

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-1:2010

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 1: BỆNH LỞ MÒM LONG MÓNG**

*Animal disease – Diagnostic procedure –
Part 1: Foot and mouth disease*

HÀ NỘI – 2010

Lời nói đầu

TCVN 8400-1:2010 do 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.

TCVN 8400 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán* gồm có các phần sau:

- TCVN 8400-1:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 1: Bệnh lở mồm long móng;*
- TCVN 8400-2:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 2: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus suis gây ra trên lợn;*
- TCVN 8400-3:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 3: Bệnh giun xoắn;*
- TCVN 8400-4:2010 *Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 4: Bệnh Niu cát xon.*

Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán –

Phần 1: Bệnh lở mồm long móng

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 1: Foot and mouth 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 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 lở mồm long móng đối với động vật móng guốc chẵn.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh lở mồm long móng (foot and mouth disease)

Bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của động vật móng guốc chẵn như trâu, bò, lợn, dê, cừu và một số động vật hoang dã khác như hươu, nai. Bệnh do aphthovirus thuộc họ Picornaviridae gây nên. Có 7 typ huyết thanh (serotyp) gồm: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 và Asia 1. Mỗi serotyp lại có nhiều subtyp căn cứ vào sự khác biệt về gen và cấu trúc kháng nguyên. Virus gây bệnh có triệu chứng lâm sàng giống nhau nhưng các serotyp khác nhau không gây miễn dịch chéo cho nhau.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

TCVN 8400-1:2010

- Carbonat/Bicarbonat ($\text{CaCO}_3/\text{NaHCO}_3$), dạng viên
- Thuốc thử, Tween 20
- Axit clohydric (HCl)
- Glyxerin [$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$]
- Dung dịch TE
- Dung dịch TAE 1X.
- Agarosa
- Etdi bromua (EtBr)
- Bộ kit ELISA phát hiện kháng nguyên lở mồm long móng (Pirbright-UK)
- Bộ kit LPB-ELISA phát hiện kháng thể lở mồm long móng (Pirbright-UK)
- Bộ kit FMD-3ABC ELISA phát hiện kháng thể lở mồm long móng do mắc bệnh tự nhiên
- Bộ kit chiết tách ARN
- Bộ kit nhân gen RT-PCR
- Môi trường tế bào MEM (*Modified Eagles medium*)
- Tế bào dòng BHK-21 (*Baby Hamster kidney*) hoặc tế bào thận cừu sơ cấp

4 Thiết bị, dụng cụ

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

- Tủ lạnh
- Tủ ấm 37 °C
- Máy lắc đĩa (*orbital shaker*)
- Máy lắc trộn (*vortex mixer*)
- Nồi đun cách thủy (*water bath*)
- Máy đọc ELISA với kính lọc 492 nm

- Máy rửa đĩa ELISA.
- Buồng cấy ATSH cấp II (*BSC II-Bio-safety cabinet*)
- Máy ly tâm
- Máy PCR
- Máy Realtime PCR
- Bình nón, dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml.
- Ống đong thủy tinh, dung tích 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml.
- Cốc có mỏ các cỡ: 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1000 ml
- Ống nghiệm
- Lọ nhỏ
- Máng trộn chất phản ứng (*reagent trough*)
- Pipet thủy tinh, dung tích 1 ml, 5 ml và 10 ml.
- Micropipet đơn kênh, dung tích từ 0,5 μ l đến 10 μ l, từ 5 μ l đến 40 μ l, từ 40 μ l đến 200 μ l, từ 200 μ l đến 1000 μ l.
- Micropipet đa kênh, dung tích từ 8 μ l đến 12 μ l, từ 5 μ l đến 50 μ l, từ 50 μ l đến 300 μ l.
- Đầu tip phù hợp với micropipet
- Bộ cối chà sỏi
- Cát sạch để nghiên cứu bệnh phẩm
- Khăn bông
- Dao, kéo, phanh kẹp.

5 Lấy mẫu

Bệnh phẩm để phát hiện virus hoặc kháng nguyên là tổ chức biểu mô của mụn nước chưa vỡ hoặc mới vỡ và dịch mụn nước. Mẫu bệnh phẩm biểu mô tối thiểu là 2 g. Bệnh phẩm sau khi lấy được bảo quản trong dung dịch đệm PBS 0,04 M có Glyxerin, pH từ 7.2 đến 7.6 ở nhiệt độ -20°C . Mẫu biểu mô

TCVN 8400-1:2010

và mụn nước để phát hiện kháng nguyên thì trong vòng 7 ngày kể từ khi phát hiện bệnh còn sau 7 ngày nên lấy mẫu huyết thanh để phát hiện kháng thể, máu được lấy vô trùng, lượng tối thiểu là 3 ml, để đông, chất lấy huyết thanh. Bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Nên lấy ít nhất là 5 mẫu.

Mẫu sau khi lấy được giữ trong điều kiện lạnh, bao gói cẩn thận để không làm lây lan bệnh rồi chuyển tới phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt để có kết quả xét nghiệm chính xác.

6 Cách tiến hành

6.1 Chẩn đoán lâm sàng

6.1.1 Dịch tễ học

Bệnh lở mồm long móng gây thành dịch ở nhiều loài động vật móng góc chẵn, chủ yếu ở trâu bò và lợn. Sự nhiễm khuẩn qua nhiều con đường nhưng chủ yếu là qua không khí.

Bệnh do nhiều typ và tiểu typ của Aphthovirus gây ra. Các typ huyết thanh có sự phân bố khác nhau trên thế giới. Typ huyết thanh O, A được nhận biết ở nhiều vùng khác nhau trên thế giới. Trái lại các typ huyết thanh SAT1, SAT2, SAT3 được giới hạn ở một số nước thuộc châu Phi. Typ huyết thanh Asia 1 được tìm thấy ở nhiều nước thuộc châu Á.

Trong các ổ dịch, động vật có thể mắc bệnh do một hoặc cùng một lúc nhiều typ. Bệnh có tính chất lây lan nhanh, mạnh, rộng đối với động vật mẫn cảm.

Bệnh có thể lây trực tiếp từ động vật mắc bệnh đến động vật mẫn cảm, hay lây gián tiếp qua sản phẩm động vật (thịt, sữa, tinh dịch, da..), dụng cụ chăn nuôi, vận chuyển gia súc...

6.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Ở trâu bò và lợn hoặc các loài vật khác đều có chung đặc điểm là sốt đột ngột trong khoảng từ 2 ngày đến 3 ngày, viêm mụn nước rồi lở loét ở miệng, vú, vùng móng chân, nước bọt chảy nhiều như bọt bia. Niêm mạc miệng, môi, lợi, chân răng đỏ ửng, khô, nóng. Mụn nước bắt đầu mọc ở bên trong má, mép, chân răng, môi, lợi, và bề mặt lưỡi. Kích thước mụn bằng hạt gạo, hạt ngô hoặc to hơn. Mụn nước phồng lên, có màng bọc mỏng, bên trong chứa nước trong, sau đục dần. Sau 1 ngày đến 2 ngày, mụn nước bị vỡ, lớp niêm mạc tróc ra để lộ mặt dưới đỏ, chạm nhẹ vào dễ chảy máu. Mụn nước thường không có mủ. Nước bọt sùi ra đầy mồm miệng, chảy lòng thòng thành sợi dài.

Do có viêm mụn nước ở vùng vành móng, kẽ móng chân làm con vật khó chịu, tỏ ra đau đớn, bồn chồn, luôn nhấc chân lên. Dễ thấy nhất là hiện tượng què trong khoảng 1 tuần đến 2 tuần. Có trường hợp móng chân bị long hẳn ra, phổ biến nhất là ở lợn.

Ở con vật cái đang nuôi con, triệu chứng ở bầu vú, núm vú cũng tương tự như ở miệng và chân làm con vật giảm tiết sữa, sữa bị giảm phẩm chất. Con mẹ thường không cho con bú vì đau, làm con non thiếu sữa. Hơn nữa chính con non cũng bị viêm lở mồm như mẹ nên không bú được. Hậu quả có tới 50 % đến 80 % gia súc non bị chết. Con vật mang thai dễ bị sảy thai.

Biến chứng: Viêm cơ tim ở súc vật non và viêm ruột (bê non, lợn dưới 2 tháng).

6.1.3 Giải phẫu bệnh học

Mổ khám bệnh tích chủ yếu là từ miệng tới thực quản, dạ dày, ruột đều có mụn loét với từng mảng xuất huyết hoặc tụ máu. Bộ máy hô hấp cũng bị viêm. Có mụn nước ở mồm (niêm mạc môi, lợi, lưỡi và vòm miệng), mũi, kẽ móng, viền móng và núm vú. Mụn nước vỡ có thể thành vết loét, chảy máu.

Lưỡi trâu, bò thường bị bong tróc biểu mô 2/3 phía trước, móng bị tụ, mặt ngoài tim có những vết hoại tử màu trắng xen kẽ trông giống như da hổ nên gọi là "tim vằn hổ".

6.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

6.2.1 Phát hiện kháng nguyên

6.2.1.1 Xử lý bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là biểu mô của mụn nước được nghiền trong cối chày sứ với dung dịch PBS 0,04 M tỷ lệ 1:10. Ly tâm huyền dịch bệnh phẩm 2000 r/min trong 10 min. Hút lấy dịch nước trong ở phía trên rồi cho dung dịch kháng khuẩn vào (0,01 ml/ 1ml huyền dịch, xem Phụ lục A) lắc đều trong 15 min đến 20 min rồi tiến hành làm phản ứng ELISA, RT-PCR (rRT-PCR) hoặc phân lập trên tế bào.

6.2.1.2 Phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên

6.2.1.2.1 Nguyên tắc

Phản ứng Sandwich ELISA gián tiếp có thể phát hiện nhiều typ kháng nguyên (O, A, C và Asia 1). Phản ứng được thực hiện trên đĩa đáy bằng, 96 lỗ (*Nunc, Maxisorp*).

6.2.1.2.2 Các bước tiến hành (xem Phụ lục B)

6.2.1.3 Phương pháp RT-PCR và rRT-PCR

6.2.1.3.1 Nguyên tắc

Phản ứng chuỗi polyme phiên mã ngược dùng để phát hiện ARN của virus lở mồm long móng. Hiện nay phản ứng RT-PCR có thể phát hiện và định typ của virus lở mồm long móng, còn phản ứng rRT-PCR chỉ cho phép phát hiện virus lở mồm long móng.

TCVN 8400-1:2010

6.2.1.3.2 Các bước tiến hành (Xem Phụ lục C)

- Chiết tách ARN bằng kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Chạy RT-PCR hoặc Realtime RT-PCR

6.2.1.4 Phân lập virus trên môi trường tế bào

Dùng tế bào dòng BHK-21 hoặc tế bào thận cừu sơ cấp.

Nhiễm huyền dịch bệnh phẩm 1 ml/ chai tế bào (T25).

Ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 60 min, sau đó cho dung dịch MEM (*Eagle's*) không có huyết thanh nuôi tiếp.

Hàng ngày kiểm tra bệnh tích tế bào-cytopathogen effect (CPE): Nếu tới 48 h có CPE xuất hiện thì thu hỗn dịch tế bào, ly tâm 2000 g/min trong 15 min. Lấy dịch nổi giám định virus. Nếu sau 48 h không có CPE thì thu hỗn dịch tế bào và cấy chuyển tiếp, sau 3 lần không có CPE thì mẫu được coi là âm tính (không có virus lở mồm long móng).

Giám định virus phân lập:

Sử dụng phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên.

Sử dụng phương pháp RT-PCR phát hiện ARN virus.

6.2.2 Phát hiện kháng thể

Phát hiện kháng thể lở mồm long móng dùng để chẩn đoán trong trường hợp gia súc mắc bệnh có triệu chứng của bệnh lở mồm long móng, chưa bao giờ tiêm phòng vắc xin lở mồm long móng.

6.2.2.1 Phương pháp ELISA FMD-3ABC, dùng để phát hiện kháng thể lở mồm long móng ở gia súc do nhiễm tự nhiên.

6.2.2.1.1 Nguyên tắc

Gia súc nhiễm bệnh lở mồm long móng sẽ sản sinh kháng thể kháng protein không cấu trúc (3ABC), trong khi gia súc khỏe mạnh, chưa bao giờ nhiễm bệnh được tiêm phòng vắc xin lở mồm long móng tinh khiết không có kháng thể này.

6.2.2.1.2 Các bước tiến hành: Theo quy trình của nhà sản xuất.

6.2.2.2 Phương pháp Liquid phase blocking ELISA:

6.2.2.2.1 Nguyên tắc

Sử dụng bộ kit ELISA phát hiện kháng thể lở mồm long móng ở gia súc. Dùng để định typ virus nếu gia súc chưa bao giờ tiêm phòng mà có kháng thể lở mồm long móng tự nhiên dương tính và có thể dùng để đánh giá hiệu giá kháng thể sau khi tiêm phòng vắc xin lở mồm long móng. Dựa trên nguyên tắc phản ứng Sandwich ELISA gián tiếp phát hiện và định typ huyết thanh của kháng thể lở mồm long móng. Phản ứng thực hiện trên đĩa đáy bằng, 96 lỗ (*Nunc, Maxisorp*).

6.2.2.2.2 Các bước tiến hành (xem Phụ lục D)

6.2.3 Chẩn đoán phân biệt với một số bệnh

- Bệnh viêm miệng có mụn nước (vesicular stomatitis)
- Bệnh mụn nước ở lợn (swine vesicular disease)
- Bệnh ngoại ban mụn nước (vesicular exanthema)

7 Kết luận

Gia súc được xác định mắc bệnh lở mồm long móng khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng của bệnh lở mồm long móng và kết quả dương tính với một trong những phương pháp xét nghiệm sau:

- Phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên dương tính.
- Phản ứng RT-PCR phát hiện virus dương tính.
- Phản ứng ELISA phát hiện kháng thể dương tính ở gia súc chưa tiêm phòng.
- Phương pháp ELISA FMD-3ABC phát hiện kháng thể kháng virus lở mồm long móng do nhiễm tự nhiên dương tính.
- Phân lập được virus trên môi trường tế bào, và giám định virus lở mồm long móng dương tính.

Phụ lục A

(Quy định)

Các công thức pha chế dung dịch**A.1 Dung dịch bảo quản**

– PBS 0,04 M:

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	3,05 g
KH ₂ PO ₄	0,39 g
Nước cất	500 ml
Đồ phenol 1%	1 ml

– Kháng sinh:

Penicilline	1000 UI/ml
Mycostatine	100 UI/ml
Neomycine	100 UI/ml
Polymicine	50 UI/ml

Sau khi pha kiểm tra pH từ 7,2 đến 7,6 chỉnh pH với NaOH 1 N hoặc HCl 1 N

Chú ý: Khi dùng pha dung dịch bảo quản với glycerin tỷ lệ 1:1

A.2 Dung dịch đệm

Dung dịch đệm carbonat/bicarbonat dung dịch đệm 0,05 M, pH 9,6

NaHCO ₃	2,93 g/l
Na ₂ CO ₃	1,59 g/l

A.3 Dung dịch PBS 0,002 M, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	4,84 g/l
KH ₂ PO ₄	0,80 g/l
NaCl	32,00 g/l
KCl	0,80 g/l

A.4 Dung dịch đệm A: PBS 0,01 M + 0,05 % Tween 20, pH từ 7,2 đến 7,6

Na ₂ HPO ₄	1,21 g/l
KH ₂ PO ₄	0,20 g/l
NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l

A.5 Dung dịch đệm B: PBS 0,01 M + 0,05 % Tween 20 + 5 % sữa bột tách bơ, pH từ 7,2 đến 7,6

Na ₂ HPO ₄	1,21 g/l
KH ₂ PO ₄	0,20 g/l
NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l

A.6 Dung dịch kháng khuẩn

Hòa tan kháng sinh bằng nước cất rồi lọc màng lọc cỡ lỗ 0,45 μm, bảo quản ở ngăn đá tủ lạnh.

Penicilline	1.000.000 UI
Mycostatine	250.000 UI
Streptomycine	200 mg
Kanamicine	1.000.000 UI
Nước cất vô trùng	10 ml

A.7 Chuẩn bị môi

– Môi đông khô phải được ly tâm ngắn để chắc chắn rằng môi được lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng đệm TE để hoàn nguyên môi ở nồng độ 200 pmol/μl làm gốc.

– Môi sử dụng ở nồng độ 20 pmol/μl: pha loãng môi gốc bằng nước không có nuclease.

Môi gốc	10 μl
Nước không chứa RNase	90 μl
Tổng lượng	100 μl

Phụ lục B

(Quy định)

Quy trình ELISA phát hiện kháng nguyên

B.1 Cách tiến hành

– Gắn đĩa (coating): Kháng huyết thanh thô kháng virus lở mồm long móng của các typ O, A, C và Asia 1 pha loãng 1:1000 với dung dịch coating dung dịch đệm (Phụ lục A), nhỏ 50 µl vào các giếng tương ứng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/1 h hoặc ủ qua đêm ở 4 °C.

– Rửa đĩa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002M.

– Nhỏ 50 µl kháng nguyên đối chứng dương tính mạnh (1:10) và yếu (1:100) pha loãng bằng dung dịch đệm A (Phụ lục A) và mẫu bệnh phẩm vào các giếng quy định (Phụ lục B), ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/1 h.

– Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002M (Phụ lục A)

– Nhỏ kháng thể phát hiện: Mỗi giếng nhỏ 50 µl kháng huyết thanh chuột lang kháng virus lở mồm long móng vào các giếng tương ứng, mỗi serotyp được pha loãng (1:100) với dung dịch đệm B (xem Phụ lục A). Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/1 h.

– Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (Phụ lục A)

– Nhỏ chất gắn kết (1:200 pha với dung dịch đệm B): 50 µl/giếng.

Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/40 min.

– Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (Phụ lục A)

– Nhỏ cơ chất chromogen (dung dịch chromogen + 5 % cơ chất): 50 µl/giếng, để 20 min ở nhiệt độ phòng, chỗ tối.

– Dừng phản ứng: nhỏ dung dịch H₂SO₄ 1,25 M với 50 µl/giếng.

B.2 Đọc kết quả

Đọc bằng máy đọc ELISA có kính lọc 492 nm. Nếu giá trị OD > 0,1 sau khi đã trừ đi giá trị trung bình của cột trắng thì phản ứng được coi là dương tính với serotyp đó.

Nếu OD = 0,1 thì cấy chuyển mẫu bệnh phẩm lên môi trường tế bào rồi kiểm tra lại.

Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên

	(+) Mạnh		(+) Yếu		Trắng		Mẫu 1		Mẫu 3		Mẫu 5	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O												
A												
C												
Asia 1												
O												
A												
C												
Asia 1												

Mẫu 2
Mẫu 4
Mẫu 6

Phụ lục C

(Quy định)

Quy trình kỹ thuật RT- PCR phát hiện ARN virus lở mồm long móng**C.1 Chiết tách ARN**

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

C.2 Tiến hành phản ứng RT-PCR**C.2.1 Công thức**

Áp dụng cho kit RT-PCR 1 bước của hãng Qiagen (nếu dùng kit khác có thể phải thay đổi công thức pha chế)

Nguyên liệu	Thể tích (μl)
H ₂ O	12,0
5X Dung dịch đệm	5,0
dNTP	1,0
Hỗn hợp enzym	1,0
Mồi xuôi	0,5
Mồi ngược	0,5
Mẫu ARN	5,0
Tổng cộng	25,0

FMDV- Uni	Mồi	Chiều	Chuỗi (5' – 3')	Kích thước (bp)
	1R	Ngược	CCA GTC CCC TTC TCA GAT C	
	1F	Xuôi	GCC TGG TCT TTC CAG GTC	

C.2.2 Chu trình nhân gen

Bước	Chu kỳ	Thời gian	Nhiệt độ
Bước 1	1 chu kỳ	45 min	37 °C
Bước 2	1 chu kỳ	10 min	94 °C
Bước 3	1 chu kỳ	5 min	94 °C
	30 chu kỳ	1 min	94 °C
		1 min	55 °C
		1 min	72 °C
Bước 4	1 chu kỳ	8 min	72 °C
Bước 5	1 chu kỳ	∞	4 °C

C.2.3 Chạy điện di

- Chuẩn bị thạch Agarosa 2 % pha trong dung dịch TAE 1X hoặc TBE 1X có Etidi bromua (10 µg/µl).
- Đổ thạch vào khuôn điện di (có lược).
- Thạch khô, rút lược ra và cho mẫu vào các giếng (8 µl sản phẩm PCR + 2 µl dung dịch loading dung dịch đệm).
- Sử dụng Marker trọng lượng phân tử (thang 100 bp).
- Chú ý khi chạy PCR phải có mẫu đối chứng dương và đối chứng âm đi kèm (mẫu đối chứng âm có thể là nước cất sạch).

C.2.4 Đọc kết quả

- Mẫu dương tính: Xuất hiện vạch và có kích thước bằng kích thước giếng mẫu đối chứng dương
- Mẫu âm tính: Không có vạch.

C.2.5 Đánh giá kết quả

Có virus Lở mồm long móng ở trong mẫu bệnh phẩm nếu kết quả PCR dương tính.

C.3 Phương pháp Realtime RT-PCR: sử dụng môi và probe**C.3.1 Công thức**

Áp dụng cho kit RT-PCR 1 bước của hãng Qiagen (nếu dùng kit khác có thể phải thay đổi công thức pha chế).

Nguyên liệu	Thể tích (μl)
H ₂ O	10,5
Dung dịch đệm 5X	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,2
dNTP	0,8
Hỗn hợp enzym	1,0
Mồi xuôi (20 μM)	0,5
Mồi ngược (20 μM)	0,5
Probe (6 μM)	0,5
Mẫu ARN	5,0
Tổng cộng	25,0

Mồi và probe	Chuỗi (5' – 3')-FAM
Mồi xuôi	AGATGCAGGARGACATGTCAA
Mồi ngược	TTGTACCAGGGYTTGGCYT
Probe	AAACACGGACCCGACTTTAACCG

C.3.2 Chu trình nhân gen

Bước	Chu kỳ	Thời gian	Nhiệt độ
Bước phiên mã ngược	1 chu kỳ	15 min	50 °C
		2 min	95 °C
Bước biến tính	40 chu kỳ	10 s	95 °C
Bắt cặp		50 s	60 °C

C.3.3 Đọc kết quả

- Mẫu dương tính: Khi $35 \geq C_t \geq 20$.
- Mẫu âm tính: Khi không có C_t .
- Mẫu nghi ngờ: Khi $40 \geq C_t \geq 35$.

C.3.4 Đánh giá kết quả

Có virus lở mồm long móng ở trong mẫu bệnh phẩm nếu kết quả đồ thị Realtime RT-PCR dương tính. Với những mẫu nghi ngờ cần làm lại.

C.4 Định typ virus lở mồm long móng: sử dụng mỗi typ O, A, Asia1 của Pirbright

C.4.1 Công thức

Áp dụng cho kit RT-PCR 1 bước của hãng Qiagen (nếu dùng kit khác có thể phải thay đổi công thức pha chế)

Nguyên liệu	Thể tích (μ l)
H ₂ O	12,0
5X Dung dịch đệm	5,0
dNTP	1,0
Hỗn hợp enzym	1,0
Mồi xuôi	0,5
Mồi ngược	0,5
Mẫu ARN	5,0
Tổng cộng	25,0

C.4.2 Chu trình nhân gen

Bước	Chu kỳ	Thời gian	Nhiệt độ
Bước 1	1 chu kỳ	45 min	37 °C
Bước 2	1 chu kỳ	10 min	94 °C
Bước 3	1 chu kỳ	5 min	94 °C
	20 chu kỳ	1 min	94 °C
		1 min	58 °C
		2 min	72 °C
Bước 4	1 chu kỳ	8 min	72 °C
Bước 5	1 chu kỳ	∞	4 °C

Quy trình nhân gen này áp dụng cho mỗi typ O, A, Asia1 của Pirbright, đối với các cặp mồi khác quy trình có thể thay đổi cho phù hợp.

Typ Virus	Cặp mồi	Chiều	Chuỗi (5' – 3')	Kích thước (bp)
FMDV O	P33	Ngược	AGC TTG TAC CAG GGT TTG GC	402
	P38	Xuôi	GCT GCC TAC CTC CTT CAA	
FMDV A	P33	Ngược	AGC TTG TAC CAG GGT TTG GC	732
	P87	Xuôi	GTC ATT GAC CTC ATG CAG ACC CAC	
FMDV C	P33	Ngược	AGC TTG TAC CAG GGT TTG GC	596
	P40	Xuôi	GTT TCT GCA CTT GAC AAC ACA	
FMDV Asia 1	P33	Ngược	AGC TTG TAC CAG GGT TTG GC	292
	P74	Xuôi	GAC ACC ACT CAG GAC CGC CG	

C.4.3 Chạy điện di

- Chuẩn bị thạch Agarosa 2 % pha trong dung dịch TAE 1X hoặc TBE 1X có Etidi bromua (10 ug/ul).
- Đổ thạch vào khuôn điện di (có lược).
- Thạch khô, rút lược ra và cho mẫu vào các giếng (8ul sản phẩm PCR + 2ul dung dịch loading dung dịch đệm).
- Sử dụng Marker trọng lượng phân tử (thang 100 bp).
- Chú ý khi chạy PCR phải có mẫu đối chứng dương và đối chứng âm đi kèm (mẫu đối chứng âm có thể là nước cất sạch).

C.4.4 Đọc kết quả

- Mẫu dương tính: Xuất hiện vạch và có kích thước bằng kích thước giống mẫu đối chứng dương
- Mẫu âm tính: Không có vạch.

C.4.5 Đánh giá kết quả

Virus lở mồm long móng ở trong mẫu bệnh phẩm thuộc typ gì tùy thuộc kết quả chạy điện di dương tính ở loại mồi nào.

Phụ lục D

(Quy định)

Quy trình kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể của PIRBRIGHT**D.1 Cách tiến hành**

Gắn đĩa (coating): Kháng huyết thanh thô kháng virus lở mồm long móng đã pha loãng 1:1000 với coating dung dịch đệm, nhỏ 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/1 h hoặc ủ qua đêm ở 4 °C.

Chuẩn bị hỗn hợp kháng nguyên-huyết thanh (*liquid phase blocking*), nhỏ vào đĩa nhựa polypropylen 96 giếng đáy chữ U (Phụ lục A):

- Huyết thanh đối chứng và kiểm tra được pha loãng 1:16 với dung dịch đệm A, 50 µl/giếng.
- Kháng nguyên pha loãng theo tỷ lệ cho trước, 50 µl/giếng.

Hỗn hợp được ủ qua đêm ở 4 °C.

Rửa đĩa ELISA 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (Phụ lục A)

Chuyển 50 µl hỗn hợp kháng nguyên-huyết thanh từ đĩa chữ U sang đĩa ELISA theo vị trí tương ứng (Phụ lục D). Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37°C/1 h.

Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002M (Phụ lục A)

Nhỏ kháng thể phát hiện: Kháng huyết thanh chuột lang kháng virus lở mồm long móng pha loãng 1:100 với dung dịch đệm B, 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/1 h.

Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (Phụ lục A)

Nhỏ chất gắn kết: pha loãng 1:200 với dung dịch đệm B, 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C/40 min.

Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (Phụ lục A)

Nhỏ cơ chất chromogen (dung dịch chromogen + 5 % cơ chất): 50 µl/giếng, để 20 min ở nhiệt độ phòng, chỗ tối.

Dừng phản ứng: nhỏ 50 µl/giếng bằng dung dịch H₂SO₄ 1,25 M.

TCVN 8400-1:2010

D.2 Đọc kết quả

Sử dụng máy đọc ELISA, kính lọc 492 nm. Sử dụng phần mềm EDI để tính PI (phần trăm ức chế). Nếu $PI \geq 50$ thì mẫu được coi là dương tính, trong huyết thanh có kháng thể lở mồm long móng.

Sơ đồ đĩa ELISA phát hiện kháng thể được trình bày ở Phụ lục D.

CHÚ Ý: Xác định hiệu giá kháng thể, mẫu huyết thanh được pha như sau:

- Huyết thanh kiểm tra: Pha loãng theo tỷ lệ 1:8.
- Nhỏ dung dịch dung dịch đệm A: 50 μ l/giếng vào các lỗ của đĩa chữ U bắt đầu từ cột 3 cho đến cột thứ 12 của tất cả các hàng.
- Nhỏ huyết thanh kiểm tra đã pha loãng 1:8 vào các lỗ tương ứng 50 μ l/giếng và pha loãng theo cơ số 2 từ hàng A đến hàng D và từ hàng E đến hàng H.
- Huyết thanh đối chứng: Chuẩn bị giống phát hiện kháng thể
- Nhỏ kháng nguyên đã pha loãng theo tỷ lệ cho trước 50 μ l/giếng.
- Hỗn hợp kháng nguyên-huyết thanh được ủ qua đêm ở 4 °C.
- Các bước sau tiến hành theo trình tự giống phản ứng ELISA phát hiện kháng thể.

Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA

Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng thể

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁺⁺		1		9		17		25		33	
B			2		10		18		26		34	
C	C ⁺		3		11		19		27		35	
D			4		12		20		28		36	
E	C ⁻		5		13		21		29		37	
F			6		14		22		30		38	
G	Ca		7		15		23		31		39	
H			8		16		24		32		40	

Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA định lượng kháng thể

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁺⁺		1		3		5		7		9	
B			1		3		5		7		9	
C	C ⁺		1		3		5		7		9	
D			1		3		5		7		9	
E	C ⁻		2		4		6		8		10	
F			2		4		6		8		10	
G	Ca		2		4		6		8		10	
H			2		4		6		8		10	

CHÚ THÍCH C⁺⁺: huyết thanh ĐC dương tính mạnh

C⁺: huyết thanh ĐC dương tính yếu

C⁻: huyết thanh ĐC âm tính

Ca: đối chứng kháng nguyên

Công thức tính PI: $PI = 100 - \left(\frac{OD_{huyetthanh}}{OD_{trungbinhCa}} * 100 \right)$

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn - Cục Thú y, 2006. Tiêu chuẩn, quy trình ngành thú y, *Quy trình chẩn đoán bệnh Dịch tả lợn /10 TCN 717-2006*, trang 270-282
 - [2] O.I.E., 2009. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, *Foot and Mouth Disease*, chapter 2.1.5
 - [3] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn – Viện Thú y, 2002. Cẩm nang chẩn đoán tiêu chuẩn về các bệnh gia súc ở Việt Nam, in lần thứ nhất, *bệnh Lở mồm Long móng* , trang 32-33.
-