

TCVN 8400-47: 2019

(Xuất bản lần 1)

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN
PHẦN 47: BỆNH DỊCH TẢ LỢN CỔ ĐIỂN**

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 47: Classical Swine Fever Disease

HÀ NỘI – 2019

Lời nói đầu

TCVN 8400-47:2019 thay thế TCVN 5273:2010

TCVN 8400-47:2019 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 47 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 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 8400-47: 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 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;
- 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;

- 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 –

Phần 47: Bệnh dịch tả lợn cổ điển

Animal diseases - Diagnostic procedure - Part 47: Classical swine fever 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 dịch tả lợn cổ điển.

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 dịch tả lợn cổ điển (Classical swine fever disease- CSF) là bệnh truyền nhiễm có tính chất lây lan nhanh. Bệnh chỉ xảy ra ở lợn với các mức độ khác nhau tùy thuộc vào độc lực vi rút, tuổi động vật mắc cảm và thời gian nhiễm bệnh. Vi rút tác động gây biến đổi bệnh lý ở nhiều cơ quan, bộ phận, đặc biệt là bộ phận tiêu hóa làm con vật tiêu chảy trầm trọng do loét ruột.

CHÚ THÍCH: Vi rút gây bệnh dịch tả lợn cổ điển là vi rút ARN thuộc giống *Pestivirus*, họ *Flaviridae*.

3.2 Từ viết tắt

- **CSF** (Classical swine fever): Bệnh dịch tả lợn cổ điển;
- **CSFV** (Classical swine fever virus): Vi rút dịch tả lợn cổ điển;
- **ADN**: Axít deoxyribonucleic;

- **ELISA** (Enzyme-linked immunosorbent assay): Phản ứng miễn dịch liên kết enzyme;
- **FBS** (Fetal bovine serum): Huyết thanh thai bê;
- **FITC** (Fluorescein isothiocyanate): thuốc nhuộm phát huỳnh quang;
- **MEM** (Minimal essential medium): Môi trường nuôi cấy tế bào;
- **NPLA** (Neutralising Peroxidase - Linked Assay): Phương pháp trung hòa trên tế bào;
- **PBS** (Phosphate buffered saline): Dung dịch muối đệm phát phát;
- **Ct** (Threshold cycle): chu kỳ ngưỡng;
- **PK 15** (Porcine kidney): Tế bào thận lợn dòng 15;
- **Realtime RT-PCR** (Realtime - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Phản ứng sao chép ngược chuỗi trùng hợp thời gian thực;
- **ARN**: Axít ribonucleic;
- **SK-6** (Swine kidney 6): Tế bào thận lợn dòng 6;
- **TCID₅₀** (50 % tissue culture infective dose): Liều gây nhiễm 50 % tế bào.

4 Thuốc thử, vật liệu thử

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

4.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho lấy mẫu

- 4.1.1 Dung dịch aceton (100% aceton)**, dùng cố định mô;
- 4.1.2 Dung dịch Methanol (CH₃OH)**;
- 4.1.3 Natri clorua (NaCl)**;
- 4.1.4 Natri phosphat (Na₂HPO₄)**;
- 4.1.5 Dung dịch natri hydroxit (NaOH) 1 N**;
- 4.1.6 Dung dịch axit chlohydric (HCl) 1N**;
- 4.1.7 Dung dịch đệm phosphate glycerin**;
- 4.1.8 Các loại thuốc kháng sinh**: penicillin, streptomycin, polymycin (xem phụ lục A);
- 4.1.9 Cồn (Ethanol)**, từ 70 % đến 100 %;
- 4.1.10 Ống nghiệm sạch**, vô trùng và có chất chống đông EDTA;
- 4.1.11 Dung dịch muối đệm phát phát (PBS)**, pH 7,2 ± 0,2 (xem Phụ lục A);
- 4.1.12 Formaldehyde (CH₂O)**.

4.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho realtime RT-PCR

4.2.1 Bộ kit chiết tách ARN;**4.2.2 Bộ kit nhân gen;****4.2.3 Môi xuôi, môi ngược và đoạn dò;**

4.2.4 Mẫu chuẩn dương, được chứng nhận dương tính hoặc ARN chuẩn dương tính tách chiết từ vi rút dịch tả lợn có giá trị Ct đã biết trước.

4.3 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phân lập và miễn dịch huỳnh quang

4.3.1 Môi trường nuôi cấy tế bào: Hank's MEM, Eagle's MEM, Hank's BSS (xem phụ lục A);

4.3.2 Huyết thanh thai bê;**4.3.3 Tế bào thận lợn sơ cấp, tế bào dòng PK 15, SK-6;****4.3.4 Kháng thể dịch tả lợn đơn dòng;****4.3.5 Chất gắn kết dịch tả lợn (Kháng thể huỳnh quang dịch tả lợn) (FITC);****4.3.6 Vi rút dịch tả lợn gây bệnh trên lợn;****4.3.7 Vi rút dịch tả lợn chủng thuần hóa trên tế bào;****4.3.8 Đĩa 96 giếng, dùng cho nuôi tế bào.****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 Tủ lạnh: tủ lạnh thường (từ 0 °C đến 8 °C), tủ lạnh âm sâu (từ âm 20 °C đến âm 80 °C);

5.2 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2;

5.3 Thiết bị ủ mẫu, có thể duy trì ở nhiệt độ 37 °C;

5.4 Cân điện tử, có mức cân nhỏ nhất là 1/10000 g;

5.5 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2;

5.6 Máy ly tâm lạnh, có thể đạt gia tốc ly tâm 1500 g đến 2500 g, 10000 g và 12000 g;

5.7 Máy khuấy từ;

5.8 Máy lắc trộn;

5.9 Kính hiển vi đảo ngược (dùng soi tế bào);

5.10 Máy đọc ELISA, có thể đọc ở bước sóng từ 450 nm đến 650 nm;

5.11 Máy realtime PCR;

5.12 Máy chiết tách ADN/ARN tự động (nếu có);

5.13 Máy nghiền mẫu hoặc cối, chày sứ, panh, kéo, vô trùng;

5.14 Xy lanh và kim tiêm loại 18G;

5.15 Dụng cụ tiêu hao như: găng tay, khẩu trang, bảo hộ cá nhân.

5.16 Ống Leighton;

5.17 Lọ nuôi tế bào, loại T25, T75;

5.18 Đĩa nuôi tế bào, loại 96 giếng;

5.19 Lam kính/ lamen.

5.20 Kính hiển vi huỳnh quang;

5.21 Máy cắt mô lạnh;

5.22 Tủ ấm, nhiệt độ 37°C.

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 dịch tả lợn cổ điển chỉ xảy ra ở lợn. Bệnh có tính chất lây lan nhanh và lợn mắc ở mọi lứa tuổi, nhất là lợn con, tỷ lệ bệnh và chết cao, không có vùng dịch rõ ràng về mặt địa lý và bệnh mắc quanh năm không theo mùa. Bệnh có thể xuất hiện dưới nhiều dạng khác nhau: thể cấp tính, dưới cấp, mạn tính và thể ẩn. Đặc biệt thể mang trùng trên lợn nái là thể bệnh hết sức nguy hiểm về dịch tễ.

Lợn thường nhiễm CSFV ngoài tự nhiên qua đường mũi, miệng. Thời gian ủ bệnh từ 3 ngày đến 8 ngày, sau đó xuất hiện các triệu chứng như sốt cao trên 40 °C, suy nhược cơ thể, chán ăn, hay nghiến răng hoặc kêu rên khê, viêm kết mạc mắt có dử, giảm số lượng bạch cầu trong máu, lợn bị táo bón sau đó tiêu chảy phân thối khắm là các dấu hiệu đặc trưng của bệnh.

Bệnh dịch tả lợn cổ điển có đặc điểm là sung huyết dưới da hoặc tím tái và không có dấu hiệu lâm sàng đặc hiệu. Trong một số trường hợp các bệnh tích quan sát không đủ cơ sở kết luận bệnh do có thể nhầm lẫn với các trường hợp do dịch tả lợn Châu Phi, bệnh phó thương hàn do *Salmonella*, bệnh tụ huyết trùng do *Pasteurella*, bệnh viêm phổi do *Actinobacillus* và *Haemophilus suis* hay bệnh do PCV2, hội chứng PRRS.

6.2 Triệu chứng lâm sàng

Thời gian ủ bệnh từ 3 ngày đến 8 ngày, bệnh xuất hiện với các thể như sau:

- Thể quá cấp tính

Bệnh xuất hiện đột ngột, không có triệu chứng ban đầu (tiền chứng), con vật ủ rũ, bỏ ăn, sốt cao 40 °C đến 42 °C, con vật dầy dụa rồi chết nhanh. Diễn biến bệnh trong vòng 1 ngày đến 2 ngày, tỷ lệ chết lên đến 100 %.

- Thể cấp tính

Lợn ủ rũ, kém ăn, rồi bỏ ăn, sốt cao 41 °C đến 42 °C kéo dài đến lúc gần chết, mắt viêm đỏ có dử, chảy nước mũi, miệng có loét phủ bựa vàng ở lợi, chân răng, hầu; lợn thường bị ói mửa, thở khó. Lúc đầu táo bón sau đó tiêu chảy phân bết vào mông, đuôi mùi thối khắm đôi khi có máu tươi. Trên da có nhiều điểm xuất huyết lấm tấm ở tai, mõm, bụng và 4 chân. Vào cuối kỳ bệnh, lợn bị bại 2 chân sau đi loạng choạng hoặc không đi được. Nếu ghép với các bệnh khác thì các triệu chứng trên trầm trọng hơn.

- Thể mạn tính

Nếu thể cấp tính kéo dài con vật chuyển sang thể mạn tính. Con vật gầy còm lúc bị táo bón và lúc bị tiêu chảy, ho khó thở, da lưng sườn có những vết đỏ có khi loét ra từng mảng.

Bệnh tiến triển từ 1 tháng đến 2 tháng lợn chết do kiệt sức hoặc có thể khỏi nhưng gầy còm khó vỗ béo. Những con khỏi bệnh có thể miễn dịch nhưng nó là nguồn gieo rắc vi rút.

6.3 Bệnh tích

- Thể quá cấp tính

Bệnh tích không rõ, chỉ thấy niêm mạc viêm đỏ, thận xuất huyết, vùng vỏ hạch lâm ba sưng đỏ.

- Thể cấp tính

Có nhiều điểm xuất huyết ở niêm mạc, niêm mạc miệng lở viêm xuất huyết, có khi có mụn loét nông hay sâu, phủ chất bựa màu vàng trắng. Niêm mạc dạ dày sưng màu đỏ gạch, niêm mạc ruột nhất là van hồi manh tràng có những nốt loét, hạch lâm ba sưng tụ máu có màu đỏ sẫm.

Lách không sưng hoặc ít sưng nhưng có hiện tượng nhồi huyết, xuất huyết ở viền lách.

Thận xuất huyết ở lớp vỏ. Phổi viêm tụ máu có nhiều vùng bị gan hóa, hoại tử cứng lại. Màng phổi có những chỗ chấm đỏ xuất huyết.

- Thể mạn tính

Ruột viêm có mụn loét tròn hay các vết "loét hình cúc áo". Có khi thấy thành ruột già dày cứng lên, niêm mạc trở nên sần sùi. Phổi dính vào lồng ngực.

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: máu kháng đông, lách, hạch bạch huyết, hạch amidan, thận, dịch nổi tế bào sau khi phân lập vi rút để phát hiện vi rút. Mẫu bệnh phẩm là huyết thanh để phát hiện kháng thể kháng CSFV.

CHÚ THÍCH: Đối với máu chống đông dùng kim tiêm vô trùng 18G (5.14) lấy khoảng 5 ml máu của động vật đang sốt nghi mắc bệnh cho vào ống nghiệm có chất chống đông EDTA (4.1.10), lắc nhẹ.

Mẫu được bảo quản trong túi nylon hoặc lọ đựng bệnh phẩm vô trùng, tất cả được đặt trong thùng bảo ôn và vận chuyển trong điều kiện 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 đông băng từ âm 20 °C đến âm 80 °C. Huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C tối đa 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 khác).

7.1.2 Xử lý mẫu bệnh phẩm

Tạo huyền dịch 10% từ mẫu bệnh phẩm (lách, hạch amidan, hạch bạch huyết, thận của lợn) nghiền (5.13) trong dung dịch PBS (4.1.11) vô trùng (ví dụ: nghiền 1 g mẫu bệnh phẩm trong 9 ml dung dịch PBS (4.1.11)). Sau đó ly tâm huyền dịch 2500 g trong 15 phút bằng máy ly tâm (5.2.2). Thu dịch nổi để chẩn đoán phát hiện ASFV bằng phương pháp ELISA, realtime RT-PCR, RT-PCR hoặc phân lập vi rút.

7.2 Phát hiện kháng nguyên

7.2.1 Phương pháp ELISA

Sử dụng mẫu bệnh phẩm là huyền dịch nghiền từ mẫu bệnh phẩm (7.1.2) hoặc huyết thanh/huyết tương lợn nghi mắc bệnh. 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 realtime RT-PCR

7.2.2.1 Chiết tách ARN

- Sử dụng kit chiết tách ARN vi rút dịch tả lợn cổ điển theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ sử dụng kit chiết tách InviMAG Virus DNA/RNA Mini Kit/KF96¹⁾ của hãng Stratec. 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 Chuẩn bị môi và đoạn dò

- Chuẩn bị môi và đoạn dò cho phản ứng realtime RT-PCR: Trình tự môi và đoạn dò để phát hiện vi rút dịch tả lợn cổ điển tham khảo Bảng D.1 (xem Phụ lục D).

¹⁾ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện 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 thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

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

7.2.2.3 Tiến hành phản ứng realtime RT-PCR

- Sử dụng cặp mồi và đoạn dò với nồng độ thích hợp (tham khảo Bảng D.2, Phụ lục D) đã chuẩn bị (7.2.2.2) 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 bộ 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 thành phần master mix).
- Lượng hỗn hợp nhân gen dùng cho 1 phản ứng tham khảo Bảng D.2, Phụ lục D.
- Sau khi chuẩn bị xong nguyên liệu master mix tiến hành:
 - + Cho 20 µl 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 tách chiết vào ống PCR;
 - + Cho 5 µl ARN dương chuẩn của vi rút dịch tả lợn cổ điển có giá trị Ct đã biết trước vào ống PCR đối chứng dương;
 - + Đặt ống PCR vào máy realtime PCR (5.11).

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 D.3, phụ lục D.

7.2.2.4 Đọc kết quả

- Kết quả của phản ứng realtime RT-PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).
- Phản ứng được công nhận: 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 < 40
- + Mẫu âm tính khi không có giá trị Ct
- + Mẫu nghi ngờ khi giá trị $40 \leq Ct \leq 45$

²⁾ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện 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 thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

- Đánh giá kết quả: Mẫu có vi rút dịch tả lợn cổ điển 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

7.2.3.1 Chuẩn bị tế bào

Tách tế bào một lớp (thận lợn sơ cấp, PK-15, SK-6 (4.3.3)) bằng trypsin 0,05 % (4.3.9) khoảng từ 5 đến 10 phút ở nhiệt độ 37 °C. Cho môi trường phát triển (dung dịch Eagle' MEM (4.3.1) chứa 5 % huyết thanh thai bê (4.3.2)) vào trộn đều, ly tâm 160 g trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, hòa tan tế bào với một lượng môi trường phát triển sao cho đạt mật độ 2×10^6 tế bào/ml môi trường phát triển và bổ sung dung dịch kháng sinh/Glutamin (xem Phụ lục A) (0,2 ml dung dịch kháng sinh/ Glutamin trong 10 ml huyền dịch tế bào).

7.2.3.2 Gây nhiễm tế bào

- Trộn huyền dịch bệnh phẩm đã xử lý (7.1.2) với huyền dịch tế bào theo tỷ lệ 1/10, rồi nuôi cấy trong ống Leighton (5.16) có sẵn lamên (5.19) hoặc trong các lọ nuôi tế bào (5.17) hay đĩa nuôi tế bào (5.18). Ủ ở 37 °C.
- Thu hoạch huyền dịch tế bào sau từ 24 giờ đến 72 giờ gây nhiễm, giám định vi rút bằng phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên hoặc phương pháp realtime RT-PCR.

7.2.4 Phương pháp miễn dịch huỳnh quang

7.2.4.1 Chuẩn bị mẫu

- Chuẩn bị mẫu: Dùng máy cắt mô lạnh (5.21) cắt các mô bệnh phẩm (amidan, lách, hạch) thành những lát mỏng từ 2 µm đến 5 µm đặt lên lam kính (5.19), mỗi phiến từ 2 lát đến 3 lát. Dùng bút đánh dấu ký hiệu mẫu lên lam kính. Thực hiện tương tự đối với các mô đối chứng dương tính và âm tính.
- Để tiêu bản khô tự nhiên
- Nếu không có máy cắt mô lạnh thì dùng phương pháp in tổ chức: dùng dao sắc mỏng cắt đứt khoát một nhát trên miếng tổ chức (amidan, lách, hạch), dùng panh nhọn gấp miếng tổ chức thấm trên giấy lọc cho đến hết máu, ấn nhẹ mặt cắt tổ chức lên lam kính, dùng bút đánh dấu ký hiệu mẫu lên lam kính, để khô tự nhiên.

7.2.4.2 Chuẩn bị mẫu thử trên môi trường tế bào

- Mẫu huyền dịch từ mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị (7.1.2) được lọc qua màng lọc 0.45 µm.
- Cấy mẫu huyền dịch lên tế bào thận lợn (4.3.3) đã chuẩn bị sẵn trong ống nghiệm Leighton có lamên, mỗi mẫu bệnh phẩm cấy 2 ống đến 4 ống.
- Khi cấy bệnh phẩm 24 giờ đến 48 giờ, lấy lamên ra, để khô tự nhiên và chờ tiến hành các bước sau.

CHÚ THÍCH: Khi cấy bệnh phẩm lên tế bào cần có 2 ống đối chứng tế bào khỏe, 2 ống đối chứng nhiễm CSFV. Đánh dấu các ống tế bào.

7.2.4.3 Cố định tiêu bản

- Các tiêu bản đã được chuẩn bị ở 7.2.4.1 đem cố định bằng dung dịch aceton (4.1.1).
- Đặt các lam kính đã chuẩn bị ở trên vào cốc nhuộm, đổ dung dịch aceton (4.1.1) vào. Các lá kính chuẩn bị ở 7.2.4.2 thì để nguyên trong ống Leighton, đổ bỏ môi trường cho dung dịch aceton (4.1.1) vào cố định, để ở âm 20 °C trong 1 giờ hoặc ở 37 °C trong 30 phút. Sau đó lấy tiêu bản ra để khô tự nhiên.

7.2.4.4 Nhuộm mẫu thử

- Dùng chất gắn kết dịch tả lợn (FITC) (4.3.5) đã pha loãng ở nồng độ sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất nhỏ lên các lam kính hoặc lamén đã gắn bệnh phẩm đảm bảo thuốc nhuộm phủ kín các mô/tế bào. Đặt các lam kính, lamén kính vào khay ẩm (giữ cho bề mặt luôn ướt trong suốt quá trình nhuộm) của tủ ẩm (5.22) ở nhiệt độ 37 °C trong 30 phút.
- Sau khi lấy ở tủ ẩm ra, đổ bỏ chất gắn kết, rửa các tiêu bản qua dung dịch đệm PBS (4.1.11): đặt tiêu bản vào cốc có rãnh, đổ ngập dung dịch PBS vào ngâm rửa 2 lần đến 3 lần, mỗi lần 5 phút. Cuối cùng tráng lại bằng nước cất hai lần.
- Đặt nghiêng tiêu bản trên giấy lọc hoặc thấm nhẹ cho khô
- Nhỏ một giọt dung dịch đệm glycerin lên phiến kính tiêu bản rồi đặt lá kính lên hoặc nhỏ 1 giọt dung dịch đó lên phiến kính sạch rồi đặt lá kính lên.

7.2.4.5 Đọc kết quả

- Dùng kính hiển vi huỳnh quang (5.20) lần lượt đọc các mẫu từ đối chứng đến các mẫu bệnh phẩm.

CHÚ THÍCH: Kháng nguyên vi rút dịch tả lợn không có cấu trúc rõ ràng, huỳnh quang dương tính (+) là những đám phát quang màu xanh lá cây (nhuộm bằng FITC) ở nguyên sinh chất. Khi sử dụng phương pháp nhuộm huỳnh quang nhất thiết phải có đối chứng.

- Các đối chứng trong phương pháp huỳnh quang:
 - + Đối chứng âm tính (-): tiêu bản tế bào thận lợn hoặc hạch, lách lợn khỏe mạnh nhuộm chất gắn kết. Kết quả không phát quang.
 - + Đối chứng dương tính (+): tiêu bản có vi rút dịch tả lợn dương tính nhuộm chất gắn kết. Kết quả có phát quang sáng rõ từng đám ở những nguyên sinh chất có vi rút dịch tả lợn cổ điển.
 - + Đối chứng miễn dịch đặc hiệu: tiêu bản bệnh phẩm sau khi cố định dung dịch aceton được nhỏ 1 giọt kháng huyết thanh dịch tả lợn cổ điển đặc hiệu, để ở 37 °C trong 30 phút. Đổ bỏ huyết thanh, rửa bằng PBS trước khi gắn chất gắn kết. Kết quả tiêu bản không phát quang hoặc phát quang yếu hơn.
- Đọc và trả lời kết quả theo Bảng 1.

Bảng 1 - Cách đọc kết quả

Các tiêu bản	Kết quả huỳnh quang	Kết luận
Bệnh phẩm	Có	Có vi rút dịch tả lợn
Bệnh phẩm	Không	Không có vi rút dịch tả lợn

7.3 Phát hiện kháng thể

Phát hiện kháng thể dịch tả lợn cổ điển có ý nghĩa chẩn đoán đối với lợn ốm có triệu chứng của bệnh dịch tả lợn cổ điển và chưa từng tiêm phòng, hoặc nhiễm vi rút dịch tả lợn từ trước.

7.3.1 Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể

Sử dụng kit ELISA phát hiện kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành tham khảo Phụ lục E.

7.3.2 Phương pháp trung hòa kháng thể dịch tả lợn trên môi trường tế bào

Ngoài mục đích chẩn đoán bệnh, phương pháp phát hiện kháng thể bằng phương pháp trung hòa trên tế bào còn có ý nghĩa đánh giá hiệu giá kháng thể sau tiêm phòng vắc xin CSF. Phương pháp này để xác định hàm lượng kháng thể có trong huyết thanh nhờ sự ức chế của kháng thể đối với CSFV được gây nhiễm trên tế bào.

Các bước tiến hành tham khảo Phụ lục F.

8 Kết luận

Lợn được xác định mắc bệnh dịch tả lợn khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng của bệnh dịch tả lợn 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 realtime RT-PCR phát hiện vi rút dương tính.
- Phân lập được vi rút trên môi trường tế bào, và giám định vi rút dịch tả lợn dương tính.
- Phương pháp miễn dịch huỳnh quang dương tính.
- Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể dương tính ở lợn chưa tiêm phòng.
- Phương pháp trung hòa trên tế bào dương tính (chỉ áp dụng đối với lợn chưa tiêm phòng trong trường hợp chẩn đoán).

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị môi trường, dung dịch thuốc thử**A.1 Dung dịch Glutamin/kháng sinh 100 lần (100 X)**

- Dung dịch A:

Thành phần:	Glutamin	2,92 g
	Nước cất hai lần	50 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên rồi lọc qua màng lọc có kích thước 0,45 µm.

- Dung dịch B:

Thành phần:	Penicillin	1000000 UI
	Streptomycin	1g
	Mycostatin	500000 UI
	Polymicin	150000 UI
	Kanamycin	1 g
	Nước cất hai lần	10 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên bằng cách lắc đều.

- Dung dịch C:

Thành phần: Dung dịch A, dung dịch B và nước cất hai lần.

Cách chuẩn bị: Hòa tan 50 ml dung dịch A, 10 ml dung dịch B và 40 ml nước cất hai lần và đem bảo quản ở âm 20 °C.

A.2 Dung dịch muối đệm Hank's (BSS) hoặc môi trường Hank's MEM

Pha theo chỉ dẫn của hãng sản xuất. Sau đó, hấp vô trùng 121 °C trong thời gian 15 phút và bảo quản ở 4 °C.

A.3 Môi trường nuôi cấy tế bào Eagle's MEM

Thành phần:	Môi trường Eagle's MEM	9,4 g
	Nước cất hai lần	1000 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Sau đó, hấp vô trùng 121 °C trong thời gian 15 phút và bảo quản ở 4 °C.

A.4 Dung dịch Trypsin 0,5 % (10 X)

Thành phần:	Trypsin 1:250	5g
	Nước cất hai lần	1000 ml.

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên, khuấy đều bằng cá từ và để qua đêm ở 4 °C. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C. Trước khi dùng pha loãng với nước cất hai lần vô trùng để được 0,05%.

A.5 Dung dịch muối đệm phát pH ~ 7,2 (PBS).

Thành phần

Natri clorua (NaCl)	8,0 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Natri hydrophosphat (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g
Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Cách chuẩn bị

Hòa tan natri clorua, kali clorua, natri hydrophosphat và kali dihydrophosphat trong 1000 ml nước cất. Chỉnh pH trong khoảng 7,2 ± 0,2. Hấp 121 °C trong thời gian 15 phút, chia nhỏ và bảo quản ở 4 °C trong khoảng 3 tháng.

GHI CHÚ: Có thể sử dụng PBS thương mại và chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

A.6 Dung dịch đệm glycerin pH ~ 8,3

Thành phần:	Natri dihydrocacbonat (NaHCO ₃)	0,0715 g
	Dinatri cacbonat (Na ₂ CO ₃)	0,00160g
	Nước cất vô trùng	10 ml
	Glycerin vừa đủ	100 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Bảo quản ở nhiệt độ 4 °C, dùng khi đọc huỳnh quang.

A.7 Cơ chất AEC (Amino Ethyl Carbazole)

Thành phần:	Amino Ethyl Carbazole	2 mg
	N, N-DiMethyl Formamide DMF	500 µl
	0.05 M Acetate Buffer	9,5 ml
	30% Hydrogen Peroxide H ₂ O ₂	5 µl

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên, dùng ngay sau khi pha.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên vi rút dịch tả lợn

Hiện nay có nhiều kit ELISA phát hiện kháng nguyên vi rút dịch tả lợn khác nhau được cung cấp trên thị trường. Ví dụ, sử dụng kit IDEXX CSFV Ag serum plus của hãng IDEXX Cat.no: 99-40939³⁾ thì các bước được thực hiện như sau:

B.1 Chuẩn bị

Tất cả nguyên liệu được để ra ngoài nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 25 °C) và lắc đều trước khi sử dụng.

- Chuẩn bị pha loãng mẫu xét nghiệm: Mẫu huyết thanh hoặc huyết tương xét nghiệm và mẫu đối chứng được pha loãng 1/2. Thay đổi đầu tip cho mỗi mẫu, ghi lại ký hiệu mẫu theo sơ đồ bố trí phản ứng trên đĩa và phải lắc đều mẫu trước khi pha loãng.

- Chuẩn bị nước rửa: Lắc đều dung dịch nước rửa có nồng độ đậm đặc 10 lần để hòa tan hết một vài thành phần muối. Pha loãng 1/10 từ dung dịch đậm đặc 10 lần với nước cất hai lần trước khi sử dụng.

B.2 Thực hiện phản ứng

- Cho 50 µl dung dịch kháng thể phát hiện (Detection antibodies) vào từng giếng.

- Cho 50 µl mẫu đối chứng âm vào giếng A1, B1.

- Cho 50 µl mẫu đối chứng dương vào giếng C1, D1.

- Cho 50 µl mẫu xét nghiệm vào từng giếng tương ứng với sơ đồ xét nghiệm. Lắc đều đĩa.

- Ủ 2 giờ ở 37 °C hoặc ủ qua đêm (12 giờ đến 18 giờ) ở 2 °C đến 8 °C. Dán kín đĩa để tránh bay hơi.

- Sau khi kết thúc giai đoạn ủ, rửa đĩa 5 lần với nước rửa. Mỗi giếng rửa với khoảng 300 µl nước rửa. Làm sạch nước rửa có trong giếng sau khi rửa. Tránh làm khô đĩa trước khi bổ sung conjugate.

- Cho 100 µl dung dịch conjugate vào tất cả các giếng phản ứng.

- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng 18 °C đến 25 °C.

- Sau khi kết thúc giai đoạn ủ, rửa đĩa 5 lần với nước rửa.

- Cho 100 µl dung dịch TMB vào tất cả các giếng phản ứng.

- Ủ 10 phút ở nhiệt độ 18 °C đến 25 °C.

- Cho 100 µl dung dịch Stop vào tất cả các giếng phản ứng.

³⁾ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện 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 thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 8400-47:2019

- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA (5.10)
- Tính toán kết quả.

B.3 Kết quả

- Đánh giá kết quả

Kết quả có giá trị khi hiệu giữa giá trị OD trung bình mẫu đối chứng dương và trung bình mẫu đối chứng âm phải lớn hơn hoặc bằng 0,150. Ngoài ra, giá trị OD trung bình mẫu đối chứng âm phải nhỏ hơn hoặc bằng 0,250.

Đối với các kết quả không hợp lệ, khảo nghiệm phải được lặp lại.

Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên dịch tả lợn trong mẫu được xác định bởi giá trị OD (SN) cho mỗi mẫu.

- Phân tích kết quả

Trung bình mẫu đối chứng âm: $NC = (\text{giếng A1} + \text{giếng B1})/2$

Trung bình mẫu đối chứng dương: $PC = (\text{giếng C1} + \text{giếng D1})/2$

Mẫu xét nghiệm ($S - NC$): $S - NC = \text{mẫu} - NC$

- Giải thích kết quả

Nếu mẫu có giá trị $(S - NC) \leq 0,300$: mẫu âm tính với CSFV.

Nếu mẫu có giá trị $(S - NC) > 0,300$: mẫu dương tính và cần được xác nhận với một thử nghiệm cụ thể CSFV để xác định BVD, BVDV hay CSFV.

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 thì các bước được thực hiện như sau:

B.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 ADN/ARN sau khi tách chiết được sử dụng trực tiếp từ ống gốc của bộ kit.

B.2 Tiến hành chiết tách 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 trộn đều.
- Ly tâm lắng (5.2.4) để kéo các phần bám trên nắp ống eppendorf xuống.
- Đặt 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.
- Chuẩn bị các đĩa 96 giếng sâu và đĩa 96 thu hồi ADN/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: mỗi giếng 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 ADN/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.

TCVN 8400-47:2019

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

Phụ lục D

(Tham khảo)

Phương pháp realtime RT-PCR để phát hiện vi rút dịch tả lợn**Bảng D.1 - Trình tự mồi và đoạn dò**

Mồi và đoạn dò	Trình tự (5'-3')
Theo Risatti	
Mồi xuôi CSFV	CCCTGGGTGGTCTAAG
Mồi ngược CSFV	CATGCCCTCGTCCAC
Đoạn dò CSFV	FAM-CCTGAGTACAGGACAGTCGTCAGTAGTT-TAMRA
Theo Hoffmann	
Mồi xuôi CSFV	ATGCCAYAGTAGGACTAGCA
Mồi ngược CSFV	CTACTGACGACTGTCCTGTAC
Đoạn dò CSFV	FAM-TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT-TAMRA

Bảng D.2 - Thành phần phản ứng realtime RT-PCR

STT	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
1	Nước không có RNase và DNase		5,5
2	Dung dịch đệm 2X		12,5
3	Mồi xuôi CSFV	20	0,5
4	Mồi ngược CSFV	20	0,5
5	Đoạn dò CSFV	6	0,5
6	Enzyme Mix		0,5
7	Mẫu chiết tách (ARN)		5
Tổng thể tích cho 1 phản ứng:			25

Bảng D.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	15 giây	45
60	45 giây (ghi nhận tín hiệu quang)	
CHÚ THÍCH: Nhiệt độ và thời gian (*) chỉ phù hợp với kitSuperScript ® III Platinum ® One step Quantitative RT-PCR system, Cat. No.: 11732-020 của hãng Invitrogen.		

PHỤ LỤC E

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể vi rút dịch tả lợn

Hiện nay có nhiều kit ELISA phát hiện kháng thể vi rút dịch tả lợn khác nhau được cung cấp trên thị trường. Ví dụ, sử dụng kit Priocheck® CSFV Ab 2.0. CSFV antibody test kit ⁴⁾ của Prionics Thermo Fisher Scientific thì các bước được thực hiện như sau:

E.1 Chuẩn bị

Để tất cả nguyên liệu ra ngoài nhiệt độ phòng (18 °C đến 25 °C) và lắc đều trước khi sử dụng.

Chuẩn bị nước rửa: Lắc đều dung dịch nước rửa có nồng độ đậm đặc 200 lần để hoà tan hết một vài thành phần muối. Pha loãng 1/200 từ dung dịch đậm đặc 200 lần với nước cất hai lần trước khi sử dụng.

E.2 Thực hiện phản ứng

- Cho 20 µl dung dịch pha loãng mẫu vào tất cả các giếng theo sơ đồ xét nghiệm.
- Cho 80 µl mẫu đối chứng âm vào giếng A1, B1.
- Cho 80 µl mẫu đối chứng dương yếu vào giếng C1, D1.
- Cho 80 µl mẫu đối chứng dương mạnh vào giếng E1, F1.
- Cho 80 µl mẫu xét nghiệm vào các giếng còn lại theo sơ đồ.
- Dán kín đĩa.
- Lắc đều đĩa.
- Ủ 60 phút ± 5 phút ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C.
- Sau khi kết thúc giai đoạn ủ, rửa đĩa 6 lần với nước rửa.
- Cho 100 µl dung dịch Conjugate vào tất cả các giếng phản ứng.
- Dán kín đĩa.
- Ủ 30 phút ± 1 phút ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C.
- Sau khi kết thúc giai đoạn ủ, rửa đĩa 6 lần với nước rửa.
- Cho 100 µl dung dịch TMB vào tất cả các giếng phản ứng.
- Ủ 20 phút ± 1 phút ở nhiệt độ 22 °C ± 3 °C.
- Cho 100 µl dung dịch Stop vào tất cả các giếng phản ứng.

⁴⁾ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện 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 thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA (5.10).
- Tính toán kết quả.

E.3 Kết quả

- Tính giá trị trung bình 450 nm của đối chứng âm (giếng A1 và B1). Đây chính là giá trị OD max.
- Tính phần trăm ức chế (PI) của đối chứng dương yếu và đối chứng dương mạnh trong đĩa phản ứng và giá trị PI của mẫu xét nghiệm được tính theo công thức như sau:

$$PI = 100 - ((\text{Giá trị OD}_{450} \text{ của mẫu} / \text{OD}_{450} \text{ max}) \times 100)$$

- Đánh giá kết quả

Phản ứng có giá trị khi:

- + Giá trị OD trung bình của đối chứng âm phải lớn hơn 1,0 (ODmax > 1,0).
- + PI của mẫu đối chứng dương yếu phải lớn hơn 50 % (PI > 50 %).
- + PI của mẫu đối chứng dương mạnh phải lớn hơn 80 % (PI > 80 %).

Phản ứng không chấp nhận nếu không đạt các giá trị nêu trên.

- Phân tích kết quả

Nếu giá trị PI < 40 %: mẫu không có kháng thể đặc hiệu với vi rút dịch tả lợn.

Nếu giá trị PI ≥ 40 %: mẫu có kháng thể đặc hiệu với vi rút dịch tả lợn.

PHỤ LỤC F

(Tham khảo)

Phương pháp trung hòa kháng thể dịch tả lợn trên môi trường tế bào (phản ứng NPLA)

F.1 Chuẩn bị

- Huyết thanh cần xét nghiệm đầu tiên phải được bất hoạt ở 56°C trong 30 phút.
 - Pha loãng huyết thanh cần xét nghiệm với môi trường MEM (4.3.1) có chứa 5 % FBS (4.3.2) theo bậc 2 bắt đầu từ 1/4 (độ pha loãng huyết thanh cuối cùng là 1/8). Kể cả huyết thanh đối chứng dương và âm.
 - Cho 50 µl huyết thanh đã pha loãng vào đĩa tế bào 96 giếng (4.3.8), mỗi nồng độ 2 giếng.
- LƯU Ý: Cần có huyết thanh đối chứng dương và âm để kiểm soát phản ứng.
- Cho 50 µl vi rút dịch tả lợn cổ điển (4.3.7) ở nồng độ 200 TCID₅₀ / 50 µl được pha trong môi trường MEM (4.3.1) có chứa 5 % FBS (4.3.2) vào tất cả các giếng.
 - Ủ đĩa trong tủ ấm (5.22) ở 37°C trong 1 giờ.
 - Cho 100 µl 3×10^4 tế bào PK 15/ml pha trong môi trường MEM (4.3.1) có chứa 5 % FBS (4.3.2) vào tất cả các giếng.
 - Vi rút dịch tả lợn cổ điển (4.3.7) ở nồng độ 100 TCID₅₀ / 50 µl phải được chuẩn độ lại và ủ cùng với đĩa trung hoà.
 - Ủ đĩa trong tủ ấm (5.22) ở 37 °C và 5% CO₂ trong 3 ngày đến 4 ngày.
 - Cố định tế bào: Đổ bỏ môi trường trong đĩa và rửa đĩa bằng dung dịch đệm PBS có 1 % Tween 80 từ 2 đến 3 lần (200 µl/giếng). Cho vào mỗi giếng 100 µl dung dịch cố định PBS có 1 % Tween 20, 10 % formaline, 1 % NP 40. Ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút.
 - Rửa đĩa 3 lần bằng PBS có 1 % Tween 80.
 - Cho 50 µl kháng thể dịch tả lợn đơn dòng (4.3.4) đã được pha loãng theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong PBS vào mỗi giếng, ủ 37 °C trong 30 phút.
 - Rửa đĩa 3 lần bằng PBS có 1 % Tween 80.
 - Cho 50 µl kháng thể thứ cấp (Anti-pig IgG peroxidase conjugate hoặc Anti-mouse HRPO conjugate) đã được pha loãng theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong PBS vào mỗi giếng, ủ 37 °C trong 30 phút.
 - Rửa đĩa 3 lần bằng PBS có 1 % Tween 80.
 - Cho 50 µl cơ chất ACE vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng từ 15 đến 30 phút.

F.3 Đọc kết quả

- Quan sát đĩa bằng kính hiển vi soi ngược.
- Nguyên sinh chất của tế bào bắt màu đỏ đậm (màu của ACE), kết luận không có kháng thể.

- Nguyên sinh chất của tế bào không bắt màu, kết luận có kháng thể.

Tính hiệu giá kháng thể trung hòa của mẫu huyết thanh:

- Độ pha loãng của huyết thanh phải chuyển về $\log_{10}$ (huyết thanh pha loãng $1/X$, lấy $\log_{10}$ của X) để đưa vào công thức Karber (1931).

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

Với: a: độ pha loãng huyết thanh cao nhất có ít nhất một giếng có bắt màu.

$\sum r_i$: tổng số giếng không có bắt màu trong các độ pha loãng có ít nhất một giếng có bắt màu.

n: số giếng sử dụng cho một độ pha loãng

F.4 Điều kiện để chấp nhận kết quả

- Một xét nghiệm có giá trị và kết quả chấp nhận nếu đối chứng và nồng độ của vi rút nằm trong khoảng chấp nhận:

+ Hiệu giá của mẫu đối chứng huyết thanh âm tính có hiệu giá nhỏ hơn $1/8$.

+ Hiệu giá của mẫu đối chứng huyết thanh dương tính có giá trị tương đương với giá trị đã biết (± 1 độ pha loãng).

+ Hiệu giá chuẩn độ lại vi rút (200TCID_{50}) phải nằm trong khoảng $\log_{10} 1,5 - 2,5$.

- Mẫu huyết thanh được xem là dương tính nếu nồng độ trung hòa vi rút lớn hơn hoặc bằng $1/8$. Tất cả các mẫu được cho là dương tính trong trường hợp xét nghiệm lặp lại được xác định là dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OIE (Office International des Epizooties), 2014. *Classical Swine Fever (Infection with Classical Swine Fever)*. Chapter 2.8.3. Terrestrial Manual
- [2] AAHL (Australian Animal Health Laboratory) Regional Programme, 2011. *CSFV TaqMan Assays*. Nucleic acid detection for disease diagnosis and emergency disease investigation.
- [3] Chi cục Thú y vùng VI, 2017, *Quy trình phát hiện kháng nguyên Dịch tả lợn bằng kỹ thuật ELISA*.
- [4] Chi cục Thú y vùng VI, 2017, *Quy trình phát hiện kháng thể Dịch tả lợn bằng kỹ thuật ELISA*.
- [5] Chi cục Thú y vùng VI, 2017, *Quy trình phát hiện vi rút gây bệnh Dịch tả lợn (CSFV) bằng kỹ thuật realtime RT-PCR*.
- [6] Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirrmeyer H. and Depner K., 2005, *Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever*. J. Virol. Methods 130:36–44
- [7] Risatti G.R., Callahan J.D., Nelson W.M. and Borca M.V., 2003, *Rapid detection of Classical swine fever virus by a portable Real-Time PCR reverse transcriptase PCR assay*. Journal of clinical microbiology 41(1): 500-505