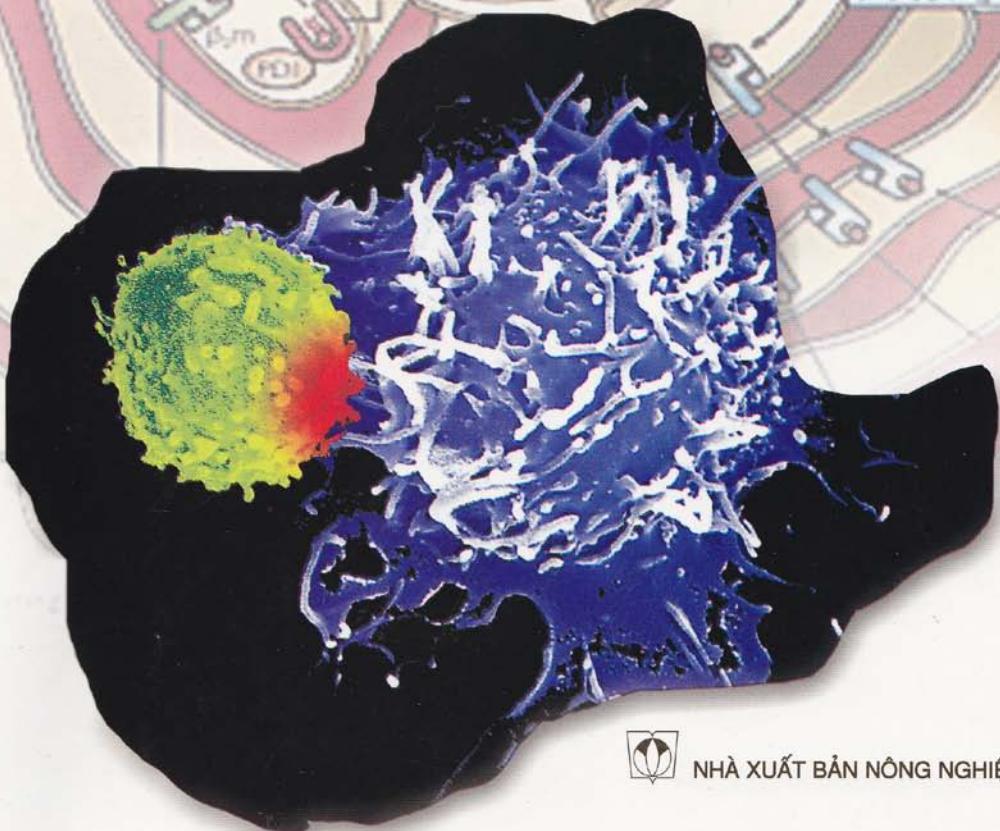


BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

TS. NGUYỄN BÁ HIÊN (CHỦ BIÊN)  
TS. TRẦN THỊ LAN HƯƠNG

GIÁO TRÌNH  
**MIỄN DỊCH HỌC  
ỨNG DỤNG**



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

## LỜI NÓI ĐẦU

Năm 2007, để thực hiện yêu cầu đào tạo cán bộ bậc đại học chuyên ngành thú y thuộc chương trình mới của Bộ Giáo dục và Đào tạo, môn học “**Miễn dịch học ứng dụng**” bắt đầu được đưa vào giảng dạy cho sinh viên từ khóa 48 ngành thú y của khoa Thú y trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Vì đây là một môn học mới và rất cần thiết, trải nghiệm 3 năm giảng dạy, chúng tôi thấy cần phải biên soạn giáo trình này giúp sinh viên có tài liệu để học tập.

Giáo trình “**Miễn dịch học ứng dụng**” là một tài liệu đầy đủ và cập nhật nhất ở Việt Nam về vacxin thú y và ứng dụng những kiến thức của miễn dịch học trong thú y. Vì vậy, giáo trình cũng là một tài liệu tham khảo tốt cho các cán bộ làm công tác nghiên cứu, xét nghiệm và thực hành trong nhiều lĩnh vực của ngành thú y.

Trong quá trình biên soạn, chúng tôi đã cố gắng thể hiện tính cơ bản, tính hiện đại, tính khoa học và tính hệ thống của chương trình môn học.

Là giáo trình của một môn học mới, mà số tài liệu tham khảo về môn học còn ít, trải nghiệm giảng dạy môn học còn ngắn và khả năng của người viết có hạn nên không tránh khỏi nhiều thiếu sót, rất mong nhận được sự chỉ dẫn, sự đóng góp của bạn đọc xa gần để cuốn sách được hoàn thiện trong lần tái bản tới.

Xin được trân trọng cảm ơn.

**Thay mặt các tác giả  
Chủ biên**

**TS. Nguyễn Bá Hiên**

# PHẦN MỞ ĐẦU

## I. KHÁI NIỆM VỀ MÔN HỌC

Miễn dịch học ứng dụng (Applied immunology) là một môn khoa học nghiên cứu ứng dụng những kiến thức của miễn dịch học vào y học, thú y học và nhiều lĩnh vực khoa học khác nhằm mục đích phục vụ đời sống và bảo vệ sức khỏe của con người.

Nội dung chính của môn học bao gồm:

1. Miễn dịch học ứng dụng trong phòng bệnh: tức là nghiên cứu về vaccine để phòng các bệnh truyền nhiễm, bệnh ký sinh trùng và sử dụng vaccine trong một số trường hợp đặc biệt khác.
2. Miễn dịch học ứng dụng trong điều trị đặc hiệu.
3. Miễn dịch học ứng dụng trong chẩn đoán.
4. Miễn dịch học ứng dụng trong nghiên cứu những biểu hiện bệnh lý do rối loạn của quá trình miễn dịch nhằm:
  - Nhận biết và tìm hiểu cơ chế bệnh sinh của sự rối loạn hoạt động ở hệ thống miễn dịch.
  - Tìm phương pháp điều trị thích hợp với cơ chế bệnh sinh ấy.

Khoa học miễn dịch học ứng dụng có liên quan chặt chẽ tới nhiều môn học khác như: sinh lý học, sinh hóa học, bệnh lý học, vi sinh vật học, bệnh truyền nhiễm, sinh học phân tử và đặc biệt là miễn dịch học.

Trong khuôn khổ của giáo trình này, miễn dịch học ứng dụng chỉ đề cập đến ba nội dung trên. Nội dung thứ tư bạn đọc có thể tìm hiểu trong lĩnh vực về miễn dịch bệnh lý đã trình bày trong giáo trình miễn dịch học thú y và bệnh lý học thú y.

## II. VAI TRÒ VÀ VỊ TRÍ CỦA MÔN HỌC

Như trên đã nêu, miễn dịch học ứng dụng là một môn khoa học nghiên cứu ứng dụng những kiến thức của miễn dịch học vào nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau.

①. Trong lĩnh vực đầu tranh phòng chống các bệnh truyền nhiễm và ký sinh trùng, việc nghiên cứu các vaccine phòng bệnh là một việc làm cực kỳ cần thiết. Nhờ có vaccine mà nhiều bệnh truyền nhiễm nguy hiểm đối với con người và động vật đã được khống chế và từng bước bị loại trừ.

Vaccine được coi là thành tựu vĩ đại nhất của y học và thú y học hiện đại, công tác tiêm chủng đã và đang được thực hiện ở tất cả các quốc gia và thực sự trở thành tấm lá chắn vững chắc để phòng chống nhiều bệnh truyền nhiễm ở người và động vật. Tuy nhiên, cuộc chiến chống lại dịch bệnh vẫn còn rất phức tạp, vì thế việc nghiên cứu để cải tạo các vaccine hiện có và chế tạo các vaccine mới đang là mục tiêu phấn đấu của các nhà khoa học. Trong lĩnh vực nghiên cứu này, một môn khoa học mới đã ra đời đó là môn “Vaccine học - **Vaccinology**”.

Ngày nay, khái niệm về vaccine đã có sự thay đổi, nó không còn là chế phẩm từ vi sinh vật dùng để phòng bệnh, mà còn được làm từ vật liệu sinh học không vi sinh vật và được dùng với mục đích không phải phòng bệnh. Ví dụ: vaccine chống khối u làm từ tế bào sinh khối u, dùng để chống lại tế bào ác tính trong việc ngăn chặn sự phát triển của khối u trong ung thư; vaccine chống thụ thai làm từ receptor của trứng với tế bào ở nội mạc tử cung; vaccine kháng tinh trùng; vaccine chống HCG (Human Chorionic Gonadotropin) với mục đích chống thụ thai...

②. Trong lĩnh vực điều trị đặc hiệu đối với các bệnh truyền nhiễm, miễn dịch học ứng dụng cũng đóng một vai trò hết sức quan trọng.

Song song với sự phát triển của vaccine thì việc dùng kháng huyết thanh trong chẩn đoán và điều trị cũng ngày càng được phát triển và ứng dụng rộng rãi.

Kể từ năm 1890, khi Behring và Kitasato phát hiện ra kháng thể trung hòa độc tố của vi khuẩn, sau đó việc tìm hiểu về các yếu tố miễn dịch dịch thể được tập trung nghiên cứu, người ta đã phát hiện ra phân tử kháng thể dịch thể đặc hiệu (Immunoglobulin). Huyết thanh động vật chứa Immunoglobulin đặc hiệu được gọi là huyết thanh miễn dịch hay kháng huyết thanh.

Việc sử dụng kháng huyết thanh trong điều trị các bệnh truyền nhiễm ở người và động vật với những tình trạng bệnh lý nguy kịch do sự tấn công ôn ác của mầm bệnh truyền nhiễm mà không có loại hóa dược nào ngăn cản nổi, đã là một phương thức kỳ diệu cứu sống sinh mạng của hàng triệu con người.

Ngày nay, huyết thanh miễn dịch đã đư ợc thay thế bởi Immunoglobulin tinh chế và được sử dụng để:

- Điều trị hỗ trợ các nhiễm trùng nặng
- Điều trị thay thế tình trạng thiếu hụt Immunoglobulin tiên phát và thứ phát
- Điều hòa miễn dịch trong một số trường hợp viêm miễn dịch mạn tính và bệnh tự miễn dịch ở người.

③. Trong lĩnh vực chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm và ký sinh trùng, miễn dịch học ứng dụng cũng đóng một vai trò tích cực, cùng với các phương pháp chẩn đoán khác như chẩn đoán dịch tễ học, chẩn đoán vi sinh vật học, ... thì chẩn đoán huyết thanh học là một phương pháp ưu việt vì cho kết quả nhanh và chính xác.

Năm 1898, Bordet phát hiện tác dụng của bô thể và được dùng như một chỉ thị của sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể. Việc phát hiện kháng thể dịch thể dẫn đến việc dùng kháng huyết thanh để định loại các vi sinh vật và chẩn đoán bệnh truyền nhiễm đã được ứng dụng rộng rãi. Đến nay, những kỹ thuật miễn dịch hiện đại như miễn dịch phóng xạ, ELISA, miễn dịch huỳnh quang, ... với nguyên lý đánh dấu kháng thể thì độ nhạy của việc phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể của các kỹ thuật chẩn đoán huyết thanh học được nâng cao rất nhiều. Nó cho phép phát hiện những kháng thể dịch thể đặc hiệu có hàm lượng rất thấp nhưng lại rất đặc hiệu trong huyết thanh và thể dịch của vật bệnh, giúp ích rất nhiều cho việc chẩn đoán.

Đặc biệt, vào năm 1975 Milstein và Koler đã đưa ra phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật liên hợp tế bào Myeloma với tế bào lympho B đã đư ợc hoạt hóa của chuột. Sự ra đời của kháng thể đơn dòng đã góp phần đắc lực trong lĩnh vực nghiên cứu cấu trúc của kháng nguyên, tính đặc hiệu của phản ứng giữa kháng nguyên với kháng thể và trong chẩn đoán bệnh.

Như vậy, cho đến thời điểm hiện tại, ứng dụng những kiến thức về miễn dịch học trong khoa học và trong đời sống ngày càng được mở rộng và mang lại nhiều thành tựu hữu ích cho con người.

### **III. KHÁI QUÁT NỘI DUNG CHƯƠNG TRÌNH MÔN HỌC**

#### **1. Thông tin về học phần**

“Miễn dịch học ứng dụng” là môn học bắt buộc cho sinh viên ngành thú y, học vào học kỳ IX trong tiến trình đào tạo 5 năm.

Số tín chỉ: 2 (1,5 lý thuyết + 0,5 thực hành)

#### **2. Điều kiện tiên quyết**

Là môn học chuyên môn được học tiếp sau các môn Miễn dịch học thú y, Vi sinh vật học thú y, Dịch tễ học thú y và Bệnh truyền nhiễm động vật

### **3. Nhiệm vụ của sinh viên**

- Dự lớp: Đây là điều kiện bắt buộc, sinh viên không được vắng mặt 1/5 số tiết quy định.
- Bài tập: Sinh viên phải làm các tiểu luận, chuyên đề theo yêu cầu của giáo viên.
- Thực hành: Sinh viên phải tham gia đầy đủ các bài thực hành của môn học.

### **4. Tiêu chuẩn đánh giá sinh viên**

- Dự lớp: Sinh viên dự lớp đủ thời gian qui định mới được phép dự thi hết môn học.
- Tham gia thảo luận và thuyết trình môn học.
- Viết tiểu luận theo các chủ đề mà giáo viên yêu cầu.
- Kiểm tra giữa học phần.
- Bài thi cuối kỳ : Sinh viên phải dự thi hết môn học theo hình thức thi viết hoặc thi vấn đáp sau khi hoàn thành các nội dung trên.
- Bài thi được chấm theo thang điểm 10 trên cơ sở tổng hợp các kết quả đánh giá đã nêu

### **5. Mục tiêu**

Nắm được kiến thức cơ bản trong sản xuất vacxin, kháng huyết thanh và các phương pháp sử dụng phản ứng huyết thanh học để chẩn đoán bệnh.

### **6. Mô tả văn tắt nội dung học phần**

Ứng dụng miễn dịch học trong phòng bệnh truyền nhiễm cho vật nuôi: phân loại vacxin, sản xuất, kiểm nghiệm, sử dụng.

Biện pháp nâng cao hiệu quả sử dụng vacxin trong phòng bệnh truyền nhiễm cho vật nuôi và đối tượng nuôi trồng thủy sản.

Miễn dịch học ứng dụng trong chẩn đoán, điều trị bệnh truyền nhiễm cho vật nuôi.

### **7. Tài liệu học tập**

- + Giáo trình **Vi sinh vật thú y**

*Nguyễn Như Thành - Nguyễn Bá Hiên - Trần Thị Lan Hương* - NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2001

- + Giáo trình **Miễn dịch học ứng dụng**

*Nguyễn Bá Hiên - Trần Thị Lan Hương*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2009

- + Giáo trình **Miễn dịch học thú y**

*Nguyễn Bá Hiên - Trần Thị Lan Hương*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2009

### **Tài liệu tham khảo:**

- + **Miễn dịch học**

*Vũ Triệu An - Jean Claude Homberg* - Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1997

- + **Miễn dịch - Dị ứng học cơ sở**

*Vũ Minh Thực* - Nhà xuất bản đại học Quốc gia Hà Nội, 2005

- + **Miễn dịch học**

*Nguyễn Ngọc Lan, Văn Định Hoa* - NXB Y học Hà Nội, 2006

- + **Vi sinh vật - Bệnh truyền nhiễm vật nuôi**

*Nguyễn Bá Hiên, Nguyễn Quốc Doanh, Phạm Sỹ Lăng, Nguyễn Thị Kim Thành, Chu Đình Tới* - NXB Giáo dục, Hà Nội, 2008

- + **Vacxin và chế phẩm miễn dịch trong phòng và điều trị**

*Nguyễn Đình Bảng, Ngô Thị Kim Hương* –NXB Y học Hà Nội, 2003

- + Tiêu chuẩn, quy trình ngành thú y

Cục thú y, NXB Nông nghiệp Hà Nội, 2007

## Chương I

### KHÁI NIỆM VÀ PHÂN LOẠI VACXIN

**Mục tiêu :** Nắm được đặc tính, thành phần và cách phân loại vacxin

**Kiến thức trọng tâm :**

- Khái niệm và nguyên lý của vacxin
- Đặc tính cơ bản của vacxin
- Thành phần của vacxin
- Proteosom, liposom và coclet
- Phân loại vacxin

#### I. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN VÀ DANH PHÁP

Từ xa xưa, con người đã nhận thấy có những bệnh truyền nhiễm chỉ gặp ở một số loài động vật và trong cùng một vụ dịch có thể có cả thể mắc nặng, có cả thể mắc nhẹ. Mặt khác, có những bệnh sau khi bị bệnh qua khỏi thì vĩnh viễn không bị mắc lại, tức là con người đã biết tới những gì mà ngày nay chúng ta gọi là miễn dịch.

Đối với các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, con người đã có một quá trình đấu tranh phòng chống để giành giật lấy sự sống.

Để phòng chống bệnh đậu, nhà khoa học nổi tiếng nhất người Hy Lạp (384 - 322 trước Công nguyên) đã đề nghị chặt bỏ tổ chức bị chó dại cắn.

Đấu tranh phòng chống bệnh đậu mùa, một bệnh truyền nhiễm cực kỳ nguy hiểm của loài người trong những thế kỷ trước, ở thời kỳ sơ khai, người ta đã biết lấy từ mụn nước, mụn mủ, vảy đậu của bệnh nhân mắc bệnh đậu mùa rồi phơi khô, tán nhỏ cho người lành hít để gây bệnh nhẹ, tạo ra một tình trạng miễn dịch. Phương thức này đã có sau Công nguyên khoảng 1.000 năm ở Trung Quốc. Cách phòng bệnh đậu mùa theo đường chủng được thực hiện ở Ấn Độ, Đông Nam Á và Bắc Phi vào thế kỷ 16 và 17. Những thông tin về chủng đậu ở nước Anh xuất hiện vào những năm từ 1698 đến 1700 mà bây giờ biết được là qua những bức thư của một người Anh tên là Joseph Lister làm việc tại Trung Quốc trong thời kỳ đó.

Nhiều tài liệu cho rằng bà Mary Montague là vợ của một viên đại sứ Anh sống ở Constatinophe đã đưa phương pháp chủng đậu vào nước Anh năm 1721, khi dịch đậu mùa tràn vào thủ đô London, bà đã cùng với bác sĩ Mailand áp dụng chủng đậu cho nhiều người và đã cứu sống được họ trước sự ngạc nhiên của Hoàng gia Anh và giới chuyên môn thuộc trường đại học Y London. Bà Mary Montague đã được ghi tên vào lịch sử y học nước Anh do có những đóng góp đầu tiên đó.

Bước ngoặt lịch sử trong phòng và chống bệnh đậu mùa được đánh dấu vào năm 1798. Lúc này, bệnh đậu mùa lan rộng khắp châu Âu và làm chết rất nhiều người đến nỗi ở châu Âu có câu ngạn ngữ : “Tình yêu và bệnh đậu mùa không trừ một ai”. Tại vùng Gloucestershire thuộc vương quốc Anh. Một bác sĩ thú y tên là Edward Jenner đã quan sát thấy các phụ nữ vắt sữa bò đã không mắc bệnh đậu mùa. Từ quan sát thực tế và với trình độ hiểu biết, năm 1776 ông đã tiến hành thử nghiệm một cách thận trọng và có nguyên tắc bằng cách gây miễn dịch chủ động cho một bé trai 8 tuổi với dịch chứa virus đậu bò và sau đó thử thách với bệnh đậu mùa, kết quả bé trai đã không mắc bệnh đậu mùa. Từ kết quả này, năm 1796 Jenner mở rộng áp dụng phương pháp phòng bệnh đó, năm 1798 Jenner xuất bản cuốn sách về phòng bệnh đậu mùa từ chế phẩm đậu bò. Đây là một phát minh quan trọng trong sự phát triển của miễn dịch học, tức là mở đầu cho sự nghiên cứu về khả năng phòng vệ đặc hiệu của cơ thể chống

lại tác nhân gây bệnh.

Để ghi nhận sự kiện này, năm 1885 Louis Pasteur (người Pháp), nhà khoa học đứng hàng đầu thế giới trong lĩnh vực vi sinh vật đã đề nghị dùng từ “vaccine” để gọi tất cả các chế phẩm sinh học có nguyên lý phòng bệnh như vậy nhằm tỏ lòng tôn kính Edward Jenner. Thuật ngữ này bắt nguồn từ ngôn từ “vaccinia” (tên của virus đậu bò).

Cuối thế kỷ 19, nhiều vi khuẩn là nguyên nhân gây ra các bệnh truyền nhiễm ở người và động vật được phát hiện như vi khuẩn thương hàn, bạch hầu, nhiệt thán, lao... Người ta đã xây dựng được các phòng thí nghiệm có thể nuôi cấy thuần khiết các vi khuẩn này và mở đường cho sự phát triển của vaccine.

Louis Pasteur, trên cơ sở phát hiện của Jenner đã nghiên cứu tạo được vaccine phòng bệnh cho người và động vật. Lần đầu tiên, nhà khoa học này đã phát hiện ra hiện tượng giảm độc lực của vi khuẩn và đã tạo ra được giống vi khuẩn nhiệt thán giảm độc dùng để chế vaccine. Tháng 5 năm 1881, Pasteur và các đồng nghiệp Emin Roux, Charles Chamberland đã tiến hành một thí nghiệm lịch sử ở Ponilly - le - Fort bằng vaccine nhiệt thán trên cừu. Kết quả là những con cừu được tiêm vaccine nhiệt thán đã không mắc bệnh khi thử thách bằng vi khuẩn nhiệt thán cường độ.

Phát triển ý tưởng của Pasteur, Haffkine đã chế tạo được vaccine nhược độc phòng bệnh tả. Calmette - Guerin đã chế tạo thành công vaccine BCG.

Năm 1896, Wilhelm Kolle làm bất hoạt vi khuẩn tả bằng nhiệt để gây miễn dịch. Cùng năm đó, Richard Pfeiffer làm bất hoạt vi khuẩn thương hàn bằng nhiệt và bảo quản trong phenol để chế vaccine, đến năm 1915, vaccine thương hàn vô hoạt đã được dùng cho binh lính ở châu Âu và châu Mỹ.

Như vậy, các nhà khoa học trên đã đưa ra nguyên lý sử dụng vi khuẩn toàn tế bào bất hoạt để gây miễn dịch.

Vào những năm 20 của thế kỷ XX, Max Theiler đã phát hiện được một chủng virus sốt vàng không độc bằng cách cấy chuyền nhiều lần virus độc trên mô phổi gà, ông đã tao ra được chủng virus vaccine nhược độc có ký hiệu 17D để sản xuất vaccine phòng bệnh sốt vàng. Sau đó, hàng loạt các vaccine chế tạo từ các chủng virus được gây nhược độc nhân tạo ra đời như vaccine bại liệt, vaccine quai bị.

Năm 1890, Behring và Kitasato đã phát hiện ra rằng nếu nuôi cấy vi khuẩn bạch hầu hoặc uốn ván trong môi trường lỏng, các loài vi khuẩn này sẽ tiết ngoại độc tố vào trong môi trường. Sau khi xử lý bằng formalin, độc tố sẽ bị giải độc nhưng vẫn giữ được tính kháng nguyên để kích thích cơ thể động vật sinh miễn dịch. Độc tố mất độc lực được gọi là giải độc tố (anatoxin) dùng để chế vaccine. Phát hiện này là cơ sở để chế tạo các vaccine dưới đơn vị (Subunit).

Đến nay, những tiến bộ về kỹ thuật gen không chỉ ảnh hưởng đến thiết kế vaccine dưới đơn vị mà còn được áp dụng trong 3 lĩnh vực đặc biệt khác:

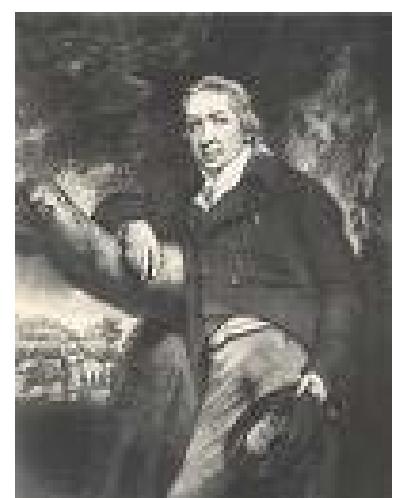
① Làm mất đoạn và biến đổi gen để tạo ra những chủng vi khuẩn, virus không độc để chế tạo vaccine. Ví dụ: vaccine Aujesky

② Tạo ra các vector mang gen chi phối sự sinh sản kháng nguyên tái tổ hợp, cytokine tái tổ hợp để tạo ra các vaccine tái tổ hợp có vector dẫn truyền.

③ Thúc đẩy về sự ra đời vaccine ADN dưới dạng một plasmid với một gen khởi động (promotor) thích hợp.

Tóm lại, lịch sử phát triển của vaccine có thể chia thành 3 giai đoạn lớn:

❶ Giai đoạn Jenner (từ 1796): Sử dụng các virus nguyên



E.Jenner

độc để gây miễn dịch cho người.

❷ *Giai đoạn Pasteur* (1860 - 1990): Sử dụng các mầm bệnh nhược độc và các tế bào vi khuẩn toàn vẹn đã được vô hoạt để chế tạo vaccine.



L.Pasteur

❸ *Giai đoạn vaccine ADN* (từ 1996): đánh dấu một giai đoạn mới trong cuộc cách mạng về vaccine, có rất nhiều hướng để tạo ra những vi khuẩn thế hệ mới, hiện đại và có hiệu quả.

Hiện nay, danh pháp của một vaccine gồm 2 từ ghép :

- Từ đầu: vaccine
- Từ sau: tên bệnh

Tuy nhiên các thuật ngữ về các sản phẩm sinh học dùng trong thú y thay đổi giữa các quốc gia.

Ví dụ: ở Mỹ, thuật ngữ vaccine được dùng để chỉ những sản phẩm chứa virus hoặc nguyên trùng sống hay nhược độc, vi khuẩn sống hoặc các axit nucleic.

Các sản phẩm chứa vi khuẩn chết và các vi sinh vật khác được gọi tên như bacterin, chất chiết của vi khuẩn (bacterial extract), các chất dưới đơn vị (sub units), độc tố vi khuẩn (toxoid). Ở châu Âu, các sản phẩm dùng trong thú y được gọi là “các sản phẩm sử dụng cho động vật nhằm tạo ra miễn dịch chủ động hoặc bị động để chẩn đoán tình trạng miễn dịch”.

Trong chương này, thuật ngữ vaccine bao gồm tất cả các sản phẩm tạo ra để kích thích sinh miễn dịch chủ động cho cơ thể động vật chống lại bệnh, việc sử dụng này phù hợp với thuật ngữ quốc tế, không liên quan đến các sản phẩm sinh học sinh miễn dịch thụ động, chất kích thích miễn dịch, chất điều trị dị ứng hoặc chẩn đoán bệnh.

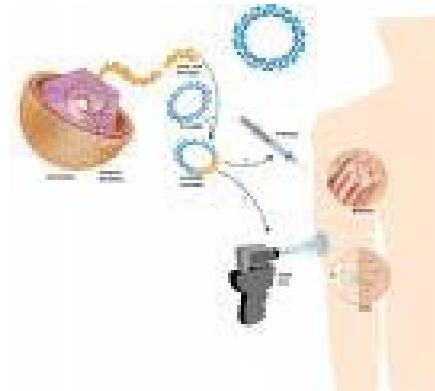
Vaccine ra đời đã làm công cuộc phòng chống các bệnh truyền nhiễm ngày càng có hiệu quả, đã có nhiều bệnh truyền nhiễm nguy hiểm đối với con người và động vật được khống chế và từng bước được loại trừ.

Năm 1977, trường hợp đậu mùa cuối cùng ở người trên thế giới là Ali Maow Maalin, người Somalia.

Năm 1979, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã công bố loại trừ hoàn toàn bệnh đậu mùa trên toàn thế giới.

Năm 1987, kỷ niệm 10 năm thanh toán bệnh đậu mùa.

Năm 2000, Bộ Y tế Việt Nam tuyên bố loại trừ bệnh bại



Sản xuất vaccine ADN



Ảnh chụp năm 1977, Ali Maow Maalin, người Somalia, được xem là bệnh nhân cuối cùng mắc bệnh đậu mùa.

liệt ở Việt Nam.

Trong lĩnh vực thú y, bệnh dịch tả trâu bò cũng đã được thanh toán

Vaccine được coi là thành tựu vĩ đại nhất của y học hiện đại. Công tác tiêm chủng đã được thực hiện ở tất cả các quốc gia và đã thay đổi sự trở thành tâm lá chắn để phòng chống nhiều bệnh truyền nhiễm ở người và động vật. Tuy nhiên, còn nhiều bệnh truyền nhiễm hiểm nghèo do các vi sinh vật, đặc biệt là do virus gây ra vẫn chưa tìm được vaccine dự phòng.

Hiện nay, việc nghiên cứu để cải tạo các vaccine hiện có, chế tạo các vaccine mới đang là mục tiêu phấn đấu của các nhà khoa học.

## II. KHÁI NIỆM VỀ VACXIN

### 2.1. Khái niệm

Theo quan điểm trước đây, vaccine là một chế phẩm sinh học trong đó chứa chính mầm bệnh hoặc kháng nguyên của mầm bệnh gây ra một bệnh truyền nhiễm nào đó cần phòng (nếu là mầm bệnh thì phải được giết hoặc làm nhược độc bởi các yếu tố vật lý, hóa học và sinh vật học). Khi sử dụng cho động vật, vaccine tạo ra một đáp ứng miễn dịch chủ động giúp động vật chống lại được sự xâm nhiễm của mầm bệnh tương ứng.

Cách hiểu này được hình thành trên cơ sở thực sản xuất vaccine, ví dụ: vaccine nhiệt thán được làm từ vi khuẩn nhiệt thán nhược độc nha bào, vaccine phòng lao đục làm từ vi khuẩn lao biến dị (BCG), vaccine tụ huyết trùng được làm từ vi khuẩn tụ huyết trùng đã được vô hiệu, vaccine uốn ván được làm từ ngoại độc tố đã được giải độc...

Ngày nay, khái niệm về vaccine đã có sự thay đổi. Nó không chỉ còn là chế phẩm từ vi sinh vật hoặc ký sinh trùng đục dùng để phòng bệnh mà còn đục làm từ các vật liệu sinh học khác (không vi sinh vật) và được dùng với mục đích không phòng bệnh. Ví dụ: vaccine chống khói u làm từ tế bào sinh khói u, vaccine chống thụ thai làm từ receptor của trứng ...

Nhưng dù là vaccine được chế tạo từ vật liệu nào và được dùng với mục đích gì thì thành phần bắt buộc phải có trong vaccine là kháng nguyên và khi đưa vào cơ thể động vật, kháng nguyên sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch.

Như vậy, hiện nay vaccine được hiểu với khái niệm rộng hơn: Vaccine là chế phẩm sinh học chứa kháng nguyên có thể tạo cho cơ thể một đáp ứng miễn dịch và được dùng với mục đích phòng bệnh hoặc với mục đích khác.

### 2.2. Nguyên lý

Vaccine tạo ra trong cơ thể sống một đáp ứng miễn dịch. Hệ thống miễn dịch của cơ thể hoạt động, sinh ra kháng thể dịch thể đặc hiệu hoặc kháng thể tế bào chống lại những nhóm quyết định kháng nguyên của yếu tố gây bệnh, cơ thể sử dụng vaccine xuất hiện trạng thái miễn dịch thu được chủ động nhân tạo có khả năng chống lại sự xâm nhiễm của yếu tố gây bệnh tương ứng.

## III. ĐẶC TÍNH CƠ BẢN CỦA VACXIN

**Vaccine phải đảm bảo 4 đặc tính cơ bản là:**

**① Tính sinh miễn dịch hay tính mẫn cảm**

Đó là khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch dịch thể hoặc tế bào hay cả hai. Tính sinh miễn dịch phụ thuộc vào kháng nguyên và cơ thể nhận kích thích. Có nghĩa là phụ thuộc vào tính lặn của kháng nguyên, đường đưa của kháng nguyên và cơ địa của mỗi cá thể động vật.

**②. Tính kháng nguyên hay tính sinh kháng thể**

Một vaccine khi đưa vào cơ thể phải có khả năng kích thích cơ thể sinh ra kháng thể. Các yếu tố gây bệnh có thể có nhiều Epitope khác nhau. Trong đó có thể có Epitope quá nhỏ (Hapten) không có tính sinh kháng thể nếu để nguyên. Muốn chúng sinh kháng thể chống lại

mầm bệnh cần đổi chúng thành có tính kháng nguyên, thường kết hợp chúng với một protein mang tải vô hại.

### ③. Tính hiệu lực

Tính hiệu lực nói lên khả năng bảo hộ động vật sau khi được sử dụng vacxin.

Một vacxin đưa vào cơ thể, nhiều kháng thể được tạo ra nhưng không phải loại nào cũng có hiệu lực tức là tiêu diệt được yếu tố gây bệnh. Do yếu tố gây bệnh có nhiều kháng nguyên khác nhau nên trong bào chế vacxin trước tiên phải làm sao cho đáp ứng miễn dịch chống lại những nhóm quy định kháng nguyên thiết yếu, nghĩa là nếu đánh vào đó thì yếu tố gây bệnh bị tiêu diệt hoặc chí ít cũng không còn khả năng sinh hại nữa.

Vì thế, trong nghiên cứu sản xuất vacxin hiện nay người ta đang có những cố gắng phân lập những kháng nguyên hay nhóm quy định kháng nguyên thiết yếu để làm cho vacxin được thuần khiết và tiến tới có thể tổng hợp được chúng.

Ví dụ: virus Gumboro thì protein VP<sub>2</sub> là kháng nguyên thiết yếu; với virus cúm gia cầm thì kháng nguyên H và N là thiết yếu; virus viêm gan B thì kháng nguyên bề mặt HBs là thiết yếu.

Tính hiệu lực hay khả năng bảo vệ của vacxin được đánh giá qua thực nghiệm, nhưng chủ yếu phải là đánh giá trên thực địa sau tiêm chủng ở các cá thể và mức độ miễn dịch quần thể, có thể thông qua hàm lượng kháng thể trung bình trong huyết thanh và tỷ lệ bảo hộ trong quần thể.

- Trên động vật thí nghiệm: Đánh giá mức độ đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng vacxin và đánh giá hiệu lực bảo hộ là động vật qua thử thách cường độc.

- Thủ nghiệm thực địa: Vacxin được tiêm chủng cho một quần thể động vật, theo dõi thống kê các phản ứng phụ, đánh giá khả năng bảo hộ khi mùa dịch tới đồng thời tiến hành thử thách cường độc một nhóm ngẫu nhiên trong quần thể.

Vacxin có hiệu lực là vacxin gây được miễn dịch ở mức độ cao và bảo vệ cơ thể động vật lâu bền.

Tuy nhiên, hiệu lực của một vacxin phụ thuộc vào nhiều yếu tố như bảo quản, vận chuyển và kỹ thuật tiêm phòng. Vì vậy, người ta đã xây dựng một môn khoa học mới gọi là vacxin học (vaccineology) mà mục đích là nghiên cứu mọi biện pháp từ lúc sản xuất đến lúc tiêu dùng để tăng tính hiệu lực của vacxin.

### ④ Tính an toàn

Đây là một đặc tính quan trọng. Sau khi sản xuất vacxin phải được cơ quan kiểm định nhà nước kiểm tra chặt chẽ về mặt vô trùng, thuần khiết và vô độc.

- Vô trùng: Không được nhiễm các vi sinh vật khác.

- Thuần khiết: Không được lẫn các thành phần kháng nguyên khác có thể gây ra các phản ứng phụ.

- Vô độc: Liều sử dụng phải thấp hơn rất nhiều so với liều gây độc.

Sau sản xuất, vacxin phải được thử tính an toàn qua nhiều bước thử trong phòng thí nghiệm, trên thực địa, thử ở quy mô nhỏ và đại trà.

Tần suất và mức độ nặng nhẹ của các phản ứng phụ nếu có phải được xác định trước khi được đem ra dùng nhưng vẫn phải được theo dõi hết sức cẩn thận.

## IV. THÀNH PHẦN CỦA VACXIN

Vacxin bao gồm hai thành phần chính là kháng nguyên và chất bổ trợ.

### 4.1. Kháng nguyên

Trước đây kháng nguyên được coi là một chất lạ có bản chất là protein, khi đưa vào cơ thể kích thích cơ thể sản sinh ra kháng thể đặc hiệu và kháng thể đặc hiệu sẽ trung hoà kháng

nguyên đó. Ngày nay khi nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của cơ thể người ta thấy rằng khi cơ thể nhận được kháng nguyên không chỉ sản sinh kháng thể đặc hiệu (đáp ứng miễn dịch đích thể) mà còn tạo ra một lớp tế bào mẫn cảm. Tế bào này cũng có khả năng tạo phản ứng với kháng nguyên (miễn dịch tế bào). Vì vậy, hiện nay kháng nguyên được hiểu là những chất khi đưa vào cơ thể sẽ kích thích cơ thể sản sinh ra kháng thể đích và tế bào mẫn cảm đặc hiệu chống lại sự xâm nhập và gây bệnh của mầm bệnh. Khả năng kích thích sinh miễn dịch đích thể và miễn dịch tế bào của kháng nguyên gọi là tính kháng nguyên. Tính kháng nguyên của một kháng nguyên trong vaccine mạnh hay yếu phụ thuộc vào tổng số nhóm quyết định kháng nguyên, trọng lượng phân tử, thành phần hoá học, cấu trúc lập thể và khả năng tích điện của các phân tử kháng nguyên. Một kháng nguyên tạo phòng vệ tốt cho cơ thể, ngoài tính kháng nguyên mạnh cần có tính đặc hiệu cao. Tính đặc hiệu của kháng nguyên phụ thuộc vào tính chất và cấu trúc của các nhóm quyết định tính kháng nguyên. Tính đặc hiệu của kháng nguyên cao không chỉ đặc trưng đối với loài mà còn đặc trưng đối với cả typ và subtyp.

Kháng nguyên để chế tạo vaccine phòng bệnh truyền nhiễm thường là kháng nguyên của vi sinh vật, có thể bao gồm kháng nguyên của thân, lông, vỏ bọc và độc tố của chúng sản sinh ra trong quá trình phát triển (vaccine toàn khuẩn - vaccine thế hệ I) như vaccine phòng bệnh tụ huyết trùng gia súc, gia cầm, vaccine phòng bệnh phó thương hàn lợn con. Có thể là thành phần của các yếu tố gây bệnh của vi sinh vật (vaccine tiểu phần - vaccine thế hệ II) như vaccine chứa kháng nguyên F4, F5, F6, F18 của vi khuẩn *E.coli* phòng bệnh tiêu chảy lợn con, bê, nghé, phù đầu lợn hay vaccine chứa kháng nguyên VP2 của virus *Gumboro* dùng phòng bệnh *Gumboro* của gà. Có thể là DNA, protein tái tổ hợp (vaccine thế hệ III) như vaccine tái tổ hợp phòng bệnh lở mồm long móng và bệnh lưỡi xanh, vaccine Trovac phòng bệnh cúm gia cầm H5N.

Thành phần hoá học của các kháng nguyên vi sinh vật trong vaccine đều là protein (kháng nguyên lông, kháng nguyên độc tố), lipopolysaccharit (kháng nguyên thân), polysaccharit (kháng nguyên vỏ bọc). Trong các loại kháng nguyên của vi sinh vật, kháng nguyên có bản chất là protein và lipopolysaccharit có tính kháng nguyên mạnh, tính đặc hiệu cao. Kháng nguyên có bản chất polysaccharit thường có phản ứng chéo với nhau, vì chúng có những nhóm đường cầu tạo nên các quyết định kháng nguyên giống nhau.

## 4.2. Chất bổ trợ

### 4.2.1. Khái niệm

Chất bổ trợ là những hợp chất hóa học được thêm vào trong vaccine nhằm làm tăng khả năng kích thích miễn dịch và tăng hiệu lực của vaccine.

Trong quá trình chế tạo, sử dụng thấy rằng nếu vaccine chỉ chứa kháng nguyên, khi dùng tiêm phòng tạo hiệu lực bảo hộ thấp, không kéo dài, phản ứng xảy ra với tỉ lệ thấp. Nhưng khi cho thêm những chất không phải là kháng nguyên vào vaccine sẽ làm cho hiệu lực và thời gian bảo hộ của vaccine tăng lên. Các chất đưa vào vaccine được gọi là chất bổ trợ. Vậy chất bổ trợ của vaccine là những chất có hoạt tính kích thích miễn dịch không đặc hiệu dùng bổ sung vào vaccine để nâng cao hiệu lực và độ dài miễn dịch (Ramon, 1931). Theo Bahneman (1990), chất bổ trợ của vaccine có ba tác dụng:

- Hấp thu và lưu giữ kháng nguyên trong cơ thể lâu hơn, không bài thải nhanh kháng nguyên.
- Tạo kích thích đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cơ thể.
- Giảm kích thích phản ứng của độc tố (nếu có) trong vaccine đối với cơ thể.

### 4.2.2. Phân loại

Căn cứ vào bản chất, thành phần cấu tạo của chất bổ trợ, người ta chia chất bổ trợ đang được dùng trong chế tạo vaccine hiện nay thành các nhóm sau:

❖ *Chất bổ trợ vô cơ*: Bao gồm các loại muối nhôm, than hoạt tính, Alumin Hydroxit  $\text{Al(OH)}_3$ , Sunfat Alumin Kali  $\text{AlK(SO}_4\text{)}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , Phosphat Aluminum  $\text{Al(PO}_4\text{)}_x$ .... Các chất bổ

trợ vô cơ thường hấp phụ kháng nguyên lên bề mặt để tăng cường độ kích thích đáp ứng miễn dịch của cơ thể, đồng thời giải phóng kháng nguyên từ từ vào hệ bạch huyết để kéo dài thời gian kích thích đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Với mầm bệnh có sản sinh độc tố, sau khi đã được vô hoạt (giải độc tố) cũng được chất bổ trợ hấp thu và giải phóng từ từ để hạn chế tác động gây phản ứng cục bộ và toàn thân. Trong thú y, người ta hay dùng chất bổ trợ là AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O (gọi là keo phèn) trong các vaccine vi khuẩn vô hoạt.

❖ *Chất bổ trợ hữu cơ:* Bao gồm các loại dầu thực vật như dầu hướng dương, dầu lạc, dầu ôliu, các loại mỡ động vật, các sản phẩm của dầu khoáng hoặc montanide 50 của Pháp... Các chất bổ trợ hữu cơ khi hỗn hợp với kháng nguyên sẽ tạo thành dạng nhũ tương nước trong dầu. Ở dạng nhũ tương này, kháng nguyên nằm trong huyền dịch dầu. Để khắc phục những nhược điểm của vaccine nhũ nước trong dầu như dễ phân lớp, rít kim khi tiêm, về sau người ta đã nghiên cứu chế tạo ra loại vaccine dạng nhũ tương kép: nước trong dầu trong nước.

Khi vaccine nhũ có chứa xác vi khuẩn (thường dùng xác vi khuẩn thuộc họ *Mycobacterium*, đặc biệt là *M.tuberculosis*) được gọi là vaccine nhũ hoàn toàn, vaccine nhũ không chứa xác vi khuẩn được gọi là vaccine nhũ không hoàn toàn.

Tác dụng của chất bổ trợ dầu trong vaccine cũng tương tự như tác dụng của chất bổ trợ vô cơ. Nhờ các phức hợp nhũ kháng nguyên - dầu - nước mà kháng nguyên tự do được giải phóng từ từ vào cơ thể để kích thích sản sinh kháng thể và tế bào miễn dịch đặc hiệu kéo dài. Đồng thời các hạt nhũ cũng di chuyển từ chỗ tiêm vào hạch lympho hoặc đến các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch để kích thích miễn dịch không đặc hiệu. Kết quả là liều vaccine tiêm giảm, hiệu lực miễn dịch tăng cao, thời gian miễn dịch kéo dài.

❖ *Chất bổ trợ là sinh vật:* Thường dùng là xác của một số loài vi khuẩn như *M. tuberculosis* hay *Salmonella typhimurium*. Cũng có thể dùng nội độc tố của vi khuẩn như Lipopolysaccharit. Gồm có các dạng sau :

- Sản phẩm từ vi khuẩn:
  - + Trợ chất đầy đủ của Freund's
  - + ( CFA, FCA ) (M. Tuberculosis chét)
  - + DETOX<sup>TM</sup> (thành tế bào *Mycobacterium phlei*)
  - + Trehalose dimycolat
  - + *Bacterium Calmette - Guerin* (BCG)
  - + Muramyl dipeptid
    - . Methyl - ester - MDP (Murametid)
    - . Butyl - ester - MDP (Murametid<sup>TM</sup>)
    - . Threonyl - MDP (Termurtid)
    - . Dipalmitoyl phosphatidylethanolamin - MTP (MTP - PE)
    - . Glycerol dipalmitat - MDP (Immther) - Dipalmitoxy - Propylamid - MDP (Theramid<sup>TM</sup>)
  - Gamma inulin và Algammulin
  - β - glucan (α - glucan, pleuran)
  - Monophosphoryl lipid A (MPL")
  - Neuraminidase - Galactose oxydase (NAGO)
  - *Klebsiella pneumoniae* glycoprotein
  - *Bordetella pertussis*
  - *Corynebacterium parvum*

#### Nếu phân loại chất bổ trợ theo cơ chế tác dụng, có:

❖ *Chất mang kháng nguyên:*

Là một protein sinh miễn dịch gắn với một hapten hoặc một kháng nguyên sinh miễn dịch yếu. Chất mang kháng nguyên có thể là một sinh vật (vector) mang gen biểu thị hapten hoặc

mang kháng nguyên ngoại lai trên bề mặt của nó. Chất mang cung cấp cho tế bào T hỗ trợ hapten hoặc kháng nguyên làm tăng cường quá trình đáp ứng miễn dịch:

- Toxoid vi khuẩn (uốn ván, bạch hầu...)
- Protein màng ngoài não mô cầu (Proteosome)
- Axit béo
- Độc tố tả, độc tố LT
- Vacxin nucleic acid
- Vector sống
- Virus đậu mùa
- Adenovirus
- Canarypox
- Poliovirus
- BCG
- Salmonella giảm độc
- Phẩy khuẩn tả giảm độc
- Shigella giảm độc.

❖ *Chất chuyển tải kháng nguyên:*

Cung cấp giá chuyển tải cho trợ chất kháng nguyên hoặc cho kháng nguyên. Không giống như các chất mang kháng nguyên, bản thân chất chuyển tải không sinh ra miễn dịch. Giống như chất mang, phần lớn các chất chuyển tải có thể làm tăng phẩm chất kháng nguyên, do đó được coi là trợ chất khác.

Như vậy, công thức trợ chất gồm một trợ chất nằm trong một chất chuyển tải phù hợp. Ví dụ một số trợ chất:

- Monophosphoryl lipid A và trợ chất khung thành tế bào của *Mycobacterium phlei* trong một chất chuyển tải là nhũ tương Squalan trong nước.
- Trợ chất threonyl - muramyl dipeptid trong chất chuyển tải là nhũ tương squalan và tween 80.
- Trợ chất muramyl tripeptid - dipalmitoyl phosphatidylethanolamin trong chất chuyển tải là nhũ tương squalan trong nước.

**4.2.3. Cơ chế hoạt động**

- Các vacxin siêu phân tử phần lớn là các kháng nguyên yếu, dù là sản phẩm tự nhiên, sản phẩm tái tổ hợp, peptid tái tổ hợp hoặc peptid tổng hợp. Các kháng nguyên siêu phân tử kém tác dụng kích thích miễn dịch vì nhiều lý do như: sự xử lý sai của hệ miễn dịch, thanh thải nhanh, thiếu epitop của tế bào T hoặc B chủ yếu. Điều này có thể khắc phục bằng gắn kháng nguyên siêu phân tử cùng trợ chất.

- Các vacxin sống hoặc vacxin toàn tế bào là các vacxin mạnh. Các vacxin này có cấu trúc phức tạp hơn và chứa đựng nhiều epitop dư thừa nên tạo được nhiều cơ hội tránh sự hạn chế di truyền của người và động vật được tiêm vacxin.

\* *Tác dụng của chất bổ trợ :*

- Đưa kháng nguyên vào vị môi trường cơ thể thích hợp
- Hoạt hoá bổ thể và đưa đến tổng hợp, giải phóng và liên kết các Cytokine
- Kích thích miễn dịch do bản thân chất bổ trợ gây phản ứng viêm nhẹ, kéo các đại thực bào và các tế bào có thâm quyền miễn dịch khá tốt.
- Hấp phụ kháng nguyên, khoanh vùng kháng nguyên, làm chậm quá trình giải phóng kháng nguyên tại vị trí tiêm, do đó kháng nguyên tồn tại lâu trong cơ thể, kéo dài sự trình diện kháng nguyên.
- Kích thích sự hoạt động của APC để quá trình phân tích, trình diện kháng nguyên đạt hiệu quả.

- Chất bô trợ sinh vật có tác dụng kích thích tế bào miễn dịch.

\* *Trợ chất của vacxin có thể:*

- Làm tăng tiềm năng của các peptid nhỏ: xác vi khuẩn lao làm tăng tương tác giữa tế bào lympho và đại thực bào, do đó làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào; LPS tác động đến tế bào lympho B làm tăng quá trình phân bào& plasmocyte do đó tăng hàm lượng kháng thể dịch thể đặc hiệu.
- Làm tăng tốc độ, cường độ và sự bền vững của đáp ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên mạnh như: trợ chất nhôm sử dụng với vacxin DPT gây nên một đáp ứng miễn dịch cao hơn và sớm hơn sau lần tiêm đầu tiên so với vacxin không có trợ chất.
- Làm tăng đáp ứng miễn dịch với vacxin trong các trường hợp như chưa đủ sức miễn dịch, mất miễn dịch hoặc lão hóa
- Lựa chọn hoặc điều chỉnh miễn dịch dịch thể hoặc miễn dịch qua trung gian tế bào

#### **4.2.4. Tính an toàn của chất bô trợ**

Thuộc tính quan trọng của một trợ chất vacxin là tính an toàn của nó. Nhiều trợ chất vacxin đã được tìm thấy nhưng không được chấp nhận vì độc tính của nó và phản ứng bất thường đến chậm. Vacxin phải được coi trọng về mặt an toàn hơn hiệu quả, chính điều này đã khuyến khích việc phát triển những cấu trúc kháng nguyên tổng hợp duy nhất không phụ thuộc vào trợ chất.

Ví dụ như chất polyme hoá của hapten và peptid liên kết với nhau trong một hình thái multimeric để gia tăng khả năng hỗ trợ nội tại. Nếu thành công những cấu trúc như vậy sẽ không dùng đến trợ chất, chất mang hoặc chất chuyển tải hoá học hoặc sinh học ngoại lai.

Phản ứng bất thường do trợ chất gây ra có thể là:

- Phản ứng cục bộ: Phản ứng thường gặp nhất là hình thành áp xe gây đau và nổi hạch. Phản ứng này thường thấy với trợ chất chậm tan như dầu, liposom, vi cầu polyme. Phản ứng tại chỗ thường xảy ra sau tiêm IFA (chất bô trợ không đầy đủ của Freund), Detox<sup>TM</sup> (monophosphoryl lipid A + M. phlei + chất chuyển tải squalan dầu + Tween 20 nhũ tương và muramyl tripeptid đồng hoá trị liên kết với dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamin (MTP - PE) trong nhũ tương Squalan trong nước

- Phản ứng toàn thân: Đã có nhiều nghiên cứu về phản ứng toàn thân của trợ chất nhưng chưa có bằng chứng thuyết phục.

#### **4.2.5. Yêu cầu đối với một trợ chất**

- An toàn
- Đồng nhất về hóa học và sinh học trong các lô sản phẩm khác nhau
- Kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ hơn so với kháng nguyên không có trợ chất
- Có hiệu quả khi sử dụng với lượng ít vacxin
- Vacxin có trợ chất ổn định ít nhất 2 năm
- Có thể phân giải về mặt sinh học và dễ dàng đào thải khỏi cơ thể
- Rẻ tiền.

\* Trợ chất dùng phổ biến hiện nay là phức hợp nhôm:

▪ **Ưu điểm:**

- Sự an toàn qua hàng triệu liều vacxin
- Hình thành kháng thể có hàm lượng cao và kéo dài sau lần đầu tiêm vacxin;
- Vacxin với trợ chất nhôm cho phép giải phóng dần dần kháng nguyên;
- Tế bào miễn dịch hấp thu tốt các hạt kháng nguyên hấp phụ nhôm do bản chất đặc thù và cỡ hạt <10 mcg.

▪ **Nhược điểm:**

- Có thể xuất hiện các hạt nhỏ đau hoặc sưng và ban đỏ nơi tiêm;
- Nhôm tồn tại dưới da nơi tiêm cho tới 1 năm trên động vật thí nghiệm;
- Phức hợp nhôm kém kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào, đặc biệt Tc gây độc đối với các tế bào có vi sinh vật bên trong.

#### **4.2.6. Proteosom, liposom và coclet**

##### **❶ Proteosom**

Các kháng nguyên tiêu đơn vị (subunit) có thể là peptid tổng hợp, protein tái tổ hợp, độc tố mêt độc tính vê mặt di truyền hoặc hoá học, polysaccharit, lipopolysaccharit hoặc protein thuần khiết từ vi sinh vật. Sử dụng vaccine tiêu đơn vị có lợi ích là chỉ bao gồm các kháng nguyên cần cho đáp ứng miễn dịch bảo vệ trong khi loại trừ được các thành phần tế bào hoặc các yếu tố ngoại lai. Hơn nữa vaccine tiêu đơn vị có thể sử dụng các epitop quan trọng, các epitop này nếu là thành phần của toàn bộ vi sinh vật có thể kém tác dụng tạo đáp ứng miễn dịch.

Các peptid và protein tái tổ hợp có thể được tạo ra với khối lượng lớn mà ít tốn kém. Tuy nhiên vaccine tiêu đơn vị sử dụng các vaccine như vậy có thể bị hạn chế khả năng sinh miễn dịch khi được tiêm hoặc qua niêm mạc mà không có chất vận chuyển hoặc không có trợ chất.

Proteosom đã khắc phục được những hạn chế trên. Proteosom là thuật ngữ mô tả các chế phẩm của protein màng ngoài của cầu khuẩn màng não. Protein proteosom rất kỵ nước phản ánh vai trò như là protein và porin xuyên màng. Khi tách ra, tương tác protein - protein kỵ nước làm cho chúng tự sắp xếp một cách tự nhiên vào các bong có kích thước từ 60 đến 100nm có tính chất màng.

Các kháng nguyên vaccine liên kết với Proteosom có thể kéo dài sự thoái biến kháng nguyên, thúc đẩy quá trình xử lý và hấp thụ kháng nguyên bởi các tế bào thực bào và tế bào trình diện kháng nguyên (APC).

Các proteosom của cầu khuẩn màng não là các mitogen và các chất hoạt hóa dòng clon kẽ cả CH<sub>3</sub>/Hej kháng LPS của chuột và người. Tiềm năng miễn dịch của proteosom liên quan đến sự hoạt hóa tế bào B.

Liên kết kháng nguyên với kháng globulin miễn dịch để hướng kháng nguyên vào các điểm cảm thụ với globulin miễn dịch trên bề mặt tế bào B có thể là yếu tố để kích thích miễn dịch. Các kháng nguyên liên kết với proteosom có thể được hướng tới tế bào B khi những tế bào này liên kết với proteosom tại các điểm cảm thụ với mitogen của chúng. Tính sinh miễn dịch sẽ được tăng cường hơn khi APC trình bày có hiệu quả kháng nguyên được liên kết với mitogen cho các tế bào T hỗ trợ. Tính sinh miễn dịch được tăng cường khi kháng nguyên được phức hợp với một protein mang và một chất bổ trợ. Proteosom có thể đáp ứng được cả hai vai trò này.

Bất kỳ một kháng nguyên kỵ nước bán phần cũng dễ phù hợp với hệ thống proteosom. Những chất kháng nguyên như vậy gồm protein vỏ hoặc protein xuyên màng của vi sinh vật với chuỗi acid amin kỵ nước tự nhiên, các polysaccharit, lipopolysaccharit. Các protein tái tổ hợp có thể được hợp nhất dễ dàng vào proteosom. Các peptid phân nhánh có thể ứng dụng cho vaccine proteosom. Vaccine proteosom được thiết kế để chống lại những bệnh không do cầu khuẩn màng não nên vaccine proteosom có tiềm năng nhị giá nội sinh (intrinsic bivalent potential).

Các vaccine proteosom cũng đã được làm đông khô và được hồi phục lại sau đó mà không mất hiệu lực.

##### **\* Những ứng dụng của vaccine proteosom đường uống:**

###### **+ Các lipopolysaccharit**

Các nghiên cứu vaccine proteosom đường uống được bắt đầu với lipopolysaccharit của vi khuẩn lỵ *Shigella*.

Kháng thể IgA niêm mạc có vai trò bảo vệ chống lại bệnh lỵ chung ngăn cản sự bám dính của vi khuẩn lỵ trên bề mặt niêm mạc và thúc đẩy hoạt động kháng khuẩn qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể.

Những thập kỷ qua, các nghiên cứu về vaccine lỵ *Shigella* tập trung vào việc tạo ra chủng vi khuẩn sống không độc nhờ kỹ thuật gen, nhưng vẫn chưa thành công. Điều này là do thiếu một liều cửa sổ đủ để tạo ra đáp ứng miễn dịch hiệu quả mà vẫn đảm bảo được tính an toàn. Do đó, *Shigella* được coi là một đối tượng nhằm thăm dò ứng dụng của proteosom để tìm ra khả năng sinh miễn dịch theo đường niêm mạc.

Lipopolysaccharit của vi khuẩn lỵ *Shigella* góp phần hình thành phức hợp kỵ nước với proteosom. Điều này dẫn đến kết quả là các vaccine proteosom rất dễ hòa tan đến mức độ có thể

qua được màng lọc 0,22 µm.

Người ta đưa hai liều vaccine Proteosom - *Shigella* LPS qua đường mũi và đường uống vào chuột đã dẫn đến sự xuất hiện kháng thể IgA và kháng thể IgG kháng LPS tương ứng trong huyết thanh chuột. Dùng vaccine qua đường mũi làm giảm được liều từ 10 đến 100 lần so với đường uống trong khi kháng thể IgA khích thích quan lại có mức cao hơn. Một số nghiên cứu tiếp theo cũng thấy rằng dùng vaccine qua đường mũi đã cho đáp ứng miễn dịch cao đồng thời thể hiện trên cả niêm mạc mũi và niêm mạc ruột. Một thông báo nghiên cứu khác cho hay dùng vaccine Proteosom *Shigella* LPS qua đường mũi đã ngăn chặn lâu dài và hoàn toàn nhiễm khuẩn mắt của chuột.

Các đáp ứng miễn dịch có hiệu quả có được do sử dụng vaccine proteosom dùng theo đường niêm mạc có thể ứng dụng rộng rãi trong tiêm chủng chống lại các mầm bệnh đường hô hấp bao gồm *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* và *Klebsiella*.

#### + Các protein

Độc tố ruột của tụ cầu khuẩn *Staphylococcus* (*Staphylococcus enterotoxin B*: SEB) là tác nhân gây nôn và tiêu chảy của các trường hợp nhiễm trùng, nhiễm độc thức ăn ở người. SEB có khả năng kích thích bạch cầu đơn nhân tăng sinh và tiết ra một lượng lớn cytokin, do đó SEB được xem như một siêu kháng nguyên.

SEB qua xử lý với formalin sẽ trở nên mất độc và được gọi là giải độc tố B của tụ cầu khuẩn. Khi chuột được dùng qua đường mũi vaccine proteosom SEB giải độc tố sẽ tạo ra được mức cao kháng thể IgG kháng lại SEB trong máu và kháng thể IgA kháng lại SEB ở niêm mạc đường hô hấp và đường ruột. Vaccine proteosom - SEB giải độc tố này cũng đã chứng tỏ hiệu quả bảo vệ tối ưu đối với 100% số khỉ thực nghiệm. Những dữ liệu này mở ra khả năng ứng dụng vaccine proteosom để kích thích miễn dịch niêm mạc và miễn dịch hệ thống chống lại các bệnh xâm nhập qua đường tiêu hóa, đường hô hấp, đường sinh dục, bao gồm cả việc nghiên cứu phát triển vaccine phòng virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV).

#### + Các peptid

Peptid của virus cúm là mẫu hình nghiên cứu phát triển vaccine proteosom - peptid. Peptid HA 91 có chứa epitope tế bào B, peptid NP 55 có chứa epitope trợ giúp tế bào T đã được đưa vào chế tạo vaccine proteosom - peptid chống bệnh cúm bằng cách dùng qua đường mũi. Ưu thế của vaccine proteosom chứa cả epitope tế bào B và tế bào T được chỉ ra qua sự giảm mạnh lượng virus cúm trong đường hô hấp.

## ❷ Liposom

Từ năm 1990, nhiều nghiên cứu về liposom đã đư ợc công bố. Liposom là chất mang kháng nguyên của vaccine có cấu trúc hai màng lipid, có thể tháo biến về mặt sinh học. Liposom cũng bị các đại thực bào “ăn” để rồi trình diện kháng nguyên vaccine và bắt đầu quá trình đáp ứng miễn dịch.

Ngoài thuộc tính tự nhiên trên, liposom có tính ưu việt nổi bật đối với các kháng nguyên hòa tan để kháng nguyên đó thẩm thấu dần. Ngoài kháng nguyên được gắn kết vào màng liposom, một số chất bổ trợ như lipid A (lipid polysaccharit của vi khuẩn Gr - ) hoặc dẫn chất của dipeptid lipophilic muramyl (MDP) cũng có thể lồng ghép vào hai lớp lipid của liposom.

#### + Tính an toàn:

Tính an toàn là điều được cân nhắc quan trọng nhất trong việc phát triển các trợ chất mới. Điều này đòi hỏi các nhà nghiên cứu và sản xuất vaccine phải thận trọng đối với các trợ chất, bao gồm cả công thức trợ chất liposom.

Liposom đang được nghiên cứu với nhiều loại kháng nguyên khác nhau như với vaccine ký sinh trùng sốt rét, kháng nguyên HIV. Gần đây, vaccine viêm gan A liposom đã đư ợc sản xuất ở Thụy Sĩ. Vaccine liposom chứng tỏ an toàn và hiệu lực cao và giảm đau rõ rệt. Khi so sánh với vaccine sử dụng chất hấp phụ nhôm hydroxyt. Tại Mỹ, vaccine cúm liposom chứa haemagglutinin từ 3 chủng virus cúm đã tạo được hiệu lực bảo vệ cao hơn vaccine cúm toàn phần và vaccine cúm tiểu đơn vị. Một vaccine liposom chứa kháng nguyên haemagglutinin và

neuraminidase của virus cúm đang được thử nghiệm ở Nhật.

Công thức liposom gồm một phần lipophilic MDP (B30 - MDP). Vacxin liposom này tạo ra hiệu giá kháng thể chống lại virus cao hơn so với ba vacxin haemagglutinin khác hiện đang sử dụng. Tại Mỹ, một vacxin hỗn hợp kháng nguyên đang được nghiên cứu sản xuất dưới dạng liposom; năm loại kháng nguyên đó là kháng nguyên virus viêm gan A, Viêm gan B, độc tố bạch hầu, độc tố uốn ván α và β, kháng nguyên haemagglutinin và neuramidase.

#### + Mô hình động vật thực nghiệm

Mặc dù liposom đã được áp dụng như một nhân tố kích thích miễn dịch có hiệu lực cao cho vacxin. Nhưng những nghiên cứu phát triển vacxin liposom vẫn phải được tiếp tục trên động vật với những mô hình khác nhau. Bảng dưới đây sẽ tóm tắt một số báo cáo được công bố. Các công bố này cho chúng ta lạc quan về cơ sở liposom sẽ là một chất thêm vào có lợi cho việc phát triển rộng rãi các vacxin hiện đại.

**Bảng 1.1: Một số vacxin có dùng chất mang liposom**

<b>Bệnh hoặc tác nhân gây bệnh</b>	<b>Kháng nguyên</b>	<b>Đường tiêm</b>	<b>Động vật</b>
Sốt rét	Kháng nguyên merozoit P.falciparum	Bắp	Khi cú
Sốt rét	Đa kháng nguyên peptid từ P.yoelit protein circum porozoit	Dưới da	Chuột BALB/c ByJ
Streptococcus pneumoniae	Liên hợp hexasaccharit	Tĩnh mạch	Chuột BALB
U lympho do Epstein Barr virus	MA gp 340	Ó bụng	Tamarin Đầu bang
Virus dại	Glycoprotein	Bắp	Chuột đồng
Rắn độc:			
Carpet viper	Toàn nọc	Dưới da	Chuột TFW
Carpet viper	Toàn nọc	Tĩnh mạch	Cừu
Rắn chuông	Toàn nọc	Dưới da hay tĩnh mạch	Chuột TFW
Độc tố bọ cạp	Một phần độc tố	Dưới da	Chuột C57B1/6
Sâu răng do Streptococcus robrunus	Protein ribosom	Uống	
Sâu răng do S.mutans	Kháng thể anti - idiosyncratic Carbonhydrat đặc hiệu serotyp	Uống Uống	Chuột không có mầm bệnh
U sác tố	Kháng nguyên kết hợp với khói u B16	Dưới da	Chuột C57B1/6
Virus cúm	Virus bất hoạt tự do (trộn lẫn với liposom chứa IL - 2)	Ó bụng	Chuột BALB/c
Herpes simplex	Glycoprotein D	IC	Chuột lang (cái Harley)
Herpes simplex	Glycoprotein D	Ó bụng	Chuột CH3/HeN
Herpes simplex	Glycoprotein D tự do (trộn lẫn với liposom chứa IL - 2)	Dưới da	Chuột lang (cái Harley)
Leishmania major (ở da)	Lipophosphatglycan và gp 63	Tĩnh mạch	Chuột BALB/c
Toxoplasma grondit	Kháng nguyên màng p30	Ó bụng	Chuột Swiss - webster
Thymoma (truyền nhiễm với Ovalbumin)	Ovalbumin	Tĩnh mạch	Chuột C57B1/6
SIV (Simian immunodeficiency virus)	Bốn protein hỗn hợp SIV galactosida β vỏ	Bắp	Khi Rhesus macaque

#### ③. Coclet

Để phòng bệnh và điều trị bệnh có hiệu quả cao, một yêu cầu quan trọng của kỹ thuật sinh học hiện đại là phải đưa được vào bên trong tế bào cơ thể những chất cần thiết. Khó khăn chính đối với kỹ thuật này là thiếu một phương pháp đơn giản, an toàn hiệu quả và có thể vượt qua được hàng rào bảo vệ của tế bào.

Màng tế bào là hàng rào chính ngăn cản và chọn lọc các phân tử đi vào trong tế bào. Màng tế bào có cấu trúc đại phân tử, vững bền cao về nhiệt động học, có cơ chế rất tinh vi điều hoà sự đi qua màng đối với các phân tử, các ion. Các nhà nghiên cứu đã dựa theo cơ chế tự nhiên của tế bào để tế bào có thể dung nạp một ché phẩm có cấu trúc màng cuộn mang tên coclet có chứa kháng nguyên bên trong (antigen cochleate).

+ *Cấu trúc của màng cuộn coclet*

Màng cuộn coclet được hợp thành bởi phosphatidylserin, cholesterol và calci. Chúng có cấu trúc bao gồm một lá hai lớp lipid rộng, rắn cuộn theo hình xoắn ốc, không có khoang chứa nước bên trong. Chất calci giữ cho coclet ở hình thái cuộn, với những cầu nối giữa các lớp cạnh nhau. Một trong những điện tích dương của nó tương tác với một điện tích âm ở đầu phospholipid của nhóm trong một lớp và điện tích kia với phospholipid của lớp nối điện.

Trước khi tạo được màng cuộn coclet, người ta đã tạo được một dạng cấu trúc có tên liposom. Liposom có hai lớp lipid nhân tạo, ở dạng dịch treo. Liposom được dùng để đưa kháng nguyên vào tế bào. Nhưng liposom nhạy cảm với sự thay đổi pH (cao quá hoặc thấp quá), dễ bị phá huỷ bởi enzym lipase. Việc lấy nước đi, thí dụ như đông khô sẽ phá huỷ cấu trúc của liposom. Coclet ở thế rắn không chứa nước ở bên trong, không tan, đông khô được. Các lớp của màng cuộn coclet ngăn cách nhau giữa phospholipid điện tích âm và calci. Cấu trúc này bảo đảm cho các phân tử ở bên trong không bị phá huỷ, mặc dù lớp ngoài của coclet bị phơi ra với các tác dụng khắc nghiệt của môi trường hay của enzym.

+ *Sản xuất màng cuộn coclet*

Nhiều loại phức hợp dưới dạng coclet đã được nghiên cứu tạo thành trong phòng thí nghiệm. Những protein phân tử cao và phân tử thấp, các peptid, axit nucleic và thuốc đã được liên kết với lớp trong của coclet. Quá trình đưa các phân tử vào coclet được tiến hành như sau:

- Nguyên liệu cần đưa vào coclet được cho vào một dung dịch chứa trong dung dịch đệm muối nồng độ cao.
- Dung dịch này được cho vào các lipid tự nhiên phosphatidylserin và cholesterol.
- Chất β - D - octylglucopyranosid được lấy đi bằng thẩm tích, kết quả là hình thành các bọng nhỏ lipid.
- Cho calci vào làm hình thành các lá dài calci kẹp hai lớp phospholipid
- Các lá cuộn lại để hình thành các coclet kết tua không tan chứa đựng nguyên liệu

+ *Màng cuộn coclet hoạt động như phương tiện vận tải vào trong tế bào*

Coclet được chứng minh là chất trung gian đơn giản, an toàn và hiệu quả cao để đưa protein, peptid và ADN vào cơ thể để gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với kháng nguyên bằng đường uống, đường mũi hoặc tiêm bắp. Khả năng của coclet làm trung gian gây cảm ứng với các tế bào lympho gây độc CD8 đặc hiệu kháng nguyên đã ủng hộ một cách có ý nghĩa giả thuyết rằng coclet tạo thuận lợi cho việc đưa vào trong tế bào các đại phân tử gắn kết với coclet.

**Bảng 1.2: So sánh đặc tính của coclet và liposom**

Đặc tính	Liposom	Coclet
Màng	Chất lỏng	Chất rắn
Hai lớp	Chống lại dung hợp	Là trung gian của sự dung hợp màng tế bào
Bên trong	Có nước	Không có nước
Đông khô	Xep xuông	Vững bền
Môi trường khắc nghiệt	Liposom và các nguyên liệu khác bị phá huỷ	Coclet và các vật liệu kết hợp vững bền
Kháng nguyên uống	Rất kém hiệu quả	Hiệu quả cao
Đưa AND vào in vivo	Hiệu quả rất thấp	Hiệu quả cao

+ *Màng cuộn coclet đã được dùng như thế nào?*

▪ Protein

Các màng protein, như glycoprotein của virut có vỏ bọc, có thể gắn kết với hai lớp lipid của coclet và tồn tại như một phức hợp có tên coclet protein. Các coclet protein là một kiêu

vaccine tiêu đơn vị an toàn, hiệu lực, ổn định và trình diện kháng nguyên với tế bào miễn dịch

Qua nhiều nghiên cứu người ta nhận thấy: Coclet protein là chất có khả năng gây miễn dịch với hiệu quả cao khi tiêm bắp. Khi gây miễn dịch bằng tiêm bắp, coclet protein kích thích mạnh tạo ra kháng thể tuần hoàn và kháng thể niêm mạc, đáp ứng tăng sản và ly giải tế bào đối với các glycoprotein của virus như virus cúm, virus á cúm và kháng nguyên tái tổ hợp gp160 của virus HIV - 1.

Coclet protein dùng qua đường uống cũng dẫn đến đáp ứng kháng thể tuần hoàn và niêm mạc tồn tại lâu, mạnh cùng với ký ức miễn dịch dài hạn. Các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào gồm các hoạt động tăng sản và ly giải tế bào cũng đều được sinh ra. Thêm nữa sau khi đưa coclet virus cúm sống vào đường mũi, đã tạo ra được sự bảo vệ do virus nhân lên trong khí phế quản.

#### ▪ Peptid

Các peptid có tính kháng nguyên mạnh hơn khi nó ở dạng coclet và được dùng theo đường uống hay tiêm bắp. Bảng dưới đây liên quan đến việc dùng 32 acid amin V3 peptid từ HIV - Hib. V3 được gắn đồng hóa trị với phosphatidylethanolamin thành dạng coclet và được đưa vào chuột nhắt Balb/c (100 µg mỗi con), dùng một liều duy nhất theo đường uống hoặc theo đường bắp.

Các coxleatepeptid gây ra một đáp ứng miễn dịch thể và tế bào, hệ thống và niêm mạc.

**Bảng 1.3: Kết quả đáp ứng miễn dịch do coclet gây ra theo các đường đưa khác nhau**

Đường gây miễn dịch	Đáp ứng miễn dịch đo được	
Tiêm bắp	Hiệu giá kháng thể huyết thanh Tăng sản của: - Tế bào lách - Tế bào hạch bạch huyết - Tế bào lách độc tế bào	200 sau 3 tuần SI <sup>a</sup> 6.5 ở tuần 2 SI <sup>a</sup> 2.2 sau 3 ngày 35% ly giải tế bào đặc hiệu sau 2 tuần
Uống	Hiệu giá kháng thể huyết thanh Kháng thể trong nước bọt: - IgG - IgA Kháng thể trong ruột: - IgG - IgA Tăng sản: - Tế bào hạch bạch huyết mạc treo ruột - Tế bào của mảng Payer Độc tế bào: - Các tế bào lympho nội biểu mô ruột	1600 sau 3 tuần 7,5 µg/ml sau 2 tuần 35 µg/ml sau 2 tuần 20 µg/ml sau 3 ngày 340 µg/ml sau 3 ngày SI <sup>a</sup> 4.9 sau 3 ngày SI <sup>a</sup> 2.8 sau 3 ngày 62% ly giải tế bào đặc hiệu sau 3 ngày.

SI<sup>a</sup>: Chỉ số kích thích, đo vào ngày thứ 4, tính theo đối chứng.

#### + Vaccine ADN

Coclet ADN đã được điều chế và thử nghiệm. Các bước điều chế coclet ADN bắt đầu với phosphatidylserin và cholesteron hòa tan bằng β - D - octylglucopyranosid trong đệm có nồng độ muối cao. ADN được cho vào và các coclet ADN được hình thành từ dung dịch này.

Vì các coclet là các chất kết tủa không tan bao gồm các lớp xen kẽ nhau của các ion calci và các phospholipid tích điện âm. ADN chứa các gốc phosphat tích điện âm nên nó sẽ gắn kết với các ion Ca<sup>++</sup> làm cho ADN bị mắc trong các lớp cuốn của coclet.

Những nghiên cứu mới đây chứng minh rằng các coclet ADN có hiệu quả trong việc làm trung gian gây đáp ứng miễn dịch với các gen biểu thị bởi các ADN plasmid. Đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh đối với protein do ADN mã hoá xảy ra sau khi tiêm bắp một lần ADN. Đường uống cũng tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh như khi tiêm bắp.

**Bảng 1.4 : Đáp ứng miễn dịch tế bào do coclet ADN**

Công thức	Đường gây nhiễm	Liều lượng ( $\mu\text{g}/\text{chuột nhắt}$ )	Hoạt tính ly giải tế bào đặc hiệu kháng nguyên	Tăng sản tế bào lách (chỉ số kích thích)
Coclet đơn giản	Tiêm bắp	1,5	43,1	4,3
Coclet đơn giản	Tiêm bắp	13,0	82,2	4,3
Coclet protein	Tiêm bắp	1,5	77,6	3,2
Coclet protein	Tiêm bắp	13,0	96,5	4,3
Coclet đơn giản	Uống	3,0	72	Không làm
Coclet đơn giản	Uống	15,0	88	Không làm

## V. YÊU CẦU CỦA MỘT VACXIN

Để đáp ứng được yêu cầu phòng bệnh, một loại vacxin phải đáp ứng được những yêu cầu tối thiểu sau đây:

- Vacxin phải chứa các kháng nguyên và các kháng nguyên đó phải được hệ thống miễn dịch coi là mục tiêu cần tấn công.
- Các kháng nguyên trong vacxin phải kích thích sinh đáp ứng miễn dịch phòng hộ, nghĩa là kháng nguyên không kích thích sinh các đáp ứng miễn dịch không phòng hộ. Sự phòng hộ phải đạt được khi cơ thể tiếp xúc với mầm bệnh và lý tưởng nhất sự phòng hộ này phải kéo dài.
- Vacxin phải kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh và tốt nhất là không cần chất bổ trợ.
- Vacxin kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tốt mà không cần dùng nhắc lại (bổ sung) và tốt nhất là đường dùng vacxin đơn giản.
- Vacxin phải an toàn, đây là tiêu chuẩn đánh giá khi sử dụng vacxin trên chính đối tượng được hưởng, tức là vacxin không gây nên bệnh, các phản ứng có hại, hoặc gây chết ở con vật được dùng vacxin.
- Vacxin phải thuần khiết tức là vacxin chỉ chứa duy nhất một hay một vài loại kháng nguyên được dùng làm vacxin mà không bị nhiễm tạp các loại khác.
- Về mặt thực tế: giá một liều vacxin phải thấp, ổn định về mặt sinh học, dễ sử dụng, ít tác dụng phụ.

## VI. PHÂN LOẠI VACXIN

Có thể chia vacxin làm 4 loại sau:

- Vacxin chết (vô hoạt)
- Vacxin sống
- Vacxin dưới đơn vị
- Vacxin thế hệ mới sản xuất bằng công nghệ gen.

### 6.1. Vacxin chết

Là loại kinh điển nhất, nguyên tắc là làm chết yếu tố gây bệnh (virus hoặc vi khuẩn) nhưng vẫn giữ được tính miễn cảm và tính kháng nguyên, vacxin loại này chủ yếu gây đáp ứng miễn dịch kiểu dịch thể.

#### ❖ Phương pháp làm chết yếu tố gây bệnh:

Có 2 phương pháp: hóa học và vật lý.

- *Phương pháp hóa học*: Dùng các hóa chất như formol để giết chết vi khuẩn.

Ví dụ: vaccine tụ huyết trùng lợn vô hoạt, vaccine đóng dấu lợn vô hoạt.

Với virus có thể dùng các chất khử có hoạt tính cao như Ethylenimine hay  $\beta$  propiolacton. Những hóa chất này vô hoạt hoàn toàn virus nhưng không làm biến đổi protein cấu trúc.

Ví dụ: Vaccine bại liệt Salk dạng tiêm ở người

Vaccine dài bất hoạt dùng  $\beta$  propiolacton

Vaccine lở mồm long móng dùng Ethylenimine

- *Phương pháp lý học*: Dùng sức nóng, tia xạ (X, UV).

❖ **Ưu, nhược điểm của vaccine chết:**

- **Ưu điểm:** Không độc, không gây ô nhiễm môi trường, tính an toàn cao.

- **Nhược điểm:**

. Thời gian duy trì miễn dịch ngắn do lượng kháng nguyên cố định và ít dần chứ không nhân lên được như vaccine sống.

. Liều lượng tiêm lớn do đó khó tiêm và dễ gây áp xe.

. Miễn dịch xuất hiện chậm, gây miễn dịch tế bào kém.

. Không can thiệp trực tiếp vào ổ dịch

. Phải đưa vaccine nhiều lần, tăng nguy cơ dị ứng.

Do làm bất hoạt mầm bệnh cường độc để chế vaccine, nên nếu bất hoạt không tốt mầm bệnh sẽ có nguy cơ bùng phát thành dịch. Ví dụ: một vụ dịch bại liệt xảy ra ở Mỹ mà nguyên nhân là do sử dụng vaccine bại liệt vô hoạt nhưng không triệt để nên virus bại liệt cường độc có cơ hội bùng phát thành dịch.

## 6.2. Vaccine sống

Vaccine sống là loại vaccine được sản xuất nhờ chủng virus hay vi khuẩn còn sống, hầu như không có tính gây bệnh cho động vật được tiêm phòng nhưng có khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh, chúng nhân lên trong cơ thể vật chủ và tiếp tục tạo ra sự kích thích của kháng nguyên trong một khoảng thời gian.

Vaccine sống bao gồm: vaccine nguyên độc, vaccine vô độc và vaccine nhược độc.

\* *Vaccine nguyên độc*: Dùng chủng virus nguyên độc có quan hệ từ loài động vật khác.

Ví dụ: Dùng virus đậu bò làm vaccine phòng bệnh đậu ở người.

Đưa vào cơ thể virus có độc lực hoặc đã giảm một phần độc lực theo con đường thực nghiệm: Độc lực của virus sẽ giảm đi khi chúng được đưa vào cơ thể theo đường thực nghiệm (không giống sự xâm nhập của chúng trong tự nhiên). Ví dụ: Tiêm phòng hội chứng viêm phổi ở người bằng adenovirus sống.

\* *Vaccine vô độc* (vaccine nhược độc tự nhiên): được sản xuất từ những chủng vi sinh vật vô độc phân lập trong tự nhiên.

\* *Vaccine nhược độc hóa*: được sản xuất từ những chủng vi sinh vật sống có độc lực yếu, không có khả năng gây bệnh cho động vật được tiêm chủng.

Các chủng vi sinh vật này được làm giảm độc lực bằng các phương pháp: vật lý, hóa học, sinh vật học và công nghệ gen.

❖ **Phương pháp làm giảm độc vi sinh vật:**

- *Giảm độc bằng nhiệt độ*: Vi sinh vật gây bệnh thường nhạy cảm với yếu tố nhiệt độ, nếu nuôi cấy chúng ở nhiệt độ không phù hợp, vi sinh vật sẽ giảm độc lực nhưng vẫn giữ được tính kháng nguyên.

Ví dụ:

- Vacxin nhiệt thán: Nuôi vi khuẩn nhiệt thán ở nhiệt độ 42,5 - 43°C từ 15 - 20 ngày, vi khuẩn mất khả năng hình thành giáp mỏ, lực giáp giảm, sử dụng làm giống gốc sản xuất vacxin.

- Vacxin Sabin dạng uống chống bại liệt: Chọn các chủng virus bại liệt đã đột biến, cho nhân lên nhiều lần trong tế bào thận khỉ, nuôi cấy ở nhiệt độ thấp. Virus có thể nhân lên trong tuyến nước bọt đường tiêu hóa nhưng không xâm nhập được vào mô thần kinh do đó không gây chứng bại liệt nữa.

- *Giảm độc bằng yếu tố hóa học*

Ví dụ: Vacxin BCG (Bacterium Calmette Guerin) là một chủng trực khuẩn lao bò M.T. bovinus có độc lực cao, nuôi cấy trong môi trường có mật bò trong 13 năm sau 230 lần cấy chuyển, vi khuẩn đã không còn độc, được sử dụng để sản xuất vacxin BCG.

Vacxin nhiệt thán nhược độc giáp mỏ chế bằng cách: Vi khuẩn nhiệt thán nuôi cấy trong môi trường nghèo O<sub>2</sub> chỉ có CO<sub>2</sub>, vi khuẩn không có khả năng hình thành giáp mỏ. Nếu đem vi khuẩn đó nuôi cấy tiếp ở môi trường có đủ O<sub>2</sub> thì vi khuẩn lại hình thành giáp mỏ, nhưng độc lực yếu không có khả năng gây bệnh được sử dụng làm vacxin.

- *Giảm độc bằng phương pháp sinh vật học*

Đây là phương pháp giảm độc vi sinh vật cổ điển, phần lớn vacxin virus sử dụng cho người, động vật được sản xuất theo phương pháp này. Người ta cấy chuyển sinh vật nhiều đời qua môi trường ít cảm thụ (động vật thí nghiệm hoặc môi trường nuôi tế bào hoặc phôi gia cầm). Vi sinh vật không đủ điều kiện để thực hiện đầy đủ chu kỳ sống nên thay đổi hệ gen để thích nghi với điều kiện sống mới, do đó vi sinh vật thay đổi về độc lực và khả năng gây bệnh.

Ví dụ:

Dùng virus cường độc dịch tả lợn tiêm truyền liên tục 155 đời qua thỏ sẽ thu được giống virus nhược độc dịch tả lợn.

Virus dịch tả vịt chuyển 41 - 46 đời qua phôi gà.

Virus viêm gan vịt typ I cấy chuyển 54 đời qua phôi gà.

Virus bại liệt được cấy chuyển nhiều đời qua môi trường tế bào thận khỉ.

Virus sởi được nuôi cấy qua tế bào xơ phôi gà.

❖ **Ưu điểm của vacxin sống:**

- Tạo miễn dịch nhanh, mạnh, miễn dịch tồn tại lâu bền do vi sinh vật vẫn có khả năng nhân lên và tồn tại lâu trong cơ thể được tiêm chủng.

- Tạo miễn dịch tế bào cao hơn so với vacxin chết.

- Có thể dùng can thiệp trực tiếp vào ổ dịch.

- Liều lượng ít, dễ tiêm chủng.

❖ **Nhược điểm:**

- Mức độ an toàn thấp do đột biến dẫn đến sự trở lại cường độc.

- Tụt nhiễm virus trong nuôi cấy tế bào; ví dụ: tế bào thận khỉ có thể tụt nhiễm với SV<sub>40</sub> (*Simianvirus*)

- Khó bảo quản, chi phí lớn.

- Không sử dụng được cho động vật mang thai.

- Không dùng cho những vùng an toàn dịch.

Ở một số bệnh do virus gây ra, vacxin không dùng toàn bộ hạt virus mà chỉ dùng một

vài thành phần của virus như protein capxit hoặc glycoprotein vỏ ngoài do đó vacxin òn được gọi là vacxin dưới hạt (subvirion).

Sở dĩ không dùng virus nguyên vẹn là do:

- Nhiều loại virus không có khả năng nhân lên ở các tế bào nuôi cấy (virus viêm gan B).
- Một số virus được coi là rất nguy hiểm nên không đảm bảo an toàn khi sản xuất kể cả vacxin sống hoặc chết (HIV).
- Một số vacxin nếu sản xuất từ virus nguyên vẹn có thể ảnh hưởng đến cơ thể do gây phản ứng phụ (vacxin cúm).

Các protein capxit hoặc glycoprotein vỏ ngoài thường gắn vào receptor trên bề mặt một số loại tế bào ký chủ, hoặc thu được từ huyết tương bệnh nhân, sau đó làm bất hoạt (kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan HB<sub>S</sub>Ag) hoặc có thể sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN....

Các vacxin subvirion như: vacxin HB<sub>S</sub> chống virus viêm gan B.

**Bảng 1.5: So sánh giữa 2 loại vacxin**

<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Loại vacxin</b>	<b>Vacxin sống</b>	<b>Vacxin chết</b>
Phương thức sản xuất	Đơn giản	Đơn giản	
Tính ổn định	Tương đối ổn định	Ôn định	
Liều lượng	Thấp	Cao	
Số lần đưa vacxin	1 lần	Nhiều lần	
Chất bổ trợ	Không	Có	
Thời gian miễn dịch	Dài	Ngắn	
Đáp ứng miễn dịch tế bào	Tốt	Kém	
Sự trở lại cường độ	Có thể có	Không	

### 6.3. Vacxin dưới đơn vị

Vacxin dưới đơn vị là vacxin sản xuất chứa những kháng nguyên tương đối tinh khiết phân lập từ virus hay vi khuẩn sinh bệnh

Đầu tiên là các vacxin chống độc tố. Một số vi khuẩn gây bệnh bằng độc tố như *Cl.tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, người ta nuôi cấy vi khuẩn, chiết tách độc tố, giải độc bằng yếu tố hóa học hoặc vật lý theo nguyên lý của vacxin chết. Các độc tố mất hoạt tính được gọi là giải độc tố (anatoxin) và được dùng làm vacxin.

Phẩy khuẩn tả gây bệnh nhờ Enterotoxin, độc tố này gồm 1 dưới đơn vị A rất độc và 5 dưới đơn vị B không độc, nhưng B lại có khả năng sinh kháng thể bảo vệ nên người ta nuôi vi khuẩn, tinh lọc Enterotoxin, tách dưới đơn vị B dùng làm vacxin chống bệnh thối tả.

Cần lưu ý rằng việc tăng độ tinh khiết có thể dẫn đến mất tính sinh miễn dịch hoặc sẽ bị các enzym phá hủy trước khi kích thích miễn dịch. Vì vậy loại vacxin này đòi hỏi phải có chất mang hay chất bổ trợ, ví dụ như muối nhôm.

Vacxin dưới đơn vị có mức độ thuần nhất và tinh khiết hơn toàn bộ vi sinh vật cho nên các tính mẫn cảm, tính sinh kháng thể và tính hiệu lực đều cao.

### 6.4. Vacxin thế hệ mới sản xuất bằng công nghệ gen

#### 6.4.1. Khái niệm

Những tiến bộ về khoa học kỹ thuật trong lĩnh vực vi sinh vật, miễn dịch học, sinh hóa

protein, đặc biệt là kỹ thuật gen học và công nghệ sinh học phân tử đã mở ra một hướng ứng dụng mới đó là nghiên cứu sản xuất các loại hình vaccine bằng công nghệ gen. Những loại vaccine tạo ra bằng phương pháp này được gọi là vaccine thế hệ mới nhằm phân biệt với các loại vaccine đã có được nghiên cứu sản xuất bằng phương pháp công nghệ truyền thống.

Một vaccine được gọi là vaccine thế hệ mới phải là thành phẩm của một quy trình có sự can thiệp, sử dụng, thao tác của công nghệ gen.

Hiện nay, nhiều loại vaccine thế hệ mới đã và đang đưa vào sử dụng có hiệu quả, góp phần vào việc phòng chống bệnh tật cho người và động vật.

#### 6.4.2. Nguyên lý

Trong một loại vaccine, yếu tố quyết định tính sinh miễn dịch chính là thành phần protein đặc biệt có trên bề mặt của vi sinh vật gây bệnh. Thành phần protein này được gọi là kháng nguyên và do một gen hay một số gen có trong hệ gen của vi sinh vật gây bệnh quyết định tổng hợp nên. Những gen chịu trách nhiệm về việc tổng hợp (hay sản xuất) protein kháng nguyên được gọi là gen kháng nguyên.

Nếu tách gen kháng nguyên khỏi vật liệu di truyền của vi sinh vật rồi ghép vào một hệ thống plasmid vector thích ứng nào đó thì gen kháng nguyên này vẫn hoạt động như khi tồn tại trong hệ gen của vi sinh vật chủ và phân tử protein kháng nguyên được tổng hợp ra vẫn có thể có chức năng như cũ, tức là có tính sinh miễn dịch. Chế phẩm protein kháng nguyên được tạo ra như thế được gọi là vaccine tái tổ hợp gen hay vaccine thế hệ mới - vaccine công nghệ gen.

#### 6.4.3. Phân loại

Vaccine thế hệ mới có nhiều loại. Căn cứ vào nguồn kháng nguyên nhân lên được hay không nhân lên trong cơ thể động vật, người ta chia vaccine thế hệ mới làm 2 loại:

❖ **Vaccine có kháng nguyên sống được nhân lên**, bao gồm:

① **Vaccine tái tổ hợp có vector dẫn truyền**

Loại vaccine này chứa 2 thành phần chính:

- Đoạn ADN chứa gen mã hóa cho kháng nguyên chính đ~~u~~ ợc tách ra từ vi sinh vật gây bệnh.

- Hệ gen của vector dẫn truyền.

Người ta tách rời gen kháng nguyên từ vi sinh vật gây bệnh rồi ghép vào hệ gen của vector dẫn truyền là plasmid hay vi sinh vật rồi đưa vào vật chủ. Là vi sinh vật sống nên khi gây nhiễm, chúng sẽ nhân lên do đó nguồn gen kháng nguyên và sản phẩm của gen kháng nguyên là protein kháng nguyên luôn được sản xuất ra tạo miễn dịch lâu bền cho cơ thể.

\* Các vector dẫn truyền:

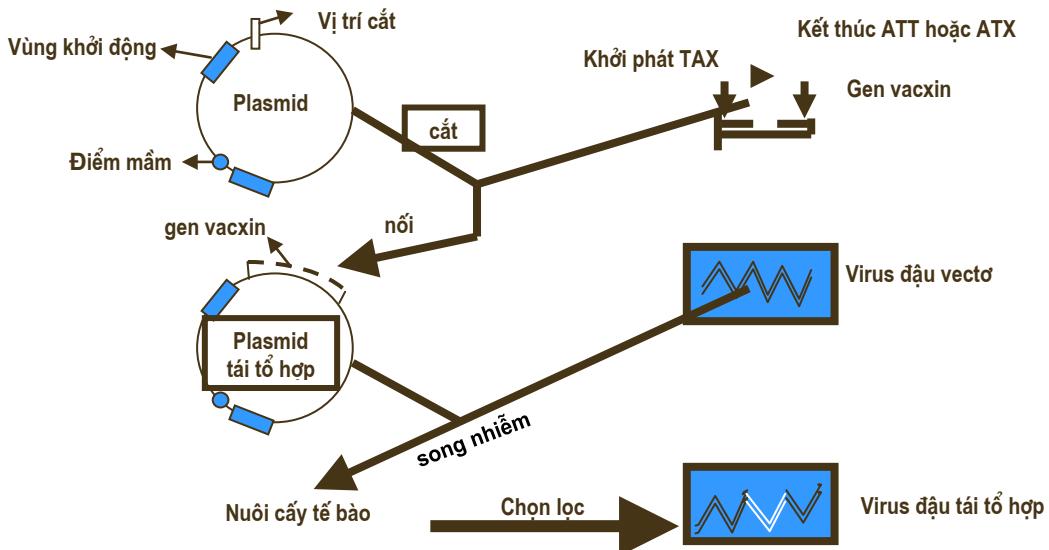
Hiện nay các vector dẫn truyền được chọn thường là những sinh vật (vi khuẩn, virus, nấm men, thực vật) thông dụng có thể nhân lên được ở nhiều loài động vật và đã được làm giảm độc hoặc vô độc bằng kỹ thuật gen.

Ví dụ như vi khuẩn *Salmonella typhimurium*: đây là loại vi khuẩn không độc được chọn làm vector dẫn truyền vì có các ưu điểm:

- Dễ sử dụng qua đường tiêu hóa.

- Có thể tồn tại và nhân lên ở tổ chức lympho đường tiêu hóa, cung cấp protein kháng nguyên bền vững để gây đáp ứng miễn dịch toàn diện: dịch thể, tế bào và miễn dịch cục bộ.

- Việc nuôi cấy vi khuẩn tái tổ hợp gen này dễ thực hiện và thời gian sản xuất rút ngắn.



**Hình 1.1: Mô phỏng quy trình tạo vaccine tái tổ hợp vécto dẩn truyền**

Hiện nay *Salmonella typhimurium* được sử dụng phổ biến làm vector dẩn truyền để sản xuất các vaccine: cúm, viêm gan B, sốt xuất huyết, thổ tả, liên cầu khuẩn, ký sinh trùng sốt rét...

Ngoài *Salmonella typhimurium*, người ta còn sử dụng vi khuẩn *E.coli* và một số loài nấm men như *Pichia pastoris* hoặc *Saccharomyces cerevisiae* làm vector dẩn truyền.

+ Virus đậu bò vaccinia: Virus vaccinia thuộc nhóm Orthopoxvirus đã được sử dụng một thời kỳ dài làm vaccine phòng bệnh đậu mùa (small pox).

Hệ gen của vaccinia có 200.000 nucleotit và có khả năng tiếp nhận nhiều gen ngoại lai có độ dài 25.000 nucleotit do đó là vector lý tưởng để sản xuất vaccine đa giá. Mặt khác virus vaccinia có khả năng gây nhiễm vào nhiều loại vật chủ nhưng không gây bệnh, cũng vậy, có thể nhân lên trong nhiều loại tế bào nuôi cấy, thậm chí ở nhiều dòng tế bào mà ở đó chúng không hoàn thiện được chu trình nhân lên do đó không bị dung bào nên rất thuận tiện để làm vector. Virus vaccinia tái tổ hợp có thể biểu hiện gen kháng nguyên sớm và sản xuất ra protein kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch toàn diện.

Các vaccine sử dụng virus vaccinia làm vector dẩn truyền như:

- Vaccine ND với gen mã hóa kháng nguyên F
- Vaccine cúm với gen mã hóa kháng nguyên H và N
- Vaccine viêm gan B với gen mã hóa bề mặt HB<sub>S</sub> - Ag (Hepatitis B surface Antigen).

## ② Vaccine axit nucleic (vaccine ADN)

Đây là vaccine có thành phần chính là ADN của plasmid tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên.

Gen mã hóa cho kháng nguyên của vi sinh vật gây bệnh được tạo dòng rồi gắn vào plasmid. Đưa plasmid tái tổ hợp vào cơ thể bằng cách tiêm hoặc bằng súng bắn gen.

Vaccine thường được tiêm vào cơ thể để đưa gen trực tiếp vào một số tế bào cơ. Khi vào trong tế bào, ADN của plasmid tái tổ hợp được nhân lên, protein kháng nguyên được sản sinh trực tiếp bởi tế bào vật chủ, chúng sẽ kích thích cơ thể sản sinh miễn dịch.

- Ưu điểm của vaccine ADN:
  - Gen kháng nguyên biểu thị mạnh, thời gian sản xuất kháng nguyên lâu do đó tạo miễn dịch mạnh và lâu bền nên không cần tiêm nhắc lại.
  - Vaccine ADN rất an toàn vì gen đã được loại trừ, hiệu lực ổn định, dễ bảo quản,

thuận tiện cho việc sử dụng, có ý nghĩa kinh tế.

- Tạo miễn dịch tốt ở những cơ thể bị suy giảm miễn dịch và cơ thể suy nhược.
- Có thể thiết kế một vaccine đa giá do trên cùng một plasmid gắn nhiều gen mã hóa hoặc trộn nhiều loại plasmid có chứa ADN mã hóa cho các loại protein kháng nguyên khác nhau mà hỗn hợp vaccine ADN này không bị ảnh hưởng lẫn nhau, như thế sẽ đơn giản hóa được tiến trình tiêm chủng.

▪ Nhược điểm:

Thực nghiệm cho thấy khi đưa vaccine ADN vào cơ thể động vật, sự phân bố ADN vaccine trong tế bào không đạt được mức tối đa. Mặt khác, nếu ADN vaccine hòa nhập vào hệ gen của động vật chủ sẽ gây hậu quả về di truyền ở các thế hệ tiếp theo hoặc có thể đột biến tế bào gây ung thư hoặc ức chế sự hoạt động của gen chống ung thư, gây biến đổi tế bào dẫn đến trạng thái tự miễn dịch.

Vaccine ADN thuộc thế hệ mới nhất, được coi là loại vaccine có triển vọng lớn. Hiện tại vaccine này mới được nghiên cứu thử nghiệm trên động vật như:

Vaccine ADN chứa gen HBsAg

Vaccine ADN chứa gen kháng nguyên chủ yếu của HIV

Vaccine ADN chứa gen H và N chống cúm

③ *Vaccine hóa gen độc*: Là vaccine chứa yếu tố gây bệnh được làm nhược độc bằng kỹ thuật gen cắt bỏ gen độc.

Ví dụ: Để tạo ra giống gốc sản xuất vaccine cúm, hiện tại Bộ Y tế và Viện Khoa học Công nghệ Việt Nam nhập ngoại chủng virus vaccine NiBRG - 14 từ Viện Tiêu chuẩn và Kiểm nghiệm Dịch sinh phẩm Quốc gia - Vương quốc Anh thông qua WHO. Chủng NiBRG - 14 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ngược thông qua việc ghép 6 gen của chủng /PR8/34 ( $H_1N_1$ ) với 2 gen  $H_5N_1$  của chủng A/Vietnam/1194/2004 ( $H_5N_1$ ). Riêng gen  $H_5$  bị loại 12 nucleotit mã hóa 4 axit amin thuộc vùng độc, chủng virus này có thể nuôi cấy trên phôi gà.

Vaccine Aujeski cũng là một vaccine nhược độc kiểu này.

❖ **Vaccine có nguồn gốc kháng nguyên không nhân lên**

Đây là các loại vaccine vô hoạt sản xuất bằng kỹ thuật gen bao gồm:

① *Vaccine chứa kháng nguyên là protein sản xuất bằng kỹ thuật gen*

Loại vaccine này được sản xuất bằng cách tách gen kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh, ghép vào hệ gen của một loại vi sinh vật làm vector dẫn truyền (vi khuẩn, virus, nấm men), nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này trong môi trường thích ứng như hệ thống bioreactor hoặc thiết bị lên men lớn, lượng protein sẽ được sản xuất với số lượng nhiều sau đó.

Chiết tách protein kháng nguyên để làm vaccine.

② *Vaccine ăn được*

Dùng thực vật là bioreactor để sản xuất được chất protein là một xu thế phát triển của công nghệ sinh học. Nhiều gen mã hóa kháng nguyên virus đã được chuyển vào thực vật và đã biểu hiện với hiệu quả cao. Vì vậy, sản xuất vaccine ăn được là hướng nghiên cứu có triển vọng, vaccine ăn được có hoạt tính tương tự vaccine thông thường, chỉ khác là vaccine này được thực vật sản xuất trong những phần ăn được như lá, củ, quả và hạt.

Nỗ lực sản xuất vaccine ăn được từ thực vật đầu tiên được ghi nhận vào năm 1990 bởi 2 nhà khoa học Curtis và Cardineau khi biểu hiện thành công protein kháng nguyên bề mặt A của vi khuẩn *Streptococcus mutans* ở cây thuốc lá. Sau đó nhiều thành công khác về vaccine thực vật đã được công bố sản xuất trên nhiều loại cây khác nhau như rau diếp, cà chua, khoai tây, lúa mì, đậu tương và ngô... Số lượng các công trình nghiên cứu về vaccine ăn được ngày một tăng đã

chứng tỏ tính ưu việt của thực vật như một hệ thống biểu hiện protein kháng nguyên hiệu quả cao, chi phí sản xuất thấp, an toàn sinh học, sử dụng bảo quản dễ dàng do không phải giữ lạnh. Mặt khác, gọi là vacxin ăn được là đề cập đến sự chấp nhận của cơ thể động vật, tức là vacxin bền vững trong dịch tiêu hóa, sau khi ăn vào, vacxin không bị phân hủy và có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh.

Người ta dùng thuật ngữ “Plan edible vacxin” để chỉ loại vacxin ăn được sản xuất từ thực vật biến đổi gen này.

Nguyên lý sản xuất vacxin ăn được: Vacxin ăn được là loại vacxin tiêu phần bao gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit của protein kháng nguyên trong vi sinh vật gây bệnh, người ta chọn lọc những gen mã hóa cho các thành phần này, đưa vào vector (plasmid hoặc vi khuẩn, ví dụ *Agrobacterium tumefaciens*), đưa vào hệ thống di truyền thực vật để khuyếch đại gen và biểu hiện thành các protein kháng nguyên mong muốn trong các bộ phận ăn được của thực vật.

**Bảng 1.6: Các thành tựu nghiên cứu vacxin ăn được đã được công bố**

Nguồn protein	Protein/Peptit	Đối tượng thực vật	Đáp ứng miễn dịch	Tác giả, năm báo cáo
E.coli	Tiêu phần B - độc tố kém chịu nhiệt LT - B	Thuốc lá Khoai tây	Kháng thể dịch thể và kháng thể tế bào theo đường uống và ăn	Hag et al, 1995
Vibrio cholerae	Độc tố tă Tiêu phần B	Khoai tây	Cho ăn	Arakawa, 1998
Virus viêm gan B	HBs - Ag	Thuốc lá	Chưa thử nghiệm	Mason et al, 1992
Virus dại	Glycoprotein	Cà chua		McGarvey et al, 1995
Cl.tetani	Ngoại độc tố	Lục lạp thuốc lá	Cho ăn	Tregoing et al, 2003

③ *Vacxin peptit tổng hợp:* là vacxin thành phần chỉ chứa duy nhất polypeptit kháng nguyên (8 - 20 axit amin)

Do chỉ có các epitop kháng nguyên nên không có khả năng kích thích sinh miễn dịch vì vậy sau khi các peptit được tổng hợp, người ta phải gắn chúng vào các giá đỡ đó là các hạt polymé có khả năng hấp phụ cao.

Ví dụ: Vacxin peptit phòng bệnh lở mồm long móng, việc bảo hộ đạt được bằng cách tiêm cho động vật một tập hợp các chuỗi peptit kháng nguyên gồm 20 axit amin.

Vacxin peptit có nhiều ưu điểm như:

- Sản xuất và kiểm soát chất lượng đơn giản.
- Không có các thành phần không cần thiết như nucleic, protein ngoại lai do đó ít độc.
- Có thể thay đổi theo sự biến đổi tự nhiên đối với những virus không ổn định như virus cúm.
- Có tính khả thi thậm chí trong trường hợp không nuôi cây được virus.
- Ổn định, giá thành hạ.

Tuy nhiên, nhược điểm của loại vacxin này là:

- Sinh miễn dịch có thể kém so với các vacxin vô hoạt truyền thống.
- Bắt buộc phải có chất bổ trợ.
- Yêu cầu tiêm nhắc lại.

## **6.5. Vacxin chống ung thư**

### **6.5.1. Một số hiểu biết về ung thư**

Bệnh sinh ung thư là một vấn đề vô cùng phức tạp mà cho đến nay khoa học vẫn chưa thể khám phá hết. Năm 1908, Ellerman và Bang lấy máu gà bị bệnh bạch cầu (Leucosis) lọc qua màng lọc vi khuẩn rồi tiêm cho gà khoẻ mạnh. Gà mắc bệnh bạch cầu, nhốt gà trưởng thành bị bệnh với gà con 30 ngày tuổi, thì 50% gà con sẽ mắc bệnh.

Năm 1933, Shope nghiên cứu u nhú (papillome) ở da thỏ và xác nhận khả năng lây bệnh của u nhú bằng cách tiêm dịch lọc từ u nhú.

Các thí nghiệm trên đây chứng tỏ tác nhân gây bệnh bạch cầu gà và u nhú thỏ có kích thước rất nhỏ, nhỏ hơn vi khuẩn và chúng có thể truyền bệnh từ cơ thể này sang cơ thể khác. Về sau hiểu rằng tác nhân gây bệnh đó là virus.

Trong khoảng thời gian trên, Rous và Kidd dùng hắc ín chà xát nhiều lần lên da thỏ, đã gây được khối u ở da. Thí nghiệm này đã chứng tỏ tác nhân gây bệnh ngoài virus ra còn có hoá chất.

Năm 1951, Gross lấy phủ tạng chuột bị bệnh bạch cầu nghiên và chiết xuất lấy acid nucleic rồi tiêm cho chuột mới sinh đã gây được bệnh bạch cầu cho chuột. Điều này chứng minh acid nucleic có liên quan đến cơ chế sinh ung thư.

Cơ chế sinh bệnh ung thư dần dần được sáng tỏ nhờ những tiến bộ của kỹ thuật sinh học phân tử. Ung thư được điều hành bởi gen ung thư (onco - gen). Các gen nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào. Bình thường gen ung thư ở trạng thái không hoạt động. Nó sẽ bị kích hoạt bởi các yếu tố như virus sinh ung thư, hoá chất, tia xạ. Khi bị kích hoạt, gen ung thư hoạt động chi phối một bộ phận tế bào cơ thể tăng sinh, xâm lấn, di căn theo cách thức không bình thường, ngoài sự kiểm soát của cơ thể. Khi số lượng tế bào ung thư đạt tới 1000 tỷ thì bệnh ung thư có biểu hiện rõ ràng. Một số virus gây bệnh ung thư ở động vật:

- Virus SV40: Virus này thường thấy trên khỉ Rhesus Cynomolgus. Vacxin sản xuất từ tế bào khỉ có nguy cơ nhiễm virus SV40 do đó trong quy trình sản xuất phải có kỹ thuật kiểm tra và loại trừ virus này;
- Virus HTLV1, HTLV2 (human T lymphotropic virus type 1, type 2). Được tìm thấy trong tế bào lympho T của bệnh nhân bị bệnh bạch cầu và u lympho với tế bào T;
- Virus Marek gây khối u ở gà;
- Virus nhóm Leucosis – Sarcoma;
- Virus gây bệnh tăng nguyên hồng cầu gà;
- Virus gây bệnh tăng nguyên tuỷ bào gà;
- Virus gây bệnh tăng lympho bào gà;
- Adenovirus;
- Virus viêm gan B.

### **6.5.2. Vacxin trong phòng chống ung thư**

Thí nghiệm ghép u ở chuột:

Người ta tiến hành mổ cấy chuột bằng ghép những mảnh sarcoma nhỏ lấy từ chuột bị sarcoma cho một con chuột khác trong dòng thuần chủng. Sau khi khối u phát triển một thời gian, người ta thắt dây khống u làm cho máu không đến được khối u, khối u sẽ teo và chết. Sau một thời gian con chuột này được ghép lại mảnh sarcoma cùng loại thì mảnh ghép bị loại bỏ.

Nhưng nếu ghép mảnh ghép loại khác thì nó không có hiện tượng thải ghép. Như vậy, chuột đã có miễn dịch (mẫn cảm) với tế bào u loại nào thì không mắc u loại đó nữa

Tiêm cho chuột các tế bào ung thư đã bị át hoạt bởi các hoá chất (mitocycin C hoặc tia xạ) sau đó tiêm tế bào ung thư sống cùng loại (lấy từ khối u thắt hoặc cắt không bắt hoạt) thì ung thư không phát triển được.

Nếu tiêm các tế bào ung thư đó cho chuột không được gây miễn dịch thì ung thư phát triển.

Thí nghiệm trên chứng tỏ cơ thể vật chủ có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chống kháng nguyên ung thư. Kháng nguyên ung thư khác với kháng nguyên của mô bình thường, vì thế nếu thay mẫn cảm chuột với các mảnh ghép sarcoma nhỏ (gồm các tế bào ung thư đã bị át hoạt) bằng các mô bình thường (da hoặc tế bào) thì chuột không có khả năng ngăn cản ung thư phát triển.

Từ những kết quả thí nghiệm trên người ta thấy rằng ung thư vẫn có thể phòng được bằng vacxin. Đối với những ung thư do virus có thể phòng bằng cách chủng vacxin với những kháng nguyên virus, ví dụ: Leukemia ở mèo, bệnh Leuco - Marerk ở gà, virus viêm gan B trong bệnh ung thư gan ở người...

Đối với những ung thư không phải do nguyên nhân vi sinh vật thì người ta dùng vacxin là một hỗn hợp tế bào khối u đã được bắt hoạt, hoặc sử dụng các peptide khối u hoặc hỗn hợp các tế bào đã được bắt hoạt từ vài ba khối u cùng loài kết hợp với trợ chất để phòng bệnh cho người, động vật.

Ngoài ra, có thể kết hợp giữa dị kháng nguyên với kháng nguyên ung thư trong phòng bệnh, sự biểu hiện của hai loại kháng nguyên này đã dẫn đến một phản ứng viêm cục bộ và hoạt hóa mạnh mẽ tế bào Lympho T phản ứng với khối u. Các nhà khoa học đã thí nghiệm đưa kháng nguyên HA của virus cúm vào sarcoma của chuột làm ngăn cản sự phát triển của khối u và xuất hiện một đáp ứng Lympho Tc huỷ diệt tế bào ung thư. Một thí dụ khác, đưa trực tiếp một plasmid chứa dị nguyên HLA trong một phức hợp ADN - liposom vào u sắc tố dẫn đến một đáp ứng miễn dịch tế bào Tc với khối u.

Mặc dù protein được coi là chất chủ yếu để chế tạo vacxin nhưng một số kháng nguyên Carbonhydrat cũng đã được nghiên cứu để chế tạo vacxin chống khối u. Chuột thực nghiệm được gây miễn dịch với một vacxin biểu thị kháng nguyên Carbonhydrat có tên sialyl - Tn epitop đã kích cơ thể sản sinh ra IgG đặc hiệu ức chế sự di căn ung thư.

## 6.6. Vacxin tránh thai

Nguyên lý cơ bản của vacxin tránh thai là tạo cho cơ thể đáp ứng miễn dịch kháng lại các yếu tố thụ và hình thành thai.

Vacxin tránh thai khác với vacxin chống nhiễm khuẩn ở hai điểm: Một là khả năng bảo vệ của vacxin tránh thai có tính tạm thời, trong khi đó khả năng bảo vệ của vacxin chống nhiễm khuẩn có tính lâu dài. Hai là đối tượng tác động của vacxin tránh thai là các phân tử tham gia sinh sản trong khi đối tượng tác động của vacxin chống nhiễm khuẩn là các vi sinh vật gây bệnh.

Tác dụng của vacxin tránh thai là:

- Tránh được di chứng về kinh nguyệt hoặc chuyển hoá (thuốc tránh thai);
- Thời gian tránh thai được xác định từ đầu, khi bắt đầu tiêm vacxin (12 tháng hoặc 18 tháng hoặc lâu hơn);

- Không cần trở hoạt động đáp ứng tình dục.

Một số loại vaccine tránh thai đang được nghiên cứu với hiệu quả bước đầu được nhận:

### **❶. Vaccine kháng tinh trùng**

Ý tưởng sản xuất vaccine kháng tinh trùng được bắt đầu từ việc tìm thấy kháng thể kháng tinh trùng tồn tại ở một số phụ nữ vô sinh.

Thành phần chính của vaccine kháng tinh trùng có tác dụng tạo ra đáp ứng miễn dịch là kháng nguyên tinh trùng. Kháng nguyên này có ở bề mặt tinh trùng, là một glycopeptid. Ngoài ra một vài enzym do tinh trùng sản sinh ra cũng có tính kháng nguyên như enzym hyaluronidase, enzym LDH - C4 của acrosom.

Ngày nay người ta có thể tạo ra kháng nguyên tái tổ hợp LDH - C4 có nhiều hứa hẹn cho việc sản xuất vaccine kháng tinh trùng. Một số nghiên cứu trên khỉ của Goldberg về vaccine tái tổ hợp LDH - C4 cho hay vaccine đã làm giảm 75% mức độ sinh đẻ của khỉ.

### **❷. Vaccine kháng trứng**

Trứng là một trong những mục tiêu tác động của vaccine tránh thai.

Trên bề mặt của trứng tại vị trí tiếp nhận tinh trùng có chứa nhiều kháng nguyên zona pellucida (ZP), với bản chất hoá học là mucopolysaccharid. Sự phát hiện thấy trong huyết thanh của phụ nữ vô sinh chất kháng thể kháng lại ZP là gợi ý đầu tiên để tiếp cận nghiên cứu về vaccine ZP. Vai trò của ZP là gắn tinh trùng vào trứng, vaccine chứa kháng nguyên ZP kích thích cơ thể sinh kháng thể. Kháng thể này chiếm lĩnh vị trí ZP trên trứng làm cho tinh trùng không thể vào trứng, do đó không thể thụ thai.

Người ta đã phân biệt được 3 ZP khác nhau là ZP1, ZP2, ZP3 trong đó ZP2 và ZP3 được chú ý nhiều nhất do có tính kháng nguyên mạnh.

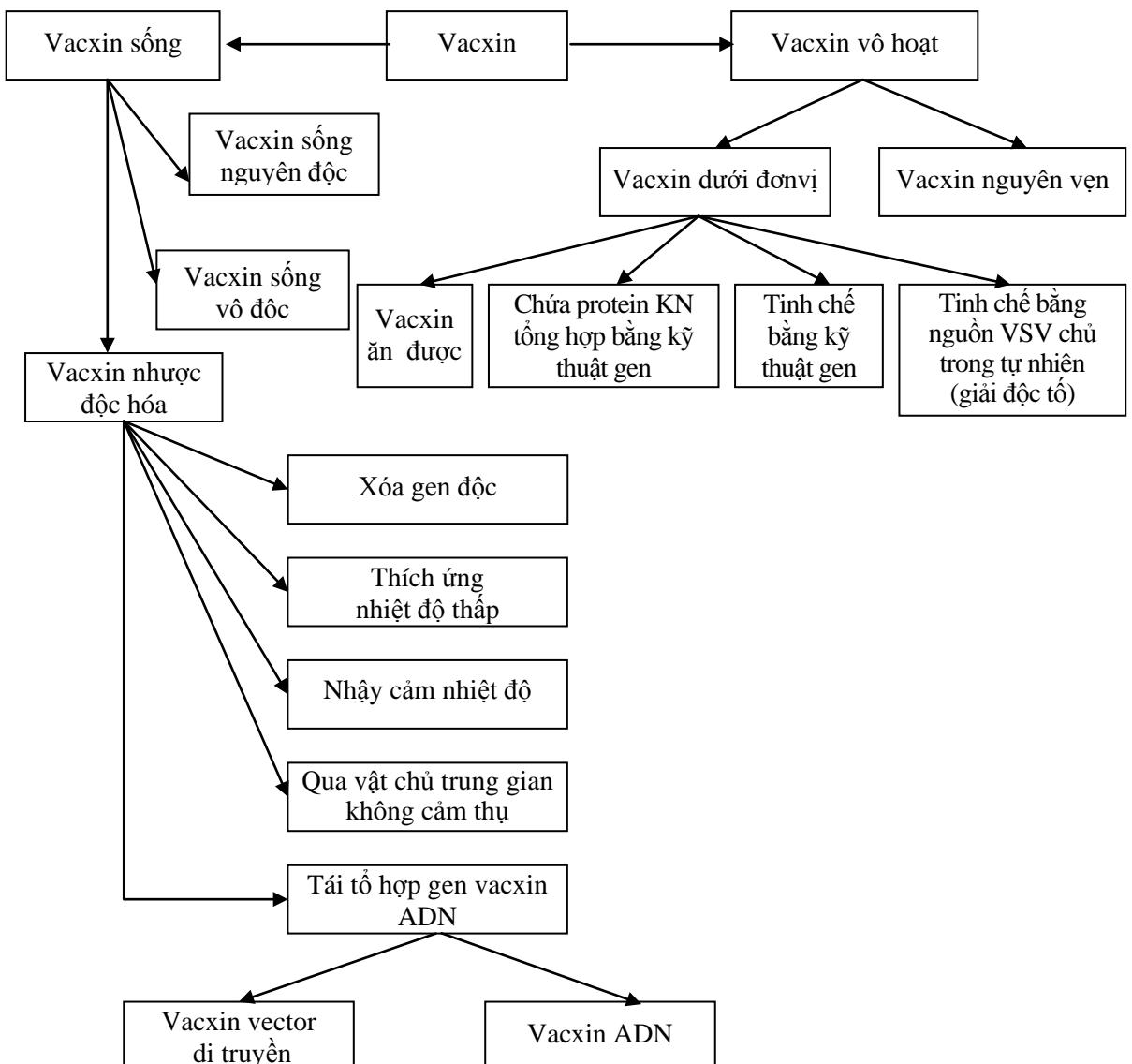
### **❸. Vaccine kháng HCG**

HCG (Human chorionic gonadotropin) là chất nội tiết được sinh ra từ rất sớm bởi tế bào của lá nuôi phôi, tiền thân của nhau thai. HCG có vai trò đặc biệt cần thiết nuôi dưỡng phôi thai ở tuần thai đầu tiên.

HCG có cấu trúc gồm hai phân tử α và β liên kết không đồng hoá trị với nhau. Người ta đã xác định số lượng α HCG và β HCG. β HCG có tính kháng nguyên mạnh nên kích thích cơ thể sinh nhiều kháng thể và epitope sinh kháng thể trên β HCG

β HCG tận cùng carboxyl (β HCG - COOH) đã được tổng hợp trong phòng thí nghiệm để làm vaccine dự tuyển. Để tăng cường độ đáp ứng tạo kháng thể, β HCG - COOH được gắn với một protein载体 có trọng lượng phân tử lớn là giải độc tố của vi khuẩn bạch hầu. Vaccine liên kết này kích thích cơ thể sinh kháng thể HCG, làm cho HCG không còn để nuôi phôi thai mới được hình thành.

Vaccine HCG được thử nghiệm lâm sàng, bước đầu đã cho nhiều kết quả khả quan. Sau khi tiêm vaccine 2 - 4 tuần lượng kháng thể đạt được mức cần thiết để tránh thai là lớn hơn hoặc bằng 50ng/ml, thời gian tránh thai là 18 tháng, có trường hợp lên tới 30 tháng.



*Hình 1.2. Sơ đồ tóm tắt phân loại vacxin*

### Câu hỏi ôn tập chương

1. Trình bày khái niệm về vacxin, đặc tính cơ bản của một vacxin
2. Yêu cầu của kháng nguyên trong vacxin
3. Khái niệm về chất bổ trợ, cơ chế tác dụng và phân loại
4. Hiểu biết của anh (chị) về proteosom, liposom và coclet
5. Hiểu biết về các loại vacxin chết và vacxin sống
6. Thế nào là vacxin thế hệ mới (khái niệm, nguyên lý và phân loại).
7. Hiểu biết về vacxin không phòng bệnh.

## Chương 2

### SẢN XUẤT VACXIN THÚ Y

**Mục tiêu:** Năm được nguyên lý chung của quá trình sản xuất vacxin và một số quy trình sản xuất vacxin.

**Kiến thức trọng tâm:**

- + Nhân sự trong cơ sở sản xuất vacxin
- + Yêu cầu về cơ sở vật chất trong sản xuất vacxin
- + Vấn đề sản xuất vacxin
- + Năm được một số quy trình sản xuất vacxin.

#### I. NGUYÊN LÝ SẢN XUẤT VACXIN THÚ Y

Để đảm bảo sức khỏe tốt cho vật nuôi và thực hiện thành công chương trình sản xuất động vật, cần một nguồn vacxin tinh khiết, an toàn, hiệu lực và có hiệu quả.

Tất cả các vacxin thú y phải được sản xuất trong điều kiện kiểm tra, giám sát cẩn thận. Những yêu cầu và nguyên lý mô tả ở đây phù hợp với những tiêu chuẩn đã phát hành để tạo ra một vacxin có chất lượng cao mà chất lượng vacxin thú y lại dựa vào những nguyên liệu ban đầu của quá trình sản xuất, nhà xưởng, thiết bị và cá nhân con người có liên quan.

##### 1.1. Nhân sự

Tất cả các cá nhân làm việc trong cơ sở sản xuất vacxin phải được đào tạo và nắm được những kiến thức cơ bản của quá trình sản xuất, sau đó phải tiếp tục được dự học những khóa học nâng cao phù hợp với những yêu cầu kỹ thuật mới (ví dụ GMP).

Cơ cấu tổ chức của một cơ sở sản xuất vacxin gồm có:

❖ **Ban giám đốc:** Cơ sở sản xuất vacxin được lãnh đạo bởi ban giám đốc cơ sở. Mỗi người lãnh đạo có trách nhiệm giám sát một khâu sản xuất hoặc một chế phẩm phải được đào tạo và có kinh nghiệm để thực hiện những chức năng được giao.

*Ban giám đốc gồm có:*

+ Giám đốc sản xuất: Phải được đào tạo đầy đủ và có khả năng thực tiễn tốt về lĩnh vực sản xuất, phải có đầy đủ quyền hạn và trách nhiệm quản lý sản xuất ra các chế phẩm, kiểm tra những nguyên liệu ban đầu và chế phẩm cuối cùng.

+ Giám đốc kiểm tra chất lượng: Có đầy đủ quyền hạn và trách nhiệm về mọi nhiệm vụ kiểm tra chất lượng.

+ Các giám sát viên: Giám sát viên giúp giám đốc sản xuất và giám đốc kiểm tra chất lượng thực hiện giám sát trực tiếp quá trình sản xuất, những người này phải qua đào tạo, có kinh nghiệm và luôn theo học các khóa nâng cao về GMP định kỳ.

❖ **Các kỹ thuật viên:** Phải đọc và hiểu được quy trình kỹ thuật và phải được đào tạo đầy đủ về:

- Quy trình sản xuất giống gốc (master seed), giống sản xuất (working seed).
- Thực hiện những nguyên lý sản xuất.

+ Số lượng nhân viên: Phải đầy đủ để thực hiện quy trình sản xuất, tạo ra được sản phẩm vacxin có chất lượng.

Tất cả mọi người trong cơ sở sản xuất vacxin phải khỏe mạnh, có ý thức giữ gìn vệ sinh môi trường và vệ sinh cá nhân cao.

Phải có trang bị bảo hộ lao động an toàn, phù hợp để bảo vệ con người và bảo vệ chế

phẩm không bị ô nhiễm.

## 1.2. Cơ sở vật chất

Các cơ sở sản xuất sử dụng để sản xuất vacxin phải được thiết kế để đảm bảo độ tinh khiết của sản phẩm trong suốt quá trình sản xuất và sự an toàn cho sức khỏe con người.

### ❖ Cấu trúc cần đạt:

- Có thể dễ dàng rửa sạch.
- Có đầy đủ các phòng chuẩn bị riêng biệt.
- Đảm bảo thông gió tốt.
- Có đầy đủ nước nóng và lạnh sạch.
- Có phòng thay quần áo và các điều kiện tiện nghi khác để người làm việc có thể không cần đi qua khu vực không cần thiết cho hoạt động sản xuất của mình.

### ❖ Cơ sở vật chất phải đảm bảo đầy đủ cho quá trình sản xuất:

- Khu vực bảo quản giống.
- Khu vực chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị.
- Khu vực chuẩn bị chất bổ trợ.
- Khu vực hình thành sản phẩm, ra chai, đóng khô, làm nút, dán nhãn, bảo quản sản phẩm cuối cùng.
- Khu vực kiểm nghiệm...

Mỗi hoạt động yêu cầu những diện tích riêng biệt. Tất cả các phòng và hệ thống thông khí phải được thiết kế để tránh tạp nhiễm từ các sản phẩm khác, từ con người và trang thiết bị.

Các vi sinh vật có độc lực hoặc nguy hiểm phải được chuẩn bị và bảo quản ở các phòng tách biệt; những vi sinh vật dùng công cường độc cần phải bảo quản hoàn toàn biệt lập với các chủng vacxin.

Tất cả các trang thiết bị tiếp xúc với sản phẩm phải được tiệt trùng theo các quy trình quy chuẩn.

Cơ sở vật chất phải được thiết kế hạn chế tối đa sự ô nhiễm môi trường.

Tất cả các chất sử dụng trong quá trình sản xuất phải được làm cho an toàn trước khi ra ngoài cơ sở sản xuất.

Nếu cấy chuyển các vi sinh vật có lây nhiễm cao, không khí ô nhiễm cần phải xử lý để tránh lây lan mầm bệnh. Con người phải đặc biệt tuân theo quy trình an toàn như tách biệt, tránh tiếp xúc với động vật mẫn cảm sau khi ra khỏi cơ sở sản xuất.

Chú ý rằng chất liệu và thiết kế cơ sở sản xuất có thể thay đổi nhưng phải tuân thủ, đảm bảo mức tiêu chuẩn của loại vacxin được sản xuất.

Ví dụ: Yêu cầu cơ sở vật chất để sản xuất vacxin qua phôi gà dùng cho uống, nhổ mũi không giống như sản xuất vacxin bằng nuôi cấy tế bào dùng để tiêm.

## 1.3. Sản xuất vacxin

Những yếu tố đầu tiên cho việc sản xuất vacxin đạt hiệu quả là:

- Có những quy trình thao tác chung viết bằng văn bản.
- Có hướng dẫn về sản xuất rõ ràng cho từng loại vacxin được sản xuất.
- Sự tôn trọng triệt để các hướng dẫn trên trong quá trình sản xuất.

**Các bước sản xuất vacxin bao gồm:**

### 1.3.1. Lập kế hoạch

Mỗi loại vacxin được sản xuất trong một cơ sở phải có kế hoạch sản xuất chi tiết mô tả các bước của quy trình, số lượng sản phẩm cần sản xuất, thời gian tiến hành... Nói chung kế hoạch được lập là tài liệu trong quy trình sản xuất chuẩn được chi tiết hóa.

### **1.3.2. Tài liệu của quy trình sản xuất**

Cần có quy trình kỹ thuật chi tiết là tài liệu sản xuất cho mỗi loại vacxin. Tài liệu phải nêu rõ nguyên lý sản xuất, các công đoạn sản xuất và phương pháp kiểm tra sản phẩm sau mỗi công đoạn.

Tài liệu nên nêu rõ quá trình giữ và sản xuất giống gốc như: nguồn gốc của giống gốc, quá trình phân lập, phương pháp tạo giống, cách xác định độc lực của giống, các chỉ số sinh học của giống gốc ( $LD_{50}$ ,  $EID_{50}$ ,  $TCID_{50}$ ...), quy trình giữ giống, môi trường hay hệ thống tế bào sử dụng để nuôi cây và sản xuất giống gốc...

- Quy trình nhân giống sản xuất (working seed);
- Trình tự sản xuất;
- Kiểm nghiệm sản phẩm;

Mỗi công đoạn đều phải mô tả chi tiết các thao tác kỹ thuật, phương pháp đánh giá sản phẩm của công đoạn. Ví dụ: phương pháp để chứng minh môi trường đó vô trùng, phương pháp tiệt trùng môi trường, điều kiện bảo quản tế bào dòng, kích thước của bình nuôi cây, điều kiện và thời gian nuôi cây, những quan sát của quá trình nhân lên, các chỉ tiêu và lưu ý để thu hoạch sản phẩm, kỹ thuật thu hoạch.

Tài liệu cũng hướng dẫn cách kiểm nghiệm sản phẩm, các test kiểm tra độ tinh khiết, an toàn, hiệu lực và các yêu cầu khác của mỗi lô sản phẩm hoàn chỉnh. Những lưu ý đặc biệt khi kết thúc bao gồm quá trình đóng gói, dán nhãn, chỉ dẫn và lưu ý sử dụng, hạn sử dụng của sản phẩm.

Những hướng dẫn để sản xuất các loại vacxin thú y phải được sự phê duyệt bởi cơ quan có thẩm quyền, là tiêu chuẩn thống nhất của tất cả các lô sản xuất.

### **1.3.3. Sản xuất vacxin**

#### **❖ Quá trình nhân giữ giống (Master seed)**

Mỗi loại vacxin được sản xuất từ một giống vi sinh vật gốc, giống vi sinh vật này qua quá trình tuyển chọn, có đủ các đặc tính sinh học đạt yêu cầu dùng để làm giống cho quá trình sản xuất vacxin (ví dụ: có tính kháng nguyên đặc trưng và ổn định), giống gốc phải có lý lịch rõ ràng, đặc biệt phải có các thông số về nguồn gốc, các chỉ số sinh học, có quy trình nhân giống và bảo quản.

Khi sản xuất giống gốc, nên sản xuất các mẻ đơn rồi trộn lẫn với nhau để tạo thành một mẻ lớn. Giống gốc nên được đông khô rồi bảo quản ở nhiệt độ thích hợp để duy trì sự sống.

Ví dụ: Giống virus nên bảo quản ở  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Mỗi giống gốc cần được kiểm tra sự đồng nhất, an toàn và hiệu lực, độ tinh khiết cần được kiểm tra để đảm bảo giống không lẫn vi khuẩn, nấm, Mycoplasma và virus ngoại lai.

Cần chú ý rằng việc sử dụng một giống gốc và số lần lây truyền giới hạn sẽ giúp duy trì sự đồng nhất và tính ổn định của sản phẩm vacxin.

- ❖ Một số quy trình nuôi giữ giống vi sinh vật**
- Quy trình nuôi giữ giống xoắn khuẩn *Leptospira***

#### **① Phạm vi áp dụng**

Quy trình này áp dụng cho việc nuôi giữ giống xoắn khuẩn gồm 6 chủng đang được nuôi giữ và sử dụng trong ngành thú y nước ta. Tên khoa học của giống:

- *Leptospira bataviae*
- *L. canicola*
- *L. grippotyphosa*
- *L. icterohaemorrhagiae*

- *L. mitis*
- *L. pomona*

Giống L. grippotyphosa có nguồn gốc từ Rumani, giống L. icterohaemorrhagiae có nguồn gốc từ Liên Xô cũ. Các giống còn lại do Viện Thú y phân lập tại Việt Nam. Giống được dùng để sản xuất và kiểm nghiệm vaccine vô hoạt.

### ❷ Tiêu chuẩn sinh vật học của giống

- *Nhận dạng:* Kháng thể trong máu của động vật mẫn cảm được tiêm canh trùng vô hoạt sẽ ngưng kết đặc hiệu với chủng vi khuẩn dùng làm kháng nguyên.

- *Nuôi cấy:* Vi khuẩn mọc tốt trong các môi trường chuyên dụng, đặc biệt là EMJH (Johnson and Harris modification of the Ellinghausen and Mc Cullough medium) pH = 7,2 - 7,4, nhiệt độ nuôi cấy 28 - 30°C, hiếu khí.

#### - *Hình thái:*

Xem tươi dưới kính hiển vi nền đèn bội giác thấp 10x/20x10 - 20, vi khuẩn có dạng mảnh, di động theo nhiều kiểu: thẳng tiến, xoay vòng hoặc bật lò xo.

Xem tiêu bản nhuộm bằng phương pháp Morosop dưới kính hiển vi bội giác cao 10 x 20 x 100 (vật kính dầu) vi khuẩn có hình sợi dài, hai đầu hơi cong, bắt màu tím sẫm, kích thước: 0,1 - 1 x 6 - 20 µm. Do đặc tính di động cùng với kích thước nhỏ dài nên qua được màng lọc 0,2 µm.

#### - *Tính độc:*

Đối với chuột lang non (thể trọng 120 - 130g): Tiêm liều 3ml canh trùng 4 - 7 ngày vào xoang bụng gây sốt nhẹ (tăng 0,5 - 1°C), có thể có hoàng đản ở niêm mạc mắt, có khi gây chết động vật thí nghiệm.

Đối với thỏ non (thể trọng 200 - 250g): Tiêm liều 3ml canh trùng 4 - 7 ngày vào xoang bụng gây sốt nhẹ (0,5 - 1°C), không có triệu chứng lâm sàng rõ rệt.

#### - *Tính gây miễn dịch:*

Tiêm vào dưới da thỏ với liều 5 ml kháng nguyên (đã vô hoại bằng nhiệt độ 56°C/60 phút) 2 lần, lần một cách lần hai 7 ngày sẽ sản sinh ra kháng thể ngưng kết với kháng nguyên tương ứng ở hiệu giá thấp nhất là 1/100.

Thỏ được tối thiểu hóa theo "Quy trình chế tạo kháng huyết thanh đơn giá qua thỏ" phải được tạo kháng thể có hiệu giá ngưng kết với kháng nguyên cùng chủng không dưới 1/10000, không có phản ứng chéo giữa các chủng ở độ pha loãng huyết thanh 1/12800.

Kháng huyết thanh này được dùng để kiểm tra giống và xác định mẫu dương tính trong phản ứng trung hòa.

### ❸ Phương pháp giữ giống

#### - *Giữ ở - 80°C:*

Giống giữ ở - 80°C lấy ra khỏi tủ lạnh và làm rã đông nhanh ở 37°C, cấy chuyển sang môi trường EMJH mới. Giống được phục hồi sau 10 - 15 ngày.

Giống sau khi phục hồi được tăng cường qua động vật mẫn cảm: Hai chuột lang non (thể trọng 120 - 130g) hoặc hai thỏ non (200 - 250g) được tiêm liều 3 - 4 ml/con vào xoang bụng canh trùng 4 - 7 ngày. Sau 7 - 24h lấy máu cấy vào môi trường EMJH, nuôi cấy ở 28 - 30°C từ 7 - 15 ngày.

Sau khi tăng cường qua động vật mẫn cảm, giống phải đạt các tiêu chuẩn như ở mục ❷.

Giống được cấy chuyển sang bình chứa 100ml môi trường EMJH. Bổ sung 2,5% dimethylsulfoxide (DMSO), chia vào ống nghiệm, bảo quản ở - 80°C hoặc thấp hơn.

- **Giữ tươi:**

Giống phải được cấy chuyển 7 ngày một lần sang môi trường EMJH, tỷ lệ giống cấy chuyển là 1 - 2%, nuôi cấy ở 28 - 30°C. Sau 3 - 5 tháng giống được tăng cường qua động vật mẫn cảm như phần trên.

Giống giữ tươi sau khi tăng cường qua động vật phải đạt tiêu chuẩn như ở mục ②.

④ **Bảo quản**

Canh khuẩn được lưu giữ ở 28 - 30°C được 7 ngày và - 80°C hoặc thấp hơn nữa được 2 năm.

❖ **Quy trình nuôi giữ giống cường độc Gumboro**

① **Phạm vi ứng dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc nuôi giữ giống virus gây bệnh viêm túi Fabricius ở gia cầm (Infectious Bursal Disease hay Gumboro).

Nguồn gốc: chủng virus cường độc CVL 52/70 do Tổ chức nông lương thế giới (FAO) cung cấp năm 1991.

Giống được dùng để chế vacxin và kiểm nghiệm vacxin phòng bệnh Gumboro.

② **Tiêu chuẩn sinh vật học của giống**

- **Nhận dạng:** Virus được trung hòa với kháng huyết thanh đặc hiệu sẽ không gây bệnh cho gà mẫn cảm.

- **Thuần khiết:** theo 10 TCN 161 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình kiểm tra thuần khiết"

- **Độc lực:**

+ **Với phôi gà:** Tiêm 0,2ml giống pha  $10^{-2}$  lòng đỏ phôi trứng áp 6 - 8 ngày hoặc tiêm màng CAM phôi trứng 9 - 10 ngày tuổi. Soi trứng hàng ngày, loại bỏ trứng chết trước 48 giờ. Mổ khám phôi chết, quan sát bệnh tích: phôi trứng, phù thũng dưới da, xuất huyết. Phôi chết muộn gan sưng to có màu xanh, xung huyết và xuất huyết thường hoại tử tùng mảng.

+ **Với gà:** Giống pha ở nồng độ  $10^{-2}$  nhỏ mắt, mũi 0,1ml/gà (gà 4 - 6 tuần tuổi không có kháng thể gumboro). Sau 48 - 72 giờ mổ quan sát túi Fabricius: túi phù nề, có dịch nhầy màu vàng chanh bao quanh, túi bục bở có màu đục, đôi khi có xuất huyết và bã đậu ở vách mũi khé. Cơ đùi và bắp thịt ngực thường có xuất huyết, thận lỏng đọng urat.

③ **Phương pháp giữ giống**

Giống đông khô giữ ở nhiệt độ thấp hơn - 50°C. Sau 2 năm phải tiến hành kiểm tra lại các tiêu chuẩn giống như sau:

- **Trên gà:**

Giống pha loãng ở nồng độ  $10^{-1}$ , nhỏ mắt mũi cho gà 4 - 6 tuần tuổi (không có kháng thể gumboro) liều 0,2ml/gà. Theo dõi trong vòng 48 - 72 giờ sau khi gây nhiễm. Mổ thu hoạch túi Fabricius, xem bệnh tích (như mục ②). Chọn những túi có bệnh tích điển hình để đông khô.

- **Đông khô giống:**

Nghiền túi Fabricius, trộn đều với chất bổ trợ (sữa bò đã tách bơ), lọc bỏ xơ và chia vào ống đông khô. Tiến hành đông khô.

Sau khi đông khô phải kiểm tra các tiêu chuẩn của giống:

- **Tiêu chuẩn vật lý:**

+ Ống giống kín, không rạn nứt, chế phẩm xốp, màu đồng nhất.

+ Độ chân không được kiểm tra bằng máy đo chân không.

+ Độ ẩm dưới 4%.

+ Độ hòa tan chế phẩm tan trở lại dung dịch ban đầu trong nước sinh lý trong vòng 2 - 3 phút (có lắc nhẹ).

- Tiêu chuẩn sinh vật:

Giống đong khô phải đạt các chỉ tiêu ở mục ②.

#### ④ Bảo quản

Bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng âm  $50^{\circ}\text{C}$  được 2 năm

#### c. Nhân giống sản xuất (working seed)

Giống sản xuất là giống dùng để tạo ra sản phẩm vacxin. Tùy quy mô sản xuất mà phải nhân giống sản xuất tới một số lượng nào đó cho phù hợp.

Giống sản xuất được tạo ra từ giống gốc bằng cách cây chuyển tiếp nhưng không quá 5 - 10 lần. Số lần cây chuyển tiếp có thể được xác định qua dữ liệu và được thiết lập cho phù hợp trong từng trường hợp cũng nhằm duy trì sự đồng nhất và tính ổn định của vacxin.

#### d. Chuẩn bị nguyên vật liệu và môi trường nuôi cấy

##### Nguyên vật liệu, hóa chất

Chi tiết và nguồn gốc của tất cả các thành phần trong sản phẩm như hóa chất, nguyên vật liệu được sử dụng trong quá trình sản xuất vacxin phải đảm bảo yêu cầu kỹ thuật và phải được phê chuẩn của cơ quan cấp giấy chứng nhận có thẩm quyền quốc gia. Tất cả các thành phần có nguồn gốc động vật như máu, huyết thanh mà không được tiệt trùng đều phải có kiểm tra để đảm bảo không có vi khuẩn, nấm, mycoplasma và virus ngoại lai hoặc TSE (prion) đồng thời phải biết được quốc gia nào cung cấp chúng.

Để tránh nhiễm khuẩn từ ngoài vào trong suốt quá trình sản xuất nên khuyến khích việc sử dụng các kỹ thuật tiệt trùng nghiêm ngặt để đảm bảo độ thuần khiết. Hạn chế sử dụng các chất bảo quản, đặc biệt là kháng sinh. Không nên bổ sung bất kỳ loại kháng sinh nào trong quá trình sản xuất nhất là dịch nuôi cấy tế bào, các môi trường, dịch tiêm trúng. Trong trường hợp cần thiết có thể sử dụng không quá 3 loại kháng sinh cùng một loại sản phẩm.

Một số tiêu chuẩn còn cấm dùng Penicillin và Streptomycin trong những vacxin sử dụng theo đường khí dung và đường tiêu hóa.

Những kháng sinh sử dụng trong sản xuất phải không gây ảnh hưởng cho loài vật sử dụng vacxin và không gây ô nhiễm thực phẩm có nguồn gốc từ các loài động vật sử dụng vacxin.

##### Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

###### ① Nếu là vacxin virus: Môi trường nuôi cấy thường là:

###### \* Phôi trứng

Phôi trứng được sử dụng phổ biến để sản xuất các loại vacxin virus, đặc biệt là vacxin dùng cho gia cầm. Để nhân và giữ giống gốc người ta thường dùng trứng của các đàn gà “sạch bệnh” SPF (Specific Pathogenic Free) có chứng chỉ kiểm dịch sạch 18 loại virus và các vi khuẩn như Salmonella, Mycoplasma và Mycobacterium.

Trứng dùng cho sản xuất vacxin thành phẩm có thể dùng các đàn gà sạch nuôi trong các trại gà tập trung có theo dõi dịch bệnh và phải được kiểm tra sạch với một số mầm bệnh, đặc biệt là H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, Newcastle, Mycoplasma, Salmonella và không được tiêm vacxin.

Đường tiêm trúng cũng như loại chất thu hoạch tùy thuộc vào từng loại vi sinh vật đã được cấy chuyển.

###### \* Môi trường nuôi cấy tế bào

Với các vacxin được sản xuất bằng nuôi cấy tế bào cần chuẩn bị một nguồn tế bào MCS (Master Cell Stock) phù hợp và ổn định. Mỗi nguồn tế bào cần đảm bảo tính đồng nhất và đặc tính di truyền trong giới hạn số lần cấy chuyển đồng thời phải tinh khiết, không được lẩn vi khuẩn, nấm, Mycoplasma và virus ngoại lai.

Môi trường tế bào được sử dụng trong sản xuất vacxin thường là các tế bào nguyên thủy

(primary cell) có nguồn gốc từ những mô thông thường bao gồm cả những tế bào sau khi cấy chuyển lần thứ 10. Các vacxin sử dụng cho gia cầm thường được sản xuất từ nguồn nuôi tế bào xơ phôi gà sạch bệnh; Một số loại vacxin được sản xuất từ nguồn nuôi tế bào nguyên thủy có nguồn gốc từ các phôi thông thường của động vật khỏe mạnh.

Mỗi loại tế bào đều có một quy trình chi tiết chỉ dẫn kỹ thuật nuôi cấy cho đến bước cuối cùng là thu hoạch vacxin.

②. *Vacxin vi khuẩn*: Cân chuẩn bị các môi trường thích hợp để nhân giống sản xuất và môi trường sản xuất vacxin. Tùy theo quy mô mà chuẩn bị lượng môi trường, nhiều ít khác nhau.

Dù là vacxin vi khuẩn nhưng độc hay vô hoạt, bước đầu người ta đều cấy giống sản xuất vào môi trường sản xuất vacxin và nuôi ở  $37^0\text{C}$  trong các bình nuôi cấy hoặc các thiết bị lén men sục khí.

Ví dụ: Môi trường sản xuất thường dùng với vacxin phó thương hàn lợn vô hoạt:

Hottinger	50%
Nước dạ dày lợn	50%
Pepton bột	10%
Glucoza	0,2%
NaCl	0,9%

### 1.3.4. Vệ sinh khu vực sản xuất

#### a. Mục đích

Đảm bảo yêu cầu vô trùng về nhà xưởng, trang thiết bị trong khu vực sản xuất trước và sau khi sản xuất, đặc biệt là phòng vô trùng, nơi thực hiện những thao tác kỹ thuật chính trong nuôi cấy, san, chia môi trường và chế phẩm.

#### b. Thực hiện

\* Trước khi làm việc 1 ngày cần tiến hành:

Lau hốt bằng gạc vô trùng có tẩm cồn  $70^0$

Hút bụi sàn nhà, lau sàn nhà 2 lần, lần 1 bằng nước cất, lần 2 bằng dung dịch sát trùng thích hợp (ví dụ Extran 3%).

Bật máy hút ẩm.

Bật đèn tử ngoại 30 phút trước khi vào phòng làm việc.

Kiểm tra vô trùng bằng phương pháp đặt đĩa thạch.

\* Sau khi làm việc:

Lau hốt bằng gạc vô trùng có tẩm cồn  $70^0$

Lau các dụng cụ thường dùng (dao, kéo, pank, kẹp...) và bàn làm việc bằng gạc tẩm cồn  $70^0$

Hút bụi sàn nhà, lau sàn 2 lần.

Hút ẩm

Bật đèn tử ngoại

\* Một tuần tổng vệ sinh toàn bộ nhà xưởng như hút bụi, lau sàn, dụng cụ thường dùng và bàn làm việc, cửa kính...

\* Xông phòng hàng quý hoặc trước khi vào đợt sản xuất mới.

Sau khi tổng vệ sinh toàn bộ khu vực sản xuất, dùng Formaldehyde 40% để khử trùng.

Liều lượng: 35 ml Formol + 17,5g KMnO<sub>4</sub>/m<sup>3</sup> không khí, thời gian xông 48 giờ.

Trung hòa bằng Amonhydroxyt 0,5 ml/m<sup>3</sup> không khí.

\* Kiểm tra vô trùng bằng phương pháp đặt đĩa thạch.

Vaxxin virus ché trên môi trường nuôi cấy tế bào

Ví dụ: Thường quy sản xuất một loại vaxxin sống giảm độc trên tế bào thận khỉ

Vaxxin sống giảm độc được sản xuất từ virus được nhiễm vào lớp tế bào thận khỉ tiên phát, tế bào thận khỉ được lấy ra bằng phương pháp trypsin hóa.

### ❶. Tách tế bào thận khỉ bằng phương pháp truyền dịch

Khi dùng cho sản xuất là giống khỉ Macaca mulatta;

Cân nặng 2 - 3 kg, 2 - 2,5 năm tuổi;

Không có tác nhân ngoại lai SV<sub>40</sub>, SIV, STLV;

Không có kháng thể polio;

Cách ly kiểm dịch 6 tuần.

\* Mổ lấy thận (vô trùng): Gây mê sâu bằng ketamin liều 10 - 20mg/kg P, cắt động mạch cổ, tăm bằng xà phòng và cloramin, lột da bụng, mổ bộc lộ thận, bóc tách thận, đầm bão không gây tổn thương nhu mô thận.

Bảo quản thận trong bình có 100ml môi trường LHE hoặc Hanks ủ ấm 37°C.

\* Tripsin hóa: Lấy thận đặt vào đĩa petri, luồn kim vào động mạch thận, truyền dung dịch versen 150ml - 200ml vào động mạch thận với tốc độ 15 - 20ml/phút đầy máu động trong nhu mô, tiếp theo truyền 150 - 200ml dung dịch tripsin với tốc độ trên cho tới khi thấy dịch chảy ra ngoài nhót; nhu mô thận xuất hiện vết nứt. Cho thận vào bình chứa 80 - 100ml môi trường LHE, lắc nhẹ đến khi môi trường hóa đặc (tế bào được tách ra) - hỗn dịch tế bào được thu giữ lại trong bình có 100 - 150ml huyết thanh bê và giữ trong lạnh.

Tiếp tục tripsin hóa cho đến khi nhu mô thận tan hết.

Hỗn dịch tế bào được cho thêm LHE vừa đủ 1000 - 1500ml sao cho nồng độ huyết thanh bê đạt 10% và bảo quản lạnh 4 - 8°C cho đến khi nuôi cấy.

+ Kiểm tra vô trùng.

+ Đếm tế bào: Pha tế bào bằng xanh trypan với tỷ lệ 1,5 lần, đếm bằng buồng đếm hồng cầu trên kính hiển vi phản pha.

+ Tiêu chuẩn chấp nhận:

- Hỗn dịch tế bào đồng nhất;
- Tỷ lệ sống trên 80%;
- Lượng tế bào đủ nuôi cấy trên 100 bình Roux.

### ❷. Nuôi cấy tế bào

Pha tế bào bằng môi trường phát triển LHE để đạt nồng độ 70.000 tế bào/1ml.

Môi trường LHE gồm: 50% LH 0,5% + 50% Eargle + NaHCO<sub>3</sub> 0,025% + huyết thanh bê 7 - 10% + kháng sinh; nuôi cấy vào các bình Roux dung tích 1200 ml, diện tích nuôi cấy 250cm<sup>2</sup>, khói lượng 170ml hỗn dịch tế bào đã pha loãng.

Nuôi cố định ở 37°C trong 4 - 5 ngày, thay môi trường bằng môi trường duy trì có 2 - 5% huyết thanh bê. Tiếp tục nuôi 3 - 4 ngày để tế bào mọc kín một lớp.

Kiểm tra sự phát triển của tế bào hàng ngày.

\* Tiêu chuẩn chấp nhận:

- Tế bào mọc kín 1 lớp;
- Không nhiễm khuẩn;
- Số tế bào trong 1 chai khoảng 30 - 40 triệu.

### ❸. Gây nhiễm virus

Gây nhiễm virus là giai đoạn chính, quan trọng nhất trong quá trình sản xuất vaxxin nói chung. Mỗi chủng virus có một nồng độ gây nhiễm riêng đảm bảo thu được vaxxin an toàn, đạt hiệu quả cao nhất.

\* Pha loãng giống vacxin: Tính số lượng virus cần gây nhiễm trong lô sản xuất. Ví dụ :  
Với vacxin Bai liệt :

Dùng chủng gốc virus bai liệt typ I: WHO - IS - 90C do viện nghiên cứu bai liệt Nhật Bản cung cấp, chủng có nguồn gốc từ chủng Sarbin (SO) được cấy truyền 2 lần (SO+2) hiệu giá  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Pha loãng với LH<sub>3</sub>E, với khối lượng cần thiết.

\* Rửa tế bào

- Loại bỏ hết môi trường trong chai tế bào;
- Cho vào mỗi chai 100ml Hank's láng qua, lắc nhẹ, hút hết dịch rửa Hank's;
- 25% số chai tế bào chọn ngẫu nhiên làm đối chứng.

\* Gây nhiễm: Cho vào mỗi chai 3ml hỗn dịch giống bằng bơm tự động, láng đều hỗn dịch virus lên bề mặt tế bào.

\* Hấp phụ virus: Toàn bộ số chai tế bào gây nhiễm và chai đối chứng được để hấp phụ ở 33,5°C/1 giờ.

Cứ 15 phút láng nhẹ 1 lần hỗn dịch virus trên toàn bộ bề mặt chai tế bào.

\* Bổ sung môi trường: Cho vào mỗi chai 110 - 120ml LH<sub>3</sub>E nuôi ở 33,3°C, theo dõi sự hủy hoại tế bào. Những chai được thu hoạch khi trên 80% tế bào bị hủy hoại với mức CPE3+ đến 4+.

#### ④. Thu hoạch vacxin

Thu hoạch vacxin đúng quy trình sẽ mang lại hiệu quả cao nhất trong sản xuất.

\* Kiểm tra tế bào đối chứng: Môi trường vàng cam, trong suốt, tế bào bám đều khắp bề mặt chai, tế bào không bị thoái hóa.

\* Kiểm tra các chai gây nhiễm virus:

- Môi trường có màu vàng sẫm, trong suốt;
- Soi trên kính hiển vi thấy có hiện tượng hủy hoại: Tế bào co tròn, bong khỏi thành chai (3+: hầu hết tế bào thoái hóa; 4+: tế bào bong hết khỏi thành chai).

\* Thu hoạch:

Thời gian thu hoạch khoảng 65 - 90 giờ sau gây nhiễm.

Dùng tay lắc mạnh chai cho tế bào bong hết khỏi thành chai, bảo quản trong tủ - 20°C.

Ta thu được vacxin bán thành phẩm.

Thử vô trùng bán thành phẩm.

\* Tập trung vacxin:

- Lấy chai tế bào ra khỏi tủ đá để ở nhiệt độ phòng khi gần tan hết đá, dùng tay lắc mạnh để đập vỡ tế bào giải phóng virus.

- Chuyển vacxin từ bình Roux sang chai 2,5 lít, chuyển chai 2,5 lít sang chai 20 lít, xác định số lượng vacxin thu được.

- Chia vacxin từ chai 20 lít ra chai 1,5 lít, bảo quản ở - 20°C, lấy 100ml mẫu kiểm định, thử vô trùng.

\* Lọc vacxin: Nhầm loại bỏ tế bào và các tạp chất trong quá trình nuôi cấy, đảm bảo vô trùng.

\* Trộn vacxin thành vacxin thành phẩm:

Các vacxin bai liệt đơn giá typ I, II, III sau khi chế đơn giá được trộn lại với nhau thành vacxin bai liệt thành phẩm, ra chai, dán nhãn, bảo quản.

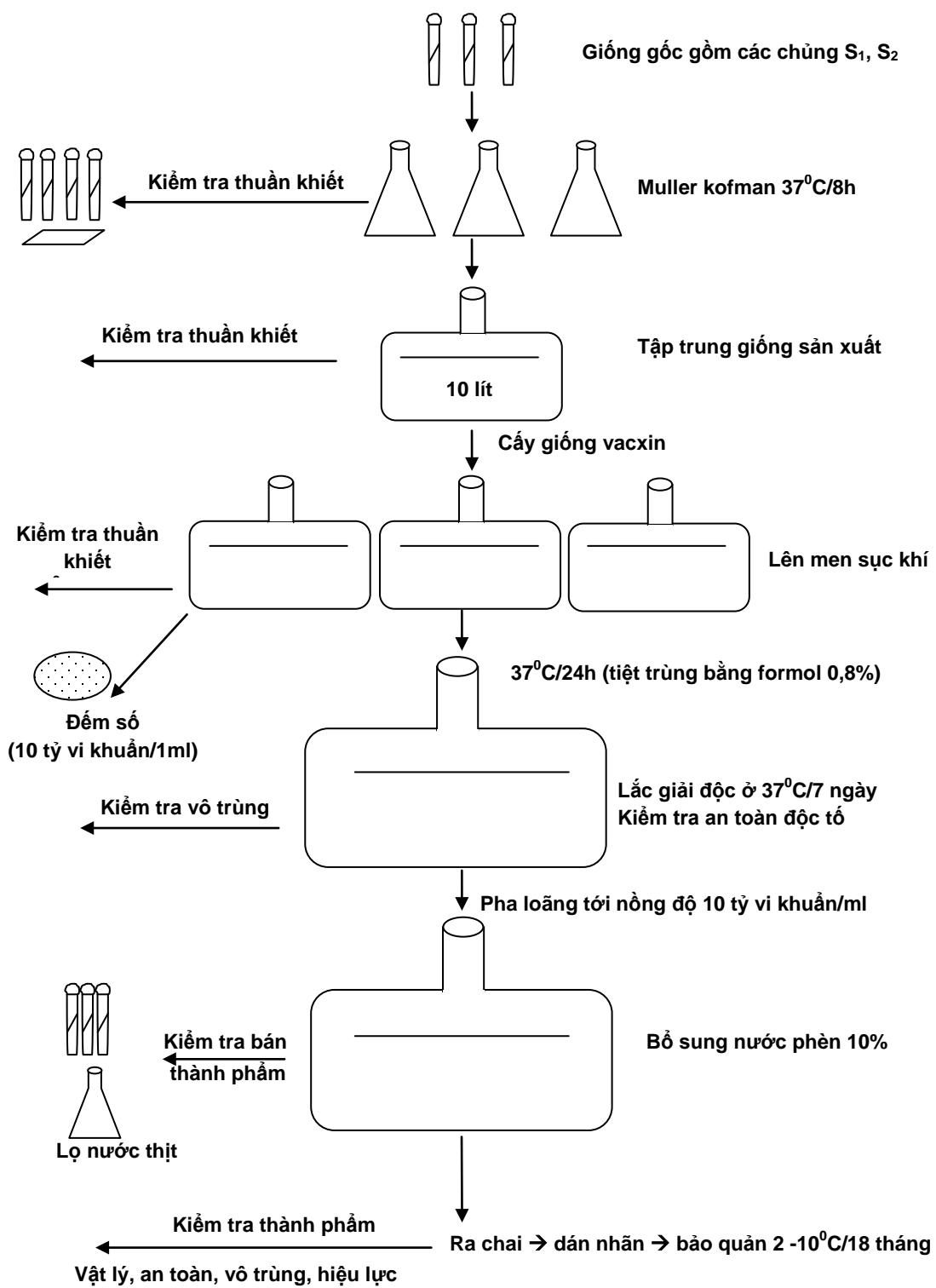
#### ⑤. Kiểm định vacxin

Nếu kiểm định đạt yêu cầu - quy trình chế tạo vacxin hoàn thiện.

## II. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VACXIN

### 2.1. Quy trình sản xuất vacxin vi khuẩn

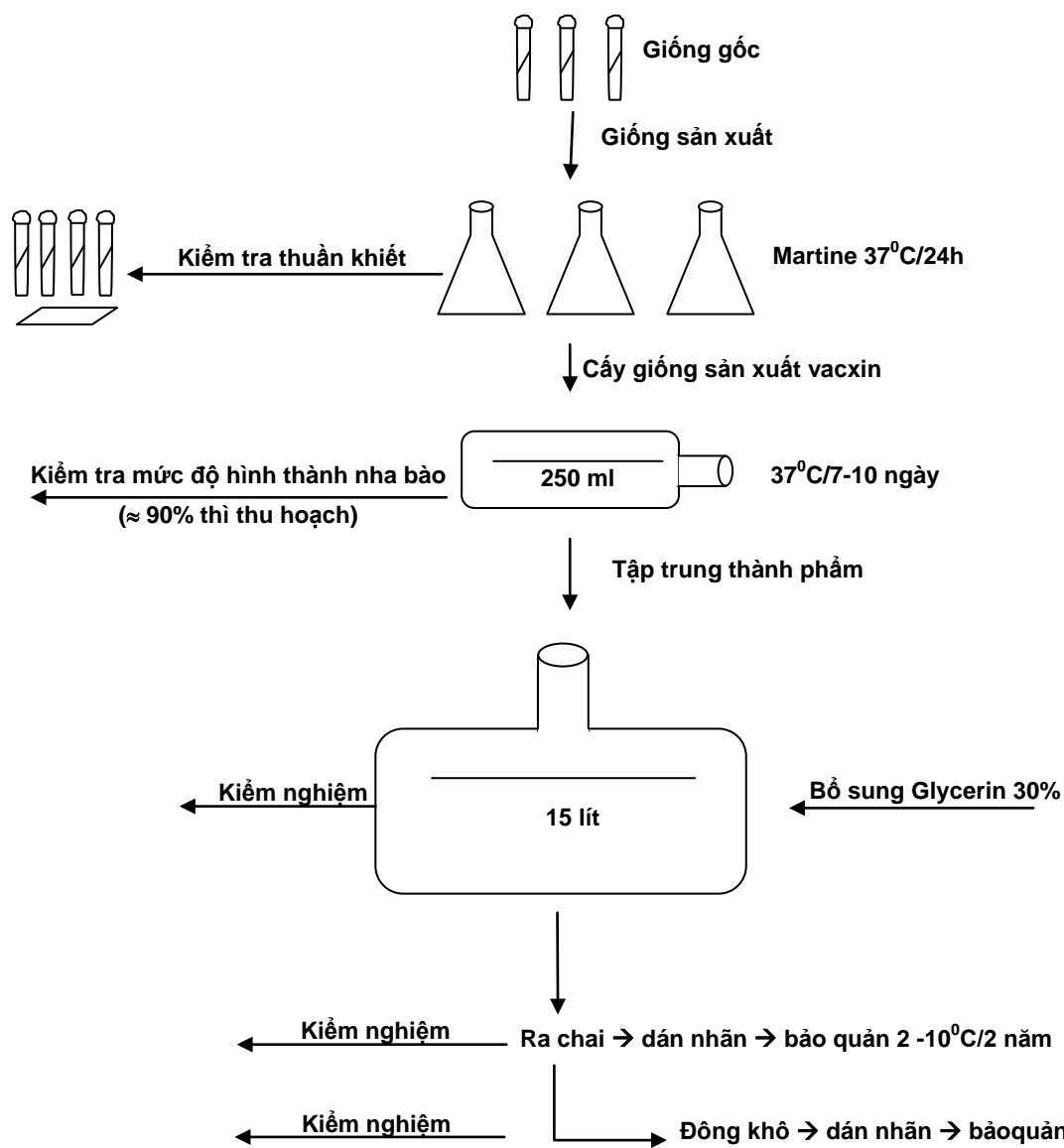
#### 2.1.1. Quy trình sản xuất vacxin phó thương hàn lợn vô hoạt (Swine Salmonella vaccine)



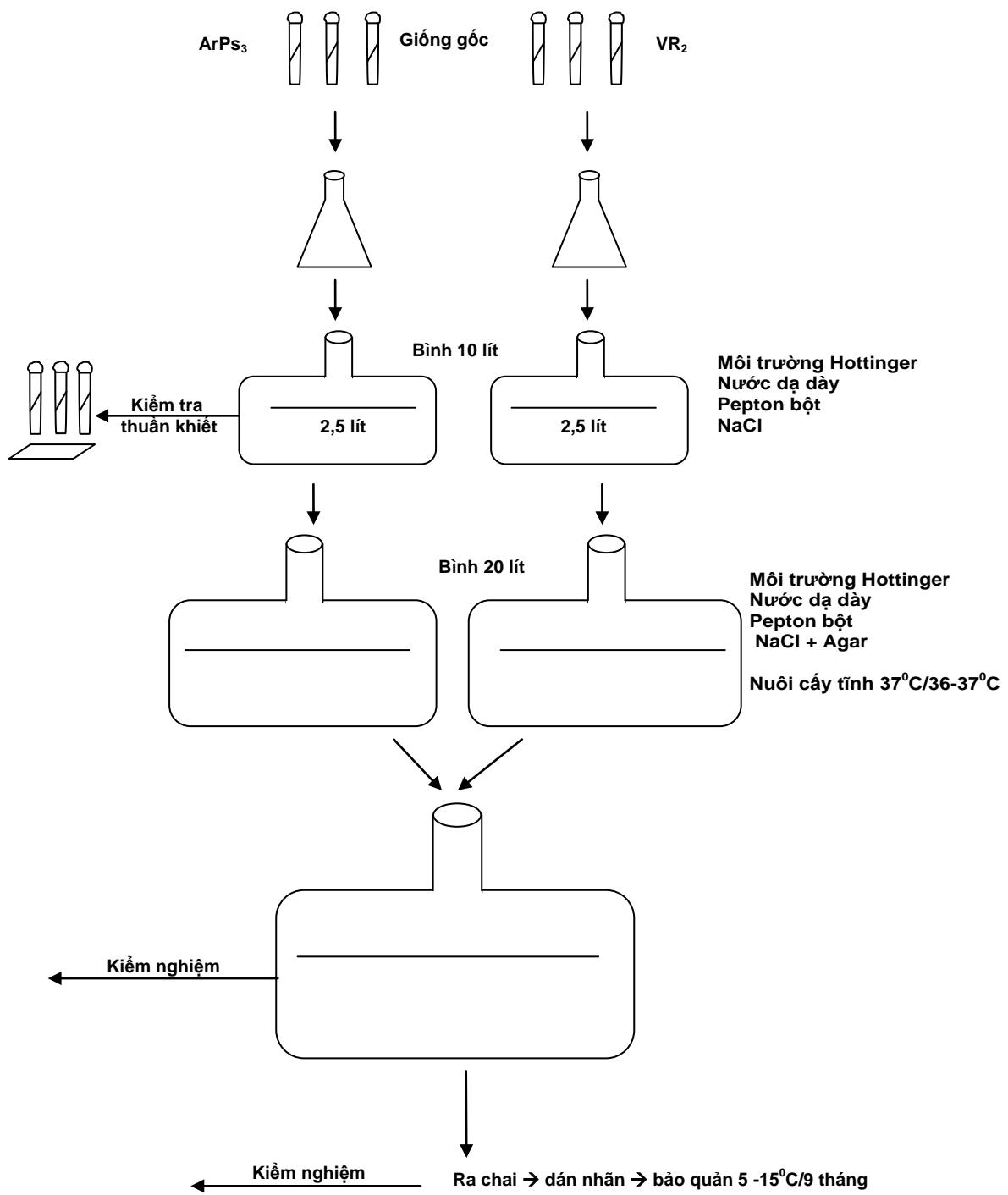
### 2.1.2. Quy trình sản xuất vacxin nhiệt thán (*Anthrax spore vaccine*)

Vacxin nhiệt thán được chế tạo từ nha bào của vi khuẩn nhiệt thán vô độc không có giáp mỏ (Avirulent B. anthracis strain)

Vacxin được sản xuất từ 2 thể: thể đông khô và thể lỏng trong dung dịch glycerin, mỗi ml vacxin chứa khoảng 30 triệu nha bào.

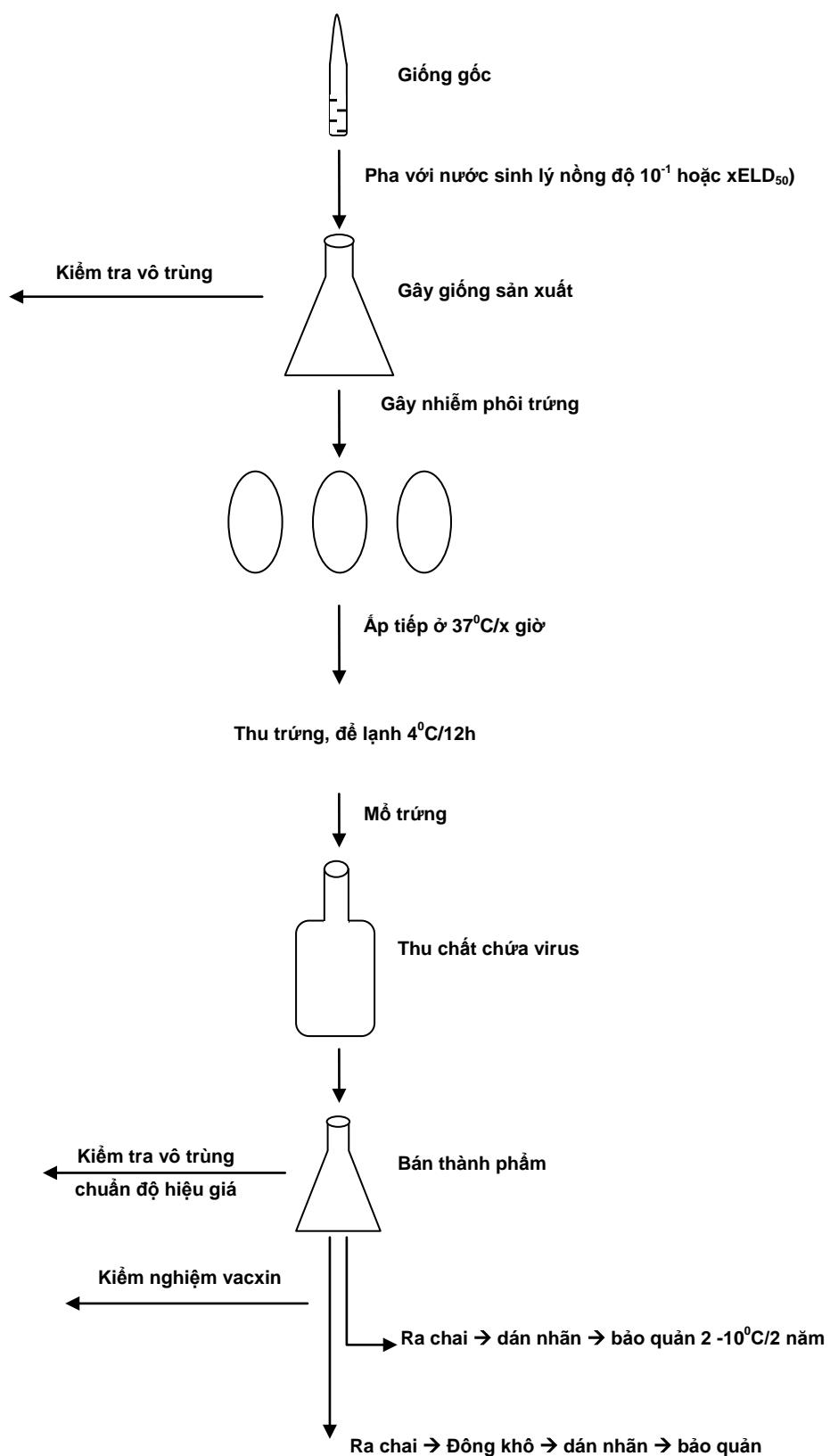


**2.1.3. Quy trình sản xuất vacxin tụ dầu (Swine Erysipelas and Pasteurella live vaccine)**  
 Là vacxin nhị giá với 2 chủng vi khuẩn AvPs<sub>3</sub> và VR<sub>2</sub> nhược độc ở dạng thạch lỏng.



## 2.2. Quy trình sản xuất vacxin virus

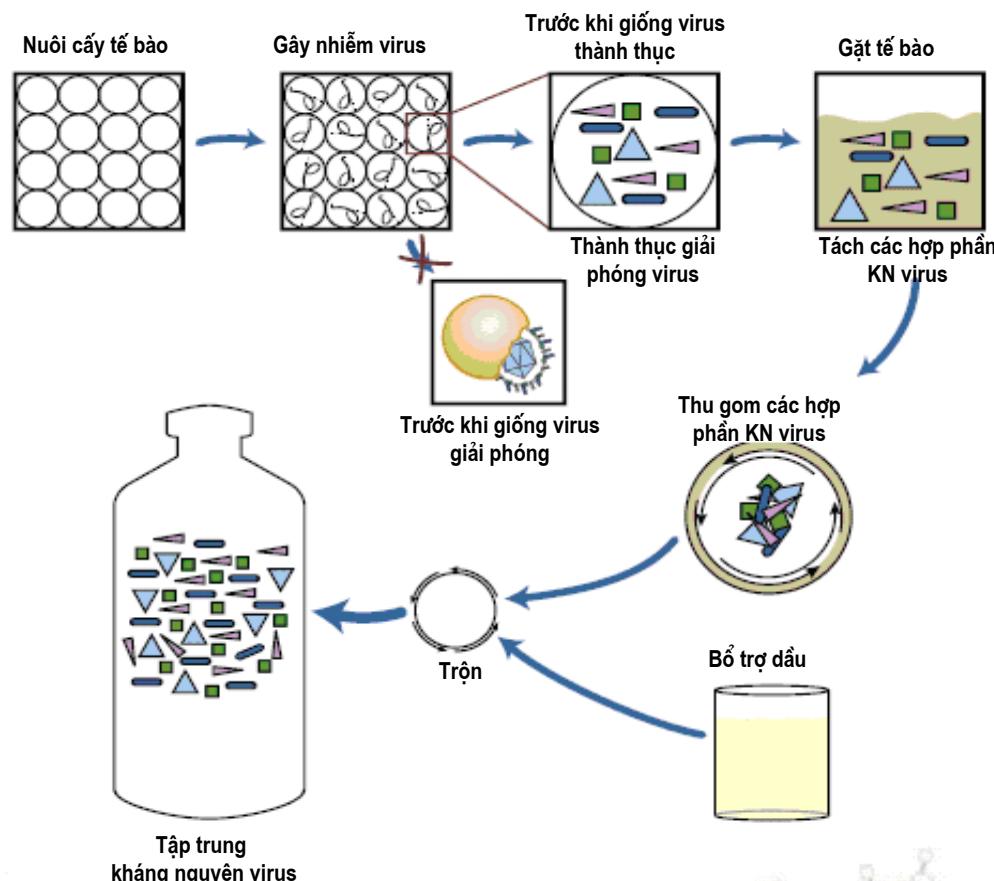
### 2.2.1. Vacxin nhược độc ché trên phôi trứng



### 2.2.2. Quy trình sản xuất vacxin virus bằng công nghệ lựa chọn kháng nguyên

Đối với vacxin virus còn có công nghệ sản xuất lựa chọn kháng nguyên. Nguyên lý của công nghệ này dựa theo nguyên lý sản xuất vacxin PRRS như sau:

Để phòng bệnh đặc hiệu, các nhà khoa học đã tiến hành sản xuất vacxin PRRS dựa trên việc nghiên cứu công nghệ lựa chọn kháng nguyên <sup>TM</sup>**MJPRRS**<sup>TM</sup>. Nguyên lý sản xuất này đòi hỏi phải thu hoạch vacxin trước khi virus thành thực và giải phóng ra khỏi tế bào nuôi cấy. Việc làm này sẽ tối đa hóa được lượng kháng nguyên trong sản phẩm.



Hình 2.1: Quy trình sản xuất vacxin phòng PRRS theo công nghệ lựa chọn kháng nguyên <sup>TM</sup>**MJPRRS**<sup>TM</sup>.

Khi thu hoạch được tế bào chứa các hạt virus, người ta tiến hành tách các hợp phần kháng nguyên, thu gom lại và gia thêm bổ trợ để được vacxin thành phẩm. Công nghệ <sup>TM</sup>**MJPRRS**<sup>TM</sup> tương tự một quy trình sản xuất vacxin dưới đơn vị. Việc triết tách các hợp phần kháng nguyên từ tế bào nuôi cấy có một vài bước đặc biệt so với quy trình sản xuất vacxin thông thường để gần như loại bỏ hết các tế bào nuôi cấy trong sản phẩm cuối cùng và như vậy, có một thành phẩm vacxin đạt độ tinh khiết kháng nguyên rất cao - đó là vacxin phòng PRRS trong tương lai.

### 2.2.3. Quy trình chế vacxin nhược độc Dịch tả lợn qua thỏ

Quy trình chế vacxin dịch tả lợn qua thỏ gồm các bước:

- Chuẩn bị
- Tiếp giống và theo dõi
- Mổ thỏ kiểm tra bệnh tích
- Chế vacxin

#### Bước 1: Chuẩn bị

❖ Chuẩn bị thỏ :

Thỏ được đưa về trước 10 ngày, nhốt riêng, chăm sóc, nuôi dưỡng chu đáo. Thỏ phải đạt được các yêu cầu là: khỏe mạnh, không mắc bệnh truyền nhiễm, ký sinh trùng (đặc biệt bệnh cầu trùng); khối lượng thỏ > 1,8 kg.

Ba ngày trước khi tiếp giống tiến hành đo thân nhiệt thỏ, ngày 2 lần (sáng và chiều) vào những giờ nhất định, yêu cầu nhiệt độ trung bình các ngày không vượt quá 39,5°C.

Số lượng thỏ chuẩn bị cần cứ vào lượng vaccine cần phải chế trong 1 đợt. Với thỏ nặng 1,8 - 2 kg cho 18 - 20g hạch, lách. Khi pha vaccine nghiên hạch, lách theo tỷ lệ 1/200.

Số lượng thỏ chuẩn bị cần phải dư vì trong quá trình nuôi và theo dõi có những thỏ không đạt tiêu chuẩn

❖ Dụng cụ:

- Bơm tiêm, kim tiêm để tiếp giống
- Dao, kéo, bông cồn, vải gạc, cốc đong, cối chày sứ
- Tùy theo tính chất từng loại dụng cụ, tiến hành tiêu độc bằng cách sấy khô hoặc hấp ướt.

❖ Giống virus vaccine

- Có thể là giống đông khô hoặc hạch, lách tươi

❖ Phòng chế

- Đảm bảo vệ sinh, điều kiện vô trùng

**Bước 2: Tiếp giống và theo dõi**

❖ Tiếp giống

- Nếu là giống đông khô, hòa với nước sinh lý theo hướng dẫn
- Nếu là hạch, lách nguyên thì cắt bỏ bạc nhạc, màng mỡ bên ngoài, cân lên và nghiên với nước sinh lý theo tỷ lệ 1/20, lọc, xử lý kháng sinh
- Tiêm 1ml vào tĩnh mạch đùi tai thỏ

❖ Theo dõi thỏ

- Thỏ được tiếp giống dịch tả lợn sau khi tiêm cứ 6 giờ theo dõi nhiệt độ 1 lần (không kể ngày đêm)
- Sau 1 - 2 ngày thỏ bắt đầu sốt, sốt cao hơn bình thường 1 - 2°C
- Mổ thỏ để lấy hạch màng treo ruột và lá lách để chế vaccine
- Không lấy hạch và lá lách của những thỏ sốt lên xuống thất thường và thỏ sốt dưới 0,5°C.

**Bước 3 : Mổ thỏ kiểm tra bệnh tích**

- ❖ Nếu thỏ phản ứng nhiệt độ đúng tiêu chuẩn, thường giết thỏ trong khoảng 59 - 62 giờ tính từ khi tiếp giống.
- ❖ Kiểm tra bệnh tích: **Thỏ tiếp giống dịch tả lợn hầu như không có bệnh tích, nếu có chỉ là sưng hạch lâm ba và lá lách.**

**Bước 4: Chế vaccine**

Toàn bộ hạch và lá lách của thỏ đạt tiêu chuẩn được tập trung để chế thành 1 lô vaccine, được xử lý:

- Nghiền với nước sinh lý theo tỷ lệ 1/200
- Lọc, xử lý kháng sinh, để kháng sinh tác động 1 giờ, tiến hành ra chai, dán nhãn, đóng nút
- Kiểm tra vô trùng
- Đông khô vaccine
- Bảo quản và sử dụng

## **Câu hỏi ôn tập chương**

1. Trình bày những yêu cầu chung về nhân sự và cơ sở vật chất trong sản xuất vacxin.
2. Kế hoạch và tài liệu cho quy trình sản xuất vacxin.
3. Quá trình nhân và giữ giống vi sinh vật cho sản xuất vacxin, cho ví dụ?
4. Nhân giống, sản xuất, chuẩn bị nguyên vật liệu và môi trường dùng trong sản xuất vacxin.
5. Công tác vệ sinh khu vực sản xuất.
6. Trình bày một số quy trình sản xuất vacxin vi khuẩn (vacxin phó thương hàn lợn vô hoạt, vacxin nhiệt thán, vacxin tụ dầu).
7. Trình bày một số quy trình sản xuất vacxin virus (vacxin virus nhược độc trên phôi trứng, qui trình sản xuất vacxin bằng công nghệ lựa chọn kháng nguyên).

## Chương 3

### KIỂM NGHIỆM VACXIN

#### ❖ Mục tiêu:

Nắm được nội dung của quá trình kiểm nghiệm vacxin.

#### ❖ Kiến thức cơ bản:

- + Tiêu chuẩn của một phòng kiểm nghiệm vacxin động vật.
- + Các chỉ tiêu vacxin cần kiểm nghiệm và phương pháp kiểm nghiệm vacxin.
- + Quy trình kiểm nghiệm của một số loại vacxin.

Trước khi phân phối, thành phẩm vacxin cần phải được kiểm nghiệm.

Kiểm nghiệm là thực hiện các phương pháp kiểm tra tổng thể chất lượng của loại vacxin vừa hoàn thành theo quy trình sản xuất, đảm bảo lô vacxin xuất xưởng phải có độ tinh khiết, an toàn và có hiệu lực.

Các bước kiểm nghiệm phải được tiến hành tại cơ sở sản xuất (kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn cơ sở) và kiểm nghiệm tại cơ quan pháp chế Quốc gia, ở Việt Nam là Trung tâm kiểm nghiệm thuốc và vacxin thú y - Cục Thú y.

Sau khi có đầy đủ hồ sơ pháp chế, vacxin mới được xuất xưởng, lưu hành.

#### I. TIÊU CHUẨN CỦA MỘT PHÒNG KIỂM NGHIỆM VACXIN ĐỘNG VẬT

1. Phòng kiểm nghiệm vacxin vi khuẩn, virus và pha chế môi trường phải tách rời nhau.
2. Thiết bị và máy móc phục vụ cho các khâu kiểm nghiệm phải đầy đủ và đạt tiêu chuẩn quy định.
3. Thiết kế phù hợp, dễ vệ sinh, sàn và tường không thấm nước và chịu được hóa chất.
4. Có các buồng an toàn về vi sinh vật bảo vệ được sản phẩm và người thao tác.
5. Có hệ thống thông gió tốt và an toàn.
6. Trang thiết bị bảo hộ tốt.
7. Phải có khu nhà nuôi động vật thí nghiệm bao gồm:
  - ❖ Nhà nuôi gia cầm;
  - ❖ Nhà nuôi gia súc nhỏ;
  - ❖ Nhà nuôi gia súc lớn.

Mỗi nhà nuôi này có 2 khu tách biệt dành cho kiểm nghiệm vacxin vi khuẩn và vacxin virus.

Kết cấu của nhà nuôi phải đảm bảo an toàn sinh học, có nghĩa là khi tiến hành công cường độc, các vi sinh vật cường độc không được gây ô nhiễm ra môi trường bên ngoài.

Với yêu cầu như vậy phòng phải có:

- ❖ Phương tiện đốt xác động vật, hệ thống vệ sinh tiêu độc triệt để.
- ❖ Hệ thống thông gió ra vào phòng phải qua một hệ thống lọc hiệu quả.
- ❖ Có đầy đủ các phương tiện cách ly.
- ❖ Hệ thống nước thải phải được xử lý an toàn sinh học trước khi thải ra ngoài khu vực.

#### II. CÁC CHỈ TIÊU VACXIN CẦN KIỂM NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM

##### 2.1. Các chỉ tiêu kiểm nghiệm

1. Độ thuần khiết
2. An toàn
3. Hiệu lực

## **2.2. Phương pháp kiểm nghiệm**

### **2.2.1. Lấy mẫu và bảo quản mẫu**

Mẫu kiểm nghiệm là các đơn vị sản phẩm được lấy ra từ các lô vaccine để tiến hành kiểm nghiệm trước khi xuất ra sử dụng và lưu giữ trong thời gian bảo quản của vaccine để giải quyết các tranh chấp nếu có.

Mẫu phải có tính đại diện, lấy ngẫu nhiên tỷ lệ quy định và được bảo quản trong điều kiện phù hợp và an toàn, khi đến phòng kiểm nghiệm phải được tiến hành ngay các thủ tục kiểm nghiệm trong thời gian ngắn nhất.

Các nhà sản xuất cũng nên giữ mẫu này trong vòng 6 tháng sau khi hết hạn sử dụng ghi trên nhãn vì chúng có thể giúp đánh giá những vấn đề xảy ra trong quy trình sử dụng vaccine.

#### **Lấy mẫu:**

Mẫu được lấy theo lô vaccine. Lô vaccine là toàn bộ các sản phẩm được chia vào vật chứa cuối cùng từ cùng một khối lượng vaccine đồng nhất, trong cùng một ca sản xuất. Mẫu được lấy theo tỷ lệ sau:

- 10% sản phẩm (ít nhất là 5) đối với lô dưới 100 sản phẩm.
- 10% sản phẩm với lô từ 100 đến dưới 500 sản phẩm.
- 2% sản phẩm đối với lô từ 500 sản phẩm trở lên (nhiều nhất là 20 sản phẩm).

Mẫu lấy xong phải được bao gói, dán nhãn và bảo quản ở điều kiện bảo quản của vaccine.

Nhãn phải ghi rõ:

- Nơi sản xuất
- Tên sản phẩm
- Số lô..., ngày ...tháng ... năm ... sản xuất
- Số lượng và đặc điểm sản phẩm
- Người lấy mẫu
- Thời gian lấy mẫu
- Điều kiện bảo quản.

Sử dụng mẫu: mẫu được chia làm 3 nhóm như sau:

- Nhóm 1: từ 3 sản phẩm trở lên, dùng để kiểm tra thuần khiết.
- Nhóm 2: từ 3 sản phẩm trở lên dùng để kiểm tra các chỉ tiêu khác.
- Nhóm 3: 2 sản phẩm để lưu giữ.

Trong trường hợp mẫu có số lượng tối thiểu (5 sản phẩm) thì nhóm 1 và 2 gộp làm một.

### **2.2.2. Các phương pháp kiểm nghiệm**

Mỗi loại vaccine có một quy trình kiểm nghiệm được chấp nhận bởi cơ quan có thẩm quyền quốc gia. Nội dung kiểm nghiệm chung bao gồm:

#### **①. Kiểm tra độ thuần khiết**

Độ thuần khiết của vaccine được xác định bằng các kiểm tra việc nhiễm tạp khuẩn.

Các xét nghiệm xác định sự nhiễm khuẩn được tiến hành trên giống gốc, giống sản xuất, môi trường tế bào nguyên thủy, các thành phần có nguồn gốc động vật như huyết thanh bê và mỗi lô sản phẩm trước khi mang ra sử dụng.

Các phương pháp sử dụng để đảm bảo độ tinh sạch của sản phẩm thay đổi tùy theo bản chất của sản phẩm, được mô tả chi tiết trong quy trình kiểm nghiệm hoặc trong quy trình sản xuất của từng loại vaccine (tiêu chuẩn kiểm nghiệm cơ sở).

\* Để xác định vi sinh vật ngoại lai là vi khuẩn, Mycoplasma và nấm, người ta cấy mẫu vào các môi trường nuôi cấy thích hợp, nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu trong vòng 14 giờ rồi đọc kết quả.

\* Môi trường sử dụng:

❖ Môi trường phát hiện vi khuẩn gồm:

Môi trường nước thịt pepton

Môi trường nước thịt gan yếm khí  
Môi trường thạch máu  
Môi trường thạch thường  
Môi trường đặc biệt (tùy yêu cầu).

❖ Môi trường phát hiện nấm:

Sabouraud  
SCD (Soybeancasein digest)

Với môi trường lỏng được đựng trong ống φ16, mỗi ống chứa 15ml môi trường.

❖ Tiến hành:

Mẫu thử	Loại môi trường	Số lượng môi trường	Số lượng mẫu cấy	Nhiệt độ nuôi	Thời gian theo dõi (ngày)
Huyết thanh	Nước thịt	4 ống	1ml/ống	37°C	14 ngày
	Thạch máu	4 ống		37°C	
	Nước thịt gan yếm khí	4 ống		37°C	
	SCD	4 ống		20 - 25°C	
Giống gốc (virus)	Nước thịt	4 ống	1ml/ống	37°C	14 ngày
	Thạch máu	4 ống		37°C	
	Nước thịt gan yếm khí	4 ống		37°C	
	SCD	4 ống		20 - 25°C	
Hỗn dịch tế bào	Nước thịt	4 ống	1ml/ống	37°C	14 ngày
	Thạch máu	4 ống		37°C	
	Nước thịt gan yếm khí	4 ống		37°C	
	SCD	4 ống		20 - 25°C	
Vacxin bán thành phẩm	Nước thịt	4 ống	1ml/ống	37°C	14 ngày
	Thạch máu	4 ống		37°C	
	Nước thịt gan yếm khí	4 ống		37°C	
	SCD	4 ống		20 - 25°C	
Vacxin thành phẩm	Nước thịt	4 ống	1ml/ống	37°C	14 ngày
	Thạch máu	4 ống		37°C	
	Nước thịt gan yếm khí	4 ống		37°C	
	SCD	4 ống		20 - 25°C	

\* Đánh giá kết quả:

- Đến cuối quá trình theo dõi mà tất cả các ống thử đều trong suốt, màu sắc môi trường không đổi, kết quả là âm tính.
- Nếu có một trong các ống thử có biểu hiện nhiễm trùng thì phải tiến hành nhuộm và soi kính để xác định loại vi khuẩn, đồng thời kiểm tra lại lần 2 với số mẫu như trên. Nếu lần 2 âm tính thì mẫu được coi là âm tính.
- Nếu lần 2 cũng dương tính và cùng loại tạp khuẩn như lần 1 thì mẫu đó được coi là dương tính. Loại vacxin hay lô có mẫu kiểm tra phải loại bỏ.
- Nếu lần 2 dương tính nhưng với loại tạp khuẩn khác thì phải tiến hành thêm lần 3 với cách thức như trên.

\* Xác định virus ngoại lai: Tùy theo yêu cầu kiểm tra loại virus ngoại lai, dựa vào đặc tính của virus mà lựa chọn những phương pháp thích hợp.

Ví dụ: Với virus gây ngưng kết hồng cầu có thể kiểm tra bằng phản ứng HA.

Virus gây bệnh Leucosis, viêm màng não, SV<sub>40</sub>... có thể sử dụng PCR, các phản ứng

huyết thanh học như ELISA, miễn dịch huỳnh quang, thậm chí có thể gây nhiễm trên tế bào hoặc qua phôi trứng.

Những biện pháp trên cũng có thể áp dụng để kiểm tra các loại vaccine vô hoạt ở góc độ: quá trình vô hoạt đã triệt để hay chưa.

#### ②. Kiểm tra độ an toàn

An toàn là chỉ tiêu quan trọng của một loại vaccine. Một vaccine khi sử dụng phòng bệnh cho động vật phải đạt được chỉ tiêu này.

Độ an toàn thực chất của một vaccine phải được chứng minh sớm trong giai đoạn hình thành sản phẩm và sau khi sản xuất.

Xác định chỉ tiêu an toàn phải được tiến hành qua nhiều bước thử trong phòng thí nghiệm, trên thực địa, ở quy mô nhỏ và đại trà.

##### \* Kiểm tra khả năng tăng độc lực: Yêu cầu này được thực hiện với các loại vaccine sống.

Khi sử dụng vaccine sống tiêm cho vật chủ, các vi sinh vật có thể từ đó lây lan sang những động vật tiếp xúc với nó và có thể gây thành bệnh nếu như vi sinh vật vẫn còn độc lực hoặc trở nên có độc lực trở lại. Do vậy, tất cả các loại vaccine nhược độc cần phải kiểm tra độc lực bằng phương pháp tiêm truyền. Vi sinh vật trong vaccine được cấy chuyển *in vivo* bằng cách gây nhiễm vaccine cho một nhóm động vật cảm thụ với giống gốc luôn dùng đường mắc bệnh tự nhiên với loài động vật đó. Sau đó, vi sinh vật vaccine được thu nhận lại từ mô bào hay chất bài tiết của động vật đã gây nhiễm trên được dùng để gây nhiễm cho nhóm động vật khác. Sau không ít hơn 5 lần cấy chuyển như vậy, chủng vi sinh vật được phân lập lại và được kiểm tra đầy đủ các đặc tính sinh học và độc lực như phương pháp kiểm tra giống gốc.

Vi sinh vật vaccine phải có độc lực giảm và ổn định có thể chấp nhận được sau khi cấy chuyển theo cách này.

##### \* Kiểm tra nguy cơ với môi trường:

Vaccine sống có thể bài thải, làm lây lan cho động vật mẫn cảm hoặc không mẫn cảm và gây hại cho môi trường. Vì thế cần tiến hành kiểm tra nguy cơ ô nhiễm vi sinh vật vaccine (nếu có) để khi sử dụng vaccine cần có những biện pháp khống chế.

Ví dụ: Vaccine nhược độc nha bào nhiệt thán khi tiêm phải hạn chế rọi rót ra bên ngoài, bơm tiêm và lọ vaccine dùng xong phải tiêu độc...

##### \* Kiểm tra tính an toàn của vaccine trước khi sử dụng cho động vật:

Các kiểm tra an toàn với một lô sản phẩm vaccine thường được tiến hành bằng cách tiêm cho động vật thí nghiệm (chuột nhắt, chuột lang, mèo, chó, lợn, gia cầm) hoặc cho bản động vật tùy theo quy trình chỉ dẫn.

Việc kiểm tra này được thực hiện theo các bước:

- Trong phòng thí nghiệm: Nguyên tắc chung, tất cả các loại vaccine đều yêu cầu các thử nghiệm sử dụng quá liều: gấp 10 lần đối với vaccine sống và gấp 2 lần với vaccine vô hoạt.

- Trong điều kiện không thực hiện được có thể nhận kết quả của các thí nghiệm kiểm tra hiệu lực, khi dùng vật chủ để kiểm tra hiệu lực của vaccine trong phòng thí nghiệm, độ an toàn có thể được xác định dựa vào các quan sát hàng ngày của động vật sau khi được tiêm vaccine trong suốt giai đoạn trước khi công cường độc.

##### ❖ Nội dung tiến hành:

Pha vaccine với liều đã hướng dẫn trong quy trình kiểm nghiệm, tiêm cho động vật thí nghiệm với các lô đã được bố trí theo các liều thử khác nhau, sau đó theo dõi một thời gian đã được quy định.

##### ❖ Nội dung theo dõi gồm:

- Phản ứng toàn thân: sốt, kém ăn, bỏ ăn, sốc vaccine tức thì, các phản ứng phụ khác...
- Phản ứng cục bộ: viêm, sưng.

Tính tỷ lệ phản ứng của mỗi nội dung theo dõi, ghi chép đánh giá kết quả.

- Thủ nghiệm lâm sàng: tất cả các vacxin dùng cho động vật nên được kiểm tra an toàn, nếu có thể trên lâm sàng (thực tế sản xuất) trước khi được cấp giấy chứng nhận cho phép sử dụng chính thức.

Trong điều kiện thực tế, vừa xác định các phản ứng không mong muốn bao gồm cả tỷ lệ chết mà những vấn đề này không thể quan sát được trong quá trình sản xuất. Các thí nghiệm được thực hiện trên bản động vật, ở các vùng địa lý khác nhau và với một số lượng lớn động vật mẫn cảm. Động vật thí nghiệm cần đại diện cho mọi lứa tuổi, loại hình chăn nuôi. Thí nghiệm cần được tiến hành với nhiều lô vacxin trong các mẻ sản xuất.

Phương pháp tiến hành là sử dụng vacxin theo liều lượng chỉ dẫn và theo dõi các phản ứng nếu có.

Hoàn thiện quy trình về phương pháp quan sát và ghi chép thí nghiệm. Vacxin được coi là an toàn khi không có hoặc có ít các phản ứng sau khi sử dụng. Các phản ứng này ở trong mức độ cho phép.

### ③. Kiểm tra hiệu lực

Kiểm tra hiệu lực của vacxin là yêu cầu cần thiết đối với mỗi lô sản xuất.

Có nhiều phương pháp kiểm tra, nhưng hiệu lực của vacxin dùng trong thú y nên được chứng minh bằng phương pháp công cường độc trên bản động vật, với những con ở lứa tuổi mẫn cảm nhất, thực hiện dưới những điều kiện tiêu chuẩn và trên những động vật có huyết thanh âm tính.

Trong trường hợp có các phương pháp thử khác thay thế có giá trị tin tưởng, người ta sẽ hạn chế sử dụng phương pháp công cường độc. Vì vậy, việc áp dụng các nguyên lý thay thế, giảm hoặc chọn lọc các kiểm tra trên động vật (nguyên lý 3R - Replace, Reduce và Refine animal test) được khuyến khích sử dụng nếu có thể được.

#### ❖ Phương pháp công cường độc

Để thực hiện phương pháp này, người ta cần phải có giống vi sinh vật cường độc tiêu chuẩn có các chỉ số sinh học ổn định, đặc biệt là chỉ số LD<sub>50</sub> với bản động vật và động vật thí nghiệm thay thế.

Tiến hành gây miễn dịch cho nhóm động vật thí nghiệm bằng liều vacxin sử dụng khi có miễn dịch chắc chắn (khoảng 2 - 3 tuần) tiến hành gây nhiễm giống cường độc tiêu chuẩn với liều chí tử (thường là 100 LD<sub>50</sub> - 1.000 LD<sub>50</sub>), có bố trí lô động vật đối chứng không được tiêm vacxin.

Tiêu chuẩn của động vật thí nghiệm trong thử thách cường độc là khoẻ mạnh, có phản ứng huyết thanh âm tính với loại vi sinh vật có trong vacxin đem thử.

Theo dõi những biểu hiện lâm sàng và tỷ lệ chết của cả 2 lô thí nghiệm và đối chứng.

Thí nghiệm đạt được khi ở lô đối chứng động vật mang thử chết 100% với triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh. Tính tỷ lệ phân trăm sống sót ở lô thí nghiệm, tỷ lệ này phải đạt ít nhất 80% thì lô vacxin mới đạt được chỉ tiêu hiệu lực. Dĩ nhiên, tỷ lệ này càng cao càng tốt.

Cũng có thể tiến hành thí nghiệm trên thực địa bằng cách tiêm vacxin với liều sử dụng cho một quần thể động vật ngoài thực địa, sau một thời gian khi miễn dịch được thành lập chắc chắn, bắt ngẫu nhiên một lượng cá thể đủ lớn rồi tiến hành thử thách cường độc, xác định tỷ lệ bảo hộ.

Cần chú ý rằng: việc tiến hành công cường độc phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm chuyên biệt để kiểm nghiệm vacxin động vật, phải đảm bảo độ an toàn sinh học tuyệt đối, có nghĩa là khi tiến hành công cường độc, các vi sinh vật cường độc không được gây ô nhiễm ra môi trường bên ngoài.

#### ❖ Các phương pháp thử hiệu lực thay thế

### **❶ Phương pháp thử hiệu lực lâm sàng**

Phương pháp này có thể sử dụng để thiết lập hiệu lực khi các nghiên cứu công cường độc không thể thực hiện được.

Người ta sử dụng vacxin cho một quần thể động vật trên thực địa, đan xen với các quần thể động vật khác không được sử dụng vacxin và trong vùng địa lý đang có dịch lưu hành. Theo dõi khả năng miễn dịch ở quần thể đã sử dụng vacxin.

Tuy nhiên, khó có thể nhận được các thông số rõ ràng để chứng minh hiệu lực vacxin trong trường hợp này bởi vì quy trình thử nghiệm lâm sàng rất phức tạp, dù cho có một thiết kế thí nghiệm phù hợp nhưng cũng khó kết luận do các ảnh hưởng phụ không mong muốn như: khả năng chống chịu của các cá thể khác nhau rất lớn, khả năng mắc bệnh thấp ở đàn không sử dụng vacxin hoặc có những nguyên nhân khác cũng gây ra bệnh tương tự.

Do đó, ở một số loại vacxin, yêu cầu xác định hiệu lực bằng cả hai phương pháp: thử nghiệm hiệu lực trong phòng thí nghiệm và thử nghiệm lâm sàng.

### **❷ Định lượng kháng nguyên**

Với một số loại vacxin, việc đánh giá hiệu lực có thể được thực hiện bằng phương pháp định lượng kháng nguyên.

❖ VỚI vacxin vi khuẩn, tiến hành đếm số lượng vi khuẩn. Số lượng vi khuẩn đếm được trong 1 đơn vị dung tích của vacxin (ml) phải đủ lớn để có thể gây miễn dịch bảo hộ và trong bất cứ khoảng thời gian nào trước khi hết hạn sử dụng thì số lượng vi khuẩn đếm được phải bằng hoặc lớn hơn số lượng vi khuẩn tối thiểu đủ khả năng gây miễn dịch.

Ví dụ: trong vacxin tụ huyết trùng lợn vô hoạt, 1ml vacxin có chứa ít nhất  $10^{10}$  tế bào vi khuẩn.

Vacxin phó thương hàn lợn vô hoạt có 10 tỷ vi khuẩn/ml.

Vacxin phó thương hàn lợn nhược độc có 2 - 2,5 tỷ vi khuẩn/ 1 liều dùng.

Vacxin nhược độc nha bào nhiệt thán có 30 triệu nha bào/ml...

❖ VỚI các vacxin virus, người ta tiến hành định lượng theo phương pháp in vitro.

Ví dụ: VỚI các virus nhược độc có khả năng ngưng kết hồng cầu, người ta xác định đậm độ virus trong vacxin thông qua hiệu giá của phản ứng HA.

Vacxin Newcastle hệ II chủng lasota, hiệu giá HA tối thiểu phải đạt 1/64 (6log2), còn vacxin hệ I, hiệu giá này là 1/32 (5log2).

### **❸ Định lượng kháng thể trong huyết thanh**

Tiêm vacxin cho động vật thí nghiệm, tại thời điểm có miễn dịch chắc chắn, tiến hành lấy mẫu huyết thanh để định lượng kháng thể. Thông qua chỉ số trung hoà (NI) hoặc hiệu giá của phản ứng HI (với virus gây ngưng kết hồng cầu) để đánh giá hiệu lực của vacxin.

## **2.3. Các kiểm tra khác**

Tùy theo loại vacxin được sản xuất, một số kiểm tra nhất định cần được thực hiện. Các kiểm tra này có thể bao gồm:

Độ ẩm trong vacxin đông khô.

Mức độ chất không hoạt động còn lại trong sản phẩm vô hoạt.

Độ pH.

Mức độ chất bảo quản và lượng kháng sinh tối đa cho phép.

Độ ổn định về tính chất vật lý của chất bổ trợ.

Mức chân không trong vacxin đông khô.

Thành phẩm vacxin trước khi xuất xưởng phải được bao gói hoặc đóng trong hộp carton để tránh sụp và đập trong quá trình vận chuyển phân phối.

Các loại vacxin đều được dán nhãn rõ ràng. Tuy nhiên, tất cả chỉ dẫn và khẳng định trên nhãn phải được xác nhận của cơ quan quốc gia có thẩm quyền.

Tất cả các nhãn vacxin thú y phải không thấm nước và phải chứa đựng đầy đủ các thông tin cần thiết, dù cho vacxin được chứa trong các ampoul nhỏ.

Trên hộp carton hoặc bao gói bên ngoài sản phẩm vacxin cũng phải có nhãn ghi vấn tắt các thông tin nổi bật. *Yêu cầu nhãn vacxin phải có:*

1. Tên chính xác của vacxin, các chữ cái nổi bật nhấn mạnh giống nhau của một từ.
2. Tên và địa chỉ của nhà sản xuất (ghi cả nhà nhập khẩu cho những vacxin nhập khẩu).
3. Nhiệt độ bảo quản.
4. Dòng khuyến cáo “chỉ dùng cho thú y (hoặc động vật)”.
5. Hướng dẫn cách sử dụng đầy đủ bao gồm tất cả các cảnh báo cần thiết.
6. Với những động vật cung cấp thực phẩm, cần có cảnh báo thời gian không dùng vacxin trước khi giết mổ trong một khoảng thời gian nhất định, điều này tùy thuộc vào loại vacxin chứ không là điều kiện bắt buộc với tất cả.
7. Thời hạn sử dụng.
8. Số lô sản xuất.
9. Số chứng nhận (cấp phép) của sản phẩm, một số quốc gia thay vào đó là số giấy phép hay số đăng ký của nhà sản xuất.
10. Số liều.
11. Khuyến cáo nên dùng toàn bộ sau khi đã mở lọ vacxin hoặc thời gian bảo quản vacxin sau khi mở thích ứng với từng loại, phương pháp xử lý thích hợp với phần vacxin thừa.
12. Cảnh báo an toàn phù hợp cho người sử dụng.  
Ví dụ: Vô tình tiêm vào tay thì phải làm gì?
13. Khi bổ sung kháng sinh trong quá trình sản xuất, cần khuyến cáo “có sử dụng kháng sinh (tên cụ thể) để bảo quản”.
14. Nhãn sản phẩm cũng phải bao gồm các khuyến cáo chính xác khác. Nhất là những lưu ý đặc biệt (nếu có) trong việc sử dụng và bảo quản vacxin.
15. Những thông tin tương tự cũng nên ghi vào tờ rơi giới thiệu, sản phẩm được gửi kèm theo gói sản phẩm. Tờ giới thiệu này có thể ghi chi tiết hơn về cách sử dụng và các phản ứng phụ gây hại của vacxin.

### **III. MỘT SỐ QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VACXIN TẠI VIỆT NAM**

#### **3.1. Quy trình kiểm nghiệm một số vacxin vi khuẩn**

##### **3.1.1. Quy trình kiểm nghiệm vacxin tụ huyết trùng lợn vô hoạt**

###### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Qui trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin vô hoạt được chế tạo từ các chủng vi khuẩn *Pasteurella multocida suisceptica*. Vacxin có chất bổ trợ, dạng lỏng.

①. *Mẫu:* Theo 10 TCN 160 - 92 “Vacxin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm”.

②. *Kiểm tra vô trùng:* Theo 10 TCN 161 - 92 “Vacxin thú y - Quy trình kiểm tra thuần khiết”.

③. *Kiểm tra an toàn:*

###### *a. Phương pháp trọng tài:*

Tiêm dưới da cho 2 lợn khoẻ, thể trọng 20 - 30kg, mỗi con 2 liều vacxin ghi trên nhãn. Sau 10 ngày theo dõi, toàn bộ động vật phải sống khoẻ.

###### *b. Phương pháp thay thế:*

Tiêm vacxin vào dưới da cho động vật thí nghiệm như sau:

- 2 thỏ, thể trọng 1,5 - 2kg/con, mỗi con 1 liều vacxin
- 2 chuột lang, thể trọng 300 - 400g/con, mỗi con 1 liều vacxin
- 5 chuột nhắt trắng, thể trọng 18 - 20g/con, mỗi con 0,5ml vacxin.

Toàn bộ động vật phải sống khoẻ sau 10 ngày theo dõi.

④. Kiểm tra hiệu lực:

a. Phương pháp trọng tài (dùng lợn):

Tiêm miễn dịch cho 5 lợn khoẻ mạnh (20 - 30kg/con), mỗi con một liều vacxin ghi trên nhãn (1 liều chứa ít nhất  $7 \times 10^9$ CFU). Sau 14 - 21 ngày, các lợn đã được gây miễn dịch cùng với 3 lợn đối chứng được thử thách với một chủng cường độc *P.multocida* tương ứng mỗi con 1 MLD của lợn vào dưới da. Theo dõi 7 ngày, lô vacxin được coi là đạt tiêu chuẩn nếu:

- Lợn đối chứng chết hết, lợn miễn dịch sống ít nhất 3 con hoặc
- Lợn đối chứng chết 2 con, lợn miễn dịch sống cả 5 con.

b. Phương pháp thay thế:

Dùng một trong các phương pháp sau:

- Chọn 4 thỏ khoẻ, thể trọng 1,5 - 2kg/con, mỗi con được tiêm 1/2 liều vacxin vào dưới da. Mũi thứ hai được tiêm sau mũi một 7 ngày với cùng 1 liều lượng và đường tiêm. Sau lần miễn dịch thứ hai 14 ngày, 4 thỏ miễn dịch cùng 2 thỏ đối chứng cùng trọng lượng được thử thách với một chủng cường độc *P.multocida* tương ứng liều 10 - 20LD<sub>50</sub> của chuột nhắt trắng. Liều LD<sub>50</sub> phải được xác định trong từng lô kiểm nghiệm. Động vật được theo dõi 7 ngày. Lô vacxin được coi là đạt nếu thỏ miễn dịch sống ít nhất 50% và thỏ đối chứng chết 100%.
- Chọn 100 chuột nhắt trắng thể trọng 18 - 20g/con, được chia làm 2 lô, mỗi lô 50 con:
  - Tiêm miễn dịch cho 50 chuột vào dưới da, mỗi con 1/5 liều vacxin ghi trên nhãn. Mũi thứ hai được tiêm sau mũi một 7 ngày với cùng 1 liều lượng và đường tiêm.
  - Mười bốn ngày sau khi tiêm lần hai, 50 chuột đã được miễn dịch cùng với 50 chuột đối chứng được thử thách với 0,1ml canh trùng cường độc *P.multocida* tương ứng pha loãng từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-10}$ .
  - Theo dõi trong 7 ngày, ghi chép số động vật chết.
  - Tính giá trị LD<sub>50</sub> của từng lô theo phương pháp Reed - Muench. Lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu giá trị LD<sub>50</sub> của hai lô khác nhau 4lg. Phương pháp tính toán như sau:

\* Phương pháp tiêm cường độc cho chuột với *P.multocida*:

Độ pha loãng canh trùng	Chuột miễn dịch	Chuột đối chứng
$10^{-1}$	5	5
$10^{-2}$	5	5
$10^{-3}$	5	5
$10^{-4}$	5	5
$10^{-5}$	5	5
$10^{-6}$	5	5
$10^{-7}$	5	5
$10^{-8}$	5	5
$10^{-9}$	5	5
$10^{-10}$	5	5

Chỉ số LD<sub>50</sub> được tính theo công thức của Reed - Muench:

$$Lg LD_{50} = lgA + X lgf$$

$$X = \frac{A' - 50}{A' - B'}$$

Trong đó:

X: khoảng cách cân đối

A: độ pha loãng virus gây chết cận trên 50%

A': tỷ lệ % chuột chết cận trên 50%

B': tỷ lệ chuột chết cận dưới 50%

f: bậc pha loãng của virus  $1/10 (10^{-1})$

Đánh giá hiệu lực bằng chỉ số

$$\lg PD_{50} = \frac{\lg LD_{50} \text{ miễn dịch}}{\lg LD_{50} \text{ đối chứng}} \geq 4$$

➤ Lô vaccine mẫu và lô vaccine chuẩn được pha loãng theo cấp số 5 (1/5; 1/25; 1/125). Miễn dịch cho 3 nhóm chuột nhắt trắng (18 - 20g/con), mỗi nhóm ít nhất 10 chuột, mỗi con 1/5 liều ghi trên nhãn ở mỗi độ pha loãng vào dưới da.

Miễn dịch lần hai sau 7 ngày, tiến hành làm giống lần một. 21 ngày sau lần tiêm đầu, toàn bộ chuột được thử thách với một chủng cường độc *P.multocida* tương ứng liều 10 - 20 LD<sub>50</sub>.

Theo dõi động vật trong 7 - 10 ngày. Vaccine đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu có chỉ số hiệu lực quan hệ lớn hơn hoặc bằng 0,5.

\* Phương pháp chuẩn bị lô vaccine và tính toán như sau:

➤ Chuẩn bị lô vaccine chuẩn:

Vaccine chuẩn có độ pha loãng thấp nhất bảo hộ lớn hơn hoặc bằng 50% số động vật thí nghiệm và độ pha loãng cao nhất bảo hộ dưới 50% động vật thí nghiệm trong điều kiện đã được kiểm chứng trên động vật đích.

➤ Phương pháp tính liều bảo hộ:

$$\lg PD_{50} = L - d (s - 0,5)$$

Trong đó:

L: logarit của độ pha loãng đậm nhất đã thử

d: hệ số pha loãng

s: tổng các tỉ lệ sống (thập phân)

➤ Chỉ số bảo hộ:

$$Rp = \frac{1/PD_{50} \text{ mẫu}}{1/PD_{50} \text{ chuẩn}}$$

- CFU: Colony Form Unit - Đơn vị khuẩn lạc

- lg: logarit cơ số 10

- LD<sub>50</sub>: Lethal Dose 50% - Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm

- MLD: Minimum Lethal Dose - Liều nhỏ nhất gây chết hết động vật thí nghiệm.

- PD<sub>50</sub>: Protective dose 50%: Liều bảo hộ 50% động vật thí nghiệm.

### 3.1.2 Quy trình kiểm nghiệm vaccine đóng dấu lợn nhược độc chủng VR2

❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vaccine chế tạo từ chủng đóng dấu lợn nhược độc VR2 có chất bồi trợ là thạch, dạng lỏng.

①. Mẫu: theo 10 TCN 160 - 92

②. Kiểm tra thuần khiết: theo 10 TCN 161 - 92

③. Kiểm tra an toàn:

➤ Phương pháp trọng tài: Tiêm dưới da cho hai lợn mẫn cảm (20 - 30 kg), mỗi con 20 liều vaccine sử dụng. Sau khi tiêm lợn có thể có phản ứng toàn thân (thân nhiệt tăng 1 - 2°C, kém ăn 1 đến 2 ngày rồi trở lại bình thường). Cả hai lợn phải sống khoẻ trong 10 ngày theo dõi.

➤ Phương pháp thay thế: Tiêm dưới da cho 5 chuột nhắt trắng (16 - 20g), mỗi con 1/4 liều sử dụng. Tất cả chuột phải sống khoẻ trong thời gian 14 ngày theo dõi.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

➤ Phương pháp trọng tài: Tiêm cho 5 lợn (20 - 30kg) mỗi con một liều sử dụng. Sau 10 - 20 ngày các lợn đã gây miễn dịch cùng với 5 lợn đối chứng được thử thách với vi khuẩn đóng dấu lợn cường độc mỗi con 1MLD vào tĩnh mạch. Theo dõi trong 10 ngày, lô vaccine đạt tiêu chuẩn nếu: lợn đối chứng có 4 con mắc bệnh đóng dấu (ủ rũ, bỏ ăn, sốt 41 - 42°C, viêm khớp, nổi đậu) trong đó ít nhất 2 con chết, lợn miễn dịch được phép có 1 con phát bệnh và cả 5 lợn đều phải sống.

➤ Phương pháp thay thế: Tiêm dưới da cho một số chuột nhắt trắng, mỗi con 1/10 liều vaccine sử dụng. Sau 10 - 20 ngày, 12 chuột miễn dịch cùng với 6 chuột đối chứng được thử thách với vi khuẩn đóng dấu lợn cường độc vào dưới da. Liều 1000 MLD cho mỗi chuột miễn dịch, liều 10 MLD cho mỗi chuột đối chứng. Lô vaccine đạt tiêu chuẩn nếu chuột đối chứng chết hết, chuột miễn dịch sống ít nhất 9 con trong thời gian 10 ngày theo dõi.

**3.1.3. Quy trình kiểm nghiệm vaccine kép tụ huyết trùng và đóng dấu lợn nhược độc**

❖ *Phạm vi áp dụng:*

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vaccine kép nhược độc chế tạo từ chủng vi khuẩn tụ huyết trùng AvPs 3 và chủng đóng dấu lợn VR2, vaccine có chất phụ gia là thạch, dạng lỏng.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn:*

➤ Phương pháp trọng tài: Tiêm dưới da cho hai lợn mẫn cảm (20 - 30 kg), mỗi con 10 liều vaccine sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày, lợn có thể có phản ứng nhẹ (thân nhiệt tăng 1 - 2°C, kém ăn 1 - 2 ngày rồi trở lại bình thường). Cả hai lợn phải sống khoẻ.

➤ Phương pháp thay thế: Tiêm dưới da cho 2 thỏ (1,5 - 2kg) mỗi con 2 liều vaccine sử dụng và 5 chuột nhắt trắng (18 - 20g) mỗi con 1/5 liều sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày đối với thỏ và 4 ngày đối với chuột. Tất cả động vật phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

❖ *Phương pháp trọng tài:*

①. *Đối với thành phần tụ huyết trùng:*

- Gây miễn dịch bằng cách tiêm vaccine cho 5 lợn (20 - 30kg) mỗi con một liều quy định. Sau 10 - 20 ngày, lợn miễn dịch đối với 3 lợn đối chứng được thử thách với vi khuẩn Tụ huyết trùng lợn cường độc, 1 MLD vào dưới da. Theo dõi trong 10 ngày, vaccine được xem là đạt tiêu chuẩn với thành phần tụ huyết trùng nếu:

- Lợn đối chứng chết hết, lợn miễn dịch sống ít nhất 3 con hoặc lợn đối chứng chết 2, lợn miễn dịch sống cả 5 con.

②. *Đối với thành phần đóng dấu:*

Gây miễn dịch bằng cách tiêm vaccine cho 5 lợn (20 - 30kg) mỗi con một liều quy định. Sau 10 - 20 ngày, lợn miễn dịch cùng với 5 lợn đối chứng được thử thách với vi khuẩn đóng dấu lợn cường độc, liều 1MLD vào tĩnh mạch. Theo dõi trong 10 ngày. Vaccine đạt tiêu chuẩn nếu lợn miễn dịch sống cả (cho phép có 1 lợn phát bệnh nhưng vẫn sống). Lợn đối chứng phát bệnh ít nhất 4 con trong đó có 2 con chết vì đóng dấu lợn.

❖ *Phương pháp thay thế:*

## ❶ Đối với thành phần tụ huyết trùng:

Gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da cho một số chuột nhắt trắng (16 - 18g) mỗi con 1/10 liều vaccine quy định. Sau 10 - 20 ngày, 10 chuột miễn dịch cùng với 5 chuột đối chứng được thử thách với vi khuẩn tụ huyết trùng lợn cường độc, liều 1MLD vào dưới da. Theo dõi trong 10 ngày, vaccine được xem là đạt tiêu chuẩn đối với thành phần Tụ huyết trùng nếu:

- Chuột đối chứng chết hết, chuột miễn dịch sống không ít hơn 5 con.
- Hoặc chuột đối chứng chết 4, chuột miễn dịch sống không ít hơn 7 con.

## ❷ Đối với thành phần đóng dấu:

Gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da cho một số chuột nhắt trắng (16 - 18g) mỗi con 1/10 liều vaccine qui định. Sau 10 - 20 ngày, 12 chuột miễn dịch cùng với 6 chuột đối chứng được thử thách với vi khuẩn đóng dấu lợn cường độc, liều 1000 MLD cho chuột miễn dịch và 10 MLD cho chuột đối chứng vào dưới da. Theo dõi trong 10 ngày, vaccine được xem là đạt tiêu chuẩn đối với thành phần đóng dấu nếu chuột đối chứng chết hết, chuột miễn dịch sống ít nhất 9 con

### 3.1.4. Quy trình kiểm nghiệm vaccine phó thương hàn lợn vô hoạt.

#### ❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vaccine vô hoạt chế từ các chủng vi khuẩn *Salmonella cholera suis*, có hoặc không có chất bổ trợ, dạng lỏng.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn*:

Phương pháp trọng tài: Tiêm dưới da cho 3 lợn mới cai sữa, mỗi con 1 liều vaccine sử dụng. Theo dõi trong 21 ngày, lợn có thể có phản ứng nhẹ (kém ăn, nơi tiêm hơi sưng) nhưng sau 2 - 3 ngày phải trở lại bình thường. Không được có các triệu chứng nặng khác (ia chảy, sốt, kéo dài, gầy yếu).

Phương pháp thay thế:

Tiêm dưới da cho 3 chuột lang (250 - 400g) mỗi con 3/5 liều vaccine sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày, động vật phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực*:

Dùng 1 trong 2 phương pháp sau:

#### ❖ Phương pháp dùng chuột lang:

Gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da cho 5 chuột lang (250 - 400g) mỗi con 1/5 liều vaccine sử dụng. Sau 7 ngày chuột được miễn dịch lần thứ 2 với liều vaccine như lần 1. Sau 14 ngày kể từ lần tiêm thứ 2, chuột miễn dịch cùng với 2 chuột đối chứng được thử thách với chủng vi khuẩn cường độc phó thương hàn lợn tương ứng, liều 1 MLD vào dưới da. Theo dõi trong 3 tuần chuột đối chứng phải chết hết trong khi chuột miễn dịch sống ít nhất 3 con.

#### ❖ Phương pháp dùng bồ câu:

Gây miễn dịch bằng cách tiêm bắp thịt cho 5 bồ câu (250 - 350g) mỗi con 1/5 liều vaccine sử dụng. Sau 14 - 21 ngày, bồ câu được miễn dịch cùng với 2 bồ câu đối chứng được thử thách với chủng vi khuẩn cường độc phó thương hàn lợn tương ứng, liều 1 MLD vào bắp thịt. Theo dõi trong 21 ngày, bồ câu đối chứng chết hết trong khi miễn dịch sống ít nhất 3 con.

### 3.1.5. Quy trình kiểm nghiệm vaccine phòng bệnh *E.coli* ở lợn

#### ❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vaccine vô hoạt được chế tạo từ các chủng *Escherichia coli*. Vaccine có chất bổ trợ, dạng lỏng.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm".

②. *Kiểm tra vô trùng*: theo 10 TCN 161 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình kiểm tra vô trùng".

③. *Kiểm tra an toàn*:

➤ Vacxin phải được kiểm tra an toàn trên động vật chủ:

Ít nhất 2 lợn khỏe mạnh trọng lượng 25 - 30kg/con được tiêm 2 liều vacxin theo đường tiêm ghi trên nhãn. Lợn được theo dõi ít nhất 7 ngày, không được có bất cứ phản ứng bất thường nào ở vị trí tiêm hoặc triệu chứng lâm sàng của bệnh do vacxin gây ra.

➤ Phương pháp thay thế:

Sử dụng một trong hai phương pháp sau:

+ Chọn ít nhất 5 chuột nhắt trắng trọng lượng 18 - 20g/con, mỗi con được tiêm vào xoang bụng hoặc dưới da 0,5ml vacxin. Tất cả chuột phải hoàn toàn khỏe mạnh sau thời gian 7 ngày theo dõi.

+ Chọn ít nhất 2 chuột lang trọng lượng 300 - 400 g/con, mỗi con được tiêm 2 liều vacxin vào xoang bụng. Tất cả chuột đều phải hoàn toàn khỏe mạnh sau thời gian 7 ngày theo dõi.

④. *Hiệu lực*:

Vacxin được kiểm tra hiệu lực bằng một trong các cách sau đây:

➤ *Cách 1*:

- Chọn 5 chuột lang trọng lượng 300 - 400g/con được tiêm 1/2 liều vacxin qui định (1ml vacxin phải có  $n \times 10^9$  CFU trong đó: n: Số kháng nguyên trong vacxin, (CFU: Colony Form Unit)<sup>1</sup> vào bắp thịt.

- Sau 14 ngày gây miễn dịch lần 2 cùng liều lượng và đường tiêm, 14 ngày sau lần miễn dịch lần 2, lấy máu làm phản ứng ngưng kết chậm trong ống nghiệm với kháng nguyên K nhuộm màu TTC 4% (Triphenyl Tetraosolum Chloride) của các chủng có trong vacxin. Huyết thanh đối chứng được lấy trước khi miễn dịch.

- Huyết thanh pha loãng theo cấp số 2 hoặc pha loãng gấp 2 lần. Vacxin đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu huyết thanh của ít nhất 3/5 chuột lang miễn dịch có hiệu giá ngưng kết với kháng nguyên K của chủng E.coli có trong vacxin tăng ít nhất 4 lần so với huyết thanh đối chứng.

➤ *Cách 2*:

- Chọn 30 chuột bạch trọng lượng 18 - 20g/con được chia làm 2 lô:

Lô 1: gồm 10 con được lấy máu ngay, chắt huyết thanh làm đối chứng.

Lô 2: gồm 20 con được miễn dịch lần 1 với liều 1/10 liều vacxin quy định vào dưới da.

- Sau 21 ngày lấy máu 1/2 số chuột và miễn dịch lần 2 cho 1/2 số chuột còn lại. Nếu chuột miễn dịch lần 1 cho hiệu giá kháng thể của lô vacxin tăng gấp 4 lần so với đối chứng thì không cần phải chờ kết quả của miễn dịch lần 2.

- Nếu miễn dịch lần 1 không đạt thì sau khi miễn dịch lần thứ hai 14 ngày lấy máu chuột làm phản ứng ngưng kết chậm.

- Vacxin đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu huyết thanh tập trung của 10 chuột bạch có hiệu giá ngưng kết với kháng nguyên K của các chủng E.coli có trong vacxin tăng ít nhất 4 lần so với huyết thanh đối chứng.

<sup>1</sup> CFU: Colony Form Unit - Đơn vị khuẩn lạc

### **3.1.6. Quy trình kiểm nghiệm vacxin nhiệt thán nha bào nhược độc**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ chủng nhiệt thán nha bào nhược độc không sinh giáp mô, vacxin có hoặc không có chất bổ trợ, dạng lỏng hoặc đông khô.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

Ngoài những kiểm tra theo 10 TCN 161 - 92 phải tiến hành kiểm tra di động. Không được có vi sinh vật di động.

③. *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm dưới da cho 2 dê hoặc cừu mẫn cảm (1 năm tuổi), mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày động vật phải sống khoẻ. Có thể có phản ứng phù nề ở nơi tiêm nhưng không được có triệu chứng hoại tử phát triển.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm dưới da cho 10 chuột lang mẫn cảm (300 - 500g), mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Sau 3 tuần nếu chuột miễn dịch sống 80% trở lên (ít hơn phải làm lại) thì chúng được thử thách với chủng nhiệt thán cường độc tương ứng (17 JB) cùng với 3 chuột đối chứng. Liều 100 MLD cho chuột miễn dịch, 10 MLD cho chuột đối chứng. Theo dõi trong 10 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: Chuột đối chứng chết hết, chuột miễn dịch sống tất cả. Nếu có chuột miễn dịch chết thì phải làm lại.

### **3.1.7. Quy trình kiểm nghiệm vacxin *Leptospira***

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin vô hoạt được chế tạo từ các chủng vi khuẩn *Leptospira*. Vacxin dạng lỏng.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

Ngoài những kiểm tra theo 10 TCN 161 - 92 phải tiến hành kiểm tra trên môi trường chuyên dụng (Terskith): Cấy vacxin vào môi trường theo tỷ lệ 1/10 giữ ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 2 tuần. Không được có vi khuẩn *Leptospira* mọc trong thời gian được theo dõi (nên có một ống môi trường chuyên dụng cấy vi khuẩn *Leptospira* làm đối chứng).

③. *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm dưới da cho 2 chuột lang (250 - 350g) mỗi con một liều vacxin sử dụng và 3 chuột nhắt trắng (18 - 20g) mỗi con 1/6 liều sử dụng (liều miễn dịch lần đầu cho bản động vật). Theo dõi trong 10 ngày, tất cả động vật phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da cho 4 thỏ mẫn cảm (2,0 - 2,5kg) mỗi con 1 liều vacxin qui định 2 lần cho bản động vật. Sau 7 ngày thỏ được miễn dịch tiếp, mỗi con 1 liều vacxin qui định 2 lần cho bản động vật. Sau 3 tuần kể từ lần tiêm đầu hiệu lực của vacxin được đánh giá bằng một trong hai phương pháp sau:

#### **➤ Phản ứng vi ngưng kết:**

Bốn mẫu huyết thanh của 4 thỏ miễn dịch cùng với 2 mẫu huyết thanh của hai thỏ đối chứng không tiêm vacxin pha loãng 1/50, được kiểm tra qua phản ứng vi ngưng kết trên phiến kính với từng chủng *Leptospira* có trong vacxin. Đọc kết quả sau 20 - 30 phút trên kính tụ quang nền đen:

+ Phải có ít nhất 2 mẫu huyết thanh miễn dịch có phản ứng dương tính với các chủng

*Leptospira* có trong vacxin trong khi các mẫu huyết thanh đối chứng âm tính. Ít nhất 4 chủng *Leptospira* phản ứng dương tính.

+ Vacxin không có hiệu lực đối với những chủng có phản ứng âm tính (không ngưng kết).

➤ Phản ứng trung hoà:

+ Hai thỏ miễn dịch cùng với 2 thỏ đối chứng được tiêm tĩnh mạch mỗi con 3ml canh trùng của tất cả các chủng *Leptospira* có trong vacxin (theo tỷ lệ bằng nhau). Sau 24h và 48h, lấy máu tim từng thỏ cấy kiểm tra trên môi trường chuyên dụng. Giữ ở 28 - 30°C. Theo dõi trong 7 - 14 ngày:

+ Môi trường nuôi cấy máu thỏ miễn dịch không có *Leptospira* mọc trong khi môi trường cấy máu đối chứng có *Leptospira* mọc. Nếu máu thỏ miễn dịch có *Leptospira* mọc thì dùng huyết thanh đơn giá làm phản ứng vi ngưng kết. Vacxin không có hiệu lực đối với những chủng có phản ứng dương tính với huyết thanh đơn giá tương ứng. Không quá 2 chủng có phản ứng dương tính.

### **3.1.8. Quy trình kiểm nghiệm vacxin nhiệt thán nha bào vô độc chủng Trung Quốc**

❖ **Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ chủng Nhiệt thán nha bào vô độc không sinh giáp mô, vacxin có chất bổ trợ glycerin, dạng lỏng.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

Ngoài những kiểm tra theo 10 TCN 161 - 92 phải tiến hành kiểm tra di động. Không được có vi sinh vật di động.

③. *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm dưới da cho 4 thỏ mẫn cảm (1,5 - 2,5 kg), mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Tất cả thỏ phải sống khoẻ trong thời gian 14 ngày theo dõi. Nếu có thỏ chết do vacxin gây ra thì kiểm tra lại lần thứ 2 như sau: Tiêm dưới da cho 4 thỏ (1,5 - 2,5 kg) mỗi con 1/2 liều vacxin sử dụng và 2 bê (1 năm tuổi), mỗi con 1 liều sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày, nếu vẫn có thỏ chết nhưng cả 2 bê đều sống thì vacxin được xem là đạt tiêu chuẩn.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm dưới da cho 4 thỏ (1,5 - 2,5 kg) mỗi con 1/2 liều vacxin sử dụng. Sau 14 ngày, các thỏ đã được gây miễn dịch cùng với 2 thỏ đối chứng được thử thách với vi khuẩn cường độc Nhiệt thán. Mỗi con 100 MLD. Theo dõi trong 14 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: Thỏ đối chứng chết hết, thỏ miễn dịch sống ít nhất 3 con.

### **3.1.9. Quy trình kiểm nghiệm vacxin tụ huyết trùng gà**

❖ **Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin vô hoạt, chế tạo từ các chủng vi khuẩn tụ huyết trùng gà thích hợp. Vacxin có hoặc không có chất bổ trợ, dạng lỏng hoặc đông khô.

① *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm cho 2 gà khoẻ mạnh (1 - 2 kg) mỗi con liều vacxin quy định. Theo dõi trong 10 ngày. Cả 2 gà phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm miễn dịch cho 4 gà (1 - 2 kg), mỗi con một liều vacxin quy định. Sau 21 ngày gà

miễn dịch cùng với gà đồi chứng (cùng nguồn gốc và lứa tuổi) được thử thách với vi khuẩn tụ huyết trùng gà cường độc tương ứng, liều 1 MLD vào dưới da. Theo dõi trong 10 ngày, vaccine được xem là đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu:

- Gà đồi chứng chết hết trong khi gà miễn dịch sống ít nhất 2 con.
- Hoặc gà đồi chứng chết một, gà miễn dịch sống tất cả.

### **3.1.10. Quy trình kiểm nghiệm vaccine tụ huyết trùng trâu bò vô hoạt**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vaccine Tụ huyết trùng trâu bò vô hoạt được chế từ các chủng P. multocida type B (theo phân loại của Carter G.A), dạng lỏng (có chất bổ trợ là phèn chua, keo phèn) hoặc dạng nhũ dầu.

① *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92 "Vaccine thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm".

② *Kiểm tra vô trùng:* theo 10 TCN 161 - 92 "Vaccine thú y - Quy trình kiểm tra vô trùng".

③. *Kiểm tra an toàn:*

#### **➤ Phương pháp trọng tài:**

Chọn 2 bê hoặc nghé 6 - 12 tháng tuổi khỏe mạnh, mẫn cảm (IHA <1/8) được tiêm 2 liều vaccine ghi trên bao nhän vào d<sup>r</sup> ối da (1 liều vaccine chứa 1,5 - 3,0mg vật chất khô hoặc 10 - 30 x 10<sup>9</sup>CFU). Tất cả động vật phải sống khỏe sau 10 ngày theo dõi.

#### **➤ Phương pháp thay thế:**

- Với vaccine dạng lỏng: Chọn 10 chuột nhắt trắng khỏe mạnh 18 - 20g được tiêm 1/4 liều vaccine vào dưới da và 2 thỏ khỏe, thể trọng từ 1,5 - 2kg mỗi con 1 liều vaccine ghi trên nhän vào dưới da.

- Với vaccine dạng nhũ dầu: Chọn 2 thỏ khỏe mạnh, thể trọng từ 1,5 - 2 kg được tiêm 1 liều vaccine ghi trên nhän vào bắp thịt.

Sau 10 ngày theo dõi, động vật phải sống khỏe không có phản ứng toàn thân và loét cục bộ nơi tiêm.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

#### **➤ Phương pháp trọng tài: Kiểm tra hiệu lực trên bản động vật.**

Chọn 3 bê hoặc nghé 6 - 12 tháng tuổi khỏe mạnh, được tiêm 1 liều vaccine ghi trên nhän vào d<sup>r</sup> ối da (nếu là vaccine dạng lỏng) hoặc bắp thịt (nếu là vaccine dạng nhũ dầu). Sau 21 ngày gây miễn dịch, 3 bê hoặc nghé cùng 2 con đồi chứng cùng loài và độ tuổi được thử thách cường độc với liều 10<sup>8</sup> LD<sub>50</sub> của chuột nhắt trắng. Theo dõi động vật 7 - 10 ngày, lô vaccine được coi là đạt tiêu chuẩn nếu động vật đồi chứng chết hết, động vật miễn dịch sống ít nhất 2/3.

#### **➤ Phương pháp thay thế: Kiểm tra hiệu lực trong trường hợp vaccine dạng nhũ dầu.**

Dùng 1 trong 2 phương pháp sau:

##### **a. Kiểm tra hiệu lực trên thỏ:**

Chọn 4 thỏ khỏe mạnh, thể trọng 1,5 - 2kg được tiêm 1/2 liều vaccine ghi trên nhän vào bắp thịt. Sau 21 ngày gây miễn dịch số thỏ trên cùng 2 thỏ đồi chứng khỏe mạnh, cùng trọng lượng được thử thách với 10LD<sub>50</sub> - 20 LD<sub>50</sub> của chuột nhắt trắng vào dưới da. Động vật được theo dõi 7 - 10 ngày, thỏ miễn dịch phải sống ít nhất 50% trong khi thỏ đồi chứng phải chết hết.

##### **b. Kiểm tra hiệu lực gián tiếp qua chuột nhắt trắng:**

Chọn 3 thỏ khỏe mạnh, thể trọng 1,5 - 2 kg được tiêm 1/2 liều vaccine ghi trên nhän vào bắp thịt. Bốn tuần sau khi gây miễn dịch, lấy máu thỏ tập trung huyết thanh lại tiêm vào dưới da cho 20 chuột nhắt trắng, mỗi con 0,5ml. 24 giờ sau khi tiêm huyết thanh, số chuột

trên cùng 10 chuột đồi chứng được thử thách cường độc với chủng *P.multocida* tương ứng liều 100LD<sub>50</sub> của chuột nhắt trắng vào dưới da. Sau 7 - 10 ngày theo dõi, chuột đồi chứng phải chết hết trong khi chuột miễn dịch phải sống ít nhất 80%.

\* *Kiểm tra hiệu lực trong trường hợp vacxin dạng lỏng:*

Dùng một trong hai phương pháp sau:

① *Kiểm tra hiệu lực trên thỏ:*

Chọn 4 thỏ khỏe mạnh, thể trọng 1,5 - 2kg được tiêm 1/4 liều vacxin ghi trên nhãn vào dưới da. Sau 21 ngày gây miễn dịch số thỏ trên cùng 2 thỏ đồi chứng khỏe mạnh, cùng trọng lượng được thử thách với 10 LD<sub>50</sub> - 20 LD<sub>50</sub> của chuột nhắt trắng vào dưới da. Động vật được theo dõi 7 - 10 ngày, thỏ miễn dịch phải sống ít nhất 50% trong khi thỏ đồi chứng phải chết hết.

② *Kiểm tra hiệu lực trên chuột nhắt trắng:*

Dùng 50 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, thể trọng 18 - 20g được gây miễn dịch với liều 0,2ml chứa 1/10 liều vacxin ghi trên nhãn vào bắp thịt 2 lần cách nhau 7 ngày. Sau 14 ngày gây miễn dịch lần thứ 2, 50 chuột miễn dịch cùng 50 chuột đồi chứng (nuôi trong cùng điều kiện) được chia thành 10 lô. Mỗi lô được thử thách cường độc với 1 độ pha loãng của canh trùng *P.multocida* 6 - 8 giờ (lắc 400 vòng/phút ở 37°C) tương ứng từ 10<sup>-10</sup> đến 10<sup>-4</sup>. Tất cả chuột được theo dõi từ 5 - 7 ngày. Hiệu lực vacxin được đánh giá bằng chỉ số IgPD<sub>50</sub> theo công thức của Asmarin được biến đổi từ công thức Reed & Muench. Vacxin được coi là đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu IgPD<sub>50</sub> lớn hơn hoặc bằng 4.<sup>(2)</sup>

### 3.1.11. Quy trình kiểm nghiệm vacxin ung khí thán

❖ **Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin vô hoạt chế từ chủng vi khuẩn *Clostridium chauvoei*, vacxin có chất bổ trợ dạng lỏng.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

② *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm dưới da cho 3 chuột lang (250 - 350g) mỗi con 2/5 liều vacxin sử dụng (cho trâu bò). Có thể tiêm ở 2 vị trí khác nhau. Theo dõi trong 14 ngày, tất cả chuột phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm miễn dịch cho 4 chuột lang (250 - 350g) đường bắp thịt mỗi con 1/5 liều vacxin sử dụng (cho trâu bò). Sau 14 ngày, chuột miễn dịch cùng 2 chuột đồi chứng được thử thách với vi khuẩn cường độc *Clostridium chauvoei* tương ứng, liều 1MLD vào bắp thịt. Theo dõi trong 10 ngày, vacxin được xem là đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu chuột đồi chứng chết hết, chuột miễn dịch sống ít nhất 3 con

### 3.2. Quy trình kiểm nghiệm vacxin virus

#### 3.2.1. Quy trình kiểm nghiệm vacxin Newcastle chủng Lasota

❖ **Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ chủng virus Lasota

---

<sup>(2)</sup> Liều LD<sub>50</sub> phải được xác định trong từng lô kiểm nghiệm:

$$\text{lgPD}_{50} = \frac{\text{lg LD}_{50}\text{MD}}{\text{lg LD}_{50}\text{DC}} \geq 4$$

PD<sub>50</sub>: Protective Dose 50% (liều bảo hộ 50% động vật thí nghiệm).

phòng bệnh Newcastle cho gà dưới 2 tháng tuổi, dạng đông khô.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

② *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92

③ *Kiểm tra an toàn*:

Dùng 20 gà mẫn cảm (2 - 10 ngày tuổi) chia làm 2 tố:

- Tố 1: 10 con, mỗi con được uống 1 liều vacxin sử dụng

- Tố 2: 10 con làm đối chứng.

Theo dõi trong 10 ngày. Gà ở mỗi tố không được chết quá 3 con. Số gà chết bằng nhau hoặc tố 1 chết ít hơn và không được có triệu chứng bệnh tích giống bệnh Newcastle.

④ *Kiểm tra hiệu lực*:

➤ Phương pháp trọng tài:

Gây miễn dịch cho 10 gà (dưới 2 tháng tuổi) mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Sau 14 ngày các gà miễn dịch (sau khi đã đư ợc lấy máu làm phản ứng HI) cùng với 5 gà đối chứng được thử thách với virus Newcastle cường độc, mỗi con  $10^5$  -  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Theo dõi trong 14 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: gà đối chứng chết ít nhất 3 con; gà miễn dịch chết không quá 2 con. Trường hợp gà chết không đúng, quá quy định thì hiệu giá HI bình quân của gà miễn dịch phải từ 1/20 trở lên.

➤ Phương pháp thay thế:

Chuẩn độ hàm lượng virus. Mỗi liều vacxin phải chứa ít nhất  $10^6$  EID<sub>50</sub>.

### 3.2.2. *Quy trình kiểm nghiệm vacxin Newcastle chủng Hेठ I*

❖ *Phạm vi áp dụng*:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ chủng virus Newcastle hệ I phòng bệnh Newcastle cho gà trên 2 tháng tuổi, dạng đông khô.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn*:

Tiêm dưới da cho 3 gà mẫn cảm (trên 2 tháng tuổi trọng lượng từ 0,7 kg trở lên), mỗi con 10 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày, tất cả gà phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực*:

➤ Phương pháp trọng tài:

Gây miễn dịch cho 3 gà (tiêu chuẩn như trên), mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Sau 10 - 14 ngày, các gà miễn dịch cùng với 3 gà đối chứng được thử thách với virus cường độc Newcastle, đường dưới da, mỗi con từ  $10^5$  -  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Theo dõi trong 14 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: Tất cả các gà miễn dịch đều sống khoẻ, gà đối chứng chết ít nhất 2 con.

➤ Phương pháp thay thế:

Chuẩn độ hàm lượng virus. Mỗi liều vacxin phải chứa ít nhất  $10^6$  EID<sub>50</sub>.

### 3.2.3. *Quy trình kiểm nghiệm vacxin Newcastle chủng F*

❖ *Phạm vi áp dụng*:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ chủng F phòng bệnh Newcastle cho gà, dạng đông khô.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn*:

Dùng 20 gà mẫn cảm (2 - 10 ngày tuổi) chia làm 2 tố:

- Tô 1: 10 con, mỗi con được nhổ mắt 10 liều vacxin sử dụng
- Tô 2: 10 con làm đối chứng.

Theo dõi trong 10 ngày, gà ở mỗi tô không được chết quá 3 con. Số gà chết bằng nhau hoặc tô 1 chết ít hơn và không được có triệu chứng bệnh tích giống bệnh Newcastle.

**④. Kiểm tra hiệu lực:**

➤ Phương pháp trọng tài:

Gây miễn dịch cho 10 gà (10 - 15 ngày tuổi) mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Sau 14 ngày, các gà miễn dịch cùng với 5 gà đối chứng được thử thách với virus Newcastle cường độc mỗi con  $100 \text{ LD}_{50}$ . Theo dõi 10 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: gà đối chứng chết ít nhất 4 con, gà miễn dịch chết không quá 2 con.

➤ Phương pháp thay thế: Chuẩn độ hàm lượng virus.

Mỗi liều vacxin phải chứa ít nhất  $10^6 \text{ EID}_{50}$ .

**3.2.4. Quy trình kiểm nghiệm vacxin Gumboro nhược độc**

❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ phôi gà hoặc tế bào đã được gây nhiễm bằng một chủng virus Gumboro (Infectious Bursa Disease Virus - IBDV) nhược độc hoặc vô độc tự nhiên. Vacxin dạng đông khô.

①. Mẫu: theo 10 TCN 160 - 92

②. Kiểm tra thuần khiết: theo 10 TCN 161 - 92

Kiểm tra tạp nhiễm virus Newcastle bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

③. Kiểm tra an toàn:

➤ Phương pháp trọng tài:

Nhổ mắt hoặc uống cho 15 gà mẫn cảm (1 ngày tuổi) mỗi con 10 liều vacxin sử dụng. 15 gà khác cùng nguồn gốc và lứa tuổi được nuôi cách ly nghiêm ngặt làm đối chứng. Sau 3 tuần theo dõi đánh giá bằng 1 trong 2 cách sau:

- Xét nghiệm bệnh lý tổ chức túi Fabricius. Tất cả gà đều không được có dấu hiệu bệnh lý của IBD ở túi Fabricius

- So sánh tỷ lệ giữa trọng lượng của túi và thể trọng của gà ở cả hai lô dùng vacxin và đối chứng. Tỷ lệ giữa trọng lượng của túi và thể trọng của gà giữa hai lô không được có sai khác đáng kể ( $P < 0,01$ ).

➤ Phương pháp thay thế:

Nhổ mắt cho 10 gà 1 ngày tuổi (hoặc cho uống), mỗi con 10 liều vacxin sử dụng, 10 gà khác cùng nguồn gốc và lứa tuổi được nuôi cách ly nghiêm ngặt làm đối chứng. Sau 14 ngày cả 2 lô gà được miễn dịch bằng vacxin Newcastle chủng Lasota hoặc chủng F, mỗi con một liều qui định. Theo dõi tiếp trong 10 - 14 ngày. Toàn bộ gà được lấy máu kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng Newcastle bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HI). Hiệu giá HI giữa 2 lô gà không được có sự khác biệt đáng kể (không quá 30% mẫu máu của lô miễn dịch thấp hơn lô đối chứng).

**④ Kiểm tra hiệu lực:**

➤ Phương pháp trọng tài:

Miễn dịch cho 20 gà (1 tuần tuổi) mỗi con 1 liều vacxin quy định. Sau 10 - 14 ngày, gà miễn dịch cùng với 20 gà đối chứng được thử thách với virus cường độc IBD tương ứng với liều  $10^2 \text{ TCID}_{50}$ . Theo dõi trong 10 ngày. Vacxin được xem là đạt tiêu chuẩn hiệu lực khi ít nhất 50% gà đối chứng chết hoặc có triệu chứng của IBD, số đối chứng còn lại phải có dấu hiệu bệnh lý tổ chức nặng ở túi Fabricius, còn đối với gà được miễn dịch thì yêu cầu gà khoẻ

mạnh đạt từ 70% trở lên sau khi công cường độc được 10 ngày.

➤ Phương pháp thay thế:

Chuẩn độ hàm lượng virus có trong vacxin. Mỗi liều vacxin phải có không ít hơn  $10^3$  TCID<sub>50</sub>.

Xác định hiệu giá kháng thể trung hoà. Không ít hơn 10 mẫu máu gà đã được miễn dịch như quy định, được kiểm tra bằng phản ứng trung hoà với liều virus cố định  $10^2$  TCID<sub>50</sub>. Huyết thanh phản ứng phải đạt hiệu giá ít nhất 1/256.

### 3.2.5. Quy trình kiểm nghiệm vacxin đậu gà

❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin ché tạo từ một chủng virus đậu nhược độc thích hợp (đậu gà, đậu gà tây, đậu bồ câu) trên phôi gà hoặc tế bào. Vacxin dạng đông khô.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn*: Chủng vacxin vào dưới da cho 10 gà (1 - 2 tuần tuổi) mỗi con 10 liều quy định. Theo dõi trong 14 ngày, tất cả gà phải sống khỏe.

➤ Phương pháp trọng tài:

Miễn dịch cho 10 gà (2 - 6 tuần tuổi) mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Sau 3 tuần tuổi gà miễn dịch cùng với 5 gà đối chứng được thử thách với chủng virus đậu cường độc. Theo dõi trong 10 ngày, tất cả gà đối chứng phải có bệnh tích mụn đậu trong khi gà miễn dịch không có.

➤ Phương pháp thay thế:

Miễn dịch cho 10 gà (3 - 10 ngày tuổi) mỗi con 1 liều sử dụng bằng cách chủng vào dưới da. Theo dõi trong 10 ngày, vacxin được xem là đạt tiêu chuẩn hiệu khi có không ít hơn 8 gà có mụn đậu ở nơi chủng trong khoảng 3 - 5 ngày.

Chuẩn độ hàm lượng virus có trong vacxin, mỗi liều vacxin phải chứa không ít hơn  $10^2$  EID<sub>50</sub>.

### 3.2.6. Quy trình kiểm nghiệm vacxin vô hoạt Egg Drop syndrome

❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin vô hoạt ché từ chủng virus Egg Drop Syndrome 76 (EDS), phòng bệnh hội chứng giảm đẻ ở gà.

①. *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm".

②. *Kiểm tra vô trùng*: theo 10 TCN 161 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình kiểm tra vô trùng".

③ *Kiểm tra vô hoạt*:

Ít nhất 10 phôi thai vịt 11 - 12 ngày tuổi, mẫn cảm với virus EDS, mỗi phôi được tiêm 0,2ml vacxin vào xoang niệu. Trứng được áp tiếp 3 - 7 ngày. Mỗ thu hoạch nước trứng, kiểm tra virus bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu gà (HA), có thể tiến hành kiểm tra virus trên tế bào gan phôi hoặc tế bào xơ phôi thai vịt.

Kết quả đạt nếu không có dấu hiệu của virus EDS.

④ *Kiểm tra an toàn*:

20 gà khỏe mạnh 4 - 6 tuần tuổi, mỗi con 2 liều vacxin sử dụng, tiêm bắp. Theo dõi 14 ngày, tất cả gà phải sống khỏe.

⑤ *Kiểm tra hiệu lực*:

20 gà khỏe mạnh, 4 - 6 tuần tuổi. Mỗi con được tiêm 1 liều vacxin sử dụng, tiêm bắp.

Sau 3 tuần gà đã đư ợc miễn dịch cùng 5 gà đối chứng (không tiêm vacxin) được lấy máu kiểm tra huyết thanh bằng phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) hoặc bằng phương pháp ELISA.

- Kháng nguyên dùng trong phản ứng HI là chủng virus EDS 76 đạt 4 đơn vị HA.
- Huyết thanh bắc đầu với độ pha loãng 1 : 4
- Hồng cầu gà 0,8%.

Chủng virus EDS 76 có khả năng ngưng kết hồng cầu gà, gà tây, ngan và vịt không ngưng kết hồng cầu của động vật có vú.

Vacxin đạt tiêu chuẩn nếu:

Hiệu giá HI lớn hơn hoặc bằng  $8\log_2$  và gà đối chứng phải có phản ứng âm tính.

### **3.2.7. Quy trình kiểm nghiệm vacxin Viêm gan siêu vi trùng vịt**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế từ chủng virus viêm gan vịt nhược độc, phòng bệnh viêm gan vịt và ngan dưới 6 tuần tuổi.

① *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm".

② *Kiểm tra thuần khiết*: theo 10 TCN 161 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình kiểm tra thuần khiết".

③ *Kiểm tra an toàn*:

Tiêm dưới da hoặc bắp thịt cho 20 vịt con 1 - 3 ngày tuổi, mỗi con được tiêm 10 liều vacxin quy định. Theo dõi 14 ngày, tất cả vịt phải sống khỏe.

④. *Kiểm tra hiệu lực*:

Sử dụng một trong 2 phương pháp sau:

#### **➤ Phương pháp trọng tài:**

Tiêm miễn dịch cho 20 vịt con 1 - 3 ngày tuổi (tiêm dưới da). Sau 72 giờ, các vịt miễn dịch cùng với 20 vịt đối chứng được thử thách với virus viêm gan vịt cường độc liều  $10^{3,0}LD_{50}$  (tiêm dưới da). Theo dõi 10 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu ít nhất 70% vịt được tiêm vacxin sống và ít nhất 70% vịt đối chứng chết.

#### **➤ Phương pháp thay thế:**

Chuẩn độ hàm lượng virus vacxin bằng phương pháp tiêm túi niệu phôi gà 8 - 10 ngày. Tiêm túi niệu nang. Mỗi liều vacxin phải chứa ít nhất  $10^{3,3}ELD_{50}$ .<sup>(3)</sup>

### **3.2.8. Quy trình kiểm nghiệm vacxin dịch tả vịt nhược độc**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế từ chủng virus dịch tả vịt nhược độc qua phôi vịt, dạng đông khô.

① *Mẫu*: theo 10 TCN 160 - 92

② *Kiểm tra thuần khiết*:

- theo 10 TCN 161 - 92

- Kiểm tra tạp nhiễm virus viêm gan vịt

Tiêm vào dưới da cho 5 vịt mới nở, mỗi con 10 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 14

<sup>(3)</sup>

$ELD_{50}$ : Embryo Lethal Dose 50% - Liều gây chết 50 % phôi thí nghiệm

MLD: Minimum Lethal Dose - Liều nhỏ nhất gây chết hết động vật thí nghiệm.

ngày, tất cả vịt phải sống khoẻ mạnh.

③. *Kiểm tra an toàn:*

➤ Phương pháp trọng tài:

Tiêm dưới da cho 3 vịt mẫn cảm (0,7 - 1 kg) mỗi con 50 liều vacxin sử dụng. Theo dõi 14 ngày, tất cả vịt đều phải sống khoẻ mạnh.

➤ Phương pháp thay thế: như phần 3.2.7.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm miễn dịch cho 3 vịt (0,7 - 1 kg), mỗi con một liều vacxin sử dụng. Sau 14 ngày, các vịt miễn dịch cùng với 3 vịt đối chứng được thử thách với virus dịch tả vịt cường độc với liều  $10^3$  EID<sub>50</sub> (tương đương 1ml giống nguyên pha loãng  $10^{-2}$ ). Theo dõi 14 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: Vịt đối chứng chết hết, vịt miễn dịch sống toàn bộ.

**3.2.9. Quy trình kiểm nghiệm vacxin đại cổ định**

❖ **Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chế tạo từ não bê đã được gây nhiễm virus đại cổ định và vô hoạt bằng phương pháp thích hợp. Vacxin có dạng lỏng hoặc đông khô.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn:*

➤ Phương pháp trọng tài:

Tiêm cho 2 chó mẫn cảm (3 tháng tuổi) mỗi con 2 liều vacxin sử dụng theo phương pháp qui định. Theo dõi trong 10 ngày, cả hai chó phải sống khoẻ.

➤ Phương pháp thay thế:

Tiêm vào dưới da hay xoang bụng cho 3 chuột nhắt trắng (18 - 20g) mỗi con 1/10 liều vacxin sử dụng và 2 chuột lang (250 - 350g) mỗi con 1 liều sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày tất cả động vật phải sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:*

➤ Phương pháp trọng tài:

Gây miễn dịch cho 60 chuột nhắt trắng (15 - 16g) bằng cách tiêm xoang bụng, trong 2 tuần liên, mỗi tuần 3 lần, mỗi lần 0,25 ml vacxin cho một chuột (tổng số 6 lần). 30 chuột cùng nguồn gốc và lứa tuổi được giữ làm đối chứng, không tiêm vacxin.

Sau 14 ngày kể từ lần tiêm thứ nhất, chuột miễn dịch được thử thách với virus đại cường độc CVS (Challenge virus Standara) theo 5 nhóm, mỗi nhóm 10 con với liều  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ..., và  $10^{-5}$ . Đồng thời đối chứng cũng được tiêm cường độc theo 3 nhóm mỗi nhóm 10 con, liều  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  và  $10^{-7}$ , đường tiêm não (intracerebrally), 1 giọt tiêm 0,03ml. Theo dõi trong 14 ngày, chỉ tính những chuột chết và bại liệt từ ngày thứ 5 trở đi, LD<sub>50</sub> của 2 lô chuột đối chứng và miễn dịch phải khác nhau ít nhất 3 log thì vacxin được xem là đạt tiêu chuẩn hiệu lực.

➤ Phương pháp thay thế:

Dùng 8 chuột lang (250 - 300g) chia làm 4 nhóm mỗi nhóm 2 con. Chuột được tiêm vacxin vào não theo sơ đồ sau:

Nhóm 1: Liều tiêm bằng 1/150 liều sử dụng, vacxin pha 1/50

Nhóm 2: Liều tiêm bằng 1/1500 liều sử dụng, vacxin pha 1/500

Nhóm 3: Liều tiêm bằng 1/15000 liều sử dụng, vacxin pha 1/5000

Nhóm 4: Liều tiêm bằng 1/150.000 liều sử dụng, vacxin pha 1/50.000

Theo dõi trong 14 ngày, vacxin đạt tiêu chuẩn hiệu lực nếu:

Nhóm 1: Chuột chết hết.

Nhóm 2 hoặc 3: Chuột có thể sống hoặc chết.

Nhóm 4: Chuột sống cả 2 con

### 3.2.10. Quy trình kiểm nghiệm vacxin dại Flury - Lep

#### ❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chê từ virus dại nhược độc Flury - Lep qua phôi gà. Vacxin có dạng lỏng hoặc đông khô.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

②. *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③. *Kiểm tra an toàn:*

#### ➤ Phương pháp trọng tài:

Tiêm cho 3 chó mẫn cảm (3 - 4 tháng tuổi) mỗi con 1 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 21 ngày, cả hai chó phải sống khoẻ.

#### ➤ Phương pháp thay thế:

Tiêm vào dưới da hay xoang bụng cho 8 chuột nhắt trắng (16 - 18g) mỗi con 1/4 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 7 ngày ít nhất phải có 7 chuột sống khoẻ.

④. *Kiểm tra hiệu lực:* Dùng 1 trong 2 phương pháp sau:

#### ➤ Kiểm tra hiệu lực bằng chuột lang:

Tiêm bắp cho 10 chuột lang (300 - 350g), mỗi con 1/80 liều sử dụng (vacxin đã đư ợc pha loãng thành huyền dịch 5% với nước sinh lý và có 2% huyết thanh ngựa).

Sau 21 ngày các chuột đã gây miễn dịch cùng với 5 chuột đối chứng được thử thách với virus dại cường độc, chủng CVS, mỗi con 1/2 liều gây chết 100% chuột lang.

Theo dõi trong 14 ngày, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: Chuột miễn dịch sống 70%, chuột đối chứng chết 80% vì bệnh dại.

#### ➤ Chuẩn độ hàm lượng virus: Vacxin phải đạt hiệu giá $10^{3.8}$ LD<sub>50</sub>/0,03ml.

### 3.2.11. Quy trình kiểm nghiệm vacxin dịch tả lợn

#### ❖ Phạm vi áp dụng:

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin chê từ các chủng virus dịch tả lợn nhược độc dạng đông khô.

①. *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92 "Vacxin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm".

②. *Phương pháp thay thế 1:*

Gây miễn dịch cho 3 lợn như phương pháp trọng tài, sau 14 ngày lấy máu chắt huyết thanh cùng 3 lợn đối chứng không tiêm vacxin.

Các mẫu huyết thanh được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA để xác định hàm lượng kháng thể.

③. *Phương pháp thay thế 2:*

- Tiêm tĩnh mạch cho 3 thỏ khỏe mạnh (1,5 - 2 kg/con) chưa nhiễm virus dịch tả lợn, mỗi con 1ml vacxin pha loãng 1/10000.

- Sau 24 giờ đo thân nhiệt lần đầu, sau đó cứ 4 giờ đo thân nhiệt một lần cho tới 120 giờ.

- Lô vacxin đạt tiêu chuẩn khi 1 thỏ có phản ứng sốt điển hình hoặc 2 thỏ có phản ứng sốt nhẹ.

*Ghi chú:* Cách đánh giá phản ứng sốt của thỏ

- Sốt điển hình: Thời gian nung bệnh 24 - 48h, thân nhiệt cao hơn bình thường 1,5 - 2°C, kéo dài 12 - 48 giờ.

- Sốt nhẹ: Thời gian nung bệnh 25 - 72 giờ, thân nhiệt cao hơn bình thường 0,5 - 1°C, kéo dài 12 - 48 giờ.

- Quy trình này thay thế cho quy trình 164/92

### **3.2.12. Quy trình kiểm nghiệm vacxin dịch tả trâu bò nhược độc thỏ hóa**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin ché từ chủng virus dịch tả trâu bò nhược độc thỏ hoá, dạng đông khô.

① *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

② *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③ *Kiểm tra an toàn:*

Tiêm dưới da cho 3 chuột lang (250 - 400g) mỗi con 2 liều vacxin sử dụng và 3 chuột nhắt trắng (18 - 20g) mỗi con 1 liều sử dụng. Theo dõi trong 10 ngày tất cả động vật phải sống khoẻ.

④ *Kiểm tra hiệu lực:*

Tiêm vào tĩnh mạch tai cho 3 thỏ mẫn cảm (1,5 - 2,0kg), mỗi con 1/50 liều vacxin sử dụng. Theo dõi thân nhiệt ngày 2 lần trong 5 ngày liền. Sau khi tiêm 2 ngày thỏ có phản ứng sốt kéo dài 48h thì mổ ra xem bệnh tích hoại tử ở ruột non, túi tròn và manh tràng, lô vacxin đạt tiêu chuẩn nếu: ít nhất có 1 thỏ có phản ứng sốt điển hình và có bệnh tích rõ rệt.

Ghi chú: Phản ứng sốt điển hình: ủ bệnh từ 24 - 48 giờ. Thân nhiệt cao hơn bình thường 1,5 - 2°C kéo dài từ 18 - 48h.

### **3.2.13. Quy trình kiểm nghiệm vacxin dịch tả trâu bò nhược độc chủng KABETA 0**

#### **❖ Phạm vi áp dụng:**

Quy trình này áp dụng cho việc kiểm nghiệm vacxin ché từ chủng virus dịch tả trâu bò nhược độc chủng Kagenta 0, nuôi cấy trên tế bào thận bê, dạng đông khô.

① *Mẫu:* theo 10 TCN 160 - 92

② *Kiểm tra thuần khiết:* theo 10 TCN 161 - 92

③ *Kiểm tra an toàn:*

➤ Phương pháp trọng tài: Tiêm dưới da cho 2 bê mẫn cảm (6 - 12 tháng tuổi), mỗi con 100 liều vacxin sử dụng. Theo dõi trong 21 ngày, cả hai bê phải sống khoẻ.

➤ Phương pháp thay thế: Tiêm phúc mạc cho 2 chuột lang (250 - 350g), mỗi con 2 liều vacxin sử dụng và 6 chuột nhắt (18 - 20g), mỗi con một liều sử dụng.

Theo dõi trong 21 ngày tất cả động vật phải sống khoẻ, mổ khám không có bệnh tích của dịch tả trâu bò.

④ *Kiểm tra hiệu lực:*

➤ Phương pháp trọng tài: Tiêm dưới da cho 2 bê (6 - 12 tháng tuổi) mỗi con 1 liều sử dụng. Sau 21 ngày các bê đã tiêm vacxin cùng với 2 bê đối chứng được thử thách với virus dịch tả trâu bò arong độc, liều  $10^4$  ID<sub>50</sub>. Theo dõi trong 14 ngày, tất cả bê miễn dịch phải sống khoẻ, tất cả bê đối chứng phải phát bệnh dịch tả trâu bò.

➤ Phương pháp thay thế: Chuẩn độ hàm lượng virus, mỗi liều vacxin phải chứa ít nhất  $10^{2.5}$  CCID<sub>50</sub>.

## **IV. TIÊU CHUẨN ASEAN ĐỐI VỚI MỘT SÓ LOẠI VACXIN**

### **5.1. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt tụ huyết trùng lợn**

#### **5.1.1. Yêu cầu đối với giống và nguyên liệu sản xuất**

① *Giống:* Giống gốc là Pasteurella multocida cường độc đối với bản động vật. Giống được chia ra các lô riêng rẽ và bảo quản thấp hơn -18°C.

② *Nguyên liệu sản xuất:* Môi trường nhân tạo cho phép sự phát triển tốt nhất của vi khuẩn.

#### **5.1.2. Yêu cầu kiểm tra chất lượng**

① *Kiểm tra vô trùng:* Mẫu thành phẩm được kiểm tra xem có vi khuẩn ngoại lai và nấm theo phương pháp được mô tả ở phụ lục 2.

② *Kiểm tra thuần khiết:* Mẫu lớn chưa đóng gói được kiểm tra như sau: Phết kính

nhuộm canh khuẩn để kiểm tra đặc điểm hình thái. Chỉ có mặt *Swine Pasteurella multocida*.

③ Kiểm tra an toàn

Mẫu cuối cùng phải được kiểm tra như sau:

+ Ít nhất 10 chuột nhắt nặng 18 – 22 g được tiêm 0,5 ml canh khuẩn vào xoang phúc mạc hay dưới da và theo dõi ít nhất 14 ngày. Không có bất cứ phản ứng có hại nào.

+ Ít nhất 2 chuột lang mỗi con được tiêm 2 ml canh khuẩn vào dưới da hay vào bắp và theo dõi ít nhất 14 ngày. Không có bất cứ phản ứng có hại do vacxin trên chuột lang.

④ Kiểm tra hiệu lực

Mẫu lớn chưa đóng gói/ Mẫu thành phẩm được kiểm tra như sau:

Chuẩn bị một liều chuột, tương đương 1/20 liều lợn của vacxin đang kiểm tra và vacxin tham chiêu chuẩn. Ít nhất có 10 chuột nhắt trong 1 lô và mỗi lô được tiêm vào xoang phúc mạc với các nồng độ pha loãng giảm dần liều chuột của vacxin đang kiểm tra và vacxin tham chiêu chuẩn. Tối thiểu 14 ngày sau, chuột lại được tiêm lại như trên. Ít nhất 10 ngày kể từ lần tiêm cuối, chuột miễn dịch cùng chuột đối chứng được công cường độc bằng vi khuẩn *Pasteurella multocida* cường độc và theo dõi ít nhất 10 ngày. Chuột đối chứng phải chết.

Hiệu lực của vacxin tính như sau ít nhất phải là 0,5.

Nghịch đảo của 50% nồng độ pha loãng cuối cùng của vacxin

$\leq 0,5$

Nghịch đảo của nồng độ pha loãng cuối cùng của vacxin tham chiêu chuẩn

### 5.1.3. Các yêu cầu khác

Vacxin phải tuân theo các yêu cầu chung đối với vacxin thú y được mô tả ở Phụ lục 4.

## 5.2. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt phòng bệnh Newcastle

### 5.2.1. Yêu cầu đối với giống và nguyên liệu sản xuất

① Giống: Giống gốc và giống sản xuất được nuôi cấy trên trứng gà sạch bệnh trong hệ thống lô giống. Giống sản xuất không được liên tiếp truyền quá 2 lần từ giống gốc. Giống sản xuất phải đạt tiêu chuẩn vô trùng, thuần khiết, an toàn và hiệu lực trước khi đưa vào sản xuất. Giống virus được đóng am pul hoặc bảo quản trong những lọ nhỏ ở  $-50^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn.

② Nguyên liệu sản xuất: Trứng có phôi sử dụng sản xuất vacxin phải bắt nguồn từ đàn gà sạch bệnh hay đàn khỏe mạnh.

### 5.2.2. Yêu cầu chung

Sau khi lắc mạnh, lọ vacxin phải đồng nhất.

### 5.2.3. Yêu cầu kiểm tra chất lượng

① Kiểm tra vô trùng: Mẫu thành phẩm được kiểm tra xem có vi khuẩn, *Salmonella*, *Mycoplasma* và nấm theo phương pháp được mô tả ở phụ lục 2. Tuy nhiên có thể kiểm tra xem có *Salmonella* và *Mycoplasma* ở mẫu lớn chưa đóng gói. Có thể không cần làm xét nghiệm xem có *Mycoplasma* nếu có thể chứng minh rằng nhân tố vô hoạt đã diệt *Mycoplasma*.

② Kiểm tra thuần khiết: Mẫu lớn chưa đóng gói được kiểm tra xem có virus gây Leucosis ở gia cầm bằng phản ứng COFAL. Có thể thay bằng kiểm tra giống gốc nếu vacxin bắt nguồn từ trứng gà sạch bệnh SPF. Có thể không làm xét nghiệm này nếu có thể chứng minh rằng các nhân tố vô hoạt đã diệt virus gây bệnh Leucosis ở gia cầm.

③ Kiểm tra tính vô hoạt: Tối thiểu 10 trứng gà mẫn cảm với virus Newcastle được tiêm chung với liều 0,2 ml vacxin vào túi niệu. Trứng được áp tiếp ít nhất 7 ngày. Thực hiện cấy chuyển thêm 1 lần. Không có virus Newcastle.

④ Kiểm tra an toàn: Mẫu thành phẩm được kiểm tra trên ít nhất 10 gà nhạy cảm; mỗi con được tiêm tối thiểu 1 liều vacxin theo đường khuyến nghị và theo dõi tối thiểu 14 ngày. Không có phản ứng cục bộ hay toàn thân bất thường nào.

⑤ Kiểm tra hiệu lực:

+ Ít nhất 10 gà mẫn cảm được tiêm với 1 liều vacxin theo đường khuyến nghị. Sau khi tiêm 14 ngày, gà miễn dịch cùng với 10 gà đối chứng được công cường độc bằng 5,0 logEID 50 virus Newcastle cường độc và theo dõi 10 ngày. Ít nhất 80% gà miễn dịch phải sống và không có triệu chứng của bệnh và ít nhất 80% gà đối chứng phải chết.

+ Ít nhất 10 gà mẫn cảm một nhóm được tiêm bằng vacxin được pha loãng giảm dần theo đường khuyến nghị. Tối thiểu 2 tuần sau khi tiêm vacxin, gà miễn dịch cùng với 5 gà đối chứng được công cường độc với liều 5,0log50 virus Newcastle cường độc và theo dõi 10 ngày . Tất cả gà đối chứng phải chết. Vacxin phải chứa tối thiểu 50 PD50 trong 1 liều.

### 5.3. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin phòng bệnh dịch tả lợn

#### 5.3.1. Yêu cầu đối với giống và nguyên liệu sản xuất

① Giống: Giống gốc và giống sản xuất được nuôi cấy trên tế bào nguyên thủy hay dòng tế bào thỏa mãn yêu cầu nêu ra ở mục 2 dưới đây trong hệ thống lô giống. Giống sản xuất không được tiếp truyền quá 2 đời kể từ giống gốc. Giống sản xuất phải đạt tiêu chuẩn vô trùng, thuần khiết, an toàn và hiệu lực trước khi đưa vào sản xuất. Giống virus được đóng trong ống am pul hoặc bảo quản trong những lọ nhỏ ở -70°C hoặc thấp hơn.

② Nguyên liệu sản xuất: Tế bào nguyên thủy hay dòng tế bào sử dụng để sản xuất vacxin phải không có các nhân tố gây bệnh tích tế bào và hấp phụ máu. Tế bào lợn phải được kiểm tra xem có virus dịch tả lợn Swine fever bằng kỹ thuật kháng thể huỳnh quang trừ khi vacxin được sản xuất ở đất nước đã hoàn toàn loại bỏ được bệnh Dịch tả lợn.

#### 5.3.2. Yêu cầu kiểm tra chất lượng

① Kiểm tra vô trùng: Mẫu thành phẩm được kiểm tra xem có vi khuẩn, Mycoplasma và nấm. Có thể kiểm tra xem có Mycoplasma ở mẫu sản phẩm chờ đóng gói.

② Kiểm tra thuần khiết: Lô giống, sản phẩm chờ đóng gói mẫu thành phẩm được kiểm tra xem có các nhân tố gây bệnh tích tế bào và hấp phụ máu.

##### ③ Kiểm tra an toàn:

✧ Mẫu thành phẩm được kiểm tra bởi một hoặc nhiều cách sau đây:

+ Ít nhất 5 chuột nhắt, mỗi con được tiêm 0,5 ml vacxin vào xoang phúc mạc hay dưới da hoặc 0,03 ml vào trong não và theo dõi ít nhất 7 ngày. Không có những phản ứng bất lợi do vacxin gây ra ở chuột nhắt.

+ Ít nhất 2 chuột lang, mỗi con được tiêm 2 ml vacxin vào phúc mạc, bắp hay dưới da và theo dõi trong 7 ngày. Không có những phản ứng bất lợi do vacxin gây ra ở chuột lang.

✧ Mẫu thành phẩm cần được kiểm tra như sau:

Ít nhất 2 lợn mẫn cảm, nhỏ nhất trong lứa tuổi được tiêm vacxin, được tiêm mỗi con 10 liều vacxin theo đường khuyến nghị và theo dõi ít nhất 21 ngày. Không có triệu chứng lâm sàng hay bệnh tích của bất cứ bệnh nào do vacxin gây ra trên lợn.

④ Kiểm tra hiệu lực: Sản phẩm chờ đóng gói/ Mẫu thành phẩm được kiểm tra như sau:

Ít nhất 4 lợn mẫn cảm mỗi con được tiêm 1/100 liều vacxin thực địa như khuyến nghị. Sau 2 tuần tiêm vacxin, lợn miễn dịch cùng với 2 lợn đối chứng được công cường độc bằng virus dịch tả lợn cường độc và theo dõi ít nhất 14 ngày. Lợn đối chứng phải chết hay có triệu chứng nghiêm trọng của bệnh. Tất cả lợn miễn dịch phải sống và không có triệu chứng lâm sàng nghiêm trọng.

⑤ Kiểm tra hàm lượng virus: Nếu không kiểm tra hiệu lực ở thành phẩm, thì phải kiểm tra hiệu giá của vacxin. Vacxin phải có hiệu giá ít nhất là 2,3 logTCID50 một liều 9 hoặc hiệu giá virus tương đương với 100 liều bảo hộ lợn ở bất cứ thời điểm sử dụng nào trước khi hết hạn.

## **5.4. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt phòng bệnh lở mồm long móng ở trâu bò**

### **5.4.1. Yêu cầu đối với giống và nguyên liệu sản xuất**

#### **① Giống virus**

Giống gốc là chủng virus thực địa được thích nghi trên môi trường tế bào 1 lớp BKH – 21 và không được tiếp truyền quá 3 đời. Hiệu giá của giống gốc không thấp hơn 108.0 TCID<sub>50</sub> trong 1ml.

Giống sản xuất phải bắt nguồn từ giống gốc và thích nghi trên môi trường tế bào 1 lớp BKH – 21. Giống sản xuất không được tiếp truyền quá 10 đời và hiệu giá virus không thấp hơn 107.5 TCID<sub>50</sub> trong 1ml.

#### **② Nguyên liệu sản xuất**

Dòng tế bào BKH – 21 dùng trong sản xuất không có bệnh tích tế bào và nhân tố hấp phụ máu. Chỉ sử dụng các nhân tố vô hoạt hàng đầu như aziridine.

### **5.4.2. Yêu cầu kiểm tra chất lượng**

#### **① Kiểm tra vô trùng**

Mẫu thành phẩm được kiểm tra xem có vi khuẩn, Salmonella, Mycoplasma và nấm theo phương pháp được mô tả ở Phụ lục 2. Có thể không cần làm xét nghiệm xem có Mycoplasma nếu có thể chứng minh rằng nhân tố vô hoạt đã diệt Mycoplasma.

#### **② Kiểm tra an toàn**

Mỗi bò trong 3 bò trên 6 tháng tuổi và không có kháng thể bệnh lở mồm long móng được tiêm vacxin 2 lần. Lần tiêm thứ nhất là một liều vacxin được tiêm vào 20 chỗ khác nhau dưới biểu bì lõi ối. Lần tiêm thứ hai là 2 liều vacxin được tiêm dưới da 4 ngày sau đó. Đo nhiệt độ ở hậu môn và kiểm tra lưỡi, mồm hàng ngày xem có bệnh tích không trong 10 ngày sau khi tiêm. Vacxin được coi là an toàn khi không thấy có triệu chứng gì.

#### **③ Kiểm tra hiệu lực**

Mỗi bò trong 5 bò trên 6 tháng tuổi và không có kháng thể bệnh lở mồm long móng được tiêm dưới da với 1 liều vacxin. Bò miễn dịch sau 21 ngày tiêm vacxin cùng với ít nhất là 1 bò mẫn cảm không tiêm vacxin được công cường độc bằng cách tiêm vào 10 vị trí khác nhau 10ID<sub>50</sub> chủng đồng nhất của bò. Hiệu giá virus công cường độc được chuẩn dộ ngay trước khi công.

Đo nhiệt độ hậu môn và kiểm tra hàng ngày bệnh tích ở lưỡi và chân trong 10 ngày sau khi tiêm. Vacxin được coi là đạt tiêu chuẩn khi không quá một chân trong số chân của 5 bò có bệnh tích thứ phát.

### **5.4.3. Các yêu cầu khác**

Vacxin phải tuân theo các yêu cầu chung đối với vacxin thú y được mô tả ở Phụ lục 4.

## **Câu hỏi ôn tập chương**

1. Yêu cầu của một phòng kiểm nghiệm vacxin động vật
2. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu trong kiểm nghiệm vacxin
3. Phương pháp kiểm tra độ thuần khiết của vacxin.
4. Phương pháp kiểm tra độ an toàn của vacxin.
5. Phương pháp kiểm tra hiệu lực của vacxin.
6. Ngoài các chỉ tiêu chính, vacxin thành phẩm cần phải chú ý kiểm tra những vấn đề gì?
7. Trình bày quy trình kiểm nghiệm của một số loại vacxin vi khuẩn và virus?

## Chương 4

### SỬ DỤNG VACXIN

**Mục tiêu:** Nắm được phương pháp sử dụng vacxin

**Kiến thức trọng tâm:**

- Quy luật hình thành kháng thể sau khi sử dụng vacxin ở động vật
- Tiêm nhắc nhở và tái chủng
- Nguyên tắc sử dụng vacxin
- Các phản ứng không mong muốn khi tiêm phòng vacxin và cách khắc phục
- Quy định về tiêm phòng vacxin bắt buộc cho gia súc, gia cầm ở Việt Nam
- Một số lịch sử dụng vacxin cho vật nuôi
- Quy chế thử nghiệm và khảo nghiệm vacxin thú y

#### I. NGUYÊN LÝ SỬ DỤNG VACXIN

Khi đưa vacxin vào cơ thể động vật, với sự kích thích của yếu tố kháng nguyên có trong vacxin, hệ thống miễn dịch của cơ thể hoạt động, tạo ra một đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào. Đáp ứng này làm sản sinh ra các yếu tố vận chuyển để chống lại kháng nguyên, đó là kháng thể dịch thể đặc hiệu hoặc kháng thể tế bào. Các yếu tố này lưu thông trong máu và dịch thể của cơ thể động vật, gây ra trạng thái miễn dịch tiếp thu chủ động nhân tạo. Khi kháng nguyên là mầm bệnh cường độc từ ngoài xâm nhập, chúng sẽ bị các kháng thể đặc hiệu tiêu diệt hoặc loại trừ, không thực hiện được quá trình gây bệnh. Phản ứng tiêu diệt hoặc loại trừ mầm bệnh của các yếu tố kháng thể là rất đặc hiệu. Vì vậy, không phải vacxin nào cũng gây miễn dịch chung chống lại mọi tác nhân gây bệnh, vacxin tạo ra từ loại tác nhân gây bệnh nào thì chỉ có tác dụng sinh đáp ứng miễn dịch chống lại chính tác nhân đó.

Thực tế đã cho thấy: Dùng vacxin phòng bệnh cho người và động vật là biện pháp căn bản nhất, chủ động nhất để khống chế và tiến tới thanh toán bệnh truyền nhiễm.

#### II. QUY LUẬT HÌNH THÀNH KHÁNG THỂ DỊCH THỂ SAU KHI SỬ DỤNG VACXIN Ở ĐỘNG VẬT

Khi đưa vacxin vào cơ thể, kháng thể chưa sinh ra ngay lập tức mà phải sau một thời gian tiềm tàng, dài hay ngắn phụ thuộc vào kháng nguyên chứa trong vacxin và sự xâm nhập của kháng nguyên vacxin lần đầu hay lần thứ hai, thứ ba... Sau đó kháng thể mới được sinh ra, lượng kháng thể tăng dần, đạt mức cao nhất sau 2 - 3 tuần rồi giảm dần và mất đi sau vài tháng hoặc hàng năm.

Sử dụng vacxin lần đầu, đáp ứng miễn dịch gọi là sơ cấp hay tiên phát.

Sử dụng vacxin lần hai, đáp ứng miễn dịch gọi là thứ cấp hay thứ phát. Trong đáp ứng miễn dịch thứ phát, thời gian tiềm tàng ngắn hơn, lượng kháng thể sinh ra nhiều hơn và thời gian xuất hiện kháng thể sớm.

#### III. TIÊM VACXIN NHẮC NHỎ

Sự khác biệt của đáp ứng miễn dịch sơ cấp và thứ cấp là do vai trò của các tế bào nhớ miễn dịch. Trong đáp ứng miễn dịch thứ cấp, các tế bào này phát triển nhanh và mạnh, tạo ra một lớp tế bào sản xuất kháng thể nhanh và nhiều hơn nên kháng thể xuất hiện sớm, hàm lượng nhiều hơn rõ rệt. Nếu cách lần dùng vacxin đầu 3 - 4 tuần, sử dụng tiếp lần thứ hai thì đáp ứng miễn dịch sẽ nhanh hơn, mạnh hơn, có thể gấp hàng trăm lần và thời gian miễn dịch dài hơn.

Đây là cơ sở khoa học cho việc tiêm phòng vacxin nhắc lại, tạo mức độ miễn dịch cao cho cơ thể. Khi kiểm tra hàm lượng kháng thể trong cơ thể đã sử dụng vacxin kết hợp với phương pháp công cường độc, người ta nhận thấy rằng không phải kháng thể cứ xuất hiện trong máu là con vật được bảo vệ khỏi sự tấn công của mầm bệnh cường độc mà lượng kháng thể phải đạt đến một trị số nhất định thì cơ thể mới có mức độ miễn dịch bảo vệ. Trị số kháng

thể này được gọi là ngưỡng bảo hộ. Hàm lượng kháng thể càng cao hơn ngưỡng bảo hộ thì mức độ miễn dịch của cơ thể càng cao và ngược lại.

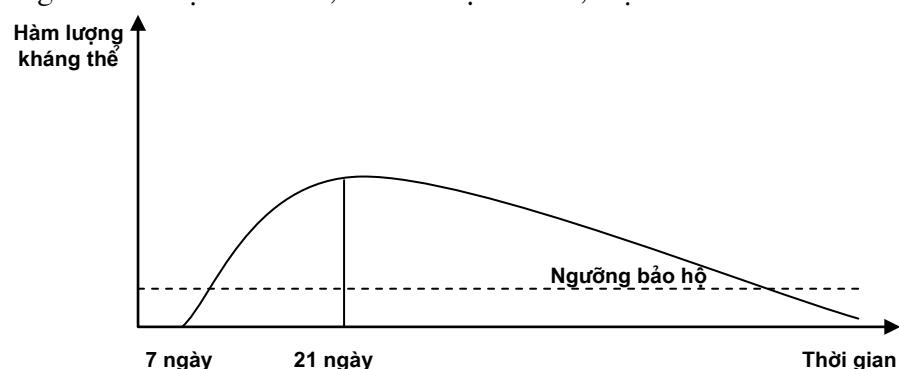
#### IV. TÁI CHỦNG

Mỗi loại vacxin khi đưa vào cơ thể sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch và trạng thái miễn dịch ở động vật được duy trì một thời gian nhất định gọi là độ dài miễn dịch. Tùy từng loại vacxin mà thời gian này dài ngắn khác nhau, khi hết thời gian đó cơ thể không còn khả năng chống lại mầm bệnh nữa, vì vậy người ta phải tiến hành tái chủng.

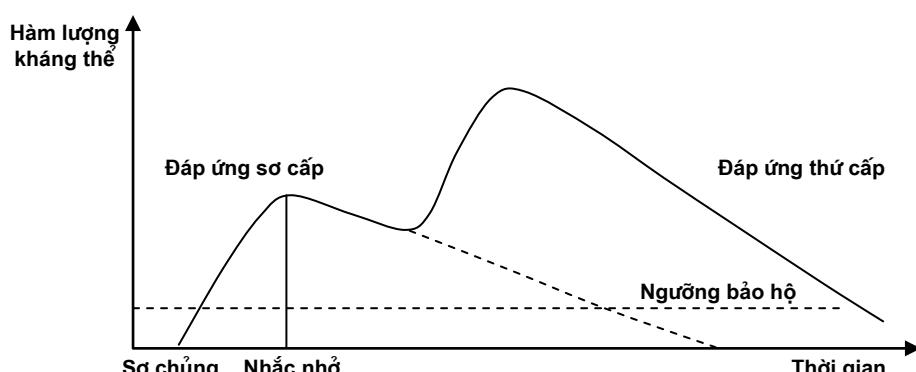
Như vậy, để duy trì đáp ứng miễn dịch và nâng cao khả năng miễn dịch cứ khoảng một thời gian nhất định nên tái chủng vacxin một lần cho động vật, tùy theo loại vacxin, tùy theo loài động vật và tình hình dịch tễ.

Vacxin vô hoạt, nhất là vacxin vi khuẩn thường có thời gian miễn dịch ngắn 3 - 9 tháng.

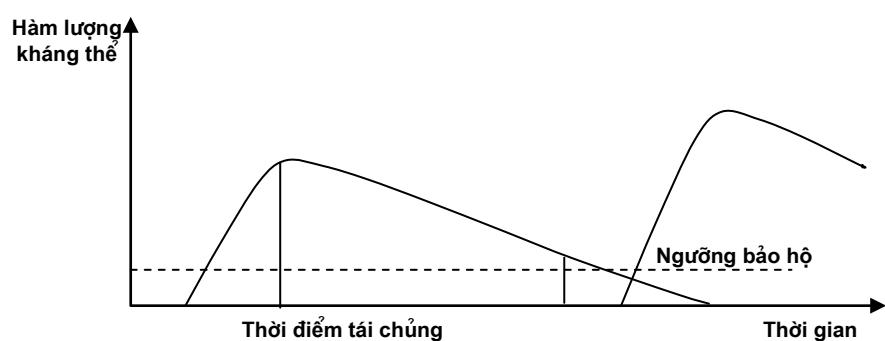
Vacxin nhược độc, nhất là các vacxin virus thường cho đáp ứng miễn dịch mạnh, ổn định và thời gian miễn dịch kéo dài, có thể được 1 năm, thậm chí suốt đời.



Hình 4.1. Đường biểu diễn quy luật hình thành kháng thể khi dùng vacxin ở động vật



Hình 4.2. Đường biểu diễn phản ứng miễn dịch khi tiêm vacxin nhắc nhở



Hình 4.3. Đường biểu diễn phản ứng miễn dịch khi tái chủng

## V. NGUYÊN TẮC SỬ DỤNG VACXIN

Để có được hiệu quả như mong muốn sau khi tiêm phòng vacxin thì việc sử dụng vacxin đúng nguyên tắc luôn là điều kiện tiên quyết. Sử dụng vacxin sai nguyên tắc không những không mang lại được hiệu quả phòng bệnh mà còn dẫn đến nhiều nguy cơ khác như làm giảm khả năng đề kháng của vật nuôi, thậm chí gây ra những tai biến đáng tiếc. Vì vậy, trong quá trình sử dụng vacxin cần tuân thủ các nguyên tắc sau đây:

### 5.1. Tiêm phòng vacxin trên phạm vi hợp lý, đạt tỷ lệ cao

Việc xác định chính xác và hợp lý phạm vi tiêm phòng của vacxin là vô cùng quan trọng và cần thiết, nó đảm bảo tính tiết kiệm trong sử dụng vacxin, đồng thời lại đáp ứng được yêu cầu phòng bệnh. Để làm được điều này thì công tác điều tra về dịch tễ học cần được chú trọng. Thông qua các thông tin về dịch tễ học và bản đồ dịch tễ học các nhà hoạch định kế hoạch tiêm phòng có thể xác định một cách chính xác các typ vi khuẩn, virus đã từng gây bệnh trong khu vực định tiêm là gì, phạm vi dịch xảy ra ở mức độ rộng hay hẹp, lần cuối cùng dịch xảy ra tại địa phương đó là khi nào... từ đó đưa ra kế hoạch nhập chủng loại và số lượng vacxin hợp lý phục vụ cho công tác tiêm phòng tại địa phương.

Ví dụ trong công tác phòng bệnh lở mồm long móng ở Việt Nam chúng ta chỉ nhập vacxin chứa các typ O, A và Asia 1 trong khi virus lở mồm long móng có tất cả 7 typ.

Cần phải tiêm phòng các ổ dịch cũ, những vùng hàng năm có dịch đe dọa, những vùng hai bên đường giao thông trọng yếu, quanh các chợ, xí nghiệp chế biến sản, vùng biên giới ... Khi có dịch xảy ra phải tiêm chống dịch trong ổ dịch và các vùng xung quanh (vùng bị dịch uy hiếp). Ngoài khu vực bị uy hiếp là vùng an toàn, mầm bệnh khó có thể lây lan trong thời gian trước mắt. Các ba vùng đều phải tiêm phòng vacxin cho gia súc còn khỏe để tạo ngay một vành đai an toàn dịch ngăn chặn dịch lây lan. Đối với những con nghi lây trong ổ dịch ngoài việc nhanh chóng cách ly để theo dõi có thể tiêm huyết thanh cùng một lúc với vacxin để tạo miễn dịch nhanh chóng nhưng phải tiêm ở hai nơi khác nhau và chỉ ứng dụng với vacxin chết. Đối với gia súc khác loài nhưng có thụ cảm với cùng bệnh thì cũng cần được tiêm vacxin.

Để đáp ứng được yêu cầu phòng bệnh thì tiêm phòng cần đạt tỷ lệ càng cao càng tốt, nói chung phải đạt tỷ lệ 80%, các vùng bị uy hiếp phải đạt tỷ lệ 90 - 95%.

### 5.2. Tiêm phòng vacxin đúng đối tượng

Vacxin là thuốc phòng bệnh cho động vật khỏe, chưa mắc bệnh. Nếu trong cơ thể động vật đã mang sẵn mầm bệnh nhưng chưa phát ra sau khi tiêm kháng nguyên cùng loại với mầm bệnh có trong cơ thể thì bệnh phát ra sớm hơn, nặng hơn. Trường hợp ngoại lệ có thể dùng vacxin mà động vật đã nhiễm mầm bệnh. Ví dụ: sử dụng vacxin chống bệnh dại cho người đã bị chó dại cắn, trường hợp này vacxin đã tạo ra kháng thể chống virus dại trước khi virus dại lên não và tiêu diệt virus dại. Ở bệnh dịch tả lợn việc tiêm thẳng vacxin vào ổ dịch sẽ có tác dụng loại trừ nhanh con mắc bệnh nặng, còn những con mắc bệnh nhẹ hoặc chưa mắc bệnh sẽ tạo được miễn dịch.

Bình thường không dùng vacxin cho động vật quá non và thận trọng với động vật có thai. Ở động vật non, các cơ quan đảm nhận chức năng miễn dịch bảo vệ cơ thể chưa hoàn chỉnh nên đáp ứng miễn dịch với vacxin còn yếu, không những thế động vật non còn có một lượng kháng thể thụ động do mẹ truyền cho, những kháng thể đó có thể ngăn cản vacxin phát huy tác dụng. Nếu không có dịch đe dọa thì chỉ nên dùng vacxin cho súc vật từ 2 - 7 tuần tuổi, dùng vacxin càng muộn càng tốt. Khi có dịch đe dọa buộc phải tiêm phòng sớm cho động vật

non nhưng sau đó cần tiêm bổ sung.

Ở động vật mang thai, trạng thái sinh lý có nhiều thay đổi nên dùng vacxin dễ gây ra những phản ứng mạnh và làm sảy thai. Một lý do nữa khiến chúng ta không nên sử dụng vacxin trong thời kỳ gia súc cái mang thai là bào thai sẽ nhầm lẫn kháng nguyên đưa vào là thành phần của bản thân nó do đó khi sinh ra nó sẽ không sinh được miễn dịch ngay cả khi tiêm phòng bằng loại vacxin đó (hiện tượng dung nạp miễn dịch). Đặc biệt không sử dụng vacxin uống cho súc vật mang thai nhất là vacxin nhược độc.

### **5.3. Tiêm phòng đúng thời gian, đúng quy cách, đạt tỷ lệ cao**

#### *a. Tiêm đúng thời gian*

Phân lớn các bệnh truyền nhiễm thường xảy ra hoặc phát triển rầm rộ vào một thời gian nhất định trong năm như bệnh tụ huyết trùng vật nuôi thường xảy ra vào mùa mưa; dịch tả lợn xảy ra vào vụ đông xuân; bệnh lở mồm long móng ở trâu bò xảy ra vào mùa nóng tập trung vào tháng 4 - 5. Vì vậy, để phòng một bệnh truyền nhiễm nào đó cần tiêm phòng vacxin trước mùa bệnh xảy ra một khoảng thời gian đủ cho cơ thể tạo được miễn dịch phòng vệ chắc chắn (thường là 2 - 3 tuần). Vì vậy, mùa tiêm phòng của nước ta thường là tháng 3, tháng 4 và tháng 9, tháng 10 hàng năm.

Sau khi tiêm phòng vacxin, cơ thể chỉ được bảo hộ đối với bệnh đã tiêm phòng trong khoảng thời gian nhất định, khoảng thời gian đó phụ thuộc vào từng loại vacxin (thường từ 3 - 12 tháng). Hết thời gian đó cơ thể lại cảm nhiễm với mầm bệnh vì vậy cần tiêm nhắc lại kịp thời để tạo khả năng bảo hộ liên tục. Cá biệt có những loại vacxin sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch suốt đời như vacxin sởi ở người.

Hiện tại, do ý thức phòng bệnh bằng vacxin của người chăn nuôi chưa cao cùng với tập quán chăn nuôi nhỏ lẻ, quy mô chăn nuôi nhỏ lẻ nên công tác tổ chức tiêm phòng cho vật nuôi còn gặp nhiều khó khăn. Ở Việt Nam, pháp lệnh thú y quy định hàng năm phải tiêm phòng cho tất cả các bệnh bắt buộc phải tiêm phòng cho vật nuôi vào hai đợt, đợt một là tháng 3 - 4, đợt hai là tháng 9 - 10. Không những thế việc tiêm phòng bổ sung cho gia súc mới sinh, gia súc mới nhập là một việc làm cũng hết sức quan trọng.

#### *b. Tiêm đúng liều và đúng đường*

Tiêu đúng liều: phải tiêm đủ liều vacxin cho động vật theo khuyến cáo của nhà sản xuất ghi trên nhãn mác hoặc trong bản hướng dẫn kèm theo vacxin. Nếu tiêm quá liều sẽ tạo ức chế đáp ứng miễn dịch đối với cơ thể, hiệu giá kháng thể đặc hiệu tạo ra sẽ thấp, hoạt động của miễn dịch tế bào sẽ hạn chế, lãng phí vacxin, chi phí tiêm phòng tăng. Ngược lại nếu tiêm liều thấp hơn liều quy định, sẽ không đủ lượng kháng nguyên kích thích cơ thể đáp ứng miễn dịch, hiệu giá kháng thể đặc hiệu và hoạt động miễn dịch của tế bào đều thấp, không tạo được khả năng phòng vệ cho cơ thể.

Đưa vacxin đúng đường quy định: đường xâm nhập thích hợp của từng loại mầm bệnh vào cơ thể để gây bệnh lại rất khác nhau do đó đối với mỗi loại vacxin sẽ có một đường đưa vào nhất định. Các đường đưa vacxin phổ biến hiện nay là tiêm bắp, tiêm dưới da, nhổ mắt, mũi, khí dung... Khả năng đáp ứng miễn dịch của các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch trong hệ thống miễn dịch của cơ thể đối với vacxin đưa vào cơ thể bằng các đường khác nhau cũng khác nhau. Vì vậy trong quá trình nghiên cứu chế tạo vacxin các nhà nghiên cứu đã chú ý lựa chọn đường đưa tối ưu vào cơ thể cho từng loại vacxin. Do đó khi sử dụng vacxin tiêm phòng cho động vật nên đưa theo đường khuyến cáo của nhà sản xuất.

Đường thường tiêm vacxin là tiêm dưới da, nhất là vacxin có chất bô trợ và tiêm với liều lượng lớn (vacxin keo phèn, vacxin tụ huyết trùng, vacxin đóng dấu lợn). Có loại phải tiêm đúng dưới da để tránh phản ứng (vacxin nhược độc nhiệt thán, nhược độc dịch tả trâu bò, dịch tả lợn qua thỏ,...) nếu tiêm liều lượng nhỏ thì có thể tiêm bắp thịt. Một số vacxin có thể sử dụng cho uống, nhỏ mắt, nhỏ mũi,...

Theo Pastoret (1988) để phòng bệnh đường hô hấp nên lựa chọn vacxin đưa qua mũi hoặc mắt như vacxin Lasota nhỏ mắt, nhỏ mũi phòng bệnh Newcastle cho gà. Phòng bệnh đường ruột nên chọn vacxin cho qua đường miệng như vacxin E.coli cho uống phòng bệnh phân trắng ở lợn con.

Đường đưa vacxin còn phụ thuộc vào đối tượng phòng bệnh như phòng bệnh dại cho động vật nuôi có thể dùng vacxin tiêm nhưng phòng bênh dại cho động vật hoang dã như chồn, cáo phải dùng vacxin qua đường miệng. Chú ý không tiêm vacxin vào mạch máu.

#### c. Kỹ thuật sử dụng vacxin

Khả năng tạo miễn dịch của vacxin phụ thuộc rất nhiều vào việc sử dụng vacxin có đúng kỹ thuật hay không. Kỹ thuật sử dụng vacxin bao gồm kỹ thuật bảo quản vacxin và đường đưa vacxin.

Điều kiện bảo quản vacxin phải đảm bảo, vacxin phải để nơi râm mát tránh ánh sáng trực tiếp. Nhiệt độ thích hợp cho việc bảo quản vacxin là 2 - 4°C. Đặc biệt vacxin nhược độc chế từ virus phải được bảo quản ở - 15°C.

Trước khi sử dụng phải kiểm tra thật kỹ, nếu thấy vacxin chuyển màu quá hạn sử dụng phải huỷ bỏ. Vacxin phải đạt mức độ bảo hộ lớn hơn hoặc bằng 70%.

Nơi tiêm phải sát trùng, dụng cụ tiêm phải tiêu độc, liều lượng tiêm phải đảm bảo. Khi dùng vacxin nhược độc nhất là loại có nha bào thì không làm vương vãi vacxin.

Súc vật được tiêm là những con khoẻ mạnh, không tiêm vacxin cho những con đang ốm, những con quá già yếu, quá non, con mới đẻ, những con mới phẫu thuật chưa lành, những con có nhiều ký sinh trùng, sau khi tiêm cần nuôi dưỡng, chăm sóc tốt.

#### 5.4. Phối hợp các loại vacxin

Trước kia người ta sử dụng vacxin nhược độc chế từ vi sinh vật sống đã làm mất hoạt lực, vacxin nhược độc được chế từ vi sinh vật bị làm chết bằng các tác nhân lý hóa (nhiệt độ, hóa chất,...). Mỗi loại vacxin chỉ mang một mầm bệnh và do đó nó chỉ có tác dụng phòng một bệnh duy nhất, đó chính là vacxin đơn giá.

Ngày nay, việc phối hợp nhiều loại kháng nguyên trong cùng một chế phẩm vacxin để phòng bệnh cho vật nuôi và cả cho người ngày càng được nghiên cứu và sử dụng một cách rộng rãi. Trong cùng một chế phẩm vacxin có thể chứa tới hai loại kháng nguyên (vacxin nhị giá) ví dụ vacxin tụ dầu 3/2 phòng đồng thời hai bệnh đó là tụ huyết trùng lợn và đóng dấu lợn, thậm chí ba hay nhiều loại kháng nguyên khác nhau (vacxin tứ liên dịch tả lợn, phó thương hàn, tụ huyết trùng, đóng dấu lợn) và chúng được gọi bằng tên chung là vacxin đa giá.

Việc sử dụng nhiều loại vacxin phối hợp với nhau trong cùng một chế phẩm vacxin có nhiều ưu điểm. Ở một số bệnh truyền nhiễm nhất thiết phải sử dụng vacxin nhiều kháng nguyên khi bệnh nguyên gồm nhiều serotyp khác nhau, mà miễn dịch chéo không đủ để bảo hộ được (như bệnh lở mồm long móng) hoặc bệnh do nhiều loại bệnh nguyên gây nên (bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm). Sự kết hợp nhiều serotyp hoặc nhiều loại bệnh nguyên sẽ làm tăng khả năng phòng bệnh của vacxin. Không những thế dùng vacxin đa giá cho phép giảm số lần tiêm chủng, như vậy giảm được giá thành cũng như giảm được stress cho con vật.

Tuy nhiên chất bô trợ thích hợp cho từng loại kháng nguyên khác nhau là không giống nhau, vì vậy không thể phối hợp một cách ngẫu nhiên các loại vacxin với nhau mà việc phối

hợp này cần phải được nghiên cứu và thử nghiệm kỹ lưỡng trước khi sử dụng nó cho công tác phòng bệnh.

### 5.5. Một số điều chú ý khi sử dụng và bảo quản vacxin

- ❖ Bảo quản vacxin trong điều kiện quy định:
  - Để trong phòng lạnh hoặc tủ lạnh +4 ÷ +10°C
  - Không để vacxin ở chỗ nóng, tránh ánh sáng mặt trời
  - Không giữ vacxin ở nhiệt độ âm (trừ vacxin virus dạng tươi)
- ❖ Sử dụng:
  - Kiểm tra lọ vacxin trước khi sử dụng:
    - Trạng thái vật lý
    - Màu sắc
    - Dộ trong, đục
  - Kiểm tra nhãn lọ vacxin:
    - Tên vacxin: có đúng với nhu cầu không
    - Số lô, số liều, liều lượng sử dụng
    - Ngày sản xuất, số kiểm nghiệm xuất xưởng
    - Thời hạn sử dụng, quy cách bảo quản
  - Không dùng:
    - Lọ vacxin đã có thay đổi về trạng thái vật lý
    - Nút lỏng, đã có thay đổi về trạng thái vật lý
    - Lọ nứt
    - Không dùng vacxin đã quá hạn ghi trên nhãn
- ❖ Thao tác sử dụng:
  - Khi pha vacxin: dụng cụ và nước sinh lý phải được tiệt trùng, để nguội
  - Dụng cụ tiêm vacxin, tay người pha vacxin, vị trí tiêm cũng phải được tiệt trùng
  - Với vacxin sống: dụng cụ pha thuốc phải được tiệt trùng và để nguội, không được rửa bằng thuốc sát trùng
  - Khi dùng xong dụng cụ phải được tiệt trùng trở lại, tránh để **đẩy** vacxin ra ngoài
  - Khi dùng vacxin phải đưa thuốc đúng đường quy định.

### 5.6. Các phản ứng không mong muốn khi tiêm phòng vacxin và cách khắc phục

Khi tiếp nhận vacxin, cơ thể huy động bộ máy miễn dịch để tạo kháng thể chống lại virus, lượng kháng thể đạt mức tối đa sau khoảng 3 tuần tiêm vacxin và nó duy trì trong một thời gian nhất định, có khi suốt cả đời sống của con vật. Những phản ứng không mong muốn khi sử dụng vacxin có thể là các tác dụng phụ của vacxin hay những tai biến do việc sử dụng vacxin gây ra. Nguyên nhân của các phản ứng này hoặc thuộc về thuộc tính của vacxin hoặc do bảo quản vacxin không tốt (để nhiễm khuẩn, để đồng bằng với vacxin không được đồng bằng) hoặc do sai quy chế sử dụng (sai chỉ định, quá liều) và đặc biệt do đánh giá chất lượng, cấp phép xuất xưởng, không được thực hiện chu đáo, không đúng quy trình kỹ thuật. Những phản ứng ngoài ý muốn như vậy dẫn đến sự cần thiết thực hiện nghiêm ngặt đối với sản xuất, kiểm nghiệm vacxin.

#### 5.6.1. Những tác dụng phụ thường gặp khi tiêm phòng vacxin

Thông thường thì các loại vacxin sau khi được tiêm vào cơ thể được coi là có hiệu quả nếu nó gây ra được một phản ứng nào đó, tuy nhiên ở đây ta đề cập đến những phản ứng do các nguyên nhân tiêm không đúng vị trí hoặc do cơ thể quá mẫn cảm với chế phẩm vacxin.

Một phản ứng cục bộ tại nơi tiêm thường là sưng đỏ, phù nề, ngứa chỗ tiêm, có khi dẫn đến đau, có khi gây ra những nốt loét thậm chí tạo một cục cứng ngay tại nơi tiêm, một số ít trường hợp còn thấy xuất hiện hiện tượng viêm hạch tại nơi tiêm. Trường hợp nhẹ có thể

không cần can thiệp, sau 24h phản ứng sẽ mất. Trường hợp nơi tiêm sưng to và có thủy thũng dùng dầu nóng xoa bóp nơi sưng 2 - 3 lần/ngày cho con vật nghỉ ngơi ăn uống tốt, sau 2 - 3 ngày các triệu chứng sẽ khỏi.

Một số phản ứng toàn thân ở dạng nhẹ có thể gặp là sốt nhẹ từ 0.5 - 1°C có khi lên tới 1.5°C, con vật cảm thấy mệt mỏi, giảm ăn hoặc bỏ ăn nhiều khi có phản ứng nôn ợ, trên bề mặt da thấy nổi mề đay hay nổi các ban đỏ với nhiều kích thước và hình dạng khác nhau. Triệu chứng nặng hơn có thể gặp là co thắt phế quản, ngất, hạ huyết áp, bệnh thần kinh, loạn thị, liệt... Nếu các phản ứng ở thể nhẹ chỉ cần để vật nuôi nghỉ nơi thoáng mát, cho ăn thức ăn loãng, giàu đạm, tiêm các loại vitamin và thuốc trợ sức (cafein natri benzoat 25%).

Khi con vật sốt cao, các triệu chứng toàn thân nặng có thể dùng kháng sinh kết hợp với thuốc hạ sốt (paracetamol, diclofenac 2,5%) và các loại vitamin (B1, C) để tiêm bắp, chăm sóc nuôi dưỡng tốt đến khi vật nuôi hết triệu chứng, nếu con vật sốt quá cao phải dùng thuốc hạ sốt.

### 5.6.2. Những tai biến khi sử dụng vacxin

Bên cạnh những phản ứng có ích và những phản ứng phụ nhẹ có thể tự qua khỏi, vacxin vẫn gây ra những tai biến ngoài ý muốn. Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến tình trạng này, tuy nhiên trước hết phải kể đến là do có các thành phần thừa trong chế phẩm vacxin (không phải là thành phần kháng nguyên mang tính quyết định) gây ra, cũng có thể do việc tiêm phòng vacxin trong lúc cơ thể vật nuôi đang mắc một bệnh cấp tính hay một số bệnh mạn tính nặng, gia súc đang sốt hay tiêu chảy, gia súc bị suy dinh dưỡng... Một số loại vacxin không sử dụng cho gia súc mang thai, một số loại chỉ sử dụng cho vật nuôi ở một lứa tuổi nhất định...

Ngay cả khi tuyệt đối hóa chất lượng của tất cả các loại chất bổ trợ trong thành phần của vacxin thì việc xảy ra các tai biến là điều không thể tránh khỏi.

Trong thú y, khi sử dụng vacxin thường gặp những tai biến do sử dụng vacxin quá liều lượng quy định hoặc tiêm vacxin khi cơ thể đang mang chính mầm bệnh của kháng nguyên được đưa vào, vì vậy sau khi tiêm vacxin có những bệnh sẽ nhanh bùng phát hơn và nặng hơn so với khi không tiêm. Lợi dụng đặc điểm này mà người ta có thể tiêm vacxin cho vật nuôi để chẩn đoán sớm xem vật nuôi có đang mang mầm bệnh nào đó không.

Những tai biến thường gặp khi sử dụng vacxin có thể kể đến là nhiễm bệnh, các bệnh miễn dịch, sốc quá mẫn và nguy cơ biến chứng của mầm bệnh.

#### a. Nhiễm bệnh

Vacxin sống, giảm độc lực có thể gây bệnh cho các cơ thể bị suy giảm miễn dịch. Nguy cơ gây ra hiện tượng đó là do các thành phần kháng nguyên là vi sinh vật có thể hồi phục trở lại, một tác nhân bị làm giảm độc lực tìm lại được độc tính của mình và trở thành mầm bệnh tác động lên cơ thể. Trường hợp này có thể xảy ra khi tiêm quá liều lượng vacxin quy định vào cơ thể, hoặc quá trình bảo quản, vận chuyển và sử dụng vacxin sai quy cách làm cho kháng nguyên tìm lại được độc lực của mình để gây bệnh. Nguy cơ này ở vacxin ngừa bại liệt ở trẻ nhỏ là  $10^{-7}$ , nghĩa là cứ 10 triệu trẻ em uống vacxin Sabin thì có một em tai nạn loại này. Điều này không ngăn cản được việc sử dụng vacxin này bởi lẽ tỉ lệ đó được xem là chấp nhận được.

Nguy cơ trên cũng có thể xảy ra do chế phẩm vacxin nhiễm các tác nhân gây bệnh khác vào. Điều này có thể hạn chế bằng các quy trình sản xuất, bảo quản và sử dụng chặt chẽ.

#### b. Bệnh miễn dịch

Thử nghiệm vacxin phòng bệnh dại trên cừu cho thấy có xác suất gây EAE, một bệnh tự miễn trên hệ thần kinh khoảng 1/3000 - 1/1000. Lý do có thể là do vacxin chiết suất từ não chó đã mang theo cả những mảng protein của tế bào thần kinh, khi tạo miễn dịch cơ thể (được tiêm) đã tạo ra cả kháng thể chống lại cấu trúc thần kinh của mình.

Vacxin phòng ho gà có thể gây sốc kèm di chứng thần kinh với xác suất  $10^{-4} - 10^{-6}$ .

Việc tinh lọc vacxin này sẽ làm tăng mức an toàn khi sử dụng nhưng đồng nghĩa với việc làm giảm hiệu quả của nó.

c. *Sốc quá mẫn*

Thường xảy ra ngay sau khi tiêm vacxin do vacxin chứa lượng độc tố cao chưa được vô hoạt triệt đẽ. Biểu hiện của quá trình này thường là con vật khó thở, niêm mạc mắt, mũi đỏ ửng, các cơ đặc biệt là các cơ vân rung mạnh, các triệu chứng thần kinh kèm theo như dãy dưa, kêu rống. Nặng hơn còn có thể gặp là hiện tượng ỉa đái lung tung, sùi bọt mép, niêm mạc tím tái...

Khi động vật sốc quá mẫn phải can thiệp khẩn trương, kịp thời bằng cách đưa ngay động vật vào nơi thoáng mát yên tĩnh ở tư thế đầu cao hơn đuôi cho động vật dễ thở, xoa bóp vùng ngực để tăng cường hô hấp và nhịp tim. Dùng các loại thuốc kháng Histamin như: Dimedron, Ephedrin, Phenegan, Adrenalin..., kết hợp truyền dung dịch sinh lý mặn hoặc sinh lý ngọt có trộn thêm vitamin B<sub>1</sub> hoặc vitamin C.

d. *Tạo ra những biến chứng mới*

Điều này xảy ra khi kháng nguyên được đưa vào có cấu trúc giống với kháng nguyên hiện có trong cơ thể của vật nuôi, hiện tượng này cũng có thể gặp khi sử dụng các loại vacxin như có độc kém chất lượng. Điều đó lý giải tại sao chúng ta chỉ có thể tiêm vacxin H5N2 cho gà để phòng cúm A H5N1 (vacxin dị ứng).

Ở người, đã có một số thảm họa vacxin xảy ra trên thế giới mà lịch sử phát triển vacxin đã phải ghi nhận:

\* Thảm họa Mulkowal: xảy ra vào tháng 10 năm 1902 ở Mulkowal, Ấn Độ, 19 người chết vì uốn ván sau khi tiêm vacxin dịch hạch bất hoạt toàn tế bào, đó là do vacxin này bị nhiễm khuẩn trong quá trình sản xuất tại cơ sở Haffkine ở Bombay Ấn Độ.

\* Thảm họa Lucbeck: Ở Lucbeck, Đức khoảng 250 trẻ em đã tình cờ bị cho uống vi khuẩn lao độc thay vì vacxin BCG không độc. Đó là sự nhầm lẫn trong phòng thí nghiệm do để chung vi khuẩn lao độc và vi khuẩn lao không độc để sản xuất vacxin. Kết quả là 72 trẻ chết do lao trong vòng 12 tháng. Từ thảm họa này, người ta đã đưa ra những quy định đảm bảo an toàn cho phòng thí nghiệm và đội ngũ nhân viên.

\* Thảm họa Cutter: vacxin bại liệt bất hoạt Salk sản xuất tại Mỹ đã được cơ quan kiểm định quốc gia FDA cấp đăng ký sử dụng. Tháng 4 năm 1955, có 120.000 trẻ em được tiêm lô vacxin Salk sản xuất tại Cutter, California. Kết quả là 60 trẻ em bị liệt, nguyên nhân do phạm sai lầm trong sản xuất, xử lý không đủ nồng độ formaline nên virus bại liệt cường độc trong vacxin vẫn còn sống.

\* Thảm họa vacxin cúm lợn: mùa xuân 1976 ở Mỹ, từ vụ dịch cúm gây chết người, người ta đã phân lập được một chủng virus cúm từ lợn có công thức kháng nguyên HSw1N1, chủng virus này có cấu trúc kháng nguyên giống với virus cúm đã gây đại dịch năm 1918 - 1919 với đặc tính gây tử vong cao. Cơ quan y tế Mỹ cho sản xuất vacxin cúm từ chủng virus này để dùng rộng rãi từ tháng 12 năm 1976, khoảng 45 triệu liều vacxin cúm lợn đã được dùng cho người. Ngay sau đó, những người được tiêm vacxin xuất hiện hội chứng viêm đa thần kinh nặng.

## VI. QUY ĐỊNH VỀ VIỆC TIÊM PHÒNG BẮT BUỘC VACXIN CHO GIA SÚC VÀ GIA CẦM Ở VIỆT NAM

### 6.1. Phạm vi, đối tượng áp dụng

1. Quy định này được áp dụng đối với gia súc, gia cầm trong diện phải tiêm phòng tại các hộ gia đình, cá nhân, cơ sở chăn nuôi động vật tập trung.

2. Tổ chức, cá nhân trong nước, nước ngoài có hoạt động chăn nuôi gia súc, gia cầm trên lãnh thổ Việt Nam phải tuân theo qui định này.

### 6.2. Giải thích thuật ngữ

1. Gia súc, gia cầm thuộc diện tiêm phòng là gia súc, gia cầm trong vùng quy định phải tiêm phòng và có đủ điều kiện để tiêm phòng (không tính gia súc đang mắc bệnh, có chửa kỳ cuối, gia súc mới sinh).

2. Tiêm phòng định kỳ là tiêm phòng vào thời gian nhất định được quy định trong năm tùy theo từng bệnh.

3. Tiêm phòng bổ sung là tiêm phòng ngoài thời gian tiêm định kỳ đối với gia súc mới sinh đến độ tuổi tiêm phòng, gia súc mới nhập đàn, gia súc chưa được tiêm trong lần tiêm định kỳ.

4. Tiêm phòng khẩn cấp là tiêm phòng khi xảy ra dịch bệnh.

### **6.3. Các bệnh phải tiêm phòng, tỷ lệ tiêm phòng**

1. Các bệnh phải tiêm phòng bắt buộc, bao gồm:

Bệnh Lở mồm long móng

Bệnh Dịch tả lợn

Bệnh Nhiệt thán

Bệnh Tụ huyết trùng trâu bò, lợn

Bệnh Đại

Bệnh Newcastle

Bệnh Dịch tả vịt

Khi tiêm phòng những bệnh trên đây, tỷ lệ tiêm phòng phải đạt 100% cho gia súc, gia cầm trong diện tiêm.

2. Những bệnh khác: tiêm phòng để không chê, thanh toán dịch bệnh theo đề nghị của Cục Thú y.

### **6.4. Tiêm phòng đối với từng bệnh**

#### **6.4.1. Bệnh Lở mồm long móng**

1. Đối tượng tiêm phòng bao gồm trâu, bò, dê, cừu, lợn nái, lợn đực giống.

2. Phạm vi tiêm phòng:

a) Tiêm phòng định kỳ đối với các huyện, quận, thị xã, thành phố thuộc tỉnh (sau đây gọi chung là cấp huyện) có biên giới với các nước khác; các xã, phường, thị trấn (sau đây gọi chung là cấp xã) đã xảy ra dịch trong vòng 2 năm trước đó.

Tiêm 2 lần trong năm, lần sau cách lần trước 6 tháng; thời gian tiêm vào tháng 3 - 4 và tháng 9 - 10 hàng năm.

b) Tiêm phòng khẩn cấp khi có dịch xảy ra: tiêm gia súc mẫn cảm với bệnh tại các thôn, ấp, xã, huyện xung quanh nơi xảy ra dịch, tiêm từ ngoài vào trong. Chi cục Thú y quyết định vùng tiêm tùy theo tính chất lây lan của bệnh.

3. Chế độ tiêm phòng:

a) Đối với vùng biên giới tiêm liên tục 5 năm. Thời gian tiêm có thể kéo dài, vùng tiêm có thể thu hẹp tùy theo tình hình dịch bệnh tại nơi đó và tình hình dịch bệnh ở nước láng giềng.

b) Đối với vùng ổ dịch cũ (bao gồm vùng có dịch và vùng bị dịch uy hiếp) không thuộc vùng biên giới; tiêm liên tục trong 2 năm, sau đó không tiêm nữa nếu trong thời gian 2 năm đó không xảy ra dịch.

c) Những tỉnh nằm trong vùng dự kiến thanh toán bệnh không phải tiêm phòng.

4. Liều lượng, đường tiêm, gia súc trong diện tiêm theo hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin và Cục Thú y.

#### **6.4.2. Bệnh Dịch tả lợn**

1. Đối tượng tiêm phòng: tất cả các loại lợn trong diện tiêm phòng

2. Phạm vi tiêm phòng: Các ơ sở chăn nuôi tập trung, chăn nuôi hộ gia đình trong phạm vi cả nước.

3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 2 lần vào tháng 3 - 4 và 9 - 10 hàng năm.

4. Tiêm phòng bổ sung đối với lợn mới sinh, mới nhập về chưa được tiêm trong thời gian tiêm định kỳ.

5. Tiêm phòng khẩn cấp: khi có dịch xảy ra, tiêm thẳng vào ổ dịch trong phạm vi xã có dịch.  
6. Liều lượng, đường tiêm, lợn trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin.

#### **6.4.3. Bệnh Nhiệt thán**

1. Đối tượng tiêm phòng: trâu, bò, ngựa  
2. Phạm vi tiêm phòng: Các tỉnh có dịch trong thời gian 10 năm tính từ ổ dịch cuối cùng.  
3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 2 lần vào tháng 3 - 4 và 9 - 10 hàng năm.  
4. Tiêm phòng bổ sung đối với gia súc mới sinh, gia súc thuộc diện tiêm phòng mới nhập về.

5. Liều lượng, đường tiêm, gia súc trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin

#### **6.4.4. Bệnh Tụ huyết trùng**

1. Đối tượng tiêm phòng: trâu, bò, lợn.  
2. Phạm vi tiêm phòng: các cơ sở chăn nuôi tập trung, chăn nuôi hộ gia đình trong phạm vi cả nước.  
3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 2 lần vào tháng 3 - 4 và 9 - 10 hàng năm.  
4. Tiêm phòng bổ sung đối với gia súc mới sinh, gia súc thuộc diện tiêm phòng mới nhập về.  
5. Liều lượng, đường tiêm, gia súc trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin

#### **6.4.5. Bệnh Đại**

1. Đối tượng tiêm phòng: chó, mèo nuôi.  
2. Phạm vi tiêm phòng: cá nhân, tổ chức trong phạm vi cả nước.  
3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 1 lần bằng vacxin té bào.  
4. Tiêm phòng bổ sung cho chó, mèo mới sinh.  
5. Liều lượng, đường tiêm, gia súc trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin.

#### **6.4.6. Bệnh Newcastle**

1. Đối tượng tiêm phòng: gà các lứa tuổi.  
2. Phạm vi tiêm phòng: các cơ sở chăn nuôi tập trung, chăn nuôi hộ gia đình trong phạm vi cả nước.  
3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 2 lần. Tùy theo lứa tuổi gà, loại vacxin. Có thể nhỏ vacxin vào mắt, mũi hoặc tiêm đối với chăn nuôi hộ gia đình, cá nhân. Đối với các cơ sở chăn nuôi tập trung tiêm phòng theo lịch.  
4. Liều lượng, đường tiêm, gia cầm trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin.

#### **6.4.7. Bệnh Dịch tả vịt**

1. Đối tượng tiêm phòng: vịt, ngan các lứa tuổi  
2. Phạm vi tiêm phòng: các cơ sở chăn nuôi tập trung, chăn nuôi hộ gia đình trong phạm vi cả nước.  
3. Tiêm phòng định kỳ mỗi năm 2 lần, tùy theo lứa tuổi.  
4. Liều lượng, đường tiêm, gia cầm trong diện tiêm theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất vacxin.

#### **6.5. Trách nhiệm thực hiện**

1. Tổ chức, cá nhân chăn nuôi động vật phải nghiêm chỉnh chấp hành bản Quy định này.  
2. Cơ quan quản lý nhà nước chuyên ngành về thú y các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương có trách nhiệm lập kế hoạch và tổ chức thực hiện việc tiêm phòng, hướng dẫn việc sử dụng, bảo quản vacxin.  
3. Cục Thú y có trách nhiệm hướng dẫn việc tiêm phòng bắt buộc vacxin cho gia súc, gia cầm khi có dịch bệnh xảy ra.

## VII. MỘT SỐ LỊCH SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO GIA SÚC, GIA CÀM

### 7.1. Lịch sử dụng vacxin cho lợn

#### LỊCH CHUNG SỬ DỤNG VACXIN CHO LỢN

Loại vacxin	Thời gian miễn dịch	Định kỳ/năm	Thời gian tiêm phòng	Liều lượng	Đối tượng			
					Lợn con	Lợn thịt	Lợn nái	Đực giống
Dịch tả lợn	1 năm	2 lần (có bổ sung)	tháng 3 - 4 và 8 - 9	1ml	30 - 45 ngày tuổi/ tiêm mũi đầu	Không tiêm mũi 3	1 lần/năm	
Đóng dấu lợn vô hoạt	9 tháng	2 lần	3 - 4 và 8 - 9	2 - 3ml	>2 tháng/ tiêm lần đầu		2 lần/năm	
Đóng dấu lợn VR2 nhược độc	8 - 12 tháng	2 lần	3 - 4 và 8 - 9	1 - 2ml	>2 tháng/ tiêm lần đầu		2 lần/năm	
Tụ huyết trùng vô hoạt - keo phèn	6 - 9 tháng	2 lần	Trước mùa mưa 1 tháng	2ml	>2 tháng tiêm lần đầu, nhắc lại sau 3 tuần			
Tụ huyết trùng nhũ hóa				2ml/ bắp sâu				
Phó thương hàn lợn vô hoạt keo phèn	4 - 5 tháng			2ml	20 ngày tuổi tiêm lần 1, nhắc lại sau 2 tuần			
Leptospirosis vô hoạt	6 - 9 tháng			2 - 5 ml	>2 tháng tiêm lần đầu, nhắc lại sau 3 tuần			
Lở mồm long móng	6 tháng	2 lần	3 - 4 và 9 - 10		2 tuần tuổi - 2 tháng tuổi tiêm lần đầu			2 lần/năm

#### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO LỢN CON (theo công ty CP)

Tuần tuổi	Vacxin	Cách sử dụng	Phòng bệnh
1	Resisure	Tiêm bắp, dưới da	Suyễn lợn
2	Resisure	Tiêm bắp, dưới da	Suyễn lợn
3			
4	Lở mồm long móng	Tiêm bắp, dưới da	Lở mồm long móng
5	Pestiffa	Tiêm bắp, dưới da	Lở mồm long móng

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO LỢN HẬU BỊ

Tuần trước khi phổi	Vacxin	Cách sử dụng	Phòng bệnh
7	Respisure	Tiêm dưới da	Suyễn lợn
6	Pr - Vac - Plus (Pseudorabies nhược độc tự nhiên) + Farrowsure B (Parvovirus - 6 chủng <i>Leptospira</i> và đóng dấu lợn)	Tiêm dưới da	Viêm phổi do Pseudomonas + Parvovirus + <i>Leptospira</i> + Đóng dấu lợn
5	Lở mồm long móng	Tiêm dưới da	Lở mồm long móng
4	Respisure	Tiêm dưới da	Suyễn lợn
3	Farrowsure B (Parvovirus - 6 chủng <i>Leptospira</i> và đóng dấu lợn)	Tiêm dưới da	Parvovius và <i>Leptospira</i>
2	0		
1	0		
Phổi	0		

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO LỢN NÁI

Tuần trước khi phổi	Vacxin	Cách sử dụng	Phòng bệnh
12	Dịch tả, lở mồm long móng	Tiêm dưới da	Dịch Tả lợn + Lở mồm long móng
13	Pr - Vac - Plus, Farrowsure B	Tiêm dưới da	Viêm phổi do Pseudomonas + Parvovirus + <i>Leptospira</i> + Đóng dấu lợn
14	0		
15	0		
16		Lợn đẻ	
2 (sau khi sinh)	0		
Cai sữa	0		

*Ghi chú:*

- Respisure:** Phòng bệnh Suyễn do Mycoplasma hyopneumonia, Prizer sản xuất  
 - Pr - Vac - Plus (Pseudorabies nhược độc tự nhiên)  
 - Farrowsure B (Parvovirus - 6 chủng *Leptospira* và đóng dấu lợn)

## 7.2. Lịch sử dụng vacxin cho gà

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO ĐÀN GÀ GIÓNG THỊT

Ngày tuổi	Vaccine sử dụng	Phòng bệnh
7	Lasota lần 1 (nhỏ mắt, miệng)	Newcastle
	Chủng đậu lần 1	Đậu gà
7	Vaccine Gumboro lần 1 (Nhỏ mắt, miệng)	Gumboro
15	Vaccine Gumboro lần 2	Gumboro
25	Vaccine Gumboro lần 3	Gumboro
30	Lasota lần 2	Newcastle
51	Tiêm Newcastle Hè I (Lần 1)	Newcastle
112	Chủng đậu lần 2	Đậu gà
140	Tiêm Newcastle Hè I (Lần 2)	Newcastle
226	Tiêm Newcastle Hè I (Lần 3)	Newcastle

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO ĐÀN GÀ GIÓNG TRÚNG

Ngày tuổi	Vaccine sử dụng	Phòng bệnh
5	Vaccine Gumboro lần 1 (nhỏ mắt, miệng)	Gumboro
7	Lasota lần 1(nhỏ mắt, miệng)	Newcastle
	Chủng đậu	Đậu gà
15	Vaccine Gumboro lần 2	Gumboro
25	Vaccine Gumboro lần 3	Gumboro
30	Lasota lần 2	Newcastle
45	Lasota lần 3	Newcastle
63	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle
112	Chủng đậu lần 2	Đậu gà
115	Tiêm phòng Gumboro bằng vaccine đậu	Gumboro
140	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle
226	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO ĐÀN GÀ THƯƠNG PHẨM TRÚNG

Ngày tuổi	Vaccine sử dụng	Phòng bệnh
5	Chủng đậu + Nhỏ vaccine Gumboro lần 1	Đậu gà + Gumboro
7	Lasota lần 1(nhỏ mắt, miệng)	Newcastle
	Chủng đậu lần 2	Đậu gà
15	Vaccine Gumboro lần 2	Gumboro
25	Vaccine Gumboro lần 3	Gumboro
30	Lasota lần 2	Newcastle
45	Lasota lần 3	Newcastle
63	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle
112	Chủng đậu lần 3	Đậu gà
140	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle
226	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle

### LỊCH PHÒNG VACXIN CHO ĐÀN GÀ THƯƠNG PHẨM

Ngày tuổi	Vaccine sử dụng	Phòng bệnh
1	Gumboro 1(nhỏ mắt, miệng)	Gumboro
7	Chủng đậu	Đậu gà
	Lasota lần 1(nhỏ mắt, miệng)	Newcastle
10	Gumboro lần 2	Gumboro
20	Gumboro lần 3	Gumboro
25	Lasota lần 2	Newcastle
40	Tiêm Newcastle Hè I	Newcastle

### 7.3. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho vịt - ngan

Ngày tuổi	Vaccine	Liều lượng và cách sử dụng
VỊT GIÓNG		
2 tuần tuổi	Vaccine H5N1 (Trung Quốc) mũi 1	0.5 ml/con, tiêm bắp hoặc dưới da
6 tuần tuổi	Vaccine H5N1 (Trung Quốc) mũi 2 (Sau 5 tháng tiêm nhắc lại)	1 ml/con, tiêm bắp hoặc dưới da
7 tuần tuổi	Viêm gan vịt - ngan Dịch tả vịt	Mũi 1
Trước đẻ 2 tuần	Viêm gan vịt - ngan Dịch tả vịt	Mũi 2
VỊT CON		
Từ 1 - 7 ngày tuổi	Viêm gan vịt - ngan Dịch tả vịt	Tiêm bắp, dưới da, nhỏ mắt, nhỏ mũi, cho uống.
2 tuần tuổi	Vaccine H5N1 (Trung Quốc) mũi 1	0.5 ml/con, tiêm bắp hoặc dưới da
6 tuần tuổi	Vaccine H5N1 (Trung Quốc) mũi 2 (Sau 5 tháng tiêm nhắc lại)	1 ml/con, tiêm bắp hoặc dưới da

### 7.4. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho chó – mèo

Tuần tuổi	Vaccine	Cách dùng	Phòng bệnh
7	Tetradog(lần 1)	Tiêm bắp, dưới da	Bệnh sài sốt, bệnh do Adenovirus gây ra, bệnh do Parvovirus và bệnh xoắn khuẩn
10	Tetradog (lần 2)	Tiêm bắp, dưới da	(như trên)
12	Rabisin vô hoạt	Tiêm bắp, dưới da	phòng bệnh chó dài

### 7.5. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho trâu bò

Vaccine	Trình bày	Thời gian MD	Định kỳ/năm	Thời gian tiêm (tháng)	Liều lượng	Ghi chú
LMLM	100ml có 33 liều	6 tháng	2 lần	3 - 4, 9 - 10	3ml/con	Bê nghé 2 - 4 tháng tiêm mũi đầu
Nhiệt thán (nhược độc nha bào)	Lọ 50 ml/50 liều	1 năm	2 lần	3 - 4, 9 - 10 (bổ sung)	1ml/con	Bê nghé 2 - 4 tháng tiêm mũi đầu
THT chủng Robert vô hoạt		9 tháng	1 lần trước mùa mưa 1 tháng		2 ml/con	
THT chủng Iran vô hoạt		9 tháng	1 lần trước mùa mưa 1 tháng		2 ml	
THT P52 vô hoạt		1 năm	1 lần	3 - 4	5 ml	Tiêm bổ sung hàng tháng
THT chủng T1, T2, T3 vô hoạt		5 - 6 tháng	1 lần	3 - 4, 8 - 9	2 - 3 ml	

## VIII. MỘT SỐ LOẠI VACXIN ĐANG ĐƯỢC LUU HÀNH TẠI VIỆT NAM

BỘ NÔNG NGHIỆP  
VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN.

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
*Độc lập - Tự do - Hạnh phúc*

### DANH MỤC VẮC XIN, CHÉ PHẨM SINH HỌC, VI SINH VẬT DÙNG TRONG THÚ Y ĐƯỢC LUU HÀNH TẠI VIỆT NAM

(Ban hành kèm theo Quyết định số 42/2008/QĐ-BNN  
ngày 05 tháng 3 năm 2008 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và PTNT)

#### CANNADA CÔNG TY VETECH LABORATORIES

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Immucox vaccine for chicken I	Uniformly low doses of live oocysts	lọ	15ml	Phòng bệnh cầu trùng	VTL - 1
	Immucox vaccine for chicken II	Uniformly low doses of live oocysts	lọ	15ml	Phòng bệnh cầu trùng	VTL - 2

#### CÔNG TY INTERVET

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
1.	Nobilis Duck Plague	Virus dịch tả vịt nhược độc	lọ	250, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Dịch tả vịt	Intervet Hà Lan	IT - 2
2.	Nobilis Coryza	Virus khuẩn Coryza	chai	250ml; 500ml	Phòng bệnh Sưng phù đầu gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 4
3.	Nobilis MA 5	Virus IB dòng MA5 nhược độc	lọ	500, 1000; 2500, 5000 liều	Phòng bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 5
4.	Nobilis IB+G+ND	Virus IB, G, ND	chai	500ml	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, Gumboro, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 6
5.	Nobilis Gumboro Inac	Virus Gumboro	chai	500ml	Phòng bệnh Gumboro trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 7
6.	Nobilis Gumboro 228E	Virus Gumboro	lọ	500, 1000; 2500 liều	Phòng bệnh Gumboro trên gà	Intervet Hà Lan, Ấn Độ	IT - 8

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
7.	Nobilis ND+EDS 0.25; Nobilis ND+EDS 0.5	Virus ND, EDS	lọ, chai	250, 500ml	Phòng bệnh Newcastle, hội chứng giảm đẻ trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 9
8.	Nobilis REO 1133	Virus REO 1133	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm khớp trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 10
9.	Nobilis Gumboro D78	Virus Gumboro D78 nhược độc	lọ	200, 500;1000; 2500,5000 liều	Phòng bệnh Gumboro trên gà	Intervet Hà Lan, Ấn Độ	IT - 11
10.	Nobilis REO+IB+G+ND	Virus REO, IB, G,ND	chai	500ml	Phòng bệnh viêm khớp, viêm phế quản truyền nhiễm, Gumboro, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 12
11.	Nobilis IB+ND	Virus IB, ND	chai	500ml	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 13
12.	Nobilis REO inac	Virus Reo	chai	500ml	Phòng bệnh viêm khớp trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 14
13.	Nobilis MG 6/85	Vi khuẩn MG nhược độc	lọ	1000 liều	Phòng bệnh do Mycoplasma trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 15
14.	Nobilis Marek THV Lyo	Virus Marek	lọ	250,1000, 2000liều	Phòng bệnh Marek trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 16
15.	Nobilis FC Inac	Vi khuẩn FC	chai	500ml	Phòng Tụ huyết trùng trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 17
16.	Nobilis Marexin SB1	Virus Marek	týp	1000; 2000 liều	Phòng bệnh Marek trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 18
17.	Nobilis SG 9R	Vi khuẩn SG9R nhược độc	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh Salmonella trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 19
18.	Nobilis Rismavac	Virus Marek	ống	1000; 2000 liều	Phòng bệnh Marek trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 20
19.	Nobilis G+ND+EDS	Virus G, ND, EDS	chai	500ml	Phòng bệnh Gumboro, Newcastle, Hội chứng giảm đẻ trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 21
20.	Nobilis Marexin CA126	Virus Marek	ống	1000, 2000 liều	Phòng bệnh Marek trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 22
21.	Nobilis MA5 +Clone 30	Virus IB, ND nhược độc	lọ	500, 1000 2500liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Ấn Độ	IT - 23
22.	Nobilis AE +Pox	Virus AE, Pox nhược độc	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm não tuy truyền nhiễm, đậu trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 24
23.	Nobilis ILT	Virus ILT nhược độc	lọ	1000; 2500 liều	Phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 25
24.	Nobilis MG inac	Vi khuẩn MG	chai	500ml	Phòng bệnh do Mycoplasma trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 26

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
25.	Nobilis IB+ND+EDS	Virus IB, ND, EDS	chai	500ml	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, Newcastle, Hội chứng giảm đẻ trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 27
26.	Nobilis IB H 120	Virus IB nhược độc	lọ	1000; 2500 , 5000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 28
27.	Nobilis G+ND	Virus G, ND	chai	500ml	Phòng bệnh Gumboro, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 29
28.	Nobilis MG Antigen	Vi khuẩn MG vô hoạt	lọ	200 test/10ml	Kháng nguyên chẩn đoán bệnh do Mycoplasma trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 30
29.	Nobilis MS Antigen	Vi khuẩn MS vô hoạt	lọ	200 test/10ml	Kháng nguyên chẩn đoán bệnh viêm khớp do Mycoplasma synoviae trên g	Intervet Hà Lan	IT - 31
30.	Nobilis SP Antigen	Vi khuẩn SP vô hoạt	lọ	200 test/10ml	Kháng nguyên chẩn đoán bệnh do Salmonella trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 32
31.	Nobilis ND Hichner	Virus ND vô hoạt	lọ	500, 1000; 2500 liều	Phòng bệnh Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 33
32.	Porcilis Aujeszky	Virus Aujeszky	lọ	20; 100ml	Phòng bệnh Giả dại trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 34
33.	Porcilis Begonia	Virus Aujeszky nhược độc	lọ	10;25; 50;100 liều	Phòng bệnh Giả dại trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 35
34.	Porcilis Aujeszky +Coli	Virus Aujeszky + Coli	lọ	20;50ml	Phòng bệnh giả dại, E coli trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 36
35.	Porcilis Aujeszky+Parvo	Virus Aujeszky + Parvo	lọ	20ml	Phòng bệnh giả dại, khô thai trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 37
36.	Porcilis Parvo	Virus Parvo	lọ	20;50ml	Phòng bệnh khô thai trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 38
37.	Porcilis Coli	Vi khuẩn Coli	lọ	20;50ml	Phòng bệnh tiêu chảy do E coli trên lợn con	Intervet Hà Lan	IT - 39
38.	Nobivac Lepto	Vi khuẩn Lepto nhược độc	lọ	1 liều; 50 liều	Phòng bệnh Lepto trên chó	Intervet Hà Lan	IT - 40
39.	Nobivac DHP	Virus DHP	lọ	1 liều; 50 liều	Phòng bệnh Care, Viêm gan, khô thai trên chó	Intervet Hà Lan	IT - 41
40.	Nobivac Rabies	Virus dại	lọ	1 liều ;10 liều	Phòng bệnh dại chó	Intervet Hà Lan	IT - 42
41.	Nobivac DHPPi	Virus DHPPi	lọ	1 liều; 50 liều	Phòng bệnh Care, Viêm gan, khô thai, phó cúm trên chó	Intervet Hà Lan	IT - 43
42.	Nobi - Equenza T	Virus influenza	lọ	1 liều	Phòng bệnh uốn ván và hô hấp do virus cúm gây ra trên ngựa	Intervet Hà Lan	IT - 44
43.	Decivac FMD	Virus FMD DOE	Lọ	20, 50;100;250ml	Phòng bệnh LMLM trên trâu bò, lợn	Intervet Hà Lan,	IT - 66

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
	DOE Monovalent					Ân Độ	
44.	Nobilis ND Clone 30	Virus ND nhược độc	lọ	200, 500, 1000, 2500, 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Ân Độ	IT - 67
45.	Nobilis Newcavac	Virus ND	lọ	500,1000; 2500liều	Phòng bệnh Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 68
46.	Nobilis EDS	Virus EDS	lọ	500,1000; 2500 liều	Phòng hội chứng gián đê trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 69
47.	Decivac FMD ALSA	Virus FMD ALSA	lọ	20, 50, 100ml	Phòng bệnh LMLM trên trâu bò	Intervet Hà Lan, Ân Độ	IT - 71
48.	Nobilis Ovo - Diphterin	Virus đậu nhược độc	lọ	500;1000 liều	Phòng bệnh đậu gà	Intervet Hà Lan	IT - 76
49.	Nobilis Coryza +ND	Vi khuẩn Coryza, virus ND	chai	12 x 500ml	Phòng bệnh sưng phù đầu, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 77
50.	Nobilis CAV P4	Virus CA	lọ	1000 liều	Phòng bệnh thiếu máu truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 78
51.	Porcilis Ery+Parvo	Vi khuẩn Ery, virus parvo	lọ	20, 50 ml	Phòng bệnh đau sọkhô thai trên lợn	Intervet Hà Lan	IT - 79
52.	Nobilis ND Lasota	Virus ND Lasota nhược độc	lọ	10x 200, 500;1000; 2500 liều	Phòng bệnh Newcastle	Intervet Hà Lan, Ân Độ	IT - 80
53.	Nobilis ND Broiler	Virus ND	lọ	200, 500ml	Phòng bệnh Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 87
54.	Nobilis IB 4/91	Virus IB 4/91 nhược độc	lọ	500;1000;2500;500 0 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 88
55.	Nobilis RT +IBmulti +G+ND	Virus RT, IB,G,ND	chai	12 x 500ml	Phòng bệnh viêm mũi, viêm phế quản truyền nhiễm, Gumboro, Newcastle trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 89
56.	Nobilis IB D 1466	Virus IB, D 1466 nhược độc	lọ	10, 500, 1000, 2500, 5000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 90
57.	Nobilis RT Inac	Virus RT	chai	12 x 500ml	Phòng bệnh viêm mũi truyền nhiễm trên gà	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 91
58.	Nobilis Rismavac + CA 126	Virus Marek nhược độc	lọ	1000; 2000 liều	Phòng bệnh Marek gà	Intervet Hà Lan	IT - 92
59.	Nobilis Marexine CA 126 + SB1	Virus Marek nhược độc	lọ	1000 ; 2000 liều	Phòng bệnh Marek gà	Intervet Hà Lan	IT - 93
60.	Porcilis Pesti	Virus CSF	lọ	50,100,250ml	Phòng bệnh Dịch tả lợn	Intervet Hà Lan	IT - 94

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
61.	Porcilis M	Vi khuẩn Mycoplasma	lọ	20,50,100ml	Phòng bệnh Suyễn lợn	Intervet Hà Lan, Mỹ	IT - 95
62.	Porcilis APP	độc tố Apx1,2,3,OMP	lọ	20,100,200ml	Phòng bệnh viêm phổi màng phổi lợn	Intervet Hà Lan	IT - 96
63.	Regumate Porcin	Altrenogest	chai	360ml	Làm lên giống đòng lợn, tăng số lợn con mỗi lứa	Intervet Pháp	IT - 118
64.	Dri - Vac HVT	Virus Marek	lọ	500,1000,5000 liều	Phòng bệnh Marek trên gà	Tribio Mỹ	IT - 119
65.	Bio - Burs	Virus Gumboro	lọ	500,1000,5000 liều	Phòng bệnh Gumboro	Tribio Mỹ	IT - 120
66.	Bio - Sola Bron MM	Virus IB	lọ	500,1000,5000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Tribio Mỹ	IT - 121
67.	Solvens Oculo/Nasal (Solvens O/N)	Patent Blue V	lọ	36ml	Nước pha vacxin gà	Intervet Hà Lan, Anh Đô	IT - 122
68.	Nobilis E.Coli Inac	Kháng nguyên F11, FT	lọ	500ml	Phòng bệnh E.coli trên gà	Intervet Hà Lan	IT - 123
69.	Nobilis Cox ATM	Noãn nang E. acervulina, E.Tenalla,E. maxima	lọ	100; 500ml	Phòng bệnh Cầu trùng gà	Intervet Hà Lan	IT - 124
70.	Porcilis CSF live	virus Hogcholera nhược độc	lọ	10;20;50;100 liều	Phòng bệnh Dịch tả lợn	Intervet Anh Đô, Japan	IT - 126
71.	Nobilis IB multi + G+ND	virus IB, G, ND vô hoạt	lọ	1000 liều (500ml)	Phòng viêm phế quản truyền nhiễm, Gumboro, Newcastle	Intervet Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 127
72.	Bovine PPD Turberculin	Mycobacterium	lọ	2,2ml (20 liều) 1,6ml (15 liều)	Chẩn đoán bệnh lao bò	Intervet Hà Lan, Anh Đô	IT - 128
73.	Porcilis PRRS	Virus PRRS	lọ	10,25,50,100 liều	Phòng hội chứng rối loạn hô hấp, sinh sản lợn	Intervet Hà Lan, Anh Đô	IT - 129
74.	Nobilis ND C2	Virus Newcastle type B1, dòng C2	lọ	1000, 2000, 10000, 25000 liều	Phòng bệnh Newcastle	Intervet Hà Lan, Anh Đô, USA	IT - 130
75.	Unisolve	Sucrose, Disodium phosphate dihydrate	lọ	Lọ 10, 20, 50, 100, 200ml	Nước pha vacxin lợn	Intervet Hà Lan, Anh Đô	IT - 131
76.	Diluvac Forte	dl - tocopherol acetate, disodium phosphate dihydrate	lọ	Lọ 10, 20, 50, 100, 200ml	Nước pha vacxin lợn	Intervet Hà Lan, Anh Đô	IT - 132
77.	Prosystem BPM (Porcilis BPM)	Bordella bronchiseptica, Pasteurella multocida type A, D và M.hyopneumoniae	lọ	50; 100ml	Phòng các bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm, bệnh tụ huyết trùng và bệnh Suyễn lợn	Mỹ, Hà Lan	IT - 133

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
78.	Nobivac RL	Kháng nguyên virus dại dòng Pasteur RIV, <i>Leptospira interrogans:</i> L.Caniola, L.Icterohaemorrhagiae	Lọ	1ml (1 liều)	Phòng bệnh Đại, Lepto ở chó	Intervet Hà Lan	IT - 135
79.	Nobilis Salenvac T	<i>S. enteritidis</i> PT4 <i>S. typhimurium</i> DT 104	Lọ	10ml	Vắcxin vô hoạt Phòng bệnh do <i>Salmonella</i> ở gà	Intervet Hà Lan	IT - 136
80.	Porcilis® Myco silencer once	Kháng nguyên <i>Mycoplasma hyopneumonia</i> strain 11	Lọ (PE)	20;50;100ml; 200;500ml (2ml / 1 liều)	Vắcxin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do <i>Mycoplasma hyopneumonia</i>	Intervet USA	IT - 139
81.	Nobilis® Covac - 4	Kháng nguyên <i>Haemophilus paragallinarum</i> :	Lọ (PE)	500ml (0,5ml/1 liều)	Vắcxin vô hoạt phòng bệnh Coryza do <i>H. paragallinarum</i> .	Intervet Hà Lan	IT - 140
82.	Prosystem® 2*1*4*3( ProSystem Trec)	- ProSystem 2*1: Kháng nguyên Rotavirut (serotype G <sup>4,5</sup> ) và virut viêm dạ dày ruột truyền nhiễm. - ProSystem 4*3: Giải độc tố vi khuẩn <i>E.coli</i> và <i>Cl.perfringens</i> (typeC)	Lọ	1lọ đđóng khô + 1 lọ 20ml dung dịch (mười liều)	Phòng bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGE) và tiêu chảy do Rotavirut. Phòng, không ché bệnh do <i>E.coli</i> (K88, K99, F41, 987P) và do <i>Cl.perfringens</i> type C cho lợn.	Intervet USA	IT - 141
83.	Nobilis Diluent FD	Đường, Potassium dihydrogen , Disodium phosphate dihydrate, Sodium chloride, Phenol sulfonpyphthalein,	Lọ	200; 400ml 200; 400; 500ml	Dung dịch pha vắcxin sống đông khô	Intervet Hà lan	IT - 142
84.	Nobilis Diluent CA	Đường, Pancreatic digest of casein, Kali dihydrogen phosphate, Phenol sulfonpyphthalein,	Lọ	200; 400; 500 ml 200; 400; 500; 600; 800ml; 1; 1,2l	Dung dịch pha vắcxin liên kết tế bào	Intervet Hà lan	IT - 143
85.	Porcilis M Hyo	Mycoplasma hyopneumonia dòng 11 vô hoạt	Lọ	20ml (10liều); 50ml (25liều); 100ml (50liều);	Phòng bệnh viêm phổi do <i>Mycoplasma hyopneumonia</i> gây ra trên lợn	Intervet Hà lan	IT - 144

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
				200ml (100liều); 250ml (125liều)			
86.	Porcilis AR - T	Giải độc tố Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica vô hoạt	lọ	20ml (10liều); 50ml (25liều)	Phòng bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm trên lợn	Intervet Hà lan	IT - 145
87.	Nobilis Influenza H5	Kháng nguyên vi rút cúm gia cầm vô hoạt тип A, тип phụ H5N2,	chai	500ml	Phòng bệnh cúm gia cầm trên gà do virus cúm chủng A, phân chủng H5	Hà Lan, Tây Ban Nha	IT - 146
88.	DECIVAC FMD DOE - Trivalent	Kháng nguyên LMLM vô hoạt type O1, A22, Asia1.	lọ	20ml(10liều); 30ml(15 liều); 50ml(25liều); 100ml(50liều)	Phòng bệnh LMLM trên trâu, bò, cừu, dê, lợn	Ấn Độ	IT - 148
89.	DECIVAC FMD DOE	Kháng nguyên LMLM vô hoạt chủng O1 Manisa	chai	20; 50ml 100; 250; 500ml	Vaccine ngừa lở mồm long móng	Hà Lan	IT - 149

## HÀN QUỐC

### CÔNG TY KOREA MICROBIOLOGICAL LAB

TT	Tên thuốc (nguyên liệu)	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Thể tích/ khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
1.	Tissue - Culture Rabies Vac	Vaccine sống đông khô	lọ	1; 2; 5; 10liều	Phòng bệnh dại	KMB - 4
2.	IBD - VAC	Bursal disease virus	lọ	1000liều	Phòng bệnh Gumboro trên gà	KMB - 5
3.	HC Vac (hog cholera vaccine)	Hog Cholera	chai	2; 5; 10; 20; 50liều	Vaccine dịch tả lợn	KMB - 18
4.	Rabies vaccine	Virus dại	lọ	1; 2; 3; 5; 10; 20 liều	Vaccine phòng bệnh dại	KMB - 19

**CÔNG TY GREEN GROSS VETERINARY PRODUCTS**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Porcine parvovirus gene vacxin	Porcine parvovirus VP2 protein	lọ	5 liều	Phòng bệnh do Parvovirus gây ra	GGVK - 01
	Swine E.coli vacxin	K88 ab, K88 ac, K99, 987P K88 ab pili, K88 ac pili	lọ	5 liều	Phòng bệnh do E.coli gây ra	GGVK - 02
	IB1 Live/IB vacxin	Infectious bronchitis virus (H - 20 strain) Newcastle disease virus (B1 strain)	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và bệnh Viêm thanh khí quản truyền nhiễm	GGVK - 03

**CÔNG TY CHOONG ANG VACXIN LABORATORY**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Khối lượng/ thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1	NDLS - VAC	Virut Newcastle sống, (chủng Lasota, B1).	lọ	500;1000 liều	Phòng bệnh Newcastle của gà	CADL - 1
2	NB <sup>LH</sup> - VAC (vắcxin)	Virut Newcastle sống (chủng Lasota, type B1); Virut viêm phế quản truyền nhiễm sống (Type Mass, chủng H - 120)	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm của gà	CADL - 2
3	IBD - VAC (vắcxin)	Virut Gumboro sống (chủng CAG).	lọ	500;1000 liều	Phòng bệnh Gumboro (viêm túi Bursa) của gà	CADL - 3
4	NB <sup>BH</sup> - VAC (vắcxin)	Virut Newcastle (chủng B1, Type B1); Virut viêm phế quản truyền nhiễm của gà (Type Mass, chủng H - 120)	lọ	500;1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và viêm phế quản truyền nhiễm của gà	CADL - 4
5	IB - VAC (vắcxin)	Virut viêm phế quản truyền nhiễm sống (Type Mass chủng H- 120)	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm của gà	CADL - 5
6	ILT - VAC (vắcxin)	Virut bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm của gà, sống (chủng IVR - 12)	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm của gà.	CADL - 6
7	HC - VAC	Virut Dịch tả lợn nhược độc (chủng LOM)	lọ	10; 20 liều	Phòng bệnh Dịch tả lợn	CADL - 7
8.	PPV - VAC (vắcxin)	Virut Parvo của lợn (chủng PVK 1 - 3) vô hoạt	lọ	5;10 liều	Phòng bệnh do Parvovirus của lợn	CADL - 8

## CỘNG HÒA SÉC

CÔNG TY BIOVETA, A.S

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Polypleurosin (inj.ad us.vet.)	Pasteurella multocida (type A; D) ; Actinobacillus pleuropneumoniae (type 2; 9) ; Bordetella bronchiseptica	chai	5, 10, 20, 25, 50, 100, 200ml	Vaxxin phòng hội chứng ho thở trên lợn	BVTC - 1
	Rokovac (Inj.ad us.vet.)	Rotavirus suis; - Escherichia coli (O 101:K99; O 147:K88; O 149:K88; K85:987P)	chai	5, 10, 20, 25, 50, 100, 200ml	Vaxxin phòng hội chứng lợn con phân trắng	BVTC - 2
	Parvoerysin (inj.ad us.vet.)	Parvovirus enteritidis Erysipelothrix rhusiopathiae	chai	5, 10, 20, 25, 50, 100, 200ml	Phòng bệnh Parvo và bệnh đóng dấu lợn	BVTC - 3
	Parvosin - OL (inj.ad us.vet.)	Parvovirus suis inactivatum	chai	5, 10, 20, 25, 50, 100, 200ml.	Phòng bệnh Parvo virus lợn	BVTC - 4
	Biocan Puppy inj	Kháng nguyên Virus Febris contagiosae canis và Parvovirus enteritidis canis inact.	chai	1; 5; 10; 20; 25; 50; 100ml. (1ml/1liều)	Vaxxin phòng bệnh sài sốt và bệnh Parvovirus cho chó.	BVTC - 8
	Biocan DHPPi	Kháng nguyên Virus Febris, Infectious canine laryngotracheitis, parvovirus, parainfluenza virus	chai	1; 5; 10; 20; 25; 50; 100 ml. (1ml/1liều)	Phòng bệnh sài sốt, bệnh Parvovirus, viêm phổi do Adenovirus và bệnh Cúm cho chó.	BVTC - 9

INDONESIA  
CÔNG TY P.T. SURYA HYDUP SATWA

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Bivalent Coryza Vacxin	Kháng nguyên Coryza	lọ	100; 200 liều (100ml) 250; 500 liều (250ml) 500; 1000 liều (500ml)	Phòng trị bệnh Coryza ở gia cầm	SHS - 01

**CÔNG TY P.T. MEDION**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Khối lượng/Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Medivac ND Lasota	ND chủng virus La Sota	lọ	50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MDI - 01
	Medivac Gumboro B	IBD chủng virus D22	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Gumboro	MDI - 02
	Medivac Coryza B	Haemophylus paragallinarum W chủng strain và Modesto	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Coryza	MDI - 03
	Medivac Coryza T	Haemophylus paragallinarum W, chủng Spross và Modesto	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Coryza	MDI - 04
	Medivac ILT	Vaccine ILT chủng virus A 96	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm	MDI - 05
	Medivac Pox	Fowl Pox virus M - 92 strain	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh đậu gà	MDI - 06
	Medivac ND Emulsion	Newcastle virus, chủng Lasota	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MDI - 07
	Medivac ND Hitchner B1	Vaccine Newcastle chủng Hitchner B1 strain	lọ	50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MDI - 08
	Medivac ND clone 45	Vaccine Newcastle chủng virus Clone 45	lọ	100, 200, 500, 1000, 2000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MDI - 09
	Medivac ND - IB	Vaccine Newcastle chủng virus Clone 45 và IB virus H - 120 Massachusetts	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và bệnh viêm phế quản truyền nhiễm	MDI - 10
	Medivac Gumboro A	Vaccine IBD chủng virus Cheville (1/68)	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Gumboro	MDI - 11
	Medivac ND - EDS Emulsion	Vaccine Newcastle chủng La Sota , Adenovirus 127 Mc Ferran	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và hội chứng giảm đẻ	MDI - 12
	Medivac IB H - 120	Vaccine IB chủng virus H - 120 Massachusetts	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm	MDI - 13
	Medivac IB H - 52	Vaccine IB chủng virus H - 52 Massachusetts	lọ	100, 200, 500, 1000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm	MDI - 14
	Medivac Gumboro Emulsion	Gumboro virus	chai, lọ	200; 500; 1000 liều	Phòng bệnh Gumboro	MDI - 47
	Medivac ND - EDS - IB Emulsion	Newcastle virus lasota strain, Infectious bronchitis virus mass 41 strain, Avian adeno virus 127 Mc Ferran	chai, lọ	200; 500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle, hội chứng giảm đẻ và viêm phế quản truyền nhiễm gia cầm	MDI - 48
	Medivac ND - IB - IBD Emulsion	Newcastle virus, Infectious bronchitis virus, Infectious Bursal Disease virus	chai, lọ	200; 500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm và bệnh Gumboro ở gia cầm	MDI - 49

**MALAYSIA**  
**CÔNG TY VACXINS AND PHARMACEUTICALS SDN.BHD**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
	My vac HC(GPE - ) Hog Cholera Vacxin	Virus nhược độc dịch tả lợn, chủng GPE - ve	lọ	10; 20; 50; 100 liều	Phòng bệnh dịch tả lợn	Malaysia	MVP - 1
	My vac ND - S Newcastle Disease Vacxin	Virus nhược độc Newcastle, chủng Mukteswar 'S'	lọ	200; 500; 1.000; 2.000liều	Phòng bệnh Newcastle cho gà từ 6 tuần tuổi	Malaysia	MVP - 2
	My vac ND - F Newcastle Disease Vacxin	Virus nhược độc Newcastle, chủng Asplin 'F'	lọ	200; 500; 1.000; 2.000liều	Phòng bệnh Newcastle cho gà 1 ngày tuổi	Malaysia	MVP - 3
	My vac Gumboro Plus Vacxin Gumboro V877	Virus nhược độc Gumboro, chủng V877	lọ	200; 500; 1.000; 2.000liều	Phòng bệnh Gumboro cho gà từ 10 - 14 ngày tuổi.	Malaysia	MVP - 4
	My vac Fox Fowl Pox Vacxin	Virus nhược độc đậu gà, chủng Beaudette	lọ	200; 500; 1.000; 2.000liều	Phòng bệnh đậu gà cho gà 2 tuần tuổi trở lên.	Malaysia	MVP - 5

**MỸ**  
**CÔNG TY FORT DODGE ANIMAL HEALTH**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
1	Poxin	Chứa virus đậu sống	lọ	500, 1000 liều	Phòng bệnh đậu gà ở gia cầm	Mỹ	SAH - 1
2	MD Vac Lyo CFL	Herpesvirus sống	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh viêm đa dây thần kinh ở gia cầm.	Mỹ	SAH - 2
3	Newcastle K ( New - Vac K)	Virus Newcastle chết	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	Mỹ, Brazil	SAH - 3
4	Newcastle Lasota + Bron Mass	Virus Newcastle sống - Lasota; Virus Bronchitis sống - Massachusset	lọ	1000 liều	Vacxin sống phòng bệnh Newcastle và viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm.	Mỹ	SAH - 4
5	Bursine K	Virus Gumboro chết	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro	Mỹ	SAH - 5
6	Bursine 2	Virus Gumboro	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro	Mỹ	SAH - 6
7	Newcastle B1+Bron Conn	Virus Newcastle - B1 Virus Bronchitis - Connecticut	lọ	1000 liều	phòng Newcastle và viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm.	Mỹ	SAH - 7

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
8	Suvaxyn PrV (Aujeszky vacxin)	Pseudorabies	lọ	25; 100 liều	Vacxin phòng già dại	Mỹ	SAH - 8
9	Rabvac 3 TM	Virus dại	lọ	1; 10liều	Vacxin phòng bệnh dại	Mỹ	SAH - 10
10	Duramune DA <sub>2</sub> L	Virus Distemper sống Adenovirus sống, <i>Leptospira</i> vô hoạt	lọ	1; 10 liều	Vacxin phòng bệnh Care, Lepto, Adenovirus	Mỹ	SAH - 11
11	Duramune Max 5/4L	Virus Distemper, Adenovirus, Parvovirus sống, Khuẩn <i>Leptospira</i>	lọ	1 liều 10 liều	Vacxin phòng bệnh do Care, <i>Leptospira</i> , Adenovirus, Parvovirus gây ra	Mỹ	SAH - 12
12	Bursine N - K TM	Virus Gumboro chết Virus Newcastle chết	lọ	500 1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro, Newcastle	Mỹ	SAH - 13
13	New Bronz TM	Virus Newcastle chết Virus Bronchitis chết	lọ	500 1000 liều	Vacxin phòng bệnh dịch tả ở gia cầm giai đoạn gà con	Mỹ	SAH - 14
14	Laryngo Vac TM	Virus sống Laryngotracheitis	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm trên gia cầm.	Mỹ	SAH - 15
15	Bursine Plus	Virus Gumboro	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro	Mỹ	SAH - 16
16	Suvaxyn RespiFend MH	Khuẩn Mycoplasma Hyopneumonia vô hoạt	lọ	10; 50 liều	Vacxin phòng bệnh viêm phổi địa phương trên lợn.	Mỹ	SAH - 17
17	Pest - Vac	Pestivirus sống	lọ	10; 25; 50 liều	Vacxin phòng bệnh dịch tả lợn.	Brazil	SAH - 18
18	Poulvac Coryza ABC IC <sub>3</sub>	Haemophilus paragallinarum	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Coryza	Mỹ	FDA - 3
19	Newcastle Disease B1 Type, B1 Strain	Virus Newcastle sống	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	Mỹ	FDA - 4
20	Newcastle Disease B1 Type, Lasota Strain	Virus Newcastle sống	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	Mỹ	FDA - 5
21	Bursal Disease - Newcastle Disease Bronchitis Vacxin (Provac - 3)	Virus Newcastle, Bursal, Bronchitis chết	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Gumboro, Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm	Mỹ	FDA - 6
22	Mycoplasma gallisepticum bacterin (MG - Bac)	Mycoplasma gallisepticum bacterin	lọ	1000 liều	Phòng bệnh do Mycoplasma gallisepticum bacterin gây ra	Mỹ	FDA - 7
23	Avian Reovirus Vacxin (Tri - Reo)	Reovirus	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm khớp	Mỹ	FDA - 8

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
24	Suvaxyn Aujeszky NIA <sub>3</sub> - 783	Dòng virus Aujeszky NIA <sub>3</sub> - 783	lọ	10; 50 liều	Phòng bệnh giả dại	Hà Lan	FDA - 9
25	Tenosynovitis Vacxin (V.A - Vac)	Reo virus sống	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Reo	Mỹ	FDA - 10
26	Bursal Disease - Newcastle Disease - Bronchitis - Reovirus vacxin ( Provac - 4)	Virus Newcastle, Bursal, Bronchitis và Reovirus chết	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro và bệnh dịch tả viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm	Mỹ	FDA - 11
27	EDS - New vacxin	Virus Newcastle và E.D.S	chai	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và Hội chứng giảm đẻ	Brazil	FDA - 12
28	Suvaxyn MH - One	Kháng nguyên Mycoplasma Hyopneumoniae, chủng P - 5722 - 3	lọ	30ml(10liều); 120ml(50liều); 250ml(125liều); 500ml(250liều);	Phòng bệnh đường hô hấp do Mycoplasma Hyopneumoniae gây ra trên lợn	Mỹ	SAH - 19
29	Chick i N - K Newcastle Disease vacxin	Kháng nguyên virus gây bệnh Newcastle vô hoạt	lọ	250ml(2500liều); 500ml(5000liều)	Phòng bệnh Newcastle do virus Newcastle, type B1, chủng Lasota gây ra trên gà.	Brazil	FDA - 14
30	Poulvac EDS New Bronz Vacxin	Kháng nguyên virus: Egg Drop Syndrome, chủng AD 127; Newcastle, type B1, chủng Lasota ND; virus gây viêm phế quản truyền nhiễm chủng H120	lọ	250ml(500liều); 500ml(1000liều)	Phòng hội chứng suy giảm đẻ trứng, bệnh Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm trên gà	Mỹ	FDA - 15

**CÔNG TY LOHMANN ANIMAL HEALTH INT.**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1	Newcastle Bronchitis vacxin, B1 Type	Virus Newcastle và Infectious bronchitis	lọ	1000,2000,2500,5000 liều	Vacxin phòng bệnh Newcastle và viêm phế quản ở gà	VL - 1
2	Fowl Pox vacxin	Virus sống, có nguồn gốc phôi gà	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh đậu ở gia cầm .	VL - 2
3	Avian encephalo - myclitis Fowl vacxin	Virus sống, có nguồn gốc phôi gà	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh viêm não tủy và đậu gà ở gia cầm	VL - 3
4	Fowl Laryngo - trachetis Modified	Virus sống, có nguồn gốc phôi gà	lọ	1000; 2000, 2500, 5000 liều	Vacxin phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm	VL - 4
5	Bursal Disease Newcastle Brochitis Reovirus vacxin	Virus IBD, Newcastle, Reovirus và Infectious bronchitis	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro, Newcastle, viêm phế quản, viêm khớp - chống còi cọc	VL - 5
6	Bursal Disease vacxin	Virus IBD, nguồn gốc phôi gà	lọ	1000; 2500, liều	Vacxin phòng Gumboro ở gia cầm	VL - 6
7	Bursal Disease vacxin	Virus IBD, nguồn gốc phôi gà	lọ	1000; 2000, 2500 liều	Vacxin phòng bệnh Gumboro	VL - 7
8	Newcastle Disease vacxin	Virus Newcastle	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh Dịch tả gà	VL - 8
9	Bursal - Newcastle Disease vacxin	Virus vô hoạt	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng Gumboro, Dịch tả	VL - 9
10	Marek's disease vacxin	Virus sống	lọ	1000; 2000, liều	Phòng bệnh viêm đa dây thần kinh	VL - 10
11	Haemophilus para - galinarum bacterin	Vi khuẩn Haemophilus paragallinarum	lọ	1000 liều	Vacxin phòng bệnh sổ mũi truyền nhiễm ở gia cầm .	VL - 11
12	Avian Reo Bursal Disease vacxin	Virus IBD, Reovirus	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng bệnh viêm khớp - còi cọc và bệnh Gumboro	VL - 12
13	Avian Reovirus	Virus Reovirus	lọ	500; 1000 liều	Vacxin phòng viêm khớp gia cầm.	VL - 13
14	Pasteurella multocida baterin	Vi khuẩn pasteurella multocida	lọ	1000 liều	Vacxin chêt phòng bệnh Tụ huyết trùng ở gia cầm	VL - 14
15	Tenosynovitis vacxin	Reovirus	lọ	1000; 2000, 2500 liều	Vacxin phòng viêm khớp ở gia cầm	VL - 15
16	Mycoplasma gallisepticum	Mycoplasma gallisepticum	lọ	1000 liều	Vacxin phòng C.R.D ở gia cầm	VL - 16
17	Pasteurella multocida vacxin	Vi khuẩn pasteurella multocida	lọ	500; 1000 liều	Vacxin sống phòng bệnh Tụ huyết trùng ở gia cầm	VL - 17
18	Newcastle Disease vacxin	Virus Newcastle	lọ	1000, 2000, 2500 liều	Vacxin phòng bệnh Newcastle ở gia cầm	VL - 18

**CÔNG TY EMBREX, INC**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
	Bursaplex TM (Bursal disease vacxin - Live vacxin)	Bursal disease vacxin - Live virus	lọ	1000; 8000 liều	Phòng bệnh Gumboro	EMB - 1

**CÔNG TY PFIZER**

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
	Resisure	M.Hyopneumonia bacterin	lọ	10 ds (20ml) 50 ds (100ml) 250 ds (500ml)	Vacxin phòng bệnh viêm phổi địa phương truyền nhiễm trên lợn	USA	PFU - 1
	Farrowsure B	Erysipelas, Parvovirus, L.canicola, L. grippotyphosa, L.gardio L. ictehoamorrhagiae, L. pomona bacterin, L.bratislava	lọ	10 ds (50ml) 50 ds (250ml)	Vacxin phòng bệnh đóng dấu, Parvovirus, 6 chủng Lepto	USA	PFU - 2
	Brativac - 6	L. ictehoamorrhagiae, L. pomona bacterin, L.bratislava, L.canicola, L. grippotyphosa, L.hardio	lọ	10 ds (20ml) 50 ds (100ml)	Vacxin phòng bệnh Lepto	USA	PFU - 3
	PR - Vac Plus	Pseudorabies MLV; Amphigen	lọ	10 ds (20ml) 25 ds (50ml) 50 ds (100ml)	Vacxin phòng bệnh giả dại ở lợn	USA	PFU - 4
	LitterGuard LT - C	E.coli, Clostridium perfringen + LT - Toxoid	lọ	1ds (2ml); 10 ds (20ml) 50 ds (100ml)	Vacxin phòng bệnh tiêu chảy do E.coli, độc tố E.colivà độc tố do Clostridium perfringen	USA	PFU - 5
	Biocid 30	Iodine	chai	100, 500 ml 1,2,4,5,25 lít	Thuốc sát trùng chuồng trại	Phillipines	PFU - 14
	Resisure - One™	Mycoplasma pneumonia Bacterin	lọ	10 ds (20 ml) 50 ds (100 ml) 100 ds (200ml)	Vacxin phòng bệnh viêm phổi địa phương truyền nhiễm trên lợn, 1 liều	USA	PFU - 19

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
				250 ds(500 ml)			
	VanGuard Plus 5	Distemper, Parvovirus, ParaInfluenza, Adenovirus type 2	chai	1 ds (1ml)	Phòng bệnh care, bệnh ho cũi do Para - influenza, viêm ruột do Parvovirus, bệnh hô hấp type 2	USA	PFU - 22
	Vanguard Plus 5/L	Distemper, Parvovirus, ParaInfluenza, Adenovirus type 2 <i>Leptospira</i>	chai	1 ds (1ml)	Phòng bệnh care,bệnh ho cũi do Para - influenza, bệnh viêm ruột do Parvovirus, bệnh hô hấp type 2, bệnh Lepto	USA	PFU - 23
	Vanguard Plus CPV	Canine Parvovirus	chai	1 ds (1ml)	Vaccine phòng bệnh Parvovirus	USA	PFU - 24
	Vanguard Plus 5/CV - L	Distemper, Parvovirus, ParaInfluenza, Adenovirus type 2 <i>Leptospirosis</i> , Coronavirus	chai	1 ds (1ml)	Phòng bệnh care, bệnh ho cũi do Para - influenza, viêm ruột do Parvovirus, Bệnh hô hấp type 2, bệnh do Lepto, viêm ruột do Coronavirus	USA	PFU - 25
	Aradicator	Bordetella bronchiseptica; Pasteurella multocida	chai	1; 10 ds (20ml) 25 ds (50ml) 50 ds (100ml)	Phòng bệnh tụ huyết trùng và viêm teo mũi truyền nhiễm ở lợn	USA	PFU - 29
	Leptoferm 5	L.canicola, L.pomona, L. pripotiphosa, L.hardjo, L. icerohaemorrhagiae	chai	10 ds (20ml) 25 ds (50ml) 50 ds (100ml)	Phòng bệnh Lepto ở lợn và bò	USA	PFU - 30
	Farrowsure - PRV	Erysipelas, Parvovirus, L.canicola, L. grippotyphosa, L.hardio, L.icteohaemorrhagiae, L. pomona bacterin, L.bratislava, Pseudorabies virus	chai	10 ds (50ml) 50 ds (250ml)	Phòng bệnh do Parvo virus, đóng dấu, giả dại và Lepto trên lợn nái	USA	PFU - 31
	Cattle - Master 4 - 5L	Bovine rhinotracheitis virus, Parainfluenza, L.canicola; L.pomona; L.grippotyphosa; L.harjio; L.icterohaemorrhagiae, Bovine virus diarrhea, Respiratory Syncytial virus	chai	5 ds (25ml) 10 ds (50ml) 50 ds (250ml)	Phòng 5 bệnh trên bò viêm mũi viêm khí quản truyền nhiễm do virus Rhinotracheitis, tiêu chảy do virus IBR, bệnh virus Parainfluenza 3A, bệnh virus hợp bào đường hô hấp (BRSV) và 5 chủng Lepto	USA	PFU - 32

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
	OneShot	Pasteurella haemolityca	chai	5 ds (10ml) 10 ds (20ml)	Phòng tụ huyết trùng trên bò	USA	PFU - 33
	Defensor 1	Rabies vaccine, killed virus	chai	1 ds (1ml)	Phòng bệnh dại ở chó	USA	PFU - 34
	Defensor 3	Rabies vaccine, killed virus	chai	1 ds (1ml)	Phòng bệnh dại ở chó	USA	PFU - 35
	PR - Vac MLV	Pseudorabies MLV	chai	10 ds (20ml) 25 ds (50ml) 50 ds (100ml)	Phòng bệnh giả dại	USA	PFU - 44
	PR - Vac Killed	Pseudorabies inactivated	chai	10 ds (20ml) 25 ds (50ml) 50 ds (100ml)	Phòng bệnh giả dại	USA	PFU - 45
	CoughGuard B	Bordetella bronchiseptica	chai	1 ds (1ml)	Vaccine phòng bệnh ho cũi chó	USA	PFU - 47
	Vanguard 5/B	Canine adenovirus type 2, Parainfluenza virus, Canine parvo - virus, Bordetella bronchiseptica, Canine Distemper	chai	1ds (1ml)	Vaccine phòng bệnh ho cũi do Parainfluenza, bệnh viêm ruột do Parvovirus, bệnh hô hấp type 2, bệnh ho do Bordetella	USA	PFU - 48
	LitterGuard LT	E.coli bacterin, Toxoid	chai	10 ds (20ml) 50 ds (100ml)	Vaccine phòng bệnh tiêu chảy do vi khuẩn E.coli	USA	PFU - 50
	Farrowsure Plus B	Erysipelas, Parvovirus, L.canicola, L. grippotyphosa, L.hardio, L. ictehoamorrhagiae, L. pomona bacterin, L.bratislava Amphigen	chai	10 ds (50ml) 50 ds (250ml) 100 ds (500ml)	Vaccine phòng bệnh đóng dấu, Parvovirus, 6 chủng Lepto	USA	PFU - 51
	Scourguard 3K/C	Rotavirus, E.coli chủng K99, Coronavirus, Clostridium perfringen chủng C	chai	1; 10; 50liều	Phòng bệnh ỉa chảy ở bò do Rotavirus, Coronavirus, E.coli chủng K99, Clo.perfringen chủng C	USA	PFU - 53
	Raksharab	Kháng nguyên vi rút Đại vô hoạt	lọ	1ml;5ml;10ml (1ml/1liều)	Phòng bệnh Đại cho Chó	INDIA	PFU - 60
	Cholera vac®	Kháng nguyên vi rút dịch tả lợn	lọ	10; 20; 50ml (1ml/1liều)	Phòng bệnh Dịch tả lợn	Croatia	PFU - 61

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Nước sản xuất	Số đăng ký
	Pestikal	Virus Newcastle vô hoạt, chủng Lasota	lọ	500ml (1000 liều)	Phòng bệnh Newcastle ở gà	Croatia	VAHC - 1
	Gumpeskal+IB+EDS	Kháng nguyên virus Gumboro chủng, Winterfield 2512; Newcastle chủng Lasota; viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) chủng Massachussets 41; Hội chứng giảm đẻ (EDS) chủng EDS/RS	lọ	500ml (1000 liều)	Phòng bệnh Gumboro, Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) và hội chứng giảm đẻ (EDS) ở gà	Croatia	VAHC - 2
	Pestikal+EDS+IB	Kháng nguyên virus Newcastle chủng Lasota; viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) chủng Massachussets 41; Virus gây hội chứng giảm đẻ (EDS) chủng EDS/RS	lọ	500ml (1000 liều)	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) và hội chứng giảm đẻ (EDS) ở gà	Croatia	VAHC - 3
	Gumbokal	Kháng nguyên virus Gumboro vô hoạt, chủng Winterfield 2512	lọ	500ml (1000 liều)	Phòng bệnh Gumboro ở gà	Croatia	VAHC - 4
	Gumpeskal+IB	Kháng nguyên virus Gumboro chủng Winterfield 2512; Newcastle chủng Lasota; Viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) chủng Massachussets 41	lọ	500ml (1000 liều)	Phòng bệnh Gumboro, Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) ở gà	Croatia	VAHC - 5
	Bodikal® SPF	Kháng nguyên VR đậu nhược độc	lọ	500ml (1000 liều)	Vacxin phòng bệnh đậu gà	Croatia	PFU - 67
	Bronhopest® SPF	Kháng nguyên Newcastle chủng Lasota, Kháng nguyên IB chủng H - 120	lọ	1000; 2000 liều	Phòng Newcastle và viêm thanh khí quản truyền nhiễm.	Croatia	PFU - 68
	Bronhikal® SPF	Kháng nguyên vi rút Viêm phế quản truyền nhiễm nhược độc, chủng H - 5	lọ	1000; 2000 liều	Vacxin phòng viêm phế quản TN cho gà mái đẻ.	Croatia	PFU - 69
	POSI - FMD (trivalent)	Kháng nguyên FMD chủng O1, A, Asian 1	chai	30; 100; 200ml	Phòng bệnh LMLM trên trâu, bò, bê, lợn, cừu, dê.	Ấn Độ	PFU - 75
	POSI - FMD (Monovalent)	Kháng nguyên FMD chủng O1 Manisa	chai	30; 100; 200ml	Phòng LMLM trên trâu, bò, bê, lợn, cừu, dê.	Ấn Độ	PFU - 76

**SHERING - PLOUGH ANIMAL HEALTH CORPORATION**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
	Newcastle B1	Virus Newcastle	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MKV - 1
	Bursa - Vac	Virus Gumboro	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Gumboro	MKV - 2
	AE+POX	Fowl pox vacxin (AE + POX)	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh đậu gà	MKV - 3
	Polybron - B1	B1 type, lasota strain Massachusetts and Connecticut types (Polybron B1)	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản	MKV - 4
	Polybron - N63	B1 typ, Lasota strain - Mass and Conn types (Polybron - N 63)	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản	MKV - 5
	Coccivac D	Coccidiosis vacxin	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh cầu trùng	MKV - 6
	Broiler	B1 type Lasota strain, massachusetts type (Broilebron H - N - 79)	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản	MKV - 7
	Newcastle disease vacxin	Castle - vac - K	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MKV - 8
	Broilertrake - M	Fowl - Laryngotrachetis vacxin	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh	MKV - 9
	Fowl Pox vacxin	AVA - POX - CE	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh đậu gà	MKV - 10
	Newcastle N 63	B1 typeLasota strain (Newcastle N 63)	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MKV - 11
	Newcastle N 79	B1 type Lasota strain N 79	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle	MKV - 12
	Bursa - Vac 3	Virus Gumboro	lọ	500; 1000; 5000 liều	Phòng bệnh Gumboro	MKV - 13
	M+Pac	Mycoplasma hyopneumoniae bacterin	chai	10;50;100;250;500 liều	Phòng bệnh viêm phổi lợn	MKV - 14
	Planate injection	Cloprostestol	chai	10; 20ml	Kích thích sinh đẻ trên lợn.	MKV - 18
	Myco - Pac <sup>Ø</sup>	Mycoplasma hyopneumonia	lọ	10; 50; 100; 250ml	Phòng bệnh viêm phổi do Mycoplasma hyopneumonia gây ra trên lợn.	MKV - 19
	PRV/ Marker Gold <sup>Ø</sup>	Virus giả dại nhuộc độc dòng S - PRV - 155	lọ	20; 50; 100; 200ml	Phòng bệnh giả dại trên lợn	MKV - 20

**NHẬT BẢN**  
**CÔNG TY KITASATO INSTITUTE**

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
	Live Hog Cholera Vacxin	Live Hog Cholera virus	lọ	20; 50 liều	Phòng bệnh dịch tả lợn	KTS - 1

**KYORITSU SEIYAKU CORPORATION**

TT	Tên thuốc	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
	Swivac C	Virus dịch tả lợn nhược độc ( GPE chủng)	chai	20ml	Phòng dịch tả lợn	KSC - 1

**PHÁP**  
**CÔNG TY MERIAL (RHÔNE MERLIEUX - RHÔNE POULENC)**

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Nguồn gốc	Số đăng ký
1	Aviffa RTI	Virus RTI - SIGT (chủng VCO3 cải tiến)	lọ	1000; 2000 liều	Phòng bệnh viêm mũi, viêm khí quản truyền nhiễm ở gà tây và hội chứng sưng phù đầu ở gà mái tơ	PHÁP	MRA - 1
2	Gallimune 302 ND+IB+EDS	Virus viêm phế quản, Newcastle vô hoạt; virus gây hội chứng giảm đẻ chủng 127 vô hoạt	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, bệnh Newcastle và hội chứng giảm đẻ ở gà	Italy	MRA - 5
3	Bioral H120	Virus viêm phế quản truyền nhiễm chủng H120 nhược độc	lọ	1000; 5000; 15000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm chủng H120 ở gà	PHÁP	MRA - 7
4	Bipestos	Vi rút gây bệnh Newcastle nhược độc; viêm phế quản truyền nhiễm	lọ	1000; 5000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm ở gà	PHÁP	MRA - 8
5	Bur 706	Virus gây bệnh Gumboro nhược độc, chủng S706	lọ	1000; 5000 liều	Phòng bệnh Gumboro ở gà	PHÁP	MRA - 9
6	Gallimune 204 ND+IBD	Virus gây bệnh Newcastle và Gumboro vô hoạt	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle và Gumboro ở gà	Italy	MRA - 10
7	Gumboriffa	Virus gây bệnh gumboro vô hoạt chủng VNJO	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh Gumboro ở gà	PHÁP	MRA - 12
8	Haemovax	Heamophilus paragallinarum typ A,typ C	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh sô mũi truyền nhiễm	PHÁP	MRA - 13

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Nguồn gốc	Số đăng ký
9	Hepatovax	Virus gây bệnh viêm gan chủng E 52	lọ	100; 500 liều	Phòng bệnh viêm gan siêu vi ở vịt	PHÁP	MRA - 14
10	Marex' s disease vacxin, Serotype 3 live virus	chủng HVT FC 126	lọ	1000; 2000 liều	Phòng bệnh Marek ở gà	MỸ	MRA - 15
11	Myelovax	Virus Calnek chủng 1143	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm não tuy truyền nhiễm gia cầm	PHÁP	MRA - 16
12	Newvaxidrop	Virus gây hội chứng giảm đẻ, Newcastle vô hoạt	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle, hội chứng giảm đẻ ở gà.	PHÁP	MRA - 18
13	Aftopor	Kháng nguyên LMLM đơn type O (O Manisa, O <sub>3039</sub> )	chai	25 liều/ 50ml; 50liều/100ml	Phòng bệnh Lở mồm long móng cho trâu, bò, lợn	ANH PHÁP	MRA - 19
14	Geskypur	Dung dịch glycoproteine (gII,gIII)	lọ	1; 10; 50 liều	Phòng bệnh giá dại ở lợn	PHÁP	MRA - 20
15	Neocolipor	Chủng F4,F5,F6,F41	lọ	5; 10; 25 liều	Phòng bệnh tiêu chảy do E coli ở lợn	PHÁP	MRA - 23
16	Parvovax	Virus vô hoạt	lọ	5; 25 liều	Phòng bệnh do parvovirus ở lợn	PHÁP	MRA - 24
17	Parvoruvax	Virus parvo và virus erysipelothrix typ 2	lọ	5; 25 liều	Phòng bệnh do parvovirus và đóng dấu son	PHÁP	MRA - 25
18	Tetradog	Virus carrê ,parvo, adeno nhược độc; vi khuẩn L. canicola, L. icterohaemorragiae vô hoạt	lọ	1;10 bl; 100 liều	Phòng bệnh carré, bệnh do Adenovirus do parvovirus, do <i>Leptospira</i>	PHÁP	MRA - 27
19	Hexadog	Virus carrê ,parvo, adeno nhược độc; vi khuẩn L. canicola, L. icterohaemorragiae vô hoạt; virus đại vô hoạt	lọ	1; 10 b; 100 liều	Phòng bệnh carré, do parvovirus, do Adenovirus, do leptosira và bệnh đại	PHÁP	MRA - 28
20	Leucorifelin	Virus giảm bạch cầu, sống cài tiên , nhược độc chủng PLI - IV. Kháng nguyên Calici virus thuần khiết. virus Herps nhược độc	lọ	1; 10; 50 liều	Phòng bệnh giảm bạch cầu và sổ mũi do herpes virus và calici virus ở mèo	PHÁP	MRA - 30
21	Rabisin	Virus Đại vô hoạt	lọ	1;100;1000 liều	Phòng bệnh Đại	PHÁP	MRA - 31
22	Aftovax	Kháng nguyên LMLM đa type O, A, Asia1	chai 50 liều	100ml	Phòng bệnh Lở mồm long móng cho trâu, bò	ANH PHÁP	MRA - 32
23	Miloxan	Giải độc tố vi khuẩn Clostridium perfringens typ A,C,D Cl. septicum; Cl. novyi; Cl. Tetani	chai	4ml; 50ml; 250ml	Phòng bệnh nhiễm do vi khuẩn yếm khí ở bò,cừu, dê	PHÁP	MRA - 33
24	Rhiniffa T	Vi khuẩn Bordetella bronchiseptica vô hoạt	chai	2; 10 ml	Phòng bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm ở lợn	PHÁP	MRA - 35
25	Diftosec CT	Virus đậu gà, chủng DCEP25	lọ	1000 liều	Phòng bệnh đậu gà và gà tây	PHÁP	MRA - 36

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Nguồn gốc	Số đăng ký
26	Gallimune 407 ND+ IB+ EDS+ ART	virus viêm phế quản, hội chứng giảm đẻ, Newcastle, song phù đầu vô hoặt.	chai	500; 1000 liều	Phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, dịch tả, hội chứng giảm đẻ và hội chứng sưng đầu ở gà	Ý	MRA - 37
27	Palmivax	Virus Derrzy nhược độc , chủng Hoekstra	lọ	30; 150 ml	Vắc - xin phòng bệnh Derzsy ở vịt, ngỗng	PHÁP	MRA - 38
28	Cryomarex HVT	Virus nhược độc đông khô , chủng HVT FC 126 ở gà	lọ	1000 liều (+ lọ nước pha200ml)	Phòng bệnh Marek	PHÁP	MRA - 39
29	Cryomarex RISPENS	Virus nhược độc đông khô , chủng Rispen	lọ	1000 liều (+ lọ nước pha200ml)	Phòng bệnh Marek ở gà	PHÁP	MRA - 39
30	Cryomarex RISPENS+HVT	Virus nhược độc đông khô chủng Rispen, HVT+ FC126	lọ	1000 liều (+ lọ nước pha 200ml)	Phòng bệnh marek	PHÁP	MRA - 39
31	Vaxiduk	Virus dịch tả chủng Jansen	lọ	100; 500 ds	Phòng bệnh dịch tả vịt	PHÁP	MRA - 98
32	COR 2	Coronavirus vô hoạt chủng PL 84084, CR88121.	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh giảm đẻ do các chủng coronavirus	PHÁP	MRA - 156
33	Aftopor/BOV	Kháng nguyên LMLM đơn type O (O Manisa, O <sub>3039</sub> , O Philipine)	chai 25 liều	50ml	Phòng bệnh Lở mồm long móng cho trâu, bò	PHÁP	MRA - 157
34	Avinew	Kháng nguyên Virus Newcastle, chủng VG/GA	lọ	500; 1000; 2000 2500 liều	Phòng bệnh Newcastle ở gia cầm	PHÁP TQ	MRA - 158
35	IBD Blen	Virus	lọ	500; 1000; 2000 2500 liều	Phòng bệnh gumboro cho gà	MỸ	MRA - 159
36	Pestiffa	K. nguyên virus dịch tả lợn	lọ	10; 25; 50 ds	Phòng bệnh dịch tả lợn	PHÁP	MRA - 160
37	Gallimune ND	Kháng nguyên virus Newcastle vô hoạt	lọ	500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	Italy	MRA - 166
38	Akipor 6.3	chủng gE - Bartha	lọ	10; 25; 50 liều	Phòng bệnh già dại ở lợn	PHÁP	MRA - 169
39	Nemovac	Kháng nguyên virus viêm phổi chủng PL21	lọ	1000 liều	Phòng hội chứng sưng phù đầu ở gà	PHÁP	MRA - 170
40	Homoserum	Kháng huyết thanh	lọ	50 ml	Phòng và trị bệnh do virus carré, adeno típ 1,2, Bordetella	PHÁP	MRA - 171
41	Hyoresp	Kháng nguyên Mycoplasma hyopneumonia vô hoạt	lọ	10; 50; 100 liều	Phòng bệnh viêm phổi địa phương ở lợn	PHÁP	MRA - 173

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Nguồn gốc	Số đăng ký
42	Eurican DHPPI2 (CHPPI2)	Kháng nguyên virus Carré, Adenovirus, Parvovirus, Parainfluenza typ 2	lọ	1 liều (hộp 100 lọ)	Phòng bệnh Carré, do Adenovirus, Parvovirus, parainfluenza typ2	PHÁP	MRA - 180
43	Eurican DHPPI 2 - L (CHPPI2 - L)	Kháng nguyên virus Carré, Adenovirus, Parvovirus, Parainfluenza typ 2 và vi khuẩn <i>L.canicola</i> ; <i>L.icterohaemorhagiae</i> vô hoạt	lọ	1 liều (hộp 100 lọ)	Phòng bệnh Carré, bệnh do Adenovirus, Parvovirus, parainfluenza typ 2 và <i>Leptospira</i>	PHÁP	MRA - 181
44	Eurican DHPPI 2 - LR (CHPPI2 - LR)	Kháng nguyên virus Carré, Adenovirus, Parvovirus, parainfluenza typ 2 sóng đông khô và <i>L. canicola</i> , và đại vô hoạt, <i>L.icterohaemorhagiae</i>	lọ	1 liều (hộp 100 lọ)	Phòng bệnh Carré, bệnh do Adenovirus, Parvovirus, parainfluenza typ 2 và <i>Leptospira</i> và bệnh đại	PHÁP	MRA - 182
45	Gallimune 503	Kháng nguyên virus Newcastle, viêm phế quản, giảm đẻ và coryza vô hoạt	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Newcastle, viêm phế quản truyền nhiễm, hôi chứng giảm đẻ và Coryza	Ý	MRA - 183
46	Gallivac IB 88	chủng CR88121	lọ	1000; 2000 liều	Phòng viêm phế quản truyền nhiễm	PHAP	MRA - 184
47	Burcell - S706+HVT	chủng 706, Marek chủng HVT+FC126	lọ	1000 liều, 2000 liều	Phòng bệnh Gumboro, bệnh Marek	PHÁP	MRA - 185
48	Gallimune SE	Vắc - xin vi khuẩn Salmonella vô hoạt	lọ	1000 liều	Phòng bệnh viêm ruột do Salmonella trên gà	Ý	MRA - 192
49	Recombitek® C6/CV	Ví rút nhược độc Carre, Adeno, Corona, Parvo, Parainfluenza, vi khuẩn <i>L. canicola</i> và <i>L.icterohaemorrhagiae</i> .	lọ	1ml/ 1 liều	Phòng bệnh do ví rút Carre, Adeno, Corona, Parvo, Parainfluenza và vi khuẩn <i>Leptospira canicola</i> <i>L.icterohaemorrhagiae</i> cho chó.	Mỹ	MRA - 201
50	Primodog	Ví rút Parvo sống nhược độc	lọ	1ml/ 1 liều	Phòng bệnh do Parvovirus gây ra cho chó.	Pháp	MRA - 202
51	Gallivac AE	Kháng nguyên vi rut Encephalomyelitis	lọ	1liều	Phòng bệnh viêm não tuỷ truyền nhiễm trên gà	Mỹ	MRA - 203
52	Aftopor monovalent	Kháng nguyên LMLM vô hoạt đơn type A (A22 Iraq, A May 97)	lọ	20; 50; 100ml	Phòng bệnh lở mồm long móng cho lợn và thú nhai lại	Anh, Pháp	MRA - 204
53	Aftopor bivalent	Kháng nguyên LMLM vô hoạt type O (O Manisa và O 3039), A(A22 Iraq, A May 97)	lọ	20; 50; 100ml	Phòng bệnh lở mồm long móng cho lợn và thú nhai lại	Anh, Pháp	MRA - 205
54	Aftopor trivalent	Kháng nguyên LMLM vô hoạt type O (O Manisa và O 3039), A(A22 Iraq, A Malaysia 97), Asian 1(Asian 1 Shamir)	lọ	20; 50; 100ml	Phòng bệnh lở mồm long móng cho lợn và thú nhai lại	Anh, Pháp	MRA - 206
55	Aftovaxpur trivalent	Kháng nguyên LMLM vô hoạt type O(O Manisa và O 3039), A(A22 Iraq, A Malaysia 97), Asian 1(Asian 1 Shamir)	lọ	20; 50; 100ml	Phòng bệnh lở mồm long móng cho thú nhai lại	Anh, Pháp	MRA - 207
56	Trovac - AIV H5	Virus tái tổ hợp cúm gà trên véc tơ đậu gà	lọ	1000; 2000 liều	Phòng bệnh cúm gà gây ra do тип H5 và đậu gà.	Mỹ	MRA - 208

**CÔNG TY CEVASANTE ANIMALE**

<b>TT</b>	<b>Tên sản phẩm</b>	<b>Hoạt chất chính</b>	<b>Dạng đóng gói</b>	<b>Thể tích/ Khối lượng</b>	<b>Công dụng</b>	<b>Số đăng ký</b>
1	Cevac IBD K	Kháng nguyên virus Gumboro	chai	1000 liều	Phòng bê nh Gumboro	SNF - 46
2	Cevac ND - IB K	Kháng nguyên virus dịch tả gà - viêm phế quản truyền nhiễm gà	chai	1000 liều	Phòng bê nh dịch tả - viêm phế quản gà	SNF - 47
3	Cevac ND IB EDS K	Kháng nguyên virus dịch tả - viêm phế quản truyền nhiễm gà - hội chứng giảm đẻ	chai	1000 liều	Phòng bê nh dịch tả- viêm phế quản gà - hội chứng giảm đẻ	SNF - 48
4	Cevac ND EDS K	Kháng nguyên virus dịch tả gà - hội chứng giảm đẻ	chai	1000 liều	Phòng bê nh dịch tả gà, hội chứng giảm đẻ	SNF - 49
5	Cevac ND IB IBD EDS K	Kháng nguyên virus dịch tả gà - viêm phế quản truyền nhiễm gà - bệnh Gumboro - hội chứng giảm đẻ	chai	1000 liều	Phòng bê nh dịch tả- viêm phế quản - bệnh Gumboro - hội chứng giảm đẻ	SNF - 50
6	Aujecpig K	Kháng nguyên Aujeszky vô hoạt	lọ	10; 25; 50 liều	Phòng bệnh Aujeszky	SNF - 51
7	Coglapest	Kháng nguyên virus dịch tả lợn, chủng Thiverval	lọ	10;25;50 liều	Phòng bê nh dịch tả lợn	SNF - 52
8	Kapevac	Kháng nguyên virus dịch tả vịt	lọ	100;200;500ml	Phòng bê nh dịch tả vịt	SNF - 53
9	Cevac New K	Kháng nguyên Newcastle vô hoạt	lọ	1000 liều	Phòng bê nh dịch tả gà	SNF - 60
10	Cevac Gumbo L	Kháng nguyên virus Gumboro, chủng LIBDV	lọ	1000 liều	Phòng bệnh Gumboro	SNF - 62
11	Cevac Bron L	Kháng nguyên virus viêm thanh khí quản, chủng H120			Phòng bê nh viêm thanh khí quản truyền nhiễm gà	SNF - 64
12	Cevac LTL	Kháng nguyên virus viêm thanh khí quản	lọ	1000 liều	Phòng bê nh viêm thanh khí quản truyền nhiễm gà	SNF - 69
13	Cevac IBD L	Kháng nguyên virus Gumboro Chủng 2512	lọ	1000 liều	Phòng bê nh Gumboro	SNF - 70
14	Cevac New L	Kháng nguyên virus Newcastle chủng Lasota	lọ	1000 liều	Phòng bê nh Newcastle	SNF - 72
15	Cevac BIL	Kháng nguyên virus Newcastle chủng Lasota, virus phòng bệnh viêm thanh khí quản chủng B48	lọ	1000 liều	Phòng bê nh Newcastle và viêm khí quản truyền nhiễm gà	SNF - 73
16	Cevac UNI L	Kháng nguyên virus Newcastle, chủng hitchner B1	lọ	1000 liều	Phòng bê nh Newcastle	SNF - 74
17	Cevac Mass	Kháng nguyên virus gây viêm thanh khí quản , chủng B48	lọ	1000 liều	Phòng bê nh viêm khí quản truyền nhiễm gà	SNF - 75
18	Cevac FP L	Virus phòng bê nh viêm đậu gà	lọ	1000 liều	Phòng bê nh đậu gà	SNF - 76
19	Cevac ND - IB - IBD K	Kháng nguyên virus Newcastle chủng lasota, viêm phế quản truyền nhiễm chủng Massachusetts, Gumboro	lọ	1000 liều	Phòng bê nh Newcastle viêm phế quản truyền nhiễm và Gumboro gà	SNF - 80
20	Cevac Vitapest L	Virus Newcastle arirulent, chủng NDV 6/10	lọ	1000, 2000 liều	Phòng bê nh Newcastle	SNF - 81

**CÔNG TY VIRBAC**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1	Canigen DHA2PPi/L	Canine distemper live virus, Canine contagious live virus, Canine parvovirus live virus, Canine parainfluenza live virus, <i>Leptospira</i> inactivated	lọ	1 liều	Phòng các bệnh truyền nhiễm trên chó	VB - 24
2	Suigen - Aujeszky Live	Chủng bartha	lọ	10; 25; 50 liều	Phòng bệnh giải độc trên lợn	VB - 25
3	Suigen - Aujeszky Inactivated	Chủng bartha K/61	lọ	25; 50 liều	Phòng bệnh giải độc trên lợn	VB - 26
4	Suigen Swine Fever	Chinese strain	lọ	10; 25; 50 liều	Phòng bệnh dịch tả trên lợn	VB - 27
5	Rabigen - Mono	Rabies virus, chủng PV 12	lọ	1; 10; 25 liều	Phòng bệnh dại chó mèo	VB - 28

**SINGAPORE  
BESTAR LABORATORIES**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng (liều)/ Thể tích (ml)	Công dụng	Số đăng ký
1	BAK - ND+EDS	Newcastle virus	lọ	500/250; 1000/500	Phòng bệnh Newcastle, Hội chứng giảm đẻ	BTS - 1
2	BAL - IBD	Gumboro virus	lọ	500; 1000; 2000 liều	Phòng bệnh Gumboro	BTS - 2
3	BDK - PM	Vi khuẩn Pasteurella multocida vô hoạt	lọ	250/250; 500/500	Phòng bệnh Tụ huyết trùng ở vịt	BTS - 3
4	BAK - ND+IBD	Newcastle, Gumboro inactivated virus	lọ	500/250; 1000/500	Phòng bệnh Newcastle, Gumboro	BTS - 4
5	BAK - ND+MG	Newcastle virus, Mycoplasma gallisepticum	lọ	500/250; 1000/500	Phòng bệnh Newcastle, Mycoplasma	BTS - 5
6	BAK - IC	Heamophilus paragallinarum serotype A, C	lọ	500/250; 1000/500	Phòng bệnh Coryza	BTS - 6
7	BAK - ND	Newcastle inactivated virus	lọ	500/250; 1000/500	Phòng bệnh Newcastle	BTS - 7
8	BAL - ND 'S'	Newcastle inactivated virus	lọ	500; 1000; 2000 liều	Phòng bệnh Newcastle	BTS - 8
9	BAL - ND 'Lasota'	Newcastle virus, Lasota strain	lọ	500; 1000; 2000 liều	Phòng bệnh Newcastle	BTS - 9
10	BAL - ND 'B <sub>1</sub> '	Newcastle virus, B1 strain	lọ	500; 1000; 2000 liều	Phòng bệnh Newcastle	BTS - 10
11	BAL - ND+IB	Newcastle virus, Bronchitis virus	lọ	500; 1000; 2000 liều	Phòng bệnh Newcastle và viêm phế quản	BTS - 11
12	BSK - Auj,gI	Inactivated Aujeszky virus	lọ	10; 20; 25; 50 liều	Phòng bệnh Aujeszky	BTS - 12
13	BSL - PS 100	PPRS virus	lọ	10; 20; 25; 50 liều	Phòng hồi chứng rồi loại hô hấp, sinh sản	BTS - 13
14	BSL - HC	Lyophilized live GPE, strain swine fever	lọ	10; 20; 25; 50 liều	Phòng bệnh Dịch tả lợn	BTS - 14

**TÂY BAN NHA**  
**CÔNG TY LABORATORIES HIPRA S.A**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1	Auskipra - BK	Inactivated ADV, strain Bartha K61 gI negativa	lọ	10, 20, 50 liều	Phòng bệnh gián đại (Ausjecki)	HP - 16
2	Hipra Viar - S	vi rút Newcastle train Lasota	lọ	100; 500; 1000 liều	Phòng bệnh Newcastle	HP - 17
3	Hipra Gumboro	IBD Virus W2512	lọ	500, 1000; 2500; 5000 liều	Phòng bệnh Gumboro	HP - 18
4	Hipra Gumboro CH/80	IBDV, clone CH/80	lọ	500, 1000; 2500; 5000 liều	Phòng bệnh Gumboro	HP - 19
5	Amervac PRRS	Vaccine sống động khô chủng VP - 046 BIS	lọ	10; 50 liều	Ngừa hội chứng sảy thai và hô hấp lợn	HP - 25
6	Mypravac suis	Vaccine chủng Mycoplasma suis	lọ	10; 25; 50 liều	Ngừa bệnh viêm phổi địa phương	HP - 26
7	Hipradog - 7	Canine parvovirosis, distemper, hepatitis, Laringotracheitis, Canine Tracheobronchitis, <i>Leptospira</i> vô hoạt	lọ	1 liều	Phòng 7 bệnh trên chó	HP - 27
8	Auskipra - GN	Vaccine sống động khô chủng Bartha K.61 (gE - )	lọ	10; 25; 50 liều	Ngừa bệnh gián đại trên lợn	HP - 28

**THÁI LAN**  
**NB. LABORATORYES COMPANY LTD.**

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Khối lượng/ Thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1.	Diluent for Swine Fever Vaccine	Sodium chloride, Potassium chloride, Potassium dihydrogen phosphate, Disodium hydrogen phosphate anhydrous	chai	20; 100ml	Dùng pha vaccine dịch tả lợn	ANB - 1

**THỦY SỸ**  
**CÔNG TY NOVARTIS CONSULTING AG**

TT	Tên sản phẩm	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
	Pleurostar APP	Actinobacillus (Heamophilus)	lọ	100ml	Phòng các bệnh về đường hô hấp	NVT - 5
	Coxabic®	Gametocyte protein (APGA).	chai	50ml; 250ml; 500ml. (0,5ml/liều)	Phòng bệnh Cầu trùng cho gà.	NVT - 7
	Vira Shield 5	Herpes virus, Pestivirus, Paramyxovirus, Pneumovirus	lọ	10, 20, 50 liều (50; 100; 250ml)	Phòng bê nh viêm xoang mũi tiêu chảy, cảm cúm, viêm đường hô hấp	GRA - 1
	VIB Shield L5	Campylobacter fetus và 5 chủng <i>Leptospira</i>	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Phòng bệnh xá thai truyền nhiễm	GRA - 2
	Bovine Ecolizer	Máu ngựa 4 dòng E.coli KN K99	lọ	10ml	Kháng huyết thanh phòng bê nh E.coli	GRA - 3
	Parvo Shield L5E	Parvo virus, 5 chủng <i>Leptospira</i> , Erysipelothrix	lọ	10, 20, 50 liều (50; 100; 250ml)	Phòng bệnh sẩy thai, chết thai	GRA - 4
	Rhinicell	Bordetella bronchiseptica	lọ	30 liều (30ml, 1000 ml)	Phòng viêm mũi, viêm teo mũi	GRA - 5
	Borde Shield 4	Bordetella bronchiseptica P.multocida, E.rhusiopathiae	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Viêm teo mũi truyền nhiễm, đóng đờm, viêm phổi.	GRA - 6
	Parapleuro Shield P	Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis - P. multocida bacterin	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Phòng bệnh Glasser's, viêm màng phổi, viêm phổi.	GRA - 7
	Porcine Ecolizer	Kháng huyết thanh E.coli	lọ	5; 6, 50, 100 liều (10; 12; 100; 200ml)	Kháng huyết thanh phòng bệnh E.coli.	GRA - 8
	Parapleuro Shield P+BE	Bordetella bronchiseptica, Ery. rhusiopathiae	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Phòng bệnh viêm mũi và đóng đờm	GRA - 9
	Porcine pili shield (vi khuẩn E.coli)	E.coli K99, K88, 987P, F41	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Phòng phòng bê nh tiêu chảy và phì đầu ở lợn	GRA - 12
	Myco shield TM	Mycoplasma hyopneumoniae	lọ	10, 50 liều (20; 100ml)	Phòng viêm phổi i địa phương ở lợn	GRA - 13

## TRUNG QUỐC

### CÔNG TY CHINA AGRICULTURAL VETERINARY BIOLOGICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD

Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính	Dạng đóng gói	Thể tích/ Khối lượng	Công dụng	Số đăng ký
Vaxxin Lở mồm long móng vô hoạt nhị giá Type O - Asia 1	Virus lở mồm long móng type O (ONXC/92), Asia 1	chai	20; 50; 100ml	Phòng bệnh Lở mồm long móng do vi rút type O, Asia1 trên trâu, bò, lợn, dê, cừu.	CAV - 1

### LANZHOU VETERINARY RESEARCH INSTITUTE

TT No	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ thể tích	Công dụng (Indications)	Số đăng ký
1.	Vaxxin LMLM vô hoạt type O	Kháng nguyên lở mồm long móng vô hoạt type O	chai	20; 50; 100ml	Phòng bệnh LMLM trên trâu, bò.	VLC - 1
2.	Vaxxin LMLM vô hoạt type O(II)	Kháng nguyên lở mồm long móng vô hoạt type O(II)	chai	20; 50; 100ml	Phòng bệnh LMLM trên lợn.	VLC - 2

### CÔNG TY PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC HARBIN

TT	Tên thuốc, nguyên liệu	Hoạt chất chính (chủng VSV)	Dạng đóng gói	Khối lượng/ thể tích	Công dụng	Số đăng ký
1	Vaxxin cúm gia cầm vô hoạt, nhũ dầu (H5N1)	Kháng nguyên vi rút cúm gia cầm vô hoạt chủng A/ Re - 1/2003(H5N1)	chai	500liều	Phòng bệnh cúm gia cầm trên gà, vịt, do virus cúm chủng A, phân chủng H5	HBD - 1
2	Vaxxin cúm gia cầm vô hoạt, nhũ dầu ( H5, N28)	Kháng nguyên vi rút cúm gia cầm vô hoạt chủng A/N28/1973(H5N2)	chai	500liều	Phòng bệnh cúm gia cầm trên gà, vịt, do virus cúm chủng A, phân chủng H5	HBD - 2

**VIỆT NAM**  
**Vaxxin cho gia cầm**  
**Sản phẩm của Xí nghiệp thuốc thú y Trung ương I**

TT	Tên vaxxin	Thành phần	Chỉ dẫn	Liều lượng và cách dùng	Quy cách
1	Vaxxin Lasota nhược độc đông khô	Virus nhược độc Newcastle, chủng Lasota. Mỗi liều chứa ít nhất $10^6$ EID <sub>50</sub> virus Newcastle và chất bổ trợ	Phòng bệnh Newcastle cho gà < 2 tháng tuổi.	*Nhỏ mắt mũi: một liều 0.1 - 0.2 ml *Cho uống: mỗi liều 3 - 5 ml	Lọ: 20 - 50 - 100 - 250 liều Hộp 50 lọ
2	Vaxxin Newcastle nhược độc đông khô	Virus nhược độc Newcastle chủng Muktewar mỗi liều chứa ít nhất $10^6$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh Newcastle cho gà > 2 tháng tuổi.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da: 1liều 0.1 - 0.2 ml	Lọ: 20 - 40 - 250 liều Hộp 50 lọ
3	Vaxxin Gumboro nhược độc đông khô	Virus nhược độc Gumoro chủng 2512 serotyp I. Mỗi liều chứa ít nhất $10^3$ TCID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh Gumboro cho gà. Dùng cho gà 5 - 7 ngày tuổi trở lên, sau 2 tuần dùng nhắc lại.	Nhỏ mắt mũi: 0.1 - 0.2 ml/liều Cho uống: 3 - 5 ml/liều	Lọ: 50 - 100 - 250 liều Hộp 50 lọ
4	Vaxxin Đậu gà nhược độc đông khô	Virus nhược độc đậu gà chủng C. Mỗi liều chứa ít nhất $10^2$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh đậu cho gà. mọi lứa tuổi.	Chủng ở khuỷu cánh: 0.1 - 0.2 ml/liều Thảm qua lỗ chân lông: 0.1 - 0.2 ml/liều	Lọ: 50 - 100 - 250 liều Hộp 50 lọ
5	Vaxxin Tụ huyết trùng (THT) gia cầm vô hoạt dạng nước	Vi khuẩn THT ( <i>Pasteurella aviseptica</i> ) vô hoạt. Mỗi liều chứa 8 tỉ vi khuẩn + chất bổ trợ	Phòng bệnh THT cho gà, vịt, ngan, ngỗng, gà tây. dùng cho gia cầm >2 tháng tuổi	Tiêm dưới da: 1 ml/ liều.	Lọ nhựa: 20 - 50 - 100 - liều
6	Vaxxin Dịch tả vịt nhược độc đông khô	Virus nhược độc dịch tả vịt. Mỗi liều chứa ít nhất $10^4$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ.	Phòng bệnh dịch tả cho vịt - ngan mọi lứa tuổi	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da: 0.2 - 0.5 ml/liều	Lọ: 100 - 150 - 200 - 500 liều Hộp 50 lọ
7	Vaxxin Viêm gan vịt - ngan nhược độc đông khô	Virus nhược độc viêm gan truyền nhiễm (DHV) Mỗi liều chứa ít nhất $10^{3,5}$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ.	Phòng bệnh viêm gan truyền nhiễm cho vịt - ngan từ 1 ngày tuổi trở lên.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da: 0.2 - 0.5 ml/liều Nhỏ mắt, mũi: 0.03 ml/liều Uống: 3.5 ml/liều	Lọ: 100 - 150 - 200 - 500 liều Hộp 50 lọ

## Sản phẩm của Công ty thuốc thú y Trung ương II

TT	Tên vacxin	Thành phần	Chỉ dẫn	Liều lượng và cách dùng	Quy cách
1	Vaccine lasota nhược độc đông khô	Virus nhược độc Newcastle, chủng Lasota. Mỗi liều chứa ít nhất $10^{6.5}$ EID <sub>50</sub> virus Newcastle và chất bổ trợ	Phòng bệnh Newcastle cho gà > 2 tuần tuổi.	*Nhỏ mắt *Cho uống Số ml tùy thuộc độ pha loãng	Lọ: 100 liều
2	Vaccine Newcastle nhược độc đông khô	Virus nhược độc Newcastle chủng "Asplin" F (hệ 2) mỗi liều chứa ít nhất $10^7$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh Newcastle cho gà > 1 ngày tuổi.	Nhỏ mắt mũi	Lọ: 100 liều
3	Vaccine Gumboro nhược độc đông khô	Virus nhược độc Gumboro chủng 2512 serotyp I. Mỗi liều chứa ít nhất $10^3$ TCID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh Gumboro cho gà. Dùng cho gà 5 - 7 ngày tuổi trở lên, sau 2 tuần dùng nhắc lại.	Nhỏ mắt mũi: 0.1 - 0.2 ml/liều Cho uống: 3 - 5 ml/liều	Lọ: 50 - 100 - 250 liều Hộp 50 lọ
4	Vaccine Đậu gà nhược độc đông khô	Virus nhược độc đậu gà chủng C. Mỗi liều chứa ít nhất $10^2$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ	Phòng bệnh đậu cho gà. Mọi lứa tuổi.	Chủng ở khuỷu cánh: 0.1 - 0.2 ml/liều Thảm qua lỗ chân lông: 0.1 - 0.2 ml/liều	Lọ: 50 - 100 - 250 liều Hộp 50 lọ
5	Vaccine Tụ huyết trùng (THT) gia cầm vô hoạt dạng nước	Vi khuẩn THT (Pasteurella aviseptica) vô hoạt. Mỗi liều chứa 8 tỷ vi khuẩn + chất bổ trợ	Phòng bệnh THT cho gà, vịt, ngan, ngỗng, gà tây. Dùng cho gia cầm > 2 tháng tuổi	Tiêm dưới da: 1 ml/liều	Lọ nhựa: 20 - 50 - 100 - liều
6	Vaccine Dịch tả vịt nhược độc đông khô	Virus nhược độc dịch tả vịt. Mỗi liều chứa ít nhất $10^4$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ.	Phòng bệnh dịch tả cho vịt - ngan mọi lứa tuổi	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da: 0.2 - 0.5 ml/liều	Lọ: 100 - 150 - 200 - 500 liều Hộp 50 lọ
7	Vaccine Viêm gan vịt - ngan nhược độc đông khô	Virus nhược độc viêm gan truyền nhiễm (DVH). Mỗi liều chứa ít nhất $10^{3.5}$ EID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ.	Phòng bệnh viêm gan truyền nhiễm cho vịt - ngan từ 1 ngày tuổi trở lên.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da: 0.2 - 0.5 ml/liều Nhỏ mắt, mũi: 0.03 ml/liều Uống: 3.5 ml/liều	Lọ: 100 - 150 - 200 - 500 liều Hộp 50 lọ

## VACXIN DÙNG CHO LỢN

### Sản phẩm của Xí nghiệp Thuốc thú y Trung ương I

TT	Tên vacxin	Thành phần	Chỉ dẫn	Liều lượng và cách dùng	Quy cách
1	Vaccine Phô thương hàn lợn vô hoạt dạng nước	Vi khuẩn Sal.cholera suis vô hoạt - chủng F. Mỗi liều chứa ít nhất 10 tỷ vi khuẩn + chất bổ trợ.	Phòng bệnh phô thương hàn. Cho lợn > 20 ngày tuổi.	Tiêm bắp hoặc dưới da: 1 ml/liều	Lọ nhựa: 10 - 15 - 20 liều. Hộp 10 lọ
2	Vaccine Phô thương hàn lợn nhược độc đông khô	Vi khuẩn Sal.cholera suis typ 0:6, 7; H: 1,5 nhược độc. Mỗi liều chứa ít nhất 2.5 tỷ CFU + chất bổ trợ.	Phòng bệnh phô thương hàn. Cho lợn > 25 ngày tuổi. Tiêm cho lợn mẹ để có miễn dịch cho đàn con.	Tiêm bắp hoặc dưới da: 1 ml/liều	Lọ: 10 liều

<b>TT</b>	<b>Tên vacxin</b>	<b>Thành phần</b>	<b>Chỉ dẫn</b>	<b>Liều lượng và cách dùng</b>	<b>Quy cách</b>
3	Vacxin Tụ huyết trùng (THT) lợn vô hoạt dạng nước.	Vi khuẩn Pasteurella suisceptica typ B vô hoạt. Mỗi liều chứa ít nhất $10^{10}$ vi khuẩn + chất bổ trợ.	Phòng bệnh THT cho lợn. Dùng cho lợn sau khi cai sữa.	Tiêm bắp hoặc dưới da: 1 ml/liều	Lọ nhựa: 10 - 15 - 20 liều
4	Vacxin Đóng dấu lợn (DDL) nhược độc dạng nước	Vi khuẩn (DDL) chủng VR <sub>2</sub> typ N nhược độc. Mỗi liều chứa ít nhất 1,3 triệu vi khuẩn + chất bổ trợ.	Phòng bệnh Đóng dấu cho lợn > 2 tháng tuổi.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da - Lợn < 25kg tiêm 2 ml - Lợn > 25kg tiêm 3 ml	Lọ nhựa: 20 liều
5	Vacxin Tụ dấu lợn nhược độc dạng nước	Vi khuẩn (DDL) chủng VR <sub>2</sub> nhược độc. Vi khuẩn tụ huyết trùng lợn AvPs - 3 nhược độc + chất bổ trợ.	Phòng bệnh Đóng dấu và bệnh tụ huyết trùng cho lợn > 2 tháng tuổi.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da - Lợn < 25kg tiêm 2 ml - Lợn > 25kg tiêm 3 ml	Lọ nhựa: 45 ml
6	Vacxin Dịch tả lợn nhược độc đông khô	Virus nhược độc dịch tả lợn - chủng C. Mỗi liều chứa $10^4$ RID <sub>50</sub> virus và chất bổ trợ.	Phòng bệnh dịch tả cho lợn. Dùng cho lợn sau cai sữa. Lợn giống tiêm 2 lần/năm.	Tiêm bắp hoặc dưới da: 1 ml/liều	Lọ: 10 - 15 - 20 - 25 - 50 liều Hộp 50 lọ
7	Vacxin Parvo vô hoạt dạng nước	Virus Parvo vô hoạt + bổ trợ.	Phòng bệnh rối loạn sinh sản ở lợn do Virus Parvo gây ra.	Tiêm bắp hoặc dưới da: 2 ml/liều	Lọ: 1 liều Hộp 50 lọ

### Sản phẩm của Công ty Thuốc thú y Trung ương II

1	Vacxin Phó thương hàn lợn vô hoạt.	Vi khuẩn Sal.cholera suis vô hoạt - chủng Kunzendorf. Mỗi ml chứa 10 tỷ tế bào vi khuẩn + chất bổ trợ.	Phòng bệnh phó thương hàn. Cho lợn > 20 ngày tuổi.	Tiêm dưới da sau gốc tai hoặc trong đùi 1ml/liều cho lợn 20 - 30 ngày tuổi, 3 tuần sau nhắc lại với 2ml/liều.	Lọ: 10 - 20 - 50 ml
2	Vacxin Phó thương hàn lợn nhược độc đông khô	Vi khuẩn Sal.cholera suis typ 0:6, 7; H: 1,5 nhược độc. Mỗi liều chứa ít nhất 2,5 tỷ CFU + chất bổ trợ.	Phòng bệnh phó thương hàn. Cho lợn > 20 ngày tuổi. Tiêm cho lợn mẹ để có miễn dịch cho đàn con.	Tiêm bắp hoặc dưới da: Theo liều ghi trên nhãn	Lọ: 10 - 25 liều
3	Vacxin Tụ huyết trùng (THT) lợn vô hoạt.	Vi khuẩn Pasteurella multocida chủng FgHc vô hoạt. Mỗi ml chứa 10 tỷ tế bào vi khuẩn + chất bổ trợ.	Phòng bệnh THT cho lợn. Dùng cho lợn sau khi cai sữa.	Tiêm dưới da sau gốc tai hoặc trong đùi, 1 ml/liều cho lợn 20 - 30 ngày tuổi, 3 tuần sau nhắc lại với 2ml/liều. 2ml/liều cho lợn nái, đực giống, lợn 2 - 3 tháng tuổi.	Lọ: 10 - 20 - 50 ml
4	Vacxin Dịch tả lợn đông khô và tươi	Virus dịch tả lợn ché từ lách thỏ, chủng C. Mỗi liều chứa ít nhất 100 PD <sub>50</sub> + chất bổ trợ.	Phòng bệnh dịch tả lợn cho lợn mọi lứa tuổi.	Tiêm dưới da sau gốc tai hoặc bên trong đùi - Lợn con theo mẹ 0,5 ml/con - Lợn trưởng thành 1 ml/con	Lọ 10 - 25 - 100 liều

**VACXIN DÙNG CHO TRÂU BÒ**  
**Sản phẩm Công ty Thuốc thú y Trung ương II**

TT	Tên vacxin	Thành phần	Chỉ dẫn	Liều lượng và cách dùng	Quy cách
1	Vacxin Tụ huyết trùng (THT) trâu bò.	Vi khuẩn Pasteurella multocida chủng P <sub>52</sub> . Mỗi ml chứa 10 tỉ tế bào + chất bổ trợ.	Phòng bệnh THT cho trâu bò.	Tiêm dưới da cõi: - 2 ml/liều cho trâu >1 năm tuổi - 1.5 ml/liều cho nghé từ 6 tháng đến 1 năm tuổi	Lọ: 50 ml
2	Vacxin Nhiệt thán nhược độc đông khô.	Nha bào vi khuẩn nhiệt thán nhược độc chủng Stern 34F <sub>2</sub> . Mỗi liều cho trâu bò chứa 10 triệu nha bào + chất bổ trợ; cho lợn, dê, cừu chứa 5 triệu nha bào + chất bổ trợ	Phòng bệnh nhiệt thán cho trâu - bò >4 tháng tuổi; cho lợn, dê, cừu > 3 tháng tuổi	Tiêm dưới da: - Trâu - bò 1 ml/liều - Dê - lợn - cừu 0.5 ml/liều	Lọ 5 liều, 10 liều
3	Vacxin Dịch tả trâu - bò nhược độc đông khô.	Chết từ môi trường tế bào thận bê chủng Kabete O. Mỗi liều đông khô chứa 10 <sup>4.5</sup> TCID <sub>50</sub> virus.	Phòng bệnh dịch tả cho trâu bò mọi lứa tuổi.	Tiêm dưới da: 1 - 2 ml/liều (tùy vào độ pha loãng)	Lọ 40 liều

**Sản phẩm của Xí nghiệp Thuốc thú y Trung ương**

1	Vacxin Tụ huyết trùng (THT) trâu bò vô hoạt dạng nước.	Vi khuẩn pasteurella bovisepica typ B vô hoạt. Mỗi liều chứa ít nhất 10 tỉ tế bào + chất bổ trợ.	Phòng bệnh THT cho trâu bò.	Tiêm dưới da: 2 ml/liều	Lọ nhựa: 10 - 20 - 25 liều
2	Vacxin Nhiệt thán nhược độc dạng nước.	Nha bào vi khuẩn nhiệt thán vô độc không có giáp mỏ. Mỗi liều chứa ít nhất 25 triệu nha bào + chất bổ trợ.	Phòng bệnh nhiệt thán cho Trâu - bò - lợn - cừu - ngựa.	Tiêm dưới da: - Trâu - bò - lợn - cừu - ngựa > 1 tuổi, 1 ml/liều - Trâu - bò - lợn - cừu - ngựa < 1 tuổi, 0.5 ml/liều	Lọ nhựa: 15 ml
3	Vacxin Ung khí thán vô hoạt dạng nước.	Vi khuẩn Clostridium chauvoei vô hoạt + chất bổ trợ.	Phòng bệnh Ung khí thán cho trâu bò mọi lứa tuổi.	Tiêm dưới da: 5 ml/liều	Lọ nhựa: 10 liều
4	Vacxin AFTOVAX vô hoạt dạng nước Merial - pháp	Virus Lở mồm long móng đa typ O; A; Asia1 + chất bổ trợ nhũ dầu kép (DOE)	Phòng bệnh LMLM cho trâu bò.	Tiêm bắp: 2 ml/liều	Lọ: 20 - 50 - 100 ml
5	Vacxin AFTOPOR vô hoạt dạng nước Merial - pháp	Virus Lở mồm long móng vô hoạt đơn typ O mỗi liều chứa ít nhất 3PD <sub>50</sub> + chất bổ trợ nhũ dầu kép (DOE)	Phòng bệnh LMLM cho gia súc nhai lại và lợn.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da - Trâu - bò - lợn 2 ml/liều - Dê cừu 1ml/liều.	Lọ: 20 - 50 - 100 ml
6	Vacxin xoắn khuẩn vô hoạt dạng nước Merial - pháp	Vi khuẩn <i>Leptospira</i> vô hoạt gồm 6 chủng: L.Bataviae; L.Canicola; L.Grippotyphosa; L.Mitis; L.pomona; L.icterohaemorrhagiae + chất bổ trợ.	Phòng bệnh xoắn trùng cho trâu - bò lợn. tiêm 2 lần cách nhau 1 - 2 tuần.	Tiêm bắp hoặc tiêm dưới da - Trâu - bò 5 ml/liều - Lợn 3ml/liều.	Lọ nhựa: 45 ml

## **IX. QUY CHẾ THỦ NGHIỆM VÀ KHẢO NGHIỆM VACXIN THÚ Y**

### **9.1. Phạm vi áp dụng:**

Quy chế này quy định việc thử nghiệm, khảo nghiệm đối với:

a) Vacxin thú y sản xuất trong nước đang trong giai đoạn nghiên cứu, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho phép sản xuất thử;

b) Vacxin thú y sản xuất trong nước, nhập khẩu đăng ký để lưu hành tại Việt Nam, được Hội đồng khoa học Cục Thú y xem xét, đề nghị Cục trưởng Cục Thú y cho phép thử nghiệm, khảo nghiệm.

c) Vacxin thú y đã có trong Danh mục vacxin, chế phẩm sinh học, vi sinh vật, hóa chất dùng trong thú y được phép lưu hành tại Việt Nam nhưng có thay đổi công thức, thành phần, dạng, tiêu chuẩn chất lượng.

### **9.2. Đối tượng áp dụng**

Tổ chức, cá nhân Việt Nam, tổ chức, cá nhân nước ngoài có hoạt động sản xuất, nhập khẩu, thử nghiệm, khảo nghiệm Vacxin thú y trên lãnh thổ Việt Nam phải tuân theo Quy chế này.

### **9.3. Nội dung thử nghiệm, khảo nghiệm**

#### **9.3.1. Chỉ tiêu thử nghiệm, khảo nghiệm**

1. An toàn: Đối với các loài động vật là đối tượng sử dụng vacxin.
2. Hiệu lực: Đối với các loài động vật là đối tượng sử dụng vacxin.

#### **9.3.2. Điều kiện đối với cơ sở thử nghiệm, khảo nghiệm**

1. Tổ chức, cá nhân đăng ký thử nghiệm, khảo nghiệm đề nghị địa điểm và phải được Cục Thú y chấp nhận trên cơ sở kết quả thẩm định của Chi cục Thú y quản lý địa bàn có cơ sở thử nghiệm, khảo nghiệm.
2. Địa điểm thử nghiệm, khảo nghiệm phải cách biệt với khu dân cư, công trình công cộng và đảm bảo các điều kiện vệ sinh thú y theo quy định tại khoản 2 điều 55 của Nghị định số 33/2005/NĐ - CP ngày 15/3/2005 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Pháp lệnh Thú y.
3. Chủ hoặc người phụ trách kỹ thuật của cơ sở tiếp nhận việc thử nghiệm, khảo nghiệm phải có chứng chỉ hành nghề do Cục Thú y cấp.

#### **9.3.3. Động vật dùng thử nghiệm, khảo nghiệm**

1. Loài động vật được dùng để thử nghiệm, khảo nghiệm là tất cả các đối tượng khuyến cáo sử dụng vacxin.
2. Khỏe mạnh về lâm sàng.
3. Không có kháng thể tương ứng với loại vacxin thử nghiệm, khảo nghiệm.

#### **9.3.4. Quy mô thử nghiệm, khảo nghiệm**

1. Số lượng động vật thử nghiệm, khảo nghiệm:

- Gia cầm: từ 1000 đến 2000 con;
- Lợn: từ 50 đến 100 con;
- Trâu, bò, dê, cừu: từ 50 đến 100 con;
- Ngựa: từ 20 đến 25 con;
- Chim, thú cảnh: từ 25 đến 50 con;

2. Trong từng trường hợp cụ thể việc xác định nhóm động vật thử nghiệm, khảo nghiệm cần thiết để có kết quả tin cậy về thống kê sẽ được qui định cụ thể trong giấy phép. Riêng đối với vacxin cúm gia cầm mỗi ô chuồng phả có 1% động vật cảnh báo không tiêm vacxin.

#### **9.4. Thủ tục đăng ký**

##### **9.4.1. Hồ sơ đăng ký**

Tổ chức, cá nhân có nhu cầu thử nghiệm, khảo nghiệm vacxin thú y làm hồ sơ đăng ký bao gồm:

- a) Đơn đăng ký: mẫu đơn đăng ký như sau:

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

**ĐƠN ĐĂNG KÝ THỬ NGHIỆM, KHẢO NGHIỆM VACXIN THÚ Y**

....., ngày.....tháng.....năm.....

Kính gửi: Cục Thú y - Bộ Nông nghiệp & Phát triển nông thôn

Cơ sở đăng ký thử nghiệm, khảo nghiệm vacxin thú y: .....

Các loại vacxin đăng ký thử nghiệm:

TT	Tên vacxin thử nghiệm, khảo nghiệm	Dạng vacxin và đường cho vacxin
1		
2		
3		
...		
...		

Đề nghị Cục Thú y duyệt cấp Giấy phép thử nghiệm, khảo nghiệm.

**Hồ sơ kèm theo:**

- Hợp đồng thử nghiệm, khảo nghiệm
- Hồ sơ kỹ thuật (theo Hồ sơ đăng ký)
- Các giấy tờ khác có liên quan

**Đại diện**

*Ký và đóng dấu*

- b) Tài liệu thử nghiệm đã làm trên động vật thí nghiệm;
- c) Phiếu kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn chất lượng của Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trực thuộc Cục Thú y;
- d) Đè cương thử nghiệm, khảo nghiệm chi tiết;
- e) Hợp đồng thử nghiệm, khảo nghiệm giữa bên có vacxin và bên tiếp nhận: mẫu hợp đồng như sau:

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

---

**HỢP ĐỒNG THỬ NGHIỆM, KHẢO NGHIỆM VACXIN THÚ Y**

Số: .....HĐTN, KN  
....., ngày .....tháng .....năm .....

**Bên A: bên có vacxin thử nghiệm, khảo nghiệm**

Đại diện: ông/bà

Chức vụ:

Đại chỉ:

Số điện thoại:

Số Fax:

**Bên B: Bên nhận thử nghiệm, khảo nghiệm:**

Đại diện: ông/bà

Chức vụ:

Địa chỉ:

Số điện thoại:

Số Fax:

Sau khi thảo luận kỹ về nội dung thử nghiệm, khảo nghiệm vacxin thú y, hai bên cùng nhất trí thực hiện Hợp đồng trên những điều khoản sau:

**I - Các sản phẩm vacxin thú y được đưa vào thử nghiệm, khảo nghiệm:**

TT	Tên vacxin thử nghiệm, khảo nghiệm	Loại, số lượng động vật thử nghiệm, khảo nghiệm
1		
2		
3		

a. Thời gian bắt đầu thử nghiệm, khảo nghiệm:

b. Thời gian kết thúc thử nghiệm, khảo nghiệm:

c. Địa điểm thử nghiệm, khảo nghiệm: - Hiệu lực  
- An toàn  
- Các chỉ tiêu khác

**II. Trách nhiệm của mỗi bên:**

**1. Trách nhiệm của bên A:**

- Cung cấp đầy đủ vacxin trong suốt quá trình thử nghiệm, khảo nghiệm.
- Cử cán bộ kỹ thuật đến địa điểm thử nghiệm, khảo nghiệm để phối hợp cùng với bên B tiến hành và theo dõi.

- Cùng bên B thông nhất giải quyết những sự cố có thể xảy ra trong quá trình thử nghiệm, khảo nghiệm. Chịu trách nhiệm bồi thường trong trường hợp xảy ra tổn thất do thử nghiệm, khảo nghiệm vacxin.

Các thỏa thuận khác về trách nhiệm bên A:

- Làm báo cáo kết quả thử nghiệm, khảo nghiệm sau khi kết thúc quá trình kiểm tra theo đúng hồ sơ theo dõi.

## **2. Trách nhiệm của bên B:**

- Tạo điều kiện thuận lợi cho bên A tiến hành thử nghiệm, khảo nghiệm đúng thời gian, đúng tiến độ trong các việc:

+ Chọn động vật thử nghiệm, khảo nghiệm, phân nhóm.

+ Cử cán bộ kỹ thuật, công nhân phối hợp thực hiện.

+ Giúp đỡ phương tiện thực hiện thử nghiệm, khảo nghiệm trong phạm vi có thể (cân, đo, cỗ định động vật thử nghiệm, khảo nghiệm, theo dõi kết quả ...).

- Cùng bên A giải quyết kịp thời khi phát hiện những sự cố trên đàn động vật thử nghiệm, khảo nghiệm.

- Ký xác nhận trong báo cáo kết quả thử nghiệm, khảo nghiệm.

## **III. Điều khoản chung:**

Hai bên cam kết thực hiện đúng và đầy đủ trách nhiệm của mình. Trong quá trình thực hiện, nếu có những nội dung cần thay đổi phải có văn bản ghi nhận với sự thống nhất của hai bên, báo cáo Cục Thú y cho phép.

Hợp đồng này được lập thành 03 bản, bên B giữ 01 bản, bên A giữ 01 bản, 01 bản được lưu giữ trong Hồ sơ thử nghiệm, khảo nghiệm của Cục Thú y.

**Đại diện bên A**  
*Ký tên, đóng dấu*

**Đại diện bên B**  
*Ký tên, đóng dấu*

**Ý kiến của Chi cục thú y**  
*Ký tên, đóng dấu*

**Ghi chú:** mẫu chỉ ghi các điều khoản cần thiết liên quan đến thử nghiệm, khảo nghiệm. Trong bản Hợp đồng này, các đơn vị có thể bổ sung các điều khoản phù hợp.

Trong trường hợp bên đăng ký thử nghiệm, khảo nghiệm đã tiến hành làm trên động vật đúng đối tượng tại cơ sở của mình, cần gửi kèm tư liệu trong hồ sơ đăng ký để tham khảo.

f) Hồ sơ đăng ký được chia thành 03 bộ gửi tới Cục Thú y.

#### **9.4.2. Cấp giấy phép**

1. Trong thời gian 03 tháng kể từ ngày nhận được hồ sơ hợp lệ, Cục Thú y sẽ trả lời bằng văn bản cấp hoặc từ chối cấp giấy phép thử nghiệm, khảo nghiệm.

Nếu bên thử nghiệm, khảo nghiệm chủ động tìm địa điểm và được Cục Thú y chấp thuận thì thời hạn trả lời là 01 tháng.

Nội dung giấy phép qui định:

- a) Chỉ tiêu thử nghiệm hoặc khảo nghiệm;
- b) Địa điểm sẽ tiến hành thử nghiệm hoặc khảo nghiệm;
- c) Thời hạn thử nghiệm hoặc khảo nghiệm;
- d) Loại và số lượng động vật thử nghiệm hoặc khảo nghiệm;
- e) Số lượng vaccine thử nghiệm hoặc khảo nghiệm;
- f) Cơ quan thú y có trách nhiệm theo dõi và đánh giá kết quả;
- g) Trách nhiệm của các bên liên quan.

### **9.5. Trách nhiệm của các bên liên quan**

#### **9.5.1. Bên thử nghiệm, khảo nghiệm**

1. Thực hiện đúng qui định trong giấy phép được cấp. Trường hợp có thay đổi bất kỳ nội dung nào trong giấy phép phải báo cáo bằng văn bản trình bày lý do xin thay đổi giấy phép.

2. Cung cấp các vật tư - kỹ thuật liên quan nếu cần.

3. Cử cán bộ kỹ thuật phối hợp với bên tiếp nhận tiến hành thử nghiệm, khảo nghiệm theo qui định.

4. Phải có hồ sơ theo dõi, ghi chép chi tiết diễn biến và đánh giá kết quả thử nghiệm, khảo nghiệm. Mẫu báo cáo như kết quả, khảo nghiệm, thử nghiệm kết quả vaccine như sau:

Đơn vị thử nghiệm, khảo nghiệm  
Số: .....

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc  
Independence - Freedom - Happiness

Date of tissue ..... , ngày.....tháng.....năm.....

**BÁO CÁO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM, KHẢO NGHIỆM VACXIN THÚ Y**  
(Report on test results of veterinary product)

N<sup>o</sup> .....

**I. Mục đích (purpose):**

(Thử nghiệm, khảo nghiệm này nhằm mục đích chứng minh tính an toàn, hiệu lực, .....của vacxin.....trên thực địa.....).

**II. Nguyên liệu (Materials):**

A: Vacxin (vacxin)

B: Động vật thử nghiệm, khảo nghiệm (Animals test)

1. Số lượng động vật được thử nghiệm, khảo nghiệm tại trại A
2. Số lượng động vật được thử nghiệm, khảo nghiệm tại trại B ...

C. Lịch tiêm chủng (Vaccination program)

Ngày tuổi.....tiêm vacxin lần 1

Ngày tuổi.....tiêm vacxin lần 2 (nếu có).

D. Người theo dõi (Investigations and observers)

**III. Tiến hành (Procedure):**

Tiêm miễn dịch (Vaccination):

1. Số lượng động vật, tuổi....., giống ..... đã được tiêm những vacxin gì (hoặc chưa tiêm vacxin nào) đã được thử nghiệm, khảo nghiệm.
2. Bao nhiêu trong số đó được tiêm vacxin (loại đăng ký thử nghiệm, khảo nghiệm), đường tiêm, liều...
3. Bao nhiêu trong số đó là đối chứng không tiêm vacxin.

B. Quan sát (Observation)

1. Động vật được theo dõi (hàng ngày) trong thời gian (21 - 28) sau khi tiêm vacxin.
2. Theo dõi ghi chép chi tiết số ôm, chết liên quan đến bệnh (mà vacxin có mục đích phòng bệnh đó. Mô tả càng chi tiết càng tốt).
3. Sau bao nhiêu ngày (21 - 28, lấy máu bao nhiêu động vật để xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh (hoặc số lượng động vật để tiêm cường đặc).

**IV. Kết quả (Results):**

- A. Tình hình chung của đàn (Flock health)
- B. Số (tỷ lệ) chết (Mortality): Báo cáo chi tiết bằng lời
- C. Kiểm tra huyết thanh (Serological tests)

**V. Kết luận (Conclusion): (Kèm theo bảng, biểu số liệu)**

**Người thực hiện bên A**

Part A - Perfomed by

(Signature with full name)

**Người thực hiện bên B**

Part B - Performed by

(Signature with full name)

**Đại diện bên A xác nhận**  
Confirmed by Representative of part A

**Đại Diện bên B xác nhận**  
Confirmed by Representative of part B

**Ý kiến của Chi cục thú y**  
(Confirmation by sub DAH)  
(Signature and stamp)

## SỐ CHẾT

(sau thời gian.....tuần hoặc tháng theo dõi)

Chuồng số	Nhóm	Tổng số động vật	Chết	
			Số lượng	%
1	Đối chứng	.....	.....	.....
2	Vaxxin	.....	.....	.....
3	Vaxxin	.....	.....	.....
- -	Vaxxin	.....	.....	.....

## TĂNG TRỌNG BÌNH QUÂN\*

(Trong thời gian.....tuần hoặc tháng theo dõi)

Chuồng số	Tuần (tháng)						
	1	2	3	4	5	6	7
1							
2							
3							

\*Tính bằng kg/con

## BẢNG (BIỂU ĐỒ THỊ)

Thể hiện các số liệu cụ thể về an toàn, hiệu lực (kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh, kết quả tiêm cường độc, thân nhiệt, tần số hô hấp, các thể hiện lâm sàng khác... tùy theo từng loại vaxxin)..

### 9.5.2. Bên tiếp nhận thử nghiệm, khảo nghiệm

1. Tạo mọi điều kiện thuận lợi cho việc thử nghiệm, khảo nghiệm được tiến hành đúng tiến độ, bảo đảm các nội dung sau:

- a) Chọn, phân nhóm động vật;
  - b) Cử cán bộ kỹ thuật theo dõi, công nhân chăn nuôi phối hợp thực hiện;
  - c) Giúp đỡ về phương tiện dụng cụ, nguyên vật liệu cần thiết theo khả năng để cân, đo, cò định động vật.
2. Quản lý chặt chẽ số lượng vaxxin dùng thử nghiệm, khảo nghiệm.
3. Khi phát sinh những sự cố trong quá trình thử nghiệm, khảo nghiệm phải phối hợp, bàn bạc với bên có vaxxin để kịp thời giải quyết, hạn chế thiệt hại.
4. Đánh giá trung thực kết quả.

### 9.5.3. Phân công trách nhiệm

1. Chi cục Thú y tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương có cơ sở được chọn làm địa điểm thử nghiệm, khảo nghiệm trên địa bàn thuộc phạm vi quản lý của mình có trách nhiệm:

- a) Thẩm định địa điểm thử nghiệm, khảo nghiệm;
- b) Kiểm tra các chỉ tiêu thử nghiệm, khảo nghiệm tại cơ sở;
- c) Xác nhận kết quả thử nghiệm, khảo nghiệm.

3. Cục Thú y: Đánh giá kết quả thử nghiệm, khảo nghiệm, đề nghị Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận, đưa vào Danh mục vacxin, chế phẩm sinh học, vi sinh vật, hóa chất dùng trong thú y được phép lưu hành tại Việt Nam.

#### **9.5.4. Hướng dẫn thi hành**

Cục Thú y hướng dẫn các tổ chức, cá nhân có nhu cầu thử nghiệm, khảo nghiệm vacxin làm hồ sơ và thủ tục xin cấp phép.

#### **9.5.5. Giải quyết vướng mắc**

1. Mọi cơ quan, tổ chức, cá nhân có liên quan chịu trách nhiệm chấp hành Quy chế này.
2. Trong quá trình thực hiện nếu phát sinh những vướng mắc mà các bên không thể giải quyết cần báo cáo về Cục Thú y để có biện pháp xử lý kịp thời.

### **Câu hỏi ôn tập chương**

1. Trình bày quy luật hình thành kháng thể sau khi sử dụng vacxin ở động vật, cơ sở của việc tiêm nhắc nhở và tái chủng vacxin
2. Nguyên tắc sử dụng vacxin
3. Trình bày các phản ứng không mong muốn khi tiêm phòng vacxin và cách khắc phục
4. Những tai biến khi sử dụng vacxin
5. Trình bày quy định về việc tiêm phòng vacxin bắt buộc cho gia súc, gia cầm ở Việt Nam
6. Trình bày quy chế thử nghiệm và khảo nghiệm vacxin thú y
7. Trình bày lịch tiêm phòng vacxin cho vật nuôi

## Chương 5

# SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO CÁ

**Mục tiêu:** Nắm được những quy tắc sử dụng vacxin phòng bệnh cho cá

**Kiến thức trọng tâm:**

- Các kỹ thuật gây miễn dịch cho cá
- Các phương pháp đánh giá hiệu quả khi sử dụng vacxin
- Hiện trạng sử dụng vacxin phòng bệnh cho cá và triển vọng của việc sử dụng vacxin trong nuôi trồng thuỷ sản

Phòng bệnh bằng vacxin có nhiều ưu điểm hơn các biện pháp sử dụng hoá dược. Về nguyên lý, vacxin chủ yếu dùng để phòng ngừa trong khi hoá dược để trị bệnh. Nhiều nhược điểm của việc sử dụng hoá chất trị bệnh có thể khắc phục được nhờ việc sử dụng vacxin.

### Ưu nhược điểm của vacxin và trị liệu bằng hoá dược

Gây miễn dịch bằng vacxin	Trị liệu hoá chất hoặc kháng sinh
Không hoặc rất ít tổn thất	Cá chết trước khi việc trị liệu có tác dụng
Thời gian phòng bệnh lâu dài với chỉ 1 - 2 lần gây miễn dịch	Thời gian phòng bệnh ngắn; đòi hỏi sử dụng liên tục
Phương pháp tắm có thể gây miễn dịch cho mọi cá thể trong đàn	Phân lớn kháng sinh được trộn vào thức ăn, nhưng cá bệnh thường bỏ ăn nên không tiếp thu việc trị liệu
Không có phản ứng phụ độc hại, cá khoẻ sinh trưởng tốt	Có thể có tác dụng phụ độc hại đáng chú ý; việc trị liệu dựa trên sự khác biệt về độc tính của thuốc đối với cá và tác nhân gây bệnh dựa trên một số chỉ số nhất định; thường gây ức chế sinh trưởng
Không tích luỹ dư lượng độc hại	Hoá chất độc hại có thể tồn lưu trong sản phẩm hàng hoá; cần có thời gian phân giải trước khi đưa sản phẩm ra thị trường
Tác nhân gây bệnh ít khi “nhòm” vacxin	Nhiều vi khuẩn “nhòm” kháng sinh
Luật pháp không hạn chế vacxin “an toàn”	Do khả năng hình thành các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh, nhiều nước giới hạn các loại kháng sinh dùng cho động vật nhằm đảm bảo việc sử dụng lâu dài kháng sinh trị bệnh cho người.
Về lý thuyết có thể phòng mọi loại bệnh	Hoá trị liệu có giới hạn, không thể phòng trị bệnh do virus
Không tác động xấu đến môi trường	Hoá chất có thể phá huỷ cân bằng sinh thái

Phòng bệnh cho cá bằng vacxin ở quy mô thương mại đã được thực hiện rất hiệu quả trong nghề nuôi cá hồi nhằm phòng ngừa các bệnh do vi khuẩn: bệnh xuất huyết đường tiêu hoá (enteric red mouth - ERM), bệnh do *Vibrio* (vibriosis), bệnh do *Vibrio* mùa lạnh (cold water vibriosis), và bệnh lở loét (furunculosis).

### I. KỸ THUẬT GÂY MIỄN DỊCH

Các kỹ thuật gây miễn dịch bao gồm cho ăn, phun, ngâm trực tiếp (direct immersion), ngâm trong dung dịch ưu trương (hyperosmotic immersion), và tiêm xoang bụng (intraperitoneal injection) với liều dùng hữu hiệu, mức độ bảo vệ và thời gian bảo vệ tăng dần theo thứ tự ấy. Phương pháp tắm rất có hiệu quả đối với vacxin phòng Vibriosis và ERM. Các vacxin này được sản xuất từ vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường dịch thể và được bất hoạt bằng hoá chất (thường là formalin). Những nỗ lực nhằm tạo vacxin phòng ngừa các loại bệnh khác theo cùng quy trình này chưa mang lại hiệu quả khả quan do khó khăn trong quá trình nghiên cứu sản xuất vacxin, ví dụ: ít thông tin về các yếu tố quyết định tính sinh miễn dịch,

khả năng kiểm định hiệu quả của việc sử dụng vacxin bằng thí nghiệm thử thách cường độ (challenge test) trên cá là việc khá phức tạp và khó triển khai hoàn chỉnh.

## 1.1 Tiêm

Phương pháp tiêm vacxin được áp dụng phổ biến trong nghề nuôi cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*), cá giống được tiêm vacxin vào xoang bụng nhiều tháng trước khi đưa cá ra nuôi ở biển. Đây là phương pháp có hiệu quả nhất để kích thích sản xuất kháng thể toàn thân cũng như tạo nên hiệu quả bảo vệ tốt nhất. Phương pháp này cũng cho phép việc sử dụng chất bổ trợ. Tuy nhiên, có khá nhiều nhược điểm: gây stress cho cá do hoạt động đánh bắt và tiêm, không thể áp dụng cho cá nhỏ, đòi hỏi nhiều thời gian và công sức. Nhằm khắc phục các nhược điểm này, các chất gây mê được sử dụng để giảm thiểu stress cho cá, đồng thời các thiết bị tiêm vacxin tự động với các dây chuyên hiện đại cũng đang được đưa ra thị trường nhằm đáp ứng công nghiệp nuôi cá tại nhiều nước trên thế giới.

## 1.2 Dẫn truyền qua da

Dẫn truyền vacxin qua da bao gồm các phương pháp ngâm, tắm, và phun trực tiếp lên cá.

*Phương pháp ngâm* bao gồm việc ngâm trực tiếp cá vào dung dịch vacxin (direct immersion - DI), sau khi đã xử lý cá trong nước muối ưu trương (hyperosmotic immersion - HI). Phương thức này có hiệu quả ở cá hồi trong việc gây miễn dịch đề kháng vibriosis và ERM. Trước đây, HI được sử dụng khá phổ biến nhưng gần đây nhiều tác giả phát hiện rằng có thể bỏ qua bước xử lý cá bằng dung dịch muối ưu trương mà không làm suy giảm đáp ứng miễn dịch, đồng thời giảm bớt stress cho cá trong điều kiện ưu trương. Hiệu quả bảo vệ tốt cho cá đã được chứng minh khi dùng phương pháp ngâm trực tiếp đối với các loại vacxin phòng Vibriosis, ERM, *A. hydrophila*; và ở mức độ thấp hơn đối với vacxin phòng bệnh do *Edwardsiella tarda*.

*Phương pháp phun* (spray): phun vacxin trực tiếp lên cá cũng được thông báo có hiệu quả đối với bệnh do *Vibrio* ở cá hồi.

Việc gây miễn dịch qua da tạo nên hiệu quả bảo vệ cao đối với *Vibriosis* khi gây nhiễm vi khuẩn cho cá bằng cách tắm trong dung dịch vi khuẩn gây bệnh, nhưng hệ số bảo vệ tương đối thu được rất hạn chế nếu gây cảm nhiễm thực nghiệm cho cá bằng cách tiêm vi khuẩn gây bệnh. Việc gây miễn dịch bằng cách ngâm thường không tạo nên việc sản xuất kháng thể huyết thanh, nhưng có thể tạo nên các đáp ứng miễn dịch cục bộ ở da, niêm mạc và đáp ứng này có thể bảo vệ cá hiệu quả đối với phương thức cảm nhiễm của vi khuẩn thực tế xảy ra trong hoạt động sống của cá.

Những ưu điểm của phương pháp ngâm, đặc biệt đối với phương pháp ngâm trực tiếp, dễ thực hiện với số cá lớn và nhất là cá con vì không gây nhiều stress cho cá do hoạt động đánh bắt, không mất thời gian, chỉ ngâm cá trong dung dịch vacxin vài giây.

## 1.3. Dẫn truyền qua đường miệng (oral administration)

Dẫn truyền vacxin qua đường miệng được thực hiện chủ yếu bằng cách trộn vào thức ăn. Ưu điểm của phương thức này là không gây stress cho cá tuy nhiên có thể dẫn đến lượng vacxin mà từng cá thể ăn được không giống nhau do khả năng bắt mồi không đồng đều giữa các cá thể trong đàn. Nhược điểm của phương pháp cho ăn là lượng vacxin tiêu tốn lớn, phải cho ăn vacxin trong nhiều ngày và trong đa số trường hợp thực nghiệm cho thấy hiệu quả bảo vệ thu được chỉ đạt mức độ trung bình.

Khó khăn của việc gây miễn dịch bằng phương pháp cho ăn là sự phân huỷ vacxin do tác dụng của các men tiêu hoá. Thí nghiệm với vacxin phòng Vibriosis ở cá hồi cho thấy, phần ruột sau của cá chính là nơi tiếp thụ, xử lý và trình diện kháng nguyên, và hiệu quả bảo vệ cao nhất đạt được khi bơm vacxin vào phần ruột sau qua hậu môn của cá thí nghiệm. Vì thế, việc bao gói vacxin (micro - encapsulate) nhằm bảo vệ vacxin không bị phá huỷ khi đi qua phần ruột trước của cá hẳn sẽ là phương thức hữu hiệu trong việc gia tăng hiệu quả sử dụng vacxin theo phương thức cho ăn trong tương lai.

## **II. Các phương pháp đánh giá hiệu quả sử dụng vacxin**

Hai nhân tố chính có liên quan đến việc đánh giá vacxin: Phương pháp gây nhiễm thực nghiệm và phương pháp tính toán hiệu quả bảo vệ.

### **2.1. Phương pháp gây nhiễm thực nghiệm**

Phương pháp gây nhiễm nhằm đánh giá khả năng đề kháng bệnh của cá thí nghiệm đã được gây miễn dịch bằng vacxin có vai trò quan trọng trong khi đánh giá hiệu quả bảo vệ của vacxin. Trong khi việc gây miễn dịch cho cá bằng phương pháp ngâm tạo nên sức đề kháng tốt cho cá thí nghiệm được gây nhiễm bằng cách tắm với vi khuẩn gây bệnh cũng như trong thực tế sản xuất khi tiếp xúc với tác nhân gây bệnh một cách tự nhiên thì lại tỏ ra ít hiệu quả nếu gây nhiễm bằng cách tiêm vi khuẩn này vào cá thí nghiệm. Tuy nhiên, nếu cá được gây miễn dịch bằng cách tiêm thì khả năng đề kháng bệnh cao hơn khi gây nhiễm bệnh thực nghiệm cho cá bằng cách tiêm vi khuẩn. Việc tiêm vacxin cho cá tạo nên hàm lượng kháng thể cao trong máu, nhưng dẫn truyền vacxin qua da lại không tạo nên được đáp ứng kháng thể này. Điều này cho thấy rằng việc gây miễn dịch bằng cách ngâm kích thích đáp ứng miễn dịch cục bộ ở da và niêm mạc, đáp ứng này đủ để bảo vệ cá kháng lại sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh trong tự nhiên.

Vì vậy, việc đánh giá hiệu quả của vacxin bằng phương thức gây nhiễm thực nghiệm tương tự như điều kiện lây nhiễm của cá trong tự nhiên có ý nghĩa hết sức quan trọng. Từ lý do này mà phương pháp gây nhiễm qua nước nuôi cá (water borne challenge system), là thích hợp hơn phương pháp tiêm tác nhân gây bệnh cho cá thí nghiệm. Đáng tiếc là đối với nhiều loại tác nhân gây bệnh, việc gây nhiễm thực nghiệm cho cá qua nước bể nuôi thường khó tạo nên tỷ lệ cảm nhiễm và tỷ lệ chết cao. Do đó, nhiều nhà nghiên cứu buộc phải dùng cách tiêm tác nhân gây bệnh cho cá khi đánh giá hiệu quả của vacxin.

### **2.2. Phương pháp tính toán hiệu quả của vacxin**

Có 2 phương pháp để tính toán hiệu quả bảo vệ của vacxin:

#### **① Hệ số bảo vệ tương đối (Relative Percent Survival - RPS)**

Phương pháp này phù hợp cho các thực nghiệm trong phòng cũng như ngoài thực tế sản xuất bằng cách gây nhiễm các nhóm cá được gây miễn dịch và nhóm cá đối chứng không được gây miễn dịch rồi theo dõi tỷ lệ sống của các nhóm cá này trong một khoảng thời gian định trước. Phương pháp này có một số tiêu chuẩn cơ bản: mỗi nhóm phải có tối thiểu 25 cá thể với độ lặp lại (replicate) là 2; việc gây nhiễm với tác nhân gây bệnh phải đạt được tỷ lệ chết hoặc mắc bệnh trên 60% đối với nhóm cá đối chứng trong khoảng thời gian tương tự như ngoài tự nhiên; nguyên nhân tử vong của mọi cá thể trong thí nghiệm phải được xác minh với số cá chết do nguyên nhân khác ngoài tác nhân gây bệnh không được vượt quá 10% đối với tất cả các nhóm, và tỷ lệ chết của cá được gây miễn dịch không được vượt quá 24%. Nếu thỏa mãn các tiêu chí này, RPS được tính theo công thức:

$$RPS = 1 - \frac{\text{Tỷ lệ chết của nhóm gây miễn dịch}}{\text{Tỷ lệ chết của nhóm đối chứng}} \times 100$$

Vacxin được xem là có hiệu quả bảo vệ cho cá, có thể đưa vào ứng dụng trong thực tế khi RPS > 60%.

#### **② Gia tăng liều gây chết 50% (Lethal Dose 50 per cent - LD<sub>50</sub>)**

Kiểm định này chỉ được thực hiện trong phòng thí nghiệm và dựa trên cơ sở xác định số lượng sinh vật gây bệnh cần thiết để gây nên tỷ lệ tử vong 50% ở nhóm cá được gây miễn dịch và cá đối chứng. Phương pháp kiểm định này cho kết quả đánh giá hiệu quả bảo vệ của vacxin mang tính chất định lượng tốt hơn kiểm định RPS nhưng việc triển khai thực hiện phức tạp hơn. Cá thí nghiệm và cá đối chứng được chia thành nhiều nhóm, mỗi nhóm tối thiểu là 6 cá thể, và được gây nhiễm tác nhân gây bệnh với liều lượng theo thang tăng dần. Đối với vi khuẩn, như *A. salmonicida*, gây cảm nhiễm bằng cách tiêm với liều lượng từ 10 CFU/con đến 10<sup>6</sup>CFU/con, tăng dần theo thang nồng độ hệ thống 10 lần. Việc gây cảm nhiễm bằng cách ngâm có thể thực hiện tương tự, với nồng độ vi khuẩn trong nước (CFU/ml) tăng dần. Ghi nhận tỷ lệ chết của cá trong các nhóm thí nghiệm trong một thời gian xác định tương ứng thời

gian thực tế tiến triển của bệnh trong tự nhiên (đối với bệnh lở loét của cá hồi là 14 ngày). Nguyên nhân gây chết của cá thí nghiệm phải được khẳng định bằng việc tái phân lập được tác nhân gây bệnh từ các cá thể bị chết trong thí nghiệm. Số lượng tác nhân gây bệnh cần thiết để gây tỷ lệ tử vong 50% ( $LD_{50}$ ) cho cá đối chứng và cá được sử dụng vacxin được tính theo công thức của Reed & Muench (1938). Theo đó,  $LD_{50}$  = liều thấp nhất gây chết trên 50% cá thể trừ đi hệ số hiệu chỉnh (proportionate distance : p.d.). Số hiệu chỉnh p.d. được tính theo công thức:

$$P.D = \frac{\text{Tỷ lệ chết trên } 50\% \text{ thấp nhất}}{\text{Tỷ lệ chết trên } 50\% \text{ thấp nhất} - \text{Tỷ lệ chết dưới } 50\% \text{ cao}}$$

Một loại vacxin được xem là có khả năng tạo nên đáp ứng miễn dịch bảo vệ tốt cho động vật thí nghiệm khi  $LD_{50}$  của nhóm cá thí nghiệm cao hơn  $LD_{50}$  của nhóm cá đối chứng trên 100 lần.

### **III. HIỆN TRẠNG SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO CÁ**

Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của nghề nuôi trồng thuỷ sản cả về quy mô lẫn mức độ thâm canh, tình hình dịch bệnh trên các đối tượng nuôi thuỷ sản ngày càng nghiêm trọng, đòi hỏi phải có các biện pháp phòng bệnh hữu hiệu nhằm giảm bớt thiệt hại cho các nhà sản xuất. Việc sử dụng vacxin cho các đối tượng nuôi thuỷ sản, đặc biệt là các loài cá xương được nghiên cứu từ những năm 1960 và bắt đầu đưa ra thị trường từ đầu những năm 1980. Tại Na Uy, nhờ việc sử dụng vacxin để phòng các bệnh do vi khuẩn gây ra mà lượng kháng sinh dùng phòng trị bệnh giảm thiểu ngày càng rõ rệt, đồng thời tạo nên sự phát triển ổn định của nghề nuôi cá hồi, Na Uy trở thành nước phát triển hàng đầu trên thế giới trong lĩnh vực này

Hiện nay, nhiều loại vacxin phòng bệnh cho cá nuôi, chủ yếu là các loài cá biển, được sử dụng rộng rãi tại các nước tiên tiến.

#### **Các loại vacxin phục vụ NTTS hiện đang được sử dụng hoặc đang trong giai đoạn nghiên cứu thử nghiệm (theo Hastein, 2002)**

Vacxin đang được sử dụng	Vacxin đang nghiên cứu
<i>Phòng bệnh do vi khuẩn</i>	
<i>Yersinia ruckeri</i> (ERM) 1976	<i>Flexibacter maritimus</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> serotype O1	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> serotype O2	<i>Flavobacterium columnaris</i>
<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Vibrio</i> sp.
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
<i>Vibrio salmonicida</i>	
<i>Pasterella piscicida</i>	
<i>Vibrio viscosus</i>	
<i>Aerococcus garvieae</i>	
<i>Lactococcus garvieae</i>	
<i>Streptococcosis</i>	
<i>Piscirickettsiosis</i>	
<i>Edwardsiellosis</i>	
<i>F. maritimus</i>	
<i>F. columnare</i>	
<i>Phòng bệnh do virus</i>	
<i>Infectious Pancreatic Necrosis</i>	<i>Infectious Hematopoietic Necrosis</i>
<i>Iridovirus</i>	<i>Viral Nervous Necrosis</i>
<i>Infectious Salmonid Anemia</i>	
<i>Viral Hemorrhagic Septicemia</i>	
<i>Grass carp hemorrhagic Disease (GCHD)</i>	
<i>Phòng bệnh ký sinh trùng</i>	
<i>Không có</i>	

#### **IV. TRIỀN VỌNG CỦA VIỆC SỬ DỤNG VACXIN TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN**

Vẫn còn nhiều vấn đề liên quan đến hệ miễn dịch của cá cần phải được tiếp tục nghiên cứu để có thể hiểu được cơ chế hoạt động của vacxin ở các đối tượng này. Một trong những điểm quan trọng cần phải được chú ý là bản chất của đáp ứng miễn dịch cục bộ. Các thí nghiệm cho thấy hiệu quả bảo vệ đối với việc sử dụng vacxin phòng bệnh vibriosis đạt rất cao trong khi lại không phát hiện được kháng thể trong huyết thanh của cá. Điều này cho thấy nếu chúng ta hiểu được rằng đáp ứng miễn dịch dịch thể và qua trung gian tế bào cả ở mức độ cục bộ lẫn toàn thân có vai trò như thế nào trong việc bảo vệ các đối với tác nhân gây bệnh thì kiến thức này hẳn sẽ rất hữu ích trong việc nghiên cứu chế tạo vacxin cho cá. Nhờ đó, có thể thiết kế các phương pháp hữu hiệu để kiểm định và đánh giá hiệu quả của kháng nguyên trong việc tạo nên đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cá.

Những hiểu biết hiện tại về cơ chế gây bệnh của đa số các tác nhân gây bệnh ở cá vẫn còn hạn chế, do đó chưa có đủ cơ sở cho việc tạo nên các kháng nguyên có thể gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ có hiệu quả cho cá. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ của cá thường chỉ được tạo nên bởi một vài kháng nguyên của tác nhân gây bệnh được tinh chế và thậm chí phải có một số bổ sung nhất định, các biện pháp này chỉ có thể đạt được toàn vẹn khi có đầy đủ thông tin từ các nghiên cứu về bản thân tác nhân gây bệnh cho cá. Tuy nhiên, với những tiến bộ đã đạt được trong gần 30 năm qua kể từ khi loại vacxin đầu tiên trong nuôi trồng thủy sản được cấp phép lưu hành vào năm 1976 (vacxin phòng ERM) và sự thừa nhận rộng rãi của người nuôi cá về vai trò quan trọng của vacxin trong việc quản lý và phòng ngừa dịch bệnh là những cơ sở quan trọng đảm bảo cho sự phát triển liên tục trong lĩnh vực này, đặc biệt là việc sử dụng công nghệ sinh học phân tử nhằm sản xuất các loại vacxin rẻ tiền để phòng ngừa các loại virus gây bệnh, bao gồm cả việc sử dụng các loại vacxin thế hệ mới.

#### **Câu hỏi ôn tập chương**

1. Trình bày các kỹ thuật gây miễn dịch cho cá
2. Trình bày các phương pháp đánh giá hiệu quả sử dụng vacxin trên cá

# Chương 6

## MIỄN DỊCH HỌC ÚNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH TRUYỀN NHIỄM CỦA VẬT NUÔI

**Mục tiêu:** Nắm được các phản ứng huyết thanh học để chẩn đoán bệnh truyền nhiễm của vật nuôi.

### Kiến thức trọng tâm:

- Sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể
- Các phản ứng huyết thanh học ứng dụng trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm

## I. SỰ KẾT HỢP GIỮA KHÁNG NGUYÊN VÀ KHÁNG THỂ

### 1. Khái niệm

Khi cho kháng thể đặc hiệu tiếp xúc với kháng nguyên đã kích thích sinh ra chúng thì phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ xảy ra một cách đặc hiệu. Phản ứng kết hợp này có thể xảy ra trong cơ thể động vật (invivo) hay trong ống nghiệm (invitro).

Kháng thể dịch thể đặc hiệu thường tồn tại trong huyết thanh và chất dịch của cơ thể, nên phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể dịch thể gọi là phản ứng huyết thanh học. Phương pháp chẩn đoán dựa vào phản ứng huyết thanh học gọi là phương pháp chẩn đoán huyết thanh học. Phương pháp này thường được thực hiện trong phòng thí nghiệm hay trên cơ thể động vật.

Việc dùng phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu cho phép ta xác định một kháng nguyên chưa biết bằng một kháng thể đã biết hoặc ngược lại.

### 2. Kết quả sinh học của sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể

Khi bị kháng thể kết hợp, kháng nguyên không bị biến đổi về mặt cấu trúc hóa học nhưng bị thay đổi về tính chất sinh học. Vì khuẩn hoặc virus mang kháng nguyên khi bị kháng thể đặc hiệu kết hợp sẽ mất khả năng nhân lên, làm rối loạn chuyển hóa nội bào, thoái biến, dễ bị thực bào và bổ thể tiêu diệt. Các phân tử có hoạt tính nếu bị kết hợp với kháng thể sẽ mất hoạt tính, ví dụ: độc tố, enzym,... Dưới đây là các kết quả sinh học chủ yếu của sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể.

#### 2.1. Bất hoạt các phân tử có hoạt tính

Các phân tử kháng nguyên có hoạt tính khi bị kháng thể đặc hiệu kết hợp sẽ mất hoạt tính. Từ lâu, người ta đã biết sản xuất kháng thể chống độc tố (uốn ván, bạch hầu) để dùng trong phòng và trị bệnh; trong bệnh lý, kháng thể chống insulin, thyroglobulin gây suy giảm chức năng tuyến tụy, tuyến giáp; kháng thể chống enzym có tác dụng khử hoạt tính của enzym.

Cơ chế khử hoạt có thể là:

- Vị trí hoạt động của phân tử kháng nguyên bị kháng thể che phủ khiến nó không tiếp xúc được với đối tượng tác động nữa (thụ thể tế bào đích chẳng hạn)
- Cấu hình của vị trí có hoạt tính bị biến dạng không còn tính đặc hiệu nữa
- Phân tử có hoạt tính bị thay đổi về hình thể không gian

#### 2.2. Bất hoạt virus

Kháng thể làm cho virus mất khả năng kết hợp với thụ thể của tế bào đích nên không xâm nhập vào nội bào được và sẽ nhanh chóng chết ở ngoại bào.

Trường hợp virus đã lọt vào nội bào, kháng thể vẫn có khả năng gây bất hoạt theo một cơ chế khác. Virus có thể tồn tại và phát triển trong tế bào đó, hình thành một số Epitop, các Epitop này được đưa lên bề mặt tế bào và bị kháng thể kết hợp. Trong trường hợp này, kháng thể không

trực tiếp diệt virus mà có tác dụng hấp dẫn đại thực bào, tế bào NK đến tiêu diệt cả tế bào nhiễm lẩn virus bên trong. Đó là cơ chế “gây độc tế bào thông qua kháng thể”.

### 2.3. *Bất hoạt vi khuẩn, ký sinh trùng và ấu trùng của chúng.*

- Xoắn khuẩn mất khả năng di động khi bị kháng thể kết hợp.
- Nếu bị kháng thể tác động, tốc độ nhân lên của vi khuẩn giảm đi rõ rệt hoặc mất hẳn (không tạo được khuẩn lạc trong môi trường thạch). Các quá trình trao đổi chất qua màng và chuyển hóa nội bào bị rối loạn, gián đoạn hoặc ngừng, dẫn đến làm chết vi khuẩn.
- Sự kết hợp kháng thể với vi sinh vật là tác nhân mở màn làm vi khuẩn bị tiêu diệt nhanh hơn do thực bào, do hoạt hóa bổ thể hoặc do thuốc...
- Các ký sinh trùng đơn bào và một số đa bào (ký sinh trùng sét rết, amip, giun chỉ...) bị kháng thể diệt trực tiếp như cơ chế diệt vi khuẩn. Nhiều loại ấu trùng của giun sán bị IgG và IgA ở ruột làm chậm hay ngừng phát triển, tỷ lệ nở và trưởng thành giảm rõ rệt hoặc chúng không thể thâm nhập qua niêm mạc ruột để vào máu.

IgE trong các mô có vai trò rất quan trọng để bất hoạt và diệt ký sinh trùng hoặc ấu trùng của chúng, sự kết hợp của kháng thể này với ký sinh trùng tạo điều kiện cho bạch cầu ưa axit và đại thực bào tiêu diệt chúng.

### 2.4. *Chức năng tập trung kháng nguyên*

Bằng cách gây tủa, gây ngừng kết, kháng thể có vai trò làm cho kháng nguyên từ dạng phân tán trở thành tập trung lại, do vậy nó hạn chế khả năng lan rộng của kháng nguyên đồng thời tạo điều kiện quy tụ các biện pháp bảo vệ không đặc hiệu vào nơi kháng nguyên tập trung (viêm, thực bào, bổ thể ...) để tiêu diệt chúng.

## II PHẢN ỨNG HUYẾT THANH HỌC

### 1. Cơ chế chung của phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể dịch thể đặc hiệu

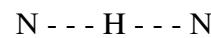
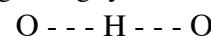
Khi kháng nguyên tiếp xúc với kháng thể dịch thể đặc hiệu tương ứng thì phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ xảy ra một cách đặc hiệu. Cụ thể Epitop sẽ kết hợp chính xác với Paratop và còn nhờ các lực liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể:

- Lực hút tĩnh điện: Giữa một nhóm chức mang điện của Paratop với một nhóm chức mang điện khác dấu của Epitop.

Ví dụ:  $\text{COO}^-$  với  $\text{NH}_3^+$

- Lực của cầu nối Hydro: Lực tạo ra giữa nguyên tử Hydro với  $\text{O}^-$ ,  $\text{N}^-$

$\text{H}^+$  với  $\text{O}^-$  hoặc  $\text{N}^-$



- Lực liên kết kỵ nước

Lực tạo ra khi hai nhóm kỵ nước nằm gần nhau:



- Lực Vander Walls: Lực liên kết giữa các phân tử với nhau

Sự kết hợp giữa kháng nguyên - kháng thể phải được thực hiện trong một điều kiện nhất định: nhiệt độ, pH thích hợp và môi trường có chất điện giải.

- Kết quả của phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể có thể trực tiếp hoặc gián tiếp quan sát được bằng mắt thường hoặc bằng kính hiển vi.

### 2. Các phản ứng huyết thanh học có thể quan sát trực tiếp

#### 2.1. *Phản ứng ngưng kết (Agglutination Test)*

Là phản ứng liên kết các tiểu thể có kích thước nhỏ tính bằng Micromet thành một cấu trúc lớn quan sát được bằng mắt thường.

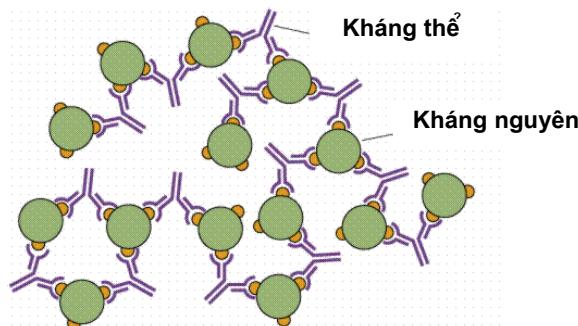
Ở đây kháng nguyên là một cấu phần nằm trên bề mặt tiểu thể.

##### 2.1.1. *Nguyên lý*

Đối với kháng nguyên hữu hình (xác vi khuẩn, tế bào hồng cầu...) khi gặp kháng thể đặc

hiệu, các vi khuẩn sẽ kết lại với nhau thành đám lớn, mắt thường có thể quan sát được.

Sự ngưng kết kháng nguyên - kháng thể dưới hình thức mạng lưới nhiều chiêu, tạo nên đám ngưng kết, biểu hiện của nó bằng những đám lấm tấm hoặc lổn nhổn như những hạt cát.



**Hình 6.1. Mô phỏng mạng lưới ngưng kết giữa kháng nguyên và kháng thể**

Với lớp kháng thể IgM, phản ứng ngưng kết dễ xảy ra hơn vì nó có 10 vị trí kết hợp với kháng nguyên, IgG chỉ có 2 vị trí.

#### 2.1.2. Các loại phản ứng ngưng kết

##### ① Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính

Đây là phản ứng có tính chất định tính. Thường sử dụng kháng nguyên đã biết được nhuộm màu để phát hiện kháng thể tương ứng trong huyết thanh. Thường dùng để chẩn đoán bệnh truyền nhiễm như: bệnh thương hàn gà (*Typhus avium*), CRD (*Chronic respiratory disease*), liên cầu khuẩn, đóng dấu lợn, sảy thai truyền nhiễm □

\* Cách làm:

Dùng một phiến kính chia hai phần: một bên thí nghiệm, một bên đối chứng.

Bên thí nghiệm nhỏ một giọt huyết thanh cần chẩn đoán, bên đối chứng nhỏ 1 giọt nước sinh lý, sau đó mỗi bên nhỏ 1 giọt kháng nguyên đã biết, rồi trộn đều, 1 - 2 phút sau đọc kết quả:

Phản ứng dương tính: kháng nguyên bị ngưng kết thành từng đám lấm tấm trên phiến kính, mắt thường nhìn thấy được.

Phản ứng âm tính: không có hiện tượng ngưng kết, kháng nguyên hòa đều trong hỗn dịch giống như bên đối chứng.



**Hình 6.2. Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính.**

\* Ứng dụng:

➤ Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính để chẩn đoán bệnh đóng dấu lợn

##### Các bước tiến hành:

- Chuẩn bị kháng nguyên: Kháng nguyên là biến thể vi khuẩn *E. rhusiopathiae* nuôi trong 24 - 48h, đây là kháng nguyên sống.

- Chuẩn bị huyết thanh nghi: Lấy máu lợn nghi mắc bệnh chắt lấy huyết thanh, pha loãng thành 4 nồng độ khác nhau với nước sinh lý: huyết thanh nguyên, 1/4, 1/8, 1/16.

Cách làm: Dùng phiến kính chuyên dụng có 5 lỗ lõm và 5 lamen để úp vào 5 lỗ đó.

Nhỏ lên 4 lamen mỗi lamen một giọt huyết thanh ở các nồng độ pha loãng như trên, lamen thứ 5 nhỏ một giọt nước sinh lý làm đối chứng âm (-).

Nhỏ lên trên các giọt huyết thanh ở mỗi lamen 1 giọt kháng nguyên sống, trộn đều. Bôi

vaselin lên bờ các lỗ lõm rồi lật úp các lamen vào các lỗ lõm. Đέ tủ ám  $37^{\circ}\text{C}/15$  phút, lấy ra đọc kết quả trên kính hiển vi với vật kính có số bội giác thấp.

#### Kết quả:

- Phản ứng dương tính: vi khuẩn bị ngưng kết thành từng đám, xung quanh trong. Lợn mắc bệnh.

- Phản ứng âm tính: vi khuẩn phân tán đều giống đối chứng. Lợn không mắc bệnh.

➤ *Phản ứng ngưng kết nhanh với máu để chẩn đoán bệnh đóng dấu lợn*

#### \* Chuẩn bị:

- Chế kháng nguyên: Nuôi cấy vào môi trường trực khuẩn đóng dấu lợn chủng tiêu chuẩn, sau 24h đem ly tâm lấy cặn, pha thành nồng độ có 15 tỷ vi khuẩn/ml với nước sinh lý có 1% fomol. Đέ tủ lạnh  $4^{\circ}\text{C}$  thời gian 1 tuần, hút bỏ 20% nước trong, bổ sung 20% glyxerin rồi nhuộm vi khuẩn bằng tím gentian bão hoà (98ml n óc và 2g tím gentian), cứ 10ml huyền dịch vi khuẩn có glycerin thì cho thêm 0,2ml dung dịch tím gentian.

- Lấy máu lợn nghi bệnh: Lấy máu ở tĩnh mạch tai, khi cần vận chuyển đi xa cho thêm xitrat natri 5% để chống đông.

#### \* Tiến hành phản ứng:

Dùng một phiến kính chia hai phần: một bên thí nghiệm, một bên đối chứng.

Bên thí nghiệm nhỏ một giọt huyết thanh cần chẩn đoán, bên đối chứng nhỏ 1 giọt nước sinh lý, sau đó mỗi bên nhỏ 1 giọt kháng nguyên đã biết, rồi trộn đều, 1 - 2 phút sau đọc kết quả:

Phản ứng dương tính: kháng nguyên bị ngưng kết thành từng đám lấm tấm trên phiến kính, mắt thường nhìn thấy được.

Phản ứng âm tính: không có hiện tượng ngưng kết, kháng nguyên hòa đều trong hỗn dịch giống như bên đối chứng.

#### \* Kết quả:

- Phản ứng dương tính: vi khuẩn bị ngưng kết thành từng đám màu tím, nước xung quanh trong. Lợn mắc bệnh.

- Phản ứng âm tính: hỗn dịch có màu tím, vi khuẩn phân tán đều giống như bên đối chứng. Lợn không mắc bệnh.

➤ *Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính (phản ứng Huddleson) chẩn đoán bệnh sảy thai truyền nhiễm*

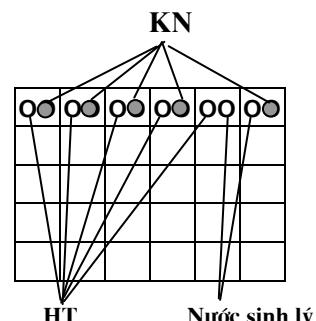
+ Chuẩn bị kháng nguyên tiêu chuẩn - kháng nguyên Huddleson: Dùng vi khuẩn brucella tiêu chuẩn cấy vào môi trường thạch có glyxerin và đường glucoza, nuôi ở  $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ . Dùng nước muối 12% để rửa mặt thạch, sau đó cho axit fenic giết vi khuẩn và cho tím gentian để nhuộm màu kháng nguyên, hỗn dịch kháng nguyên có màu tím.

+ Chuẩn bị kháng thể: Lấy máu gia súc nghi bệnh chắt lấy huyết thanh. Pha loãng huyết thanh ở nồng độ 1/50 sau đó pha ~~lòng~~ huyết thanh theo các hiệu giá khác nhau 1/100, 1/200, 1/400..., huyết thanh phải tươi, trong, không lẫn máu.

#### + Tiến hành phản ứng :

- Dùng tấm kính sạch có kích thước 30 x 25cm. Dùng bút viết kính chia chiều ngang làm 4 phần chiều dọc làm 6 phần được 24 ô. Có thể làm phản ứng với 4 mẫu huyết thanh khác nhau trên một tấm kính.

Nguyên liệu	1	2	3	4	Đ/C HT	Đ/C KN
Huyết thanh nghi ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50	
Hiệu giá huyết thanh	1/50	1/100	1/200	1/400		
Kháng nguyên ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50		50
Nước sinh lý ( $\mu\text{l}$ )					50	50



- Nhỏ kháng nguyên chuẩn lên tấm kính, sau đó nhỏ huyết thanh sát vào bên cạnh kháng nguyên, dùng đũa thuỷ tinh vô trùng trộn đều kháng nguyên với huyết thanh (trộn từ phải sang trái). Hơi qua tấm kính trên ngọn lửa đèn cồn ( $37^{\circ}\text{C}$ ), trong vòng 1 - 2 phút.

- Đọc kết quả: Dựa vào mức độ ngưng kết và sự mất màu của hỗn dịch.

Ngưng kết ++++: Hỗn dịch mất màu hoàn toàn, các cụm ngưng kết lớn màu xanh tím.

Ngưng kết ++: Hỗn dịch mất màu, nhiều cụm ngưng kết nhỏ màu xanh tím.

Ngưng kết +: Hỗn dịch nhạt màu, một số cụm ngưng kết nhỏ màu xanh tím.

Ngưng kết -: Hỗn dịch mất màu không rõ.

+ Đánh giá phản ứng: Nếu có ngưng kết ở mức ++ và độ pha loãng từ 1/100 đến 1/200 trở lên thì phản ứng được coi dương tính. Con vật mắc bệnh.

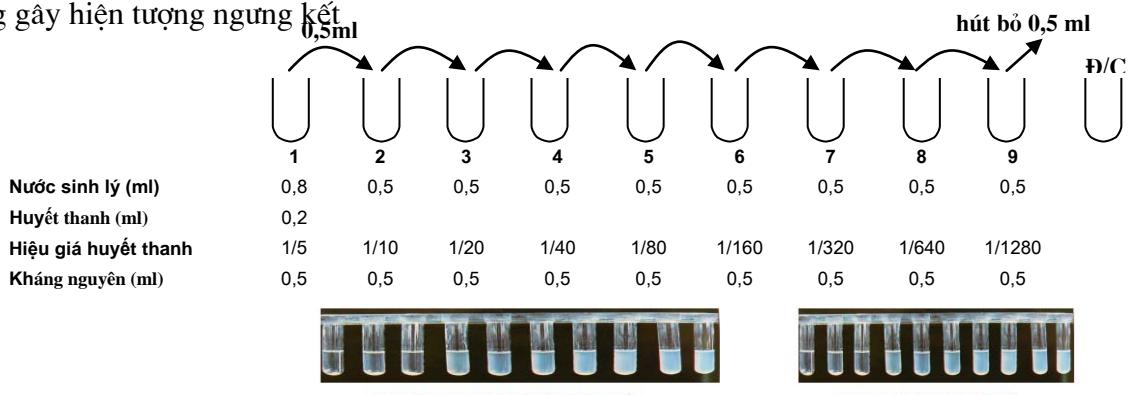
➤ *Phản ứng ngưng kết chậm trong ống nghiệm để chẩn đoán bệnh sảy thai truyền nhiễm*

Phản ứng vừa có tính chất định tính, vừa có thể định lượng kháng thể

Cách làm:

Dùng một dãy ống nghiệm, cho vào ống thứ nhất một lượng huyết thanh, rồi pha loãng huyết thanh theo cơ số 2 ( $1/2$ ;  $1/4$ ;  $1/8$ ...). Sau đó cho vào mỗi ống nghiệm một lượng kháng nguyên (lượng kháng nguyên tương đương với lượng kháng thể). Trộn đều để ở nhiệt độ thích hợp (tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$ ) sau 30 phút hoặc vài giờ, đọc kết quả và tính được hiệu giá ngưng kết.

Hiệu giá ngưng kết: Là độ pha loãng cao nhất của huyết thanh mà ở đó vẫn còn khả năng gây hiện tượng ngưng kết



**Hình 6.3: Dãy ống nghiệm thử phản ứng ngưng kết**

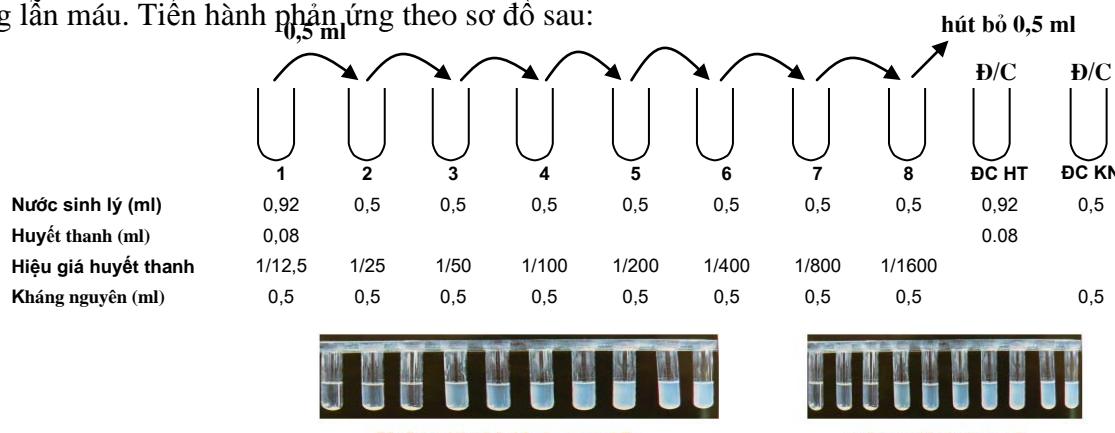
## ② Phản ứng ngưng kết chậm trong ống nghiệm:

Hay còn gọi là phản ứng Vrait (Wright). Phản ứng này có tính chất định lượng

+ Chuẩn bị:

- Kháng nguyên Vrait: Vi khuẩn *Brucella* trong nước sinh lý có fommon ở nồng độ đặc 10 tỷ vi khuẩn trong 1ml. Trước khi dùng để chẩn đoán pha loãng 1/10 với nước sinh lý, như vậy sẽ có 1 tỷ vi khuẩn trong 1ml.

- Kháng thể: Huyết thanh của gia súc nghi mắc bệnh, huyết thanh phải tươi, trong, không lẫn máu. Tiến hành phản ứng theo sơ đồ sau:



**Hình 6.4: Dãy ống nghiệm thử phản ứng ngưng kết**

Pha loãng huyết thanh từ ống 1 - 8 để có hiệu giá từ 1/12,5 - 1/1600. Sau đó cho vào mỗi ống 0,5ml hỗn dịch kháng nguyên 1/10, có bối trí ống đối chứng. Khối lượng sau cùng trong mỗi ống là 1ml.

Lắc mạnh các ống nghiệm trong 1 phút, để các ống nghiệm vào tủ âm  $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ , lấy ra để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 1 giờ và đọc kết quả, dựa vào độ ngưng kết và độ trong của mỗi ống nghiệm người ta quy định các mức độ ngưng kết sau.

- Ngưng kết ++++: Nước nỗi bên trên trong hoàn toàn, lắng cặn nhiều, hiện tượng ngưng kết giống như cái dù lộn ngược.

- Ngưng kết ++: Nước nỗi bên trên gần trong hoàn toàn, lắng cặn nhiều.

- Ngưng kết +: Nước nỗi bên trên không trong, trong nước có những hạt vẫn, lắng cặn ở đáy ống.

- Ngưng kết -: Nước nỗi không trong, trong nước có nhiều hạt lơ lửng, không có lắng cặn ở đáy.

- Không có hiện tượng ngưng kết: Hỗn dịch vẫn đục đều.

Nếu có độ ngưng kết (+) ở độ pha loãng huyết thanh từ 1/200 - 1/400 thì phản ứng được coi là dương tính, con vật mắc bệnh.

➤ *Úng dụng phản ứng ngưng kết chẩn đoán bệnh do Leptospira gây ra*

▪ *Phản ứng vi ngưng kết tan với kháng nguyên sống trên phiến kính*

+ Nguyên lý của phản ứng:

Khi trộn huyết thanh của gia súc nghi mắc Leptospirosis với hỗn dịch canh khuẩn *Leptospira* (gồm nhiều chủng khác nhau), nếu trong huyết thanh có ít kháng thể thì *Leptospira* sẽ ngưng kết chụm lại như hình sao hay hình mảng nhện, hay cụm nhỏ. Nếu trong huyết thanh có nhiều kháng thể thì *Leptospira* mới đầu bị ngưng kết, sau đó tan ra thành từng mảnh nhỏ, nên phản ứng này gọi là phản ứng ngưng kết tan với kháng nguyên sống trên phiến kính.

Phản ứng này dùng kháng nguyên là 12 chủng *Leptospira* sống, thực hiện phản ứng trên phiến kính rồi đọc kết quả phản ứng dưới kính hiển vi có tụ quang nền đen.

+ Chuẩn bị

- Kháng thể nghi: Lấy máu của gia súc nghi mắc bệnh khoảng 2ml để đông, chắt lấy huyết thanh, pha loãng huyết thanh với nước sinh lý thành nồng độ 1/200 (nên lấy máu từ ngày thứ 5 sau khi con vật ốm trở đi).

- Kháng nguyên: Là canh khuẩn non của 12 chủng *Leptospira*, các xoắn khuẩn này phải khoẻ, hình thái rõ, có từ 150 - 300 xoắn khuẩn trên một vi trường.

Thường dùng 12 chủng *Leptospira* được xếp theo thứ tự A, B, C như sau: *L. australis*, *L. autumnalis*, *L. botaviae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis*, *L. icterohemorrhagiae*, *L. mitis*, *L. poi*, *L. pomona*, *L. saxkoebing*, *L. sejroe*.

Mỗi chủng *Leptospira* này được nuôi cấy riêng trong môi trường Terskich hay EMJH, kháng nguyên được giữ ở nhiệt độ  $20^{\circ}\text{C}$ , sau 7 - 15 ngày phải cấy chuyển sang môi trường Terskich mới hoặc EMJH mới và sau 3 tháng phải tiếp đới qua chuột lang một lần.

+ Tiến hành phản ứng:

- Mỗi mẫu huyết thanh dùng 3 phiến kính, mỗi phiến kính chia làm 4 ô, tất cả được 12 ô cho 12 chủng. Có thể tiến hành chẩn đoán nhiều mẫu huyết thanh cùng một lúc, mỗi mẫu huyết thanh 3 phiến kính, ghi thứ tự phiến kính 1, 2, 3 ở góc dưới phiến kính về phía bên phải, còn góc trên về phía bên trái thì ghi số mẫu huyết thanh cần chẩn đoán.

- Nhỏ lên mỗi ô một giọt huyết thanh đã được pha loãng, rồi lần lượt cho vào mỗi ô một giọt canh khuẩn của chủng *Leptospira*. Dùng đĩa thuỷ tinh vô trùng trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 15 - 20 phút, đọc kết quả trên kính hiển vi có tụ quang nền đen.

- Đánh giá kết quả người ta dùng kí hiệu L (Lyse) chỉ hiện tượng tan xoắn khuẩn. L+ vừa có ngưng kết vừa có tan xoắn khuẩn.

- L++++: Ngưng kết xảy ra mạnh, có 30 cụm ngưng kết hình con nhện không có xoắn khuẩn tự do.

- L+++: Ngưng kết vừa, có 20 - 30 cụm ngưng kết hình con nhện, có ít xoắn khuẩn tự do

- L++: Ngưng kết yếu, có từ 6 - 12 cụm ngưng kết, có nhiều xoắn khuẩn tự do.

- L+: Ngưng kết rất yếu, có từ 3 - 5 cụm ngưng kết, có nhiều xoắn khuẩn tự do.

- L - : Không có ngưng kết, từng con bơi ròng rạc.

Khi làm phản ứng, nếu có ô nào có ngưng kết ở mức L+++ trở lên thì được coi ở đó có chủng *Leptospira* gây ra bệnh.

- Do đặc điểm của *Leptospra* có kháng nguyên chung dễ gây hiện tượng ngưng kết chéo giữ các chủng, mặt khác *Leptospira* gây bệnh bao giờ cũng cho hiệu giá kháng thể cao hơn các chủng *Leptospira* khác. Vì vậy muốn xác định chủng gây bệnh phải pha loãng huyết thanh cao hơn nữa: 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 rồi làm lại phản ứng ngưng kết với chủng *Leptospira* ở trên.

- Đối với bò, lợn, chó có hiệu giá kháng thể từ 1/400 thì chủng *Leptospira* đó được coi là chủng gây bệnh, hiệu giá kháng thể 1/200 là nghi ngờ

- Đối với ngựa có hiệu giá kháng thể từ 1/800 thì chủng *Leptospira* đó được coi là chủng gây bệnh, hiệu giá kháng thể 1/400 là nghi ngờ

- Nếu nghi ngờ, sau 7 - 10 ngày lấy máu lần 2 để làm phản ứng.

\* Ưu điểm của phản ứng: Phản ứng nhanh, độ chính xác cao.

Nhược điểm: - Nguy hiểm cho người làm thí nghiệm do phải sử dụng vi khuẩn sống

- Phải nuôi cấy và tiếp đới vi khuẩn. Khó thực hiện ở địa phương.

▪ *Phản ứng ngưng kết với kháng nguyên chết trên phiến kính*

- Ưu điểm: An toàn cho người làm, kháng nguyên bảo quản được lâu và vận chuyển đi xa được, nên có thể áp dụng được ở các địa phương.

- Nhược điểm: Độ chính xác không cao.

+ Chuẩn bị:

- Kháng thể nghi: Lấy máu của gia súc nghi mắc bệnh, để đông chát lấy huyết thanh, pha loãng huyết thanh với nước sinh lý thành nồng độ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...

- Kháng nguyên chuẩn: Là 12 chủng *Leptospira*, các chủng này được nuôi riêng trong môi trường Terskikh hoặc EMJH ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 7 - 10 ngày.

- Kiểm tra vi khuẩn nếu đạt tiêu chuẩn: thuần khiết, mọc dày, di động mạnh, không tự ngưng kết thì giết chết bằng formol 2% hoặc đun 56°C/1h. Sau đó để tủ âm 30°C/24h rồi đem kiểm tra.

- Đem hỗn dịch chứa *Leptospira* chết hoàn toàn ly tâm hai lần: Lần 1 ly tâm 2000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ phần cặn hay gây ngưng kết giả, sau đó lấy nước trong ly tâm lần 2 với tốc độ 6000 - 8000 vòng/phút trong 1h. Sau đó gạn bỏ 9/10 nước trong ở bên trên, phần xác ở đáy ống đóng riêng từng chủng.

+ Tiến hành phản ứng:

- Mỗi một chủng kháng nguyên được làm trên một phiến kính với huyết thanh nghi đã pha loãng ở các nồng độ

- Nhỏ huyết thanh nghi đã pha loãng trên phiến kính, sau đó nhỏ kháng nguyên lên. Dùng đũa thuỷ tinh trộn đều. Để yên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sau 10 phút đọc kết quả:

- Phản ứng dương tính: *Leptospira* bị ngưng kết tập trung thành cặn, lấm tấm trên phiến kính, nước xung quanh trong.

- Phản ứng âm tính: Không có hiện tượng ngưng kết, dung dịch đục đều.

Khi dùng kháng nguyên chết để chẩn đoán *Leptospira* nếu hiệu giá kháng thể đạt từ 1/8 trở lên thì chủng *Leptospira* đó được coi là chủng gây bệnh, hiệu giá kháng thể 1/4 là nghi ngờ.

#### ❖ Phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động

Trong phản ứng ngưng kết khi dùng kháng nguyên hoà tan để phát hiện một kháng thể tương ứng. Phải cần đến tế bào mang làm giá đỡ, mang các phân tử kháng nguyên hoà tan.

Thường dùng hồng cầu làm tế bào mang.

\* Nguyên lý:

Kháng nguyên hoà tan trở thành kháng nguyên hữu hình bằng cách gắn kháng nguyên hoà tan vào hồng cầu, như vậy hồng cầu làm giá đỡ cho kháng nguyên. Phản ứng ngưng kết dễ dàng xảy ra.

Có nhiều phương pháp gắn kháng nguyên hoà tan lên bề mặt hồng cầu: Dùng một số hóa chất như axit tanic, benzidin, muối crôm, glutaldehyt để xử lý hồng cầu. Các chất này có một nhóm chức gắn với hồng cầu, một nhóm gắn với kháng nguyên.

Khi kháng nguyên gặp kháng thể tương ứng, phản ứng ngưng kết xảy ra, ta quan sát rõ.

Ngoài sử dụng hồng cầu làm giá đỡ, còn sử dụng các hạt chất dẻo như: hạt latex, bentonít. Các hạt này có tác dụng hấp phụ kháng nguyên hoà tan vào trong đó.

#### ➤ *Ứng dụng phản ứng ngưng kết gián tiếp hồng cầu chẩn đoán bệnh dịch tả lợn*

Phản ứng này được Serge dùng lần đầu tiên để chẩn đoán virus dịch tả lợn vào năm 1962

Bình thường virus dịch tả lợn không hấp phụ lên hồng cầu được. Do đó phải xử lý hồng cầu bằng axit tanic 1%, chất này có một chức gắn với hồng cầu, còn một chức gắn với virus dịch tả lợn để virus hấp phụ được hồng cầu: khi gặp kháng thể tương ứng thì virus kết hợp với kháng thể làm hồng cầu dính lại qua cầu nối là kháng thể gây hiện tượng ngưng kết hồng cầu.

- Chuẩn bị:

+ Kháng nguyên nghi: Bệnh phẩm là lách của lợn nghi mắc bệnh nghiên với nước sinh lý, ly tâm lấy nước trong, rồi cho hấp phụ lên hồng cầu cùn, thỏ hoặc chuột lang 2,5% đã xử lý bằng axit tanic 1%.

+ Kháng thể dương: Là huyết thanh dịch tả lợn chế từ lợn được gây tối miễn dịch.

+ Huyết thanh âm: là huyết thanh của lợn khoẻ mạnh.

- Phương pháp tiến hành:

Phản ứng có thể tiến hành trên tấm nhựa vi ngưng kết (Microplates) 96 lỗ đáy chữ U hay trên dây ống nghiệm.

Huyết thanh được pha loãng từ nồng độ 1/10 đến 1/1280, rồi cho kết hợp kháng nguyên nghi.

Phản ứng dương tính: Có hiện tượng ngưng kết hồng cầu, hồng cầu rải đều trên thành đáy ống.

Phản ứng âm tính: Hồng cầu lắng xuống đáy thành cục tròn.

#### ❖ *Ứng dụng phản ứng ngăn trờ ngưng kết hồng cầu HI (Haemagglutination inhibition test) để phân biệt bệnh Newcastle và cúm gia cầm*

Đặc tính virus Newcastle và cúm gia cầm đều có khả năng ngưng kết hồng cầu một số loài động vật: gà, bò, ngựa,... Có thể dùng phản ứng HI để giám định virus. Để tiến hành phản ứng HI, trước hết phải làm phản ứng HA (Haemagglutination test) để xác định đơn vị HA dùng trong phản ứng HI.

##### ① Phản ứng HA:

\* Chuẩn bị:

- Hồng cầu gà 1%: Lấy 10ml máu tim gà + 5ml xitrat natri 5% để chống đông

Ly tâm 2.000 vòng/phút, hút bỏ nước phía trên đi, thu lấy hồng cầu đặc. Cho nước sinh lý vào rửa hồng cầu, ly tâm, hút bỏ phần nước trong (làm như vậy 3 lần).

Lấy hồng cầu đặc pha với nước sinh lý thành hỗn dịch hồng cầu 1%.

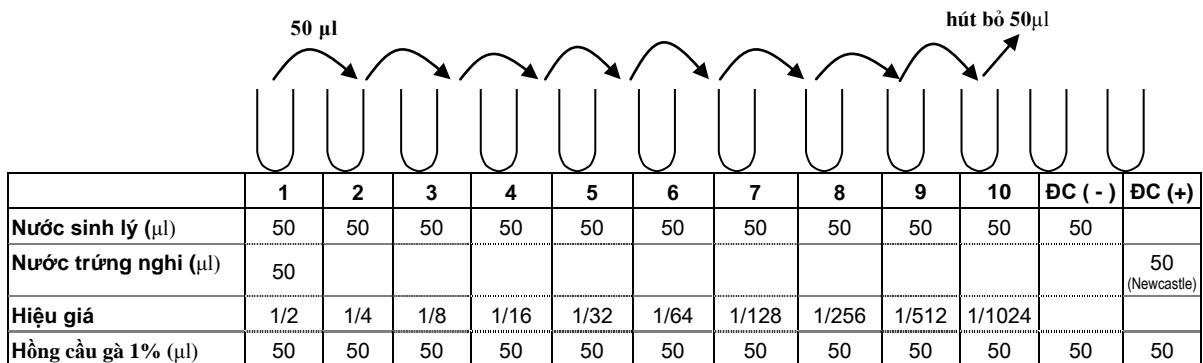
- Chuẩn bị nước trung cấy virus:

Lấy óc gà nghi mắc bệnh nghiêm thành huyễn dịch với nước sinh lý theo tỷ lệ 1/10. Khử tạp khuẩn bằng kháng sinh rồi cấy vào phôi thai gà 10 ngày tuổi, tiêm 0,2ml vào xoang niệu mô, áp tiếp ở  $37^{\circ}\text{C}$  sau 2 - 4 ngày, những phôi gà chết, lấy ra để tủ lạnh 0 -  $4^{\circ}\text{C}/6\text{h}$ . Sau đó mổ trứng thu nước trứng, thử vô trùng bằng cách cấy trên các môi trường. Nước trứng này được giữ ở tủ lạnh âm.

- Tiến hành phản ứng:

Phản ứng có thể tiến hành trên ống nghiệm, trên tấm nhựa vi ngưng kết (Microplates) có 96 lỗ đáy chữ U hoặc chữ V.

Cho các thành phần vào dãy phản ứng theo sơ đồ (hình 7.5):



**Hình 6.5: Sơ đồ phản ứng HA**

- Pha loãng nước trứng nghi theo bậc 2 để có hiệu giá 1/2, 1/4... 1/1024.
- Nhỏ 50  $\mu\text{l}$  hồng cầu 1% vào tất cả các giếng.
- Lắc đều, để tắm nhựa ở nhiệt độ phòng, sau 20 phút đọc kết quả.
- Phản ứng dương tính: hồng cầu ngưng kết nằm rải đều ở đáy giếng giống như hình cái dù lộn ngược.

Hiệu giá phản ứng HA là độ pha loãng virus lớn nhất mà ở đó vẫn còn một lượng virus làm ngưng kết hồng cầu, ta gọi là 1 đơn vị HA.

- Phản ứng âm tính: hồng cầu lắng xuống đáy thành cục tròn đỏ, giống đối chứng âm.

## ② Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà HI (Haemagglutination inhibition test).

+ Nguyên lý: trên capxit của virus Newcastle và virus cúm gia cầm trong cấu trúc có chứa kháng nguyên HA gây ngưng kết hồng cầu, nếu gặp kháng thể đặc hiệu tương ứng kết hợp với kháng nguyên thì virus mất khả năng này, hay nói cách khác kháng thể đã ngăn阻止 virus gây ngưng kết hồng cầu.

+ Chuẩn bị:

- Hồng cầu gà 1%: chế nhu trong phản ứng HA
- Huyết thanh chuẩn: kháng huyết thanh Newcastle và kháng huyết thanh cúm gia cầm.
- Kháng nguyên nghi: nước trứng có chứa virus gây ngưng kết hồng cầu được pha ở hiệu giá 4HA với virus Newcastle, hiệu giá 8HA với virus cúm.

+ Tiến hành phản ứng:

Phản ứng có thể tiến hành trên ống nghiệm, trên tấm nhựa vi ngưng kết (Microplates) có 96 lỗ đáy chữ U hoặc chữ V.

Mỗi mẫu chẩn đoán dùng 2 dãy giếng, cho các thành phần vào dãy phản ứng theo sơ đồ 1 và 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	ĐC (+)	ĐC (-)
Nước sinh lý ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	50	
KHT Newcastle ( $\mu\text{l}$ )	25									
Hiệu giá huyết thanh	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256		
Nước trứng nghi có 4HA ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25		50 (Newcastle)
Lắc đều, để yên 30 phút										
Hồng cầu gà 1%	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lắc đều, để yên 30 phút										

**Hình 6.6a: Sơ đồ 1 - Phản ứng HI với kháng huyết thanh Newcastle**

	1	2	3	4	5	6	7	8	ĐC (+)	ĐC (-)
Nước sinh lý ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	50	
KHT cúm gia cầm ( $\mu\text{l}$ )	25									
Hiệu giá huyết thanh	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256		
Nước trứng nghi có 8HA ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25		50 (Virus cúm)
Lắc đều, để yên 30 phút										
Hồng cầu gà 1%	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lắc đều, để yên 30 phút										

**Sơ đồ 6.6b: Phản ứng HI với kháng huyết thanh cúm gia cầm**

- Pha loãng kháng huyết thanh Newcastle, cúm gia cầm theo bậc 2: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.
- Cho 25 $\mu\text{l}$  dung dịch kháng nguyên nghi có hiệu giá 4HA (ở sơ đồ 1), 8HA (ở sơ đồ 2) vào các giếng.
- Lắc đều tấm nhựa, để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 phút.
- Cho 25 $\mu\text{l}$  hồng cầu gà 1% vào các lỗ giếng.
- Đέ 30 phút trong phòng thí nghiệm rồi đọc kết quả.

+ Đọc kết quả:

Nếu bên dãy có kháng huyết thanh Newcastle không gây ngưng kết hồng cầu, còn bên dãy có kháng huyết thanh cúm gây ngưng kết hồng cầu thì kết luận trong nước trứng nghi có mặt virus Newcastle.

Vì kháng huyết thanh Newcastle đã trung hòa hết virus Newcastle ở trong nước trứng, do đó không còn virus để gây ngưng kết hồng cầu. Còn bên dãy có kháng huyết thanh cúm không trung hòa được virus Newcastle, do đó virus Newcastle vẫn còn sẽ gây ngưng kết hồng cầu.

Cũng lý luận như trên để giải thích trường hợp nếu bên dãy có kháng huyết thanh cúm không gây ngưng kết hồng cầu, còn bên dãy kháng huyết thanh Newcastle làm ngưng kết hồng cầu thì kết luận trong nước trứng nghi có mặt virus cúm gia cầm.

Nếu cả hai dãy đều làm ngưng kết hồng cầu thì kết luận trong nước trứng có chứa cả hai loại virus.

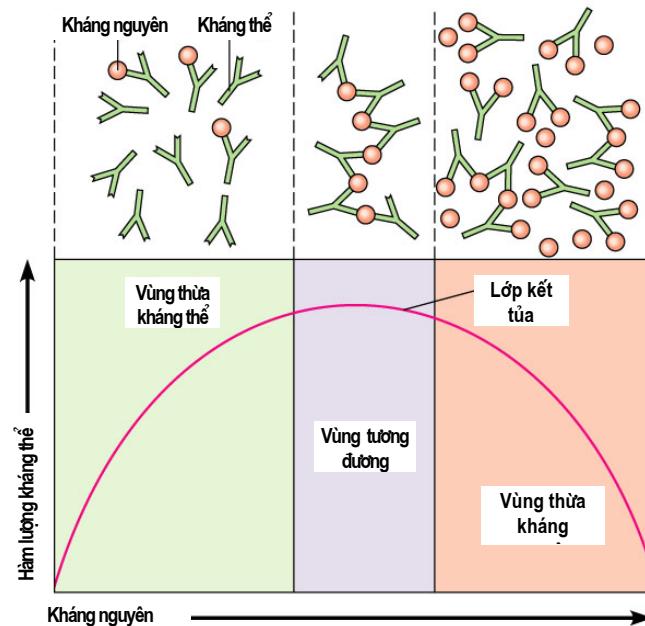
## 2.2. Phản ứng kết tủa (Precipitation test)

### ①. Nguyên lý

Kháng nguyên hoà tan khi gặp kháng thể tương ứng trong một tương quan thoả đáng (lượng kháng nguyên và kháng thể thích hợp) thì hiện tượng kết tủa sẽ xảy ra.

Sự kết hợp của kháng nguyên với kháng thể tạo thành một tập hợp: kháng nguyên - kháng thể - kháng nguyên - kháng thể, hình thành cấu trúc mạng lưới 3 chiều trong không gian, quan sát được bằng mắt thường biểu hiện của nó là chất tủa màu đục.

Trong phản ứng kết tủa nếu quá thừa kháng thể hoặc quá thừa kháng nguyên thì sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể vẫn xảy ra nhưng hiện tượng tủa không xuất hiện.



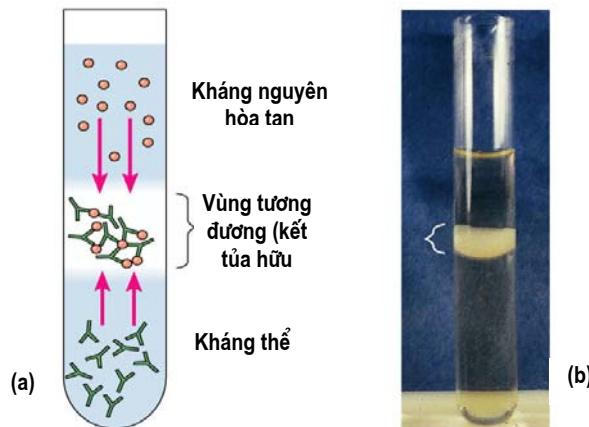
**Hình 6.7. Mô phỏng tỷ lệ phù hợp để gây tủa trong phản ứng kết tủa**

## ②. Phản ứng kết tủa trong môi trường lỏng

- Phản ứng kết tủa tạo vòng

Là phản ứng có tính chất định tính. Dùng 1 ống nghiệm nhỏ, cho vào đó một lượng kháng nguyên hòa tan. Dùng pipet đã hút kháng huyết thanh tương ứng, cho đầu pipet sát đáy ống nghiệm rồi thả từ từ kháng huyết thanh ra với một lượng tương đương với kháng nguyên. Kháng huyết thanh sẽ đội kháng nguyên lên. Sau thời gian 15 - 20 phút tại vùng tiếp xúc sẽ xuất hiện một đĩa tủa mỏng.

Phản ứng này được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh nhiệt thán. Còn gọi là phản ứng kết tủa Ascoli.



**Hình 6.8. Phản ứng kết tủa tạo vòng**

➤ *Ứng dụng phản ứng kết tủa Ascoli để chẩn đoán bệnh nhiệt thán.*

\* Nguyên lý của phản ứng:

Ở vi khuẩn nhiệt thán đặc biệt là trong giáp mô có kháng nguyên gọi là kết tủa tố nguyên có khả năng kích thích cơ thể động vật sản sinh ra kháng thể đặc hiệu gọi là kết tủa tố. Khi kết tủa tố nguyên gặp kết tủa tố sẽ tạo ra phức hợp kháng nguyên kháng thể là một chất cặn không tan.

\* Các bước chuẩn bị:

- Chuẩn bị kháng nguyên nghi:
    - Nếu bệnh phẩm là lách, đem nghiên nhỏ, cho vào 10 phần nước sinh lý, đun sôi cách thuỷ 15 - 20 phút, để nguội, lọc kỹ, ly tâm lấy nước trong.
    - Nếu bệnh phẩm là da, lông, xương, đem hấp ướt  $120^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút để khử trùng cắt nhỏ, cho vào 10 phần nước sinh lý, để tủ lạnh  $5^{\circ}\text{C}$  trong 24h, lọc kỹ, ly tâm, lấy nước trong.
    - Dịch lọc này được gọi là kháng nguyên nghi.
  - Chuẩn bị kháng nguyên âm:
    - Lấy gan, lách của gia súc khỏe để chế kháng nguyên âm, cách làm giống như chế kháng nguyên nghi, kháng nguyên này dùng để làm đối chứng.
  - Chuẩn bị kháng thể:
    - Kháng thể là kháng huyết thanh nhiệt thán đã chế bằng cách gây tối miễn dịch cho ngựa.
- \* Cách làm phản ứng:

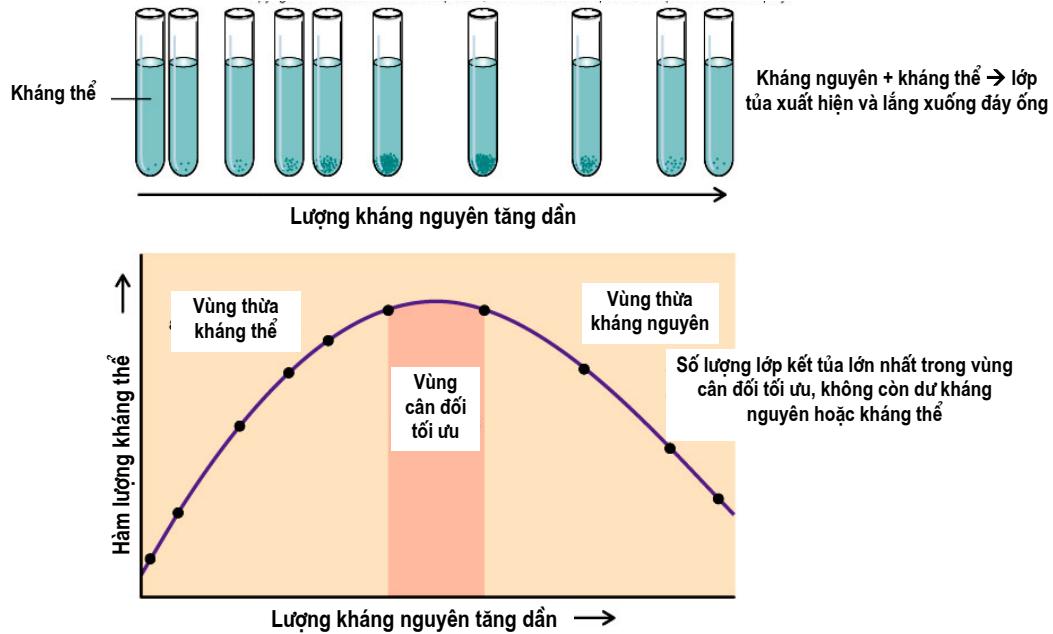
Dùng 2 ống nghiệm nhỏ, một ống làm thí nghiệm, một ống làm đối chứng. Cho 0,5ml kháng nguyên nghi vào ống thứ nhất, 0,5ml kháng nguyên âm vào ống thứ hai. Dùng ống hút có đầu nhỏ và dài hút huyết thanh kháng nhiệt thán rồi cho vào mỗi ống 0,5ml, chú ý phải cho đầu ống hút sát xuống đáy ống nghiệm rồi từ từ thả huyết thanh kháng nhiệt thán xuống, huyết thanh sẽ đội kháng nguyên lên. Để yên 10 - 15 phút trong phòng thí nghiệm rồi đọc kết quả:

- Phản ứng dương tính: Nơi tiếp xúc giữa hai lớp kháng nguyên và kháng thể xuất hiện một đĩa tủa màu trắng, chứng tỏ trong bệnh phẩm có mặt kháng nguyên nhiệt thán.
- Phản ứng âm tính: Không xuất hiện đĩa tủa.

#### + Phương pháp Heidelberger Kendall

Phương pháp này vừa có tính chất định tính, vừa có tính chất định lượng.

Phương pháp này còn được dùng để tìm tỷ lệ thích hợp kháng nguyên, kháng thể cho phản ứng.

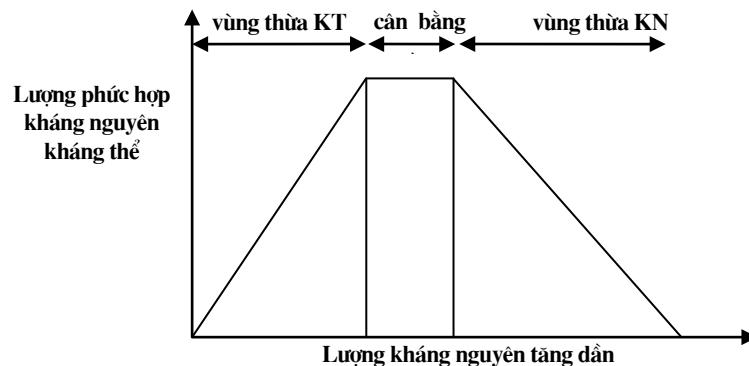


**Hình 6.9. Phản ứng kết tủa theo phương pháp H.Kendall**

Dùng một dãy ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1 lượng kháng huyết thanh như nhau. Sau đó cho kháng nguyên vào với lượng từ ít đến nhiều.

Kết quả những ống đầu và ống cuối không có tua vì thừa kháng thể hoặc thừa kháng nguyên. Những ống ở giữa thì tua xuất hiện, tăng dần đến cực đại, rồi giảm dần.

Lập bảng biểu diễn sẽ thấy 3 vùng: vùng thừa kháng thể, vùng cân bằng kháng nguyên, kháng thể và vùng thừa kháng nguyên.



**Hình 6.10. Đường biểu diễn tua**

- *Phản ứng kết tua trong môi trường đặc (gel)*

Dùng thạch Agar để tạo môi trường đặc: phần đặc chỉ chiếm 1 - 2% khối lượng, 98 - 99% là chất lỏng. Thạch có cấu trúc dạng sợi nên tạo được một cấu trúc lưới trong không gian chứa được rất nhiều chất lỏng.

Nguyên tắc: Trong môi trường gel, kháng nguyên và kháng thể cách nhau một khoảng, chúng sẽ khuếch tán về phía nhau, rồi gặp nhau. Nếu kháng nguyên, kháng thể tương ứng sẽ kết hợp tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Tại vùng có lượng kháng nguyên, kháng thể thích hợp đường tua sẽ xuất hiện. Có thể quan sát được.

\* *Phản ứng kết tua trong thạch trong ống nghiệm (kỹ thuật Oudin)*

Có thể chia làm 2 loại:

1. *Phản ứng kết tua khuyếch tán trong thạch đơn*

Dùng một ống nghiệm có đường kính nhỏ, cho vào đó một lượng kháng thể đã trộn lẫn với thạch. Trên mặt thạch cho một lượng dung dịch kháng nguyên. Kháng nguyên từ môi trường lỏng sẽ khuyếch tán vào thạch, càng xuống sâu lượng kháng nguyên càng loãng. Ở nơi tỷ lệ kháng nguyên và kháng thể tương ứng sẽ xuất hiện đường tua dễ quan sát không bị tan khi lắc, thuận lợi khi di chuyển hoặc chụp ảnh.

Độ nhạy của phản ứng tăng gấp 2 - 3 lần so với khi thực hiện phản ứng trong môi trường lỏng.

2. *Phản ứng kết tua khuyếch tán trong thạch kép*

Dùng một ống nghiệm có đường kính nhỏ, cho kháng thể vào trước, rồi cho vào bên trên kháng thể một lượng thạch. Sau đó cho lên trên mặt thạch một lượng dung dịch kháng nguyên.

Kháng nguyên bên trên từ môi trường lỏng sẽ khuyếch tán đi vào trong thạch, kháng thể bên dưới khuyếch tán lên trên cũng đi vào trong thạch. Ở nơi tỷ lệ kháng nguyên, kháng thể tương ứng sẽ xuất hiện đường kết tua.

Trong cùng một ống nghiệm nếu dùng nhiều cặp kháng nguyên, kháng thể khác nhau để chẩn đoán sẽ xuất hiện nhiều đường kết tua riêng rẽ ở độ nông sâu khác nhau.

+ Phản ứng kết tua trong thạch trên phiến kính hoặc đĩa petri (kỹ thuật Ouchterlony)

Thực chất là phản ứng kết tua khuyếch tán trong thạch kép, dễ làm, hay sử dụng. (Phản ứng AGP: Agar gel precipitation).

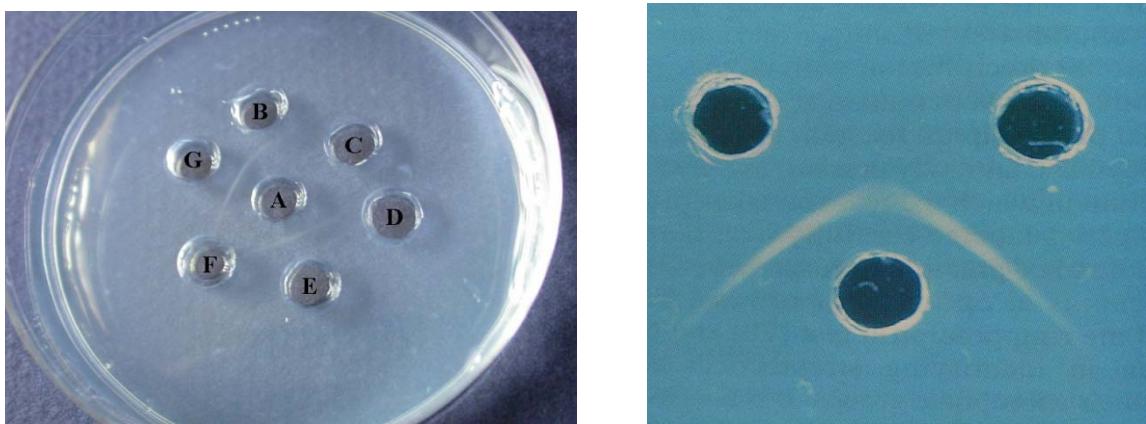
Trên phiến kính hoặc trên hộp petri, đổ một lớp thạch mỏng 1 - 2mm. Khi thạch đông lại, đục các lỗ tròn: đường kính của lỗ 4 - 5mm, khoảng cách từ lỗ trung tâm với lỗ xung quanh từ 5 - 6mm.

Lỗ A: Kháng nguyên đã biết

Lỗ B: Kháng thể tương ứng

Lỗ C, D, E, F, G: Kháng thể chưa biết

Kháng nguyên và kháng thể cách nhau một khoảng trong thạch, chúng sẽ khuyếch tán ra mọi phía, càng xa lỗ, nồng độ càng loãng. Ở nơi kháng nguyên, kháng thể tương ứng sẽ xuất hiện đường tủ.



Hình 6.11. Phản ứng AGP dương tính

Có thể dùng một hỗn hợp kháng thể để phát hiện nhiều kháng nguyên trong dung dịch. Lúc đó sẽ xuất hiện nhiều đường tủ, mỗi đường tủ là một cặp đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể.

Có thể thấy nhiều loại kết quả:

- Phản ứng giống hệt nhau: Khi 2 kháng nguyên y hệt nhau, thì hai đường kết tủ sẽ nối liền nhau.
- Phản ứng không giống hệt: Khi 2 kháng nguyên khác nhau, sẽ kết hợp riêng rẽ với 2 kháng thể, hai đường tủ sẽ không gặp nhau.
- Phản ứng giống một phần: Khi 2 kháng nguyên có chung 1 Epitop và 1 Epitop riêng khác sẽ cho 1 đường kết tủ chung liền với nhau và 1 đường tủ phụ xuất hiện như một cái cưa gắn với đường tủ trước đối với kháng nguyên thứ hai.

Phản ứng này được ứng dụng trong chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm: dịch tả lợn, Gumboro, dịch tả trâu bò, Marek.

➤ *Ứng dụng phản ứng kết tủ khuyếch tán trên thạch chẩn đoán bệnh dịch tả lợn*

Phản ứng này được Mansi dùng lần đầu tiên vào năm 1957 để chẩn đoán bệnh dịch tả lợn.

\* Chuẩn bị

- Kháng nguyên nghi: Bệnh phẩm của lợn nghi mắc bệnh nghiên với nước sinh lý có pha thêm 1 - 2% axit phenic, lọc qua gạc và ly tâm lấy nước trong.

- Kháng nguyên dương: Được chế tạo như trên, từ phủ tạng lách, hạch của lợn được tiêm virus dịch tả lợn cường độc.

- Kháng nguyên âm: Được chế như trên từ hạch lách của lợn khoẻ.

- Kháng thể: Là huyết thanh dịch tả lợn được chế từ lợn hoặc thỏ bằng phương pháp gây tối miễn dịch.

\* Phương pháp tiến hành: Phản ứng có thể tiến hành trong đĩa Petri hoặc trên phiến kính, nhưng thường làm trên phiến kính vì đỡ cồng kềnh, đỡ tốn thạch.

- Đun chảy thạch 1,5% trong nước muối sinh lý.

- Đổ thạch lên phiến kính, lượng thạch cần dùng là  $0,12\text{ml/cm}^2$ , để đông thạch

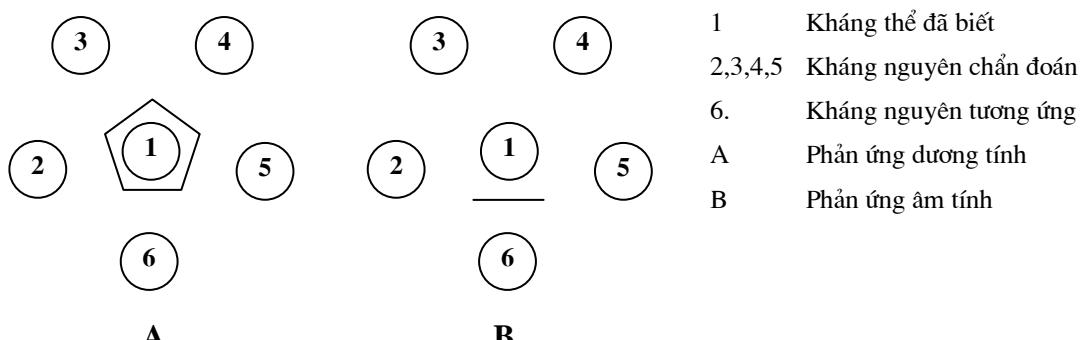
- Đục lỗ theo sơ đồ A, đường kính của lỗ 4 - 5 mm. Khoảng cách từ lỗ trung tâm tới các lỗ từ 5 - 6 mm.

- Thể tích mỗi thành phần phản ứng **20 µl**, cho vào theo sơ đồ A.

Sau khi đã cho các thành phần của phản ứng vào các lỗ, đặt phiến kính vào hộp ấm, cho vào tủ âm  $37^{\circ}\text{C}/12 - 24\text{h}$ . Đọc kết quả:

Phản ứng dương tính: Giữa kháng thể dịch tả lợn với kháng nguyên nghi xuất hiện đường kết tua tráng

Phản ứng âm tính: Giữa kháng thể dịch tả lợn với kháng nguyên không có đường kết tua tráng.



**Hình 6.12: Sơ đồ phản ứng khuyếch tán trên thạch chẩn đoán bệnh dịch tả lợn**

- **Phản ứng kết tua khuyếch tán điện**

Là sự kết hợp phản ứng kết tua với sự di chuyển trong điện trường.

Đây là một cải tiến rất có ý nghĩa.

+ Dùng điện trường để đẩy nhanh tốc độ phản ứng kháng nguyên - kháng thể.

Kháng thể là  $\gamma$  globulin trong điện trường di chuyển về cực âm. Nếu kháng nguyên là chất bị hút về cực dương, chúng di chuyển gần nhau nhanh hơn (1 - 2 giờ thay vì 24 - 48 giờ).

Phản ứng xảy ra cũng nhạy hơn (nhờ điện trường 90% kháng nguyên, kháng thể đi ngược chiều nhau để gặp nhau, thay vì khuyếch tán từ phía chỉ có 25% gặp nhau).

+ Miễn dịch điện di

Dùng điện trường để di chuyển hỗn hợp kháng nguyên thành một dải kháng nguyên. Sau đó cho kháng thể vào một rãnh song song với hàng kháng nguyên, chúng sẽ khuyếch tán, gặp nhau, các đường tua sẽ nằm cách xa nhau, thay vì nằm tập trung vào một vùng chật hẹp như trong phản ứng khuyếch tán kép (Ouchterlony). Vì vậy dễ quan sát và nhận định.

Miễn dịch điện di cho phép phát hiện kháng nguyên có 30 loại protein thay vì 5 - 6 loại protein trong phản ứng điện di thường và 8 - 10 loại protein trong kỹ thuật Ouchterlony.

### 2.3. Phản ứng kết hợp bổ thể (phản ứng cố định bổ thể, phản ứng tiêu thụ bổ thể)

Là phản ứng huyết thanh học, có 3 thành phần tham gia: kháng nguyên, kháng thể và bổ thể.

Kháng thể trong phản ứng này thuộc lớp IgM, IgG có khả năng hoạt hóa bổ thể. Khi kháng nguyên kết hợp với kháng thể tạo thành phức hợp kháng nguyên - kháng thể, nếu có mặt bổ thể thì bổ thể sẽ được hoạt hóa và gắn vào phức hợp để tạo thành: kháng nguyên - kháng thể - bổ thể.

Phản ứng được dùng để phát hiện kháng thể có khả năng hoạt hóa bổ thể và định lượng bổ thể có trong huyết thanh.

Phản ứng được thực hiện nhờ hai hệ thống: dung khuẩn, dung huyết và sự tham gia của bổ thể.

- **Hiện tượng dung khuẩn (Bacteriolysin)**

+ Thí nghiệm của Faifor (Pfaifer)

Năm 1894 ông dùng vaccine phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*) tiêm cho chuột lang để gây miễn dịch. Đồng thời dùng chuột lang khác làm đối chứng không tiêm vaccine.

Sau 2 - 3 tuần ông dùng phẩy khuẩn tả cường độc tiêm vào phúc mạc cho cả 2 loại chuột lang này với liều gây chết. Sau đó tại thời điểm 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ ông rút nước phúc mạc kiểm tra vi khuẩn dưới kính hiển vi và nuôi cấy vào môi trường lỏng để quan sát

tính chất mọc của vi khuẩn thì thấy:

❖ Ở chuột lang được gây miễn dịch, nước phết mạc sau 15 phút vi khuẩn mọc nhiều, sau thời gian này vi khuẩn giảm dần, đến sau 2 giờ không còn vi khuẩn.

Kiểm tra trên kính hiển vi: nước phết mạc lấy sau 15 phút, vi khuẩn không còn di động, vi khuẩn biến hình, phình dài ra. Nước lấy về sau vi khuẩn đã tan. Chuột lang này sống.

❖ Ở chuột lang không được gây miễn dịch có hiện tượng khác: Nước phết mạc lấy về sau số lượng vi khuẩn càng nhiều lên, kiểm tra trên kính hiển vi, vi khuẩn không bị biến dạng, số lượng nhiều lên. Chuột lang này chết.

Minh họa thí nghiệm của Pfaifer:

#### **Chuột thí nghiệm**

- Tiêm vắc-xin phẩy khuẩn tả
- Sau 2 - 3 tuần tiêm phẩy khuẩn tả cường độc vào phết mạc
- Lấy dịch phết mạc kiểm tra

#### *Chuột sống*

Qua thí nghiệm nhận thấy trong huyết thanh của chuột lang được gây miễn dịch có kháng thể đặc hiệu chống lại vi khuẩn tả, sự kết hợp của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên làm vô hiệu hoá vi khuẩn, đồng thời còn làm chúng bị dung giải.

#### + Thí nghiệm của Borde

Để làm rõ hơn, Borde đã làm thí nghiệm sau:

- Cho vi khuẩn tả kết hợp với huyết thanh miễn dịch tả còn tươi thấy có hiện tượng tan vi khuẩn tả.
  - Cho vi khuẩn tả kết hợp với huyết thanh miễn dịch tả đã đun  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút, vi khuẩn tả không bị tan.
  - Cho vi khuẩn tả kết hợp với huyết thanh tươi của chuột lang, vi khuẩn không bị tan.
- Như vậy thí nghiệm này cho thấy trong huyết thanh miễn dịch phải có 2 loại kháng thể cùng tham gia làm tan xoắn khuẩn.
- Một loại kém chịu nhiệt, bị mất tác dụng khi đun ở  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút, không có tính đặc hiệu đó là kháng thể không đặc hiệu gọi là bô thể.
  - Một loại chịu được nhiệt độ  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút chỉ có trong huyết thanh miễn dịch là kháng thể đặc hiệu, có khả năng hoạt hoá bô thể làm tan vi khuẩn.

Như vậy, hiện tượng tan vi khuẩn phải có 3 thành phần tham gia: kháng nguyên, kháng thể, bô thể. Hiện tượng tan vi khuẩn còn gọi là hiện tượng dung khuẩn, không nhìn thấy được bằng mắt thường.

#### • Hiện tượng dung huyết (Haemolysis)

Hồng cầu của loài này là kháng nguyên đối với loài khác. Vì vậy người ta lấy hồng cầu cùu tiêm vào dưới da cho thỏ, thỏ sản sinh kháng thể chống lại hồng cầu cùu, kháng thể đó được gọi là kháng thể kháng hồng cầu cùu.

Tuần tự làm 4 thí nghiệm như của Borde

- Hồng cầu cùu + kháng thể kháng hồng cầu cùu gây tan hồng cầu. Huyết dịch có màu đỏ.
- Hồng cầu cùu + kháng thể kháng hồng cầu cùu đun ở  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút, không tan hồng cầu, hồng cầu lắng xuống đáy, nước phía trên trong.
- Hồng cầu cùu + kháng thể kháng hồng cầu cùu đun ở  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút + huyết thanh chuột lang gây tan hồng cầu.
- Hồng cầu cùu + huyết thanh chuột lang, không tan hồng cầu.

Như vậy hiện tượng này cho thấy, để làm tan hồng cầu trong huyết thanh kháng hồng cầu phải có 2 loại kháng thể:

- Một loại là kháng thể không đặc hiệu, bị mất tác dụng khi đun nóng ở  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút, đó là bô thể.
- Một loại là kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh miễn dịch, chịu được nhiệt

#### **Chuột đối chứng**

- Không tiêm vắc-xin phẩy khuẩn tả
- Tiêm phẩy khuẩn tả cường độc
- Lấy dịch phết mạc kiểm tra

#### *Chuột chết*

56°C/30 phút. Kháng thể này có khả năng làm tan hồng cầu nếu có sự tham gia của bô thể.

Như vậy hiện tượng dung khuẩn hay hiện tượng dung huyết muối xảy ra, ngoài thành phần kháng nguyên, kháng thể đặc hiệu còn có sự tham gia của bô thể nên người ta gọi phản ứng này là phản ứng tiêu thụ bô thể.

\* Cách tiến hành phản ứng kết hợp bô thể:

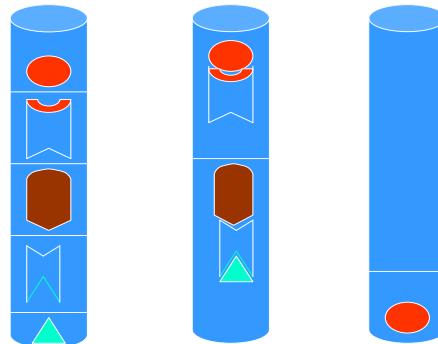
Phản ứng kết hợp bô thể phải dùng hai hệ thống: Hệ thống dung khuẩn và hệ thống dung huyết. Bởi vì sự dung khuẩn mắt thường không quan sát được do đó phải dùng hệ thống dung huyết để đánh giá kết quả qua quan sát bằng mắt thường.

+ Chuẩn bị:

- Kháng nguyên: Là kháng nguyên đã biết. Ví dụ: Vi khuẩn *Brucella*
- Kháng thể: là kháng thể nghi. Lấy máu của vật nghi mắc bệnh chắt huyết thanh, đun 56°C/30 phút để diệt bô thể.
- Hồng cầu cùu
- Huyết thanh kháng hồng cầu cùu đã đun 56°C/30 phút
- Bô thể: Huyết thanh chuột lang được chuẩn độ theo hệ thống dung huyết.

+ Cách làm:

- Cho vào ống nghiệm hệ thống dung khuẩn gồm có: kháng nguyên, kháng thể nghi và cho tiếp vào một lượng bô thể đã được chuẩn độ. Để ở 37°C trong 20 - 30 phút.
- Cho tiếp vào ống nghiệm hệ thống dung huyết gồm có hồng cầu cùu, huyết thanh kháng hồng cầu cùu. Để ở 37°C trong 20 - 30 phút, rồi đọc kết quả.

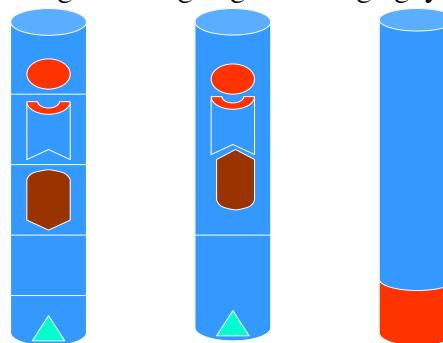


Hình 6.13. Mô phỏng phản ứng dương tính

\* Phản ứng dương tính:

Hồng cầu không tan, lắng xuống đáy thành cục tròn đỏ, nước ở bên trên trong. Đó là do kháng nguyên + kháng thể tương ứng + bô thể.

Bô thể đã được sử dụng không còn cho hệ thống dung huyết. Phản ứng dương tính chứng tỏ trong huyết thanh của vật nghi có kháng thể tương ứng với kháng nguyên, con vật mắc bệnh.



Hình 6.14. Mô phỏng phản ứng âm tính

\* Phản ứng âm tính:

Hồng cầu bị tan, huyền dịch có màu đỏ. Đó là do không có kháng thể tương ứng với kháng nguyên, bô thể không dùng cho hệ thống dung khuẩn mà tham gia vào hệ thống dung huyết làm hồng cầu bị tan, phản ứng âm tính, con vật không mắc bệnh.

Phản ứng này được ứng dụng để chẩn đoán các bệnh: Dịch tả trâu bò, bệnh do liên cầu khuẩn, virus care, lở mồm long móng.

## 2.4. Phản ứng trung hoà (Neutralization test)

Một số kháng thể khi gặp kháng nguyên đã kích thích sinh ra chúng như: virus, độc tố của vi khuẩn,... sẽ làm cho chúng không còn khả năng gây bệnh.

Phản ứng kết hợp của kháng nguyên với kháng thể này gọi là phản ứng trung hoà.

Phản ứng trung hoà hay sử dụng là phản ứng trung hoà độc tố và phản ứng trung hoà virus.

### ①. Phản ứng trung hoà độc tố của vi khuẩn

Một số vi khuẩn như vi khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*), vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*) có khả năng sản sinh ngoại độc tố và gây bệnh nhờ độc tố này.

Độc tố có bản chất là protein, có tính kháng nguyên cao và rất độc. Dưới tác dụng của một số yếu tố như nhiệt độ, formol, độc tố mất độc tính trở thành giải độc tố, nhưng tính kháng nguyên vẫn cao nên có thể dùng làm vaccine.

Khi tiêm giải độc tố vào cơ thể, cơ thể sản sinh kháng thể đặc hiệu với độc tố, gọi là kháng độc tố.

Khi kháng độc tố gặp độc tố, phản ứng trung hoà xảy ra, độc tố không còn độc nữa.

Phản ứng trung hoà độc tố có thể thực hiện trong cơ thể động vật hoặc trong ống nghiệm. Nếu thực hiện phản ứng trung hoà trong ống nghiệm ta thấy phức hợp kháng nguyên - kháng thể biểu hiện như những cụm lông lơ lửng, vì vậy người ta gọi phản ứng này là phản ứng lên bông.

### ②. Phản ứng trung hoà virus

Virus khi vào cơ thể kích thích sinh ra kháng thể đặc hiệu, sự kết hợp giữa virus với kháng thể đặc hiệu làm cho virus không còn khả năng gây bệnh nữa. Phản ứng này gọi là phản ứng trung hoà virus.

- Nguyên lý:

Trên đối tượng nuôi cấy virus: phôi gà, động vật cảm thụ, môi trường tế bào, virus sẽ nhân lên và gây bệnh tích cho các đối tượng trên. Còn khi hỗn hợp virus với kháng thể đặc hiệu tương ứng, virus sẽ bị trung hoà, không nhân lên được và không gây bệnh tích.

Để thực hiện phản ứng trung hoà cần phải có:

- Huyết thanh miễn dịch chuẩn
- Bệnh phẩm chứa virus
- Huyết thanh thường làm đối chiếu
- Phương pháp làm phản ứng trung hoà: có 2 phương pháp.

\* Phương pháp thứ nhất:

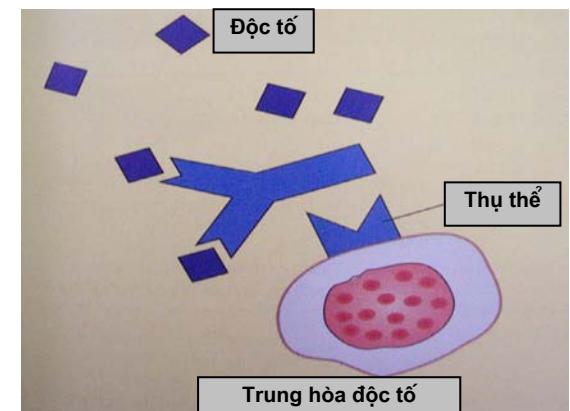
Huyết thanh không pha loãng (cố định), virus pha loãng.

Theo phương pháp này virus được pha loãng theo cơ số  $10: 10^{-1} \dots 10^{-7}$ ..., rồi hỗn hợp với một lượng tương đương huyết thanh miễn dịch ở mỗi nồng độ. Để ở nhiệt độ phòng 30 phút đến 1 giờ, rồi đem gây nhiễm cho đối tượng nuôi cấy virus (phôi gà hoặc động vật thí nghiệm hoặc môi trường tế bào). Mỗi nồng độ gây nhiễm cho 4 - 6 đối tượng nuôi cấy.

Bằng phương pháp này người ta chuẩn độ được hiệu giá của virus hỗn hợp trong huyết thanh.

Sơ đồ của phản ứng:

Huyết thanh	Số ống	Độ pha loãng virus					
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Huyết thanh không pha loãng, mỗi ống 0,2ml	1	0,2 ml					
	2		0,2 ml				
	3			0,2 ml			
	4				0,2 ml		
	5					0,2 ml	
	6						0,2 ml



Hình 6.15. Sự tiêu tan độc tố nhờ liên kết của kháng thể

Làm theo phương pháp thứ nhất tiện hơn, vì trước khi làm không cần phải chuẩn độ sơ bộ virus.

Phản ứng trung hoà phải có phản ứng đối chiếu kèm theo trong đó huyết thanh miễn dịch được thay thế bằng huyết thanh bình thường.

Kết quả phản ứng trung hoà biểu diễn bằng chỉ số trung hoà.

**Chỉ số trung hoà:**

Chỉ số trung hoà biểu diễn liều tối đa của virus bị trung hoà bởi huyết thanh so với đối chiếu.

$$NI = \text{colog} \frac{SN}{SS}$$

NI: Neutralization Index (chỉ số trung hoà)

SS: Serum special (huyết thanh miễn dịch hoặc huyết thanh thí nghiệm)

SN: Serum normal (huyết thanh bình thường)

NI từ 11 - 50: phản ứng nghi ngờ

NI > 50: phản ứng dương tính.

Dưới đây là biên bản của một phản ứng trung hoà tiến hành trên chuột thí nghiệm:

Huyết thanh	Độ pha loãng virus						Hiệu giá virus trong hỗn hợp với huyết thanh ( $LD_{50}$ )	Chỉ số trung hoà
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$		
Huyết thanh thí nghiệm	+	+	0	0	0	0	$10^{-1,23}$	3467
	+	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0		
Huyết thanh đối chiếu (huyết thanh thường)	+	+	+	+	+	0	$10^{-4,77}$	
	+	+	+	+	+	0		
	+	+	+	+	0	0		
	+	+	+	0	0	0		

Ghi chú: + Chuột chết

0: chuột khoẻ

Để tính chỉ số trung hoà:

- Tính chỉ số  $LD_{50}$  theo phương pháp Reed - Muench như sau:

Huyết thanh	Độ pha loãng Virus	Liều gây nhiễm (ml)	Số chuột TN	Số liệu thực tế		Số liệu tính toán		Tỷ lệ chuột chết (%)	$LD_{50}$
				Số chuột khoẻ	Số chuột chết	Số chuột khoẻ	Số chuột chết		
Huyết thanh thí nghiệm	$10^{-1}$	0,2	4	2	2	2	3	60	$10^{-1,23}$
	$10^{-2}$	0,2	4	3	1	5	1	17	
	$10^{-3}$	0,2	4	4	0	9	0	0	
	$10^{-4}$	0,2	4	4	0	13	0	0	
	$10^{-5}$	0,2	4	4	0	17	0	0	
	$10^{-6}$	0,2	4	4	0	21	0	0	
Huyết thanh đối chiếu	$10^{-1}$	0,2	4	0	4	0	17	100	$10^{-4,77}$
	$10^{-2}$	0,2	4	0	4	0	13	100	
	$10^{-3}$	0,2	4	0	4	0	9	100	
	$10^{-4}$	0,2	4	1	3	1	5	83	
	$10^{-5}$	0,2	4	2	2	3	2	40	
	$10^{-6}$	0,2	4	4	0	7	0	0	

- Sử dụng phương pháp công dòn số liệu theo chiều mũi tên như trong bảng trên để tính số liệu tính toán.

- Tỷ lệ % chuột chết trong trường hợp này được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ chuột chết (\%)} = \frac{\text{Tổng số chuột chết}}{\text{Tổng số chuột khỏe} + \text{Tổng số chuột chết}} \times 100$$

- Chỉ số LD<sub>50</sub> được tính theo công thức của Reed - Muench:

$$\text{Lg LD}_{50} = \lg A + X \lg f$$

$$X = \frac{A' - 50}{A' - B'}$$

Trong đó:

X: khoảng cách cân đối

A: độ pha loãng virus gây chết cận trên 50%

A': tỷ lệ % chuột chết cận trên 50%

B': tỷ lệ chuột chết cận dưới 50%

f: bậc pha loãng của virus 1/10 ( $10^{-1}$ )

Dựa vào công thức trên tính được chỉ số LD<sub>50</sub> trong từng trường hợp như sau:

- VỚI HUYẾT THANH THÍ NGHIỆM:

$$X = \frac{60 - 50}{60 - 17} = 0,23$$

$$\text{Lg LD}_{50} = \lg 10^{-1} + (0,23) \lg 10^{-1} = -1,23 \rightarrow \text{LD}_{50} = 10^{-1,23}$$

- VỚI HUYẾT THANH ĐỐI CHIỀU (HUYẾT THANH THƯỜNG):

$$X = \frac{83 - 50}{83 - 40} = 0,77$$

$$\text{Lg LD}_{50} = \lg 10^{-4} + (0,77) \lg 10^{-1} = -4,77 \rightarrow \text{LD}_{50} = 10^{-4,77}$$

$$- \text{ Chỉ số trung hoà: NI} = \text{colog} \frac{10^{-4,77}}{10^{-1,23}} = \text{colog} 10^{-3,54}$$

Sau đó tìm trong bảng đổi log ta có chỉ số trung hoà: colog 10<sup>-3,54</sup> = 3467

Vậy NI = 3467

3467 > 50 nên phản ứng dương tính.

\* Phương pháp thứ hai:

Virus cố định, huyết thanh pha loãng.

Theo phương pháp này, huyết thanh miến dịch được xử lý ở 56°C/30 phút và được pha loãng với nước muối sinh lý theo cơ số 2 (1/2; 1/4; 1/8...), rồi hỗn hợp với một lượng virus nhất định (thường dùng một lượng virus tương đương với liều 100 đến 1000 liều EID<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>).

Theo phương pháp này trước khi làm phản ứng phải xác định được liều gây nhiễm hoặc liều gây chết 50% đối tượng nuôi cấy virus (EID<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>).

Phương pháp này xác định được hiệu giá của huyết thanh trung hoà.

Sơ đồ của phản ứng:

Virus	Số ống	Độ pha loãng huyết thanh					
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Virus pha loãng tương đương 100EID <sub>50</sub> (hoặc 100LD <sub>50</sub> , TCID <sub>50</sub> ), mỗi ống 0,2ml	1	0,2 ml					
	2		0,2 ml				
	3			0,2 ml			
	4				0,2 ml		
	5					0,2 ml	
	6						0,2 ml

Pha huyết dịch virus sao cho cứ 0,2ml có 100EID<sub>50</sub> (hoặc 100LD<sub>50</sub>, TCID<sub>50</sub>).

Trộn huyết thanh với huyết dịch virus theo tỷ lệ 1:1 (0,2ml virus với 0,2ml huyết thanh) sau đó đỗ ủ ở 37°C trong 30 phút đến 1 giờ và tiêm cho phôi, động vật cảm thụ hay cấy vào lợ

tế bào, mỗi nồng độ huyết thanh gây nhiễm cho 5 đôi tượng, mỗi đôi tượng 0,2ml rồi theo dõi trong 96 giờ. Hàm lượng kháng thể trong huyết thanh được biểu diễn thông qua hiệu giá kháng thể và đơn vị trung hoà (đvth).

Hiệu giá kháng thể chống virus là độ pha loãng lớn nhất của huyết thanh ngăn cản hoàn toàn sự gây nhiễm hay chết phôi hoặc động vật thí nghiệm.

Đơn vị trung hoà được tính như sau: Nếu lượng kháng thể trung hoà có trong huyết thanh thí nghiệm trung hòa đư ợc  $1EID_{50}$  ( $LD_{50}$ ,  $TCID_{50}$ ) virus ở thể tích tương đương th trong mẫu huyết thanh đó chứa 1 đơn vị trung hoà.

Ví dụ: nếu 0,1 ml huyết thanh ở độ pha loãng 1/4 trung hoà hết 0,1ml virus chứa  $50EID_{50}$  ( $LD_{50}$ ,  $TCID_{50}$ ) (vì khi pha 0,2ml virus với 0,2ml huyết thanh để trung hoà đã làm thể tích tăng lên gấp đôi nên nồng độ virus giảm xuống một nửa), có nghĩa là 0,1ml huyết thanh ở độ pha loãng 1/4 có chứa 50 đvth, như vậy trong 0,1 ml huyết thanh đặc sẽ có  $50 \times 4 = 200$  (đvth), do đó 1ml huyết thanh đặc chứa  $200 \times 10 = 2000$  (đvth). Cũng như cách th ú nhất, nếu mẫu huyết thanh thí nghiệm trung hoà đư ợc từ 50 đvth trở lên, phản ứng trung hoà là dương tính.

Tuy nhiên, để bảo hộ được động vật, hàm lượng kháng thể trong huyết thanh miễn dịch phải càng cao càng tốt và tùy thuộc vào từng trường hợp.

Trong trường hợp xác định hiệu lực của vacxin dịch tả vịt, theo tác giả Woolcock P.R. và cộng sự (1991) khi làm phản ứng trung hoà theo phương pháp huyết thanh pha loãng, virus cố định; vào ngày 21 sau khi tiêm vacxin, nếu đơn vị trung hoà của huyết thanh đạt trên 32000 đvth thì vacxin có hiệu lực bảo hộ

- Ứng dụng phản ứng trung hoà trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm: Dịch tả vịt, viêm gan vịt, lở mồm long móng, dịch tả lợn, Marek.

#### ❶ Phản ứng trung hoà trên thỏ chẩn đoán bệnh Dịch tả lợn

- Nguyên lý: Dựa vào tính gây bệnh khác nhau trên thỏ và lợn của 2 chủng virus dịch tả lợn cường độc và nhược độc, nhưng chúng lại có chung đặc tính kháng nguyên.

+ Chủng virus cường độc dịch tả lợn: gây bệnh cho lợn nhưng không độc cho thỏ, nếu tiêm cho thỏ gây được miễn dịch .

+ Chủng virus nhược độc dịch tả lợn: không độc với lợn nhưng độc với thỏ, nếu tiêm cho thỏ làm thỏ sốt. Dùng bệnh phẩm nghi dịch tả lợn tiêm cho thỏ nếu bệnh phẩm có virus dịch tả lợn cường độc, thỏ sẽ được miễn dịch, trong máu có kháng thể trung hoà virus dịch tả lợn.

Tiêm tiếp cho thỏ bằng virus dịch tả lợn nhược độc, virus này sẽ bị kháng thể trung hoà có trong máu thỏ trung hoà hết nên không gây sốt cho thỏ.

- Tiến hành:

Dùng bệnh phẩm là lách của lợn nghi mắc bệnh, nghiền với nước sinh lý thành 2 nồng độ 1/10 và 1/100 tiêm bắp thịt cho 2 thỏ khoẻ mạnh:

+ Thỏ 1: tiêm 1ml huyền dịch 1/10

+ Thỏ 2: tiêm 1ml huyền dịch 1/100

Sau 5 - 10 ngày, dùng giống virus nhược độc dịch tả lợn qua thỏ pha thành 2 nồng độ 1/10 và 1/100 tiêm bắp thịt cho 2 thỏ trên:

+ Thỏ 1: tiêm 1ml huyền dịch 1/10

+ Thỏ 2: tiêm 1ml huyền dịch 1/100

Kết quả là hai thỏ này không sốt. Lấy máu của hai thỏ này tiêm qua 2 thỏ khoẻ khác, 2 thỏ này cũng không sốt chứng tỏ virus dịch tả lợn nhược độc đã bị trung hoà bởi kháng thể dịch tả lợn. Kháng thể này có được là do trong bệnh phẩm có virus dịch tả lợn cường độc kích thích sản xuất ra, chứng tỏ lợn đã mắc bệnh.

Trong khi lô đối chứng: Tiêm máu hoặc lách của lợn khỏe, 10 ngày sau tiêm tiếp bằng virus dịch tả lợn như độc, 2 thỏ này có phản ứng sốt.

## ❷ Phản ứng trung hoà trên gà và trên phôi gà chẩn đoán virus Newcastle

\* Trung hoà trên gà thí nghiệm:

- Dùng hai lô gà: Một lô thí nghiệm và một lô đối chứng. Lô thí nghiệm được tiêm vacxin Newcastle; Lô đối chứng không được tiêm vacxin. Sau 5 - 7 ngày cả hai lô đều được tiêm bệnh phẩm của gà nghi mắc bệnh Newcastle vào dưới da hay bắp thịt đùi của gà.

- Nếu bệnh phẩm chứa virus Newcastle thì ở lô thí nghiệm gà không bị chết, gà vẫn phát triển bình thường. Điều này là do sau khi tiêm vacxin gà đã có kháng thể chống virus Newcastle, nên kháng thể đã trung hoà hết virus có trong bệnh phẩm.

Trong khi đó ở lô đối chứng gà bị chết, bởi vì gà ở lô này không được tiêm vacxin nên không có kháng thể bảo hộ chống virus.

\* Trung hoà trên môi trường tế bào, trên phôi gà.

Dùng hai lô: 1 lô thí nghiệm và 1 lô đối chứng.

- Lô thí nghiệm: Được tiêm hoặc cấy hồn dịch bệnh phẩm sau khi đã được hồn hợp với 1 lượng kháng huyết thanh Newcastle tương đương để ở 37°C/1 - 2h

- Lô đối chứng: Chỉ được tiêm hoặc cấy hồn dịch bệnh phẩm nghi có virus Newcastle

Kết quả: Nếu trong bệnh phẩm có chứa virus Newcastle thì các lô thí nghiệm là phôi gà, tế bào vẫn phát triển và sống bình thường vì virus có trong bệnh phẩm đã bị kháng huyết thanh Newcastle trung hoà không còn khả năng gây huỷ hoại tế bào hay phôi gà. Trong khi đó ở các lô đối chứng, tế bào nuôi bị huỷ hoại, phôi bị chết

## 3. Các phản ứng huyết thanh học phải dùng kỹ thuật đánh dấu để phát hiện

Trong nhiều trường hợp để phát hiện sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, người ta phải dùng những chất đánh dấu như: chất phát huỳnh quang, enzyme, chất đồng vị phóng xạ... gắn vào kháng nguyên hoặc kháng thể, thì độ nhạy của phản ứng được tăng lên nhiều lần.

Những chất dùng để đánh dấu phải đạt tiêu chuẩn:

- Không được làm biến tính kháng nguyên, kháng thể.
- Không dễ bị bong ra sau khi gắn.

### 3.1. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang (Immuno - fluorescent - test) IF

Dùng chất đánh dấu là chất phát huỳnh quang (khi hấp thụ 1 ánh sáng có bước sóng nhất định sẽ phát ra 1 ánh sáng có bước sóng dài hơn).

#### ①. Nguyên lý

Khi dùng kháng thể hoặc kháng kháng thể đã được nhuộm bằng chất phát huỳnh quang, rồi cho kết hợp với kháng nguyên cần chẩn đoán. Nếu có phức hợp kháng nguyên - kháng thể khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ phát sáng.

Có thể dùng các chất phát huỳnh quang sau để nhuộm kháng thể:

- Fluorescent Isothiocyanat: cho màu xanh lục
- Rodamin: màu đỏ gạch
- Lixamin: có màu đỏ gạch
- Rodamin B (RB200): màu vàng da cam

Có 2 phương pháp: trực tiếp và gián tiếp.

#### ②. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang trực tiếp

Trong phản ứng này thường dùng kháng thể đặc hiệu nhuộm chất phát huỳnh quang để phát hiện kháng nguyên chưa biết.

Cách làm:

- Lấy bệnh phẩm cần chẩn đoán, làm thành tiêu bản (phiết bệnh phẩm lên phiến kính, cố định) để kháng nguyên gắn chặt lên phiến kính.

- Nhỏ một giọt kháng thể đặc hiệu đã gắn chất phát huỳnh quang lên tiêu bản.

- Để một thời gian 30 phút, rửa nước, để khô, quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (ánh sáng tia tử ngoại). Đọc kết quả.

- Phản ứng dương tính:

Có hiện tượng phát sáng do có sự kết hợp của kháng nguyên - kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang.

- Phản ứng âm tính:

Không có phát sáng, do không có sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể.

#### ③. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

Dùng kháng kháng thể được nhuộm chất phát huỳnh quang để phát hiện kháng nguyên cần chẩn đoán.

Phương pháp này còn gọi là kỹ thuật 2 lớp với 3 thành phần tham gia.

- Kháng nguyên cần chẩn đoán (kháng nguyên nghi).
- Kháng thể đặc hiệu.
- Kháng kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang.

Trong đó kháng thể đặc hiệu có 2 chức năng:

- Là kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên cần chẩn đoán
- Là kháng nguyên của kháng kháng thể đã đánh dấu (kháng kháng thể là kháng thể kháng globulin cùng loài).

#### \* Cách tiến hành:

- Lấy bệnh phẩm cần chẩn đoán làm tiêu bản để kháng nguyên gắn chặt lên phiến kính.
- Nhỏ một giọt kháng thể đặc hiệu lên phiến kính. Để tác động 15 phút, rồi rửa nước.
- Nhỏ tiếp 1 - 2 giọt kháng kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang.

Để tác động một thời gian, rửa nước, để khô, quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

#### \* Đọc kết quả:

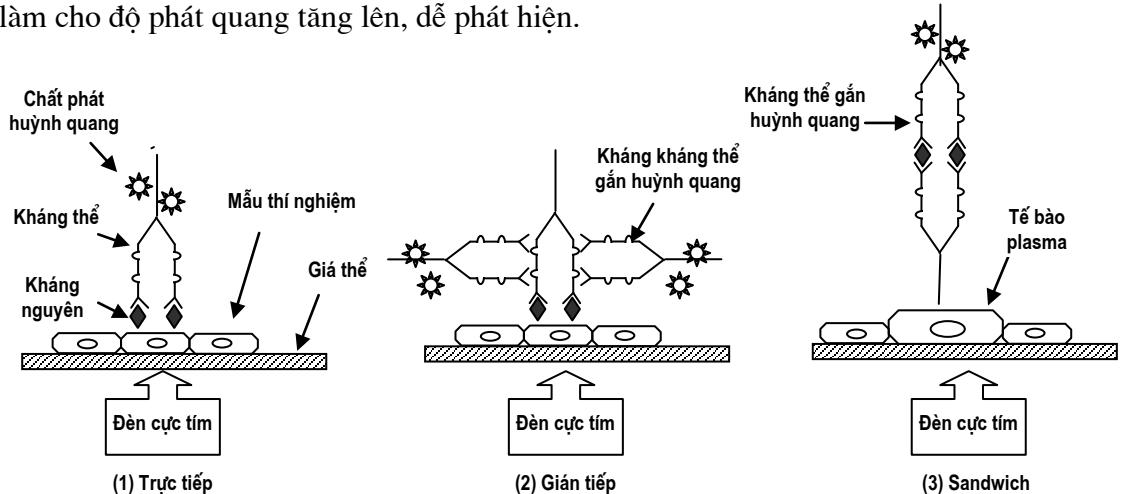
- Phản ứng dương tính:

Có hiện tượng phát sáng, tức là có hiện tượng kết hợp kháng nguyên + kháng thể + kháng kháng thể, gia súc mắc bệnh.

- Phản ứng âm tính:

Không có hiện tượng phát sáng, tức là không có hiện tượng kết hợp kháng nguyên + kháng thể + kháng kháng thể. Bởi vì kháng nguyên và kháng thể không tương ứng, không có sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, kháng thể bị rửa trôi.

Tuy nhiên, phương pháp gián tiếp hay được sử dụng vì chỉ cần một lần gắn kháng kháng thể với chất huỳnh quang ta có thể sử dụng để chẩn đoán nhiều kháng nguyên khác nhau, với điều kiện kháng thể đặc hiệu của chúng phải được chế trên cùng một loài vật. Mặt khác, độ nhạy của phản ứng cao hơn, bởi vì 1 phân tử kháng nguyên có thể bị nhiều kháng kháng thể bám vào làm cho độ phát quang tăng lên, dễ phát hiện.



**Hình 6.13. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang**

#### ④. Kỹ thuật Sandwich ("Bánh mì kẹp chả")

Đây là một dạng cải biến của miễn dịch huỳnh quang, dùng để phát hiện tế bào tạo kháng thể.

Cắt một mảnh tổ chức dạng lympho, đặt mảnh tổ chức lên phiến kính.

Lấy kháng nguyên phủ lên mảnh cắt. Để một thời gian, rửa nước, loại bỏ kháng nguyên chưa gắn với kháng thể đặc hiệu trên bề mặt tế bào lympho.

Nhỏ tiếp kháng thể đặc hiệu đã gắn chất phát huỳnh quang, để một thời gian, rửa nước, để khô, quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Đọc kết quả.

- Nếu có hiện tượng phát sáng, chứng tỏ các tế bào đang sản xuất kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên.

Phản ứng được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh dịch tả lợn, Marerk,ẠI

➤ *Ứng dụng trong chẩn đoán bệnhẠI*

\* *Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp*

Dùng kháng thể đặc hiệu nhuộm màu huỳnh quang để phát hiện kháng nguyênẠI.

▪ Chuẩn bị:

- Chuẩn bị kháng nguyên nghi: dùng bệnh phẩm là não, mồ óc bọt hoặc áp kính vào vùng sừng Amon của động vật nghi mắc bệnhẠI, cố định tiêu bản bằng ete hoặc hơi nóng trên ngọn lửa đèn cồn.

- Chuẩn bị kháng thể đặc hiệu nhuộm huỳnh quang: dùng virusẠI gây tối miễn dịch cho thỏ, lấy máu chất huyết thanh, tách phần gamma globulin ( $\gamma$ Ig) đem nhuộm màu huỳnh quang.

▪ Tiến hành phản ứng:

- Nhỏ 1 - 2 giọt kháng thể đã nhuộm màu huỳnh quang lên tiêu bản, để ở 37°C/30 phút, rồi đem rửa nước, làm khô. Đọc kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang.

▪ Kết quả:

- Phản ứng dương tính: Có hiện tượng phát sáng do có sự kết hợp của kháng nguyên - kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang, con vật mắc bệnhẠI

- Phản ứng âm tính: Không có hiện tượng phát sáng, do không có sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể.

\* *Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp*

Dùng kháng kháng thể đã nhuộm màu huỳnh quang để phát hiện kháng nguyên cần chẩn đoán.

▪ Chuẩn bị:

- Chuẩn bị kháng nguyên nghi: giống như trong phản ứng trực tiếp.

- Chuẩn bị kháng thể  $\gamma$ Ig: dùng  $\gamma$ Ig của thỏ tiêm cho gà trống, sau 2 - 3 tuần lễ, lấy máu gà, chất huyết thanh, rồi tách phần  $\gamma$ Ig, sẽ thu được kháng kháng thể  $\gamma$ Ig của thỏ, đem nhuộm màu huỳnh quang.

- Chuẩn bị kháng thể đặc hiệu: giống như trong phản ứng huỳnh quang trực tiếp nhưng kháng thể không nhuộm màu huỳnh quang.

▪ Tiến hành phản ứng:

- Nhỏ 1 - 2 giọt kháng thể đặc hiệu lên phiến kính. Để tác động 15 phút, rồi rửa nước.

- Nhỏ tiếp 1 - 2 giọt kháng kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang.

Để tác động một thời gian, rửa nước, để khô. Đọc kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang.

▪ Kết quả:

- Phản ứng dương tính: Có hiện tượng phát sáng, tức là có hiện tượng kết hợp kháng nguyên + kháng thể + kháng kháng thể, con vật mắc bệnh. Trong bệnh phẩm có virusẠI

- Phản ứng âm tính: Không có hiện tượng phát sáng, tức là không có hiện tượng kết hợp kháng nguyên + kháng thể + kháng kháng thể. Bởi vì kháng nguyên và kháng thể không tương ứng, không có sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, kháng thể bị rửa trôi. Con vật không bị bệnhẠI.

➤ *Ứng dụng phản ứng miễn dịch huỳnh quang chẩn đoán bệnh dịch tả lợn*

- Chuẩn bị:

+ Kháng thể: là kháng thể dịch tả lợn đã nhuộm màu huỳnh quang

+ Kháng nguyên nghi: lấy bệnh phẩm của lợn nghi mắc bệnh dịch tả lợn (lách, hạch...) làm thành tiêu bản.

- Phương pháp tiến hành:

+ Nhỏ lên tiêu bản 1 - 2 giọt kháng thể dịch tả lợn đã nhuộm màu huỳnh quang, để trong hộp ấm 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó rửa nước, để khô và đọc kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang.

- Kết quả:

+ Phản ứng dương tính:

Có hiện tượng phát sáng do có sự kết hợp của kháng nguyên - kháng thể đã gắn chất phát huỳnh quang. Con vật bị bệnh dịch tả lợn

+ Phản ứng âm tính:

Không có phát sáng, do không có sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Con vật không mắc bệnh.

### 3.2. Phản ứng miễn dịch gắn enzyme ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)

#### 3.2.1. Những hiểu biết chung về phản ứng ELISA

- *Khái niệm*

ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) là một kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch dựa trên cơ chế kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể (kháng thể có gắn enzyme) và dùng cơ chất đặc hiệu với enzym để phát hiện phức hợp kháng nguyên – kháng thể.

- *Nguyên lý chung*

Dùng kháng thể hoặc kháng kháng thể được gắn enzyme rồi cho kết hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng nguyên, sau đó cho cơ chất phù hợp với enzyme vào, enzyme sẽ tác động đến cơ chất tạo màu, khi đọc trong quang phổ kế sẽ xác định được mật độ quang học và dựa trên mật độ quang học người ta sẽ đánh giá được mức độ của phản ứng.

Các enzyme dùng cho phản ứng ELISA phải có hoạt tính cao, người ta hay dùng Peroxydaza, Alkaline photphataza, Beta - galactosidaza. Các cơ chất phải chọn sao cho phù hợp với enzyme, để khi tác động có thể đo được màu ở quang phổ kế.

Peroxydaza là enzyme phổ biến trong ELISA để gắn với kháng thể.

Cơ chất hay dùng là 3,3' diamin benzidin, dưới tác dụng của oxy, peroxydaza sẽ cho màu nâu sẫm.

- *Các bước chuẩn bị cho phản ứng ELISA*

+ Gắn kháng nguyên hoặc kháng thể tạo KIT (pha rắn - Solid phase): Dùng kháng nguyên hoặc kháng thể đã biết gắn lên đĩa phản ứng để tạo KIT. Việc lựa chọn giá thể để làm ELISA đã có nhiều thay đổi. Lúc đầu người ta chọn các que, ống, các viên bi với các chất liệu khác nhau (thủy tinh, nhựa...) để làm giá thể. Nhưng sử dụng giá thể loại này rất cồng kềnh, mất nhiều thời gian, nên người ta đã nghiên cứu và đã đưa ra một loại giá thể thích hợp cho ELISA, đó là bản nhựa 96 giếng. Với loại bản nhựa này cùng một lúc có thể kiểm tra được nhiều mẫu, tiện lợi trong sử dụng và không phải ly tâm.

Hiện nay, đĩa nhựa loại polystyrene được dùng khá phổ biến.

Người ta cho kháng nguyên hoặc kháng thể hấp phụ thụ động lên giá thể, phần kỵ nước (hydrophobic) của kháng nguyên hoặc kháng thể sẽ gắn với mặt rắn, phần ưa nước (hydrophilic) sẽ quay ra ngoài làm kháng nguyên hoặc kháng thể sẽ gắn rất chặt vào giá thể.

Sự hấp phụ của kháng nguyên hay kháng thể trên giá thể nhiều hay ít phụ thuộc vào các yếu tố:

- Hệ số khuyếch tán của các phân tử được hấp phụ.
- Tỷ lệ giữa diện tích bề mặt của các giếng và thể tích của dung dịch gắn kháng nguyên.
- Nồng độ dung dịch gắn kháng nguyên.
- Thời gian hấp phụ kháng nguyên.
- Nhiệt độ của quá trình hấp phụ.

Sau đó tiến hành rửa đĩa đã gắn kháng nguyên hoặc kháng thể, đây là một khâu quan trọng, ảnh hưởng nhiều đến sự thành công của phản ứng. Bởi vì, nếu rửa không triệt để sẽ còn sót lại kháng nguyên hoặc kháng thể thừa và như vậy không loại bỏ được yếu tố liên kết không đặc hiệu, điều đó sẽ làm sai lạc phản ứng. Để rửa đĩa, người ta phải lựa chọn một dung dịch đậm đặc phù hợp. Hiện nay người ta sử dụng rộng rãi dung dịch PBS (photphate buffer saline), Tween - 20 có nồng độ 0,05% là dung dịch đậm tốt nhất. Tween - 20 vừa có tác dụng loại bỏ những liên kết không đặc hiệu, vừa có tác dụng lấp chỗ trống trên bề mặt giá thể.

- + *Tạo Conjugate* (liên kết enzyme - kháng thể)

Việc lựa chọn enzyme thích hợp để chế conjugate cần đạt những tiêu chuẩn sau:

- + Enzym phải có hoạt tính cao và ổn định;
- + An toàn, rẻ tiền, dễ kiểm;
- + Có khả năng phân giải nhiều cơ chất khác nhau.

Phổ biến hơn cả là Peroxydase và Alkaline photphataza.

Muốn tạo conjugate, enzyme không thể gắn trực tiếp với kháng thể mà phải thông qua tác nhân gắn (cross linking agent). Các tác nhân này ít nhất có hai nhóm hoạt động, một nhóm sẽ kết hợp với kháng thể và một nhóm sẽ kết hợp với enzyme. Các tác nhân hay được sử dụng là glutaraldehyde và periodate.

Độ pha loãng conjugate có ảnh hưởng đến thời gian ủ và thời gian phản ứng với cơ chất. Khi conjugate pha loãng nhiều thì thời gian ủ dài và thời gian phản ứng với cơ chất lâu hơn.

+ *Lựa chọn cơ chất:* Mục đích của việc lựa chọn cơ chất là làm sao cho cơ chất phải phù hợp với enzyme trong conjugate, cơ chất đạt yêu cầu phải an toàn, rẻ tiền, dễ sử dụng, có hệ số tạo màu cao giúp việc xác định sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể dễ dàng. Người ta thường sử dụng những cơ chất như bảng dưới đây:

#### Các cơ chất thường dùng cho phản ứng ELISA

Cơ chất	Dung dịch đậm	Bước sóng hấp phụ (nm)	Sinh màu	Khả năng hòa tan trong nước
ABTS (2,2' azino - di - (3 ethylbenzthiazolinsulphonate (6))	Photphate/citrate pH 4,2	405 - 414	Xanh lá cây	Có
TMB 3,3', 5,5' tetramethyl benzidin	Acetate pH 5,6	450 - 650	Xanh da trời đến vàng sau khi dùng phản ứng bằng acid	Có
OPD (1,2 phenylenediamined hydro chloride	Photphate/citrate pH 5,0	492	Da cam	Có
Tuluidin	Photphate/citrate pH 4,2	450 - 625	Xanh da trời vàng sau khi dùng phản ứng	Có

#### 3.2.2. Các dạng cơ bản của phản ứng ELISA

- *Phản ứng ELISA trực tiếp (Direct ELISA)*

Dùng để phát hiện kháng nguyên:

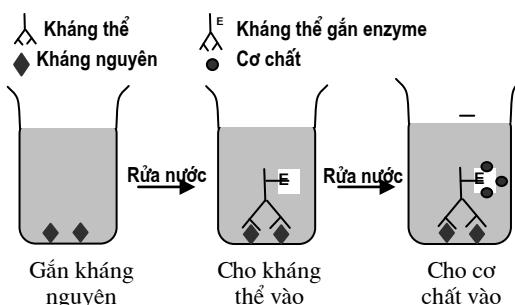
- Cho kháng nguyên cần chẩn đoán hấp phụ lên các lỗ bẩn nhựa, để một thời gian, rửa nước nhầm loại bỏ kháng nguyên không gắn.

- Cho kháng thể đặc hiệu đã gắn enzyme vào, để một thời gian, rửa nước.
- Cho cơ chất đặc hiệu với enzyme vào, để một thời gian.
- Cho chất dừng phản ứng vào. Đọc kết quả trên quang phổ kế.

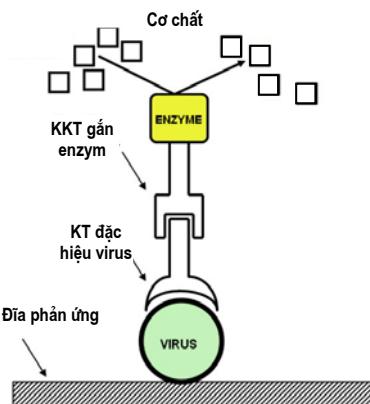
+ Phản ứng dương tính: có màu xuất hiện tức là có kháng nguyên tương ứng với kháng thể đặc hiệu. So màu trong quang phổ kế để định lượng mức độ của phản ứng.

+ Phản ứng âm tính: không xuất hiện màu.

+ Nhược điểm của phản ứng này là phải gắn Enzyme cho tất cả các loại kháng thể tương ứng dùng để tìm các loại kháng nguyên khác nhau, nên người ta ít dùng phản ứng này.



Hình 6.14. Mô phỏng phản ứng ELISA trực tiếp



Hình 6.15. Mô phỏng phản ứng ELISA gián tiếp

- *Phản ứng ELISA gián tiếp (Indirect ELISA)*

Dùng để phát hiện kháng thể

- Cho kháng nguyên đã biết hấp phụ lên bẩn nhựa, để một thời gian (qua đêm), rửa nước nhầm loại bỏ kháng nguyên thừa.

- Cho huyết thanh cần chẩn đoán vào, để một thời gian, rửa nước.
- Cho kháng kháng thể tương ứng gắn enzyme vào, để một thời gian, rửa nước.
- Cho cơ chất đặc hiệu với enzyme vào, để một thời gian. Sau đó cho chất dừng phản ứng vào, đọc kết quả.

Phản ứng dương tính: Có xuất hiện màu. So màu trong quang phổ kế để định lượng mức độ của phản ứng.

Phản ứng âm tính: Không xuất hiện màu.

- *Phản ứng Sandwich ELISA*

Có hai dạng phản ứng Sandwich ELISA là:

- \* *Sandwich ELISA trực tiếp (Direct Sandwich ELISA)*

Dùng để phát hiện kháng nguyên:

Các bước tiến hành:

- + Cho kháng thể đã biết hấp phụ lên các lỗ của bản nhựa, ủ một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng nguyên nghi vào, để một thời gian rồi rửa nước
- + Cho kháng kháng thể có gắn enzyme vào, để một thời gian, rửa nước, sau đó cho cơ chất đặc hiệu với enzym vào để một thời gian.
- + Cho chất dừng phản ứng vào.
- + Đọc kết quả trên quang phổ kế.

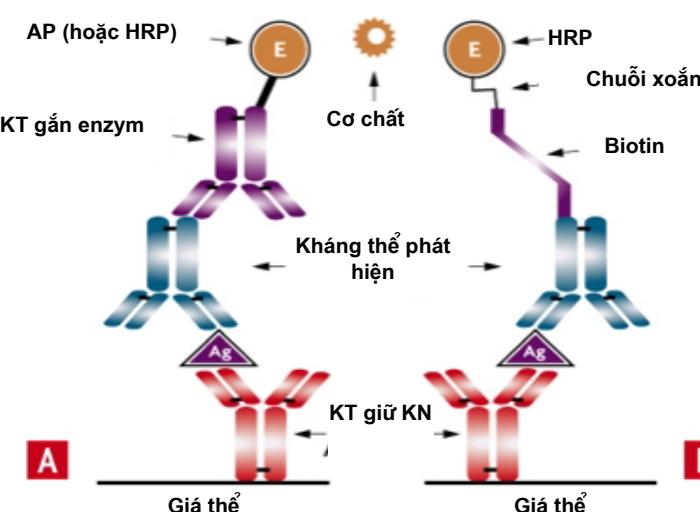
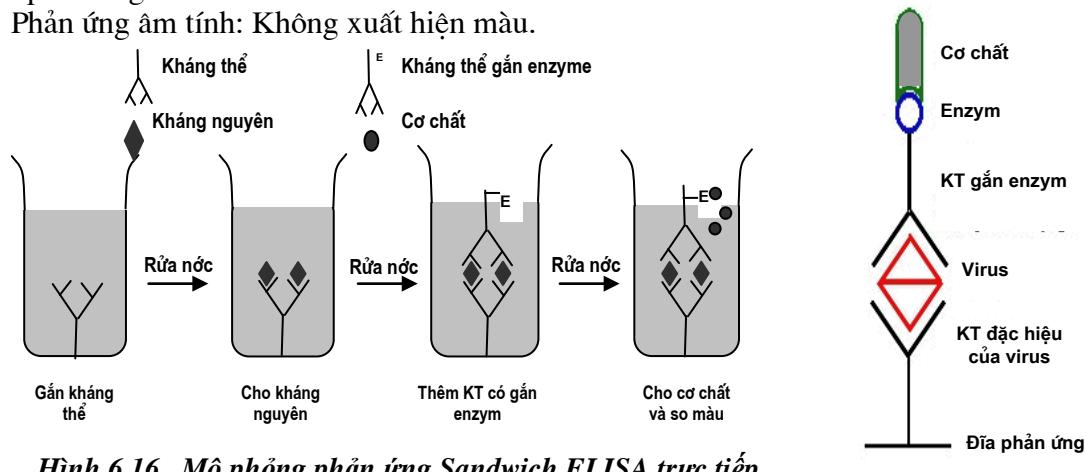
Phản ứng dương tính: Có xuất hiện màu. So màu trong quang phổ kế để định lượng mức độ của phản ứng.

Phản ứng âm tính: Không xuất hiện màu.

**Hình 6.16. Mô phỏng phản ứng Sandwich ELISA trực tiếp**

\* *Sandwich ELISA gián tiếp (Indirect Sandwich ELISA)*

Dùng để phát hiện kháng thể:



**Hình 6.17. Mô phỏng phản ứng Sandwich ELISA gián tiếp**

### Các bước tiến hành

- + Cho kháng thể đã biết hấp phụ lên các lỗ của bản nhựa, ủ một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng nguyên chuẩn vào, để một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng thể nghi vào, để một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng thể có gắn enzyme, để một thời gian, rửa nước.
- + Cho cơ chất vào.
- + Cho chất dừng phản ứng vào.

Đọc kết quả trên quang phổ kế.

Phản ứng dương tính: Có xuất hiện màu. So màu trong quang phổ kế để định lượng mức độ của phản ứng.

Phản ứng âm tính: Không xuất hiện màu.

- *Phản ứng ELISA cạnh tranh*

➤ Phản ứng ELISA cạnh tranh để phát hiện kháng nguyên.

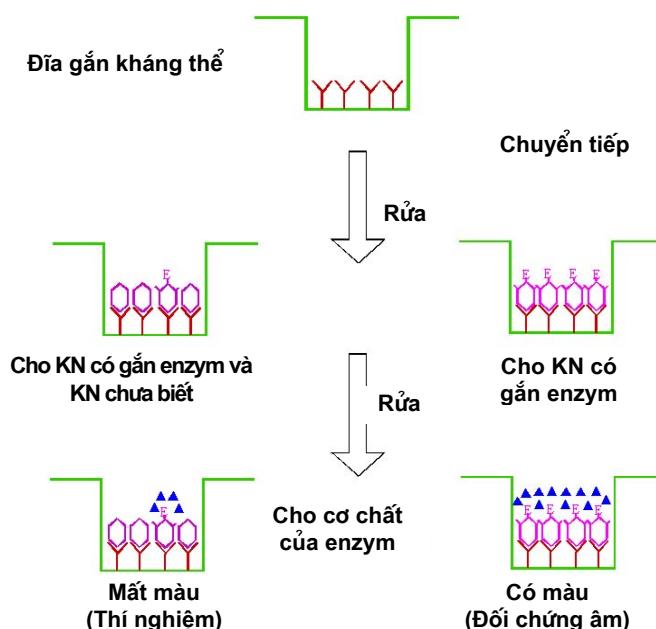
\* Các bước tiến hành:

- + Cho kháng thể đã biết hấp phụ lên các lỗ của bản nhựa, ủ một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng nguyên nghi vào, để một thời gian, rửa nước nhầm loại bỏ kháng nguyên thừa.
- + Cho kháng nguyên đã biết có gắn enzyme vào, để một thời gian, rửa nước. Cho cơ chất phù hợp với enzyme vào, để một thời gian. Sau đó cho chất dừng phản ứng vào.

+ Đọc kết quả:

Phản ứng dương tính: không xuất hiện màu, do kháng nguyên nghi phù hợp với kháng thể đã biết nên cạnh tranh sự kết hợp của kháng nguyên chuẩn có gắn enzyme

Phản ứng âm tính: phức hợp xuất hiện màu đặc trưng, do kháng nguyên nghi không phù hợp với kháng thể nên bị rửa trôi. Kháng nguyên đã biết có gắn enzyme trực tiếp kết hợp với kháng thể gắn trên kit. Khi cho cơ chất phù hợp vào sẽ tạo màu



**Hình 6.18. Mô phỏng phản ứng ELISA cạnh tranh để phát hiện kháng nguyên**

➤ Phản ứng ELISA cạnh tranh để phát hiện kháng thể

\* Các bước tiến hành:

- + Cho kháng thể đã biết hấp phụ lên các lỗ của bản nhựa, ủ một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng nguyên đã biết vào, để một thời gian, rửa nước nhầm loại bỏ kháng nguyên thừa.

- + Cho kháng thể nghi vào, để một thời gian, rửa nước.
- + Cho kháng thể chuẩn đặc hiệu với kháng nguyên đã gắn enzyme, để một thời gian, rửa nước.
- + Cho cơ chất đặc hiệu với enzyme.
- + Cho chất dừng phản ứng vào.
- + Đọc kết quả:

**Phản ứng dương tính:** phức hợp không xuất hiện màu, do kháng thể nghi phù hợp với kháng nguyên đã biết nên cạnh tranh sự kết hợp của kháng thể chuẩn có gắn enzyme

**Phản ứng âm tính:** phức hợp xuất hiện màu đặc trưng, do kháng thể nghi không phù hợp với kháng nguyên chuẩn nên bị rửa trôi. Kháng thể đã biết có gắn enzyme trực tiếp kết hợp với kháng nguyên đã biết. Khi cho cơ chất phù hợp vào sẽ tạo màu.

\* Phương pháp NSP - ELISA (Non structure protein - ELISA)

**Nguyên lý:**

Virus sau khi xâm nhập vào cơ thể sẽ nhân lên, tạo ra trong tế bào các thành phần của mình trong đó có: protein cấu trúc (Structure Protein) tham gia cấu trúc nên hạt virus mới và protein không cấu trúc (NSP - Non structure protein) là enzyme xúc tác tổng hợp các thành phần của virion.

Trong đó, NSP có tính kháng nguyên kích thích cơ thể tạo ra một lượng lớn kháng thể, kháng thể này tồn tại nhiều trong huyết thanh con vật bệnh.

Khi tiêm vaccine vô hoạt vào cơ thể, virus đã bị vô hoạt không có khả năng nhân lên, nên không sản sinh ra NSP, do vậy không có kháng thể kháng NSP.

**Ưu điểm:**

Phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng nguyên NSP từ đó có thể xác định được con vật đang bị nhiễm virus với bất kỳ serotype nào. Phương pháp này cho phép phân biệt được kháng thể tạo ra do con vật đang bị nhiễm bệnh hay do con vật được tiêm phòng vaccine vô hoạt, từ đó giúp cho việc chẩn đoán chính xác bệnh

Kháng nguyên NSP xuất hiện sớm nhất sau 8 ngày nhiễm virus ở trâu bò và 10 ngày ở dê cừu

### 3.2.2. Ứng dụng phản ứng ELISA trong chẩn đoán một số bệnh truyền nhiễm

\* Phương pháp ELISA gián tiếp trong chẩn đoán hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PPRS)

- **Nguyên liệu:**

- Bộ Kit INDEXX Herd Check gồm:
- + Đĩa nhựa 96 giếng
- + Đôi chứng dương, âm
- + Nước rửa 10X
- + Dung dịch pha loãng mẫu (Sample Diluent)
- + Antiporcine HRPO conjugate – kháng kháng thể gắn enzyme.
- + TMB (3, 3, 5, 5 tetra methyl benzidine) substrate – cơ chất của phản ứng ELISA.
- + Dung dịch dừng phản ứng (stop solution)
- Mẫu huyết thanh cần chẩn đoán

- **Chuẩn bị:**

+ Mẫu huyết thanh cần chẩn đoán: Lấy máu con vật nghi mắc bệnh, chắt huyết thanh, pha loãng ở nồng độ 1/40 (10 µl huyết thanh + 390 µl PBS)

+ Nguyên liệu dùng cho phản ứng: Trước khi làm phản ứng, lấy ra để ở nhiệt độ phòng từ 5 – 10 phút.

+ Chuẩn bị đĩa phản ứng.

- Các bước tiến hành phản ứng:

Bước 1:

- Nhỏ huyết thanh đối chứng dương và âm theo đúng sơ đồ đĩa ELISA với số lượng 100µl.
- Nhỏ mẫu huyết thanh cần chẩn đoán vào các vị trí từ 1 – 46 (theo sơ đồ), mỗi giếng 100µl.

Bước 2: Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng

Bước 3: Rửa đĩa 3 – 5 lần bằng nước rửa, mỗi lần rửa cho vào mỗi giếng 300µl

Bước 4: Nhỏ 100µl Conjugate vào tất cả các giếng.

Bước 5: Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút

Bước 6: Rửa đĩa 3 – 5 lần bằng nước rửa, mỗi lần rửa cho vào mỗi giếng 300µl

Bước 7: Nhỏ 100µl TMB

Bước 8: Đê ở nhiệt độ phòng trong 15 phút

Bước 9: Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng vào các giếng.

Bước 10: Kết quả được đọc trên máy ELISA Labsystems multiskan MS ở bước sóng 650nm

Bước 11: Tính kết quả dựa vào công thức

$$\text{OD mẫu PRRS} - \text{OD NHC}$$

$$S/P = \frac{\text{OD pos PRRS} - \text{OD NHC}}{\text{OD pos PRRS} - \text{OD NHC}}$$

Chú thích:

OD mẫu PRRS: Giá trị OD của mẫu huyết thanh cần kiểm tra

OD NHC: Giá trị OD của huyết thanh đối chứng âm

OD pos PRRS: Giá trị OD của huyết thanh đối chứng dương

$$S/P \geq 0,4 \text{ là dương tính}$$

\* Lưu ý: Kết quả ELISA chính xác cần thỏa mãn các điều kiện:

$$\text{PC}(PRRS) - \text{NC}(PRRS) \geq 0,15$$

$$\text{PC}(NHC) \leq 0,12$$

$$\text{NC}(NHC) \leq 0,25$$

\* Sơ đồ đĩa ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PRRS	NHC	PPRS	NHC	PPRS	NHC	PPRS	NHC	PPRS	NHC	PPRS	NHC
A	ĐC(+)	ĐC(+)	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
B	ĐC(-)	ĐC(-)	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
C	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
D	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
E	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
F	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
G	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45
H	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46

\* Phương pháp ELISA gián tiếp trong chẩn đoán bệnh lở mồm long móng

Ở những gia súc bị nhiễm virus lở mồm long móng (LMLM), virus sẽ nhân lên trong tế bào. Trong quá trình nhân lên của virus có tạo ra: protein cấu trúc (structure protein) và

protein không cấu trúc (non - structure protein).

Trong các protein không cấu trúc của virus LMLM thì kháng nguyên 3ABC có tính kháng nguyên rất cao, nó kích thích cơ thể gia súc tạo ra kháng thể đặc hiệu với số lượng lớn và tồn tại nhiều tháng trong huyết thanh trâu bò bị nhiễm. Do đó việc phát hiện kháng thể đặc hiệu 3ABC cho phép kết luận gia súc đang bị nhiễm virus LMLM.

Hiện nay nước ta đang sử dụng vaccine LMLM nhập từ hãng Intervet (Hà Lan) và Merial (Pháp). Những loại vaccine này là vô hoạt và đã loại bỏ những kháng nguyên không cấu trúc. Sau khi tiêm cho gia súc chỉ kích thích cơ thể sản sinh ra kháng thể chống lại kháng nguyên cấu trúc (hạt virus) chứ không có kháng thể kháng lại kháng nguyên không cấu trúc 3ABC. Do đó, dùng phản ứng ELISA sẽ phát hiện được trâu bò nhiễm virus LMLM, kể cả những trâu bò đã được tiêm phòng.

\* Sơ đồ đĩa phản ứng CHEKIT FMD - 3ABC - BO - OV dùng cho huyết thanh trâu bò.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	13	21	29	37						
B	P	P	14	22	30	38						
C	1	7	15	23	31	39						
D	2	8	16	24	32	40						
E	3	9	17	25	33	41						
F	4	10	18	26	34	42						
G	5	11	19	27	35	43						
H	6	12	20	28	36	44						92

Chú thích:

N: huyết thanh đối chứng âm

P: Huyết thanh đối chứng dương

1, 2, ..., 92: huyết thanh cần kiểm tra

➤ Chuẩn bị:

+ Mẫu huyết thanh cần chẩn đoán: Lấy máu con vật nghi mắc bệnh, chắt huyết thanh, pha loãng ở nồng độ 1% với dung dịch pha loãng máu.

+ Huyết thanh đối chứng pha loãng ở nồng độ 1% với dung dịch pha loãng máu.

+ Nguyên liệu dùng cho phản ứng: Trước khi làm phản ứng, lấy ra để ở nhiệt độ phòng từ 5 – 10 phút.

➤ Tiến hành:

Bước 1:

- Nhổ huyết thanh đối chứng dương và âm theo đúng sơ đồ đĩa ELISA với số lượng 100µl.

- Nhổ mẫu huyết thanh cần chẩn đoán vào các vị trí từ 1 – 46 (theo sơ đồ), mỗi giếng 100µl.

- Đậy nắp, cho đĩa vào trong hộp ấm, để ở tủ ấm 37°C/1h

Bước 2: Rửa đĩa 3 lần bằng nước rửa, mỗi lần rửa cho vào mỗi giếng 300µl

Bước 3: Nhổ 100µl Conjugate vào tất cả các giếng

Đậy nắp, cho đĩa vào trong hộp ấm, để ở tủ ấm 37°C/1h

Sau đó rửa đĩa 3 – 5 lần bằng nước rửa, mỗi lần rửa cho vào mỗi giếng 300 µl

Bước 4: Nhổ 100µl TMB

Để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút

Bước 5: Nhỏ 100μl dung dịch dừng phản ứng vào các giếng.

Bước 6: Kết quả được đọc trên máy ELISA Titertek Multiskan Plus MKII ở bước sóng 450nm.

Tính kết quả phản ứng dựa trên sự so sánh giá trị OD của huyết thanh đối chứng và OD của huyết thanh kiểm tra theo công thức sau:

$$\text{Value (\%)} = \frac{\text{OD}_M - \text{OD}_N}{\text{OD}_P - \text{OD}_N} \times 100\%$$

$\text{OD}_M$ : giá trị OD của mẫu huyết thanh kiểm tra.

$\text{OD}_N$ : giá trị OD của mẫu huyết thanh đối chứng âm.

$\text{OD}_P$ : giá trị OD của huyết thanh đối chứng dương.

Giá trị (%)	< 20%	20% - 30%	> 30%
Kết quả	Âm tính	Nghi ngờ	Dương tính

Khi kết quả xét nghiệm là dương tính, chúng ta kết luận trong huyết thanh của trâu bò kiểm tra có kháng thể kháng virus LMLM do nhiễm virus tự nhiên. Như vậy, kết luận trâu bò kiểm tra đã bị nhiễm virus LMLM.

Với những mẫu nghi ngờ cần lấy máu xét nghiệm lại sau 15 ngày.

*Sơ đồ đĩa phản ứng CHEKIT FMD - 3ABC - BO - PO dùng cho huyết thanh lợn.*

Tương tự như sơ đồ phản ứng của CHEKIT FMD - 3ABC - BO - OV chỉ khác ở độ pha loãng mẫu huyết thanh của lợn là 1:10. Và đọc kết quả ở bước sóng 405nm. Còn các bước tiến hành phản ứng thì tương tự.

### Câu hỏi ôn tập chương

1. Trình bày hiểu biết của anh (chị) về sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể?
2. Trình bày phản ứng ngưng kết và những ứng dụng trong chẩn đoán?
3. Trình bày phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) trong chẩn đoán?
4. Trình bày phản ứng kết tủa và những ứng dụng trong chẩn đoán?
5. Phản ứng kết hợp bô thể, ứng dụng?
6. Các phương pháp làm phản ứng trung hòa?
7. Trình bày phản ứng miễn dịch huỳnh quang và ứng dụng của nó?
8. Trình bày hiểu biết chung về phản ứng ELISA?
9. Các dạng cơ bản của phản ứng ELISA - ứng dụng?

## Chương 7

# MIỄN DỊCH HỌC ỨNG DỤNG TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH TRUYỀN NHIỄM CỦA VẬT NUÔI

**Mục tiêu:** Năm được những kiến thức cơ bản và ứng dụng kháng huyết thanh trong điều trị bệnh truyền nhiễm.

**Kiến thức trọng tâm:**

- Ứng dụng của kháng thể dịch đặc hiệu trong điều trị bệnh
- Sản xuất kháng huyết thanh và các chế phẩm kháng thể ứng dụng để chẩn đoán và điều trị

### I. LỊCH SỬ PHÁT HIỆN

Năm 1890 Emil von Behring và Kitasato thông báo thí nghiệm: tiêm độc tố vi khuẩn Bạch hầu với liều nhỏ cho thỏ, sau ít ngày lấy huyết thanh thỏ trộn với độc tố bạch hầu với liều gây chết rồi tiêm cho thỏ khác thì thỏ này không chết, các tác giả đã làm một thí nghiệm tương tự với độc tố uốn ván và đi đến kết luận: huyết thanh thỏ được gây miễn dịch với độc tố có khả năng trung hòa độc tố và có tính đặc hiệu cao.

Hiệu quả trung hòa được quyết định bởi các đoạn protein có trong huyết thanh động vật và có thể kết tủa chúng với  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , đó chính là Globulin miễn dịch (Ig). Huyết thanh chứa Ig được gọi là huyết thanh miễn dịch hay kháng huyết thanh.

Huyết thanh miễn dịch và tế bào miễn dịch là vũ khí duy nhất bảo vệ người, động vật chống lại vi khuẩn và độc tố của vi khuẩn một cách đặc hiệu trong khi kháng sinh không có tác dụng với các đối tượng này.

Để có được một lượng lớn huyết thanh miễn dịch, người ta thường gây miễn dịch cho ngựa. Việc sử dụng huyết thanh miễn dịch từ ngựa kháng dại, kháng bạch hầu, kháng nọc rắn trong điều trị đã cứu sống được rất nhiều người, đó là một dấu mốc trong lịch sử Y học. Tuy nhiên với người, đây là miễn dịch dị loài nên dễ có tai biến khi dùng.

Sau này người ta đã tinh chế được Ig miễn dịch nhờ phương pháp kết tủa Ethanol lạnh của Cohn và được hoàn thiện bởi Kistler.

Năm 1884, Metchnikoff phát hiện ra hiện tượng thực bào là phương tiện bảo vệ cơ thể.

Năm 1887 thuyết dịch thể ra đời. Học thuyết chỉ ra rằng khả năng miễn dịch của cơ thể là do chất nào đó có trong huyết thanh và dịch tiết của cơ thể.

Năm 1890, Koch phát hiện phản ứng của da khi tiếp xúc với kháng nguyên của vi khuẩn lao là hình thái quá mẫn muộn trong đó tế bào tham gia là chủ yếu.

Năm 1891, Emin Behring (Đức) đã nghiên cứu sản xuất ra kháng huyết thanh uốn ván và kháng huyết thanh bạch hầu, cứu sống hàng triệu trẻ em. Đây là cơ sở để sản xuất ra các kháng huyết thanh phòng bệnh khác.

Năm 1901, thuyết kháng thể được ra đời

Năm 1917, Landsteiner phát hiện những chất có phân tử lượng nhỏ (Haptens) cũng có tính kháng nguyên đã thúc đẩy hóa miễn dịch phát triển mạnh.

Năm 1929, Heidelberger đưa ra phương pháp Huyết thanh học định lượng

Năm 1938, Kabat dùng điện di để phân tách các thành phần huyết thanh để xác định kháng thể nằm ở vùng globulin.

Năm 1958, công trình của Porter về cấu trúc globulin miễn dịch

Năm 1958, công trình của Ederman về trình tự axit amin của globulin miễn dịch

Năm 1975, Milstein và Kohler đưa ra phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật liên hợp tế bào Myeloma với tế bào lympho B hoạt hoá của chuột.

Hai mươi năm sau (1941 - 1942) bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang, Coons nhận thấy sự hiện diện của kháng nguyên, kháng thể nằm bên trong tế bào

Năm 1943, Landsteiner phân miễn dịch thành 2 loại: dịch thể và tế bào

Năm 1958, Medawar đã chứng minh các lympho là những tế bào có khả năng miễn dịch. Wesslen (1952), Bloom (1967) nhận thấy phản ứng quá mẫn muộn có thể truyền thụ động bằng các lympho bào đã mẫn cảm

Năm 1967, Mackanes và Blanden với nhiều nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh:

- Phản ứng quá mẫn muộn, phản ứng ghép chỉ có thể truyền thụ động bằng tế bào mà không có thể bằng huyết thanh.

- Phản ứng miễn dịch dịch thể chỉ có thể truyền thụ động bằng huyết thanh mà không có thể bằng tế bào

## **II. KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU VÀ ÚNG DỤNG**

Kháng thể đặc hiệu là chất được cơ quan, tế bào miễn dịch sản xuất ra khi có sự kích thích của kháng nguyên, chúng sẽ tương tác với kháng nguyên theo nhiều cách khác nhau, mục đích cuối cùng là vô hiệu hóa và loại trừ kháng nguyên ra khỏi cơ thể

Kháng thể đặc hiệu gồm có: kháng thể dịch thể đặc hiệu và kháng thể tế bào

### **2.1. Úng dụng kháng thể dịch thể đặc hiệu trong chẩn đoán bệnh**

#### **2.2.1. Trong chẩn đoán ung thư**

\* *In vitro* (trong phòng thí nghiệm):

Các nhà nghiên cứu đã dùng các kỹ thuật khác nhau để xác định kháng nguyên trên bề mặt tế bào ung thư bằng các kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh của bệnh nhân hoặc súc vật thí nghiệm đã có miễn dịch đối với ung thư đó.

Các kỹ thuật thường được sử dụng trong chẩn đoán ung thư là: phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp với kháng kháng thể đặc hiệu được đánh dấu chất huỳnh quang, đồng vị phóng xạ, enzim.

Gần đây người ta dùng kháng thể đơn Clon để xác định loại tế bào ở các giai đoạn biệt hoá khác nhau của Leucosis, Lymphoma, các dấu ấn đặc biệt có trong từng mô ung thư, số lượng của các tế bào và các phân tử protein tham gia vào đáp ứng miễn dịch chống ung thư như kháng thể chống phân tử MHC của TCD4 (Th), CD3 của TCD8 (Tc).

\* *In vivo* (trong cơ thể sống):

Kháng thể đặc hiệu được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ được sử dụng để tiêm vào cơ thể. Kháng thể này sẽ tập trung tại nơi có kháng nguyên đặc hiệu. Theo dõi vị trí tập trung phóng xạ có thể xác định được mô bị ung thư.

Thử nghiệm ở động vật nhằm theo dõi sự phát triển của khối u dạng lympho bằng cách tiêm kháng thể gây độc phụ thuộc cùng với tế bào ung thư và đại thực bào (có MHC phù hợp) khối u sẽ không phát triển hơn nếu không có hiện tượng tạo thuận xảy ra.

Giá trị của kháng thể đơn clon *in vivo* rất lớn. Người ta có thể xác định một số kháng nguyên ung thư với một lượng rất ít trên tế bào bằng các gắp kháng thể đơn Clon với các chất đánh dấu rồi tiêm vào cho cơ thể để phát hiện một số ít tế bào di căn hoặc còn sót sau phẫu thuật hoặc sau lý trị liệu. Có thể gắp kháng thể đơn clon với các thuốc diệt tế bào ung thư. Khi tiêm phức hợp kháng thể và thuốc vào cơ thể, kháng thể sẽ đưa thuốc vào nơi có ung thư, do đó có thể tránh được tác dụng của thuốc vào mô bình thường.

#### **2.1.2. Trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm (xem chương 7)**

### **2.2. Úng dụng kháng thể dịch thể đặc hiệu trong điều trị bệnh**

#### **2.2.1. Trong điều trị ung thư**

#### ❖ Trong điều trị dự phòng các bệnh ung thư

Trước đây, các biện pháp miễn dịch được sử dụng để điều trị ung thư đều mang tính chất không đặc hiệu, các chất thường được dùng là BCG, Levamisol và một số dược liệu khác. Mười năm gần đây nhờ những tiến bộ khoa học trong lĩnh vực ung thư học, người ta đã sử dụng kết hợp cả hai phương pháp không đặc hiệu lẫn các phương pháp hứa hẹn mang tính chất đặc hiệu chống ung thư.

##### + Kích thích các hiệu ứng miễn dịch

Phòng vệ các ung thư do virus bằng cách chủng vacxin với những kháng nguyên virus. Ví dụ: Leukemia ở mèo, bệnh Marek ở gà và virus viêm gan B trong ung thư gan ở người.

Kích thích miễn dịch không đặc hiệu với các tá chất, BCG... không liên quan đến ung thư. Trong thực nghiệm có thể kích thích không đặc hiệu cho chuột ghép fibrosarcoma bằng cách tiêm liều thấp kháng thể chống CD3 khoảng  $4\mu\text{l}$  nhưng ngược lại với liều  $40\mu\text{l}$  lại có tác dụng ức chế miễn dịch được dùng chống thải ghép.

##### + Kháng thể trị liệu

Sử dụng các kháng thể chống idiotyp dùng cho lymphoma tế bào B (kháng thể kháng idiotyp gây miễn dịch cho thỏ với ung thư tế bào B của bệnh nhân). Các tế bào lymphoma cố định bồi thể hoặc kháng thể phụ thuộc bị diệt.

Sử dụng các kháng thể chống trực tiếp receptor của yếu tố phát triển (IL - 2R) dùng trong điều trị thực nghiệm ung thư lympho T người như HTLV - 1 liên quan với leukemia và lymphoma. IL - 2 có tác dụng kích thích phát triển tế bào ung thư này do các kháng thể gây điều hoà hoặc phong bế chức năng của IL - 2R. Mặt khác, kháng thể còn có tác dụng ly giải các tế bào ung thư có biểu lộ IL - 2R.

Các kháng thể đặc hiệu đối với sản phẩm là oncogen: kháng thể đơn clon chống protein bề mặt tế bào được mã bởi new oncogen, làm cho các tế bào chuyển dạng.

Các kháng thể chống ung thư gắn với phân tử gây độc, chất phóng xạ và dược phẩm cũng được sử dụng trong miễn dịch trị liệu liều cho bệnh nhân ung thư và ung thư thực nghiệm.

Ví dụ: các độc tố như riocin hoặc độc tố thương hàn đã ức chế mạnh tổng hợp protein. Với 1 liều rất thấp gắn với kháng thể đặc hiệu ung thư sẽ trở thành độc tố miễn dịch.

Các kháng thể công hợp đa loài (heteroconjugate antibodies); các tế bào hiệu ứng gây độc tìm đến đích có trên bề mặt tế bào ung thư bằng các kháng thể công hợp đa loài. Điều đó có nghĩa là một kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên gắn đồng hóa trị với kháng thể chống protein có trên tế bào hiệu ứng gây độc (NK hoặc CTL). Như vậy các kháng thể công hợp đa loài đã giúp các tế bào NK hoặc CTL đến các tế bào đích (tế bào ung thư). Ví dụ kháng thể chống CD3 trên bề mặt CTL sẽ gắn với kháng thể chống protein trên bề mặt tế bào ung thư, làm ly giải tế bào ung thư của CTL. Kháng thể chống CD3 không những đưa CTL đến với tế bào ung thư mà còn hoạt hoá CTL.

Cộng hợp của các kháng thể và hormon: Các kháng thể chống CD3 gắn với hormon có tác dụng kích thích melanocyte, làm tăng khả năng phá huỷ của CTL đối với các tế bào melanoma người gắn hormon.

#### ❖ Miễn dịch học trị liệu vay mượn

Đây là phương pháp truyền các tế bào miễn dịch nuôi cấy đã có phản ứng chống ung thư cho vật chủ bị ung thư đó. Có 2 phương pháp được dùng thử trong lâm sàng.

Trị liệu bằng NK hoạt hoá bởi lymphokin (Lymphokin activated killer cell - LAK cell). Người ta nuôi cấy lympho bào từ bệnh nhân bị ung thư bạch cầu trong môi trường có IL - 2 có đậm độ cao. Sau 3 - 5 ngày sẽ xuất hiện tế bào LAK, tiêm tế bào LAK trả lại cho bệnh nhân ung thư. Tế bào LAK có khả năng làm tan các tế bào ung thư mà không làm tan các tế bào thường.

Trị liệu bằng tế bào lympho thâm nhiễm trong khối u (tumor - infiltrating - lymphocyte therapy) sau khi nuôi cấy in vitro với IL - 2 (như trên).

❖ *Cytokin trị liệu*

Các cytokin được dùng để trị liệu ung thư với mục đích là làm tăng một hoặc nhiều thành phần chức năng của miễn dịch tế bào. Hiệu quả của cytokin không đặc hiệu cho các tế bào hiệu ứng chống ung thư.

Các Cytokin đang được dùng là:

IL - 2 là glycoprotein có khả năng hoạt hoá tế bào NK hoặc CTL và biệt hoá LAK, IL - 2 có thể gây độc, gây sốc và sốt cho cơ thể. Hiệu quả gây độc có thể gián tiếp do hoạt tính của IL - 2 trên các tế bào lympho khác làm tăng sản xuất TNF, IFN $\gamma$  và lymphot oxin, góp phần làm tiêu diệt các tế bào ung thư.

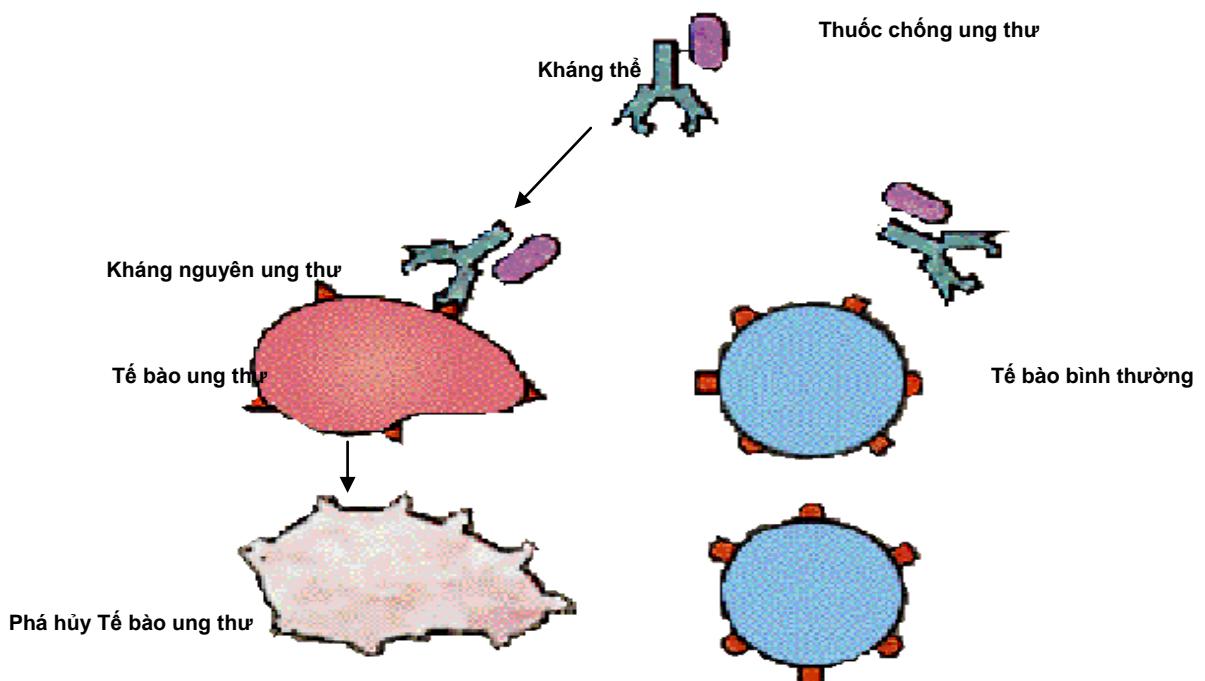
IL - 4 cũng có khả năng hoạt hoá CTL và đang được sử dụng trong lâm sàng. Nếu sử dụng cả hai IL - 2, IL - 4 thì hiệu quả điều trị ung thư sẽ tăng lên.

TNF (Tumor necrosis factor - Yếu tố hoại tử mô ung thư), được dùng để điều trị các ung thư nguyên phát. TNF có tác dụng chống ung thư in vitro, nhưng nó gây nhiều hậu quả không mong muốn và độc tính của nó cao, nhất là những liều đủ để diệt tế bào ung thư in vivo.

Alpha interferon (IFN $\alpha$ ). IFN $\alpha$  có tác dụng chống tăng sinh tế bào in vitro, làm tăng khả năng ly giải tế bào ung thư của tế bào NK và tăng bộc lộ MHC I của nhiều loại tế bào khác nhau.

IFN $\gamma$  được dùng để điều trị ung thư mô tạo máu và các ung thư chắc nhưng hiệu quả điều trị còn hạn chế. IFN $\gamma$  có tác dụng hoạt hoá tế bào NK và đại thực bào làm tăng bộc lộ phân tử MHC, tăng điều hòa đáp ứng miễn dịch để tăng khả năng chống ung thư.

Các yếu tố phát triển kích thích tạo máu (hematopoietic growth factors) bao gồm các yếu tố kích thích tạo clon đại thực bào, bạch cầu hạt (GM - CSF) và yếu tố kích thích tạo clon bạch cầu hạt (G - CSF). Các yếu tố này có tác dụng làm tăng đáp ứng miễn dịch chống ung thư, rút ngắn thời gian giảm bạch cầu trung tính sau hoá trị liệu hoặc sau ghép tủy xương tự thân vì chúng có tác dụng kích thích trưởng thành bạch cầu hạt.



Hình 7.1: Các cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư

Gần đây nhờ sự tiến bộ của kỹ nghệ gen học, trong thực nghiệm người ta đã thành công trong việc gây nhiễm cho các tế bào ung thư gen sinh cytokin IL - 2 hoặc IL - 4 hoặc IFN...

trong in vitro. Sau đó ghép các tế bào này vào súc vật bị ung thư. Bằng cách này tại mô ung thư các cytokin sẽ được sinh ra rất nhiều, chúng kích thích miễn dịch đặc hiệu đồng thời ức chế khối u phát triển. Hy vọng trong tương lai phương pháp này được sử dụng và có nhiều kết quả trong điều trị ung thư ở người.

### 2.2.2. *Ứng dụng kháng huyết thanh trong điều trị bệnh truyền nhiễm*

#### ❖ *Nguyên lý:*

Khi mắc bệnh cấp tính, cơ thể động vật chưa có miễn dịch, trong khi đó mầm bệnh lại tấn công ồ ạt nên có thể sử dụng kháng huyết thanh đưa vào cơ thể để tạo miễn dịch thu được nhân tạo bị động, giúp con vật thoát cơn nguy hiểm.

#### ❖ *Các loại kháng huyết thanh dùng trong điều trị bệnh:*

##### \* *Kháng huyết thanh dị loài:*

Là kháng huyết thanh được sản xuất từ động vật khác loài. Trước đây khi chưa có kháng sinh, người ta sử dụng huyết thanh ngựa hay cừu đã được siêu mẫn cảm với vi sinh vật gây bệnh để điều trị các bệnh truyền nhiễm. Hay dùng là huyết thanh chống uốn ván, chống hoại tử sinh hơi và chống nọc các loại rắn độc. Huyết thanh dị loài đã giúp cứu sống được nhiều ca bệnh nguy kịch, nhưng do sử dụng liều cao 200ml/lần nên hay sinh ra các biến chứng như là sốc phản vệ (do hình thành IgE) hay bệnh huyết thanh (do hình thành phức hợp miễn dịch), nguy hiểm cho người và động vật sử dụng. Sau này để giảm lượng tiêm và hạn chế tác dụng không mong muốn, người ta tiến hành chiết tách lấy phần  $\gamma$ -globulin để điều trị. Nhưng huyết thanh vẫn có bản chất khác loài nên khả năng sinh sốc phản vệ rất cao, nhất là khi tiêm lần sau mà không tiêm giải mẫn cảm trước. Do vậy các loại huyết thanh dị loài rất hạn chế dùng, hiện nay chỉ còn sử dụng nhiều là huyết thanh chống nọc độc của rắn.

##### \* *Kháng huyết thanh cùng loài:*

Là kháng huyết thanh được sản xuất từ những cá thể trong cùng một loài, như thế tránh được sốc phản vệ hay bệnh huyết thanh. Huyết thanh cùng loài được chế từ gia súc lớn (ngựa, bò, lợn) hoặc từ lòng đỏ trứng gà bằng cách dùng vi khuẩn hoặc virus đã làm mất khả năng gây bệnh để gây tối miễn dịch cho chúng rồi chắt lấy huyết thanh. Hoặc có thể được chiết tách từ những cá thể cùng loài mắc bệnh nhưng đã qua khỏi, hiệu giá kháng thể cao và rất đặc hiệu với bệnh.

Kháng huyết thanh có thể là đơn giá chống lại một loại mầm bệnh nhất định (kháng huyết thanh dịch tả lợn, kháng huyết thanh dại...), có thể là huyết thanh đa giá chống được nhiều mầm bệnh khác nhau (kháng thể chế từ lòng đỏ trứng gà chứa kháng thể chống Gumboro, Newcastle, viêm thanh khí quản truyền nhiễm,...). Có thể là kháng huyết thanh chống mầm bệnh là virus, vi khuẩn, có thể là huyết thanh kháng độc tố (kháng độc tố uốn ván).

#### ❖ *Nguyên tắc dùng kháng huyết thanh:*

- Sau khi tiêm kháng huyết thanh vài giờ thì cơ thể có miễn dịch. Vì vậy chỉ dùng kháng huyết thanh khi cần phòng bệnh khẩn cấp như tiêm cho gia súc trong ổ dịch nhưng chưa phát bệnh ở vùng có nguy cơ bị dịch uy hiếp hay tiêm phòng cho gia súc cần xuất cảng ngay hoặc dùng kháng huyết thanh trong trường hợp cần chữa bệnh truyền nhiễm khẩn cấp.

Ví dụ: Dùng kháng huyết thanh dại để chữa bệnh cho người vừa bị chó nghi dại cắn.

Với người, khi bị chó dại cắn phải xử lý vết thương: rửa vết cắn với xà phòng đặc, sát trùng vết thương bằng cồn iod 5% hoặc cồn 70°, sau đó tiêm ngay kháng huyết thanh dại. Chú ý không để muộn quá 72 giờ, bởi vì thời điểm đó virus đã xâm nhập vào tế bào thần kinh nên kháng thể không có tác dụng.

Liều lượng: Loại chế trên ngựa tiêm 40UI/1kgP.

Loại chế từ người tiêm 20 UI/1kgP.

Tiêm bắp quanh vết cắn.

- Thời gian miễn dịch do tiêm huyết thanh rất ngắn (1 đến 3 tuần). Vì vậy sau khi tiêm huyết thanh 10 ngày cần phải tiêm vacxin để tạo miễn dịch chủ động, lâu dài.

- Liều lượng kháng huyết thanh dùng để tiêm phòng bằng một nửa liều chữa bệnh mỗi lần.
- Không nên tiêm kháng huyết thanh và vacxin tương ứng cùng một lúc, vào một chỗ trên cơ thể. Chỉ tiêm vacxin từ 8 - 10 ngày sau khi tiêm kháng huyết thanh.
- Kháng huyết thanh cần phải đảm bảo vô trùng, cần phải kiểm tra phẩm chất huyết thanh trước khi dùng để phòng các phản ứng phụ bất lợi có thể xảy ra.

Kháng huyết thanh cần được bảo quản từ 2°C - 8°C.

❖ *Globulin miễn dịch:*

Globulin miễn dịch (IgG) dùng trong điều trị là sản phẩm được điều chế hoặc từ máu động vật (thường là ngựa) hoặc từ máu người đã được miễn dịch.

Globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật như huyết thanh kháng độc tố uốn ván, huyết thanh kháng dại, huyết thanh kháng nọc rắn là IgG dị loài.

\* IgG có 2 loại:

IgG không đặc hiệu: được tách chiết từ huyết tương của máu người hoặc động vật có chứa một vài kháng thể kháng lại một vài vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm trong cộng đồng. Ví dụ: IgG được chế từ máu người mẹ để chữa bệnh sởi cho trẻ em.

IgG đặc hiệu: được tách chiết từ huyết tương của máu người hoặc động vật đã cảm nhiễm với vi sinh vật tương ứng đã qua khỏi hoặc từ máu của người và động vật được tiêm vacxin tương ứng trong thời gian gần nhất. Ví dụ: IgG được chế từ lòng đỏ trứng gà để phòng bệnh Gumboro.

\* IgG 7S và IgG 5S:

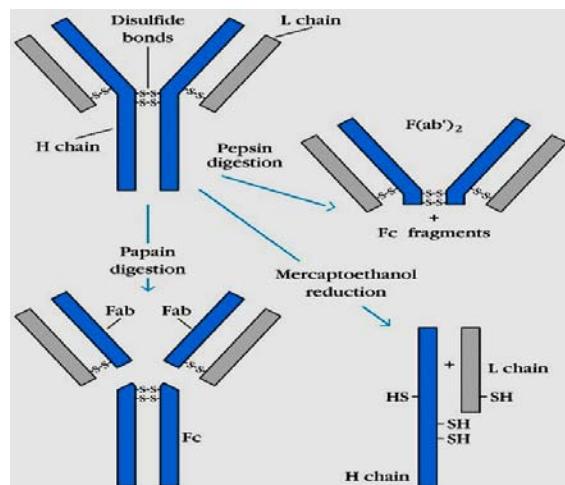
**Bảng 7.1: Tính chất khác nhau của IgG 7S và IgG 5S**

Tính chất	IgG 7S	IgG 5S
- Các phân cấu trúc	Fab và Fc	Fab
- Trọng lượng phân tử	150.000 Dalton	100.000 Dalton
- Thời gian bán hủy	8 - 28 ngày	12 - 36 giờ
- Giảm tổng hợp kháng thể do bão hòa các thụ thể Fc trên tế bào B	++	-
- Cách hoạt hóa bổ thể:		
+ Con đường cổ điển	++	-
+ Con đường cạnh	+	++
- Tăng chuyển hóa Ig G	+	-
- Cơ chế kháng lại độc tố:		
+ Trung hòa	++	++
+ Loại bỏ	++	++
- Kháng vi khuẩn	++	++
- Tác động thực bào		
+ Với đại thực bào	++	++
+ Với bạch cầu hạt:		
Qua tiếp nhận Fc	++	-
Qua tiếp nhận C3b	++	++
- Tiêm tĩnh mạch	++	++
- Dùng liều cao nhiều lần	+	++
- Thời gian đạt nồng độ tối đa trong máu	+	++
- Khả năng thâm vào mô tế bào	+	++
- Khả năng loại bỏ kháng nguyên	Chậm	Nhanh
- Loại bỏ tế bào tổng hợp	Lympho B	Lympho B

Globulin dùng lặp lại nhiều lần sẽ gây ra các tác dụng phụ bất lợi như sốc phản vệ hay bệnh huyết thanh. Để tránh các phản ứng miễn dịch không mong muốn, người ta thường tinh chế lấy thành phần IgG, có 2 loại IgG tinh chế là IgG 7S và IgG 5S, IgG 7S là IgG nguyên vẹn, IgG 5S là IgG đã bị enzyme cắt bỏ phần Fc. Các enzyme thường dùng để tác động vào IgG là plasmin, trypsin, papain, pepsin.

Tác động của plasmin cắt phân tử IgG ở vị trí đặc hiệu phía trên cầu nối disulfit, pepsin cắt phân tử IgG ở vị trí dưới cầu nối disulfit, tác dụng của pepsin tạo ra chế phẩm IgG 5S. Trong quá trình điều chế, bằng kỹ thuật li tâm đặc biệt của Svedberg, phân tử IgG nguyên vẹn di chuyển đến vùng 7 nên gọi là IgG 7S còn phân tử IgG đã cắt Fc di chuyển đến vùng 5 nên gọi là IgG 5S.

Tuy nhiên, trong quá trình điều chế, không tránh khỏi việc hình thành các phân tử kép (dimer) hoặc đa phân tử (polymer), đó là kết quả của việc tự kết vón (aggregation) của các mảnh Fc. Các mảnh Fc có trong những kết vón này sẽ nhận biết C1q của hoạt hóa bô thể theo con đường cổ điển, tạo ra sự hoạt hóa bô thể một cách ồ ạt và sẽ giải phóng ra các yếu tố hoạt mạch gây nên phản ứng phản vệ một cách nghiêm trọng. Do vậy, trong điều chế IgG 5S, phải đạt được sự tinh khiết của sản phẩm là chỉ có IgG 5S và không thể lẫn Fc kết vón.



**Hình 7.2. IgG 7S tác động bởi enzym papain và pepsin**

#### \* Ứng dụng lâm sàng của Ig

Có thể tập hợp các ứng dụng lâm sàng của Ig trong ba nhóm mục đích:

+ **Phòng và điều trị nhiễm trùng:** Tạo miễn dịch thụ động, cung cấp nhanh chóng cho cơ thể kháng thể để bắt hoạt vi sinh vật hoặc độc tố của vi sinh vật gây bệnh.

+ **Điều hòa miễn dịch:** Với tác dụng điều hòa miễn dịch, trước đây Ig được khuyến nghị dùng cho bệnh xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn dịch cấp ở trẻ em và bệnh Kawasaki. Các bệnh được chỉ định dùng IgG là:

Bệnh đại

Bệnh bạch cầu lympho mạn tính

Bệnh Gumboro

Bệnh thiếu hụt miễn dịch tiên phát

Bệnh thiếu hụt dưới lớp IgG

Bệnh giảm bạch cầu trung tính tự miễn

+ **Điều trị thay thế**

#### **Điều trị thay thế thiếu hụt miễn dịch tiên phát**

**Giảm  $\gamma$  globulin máu tiên phát:** Ig có hiệu quả điều trị mọi trường hợp suy giảm bẩm sinh năng khả năng sinh kháng thể bao gồm cả 5 lớp kháng thể.

**Thiếu hụt tính đặc hiệu kháng thể đối với những trường hợp không có khả năng sản sinh kháng thể chống lại kháng nguyên là polysaccharit** thì Ig được chỉ định để điều trị trong trường hợp này.

**Thiếu hụt ái lực kháng thể:** Trong một số trường hợp do thiếu hụt tạm thời về ái lực của kháng thể IgG đối với các kháng nguyên đặc hiệu, làm cho khả năng trung hòa kháng nguyên của IgG kém mặc dù nó vẫn được sản xuất bình thường. Thay vì thực bào các kháng nguyên gây bệnh các kháng thể ái lực thấp này tạo ra những phức hợp miễn dịch lưu hành hòa tan, do đó làm suy yếu quá trình loại bỏ kháng nguyên. Trong trường hợp này, dùng IgG đa giá ái lực

cao để điều trị sẽ làm thay đổi tình trạng bệnh tốt hơn. Nhờ có IgG ngoại sinh cạnh tranh với IgG nội sinh ái lực thấp trong cơ chế gắn với kháng nguyên, làm tăng thực bào phức hợp kháng nguyên kháng thể.

Thiếu hụt dưới lớp IgG mặc dù IgG vẫn được tổng hợp bình thường, thậm chí cao hơn bình thường nhưng vẫn xảy ra nhiễm khuẩn tái phát nặng. Nguyên nhân có thể là do sự thiếu hụt có chọn lọc các dưới lớp IgG. Những trường hợp này cần phải được điều trị bằng immunoglobulin.

#### *Điều trị thay thế thiếu hụt miễn dịch thứ phát*

IgG trong điều trị bệnh bạch cầu lympho mãn tính: các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng những trường hợp được điều trị bằng IgG 7S với liều 400mg/kg thể trọng trong 3 tuần liên tiếp ít bị nhiễm trùng so với nhóm dùng giả dược placebo với P=0,001.

IgG trong điều trị hội chứng thiếu hụt miễn dịch mắc phải: hội chứng này được đặc trưng bởi giảm toàn bộ số lượng và chức năng của tế bào lympho T, làm cho người bệnh dễ bị nhiễm trùng do khả năng đáp ứng miễn dịch kém. Nhưng khi sử dụng IgG với liều 400mg/kg thể trọng kéo dài hàng tháng giúp bệnh nhân chống được nhiễm trùng cơ hội.

IgG trong đa chấn thương (polytrauma) sử dụng IgG 7S với liều 400mg/kg thể trọng giúp tránh được các trường hợp viêm phổi do vi khuẩn Gram (-).

IgG được ứng dụng trong điều trị mất protein nguyên phát

Chú ý: chống chỉ định IgG đối với các trường hợp mất protein thứ phát như hội chứng thận hư, bệnh viêm ruột mãn tính, bong nặng.

### **III. SẢN XUẤT KHÁNG THỂ DỊCH THỂ ĐẶC HIỆU**

Những yếu tố đầu tiên cho việc sản xuất kháng thể đạt hiệu quả là:

- Có những quy trình thao tác chung viết bằng văn bản.
- Có tài liệu hướng dẫn về sản xuất rõ ràng cho từng loại kháng thể được sản xuất.
- Sự tôn trọng tuyệt đối các hướng dẫn trên trong quá trình sản xuất.

**Các bước sản xuất kháng thể bao gồm:**

#### **3.1. Lập kế hoạch**

Mỗi loại kháng thể được sản xuất trong một cơ sở phải có kế hoạch sản xuất chi tiết mô tả các bước của quy trình, số lượng sản phẩm cần sản xuất, thời gian tiến hành...

Kế hoạch được lập là tài liệu trong quy trình sản xuất chuẩn được chi tiết hóa.

#### **3.2. Tài liệu của quy trình sản xuất**

+ Quy trình kỹ thuật chi tiết là tài liệu sản xuất cho mỗi loại kháng thể.

Tài liệu phải nêu rõ nguyên lý sản xuất, các công đoạn sản xuất và phương pháp kiểm tra sản phẩm sau mỗi công đoạn.

+ Tài liệu nêu rõ:

- Nguồn gốc của kháng nguyên để gây miễn dịch.
- Động vật và tiêu chuẩn của động vật dùng sản xuất kháng thể.
- Trình tự sản xuất
- Kiểm nghiệm sản phẩm

Mỗi công đoạn đều phải mô tả chi tiết các thao tác kỹ thuật, phương pháp đánh giá sản phẩm của từng công đoạn.

#### **3.3. Quy trình sản xuất kháng thể đặc hiệu**

##### **3.3.1. Nguyên lý chung của quá trình tạo miễn dịch cao cho động vật**

- Mỗi loại kháng thể đặc hiệu được hệ miễn dịch của động vật sản sinh ra khi có kích thích của kháng nguyên của một loại vi sinh vật dùng làm giống gốc

- Để có hàm lượng kháng thể cao phải gây tối thiểu miễn dịch cho động vật theo nguyên lý chung:

+ Dùng vacxin gây miễn dịch cơ sở

+ Gây tối thiểu miễn dịch bằng cách nhắc lại nhiều lần bằng vacxin hoặc công cường độc với liều tăng dần

### 3.3.2. Yêu cầu về nguyên liệu, động vật

+ *Nguyên vật liệu, hóa chất:* nguyên vật liệu, hóa chất được sử dụng trong quá trình sản xuất kháng thể phải đảm bảo yêu cầu kỹ thuật và phải được phê chuẩn của cơ quan cấp giấy chứng nhận có thẩm quyền quốc gia.

+ Động vật dùng trong sản xuất và kiểm định: phải đạt tiêu chuẩn và yêu cầu kỹ thuật

## IV. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG HUYẾT THANH

### 4.1. Quy trình sản xuất kháng huyết thanh dại

(Viện các chế phẩm sinh học Trường xuân, Trung Quốc)

Kháng huyết thanh dại được sản xuất từ huyết thanh của ngựa đã được gây miễn dịch bằng virus dại cố định.

Kháng huyết dại là globulin miễn dịch dạng dung dịch hoặc dạng đông khô.

*Sơ đồ tóm tắt sản xuất kháng huyết thanh dại gồm các bước sau:*

Bước 1: Gây miễn dịch cho ngựa

- Gây miễn dịch cơ sở: dùng kháng nguyên là virus dại vô hoạt
- Gây tăng miễn dịch: dùng vaccine nhắc lại.

Bước 2: Lấy máu để thu huyết tương

Khi huyết thanh ngựa có nồng độ kháng thể dại đạt 100UI/ml, lấy máu (cho chất chống đông và kháng sinh) rồi loại bỏ hồng cầu để thu huyết tương.

Bước 3: Tiêu hoá huyết tương

Pha loãng huyết tương 2 - 3 lần. Để ở nhiệt độ 30°C, điều chỉnh pH, thêm pepsin.

Bước 4: Quá trình tinh chế

- + Làm biến tính bằng nhiệt để loại bỏ Fibrin, Albumin, mảnh Fc
- Đun nóng 57 - 59°C, thêm Amonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15%
- Lọc loại bỏ chất tủa, giữ lại phần nước nổi
- + Tạo tủa
  - Cho thêm Amonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20% để gây tủa
  - Giữ lại tủa, loại bỏ phần nước nổi

Bước 5: Cô đặc, gạn lọc, vô trùng  $\text{F(ab)}_2$

- + Thêm nhôm 5% để hấp phụ chất gây sốt và protein tạp.
- + Cô đặc  $\text{F(ab)}_2$  bằng phương pháp siêu lọc
- + Cho thêm chất dinh dưỡng vào rồi lọc vô trùng

Bước 6: Kiểm định sản phẩm

- + Hoá lý
- + Vô khuẩn
- + An toàn
- + Công hiệu
- + Hàm lượng  $\text{F(ab)}_2$

Bảng 7.2: Tiêu chuẩn kỹ thuật của kháng huyết thanh dại

Thử nghiệm	Tiêu chuẩn kỹ thuật
Trạng thái khi lắc	Trong, màu trắng
Nhận dạng	Đạt
Hàm lượng Protein	< 170 g/l
pH	6 - 7
Muối	7,5 - 9,5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	< 0,1 g/l
Chloroform	< 0,5 % (ml/ml)
Albumin	Không có
$\text{F(ab)}_2$	> 60%
Vô khuẩn	Đạt
An toàn	Đạt
Chí nhiệt tố	Nhiệt độ tăng < 1,3°C

Nguyên liệu tương tự nhóm máu A	< 4µg/ml
Công hiệu	>200 UI/ml
Kết luận	Đạt

#### 4.2. Quy trình chế tạo IgG thỏ đặc hiệu

Thỏ là động vật hay được sử dụng để sản xuất kháng thể dịch thể đặc hiệu dùng trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm. Ví dụ: Bệnh dại, bệnh dịch tả lợn, bệnh tụ huyết trùng

*Qui trình sản xuất IgG thỏ đặc hiệu gồm các bước sau:*

*Bước 1: Gây miễn dịch cho thỏ*

- Gây miễn dịch cơ sở: dùng kháng nguyên là virus hoặc vi khuẩn vô hoạt.
- Gây tối miễn dịch: dùng vaccine nhắc lại và kiểm tra hàm lượng kháng thể

*Bước 2: Thu hoạch huyết thanh*

- Khi huyết thanh thỏ có nồng độ kháng thể cao. Ví dụ: Trong sản xuất kháng huyết thanh tụ huyết trùng, kiểm tra máu thấy hiệu giá phản ứng IHA đạt  $>1/160$ , tiến hành lấy máu thỏ vô trùng bằng cách bộc lộ động mạch cổ lấy máu để  $37^{\circ}\text{C}/1$  giờ, sau đó cho vào tủ lạnh để  $4^{\circ}\text{C}$  qua đêm, chắt lấy huyết thanh.

*Bước 3: Chiết tách IgG: Phương pháp Caprylic axit - Amonium sulphat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$*

- Cho 1 thể tích huyết thanh + 4 thể tích dung dịch đệm ( $60\text{mM}$  Axetat buffer pH=4)
- Nhỏ từng giọt Caprylic axit vào, tỷ lệ  $25\mu\text{l}/1\text{ml}$  huyết thanh pha loãng, để ở nhiệt độ phòng 30 phút; ly tâm  $10.000$  vòng/phút / 30 phút, ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ .

Loại bỏ cặn (Albumin). Thu lại dịch nổi. Thêm vào dịch nổi Amonium sulphat cho đến khi bão hòa. Khuấy đều, để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút. Ly tâm  $10.000$  vòng/phút / 30 phút ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Thu lấy cặn (IgG kết tủa). Thêm vào IgG đã kết tủa 1 lượng nhỏ dung dịch đệm PBS.

*Bước 4: Kiểm tra độ tinh khiết, hiệu giá, tính đặc hiệu*

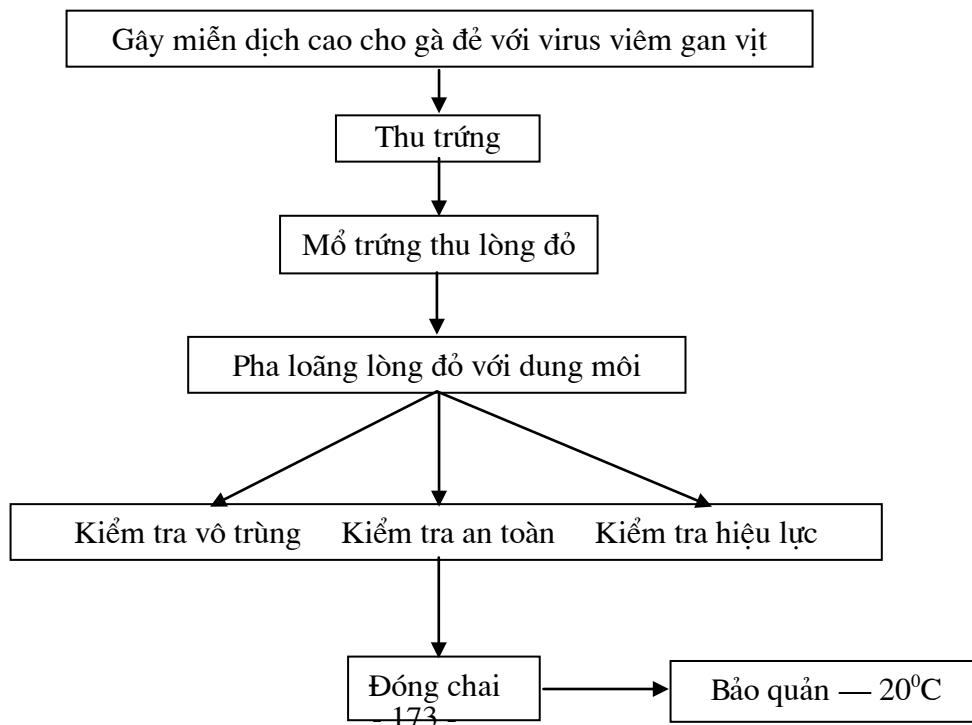
- Kiểm tra độ tinh khiết của IgG bằng phương pháp điện di.
- Kiểm tra hiệu giá, tính đặc hiệu bằng phương pháp huyết thanh học

#### V. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ LÒNG ĐỎ

Kháng thể lòng đỏ là trong lòng đỏ của trứng gia cầm có kháng thể dịch thể đặc hiệu

Kháng thể được tạo ra bằng phương pháp gây miễn dịch cao cho động vật, nên kháng thể đặc hiệu chính là lớp IgG. Động vật hay sử dụng để chế kháng thể lòng đỏ là gà.

Ví dụ: Kháng thể lòng đỏ kháng virus Gumboro, kháng thể lòng đỏ kháng virus viêm gan vịt, kháng thể lòng đỏ kháng *Mycoplasma gallisepticum*.



*Hình 7.1: Quy trình sản xuất kháng thể lỏng để kháng virus viêm gan vịt*

## **VI. MỘT SỐ CHẾ PHẨM HUYẾT THANH DÙNG TRONG Y HỌC VÀ THÚ Y HỌC**

### **6.1. Huyết thanh kháng độc tố uốn ván**

Huyết thanh kháng độc tố uốn ván được điều chế từ máu ngựa đã gây miễn dịch bằng giải độc tố uốn ván. Ngoài thành phần chính là immunoglobulin đặc hiệu có khả năng trung hòa độc tố uốn ván, còn có chất bảo quản là tricesol, các chất ổn định pH và tính đắng trưng của dung dịch.

Chế phẩm là dung dịch tiêm, ống 1ml có chứa 1500 IU (International Unit - đơn vị quốc tế) hoặc ống 2 ml có 6000 IU hoặc 10000 IU. Chỉ định dùng phòng bệnh uốn ván cho người và động vật bị vết thương phần mềm dập nát, vết thương sâu kín, vết thương nhiễm bẩn. Thường dùng với liều 1.500 hoặc 3.000 IU.

Khi điều trị uốn ván dùng với liều cao hơn 6000 IU, 10.000IU hoặc hơn. Tiêm dưới da  
Bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

### **6.2. Globulin miễn dịch kháng độc tố uốn ván**

Globulin miễn dịch kháng độc tố uốn ván được điều chế từ máu người hoặc động vật đã được miễn dịch bằng giải độc tố uốn ván. Globulin miễn dịch cùng loài nên lúc dùng hiếm khi gây ra các phản ứng phụ.

+ Thành phần:

IgG đặc hiệu kháng uốn ván và một số thành phần khác như: glycocol, natri mercurothiolat.

+ Trình bày: hỗn dịch tiêm, ống hoặc bơm tiêm.

+ Chỉ định phòng và điều trị bệnh uốn ván như huyết thanh kháng độc tố uốn ván.

+ Cách dùng: tiêm bắp thịt

+ Bảo quản: ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C, tránh ánh sáng.

### **6.3. Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu**

Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu được điều chế từ máu ngựa đã gây miễn dịch bằng giải độc tố bạch hầu.

+ Thành phần: Ig đặc hiệu có khả năng trung hòa độc tố do vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*) tiết ra và chất bảo quản.

+ Trình bày: dung dịch tiêm, thường đóng ống 10ml chứa 10.000 IU

+ Chỉ định dùng: phòng và điều trị bệnh bạch hầu.

+ Cách dùng: tiêm dưới da hoặc bắp thịt

+ Bảo quản: ở nhiệt độ từ 2°C - 8°C.

### **6.4. Huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn độc thịt**

Huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn độc thịt (Botulinum antitoxin) là chế phẩm chứa IgG kháng độc có khả năng trung hòa độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* typ A, B, E hoặc hỗn hợp các typ.

Vi khuẩn *C. botulinum* thường nhiễm vào thực phẩm trong môi trường kị khí, chủ yếu là thịt hoặc chế phẩm từ thịt.

Người và động vật bị nhiễm độc do ăn thực phẩm có độc tố với các biểu hiện như: đau quặn bụng, nôn, thở gấp và có thể dẫn đến liệt cơ bộ phận.

+ Thành phần: huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn độc thịt thương mại thường là đa giá, gồm 3 typ A, B, E điều chế từ máu ngựa đã được gây miễn dịch.

+ Trình bày: dung dịch tiêm

- + Cách dùng: tiêm bắp thịt
- + Bảo quản: ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C, không làm đông băng.

Trong 1ml huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn độc thịt của Aventis Pasteur có:

- Kháng độc tố typ A: 500 IU
- Kháng độc tố typ B: 500 IU
- Kháng độc tố typ E: 50 IU
- Cresol tối đa 3 mg

### **6.5. Huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn hoại thư sinh hơi**

Độc tố hoại thư sinh hơi (gas - gagrene toxin) do vi khuẩn kị khí Clostridium gây nên. Giống vi khuẩn Clostridium gồm nhiều loài, trong số đó có 3 loài gây bệnh thường gặp là: C. perfringens; C. septicum; C.novyi.

Những vết thương phần mềm sâu, kín, bẩn dễ bị nhiễm vi khuẩn hoại thư sinh hơi. Người và động vật bị bệnh hoại thư sinh hơi có biểu hiện nhiễm trùng, nhiễm độc nặng. Ở phần cơ thể bị hoại tử da tím tái, phù nề, có lớp hôi dưới da. Tổn thương hoại tử lan rộng dẫn đến nguy cơ phải tháo khớp.

+ Thành phần: huyết thanh kháng độc tố hoại thư sinh hơi được điều chế từ máu ngựa đã được miễn dịch là chế phẩm chứa Ig kháng độc tố có khả năng trung hòa đặc hiệu độc tố các loài gây bệnh Clostridium tương ứng. Ngoài Ig đặc hiệu còn có các tá chất bảo quản và duy trì sự ổn định của chế phẩm

- + Trình bày: dung dịch tiêm
- + Chỉ định dùng: Để điều trị bệnh hoại thư sinh hơi hoặc dự phòng cho những bệnh nhân bị chấn thương nặng.

- + Cách dùng: tiêm tĩnh mạch
- + Bảo quản: ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.
- + Trong 1ml huyết thanh kháng độc tố hoại thư sinh hơi của Aventis Pasteur có:
  - Kháng độc tố *C. perfringens*: 1000 IU
  - Kháng độc tố *C. septicum*: 500 IU
  - Kháng độc tố *C. novyi*: 1000 IU
  - Cresol tối đa 3 mg

### **6.6. Huyết thanh kháng dại**

Huyết thanh kháng dại được điều chế từ máu ngựa được gây miễn dịch bằng vacxin dại.

+ Thành phần: Ig đặc hiệu có khả năng bắt hoạt virus dại, chất bảo quản và tá dược.

- + Trình bày: dung dịch tiêm, thường đóng lọ 5 ml, chứa 1000 IU
- + Chỉ định dùng: tiêm cho người, động vật bị chó nghi dại hoặc chó dại cắn gần đầu hoặc bị cắn nhiều vết thương. Huyết thanh kháng dại thường dùng kết hợp với vacxin dại.
- + Cách dùng: tiêm bắp thịt ở vị trí khác bên với vị trí tiêm vacxin dại. Huyết thanh kháng dại còn được dùng để tiêm xung quanh vết thương hoặc để tẩm đắp vào vết thương bị chó cắn.
- + Bảo quản: Ở nhiệt độ từ 2°C - 8°C.

### **6.7. Globulin miễn dịch kháng dại**

Globulin miễn dịch kháng dại được điều chế từ máu người hoặc động vật đã gây miễn dịch bằng vacxin dại

- + Thành phần: Ig đặc hiệu kháng dại, Glycocol, Natri clorua, Merthiolat
- + Trình bày: hỗn dịch tiêm thường đóng ống 2ml, chứa 150 IU.
- + Chỉ định dùng: Tiêm cho người và động vật bị chó nghi dại hoặc chó dại cắn gần đầu hoặc cắn nhiều vết. Huyết thanh kháng dại thường dùng kết hợp với vacxin dại.

+ Cách dùng: tiêm bắp thịt ở vị trí khác bên với vị trí tiêm vacxinẠI. Huyết thanh kháng dại còn được dùng để tiêm xung quanh vết thương hoặc để tẩm đắp vào vết thương bị chó cắn.

+ Bảo quản: Ở nhiệt độ từ 2 - 8°C

#### **6.8. Nhū dīch tiêm chūa khāng thē chōng bēnh Gumboro, Newcastle, IB (Infectious Bronchitis - viēm khí quān truyēn n̄hiēm).**

+ Mô tả: kháng thể chống bệnh Gumboro, Newcastle, IB là một nhū dịch tiêm vô trùng, chế từ trứng gà của đàn gà đã được gây tối miễn dịch với virus Gumboro, Newcastle, IB.

+ Thành phần: kháng thể đặc hiệu chống virut Gumboro, Newcastle, IB và một số kháng thể không đặc hiệu khác.

Mỗi ml nhū dịch chứa ít nhất 25 - 30 mg hàm lượng IgG

+ Tác dụng: là 1 kháng thể đặc hiệu có tác dụng trung hòa các virus gây bệnh Gumboro, Newcastle, IB ở gà. Kháng thể có tác dụng chữa bệnh và phòng các bệnh truyền nhiễm do virus Gumboro, Newcastle, IB cho gà ở các lứa tuổi khác nhau

Kháng thể Gumboro tồn tại trong cơ thể 20 ngày, nhưng nồng độ có tác dụng bảo hộ tốt nhất trong thời gian 10 ngày sau khi tiêm. Ngoài ra kháng thể còn có tác dụng như một liệu pháp protein cho cơ thể.

+ Chỉ dẫn: Đặc hiệu chữa bệnh và phòng các bệnh truyền nhiễm do virus Gumboro, Newcastle, IB cho gà ở các lứa tuổi khác nhau. Và tăng sức đề kháng cho đàn gà.

+ Liều lượng và cách sử dụng: Tiêm bắp cho gà càng sớm càng tốt sau khi mắc bệnh

	Phòng bệnh	Chữa bệnh
Gà dưới 500 g	0,5 ml / con	0,5 - 1 ml / con
Gà trên 500 g	1 ml / con	1 - 2 ml / con

+ Chú ý: Để kháng thể ở nhiệt độ bình thường từ 5 - 10 phút và lắc kĩ trước khi tiêm

Cần bổ sung thêm vitamin B - complex và chất điện giải cho gà.

Thuốc dễ nhiễm khuẩn, nếu bảo quản không tốt rất dễ hỏng nên chỉ dùng một lần sau khi mở nắp.

+ Bảo quản và hạn dùng:

Bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C - 4°C được 2 tháng

Bảo quản ở nhiệt độ âm sẽ được 6 tháng

Bảo quản lạnh, tránh ánh sáng khi vận chuyển

+ Trình bày: Thuốc đóng lọ 50 ml, 100 ml

#### **6.9. Kháng thē đa giá phòng, chūa bēnh viēm gan do virus Ở vīt.**

+ Thành phần: Là kháng thể đa giá được chế từ vīt đã gây tối miễn dịch bằng các kháng nguyên, bao gồm:

Kháng thē chống bệnh viêm gan virus Ở vīt.

Kháng thē chống bệnh dịch tả vīt.

Kháng thē không đặc hiệu khác.

+ Tác dụng:

Kháng thē rất có hiệu quả trong điều trị và phòng các bệnh viêm gan do virus Ở vīt, dịch tả vīt.

Kháng thē có tác dụng điều trị ngay sau khi tiêm vài giờ

Có tác dụng như protein liệu pháp nhằm tăng sức đề kháng chung cho thủy cầm.

Kháng thē lưu giữ trong máu 20 ngày nhưng tác dụng bảo hộ tốt nhất trong vòng 10 ngày đầu sau khi tiêm.

+ Liều lượng và cách sử dụng: tiêm bắp thịt hoặc dưới da

- Phòng bệnh viêm gan do virus: vīt, ngan từ 1 - 7 ngày tuổi tiêm bắp 0,5ml/con. Tiêm phòng nhắc lại sau 10 ngày với liều 1ml/con.

- Điều trị bệnh viêm gan do virus, dịch tả vịt:

Vịt, ngan dưới 2 tuần tuổi:

Lần 1: 0,5 - 1 ml/con

Lần 2: 0,5 - 1 ml/con sau 3 ngày

Vịt, ngan trên 2 tuần tuổi :

Lần 1: 1 - 2 ml/con

Lần 2: 1 - 2 ml/con sau 3 ngày

Tăng sức đề kháng cho con bệnh bằng B - complex, thuốc điện giải. Kết hợp với kháng sinh chống bội nhiễm.

Chú ý :

- Thuốc rất an toàn, hiệu quả cao
- Đeo ở nhiệt độ phòng 30 phút và lắc kỹ trước khi dùng
- Sát trùng bơm kim tiêm trước khi dùng
- Mỗi lọ kháng thể khi đã mở ra chỉ dùng 1 lần.

Bảo quản:

- Bảo quản lạnh ở nhiệt độ 2 - 8°C, tránh ánh sáng trực tiếp.
- Thời gian bảo quản 2 tháng kể từ ngày sản xuất

Hạn dùng: 3 tháng kể từ ngày sản xuất

Trình bày: lọ nhựa 50 ml, 100 ml.

#### 6.10. Huyết thanh kháng nọc rắn

Rắn độc gồm nhiều giống khác nhau, trong mỗi giống có nhiều loài. Nạn nhân bị rắn độc cắn có biểu hiện đau, sưng nề tại chỗ, tím tái, xuất huyết nặng, rối loạn hô hấp, truy tim mạch và tử vong nếu không được xử lý và điều trị kịp thời.

Khi bị rắn cắn, thường là không xác định được rắn đó thuộc loài rắn nào. Do vậy huyết thanh kháng nọc rắn dùng để điều trị thường là huyết thanh đa giá, hỗn hợp của huyết thanh đơn giá đặc hiệu đối với những loài rắn thường gặp.

Huyết thanh kháng nọc rắn đa giá được điều chế từ máu ngựa được gây miễn dịch bằng hỗn hợp giải độc tố nọc rắn của các loài rắn độc thường gặp

Thành phần :

- Immunoglobulin đa giá có khả năng trung hoà các nọc rắn tương ứng
- Glycocol
- Phenol làm chất bảo quản
- Tá dược

Trình bày: dung dịch tiêm đóng lọ 5ml hoặc đóng trong bơm tiêm có sẵn kim tiêm để kịp thời tiêm cho nạn nhân.

Cách dùng : tiêm bắp thịt

Bảo quản : giữ ở nhiệt độ 2 - 8°C, tránh ánh sáng.

### Câu hỏi ôn tập chương

1. Ứng dụng của kháng thể dịch thể đặc hiệu trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm và chẩn đoán ung thư?
2. Ứng dụng của kháng thể dịch thể đặc hiệu trong phòng bệnh truyền nhiễm?
3. Ứng dụng của kháng thể dịch thể đặc hiệu trong điều trị bệnh truyền nhiễm?
4. Nguyên lý chung của quá trình sản xuất kháng thể dịch thể đặc hiệu.

5. Quy trình sản xuất kháng huyết thanh大专.
6. Quy trình sản xuất IgG thỏ dùng cho chẩn đoán.
7. Quy trình sản xuất chế phẩm kháng thể từ lòng đỏ trứng gà.

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1

#### TIÊU CHUẨN ĐÓI VỚI ĐÀN GÀ SẠCH BỆNH (SPF – Specific pathogen free)

Đàn gà sạch bệnh SPF dùng sản xuất trứng SPF cần được kiểm tra như sau :

- a/ 50% đàn được kiểm tra cách 1 tháng 1 lần và cho thấy không nhiễm các mầm bệnh sau đây
- b/ 50% đàn được kiểm tra 3 tháng/1 lần

Mầm bệnh	Kiểm tra
M. gallisepticum	SA
M.synoviae	SA
M.pullorum	SA
Virus Newcastle	HI
Virus gây viêm phế quản truyền nhiễm IB	HI/ELISA/AGPT
Virus gây viêm thanh quản truyền nhiễm ILT	HI/ELISA/AGPT
Virus Gumboro IBD	HI/ELISA/AGPT
Virus Avian Adeno GPI	AGP/SN/FA
Virus Avian Adeno GPII	AGP
Virus gây hội chứng giám đẻ EDS 76	HI
Virus đậu gà Fow Pox	Lâm sàng/ AGP
Virus Avian Reo	SN/AGP/FA
Virus gây viêm não tuỷ truyền nhiễm ở gia cầm (Avian Encephalomyelitis)	FES/ELISA/AGP/SN
Virus gây bệnh Marek's	AGP
Virus gây bệnh leucosis ở gia cầm	PM/SN/ELISA
Virus gây bệnh lưới nội mô Reticuloendotheliosis	SN/FA/ELISA/AGP
Mầm bệnh gây bệnh cúm ở gia cầm Avian influenza	AGP
Vi khuẩn Salmonella	Kiểm tra vi khuẩn
Nhân tố gây bệnh thiếu máu Chicken Anaemia CAA	SN/IFA/ELISA
Virus Avian Nephaeitis	FA
Virus gây bệnh viêm mũi - khí quản ở gà tây (Turkey Rhinotracheitis)	ELISA

SA: Ngưng kết trên phiến kính

FES: Mẫn cảm phôi

PM: Trộn lẩn kiểu hình

## **Phụ lục 2 KIỂM TRA VÔ TRÙNG VACXIN THÚ Y**

**1. Cốm mẫu:** Mẫu gồm 1% số lọ trong 1 lô định kiểm tra: tối thiểu 3 lọ và tối đa 10 lọ

**2. Kiểm tra phát hiện vi khuẩn:**

2.1. Môi trường: một trong các loại môi trường sau:

- Thioglycollate broth
- Soybean casein digest broth
- Trypticase soy broth (TSB)

2.2. Cách làm:

Mẫu được hoàn nguyên như khuyến nghị trên nhãn và ít nhất 1ml mẫu đã hoàn nguyên được cấy vào môi trường nước thịt (thể tích mẫu không vượt quá 10% thể tích môi trường). Nuôi cấy ở 30 - 37°C trong ít nhất 7 ngày. TSB được nuôi cấy trong điều kiện yếm khí. Trong trường hợp có vi khuẩn đường ruột, mẫu cũng được cấy vào thạch Heart Infusion Agar.

2.3. Đánh giá: Không có tạp nhiễm vi khuẩn hoặc trong trường hợp có vi khuẩn đường ruột cho phép không quá 1 khuẩn lạc của vi khuẩn hoại sinh.

**3. Kiểm tra Mycoplasma**

3.1. Môi trường:

a/ Heart Infusion Broth (Heart Infusion Agar), với các phụ gia sau: Proteose peptone, chiết suất yeast autolysate/ Fresh yeast, nicotinamide adenine dinucleotide, L-cysteine hydrochloride, huyết thanh ngựa và tetrazolium chloride hoặc chất chỉ thị khác.

b/ Nước thịt PPLO (Hayflick) – Thạch PPLO (Hayflick), với các phụ gia sau: huyết thanh ngựa, chiết suất từ nấm.

3.2. Cách làm:

Mẫu được hoàn nguyên như khuyến nghị và cấy đồng thời vào nước thịt PPLO (1ml trong 100ml) và thạch PPLO (0,1ml). Nước thịt được nuôi cấy ở 33 – 37°C trong 14 ngày, trong thời gian này cấy thêm 0,1 ml mẫu vào thạch PPLO trong ngày thứ 3, 7, 10, 14. Tất cả các đĩa thạch được nuôi cấy ở nơi có độ ẩm cao, 4 – 6% CO<sub>2</sub>, nhiệt độ 33 – 37°C trong 10 – 14 ngày.

3.3. Đánh giá:

Qua kính hiển vi, không có tạp nhiễm Mycoplasma ở các đĩa thạch

**4. Kiểm tra Salmonella**

4.1. Môi trường:

- Môi trường lỏng: sử dụng một trong hai loại môi trường sau:

Nước thịt Selenite

Nước thịt Tetrahionate

- Môi trường rắn: Sử dụng một trong các loại môi trường sau:

Thạch Mac Conkey

Thạch Salmonell Shigella

Thạch Brilliant Green

Thạch Desoxycholate Citrate

Thạch XLD

4.2. Cách làm:

Mẫu được hoàn nguyên và tối thiểu 1ml mẫu được cấy vào môi trường lỏng (không quá 10% thể tích). Nuôi cấy ở 35 – 37°C trong 18 – 24 giờ, sau đó lấy canh khuân cấy vào thạch, để thạch ở 35 – 37°C ít nhất 48 giờ.

Đánh giá: Không thấy vi khuẩn Salmonella

**5. Kiểm tra phát hiện nấm:**

5.1. Môi trường:

Nước thịt và Sabouraud

Nước thịt và thạch Soybean Casein Digest

5.2. Cách làm: Mẫu được hoàn nguyên và tối thiểu 1ml được cấy vào nước thịt (không quá 10% thể tích môi trường). Nuôi cấy ở 20 – 25°C trong 14 ngày.

5.3. Đánh giá: không có tạp nhiễm nấm.

## Phụ lục 3 KIỂM TRA VIRUS NGOẠI LAI TRONG VACXIN THÚ Y

### *1. Kiểm tra bằng cách tiêm trúng*

Tiệm huyền dịch mẫu cần kiểm tra vào màng đệm túi niệu (CAM) và túi niệu. Trứng phải được lấy từ đàn gà sạch bệnh (SPF) hoặc có kết quả kiểm tra âm tính với các bệnh Newcastle, CELO, viêm phế quản truyền nhiễm IB, Marek's, hội chứng giảm đẻ EDS 76, Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae và Salmonella pullorum.

#### *1.1. Vào màng CAM*

10 liều vacxin đã trung hoà đư ợc tiêm vào 10 phôi gà 9 – 12 ngày tuổi. Phôi nào chết trong 24 giờ đầu thì loại bỏ. Tất cả phôi chết sau 24 giờ và sống được kiểm tra khả năng ngưng kết hồng cầu. Sau 7 ngày nước niệu nang được trộn để cấy truyền và quy trình trên được lặp lại.

Đánh giá: Không có phôi chết hoặc bắt thường do vacxin gây ra hoặc không gây ngưng kết hồng cầu.

#### *2. Kiểm tra bằng cách tiêm vào gà*

Phương pháp này được thực hiện bằng một trong 2 cách sau:

2.1. Chọn gà khoẻ mạnh ở đàn gà sạch bệnh (SPF) hoặc có kết quả kiểm tra âm tính với các bệnh Newcastle, CELO, viêm phế quản truyền nhiễm IB, Marek's, hội chứng giảm đẻ EDS 76, Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae và Salmonella pullorum.

Thí nghiệm được tiến hành trên 20 gà, mỗi gà được được tiêm 10 liều vacxin theo những đường sau: dưới da hoặc bắp, rạch vào mào và nhổ mắt, 5 gà dùng làm đối chứng. Theo dõi gà trong 21 ngày xem có phản ứng cục bộ hay toàn thân không. Gà chết được mở khám kiểm tra bệnh tích

Đánh giá gà không có triệu chứng lâm sàng do vacxin

2.2. Thí nghiệm được tiến hành tương tự như trên nhưng dùng 10 gà và cuối giai đoạn theo dõi, 10 gà được kiểm tra huyết thanh xem có kháng thể chống các tác nhân gây bệnh trên hay không.

Đánh giá: Gà khoẻ mạnh và có kết quả huyết thanh âm tính với các yếu tố gây bệnh trên trừ virus vacxin.

#### *3. Kiểm tra bằng cách cấy vào môi trường tế bào*

Mẫu vacxin đại diện không dưới 10 liều được trung hoà với huyết thanh tối miễn dịch đặc hiệu. Sau đó vacxin trung hoà được tiêm vào tối thiểu 1 loại tế bào 1 lớp hoặc dòng tế bào có nguồn gốc từ bản động vật khoẻ mạnh. Để virus hấp thụ lên tế bào ở 37°C trong 1 giờ. Môi trường tế bào mới được bổ sung trước khi nuôi cấy lại ở 37°C. Quan sát tế bào 1 lớp trong 1 tuần để tìm bệnh tích tế bào. Nếu không có bệnh tích, trộn dung dịch tế bào và tế bào được nuôi cấy lại trên môi trường tế bào mới. Nếu không có bệnh tích tế bào, kiểm tra khả năng hấp phụ hồng cầu, sử dụng RBC từ chuột lang hoặc loài bản động vật của vacxin, thực hiện trên tế bào 1 lớp, vacxin được coi là nhân tố ngoại lai nếu không tìm thấy nhân tố hấp phụ hồng cầu.

#### *4. Phản ứng kết hợp bô thể phát hiện virus gây bệnh Leucosis ở gia cầm:*

Môi trường tế bào xơ phôi gà được dùng phải mẫn cảm với cận nhóm A và B của virus gây bệnh Leucosis. Tối thiểu 10 liều vacxin được tiêm vào môi trường tế bào. Môi trường được duy trì tối thiểu 9 ngày, thời gian đó tế bào được bổ sung 3-4 ngày 1 lần. Môi trường đối chứng dương sử dụng nhóm A và B và có đối chứng âm. Cuối giai đoạn nuôi cấy, thực hiện phản ứng kết hợp bô thể xem có kháng nguyên của virus Leucosis hay không.

Đánh giá: Không có tạp nhiễm virus gây bệnh Leucosis.

## Phụ lục 4 YÊU CẦU CHUNG ĐỐI VỚI VACXIN THÚ Y

### 1. Kiểm tra chân không

Mẫu vacxin đông khô được kiểm tra chân không bằng máy kiểm tra chân không tần số cao. Vacxin đạt yêu cầu nếu lọ vacxin phát huỳnh quang màu xanh khi điện cực chiếu vào.

### 2. Kiểm tra độ ẩm: Mẫu thành phẩm được kiểm tra độ ẩm không vượt quá 4%.

### 3. Độ đồng nhất

- Lọ vacxin thành phẩm phải có bánh đông khô không vỡ, rắn chắc và mẫu phải tan hết sau khi hoàn nguyên bằng dung môi.

- Vacxin nhũ dầu phải đồng nhất sau khi lắc.

### 4. Giống vacxin/serotype

Giống dùng vacxin phải được công bố và nếu là chủng mới thì phải mô tả nguồn gốc và cung cấp kết quả thử nghiệm thuốc khi đăng kí.

### 5. Nhãn mác và hướng dẫn sử dụng

Trong nhãn mác và hướng dẫn sử dụng phải có tên nhà sản xuất, nước sản xuất công bố số lô, chủng vacxin, loài bản động vật và tuổi, số liều, đường tiêm, ngày hết hạn và điều kiện bảo quản, khuyến cáo và những hướng dẫn khác về cách vận chuyển và sử dụng vacxin cũng như lịch dùng vacxin.

### 6. Hệ thống lô giống

Tất cả vacxin phải được sản xuất từ giống vacxin được tiếp truyền không quá 5 đời từ giống gốc.

### 7. Cơ sở sản xuất

Vacxin phải được sản xuất ở cơ sở đã được cơ quan có thẩm quyền về thú y của nước sản xuất cho phép sản xuất và báo cáo về vacxin.

Trong trường hợp cơ sở sản xuất mới được thành lập, thông tin chi tiết của quá trình sản xuất và trang thiết bị kiểm tra chất lượng cũng như nhân sự phải cung cấp trong quá trình đăng kí.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### A. Tài liệu trong nước

1. **Vũ Triệu An, Jean Claude Homberg** (1997). *Miễn dịch học*. NXB Y học, Hà Nội
2. **Nguyễn Đình Bảng, Nguyễn Thị Kim Hương** (2003). *Vaccine và chế phẩm trong phòng và điều trị*. NXB Y học, Hà Nội.
3. **Bộ môn dí ứng học** (2002). *Chuyên đề dí ứng học tập I và tập II*. NXB Y học, Hà Nội
4. **Cục Thú y** (2007). *Quy trình - Tiêu chuẩn ngành thú y*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội
5. **Nguyễn Bá Hiên, Nguyễn Quốc Doanh, Phạm Sỹ Lăng, Nguyễn Thị Kim Thành, Chu Đình Tối** (2008). *Vi sinh vật - Bệnh truyền nhiễm vật nuôi*. NXB Giáo dục, Hà Nội
6. **Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tê, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội** (2004). *Bệnh học thủy sản*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội
7. **Nguyễn Ngọc Lan, Văn Đình Hoa** (2006). *Miễn dịch học*. NXB Y học, Hà Nội
8. [www.google.com.vn](http://www.google.com.vn)

### B. Tài liệu nước ngoài

1. **C.L.Baldwin, C.J.Howard, J.Nacssens** (2009). "Veterinary immunology and immunopathology".
2. **Goodman J.W.** *The immune response*, In Stites D.P., Terr Al, Editor: *Basic and clinical immunology*, ed 7, Norwalk, CT, 1991, Appleton and Lange, pp 34 - 44.
3. **Mosmann T.r., Coffman R.L.**, Th1 and Th2 cells: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu. Rev. Immunol.* 7:145, 1989.
4. **Weller P. F.** The immunobiology of eosinophils, *N. Engl. J. Med.* 320:1110 - 1118, 1991.

## MỤC LỤC

<b>PHẦN MỞ ĐẦU.....</b>	<b>2</b>
I. KHÁI NIỆM VỀ MÔN HỌC.....	2
II. VAI TRÒ VÀ VỊ TRÍ CỦA MÔN HỌC .....	2
III. KHÁI QUÁT NỘI DUNG CHƯƠNG TRÌNH MÔN HỌC.....	3
1. Thông tin về học phần.....	3
2. Điều kiện tiên quyết.....	3
3. Nhiệm vụ của sinh viên .....	4
4. Tiêu chuẩn đánh giá sinh viên .....	4
5. Mục tiêu .....	4
6. Mô tả văn bản nội dung học phần .....	4
7. Tài liệu học tập .....	4
<b>Chương I KHÁI NIỆM VÀ PHÂN LOẠI VACXIN .....</b>	<b>5</b>
I. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN VÀ DANH PHÁP .....	5
II. KHÁI NIỆM VỀ VACXIN.....	8
2.1. Khái niệm.....	8
2.2. Nguyên lý .....	8
III. ĐẶC TÍNH CƠ BẢN CỦA VACXIN.....	8
IV. THÀNH PHẦN CỦA VACXIN.....	9
4.1. Kháng nguyên .....	9
4.2. Chất bổ trợ .....	10
V. YÊU CẦU CỦA MỘT VACXIN.....	19
VI. PHÂN LOẠI VACXIN.....	19
6.1. Vacxin chết .....	19
6.2. Vacxin sống .....	20
6.3. Vacxin dưới đơn vị .....	22
6.4. Vacxin thế hệ mới sản xuất bằng công nghệ gen .....	22
6.5. Vacxin chống ung thư .....	27
6.6. Vacxin tránh thai .....	28
<b>Chương 2 SẢN XUẤT VACXIN THÚ Y.....</b>	<b>31</b>
I. NGUYÊN LÝ SẢN XUẤT VACXIN THÚ Y .....	31
1.1. Nhân sự .....	31
1.2. Cơ sở vật chất .....	32
1.3. Sản xuất vacxin .....	32
II. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VACXIN .....	40
2.1. Quy trình sản xuất vacxin vi khuẩn .....	40
2.2. Quy trình sản xuất vacxin virus .....	43
<b>Chương 3 KIỂM NGHIỆM VACXIN .....</b>	<b>47</b>
I. TIÊU CHUẨN CỦA MỘT PHÒNG KIỂM NGHIỆM VACXIN ĐỘNG VẬT.....	47
II. CÁC CHỈ TIÊU VACXIN CẦN KIỂM NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM .....	47
2.1. Các chỉ tiêu kiểm nghiệm .....	47
2.2. Phương pháp kiểm nghiệm .....	48
2.3. Các kiểm tra khác.....	52
III. MỘT SỐ QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VACXIN TẠI VIỆT NAM.....	53
3.1. Quy trình kiểm nghiệm một số vacxin vi khuẩn .....	53
3.2. Quy trình kiểm nghiệm vacxin virus.....	62
IV. TIÊU CHUẨN ASEAN ĐỐI VỚI MỘT SỐ LOẠI VACXIN.....	69
5.1. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt tụ huyết trùng lợn .....	69
5.2. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt phòng bệnh Newcastle.....	70
5.3. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin phòng bệnh dịch tả lợn .....	71
5.4. Tiêu chuẩn Asean đối với vacxin vô hoạt phòng bệnh lở mồm long móng ở trâu bò .....	72
<b>Chương 4 SỬ DỤNG VACXIN .....</b>	<b>73</b>

I. NGUYÊN LÝ SỬ DỤNG VACXIN.....	73
II. QUY LUẬT HÌNH THÀNH KHÁNG THỂ DỊCH THỂ SAU KHI SỬ DỤNG VACXIN Ở ĐỘNG VẬT .....	73
III. TIÊM VACXIN NHẮC NHỎ.....	73
IV. TÁI CHỦNG .....	74
V. NGUYÊN TẮC SỬ DỤNG VACXIN .....	75
5.1. Tiêm phòng vacxin trên phạm vi hợp lý, đạt tỷ lệ cao.....	75
5.2. Tiêm phòng vacxin đúng đối tượng.....	75
5.3. Tiêm phòng đúng thời gian, đúng quy cách, đạt tỷ lệ cao .....	76
5.4. Phối hợp các loại vacxin .....	77
5.5. Một số điều chú ý khi sử dụng và bảo quản vacxin .....	78
5.6. Các phản ứng không mong muốn khi tiêm phòng vacxin và cách khắc phục .....	78
VI. QUY ĐỊNH VỀ VIỆC TIÊM PHÒNG BẮT BUỘC VACXIN CHO GIA SÚC VÀ GIA CÀM Ở VIỆT NAM .....	80
6.1. Phạm vi, đối tượng áp dụng .....	80
6.2. Giải thích thuật ngữ .....	80
6.3. Các bệnh phải tiêm phòng, tỷ lệ tiêm phòng.....	81
6.4. Tiêm phòng đối với từng bệnh.....	81
6.5. Trách nhiệm thực hiện .....	82
VII. MỘT SỐ LỊCH SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO GIA SÚC, GIA CÀM.....	83
7.1. Lịch sử dụng vacxin cho lợn.....	83
7.2. Lịch sử dụng vacxin cho gà .....	85
7.3. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho vịt - ngan .....	86
7.4. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho chó - mèo .....	86
7.5. Lịch sử dụng vacxin phòng bệnh cho trâu bò .....	86
VIII. MỘT SỐ LOẠI VACXIN ĐANG ĐƯỢC LUU HÀNH TẠI VIỆT NAM .....	87
IX. QUY CHẾ THỦ NGHIỆM VÀ KHẢO NGHIỆM VACXIN THÚ Y .....	119
9.1. Phạm vi áp dụng: .....	119
9.2. Đối tượng áp dụng .....	119
9.3. Nội dung thử nghiệm, khảo nghiệm.....	119
9.4. Thủ tục đăng ký .....	120
9.5. Trách nhiệm của các bên liên quan .....	123
<b>Chương 5 SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO CÁ .....</b>	<b>127</b>
I. KỸ THUẬT GÂY MIỄN DỊCH.....	127
1.1 Tiêm .....	128
1.2 Dẫn truyền qua da .....	128
1.3. Dẫn truyền qua đường miệng (oral administration).....	128
II. Các phương pháp đánh giá hiệu quả sử dụng vacxin .....	129
2.1. Phương pháp gây nhiễm thực nghiệm.....	129
2.2. Phương pháp tính toán hiệu quả của vacxin .....	129
III. HIỆN TRẠNG SỬ DỤNG VACXIN PHÒNG BỆNH CHO CÁ.....	130
IV. TRIỀN VỌNG CỦA VIỆC SỬ DỤNG VACXIN TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN .....	131
<b>Chương 6 MIỄN DỊCH HỌC ÚNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH TRUYỀN NHIỄM CỦA VẬT NUÔI.....</b>	<b>132</b>
I. SỰ KẾT HỢP GIỮA KHÁNG NGUYÊN VÀ KHÁNG THỂ.....	132
1.Khái niệm.....	132
2. Kết quả sinh học của sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể .....	132
II PHẢN ÚNG HUYẾT THANH HỌC .....	133
1. Cơ chế chung của phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể dịch thể đặc hiệu .....	133
2. Các phản ứng huyết thanh có thể quan sát trực tiếp.....	133
3. Các phản ứng huyết thanh phải dùng kỹ thuật đánh dấu để phát hiện .....	153
<b>Chương 7 MIỄN DỊCH HỌC ÚNG DỤNG TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH TRUYỀN NHIỄM CỦA VẬT NUÔI.....</b>	<b>164</b>
I. LỊCH SỬ PHÁT HIỆN .....	164

<b>II. KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU VÀ ỨNG DỤNG .....</b>	<b>165</b>
2.1. Ứng dụng kháng thể đặc hiệu trong chẩn đoán bệnh .....	165
2.2. Ứng dụng kháng thể đặc hiệu trong điều trị bệnh .....	165
<b>III. SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU.....</b>	<b>171</b>
3.1. Lập kế hoạch .....	171
3.2. Tài liệu của quy trình sản xuất .....	171
3.3. Quy trình sản xuất kháng thể đặc hiệu .....	171
<b>IV. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG HUYẾT THANH.....</b>	<b>172</b>
4.1. Quy trình sản xuất kháng huyết thanh đại.....	172
4.2. Quy trình chế tạo IgG thỏ đặc hiệu .....	173
<b>V. MỘT SỐ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ LÒNG ĐỎ .....</b>	<b>173</b>
<b>VI. MỘT SỐ CHẾ PHẨM HUYẾT THANH DÙNG TRONG Y HỌC VÀ THÚ Y HỌC .....</b>	<b>174</b>
6.1. Huyết thanh kháng độc tố uốn ván.....	174
6.2. Globulin miễn dịch kháng độc tố uốn ván .....	174
6.3. Huyết thanh kháng độc tố bạch hầu .....	174
6.4. Huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn độc thịt .....	174
6.5. Huyết thanh kháng độc tố vi khuẩn hoại thư sinh hơi .....	175
6.6. Huyết thanh kháng đại .....	175
6.7. Globulin miễn dịch kháng đại .....	175
6.8. Nhũ dịch tiêm chứa kháng thể chống bệnh Gumboro, Newcastle, IB (Infectious Bronchitis - viêm khí quản truyền nhiễm). .....	176
6.9. Kháng thể đa giá phòng, chữa bệnh viêm gan do virus ở vịt.....	176
6.10. Huyết thanh kháng nọc rắn .....	177
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>179</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>183</b>