chuẩn và vắc xin thử. Pha vắc xin trong một loại dung dịch đệm sinh lý (dung dịch natri clorid 0,85 %). Các độ pha vắc xin được chọn dựa vào các số liệu trước đó và tùy thuộc vào chủng loại chuột thí nghiệm nhưng phải dựa trên nguyên tắc ED₅₀ không được lệch ngoài khoảng giữa độ pha loãng cao nhất và độ pha loãng thấp nhất.

Nếu không có sẵn số liệu trước đó có thể pha 3 độ pha bậc 5 của vắc xin chuẩn và vắc xin thử như ví dụ dưới đây:

Vắc xin mẫu chuẩn

A = 1/30 =	1 ống mẫu chuẩn	+ 30 ml NMSL
B = 1/150 =	5 ml A	+ 20 ml NMSL
C = 1/750 =	5 ml B	+ 20 ml NMSL

Vắc xin DTwP mẫu thử

A = 1/5 =	5 ml vắc xin mẫu thử	+ 20 ml NMSL
B = 1/25 =	5 ml dung dịch A	+ 20 ml NMSL
C = 1/125 =	5 ml dung dịch B	+ 20 ml NMSL

Tiêm miễn dịch

Chọn chuột nhất trắng có cân nặng từ 10 g đến 18 g, nhưng các chuột trong một thử nghiệm không được chênh lệch khối lượng quá 4 g. Dùng chuột cùng giới, nếu khác giới phải chia đều số chuột đực, cái vào các nhóm và nhốt riêng. Chuột được tiêm miễn dịch sau khi đã được ăn uống đầy đủ 1 h. Tiêm ổ bụng 0,5 ml/chuột. Mỗi độ pha vắc xin tiêm cho một nhóm chuột, số lượng chuột trong mỗi nhóm tùy theo kết quả thẩm định thử nghiệm nhưng không được ít hơn 20 chuột. Tiêm miễn dịch theo thứ tự từ độ pha loãng

nhất (từ độ pha C đến A) cho cả loạt vắc xin mẫu thử và mẫu chuẩn.

Bốn nhóm chuột đối chứng: Mỗi nhóm 10 con, được nuôi song song với nhóm chuột miễn dịch dùng để kiểm chứng độc lực của chủng thử thách.

Trong thời gian miễn dịch (14 ngày đến 17 ngày), chuột phải khỏe và tăng trọng bình thường, ít nhất 94 % số chuột đã được miễn dịch ở mỗi độ pha của cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thử nghiệm phải được sống sót và khỏe mạnh cho đến ngày thử thách.

Tiêm thử thách

Sau 14 ngày đến 17 ngày miễn dịch, chuột được thử thách với chủng *B. pertussis* 18323. Chủng thử thách có thể dùng chủng tươi hoặc chủng ở dạng huyền dịch đông băng (10 tỷ vi khuẩn ho gà) được bảo quản trong nitơ lỏng. Chủng thử thách được pha trong dung dịch casein 1 %. LD₅₀ của chủng thử thách phải nằm trong khoảng 100 đến 1000 vi khuẩn.

Cách pha dung dịch casein 1 %

Hòa tan 10 g bột casein trong 1000 ml nước cất 2 lần, cho thêm 2,3 g natri clorid. Điều chỉnh đến pH 7 - 7,2 bằng dung dịch natri hydroxyd hoặc acid hydrocloric loãng. Hấp 121 °C trong 30 min.

Dung dịch casein 1 % phải được kiểm tra an toàn bằng cách tiêm vào não cho 5 chuột nhất, mỗi con 0,02 ml. Theo dõi 3 ngày, toàn bộ chuột thí nghiệm phải sống. Nếu có 1 chuột chết phải pha lại dung dịch.

Cách pha hỗn dịch vi khuẩn để kiểm tra liều LD₅₀ và để thử thách

Chủng *B. pertussis* 18323 được cấy truyền đời 2 hoặc đời 3 trên môi trường Bordet - Gengou có chứa ≥ 15 % máu động vật phù hợp, huyền dịch vi khuẩn ho gà gặt từ nuôi cấy 20 h đến 22 h được dùng để pha thành hỗn dịch thử thách hoặc sử dụng huyền dịch vi khuẩn ho gà đậm độ 10 tỷ vi khuẩn/ml đã bảo quản trong nitơ lỏng để pha dung dịch thử thách. Trong khi pha cũng như trong khi tiêm thử thách, hỗn dịch vi khuẩn ho gà phải giữ trong đá lạnh. Thời gian bắt đầu pha đến khi tiêm xong hỗn dịch vi khuẩn thử thách không được quá 150 min. Xác định đậm độ vi khuẩn ho gà bằng mắt thường khi so với ống độ đục chuẩn quốc tế 10 IOU hoặc đo OD bằng máy quang phổ kế để tính số vi khuẩn ho gà trong hỗn dịch gặt. Pha loãng huyền dịch vi khuẩn ho gà bằng casein 1 % để có nồng độ là 10 × 10⁹ vi khuẩn/ml (*). Nếu sử dụng chủng ho gà được bảo quản trong nitơ lỏng thì phải làm tan băng nhanh trước khi thử thách. Các độ pha loãng của chủng ho gà được pha theo sơ đồ dưới đây (Ví dụ 1) trong dung dịch casein 1 %.

Tiêm chuột

Sau 14 ngày đến 17 ngày, toàn bộ chuột đã miễn dịch bởi vắc xin mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm thử thách vào não, mỗi con nhận 0,02 ml hỗn dịch chứa 100.000 vi khuẩn (độ pha A5) bằng một bơm tiêm bán tự động Hamilton.