

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-22 : 2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 22: BỆNH GIẢ DẠI Ở LỢN**

Animal disease – Diagnostic procedure

Part 22: Aujeszky's disease

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-22:2014 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 22: Bệnh giả dại ở lợn

Animal disease – Diagnostic procedure – Part 22: Aujeszky's disease

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 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 giả dại đối với lợn.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

2.1 Bệnh giả dại là một bệnh truyền nhiễm gia súc do vi rút Pseudorabies gây ra (phần lớn do *Suid herpesvirus 1*, họ *Herpesviridae*, phân họ *Alphaherpesviridae*, giống *Alphaherpesvirus*). Vi rút gây bệnh chủ yếu ở hệ thần kinh trung ương và đường hô hấp của lợn.

2.2 CPE (Cytopathic effect):	biến đổi bệnh lý tế bào
2.3 FCS (Fetal calf serum):	huyết thanh thai bê
2.4 PK15 (pig kidney 15):	tế bào thận lợn 15
2.5 OD (optical density):	mật độ quang
2.6 ADN (Acid deoxyribonucleic)	axit deoxyribonucleic
2.7 EMEM (Eagle's minimum essential medium):	môi trường tế bào Eagle
2.8 DMSO (dimethyl sulfoxide):	dung môi hữu cơ dimetyl sulfoxid
2.9 PBS (phosphate buffered saline):	dung dịch đệm phosphat

3 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 Môi trường nuôi cấy tế bào Minimum essential medium (MEM).

3.2 Môi trường nuôi dưỡng Eagle (EMEM)

3.3 Trypsin/ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 0,25 %

3.4 Huyết thanh thai bê (FCS) 5 % và FCS 10 %

3.5 Cặp mồi (xuôi và ngược), dùng để phát hiện vi rút PCV2.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy ly tâm, có thể tạo gia tốc ly tâm 900g, 1000g, 6800g và 14000g

4.2 Micropipet, có dung tích thích hợp.

4.3 Chai nuôi tế bào, 25 cm², 75 cm²

4.4 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C có chứa 5 % CO₂

4.5 Tủ lạnh đông, có thể duy trì nhiệt độ -20 °C, -70 °C và -90 °C.

4.6 Nồi hấp tiệt trùng, có thể duy trì ở 121 °C.

4.7 Máy đọc ELISA.

4.8 Máy Realtime RT-PCR.

4.9 Máy PCR.

4.10 Bộ điện di sản phẩm PCR.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tễ

Vì rút giả dại gây bệnh chủ yếu ở lợn sơ sinh với những biểu hiện rối loạn thần kinh, tỉ lệ chết gần 100%. Lợn ở lứa tuổi lớn hơn chủ yếu mắc bệnh với triệu chứng hô hấp và không chết kể cả khi nhiễm bệnh cấp tính, bệnh thường dẫn đến sảy thai đối với lợn nái. Lợn nhiễm bệnh không chết sẽ mang trùng cả đời.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Lợn nhiễm bệnh có những triệu chứng rối loạn hô hấp và thần kinh.

Lợn con chưa cai sữa có biểu hiện giảm cân, bỏ ăn, sốt (41 °C đến 42 °C), run rẩy, chảy nhiều nước dãi, giạt cầu mắt. Triệu chứng thần kinh xuất hiện sau 24 h và chết sau 24 h đến 36 h, tỉ lệ chết gần 100%.

Lợn sau cai sữa (từ 3 đến 4 tuần tuổi) có biểu hiện nhẹ hơn so với lợn con đang bú và ít bị mắc triệu chứng thần kinh, tỉ lệ chết giảm, tuy nhiên cũng có thể lên đến 50 % trong một số ổ dịch. Lợn lứa tuổi này có các triệu chứng hô hấp như: hắt hơi, chảy nước mũi, khó thở và ho nặng.

Lợn choai có biểu hiện sốt (từ 41 đến 42 °C) mệt mỏi, kém ăn, có triệu chứng hô hấp như hắt hơi, chảy nước mũi, ho nặng, thở khó, giảm cân. Bệnh kéo dài từ 6 ngày đến 10 ngày. Tỉ lệ mắc có thể đến 100 %, tỉ lệ chết từ 1 % đến 2 %.

Lợn trưởng thành chủ yếu có biểu hiện hô hấp như lợn choai, lợn nái có thể sảy thai. Tỉ lệ chết hiếm khi vượt quá 2%.

5.1.3 Bệnh tích

Bệnh tích của bệnh giả dại thường ít hoặc không phát hiện được, đôi khi có một số đặc điểm sau:

- Xung huyết màng não kèm theo tăng sinh dịch não tủy.
- Xung huyết niêm mạc vùng mũi và hầu họng.
- Viêm hoại tử ở hạch amidan, hầu họng, khí quản và thực quản.
- Có các điểm hoại tử ở gan, lách, hạch, thận.
- Xuất huyết điểm lấm tẩm ở cầu thận và vỏ não.

5.1.4 Bệnh tích vi thể

- Viêm não, màng não không mũ và viêm hạch thần kinh lan tràn.
- Xuất hiện bạch cầu thấm nhập quanh thành mạch, viêm tế bào đệm thần kinh lan tràn kèm theo hoại tử tế bào thần kinh và tế bào đệm thần kinh.
- Các thể vùi trong nhân ở tế bào kẽ của hạch amidan, lớp nội mô của phế nang, tế bào thần kinh và các tế bào đệm trong não.

5.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

5.2.1.1 Mẫu cho xét nghiệm vi rút

Đối với lợn bệnh còn sống: Lấy tăm bông để ngoáy dịch miệng hầu hoặc mũi hoặc amidan cho vào môi trường bảo quản có kháng sinh (xem A.1 phụ lục A).

Đối với lợn bệnh được mổ khám: Lấy 3 gam đến 5 gam não, amidan, phổi, lách, hạch.

5.2.1.2 Mẫu cho xét nghiệm kháng thể: sử dụng xy lanh 5 ml để lấy 2 ml máu của lợn bị mắc bệnh chưa tiêm vắc xin phòng bệnh Aujeszky. Sau khi lấy, rút cán xy lanh tới mức cao nhất để tạo nhiều khoảng trống bên trong, đặt xy lanh nằm nghiêng 5° ở nhiệt độ từ 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 trong 5.2.4.3

5.2.1.3 Bảo quản mẫu: trong quá trình vận chuyển phải bảo quản mẫu trong thùng bảo ôn (nhiệt độ từ 2 °C đến 4 °C) không quá 48 h. Ở phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, phải được giữ trong tủ lạnh đông -70 °C (xem 4.5) đối với mẫu xét nghiệm vi rút, - 20 °C đối với mẫu xét nghiệm kháng thể.

CHÚ THÍCH 1: Trong chăn nuôi, việc sử dụng vắc xin giả dại có thể làm ảnh hưởng đến kết quả của các phương pháp xét nghiệm. Do vậy, đối với lợn được tiêm vắc xin sống nhược độc, không lấy mẫu trong thời gian 4 tuần sau khi tiêm (thời gian vắc xin tồn tại trong cơ thể lợn) để xét nghiệm vi rút giả dại vì các phương pháp trong tiêu chuẩn này không phân biệt được vi rút vắc xin nhược độc và vi rút thực địa. Đối với lợn được tiêm vắc xin đánh dấu nhược độc (xoá gen gE), có thể lấy mẫu để xét nghiệm vi rút bằng phương pháp Nested PCR hoặc Realtime-RT PCR phát hiện gen gE mà không bị ảnh hưởng của vi rút vắc xin.

CHÚ THÍCH 2: Không lấy mẫu huyết thanh ở lợn đã được tiêm vắc xin giả dại để xét nghiệm kháng thể vì các phương pháp trong tiêu chuẩn này không phân biệt được kháng thể nhiễm tự nhiên và kháng thể do tiêm vắc xin. Đối với lợn được tiêm vắc xin đánh dấu nhược độc (xoá gen gE), có thể lấy mẫu để xét nghiệm kháng thể gE bằng phương pháp ELISA mà không bị ảnh hưởng bởi vi rút vắc xin.

5.2.2 Phản ứng Nested PCR (PCR lồng) xét nghiệm vi rút

5.2.2.1 Xử lý mẫu

Nghiền mẫu phủ tạng với dung dịch PBS (xem A.2 phụ lục A) có kháng sinh [hoặc môi trường nuôi cấy tế bào (xem 3.1) có kháng sinh (chất kháng sinh và kháng nấm)], ly tâm ở gia tốc 900 g (xem 4.1) trong 10 min, thu phần dịch nổi để xét nghiệm PCR. Đối với dịch ngoáy miệng hầu (mũi hoặc amidan) trong dung dịch bảo quản có kháng sinh, có thể sử dụng ngay để xét nghiệm.

5.2.2.2 Chiết tách ADN

Dùng kit chiết tách thương mại để chiết tách ADN của vi rút và theo hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục B).

5.2.2.3 Tiến hành phản ứng Nested PCR

Phương pháp Nested PCR bao gồm 2 lần thực hiện PCR thường với 2 cặp mồi khác nhau để phát hiện 1 đoạn gen đích. Trong đó sản phẩm PCR của lần thực hiện PCR thứ nhất dùng để làm khuôn mẫu cho lần thực hiện PCR thứ hai. Mục đích của sử dụng Nested PCR (2 lần thực hiện PCR) là để làm tăng độ đặc hiệu của phản ứng hơn so với PCR thường (1 lần thực hiện PCR).

Phản ứng Nested PCR xét nghiệm vi rút giả dại trong qui trình này sử dụng các cặp mồi (xem 3.5) để phát hiện các đoạn gen đích thuộc gen B hoặc gen E trong Bảng 1.

Bảng 1 – Trình tự các cặp mồi

Gen đích	Lần chạy PCR	Cặp mồi	Trình tự 5'-3'	Kích thước sản phẩm (bp)
gB	Lần 1	Mồi xuôi 1 gB	ATG GCC ATC TCG CGG TGC	334
		Mồi ngược 1 gB	ACT CGC GGT CCT CCA GCA	
	Lần 2	Mồi xuôi 2 gB	ACG GCA CGG GCG TGA TC	195
		Mồi ngược 2 gB	GGT TCA GGG TCA CCC GC	
gE	Lần 1	Mồi xuôi 1 gE	TCG TGA TGA CGT GCG TCG TCG	377
		Mồi ngược 1 gE	GGG TCC ATT CGT CAC TTC CGG	
	Lần 2	Mồi xuôi 2 gE	CCC ACG CAC GAG GAC TAC TAC	211
		Mồi ngược 2 gE	CGC GGA ACC AGT CGT CGA AGC	

Phương pháp Nested PCR sử dụng các cặp mồi phát hiện gen gE có thể phân biệt được vi rút thực địa và vi rút của vắc xin nhược độc được đánh dấu bằng xoá gen gE.

5.2.2.3.1 Hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng và cài đặt chu trình nhiệt trong máy PCR (xem 4.9) có thể được thực hiện theo hướng dẫn kèm theo bộ kit sử dụng (xem C.1 phụ lục C).

5.2.2.3.2 Điện di sản phẩm PCR

Pha 1,5 g bột agarose với 100 ml 1xTAE, 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 (10 mg/ml) vào. 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 vào bộ điện di (xem 4.10) đến vạch full level, đặt khay gel vào vị trí trong bể điện di. Pha 2 µl dung dịch đệm tải mẫu (loading dye) với 4 µl dung dịch thang chuẩn (100 bp ladder) rồi đưa vào giếng đầu tiên của miếng gel. Pha 2 µl dung dịch đệm tải mẫu với 8 µl mẫu (đối chứng âm và dương) rồi dùng micropipet (xem 4.2) đưa vào các giếng còn lại của miếng gel.

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

5.2.2.3.3 Đọc kết quả

Đặt gel đã điện di vào máy chiếu tử ngoại (UV transilluminator) có bước sóng 590 nm.

Nếu sử dụng các cặp mồi phát hiện gen B, mẫu dương tính có hiển thị vạch sản phẩm giống như đối chứng dương và có kích thước 334 bp (lần PCR 1) và 195 bp (lần PCR 2), với điều kiện đối chứng âm không có vạch sản phẩm xuất hiện.

Tương tự, nếu sử dụng các cặp mồi phát hiện gen E, mẫu dương tính có hiển thị vạch sản phẩm giống như đối chứng dương và có trọng lượng 377 bp (lần PCR 1) và 211 bp (lần PCR 2).

Mẫu âm tính giống đối chứng âm và không có vạch sản phẩm xuất hiện.

Mẫu nghi ngờ hiển thị vạch sản phẩm không rõ nét hoặc hiển thị nhiều hơn 1 vạch sản phẩm. Trường hợp này cần xét nghiệm lại hoặc sử dụng các phương pháp khác để khẳng định.

5.2.3 Phản ứng Realtime RT-PCR xét nghiệm vi rút

5.2.3.1 Xử lý mẫu (xem 5.2.2.1)

5.2.3.2 Chiết tách ADN (xem 5.2.2.2)

5.2.3.3 Tiến hành phản ứng Realtime RT-PCR

Phản ứng này không cần bước điện di để đọc kết quả nhưng cần sử dụng thêm mẫu dò (probe) có đánh dấu huỳnh quang và thực hiện trên máy Realtime RT-PCR.

Phản ứng Realtime RT-PCR xét nghiệm vi rút giả đại trong qui trình này sử dụng các cặp mồi và mẫu dò để phát hiện các đoạn gen đích thuộc gen gB hoặc gen gE. Trình tự các cặp mồi và mẫu dò được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Cặp mồi và mẫu dò

Gen đích	Cặp mồi	Trình tự 5'-3'
gB	Mồi xuôi	ACGGCACGGGCGTGATC
	Mồi ngược	ACTCGCGGTCCTCCAG CA
	Mẫu dò (TaqMan Probe)	TET-CTCGCGCGACCTCATCGAGCCCTGCAC-TAMARA
gE	Mồi xuôi	TCGTGATGACGTGCGTCGTCG
	Mồi ngược	CGCGGAACCAGTCGTCGAAGC
	Mẫu dò (TaqMan Probe)	FAM-CTACGAGGGGCCGTACGCGAGCCTGGA-TAMARA

Phản ứng Realtime RT-PCR sử dụng cặp mồi và mẫu dò để phát hiện gen gE có thể phân biệt được vi rút thực địa và vi rút của vắc xin nhược độc được đánh dấu bằng xoá gen gE.

5.2.3.3.1 Hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt

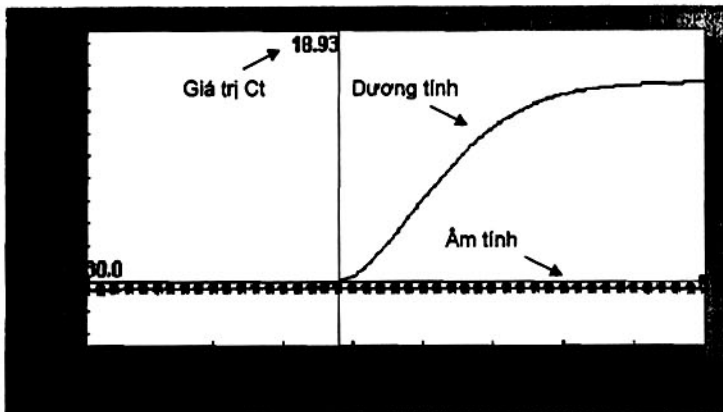
Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng và cài đặt chu trình nhiệt PCR trong máy realtime RT-PCR (xem 4.8) có thể được thực hiện theo hướng dẫn kèm theo bộ kit được sử dụng (xem C2 phụ lục C).

5.2.3.3.2 Đọc kết quả

Mẫu dương tính khi kết quả xét nghiệm PCR có giá trị Ct ≤ 35 và đường khuếch đại có dạng cong chuẩn (xem Hình 1).

Mẫu âm tính không có giá trị Ct hoặc có giá trị Ct > 40 và đường khuếch đại nằm dưới đường nền (xem Hình 1).

Mẫu nghi ngờ khi có giá trị Ct nằm trong khoảng > 35 và ≤ 40 . Trường hợp này cần xét nghiệm lại hoặc sử dụng các phương pháp khác để hỗ trợ.



Hình 1 – Ví dụ về kết quả Realtime RT-PCR

5.2.4 Phương pháp phân lập vi rút

Phương pháp này dùng trong trường hợp mẫu xét nghiệm bằng phản ứng Nested PCR hoặc realtime RT-PCR cho kết quả nghi ngờ.

5.2.4.1 Xử lý mẫu (xem 5.2.2.1)

Các dịch bệnh phẩm thu được sau quá trình xử lý mẫu nên được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm trước khi tiến hành phân lập.

5.2.4.2 Tiến hành phân lập

Sử dụng 200 µl dịch ngoáy (gồm cả môi trường bảo quản) hoặc dịch nghiền phủ tạng (dịch nổi thu được sau ly tâm) cho nhiễm vào tế bào PK15 (xem phụ lục D). Theo dõi trong 7 ngày.

5.2.4.3 Đọc kết quả

Mẫu dương tính khi tế bào có xuất hiện biến đổi bệnh lý, thường xuất hiện trong vòng từ 24 h đến 72 h. Biến đổi bệnh lý tế bào (CPE) bao gồm: trên mặt tế bào đơn lớp hình thành các đám tế bào lưỡng chiết, sau đó bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy, sự hợp bào cũng xuất hiện với các kích thước khác nhau.

Trong trường hợp không xuất hiện CPE, thì tiến hành chuyển dịch nuôi tế bào (200 µl) sang môi trường nuôi cấy tế bào (xem 3.1) mới thêm một lần nữa và theo dõi trong 7 ngày.

Để khẳng định những biến đổi tế bào là do vi rút giả dại gây ra, lấy dịch nuôi tế bào xét nghiệm vi rút bằng phản ứng Nested PCR (xem 5.2.2) hoặc Realtime RT-PCR (xem 5.2.3).

5.2.4.4 Phát hiện kháng thể bằng phản ứng ELISA

Hiện nay các kit ELISA thương mại đã có sẵn trên thị trường dùng để phát hiện kháng thể gB và kháng thể gE trên lợn bị nhiễm vi rút bệnh giả dại (xem phụ lục E). Kit phát hiện kháng thể gE có thể phân biệt được kháng thể do nhiễm tự nhiên và kháng thể do tiêm vắc xin được đánh dấu bằng xoá gen gE.

6 Báo cáo kết quả

Lợn được kết luận là mắc bệnh giả dại khi có các đặc điểm dịch tễ và triệu chứng điển hình và có kết quả xét nghiệm vi rút hoặc kháng thể dương tính bằng một trong những phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

Phụ lục A

(Quy định)

Pha môi trường bảo quản mẫu và dung dịch PBS**A.1 Dung dịch bảo quản mẫu**

Trộn dung dịch PBS với glycerol theo tỉ lệ 1:1 và bổ sung kháng sinh theo tỉ lệ như sau:

Penicillin G	2.000.000U/lit
Streptomycin	200 mg/lit
Polymyxin B	2.000.000 U/lit
Gentamicin	250 mg/lit
Nystatin	500.000 U/lit
Ofloxacin HCl	60 mg/lit
Sulfmethoxasole	200 mg/lit

A.2 Pha dung dịch PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Khuấy đều cho đến khi các thành phần tan hoàn toàn trong nước rồi hấp tiệt trùng bằng nồi hấp (xem 4.6) trong 15 min.

Phụ lục B
(Tham khảo)

Quy trình chiết tách ADN của vi rút bệnh giả dại từ mẫu bệnh phẩm

Chiết tách ADN của vi rút theo hướng dẫn của bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Kit (Cat. No. 12280-050), như sau:

- Nhỏ 25 µl protease K vào ống 1,5 ml.
- Nhỏ 200 µl huyền dịch bệnh phẩm vào ống.
- Nhỏ 200 µl dung dịch Lysis Buffer vào ống.
- Lắc ống trong 15 s và ly tâm nhẹ. Ủ ở 56 °C trong 15 min rồi ly tâm nhẹ.
- Nhỏ 250 µl Ethanol có nồng độ 100 % vào ống, lắc đều trong 15 s rồi ly tâm nhẹ.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 min.
- Chuyển toàn bộ dịch trong ống (675 µl) vào cột lọc có ống thu.
- Ly tâm cột lọc và ống thu ở gia tốc 6800 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash Buffer, ly tâm ở gia tốc 6800 g (xem 4.1) trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash Buffer, ly tâm ở gia tốc 6800 g (xem 4.1) trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới, ly tâm ở gia tốc 14000 g (xem 4.1) trong 1 min.
- Chuyển cột lọc sang ống 1,5 ml sạch Dnase/Rnase.
- Nhỏ 50 µl nước sạch Dnase/Rnase vào cột lọc, ủ 1 min ở nhiệt độ phòng
- Ly tâm cột lọc và ống 1,5 ml ở gia tốc 14000 g (xem 4.1) trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Bỏ cột lọc, giữ lại ống 1,5 ml chứa 50 µl ADN. Bảo quản ADN ở 4 °C nếu thực hiện PCR ngay hoặc ở âm 20 °C nếu thực hiện PCR sau 24 h.

Phụ lục C
(Tham khảo)

Công thức chuẩn bị hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt PCR

C.1 Công thức chuẩn bị hỗn hợp phản ứng cho phản ứng PCR (lồng)

Theo hướng dẫn của bộ kit GoTaq Green Master Mix (Promega – Part. 9PIM712, Cat. M7122)

TT	Thành phần hỗn hợp phản ứng	Số lượng (tổng lượng 25 µl)	Chu trình nhiệt
1	GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)	12,5 µl	1 vòng : 94 °C, 5 min 40 vòng: [94 °C, 20 s (biến tính ADN) 55 °C, 30 s (gắn mồi) 72 °C, 60 s (tổng hợp mạch ADN)] 1 vòng: 72 °C, 7 min (tổng hợp mạch ADN lần cuối)
2	Mồi xuôi ^a (forward primer), 10 µM	0,5 µl	
3	Mồi ngược ^a (reverse primer), 10 µM	0,5 µl	
1	Mẫu ADN	2,5 µl	
2	Nước sạch Rnase	9 µl	
CHÚ THÍCH: Trình tự các đoạn mồi: xem Bảng 1.			

C.2 Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng cho phản ứng Realtime RT-PCR

Theo hướng dẫn của bộ kit Platinum Quantitative PCR Supermix-UDG (Invitrogen – Cat 11730-017)

Thành phần hỗn hợp phản ứng	Thể tích (tổng thể tích 50 µl)	Chu trình nhiệt
Nước sạch nuclease	12 µl	1 vòng : 50 °C, 120 s, 95 °C, 120 s 40 vòng : 95 °C, 10 s, 63 °C, 30 s
Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Cat no. 11730-025)	25 µl	
Mồi xuôi ^{a)} , 20 µM	1 µl	
Mồi ngược ^{a)} , 20 µM	1 µl	
Mẫu dò (TaqMan probe), 6 µM	1 µl	
Mẫu ADN, từ 100 pg đến 1 µg	10 µl	
CHÚ THÍCH: Trình tự các đoạn mồi và mẫu dò theo quy định tại Bảng 2.		

Phụ lục D**(Tham khảo)****Chuẩn bị tế bào PK15 để phân lập vi rút****D.1 Khôi phục tế bào**

- Lấy ống tế bào được bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng ra và rã đông nhanh chóng bằng cách đặt vào nước ấm 35 °C đến 39 °C trong 1 min.
- Chuẩn bị chai nuôi cấy với 10 ml môi trường nuôi dưỡng (EMEM + FCS 10 % (xem 3.4) + kháng sinh 100 IU/ml penicillin và 100 µg/ml hoặc 50 µg/ml gentamycin).
- Khi tế bào đã rã đông; nhanh chóng dùng pipet hút dung dịch tế bào sang ống ly tâm 15 ml và cho tiếp vào 10 ml môi trường nuôi dưỡng, trộn đều bằng pipet hút nhẹ nhàng để tránh bọt.
- Ly tâm ở 1000 g (xem 4.1) trong 5 min.
- Hút bỏ phần dịch nổi. Giữ lại phần tế bào lắng cặn ở dưới. Cho tiếp 2 ml môi trường nuôi dưỡng tế bào EMEM + FCS 10 % (xem 3.4). Trộn đều bằng cách dùng pipet hút nhẹ.
- Chuyển toàn bộ dung dịch tế bào này vào chai nuôi tế bào (25 cm²) (xem 4.3) đã có 15 ml môi trường nuôi dưỡng FCS 10 % (xem 3.4). Ủ chai nuôi cấy ở tủ ấm 37 °C có 5 % CO₂ (xem 4.4).
- Qua 1 ngày, loại bỏ môi trường nuôi dưỡng cũ để loại bỏ DMSO, rửa lớp tế bào bằng dung dịch PBS rồi cho môi trường nuôi dưỡng mới có FCS 10 % (xem 3.4). Ủ chai nuôi tế bào ở tủ ấm 37 °C có CO₂ 5 % (xem 4.4) để tế bào phát triển.

D.2 Chuyển đời tế bào

- Hút bỏ môi trường nuôi dưỡng (xem 3.2) cũ trong chai 25 cm², cho 10 ml dung dịch PBS vào để rửa sạch lớp tế bào sau đó hút bỏ dung dịch rửa này đi.
- Cho 2 ml đến 3 ml dung dịch Trypsin/ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 0,25 % (xem 3.3) vào và ủ ở 37 °C từ 5 min đến 10 min để cho tế bào bong ra khỏi bề mặt chai nuôi cấy. Có thể vỗ nhẹ vào thành chai nuôi cấy để tế bào bong ra.
- Cho thêm 5 ml môi trường nuôi dưỡng EMEM + FCS 5 % (xem 3.4) (huyết thanh trong môi trường tăng trưởng sẽ vô hoạt trypsin), rồi hút toàn bộ dung dịch này sang ống ly tâm 50 ml. Ly tâm bằng máy (xem 4.1) ở 1000 g trong 5 min.
- Hút bỏ phần dịch nổi. Giữ lại phần tế bào lắng cặn ở dưới. Cho tiếp 10 ml môi trường nuôi dưỡng tế bào EMEM + FCS 5 % (xem 3.4). Trộn đều bằng cách dùng pipet hút nhẹ nhiều lần.

- Chia đều dung dịch tế bào này sang các chai nuôi cấy có chứa môi trường nuôi dưỡng mới với lượng 5×10^4 tế bào/ml. Ủ đĩa ở tủ ấm 37°C có 5 % CO_2 (xem 4.4) từ 5 ngày đến 7 ngày. Theo dõi tế bào phát triển hàng ngày và loại bỏ ngay những chai tế bào bị nhiễm khuẩn.
- Chuyển đời tế bào theo tỷ lệ 1:5. Lượng tế bào từ 01 chai 25 cm^2 (xem 4.3) đạt 100 % diện tích nuôi cấy có thể chuyển đời sang 5 chai 25 cm^2 (xem 4.3) khác.
- Nếu tế bào phát triển kém, hút bỏ môi trường nuôi dưỡng cũ, rửa thăm tế bào bằng dung dịch đệm PBS rồi đưa môi trường nuôi dưỡng mới vào.
- Tế bào phát triển tốt sau khi được chuyển đời và đạt khoảng 90 % diện tích nuôi cấy thì đem sử dụng để lấy nhiễm vi rút (phân lập vi rút).

D.3 Đông lạnh tế bào

- Đối với tế bào được nuôi trong chai 25 cm^2 , hút bỏ môi trường cũ, cho 10 ml dung dịch PBS vào để rửa lớp tế bào, sau đó hút bỏ dung dịch rửa này đi.
- Cho 2 ml đến 3 ml dung dịch Trypsin/ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 0,25 % (xem 3.3) vào và ủ ở 37°C từ 5 min đến 10 min để cho tế bào bong ra khỏi bề mặt chai nuôi cấy. Có thể vỗ nhẹ vào thành chai nuôi cấy để tế bào bong ra.
- Cho thêm 10 ml môi trường nuôi dưỡng EMEM + FCS 5 % (xem 3.4) (huyết thanh trong môi trường tăng trưởng sẽ vô hoạt trypsin), rồi hút toàn bộ dung dịch này sang ống ly tâm 50 ml.
- Ly tâm bằng máy (xem 4.1) ở 1000 g trong 5 min.
- Đổ bỏ phần dung dịch nổi, hoà phần tế bào lắng cặn trong 1 ml môi trường không có huyết thanh (Glasgow Eagle's) và dùng pipet hút nhả nhiều lần để trộn đều.
- Cho 3 ml chất bảo vệ đông lạnh (huyết thanh bò 90 % + DMSO 10 %) vào trộn đều, nhẹ bằng pipet để tránh bọt.
- Chuyển 4 ml dung dịch tế bào vào ống đông lạnh cryotube (4,5 ml). Bọc ống đông lạnh trong bông vô trùng hoặc giấy vệ sinh vô trùng để làm chậm quá trình đông lạnh. Đặt ống đông lạnh vào tủ lạnh đông (xem 4.5) -50°C đến -80°C qua đêm, sau đó chuyển vào giữ ở nitơ lỏng.

Phụ lục E
(Tham khảo)

Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể gB và kháng thể gE

E.1 Phương pháp phát hiện kháng thể gB (sử dụng kit PrioCheck PRV gB của hãng Prionics)

Bước 1: Nhỏ 100 µl huyết thanh tham chiếu 1 vào các giếng A1 và B1 trong đĩa ELISA (xem sơ đồ đĩa ELISA).

Sơ đồ vị trí mẫu trong đĩa ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC 1	M2	M4	M8	M12	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40
B	TC 1	M2	M4	M8	M12	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40
C	TC 2	M3	M5	M9	M13	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M41
D	TC 2	M3	M5	M9	M13	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M41
E	TC 3	M4	M6	M10	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M42
F	TC 3	M4	M6	M10	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M42
G	M1	M5	M7	M11	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M43
H	M1	M5	M7	M11	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M43

CHÚ THÍCH: TC: mẫu tham chiếu; M: mẫu

Bước 2: Nhỏ 100 µl huyết thanh tham chiếu 2 vào các giếng C1 và D1.

Bước 3: Nhỏ 100 µl huyết thanh tham chiếu 3 vào các giếng E1 và F1.

Bước 4: Nhỏ 100 µl mẫu huyết thanh kiểm tra vào các giếng còn lại (mỗi mẫu làm hai giếng). Đậy nắp đĩa và lắc đĩa nhẹ trong 15 s.

Bước 5: Ủ đĩa trong hộp giữ ẩm, ở nhiệt độ 37 °C trong 60 min.

Bước 6: Sau khi ủ, đổ hết dung dịch trong đĩa ra và rửa đĩa 6 lần bằng dung dịch rửa, từ 200 µl đến 300 µl dung dịch rửa cho mỗi giếng. Sau lần rửa cuối cùng, đập nhẹ đĩa vài lần xuống mặt bàn có lót khăn bông để làm sạch các dung dịch bên trong đĩa.

Bước 7: Nhỏ 100 µl conjugate vào các giếng. Đậy nắp đĩa.

Bước 8: Ủ đĩa trong hộp giữ ẩm, ở nhiệt độ 37 °C trong 60 min.

Bước 9: Rửa đĩa như trên.

Bước 10: Nhỏ 100 µl cơ chất Chromogen (TMB) vào tất cả các giếng.

Bước 11: Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng (22 °C ± 3 °C) trong thời gian 20 min.

Bước 12: Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng và lắc đĩa nhẹ.

Bước 13: Đo giá trị OD của các giếng ở bước sóng 450 nm trong 15 min sau khi dừng phản ứng và đọc kết quả.

Điều kiện để phản ứng ELISA được công nhận là:

Giá trị OD_{450 max} phải ít nhất bằng 1,00

PI của mẫu tham chiếu 1 phải lớn hơn 50 %

PI của mẫu tham chiếu 2 phải nhỏ hơn 50 %

Tính phần trăm ức chế PI, theo công thức sau:

$$PI = \left[\frac{OD_{450 \text{ sample}}}{OD_{450 \text{ max}}} \right] \times 100$$

CHÚ THÍCH:

OD_{450 sample} là giá trị OD đo được ở mỗi giếng mẫu hoặc giá trị OD trung bình của mẫu tham chiếu 1 (giếng A1 và B1) hoặc tham chiếu 2 (giếng C1 và D1).

OD_{450 max} là giá trị OD trung bình của mẫu tham chiếu 3 (giếng E1 và F1);

Đánh giá kết quả:

Mẫu dương tính kháng thể gB của vi rút bệnh giả dại nếu có PI bằng hoặc lớn hơn 50 %.

Mẫu âm tính kháng thể gB của vi rút bệnh giả dại nếu có PI nhỏ hơn 50 %.

E.2 Phương pháp phát hiện kháng thể gE (sử dụng kit PrioCheck PRV gE 2.0 của hãng Prionics)

Bước 1: Nhỏ 50 µl dung dịch đệm ELISA vào tất cả các giếng cần dùng trong đĩa ELISA

Bước 2: Nhỏ 50 µl đối chứng dương vào 2 giếng A1 và B1 trong đĩa ELISA (xem sơ đồ đĩa ELISA)

Bước 3: Nhỏ 50 µl đối chứng âm vào 2 giếng C1 và D1

Bước 4: Nhỏ 50 µl đối chứng hợp lệ vào 2 giếng E1 và F1 (tùy chọn)

Bước 5: Nhỏ 50 µl mỗi mẫu huyết thanh vào một giếng (hoặc 2 giếng gần nhau trong đĩa). Đậy nắp đĩa và lắc đĩa nhẹ trong 15 s

Bước 6: Ủ đĩa trong hộp giữ ẩm (90 %) ở nhiệt độ 37 °C trong 60 min hoặc ủ qua đêm ở 5 °C

Bước 7: Sau khi ủ, đổ hết dung dịch trong đĩa ra và rửa đĩa 6 lần bằng dung dịch rửa, từ 200 µl đến 300 µl cho mỗi giếng. Sau lần rửa cuối cùng, đập nhẹ đĩa vài lần xuống mặt bàn có lót khăn bông để làm sạch các dung dịch bên trong đĩa.

Bước 8: Nhỏ 100 µl cộng hợp (conjugate) vào các giếng. Đậy nắp đĩa.

Bước 9: Ủ đĩa trong hộp giữ ẩm (90 %) ở nhiệt độ 37 °C trong 60 min.

Bước 10: Rửa đĩa như trên.

Bước 11: Nhỏ 100 µl cơ chất Chromogen (TMB) vào tất cả các giếng.

Bước 12: Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng (22 °C ± 3 °C) trong thời gian 20 min.

Bước 13: Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng.

Bước 14: Đo giá trị OD bằng máy Elisa (xem 4.7) trong vòng 15 min sau khi dừng phản ứng và đọc kết quả.

Điều kiện để phản ứng ELISA được công nhận là:

Giá trị OD_{450 max} lớn hơn 0,9

PI của đối chứng dương phải lớn hơn 65 %

PI của đối chứng hợp lệ phải nhỏ hơn 45 %.

Tính phần trăm ức chế, *PI*, theo công thức sau:

$$PI = \left[\frac{OD_{450 \text{ sample}}}{OD_{450 \text{ max}}} \right] \times 100$$

CHÚ THÍCH:

OD_{450 max} là giá trị OD trung bình đo được ở 2 giếng C1 và D1 đối chứng âm;

$OD_{450 \text{ sample}}$ là giá trị OD đo được ở mỗi giếng mẫu (tính trung bình nếu làm 2 giếng) hoặc giá trị OD trung bình của đối chứng dương (giếng A1 và B1) hoặc đối chứng hợp lệ (E1 và F1).

Đánh giá kết quả

Mẫu dương tính kháng thể gE của vi rút bệnh giả dại nếu có PI bằng hoặc lớn hơn 35 %.

Mẫu âm tính kháng thể gE của vi rút bệnh giả dại nếu có PI nhỏ hơn 35 %.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] O.I.E. (2008). *Aujeszky's Disease. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (P145-157)*.
- [2] Bộ Nông nghiệp và PTNT – Viện Thú y Quốc gia – Tổ chức hợp tác quốc tế Nhật Bản JICA (2002). *Bệnh Aujeszky's (Bệnh Giả dại)*. Trong *Cẩm nang chẩn đoán tiêu chuẩn về các bệnh gia súc ở Việt Nam (trang 94-95)*.
-