

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

MANNITOL SALT AGAR

ĐỊNH LƯỢNG *STAPHYLOCOCCI* GÂY BỆNH

1 MỤC ĐÍCH

Manitol Salt Agar được sử dụng để phân lập, phát hiện và định lượng *staphylococci* gây bệnh trong nước lọc như trong nước hồ bơi, nước uống hoặc suối nước khoáng. Nó cũng được dùng để phát hiện *Staphylococcus aureus* theo dược điển và trong các sản phẩm mỹ phẩm.

Thành phần điển hình theo Dược điển Châu Âu và trong Hướng dẫn NF T90-421 cho kiểm tra nước và Hướng dẫn NF EN ISO 22718 trong mỹ phẩm

2 LỊCH SỬ

Thí nghiệm của Koch cho thấy *staphylococci* có thể chịu được môi trường siêu mặn với nồng độ 7.5%. Chapman xác nhận các kết quả ban đầu này và cũng nhận thấy *staphylococci* làm đông tụ huyết tương thô, hình thành khuẩn lạc vàng trên môi trường này, trong khi hầu hết các khuẩn khác bị ức chế.

3 NGUYÊN TẮC

Nồng độ natri clorua cao ức chế sự tăng trưởng của hầu hết các loại vi khuẩn khác ngoại trừ *staphylococci*.

Lên men Mannitol được thể hiện bởi sự thay đổi màu của chỉ thị pH (phenol đỏ) sang màu vàng.

Sự tồn tại của *staphylococci* gây bệnh được khẳng định lại bởi thử nghiệm coagulase.

4 THÀNH PHẦN

Các thành phần có thể được điều chỉnh để có được hiệu suất tối ưu.

Đối với 1 lít môi trường:

| | |
|-------------------------------|---------|
| - Tryptone | 5.0 g |
| - Peptic digest of meat | 5.0 g |
| - Meat extract | 1.0 g |
| - Mannitol | 10.0 g |
| - Sodium chloride | 75.0 g |
| - Phenol red..... | 25.0 mg |
| - Bacteriological agar | 15.0 g |

pH trong môi trường hoàn chỉnh ở 25°C : 7.4± 0.2.

5 CHUẨN BỊ

- Hòa tan 111.0 g môi trường khan (BK030HA) trong 1 lít nước khử khoáng hoặc nước cất vô trùng.
- Đun từ từ cho đến sôi, khuấy cho đến khi môi trường tan hoàn toàn.
- Phân phối vào trong các ống nghiệm hoặc bình.
- Hấp tiệt trùng ở 121⁰C trong vòng 15 phút.
- Làm nguội và duy trì ở 44-47⁰C.
- Đổ vào các đĩa Petri vô trùng (φ 55 mm hoặc 90 mm tùy mục đích) và để đông lại trên bề mặt nhẵn, lạnh.

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Phát hiện *Staphylococcus aureus* (Được điện, NF EN ISO 22718)

- Làm khô đĩa trong tủ ẩm với nắp đóng hờ.
- Chuyển 0.1 mL mẫu cần phân tích lên bề mặt đĩa.
- Dùng que cấy tam giác trải đều mẫu khắp bề mặt đĩa.
- Ủ ở 30-35⁰C trong 18 - 24 giờ.

Kiểm tra nước bằng phương pháp màng lọc

- Bằng kỹ thuật vô trùng, lọc một lượng nước thích hợp qua màng nitrocellulose.
- Đặt màng lọc lên bề mặt của môi trường thạch đã được chuẩn bị như miêu tả (hoặc dùng đĩa được chuẩn bị sẵn BM148), đảm bảo tiếp xúc hoàn toàn, không bị bọt khí.
- Ủ (36 ± 2)⁰C trong (44 ± 4) giờ

7 KẾT QUẢ

Đếm các khuẩn lạc đặc trưng.

Staphylococci gây bệnh hình thành khuẩn lạc nhiều màu sắc, bao quanh bởi vòng màu vàng do quá trình lên men của mannitol.

Staphylococci không gây bệnh hình thành khuẩn lạc nhỏ màu đỏ và không làm thay đổi màu môi trường. Một vài chủng *Staphylococcus epidermidis* có thể lên men mannitol.

Sau 48 giờ ủ, một số chủng vi khuẩn *Bacillus*, *Micrococcus* và *Serratia* có thể phát triển.

8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Môi trường bột khô: Bột màu hồng kem nhạt, chảy tự do và đồng nhất.

Môi trường chuẩn bị sẵn: thạch màu đỏ

Phản ứng nuôi cấy đặc trưng sau 18-24 h ủ tại 30-35⁰C:

| Vi sinh vật | | Phát triển Productivity Ratio P _R | Đặc trưng |
|-----------------------------------|------------|-------------------------------------------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | WDCM 00032 | P _R ≥ 50 % | Khuẩn lạc vàng |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | WDCM 00034 | P _R ≥ 50 % | Khuẩn lạc vàng |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | WDCM 00036 | Tốt, score 2 | Khuẩn lạc hồng |
| <i>Escherichia coli</i> | WDCM 00013 | Ức chế, score 0 | - |

Phản ứng nuôi cấy đặc trưng sau 44 h ủ tại 36⁰C:

| Vi sinh vật | | Phát triển R ₃ acc. to NF T90-461 | Đặc trưng |
|------------------------------|------------|-------------------------------------------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | WDCM 00035 | 66 % ≤ R ₃ ≤ 150 % | Khuẩn lạc vàng |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | WDCM 00176 | Inhibited | - |

9 BẢO QUẢN

Môi trường khô: 2-30⁰C

Đĩa môi trường đổ sẵn: 2-8⁰C

Hạn sử dụng được in trên bao bì.

Môi trường pha sẵn:

- Môi trường cơ bản: bảo quản 180 ngày ở 2-8⁰C.
- Môi trường hoàn chỉnh: 30 ngày ở 2-8⁰C.

(*) Giá trị chuẩn được xác định trong các điều kiện chuẩn bị tiêu chuẩn, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10 ĐÓNG GÓI

Môi trường bột khô (không có Novobiocin) :

Chai 500 g..... BK030HA

Môi trường đổ sẵn trong đĩa petri (Ø 55 mm):

20 đĩa BM14808

11 THAM KHẢO

Chapman, G.H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. Bacteriol., 50: 201.

Chapman, G.H. 1948. An improved Stone medium for the isolation and testing of food poisoning *staphylococci*. Food Research, 13: 100-105.

NF T 90-421. Août 2006. Essais des eaux. Examens bactériologiques des eaux de piscines. NF EN ISO 22718. Septembre 2009. Cosmétiques. Microbiologie. Détection de *Staphylococcus aureus*.

Pharmacopée européenne. Chapitre 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés.

12 THÔNG TIN BỔ SUNG

Thông tin được cung cấp trên nhãn được ưu tiên hơn các công thức hoặc hướng dẫn được mô tả trong tài liệu này và dễ bị sửa đổi bất cứ lúc nào mà không cần cảnh báo.

Mã tài liệu: MANNITOL SALT_EN V11

Ngày tạo: 04-2001

Cập nhật: 03-2020

Nguồn gốc của sửa đổi: Thay đổi màu bột

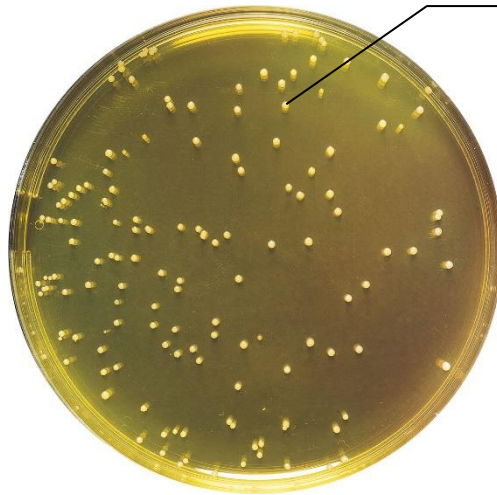
PHỤ LỤC HÌNH ẢNH

Mannitol Salt Agar

Phát hiện và định lượng *staphylococci* gây bệnh

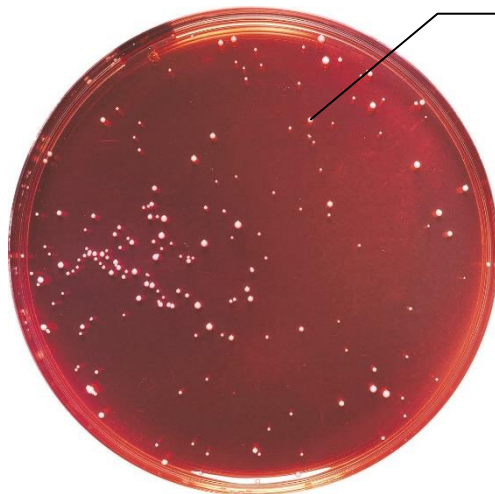
Kết quả:

Sự tăng sinh sau 24 giờ ủ ở 37°C (ủ bề mặt):



Staphylococcus aureus

Khuẩn lạc đặc trưng:
Khuẩn lạc vàng trên môi trường vàng,
hoặc được bao quanh bởi một vòng hào
quang màu vàng



Staphylococcus epidermidis:

Khuẩn lạc không đặc trưng: khuẩn
lạc trắng trên thạch đỏ