

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

HALF-FRASER BROTH

MÔI TRƯỜNG TĂNG SINH LẦN 1 CHO *LISTERIA*

1 MỤC ĐÍCH

Half-Fraser broth được dùng để tăng sinh chọn lọc và phân biệt (canh tăng sinh sơ cấp) của *Listeria monocytogenes* và của *Listeria* spp. trong sản phẩm thực phẩm, theo tiêu chuẩn NF EN ISO 11290-1. Môi trường truyền thống cũng được sử dụng trong phương pháp nhanh để phát hiện và định lượng *Listeria monocytogenes* hoặc *Listeria* spp.

2 LỊCH SỬ

Môi trường được nghiên cứu bởi Fraser et al. vào năm 1988 là một sửa đổi của công thức của Donnelly và Baigent. Thành phần của cơ bản giống hệt với UVM Broth và đã được sửa đổi bằng cách bổ sung lithium clorua làm tác nhân chọn lọc và ferric ammonium citrate để nhận thấy thủy phân esculin của môi trường, bằng cách làm đen môi trường.

3 NGUYÊN TẮC

Sự phục hồi rất tốt của *Listeria monocytogenes* được đảm bảo bởi sự khác biệt nồng độ trong axit nalidixic và acriflavine giữa Half-Fraser và Fraser, cũng như hai bước làm giàu. Half-Fraser Broth cho phép bước làm giàu chính, với việc làm giàu thứ cấp được thực hiện trong Fraser Broth.

Polypeptone, chiết xuất men và chiết xuất thịt cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của *Listeria*. Hàm lượng natri clorua cao làm tăng tính chọn lọc của môi trường.

Phosphate hoạt động như chất đệm và duy trì độ pH của môi trường.

Esculin bị thủy phân bởi *Listeria* thành glucose và esculetin, hợp chất thứ hai tạo thành phức hợp màu đen với các ion sắt được cung cấp bởi ferric citrate, được bổ sung ngay trước khi sử dụng, cũng hỗ trợ sự phát triển của *Listeria*.

Liti clorua ức chế sự phát triển của hầu hết các loại enterococci cũng có thể thủy phân esculin. Axit nalidixic ngăn chặn sự sao chép DNA của vi khuẩn nhạy cảm với tác nhân kháng khuẩn này. Sự phát triển của hệ vi sinh Gram dương thứ phát bị ức chế bởi acriflavine.

4 THÀNH PHẦN

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

Trong 1 lít môi trường :

- Enzymatic digest of animal tissues5,0 g

- Enzymatic digest of casein	5,0 g
- Yeast extract	5,0 g
- Meat extract	5,0 g
- Sodium chloride	20,0 g
- Disodium phosphate, anhydrous*	9,6 g
- Monopotassium phosphate	1,35 g
- Esculin	1,0 g
- Lithium chloride	3,0 g
- Nalidixic acid	10,0 mg
- Acriflavine hydrochloride	12,5 mg
- Ferric ammonium citrate	0,5 g

pH của môi trường chuẩn bị sẵn ở 25 °C : $7,2 \pm 0,2$.

Đối với 55 g môi trường khan cơ bản BK133

- Enzymatic digest of animal tissues	5,0 g
- Enzymatic digest of casein	5,0 g
- Yeast extract	5,0 g
- Meat extract	5,0 g
- Sodium chloride	20,0 g
- Disodium phosphate, anhydrous*	9,6 g
- Monopotassium phosphate	1,35 g
- Esculin	1,0 g
- Lithium chloride	3,0 g

Đối với một lọ chất bổ sung BS030

- Nalidixic acid	5,00 mg
- Acriflavine hydrochloride	6,25 mg
- Ferric ammonium citrate	0,25 g

Đối với một lọ chất bổ sung BS032

- Nalidixic acid	22,5 mg
- Acriflavine hydrochloride	28,125 mg
- Ferric ammonium citrate	1,125 g

Đối với 55 g môi trường khan cơ bản BK173

- Enzymatic digest of animal tissues	5,0 g
- Enzymatic digest of casein	5,0 g
- Yeast extract	5,0 g
- Meat extract	5,0 g
- Sodium chloride	20,0 g
- Disodium phosphate, anhydrous*	9,6 g
- Monopotassium phosphate	1,35 g
- Esculin	1,0 g
- Lithium chloride	3,0 g
- Nalidixic acid	10,0 mg
- Acriflavine hydrochloride	12,5 mg

Đối với một ống bổ sung BS062 (10 mL)

- Ferric ammonium citrate	0,5 g
---------------------------------	-------

Đối với một ống bổ sung BS059 (90 mL)

- Ferric ammonium citrate	4,5 g
---------------------------------	-------

* NOTE : Tương đương với 12 g Disodium hydro phosphate dihydrate.

5 CHUẨN BỊ

- Hòa tan 55,0 g dehydrated Fraser broth (BK133 or BK173) trong 1 lít nước cất hoặc nước khử khoáng.
- Khuấy từ từ cho đến khi tan hoàn toàn.
- Chia vào lọ, 225 mL / lọ.
- Vô trùng trong nồi hấp ở 121 °C trong 15 phút.
- Để nguội đến nhiệt độ phòng.

☐ **Nồng độ**

55,0 g/L

☐ **Tiệt trùng :**

15 phút - 121 °C

Sử dụng môi trường khan cơ bản BK133

- Phục hồi supplement Half Fraser qsp 500 mL (BS030) với 5 mL dung dịch 1: 1 etanol / nước cất vô trùng hoặc supplement for 2,25 L (BS032) với 20 mL dung dịch tương tự.
- Trộn đều, tránh tạo bọt.
- Thêm 2,25 mL supplement BS030 hoặc 2 mL supplement BS032 đã pha vào mỗi lọ 225 mL nước dùng.
- Trộn đều.

Sử dụng môi trường khan cơ bản BK173

- Thêm 2,25 mL dung dịch 5% ferric ammonium citrate (BS059 hoặc BS062) vào mỗi lọ 225ml môi trường
- Trộn đều.

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

- Thêm vô trùng 25g mẫu cần kiểm tra vào các lọ được chuẩn bị như trên hoặc các môi trường đồ sẵn (BM016, BM133, BM134)
- Trộn đều.
- Ủ ở $30 \pm 1^\circ \text{C}$ trong 24 đến 26 giờ.

CHÚ Ý

Half-Fraser broth có thể được sử dụng như chất pha loãng để định lượng *Listeria monocytogenes* (NF VALIDATION, BKR 23/05-12/07).

7 KẾT QUẢ

Tất cả các ống, thể hiện màu đen hoặc không, phải được cấy lại vào môi trường làm giàu thứ cấp hoặc lên môi trường phân lập chọn lọc. Cần ủ tối thiểu 24 giờ để quan sát được phản ứng hóa đen.

Cấy lại 0,1 mL từ mỗi ống vào một ống Fraser Broth cho các phương pháp chuẩn hóa (chuẩn). Cấy vào COMPASS® *Listeria* Agar để phát hiện nhanh *Listeria monocytogenes* và *Listeria* spp (NF VALIDATION, BKR 23 / 02-11 / 02).

CHÚ THÍCH :

Đối với tất cả các ứng dụng khác, sử dụng phương pháp tham chiếu.

8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Môi trường khan : bột màu vàng, chảy tự do và đồng nhất.

Chất bổ sung chọn lọc đông khô : viên màu nâu, sau khi pha cho ra dung dịch màu nâu, có thể có kết tủa.

Ferric ammonium citrate 5% solution : chất lỏng màu nâu, có thể có kết tủa nhẹ.

Môi trường pha sẵn (hoàn toàn) : dung dịch màu nâu với phản xạ hơi xanh, có thể chứa kết tủa nhẹ.

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 24h và ủ ở 30°C , theo (NF EN ISO 11133) :

Vi sinh vật		Tăng trưởng
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	WDCM 00021	> 10 khuẩn lạc đặc trưng
+ <i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	WDCM 00109	> 10 khuẩn lạc đặc trưng
+ <i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	< 100 khuẩn lạc ức chế
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	

9 BẢO QUẢN

Môi trường khan cơ bản : 2-30 °C.

Half-Fraser broth selective supplements : 2-8 °C.

Sterile 5% solution of ferric ammonium citrate : 2-25 °C.

Môi trường hoàn chỉnh trong lọ hoặc túi mềm : 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Hạn sử dụng được ghi trên bao bì.

CHÚ Ý :

Môi trường chuẩn bị sẵn trong lọ hoặc túi mềm có thể được giữ ở 15 - 25 °C, tránh ánh sáng, không có bất kỳ tác động nào đến hiệu suất vi sinh.

Môi trường pha sẵn cơ bản trong lọ BK133 (*) : 180 ngày ở 2-8 °C.

Môi trường pha sẵn cơ bản trong lọ BK173 (*) : 180 ngày ở 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Môi trường pha sẵn hoàn chỉnh trong lọ (*) : 180 ngày ở 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Rehydrated freeze-dried supplements (*) : 30 ngày ở 2-8 °C, tránh ánh sáng.

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

10 ĐÓNG GÓI

Dehydrated media FRASER base II :

500 g bottle BK133HA

5 kg drum BK133GC

Half-FRASER selective supplement :

10 lọ tương đương 500 mL BS03008

8 lọ tương đương 2,25 L BS03208

Half-FRASER dehydrated media base (không có ferric ammonium citrate) :

Chai 500 g BK173HA

Thùng 5 kg BK173GC

Sterile 5% solution Ferric ammonium citrate :

10 x 90 mL/ lọ BS05908

7 x 10 mL/ ống BS06208

Môi trường chuẩn bị sẵn trong lọ :

10 x 225 mL/ lọ BM01608

Môi trường chuẩn bị sẵn trong túi mềm :

3 x 3 L túi BM13308

2 x 5 L túi BM13408

40 x 5 L túi (carton) BM18808

11 THAM KHẢO

Donnelly, C.W., and Baigent, G.J.. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Applied and Environmental Microbiology, **52** : 689-695.

Fraser, J.A., and Sperber, W.H.. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. Journal of Food Protection, **51** : 762-765.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau -

Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 11290-1. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de recherche.

12 THÔNG TIN BỔ SUNG

COMPASS® là nhãn hiệu đã đăng ký của SOLABIA S.A.S.

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

Mã tài liệu : HALF FRASER

BROTH_ENv18. Ngày tạo :
04-2003

Cập nhật : 08-2018

Nguồn gốc sửa đổi : Chính lưu chỉ định acriflavine