

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-28:2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 28: BỆNH VIÊM RUỘT HOẠI TỬ DO VI KHUẨN
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS**

Animal diseases - Diagnostic procedure –

Part 28: Necrotic enteritis cause by clostridium perfringens

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-28:2014 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 28: Bệnh viêm ruột hoại tử do vi khuẩn *Clostridium perfringens*

Animal diseases – Diagnostic procedure –

Part 28: Necrotic Enteritis cause by Clostridium perfringens

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 cho người xét nghiệm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Khi áp dụng tiêu chuẩn người sử dụng tiêu chuẩn phải tự thiết lập các thao tác phù hợp để đảm bảo an toàn sức khỏe và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh viêm ruột hoại tử ở gà và lợn do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây ra.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh viêm ruột hoại tử ở gà, ở lợn

Là bệnh truyền nhiễm, do vi khuẩn *Clostridium perfringens* typ A và/hoặc typ C. Bệnh xảy ra chủ yếu ở gà ít ngày tuổi, ở lợn con theo mẹ.

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) là vi khuẩn Gram dương, yếm khí có khả năng gây bệnh ở vật nuôi, động vật hoang dã và ở người. Vi khuẩn *C. perfringens* có khả năng sản sinh 16 loại độc tố. Dựa vào khả năng sản sinh 4 loại độc tố chính là độc tố alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ), iota (ι), vi khuẩn được chia thành 5 typ A, B, C, D, E (typ độc tố) (xem bảng 1).

Bảng 1 – Các typ độc tố chính của vi khuẩn *C. perfringens*

Typ độc tố	α	β	ϵ	I
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

CHÚ THÍCH: có sản sinh độc tố (+); không sản sinh độc tố (-)

C. perfringens typ A thường có ở trong đường ruột của gà, lợn khỏe với số lượng nhỏ, khi gặp những điều kiện bất lợi như thay đổi chế độ chăm sóc nuôi dưỡng, mật độ chăn nuôi cao hoặc nhiễm cầu trùng, vi khuẩn nhân lên nhanh chóng và sản sinh độc tố (chủ yếu là độc tố α) gây viêm ruột hoại tử.

C. perfringens typ C hiếm khi phân lập được từ gà khỏe, lợn khỏe và độc tố α và β được xác định là yếu tố độc lực chủ yếu trong quá trình sinh bệnh của *C. perfringens* typ C.

3 Thuốc thử và 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.

3.1 Môi trường nước thịt.

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

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

3.4 Túi tạo khí CO₂, đảm bảo từ 5 % đến 10 % CO₂ trong dụng cụ nuôi cấy yếm khí.

3.5 Môi trường Thioglycolate.

3.6 Bộ thuốc nhuộm Gram (xem phụ lục A).

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

3.8 Nguyên liệu cho PCR (Polymerase Chain Reaction) (xem điều C.1 phụ lục C).

3.9 Môi trường TSC (tryptose sulfite cycloserine).

3.10 Thạch máu cơ bản hay thạch thường.

3.11 Môi trường nước pepton.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ 37 °C và bổ sung từ 5 % đến 10 % CO₂.

4.2 Kính hiển vi quang học, có vật kính với độ phóng đại 10 lần, 40 lần, 100 lần.

4.3 Bình nuôi cấy vi khuẩn yếm khí và túi nuôi cấy vi khuẩn yếm khí .

4.4 Máy li tâm, có thể li tâm với gia tốc 12 000 g.

4.5 Máy nhân gen (máy PCR).

4.6 Nồi hấp, có thể duy trì ở nhiệt độ 115°C, 121 °C.

4.7 Que cấy, vô trùng.

4.8 Que cấy chích sâu, vô trùng.

4.9 Phiến kính, sạch.

4.10 Ống nghiệm, sạch, vô trùng.

4.11 Đèn cồn.

4.12 Màn lọc, có kích thước lỗ lọc 0,45 µm.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Bệnh viêm ruột hoại tử ở gà

5.1.1.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh viêm ruột hoại tử thường xảy ra ở gà ít ngày tuổi từ 2 tuần đến 5 tuần tuổi, gà tây từ 7 tuần đến 12 tuần tuổi nhưng cũng có thể xảy ra ở gà hậu bị và gà đẻ.

- Bệnh lây lan qua đường thức ăn, nước uống do vi khuẩn *C. perfringens* có nhiều trong môi trường đất, thức ăn, phân, chất độn chuồng, rác, chất chứa đường ruột,...
- Tỷ lệ nhiễm bệnh viêm ruột hoại tử ở gà con có thể lên tới 50 %, ở gà thịt khoảng từ 13 % đến 37,3 %.

5.1.1.2 Triệu chứng lâm sàng

- Trong trường hợp cấp tính gà chết nhanh (từ 1 h đến 2 h) khi chưa biểu hiện triệu chứng của bệnh. Tỷ lệ chết cao, có thể lên tới 50 %.
- Gà thường chết đột ngột, các triệu chứng lâm sàng thấy được trong thời gian ngắn.
- Triệu chứng thường thấy của bệnh là gà bị tiêu chảy, phân nhiều nước, có màu đỏ, nâu đỏ, màu vàng hoặc lẫn thức ăn.
- Gà có biểu hiện ủ rũ, ăn ít, giảm tăng trọng, xác chết gầy và ướt.

5.1.1.3 Bệnh tích đại thể

- Bệnh tích thường quan sát thấy ở phần ruột non chủ yếu là ở không tràng và hồi tràng. Niêm mạc ruột bị xuất huyết, hoại tử. Lớp chất nhầy ở ruột có màu xám nâu đến vàng xanh lá cây hoặc có màng giả.
- Thành ruột non và thỉnh thoảng ở đoạn manh tràng mỏng, dễ nát, giãn to và tích khí.
- Gan không to nhưng màu sắc thay đổi, có màu thẫm hoặc vàng hơn bình thường. Trên bề mặt gan có lấm tấm điểm hoại tử màu vàng.
- Lách có thể sưng to, sung huyết hoặc xuất huyết, có các điểm hoại tử.
- Thận có thể sưng to, biến màu có thể có các điểm hoại tử.

5.1.2 Bệnh viêm ruột hoại tử ở lợn

5.1.2.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh thường xảy ra ở lợn con dưới 7 ngày tuổi (tỷ lệ mắc cao ở lợn 3 ngày tuổi).
- Bệnh có thể xuất hiện kế phát sau các nguyên nhân nguyên phát hoặc khi có yếu tố bất lợi xảy ra.
- Mầm bệnh có thể lây truyền cho lợn con từ phân của lợn nái có chứa vi khuẩn.
- Tùy thuộc vào trạng thái miễn dịch của lợn và thể bệnh tỷ lệ chết có thể thay đổi, có thể từ 50 % đến 60 % có khi đến 100 %.

5.1.2.2 Triệu chứng lâm sàng

Thể cấp tính

- Lợn có thể mắc bệnh ngay từ ngày tuổi đầu tiên.
- Lợn tiêu chảy phân lẫn máu hoặc phân màu đỏ nâu lẫn các mảng niêm mạc ruột bị hoại tử màu xám.
- Lợn con yếu, đi lại khập khiễng hay nằm một chỗ.
- Những con gần chết da bụng chuyển màu xanh, thân nhiệt hạ xuống 35 °C, vùng da bụng phù nề.
- Con vật gầy còm và thường chết từ 12 h đến 48 h sau khi xuất hiện triệu chứng tiêu chảy. Tỷ lệ chết cao từ 50 % đến 100 %.
- Có trường hợp lợn có thể chết không có triệu chứng tiêu chảy.
- Ruột non xuất huyết, sinh hơi thường ở vùng không tràng và hồi tràng, chất chứa có thể lẫn máu và các mảng hoại tử màu xám. Niêm mạc ruột màu đỏ hay đen.
- Dịch xoang bụng có màu đỏ.

Thể á cấp tính

- Thường xảy ra ở lợn từ 5 ngày đến 7 ngày tuổi.
- Lợn tiêu chảy phân vàng không lẫn máu.
- Bỏ ăn, gầy còm và chết do mất nước.

Thể mạn tính

- Lợn tiêu chảy dai dẳng khoảng hơn một tuần.
- Phân nhiều nước, màu vàng xám có lẫn chất nhầy.
- Con vật gầy còm nhợt nhạt, không chết hoặc chết sau vài tuần, còi cọc sau khi khỏi triệu chứng.

5.1.2.3 Bệnh tích đại thể

- Ruột non xuất huyết, thành ruột non mỏng, chứa đầy khí, sinh hơi thường ở vùng không tràng và hồi tràng, chất chứa có thể lẫn máu và các mảng hoại tử màu xám. Niêm mạc ruột màu đỏ hay đen.
- Ruột già giãn, nhợt nhạt, chất chứa nhão.
- Dịch xoang bụng có màu đỏ.

5.2 Chẩn đoán phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu

Bệnh phẩm bao gồm: ruột non, phân.

Bệnh phẩm ruột: lấy từ 10 cm đến 15 cm vùng ruột non (hồi tràng) có bệnh tích.

Bệnh phẩm phân: lấy phân trực tiếp từ trực tràng (lấy khoảng 10 g).

Cho mỗi loại bệnh phẩm 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 Kiểm tra trực tiếp vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm

Sử dụng phương pháp nhuộm Gram để kiểm tra hình thái vi khuẩn.

5.2.2.1 Cách làm tiêu bản

Dùng que cấy (4.7) lấy niêm mạc ruột (vùng niêm mạc ruột có bệnh tích của bệnh), phết lên phiến kính (4.9), để khô.

5.2.2.2 Cố định tiêu bản

Nhỏ cồn methanol ngập tiêu bản (xem 5.2.2.1), để khô.

Nhuộm Gram theo quy định của phụ lục A.

5.2.2.3 Quan sát hình thái vi khuẩn

Vi khuẩn bất màu tím (màu Gram dương), trực khuẩn to, thẳng, hai đầu tròn, có kích thước từ (từ 0,6 µm đến 0,8 µm) x (từ 2 µm đến 4 µm), thường đứng riêng lẻ hay thành chuỗi ngắn.

Bệnh phẩm nghi nhiễm bệnh khi có nhiều vi khuẩn có hình thái đặc trưng của *C. perfringens* trên vi trường.

5.2.3 Phân lập vi khuẩn

Bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường thạch máu (3.2) hoặc thạch máu Schaedler (3.3), nuôi ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4) từ 24 h đến 48 h.

(CHÚ THÍCH: các dụng cụ nuôi cấy vi khuẩn yếm khí, phương pháp bổ sung khí CO₂ được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

Với bệnh phẩm phân, ngoài nuôi cấy vào các môi trường trên, nuôi cấy thêm vào môi trường chọn lọc như môi trường TSC (3.9).

Sau từ 24 h đến 48 h nuôi cấy, khuẩn lạc trên môi trường thạch máu (3.2) và thạch máu Schaedler (3.3) có màu trắng xám đường kính từ 2 mm đến 4 mm, hơi vồng, tròn, bóng và có 2 vòng dung huyết (dung huyết kép). Vòng dung huyết phía trong rõ (dung huyết beta – β), vòng dung huyết phía ngoài mờ (dung huyết alpha – α).

Trên môi trường TSC (3.9) khuẩn lạc *C. perfringens* có màu đen.

Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường nước thịt (3.1) hoặc môi trường Thioglycolate (3.5) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4), nuôi ở tủ ấm (4.1), từ 24 h đến 48 h để kiểm tra hình thái và đặc tính sinh hóa.

5.2.4 Xác định vi khuẩn

5.2.4.1 Quan sát hình thái vi khuẩn

- Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc hòa đều vào giọt nước sinh lý trên phiến kính (4.9) hoặc lấy một vòng que cấy (4.7) canh trùng đã nuôi cấy vi khuẩn dàn mỏng lên trên phiến kính (4.9), để khô và cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn (4.11).
- Tiêu bản sau khi đã được cố định, nhuộm bằng phương pháp Gram (xem Phụ lục A).
- Vi khuẩn bất màu tím (màu Gram dương), trực khuẩn to, thẳng, hai đầu tròn, có kích thước (từ 0,6 μ m đến 0,8 μ m) x (từ 2 μ m đến 4 μ m), thường đứng riêng lẻ hay thành chuỗi ngắn.

5.2.4.2 Kiểm tra đặc tính sinh hóa

Xác định vi khuẩn *C. perfringens* dựa vào một số đặc tính sinh hóa được nêu trong bảng 2.

Bảng 2 (tiếp theo) – Một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *C. perfringens*

Tính chất	<i>C. perfringens</i>
Lecithinase	+
Lipase	-
Phân giải casein	+
Indole	-
Di động	-

Bảng 2 (kết thúc) – Một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *C. perfringens*

Tính chất	<i>Clostridium perfringens</i>
Glucose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Salicin	-
Phản ứng CAMP* ngược	+

*CAMP: Christie – Atkins – Munch – Petersen

Tiến hành các phản ứng sinh hóa theo quy định tại Phụ lục B.

GHI CHÚ: Có thể sử dụng kit sinh hóa thương mại để kiểm tra đặc tính của vi khuẩn *C. perfringens***5.2.4.3 Định typ và xác định độc tố của vi khuẩn *C. perfringens***

Sử dụng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 – Các cặp mồi và chu trình nhiệt cho PCR xác định độc tố α , β , ϵ , ι

Độc tố	Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'	Kích thước sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt
α	CPA Fw	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324	95 °C, 10 min ; 40 chu trình : (94 °C, 30 s; 53 °C, 90 s; 72 °C, 90 s) 72 °C, 10 min.
	CPA Rv	CCTCTGATACATCGTGTAAG		
β	Cpb Fw	GCGAATATGCTGAATCATCTA	196	
	Cpb Rv	GCAGGAACATTAGTATATCTTC		
ϵ	EtX Fw	GCGGTGATATCCATCTATTC	655	
	EtX Rv	CCACTTACTTGTCCCTACTAAC		
ι	Iap Fw	ACTACTCTCAGACAAGACAG	446	
	Iap Rv	CTTTCCTTCTATTACTATACG		

- Tiến hành phản ứng PCR theo quy định tại Phụ lục C.
- Vi khuẩn *C. perfringens* được xác định là typ A khi PCR dương tính với độc tố α ; âm tính với độc tố β , ϵ , I.
- Vi khuẩn *C. perfringens* được xác định là typ C khi PCR dương tính với độc tố α và β ; âm tính với độc tố ϵ .

6 Kết luận

Gà, lợn được xác định là mắc bệnh viêm ruột hoại tử do vi khuẩn *C. perfringens* khi có đủ các điều kiện sau:

- Có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể của bệnh;
- Nhuộm tiêu bản niêm mạc ruột thấy nhiều vi khuẩn có hình thái đặc trưng của vi khuẩn *C. perfringens*;
- Phân lập và giám định được vi khuẩn *C. perfringens* thuộc typ A hoặc typ C.

Phụ lục A
(Quy định)

Phương pháp nhuộm Gram

A.1 Thuốc thử

A.1.1 Dung dịch tím tinh thể

Tím tinh thể ($C_{25}H_{30}N_3Cl$)	2,0 g
Etanol 95 %	20,0 ml
Amoni oxalat [$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$]	0,8 g
Nước	80,0 ml

Hoà tan tím tinh thể trong etanol và hòa tan amoni oxalat trong nước. Sau đó, trộn 2 dung dịch này với nhau và lắc cho tan hết.

A.1.2 Dung dịch fuchsin đậm đặc

Fuchsin basic ($C_{20}H_{20}ClN_3$)	1 g
Etanol 95 %	10 ml
Phenol (C_6H_6O)	5 g
Nước	100 ml

Khi dùng, pha loãng dung dịch fuchsin đậm đặc với nước theo tỉ lệ 1:10 (thể tích).

A.1.3 Dung dịch lugol

Kali iodua (KI)	2 g
Iốt (I_2) tinh thể	1 g
Nước	200 ml

Nghiền kali iodua và iốt tinh thể, cho nước vào từ từ và lắc cho tan.

A.1.4 Cồn axeton

Etanol 95 %	3 phần
Axeton (C_2H_6O)	1 phần

A.2 Cách tiến hành

Nhỏ dung dịch tím tinh thể lên tiêu bản (đã cố định), để từ 1 min đến 2 min sau đó rửa nước nhanh và để khô.

Nhỏ dung dịch lugol, để 1 min sau đó rửa nước nhanh và để khô.

Nhỏ cồn axeton, rửa nước thật nhanh và để khô.

Nhỏ dung dịch fuchsin loãng, để 1 min sau đó rửa nước rồi thấm khô hoặc sấy khô.

A.3 Xem tiêu bản

Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản và xem tiêu bản bằng kính hiển vi (4.2) với vật kính độ phóng đại 100 lần.

Phụ lục B
(Quy định)

Phương pháp kiểm tra các đặc tính sinh hóa

B.1 Kiểm tra đặc tính sinh lecithinase và lipase

B.1.1 Môi trường thạch lòng đỏ trứng

Chuẩn bị môi trường thạch lòng đỏ trứng: sử dụng môi trường thạch máu cơ bản (3.10) có bổ sung huyết dịch lòng đỏ trứng (thương mại). Pha chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

B.1.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường thạch lòng đỏ trứng (xem mục B.1.1), nuôi ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4) và kiểm tra sau từ 24 h đến 48 h.

B.1.3 Đọc kết quả

B.1.3.1 Khả năng sinh lecithinase

- Dương tính: Có quầng mờ đục ở môi trường xung quanh khuẩn lạc;
- Âm tính: Không có quầng mờ đục ở môi trường xung quanh khuẩn lạc.

B.1.3.2 Khả năng sinh lipase

- Dương tính: Có lớp như ngọc trai hay vảy cá bao phủ khuẩn lạc (có thể lan ra thạch xung quanh khuẩn lạc);
- Âm tính: Không có lớp như ngọc trai hay vảy cá bao phủ khuẩn lạc.

B.2. Phản ứng phân giải casein

B.2.1 Môi trường thạch casein

Thành phần môi trường:

- Sữa tách bơ (skim milk)	100 g
- Nước cất	1000 ml

Chỉnh pH môi trường ở $6,8 \pm 0,2$.

Hòa các thành phần trên với nhau, lắc đều.

Chia ra các ống nghiệm (4.10), 10ml / 1 ống nghiệm.

Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (4.6) ở 121 °C trong 5 min.

B.2.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy lấy khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường thạch casein (xem mục B.2.1), nuôi ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4) đọc kết quả hàng ngày trong 5 ngày.

B.2.3 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính: sữa đông vón có vẩn như mây (stormy clot).
- Phản ứng âm tính: sữa không đông vón.

Ghi chú: Kiểm tra phản ứng phân giải casein có thể sử dụng môi trường thương mại sữa Litmus (Litmus milk).

B.3 Phản ứng sinh hóa đường

B.3.1 Môi trường

Sử dụng môi trường nước pepton có đường gồm các thành phần:

- Nước pepton (3.11).
- Dung dịch chỉ thị màu bromocrezol.

Cho 0,2 g bromocrezol vào 100 ml etanol 90 % và lắc cho tan hết.

- Dung dịch đường

Pha đường với nước thành dung dịch 10 %, tiệt trùng môi trường bằng nồi hấp (4.6) ở 110 °C trong 15 min đến 20 min hoặc hấp cách quãng 3 lần ở 100 °C trong 30 min hoặc lọc qua màng lọc (4.12)

Chuẩn bị môi trường:

Cho 0,1 ml chỉ thị màu bromocrezol vào 100 ml môi trường nước pepton, chia 4 ml vào mỗi ống nghiệm (4.10). Tiệt trùng bằng nồi hấp (4.6) ở 120 °C trong 30 min. Chính pH môi trường ở 6,8 ± 0,2.

Pha môi trường nước pepton-đường: cho 0,4 ml dung dịch đường 10% vào ống nghiệm chứa 4ml nước pepton đã được hấp tiệt trùng

B.3.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào các ống môi trường nước pepton - đường (xem mục B.3.1), để vào tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4), đọc kết quả sau từ 24 h đến 48 h.

B.3.3 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính: Môi trường chuyển màu vàng;
- Phản ứng âm tính: Môi trường không thay đổi màu.

B.4 Kiểm tra khả năng sinh Indol

B.4.1 Thuốc thử Kovac's

Paradimetyl aminobenzaldehyt	5 g
Cồn amylic (C ₅ H ₁₁ OH)	75 ml
Axit clohydric đặc	25 ml

Trộn dung dịch paradimetyl aminobenzaldehyt vào cồn amylic cho tan hết và để trong tủ lạnh 4 °C. Thêm từ từ 5 ml đến 10 ml HCl, trộn đều rồi để tủ lạnh, sau đó lại tiếp tục bổ sung HCl.

Bảo quản thuốc thử trong lọ màu, ở 4 °C.

B.4.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường nước peptone (3.11) hoặc môi trường nước peptone (3.11) có bổ sung tryptophan, nuôi ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3).

Sau 24 h nuôi cấy, nhỏ từ 0,2 ml đến 0,3 ml dung dịch thuốc thử Kovac's vào môi trường, lắc nhẹ.

B.4.3. Đọc kết quả

Phản ứng dương tính (sinh indol): xuất hiện vòng màu đỏ phía trên môi trường.

Phản ứng âm tính (không sinh indol): không xuất hiện vòng màu đỏ.

B.5 Kiểm tra khả năng di động

B.5.1 Môi trường thạch lỏng

Thành phần môi trường:

Peptone	10 g
Meat extract	3 g

NaCl	5 g
Agar	4 g
Gelatin	80 g
Nước cất	1000 ml

Hòa gelatine vào nước để 30 min, bổ sung các thành phần khác, đun cho tan hoàn toàn.

Chia 6ml vào mỗi ống nghiệm (4.10).

Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (4.6) ở 115 °C trong 20 min.

GHI CHÚ: Kiểm tra khả năng di động và sinh indol có thể sử dụng môi trường SIM (Sulfide Indole Motility) thương mại.

B.5.2 Cách tiến hành

- Dùng que cấy chích sâu lấy khuẩn lạc cần kiểm tra, chích thẳng xuống gần đáy của ống nghiệm có môi trường thạch lỏng (xem mục B.5.1).
- Nuôi cấy ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4), đọc kết quả sau từ 24 h đến 48 h.

B.5.3 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính (có khả năng di động): môi trường đục, không nhìn rõ đường cấy chích sâu;
- Phản ứng âm tính: môi trường trong và nhìn thấy đường cấy chích sâu.

B.6 Phản ứng CAMP ngược

B.6.1 Chuẩn bị

- Thạch máu cừu.
- Chủng vi khuẩn: *Streptococcus agalactiae*, vi khuẩn *Clostridium perfringens* nghi ngờ.

B.6.2 Tiến hành phản ứng

- Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc nghi ngờ *Clostridium perfringens* cấy thành 1 đường thẳng ngang mặt đĩa thạch.
- Dùng que cấy (4.7) lấy khuẩn lạc *Streptococcus agalactiae* cấy vuông góc nhưng không tiếp xúc (cách khoảng 2 mm) với đường cấy khuẩn lạc nghi ngờ *Clostridium perfringens*.

- Nuôi cấy ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4), đọc kết quả sau 24 h.

B.6.3 Đọc kết quả

- Phản ứng dương tính: xuất hiện mùi tên hướng về phía đường cấy *Clostridium perfringen* nghi ngờ.
- Phản ứng âm tính: không xuất hiện mùi tên hướng về phía đường cấy *Clostridium perfringen* nghi ngờ.

Phụ lục C (Quy định)

Phương pháp PCR kiểm tra các yếu tố độc lực

C.1 Nguyên liệu PCR

C.1.1 Taq PCR Master Mix Kit

C.1.2 Cặp mồi (primers): mồi xuôi và mồi ngược (xem bảng 3)

C.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease

C.1.4 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE

C.1.5 Ethidi bromua hoặc chất nhuộm màu SYBR green

C.1.6 Loading dye

C.1.7 ADN (Acid Deoxyribo Nucleic) chuẩn (Ladder, marker)

C.2 Chuẩn bị mẫu

Mẫu kiểm tra là vi khuẩn *Clostridium perfringens* đã nuôi cấy thuần khiết trên thạch máu (3.2) ở tủ ấm (4.1) trong điều kiện yếm khí (4.3) có bổ sung CO₂ (3.4), từ 24 h đến 48 h.

Đối chứng dương: chủng vi khuẩn đã được giám định là *Clostridium perfringens* hoặc sử dụng các chủng *Clostridium perfringens* chuẩn.

C.3 Tách chiết ADN

Các vi khuẩn phân lập được từ mẫu bệnh phẩm và các mẫu đối chứng dương được tách chiết ADN bằng các kit thương mại hoặc bằng phương pháp sốc nhiệt. Nếu sử dụng kit thì các bước tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tách chiết bằng phương pháp sốc nhiệt: Lấy từ 3 khuẩn lạc đến 4 khuẩn lạc, hòa vào 100 µl nước vô trùng không chứa các enzym Rnase và se (nuclease free water). Đun sôi cách thủy trong 10 min rồi làm lạnh nhanh huyền dịch trong đá 5 min. Ly tâm huyền dịch bằng máy ly tâm (4.4) với gia tốc 12 000 g trong 4 min. Thu hoạch phần trong phía trên để thực hiện phản ứng PCR.

C.4 Tiến hành

Có thể sử dụng các kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nên sử dụng Multiplex PCR kit.

Sử dụng cặp mồi và chu trình nhiệt trong Bảng 3.

Đối chứng dương: tách chiết từ vi khuẩn *Clostridium perfringens* (xem mục C.3).

Đối chứng âm: gồm đầy đủ thành phần của một phản ứng PCR, nhưng không có ADN của vi khuẩn.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.5).

C.5 Chạy điện di

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose 1,5 % đến 2 % trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE.

Cho 2 µl dung dịch loading dye vào 8 µl sản phẩm PCR, trộn đều cho vào từng giếng trên bản thạch.

Cho 10 µl thang chuẩn (marker) vào một giếng.

Bản thạch được điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại dung dịch đệm sử dụng khi pha thạch), trong thời gian 30 min đến 40 min, ở 100 V.

Sau đó nhuộm bằng dung dịch ethidi bromua 0,2 mg / 100ml.

Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha chế thạch agarose (ví dụ như SYBR safe ADN gel stain của hãng Invitrogen) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

C.6 Đọc kết quả

Phản ứng dương tính khi:

- Mẫu đối chứng dương có một vạch duy nhất đúng kích cỡ của sản phẩm.
- Mẫu đối chứng âm: không xuất hiện vạch.
- Mẫu kiểm tra có vạch giống mẫu đối chứng dương.

Phản ứng âm tính khi:

- Mẫu đối chứng dương có một vạch duy nhất đúng kích cỡ của sản phẩm.
- Mẫu đối chứng âm: không xuất hiện vạch.
- Mẫu kiểm tra không có vạch giống mẫu đối chứng dương.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lãnh, Đỗ Ngọc Thúy, 2012. *Giáo trình bệnh truyền nhiễm Thú y*. Nhà xuất bản Đại học Nông nghiệp, trang 431 - 434.
 - [2] A. Heikinheimo, H. Korkeala, 2005. *Multiplex PCR assay for toxinotyping Clostridium perfringens isolates obtained from Finnish broiler chickens*. Article first published online: 13 APR 2005; Volume 40, Issue 6, pages 407–411.
 - [3] Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Shamsaddini MB (2010). *Clostridium perfringens isolate typing by multiplex PCR*. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases ISSN 1678-9199, volume 16, issue 4, p. 573-578.
 - [4] Arunava Das, Yahya Mazumder, Biman Kumar Dutta (2008). *Clostridium perfringens Type A from Broiler Chicken with Necrotic Enteritis*. International Journal of Poultry Science 7 (6), p. 601 – 609.
 - [5] Farzan A, Kircanski J, DeLay J, Soltes G, Songer JG, Friendship R, Prescott JF. 2013. An investigation into the association between cpb2-encoding Clostridium perfringens type A and diarrhea in neonatal piglets. Can J Vet Res. 77(1):45-53.
 - [6] JICA. Third edition, 2003. *Standard Diagnostic Manual for livestock diseases in Thailand*. p.118 – 119; 181 – 182.
 - [7] J.Quinn, M.E.Carter, B.Markey, G.R.Carter, 2004. Chapter 17: Clostridium species. *Veterinary Clinical Microbiology*. 6th Edition. Printed in Spain, p.191 – 208.
 - [8] Kenneth Opengart, 2008. Chapter 22: Necrotic Enteritis. Clostridial Diseases. *Diseases of Poultry*. 12th Edition. Blackwell Publishing, p.872 – 879.
 - [9] Richard L.Wood, Louis M.Henderson, 2006. Chapter 36: Clostridial infection. *Diseases of Swine*. 9th Edition. Blackwell Publishing, p. 613 – 619.
 - [10] Songer JG, Glock RD. 1998. Enteric infection of swine with Clostridium perfringens types A and C. Diagnostic Notes. *Swine Health and Production* 6 (5). p. 223-225.
 - [11] Van Asten AJAM, van der Wiel CW, Nikolaou G, Houwers DJ, Grone A (2009). *A multiplex PCR for toxin typing of Clostridium perfringens*. Vet Microbiol.136 (1), p.411 – 412.
-