

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

10TCN

TIÊU CHUẨN NGÀNH

10 TCN 732-2006

THỊT VÀ CÁC SẢN PHẨM CỦA THỊT-PHÁT HIỆN

LISTERIA MONOCYTOGENES

THỊT VÀ CÁC SẢN PHẨM CỦA THỊT-PHÁT HIỆN LISTERIA MONOCYTOGENES

(*Meat and meat products - Detection of Listeria monocytogenes*)

(Ban hành kèm theo Quyết định số QĐ/BNN-KHCN
ngày tháng 6 năm 2006 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

1. Phạm vi áp dụng:

Qui trình này để phát hiện *Listeria monocytogenes* trong thịt và sản phẩm của thịt.

2. Định nghĩa:

Listeria monocytogenes là loại vi sinh vật nguy hiểm, gây bệnh cho người và động vật. *L. monocytogenes* là vi khuẩn hình que, gram dương, chịu lạnh và không sinh nha bào phát triển tốt ở môi trường nghèo oxy. Các phản ứng sinh hoá đặc trưng cho *L. monocytogenes* là: phản ứng catalase và VP dương tính, oxidase âm tính, di động, thủy phân aesculin, lên men đường rhamnose, nhưng không lên men đường xylose và mannitol.

3. Thiết bị, dụng cụ thủy tinh và giống vi khuẩn

3.1. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

3.1.1. Tủ lạnh

3.1.2 Tủ sấy

3.1.3. Tủ ấm

3.1.4. Máy đồng nhất mẫu (Stomacher)

3.1.5. Máy trộn tốc độ cao (Vortex)

3.1.6. Nồi hấp cách thủy

3.1.7. Nồi hấp áp lực

3.1.8. Máy đo pH

3.1.9. Kính hiển vi

3.1.10. Bộ gương, đèn chiếu và giá 3 chân

3.1.11. Que cấy vòng (đường kính 3-4mm) và kim cấy

3.1.12. Đèn cồn

3.1.13. Dụng cụ thủy tinh

Bình thủy tinh 1000ml, 500ml và 200ml

Ống đong

Pipet các loại 25ml, 10ml, 5ml và 1ml, được chia vạch 0,5ml và 0,1ml

Ống nghiệm 13x100mm và 16x125mm

Đĩa petri tiệt trùng

Phiến kính soi tiêu bản

3.2. Giống vi khuẩn

Chủng *L. monocytogenes* chuẩn để làm chứng dương

Chủng *Staphylococcus aureus* và chủng *Rhodococcus equi* (để sử dụng trong phản ứng CAMP).

Bảo quản các giống gốc *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* và *L. innocua* bằng cách nuôi cấy trên môi trường TSA-YE (4.2.). Nuôi giống ở 37°C từ 24-48h, bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C. Cấy chuyển hàng tuần và để không quá 42 tuần.

4. Môi trường nuôi cấy và thuốc thử (xem phần phụ lục)

4.1. Canh thang Trypticase đậu tương có bổ sung 0,6% cao men (Trypticase soy broth with 0,6% Yeast Extract-TSB-YE)

4.2. Thạch Trypticase đậu tương có bổ sung 0,6% cao men (Trypticase soy agar with 0,6% Yeast Extract-TSA-YE)

4.3. Thạch Oxford

4.4. Thạch máu

4.5. Thuốc nhuộm gram

4.6. Môi trường kiểm tra đặc tính di động

4.7. Môi trường và thuốc thử phản ứng Voges-Proskauer (VP)

4.8. Canh thang kiểm tra sự lên men đường

4.9. Môi trường của phép thử CAMP

4.10. Thuốc thử của phản ứng catalase

4.11. Thuốc thử của phản ứng oxidase

5. Lấy mẫu

Theo TCVN 4833 - 2002

6. Cách tiến hành

Tiến hành nuôi cấy chủng chuẩn *L. monocytogenes* tuần tự theo qui trình nuôi cấy mẫu để kiểm tra chất lượng môi trường và phương pháp.

6.1. Tăng sinh

6.1.1. Cấy vào môi trường tăng sinh

Cân 25g thịt hoặc sản phẩm thịt đã được nghiền nhỏ vào bình chứa 225ml môi trường tăng sinh TSB-YE (4.1.5) và lắc đều.

6.1.2. Nuôi ấm

Để môi trường tăng sinh đã cấy mẫu vào tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

6.2. Nuôi cấy phân lập

Dùng que cấy vòng, ria cấy canh trùng (6.1.2) lên bề mặt đĩa thạch Oxford (4.3.). Đặt các đĩa thạch vào tủ ấm ở 37°C trong 48 giờ.

6.3. Quan sát khuẩn lạc bằng chùm tia sáng trắng

Từ mỗi đĩa môi trường phân lập thạch Oxford (6.2.) chọn 5 khuẩn lạc điển hình, ria cấy lên bề mặt đĩa thạch TSA-YE (4.2), sao cho các khuẩn lạc mọc riêng rẽ. Đặt các đĩa thạch này trong tủ ấm ở 37°C trong 24-48 giờ. Dùng chùm tia sáng trắng (3.1.10) để kiểm tra các đĩa thạch đã cấy mẫu, rồi tới đáy của đĩa thạch tạo góc 45°C (xem hình 1 phần phụ lục). Khi kiểm tra các khuẩn lạc dưới ánh sáng truyền qua (độ rọi henry), các khuẩn lạc *Listeria ssp* có màu xanh lam và bề mặt có dạng hạt.

6.4. Khảo định vi khuẩn

6.4.1. Đánh giá vi khuẩn học

* Quan sát dưới kính hiển vi

Chọn 1 khuẩn lạc điển hình cấy vào một ống nghiệm chứa môi trường TSB-YE. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 20-25°C cho đến khi thấy màu đục rõ (từ 8h-24h). Dùng que cấy, lấy một vòng đầy canh khuẩn (10 l) và kiểm tra dưới kính hiển vi. Vi khuẩn *Listeria ssp* xuất hiện thưa, dạng que ngắn có chuyển động quay nhẹ hoặc hỗn loạn.

* Nhuộm gram

Lấy một khuẩn lạc điển hình trên môi trường TSA-YE (6.3.) để nhuộm gram. Quá trình nhuộm tiến hành trong vòng 3-4 phút, rồi đọc kết quả. *Listeria ssp* bắt màu tím, nên là vi khuẩn gram dương.

6.4.2 Khảo định bằng các phản ứng sinh hoá

* Kiểm tra đặc tính di động

Dùng que cấy chọn một khuẩn lạc điển hình trên môi trường TSA-YE (6.3.) cấy trích sâu vào môi trường di động (4.6.), nuôi ở 25°C trong 48h. *Listeria ssp* là loại vi khuẩn di động, có kiểu mọc giống như hình chiếc ô rất đặc thù. Nếu kết quả âm tính nên nuôi thêm 5 ngày nữa.

* Phản ứng catalaza

Lấy một khuẩn lạc điển hình trên môi trường TSA-YE (6.3) hoà vào một giọt dung dịch hydro peroxit 3% trên phiến kính. Đọc kết quả trong vòng 1 phút, khi thấy có tạo bọt khí chứng tỏ là phản ứng dương tính.

* Thử phản ứng oxidase

Nhỏ thuốc thử oxidase, đọc kết quả trong vòng 1 phút, nếu phản ứng dương tính khuẩn lạc biến đổi sang màu hồng và chuyển dần sang màu tím. Khuẩn lạc không đổi màu là phản ứng âm tính. *L. monocytogenes* có phản ứng oxidase âm tính.

* Phản ứng VP

Lấy đầy 1 vòng que cấy canh khuẩn (10 l) cấy chuyển vào môi trường VP (4.7.1) và để ở 35°C trong 48 h. Sau đó lấy 1ml canh khuẩn cho vào ống nghiệm kích thước 16x125 mm và thêm vào 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml potassium hydroxide 40% (4.7.2). Lắc đều và thêm vào một vài tinh thể creatine (4.7.3). Để tại nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 1 giờ. Phản ứng dương tính khi có màu hồng hoặc màu tím xuất hiện.

* Đặc tính dung huyết

Làm khô bề mặt thạch máu (4.4) trước khi sử dụng. Vạch 20-25 ô hình lưới trên đáy đĩa thạch máu. Dùng kim cấy lấy khuẩn lạc điển hình trên đĩa TSA-YE chấm vào các ô, mỗi ô 1 khuẩn lạc. Đồng thời chấm các chủng kiểm tra dương tính và âm tính (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* và *L. innocua*) vào các ô đối chứng. Sau khi nuôi ấm ở 35°C trong 48h, kiểm tra các chủng từ mẫu thử chuẩn. *L. monocytogenes* tạo nên vùng sáng, trong và hẹp xung quanh vết cấy (kiểu dung huyết ò). So sánh các chủng xét nghiệm với chủng chuẩn.

* Thử đặc tính lên men đường (xem bảng 1)

Lấy 0,1ml từ canh trùng TSB-YE (6.1.2) vào mỗi ống canh thang đường (4.8), nuôi mẫu ở 35°C. Phản ứng dương tính, môi trường chuyển sang màu vàng. Phần lớn sự chuyển màu của môi trường xảy ra trong vòng từ 24-48h.

* Phép thử CAMP

Ria cấy các chủng *S. aureus* và *R. equi* thành những vạch đơn ngang trên mặt đĩa thạch máu (4.4 hoặc 4.9), 2 vết cấy này phải song song và cân đối nhau trên đĩa. Vết cấy phải mảnh và đều được thực hiện bằng cách giữ kim cấy hoặc vòng cấy vuông góc với mặt thạch. Ria cấy chủng xét nghiệm theo cách tương tự, vuông góc với các vết cấy trên sao cho chủng xét nghiệm và các chủng chuẩn trên không chạm nhau nhưng phải rất gần nhau, cách từ 1-2mm. Có thể ria cấy được một vài chủng xét nghiệm trên cùng một đĩa thạch. Đồng thời, ria cấy các chủng chuẩn làm đối chứng (chủng *L. monocytogenes* và *L. ivanovii* làm chứng dương, *L. innocua* làm chứng âm). Đặt các đĩa đã ria cấy vào tủ ấm ở 35°C và đọc kết quả sau 24h.

Gần đường cấy *S. aureus*, dải dung huyết của *L. monocytogenes* hẹp hình que diêm. Dải dung huyết của *L. ivanovii* rõ hơn gần đường cấy *R. equi*, tạo ra một quầng tan máu rộng 5-10mm hình đầu mũi tên. *L. innocua* không có hiện tượng dung huyết.

6.5. Các phản ứng khẳng định

6.5.1. Phân biệt *L. monocytogenes* với các loài *Listeria* ssp khác

Bảng 1: Phản ứng phân biệt các loài *Listeria*

Các loài <i>Listeria</i>	Lên men đường		Thử CAMP		Dung huyết ()
	Rhamnose	xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+	++

v = Phản ứng có thể thay đổi

+= Phản ứng dương tính

- = Phản ứng âm tính

6.5.2. Các tiêu chuẩn khẳng định *L. monocytogenes*

Nhuộm gram	Gram dương, hình que
Đặc tính di động	dương tính
Phản ứng catalase	dương tính
Phản ứng VP	dương tính
Phản ứng oxidase	âm tính
Lên men đường	rhamnose (+), xylose và mannitol (-)
Phản ứng CAMP với <i>S. aureus</i>	dương tính
Phản ứng CAMP với <i>R. equi</i>	âm tính

7. Biểu thị kết quả

Báo cáo sự có mặt hay không của *L. monocytogenes* trong 25 g mẫu thử.

8. Tài liệu tham khảo

8.1. FAO 1992, 14/4 Rev.1.

8.2. Microbiological method for meat industry 1991 New Zealand.

8.3. TCVN 6404: 1998 (US 7218: 1997) Vi sinh vật học - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật

8.4. TCVN 4833: 2002- Lấy mẫu thịt

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Bùi Bá Bổng

Phụ lục

4. Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

4.1. Canh thang Trypticase đậu tương có bổ sung 0,6% cao men (Trypticase soy broth with 0,6% Yeast Extract-TSB-YE)

4.1.1. Môi trường cơ bản

Thành phần:

Canh thang Trypticase đậu tương *	30,0g
Cao men	6,0g
Nước cất	1000ml

*Thành phần của canh thang Trypticase đậu tương:

Trypticase peptone	17,0g
Yoytone peptone	3,0g
Glucose	2,5g
NaCl	5,0g
K ₂ HPO ₄	2,5g

Cách pha chế:

Đun sôi để hoà tan các thành phần khô trong nước. Rót một lượng 225ml vào các bình thí nghiệm dung tích 500ml, hấp ướ ở 121°C trong 15 phút.

4.1.2. Thành phần bổ sung 1:

Thành phần

Acriflavin HCl	23,0mg
Nước cất	10,0ml

Cách pha chế:

Hoà tan Acriflavin hydroclorua trong nước. Lọc qua màng lọc vi khuẩn để khử trùng. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, trung tính.

4.1.3. Thành phần bổ sung 2:

Thành phần:

Axít nalidixic	46,0mg
----------------	--------