

lần bằng nước cất 2 lần tính theo thể tích và đun nhẹ bình số 1 (chứa mẫu vắc xin thử) trong cách thủy cho đến khi tan hết. Thêm vào mỗi bình 5 ml *dung dịch kali permanganat 5 % (TT)*, lắc đều và để yên trong 1 h.

Loại bỏ *kali permanganat* thừa bằng cách thêm 1,5 ml *dung dịch hydroxylamin clorid 10 % (TT)*, thêm 35 ml nước cất 2 lần, 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và trộn đều. Dùng buret thêm chính xác vào mỗi bình 10 ml *dung dịch dithizon 0,001 %* và lắc 30 s.

Chuyển toàn bộ dung dịch thử của từng bình vào mỗi bình lắng gạn riêng biệt, tách lớp cloroform qua một lớp bông đã hấp và sấy khô vào các ống nghiệm. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm (Phụ lục 4.1).

Hàm lượng thimerosal (X %) có trong vắc xin thử được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{a \times 100 \times 100}{0,2 \times 49,55 \times 1.000.000} = a \times 0,00101$$

Trong đó:

a là lượng thủy ngân (μg) xác định được theo đường chuẩn;

0,2 là số ml dung dịch vắc xin thử;

49,55 là hàm lượng thủy ngân có trong 100 phần của thimerosal;

100 là 100 phần thimerosal;

100 là đổi ra phần trăm;

1.000.000 là hệ số chuyển đổi từ μg sang g.

Cách dựng đường chuẩn:

Cân chính xác 0,5 g thủy ngân, hòa vào 15 ml *acid nitric (TT)* và thêm nước cất vừa đủ 500 ml, được dung dịch thủy ngân có hàm lượng 1 mg/ml (DD*). Xác định hàm lượng thủy ngân như sau: Lấy 10 ml DD*, cho thêm 10 giọt *dung dịch phenyl sắt amoni 10 %* và chuẩn độ từ từ với *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* cho đến khi xuất hiện màu da cam.

1 ml *dung dịch amoni sulfocyanid 0,01 N (CĐ)* tương đương với 0,001003 g thủy ngân.

Lấy 5 bình nút mài có dung tích 100 ml để tiến hành song song 5 thí nghiệm với 5 mẫu: 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml dung dịch thủy ngân chuẩn trên. Thêm vào mỗi bình 1,2 ml *acid sulfuric (TT)* đã pha loãng 2 lần bằng nước cất 2 lần và 30 ml nước cất 2 lần. Nếu không có nước cất 2 lần thì sử dụng nước xử lý dithizon như sau: Cho vào mỗi bình gạn 10 ml *dung dịch dithizon (TT)* (0,01 g/L), sau đó tách phần cloroform ra. Nếu màu của dithizon thay đổi thì làm đi làm lại vài lần cho đến khi màu của dithizon không thay đổi. Thêm 5 ml *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)* và 5 ml *dung dịch acid acetic 6 M (TT)* và tiến hành tiếp tục như đối với mẫu kiểm tra ghi ở phần trên. Các kết quả thu được cho phép lập một đường chuẩn về thủy ngân.

Cách pha dung dịch dithizon 0,001 %:

Cân chính xác 10 mg *dithizon (TT)* hòa tan vào *cloroform (TT)* và thêm vừa đủ 100 ml với cùng dung môi.

Bảo quản dung dịch ở chỗ tối 4 °C đến 8 °C trong vòng 1 tháng. Trước khi dùng pha loãng 10 lần.

Phương pháp vi sinh vật

Nguyên lý:

Phương pháp thực hiện dựa trên sự hình thành vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật được tạo bởi dung dịch thimerosal chuẩn và thimerosal có trong mẫu thử; so sánh đường kính vòng ức chế vô khuẩn.

Cách tiến hành:

Pha thạch thường, đun nóng chảy hoàn toàn và đổ thạch dày 4 mm lên một phiến kính hình chữ nhật phẳng. Để thạch nguội hoàn toàn, đục lỗ thạch (đường kính 8 mm) sao cho khoảng cách giữa các lỗ thạch ít nhất là 30 mm. Cấy chủng *Staphylococcus aureus* trên thạch nghiêng, ủ ở 37 °C trong 18 h đến 24 h. Gặt và pha vi khuẩn bằng nước muối sinh lý vô khuẩn thành huyền dịch 10^9 vi khuẩn/ml. Lắng đều huyền dịch vi khuẩn (0,5 ml/đĩa thạch) trên đĩa thạch đã đục lỗ. Nhỏ vào mỗi lỗ 100 μl dung dịch thimerosal chuẩn nồng độ 1 g/L ở các độ pha loãng 1/2,5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Ủ ở 37 °C trong 24 h.

Đọc kết quả:

Đo đường kính các vùng ức chế vi khuẩn mọc của các đậm độ thimerosal chuẩn, xây dựng đường chuẩn. Dựa vào đường chuẩn và đường kính vùng ức chế của vắc xin mẫu thử để tính ra hàm lượng thimerosal có trong vắc xin mẫu thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Hàm lượng thimerosal trong mỗi vắc xin và sinh phẩm có thể khác nhau tùy theo yêu cầu cụ thể, nhưng không được thấp hơn hàm lượng cho thấy có khả năng kháng khuẩn và không cao hơn 115 % hàm lượng thimerosal ghi trên nhãn. Yêu cầu chung cho hàm lượng thimerosal trong các vắc xin và sinh phẩm có sử dụng thimerosal làm chất bảo quản đều không được vượt quá 0,02 % trừ khi có chỉ dẫn khác.

15.31 XÁC ĐỊNH HIỆU LỰC VẮC XIN DẠI THEO PHƯƠNG PHÁP NIH

Nguyên lý

Thử nghiệm NIH (National Institute of Health - USA) được Tổ chức Y tế Thế giới chính thức công nhận để kiểm tra công hiệu vắc xin dại bất hoạt. Công hiệu vắc xin dại được xác định bằng cách so sánh liều hữu hiệu bảo vệ chuột chống lại liều gây chết của virus dại với một vắc xin dại mẫu chuẩn đã biết trước công hiệu (IU/ml). Thử nghiệm được tiến hành song song 2 vắc xin (mẫu thử và mẫu chuẩn), sau 14 ngày thử thách với cùng 1 liều chủng virus thử thách CVS.

Phương pháp tiến hành

Pha vắc xin và gây miễn dịch:

Pha vắc xin mẫu chuẩn bằng nước vô khuẩn để tiêm (hoặc PBS pH 7,2 - 7,4) để có được độ pha có chứa khoảng 2 IU/ml. Phân chia vào các ống một lượng vắc xin đủ dùng cho một lần pha tiêm miễn dịch. Bảo quản ở -20 °C.

Pha vắc xin thử: Nếu là vắc xin đông khô phải hoàn nguyên bằng nước hồi chinh cho tới nồng độ liều tiêm cho người. Dung dịch vắc xin chuẩn và dung dịch vắc xin thử đã hoàn nguyên tiếp tục được pha loãng thành ít nhất 3 độ pha trong nước muối sinh lí (hoặc PBS). Các độ pha được chọn sao cho có ED₅₀ trung bình không nằm ngoài các độ pha loãng của vắc xin mẫu thử và vắc xin mẫu chuẩn, thường sử dụng độ pha loãng bậc 5 là 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 để pha tiêm miễn dịch.

Gây miễn dịch: Mỗi độ pha loãng vắc xin được gây miễn dịch cho ít nhất 16 chuột nhắt trắng, 11 g đến 15 g. Mỗi chuột tiêm 0,5 ml vào phúc mạc. Tiêm 2 mũi vào ngày 0 và ngày 7.

Nhóm chuột đối chứng gồm 40 con được nuôi song song trong cùng điều kiện với nhóm chuột miễn dịch. Chuột đối chứng được dùng để chuẩn độ hiệu giá chủng virus thử thách, mỗi độ pha loãng tiêm 10 chuột.

Pha chủng CVS và thử thách.

Nhóm chuột miễn dịch được tiêm thử thách với liều trong khoảng từ 10 đến 100 LD₅₀. Thường dùng liều thử thách có chứa 25 đến 50 LD₅₀.

Ví dụ: sau 5 lần chuẩn độ hiệu giá chủng CVS là 10^{-6,81}. Như vậy để có được liều 25 LD₅₀ phải dùng độ pha đậm đặc hơn 1,4 log tức là độ pha 10^{-5,4}.

Cách pha cụ thể:

Dùng huyết thanh ngựa 2 % pha hỗn dịch CVS 20 % để có được hỗn dịch 10 % (hỗn dịch A). Sau đó pha tiếp:

	Độ pha loãng	Ký hiệu
0,3 ml A + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 ⁻²	B
0,3 ml B + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 ⁻³	C
0,3 ml C + 2,7 ml huyết thanh 2 %	10 ⁻⁴	D
1 ml D + 24 ml huyết thanh 2 %	10 ^{-5,4}	E

Lấy độ pha E tiêm cho tất cả nhóm chuột miễn dịch, mỗi chuột tiêm 0,03 ml vào não.

Để chuẩn độ hiệu giá chủng CVS thử thách thực tế trong thử nghiệm, tiếp tục pha loãng bậc 10 từ hỗn dịch E (10^{-5,4}) để có các độ pha 10^{-6,4}, 10^{-7,4}, 10^{-8,4}. Mỗi độ pha chủng CVS tiêm vào não cho 10 chuột, mỗi chuột 0,03 ml.

Theo dõi và đọc kết quả:

Sau khi tiêm thử thách, theo dõi các nhóm chuột trong vòng 14 ngày. Những chuột liệt hoặc chết từ ngày thứ 5 mới được tính vào kết quả. Những chuột có dấu hiệu co giật, liệt, rối loạn vận động được coi như chết vì bệnh dại. Cần ghi chép kết quả hàng ngày. Đọc và tính kết quả cuối cùng vào ngày thứ 14 sau tiêm thử thách.

Tính kết quả:

Hiệu giá chủng thử thách CVS tính theo phương pháp Reed-Muench.

Công hiệu (ED₅₀) tính theo chương trình Probit analysis.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Vắc xin dại phải đạt công hiệu ≥ 2,5 IU/liều.

15.32 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ PROTEIN 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 protein.

Phương pháp tiến hành

Chuẩn bị mẫu thử

Cho 1 ml chế phẩm và 1 ml *dung dịch acid trichloroacetic 20 % (TT)* vào một ống ly tâm 10 ml, để ở nhiệt độ 4 °C đến 8 °C trong 10 h đến 12 h. Sau đó ly tâm 3500 rpm trong 1 h, loại bỏ phần nước. Rửa tủa bằng 2 ml *dung dịch acid trichloroacetic 5 %*, tiếp tục ly tâm 3500 rpm trong 1 h, loại bỏ phần nước. Thêm vào cặn 0,2 ml *acid sulfuric (TT)* đem vô cơ hóa trên bếp cát cho đến khi dung dịch mất màu. Để tăng tốc độ phản ứng thỉnh thoảng cho vài giọt *dung dịch oxy già đậm đặc* vào ống đốt sau khi làm nguội. Khi chế phẩm đã được vô cơ hóa hoàn toàn, dung dịch mất màu, thêm *nước cất 2 lần* vừa đủ b ml, thu được dung dịch A.

Lấy 1 ml dung dịch A vào ống nghiệm, thêm 8,5 ml nước cất 2 lần và 0,5 ml *thuốc thử Nessler (TT)*, được mẫu thử.

Chuẩn bị mẫu trắng: Trộn đều 9,5 ml nước cất 2 lần và 0,5 ml *thuốc thử Nessler (TT)*.

Dụng đường chuẩn

Hút dung dịch amoni sulfat chuẩn có hàm lượng 0,05 mg nitơ/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; 0,7 ml. Thêm *nước cất 2 lần* vừa đủ 9,5 ml và 0,5 ml *thuốc thử Nessler (TT)*.

Lắc đều các ống nghiệm.

Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 420 nm.

Vẽ đồ thị đường chuẩn.

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

$$X \text{ (mg/ml)} = \frac{a \times b}{1,0 \times 1,0}$$

Trong đó:

a là lượng nitơ tìm được trên đường chuẩn (mg);

b là thể tích dung dịch A (ml);

1,0 là thể tích mẫu sau pha loãng đem so màu (ml);

1,0 là thể tích mẫu đem tủa rồi vô cơ hóa (ml);

Cách pha 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 vừa đủ 500 ml bằng nước cất 2 lần. Dung dịch vừa pha có hàm lượng nitơ 0,1 mg/ml, trước khi dùng pha loãng gấp đôi bằng nước cất 2 lần.

Tiêu chuẩn cho phép

Hàm lượng nitơ protein trong vắc xin và sinh phẩm theo quy định riêng.