

Pha vắc xin thử: Nếu là vắc xin đông khô phải hoàn nguyên bằng nước hồi chình 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.