

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-26:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 26: BỆNH CÚM GIA CẦM H5N1**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 26: Avian influenza H5N1

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-26:2014 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 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1

Animal diseases - Diagnostic procedure – Part 26: Avian influenza H5N1

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 đưa ra hết các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn 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 này.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh cúm gia cầm do vi rút A gây ra đối với gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

2.1 Bệnh cúm gia cầm là bệnh do vi rút cúm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra trên các loài gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã. Dựa vào độc lực của vi rút cúm gia cầm người ta xếp loại: bệnh cúm gia cầm độc lực cao, tỉ lệ chết rất cao và cúm gia cầm độc lực thấp với triệu chứng bệnh không rõ rệt và tỷ lệ chết thấp.

Vi rút cúm A thuộc subtype H5N1, hệ gen ARN có khả năng biến đổi rất nhanh, tạo ra những chủng, nhánh mới là nguyên nhân gây ra các ổ dịch cúm gia cầm.

2.2 CEF (Chicken Embryo Fibroblast cell): Tế bào xơ phôi gà

2.3 CPE (Cytopathic effect): Biến đổi bệnh lý tế bào

2.4 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): Chất tạo phức EDTA

2.5 EMEM (Eagle's Minumun Essential Medium): Môi trường EMEM dùng cho tế bào

2.6 FCS (Fetal calf serum): Huyết thanh thai bê

2.7 HA (Haemagglutination Assay): Phép thử phản ứng ngưng kết hồng cầu.

2.8 HI (Haemagglutination inhibition Assay): Phép thử phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu.

2.9 HPAI (High pathogenic avian influenza): Bệnh cúm gia cầm độc lực cao

2.10 LPAI (Low pathogenic avian influenza): Bệnh cúm gia cầm độc lực thấp

2.11 MDCK cell (Madin-Darby Canine Kidney cell): Tế bào thận chó

2.12 PBS (Photphate Buffered Salin): Dung dịch đệm

2.13 RDE (Receptor Destroying Enzyme): Men vô hiệu thụ thể (dùng để chống ức chế giả trong HI)

2 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 Axit clohydric (HCl) 1 N.

3.2 Natri hydroxit (NaOH) 1 N.

3.3 Etanol 70 %.

3.4 Bột agarose.

3.5 Dung dịch 1xTAE.

3.6 Etidi bromua

3.7 Hồng cầu gà 1 %, xem A.4 phụ lục A.

3.8 Dung dịch PBS, pH 7,2-7,4, xem A3 phụ lục A.

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, vô trùng

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 Đĩa nuôi tế bào 12 giếng**4.5 Buồng an toàn sinh học cấp 2**

4.6 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở 1500 g/min đến 2500 g/min, 10.000 g/min và 12.000 g/min.

4.7 Máy lắc ống (vortex mixer)**4.8 Máy Realtime RT-PCR hoặc máy PCR**

4.9 Thiết bị điện di: có bể điện di, khay đổ thạch, lược và máy chiếu UV...

4.10 Tủ ẩm có chứa 5 % CO₂, duy trì được ở 37 °C.

4.11 XI ranh, dung tích 1 ml, 5 ml.

4.12 Kính hiển vi, đảo ngược.

5 Cách tiến hành**5.1 Chẩn đoán lâm sàng****5.1.1 Đặc điểm dịch tễ**

Bệnh cúm gia cầm có tính lây truyền rất nhanh và mạnh. Trong đó, thủy cầm là nguồn mang mầm bệnh chính. Gia cầm nhiễm bệnh chủ yếu thông qua tiếp xúc trực tiếp giữa gia cầm mắc bệnh với gia cầm bị bệnh hoặc phân và chất thải của gia cầm bị bệnh. Các loài chim hoang dã cũng bị mắc bệnh và là nguồn lây lan mầm bệnh cho gia cầm và thủy cầm.

5.1.1.1 Thử độc lực cao

Trên gà: tốc độ lây lan bệnh rất nhanh, tỉ lệ chết có thể đến 100 % trong thời gian 3 ngày đến 4 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng đầu tiên.

Trên vịt: ngỗng, bệnh ít trầm trọng hơn so với ở gà, tuy nhiên trong một số trường hợp tỉ lệ chết do bệnh trên vịt > 70 % và ngỗng > 50 %.

5.1.1.2 Thử độc lực thấp

Bệnh thử độc lực thấp không có biểu hiện rõ rệt, nếu có bệnh thường bị nhầm lẫn với các dạng nhiễm trùng khác. Tỉ lệ chết của cả đàn là 2 % đến 3 % đối với gà và không gây chết trên vịt.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng**5.1.2.1 Thử quá cấp**

- Già cầm chết nhanh, đột ngột.
- Chưa có biểu hiện lâm sàng về bệnh lý.

5.1.2.2 Thể độc lực cao

- Sốt cao từ 40 °C trở lên
- Xù lông, ủ rũ, bỏ ăn, giảm đẻ
- Đầu, mặt sưng, phù quanh mắt. Mào, tích sưng, xuất huyết
- Mắt bị viêm kết mạc và có thể xuất huyết
- Xuất huyết điểm ở giữa vùng bàn chân và khuỷu chân
- Có triệu chứng hô hấp, mủ chảy nhiều rớt dãi
- Có triệu chứng thần kinh, ngheo cổ, sã cánh
- Phân xanh, phân trắng
- Vịt, ngỗng chủ yếu bị các triệu chứng thần kinh, vẹo cổ, mất điều hòa, run rẩy, mệt mỏi nhẹ.

5.1.2.3 Thể độc lực thấp

Trên gà: Mệt mỏi, có triệu chứng hô hấp nhẹ, thở khò khè, ho nhẹ. Trong một số ít trường hợp, thể độc lực thấp cũng biểu hiện các triệu chứng của thể độc lực cao như mào tích tím tái, giảm đẻ, tỉ lệ chết có thể lên đến > 50 %. Trên vịt và ngỗng: Không có biểu hiện lâm sàng.

5.1.3 Bệnh tích

5.1.3.1 Thể độc lực cao

Trên gà:

- Xuất huyết tràn lan ở các bề mặt niêm mạc, màng thanh dịch và mỡ bụng;
- Xuất huyết tụy, màng ngoài bao tim, lớp màng ngoài bao tim, cơ ngực, chân;
- Xuất huyết dạ dày và dạ dày tuyến, ruột, manh tràng;
- Phù thũng dưới da vùng đầu, cổ và ngực;
- Miệng chứa nhiều dịch;

- Khí quản xuất huyết chứa nhiều dịch nhày;
- Gà đẻ có xuất huyết ở buồng trứng;

Trên vịt:

- Xuất huyết đường ruột, dạ dày và dạ dày tuyến;
- Xuất huyết bề mặt tụy, khí quản;
- Viêm túi khí;
- Sung huyết hoặc xuất huyết điểm ở não.

5.1.3.2 Thẻ độc lực thấp

Trên gà:

- Nang buồng trứng xuất huyết, phù nề
- Vòi trứng phù, viêm cata
- Viêm phúc mạc fibrin lẫn lòng vàng trứng
- Xung huyết phổi, khí quản, phù phổi
- Xuất huyết điểm màng ngoài tim, gan, màng thanh dịch ruột.

Trên vịt và ngỗng:

- Không có biểu hiện bệnh lý.

CHÚ THÍCH: Đặc điểm dịch tễ của chim hoang dã vẫn chưa có tài liệu chính thức nào nghiên cứu.

5.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Sơ đồ chẩn đoán bệnh cúm gia cầm: (xem Phụ lục F) Tất cả các thao tác liên quan đến xử lý mẫu, chiết tách ARN, phân lập vi rút trong tiêu chuẩn này phải được tiến hành trong buồng an toàn sinh học cấp 2 (xem 4.5) trở lên.

5.2.1 Lấy mẫu bệnh phẩm

5.2.1.1 Lấy mẫu xét nghiệm kháng nguyên

Mẫu xét nghiệm kháng nguyên: lấy 3 gam đến 5 gam bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, ruột...) của gia cầm bị bệnh. Trong trường hợp gia cầm còn sống, sử dụng tăm bông để ngoáy dịch ở nhớt

(swab), họng hoặc lấy phân tươi sau đó cho vào dung dịch PBS (xem 3.8), pH 7,2 đến 7,4, có bổ sung dung dịch kháng sinh theo tỉ lệ 1:10 (xem A.1 phụ lục AA.1)

5.2.1.2 Lấy mẫu xét nghiệm kháng thể

Chỉ thực hiện đối với gia cầm chưa tiêm vắc xin cúm gia cầm: lấy máu của gia cầm nghi mắc cúm bằng cách sử dụng xy lanh 5 ml để lấy 1 ml máu, rút cán xy lanh tới mức cao nhất để tạo nhiều khoảng trống bên trong, đặt xy lanh nằm nghiêng 5° ở nhiệt độ 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.

Các mẫu phải được bảo quản lạnh từ 2°C đến 8°C và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong vòng 24h.

5.2.2 Phát hiện kháng nguyên

5.2.2.1 Xử lý mẫu

a) Mẫu bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, ruột)

Nghiền 1 gam bệnh phẩm bằng cối chày sứ (xem 4.1) với dung dịch PBS pH 7,2 theo tỉ lệ 1:10 thành huyền dịch 10 %.

Bổ sung 1/10 lượng kháng sinh đậm đặc (xem A1 phụ lục A), chuyển sang ống ly tâm. Ly tâm ở tốc độ 8 000 r/min trong 15 s.

Thu dịch bệnh phẩm phía trên vào 2 ống 1,5 ml. Một ống dùng cho các xét nghiệm Realtime RT-PCR (rRT-PCR), phân lập vi rút trên tế bào, phân lập trên trứng, ống còn lại dùng làm mẫu lưu bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

b) Dịch ngoáy ở nhớt, họng, khí quản, phân tươi

Lắc ống chứa tấm bông dịch ngoáy bằng máy lắc trong 15 s, ly tâm ống ở tốc độ 8000 g/min trong 15 s

Dùng pipet hút dịch trong ống chuyển sang 2 ống 1,5 ml. Một ống dùng cho các xét nghiệm Realtime RT-PCR, phân lập vi rút trên tế bào hoặc phân lập trên trứng, ống còn lại dùng làm mẫu lưu bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

5.2.2.2 Phương pháp Realtime RT-PCR

a) Chiết tách ARN

Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách ARN đối với các dịch bệnh phẩm bằng kit thương mại (xem phụ lục D). ARN thu được sau quá trình chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.

b) Tiến hành phản ứng

Phản ứng realtime RT-PCR phát hiện vi rút cúm gia cầm trên cơ sở phát hiện các đoạn gen M, H5 và N1 được thực hiện như sau:

Lựa chọn môi và mẫu dò cho phản ứng realtime RT-PCR: cần tham khảo các báo cáo giám sát để biết để lựa chọn môi và mẫu dò phù hợp với các chủng vi rút đang lưu hành. Các bộ môi và mẫu dò để phát hiện các chủng vi rút H5N1 lưu hành được liệt kê trong Bảng E.1 phụ lục E.

Chuẩn bị môi ở nồng độ 20 μ M và mẫu dò ở nồng độ 6 μ M với nước sạch Dnase/Rnase.

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng và cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng Realtime RT-PCR phát hiện các đoạn gen M, H5, N1 theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (Bảng E2 và E3 phụ lục E).

c) Đọc kết quả

Điều kiện phản ứng được công nhận: Mẫu đối chứng dương tính (chuẩn độ trước) có giá trị $Ct \leq 25 (\pm 2 Ct)$, mẫu đối chứng âm tính không có Ct.

Với điều kiện như trên, mẫu có giá trị $Ct \leq 35$ được coi là dương tính. Mẫu không có Ct là âm tính. Mẫu có giá trị $35 < Ct \leq 40$ được coi là nghi ngờ.

Những mẫu nghi ngờ cần được xét nghiệm lại bằng phương pháp khác (phân lập vi rút) để khẳng định.

5.2.2.3 Phương pháp RT-PCR

a) Chiết tách ARN

Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách ARN đối với các dịch bệnh phẩm bằng kit thương mại (xem phụ lục D). ARN thu được sau quá trình chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.

b) Tiến hành phản ứng

Tương tự phản ứng Realtime RT-PCR, phản ứng RT-PCR phát hiện vi rút cúm gia cầm trên cơ sở phát hiện các đoạn gen M, H5 và N1 và được thực hiện như sau:

Chuẩn bị môi ở nồng độ 20 μ M với nước sạch Dnase/Rnase (trình tự môi xem Bảng E1 phụ lục E)

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng RT-PCR để phát hiện mỗi loại gen của vi rút cúm gia cầm theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (xem Bảng E2 và E3 phụ lục E).

Sản phẩm thu được sau phản ứng RT-PCR đem điện di để đọc kết quả.

c) Điện di sản phẩm RT-PCR:

Pha 1,5 g bột agarose (xem 3.4) với 100 ml dung dịch 1xTAE (xem 3.5), 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 (xem 3.6). 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 (xem 3.5) vào bể điện di (đến vạch full level), đặt khay gel vào vị trí trong bể điện di. Pha 2 µl loading dye với 4 µl 100 bp ladder rồi đưa vào giếng đầu tiên của miếng gel. Pha 2 µl loading dye với 8 µl mẫu (đối chứng âm và dương), đưa vào các giếng còn lại của miếng gel.

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

Sau khi điện di xong, đặt gel đã điện di vào máy chiếu UV có bước sóng 590 nm để đọc kết quả.

d) Đọc kết quả:

Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng RT-PCR phát hiện các gen M, H5 hoặc N1 được đọc như sau:

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen M dương tính hiển thị vạch sản phẩm 201 bp (cặp mồi: M52F và M253R).

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen H5 dương tính hiển thị vạch sản phẩm 363bp (cặp mồi: H5F 936 và H5R 1299).

Phản ứng RT-PCR phát hiện gen N1 dương tính hiển thị vạch sản phẩm 150 bp (AI N1-F6 và AI N1-595).

Các phản ứng RT-PCR không hiển thị vạch sản phẩm như xác định ở trên là phản ứng âm tính.

5.2.2.4 Phân lập trên trứng

Tất cả các thao tác tiêm truyền trứng và thu hoạch nước trứng (dịch niệu mô) sau phân lập phải được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3.

a) Tiêm truyền bệnh phẩm

Mỗi mẫu bệnh phẩm cần được tiêm truyền lên 3 trứng.

Chọn trứng gà có phôi 9 ngày đến 10 ngày tuổi khỏe mạnh không có kháng thể cúm.

Lau trứng bằng cồn 70 % và đục lỗ nhỏ phía trên buồng hơi.

Dùng xi lanh 1 ml (xem 4.11) với kim 23G và hút dịch bệnh phẩm tiêm phía trên buồng hơi thẳng xuống xoang niệu mô với lượng 0,2 ml/trứng.

Bịt lỗ tiêm trên vỏ trứng bằng keo dán.