

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-23:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 23: BỆNH UNG KHÍ THÁN**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 23: Blackleg disease

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-23:2014 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 23 : Bệnh ung khí thán

Animal diseases - Diagnostic procedure – Part 23: Blackleg 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 thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh ung khí thán trên trâu, bò do vi khuẩn *Clostridium chauvoei* gây ra.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh ung khí thán (Blackleg disease)

Bệnh ung khí thán là bệnh truyền nhiễm cấp tính ở trâu, bò do vi khuẩn yếm khí *Clostridium chauvoei* gây ra, có đặc trưng là trâu, bò sốt cao, các bắp thịt sưng, khí thũng.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

3.1 Thạch máu, thạch máu cơ bản được bổ sung từ 5 % đến 7 % máu cừu, máu bê, hoặc máu thỏ (pha chế thạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

3.2 Thạch thường.

3.3 Canh thang thịt (cooked meat).

3.4 Môi trường nước thịt BHI (Brain heart Infusion broth).

3.5 Môi trường pepton.

3.6 Nguyên liệu, hóa chất cho phương pháp nhuộm Gram (xem Phụ lục A)

3.7 Nguyên liệu, hóa chất cho các phản ứng sinh hóa (xem Phụ lục B).

3.8 Môi trường urê cơ bản.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Tủ ấm, duy trì nhiệt độ 37 °C.

4.2 Que cấy, vô trùng.

4.3 Đèn cồn.

4.4 Nồi hấp, duy trì ở nhiệt độ 115 °C, 121 °C.

4.5 Nồi đun cách thủy, duy trì ở 100 °C.

4.6 Kính hiển vi quang học, có độ phóng đại 1000 lần.

4.7 Ống nghiệm, sạch, vô trùng.

4.8 Phiến kính, sạch.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh xảy ra quanh năm nhưng thường tập trung vào những tháng nóng, ẩm, mưa nhiều.
- Bệnh xuất hiện lẻ tẻ.
- Vi khuẩn không lây trực tiếp từ con ốm sang con khỏe. Nha bào từ xác chết, phân, dịch bài xuất vào trong đất và sống ở đó. Khi mưa, lũ lụt, nước làm nha bào nổi lên mặt đất. Gia súc ăn phải nha bào sẽ mắc bệnh.

- Bệnh thường xảy ra ở trâu, bò, dê, cừu, lợn, ngựa ít mắc bệnh. Súc vật non từ 6 tháng tuổi đến 3 năm tuổi mắc bệnh nhiều hơn súc vật già.

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng

- Thể quá cấp tính: Một vài con trâu, bò chết đột ngột mà không biểu hiện triệu chứng lâm sàng.
- Thể cấp tính: Ban đầu sốt cao từ 39 °C tới 39,5 °C, khi các triệu chứng bệnh biểu hiện rõ ràng thì nhiệt độ giảm xuống bình thường.
- Con vật có các khối ung, khí thũng ở vùng cơ mông, chi sau, ngực, vai, lưng.
- Khối ung nóng và đau, sau đó trở nên lạnh và không đau, ấn tay vào có tiếng kêu lạo xạo.
- Khi ung ở đùi, chân, con vật đi lại khó khăn.
- Khi ung ở cổ, con vật thè lưỡi, khó thở.

5.1.3 Bệnh tích đại thể

- Bệnh tích chủ yếu là các khối ung. Ở giữa ung, bắp thịt bị thâm tím, đen xạm hoặc nâu xạm, bị hoại tử, có chất keo, nhầy hoặc như thịt đông, cắt vào sâu thấy sùi bọt và có tiếng lạo xạo, mùi bơ ôi. Phía ngoài bắp thịt có màu nhạt, xung quanh có vùng thủy thũng, xuất huyết.
- Hạch ở vùng có ung sưng to, thấm tương dịch.
- Nếu ung xuất hiện ở ức và ngực thì tim tụ máu, ngoại tâm mạc có nước vàng, phổi tụ máu, sưng.
- Nếu ung xuất hiện ở bụng thì dạ dày, ruột bị tụ máu, màng bọc gan có các vết trắng hoại tử, trên mặt có vân như đá hoa, mật sưng.
- Lách sưng, khi cắt có chất màu đỏ xám lẫn khí ở bề mặt cắt.
- Máu màu sẫm.

5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

Bệnh phẩm gồm: Các vùng cơ, vùng mô bị phù nề, gan.

Lấy vô trùng từ 50 g đến 100 g mỗi loại bệnh phẩm, cho vào từng lọ hay túi ni lon vô trùng riêng biệt, đậy kín, bảo quản trong điều kiện lạnh từ 2 °C đến 8 °C và gửi về phòng thí nghiệm chậm nhất 24 h sau khi lấy mẫu.

Gửi kèm theo bệnh phẩm giấy yêu cầu xét nghiệm có ghi rõ triệu chứng, bệnh tích và đặc điểm dịch tễ.

5.2.2 Tiêm động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm: Chuột lang khỏe mạnh có trọng lượng từ 200 g tới 250 g.

Tiêm động vật thí nghiệm: Mẫu bệnh phẩm được nghiền nát, hoà với nước muối sinh lý 0,9 % theo tỷ lệ 1/10, tiêm vào bắp thịt cho chuột lang từ 0,1 ml đến 0,2 ml.

Vi khuẩn *Clostridium chauvoei* làm chết chuột lang trong vòng 24 h đến 48 h. Mẫu cơ, mô vùng phù nề, gan được làm tiêu bản để kiểm tra hình thái vi khuẩn trên kính hiển vi và tiến hành phân lập, giám định vi khuẩn.

5.2.3 Phân lập vi khuẩn

Bệnh phẩm (xem 5.2.1) được cấy vào canh thang thịt (xem 3.3) và đun trong nồi đun cách thủy (xem 4.5) trong 10 min. Chuyển 10 µl canh thang vào thạch máu (xem 3.1), nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí trong 48 h.

Trên thạch máu, khuẩn lạc nghi ngờ có màu xám, đường kính từ 2 mm đến 3 mm, dẹt, tròn, bóng và gây tan huyết.

Chọn khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường thạch máu (xem 3.1), môi trường nước thịt BHI (xem 3.4), nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí trong 48 h để kiểm tra các đặc tính sinh hóa.

5.2.4 Xác định vi khuẩn

5.2.4.1 Quan sát hình thái

- Làm tiêu bản và cố định tiêu bản: Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc hòa đều vào giọt nước muối sinh lý trên phiến kính (xem 4.8) hoặc lấy canh thang đã nuôi cấy vi khuẩn dàn mỏng lên trên phiến kính (xem 4.8). Cố định tiêu bản bằng cách để khô hoặc làm khô tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn (xem 4.3).
- Nhuộm tiêu bản: Tiêu bản sau khi cố định được nhuộm bằng phương pháp nhuộm Gram (xem phụ lục A)
- Vi khuẩn *Clostridium chauvoei* dạng trực khuẩn ngắn, hai đầu tròn, kết thành chuỗi ngắn từ 2 vi khuẩn đến 5 vi khuẩn, có nha bào hình bầu dục, chiều ngang của nha bào có kích thước lớn hơn chiều ngang của vi khuẩn.

5.2.4.2 Kiểm tra các đặc tính sinh hóa

Xác định vi khuẩn *Clostridium chauvoei* dựa vào các đặc tính sinh hóa được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *Clostridium chauvoei*

Lecithinase	Lipase	Thủy phân gelatin	Phân giải casein	Glucose	Lactose	Sucrose	Maltose	Salicin	Indol
–	–	+	–	+	+	+	+	–	–

Xác định đặc tính sinh hóa theo Phụ lục B.

5.2.4.3 Xác định vi khuẩn *Clostridium chauvoei* bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sử dụng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt ở Bảng 2.

Bảng 2 – Cặp mồi và chu trình nhiệt cho PCR

Gene đích	Kí hiệu	Sequence (5'-3')	Kích cỡ sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt
16S-23S rDNA	IGSC4 23UPCH	GAATTAACAACACTTTATTAACAAATG GGATCAGAACTCTAAACCTTTCT	509	94 °C, 5 min ; Chu trình 30 vòng: (94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) 72 °C - 7 min. Giữ: 4 °C

Tiến hành phản ứng PCR theo Phụ lục C.

6 Kết luận

Trâu, bò được xác định là mắc bệnh ung khí thán khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình của bệnh và phân lập được vi khuẩn *Clostridium chauvoei* trong phòng thí nghiệm.