

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8685-12: 2014**

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –  
PHẦN 12: VẮC XIN NHƯỢC ĐỘC, ĐÔNG KHÔ PHÒNG HỘI  
CHỨNG RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN (PRRS)**

*Vaccine testing procedure –  
Part 12: Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine, living*

**HÀ NỘI – 2014**

**Lời nói đầu**

TCVN 8685-12:2014 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 12: Vắc xin nhược độc, đông khô phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS)

*Vaccine testing procedure -*

*Part 12: Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine, living*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định yêu cầu kỹ thuật để kiểm nghiệm vắc xin nhược độc, đông khô phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn.

### 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 thí nghiệm

#### 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 dạng đông khô cần lấy

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

## **TCVN 8685-12:2014**

### **3.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm**

11 con lợn khỏe mạnh từ 3 đến 4 tuần tuổi, âm tính với kháng thể kháng vi rút hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản.

## **4 Cách tiến hành**

### **4.1 Kiểm tra cảm quan**

Kiểm tra bằng mắt thường: Vắc xin dạng bánh xốp, dễ tách khỏi thành lọ.

### **4.2 Kiểm tra độ thuần khiết: Theo TCVN 8684:2011.**

#### **4.2.1 Kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn**

#### **4.2.2 Kiểm tra tạp nhiễm nấm mốc**

### **4.3 Kiểm tra tính an toàn**

Tiêm bắp cho 3 con lợn mẫn cảm, khỏe mạnh, mỗi con 10 liều vắc xin ghi trên nhãn. Theo dõi lợn trong 21 ngày.

Vắc xin được coi là đạt nếu tất cả lợn sống khỏe mạnh, không có phản ứng cục bộ, có thể có phản ứng sốt nhẹ (tăng 0,5 °C sau khi tiêm từ 3 đến 5 ngày).

## **4.4 Kiểm tra hiệu lực**

### **4.4.1 Phương pháp trọng tài**

#### **4.4.1.1 Gây miễn dịch**

Tiêm cho 5 con lợn, mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn. 3 con lợn đối chứng không tiêm vắc xin.

28 ngày sau mũi tiêm cuối cùng, 5 con lợn được tiêm và 3 con lợn đối chứng được tiến hành lấy máu và công cường độc bằng chủng vi rút gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản được phân lập tại Việt Nam.

Theo dõi 21 ngày sau công cường độc.

#### **4.4.1.2 Các chỉ tiêu đánh giá hiệu lực**

##### **4.4.1.2.1 Đánh giá kết quả công cường độc**

– Lô miễn dịch: 100 % lợn sống khỏe mạnh, có thể có biểu hiện sốt nhẹ, kém ăn, chảy nước mũi sau công cường độc khoảng 3 đến 5 ngày, sau đó trở lại bình thường.

– Lô đối chứng: Lợn chết vì hội chứng PRRS hoặc có triệu chứng, bệnh tích điển hình của hội chứng PRRS.

**4.4.1.2.2 Đánh giá hiệu giá kháng thể hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản bằng phản ứng ELISA**

Lấy máu, thu huyết thanh tại các thời điểm 0 và 21 ngày sau công cường độc và đánh giá hàm lượng kháng thể bằng phản ứng ELISA.

Kết quả: Đánh giá theo bộ kit được sử dụng.

**4.4.1.2.3 Đánh giá hiệu giá kháng thể hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản bằng phản ứng miễn dịch có gắn men trên tế bào 1 lớp (IPMA – Immunoperoxidase monolayer assay)**

Lấy máu, thu huyết thanh tại các thời điểm 0 và 21 ngày sau công cường độc và đánh giá hàm lượng kháng thể bằng phản ứng IPMA

Kết quả: Hiệu giá kháng thể  $\geq 1/640$  (tại thời điểm 21 ngày sau công cường độc): Đạt bảo hộ.

**4.4.1.3 Đánh giá kết quả**

Vắc xin được coi là đạt nếu đáp ứng được 3 chỉ tiêu nêu trên.

**4.4.2 Phương pháp thay thế (Phương pháp chuẩn độ)**

**4.4.2.1 Chuẩn bị tế bào MARC-145 trên đĩa 96 giếng**

Tế bào MARC-145 được trypsin hóa thành huyền dịch có mật độ  $5 \times 10^3$  tế bào/ml. Cho 100  $\mu$ l huyền dịch tế bào trên vào tất cả các giếng. Đậy nắp, ủ tế bào ở 37 °C trong môi trường 5 % CO<sub>2</sub>, theo dõi hàng ngày.

Khi quan sát thấy tế bào bám đáy trên 80 % thì tiến hành chuẩn độ vi rút.

**4.4.2.2 Chuẩn độ vi rút**

– Pha loãng vắc xin trong ống nghiệm theo cơ số 10 bằng môi trường nuôi cấy tế bào từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-6}$  hoặc thấp hơn tùy theo cách bố trí thí nghiệm (xem Hình 1).

– Lấy đĩa tế bào MARC-145 đã nuôi, loại bỏ môi trường cũ.

– Rửa tế bào bằng dung dịch PBS (-), 200  $\mu$ l/giếng, sau đó loại bỏ dung dịch PBS (-).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	ĐCTB						
C	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	ĐCTB						
D	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	ĐCTB						
E	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	ĐCTB						
F	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	ĐCTB						
G	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	ĐCTB						
H												

Hình 1 – Sơ đồ bố trí phản ứng chuẩn độ vi rút trên tế bào

- Hút 100 µl huyền dịch vắc xin đã pha loãng lần lượt vào các giếng tương ứng trên đĩa tế bào (từ B1 đến G5), dãy đối chứng tế bào (từ B6 đến G6), cho 100 µl môi trường duy trì vào mỗi giếng.
- Ủ tế bào ở 37 °C trong môi trường có 5 % CO<sub>2</sub> trong 30 min.
- Rửa tế bào bằng dung dịch PBS (-), 200 µl/giếng, loại bỏ dung dịch PBS (-).
- Cho 200 µl môi trường duy trì vào mỗi giếng.
- Nuôi tế bào ở 37 °C trong môi trường có 5 % CO<sub>2</sub>, theo dõi hàng ngày, trong 5 ngày.
- Đọc kết quả: giếng có bệnh tích tế bào là dương tính.

#### 4.4.2.3 Tính kết quả

Theo công thức Spearman-Kärber:

$$\lambda.TCID_{50} (0,1 \text{ ml}) = X + 1/2 - (N_x/n)$$

trong đó:

X là logarit cơ số 10 của độ pha loãng vi rút có 100 % giếng xuất hiện bệnh tích tế bào;

N<sub>x</sub> là tổng số giếng có bệnh tích tế bào trong thí nghiệm;

n là số giếng của mỗi độ pha loãng;

λ là độ pha loãng vi rút.

**4.4.2.4 Đánh giá kết quả**

Vắc xin được coi là đạt nếu mỗi liều vắc xin có ít nhất  $10^5$  TCID<sub>50</sub>.

**TCVN 8685-12:2014**

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Chapter 2.8.7: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, OIE Terrestrial Manual 2010
-