

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 phen 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 như dầu đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn. Vắc xin keo phen 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:

- Tiêm bắp cho 2 con lợn, mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.
- 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:

- 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 Phủ 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 µl 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°C đến 39°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 µl 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 µl 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 µl 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 µl dung dịch substrate/chromogen và 50 µl 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 dấu (ví dụ: dấu vân tay) hoặc ngưng tụ trên thành của đĩa phản ứng. Nếu cần thiết, làm vỡ bong bóng bất kỳ bằng một tip sạch.