TCVN **TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

TCVN 8685-39:2020

(Xuất bản lần 1)

QUY TRÌNH KIỂM NGHIỆM VẮC XIN – PHẦN 39: VẮC XIN VÔ HOẠT PHÒNG HỘI CHỨNG CÒI CỌC DO *CIRCOVIRUS* GÂY RA Ở LỢN

Vaccine testing procedure –

Part 39: Porcine circovirus vaccine, inactivated

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 8685-39:2020 do Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y Trung Ương 1 - 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 8685-15:2017, *Phần 15: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do pasteurella multocida type D gây ra ở lợn*;
- TCVN 8685-16:2017, *Phần 16: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm teo mũi*

truyền nhiễm ở lợn;

- TCVN 8685-17:2017, *Phần 17: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn*;
- TCVN 8685-18:2017, *Phần 18: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh newcastle*;
- TCVN 8685-19:2017, *Phần 19: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh gumboro*;
- TCVN 8685-20:2018, *Phần 20: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Newcastle;*
- TCVN 8685-21:2018, *Phần 21: Vắc xin phòng bệnh đậu gà;*
- TCVN 8685-22:2018, *Phần 22: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng ở gia cầm;*
- TCVN 8685-23:2018, *Phần 23: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Salmonella enteritidis ở gà;*
- TCVN 8685-24:2018, *Phần 24: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Salmonella typhimurium ở gà;*
- TCVN 8685-25:2018, *Phần 25: Vắc xin phòng bệnh giả dại ở lợn;*
- TCVN 8685-26:2018, *Phần 26: Vắc xin nhược độc phòng bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm ở gà;*
- TCVN 8685-27:2018, *Phần 27: Vắc xin nhược độc phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gà;*
- TCVN 8685-28:2019, *Phần 28: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Tụ huyết trùng ở lợn;*
- TCVN 8685-29:2019, *Phần 29: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm (IB) ở gà;*
- TCVN 8685-30:2019, *Phần 30: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Viêm não tủy truyền nhiễm ở gà;*
- TCVN 8685-31:2019, *Phần 31 Vắc xin phòng bệnh Dại ở chó;*
- TCVN 8685-32:2019, *Phần 32: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Mycoplasma gallisepticum ở gia cầm;*
- TCVN 8685-33:2019, *Phần 33: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Riermerella anatipestifer;*
- TCVN 8685-34:2020, *Phần 34: Vắc xin phòng bệnh tiêu chảy thành dịch do Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây ra ở lợn;*
- TCVN 8685-35:2020, *Phần 35: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng ở*

trâu bò;

- TCVN 8685-36:2020, *Phần 36: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh tụ huyết trùng và bệnh đóng dấu ở lợn;*

- TCVN 8685-37:2020, *Phần 37: Vắc xin nhược độc phòng bệnh Marek ở gà;*

- TCVN 8685-38:2020, *Phần 38: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh do Leptospira gây ra;*

- TCVN 8685-39:2020, *Phần 39: Vắc xin vô hoạt phòng hội chứng còi cọc do Circovirus gây ra ở lợn.*

Quy trình kiểm nghiệm vắc xin – Phần 39: Vắc xin vô hoạt phòng Hội chứng còi cọc do *Circovirus* gây ra ở lợn

Vaccine testing procedure – Part 39: Porcine circovirus vaccine, inactivated

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình kiểm nghiệm vắc xin vô hoạt phòng hội chứng còi cọc do *Circovirus serotype 2* (PCV2) gây ra ở lợn.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các bản 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 Chữ viết tắt

PCV2: Porcine Circo Virus Serotype 2 (Vi rút Circo tuýp 2)

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Phản ứng miễn dịch gắn enzyme)

PK: Porcine kidney (Tế bào thận lợn)

4 Nguyên tắc

Vắc xin được kiểm tra các chỉ tiêu cảm quan, độ thuần khiết, vô hoạt bằng các phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm, các chỉ tiêu an toàn và hiệu lực được đánh giá trên lợn từ 3 tuần tuổi đến 4 tuần tuổi khỏe mạnh, không có kháng thể PCV2.

5 Vật liệu và thuốc thử

5.1 Lợn từ 3 tuần tuổi đến 4 tuần tuổi, lợn khỏe, không có kháng thể PCV2.

5.2 Kit ELISA phát hiện kháng thể PCV2.

5.3 Nước muối sinh lý vô trùng, nồng độ từ 0,85 % đến 0,9 %.

5.4 Tế bào PK 15.

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, duy trì nhiệt độ ấm 20 °C.

6.2 Máy ly tâm, ly tâm với gia tốc 9000 *g*.

6.3 Tủ ấm CO_2, duy trì nhiệt độ 37 °C, có từ 5 % đến 10 % CO_2.

6.4 Kính hiển vi, có vật kính với độ phóng đại 10 X.

7 Cách tiến hành

7.1 Kiểm tra cảm quan

- Lắc nhẹ lọ vắc xin và quan sát độ đồng đều của hỗn dịch bằng mắt thường.

- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra cảm quan khi có hỗn dịch đồng đều, không đông vón, không lắng cặn.

7.2 Kiểm tra độ thuần khiết

- Kiểm tra độ thuần khiết theo 4.1, 4.2 TCVN 8684:2011.

- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra độ thuần khiết khi không có bất cứ tạp khuẩn hay nấm mốc nào mọc trên các môi trường kiểm tra trong thời gian theo dõi.

7.3 Kiểm tra vô hoạt

7.3.1 Chiết tách kháng nguyên PCV2 từ vắc xin: vắc xin được đông lạnh ở tủ ấm (6.1) trong 12 giờ, sau đó được giải đông ở nhiệt độ phòng và ly tâm ở máy ly tâm (6.2) với tốc độ 9000 *g* trong 10 phút để vắc xin tách thành 2 phần nước và dầu. Loại bỏ phần dầu và giữ lại phần nước.

7.3.2 Gây nhiễm 100 µl kháng nguyên PCV2 chiết tách từ vắc xin (7.3.1) trên tế bào PK 15 (5.4), ủ ở tủ ấm CO_2 (6.3) trong 48 giờ, sau đó kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi (6.4) ở vật kính 10 X.

7.3.3 Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra vô hoạt khi không có bệnh tích tế bào sau 48 giờ gây nhiễm.

7.4 Kiểm tra an toàn

- Tiêm bắp cho 03 lợn (5.1), mỗi lợn 2 liều vắc xin ghi trên nhãn.

- Sau khi tiêm, theo dõi lợn thí nghiệm trong 21 ngày.

- Đánh giá kết quả: vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra an toàn khi cả 3 lợn sống khỏe, phát triển bình thường, không có biểu hiện khác thường cũng như không có biểu hiện triệu chứng của bệnh do PCV2 gây ra.

7.5 Kiểm tra hiệu lực

7.5.1 Cách tiến hành

- Sử dụng 08 lợn (5.1), chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm 1: gồm 05 lợn, mỗi lợn được tiêm bắp 1 liều vắc xin ghi trên nhãn;

+ Nhóm 2: gồm 03 lợn làm đối chứng, mỗi lợn được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (5.3) với liều lượng và đường tiêm như nhóm 1.

- Sau khi tiêm vắc xin từ 21 ngày đến 28 ngày, 05 lợn nhóm 1 và 03 lợn nhóm 2 được lấy máu, chắt huyết thanh, kiểm tra kháng thể bằng phương pháp ELISA, sử dụng kit ELISA phát hiện kháng thể PCV2 (5.2).

CHÚ THÍCH: Hiện nay, có nhiều bộ KIT ELISA phát hiện kháng thể PCV2 bán sẵn trên thị trường. Khi sử dụng phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ về phản ứng ELISA sử dụng KIT thương mại được nêu trong phụ lục A.

7.5.2 Đánh giá kết quả

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm tra hiệu lực khi:

+ Ít nhất 80 % mẫu huyết thanh của lợn nhóm 1 dương tính;

+ 100 % mẫu huyết thanh của lợn nhóm 2 âm tính.

8 Kết luận

Vắc xin đạt yêu cầu kiểm nghiệm khi đáp ứng được tất cả các yêu cầu về cảm quan, độ thuần khiết, vô hoạt, an toàn và hiệu lực như đã nêu lần lượt ở 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 và 7.5.

Phụ lục A
(Tham khảo)
Ví dụ về phản ứng ELISA sử dụng KIT thương mại

A.1 Nguyên vật liệu

A.1.1 Huyết thanh lợn cần kiểm tra (xem 7.5.1).

A.1.2 Nước cất đã khử ion.

A.1.3 Bộ kit PCV2 Ab hãng BIOVET INC (Porcine Circovirus type 2 IgG antibody Test Kit Swinecheck® PCV2 indirect – 2 plates Insert).

A.2 Thiết bị và dụng cụ

A.2.1 Tủ lạnh, duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

A.2.2 Micropipet, dung tích từ 100 µl đến 1000 µl.

A.2.3 Micropipet, dung tích từ 50 µl đến 100 µl.

A.2.4 Máy đọc ELISA, có thể đọc ở bước sóng 450 nm.

A.3 Chuẩn bị

A.3.1 Chuẩn bị dung dịch rửa 1 X

Lắc đều dung dịch rửa đậm đặc 10 X, sau đó pha loãng với nước cất (A.1.2) theo tỷ lệ 1/10 (ví dụ, 100 ml dung dịch rửa đậm đặc 10 X với 900 ml nước cất).

A.3.2 Chuẩn bị chất pha loãng mẫu 1 X

Lắc đều dung dịch pha loãng mẫu đậm đặc 5 X, sau đó pha loãng với nước cất (A.1.2) theo tỷ lệ 1/5 (ví dụ, 10 ml dung dịch pha loãng mẫu đậm đặc 5 X với 40 ml nước cất).

A.3.3 Chuẩn bị mẫu huyết thanh

Pha loãng mẫu huyết thanh lợn bằng chất pha loãng mẫu 1 X (A.3.2) theo tỷ lệ 1/200 (ví dụ, 5 µl mẫu huyết thanh lợn với 1000 µl chất pha loãng mẫu 1 X).

A.4 Cách tiến hành

Trước khi tiến hành phản ứng, toàn bộ hóa chất của KIT ELISA cần được để ở nhiệt độ phòng và lắc kỹ trước khi sử dụng. Phức hợp enzyme sau khi sử dụng xong cần được bảo quản lại ở tủ lạnh (A.2.1).

- Dùng micropipet (A.2.2) nhỏ 100 µl đối chứng âm PCV2 vào giếng A1 và A2 của đĩa có phủ kháng nguyên PCV2.

- Dùng micropipet (A.2.2) nhỏ 100 µl đối chứng dương PCV2 vào giếng B1 và B2 của đĩa có phủ kháng nguyên PCV2.
- Dùng micropipet (A.2.3) nhỏ 100 µl mẫu huyết thanh đã pha loãng (A.3.3) vào các giếng còn lại (trừ giếng A1, A2, B1, B2) của đĩa có phủ kháng nguyên PCV2.
- Đậy kín các giếng và ủ ở nhiệt độ 23 ^{0}C ± 2 ^{0}C trong 1 h.
- Rửa mỗi giếng 4 lần, mỗi lần 300 µl dung dịch rửa 1 X (A.3.1). Bỏ đi tất cả dung dịch chứa trong đĩa sau mỗi lần rửa.
- Dùng micropipet (A.2.3) nhỏ 100 µl phức hợp enzyme vào mỗi giếng.
- Đậy kín các giếng và ủ ở nhiệt độ 23 ^{0}C ± 2 ^{0}C trong 30 phút.
- Rửa mỗi giếng 6 lần, mỗi lần 300 µl với 300 µl dung dịch rửa 1 X (A.3.1). Bỏ đi tất cả dung dịch chứa trong đĩa sau mỗi lần rửa.
- Dùng micropipet (A.2.3) nhỏ 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.
- Đậy kín các giếng và ủ ở nhiệt độ 23 ^{0}C ± 2 ^{0}C trong 10 phút, tránh ánh sáng.
- Dùng micropipet (A.2.3) nhỏ µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.
- Nhỏ dung dịch dừng phản ứng vào tất cả các giếng của đĩa phản ứng, mỗi giếng 100 µl, sau đó đặt đĩa vào máy đọc ELISA (A.2.4) ở bước sóng 450 nm để thu được các giá trị mật độ quang (Optical density - OD) của các mẫu trong đĩa phản ứng.

Bảng A.1 - Sơ đồ vị trí mẫu trong đĩa ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
B	PC	PC	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
C	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
D	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
E	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
F	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
G	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45
H	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38	S46	S46

CHÚ THÍCH:

NC: negative control (đối chứng âm)

PC: positive control (đối chứng dương)

S: sample (mẫu kiểm tra)

S1 đến S46: mẫu kiểm tra số 1 đến mẫu kiểm tra số 46

- Phản ứng được công nhận khi:

+ mật độ quang (OD) của đối chứng âm < 0,35;

+ mật độ quang (OD) của đối chứng dương > 0,70.

- Đánh giá kết quả dựa trên tỷ lệ S/P (tỷ lệ mẫu/mẫu dương tính):

$$S/P = \frac{\text{OD của mẫu}}{\text{OD của đối chứng dương}}$$

+ Mẫu dương tính: $S/P \geq 0,45$;

+ Mẫu âm tính: $S/P < 0,45$.

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] EMA, (2017). *VICH GL50 on Harmonisation of criteria to waive target animal batch safety testing for inactivated vaccines for veterinary use.*

[2] Intervet, (2007). *CIRCUMVENT PCV Control tests on the finished product.*

[3] COEN – BIO, (2017). *Porcine Circovirus Vaccine Type 2, Inactivated (Strain DBN-SX07).*

[4] Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I, (2010). *20VR-10KN1 – Quy trình kiểm nghiệm vacxin Circovirus.*