

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-18 : 2014

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 18: BỆNH PHÙ ĐẦU GÀ (CORYZA)**

Animal disease – Diagnostic procedure - Part 18: Infectious Coryza

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 8400-19:2014 do Trung tâm Chẩn đoán Thú ý 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 18: Bệnh phù đầu gà (coryza)

Animal diseases - Diagnostic procedure - Part 18: Infectious coryza

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 thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh phù đầu gà do vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* (trước đây tên vi khuẩn là *Haemophilus paragallinarum*) gây ra.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh phù đầu gà (Infectious coryza)

Bệnh phù đầu gà là bệnh truyền nhiễm đường hô hấp cấp tính ở gà với các đặc trưng là chảy nước mũi, mặt sưng. Bệnh do vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* gây ra.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Trong tiêu chuẩn này chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, 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 sô-cô-la

Pha môi trường thạch máu cơ bản (4 g thạch máu cơ bản trong 90 ml nước), hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.2) ở 121 °C trong 15 min. Để môi trường nguội đến 75 °C, rồi bổ sung từ 5 % đến 10 %

máu cừu, máu bê, hoặc máu thỏ và đặt trong bể ủ nhiệt (xem 4.9) trong từ 15 min đến 30 min. Để môi trường nguội đến 45 °C, rồi bổ sung 1% β -NAD (25 μ g trong 100 ml nước), 5 % chất chiết nấm men. Chia đều môi trường ra các đĩa Petri (xem 4.3), mỗi đĩa khoảng 20 ml.

3.3 Môi trường TSB.

3.4 Môi trường urê cơ bản.

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

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

4 Thiết bị, dụng cụ.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường, cụ thể như sau:

4.1 Tủ ấm, duy trì ở nhiệt độ 37 °C, có 5 % CO₂.

4.2 Nồi hấp, duy trì ở nhiệt độ 100 °C, 110 °C, 121 °C.

4.3 Đĩa Petri.

4.4 Phiến kính, sạch.

4.5 Que cấy, vô trùng.

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

4.7 Đèn cồn.

4.8 Màng lọc, có kích thước lỗ lọc 0,45 μ m.

4.9 Bể ủ nhiệt, duy trì ở 75 °C.

4.10 Ống nghiệm, sạch, vô trùng.

4.11 Máy ổn nhiệt khô, duy trì 100 °C.

5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tễ

– Gà ở tất cả các lứa tuổi đều có thể mắc bệnh, chủ yếu trên gà trưởng thành và gà đẻ, gà con mắc ít hơn và nếu mắc cũng ít trầm trọng hơn.

- Bệnh thường xảy ra vào mùa thu, đông.
- Bệnh lây truyền qua đường hô hấp và không lây truyền qua trứng.
- Tỷ lệ mắc bệnh cao, tỷ lệ chết thấp (khoảng 10 %).

5.1.2 Triệu chứng lâm sàng

- Có nhiều dịch mũi; mặt sưng, tích bị sưng; chảy nước mắt, viêm kết mạc mắt.
- Gà giảm ăn, uống và có thể bị ỉa chảy.
- Giảm tăng trọng ở gà nuôi thịt và giảm sản lượng trứng ở gà đẻ (tới 40 %).

5.1.3 Bệnh tích

- Màng nhày xoang mũi, kết mạc mắt bị viêm cata, túi khí viêm.
- Mặt, tích bị phù dưới da.

5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

5.2.1 Lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm: Dịch xoang mũi, dịch từ khí quản, dịch lấy từ các túi khí.

Bệnh phẩm phải được 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 kèm theo giấy yêu cầu xét nghiệm có ghi rõ triệu chứng, bệnh tích và những thông tin về dịch tễ

5.2.2 Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường thạch máu (xem 3.1) có cấy kèm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* hoặc thạch sô-cô-la (xem 3.2). Nuôi vi khuẩn trong tủ ấm (xem 4.1) trong 24 h. Nếu trong mẫu bệnh phẩm có vi khuẩn, các khuẩn lạc sẽ được hình thành với hình thái như sau:

a) Trên môi trường thạch máu (xem 3.1) có cấy kèm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* có các khuẩn lạc tròn, trong suốt, kích thước nhỏ (khoảng 0,3 mm), không gây dung huyết, mọc xung quanh đường cấy vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

b) Trên môi trường thạch sô-cô-la (xem 3.2) có các khuẩn lạc nhỏ (khoảng 0,3 mm), trong suốt.

Chọn khuẩn lạc có hình thái đặc trưng cấy vào môi trường thạch sô-cô-la (xem 3.2) nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) trong thời gian 24 h để tiến hành quan sát hình thái và kiểm tra các đặc tính sinh hoá của vi khuẩn hoặc xác định vi khuẩn bằng PCR.

5.2.3 Xác định vi khuẩn

5.2.3.1 Quan sát hình thái vi khuẩn từ môi trường nuôi cấy

Làm tiêu bản và cố định tiêu bản: Dùng que cấy (xem 4.5) lấy khuẩn lạc nghi ngờ thu được trong mục 5.2.2 hòa đều vào giọt nước sinh lý trên phiến kính (xem 4.4). Cố định tiêu bản bằng cách để khô hoặc làm khô tiêu bản trên ngọn lửa của đèn cồn (xem 4.7).

Nhuộm tiêu bản: Tiêu bản sau khi cố định được nhuộm bằng phương pháp nhuộm Gram (Phụ lục A).

Hình thái vi khuẩn: Vi khuẩn bắt màu đỏ (gram âm), đa hình thái với dạng trực khuẩn ngắn, cầu trực khuẩn hay dạng sợi, kích thước từ 1 μm đến 3 μm x từ 0,4 μm đến 0,8 μm .

5.2.3.2 Kiểm tra các đặc tính sinh hóa

Kiểm tra các đặc tính sinh hóa theo Bảng 1 sau:

Bảng 1 – Đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum*

Urê	Catalase	Oxidase	Manitol	Glucose	Sucrose	D-Xylose
-	-	-	+	+	+	+

Phương pháp tiến hành, theo Phụ lục B.

5.2.3.3 Xác định vi khuẩn bằng phương pháp PCR

Sử dụng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Cặp mồi đặc hiệu cho *Avibacterium paragallinarum*

Tên mồi	Trình tự từ đầu 5' tới 3'	Kích thước sản phẩm	Chu trình nhiệt
N1	TgA ggg TAg TCT TgC ACg CgA AT	500 bp	94 °C, 10 min; Chu trình 30 vòng: (94 °C, 25 s; 55 °C, 50 s; 72 °C, 40 s) 72 °C trong 7 min. Giữ ở 4 °C
R1	CAA ggT ATC gAT CgT CTC TCT ACT		

Tiến hành phản ứng PCR theo Phụ lục C.

6 Kết luận

Gà được xác định là mắc bệnh phù đầu khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình của bệnh và phân lập được vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* 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
Iod 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 Cồn 95 %

A.2 Cách tiến hành

- Nhỏ dung dịch tím tinh thể lên tiêu bản: từ 1 min đến 2 min
- Rửa nước nhanh, để khô
- Nhỏ dung dịch lugol, để 1min
- Rửa nước nhanh, để khô
- Nhỏ cồn 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 soi kính 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 *Avibacterium paragallinarum***B.1 Khả năng phân giải urê**

- Sử dụng môi trường urê cơ bản (xem 3.4) (pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất) có bổ sung thêm 1% huyết thanh gà, β -NAD nồng độ cuối cùng là 5 μ M và urê nồng độ cuối cùng là 20%.
- Dùng que cấy (xem 4.5) lấy khuẩn lạc từ thạch máu hoặc thạch sô-cô-la trong mục 5.2.2 cấy vào môi trường có urê, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1), đọc kết quả sau 24 h.
- + Phản ứng dương tính: Môi trường có màu hồng.
- + Phản ứng âm tính: Môi trường không thay đổi màu.

B.2 Phản ứng oxidaza

Phản ứng được tiến hành trên giấy có tẩm dung dịch 1 % Tetramethyl-P. phenylene diamin hydrochloride. Dùng que cấy (xem 4.5) lấy khuẩn lạc từ môi trường thạch máu hoặc thạch sô-cô-la trong mục 5.2.2 chà sát lên trên mặt giấy. Phản ứng dương tính khi xuất hiện màu đen tím sau 30 s. Phản ứng âm tính khi giấy tẩm giữ nguyên màu.

B.3 Phản ứng catalaza

Dùng que cấy (xem 4.5) lấy khuẩn lạc từ môi trường thạch máu hoặc thạch sô-cô-la trong mục 5.2.2 đặt lên một điểm trên phiến kính (xem 4.4). Nhỏ một giọt dung dịch H_2O_2 3 % lên khuẩn lạc trên phiến kính (xem 4.4). Phản ứng dương tính khi thấy có hiện tượng sủi bọt sau vài giây. Phản ứng âm tính khi không có hiện tượng sủi bọt.

B.4 Lên men đường

- Chuẩn bị môi trường TSB-đường:

Pha môi trường TSB (xem 3.3) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bổ sung 1% chỉ thị màu phenol red 0,2%, 1% NaCl (g/v). Chỉnh pH môi trường ở $6,8 \pm 0,2$, hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.2) ở 121 °C trong 15 min. Để nguội đến 45 °C, rồi bổ sung 1 % β -NAD, 1 % huyết thanh gà. Chia môi trường ra các ống nghiệm (xem 4.10), mỗi ống nghiệm khoảng 4 ml.

Chuẩn bị đường: Pha các loại đường thành dung dịch 10 %, hấp tiệt trùng trong nồi hấp (xem 4.2) 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 (xem 4.8).

Thêm 0,4 ml dung dịch đường 10 % vào ống chứa 4 ml môi trường TSB.

– Tiến hành: Dùng que cấy (xem 4.5) lấy khuẩn lạc từ thạch máu hoặc thạch sô-cô-la trong mục 5.2.2 cấy vào các ống môi trường TSB-đường ở phần trên, nuôi trong tủ ấm (xem 4.1) sau 24 h đọc kết quả.

+ Phản ứng âm tính: môi trường không thay đổi màu.

+ Phản ứng dương tính: môi trường chuyển màu vàng.

Phụ lục C

(Quy định)

Phát hiện vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* 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 *Avibacterium paragallinarum* đã nuôi cấy thuần khiết trên thạch máu (xem 3.1) có cấy kèm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* hay thạch sô-cô-la (xem 3.2) được để ở tủ ấm (xem 4.1) trong 24 h.

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

C.3 Tách chiết DNA

Các vi khuẩn phân lập được từ mẫu bệnh phẩm và các mẫu đối chứng dương được tách chiết DNA bằng các kit thương mại hay 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. Đun huyền dịch trong máy ổn nhiệt khô (xem 4.11) trong 10 min rồi làm lạnh nhanh huyền dịch trong đá lạnh trong 5 min. Ly tâm huyền dịch với gia tốc 12000 g trong 4 min. Thu hoạch phần nước trong phía trên để thực hiện phản ứng PCR.

C.4 Phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi và chu trình nhiệt được nêu trong Bảng 2, chuẩn bị mồi ở nồng độ 20 μM . 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
Tổng thể tích	25 μl

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

Đối chứng âm: Gồm đầy đủ các 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]. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne, L.K. NoLan, 2008. *Diseases of poultry*, 789-803.
 - [2]. Chen, X., Miflin, J. K., Zhang, P. & Blackall, P. J. (1996). *Development and application of DNA probes and PCR tests for Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 40, 398-407.
 - [3]. X. Chen, Q. Chen, P. Zhang, W. Feng, P.J. Blackall. *Evaluation of a PCR test for the detection of Haemophilus paragallinarum in China*. *Avian Pathology* Volume 27, Issue 3, 1998
 - [4]. Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. *Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza*. *Avian Pathol.* 1998;27(6):618-24.
 - [5]. Blackall PJ. *Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options*. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):627-32. Review.
 - [6]. P.J.Quin, M.E.Cater, B. Markey, G.R.Cater, 1994. *Clinical veterinary microbiology*, 273-277.
 - [7]. D de B Welchman, S A King, P Wragg, A M Wood, R M Irvine, W J Pepper, R Dijkman, J J de Wit. *Infectious coryza in chickens in Great Britain*. *The Veterinary record* 12/2010; 167(23):912-3
 - [8]. Viện Thú y quốc gia - Jica, 2002. *Cẩm nang chẩn đoán tiêu chuẩn về các bệnh gia súc ở Việt Nam*, 182-183.
-