

TCVN 8400-25:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 25: BỆNH CÚM LỢN**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 25: Swine influenza

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-25:2014 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 25: Bệnh cúm lợn

Animal diseases - Diagnostic procedure – Part 25: Swine influenza

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 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.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh cúm lợn do vi rút A, subtype H1N1, H3N2 gây ra đối với lợn ở mọi lứa tuổi.

2 Thuật ngữ, định nghĩa và chữ viết tắt

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và những chữ viết tắt sau:

2.1 Thuật ngữ, định nghĩa

Bệnh cúm lợn (influenza swine disease) là bệnh truyền nhiễm do vi rút cúm type A, subtype H1N1 và/hoặc H3N2, thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra cho lợn ở mọi lứa tuổi nhưng bệnh xảy ra nhiều nhất ở lợn từ 1 tuần tuổi đến 5 tuần tuổi, với biểu hiện là gây chết nhanh và xuất huyết nặng ở khí quản, phổi.

2.2 Chữ viết tắt

- Realtime-RT PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction): Phản ứng PCR.
- HA (Haemagglutination): Phản ứng ngưng kết hồng cầu.
- HI (Haemagglutination inhibition): Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu.
- ELISA (Enzymed linked immunosorbent assay): Phản ứng ELISA.

- MDCK cell (Madin-Darby Canine Kidney cell):	Tế bào thận chó
- CPE (Cytopathic effect):	Bệnh tích tế bào
- FCS (Fetal calf serum):	Huyết thanh thai bê
- EMEM (Eagle's Minimun Essential Medium):	Môi trường nuôi dưỡng tế bào Eagle
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid):	Ethylenediamin tetraaxetic axit
- TPCK (Tosylphenylalanychloromethane):	Enzym kích hoạt vi rút phát triển
- RDE (Receptor Destroying Enzyme):	Enzym chống ức chế giả
- PBS (Phosphate Buffered Saline):	Dung dịch đệm phosphat

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết, sử dụng nước cất hai lần, nước đã được khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Natri hydroxit (NaOH) 1 M.

3.2 Axit clohidric (HCl) 1 M.

3.3 Etanol 70 %.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm sinh học và cụ thể như sau:

4.1 Cối, chày sứ.

4.2 Pipet, có đầu tip các cỡ 30 µl, 200 µl và 1000 µl sử dụng cho micropipet (có lọc và không lọc).

4.3 Đĩa 96 giếng đáy chữ V hoặc chữ U.

4.4 Kính hiển vi đảo ngược

4.5 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở gia tốc 500 g, 900 g, 100 g và 8 000 g.

4.6 Máy lắc ống (vortex mixer).

4.7 Máy Realtime RT-PCR hoặc máy PCR.

4.8 Tủ ấm có chứa 5 % CO₂, duy trì được ở 37 °C.

4.9 Xi lanh, dung tích 1 ml và 5 ml.-

4.10 Ống effendorf, dung tích 1,5 ml.

4.11 Chai nuôi tế bào 75 cm².

4.12 Màng lọc, có kích thước lỗ lọc là 0,45 µm.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tế

Cúm lợn là một bệnh hô hấp cấp tính ở lợn có tính lây truyền nhanh. Tỷ lệ mắc thường cao, tỷ lệ tử vong thấp (từ 1% đến 4%). Vi rút lây truyền qua đường không khí hoặc qua tiếp xúc (trực tiếp hoặc gián tiếp). Lợn có thể mang mầm bệnh mà không có triệu chứng. Bệnh có thể xảy ra quanh năm nhưng chủ yếu vào mùa thu và mùa đông và ở lợn từ 4 đến 6 tuần tuổi.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Thể cấp tính: Bệnh có các triệu chứng ho, ho co giật từng cơn, hắt hơi, chảy nước mắt nước mũi, khó thở, biếng ăn, sốt từ 40,5 °C đến 42,5 °C kéo dài 4 ngày đến 5 ngày liền.

Thể mãn tính: Bệnh có triệu chứng ho nhẹ, con vật chậm lớn, đàn con phát triển không đồng đều.

Bệnh cúm lợn rất dễ lây truyền do tiếp xúc trực tiếp giữa lợn khỏe mạnh và lợn bị bệnh qua đường hô hấp chủ yếu qua mồm và do hít thở không khí có chứa vi rút.

5.1.3 Bệnh tích

Thể cấp tính: Bệnh tích thường thấy là viêm phế quản, phổi hoặc viêm rải rác các thùy phổi, tập trung ở một khối thùy. Ở lợn con bú mẹ hoặc lợn con cai sữa có bệnh tích viêm phổi cata, vùng viêm sưng cứng, có tổ chức phổi chắc, màu nâu hoặc xám mặt cắt ướt. Cắt phế quản, tiểu phế quản và bóp thấy chảy ra dịch đục dính, màu đỏ hoặc xám, phế quản và phế nang chứa tương dịch.

5.1.4 Bệnh tích vi thể

Xung quanh phế quản và mạch quản có thâm nhiễm tế bào như lâm ba cầu, bạch cầu đa nhân trung tính. Bệnh tích cũ thấy có những ổ casein (bã đậu), mủ, tạo hốc do tác động của tập khuẩn kế phát.

Thể mạn tính: Lợn bị bệnh vùng phổi bị viêm có giới hạn rõ ràng với vùng phổi khỏe, ở lợn con bú mẹ có triệu chứng hạch phế quản sưng. Ngoài ra, có bệnh tích viêm dạ dày, sưng hạch màng treo ruột.

5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

- Lấy 5 gam đến 10 gam não, mô phổi, dịch mũi (swab), máu của lợn nghi mắc bệnh.

CHÚ THÍCH:

+ Mẫu tổ chức được lấy ngay sau khi mổ khám và được đựng vào lọ hoặc túi nilon sạch. Mẫu Swab là tăm bông lấy dịch mũi được để và trong dung dịch bảo quản ((PBS+ glycerol theo tỉ lệ 1:1) + 1% dung dịch kháng sinh đậm đặc (Xem A1 phụ lục A))

+ Chỉ lấy mẫu máu của lợn chưa được tiêm phòng vaccin cúm để xét nghiệm kháng thể.

- Tất cả các mẫu phải được dán nhãn và kèm theo các thông tin dịch tễ, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích (nếu mổ khám) của bệnh.

- Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C và gửi đến phòng thí nghiệm càng sớm càng tốt, chậm nhất là 24h và có kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm.

5.2.2 Phát hiện kháng nguyên

5.2.2.1 Xử lý bệnh phẩm

Mẫu xét nghiệm kháng nguyên:

+ Mẫu bệnh phẩm là mô phổi, não được nghiền nát bằng cối chày sứ (Xem 4.1), bổ sung dung dịch PBS pH~7,2 (Xem A.3 phụ lục A) vào, để thu được huyền dịch 1/10 (1g phủ tạng + 900µl PBS pH~7,2, ly tâm (Xem 4.5) ở gia tốc 900 g trong thời gian 10 min). Thu phần dịch nổi phía trên, xử lý vô trùng bằng cho thêm dung dịch kháng sinh đậm đặc (Xem A.1 phụ lục A) theo tỉ lệ 0,1 ml kháng sinh + 10 ml huyền dịch bệnh phẩm, để ở nhiệt độ phòng trong 30 min hoặc có thể xử lý vô trùng huyền dịch bệnh phẩm bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm (Xem 4.12).

+ Mẫu bệnh phẩm là tăm bông ngoáy dịch mũi để trong 2ml dung dịch PBS (Xem A.3 phụ lục A), lắc (Xem 4.6) đều và li tâm (Xem 4.5) ống đựng huyền dịch ở gia tốc 900 g trong thời gian 10 min, thu huyền dịch ở trên.

Mẫu xét nghiệm kháng thể: Sử dụng xy lanh 5 ml (Xem 4.9) để lấy 1 ml máu lợn. Sau khi lấy, rút cán xy lanh tới mức cao nhất để tạo nhiều khoảng trống bên trong, đặt xy lanh nằm nghiêng 5° ở nhiệt độ từ 20 đến 30°C trong thời gian 30 min để máu tự đông lại và tiết ra huyết thanh. Chắt huyết thanh sang ống 1,5 ml (Xem 4.10) mới để dùng cho xét nghiệm.

Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C cho đến khi xét nghiệm.

5.2.2.2 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp Realtime-RT PCR

Bảng 1: Trình tự mồi - mẫu dò phát hiện gen M, H1, H3, N1, N2 của vi rút cúm lợn

Gen đích	Cặp mồi và mẫu dò	Trình tự 5'-3'
M 100 base pairs*	Mồi xuôi	5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'
	Mồi ngược	5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3'
H1 102 base pairs*	Mồi xuôi	5'-AAT AAT TCA ACY GAC ACT G-3'
	Mồi ngược	5'-GTT TAC ATA GTT TYC CRT-3'
	Mẫu dò	TXRED-AAG AAT GTA ACM GTA ACA CAC TCT G-BHQ2
H3 244 base pair*	Mồi xuôi	5'-AAA TTG AAG TGA CTA ATG CTA C-3'
	Mồi ngược	5'-TGA GGC AAC TAG TGA CCT AAG-3'
	Mẫu dò	FAM-CAA CAG GTA GAA TAT GCG ACA GTC C-TAMRA
N1 267 base pairs*	Mồi xuôi	5'-GTA ATG GTG TTT GGA TAG GAA G-3'
	Mồi ngược	5'-ATG CTG CTC CCA CTA GTC CAG-3'
	Mẫu dò	FAM-TGA TTT GGG ATC CTA ATG GAT GGA CAG-TAMRA
N2 233 base pairs*	Mồi xuôi	5'-TGG ACA GGG AAC AAC ACT AAA C-3'
	Mồi ngược	5'-ACA AGC CTC CCA TCG TAA AT-3'
	Mẫu dò	TXRED-CAA ATG AAA TGG AAC ACC CAA CTC AT-BHQ2

*Trọng lượng sản phẩm đoạn gen được khuếch đại sau khi chạy phản ứng PCR.

Huỷ diệt bệnh phẩm sau khi được xử lý (Xem 5.2.2.1), tiến hành chiết tách ARN bằng kit thương mại (Xem D.1 phụ lục D). Mẫu ARN sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp các mạch cDNA của vi rút cúm lợn (Xem D.2 phụ lục D). Phương pháp Realtime-RT PCR sau đó được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các cDNA này bằng việc sử dụng các cặp mồi và mẫu dò (Xem bảng 1) đặc hiệu cho các đoạn gen H1, H3, N1 và N2 trong 4 phản ứng riêng rẽ (Xem D4 phụ lục D).

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp cần tiết kiệm chi phí, thực hiện phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen M của vi rút typ A trước (Xem D.3 phụ lục D), nếu dương tính mới tiếp tục xét nghiệm các gen đặc hiệu của vi rút cúm lợn (H1, H3, N1 và N2).

Đánh giá kết quả:

- Nếu dương tính với 2 phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen H1 và N1, mẫu bệnh phẩm đó có vi

rút cúm lợn H1N1. Nếu dương tính với 2 phản ứng Realtime-RT PCR phát hiện gen H3 và N2, mẫu có vi rút cúm lợn H3N2.

- Nếu dương tính với 4 phản ứng Realtime-RT PCR trên, mẫu có cả vi rút cúm lợn H1N1 và H3N2.
- Mẫu không có vi rút cúm lợn hoặc chỉ có một trong hai loại vi rút cúm lợn H1N1 hoặc H3N2.

5.2.2.3 Phân lập trên trứng

Phương pháp này sử dụng trứng gà có phôi 10 ngày đến 11 ngày tuổi.

Sử dụng 0,2 ml bệnh phẩm đã được xử lý (Xem 5.2.2.1) tiêm (Xem 4.9) vào xoang niệu mô của trứng, mỗi mẫu bệnh phẩm tiêm từ 3 đến 4 trứng.

Ủ trứng có phôi đã tiêm truyền trong tủ ẩm ở 37°C (Xem 4.8) và theo dõi hàng ngày. Thu hoạch dịch niệu mô của tất cả trứng chết sau 24h tiêm huyền dịch và của tất cả trứng không chết 96 h tiêm huyền dịch. Sau đó, xác định vi rút bằng phương pháp HA (Xem phụ lục B), HI (Xem phụ lục C) sử dụng kháng huyết thanh chuẩn H1 và H3 hoặc kiểm tra bằng phương pháp Realtime- RT PCR (Xem phụ lục D).

Đánh giá kết quả:

- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR dương tính, xác định có vi rút cúm lợn trong mẫu.
- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR âm tính, cần tiêm truyền trứng lần thứ hai. Nếu sau lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm lợn

5.2.2.4 Phân lập trên tế bào

Chuẩn bị:

- Chuẩn bị MDCK cell có độ bao phủ 90 % bề mặt đĩa nuôi cấy 12 giếng (Xem A.9 phụ lục A).
- Chuẩn bị môi trường phát triển có chứa 1µg/ml TCPK trypsin (Xem A.7 phụ lục A)

Tiến hành:

Hút bỏ môi trường cũ trong giếng tế bào đang nuôi, rửa bề mặt thảm tế bào 3 lần bằng PBS⁻ pH 7,4 (Xem A.2 phụ lục A) sau đó nhỏ 50 µl mẫu đã được xử lý và 1,5 ml môi trường đã chuẩn bị vào mỗi giếng.

Ủ đĩa nuôi cấy trong tủ ẩm ở 37 °C có chứa 5 % CO₂ (Xem 4.8). Kiểm tra đĩa tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi (Xem 4.4), theo dõi tối đa trong 5 ngày.

Khi trên thăm tế bào xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE) thì tiến hành thu hoạch dung dịch môi trường chứa vi rút và xác định vi rút bằng phương pháp HA, HI (Xem phụ lục B và Phụ lục C) với kháng huyết thanh chuẩn H1 và H3 hoặc kiểm tra bằng phương pháp rRT-PCR (Xem phụ lục D).

Đánh giá kết quả:

- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR dương tính, xác định có vi rút cúm lợn trong mẫu.
- Nếu kết quả HA (Xem phụ lục B) và HI (Xem phụ lục C) hoặc Realtime-RT PCR âm tính, thì phân lập lại lần hai. Nếu sau lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm lợn.

5.2.3 Phát hiện kháng thể

Mẫu phát hiện kháng thể là huyết thanh của lợn chưa được tiêm phòng vaccin cúm lợn (xem 5.2.1) dùng để chẩn đoán phát hiện kháng thể bằng phương pháp HI hoặc ELISA.

5.2.3.1 Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu chuột lang

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (phản ứng HI: (Xem phụ lục C) dùng để kiểm tra kháng thể kháng vi rút cúm lợn H1, H3 trong huyết thanh kiểm tra.

Huyết thanh kiểm tra cần được vô hoạt bỏ thể ở 56 °C trong 30 min và huyết thanh đó cần phải được xử lý RDE (Xem A5 phụ lục A) chống hiện tượng ức chế giả.

Chuẩn bị kháng nguyên: Kháng nguyên chuẩn H1 và H3 được pha 4 đơn vị HA (Xem A.10 phụ lục A).

Thực hiện phản ứng HI: Huyết thanh kiểm tra đã xử lý RDE (Xem A.5 phụ lục A) pha loãng với dung dịch đệm PBS ~ pH 7,2 (Xem A.3 phụ lục A) sau đó bổ sung kháng nguyên chuẩn đã pha loãng 4HA. Ủ huyết thanh kiểm tra và kháng nguyên chuẩn thời gian là 40 min sau đó cho tác dụng với hồng cầu chuột lang 0,5 %.

Đánh giá kết quả:

- Mẫu có kháng thể kháng vi rút cúm lợn H1 hoặc H3: Dương tính với phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu chuột lang (Xem phụ lục C).
- Mẫu không có kháng thể vi rút cúm lợn H1 hoặc H3: Âm tính với phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu chuột lang (Xem phụ lục C).

5.2.3.2 Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể

Sử dụng mẫu bệnh phẩm là huyết thanh của lợn ốm.

Sử dụng kit ELISA thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Xem phụ lục E).

6 Kết luận

Lợn được xác định mắc bệnh cúm lợn khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh cúm lợn và kết quả xét nghiệm mẫu bằng các phương pháp rRT-PCR hoặc phân lập cho thấy có vi rút cúm lợn hoặc bằng các phương pháp HI hoặc ELISA cho thấy có kháng thể với vi rút cúm lợn.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**A.1 Dung dịch kháng sinh đậm đặc**

Penicillin	10 ⁸ IU
Streptomycin	1 g
Kanamycin	1 g
Nước	10 ml

Lắc (Xem 4.6) đều cho tan, lọc vô trùng bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm (Xem 4.12). Sử dụng tốt nhất trong 1 tuần, bảo quản ở - 20 °C.

A.2 Dung dịch muối đệm phosphat pH ~ 7,4

Dung dịch muối đệm phosphat 10x	100 ml
Nước cất (tiệt trùng)	900 ml

A.3 Dung dịch muối đệm phosphat pH ~ 7,2

Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Dinatri hydrophosphat (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g
Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 1 M (Xem 3.1) hoặc dung dịch HCl 1 M (Xem 3.2). Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.4 Dung dịch hồng cầu chuột lang 0,5%

Hồng cầu chuột lang đặc	0, 5 ml
-------------------------	---------

Dung dịch PBS pH ~ 7,2	100 ml
------------------------	--------

Lắc (Xem 4.6) đều, sử dụng trong 1 đến 2 ngày. Bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

A.5 Xử lý mẫu huyết thanh kiểm tra bằng dung dịch RDE

RDE	20 ml
Nước muối sinh lý	20 ml

Lắc (Xem 4.6) đều và chia nhỏ ra ống 3 ml và bảo quản trong -20 °C.

Xử lý RDE: Nhỏ 1 phần huyết thanh kiểm tra vào 3 phần RDE, lắc (Xem 4.6) đều và ủ trong nồi cách thủy ở 37°C trong thời gian từ 18 h đến 20 h, sau đó chuyển sang ủ trong nồi cách thủy ở 56 °C trong thời gian từ 30 min đến 60 min. Kết thúc quá trình ủ, giữ ở 4 °C trong 30 min sau đó nhỏ thêm 6 phần dung dịch PBS pH ~7,2. Vậy khi xử lý RDE xong huyết thanh cần xét nghiệm đã được pha loãng 10 lần.

A.6 Môi trường nuôi tế bào (Sử dụng trong quá trình cấy chuyển và nuôi tế bào MDCK)

Môi trường EMEM	500 ml
Huyết thanh thai bê (FCS), 10 %	50 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin: 10000 UI/ml)	5 ml
Chống nấm (Fungizone: 250 µg/ml)	5 ml

* Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C

A.7 Môi trường phân lập vi rút

Môi trường EMEM	500 ml
Huyết thanh thai bê (FCS), 10 %	50 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin: 10000 UI/ml)	5 ml
Chống nấm (Fungison: 250 µg/ml)	5 ml
TPCK trypsin (Xem A.8 phụ lục A)	500 µl

* Sử dụng tốt nhất trong ngày, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C

A.8 TPCK (Tosylphenylalanylchloromethane) trypsin: 1 mg/ml

TPCK trypsin	50 mg
PBS (Xem A.2 phụ lục A)	50 ml

Hòa tan TPCK trypsin trong PBS⁻ rồi lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 μm (Xem 4.12), sau đó chia nhỏ lượng ra ống và bảo quản ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sử dụng tốt nhất trong 6 tháng.

A.9 Cấy chuyển và nuôi tế bào

Nguyên vật liệu :

Chai nuôi tế bào 75 cm^2 (Xem 4.11) đã phát triển thành 1 lớp đạt 100 % bề mặt chai

Môi trường nuôi tế bào (Xem A.6 phụ lục A)

Trypsin có 0,05 % EDTA

PBS⁻ ~ pH 7,4 (Xem A.2 phụ lục A)

Chú ý: Tất cả các môi trường phải được cân bằng ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi sử dụng và tất cả vật tư dùng cho tế bào đều phải được hấp vô trùng trước khi sử dụng.

Tiến hành như sau:

Bước 1: Hút bỏ môi trường trong chai tế bào 75 cm^2 (Xem 4.11) đang nuôi MDCK cell 1 lớp 100 % bề mặt chai.

Bước 2: Rửa bề mặt thảm tế bào bằng PBS 2 lần với lượng là 10 ml cho 1 chai 75 cm^2 (Xem 4.11). Tráng qua và hút bỏ PBS⁻.

Bước 3: Tách tế bào

Cho 2 ml trypsin (có 0,05 % EDTA) vào chai tế bào 75 cm^2 (Xem 4.11) láng đều lên bề mặt tế bào sao cho bề mặt tế bào được phủ trypsin. Ủ trong thời gian từ 5 min đến 10 min trong tủ ấm ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Xem 4.8).

Chú ý: Không để tế bào trong trypsin quá 15 min.

Khi tế bào đã tách hết, bổ sung 5 ml môi trường nuôi tế bào (Xem A.6 phụ lục A) vào chai để vô hoạt trypsin, trộn đều, chuyển toàn bộ huyền dịch tế bào sang ống ly tâm 15 ml.

Bước 4: Loại bỏ Trypsin

Ly tâm (Xem 4.5) huyền dịch tế bào ở gia tốc 500 g trong 5 min.

Loại bỏ phần dung dịch ở trên, giữ cặn tế bào.

Bước 5: Cân bằng môi trường và đếm số tế bào

Đánh tan tế bào thu được (búng nhẹ).

Bổ sung 10 ml môi trường nuôi tế bào. (Rất nhẹ nhàng hòa tan tế bào bằng pipet (Xem 4.2).

Đếm tế bào: Pha loãng tế bào 100 lần (10 µl tế bào trong 990 µl môi trường nuôi tế bào), đếm tế bào bằng buồng đếm trên kính hiển vi, tính số tế bào trong 1 ml.

Bước 6: Cấy chuyển tế bào

Ghi nhãn đĩa 12 giếng nuôi tế bào mới (tên dòng tế bào, ngày nuôi cấy, lần cấy chuyển).

Chia tế bào vào 1 đĩa 12 giếng: Đĩa tế bào 12 giếng khi nuôi cấy cần 1×10^6 tế bào/đĩa.

Bước 7: Nuôi tế bào và kiểm tra sự phát triển:

Đĩa tế bào 12 giếng: Lượng tế bào đếm được 1×10^6 tế bào/đĩa và bổ sung 20 ml môi trường nuôi cấy (Xem A.6 phụ lục A).

Nuôi đĩa tế bào trong tủ ẩm 37°C có 5 % CO₂ (Xem 4.8).

Theo dõi sự phát triển hàng ngày của tế bào trên kính hiển vi đảo ngược.

A.10 Pha và chuẩn độ kháng nguyên 4HA, 8HA

+ VÍ DỤ: Hiệu giá kháng nguyên trong phản ứng HA là 1/256 thì 4 HA bằng $1/256 \times 4 = 1/64$.

Pha 4 HA/25 µl gồm 1 phần kháng nguyên và 63 phần PBS pH ~ 7,2.

Chuẩn độ kháng nguyên 4 HA/25 µl đã pha bằng phản ứng HA. Nếu kết quả ngưng kết đến giếng thứ 2 là kháng nguyên pha đạt. Nếu ngưng kết đến giếng thứ 3 (hoặc hơn) là kháng nguyên pha đặc. Nếu ngưng kết chỉ ở giếng đầu tiên hoặc giếng thứ 1 là kháng nguyên pha loãng. Dựa vào kết quả đó để bổ sung thêm kháng nguyên hoặc PBS pH ~ 7,2 để có kháng nguyên là 4 HA chuẩn.

+ VÍ DỤ: Hiệu giá kháng nguyên trong phản ứng HA là 1/256 thì 8 HA bằng $1/256 \times 8 = 1/32$.

Pha 8 HA/50 µl gồm 1 phần kháng nguyên và 31 phần PBS pH ~ 7,2.

Chuẩn độ kháng nguyên 8 HA/50 µl đã pha bằng phản ứng HA. Nếu kết quả ngưng kết đến giếng thứ 3 là kháng nguyên pha đạt. Nếu ngưng kết đến giếng thứ 4 (hoặc hơn) là kháng nguyên pha đặc. Nếu

ngưng kết chỉ ở giếng đầu tiên hoặc giếng thứ 2 là kháng nguyên pha loãng. Dựa vào kết quả đó để bổ sung thêm kháng nguyên hoặc PBS pH ~ 7,2 để có kháng nguyên là 8 HA chuẩn.

Phụ lục B

(Quy định)

Cách tiến hành phản ứng ngưng kết hồng cầu chuột lang (HA)

B.1 Thuốc thử và vật liệu thử

- Hồng cầu chuột lang 0,5 % (Xem A.4 phụ lục A).
- Dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào hoặc dung dịch niệu mô sau khi phân lập trên trứng
- Kháng nguyên chuẩn cúm lợn H1 hoặc H3
- Dung dịch PBS pH ~7,2 (Xem A.3 phụ lục A).

B.2 Thiết bị, dụng cụ

Đĩa ngưng kết 96 giếng (Xem 4.3), đáy chữ V, pipet (Xem 4.2) các loại với đầu tip các loại.

B.3 Cách tiến hành (Xem sơ đồ 1)

Cho 50 µl PBS pH ~7,2 vào các giếng từ giếng 1 đến giếng 12. Cho 50 µl dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào, dung dịch niệu mô sau khi phân lập trên trứng hoặc kháng nguyên chuẩn vào giếng 1.

Trộn đều huyền dịch hoặc kháng nguyên với PBS ở giếng 1, chuyển 50 µl sang giếng 2 và trộn đều, chuyển 50 µl sang giếng 3 và trộn đều, tiếp tục cho đến giếng 11, hút bỏ 50 µl ở giếng 11. Giếng 12 chỉ có PBS để làm đối chứng hồng cầu.

Cho 50 µl hồng cầu chuột lang 0,5% vào mỗi giếng, lắc (Xem 4.6) nhẹ trên máy lắc trong 1 min. Để đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau từ 30 min đến 60 min.

B.4 Đọc kết quả

Định tính:

- Phản ứng HA dương tính khi có hạt ngưng kết lắng chấm ở độ pha loãng (hiệu giá) lớn hơn hoặc bằng 1/4 với lượng 25 µl tương đương 2log2 hoặc 1/8 với lượng 50 µl tương đương 3log2
- Phản ứng HA âm tính khi không có ngưng kết hồng cầu hoặc có ngưng kết nhưng ở độ pha loãng nhỏ hơn 1/4 với lượng 25 µl tương đương 2log2 hoặc 1/8 với lượng 50 µl tương đương 3log2.

Những mẫu dương tính với phản ứng HA là những mẫu có chứa vi rút gây ngưng kết hồng cầu (một đặc tính của vi rút cúm).

Định lượng: Hiệu giá HA của một mẫu được xác định tại nồng độ pha loãng cao nhất có ngưng kết hồng cầu. Ví dụ mẫu có phản ứng HA dương tính ở độ pha loãng 1/1024 thì hiệu giá HA của mẫu được xác định là 1/1024 tương đương $10 \log_2$.

Sơ đồ 1 – Các bước tiến hành phản ứng ngưng kết hồng cầu chuột lang (HA)

Các bước	Nguyên liệu	Giếng											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pha loãng kháng nguyên	PBS, μ l	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Kháng nguyên kiểm tra, μ l	50	Chuyển 50 μ l từ giếng 1 sang giếng 2, trộn đều, chuyển tiếp tục đến giếng 11 rồi hút bỏ 50 μ l										0
Cho HC chuột lang	Hồng cầu 0, 5 %, μ l	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Độ pha loãng kháng nguyên	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	

Phụ lục C

(Quy định)

Cách tiến hành phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu chuột lang (HI)

C.1 Thuốc thử, môi trường và vật liệu thử

- Dung dịch PBS pH ~7,2 (Xem A.3 phụ lục A)
- Hồng cầu chuột lang 0,5 % (Xem A.4 phụ lục A)
- Huyết thanh kiểm tra 1/10 đã được xử lý RDE (Xem A.5 phụ lục A) hoặc kháng huyết thanh chuẩn cúm lợn H1 và H3 đã pha loãng 1/10.
- Kháng nguyên chuẩn H1, H3 (dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào hoặc dung dịch niệu mô sau khi phân lập trên trứng).
- Kháng nguyên chuẩn H1, H3 hoặc dịch môi trường sau khi phân lập trên tế bào, dung dịch niệu mô sau khi phân lập trên trứng dương tính ở Phụ lục B dùng cho phản ứng HI được pha 8 HA/50 µl hoặc (4 HA/25 µl) (Xem A.10 phụ lục A).

C.2 Thiết bị, dụng cụ

Đĩa ngưng kết 96 giếng (Xem 4.3), đáy chữ V, pipet (Xem 4.2) các loại với đầu tip các loại.

C.3 Cách tiến hành (Xem sơ đồ 2)

Cho 25 µl PBS pH ~7,2 vào các giếng từ giếng 2 đến giếng 12. Cho 50 µl huyết thanh cần kiểm tra vào giếng 1. Chuyển 25 µl từ giếng 1 sang giếng 2.

Trộn đều huyết thanh với PBS ở giếng 2, rồi chuyển 25 µl sang giếng 3 và trộn đều, chuyển 25 µl sang giếng 4, tiếp tục cho đến giếng 11, hút bỏ 25 µl ở giếng 11.

Cho 25 µl kháng nguyên 4 HA/25µl (hoặc 8 HA/50 µl) vào các giếng từ 1 đến 11. Giếng 12 cho thêm 25 µl PBS làm đối chứng hồng cầu. Lắc nhẹ trên máy lắc (Xem 4.6) sau đó để đĩa ở nhiệt độ phòng 30 min.

Cho 50 µl hồng cầu chuột lang 0,5 % vào mỗi giếng, lắc (Xem 4.6) nhẹ trong 1 min. Để đĩa phản ứng ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau 30 min đến 60 min.

Mỗi đĩa phản ứng phải có mẫu đối chứng kháng nguyên chuẩn hoặc kháng thể chuẩn làm tương tự như mẫu cần chẩn đoán để đảm bảo 4 HA/25 µl (hoặc 8 HA/50 µl) đã được sử dụng cho phản ứng là đúng, mục đích là để kiểm soát mẫu huyết thanh và mẫu bệnh phẩm khi làm phản ứng (mẫu này được gọi là đối chứng nội).

Sơ đồ 2 – Các bước tiến hành phản ứng ngưng kết hồng cầu chuột lang (HI)

Các bước	Nguyên liệu	Giếng											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pha loãng huyết thanh	PBS, µl	0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
	Huyết thanh kiểm tra	50	Chuyển 25 µl từ giếng 1 sang giếng 2, trộn đều, chuyển tiếp tục đến giếng 11 rồi hút bỏ 25 µl										0
Cho kháng nguyên	Kháng nguyên 4 HA, µl	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
Lắc nhẹ, để 30 min ở nhiệt độ phòng													
Cho HC chuột lang	Hồng cầu, µl	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Độ pha loãng huyết thanh	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	

C.4 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính: Hồng cầu lắng xuống đáy, chứng tỏ kháng nguyên và kháng thể tương ứng. Hiệu giá kháng thể được tính ở độ pha loãng cao nhất còn có hiện tượng ức chế ngưng kết hoàn toàn.
- Phản ứng âm tính: Có hạt ngưng kết lấm tấm, chứng tỏ không có kháng thể kết hợp với kháng nguyên trong phản ứng.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Phản ứng Realtime - RT PCR phát hiện vi rút cúm lợn H1N1 và H3N2

D.1 Chiết tách ARN

Dùng huyền dịch đã xử lý (Xem 5.2.2.1) để chiết tách ARN. Có thể sử dụng bộ kit Qiagen® Rneasy Extraction cat # 74104 50 prep hoặc # 74106 250 prep theo quy trình dưới đây.

Nhỏ 200µl dịch nghiền mô vào ống ly tâm (Xem 4.12) loại 1,5ml (Xem 4.10) cùng với 600µl Qiagen® buffer RLT có 1 % β -ME, lắc (Xem 4.6) đều trên máy Vortex rồi ly tâm (Xem 4.5) nhẹ.

Thêm 500 µl etanol 70 % (Xem 3.3) vào ống, lắc mạnh bằng máy Vortex (Xem 4.6) rồi ly tâm (Xem 4.5) nhẹ.

Chuyển tất cả dịch nổi sang cột lọc RNeasy® Qiagen, ly tâm trong 15 s với gia tốc $\geq 8000 g$ ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung 700µl dung dịch rửa 1 (RW1 buffer) vào cột RNeasy® Qiagen, ly tâm (Xem 4.5) trong 15 s ở gia tốc $\geq 8000 g$, thay ống thu mới vào cột lọc.

Nhỏ 500µl dung dịch rửa RPE buffer vào cột RNeasy® và ly tâm (Xem 4.5) trong 15 s ở gia tốc $\geq 8000 g$, thay ống thu mới, lặp lại 2 lần với dung dịch rửa RPE buffer.

Thay ống thu mới, ly tâm (Xem 4.5) cột lọc và ống thu trong 2 min ở gia tốc tối đa, bỏ ống thu.

Đặt cột lọc vào ống thu ARN, nhỏ 50 µl nước sạch nuclease vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 1 min. Tách ARN bằng cách ly tâm (Xem 4.5) trong 1 min ở gia tốc $\geq 8000 g$, bỏ cột lọc, giữ lại dung dịch trong ống thu ARN.

Bảo quản mẫu ARN thu được ở 4 °C trong thời gian ngắn trước khi làm RT-PCR, nếu sau 24 h, nên bảo quản mẫu ở âm 20 °C hoặc nhiệt độ thấp hơn.

D.2 Tổng hợp cDNA

Tổng hợp cDNA bằng kit SuperScript III First- Strand Synthesis.

Bước 1: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng phiên mã ngược trong ống PCR

Bước 2: Đặt ống hỗn hợp phản ứng phiên mã ngược vào máy PCR (Xem 4.7) và chạy chu trình nhiệt: 65 °C, 5 min, 4 °C, 1 min. Sản phẩm thu được dùng để tổng hợp.

Hỗn hợp phản ứng phiên mã ngược	Lượng cho 1 phản ứng, μ l
Mồi gen nôm 10 mM (Trình tự mồi: AGCAAAAGCAGG)	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Mẫu ARN	2
Tổng lượng	5

Bước 3: Chuẩn bị hỗn hợp tổng hợp cDNA trong ống PCR

Hỗn hợp phản ứng tổng hợp cDNA	Lượng cho 1 phản ứng, μ l
MgCl ₂ 25 mM	2
10 $\times$ Rtbuffer	1
0,1M DTT	1
Super Script III	0,5
Nước cất sạch nuclease	0,5
Sản phẩm phiên mã ngược (từ bước 1)	5
Tổng lượng	10

Bước 4: Đặt ống hỗn hợp phản ứng tổng hợp cDNA vào máy PCR và chạy chu trình nhiệt: 25 °C, 10 min, 42 °C, 50 min, 85 °C, 5 min.

Bước 5: Bổ sung nước cất sạch nuclease: 0,5 μ l và chạy chu trình nhiệt là 37 °C, 20 min

Tổng lượng cDNA thu được là 10,5 μ l.

D.3 Phản ứng real-time RT PCR để phát hiện gen M của vi rút cúm A

Bước 1: Chuẩn bị mồi và mẫu dò: chuẩn bị ở nồng độ 10 μ M với nước sạch Dnase/Rnase.

Bước 2: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time RT PCR để phát hiện gen Matrix của vi rút cúm A theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng.

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml.

Hỗn hợp phản ứng (kit SYBR® Premix Ex Tap™)	Lượng cho 1 phản ứng, µl
2x SYBR Premix Ex taq	12,5
Mồi xuôi 10 µM	0,5
Mồi ngược 10 µM	0,5
Nước cất sạch nuclease	9,5
Mẫu cDNA	2
Tổng	25

Bước 3: Đặt ống vào máy Realtime (Xem 4.7) và Chạy chu trình nhiệt sau:

Chu trình 1	Chu trình 2	Chu trình 3
95°C, 30 min	40 vòng: {95 °C, 5 s; 60 °C, 1 min}	95 °C 15 s giai đoạn phân ly 60 °C 1 min 95 °C 15 s

Bước 4: Đọc kết quả

Điều kiện phản ứng được công nhận: mẫu đối chứng dương có giá trị $C_t \leq 35$ (± 2 Ct) và nhiệt độ tan chảy bằng 84 °C, mẫu đối chứng âm tính không có C_t .

Với điều kiện như trên, mẫu có giá trị $C_t \leq 35$ và có nhiệt độ tan chảy bằng 84 °C được coi là dương tính. Mẫu không có C_t và nhiệt độ tan chảy là âm tính. Mẫu có giá trị C_t nhưng có nhiệt độ tan chảy nhỏ hơn hoặc lớn hơn 84 °C được coi là nghi ngờ.

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

D.4 Phản ứng real-time RT-PCR (TaqMan) để phát hiện vi rút cúm lợn (H1N1 và H3N2)

Cần thực hiện 4 phản ứng real-time RT-PCR riêng rẽ cho 4 đoạn gen H1, N1, H3 và N2. Mỗi phản ứng được thực hiện như sau:

Bước 1: Chuẩn bị mồi và mẫu dò: các cặp mồi và mẫu dò để phát hiện các đoạn gen H1, N1, H3 hoặc N2 được chuẩn bị ở nồng độ 10 µM với nước sạch Dnase/Rnase.

Bước 2: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time RT-PCR theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng:

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống PCR.

Hỗn hợp phản ứng (kit Quantitect)	Lượng cho 1 phản ứng, μ l
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12,5
Mồi xuôi 10 μ M	1
Mồi ngược 10 μ M	1
Taqman probe 10 μ M	0,5
QuantiTect RT Mix	0,25
Nước cất sạch nuclease	4,75
Mẫu ARN	5
Tổng	25

Bước 3: đặt ống hỗn hợp phản ứng vào máy PCR (Xem 4.7) và chạy chu trình nhiệt.

Chu trình 1	Chu trình 2
50 °C, 30 min	45 vòng x (94 °C, 15 s; 55 °C, 1 min)
95 °C, 15 min	

Bước 4: Đọc kết quả

Điều kiện phản ứng được công nhận: mẫu đối chứng dương (được chuẩn độ trước) phải có giá trị $C_t \leq 35 (\pm 2 C_t)$, mẫu đối chứng âm không có C_t .

Với điều kiện phản ứng trên, mẫu có giá trị $C_t \leq 35$ được coi là dương tính, mẫu không có giá trị C_t là âm tính. 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 bằng phương pháp khác (phân lập vi rút để khẳng định).

Phụ lục E

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể cúm type A

Hiện nay có rất nhiều các loại kit phát hiện kháng thể cúm khác nhau được cung cấp trên thị trường nên khi sử dụng tuân theo qui trình của nhà sản xuất.

Nếu sử dụng bộ kit chẩn đoán

- Influenza A Virus Antibody Test Kit của IDEXX thì các bước tiến hành được thực hiện như sau:

- Bước 1: Chuẩn bị bộ kit: số mẫu + 01 đối chứng dương + 01 đối chứng âm

- Bước 2: Pha loãng mẫu với tỷ lệ 1/10: 10 µl mẫu kiểm tra + 90 µl dung dịch pha loãng mẫu trong ống pha loãng. Sau đó chuyển 100 µl dung dịch mẫu kiểm tra đã pha loãng sang đĩa ELISA với sơ đồ bố trí mẫu tương ứng.

* Nhỏ 100 µl đối chứng âm và đối chứng dương (không pha loãng) vào đĩa ELISA theo vị trí bố trí.

- Bước 3: Vỗ nhẹ đĩa, đậy nắp. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 60 min

- Bước 4: Pha nước rửa đĩa 1X từ dung dịch rửa đĩa 10X có sẵn trong bộ kit.

- Bước 5: Sau 60 min ủ đĩa, đổ bỏ dung dịch trong đĩa, rửa đĩa 3 lần với lượng 300 µl/giếng bằng dung dịch rửa đĩa 1X.

- Bước 6: Nhỏ 100 µl chất gắn kết (conjugate) vào tất cả các giếng. Ủ tiếp đĩa ở nhiệt độ phòng trong 60 min.

- Bước 7: Sau đó đổ bỏ dung dịch trong đĩa, rửa đĩa 3 lần với lượng 300 µl/giếng bằng dung dịch rửa đĩa 1X.

- Bước 8: Nhỏ 100 µl cơ chất vào các giếng, ủ đĩa trong 15 min.

- Bước 9: Dừng phản ứng bằng cách cho 100 µl dung dịch stop vào các giếng.

- Bước 10: Đọc đĩa ở bước sóng 650 nm và tính kết quả.

Phản ứng được công nhận khi:

+ OD của đối chứng âm > 0,6

+ OD của đối chứng dương – OD của đối chứng âm $\leq 0,6$

S/N= (OD của mẫu -OD của đối chứng âm)

Đánh giá kết quả:

+ Mẫu dương tính: S/N không lớn hơn 0,6

+ Mẫu âm tính: S/N Lớn hơn 0,6

Sơ đồ đĩa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ĐC(-)	S4	S11	S18	S25	S32	S39	S46	S53	S60	S67	S74
B	ĐC(-)	S5	S12	S19	S26	S33	S40	S47	S54	S61	S68	S75
C	ĐC(+)	S6	S13	S20	S27	S34	S41	S48	S55	S62	S69	S76
D	ĐC(+)	S7	S14	S21	S28	S35	S42	S49	S56	S63	S70	S77
E	S1	S8	S15	S22	S29	S36	S43	S50	S57	S64	S71	S78
F	S2	S9	S16	S23	S30	S37	S44	S51	S58	S65	S72	S79
G	S3	S10	S17	S24	S31	S38	S45	S52	S59	S66	S73	S80

CHÚ THÍCH: - ĐC (-): mẫu đối chứng âm.

- ĐC (+): mẫu đối chứng dương.

- S1, S2, S3,...,S80: mẫu huyết thanh cần kiểm tra số 1, số 2, số 3, ... đến mẫu số 80.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] O.I.E., 2009. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, *Swine influenza*, Chapter 2.8.8.
- [2] Juergen A. Richt, Kelly M. Lager, Deborah F. Clouser, Erica Spackman, David L. Suarez, Kyoung-Jin Yoon (2004). Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection and Differentiation of North American Swine Influenza Viruses. *J Vet Diagn Invest*, 16:367–373.
-