

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-17:2017

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN - PHẦN 17: VẮC XIN
VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH VIÊM MÀNG PHỔI Ở LỢN**

Vaccine testing procedure - Part 17: Actinobacillus pleuropneumoniae vaccine, inactivated

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 8685-17 : 2017 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.

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

TCVN 8685-17 : 2017

đầu gà (coryza);

- TCVN 8685-12 : 2014, *Phần 12: Vaccin nhược độc, đông khô phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8685-13 : 2014, *Phần 13: Vaccin vô hoạt phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8685-14 : 2017, *Phần 14: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi thể kính ở lợn;*
- TCVN 8685-15 : 2017, *Phần 15: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do pasteurella multocida type D gây ra ở lợn;*
- TCVN 8685-16 : 2017, *Phần 16: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm ở lợn;*
- TCVN 8685-17 : 2017, *Phần 17: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn;*
- TCVN 8685-18 : 2017, *Phần 18: Vaccin vô hoạt phòng bệnh newcastle;*
- TCVN 8685-19 : 2017, *Phần 19: Vaccin vô hoạt phòng bệnh gumboro.*

Quy trình kiểm nghiệm vắc xin -

Phần 17: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi lợn

Vaccine testing procedure - Part 17: Actinobacillus pleuropneumoniae vaccine, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt được sản xuất từ chủng vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* phòng bệnh viêm màng phổi 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 Ký hiệu và chữ viết tắt

BAB : Blood Agar Base

BHI: Brain heart infusion

EDTA: Ethylene diamine tetra-acetic acid

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

PBS : Phosphate buffered saline

4 Nguyên tắc

Vắc xin được kiểm tra các chỉ tiêu cảm quan, độ vô trùng bằng các phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm, các chỉ tiêu tính an toàn và tính hiệu lực được đánh giá trên các động vật thí nghiệm.

5 Động vật thí nghiệm và giống gốc công cường độc

5.1 Vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* cường độc

5.2 Lợn từ 2 tháng tuổi đến 6 tháng tuổi, khỏe mạnh không có kháng thể *Actinobacillus pleuropneumoniae*

5.3 Thỏ trọng lượng từ 1,8 kg đến 2 kg, khỏe mạnh

5.4 Chuột lang trọng lượng từ 350 g đến 400g, khỏe mạnh

5.5 Chuột nhắt trắng trọng lượng từ 18 g đến 20 g, khỏe mạnh

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Tủ ấm CO₂ có thể duy trì nhiệt độ 37 °C

6.2 Tủ lạnh có thể duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C

6.3 Tủ lạnh sâu có thể duy trì nhiệt độ âm 80 °C

6.4 Máy lắc trộn (vortex mixer) có tốc độ lắc từ 50 rpm đến 2400 rpm

6.5 Máy ly tâm, ly tâm với gia tốc 12 000 g

6.6 Nồi cách thủy có thể duy trì ở các nhiệt độ 100 °C, 110 °C, 121 °C trong thời gian 10 min, 15 min, 20 min

6.7 Micropipet, dung tích từ 0,5 µl đến 10 µl, từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl, từ 100 µl đến 1000 µl

6.8 Micropipet đa kênh, dung tích từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl

6.9 Đĩa lồng, ống nghiệm thủy tinh vô trùng

6.10 Đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ U

6.11 Bình tam giác 100 ml, 200 ml vô trùng

6.12 Dao, kéo, panh kẹp vô trùng

6.13 Bơm kim tiêm một lần 5 ml, 10 ml

6.14 Cân phân tích có dải đo từ 0 g đến 30 g

7 Lấy mẫu sản phẩm và chuẩn bị động vật thí nghiệm

7.1 Lấy mẫu sản phẩm:

Số lượng mẫu cần lấy: 12 mẫu (chai/lọ)

7.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

- Ít nhất 10 lợn (5.2)

- Ít nhất 03 thỏ (5.3)

- Ít nhất 02 chuột lang (5.4)

- Ít nhất 50 chuột nhắt trắng (5.5)

8 Cách tiến hành

8.1 Kiểm tra cảm quan

Quan sát bằng mắt thường, vắc xin đạt chỉ tiêu cảm quan khi lọ vắc xin đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn.

8.2 Kiểm tra vô trùng

8.2.1 Kiểm tra tạp nhiễm vi khuẩn Theo TCVN 8684 : 2011

8.2.2 Kiểm tra tạp nhiễm nấm mốc Theo TCVN 8684 : 2011

8.3 Kiểm tra tính an toàn

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

8.3.1 Phương pháp trọng tài

- Tiêm bắp hoặc dưới da ít nhất 02 lợn (5.2), mỗi con 2 liều vắc xin trên nhãn, theo dõi lợn từ 10 ngày đến 14 ngày.

- Vắc xin được coi là đạt chỉ tiêu về an toàn nếu tất cả lợn sống khỏe, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân.

8.3.2 Phương pháp thay thế

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

- Tiêm vào dưới da hoặc xoang bụng cho ít nhất 10 chuột nhất trắng (5.5) mỗi con 0.5 ml vắc xin, theo dõi chuột từ 10 ngày đến 14 ngày. Vắc xin được coi là đạt chỉ tiêu về an toàn nếu tất cả chuột sống khỏe, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân.

- Tiêm dưới da hoặc tiêm bắp cho ít nhất 02 chuột lang (5.4) mỗi con 2 ml vắc xin, theo dõi chuột từ 10 ngày đến 14 ngày. Vắc xin được coi là đạt chỉ tiêu về an toàn nếu tất cả chuột sống khỏe, phát triển bình thường và không có biến đổi bất thường về cục bộ hay triệu chứng toàn thân.

8.4 Kiểm tra hiệu lực

Chọn 1 trong 3 phương pháp sau:

8.4.1 Phương pháp công cường độc trên lợn

Lợn được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm 1: Tiêm bắp ít nhất 05 lợn (5.2) mỗi con tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn.

- Nhóm 2: Tiêm bắp ít nhất 03 lợn (5.2) nước sinh lý vô trùng với liều lượng như tiêm vắc xin.

- 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ lợn nhóm 1 được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất.

TCVN 8685-17 : 2017

- 21 ngày sau mũi tiêm thứ 2, toàn bộ lợn nhóm 1 và nhóm 2 được thử thách với vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* cường độc (5.1) mỗi con 1 ml (tương đương với liều 10^9 CFU/ml) theo đường dưới da.

- Theo dõi động vật thí nghiệm trong 7 - 10 ngày.

- Vắc xin được coi là đạt nếu:

+ Ít nhất 2/3 lợn nhóm 2 chết hoặc có triệu chứng bệnh tích điển hình của bệnh viêm dính màng phổi ở lợn

+ Ít nhất 4/5 lợn nhóm 1 không có bất kỳ các triệu chứng bệnh tích nào của bệnh viêm dính màng phổi ở lợn.

8.4.2 Phương pháp công cường độc trên chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm 1: Tiêm phúc xoang ít nhất 20 chuột nhắt trắng (5.5) mỗi con tiêm không quá 1/40 liều vắc xin được ghi trên nhãn.

- Nhóm 2: Tiêm phúc xoang ít nhất 20 chuột nhắt trắng (5.5) nước sinh lý vô trùng với liều lượng như tiêm vắc xin.

- 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ chuột nhóm 1 được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất.

- 10 ngày sau mũi tiêm thứ hai, toàn bộ chuột nhóm 1 và chuột nhóm 2 được thử thách với vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* cường độc (5.1) mỗi con 0,2 ml (tương đương với $1,7.10^8$ CFU/0,2 ml) theo đường dưới da.

- Theo dõi trong 10 ngày, vắc xin được coi là đạt nếu:

+ Ít nhất 18/20 chuột nhóm 2 chết

+ Ít nhất 15/20 chuột nhóm 1 sống

8.4.3 Phương pháp huyết thanh học

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

8.4.3.1 Đánh giá hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ELISA

-Tiêm bắp ít nhất 05 lợn (5.2) mỗi con 1 liều vắc xin được ghi trên nhãn. 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ lợn được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất. 21 ngày sau mũi tiêm thứ hai, lợn được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ELISA.

-Tiêm bắp ít nhất 03 thỏ (5.3) mỗi con 1 liều vắc xin được ghi trên nhãn. 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ thỏ được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất. 21 ngày sau mũi tiêm thứ hai, thỏ được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ELISA.

- Đánh giá kết quả: Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi ít nhất 75 % mẫu huyết thanh đạt giá trị dương tính.

8.4.3.2 Đánh giá hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ngưng kết chậm.

-Tiêm bắp ít nhất 05 lợn (5.2) mỗi con 1 liều vắc xin được ghi trên nhãn. 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ lợn được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất. 21 ngày sau mũi tiêm thứ hai, lợn được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ngưng kết chậm (xem phụ lục A).

-Tiêm bắp ít nhất 03 thỏ (5.3) mỗi con 1 liều vắc xin được ghi trên nhãn. 14 ngày sau mũi tiêm thứ nhất, toàn bộ thỏ được tiêm mũi thứ hai với liều lượng và đường tiêm như mũi thứ nhất. 21 ngày sau mũi tiêm thứ hai, thỏ được lấy máu, chất huyết thanh làm phản ứng ngưng kết chậm (xem phụ lục A).

- Đánh giá: Vắc xin đạt tiêu chuẩn nếu hiệu giá kháng thể của ít nhất 75 % mẫu huyết thanh miễn dịch phải cho kết quả $\geq 1:16$.

Phụ lục A

(Quy định)

Kiểm tra hiệu giá kháng thể *Actinobacillus* bằng phản ứng ngưng kết chậm**A.1 Chuẩn bị môi trường hóa chất**

- Đĩa thạch chocolate bổ sung Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 5 %
- Đĩa thạch máu đường kính 8 cm đến 10 cm
- Canh thang Brain heart infusion (BHI) đóng ống 4 ml
- Acid Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 1N
- Formaldehyde solution min 37 % (HCHO)
- Dung dịch PBS: 1000ml được pha theo công thức sau:

Natri clorua (NaCl)	8 g
Kali clorua (KCl)	2 g
Natri hiđro photphat (Na_2HPO_4)	1,15 g
Mono kali photphat (KH_2PO_4)	0,2 g
Nước	1000 ml

Chỉnh pH đến 7,2 bằng dung dịch NaOH 1N hoặc dung dịch HCl 1N. Hấp diệt trùng ở nhiệt độ 121 °C trong 1 h. Bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

A.2 Chuẩn bị kháng nguyên thân (*KNO* - Somatic antigen - KN xử lý acid EDTA)

A.2.1 Cấy 0,01 ml vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* cường độc (5.1) vào môi trường thạch chocolate bổ sung NAD 5 % (A.1), ủ ở tủ ấm 37 °C (6.1) trong 24 h

A.2.2 Chọn khuẩn lạc điển hình trên môi trường thạch chocolate (A.2.1) cấy vào môi trường canh thang BHI (A.1) bổ sung NAD 5 %, rồi ủ ở tủ ấm 37 °C (6.1) trong 24 h

A.2.3 Láng 4 ml canh trùng (A.2.2) lên 2 đĩa thạch chocolate (A.1) rồi ủ ở tủ ấm 37 °C (6.1) trong 24 h

A.2.4 Thu hoạch vi khuẩn sau khi láng trên mặt thạch chocolate (A.2.3) bằng cách dùng 5ml PBS rửa bề mặt hai đĩa thạch, hút huyền dịch vi khuẩn thu được vào ống nghiệm

A.2.5 Nhỏ 0,02 ml Formaldehyde solution 37 % (A.1) vào huyền dịch vi khuẩn thu được (A.2.4) rồi ủ ở tủ ấm 37 °C (6.1) trong 24 h, sau đó đem kiểm tra vô trùng huyền dịch vi khuẩn

A.2.6 Huyền dịch vi khuẩn (A.2.5) đạt chỉ tiêu vô trùng sẽ được ly tâm bằng máy ly tâm (6.5) với tốc độ 12000 rpm trong 20 min ở nhiệt độ 4 °C, thu lấy cặn, hoàn nguyên lại bằng 20 ml EDTA 1 %, lắc đều rồi ủ ở tủ ấm 37 °C (6.1) trong 24 h

A.2.7 Sau đó tiếp tục ly tâm huyền dịch vi khuẩn (A.2.6) bằng máy ly tâm (6.5) với tốc độ 12000 rpm trong 20 min ở nhiệt độ 4 °C, cạn thu được sẽ rửa bằng 5 ml PBS có bổ sung 0,3 % Formaldehyde solution min 37 % (A.1), lặp lại 2 lần.

A.2.8 Tiếp tục ly tâm huyền dịch vi khuẩn (A.2.7) bằng máy ly tâm (6.5) với tốc độ 12000 rpm trong 20 min ở nhiệt độ 4 °C, cạn thu được sẽ được hoàn nguyên bằng 5 ml PBS để thu hoạch kháng nguyên

A.2.9 Kiểm tra kháng nguyên (A.2.8) xem có tự ngưng kết không, kháng nguyên đạt yêu cầu khi không có hiện tượng ngưng kết.

A.3 Chuẩn bị huyết thanh kiểm tra

Lấy máu động vật (8.4.3.2), chất lấy huyết thanh. Sau đó khử bỏ thể bằng cách đun ở nồi cách thủy (6.6) ở nhiệt độ 56 °C trong 30 min.

A.4 Cách tiến hành

Quy trình cho phản ứng ngưng kết chậm với kháng nguyên O (kháng nguyên Somatic) thực hiện trên đĩa 96 giếng đáy chữ U

Sơ đồ phản ứng ngưng kết chậm

Dung dịch	Thí nghiệm								Đối chứng				
									-		+		
Thứ tự	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PBS	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
Huyết thanh	50 µl	50µ	50 µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl			50 µl	50 µl	
Kháng nguyên	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	

- Thực hiện thí nghiệm theo sơ đồ phản ứng ngưng kết chậm như trên

- Đối với các giếng thí nghiệm:

+ Cho dung dịch PBS vào các dãy giếng thí nghiệm trên đĩa 96 đáy chữ U (50 µl/giếng)

+ Thêm vào giếng đầu tiên 50 µl huyết thanh và pha loãng huyết thanh theo cơ số 2

+ Nhỏ vào các giếng 50 µl kháng nguyên

- Đối với các giếng đối chứng:

+ Đối chứng âm: 50 µl dung dịch PBS + 50 µl kháng nguyên

TCVN 8685-17 : 2017

- + Đối chứng dương: 50 µl dung dịch PBS + 50 µl huyết thanh tối miễn dịch và pha loãng theo cơ số 2
- + 50 µl kháng nguyên
- Lắc nhẹ cho đều rồi dính bằng dính để ở tủ ấm 37 °C (6.1) qua đêm
- Đọc kết quả:
 - + Phản ứng âm tính: Kháng nguyên lắng tròn đáy giếng
 - + Phản ứng dương tính: Xảy ra hiện tượng ngưng kết, kháng nguyên ngưng kết thành cụm lấm tấm xung quanh 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] ASEAN Standards for Animal Vaccines (Second Edition): *Requirements for Actinobacillus pleuropneumoniae Bacterin*
- [2] Alexander Maas, Ilse D. Jacobsen, Jochen Meens and Gerald-F. Gerlach* *Use of an Actinobacillus pleuropneumoniae Multiple Mutant as a Vaccine That Allows Differentiation of Vaccinated and Infected Animal*, Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30173 Hannover, Germany
- [3] Mario Jacques¹, *Isolation of an Atypical Strain of Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 1 with a Truncated Lipopolysaccharide Outer Core and No O.*
-