

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8683-15:2017

**GIỐNG VI SINH VẬT THÚ Y - PHẦN 15: QUY TRÌNH GIỮ
GIỐNG VI RÚT VIÊM GAN VỊT CƯỜNG ĐỘ**

*Master seed of microorganisms for veterinary use -
Part 15: The procedure for preservation of virulent duck hepatitis virus*

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 8683-15:2017 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 8683 *Giống vi sinh vật thú y – Quy trình giữ giống* gồm các phần:

- TCVN 8683-1 : 2011, *Phần 1: Quy trình giữ giống vi rút dịch tả lợn qua thử, chủng C*;
- TCVN 8683-2 : 2011, *Phần 2: Quy trình giữ giống vi rút cường độc dịch tả lợn, chủng Thạch môn*;
- TCVN 8683-3 : 2011, *Phần 3: Quy trình giữ giống vi rút Newcastle, chủng hệ I*;
- TCVN 8683-4 : 2011, *Phần 4: Quy trình giữ giống vi rút đại chủng cổ định*;
- TCVN 8683-5 : 2011, *Phần 5: Quy trình giữ giống vi khuẩn đóng dấu lợn nhược độc, chủng VR2*;
- TCVN 8683-6 : 2011, *Phần 6: Quy trình giữ giống vi khuẩn nhiệt thán vô độc, chủng 34 F2*;
- TCVN 8683-7 : 2011, *Phần 7: Quy trình giữ giống vi khuẩn nhiệt thán cường độc, chủng 17JB*;
- TCVN 8683-8 : 2011, *Phần 8: Quy trình giữ giống vi khuẩn phó thương hàn lợn, các chủng SC.1; SC.2; SC.4 và SC.5*;
- TCVN 8683-9 : 2011, *Phần 9: Quy trình giữ giống vi khuẩn tụ huyết trùng trâu bò, các chủng PB.1, PB.2, P.52, PBU.1 và PBU.2*;
- TCVN 8683-10 : 2011, *Phần 10: Quy trình giữ giống vi khuẩn tụ huyết trùng lợn nhược độc, chủng AVPS3*;
- TCVN 8683-11 : 2011, *Phần 11: Quy trình giữ giống vi khuẩn tụ huyết trùng lợn, chủng PS1*;
- TCVN 8683-12 : 2011, *Phần 12: Quy trình giữ giống vi khuẩn tụ huyết trùng gà, các chủng PA.1, PA.2*;
- TCVN 8683-13 : 2011, *Phần 13: Quy trình giữ giống vi khuẩn đóng dấu lợn, các chủng E.37, E.47 và E.80*;

TCVN 8683-15 : 2017

- TCVN 8683-14 : 2011, *Phần 14: Quy trình giữ giống vi khuẩn ung khí thán, các chủng CL.C1 và CL.C2;*
- TCVN 8683-15:2017, *Phần 15: Quy trình giữ giống vi rút viêm gan vịt cường độc;*
- TCVN 8683-16:2017, *Phần 16: Quy trình giữ giống vi rút gumboro nhược độc chủng 2512;*
- TCVN 8683-17:2017, *Phần 17: Quy trình giữ giống vi khuẩn bordetella bronchiseptica.*

Giống vi sinh vật thú y -**Phần 15: Quy trình giữ giống vi rút viêm gan vịt cường độc**

Master seed of microorganisms for veterinary use -

Part 15: The procedure for preservation of Virulent Duck Hepatitis Virus

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình nuôi giữ giống vi rút Viêm gan vịt cường độc (DHV-1) được sử dụng trong công tác giữ giống, chẩn đoán, nghiên cứu, đánh giá chất lượng vắc xin và chế phẩm sinh học.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 8684 : 2011, *Vắc xin và chế phẩm sinh học dùng trong thú y – Phép thử độ thuần khiết.*

3 Ký hiệu và chữ viết tắt

LD ₅₀	50 % Lethal Dose
EID ₅₀	50 % Egg Infective Dose
SPF	Specific Pathogen Free
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

4 Nguyên tắc

Lấy giống vi rút Viêm gan vịt cường độc được giữ ở dạng đông khô để kiểm tra đặc tính sinh học của giống bằng các phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm. Sau đó giống vi rút Viêm gan vịt được bồi dưỡng bằng cách tiêm truyền trên vịt con từ 1 đến 3 ngày tuổi, sau 72 h thu hoạch vi rút và giám định bằng phương pháp trung hòa hoặc phương pháp RT-PCR, nếu giống vi rút Viêm gan vịt đạt yêu cầu được đông khô và bảo quản ở nhiệt độ âm 80 °C.

5 Vật liệu và thuốc thử

5.1 Vật liệu

5.1.1 Giống vi rút Viêm gan vịt cường độc được đông khô với hàm lượng 0,1 ml/lọ với hiệu giá vi rút là 10^6 LD₅₀/0,5 ml, giống đạt chỉ tiêu vô trùng, thuần khiết và được nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR

5.1.2 Vịt từ 1 ngày tuổi đến 3 ngày tuổi (vịt khỏe mạnh, không có kháng thể kháng vi rút Viêm gan vịt, có nguồn gốc từ đàn vịt bố mẹ khỏe mạnh, không tiêm phòng vắc xin Viêm gan vịt)

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

5.1.4 Huyết thanh dương tính Viêm gan vịt

5.1.5 Huyết thanh âm tính Viêm gan vịt

5.2 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hai lần (pH 7) hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương không có enzym phân giải RNA (RNase), trừ khi có quy định khác.

5.2.1 Sữa bò tách bơ 10 % trong dung dịch PBS (xem phụ lục A)

5.2.2 Dung dịch PBS pH 7,2 (xem phụ lục A)

5.2.3 Cloroform 5 %

5.2.4 Các loại kháng sinh Penicillin (200 UI/ml), Streptomycin (200 µg/ml)

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 lạnh (có thể duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C), **tủ lạnh sâu** (có thể duy trì nhiệt độ âm 80 °C)

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

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

6.4 Máy khuấy từ có tốc độ khuấy tới 2400 rpm

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

6.6 BSC II màng lọc ULPA với hiệu suất lọc 99,99 % đối với các hạt có kích thước 0,1 mm đến 0,3 mm

6.7 Máy ly tâm, có thể ly tâm với gia tốc tới 12 000 rpm

6.8 Máy đông khô có nhiệt độ âm sâu tới âm 80 °C

6.9 Máy RT-PCR

6.10 Máy điện di kiểm tra sản phẩm PCR/RT-PCR của hãng Fermentas và Bio-Rad

6.11 Máy soi gel Dolphin-Doc (Wealtech, Mỹ)

6.12 Máy tính và các phần mềm sinh - tin học

6.13 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

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

6.15 Màng lọc cỡ lỗ 0,45 µm

6.16 Đầu tip phù hợp với micropipet

6.17 Đèn soi trứng

6.18 Tủ áp trứng có thể duy trì nhiệt độ 37 °C

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

6.20 Bộ cối chày sứ vô trùng

6.21 Lọ đông khô giống vô trùng

6.22 Đĩa Petri vô trùng

6.23 Dao, kéo, panh kẹp vô trùng

7 Yêu cầu của giống vi rút Viêm gan vịt cường độc

7.1 Yêu cầu kỹ thuật đối với ống giống

- Lọ kín, không rạn nứt, đảm bảo chân không.
- Hợp chất trong ống giống xốp, màu đồng nhất, độ ẩm dưới 4 % và hòa tan hoàn toàn trong nước sinh lý sau 2 min.

7.2 Yêu cầu sinh học của giống

- Giống vi rút đảm bảo vô trùng (không bị tạp nhiễm vi khuẩn, nấm mốc), đảm bảo thuần khiết (không bị tạp nhiễm Mycoplasma, Salmonella và vi rút ngoại lai)
- Giống vi rút được nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR (xuất hiện vạch giống như mẫu đối chứng dương)

TCVN 8683-15 : 2017

- Hiệu giá vi rút của giống phải đạt ít nhất 10^6 LD₅₀/0,5 ml

8 Cách tiến hành

8.1 Nhận dạng giống

Giống vi rút (5.1.1) được nhận dạng bằng phương pháp RT – PCR (tham khảo phụ lục D).

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 thuần khiết

8.3.1 Kiểm tra tạp nhiễm Mycoplasma. Theo TCVN 8684:2011

8.3.2 Kiểm tra tạp nhiễm Salmonella. Theo TCVN 8684:2011

8.3.3 Kiểm tra vi rút ngoại lai

Kiểm tra tạp nhiễm vi rút Dịch tả vịt (Duck Enteritis Virus) được tiến hành bằng phản ứng RT-PCR (tham khảo phụ lục C), sử dụng cặp mồi của vi rút Dịch tả vịt.

8.4 Chuẩn độ vi rút

- Chuẩn bị:

+ Giống vi rút (5.1.1) được pha loãng với PBS (5.2.2) thành các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10} .

+ 50 vịt (5.1.2).

- Cách tiến hành:

Tiêm huyền dịch giống vi rút đã pha loãng vào bắp đùi vịt mỗi con 0,5 ml, mỗi nồng độ tiêm 5 con. Theo dõi trong 72 h, mổ khám vịt chết và quan sát bệnh tích.

- Đánh giá kết quả: Giống đạt yêu cầu khi trên 70 % vịt chết hoặc có biểu hiện triệu chứng điển hình và hiệu giá vi rút của giống phải đạt ít nhất 10^6 LD₅₀/0,5 ml (xem phụ lục B).

8.5 Bồi dưỡng giống vi rút

8.5.1 Tiêm truyền giống

Giống vi rút (5.1.1) được hoàn nguyên bằng 1 ml PBS (5.2.2) rồi pha loãng theo cơ số 10 đến nồng độ 10^{-5} rồi tiêm cho vịt (5.1.2) ở nồng độ 10^{-5} với liều 0,5 ml/con (tương đương $10^{3,0}$ LD₅₀). Theo dõi toàn đàn trong vòng 24 h đến 72 h sau khi tiêm.

8.5.2 Thu hoạch giống

8.5.2.1 Chuẩn bị

Lựa chọn những vịt có triệu chứng và bệnh tích như sau để thu hoạch gan:

- Triệu chứng: Triệu chứng về thần kinh (mất thăng bằng khi vận động, đi liêu xiêu hoặc bị ngã, trước khi chết hai chân duỗi thẳng như bơi chèo).
- Bệnh tích: gan sưng, trên bề mặt có các điểm xuất huyết, xung quanh các điểm xuất huyết còn thấy các đám tụ máu. Một số trường hợp lách lỏm đốm xuất huyết và sưng, thận tụ máu và có dịch rỉ viêm.

8.5.2.2 Cách tiến hành

8.5.2.2.1 Thu hoạch gan

Cắt bỏ lông vùng bụng của vịt, dùng phanh kẹp và kéo nhọn (6.23) bóc lộ xoang bụng sau đó dùng kéo cong nhỏ (6.23) thu hoạch toàn bộ gan rồi cho vào lọ đông khô giống vỏ trùng (6.21).

8.5.2.2.2 Kiểm tra vô trùng gan của vịt (8.5.2.2.1)

Gan vịt đã thu hoạch (8.5.2.2.1) được nghiền nát bằng cối chày sứ (6.20) rồi pha loãng với PBS (5.2.2) thành huyền dịch có nồng độ 10^{-1} . Dem huyền dịch này kiểm tra vô trùng theo TCVN 8684 : 2011, nếu đạt vô trùng sẽ tiến hành phát hiện và giám định vi rút.

8.5.2.3 Phát hiện và giám định vi rút

8.5.2.3.1 Xử lý gan

- Nghiền gan vịt (8.5.2.2.1) trong cối chày sứ với dung dịch PBS (5.2.2) thành huyền dịch 10 % sau đó xử lý vô trùng bằng kháng sinh penicillin và streptomycin (5.2.4)
- Ly tâm huyền dịch bệnh phẩm 2000 rpm trong 15 min sau đó hút lấy dịch nước trong ở phía trên khoảng 3ml đến 4ml.
- Xử lý dịch thu được bằng cloroform 5 % trong 15 min ở nhiệt độ phòng.

8.5.2.3.2 Phát hiện vi rút

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

8.5.2.3.2.1 Tiêm truyền trên phôi gà

- Tiêm huyền dịch gan vịt (8.5.2.3.1) vào xoang niệu mô hoặc màng CAM của 3 trứng gà (5.1.3) mỗi trứng 0,2 ml. Ấp các trứng đã được tiêm ở tủ ấp trứng (6.18) trong 7 ngày. Hàng ngày, soi trứng và loại bỏ trứng chết phôi trước 24 h.
- Thu hoạch gan của phôi trứng đáp ứng các yêu cầu sau:
 - + Phôi chết trong khoảng 5 ngày đến 8 ngày sau khi tiêm
 - + Phôi chết có bệnh tích còi cọc, xuất huyết toàn thân, phù nề ở bụng, gan xuất huyết và hoại tử
 - + Đối với phôi chết muộn hơn, dịch niệu có màu xanh lục.
- Các gan của phôi trứng đã thu hoạch ở trên sẽ được xử lý theo 8.5.2.3.1 để giám định vi rút.

8.5.2.3.2.2 Tiêm truyền cho vịt

- Cách tiến hành: Tiêm huyền dịch gan của phôi trứng (8.5.2.3.2.1) vào bắp đùi của 3 vịt (5.1.2) mỗi con 0,5ml. Theo dõi toàn đàn trong vòng 24 h đến 72 h sau khi tiêm.

- Đánh giá kết quả: Nếu trong bệnh phẩm có vi rút viêm gan vịt thì vịt sẽ chết trong khoảng 18 h đến 48 h với các triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh như đã mô tả ở 8.5.2.1.

Thu hoạch gan vịt và xử lý theo 8.5.2.3.1 để giám định vi rút.

8.5.2.3.3 Giám định vi rút

Lựa chọn phương pháp trung hòa (8.5.2.3.3.1) hoặc phương pháp RT-PCR (8.5.2.3.3.2) để giám định vi rút

8.5.2.3.3.1 Phương pháp trung hòa

Chọn 1 trong 2 phương pháp sau:

- Phương pháp trung hòa trên phôi gà:

+ Vi rút đã phát hiện ở 8.5.2.3.2 được pha loãng với PBS (5.2.2) thành các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10}

+ Trộn huyết thanh dương tính viêm gan vịt (5.1.4) với các nồng độ vi rút đã pha loãng ở trên theo tỷ lệ 1:1

+ Trộn huyết thanh âm tính viêm gan vịt (5.1.5) với các nồng độ vi rút đã pha loãng ở trên theo tỷ lệ 1:1

+ Ủ hỗn hợp vi rút và huyết thanh trên ở tủ ấm (6.2) trong 1 h

+ 100 trứng gà SPF có phôi (5.1.3) được chia thành 2 lô:

Lô đối chứng dương tính: Tiêm 0,2 ml hỗn hợp vi rút và huyết thanh dương tính viêm gan vịt vào xoang niệu mô của trứng (5.1.3), mỗi nồng độ tiêm 5 trứng.

Lô đối chứng âm tính: Tiêm 0,2 ml hỗn hợp vi rút và huyết thanh âm tính viêm gan vịt vào xoang niệu mô của trứng (5.1.3), mỗi nồng độ tiêm 5 trứng.

+ Ấp các trứng đã được tiêm ở tủ ấp trứng (6.18) trong 7 ngày. Hàng ngày, soi trứng và loại bỏ trứng chết phôi trước 24 h

+ Đánh giá kết quả: Giống vi rút đạt yêu cầu khi đáp ứng 2 điều kiện sau:

Lô đối chứng dương tính: phôi sống khỏe.

Lô đối chứng âm tính: phôi chết với bệnh tích còi cọc, xuất huyết và phù nề.

- Phương pháp trung hòa trên vịt:

+ Vi rút đã phát hiện ở 8.5.2.3.2 được pha loãng với PBS (5.2.2) thành các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10}

+ Trộn huyết thanh dương tính viêm gan vịt (5.1.4) với các nồng độ vi rút đã pha loãng ở trên theo tỷ lệ 1:1

- + Trộn huyết thanh âm tính viêm gan vịt (5.1.5) với các nồng độ vi rút đã pha loãng ở trên theo tỷ lệ 1:1
- + Ủ hỗn hợp vi rút và huyết thanh trên ở tủ ấm (6.2) trong 1 h
- + 100 vệt (5.1.2) được chia thành 2 lô:

Lô đối chứng dương tính: Tiêm 0,5 ml hỗn hợp vi rút và huyết thanh dương tính viêm gan vịt vào bắp đùi vệt mỗi con 0,5 ml, mỗi nồng độ tiêm 5 vệt.

Lô đối chứng âm tính: Tiêm 0,5 ml hỗn hợp vi rút và huyết thanh âm tính viêm gan vịt vào bắp đùi vệt mỗi con 0,5 ml, mỗi nồng độ tiêm 5 vệt.

+ Quan sát theo dõi vệt trong 72 h

+ Đánh giá kết quả: Giống đạt yêu cầu khi đáp ứng 2 điều kiện sau:

Lô đối chứng dương tính: vệt sống khỏe.

Lô đối chứng âm tính: vệt chết trong khoảng từ 18 h đến 48 h với các triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh viêm gan vệt.

8.5.2.3.2 Phương pháp RT- PCR

Giống vi rút (5.1.1) được nhận dạng bằng phương pháp RT – PCR (tham khảo phụ lục D).

8.6 Đông khô giống vi rút

Nghiền những gan vệt chết đạt yêu cầu của 8.5.2.3.3, trộn đều với sữa bò tách bơ (5.2.1), lọc bỏ cặn và chia vào lọ đông khô (6.21), giữ ở nhiệt độ âm 80 °C từ 8 h đến 12 h rồi chuyển vào máy đông khô (6.8).

- Chạy đông khô theo quy trình của máy đông khô.

9 Kiểm tra ống giống vi rút sau đông khô

9.1 Kiểm tra đặc tính kỹ thuật của ống giống

- Cảm quan: Quan sát bằng mắt thường, ống giống vi rút được coi là đạt yêu cầu khi lọ kín, không rạn nứt, chế phẩm xộp, màu đồng nhất.

- Chân không: Sử dụng máy đo chân không, ống giống vi rút được coi là đạt yêu cầu khi phát huỳnh quang màu ánh tím.

- Độ ẩm: Sử dụng máy đo độ ẩm, ống giống vi rút được coi là đạt yêu cầu khi độ ẩm dưới 4%.

- Độ hòa tan: ống giống vi rút được coi là đạt yêu cầu khi hòa tan hoàn toàn trong nước sinh lý sau 2 min có lắc nhẹ.

9.2 Kiểm tra đặc tính sinh học của giống vi rút

Đạt các chỉ tiêu ở mục 7

TCVN 8683-15 : 2017

10 Bao gói, bảo quản ống giống vi rút sau đông khô

Chọn những ống giống đạt các chỉ tiêu ở mục 9 để dán nhãn, bao gói và bảo quản:

10.1 Dán nhãn

- Các ống giống vi rút phải được dán nhãn
- Nhãn phải có các thông tin sau:
 - + Nơi sản xuất
 - + Tên giống
 - + Số lô...ngày...tháng...năm... sản xuất
 - + Người thực hiện
 - + Điều kiện bảo quản

10.2 Bao gói và bảo quản

Ống giống được bao gói bằng giấy, để trong túi Polyeste và được giữ ở nhiệt độ âm 80°C trong 2 năm.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**A.1 Dung dịch PBS pH 7,2**

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

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

A.2 Dung dịch sữa bò tách bơ 10%

Sữa bò tách bơ	10 g
PBS	90 ml

Đun sôi PBS rồi để nguội đến nhiệt độ 50 °C đến 70 °C rồi cho sữa bò tách bơ vào, lắc đều cho sữa tan hết.

A.3 Chuẩn bị đoạn gen mồi cho quá trình nhân gen

Dùng dung dịch đệm TE để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 200 pmol/μl làm mồi gốc.

Mồi sử dụng ở nồng độ 10 pmol/μl: pha loãng mồi gốc bằng nước không có nuclease.

Mồi đông khô phải được ly tâm ngắn để chắc chắn rằng mồi được lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên.

Mồi gốc	10 μl
Nước không chứa RNase	90 μl
Tổng lượng	100 μl

Phụ lục B

(Quy định)

Công thức tính liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD₅₀) của Reed Muench

Công thức: $LgLD_{50} = LgA + Xl_gf$

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

Trong đó:

X: Khoảng cách tỷ lệ

A: Nồng độ pha loãng vi rút gây chết động vật thí nghiệm cận trên 50 %

A': Tỷ lệ % động vật thí nghiệm chết cận trên 50 %

B': Tỷ lệ % động vật thí nghiệm chết cận dưới 50 %

f: Cơ số pha loãng vi rút

Phụ lục C

(Tham khảo)

Quy trình RT-PCR phát hiện ARN vi rút Dịch tả vịt**C.1 Chiết tách ARN**

Chiết tách ARN bằng bộ kit, khi sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

C.2 Tiến hành phản ứng RT-PCR

Áp dụng cho bộ Maxime RT-PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology)

Nguyên liệu	Thể tích (μl)
H ₂ O	9
Dung dịch đệm RT- PCR (Tris/HCl và KCl)	1
OptiScript reverse transcriptase	2
dNTP	1
i-StarTaq DN A polymerase	1
Mồi xuôi (10pmole/ μl)	1
Mồi ngược (10pmole/ μl)	1
Mẫu ARN	4
Tổng cộng	20

Mồi	Chiều	Chuỗi (5' - 3')	Kích thước (bp)
DTVF	Xuôi	5' - GAAGGCGGGTATGTAATGTA -3'	467
DTVR	Ngược	5' - CAAGGCTCTATTCGGTAATG -3'	

C.3 Chu trình nhân gen

Bước	Chu kỳ	Thời gian	Nhiệt độ (°C)
Bước 1	1 chu kỳ	30 min	45
Bước 2	1 chu kỳ	5 min	94
Bước 3	40 chu kỳ	30 s	52
		30 s	72
		20 s	94
Bước 4	1 chu kỳ	5 min	72
Bước 5	1 chu kỳ	∞	4

C.4 Chạy điện di

Chuẩn bị thạch agarose 2 % pha trong dung dịch TAE 1X hoặc TBE 1X có ethidi bromua (10 µg/µl). Đổ thạch vào khuôn điện di có lược.

Thạch khô, rút lược ra và cho mẫu vào các giếng (8 µl sản phẩm PCR + 2 µl dung dịch tải). Sử dụng thang chuẩn (Marker) 100 bp trở lên.

Chú ý khi chạy PCR phải có mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm đi kèm (mẫu đối chứng âm có thể là nước).

C.5 Đọc kết quả

Mẫu dương tính: Xuất hiện vạch và có kích thước bằng kích thước mẫu đối chứng dương.

Mẫu âm tính: Không có vạch.

C.6 Đánh giá kết quả

Có vi rút Dịch tả vịt trong mẫu bệnh phẩm nếu kết quả RT-PCR dương tính.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Quy trình RT-PCR phát hiện ARN vi rút Viêm gan vệt

D.1 Chiết tách ARN

Chiết tách ARN bằng bộ kit, khi sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

D.2 Tiến hành phản ứng RT-PCR

Áp dụng cho bộ Maxime RT-PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology)

Nguyên liệu	Thể tích (μl)
H ₂ O	9
Dung dịch đệm RT- PCR (Tris/HCl và KCl)	1
OptiScript reverse transcriptase	2
dNTP	1
i-StarTaq DN A polymerase	1
Mồi xuôi (10pmole/ μl)	1
Mồi ngược (10pmole/ μl)	1
Mẫu ARN	4
Tổng cộng	20

Mồi	Chiều	Chuỗi (5' - 3')	Kích thước (bp)
DHV-1 Com F	Xuôi	AAG-AAG-GAG-AAA-ATY-[C hoặc T]-AAG-GAA-GG	467
DHV-1 Com R	Ngược	TTG-ATG-TCA-TAG-CCC-AAS- [C hoặc G]-ACA-GC	

D.3 Chu trình nhân gen

Bước	Chu kỳ	Thời gian	Nhiệt độ (°C)
Bước 1	1 chu kỳ	30 min	45
Bước 2	1 chu kỳ	5 min	94
Bước 3	40 chu kỳ	30 s	52
		30 s	72
		20 s	94
Bước 4	1 chu kỳ	5 min	72
Bước 5	1 chu kỳ	∞	4

D.4 Chạy điện di

Chuẩn bị thạch agarose 2 % pha trong dung dịch TAE 1X hoặc TBE 1X có ethidi bromua (10 µg/µl). Đổ thạch vào khuôn điện di có lược.

Thạch khô, rút lược ra và cho mẫu vào các giếng (8 µl sản phẩm PCR + 2 µl dung dịch tải). Sử dụng thang chuẩn (Marker) 100 bp trở lên.

Chú ý khi chạy PCR phải có mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm đi kèm (mẫu đối chứng âm có thể là nước).

D.5 Đọc kết quả

Mẫu dương tính: Xuất hiện vạch và có kích thước bằng kích thước mẫu đối chứng dương.

Mẫu âm tính: Không có vạch.

D.6 Đánh giá kết quả

Có vi rút viêm gan vệt typ I trong mẫu bệnh phẩm nếu kết quả RT-PCR dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OIE Terrestrial Manual 2012 - *Chapter 2.3.7 - Duck virus hepatitis*
 - [2] OIE Terrestrial Manual 2012 - *Chapter 2.3.8 - Duck virus enteritis*
 - [3] TCCS 13:2005 - *Quy trình giữ giống Viêm gan vịt cường độc*
 - [4] Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xây dựng danh mục giống vi rút gia cầm Quốc gia - *Mục 4.3 - Nội dung 3: Kết quả xác định đặc tính sinh học; Giải mã gen đặc trưng, xây dựng dữ liệu sinh học của giống vi rút Viêm gan vịt cường độc.*
-