

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-13: 2014

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –
PHẦN 13: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH HỘI CHỨNG
RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN (PRRS)**

*Vaccine testing procedure –
Part 13: Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine, Inactivated*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8685-13:2014 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 13: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS)

Vaccine testing procedure –

Part 13: Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định yêu cầu kỹ thuật để kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt 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 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 8685-13:2014

3.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

- 11 con lợn từ 3 đến 4 tuần tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản;
- 3 con thỏ khỏe mạnh có khối lượng từ 1,8 kg đến 2 kg;
- 15 con chuột lang có khối lượng từ 300 g đến 350 g;
- 5 con chuột nhắt trắng có khối lượng từ 15 g đến 20 g.

4 Cách tiến hành

4.1 Kiểm tra cảm quan

Kiểm tra bằng mắt thường: Vắc xin đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn.

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

4.3.1 Phương pháp trọng tài

Tiêm cho 3 con lợn, mỗi con 2 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).

4.3.2 Phương pháp thay thế

Sử dụng cả 3 phương pháp sau:

- Tiêm xoang bụng cho 5 con chuột nhắt trắng, mỗi con 0,5 ml vắc xin;
- Tiêm bắp cho 3 con chuột lang, mỗi con 2 ml vắc xin;
- Tiêm bắp cho 3 con thỏ, mỗi con 2 ml vắc xin;

Theo dõi trong 7 ngày. Vắc xin được coi là đạt nếu tất cả động vật sống khỏe mạnh, không có phản ứng cục bộ hay phản ứng toàn thân.

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

Tiến hành theo Phụ lục A.

– 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. 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. Đánh giá hàm lượng kháng thể bằng phản ứng IPMA theo Phụ lục B.

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.

TCVN 8685-13:2014

4.4.2 Phương pháp thay thế

Tiêm bắp cho 10 con chuột lang, mỗi con 1 ml vắc xin ghi trên nhãn. 2 con chuột đối chứng không tiêm vắc xin.

Sau 3 tuần tiêm lại lần 2 với một liều tương tự lần 1.

14 ngày sau mũi tiêm lần 2, chuột được tiêm và chuột đối chứng được lấy máu và tiến hành làm phản ứng trung hòa với chủng vi rút tương ứng.

Vắc xin được coi là đạt nếu:

- + 2 mẫu huyết thanh của chuột đối chứng âm tính;
- + 10 mẫu huyết thanh của chuột được tiêm đạt nếu cho kết quả trung hòa huyết thanh 1/8 trở lên.

Phụ lục A
(Quy định)

Phương pháp chuẩn độ vi rút TCID₅₀
(Chuẩn độ vi rút xác định liều công cường độc)

A.1 Chuẩn bị tế bào MARC-145 trên đĩa 96 giếng

Tế bào MARC-145 được trypsin hóa thành huyền dịch có mật độ 5×10^3 tế bào/ml. Cho 100 μ l huyền dịch tế bào trên vào tất cả các giếng. Đậy nắp, ủ tế bào ở 37 °C có 5 % CO₂, theo dõi hàng ngày.

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

A.2 Chuẩn độ vi rút

- Lấy ống 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 A.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	ĐCTB						
C	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	ĐCTB						
D	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	ĐCTB						
E	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	ĐCTB						
F	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	ĐCTB						
G	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	ĐCTB						
H												

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

TCVN 8685-13:2014

- Lấy đĩa tế bào MARC-145 đã nuôi, loại bỏ môi trường cũ.
- Rửa tế bào bằng dung dịch PBS (-), 200 µl/giếng, sau đó loại bỏ dung dịch PBS (-).
- Hút 100 µl huyền dịch vi rút 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 % CO₂ trong 30 min.
- Loại bỏ huyền dịch trong các giếng.
- 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 % CO₂, theo dõi hàng ngày, trong 5 ngày.
- Đọc kết quả: giếng có bệnh tích tế bào là dương tính.

A.3 Tính kết quả

Theo công thức tính 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_x 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.

Phụ lục B

(Quy định)

Phương pháp phản ứng miễn dịch có gắn men trên tế bào 1 lớp (IPMA)**B.1 Cấy giống các đại thực bào trên đĩa phản ứng**

- Giải đông một chai chứa 6×10^7 đại thực bào/1,5 ml.
- Rửa tế bào một lần với 50 ml PBS và ly tâm dịch chứa tế bào này trong 10 min ở 300 g (nhiệt độ phòng).
- Thu tế bào bằng 40 ml môi trường RPMI 1640 (được bổ sung 5% dung dịch FBS, 100 IU penicillin và 100 μ g streptomycin).
- Chia 100 μ l dịch chứa tế bào này vào từng giếng của một đĩa .
- Ủ đĩa tế bào từ 18-24 h ở 37°C trong môi trường có 5 % CO₂.

B.2 Gây nhiễm các tế bào bằng vi rút PRRS

- Cho vào từng giếng 50 μ l dung dịch chứa vi rút nồng độ 10^5 TCID₅₀/ml, để lại hai giếng làm đối chứng.
- Ủ đĩa này trong 18-24 h, ở 37°C trong môi trường có 5 % CO₂

B.3 Cố định các tế bào

- Bỏ môi trường nuôi cấy và rửa đĩa một lần trong PBS-
- Gõ nhẹ đĩa vào giấy thấm để loại bỏ dịch thừa và sau đó để khô đĩa trong 45 min ở 37 °C.
- Làm lạnh đĩa trong 45 min ở -20 °C.
- Ủ đĩa tế bào trong 10 min ở nhiệt độ phòng với paraformaldehyd 4%.
- Bỏ paraformaldehyd và rửa đĩa một lần trong PBS-

B.4 Chuẩn bị pha loãng huyết thanh

- Cho 180 μ l của NaCl 0,5 M với 4 % huyết thanh ngựa và 0,5 % Tween 80, có pH 7,2 vào từng giếng của các hàng A và E của đĩa.

TCVN 8685-13:2014

- Chia 120 μ l dung dịch đệm vào tất cả các giếng khác.
- Pha 20 μ l huyết thanh xét nghiệm hay huyết thanh đối chứng vào các giếng của các hàng A và E (độ pha loãng 1/10), và lắc đều.
- Pha loãng huyết thanh bốn lần bằng chuyển 40 μ l từ các hàng A và E sang các hàng B và F, và tiếp tục, để cho ra các độ pha loãng 1/40, 1/160 và 1/640.

B.5 Ủ huyết thanh trong đĩa đã có đại thực bào cố định

- Chuyển 50 μ l từ mỗi giếng của đĩa đệm vào các giếng tương ứng của đĩa đã có đại thực bào cố định. Đậy đĩa và ủ trong 1 h ở 37 °C.
- Rửa dung dịch huyết thanh và rửa đĩa ba lần bằng dung dịch NaCl 0,15 M và Tween 80 nồng độ 0,5 %.

B.6 Ủ với dung dịch conjugate

- Pha loãng HRPO conjugate (thỏ kháng lợn) thành độ pha loãng xác định trước trong dung dịch NaCl 0,15 M và Tween 80 nồng độ 0,5 %. Thêm 50 μ l dịch pha loãng này vào từng giếng của đĩa. Đậy và ủ trong 1 h ở 37 °C. Rửa đĩa ba lần.

B.7 Phương pháp nhuộm

- Chia 50 μ l dung dịch chất AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) đã lọc vào các giếng của đĩa.
- Ủ với dung dịch AEC này trong 30 min ở nhiệt độ phòng.
- Thay thế dung dịch AEC bằng 50 μ l natri acetat 0,05 M, có pH 5,0.

B.8 Đọc và giải thích các kết quả

- Nếu các kháng thể có trong huyết thanh xét nghiệm, cytoplasm của khoảng 30 % đến 50 % các tế bào trong một giếng được nhuộm màu đỏ đậm bởi chất nhuộm sắc. Huyết thanh âm tính được nhận biết do cytoplasm vẫn không bắt màu. Huyết thanh có phản ứng không đặc hiệu sẽ nhuộm màu tất cả các tế bào trong một giếng (so sánh với huyết thanh dương tính đối chứng).
- Hiệu giá của huyết thanh được thể hiện là mẫu số của độ pha loãng cao nhất mà nhuộm màu 50 % tế bào hay nhiều hơn trong các giếng.
- Huyết thanh với hiệu giá <10 được coi là âm tính.
- Huyết thanh với hiệu giá từ 10 đến 40 được coi là dương tính yếu. Thường màu nhuộm không đặc hiệu được phát hiện thấy ở những độ pha loãng này.
- Huyết thanh với hiệu giá \geq 160 được coi là dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

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