

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-35:2020

(Xuất bản lần 1)

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –
PHẦN 35: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH TỤ HUYẾT
TRÙNG Ở TRÂU BÒ**

Vaccine testing procedure –

Part 35: Haemorrhagic septicaemia vaccine for cattle and buffaloes, inactivated

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 8685-35:2020 do Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y Trung Ương 1 - 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 phổi thể kính ở lợn;
- TCVN 8685-15:2017, Phần 15: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do *pasteurella multocida* type D gây ra ở lợn;
- TCVN 8685-16:2017, Phần 16: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm teo mũi

truyền nhiễm ở lợn;

- TCVN 8685-17:2017, Phần 17: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn;
- TCVN 8685-18:2017, Phần 18: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh newcastle;
- TCVN 8685-19:2017, Phần 19: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh gumboro;
- TCVN 8685-20:2018, Phần 20: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Newcastle;
- TCVN 8685-21:2018, Phần 21: Vắc xin phòng bệnh đậu gà;
- TCVN 8685-22:2018, Phần 22: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng ở gia cầm;
- TCVN 8685-23:2018, Phần 23: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Salmonella enteritidis ở gà;
- TCVN 8685-24:2018, Phần 24: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Salmonella typhimurium ở gà;
- TCVN 8685-25:2018, Phần 25: Vắc xin phòng bệnh giả dại ở lợn;
- TCVN 8685-26:2018, Phần 26: Vắc xin nhược độc phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm ở gà;
- TCVN 8685-27:2018, Phần 27: Vắc xin nhược độc phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gà;
- TCVN 8685-28:2019, Phần 28: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Tụ huyết trùng ở lợn;
- TCVN 8685-29:2019, Phần 29: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm (IB) ở gà;
- TCVN 8685-30:2019, Phần 30: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Viêm não tủy truyền nhiễm ở gà;
- TCVN 8685-31:2019, Phần 31 Vắc xin phòng bệnh Dại ở chó;
- TCVN 8685-32:2019, Phần 32: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Mycoplasma gallisepticum ở gia cầm;
- TCVN 8685-33:2019, Phần 33: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Riermerella anatipestifer;
- TCVN 8685-34:2020, Phần 34: Vắc xin phòng bệnh tiêu chảy thành dịch do Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây ra ở lợn;
- TCVN 8685-35:2020, Phần 35: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng ở

TCVN 8685-35:2020

trâu bò;

- TCVN 8685-36:2020, *Phần 36: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng và bệnh đóng dấu ở lợn;*

- TCVN 8685-37:2020, *Phần 37: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Marek ở gà;*

- TCVN 8685-38:2020, *Phần 38: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh do Leptospira gây ra;*

- TCVN 8685-39:2020, *Phần 39: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng còi cọc do Circovirus gây ra ở lợn.*

Quy trình kiểm nghiệm vắc xin –

Phần 35: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng ở trâu bò

Vaccine testing procedure – Part 35: Haemorrhagic septicaemia vaccine for cattle and buffaloes, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt dạng nhũ dầu hoặc kẹo phèn được sản xuất từ chủng vi khuẩn *Pasteurella multocida* phòng bệnh tụ huyết trùng ở trâu bò.

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 Chữ viết tắt

CFU: Colony Forming Unit (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)

MLD: Minimum Lethal Dose (Liều gây chết nhỏ nhất)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Dung dịch muối đệm photphat)

LD₅₀: 50 % Lethal Dose (Liều gây chết 50 % động vật thí nghiệm)

4 Nguyên tắc

Vắc xin được kiểm tra các chỉ tiêu cảm quan, độ thuần khiết, vô hoạt bằng các phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm, các chỉ tiêu an toàn và hiệu lực được đánh giá trên động vật đích và động vật thay thế

5 Vật liệu và thuốc thử

5.1 Bê, nghé từ 06 tháng tuổi đến 12 tháng tuổi, khỏe mạnh, không có kháng thể *Pasteurella multocida*.

5.2 Thỏ từ 1,8 kg đến 2,0 kg, khỏe mạnh, không có kháng thể *Pasteurella multocida*.

5.3 Chuột nhắt trắng từ 18 g đến 22 g, khỏe mạnh, không có kháng thể *Pasteurella multocida*.

TCVN 8685-35:2020

5.4 Vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc serotype B:2.

5.5 Môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (xem B.3.1) vô trùng.

5.6 Nước muối sinh lý vô trùng, nồng độ từ 0,85 % đến 0,9 %.

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Tủ ấm có thể duy trì nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 Kính hiển vi, có vật kính với độ phóng đại 100 X.

6.3 Pipette đơn kênh, dung tích từ 50 µl đến 200 µl, từ 100 µl đến 1000 µl.

6.4 Pipette đa kênh, dung tích từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl.

7 Cách tiến hành

7.1 Kiểm tra cảm quan

- Lắc nhẹ lọ vắc xin và quan sát độ đồng đều của hỗn dịch bằng mắt thường.
- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra cảm quan khi có hỗn dịch đồng đều, không đông vón, không lắng cặn.

7.2 Kiểm tra độ thuần khiết

7.2.1 Kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn và nấm mốc (kiểm tra vô trùng)

- Kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn và nấm mốc theo 4.1, 4.2 TCVN 8684 : 2011.
- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn và nấm mốc khi không có bất cứ tạp khuẩn hay nấm mốc nào mọc trên các môi trường kiểm tra trong thời gian theo dõi.

7.2.2 Kiểm tra hình thái vi khuẩn

- Kiểm tra hình thái vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram. Phương pháp nhuộm Gram được nêu tại Phụ lục A.
- Quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi (6.2).
- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hình thái vi khuẩn khi trên tiêu bản nhuộm Gram chỉ quan sát thấy vi khuẩn *Pasteurella multocida*. Vi khuẩn *Pasteurella multocida* bắt màu hồng (Gram âm), đa hình thái (hình cầu, hình cầu trực khuẩn, hình trực khuẩn ngắn), thường đứng riêng lẻ hay thành cặp.

7.3 Kiểm tra vô hoạt

- Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ 100 µl vắc xin vào môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (5.5) rồi ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ đến 48 giờ.
- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra vô hoạt khi không phát hiện vi khuẩn *Pasteurella multocida* trên môi trường kiểm tra.

7.4 Kiểm tra an toàn

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

7.4.1 Phương pháp kiểm tra trên động vật đích

- Tiêm bắp hoặc dưới da cho ít nhất 02 bê hoặc 02 nghé (5.1), mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.
- Sau khi tiêm, theo dõi 02 bê hoặc 02 nghé trong 10 ngày.
- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra an toàn khi tất cả bê hoặc nghé sống khỏe, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân như: sưng vị trí tiêm, mệt mỏi, sốt, bỏ ăn.

7.4.2 Phương pháp kiểm tra trên động vật thay thế

- Tiêm dưới da cho ít nhất 02 thỏ (5.2) mỗi con 1 liều vắc xin ghi trên nhãn và 10 chuột nhắt trắng (5.3) mỗi con 0,5 ml vắc xin.
- Sau khi tiêm, theo dõi thỏ và chuột nhắt trắng trong 10 ngày.
- Đánh giá kết quả:

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra an toàn khi 02 thỏ và 10 chuột nhắt trắng sống khỏe mạnh, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường tại vị trí tiêm hay triệu chứng toàn thân như: sưng vị trí tiêm, chậm chạp, lông xù, chán ăn.

7.5 Kiểm tra hiệu lực

7.5.1 Phương pháp kiểm tra trên động vật đích

- Sử dụng ít nhất 08 bê hoặc 08 nghé (5.1), chia làm 2 nhóm:
 - + Nhóm 1: gồm 05 bê hoặc 05 nghé, mỗi con được tiêm bắp 1 liều vắc xin ghi trên nhãn;
 - + Nhóm 2: gồm 03 bê hoặc 03 nghé, mỗi con được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.6) với liều lượng và đường tiêm như nhóm 1.
- Ba tuần sau khi tiêm, toàn bộ bê hoặc nghé nhóm 1 và nhóm 2 được công cường độc với vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc (5.4), mỗi con 10^8 LD₅₀ theo đường tiêm bắp hoặc tiêm dưới da.
- Sau khi tiêm, theo dõi bê hoặc nghé nhóm 1 và nhóm 2 trong 7 ngày đến 10 ngày.
- Đánh giá kết quả:
 - Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi:
 - + Bê hoặc nghé nhóm 2 chết 100 %;
 - + Bê hoặc nghé nhóm 1 sống ít nhất 60 %.

7.5.2 Phương pháp thay thế

Chọn 1 trong 3 phương pháp sau:

7.5.2.1 Công cường độc trên thỏ

- Sử dụng ít nhất 06 thỏ (5.2), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 04 thỏ, mỗi con được tiêm dưới da 2/5 liều vắc xin ghi trên nhãn;

+ Nhóm 2: gồm 02 thỏ làm đối chứng, mỗi con được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.6) với liều lượng và đường tiêm như thỏ nhóm 1.

- Ba tuần sau khi tiêm, toàn bộ thỏ nhóm 1 và nhóm 2 được công cường độc với vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc (5.4), mỗi con 1 MLD theo đường tiêm dưới da.

- Sau khi tiêm, theo dõi thỏ nhóm 1 và nhóm 2 trong 7 ngày đến 10 ngày.

- Đánh giá kết quả:

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi:

+ Thỏ nhóm 2 chết 100 %;

+ Thỏ nhóm 1 sống ít nhất 50 %.

7.5.2.2 Công cường độc trên chuột nhắt trắng

- Sử dụng 100 chuột nhắt trắng (5.3), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 50 chuột nhắt trắng, mỗi con được tiêm phúc xoang 0,2 ml vắc xin;

+ Nhóm 2: gồm 50 chuột nhắt trắng làm đối chứng, mỗi con được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.6) với liều lượng và đường tiêm như chuột nhắt trắng nhóm 1.

- Ba tuần sau khi tiêm, tất cả chuột nhắt trắng ở nhóm 1 và nhóm 2 được chia thành 10 nhóm, mỗi nhóm 5 chuột nhắt trắng, mỗi con được công cường độc với 0,1 ml vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc (5.4) có độ pha loãng từ nồng độ 10^{-1} đến nồng độ 10^{-10} .

- Sau khi tiêm, theo dõi chuột nhắt trắng trong 7 ngày.

- Tính LD_{50} ở mỗi nhóm theo phương pháp Reed – Muench:

$$\log LD_{50} = \log A - \frac{50 - a}{b - a} \times k$$

Trong đó:

LD_{50} : liều gây chết 50 % động vật thí nghiệm

A: độ pha loãng của canh khuẩn sát dưới gây chết 50 % chuột

B: độ pha loãng của canh khuẩn sát dưới liều gây chết 50 % chuột

a: tỷ lệ % chuột chết do liều A gây ra

b: tỷ lệ % chuột chết do liều B gây ra

k: log của độ pha loãng

- Đánh giá kết quả:

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi: LD_{50} ở nhóm 1 > LD_{50} ở nhóm 2 ít nhất 10^4 .

7.5.2.3 Phương pháp huyết thanh học

7.5.2.3.1 Đánh giá hiệu giá kháng thể trên trâu bò bằng phản ứng ngưng kết chậm

- Sử dụng ít nhất 08 bê hoặc 08 nghé (5.1), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 05 bê hoặc 05 nghé, mỗi con được tiêm bắp 1 liều vắc xin ghi trên nhãn;

+ Nhóm 2: gồm 03 bê hoặc 03 nghé, mỗi con được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.6) với liều lượng và đường tiêm như nhóm 1.

- Ba tuần sau khi tiêm, toàn bộ bê hoặc nghé nhóm 1 và nhóm 2 được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ngưng kết chậm. Các bước thực hiện phản ứng ngưng kết chậm được nêu tại Phụ lục B.

- Đánh giá kết quả:

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi:

+ Ít nhất 80 % mẫu huyết thanh bê hoặc nghé nhóm 1 có hiệu giá kháng thể $\geq 4 \log_2$;

+ 100 % mẫu huyết thanh bê hoặc nghé nhóm 2 có hiệu giá kháng thể $< 4 \log_2$.

7.5.2.3.2 Đánh giá hiệu giá kháng thể trên thỏ bằng phản ứng ngưng kết chậm

- Sử dụng ít nhất 06 thỏ (5.2), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 04 thỏ, mỗi con được tiêm dưới da 2/5 liều vắc xin ghi trên nhãn;

+ Nhóm 2: gồm 02 thỏ làm đối chứng, mỗi con được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.6) với liều lượng và đường tiêm như thỏ nhóm 1.

- Ba tuần sau khi tiêm, toàn bộ thỏ nhóm 1 và nhóm 2 được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ngưng kết chậm. Các bước thực hiện phản ứng ngưng kết chậm được nêu tại Phụ lục B.

- Đánh giá kết quả:

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi:

+ Ít nhất 75 % mẫu huyết thanh thỏ nhóm 1 có hiệu giá kháng thể $\geq 4 \log_2$;

+ 100 % mẫu huyết thanh thỏ nhóm 2 có hiệu giá kháng thể $< 4 \log_2$.

8 Kết luận

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm nghiệm khi đáp ứng được tất cả các yêu cầu về cảm quan, độ thuần khiết, vô hoạt, an toàn và hiệu lực như đã nêu lần lượt ở mục 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 và 7.5.

Phụ lục A
(Quy định)
Phương pháp nhuộm Gram

A.1 Hóa chất

A.1.1 Dung dịch tím gentians, sản phẩm thương mại

A.1.2 Dung dịch lugol, sản phẩm thương mại

A.1.3 Dung dịch cồn 90 %

A.1.4 Dung dịch fuchsin kiềm, sản phẩm thương mại

A.2 Thiết bị và dụng cụ

A.2.1 Phiến kính sạch

A.2.2 Que cấy vô trùng

A.2.3 Đèn cồn

A.3 Chuẩn bị tiêu bản

Bước 1: Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ một giọt vắc xin lên phiến kính (A.2.1) rồi dùng que cấy (A.2.2) dàn đều, để khô trong phòng thí nghiệm.

Bước 2: Cố định tiêu bản bằng cách hơi nhanh trên ngọn lửa đèn cồn (A.2.3) từ 2 lần đến 3 lần.

A.4 Cách tiến hành

Bước 1: Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ một lượng dung dịch tím gentians (A.1.1) lên tiêu bản sao cho dung dịch phủ đều chỗ phết vi khuẩn, để từ 1 phút đến 2 phút sau đó rửa nhanh bằng nước và làm khô tiêu bản.

Bước 2: Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ một lượng dung dịch lugol (A.1.2) lên tiêu bản sao cho dung dịch phủ đều chỗ phết vi khuẩn, để 1 phút, sau đó rửa nhanh bằng nước và làm khô tiêu bản.

Bước 3: Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ một lượng dung dịch cồn (A.1.3) lên tiêu bản sao cho dung dịch phủ đều chỗ phết vi khuẩn, rửa nhanh bằng nước và làm khô tiêu bản.

Bước 4: Dùng pipette đơn kênh (6.3) nhỏ một lượng dung dịch fuchsin sao cho dung dịch phủ đều chỗ phết vi khuẩn, để 1 phút, sau đó rửa nhanh bằng nước và làm khô tiêu bản.

Bước 5: Xem tiêu bản dưới kính hiển vi (6.2) ở vật kính dầu 100 X.

Phụ lục B

(Quy định)

Kiểm tra hiệu giá kháng thể Tự huyết trùng trâu bò bằng phản ứng ngưng kết chậm

B.1 Vật liệu và thuốc thử

B.1.1 Môi trường thạch máu cơ bản (Blood Agar Base - BAB), sản phẩm thương mại.

B.1.2 Môi trường canh thang não tim (Brain heart infusion - BHI), sản phẩm thương mại.

B.1.3 Máu thỏ vô trùng

B.1.4 Dung dịch acid chlohydric (HCl) 1 N.

B.1.5 Dung dịch formaldehyde (HCHO) 37 %.

B.1.6 Dung dịch PBS 1 X, pH 7,2.

B.2 Thiết bị và dụng cụ

B.2.1 Máy ly tâm có thể quay với tốc độ 12000 vòng/phút.

B.2.2 Nồi hấp có thể duy trì ở nhiệt độ 121 °C trong thời gian 15 phút.

B.2.3 Bể ủ nhiệt, duy trì nhiệt độ 56 °C.

B.2.4 Đĩa lòng Ø 20, ống nghiệm thủy tinh 12 x 120 mm vô trùng.

B.2.5 Đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ U.

B.3 Chuẩn bị

B.3.1 Môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ

Môi trường thạch máu cơ bản (B.1.1) được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó đem hấp diệt trùng ở nồi hấp (B.2.2) nhiệt độ 121 °C trong 15 phút, để nguội đến 45 °C rồi bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (B.1.3) và đổ ra đĩa lòng vô trùng (B.2.4).

B.3.2 Ống môi trường canh thang não tim BHI

Môi trường canh thang não tim (B.1.2) được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất, lắc đều và chia ra các ống nghiệm thủy tinh vô trùng (B.2.4) (4 ml/ ống), sau đó đem hấp diệt trùng ở nồi hấp (B.2.2) nhiệt độ 121 °C trong 15 phút.

B.3.3 Kháng nguyên thân (Kháng nguyên O - Somatic antigen – Kháng nguyên được xử lý bằng dung dịch acid chlohydric 1 N)

- Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0,01 ml canh khuẩn chứa vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc (5.4) vào môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (B.3.1), ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ.

- Dùng que cấy lấy 1 đến 2 khuẩn lạc cấy vào ống môi trường canh thang não tim BHI (B.3.2), rồi ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 h. Sau đó dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0.1 ml canh trùng 24 h trên lắng lên 2 đĩa môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ bằng cách dùng que cấy vô trùng dàn đều trên mặt thạch (B.3.1), tiếp tục ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ.
- Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 5 ml dung dịch PBS để rửa bề mặt hai đĩa thạch, hút huyền dịch vi khuẩn thu được vào ống nghiệm thủy tinh vô trùng (B.2.4).
- Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0,02 ml dung dịch formaldehyde (B.1.5) nhỏ vào huyền dịch vi khuẩn thu được ở trên rồi ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ, sau đó đem kiểm tra vô trùng huyền dịch vi khuẩn bằng cách ria trên môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (B.3.1)
- Huyền dịch vi khuẩn đạt chỉ tiêu vô trùng (không có vi khuẩn mọc trên đĩa thạch) sẽ được ly tâm bằng máy ly tâm (B.2.1) với tốc độ 12 000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4 °C, loại bỏ phần dung dịch nổi bên trên. Sau đó thêm 20 ml dung dịch HCl 1N (B.1.4), lắc đều rồi ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ.
- Huyền dịch vi khuẩn sau khi ủ ở tủ ấm tiếp tục được ly tâm bằng máy ly tâm (B.2.1) với tốc độ 12 000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4 °C, loại bỏ phần dung dịch nổi bên trên, thêm dung dịch PBS (B.1.6) có bổ sung 0,3 % dung dịch formaldehyde (B.1.5). Ly tâm lặp lại 2 lần, loại bỏ phần dung dịch nổi bên trên sau lần ly tâm cuối, cặn thu được sẽ được hoàn nguyên bằng 5 ml dung dịch PBS (B.1.6) để thu hoạch kháng nguyên thân.
- Kháng nguyên đạt yêu cầu khi không có hiện tượng ngưng kết, kháng nguyên lắng tròn nhỏ đáy giếng.

B.3.4 Huyết thanh thí nghiệm

Lấy máu động vật (7.5.2.3), chất lấy huyết thanh. Sau đó khử bổ thể bằng cách ủ ở bể ủ nhiệt (B.2.3) trong 30 phút ở nhiệt độ 56 °C.

B.3.5 Canh trùng 2×10^9 CFU/ml

- Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0,01 ml canh khuẩn chứa vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độ (5.4) vào môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (B.3.1), ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ.
- Dùng que cấy lấy 1 đến 2 khuẩn lạc cấy vào ống môi trường canh thang não tim BHI (B.3.2), rồi ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ. Sau đó dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0.1 ml canh trùng 24 giờ trên lắng lên 2 đĩa môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ bằng cách dùng que cấy vô trùng dàn đều trên mặt thạch (B.3.1), tiếp tục ủ ở tủ ấm (6.1) trong 24 giờ.
- Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 5 ml dung dịch PBS để rửa bề mặt hai đĩa thạch, hút huyền dịch vi khuẩn thu được vào ống nghiệm thủy tinh vô trùng (B.2.4).
- Từ canh trùng ban đầu (canh trùng này bắt buộc mật độ vi khuẩn phải lớn hơn 2 tỷ CFU/ml) pha thành canh trùng có mật độ 2 tỷ CFU/ml theo các bước sau:

TCVN 8685-35:2020

- + Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút nước muối sinh lý vô trùng (5.7) vào 7 ống nghiệm thủy tinh vô trùng (B.2.4), mỗi ống 9 ml và đánh số từ 1 đến 7;
- + Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 1 ml canh trùng ban đầu vào ống thứ 1, trộn đều bằng cách lắc đều rồi chuyển 1 ml huyền dịch từ ống thứ 1 sang ống thứ 2, lặp lại như vậy đến ống thứ 7;
- + Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 0,1 ml huyền dịch ở 2 nồng độ pha loãng liên nhau, nhỏ lên môi trường thạch máu bổ sung từ 5 % đến 8 % máu thỏ (B.3.1) (mỗi nồng độ 2 đĩa, mỗi đĩa 0,1 ml), rồi dùng que trang dàn đều mẫu và ủ ở tủ ấm (6.1) trong 18 giờ đến 20 giờ;
- + Đếm số khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa và tính mật độ vi khuẩn theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1)} \times d$$

Trong đó:

N: tổng số vi khuẩn trong 1 ml canh trùng

C: số khuẩn lạc đếm được ở các đĩa có nồng độ liên nhau

V: thể tích cấy ở mỗi đĩa

n1: số đĩa của độ pha loãng ban đầu (2 đĩa)

n2: số đĩa của độ pha loãng tiếp theo (2 đĩa)

d: độ pha loãng ban đầu

- Pha canh trùng 2×10^9 CFU/ml như sau:

Lấy số vi khuẩn đã tính được ở trên (N) chia cho số vi khuẩn cần dùng (2×10^9 CFU/ml) ta được một thông số (X). Sau đó ta lấy 1 ml canh trùng nguyên ban đầu cộng với số ml (Y) nước muối sinh lý. Số ml của $Y = X - 1$ ($X \geq 1$).

Ví dụ: Ta có canh trùng 3×10^9 CFU/ml muốn pha thành canh trùng 2×10^9 CFU/ml thì làm như sau:

Lấy 3×10^9 CFU/ml chia cho 2×10^9 CFU/ml được thông số là 1,5. Để được canh trùng 2×10^9 CFU/ml ta sẽ lấy 1 ml canh trùng 3×10^9 CFU/ml và thêm vào 0,5 ml nước muối sinh lý. Hỗn dịch cuối cùng là canh trùng cần pha.

B.3.6 Huyết thanh tối miễn dịch

- Tiêm 2 ml canh trùng (B.3.5) cho thỏ (5.3) theo đường dưới da.
- Ngày thứ 7: tiêm tiếp 0,2 ml canh trùng (B.3.5) cho thỏ theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 11: tiêm tiếp 0,5 ml canh trùng (B.3.5) cho thỏ theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 15: tiêm tiếp 1 ml canh trùng (B.3.5) cho thỏ theo đường tĩnh mạch tai.

- Ngày thứ 19: tiêm tiếp 1,5 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 23: tiêm tiếp 2 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 27: tiêm tiếp 2,5 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 31: tiêm tiếp 3 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 35: tiêm tiếp 3,5 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Ngày thứ 39: tiêm tiếp 4 ml canh trùng (B.3.5) cho thử theo đường tĩnh mạch tai.
- Một tuần sau mũi tiêm cuối cùng tiến hành lấy máu thử, chất huyết thanh. Đó chính là huyết thanh tối miễn dịch.

B.4 Cách tiến hành

Quy trình cho phản ứng ngưng kết chậm với kháng nguyên thân (B.3.3) thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ U (B.2.5).

- Bố trí thí nghiệm.
- + Giếng thí nghiệm: A1 đến H8;
- + Giếng đối chứng âm: A9 đến H10;
- + Giếng đối chứng dương: A11 đến H12.

Sơ đồ phản ứng ngưng kết chậm

	Thí nghiệm								Đối chứng			
									-		+	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl
B	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
C	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
D	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
E	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
F	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
G	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
H	50 µl	50µl	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

TCVN 8685-35:2020

- Thực hiện thí nghiệm theo sơ đồ phản ứng ngưng kết chậm như trên.
- Đối với các giếng thí nghiệm:
 - + Dùng pipette đa kênh (6.4) hút 50 µl dung dịch PBS (B.1.6) vào mỗi giếng thí nghiệm (A1 đến H8);
 - + Dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 50 µl huyết thanh (B.3.4) cho vào giếng đầu tiên và pha loãng theo cơ số 2 bằng cách trộn đều rồi chuyển 50 µl sang giếng thứ 2, cứ như vậy đến giếng số 8 trộn đều rồi hút bỏ đi 50 µl;
 - + Dùng pipette đa kênh (6.4) hút 50 µl kháng nguyên thân (B.3.3) cho vào các giếng (A1 đến H8);
- Đối với các giếng đối chứng:
 - + Đối chứng âm (A9 đến H10): dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 50 µl dung dịch PBS (B.1.6) và 50 µl kháng nguyên thân (B.3.3);
 - + Đối chứng dương (A11 đến H12): dùng pipette đơn kênh (6.3) hút 50 µl huyết thanh tối miễn dịch (B.3.6) và 50 µl kháng nguyên thân (B.3.3).
- Lắc nhẹ rồi đậy nắp, để ở tủ ấm (6.1) qua đêm.
- Đọc kết quả:
 - + Phản ứng âm tính: kháng nguyên lắng tròn đáy giếng ;
 - + Phản ứng dương tính: xảy ra phản ứng ngưng kết, kháng nguyên ngưng kết thành cụm lấm tấm đều ở đáy giếng ;
 - + Đọc hiệu giá ngưng kết: hiệu giá ngưng kết được đánh giá ở độ pha loãng cao nhất còn có phản ứng ngưng kết xảy ra.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I, (1992). *TCCS 01VT- 92/KNI : Quy trình kiểm tra vắc xin Tụ huyết trùng trâu bò.*
 - [2] ASEAN, (2012). *Asean standard Requirements for Haemorrhagic septicaemia for cattle and bufaloes.* 2nd edition, p15 - 17.
 - [3] OIE Terrestrial Manual (2012). *Chapter 2.4.12.Haemorrhagic septicaemia.* Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012.
-