

TCVN 8400-xx : 2025

(Xuất bản lần 1)

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN xx : BỆNH CÚM GIA CẦM A/H9N2**

*Animal diseases – Diagnostic procedure –
Part xx : Avian influenza A/H9N2*

HÀ NỘI - 2025

Lời nói đầu

TCVN 8400-xx : 2025 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tài liệu của tổ chức Thú y thế giới (WOAH).

TCVN 8400-xx : 2025 do Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương - Cục Chăn nuôi và Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Môi trường đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8400 *Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán* gồm các phần sau:

- TCVN 8400-1 : 2019, *phần 1: Bệnh Lở mồm long móng;*
- TCVN 8400-2 : 2010, *phần 2: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus suis gây ra trên lợn;*
- TCVN 8400-3 : 2010, *phần 3: Bệnh giun xoắn;*
- TCVN 8400-4 : 2010, *phần 4: Bệnh Núi cát 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 : 2022, *phần 10: Bệnh Lao bò;*
- TCVN 8400-11 : 2019 *phần 11: Bệnh Dịch tả vịt;*
- TCVN 8400-12 : 2011, *phần 12: Bệnh Bạch lỵ và thương hàn ở gà;*
- TCVN 8400-13 : 2019, *phần 13: Bệnh Sảy thai truyền nhiễm do Brucella;*
- TCVN 8400-14 : 2011, *phần 14: Bệnh Tụ huyết trùng ở trâu bò;*
- TCVN 8400-15 : 2019, *phần 15: Bệnh xoắn khuẩn do Leptospira;*
- TCVN 8400-16 : 2011, *phần 16: Bệnh Phù ở lợn do vi khuẩn E.coli;*
- TCVN 8400-17 : 2011, *phần 17: Bệnh do Staphylococcus aureus ở gà;*
- TCVN 8400-18 : 2014, *phần 18: Bệnh Phù đầu gà (coryza);*
- TCVN 8400-19 : 2014, *phần 19: Bệnh Phó thương hàn lợn;*
- TCVN 8400-20 : 2014, *phần 20: Bệnh Đóng dấu lợn;*
- TCVN 8400-21 : 2014, *phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS);*
- TCVN 8400-22 : 2014 *phần 22: Bệnh Giả Viêm da nổi cục 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 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-xx : 2025

- 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 tỵ thư 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 cúm gia cầm A/H9N2

Animal disease – Diagnostic procedure – Part xx: Avian influenza A/H9N2

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 sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn này.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh cúm gia cầm do vi rút cúm A/H9N2 thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra trên các loài gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã.

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 cả các bản sửa đổi, bổ sung (nếu có).

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

TCVN 6507

QCVN 01 - 83: 2011/BNNT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về bệnh động vật – Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển.

3. Thuật ngữ, định nghĩa và từ viết tắt

3.1. Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1.1 Bệnh cúm gia cầm

Bệnh cúm gia cầm (CGC) là bệnh truyền nhiễm do vi rút cúm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra trên các loài gia cầm, thủy cầm và chim hoang dã. Dựa vào độc lực của vi rút cúm gia cầm các nhà

khoa học xếp loại: bệnh cúm gia cầm độc lực cao (HPAI), tỉ lệ chết rất cao và cúm gia cầm độc lực thấp (LPAI) với triệu chứng bệnh không rõ rệt và tỷ lệ chết thấp.

3.1.2 Vi rút cúm gia cầm

Vi rút cúm gia cầm (CGC) thuộc vi rút cúm type A, hệ gen của vi rút bao gồm 8 đoạn ARN sợi đơn âm (ssRNA). Vi rút được phân chia thành nhiều subtype khác nhau dựa trên hai glycoprotein bề mặt là HA (Haemagglutinin) và NA (Neuraminidases). Nhóm vi rút cúm A có 16 subtype HA (từ H1 đến H16) và 9 subtype NA (từ N1 đến N9). Sự tổ hợp giữa các subtype HA và NA sẽ tạo ra các subtype vi rút khác nhau, có khả năng biến đổi rất nhanh, tạo ra những chủng mới, nhánh mới.

Vi rút cúm A/H9N2 là vi rút cúm gia cầm type A, subtype H9N2 thường được biết đến là vi rút cúm gia cầm độc lực thấp (LPAI) thường không có triệu chứng bệnh hoặc có rất ít triệu chứng.

3.2 Từ viết tắt

- CGC: Cúm gia cầm
- Ct (Threshold cycle): Chu kỳ ngưỡng.
- HA (Haemagglutination assay): Phản ứng ngưng kết hồng cầu
- HI (Haemagglutination inhibition assay): Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu.
- HPAI (High pathogenic avian influenza): Cúm gia cầm độc lực cao.
- LPAI (Low pathogenic avian influenza): Cúm gia cầm độc lực thấp.
- PBS (Phosphate buffered saline): Dung dịch muối đệm phosphat.
- Realtime RT – PCR (Realtime reverse transcripton – Polymerase chain reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược thời gian thực.
- RNA (Acid ribonucleic): Axit ribonucleic.
- SAN (Specific antibody negative): Âm tính kháng thể đặc hiệu
- SPF (Specific pathogen free): Không có tác nhân gây bệnh.
- ssRNA ((single-stranded Acid ribonucleic): Axit ribonucleic sợi đơn
- TE (Tris – EDTA): Tris Axit – Etylendiamintetraaxetic.

4. Thuốc thử, vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích; sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương không có Rnase, trừ các trường hợp có quy định khác.

4.1 Ethanol, từ 70% đến 100% (C₂H₆O)

4.2 Hồng cầu gà (gà khỏe mạnh không chứa kháng thể cúm hoặc các kháng thể gây ngưng kết hồng cầu và vi rút cúm gia cầm)

4.3 Dung dịch muối đệm photphat (PBS)**4.4 Nguyên liệu tách chiết RNA****4.5 Nguyên liệu nhân gen cho phản ứng realtime RT - PCR****4.6 Cặp mồi, mẫu dò cho phản ứng realtime RT - PCR****4.7 Dung dịch đệm TE.****4.8 Nước tinh khiết, không có nuclease.****4.9 Mẫu chuẩn dương, được chứng nhận là dương tính hoặc RNA chuẩn dương tách chiết từ mẫu chuẩn dương.****4.10 Kháng nguyên chuẩn subtype H9N2****4.11 Kháng huyết thanh chuẩn subtype H9N2.****4.12 Trứng gà có phôi 9 – 11 ngày tuổi SPF hoặc SAN.****4.13 Natri Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)****5. Thiết bị, dụng cụ**

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

5.1 Máy realtime PCR**5.2 Máy ly tâm, có thể ly tâm với gia tốc 1 500 g, 6 000 g, 12 000 g.****5.3 Máy lắc trộn vortex****5.4 Máy ly tâm lắng spindown****5.5 Nồi hấp vô trùng, có thể duy trì ở nhiệt độ 110 °C, 121 °C.****5.6 Tủ an toàn sinh học cấp I, II.****5.7 Máy đồng nhất mẫu****5.8 Tủ mát, có thể duy trì ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C.****5.9 Tủ âm sâu, có thể duy trì ở nhiệt độ - 20 °C đến - 80 °C.****5.10 Ống vô trùng, dung tích 1,5 ml, 15 ml, 50 ml.****5.11 Ống PCR 0.1 – 0.2 ml, không chứa Rnase/Dnase.****5.12 Ống eppendorf, không chứa không chứa Rnase/Dnase.****5.13 Bơm tiêm vô trùng có dung tích 1 ml, 5 ml, 10 ml****5.14 Kim tiêm vô trùng loại 23G và 20G.****5.15 Dao mổ, panh và kéo, vô trùng.**

5.16 Micropipet có thể hút được dung tích 0.5 – 10 µl; 1 – 30 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl;

5.17 Đầu tip các loại , phù hợp với Micropipet.

5.18 Đĩa 96 giếng vô trùng đáy chữ V

5.19 Tăm bông, vô trùng.

5.20 Túi lynnơ vô trùng.

5.21 Ống nghiền mẫu.

5.22 Cối, chày sứ.

5.23 Máy tách chiết RNA/DNA tự động (nếu có)

5.24 Tủ áp trứng.

6. Chẩn đoán lâm sàng

6.1 Dịch tễ học

Bệnh cúm gia cầm có tính lây truyền rất nhanh và mạnh. Gia cầm nhiễm bệnh chủ yếu thông qua tiếp xúc trực tiếp giữa gia cầm mắc bệnh với gia cầm bị bệnh hoặc phân và chất thải của gia cầm bị bệnh.

Tùy thuộc vào loài mắc bệnh, lứa tuổi, loại gia cầm, yếu tố môi trường và độc lực của vi rút gây bệnh mà gia cầm khi nhiễm bệnh có biểu hiện các thể bệnh khác nhau:

- Thể độc lực cao: tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao có thể đến 100 % trong thời gian 2 ngày đến 3 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng đầu tiên.

- Thể độc lực thấp: thường gây bệnh lý nhẹ hoặc không có biểu hiện bệnh lý lâm sàng, dễ bội nhiễm cùng các bệnh gây ra do vi rút hoặc vi khuẩn khác.

Cúm gia cầm A/H9N2 thường được biết đến là CGC độc lực thấp (LPAI) lưu hành trên toàn thế giới và có thời gian lưu hành lâu dài trong các quần thể gia cầm ở Châu Á, Châu Phi và Trung Đông. Các loài chim nước hoang dã được coi là nguồn chứa vi rút. Chúng thường không có triệu chứng và mang trùng vi rút quanh năm, tỷ lệ mắc bệnh của quần thể có thể tăng lên theo mùa di cư.

6.2 Triệu chứng lâm sàng

Cúm gia cầm A/H9N2 thường không có triệu chứng rõ rệt hoặc có rất ít triệu chứng không như bệnh gây ra bởi cúm gia cầm thể độc lực cao subtype H5 và H7. Một số triệu chứng của cúm A/H9N2 được ghi nhận:

- Giảm tiêu thụ thức ăn và nước, trầm cảm, lơ đãng, lông xù, ho, hắt hơi

- Giảm sản lượng trứng, trứng bị biến dạng.

- Tím tái nhẹ ở mào và yếm

6.3 Bệnh tích

- Tổn thương đại thể chỉ thấy ở hệ hô hấp, có tình trạng đục túi khí ngực và bụng, kèm tắc nghẽn nhẹ ở khí quản và phổi.
- Viêm nhiễm trùng lỗ mũi, chảy dịch nhiều ở mắt
- Viêm nhẹ ống dẫn trứng và viêm buồng trứng
- Có tổn thương bệnh mô học ở khí quản, phổi với tình trạng viêm lympho, viêm phổi kẽ.
- Tăng cân chậm.

7. Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

Tất cả các thao tác liên quan đến xử lý chuẩn bị mẫu, tách chiết RNA, phân lập vi rút trong tiêu chuẩn này phải được tiến hành trong tủ an toàn sinh học cấp 2 trở lên.

7.1 Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển và xử lý mẫu

Lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu được thực hiện theo QCVN 01-83: 2011/BNNTPTNT

7.1.1 Lấy mẫu

a) Gia cầm chết hoặc nghi mắc bệnh

Mổ khám theo TCVN 8402 : 2010

Lấy 3 gam đến 5 gam bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, ruột...) của gia cầm chết hoặc nghi mắc bệnh cho vào ống nghiệm 50 ml (5.10) hoặc túi lỵnon vô trùng (5.20).

b) Gia cầm sống không có triệu chứng lâm sàng

Sử dụng tăm bông vô trùng (5.19) để ngoáy dịch hầu họng, ổ nhóp (swab) sau đó cho vào ống nghiệm chứa dung dịch PBS (xem A.2, phụ lục A) có bổ sung dung dịch kháng sinh theo tỉ lệ 1:10 (xem A.1, phụ lục A).

c) Mẫu môi trường

Sử dụng tăm bông vô trùng (5.19) quét mẫu phân tươi cho vào ống nghiệm có chứa dung dịch PBS (xem A.2, phụ lục A) có bổ sung dung dịch kháng sinh theo tỉ lệ 1:10 (xem A.1, phụ lục A).

Sử dụng bơm tiêm 5 ml vô trùng (5.13) hút khoảng 3 ml nước uống hoặc nước thải tại nơi nuôi nhốt gia cầm cho vào ống nghiệm vô trùng 15 ml (5.10).

d) Các sản phẩm động vật đông lạnh, sản phẩm có nguồn gốc từ gia cầm và môi trường

Lấy mẫu sản phẩm theo TCVN 6507

Lấy khoảng 10 g từ các vị trí khác nhau và cho vào ống nghiệm 50 ml vô trùng (5.10)

CHÚ THÍCH: Đối với mẫu xét nghiệm vi rút cúm gia cầm, có thể gộp tối đa 05 mẫu đơn thành 01 mẫu xét nghiệm.

e) Mẫu huyết thanh

Thực hiện đối với gia cầm chưa tiêm vắc xin cúm gia cầm và cả gia cầm đã được tiêm phòng vắc xin cúm gia cầm: lấy máu bằng cách sử dụng bơm và kim tiêm loại 5 ml (5.13) để hút 1 ml máu của động vật cần kiểm tra, rút cán bơm tiêm tới mức cao nhất để tạo nhiều khoảng trống bên trong, đặt bơm tiêm nằm nghiêng 5° ở nhiệt độ 20 °C đến 30 °C trong thời gian 30 min để máu tự đông lại và tiết ra huyết thanh. Chất huyết thanh sang ống 1,5 ml (5.10) mới để dùng cho xét nghiệm.

Các mẫu phải được bảo quản lạnh từ 2 °C đến 8 °C và vận chuyển nhanh nhất đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 h.

7.1.2 Bảo quản và vận chuyển mẫu

Tất cả các mẫu bệnh phẩm (xem 7.1.1) phải được bao gói bằng dụng cụ vô trùng, đảm bảo an toàn sinh học, bảo quản ở nhiệt độ 2 °C – 8 °C trong thùng bảo ôn, vận chuyển ngay đến phòng xét nghiệm, trong vòng không quá 24 h. Trong phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, mẫu phải được giữ trong tủ - 80 °C (5.9)

- Trường hợp mẫu vận chuyển trên quãng đường dài không thể bảo quản lạnh thì môi trường bảo quản cần bổ sung 10% glycerol.

CHÚ THÍCH: Các mẫu bệnh phẩm phải được dán nhãn, có ký hiệu thích hợp và kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm với các thông tin dịch tễ, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích của bệnh (nếu mổ khám).

7.1.3 Xử lý mẫu

Mẫu bệnh phẩm (xem 7.1.1) được xử lý tại phòng thí nghiệm như sau:

a) Mẫu mô bệnh phẩm

Cắt nhỏ 1g mẫu bệnh phẩm bằng panh, kéo (5.15), đồng nhất bằng ống nghiền mẫu (5.21) hoặc cối chày sứ (5.22) với dung dịch PBS (xem A.2, phụ lục A). Chuyển sang ống ly tâm và ly tâm ở 8000 g trong 15 s.

Thu dịch bệnh phẩm phía trên vào ít nhất 02 ống nghiệm 1,5 ml (5.10). Một ống dùng cho xét nghiệm và ống còn lại lưu bảo quản ở nhiệt độ - 80 °C.

b) Dịch ngoáy ổ nhóp, họng, khí quản, phân tươi, môi trường

Lắc ống chứa tăm bông dịch ngoáy hầu họng, ổ nhóp (swab) bằng máy lắc (5.3) trong 15 s, ly tâm ống bằng máy ly tâm (5.2) ở 8000 g trong 15 s.

Thu dịch bệnh phẩm phía trên vào ít nhất 02 ống nghiệm 1,5 ml (5.10). Một ống dùng cho xét nghiệm và ống còn lại lưu bảo quản ở nhiệt độ - 80 °C.

c) Đối với sản phẩm đông lạnh

Lấy mẫu từ các mô mẫu rồi gộp thành 1 mẫu, lượng mẫu lấy để tách chiết RNA khoảng 01 g.

Cắt nhỏ 1g mẫu bệnh phẩm bằng panh, kéo (5.15), đồng nhất bằng ống nghiền mẫu (5.21) hoặc cối chày sứ (5.22) với dung dịch PBS (xem A.2, phụ lục A). Chuyển sang ống ly tâm và ly tâm ở 8000 g trong 15 s.

Thu dịch bệnh phẩm phía trên vào ít nhất 02 ống nghiệm 1,5 ml (5.10). Một ống dùng cho xét nghiệm và ống còn lại lưu bảo quản ở nhiệt độ - 80 °C.

7.2 Phát hiện vi rút CGC bằng phương pháp realtime RT – PCR

7.2.1 Tách chiết RNA

Căn cứ điều kiện phòng thí nghiệm và loại mẫu bệnh phẩm để lựa chọn kĩ thuật và nguyên liệu tách chiết RNA thích hợp.

- Sau khi xử lý mẫu, lấy dịch bệnh phẩm phía trên (7.1.3) để tách chiết RNA (xem phụ lục B)
- Mẫu RNA thu được sau tách chiết được dùng để xét nghiệm vi rút CGC type A, subtype H9, và subtype N2.
- Mẫu RNA được bảo quản ở 4 °C nếu tiến hành xét nghiệm ngay hoặc bảo quản ở - 20 °C chờ đến khi tiến hành xét nghiệm.

7.2.2 Thực hiện phản ứng realtime RT – PCR

a) Chuẩn bị cặp mồi, mẫu dò

- Trình tự cặp mồi, mẫu dò xác định vi rút CGC A/H9N2 (xem bảng C.2, phụ lục C).
- Chuẩn bị cặp mồi và mẫu dò ở nồng độ sử dụng thích hợp (xem C.3.1, phụ lục C)

b) Tiến hành phản ứng

Cặp mồi, mẫu dò đã chuẩn bị ở nồng độ sử dụng thích hợp cùng kit nhân gen, pha hỗn hợp nhân gen theo hướng dẫn của bộ kit (xem các bảng C.3.2.1, bảng C.3.2.2 hoặc bảng C.3.2.3, phụ lục C)

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống PCR 0.1 – 0.2 ml (5.11)

- Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ARN chuẩn dương;
- Mẫu đối chứng âm: Cho 5 µl nước tinh khiết không có nuclease;
- Mẫu kiểm tra: Cho 5 µl mẫu ARN kiểm tra vào ống phản ứng;
- Ly tâm lắng ống phản ứng trong khoảng 30 s.

CHÚ THÍCH :

- 1) Mỗi phản ứng realtime RT- PCR ngoài mẫu cần kiểm tra đều phải đi kèm với mẫu đối chứng dương và đối chứng âm tương ứng của vi rút cần xác định.
 - 2) Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng realtime RT – PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy nhân gen (5.1), cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng (bảng C.3.2.4, phụ lục C)

Đọc kết quả

Phản ứng được công nhận: Mẫu đối chứng dương tính (được chuẩn độ trước) phải có giá trị Ct tương đương giá trị Ct đã biết (± 2 Ct), mẫu đối chứng âm không có Ct.

Với điều kiện phản ứng trên:

- Mẫu có giá trị Ct ≤ 35 được coi là dương tính.
- Mẫu không có giá trị Ct là âm tính.
- Mẫu có giá trị $35 < Ct \leq 40$ được coi là nghi ngờ.

Những mẫu nghi ngờ, cần tiến hành xét nghiệm lại hoặc lấy mẫu lại để xét nghiệm lại (nếu cần).

7.3 Phân lập vi rút CGC trên phôi trứng

Tất cả các thao tác tiêm truyền trứng và thu hoạch nước trứng (dịch niệu mô) sau phân lập phải được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3.

7.3.1 Chuẩn bị mẫu

Mẫu bệnh phẩm được xử lý (7.1.3), lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 μm để loại bỏ vi khuẩn trước khi tiêm truyền trên phôi trứng.

7.3.2 Tiêm truyền

- Chọn trứng gà SPF hoặc trứng gà SAN có phôi 9 ngày đến 11 ngày tuổi (4.12) để tiêm truyền huyền dịch bệnh phẩm đã xử lý (7.3.1).
- Mỗi bệnh phẩm tiêm truyền từ 3 – 5 trứng.
- Xác định túi niệu mô và buồng hơi của phôi trứng. Đục thủng buồng hơi, dùng bơm tiêm 1 ml (5.13) với kim 23G (5.14) hút huyền dịch đã xử lý (mục D.1) tiêm thẳng xuống túi niệu mô với lượng 0,1 ml/trứng. Bịt kín lỗ tiêm trên vỏ trứng bằng keo dán.
- Đặt trứng trong tủ ấp trứng (5.24) ở 37 °C và theo dõi trong vòng 2 – 7 ngày.
- Soi trứng mỗi ngày 2 lần, nếu phát hiện trứng chết, giữ trứng trong tủ mát (4 °C) (5.8) cho đến khi thu hoạch dịch niệu mô để giám định vi rút, nên thu hoạch sớm trong vòng 12 h sau khi phát hiện trứng chết để tránh nhiễm khuẩn dịch niệu mô.
- Đối với trứng không chết sau 5 - 7 ngày, cất vào tủ mát (4 °C) (5.8) qua đêm hoặc ít nhất 4 h trước khi thu hoạch dịch niệu mô cho giám định vi rút.

7.3.3 Thu hoạch dịch niệu mô

- Sát trùng vỏ trứng bằng cồn 70 %.
- Dùng panh và kéo vô trùng (5.15) cắt vỏ trứng, bộc lộ buồng hơi.
- Dùng bơm tiêm 5 ml hoặc 10 ml (5.13) với kim 20G (5.14) chọc qua lớp màng xoang niệu mô hút lấy dịch niệu mô chứa vào các ống 15 ml vô trùng (5.10) để giám định vi rút.

- Kiểm tra bệnh tích của phôi: trường hợp mẫu âm tính hoặc vi rút độc lực thấp, hàm lượng vi rút thấp, phôi sẽ không có biểu hiện bệnh tích.

Trường hợp mẫu có vi rút cúm độc lực cao, phôi sẽ có xuất huyết lấm tấm trên đầu, thân, cánh, chân.

7.3.4 Giám định vi rút

- Tiến hành xác định sự có mặt của vi rút gây ngưng kết hồng cầu bằng phản ứng HA (phụ lục E).
- Giám định các mẫu nước trứng dương tính HA bằng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) với kháng thể kháng cúm gia cầm subtype H9 chuẩn (Phụ lục F)
- Hoặc giám định vi rút cúm gia cầm bằng phương pháp realtime RT-PCR với cặp mồi/mẫu dò tương ứng với từng subtype (xem 7.2).
- Với những mẫu dịch niệu mô sau khi giám định là âm tính cần tiến hành tiêm truyền lại một lần nữa trên phôi trứng như trên để xác nhận lại.

7.3.5 Đánh giá kết quả

- Mẫu dương tính: khi có kết quả xét nghiệm dương tính bằng phương pháp HI với subtype H9, hoặc phương pháp realtime RT-PCR.
- Mẫu âm tính: Khi có kết quả âm tính với phương pháp HA, hoặc phương pháp realtime RT PCR.

Trong trường hợp giám định âm tính, dùng dịch niệu mô thu hoạch ở lần thứ nhất để tiêm truyền trứng lần hai. Sau đó theo dõi và thu hoạch dịch niệu mô như lần thứ nhất để giám định vi rút. Nếu kết quả giám định lần thứ hai vẫn âm tính thì kết luận mẫu âm tính với vi rút cúm gia cầm.

7.4 Phát hiện kháng thể CGC bằng phương pháp HI

7.4.1 Xử lý mẫu

Huyết thanh kiểm tra: Ngoại trừ huyết thanh gà, trước khi xét nghiệm huyết thanh của các loài (không phải là gà) như vịt, ngan, ngỗng... cần được vô hoạt bổ thể ở 56 °C trong 30 min và phải xử lý hấp phụ hồng cầu để tránh hiện tượng ngưng kết giả.

Cách hấp phụ hồng cầu: trộn hồng cầu gà đặc với huyết thanh cần kiểm tra theo tỷ lệ 1: 20, ví dụ 25 µl hồng cầu gà + 500 µl huyết thanh. Trộn nhẹ và để lắng ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 30 min. Sau đó ly tâm 800 g trong 2 – 5 min rồi thu lấy dịch huyết thanh ở trên để làm phản ứng HI.

7.4.2. Cách tiến hành

Theo phụ lục G

7.4.3 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính: hồng cầu lắng xuống đáy, khi nghiêng đĩa phản ứng tạo dòng chảy liền mạch
- Phản ứng âm tính: hồng cầu ngưng kết lấm chấm, không chảy thành dòng.

Hiệu giá kháng thể được tính ở độ pha loãng cao nhất còn có hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu hoàn toàn.

Mẫu huyết thanh được coi là dương tính với kháng thể kháng vi rút cúm gia cầm khi có hiệu giá HI $\geq 1/16$ ($4 \log_2$).

Mẫu huyết thanh được xem là âm tính (không có kháng thể) khi có hiệu giá kháng thể HI $\leq 1/8$ ($3 \log_2$)

8 Kết luận

- Gia cầm, thủy cầm hoặc chim hoang dã được xác định mắc bệnh cúm A/ H9N2 khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh cúm gia cầm và có kết quả xét nghiệm dương tính với phương pháp realtime RT-PCR, hoặc phân lập vi rút trên trứng trong tiêu chuẩn này
- Gia cầm, thủy cầm hoặc chim hoang có kết quả dương tính kháng thể H9N2 bằng phương pháp HI được coi là nhiễm vi rút CGC A/H9N2 (khi gia cầm chưa tiêm phòng vắc xin phòng cúm gia cầm).
- Gia cầm, sản phẩm từ gia cầm được coi là nhiễm vi rút CGC A/H9N2 khi có kết quả xét nghiệm dương tính với phương pháp realtime RT – PCR hoặc phân lập vi rút trên trứng trong tiêu chuẩn này.

Phụ lục A

(Quy định)

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

Penicillin	1.000.000 IU
Streptomycin	1 g
Nystatin	500.000 IU
Nước cất	10 ml

Cách chuẩn bị:

Hòa tan các thành phần trong 10 ml nước cất, lọc vô trùng bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Sử dụng tốt nhất trong 1 tuần, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

A.2 Dung dịch muối đệm photphat (PBS) pH ≈ 7,4 .**Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	8 g
Natri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,9 g
Kali dihydro photphat (KH_2PO_4)	0,2 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Nước cất	1000 ml

Cách chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong 1000 ml nước cất. Chính pH trong khoảng 7.4 ± 0.2 bằng dung dịch NaOH 1 N hoặc dung dịch HCl 1 N. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

Để dùng làm dung dịch bảo quản mẫu: pha 9 phần PBS + 1 phần dung dịch kháng sinh đậm đặc (A.1). Trường hợp mẫu cần bảo quản lâu có thể pha thành môi trường đệm glycerin bằng cách trộn đều 1 phần PBS với 1 phần glycerin (tỷ lệ 1 : 1). Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C và lâu hơn nếu bảo quản ở nhiệt độ - 20 °C.

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

A.3 Dung dịch natri citrat 4%

Thành phần

Natri citrat	4g
Nước cất	100 ml

Cách chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong 100 ml nước cất, lọc vô trùng bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Quy trình tách chiết RNA

CẢNH BÁO: Việc tách chiết RNA 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.

Căn cứ vào điều kiện thực tiễn của phòng thí nghiệm mà lựa chọn nguyên liệu tách chiết RNA thích hợp. Ví DỤ: kit tách chiết TACO DNA/RNA Extraction Kit hoặc kit tương đương.

B.1 Nguyên liệu

- Bộ kit tách chiết TACO DNA/RNA extraction kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna)¹
- Cồn Ethanol 96 %-100 % (4.1)

B.2 Cách tiến hành

Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- 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 %.
- Tiến hành nhỏ các dung dịch cho việc chiết tách theo sơ đồ:

Thuốc thử	Lượng (µl)	Thuốc thử	Lượng (µl)		H	G	F	E	D	C	B	A	
Ethanol	200	Lysis buffer	500	→									1
Washing buffer A	750	Magnet beads	50	→									2
Washing buffer A	750			→									3
Washing buffer B	750			→									4
Washing buffer B	750			→									5
Elution buffer	100			→									6
Giống như trên													7
													8
				→									9
													10
													11
													12

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

TCVN 8400-xx : 2025

- Cho 200 µl huyền dịch mẫu đã được xử lý (7.1.3) sau khi ly tâm vào các giếng ở cột 1 hoặc cột 7.
- Chuẩn bị máy chiết tách (5.23): Khởi động, cài lọc sạch vào máy.
- Đặt đĩa đã nhỏ mẫu và dung dịch ở trên vào máy Taco và cho máy chạy.
- Sau khi máy chạy xong, thu 100 µl RNA từ các giếng tại cột 6 hoặc 12 sang các ống sạch vô trùng free RNA/DNA (5.12) mới để tiến hành xét nghiệm.

Phụ lục C

(Tham khảo)

**Trình tự cặp mồi, mẫu dò, thành phần phản ứng và chu trình nhiệt cho phản ứng
realtime RT – PCR phát hiện CGC A/H9N2****C.1 Nguyên liệu**

- Nước tinh khiết không có nuclease;
- Dung dịch đệm TE
- Cặp mồi và mẫu dò phát hiện vi rút CGC A/H9N2.
- Kit nhân gen realtime RT - PCR

VÍ DỤ: kit Quantabio qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix (95132-500) ² hoặc kit tương đương phù hợp nhân gen realtime RT - PCR.

C.2 Trình tự cặp mồi, mẫu dò cho phương pháp realtime RT – PCR**Bảng C.2 - Cặp mồi và mẫu dò phát hiện vi rút CGC A/H9N2**

TT	Gen đích	Cặp mồi/mẫu dò	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'
1	Type A ^[4]	Mồi xuôi M (InfA)	5'- GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3'
		Mồi ngược M (InfA)	5'- AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA-3'
		Đoạn dò M (InfA)	5'- FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG BHQ1-3'
		Mồi xuôi M (IVA-D161M)	5'- AGA TGAGYCTTCTAACCGAGGTCTG-3'
		Mồi ngược (IVA-D162M)	5'- TGC AAA NAC ATC YTC AAG TCT CTG-3'
		Đoạn dò M (IVA-MA)	5'- FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1-3'
2	Subtype H9 ^[6]	Mồi xuôi H9	5'- ATGGGGTTTGCTGCC -3'
		Mồi ngược H9	5'-TTATATACAAATGTTGCAC(T)CTG-3'
		Đoạn dò H9	5'- FAM- TTCTGGGCCATGTCCAATGG-TAMRA -3'
3	Subtype N2 ^[7]	Mồi xuôi N2 (AIVN2-1367F)	5'- AGTCTGGTGGACYTCAAAYAG -3'
		Mồi ngược N2 (AIVN2-1418R)	5'-GCGAAAGCTTATATAGSCAT-3'
		Đoạn dò N2 (AIVN2R- 1383FAM)	5'FAM-CCATCAGGCCATGAGCCTG (RTQ1)-3'

CHÚ THÍCH:

²⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương

- 1) Việc lựa chọn các môi và mẫu dò cho phản ứng realtime RT-PCR cần tham khảo theo hướng dẫn của Tổ chức Thú y Thế giới (OIE/WOAH), hoặc quy trình của Phòng thí nghiệm tham chiếu của OIE về bệnh, đồng thời cần được đánh giá trên các mẫu chuẩn để cập nhật môi cho phù hợp.
- 2) Trong trường hợp vi rút có biến đổi về cấu trúc gen và không phát hiện được với cặp môi/ mẫu dò như trong Bảng C.1, Phòng thí nghiệm cần gửi mẫu giải trình tự gen để xác định sự thay đổi về trình tự gen HA và lựa chọn trình tự môi/ mẫu dò phù hợp.

C.3 Thực hiện phản ứng nhân gen Realtime RT - PCR

C.3.1 Chuẩn bị cặp môi và mẫu dò

- Hoàn nguyên : Môi và mẫu dò ở trạng thái đông khô được ly tâm nhanh (5.4) ở gia tốc 8 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (4.7) để hoàn nguyên môi và mẫu dò ở nồng độ 100 µM làm môi gốc và mẫu dò gốc.

- Pha nồng độ sử dụng: Chuẩn bị môi sử dụng ở nồng độ 20 µM, mẫu dò sử dụng ở nồng độ 6 µM được pha loãng từ môi gốc, mẫu dò gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (4.8)

Ví DỤ: lấy 20 µl môi gốc có nồng độ 100 µM và thêm 80 µl nước tinh khiết không có nuclease (4.8) sẽ được môi sử dụng có nồng độ 20 µM / µl.

Ví DỤ: lấy 6 µl mẫu dò gốc có nồng độ 100 µM và thêm 94 µl nước tinh khiết không có nuclease (4.8) sẽ được mẫu dò sử dụng có nồng độ 6 µM / µl.

C.3.2 Cách tiến hành

Dùng cặp môi, mẫu dò ở nồng độ sử dụng thích hợp và kit nhân gen realtime RT – PCR, pha hỗn hợp nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần và lượng cho 1 phản ứng xem bảng C.3.2.1 hoặc bảng C.3.2.2 hoặc bảng C.3.2.3

Chu trình nhiệt xem bảng C.3.2.4.

Bảng C.3.2.1 - Thành phần phản ứng realtime RT - PCR phát hiện vi rút CGC type A

Thành phần	Nồng độ	Thể tích cho 1phản ứng (µl)
Nước tinh khiết		6
2X Reaction Mix		12.5
Môi xuôi M (InfA)	20 µM	0.25
Môi ngược M (InfA)	20 µM	0.25
Đoạn dò M (InfA)	6 µM	0.25
Môi xuôi M (IVA-D161M)	20 µM	0.25
Môi ngược M (IVA-D162M)	20 µM	0.25
Đoạn dò M (IVA-MA)	6 µM	0.25
Mẫu ARN		5
Tổng thể tích		25

Bảng C.3.2.2 - Thành phần phản ứng realtime RT – PCR phát hiện vi rút CGC subtype H9

Thành phần	Nồng độ	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
Nước tinh khiết		6
2X Reaction Mix		12.5
Mồi xuôi H9	20 µM	0.5
Mồi ngược H9	20 µM	0.5
Đoạn dò H9	6 µM	0.5
Mẫu RNA		5
Tổng thể tích		25

Bảng C.3.2.3 - Thành phần phản ứng realtime RT - PCR phát hiện vi rút CGC subtype N2

Thành phần	Nồng độ	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
Nước tinh khiết		6
2X Reaction Mix		12.5
Mồi xuôi N2	20 µM	0.5
Mồi ngược N2	20 µM	0.5
Đoạn dò N2	6 µM	0.5
Mẫu RNA		5
Tổng thể tích		25

- Tiến hành phản ứng realtime RT – PCR bằng máy nhân gen (5.1) cài đặt chu trình nhiệt như trong bảng C.3.2.4

Bảng C.3.2.4 - Chu trình nhiệt phản ứng realtime RT - PCR

Các bước phản ứng PCR	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
1	50	15 min	01
2	95	2 min	
3	95	15 s	40
4	60	45 s Ghi nhận tín hiệu quang ở bước này	

CHÚ THÍCH: Chu trình nhiệt của phản ứng Realtime RT – PCR có thể thay đổi tùy theo từng loại kit nhân gen sử dụng và nhiệt độ bắt cặp của từng cặp mồi/mẫu dò. Phòng thí nghiệm cần tối ưu phản ứng trước khi đưa vào áp dụng.

Phụ lục D

(Qui định)

Chuẩn bị hồng cầu gà 1%

D.1 Nguyên liệu và dụng cụ

- Gà lấy máu là gà đã trưởng thành, khỏe mạnh âm tính kháng thể CGC, Niu cát xon, và được nuôi ở chuồng an toàn dịch bệnh.
- Xy lanh 10 ml
- Dung dịch chống đông: Natri citrat 4% (xem A.3, phụ lục A)
- Dung dịch PBS (xem A.2, phụ lục A)
- Máy ly tâm và các dụng cụ phòng thí nghiệm khác.

D.2 Chuẩn bị hồng cầu

- Sát trùng vị trí lấy máu (tĩnh mạch cánh hoặc tim) bằng bông cồn 70 %. Dùng bơm tiêm từ 5 ml đến 10 ml hút khoảng 1 ml dung dịch chống đông (Natri citrat 4%) để lấy máu gà. Cho máu vào ống nghiệm.

Ghi chú: Tỷ lệ tối thiểu của dung dịch Natri citrat và máu là 1: 4

- Rửa hồng cầu:

+ Cho PBS vào ống lấy máu, một lượng gấp đôi lượng máu trong ống, lắc đều nhẹ nhàng. Ly tâm ở 1000 g trong 10 min, bỏ huyết tương ở trên.

+ Rửa như trên từ 2 lần đến 3 lần. Sau lần ly tâm cuối, bỏ nước ở trên, lấy hồng cầu để pha thành hồng cầu 1%.

Hồng cầu gà đặc	1 ml
-----------------	------

Dung dịch PBS (pH ~ 7,4)	99 ml
--------------------------	-------

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

Phụ lục E

(Qui định)

Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)**E.1 Nguyên liệu và dụng cụ**

- Hồng cầu gà 1% (phụ lục D)
- Dịch niệu mô thu hoạch sau phân lập (hoặc kháng nguyên chuẩn vi rút CGC subtype H9)
- Dung dịch PBS (xem A2, phụ lục A)
- Đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ V (5.18)
- Micropipet đơn kênh và đa kênh.

E.2 Tiến hành phản ứng

Phản ứng được tiến hành trên đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ V. Thực hiện phản ứng theo Sơ đồ E.2

Bảng E.2 – Sơ đồ phản ứng ngưng kết hồng cầu HA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Kháng nguyên ((μl)	25	Trộn đều, chuyển 25 μl từ giếng 1 đến giếng 11 rồi hút bỏ 25 μl										0
PBS (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Hồng cầu 1 % (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Độ pha loãng KN	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	

- Cho 25 μl dung dịch PBS vào các giếng của đĩa nhựa 96 giếng đáy V
- Cho 25 μl dịch kháng nguyên vi rút vào giếng đầu tiên của đĩa nhựa 96 giếng đã nhỏ PBS ở trên.
- Pha loãng kháng nguyên vi rút theo hệ số 2: Trộn đều kháng nguyên với PBS ở giếng 1, hút 25 μl từ giếng 1 và chuyển sang giếng thứ 2 và trộn đều, tiếp tục làm như vậy đến giếng 11 và sau khi trộn đều ở giếng này thì loại bỏ 25 μl. Giếng 12 chỉ có PBS để làm đối chứng hồng cầu.
- Thêm 25 μl dung dịch PBS vào tất cả các giếng.
- Thêm 25 μl dung dịch hồng cầu gà 1% vào tất cả các giếng. Gỡ nhẹ đĩa, đậy nắp, để đĩa ở nhiệt độ phòng, tức 20 °C trong 40 min hoặc 4 °C trong 60 min để hồng cầu lắng.

E.3 Đọc kết quả: nghiêng đĩa quan sát dòng chảy của hồng cầu

- + Phản ứng dương tính: có hạt hồng cầu ngưng kết lắng chầm, không chảy thành dòng
- + Phản ứng âm tính: Hồng cầu lắng xuống đáy tạo thành chấm tròn, khi nghiêng đĩa sẽ tạo dòng chảy liên mạch của hồng cầu.

Hiệu giá ngưng kết HA hoàn chỉnh được tính ở độ pha loãng kháng nguyên cao nhất còn xuất hiện ngưng kết hoàn toàn (không có dòng chảy hồng cầu).

Ví dụ: giếng thứ 8 là giếng cuối cùng còn có ngưng kết hoàn toàn, vậy hiệu giá HA = $1/256$ (hay $8 \log_2$).

E.4 Đánh giá kết quả

- Phản ứng HA dương tính: Kết luận có vi rút gây bệnh. Để xác định là vi rút CGC cần phải giám định bằng phản ứng HI với kháng huyết thanh dương tính chuẩn tương ứng với từng subtype, hoặc bằng phương pháp realtime RT-PCR (xem 7.4).
- Phản ứng HA âm tính: Có thể trong bệnh phẩm không có mặt vi rút cúm gia cầm hoặc lượng vi rút quá ít. Vì vậy, cần tiếp tục tiêm phơi trứng lần 2 (dùng nước trứng thu hoạch lần 1 để tiêm truyền).

Phụ lục F

(Qui định)

Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI)

Phương pháp này chủ yếu áp dụng để xác định các subtype kháng nguyên H gây ngưng kết hồng cầu của vi rút CGC.

Với subtype kháng nguyên N đòi hỏi chuyên môn và thuốc thử chuyên biệt, thường chỉ thực hiện tại các phòng thí nghiệm tham chiếu của OIE.

F.1 Nguyên liệu và dụng cụ

- Hồng cầu gà 1% (phụ lục D)
- Dung dịch PBS (mục A2, phụ lục A)
- Huyết thanh chuẩn dương tính và âm tính với subtype H9
- Huyết thanh cần kiểm tra.
- Kháng nguyên chuẩn subtype H9 và 4 HAU của kháng nguyên.
- Đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ V (5.18)
- Micropipet đơn kênh và đa kênh.

F.2 Pha 4 HAU và chuẩn độ kháng nguyên 4 HAU

- Thực hiện phản ứng HA (phụ lục E) để xác định hiệu giá kháng nguyên.
- Pha 4 HAU từ hiệu giá ngưng kết kháng nguyên HA đã biết với PBS.

Ví dụ: nếu sự ngưng kết của kháng nguyên vi rút kiểm tra ở độ pha loãng 8 log₂ tức HA = 1/256 thì 4 đơn vị kháng nguyên (4 HAU) được pha loãng là 1/64 (256/4 = 64). Pha 4 HAU gồm 1 phần kháng nguyên và 63 phần PBS.

- Chuẩn độ lại kháng nguyên 4 HAU đã pha bằng phản ứng HA, đạt yêu cầu mới được dùng tiếp cho phản ứng HI.

Nếu chuẩn độ lại 4 HAU có kết quả ngưng kết đến giếng thứ 2, như vậy 4 HAU đã pha đạt yêu cầu. Nếu ngưng kết ở giếng thứ 3 hoặc hơn là kháng nguyên đặc, cần bổ sung thêm PBS để có kháng nguyên 4 HAU chuẩn.

Nếu ngưng kết ở giếng đầu tiên là kháng nguyên loãng, cần bổ sung thêm kháng nguyên để đạt 4 HAU chuẩn.

F.3 Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI)

Phản ứng được tiến hành trên đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ V. Thực hiện phản ứng theo Sơ đồ F.3

- Cho 25 µl dung dịch PBS vào các giếng của đĩa nhựa 96 giếng đáy V
- Cho tiếp 25 µl huyết thanh của mẫu cần kiểm tra vào giếng đầu tiên của đĩa chữ V ở trên.
- Pha loãng huyết thanh theo hệ số 2 trên toàn bộ đĩa: hút 25 µl từ giếng 1 và chuyển sang giếng thứ 2 và trộn đều, tiếp tục làm như vậy đến giếng 11 và sau khi trộn đều ở giếng này thì loại bỏ 25 µl.
- Riêng cột 12 dùng làm đối chứng hồng cầu cho mỗi đĩa phản ứng.
- Cho 25 µl kháng nguyên 4HA vào tất cả các giếng trừ cột 12. Cột 12 bổ sung 25 µl PBS.
- Gỡ nhẹ đĩa, đậy nắp, để đĩa ở nhiệt độ phòng, tức 20 °C trong tối thiểu 30 min hoặc 4 °C trong 60 min.
- Thêm 25 µl dung dịch hồng cầu gà 1% vào tất cả các giếng. Gỡ nhẹ đĩa, đậy nắp, để đĩa ở nhiệt độ phòng, tức 20 °C trong 40 min hoặc 4 °C trong 60 min để hồng cầu lắng.

Bảng F.3 - Sơ đồ phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu HI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Huyết thanh (µl)	25	Trộn đều, chuyển 25 µl từ giếng 1 đến giếng 11 rồi hút bỏ 25 µl										0
KN 4HA (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
Lắc nhẹ, để 30 min ở nhiệt độ phòng hoặc 60 min ở 4 °C.												
Hồng cầu 1 % (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Độ pha loãng HT	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	

CHÚ THÍCH:

- 1) Khi thực hiện phản ứng thì tiến hành đồng thời cả mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm (với hiệu giá đã biết). Quy trình thực hiện như mẫu huyết thanh kiểm tra (không cần phải xử lý huyết thanh).
- 2) Hiệu giá kháng thể HI có thể thay đổi khi sử dụng vi rút chuẩn khác nhau, vì vậy cần lựa chọn chủng vi rút chuẩn có tính tương đồng về kháng nguyên so với vi rút vắc xin.

F.4 Đọc kết quả: sau 40 min khi đối chứng hồng cầu đã lắng, nghiêng đĩa quan sát dòng chảy của hồng cầu.

- + Phản ứng dương tính: Hồng cầu tạo dòng chảy liên mạch giống như giếng đối chứng hồng cầu tại cột 12.
- + Phản ứng âm tính: hồng cầu ngưng kết lấm chấm, không chảy thành dòng.

Hiệu giá HI được tính ở độ pha loãng cao nhất của huyết thanh gây ức chế hoàn toàn 4HAU của kháng nguyên.

- Kết quả hợp lệ khi:

Huyết thanh đối chứng âm tính chuẩn có hiệu giá HI nhỏ hơn 1:4 ($2 \log_2$).

Huyết thanh đối chứng dương tính chuẩn có hiệu giá HI bằng với hiệu giá kháng thể đã biết trước đó $\pm$ 01 độ pha loãng (1 : 2).

- Đánh giá kết quả:

+ Mẫu âm tính (không có kháng thể) nếu có hiệu giá kháng thể $HI \leq 1:8$.

+ Mẫu dương tính (có kháng thể) nếu có hiệu giá kháng thể $HI \geq 1:16$. Điều này có nghĩa là mẫu huyết thanh có chứa kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên của vi rút chuẩn đã dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2021). CHAPTER 3.3.4. Avian Influenza. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.
- [2] Bóna, M.; Földi, J.; Dénes, L.; Harnos, A.; Paszerbovics, B.; Mándoki, M. Evaluation of the Virulence of Low Pathogenic H9N2 Avian Influenza Virus Strains in Broiler Chickens. *Vet. Sci.* 2023, 10, 671. <https://doi.org/10.3390/vetsci10120671>
- [3] R.A.M. Fouchier* & V.J. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. Munster National Influenza Centre and Department of Virology, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, the Netherlands
- [4] TCVN 8400 - 26:2014. Bệnh động vật - Quy trình Chẩn đoán. Phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1.
- [5] TCCS 01 : 2022/TY – DT - Bệnh động vật - qui trình chẩn đoán xét nghiệm bệnh cúm gia cầm thể độc lực cao
- [6] Monne, I., Ormelli, S., Salviato, A., De Battisti, C., Bettini, F., Salomoni, A., Cattoli, G. (2008). Development and Validation of a One-Step Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1769–1773. doi:10.1128/jcm.02204-07
- [7] P. B. Akshalova¹, A. V. Andriyasov², L. O. Scherbakova³, S. N. Kolosov⁴, N. G. Zinyakov⁵, I. A. Chvala⁶, D. B. Andreychuk⁷. Development of real-time RT-PCR for N2 subtype avian influenza RNA-virus detection.
- [8] Fouchier, R., & Munster, VJ. (2009). Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 28(1), 49-58.
- [9] Yang, J., Müller, N. F., Bouckaert, R., Xu, B., & Drummond, A. J. (2019). Bayesian phylodynamics of avian influenza A virus H9N2 in Asia with time-dependent predictors of migration. *PLOS Computational Biology*, 15(8), e1007189. doi:10.1371/journal.pcbi.1007189
- [10] Peacock, T. P., James, J., Sealy, J. E., & Iqbal, M. (2019). A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. *Viruses*, 11(7), 620. doi:10.3390/v11070620.