



TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-56:2023

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 56: BỆNH TỤ HUYẾT TRÙNG Ở LỢN,
TRÂU, BÒ, GIA CẦM**

*Animal disease – Diagnostic procedure –
Part 56: Pasteurellosis in swine, cattle, poultry*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 8400-56:2023 thay thế TCVN 8400-14:2011 và TCVN 8400-31:2015.

TCVN 8400-56:2023 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.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8400 *Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán* gồm các phần sau đây:

- 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 Niu 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 lý và thương hàn ở gà*;
- TCVN 8400-13:2019, *Phần 13: Bệnh sảy thai truyền nhiễm do Brucella*;
- 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 dại ở lợn*;
- TCVN 8400-23:2014, *Phần 23: Bệnh ung khí thán*;
- 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 8400-56:2023

- 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 8400-32:2015, *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 vi rút 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 vi rút;*
- TCVN 8400-39:2016, *Phần 39: Bệnh viêm đường hô hấp mãn tính ở gà;*
- TCVN 8400-40:2016, *Phần 40: Bệnh nhiễm trùng huyết ở thủy cầm do vi khuẩn Riemerella 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 nhỏ;*
- 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 dại;*
- 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 ở gà;*
- 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.*

Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán –

Phần 56: Bệnh tụ huyết trùng ở lợn, trâu, bò, gia cầm

Animal disease – Diagnostic procedure –

Part 56: Pasteurellosis in swine, cattle, poultry

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 tụ huyết trùng do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra ở lợn, trâu, bò, gia cầm.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng để chẩn đoán bệnh do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra ở động vật có vú, động vật nhai lại hoang dã, dê, cừu, nai, linh dương,...

2 Tài liệu viện dẫn

Tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với 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 8128:2015 *Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước – Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử nghiệm của môi trường nuôi cấy.*

TCVN 8402:2010 *Bệnh động vật – Quy trình mổ khám.*

3 Thuật ngữ, định nghĩa và các từ viết tắt

3.1 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1.1

Bệnh tụ huyết trùng (*Pasteurellosis*)

Bệnh truyền nhiễm, thường xảy ra ở thể cấp tính, phổ biến ở lợn, trâu, bò, gia cầm do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra. Ngoài ra động vật có vú, động vật nhai lại, động vật hoang dã cũng có thể mắc bệnh.

Theo phân loại bệnh của Tổ chức Thú y Thế giới, bệnh tụ huyết trùng ở trâu, bò (Haemorrhagic Septicaemia) do *Pasteurella multocida* typ B và bệnh tụ huyết trùng ở gia cầm (Fowl Cholera – bệnh dịch tả gia cầm) do *Pasteurella multocida* typ A gây ra được xếp vào danh mục các bệnh truyền nhiễm bảng B.

3.1.2

Vi khuẩn *Pasteurella multocida* (*P. multocida*)

Vi khuẩn Gram âm, đa hình thái, thường đứng đơn lẻ hoặc đôi, không di động, không nha bào, hiếu khí, yếm khí tùy tiện, chiều rộng có kích thước từ 0,2 µm đến 0,4 µm và chiều dài có kích thước từ 0,6 µm đến 2,5 µm.

Dựa vào sự khác nhau của giáp mô, chia *P. multocida* thành 5 typ huyết thanh gồm: A, B, D, E, F. Tùy vào typ huyết thanh của vi khuẩn sẽ gây bệnh khác nhau trên các loài động vật khác nhau.

- *P. multocida* typ A gây bệnh cho trâu, bò, cừu, lợn, thỏ, gia cầm, một số động vật nuôi và động vật hoang dã.
- *P. multocida* typ B gây bệnh cho trâu, bò, lợn, gia cầm và một số loài nhai lại khác.
- *P. multocida* typ D gây bệnh cho lợn (viêm phổi, viêm teo mũi), gia cầm và một số loại vật nuôi.
- *P. multocida* typ E gây bệnh cho trâu, bò (chỉ ở châu Phi).
- *P. multocida* typ F gây bệnh cho gà, gà tây.

3.2 Các từ viết tắt

- ADN	Acid Deoxyribonucleic	Axit Deoxyribonucleic
- BHI	Brain Heart Infusion	Dịch tim não
- CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc

- EDTA	Ethylene Diamin Tetraacetic Acid	Axit Ethylene Diamin Tetraacetic
- LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification	Phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp
- PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
- TAE	Tris – Acetate – Ethylenediaminetetraacetic acid	Axit Tris – Acetate – Ethylenediaminetetraacetic
- TBE	Tris – Borate – Ethylenediaminetetraacetic acid	Axit Tris – Borate – Ethylenediaminetetraacetic
- TE	Tris – Ethylenediaminetetraacetic acid	Axit Tris – Ethylenediaminetetraacetic

4 Thuốc thử, vật liệu thử và môi trường nuôi cấy

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

- 4.1 Bộ thuốc nhuộm Gram (Xem Phụ lục A.1)
- 4.2 Bộ thuốc nhuộm Giemsa (Xem Phụ lục A.2)
- 4.3 Môi trường BHI (Xem Phụ lục B.1)
- 4.4 Môi trường thạch máu (Xem Phụ lục B.2)
- 4.5 Máu, là máu cừu hoặc máu bê hoặc máu thỏ, vô trùng.
- 4.6 Môi trường thạch MacConkey (Xem Phụ lục B.3)
- 4.7 Các môi trường xác định các đặc tính sinh hóa (Xem Phụ lục C)
- 4.8 Nguyên liệu cho PCR (Xem Phụ lục D, Phụ lục G)
- 4.9 Nguyên liệu cho Realtime PCR (Xem Phụ lục E)
- 4.10 Nguyên liệu cho LAMP (Xem Phụ lục F)
- 4.11 Nước muối sinh lý, là dung dịch NaCl 0,9 %, vô trùng.
- 4.12 Chất chống đông, là EDTA hoặc heparin hoặc citrat natri 3,8 %.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm sinh học và các thiết bị, dụng cụ sau:

- 5.1 Tủ ẩm, duy trì nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 5.2 Kính hiển vi, có vật kính với độ phóng đại 10 X, 40 X, 100 X
- 5.3 Nồi hấp, duy trì ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4 Máy ly tâm, ly tâm với gia tốc 1 500 g, 6 000 g, 12 000 g.
- 5.5 Máy Realtime PCR
- 5.6 Máy PCR
- 5.7 Bộ điện di, gồm bộ nguồn điện di, bể điện di, khay điện di.
- 5.8 Máy đọc gel
- 5.9 Pank, kéo, vô trùng.
- 5.10 Bể điều nhiệt, duy trì nhiệt độ từ $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.11 Bơm tiêm, có dung tích 5 ml, 10 ml, vô trùng.
- 5.12 Kim tiêm, loại 18 G hoặc 20 G hoặc 23 G, vô trùng.
- 5.13 Ống nghiệm, có thể tích từ 10 ml đến 15 ml, sạch và vô trùng.
- 5.14 Đĩa petri (hộp lồng), có đường kính từ 90 mm đến 100 mm, sạch và vô trùng.
- 5.15 Que cấy, vô trùng.
- 5.16 Bông cotton, bông cot-ton đã được tẩy cồn 70 %
- 5.17 Tăm bông, vô trùng.
- 5.18 Phiến kính, sạch.
- 5.19 Cưa, kim, vô trùng.
- 5.20 Cối chày sứ nghiền mẫu, vô trùng.
- 5.21 Ống ly tâm (hay ống eppendorf), vô trùng, có thể tích 0,2 ml, 1,5 ml.

5.22 Tủ lạnh, duy trì nhiệt độ từ 4 oC đến 8 oC

5.23 Máy lắc (Máy vortex), có tốc độ lắc từ 50 rpm đến 2 400 rpm

5.24 Micropipet và đầu tip các loại, có dung tích 100 µl, 200 µl, 1000 µl

6 Chẩn đoán lâm sàng

6.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh tụ huyết trùng là bệnh truyền nhiễm ở nhiều loài động vật, phổ biến ở lợn, trâu, bò, gia cầm. Bệnh xảy ra thường ở thể cấp tính. Ở lợn, trâu, bò mắc bệnh do *P. multocida* typ A với đặc trưng là sốt và viêm phổi; Lợn, trâu, bò mắc bệnh do *P. multocida* typ B với đặc trưng là xuất huyết, nhiễm trùng huyết; Gia cầm mắc bệnh do *P. multocida* typ A với đặc trưng là tiêu chảy, phân lỏng;

- Động vật mọi lứa tuổi đều có thể mắc bệnh tụ huyết trùng. Trâu, bò thường mắc lúc 2 tuổi đến 3 tuổi; Lợn thường mắc lúc 16 tuần tuổi đến 18 tuần tuổi; Gia cầm thường mắc lúc 3 tuần tuổi đến 4 tuần tuổi;

- Bệnh tụ huyết trùng xảy ra quanh năm, nhưng hay gặp nhất là lúc thời tiết giao mùa, ở miền Bắc là lúc thời tiết chuyển từ mùa xuân sang mùa hè và mùa thu sang mùa đông; ở miền Nam là từ mùa mưa sang mùa khô và ngược lại;

- Bệnh lây trực tiếp từ con ốm sang con khỏe qua tiếp xúc, qua đường hô hấp hoặc gián tiếp qua thức ăn nước uống, dụng cụ chăn nuôi, vận chuyển, động vật trung gian như chó, mèo, chuột, côn trùng, ruồi, muỗi, mòng

6.2 Triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể

6.2.1 Ở lợn

6.2.1.1 Triệu chứng lâm sàng

Thường gặp ở 3 thể sau:

- Thể cấp tính:

Lợn sốt cao (có thể lên tới 42 °C), khó thở, thở thở bụng.

Da ở vùng bụng, nách, bẹn có màu đỏ tím.

Tỷ lệ chết có thể lên tới 40%.

- Thể bán cấp tính (Thể á cấp tính):

TCVN 8400-56:2023

Thể bán cấp tính thường xảy ra ở lợn choai hoặc lợn ở giai đoạn xuất chuồng, từ 16 tuần đến 18 tuần tuổi.

Lợn ho, thở thể bụng.

- Thể mạn tính:

Thường xảy ra ở lợn từ 10 tuần đến 16 tuần tuổi.

Triệu chứng đặc trưng là lợn ho dai dẳng, thở mạnh, sốt nhẹ hoặc sốt không điển hình.

6.2.1.2 Bệnh tích đại thể

- Thể cấp tính: Bệnh tích chưa biểu hiện rõ ràng.

- Thể bán cấp tính:

Xoang ngực, xoang bao tim và xoang phúc mạc tích nhiều nước.

Phổi viêm, màu đỏ sẫm do tụ huyết và xuất huyết. Phổi có nhiều điểm bị gan hóa, có nhiều tổ chức xơ hóa, có thể có ổ hoại tử bã đậu. Màng phổi viêm, có thể dính vào lồng ngực.

Hạch ở hầu, họng sưng, xuất huyết.

- Thể mạn tính:

Xác lợn thường gầy.

Phổi có nhiều điểm bị gan hóa, có nhiều tổ chức xơ hóa, có thể có ổ hoại tử bã đậu.

Có hiện tượng viêm khớp có mủ.

6.2.2 Ở trâu, bò

6.2.2.1 Triệu chứng lâm sàng

Thường gặp ở 3 thể:

- Thể quá cấp tính:

Thể này ít gặp. Trâu, bò phát bệnh nhanh, sốt cao từ 41 °C đến 42 °C, chết nhanh trong vòng 24 h.

Trâu, bò có triệu chứng thần kinh như điên cuồng, hung dữ, lông lên, run rẩy ngã xuống, giãy rụa, ...

- Thể cấp tính:

Thể này xảy ra phổ biến. Thời gian nung bệnh từ 1 ngày đến 3 ngày, trâu, bò sốt cao từ 40 °C đến 42 °C.

Trâu, bò chảy nước mắt, nước mũi liên tục. Các niêm mạc mắt, mũi, miệng đỏ ửng rồi sẫm màu.

Các hạch lympho sưng: đặc biệt là hạch dưới hầu làm cho trâu, bò thè lưỡi ra ngoài, thở khó khăn; hạch trước đùi sưng làm cho trâu, bò đi lại khó khăn.

Trâu, bò nằm liệt, đái ra máu, thở khó khăn, trên niêm mạc có nhiều vết sẫm màu và chết sau 3 ngày đến 5 ngày.

Tỷ lệ chết có thể lên tới 100 %.

- Thể mạn tính:

Rất ít gặp. Đây là thể tiến triển sau của thể cấp tính nếu trâu, bò không chết. Trâu, bò đi lại khó khăn, viêm khớp mạn tính; viêm phế quản và viêm phổi mạn tính; viêm ruột mạn tính biểu hiện là lúc táo bón, lúc tiêu chảy.

6.2.2.2 Bệnh tích đại thể

- Niêm mạc ở mắt, mũi, mồm và tổ chức liên kết dưới da bị tụ huyết, xuất huyết.
- Các hạch lâm ba, đặc biệt là hạch sau hầu, họng sưng to, xuất huyết.
- Xoang ngực, xoang bụng tích nhiều dịch, có lẫn máu.
- Lòng ống khí quản, phế quản có dịch nhầy nhớt, nhiều bọt và xuất huyết.
- Tim sưng to, xoang bao tim tích dịch màu vàng, mỡ vành tim xuất huyết, cơ tim xuất huyết.
- Phổi viêm, tổ chức phổi dai, không xốp, có nhiều phần bị gan hóa. Màng phổi viêm tơ huyết, dày lên, có thể dính vào thành lồng ngực.

6.2.3 Ở gia cầm

6.2.3.1 Triệu chứng lâm sàng

Thường thấy ở 3 thể:

- Thể quá cấp tính:

Gia cầm chết nhanh khi chưa biểu hiện triệu chứng.

- Thể cấp tính:

TCVN 8400-56:2023

Gia cầm chết khi mới xuất hiện triệu chứng trong vài giờ đến 2 ngày.

Gia cầm ủ rũ, xù lông, bỏ ăn, thở khó, thở mạnh, có dịch nhớt chảy ra từ miệng và mũi.

Gia cầm tiêu chảy, phân lỏng, nhiều nước, phân lúc đầu trắng sau chuyển thành màu xanh, có thể có dịch nhầy, lẫn máu.

Toàn thân gia cầm màu xanh tím, nhất là vùng đầu không lông như mào, tích.

- Thể mạn tính:

Đây là thể tiến triển từ thể cấp tính nhưng gia cầm không chết.

Mắt và mũi của gia cầm có chất dịch dính, kết mạc mắt viêm, có dử mắt.

Gia cầm ngoẹo cổ, khó thở, có tiếng khò khè ở khí quản.

Ở vùng đầu, chân, cánh, vùng xương ức của gia cầm có những ổ viêm cục bộ.

6.2.3.2 Bệnh tích đại thể

- Thể quá cấp tính: Chưa biểu hiện bệnh tích.

- Thể cấp tính:

Phổi xuất huyết.

Xoang bao tim có dịch màu vàng. Lớp mỡ vành tim, cơ tim có xuất huyết vết hoặc lấm tẩm bằng đầu đinh ghim.

Dạ dày tuyến xuất huyết lấm tẩm.

Gan sưng, trên bề mặt có điểm hoại tử lấm tẩm.

Buồng trứng xuất huyết.

Ruột xuất huyết từng mảng lớn hay lấm tẩm. Chất chứa trong ruột lẫn máu.

- Thể mạn tính:

Phân mặt sưng, kết mạc mắt viêm.

Có các ổ mủ rải rác trong toàn cơ thể.

Phổi sưng, có viêm.

Gan sưng.

Khớp chân, đệm chân, xoang bụng, vòi trứng có dịch bã đậu.

6.3 Chẩn đoán phân biệt

6.3.1 Chẩn đoán phân biệt bệnh tụ huyết trùng với một số bệnh khác ở lợn

- Bệnh dịch tả lợn cổ điển: Do vi rút thuộc họ *Flaviviridae*, giống *Pestivirus* gây ra. Ban đầu lợn sốt cao (41 °C - 42 °C), phân táo; sau khi giảm sốt lợn tiêu chảy, phân thối khắm đặc trưng. Niêm mạc dạ dày, ruột có nhiều mảng xuất huyết, loét, đặc trưng là nốt loét ở van hồi manh tràng. Hạch lâm ba sưng, xuất huyết (như vân đá hoa, nặng hơn thì thâm tím). Lách không sưng, phần rìa có nhồi huyết răng cưa. Thận xuất huyết điểm lan tràn hoặc thành đám trên bề mặt.

- Bệnh dịch tả lợn Châu Phi: Do vi rút thuộc họ *Asfaveridae*, giống *Asfavirus* gây ra. Bệnh tích đặc trưng của bệnh là các hạch lâm ba sưng, xuất huyết; Niêm mạc dạ dày, ruột xuất huyết; Lách sưng, xuất huyết nặng; Thận xuất huyết đỉnh ghim.

- Bệnh đóng dấu lợn: Do vi khuẩn *Erysipelothrix rhusiopathiae* gây ra. Trên da có những vết (dấu) đỏ hình vuông, hình tròn,... các vết này lúc đầu đỏ tươi, sau đỏ thẫm, tím bầm, khô lại thành vảy. Van tim viêm, nhất là van 2 lá viêm ở thể loét, sùi. Khớp gối và khớp bàn chân viêm.

- Bệnh phó thương hàn lợn: Do vi khuẩn *Salmonella choleraesuis* chủng Kunzendorf và *Salmonella typhimurium* gây nên. Lợn tiêu chảy. Ở phần tai, mồm, bụng và 4 chân của lợn có xuất huyết, sau dần chuyển sang màu xanh, vàng. Ở gan có hoại tử điểm, ruột già có nhiều vết loét.

- Bệnh viêm teo mũi ở lợn: Do vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* hoặc vi khuẩn *P. multocida* typ D hoặc cả hai vi khuẩn này kết hợp gây ra. Biểu hiện đặc trưng của bệnh là viêm mũi, xoang mũi gây teo xương mũi hoặc làm cong bả mía mũi làm cho mặt bị méo mó. Lợn từ 1 tuần đến 3 tuần tuổi là mắc nhất.

- Bệnh viêm phổi màng phổi: Do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* gây ra. Lợn sốt cao (40,5 °C - 41 °C), có ho, phải há mồm ra để thở, có tư thế ngồi để thở. Màng phổi viêm có nhiều sợi tơ huyết (fibrin), có thể viêm dính vào phần sườn. Phổi viêm thành từng mảng, có tính chất đối xứng.

- Bệnh viêm phổi địa phương (bệnh suyễn lợn): Do vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra. Lợn thường gầy, ho, khó thở, không sốt cao (dưới 40 °C). Phổi viêm đối xứng, viêm từ thùy tim sang thùy đỉnh ở phía trước và thùy hoành ở phía sau. Phổi bị viêm lúc đầu có màu đỏ, sau chuyển sang thâm, bề mặt bóng, bên trong có chất keo, tiếp sau phổi chắc lại như miếng thịt (phổi bị nhục hóa).

- Bệnh Glasser's (bệnh viêm đa xoang) ở lợn: Do vi khuẩn *Haemophilus parasuis* gây ra. Đặc trưng của bệnh là viêm thanh mạc, viêm màng phổi, viêm màng não, viêm khớp.

6.3.2 Chẩn đoán phân biệt bệnh tụ huyết trùng với một số bệnh khác ở trâu, bò

- Bệnh nhiệt thán: Do vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây ra. Trâu, bò sốt cao (có thể lên tới 42 °C), có triệu chứng thần kinh và chết nhanh. Khi chết, xác chết phình to, các lỗ tự nhiên chảy máu thâm đen, không đông. Lách sưng to, dễ nát.

- Bệnh ung khí thán: Do vi khuẩn *Clostridium chauvoei* gây ra. Trâu, bò sốt (thường dưới 40 °C). Trên các bắp thịt ở cổ, vai, bắp chân, đùi, móng có các khối sưng (ung) nếu ấn tay thấy lõm và có các tiếng lạo xạo. Cắt ở chỗ có ung, thấy có chất keo lầy nhầy, có thấy sùi bọt, có tiếng lạo xạo, phần cơ có màu thâm đen.

6.3.3 Chẩn đoán phân biệt bệnh tụ huyết trùng với một số bệnh khác ở gia cầm

- Bệnh Newcastle: Do giống *Avulavirus*, thuộc họ *Paramyxoviridae* gây ra. Gia cầm bỏ ăn, lông xù, có thể bị liệt chân, liệt cánh (cánh xã như khoác áo tơ), mũi chảy dịch nhớt màu đỏ xám, vươn cổ há mỏ để thở, mào và tích sưng phù, có màu tím sẫm. Khí quản chứa nhiều dịch viêm, niêm mạc viêm cata. Phổi sưng to, xuất huyết. Dạ dày cơ, dạ dày tuyến, lớp mỡ vành tim xuất huyết.

- Bệnh cúm gia cầm độc lực cao: Do vi rút *Influenza typ A*, thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra. Mào và tích gia cầm sưng, thâm tím. Phân thường loãng, có màu trắng, xanh, vàng. Niêm mạc khí quản có dịch nhầy lẫn máu. Phổi xung huyết, tụ huyết nặng. Tim, gan, lách, thận xuất huyết, dạ dày, niêm mạc đường tiêu hóa xuất huyết.

- Bệnh phù đầu gà (Coryza): Do vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* gây ra. Đây là bệnh truyền nhiễm đường hô hấp cấp tính ở gà với các đặc trưng là chảy nước mũi, kết mạc mắt bị viêm cata, túi khí viêm, mặt và tích sưng phù dưới da.

- Bệnh nhiễm trùng huyết ở thủy cầm: Do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* gây ra. Triệu chứng đầu tiên là thủy cầm bị tiêu chảy, chảy nước mắt, nước mũi, hít thở khó khăn, có ho nhẹ, đi lại khó khăn, kéo lê chân hoặc không đi lại được. Thủy cầm mất cân bằng, sưng phù đầu, nghẹo cổ, đầu và cổ bị run, dễ bị kích thích bởi tiếng động, hai chân duỗi ra như bơi. Bệnh tích đặc trưng là viêm tơ huyết thành màng ở các cơ quan nội tạng.

7 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

7.1 Lấy mẫu và bảo quản mẫu

7.1.1 Lấy mẫu

Đối với động vật nghi mắc bệnh còn sống lấy mẫu là dịch tiết đường hô hấp trên hoặc mẫu máu có chất chống đông.

- Lấy mẫu dịch tiết đường hô hấp trên: Dùng tăm bông (5.17) lấy dịch mũi hoặc dịch hầu họng, cho tăm bông vào ống nghiệm (5.13) có chứa dung dịch nước muối sinh lý (4.11), đậy kín, ghi ký hiệu mẫu;

- Mẫu máu có chất chống đông: Sát trùng vị trí lấy máu bằng cồn 70 %, dùng bơm tiêm (5.11) và kim tiêm (5.12) lấy khoảng 1 ml đến 3 ml máu từ tĩnh mạch. Chuyển máu sang ống nghiệm đã có chất chống đông (4.13), trộn đều nhẹ nhàng trong 10 giây, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu;

Đối với động vật đã chết hoặc động vật nghi mắc bệnh cần mổ khám để kiểm tra bệnh tích, lấy mẫu bệnh phẩm được thực hiện theo TCVN 8402:2010 và hướng dẫn kỹ thuật về lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm động vật trên cạn. Bệnh phẩm bao gồm: Phổi, gan, lách, máu tim, dịch xoang bao tim, tủy xương.

- Lấy mẫu phổi, gan, lách: Dùng pank, kéo (5.9) cắt từ 10 g đến 100 g mỗi loại bệnh phẩm, để vào từng lọ hay túi ni lon vô trùng riêng biệt, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu;

- Lấy mẫu máu tim, dịch xoang bao tim: Dùng bơm tiêm (5.11) và kim tiêm (5.12) hoặc pipet (5.24) để hút lấy máu tim, dịch xoang bao tim. Để mẫu trong bơm tiêm hoặc chuyển sang lọ vô trùng riêng biệt, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu;

- Tủy xương: Xương ống đã được bóc bỏ phần thịt, để vào từng túi ni lon vô trùng riêng biệt, đậy kín, ghi ký hiệu mẫu.

7.1.2 Bảo quản mẫu

Mẫu bệnh phẩm (xem 7.1.1) được đựng trong dụng cụ vô trùng, bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C trong thùng bảo ôn, vận chuyển đến phòng thí nghiệm tốt nhất trước 24 h kể từ khi lấy mẫu.

CHÚ THÍCH: Tất cả các mẫu phải được dán nhãn, ghi mã kí hiệu, gửi kèm theo phiếu gửi mẫu bệnh phẩm và các thông tin dịch tễ, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích của ca bệnh.

7.2 Chuẩn bị mẫu, nuôi cấy và phân lập *P. multocida*

7.2.1 Chuẩn bị mẫu và nuôi cấy *P. multocida*

- Mẫu là dịch tiết đường hô hấp trên: Ống nghiệm đã có tăm bông lấy mẫu (xem 7.1.1) được lắc kỹ bằng máy lắc (5.23). Dùng pipet (5.24) hoặc dùng que cấy (5.15) lấy từ 5 µl đến 10 µl dung dịch mẫu nhỏ lên bề mặt môi trường thạch máu (4.4), môi trường thạch MacConkey (4.6), môi trường BHI (4.3). Dùng que cấy (5.15) ria cấy chỗ đã nhỏ bệnh phẩm lên các môi trường thạch;

- Mẫu là máu có chất chống đông, dịch xoang bao tim: Dùng pipet (5.24) hoặc dùng que cấy (5.15) lấy máu hoặc dịch xoang bao tim phết lên bề mặt môi trường thạch máu (4.4), môi trường thạch MacConkey (4.6) và cho vào môi trường BHI (4.3). Dùng que cấy (5.15) ria cấy chỗ đã phết bệnh phẩm lên các môi trường thạch;

TCVN 8400-56:2023

- Mẫu là phổi, gan, lách: Sát trùng bề mặt ngoài của mẫu bằng bông cồn (5.16), rồi dùng pank, kéo (5.9) cắt sâu vào tổ chức bên trong lấy một mẫu nhỏ. Dùng pank (5.9) kẹp lấy mẫu bệnh phẩm vừa cắt phết lên bề mặt môi trường thạch máu (4.4), môi trường thạch MacConkey (4.6) và cho mẫu phổi, gan, lách vào môi trường BHI (4.3). Dùng que cấy (5.15) ria cấy chỗ đã phết bệnh phẩm lên các môi trường thạch;

- Mẫu là tủy xương: Dùng cưa, kim (5.19) cắt phần đầu của xương ống để bộc lộ phần tủy đỏ. Dùng pank, kéo (5.9) để lấy phần tủy đỏ để phết lên bề mặt môi trường thạch máu (4.4), môi trường thạch MacConkey (4.6) và cho vào môi trường BHI (4.3). Dùng que cấy (5.15) ria cấy chỗ đã phết bệnh phẩm lên các môi trường thạch;

Ủ các đĩa và ống môi trường đã cấy mẫu vào trong tủ ấm (5.1). Kiểm tra kết quả sau 18 h đến 24 h.

7.2.2 Phân lập *P. multocida*

Tính chất mọc của *P. multocida* trên các loại môi trường sau 18 h đến 24 h nuôi cấy:

- Trong môi trường BHI đã nuôi cấy vi khuẩn (7.2.1): *P. multocida* mọc làm môi trường đục, lắc có vẩn nhẹ (như sương mù), môi trường không có cặn ở đáy;

- Trên thạch máu đã nuôi cấy vi khuẩn (7.2.1): Khuẩn lạc *P. multocida* không gây dung huyết, có mùi tanh, có 3 dạng: dạng M (Mucous) – dạng nhầy, ướt, có kích thước to nhất, có màu trắng hơi xám; dạng S (Smooth) – dạng trơn, có kích thước nhỏ, bóng, ria nhẵn, mặt hơi vồng; dạng R (Rough) – khuẩn lạc thường dẹt, xù xì;

- Trên thạch MacConkey đã nuôi cấy vi khuẩn (7.2.1): *P. multocida* không mọc;

Chọn khuẩn lạc nghi ngờ cấy vào môi trường BHI (4.3) hoặc thạch máu (4.4) nuôi trong tủ ấm (xem 5.1) để xác định *P. multocida*.

7.3 Xác định hình thái của *P. multocida*

7.3.1 Nguyên tắc xác định hình thái của vi khuẩn

Vi khuẩn bắt màu Gram dương hay Gram âm là do sự khác nhau về thành phần và cấu trúc vách của tế bào vi khuẩn. Vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày, nhiều axit teichoic và lipid nên không bị cồn tẩy màu, giữ nguyên màu tím. Vi khuẩn Gram âm có một lớp peptidoglycan gắn với lớp phospholipit kép, xen kẽ các protein ở màng ngoài, lớp màng này dễ bị phá hủy bởi cồn khi tẩy màu, do đó phức hợp tím tinh thể – iốt không bền, bị tẩy màu và được thay bằng bằng màu hồng của thuốc nhuộm fuchsin.

7.3.2 Xác định hình thái *P. multocida* từ bệnh phẩm

Cách làm tiêu bản:

- Từ bệnh phẩm máu có chất chống đông: Lấy 1 giọt máu nhỏ lên 1 phiến kính (5.18), sau đó dùng 1 phiến kính khác dàn mỏng giọt máu, để khô;
- Từ bệnh phẩm (phổi, gan, lách, tủy xương): Cắt một miếng nhỏ bệnh phẩm, phết mỏng trên phiến kính (5.18), để khô.

Tiêu bản đã được để khô, nhỏ cồn methanol ngập tiêu bản, để khô.

Sau đó tiêu bản được nhuộm theo phương pháp nhuộm Gram (xem Phụ lục A.1); Hoặc phương pháp nhuộm Giemsa (xem Phụ lục A.2);

Đọc kết quả nhuộm:

- Nhuộm Gram: *P. multocida* bắt màu hồng (màu của Gram âm), đa hình thái (cầu khuẩn, trực khuẩn, cầu trực khuẩn), lưỡng cực (hai đầu đậm hơn).
- Nhuộm Giemsa: *P. multocida* bắt màu xanh tím, đa hình thái, lưỡng cực.

7.3.3 Xác định hình thái *P. multocida* từ canh khuẩn, khuẩn lạc

Từ canh khuẩn (môi trường BHI đã nuôi cấy vi khuẩn) hoặc khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida* (xem 7.2.2) tiến hành làm tiêu bản:

- Từ khuẩn lạc: Nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý (4.11) lên phiến kính (5.18), dùng que cấy (5.15) lấy khuẩn lạc hòa đều vào giọt nước muối sinh lý.
- Từ canh khuẩn: Dùng que cấy (5.15) lấy một vòng canh khuẩn dàn mỏng lên trên phiến kính (5.18).

Tiêu bản được để khô và cố định trên ngọn lửa đèn cồn khoảng từ 3 giây đến 5 giây;

Nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm Gram (xem Phụ lục A.1);

Đọc kết quả nhuộm Gram: *P. multocida* bắt màu hồng (màu của Gram âm), đa hình thái (cầu khuẩn, trực khuẩn, cầu trực khuẩn).

LƯU Ý: Việc xác định hình thái của vi khuẩn bằng kính hiển vi chỉ là nhận định ban đầu, chưa thể xác định được vi khuẩn. Cần xác định vi khuẩn bằng các phương pháp khác như các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn, phương pháp PCR, LAMP, Realtime PCR, ngưng kết.

7.4 Xác định *P. multocida* bằng phản ứng sinh hóa

Từ canh khuẩn hoặc khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida* (xem 7.2.2) tiến hành xác định một số đặc tính sinh hóa đặc trưng được nêu trong Bảng 1.

Môi trường xác định các đặc tính sinh hóa của *P. multocida* và cách tiến hành các phản ứng được nêu trong Phụ lục C.

Xác định đặc tính sinh hóa của *P. multocida* có thể sử dụng kit thương mại hoặc máy định danh vi khuẩn. Quy trình tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1 – Một số đặc tính sinh hoá đặc trưng của *P. multocida*

Chỉ tiêu	Đặc tính sinh hóa của <i>P. multocida</i>
Lên men đường glucose	Dương tính
Lên men đường lactose	Âm tính
Lên men đường mannitol	Dương tính
Di động	Âm tính
Sinh H ₂ S	Âm tính
Sinh indol	Dương tính
Phân giải urease	Âm tính
Phản ứng catalase	Dương tính
Phản ứng oxidase	Dương tính

7.5 Xác định *P. multocida* bằng phương pháp PCR

7.5.1 Chuẩn bị mẫu

- Với mẫu bệnh phẩm là dịch đường hô hấp trên: Ống nghiệm đã có tăm bông lấy mẫu (xem 7.1.1) được lắc kỹ bằng máy lắc (5.23). Dùng pipet (5.24) lấy 200 µl dung dịch mẫu cho vào ống ly tâm 1,5 ml để tách chiết ADN của vi khuẩn;
- Với mẫu bệnh phẩm là máu có chất chống đông hoặc dịch xoang bao tim: Dùng pipet (5.24) lấy 200 µl mẫu cho vào ống ly tâm 1,5 ml để tách chiết ADN của vi khuẩn;
- Với mẫu bệnh phẩm là phổi, gan, lách, tủy xương: Đồng nhất mẫu bằng cách dùng pank kéo (5.9) cắt nhỏ và nghiền mẫu bệnh phẩm với nước muối sinh lý (4.11) theo tỉ lệ 1 : 9 (phần thể tích) bằng cối chày sứ (5.20) hoặc bằng máy nghiền mẫu, máy đập mẫu. Chuyển huyền dịch bệnh phẩm vừa đồng nhất vào ống ly tâm và ly tâm với gia tốc 1.500 g trong 10 min, loại bỏ cặn thu lấy dịch nổi phía trên vào ống 1,5 ml để tách chiết ADN của vi khuẩn;

Với khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida*, lấy từ 3 khuẩn lạc đến 4 khuẩn lạc, hòa vào 200 µl nước vô trùng không chứa nuclease (nuclease free water); Với canh khuẩn thì lấy 200 µl để tách chiết ADN của vi khuẩn.

7.5.2 Tách chiết ADN

Tách chiết ADN từ bệnh phẩm hoặc vi khuẩn nghi ngờ bằng kit thương mại. Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Kit tách chiết ADN của hãng Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit, Catalog number: 69504); Kit tách chiết ADN của hãng Invitrogen (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Catalog number: K182002).

Với vi khuẩn hay canh khuẩn nghi ngờ là *P. multocida* có thể tách chiết ADN của vi khuẩn bằng phương pháp sốc nhiệt (xem Phụ lục D.2).

7.5.3 Tiến hành

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu được nêu trong bảng 2.

Bảng 2 – Cặp mồi xác định *P. multocida* ^[1,7]

Gen đích	Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'	Kích thước sản phẩm (bp)
KMT1	KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460
	KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	

[1] OIE, 2021. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.4.10: Hemorrhagic septicemia*;

[7] Development of PCR assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates.

Chuẩn bị mẫu, các bước tiến hành phản ứng PCR, chu trình nhiệt của phản ứng PCR được quy định tại Phụ lục D

7.5.4 Đọc kết quả

Mẫu kiểm tra dương tính khi có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (kích cỡ sản phẩm 460 bp);

Mẫu kiểm tra âm tính khi không có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương.

7.6 Xác định *P. multocida* bằng phương pháp Realtime PCR

7.6.1 Chuẩn bị mẫu

Xem 7.5.1.

7.6.2 Tách chiết ADN

Xem 7.5.2.

7.6.3 Tiến hành

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp Realtime PCR với cặp mồi và mẫu dò đặc hiệu được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 – Cặp mồi và mẫu dò xác định *P. multocida* ^[2]

Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'
PMA2f	ATAACTGTGGGAAACTGCAGCTAA
PMA2r	GGTCCCACCCTTT(A/C)CTCCTC
Mẫu dò MGB PMA2	6 FAM - CCGCGTA(A/T)TCTCT - MGBNFQ

[2] OIE, 2021. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.3.9: Fowl Cholera*

Chuẩn bị mẫu, các bước tiến hành phản ứng Realtime PCR, chu trình nhiệt của phản ứng Realtime PCR được quy định tại Phụ lục E.

7.6.4 Đọc kết quả

Xem Phụ lục E.5.

7.7 Xác định *P. multocida* bằng phương pháp LAMP

7.7.1 Chuẩn bị mẫu

Xem 7.5.1.

7.7.2 Tách chiết ADN

Xem 7.5.2.

7.7.3 Tiến hành

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp LAMP với cặp mồi đặc hiệu được nêu trong bảng 4.

Bảng 4 – Trình tự các cặp mồi cho phản ứng LAMP [9]

TT	Gen đích	Trình tự từ đầu 5' tới 3'
1	F3	GGTGCCTATCTTGCTTCG
	B3	TCGATCGCTAGCACCACA
2	FIP (F1c+F2)	TGCCGTAGCAGAACTGGAC+AGGTGAGCCATGTGAGCT
	BIP (B2+B1c)	CACACCGAAGCCAGGACTT+CACCAAATGTACTGGTTGCTTC
3	Loop F	CGACCATCGGTTGCATTTTC
	Loop B	TGGCATTGCATGGCTATCA

[9] Loop-mediated Isothermal Amplification assay (LAMP) based detection of *Pasteurella multocida* in cases of haemorrhagic septicaemia and fowl cholera

CHÚ THÍCH: dấu (+) được thay bằng trình tự TTTT khi thiết kế mồi để nối giữa trình tự F1c và F2 (trong mồi FIP), nối trình tự B2 và B1c (trong mồi BIP).

Chuẩn bị mẫu, các bước tiến hành phản ứng LAMP, chu trình nhiệt của phản ứng và đọc kết quả được quy định tại Phụ lục F.

7.7.4 Đọc kết quả

Kết quả của phản ứng LAMP có thể đọc bằng mắt ở điều kiện ánh sáng bình thường dựa vào sự thay đổi màu của dung dịch trong ống phản ứng:

- + Mẫu kiểm tra dương tính: Ống mẫu có thay đổi màu, giống màu của ống đối chứng dương;
- + Mẫu kiểm tra âm tính: Ống mẫu không thay đổi màu, có màu giống đối chứng âm.

Kết quả của phản ứng LAMP có thể đọc bằng đèn tia cực tím (đèn UV) hoặc điện di (Xem Phụ lục F.5).

7.8 Xác định typ huyết thanh của *P. multocida* bằng phương pháp PCR

7.8.1 Chuẩn bị mẫu

Xem 7.5.1.

7.8.2 Tách chiết ADN

Xem 7.5.2.

7.8.3 Tiến hành

TCVN 8400-56:2023

Xác định *P. multocida* thuộc typ A hoặc typ B bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu được nêu trong bảng G.1.

Chuẩn bị mẫu, các bước tiến hành phản ứng PCR, chu trình nhiệt của phản ứng PCR được quy định tại Phụ lục G

7.8.4 Đọc kết quả

Xem Phụ lục G.6.

Mẫu kiểm tra dương tính với *P. multocida* typ A khi kết quả PCR có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (sản phẩm là 564 bp) hoặc mẫu kiểm tra dương tính với *P. multocida* typ B khi kết quả PCR có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (sản phẩm là 620 bp).

Mẫu kiểm tra âm tính khi không có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương.

7.9 Xác định *P. multocida* bằng phương pháp ngưng kết

7.9.1 Chuẩn bị mẫu

Mẫu kiểm tra: canh khuẩn, khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida* (xem 7.2.2).

Mẫu đối chứng dương: là kháng nguyên chuẩn (xem H.2.2).

Mẫu đối chứng âm (xem H.2.3).

7.9.2 Cách tiến hành

Xem Phụ lục H.

7.9.3 Đọc kết quả

Mẫu kiểm tra dương tính: có xuất hiện các hạt ngưng kết lấm tấm.

Mẫu kiểm tra âm tính: không xuất hiện hạt ngưng kết.

8 Kết luận

Lợn, trâu, bò, gia cầm được kết luận mắc bệnh tụ huyết trùng khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và một trong số các kết quả sau đây:

- Phân lập, xác định hình thái (xem 7.3) và xác định được vi khuẩn bằng các phản ứng sinh hóa (xem 7.4);

- Kết quả xét nghiệm PCR dương tính với *P. multocida* (xem 7.5);
- Kết quả xét nghiệm Realtime PCR dương tính với *P. multocida* (xem 7.6);
- Kết quả xét nghiệm LAMP dương tính với *P. multocida* (xem 7.7);
- Kết quả xét nghiệm PCR dương tính với *P. multocida* typ A hoặc typ B (xem 7.8);
- Kết quả xét nghiệm ngưng kết dương tính với *P. multocida* (xem 7.9).

Phụ lục A
(Quy định)

Các phương pháp nhuộm *P. multocida*

A.1 Phương pháp nhuộm Gram

A.1.1 Thuốc thử

A.1.1.1 Dung dịch tím tinh thể

Tím tinh thể ($C_{25}H_{30}N_3Cl$)	2,0 g
Etanol 95 % (thể tích)	20,0 ml
Amoni oxalat [$(NH_4)_2C_2O_4.2H_2O$]	0,8 g
Nước cất	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.1.1.2 Dung dịch fuchsin đậm đặc

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

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

A.1.1.3 Dung dịch lugol

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

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

A.1.1.4 Cồn axeton

Etanol 95 % (thể tích)	3 phần
Axeton (C_2H_6O)	1 phần

A.1.2 Cách tiến hành

Nhỏ dung dịch tím tinh thể lên tiêu bản, 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 để khô.

A.1.3 Soi tiêu bản

Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản và soi tiêu bản bằng kính hiển vi quang học (5.2).

A.2 Phương pháp nhuộm Giemsa**A.2.1 Thuốc thử****A.2.1.1 Dung dịch Giemsa đậm đặc**

Giemsa (dạng bột)	1,0 g
Glycerin [$C_3H_5(OH)_3$]	66 ml
Cồn metanol nguyên chất	66 ml

Làm nóng glycerin trong bể điều nhiệt (5.10). Thêm thuốc nhuộm Giemsa trộn đều và ủ trong 2 h. Sau đó để nguội và thêm cồn methanol và giữ trong khoảng 2 tuần trước khi sử dụng.

Khi sử dụng pha loãng theo tỷ lệ 1:10 (thể tích) trong dung dịch đệm phosphate 0,01 M (pH = 7,0) và giữ trong 30 min.

A.2.1.2 Dung dịch đệm phosphate

Dung dịch natri hydrophotphat (Na_2HPO_4)	9,47 g
Dung dịch kali dihydrophotphat (KH_2PO_4)	9,08 g
Nước cất	900 ml

TCVN 8400-56:2023

Hòa tan natri hydrophotphat, kali dihydrophotphat trong nước và lắc cho tan hết.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng thuốc nhuộm Giemsa thương mại và pha loãng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

A.2.2 Cách tiến hành

Sau khi làm xong tiêu bản máu, cố định bằng cồn metanol nguyên chất trong 10 min rồi rửa bằng nước.

Nhỏ dung dịch Giemsa ngập tiêu bản, để từ 20 min đến 30 min, rồi rửa nhanh với nước và sấy khô.

A.2.3 Soi tiêu bản

Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản và soi tiêu bản bằng kính hiển vi quang học (5.2).

Phụ lục B
(Quy định)

Môi trường nuôi cấy *P. multocida*

B.1 Môi trường BHI

B.1.1 Nguyên liệu

Thành phần:

Môi trường BHI (*)	3,7 g
Nước cất vừa đủ	100 ml
Chỉnh pH = 7,4 ± 0,2 ở 25 °C	

VÍ DỤ: (*) dùng môi trường BHI (Brain Heart infusion) của hãng Merck (Cat. No. 110493) ¹⁾, thành phần cho môi trường BHI được nêu ở mục B.1.1.

LƯU Ý: Môi trường BHI nuôi cấy vi khuẩn *Pasteurella multocida* có thể bổ sung 5 % huyết thanh vô trùng, tạo điều kiện cho vi khuẩn mọc tốt hơn.

B.1.2 Cách tiến hành

Chuẩn bị môi trường BHI (*) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vô trùng môi trường BHI ở 121 °C trong 20 min bằng nồi hấp (xem 5.3).

Lắc đều và chia ra ống nghiệm (5.13) khoảng 5 ml / ống.

Kiểm tra vô trùng môi trường.

Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

B.2 Môi trường thạch máu

B.2.1 Nguyên liệu

Thành phần:

Thạch máu cơ bản (")	4 g
Nước cất vừa đủ	100 ml

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Chỉnh pH = $7,4 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

VÍ DỤ: (**) dùng môi trường thạch máu cơ bản (Blood agar base) của hãng Merck (Cat. No. 110886)²⁾, thành phần cho môi trường thạch máu bổ sung được nêu ở mục B.2.1.

LƯU Ý: Môi trường thạch máu nuôi cấy vi khuẩn *Pasteurella multocida* có thể bổ sung 5 % huyết thanh vô trùng, tạo điều kiện cho vi khuẩn mọc tốt hơn.

B.2.2 Cách tiến hành

Chuẩn bị môi trường thạch máu cơ bản (**) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vô trùng môi trường thạch máu ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 min bằng nồi hấp (xem 5.3).

Đợi nhiệt độ của môi trường thạch máu cơ bản đã vô trùng khoảng $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì bổ sung máu (4.5).

Lắc đều và chia ra đĩa petri (5.14) khoảng 20 ml / đĩa.

Kiểm tra vô trùng môi trường.

Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3 Môi trường thạch MacConkey

B.3.1 Nguyên liệu

Thành phần:

Môi trường thạch MacConkey(***) 5 g

Nước cất vừa đủ 100 ml

Chỉnh pH = $7,4 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

VÍ DỤ: (***) dùng môi trường thạch MacConkey (MacConkey agar) của hãng Merck (Cat. No. 105465)³⁾, thành phần cho môi trường thạch MacConkey được nêu ở mục B.3.1.

B.3.2 Cách tiến hành

Chuẩn bị môi trường thạch MacConkey (**) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vô trùng môi trường thạch MacConkey ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 min bằng nồi hấp (xem 5.3).

^{2,3)} Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Lắc đều, để môi trường nguội xuống khoảng 40 °C, chia ra đĩa petri (5.14) khoảng 20 ml / đĩa.

Kiểm tra vô trùng môi trường.

Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

Phụ lục C
(Quy định)

Xác định các đặc tính sinh hóa của *P. multocida*

C.1 Môi trường và thuốc thử

C.1.1 Môi trường thạch Kligler hoặc thạch TSI (Triple Sugar Iron agar)

Thành phần:

Peptone	15 g
Lactose	10 g
Proteose peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Chất chiết thịt bò	3 g
Cao nấm men	3 g
Dextrose	1 g
Sodium thiosulfate	0,3 g
Phenol red	0,024 g
Agar	12 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh pH = 7,4 ± 0,2 ở 25 °C

VÍ DỤ: dùng môi trường thạch Kligler của hãng Merck (Cat. No. 103913)⁴⁾

Cách tiến hành:

Chuẩn bị môi trường thạch Kligler hoặc môi trường thạch TSI (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

Vô trùng môi trường ở 121 °C trong 20 min bằng nồi hấp (5.3).

Lắc đều và chia ra ống nghiệm (5.13) khoảng 10 ml / ống.

Đặt ống môi trường nghiêng để được 2 phần. Phần thạch đứng bên dưới để kiểm tra khả năng lên

⁴⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

men đường glucose, sinh hơi, sinh H_2S , phần thạch nghiêng để kiểm tra khả năng lên men đường lactose.

Kiểm tra vô trùng môi trường. Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

C.1.2 Môi trường thạch bán lỏng mannitol

Thành phần:

Pepton	10 g
Mannitol	2 g
KNO ₃	1,7 g
Agar	2,5 g
Đỏ phenol 0,2 %	20 ml
Nước cất	1000 ml
Chỉnh pH = 7,4 ± 0,2 ở 25 °C	

Cách tiến hành:

Hòa tan các thành phần trên và đun sôi cho tan hoàn toàn.

Chia ra các ống nghiệm (5.13), khoảng 6 ml / 1 ống nghiệm.

Hấp tiệt trùng trong nồi hấp (5.3) ở 115 °C trong 20 min.

Kiểm tra vô trùng môi trường. Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

C.1.3 Môi trường thạch urê

Thành phần dung dịch urê 40 %:

Urê	40 g
Nước cất	100 ml

Thành phần thạch urê cơ bản:

Peptone	1 g
Glucose	1 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Đỗ phenol	0,012 g
Agar	15 g
Nước cất	950 ml

Chỉnh pH = $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C

Có thể sử dụng môi trường urê cơ bản (urea agar base – Christensen). Pha chế môi trường và bổ sung urê theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: dùng môi trường thạch Ure cơ bản (Ure agar base) của hãng Merck (Cat. No. 108492) ⁹⁾

Cách tiến hành:

Lấy 40 g urê hòa tan trong 100 ml nước cất. Tệt trùng dung dịch urê bằng cách lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm.

Hòa tan các thành phần của thạch urê cơ bản và đun sôi cho tan hoàn toàn. Sau đó hấp tệt trùng trong nồi hấp (5.3) ở 115 °C trong 20 min.

Thạch urê cơ bản đã tệt trùng, để nguội khoảng 40 °C sẽ được bổ sung với 50 ml dung dịch urê 40%.

Lắc đều và chia ra các ống nghiệm (5.13), khoảng 6 ml / 1 ống nghiệm.

Kiểm tra vô trùng môi trường. Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

⁹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

C.1.4 Môi trường nước pepton

Thành phần:

Peptone ^(*)	2,25 g
Nước cất vừa đủ	100 ml
Chỉnh pH = $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C	

VÍ DỤ: (*) dùng môi trường Peptone của hãng Merck (Cat. No. 107228) ^(*)

Cách tiến hành:

Chuẩn bị môi trường nước pepton theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vô trùng môi trường nước pepton ở 121 °C trong 20 min bằng nồi hấp (5.3).

Lắc đều và chia ra ống nghiệm (5.13) khoảng 5 ml / ống.

Kiểm tra vô trùng môi trường. Bảo quản môi trường ở điều kiện khoảng từ 4 °C đến 8 °C.

C.1.5 Thuốc thử Kovac's

Thành phần:

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

Cách tiến hành:

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.

CHÚ THÍCH: có thể sử dụng thuốc thử Kovac's thương mại và làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: dùng thuốc thử Kovac's của hãng Merck (Cat. No. 109293)

C.1.6 Thuốc thử H₂O₂ 3 % (thể tích)

^(*) Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

C.1.7 Thuốc thử oxidase hoặc giấy lọc tẩm 1 % tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride

C.2 Cách tiến hành

C.2.1 Kiểm tra đặc tính lên men đường glucose, đường lactose, sinh H₂S trên môi trường thạch Kligler hoặc TSI

Cách tiến hành:

Dùng que cấy chích sâu (5.15) lấy khuẩn lạc cấy thẳng (chính giữa phần thạch đứng) xuống đáy ống nghiệm môi trường thạch Kligler hoặc thạch TSI (xem điều C.1.1 Phụ lục C).

Nuôi trong tủ ấm (5.1), sau 24 h đọc kết quả:

Lên men đường glucose:

- Phản ứng dương tính: Phần đứng của môi trường thạch chuyển sang màu vàng;
- Phản ứng âm tính: Phần đứng của môi trường thạch không chuyển màu.

Lên men đường lactose:

- Phản ứng dương tính: Phần nghiêng của môi trường thạch chuyển sang màu vàng;
- Phản ứng âm tính: Phần nghiêng của môi trường thạch không chuyển màu.

Khả năng sinh H₂S:

- Phản ứng dương tính: Đáy ống nghiệm có màu đen;
- Phản ứng âm tính: Đáy ống nghiệm không có màu đen.

C.2.2 Kiểm tra đặc tính lên men đường mannitol và khả năng di động của vi khuẩn trên môi trường thạch mannitol bán lỏng

Cách tiến hành:

Dùng que cấy chích sâu (5.15) lấy khuẩn lạc cấy thẳng xuống gần đáy của ống nghiệm có môi trường thạch lỏng (xem điều C.1.2 Phụ lục C).

Nuôi trong tủ ấm (5.1), đọc kết quả sau 24 h:

Lên men đường mannitol:

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

Khả năng di động của vi khuẩn:

- 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.

C.2.3 Kiểm tra khả năng phân giải urê

Cách tiến hành:

Dùng que cấy (5.15) lấy khuẩn lạc cấy vào môi trường thạch urê (xem điều C.1.3 Phụ lục C).

Nuôi trong tủ ấm (5.1), đọc kết quả sau 24 h:

- Phản ứng dương tính: Môi trường chuyển sang màu hồng;
- Phản ứng âm tính: Môi trường không chuyển màu.

C.2.4 Kiểm tra khả năng sinh indol

Cách tiến hành:

Dùng que cấy (5.15) lấy khuẩn lạc cấy vào môi trường nước pepton (xem điều C.1.4 Phụ lục C).

Nuôi trong tủ ấm (5.1)

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

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.

C.2.5 Phản ứng catalase

Cách tiến hành:

Nhỏ một giọt thuốc thử H_2O_2 3 % lên phiến kính (5.18).

Dùng que cấy (5.15) lấy khuẩn lạc nghi ngờ cho vào giọt thuốc thử H_2O_2 đã nhỏ trên phiến kính.

TCVN 8400-56:2023

Đọc kết quả sau 5 s:

- Phản ứng dương tính: Có hiện tượng sủi bọt;
- Phản ứng âm tính: Không có hiện tượng sủi bọt.

C.2.6 Phản ứng oxidase

Cách tiến hành:

Dùng giấy lọc đã tẩm 1 % tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride hoặc nhỏ một giọt thuốc thử oxidase lên giấy lọc.

Dùng que cấy (5.15) lấy khuẩn lạc nghi ngờ phết vào phần giấy lọc đã có thuốc thử.

Đọc kết quả sau 20 s:

- Phản ứng dương tính: Chỗ phết khuẩn lạc trên giấy lọc có màu tím;
- Phản ứng âm tính: Chỗ phết khuẩn lạc trên giấy lọc không chuyển màu.

Phụ lục D

(Quy định)

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp PCR**D.1 Nguyên liệu PCR****D.1.1 Taq PCR Master Mix Kit;**

VÍ DỤ: Dùng kit nhân gen Taq PCR Mastermix kit Qiagen (Cat. No. 201443); Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X) (Cat. No. K1071)

D.1.2 Cặp mồi (primers): mồi xuôi (KMT1T7) và mồi ngược (KMT1SP6) (Bảng 2);**D.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease;****D.1.4 Dung dịch đệm điện di: Có thể dùng dung dịch đệm TAE hoặc TBE;****D.1.5 Chất nhuộm màu ADN;**

VÍ DỤ: Chất nhuộm màu SYBR safe ADN gel stain của hãng Invitrogen; hoặc chất nhuộm màu Gel Red của hãng Biotium.

KHUYẾN CÁO: Chất nhuộm màu Ethid bromua có thể gây ung thư nên khuyến cáo không sử dụng.

D.1.6 Loading dye (Đệm tải mẫu);**D.1.7 ADN (Acid Deoxyribo Nucleic) chuẩn (Ladder, marker), thang 100 bp;****D.1.8 Dung dịch đệm TE.****D.2 Chuẩn bị mẫu**

Mẫu kiểm tra: Là bệnh phẩm nghi mắc bệnh tụ huyết trùng (xem 7.1.1) hoặc là canh khuẩn, khuẩn lạc *P. multocida* nghi ngờ (xem 7.2.2).

Mẫu đối chứng dương: Là chủng vi khuẩn đã được xác định là *P. multocida* hoặc sử dụng các chủng *P. multocida* chuẩn.

Tách chiết ADN

- Tách chiết ADN của vi khuẩn *P. multocida* bằng kit thương mại: Các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TCVN 8400-56:2023

VÍ DỤ: Kít tách chiết ADN của hãng Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kít , Catalog number: 69504); Kít tách chiết ADN của hãng Invitrogen (PureLink™ Genomic DNA Mini Kít, Catalog number: K182002).

- Tách chiết ADN của vi khuẩn *P. multocida* bằng phương pháp sốc nhiệt: Lấy từ 3 khuẩn lạc đến 4 khuẩn lạc, hòa vào 100 µl nước vô trùng không chứa nuclease (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 (5.4) với gia tốc 12 000 g trong 4 min. Thu hoạch phần trong phía trên để thực hiện phản ứng PCR.

D.3 Chuẩn bị môi

Môi được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị môi gốc: Môi gốc ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (5.4) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (D.1.8) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM /µl làm môi gốc;
- Chuẩn bị môi sử dụng ở nồng độ 20 µM: Pha loãng môi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (D.1.3).

VÍ DỤ: lấy 20 µl môi gốc có nồng độ 100 µM và thêm 80 µl nước sẽ được môi sử dụng có nồng độ 20 µM / µl.

D.4 Tiến hành

Sử dụng cặp môi đã được chuẩn bị (xem D.3). Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml.

Sử dụng kít nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: dùng kít nhân gen của Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X) (Cat. No. K1071)⁷⁾, thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng D.1.

⁷⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Bảng D.1 – Thành phần của phản ứng PCR xác định *P. multocida*

Thành phần	Thể tích cho 01 phản ứng (µl)
Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X)	12,5
Nước không có nuclease	6,5
Mồi xuôi (20 µM)	0,5
Mồi ngược (20 µM)	0,5
Tổng thể tích	20,0

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng.

- Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ADN của *P. multocida* vào ống phản ứng.
- Mẫu đối chứng âm: Cho 5 µl nước tinh khiết không có nuclease vào ống phản ứng.
- Mẫu bệnh phẩm: Cho 5 µl mẫu ADN cần kiểm tra vào ống phản ứng.

LƯU Ý: Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng bằng máy PCR (5.6) với chu trình nhiệt như nêu trong bảng D.2.

Bảng D.2 – Chu trình nhiệt xác định *P. multocida*

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	2 min	1 vòng
95 °C	30 s	35 vòng
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1 vòng
CHÚ THÍCH: Chu trình nhiệt và thời gian phản ứng có thể thay đổi tùy theo bộ kit nhân gen. Khi sử dụng các bộ kit khác nhau cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.		

D.5 Chạy điện di

TCVN 8400-56:2023

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose 1,5 % đến 2 % trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE có bổ sung chất nhuộm màu (D.1.5). Cách pha chế thạch agarose và bổ sung chất nhuộm màu, sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cho 2 µl dung dịch loading dye vào 10 µl sản phẩm PCR, trộn đều cho vào từng giếng trên bản thạch. Cho 10 µl ADN chuẩn (marker) (D.1.7) vào một giếng.

Bản thạch được chạy điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại dung dịch đệm sử dụng khi pha thạch) ở bộ điện di (5.7), trong thời gian từ 20 min đến 30 min, ở 100 V.

D.6 Đọc kết quả

Phản ứng PCR được công nhận khi: ADN có dải vạch sáng rõ ràng; Mẫu đối chứng dương tính có một vạch duy nhất đúng kích cỡ sản phẩm (460 bp) và mẫu đối chứng âm không có vạch sản phẩm;

- Mẫu kiểm tra dương tính khi có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (sản phẩm có kích cỡ 460 bp);
- Mẫu kiểm tra âm tính khi không có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương;

Phụ lục E

(Quy định)

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp Realtime PCR**E.1 Nguyên liệu cho phương pháp Realtime PCR****E.1.1 Realtime Master Mix kit;**

VÍ DỤ: QuantiTect Probe PCR kit (Cat. No. 204343), Platinum™ Quantitative PCR SuperMix-UDG (Cat. No. 11730025);

E.1.2 Cặp mồi (primers) và mẫu dò: (xem bảng 3);**E.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease;****E.1.4 Dung dịch đệm TE****E.2 Chuẩn bị mẫu**

Mẫu kiểm tra: Là bệnh phẩm từ gia cầm nghi mắc bệnh tụ huyết trùng (xem 7.1.1) hoặc canh khuẩn, khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida* (xem 7.2.2).

Mẫu đối chứng dương: Chủng vi khuẩn đã được xác định là *P. multocida* hoặc sử dụng các chủng *P. multocida* chuẩn.

Chuẩn bị mẫu: Xem Phụ lục D.2.

E.3 Chuẩn bị mồi và mẫu dò

- Chuẩn bị mồi gốc và mẫu dò gốc: Mồi và mẫu dò ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh (5.4) ở gia tốc 6 000 vòng trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (xem E.1.4) để hoàn nguyên mồi và mẫu dò ở nồng độ 100 μM làm mồi gốc và mẫu dò gốc.
- Chuẩn bị mồi sử dụng ở nồng độ 20 μM , mẫu dò sử dụng ở nồng độ 20 μM được pha loãng từ mồi gốc, mẫu dò gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (E.1.3).

VÍ DỤ: lấy 20 μl mồi gốc có nồng độ 100 μM và thêm 80 μl nước sẽ được mồi sử dụng có nồng độ 20 μM / μl .

E.4 Tiến hành

Sử dụng cặp mồi và mẫu dò đã được chuẩn bị (xem E.3).

Phản ứng Realtime PCR sử dụng kit nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Sử dụng kit nhân gen QuantiTect Probe PCR kit, code: 204343

Bảng E.1 – Thành phần của phản ứng Realtime PCR

Thành phần	Thể tích cho 01 phản ứng (μ l)
QuantiTect Probe PCR kit	12,5
Nước không có nuclease	6,8
Probe (20 μ M)	0,3
Mồi xuôi (20 μ M)	0,2
Mồi ngược (20 μ M)	0,2
Tổng thể tích	20,0

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml.

Chuyển 20 μ l hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng.

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 5 μ l mẫu ADN có giá trị Ct đã biết trước vào ống phản ứng.
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 5 μ l nước tinh khiết không có nuclease vào ống phản ứng.
- Mẫu bệnh phẩm: Cho 5 μ l mẫu AND vào ống phản ứng.

LƯU Ý: Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng bằng máy Realtime PCR (5.5) theo đặt chu trình nhiệt nêu trong Bảng E.2.

Bảng E.2 – Chu trình nhiệt phản ứng Realtime PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	5 min	1 vòng
94 °C	10 s	40 vòng
56 °C ^(*)	20 s	
62 °C	20 s	

(*) Thời điểm ghi nhận tín hiệu huỳnh quang.

CHÚ THÍCH: Chu trình nhiệt và thời gian phản ứng có thể thay đổi tùy theo bộ kit nhân gen. Khi sử dụng các bộ kit khác nhau cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

E.5 Đọc kết quả

Đọc kết quả phản ứng bằng máy Realtime PCR dựa trên giá trị Ct (Ct – Cycle threshold, là thời điểm máy đọc Realtime PCR ghi nhận tín hiệu huỳnh quang phát ra từ ống phản ứng bắt đầu vượt qua cường độ huỳnh quang nền).

Điều kiện phản ứng được công nhận: Mẫu kiểm chứng dương tính có giá trị Ct biết trước (± 2 giá trị Ct), mẫu kiểm chứng âm tính không có Ct;

- Mẫu kiểm tra dương tính khi giá trị $Ct \leq 35$;
- Mẫu kiểm tra âm tính khi không có giá trị Ct;
- Mẫu kiểm tra nghi ngờ khi có giá trị $35 < Ct \leq 40$.

Những mẫu nghi ngờ cần được xét nghiệm lại theo quy trình hoặc bằng phương pháp khác để khẳng định.

Phụ lục F
(Quy định)

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp LAMP

Nguyên lý của phương pháp LAMP

Phản ứng LAMP muốn hoạt động cần có sự tham gia của 03 cặp mồi: cặp mồi trong (FIP và BIP), cặp mồi ngoài (F3 và B3) và cặp mồi vòng (LF và LB).

Cặp mồi trong (FIP - Forward inner primer và BIP - Backward inner primer) và cặp mồi ngoài (F3 và B3) được sử dụng để tạo sợi khởi đầu cho phản ứng LAMP. Hai cặp mồi này (4 mồi) được thiết kế dựa trên 6 vùng khác nhau của ADN đích: vùng F3c, F2c, F1c ở đầu 3' và vùng B1, B2, B3 ở đầu 5'. Trình tự FIP và BIP được thiết kế như sau:

- FIP chứa F1c, một đoạn TTTT và một trình tự F2 bổ sung với F2c.
- BIP sẽ chứa trình tự B1c bổ sung cho B1, một đoạn TTTT và B2.
- Hai mồi ngoài B3 bổ sung cho đoạn B3c và trình tự F3 bổ sung cho F3c.

Cặp mồi Loop (LF - Loop Forward và LB - Loop Backward) được dùng cho giai đoạn sau của quá trình khuếch đại, quá trình tự mồi để làm tăng hiệu quả của phản ứng.

Kết quả của phản ứng LAMP là tạo ra nhiều cấu trúc ADN kép bao gồm các trình tự lặp đi lặp lại luân phiên đảo ngược trình tự đích được ngăn cách với nhau bởi các vòng lặp trong cùng một sợi trên một phân tử ADN kép.

F.1 Nguyên liệu của phương pháp LAMP

F.1.1 LAMP Master Mix Kit;

Ví dụ: dùng kit nhân gen Bst DNA Polymerase, Large Fragment (Cat. No. M0275) của hãng New England Biolabs, Mỹ.

F.1.2 Các cặp mồi (xem bảng 4) và thành phần hỗn hợp các mồi cho phản ứng LAMP (xem bảng F.1);

F.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease;

F.1.4 Dung dịch đệm TE;

F.1.5 Chất chỉ thị màu huỳnh quang (xem bảng F.2).

F.2 Chuẩn bị mẫu

Xem Phụ lục D.2.

F.3 Chuẩn bị môi và chất chỉ thị màu huỳnh quang

F.3.1 Chuẩn bị môi

Chuẩn bị môi gốc: Môi gốc ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (5.4) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (E.1.4) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM /µl làm môi gốc;

Môi sử dụng cho phản ứng LAMP được chuẩn bị thành hỗn hợp môi (xem bảng F.1). Nồng độ các môi trong 25 µl thể tích phản ứng là: môi FIP và BIP có nồng độ 20 µM /µl; môi F3 và B3 có nồng độ 5 µM /µl; môi Loop F và Loop B có nồng độ 10 µM /µl.

Bảng F.1 – Hỗn hợp môi cho phản ứng LAMP

Thành phần	Thể tích cho 01 phản ứng (µl)	Thể tích cho 100 phản ứng (µl)
Môi FIP (100 pmol)	5	50
Môi BIP (100 pmol)	5	50
Môi F3 (100 pmol)	1,25	12,5
Môi B3 (100 pmol)	1,25	12,5
Môi Loop F (100 pmol)	2,5	25
Môi Loop B (100 pmol)	2,5	25
Tổng thể tích	17,5	175

F.3.2 Chuẩn bị chất chỉ thị màu huỳnh quang

Tùy thuộc vào chất chỉ thị và chất huỳnh quang khác nhau sẽ có sự chuẩn bị tối ưu khác nhau.

VÍ DỤ: Chuẩn bị chất chỉ thị màu huỳnh quang sử dụng chất chỉ thị là Hydroxynaphthol Blue và chất huỳnh quang là Sybr Green (xem bảng F.2)

Bảng F.2 – Chất chỉ thị màu huỳnh quang cho phản ứng LAMP

Thành phần của chất chỉ thị màu huỳnh quang	Cho 1000 phản ứng
---	-------------------

Nước tinh khiết không có nuclease	967 µl
Chỉ thị màu Hydroxynapthol Blue (100mM)	30 µl
Sybr Green (10.000X)	3 µl

F.4 Tiến hành

Sử dụng kit nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: dùng kit nhân gen Bst DNA Polymerase, Large Fragment (Cat. No. M0275) của hãng New England Biolabs, Mỹ. Thành phần của phản ứng LAMP xác định *P. multocida* (xem bảng F.3)

Bảng F.3 – Thành phần của phản ứng LAMP

Thành phần	Thể tích cho 01 phản ứng (µl)
10X ThermoPol buffer	2,5
MgSO4 (100 mM)	1,5
dNTP Mix (10mM)	3,5
Hỗn hợp mồi cho phản ứng LAMP (xem bảng F.1)	17,5
Bst DNA Polymerase, Large Fragment (8.000U/ml)	1
Nước không có nuclease	4,5
Chất chỉ thị và chất huỳnh quang (xem bảng F.2)	1
Tổng thể tích	20,0

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng.

- Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ADN của *P. multocida* vào ống phản ứng;
- Mẫu đối chứng âm: Cho 5 µl nước tinh khiết không có nuclease vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm tra: Cho 5 µl mẫu ADN cần kiểm tra vào ống phản ứng.

LƯU Ý: Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng LAMP bằng máy nhân gen (5.6) hoặc bể ổn nhiệt với chu trình nhiệt như nêu trong bảng F.4.

Bảng F.4 – Chu trình nhiệt xác định *P. multocida*

Nhiệt độ	Thời gian
65 °C	30 min
80 °C	5 min

F.5 Đọc kết quả

Phản ứng LAMP có thể đọc kết quả bằng mắt ở điều kiện ánh sáng bình thường hoặc bằng đèn tia cực tím (đèn UV) hoặc điện di để kiểm tra sản phẩm của phản ứng.

F.5.1 Đọc kết quả bằng mắt ở điều kiện ánh sáng bình thường

Kết quả của phản ứng LAMP có thể đọc bằng mắt ở điều kiện ánh sáng bình thường dựa vào sự thay đổi màu của dung dịch trong ống phản ứng:

- + Mẫu kiểm tra dương tính: Ống mẫu thay đổi màu, có màu giống ống đối chứng dương (màu xanh);
- + Mẫu kiểm tra âm tính: Ống mẫu không thay đổi màu, có màu giống đối chứng âm (màu tím).

F.5.2 Đọc kết quả bằng đèn tia cực tím

Các ống của phản ứng LAMP được bổ sung chất nhuộm ADN. Kết quả của phản ứng được đọc bằng đèn tia cực tím và quan sát sự phát sáng trong ống phản ứng:

- + Mẫu kiểm tra dương tính: Ống mẫu có phát sáng và có màu giống ống đối chứng dương (màu xanh nếu sử dụng thuốc nhuộm ADN là SYBR green);
- + Mẫu kiểm tra âm tính: Ống mẫu không phát sáng, giống đối chứng âm.

F.5.3 Đọc kết quả bằng điện di sản phẩm

Sản phẩm của phản ứng LAMP được điện di trên thạch agarose 1,5 % đến 2 % trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE.

Cho 2 µl dung dịch loading dye vào 10 µl sản phẩm PCR, trộn đều cho vào từng giếng trên bản thạch. Cho 10 µl ADN chuẩn (marker) vào một giếng.

Bản thạch được chạy điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại dung dịch đệm sử dụng khi pha thạch) ở bộ điện di (5.7) trong thời gian từ 20 min đến 30 min, ở 100 V.

TCVN 8400-56:2023

Kết quả điện di: ADN chuẩn có dải gồm các vạch sáng rõ ràng;

+ Mẫu kiểm tra dương tính: Khi có nhiều vạch sản phẩm có kích thước khác nhau trên bản điện di, giống mẫu đối chứng dương;

+ Mẫu kiểm tra âm tính: Khi không có vạch sản phẩm, giống mẫu đối chứng âm.

Phụ lục G
(Quy định)

Định typ *P. multocida* bằng phương pháp PCR

G.1 Nguyên liệu PCR

G.1.1 Taq PCR Master Mix Kit;

VÍ DỤ: dùng kit nhân gen Taq PCR Mastermix kit Qiagen (Cat. No. 201443); Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X) (Cat. No. K1071)

G.1.2 Các cặp mồi (xem bảng G.1);

Bảng G.1 – Cặp mồi xác định typ *P. multocida* ^[1]

Typ	Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'	Kích thước sản phẩm (bp)
A	RGPMA5	AATGTTTGCGATAGTCCGTTAGA	564
	RGPMA6	ATTTGGCGCCATATCACAGTC	
B	KTT72	AGGCTCGTTTGGATTATGAAG	620
	KTSP61	ATCCGCTAACACACTCTC	

[1] OIE, 2021. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.4.10: Hemorrhagic septicemia*

G.1.3 Nước tinh khiết không có nuclease;

G.1.4 Dung dịch đệm điện di: Có thể dùng dung dịch đệm TAE hoặc TBE;

G.1.5 Chất nhuộm màu ADN;

VÍ DỤ: Chất nhuộm màu SYBR safe ADN gel stain của hãng Invitrogen; hoặc chất nhuộm màu Gel Red của hãng Biotium.

KHUYẾN CÁO: Chất nhuộm màu Ethidi bromua có thể gây ung thư nên khuyến cáo không sử dụng.

G.1.6 Loading dye (Đệm tải mẫu);

G.1.7 ADN (Acid Deoxyribo Nucleic) chuẩn (Ladder, marker), thang 100 bp;

G.1.8 Dung dịch đệm TE.

G.2 Chuẩn bị mẫu

Xem Phụ lục D.2.

G.3 Chuẩn bị môi

Môi được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị môi gốc: Môi gốc ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (5.4) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (G.1.8) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 μM / μl làm môi gốc;
- Chuẩn bị môi sử dụng ở nồng độ 20 μM / μl : Pha loãng môi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (G.1.3).

Ví DỤ: lấy 20 μl môi gốc có nồng độ 100 μM và thêm 80 μl nước sẽ được môi sử dụng có nồng độ 20 μM / μl .

G.4 Tiến hành

Sử dụng cặp môi đã được chuẩn bị (xem G.3). Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 ml.

Sử dụng kit nhân gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: dùng kit nhân gen của Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X) (Cat. No. K1071)⁸⁾, thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng G.2.

Bảng G.2 – Thành phần của phản ứng PCR xác định typ *P. multocida*

Thành phần	Thể tích cho 01 phản ứng (μl)
Thermo Scientific Dream Taq PCR Mastermix (2X)	12,5
Nước không có nuclease	6,5
Môi xuôi (20 μM)	0,5
Môi ngược (20 μM)	0,5
Tổng thể tích	20,0

Chuyển 20 μl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng.

- Mẫu đối chứng dương: Cho 5 μl mẫu ADN của *P. multocida* vào ống phản ứng.
- Mẫu đối chứng âm: Cho 5 μl nước tinh khiết không có nuclease vào ống phản ứng.
- Mẫu bệnh phẩm: Cho 5 μl mẫu ADN cần kiểm tra vào ống phản ứng.

⁸⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

LƯU Ý: Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. Mẫu và nguyên vật liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng bằng máy PCR (5.6) với chu trình nhiệt như nêu trong bảng G.3.

Bảng G.3 – Chu trình nhiệt xác định typ *P. multocida*

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	2 min	1 vòng
95 °C	30 s	35 vòng
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1 vòng
CHÚ THÍCH: Chu trình nhiệt và thời gian phản ứng có thể thay đổi tùy theo bộ kit nhân gen. Khi sử dụng các bộ kit khác nhau cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.		

G.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 có bổ sung chất nhuộm màu (G.1.5). Cách pha chế thạch agarose và bổ sung chất nhuộm màu, sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cho 2 µl dung dịch loading dye vào 10 µl sản phẩm PCR, trộn đều cho vào từng giếng trên bản thạch. Cho 10 µl ADN chuẩn (marker) (G.1.7) vào một giếng.

Bản thạch được chạy điện di trong môi trường dung dịch đệm TAE hoặc TBE (tùy thuộc vào loại dung dịch đệm sử dụng khi pha thạch) ở bộ điện di (5.7), trong thời gian từ 20 min đến 30 min, ở 100 V.

G.6 Đọc kết quả

Phản ứng PCR được công nhận khi: ADN có dải vạch sáng rõ ràng; Mẫu đối chứng dương tính có vạch đúng kích cỡ sản phẩm (của typ A là 564 bp, của typ B là 620 bp); mẫu đối chứng âm không có vạch sản phẩm;

Mẫu kiểm tra dương tính với *P. multocida* typ A khi kết quả PCR có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (sản phẩm là 564 bp) hoặc mẫu kiểm tra dương tính với *P. multocida* typ B khi kết quả PCR có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương (sản phẩm là 620 bp).

Mẫu kiểm tra âm tính khi không có vạch sản phẩm giống mẫu đối chứng dương.

Phụ lục H

(Quy định)

Xác định *P. multocida* bằng phương pháp ngưng kết

LƯU Ý: Phương pháp ngưng kết áp dụng để xét nghiệm *P. multocida* gây bệnh tụ huyết trùng ở trâu, bò.

H.1 Nguyên lý của phương pháp ngưng kết

Là sự kết hợp giữa kháng nguyên hữu hình với kháng thể tương ứng, tạo thành các hạt ngưng kết mà mắt thường có thể quan sát được.

Phương pháp ngưng kết xác định *P. multocida* sử dụng kháng nguyên là *P. multocida* nghi ngờ và kháng thể chuẩn (xem H.2.1).

H.2 Nguyên liệu của phương pháp ngưng kết

H.2.1 Huyết thanh chuẩn (Kháng thể chuẩn): là huyết thanh được chế từ chủng *P. multocida* chuẩn chủng B2 (hoặc vi khuẩn đã được xác định là *P. multocida* gây bệnh tụ huyết trùng ở trâu, bò).

H.2.2 Mẫu đối chứng dương (Kháng nguyên chuẩn): là *P. multocida* chuẩn (hoặc vi khuẩn đã được xác định là *P. multocida*).

H.2.3 Mẫu đối chứng âm: là nước cất vô trùng.

H.2.4 Mẫu kiểm tra: Canh khuẩn, khuẩn lạc nghi ngờ là *P. multocida* (xem 7.2.2). Nếu mẫu kiểm tra là khuẩn lạc thì hòa với nước cất vô trùng, đảm bảo nồng độ vi khuẩn đạt 10^8 đến 10^9 .

H.3 Cách tiến hành

- Các nguyên liệu và mẫu xét nghiệm được để ở nhiệt độ phòng khoảng 1 h trước khi làm phản ứng.
- Lắc nhẹ ống đựng kháng thể chuẩn (huyết thanh) để dung dịch trong ống được đồng nhất.
- Nhỏ 30 ul huyết thanh (xem H.2.1) lên trên phiến kính.
- Nhỏ 30 ul mẫu kiểm tra lên giọt huyết thanh đã có trên phiến kính
- Trộn đều mẫu kiểm tra với huyết thanh bằng que trộn.

TCVN 8400-56:2023

- Lập lại các bước trên với mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương.
- Lắc tròn nhẹ nhàng phiến kính trong 2 min (có thể sử dụng máy lắc).
- Đọc kết quả sau 2 min tính từ khi bắt đầu lắc.

LƯU Ý: chỉ đọc kết quả trong 2 min tính từ khi lắc phiến kính.

H.4 Đọc kết quả

Mẫu kiểm tra dương tính: có xuất hiện các hạt ngưng kết lấm tẩm.

Mẫu kiểm tra âm tính: không xuất hiện hạt ngưng kết.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OIE, 2021. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.4.10: Haemorrhagic septicaemia*, p.1-16.
- [2] OIE, 2021. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.3.9: Fowl Cholera*, p.1-15.
- [3] TCVN 8400-14 : 2011 - Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán bệnh tụ huyết trùng trâu bò.
- [4] TCVN 8400-31 : 2015 - Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán bệnh tụ huyết trùng gia cầm.
- [5] TCCS 36 : 2018/VT-CĐ - Quy trình chẩn đoán bệnh tụ huyết trùng lợn.
- [6] P. J. Quinn, M. E. Carter , B. Markey, G. R. Cater, 2004. *Clinical Veterinary Microbiology. Chapter 22: Pasteurella species*. Elsevier Publish, the 5th Edition, p.254-258.
- [7] Towensend, K. M., Frost, A. J., Lee, C. W. , Papadimitriou, J. M., Dawkins , J.S. 1998. Development of PCR assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates . J. Clini. Micro. 36 (4): p.1096- 1100.
- [8] Mayurkumar P. Bhimani, Bharat B. Bhandari, Ashish Roy, 2015. *Loop-mediated Isothermal Amplification assay (LAMP) based detection of Pasteurella multocida in cases of haemorrhagic septicaemia and fowl cholera*. India Veterinary Microbiology, p.115-121.
- [9] Carlos Pijoan, 2006. *Diseases of swine. Chapter 43: Pneumonic Pasteurellosis*. Blackwell Publish, the 9th Edition, p.719-726.
- [10] John R. Glisson, Charles L. Hofacre and P. Christensen, 2008. *Diseases of Poultry, Chapter 19: Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections*. Blackwell Publish, the 12th Edition, p.739-758.
- [11] Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lãnh, Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trương Hà Thái, Chu Thị Thanh Hương, 2020. *Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y. Phần 3.10: Bệnh tụ huyết trùng trâu bò*, trang 196-202; *Phần 4.15: Bệnh tụ huyết trùng lợn*, trang 355-360; *Phần 5.17: Bệnh tụ huyết trùng gia cầm*, trang