

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-15 : 2019

(Xuất bản lần 2)

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 15: BỆNH XOẮN KHUẨN DO LEPTOSPIRA**

Animal diseases – Diagnostic procedure –

Part 15 : Leptospirosis

HÀ NỘI - 2019

Lời nói đầu

TCVN 8400-15:2019 được thay thế cho TCVN 8400-15 : 2011.

TCVN 8400-13:2019 do 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 sau:

- 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 Núi cát lợn*;
- 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 : 2019 *phần 11: Bệnh Dịch tả vịt*;
- TCVN 8400-12 : 2011, *phần 12: Bệnh Bạch lỵ 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 8400-21 : 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 8400-15 : 2019

- 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;
- TCVN 8400-39 : 2016, phần 39: Bệnh Viêm đường hô hấp mãn tính ở gà và gà tây;
- TCVN 8400-40 : 2016, phần 40: Bệnh Nhiễm trùng huyết ở thủy cầm do vi khuẩn *Reimerella 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;
- 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;
- TCVN 8400-46 : 2019, phần 46: Bệnh Đại;
- TCVN 8400-47 : 2019, phần 47: Bệnh dịch tả lợn cổ điển;

Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Bệnh Xoắn khuẩn do *Leptospira*

Animal diseases – Diagnostic procedure – Leptospirosis

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 quy trình chẩn đoán bệnh Xoắn khuẩn do vi khuẩn *Leptospira* gây ra đối với gia súc.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh Xoắn khuẩn do *Leptospira* gây ra (Leptospirosis)

Bệnh xoắn khuẩn là bệnh truyền lây chung cho người và gia súc do các chủng gây bệnh xoắn khuẩn *Leptospira* gây ra. Đặc trưng của bệnh là con vật sốt định kì, rối loạn tiêu hóa, viêm gan, viêm thận, ở con cái có thể sảy thai. *Leptospira* tác động phá hủy tế bào máu dẫn đến hiện tượng vàng da, vàng niêm mạc, nước tiểu có màu vàng hoặc đái ra máu.

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 không có Rnase, trừ khi có quy định khác.

3.1 Dung dịch PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,2 - 7,6 (phụ lục A.2).

3.2 Môi trường EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) (xem phụ lục B.1)

3.3 Môi trường bán lỏng Fletcher's (phụ lục B.2)

- 3.4 Nguyên liệu nhuộm Morosop (phụ lục C)
- 3.5 Dung dịch kháng khuẩn (phụ lục A.1)
- 3.6 Chất chống đông, thường dùng Citrat natri 4 %, Heparin, Alsever, EDTA
- 3.7 Kháng nguyên chuẩn *Leptospira* (16 chủng – phụ lục D).
- 3.8 Kháng huyết thanh chuẩn *Leptospira*
- 3.9 Kit tách chiết ADN, ví dụ: Qiagen® Rneasy Extraction cat # 74104.
- 3.10 Kit nhân gen, ví dụ: Superscript 3 platinum one-step qRT-PCR kit cat # 11732-020
- 3.11 Môi nuôi, môi ngược và mẫu dò.
- 3.12 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).
- 3.13 Nước tinh khiết không có nuclease
- 3.14 Môi trường vận chuyển : Môi trường EMJH hoặc dung dịch có 1% bovine serum albumin (BSA) chứa 5-fluorouracil at 100–200 µg/ml

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm sinh học cụ thể sau:

- 4.1 Kính hiển vi nền đen, vật kính 10 và 20
- 4.2 Kính hiển vi thường, vật kính 10 và 20
- 4.3 Tủ ấm có thể duy trì nhiệt độ $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.4 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ từ 2°C đến 8°C
- 4.5 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20°C đến âm 80°C .
- 4.6 Buồng an toàn sinh học cấp II
- 4.7 Máy hoặc bút đo pH
- 4.8 Nồi chưng cách thủy, nồi hấp tiệt trùng
- 4.9 Máy nghiền mẫu hoặc cối chày sứ.
- 4.10 Máy nhân gen (realtime PCR).
- 4.11 Máy ly tâm, có thể đạt gia tốc ly tâm 900 g; 6 000 g và 20 000 g.
- 4.12 Máy lắc trộn vortex.
- 4.13 Máy spindown.
- 4.14 Xi-lanh, loại 5ml hoặc 10ml, có gắn kim lấy máu, vô trùng

- 4.15 Màng lọc milipore 0,22 μm .
- 4.16 Máy cất nước
- 4.17 Micropipette các loại hút được từ 10 μl cho tới 1000 μl
- 4.18 Lam kính, lamén, khay để lam kính
- 4.19 Ống nghiệm các loại, giá để ống nghiệm
- 4.20 Bình tam giác các loại, ống đong hình trụ các loại
- 4.21 Đèn cồn, bút chì viết kính
- 4.22 Panh, kéo vô trùng
- 4.23 Ống ly tâm (hay ống eppendoff), vô trùng, có thể tích 1,5 ml
- 4.24 Ống ly tâm (hay ống eppendoff), vô trùng, có thể tích 0,2 ml

5. Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Trong thiên nhiên, tất cả các loài động vật có vú đều có thể mắc bệnh do *Leptospira* gây ra, bao gồm động vật cảnh, động vật nuôi, động vật hoang dã và người
- Bệnh thường xảy ra vào mùa mưa, lũ lụt.
- Các loài gặm nhấm và thú hoang được coi là nguồn mang bệnh chủ yếu.
- Đường xâm nhập của vi khuẩn chủ yếu qua đường tiêu hóa, gia súc ăn phải thức ăn nước uống nhiễm nước tiểu của gia súc mang mầm bệnh và nhiễm nước tiểu của loài gặm nhấm, do sự lây nhiễm với gia súc nuôi tại nhà. Ngoài ra, *Leptospira* có thể lây qua đường da và niêm mạc lành hoặc xây xước hoặc lây qua đường sinh dục.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

5.2.1 Thể cấp tính

- Trâu bò, dê, cừu
- Sốt kéo dài từ 1 đến 8 ngày, mệt mỏi, bỏ ăn.
- Vàng da.
- Chảy nước mắt.
- Gia súc cho sữa mất sữa đột ngột và có hiện tượng viêm vú.
- Mủ chảy ra từ khoang mũi (dê, cừu).
- Thiếu máu và đại ra huyết sắc tố, đặc biệt ở gia súc non.

- **Chó**

- Sốt 40 – 41 °C , trước khi chó chết thân nhiệt hạ xuống 36 - 36,5 °C.
- Ủ rử, nôn mửa, run rẩy, viêm não, tiêu chảy, trong phân có lẫn máu.
- Vàng da nặng, niêm mạc xuất huyết.
- Bệnh kéo dài từ 2 -12 ngày.
- Tỷ lệ chết có thể lên tới 50 %.

- **Lợn**

- Sốt, bỏ ăn bất thường hoặc ăn ít, mệt mỏi, thích nằm ở xó chuồng.
- Phù nề, đầu to, mắt híp.
- Tiếng kêu yếu, khản đặc hay mất hẳn, lông rụng.
- Nước tiểu vàng, hơi sánh, có thể có màu cà phê.
- Niêm mạc và da vàng, lợn bị bệnh nặng da toàn thân có màu vàng.
- Mắt đau có dử, có khi mù mắt.
- Lợn nái có chữa: sảy thai hàng loạt, đẻ ra lợn con gầy còm, ốm yếu.
- Lợn nái sau khi sảy thai 3 - 6 tuần thường chịu đực mà không có biểu hiện chung của động dục.

5.2.2 Thể mạn tính

- Gia súc sốt nhẹ 39 - 39,5 °C .
- Gia súc cái có chữa có hiện tượng: sảy thai, đẻ non, bất dục; nếu sinh con thì con non để ra yếu.
- Gia súc đực có hiện tượng: viêm khớp, sưng dịch hoàn, tinh dịch loãng, tỷ lệ tinh trùng dị hình cao.

5.3 Bệnh tích đại thể

Tùy từng loài gia súc diễn biến của bệnh và thể hiện lâm sàng khác nhau, nhưng nói chung là các loài có biểu hiện vàng da. Gia súc (lợn) bị bệnh nặng khi mổ ra có mùi khét; tổ chức liên kết dưới da vàng, keo nhầy và thủy thũng, mỡ vàng, dịch trong xoang ngực và xoang bụng vàng, máu loãng, xuất huyết dưới da nhiều, xuất huyết niêm mạc ruột, phổi, tim, thận và lách. Nhìn chung các loài gia súc có bệnh tích như sau :

- Phổi thủy thũng, trong phế quản và phế nang có tích nhiều nước màu vàng.
- Mỡ vành tim vàng.
- Bàng quang căng, niêm mạc xuất huyết nặng, chứa đầy nước tiểu màu vàng, đỏ hoặc đỏ xẫm. Cũng có khi bàng quang xẹp, không chứa nước tiểu.
- Gan sưng, vàng, nát.

- Túi mật phần lớn teo, dịch mật sánh lại như kẹo mạch nha. Cũng có trường hợp túi mật căng.
- Hạch lâm ba ruột sung, thủy thũng. Bệnh nặng màng treo ruột thoái hóa biến thành tổ chức nhầy có màu vàng.
- Thận nhạt màu hoặc có màu vàng lẫn xám, có thể có những điểm hoại tử trắng hoặc những điểm xuất huyết nhỏ trên bề mặt của quả thận.
- Bào thai bị sảy có các điểm hoại tử như đầu đinh ghim trên gan, dịch trong cơ thể có màu vàng.

5.4 Chẩn đoán phân biệt: Phụ lục B

- Bệnh sảy thai truyền nhiễm do *Brucella*
- Bệnh giả dại (bệnh *Aujeszky*)
- Bệnh dịch tả lợn.
- Hội chứng ngộ độc *Aflatoxin*.

6. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Bảng 1. Các phương pháp dùng trong chẩn đoán bệnh Xoắn khuẩn

6

Phương pháp	Mục đích					
	Trường hợp sàng lọc	Kiểm soát trong quá trình vận chuyển	Thực hiện chính sách thanh toán bệnh	Xác nhận triệu chứng lâm sàng	Điều tra, giám sát bệnh	Kiểm tra tình trạng miễn dịch của cá thể động vật hoặc sau khi tiêm vaccin trong đàn
Phát hiện tác nhân						
Nuôi cấy, phân lập	—	+++	—	+++	—	—
PCR/Realtime PCR	—	++	—	++	—	—
Kiểm tra đáp ứng miễn dịch						
MAT	—	+++	—	++	+++	—
ELISA	+++	—	+++	+++	++	+++

Chú thích: +++ : Phương pháp khuyến cáo

++ : Phương pháp phù hợp

+ : có thể sử dụng trong một số trường hợp, nhưng giá cả, độ tin cậy hoặc một số yếu tố khác bị hạn chế trong khi áp dụng

— : Không phù hợp với mục đích này.

PCR = polymerase chain reaction; MAT = microscopic agglutination test; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

6.1 Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Trong trường hợp con vật có những dấu hiệu bệnh cấp tính hoặc là thai của động vật mẹ mắc bệnh mạn tính thì bệnh phẩm là gan, phổi, thận, não và các dịch thể như máu, sữa, dịch não tủy, dịch màng ngực.

Trong trường hợp nghi con vật mắc bệnh mạn tính thì bệnh phẩm lấy là thận, nước tiểu, bộ phận sinh dục

Mẫu bệnh phẩm gửi đi xét nghiệm phải được bảo quản trong thùng lạnh từ 2 °C đến 8 °C và gửi đến phòng thí nghiệm càng nhanh càng tốt. Bệnh phẩm là phủ tạng, máu và nước tiểu để nuôi cấy phân lập phải bảo quản trong môi trường vận chuyển(3.14).

Gửi kèm theo bệnh phẩm giấy yêu cầu xét nghiệm có ghi rõ triệu chứng, bệnh tích, đặc điểm dịch tễ.

6.2 Chẩn đoán huyết thanh học

Phản ứng huyết thanh học dùng trong chẩn đoán bệnh Xoắn khuẩn là phản ứng ngưng kết trên phiến kính (MAT) với bộ kháng nguyên sống gồm 16 chủng *Leptospira* lưu hành ở Việt Nam.

Mẫu bệnh phẩm xét nghiệm kháng thể *Leptospira* là huyết thanh: dùng xi lanh (4.14) không có chất chống đông hút máu khoảng 0.5 ml đến 1 ml, đặt nghiêng để ra huyết thanh, ghi ký hiệu mẫu.

6.2.1. Chuẩn bị: Kháng nguyên chuẩn, kháng huyết thanh chuẩn, huyết thanh kiểm tra và dung dịch PBS phải để ở nhiệt độ phòng khoảng 1 h trước khi làm phản ứng.

6.2.2. Cách tiến hành phản ứng: theo phụ lục E.2

6.3 Chẩn đoán vi khuẩn học

6.3.1 Kiểm tra hình thái học

Mẫu bệnh phẩm xét nghiệm vi khuẩn *Leptospira* gồm:

- Lấy mẫu máu xét nghiệm vi khuẩn *Leptospira* : dùng xi lanh (4.14) có chất chống đông hút máu khoảng 0.5 ml đến 1 ml, ghi ký hiệu mẫu.
- Lấy mẫu phủ tạng xét nghiệm vi khuẩn : dùng pank, kéo (4.22) lấy khoảng 10 g đến 50 g, cho vào từng lọ hoặc túi ni lon vô trùng riêng biệt, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu.
- Lấy mẫu nước tiểu nuôi cấy phân lập : lấy nước tiểu lấy vào giai đoạn hết sốt và cho 1 ml nước tiểu vào 9 ml môi trường vận chuyển(3.14).
- Máu: đã có chất chống đông, ly tâm rồi dùng pipet hút lớp dịch ở trên nhỏ lên phiến kính kiểm tra và soi bằng kính hiển vi nền đen.
- Mẫu nước tiểu: ly tâm, lấy cặn soi trên kính hiển vi nền đen phát hiện *Leptospira*.
- Nghiền phủ tạng với dung dịch PBS theo tỷ lệ 1:9, đem li tâm lấy phần trên soi tươi. Quan sát dưới kính hiển vi nền đen thấy: *Leptospira* di động.
- Vi khuẩn *Leptospira* nhuộm theo phương pháp Morosop (phụ lục D) được soi trên kính hiển vi thường, vi khuẩn *Leptospira* bắt màu nâu như sợi thuốc lào.

6.3.2 Phân lập vi khuẩn

- **Cấy chuyển trong môi trường**

Mẫu được bảo quản trong môi trường vận chuyển (3.14) được cấy chuyển vào môi trường lỏng EMJH (phụ lục C.1) hoặc môi trường bán cố thể Fletcher (phụ lục C.2) ở 28 – 30 °C. Theo dõi trong vòng từ 16 tuần cho đến 26 tuần.

- **Tiêm truyền động vật thí nghiệm**

Nếu có *Leptospira* mọc trong các môi trường nuôi cấy sẽ được tiêm truyền 2 ml vào xoang phúc mạc chuột lang (khoảng 150 g) hoặc thỏ non sau cai sữa, sau đó lấy máu tim chuột lang (hoặc thỏ non), cấy vào môi trường EMJH để lọc tạp khuẩn và thuần khiết. Theo dõi ít nhất sau 26 tuần, nếu không thấy xoắn khuẩn mọc thì ta có thể loại bỏ.

Một phần mẫu bệnh phẩm đem nghiền với dung dịch PBS theo tỷ lệ 1 : 9, lấy huyền dịch đó tiêm vào xoang phúc mạc chuột lang (hoặc thỏ) 2 ml/con . Sau 1, 2, 6, 24 h lấy máu cấy vào môi trường EMJH và theo dõi ít nhất 26 tuần.

- **Định tuýp huyết thanh**

Sau khi đã phân lập được *Leptospira* tiến hành định tuýp, qui trình định tuýp được tiến hành bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính (MAT) với cả 16 mẫu kháng huyết thanh đơn giá dương tính chuẩn của 16 chủng.

Mẫu kháng huyết thanh nào cho phản ứng ngưng kết mạnh nhất thì chủng *Leptospira* này thuộc vào nhóm đó. Còn mẫu kháng huyết thanh nào mà cũng cho phản ứng ngưng kết nhưng yếu hơn thì đó chỉ là hiện tượng ngưng kết chéo giữa chủng này với kháng huyết thanh chuẩn của các chủng khác.

6.3.3 Phương pháp Realtime PCR

6.3.3.1 Xử lý mẫu

Mẫu bệnh phẩm là phủ tạng (thận, gan...): dùng panh, kéo lấy từ 1 g đến 2 g, cắt nhỏ rồi nghiền trong cối chày sứ (4.9) vô trùng với dung dịch PBS (3.1) theo tỷ lệ 1: 9 (1g phủ tạng + 900 ml dung dịch PBS).

Dùng pipet hút huyền dịch vừa nghiền vào 2 ống ly tâm (4.23), 1 ống dùng làm lưu mẫu. Ống dùng làm mẫu, ly tâm (4.11) ở gia tốc 900 g trong 10 min, rồi thu lấy dịch nổi để xét nghiệm vi khuẩn *Leptospira* bằng phương pháp realtime PCR.

6.3.3.2 Cách tiến hành

a. Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ: sử dụng quy trình tách

chiết ADN (3.7) bằng protein K hoặc kit tách chiết bằng cột lọc của kit (Phụ lục G.1).¹⁾

b. Chuẩn bị mẫu

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.9) theo phương pháp realtime PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu *lipL 32* của *Leptospira* sử dụng cặp mồi xuôi và mồi ngược (3.11). Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng 3 (Phụ lục G.2)

Chuẩn bị mẫu như sau:

- Mồi và mẫu dò ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.13) ở gia tốc 6000 g trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên dùng dung dịch đệm TE (3.10) để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mồi được sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mồi gốc bằng nước không có nuclease (20 µl mồi gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease). Mẫu dò được sử dụng ở nồng độ 6 µM (6 µl mồi gốc và 94 µl nước tinh khiết không có nuclease). Trộn cùng 1 thể tích mồi xuôi, mồi ngược và mẫu dò sau khi pha thành hỗn hợp để tiện khi sử dụng.

c. Tiến hành phản ứng real time PCR

Sử dụng cặp mồi đã chuẩn bị (6.1.4.2). Đối với kit nhân gen Superscrip 3 platinum one – step qRT-PCR (Cat. 11732-020) (3.10) thành phần của một phản ứng được trình bày ở Bảng 2. Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml (4.24), có đầy đủ đối chứng âm và đối chứng dương.

Thành phần cho một phản ứng realtime PCR (phụ lục G.3, theo hướng dẫn của kit thương mại được sử dụng).

Đối chứng dương: Là mẫu ADN được tách chiết từ mẫu *Leptospira* chuẩn.

Đối chứng âm: sử dụng nước tinh khiết không có nuclease.

Sau khi chuẩn bị xong hỗn hợp nguyên liệu:

Đặt ống PCR vào máy realtime PCR (4.10).

LƯU Ý: Phản ứng realtime PCR phải bao gồm: mẫu xét nghiệm, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

- Ví dụ: Đối với kit Platinum qPCR SuperMix-UDG (Cat.11732-020) (3.8), chu kỳ nhiệt được nêu trong Bảng 3 (phụ lục G.4)

CHÚ THÍCH: Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng realtime PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

6.3.3.3 Đọc kết quả

¹⁾Sản phẩm do hãng Invitrogen cung cấp. 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.

Phản ứng được công nhận: mẫu đối chứng dương tính (đã biết trước C_t) phải có giá trị $C_t \leq 35$, mẫu đối chứng âm không có C_t .

Với điều kiện phản ứng trên:

- 1) Mẫu có giá trị $C_t \leq 35$ được coi là dương tính,
- 2) Mẫu không có giá trị C_t là âm tính.
- 3) Mẫu có giá trị $C_t \leq 40$ và > 35 được coi là nghi ngờ.

Những mẫu nghi ngờ này cần được xét nghiệm lại hoặc xét nghiệm bằng phương pháp khác tương đương để khẳng định và kết luận cuối cùng.

7. Kết luận

Động vật được kết luận mắc bệnh Xoắn khuẩn do *Leptospira* gây ra khi có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng, bệnh tích đặc trưng và có kết quả xét nghiệm dương tính với vi khuẩn *Leptospira* (bằng phương pháp nuôi cấy phân lập hoặc realtime PCR) hoặc dương tính kháng thể *Leptospira* (bằng phương pháp MAT) trong tiêu chuẩn này.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và dung dịch thử**A.1 Dung dịch kháng khuẩn****A.1.1 Thành phần**

Penicillin	1 000 000 UI
Mycostatin	250 000 UI
Streptomycin	200 mg
Kanamycin	1 000 000 UI
Nước cất	10 ml

A.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan kháng sinh bằng nước cất rồi lọc bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,22 μm . Bảo quản ở âm 20 °C (4.1.2).

A.2 Dung dịch PBS 0,01 M, pH 7,2 – 7,6**A.2.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	8 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Di natri hidrophosphat (Na_2HPO_4)	1,15 g
Kali dihidrophosphat (KH_2PO_4)	0,2 g
Nước cất	1 000 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước cất, chỉnh pH đến 7,2 – 7,6 bằng dung dịch natri hydroxit (NaOH) 1 N hoặc dung dịch axit clohydric (HCl) 1 N. Hấp tiệt trùng và bảo quản ở 4 - 8 °C .

Phụ lục B

(Tham khảo)

Bảng 2 – Chẩn đoán bệnh Xoắn khuẩn do *Leptospira* với một số bệnh khác

	Bệnh Xoắn khuẩn do <i>Leptospira</i>	Bệnh Sảy thai truyền nhiễm do <i>Brucella</i>	Bệnh Giả dại (Bệnh <i>Aujesky</i>)	Bệnh Dịch tả lợn	Hội chứng ngộ độc Aflatoxin
Dịch tễ học	- Bệnh lây sang người, mắc ở mọi lứa tuổi. - Tỷ lệ chết thấp. - Bệnh lây chủ yếu qua đường tiêu hóa. Ngoài ra bệnh có thể lây qua đường da và niêm mạc lành hoặc xây xát hoặc lây qua đường sinh dục	- Bệnh lây sang người, ở nhiều loài động vật khác và động vật hoang dã. - Lây trực tiếp qua tiêu hóa, sinh dục, con bú mẹ...	- Mắc bệnh chủ yếu ở lợn sơ sinh. - Tỷ lệ chết gần 100%.	- Mắc ở mọi lứa tuổi, và mắc nhiều nhất là lợn con. - Tỷ lệ ốm, chết cao	- Thường xảy ra ở khu vực nông hộ sử dụng nguồn nguyên liệu tại chỗ (ngô hoặc ngũ cốc), sau vụ thu hoạch, thời tiết ẩm hoặc nhiều mưa - Lứa tuổi lợn mắc cảm: cai sữa, sau cai sữa và lợn thịt - Không có tính lây lan.
Triệu chứng	- Sốt cao. - Gia súc cái mang thai: sảy thai, đẻ non, bất dục, nếu sinh con thì con yếu. - Gia súc đực: viêm khớp, sưng dịch hoàn, tinh dịch loãng, tỷ lệ tinh trùng dị hình cao.	- Con cái: Sảy thai, đẻ non, sát nhau, bất dục. - Con đực: Viêm tinh hoàn, sưng khớp gối.	- Rối loạn hô hấp và thần kinh trong đó ở lợn con triệu chứng thần kinh xuất hiện sau 24 h và chết sau 24 h đến 36 h, tỷ lệ chết gần 100%.	- Giảm ăn hoặc bỏ ăn, ủ rũ, sốt cao, ỉa chảy, ho, khó thở. - Những phần da mỏng xuất hiện những nốt đỏ như muỗi đốt.	- Bệnh thường diễn biến ở thể mạn tính, không sốt, Lợn ăn kém, chậm lớn, lông xù, da nhợt nhạt - Trường hợp nặng, da và niêm mạc có thể vàng - Trường hợp quá cấp lợn có thể nôn mửa, chết đột ngột, vàng da niêm mạc, phân có lẫn máu.
Bệnh tích	- Cơ quan phủ tạng hoại tử, có dịch vàng. - Bào thai bị sảy có các điểm hoại tử như đầu đinh ghim trên gan, có dịch vàng trong cơ thể.	- Trên bào thai: Xuất huyết, hoại tử lan tràn. - Con đực: dịch thượng hoàn sưng to gấp 2 lần đến 3 lần bình thường, lượng tinh giảm, có khi bị viêm khớp u mềm có mủ. - Cơ quan phủ tạng: gan lách sưng hay hoại tử.	- Xuất huyết điểm lấm tấm ở cầu thận và vỏ não. - Hoại tử ở hạch amidan, hạch họng, khí quản và thực quản; có các điểm hoại tử ở gan, lách, hạch, thận.	- Phổi viêm tụ máu có nhiều vùng bị gan hóa, hoại tử cứng lại. - Van hồi manh tràng có những nốt loét. - Hạch lâm ba sưng tụ máu có màu đỏ sẫm.	- Không có mùi khét đặc trưng như lợn nhiễm <i>Leptospira</i> - Bệnh tích chủ yếu ở gan: gan sưng nhạt màu hoặc vàng sẫm nhiễm mỡ, có điểm xuất huyết hoặc hoại tử. Trường hợp mạn tính: gan nhợt nhạt, cứng do hoại tử, xơ hóa - Thận sưng, màu nhợt nhạt, có thể xuất huyết - Bàng quang sưng to, mật loãng, xuất huyết đường tiêu hóa.

Phụ lục C

(Quy định)

C.1 MÔI TRƯỜNG LỎNG (EMJH)**C.1.1 Chế môi trường cơ bản:**

Cho 2,3 g bột EMJH cơ bản vào bình thủy tinh + 900 ml nước cất và đem hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 min. Cũng có thể chế môi trường cơ bản theo công thức sau: 1 gr Na_2HPO_4 + 0,3 gr KH_2PO_4 + 1 gr NaCl + 0,25 gr NH_4Cl + 0,005 gr Vitamin B1 + 900 ml nước cất và đem hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút.

C.1.2 Chế Enrichment:

Dung dịch 1: 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + nước cất vừa đủ 100 ml (luôn chuẩn bị dung dịch mới).

Dung dịch 2: 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + nước cất vừa đủ 100 ml.

Dung dịch 3: 0,02 g Vitamin B12 + nước cất vừa đủ tới 100 ml (giữ trong đông lạnh)

Dung dịch 4: 20 ml Tween 80 + nước cất vừa đủ tới 100 ml

Dung dịch 5: 0,4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + nước cất vừa đủ 100 ml

Dung dịch 6: 1 g Vitamin B1 (Thiamin) + nước cất vừa đủ 100 ml

Dung dịch 7: 10 g bột Bovine Albumin Serum + 66 ml nước cất, cho vào máy khuấy từ khuấy đều ở 4°C cho tan hết.

Lần lượt cho các dung dịch trên với liều lượng như sau: 10 ml dung dịch 1 + 1 ml dung dịch 2 + 1 ml dung dịch 3 + 6,25 ml dung dịch 4 + 1 ml dung dịch 5 + 0,5 ml dung dịch 6 + dung dịch 7, cho thêm nước cất vừa đủ 100 ml.

Lắc đều và đem lọc qua lọc milipore

C.1.3 Phối trộn:

Cho 100 ml dung dịch Enrichment vào 900 ml môi trường cơ bản ta được 1 lít môi trường EMJH, chỉnh pH = 7,5 bằng các dung dịch HCl 1N và NaOH 1N.

C.1.4 San môi trường:

Chia vào các ống nghiệm, mỗi ống 3 ml. Tất các thao tác pha chế và chia môi trường phải được tiến hành trong buồng cấy vô trùng.

C.2 MÔI TRƯỜNG BÁN LỎNG (FLETCHER'S)

Cho 2 g thạch vào 900 ml môi trường cơ bản, đem hấp 121°C trong 20 phút cho thạch tan hoàn toàn, để nguội còn 50°C, cho 100 ml Enrichment vào và lắc đều, chỉnh pH = 7,5 và chia các ống nghiệm, mỗi ống khoảng 5 ml. Tất các thao tác pha chế và chia môi trường phải được tiến hành trong buồng cấy vô trùng.

Phụ lục D
(Quy định)

Phương pháp nhuộm Monosop**1. Thuốc nhuộm****Dung dịch 1:** dùng để cố định tiêu bản

Acide acetic (CH_3COOH)	1 ml
Formol (Formaldehyde 10% – CH_2O)	2 ml
Nước cất (H_2O)	100 ml

Dung dịch 2: dùng để gắn màu

Acide Tanic (Tanin – $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$)	5 g
Acide Phenic (Phenol – $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)	1 ml
Nước cất (H_2O)	100 ml

Dung dịch 3: dùng để nhuộm màu bạc**Dung dịch 10X:**

Nitrate bạc (AgNO_3)	5 g
Nước cất	100 ml

Thêm từng giọt Amonium hydroxyde (NH_4OH) cho tới khi dung dịch trong trở lại.**Dung dịch nhuộm:** Pha loãng dung dịch 10X theo tỷ lệ 1:10 (1 phần dung dịch 10X + 9 phần nước cất)**2. Phương pháp nhuộm**

Nhỏ dung dịch 1 lên tiêu bản đã để khô, để 1 – 2 min sau đó rửa bằng nước cất.

Nhỏ dung dịch 2, đun 1 – 2 min và rửa sạch bằng nước cất.

Nhỏ dung dịch 3, đun 1 – 2 min và rửa sạch bằng nước cất, để khô và đem soi trên kính hiển vi quang học. *Leptospira* sẽ bắt màu nâu đậm trên nền vàng nhạt (giống như sợi thuốc lào).

Phụ lục E
(Quy định)

E1. 16 chủng *Leptospira* làm kháng nguyên

STT	Nhóm	Loại	Chủng
1	AUTRALIS	Autralis	Ballico
2	AUTUMNALIS	Autumnalis	akiyamiA
3	BATAVIAE	Bataviae	Van Tienen
4	AUTRALIS	Bratilava	
5	CANICOLA	Canicola	Hond Utrecht IV
6	GYROGENES	Pyrogenes	Salinem
7	ICTEROHAEMORRHAGIAE	Icterohaemorrhagiae	Verdun
8	GRYPHOTYPHOSA	Gryppotypophosa	Moskva V
9	SEJROE	Hardjo	Hardjo Bovis
10	HEBDOMADIS	Hebdomadis	Hebdomadis
11	JAVANICA	Javanica	Veldrat Bataviae 46
12	PANAMA	Panama	Cz 214k
13	SEMARANGA	Patoc	Patoc I
14	POMONA	Pomona	Pomona
15	TARASSOVI	Tarassovi	Mitis Johnson
16	SEJROE	saxkoebing	Mus 24

E2. Quy trình phản ứng MAT

Bước 1 : Lấy giống vi khuẩn *Leptospira* sử dụng làm kháng nguyên là giống vi khuẩn *Leptospira* được nuôi cấy ở môi trường lỏng EMJH ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$ trong khoảng từ 4 - 8 ngày với mật độ *Leptospira* là 2×10^8 *Leptospira* /ml.

Bước 2 : Huyết thanh được pha loãng ở nồng độ 1/50 (VD: 20 µl huyết thanh + 980 µl dung dịch PBS)

Bước 3 : Sử dụng 16 chủng *Leptospira* làm kháng nguyên để xác định với huyết thanh kiểm tra bằng cách nhỏ từng kháng nguyên với lượng tương đương với lượng huyết thanh vào mỗi giếng đĩa 96 (Ví dụ : 30 µl kháng nguyên + 30 µl huyết thanh), để lượng huyết thanh pha loãng cuối cùng là 1/100.

Bước 4 : Lắc đều và ủ đĩa ở tủ ấm $29 \pm 1^\circ\text{C}$ trong khoảng thời gian từ 1,5 - 4 h

Bước 5 : Đọc kết quả dưới kính hiển vi nền đen. Nếu không có kính hiển vi nền đen đọc trên đĩa 96, có thể hút ra lam kính để kiểm tra.

- Phản ứng được đánh giá là dương tính nếu như tại độ pha loãng 1/100 quan sát thấy 50 % vi khuẩn ngưng kết, 50 % vi khuẩn tự do. Nếu vi khuẩn ngưng kết trên 50 % thì tiếp tục pha loãng với các hiệu giá 1/200; 1/400... Ở nồng độ huyết thanh pha loãng nào vẫn gây ngưng kết 50 % vi khuẩn thì kết luận mẫu huyết thanh kiểm tra dương tính ở hiệu giá đó.

- Phản ứng âm tính là phản ứng mà tại đó *Leptospira* vẫn hoạt động bình thường, có cụm ngưng kết nhỏ hơn 50 % *Leptospira* ngưng kết.

* Chú ý: một mẫu đối chứng âm dùng dung dịch muối đệm phát phát, một mẫu đối chứng dương dùng kháng huyết thanh chuẩn.

Phụ lục G

(Tham khảo)

G1. Quy trình tách chiết ADN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ADN có sử dụng hoá chất nguy hiểm và có khả năng gây hại nếu thao tác không cẩn thận. Do vậy, nên tránh tiếp xúc trực tiếp với da và hít phải hơi của các hoá chất này. Luôn luôn đeo găng tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

Tách chiết ADN theo quy trình của kit Invitrogen (Cat No. 69506): thực hiện như sau:

- Nhỏ 200 µl huyền dịch bệnh phẩm vào ống 1,5 ml cùng với 200 µl Lysis buffer có 25 µl proteinase K, lắc đều trên máy lắc trộn Vortex (4.12) trong 15 s rồi ly tâm bằng máy ly tâm (4.11) ở 8 000 g trong 1 min;
- Ủ hỗn hợp này ở 56 °C trong 15 min;
- Ly tâm (4.11) ở 8 000 g trong 1 min, thêm 250 µl etanol 100 % thể tích vào ống, lắc mạnh bằng máy lắc trộn Vortex trong 15s rồi ủ 5 min;
- Ly tâm (4.11) ở 10 000g trong 1 min;
- Chuyển toàn bộ hỗn hợp (675 µl) sang cột lọc có ống thu;
- Ly tâm (4.11) ở 8 000 g trong 1 min. Thay cột thu mới;
- Cho 500 µl nước rửa (washing buffer) vào cột lọc. Ủ 1 min, ly tâm bằng (4.11) 8 000 g trong 1 min. Đổ bỏ nước trong ống thu đi;
- Cho 500 µl nước rửa (washing buffer) vào cột lọc. Ly tâm bằng (4.11) 13 000 g trong 1 min;
- Thay ống thu mới, ly tâm cột lọc và ống thu trong 2 min ở tốc độ tối đa, bỏ ống thu;
- Đặt cột lọc vào ống thu ADN, nhỏ 50 µl nước không chứa men DNase vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 1 min. Tách ADN bằng cách ly tâm (4.11) ở 13 000 g trong 1 min, bỏ cột lọc, giữ lại dịch trong ống thu ADN;

Bảo quản mẫu ADN thu được ở 4 °C (4.4) trong thời gian ngắn trước khi tiến hành chạy realtime PCR. Nếu thực hiện sau 24 h, nên bảo quản mẫu ở nhiệt độ dưới âm 20 °C (4.5).

G2. Trình tự môi và đầu dò

Bảng 3 – Cặp môi và đầu dò^{[3], [4]}

Môi (primers)	Trình tự (5'-3')
Môi xuôi (forward primer)	CCC GCG TCC GAT TAG
Môi ngược (reverse primer)	TCC ATT GTG GCC GR ^{AG} A CAC
Mẫu dò (probe)	(FAM) CTC ACC AAG GCG ACG ATC GGT AGC(TAMRA)

G3. Thành phần phản ứng Realtime PCR

Bảng 4 – Thành phần phản ứng realtime PCR

Thành phần	Thể tích (µl)
Nước tinh khiết không có nuclease	6,0
Platinum SuperMix UDG	12,5
Môi xuôi	0,5
Môi ngược	0,5
Probe	0,5
Mẫu ADN	5
Tổng thể tích	25

E4. Chu trình nhiệt của phản ứng realtime PCR

Bảng 5 – Chu trình nhiệt của phản ứng realtime PCR^[4]

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	2 min	1 vòng
95 °C	05 s	40 vòng
58 °C	30 s	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Leptospirosis – chapter 2.1.12 – Version adopted by the World Assembly of delegates of the OIE in May 2014.
 - [2] AHMED A., ENGELBERTS M.F.M., BOER K.R., AHMED N. & HARTSKEERL R.A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One*, 4, e7093.
 - [3] Duangjai SUWANCHAOEN và cs "Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for pathogenic *Leptospira* spp. detection with leptospire isolation and real-time PCR"
 - [4] *Pascale Bourhy, Sylvie Bremont, Farida Zinini và cs "Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences"
 - [5] Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 15: Bệnh Xoắn khuẩn do *Leptospira*
-