

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-1: 2019

(Xuất bản lần 2)

BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –

PHẦN 1: BỆNH LỞ MÒM LONG MÓNG

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 1: Foot and Mouth Disease

HÀ NỘI – 2019

Lời nói đầu

TCVN 8400-1: 2019 thay thế TCVN 8400-1: 2010.

TCVN 8400-1: 2019 do Chi cục Thú y Vùng VI - Cục Thú y biên soạn trên cơ sở tham khảo tài liệu của Tổ chức Thú y thế giới (OIE) và các bài báo khoa học quốc tế, 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:

- TCVN 8400-1: 2019, *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 dẻ*;
- 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: 2019, *phần 11: Bệnh dịch tả vịt*;
- TCVN 8400-12: 2011, *phần 12: Bệnh bạch lý và thương hàn ở gà*;
- TCVN 8400-13: 2019, *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: 2019, *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 8400-20: 2014, *phần 20: Bệnh đóng dấu lợn*;

TCVN 8400-1: 2019

- 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 biến 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 *Circovirus 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: Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà;
- TCVN 8400-40: 2016, phần 40: Bệnh nhiễm trùng huyết ở thủy cầm do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* gây ra.
- TCVN 8400-41: 2019, phần 41: Bệnh dịch tả lợn Châu Phi.
- TCVN 8400-42: 2019, phần 42: Bệnh dịch tả loài nhai lại nhỏ;
- TCVN 8400-43: 2019, phần 43: Bệnh lưỡi xanh;
- TCVN 8400-44: 2019, phần 44: Bệnh roi trùng *Trichomonosis*;
- TCVN 8400-45: 2019, phần 45: Bệnh gạo lợn, bệnh gạo bò;

Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán –

Phần 1: Bệnh lở mồm long móng

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 1: Foot and Mouth Disease

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 sinh học 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 bệnh lở mồm long móng trên động vật móng guốc chẵn.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8402 : 2010 *Bệnh động vật – Quy trình mổ khám.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa, các từ viết tắt

3.1 Thuật ngữ và định nghĩa

Bệnh lở mồm long móng (foot and mouth disease) là bệnh truyền nhiễm ở các loài động vật móng guốc chẵn như trâu, bò, lợn, dê, cừu và một số động vật hoang dã khác như hươu, nai.

Dịch probang: dịch thu thập được từ vùng hầu họng bằng dụng cụ lấy mẫu probang gọi là probang cup, được sử dụng để phát hiện vi rút lở mồm long móng bằng RT-PCR/ Realtime RT-PCR hay phân lập.

CHÚ THÍCH: Vi rút gây bệnh lở mồm long móng thuộc họ *Picornaviridae*, giống *Aphthovirus*, có 7 typ huyết thanh (serotyp) gồm: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 và Asia 1.

3.2 Từ viết tắt

- **RT-PCR** (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược;

TCVN 8400-1: 2019

- **Realtime RT-PCR** (Realtime - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Phản ứng sao chép ngược chuỗi trùng hợp thời gian thực;
- **Ct** (Cycle threshold): Chu kỳ ngưỡng;
- **TPB** (Tryptose Phosphate Broth): Môi trường nuôi cấy;
- **PBS** (Phosphate buffered saline): Dung dịch muối đệm phát;
- **VNT** (Virus Neutralization Test): Phản ứng trung hoà vi rút;
- **TCID₅₀** (50 % tissue culture infective dose): Liều gây nhiễm 50 % tế bào;
- **FBS** (Fetal bovine serum): Huyết thanh thai bê;
- **CPE** (Cytopathic pathogene effect): Bệnh tích tế bào;
- **BHK** (Baby Hamster kidney): Tế bào thận chuột Hamster;
- **ARN**: Axít ribonucleic;
- **ADN**: Axít deoxyribonucleic;
- **FMD** (Foot and mouth disease): Lở mồm long móng;
- **DNAse** (Deoxyribonuclease): Enzyme thủy phân liên kết của phân tử ADN;
- **RNAse** (Ribonuclease): Enzyme thủy phân liên kết của phân tử ARN;
- **TBE 10X** (Tris-axít boric- Ethylendiamin Tetraacetic axít): Dung dịch đệm TBE đậm đặc 10 lần.

4 Thuốc thử, vật liệu thử

Chỉ sử dụng các 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 và DNAse, trừ khi có quy định khác.

- 4.1 Thuốc thử, Tween 20;**
- 4.2 Dung dịch axít chlorhydric (HCl) 1 N;**
- 4.3 Dung dịch axít sunfuric (H₂SO₄) 1,25 M;**
- 4.4 Dung dịch natri hydroxit (NaOH) 1 N;**
- 4.5 Cồn (Ethanol), từ 70 % đến 100 % (C₂H₆O);**
- 4.6 Carbonat/Bicarbonat (CaCO₃/NaHCO₃), dạng viên;**
- 4.7 Glyxerin [C₃H₅(OH)₃];**
- 4.8 Dung dịch TBE 10X;**
- 4.9 Thang chuẩn AND (100 bp)**
- 4.10 Bột agarose;**

- 4.11 Chất nhuộm gel (gel red hoặc chất nhuộm gel tương đương);
- 4.12 Môi trường tế bào EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) / BME (Basal medium Eagle);
- 4.13 Môi trường MEM (Minimum Essential Medium)
- 4.14 Tế bào dòng BHK 21 (Baby Hamster kidney);
- 4.15 Dung dịch vi rút lơ lửng mồm long móng;
- 4.16 Môi trường bảo quản mẫu (xem phụ lục A);
- 4.17 Cặp mồi và đoạn dò cho phương pháp realtime RT-PCR;
- 4.18 Mẫu chuẩn dương, được chứng nhận dương tính hoặc ARN chuẩn dương tính tách chiết từ FMDV có giá trị Ct đã biết trước.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm sinh học, bao gồm những thiết bị, dụng cụ sau:

5.1 Thiết bị, dụng cụ sử dụng chung

- 5.1.1 Tủ lạnh: tủ lạnh thường (từ 0 °C đến 8 °C), tủ lạnh âm sâu (từ âm 20 °C đến âm 80 °C);
- 5.1.2 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2;
- 5.1.3 Máy lắc trộn vortex, có thể hoạt động với tốc độ từ 200 g đến 2500 g;
- 5.1.4 Máy nghiền mẫu hoặc cối, chày sứ, panh, kéo, vô trùng;
- 5.1.5 Dụng cụ tiêu hao như: găng tay, khẩu trang, bảo hộ cá nhân.

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

- 5.2.1 Máy PCR, realtime PCR;
- 5.2.2 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở 1500 g đến 2500 g, 10000 g và 12000 g;
- 5.2.3 Máy lắc ủ nhiệt;
- 5.2.4 Máy spindown, máy ly tâm lắng;
- 5.2.5 Máy chiết tách ADN/ARN tự động (nếu có);

5.3 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp ELISA

- 5.3.1 Máy đọc ELISA, có thể đọc ở bước sóng từ 450 nm đến 650 nm;
- 5.3.2 Thiết bị ủ mẫu, có thể duy trì ở nhiệt độ 37 °C, tốc độ lắc từ 400 rpm đến 700 rpm.

5.4 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp phân lập vi rút trên môi trường tế bào

- 5.4.1 Đĩa 96 giếng, dùng cho nuôi tế bào
- 5.4.2 Lọ nuôi tế bào (T25);

5.4.3 Tủ ẩm, có chứa 5 % CO₂, duy trì được ở 37 °C;

5.4.4 Kính hiển vi soi ngược;

Ngoài ra, còn có các loại đầu tip, pipet, ống nghiệm, đĩa petri và các vật tư tiêu hao phù hợp cho quá trình thực hiện các biện pháp kỹ thuật trong tiêu chuẩn này.

6 Chẩn đoán lâm sàng

6.1 Dịch tễ học

Bệnh lở mồm long móng gây thành dịch trên nhiều loài động vật móng guốc chẵn, chủ yếu ở trâu bò và lợn.

Bệnh do nhiều typ và tiểu typ của *Aphthovirus* gây ra. Các typ huyết thanh có sự phân bố khác nhau. Typ huyết thanh O, A phát hiện ở nhiều vùng khác nhau trên thế giới. Trái lại các typ huyết thanh SAT1, SAT2, SAT3 được giới hạn ở một số nước thuộc Châu Phi. Typ huyết thanh Asia 1 được tìm thấy ở nhiều nước thuộc Châu Á. Trong các ổ dịch, động vật có thể mắc bệnh do một hoặc cùng một lúc nhiều typ. Bệnh có tính chất lây lan nhanh, mạnh, rộng đối với động vật mắc cảm.

Bệnh có thể lây trực tiếp từ động vật mắc bệnh đến động vật mắc cảm, hay lây gián tiếp qua sản phẩm động vật (thịt, sữa, tinh dịch, da), dụng cụ chăn nuôi, vận chuyển gia súc.

6.2 Triệu chứng lâm sàng

Ở trâu bò và lợn hoặc các loài vật khác đều có chung đặc điểm là sốt trong khoảng từ 2 đến 3 ngày, viêm mụn nước rồi lở loét ở miệng, vú, vùng móng chân, chảy nhiều nước bọt. Niêm mạc miệng, môi, lợi, chân răng đỏ ửng. Mụn nước bắt đầu xuất hiện ở bên trong má, mép chân răng, môi, lợi, và bề mặt lưỡi. Mụn nước phồng lên, có màng bọc mỏng, bên trong chứa nước trong, sau đục dần. Sau 1 đến 2 ngày, mụn nước bị vỡ, lớp niêm mạc tróc ra.

Do có viêm mụn nước ở vùng vành móng, kẽ móng chân làm con vật khó chịu, tỏ ra đau đớn, đi lại khó. Có trường hợp móng chân bị bong hết ra, phổ biến ở lợn.

Ở con vật cái đang nuôi con, triệu chứng ở bầu vú, núm vú cũng tương tự như ở miệng và chân làm con vật giảm tiết sữa, sữa bị giảm phẩm chất. Do đau ở vú nên con mẹ thường không cho con non bú làm con non bị thiếu sữa. Hơn nữa chính con non cũng bị viêm lở miệng nên không bú được. Hậu quả có tới 50 % đến 80 % gia súc non bị chết. Con vật mang thai dễ bị sảy thai.

6.3 Bệnh tích

Mở khám bệnh tích chủ yếu là từ miệng tới thực quản, dạ dày, ruột đều có mụn loét với từng mảng xuất huyết hoặc tụ máu. Bộ máy hô hấp cũng bị viêm. Có mụn nước ở miệng (niêm mạc môi, lợi, lưỡi và vòm miệng), mũi, kẽ móng, viền móng và núm vú. Mụn nước vỡ có thể thành vết loét, chảy máu.

Lưỡi trâu, bò thường bị bong tróc biểu mô 2/3 phía trước, móng bị rụng, mặt ngoài tim có những vết hoại tử màu trắng xen kẽ trông giống như da hổ nên gọi là "tim vằn hổ".

Biểu chứng: Viêm cơ tim và viêm ruột ở gia súc non (bê non, lợn dưới 2 tháng tuổi).

7 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

7.1 Lấy mẫu và xử lý mẫu bệnh phẩm

7.1.1 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo hướng dẫn của quy trình mổ khám TCVN 8402 : 2010.

Mẫu bệnh phẩm: dịch probang, mô cơ tim, biểu mô của mụn nước chưa vỡ hoặc mới vỡ, dịch mụn nước để phát hiện kháng nguyên vi rút. Mẫu huyết thanh để phát hiện kháng thể kháng vi rút lở mồm long móng.

Mẫu biểu mô trong vòng 7 ngày kể từ khi phát hiện bệnh để phát hiện kháng nguyên, còn sau 7 ngày nên lấy mẫu huyết thanh để phát hiện kháng thể. Mẫu bệnh phẩm biểu mô tối thiểu là 2 g. Bệnh phẩm sau khi lấy được bảo quản trong dung dịch bảo quản đệm PBS 0,04 M có bổ sung kháng sinh và Glyxerin 1:1 (xem phụ lục A), pH từ 7,2 đến 7,6 ở nhiệt độ âm 20 °C. Mẫu được lấy lượng tối thiểu là 3 ml, để máu đông tự nhiên, tách lấy huyết thanh, bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Mẫu dịch probang được lấy khi mẫu biểu mô không sẵn có từ con vật như trong trường hợp đang hồi phục, hay trường hợp nghi ngờ bệnh lở mồm long móng mà không thể hiện các dấu hiệu lâm sàng. Cho mẫu probang vào ống thu thập mẫu có chứa một lượng môi trường vận chuyển (xem phụ lục A) tương đương. Lắc nhẹ hỗn hợp và đảm bảo pH cuối cùng khoảng 7,6.

Mẫu bệnh phẩm được bảo quản trong lọ đựng bệnh phẩm vô trùng, tất cả được đặt trong thùng bảo ôn và vận chuyển trong điều kiện lạnh từ 2 °C đến 8 °C. Mẫu bệnh phẩm gửi đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ sau khi lấy, kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm, nếu quá thời gian đó, bệnh phẩm phải được bảo quản ở nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C. Huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C tối đa trong 7 ngày. Lưu mẫu bệnh phẩm ở nhiệt độ âm 20 °C (đối với mẫu huyết thanh) và ở âm 80 °C (đối với mẫu bệnh phẩm phát hiện vi rút).

7.1.2 Xử lý mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là biểu mô của mụn nước được rửa 01 lần với dung dịch xử lý mẫu biểu mô (xem phụ lục A) hoặc thấm trên giấy để giảm lượng glycerol, sau đó được nghiền thành huyền dịch 10 % (ví dụ: 1g biểu mô trong 9 ml dung dịch xử lý mẫu biểu mô (xem phụ lục A)). Ly tâm huyền dịch bệnh phẩm 2500 g trong 15 phút (5.2.2). Thu dịch nổi để chẩn đoán phát hiện vi rút lở mồm long móng bằng phương pháp ELISA, RT-PCR, realtime RT-PCR hoặc phân lập trên tế bào.

7.2 Phát hiện kháng nguyên

7.2.1 Phương pháp ELISA

- Nguyên tắc: Phản ứng Sandwich ELISA gián tiếp phát hiện nhiều typ kháng nguyên (O, A, C và Asia 1). Phản ứng được thực hiện trên đĩa đáy bằng 96 giếng. Khi sử dụng kit ELISA, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Các bước tiến hành tham khảo Phụ lục B.

7.2.2 Phương pháp RT-PCR và realtime RT-PCR

7.2.2.1 Chiết tách ARN

- Sử dụng kit chiết tách ARN vi rút lở mồm long móng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ sử dụng kit chiết tách InviMAG Virus DNA/RNA Mini Kit/KF96 ¹⁾, hoặc có thể sử dụng các loại kit chiết tách tương đương, phù hợp cho chiết tách ARN vi rút (tham khảo Phụ lục C).

- ARN vi rút sau khi chiết tách được bảo quản ở 4 °C nếu xét nghiệm ngay, hoặc bảo quản ở âm 20 °C chờ đến khi tiến hành xét nghiệm.

7.2.2.2 Phương pháp RT-PCR

- Chuẩn bị mẫu cho phản ứng RT-PCR: Trình tự mẫu phát hiện vi rút lở mồm long móng (tham khảo Bảng D.1, Phụ lục D).

CHÚ THÍCH: Trình tự cặp mẫu cần tham khảo khuyến cáo của OIE cập nhật mới để lựa chọn mẫu phù hợp.

- Tiến hành phương pháp RT-PCR (tham khảo Phụ lục D).

7.2.2.3 Phương pháp realtime RT-PCR

- Chuẩn bị mẫu và đoạn dò cho phản ứng realtime RT-PCR: Trình tự mẫu và mẫu dò để phát hiện vi rút lở mồm long móng tham khảo Bảng E.1 (xem Phụ lục E).

CHÚ THÍCH: Trình tự cặp mẫu và đoạn dò cần tham khảo khuyến cáo của OIE cập nhật mới để lựa chọn phù hợp.

- Tiến hành phản ứng realtime RT-PCR: Sử dụng cặp mẫu và đoạn dò với nồng độ thích hợp (tham khảo bảng E.2, phụ lục E) đã chuẩn bị và bộ kit pha hỗn hợp phản ứng (master mix) và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ sử dụng kit Master mix SuperScript[®] III Platinum[®] One step Quantitative RT-PCR system²⁾, Cat. No.: 11732-020 của hãng Invitrogen (nếu áp dụng kit khác có thể thay đổi công thức master mix).

- Lượng hỗn hợp nhân gen cho 1 phản ứng (tham khảo Bảng E.2, phụ lục E).

- Sau khi chuẩn bị xong nguyên liệu master mix tiến hành:

+ Cho 20µl hỗn hợp master mix vào ống PCR 0,2 ml;

+ Cho 5 µl nước tinh khiết, không có DNase/RNase vào ống PCR đối chứng âm;

+ Cho 5 µl ARN của mẫu vừa chiết tách vào ống PCR;

+ Cho 5 µl ARN dương chuẩn của vi rút lở mồm long móng có giá trị Ct đã biết trước vào ống PCR đối chứng dương;

^{1) và 2)} Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

+ Đặt ống PCR vào máy realtime PCR (5.2.1).

CHÚ THÍCH:

- 1) Phản ứng realtime RT-PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.
 - 2) Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng realtime RT-PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị.
- Chu trình nhiệt chạy phản ứng tham khảo Bảng E.3, Phụ lục E.
 - Kết quả của phản ứng realtime RT-PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).
 - Phản ứng được công nhận khi: mẫu đối chứng dương tính (chuẩn độ trước) phải có giá trị Ct tương đương giá trị Ct đã biết (± 2 Ct), mẫu đối chứng âm tính không có Ct.

Với điều kiện phản ứng:

- + Mẫu dương tính khi giá trị $Ct \leq 35$
- + Mẫu âm tính khi không có giá trị Ct
- + Mẫu nghi ngờ khi giá trị $35 < Ct \leq 40$

- Đánh giá kết quả: Mẫu có vi rút gây bệnh lở mồm long móng khi kết quả realtime RT-PCR dương tính. Với những mẫu nghi ngờ cần được thực hiện lại xét nghiệm hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm khác để khẳng định kết quả.

7.2.3 Phân lập vi rút trên môi trường tế bào

- Sử dụng tế bào dòng BHK-21 để phân lập vi rút lở mồm long móng.
- Nhiễm huyền dịch bệnh phẩm 1 ml/ lọ nuôi tế bào (T25).
- Ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 60 phút, sau đó bổ sung 5 ml đến 8ml môi trường duy trì cho phân lập vi rút (tham khảo phụ lục A) .
- Kiểm tra bệnh tích tế bào- cytopathogen effect (CPE) hàng ngày trên kính hiển vi soi ngược (5.4.4).
- Nếu trong 48 giờ có CPE xuất hiện thì thu huyền dịch tế bào, ly tâm 2000 g trong 15 phút. Thu dịch nổi giám định vi rút. Nếu sau 48 giờ không có CPE thì thu huyền dịch tế bào và cấy chuyển tiếp, sau 3 lần cấy chuyển không có CPE thì mẫu được coi là âm tính (không có vi rút lở mồm long móng).
- Giám định vi rút sau phân lập: bằng phương pháp ELISA hoặc phương pháp realtime RT-PCR.

7.3 Phát hiện kháng thể

7.3.1 Phương pháp ELISA FMD - 3ABC

- Nguyên tắc: Vắc xin chỉ chứa hạt vi rút tinh sạch nên đáp ứng miễn dịch với vắc xin chỉ tạo ra kháng thể kháng protein cấu trúc của vi rút. Trong trường hợp vắc xin không tinh sạch, nhiễm protein không cấu trúc, cũng xảy ra đáp ứng miễn dịch yếu và ngăn đối với loại protein không cấu trúc này vì hàm lượng rất thấp. Do đó, sử dụng phương pháp ELISA FMD - 3ABC phát hiện kháng thể kháng protein không cấu trúc có thể kết luận con vật bị nhiễm vi rút lở mồm long móng chứ không phải do tiêm vắc xin.

- Tiến hành phản ứng ELISA (tham khảo Phụ lục F).

7.3.2 Phương pháp Liquid phase blocking ELISA

- Nguyên tắc: Sử dụng bộ kit ELISA phát hiện kháng thể lở mồm long móng ở gia súc. Dùng để định typ vi rút nếu gia súc chưa tiêm phòng mà có kháng thể lở mồm long móng tự nhiên dương tính và có thể dùng để đánh giá hiệu giá kháng thể sau khi tiêm phòng vắc xin lở mồm long móng. Dựa trên nguyên tắc phản ứng Sandwich ELISA gián tiếp phát hiện và định typ huyết thanh của kháng thể lở mồm long móng.

- Tiến hành phản ứng ELISA (tham khảo Phụ lục G).

7.3.3 Phương pháp trung hoà vi rút trên tế bào động vật

Tiến hành phản ứng (tham khảo Phụ lục H).

8 Kết luận

Gia súc được xác định mắc bệnh lở mồm long móng khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng của bệnh lở mồm long móng và phải có kết quả dương tính với một trong những phương pháp xét nghiệm sau:

- Phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên dương tính.
- Phương pháp RT-PCR phát hiện vi rút dương tính.
- Phương pháp realtime RT-PCR phát hiện vi rút dương tính.
- Phân lập được vi rút trên môi trường tế bào, và giám định vi rút lở mồm long móng dương tính.
- Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể dương tính ở gia súc chưa tiêm phòng.
- Phương pháp ELISA FMD-3ABC phát hiện kháng thể kháng vi rút lở mồm long móng do nhiễm tự nhiên dương tính.
- Phương pháp trung hòa trên tế bào dương tính (chỉ áp dụng đối với gia súc chưa tiêm phòng trong trường hợp chẩn đoán).

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**A.1 Môi trường pha loãng mẫu huyết thanh và vi rút**

Thành phần:	TPB (29,5 g/L)	5 ml
	Hepes (1M)	0,5 ml
	Glutamine (100X)	0,5 ml
	Fungizone (250 ug/ml)	0,5 ml
	Penicilline / Streptinomycine (10000 UI)	0,5 ml
	NaHCO ₃ (7 %)	0,5 ml
	EMEM / BME (1X)	42,5 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên bằng cách lắc đều. Môi trường pha loãng được sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.2 Môi trường duy trì cho phân lập vi rút

Thành phần:	FBS	0,5 ml
	TPB (29,5 g/L)	5 ml
	Hepes (1M)	0,5 ml
	Glutamine (100X)	0,5 ml
	Fungizone (250 ug/ml)	0,5 ml
	Penicilline / Streptinomycine (10 000 UI)	0,5 ml
	NaHCO ₃ (7 %)	0,5 ml
	EMEM / BME (1X)	42 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên bằng cách lắc đều. Môi trường duy trì được sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.3 Môi trường vận chuyển chứa mẫu probang

Thành phần:	Hepes (1M)	12,5 ml
	Fungizone (250 ug/ml)	20,0ml
	Penicilline / Streptinomycine (10000 UI)	20,0 ml
	MEM (1X)	448,5 ml

TCVN 8400-1: 2019

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên bằng cách lắc đều. Môi trường vận chuyển được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.4 Dung dịch xử lý, bảo quản mẫu biểu mô

Thành phần:	- PBS 0,04 M	
	Na ₂ HPO ₄	4,60 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,80 g/L
	NaCl	16,00 g/l
	KCl	0,80 g/L
	- Kháng sinh	
	Penicilline	1000 UI/ml
	Mycostatine	100 UI/ml
	Neomycine	100 UI/ml
	Polymicine	50 UI/ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần của từng dung dịch PBS 0,04 M và dung dịch kháng sinh trong 1 lít nước cất. Sau đó, kiểm tra pH từ 7,2 đến 7,6, chỉnh pH với NaOH 1 N hoặc HCl 1 N.

LƯU Ý: Khi sử dụng để bảo quản mẫu biểu mô, pha dung dịch bảo quản với Glyxerin tỷ lệ 1:1

A.5 Dung dịch đệm carbonat / bicarbonat 0,05 M, pH 9,6

Thành phần:	NaHCO ₃	2,93 g/L
	Na ₂ CO ₃	1,59 g/L

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên trong nước cất để tạo thành 1 lít dung dịch đệm carbonat/ bicarbonat.

A.6 Dung dịch PBS 0,002 M, pH 7,4

Thành phần:	Na ₂ HPO ₄	0,23 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,04 g/L
	NaCl	1,6 g/L
	KCl	0,04 g/L

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên trong nước cất để tạo thành 1 lít dung dịch PBS 0,002 M. Dùng cho phương pháp ELISA.

A.7 Dung dịch đệm A: PBS 0,01 M + 0,05 % Tween 20, pH từ 7,2 đến 7,6

Thành phần:	Na ₂ HPO ₄	1,15 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,20 g/L
	NaCl	8,00 g/L
	KCl	0,20 g/L
	Tween 20	0,50 ml/L

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên trong nước cất để tạo thành 1 lít dung dịch đệm A. Dùng cho phương pháp ELISA.

A.8 Dung dịch đệm B: PBS 0,01 M + 0,05 % Tween 20 + 5 % sữa bột tách bơ, pH từ 7,2 đến 7,6

Thành phần:	Na ₂ HPO ₄	1,15 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,20 g/L
	NaCl	8,00 g/L
	KCl	0,20 g/L
	Tween 20	0,50 ml/L
	Sữa bột tách bơ	10,00g/L

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên trong nước cất để tạo thành 1 lít dung dịch đệm B. Dùng cho phương pháp ELISA.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên vi rút lở mồm long móng

B.1 Cách tiến hành

- Gắn đĩa (coating): Kháng huyết thanh thô kháng vi rút lở mồm long móng của các typ O, A, C và Asia 1 pha loãng 1:1000 với dung dịch đệm carbonat/ bicarboant (xem Phụ lục A), nhỏ 50 µl vào các giếng tương ứng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ hoặc ủ qua đêm ở 4 °C.
- Rửa đĩa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (xem Phụ lục A).
- Nhỏ 50 µl kháng nguyên đối chứng dương tính mạnh (1:10) và yếu (1:100) pha loãng bằng dung dịch đệm A (xem Phụ lục A) và mẫu bệnh phẩm vào các giếng quy định, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M.
- Nhỏ kháng thể phát hiện: Mỗi giếng nhỏ 50 µl kháng huyết thanh chuột lang kháng vi rút lở mồm long móng vào các giếng tương ứng, mỗi serotyp được pha loãng (1:100) với dung dịch đệm B (xem Phụ lục A). Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M
- Nhỏ dung dịch Conjugate (1:200 pha với dung dịch đệm B): 50 µl/giếng.
- Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M
- Nhỏ cơ chất chromogen (dung dịch chromogen + 5 % cơ chất H₂O₂ 3%): 50 µl/giếng, để 15 phút ở nhiệt độ phòng, nơi tối.
- Dừng phản ứng: nhỏ dung dịch H₂SO₄ 1,25 M với 50 µl/giếng.

B.2 Đọc kết quả

- Đọc bằng máy đọc ELISA (5.3.1) chọn bước sóng 492 nm.
- + Nếu giá trị OD > 0,1 sau khi đã trừ đi giá trị trung bình của cột trắng thì phản ứng được coi là dương tính với serotyp đó.
- + Nếu OD = 0,1 thì cấy chuyển mẫu bệnh phẩm lên môi trường tế bào rồi kiểm tra lại.

Bảng B.1 - Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O	++	++	+	+	Bl	Bl	1	1	3	3	5	5
A	++	++	+	+	Bl	Bl	1	1	3	3	5	5
C	++	++	+	+	Bl	Bl	1	1	3	3	5	5
Asia 1	++	++	+	+	Bl	Bl	1	1	3	3	5	5
O	++	++	+	+	Bl	Bl	2	2	4	4	6	6
A	++	++	+	+	Bl	Bl	2	2	4	4	6	6
C	++	++	+	+	Bl	Bl	2	2	4	4	6	6
Asia 1	++	++	+	+	Bl	Bl	2	2	4	4	6	6

CHÚ THÍCH ++: kháng nguyên đối chứng dương tính mạnh

+: kháng nguyên đối chứng dương tính yếu

1, 2, 3, 4, 5, 6: mẫu xét nghiệm

Bl: mẫu trắng

Phụ lục C

(Tham khảo)

Quy trình chiết tách ADN/ARN

Sử dụng kit chiết tách ADN/ARN. Hiện nay có rất nhiều các loại kit chiết tách khác nhau được cung cấp trên thị trường. Do đó, tùy thuộc vào điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm để lựa chọn bộ kit phù hợp. Nếu sử dụng kit chiết tách InviMAG Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100 bằng máy Thermo Scientific KingFisher KF 96 (5.2.5) thì các bước được thực hiện như sau:

C.1 Chuẩn bị

- Dung dịch đệm Lysis Buffer RV: Cho thêm Proteinase K và Carrier RNA vào dung dịch đệm Lysis theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dung dịch này được bảo quản ở nhiệt độ phòng 15 °C đến 30 °C.
- Dung dịch hạt từ (Bead Mix): Cho dung dịch MAP vào dung dịch Binding theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Dung dịch rửa 1 (Washing Wash 1), dung dịch rửa 2 (Washing Wash 2): Cho thêm ethanol 100 % vào dung dịch theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Dung dịch Elution Buffer: dung dịch thu hồi RNA/DNA sau khi tách chiết được sử dụng trực tiếp từ ống gốc của bộ kit.

C.2 Tiến hành tách chiết mẫu tự động bằng máy Thermo Scientific KingFisher KF

- Hút 200 µl dung dịch đệm Lysis Buffer cho vào ống eppendorf 1,5 ml vô trùng có ghi sẵn ký hiệu mẫu.
- Giải đông, vortex huyền dịch 10 % mẫu đã chuẩn bị ở mục 7.1.2. Sau đó tiến hành ly tâm 2500 g trong 15 phút. Hút 200 µl dịch trong bên trên vào ống Lysis buffer và lắc trộn vortex (5.2.4).
- Ly tâm lắng (5.2.4) để kéo các phần bám trên nắp ống eppendorf xuống.
- Đặt các ống eppendorf lên máy lắc ủ nhiệt (5.2.3), lắc với vận tốc 750 g trong 15 phút ở nhiệt độ 65 °C.
- Lấy các ống eppendorf ra khỏi máy lắc ủ nhiệt (5.2.3) và sắp xếp thứ tự trên khay chứa.
- Chuẩn bị các đĩa 96 giếng sâu và đĩa 96 thu hồi ARN của kit.
- Hút dung dịch mẫu sau khi lắc ủ nhiệt vào đĩa 96 giếng sâu thứ 1 theo sơ đồ mẫu. Đĩa 96 giếng sâu thứ 2: cho vào 800 µl dung dịch Washing Wash 1, Đĩa 96 giếng sâu thứ 3 và 4: mỗi giếng 800 µl dung dịch Washing Wash 2, đĩa 96 giếng thu hồi ARN cho vào 100 µl dung dịch Elution Buffer.
- Sau đó cho thêm vào đĩa 96 giếng sâu thứ 1 (giếng chứa hỗn hợp mẫu và dung dịch đệm Lysis Buffer) 420 µl dung dịch hạt từ.
- Chọn chương trình máy chiết tách theo hướng dẫn của nhà sản xuất để gắn các đĩa mẫu và dung dịch chiết tách vào bên trong máy chiết tách.
- Vận hành máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Sau khi chiết tách ADN/ARN đã hoàn tất. Lấy đĩa thu ARN ra khỏi máy và đặt vào tủ an toàn sinh học cấp 2.
- Hút toàn bộ dung dịch trong giếng đĩa thu ARN cho vào ống thu hồi 500 µl vô trùng đã ghi sẵn ký hiệu mẫu tách chiết tương ứng.
- Mẫu ADN/ARN được bảo quản ở 4 °C để sẵn sàng thực hiện phản ứng realtime RT PCR/ RT PCR. Trong trường hợp mẫu ADN/ARN chưa thực hiện phản ứng realtime RT PCR/ RT PCR thì mẫu cần được lưu trữ ở nhiệt độ âm 20 °C hoặc âm 80 °C.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Phương pháp RT-PCR Phát hiện ARN vi rút lở mồm long móng

D.1 Trình tự mỗi

Bảng D.1 - Trình tự mỗi

Mỗi	Chiều	Chuỗi (5' - 3')	Kích thước bp
1R	Ngược	CCA GTC CCC TTC TCA GAT C	328
1F	Xuôi	GCC TGG TCT TTC CAG GTC	

D.2 Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt

Bảng D.2 - Thành phần phản ứng RT-PCR

Thành phần nguyên liệu (Theo hướng dẫn của kit QIAGEN One Step RT-PCR Kit)	Nồng độ nM	Thể tích cho 1 phản ứng μl
Nước không có RNase và DNase		11,0
OneStep RT-PCR buffer 5X		5,0
dNTP Mix	10	1,0
Mỗi xuôi	10	1,0
Mỗi ngược	10	1,0
Enzyme Mix		1,0
Mẫu chiết tách (ARN)		5,0
Tổng cộng		25

Bảng D.3 - Chu trình nhiệt phản ứng RT-PCR

Nhiệt độ °C	Thời gian	Số chu kỳ
50 (*)	30 phút (*)	01
95 (*)	15 phút (*)	01
94	30 giây	30
55	30 giây	
72	30 giây	
72	7 phút	01
Giữ ở 4 °C		
CHÚ THÍCH: Nhiệt độ và thời gian (*) chỉ phù hợp với kit One Step RT-PCR Kit Cat.No: 210210 (Qiagen).		

D.3 Điện di sản phẩm RT-PCR

- Chuẩn bị thạch Agarose (4.10) 2 % pha trong dung dịch TBE (4.8) 0,5X bổ sung chất nhuộm gel (4.11) (ví dụ như: gel red) với tỷ lệ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Đổ thạch vào khuôn điện di (có lược).
- Thạch khô, rút lược ra và cho thạch vào bể điện di có chứa dung dịch TBE 1X.
- Cho mẫu vào các giếng (10 µl sản phẩm PCR + 2 µl dung dịch dung dịch nạp mẫu (loading dye)).
- Sử dụng thang chuẩn ADN (100 bp) (4.9).

LƯU Ý: Khi chạy điện di sản phẩm PCR phải có mẫu đối chứng dương và đối chứng âm.

- Đậy nắp bể điện di lại và kết nối với dòng điện, phải đảm bảo dòng điện được kết nối đúng cực. Điện di trong vòng 45 phút với hiệu điện thế 80 V– 100 V.
- Sau khi điện di xong, tắt nguồn điện, lấy thạch ra rửa nước trong 5 phút và đọc kết quả bằng ánh sáng UV thích hợp, chụp ảnh.
- Đọc kết quả:

+ Mẫu dương tính: Xuất hiện vạch và có kích thước bằng kích thước giống mẫu đối chứng dương (328 bp).

+ Mẫu âm tính: Không có vạch.

- Đánh giá kết quả: Có vi rút lở mồm long móng ở trong mẫu bệnh phẩm nếu kết quả PCR dương tính. Nếu kết quả nghi ngờ cần lấy sản phẩm PCR giải trình tự gen.

Phụ lục E

(Tham khảo)

Phương pháp realtime RT- PCR Phát hiện ARN vi rút lở mồm long móng

Bảng E.1 - Trình tự mồi và đoạn dò

Mồi và đoạn dò	Trình tự (5'-3')
Mồi xuôi FMDV_Callahan 3DF	ACT GGG TTT TAC AAA CCT GTG A
Mồi ngược FMDV_Callahan 3DR	GCG AGT CCT GCC ACGGA
Đoạn dò FMDV_Callahan 3DP	FAM-TCC TTT GCA CGC CGT GGG AC-BHQ1
Mồi xuôi FMDV_SA-IR-219-246F	CAC YTY AAG RTG ACA YTG RTA CTGGTA C
Mồi ngược FMDV_SA-IR-315-293R	CAG ATY CCR AGT GWC ICI TGT TA
Đoạn dò FMDV_SAmulti2-P-IR-292-269R	FAM-CCT CGG GGT ACC TGA AGG GCA TCC-BHQ1

Bảng E.2 – Thành phần phản ứng realtime RT-PCR

Thành phần nguyên liệu (Theo hướng dẫn của kit Invitrogen Superscript III qRT-PCR Kit)	Nồng độ μM	Thể tích cho 1 phản ứng μl
Nước không có RNase và DNase		5,5
Dung dịch đệm 2X		12,5
Mồi xuôi FMDV_Callahan 3DF	20	0,5
Mồi ngược FMDV_Callahan 3DR	20	0,5
Đoạn dò FMDV_Callahan 3DP	6	0,5
Mồi xuôi FMDV_SA-IR-219-246F	20	1
Mồi ngược FMDV_SA-IR-315-293R	20	1
Đoạn dò FMDV_SAmulti2-P-IR-292-269R	6	0,5
Enzyme mix		0,5
Mẫu chiết tách (ARN)		5
Tổng thể tích cho 1 phản ứng		25

Bảng E.3 - Chu trình nhiệt phản ứng realtime RT-PCR

Nhiệt độ °C	Thời gian	Số chu kỳ
50 (*)	15 phút (*)	01
95 (*)	2 phút (*)	01
95	20 giây	40
60	40 giây (ghi nhận tín hiệu quang)	
LƯU Ý: Nhiệt độ và thời gian (*) chỉ phù hợp với kit SuperScript® III Platinum® One step Quantitative RT-PCR system, Cat. No.: 11732-020 của hãng Invitrogen.		

Phụ lục F

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA FMD - 3ABC

Sử dụng kit thương mại PrioCHECK™ FMDV NS Antibody ELISA Kit với Catalog number: 7610770.

F.1 Tiến hành phản ứng

Ngày 1

- Cho 80 µl ELISA buffer đến tất cả các giếng trong đĩa phản ứng.
- Cho 20 µl mẫu đối chứng âm vào giếng A1 và B1.
- Cho 20 µl mẫu đối chứng dương yếu vào giếng C1 và D1.
- Cho 20 µl mẫu đối chứng dương mạnh vào giếng E1 và F1.
- Cho 20 µl huyết thanh xét nghiệm vào các giếng theo sơ đồ xét nghiệm.
- Dán kín đĩa bằng tấm dán có sẵn trong bộ kit và lắc đều đĩa.
- Ủ qua đêm (từ 16 giờ đến 18 giờ) ở nhiệt độ $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Ngày 2

- Rửa đĩa phản ứng 6 lần với nước rửa từ 200 µl đến 300 µl/giếng.
- Cho 100 µl Conjugate đã pha loãng vào tất cả các giếng.
- Dán kín đĩa bằng tấm dán có sẵn trong bộ kit và ủ 60 phút ± 5 phút ở nhiệt độ $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Rửa đĩa phản ứng 6 lần với nước rửa từ 200 µl đến 300 µl /giếng.
- Cho 100 µl dung dịch TMB vào tất cả các giếng. Ủ 20 phút ở nhiệt độ $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Cho 100 µl dung dịch Stop vào tất cả các giếng.
- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm trên máy đọc ELISA (5.3.1).

F.2 Phân tích kết quả

1. Đo giá trị OD (optical density) ở bước sóng 450 nm trong vòng 15 phút sau khi cho dung dịch Stop.
2. Tính giá trị trung bình OD₄₅₀ ở giếng A1 và B1 (giá trị OD₄₅₀ max).
3. Giá trị PI (Percentage Inhibition) của mẫu đối chứng và mẫu huyết thanh xét nghiệm được tính bởi công thức: $PI = 100 - ((\text{Giá trị OD}_{450} \text{ mẫu xét nghiệm} / \text{giá trị OD}_{450} \text{ max}) \times 100)$.

F.3 Đánh giá kết quả

- Giá trị PI trung bình của mẫu đối chứng dương yếu phải $> 50\%$.
- Giá trị PI trung bình của mẫu đối chứng dương mạnh phải $> 70\%$.
- Giá trị trung bình OD₄₅₀ của mẫu đối chứng âm phải $> 1,000$.

F.4 Giải thích kết quả

- Nếu giá trị PI của mẫu $< 50\%$ ($PI < 50\%$): mẫu không có kháng thể.
- Nếu giá trị PI của mẫu $\geq 50\%$ ($PI \geq 50\%$): mẫu có kháng thể.

Phụ lục G

(Tham khảo)

Phương pháp Liquid phase blocking ELISA phát hiện kháng thể FMDV

G.1 Cách tiến hành

- Gắn đĩa ELISA: Kháng huyết thanh thô kháng vi rút lở mồm long móng đã pha loãng 1:1000 với dung dịch đệm carbonat/ bicarbonat (xem phụ lục A), nhỏ 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ và lắc ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ hoặc ủ qua đêm (từ 16 giờ đến 18 giờ) ở nhiệt độ 22 °C ± 3 °C.
- Chuẩn bị hỗn hợp kháng nguyên-huyết thanh, trên đĩa 96 giếng đáy chữ U:
 - + Huyết thanh đối chứng và kiểm tra được pha loãng 1:16 với dung dịch đệm A (xem phụ lục A), 50 µl/giếng.
 - + Kháng nguyên pha loãng 1:100 với dung dịch đệm A (xem phụ lục A), 50 µl/giếng.
- Hỗn hợp được ủ qua đêm (từ 16 giờ đến 18 giờ) ở 4 °C.
- Rửa đĩa ELISA 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (xem Phụ lục A)
- Chuyển 50 µl hỗn hợp kháng nguyên-huyết thanh từ đĩa chữ U sang đĩa ELISA theo vị trí tương ứng. Đậy nắp, ủ lắc (5.3.2) ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (xem Phụ lục A)
- Nhỏ kháng huyết thanh chuột lang kháng vi rút lở mồm long móng pha loãng 1:100 với dung dịch đệm B (xem Phụ lục A), 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ lắc (5.3.2) ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (xem Phụ lục A)
- Nhỏ conjugate: pha loãng 1:200 với dung dịch đệm B (xem Phụ lục A), 50 µl/giếng. Đậy nắp, ủ lắc (5.3.2) ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa PBS 0,002 M (xem Phụ lục A)
- Nhỏ cơ chất chromogen (dung dịch chromogen + 5 % cơ chất H₂O₂ 3%): 50 µl/giếng, để 15 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng, nơi tối.
- Dừng phản ứng: nhỏ 50 µl/giếng bằng dung dịch H₂SO₄ 1,25 M.

G.2 Đọc kết quả

- Đọc đĩa trên máy đọc ELISA (5.3.1), chọn bước sóng 492 nm.
- Tính PI: $PI = 100 - ((OD \text{ mẫu} / OD \text{ trung bình Ca}) \times 100)$
- + Nếu $PI \geq 50$ thì mẫu được coi là dương tính, trong huyết thanh có kháng thể vi rút gây bệnh lở mồm long móng.

+ Nếu $PI < 50$ thì mẫu được coi là âm tính.

Xác định hiệu giá kháng thể, mẫu huyết thanh được pha như sau:

- Huyết thanh kiểm tra: Pha loãng theo tỷ lệ 1:8 với dung dịch đệm A (xem Phụ lục A).
- Nhỏ dung dịch dung dịch đệm A: 50 μ l/giếng vào các lỗ của đĩa chữ U bắt đầu từ cột 3 cho đến cột thứ 12 của tất cả các hàng.
- Nhỏ huyết thanh kiểm tra đã pha loãng 1:8 vào các lỗ tương ứng 50 μ l/giếng và pha loãng theo cơ số 2 từ hàng A đến hàng D và từ hàng E đến hàng H.
- Huyết thanh đối chứng: Chuẩn bị giống phát hiện kháng thể
- Nhỏ kháng nguyên đã pha loãng theo tỷ lệ cho trước 50 μ l/giếng.
- Hỗn hợp kháng nguyên - huyết thanh được ủ qua đêm ở 4 °C.
- Các bước sau tiến hành theo trình tự giống phản ứng ELISA phát hiện kháng thể.
- Nếu tất cả giá trị PI trong 2 giếng của mẫu huyết thanh xét nghiệm nhỏ hơn 50 ($PI < 50$) thì mẫu này được xem là không có kháng thể (mẫu âm tính).
- Nếu có một trong 2 giếng đó có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 nhưng tất cả các giá trị PI ở độ pha loãng kế tiếp có $PI < 50$ thì mẫu xét nghiệm này có hiệu giá kháng thể là 1/32 .
- Nếu cả hai giếng có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 và tất cả các giá trị PI ở độ pha loãng kế tiếp có $PI < 50$ thì mẫu này có hiệu giá kháng thể là 1/45 và mẫu xét nghiệm này được xem là mẫu có kháng thể (mẫu dương tính).
- Hiệu giá kháng thể của các mẫu xét nghiệm có giá trị PI lớn hơn 50 ($PI > 50$) ở độ pha loãng 1/32 có thể tham khảo ở bảng G.3. Nếu hiệu giá kháng thể lớn hơn 90 (> 90) cho biết rằng con vật này có khả năng bảo hộ với serotype vi rút lở mồm long móng tương đồng với kháng nguyên sử dụng trong phản ứng.

Bảng G.1 - Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng thể

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁺	C ⁺	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	C ⁺	C ⁺	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	C ⁺	C ⁺	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	C ⁺	C ⁺	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	C ⁻	C ⁻	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	C ⁻	C ⁻	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	Ca	Ca	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	Ca	Ca	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

Bảng G.2 - Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA xác định hiệu giá kháng thể

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C**	C**	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
B	C**	C**	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
C	C*	C*	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
D	C*	C*	1	1	3	3	5	5	7	7	9	9
E	C-	C-	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
F	C-	C-	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
G	Ca	Ca	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
H	Ca	Ca	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10

CHÚ THÍCH

C**:: huyết thanh đối chứng dương tính mạnh

C*:: huyết thanh đối chứng dương tính yếu

C-:: huyết thanh đối chứng âm tính

Ca: đối chứng kháng nguyên

1 đến 40: mẫu

Bảng G.3 - Bảng tính hiệu giá kháng thể

Huyết thanh pha loãng	Mẫu huyết thanh với những giá trị PI khác nhau >50%							
	1	2	3	4	5	6	7	8
32	+-	++	++	++	++	++	++	++
64	--	--	+-	++	++	++	++	++
128	--	--	--	--	+-	++	++	++
256	--	--	--	--	--	--	+-	++
Hiệu giá kháng thể	32	45	64	90	128	181	256	>256

Phụ lục H

(Tham khảo)

Phương pháp trung hòa vi rút trên tế bào động vật (VNT)

Mẫu huyết thanh phải được xử lý nhiệt ở 56 °C trong 30 phút trước khi xét nghiệm.

Pha loãng dung dịch vi rút sử dụng với 100TCID₅₀/ 50 µl.

H.1 Thực hiện trên đĩa phản ứng: Huyết thanh pha loãng bắt đầu: 1/4 đến 1/512.

- Mỗi độ pha loãng huyết thanh được cho vào 2 giếng, mỗi giếng 50 µl.
- Cho 50 µl dung dịch vi rút với 100 TCID₅₀ /50 µl vào các giếng.
- Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút
- Sau khi ủ xong, cho 50 µl tế bào BHK 21 (10⁶ tế bào/ml trong môi trường chứa 10 % FBS) vào tất cả các giếng
- Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 48 giờ.

Kiểm tra tế bào hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược (5.4.4) để ghi nhận bệnh tích tế bào.

H.2 Thực hiện trên đĩa đối chứng

- Đối chứng huyết thanh: Huyết thanh đối chứng âm và dương tính (đã biết trước hiệu giá kháng thể) pha loãng bắt đầu: 1/4 đến 1/512.
- + Mỗi độ pha loãng huyết thanh được cho vào 2 giếng, mỗi giếng 50 µl.
- + Cho 50 µl dung dịch vi rút với 100TCID₅₀ / 50 µl vào các giếng.
- + Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút
- + Sau khi ủ xong, cho 50 µl tế bào BHK 21 (10⁶ tế bào/ml) vào tất cả các giếng
- + Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 48 giờ
- Đối chứng tế bào
- + Cho 100 µl môi trường vào giếng A6 đến D6 và A7 đến D7.
- + Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút
- Đối chứng môi trường
- + Cho 150 µl môi trường vào giếng E6 đến H6 và E7 đến H7.
- + Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút

H.3 Chuẩn độ lại vi rút sử dụng

- Pha loãng dung dịch vi rút sử dụng: từ 10^{-1} đến 10^{-4}
- Cho 50 µl môi trường vào các giếng từ A9 đến H12.
- Cho 50 µl vi rút pha loãng 10^{-1} và các giếng từ A9 đến H9.
- Cho 50 µl vi rút pha loãng 10^{-2} và các giếng từ A10 đến H10.
- Cho 50 µl vi rút pha loãng 10^{-3} và các giếng từ A11 đến H11.
- Cho 50 µl vi rút pha loãng 10^{-4} và các giếng từ A12 đến H12.
- Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút

Sau khi ủ xong, cho 50 µl tế bào BHK 21 (10^6 tế bào/ml) vào tất cả các giếng từ A1 đến H4, từ A6 đến D6, từ A7 đến D7 và từ A9 đến H12

- Ủ đĩa ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 60 phút
- Kiểm tra tế bào hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược (5.4.4) để ghi nhận bệnh tích tế bào.

H.4 Kết quả

Tính hiệu giá kháng thể trung hòa của mẫu huyết thanh dựa vào công thức Karber (1931).

$$\text{Hiệu giá trung hòa 50\%} = a + 0,5 - 1/n \times \sum ri$$

Với: a: độ pha loãng huyết thanh cao nhất có ít nhất một giếng không có bệnh tích tế bào (lấy giá trị số mũ).

$\sum ri$: tổng số giếng có bệnh tích tế bào trong các độ pha loãng có ít nhất một giếng không có bệnh tích tế bào.

n: số giếng sử dụng cho một độ pha loãng

H.5 Điều kiện để chấp nhận kết quả

- Đối chứng môi trường và tế bào: bình thường
- Hiệu giá của mẫu đối chứng huyết thanh dương chuẩn chỉ chênh lệch ± 1 độ pha loãng bậc 2 so với hiệu giá đã biết ($\log_{10}$ độ pha loãng bậc 2 của hiệu giá đã biết $\pm 0,3$)
- Hiệu giá chuẩn độ lại của vi rút nằm trong khoảng $\log_{10}$ hiệu giá vi rút đã biết $\pm 0,5$.

H.6 Kết luận

- Mẫu có hiệu giá kháng thể trung hòa 50 % $\geq 1,65$ (1/45) được xem là mẫu dương tính.
- Mẫu không có hiệu kháng thể trung hòa 50 % $\leq 1,2$ (1/16) được xem là mẫu âm tính.
- Mẫu có hiệu giá kháng thể trung hòa từ 50 % từ 1,2(1/16) đến 1,65 (1/45) được xem là mẫu nghi ngờ. Nếu mẫu kiểm tra lại lần 2 có hiệu giá $> 1,2$ (1/16) được xem là mẫu dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OIE (Office International des Epizooties), 2017. *Foot and mouth Disease*. Chapter 3.1.8. Terrestrial Manual.
- [2] Chi cục Thú y vùng VI, 2017. *Quy trình phát hiện vi rút gây bệnh lở mồm long móng bằng kỹ thuật realtime RT-PCR*.
-