

TCVN 8400-21 : 2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 21: HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN
VÀ HÔ HẤP Ở LỢN (PRRS)**

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 21: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

HÀ NỘI - 2014

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán -

Phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS)

Animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 21: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

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 hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp trên lợn.

2 Thuật ngữ, định nghĩa và chữ viết tắt

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và những chữ viết tắt sau:

2.1 Thuật ngữ, định nghĩa

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn: là bệnh truyền nhiễm do vi rút PRRS, họ Arteriviridae gây ra. Bệnh cũng được gọi theo tên viết tắt bằng tiếng Anh là bệnh PRRS hoặc trong dân gian gọi là bệnh Tai xanh.

CHÚ THÍCH 1: Biểu hiện đặc trưng của lợn bệnh là các rối loạn về sinh sản ở lợn nái như sảy thai, thai chết lưu, lợn sơ sinh chết yếu. Lợn con đang nuôi theo mẹ, lợn nái hậu bị có biểu hiện viêm đường hô hấp rất nặng.

CHÚ THÍCH 2: Vi rút PRRS có hai kiểu gen chính được công nhận là kiểu gen Châu Âu (típ I) có tên gọi là Lelystad và kiểu gen Bắc Mỹ (típ II) có tên gọi là VR2332. Vi rút PRRS gây bệnh ở Việt Nam thuộc kiểu gen Bắc Mỹ nhưng có độc lực cao và giống với các chủng vi rút PRRS của Trung Quốc.

2.2 Chữ viết tắt

- PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome): Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn.
- ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay): Phản ứng ELISA.
- rRT - PCR (real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Phản ứng Realtime-RT PCR.
- MARC-145: Tế bào thận khỉ xanh Châu Phi.
- PAM (Porcine alveolar macrophages): Tế bào đại thực bào phổi lợn.
- IPMA (Immunoperoxidase monolayer assay): Phương pháp miễn dịch có gắn enzyme trên thảm tế bào một lớp.
- CPE (Cytopathic pathogene effect): Bệnh tích tế bào.
- FCS (Fetal calf serum): Huyết thanh thai bê.
- BSC II (Bio-safety cabinet): Tủ an toàn sinh học cấp II.
- MEM (Modified Eagles medium): Môi trường tế bào.
- TCID₅₀ (50 % tissue culture infective dose): Liều gây nhiễm 50 % tế bào.
- BHI (Brain heart infusion): Canh thang tim não.
- PBS (Phosphate buffered saline): dung dịch muối đệm photphat.
- AEC: 3 – Amino – 9 – ethylcarbazole.
- TE buffer (Tris – EDTA buffer): dung dịch đệm TE.
- DMSO (Dimethylsulfoxide): chất bảo vệ đông lạnh.
- NP40: Igepal CA – 630.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

3.1 Môi trường phát triển tế bào MEM có chứa FCS (huyết thanh thai bê).

3.2 Canh thang tim não BHI.

3.3 Các loại kháng sinh Penicillin, Kanamycin, Streptomycin, Mycostatin, Gentamicin.

3.4 Formalin 40%.

3.5 Sữa gầy (skim milk).

3.6 Dung dịch NP40.

3.7 Dung dịch peroxidase (H_2O_2) 30%.

3.8 Dung dịch AEC.

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 lạnh âm sâu có thể duy trì nhiệt độ ở âm 20 °C và âm 70 °C.

4.2 Tủ lạnh thường.

4.3 Tủ ấm 37 °C có 5 % CO_2 .

4.4 Buồng an toàn sinh học cấp II.

4.5 Máy ly tâm có thể tạo gia tốc ly tâm ở 8000g, 10000g, 12000g và 14000g.

4.6 Máy ly tâm có thể tạo gia tốc ly tâm ở 1500g, 2000g, 3000g.

4.7 Máy lắc trộn (vortex mixer).

4.8 Máy khuấy từ.

4.9 Kính hiển vi soi ngược.

4.10 Kính hiển vi thường.

4.11 Máy chạy nhân gen Realtime PCR.

4.12 Nồi hấp áp lực, duy trì nhiệt độ ở 121 °C.

4.13 Chai thủy tinh, dung tích 100 ml, 200 ml, 1000 ml và 2000 ml.

4.14 Ống ly tâm dung tích 50 ml và 15 ml.

4.15 Micropipet, dung tích từ 0,5 µl đến 10 µl, từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl, từ 100 µl đến 1000µl, từ 1000 µl đến 5000 µl.

4.16 Micropipet đa kênh, dung tích từ 5 µl đến 50 µl, từ 50 µl đến 200 µl.

4.17 Bộ cối chà sừ.

4.18 Chai nhựa nuôi tế bào: 25 cm², 75 cm².

4.19 Đĩa nhựa nuôi tế bào: 24 giếng, 96 giếng.

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

4.21 Dao, kéo, panh kẹp.

4.22 Bơm kim tiêm dung tích 5ml.

4.23 Ống giữ mẫu eppendorf dung tích 1,5 ml.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tễ

- Lợn ở mọi lứa tuổi đều có thể bị mắc bệnh PRRS.

- Ở những lứa tuổi khác nhau, lợn mắc bệnh PRRS có những triệu chứng, bệnh tích biểu hiện cũng khác nhau.

- Ở Việt Nam, bệnh đã trở thành dịch địa phương nên có thể xảy ra quanh năm nhưng tập trung nhất vào thời gian từ tháng 3 đến tháng 4 và từ tháng 9 đến tháng 10 hàng năm khi người chăn nuôi tái đàn gia súc.

5.1.2 Triệu chứng

- Lợn nái: khi nhiễm bệnh thường kém ăn, bỏ ăn, sốt cao 39 °C - 40 °C, một số con bị ho.

Triệu chứng đặc trưng thường gặp là viêm vú và mất sữa. Hiện tượng tai tím, tai xanh có xuất hiện nhưng không nhiều, nếu xuất hiện thì trong vài giờ là hết.

Ở thể cấp tính lợn có thể bị sảy thai. Một số lợn đẻ non sau khi mang thai 4 tuần, sau đó duy trì tình trạng động dục giả và chậm động dục sau cai sữa. Lợn đẻ ra thai chết, thai gổ hoặc thai vẫn sống nhưng rất yếu hoặc chết yếu ngay sau đó.

Đôi khi lợn nái có triệu chứng thần kinh như mất điều hoà vận động.

- Lợn đực: mắc PRRS thường sốt trong thời gian ngắn, bỏ ăn. Một số lợn có biểu hiện hôn mê và có triệu chứng đường hô hấp như ho, thở khó khè. Đặc biệt là viêm tinh hoàn, giảm tính hăng giao phối, xuất tinh kém, tỷ lệ thụ thai thấp.

- Lợn con đang nuôi theo mẹ: thường chết yếu. Nếu sống hay mắc các bệnh đường hô hấp và thường bị ỉa chảy. Lợn có biểu hiện viêm kết mạc, sưng mí mắt. Lợn con sốt, ủ rũ, bỏ ăn, gầy còm, thở nhanh, đôi khi đi liêu xiêu, nghiêng ngả.

- Lợn cai sữa và lợn choai: có biểu hiện sốt, ủ rũ, bỏ ăn, thở nhanh, thở khó. Xuất huyết dưới da vùng tai, mõng, đùi, lông xơ xác, nếu có nhiễm trùng kế phát thì có triệu chứng đường hô hấp, tiêu hoá rối rết.

5.1.3 Bệnh tích

5.1.3.1 Bệnh tích đại thể

Bệnh tích đặc trưng nhất là ở phổi. Phổi có hiện tượng viêm hoại tử, đặc trưng bởi những đám chắc, đặc. Trên các thùy phổi bị bệnh có màu xám đỏ, có mủ, chắc đặc. Mặt cắt ngang của các thùy phổi bệnh lồi ra, khô. Nhiều trường hợp viêm phế quản phổi hoá mủ.

5.1.3.2 Bệnh tích vi thể

Quan sát dưới kính hiển vi thường (xem 4.10) có độ phóng đại 400 lần thấy phổi có hiện tượng dịch thấm xuất và hiện tượng thâm nhiễm bạch cầu, trong phế nang chứa đầy dịch viêm, đại thực bào. Một số trường hợp hình thành tế bào khổng lồ nhiều nhân. Một bệnh tích khá đặc trưng ở phổi là hiện tượng phế nang bị nhấn và có hiện tượng đại thực bào bị phân huỷ.

5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

5.2.1.1 Lấy mẫu xét nghiệm kháng nguyên

- Bệnh phẩm nội tạng là phổi, hạch lâm ba của lợn nghi mắc bệnh PRRS.

- Bệnh phẩm là huyết thanh của lợn nghi mắc bệnh đang có triệu chứng sốt cao: dùng bơm tiêm (xem 4.22) lấy máu lợn kiểm tra (khoảng 3 ml - 4 ml), đặt nghiêng, yên tĩnh cho máu đông và tránh dung huyết, sau đó chiết lấy huyết thanh cho xét nghiệm (0,5 ml đến 1 ml) giữ trong ống giữ mẫu (xem 4.23).

Tất cả mẫu bệnh phẩm sau khi lấy phải được bao gói cẩn thận không làm lây lan bệnh, bảo quản ở 4 °C đến 8 °C và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm sớm nhất có thể (trong vòng 24 h) (kèm theo phiếu bệnh phẩm). Tại phòng thí nghiệm mẫu phải được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu -70 °C.

GHÚ THÍCH: Đối với xét nghiệm kháng nguyên, không lấy mẫu phủ tạng hoặc máu chất huyết thanh từ lợn đã được tiêm phòng vắc xin nhược độc PRRS chủng JXA1-R hoặc tương tự trong phạm vi 33 ngày kể từ ngày tiêm để phát hiện vi rút PRRS.

5.2.1.2 Lấy mẫu xét nghiệm kháng thể

Mẫu lấy xét nghiệm kháng thể là huyết thanh từ 0,5 đến 1 ml của lợn cần kiểm tra: dùng bơm tiêm (xem 4.22) lấy máu lợn cần kiểm tra (khoảng 3 ml - 4 ml), đặt nghiêng, yên tĩnh cho máu đông và tránh dung huyết, sau đó chất lấy huyết thanh giữ trong ống giữ mẫu (xem 4.23) cho xét nghiệm.

CHÚ THÍCH : Đối với xét nghiệm kháng thể, không lấy mẫu chất huyết thanh của lợn được tiêm vắc xin PRRS và kể cả lợn con sinh ra từ nái mẹ đã được tiêm vắc xin PRRS. Nếu lấy mẫu huyết thanh để xét nghiệm, cần lấy 3 mẫu/đàn (đối với đàn có từ 3 con trở lên).

Mẫu bệnh phẩm sau khi lấy phải được bao gói cẩn thận không làm lây lan bệnh, bảo quản ở 4 °C đến 8 °C và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm sớm nhất có thể (trong vòng 24 h) (kèm theo phiếu bệnh phẩm). Tại phòng thí nghiệm mẫu phải được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu -70 °C.

5.2.2 Phát hiện và giám định kháng nguyên

5.2.2.1 Xử lý bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm là phổi, hạch (xem 5.2.1.1): dùng panh, kéo (xem 4.21) lấy 1 g, cắt nhỏ rồi nghiền trong cối chày sứ (xem 4.17) vô trùng với 10 ml dung dịch PBS pH = 7,2 (xem phụ lục A) thành huyền dịch 10 %. Chuyển toàn bộ huyền dịch vào ống ly tâm 50 ml (xem 4.14) rồi ly tâm bằng máy ly tâm (xem 4.6) ở gia tốc 2000 g trong 15 min. Hút lấy dịch nước trong ở phía trên xử lý với kháng sinh penicillin (200 UI/ml) và Streptomycin (200 µg/ml) (xem 3.3) hoặc có thể lọc vô trùng qua màng lọc (xem 4.20). Kiểm tra lại độ vô trùng trên canh thang BHI (xem 3.2).

- Bệnh phẩm là huyết thanh (xem 5.2.1.1): lắc bằng máy lắc trộn (xem 4.7), rồi ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (xem 4.5) ở gia tốc 8000 g trong 1 min sau đó đem chiết tách ARN.

5.2.2.2 Phương pháp rRT-PCR (real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

5.2.2.2.1 Nguyên tắc

Phản ứng rRT-PCR dùng để phát hiện ARN của vi rút PRRS. Phản ứng này có thể phân biệt vi rút PRRS thuộc chủng Châu Âu, Bắc Mỹ và Trung Quốc (vi rút PRRS độc lực cao) bằng việc sử dụng các cặp mồi và mẫu dò đặc hiệu.

Danh mục các mẫu dò và cặp mồi sử dụng cho phản ứng rRT-PCR trong qui trình này để phát hiện vi rút PRRS chủng Bắc Mỹ (NA), Châu Âu (EU) và Trung Quốc

Tên	Cặp mồi/ Mẫu dò	Trình tự gen (5'-3')	Đầu gắn huỳnh quang	
			5'	3'

PRRS-1 (NA)	Mẫu dò	TGT GGT GAA TGG CAC TGA TTG ACA	FAM	BHQ1
	Mỗi xuôi	ATG ATG RGC TGG CAT TCT	Không	Không
	Mỗi ngược	ACA CGG TCG CCC TAA TTG	Không	Không
PRRS-2 (EU)	Mẫu dò	CCT CTG CTT GCA ATC GAT CCA GAC	FAM	BHQ1
	Mỗi xuôi	GCA CCA CCT CAC CCA GAC	Không	Không
	Mỗi ngược	CAG TTC CTG CGC CTT GAT	Không	Không
PRRS- China (JVM)	Mẫu dò	CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA	HEX	BHQ1
	Mỗi xuôi	CCCAAGCTGATGACACCTTTG	Không	Không
	Mỗi ngược	AATCCAGAGGCTCATCCTGGT	Không	Không
CHÚ THÍCH: PRRS-1 (NA) dùng để phát hiện vi rút PRRS chủng Bắc Mỹ PRRS-2 (EU) dùng để phát hiện vi rút PRRS chủng châu Âu PRRS-China (JVM) dùng để phát hiện vi rút PRRS độc lực cao (Trung Quốc) gây bệnh ở Việt Nam				

5.2.2.2.2 Cách tiến hành:

- Mẫu bệnh phẩm sau khi xử lý (xem 5.2.2.1), được chiết tách ARN (xem phụ lục B) bằng kit chiết tách để làm khuôn mẫu cho phản ứng rRT-PCR.
- Phản ứng rRT-PCR (xem phụ lục B) có thể khác nhau tùy thuộc vào loại kit nhân gen sử dụng.

5.2.2.2.3 Đánh giá kết quả

Kết quả chạy rRT - PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Ct) phát hiện tín hiệu huỳnh quang.

- Mẫu được coi là dương tính khi có Ct ≤ 35 .
- Mẫu được coi là âm tính nếu không có Ct.
- Mẫu được coi là nghi ngờ nếu Ct > 35 , trường hợp này phải xét nghiệm lại hoặc dùng phương pháp khác (phân lập vi rút) để khẳng định.

5.2.2.3 Phương pháp phân lập vi rút trên tế bào

- Chuẩn bị tế bào MARC-145 hoặc tế bào PAM (xem phụ lục C) nuôi cấy lên các chai nhựa nuôi tế bào 25 cm² (xem 4.18) hoặc đĩa nhựa nuôi tế bào 24 giếng (xem 4.19) với môi trường phát triển tế bào (xem 3.1) MEM có 5% FCS (xem Phụ lục A). Sau 2 ngày đến 3 ngày tế bào mọc thành thảm (khoảng 80 %) thì gây nhiễm huyền dịch bệnh phẩm (xem 5.2.2.1) với liều 50 µl/giếng đến 100 µl/giếng hoặc 500 µl/chai.

- Kiểm tra tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi soi ngược (xem 4.9). Nếu có vi rút PRRS, vi rút sẽ gây nên những biến đổi bệnh tích tế bào (CPE) với đặc điểm các tế bào co tròn, thảm tế bào bong tróc khỏi bề mặt dụng cụ nuôi cấy. CPE thường xuất hiện sau 4 ngày đến 7 ngày gây nhiễm.

- Sau 7 ngày thu lấy hết huyền dịch tế bào vào ống ly tâm 50 ml (xem 4.14), cất ở tủ lạnh âm sâu (xem 4.1), sau đó lấy ra rã đông, ly tâm bằng máy ly tâm (xem 4.6) ở gia tốc 3000 g trong 10 min. Thu dịch nước trong cho giám định vi rút hoặc cấy chuyển lần thứ hai.

5.2.2.4 Phương pháp giám định vi rút

Giám định vi rút bằng phương pháp rRT-PCR (5.2.2.2).

5.2.3 Phát hiện kháng thể

Phản ứng huyết thanh học có ý nghĩa chẩn đoán khi lợn mắc bệnh có triệu chứng, bệnh tích nghi PRRS và chưa tiêm phòng vắc xin PRRS, hoặc sử dụng để đánh giá kết quả tiêm phòng vắc xin PRRS.

5.2.3.1 Xử lý bệnh phẩm

Bệnh phẩm là huyết thanh (xem 5.2.1.2): lắc bằng máy lắc trộn (xem 4.7), rồi ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (xem 4.5) ở gia tốc 8000 g trong 1 min. Sau đó xử lý ở nhiệt độ 56 °C trong 30 min để diệt bỏ thể rồi đem tiến hành các phương pháp để phát hiện kháng thể.

5.2.3.2 Phương pháp ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Hiện nay có nhiều bộ kit ELISA phát hiện kháng thể PRRS có bán sẵn trên thị trường. Khi sử dụng phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục D).

5.2.3.3 Phương pháp IPMA (Immunoperoxidase monolayer assay)

5.2.3.3.1 Nguyên tắc

Đây là phương pháp sử dụng một thảm tế bào đã gây nhiễm vi rút chuẩn để phát hiện kháng thể. Nếu huyết thanh có kháng thể thì có sự kết hợp của kháng nguyên, kháng thể và kháng kháng thể, khi cho

cơ chất vào sẽ xuất hiện màu đỏ đậm, đó là phản ứng dương tính. Phản ứng âm tính nếu thăm tế bào có màu hồng nhạt.

5.2.3.3.2 Chuẩn bị

- Môi trường phát triển tế bào MEM có 5 % FCS (huyết thanh thai bê) (xem phụ lục A).
- Dung dịch A: dung dịch cố định tế bào, gồm: PBS có 10 % formalin (xem 3.4) và 1 % NP40 (xem 3.6).
- Dung dịch B: dung dịch nước rửa, gồm PBS (xem phụ lục A) với 1 % Tween 80.
- Dung dịch C: dung dịch pha loãng mẫu, gồm PBS (xem phụ lục A) với 1 % Tween 80 và 5 % sữa gầy (xem 3.5).
- Dung dịch E: dung dịch AEC (3 – Amino – 9 – ethylcarbazole), gồm 1 ml dung dịch AEC (xem 3.8) nguyên chất + 14 ml dung dịch đệm axetat 0,1 M (pH 5,2) + 15 μ l H₂O₂ 30 % (xem 3.7).
- Tế bào MARC-145 hoặc tế bào PAM (xem phụ lục C).
- Giống vi rút chuẩn PRRS.

5.2.3.3.3 Cách tiến hành

a) Bước 1: Chuẩn bị tế bào MARC -145 (hoặc tế bào PAM) trên đĩa nuôi tế bào 96 giếng

- Tế bào MARC-145 (hoặc tế bào PAM) (xem phụ lục C) đựng trong ống cryo được đưa ra khỏi bình nitơ lỏng, nhanh chóng giải đông rồi cho hỗn hợp tế bào vào ống ly tâm 15 ml (xem 4.14) có chứa sẵn 10 ml môi trường phát triển tế bào MEM có 5 % FCS. Trộn đều bằng pipet 5000 ml (xem 4.15), cho vào ly tâm ở gia tốc 1500 g trong 5 min. Hút bỏ nước trong ở trên, giữ phần cặn ở dưới rồi cho tiếp vào 5ml môi trường phát triển tế bào MEM có 5 % FCS, trộn đều bằng pipet. Hút chuyển dung dịch này vào chai nuôi tế bào 25 cm². Đem giữ trong tủ ấm (xem 4.3), sau 24 h đưa ra quan sát dưới kính hiển vi (xem 4.9), xem sự phát triển của tế bào. Thay môi trường phát triển tế bào 1 lần/ngày. Sau từ 2 ngày đến 4 ngày sẽ thu được một thăm tế bào. Thu tế bào khi đã phát triển trên 90 % diện tích chai nuôi cấy.
- Thu hoạch tế bào MARC-145 (hoặc tế bào PAM) rồi tiến hành pha loãng tế bào với môi trường phát triển tế bào MEM có 5 % FCS với số lượng cần thiết (5×10^4 tế bào/ml), chia đều vào đĩa nuôi tế bào 96 giếng với lượng 100 μ l/giếng bằng pipet đa kênh (xem 4.16).
- Ủ đĩa tế bào trong tủ ấm (xem 4.3) và nuôi từ 1 ngày đến 2 ngày cho đến khi tế bào trong các giếng phát triển thành một lớp ở đáy giếng.

b) Bước 2: Gây nhiễm tế bào với vi rút PRRS