

TCVN 5154:2009

Xuất bản lần 2

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI
– PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *BACILLUS ANTHRACIS***

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Detection of Bacillus anthracis

Lời nói đầu

TCVN 5154:2009 thay thế TCVN 5154-90;

TCVN 5154:2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F8
Thịt và sản phẩm thịt biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện *Bacillus anthracis*

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Detection of *Bacillus anthracis**

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 qui định phương pháp phát hiện *Bacillus anthracis* trong thịt, sản phẩm thịt, các sản phẩm từ động vật và thức ăn chăn nuôi.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507-2:2005 (ISO 6887-2:2003) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyễn phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1**Bacillus anthracis (Bacillus anthracis)**

Trục khuẩn hình gậy, to, hai đầu vuông, Gram (+), không di động, kích thước từ $1\mu\text{m}$ đến $1.2\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$, thường kết hợp thành từng chuỗi dài trong môi trường nuôi cấy nhân tạo hoặc thành đôi/chuỗi ngắn nếu làm tiêu bản từ bệnh phẩm tự nhiên, nhạy cảm với gamma-thực khuẩn thể và penixilin. Sau khi tiếp xúc với không khí và ở giai đoạn cuối của sự phát triển trong mỗi tế bào hình thành nha bào hình bầu dục. Nha bào nằm ở giữa thân và không làm biến dạng vi khuẩn.

Vi khuẩn *B. anthracis* ở trong mô bị nhiễm bệnh thường hình thành giáp mô, nhưng tính chất này mất đi trong nuôi cấy hiểu khí nhân tạo. Giáp mô có thể hình thành khi nuôi cấy ít nhất 5 h trong môi trường bổ sung máu ngựa hoặc cùu đã tách fibrin hoặc ria cấy trên thạch dinh dưỡng chứa 0,7 % natri bicacbonat ở 37°C với sự có mặt của CO_2 .

3.2**Phát hiện *Bacillus anthracis* (detection of *Bacillus anthracis*)**

Xác định sự có mặt hay không có mặt của *Bacillus anthracis* trong một lượng sản phẩm cụ thể, khi tiến hành phép thử theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

Bacillus anthracis được phân lập rồi nhận dạng hình thể và giáp mô sau đó thử khẳng định bằng cách tiêm động vật thí nghiệm hoặc bằng phản ứng lắc cặn (phản ứng Ascoli).

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử**5.1 Yêu cầu chung**

Về thực hành trong phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

5.2 Môi trường canh thang dinh dưỡng

Xem C.1.

5.3 Môi trường thạch dinh dưỡng, thạch dinh dưỡng bổ sung 0,7 % natri bicacbonat

Xem C.2.

5.4 Môi trường thạch máu

Xem C.3.

5.5 Huyết thanh lắc cặn (kháng thể chuẩn), kháng nguyên âm tính chuẩn và kháng nguyên dương tính chuẩn (vaccine Sterne)

Kháng thể chuẩn được chuẩn bị từ thỏ bằng cách tiêm vaccine Sterne dưới da vào ngày thứ nhất và ngày thứ 14.

5.6 Nước muối đăng thương

Xem C.4.

5.6 Thuốc nhuộm gram

Xem C.5.

5.6 Thuốc nhuộm Wright

Xem C.6.

6 Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)] và cụ thể như sau:

6.1 Nồi cách thuỷ, có thể duy trì ở nhiệt độ ở 65 °C.

6.2 Que cấy vòng vô trùng, bằng platin/iridi hoặc nikten/crom hoặc bằng chất dẻo, đường kính khoảng 3 mm và vòng cấy cùng chất liệu, hoặc đũa thuỷ tinh hoặc chất dẻo.

6.3 Dao mổ, kéo cắt, vô trùng.

6.4 Phiến kính, vô trùng.

6.5 Dụng cụ nghiên phòng thử nghiệm.

6.6 Kính hiển vi có vật kính nhúng dầu.

6.7 Ống nuôi cấy có kích thước 18 mm x 180 mm và 9 mm x 180 mm, các ống phân giải huyết có kích thước 13 mm x 75 mm, các bình và/hoặc chai có dung tích thích hợp và có nắp đậy bằng kim loại không độc.

6.8 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.9 Cân.

6.10 Giấy lọc.

6.11 Pipet chia độ xả hết, dung tích danh định 1 ml và 10 ml được chia độ đến 0,1 ml, có lỗ xả rộng và pipet Pasteur.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 7925:2008 (ISO 17604:2003) và các tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

Điều quan trọng là mẫu phòng thử nghiệm nhận được phải đúng là mẫu đại diện và mẫu không bị thay đổi hoặc thay đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Nguyên tắc chung

Chuẩn bị mẫu thử, huyển phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật theo TCVN 6507-2:2005 (ISO 6887-2:2003).

8.2 Chuẩn bị mẫu các sản phẩm cụ thể

8.2.1 Sản phẩm tươi sống

Đối với mẫu thử là hạch thì bổ đôi hạch, còn các mẫu thử khác thì dùng dao mổ (6.3) đã hơ nóng trên ngọn lửa, áp nhanh lên mặt (chỗ có bệnh tích), trích sâu mũi dao vào vùng đã xử lý, dùng que cấy (6.2) lấy mẫu.

8.2.2 Sản phẩm khác (kể cả sừng, rơm, cỏ)

Cân từ 5 g đến 10 g mẫu thử, cắt hoặc nghiền vụn thành mảnh, hạt nhỏ, ngâm trong 5 phần đến 10 phần nước muối đẳng trương vô khuẩn (5.6), để trong nhiệt độ phòng từ 4 h đến 5 h và cứ sau 30 min thì lắc nhẹ trong 2 min đến 3 min. Thu lấy lớp nước trong. Nếu nghi ngờ bị nhiễm tạp khuẩn thì đun nóng trên nồi cách thủy ở 65 °C (6.1) trong 15 min đến 30 min.

CHÚ THÍCH Có thể dùng que tăm bông ướt vô khuẩn quét trên mặt mẫu thử (ở các vị trí khác nhau và cả hai mặt) rồi chuyển tăm bông vào bình đã đựng sẵn từ 20 ml đến 50 ml môi trường nước thịt, ủ ở 37 °C trong 24 h.

9 Cách tiến hành

9.1 Yêu cầu chung

Dụng cụ, môi trường, thao tác phải vô khuẩn, đảm bảo an toàn, không gây ô nhiễm. Thực hiện trong phòng thử nghiệm thông thường, xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

9.2 Ủ và cấy

Sử dụng que cấy vòng vô trùng hoặc tăm bông (6.2) ria cấy dung dịch huyền phù ban đầu hoặc mẫu máu, dịch lấy từ vết rách của mỏ hoặc phủ tạng lên môi trường thạch dinh dưỡng và thạch máu (5.3 và 5.4), mỗi loại hai đĩa. Cho vào môi trường polymyxin (100 000 UI/l) để giảm sự nhiễm khuẩn và giúp phân lập được *B. anthracis*.

9.3 Nhận dạng *B. anthracis*

Ủ các đĩa đã cấy ở 37 °C qua đêm để phát hiện sự có mặt các khuẩn lạc *B. anthracis* giả định theo các đặc trưng của chúng. Tiến hành nhuộm Gram và Wright.

Giáp mô là yếu tố độc lực của vi khuẩn, có tác dụng ngăn cản khả năng thực bào; chỉ được hình thành trong cơ thể gia súc bị bệnh, đặc tính này có thể mất đi nếu nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nhân tạo ở điều kiện hiếu khí. Giáp mô được sinh ra khi nuôi cấy vi khuẩn *B. anthracis* có độc lực ít nhất 5 h trong môi trường máu ngựa đã tách fibrin hoặc môi trường có bổ sung natri bicacbonat 0,7 % (5.3) ở nhiệt độ 37 °C có bổ sung khí CO₂ 20 %. Vi khuẩn *B. anthracis* có giáp mô sẽ hình thành những khuẩn lạc nhầy.

CHÚ THÍCH Có thể dùng tăm bông ướt vô trùng quét lên mặt mẫu thử (ở các vị trí khác nhau và cả hai mặt) rồi chuyển tăm bông vào bình chứa 20 ml đến 50ml canh thang dinh dưỡng (5.2), ủ ở 37 °C trong 24 h.

Trên môi trường thạch dinh dưỡng hay thạch máu (5.3): hình thành khuẩn lạc mờ, khá phẳng, gần giống *B. cereus* nhưng kích thước nhỏ hơn, khoảng từ 0,3 cm đến 0,5 cm, nhầy và dính hơn, trên thạch máu có màu trắng xám hoặc xám và rìa mép khuẩn lạc thường hình thành các sợi dài giống như sợi tóc xoăn.

Ria cấy trên môi trường thạch máu, thạch dinh dưỡng, mỗi loại 2 đĩa, ủ ở 37 °C trong 24 h, đọc kết quả và làm đồ phiến nhuộm Gram, Wright.

Khuẩn lạc *B. anthracis* điển hình cho thấy có dạng hình tròn, to, màu trắng đục, ướt nhầy, rìa mép nhăn nheo. Qua kính hiển vi (6.6) thấy hình sóng, chung quanh có nếp xoăn như tóc uốn, không tan máu. Trên lam kính, vi khuẩn có nha bào hình bầu dục ở giữa thân.

Chọn những khuẩn lạc điển hình ở trên, cấy truyền sang môi trường nước thịt, ủ ở 37 °C trong 18 h đến 24 h; đọc kết quả và làm đồ phiến nhuộm Gram, Wright kiểm tra tính thuần khiết. Trong nước sẽ có những sợi xốp như bông, màu trắng đục, sau lắng xuống đáy ống, phần nước phía trên trong. Nếu có lẫn tạp khuẩn thì ria cấy lại trên môi trường thạch.

9.4 Thủ khảng định bằng cách tiêm động vật thí nghiệm

Mỗi mẫu thử dùng 2 chuột nhắt trắng, nặng từ 18 g đến 20 g. Tiêm dưới da bụng con chuột 0,1 ml dịch cấy trong 9.2.

Thông thường sau 12 h đến 24 h, chuột có triệu chứng ủ rũ, lunge còng, lồng xù lên và chết sau 24 h đến 96 h; bệnh tích xuất hiện dưới da và thủy thũng vùng tiêm, lách sưng. Nếu cần, kiểm tra lại hình dạng vi khuẩn, đặc tính sinh trưởng và thử phản ứng lắc cặn (phản ứng Ascoli).

CHÚ THÍCH 1 Có thể dùng huyền dịch mẫu thử (từ 1:5 đến 1:10) với liều tiêm gấp đôi thay cho canh trùng.

CHÚ THÍCH 2 Nếu mẫu thử nghi ngờ bị nhiễm tạp khuẩn thì dùng phương pháp rạch da chuột, xát mẫu thử hoặc canh khuẩn lên chỗ rạch thay cho tiêm dưới da.

CHÚ THÍCH 3 Những lô chuột chết do tiêm mẫu nước, rơm, cỏ cần thử phản ứng lắc cặn (phản ứng Ascoli).

9.5 Thủ khảng định bằng phản ứng lắc cặn (phản ứng Ascoli)

9.5.1 Chuẩn bị mẫu thử (kháng nguyên)

9.5.1.1 Sản phẩm tươi sống

Dùng cân (6.9) cân từ 5 g đến 10 g mẫu, nghiền nhuyễn mẫu bằng dụng cụ nghiền phòng thử nghiệm (6.5), pha loãng bằng nước muối đẳng trương (5.6) thành dung dịch 1:5 đến 1:10. Đun sôi cách thủy từ 15 min đến 30 min. Lọc qua giấy lọc (6.10) thu lấy dịch trong.

9.5.1.2 Sản phẩm khác (các sản phẩm khác của động vật)

Dùng cân (6.9) cân từ 5 g đến 10 g xương, sừng, lông hoặc 15 cm^2 đến 25 cm^2 da, hấp ướt ở 102°C trong 30 min đến 60 min; để nguội cắt nhỏ hoặc nghiền vụn, hòa trộn trong 5 phần đến 10 phần nước muối đẳng trương (5.6). Đun sôi cách thủy từ 15 min đến 30 min. Lọc qua giấy lọc (6.10), thu lấy phần dịch trong.

9.5.2 Cách tiến hành

Trong ống nghiệm cỡ nhỏ hoặc ống nghiệm chuyên dụng đã chứa sẵn 0,5 ml huyết thanh lắc cặn (5.5); dùng pipet Pasteur (6.11) lấy 0,5 ml kháng nguyên (9.5.1), nhỏ từ từ theo thành ống để kháng nguyên không bị hòa tan trong huyết thanh, có đường ranh giới rõ rệt. Mỗi lần kiểm nghiệm cần kèm theo 2 ống đối chứng dương tính và âm tính.

Đọc kết quả sau 1 min đến 15 min. Nếu đường ranh giới xuất hiện vòng trắng đục chứng tỏ kết quả dương tính.

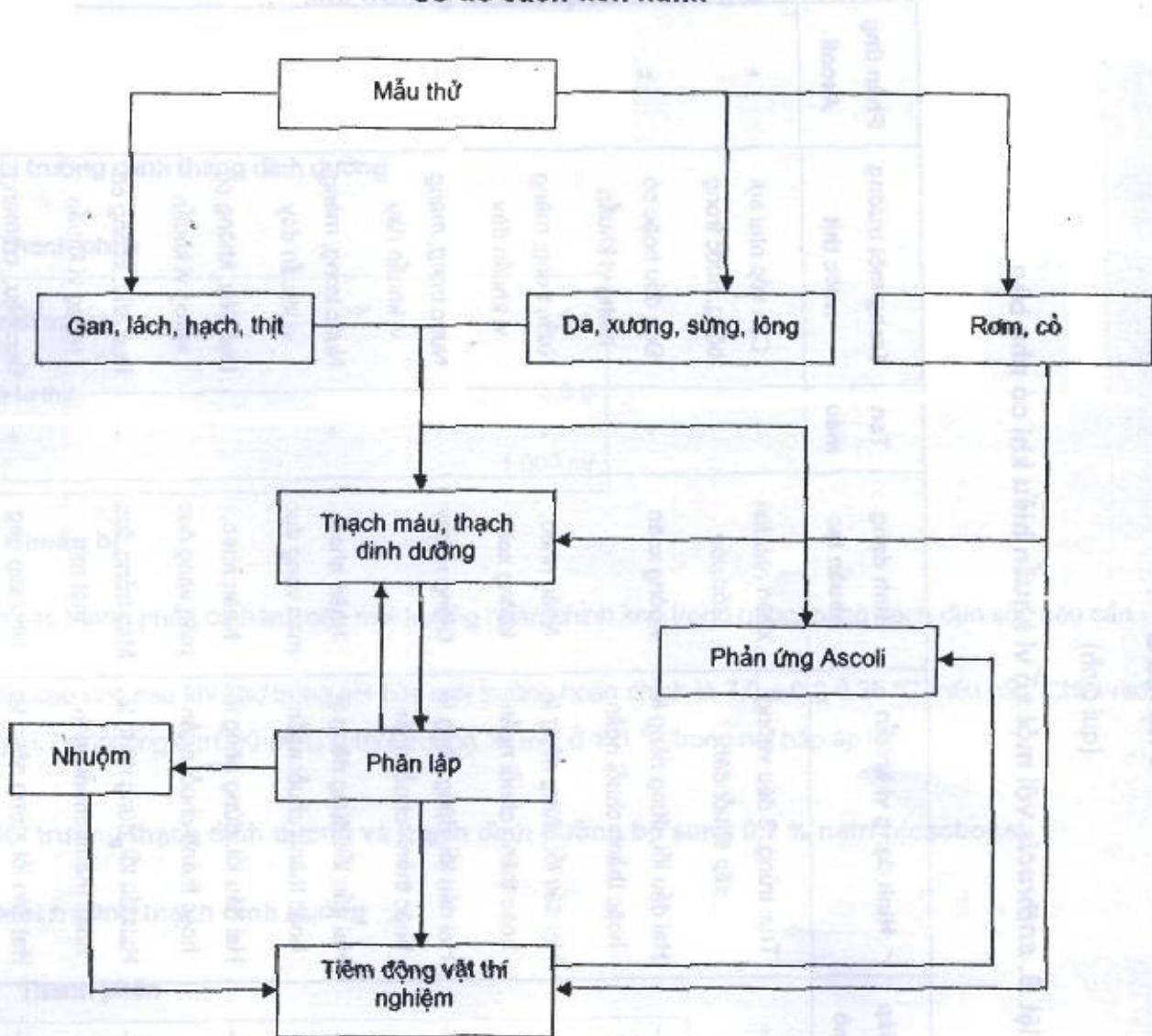
10 Diễn giải kết quả

10.1 Diễn giải kết quả theo Điều 9.

10.2 Nếu chỉ thử bằng phản ứng lắc cặn thì tùy theo kết quả phản ứng Ascoli để ghi lại là âm tính hoặc dương tính.

Phụ lục A

(qui định)

Sơ đồ cách tiến hành

Phụ lục B

(qui định)

Phân biệt *B. anthracis* với một số vi khuẩn hiếu khí có nha bào

Vi khuẩn	Di động	Giáp mô	Hình dạng vi khuẩn	Hình dạng khuẩn lạc	Tan máu	Trong môi trường nước thịt	Phản ứng Ascoli
<i>B. anthracis</i>	-	+	Trục trùng, 2 đầu vuông, xếp chuỗi dài	Xoăn như lòn tóc uốn	-	Cặn xốp như sợi bông, nước trong	+
<i>B. anthracoides</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Không xoắn	+	Đục đều hoặc có màng vi khuẩn	±
<i>B. subtilis</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Nhăn nheo, không xoắn	+	Nước trong, màng vi khuẩn dày	-
<i>B. mycoides</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Giống rễ cây	-	Nước trong, màng vi khuẩn dày	-
<i>B. vulgaris</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Nhăn nheo, màu vàng đục	+	Nước trong, màng vi khuẩn dày	-
<i>B. mesentericus</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Nhăn nheo, màu vàng đục		Đục đều, không có màng vi khuẩn	-
<i>B. megatherium</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Màu trắng đục, mặt mịn	+	Đục đều, không có màng vi khuẩn	-
<i>B. cereus</i>	+	-	Hai đầu lồi, đứng riêng lẻ hoặc thành chuỗi ngắn	Như sáp ong	+	Đục đều, có màng vi khuẩn	-

Phụ lục C

(qui định)

c. Nghiệm Gram

ng định hình tính

Thành phần**Môi trường nuôi cấy và thuốc thử****C.1 Môi trường canh thang dinh dưỡng****C.1.1 Thành phần**

Dịch chiết thịt bò	3,0 g
Pepton từ thịt	5,0 g
Nước	1 000 ml

C.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun sôi, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH của môi trường hoàn chỉnh là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần. Chia vào các ống (6.7) mỗi ống 5 ml. Khử trùng môi trường 15 min ở 121°C trong nồi hấp áp lực.**C.2 Môi trường thạch dinh dưỡng và thạch dinh dưỡng bổ sung 0,7 % natri bicacbonat****C.2.1 Môi trường thạch dinh dưỡng****C.2.1.1 Thành phần**

Canh thang dinh dưỡng (C.1)	1 000 ml
Thạch	18 g đến 20 g

C.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun sôi, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH của môi trường hoàn chỉnh là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần. Chia vào các đĩa petri (6.8), mỗi đĩa 15 ml đến 20 ml hoặc vào các ống (6.7), mỗi ống 5 ml, để ống nằm nghiêng. Khử trùng môi trường 15 min ở 121°C trong nồi hấp áp lực.

C.2.2 Thạch dinh dưỡng bổ sung 0,7 % natri bicacbonat

(tín hiệu lặp)

C.2.2.1 Thành phần

Dịch chiết thịt bò	3,0 g
Pepton từ thịt	5,0 g
Thạch	12,0 g đến 15,0 g
Natri bicacbonat (7 %)	100 ml
Nước	900 ml

C.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong 900 ml nước, bằng cách đun sôi, khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở 121 °C, giữ ở 50 °C trong nồi cách thuỷ (6.1), cho thêm 100 ml dung dịch natri bicacbonat 7 % đã qua 2 lần lọc vô trùng (qua màng lọc cỡ lỗ 0,22 µm đến 0,45 µm). Trộn đều hỗn hợp này rồi đổ vào các đĩa petri (6.8) mỗi đĩa từ 15 ml đến 20 ml.

C.3 Môi trường thạch máu**C.3.1 Thành phần**

Môi trường thạch dinh dưỡng (C.2.1)	100 ml
Máu thỏ hay máu cừu vô khuẩn (đã khử fibrin)	10 ml

C.3.2 Chuẩn bị

Đun nóng cho tan môi trường thạch. Khi nhiệt độ xuống còn 45 °C, cho máy vào trộn đều, chia vào các đĩa vô khuẩn, mỗi đĩa từ 15 ml đến 20 ml.

C.4 Nước muối đăng trưng**C.4.1 Thành phần**

Natri clorua	8,5 g
Nước cất	1 000 ml

C.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan natri clorua. Hấp ở 121 °C trong 20 min.

C.5 Thuốc nhuộm Gram

C.5.1 Dung dịch tím tinh thể

C.5.1.1 Thành phần

Tím tinh thể	2 g
Etanol 95 %	20 ml

C.5.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan 2 g tím tinh thể trong 20 ml etanol 95 %.

C.5.2 Dung dịch amoni oxalat

C.5.2.1 Thành phần

Amoni oxalat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,8 g
Nước cất	80 ml

C.5.2.1 Chuẩn bị

Hoà 0,8 g amoni oxalat vào 80 ml nước cất.

Trộn hỗn hợp các dung dịch tím và amoni oxalat. Sau 24 h, lọc dung dịch qua giấy lọc và bảo dung dịch quản tránh ánh sáng.

C.5.3 Dung dịch iốt

C.5.3.1 Thành phần

Iốt	1,0 g
Kali iodua (KI)	2,0 g
Nước cất	300 ml

C.5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan kali iodua trong 5 ml nước. Thêm iốt, lắc mạnh cho tan, sau đó bổ sung phần nước còn lại. Bảo quản dung dịch tránh ánh sáng.

C.5.4 Dung dịch safranin bổ sung 0,2% natri borat

Để rửa mè ralojo gnu 1.6.3

C.5.4.1 Thành phần

Safranin	0,25 g
Etanol 95 %	10 ml
Nước cất	90 ml

C.5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan safranin trong etanol. Thêm nước cất, lắc mạnh cho tan. Bảo quản dung dịch tránh ánh sáng.

C.5.5 Dung dịch tẩy màu: Etanol 95 %

C.6 Thuốc nhuộm Wright

C.6.1 Thành phần

Bột nhuộm Wright	0,1 g
Glyxerin lỏng thuần khiết	1,0 ml
Metanol (CH_3OH)	60 ml

C.6.2 Chuẩn bị

Nghiền nhuyễn bột nhuộm Wright cùng với glyxerin, rồi bổ sung metanol. Sau một tuần, lọc dung dịch qua giấy lọc và bảo quản tránh ánh sáng.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7925:2008 (ISO 17604:2003) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu thân thịt để phân tích vi sinh.

WHO/EMC/ZDI/98.6

- [2] Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals, 6. Bacteriology; Appendix I-Methods; Appendix II-Media and Reagents.

- [3] OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, chapter 2.2.2 ANTHRAX.