BỘ NÔNG NGHIỆP

VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

**CỤC THÚ Y**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**

**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: 515 /QĐ-TY-DT *Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2020*

**QUYẾT ĐỊNH**

**Ban hành Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục ở trâu, bò**

**CỤC TRƯỞNG CỤC THÚ Y**

*Căn cứ Quyết định số 1399/QĐ-BNN-TCCB ngày 13/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Cục Thú y;*

*Căn cứ Luật thú y ngày 19/6/2015;*

*Căn cứ Luật tiêu chuẩn và quy chuẩn kỹ thuật ngày 29/6/2006;*

*Căn cứ Thông tư số 07/2016/TT-BNNPTNT ngày 31/5/2016 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quy định về phòng, chống dịch bệnh động vật trên cạn;*

*Xét đề nghị của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương tại Công văn số*

*209/CĐ-VR ngày 30/10/2020 về việc đề xuất ban hành quy trình xét nghiệm*

*phát hiện vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục ở trâu, bò;*

*Theo đề nghị của Trưởng phòng Dịch tễ thú y, Cục Thú y.*

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Ban hành Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh

Viêm da nổi cục ở trâu, bò trên mẫu sinh phẩm từ trâu, bò.

**Điều 2.** Đối tượng và phạm vi áp dụng: Tại các phòng thử nghiệm có chức năng chẩn đoán, xét nghiệm bệnh động vật của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương và các Chi cục Thú y vùng trực thuộc Cục Thú y.

**Điều 3.** Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký ban hành.

**Điều 4.** Trưởng phòng Dịch tễ thú y và Thủ trưởng các đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

***Nơi nhận:***

- Như Điều 4;

- Thứ trưởng Phùng Đức Tiến (để b/c);

- Cục trưởng (để b/c);

- Phòng Kế hoạch;

- TTCĐTYTW (để t/h);

- Các Chi cục Thú y vùng I – VII (để t/h);

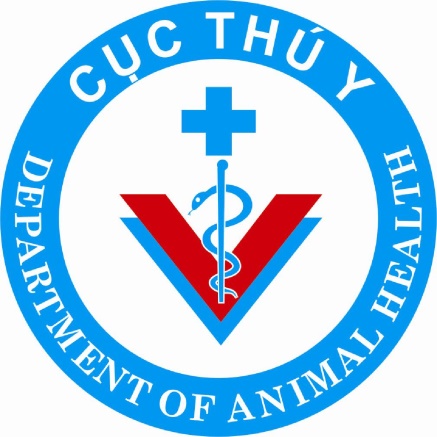
- Lưu VT, DT.

**KT. CỤC TRƯỞNG**

**PHÓ CỤC TRƯỞNG**

**Nguyễn Văn Long**

**TCCS TIÊU CHUẨN CƠ SỞ**



**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)**

**Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2020**

**LỜI NÓI ĐẦU**

Cục Thú y ban hành Tiêu chuẩn cơ sở - Quy trình xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục trên trâu bò, sản phẩm động vật, thức ăn chăn nuôi và môi trường. Tiêu chuẩn này được áp dụng tại các phòng thử nghiệm có chức năng chẩn đoán, xét nghiệm bệnh động vật của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương và các Chi cục Thú y vùng trực thuộc Cục Thú y.

Các phòng thử nghiệm khác trong hệ thống Thú y căn cứ điều kiện phòng thử nghiệm của đơn vị có thể tham khảo, áp dụng cho phù hợp, hiệu quả và theo đúng quy định của pháp luật.

Cơ quan biên soạn: Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

Cơ quan đề nghị ban hành và trình duyệt: Phòng Dịch tễ

Cơ quan xét duyệt ban hành: Cục Thú y

Quyết định ban hành số 515 QĐ-TY-DT ngày 30 tháng 10 năm 2020 của Cục trưởng Cục Thú y.

MỤC LỤC

[1. Mục đích 5](#_Toc55223842)

[2. Phạm vi áp dụng 5](#_Toc55223843)

[3. Thông tin chung 5](#_Toc55223844)

[4. Trách nhiệm 5](#_Toc55223845)

[5. Nguyên tắc 6](#_Toc55223846)

[6. Thuốc thử, thiết bị, dụng cụ 6](#_Toc55223847)

[6.1. Thuốc thử 6](#_Toc55223848)

[6.2. Thiết bị và dụng cụ 6](#_Toc55223849)

[7. Các bước thực hiện 7](#_Toc55223850)

[7.1. Chuẩn bị mẫu 7](#_Toc55223851)

[7.2. Xử lý mẫu 7](#_Toc55223852)

[7.3. Chiết tách DNA và lưu mẫu DNA 7](#_Toc55223853)

[7.4. Phương pháp Real-time PCR phát hiện vi rút Capripox 8](#_Toc55223854)

[7.5. Phương pháp Real-time PCR sử dụng mồi Snap Back phân biệt vi rút LSDV 8](#_Toc55223855)

[7.6. Phương pháp Real-time PCR sử dụng đầu dò lai kép phân biệt vi rút LSDV 9](#_Toc55223856)

[8. Kết luận 9](#_Toc55223857)

**TIÊU CHUẨN CƠ SỞ**

**QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VI RÚT**

**GÂY BỆNH VIÊM DA NỔI CỤC TRÊN TRÂU, BÒ**

**(LUMPY SKIN DISEASE)**

# 1. Mục đích

Xét nghiệm phát hiện vi rút Capripox gây bệnh Viêm da nổi cục (Lumpy skin disease virus - LSDV) trên trâu, bò và phân biệt với vi rút Capripox gây bệnh đậu dê (Goat pox virus - GTPV) và đậu cừu (Sheep pox virus - SPPV).

# 2. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả quy trình xét nghiệm vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trong phòng thử nghiệm đối với mẫu trâu bò, sản phẩm động vật, thức ăn chăn nuôi và mẫu môi trường

# 3. Thông tin chung

Bệnh viêm da nổi cục (Lumpy skin disease) là một bệnh truyền nhiễm ở trâu, bò, có tính đặc hiệu loài và không lây sang dê, cừu.

Vi rút gây ra bệnh này là một [loại vi rút](https://en.wikipedia.org/wiki/Virus) thuộc họ [Poxviridae](https://en.wikipedia.org/wiki/Poxviridae), giống Capripoxvirus. Bệnh đặc trưng bởi sốt cao 41oC, các hạch bạch huyết nông nổi to và nhiều nốt (đường kính từ 2–5 cm) trên da và niêm mạc (bao gồm cả đường hô hấp và đường tiêu hóa. Gia súc bị nhiễm bệnh cũng có thể bị phù nề ở chân và có biểu hiện què.

Động vật nhiễm vi rút sau gần 1 tuần thông thường sẽ có biểu hiện sốt và kéo dài trong 1 tuần. Tại thời điểm này, tất cả các hạch bạch huyết trên bề mặt đều phì đại. 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](https://en.wikipedia.org/wiki/Mucopurulent).

Vi rút gây bênh 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.

# 4. Trách nhiệm

Phụ trách và nhân viên phòng thử nghiệm có trách nhiệm tuân thủ các quy định của phòng thử nghiệm. Xét nghiệm viên, kỹ thuật viên, chẩn đoán viên phải thực hiện theo đúng quy trình. Phụ trách phòng thử nghiệm có trách nhiệm kiểm tra và đảm bảo quy trình được tuân thủ đúng, đủ và chính xác.

Phòng thử nghiệm phải tuân thủ theo các quy định của pháp luật về việc thực hiện xét nghiệm, bảo quản, lưu trữ mẫu cũng như đảm bảo điều kiện an toàn sinh học, an ninh sinh học và các quy định khác có liên quan.

# 5. Nguyên tắc

Quy trình này sử dụng các kỹ thuật về PCR để xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu bò.

- Kỹ thuật Real-time PCR phát hiện các vi rút thuộc giống *Capripovirus* bao gồm vi rút gây bênh viêm da nổi cục (LSDV) trên trâu, bò, vi rút gây bệnh đậu cừu (SPPV), vi rút gây bệnh đậu dê (GTPV).

- Kỹ thuật Real-time PCR Snap Back primer hoặc dual hybridyzation probe để phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu, bò với vi rút gây bệnh đậu cừu, đậu dê.

# 6. Thuốc thử, thiết bị, dụng cụ

## 6.1. Thuốc thử

- Kít chiết tách DNA theo quy trình của kit Invitrogen (Cat No. 69506) hoặc kit Qiagen All Prep DNA/RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) hoặc kít chiết tách tương đương, phù hợp cho chiết tách DNA.

- Kít nhân gen Real-time PCR Quantabio qScriptXLT 1-Step RT-qPCR ToughMix 500 Rxn (Cat No 95132-500) hoặc kít nhân gen tương đương, phù hợp.

- Mồi xuôi, mồi ngược và đầu dò cho phương pháp Real-time PCR phát hiện vi rút Capripox (Bảng 1.1, Phụ lục B.1).

- Mồi xuôi, mồi ngược và đầu dò cho phương pháp Real-time PCR sử dụng Snap Back primer (Bảng 2.1, Phụ lục B.1). hoặc dual hybridyzation probe (Bảng B.3.1, Phụ lục B.1) phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu,bò (LSDV) với vi rút gây bệnh đậu dê (GTPV), vi rút gây bênh đậu cừu (SPPV).

- 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 viêm da nổi cục (LSDV) có giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng đã biết trước).

- Nước tinh khiết, không có DNase/RNase.

- Ethanol tuyệt đối.

- Dung dịch PBS (Photphate Buffered Salin) pH 7,2 - 7,4

## 6.2. Thiết bị và dụng cụ

- Pipet các cỡ 10µl, 100µl, 1000 µl

- Tip có lọc các cỡ 10µl, 30µl, 200µl, 1000 µl

- Ống 1.5 ml không có DNase/Rnase

- Ống PCR 0,2 ml.

- Máy Real-time PCR

- Máy chiết tách RNA/DNA

- Máy trộn mẫu

- Máy ly tâm lạnh có thể đạt tốc độ 10.000 vòng

- Tủ an toàn sinh học cấp II, tủ thao tác PCR

- Nồi hấp khử trùng Autoclave

- Trang thiết bị và dụng cụ phòng thí nghiệm khác

# 7. Các bước thực hiện

## 7.1. Chuẩn bị mẫu

- Mẫu xét nghiệm là tổ chức da nổi u cục, nốt vảy, máu chống đông, hạch bạch huyết, dịch nhầy mũi, nước bọt của gia súc nghi mắc bệnh, mẫu probang, sản phẩm gia súc nghi mắc bệnh, thức ăn chăn nuôi nghi chứa chất nhiễm bệnh và mẫu môi trường.

- 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 PBS hoặc MEM, bảo quản ở nhiệt độ 4oC - 8oC hoặc -20 oC và gửi về phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt, chậm nhất là 24h 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 (-80oC).

## 7.2. Xử lý mẫu

- Mẫu nghi mắc bệnh (da nổi u cục, hạch bạch huyết, vảy da bị tổn thương) được nghiền thành huyễn dịch 10% với dung dịch bảo quản mẫu hoặc PBS vô trùng có bổ sung kháng sinh hoặc môi trường MEM có bổ sung kháng sinh. Ly tâm ở tốc độ 600 *g* vòngtrong thời gian 10 phút, thu phần dịch nổi phía trên.

- Mẫu bệnh phẩm là máu chống đông lắc đều và sử dụng luôn để chiết tách.

- *Ghi chú: Đối với mẫu sản phẩm gia súc, nguyên liệu và thức ăn nghi nhiễm mầm bệnh cũng được xử lý như mẫu nghi mắc bệnh.*

## 7.3. Chiết tách DNA và lưu mẫu DNA

-Thực hiện chiết tách DNA bằng kit chiết tách DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA đã chiết tách lưu ở nhiệt độ-20oC

## 7.4. Phương pháp Real-time PCR phát hiện vi rút Capripox

Phản ứng Real-time PCR được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các vi rút thuộc giống *Capripovirus* bao gồm vi rút gây bênh viêm da nổi cục (LSDV) trên trâu, bò, vi rút gây bệnh đậu cừu (SPPV), vi rút gây bệnh đậu dê (GTPV) bằng việc sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (phụ lục B1).

Đánh giá kết quả:

Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct), mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct). Kết quả đánh giá như sau:

1) Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

2) Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

3) Mẫu có giá trị 40 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

Những mẫu nghi ngờ này cần được xét nghiệm lại, hoặc xét nghiệm bằng phương pháp khác tương đồng hoặc phân lập vi rút để khẳng định. Nếu vẫn còn nghi ngờ, cần lấy mẫu lại để xét nghiệm kết hợp với điều tra dịch tễ học để đưa ra kết luận cuối cùng.

## 7.5. Phương pháp Real-time PCR sử dụng mồi Snap Back phân biệt vi rút LSDV

Phương pháp này được sử dụng khi cần phân biệt vi rút Viêm da nổi cục (LSDV) với các vi rút Đậu dê (GTPV) và Đậu cừu (SPPV).

Phản ứng Real-time PCR Snap Back được sử dụng để phát hiện và phân biệt sự có mặt của vi rút gây bệnh viêm da nổi cục (LSPV) 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 snap back và amplicon (phụ lục B2).

Đánh giá kết quả:

Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct), mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct). Kết quả mẫu được đánh giá như sau:

- Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

- Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

- Mẫu có giá trị 40 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

- Để phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên bò (LSDV) với vi rút gây bệnh đậu cừu (GTPV) và đậu dê (SPPV) (Phục lục B2), chuyển chế độ máy sang phân tích nhiệt độ nóng chảy. Nhiệt độ nóng chảy snapback và amplicon đối với GTPV là 58°C, 72,5°C; SPPV là 52°C, 72,5°C và LSDV là 51°C, 73,5°C.

Những mẫu nghi ngờ cần được xét nghiệm lại, hoặc xét nghiệm bằng phương pháp khác tương đồng hoặc phân lập vi rút để khẳng định. Nếu vẫn còn nghi ngờ, cần lấy mẫu lại để xét nghiệm kết hợp với điều tra dịch tễ học để đưa ra kết luận cuối cùng.

## 7.6. Phương pháp Real-time PCR sử dụng đầu dò lai kép phân biệt vi rút LSDV

Phương pháp này được sử dụng khi cần phân biệt vi rút Viêm da nổi cục (LSDV) với các vi rút Đậu dê (GTPV) và Đậu cừu (SPPV).

Phản ứng Real-time PCR sử dụng đầu dò lai ké để phát hiện vi rút gây bệnh viêm da nổi cục (LSPV) trên trâu bò và phân biệt với các vi rút đậu dê (SPPV), đậu cừu (GTPV) bằng việc sử dụng cặp mồi và mẫu dò đặc hiệu và dựa vào sự khác nhau về nhiệt độ điểm nóng chảy (Tom) sau khi phân tích đường cong nóng chảy huỳnh quang (phụ lục B3).

Đánh giá kết quả:

Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct), mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct).

Kết quả đánh giá như sau:

- Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

- Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

- Mẫu có giá trị 40 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

- Để phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu bò (LSDV) với vi rút gây bệnh đậu cừu (GTPV) và vi rút gây bệnh đậu dê (SPPV), chuyển chế độ máy sang phân tích nhiệt độ nóng chảy:

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt LSDV là 61°C

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt GTPV là 69°C

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt SPPV là 52°C.

Những mẫu nghi ngờ này cần được xét nghiệm lại, hoặc xét nghiệm bằng phương pháp khác tương đồng hoặc phân lập vi rút để khẳng định. Nếu vẫn còn nghi ngờ, cần lấy mẫu lại để xét nghiệm kết hợp với điều tra dịch tễ học để đưa ra kết luận cuối cùng.

**8. Kết luận**

Trâu bò được coi là mắc bệnh viêm da nổi cục khi có những đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng đặc trưng và có kết quả xét nghiệm dương tính bằng phương pháp Real-time PCR phát hiện vi rút Capripox trong tiêu chuẩn này.

**Phụ lục A**

**Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**

**A.1 Dung dịch kháng sinh đậm đặc**

|  |  |
| --- | --- |
| **Thành phần** | **Thể tích** |
| Penicillin | 106 IU |
| Streptomycin | 1 g |
| Kanamycin | 1 g |
| Nước cất | 10 ml |

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 oC.

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Thành phần** | **Thể tích** |
| Natriclorua (NaCl) | 8,5 g |
| Dinatri hydrophosphat (Na2HPO4) | 1,15 g |
| Kali dihydrophosphat (KH2PO4) | 0,2 g |
| Kali clorua (KCl) | 0,2 g |
| Nước cất | 1000 ml |

Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 1 M hoặc dung dịch HCl 1 M. Hấp vô trùng ở 121 oC trong 30 phút. Sử dụng tốt nhất trong 2 tuần, bảo quản ở nhiệt độ từ 4 oC đến 8 oC.

**Phụ lục B**

**Phương pháp PCR phát hiện vi rút gây bệnh viêm da nổi cục**

**B.1 Phương pháp Real-time PCR phát hiện vi rút Capripox (Bowden, 2008)**

Bước 1: Chuẩn bị mồi và mẫu dò làm việc: các cặp mồi mẫu dò được chuẩn bị ở nồng độ 18 µM và mẫu dò ở nồng độ 1 µM với nước tinh khiết, không có Dnase/Rnase.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Stt** | **Tên** | **Trình tự (5’ – 3’)** |
| 1 | Mồi xuôi (CaPV074F1) | AAAACG GTATATGGA ATA GAGTTGGAA |
| 2 | Mồi ngược (CaPV074R1) | AAATGAAACCAATGGATGGGATA |
| 3 | Đoạn dò (CaPV074P1) | FAM-TGGCTCATAGATTTCCT-MGB/NFQ |

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hỗn hợp phản ứng**  (Theo hướng dẫn của kit Platinum ® Quantitative PCR SuperMix-UDG. Cat. No: 11730-017)1 | **Nồng độ cuối cùng** | **Lượng cho 1 phản ứng (µl)** |
| Dung dịch supermix | 1X | 12,5 |
| Mồi xuôi 18 μM | 900 nM | 1,25 |
| Mồi ngược 18 μM | 900 nM | 1,25 |
| Taqman probe 5 μM | 250 nM | 1,25 |
| Nước tinh khiết, không có Dnase/RNase |  | 3,75 |
| Tổng |  | 10 |

*Chú thích: 1 Hoặc kit tương đương phù hợp với nhân gen Real-time PCR*

Bước 3: Chuyển 20 ul hỗn hợp nhân gen vào ống phản ứng PCR 0.2 ml.

Nhỏ 5 ul dung dịch chứa DNA đã chiết tách vào ống.

Ngoài mẫu xét nghiệm cần có ít nhất 1 mẫu đối chứng dương chứa gen đích và 1 mẫu đối chứng âm là nước cất.

Đặt ống vào máy Real-time PCR và chạy chu trình nhiệt sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhiệt độ** | **Thời gian** | **Chu kỳ lập** |
| 50oC | 02 phút | 1 vòng |
| 95oC | 02 phút | 1 vòng |
| 95oC | 15 giây | 45 vòng |
| 60oC | 45 giây |
| Đọc tín hiệu huỳnh quang | | |

*Ghi chú: 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.*

Bước 4: Đọc kết quả

Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct); mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct). Kết quả đánh giá như sau:

- Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

- Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

- Mẫu có giá trị 30 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

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

**B.2 Phương pháp Real-time PCR Snap Back 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) (Gelaye, 2013)**

Bước 1: Chuẩn bị cặp mồi làm việc ở nồng độ 5 pmol/µl với nước tinh khiết, không có Dnase/Rnase.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Stt** | **Tên** | **Trình tự (5’ – 3’)** |
| 1 | Mồi Snap back (Cp-HRM-SBF) | ggTGT**A**GTACGTATAAGATTATCGTATAGAAACAAGCCTTTA |
| 2 | Mồi ngược (Cp-HRM1R) | AATTTCTTTCTCTGTTCCATTTG |

Bước 2: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng Real-time PCR Snap Back theo hướng dẫn của bộ kít được sử dụng:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hỗn hợp phản ứng**  (Theo hướng dẫn của Kít SsoFast TM EvaGreen Supermix- Biorad/172-5200)1 | **Nồng độ cuối cùng** | **Lượng cho 1 phản ứng (µl)** |
| SsoFast TM EvaGreen Supermix 2X | 1X | 10 |
| Mồi Snap back (5 pmol/µl) | 500 nM | 2 |
| Mồi ngược (5 pmol/µl) | 40 nM | 0,16 |
| Nước tinh khiết, không có Dnase/RNase |  | 5,84 |
| Tổng |  | 18 |

*Chú thích: 1 Hoặc kit tương đương phù hợp với nhân gen Real-time PCR/Sybr*

Bước 3: Chuyển 18 ul hỗn hợp nhân gen vào ống phản ứng PCR 0.2 ml.

Nhỏ 2 ul dung dịch chứa DNA đã chiết tách vào ống.

Ngoài mẫu xét nghiệm cần có ít nhất 1 mẫu đối chứng dương chứa gen đích và 1 mẫu đối chứng âm là nước cất.

Đặt ống vào máy Real-time PCR và chạy chu trình nhiệt sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhiệt độ** | **Thời gian** | **Chu kỳ lập** |
| 95oC | 3 phút | 1 vòng |
| 95oC | 15 giây | 45 vòng |
| 58oC | 80 giây\* |
| 95oC | 1 phút |  |
| 40oC | 1 phút |  |
| 40- 85 oC\* | 10 giây/0.5 oC | nhiệt độ nóng chảy (\*1 lần đọc ở từng điểm nhiệt độ) |
| 37oC | 1 phút |  |
| \* Đọc tín hiệu huỳnh quang ở FAM/Sybr | | |

*Ghi chú: Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kit Kít SsoFast TM 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.*

Bước 4: Đọc kết quả

- Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct); mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct). Kết quả đánh giá như sau:

- Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

- Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

- Mẫu có giá trị 40 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

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

- Điểm nhiệt độ nóng chảy được dùng để phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên bò (LSDV) với vi rút gây bệnh đậu cừu (GTPV) và vi rút gây bệnh đậu dê (SPPV) như sau: các cặp nhiệt độ nóng chảy (đuôi snapback, amplicon) được xác định cho GTPV (58°C, 72,5°C), SPPV (52°C, 72,5°C) và LSDV (51°C, 73,5°C).

**B.3 Phương pháp Real-time PCR đầu dò lai kép (dual hybridization) 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) (Lamien, 2011)**

Bước 1: Chuẩn bị cặp mồi làm việc ở nồng độ 5 pmol/µl với nước tinh khiết, không có Dnase/Rnase.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Stt** | **Tên** | **Trình tự (5’ – 3’)** |
| 1 | Mồi xuôi (CpRt- Forward) | 5'-gatagtatcgctaaacaatgg-3' |
| 2 | Mồi ngược (CpRt –Reverse) | 5'-atccaaaccaccatactaag-3' |
| 3 | Đầu dò (Cp-LNA-FAM) | 5'-acctagcTgtAgttcaCccagtaaa-FAM-3' |
| 4 | Đầu dò (Cp-Cy5) | 5'-Cy5-tcaatttcaataaggacaaaacgatatgga-3'-phosphate |

*Ghi chú: chữ in hoa là những nucleic acid bị khóa*

Bước 2: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng Real-time PCR đầu dò lai kép theo hướng dẫn của bộ kít được sử dụng:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hỗn hợp phản ứng**  (Theo hướng dẫn của Kít iQ SuperMix 2X- Biorad/1708860)1 | **Nồng độ cuối cùng** | **Lượng cho 1 phản ứng (µl)** |
| iQ Supermix 2X | 1X | 10 |
| Mồi xuôi CpRt (5 pmol/µl) | 100 nM | 0,4 |
| Mồi ngược CpRt (5 pmol/µl) | 300 nM | 1,2 |
| Đầu dò Cp-LNA (5 pmol/µl) | 300 nM | 1,2 |
| Đầu dò Cp-Cy5 (5 pmol/µl) | 100 nM | 0,4 |
| Nước tinh khiết, không có Dnase/RNase |  | 4,8 |
| Tổng |  | 18 |

*Chú thích: 1 Hoặc kit tương đương phù hợp với nhân gen Real-time PCR*

Bước 3: Chuyển 18 ul hỗn hợp nhân gen vào ống phản ứng PCR 0.2 ml.

Nhỏ 2 ul dung dịch chứa DNA đã chiết tách vào ống.

Ngoài mẫu xét nghiệm cần có ít nhất 1 mẫu đối chứng dương chứa gen đích và 1 mẫu đối chứng âm là nước cất.

Đặt ống vào máy Real-time PCR và chạy chu trình nhiệt sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhiệt độ** | **Thời gian** | **Chu kỳ lập** |
| 95oC | 5 phút | 1 vòng |
| 95oC | 10 giây | 45 vòng |
| 46oC | 30 giây\* |
| 72oC | 30 giây |
| 95oC | 1 phút |  |
| 40oC | 1 phút |  |
| 35- 85 oC\* | 10 giây/1 oC | nhiệt độ nóng chảy (\*1 lần đọc ở từng điểm nhiệt độ) |
| 37oC | 1 phút |  |
| \* Đọc tín hiệu huỳnh quang ở Cy5 | | |

*Ghi chú: Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kit Kít SsoFast TM 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.*

Bước 4: Đọc kết quả

- Phản ứng được công nhận khi mẫu đối chứng dương tính cho kết quả dương tính, có giá trị Ct biết trước (±2 Ct); mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct). Kết quả đánh giá như sau:

- Mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính;

- Mẫu không có giá trị Ct được coi là âm tính;

- Mẫu có giá trị 40 < Ct < 45 được coi là nghi ngờ;

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

- Nhiệt độ điểm nóng chảy được dùng để phân biệt vi rút gây bệnh viêm da nổi cục trên bò (LSDV) với vi rút gây bệnh đậu cừu (GTPV) và vi rút gây bệnh đậu dê (SPPV) như sau:

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt LSDV là 61°C

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt GTPV là 69°C.

+ Nhiệt độ nóng chảy để phân biệt SPPV là 52°C

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. OIE Terrestrial Manual 2017. 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](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gelaye%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084), [Charles Euloge Lamien](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lamien%20CE%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084), [Roland Silber](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Silber%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084), [Eeva S. M. Tuppurainen](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tuppurainen%20ES%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084), [Reingard Grabherr](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grabherr%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084) and [Adama Diallo](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Diallo%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24116084) (2013). Development of a Cost-Effective Method for Capripoxvirus Genotyping Using Snapback Primer and dsDNA Intercalating Dye. [*Journal List*](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/)[*PLoS One*](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/440/)*,* 8(10), *PMC3792100*
4. Charles Euloge Lamien, Mamadou Lelenta, Wilfried Goger, Roland Silber, Eeva Tuppurainen, Mirta Matijevic, Antony George Luckins, Adama Diallo (2010). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods,* 171, 134–140*.*