

TCVN 5157-90

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VI RÚT DỊCH TẢ LỢN

Cơ quan biên soạn: Trung tâm kiểm dịch động vật xuất nhập khẩu Hà Nội

Cơ quan đề nghị ban hành:

Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm

Cơ quan trình duyệt: Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng

Cơ quan xét duyệt ban hành:

Ủy ban Khoa học Nhà nước

Quyết định ban hành số: 736/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990

THỊT VÀ SẢN PHẨM CỦA THỊT Phương pháp phát hiện virút dịch tả lợn Meat and meat products Detection of Swine fever virus	TCVN 5157-90
	Khuyến khích áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện vi - rút dịch tả lợn bằng kháng thể globulin dịch tả lợn gắn huỳnh quang iso - thyocyanat (Conjugat kháng thể huỳnh quang).

1 Đặc tính chung

Vi rút dịch tả lợn gây bệnh cho lợn ở các lứa tuổi. Bệnh tiến triển nhanh dưới thể bại huyết, có thân nhiệt cao, triệu chứng và bệnh tích chính là xuất huyết, hoại tử và liệt thần kinh. Vi rút sinh trưởng được trên tế bào thận lợn, nhưng thường không gây được những biến đổi trên tế bào.

2 Nguyên tắc

Khi kháng nguyên dịch tả lợn gặp conjugat kháng thể huỳnh quang thì kết hợp thành phức hợp kháng nguyên - kháng thể huỳnh quang. Phức hợp này qua kính hiển vi huỳnh quang phát ra những đốm sáng màu sắc riêng biệt.

3 Lấy mẫu

3.1 Tiêu chuẩn này dùng để xác định bệnh dịch tả lợn cho một lô lợn.

3.2 Lô lợn là số lượng lợn có cùng nơi xuất phát (trại, phường, xã) được vận chuyển trong một thời gian, khi nhập về được nuôi ở một khu riêng (cách ly tân đáo) không tiếp xúc với các môi giới truyền bệnh khác.

3.3 Mẫu thử là amydan, lách, hạch làm ba vừa chết hoặc vừa giết mổ. Bằng thao tác vô khuẩn lấy và đựng mẫu vào hộp (bình, lọ) thuỷ tinh hoặc chất dẻo, có nắp đậy kín để trong phích lạnh, có chứa đá vụn trộn lẫn với muối ăn (NaCl) và chuyển nhanh về cơ quan kiểm dịch trong vòng 24-48 giờ.

3.4. Một nửa mẫu để kiểm nghiệm, phần còn lại để lưu. Mẫu lưu được bảo quản ở nhiệt độ tối thiểu 15⁰C không quá 1 tháng.

Chú thích: a/ Cơ quan kiểm dịch chỉ nhận mẫu thử theo đúng quy định trên (3.3), kèm theo bản khai báo về lô lợn nghi bệnh (nguồn gốc, số lượng, trọng lượng, ngày nhận, ngày phát bệnh, số lợn ốm, chết, triệu chứng, bệnh tích...).

b/Để định bệnh được chính xác thì sau khi nhận được mẫu và báo cáo, cơ quan kiểm dịch phải cử ngay bác sĩ thú y đến nơi để xác minh tình hình dịch, kết hợp tình hình tại chỗ với kết quả phòng xét nghiệm và nếu cần được phép mời những cơ quan chuyên trách (trong và ngoài nước) để cùng định bệnh.

4 Thiết bị và dụng cụ

4.1 Thiết bị.

4.1.1. Phòng cấy vô khuẩn, trong có tủ cấy tay (thanh trùng phòng cấy và tủ cấy bằng đèn cực tím 1,5-2,5 óát/m³ trong 3 giờ, sau phun phenol 5% hoặc xông formon rồi phun phenol 5%.

4.1.2. Tủ ấm có điều chỉnh nhiệt độ ổn định 35-37-43 ± 1°C.

4.1.3 Tủ sấy khô.

4.1.4 Tủ hấp ướt.

4.1.5. Nồi cất nước 2 lần bằng thuỷ tinh.

4.1.6. Tủ lạnh 0-4°C.

4.1.7. Tủ lạnh -35°C.

4.1.8. Bình chứa nitơ lỏng.

4.1.9. Máy cất lạnh có bình khí CO₂.

4.1.10. Nồi đun cách thuỷ có điều chỉnh nhiệt độ ổn định từ 35-56°C.

4.1.11. Ly tâm thông thường, 5.000 vòng/phút và ống ly tâm đáy nhọn.

4.1.12. Máy xay thịt.

4.1.13. Máy khuấy từ.

4.1.14. Cân phân tích có độ chính xác không lớn hơn 0,01g.

4.1.15. Cân thiên bình roberval) cỡ nhỏ (50-100g).

4.1.16. Buồng đếm bạch huyết cầu.

4.1.17. Kính hiển vi có thị kính x 10, x 15.

4.1.18. Kính hiển vi huỳnh quang và các linh kiện.

4.1.19. Máy đo pH có độ chính xác hiệu chỉnh là 0,1 đơn vị pH ở 25°C.

4.1.20. Phễu thuỷ tinh đường kính 3cm.

4.1.21. Phễu lọc vi khuẩn: Seitz, EKS2, Sephadex G25, 50.

4.1.22. Dao bistouri, kéo, pince các loại.

4.1.23. Đèn cồn, bông, gạc, vải lọc.

4.2 Dụng cụ.

4.2.1. Bình tam giác và bình cầu đáy bằng có dung tích 50, 150, 250ml.

- 4.2.2. Cốc đong có chân các cỡ.
- 4.2.3. Bình đong hình trụ các cỡ.
- 4.2.4. Pipet Pasteur và pipet có khắc độ 1,5-10ml.
- 4.2.5. Đĩa Petri đường kính 150mm, chiều cao 15mm.
- 4.2.6. Ống Leighton nuôi cấy tế bào có kèm lá kính.
- 4.2.7. Ống nghiệm 18 x 150mm.

5 Hoá chất, thuốc nhuộm, môi trường tế bào thận lợn.

5.1. Nguyên liệu cơ bản: Hoá chất dùng trong môi trường pha chế dung dịch phải sử dụng loại tinh khiết A. R.; nước cất 2 lần trung tính đã qua kiểm nghiệm không có tạp chất ảnh hưởng đến tế bào và vi rút sinh trưởng. Nên sử dụng những thành phần cơ bản hoặc thành phần đã chế sẵn, nhưng khi dùng phải tuân theo chỉ dẫn của nơi sản xuất.

5.2. Hoá chất, thuốc nhuộm, môi trường tế bào (phụ lục).

5.2.1. Rửa tay và nhuộm tiêu bản.

5.2.1.1. Kháng huyết thanh dịch tả lợn (để nhuộm trực tiếp và gián tiếp).

5.2.1.2. Conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm gián tiếp).

5.2.1.3. Conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm gián tiếp).

5.2.1.4. Virút dịch tả lợn cường độc tiêu chuẩn.

5.2.1.5. Dung dịch đệm muối phosphate pH 7,0.

5.2.1.6. Dung dịch xanh evans.

5.2.1.7. Dung dịch đệm Tris pH 8,6.

5.2.1.8. Axêton.

5.2.2. Chế môi trường và xử lý mẫu thử trước khi cấy.

5.2.2.1. Clorofooc.

5.2.2.2. Natrihydro cacbonat, dung dịch 1,4% và 7% (NaHCO_3).

5.2.2.3. Dung dịch đỏ phenol (phenol red).

5.2.2.4. Dung dịch kháng khuẩn tố Penicillin và Streptomycin.

5.2.2.5. Dung dịch muối điện giải Hanks.

5.2.2.6. Dung dịch trypsin.

5.2.2.7. Dung dịch hydro-lysat-lactabunin.

5.2.2.8. Dung dịch Hanks để xử lý mẫu thử và rửa tế bào.

5.2.2.9. Dung dịch Versen.

5.2.2.10. Huyết thanh bê sơ sinh.

5.2.3. Môi trường tế bào.

5.2.3.1. Môi trường Eagle cần thiết cho tế bào sinh trưởng (minimum essential medium Eagle-growth; MEM-G).

5.2.3.2. Môi trường Eagle cần thiết để bảo quản tế bào (minium essential medium Eagle-maintenance; MEM-M).

5.2.4. Kỹ thuật sản xuất tế bào thận lợn.

6 Cách tiến hành.

6.1. Tùy theo tình hình và điều kiện của từng cơ sở mà tiến hành trước sau hoặc cùng một lúc cả hai phương pháp: Nhuộm trực tiếp và gián tiếp.

6.2. Phương pháp nhuộm trực tiếp mẫu thử cắt lạnh hoặc ép in.

6.2.1. Chuẩn bị mẫu thử - Dùng máy cắt lạnh, cắt mẫu thử thành những lát cắt có độ dày từ 5-6 micromét. Đặt nhẹ và dàn đều lát cắt lên 2 phiến kính A và B bằng mũi pince đầu nhọn (mỗi phiến kính đặt từ 2-3 lát) hoặc ép in mẫu thử thành các vết mỏng (thay cho lát cắt). hong khô tiêu bản và cố định bằng axêton ở -25°C trong 60 phút.

6.2.2. Nhuộm.

6.2.2.1. Phiến kính A (để xác định virút dịch tả lợn) đặt trên lớp bông thấm nước trong đĩa petri, nhỏ 0,2-0,3ml conjugat kháng thể huỳnh quang (thuốc nhuộm trực tiếp) lên tiêu bản, ủ 37°C trong 30 phút. Lấy ra ngâm rửa 3 lần, mỗi lần 10 phút bằng dung dịch điện muối photphat pH 7,0; tráng nước cất, hong khô đọc kết quả.

6.2.2.2. Phiến kính B (đối chứng ức chế đặc hiệu) đặt trên lớp bông thấm nước trong đĩa Petri, nhỏ 0,2-0,3ml kháng huyết thanh dịch tả lợn lên tiêu bản, ủ 37°C trong 15 phút. Lấy ra rửa nước cất rồi nhỏ tiếp lên tiêu bản 0,2-0,3ml conjugat kháng thể huỳnh quang (thuốc nhuộm trực tiếp) và làm tiếp theo 5.3.2.1.

6.3.1. Chuẩn bị mẫu thử: Cân 10g mẫu thử (lá lách), dùng kéo cắt nhỏ, nghiền trước trong cối sứ, nghiền tiếp trong máy nghiền, vừa nghiền vừa hoà loãng dung dịch Hanksoc Penicillin và Streptomycin thành huyền dịch 1:5. Ly tâm 2000 vòng/phút trong 15 phút. Lấy lượng nước trong pha loãng tiếp bằng dung dịch Hanks thành huyền dịch 10^{-1} đồng thời làm thêm mẫu thử cường độ dịch tả lợn đối chứng.

6.3.2. Cấy mẫu thử vào môi trường tế bào thận lợn.

6.3.2.1. Tế bào thận lợn nuôi cấy và đã phủ kín trên mặt lá kính trong ống Leighton chứa 2ml môi trường MEM-G sau 48-72 giờ.

Môi trường mẫu thử phải nuôi cấy ít nhất trong 2 ống môi trường, kèm theo 3 ống đối chứng cho mỗi đợt kiểm nghiệm.

Các ống môi trường được ký hiệu riêng:

A. Để xác định virút dịch tả lợn trong mẫu thử.

B. Đối chứng ức chế đặc hiệu.

C. Đối chứng dương tính.

D. Đối chứng âm tính (kiểm tra tế bào thận lợn).

6.3.2.2. Gạn bỏ lượng môi trường cũ đi và rửa lớp tế bào bằng môi trường MEM-M từ 2-3 lần, cấy vào ống A, B mỗi ống 0,2-0,3ml huyền dịch mẫu thử 10^{-1} vào ống C 0,2-0,3ml huyền dịch virút dịch tả lợn 10^{-1} vào ống D 0,2-0,3ml môi trường MEM-M, ủ tất cả 37°C từ 1-2 giờ. Gạn bỏ lượng nước vừa cấy và rửa lớp tế bào bằng môi trường MEM-M ủ 37°C từ 24-48 giờ.

6.3.3. Nhuộm: Dùng pince lấy lá kính, cố định bằng axêton ở -25°C trong 10 phút, hong khô.

- Nhuộm các lá kính A, C, D theo 6.2.2.1.

- Nhuộm lá kính B theo 6.2.2.2.

6.4. Phương pháp nhuộm gián tiếp mẫu thử (chung cho cả 2 loại tiêu bản).

6.4.1. Chuẩn bị mẫu thử: Theo 6.2.1. (mẫu thử cắt lạnh hoặc áp in); 6.3.1. và 6.3.2 (mẫu thử cấy trong môi trường tế bào).

6.4.2. Nhuộm chung cho cả hai loại tiêu bản) cố định tiêu bản bằng axêton ở -25°C trong 10 phút, hong khô, nhỏ lên tiêu bản 0,2-0,3ml kháng huyết thanh dịch tả lợn, ủ 37°C trong 30 phút. Lấy ra ngâm rửa 2 lần, mỗi lần 5 phút bằng dung dịch điện muối photphat pH 7,0. Nhỏ tiếp 0,2-0,3ml conjugat kháng thể huỳnh quang (loại thuốc nhuộm gián tiếp để pha loãng theo chỉ dẫn của nơi sản xuất); ủ 37°C trong 30 phút, sau ngâm rửa 2 lần mỗi lần 3 phút bằng dung dịch điện muối photphat pH 7,0. Gắn lam kính lên trên tiêu bản, đọc kết quả.

6.5. Nhận định một số chỉ tiêu giữa 2 phương pháp nhuộm.

Chỉ tiêu	Nhuộm trực tiếp		Nhuộm gián tiếp	
	Cắt lạnh in áp	Môi trường tế bào	Cắt lạnh in áp	Môi trường tế bào
Thời gian (giờ)	2-3	50-75	2-3	50-75
Tỷ lệ phát hiện dương tính (%)	80	85	90	95

7 Tính toán kết quả

7.1. Dùng kính hiển vi huỳnh quang đặt trong buồng tối, đọc kết quả các mẫu đối chứng trước, mẫu kiểm nghiệm sau.

Chung cho cả 2 phương pháp:

- Trên mẫu D (kiểm tra tế bào) không có hoặc có rất ít những điểm phát quang giả màu xanh nâu.
- Trên mẫu C (đối chứng dương tính): Có nhiều tế bào hoặc đám tế bào phát quang màu vàng xanh, trải đều trong nguyên chất, chung quanh tế bào có màu sáng, lượng phát quang tỉ lệ thuận với số lượng virút, riêng phương pháp nhuộm gián tiếp cho kết quả rõ hơn (sáng trên nền xanh Evans).
- Trên mẫu B (đối chứng ức chế đặc hiệu) như mẫu D.
- Trên mẫu A: Nếu kết quả đọc được như mẫu C là dương tính và ngược lại là âm tính.

7.2. Kết luận chung cho cả hai phương pháp.

Mẫu thử A	Mẫu thử B	Mẫu thử C	Mẫu thử D	Kết luận
+	-	+	-	Có virút dịch tả lợn
+	+	+	-	Sai sót kỹ thuật (làm lại)
-	-	+	-	Không có virút dịch tả lợn

Phụ lục của TCVN 5157-90

Hoá chất, thuốc nhuộm, môi trường tế bào thận lợn.

A. Dung rửa tiêu bản và pha loãng conjugat kháng thể huỳnh quang (nhuộm gián tiếp).

A1. Dung dịch đệm muối photphat pH 7,0.

A1.1. Dung dịch 1

- Natri dihydrophotphat (NaH_2PO_4)	14g
- Nước cất 2 lần (trung tính)	1.000ml

A1.2. Dung dịch 2.

- Natri dihydrophotphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	35,85g
- Nước cất hai lần (trung tính)	1.000ml

A1.3 Dung dịch hoàn chỉnh

- Dung dịch 1	39ml
- Dung dịch 2	61ml
- Natri clorua (NaCl)	8,77g
- Nước cất 2 lần (trung tính)	900ml

Hấp 121°C trong 30 phút. Bảo quản 4°C .

A2. Dung dịch xanh evans.

- Xanh evans	0,25g
- Nước cất 2 lần (trung tính)	100ml

Hấp 113°C trong 10 - 15 phút. Bảo quản 4°C .

A3. Dung dịch đệm Tris pH 8,6.

- Tris, dung dịch 2,42% trong nước	25ml
- Axit clohydric, dung dịch 0,2N (HCl)	6,1ml
- Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ	100ml

Lọc vô khuẩn. Bảo quản ở 4°C .

Ghi chú: Axit clohydric, dung dịch 0,2N (HCl).

- Axit clohydric đậm đặc	2ml
- Nước cất 2 lần (trung tính)	98ml

Hấp 121°C trong 15 phút.

B. Dùng chế môi trường và xử lý mẫu thử trước khi cấy.

B1. Natri hydro cacbonat, dung dịch 1,4% hoặc 7% (NaHCO₃).

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| - Natri hydro cacbonat | 1,4g hoặc 7g |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) | 100ml. |

Lọc Seitz. Bảo quản 4°C.

B2. Dung dịch đỏ phenol (Phenol red).

- | | |
|--|---------|
| - Đỏ phenol | 0,4g |
| - Natri hydroxit, dung dịch 0,1N trong nước (khoảng) | 10-12ml |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) vừa đủ | 100ml |

Nghiên đỏ phenol trong cối sứ, nhỏ dần dung dịch Natri hydroxit vào cho đến khi đỏ phenol tan hoàn toàn, sau đó bổ sung nước cất hai lần vừa đủ 100ml. Hấp 121°C trong 30 phút (nếu cần thì chỉnh pH 7,0 bằng Natri hydroxit dung dịch 0,05N trước khi hấp).

Ghi chú: Natri hydroxit dung dịch 0,1N hoặc 0,05N.

- | | |
|-------------------------------|------------|
| - Natri hydroxit | 2g hoặc 1g |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) | 100ml |

B3. Kháng khuẩn tố, dung dịch có 20.000 đơn vị Penicillin và Streptomycin trong 1ml nước.

- | | |
|-------------------------------|-------------------|
| - Penicillin (bột để tiêm) | 2.000.000 đơn vị. |
| - Streptomycin (bột để tiêm) | 2.000.000 đơn vị. |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) | 100ml |

Bảo quản -20°C.

B4. Dung dịch muối điện giải Henks

B4.1. Dung dịch 1

- | | |
|--|---------|
| - Natri clorua (NaCl) | 160g |
| - Kali clorua (KCl) | 8g |
| - Magiê sulphat (MgSO ₄ .7H ₂ O) | 4g |
| - Canxi clorua (CaCl ₂) | 2,8g |
| - Nước cất 2 lần (trung tính) | 1.000ml |

Cho thêm clorofooc 2ml. Bảo quản 4°C.

B4.2. Dung dịch 2.

- Natri hydro photphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3,04g
- Katri dihydro photphat (KH_2PO_4)	1,00g
- Glucose	20g
- Dung dịch đỏ phenol (B2)	100ml
- Nước cất 2 lần (trung tính)	1.000ml

Cho thêm clorofooc 2ml. Bảo quản 4°C.

B4.3. Dung dịch hoàn chỉnh.

- Dung dịch 1	50ml
- Dung dịch 2	50ml
- Nước cất 2 lần (trung tính)	900ml

Hấp 115°C trong 10 phút. Bảo quản 4°C.

Khi dùng cho thêm Natri hydro cacbonat, dung dịch 1,4% (B1): 2,5ml.

B5. Dung dịch Trypsin.

- Trypsin	1g
- Dung dịch Hanks (B4,3)	100ml

Lắc nhẹ cho tan đều. Để ở 4°C từ 12-18 giờ, để tiếp trong nồi chùng cách thủy ở 37°C trong 3 phút cho trypsin tan hoàn toàn. Lọc vô khuẩn bằng phễu thủy tinh xốp. Cho thêm dung dịch kháng khuẩn tố (B3) 1ml. Chia vào các lọ nhỏ. Bảo quản -20°C. Khi dùng pha loãng tiếp thành đậm độ 0,25%.

B6. Dung dịch hydrolysat lactabumin.

- Hydrolysat lactabumin	5g
- Dung dịch Hanks (B4.3)	1.000ml

Hấp 121°C trong 10 phút. Bảo quản 4°C.

B7. Dung dịch Hanks để xử lý, pha loãng mẫu thử và rửa tế bào.

- Dung dịch Hanks (B4.3)	100ml
- Dung dịch kháng khuẩn tố (B3)	
+ Để xử lý mẫu thử:	2ml
+ Để pha loãng mẫu thử (10^{-1}) và rửa tế bào	1ml

B8. Dung dịch đậm Versen;

- Natri clorua	8g
- Kali clorua	0,2g
- Natri hydro photphat ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,41g
- Versen	0,2g
- Đỏ phenol	0,01g
- Nước cất 2 lần (trung tính)	1.000ml

Hoà tan. Lọc vô khuẩn. Bảo quản 4°C.

C. Môi trường nuôi tế bào.

C1. Môi trường Eagle cần thiết cho các tế bào sinh trưởng (MEM-G).

- Dung dịch hydrolysat lactalbumin (B6)	90ml.
- Dung dịch kháng khuẩn tố Penicillin và Streptomycin (B3)	1ml.

Điều chỉnh pH 7,2 bằng Natri hydro cacbonat, dung dịch 7% (B1).

- Huyết thanh bê sơ sinh 10ml.

Bằng thao tác vô khuẩn trộn đều, chia vào các bình tam giác 50ml. Dùng để nuôi cấy tế bào thận lợn.

02. Môi trường Bagle cần thiết để bảo quản tế bào (MEM-M).

Thành phần như C1, chỉ khác là dùng 1ml huyết thanh bê sơ sinh thay cho 10ml. Dùng cấy mẫu thử (phân lập virút dịch tả lợn).

D. Kỹ thuật sản xuất tế bào thận lợn.

D1. Chọn tế bào: Dùng tế bào thận lợn sơ sinh, khoẻ mạnh, không có bệnh.

D2. Tách tế bào bằng dung dịch Trypsin (B5) dưới tác động của máy khuấy từ.

D3. Loại bỏ Trypsin và thu gom tế bào bằng máy ly tâm.

D4. Pha mẫu bằng MEM-G. Đếm số tế bào bằng buồng đếm bạch huyết cầu dưới kính hiển vi thông thường.

D5. Tính số lượng tế bào cần thiết để định tỷ lệ pha loãng bằng MEM-G (yêu cầu 50.000 tế bào/1ml môi trường).

D6. Chia vào các ống leighton có ghép lá kính, mỗi ống 2ml, ủ 37°C từ 24-72 giờ. Khi tế bào đã sinh trưởng và phủ kín trên bề mặt lá kính thì cấy mẫu thử (theo 6.3.2).

Ghi chú: Nếu sử dụng tế bào dòng thì pha chế theo chỉ dẫn của nơi sản xuất, nếu chuyển tiếp tế bào dòng thì dùng dung dịch versen (B8) để làm bong lớp tế bào rồi dùng dung dịch trypsin (B5) tách tế bào và làm tiếp theo phụ lục D2 đến D6.
