
ASSESSING THE QUALITY OF THE STANDARD BATCH OF TETANUS TOXIN TeToxVn0117 FOR POTENCY CONTROL TEST OF TETANUS COMPONENT AND PURIFIED TETANUS ANTITOXIN SERUM

Pham Thi Lan Anh*, Ta Nguyen Tuong Van, Luong Thi Bich Trang,
Tran Ngoc Nhon, Vu Thi Thu Huong.

Institute of Vaccines and Medical Biologicals

Received 02 May 2024

Accepted 25 June 2024

Abstract: The potency of tetanus vaccines is determined by challenge method and the titer of purified tetanus antitoxin serum (SAT) which is identified by the toxin neutralization method. Both of them require a standard tetanus toxin which was titrated to estimate virulence units either LD₅₀ (challenge method) or L+/10 (for toxin neutralization method). To meet the requirements, a standard batch of tetanus toxin TeToxVn0117 was prepared and then evaluated its quality as a secondary standard sample used for tetanus potency testing and SAT serum titration. The study aimed to assess the quality and stability of the standard batch of tetanus toxin TeToxVn0117. The LD₅₀ stability of the toxin batch was estimated annually from 2018 to 2023, and monitored through back titration of the challenge toxin in the tetanus potency test. The results showed that we produced 750 tubes of TeToxVn0117 toxin reaching an average of 417,721 LD₅₀ units and an average of 223 L+/10 units. TeToxVn0117 toxin is stable after 6 years of storage at temperatures $\leq -40^{\circ}\text{C}$, suitable for utility in the potency of tetanus and titrate SAT serum titers test.

Keywords: tetanus toxin, LD₅₀, L+/10

* Corresponding author

E-mail address: ivaclananh@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i2.156>

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG LÔ ĐỘC TỔ UỐN VÁN MẪU CHUẨN TeToxVn0117 DÙNG CHO THỬ NGHIỆM XÁC ĐỊNH CÔNG HIỆU THÀNH PHẦN UỐN VÁN VÀ HUYẾT THANH KHÁNG ĐỘC TỔ UỐN VÁN TINH CHẾ

**Phạm Thị Lan Anh*, Tạ Nguyễn Tường Vân, Lương Thị Bích Trang,
Trần Ngọc Nhơn, Vũ Thị Thu Hương.**

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Nhận ngày 08 tháng 04 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 06 năm 2024

Tóm tắt: Công hiệu của vắc xin uốn ván được xác định bằng phương pháp thử thách và hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván (SAT) được xác định bằng phương pháp trung hòa. Cả hai phương pháp này đều yêu cầu phải sử dụng độc tố uốn ván chuẩn đã được chuẩn độ xác định đơn vị độc lực hoặc LD₅₀ (dùng cho thử nghiệm kiểm tra công hiệu uốn ván) hoặc L+/10 (dùng cho thử nghiệm kiểm tra hiệu giá huyết thanh). Để đáp ứng yêu cầu trên, lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117 đã được chuẩn bị và đánh giá chất lượng như là mẫu chuẩn thứ cấp dùng cho thử nghiệm kiểm tra công hiệu uốn ván và chuẩn độ hiệu giá huyết thanh SAT. Nghiên cứu nhằm mục tiêu đánh giá chất lượng và tính ổn định của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117. Tính ổn định LD₅₀ của lô độc tố được đánh giá hàng năm từ 2018 đến 2023, đồng thời được theo dõi qua chuẩn độ ngược độc tố thử thách trong thử nghiệm công hiệu uốn ván. Kết quả nghiên cứu cho thấy lô độc tố uốn ván TeToxVn0117 có số lượng 750 ống, đạt trung bình 417721 đơn vị LD₅₀ và trung bình 223 đơn vị L+/10. Lô độc tố TeToxVn0117 ổn định sau 6 năm bảo quản ở nhiệt độ ≤-40°C, phù hợp dùng trong thử nghiệm xác định công hiệu uốn ván và chuẩn độ hiệu giá huyết thanh SAT.

Từ khóa: độc tố uốn ván, LD₅₀, L+/10.

1. Đặt vấn đề

Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) là nhà sản xuất duy nhất trong cả nước sản xuất các vắc xin có thành phần uốn ván bao gồm vắc xin uốn ván hấp phụ (TT), vắc xin uốn ván, bạch hầu (Td), vắc xin bạch hầu, ho gà, uốn ván toàn tế bào (DPT) và huyết thanh kháng độc tố uốn ván tinh chế (SAT) cung cấp cho chương trình Tiêm chủng mở rộng Quốc gia và thị trường tự do,

đáp ứng nhu cầu phòng chống bệnh uốn ván và uốn ván sơ sinh. Việc sản xuất và kiểm định chất lượng của các vắc xin uốn ván và huyết thanh kháng độc tố uốn ván tuân thủ theo hướng dẫn của Dược Điển Việt Nam V (2018), trong đó công hiệu của vắc xin uốn ván được xác định bằng phương pháp thử thách [1,2] và hiệu giá của SAT được xác định bằng phương pháp trung hòa trên chuột nhắt [1,3]. Cả hai phương pháp kiểm định

này đều yêu cầu phải sử dụng độc tố uốn ván chuẩn đã được chuẩn độ xác định đơn vị độc lực hoặc LD₅₀ (dùng cho thử nghiệm công hiệu uốn ván) hoặc L+/10 (dùng cho thử nghiệm chuẩn độ hiệu giá SAT). Độc tố uốn ván cần được chuẩn bị để đảm bảo mỗi ống chứa số đơn vị độc tố đủ cho một lần làm. Hàng năm, IVAC sử dụng khoảng 100 ống độc tố uốn ván với thể tích 1,2 ml/ống cho các thử nghiệm thường quy và nghiên cứu. Để đảm bảo tính sẵn sàng, độ chính xác, độ ổn định cho thực hiện thử nghiệm và phù hợp với khuyến cáo của WHO chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “Đánh giá chất lượng lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117 dùng cho thử nghiệm xác định công hiệu thành phần uốn ván và huyết thanh kháng độc tố uốn ván tinh chế” với mục tiêu đánh giá chất lượng cũng như tính ổn định của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: lô mẫu chuẩn độc tố uốn ván TeToxVn0117 sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Từ tháng 10/2017 đến tháng 12/2023.

Địa điểm: phòng Kiểm định, Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC).

2.3. Vật liệu, hóa chất

2.3.1. Độc tố uốn ván

- Độc tố uốn ván thô nhận từ phòng sản xuất vắc xin DPT. Lô số: 1017/T, Ngày sản xuất: 25/08/2017, Hàm lượng/nồng độ: 42 Lf/ml.
- Số lượng: 500 ml.

2.3.2. Dụng cụ, trang thiết bị

- Tủ lạnh âm (Sanyo)
- Máy khuấy từ (Tuart)
- Ống đong 500 ml (Duran)
- Chai thủy tinh 2000 ml (Duran)
- Tube nhựa 1,8 ml (Corning)

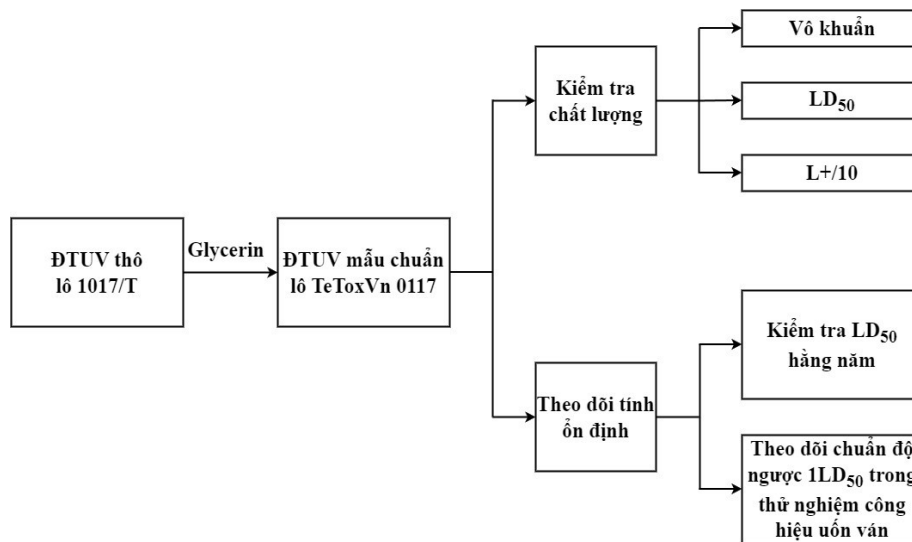
2.3.3. Dung dịch đệm bảo quản [6]

Dung dịch Glycerin 99% vô khuẩn, Sigma.

2.3.4. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng ICR, trọng lượng 17-18 g/con.

2.3. Thiết kế nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ qui trình nghiên cứu

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Chuẩn bị lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117

Lấy 450 ml độc tố uốn ván thô lô 1017/T (42 Lf/ml) pha trong glycerin với tỷ lệ 1:1, như vậy sau khi pha trong đệm glycerin mỗi ml độc tố sẽ có sẽ có 21Lf. Khuấy đều bằng máy khuấy từ trong 30 phút ở nhiệt độ 2-8°C. Sau khuấy tiến hành chia độc tố vào các tube với thể tích 1,2ml/tube. Dán nhãn lô độc tố TeToxVn0117 và bảo quản các ống độc tố trong lạnh sâu $\leq -40^{\circ}\text{C}$. Lấy mẫu kiểm tra vô khuẩn, xác định liều gây chết 50% (LD_{50}) và liều L+/10.

2.4.2. Kiểm tra vô khuẩn

Lấy 26 ống độc tố uốn ván kiểm tra vô khuẩn bằng phương pháp cấy trực tiếp trên môi trường Thio và TSB.

Tiêu chuẩn đánh giá: Sau 14 ngày không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm [1].

2.4.3. Xác định đơn vị LD_{50} của độc tố uốn ván

LD_{50} (Lethal Dose 50) là lượng độc tố gây chết 50% động vật thí nghiệm có trọng lượng xác định trong vòng 96 giờ [1], kết quả được tính bằng phương pháp Reed-Muench [7].

Lấy 1 ống độc tố TeToxVn0117 pha loãng trong đệm Jensen pepton thành 1/100.000 sau đó tiếp tục pha thành các độ pha 1/300.000, 1/400.000, 1/530.000, 1/700.000. Mỗi độ pha tiêm cho một nhóm gồm 6 chuột, mỗi con 0,5 ml vào dưới da. Sau 96h tính số chuột chết trên tổng số chuột đã tiêm (6 con) [1]. Áp dụng công thức Reed-Muench để xác định số đơn vị LD_{50} trong dung dịch độc tố [7].

Tiêu chuẩn đánh giá: độc tố phải đạt ít nhất 10000 LD₅₀ /1Lf [1].

2.4.4. Xác định liều L+/10 của độc tố uốn ván

L+/10 là lượng độc tố uốn ván nhỏ nhất còn lại sau khi trung hòa với 0,1 đơn vị quốc tế (IU) của kháng độc tố uốn ván chuẩn đủ để gây chết 1 chuột có trọng lượng đã xác định trong thời gian 96h. Độc tố uốn ván được pha thành nhiều độ pha khác nhau, sau đó trung hòa với một lượng kháng độc tố nhất định (sao cho 1 chuột chỉ được nhận 0,1IU kháng độc tố). Ở độ pha nào lượng độc tố thừa ít nhất không bị trung hòa với kháng độc tố mà vẫn còn có khả năng gây chết chuột trong thời gian 96h thì lượng độc tố đó được tính bằng liều độc tố L+/10 [1].

Lấy 1 ống độc tố TeToxVn0117, pha loãng trong đệm Jensen pepton thành các độ pha 1/43, 1/44, 1/45, 1/46, 1/47. Lấy 1ml độc tố ở mỗi độ pha trung hòa với 1ml huyết thanh uốn ván mẫu chuẩn (0,5IU/ml), sau đó bổ sung thêm 0,5ml NaCl 0,85% sao cho tổng thể tích hỗn hợp độc tố - huyết thanh là 2,5 ml. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 45 phút, mỗi hỗn hợp độc tố - huyết thanh được tiêm cho một nhóm chuột gồm 4 con, mỗi con 0,5ml vào dưới da. Do sử dụng 0,5 IU huyết thanh trung hòa với độc tố nên tại độ pha chuột chết 100% trong vòng 96h là liều 5L+/10. Số đơn vị L+/10 của dung

dịch độc tố được tính bằng nghịch đảo của độ pha loãng tại đó chuột chết 100% trong vòng 96 giờ nhân với 5 [1].

Tiêu chuẩn đánh giá: mỗi ml độc tố phải đạt liều L+/10 \geq 125 [3].

2.4.5. Theo dõi tính ổn định của độc tố uốn ván mẫu chuẩn

- Chuẩn độ LD₅₀ của độc tố mẫu chuẩn TeToxVn0117 định kỳ sau mỗi 12 tháng.

- Theo dõi tỷ lệ chuột chết trong chuẩn độ ngược 1 LD₅₀ của thử nghiệm công hiệu thành phần uốn ván đối với các vắc xin TT, DPT, Td.

- Công thức tính tỷ lệ (%) giảm liều LD₅₀ của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117:

$$A(\%) = \frac{T_0 - T_n}{T_0} \times 100$$

Trong đó:

A: Tỷ lệ % giảm liều LD₅₀ của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117.

T₀: Giá trị LD₅₀ tại thời điểm bắt đầu đặt mẫu ổn định.

T_n: Giá trị LD₅₀ tại các thời điểm T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆.

3. Kết quả

3.1. Kết quả kiểm tra lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117

Lô mẫu chuẩn độc tố uốn ván TeToxVn0117 được pha chế từ lô độc tố uốn ván thô 1017/T do phòng sản xuất vắc xin DPT (IVAC) cung cấp. Hàm lượng kháng nguyên (Lf) của lô 1017/T đạt 42 Lf/ml, hàm lượng N.Protein 0,47 mg/ml. Kết quả kiểm tra LD₅₀ của lô độc tố thô này là 800.000 LD₅₀.

Kiểm tra vô khuẩn lô độc tố mẫu chuẩn TeToxVn0117 cho thấy không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong các môi trường nuôi cấy sau 14 ngày theo dõi, đạt yêu cầu về vô khuẩn theo tiêu chuẩn của ĐĐVN V cho vắc xin và sinh phẩm.

Kiểm tra LD₅₀ và L+/10 của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117 được chỉ ra ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Kết quả chuẩn độ LD₅₀ của độc tố uốn ván mẫu chuẩn lô TeToxVn0117

Số lần thực hiện	1	2	3	4	5
Ngày thực hiện	03/10/17	09/10/17	16/10/17	23/10/17	30/10/17
Liều gây chết 50% (LD ₅₀ /ml)	457,088	389,045	416,869	426,579	399,024
Trung bình (LD ₅₀ /ml)	417,721				
SD	26,461				
CV	6,33 %				

Sau 5 lần chuẩn độ độc lập cho thấy lô độc tố TeToxVn0117 có số đơn vị LD₅₀ từ 389,045 đến 457,088, trung bình đạt 417,721 ± 26,461 LD₅₀. Sự dao động (CV) giữa các lần chuẩn độ là 6,33% <10%.

Bảng 2. Kết quả xác định L+/10 của độc tố uốn ván mẫu chuẩn lô TeToxVn0117

Lần thực hiện	1	2	3	4	5
Độ pha chuột sống 100%	1/46	1/45	1/45	1/45	1/45
Độ pha chuột chết 100%	1/45	1/44	1/45	1/45	1/44
Liều độc tố gây chết chuột sau khi trung hoà với 0,1 đơn vị huyết thanh (L+/10/ml)	225	220	225	225	220
Trung bình (L+/10/ml)	223 L+/10				
SD	2,739				
CV	1,23 %				

Sau 5 lần chuẩn độ số đơn vị L+/10 trung bình của lô độc tố TeToxVn0117 tại thời điểm tháng 10/2017 đạt 223 L+/10 ± 2,739 với hệ số biến thiên (CV) giữa các lần chuẩn độ là 1,23% < 10%.

3.2. Kết quả tính ổn định độc lực của độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117

Lô độc tố TeToxVn0117 bảo quản ở ≤ -40°C được kiểm tra hàng năm về liều LD₅₀ để đánh giá tính ổn định. Hiện nay tính ổn định của lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn này đã theo dõi được 6 năm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Tính ổn định của lô độc tố uốn ván TeToxVn0117 qua 6 năm theo dõi

Thời gian	Thời gian chuẩn độ						
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Kết quả	10/2017	10/2018	10/2019	10/2020	10/2021	10/2022	10/2023
Số đơn vị LD ₅₀ /20Lf	417,721	393,550	383,265	398,107	383,707	381,944	341,192
Tỷ lệ giảm (%)	0	5,79	8,25	4,70	8,14	8,56	18,32
Số đơn vị LD ₅₀ /1Lf	19,891	18,740	18,250	18,957	18,271	18,187	16,247

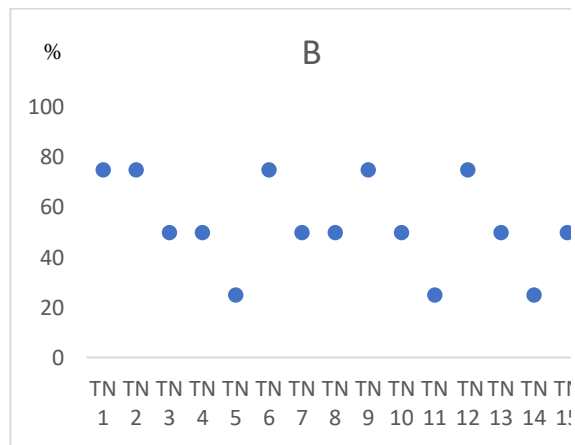
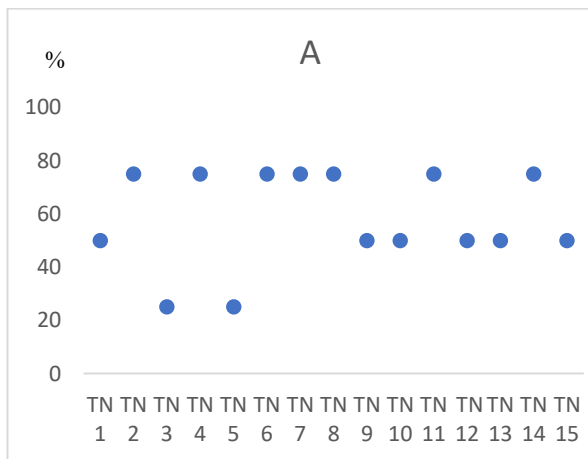
Như vậy sau 6 năm, độc lực của lô độc tố TeToxVn0117 có giảm khoảng 18,32% so với ban đầu nhưng vẫn đảm bảo đủ tiêu chuẩn làm độc tố thử thách trong thử nghiệm công hiệu uốn ván theo qui định của

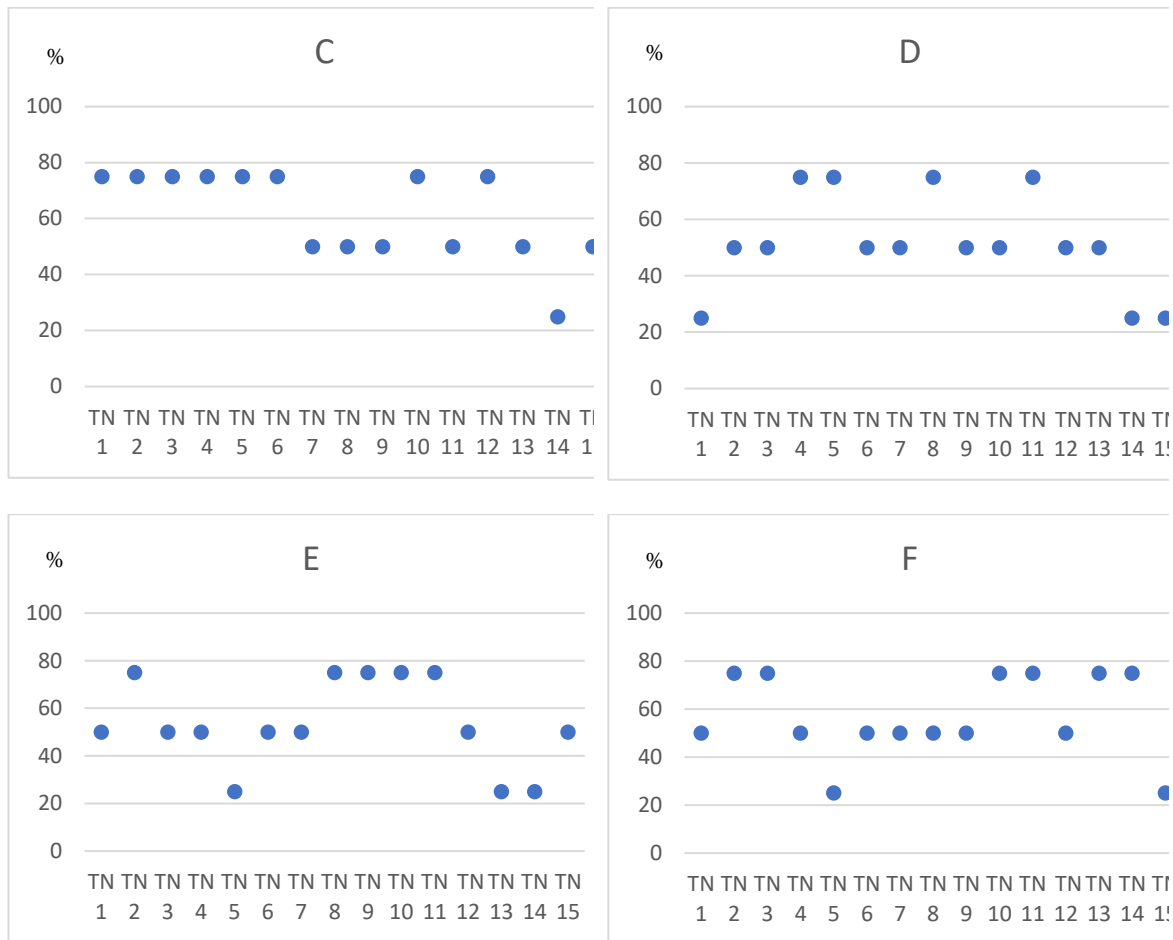
WHO. Kết quả chuẩn độ ngược độc tố thử thách trong thử nghiệm công hiệu uốn ván qua các năm cho thấy độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn 0117 là ổn định qua các năm (bảng 4, hình 2).

Bảng 4. Tỷ lệ chuột chết (%) trong chuẩn độ ngược 1LD₅₀ của thử nghiệm công hiệu thành phần uốn ván đối với các vắc xin TT, DPT, Td

	Tỷ lệ chuột chết (%) trong chuẩn độ ngược 1LD₅₀
--	---

Kết quả	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN	TN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2018	50	75	25	75	25	75	75	75	50	50	75	50	50	75	50
2019	75	75	50	50	25	75	50	50	75	50	25	75	50	25	50
2020	75	75	75	75	75	75	50	50	50	75	50	75	50	25	50
2021	25	50	50	75	75	50	50	75	50	50	75	50	50	25	25
2022	50	75	50	50	25	50	50	75	75	75	75	50	25	25	50
2023	50	75	75	50	25	50	50	50	50	75	75	50	75	75	25





Hình 2. Tỷ lệ chuột chết (%) trong chuẩn độ ngược 1 LD₅₀ của thử nghiệm công hiệu thành phần uốn ván đối với các vắc xin TT, DPT, Td qua các năm 2018 (A), 2019 (B) 2020 (C), 2021 (D), 2022 (E) và 2023 (F).

Qua 6 năm sử dụng lô độc tố mẫu chuẩn TeToxVn0117 cho thử nghiệm công hiệu uốn ván, kết quả chuẩn độ ngược 1LD₅₀ cho thấy tỷ lệ chuột chết nằm trong khoảng 25%-75%, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của thử nghiệm. Qua đó chứng tỏ lô độc tố này có chất lượng ổn định sau 6 năm theo dõi.

4. Bàn luận

Độc tố uốn ván có bản chất là một protein có cấu trúc dạng A-B, trong đó chuỗi B có trọng lượng phân tử 100 kDal giúp

phân tử độc tố liên kết với màng tế bào thần kinh, chuỗi A có trọng lượng phân tử 50kDal là một endopeptidase có khả năng tấn công và hủy hoại màng tế bào thần kinh nhờ hoạt tính enzym của nó. Các chuỗi A và B được nối với nhau bởi cầu nối disulfit [8]. Cũng như các protein khác, khi ở dạng dung dịch độc tố uốn ván có thể mất tính toàn vẹn về cấu trúc và hoạt tính của nó trong quá trình lưu trữ do hậu quả của sự phân giải protein theo thời gian khi chúng được lưu trữ ở điều kiện dưới mức tối ưu. Mức độ ‘thời

hạn sử dụng' của dung dịch protein có thể thay đổi từ vài ngày đến hơn một năm phụ thuộc vào bản chất của protein và điều kiện bảo quản được sử dụng. Các điều kiện bảo quản tối ưu sẽ khác nhau đối với từng loại protein tuy nhiên, có một số hướng dẫn chung về việc bảo quản và ổn định protein thông thường. Protein thường được bảo quản ở nhiệt độ thấp -20°C để làm chậm hoạt động của enzym và giúp duy trì tính toàn vẹn của protein lên đến một năm. Để kéo dài thời hạn sử dụng và duy trì độ ổn định của protein trong thời gian dài hơn nữa, protein có thể được bảo quản ở nhiệt độ lạnh sâu dưới -20°C hoặc cực lạnh như nhiệt độ đạt được với nitơ lỏng (-196°C). Điều này giúp ngăn chặn hiệu quả các phản ứng sinh hóa và đảm bảo độ ổn định của protein trong nhiều năm. Các chất bảo vệ lạnh như glycerin hoặc ethylene glycol có nồng độ cuối cùng là 25-50% giúp ổn định protein bằng cách ngăn chặn sự hình thành các tinh thể băng khi ở độ lạnh sâu từ -20°C có thể làm phá hủy cấu trúc protein. Ngoài ra khi chuẩn bị dung dịch protein để bảo quản lạnh sâu cần lưu ý đến nồng độ của nó vì các dung dịch protein ở nồng độ thấp hơn 1 mg/ml dễ bị phân giải protein hoặc tăng khả năng bị bất hoạt do liên kết ở mức độ thấp với bề mặt vật liệu chứa trong quá trình bảo quản [9].

Độc tố uốn ván thô lô 1017/T có hàm lượng protein là 0,47mg/ml, hàm lượng kháng nguyên 42Lf/ml, liều gây chết 50%

đạt 800.000 LD₅₀ . Như vậy lô độc tố thô 1017/T đạt tiêu chuẩn để làm độc tố dùng cho thử thách trong thử nghiệm công hiệu uốn ván ($\geq 10.000 \text{ LD}_{50}/1\text{Lf}$). Sau khi pha với glycerin thành lô độc tố mẫu chuẩn TeToxVn0117 dự kiến hàm lượng kháng nguyên và độc lực giảm còn một nửa, nghĩa là vào khoảng 21 Lf/ml và 400.000 LD₅₀/ml, đáp ứng được các yêu cầu của một mẫu chuẩn. Thực tế sau khi chuẩn độ số đơn vị LD₅₀ và L+/10 trung bình của dung dịch độc tố làm việc này đạt lần lượt là $417,721 \pm 26,461$ (19,891 LD₅₀/Lf) và $223 \text{ L}+/10 \pm 2,739$. Nhiệt độ bảo quản $\leq -40^{\circ}\text{C}$, tỷ lệ glycerin 50% v/v và hàm lượng protein trong lô độc tố này đủ cao để giảm thiểu khả năng độc tố bị phân giải và hấp thụ vào bề mặt của vật liệu chứa trong quá trình bảo quản đã giúp cho lô độc tố đạt được độ ổn định về độc lực trong suốt thời gian lưu trữ từ năm 2017 đến 2023. Trong quá trình sử dụng độc tố mẫu chuẩn TeToxVn0117 để kiểm tra công hiệu uốn ván của các vắc xin TT, Td, DPT cho thấy các kết quả công hiệu đều có giá trị (valid test) với chuẩn độ ngược liều độc tố thử thách cho biết với liều 1LD₅₀ chuột luôn chết trong khoảng 25-75%, đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của thử nghiệm.

5. Kết luận

Lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117 có số lượng 750 ống (1,2 ml/ống), số đơn vị liều gây chết 50% là 417,721 LD₅₀, và số đơn vị L+/10 đạt 223

L+/10. Kết quả đánh giá tính ổn định cho thấy lô độc tố uốn ván mẫu chuẩn TeToxVn0117 có độ ổn định độc lực trong ít nhất 6 năm khi bảo quản ở nhiệt độ $\leq -40^{\circ}\text{C}$, đồng thời đã thể hiện được sự ổn định khi sử dụng trong thử nghiệm kiểm tra công hiệu uốn ván và chuẩn độ hiệu giá huyết thanh kháng độc tố uốn ván từ năm 2017 đến nay.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V, 2018, P.L 15.22.
- [2] World Health Organization (2013), Manual for Quality Control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80681> (Accessed: 28 January 2024).
- [3] World Health Organization (2018), The immunological basis for immunization series: Module 3: Tetanus. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275340> (Accessed: 28 January 2024).
- [4] World Health Organization (2006), Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, annex 2, TRS no 932. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/annex2-trs932> (Accessed: 25 February 2024).
- [5] World Health Organization (2011), WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-IVB-11.03> (Accessed: 28 January 2024).
- [6] MacConkey AT (1924), The Stability of Tetanus Toxin in 50% Glycerine and of Tetanus Antitoxin in Saturated Salt Solution. *Epidemiology and Infection*. 1924;22(4):473-476. doi:<https://doi.org/10.1017/s0022172400008408>
- [7] Reed LJ, Muench H (1938), A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-497. doi:<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- [8] Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C (2013), Tetanus neurotoxin, *Toxicon*. 2013;66:59-63. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.027>
- [9] Pierce Biotechnology, Inc. (2003, June). "Technical resource: Protein stability and storage". The Wolfson Centre for Applied Structural Biology. https://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/StorageProteins/PIERCE_ProteinStorage.pdf