

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-9: 2014

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN –
PHẦN 9: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH CÚM GIA CẦM
A/H5N1**

*Vaccine testing procedure –
Part 9: Avian influenza A/H5N1 vaccine*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8685-9:2014 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 9: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh cúm gia cầm A/H5N1

Vaccine testing procedure - Part 9: Avian influenza A/H5N1 vaccine

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định yêu cầu kỹ thuật để kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt phòng bệnh cúm gia cầm A/H5N1 cho gà, vịt, ngan.

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 8685-9:2014

3.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

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

- 10 con gà từ 2 đến 3 tuần tuổi, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút cúm gia cầm.
- 30 con gà từ 4 đến 5 tuần tuổi, mẫn cảm, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút cúm gia cầm.
- 45 con vịt hoặc ngan từ 2 đến 3 tuần tuổi, mẫn cảm, khỏe mạnh, âm tính với kháng thể kháng vi rút cúm gia cầm.

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

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

4.3 Kiểm tra tính an toàn

- Trên gà: tiêm cho 10 con gà từ 2 đến 3 tuần tuổi, mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.
- Trên vịt hoặc ngan: tiêm cho 10 con vịt hoặc ngan từ 2 đến 3 tuần tuổi, mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.

Theo dõi động vật thí nghiệm trong 14 ngày.

Vắc xin được coi là an toàn nếu tất cả gà/vịt/ngan sống khỏe mạnh, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân.

4.4 Kiểm tra hiệu lực

4.4.1 Phương pháp trọng tài

Sử dụng 15 con gà khỏe từ 4 đến 5 tuần tuổi, chia làm 2 nhóm:

- + Nhóm 1: gồm 10 con gà, mỗi con được tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn, theo đường dưới da cổ;
- + Nhóm 2: gồm 5 con gà làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sử dụng 15 vịt hoặc ngan khỏe từ 2 đến 3 tuần tuổi, chia làm 2 nhóm:

- + Nhóm 1: gồm 10 con vịt hoặc ngan, tiêm dưới da 2 liều vắc xin (0,5 ml/con vào ngày tuổi thứ 14 và 1 ml vào ngày tuổi thứ 35);
- + Nhóm 2: gồm 5 con vịt hoặc ngan làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sau khi tiêm 21 ngày đối với gà, 14 ngày sau mũi tiêm cuối cùng đối với vịt hoặc ngan, động vật ở lô được tiêm và lô đối chứng được thử thách với chủng vi rút cúm gia cầm cường độc H5N1 hiện hành bằng phương pháp nhỏ mũi, liều 10^6 TCID₅₀/con (theo Phụ lục A).

Theo dõi động vật thí nghiệm trong 10 ngày.

Vắc xin được coi là đạt nếu:

- + ít nhất 80 % động vật ở lô được tiêm sống, không có bất kỳ biểu hiện nào của bệnh cúm gia cầm;
- + ít nhất 80 % động vật ở lô đối chứng chết.

4.4.2 Phương pháp thay thế

Sau khi tiêm 21 ngày đối với gà, 14 ngày sau mũi thứ 2 đối với vịt/ngan, tất cả động vật được lấy máu, thu huyết thanh làm phản ứng HI (theo Phụ lục B và Phụ lục C). Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi hiệu giá kháng thể trung bình (GMT) của lô miễn dịch phải $\geq 4\log_2$, trong khi đó lô đối chứng âm tính.

Phụ lục A
(Quy định)

Phương pháp chuẩn độ vi rút

A.1 Chuẩn bị

- Chuẩn bị đĩa 96 giếng có 1 lớp tế bào.
- Pha loãng vi rút trong môi trường tế bào có tolylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) trypsin.
- Pha loãng vi rút theo tỷ lệ 1:10, pha loãng 7 nồng độ.

A.2 Cách tiến hành

- Đánh dấu thứ tự các nồng độ gây nhiễm trên đĩa tế bào.
- Mỗi đĩa có 4 giếng dùng làm đối chứng.
- Loại bỏ môi trường nuôi cấy trong đĩa tế bào, rửa tế bào 1 lần bằng dung dịch muối đệm phosphat (PBS) trước khi gây nhiễm 0,1 ml dung dịch pha loãng vi rút.
- Bắt đầu từ nồng độ pha loãng cao nhất, mỗi nồng độ gây nhiễm cho 4 giếng.
- Tiếp tục gây nhiễm các giếng tiếp theo, ngược trở lại đến nồng độ pha loãng thấp nhất.
- Thay đổi đầu pipet khi cần thiết.
- Đặt đĩa vào trong tủ ấm 37 °C trong môi trường có 5 % CO₂ trong 1 h.
- Rửa bỏ những vi rút không bám trên bề mặt tế bào bằng dung dịch PBS.
- Thêm 0,5 ml môi trường có chứa dung dịch albumin huyết thanh bò (BSA), TPCK trypsin và kháng sinh.
- Đặt đĩa vào tủ ấm 37 °C trong môi trường có 5 % CO₂ và giám sát CPE (cytopathic effect) trong thời gian từ 1 ngày đến 4 ngày.
- Ghi lại số lượng giếng dương tính và âm tính.
- Tính TCID₅₀ (liều xâm nhiễm của virus gây hủy hoại 50 % số giếng tế bào) theo công thức Spearman - Kaber.

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

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)

Phản ứng ngưng kết hồng cầu gà

B.1 Thuốc thử và vật liệu thử

- Dung dịch natri citrat 4 %.
- Nước muối sinh lý (dung dịch NaCl 0,85 %).
- Máu gà trống khỏe mạnh đã trưởng thành, không có kháng thể cúm và Newcastle.
- Đĩa 96 giếng chữ U.

B.2 Thiết bị, dụng cụ

- Máy ly tâm, có thể quay với tốc độ từ 1000 r/min đến 1500 r/min.
- Ống ly tâm.
- Xyranh, dung tích 5 ml.
- Máy lắc (tùy chọn).

B.3 Chuẩn bị hồng cầu gà 1 %

- Dùng xyranh dung tích 5 ml hoặc 10 ml để hút 1 ml (10 % thể tích) dung dịch chống đông (natri citrat 4 %) cho vào ống ly tâm, thêm 9 ml máu gà trống.
- Ly tâm với tốc độ từ 1000 r/min đến 1500 r/min trong 15 min, đổ bỏ huyết tương, cho thêm nước muối sinh lý vào hồng cầu, lắc đều. Ly tâm như trên từ 3 lần đến 4 lần để rửa hồng cầu, hút bỏ nước ở trên sau lần ly tâm cuối.
- Chuẩn bị huyền dịch 1 % bằng cách pha 1 ml hồng cầu với 99 ml nước muối sinh lý.
- Bảo quản huyền dịch hồng cầu ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C. Hồng cầu sau khi pha có thể dùng trong 4 ngày đến 5 ngày (nếu dung dịch hồng cầu bị dung huyết thì loại bỏ, không nên dùng).

B.4 Cách tiến hành

- Nhỏ 50 µl nước muối sinh lý vô trùng vào đĩa 96 giếng chữ U từ giếng thứ 1 đến giếng 12 của mỗi hàng.

- Nhỏ 50 µl kháng nguyên vi rút vào cột đầu tiên của đĩa.
- Tiếp tục pha loãng kháng nguyên kiểm tra theo cơ số 2 bằng cách chuyển 50 µl từ giếng 1 đến giếng thứ 2 và tuân tự đến giếng 11 rồi bỏ đi 50 µl.
- Giếng 12 dùng đối chứng chứa: 50 µl nước muối sinh lý và 50 µl hồng cầu gà 1%.
- Nhỏ 50 µl hồng cầu gà 1% vào các giếng của đĩa phản ứng.
- Lắc nhẹ bằng tay hoặc bằng máy. Ủ đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian khoảng 30 min, sau đó đọc kết quả.

B.5 Diễn giải kết quả

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

Phụ lục C
(Quy định)

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà

C.1 Thuốc thử và vật liệu thử

- Hồng cầu gà, nồng độ từ 0,8 % đến 1 %.
- Kháng nguyên (nước trứng).
- Nước muối sinh lý (dung dịch NaCl 0,85 %).
- Đĩa ngưng kết 96 giếng đáy chữ V.

C.2 Cách tiến hành

- Đánh dấu mẫu huyết thanh cần kiểm tra lên đĩa 96 giếng đáy chữ V.
- Nhỏ 25 µl nước muối sinh lý vô trùng vào các giếng của đĩa 96 giếng.
- Nhỏ 25 µl huyết thanh cần kiểm tra vào dãy 1, pha loãng bậc 2.
- Dùng micropipet trộn đều giếng 1, chuyển 25 µl giếng 1 sang giếng 2. Tương tự đến nồng độ thích hợp. Dãy đối chứng dương nước muối sinh lý + hồng cầu, đối chứng âm kháng nguyên + hồng cầu.
- Cho vào tất cả các giếng mỗi giếng 25 µl dung dịch kháng nguyên 4HA, lắc nhẹ trong vòng 1 min. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 min.
- Hút 50 µl dung dịch hồng cầu cho vào các giếng, lắc nhẹ trong vòng 1 min. Để ở nhiệt độ phòng trong 30 min (khi nào đối chứng lắng hoàn toàn) và đọc kết quả.

C.3 Diễn giải kết quả

- Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết bông lờn vờn.
- Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo chấm tròn.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASEAN Standard Requirements for Avian Influenza Vaccine
 - [2] Chapter 2.3.4: Avian Influenza, OIE Terrestrial Manual 2009
-