

TIÊU CHUẨN

NGÀNH Y TẾ 52 TCN-TQTP 0008:2004 THƯỜNG QUY KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH

E.COLI 0157 TRONG THỰC PHẨM

Lời nói đầu

52 TCN - TQTP 0008 : 2004 do Viện Dinh dưỡng biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm đề nghị, Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành theo Quyết định số 4871/2004/QĐ-BYT ngày 31 tháng 12 năm 2004.

BỘ Y TẾ	TIÊU CHUẨN NGÀNH Y TẾ	NHÓM TQTP 52 TCN-TQTP 0008:2004 Có hiệu lực sau 15 ngày, kể từ ngày đăng Công báo
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH E.COLI 0157 TRONG THỰC PHẨM	

1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này để xác định *E.coli* O157 trong thực phẩm.

2. Nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật làm giàu, xác định khuẩn lạc nghi ngờ *E.coli* O157 trên thạch SMAC sau khi ủ ấm ở 37°C trong 24 giờ. Từ những khuẩn lạc nghi ngờ, tiến hành kiểm tra các tính chất sinh vật hóa học và ngưng kết đặc hiệu để khẳng định là *E.coli* O157.

3. Thiết bị, Dụng cụ, Môi trường

3.1. Thiết bị, dụng cụ

Dụng cụ và thiết bị chuyên dụng trong phòng kiểm nghiệm vi sinh vật.

3.2. Môi trường

- Canh thang m-EC
- Nước muối sinh lý 8,5‰
- Kháng huyết thanh *E. coli* O157
- Thạch SMAC
- Thạch CLIG
- Thạch thường

4. Chuẩn bị môi trường và mẫu thử.

4.1. Chuẩn bị môi trường

Môi trường tăng sinh, nuôi cấy và dung dịch cần thiết được điều chế theo công thức Các môi trường được đóng sẵn vào bình cầu, bình nón, ống nghiệm và được hấp tiệt trùng ($110^{\circ}\text{C}/30$ phút hoặc $121^{\circ}\text{C}/15$ phút).

4.2. Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử được cắt nhỏ hoặc xay nhuyễn bằng máy trong điều kiện vô trùng cho tới khi được thể đồng nhất.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Bước 1: Tăng sinh

- Ghi ký hiệu mẫu lên bình nón có chứa 225 ml canh thang mc-EC.
- Cân chính xác 25 g thực phẩm đã chuẩn bị (hoặc dùng pipét vô trùng hút 25 ml thực phẩm lỏng) cho vào bình nón đã ghi ký hiệu mẫu, lắc đều rồi ủ ấm ở $42^{\circ}\text{C}/24$ giờ.

5.2. Bước 2: Phân lập

- Từ bình nón canh thang m-EC đã ủ ấm, dùng que cấy vô trùng lấy canh khuẩn cấy phân vùng trên thạch SMAC để tạo các khuẩn lạc riêng rẽ.
- Ủ ấm $37^{\circ}\text{C}/24$ giờ. Sau ủ ấm, đánh dấu những khuẩn lạc nghi ngờ *E.coli* O157 trên thạch SMAC có đặc điểm: tròn đều, mặt nhẵn, khổng mầu, sáng đục (vì *E.coli* O157 không lên men đường sorbitol có trong thạch SMAC). Những khuẩn lạc *E.coli* khác có mầu đỏ, vì lên men đường sorbitol.

5.3. Bước 3: Kiểm tra tính chất sinh vật hóa học.

- Dùng que cấy nhọn đầu vô trùng lấy 1 khuẩn lạc nghi ngờ trên thạch SMAC cấy vào ống thạch thường và ống thạch CLIG như sau:
 - + Ống thạch thường: cấy rìa lên mặt thạch.
 - + Ống thạch CLIG:
 - * Phần thạch nghiêng: cấy rìa lên mặt thạch.
 - * Phần thạch đứng: cấy đâm sâu ở chính giữa.
- Ủ ấm $37^{\circ}\text{C}/24$ giờ. Sau ủ ấm đọc kết quả kiểm tra các tính chất sinh hóa trên ống thạch CLIG:
 - + Phần thạch nghiêng: giữ nguyên mầu đỏ (cellobiose âm tính)
 - + Phần thạch đứng: chuyển sang mầu vàng (lactose dương tính)
 - + Ngay sau đó chiếu đèn UV có Bước sóng 365 nmi vào ống thạch CLIG, ống thạch CLIG không phát quang (- glucuronidase âm tính).

Thạch CLIG có pH trung tính nên có mầu đỏ của chỉ thị mầu đỏ phenol. Trong thạch có 2 loại đường: cellobiose (10g/lít) và lactose (1g/lít). *E.coli* O157 không lên men đường cellobiose, nhưng lên men đường lactose tạo axit không bền vững đối với oxy. Phần nghiêng của thạch vì tiếp xúc nhiều với oxy có trong không khí nên pH vẫn trung tính, nên thạch giữ nguyên mầu đỏ. Còn phần đứng của thạch vì ít tiếp xúc với không khí nên pH thạch trở thành axit, do đó thạch chuyển sang mầu vàng.

Lưu ý: Mỗi mẫu thử nên bắt 3 khuẩn lạc nghi ngờ để kiểm tra tính chất sinh hóa. Khuẩn lạc nghi ngờ *E.coli* O157, có tính chất sinh vật hóa học của *E.coli* O157: cellobiose (-), lactose (+), - glucuronidase (-), thì tiếp tục kiểm tra ngưng kết trên lam kính.

5.4. Bước 4: Kiểm tra ngưng kết trên lam kính

5.4.1. Kiểm tra hiện tượng tự ngưng kết

- Tiến hành: Lấy 1 lam kính trong, vô trùng, nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý 8,5‰ vào bên trái lam kính. Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn ở ống thạch thường hòa vào giọt nước muối. Nghiêng đi nghiêng lại nhẹ nhàng lam kính vài lần sao cho vi khuẩn hòa đều vào giọt nước muối sinh lý.

- Đọc kết quả: Dùng kính lúp để quan sát. Nếu giọt nước muối sinh lý đục đều (tức không xảy ra hiện tượng ngưng kết), thì tiếp tục kiểm tra ngưng kết đặc hiệu.

5.4.2. Kiểm tra ngưng kết đặc hiệu

- Tiến hành: tiếp tục nhỏ 1 giọt kháng huyết thanh *E.coli* O157 lên lam kính.

Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn ở ống thạch thường hòa vào giọt kháng huyết thanh *E.coli* O157. Nghiêng đi nghiêng lại nhẹ nhàng lam kính vài lần sao cho vi khuẩn hòa đều vào giọt kháng huyết thanh *E.coli* O157.

Đọc kết quả: Dùng kính lúp để quan sát. Nếu giọt kháng huyết thanh *E.coli* O157 xuất hiện những hạt nhỏ (tức đã xảy ra hiện tượng ngưng kết giữa kháng nguyên và kháng thể). Có thể đối chiếu sự khác biệt với giọt nước muối ở bên cạnh.

Lưu ý:

- Chỉ được đọc kết quả ngưng kết trong vòng từ 30 giây đến 2 phút.

- Nếu xảy ra hiện tượng ngưng kết với nước muối sinh lý, thì không cần tiếp tục kiểm tra ngưng kết đặc hiệu (vì có thể nước muối sinh lý đã hỏng hoặc vi khuẩn phân lập không chính xác).

Tiêu chuẩn xác định là *E. coli* O157:

- Khuẩn lạc tròn đều, mặt nhẵn, không mầu, sáng đục.

- Không lên men đường cellobiose.

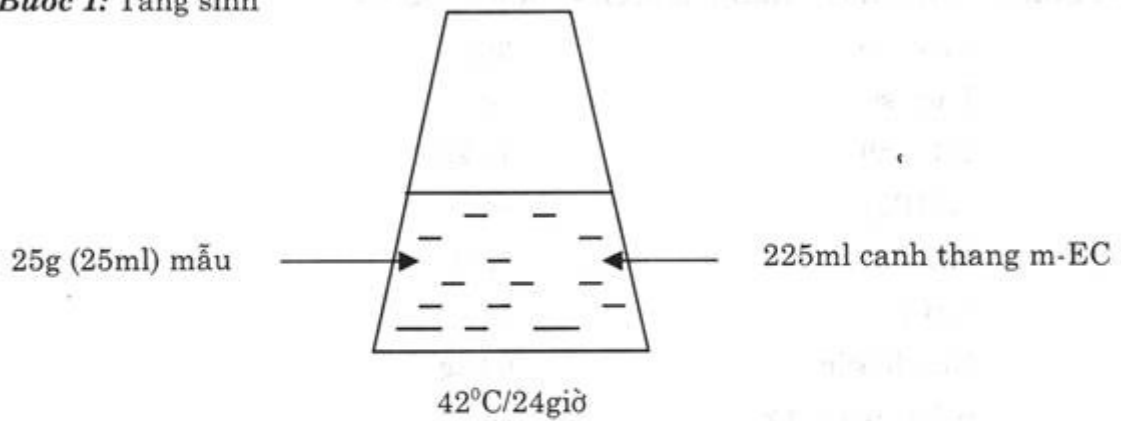
- Lên men đường lactose.

- Không có men -glucuronidase.

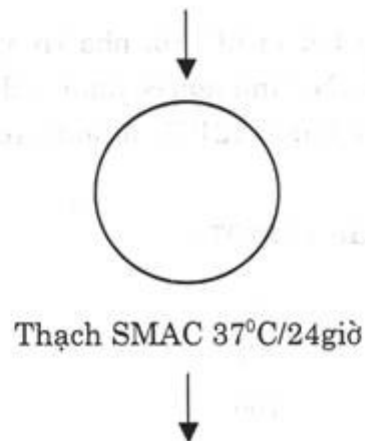
- Ngưng kết với kháng huyết thanh *E.coli* O157.

SƠ ĐỒ XÁC ĐỊNH *E. COLI* O157 TRONG THỰC PHẨM

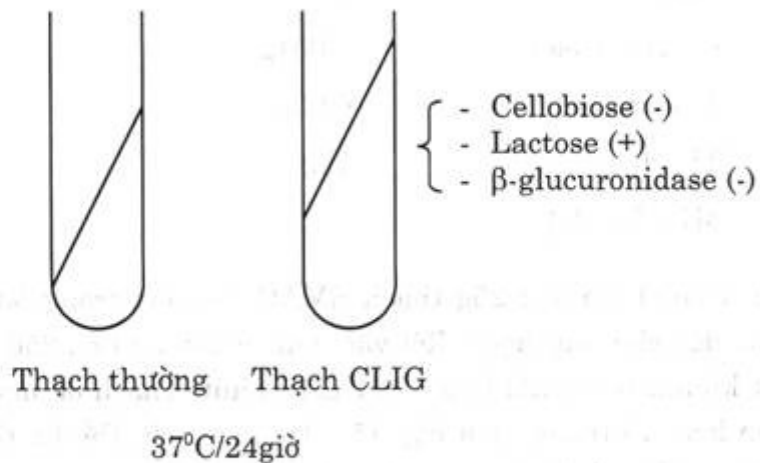
Bước 1: Tăng sinh



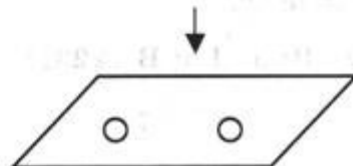
Bước 2: Phân lập



Bước 3: kiểm tra tính chất sinh hóa



Bước 4: kiểm tra ngưng kết



PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

1. Canh thang m-EC (hãng Merek - code I.14582)

Peptone	20g
Lactose	5g
Bile salts	1,12g

K ₂ HPO ₄	4g
KH ₂ PO ₄	1,5g
NaCL	5g
Novobiocin	0,02g

pH = 6,9 0,2

Pha chế: Cân chính xác 36,7g bột m-EC, rồi pha trong 1000 ml nước cất. Đun nóng, khuấy đều cho tan bột. Rót vào bình nón có dung tích 500 ml, mỗi bình 225 ml canh thang. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở 121°C/15 phút, rồi bảo quản trong tủ lạnh không quá 7 ngày.

2. Thạch SMAC (Merck - code I.09207)

Bile salts	1g
Peptone	19g
D-sorbitol	10g
Nacl	5g
Crystal violet	0,001g
Netral red	0,03g
Thạch	15g

pH = 7 0,2

Pha chế: Cân chính xác 25g thạch SMAC, rồi pha trong 500 ml nước cất. Đun nóng, khuấy đều cho tan thạch. Rót vào bình cầu dung tích 250 ml, mỗi bình 150 ml thạch. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở 121°C/15 phút. Thạch để nguội đến 45°C, rồi rót vào các hộp lồng vô trùng, mỗi hộp 15 – 18 ml thạch. Để đĩa thạch đông tự nhiên, bảo quản trong tủ lạnh không quá 15 ngày.

3. Thạch CLIG (kyokuto - Nhật Bản - Lot BL.2231)

Casein peptone	7,5g
Meat peptone	2,5g
Lactose	1g
Cellobiose	10g
Tryptophan	0,1g
MUG	0,02g
NaCL	5g
Phenol red	0,02g
Thạch	15g

ph = 7 0,2

Pha chế: Cân chính xác 4, 1g thạch CLIG, rồi phá trong 100 ml nước cất. Đun nóng, khuấy đều cho tan thạch. Rót vào ống nghiệm = 12mm, mỗi ống 3 ml thạch. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ 110°C/80 phút, đợi thạch nguội, rồi để ống thạch nằm nghiêng (sao cho mặt nghiêng dài khoảng 2 cm) cho đến khi thạch đông, rồi bảo quản trong tủ lạnh không quá 15 ngày.

4. Thạch thường

Cao thịt	1g
Peptone	2g

NaCL	1g
Thạch	3,6g
Nước cất	200ml

Pha chế: Cân chính xác các thành phần môi trường. Đun nhỏ lửa khuấy đều đến khi sôi để hòa tan các chất. Điều chỉnh pH = 7,4 - 7,6. Rót vào ống nghiệm = 16 mm, mỗi ống 5 ml thạch. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở 110⁰C /30phút, đợi thạch nguội rồi để ống thạch nằm nghiêng cho đến khi thạch đông, rồi bảo quản trong tủ lạnh không quá 30 ngày./.

TaiLieu.vn