

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-10: 2014

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –
PHẦN 10: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH
LỞ MÒM LONG MÓNG (FMD) A/H5N1**

*Vaccine testing procedure –
Part 10: Foot and mouth disease vaccine, inactivated*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8685-10:2013 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 10: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh lở mồm long móng (FMD)

Vaccine testing procedure - Part 10: Foot and mouth disease 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 lở mồm long móng dạng nhũ dầu hoặc keo phèn cho lợn và động vật nhai lại (các serotype O, A, Asia 1 đơn hoặc đa giá).

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 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 8685-10:2014

3.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

Tùy theo yêu cầu của vắc xin, chuẩn bị động vật sau:

- 8 con lợn từ 3 đến 4 tuần tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút gây bệnh lở mồm long móng.
- 8 con bê 6 tháng tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút gây bệnh lở mồm long móng.

4 Cách tiến hành

4.1 Kiểm tra cảm quan

Vắc xin nhũ dầu đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn. Vắc xin keo phèn có lắng cặn ở đáy chai.

4.2 Kiểm tra độ thuần khiết

Kiểm tra các chỉ tiêu tạp nhiễm vi khuẩn và tạp nhiễm nấm mốc theo TCVN 8684:2011.

4.3 Kiểm tra tính an toàn

4.3.1 Trên lợn

Tiêm theo một trong hai đường sau:

- a) Tiêm bắp cho 2 con lợn, mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.
- b) Tiêm vào vành móng bàn chân trước bên trái tại 2 vị trí cho 2 con lợn, mỗi vị trí 1 liều.

– Quan sát lợn được tiêm và 2 con lợn đối chứng trong 14 ngày.

- Vắc xin đạt tiêu chuẩn an toàn: Lợn sống khỏe, không có biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng của bệnh lở mồm long móng ở lưỡi, chân hoặc mõm.

4.3.2 Trên bê

Tiêm theo một trong hai đường sau:

- a) Tiêm bắp cho 2 con bê với 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.

Theo dõi trong 14 ngày.

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi không có bất kỳ triệu chứng cục bộ hay toàn thân nào trong thời gian theo dõi. Bê sống khỏe mạnh, không có triệu chứng bệnh tích điển hình của bệnh lở mồm long móng.

b) Tiêm vào nội bì lưỡi cho 2 con bê, ở 20 vị trí với liều 0,1 ml/vị trí. Sau 4 ngày quan sát, nếu không có các triệu chứng bệnh tích điển hình của bệnh thì tiêm nhắc lại theo cách trên cho mỗi con 3 liều quy định. Theo dõi tiếp 6 ngày sau tiêm lần 2.

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi không có bất kỳ triệu chứng cục bộ hay toàn thân nào trong thời gian theo dõi.

4.4 Kiểm tra hiệu lực

4.4.1 Trên lợn

Tiêm cho 3 con lợn, mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn. 28 ngày sau tiêm lần 1, tiêm mũi 2 với liều tương tự. 28 ngày sau khi tiêm lần hai, 3 con lợn được tiêm và 3 con lợn đối chứng được lấy máu để kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phương pháp trung hòa vi rút (theo Phụ lục B) hoặc phương pháp ELISA (theo Phụ lục A).

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi hiệu giá kháng thể trung hòa vi rút (viral neutralization – VN) $\geq 1/100$ hoặc hiệu giá kháng thể ELISA $\geq 1/128$ (khi vắc xin có tính tương đồng kháng nguyên).

4.4.2 Trên bê

Tiêm cho 3 con bê 6 tháng tuổi, khỏe mạnh, mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn. Bốn tuần sau khi tiêm vắc xin 3 con bê được tiêm và 3 con bê đối chứng được lấy máu. Kiểm tra hàm lượng kháng thể trong máu bằng phương pháp trung hòa vi rút trên tế bào (theo Phụ lục B) hoặc phương pháp ELISA (theo Phụ lục A) với chủng tương ứng có trong vắc xin.

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi hiệu giá kháng thể trung hòa vi rút $\geq 1/100$ hoặc hiệu giá kháng thể ELISA $\geq 1/128$ (khi vắc xin có tính tương đồng kháng nguyên).

Phụ lục A
(Quy định)

Định lượng kháng thể kháng vi rút lở mồm long móng bằng phản ứng ELISA

A.1 Cách tiến hành

A.1.1 Phù đĩa

- Lấy "rabbit antiserum" từ ngăn mát tủ lạnh, sau đó lắc đều và nhẹ nhàng để bảo đảm tính đồng nhất của nguyên liệu trước khi sử dụng.
- Chuẩn bị pha loãng 1/1000 cho mỗi rabbit antiserum serotype A trong dung dịch coating buffer (dung dịch đệm gắn đĩa) pH 9,6
- Cho 50 µl của rabbit antiserum đã pha loãng vào đĩa phản ứng (Maxisorp-NUNC) theo sơ đồ đã bố trí xét nghiệm.
- Đậy đĩa và ủ ở nhiệt độ từ 1 °C đến 8 °C qua đêm (18 h) trong hộp nhựa ẩm ướt.

A.1.2 Ủ mẫu xét nghiệm và đối chứng kháng nguyên

A.1.2.1 Pha loãng mẫu xét nghiệm trong trường hợp định tính

- Lắc đều mẫu đối chứng và mẫu xét nghiệm trước khi sử dụng.
 - Mẫu xét nghiệm và các mẫu đối chứng được pha loãng 1/16 trong đĩa polypropylen đáy chữ U.
 - Đầu tiên, chuẩn bị pha loãng 1/16 cho mỗi mẫu đối chứng và mẫu xét nghiệm trong Buffer A
- VÍ DỤ: Lấy 15 µl mỗi huyết thanh đối chứng (C++, C+, C-) cho vào 225 µl Buffer A và lấy 10 µl huyết thanh của mỗi mẫu xét nghiệm cho vào 150 µl Buffer A.
- Cho 50 µl mẫu đối chứng và mẫu xét nghiệm đã pha loãng vào các giếng tương ứng trong đĩa nhựa đáy chữ U. Cho 50 µl Buffer A vào các giếng kháng nguyên đối chứng (Ca) theo sơ đồ trong Hình A.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	C++	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	C++	C++	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	C+	C+	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	C+	C+	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	C-	C-	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	C-	C-	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	Ca	Ca	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	Ca	Ca	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

Hình A.1 – Sơ đồ các giếng trong trường hợp phát hiện kháng thể

A.1.2.2 Pha loãng mẫu xét nghiệm trong trường hợp định lượng

A.1.2.2.1 Pha loãng bậc 2

- Chuẩn bị pha loãng 1/16 cho các mẫu đối chứng theo A.1.2.1.
- Tiếp theo, chuẩn bị pha loãng 1/8 cho mỗi mẫu xét nghiệm trong đĩa nhựa hoặc trong tube (ví dụ lấy 20 µl mẫu xét nghiệm cho vào 140 µl Buffer A).
- Cho 50 µl đệm A vào tất cả các giếng từ cột 3 đến cột 12 trong đĩa polypropylen đáy chữ U. Cho 50 µl mẫu đối chứng đã pha loãng vào các giếng tương ứng như trong sơ đồ. Các giếng kháng nguyên đối chứng (Ca) cho vào 50 µl Buffer A.
- Cho 50 µl mẫu xét nghiệm đã pha loãng 1/8 đến các giếng tương ứng của hàng A hoặc E, cột 3-12. Trộn đều 100 µl trong các giếng này. Đây là thể tích 100 µl của mẫu pha loãng 1/16. Sau đó, chuyển 50 µl huyết thanh từ hàng A đến hàng B, trộn đều và chuyển đến hàng D và loại bỏ 50 µl từ hàng D. Nồng độ pha loãng mẫu lúc này là 1/16 đến 1/128. Tiếp tục cho các mẫu khác thì lặp lại như trên bắt đầu từ hàng E đến hàng H và loại bỏ 50 µl từ hàng H. Xem sơ đồ trong Hình A.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	C++	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
B	C++	C++	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
C	C+	C+	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
D	C+	C+	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
E	C-	C-	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
F	C-	C-	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
G	Ca	Ca	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
H	Ca	Ca	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10

Hình A.2 – Sơ đồ các giếng trong trường hợp định lượng kháng thể

A.1.2.2.2 Pha loãng bậc 5

- Chuẩn bị pha loãng 1/16 của mẫu đối chứng giống như trong A.1.2.1, nhưng mỗi mẫu đối chứng lấy 20 µl cho vào 300 µl đệm A. Cho 60 µl mẫu đối chứng đã pha loãng vào các giếng tương ứng trong đĩa polypropylen đáy chữ U như trong sơ đồ. Giếng đối chứng kháng nguyên (Ca) cho vào 60 µl Buffer A.

- Chuẩn bị pha loãng 1/5 cho mỗi huyết thanh xét nghiệm bằng cách lấy 20 µl huyết thanh cho vào 80 µl Buffer A.

- Tiếp theo, cho 60 µl Buffer A vào tất cả các các giếng từ cột 3 đến cột 12 trong đĩa polypropylen, lấy 15 µl huyết thanh xét nghiệm đã pha loãng 1/5 cho vào các giếng tương ứng của hàng A hoặc hàng E của cột 3-12. Đây là kết quả của pha loãng bậc 5. Trộn đều 75 µl trong các giếng này, đây là thể tích 75 µl của nồng độ pha loãng 1/25. Chuyển 15 µl của nồng độ này từ hàng A đến hàng B và trộn đều ở hàng B và tiếp tục tương tự cho đến hàng D và loại bỏ 15 µl từ hàng D. Các mẫu tiếp theo lặp lại như trên và bắt đầu từ hàng E đến hàng H và loại bỏ 15 µl từ hàng H. Xem sơ đồ trong Hình A.2.

A.1.2.3 Thêm kháng nguyên

- Chuẩn bị pha loãng 1/100 kháng nguyên lở mồm long móng serotype A22 IRAQ 24/64 trong Buffer A.

- Với đĩa định lượng pha loãng bậc 2, cho 50 µl kháng nguyên đã pha loãng 1/100 đến tất cả 96 giếng trong đĩa polypropylen đáy chữ U. Đây là nồng độ pha loãng mẫu xét nghiệm, lúc này đạt nồng độ từ 1/32 đến 1/256 của phương pháp chuẩn độ.
- Với đĩa định lượng pha loãng bậc 5, cho 60 µl kháng nguyên đã pha loãng 1/100 đến tất cả 96 giếng trong đĩa polypropylen đáy chữ U. Đây là nồng độ pha loãng mẫu xét nghiệm, lúc này đạt nồng độ từ 1/50 đến 1/6250 của phương pháp chuẩn độ.
- Lắc đều hỗn hợp huyết thanh xét nghiệm và kháng nguyên bằng tay hoặc bằng máy, dán kín đĩa. Ủ ở nhiệt độ từ 1 °C đến 8 °C qua đêm.

A.1.3 Chuyển hỗn hợp kháng nguyên và mẫu xét nghiệm

Lấy đĩa phản ứng (đĩa đã phủ rabbit antibody) và đĩa polypropylen đáy chữ U có chứa hỗn hợp mẫu xét nghiệm và kháng nguyên để ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa phủ rabbit antibody 5 lần với nước rửa PBS 0,002 M, sau đó đập làm sạch đĩa trên khăn vải mềm.

Lắc đều hỗn hợp mẫu xét nghiệm-kháng nguyên, sau đó chuyển 50 µl hỗn hợp này vào đĩa phản ứng tương ứng với sơ đồ bố trí xét nghiệm.

Đậy nắp và ủ lắc liên tục ở nhiệt độ +35 °C đến +39 °C trong 1 h.

A.1.4 Chuẩn bị dung dịch đệm B

Thêm PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween 20) 0,01 M (Buffer A) vào sữa bột gầy (skim milk) sao cho nồng độ sữa gầy là 5 %. Lắc đều và điều chỉnh pH ở đây pH 7,4 ± 0,2 bằng dung dịch NaOH 0,1 M.

VÍ DỤ: Để chuẩn bị 100 ml dung dịch đệm B thì cân 5 g sữa gầy cho vào 100 ml dung dịch Buffer A.

A.1.5 Thêm kháng thể phát hiện (Guinea Pig antiserum)

Trước khi kết thúc giai đoạn ủ hỗn hợp kháng nguyên và huyết thanh xét nghiệm, chuẩn bị pha loãng guinea pig serotype A nồng độ 1/100 trong Buffer B.

Sau khi ủ 1 h, lấy đĩa phản ứng từ tủ ấm ra ngoài và rửa 5 lần với dung dịch nước rửa PBS, pH 7,4 ± 0,2

Cho 50 µl Guinea pig đã pha loãng 1/100 vào tất cả 96 giếng trên đĩa phản ứng.

Đậy nắp và ủ lắc liên tục ở nhiệt độ từ 35 °C đến 39 °C trong 1 h.

TCVN 8685-10:2014

A.1.6 Thêm conjugate

Trước khi kết thúc giai đoạn ủ Guinea pig, chuẩn bị pha loãng conjugate 1/200 trong đệm B.

Sau 1 h ủ guinea pig, lấy đĩa phản ứng từ tủ ấm ra ngoài và rửa 5 lần với dung dịch nước rửa PBS, pH $7,4 \pm 0,2$.

Cho 50 μ l dung dịch conjugate đã pha loãng vào tất cả các giếng trên đĩa phản ứng.

Đậy đĩa và ủ lắc liên tục ở nhiệt độ $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 h.

A.1.7 Thêm dung dịch chất phát màu Substrate Chromogen và dung dịch stop

Trước khi kết thúc giai đoạn ủ conjugate, chuẩn bị dung dịch chất phát màu OPD (Ortho-Phenylendiamine). Dung dịch này phải được giữ trong tối và nếu đã chuyển sang màu vàng thì nên loại bỏ.

Chuẩn bị một đĩa sạch (blanking plate). Đĩa này sau khi dùng xong có thể rửa sạch và dán kín những giếng chưa sử dụng cho những lần xét nghiệm kế tiếp.

Sau ủ conjugate trong 1 h, lấy đĩa phản ứng từ tủ ấm ra ngoài và rửa 5 lần với dung dịch nước rửa PBS, pH $7,4 \pm 0,2$.

Chuẩn bị chất phát màu cho một đĩa phản ứng như sau: lấy 30 μ l của Substrate - H_2O_2 3 % pha trong 6 ml dung dịch chất phát màu OPD. Như vậy H_2O_2 3 % sử dụng là 1/200.

Sau khi rửa, đầu tiên cho 50 μ l của substrate/chromogen vào cột bank của đĩa "blanking plate" và sau đó là tất cả các giếng của đĩa phản ứng, đậy nắp để ở nhiệt độ phòng trong tối. Thời gian được tính bắt đầu từ giếng đầu tiên sau khi cho chất phát màu.

Sau 15 min ủ substrate/chromogen, đầu tiên cho 50 μ l dung dịch Stop (axit sulfuric 1,25 M) vào cột blank của đĩa "blanking plate", sau đó là tất cả các giếng của đĩa phản ứng. Lắc đều bằng máy lắc (hoặc dùng tay vỗ nhẹ vào các thành giếng) để bảo đảm rằng hỗn hợp này đã được trộn đều. Tất cả các giếng lúc này chứa 50 μ l dung dịch substrate/chromogen và 50 μ l dung dịch Stop.

A.1.8 Đọc đĩa phản ứng

Mật độ quang (OD) của từng giếng trong đĩa được đo bằng quang kế.

Trước khi đọc đĩa, cần phải đảm bảo rằng không có bong bóng trong bất kỳ giếng nào, vì điều này sẽ gây ra sai số quang học và đảm bảo rằng không có dầu (ví dụ: dầu vân tay) hoặc ngưng tụ trên thành của đĩa phản ứng. Nếu cần thiết, làm vỡ bong bóng bất kỳ bằng một tip sạch.

Lau sạch phía dưới đáy đĩa bằng vải mềm. Đĩa "banking plate" được đưa vào máy đọc trước, kế tiếp là các đĩa phản ứng. Kiểm tra xem kính lọc 492 nm của máy đọc đã được cài đặt, các đĩa phản ứng sẵn sàng đưa vào máy đọc.

A.2 Diễn giải kết quả

Đĩa đọc được phân tích cho hai nhóm:

A.2.1 Phân tích các giá trị đối chứng

Giá trị phần trăm giá trị ức chế (percent inhibition) của mẫu đối chứng được dùng để chấp nhận kết quả. Tính phần trăm ức chế của mẫu đối chứng, PI_R , theo công thức sau:

$$PI_R = 100 - \frac{OD_R}{OD_{Ca}} \times 100$$

Trong đó:

OD_R là mật độ quang của mẫu đối chứng;

OD_{Ca} là mật độ quang trung bình của đối chứng kháng nguyên.

Tính phần trăm giá trị ức chế của mẫu xét nghiệm, PI_S , theo công thức sau:

$$PI_S = 100 - \frac{OD_S}{OD_{Ca}} \times 100$$

Trong đó:

OD_S là mật độ quang của mẫu xét nghiệm;

OD_{Ca} là mật độ quang trung bình của đối chứng kháng nguyên.

A.2.2 Tính toán và chấp nhận các giá trị đối chứng

Các giá trị OD và PI của đối chứng kháng nguyên và các giá trị PI của ba đối chứng khác (C++, C+ và C-) được sử dụng để chấp nhận hoặc không chấp nhận kết quả khi so với bảng giới hạn bắt buộc của bảng dữ liệu, từ đó đưa ra kết luận chấp nhận cho từng đĩa phản ứng theo Bảng A.1.

Bảng A.1 – Các đối chứng Ca, C++, C+ và C-

Giá trị PI		Kết luận
Trong ^a	Ngoài ^b	
4	0	Chấp nhận
3	1	Chấp nhận
2	2	Làm lại
1	3	Làm lại
0	4	Làm lại

^a Nằm trong khoảng giới hạn trên (UCL) và giới hạn dưới (LCL);
^b Nằm ngoài khoảng giới hạn trên (UCL) và giới hạn dưới (LCL).

Với sự biến đổi trong giá trị OD và các giá trị PI của các đối chứng được so sánh với giới hạn trên và giới hạn dưới về tính ổn định của các giá trị đối chứng theo Bảng A.2.

Bảng A.2 – Giới hạn trên và giới hạn dưới của các giá trị OD và PI

Giá trị	Giới hạn trên (UCL)	Giới hạn dưới (LCL)
Ca (OD) ^a	1,9	0,8
Ca (PI) ^a	25	-25
C++ (PI) ^b	100	85
C+ (PI) ^c	85	50
C- (PI) ^d	49	0

^a Ca là đối chứng kháng nguyên;
^b C++ là dương tính mạnh;
^c C+ là dương tính yếu;
^d C- là âm tính.

Các giá trị đối chứng được xem xét một cách trình tự như sau:

a) Điều kiện đầu tiên để chấp nhận đĩa phản ứng

Đối chứng kháng nguyên (Ca)

Đầu tiên tính giá trị PI, so sánh các giá trị OD của đối chứng kháng nguyên trong bảng giới hạn trên và giới hạn dưới. Cả hai giá trị OD trung gian (tức là hai giá trị còn lại sau khi loại bỏ các giá trị thấp nhất và cao nhất) phải nằm trong những dãy giới hạn này. Nếu hai giá trị trung gian không đạt thì đĩa phản ứng phải được làm lại. Khi đó, chỉ có hai giá trị OD trung gian này được sử dụng để tính toán giá trị trung bình OD_{Ca} và được sử dụng để tính toán cho các giá trị PI tiếp theo.

b) Điều kiện tiếp theo để chấp nhận đĩa phản ứng

Đối chứng kháng nguyên (Ca), mẫu dương tính mạnh (C++), mẫu dương tính yếu (C+) và đối chứng âm (C-).

– Đối chứng kháng nguyên (Ca)

So sánh giá trị PI của đối chứng kháng nguyên trong bảng giới hạn UCL và LCL và sử dụng Bảng A.1 để chấp nhận hoặc không chấp nhận kết quả cho từng đĩa phản ứng.

– Đối chứng C++, C+ và C-

So sánh giá trị PI của các đối chứng C+, C+ và C- trong bảng giới hạn UCL và LCL và sử dụng Bảng A.1 để chấp nhận hoặc không chấp nhận kết quả cho từng đĩa phản ứng.

Phải làm lại đĩa phản ứng nếu có một vài giá trị đối chứng của Ca, C++, C+ và C- không đạt được các điều kiện của PI.

A.2.3 Giải thích kết quả mẫu huyết thanh xét nghiệm

Ngưỡng đánh giá cho phương pháp này là phần trăm giá trị ức chế 50 % (PI = 50).

A.2.3.1 Trong trường hợp phát hiện kháng thể

– Nếu giá trị PI của mẫu xét nghiệm dưới 50 % (PI < 50 %) thì mẫu huyết thanh đó được xem là không có kháng thể (mẫu âm tính).

– Nếu giá trị PI của mẫu xét nghiệm lớn hơn hoặc bằng 50 % (PI ≥ 50) thì mẫu huyết thanh đó được xem là có kháng thể (mẫu dương tính). Và mẫu huyết thanh dương tính này được đem ra chuẩn độ (xem sơ đồ 2 và 3) để biết được hiệu giá kháng thể.

TCVN 8685-10:2014

A.2.3.2 Trong trường hợp chuẩn độ

a) Chuẩn độ pha loãng bậc 2

- Nếu tất cả giá trị PI trong 2 giếng của mẫu huyết thanh xét nghiệm nhỏ hơn 50 ($PI < 50$), thì mẫu này được xem là không có kháng thể (mẫu âm tính).
- Nếu có một trong 2 giếng đó có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 nhưng tất cả các giá trị PI ở độ pha loãng kế tiếp có $PI < 50$ thì mẫu xét nghiệm này có hiệu giá kháng thể là 1/32 .
- Nếu cả hai giếng có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 và tất cả các giá trị PI ở độ pha loãng kế tiếp có $PI < 50$ thì mẫu này có hiệu giá kháng thể là 1/45 và mẫu xét nghiệm này được xem là mẫu có kháng thể (mẫu dương tính).
- Hiệu giá kháng thể của các mẫu xét nghiệm có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 có thể tham khảo ở Bảng A.3. Nếu hiệu giá kháng thể lớn hơn 90 (> 90) cho biết rằng con vật này có khả năng bảo hộ với serotype vi rút lở mồm long móng tương đồng với kháng nguyên sử dụng trong phản ứng.

Bảng A.3 – Bảng tính hiệu giá kháng thể ở độ pha loãng bậc 2

Huyết thanh pha loãng	Mẫu huyết thanh với những giá trị PI khác nhau > 50 %							
	1	2	3	4	5	6	7	8
32	+-	++	++	++	++	++	++	++
64	--	--	+-	++	++	++	++	++
128	--	--	--	--	+-	++	++	++
256	--	--	--	--	--	--	+-	++
Hiệu giá kháng thể	32	45	64	90	128	181	256	>256

b) Chuẩn độ pha loãng bậc 5

Hiệu giá kháng thể của huyết thanh xét nghiệm có giá trị PI trên 50 có thể xem ở Bảng A.4. Hiệu giá kháng thể ≥ 112 cho biết rằng con vật này có khả năng bảo hộ với serotype vi rút lở mồm long móng tương đồng với kháng nguyên sử dụng trong phản ứng.

Bảng A.4 – Bảng tính hiệu giá kháng thể ở độ pha loãng bậc 5

Huyết thanh pha loãng	Mẫu huyết thanh với những giá trị PI khác nhau > 50 %							
	1	2	3	4	5	6	7	8
50	+ -	++	++	++	++	++	++	++
250	--	--	+ -	++	++	++	++	++
1250	--	--	--	--	+ -	++	++	++
6250	--	--	--	--	--	--	+ -	++
Hiệu giá kháng thể	50	112	250	560	1250	2800	6250	>6250

Phụ lục B
(Quy định)

Định lượng kháng thể kháng vi rút lở mồm long móng
bằng kỹ thuật trung hòa vi rút trên tế bào

B.1 Cách tiến hành

B.1.1 Chuẩn độ hiệu giá vi rút

		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	Đôi chứng tế bào
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mẫu vi rút 01	A												
	B												
	C												
	D												
Mẫu vi rút 02	E												
	F												
	G												
	H												

Hình B.1 – Bố trí sơ đồ đĩa chuẩn độ hiệu giá vi rút

- B.1.1.1 Cho 200 µl môi trường EMEM vào mỗi giếng trên hàng A từ 1 đến 10 và hàng H từ 1 đến 10.
- B.1.1.2 Cho 22 µl mẫu vi rút 01 vào giếng A1 và tiến hành pha loãng bậc 10 đến giếng A10, loại bỏ 22 µl. Tương tự với mẫu vi rút 02 trên hàng H.
- B.1.1.3 Pha loãng mẫu vi rút (pha loãng bậc 10): Dùng pipet đa kênh chuyển 50 µl từ hàng A đến hàng B, C và D. Tương tự cũng chuyển 50 µl từ hàng H đến hàng G, F và E.
- B.1.1.4 Cho 50 µl môi trường EMEM huyết thanh vào tất cả các giếng từ A1 đến H10.
- B.1.1.5 Cho 100 µl môi trường EMEM huyết thanh vào tất cả các giếng A11 đến H12
- B.1.1.6 Ủ đĩa ở 37 °C/3 – 5 % CO₂/45 – 60 min.
- B.1.1.7 Cho 50 µl EMEM chứa tế bào BHK-21 vào tất cả các giếng

B.1.1.8 Ủ đĩa ở 37 °C/3 – 5 % CO₂/24 - 48 h

B.1.1.9 Kiểm tra tế bào hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược.

B.1.1.10 Nhuộm:

- a) Loại bỏ môi trường từ đĩa phản ứng cho vào lọ chứa chất khử trùng.
- b) Cố định tế bào bằng 100 µl formal 10 %.
- c) Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 min.
- d) Loại bỏ dung dịch cố định và rửa đĩa 3 lần 300 µl PBS.
- e) Cho vào 50 µl xanh methylen 0,05 %.
- f) Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 min.
- g) Loại bỏ xanh methylen và rửa đĩa 3 lần với 300 µl PBS.
- h. Quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để đọc và ghi nhận bệnh tích tế bào.

B.1.1.11 Đọc kết quả

Ghi nhận bệnh lý tế bào vào phiếu quản lý xét nghiệm (TYV6-BM-VR-09.01C) và tính nồng độ vi rút (liều gây nhiễm tế bào: TCID₅₀/ml) bằng công thức Karber (1931). Dữ liệu được tính trên phần mềm Excel hoặc theo công thức sau:

$$TCID_{50} = x + 0,5 - \sum r_i/n$$

Trong đó:

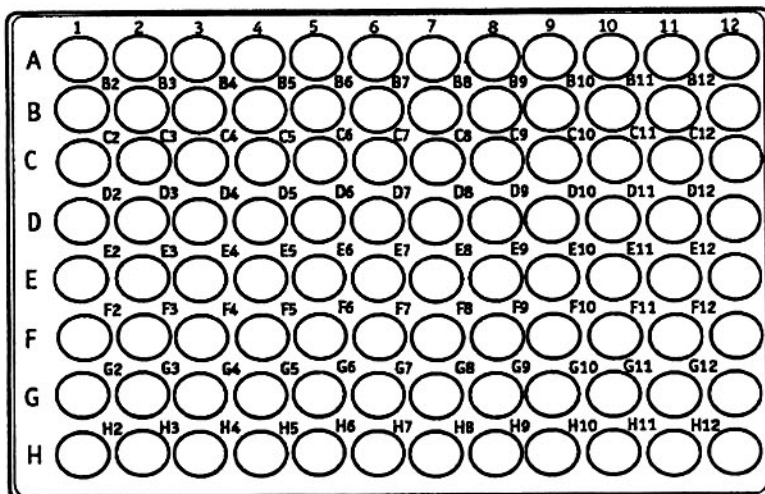
- x là độ pha loãng cao nhất có bệnh tích tế bào;
- r_i là số giếng không có bệnh tích tế bào ở từng độ pha loãng;
- n là số giếng sử dụng cho một độ pha loãng.

B.1.2 Thực hiện phản ứng VNT

B.1.2.1 Pha loãng dung dịch vi rút sử dụng với 100 TCID₅₀ trong môi trường EMEM.

VÍ DỤ: Lượng dung dịch vi rút với 100 TCID₅₀ cần cho một đĩa phản ứng là 6 ml.

B.1.2.2 Thực hiện trên đĩa phản ứng: huyết thanh pha loãng bắt đầu từ 1/4 đến 1/512.



CHÚ DẪN:

Cột: từ cột 1 đến cột 12

Hàng: từ hàng A đến hàng H

Hình B.2 – Sơ đồ đĩa phản ứng

- Cho 150 µl môi trường EMEM vào các giếng A1, A3, A5, A7, A9 và A11.
 - Cho 100 µl môi trường EMEM vào các giếng từ B1 đến H1, từ B3 đến H3, từ B5 đến H5, từ B7 đến H7, từ B9 đến H9 và từ B11 đến H11.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 01 vào giếng A1.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 02 vào giếng A3.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 03 vào giếng A5.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 04 vào giếng A7.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 05 vào giếng A9.
 - Cho 50 µl mẫu huyết thanh 06 vào giếng A11.
 - Sử dụng pipet 12 kênh pha loãng bạc 2 mẫu huyết thanh từ A1 đến H1, từ A3 đến H3, từ A5 đến H5, từ A7 đến H7, từ A9 đến H9 và từ A11 đến H11 và loại bỏ 100 µl. Sau khi pha loãng xong, sử dụng pipet 8 kênh chuyển 50 µl mẫu huyết thanh đã pha loãng từ cột 1 sang cột 2, từ cột 3 sang cột 4, từ cột 5 sang cột 6, từ cột 7 sang cột 8, từ cột 9 sang cột 10 và từ cột 11 sang cột 12.
- a) Cho 50 µl dung dịch vi rút với 100 TCID₅₀ vào các giếng.

- b) Ủ đĩa ở 37°C/3 – 5% CO₂/45 – 60 min.
- c) Sau khi ủ xong, cho 50 µl EMEM chứa tế bào BHK-21 vào tất cả các giếng.
- d) Ủ đĩa ở 37°C/3 – 5% CO₂/24 - 48 h
- e) Kiểm tra tế bào hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược để xem tế bào có ảnh hưởng bởi độc tố không (tế bào chết nhiều).

B.1.2.3 Thực hiện trên đĩa đối chứng:

a) Đối chứng huyết thanh

- Cho 150 µl môi trường EMEM vào giếng A1.
- Cho 100 µl môi trường EMEM vào các giếng từ B1 đến H1.
- Cho 50 µl huyết thanh đối chứng vào giếng A1. Tiến hành pha loãng bậc hai từ A1 đến H1 và loại bỏ 100 µl ở giếng H1.
- Sau khi pha loãng xong, sử dụng pipet 8 kênh chuyển 50 µl mẫu huyết thanh đã pha loãng từ cột 1 sang cột 2.
- Cho 50 µl dung dịch vi rút với 100 TCID₅₀ vào các giếng từ A1 đến H2.
- Ủ đĩa ở 37°C/3 – 5% CO₂/45 – 60 min

b) Đối chứng tế bào

- Cho 100 µl môi trường EMEM vào giếng A4 đến H5.
- Ủ đĩa ở 37°C/3 – 5% CO₂/45 – 60 min.

c) Đối chứng môi trường

- Cho 150 µl môi trường EMEM vào giếng A6 đến H7.
- Ủ đĩa ở 37°C/3 – 5% CO₂/45 – 60 min.

d) Chuẩn độ lại vi rút sử dụng

- Pha loãng dung dịch vi rút sử dụng: từ 10⁻¹ đến 10⁻⁸
- Cho 50 µl môi trường EMEM vào các giếng từ A9 đến H12.
- Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10⁻¹ và các giếng từ A9 đến A12.

TCVN 8685-10:2014

- Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-2} và các giếng từ B9 đến B12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-3} và các giếng từ C9 đến C12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-4} và các giếng từ D9 đến D12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-5} và các giếng từ E9 đến E12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-6} và các giếng từ F9 đến F12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-7} và các giếng từ G9 đến G12.
 - Cho 50 µl dung dịch vi rút pha loãng 10^{-8} và các giếng từ H9 đến H12.
 - Cho 50 µl môi trường EMEM vào các giếng từ G9 đến H12.
 - Ủ đĩa ở $37^{\circ}\text{C}/3 - 5\% \text{CO}_2/45 - 60 \text{ min}$.
- e) Sau khi ủ xong, cho 50 µl EMEM chứa tế bào BHK-21 vào tất cả các giếng từ A1 đến H2, từ A4 đến H5 và từ A9 đến H12.
- Ủ đĩa ở $37^{\circ}\text{C}/3 - 5\% \text{CO}_2/24 - 48 \text{ h}$.
 - Kiểm tra tế bào hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược để xem tế bào có ảnh hưởng bởi độc tố không (tế bào chết nhiều).

B.1.3 Nhuộm

- B.1.3.1 Loại bỏ môi trường từ đĩa phản ứng cho vào lọ chứa chất khử trùng.
- B.1.3.2 Cố định tế bào bằng 100 µl formal 10%
- B.1.3.3 Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 min.
- B.1.3.4 Loại bỏ dung dịch cố định và rửa đĩa 3 lần 300 µl PBS.
- B.1.3.5 Cho vào 50 µl xanh methylen 0.05%
- B.1.3.6 Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 min.
- B.1.3.7 Loại bỏ xanh methylen và rửa đĩa 3 lần với 300 µl PBS.
- B.1.3.8 Quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để đọc và ghi nhận bệnh tích tế bào.

B.2 Đọc và diễn giải kết quả

B.2.1 Đọc kết quả

Đọc kết quả sau khi nhuộm, bằng cách quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để ghi nhận bệnh lý tế bào trên từng giếng.

Kết quả dương tính là những giếng khi xem dưới kính hiển vi soi ngược không có bệnh tích tế bào (không có CPE). Nếu sau khi nhuộm thì các giếng dương tính có màu xanh (vì những giếng đó vi rút đã được trung hòa với kháng thể trong huyết thanh nên tế bào vẫn phát triển bình thường).

Kết quả âm tính là những giếng khi xem dưới kính hiển vi soi ngược có bệnh tích tế bào (có CPE), sau khi nhuộm thì các giếng âm tính sẽ trống (không có màu).

Bệnh tích tế bào được ghi nhận vào phiếu kết quả (TYV6-BM-VR-09.01A). Kết quả được tính bằng công thức Karber (1931).

$$TCID_{50} = a + 0,5 - 1/n \times \sum r_i$$

Trong đó:

- a là độ pha loãng cao nhất có bệnh tích tế bào;
- r_i là số giếng không có bệnh tích tế bào ở từng độ pha loãng;
- n là số giếng sử dụng cho một độ pha loãng.

B.2.2 Diễn giải kết quả

a) Phản ứng có giá trị khi:

- Đối chứng tế bào: bình thường;
- Đối chứng môi trường: bình thường;
- Hiệu giá của mẫu đối chứng huyết thanh dương chuẩn chỉ chênh lệch ± 2 độ pha loãng;
- Hiệu giá chuẩn độ lại vi rút ($100 TCID_{50}$) phải nằm trong khoảng $\log_{10}1,5$ đến $\log_{10}2,5$.

b) Kết quả:

Hiệu giá kháng thể có trong mẫu huyết thanh được tính ở nồng độ pha loãng cuối cùng của huyết thanh có trong hỗn hợp huyết thanh/vi rút là nơi 50 % số giếng được bảo hộ.

- Mẫu huyết thanh được xem là không có kháng thể (mẫu âm tính) nếu có hiệu giá kháng thể $\leq 1: 16$.

TCVN 8685-10:2014

- Mẫu huyết thanh được xem là có kháng thể (mẫu dương tính) nếu có hiệu giá kháng thể $\geq 1:45$.
- Mẫu huyết thanh được xem là nghi ngờ nếu có hiệu giá kháng thể từ 1:16 đến 1:32

CHÚ THÍCH: Sự chứng nhận cho từng cá thể động vật với mục đích thương mại, nồng độ từ 1/16 đến 1/32 được xem là giới hạn nghi ngờ, và cần phải lấy thêm mẫu huyết thanh để kiểm tra; kết quả được xem là dương tính nếu mẫu kiểm tra lần 2 hiệu giá là 1/16 hoặc cao hơn. Với mục đích thống kê trên cơ sở dữ liệu huyết thanh là một phần của khảo sát thống kê về hiệu lực huyết thanh, ngưỡng 1/45 có thể xem là thích hợp. Ngưỡng hiệu giá để đánh giá khả năng bảo hộ miễn dịch của vaccin phải được thiết lập từ các thí nghiệm về kết quả kiểm tra hiệu lực của vaccin liên quan và động vật mục tiêu.

Kết quả kiểm tra có thể khác nhau giữa các phòng thí nghiệm có liên quan đến ngưỡng giới hạn âm tính và dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Chapter 2.1.5: Foot and Mouth Disease, OIE Terrestrial Manual 2009
-