

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-xx : 2025

(Xuất bản lần 1)

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN xx : BỆNH VIÊM DA NỔI CỤC**

Animal diseases – Diagnostic procedure –

Part xx : Lumpy Skin Disease

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 Nui cát xon;*
- TCVN 8400-5 : 2011, *phần 5: Bệnh Tiên mao trùng;*
- TCVN 8400-6 : 2011, *phần 6: Bệnh Xuất huyết thỏ;*
- TCVN 8400-7 : 2011, *phần 7: Bệnh Đậu cừu và đậu dê;*
- TCVN 8400-8 : 2011, *phần 8: Bệnh Nấm phổi do Aspergillus ở gia cầm;*
- TCVN 8400-9 : 2011, *phần 9: Bệnh viêm gan vịt typ I;*
- TCVN 8400-10 : 2022, *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 Viêm da nổi cục ở lợn;*
- TCVN 8400-23 : 2014, *phần 23: Bệnh Ung khí thán;*

TCVN 8400-xx : 2025

- 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 8400-51 : 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 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 Viêm da nổi cục

Animal disease – Diagnostic procedure – Part xx: Lumpy Skin Disease

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không 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 Viêm da nổi cục (VDNC) gây ra ở trâu, bò, xét nghiệm vi rút gây bệnh viêm da nổi cục đối với mẫu trâu, bò, sản phẩm động vật có nguồn gốc từ trâu, bò và mẫu môi trường.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các 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
- QCVN 01-83:2011/BNNPTNT ban hành theo Thông tư số 71/2011/TT-BNNPTNT ngày 25 tháng 10 năm 2011 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
- Công văn số 2185 /TY-KH ngày 31 tháng 12 năm 2021 của Cục Thú y về việc ban hành hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm động vật trên cạn.

3 Thuật ngữ và định nghĩa, các từ viết tắt

3.1 Thuật ngữ và định nghĩa

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

- Bệnh Viêm da nổi cục (VDNC) là bệnh truyền nhiễm ở trâu, bò, có tính đặc hiệu loài và không lây sang dê, cừu. Vi rút gây bệnh là một DNA vi rút thuộc chi *Capripoxvirus* (CaPV), phân họ *Chordopoxviridae*, họ *Poxviridae*.

- Bệnh VDNC có đặc trưng sốt cao, nổi u cục trên da, niêm mạc và các cơ quan nội tạng; các hạch bạch huyết nông nổi to, phù nề da. Bệnh có tỷ lệ mắc bệnh cao và tỷ lệ tử vong thấp gây thiệt hại kinh tế do giảm cân, giảm sản lượng sữa, tổn thương trên da, gây vô sinh tạm thời hoặc vĩnh viễn cho bò đực.

3.2 Từ viết tắt

- **VDNC**: Viêm da nổi cục
- **LSDV** (Lumpy skin disease virus): Vi rút gây bệnh viêm da nổi cục
- **DNA** (Deoxyribonucleic Acid): Acid Deoxyribonucleic
- **DNase** (Deoxyribonuclease): Enzyme thủy phân liên kết của phân tử DNA
- **RNase** (Deoxyribonuclease): Enzyme thủy phân liên kết của phân tử RNA
- **PCR** (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp
- **Realtime PCR** (Realtime Polymerase Chain Reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp thời gian thực
- **Ct** (Cycle threshold): Chu kỳ ngưỡng
- **ELISA** (Enzyme-linked immunosorbent assay): Phương pháp miễn dịch liên kết enzyme
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM
- **MDBK** (Madin–Darby bovine kidney): Tế bào thận bò
- **LT** (Lamb testis): Tế bào tinh hoàn cừu
- **VNT** (Virus Neutralization test): Phản ứng trung hòa vi rút
- **CPE** (Cytopathic effect): Biến đổi bệnh lý tế bào
- **FBS** (Fetal bovine serum): Huyết thanh bào thai bê
- **PBS** (Phosphate Buffered Saline): Dung dịch muối đệm photphat
- **TCID₅₀** (Tissue culture infective dose - 50): Liều gây nhiễm 50 % tế bào

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 khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Nguyên liệu sử dụng chung

4.1.1 Ethanol tuyệt đối

4.1.2 Dung dịch muối đệm photphat (PBS - Phosphate Buffered Saline), pH 7,2 – 7,4 (xem A2 phụ lục A)

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

TCVN 8400-xx : 2025

4.1.4 Nước tinh khiết, không có nuclease

4.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp realtime PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction), SnapBack.

4.2.1 Kít chiết tách DNA TACO DNA/RNA extraction kit (GeneReach Cat. No. Atc-d/rna) hoặc kít Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Kit (Cat. No. 12280-050) (xem phụ lục B) hoặc có thể sử dụng các loại kít tương đương.

4.2.2 Kít nhân gen Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (xem bảng C2, phụ lục C), Kít SsoFast™ EvaGreen Supermix- Biorad (xem bảng D2 phụ lục D) hoặc các kít tương đương.

4.2.3 Môi xuôi, môi ngược và mẫu dò cho phương pháp realtime PCR phát hiện vi rút Capribox (xem bảng C1 phụ lục C.1).

4.2.4 Môi xuôi, môi ngược và mẫu dò cho phương pháp realtime PCR Snapback (xem bảng C4 phụ lục C.2).

4.2.5 Hệ thống đối chứng cho vi rút LSDV gồm: Đối chứng âm và đối chứng dương

Mẫu chuẩn dương vi rút gây bệnh viêm da nổi cục được chứng minh dương tính hoặc kháng nguyên vi rút thực địa hoặc DNA chuẩn dương tính tách chiết từ vi rút gây bệnh VDNC có giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng đã biết trước).

4.3 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp phân lập vi rút, trung hòa trên tế bào và ELISA

4.3.1 Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (xem A3 phụ lục A)

4.3.2 Dung dịch Trypsin 0,05 % EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid)

4.3.3 Huyết thanh bào thai bê - FBS (Fetal bovine serum)

4.3.4 MDBK (Madin–Darby bovine kidney): Tế bào thận bò

4.3.5 LT (Lamb testis): Tế bào tinh hoàn cừu

4.3.6 Huyết thanh dương chuẩn

4.3.7 Huyết thanh âm chuẩn

4.3.8 Kít ELISA phát hiện kháng thể VNVC Idvet Screen® Capripox Double Antigen Multi-species REF, CPVDA-5P, Lot. N26 (Phụ lục D).

4.3.9. HEPES

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 Trang thiết bị, dụng cụ dùng chung

5.1.1 Micropipettes, có đầu ống các cỡ 0,5 - 10 µl; 10 -100 µl; 100 – 1000 µl và 0,5 – 5 ml.

5.1.2 Bơm tiêm, dung tích 1 ml, 5 ml.

5.1.3 Đầu tip có lọc và không lọc các loại

5.1.4 Ống ly tâm, dung tích 0,5 ml, 1,5 - 2 ml, 15 ml, 50 ml.

5.1.5 Dụng cụ bảo hộ: khẩu trang, găng tay, áo bảo hộ, kính,....

5.1.6 Túi đựng rác thải

5.1.7 Tủ an toàn sinh học cấp 2

5.1.8 Nồi hấp ướt

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

5.1.10 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ - 20 °C đến – 80 °C.

5.2 Trang thiết bị, dụng cụ máy móc dùng cho phương pháp realtime PCR

5.2.1 Ống nghiền mẫu

5.2.2 Máy lắc mẫu (Vortex mixer)

5.2.3 Máy nghiền mẫu

5.2.4 Máy ly tâm, có thể thực hiện ở 1 500 g đến 2 500 g, 10 000 g, 12 000 g.

5.2.5 Máy chiết tách, TACO Nucleic acid automatic extraction system hoặc tương đương.

5.2.6 Máy ủ nhiệt, nhiệt độ từ 37 °C đến 100 °C.

5.2.7 Máy realtime PCR

5.2.8 Ống PCR, có dung tích 100 µl; 200 µl

5.3 Trang thiết bị, dụng cụ máy móc dùng cho phương pháp phân lập vi rút, trung hòa trên tế bào và ELISA

5.3.1 Tủ ấm CO₂

5.3.2 Đĩa nuôi tế bào 96 giếng

5.3.3 Chai nuôi tế bào T25, T75

5.3.4 Kính hiển vi lộn ngược

5.3.5 Buồng đếm tế bào

5.3.6 Máy đọc đĩa ELISA

6 Chẩn đoán lâm sàng

6.1 Dịch tễ học

Bệnh VDNC (Lumpy skin disease) là một bệnh truyền nhiễm ở trâu, bò, có tính đặc hiệu loài và không lây sang dê, cừu. Các đợt bùng phát bệnh viêm da nổi cục có xu hướng lẻ tẻ, tùy thuộc vào sự di

TCVN 8400-xx : 2025

chuyển của động vật, tình trạng miễn dịch, gió và lượng mưa ảnh hưởng đến quần thể véc tơ. Sự lây truyền vi rút gây bệnh VDNC chủ yếu do các véc tơ động vật chân đốt khác nhau.

Vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên gia súc rất ổn định, tồn tại một thời gian dài trong môi trường xung quanh, đặc biệt là ở dạng vảy khô. Vi rút tồn tại ở các nốt da hoại tử trong 33 ngày hoặc lâu hơn, ở các lớp vảy khô là 35 ngày và ít nhất là 18 ngày trong da sống được làm khô dần trong không khí.

6.2 Triệu chứng lâm sàng

- Thời gian ủ bệnh ở điều kiện tự nhiên chưa được báo cáo nhưng sau khi gây nhiễm thử nghiệm thời gian ủ bệnh là từ 6 đến 9 ngày, sau đó động vật bị nhiễm bắt đầu sốt, có thể vượt quá 41 °C kéo dài trong 1 tuần. Thời điểm này tất cả các hạch bạch huyết bề mặt đều to ra. Các nốt sần xuất hiện từ 7 đến 19 ngày sau khi nhiễm vi rút. Cùng với sự xuất hiện của các nốt sần, dịch tiết ra từ mắt và mũi trở thành mủ nhầy. Các tổn thương phát triển khắp cơ thể, đặc biệt là ở đầu, cổ, bầu vú, bìu, âm hộ và đáy chậu.

- Các nốt sần trên da, niêm mạc nhiều, có giới hạn rõ ràng, đường kính 0,5 - 5 cm, nốt sần chắc, có đỉnh phẳng. Các nốt sần có thể phát triển ở màng nhầy của miệng và đường tiêu hóa, đặc biệt ở da mũi khế, khí quản và phổi, dẫn đến các bệnh nguyên phát và thứ phát như viêm phổi. Các nốt sần trên niêm mạc mắt, mũi, miệng, trực tràng, bầu vú và cơ quan sinh dục nhanh chóng loét, khi đó tất cả dịch tiết, nước mắt, nước mũi và nước bọt đều chứa vi rút VDNC.

- Chân của trâu, bò nhiễm bệnh bị phù nề, con vật không muốn di chuyển.

- Bệnh gây sảy thai cho trâu, bò đang mang thai; ở trâu, bò đang cho con bú có sự giảm lượng sữa rõ rệt, bò đực nhiễm bệnh có thể vô sinh tạm thời hoặc vĩnh viễn, vi rút bài tiết qua tinh dịch trong thời gian dài.

- Quá trình phục hồi sau nhiễm bệnh diễn ra chậm, con vật gầy còm, có thể bị viêm phổi và viêm vú, có các nốt hoại tử trên da, gây ảnh hưởng kinh tế nghiêm trọng.

- Mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng bệnh Viêm da nổi cục khác nhau phụ thuộc vào một số yếu tố như chủng vi rút, tuổi, tình trạng miễn dịch, giống, loài của vật mắc bệnh.

6.3 Bệnh tích

- Các nốt u cục trên da ở lớp hạ bì và lớp biểu bì, có thể lan đến lớp dưới da và đôi khi đến cơ vân liên kề. Các tổn thương mô học cấp tính bao gồm những thay đổi không bào biểu bì với các thể vùi trong bào tương. Các tổn thương ở da bao gồm hoại tử fibrinoid, phù nề, huyết khối, viêm bạch huyết và thâm nhiễm viêm hỗn hợp. Các tổn thương mãn tính là đặc trưng bởi mô nhồi máu với lõi hoại tử, thường được bao bọc bởi mô hạt dần được thay thế bằng xơ hóa trường thành.

7 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

Để chẩn đoán phát hiện bệnh Viêm da nổi cục được thực hiện theo Sơ đồ chẩn đoán bệnh VDNC (xem Phụ lục E).

7.1 Lấy mẫu và bảo quản mẫu

7.1.1 Lấy mẫu

7.1.1.1 Lấy mẫu xét nghiệm vi rút

- Mẫu xét nghiệm là tổ chức da nổi u cục, nốt vảy, dịch nhầy mũi, nước bọt, mẫu probang, máu chống đông (bằng EDTA), huyết thanh, hạch bạch huyết và phủ tạng (hạch lympho, hạch amidan, lách, thận, phổi, gan), sản phẩm từ gia súc nghi mắc bệnh, thức ăn chăn nuôi nghi chứa chất nghi nhiễm bệnh và mẫu môi trường.

- Các nốt sần nên được lấy trong tuần đầu tiên kể từ khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng, các mẫu mô bao gồm tổn thương và mô từ khu vực xung quanh kích thước tối đa 2 cm³.

- Mẫu môi trường bao gồm: nền chuồng, phân, nước uống, nước thải.

- Sản phẩm từ trâu, bò: thịt, phủ tạng, phụ phẩm và sản phẩm thịt đông lạnh/ướp lạnh/sơ chế của trâu, bò, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ trâu, bò.

Các mẫu phải được bảo quản lạnh từ 2 °C đến 8 °C (5.1.9) và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 h.

7.1.1.2 Lấy mẫu xét nghiệm kháng thể

Sử dụng bơm tiêm 5 ml để lấy 2 ml máu, 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. Chắt huyết thanh sang ống 1,5 ml (5.1.4) mới để dùng cho xét nghiệm.

Các mẫu phải được bảo quản lạnh từ 2 °C đến 8 °C (5.1.9) và vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 h.

7.1.2 Bảo quản và vận chuyển mẫu

- Mẫu được bảo quản và vận chuyển được thực hiện theo QCVN 01-83:2011/BNNPTNT và Công văn số 2185/TY-KH.

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

- Các mẫu được lấy cho vào dung dịch bảo quản mẫu (dung dịch muối đệm photphat PBS (4.1.2) hoặc DMEM (4.3.1)), bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C hoặc - 20 °C và gửi về phòng thí nghiệm càng sớm càng tốt, chậm nhất là 24 h và có kèm theo phiếu gửi bệnh phẩm. Trường hợp mẫu vận chuyển trên quãng đường dài không bảo quản lạnh thì môi trường bảo quản cần bổ sung 10% glycerol.

- Mẫu lưu trong thời gian dài cần được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu - 80 °C (5.1.10).

7.2 Phát hiện vi rút

7.2.1 Xử lý mẫu

TCVN 8400-xx : 2025

- Mẫu u cục, phủ tạng, các sản phẩm từ trâu, bò được nghiền nhuyễn với dung dịch PBS (4.1.2) thành huyền dịch 10 % (ví dụ: nghiền 1 g mẫu trong 9 ml dung dịch PBS). Ly tâm ở gia tốc 2500 g trong 15 min (5.2.4) và thu phần dịch trong ở phía trên vào ống ly tâm 2 ml (5.1.4).
- Mẫu huyết thanh: Lấy máu của trâu, bò vào bơm tiêm 5ml rút hết pít-tông tạo khoảng trống, để ở nhiệt độ phòng, sau đó tách lấy huyết thanh chuyển sang ống ly tâm 2 ml (5.1.4).
- Mẫu máu kháng đông (bằng EDTA) được chuyển sang ống ly tâm 2 ml (5.1.4).
- Mẫu phân được pha với dung dịch PBS (4.1.2) thành huyền dịch 10 % (ví dụ: nghiền 1 g mẫu trong 9 ml dung dịch PBS). Ly tâm ở gia tốc 2500 g trong 15 min (5.2.4) và thu phần dịch nổi vào ống 2 ml (5.1.4).
- Nước thải từ chuồng nuôi được cho vào ống ly tâm (5.1.4), ly tâm (5.2.4) ở gia tốc 2500 g trong 15 min (5.2.4). Thu lấy dung dịch trong ở trên vào ống ly tâm 2 ml (5.1.4).
- Mẫu sau khi được xử lý được bảo quản và dùng để chiết tách DNA.

7.2.2 Chiết tách DNA

- Sau khi xử lý mẫu, tiến hành chiết tách DNA từ các dịch bệnh phẩm bằng kit chiết tách DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ kit TACO DNA/RNA extraction kit (GeneReach Cat. No. Atc-d/rna) hoặc kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Kit (Cat. No. 12280-050) (xem phụ lục B) hoặc có thể sử dụng các loại kit tương đương. DNA thu được sau khi chiết tách dùng làm mẫu xét nghiệm.
- Mẫu DNA đã chiết tách lưu ở nhiệt độ - 20 °C (5.1.10).

7.2.3 Phương pháp Realtime PCR

Để phát hiện vi rút VDNC bằng phương pháp realtime PCR gồm 2 bước sau:

- Bước 1: Sàng lọc vi rút Capripox bằng phương pháp realtime PCR sử dụng cặp mồi CaPV074 trên gen ORF074 mã hóa protein P32.
- Bước 2: Các mẫu dương tính với cặp mồi CaPV074 tiếp tục được thực hiện phương pháp Snapback để phát hiện, xác định vi rút VDNC và các vi rút Capripox khác.

7.2.3.1 Phương pháp realtime PCR phát hiện vi rút Capripox

Phản ứng Realtime PCR được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các vi rút thuộc giống *Capripoxvirus* bao gồm vi rút gây bệnh VDNC (LSDV) trên trâu, bò, vi rút gây bệnh đậu cừu (SPPV), vi rút gây bệnh đậu dê (GTPV) sử dụng cặp mồi CaPV074 (Bảng C1 phụ lục C) được thực hiện như sau:

- Chuẩn bị các cặp mồi xuôi/ngược (với nồng độ 20 μ M) và đoạn dò (với nồng độ 6 μ M) như trong hướng dẫn Bảng C2 phụ lục C với nước tinh khiết không chứa DNase/RNase (4.1.4).
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (xem Bảng C2 phụ lục C)
- Cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng realtime PCR (xem Bảng C3 phụ lục C).

- Đặt ống PCR (5.2.8) chứa hỗn hợp phản ứng vào máy realtime PCR (5.2.7) và chạy máy theo chương trình đã cài đặt.

Đọc kết quả

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

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

+ 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 có giá trị Ct ≤ 37 được coi là dương tính

+ Mẫu không có giá trị Ct.

+ Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $37 < Ct \leq 45$ được coi là nghi ngờ. Những mẫu nghi ngờ cần được thực hiện lại xét nghiệm hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.

7.2.3.2 Phương pháp realtime PCR sử dụng cặp mồi Snapback phân biệt vi rút VDNC và phân loại vi rút Capripox (Gelaye, 2013)

Phản ứng realtime PCR Snapback được sử dụng để phát hiện và phân biệt sự có mặt của vi rút gây bệnh VDNC (LSDV) trên trâu bò với các vi rút khác như đậu dê (SPPV), đậu cừu (GTPV) bằng việc sử dụng cặp mồi đặc hiệu xác định vùng gen RPO30 của 3 vi rút trên và dựa vào sự khác nhau về điểm nhiệt độ nóng chảy Snapback và amplicon (Bảng D1 phụ lục D).

- Chuẩn bị các cặp mồi với nồng độ 5 pmol/ μ l theo hướng dẫn Bảng D2 phụ lục D với nước tinh khiết không chứa DNase/RNase (4.1.4).

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn của bộ kit được sử dụng (xem Bảng D2 phụ lục D).

- Cài đặt chu trình nhiệt chạy phản ứng realtime PCR trên máy realtime PCR (Biorad) (xem Bảng D3, phụ lục D).

- Đặt ống PCR (5.2.8) chứa hỗn hợp phản ứng vào máy realtime PCR (5.2.7) và chạy máy theo chương trình đã cài đặt.

Đánh giá kết quả: Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính khi có nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) tương ứng với mỗi vi rút LSD (VDNC), GTP và SPP; mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính.

Nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) của các vi rút Capripox đối với máy CFX96™ Realtime PCR (Biorad) như sau:

- Vi rút VDNC (LSDV): 51 °C, 73,5 °C

- Vi rút đậu dê (GTPV): 58 °C, 72,5 °C

TCVN 8400-xx : 2025

- Vi rút đậu cừu (SPPV): 52 °C, 72,5 °C

Kết luận:

- Mẫu được coi là dương tính với vi rút gây bệnh VDNC (LSDV) khi có nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) giống với đối chứng vi rút LSD dương chuẩn là 51 °C, 73,5 °C;

- Mẫu được coi là dương tính với vi rút đậu dê (GTPV) khi có nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) giống với đối chứng vi rút đậu dê dương chuẩn là 58 °C, 72,5 °C;

- Mẫu được coi là dương tính với vi rút đậu cừu (SPPV) khi có nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) giống với đối chứng vi rút đậu cừu dương chuẩn là 52 °C, 72,5 °C;

- Mẫu không có nhiệt độ nóng chảy như đối chứng âm được coi là âm tính.

Ghi chú: Đối với các máy realtime PCR khác nhau có nhiệt độ nóng chảy khác nhau:

+ Đối với máy Rotor-Gene Q (Qiagen) nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) của các vi rút Capripox như sau:

Vi rút VDNC (LSDV): 52,2 °C, 74,9 °C

Vi rút đậu dê (GTPV): 56,5 °C, 73,9 °C

Vi rút đậu cừu (SPPV): 52,6 °C, 73,9 °C

+ Đối với máy LightCycler 480 (Roche) nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) của các vi rút Capripox như sau:

Vi rút VDNC (LSDV): 50,7 °C, 74,3 °C

Vi rút đậu dê (GTPV): 56 °C, 73,3 °C

Vi rút đậu cừu (SPPV): 51,4 °C, 73,3 °C

+ Đối với máy MimiOption™ Realtime PCR detection system (Biorad) nhiệt độ nóng chảy (Snapback và khuếch đại) của các vi rút Capripox như sau:

Vi rút VDNC (LSDV): 50,5 °C, 74 °C

Vi rút đậu dê (GTPV): 56 °C, 73 °C

Vi rút đậu cừu (SPPV): 51,5 °C, 73 °C

7.2.4 Phương pháp phân lập vi rút

7.2.4.1 Chuẩn bị tế bào

- Tế bào MDBK hoặc LT được khôi phục từ ống tế bào gốc được cất giữ trong Ni tơ hoặc – 80 °C và nuôi trong môi trường DMEM 5 % FBS (xem A3 phụ lục A) trong 48 h đến 72 h để phát triển 1 lớp đạt 100 % bề mặt nuôi trên chai tế bào T75 (5.3.3).

- Hút bỏ môi trường đang nuôi trong chai tế bào 1 lớp.

- Rửa bề mặt thảm tế bào bằng dung dịch muối đệm photphat (PBS) (4.1.2) 2 lần với 10 ml/chai T75 cm², sau đó hút bỏ PBS.

- Cho 2 ml trypsin (có 0,5 % EDTA) (4.3.2) ủ trong thời gian từ 5 min đến 10 min ở nhiệt độ 37 °C, 5 % CO₂ (5.3.1).

- Khi tế bào đã tách hết, bổ sung 5ml môi trường DMEM 5 % FBS (xem A3 phụ lục A) vào chai để vô hoạt trypsin, trộn đều và chuyển toàn bộ hỗn dịch này vào ống ly tâm 15 ml (5.1.4).
- Ly tâm tế bào ở gia tốc 1 500 g trong 5 min bằng máy ly tâm (5.2.4) để loại bỏ môi trường chứa trypsin. Đổ bỏ hỗn dịch phía trên, giữ lại phần cặn là tế bào ở dưới.
- Cho tiếp 10 ml DMEM 5 % FBS (xem A3 phụ lục A) vào phần tế bào, dùng pipet 5 ml (5.1.1) trộn đều bằng cách hút nhả vài lần.
- Đếm tế bào, thêm một lượng môi trường DMEM 5 % FBS sao cho đạt mật độ 2×10^5 tế bào/ml môi trường nuôi tế bào và có bổ sung dung dịch kháng sinh (xem A3 phụ lục A) để tế bào phát triển 1 lớp và đạt tới 90 % đến 100 %.

7.2.4.2 Gây nhiễm tế bào

- Lấy chai tế bào 1 lớp đã chuẩn bị, đổ bỏ môi trường nuôi và rửa 2 lần bằng dung dịch PBS (4.1.2)
- 1 ml huyền dịch bệnh phẩm đã xử lý (7.2.1) được nhiễm vào chai tế bào một lớp đã chuẩn bị trong chai nuôi tế bào T75 (5.3.3) và để vi rút hấp phụ trong 1 h ở 37°C 5% CO₂ (5.3.1).
- Sau đó, chai nuôi cấy được rửa bằng dung dịch PBS 1X (4.1.2) và bổ sung 10 ml môi trường GMEM (xem A.4 phụ lục A) có chứa kháng sinh và 2 % FBS (xem A4 phụ lục A)
- Ủ chai tế bào ở 37°C 5% CO₂ (5.3.1) và kiểm tra chai tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi (5.3.4) để quan sát bệnh tích tế bào (CPE) trong 7 ngày đến 14 ngày.

7.2.3.3 Đọc kết quả

- Có bệnh tích tế bào (CPE): Các tế bào bị nhiễm vi rút sẽ xuất hiện CPE bao gồm sự co lại của màng tế bào khỏi các tế bào xung quanh, các tế bào bám vào nhau tạo thành các cụm. Lúc đầu chỉ có thể nhìn thấy những vùng nhỏ của CPE sau 2 ngày sau gây nhiễm. CPE tăng dần, mở rộng ra toàn bộ lớp tế bào trong 4 ngày đến 7 ngày tiếp theo. Thu hoạch huyền dịch tế bào sau 7 ngày gây nhiễm, giám định vi rút bằng phương pháp realtime PCR. Nếu kết quả realtime PCR dương tính thì kết luận có vi rút VDNC, nếu kết quả realtime PCR/PCR âm tính thì tiến hành phân lập lần 2.
- Không có bệnh tích tế bào (không có CPE): nếu không có CPE vào ngày thứ 14 nuôi cấy, chai nuôi tế bào nuôi cấy được đông tan 3 lần và sau đó sẽ được nhiễm tế bào lần 2. Thu dịch nuôi cấy tế bào vào ống ly tâm 50 ml (5.1.4), ly tâm lấy nước trong ở trên và tiến hành phân lập lần 2. Nếu sau 3 lần phân lập không có CPE, kết luận mẫu âm tính với vi rút VDNC.

7.3. Phát hiện kháng thể

7.3.1 Xử lý mẫu

Phát hiện kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC có ý nghĩa chẩn đoán đối với trâu, bò ốm có triệu chứng của bệnh VDNC và chưa từng tiêm phòng, hoặc nhiễm vi rút gây bệnh VDNC từ trước.

TCVN 8400-xx : 2025

Mẫu huyết thanh cần xét nghiệm sau khi đã được xử lý (7.2.1) được bất hoạt ở 56 °C trong 30 min. Sau khi bất hoạt, để ngay huyết thanh ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C để dùng trong phản ứng trung hòa vi rút. Nếu mẫu đã bất hoạt thì không cần bất hoạt lại.

7.3.2. Phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA

Hiện nay có nhiều bộ kit ELISA (4.3) phát hiện kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC có bán sẵn trên thị trường. Thực hiện phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành tham khảo Phụ lục G.

7.3.2 Phương pháp trung hòa vi rút trên môi trường tế bào

Ngoài mục đích chẩn đoán bệnh, phương pháp phát hiện kháng thể bằng phương pháp trung hòa trên tế bào còn có ý nghĩa đánh giá hiệu giá kháng thể sau tiêm phòng vắc xin VDNC. Phương pháp này để xác định hàm lượng kháng thể có trong huyết thanh nhờ quan sát bệnh tích tế bào do vi rút gây bệnh VDNC gây nên.

Huyết thanh kiểm tra có thể được chuẩn độ với một nồng độ vi rút Capripox (100 TCID₅₀) hoặc có thể chuẩn độ một chủng vi rút chuẩn với một nồng độ pha loãng của huyết thanh thử nghiệm để tính chỉ số trung hòa. Do độ nhạy không ổn định của nuôi cấy mô đối với vi rút Capripox và khó khăn trong việc đảm bảo chính xác và chuẩn độ lại của liều 100 TCID₅₀/giếng, chỉ số trung hòa là phương pháp được ưu tiên trong hầu hết các phòng thí nghiệm, mặc dù việc này đòi hỏi thể tích huyết thanh thử nghiệm lớn hơn.

Các bước tiến hành tham khảo Phụ lục H.

8 Kết luận

Trâu, bò được xác định mắc bệnh VDNC khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng của bệnh VDNC và có kết quả xét nghiệm vi rút VDNC dương tính với một trong những phương pháp xét nghiệm sau:

- Kết quả xét nghiệm vi rút gây bệnh VDNC dương tính bằng phương pháp realtime PCR.
- Phân lập được vi rút trên môi trường tế bào và giám định vi rút gây bệnh VDNC dương tính.
- Phát hiện kháng thể dương tính ở trâu bò chưa tiêm phòng bằng phương pháp ELISA hoặc phương pháp trung hòa trên tế bào.

Sản phẩm động vật có nguồn gốc từ trâu, bò và mẫu môi trường được xác định dương tính với vi rút VDNC khi có kết quả xét nghiệm dương tính với vi rút VDNC bằng phương pháp realtime PCR hoặc phân lập vi rút.

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	10 ⁶ IU
Streptomycin	1 g
Kanamycin	1 g
Nước cất	10 ml

Cách chuẩn bị:

Chuẩn bị các nguyên vật liệu theo lượng như trên, hòa tan các nguyên liệu trong 10 ml nước cất, lắc đều cho tan, lọc vô trùng bằng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Sử dụng tốt nhất trong 1 tuần, bảo quản ở - 20 °C (5.1.10)

A.2 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS 10X) pH ~ 7,2

Thành phần

Natriclorua (NaCl)	8,5 g
Dinatrihydrophosphat (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

Cách chuẩn bị:

Chuẩn bị các nguyên vật liệu theo lượng như trên vào trong 1000 ml nước cất, lắc đều cho tan, chỉnh pH trong khoảng 7,2 ± 0,2 bằng dung dịch NaOH 1 M hoặc dung dịch HCl 1 M. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 15 phút (5.1.8), chia nhỏ và bảo quản ở 4 °C đến 8 °C (5.1.9). Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần.

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

A.3 Môi trường nuôi tế bào

Thành phần:

Môi trường DMEM (4.3.1)	470 ml
Huyết thanh bào thai bê (FBS) 5 % (4.3.3)	25 ml
Kháng sinh (4.1.3) (Penicillin/Streptomycin: 10 000 UI/ml)	5 ml

TCVN 8400-xx : 2025

Cách chuẩn bị:

Bổ sung FBS và dung dịch kháng sinh với lượng như trên vào 470 ml môi trường DMEM, lắc đều để cho dung dịch đồng nhất và bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8 °C. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần.

A.4 Môi trường phát triển (GMEM)

Thành phần:

Môi trường DMEM (4.3.1)	485 ml
Huyết thanh bào thai bê (FBS) 2 % (4.3.3)	10 ml
Kháng sinh (4.1.3) (Penicillin/Streptomycin: 10 000 UI/ml)	5 ml

Cách chuẩn bị:

Bổ sung FBS và dung dịch kháng sinh với lượng như trên vào 470 ml môi trường DMEM, lắc đều để cho dung dịch đồng nhất và bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8 °C. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần.

A.5 Môi trường pha loãng mẫu

Thành phần:

Môi trường DMEM (4.3.1)	487,5 ml
HEPES 2 % (4.3.9)	12,5 ml

* Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C (5.1.9).

Cách chuẩn bị:

Bổ sung 12,5 ml dung dịch HEPES vào trong 487,5 ml môi trường DMEM, lắc đều để cho dung dịch đồng nhất và bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C - 8 °C. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần.

Phụ lục B

(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.

B.1 Kít TACO DNA/RNA Extraction kit (cat. No. Atc-d/rna)¹

B.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 %.

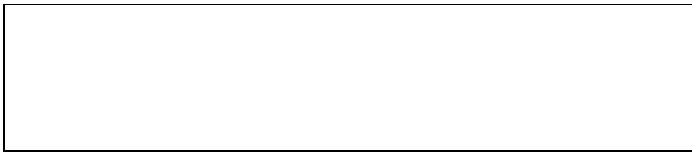
B.1.2. Cách tiến hành

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

Các bước thực hiện trên 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

- Cho 200 µl huyền dịch mẫu sau khi ly tâm vào các giếng ở cột 1 hoặc cột 7.
- Chuẩn bị máy chiết tách Taco (5.2.5): Khởi động, cài lược vào máy.
- Đặt đĩa vào máy Taco (5.2.5) và cho máy chạy.
- Sau khi máy chạy xong, thu 100 µl DNA từ các giếng tại cột 6 hoặc 12 sang các ống 1,7 ml (5.1.4) mới để tiến hành xét nghiệm.

B.2 Kít Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Kit (Cat. No. 12280-050)²

- Nhỏ 25 µl protease K vào ống eppendorf 1,5 ml (5.1.4)
- Nhỏ 200 µl huyền dịch bệnh phẩm (7.2.1) vào ống eppendorf (5.1.4)
- Nhỏ 200 µl dung dịch Lysis Buffer vào ống eppendorf (5.1.4)
- Lắc ống trong 15 s và ly tâm (5.1.4). Ủ ở 56 °C trong 15 min rồi ly tâm (5.1.4)
- Nhỏ 250 µl Ethanol có nồng độ 100 % vào ống, lắc đều trong 15 s rồi ly tâm (5.1.4).
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 min.
- Chuyển toàn bộ dịch trong ống (675 µl) vào cột lọc có ống thu.
- Ly tâm (5.2.4) cột lọc và ống thu ở gia tốc 6800 g/min trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash Buffer, ly tâm (5.2.4) ở gia tốc 6800 g/min trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới.
- Nhỏ 500 µl dung dịch Wash Buffer, ly tâm (5.2.4) ở gia tốc 6800 g/min trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Chuyển cột lọc sang ống thu mới, ly tâm (5.2.4) ở gia tốc 14000 g/min 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 (5.2.4) cột lọc và ống 1,5 ml ở gia tốc 14000 g/min trong 1 min ở nhiệt độ phòng.
- Bỏ cột lọc, giữ lại ống 1,5 ml (5.1.4) chứa 50 µl DNA. Bảo quản DNA ở 4 °C nếu thực hiện phản ứng realtime PCR ngay hoặc ở - 20 °C nếu thực hiện realtime PCR sau 24 h.

¹ và ² Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Phương pháp realtime PCR phát hiện vi rút gây bệnh VDNC**Bảng C1: Trình tự mồi - mẫu dò phát hiện vi rút Capribox trong realtime PCR**

Stt	Tên	Trình tự (5' – 3')
1	Mồi xuôi (CaPV074F1)	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
2	Mồi ngược (CaPV074R1)	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGAT A
3	Đoạn dò (CaPV074P1)	FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB/NFQ

CHÚ THÍCH 1:

- 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 Y tế Thế giới (WOAH) và các bài báo khoa học hàng năm để cập nhật mồi cho phù hợp.
- Trình tự các mồi và mẫu dò được trình bày ở bảng C1 được công bố theo tài liệu tham khảo [2]

Bảng C2: Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml với các lượng cụ thể cho mỗi phản ứng

TT	Thành phần (Theo hướng dẫn của kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG. Cat. No: 11730-017) ³	Nồng độ cuối cùng	Thể tích 1 phản ứng (µl)
1	Nước tinh khiết, không có RNA/DNA		6
2	Dung dịch supermix	1X	12,5
3	Mồi xuôi 20 µM	400 nM	0,5
4	Mồi ngược 20 µM	400 nM	0,5
5	Taqman probe 6 µM	200 nM	0,5
6	Mẫu DNA		5
	Tổng		25

CHÚ THÍCH 2:

- 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 sử dụng.

³ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

**Bảng C3: Chu trình nhiệt cho phản ứng realtime PCR
phát hiện vi rút Capribox**

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50 °C	02 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	45
60 °C *	60 s Ghi nhận tín hiệu quang ở bước này	

CHÚ THÍCH 3:

- Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG. Cat. No: 11730-017. Việc thực hiện cài đặt nhiệt độ và thời gian nên tuân thủ theo hướng dẫn của từng bộ kit được sử dụng.

PHỤ LỤC D

(Tham khảo)

Phương pháp realtime PCR sử dụng cặp mồi Snapback phân biệt vi rút VDNC và phân loại vi rút Capripox (Gelaye, 2013)**Bảng D1: Trình tự mồi - mẫu dò phân biệt vi rút gây bệnh VDNC và phân loại vi rút Capripox**

TT	Tên	Trình tự (5' – 3')
1	Mồi Snap back (Cp-HRM-SBF)	gg <u>TGTAGTACGTATAAGATTATCGTATAGAAACAAGCCTTTA</u>
2	Mồi ngược (Cp-HRM1R)	AATTTCTTTCTCTGTTCCATTTG

CHÚ THÍCH 1:

- 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.
- Trình tự các mồi được trình bày ở bảng D1 được công bố theo tài liệu tham khảo [3]

Bảng D2: Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml với các lượng cụ thể cho mỗi phản ứng

TT	Thành phần (Theo hướng dẫn của Kít SsoFast™ EvaGreen Supermix- Biorad/172-5200) ⁴	Nồng độ cuối cùng	Thể tích 1 phản ứng (µl)
1	Nước tinh khiết, không có RNA/DNA		5,84
2	SsoFast™ EvaGreen Supermix 2X (Bio-Rad)	1X	10
3	Mồi Snapback (Cp-HRM-SBF) (5 pmol/µl)	500 nM	2
4	Mồi ngược (Cp-HRN1R) (5 pmol/µl)	40 nM	0,16
6	Mẫu DNA		2
	Tổng		20

CHÚ THÍCH 2:

- 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 sử dụng.

⁴ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương

TCVN 8400-xx : 2025

³ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương.

Bảng D3: Chu trình nhiệt phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục (LSDV), vi rút gây bệnh đậu cừu (GTPV) và vi rút gây bệnh đậu dê (SPPV) trong realtime PCR Snap Back

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
95 °C	3 min	1
95 °C	15 s	45
58 °C	80 s* (ghi nhận tín hiệu ở đây)	
95 °C	1 min	
40 °C	1 min	
40 - 85 °C*	10 s/0,5 °C	nhiệt độ nóng chảy (*1 lần đọc ở từng điểm nhiệt độ)
37°C	1 phút	
* Đọc tín hiệu huỳnh quang ở FAM/Sybr		

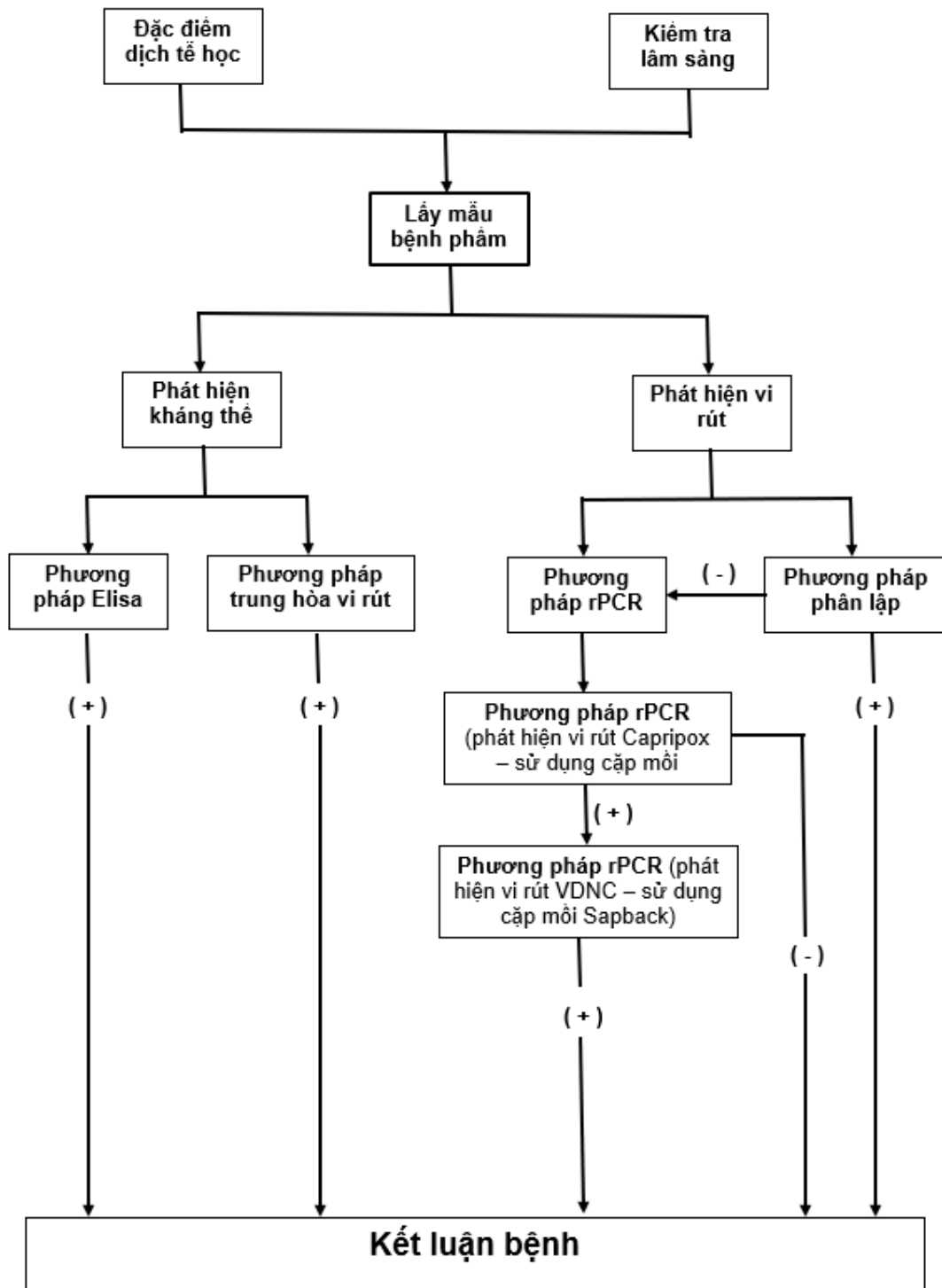
CHÚ THÍCH 3:

- Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kit Kit SsoFast™ EvaGreen Supermix- Biorad/172-5200. Việc thực hiện cài đặt nhiệt độ và thời gian nên tuân thủ theo hướng dẫn của từng bộ kit được sử dụng.

PHỤ LỤC E

(Quy định)

Sơ đồ chẩn đoán bệnh Viêm da nổi cục



PHỤ LỤC G

(Tham khảo)

Phương pháp ELISA

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

Nếu sử dụng bộ kit IDvet, mã số N26 CPVDA-5P⁵ phát hiện kháng thể kháng vi rút LSD thì các bước tiến hành được thực hiện như sau:

G.1 Chuẩn bị hóa chất

Trước khi sử dụng tất cả các nguyên liệu phải được để ổn định ở nhiệt độ phòng 21 °C (±5 °C). Các nguyên liệu được lắc đều trước khi sử dụng.

DUNG DỊCH WASHING

- Cách pha loãng: pha dung dịch Washing (20X) (cấp sẵn) theo tỉ lệ 1 phần dung dịch Washing đậm đặc với 19 phần nước cất hoặc nước khử ion (4.1.4). Ví dụ: 25 ml dung dịch Washing đậm đặc với 475 ml nước cất.

- Dung dịch Washing (1X) sau khi chuẩn bị bảo quản ở 2 °C đến 8 °C (5.1.9).

ĐỐI CHỨNG

- Một khi đã mở, đối chứng âm và đối chứng dương có thể bảo quản ở 2 °C đến 8 °C (5.1.9).

CONJUGATE:

- Cách pha loãng: pha Conjugate (10X) (cấp sẵn) theo tỉ lệ 1/10 với dung dịch pha loãng Dilution Buffer 12 (cấp sẵn). Ví dụ: 10 µl Conjugate cộng với 90 µl dung dịch pha loãng Conjugate thì đủ dùng cho 1 đĩa phản ứng.

- Cần trộn kĩ (5.2.2) dung dịch Conjugate 1/10 trước khi cho vào đĩa.

- Nên chỉ chuẩn bị một lượng Conjugate 1/10 cần đủ cho mỗi lần thực hiện, nếu còn dư sẽ không được sử dụng cho lần thực hiện tiếp theo.

G.2 Các bước thực hiện

- Nhỏ 50 µl dung dịch pha loãng mẫu Dilution Buffer 19 vào tất cả các giếng.

- Nhỏ 50 µl đối chứng âm chuẩn Negative Control vào 2 giếng (A1 và B1).

- Nhỏ 50 µl đối chứng dương Positive Control chuẩn vào 2 giếng (C1 và D1).

- Nhỏ 50 µl mẫu vào các giếng tiếp theo (1 giếng/ mẫu).

- Che phủ đĩa phản ứng bằng tấm film trong (có sẵn trong bộ kit) hoặc giấy bạc. Ủ đĩa trong 1 h 30 min (±9 min) ở 21 °C (±5 °C).

- Sau khi ủ, đổ bỏ dung dịch trong đĩa. Rửa đĩa 5 lần với 300 µl Wash Solution (1X), đập khô đĩa.

- Nhỏ 100 µl Conjugate 1/10 vừa pha vào tất cả các giếng.

- Che phủ đĩa và ủ 30 min (±3 phút) ở 21 °C (±5 °C).

- Sau khi ủ, đổ bỏ dung dịch trong đĩa. Rửa đĩa 5 lần với 300 µl Wash Solution (1X), đập khô đĩa.

⁵ Thông tin này đưa ra để tạo điều kiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm thương mại khác nếu cho kết quả tương đương

- Nhỏ 100 µl Substrate Solution vào tất cả các giếng.
- Ủ đĩa 15 phút (± 2 min) ở 21 °C (± 5 °C).
- Nhỏ 100 µl Stop Solution vào tất cả các giếng.
- Đọc kết quả (5.3.6) ở bước sóng 450 nm không quá 5 phút sau khi nhỏ Stop Solution.

G.3 Đọc và diễn giải kết quả

Xác định tính hợp lệ (Validation) của xét nghiệm

Một xét nghiệm được công nhận khi:

- + Giá trị OD của đối chứng dương lớn hơn 0.350: ODPC > 0.350
- + Giá trị OD của đối chứng âm (NC) ít nhất cao gấp 3 lần giá trị OD của đối chứng dương (PC): ODNC/ODPC > 3

Tính toán kết quả

a. Cách tính Blocking % (S/P %) của mẫu huyết thanh:

$$S/P \% = 100 \times \frac{OD \text{ Sample} - OD \text{ NC}}{OD \text{ PC} - OD \text{ NC}}$$

Nếu: S/P % \geq 30%: Dương tính

S/P % < 30%: Âm tính

Sơ đồ đĩa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ĐC (-)	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85
B	ĐC (-)	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
C	ĐC (+)	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
D	ĐC (+)	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
E	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
F	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
G	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
H	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92

CHÚ THÍCH:

- ĐC (-): Đối chứng âm.
- ĐC (+): Đối chứng dương.
- S1, S2, S3,...,S92: mẫu huyết thanh cần kiểm tra số 1, số 2, số 3, ... đến mẫu số 92.

PHỤ LỤC H

(Quy định)

Phương pháp trung hòa vi rút trên môi trường tế bào

H.1 Chuẩn bị tế bào

- Nuôi tế bào MDBK (Madin–Darby bovine kidney) (4.3.4) hoặc tế bào sơ cấp như tế bào LT (4.3.5) để phát triển một lớp đạt 100 % bề mặt trên chai tế bào T75 (5.3.3).
- Hút bỏ môi trường đang nuôi trong chai tế bào MDBK hoặc LT 1 lớp.
- Rửa bề mặt thảm tế bào bằng dung dịch muối đệm photphat (PBS) (4.1.2) 2 lần với 10 ml/chai T75 cm², tráng qua và hút bỏ PBS.
- Cho 2 ml trypsin (có 0,5 % EDTA) (4.3.2) ủ trong thời gian từ 5 min đến 10 min ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ (5.3.1).
- Khi tế bào đã tách hết, bổ sung 5ml môi trường DMEM 5 % FBS (xem A3 phụ lục A) vào chai để vô hoạt trypsin, trộn đều, chuyển toàn bộ hỗn dịch này vào ống ly tâm 15 ml (5.1.4).
- Ly tâm tế bào (5.2.4) ở gia tốc 1 500 g trong 5 min) để loại bỏ môi trường chứa trypsin. Loại bỏ hỗn dịch phía trên, giữ lại phần cặn là tế bào ở dưới.
- Cho tiếp 10 ml GMEM 2 % FBS (xem mục A.4 phụ lục A) vào ống chứa cặn tế bào, dùng pipet 5 ml (5.1.1) trộn đều bằng cách hút nhả vài lần.
- Đếm tế bào (5.3.5), thêm một lượng môi trường phát triển GMEM (xem mục A.4 phụ lục A) sao cho đạt mật độ 2×10^5 tế bào/ml môi trường phát triển.

H.2 Chuẩn bị vi rút

Chủng vi rút Capripox tham chiếu thường là chủng vắc xin đã biết, phát triển tốt trong nuôi cấy mô, với hiệu giá lớn hơn 10^6 TCID₅₀/ml. Vi rút được pha loãng theo cơ số 10 để tạo ra độ pha loãng log₁₀ 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5 TCID₅₀/ml (tương đương với log₁₀ 3.7, 2.7, 2.2, 1.7, 1.2, 0.7, 0.2 TCID₅₀/50 µl).

H.3 Trung hòa vi rút

- Huyết thanh trâu, bò, bao gồm cả đối chứng âm, đối chứng dương pha loãng 1/5 trong môi trường pha loãng DMEM (xem mục A5 phụ lục A) và bất hoạt ở 56°C trong 30 min (5.2.6).
- Nhỏ 50 µl huyết thanh mẫu 1 vào cột 1 và 2, từ hàng A đến H của đĩa tế bào 96 giếng (5.3.2),
- Nhỏ 50 µl huyết thanh mẫu 2 vào cột 3 và 4,
- Nhỏ 50 µl huyết thanh mẫu 3 vào cột 5 và 6,
- Nhỏ 50 µl huyết thanh đối chứng dương vào cột 7 và 8,
- Nhỏ 50 µl huyết thanh đối chứng âm tính vào cột 9 và 10.

- Nhỏ 50 µl môi trường pha loãng DMEM (xem mục A.5 phụ lục A) vào cột 11 và 12 và tất cả các giếng ở hàng H.

- Nhỏ 50 µl vi rút mỗi độ pha loãng vào mỗi giếng của từng hàng sao cho độ pha loãng vi rút có hiệu giá cao nhất được đặt vào hàng A, độ pha loãng vi rút có hiệu giá thấp nhất được đặt vào hàng G cụ thể như sau:

- Bắt đầu với hàng G và vi rút pha loãng đã chuẩn bị, 50 µl vi rút độ pha loãng thấp nhất (0.2 TCID₅₀/50 µl) được thêm vào mỗi giếng trong hàng G. Điều này được lặp lại lần lượt với mỗi độ pha loãng vi rút tiếp theo với các hàng thấp theo. Cuối cùng, 50 µl độ pha loãng vi rút có hiệu giá cao nhất (3,7 TCID₅₀/50 µl) được nhỏ vào tất cả các giếng hàng A.

- Ủ đĩa ở 37°C 5% CO₂ trong 1 h (5.3.1).

- Nhỏ 100 µl tế bào đã được chuẩn bị vào tất cả các giếng trừ giếng H11 và H12 để làm đối chứng môi trường, giếng từ H1 đến H10 đóng vai trò là đối chứng tế bào và huyết thanh.

- Đĩa tế bào được đậy nắp, ủ ở 37°C 5% CO₂ (5.3.1) trong 9 ngày.

- Sử dụng kính hiển vi đảo ngược (5.3.4) kiểm tra đĩa tế bào hàng ngày từ ngày thứ 4 để tìm bệnh tích tế bào (CPE).

Đọc kết quả:

+ Có bệnh tích tế bào (có CPE): Các tế bào bị nhiễm vi rút sẽ xuất hiện CPE bao gồm sự co lại của màng tế bào khỏi các tế bào xung quanh, các tế bào bám vào nhau tạo thành các cụm.

+ Không có CPE: tế bào phát triển bình thường như các giếng hàng H, không có hiện tượng các tế bào co lại và bám thành cụm.

+ Kết quả đọc cuối cùng được ghi nhận vào ngày thứ 9 và hiệu giá vi rút trong mỗi lần chuẩn độ lặp lại được tính toán bằng phương pháp Kärber.

+ Chỉ số trung hòa (NI) là chênh lệch hiệu giá log giữa hiệu giá của vi rút trong đối chứng âm và hiệu giá của vi rút trong mẫu huyết thanh thử nghiệm. Chỉ số trung hòa $\geq 1,5$ là dương tính.

Cách tính chỉ số trung hòa:

Độ pha loãng vi rút (Log ₁₀)	3,7	2,7	2,2	1,7	1,2	0,7	0,2	TCID ₅₀ (log ₁₀)	NI
HT đối chứng âm	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 2/2	0	
HT kiểm tra	(+) 2/2	(+) 2/2	(+) 1/2	(-) 2/2	(-) 2/2	(-) 2/2	(-) 2/2	2.2	2.2

Kết quả: NI = 2.2 – 0 = 2.2

Ghi chú: (+): có CPE tức là không có kháng thể để trung hòa vi rút

(-): không có CPE tức là có mẫu HT có kháng thể để trung hòa vi rút

TCVN 8400-xx : 2025

Sơ đồ đĩa phản ứng:

	Log ₁₀ (độ pha loãng VR)	3,7	2,7	2,2	1,7	1,2	0,7	0,2	
	Cột	A	B	C	D	E	F	G	H
Mẫu HT số 1	1								
	2								
Mẫu HT số 2	3								
	4								
Mẫu HT số 3	5								
	6								
Đối chứng dương	7								
	8								
Đối chứng âm	9								
	10								
Môi trường pha loãng	11								
	12								

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WOAH Terrestrial Manual 2023. Chapter 3.4.12 Lumpy skin disease
2. Timothy R. Bowden, Shawn L. Babiuk, Geoff R. Parkyn, John S. Copps, David B. Boyle (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371, 380-393.
3. Esayas Gelaye, Charles Euloge Lamien, Roland Silber, EevaS. M. Tuppurainen, Reingard Grabherrand Adama Diallo (2013). Development of a Cost-Effective Method for Capripoxvirus Genotyping Using Snapback Primer and dsDNA Intercalating Dye. *Journal ListPLoS One*, 8(10), PMC3792100.
4. Tiêu chuẩn cơ sở TCCS 04:2020/TY-DT Quy trình xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu bò (Lumpy skin disease)