

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-29:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 29: BỆNH LYMPHO LEUKO Ở GÀ**

*Animal diseases - Diagnostic procedure -
Part 29: Lymphoid leukosis of chicken*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8400-29:2015 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - 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 tiêu chuẩn TCVN 8400 *Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán* gồm 38 phần:

- TCVN 8400-1 : 2010, *phần 1: Bệnh lở mồm long móng;*
- TCVN 8400-2 : 2010, *phần 2: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus suis gây ra trên lợn;*
- TCVN 8400-3 : 2010, *phần 3: Bệnh giun xoắn;*
- TCVN 8400-4 : 2010, *phần 4: Bệnh Niu Cát Xon;*
- TCVN 8400-5 : 2011, *phần 5: Bệnh tiên mao trùng;*
- TCVN 8400-6 : 2011, *phần 6: Bệnh xuất huyết thỏ;*
- TCVN 8400-7 : 2011, *phần 7: Bệnh đậu cừu và đậu dê;*
- TCVN 8400-8 : 2011, *phần 8: Bệnh nấm phổi do Aspergillus ở gia cầm;*
- TCVN 8400-9 : 2011, *phần 9: Bệnh viêm gan vịt typ I;*
- TCVN 8400-10 : 2011, *phần 10: Bệnh lao bò;*
- TCVN 8400-11 : 2011, *phần 11: Bệnh dịch tả vịt;*
- TCVN 8400-12 : 2011, *phần 12: Bệnh bạch lý và thương hàn ở gà;*
- TCVN 8400-13 : 2011, *phần 13: Bệnh sảy thai truyền nhiễm do Brucella;*
- TCVN 8400-14 : 2011, *phần 14: Bệnh tụ huyết trùng ở trâu bò;*
- TCVN 8400-15 : 2011, *phần 15: Bệnh xoắn khuẩn do Leptospira;*
- TCVN 8400-16 : 2011, *phần 16: Bệnh phù ở lợn do vi khuẩn E.coli;*
- TCVN 8400-17 : 2011, *phần 17: Bệnh do Staphylococcus aureus ở gà;*
- TCVN 8400-18 : 2014, *phần 18: Bệnh phù đầu gà (coryza);*
- TCVN 8400-19 : 2014, *phần 19: Bệnh phó thương hàn lợn;*
- TCVN 8400-20 : 2014, *phần 20: Bệnh đống dậu lợn;*

TCVN 8400-37 : 2015

- TCVN 8400-21 : 2014, *phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8400-22 : 2014 *phần 22: Bệnh giả dại ở lợn;*
- TCVN 8400-23 : 2014, *phần 23: Bệnh ung khí thán;*
- TCVN 8400-24 : 2014, *phần 24: Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm;*
- TCVN 8400-25 : 2014, *phần 25: Bệnh cúm lợn;*
- TCVN 8400-26 : 2014, *phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1;*
- TCVN 8400-27 : 2014, *phần 27: Bệnh sán lá gan;*
- TCVN 8400-28 : 2014, *phần 28: Bệnh viêm ruột hoại tử do Clostridium perfringens;*
- TCVN 8400-29 : 2015, *phần 29: Bệnh Lympho leuko ở gà;*
- TCVN 8400-30 : 2015, *phần 30: Bệnh Marek ở gà;*
- TCVN 8400-31 : 2015, *phần 31: Bệnh tụ huyết trùng gia cầm;*
- TCVN 8400-32 : 2015, *phần 32: Bệnh gumboro ở gia cầm;*
- TCVN 8400-33 : 2015, *phần 33: Bệnh lê dạng trùng ở trâu bò;*
- TCVN 8400-34 : 2015, *phần 34: Bệnh biến trùng ở trâu bò;*
- TCVN 8400-35 : 2015, *phần 35: Bệnh theileria ở trâu bò;*
- TCVN 8400-36 : 2015, *phần 36: Hội chứng suy mòn ở lợn sau cai sữa do Circo virus typ 2;*
- TCVN 8400-37 : 2015, *phần 37: Bệnh viêm phổi địa phương ở lợn;*
- TCVN 8400-38 : 2015, *phần 38: Bệnh tiêu chảy ở lợn do Corona virus.*

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 29: Bệnh Lympho leuko ở gà

Animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 29: Lymphoid Leukosis of chicken

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 chẩn đoán bệnh Lympho leuko do virus thuộc nhóm *Leukovirus* gây ra ở gà.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Bệnh Lympho leuko (Lymphoid leukosis of chicken)

Bệnh do virus thuộc nhóm *Leukovirus*, giống *Alpharetrovirus*, họ *Retroviridae* gây ra ở gà, đặc trưng của bệnh là tăng sinh cao độ tế bào lympho non, hình thành các khối u nằm rải rác hoặc tràn lan trong các cơ quan nội tạng.

CHÚ THÍCH: Virus gây bệnh Lympho leuko được chia thành các phân nhóm A, B, C, D và J dựa trên sự khác biệt đặc tính kháng nguyên glycoprotein. Virus gây bệnh Lympho leuko nhân lên ở hầu hết các mô, cơ quan trong cơ thể.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

TCVN 8400-29 : 2015

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất, nước khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp parafin

3.1.1 Formalin, dung dịch 10 % (thể tích)

Chuẩn bị từ dung dịch formaldehyde 38 % và dung dịch muối đệm phosphat (PBS) (xem Phụ lục A) với tỷ lệ 1 : 9 (thể tích).

3.1.2 Etanol 70 % (thể tích), 90 % (thể tích) và etanol tuyệt đối.

3.1.3 Xylen.

3.1.4 Haematoxylin.

3.1.5 Eosin.

3.1.6 Parafin, có độ nóng chảy từ 56 °C đến 60 °C.

3.1.7 Keo dán lamén.

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp realtime RT-PCR (phản ứng phiên mã ngược chuỗi polymerase theo thời gian thực)

3.2.1 Dung dịch PBS, pH 7,0 (xem Phụ lục A).

3.2.2 Etanol tuyệt đối.

3.2.3 Mẫu ARN (axit ribonucleic) kiểm chứng dương, chiết tách từ virus gây bệnh Lympho leuko, có giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng) đã biết trước.

3.2.4 Kít tách chiết ARN.

3.2.5 Kít nhân gen.

3.2.6 Bộ mồi và mẫu dò (primers và probe).

3.2.7 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).

3.2.8 Nước, tinh khiết không có nuclease.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm sinh học và những thiết bị, dụng cụ sau:

4.1 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp parafin

4.1.1 Khuôn nhựa, loại chuyên dụng cho làm tiêu bản vi thể.

4.1.2 Máy xử lý mẫu mô tự động.

4.1.3 Nồi đun parafin, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 56 °C đến 65 °C.

4.1.4 Khay sắt, loại chuyên dụng cho làm tiêu bản vi thể.

4.1.5 Máy làm lạnh, có thể duy trì ở nhiệt độ từ âm 10 °C đến 4 °C.

4.1.6 Máy cắt tiêu bản, cắt ở độ mỏng từ 3 µm đến 5 µm.

4.1.7 Nồi dẫn tiêu bản, có thể làm nóng nước ở nhiệt độ từ 35 °C đến 65 °C.

4.1.8 Phiến kính, vô trùng.

4.1.9 Lamen, vô trùng.

4.1.10 Bộ cốc nhuộm tiêu bản.

4.1.11 Kính hiển vi quang học, vật kính 4 X, 10 X, 20 X, 40 X, 60 X.

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp realtime RT-PCR

4.2.1 Máy nhân gen (realtime PCR).

4.2.2 Máy spindown.

4.2.3 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C.

4.2.4 Máy ly tâm, có thể tạo gia tốc ly tâm 3 000 g, 6000 g và 20 000 g.

4.2.5 Máy lắc, có thể hoạt động với tốc độ 200 r/min đến 2 500 r/min.

4.2.6 Cối chà sứ, vô trùng.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

TCVN 8400-29 : 2015

- Gà con từ 1 ngày tuổi đến 10 ngày tuổi dễ nhiễm bệnh, nhưng không có biểu hiện lâm sàng. Thường gà trên 16 tuần tuổi các triệu chứng của bệnh mới thể hiện rõ;
- Tỷ lệ ốm và chết cao nhất thường ở gà từ tuần tuổi thứ 24 đến tuần tuổi thứ 26;
- Virus thường gây bệnh phổ biến ở các đàn gà công nghiệp;
- Virus gây bệnh Lympho leuko lan truyền chủ yếu qua trứng. Có thể lây lan qua tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

Triệu chứng bệnh Lympho leuko thường không điển hình:

- Gà thường ủ rũ, mệt mỏi, kém ăn, gầy và ỉa chảy;
- Mào yếm nhạt nhợt, thiếu máu;
- Xoang bụng căng phồng;
- Ở gà đẻ giảm sản lượng trứng.

5.3 Bệnh tích đại thể

- Bệnh tích đặc trưng của bệnh Lympho leuko là sự hình thành các khối u: khối u thường mềm, nhẵn và bóng, mặt cắt có màu xám nhạt đến màu trắng kem, hiếm khi có vùng hoại tử. Khối u có thể là dạng u cục, dạng hạt kê, dạng lan tràn hoặc hỗn hợp các dạng này;
- Dạng u cục thường có đường kính từ 0,5 cm đến 5 cm, thường dạng hình cầu hoặc dạng phẳng trên bề mặt tổ chức;
- Dạng hạt kê gồm các u nhỏ có đường kính dưới 2 mm, đồng đều và phân bố ở khắp nhu mô;
- Dạng lan tràn: các cơ quan sưng to, màu xám nhạt, dễ nát;
- Gan, lách, thận: sưng to, có các khối u;
- Có khối u ở túi Fabricius, đôi khi thấy ở tủy xương;
- Gan: thường bờ, nhạt màu; trên bề mặt có các u cục màu trắng xám, nhỏ bằng đầu đinh ghim hoặc to nổi gồ lên bề mặt.

5.4 Chẩn đoán phân biệt về lâm sàng

Chẩn đoán phân biệt về lâm sàng giữa bệnh Lympho leuko và bệnh Marek theo Bảng 1.

Bảng 1 – So sánh triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể trên gà nhiễm bệnh

Đặc điểm		Bệnh Lympho leuko	Bệnh Marek
Lứa tuổi mắc bệnh		Từ 16 tuần tuổi trở lên	Từ vài ngày tuổi trở lên
Triệu chứng		Triệu chứng thường không đặc trưng	Gà thường bị liệt chân, sã cánh
Bệnh tích đại thể	Dây thần kinh ngoại vi sưng to	Không có	Thường xuyên
	Túi Fabricius	Có các u cục	Teo nhỏ hoặc sưng to
	U ở dạ dày tuyến, da, cơ	Không có	Có thể có

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp parafin phát hiện bệnh Lympho leuko

6.1.1 Lấy mẫu

Chọn từ 3 con gà đến 5 con gà có triệu chứng điển hình mổ lấy các bệnh phẩm sau:

- Dây thần kinh: lấy hai dây thần kinh đùi và hai dây thần kinh cánh, độ dài khoảng 2 cm;
- Gan: lấy phần gan nghi có bệnh tích với độ dày khoảng 0,5 cm;
- Lách, thận: cắt một miếng với độ dày khoảng 0,5 cm;
- Túi Fabricius: cắt ngang túi Fabricius;
- Não: mở hộp sọ, lấy phần đại não và tiểu não;
- Bệnh phẩm da: lấy phần da có các nang lông sưng to.

Các mẫu bệnh phẩm trên cho vào lọ chứa formalin (3.1.1) sao cho thể tích mẫu bệnh phẩm và formalin (3.1.1) có tỷ lệ khoảng 1 : 10, ghi ký hiệu mẫu trên lọ.

CHÚ THÍCH: Đồng thời kèm theo Phiếu gửi bệnh phẩm ghi rõ yêu cầu xét nghiệm và những thông tin về dịch tễ, các biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của bệnh.

6.1.2 Bảo quản mẫu

Mẫu bệnh phẩm (6.1.1) được đảm bảo ngập trong formalin (3.1.1), tránh đổ vỡ, rơi vãi formalin (3.1.1) ra ngoài môi trường; khi gửi mẫu đến phòng thí nghiệm, bao gói lọ chứa mẫu bằng túi nilon, miệng túi được

TCVN 8400-29 : 2015

đán kín. Trong phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, mẫu phải được bổ sung hoặc thay mới formalin (3.1.1), đảm bảo thể tích mẫu bệnh phẩm và formalin đạt tỷ lệ khoảng 1 : 10.

6.1.3 Chuẩn bị mẫu

- Mẫu bệnh phẩm được cố định trong dung dịch formalin (3.1.1) trong 24 h;
- Cắt các bệnh phẩm đã cố định trên thành miếng nhỏ dày khoảng 1 mm, dài khoảng 1 cm rồi đặt vào khuôn nhựa (4.1.1).

6.1.4 Cách tiến hành

6.1.4.1 Đúc khuôn

- Rửa khuôn nhựa (6.1.3) dưới vòi nước chảy, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol 70 % (thể tích) (3.1.2), thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.2) thời gian từ 2 đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.2) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.2) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylene (3.1.3) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylene (3.1.3) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.1.6) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.1.6) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng máy xử lý mẫu mô tự động (4.1.2) thì tiến hành tiếp theo từ bước ngâm etanol.

- Đúc khuôn: rót parafin (3.1.6) nóng chảy từ nồi đun parafin (4.1.3) vào khay sắt (4.1.4), gấp bệnh phẩm từ khuôn nhựa đặt vào khay sắt, đặt khuôn nhựa (4.1.1) lên trên. Để nguội, tách lấy khối parafin.

6.1.4.2 Cắt tiêu bản

- Cắt gọt khối paraffin (6.1.4.1) cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh tiêu bản (4.1.5);
- Đặt khối parafin lên máy cắt tiêu bản (4.1.6) sao cho mặt khối parafin song song với mép lưỡi dao, cắt bỏ những lát đầu đến khi lát cắt có đủ các bệnh phẩm, điều chỉnh độ dày của lát cắt từ 3 µm đến 5 µm, cắt một vài lát;

- Chọn lát cắt phẳng thả vào nồi đun tiêu bản (4.1.7) với nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C. Dùng phiến kính (4.1.8) vớt lát cắt. Dụng nghiêng tiêu bản và để khô.

6.1.4.3 Nhuộm tiêu bản

- Ngâm tiêu bản (6.1.4.2) vào cốc xylene (3.1.3) 3 lần, thời gian mỗi lần từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.2) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.2) , thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol 70 % (thể tích) (3.1.2), thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc thuốc nhuộm haematoxylin (3.1.4), thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc thuốc nhuộm eosin (3.1.5), thời gian từ 60 s đến 90 s;
- Rửa dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Loại bỏ nước còn bám trên tiêu bản bằng cách ngâm tiêu bản vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.2) trong thời gian từ 3 s đến 5 s, sau đó ngâm tiêu bản vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.2) 3 lần, thời gian mỗi lần từ 3 s đến 5 s; chuyển tiêu bản ngâm trong cốc xylene (3.1.3) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 2 min đến 3 min; gắn lamên (4.1.9) vào tiêu bản bằng keo dán lamên (3.1.7). Để khô, soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học (4.1.11).

6.1.5 Đọc kết quả^[1]

U lympho thường có ở các cơ quan nội tạng như gan, lách, thận, túi Fabricius:

- Các u lympho ở gan: gồm các nguyên bào lympho tràn lan hoặc thành đám tập trung trong nhu mô gan; các tế bào này có kích thước và màu sắc đồng nhất, nhân to bắt màu haematoxylin đậm;
- Các u lympho ở lách: rải rác tăng sinh các tế bào lympho màu sắc và kích thước đồng nhất;
- Túi Fabricius: tăng sinh các nguyên bào lympho trong các nang lympho;
- Dây thần kinh, não, da, nang lông: không có các tế bào viêm xâm nhập.

6.1.6 Chẩn đoán phân biệt về bệnh tích vi thể

Chẩn đoán phân biệt về bệnh tích vi thể giữa bệnh Lympho leuko và bệnh Marek theo Bảng 2.

Bảng 2 – So sánh bệnh tích vi thể

Đặc điểm	Bệnh Lympho leuko	Bệnh Marek
Bệnh tích ở dây thần kinh ngoại biên	Không có	Thường xuyên có tế bào viêm xâm nhập
U cục ở gan	Các tế bào tăng sinh rải rác hoặc tràn lan	Các tế bào tăng sinh thường ở ngoại vi mạch quản
U cục ở lách	Các tế bào tăng sinh rải rác	Các tế bào tăng sinh tràn lan
Túi Fabricius	Các tế bào tăng sinh rải rác trong các nang	Các tế bào tăng sinh ở giữa các nang và/hoặc nang bị teo giảm
Tế bào lympho tăng sinh ở da, nang lông	Không có	Thường xuyên
Bệnh tích ở hệ thần kinh trung ương	Không có	Có thể có
Tế bào ở các u cục	Các nguyên bào lympho đồng đều về kích thước, màu sắc	Các tế bào lympho không đồng nhất gồm: các nguyên bào lympho, tế bào lympho lớn, trung bình, nhỏ và tế bào lưới

6.2 Phương pháp realtime RT-PCR phát hiện virus gây bệnh Lympho leuko

6.2.1 Lấy mẫu

Chọn từ 3 con gà đến 5 con gà có triệu chứng điển hình mổ lấy gan, lách, túi Fabricius (khối lượng tổng các loại từ 3 g đến 5 g) cho vào túi hoặc lọ đựng mẫu vô trùng, ghi ký hiệu mẫu trên túi.

6.2.2 Bảo quản mẫu

Mẫu bệnh phẩm (6.2.1) đựng trong túi hoặc lọ và bảo quản trong thùng lạnh (có nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C) và gửi đến phòng thí nghiệm không quá 48 h. Trong phòng thí nghiệm, nếu chưa tiến hành xét nghiệm ngay, mẫu phải được bảo quản trong tủ lạnh âm 20 °C (4.2.3).

CHÚ THÍCH: Đồng thời kèm theo Phiếu gửi bệnh phẩm ghi rõ yêu cầu xét nghiệm và những thông tin về dịch tễ, các biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của bệnh.

6.2.3 Chuẩn bị mẫu

Lấy 1 g mẫu bệnh phẩm gồm gan, lách, túi Fabricicus (6.2.1) cắt nhỏ rồi nghiền với dung dịch PBS (3.2.1) theo tỉ lệ 1 : 10 thành huyền dịch trong cối chày sứ (4.2.6). Ly tâm (4.2.4) huyền dịch ở gia tốc 3 000 g trong thời gian 5 min rồi hút lấy dịch nổi để tách chiết ARN để thực hiện phản ứng realtime RT-PCR.

6.2.4 Cách tiến hành

6.2.4.1 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.4) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: sử dụng Kit tách chiết ARN (Qiagen RNeasy mini kit, Cat. No. 74104)¹⁾ (xem Phụ lục B).

6.2.4.2 Chuẩn bị mồi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.2.1) theo phương pháp realtime RT-PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của virus gây bệnh Lympho leuko sử dụng cặp mồi và mẫu dò (primers và probe) (3.2.6) được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Cặp mồi, mẫu dò¹⁾

Mẫu dò, mồi	Trình tự từ 5' đến 3'
Mẫu dò	FAM -CCTGGAAGGTGAGCAAGAAG- BHQ1
Mồi xuôi	TTGCAGGCATTTCTGACTGG
Mồi ngược	ACACGTTTCCTGGTTGTTGC

Mồi và mẫu dò được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị mồi gốc và mẫu dò gốc: mồi và mẫu dò ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.2) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.7) để hoàn nguyên mồi và mẫu dò ở nồng độ 100 µM làm mồi gốc và mẫu dò gốc;
- Chuẩn bị mồi sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mồi gốc bằng nước (3.2.8) (20 µl mồi gốc và 80 µl nước (3.2.8));
- Chuẩn bị mẫu dò sử dụng ở nồng độ 6 µM: pha loãng mồi gốc bằng nước (3.2.8) (6 µl mồi gốc và 94 µl nước (3.2.8)).

6.2.4.3 Tiến hành phản ứng realtime PCR

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

TCVN 8400-29 : 2015

Sử dụng cặp mồi và mẫu dò đã được chuẩn bị (6.2.4.2).

Sử dụng kit nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Dùng kit nhân gen của Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR system (Cat # 11732 – 020)²⁾. Thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng 4.

Bảng 4 – Thành phần phản ứng

Thành phần	Thể tích, μl
Reaction Mix 2X	12,5
Hỗn hợp Enzym (Enzyme mix)	0,5
Mồi/mẫu dò	1,5
Nước tinh khiết không có nuclease	5,5
Tổng thể tích	20,0

Chuyển 20 μl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

- Mẫu kiểm chứng dương: cho 5 μl mẫu ARN có giá trị Ct đã biết trước vào ống phản ứng.
- Mẫu kiểm chứng âm: cho 5 μl nước (3.2.8) vào ống phản ứng.
- Mẫu bệnh phẩm: cho 5 μl mẫu ARN (phụ lục B) vào ống phản ứng.

CHÚ Ý:

- Phản ứng realtime RT-PCR phải bao gồm: mẫu bệnh phẩm, mẫu kiểm chứng dương, mẫu kiểm chứng âm.
- Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng realtime RT-PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng bằng máy realtime PCR (4.2.1) đã được cài đặt chu trình nhiệt nêu trong bảng 5.

Bảng 5 – Chu trình nhiệt phản ứng

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
50 °C	15 min	1

²⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Bảng 5 (kết thúc)

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	5 min	1
95 °C	10 s	40
60 °C	40s	40

6.2.5 Đọc kết quả

Đọc kết quả bằng máy realtime PCR (4.2.1) dựa trên giá trị Ct (Ct là thời điểm máy đọc realtime PCR ghi nhận tín hiệu huỳnh quang phát ra từ ống phản ứng bắt đầu vượt qua cường độ huỳnh quang nền)

Điều kiện phản ứng được công nhận: mẫu kiểm chứng dương tính có giá trị Ct biết trước (± 2 Ct), mẫu kiểm chứng âm tính không có Ct;

Với điều kiện như trên, mẫu có giá trị Ct ≤ 35 được coi là dương tính; mẫu không có Ct được coi là âm tính; mẫu có giá trị $35 < Ct \leq 40$ được coi là nghi ngờ;

Những mẫu nghi ngờ cần được xét nghiệm lại theo quy trình hoặc bằng phương pháp khác để khẳng định.

7 Kết luận

Gà được xác định mắc bệnh Lympho leuko khi có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể đặc trưng của bệnh và dương tính với một trong hai phương pháp xét nghiệm quy định trong tiêu chuẩn này.

Phụ lục A

(Quy định)

Chuẩn bị dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

A.1 Thành phần

Natri hydrophosphat (Na_2HPO_4)	9,47 gm
Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	9,08 gm
Nước cất	900 ml

A.2 Chuẩn bị

Hòa tan natri hydrophosphat và kali dihydrophosphat trong 900 ml nước cất. Chỉnh pH đến 7,0 bằng axit clohydric.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng PBS thương mại và pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phụ lục B
(Tham khảo)

Quy trình tách chiết ARN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ARN có sử dụng hoá chất nguy hiểm và có khả năng gây hại nếu thao tác không cẩn thận. Do vậy, nên tránh tiếp xúc trực tiếp với da và hít phải hơi của các hoá chất này. Luôn luôn đeo găng tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

Quy trình tách chiết ARN sử dụng kit QIAGEN RNeasy miniKit (CAT. No. 74104) như sau:

- Lấy 600 µl dung dịch RLT (lysis buffer) cho vào ống 1,5 ml;
- Lấy 200 µl mẫu (dịch nổi) (6.2.3) vào ống có chứa dung dịch RLT. Lắc ống bằng máy lắc (4.2.5) trong 15 s;
- Cho 400 µl etanol tuyệt đối. Lắc ống bằng máy lắc trong 15 s;
- Chuyển 600 µl dung dịch sang cột lọc (dùng cho tách chiết ARN) đựng trong ống thu; ly tâm (4.2.4) với gia tốc 6 000 g trong 15 s;
- Đổ bỏ nước trong ống thu, đặt lại cột lọc vào ống thu và lặp lại bước trên với 600 µl dung dịch còn lại;
- Lấy 700 µl dung dịch RW1 nhỏ vào cột lọc, ly tâm với gia tốc 6 000 g trong 15 s. Đổ bỏ nước trong ống thu, đặt lại cột lọc vào ống;
- Lấy 500 µl RPE nhỏ vào cột lọc, ly tâm với gia tốc 6 000 g trong 15 s; Đổ bỏ nước trong ống thu, đặt lại cột lọc vào ống. Lặp lại bước này 1 lần nữa;
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới. Ly tâm cột lọc với gia tốc 12 000 g trong 2 min;
- Chuyển cột lọc sang ống 1,5 ml Free-RNase;
- Nhỏ 50 µl nước sạch Rnase vào cột lọc, ủ trong 1 min ở nhiệt độ phòng;
- Ly tâm với gia tốc 10 000 g trong 2 min;
- Bỏ cột lọc, giữ lại ống 1,5 ml có chứa ARN;
- Giữ mẫu ARN ở 4 °C trong ngày nếu chạy phản ứng realtime RT-PCR ngay và giữ ở âm 20 °C để lưu mẫu trong thời gian dài.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Aly M. Fadly, Laurence N. Payne, 2008, *Disease of poultry*, p.449 – p.616.
 - [2] Laurence N. Payne, 2008, *Poultry disease*, 6th Edition. Saunders Elsevier, p.276 – p.293.
 - [3] Nguyễn Vĩnh Phước, 1978, *Giáo trình bệnh truyền nhiễm gia súc*
 - [4] Liting Qin, Yulong Gao, Wei Ni, Meiyu Sun, Yongqiang Wang, Chunhong Yin, Xiaole Qi, Honglei Gao, and Xiaomei Wang (2013), "Development and Application of Real-Time PCR for Detection of Subgroup J Avian Leukosis Virus", *J. Clin Microbiol.* 2013 Jan; 51(1): 149–154
 - [5] Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lành, Đỗ Ngọc Thuý, 2012. *Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y*. NXB Đại học Nông nghiệp.
 - [6] L.N. Payne & K. Venugopal, "Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis", *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, 2000,19 (2), 544-564 Available at: <http://www.oie.int/doc/ged/D9316.PDF>
 - [7] Wang et al., "Avian leukosis virus subgroup J associated with the outbreak of erythroblastosis in chickens in China". *Virology Journal*, 2013 10:92. Available at: <http://www.virologyj.com/content/pdf/1743-422X-10-92.pdf>.
 - [8] *Lymphoid Leukosis in Poultry*. Available at: http://www.merckmanuals.com/vet/poultry/neoplasms/lymphoid_leukosis_in_poultry.html
 - [9] *Lymphoid Leukosis*. Available at: <http://www.thepoultrysite.com/publications/6/diseases-of-poultry/202/lymphoid-leukosis>
-