

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-11: 2014

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –
PHẦN 11: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH PHÙ ĐẦU
GÀ (CORYZA)**

*Vaccine testing procedure –
Part 11: Haemophilus paragallinarum vaccine, inactivated*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8685-11:2014 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.

**Quy trình kiểm nghiệm vắc xin -
Phần 11: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh phù đầu gà (coryza)**

Vaccine testing procedure - Part 11: Haemophilus paragallinarum vaccine, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định yêu cầu kỹ thuật để kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt phòng bệnh phù đầu ở 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 Lấy mẫu sản phẩm và chuẩn bị động vật

3.1 Lấy mẫu sản phẩm:

Lấy mẫu sản phẩm theo qui định trong bảng như sau:

Số lượng mẫu vắc xin và chế phẩm sinh học cần lấy

| Quy cách đóng gói (ml) | Số lượng mẫu lấy (sản phẩm) |
|------------------------|-----------------------------|
| Cho tới 100 | Từ 7 đến 10 |
| Trên 100 | Từ 5 đến 7 |

TCVN 8685-11:2014

3.2 Chuẩn bị động vật

- 10 con gà từ 5 đến 6 tuần tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi khuẩn *Haemophilus paragallinarum*.
- 40 con gà từ 3 đến 6 tuần tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi khuẩn *Haemophilus paragallinarum*.

4 Cách tiến hành

4.1 Kiểm tra cảm quan

Vắc xin phải đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn.

4.2 Kiểm tra độ thuần khiết, theo TCVN 8684:2011.

4.3 Kiểm tra an toàn

Tiêm cho ít nhất 10 con gà từ 5 đến 6 tuần tuổi, mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn. Theo dõi gà trong thời gian từ 14 ngày đến 21 ngày.

Vắc xin được coi là đạt nếu tất cả gà sống khỏe mạnh, không có bất kỳ các phản ứng cục bộ hay toàn thân liên quan đến vắc xin trong thời gian theo dõi.

4.4 Kiểm tra hiệu lực

4.4.1 Phương pháp trọng tài

- Tiêm cho ít nhất 20 con gà từ 3 đến 6 tuần tuổi, mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn. 20 gà đối chứng không tiêm vắc xin.
- Sau 14 ngày toàn bộ gà được tiêm một mũi thứ 2 với liều lượng như trên.
- Từ 14 đến 21 ngày sau mũi tiêm lần 2, gà được tiêm và gà đối chứng được thử thách với vi khuẩn cường độc tương ứng.
- Theo dõi trong thời gian 7 đến 10 ngày.
- Vắc xin được coi là đạt nếu:
 - + Ít nhất 70 % gà đối chứng có triệu chứng bệnh tích của bệnh phù đầu;
 - + Ít nhất 70 % gà được tiêm không có bất kỳ các triệu chứng bệnh tích của bệnh phù đầu.

4.4.2 Phương pháp thay thế

- Tiêm ít nhất 20 con gà từ 3 đến 6 tuần tuổi, khỏe mạnh, mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn. 20 gà đối chứng không tiêm vắc xin.
- 14 ngày sau, toàn bộ gà được tiêm một mũi thứ 2 với liều lượng như trên.
- Từ 14 đến 21 ngày sau mũi tiêm lần 2, gà miễn dịch được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng huyết thanh học (theo Phụ lục A).
- Vắc xin được coi là đạt nếu:
 - + ít nhất 70 % gà được tiêm có hiệu giá kháng thể *H. paragallinarum* $\geq 4\log_2$;
 - + ít nhất 70 % gà đối chứng có hiệu giá kháng thể *H. paragallinarum* âm tính.

Phụ lục A
(Quy định)

Kiểm tra hiệu giá kháng thể Coryza bằng phương pháp HI

A.1 Chuẩn bị

A.1.1 Chuẩn bị kháng nguyên

- Cấy vi khuẩn Hpg vào môi trường thạch CMI, nuôi cấy trong tủ ấm có 5 % CO₂ ở 37 °C trong 24 h.
- Thu hoạch kháng nguyên: Cho 1 lượng 0,5 ml dung dịch PBS (Phosphate buffered saline) vào đĩa thạch. Dùng pipet Pasteur được uốn cong để thu hoạch kháng nguyên. Dùng pipet hút kháng nguyên vào ống.
- Ly tâm với tốc độ 4 000 vòng/min trong 10 min.
- Hút bỏ phần nước trong. Cho thêm PBS vào ống hoà tan cặn để rửa kháng nguyên. Làm 3 lần (lần thứ 3 ly tâm 13 000 vòng/ min trong 2 min).
- Lấy cặn và cho thêm 0,5 ml PBS để đạt độ đậm đặc ống số 5 Macfaland.
- Cho thêm 0,01 % (khối lượng/thể tích) thimerosal.
- Ủ ở 4 °C trong 3 ngày trước khi sử dụng.

A.1.2 Chuẩn bị hồng cầu

- Hồng cầu gà được lấy vào ống fancel có chất chống đông.
- Ly tâm rửa hồng cầu 3 lần bằng dung dịch PBS.
- Pha hồng cầu thành 1 %. Cho thêm 0,01 (khối lượng/thể tích) thimerosal, 0,001 % gelatin.
- Khi sử dụng pha hồng cầu thành 0,05 %.

A.1.3 Chuẩn bị hồng cầu cố định bằng formalin

- Hồng cầu đã được rửa 3 lần được pha thành nồng độ 1 %.
- Cho một lượng tương đương dung dịch formalin 8,3 % vào hồng cầu. Cho vào từ từ và lắc nhẹ trên máy lắc ở 37 °C trong 3 h.

- Thêm formalin 8,3 % vào hỗn hợp trên theo tỷ lệ 1:5, ủ ở 37 °C lắc nhẹ trong 20 h.
- Rửa hồng cầu đã cố định 10 lần bằng dung dịch PBS (tỷ tậm 200 vòng/min trong 5 -10 min).
- Cặn được hoà tan thành 10 % trong PBS.
- Thêm 0,05 % albumin huyết thanh bò (BSA).
- Thêm 0,01 % thimerosal, bảo quản ở 4 °C. Sử dụng trong vòng 2 tháng.

A.1.4 Chuẩn bị huyết thanh chẩn đoán

- Ly tâm máu và chất lấy huyết thanh.
- Cho hồng cầu đã cố định vào huyết thanh chẩn đoán theo tỷ lệ (1 phần huyết thanh với 5 phần hồng cầu đã cố định 1 %), ủ hỗn hợp ở 37 °C trong 2 h ở điều kiện lắc nhẹ trên máy lắc.
- Ly tâm chất lấy huyết thanh.
- Khi sử dụng thì lúc này huyết thanh chẩn đoán đang ở nồng độ 1/5.

A.2 Cách tiến hành

A.2.1 Với kháng nguyên Hpg A

A.2.1.1 Quy trình cho phản ứng HA cho kháng nguyên Hpg A (xem Bảng A.1)

| Dung dịch | Thí nghiệm | | | | | | | | Đối chứng | | | |
|-------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|----------------------------|-------|
| | | | | | | | | | PBS | | Hồng cầu + kháng nguyên | |
| Thứ tự | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| PBS | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |
| Kháng nguyên | 25 µl | | | | | | | | | | 25 µl | 25 µl |
| Hồng cầu 0,5 % | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Bảng A.1 – Sơ đồ phản ứng HA cho kháng nguyên Hpg A

- a) Cho dung dịch PBS vào các dây giếng (25 µl/giếng).

TCVN 8685-11:2014

b) Thêm vào giếng đầu tiên 25 µl kháng nguyên và pha loãng kháng nguyên theo cơ số 2.

c) Nhỏ vào các giếng 50 µl hồng cầu 0,5 %.

d) Các giếng đối chứng:

+ Đối chứng hồng cầu: 25 µl dung dịch PBS + 50 µl hồng cầu 0,5 %;

+ Đối chứng kháng nguyên: 25 µl dung dịch PBS + 25 µl kháng nguyên + 50 µl hồng cầu 0,5 %.

Lắc nhẹ trong 20 s, để yên 40 min rồi đọc kết quả.

* Đọc kết quả:

+ Phản ứng âm tính: Hồng cầu lắng đều ở dưới đáy giếng thành chám tròn.

+ Phản ứng dương tính: Xảy ra hiện tượng ngưng kết, hồng cầu ngưng kết thành cụm lấm tẩm 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.

A.2.1.2 Phản ứng HI cho kháng nguyên Hpg A (xem Bảng A.2)

| Nguyên liệu | Lô thí nghiệm | | Đối chứng | | |
|--|---------------|-------|-------------------|--------------|-------|
| | | | Huyết thanh chuẩn | Kháng nguyên | PBS |
| | 1 | 2 ... | 10 | 11 | 12 |
| PBS | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |
| Huyết thanh đã được xử lý hồng cầu (1:5) | 25 µl | 25 µl | 25 µl | | |
| Kháng nguyên | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | |
| Hồng cầu 0,5 % | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Bảng A.2 – Sơ đồ phản ứng HI cho kháng nguyên Hpg A

a) Cho dung dịch PBS vào các dây giếng (25 µl/giếng).

b) Nhỏ vào giếng đầu tiên 25 µl huyết thanh đã được xử lý hồng cầu.

c) Pha loãng huyết thanh theo cơ số 2.

d) Nhỏ vào các giếng 25 μ l kháng nguyên (kháng nguyên ở 4 đơn vị HA).

e) Lắc nhẹ 20 s, để yên 20 min.

f) Nhỏ vào các giếng 50 μ l hồng cầu 0,5 %.

* Đọc kết quả

- Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết bông lớn vờn.

- Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo chấm tròn.

g) Lắc nhẹ, để yên 40 min rồi đọc kết quả.

A.2.2 Với kháng nguyên Hpg C

A.2.2.1 Phản ứng HA cho kháng nguyên Hpg C (xem Bảng A.3)

| Dung dịch | Thí nghiệm | | | | | | | | Đối chứng | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|------------|
| | | | | | | | | | PBS | | Hồng cầu + kháng nguyên | |
| Thứ tự | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| PBS | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l | 25 μ l |
| Kháng nguyên | 25 μ l | | | | | | | | | | 25 μ l | 25 μ l |
| Hồng cầu cố định 1 % | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l |

Bảng A.3 – Sơ đồ phản ứng HA cho kháng nguyên Hpg C

a) Cho dung dịch PBS vào các dây giếng (25 μ l/giếng).

b) Thêm vào giếng đầu tiên 25 μ l kháng nguyên và pha loãng kháng nguyên theo cơ số 2.

c) Nhỏ vào các giếng 50 μ l hồng cầu cố định 1 %.

d) Các giếng đối chứng:

+ Đối chứng hồng cầu: 25 μ l dung dịch PBS + 50 μ l hồng cầu cố định 1 %;

+ Đối chứng kháng nguyên: 25 μ l dung dịch PBS + 25 μ l kháng nguyên + 50 μ l hồng cầu cố định 1 %.

TCVN 8685-11:2014

Lắc nhẹ trong 20 s, để yên 40 min rồi đọc kết quả.

* Đọc kết quả:

+ Phản ứng âm tính: Hồng cầu lắng đều ở dưới đáy giếng thành chấm tròn.

+ Phản ứng dương tính: Xây 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.

A.2.2.2 Phản ứng HI cho kháng nguyên Hpg C

| Nguyên liệu | Lô thí nghiệm | | Đối chứng | | |
|--|---------------|-------|-------------------|--------------|-------|
| | | | Huyết thanh chuẩn | Kháng nguyên | PBS |
| | | | 1 | 2... | 10 |
| PBS | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |
| Huyết thanh đã được xử lý hồng cầu (1:5) | 25 µl | 25 µl | 25 µl | | |
| Kháng nguyên | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | |
| Hồng cầu cố định 1 % | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Bảng A.4 – Sơ đồ phản ứng HI cho kháng nguyên Hpg C

- Cho dung dịch PBS vào các dãy giếng (25 µl/giếng).
- Nhỏ vào giếng đầu tiên 25 µl huyết thanh đã được xử lý hồng cầu.
- Pha loãng huyết thanh theo cơ số 2.
- Nhỏ vào các giếng 25 µl kháng nguyên (kháng nguyên ở 4 đơn vị HA).
- Lắc nhẹ 20 s, để yên 20 min.
- Nhỏ vào các giếng 50 µl hồng cầu cố định 1 %.
- Lắc nhẹ, để yên 40 min rồi đọc kết quả.

* Đọc kết quả

- Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết bóng lớn vờn.
- Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo chám tròn.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASEAN Standards for Animal Vaccines (Second Edition): Requirements for *Haemophilus Paragallinarum* Bacterin (Coryza)
-