

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.

Ví dụ 1: Sơ đồ các độ pha loãng của chủng ho gà trong dung dịch casein 1 %
Chủng *B. pertussis* 18323 giữ trong nitrogen lỏng là $10 \times 10^9/\text{ml}$ (*) = A_0

A1	=	1/2	=	$5 \times 10^9 / \text{ml}$	=	1 ml A_0	+	1 ml đệm Casein 1 %
A2	=	1/4	=	$5 \times 10^9 / 2 \text{ ml}$	=	1 ml A1	+	1 ml đệm Casein 1 %
A3	=	1/40	=	$5 \times 10^6 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A2	+	9 ml đệm Casein 1 %
A4	=	1/400	=	$5 \times 10^5 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A3	+	9 ml đệm Casein 1 %
A5	=	1/2000	=	$100.000 / 0,02 \text{ ml}$	=	3 ml A4	+	12 ml đệm Casein 1 %
A6	=	1/20.000	=	$10.000 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A5	+	9 ml đệm Casein 1 %
A7	=	1/100.000	=	$2000 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A6	+	4 ml đệm Casein 1 %
A8	=	1/500.000	=	$400 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A7	+	4 ml đệm Casein 1 %
A9	=	1/2.500.000	=	$80 / 0,02 \text{ ml}$	=	1 ml A8	+	4 ml đệm Casein 1 %

Nhóm chuột đối chứng, mỗi nhóm 10 con được tiêm với các độ pha từ A6 đến A9 tương ứng với hỗn dịch chứa 10.000 vi khuẩn; 2000 vi khuẩn; 400 vi khuẩn và 80 vi khuẩn.

Độ pha hỗn dịch chứa 80 vi khuẩn sẽ được cấy ít nhất trên 2 đĩa thạch Bordet Gengou sau khi pha xong hỗn dịch và sau khi kết thúc tiêm thử thách. Ủ đĩa thạch ở 35 °C trong 3 ngày đến 4 ngày, đếm số khuẩn lạc mọc. Thông thường số khuẩn lạc đạt khoảng 30 %.

Lưu ý:

Trong quá trình pha và tiêm thử thách, dung dịch chủng phải luôn giữ trong đá lạnh.

Thời gian tính từ khi bắt đầu pha chủng đến khi kết thúc thử nghiệm không được quá 2,5 h.

Tất cả vật liệu chứa chủng ho gà đều phải tiệt trùng bằng nồi hấp 121 °C trong 15 min đến 20 min hoặc luộc sôi trong 30 min trước khi rửa dụng cụ.

Những chuột chết trong 3 ngày đầu sau tiêm thử thách được coi là chuột chết không mang tính đặc hiệu của ho gà. Do đó chỉ những chuột chết từ ngày thứ 4 đến ngày 14 mới được tính kết quả.

Ngày thứ 14 sau thử thách: Tất cả những chuột chết, hay có dấu hiệu liệt rõ và sưng phồng tấy đầu đều được tính là chuột chết.

Tính kết quả

Dựa vào số chuột sống sót trong mỗi nhóm chứng, dùng phương pháp Reed Muench để tính LD_{50} của chủng thử thách. Xem ví dụ 2.

Theo ví dụ trên, LD_{50} nằm trong khoảng giữa 2 liều 2000 và 400 vi khuẩn, số % chuột chết tương ứng với liều sát trên 50 % là 76 %, số % chuột chết tương ứng liều sát dưới 50 % là 37 %

Ví dụ 2

Số vi khuẩn	Số chuột	Số sống	Số chết	Số tích lũy		Tổng số	% Chết
				Sống	Chết		
10.000	10	1	9	1	22	23	95
2000 (B)	10	3	7	4	13	17	76 (b)
400 (A)	10	6	4	10	6	16	37 (a)
80	10	8	2	18	2	20	10

Tính LD_{50} công thức sau:

$$\lg LD_{50} = \lg A + \frac{50 - a}{b - a} \times \lg f$$

Trong đó:

A là liều gây chết vừa sát dưới 50 % (trong ví dụ trên là 400);

A là % chết tương ứng với A (trong ví dụ trên là 37 %);

B là liều gây chết vừa sát trên 50 % (trong ví dụ trên là 2000);

b là % chết tương ứng với B (trong ví dụ trên là 76 %);

f là hệ số pha loãng (trong thử nghiệm này là pha loãng bậc 5).

Thay bằng con số cụ thể là:

$$\lg LD_{50} = \lg 400 + \frac{50 - 37}{76 - 37} \times \lg 5$$

$LD_{50} = 680$ vi khuẩn

Dùng phần mềm Probit analysis của WHO program để tính công hiệu của vắc xin ho gà.

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi:

ED_{50} của vắc xin chuẩn và ED_{50} vắc xin thử nghiệm nằm giữa độ pha loãng nhất và độ pha đặc nhất của các vắc xin đó.

Trong suốt thời gian miễn dịch cho đến ngày thử thách số chuột trong mỗi độ pha không được chết quá 6 %.

Liều thử thách phải chứa 100 đến 1000 LD_{50} , như vậy liều LD_{50} phải chứa 100 đến 1000 vi khuẩn.

Thử nghiệm phải đạt được tiêu chuẩn của chương trình Probit Analysis. Yêu cầu thể hiện bằng sự tương quan giữa liều miễn dịch và đáp ứng trên chuột (tính tuyến tính) và tương quan giữa vắc xin chuẩn và vắc xin thử (tính song song).

Tiêu chuẩn chấp thuận

Vắc xin đạt yêu cầu nếu công hiệu không ít hơn 4 IU trong một liều đơn vắc xin cho người và giới hạn dưới của 95 % khoảng tin cậy của công hiệu tìm được không ít hơn 2 IU trong một liều đơn vắc xin cho người.

Nếu thử nghiệm lần 1 có giá trị (valid) và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nhưng nếu không đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì thử nghiệm đó phải được làm nhắc lại. Công hiệu vắc xin đạt tiêu chuẩn chấp thuận khi kết quả trung bình nhân của các lần thử nghiệm có giá trị không thấp hơn tiêu chuẩn chấp thuận cho phép.

Nếu lần 1 không đạt yêu cầu và thử nghiệm không có giá trị (invalid) thì phải làm lại thử nghiệm. Kết quả lần thử nghiệm đầu sẽ không được dùng để xem xét. Nếu kết quả lần thử nghiệm nhắc lại có giá trị và đạt tiêu chuẩn chấp thuận thì loạt vắc xin đó coi như đạt yêu cầu về công hiệu. Nếu không đạt yêu cầu thì phải làm lại như ở trên.

15.25 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG FORMALDEHYD TỒN DƯ TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Có hai phương pháp xác định hàm lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm như sau:

Phương pháp 1: Dựa vào phản ứng tạo chất màu chinol dưới tác dụng của thuốc thử fuchsin và aldehyd hòa tan trong nước.

Phương pháp 2: Định lượng formaldehyd bằng cách so màu của 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin ở bước sóng 415 nm. Phức hợp tạo thành có màu vàng chanh do phản ứng của formaldehyd tự do trong mẫu thử với acetylaceton và amoni trong môi trường acid nhẹ.

Cách tiến hành

Phương pháp 1

Lấy 1 ml mẫu thử, cho nước cất vừa đủ 5 ml, thêm vào 1 ml thuốc thử fuchsin acid, trộn đều; đặt ống nghiệm bằng nút cao su và đợi 1 h. Đo mật độ quang học của dung dịch bằng kính lọc màu tím than (bước sóng $400\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$).

Tiến hành làm song song trên mẫu trắng theo trình tự như trên nhưng thay 1 ml mẫu thử bằng 1 ml nước cất.

Kết quả xác định được bằng cách so màu của mẫu vắc xin thử với dung dịch chuẩn có mật độ quang học gần nhau nhất.

Dụng cụ chuẩn:

Lấy 1 ml dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 % thêm nước cất vừa đủ 100 ml vào (dung dịch 0,004 %).

Lấy 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml dung dịch chuẩn formaldehyd 0,004 % cho vào các ống nghiệm và cho nước cất vừa đủ 5,0 ml, thêm 1,0 ml dung dịch thuốc thử. Đợi 1 h sau đó tiến hành phân tích như đã mô tả ở trên.

Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,4 %: Trước khi pha tiến hành xác định sơ bộ hàm lượng formaldehyd có trong dung dịch formaldehyd (dung dịch phải chứa không ít hơn 37 % formaldehyd). Cân 1 g dung dịch formaldehyd 40 % (cân chính xác, trong trường hợp dung dịch chứa ít

hơn 40 % thì phải tính toán lại cho thích hợp) cho vào một bình định mức 100 ml, cho nước cất vừa đủ tới vạch (dung dịch 0,4 %). Trước khi dùng pha loãng 100 lần.

Cách pha thuốc thử fuchsin: Hòa tan 2 g fuchsin kiềm vào 120 ml nước cất đã đun sôi, để nguội. Hòa 2 g natri sulfat (TT) vào 20 ml nước cất và trộn vào dung dịch trên, thêm 2 ml acid hydrocloric (TT). Cho nước cất vừa đủ 200 ml và chờ ít nhất 1 h mới đem sử dụng. Dung dịch này phải luôn luôn mới.

Phương pháp 2

Lấy khoảng 3 ml đến 4 ml mẫu thử ly tâm 4000 rpm trong 10 min, lấy phần nước (nếu mẫu thử trong thì không cần ly tâm). Pha loãng mẫu thử nếu cần thiết.

Lấy chính xác 3 ml mẫu thử cho vào ống nghiệm.

Dụng cụ chuẩn: Pha loãng 10 lần dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %, từ đó pha các dung dịch formaldehyd chuẩn 0,0002 %; 0,0004 %; 0,0008 %; 0,0012 %.

Lấy chính xác 3 ml các dung dịch chuẩn đã pha loãng vào các ống nghiệm.

Mẫu trắng dùng 3 ml nước cất.

Thêm 3 ml dung dịch acetylaceton vào mỗi ống nghiệm đựng mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử.

Lắc đều, đun cách thủy 100°C trong 15 min.

Để nguội ở nhiệt độ phòng.

Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 415 nm.

Cách tính kết quả:

$$X = n \times a$$

Trong đó:

X là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử (%);

a là hàm lượng formaldehyd có trong mẫu thử tìm được trên đường chuẩn (%);

n là độ pha loãng mẫu.

Cách pha dung dịch formaldehyd chuẩn 0,04 %: Cân 311 mg hexamethylentetramin hòa tan trong vừa đủ 1000 ml nước cất, dung dịch có chứa 0,04 % formaldehyd, bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng dùng trong 6 tháng.

Cách pha dung dịch acetylaceton: Cân 150 g amoni acetat (TT), hòa tan trong khoảng 500 ml nước cất. Thêm 3 ml acid acetic đậm đặc (TT), 2 ml acetylaceton (TT), khuấy đều, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml. Bảo quản dung dịch ở 2°C đến 8°C , dùng trong 2 tháng.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Mỗi loại vắc xin, sinh phẩm có tiêu chuẩn khác nhau. Các tiêu chuẩn này dựa theo quy định của WHO cho từng loại vắc xin và sinh phẩm. Tuy nhiên, lượng formaldehyd tồn dư trong vắc xin, sinh phẩm không được vượt quá 0,02 %.

15.26 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NATRI CLORID VỚI SỰ CÓ MẶT CỦA PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG GIÁN TIẾP (PHƯƠNG PHÁP CHARPENTIER-VOLHARD)

Nguyên lý

Phương pháp dựa trên phản ứng của ion Cl^- với một lượng bạc nitrat thừa.