

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-39:2016

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 39: BỆNH VIÊM ĐƯỜNG HÔ HẤP MÃN TÍNH Ở GÀ**

*Animal diseases - Diagnostic procedure -
Part 39: Chronic respiratory disease in chicken and turkey*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 8400-39:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tài liệu của Tổ chức Thú y thế giới (OIE 2008) *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 2.3.5 Avian mycoplasmosis*;

TCVN 8400-39 : 2016 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 các phần sau:

- 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 8400-39 : 2016

- 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 máu lợn;*
- 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 biên 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;*
- TCVN 8400-39 : 2016, *phần 39: Quy trình chẩn đoán bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà.*

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán -

Phần 39: Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà

Animal disease - Diagnostic procedure -

Part 39: Chronic respiratory disease in chicken and turkey

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 cho người xét nghiệm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Khi áp dụng tiêu chuẩn người sử dụng tiêu chuẩn phải tự thiết lập các thao tác phù hợp để đảm bảo an toàn sức khỏe và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà và gà tây do vi khuẩn *Mycoplasma gallisepticum* gây ra.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà (*Chronic Respiratory Disease in chicken and turkey*)

- Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà (hay còn gọi là bệnh CRD – Chronic Respiratory Disease) là bệnh phổ biến, do vi khuẩn *Mycoplasma gallisepticum* gây ra. Biểu hiện đặc trưng của bệnh là gà thờ khò khè, sưng mắt, viêm kết mạc mắt, chảy nước mũi.
- Vi khuẩn *M. gallisepticum*, là vi khuẩn Gram âm nhưng bắt màu thuốc nhuộm Gram âm rất kém, bắt màu thuốc nhuộm Giemsa tốt. Vi khuẩn *M. gallisepticum* có dạng hình cầu, kích thước khoảng 0,25 µm đến 0,5 µm.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

3.1 Môi trường nước Frey (Phụ lục A)

3.2 Môi trường thạch Frey (Phụ lục A), là môi trường nước Frey có bổ sung 1 % thạch.

3.3 Huyết thanh bổ sung, bổ sung 5 % huyết thanh thai bê hoặc huyết thanh ngựa hoặc huyết thanh lợn vô trùng đã được bất hoạt ở 56 °C trong 30 min.

3.4 Nguyên liệu cho PCR (Phụ lục B)

3.5 Bông cotton, bông cotton đã được tẩm cồn 70 %

3.6 Tăm bông vô trùng, có cán mảnh, đàn hồi, dài khoảng 20 cm, một đầu quấn bông thật chắc, to hơn hạt gạo đã được vô trùng.

3.7 Xi-lanh

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 Tủ ẩm, có bổ sung từ 5 % – 10 % CO₂ và duy trì nhiệt độ 37 °C.

4.2 Kính hiển vi: có vật kính với độ phóng đại 10 lần, 40 lần, 100 lần.

4.3 Nồi hấp, duy trì nhiệt độ 121 °C.

4.4 Máy lắc

4.5 Máy li tâm, li tâm với gia tốc 12 000 g.

4.6 Máy PCR (máy nhân gen)

4.7 Bộ điện di

4.8 Panh, kéo, vô trùng.

4.9 Màng lọc, có kích thước lỗ lọc 0,45 µm.

4.10 Pipet các loại 100 µl, 200 µl, 1000 µl

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà là bệnh truyền nhiễm ở gà và gà tây, do vi khuẩn *M. gallisepticum* gây ra.
- Gà mọi lứa tuổi đều có thể mắc bệnh, tuy nhiên gà từ 3 tuần tuổi đến 6 tuần tuổi và gà mái hậu bị mắc cảm với bệnh hơn so với các lứa tuổi khác.
- Bệnh xuất hiện quanh năm nhưng hay gặp nhất là lúc giao mùa, thời tiết thay đổi, như ở miền Bắc là chuyển từ mùa xuân sang mùa hè và mùa thu sang mùa đông; ở miền Nam là từ mùa mưa sang mùa khô và ngược lại.
- Bệnh lây nhiễm trực tiếp từ gà mẹ sang gà con qua trứng, từ gà bệnh sang gà khỏe hoặc gián tiếp qua thức ăn, nước uống, các dụng cụ chăn nuôi, người chăn nuôi.
- Tỷ lệ mắc bệnh cao (có thể lên tới 80 – 100 %) nhưng tỷ lệ chết của bệnh thấp (5 – 7 %).

5.2 Triệu chứng lâm sàng

Thời gian ủ bệnh có thể từ vài ngày đến vài tháng. Trong trường hợp bệnh truyền từ gà mẹ qua trứng sang gà con thì thời gian ủ bệnh dài hơn.

Triệu chứng bệnh ở gà con và gà hậu bị:

- Giai đoạn đầu của bệnh, gà hắt hơi, viêm kết mạc, chảy nước mắt, nước mũi, có thể viêm và sưng mí mắt.
- Gà xù lông, bỏ ăn, thở khó.
- Gà thở khò khè, có tiếng ran khí quản, dễ phát hiện vào buổi đêm.
- Bệnh tiến triển trong thời gian dài, gà gầy, yếu và chết.

Triệu chứng ở gà đẻ trứng và gà sinh sản:

- Sản lượng trứng giảm
- Gà thở khó, tiếng thở khò khè.
- Gà ho, vảy mủ, chảy nước mắt, nước mũi.
- Bệnh tiến triển, lúc đầu nước mắt, nước mũi loãng, sau đó đặc dần và đọng ở xoang mắt làm mặt gà sưng lên.
- Gà gầy nhanh và chết.

5.3 Bệnh tích

- Có dịch viêm ở mũi, khí quản, phế quản và túi khí.
- Thành túi khí dày lên và có màu trắng đục bã đậu.
- Viêm màng phổi, bề mặt có thể phủ lớp fibrin, rải rác có vùng hoại tử. Trong phổi có các vùng cứng, có thể có u hạt.
- Khớp sừng, phù nề, có dịch viêm.
- Ở gà đê, ống dẫn trứng bị viêm, sưng.

5.4 Chẩn đoán phân biệt

Chẩn đoán phân biệt bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà với một số bệnh khác ở gà theo Bảng 1.

Bảng 1 - Chẩn đoán phân biệt bệnh viêm đường hô hấp mãn tính với một số bệnh khác ở gà

Bệnh	Biểu hiện
Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm – Bệnh IB (Infectious Bronchitis)	Bệnh xảy ra ở gà mọi lứa tuổi nhưng chủ yếu là gà con. Tỷ lệ ốm của bệnh cao nhưng tỷ lệ chết thấp. Gà con nằm tùm lại. Gà khó thở, phải vươn cổ lên, há mỏ để thở. Bệnh tích đặc trưng: Khí quản xuất huyết. Túi khí dày đục, có bã đậu màu vàng. Buồng trứng dị dạng; Trứng đẻ ra bạc màu, không có vỏ với. Thận sưng. Ống dẫn niệu bị giãn, chứa đầy urat.
Bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm – Bệnh ILT (Infectious Laryngo)	Bệnh xảy ra ở gà mọi lứa tuổi. Tỷ lệ ốm của bệnh cao nhưng tỷ lệ chết không cao. Thể cấp tính: gà chảy dịch mũi, ho ra máu, khó thở, phải vươn cổ lên, há

Tracheitis)	mỏ dễ thờ; Thể nhẹ: gà viêm kết mạc, chảy dịch mắt mũi, giảm đẻ. Bệnh tích đặc trưng: Thanh quản, khí quản xuất huyết, tích dịch. Trong lòng khí quản có màng giả, lẩn máu bịt kín lòng khí quản. - Phế quản, phổi, túi khí không có bệnh tích.
Bệnh phù đầu – Bệnh IC (Infectious Coryza)	Bệnh xảy ra ở gà mọi lứa tuổi, chủ yếu ở gà trưởng thành và gà đẻ. Tỷ lệ ốm của bệnh cao nhưng tỷ lệ chết thấp. Gà chảy dịch mũi, viêm kết mạc mắt, phù mắt, tích sưng to đặc trưng. Bệnh tích đặc trưng: Mắt, tích bị phù dưới da. Màng nhày xoang mũi, kết mạc mắt bị viêm cata, túi khí viêm.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Lấy mẫu

- Nếu gà còn sống: lấy mẫu là dịch ngoáy ở hốc mắt, hốc mũi, hầu họng, khí quản.

Sát trùng bên ngoài vị trí lấy mẫu bằng bông cồn (3.5), dùng tăm bông vô trùng (3.6) ngoáy vào từng vị trí lấy mẫu rồi cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).

- Nếu gà đã chết: lấy mẫu là dịch ở hốc mắt, hốc mũi, hầu họng, khí quản, phổi, các túi khí, dịch ở khớp gối chân.

Bệnh phẩm là dịch ở hốc mắt, hốc mũi, hầu họng, khí quản, các túi khí, dịch ở khớp chân: sát trùng bên ngoài vị trí lấy mẫu bằng bông cồn (3.5), dùng tăm bông vô trùng (3.6) hoặc xi lanh vô trùng để hút dịch ở từng vị trí lấy mẫu rồi cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).

Bệnh phẩm là các túi khí: dùng kéo (4.8) mở xoang ngực, xoang bụng của gà, dùng panh (4.8) gạt phủ tạng để bộc lộ rõ túi khí, dùng tăm bông vô trùng (3.6) ngoáy vào túi khí rồi cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).

Bệnh phẩm là phổi: Lấy mẫu vô trùng từ 10 g đến 100 g, cho vào từng lọ hay túi vô trùng riêng biệt, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu

Mẫu bệnh phẩm nên được nuôi cấy trên môi trường càng nhanh càng tốt. Trong trường hợp phải vận chuyển đến phòng thí nghiệm thì mẫu bệnh phẩm phải được đựng trong các ống mẫu đã có môi trường thích hợp cho nuôi cấy vi khuẩn *M. gallisepticum* (môi trường Frey, xem 3.1), đậy kín, bảo quản trong điều kiện lạnh từ 2 °C đến 8 °C và gửi về phòng thí nghiệm trong vòng 24 h sau khi lấy mẫu. Gửi kèm theo bệnh phẩm giấy yêu cầu xét nghiệm có ghi rõ triệu chứng, bệnh tích và đặc điểm dịch tễ.

6.2 Xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* bằng phương pháp PCR từ bệnh phẩm

6.2.1 Xử lý mẫu

- Ống chứa mẫu bệnh phẩm được lắc bằng máy lắc (4.4) trong 15 s, sau đó ly tâm với gia tốc 6000 g trong 15 s.
- Dùng pipet hút dịch trong ống chuyển sang 2 ống 1,5 ml. Một ống dùng để xét nghiệm PCR, ống còn lại dùng làm mẫu lưu, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

6.2.2 Cách tiến hành

Huyền dịch bệnh phẩm sau khi xử lý (xem 5.2.2.1) được thực hiện chiết tách ADN bằng các kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản mẫu ADN ở 4 °C.

Sử dụng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt được nêu trong bảng 2 và bảng 4.

Bảng 2 – Cặp mồi xác định vi khuẩn *M. gallisepticum*

Gen đích	Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'	Kích thước sản phẩm (bp)
16S rRNA	MG-14F	GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C	185
	MG-13R	GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC	

- Tiến hành phản ứng PCR theo quy định tại Phụ lục B.

6.3 Phân lập và xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* bằng phương pháp PCR

6.3.1 Xử lý mẫu

- Với mẫu là tấm bông có dịch ngoáy (ở hốc mắt, hốc mũi, hầu họng, khí quản, túi khí) đã được lấy vô trùng: cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).
- Với mẫu là dịch khớp gối được hút bằng xi lanh vô trùng: cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).
- Với mẫu là phổi: sát trùng bề mặt ngoài của phổi bằng bông cồn (3.5), rồi dùng kéo (4.8) cắt sâu vào tổ chức phổi bên trong lấy một mẫu nhỏ cho vào môi trường nuôi cấy (3.1).

6.3.2 Phân lập vi khuẩn

Bệnh phẩm được nuôi cấy vào môi trường nước Frey (3.1), thạch Frey (3.2), nuôi ở tủ ấm (4.1). Kiểm tra kết quả nuôi cấy hàng ngày, trong khoảng từ 7 ngày đến 10 ngày.

Môi trường nước Frey: môi trường nuôi cấy chuyển màu (từ màu đỏ sang màu cam hoặc màu vàng). Khi môi trường nuôi cấy chuyển màu, lấy canh khuẩn này cấy chuyển sang môi trường thạch Frey.

Trong trường hợp môi trường Frey đã nuôi cấy từ 7 ngày đến 10 ngày không chuyển màu, lấy canh khuẩn cấy chuyển sang môi trường thạch Frey (3.2).

Môi trường thạch Frey: khuẩn lạc của vi khuẩn *M.gallisepticum* nhỏ (đường kính khoảng từ 0,2 mm đến 0,3 mm), tròn, rìa gọn, tạo thành khối mờ, ở giữa hơi lồi.

Chọn khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường thạch Frey và nuôi ở tủ ấm (4.1) để xác định PCR.

6.3.3 Xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* bằng phương pháp PCR

Vi khuẩn *M. gallisepticum* nghi ngờ đã được nuôi cấy thuần trên môi trường thạch Frey được tách chiết ADN bằng kit thương mại hoặc bằng phương pháp sốc nhiệt (Xem B.2 phụ lục B).

Sử dụng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt được nêu trong bảng 2 và bảng 4.

Tiến hành phản ứng PCR theo quy định tại Phụ lục B

6.4 Chẩn đoán huyết thanh học

Chẩn đoán huyết thanh học (tham khảo Phụ lục C) ứng dụng để chẩn đoán sự nhiễm bệnh trên toàn đàn.

Các phản ứng huyết thanh học thường dùng để phát hiện kháng thể là phản ứng ngưng kết hoặc phản ứng miễn dịch gắn enzyme (phản ứng ELISA)

7 Kết luận

Gà được kết luận mắc bệnh viêm đường hô hấp mạn tính khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh và phân lập, xác định bằng phương pháp PCR dương tính với vi khuẩn *M. gallisepticum*.

Phụ lục A

(Quy định)

Môi trường nuôi cấy cho vi khuẩn *Mycoplasma gallisepticum*

A.1 Môi trường nước Frey

Pha chế môi trường nước Frey gồm 2 dung dịch thành phần:

Dung dịch A:

Môi trường PPLO (không có crystal violet)	14,7 g
Nước	700 ml

Hoà tan môi trường PPLO trong nước.

Vô trùng bằng nồi hấp (4.3) ở 121 °C trong 15 min.

Dung dịch B:

Huyết thanh lợn (hoặc huyết thanh ngựa)	150 ml
Cao nấm men 25 %	100 ml
Dung dịch đường glucose 10 %	10 ml
Thallos acetate	10 ml
Penicilin G 2000 UI	5 ml
Đỏ phenol 0,1 %	20 ml

Hòa các dung dịch trên với nhau.

Điều chỉnh pH dung dịch B = 7,8 – 8,0 (bằng dung dịch NaOH 0,1 M).

Vô trùng dung dịch B bằng màng lọc (4.9).

Môi trường nước Frey:

Dung dịch A đã vô trùng và để nguội khoảng 40 °C đến 50 °C sẽ được bổ sung với dung dịch B vô trùng.

Chia ra các ống nghiệm vô trùng, khoảng 5 ml đến 10 ml môi trường / ống.

Bảo quản môi trường ở 4 °C.

A.2 Môi trường thạch Frey

Pha chế môi trường thạch Frey, là môi trường nước Frey có bổ sung thạch (agar), gồm 2 dung dịch thành phần:

Dung dịch A:

Môi trường PPLO (không có crystal violet)	14,7 g
Thạch (agar)	10 g
Nước	700 ml

Hoà tan môi trường PPLO và thạch trong nước.

Vô trùng bằng nồi hấp (4.3) ở 121 °C trong 15 min.

Dung dịch B:

Huyết thanh lợn (hoặc huyết thanh ngựa)	150 ml
Cao nấm men 25 %	100 ml
Thallos acetate	10 ml
Penicilin G 2000 UI	5 ml
Đồ phenol 0,1 %	20 ml

Hòa các dung dịch trên với nhau.

Điều chỉnh pH dung dịch B = 7,8 – 8,0 (bằng dung dịch NaOH 0,1 M).

Vô trùng dung dịch B bằng màng lọc(4.9).

Môi trường thạch Frey:

Dung dịch A đã vô trùng và để nguội khoảng 40 °C đến 50 °C sẽ được bổ sung với dung dịch B vô trùng.

Chia ra đĩa lỏng vô trùng, khoảng 20 ml thạch / đĩa.

Bảo quản môi trường ở 4 °C.

Phụ lục B

(Quy định)

Xác định vi khuẩn *Mycoplasma gallisepticum* bằng phương pháp PCR

B.1 Nguyên liệu PCR

- B.1.1 Taq PCR Master Mix Kit
- B.1.2 Cặp mồi (primers): mồi xuôi (MG-14F) và mồi ngược (MG-14R) (Bảng 2)
- B.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease
- B.1.4 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE
- B.1.5 Ethidi bromua hoặc chất nhuộm màu SYBR green
- B.1.6 Loading dye
- B.1.7 ADN (Acid Deoxyribo Nucleic) chuẩn (Ladder, marker)
- B.1.8 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).

B.2 Chuẩn bị mẫu

Mẫu kiểm tra là huyền dịch bệnh phẩm đã được xử lý (xem 5.2.2.1); hoặc là vi khuẩn *M. gallisepticum* nghi ngờ đã được nuôi cấy thuần khiết trên thạch Frey (xem 5.2.3.1).

Mẫu đối chứng dương: chủng vi khuẩn đã được xác định là *M. gallisepticum* hoặc sử dụng các chủng *Mycoplasma gallisepticum* chuẩn.

Tách chiết ADN

Tách chiết ADN bằng các kit thương mại đối với mẫu kiểm tra là huyền dịch bệnh phẩm hoặc vi khuẩn thì các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với vi khuẩn còn có thể tách chiết ADN bằng phương pháp sốc nhiệt.

Tách chiết bằng phương pháp sốc nhiệt: Lấy từ 3 khuẩn lạc đến 4 khuẩn lạc, hòa vào 100 µl nước vô trùng không chứa nuclease (nuclease free water). Đun sôi cách thủy trong 10 min rồi làm lạnh nhanh huyền dịch trong đá 5 min. Ly tâm huyền dịch bằng máy ly tâm (4.5) với gia tốc 12 000 g trong 4 min. Thu hoạch phần trong phía trên để thực hiện phản ứng PCR.

B.3 Chuẩn bị môi

Môi được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị môi gốc: môi gốc ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.5) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (B.1.8) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 μM làm môi gốc;
- Chuẩn bị môi sử dụng ở nồng độ 20 μM : pha loãng môi gốc bằng nước (B.1.3).

VÍ DỤ: lấy 20 μl môi gốc có nồng độ 100 μl và thêm 80 μl nước sẽ được môi sử dụng có nồng độ 20 μM / μl .

B.4 Tiến hành

Sử dụng cặp môi đã được chuẩn bị (xem B.3). Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml.

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

VÍ DỤ: dùng kit nhân gen Taq PCR Mastermix kit Qiagen (Cat. No. 201223)¹⁾, thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng 3 và chu trình nhiệt trong bảng 4.

Bảng B.1 – Thành phần của phản ứng PCR xác định *M.gallisepticum*

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước không có nuclease	35,75
PCR Buffer	5,0
dNTP 10mM	1,0
Môi xuôi 20 μM	0,5
Môi ngược 20 μM	0,5
Taq 5U/ μl	0,25
MgCl ₂ 50 mM	2,0
Mẫu ADN	5,0
Tổng thể tích	50,0

Bảng B.2 – Chu trình nhiệt xác định vi khuẩn *M. gallisepticum*

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	2 min	1 vòng

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.

95 °C	10 s	35 vòng
55 °C	20 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1 vòng

Đối chứng dương: ADN tách chiết từ vi khuẩn *M. gallisepticum* (xem B.2).

Đối chứng âm: gồm đầy đủ thành phần của một phản ứng PCR, nhưng không có ADN của vi khuẩn.

CHÚ Ý: Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.6) với chu trình nhiệt nêu trong bảng 4.

B.5 Chạy điện di

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose 1,5 % đến 2 % trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE.

Cho 2 µl dung dịch loading dye vào 8 µl sản phẩm PCR, trộn đều cho vào từng giếng trên bản thạch. Cho 10 µl thang chuẩn (marker) vào một giếng.

Bản thạch được chạy điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại dung dịch đệm sử dụng khi pha thạch) ở bộ điện di (4.7), trong thời gian từ 30 min đến 40 min, ở 100 V.

Sau đó nhuộm bằng dung dịch ethidi bromua 0,2 mg / 100ml.

Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha chế thạch agarose (VÍ DỤ: như SYBR safe ADN gel stain của hãng Invitrogen) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

B.6 Đọc kết quả

Phản ứng dương tính khi:

- Mẫu đối chứng dương có một vạch duy nhất đúng kích cỡ của sản phẩm.
- Mẫu đối chứng âm: không xuất hiện vạch.
- Mẫu kiểm tra có vạch giống mẫu đối chứng dương.

Phản ứng âm tính khi:

- Mẫu đối chứng dương có một vạch duy nhất đúng kích cỡ của sản phẩm.

- Mẫu đối chứng âm: không xuất hiện vạch.
- Mẫu kiểm tra không có vạch giống mẫu đối chứng dương.

Phụ lục C
(Tham khảo)

Chẩn đoán huyết thanh học phát hiện kháng thể *M. gallisepticum*

C.1 Phản ứng ngưng kết trên phiến kính

C.1.1 Chuẩn bị

- Huyết thanh: huyết thanh kiểm tra (có thể là máu toàn huyết), huyết thanh đối chứng (âm và dương chuẩn);
- Kháng nguyên chuẩn. Phản ứng ngưng kết thường sử dụng kháng nguyên thương phẩm. Tiến hành phản ứng và đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất;
- Dụng cụ khác: phiến kính sạch, que khuấy, đồng hồ tính giờ, đầu pip, cốc xả pip,...

C.1.2 Tiến hành

- Nhỏ 1 giọt (khoảng 30 µl) huyết thanh (hoặc máu toàn phần) lên phiến kính;
- Nhỏ 1 giọt (khoảng 30 µl) kháng nguyên thương phẩm lên phiến kính, bên cạnh giọt huyết thanh;
- Dùng que khuấy để trộn giọt huyết thanh và giọt kháng nguyên. Khuấy thành vòng rộng khoảng 1 cm; và lắc đều khoảng 2 phút và đọc kết quả;

CHÚ Ý:

- Tiến hành xét nghiệm mẫu phải làm cùng huyết thanh âm và huyết thanh dương chuẩn.
- Mẫu huyết thanh làm phản ứng ngưng kết nhanh nên được làm ngay sau khi lấy mẫu. Nếu chưa làm được ngay thì bảo quản ở 4 °C và không được để đông đá.

C.1.3 Đọc kết quả

Đọc kết quả sau 2 phút sau lắc:

Dương tính: xuất hiện hạt ngưng kết, lấm tấm (giống đối chứng dương)

Âm tính: không xuất hiện hạt ngưng kết (giống đối chứng âm)

C.2 Phản ứng miễn dịch gắn enzyme (ELISA)

C.2.1 Chuẩn bị mẫu

- Lấy mẫu: Sử dụng xi-lanh (3.7) và kim tiêm vô trùng, lấy từ 1,5 ml đến 2 ml máu tĩnh mạch cánh hoặc máu tim của gà nghi mắc bệnh nhưng chưa tiêm phòng vắc xin. Sau khi lấy, rút pit-tong lùi ra để tạo khoảng trống (hoặc bơm máu vào ống nghiệm vô trùng), ghi ký hiệu mẫu trên xi-lanh hoặc ống nghiệm

rồi đặt nằm nghiêng 45° trong hộp đựng mẫu, để đông máu trong 1 h đến 2 h ở nhiệt độ bình thường, tránh ánh nắng trực tiếp.

- Bảo quản mẫu: Tất cả các mẫu bệnh phẩm đều được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 48 h. Trong trường hợp chưa xét nghiệm ngay, mẫu huyết thanh phải được ly tâm, chất lấy phần huyết thanh sang ống khác, bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C.

- Chất huyết thanh từ xi-lanh sang ống nghiệm vô trùng, kể từ lúc lấy máu đến lúc chất huyết thanh không quá 24 h, ghi ký hiệu của mẫu lên ống chứa huyết thanh.

C.2.2 Cách tiến hành

VÍ DỤ: dùng bộ kit phát hiện kháng thể *Mycoplasma gallisepticum* Antibody Test Kit của hãng IDEXX²⁾

C.2.2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

- Các nguyên liệu của bộ kit được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C, trước khi tiến hành phản ứng phải được đem ra để cân bằng với nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 26 °C);
- Mẫu huyết thanh (6.3.3): được pha loãng thành 1/500 với dung dịch pha loãng mẫu (Lấy 1 µl huyết thanh pha với 500 µl dung dịch pha loãng mẫu);
- Pha loãng dung dịch rửa đậm đặc 10 lần (Wash Concentrate 10 X): lấy 1 phần nước rửa đậm đặc pha với 9 phần nước cất;
- Tính thể tích dung dịch nước rửa cần pha: 300 µl/giếng x 3 lần rửa x 2 bước rửa x số giếng sử dụng;
- Sơ đồ bố trí mẫu: trong sơ đồ bố trí mẫu phải có mẫu trắng (Blank), kiểm chứng âm (Negative Control – NC), kiểm chứng dương (Positive Control – PC).

C.2.2.2 Tiến hành phản ứng

Bước 1: Nhỏ huyết thanh

- Nhỏ 100 µl dung dịch pha loãng mẫu vào giếng có mẫu trắng (Blank);
- Nhỏ 100 µl kiểm chứng âm không pha loãng vào hai giếng đối chứng âm;
- Nhỏ 100 µl kiểm chứng dương không pha loãng vào hai giếng đối chứng dương;
- Nhỏ 100 µl huyết thanh (6.3.4.1) đã pha loãng vào các giếng thích hợp;

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.

TCVN 8400-39 : 2016

- Để đĩa ở nhiệt độ trong khoảng từ 18 °C đến 26 °C trong 30 min;
- Đổ bỏ dung dịch trong đĩa;
- Nhỏ 350 µl dung dịch rửa vào các giếng, rồi đổ bỏ đi. Lặp lại từ 3 lần đến 5 lần.

Bước 2: Nhỏ kháng kháng thể (conjugate)

- Nhỏ 100 µl dung dịch kháng kháng thể vào các giếng;
- Để đĩa ở nhiệt độ trong khoảng từ 18 °C đến 26 °C trong 30 min;
- Đổ bỏ dung dịch trong đĩa;
- Nhỏ 350 µl dung dịch rửa vào các giếng, rồi đổ bỏ đi. Lặp lại từ 3 lần đến 5 lần.

Bước 3: Nhỏ cơ chất

- Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất TMB vào các giếng;
- Để đĩa ở nhiệt độ trong khoảng từ 18 °C đến 26 °C trong 15 min.

Bước 4: Dừng phản ứng

- Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng (Stop Solution) vào các giếng;

Đo giá trị OD (mật độ quang học) bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 650 nm.

C.2.2.3 Đọc kết quả

Điều kiện phản ứng được công nhận khi:

- Giá trị OD của đối chứng dương trừ giá trị OD của đối chứng âm phải lớn hơn 0,075;
- Giá trị OD của đối chứng âm lớn hơn hoặc bằng 0,15.

Tính kết quả:

- Trung bình của đối chứng âm: $[NC1 A (650) + NC2 A(650)] / 2 = NC \times tb$
- Trung bình của đối chứng dương: $[PC1 A (650) + PC2 A (650)] / 2 = PC \times tb$
- Tỷ lệ S/P = (giá trị OD của mẫu - NC x tb) / (PCx tb - NCx tb)
- Hiệu giá của mẫu: $\log_{10} \text{Titer} = 1,09 (\log_{10} S/P) + 3,36$

CHÚ THÍCH: S/P là tỉ lệ được tính toán giữa giá trị OD của mẫu bệnh phẩm so với giá trị OD của mẫu kiểm chứng dương.

Đánh giá kết quả đối với mẫu bệnh phẩm:

- Mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể Gumboro có S/P lớn hơn hoặc bằng 0,20;
- Mẫu huyết thanh âm tính với kháng thể Gumboro có S/P nhỏ hơn 0,20.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] JICA, 2003. *Standard Diagnostic Manual for livestock diseases in Thailand. Third edition. p.175 – 176.*
 - [2] Stanley H. Kleven, 2008. *Diseases of poultry, Chapter 21: Mycoplasmosis. 12th Edition, Blackwell Publishing, p. 805 – 821.*
 - [3] Quinn J, Carter M.E, Markey B, Carter G.R, 2004. *Veterinary Clinical Microbiology. 6th Edition. Printed in Spain, p.320 – 326.*
 - [4] Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lãnh, Đỗ Ngọc Thúy, 2011. *Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y, trang 425 – 430.*
-