

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-38:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 38: BỆNH TIÊU CHẢY Ở LỢN DO CORONAVIRUS**

*Animal diseases - Diagnostic procedure -
Part 38: Porcine epidemic diarrhea*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8400-38:2015 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 38 phần:

- 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 Xơ* ;
- 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 8400-18 : 2014, *phần 18: Bệnh phù đầu gà (coryza)*;
- TCVN 8400-19 : 2014, *phần 19: Bệnh phó thương hàn lợn*;

TCVN 8400-38 : 2015

- TCVN 8400-20 : 2014, *phần 20: Bệnh đóng dấu 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.*

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán -**Phần 38: Bệnh tiêu chảy ở lợn do coronavirus**

Animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 38: Porcine epidemic diarrhea

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 cho quy trình chẩn đoán bệnh tiêu chảy ở lợn do coronavirus gây ra.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh tiêu chảy ở lợn do coronavirus (Porcine epidemic diarrhea)

PED

Bệnh truyền nhiễm đường ruột do coronavirus gây ra, được phân loại là ARN virus, có tính lây lan mạnh, biểu hiện đặc trưng là triệu chứng nôn mửa và tiêu chảy cấp tính dẫn đến mất nước nặng và tử vong.

CHÚ THÍCH: Bệnh tiêu chảy ở lợn do coronavirus còn được gọi là dịch tiêu chảy ở lợn con hay ở lợn.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

3.1 Nguyên liệu sử dụng chung

TCVN 8400-38 : 2015

3.1.1 Etanol, từ 70 % (thể tích) đến etanol tuyệt đối.

3.1.2 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS), pH 7,2 ± 0,2 (xem A.2).

3.1.3 Dung dịch kháng khuẩn, bao gồm các loại penicillin, kanamycin, streptomycin.

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho Realtime - RT PCR

3.2.1 Kit tách chiết RNA, ví dụ: Qiagen® Rneasy Extraction cat # 74104.

3.2.2 Kit nhân gen, ví dụ: Superscript 3 platinum one-step qRT-PCR kit cat # 11732-020

3.2.3 Mồi xuôi, mồi ngược và mẫu dò.

3.2.4 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).

3.2.5 Nước tinh khiết, không có nuclease

3.3 Nguyên liệu và vật liệu thử dùng cho phương pháp ELISA (phép thử miễn dịch liên kết enzym)

Hiện nay các kit ELISA thương mại có sẵn trên thị trường dùng để phát hiện kháng thể PED khi sử dụng phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm sinh học và những thiết bị, dụng cụ sau:

4.1 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp realtime RT-PCR

4.1.1 Máy nghiền mẫu hoặc cối chày sứ.

4.1.2 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C.

4.1.3 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

4.1.4 Máy nhân gen (realtime- PCR).

4.1.5 Máy ly tâm, có thể đạt gia tốc ly tâm 900 g; 6 000 g và 20 000 g.

4.1.6 Máy lắc trộn vortex.

4.1.7 Máy spindown.

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp ELISA

4.2.1 Máy đọc ELISA, có thể đọc đĩa ở bước sóng 650 nm.

4.2.2 Tủ ấm hoặc bàn sấy mẫu, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh tiêu chảy ở lợn do virus corona xảy ra quanh năm đối với lợn ở tất cả các lứa tuổi, tuy nhiên trên 90 % ca bệnh xảy ra ở lợn con 1 đến 2 tuần tuổi và thường xảy ra vào mùa đông;
- Tỷ lệ chết của lợn mắc bệnh tùy thuộc vào lứa tuổi mắc bệnh của lợn:
 - + Lợn con mắc bệnh ở độ tuổi từ 1 ngày tuổi đến 5 ngày tuổi tỷ lệ chết 100 %;
 - + Lợn con mắc bệnh ở độ tuổi từ 6 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi tỷ lệ chết khoảng 50 %;
 - + Lợn con mắc bệnh ở độ tuổi lớn hơn 7 ngày tuổi tỷ lệ chết khoảng 30 %.
- Nguồn lây nhiễm: lợn khỏe tiếp xúc với virus PED trong phân, dụng cụ chăn nuôi, xe vận chuyển hoặc do việc nhập đàn (lợn mang trùng, lợn nhiễm bệnh);
- Thời gian ủ bệnh từ 1 ngày đến 14 ngày.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

- Triệu chứng tiêu chảy xuất hiện sau 18 h đến 24 h khi mầm bệnh xâm nhập, bệnh lây nhanh đến tất cả các đàn lợn trong trại;
- Vào đầu ổ dịch lợn nái ốm trước, sau đến lợn con, sốt từ 40 °C đến 40,7 °C. Lợn con nôn dữ dội, kèm theo tiêu chảy phân toàn nước và bọt trắng, sau đó chuyển dần sang màu tro xám, sền sệt như bùn đất, mùi hôi rất khó chịu;
- Lợn con theo mẹ: lười bú, ói mửa, ỉa chảy có sữa không tiêu. Lợn con sụt cân nhanh do mất nước, nằm chồng đống lên nhau và thích nằm lên bụng mẹ (triệu chứng điển hình).

5.3 Triệu chứng bệnh tích

- Lợn bị tiêu chảy do virus corona có bệnh tích ruột non trương phồng, màu vàng, niêm mạc bong tróc, thành ruột mỏng, tích nhiều nước.
- Dạ dày chứa nhiều thức ăn không tiêu, tá tràng tích nước, không tràng xuất huyết, hồi tràng sưng to.
- Virus corona nhân lên trong tế bào thượng bì của ruột non lợn làm tuyến hạch bẹn sưng, hạch lympho màng treo ruột sưng huyết, viêm nặng.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp realtime RT-PCR

6.1.1 Lấy mẫu

Lấy 5 g đến 10 g ruột non, hạch lâm ba của lợn nghi mắc bệnh cho vào ống vô trùng có thể tích 15 ml.

CHÚ THÍCH: không lấy mẫu từ lợn đã được tiêm phòng vắc xin nhược độc PED trong thời gian từ 3 tháng đến 6 tháng để xét nghiệm bệnh.

6.1.2 Bảo quản mẫu

Tất cả các mẫu bệnh phẩm xét nghiệm đều được bảo quản trong thùng lạnh (nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C) chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 48 h. Trong trường hợp không tiến hành xét nghiệm mẫu ngay thì mẫu phải được bảo quản trong tủ âm sâu 80 °C (4.1.2).

CHÚ THÍCH: Mẫu được gửi tới phòng thí nghiệm có kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm ghi rõ yêu cầu xét nghiệm và những thông tin về dịch tễ, các biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của ca bệnh.

6.1.3 Chuẩn bị mẫu

Ruột non, hạch lâm ba được cắt nhỏ và nghiền nát bằng máy nghiền mẫu hoặc cối chày sứ (4.1.1), bổ sung dung dịch PBS (3.1.2), để thu được huyền dịch 1/10 (1g phủ tạng + 900 ml dung dịch PBS). Cho huyền dịch vào ống, ly tâm ở gia tốc 900 g (4.1.5) trong thời gian 10 min. Thu phần dịch nổi phía trên chẩn đoán virus PED bằng phương pháp realtime RT-PCR.

6.1.4 Cách tiến hành

6.1.4.1 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất (3.2.1). Ví dụ: sử dụng quy trình tách chiết ARN bằng kit Qiagen® Rneasy Extraction cat # 74104 (xem Phụ lục B)¹⁾.

6.1.4.2 Chuẩn bị môi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.1.4) theo phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của virus gây PED sử dụng môi xuôi, môi ngược và mẫu dò (3.2.3).

Chuẩn bị môi như sau:

Chuẩn bị môi gốc:

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.