

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 5274:2010

BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN BỆNH NHIỆT THÁN

Animal disease – Diagnostic procedure for anthrax

Lời nói đầu

TCVN 5274:2010 thay thế TCVN 5274:1990;

TCVN 5274:2010 do 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 BỆNH NHIỆT THÁN

Animal disease – Diagnostic procedure for anthrax

CẢNH BÁO: Bệnh nhiệt thán là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm giữa người và động vật. 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 qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh nhiệt thán trên động vật do vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây ra.

2. Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1. *Bacillus anthracis*

Trực khuẩn gram dương, hiếu khí, không di động, có hình thành giáp mô và nha bào.

2.2. Bệnh nhiệt thán (anthrax)

Bệnh nhiệt thán (bệnh than) là bệnh truyền nhiễm của nhiều loài động vật và có thể lây sang người, do vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây ra. Bệnh có thể xảy ra ở thể quá cấp tính, thứ cấp tính và ít khi xảy ra ở thể mạn tính.

3. Nguyên tắc

Căn cứ vào triệu chứng lâm sàng, hình thái vi khuẩn và đặc điểm được kết luận trên môi trường cấy, giám định khả năng miễn cảm với penicilin hoặc độc lực vi khuẩn bằng phản ứng chuỗi polyme (PCR).

4. Môi trường nuôi cấy và thuốc 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.

- Thạch
- Thạch máu
- Thạch bicarbonat

Pha 100 ml thạch vào 83 ml nước. Hấp và để nguội ở 50 °C trong nồi cách thủy. Thêm 7 ml huyết thanh ngựa hay máu ngựa (lọc vô khuẩn nếu cần) và 10 ml dung dịch natri bicarbonat 7 %

(huyết thanh ngựa, máu ngựa và natri bicarbonat nên để ở 50 °C trước khi thêm vào thạch). Lắc đều và đổ ra đĩa Petri.

- Thạch polymyxin-lysozym-EDTA-tali (I) axetat (PLET)

Hòa tan thạch BHI (thạch tim não) trong nước (lượng thạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Thêm EDTA 0,3 g/l và tali (I) axetat ($C_2H_3O_2TI$) 0,4 g/l, hấp vô trùng ở 121 °C trong 15 min. Để môi trường nguội tới 50 °C, thêm polymyxin B sulfat 30 000 UI/lít và lysozym 300 000 UI/l. Lắc đều và đổ ra đĩa Petri.

- Canh thang BHI.

- Agarosa.

- Ethidi bromua (EtBr).

- Giấy tẩm penicillin.

5. Thiết bị, dụng cụ

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

- Thiết bị điện di.

- Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ 37 °C.

- Tủ sấy.

- Buồng cấy.

- Kính hiển vi quang học.

- Tủ lạnh.

- Que cấy.

- Đĩa Petri.

- Lọ thủy tinh, dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1 000 ml.

6. Lấy mẫu

Nếu nghi gia súc mắc bệnh nhiệt thán, tuyệt đối không được mổ xác chết. Mẫu bệnh phẩm là máu, mẫu tai hoặc mẫu lách.

- Lấy mẫu máu: Sát trùng vị trí lấy mẫu bằng cồn, để khô. Dùng bơm kim tiêm vô trùng lấy mẫu ở tĩnh mạch cổ hoặc tĩnh mạch tai. Sau khi lấy máu xong, sát trùng kỹ nơi lấy máu bằng cồn.

- Lấy mẫu tai: Sát trùng vùng da tai, dùng kéo vô trùng cắt một mẫu tai (3 cm^2) rồi cho vào lọ hay ống nghiệm đầy nút kín. Sát trùng tại nơi đã cắt.

- Sinh thiết lách: Sát trùng và rạch một đường nhỏ sau cung xương sườn thứ 8 bên trái để lấy một mẫu lách.

CHÚ THÍCH: Lấy bệnh phẩm cẩn thận, tránh để mầm bệnh vương vãi ra ngoài môi trường. Vị trí lấy mẫu phải được sát trùng cẩn thận, môi trường xung quanh phải được tiêu độc khử trùng theo hướng dẫn của cơ quan chuyên môn.

Bệnh phẩm được bảo quản trong lọ vô trùng đóng kín nắp, dán nhãn, ghi rõ bệnh phẩm nghi mắc bệnh nhiệt thán.

Chuyển bệnh phẩm đến phòng thử nghiệm càng nhanh càng tốt trong điều kiện lạnh khoảng 2 °C đến 8 °C. Bệnh phẩm phải được gửi kèm theo một phiếu xét nghiệm có ghi rõ bệnh sử, triệu chứng, đặc điểm dịch tễ.

7. Cách tiến hành

7.1. Chẩn đoán lâm sàng

7.1.1. Đặc điểm dịch tễ

- Dịch bệnh thường xảy ra ở những vùng trước đó đã xuất hiện bệnh, hoặc do vận chuyển gia súc từ vùng có dịch nhiệt đới đến.
- Bệnh thường phát sinh vào mùa nóng ẩm, những tháng mưa nhiều (tháng 8, 9, tháng 10) hay cuối xuân đầu hè.
- Động vật ăn cỏ mẫn cảm nhất với bệnh. Lợn ít cảm nhiễm với bệnh hơn và thường mắc ở thể cục bộ. Người cũng dễ bị nhiễm bệnh.
- Bệnh lây lan chủ yếu qua đường tiêu hóa do ăn thức ăn, nước uống... có lẫn nha bào nhiệt đới. Bệnh cũng lây lan qua đường hô hấp hay các vết thương trên da.

7.1.2. Triệu chứng lâm sàng

7.1.2.1. Loài nhai lại

7.1.2.1.1. Thể quá cấp tính

- Thể bệnh này thường gặp ở trâu, bò. Con vật sốt cao từ 40,5 °C đến 42,5 °C, run rẩy, thở gấp, các niêm mạc đỏ ửng hay tím bầm, nghiêng răng, thè lưỡi, đầu gục xuống, mắt đỏ, đi lạng lạng, đứng không vững.
- Con vật chết nhanh sau khi xuất hiện triệu chứng từ một đến vài giờ.
- Sau khi chết, các lỗ tự nhiên (miệng, lỗ mũi, hậu môn và âm hộ) chảy máu đen và khó đông.

7.1.2.1.2. Thể cấp tính

- Con vật sốt cao từ 40 °C đến 42 °C, tim đập nhanh, thở nhanh, niêm mạc đỏ thẫm.
- Phân màu đen lẫn máu, nước tiểu lẫn máu.
- Mồm, mũi và bọt màu hồng lẫn máu.
- Hầu, ngực và bụng bị sưng, nóng.

7.1.2.1.3. Thể á cấp tính

- Con vật sốt cao, ăn ít hay bỏ ăn.
- Những chỗ da mỏng thường sưng, nóng rồi cứng lại, không đau, về sau chỗ da sưng bị loét và chảy nước hơi vàng, có lẫn ít máu.
- Niêm mạc mắt, miệng, hậu môn màu đỏ.

7.1.2.1.4. Thể ngoài da

Con vật có các ung nhiệt đới ở vùng cổ, mông, ngực... Ban đầu trên da có các vùng sưng, nóng, đau, về sau lạnh dần không đau, giữa ung nhiệt đới bị thối, có lúc thành mụn loét màu đỏ thẫm, chảy nước vàng.

7.1.2.2. Ngựa

Ngựa sốt từ 41 °C đến 42 °C, đau bụng dữ dội khó thở. Ngựa run rẩy, nước tiểu lẫn máu, phân lẫn máu và mủ. Mũi, miệng có thể chảy máu, con vật chết nhanh, sau khi chết bụng chướng to, lòi dom.

7.1.2.3. Lợn

Lợn bị sưng hầu, có khi lan xuống cả ngực, bụng, lên mặt. Chỗ sưng có màu đỏ sẫm, tím bầm. Lợn khó nuốt, khó thở, không kêu được.

7.2. Chẩn đoán trong phòng thử nghiệm

7.2.1. Xử lý mẫu

Nếu mẫu bệnh phẩm lấy từ động vật đã chết từ lâu, hay để lâu hoặc các sản phẩm từ động vật như lông, bột xương, thì phải nghiền bệnh phẩm thành huyền dịch từ 5 % đến 10%, một phần cấy vào môi trường thạch máu, nước thịt, một phần huyền dịch còn lại được làm sốc nhiệt bằng cách đun trong nồi cách thủy ở $62,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 15 min hoặc thêm vào một lượng tương đương cồn 95% đến 100% và để trong vòng 1 h.

7.2.2. Kiểm tra hình thái vi khuẩn từ bệnh phẩm

7.2.2.1. Làm tiêu bản

- Với mẫu máu: Nhỏ một giọt máu lên phiến kính sạch sau đó dàn mỏng, đều bằng phiến kính khác, để khô.

- Với mẫu da tai và lách: Cắt một miếng nhỏ mẫu phết lên phiến kính, để khô.

7.2.2.2. Cố định và nhuộm tiêu bản

Tiêu chuẩn được cố định và nhuộm Giemsa (xem Phụ lục B) hoặc nhuộm giáp mô theo phương pháp M'Fadyean (xem Phụ lục C).

Tiêu bản sau khi nhuộm được để khô và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1000X.

7.2.2.3. Kết luận

- Với tiêu bản nhuộm giemsa: vi khuẩn *B. anthracis* có dạng vi trực khuẩn, hai đầu vuông, đứng thành cặp hay tập trung thành chuỗi ngắn; kích thước (từ 1 μm đến 1,2 μm) x (từ 3 μm đến 5 μm). Giáp mô bắt màu hồng, vi khuẩn bắt đầu xanh.

- Với tiêu bản nhuộm M'Fadyean: vi khuẩn *B. anthracis* thường đứng cặp đôi hay thành chuỗi ngắn, hai đầu vuông. Giáp mô bao quanh vi khuẩn bắt màu hồng, tế bào vi khuẩn bắt màu xanh đen.

7.2.3. Tiêm động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm là chuột nhắt trắng hoặc chuột lang.

Bệnh phẩm được nghiền với nước sinh lý theo tỷ lệ 1:10 thành huyền dịch huyền phù. Tiêm dưới da đùi với liều 0,1 ml cho chuột nhắt trắng hoặc 0,4 ml cho chuột lang.

Vi khuẩn *B. anthracis* làm chết chuột lang trong 48 h và chuột bạch trong 24 h với bệnh tích chỗ tiêm sưng, thủy thũng có chất keo nhầy màu hồng.

CHÚ THÍCH: Tiêm động vật thí nghiệm chỉ thực hiện khi các phương pháp khác không hiệu quả.

7.2.4. Nuôi cấy, phân lập và giám định vi khuẩn

7.2.4.1. Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Bệnh phẩm mới được cấy vào môi trường thạch máu (máu cừu, máu bê), canh thang BHI (canh thang tim não). Bệnh phẩm cũ được cấy vào môi trường thạch máu, thạch PLET [thạch polymyxin-lysozym-EDTA-tali(I) axetat], canh thang BHI. Vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí ở 37°C trong 24 h.

- Trên môi trường canh thang BHI: sau 24 h nuôi cấy, vi khuẩn *B. anthracis* mọc thành cặn dính dưới đáy ống, lầy có vẩn bông như sương mù.

- Trên môi trường thạch máu: khuẩn lạc của vi khuẩn *B. anthracis* màu trắng xám, mặt nhám, xù xì (dạng R). Vi khuẩn không gây dung huyết. Dùng que cấy tách dễ dàng toàn bộ khuẩn lạc lên khỏi mặt thạch.

- Trên môi trường thạch PLET: khuẩn lạc của vi khuẩn *B. anthracis* màu trắng kem, xù xì.

7.2.4.2. Giám định vi khuẩn

7.2.4.2.1. Giám định hình thái vi khuẩn từ môi trường nuôi cấy

7.2.4.2.1.1. Làm tiêu bản

Dùng que cấy lấy khuẩn lạc hòa đều vào giọt nước sinh lý trên phiến kính hoặc lấy một vòng que cấy canh trùng đã nuôi cấy vi khuẩn dàn mỏng lên trên phiến kính, để khô và cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn.

7.2.4.2.1.2. Nhuộm tiêu bản

Nhuộm Gram (xem Phụ lục A) hoặc nhuộm giáp mô theo phương pháp M'Fadyean (xem Phụ lục E).

Khu nhuộm giáp mô, vi khuẩn nghi ngờ cần được nuôi cấy trên môi trường thạch bicarbonat. Ủ ở 37 °C trong 24 h trong điều kiện có từ 10 % đến 20 % khí CO₂.

7.2.4.2.1.3. Kết luận

- Với tiêu bản nhuộm Gram: vi khuẩn *B. anthracis* bắt màu tím (Gram dương), đứng cặp đôi hay thành chuỗi ngắn (từ canh trùng vi khuẩn xếp thành chuỗi dài), hai đầu vuông.

- Với tiêu bản nhuộm M'Fadyean: vi khuẩn *B. anthracis* thường đứng cặp đôi hay thành chuỗi ngắn, hai đầu vuông. Giáp mô bao quanh vi khuẩn bắt màu hồng, tế bào vi khuẩn bắt màu xanh đen.

7.2.4.2.2. Giám định khả năng miễn cảm của vi khuẩn *B. anthracis* với penicillin

B. anthracis thường miễn cảm với penicillin, khác với các loài *Bacillus* không gây bệnh khác thường kháng penicillin. Phương pháp thử khả năng miễn cảm với penicillin được quy định trong Phụ lục D.

7.2.4.2.3. Giám định độc lực của vi khuẩn *B. anthracis* bằng phương pháp phản ứng chuỗi polyme (PCR)

Mục đích: xác định sự có mặt của hai plasmid là pXO1 và pXO2.

CHÚ THÍCH: Plasmid pXO1 chứa các gen mã hóa cho độc tố của vi khuẩn *B. anthracis*. Plasmid pXO2 chứa gen cho sự tổng hợp giáp mô của vi khuẩn *B. anthracis*. *B. anthracis* cần hai yếu tố này để gây bệnh.

Các cặp môi thích hợp để xác định sự có mặt của hai plasmid pXO1, pXO2 và phương pháp tiến hành được quy định trong Phụ lục E.

7.2.4.3. Đọc kết quả

Kết quả dương tính khi vi khuẩn kiểm tra có hình thái của vi khuẩn *B. anthracis* và dương tính với một trong hai phương pháp giám định quy định trong 7.2.4.2.2 và 7.2.4.2.3.

7.3. Kết quả

Kết quả dương tính khi con vật có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng của bệnh và có một trong các kết quả chẩn đoán phòng thử nghiệm sau dương tính:

- Trên tiêu bản máu có nhiều vi khuẩn hình trực khuẩn có giáp mô;
- Kết quả nuôi cấy, phân lập, giám định vi khuẩn dương tính.

Phụ lục A

(Quy định)

Phương pháp nhuộm gram

A.1. Thuốc thử

A.1.1. Dung dịch tím tinh thể

Tím tinh thể (C ₂₅ H ₃₀ N ₃ Cl)	2,0 g
Etanol 95 %	20,0 ml

Amoni oxalat $[(\text{NH}_4)\text{C}_2\text{O}_4.2\text{H}_2\text{O}]$	0,8 g
Nước	80,0 ml

Hòa tan tím tinh thể trong etanol và hòa tan amoni oxalat trong nước. Trộn 2 dung dịch này với nhau, lắc đều.

A.1.2. Dung dịch fucsin gốc

Basic fuchsin (CH_{19}O)	1 g
Etanol 95%	10 ml
Phenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)	5 g
Nước	100 ml

Pha loãng dung dịch theo tỉ lệ 1:10 (phần thể tích) với nước khi sử dụng.

A.1.3. Dung dịch lugol

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

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

A.1.4. Cồn axeton

Etanol 95 %	3 phần thể tích
Axeton $[(\text{CH}_3)_2\text{CO}]$	1 phần thể tích

A.2. Cách tiến hành

Nhỏ dung dịch tím tinh thể lên tiêu bản và để từ 1 min đến 2 min, sau đó rửa nhanh với nước và để khô.

Nhỏ dung dịch lugol và để trong 1 min rồi rửa nhanh với nước và để khô.

Nhỏ cồn axeton rồi rửa thật nhanh với nước và để khô.

Nhỏ dung dịch fucsin loãng và để trong 1 min rồi rửa với nước và thấm khô hoặc sấy khô.

A.3. Xem tiêu bản

Xem tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với vật kính dầu có độ phóng đại 100X.

Phụ lục B

(Quy định)

Phương pháp nhuộm Giemsa

B.1. Thuốc thử giemsa

Giemsa ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$), dạng bột	1 g
Glyxerin	60 ml
Metanol nguyên chất	60 ml

Làm nóng glyxerin đến khoảng 55 °C đến 60 °C trong nồi cách thủy. Thêm thuốc thử Giemsa, trộn đều và ủ trong 2 h. Sau đó để nguội và thêm metanol, giữ trong khoảng 2 tuần trước khi sử dụng. Khi sử dụng, pha loãng theo tỷ lệ 1:10 (phần thể tích) trong dung dịch đệm phosphat 0,01 M (pH 7,0) và giữ trong 30 min.

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

B.2. Cách tiến hành

Sau khi làm xong tiêu bản máu, cố định tiêu bản bằng metanol nguyên chất trong 10 min rồi rửa bằng nước. Nhỏ dung dịch Giemsa ngập tiêu bản, để trong 20 min đến 30 min rồi rửa nhanh với nước và sấy khô.

B.3. Xem tiêu bản

Xem tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với vật kính dầu có độ phóng đại 100X.

Phụ lục C

(Quy định)

Phương pháp nhuộm giáp mô

C.1. Thuốc thử polycrom xanh metylen (thuốc thử M'Fadyean)

Dung dịch A

Xanh metylen ($C_{16}H_{18}N_3SCl$) 0,3 g

Etanol 95 % 30 ml

Dung dịch B

Kali hydroxit 0,01 g

Nước 100 ml.

Trộn dung dịch A và dung dịch B, lắc đều. Hỗn hợp được để trong không khí, thỉnh thoảng lắc lên trong thời gian ít nhất 1 năm trước khi sử dụng (có thể làm giảm thời gian bằng cách thêm từ từ K_2CO_3 để đạt được nồng độ cuối cùng là 1 %).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng thuốc thử M'Fadyean thương mại.

C.2. Cách tiến hành

Phiếu tiêu bản rồi cố định bằng cồn nguyên chất trong 30 min đến 60 min hoặc để khô và cố định bằng nhiệt. Nhỏ dung dịch polycrom xanh metylen cho ngập tiêu bản. Để trong 30 s đến 60 s, sau đó rửa với nước hypoclorit và để khô.

C.3. Xem tiêu bản

Xem tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với vật kính dầu có độ phóng đại 100X.

Phụ lục D

(Quy định)

Phương pháp kiểm tra sự mẫn cảm của vi khuẩn *B. anthracis* với penicillin G

D.1. Cách tiến hành

Cấy vi khuẩn cần kiểm tra vào 1,5 ml nước thịt và nuôi cấy trong 2 h ở 37 °C. Điều chỉnh để đạt được độ đục 0,5 Mc Farland.

Vi khuẩn được cấy lên toàn bộ bề mặt của đĩa thạch Mueller Hinton hay thạch máu bằng một tấm bông vô trùng. Đặt đĩa giấy tẩm penicillin G 10 UI lên đĩa và ấn nhẹ để đảm bảo giấy tẩm kháng sinh tiếp xúc với môi trường. Đặt đĩa thạch ở 37 °C trong 18 h.

Sử dụng *Bacillus cereus* là một đối chứng kháng với penicillin và *Staphylococcus aureus* ATCC là chủng mẫn cảm với penicillin.