

TCVN 8400-25:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 25: BỆNH CÚM LỢN**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 25: Swine influenza

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-25:2014 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 25: Bệnh cúm lợn

Animal diseases - Diagnostic procedure – Part 25: Swine influenza

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.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh cúm lợn do vi rút A, subtype H1N1, H3N2 gây ra đối với lợn ở mọi lứa tuổi.

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

Bệnh cúm lợn (influenza swine disease) là bệnh truyền nhiễm do vi rút cúm type A, subtype H1N1 và/hoặc H3N2, thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra cho lợn ở mọi lứa tuổi nhưng bệnh xảy ra nhiều nhất ở lợn từ 1 tuần tuổi đến 5 tuần tuổi, với biểu hiện là gây chết nhanh và xuất huyết nặng ở khí quản, phổi.

2.2 Chữ viết tắt

- Realtime-RT PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction): Phản ứng PCR.
- HA (Haemagglutination): Phản ứng ngưng kết hồng cầu.
- HI (Haemagglutination inhibition): Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu.
- ELISA (Enzymed linked immunosorbent assay): Phản ứng ELISA.

- MDCK cell (Madin-Darby Canine Kidney cell):	Tế bào thận chó
- CPE (Cytopathic effect):	Bệnh tích tế bào
- FCS (Fetal calf serum):	Huyết thanh thai bê
- EMEM (Eagle's Minimun Essential Medium):	Môi trường nuôi dưỡng tế bào Eagle
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid):	Ethylenediamin tetraaxetic axit
- TPCK (Tosylphenylalanychloromethane):	Enzym kích hoạt vi rút phát triển
- RDE (Receptor Destroying Enzyme):	Enzym chống ức chế giả
- PBS (Phosphate Buffered Saline):	Dung dịch đệm phosphat

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết, sử dụng nước cất hai lần, nước đã được khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Natri hydroxit (NaOH) 1 M.

3.2 Axit clohidric (HCl) 1 M.

3.3 Etanol 70 %.

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.

4.2 Pipet, có đầu tip các cỡ 30 µl, 200 µl và 1000 µl sử dụng cho micropipet (có lọc và không lọc).

4.3 Đĩa 96 giếng đáy chữ V hoặc chữ U.

4.4 Kính hiển vi đảo ngược

4.5 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở gia tốc 500 g, 900 g, 100 g và 8 000 g.

4.6 Máy lắc ống (vortex mixer).

4.7 Máy Realtime RT-PCR hoặc máy PCR.

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

4.9 Xi lanh, dung tích 1 ml và 5 ml.-

4.10 Ống effendorf, dung tích 1,5 ml.

4.11 Chai nuôi tế bào 75 cm².

4.12 Màng lọc, có kích thước lỗ lọc là 0,45 µm.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tế

Cúm lợn là một bệnh hô hấp cấp tính ở lợn có tính lây truyền nhanh. Tỷ lệ mắc thường cao, tỷ lệ tử vong thấp (từ 1% đến 4%). Vi rút lây truyền qua đường không khí hoặc qua tiếp xúc (trực tiếp hoặc gián tiếp). Lợn có thể mang mầm bệnh mà không có triệu chứng. Bệnh có thể xảy ra quanh năm nhưng chủ yếu vào mùa thu và mùa đông và ở lợn từ 4 đến 6 tuần tuổi.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Thể cấp tính: Bệnh có các triệu chứng ho, ho co giật từng cơn, hắt hơi, chảy nước mắt nước mũi, khó thở, biếng ăn, sốt từ 40,5 °C đến 42,5 °C kéo dài 4 ngày đến 5 ngày liền.

Thể mãn tính: Bệnh có triệu chứng ho nhẹ, con vật chậm lớn, đàn con phát triển không đồng đều.

Bệnh cúm lợn rất dễ lây truyền do tiếp xúc trực tiếp giữa lợn khỏe mạnh và lợn bị bệnh qua đường hô hấp chủ yếu qua mồm và do hít thở không khí có chứa vi rút.

5.1.3 Bệnh tích

Thể cấp tính: Bệnh tích thường thấy là viêm phế quản, phổi hoặc viêm rải rác các thùy phổi, tập trung ở một khối thùy. Ở lợn con bú mẹ hoặc lợn con cai sữa có bệnh tích viêm phổi cata, vùng viêm sưng cứng, có tổ chức phổi chắc, màu nâu hoặc xám mặt cắt ướt. Cắt phế quản, tiểu phế quản và bóp thấy chảy ra dịch đục dính, màu đỏ hoặc xám, phế quản và phế nang chứa tương dịch.

5.1.4 Bệnh tích vi thể

Xung quanh phế quản và mạch quản có thâm nhiễm tế bào như lâm ba cầu, bạch cầu đa nhân trung tính. Bệnh tích cũ thấy có những ổ casein (bã đậu), mủ, tạo hốc do tác động của tập khuẩn kế phát.

Thể mãn tính: Lợn bị bệnh vùng phổi bị viêm có giới hạn rõ ràng với vùng phổi khỏe, ở lợn con bú mẹ có triệu chứng hạch phế quản sưng. Ngoài ra, có bệnh tích viêm dạ dày, sưng hạch màng treo ruột.

5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

- Lấy 5 gam đến 10 gam não, mô phổi, dịch mũi (swab), máu của lợn nghi mắc bệnh.

CHÚ THÍCH:

+ Mẫu tổ chức được lấy ngay sau khi mổ khám và được đựng vào lọ hoặc túi nilon sạch. Mẫu Swab là tăm bông lấy dịch mũi được để và trong dung dịch bảo quản ((PBS+ glycerol theo tỉ lệ 1:1) + 1% dung dịch kháng sinh đậm đặc (Xem A1 phụ lục A))

+ Chỉ lấy mẫu máu của lợn chưa được tiêm phòng vaccin cúm để xét nghiệm kháng thể.

- Tất cả các mẫu phải được dán nhãn và kèm theo các thông tin dịch tễ, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích (nếu mổ khám) của bệnh.

- Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C và gửi đến phòng thí nghiệm càng sớm càng tốt, chậm nhất là 24h và có kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm.

5.2.2 Phát hiện kháng nguyên

5.2.2.1 Xử lý bệnh phẩm

Mẫu xét nghiệm kháng nguyên:

+ Mẫu bệnh phẩm là mô phổi, não được nghiền nát bằng cối chày sứ (Xem 4.1), bổ sung dung dịch PBS pH~7,2 (Xem A.3 phụ lục A) vào, để thu được huyền dịch 1/10 (1g phủ tạng + 900µl PBS pH~7,2, ly tâm (Xem 4.5) ở gia tốc 900 g trong thời gian 10 min). Thu phần dịch nổi phía trên, xử lý vô trùng bằng cho thêm dung dịch kháng sinh đậm đặc (Xem A.1 phụ lục A) theo tỉ lệ 0,1 ml kháng sinh + 10 ml huyền dịch bệnh phẩm, để ở nhiệt độ phòng trong 30 min hoặc có thể xử lý vô trùng huyền dịch bệnh phẩm bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm (Xem 4.12).

+ Mẫu bệnh phẩm là tăm bông ngoáy dịch mũi để trong 2ml dung dịch PBS (Xem A.3 phụ lục A), lắc (Xem 4.6) đều và li tâm (Xem 4.5) ống đựng huyền dịch ở gia tốc 900 g trong thời gian 10 min, thu huyền dịch ở trên.

Mẫu xét nghiệm kháng thể: Sử dụng xy lanh 5 ml (Xem 4.9) để lấy 1 ml máu lợn. 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 (Xem 4.10) mới để dùng cho xét nghiệm.

Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C cho đến khi xét nghiệm.

5.2.2.2 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp Realtime-RT PCR

Bảng 1: Trình tự mồi - mẫu dò phát hiện gen M, H1, H3, N1, N2 của vi rút cúm lợn

Gen đích	Cặp mồi và mẫu dò	Trình tự 5'-3'
M 100 base pairs*	Mồi xuôi	5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'
	Mồi ngược	5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3'
H1 102 base pairs*	Mồi xuôi	5'-AAT AAT TCA ACY GAC ACT G-3'
	Mồi ngược	5'-GTT TAC ATA GTT TYC CRT-3'
	Mẫu dò	TXRED-AAG AAT GTA ACM GTA ACA CAC TCT G-BHQ2
H3 244 base pair*	Mồi xuôi	5'-AAA TTG AAG TGA CTA ATG CTA C-3'
	Mồi ngược	5'-TGA GGC AAC TAG TGA CCT AAG-3'
	Mẫu dò	FAM-CAA CAG GTA GAA TAT GCG ACA GTC C-TAMRA
N1 267 base pairs*	Mồi xuôi	5'-GTA ATG GTG TTT GGA TAG GAA G-3'
	Mồi ngược	5'-ATG CTG CTC CCA CTA GTC CAG-3'
	Mẫu dò	FAM-TGA TTT GGG ATC CTA ATG GAT GGA CAG-TAMRA
N2 233 base pairs*	Mồi xuôi	5'-TGG ACA GGG AAC AAC ACT AAA C-3'
	Mồi ngược	5'-ACA AGC CTC CCA TCG TAA AT-3'
	Mẫu dò	TXRED-CAA ATG AAA TGG AAC ACC CAA CTC AT-BHQ2

*Trọng lượng sản phẩm đoạn gen được khuếch đại sau khi chạy phản ứng PCR.

Huỷ diệt bệnh phẩm sau khi được xử lý (Xem 5.2.2.1), tiến hành chiết tách ARN bằng kit thương mại (Xem D.1 phụ lục D). Mẫu ARN sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp các mạch cDNA của vi rút cúm lợn (Xem D.2 phụ lục D). Phương pháp Realtime-RT PCR sau đó được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các cDNA này bằng việc sử dụng các cặp mồi và mẫu dò (Xem bảng 1) đặc hiệu cho các đoạn gen H1, H3, N1 và N2 trong 4 phản ứng riêng rẽ (Xem D4 phụ lục D).

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp cần tiết kiệm chi phí, thực hiện phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen M của vi rút typ A trước (Xem D.3 phụ lục D), nếu dương tính mới tiếp tục xét nghiệm các gen đặc hiệu của vi rút cúm lợn (H1, H3, N1 và N2).

Đánh giá kết quả:

- Nếu dương tính với 2 phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen H1 và N1, mẫu bệnh phẩm đó có vi

rút cúm lợn H1N1. Nếu dương tính với 2 phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen H3 và N2, mẫu có vi rút cúm lợn H3N2.

- Nếu dương tính với 4 phản ứng Realtime-RT PCR trên, mẫu có cả vi rút cúm lợn H1N1 và H3N2.
- Mẫu không có vi rút cúm lợn hoặc chỉ có một trong hai loại vi rút cúm lợn H1N1 hoặc H3N2.

5.2.2.3 Phân lập trên trứng

Phương pháp này sử dụng trứng gà có phôi 10 ngày đến 11 ngày tuổi.

Sử dụng 0,2 ml bệnh phẩm đã được xử lý (Xem 5.2.2.1) tiêm (Xem 4.9) vào xoang niếu mô của trứng, mỗi mẫu bệnh phẩm tiêm từ 3 đến 4 trứng.

Ủ trứng có phôi đã tiêm truyền trong tủ ẩm ở 37°C (Xem 4.8) và theo dõi hàng ngày. Thu hoạch dịch niếu mô của tất cả trứng chết sau 24h tiêm huyền dịch và của tất cả trứng không chết 96 h tiêm huyền dịch. Sau đó, xác định vi rút bằng phương pháp HA (Xem phụ lục B), HI (Xem phụ lục C) sử dụng kháng huyết thanh chuẩn H1 và H3 hoặc kiểm tra bằng phương pháp Realtime- RT PCR (Xem phụ lục D).

Đánh giá kết quả:

- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR dương tính, xác định có vi rút cúm lợn trong mẫu.
- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR âm tính, cần tiêm truyền trứng lần thứ hai. Nếu sau lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm lợn

5.2.2.4 Phân lập trên tế bào

Chuẩn bị:

- Chuẩn bị MDCK cell có độ bao phủ 90 % bề mặt đĩa nuôi cấy 12 giếng (Xem A.9 phụ lục A).
- Chuẩn bị môi trường phát triển có chứa 1µg/ml TCPK trypsin (Xem A.7 phụ lục A)

Tiến hành:

Hút bỏ môi trường cũ trong giếng tế bào đang nuôi, rửa bề mặt thảm tế bào 3 lần bằng PBS⁻ pH 7,4 (Xem A.2 phụ lục A) sau đó nhỏ 50 µl mẫu đã được xử lý và 1,5 ml môi trường đã chuẩn bị vào mỗi giếng.

Ủ đĩa nuôi cấy trong tủ ẩm ở 37 °C có chứa 5 % CO₂ (Xem 4.8). Kiểm tra đĩa tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi (Xem 4.4), theo dõi tối đa trong 5 ngày.

Khi trên thăm tế bào xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE) thì tiến hành thu hoạch dung dịch môi trường chứa vi rút và xác định vi rút bằng phương pháp HA, HI (Xem phụ lục B và Phụ lục C) với kháng huyết thanh chuẩn H1 và H3 hoặc kiểm tra bằng phương pháp rRT-PCR (Xem phụ lục D).

Đánh giá kết quả:

- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR dương tính, xác định có vi rút cúm lợn trong mẫu.
- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR âm tính, thì phân lập lại lần hai. Nếu sau lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm lợn.

5.2.3 Phát hiện kháng thể

Mẫu phát hiện kháng thể là huyết thanh của lợn chưa được tiêm phòng vaccin cúm lợn (xem 5.2.1) dùng để chẩn đoán phát hiện kháng thể bằng phương pháp HI hoặc ELISA.

5.2.3.1 Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu chuột lang

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (phản ứng HI: (Xem phụ lục C) dùng để kiểm tra kháng thể kháng vi rút cúm lợn H1, H3 trong huyết thanh kiểm tra.

Huyết thanh kiểm tra cần được vô hoạt bỏ thể ở 56 °C trong 30 min và huyết thanh đó cần phải được xử lý RDE (Xem A5 phụ lục A) chống hiện tượng ức chế giả.

Chuẩn bị kháng nguyên: Kháng nguyên chuẩn H1 và H3 được pha 4 đơn vị HA (Xem A.10 phụ lục A).

Thực hiện phản ứng HI: Huyết thanh kiểm tra đã xử lý RDE (Xem A.5 phụ lục A) pha loãng với dung dịch đệm PBS ~ pH 7,2 (Xem A.3 phụ lục A) sau đó bổ sung kháng nguyên chuẩn đã pha loãng 4HA. Ủ huyết thanh kiểm tra và kháng nguyên chuẩn thời gian là 40 min sau đó cho tác dụng với hồng cầu chuột lang 0,5 %.

Đánh giá kết quả:

- Mẫu có kháng thể kháng vi rút cúm lợn H1 hoặc H3: Dương tính với phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu chuột lang (Xem phụ lục C).
- Mẫu không có kháng thể vi rút cúm lợn H1 hoặc H3: Âm tính với phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu chuột lang (Xem phụ lục C).

5.2.3.2 Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể

Sử dụng mẫu bệnh phẩm là huyết thanh của lợn ốm.

Sử dụng kit ELISA thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Xem phụ lục E).

6 Kết luận

Lợn được xác định mắc bệnh cúm lợn khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh cúm lợn và kết quả xét nghiệm mẫu bằng các phương pháp rRT-PCR hoặc phân lập cho thấy có vi rút cúm lợn hoặc bằng các phương pháp HI hoặc ELISA cho thấy có kháng thể với vi rút cúm lợn.