

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.

Ủ bán gel

Đổ toàn bộ nước cất ra khỏi hộp.

Phủ một lớp giấy lọc lên mặt bán gel để tránh cho bán gel không bị khô không đồng đều.

Ủ bán gel qua đêm trong tủ ẩm 37 °C.

Nhuộm và tẩy bán gel

Bóc bỏ lớp giấy lọc trên mặt bán gel.

Nhuộm bán gel bằng dung dịch nhuộm màu trong 15 min.

Trong quá trình nhuộm, lắc đều hộp dung dịch nhuộm màu có chứa bán gel bằng máy lắc.

Hút bỏ toàn bộ dung dịch nhuộm màu và bơm dung dịch tẩy màu vào hộp chứa bán gel; ngâm, lắc liên tục cho đến khi nhìn rõ những cột tên lửa trên bán gel. Nếu bán gel vẫn còn xanh đậm, có thể thay dung dịch tẩy màu mới nhằm rút ngắn thời gian tẩy màu của bán gel.

Đọc và tính kết quả

Bán gel được đưa ra khỏi hộp nhựa và đặt trên phiến kính trong. Dùng thước đo chuyên dụng để đo chiều cao các cột tên lửa trên bán gel, từ các giếng kháng nguyên chuẩn và mẫu thử. Dựa vào chiều cao các cột tên lửa, xây dựng được đường chuẩn và tính kết quả hàm lượng kháng nguyên Vi từ mẫu thử bằng chương trình Excel.

Đánh giá kết quả

Loại vắc xin thương hàn Vi polysaccharid được coi là đạt yêu cầu về chỉ số hàm lượng Vi polysaccharid khi thử nghiệm có giá trị (valid) và đạt 35 µg đến 65 µg polysaccharid/1,0 ml vắc xin.

Nếu thử nghiệm xác định hàm lượng Vi polysaccharid không có giá trị (invalid) vì một lý do nào đó thì phải nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu bằng lượng mẫu của lần kiểm tra thứ nhất.

Nếu thử nghiệm xác định hàm lượng Vi polysaccharid có giá trị (valid) nhưng không đạt yêu cầu về hàm lượng như quy định thì nhắc lại thử nghiệm với số lượng mẫu gấp đôi.

Ở lần kiểm tra thứ hai nếu hàm lượng Vi polysaccharid đạt yêu cầu (nằm trong khoảng cho phép của tiêu chuẩn chấp thuận thì loại vắc xin đó được coi là đạt yêu cầu về hàm lượng Vi polysaccharid. Nếu kết quả hàm lượng Vi polysaccharid không đạt yêu cầu thì loại vắc xin đó phải hủy bỏ, không được phép xuất xưởng đưa vào sử dụng.

Tiêu chuẩn chấp thuận

(25 µg ± 30 %) Vi polysaccharid/liều đơn vắc xin dùng cho người (0,5 ml).

15.38 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYSACCHARID TRONG VẮC XIN VÀ SINH PHẨM

Nguyên lý

Polysaccharid có trong mẫu thử được chuyển thành đường đơn, sau đó phản ứng với anthron tạo thành hợp chất màu. Đo hợp chất màu này ở bước sóng 620 nm, từ đó xác định hàm lượng polysaccharid trong mẫu thử.

Tiến hành

Pha loãng dung dịch glucose chuẩn 500 µg/ml bằng nước cất thành các nồng độ 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10,0 µg/ml; 12,5 µg/ml. Mẫu thử được điều chỉnh bằng nước cất để có nồng độ protein khoảng 200 µg/ml.

Hút 1 ml mẫu thử và mỗi dung dịch glucose chuẩn vừa pha loãng ở trên vào ống nghiệm, thêm 4 ml dung dịch anthron 0,2 %; lắc đều, đun cách thủy 100 °C trong 15 min. Làm nguội nhanh trong nước đá và để ở nhiệt độ phòng trong 60 min.

Đo mật độ quang (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 620 nm, dựng đường chuẩn, từ đó tính ra hàm lượng polysaccharid trong mẫu thử.

Đơn vị tính: µg/100 µg protein.

Cách pha các dung dịch:

Dung dịch glucose chuẩn 500 µg/ml: Hòa tan 500 mg glucose bằng nước cất trong bình định mức 100 ml, thêm nước cất vừa đủ. Trước khi dùng, pha loãng 10 lần bằng nước cất.

Dung dịch anthron 0,2 %: Cân 0,2 g anthron chuyển vào bình định mức 100 ml, thêm acid sulfuric 95 % vừa đủ 100 ml.

Bảo quản dung dịch ở 2 °C đến 10 °C trong chai thủy tinh màu, sử dụng trong vòng 2 tuần sau khi pha.

Tiêu chuẩn chấp thuận

Tùy từng loại vắc xin và sinh phẩm. Đối với bán thành phẩm viêm gan B, hàm lượng polysaccharid không lớn hơn 10 µg/100 µg protein.

15.39 XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT KHÁNG NGUYÊN HBsAg

Thử nghiệm xác định độ tinh khiết kháng nguyên HBsAg được thực hiện trong giai đoạn bán thành phẩm của vắc xin viêm gan B.

Độ tinh khiết kháng nguyên HBsAg được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Dung dịch đệm PBS pH 6,8.

Cách pha dung dịch đệm PBS pH 6,8: Cân 3,48 g natri phosphat monobasic; 9,75 g natri phosphat dibasic; 23,38 g natri clorid và 0,1 g natri azid, hoà tan trong vừa đủ 1 L nước khử ion. Điều chỉnh pH bằng 6,8 bằng acid phosphoric (TT). Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột TKgel G3000SW, Nhật Bản.

Nhiệt độ phòng

Tốc độ dòng: 0,6 ml/min.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 280 nm.

Thể tích tiêm: 50 µl.

Lọc mẫu thử qua màng lọc 0,45 µm trước khi cho mẫu vào cột.

Tiến hành sắc ký với dung dịch thử.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Tỷ lệ diện tích pic HBsAg so với tổng số các pic không nhỏ hơn 95 %.