

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

MACCONKEY SORBITOL (CT-SMAC) AGAR

PHÁT HIỆN *ESCHERICHIA COLI* O157

1 MỤC ĐÍCH

MacConkey Sorbitol (CT-SMAC) agar là môi trường chọn lọc được sử dụng để phân lập và phân biệt *Escherichia coli* O157 trong nước, sữa, sản phẩm thịt bò và các chế phẩm thực phẩm khác.

2 LỊCH SỬ

Kiểu huyết thanh O157 của *Escherichia coli* là kiểu huyết thanh gây bệnh, được xác định lần đầu tiên vào năm 1982 là tác nhân gây ra bệnh viêm đại tràng xuất huyết. Thức ăn chăn nuôi là nguồn gốc chính gây ô nhiễm cho con người. Mô thịt bò và thịt lợn, thịt gia cầm và một số sản phẩm sữa không tiệt trùng đã bị nhiễm khuẩn toxi liên quan đến *Escherichia coli* O157. Vi sinh vật này cũng đã được phân lập từ khoai tây, rượu táo và nước máy..

Năm 1985, Farmer và Davis đã xác nhận lại công trình nghiên cứu của Wells và cộng sự (1983), bằng cách chứng minh rằng đặc trưng của kiểu huyết thanh O157 là không có khả năng lên men sorbitol, trong khi hơn 80% các chủng *E. coli* dương tính với sorbitol. Năm 1986, March & Ratnam cũng quan tâm đến việc sử dụng thạch MacConkey-Sorbitol để phát hiện *Escherichia coli* O157. Năm 1991, Chapman giới thiệu cefixime để ức chế *Proteus*. Năm 1993, Zadik kết hợp hoạt động của kali Tellurite với hoạt động của cefixime. Việc bổ sung các thành phần này vào thạch làm tăng tần suất phát hiện các khuẩn lạc O157 bằng cách loại bỏ một phần lớn hệ vi sinh thứ cấp có thể có trong mẫu.

3 NGUYÊN TẮC

Tryptone và Peptic tiêu hóa từ thịt có lợi cho sự phát triển của *Escherichia coli* O157.

Các vi sinh vật âm tính với sorbitol (đặc biệt là O157) tạo ra các khuẩn lạc trong suốt.

Các vi sinh vật dương tính với Sorbitol được phát hiện khi các khuẩn lạc chuyển sang màu đỏ (dưới tác dụng của neutral red).

Hệ vi sinh thứ cấp bị ức chế bởi sự liên kết giữa muối mật, crystal violet, cefixime và Tellurite kali.

Một số chủng *Escherichia coli* O157 dương tính với sorbitol và sẽ không được phát hiện trực tiếp.

4 THÀNH PHẦN

Có thể được điều chỉnh để có được hiệu suất tối ưu.

Trong 1 lit môi trường:

- Tryptone	17,0 g
- Peptic digest of Meat	3,0 g
- D-Sorbitol	10,0 g
- Bile salts n°3.....	1,5 g
- Sodium chloride.....	5,0 g
- Neutral red	30,0 mg
- Crystal violet.....	1,0 mg
- Cefixime	0,05 mg
- Potassium tellurite	2,5 mg
- Bacteriological agar	13,5 g

pH của môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C : 7,1 ± 0,2.

Cho 50 g môi trường bột khô BK147

- Tryptone.....	17,0 g
- Peptic digest of meat	3,0 g
- D-Sorbitol	10,0 g
- Bile salts n°3	1,5 g
- Sodium chloride	5,0 g
- Neutral red	30,0 mg
- Crystal violet.....	1,0 mg
- Bacteriological agar	13,5 g

Cho 1 lọ chất bổ sung BS037

(Bổ sung cho 500 mL môi trường base)

- Cefixime	0,025 mg
- Potassium tellurite.....	1,25 mg

5 CHUẨN BỊ

- Hòa tan 50,0 g môi trường (BK147) vào 1 lít nước cất hoặc nước khử ion.
- Đun sôi từ từ, khuấy liên tục trong khoảng thời gian tối thiểu để hòa tan hoàn toàn.
- Phân phối 100ml vào mỗi chai.
- Hấp tiệt trùng tại 121 °C trong 15 phút.
- Làm nguội đến nhiệt độ 44-47 °C.
- Hoàn nguyên chất bổ sung (BS037) với 5 mL nước cất.
- Lắc bình hoặc xoay để hòa tan hoàn toàn, đồng thời tránh tạo bọt.
- Thêm vô trùng 1 mL chất bổ sung chọn lọc đã hoàn nguyên (BS037) vào lọ 100 mL môi trường cơ bản.
- Trộn đều.
- Đổ vào đĩa Petri vô trùng và để đông thạch.

✓ **Pha** :50,0 g/L

✓ **Hấp** :
15 phút tại 121 °C

✓ **Hoàn nguyên chất bổ sung**
với 5 mL nước vô trùng

✓ **Bổ sung vào môi trường cơ bản** :1 mL / 100 mL

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

- Làm khô các đĩa trong tủ ẩm.
- Sau khi tăng sinh trong môi trường modified Tryptone soja broth và novobiocin (BK150) sau khi tách từ tính miễn dịch, cấy trải lên bề mặt thạch đã chuẩn bị.
- Ủ tại 37 °C trong 18 - 24 h.

✓ **Cấy** :
Trên bề mặt

✓ **Ủ** :
18 h - 24 h tại 37 °C

7 KẾT QUẢ

Escherichia coli O157 tạo thành các khuẩn lạc trong suốt, nhẵn có thể có quang màu da cam do kiểm hóa.

Vì tính đặc hiệu không hoàn toàn của môi trường, các khuẩn lạc nghi ngờ phải được khẳng định bằng test ngưng kết huyết thanh với các kháng huyết thanh O157 cụ thể.

Xem PHỤ LỤC 1 : HÌNH ẢNH HỖ TRỢ

8 QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG

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

Chất bổ sung : viên trắng, khi được hoàn nguyên thành dung dịch trong suốt.

Môi trường đã hoàn chỉnh : agar màu tím đỏ

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 21 h ủ tại 37 °C (NF EN ISO 11133) :

Vi sinh vật		Phát triển	Đặc điểm
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	WDCM 00014	Tốt, score 2	khuẩn lạc trong suốt khuẩn lạc màu đỏ hồng
<i>Escherichia coli</i> sorbitol-positive	WDCM 00013	Yếu, score 0-1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Bị ức chế, score 0	

9 BẢO QUẢN/ HẠN SỬ DỤNG

Môi trường bột khô: 2-30 °C.

Cefixime-Tellurite chất bổ sung : 2-8 °C.

Hạn sử dụng được in trên nhãn.

Chất bổ sung đã hoàn nguyên (*) : 30 ngày tại 2-8 °C.

Môi trường cơ bản đã pha trong chai (*) : 180 ngày tại 2-8 °C.

Môi trường hoàn chỉnh trong đĩa petri (*) : 30 ngày tại 2-8 °C.

(*) Giá trị điểm 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 cefixime và potassium tellurite) :

Chai 500 g.....BK147HA

Chất bổ sung cefixime-Tellurite :

10 lọ, mỗi lọ cho 500 mL môi trường cơ bản.....BS03708

11 THAM KHẢO

Wells, J. G., B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, and G. K. Morris. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18 :512-520.

Farmer, J. J. III, and B. R. Davis. 1985. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium : a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 22 : 620-625.

March, S. B., and S. Ratnam. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157 : H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 23 : 869-872.

Chapman, P. A., C. A. Siddons, P. M. Zadik, and L. Jewes. 1991. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 35 : 107-110.

Zadik, P. M., P. A. Chapman, and C. A. Siddons. 1993. Use tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 39 : 155-158.

NF EN ISO 16654. Juillet 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

12 THÔNG TIN THÊM

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

Mã tài liệu : CT SMAC _ENv6

Ngày phát hành : 01-2003

Ngày cập nhật : 05-2016

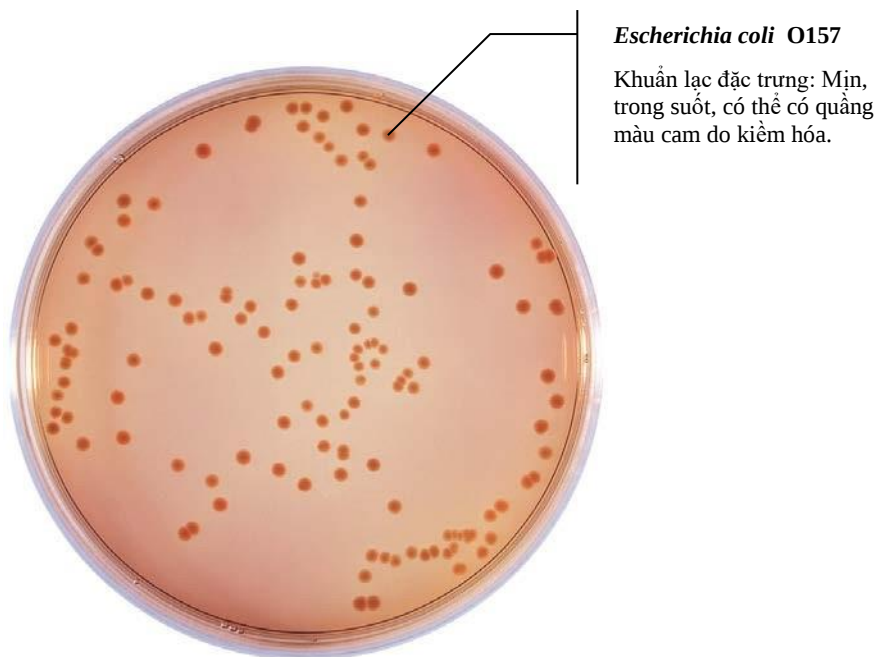
Lý do sửa đổi : Cập nhật chung.

MacCONKEY Sorbitol (CT-SMAC) Agar

Phát hiện *Escherichia coli* O157.

Kết quả :

Phát triển sau 24 h ủ tại 37 °C.



Lưu ý: Các khuẩn lạc có màu hơi nhàn tạo do sự hấp thụ của các chất màu có trong công thức môi trường. Các khuẩn lạc của *E. coli* không phải O157: H7 có màu đỏ và kích thước lớn hơn nhiều.