

Pha dung dịch chuẩn bằng nước muối sinh lý (TT) (không ít hơn 5 nồng độ) có hàm lượng trong khoảng từ 10 µg/ml đến 200 µg/ml. Điều chỉnh pH từ 8 đến 10,5 trước khi thêm thuốc thử phthaldehyd.

Dùng nước muối sinh lý (TT) làm mẫu trắng.

Trộn 10 µl các dung dịch mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu trắng với 0,1 ml thuốc thử phthaldehyd, để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 min. Thêm 3 ml dung dịch natri hydroxyd 0,5 M và lắc đều. Đo cường độ huỳnh quang các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử ở bước sóng kích thích 340 nm và bước sóng phát xạ giữa 440 nm và 445 nm.

Dựa vào đường chuẩn tính ra hàm lượng protein có trong mẫu thử.

**Pha dung dịch đệm borat:** Hòa tan 61,83 g acid boric trong nước cất và điều chỉnh pH 10,4 bằng dung dịch kali hydroxyd, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml, lắc đều.

**Pha dung dịch gốc phthaldehyd:** Hòa tan 1,20 g o-phthaldehyd trong 1,5 ml methanol (TT), thêm 100 ml dung dịch đệm borat (TT), lắc đều. Thêm 0,6 ml dung dịch macrogol 23 lauryl ether và lắc đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng sử dụng trong 3 tuần.

**Pha thuốc thử phthaldehyd:** Thêm 15 µl 2-mercaptoethanol vào 5 ml dung dịch gốc phthaldehyd. Chuẩn bị dung dịch này trước khi dùng 30 min. Sử dụng trong vòng 24 h.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Theo quy định trong chuyên luận riêng.

### 15.35 XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM TỒN DƯ TRONG VẮC XIN, SINH PHẨM ĐÔNG KHÔ

#### Nguyên lý

Sử dụng phương pháp Karl Fischer để xác định độ ẩm tồn dư trong vắc xin đông khô theo nguyên lý chung là dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong sự có mặt của alcohol và một chất base hữu cơ thích hợp.

Hiện nay có nhiều thiết bị để đo độ ẩm tồn dư trong các vắc xin, sinh phẩm đông khô, tuy nhiên nguyên tắc của các thiết bị này đều phải cấu tạo sao cho thao tác thuận tiện và tránh ẩm.

#### Phương pháp tiến hành

Tùy theo thiết bị của các hãng khác nhau nên thao tác theo hướng dẫn vận hành của hãng đó.

Phương pháp phổ biến hiện nay để đo độ ẩm tồn dư của các vắc xin và sinh phẩm đông khô là phương pháp Karl Fischer. Vận hành máy đo độ ẩm tồn dư theo hướng dẫn sử dụng. Rót dung dịch chuẩn anod và cathod vào khoang tương ứng đến đúng mức quy định. Cần lưu ý qua một thời gian nhất định, methanol trong dung dịch cathod có thể thấm qua màng trao đổi ion bằng cách thẩm thấu. Để giảm bớt tình trạng này không nên rót hóa chất đầy quá mức quy định.

Bật máy và cài đặt phương pháp lựa chọn. Nếu máy đo độ ẩm tồn dư không hoạt động trong vòng 3 tuần thì vẫn nên bật máy vài giờ trong khoảng thời gian này dù không tiến hành kiểm tra mẫu gì để nạp pin và đảm bảo tất cả các thông tin của chương trình vẫn được duy trì. Cần đảm bảo trước khi nạp mẫu thử tỷ lệ % độ ẩm trên màn hình phải ổn định và ở mức độ thấp để đủ đạt được kết quả theo yêu cầu. Cân chính xác khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu.

Nhập khối lượng tổng của cả mẫu thử và vật chứa mẫu vào máy, sau đó nhập khối lượng của vật chứa mẫu. Đưa mẫu vào khoang bên ngoài qua đường bơm mẫu (nếu vận hành trong điều kiện độ ẩm cao và sáng thì nên đóng kín nắp khoang chứa mẫu thử khi vận hành).

Khi thực hiện xong thử nghiệm, máy in sẽ tự động in ra kết quả độ ẩm tồn dư của mẫu thử.

#### Tiêu chuẩn chấp thuận

Độ ẩm tồn dư trong vắc xin và sinh phẩm đông khô không được vượt quá 3 % ( $\leq 3$  %), trừ khi có quy định trong chuyên luận riêng.

### 15.36 PHÁT HIỆN MYCOPLASMA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

#### Nguyên vật liệu

Mẫu thử nghiệm: Nước nổi nuôi tế bào, hỗn dịch virus, vắc xin bán thành phẩm và thành phẩm.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường lỏng 1: LM1 (pH 7,6 đến 7,8; môi trường có màu đỏ) và môi trường lỏng 2: LM2 (pH 7,2; môi trường có màu vàng cam), dưới dạng 100 ml/chai hoặc 10 ml/ống.

Môi trường rửa lọc: Môi trường PPLO lỏng.

Môi trường đặc: Môi trường thạch PPLO.

Màng lọc 0,1 µm, xy lạnh 10 ml và dụng cụ cần thiết đủ cho tiến hành thử nghiệm.

#### Các bước tiến hành

##### Chuẩn bị môi trường

Pha môi trường LM1 (pH 7,6 đến 7,8): 500 ml.

Nước cất pha tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

Đỏ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min, sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, 6 ml glucose 25 % và 1,25 ml penicilin G. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.

Pha môi trường LM2 (pH 7,0 đến 7,2): 500 ml.

Nước để pha thuốc tiêm: 375 ml.

Môi trường PPLO lỏng: 8 g.

L-Arginin: 1,5 g.

Đỏ phenol 0,4 %: 2,5 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 %, và 1,25 ml penicilin G, 1 ml acid hydrocloric. Trộn đều, ra chai 100 ml và ống thử 10 ml.

**Pha môi trường thạch PPLO:** 500 ml.

Thạch PPLO: 13,5 g.

Nước để pha thuốc tiêm: 375 ml.

Hấp tại 121 °C trong 15 min sau đó thêm 75 ml huyết thanh ngựa, 50 ml Yeast Extract 25 % và 1,25 ml penicilin G. Trộn đều, sau đó đổ thạch ra phiến 6 giếng: 8 ml/giếng, bảo quản 37 °C trước khi thử độ nhạy 1 ngày.

**Pha môi trường rửa màng lọc:**

Môi trường PPLO lỏng: 2,1 g.

Nước để pha thuốc tiêm: 100 ml.

Hấp ở 121 °C trong 15 min.

### Tiến hành

Lọc mẫu: Sử dụng xylanh 10 ml hút 6 ml mẫu thử vào giá lọc 0,1 µm và bơm mẫu qua lọc cho đến hết.

Rửa lọc: Sử dụng 30 ml môi trường rửa lọc và xylanh 10 ml, bỏ kim, sau đó bơm từ từ cho đến khi môi trường rửa qua hết lọc.

Tháo lọc, lấy giấy lọc cho vào đĩa petri vô trùng, cắt đôi giấy lọc, cho mỗi nửa giấy lọc vào mỗi chai môi trường LM1 và LM2 đã chuẩn bị sẵn.

Chai môi trường sau gây nhiễm được nuôi ở 37 °C trong 28 ngày.

Cấy truyền trên môi trường lỏng: sau gây nhiễm 14 ngày, lấy mẫu từ chai môi trường nuôi cấy chuyển sang ống môi trường nuôi cấy cùng loại: 0,2 ml/ống thử, 3 ống thử mỗi loại môi trường và đặt tại 37 °C trong 14 ngày.

Cấy truyền trên môi trường đặc: Thạch được chuẩn bị trên phiến 6 giếng, gây nhiễm 10 µl từ ống thử nghi ngờ lên chính giữa mặt thạch, dán kín phiến và nuôi tại 37 °C trong ít nhất 14 ngày.

### Độc kết quả

Độc kết quả lần gây nhiễm đầu tiên: Ngày thứ 28.

Độc kết quả lần cấy truyền: Ngày thứ 14 trên môi trường lỏng và ngày thứ 10 trên môi trường thạch;

Kết quả dương tính khi màu môi trường LM1 chuyển từ màu đỏ sang màu vàng cam; màu môi trường LM2 từ màu vàng cam sang màu đỏ ánh tím và có khuẩn lạc giống hình trứng óp lép trên môi trường thạch.

Kết quả âm tính khi màu môi trường của 2 loại môi trường lỏng không thay đổi giống như ống thử đối chứng và không có khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

## 15.37 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VI POLYSACCHARID CỦA VẮC XIN THƯƠNG HÀN VI POLYSACCHARID

### Nguyên lý

Sử dụng phản ứng điện di miễn dịch rocket để xác định hàm lượng Vi polysaccharid trong vắc xin thương hàn Vi.

### Phương pháp tiến hành

#### Pha dung dịch đệm và thạch agarose

Dung dịch đệm (Dung dịch đệm barbital ½ hoặc Tris 0,1 M): Dùng ống đong 500 ml đong 200 ml nước cất

3 lần cho vào chai thủy tinh loại 1000 ml, thêm 1,84 g acid bacbituric vào chai thủy tinh, đun trong cách thủy và lắc đều cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm tiếp 10,3 g natri bacbital vào chai thủy tinh, lắc cho tan. Chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 500 ml, thêm nước cất 3 lần vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Điều chỉnh đến pH 8,6 bằng dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT) hoặc dung dịch natri hydroxyd 5 M (TT).

Bảo quản dung dịch thu được ở nhiệt độ phòng, trong chai có nút vặn kín. Sử dụng trong thời gian không quá 30 ngày kể từ ngày pha chế.

Rót dung dịch đệm barbital ½ vào bể điện di.

Thạch agarose: Thêm 0,5 g thạch agarose vào 40 ml dung dịch đệm, đun cách thủy hoặc đun trên máy khuấy từ gia nhiệt cho đến khi thạch tan chảy hoàn toàn.

Đề thạch nguội đến khoảng 56 °C, cho 1 ml huyết thanh thô kháng Vi vào và lắc nhẹ tròn đều chai thạch sao cho huyết thanh thô kháng Vi hòa tan đều vào thạch nhưng không bị tạo bọt.

#### Tạo bản gel và đục lỗ thạch

Đổ thạch trên khuôn, chờ thạch nguội hoàn toàn.

Đục lỗ thạch bằng bộ đục lỗ chuyên dụng sao cho các giếng trên bản gel phải cách mép bản gel ít nhất 2 cm và cách nhau ít nhất 1 cm. Số lượng giếng trên bản gel phải được tính toán sao cho có đủ 5 giếng cho các hàm lượng kháng nguyên Vi chuẩn, 2 giếng (làm kép) cho mỗi mẫu thử.

#### Pha mẫu kháng nguyên Vi chuẩn

Pha loãng kháng nguyên Vi chuẩn bằng dung dịch PBS ở các độ pha loãng sao cho nồng độ kháng nguyên Vi mẫu thử nằm trong đường chuẩn. Ví dụ: 100 µg; 50 µg; 25 µg; 12,5 µg; 6,25 µg Vi polysaccharid/ml.

Lần lượt nhỏ mẫu chuẩn ở các độ pha loãng như trên vào từng giếng trên bản gel (thể tích phù hợp/giếng); cho vào 2 giếng tiếp theo mỗi giếng một lượng vắc xin mẫu thử với thể tích như vắc xin mẫu chuẩn.

#### Chạy điện di miễn dịch Rocket

Đặt bản gel vào máy điện di theo hướng mẫu đi từ cực âm sang cực dương.

Bật nguồn, cài đặt các thông số thích hợp về hiệu điện thế, cường độ dòng điện và thời gian chạy điện di của mẫu.

Dùng giấy lọc Whatman làm cầu nối từ bể dung dịch điện di tới bản gel ở cả 2 đầu bản gel.

Bấm nút "Run" để chạy điện di.

#### Rửa bản gel

Sau khi chạy điện di xong, tắt nguồn, lấy bản gel ra khỏi máy điện di, cho vào hộp nhựa trong có nắp kín.

Cho nước muối sinh lý ngập bản gel và ngâm, lắc nhẹ bằng máy lắc trong 3 h (thay nước muối sinh lý 1 h/lần).

Hút hết nước muối sinh lý ra và thay bằng nước cất. Ngâm và lắc hộp nước cất có chứa bản gel liên tục. Sau khi ngâm được 1 h, thay nước cất 30 min/lần.