

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8685-19:2017

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN - PHẦN 19: VẮC XIN
VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH GUMBORO**

Vaccine testing procedure - Part 19: Infectious bursal disease vaccine, inactivated

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 8685-19:2017 do Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y TW1 - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 8685 Quy trình kiểm nghiệm vắc xin gồm các phần:

- TCVN 8685-1 : 2011, *Phần 1: Vắc xin phó thương hàn lợn nhược độc;*
- TCVN 8685-2 : 2011, *Phần 2: Vắc xin viêm gan siêu vi trùng vịt;*
- TCVN 8685-3 : 2011, *Phần 3: Vắc xin E.coli của lợn;*
- TCVN 8685-4 : 2011, *Phần 4: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng giảm đẻ ở gà;*
- TCVN 8685-5 : 2011, *Phần 5: Vắc xin ung khí thán;*
- TCVN 8685-6 : 2011, *Phần 6: Vắc xin Gumboro nhược độc;*
- TCVN 8685-7 : 2011, *Phần 7: Vắc xin nhiệt thán nha bào vô độc chủng 34 F2;*
- TCVN 8685-8 : 2011, *Phần 8: Vắc xin dịch tả lợn nhược độc;*
- TCVN 8685-9 : 2014, *Phần 9: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Cúm gia cầm A/H5N1;*
- TCVN 8685-10 : 2014, *Phần 10: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Lở mồm long móng (FMD);*
- TCVN 8685-11 : 2014, *Phần 11: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Phù đầu gà (coryza);*
- TCVN 8685-12 : 2014, *Phần 12: Vắc xin nhược độc, đông khô phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8685-13 : 2014, *Phần 13: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8685-14 : 2017, *Phần 14: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi thể kính ở lợn;*

TCVN 8685-19 : 2017

- TCVN 8685-15 : 2017, *Phần 15: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do pasteurella multocida type D gây ra ở lợn;*
- TCVN 8685-16 : 2017, *Phần 16: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm teo mũi truyền nhiễm ở lợn;*
- TCVN 8685-17 : 2017, *Phần 17: Vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn;*
- TCVN 8685-18 : 2017, *Phần 18: Vaccin vô hoạt phòng bệnh newcastle;*
- TCVN 8685-19 : 2017, *Phần 19: Vaccin vô hoạt phòng bệnh gumboro.*

Quy trình kiểm nghiệm vắc xin -

Phần 19: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh gumboro

Vaccine testing procedure - Part 19: Infectious Bursal Disease vaccine, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình về kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt phòng bệnh Gumboro cho gà.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8684:2011 “Vắc xin và chế phẩm sinh học dùng trong thú y – Phương pháp kiểm tra thuần khiết”

3 Ký hiệu và chữ viết tắt

CPE	Cytopathic effect
MEM	Minimum Essential Media
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50
Ab	Antibody
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
AGP	Agar gel precipitation

4 Nguyên tắc

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

5 Vật liệu và thuốc thử

5.1 Gà 2 tuần tuổi, gà khỏe, âm tính với kháng thể kháng vi rút Gumboro

5.2 Trứng gà SPF có phôi từ 9 ngày tuổi đến 11 ngày tuổi

5.3 Kháng nguyên dương chuẩn, đối chứng âm

5.4 Huyết thanh dương chuẩn, Huyết thanh âm chuẩn

5.5 Vi rút Gumboro cường độc chủng CVL 52/70

5.6 Môi trường tế bào MEM 1x

5.7 Dung dịch PBS pH 7,2

5.8 KIT phát hiện kháng thể Gumboro

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

6.1 Tủ ấm CO₂ duy trì nhiệt độ 37 °C

6.2 Tủ ấp trứng duy trì nhiệt độ 37 °C

6.3 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml

6.4 Đĩa Petri vô trùng

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

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

6.7 Dao, kéo, panh kẹp vô trùng

6.8 Đĩa 96 giếng có 1 lớp tế bào xơ phôi gà

6.9 Máy ly tâm, có thể quay với tốc độ từ 1000 rpm đến 3000 rpm

6.10 Ống ly tâm vô trùng

6.11 Bơm tiêm dung tích 5 ml

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

6.13 Dụng cụ đục lỗ vô trùng

6.14 Chai thủy tinh schott (100 ml, 1000 ml) vô trùng

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

7.1 Lấy mẫu sản phẩm

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

7.2 Chuẩn bị động vật thí nghiệm

- Ít nhất 40 gà 2 tuần tuổi (5.1)

- Ít nhất 100 trứng gà có phôi (5.2)

8 Cách tiến hành

8.1 Kiểm tra cảm quan

Quan sát bằng mắt thường, vắc xin được coi là đạt yêu cầu khi hỗn dịch đồng nhất, không đông vón, không lắng cặn.

8.2 Kiểm tra vô trùng

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

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

8.3 Kiểm tra vô hoạt

Tiêm ít nhất 100 trứng gà (5.2), mỗi trứng 0,2 ml vắc xin vào túi lòng đỏ hoặc túi niệu. Ấp các trứng đã được tiêm ở tủ ấp trứng (6.2) trong 7 ngày. Kiểm tra bệnh tích phôi.

Vắc xin được coi là vô hoạt khi phôi không có bệnh tích của vi rút Gumboro.

8.4 Kiểm tra tính an toàn

– Tiêm cho 10 gà (5.1), mỗi con 2 liều vắc xin ghi trên nhãn theo đường dưới da cổ

– Theo dõi toàn bộ gà thí nghiệm trong 21 ngày

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

8.5 Kiểm tra hiệu lực

8.5.1 Phương pháp trọng tài

Sử dụng 30 gà (5.1), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 20 gà, mỗi con được tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn, theo đường dưới da cổ;

+ Nhóm 2: gồm 10 gà làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sau khi tiêm vắc xin từ 21 ngày đến 28 ngày, gà nhóm 1 và nhóm 2 được thử thách với chủng vi rút Gumboro cường độc (5.5) bằng phương pháp nhỏ mắt, mũi, liều 200 μ l (10^2 TCID₅₀) / con (xem Phụ lục A).

Theo dõi từ 3 ngày đến 10 ngày sau công cường độc.

Vắc xin được coi là đạt nếu:

+ Ít nhất 80 % gà nhóm 1 sống khỏe, không có bất kỳ biểu hiện nào của bệnh Gumboro;

+ Ít nhất 80 % gà nhóm 2 có biểu hiện triệu chứng và bệnh tích của bệnh Gumboro như xuất huyết cơ đùi, sưng, xuất huyết và có dịch ở túi Fabricius.

8.5.2 Phương pháp thay thế

Sử dụng 30 gà (5.1) chia làm 2 nhóm:

TCVN 8685-19 : 2017

+ Nhóm 1: gồm 20 gà, mỗi con được tiêm 1 liều vắc xin ghi trên nhãn, theo đường dưới da cổ;

+ Nhóm 2: gồm 10 gà làm đối chứng, không tiêm vắc xin.

Sau khi tiêm vắc xin từ 21 ngày đến 28 ngày, tất cả gà nhóm 1 và nhóm 2 được lấy máu, thu huyết thanh thực hiện 1 trong 2 phản ứng sau:

8.5.2.1. Phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch AGP (xem Phụ lục B)

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi hiệu giá kháng thể AGP trung bình của gà nhóm 1 $\geq 1 : 32$; trong khi đó gà nhóm 2 âm tính.

8.5.2.2. Phản ứng ELISA (Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit) (xem Phụ lục C)

Vắc xin đạt tiêu chuẩn khi ít nhất 80 % mẫu huyết thanh của lô gà nhóm 1 đạt giá trị S/P $> 0,20$ hoặc hiệu giá kháng thể > 396 ; trong khi đó ít nhất 80 % mẫu huyết thanh của lô gà nhóm 2 âm tính (giá trị S/P $\leq 0,20$ hoặc hiệu giá kháng thể ≤ 396).

Phụ lục A
(Quy định)
Phương pháp chuẩn độ vi rút

A.1 Chuẩn bị

- Chuẩn bị đĩa 96 giếng có 1 lớp tế bào xơ phôi gà
- Pha loãng vi rút trong môi trường tế bào MEM 1x
- Pha loãng vi rút theo tỷ lệ 1:10, pha loãng 7 nồng độ.

A.2 Cách tiến hành

- Đánh dấu thứ tự các nồng độ gây nhiễm trên đĩa tế bào.
- Mỗi đĩa có 4 giếng dùng làm đối chứng.
- Loại bỏ môi trường nuôi cấy trong đĩa tế bào, rửa tế bào 1 lần bằng dung dịch PBS¹.
- Bắt đầu từ nồng độ pha loãng cao nhất, mỗi nồng độ gây nhiễm cho 4 giếng (100 µl/giếng).
- Tiếp tục gây nhiễm các giếng tiếp theo, ngược trở lại đến nồng độ pha loãng thấp nhất.
- Đặt đĩa vào trong tủ ấm 37 °C trong môi trường có 5 % CO₂ trong 1 h.
- Rửa bỏ những vi rút không bám trên bề mặt tế bào bằng dung dịch PBS¹.
- Thêm 100 µl môi trường MEM 5 % huyết thanh bò.
- Đặt đĩa vào tủ ấm 37 °C trong môi trường có 5 % CO₂ và quan sát bệnh tích tế bào trong thời gian từ 1 ngày đến 4 ngày.
- Ghi lại số lượng giếng dương tính và âm tính.
- Tính TCID₅₀ (liều gây nhiễm của virus gây hủy hoại 50 % số giếng tế bào) theo phương pháp Spearman - Kaber.

$$\text{Log TCID}_{50} = (X_0 + d/2) - d \times (\sum r_i/n)$$

Trong đó:

X₀ là log của bậc pha loãng virus cao nhất;

TCVN 8685-19 : 2017

d là log của bậc pha loãng;

ri là số giếng tế bào âm tính ở mỗi bậc pha loãng;

n là số giếng tế bào được gây nhiễm ở mỗi bậc pha loãng.

Phụ lục B

(Quy định)

Phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch**B.1 Hóa chất và vật liệu**

- Agar Difco 1,5 g
- Phenol 0,5 ml
- NaCl 8,5 g
- Dung dịch PBS⁻ 0,01 M (pH 7,2)
- Kháng nguyên dương chuẩn, đối chứng âm
- Huyết thanh dương chuẩn, Huyết thanh âm chuẩn

B.2 Thiết bị, dụng cụ

- Máy ly tâm
- Máy hấp
- Ống ly tâm
- Dụng cụ đục lỗ
- Đĩa chuyên dụng
- Chai thủy tinh schott (100 ml, 1000 ml)
- Dụng cụ thường quy phòng thí nghiệm

B.3 Chuẩn bị vật liệu**B.3.1 Kháng nguyên dương tính chuẩn:**

- Gây nhiễm giống cường độc Gumboro tiêu chuẩn cho gà mẫn cảm (3 tuần tuổi đến 5 tuần tuổi), nhỏ vào mắt và mũi gà mỗi con 200 μ l (10^2 TCID₅₀)
- Sau 03 ngày gây nhiễm thu hoạch túi Fabricius, nghiền túi Fabricius có bệnh tích điển hình trong nước sinh lý với tỷ lệ 1 : 10 (1g túi Fabricius : 9 ml nước sinh lý pH 7,2)

TCVN 8685-19 : 2017

- Li tâm 1500 rpm trong 5 phút
- Giải đông tan 3 lần đến 5 lần
- Li tâm 3000 rpm trong 15 min thu lấy nước trong ở trên, bỏ cặn. Chia ống nhỏ, bảo quản âm 50 °C
- Cũng có thể dùng giống Gumboro cường độc tiêm vào màng niệu nang phôi gà miễn cảm 9-10 ngày thu hoạch phôi và nước niệu nang của các phôi chết trong vòng 48 - 96 h sau khi tiêm, trộn và xử lý như trên.

B.3.2 Chế tạo huyết thanh dương tính tiêu chuẩn

- Dùng gà trống choai khỏe mạnh (4-5 tuần tuổi, âm tính kháng thể Gumboro),
- Nhỏ mắt mũi cho mỗi gà 200 µl giống Gumboro cường độc (nồng độ 10^{-1}),
- 7 ngày sau nhỏ tiếp 200 µl giống Gumboro cường độc (nồng độ 10^{-1}) lần 2
- Nhỏ tiếp lần 3 và lần 4 cách 7 ngày
- Sau lần nhỏ lần 4, 28 ngày lấy máu gà để lấy huyết thanh, chia ống bảo quản âm 20 °C dùng dần (thời gian bảo quản 1 năm).

B.3.3 Huyết thanh âm tính:

- Lấy huyết thanh của gà khỏe mạnh chưa tiêm phòng vắc xin Gumboro

B.4 Cách tiến hành

- Dùng kháng nguyên dương tính Gumboro tiêu chuẩn: để xác định kháng thể trong huyết thanh của đàn gà cần kiểm tra (xác định mức độ kháng thể trong đàn gà miễn dịch)
- Chuẩn bị đĩa thạch: Dùng dung dịch PBS 0,01 M (pH7,2) cho thêm 8 % muối NaCl, 1 % thạch, 0,5 ml phenol đun cho tan thạch, đổ ra đĩa lòng mỗi đĩa 10 ml (thực hiện vô trùng), để nguội cho đông lại, đục lỗ tròn trên đĩa thạch, 1 lỗ giữa đĩa và 6 lỗ xung quanh, đường kính lỗ là 3 mm, các lỗ cách nhau 3 mm
- Cho thành phần phản ứng vào các lỗ: Lỗ chính giữa cho Kháng nguyên dương tính chuẩn, các lỗ xung quanh lỗ 1-4 cho huyết thanh cần kiểm tra và lỗ 5 cho huyết thanh đối chứng dương và lỗ 6 cho huyết thanh đối chứng âm. Cho đĩa vào hộp để 37 °C, quan sát trong 3 ngày

B.5 Diễn giải kết quả

- Kết quả: Sau khi quan sát đối chứng dương và đối chứng âm rõ ràng, quan sát các lỗ thí nghiệm nếu thấy giữa lỗ thí nghiệm và lỗ kháng nguyên dương tính có vạch ngưng kết thì kết luận phản ứng dương tính, không có vạch ngưng kết giống đối chứng âm thì phản ứng âm tính.

Phụ lục C
(Quy định)

Phản ứng ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

C.1 Vật liệu thử

- Huyết thanh gà cần kiểm tra
- Kit Ab ELISA (*Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit*).

C.2 Cách tiến hành

- Pha huyết thanh 1/500 trong dung dịch pha mẫu.
- Cho vào đĩa có phủ kháng nguyên.

100 µl / giếng đối chứng âm không pha loãng vào giếng A1 và A2.

100 µl / giếng đối chứng dương không pha loãng vào giếng A3 và A4.

Cho vào các giếng khác 100 µl / giếng huyết thanh mẫu cần chẩn đoán đã pha loãng 1/500, mỗi mẫu có thể làm 1 giếng hoặc 2 giếng.

- Ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút (18 °C đến 25 °C) .
- Loại bỏ dung dịch trong đĩa.
- Rửa bằng nước cất 2x (350 µl / giếng x 3 lần đến 5 lần), vỗ cho khô nước.
- Cho vào 100 µl (Goat) Anti-Chicken: Horseradish Peroxidase Conjugate cho mỗi giếng .
- Ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút (18 °C đến 25 °C)
- Loại bỏ dung dịch trong đĩa, rửa bằng nước cất 2x (350 µl / giếng x 3 lần đến 5 lần), vỗ cho khô nước.
- Cho vào 100 µl TMB substrate / giếng.
- Ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút (18 °C đến 25 °C)
- Cho vào 100 µl dung dịch dừng phản ứng / giếng.
- Đặt vào máy đọc ở bước sóng A (650).

C.3 Công thức

– Đối chứng âm trung bình (NCx) =
$$\frac{OD \text{ giếng A1} + OD \text{ giếng A2}}{2}$$

– Đối chứng dương trung bình (PCx) =
$$\frac{OD \text{ giếng A3} + OD \text{ giếng A4}}{2}$$

– Giá trị S/P =
$$\frac{OD \text{ Mẫu} - NCx}{PCx - NCx}$$

– Hiệu giá S/P ở độ pha loãng 1 : 500 : $\log_{10} \text{ Titer} = 1,09 (\log_{10} S/P) + 3,36$

C.4 Điều kiện kết quả

Giá trị OD của đối chứng đạt điều kiện như sau thì phản ứng đạt

– OD đối chứng dương – OD đối chứng âm > 0,075 (PCx - NCx > 0,075)

– OD đối chứng âm ≤ 0,150 (NCx ≤ 0,150)

C.5 Diễn giải kết quả

– Giá trị S/P ≤ 0,02 mẫu kiểm tra âm tính (S/P ≤ 0,20 : N)

– Giá trị S/P > 0,02 mẫu kiểm tra dương tính (S/P > 0,20 : P)

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Asean standard requirements for Infectious Bronchitis (Inactivated) Vaccine
 - [2] OIE: Chapter 2.3.12 *Infectious Bursal Disease* (Gumboro disease)
 - [3] TCVN 8406:2010 - *Giống vi sinh vật thú y – Quy trình giữ giống virus cường độc Gumboro*
-