

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-18:2017

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN - PHẦN 18: VẮC XIN
VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH NEWCASTLE**

Vaccine testing procedure - Part 18: newcastle disease vaccine, inactivated

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 8685-18:2017 do Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y TW1 - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 8685 Quy trình kiểm nghiệm vắc xin gồm các phần:

- TCVN 8685-1 : 2011, Phần 1: Vắc xin phó thương hàn lợn nhược độc;
- TCVN 8685-2 : 2011, Phần 2: Vắc xin viêm gan siêu vi trùng vịt;
- TCVN 8685-3 : 2011, Phần 3: Vắc xin E.coli của lợn;
- TCVN 8685-4 : 2011, Phần 4: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng giảm đẻ ở gà;
- TCVN 8685-5 : 2011, Phần 5: Vắc xin ung khí thán;
- TCVN 8685-6 : 2011, Phần 6: Vắc xin Gumboro nhược độc;
- TCVN 8685-7 : 2011, Phần 7: Vắc xin nhiệt thán nha bào vô độc chủng 34 F2;
- TCVN 8685-8 : 2011, Phần 8: Vắc xin dịch tả lợn nhược độc;
- TCVN 8685-9 : 2014, Phần 9: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Cúm gia cầm A/H5N1;
- TCVN 8685-10 : 2014, Phần 10: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Lở mồm long móng (FMD);
- TCVN 8685-11 : 2014, Phần 11: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Phù đầu gà (coryza);
- TCVN 8685-12 : 2014, Phần 12: Vắc xin nhược độc, đông khô phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);
- TCVN 8685-13 : 2014, Phần 13: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);
- TCVN 8685-14 : 2017, Phần 14: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm

TCVN 8685-18 : 2017

phổi thể kính ở lợn;

- TCVN 8685-15 : 2017, *Phần 15: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do pasteurella multocida type D gây ra ở lợn;*
- TCVN 8685-16 : 2017, *Phần 16: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm ở lợn;*
- TCVN 8685-17 : 2017, *Phần 17: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn;*
- TCVN 8685-18 : 2017, *Phần 18: Vaccin vô hoạt phòng bệnh newcastle;*
- TCVN 8685-19 : 2017, *Phần 19: Vaccin vô hoạt phòng bệnh gumboro.*

Quy trình kiểm nghiệm vắc xin -

Phần 18: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh newcastle

Vaccine testing procedure - Part 18: Newcastle disease vaccine, Inactivated

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định qui trình kỹ thuật để kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt phòng bệnh Newcastle cho gà.

2. Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8684:2011, *Vắc xin và chế phẩm sinh học dùng trong thú y – Phép thử độ thuần khiết.*

3. Nguyên tắc

Vắc xin được kiểm tra các chỉ tiêu cảm quan, độ vô trùng bằng các phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm, các chỉ tiêu tính an toàn và tính hiệu lực được đánh giá trên các động vật thí nghiệm.

4. Vật liệu và thuốc thử

4.1 Gà 21 ngày tuổi đến 28 ngày tuổi, gà khỏe, âm tính với kháng thể kháng vi rút Newcastle.

4.2 Trứng gà SPF có phôi từ 9 ngày tuổi đến 11 ngày tuổi

4.3 Dung dịch natri citrat 5 %

4.4 Nước muối sinh lý (dung dịch NaCl 0,9 %)

4.5 Vi rút Newcastle cường độ chủng VN91

4.6 Kháng nguyên Newcastle (nước trứng)

5. Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Đèn soi trứng

5.2 Tủ áp trứng duy trì nhiệt độ 37 °C

5.3 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml

5.4 Đĩa Petri vô trùng

5.5 Micropipet, dung tích từ 0,5 µl đến 10 µl, từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl, từ 100 µl đến 1000 µl

5.6 Micropipet đa kênh, dung tích từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl

5.7 Dao, kéo, panh kẹp vô trùng

5.8 Đĩa 96 giếng chữ U,V

5.9 Máy ly tâm, có thể quay với tốc độ từ 1000 rpm đến 3000 rpm

5.10 Ống ly tâm vô trùng

5.11 Bơm tiêm dung tích 5 ml

5.12 Máy lắc (vortex mixer) có tốc độ lắc từ 50 rpm đến 2400 rpm

6. Lấy mẫu sản phẩm và chuẩn bị động vật thí nghiệm

6.1 Lấy mẫu sản phẩm

Số lượng mẫu cần lấy: 12 mẫu (chai/lọ)

6.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

- 40 gà (4.1)

- 100 trứng gà (4.2)

7. Cách tiến hành

7.1 Kiểm tra cảm quan

Quan sát bằng mắt thường, vắc xin được coi là đạt yêu cầu khi hỗn dịch đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn.

7.2 Kiểm tra vô trùng

7.2.1 Kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn. Theo TCVN 8684:2011

7.2.2 Kiểm tra tạp nhiễm nấm mốc. Theo TCVN 8684:2011

7.3 Kiểm tra vô hoạt

Tiêm ít nhất 100 trứng gà (4.2), mỗi trứng 0,2 ml vắc xin vào xoang niệu mô. Ấp các trứng đã được tiêm ở tủ ẩm 37 °C (5.2) trong 5 ngày. Mô thu hoạch nước trứng làm phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) và kiểm tra bệnh tích phôi.

Vắc xin được coi là vô hoạt khi phôi không có bệnh tích và nước trứng cho kết quả âm tính trong phản ứng ngưng kết hồng cầu với kháng nguyên vi rút Newcastle.

7.4 Kiểm tra tính an toàn

- Tiêm cho 10 gà (4.1), mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn theo đường dưới da cổ.
- Theo dõi gà đã được tiêm vắc xin trong 14 ngày.
- Vắc xin được coi là an toàn nếu tất cả gà sống khỏe mạnh, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân.

7.5 Kiểm tra hiệu lực

7.5.1 Phương pháp trọng tài

Sử dụng 30 gà (4.1), chia làm 2 nhóm:

- Nhóm 1: gồm 20 con, mỗi con được tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn, theo đường dưới da cổ.
- Nhóm 2: gồm 10 con làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sau khi tiêm 21 ngày, toàn bộ gà nhóm 1 và nhóm 2 được thử thách với chủng vi rút Newcastle cường độc VN91 (4.5), liều $10^{5,0}$ EID₅₀/con theo đường tiêm bắp.

Theo dõi gà thí nghiệm trong vòng 10 ngày.

Vắc xin được coi là đạt nếu:

- Ít nhất 80 % gà nhóm 1 sống khỏe, không có bất kỳ biểu hiện nào của bệnh Newcastle.
- Ít nhất 80 % gà nhóm 2 chết vì bệnh Newcastle.

7.5.2 Phương pháp huyết thanh học

Sử dụng 30 gà (4.1), chia làm 2 nhóm:

- Nhóm 1: gồm 20 con, mỗi con được tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn, theo đường dưới da cổ.
- Nhóm 2: gồm 10 con làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sau khi tiêm 21 ngày, tất cả gà nhóm 1 và nhóm 2 được lấy máu, thu huyết thanh làm phản ứng HI (xem Phụ lục A, B).

Vắc xin đạt tiêu chuẩn nếu: Hiệu giá HI của nhóm 1 phải $\geq 1:16$ và nhóm 2 phải $\leq 1:4$.

Phụ lục A

(Quy định)

Phản ứng ngưng kết hồng cầu gà (HA)**A.1 Thuốc thử và vật liệu thử**

- Dung dịch natri citrat 5 %.
- Nước muối sinh lý (dung dịch NaCl 0,9 %).
- Máu gà trống khoẻ đã trưởng thành, âm tính với kháng thể kháng vi rút cúm và Newcastle.
- Đĩa 96 giếng chữ U.

A.2 Thiết bị, dụng cụ

- Máy ly tâm, có thể quay với tốc độ từ 1000 rpm đến 3000 rpm.
- Ống ly tâm.
- Bơm tiêm dung tích 5 ml.
- Máy lác.

A.3 Chuẩn bị hồng cầu gà 1 %

- Dùng Bơm tiêm dung tích 5 ml để hút 2,5 ml dung dịch chống đông (natri citrat 5 %) cho vào ống ly tâm, thêm 5 ml máu gà trống.

- Ly tâm với tốc độ từ 1000 rpm đến 1500 rpm trong 15 min, gạn bỏ phần nước nổi bên trên, cho thêm nước muối sinh lý vào hồng cầu, lác đều. Ly tâm như trên từ 3 lần đến 4 lần để rửa hồng cầu, hút bỏ nước ở trên sau lần ly tâm cuối.

- Chuẩn bị dung dịch 1 % bằng cách pha 1 ml hồng cầu với 99 ml nước muối sinh lý.

- Bảo quản dung dịch hồng cầu ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C. Hồng cầu sau khi pha có thể dùng trong 4 ngày đến 5 ngày (nếu dung dịch hồng cầu bị dung huyết thì loại bỏ).

A.4 Cách tiến hành

- Nhỏ 50 µl nước muối sinh lý vô trùng vào đĩa 96 giếng chữ U từ giếng thứ 1 đến giếng 12 của mỗi hàng.

- Nhỏ 50 µl kháng nguyên vi rút vào cột đầu tiên của đĩa.

- Tiếp tục pha loãng kháng nguyên kiểm tra theo cơ số 2 bằng cách chuyển 50 µl từ giếng 1 đến giếng thứ 2 và tuần tự đến giếng 11 rồi bỏ đi 50 µl.

- Giếng 12 làm đối chứng hồng cầu: 50 µl nước muối sinh lý và 50 µl hồng cầu gà 1 %.

TCVN 8685-18 : 2017

- Nhỏ 50 µl hồng cầu gà 1 % vào các giếng của đĩa phản ứng.
- Lắc nhẹ bằng tay hoặc bằng máy. Ủ đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian khoảng 30 min, sau đó đọc kết quả.

A.5 Diễn giải kết quả

- Phản ứng âm tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo thành chấm tròn.
- Phản ứng dương tính: Xảy ra hiện tượng ngưng kết, hồng cầu ngưng kết thành cụm lấm tấm xung quanh giếng.
- Đọc hiệu giá ngưng kết: Hiệu giá ngưng kết kháng nguyên được đánh giá ở độ pha loãng cao nhất còn có phản ứng ngưng kết xảy ra.

Phụ lục B

(Quy định)

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà (HI)**B.1 Thuốc thử và vật liệu thử**

- Hồng cầu gà, nồng độ 1 %.
- Nước muối sinh lý (dung dịch NaCl 0,9 %).
- Đĩa ngưng kết 96 giếng đáy chữ V.
- Kháng nguyên (nước trứng).

Kháng nguyên dùng cho phản ứng HI được pha 4 đơn vị HA

B.2 Cách tiến hành

- Nhỏ 25 µl nước muối sinh lý vô trùng vào đĩa 96 giếng chữ V từ giếng thứ 1 đến giếng 12 của mỗi hàng.
- Nhỏ 25 µl huyết thanh cần kiểm tra vào cột đầu tiên của đĩa, pha loãng bậc 2.
- Tiếp tục pha loãng huyết thanh kiểm tra theo cơ số 2 bằng cách chuyển 25 µl từ giếng 1 đến giếng thứ 2 và tuần tự đến giếng 11 rồi bỏ đi 25 µl.
- Giếng 12 làm đối chứng hồng cầu: 50 µl nước muối sinh lý và 50 µl hồng cầu gà 1 %.
- Cho vào tất cả các giếng mỗi giếng 25 µl dung dịch kháng nguyên 4 HA, lắc nhẹ trong vòng 1 min, để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 min.
- Hút 50 µl dung dịch hồng cầu 1 % cho vào các giếng, lắc nhẹ trong vòng 1 min. Để ở nhiệt độ phòng trong 30 min (khi nào đối chứng hồng cầu lắng hoàn toàn) và đọc kết quả.

B.3 Diễn giải kết quả

- Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết lấm chấm.
- Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo chấm tròn.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASEAN Standards for Animal Vaccines (Second Edition): *Requirements for Newcastle Disease Vaccine, inactivated*
-