

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-26:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 26: BỆNH CÚM GIA CẦM H5N1**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 26: Avian influenza H5N1

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-26:2014 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.

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1

Animal diseases - Diagnostic procedure – Part 26: Avian influenza H5N1

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 đưa ra hết các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn 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 này.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh cúm gia cầm do vi rút A gây ra đối với gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

2.1 Bệnh cúm gia cầm là bệnh do vi rút cúm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra trên các loài gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã. Dựa vào độc lực của vi rút cúm gia cầm người ta xếp loại: bệnh cúm gia cầm độc lực cao, tỉ lệ chết rất cao và cúm gia cầm độc lực thấp với triệu chứng bệnh không rõ rệt và tỷ lệ chết thấp.

Vi rút cúm A thuộc subtype H5N1, hệ gen ARN có khả năng biến đổi rất nhanh, tạo ra những chủng, nhánh mới là nguyên nhân gây ra các ổ dịch cúm gia cầm.

2.2 CEF (Chicken Embryo Fibroblast cell): Tế bào xơ phôi gà

2.3 CPE (Cytopathic effect): Biến đổi bệnh lý tế bào

2.4 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): Chất tạo phức EDTA

2.5 EMEM (Eagle's Minimun Essential Medium): Môi trường EMEM dùng cho tế bào

2.6 FCS (Fetal calf serum): Huyết thanh thai bê

- 2.7 HA (Haemagglutination Assay): Phép thử phản ứng ngưng kết hồng cầu.
- 2.8 HI (Haemagglutination inhibition Assay): Phép thử phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu.
- 2.9 HPAI (High pathogenic avian influenza): Bệnh cúm gia cầm độc lực cao
- 2.10 LPAI (Low pathogenic avian influenza): Bệnh cúm gia cầm độc lực thấp
- 2.11 MDCK cell (Madin-Darby Canine Kidney cell): Tế bào thận chó
- 2.12 PBS (Photphate Buffered Salin): Dung dịch đệm
- 2.13 RDE (Receptor Destroying Enzyme): Men vô hiệu thụ thể (dùng để chống ức chế giả trong HI)

2 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

- 3.1 Axit clohydric (HCl) 1 N.
- 3.2 Natri hydroxit (NaOH) 1 N.
- 3.3 Etanol 70 %.
- 3.4 Bột agarose.
- 3.5 Dung dịch 1xTAE.
- 3.6 Etili bromua
- 3.7 Hồng cầu gà 1 %, xem A.4 phụ lục A.
- 3.8 Dung dịch PBS, pH 7,2-7,4, xem A3 phụ lục A.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

- 4.1 Cối, chày sứ, vô trùng
- 4.2 Pipet, có đầu tít các cỡ 30 μ l, 200 μ l và 1000 μ l sử dụng cho micropipet (có lọc và không lọc)
- 4.3 Đĩa 96 giếng, đáy chữ V hoặc chữ U

4.4 Đĩa nuôi tế bào 12 giếng**4.5 Bường an toàn sinh học cấp 2**

4.6 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở 1500 g/min đến 2500 g/min, 10.000 g/min và 12.000 g/min.

4.7 Máy lắc ống (vortex mixer)**4.8 Máy Realtime RT-PCR hoặc máy PCR**

4.9 Thiết bị điện di: có bể điện di, khay đỡ thạch, lược và máy chiếu UV...

4.10 Tủ ấm có chứa 5 % CO₂, duy trì được ở 37 °C.

4.11 Xi lanh, dung tích 1 ml, 5 ml.

4.12 Kính hiển vi, đảo ngược.

5 Cách tiến hành**5.1 Chẩn đoán lâm sàng****5.1.1 Đặc điểm dịch tễ**

Bệnh cúm gia cầm có tính lây truyền rất nhanh và mạnh. Trong đó, thủy cầm là nguồn mang mầm bệnh chính. Gia cầm nhiễm bệnh chủ yếu thông qua tiếp xúc trực tiếp giữa gia cầm mắc bệnh với gia cầm bị bệnh hoặc phân và chất thải của gia cầm bị bệnh. Các loài chim hoang dã cũng bị mắc bệnh và là nguồn lây lan mầm bệnh cho gia cầm và thủy cầm.

5.1.1.1 Thể độc lực cao

Trên gà: tốc độ lây lan bệnh rất nhanh, tỉ lệ chết có thể đến 100 % trong thời gian 3 ngày đến 4 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng đầu tiên.

Trên vịt: ngộ độc, bệnh ít trầm trọng hơn so với ở gà, tuy nhiên trong một số trường hợp tỉ lệ chết do bệnh trên vịt > 70 % và ngộ độc > 50 %.

5.1.1.2 Thể độc lực thấp

Bệnh thể độc lực thấp không có biểu hiện rõ rệt, nếu có bệnh thường bị nhầm lẫn với các dạng nhiễm trùng khác. Tỉ lệ chết của cả đàn là 2 % đến 3 % đối với gà và không gây chết trên vịt.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng**5.1.2.1 Thể quá cấp**

- Gia cầm chết nhanh, đột ngột.
- Chưa có biểu hiện lâm sàng về bệnh lý.

5.1.2.2 Thể độc lực cao

- Sốt cao từ 40 °C trở lên
- Xù lông, ủ rũ, bỏ ăn, giảm đẻ
- Đầu, mặt sưng, phù quanh mắt. Mào, tích sưng, xuất huyết
- Mắt bị viêm kết mạc và có thể xuất huyết
- Xuất huyết điểm ở giữa vùng bàn chân và khuỷu chân
- Có triệu chứng hô hấp, mỏ chảy nhiều rớt dãi
- Có triệu chứng thần kinh, nghẹo cổ, sã cánh
- Phân xanh, phân trắng
- Vịt, ngỗng chủ yếu bị các triệu chứng thần kinh, vẹo cổ, mất điều hòa, run rẩy, mệt mỏi nhẹ.

5.1.2.3 Thể độc lực thấp

Trên gà: Mệt mỏi, có triệu chứng hô hấp nhẹ, thờ khò khè, ho nhẹ. Trong một số ít trường hợp, thể độc lực thấp cũng biểu hiện các triệu chứng của thể độc lực cao như mào tích tím tái, giảm đẻ, tỉ lệ chết có thể lên đến > 50 %. Trên vịt và ngỗng: Không có biểu hiện lâm sàng.

5.1.3 Bệnh tích

5.1.3.1 Thể độc lực cao

Trên gà:

- Xuất huyết tràn lan ở các bề mặt niêm mạc, màng thanh dịch và mỡ bụng;
- Xuất huyết tụy, màng ngoài bao tim, lớp màng ngoài bao tim, cơ ngực, chân;
- Xuất huyết dạ dày và dạ dày tuyến, ruột, manh tràng;
- Phù thũng dưới da vùng đầu, cổ và ngực;
- Miệng chứa nhiều dịch;

- Khí quản xuất huyết chứa nhiều dịch nhày;
- Gà đẻ có xuất huyết ở buồng trứng;

Trên vịt:

- Xuất huyết đường ruột, dạ dày và dạ dày tuyến;
- Xuất huyết bề mặt tụy, khí quản;
- Viêm túi khí;
- Sung huyết hoặc xuất huyết điểm ở não.

5.1.3.2 Thẻ độc lực thấp

Trên gà:

- Nang buồng trứng xuất huyết, phù nề
- Vòi trứng phù, viêm cata
- Viêm phúc mạc fibrin lẫn lòng vàng trứng
- Xung huyết phổi, khí quản, phù phổi
- Xuất huyết điểm màng ngoài tim, gan, màng thanh dịch ruột.

Trên vịt và ngỗng:

- Không có biểu hiện bệnh lý.

CHÚ THÍCH: Đặc điểm dịch tễ của chim hoang dã vẫn chưa có tài liệu chính thức nào nghiên cứu.

5.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Sơ đồ chẩn đoán bệnh cúm gia cầm: (xem Phụ lục F) Tất cả các thao tác liên quan đến xử lý mẫu, chiết tách ARN, phân lập vi rút trong tiêu chuẩn này phải được tiến hành trong buồng an toàn sinh học cấp 2 (xem 4.5) trở lên.

5.2.1 Lấy mẫu bệnh phẩm

5.2.1.1 Lấy mẫu xét nghiệm kháng nguyên

Mẫu xét nghiệm kháng nguyên: lấy 3 gam đến 5 gam bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, ruột...) của gia cầm bị bệnh. Trong trường hợp gia cầm còn sống, sử dụng tăm bông để ngoáy dịch ở nhớt

(swab), họng hoặc lấy phân tươi sau đó cho vào dung dịch PBS (xem 3.8), pH 7,2 đến 7,4, có bổ sung dung dịch kháng sinh theo tỉ lệ 1:10 (xem A.1 phụ lục AA.1)

5.2.1.2 Lấy mẫu xét nghiệm kháng thể

Chỉ thực hiện đối với gia cầm chưa tiêm vắc xin cúm gia cầm: lấy máu của gia cầm nghi mắc cúm bằng cách sử dụng xy lanh 5 ml để lấy 1 ml máu, rút cán xy lanh tới mức cao nhất để tạo nhiều khoảng trống bên trong, đặt xy lanh nằm nghiêng 5° ở nhiệt độ 20 đến 30°C trong thời gian 30 min để máu tự đông lại và tiết ra huyết thanh. Chắt huyết thanh sang ống 1,5 ml mới để dùng cho xét nghiệm.

Các mẫu phải được bảo quản lạnh từ 2°C đến 8°C và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong vòng 24h.

5.2.2 Phát hiện kháng nguyên

5.2.2.1 Xử lý mẫu

a) Mẫu bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, ruột)

Nghiền 1 gam bệnh phẩm bằng cối chày sứ (xem 4.1) với dung dịch PBS pH 7,2 theo tỉ lệ 1:10 thành huyền dịch 10 %.

Bổ sung 1/10 lượng kháng sinh đậm đặc (xem A1 phụ lục A), chuyển sang ống ly tâm. Ly tâm ở tốc độ 8 000 r/min trong 15 s.

Thu dịch bệnh phẩm phía trên vào 2 ống 1,5 ml. Một ống dùng cho các xét nghiệm Realtime RT-PCR (rRT-PCR), phân lập vi rút trên tế bào, phân lập trên trứng, ống còn lại dùng làm mẫu lưu bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

b) Dịch ngoáy ở nhớt, họng, khí quản, phân tươi

Lắc ống chứa tấm bông dịch ngoáy bằng máy lắc trong 15 s, ly tâm ống ở tốc độ 8000 g/min trong 15 s

Dùng pipet hút dịch trong ống chuyển sang 2 ống 1,5 ml. Một ống dùng cho các xét nghiệm Realtime RT-PCR, phân lập vi rút trên tế bào hoặc phân lập trên trứng, ống còn lại dùng làm mẫu lưu bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

5.2.2.2 Phương pháp Realtime RT-PCR

a) Chiết tách ARN

Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách ARN đối với các dịch bệnh phẩm bằng kit thương mại (xem phụ lục D). ARN thu được sau quá trình chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.

b) Tiến hành phản ứng

Phản ứng realtime RT-PCR phát hiện vi rút cúm gia cầm trên cơ sở phát hiện các đoạn gen M, H5 và N1 được thực hiện như sau:

Lựa chọn môi và mẫu dò cho phản ứng realtime RT-PCR: cần tham khảo các báo cáo giám sát để biết để lựa chọn môi và mẫu dò phù hợp với các chủng vi rút đang lưu hành. Các bộ môi và mẫu dò để phát hiện các chủng vi rút H5N1 lưu hành được liệt kê trong Bảng E.1 phụ lục E.

Chuẩn bị môi ở nồng độ 20 μ M và mẫu dò ở nồng độ 6 μ M với nước sạch Dnase/Rnase.

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng và cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng Realtime RT-PCR phát hiện các đoạn gen M, H5, N1 theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (Bảng E2 và E3 phụ lục E).

c) Đọc kết quả

Điều kiện phản ứng được công nhận: Mẫu đối chứng dương tính (chuẩn độ trước) có giá trị Ct \leq 25 (\pm 2 Ct), mẫu đối chứng âm tính không có Ct.

Với điều kiện như trên, mẫu có giá trị Ct \leq 35 được coi là dương tính. Mẫu không có Ct 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 bằng phương pháp khác (phân lập vi rút) để khẳng định.

5.2.2.3 Phương pháp RT-PCR

a) Chiết tách ARN

Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách ARN đối với các dịch bệnh phẩm bằng kit thương mại (xem phụ lục D). ARN thu được sau quá trình chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.

b) Tiến hành phản ứng

Tương tự phản ứng Realtime RT-PCR, phản ứng RT-PCR phát hiện vi rút cúm gia cầm trên cơ sở phát hiện các đoạn gen M, H5 và N1 và được thực hiện như sau:

Chuẩn bị môi ở nồng độ 20 μ M với nước sạch Dnase/Rnase (trình tự môi xem Bảng E1 phụ lục E)

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng RT-PCR để phát hiện mỗi loại gen của vi rút cúm gia cầm theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (xem Bảng E2 và E3 phụ lục E).

Sản phẩm thu được sau phản ứng RT-PCR đem điện di để đọc kết quả.

c) Điện di sản phẩm RT-PCR:

Pha 1,5 g bột agarose (xem 3.4) với 100 ml dung dịch 1xTAE (xem 3.5), rồi đun nóng trong lò vi sóng cho đến khi tan hoàn toàn. Khi hỗn hợp nguội bớt (khoảng 50 °C đến 60 °C), cho tiếp 2 µl etidi bromua (xem 3.6). Sau đó đổ vào khay và cắm lược. Để gel cứng lại trong khoảng 1 h, rồi rút lược ra.

Đổ đầy dung dịch 1xTAE (xem 3.5) vào bể điện di (đến vạch full level), đặt khay gel vào vị trí trong bể điện di. Pha 2 µl loading dye với 4 µl 100 bp ladder rồi đưa vào giếng đầu tiên của miếng gel. Pha 2 µl loading dye với 8 µl mẫu (đối chứng âm và dương), đưa vào các giếng còn lại của miếng gel.

Điện di gel ở 80 V đến 100 V trong 30 min đến 40 min.

Sau khi điện di xong, đặt gel đã điện di vào máy chiếu UV có bước sóng 590 nm để đọc kết quả.

d) Đọc kết quả:

Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng RT-PCR phát hiện các gen M, H5 hoặc N1 được đọc như sau:

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen M dương tính hiển thị vạch sản phẩm 201 bp (cặp mồi: M52F và M253R).

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen H5 dương tính hiển thị vạch sản phẩm 363bp (cặp mồi: H5F 936 và H5R 1299).

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen N1 dương tính hiển thị vạch sản phẩm 150 bp (AI N1-F6 và AI N1-595).

Các phản ứng RT-PCR không hiển thị vạch sản phẩm như xác định ở trên là phản ứng âm tính.

5.2.2.4 Phân lập trên trứng

Tất cả các thao tác tiêm truyền trứng và thu hoạch nước trứng (dịch niệu mô) sau phân lập phải được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3.

a) Tiêm truyền bệnh phẩm

Mỗi mẫu bệnh phẩm cần được tiêm truyền lên 3 trứng.

Chọn trứng gà có phôi 9 ngày đến 10 ngày tuổi khoẻ mạnh không có kháng thể cúm.

Lau trứng bằng cồn 70 % và đục lỗ nhỏ phía trên buồng hơi.

Dùng xi lanh 1 ml (xem 4.11) với kim 23G và hút dịch bệnh phẩm tiêm phía trên buồng hơi thẳng xuống xoang niệu mô với lượng 0,2 ml/trứng.

Bịt lỗ tiêm trên vỏ trứng bằng keo dán.

Đặt trứng trong tủ ấp trứng 37 °C và theo dõi trong vòng 72 h.

Soi trứng mỗi ngày 2 lần, nếu phát hiện trứng chết, giữ trứng trong tủ lạnh (4 °C) cho đến khi thu hoạch dịch niệu mô để giám định vi rút.

Đối với trứng không chết sau 72 h, cất vào tủ lạnh (4 °C) qua đêm hoặc ít nhất 4 h trước khi thu hoạch dịch niệu mô cho giám định vi rút.

b) Thu hoạch dịch niệu mô

Lau trứng bằng cồn 70 %.

Dùng panh và kéo vỏ trứng cắt vỏ trứng, bộc lộ buồng hơi, gạt màng xoang niệu mô sang bên.

Thu hoạch dịch niệu mô từ 5 ml đến 10 ml/trứng vào các ống nghiệm riêng rẽ để giám định vi rút.

c) Xác định

Trước khi tiến hành giám định, sử dụng phương pháp HA để xác định sự có mặt vi rút cúm gia cầm (Newcastle, vi rút gây hội chứng giảm đẻ) trong dịch niệu mô (xem phụ lục B) thông qua đặc tính gây ngưng kết hồng cầu. Nếu HA dương tính, dịch niệu mô có vi rút.

Giám định vi rút trong dịch niệu mô bằng phương pháp HI sử dụng kháng huyết thanh chuẩn H5 hoặc bằng phương pháp Realtime RT-PCR hoặc RT-PCR (xem 5.2.2.2 và 5.2.2.3).

d) Đọc kết quả

Kết quả giám định (bằng HI hoặc phản ứng realtime RT-PCR hoặc RT-PCR) dương tính, dịch niệu mô có vi rút cúm gia cầm H5N1.

Kết quả giám định âm tính, dịch niệu mô không có vi rút cúm gia cầm.

Trong trường hợp giám định âm tính, dùng dịch niệu mô thu hoạch ở lần thứ nhất để tiêm truyền trứng lần hai sau đó theo dõi và thu hoạch dịch niệu mô như lần thứ nhất để giám định. Nếu kết quả giám định lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm gia cầm H5N1.

5.2.2.5 Phân lập trên tế bào

a) Chuẩn bị:

Chuẩn bị tế bào MDCK, CEF có độ bao phủ 90 % bề mặt thảm trên đĩa 12 giếng (xem A.8 phụ lục A)

Chuẩn bị môi trường phát triển có chứa 1 µg/ml TCPK trypsin.

b) Tiến hành:

Hút môi trường cũ trong giếng bỏ đi, rửa thăm tế bào 3 lần bằng PBS (xem A2 phụ lục A) sau đó nhỏ 50 μ l mẫu đã được xử lý và 1,5 ml môi trường đã chuẩn bị vào mỗi giếng.

Ủ đĩa tế bào đã nhỏ mẫu trong tủ ấm ở 37 °C có 5 % CO₂ (xem 4.10). Kiểm tra đĩa tế bào hàng ngày, theo dõi tối đa trong 5 ngày.

Khi trên thăm tế bào xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE), tiến hành thu hoạch dịch nuôi tế bào, sau đó xác định sự có mặt của vi rút bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu gà (HA) (xem phụ lục B). Phản ứng HA dương tính, dịch nuôi tế bào có vi rút gây ngưng kết hồng cầu.

Giám định vi rút cúm gia cầm bằng phương pháp HI với kháng huyết thanh chuẩn H5 hoặc kiểm tra bằng phương pháp Realtime RT-PCR hoặc RT-PCR (xem 5.2.2.2 và 5.2.2.3).

c) Đọc kết quả

Kết quả giám định dương tính, dịch nuôi tế bào có vi rút cúm gia cầm H5N1.

Kết quả giám định âm tính, dịch nuôi tế bào không có vi rút cúm gia cầm H5N1.

Trong trường hợp giám định âm tính, dùng dịch nuôi tế bào thu hoạch ở lần thứ nhất lây nhiễm lên tế bào lần hai sau đó theo dõi và thu hoạch dịch nuôi tế bào như lần thứ nhất để giám định. Nếu kết quả giám định lần thứ 2 vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm gia cầm H5N1.

5.2.3 Phát hiện kháng thể

5.2.3.1 Xử lý mẫu

Trong trường hợp mẫu huyết thanh có lẫn máu, cần ly tâm mẫu huyết thanh ở tốc độ 1500 g/min (xem 4.6) trong 5 min, loại bỏ cặn để dùng cho xét nghiệm kháng thể bằng phương pháp HI. Lưu mẫu ở -20 °C.

5.2.3.2 Phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà (HI)

a) Chuẩn bị:

Dung dịch PBS pH ~7,2 (xem A3 phụ lục A)

Hồng cầu gà 1 % (xem A4 phụ lục A)

Đĩa 96 giếng (xem 4.3)

Huyết thanh kiểm tra: Ngoại trừ huyết thanh gà, trước khi xét nghiệm các huyết thanh vịt, ngan ngừng cần được vô hoạt bỏ thể ở 56 °C trong 30 min và huyết thanh đó phải được xử lý với RDE (xem A5

phụ lục A) để chống hiện tượng ức chế giả. Ngoài ra huyết thanh vịt, ngan, ngỗng phải xử lý hấp phụ hồng cầu để tránh hiện tượng ngưng kết giả (xem A10 phụ lục A)

Kháng nguyên: Kháng nguyên chuẩn H5 được pha 4 đơn vị HA/25 μ l (xem A9 phụ lục A).

b) Cách tiến hành: xem phụ lục C.

c) Đọc kết quả

Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết lấm tấm, chứng tỏ không có kháng thể kết hợp với kháng nguyên trong phản ứng.

Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy, chứng tỏ kháng nguyên và kháng thể tương ứng. Hiệu giá kháng thể được tính ở độ pha loãng cao nhất còn có hiện tượng ức chế ngưng kết hoàn toàn.

Huyết thanh được coi là dương tính kháng thể kháng vi rút cúm gia cầm khi có hiệu giá HI $\geq 1/16$ ($4 \log_2$).

6 Báo cáo kết quả

Gia cầm được xác định mắc bệnh cúm gia cầm H5N1 khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh cúm gia cầm và

Có kết quả xét nghiệm kháng nguyên vi rút cúm gia cầm H5N1 dương tính bằng một trong những phương pháp: Realtime RT-PCR, RT-PCR hoặc phân lập (trên trứng hoặc tế bào).

Hoặc Có kết quả dương tính kháng thể H5N1 bằng phương pháp HI (khi gia cầm chưa tiêm phòng vắc xin phòng cúm gia cầm).

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**A.1 Dung dịch kháng sinh đậm đặc**

Penicillin	1.000.000 IU
Streptomycin	1 g
Nystatin	500.000 IU
Nước cất	10 ml

Lắc đều cho tan, lọc vô trùng bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm.

Sử dụng tốt nhất trong 1 tuần, bảo quản ở +4 °C.

A.2 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS) 10x, pH ~ 7,2, sản phẩm thương mại

Dung dịch muối đệm phosphat 10x	100 ml
Nước cất (vô trùng)	900 ml

A.3 Dung dịch muối đệm photphat (PBS) pH ~ 7,2

Natri clorua (NaCl)	8 g
Natri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,9 g
Kali dihydro photphat (KH_2PO_4)	0,2 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 1 N (xem 3.2) hoặc dung dịch HCl 1 N (xem 3.1). Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

Để dùng làm dung dịch bảo quản mẫu: pha 9 phần PBS + 1 phần dung dịch kháng sinh đậm đặc (xem A1 phụ lục A). Trường hợp mẫu cần bảo quản lâu có thể pha thành môi trường đệm glycerin bằng cách trộn đều 1 phần PBS với 1 phần glycerin. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.4 Dung dịch hồng cầu gà 1%

Hồng cầu gà đặc	1 ml
Dung dịch PBS pH ~ 7,2	99 ml

Lắc đều, sử dụng trong 1 đến 2 ngày. Bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.5 Dung dịch RDE – Xử lý RDE**A.5.1 Dung dịch RDE**

RDE	20 ml
Nước muối sinh lý	20 ml

Lắc đều và chia nhỏ ra ống 3 ml và bảo quản trong tủ -20 °C.

A.5.2 Xử lý mẫu với dung dịch RDE

Nhỏ 1 phần huyết thanh cần xét nghiệm vào 3 phần RDE, lắc đều và ủ trong nồi cách thủy ở 37 °C trong thời gian từ 18 h đến 20 h, sau đó chuyển sang ủ trong nồi cách thủy ở 56 °C trong thời gian từ 30 min đến 60 min. Kết thúc quá trình ủ, giữ ở 4 °C trong 30 min sau đó nhỏ thêm 6 phần dung dịch PBS pH ~7,2. Sau khi xử lý RDE, huyết thanh xét nghiệm đã được pha loãng 10 lần.

A.6 Môi trường nuôi tế bào

Môi trường EMEM	500 ml
Huyết thanh thai bê (FCS) 10%	50 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin: 10000 UI/ml)	5 ml
Chất chống nấm (Fungizone: 250 µg/ml)	5 ml

* Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C

A.7 Môi trường phát triển tế bào

Môi trường EMEM	500 ml
Huyết thanh thai bê (FCS), 10 %	50 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin: 10000 UI/ml)	5 ml

Chống nấm (Fungison: 250 µg/ml)	5 ml
TPCK trypsin	500 µl
* Sử dụng tốt nhất trong ngày, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C	

A.8 Cấy chuyển và nuôi tế bào

Nguyên liệu: 1 chai nuôi tế bào (MDCK hoặc CEF) 75 cm² đã phát triển 1 lớp đạt 100 % bề mặt nuôi

1 đĩa tế bào (MDCK hoặc CEF) 12 giếng

Môi trường nuôi tế bào (xem A6 phụ lục A)

Trypsin có 0,05 % EDTA

PBS (xem A2 phụ lục A)

CHÚ Ý: Tất cả các môi trường phải được cân bằng ở 37 °C trước khi sử dụng và vật tư dùng cho tế bào đều phải được hấp vô trùng trước khi sử dụng.

Tiến hành như sau:

Bước 1: Hút bỏ môi trường đang nuôi trong chai tế bào MDCK, CEF 1 lớp

Bước 2: Rửa bề mặt thâm tế bào bằng PBS 2 lần với 10 ml/chai 75 cm², tráng qua và hút bỏ PBS.

Bước 3: Tách tế bào

- Cho 2 ml trypsin (có 0,05 % EDTA) vào chai tế bào 75 cm², lắc đều lên bề mặt tế bào sao cho bề mặt tế bào được phủ một lớp trypsin.
- Ủ trong thời gian từ 3 min đến 10 min trong tủ ấm ở 37 °C.

CHÚ Ý: không để tế bào trong trypsin quá 15 min.

- Khi tế bào đã tách hết, bổ sung 5 ml môi trường nuôi tế bào (xem A6 phụ lục A) vào chai để vô hoạt trypsin, trộn đều, chuyển toàn bộ huyền dịch tế bào sang ống ly tâm 15 ml.

Bước 4: Loại bỏ Trypsin

- Ly tâm huyền dịch tế bào ở gia tốc 3000 g/min trong 5 min.
- Loại bỏ phần dung dịch ở trên, giữ cặn tế bào.

Bước 5: Cân bằng môi trường và đếm số tế bào

- Làm long cặn tế bào bằng cách búng nhẹ vào thân ống chứa cặn tế bào.
- Bổ sung 10 ml môi trường nuôi tế bào, sau đó dùng pipet hút lên hút xuống nhẹ nhàng cho đến khi các tế bào phân tán đều trong dịch môi trường.
- Đếm tế bào: Pha loãng tế bào 100 lần (10 μ l tế bào trong 990 μ l môi trường nuôi tế bào), đếm tế bào bằng buồng đếm trên kính hiển vi (xem 4.12), tính số tế bào trong 1 ml.

Bước 6: Cấy chuyển tế bào:

- Ghi nhãn chai nuôi tế bào mới (tên dòng tế bào, ngày nuôi cấy, lần cấy chuyển)
- Chia huyền dịch tế bào vào 1 chai 75 cm^2 và 1 đĩa 12 giếng:

* Chai tế bào 75 cm^2 khi nuôi cấy cần 6×10^6 tế bào/chai

* Đĩa tế bào 12 giếng khi nuôi cấy cần 1×10^6 tế bào/đĩa

Bước 7: Nuôi tế bào và kiểm tra sự phát triển:

- Chai tế bào 75 cm^2 bổ sung 20 ml môi trường nuôi tế bào và 6×10^6 tế bào MDCK sau khi đếm.
- Đĩa tế bào 12 giếng : Ống ly tâm 50 ml có 18 ml môi trường nuôi tế bào và 1×10^6 tế bào MDCK, CEF sau khi đếm, trộn đều và chia nhỏ ra 12 giếng mỗi giếng 1,5 ml.

Bước 8 : Nuôi chai tế bào và đĩa tế bào trong tủ ẩm có 5 % CO_2 duy trì ở 37 $^\circ\text{C}$.

Theo dõi sự phát triển hàng ngày của tế bào trên kính hiển vi (xem 4.12)

A.9 Cách pha và hiệu chỉnh kháng nguyên 4HA

Kháng nguyên cần được kiểm tra hiệu giá bằng phản ứng HA và pha ở hiệu giá 4HA/25 μ l để dùng trong phản ứng HI. Ví dụ:

Hiệu giá kháng nguyên trong phản ứng HA là 1/256 thì 4 HA bằng $4 \times 1/256 = 1/64$

Pha 4 HA/25 μ l gồm 1 phần kháng nguyên và 63 phần PBS pH ~ 7,2.

Hiệu chỉnh kháng nguyên 4 HA/25 μ l bằng phản ứng HA (xem phụ lục B). Nếu kết quả ngưng kết đến giếng thứ 2, là kháng nguyên pha đạt. Nếu ngưng kết đến giếng thứ 3 (hoặc hơn) là kháng nguyên pha đặc, hiệu giá là 8 HA (hoặc hơn). Nếu ngưng kết chỉ ở giếng đầu tiên hoặc giếng thứ 1 là kháng nguyên pha loãng. Dựa vào kết quả đó để bổ sung thêm PBS pH ~ 7,2 hoặc kháng nguyên để có kháng nguyên là 4HA chuẩn.

A.10 Xử lý huyết thanh chống hiện tượng gây ngưng kết hồng cầu giả

Hiện tượng gây ngưng kết hồng cầu giả có thể xử lý bằng cách hấp phụ huyết thanh kiểm tra với hồng cầu gà. Thêm 25 μl hồng cầu đặc vào 500 μl huyết thanh, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng trong 30 min, sau đó ly tâm ở tốc độ 1500 đến 2500 g/min (xem 4.6) trong 2 min đến 5 min. Thu lấy huyết thanh đã hấp phụ để xét nghiệm.

Phụ lục B

(Quy định)

Phản ứng ngưng kết hồng cầu gà (HA)**B.1 Thuốc thử và vật liệu thử**

Hồng cầu gà 1 % (xem A4 phụ lục A).

Dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào hoặc dung dịch niêu mô sau khi phân lập trên trứng

Kháng nguyên chuẩn cúm gia cầm H5N1

Dung dịch PBS pH ~ 7,2 (xem A3 phụ lục A).

B.2 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các đĩa ngưng kết 96 giếng, đáy chữ V, pipet các loại, đầu tip các cỡ (xem 4.2).

B.3 Cách tiến hành (xem sơ đồ bên dưới)

Cho 25 μ l PBS pH ~7,2 vào các giếng từ giếng 1 đến giếng 12. Cho 25 μ l dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào, dung dịch niêu mô sau khi phân lập trên trứng hoặc kháng nguyên chuẩn vào giếng 1.

Trộn đều huyền dịch hoặc kháng nguyên với PBS ở giếng 1, hút 25 μ l từ giếng 1 chuyển sang giếng 2 và trộn đều, hút 25 μ l chuyển sang giếng 3 và trộn đều, tiếp tục làm như vậy đến giếng 11, hút bỏ 25 μ l ở giếng 11. Giếng 12 chỉ có PBS để làm đối chứng hồng cầu.

Cho 25 μ l hồng cầu gà 1 % vào mỗi giếng, lắc nhẹ trên máy lắc trong 1 min. Để đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 30 min.

B.4 Đọc kết quả

Định tính:

Phản ứng HA dương tính khi có hạt ngưng kết hồng cầu lấm chấm.

Phản ứng HA âm tính khi không có ngưng kết hồng cầu

Những mẫu dương tính với phản ứng HA là những mẫu có chứa vi rút gây ngưng kết hồng cầu (một đặc tính của vi rút cúm).

Định lượng:

Phản ứng HA dương tính khi có hạt ngưng kết lấm chấm ở độ pha loãng (hiệu giá) $\geq 1/4$.

Phản ứng HA âm tính khi không có ngưng kết hồng cầu hoặc có ngưng kết nhưng ở độ pha loãng < 1/4

Những mẫu dương tính với phản ứng HA là những mẫu có chứa vi rút gây ngưng kết hồng cầu

Hiệu giá HA của một mẫu được xác định tại nồng độ pha loãng cao nhất có ngưng kết hồng cầu. Ví dụ mẫu có phản ứng HA dương tính ở độ pha loãng 1/1024 thì hiệu giá HA của mẫu được xác định là 1/1024 hoặc $10 \log_2$

Sơ đồ các bước tiến hành phản ứng ngưng kết hồng cầu gà (HA)

Các bước	Nguyên liệu	Giếng												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Pha loãng KN	PBS, μ l	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	KN kiểm tra, μ l	25	Trộn đều, chuyển 25 μ l lần lượt từ giếng 1 đến giếng 11 rồi hút bỏ 25 μ l										0	
Cho HC gà	HC gà 1%, μ l	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	Độ pha loãng KN	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$		

CHÚ THÍCH: KN: kháng nguyên; HC: hồng cầu.

Phụ lục C

(Quy định)

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà (HI)

Cho 25 µl PBS pH ~7,2 vào các giếng từ giếng 1 đến giếng 12. Cho 25 µl huyết thanh cần kiểm tra vào giếng 1.

Trộn đều huyết thanh với PBS ở giếng 2, chuyển 25 µl sang giếng 3 và trộn đều, chuyển 25 µl sang giếng 4, tiếp tục đến giếng 11, hút bỏ 25 µl ở giếng 11.

Cho 25 µl kháng nguyên 4 HA/25 µl vào các giếng từ 1 đến 11. Cho thêm 25 µl PBS vào giếng 12 làm đối chứng hồng cầu.

Lắc nhẹ trên máy lắc sau đó để đĩa ở nhiệt độ phòng 30 min.

Cho 25 µl hồng cầu gà 1 % vào mỗi giếng, lắc nhẹ trong 1 min. Để đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau 30 min (xem sơ đồ dưới đây).

Sơ đồ các bước tiến hành phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà (HI)

Các bước	Nguyên liệu	Giếng											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pha loãng huyết thanh	PBS, µl	0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
	Huyết thanh kiểm tra	50	Chuyển 25 µl từ giếng 1 sang giếng 2, trộn đều, chuyển tiếp tục đến giếng 11 rồi hút bỏ 25 µl										0
Cho kháng nguyên	KN 4 HA µl	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
Lắc nhẹ, để 30 min ở nhiệt độ phòng													
Cho hồng cầu gà	Hồng cầu gà 1 %, µl	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	Độ pha loãng kháng thể	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	

Mỗi đĩa phản ứng phải có mẫu đối chứng kháng nguyên chuẩn hoặc kháng thể chuẩn làm tương tự như mẫu cần chẩn đoán để đảm bảo 4 HA/25 µl đã được sử dụng cho phản ứng là đúng, mục đích là để kiểm soát mẫu huyết thanh và mẫu bệnh phẩm khi làm phản ứng (mẫu này được gọi là mẫu đối chứng nội).

Phụ lục D

(Tham khảo)

Phương pháp chiết tách ARN

Dùng huyền dịch đã xử lý (xem 5.2.2.1) để chiết tách ARN. Có thể sử dụng bộ kit Qiagen® RNeasy Extraction cat # 74104 50 prep hoặc # 74106 250 prep theo quy trình dưới đây:

Nhỏ 200µl dịch nghiền mô vào ống ly tâm loại 1,5ml cùng với 600µl Qiagen® buffer RLT có 1 % β-ME, lắc đều trên máy Vortex rồi ly tâm nhẹ.

Thêm 500 µl etanol 70 % (xem 3.3) vào ống, lắc mạnh bằng máy Vortex rồi ly tâm nhẹ.

Chuyển tất cả dịch nổi sang cột lọc RNeasy® Qiagen, ly tâm trong 15 s với tốc độ 10.000 r/min ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung 700 µl dung dịch rửa 1 (RW1 buffer) vào cột RNeasy® Qiagen, ly tâm trong 15 s ở 10.000 g/min, thay ống thu mới vào cột lọc.

Nhỏ 500µl dung dịch rửa RPE buffer vào cột RNeasy® và ly tâm trong 15 s ở 10.000 g/min, thay ống thu mới, lặp lại 2 lần với dung dịch rửa RPE buffer.

Thay ống thu mới, ly tâm cột lọc và ống thu trong 2 min ở tốc độ 12.000 g/min trở lên, bỏ ống thu.

Đặt cột lọc vào ống thu ARN, nhỏ 50 µl nước sạch nuclease vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 1 min. Tách ARN bằng cách ly tâm trong 1 min ở tốc độ 10.000 g/min, bỏ cột lọc, giữ lại dung dịch trong ống thu ARN.

Bảo quản mẫu ARN thu được ở 4 °C trong thời gian ngắn trước khi làm RT-PCR, nếu để sau 24 h, nên bảo quản mẫu ở - 20 °C hoặc nhiệt độ thấp hơn.

Phụ lục E
(Tham khảo)

**Trình tự một số cặp mồi, hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt sử dụng cho phản ứng
rRT-PCR và RT-PCR để phát hiện vi rút cúm A H5N1**

**E.1 Trình tự mồi – mẫu dò, lượng hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt cho phản ứng
Realtime RT-PCR**

Bảng E1: Trình tự mồi-mẫu dò phát hiện gen M, H5, N1 trong RRT-PCR

Tên mồi (Ng.gốc)	Kí hiệu mồi/probe	Trình tự (5'-3')
M-4 (CDC)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm độc lực cao
	InfA Probe	FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1
	InfA xuôi	GACCRATCCTGTACCTCTGAC
	InfA ngược	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA
M (AAHL)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm độc lực thấp
	IVA-MA-P	TET-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1
	IVA-D161M-F	AGA TGAGYCTTCTAACCGAGGTCG
	IVA-D162M-R	TGC AAA NAC ATC YTC AAG TCT CTG
H5-3S (AAHL+ Probe HA 2-3)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm H5 thuộc clade 2.3.4
	Probe	HEX-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-BHQ1
	Probe	TET-TCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCA-BHQ1
	Xuôi	ACGTATGACTACCCGCGAGTATTCA
	Ngược	AGACCAGCTACCATGATTGC
H5-3 (AAHL)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm H5 thuộc clade 1
	IVA-H5a-P	TET-CAACAGTG GCGAGTTCCTAGCA-BHQ1
	IVA-D148H5-F	AAA CAGAGAGGAAATAAGTGG AGTAAA ATT
	IVA-D149H5-R	AAA GATAGACCAGCTACCATGATTGC
H5-A (CDC)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm H5 clade 2.3.2 a
	AH5a Probe1 2*	TGACTACCC GCAG*T*ATTCAGAAGAAGCAAGACTAA
	AH5a Probe2 2*	CAACTATCCGCAG*T*ATTCAGAAGAAGCAAGATTAA
	AH5a xuôi	TGGAAAGTRTAARAAACGGAACGT
	AH5a ngược	YGCTAGGGARCTCGCCACTG

Bảng E1 (kết thúc)

H5-B (CDC)		Dùng tốt cho phát hiện vi rút cúm gia cầm H5 clade 2.3.2 b
	AH5b Probe2	TACCCA TACCAACCA*T*CT ACCATTCCCTGCCAT
	AH5b xuôi	GGAATG YCCCAAATATGTGAAATCAA
	AH5b ngược	CCACTCCCCTGCTCRTTGCT
N1-2 (China)	Probe	FAM-TGGTCT TGGCCAGACGGTGC-BHQ1
	Xuôi	TGGACTAGTGGGAGCAGCAT
	Ngược	TGTCAATGGTTAAGGGCAACTC

**Bảng E2: Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml
với các lượng cụ thể cho mỗi phản ứng**

Hỗn hợp phản ứng (Theo hướng dẫn của Kit Invitrogen Superscript 3 qRT-PCR Kit)	Lượng dùng cho 1 phản ứng, μ l
2x Reaction buffer	12,5
Mồi xuôi 20 μ M	0,5
Mồi ngược 20 μ M	0,5
Taqman probe 6 μ M	0,5
Enzyme mix	0,5
Nước cất sạch nuclease	5,5
Mẫu ARN	5
Tổng	25

**Bảng E3: Chu trình nhiệt cho phản ứng Realtime RT-PCR
phát hiện vi rút cúm gia cầm H5N1**

Chu trình 1	Chu trình 2
50 °C trong 15 min 95 °C trong 2 min	(95 °C trong 10 s 58 °C trong 50 s) lặp lại 40 lần

E.2 Trình tự mỗi, lượng hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR

Bảng E4: Trình tự các cặp mồi và mẫu dò phát hiện gen M vi rút cúm A và các gen H5, N1 dùng trong phản ứng RT-PCR

TT	Cặp mồi	Trình tự chuỗi	Kích thước sản phẩm
1	H5-219f	GAG TGA AGC GTC TCA TTT TG	296
	H5-515r	GAT CTT CTT GGT TGG TAT TAT GTA GCT CC	
2	IVA-D150-H5f	GGA ATG CCC CAA ATA TGT GAA ATC	150
	IVA-D151-H5r	TCT ACC ATT CCC TGC CAT CC	
3	AI N1-f6	AGC AGG AGA TTA AAA TGA ATC CAA	586
	AI N1-595	CTG GAC CAG AAA TTC CGA TTG	
4	NP1200f	CAG RTA CTG GGC HAT AAG RAC	329
	NP 1529r	GCA TTG TCT CCG AAG AAA TAA G	
5	M52F	CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG	201
	M253R	AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA	
6	H5F 936	GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC	363
	H5R 1299	TAA ATT CTC TAT CCT CCT TTC CAA	

Bảng E5: Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml với lượng cụ thể cho mỗi phản ứng như trong bảng dưới đây tùy theo loại kit sử dụng

Kit RT-PCR 1 bước của hãng Qiagen		Kit RT-PCR của hãng Invitrogen	
H ₂ O	12 µl	H ₂ O	6 µl
5X Buffer	5 µl	2X Reaction mix	12,5 µl
dNTP	1 µl	RT/plat Taq mix	0,5 µl
Enzyme mix	1 µl	Mồi xuôi 20 µM	0,5 µl
Mồi xuôi 20 µM	0,5 µl	Mồi ngược 20 µM	0,5 µl
Mồi ngược 20 µM	0,5 µl	Mẫu ARN	5 µl
Mẫu ARN	5 µl	-	-
Tổng cộng	25 µl	Tổng cộng	25 µl

Bảng E6 – Chu trình nhân gen

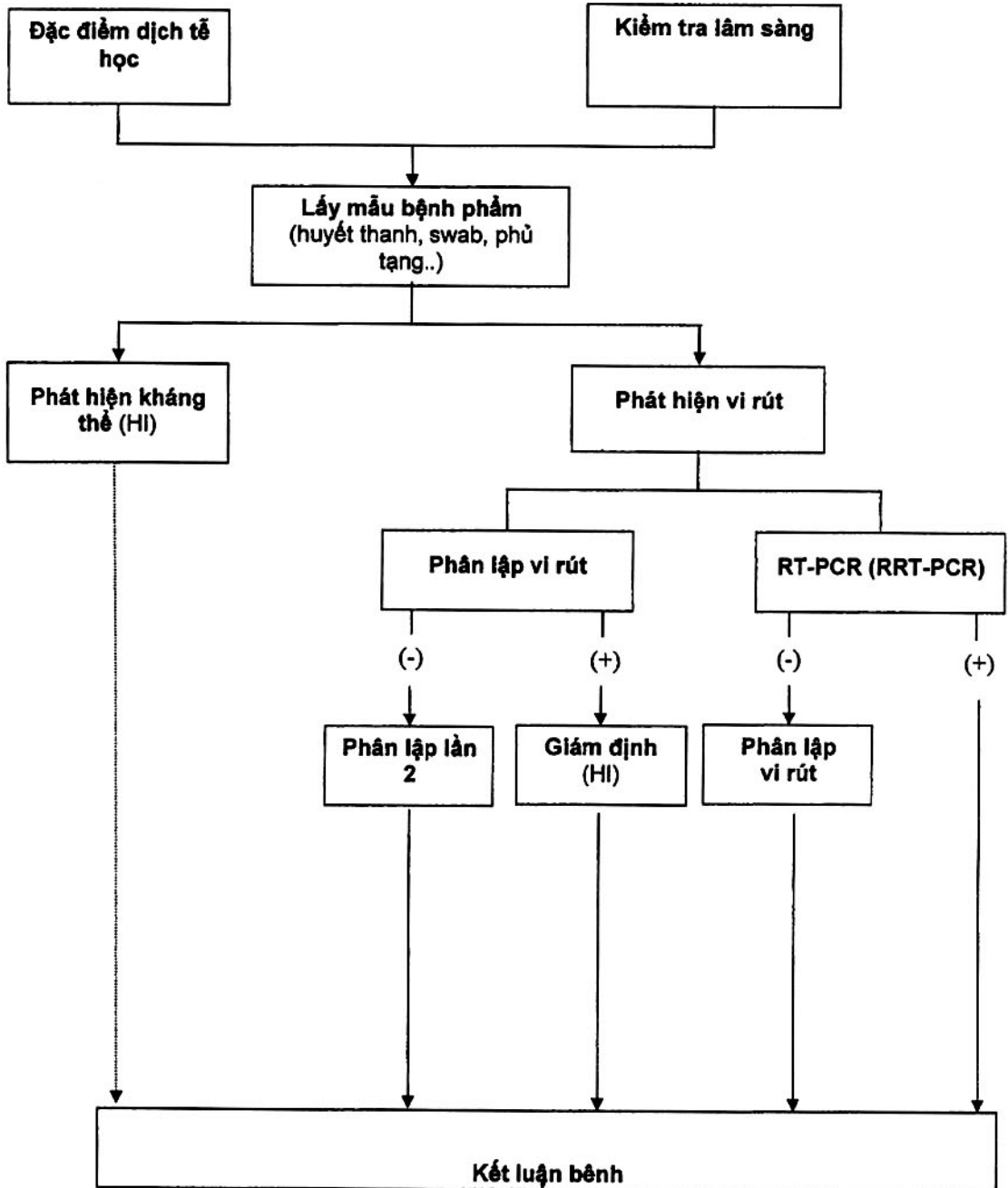
Số chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian
1 chu kỳ	60 °C	1 min
	42 °C	10 min
	50 °C	30 min
	95 °C	15 min
35 đến 40 chu kỳ	94 °C	30 s
	50 °C	30 s
	72 °C	1 min
1 chu kỳ	72 °C	10 min

Chu trình nhân gen này áp dụng cho cặp mồi H5 (F 936 và R 1299) và N1 (F 6 và R 595), đối với các cặp mồi khác quy trình có thể cần được điều chỉnh cho phù hợp.

Phụ lục F

(Qui định)

Sơ đồ chẩn đoán bệnh cúm gia cầm



Sơ đồ chẩn đoán bệnh cúm gia cầm

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] O.I.E. (2012). *Avian Influenza Disease. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012).*

[2] Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn (2006). 10 TCN - *Quy trình chẩn đoán bệnh cúm gia cầm.*
