

**TCVN 8400-XX : 2025**

(Dự thảo)

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –  
PHẦN XX: BỆNH RỤT MỎ TRÊN LOÀI THỦY CẦM**

*Animal diseases – Diagnostic procedure –  
Part XX : Infection with novel goose parvovirus*

HÀ NỘI - 2025



**Lời nói đầu**

TCVN 8400-XX : 2025 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - Cục Chăn nuôi và Thú y biên soạn trên cơ sở tham khảo tài liệu và các bài báo khoa học quốc tế, Bộ Nông nghiệp và Môi trường, 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 Nui cát xơn;*
- 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 ly và thương hàn ở gà;*
- TCVN 8400-13 : 2019, *phần 13: Bệnh Sảy thai truyền nhiễm do Brucela;*
- 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 8400-24 : 2014, *phần 24: Bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm;*

## **TCVN 8400-XX : 2025**

- 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;*
- TCVN 8400-48 : 2020, *phần 48: Bệnh tiêu chảy có màng nhày do vi rút ở bò;*
- TCVN 8400-49 : 2020, *phần 49: Bệnh viêm mũi khí quản truyền nhiễm ở bò;*
- TCVN 8400-50 : 2020, *phần 50: Bệnh viêm não Nhật Bản;*
- TCVN 8400-51 : 2020, *phần 51: Bệnh viêm phổi, màng phổi truyền nhiễm ở bò;*
- TCVN 8400-52 : 2022, *phần 52: Bệnh nhiệt thán ở gia súc;*

- TCVN 8400-53 : 2022, *phần 53: Bệnh viêm phổi hóa mủ do vi khuẩn Ornithobacterium rhinotracheale*
- TCVN 8400-54 : 2022, *phần 54: Bệnh tụ thừ ở gia súc;*
- TCVN 8400-55 : 2022, *phần 55: Bệnh u nhày ở thỏ;*
- TCVN 8400-56 : 2023, *phần 56: Bệnh tụ huyết trùng ở lợn, trâu, bò, gia cầm;*
- TCVN 8400-57 : 2024, *phần 57: Bệnh Glasser ở lợn.*

## Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán –

### Phần XX : Bệnh Rụt mỏ trên loài thủy cầm

*Animal disease – Diagnostic procedure – Part XX : Infection with novel goose parvovirus*

**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 đưa ra hết các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn 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 Rụt mỏ trên loài thủy cầm do Parvovirus gây ra.

#### 2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 1 - 1 : 2015, Phần 1: Quy trình xây dựng tiêu chuẩn quốc gia.

TCVN 1 - 2 : 2008, Xây dựng tiêu chuẩn - phần 2: Quy định về trình bày và thể hiện nội dung tiêu chuẩn quốc gia.

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

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

- Bệnh Rụt mỏ là bệnh truyền nhiễm ở thủy cầm do vi rút Parvo gây ra.
- Vi rút gây bệnh Rụt mỏ là Novel goose parvovirus (N-GPV) thuộc chi Dependoparvovirus, phân họ Parvovirinae và họ Parvoviridae, có vật liệu di truyền là DNA, vỏ ngoài là lipid.

##### 3.2 Từ viết tắt

- CPE (Cytopathic effect): Biến đổi bệnh lý tế bào;
- Ct (Threshold cycle): Chu kỳ ngưỡng;
- DEF (Duck Embryo Fibroblast): Tế bào xơ phôi vịt;

- DNA: Acid deoxyribonucleic;
- DNase (Deoxyribonuclease): Enzym thủy phân liên kết của phân tử DNA;
- EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid): Chất tạo phức EDTA;
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): Phương pháp miễn dịch liên kết enzyme;
- FBS (Fetal Bovine Serum): Huyết thanh bào thai bê;
- N-GPV: Novel goose parvovirus;
- MEM (Minimum Essential Medium): Môi trường nuôi cấy tế bào MEM;
- PBS (Photphate Buffered Salin): Dung dịch muối đệm photphat;
- Realtime PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp thời gian thực;
- RNA: Acid ribonucleic;
- RNase (Ribonuclease): Enzym thủy phân liên kết của phân tử RNA;
- TBE 10X (Tris-axit boric - Ethylendiamin Tetraacetic axit): Dung dịch đệm TBE đậm đặc 10 lần.

#### **4 Thuốc thử, vật liệu thử**

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

##### **4.1 Thuốc thử, vật liệu thử dùng chung**

**4.1.1 Cồn** (Ethanol), từ 70 % (thể tích) đến 100 %;

**4.1.2 Dung dịch muối đệm photphat** (PBS), pH  $7,2 \pm 0,2$  (xem Phụ lục A);

**4.1.3 Dung dịch kháng sinh**, bao gồm các loại penicillin, streptomycin;

##### **4.2 Thuốc thử, vật liệu thử dùng cho phương pháp phân lập**

**4.2.1 Phôi trứng vịt từ 9-11 ngày tuổi**, lấy từ vịt sạch bệnh;

**4.2.2 Tế bào xơ phôi vịt** (DEF);

**4.2.3 Môi trường MEM** (Minimum Essential Medium);

##### **4.3 Thuốc thử, vật liệu thử dùng cho phương pháp PCR và realtime PCR**

**4.3.1 Kít chiết tách DNA vi rút** (tham khảo Phụ lục D);

**4.3.2 Kít nhân gen**;

**4.3.3 Môi xuôi, môi ngược cho phương pháp PCR**;

**4.3.4 Môi xuôi, môi ngược và mẫu dò cho phương pháp realtime PCR**;

**4.3.5 Nước tinh khiết**, không có DNase/RNase;

## **TCVN 8400-XX : 2025**

**4.3.6 Dung dịch TBE 10X;**

**4.3.7 Thang chuẩn DNA 100bp;**

**4.3.8 Bột agarose;**

**4.3.9 Chất nhuộm gel (gel red hoặc chất nhuộm gel tương đương);**

**4.3.10 Loading dye;**

### **4.4 Thuốc thử, vật liệu thử dùng cho phương pháp ELISA**

**4.4.1 Kít ELISA;**

## **5 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng các trang thiết bị, dụng cụ, máy móc và vật tư của phòng thí nghiệm sinh học và cụ thể như sau:

### **5.1 Thiết bị, dụng cụ dùng chung**

**5.1.1 Pipet, có đầu tip các cỡ 30  $\mu$ l, 200  $\mu$ l và 1000  $\mu$ l;**

**5.1.2 Đầu tip các loại;**

**5.1.3 Xy lanh, dung tích 1 ml, 5 ml;**

**5.1.4 Ống ly tâm, dung tích từ 1,5 đến 2 ml, 15 ml, 50 ml;**

**5.1.5 Dụng cụ bảo hộ (khẩu trang, găng tay, áo bảo hộ, kính, ủng);**

**5.1.6 Túi đựng rác thải;**

**5.1.7 Tủ an toàn sinh học cấp 2;**

**5.1.8 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C;**

**5.1.9 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C;**

### **5.2 Thiết bị, dụng cụ cho phương pháp phân lập**

**5.2.1 Đĩa nuôi tế bào (12 giếng, 24 giếng, 96 giếng);**

**5.2.2 Chai nuôi tế bào (T25, T75);**

**5.2.3 Kính hiển vi soi ngược;**

**5.2.4 Buồng đếm tế bào;**

**5.2.5 Tủ ấm, có chứa 5% CO<sub>2</sub>, duy trì được ở 37 °C;**

### **5.3 Thiết bị, dụng cụ máy móc dùng cho phương pháp PCR và realtime PCR**

**5.3.1 Ống nghiền mẫu;**

**5.3.2 Ống PCR (0,1 ml, 0,2 ml);**

**5.3.3 Máy ly tâm lạnh, có thể thực hiện ở 1500 g đến 2500 g, 10000 g và 12000 g;**



**5.3.4 Máy lắc ống** (vortex mixer);

**5.3.5 Máy chiết tách DNA/RNA;**

**5.3.6 Máy PCR, máy realtime PCR;**

**5.3.7 Hệ thống điện di** (bộ nguồn, bể điện di, khuôn điện di, lược, máy đọc kết quả điện di);

**5.4 Thiết bị, dụng cụ cho phương pháp ELISA**

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

**5.5.2 Hệ thống rửa đĩa thủ công hoặc tự động;**

**6 Chẩn đoán lâm sàng**

**6.1 Dịch tễ học**

- Bệnh Rụt mỏ do N-GPV gây bệnh chủ yếu trên vịt. Bệnh thường xuất hiện ở vịt từ 1 tuần đến 1 tháng tuổi, tỷ lệ mắc từ 20 % đến 50 %, tỷ lệ chết từ 15 % đến 30 %. Vịt nuôi sà có mức độ lây lan và tỷ lệ mắc cao hơn vịt nuôi thả đồng. Bệnh ít xảy ra ở vịt trưởng thành.

- Bệnh lây lan chủ yếu do tiếp xúc giữa các thủy cầm khỏe mạnh và thủy cầm bị nhiễm bệnh. Bệnh có thể lây lan thông qua phân, thức ăn, nước uống chứa vi rút cho thủy cầm khỏe mạnh.

- Bên cạnh đó, những con cái sinh sản bị nhiễm bệnh cận lâm sàng đóng vai trò là vật mang mầm bệnh, từ đó truyền vi rút qua trứng và gây bệnh cho con non. Nhiễm trùng ngoài vỏ trứng cũng là tác nhân đưa mầm bệnh nhiễm vào những con không có bệnh trong trại ấp trứng.

**6.2 Triệu chứng lâm sàng**

- Các dấu hiệu lâm sàng đầu tiên là con vật di chuyển và ăn uống khó khăn. Sau đó có các dấu hiệu điển hình là: đi khập khiễng, một hoặc cả hai chân duỗi ra sau hoặc ra ngoài, mỏ ngắn, lưỡi nhô ra khỏi mỏ, có thể vát chéo sang một bên, đầu lưỡi có khi tổn thương thành sẹo. Con vật giảm ăn, còi cọc, lông xơ xác, chậm thay lông, chảy nước mắt, nước mũi, tiêu chảy, chậm phát triển.

- Bệnh gây ra sự sụt giảm đáng kể về trọng lượng và kích thước cho thủy cầm mắc bệnh.

**6.3 Bệnh tích**

- Vịt mắc bệnh có hiện tượng xung huyết ở mạch máu màng tim, gan, thận, lách, phổi, ruột.

- Có màng giả ở xoang miệng, bề mặt dạ dày tuyến và niêm mạc thực quản bám nhiều chất nhày đặc. Niêm mạc ruột mỏng, có màu đỏ nhạt và có dịch tiết viêm màu vàng bám vào. Túi mật chứa đầy dịch xanh đậm.

- Gan sưng to có phủ màng fibrin, cơ tim nhão và nhạt; một số con xuất huyết, tích dịch xoang bao tim, xuất huyết cơ đùi.

**7 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm**

**7.1 Lấy mẫu, bảo quản và xử lý mẫu**

### **7.1.1 Lấy mẫu**

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

Mẫu được lấy vào thời kỳ đầu của ổ dịch, mẫu được lấy ngay sau khi con vật bị ốm, chết hoặc mổ khám. Lấy mẫu từ 3 con đến 5 con.

- Với con vật đã chết hoặc mổ khám: lấy mẫu bệnh phẩm là lách, thận, tim, gan.
- Với con vật con sống: sử dụng xy lanh (5.1.3) để lấy máu ở cổ, cánh hoặc bàn chân, sử dụng tấm bông để ngoáy dịch mũi, ngoáy dịch họng, phân.
- Mẫu môi trường: lấy phân, nước uống, nước thải.
- Sản phẩm từ thủy cầm: thịt, phủ tạng, phụ phẩm và sản phẩm thịt đông lạnh/ ướp lạnh/ sơ chế của loài thủy cầm hoặc thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ loài thủy cầm.

Mẫu bệnh phẩm là huyết thanh để xét nghiệm phát hiện kháng thể.

### **7.1.2 Bảo quản mẫu**

Mẫu bệnh phẩm phải bao gói cẩn thận tránh lây lan, bảo quản ở nhiệt độ âm sâu hoặc ít nhất từ 2 °C đến 8 °C và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong 24 h.

CHÚ THÍCH:

- 1) 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).
- 2) Trong trường hợp không tiến hành xét nghiệm mẫu ngay thì mẫu xét nghiệm vi rút phải được bảo quản ở nhiệt độ ≤ 20 °C.
- 3) Mẫu ban đầu và rác thải xuất hiện trong quá trình chẩn đoán bệnh phải được phân loại, tiến hành hấp tiệt trùng và cho vào thùng rác y tế.

### **7.1.3 Xử lý mẫu**

Tạo huyền dịch 10% từ mẫu bệnh phẩm (lách, thận, tim, gan) trong dung dịch PBS (4.1.2) vô trùng (ví dụ: nghiền 1 g mẫu bệnh phẩm trong 9 ml dung dịch PBS). Sau đó ly tâm huyền dịch ở 2500 g trong 15 min bằng máy ly tâm (5.3.3). Thu dịch nổi để chẩn đoán phát hiện vi rút bằng phương pháp realtime PCR, PCR hoặc phân lập vi rút.

Bệnh phẩm là máu được giữ ở 4 °C đến 8 °C chờ đông rồi tách lấy huyết thanh để chẩn đoán phát hiện kháng thể.

## **7.2 Phương pháp phát hiện vi rút**

### **7.2.1 Phương pháp phân lập**

#### **7.2.1.1 Phân lập vi rút gây bệnh Rụt mỏ trên phôi trứng vịt**

Tham khảo Phụ lục B

#### **7.2.1.2 Phân lập vi rút gây bệnh Rụt mỏ trên tế bào xơ phôi vịt**

Tham khảo Phụ lục C

## 7.2.2. Phương pháp PCR

### 7.2.2.1 Chiết tách DNA

Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách DNA từ các dịch bệnh phẩm bằng kit chiết tách DNA/RNA (tham khảo Phụ lục D). DNA thu được sau quá trình chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.

### 7.2.2.2 Tiến hành phản ứng

- Sử dụng cặp mồi xuôi/ ngược cho phản ứng PCR (tham khảo mục E1, Phụ lục E) với nồng độ mồi 20  $\mu$ M.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (tham khảo mục E2, Phụ lục E) với nước tinh khiết (4.3.5).
- + Cho 20  $\mu$ l hỗn hợp Master mix vào ống PCR (5.3.2).
- + Cho 5  $\mu$ l DNA dương tính của vi rút gây bệnh Rụt mủ có giá trị Ct đã biết trước vào ống PCR đối chứng dương.
- + Cho 5  $\mu$ l nước tinh khiết (4.3.5) vào ống PCR đối chứng âm.
- + Cho 5  $\mu$ l DNA của mẫu đã tách chiết vào ống PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng PCR (tham khảo mục E3, Phụ lục E).
- Đặt ống PCR chứa hỗn hợp phản ứng vào máy PCR (5.3.6) và chạy máy theo chu trình đã cài đặt.

CHÚ THÍCH:

- 1) Phản ứng PCR phải bao gồm mẫu kiểm tra, mẫu đối chứng dương tính và đối chứng âm tính.
- 2) Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

### 7.2.2.3 Điện di

Chuẩn bị thạch Agarose 1,5 % pha trong dung dịch TBE (1X) bổ sung chất nhuộm gel (4.3.9) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đổ thạch vào khuôn điện di (có lược) (5.3.7).
- Thạch khô, rút lược ra và cho thạch vào bể điện di (5.3.7) có chứa dung dịch TBE (1X).
- Cho mẫu vào các giếng (10  $\mu$ l sản phẩm PCR + 2  $\mu$ l loading dye (4.3.10)).
- Sử dụng thang chuẩn DNA (4.3.7).
- Đậy nắp bể điện di lại (5.3.7) và kết nối với dòng điện, phải đảm bảo dòng điện được kết nối đúng cực. Điện di trong 30 min với hiệu điện thế từ 80 V đến 100 V.
- Sau khi điện di xong, tắt nguồn điện, lấy thạch ra rửa nước trong 5 min và đọc kết quả bằng ánh sáng UV thích hợp, chụp ảnh.

#### **7.2.2.4 Đọc kết quả**

- Phản ứng được công nhận:
- + Mẫu đối chứng âm tính không có vạch sản phẩm.
- + Mẫu đối chứng dương tính có vạch sản phẩm có kích thước 549 bp (thang chuẩn DNA).
- + Nếu một trong số mẫu đối chứng là không đúng thì phải thực hiện lại xét nghiệm.
- Với điều kiện phản ứng trên:
- + Mẫu xét nghiệm dương tính vi rút gây bệnh Rụt mỏ khi xuất hiện vạch sản phẩm có kích thước giống với kích thước mẫu đối chứng dương là 549 bp.
- + Mẫu âm tính không có vạch sản phẩm.
- + Mẫu xét nghiệm là nghi ngờ khi có vạch sản phẩm không rõ ràng hoặc không giống mẫu đối chứng dương. Những mẫu nghi ngờ cần làm lặp lại một lần nữa hoặc thực hiện phản ứng realtime PCR để khẳng định .

#### **7.2.3 Phương pháp realtime PCR**

##### **7.2.3.1 Chiết tách DNA**

Xem 7.2.2.1

##### **7.2.3.2 Tiến hành phản ứng**

Phương pháp realtime PCR

- Chọn môi và mẫu dò cho phản ứng realtime PCR (tham khảo mục F1, Phụ lục F) với nồng độ môi 20  $\mu$ M và nồng độ đoạn dò 10  $\mu$ M.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (tham khảo mục F2, Phụ lục F) với nước tinh khiết (4.3.5).
- + Cho 20  $\mu$ l hỗn hợp Master mix vào ống PCR (5.3.2).
- + Cho 5  $\mu$ l DNA dương tính của vi rút gây bệnh Rụt mỏ có giá trị Ct đã biết trước vào ống PCR đối chứng dương.
- + Cho 5  $\mu$ l nước tinh khiết (4.3.5) vào ống PCR đối chứng âm.
- + Cho 5  $\mu$ l DNA của mẫu đã tách chiết vào ống PCR
- Cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng realtime PCR (tham khảo mục F3, Phụ lục F).
- Đặt ống PCR chứa hỗn hợp phản ứng vào máy realtime PCR (5.3.6) và chạy máy theo chu trình đã cài đặt.

##### **7.2.3.3 Đọc kết quả**

Kết quả của phản ứng realtime PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).

- Phản ứng được công nhận:
- + Mẫu đối chứng âm tính cho kết quả không có giá trị Ct.
- + Mẫu đối chứng dương tính là mẫu chuẩn được chuẩn độ trước, cho kết quả dương tính và có giá trị Ct tương đương giá trị Ct đã biết ( $\pm 2$ ).
- + Nếu một trong số mẫu đối chứng là không đúng thì thực hiện lại xét nghiệm.
- Với điều kiện phản ứng trên:
- + Mẫu xét nghiệm dương tính với vi rút gây bệnh Rụt mủ khi có giá trị Ct  $\leq 35$ .
- + Mẫu xét nghiệm âm tính với vi rút gây bệnh Rụt mủ khi không có giá trị Ct hoặc giá trị Ct  $> 40$ .
- + Mẫu xét nghiệm được xem là nghi ngờ khi có giá trị Ct trong khoảng  $35 < Ct \leq 40$ . Những mẫu nghi ngờ này, cần được thực hiện lại xét nghiệm hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.

#### CHÚ THÍCH:

- 1) Phản ứng realtime PCR phải bao gồm mẫu kiểm tra, mẫu đối chứng dương tính và đối chứng âm tính.
- 2) 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.

### 7.3 Phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Hiện nay có nhiều bộ kit ELISA phát hiện kháng thể vi rút gây bệnh Rụt mủ ở thủy cầm có bán sẵn trên thị trường. Thực hiện phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất (tham khảo phụ lục G).

## 8. Kết luận

- Thủy cầm được xác định nhiễm vi rút gây bệnh Rụt mủ khi có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh và có kết quả xét nghiệm dương tính với một trong các phương pháp xét nghiệm sau:

- + Phương pháp realtime PCR cho kết quả dương tính.
- + Phương pháp PCR cho kết quả dương tính.
- + Phân lập được vi rút và kết quả khẳng định dương tính với vi rút gây bệnh Rụt mủ.

- Sản phẩm, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ thủy cầm và mẫu môi trường được xác định nhiễm vi rút gây bệnh Rụt mủ khi có kết quả xét nghiệm dương tính với một trong các phương pháp xét nghiệm sau:

- + Phương pháp realtime PCR cho kết quả dương tính.
- + Phương pháp PCR cho kết quả dương tính.
- + Phân lập được vi rút và kết quả khẳng định dương tính với vi rút gây bệnh Rụt mủ.

**Phụ lục A**

(Quy định)

**Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử****A.1 Dung dịch muối đệm photphat (PBS) pH 7,2 ± 0,2**

Thành phần:

Natri clorua (NaCl)	8 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Natri hydrophosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,15 g
Kali dihydro phosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan natri clorua, kali clorua, natri hydrophosphat và kali dihydro phosphat trong 1000 ml nước cất. Chỉnh pH trong khoảng 7,2 ± 0,2. Hấp ở 121 °C trong thời gian 15 min, 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.2 Dung dịch NaHCO<sub>3</sub> 7 %**

Thành phần:

NaHCO <sub>3</sub>	7 g
Nước cất	100 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Hấp ở 121 °C trong thời gian 15 min và bảo quản ở 4 °C.

**A.3 Dung dịch L-glutamine 3 %**

Thành phần:

L-glutamine	3 g
Nước cất	100 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C.

**A.4 Trypsin 0,5% (10X)**

Thành phần:

Trypsin	0,5 g
PBS	100 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ . Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C.

**A.5 Môi trường nuôi cấy tế bào**

Thành phần

MEM (Minimum Essential Medium)	435 ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	50 ml
L-glutamine 3 %	5 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7 %	5 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin)	5 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Dung dịch được bảo quản ở 4 °C.

**A.6 Môi trường duy trì tế bào**

Thành phần

MEM (Minimum Essential Medium)	480 ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	10 ml
L-glutamine 3 %	5 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7 %	5 ml
Kháng sinh (Penicillin/Streptomycin)	5 ml

Cách chuẩn bị: Hòa tan các thành phần trên. Dung dịch được bảo quản ở 4 °C.

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Phân lập vi rút gây bệnh Rụt mô trên phôi trứng vịt**

**B.1 Tiêm huyền dịch bệnh phẩm vào phôi trứng vịt:**

- Chọn trứng vịt có phôi từ 9 đến 11 ngày tuổi (không có kháng thể kháng vi rút gây bệnh Rụt mô), lấy từ trại vịt sạch bệnh.
- Soi trứng, chọn phôi khỏe. Mỗi mẫu bệnh phẩm tiêm từ 3 phôi đến 5 phôi.
- Sát trùng vỏ trứng bằng cồn 70% và đục một lỗ nhỏ làm vị trí tiêm ở phía trên buồng hơi.
- Sử dụng xy lanh hút 0,2 ml huyền dịch bệnh phẩm đã xử lý vô trùng tiêm vào xoang niệu mô.
- Bịt kín lỗ tiêm bằng keo.
- Ấp trứng ở nhiệt độ 37 °C. Theo dõi và soi trứng 2 lần/ ngày để kiểm tra sự sống sót của phôi.
- Các trứng có phôi chết bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.
- Sau 6 ngày, các trứng có phôi sống được giữ ở nhiệt độ 4 °C để làm chết phôi.

**B.2 Thu hoạch nước trứng**

- Thực hiện trong điều kiện vô trùng. Sát trùng vỏ trứng bằng cồn 70 %.
- Dùng panh và kéo vô trùng cắt vỏ trứng, bộc lộ xoang niệu mô.
- Hút dịch niệu mô từ 5 đến 10 ml/ trứng vào các ống nghiệm riêng rẽ, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C để khẳng định vi rút sau phân lập bằng phương pháp realtime PCR hoặc PCR.



**Phụ lục C**

(Tham khảo)

**Phân lập vi rút gây bệnh Rụt mỏ trên tế bào xơ phôi vịt****C.1 Chuẩn bị tế bào xơ phôi vịt (DEF – Duck Embryo Fibroblast)**

- Chọn trứng vịt có phôi từ 9 đến 10 ngày tuổi, phát triển tốt. Mổ trứng, lấy phôi.
- Rửa phôi trong dung dịch PBS có chứa 1 % kháng sinh.
- Cắt bỏ đầu, chân, cánh và các cơ quan phủ tạng.
- Rửa lại phôi từ 1 lần đến 2 lần trong dung dịch PBS có chứa 1 % kháng sinh.
- Dùng kéo cắt nhỏ phôi.
- Tách tế bào xơ phôi bằng dung dịch trypsin ẩm 0,5 % và ly tâm nhẹ 250 g (5.3.2) trong 15 min.
- Thu hoạch tế bào đã tách bằng cách lọc qua 4 lần vải gạc, cho vào môi trường MEM.
- Ly tâm huyền dịch tế bào ở tốc độ 1500 g trong 5 min ở 4 °C, loại bỏ phần nước trong.
- Rửa lại 1 lần với môi trường nuôi cấy.
- Đếm và pha loãng tế bào với môi trường phát triển (MEM + 10% FBS).

**C.2 Phân lập vi rút gây bệnh Rụt mỏ trên tế bào DEF**

- Cấy tế bào DEF trong các chai nuôi tế bào (5.2.2) hoặc đĩa nuôi tế bào (5.2.1). Sau khi tế bào mọc thành thảm (khoảng 70 %) gây nhiễm huyền dịch đã xử lý hoặc dịch niệu mô.
- Tiếp tục nuôi cấy ở tủ ấm 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>.
- Kiểm tra bệnh tích tế bào (CPE) trong chai hoặc đĩa nuôi cấy tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi (5.2.3).
- Nếu CPE đạt 70 % đến 80 % hoặc sau khi gây nhiễm 7 ngày không có CPE thì tiến hành thu hoạch hỗn dịch tế bào.
- Cho các chai nuôi cấy vào nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C làm đông, sau đó rã đông, lặp lại 2 đến 3 lần. Thu toàn bộ dịch nuôi cấy vào ống ly tâm (5.1.4). Cuối cùng ly tâm và thu phần nước trong để khẳng định vi rút hoặc cấy chuyển.
- Việc cấy chuyển 2 đến 3 lần là cần thiết trong quá trình phân lập.
- Khẳng định vi rút sau phân lập bằng phương pháp realtime PCR hoặc PCR.

**Phụ lục D**

(Tham khảo)

**Phương pháp chiết tách DNA**

**CẢNH BÁO:** Việc chiết tách DNA 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.

Hiện nay, có rất nhiều các loại kit chiết tách khác nhau được cung cấp trên thị trường. Ví dụ: sử dụng kit TACO DNA/ARN Extraction kit (cat. No. Atc-d/rna)<sup>1</sup> hoặc Kít Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA kit (Cat. No. 12280-050)<sup>2</sup>

**D.1 Kít TACO DNA/ARN Extraction kit (cat. No. Atc-d/rna)**

**D.1.1 Chuẩn bị**

- Pha dung dịch đệm rửa (Washing buffer A) với 135 ml cồn Ethanol 96 %.
- Pha dung dịch đệm rửa (Washing buffer B) với 230 ml cồn Ethanol 96 %.

**D.1.2 Cách tiến hành**

Các bước thực hiện theo sơ đồ sau:

Thuốc thử	Lượng (µl)	Thuốc thử	Lượng (µl)
Ethanol	200	Lysis buffer	500
Washing buffer A	750	Magnet beads	50
Washing buffer A	750		
Washing buffer B	750		
Washing buffer B	750		
Elution buffer	100		
Giống như trên			

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

- Nhỏ 200 µl Ethanol 96 % vào cột 1 (cột 7)
- Nhỏ 500 µl dung dịch Lysis buffer vào cột 1 (cột 7)

<sup>1</sup> và <sup>2</sup> 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. Khi sử dụng nên tuân thủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Nhỏ 750 µl dung dịch đệm rửa Washing buffer A vào cột 2 (cột 8)
- Nhỏ 750 µl dung dịch đệm rửa Washing buffer A vào cột 3 (cột 9)
- Nhỏ 750 µl dung dịch đệm rửa Washing buffer B vào cột 4 (cột 10)
- Nhỏ 750 µl dung dịch đệm rửa Washing buffer B vào cột 5 (cột 11)
- Nhỏ 100 µl dung dịch Elution buffer vào cột 6 (cột 12)
- Nhỏ 50 µl dung dịch Magnet beads vào cột 2 (cột 8). Lắc đều dung dịch Magnet beads trước khi nhỏ
- Cho 200 µl huyền dịch mẫu sau khi ly tâm vào các giếng ở cột 1 hoặc cột 7.
- Chuẩn bị máy chiết tách DNA/RNA (máy Taco) (5.3.5) : Khởi động, cài lọc vào máy.
- Đặt đĩa vào máy Taco và cho máy chạy.
- Sau khi máy chạy xong, thu 100 µl DNA từ các giếng tại cột 6 hoặc 12 sang các ống ly tâm từ 1,5 đến 2 ml mới để tiến hành xét nghiệm.

## **D.2 Kít Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA kit (Cat. No. 12280-050)**

### **D.2.1 Chuẩn bị**

- Chuẩn bị dung dịch RNA vận chuyển: Nhỏ 310 µl nước tinh khiết vào ống RNA vận chuyển đông khô (310 µg RNA vận chuyển/ống)
- Chuẩn bị dung dịch Wash buffer (1X): Thêm với 60 ml cồn Ethanol 96 % vào lọ dung dịch Wash buffer (5X).

### **D.2.2 Cách tiến hành**

- Nhỏ 25 µl protease K vào ống ly tâm 1,5 đến 2 ml (5.1.4).
- Nhỏ 200 µl huyền dịch bệnh phẩm vào ống ly tâm (5.1.4).
- Nhỏ 200 µl dung dịch Lysis Buffer (đã bao gồm 5,6 µg RNA vận chuyển) vào ống ly tâm.
- Lắc ống trong 15 s và ly tâm. Ủ ở 56 °C trong 15 min rồi ly tâm.
- Nhỏ 250 µl Ethanol 96 % vào ống, lắc đều trong 15 s rồi ly tâm.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 min.
- Chuyển toàn bộ dịch trong ống (675 µl) vào cột lọc có ống thu.
- Ly tâm cột lọc và ống thu ở gia tốc 6800 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash buffer (1X), ly tâm ở gia tốc 6800 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash buffer(1X), ly tâm ở gia tốc 6800 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng.

## **TCVN 8400-XX : 2025**

- Chuyển cột lọc sang ống thu mới, ly tâm ở gia tốc 14000 g trong 1 min.
- Chuyển cột lọc sang ống 1,5 ml sạch DNase/RNase.
- Nhỏ 50 µl nước sạch DNase/ RNase vào cột lọc, ủ 1 min ở nhiệt độ phòng
- Ly tâm cột lọc và ống 1,5 ml ở gia tốc 14000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Bỏ cột lọc, giữ lại ống ly tâm 1,5 đến 2 ml chứa 50 µl DNA. Bảo quản DNA ở 4 °C nếu thực hiện xét nghiệm ngay hoặc ở âm 20 °C nếu xét nghiệm sau 24 giờ.

**Phụ lục E**

(Tham khảo)

**Phương pháp PCR phát hiện vi rút gây bệnh Rút mỡ****E.1 Trình tự mồi****Bảng 1: Trình tự mồi**

Gen	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nồng độ (µM)	Kích thước sản phẩm (bp)	Tài liệu tham khảo
NS	GPV – F	TTT GGC HGC CCC TTT ACC TGA TCC	20	549	Chunhe Wan và cs, 2018
	MGPV – R	ATT TTT CCC TCC TCC CAC CA	20		

CHÚ THÍCH: Việc lựa chọn các mồi và mẫu dò cho phản ứng cần tham khảo theo hướng dẫn chẩn đoán bệnh động vật của Tổ chức Thú y Thế giới (WOAH) và các bài báo khoa học hàng năm để cập nhật mồi cho phù hợp.

**E.2 Thành phần phản ứng PCR****Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR**

TT	Thành phần (Theo hướng dẫn của kit Platinum® PCR SuperMix, Cat.No: 11306-016) <sup>3</sup>	Nồng độ (µM)	Thể tích (µl)
1	Dung dịch SuperMix		19
2	Mồi xuôi	20	0.5
3	Mồi ngược	20	0.5
4	Mẫu DNA		5
<b>Tổng</b>			<b>25</b>

CHÚ THÍCH: Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

**E.3. Chu trình nhiệt****Bảng 3: Chu trình nhiệt**

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	04 min	01
95 °C	40 s	35
53 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	07 min	01

<sup>3</sup> 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. Khi sử dụng nên tuân thủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

**Phụ lục F**

(Tham khảo)

**Phương pháp realtime PCR phát hiện vi rút gây bệnh Rút mỡ****F.1 Trình tự môi và đoạn dò****Bảng 1: Trình tự môi và đoạn dò**

Gen	Tên môi/ đoạn dò	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
VP3	N-GPV-F	CAA ATT CCA TCC TTC TCC AAA TCT	Wang và cs, 2017
	N-GPV-R	TCT GCA GGT ACT GGT GTA TTC TTG A	
	N-GPV-P	CTG CAC AAT CCA CCA CCA CAG GTC TTC - ECLIPSE	

CHÚ THÍCH: Việc lựa chọn các môi và mẫu dò cho phản ứng cần tham khảo theo hướng dẫn chẩn đoán bệnh động vật của WOAH và các bài báo khoa học hàng năm để cập nhật môi cho phù hợp.

**F.2 Thành phần phản ứng realtime PCR****Bảng 2: Thành phần phản ứng realtime PCR**

TT	Thành phần (Theo hướng dẫn của kit Platinum <sup>®</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017) <sup>4</sup>	Nồng độ ( $\mu$ M)	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Nước tinh khiết không có DNase/ RNase		6
2	Dung dịch SuperMix		12,5
3	Môi xuôi	20	0,5
4	Môi ngược	20	0,5
5	Đoạn dò	10	0,5
6	Mẫu DNA		5
<b>Tổng</b>			<b>25</b>

CHÚ THÍCH: Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

**F.3 Chu trình nhiệt****Bảng 3: Chu trình nhiệt**

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
50 °C	02 min	01
95 °C	30 s	01
95 °C	5 s	40
60 °C	35 s (Ghi nhận tín hiệu quang)	

<sup>4</sup> 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. Khi sử dụng nên tuân thủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

**Phụ lục G**

(Tham khảo)

**Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể Parvo vi rút**

Hiện nay có nhiều kit ELISA phát hiện kháng thể Parvo vi rút khác nhau được cung cấp trên thị trường. Ví dụ: sử dụng kit ID Screen® Duck Parvovirus Indirect của hãng ID.Vet (Cat.no: PARVOS-5P)<sup>5</sup> thì các bước được thực hiện như sau:

**G.1 Chuẩn bị**

- Chuẩn bị dung dịch rửa (1X):

Lắc đều dung dịch rửa đậm đặc 20 lần (20X) để hoà tan hết thành phần muối.

Sau đó pha loãng dung dịch rửa đậm đặc (20X) theo tỷ lệ 1/20 với nước cất/ nước khử ion.

**G.2 Thực hiện phản ứng**

Để tất cả thuốc thử đạt nhiệt độ phòng 21 °C ( ± 5 °C) trước khi sử dụng. Đồng nhất tất cả các thuốc thử bằng cách đảo ngược hoặc khuấy đều.

Đối chứng dương tính và âm tính được cung cấp sẵn. Không thêm dung dịch pha loãng vào các giếng đối chứng A1, B1, C1 và D1.

Các mẫu được thử nghiệm ở độ pha loãng cuối cùng là 1:500 trong dung dịch Dilution Buffer 14 (pha loãng trước 1:50, sau đó là 1:10 pha loãng trong microplate).

1. Thực hiện pha loãng mẫu với tỷ lệ 1/50 trong đĩa pha loãng:

- Nhỏ 245 µl dung dịch Dilution Buffer 14 vào tất cả các giếng (trừ giếng đối chứng A1, B1, C1 và D1).
- Nhỏ 5 µl của mẫu huyết thanh cần kiểm tra vào các giếng có dung dịch Dilution Buffer 14.

Sau đó trộn đều mẫu trong đĩa pha loãng bằng Pipet.

2. Thực hiện phản ứng trong đĩa ELISA:

- Nhỏ 100 µl đối chứng âm vào giếng A1 và B1
- Nhỏ 100 µl đối chứng dương vào giếng C1 và D1
- Nhỏ 90 µl dung dịch Dilution Buffer 14 vào các giếng còn lại (tùy theo số mẫu cần thử nghiệm)
- Nhỏ 10 µl mẫu đã pha loãng theo tỷ lệ 1/50 đã chuẩn bị ở trên.

3. Đậy nắp đĩa và ủ trong 30 min ( ± 3 min) ở 21 °C ( ± 5 °C).

4. Chuẩn bị Conjugate (1X) bằng cách pha loãng Conjugate (10X) theo tỷ lệ 1:10 với dung dịch Dilution Buffer 13 .

<sup>5</sup> 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. Khi sử dụng nên tuân thủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất

## TCVN 8400-XX : 2025

5. Đổ bỏ dung dịch trong đĩa ELISA. Rửa 3 lần bằng ít nhất 300  $\mu$ l dung dịch rửa (1X). Tránh làm khô các giếng giữa các lần rửa.
6. Nhỏ 100  $\mu$ l Conjugate (1X) vào mỗi giếng.
7. Đậy nắp đĩa và ủ trong 30 min ( $\pm$  3 min) ở 21 °C ( $\pm$  5 °C).
8. Đổ bỏ dung dịch trong đĩa. Rửa đĩa bằng cách thêm 300  $\mu$ l dung dịch rửa (1X) vào các giếng. Lặp lại 3 lần.
9. Nhỏ 100  $\mu$ l dung dịch Substrate vào mỗi giếng.
10. Đậy nắp đĩa và ủ 15 min ( $\pm$  2 min) ở nhiệt độ 21 °C ( $\pm$  5 °C) trong điều kiện tối.
11. Nhỏ 100  $\mu$ l dung dịch Stop Solution vào mỗi giếng để dừng phản ứng.
12. Đọc giá trị OD bằng máy đọc ELISA (5.5.1) ở bước sóng 450 nm.

### G.3 Đọc kết quả

- Điều kiện phản ứng được công nhận khi:  $OD_{PC} > 0.250$  và  $OD_{PC}/OD_{NC} > 3$

Trong đó: +  $OD_{PC}$  là giá trị OD trung bình của đối chứng dương

+  $OD_{NC}$  là giá trị OD trung bình của đối chứng âm

- Tính kết quả:

Đối với mỗi mẫu, tính tỷ lệ S/P và hiệu giá kháng thể như sau:

+ Tỷ lệ S/P

$$S/P = \frac{OD_{\text{mẫu}} - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}}$$

+ Hiệu giá kháng thể:

$$\text{Log}_{10}(\text{hiệu giá}) = 1,1 \times \text{log}_{10}(S/P) + 3,7$$

$$\text{Hiệu giá} = 10^{\text{log}_{10}(\text{hiệu giá})}$$

- Giải thích kết quả:

Giá trị S/P	Hiệu giá kháng thể	Trạng thái miễn dịch
$S/P \leq 0,15$	Hiệu giá $\leq 622$	Âm tính
$0.15 < S/P < 0,3$	$622 < \text{Hiệu giá} < 1333$	Nghi ngờ
$S/P \geq 0,3$	Hiệu giá $\geq 1333$	Dương tính

GHI CHÚ: Trong trường hợp kết quả nghi ngờ, thực hiện xét nghiệm lại.



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Wang et al., 2017. Development of a taqMan-based realtime PCR assay for the rapid and specific of novel duck- origin goose parvovirus.
- [2] ChunheWan et al., 2018. Development of a PCR assay for detection and differentiation of Muscovy duck and goose parvovirus based on NS gene characterization.
- [3] Chunhe et al., 2018. Specific detection of Muscovy duck parvovirus infection by TaqMan-based Realtime PCR assay.
- [4] Bhawna Poonia et al., 2007. Isolation and molecular characterization of a new Muscovy duck parvovirus from Muscovy ducks in the USA. Avian Pathology (December 2006) 35(6). 435-441.
- [5] Anna Karolina Matczuk et al., 2020. Short Beak and Dwarfism Syndrome in Ducks in Poland Caused by Novel Goose Parvovirus.
- [6] Jianye Wang et al., 2022. Reproduction and pathogenesis of short beak and dwarfish syndrome in Cherry Valley Pekin ducks infected with the rescued novel goose parvovirus.
- [7] Shilong Chen et al., 2016. Isolation and characterization of a distinct duck-origin goose parvovirus causing an outbreak of duckling short beak and dwarfism syndrome in China.
- [8] Nguyễn Thị Kim Oanh và cs, 2020. Ứng dụng PCR chẩn đoán parvovirus gây bệnh ở thủy cầm tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Thú y, tập XXVII.số 5.2020 (20-27).
- [9] TCCS 13:2023/CD-VR - Quy trình chẩn đoán, xét nghiệm bệnh Rụt mỏ do Parvovirus.
-