

**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 xám hoặc nâu xám, bị hoại tử, có chất keo, nhầy hoặc như thịt đông, cắt vào sâu thấy sùi bọt và có tiếng lạo xạo, mùi bở 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. Mổ 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 GGATCAGAACTCTAAACCTTCT	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.

**Phụ lục A**  
(Quy định)

**Phương pháp nhuộm gram**

**A.1 Thuốc nhuộm**

**A.1.1 Dung dịch tím tinh thể**

Tím tinh thể	2,0 g
Etanol 95 %	20,0 ml
Amoni oxalat	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 fushcin gốc**

Basic fuchsin	1 g
Etanol 95 %	10 ml
Phenol	5 g
Nước	100 ml

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

**A.1.3 Dung dịch lugol**

Kali iodua	2 g
Iodua tinh thể	1 g
Nước	200 ml

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

**A.1.4 Dung dịch tẩy màu**

Axeton	1 phần
--------	--------



Etanol 95 %

3 phần

**A.2 Cách tiến hành**

- Nhỏ dung dịch tím tinh thể lên tiêu bản, để từ 1 min đến 2 min.
- Rửa nước nhanh, để khô.
- Nhỏ dung dịch lugol, để 1 min.
- Rửa nước nhanh, để khô.
- Nhỏ etanol 95 %.
- Rửa nước thật nhanh, để khô
- Nhỏ dung dịch fuchsin loãng, để 1 min.
- Rửa nước.
- 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 quang học (xem 4.6).

**Phụ lục B**  
(Quy định)

**Phương pháp kiểm tra các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *Clostridium chauvoei***

**B.1 Kiểm tra đặc tính sinh lecithinase và lipase**

**B.1.1 Môi trường thạch lòng đỏ trứng**

Sử dụng môi trường thạch lòng đỏ trứng, có thành phần như sau:

Thạch thường (xem 3.2)	40 g
Nước	900 ml
Huyền dịch lòng đỏ trứng	100 ml

Chuẩn bị huyền dịch lòng đỏ trứng: Trộn 1 lòng đỏ trứng với 20 ml nước muối sinh lý 0,9 % vô trùng.

Pha thạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.4) ở 121 °C 15 min. Để thạch nguội khoảng từ 45 °C đến 50 °C thì bổ sung thêm huyền dịch lòng đỏ trứng.

Có thể sử dụng các môi trường thương mại.

**B.1.2 Cách tiến hành**

Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường thạch lòng đỏ trứng, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí, đọc kết quả sau 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 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 sữa**

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 và chia ra các ống nghiệm (xem 4.7) (10 ml /1 ống). Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.4) ở  $121^\circ\text{C}$  trong 5 min.

**B.2.2 Cách tiến hành**

- Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường sữa.
- Nuôi cấy trong tủ ấm (xem 4.1) trong điều kiện yếm khí, đọc kết quả hàng ngày trong 5 ngày.

**B.2.3 Đọc kết quả**

- Dương tính: sữa đông vón có vẩn như mây (stormy clot)
- 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) hoặc môi trường skim milk .

**B.3 Phản ứng thủy phân gelatin****B.3.1 Môi trường gelatin**

Sử dụng môi trường gelatin có thành phần như sau:

Môi trường nước thịt BHI (xem 3.4)	100 ml
Sodium thioglycolate	0,05 g
Gelatin	12 g

Pha 100 ml môi trường nước thịt BHI (xem 3.4) (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Cho thêm gelatin, sodium thioglycolate vào môi trường và đun nóng cho tan. Chỉnh pH 7,0 và chia ra các ống (4 ml mỗi ống). Hấp tiệt trùng môi trường trong nồi hấp (xem 4.4) ở  $115^\circ\text{C}$  trong 15 min.

### B.3.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường gelatin, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí trong thời gian 14 ngày. Cứ từ 2 ngày đến 3 ngày thì để ống vào tủ lạnh 2 h để kiểm tra sự hóa lỏng của môi trường.

### B.3.3 Đọc kết quả

- Dương tính: Môi trường bị hóa lỏng;
- Âm tính: Môi trường không bị hóa lỏng.

## B.4 Phản ứng sinh hóa đường

### B.4.1 Môi trường

Sử dụng môi trường pepton – đường gồm các thành phần:

- Môi trường pepton (xem 3.5).
- Dung dịch bromocrezol 0,2 %: Cho 0,2 g bromocrezol vào 100 ml etanol 90 % và lắc cho tan hết.
- Dung dịch đường

Pha đường thành dung dịch 10 %, hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.4) ở 110 °C trong từ 15 min đến 20 min hoặc hấp cách quãng 3 lần ở 100 °C trong 30 min hoặc lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Chuẩn bị môi trường:

Cho 0,1 ml dung dịch bromocrezol 0,2% vào 100 ml môi trường pepton (xem 3.5), chia ra các ống (4 ml mỗi ống). Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.4) ở 121 °C trong 30 min. Chính pH môi trường ở  $6,8 \pm 0,2$ . Thêm 0,4 ml dung dịch đường 10 %.

### B.4.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường pepton – đường (xem B4.1), nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí, đọc kết quả sau 48 h.

### B.4.3 Đọc kết quả

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

## B.5 Khả năng sinh indol

### B.5.1 Thuốc thử Kovac's

Paradimetyl aminobenzaldehyt	5 g
Cồn amylic	75 ml
Axit clohydric	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 axit clohydric, trộn đều rồi để tủ lạnh, sau đó lại tiếp tục bổ sung axit clohydric.

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

### B.5.2 Cách tiến hành

Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường pepton (xem 3.5) hoặc môi trường peptone (xem 3.5) có bổ sung tryptophan, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí. Sau 24 h, nhỏ từ 0,2 ml đến 0,3 ml dung dịch thuốc thử Kovac's vào môi trường, lắc nhẹ. Phản ứng dương tính khi có vòng màu đỏ xuất hiện tại nơi tiếp giáp giữa thuốc thử và môi trường (sinh indol). Phản ứng âm tính khi không có vòng màu đỏ xuất hiện tại nơi tiếp giáp giữa thuốc thử và môi trường.

### B.3 Phân giải urê

Có thể sử dụng môi trường urê cơ bản (xem 3.8) (chuẩn bị môi trường và bổ sung urê theo chỉ dẫn của nhà sản xuất).

Dùng que cấy (xem 4.2) lấy khuẩn lạc từ thạch máu trong mục 5.2.3 cấy vào môi trường có urê, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí, đọc kết quả sau 48 h.

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

**Phụ lục C**

(Quy định)

**Phát hiện vi khuẩn *Clostridium chauvoei* bằng phương pháp PCR****C.1 Nguyên liệu PCR**

C.1.1 Taq PCR Master Mix Kit.

C.1.2 Cặp mồi (primers): mồi xuôi và mồi ngược (Bảng 2).

C.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease.

C.1.4 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE.

C.1.5 Chất nhuộm màu Ethidi bromua hoặc SYBR green..

C.1.6 Loading dye.

C.1.7 DNA chuẩn (Ladder, marker).

**C.2 Chuẩn bị mẫu**

Mẫu kiểm tra là vi khuẩn nghi là *Clostridium chauvoei* được cấy trên thạch máu (xem 3.1) và nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) ở điều kiện yếm khí trong 48 h.

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

**C.3 Tách chiết DNA**

Các vi khuẩn phân lập được từ mẫu bệnh phẩm, các mẫu đối chứng dương được tách chiết DNA bằng các kit thương mại và tiến hành các bước theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

**C.4 Phản ứng PCR**

Sử dụng cặp mồi (primer) và chu trình nhiệt trong Bảng 2 và chuẩn bị mồi ở nồng độ 20  $\mu\text{M}$ . Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml. Thành phần cho 1 phản ứng (theo hướng dẫn của Kit Taq PCR master mix Kit-Qiagen) như sau:

- Taq PCR Master Mix Kit	12,5 µl
- Mồi xuôi 20 µM	1 µl
- Mồi ngược 20 µM	1 µl
- Nước không có nuclease	8,5 µl
- Mẫu DNA	2 µl
<b>Tổng thể tích</b>	<b>25 µl</b>

Đối chứng dương: DNA tách chiết từ vi khuẩn *Clostridium chauvoei* (xem C.2).

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

### C.5 Chạy điện di

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose từ 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 đệm sử dụng khi pha thạch), trong thời gian từ 30 min đến 40 min, ở 100 V, sau đó nhuộm bản thạch (sản phẩm PCR) bằng dung dịch ethidium bromide 0,2 mg/100 ml.

Có thể dùng chất nhuộm màu khác như SYBR green để nhuộm bản thạch (sản phẩm PCR) và sử dụng theo qui định của nhà sản xuất (ví dụ: SYBR safe DNA gel stain của Invitrogen).

### 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 xuất hiện vạch.



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] G.I. Barrow, R.K.A. Feltham, 1993. *Cowan and Steel's Manual for the identification of media bacteria. Third edition.*
- [2] Sydney M. Finegold, Ellen Jo Baron, 1986. *Bailey diagnostic and scott's microbiology. Seventh edition.*
- [3] E Bagge, S Sternberg Lewerin and K-E Johansson, 2009. *Detection and identification by PCR of Clostridium chauvoei in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. Acta Veterinaria Scandinavica, 51:8*
- [4] JICA. *Standard Diagnostic Manual for livestock diseases in Thailand. Third edition, 2003. 110-111.*
- [5] Yoshimasa Sasaki, Kinya Yamamoto, Akemi Kojima, Yukie Tetsuka, Mari Norimatsu, Yutaka Tamura, 2000. *Rapid and Direct Detection of Clostridium chauvoei by PCR of the 16S-23S rDNA Spacer Region and Partial 23S rDNA Sequences, J. Vet. Med. Sci. 62 (12):1275-1281.*
- [6] S. Miyashiro, A.F.C. Nassar, M.C.A.M. Souza, J.B. Carvalho, J.E.B. Adegas, 2007. *Identification of clostridium chauvoei in clinical samples cultures from blackleg cases by means of pcr. Brazilian Journal of Microbiology 38:491-493.*
- [7] P.J.Quin, M.E.Cater, B. Markey, G.R.Cater, 1994. *Clinical veterinary microbiology.*
- <sup>191</sup> Nguyễn Vĩnh Phước, 1978. *Giáo trình bệnh truyền nhiễm gia súc.*
-