

## TÀI LIỆU KỸ THUẬT

### MULLER-KAUFFMANN TETRATHIONATE-NOVOBIOCIN BROTH (MKTTN)

#### TĂNG SINH CHỌN LỌC *SALMONELLA*

## 1 MỤC ĐÍCH

MKTTn Broth được sử dụng làm một trong hai môi trường tăng sinh chọn lọc để phát hiện *salmonella* theo phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn ISO 6579-1. Cùng với môi trường MSRV, nó cũng được sử dụng trong quy trình phân lập và xác định *Salmonella* trong môi trường chăn nuôi (NF U 47-100), trong gia cầm (NF U 47-101) và động vật có vú (NF U 47-102).

MKTTn Broth cũng được sử dụng làm môi trường tăng sinh chọn lọc thứ hai để phát hiện *Salmonella* trong nước theo phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn NF ISO 19250.

## 2 LỊCH SỬ

Môi trường được mô tả bởi Müller năm 1923 để giúp cho việc ức chế vi khuẩn coliform cùng lúc với sự phát triển của typhoid và paratyphoid bacilli. Kauffmann đã sửa đổi công thức và nhận được nhiều kết quả khả quan với phương pháp tăng sinh này hơn với phương pháp phân lập trực tiếp trên môi trường chọn lọc đồ đĩa.

## 3 NGUYÊN TẮC

Muối mật và brilliant green ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương.

Tetrathionate được tạo ra do dung dịch iodine-iodide phản ứng sodium thiosulfate, ức chế vi khuẩn coliform và hầu hết các vi khuẩn đường ruột.

Novobiocin ức chế sự phát triển *Proteus*.

Calcium carbonate làm trung hòa acid sulfuric sinh ra khi tetrathionate bị khử. Kết quả là để duy trì pH ở mức không đổi.

## 4 THÀNH PHẦN

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

Đối với 1025 ml môi trường:

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| - Tryptone .....                       | 8,6 g   |
| - Meat extract.....                    | 4,3 g   |
| - Bile salts.....                      | 4,78 g  |
| - Sodium chloride .....                | 2,6 g   |
| - Calcium carbonate .....              | 38,7 g  |
| - Sodium thiosulfate, anhydrous* ..... | 30,45 g |
| - Brilliant green .....                | 9,6 mg  |
| - Iodine.....                          | 4,0 g   |

- Potassium Iodide..... 5,0 g
  - Novobiocin..... 40 mg
- pH môi trường hoàn chỉnh ở 25 ° C: 7,0 – 8,0

#### For 89,5 g of dehydrated base BK208

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| - Tryptone .....                       | 8,6 g   |
| - Meat extract .....                   | 4,3 g   |
| - Bile salts .....                     | 4,78 g  |
| - Sodium chloride .....                | 2,6 g   |
| - Calcium carbonate .....              | 38,7 g  |
| - Sodium thiosulfate, anhydrous* ..... | 30,45 g |
| - Brilliant green .....                | 9,6 mg  |
| - Novobiocin .....                     | 40 mg   |

**Iodine, Potassium iodide:**  
Not furnished

#### For 89,5 g of dehydrated base BK169

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| - Tryptone .....                       | 8,6 g   |
| - Meat extract .....                   | 4,3 g   |
| - Bile salts .....                     | 4,78 g  |
| - Sodium chloride .....                | 2,6 g   |
| - Calcium carbonate .....              | 38,7 g  |
| - Sodium thiosulfate, anhydrous* ..... | 30,45 g |
| - Brilliant green .....                | 9,6 mg  |

#### For one vial of supplement BS056

- Novobiocin ..... 40 mg

#### For one vial of supplement BS033

- Novobiocin ..... 10 mg

**Iodine, Potassium iodide:**  
Not furnished

\* LƯU Ý: 30,45g Sodium thiosulfate, khan tương đương với 47,8g Sodium thiosulfate pentahydrate

## 5 CHUẨN BỊ

### Chuẩn bị môi trường cơ bản BK208

- Hòa tan 89,5 g môi trường bột khô (BK208) trong 1 lit nước cất vô trùng hoặc nước khử ion
- Khuấy từ từ cho đến khi sôi, tan hoàn toàn
- Để sôi trong 2 phút.
- Không hấp tiệt trùng.
- Để nguội môi trường đến 25 °C
- Hoà tan 4 g iodine trong 20 mL dung dịch có chứa 5g potassium iodide trong bình vô trùng.
- Thêm dung dịch iodine-iodide vào môi trường.
- Trộn đều dung dịch.
- Phân phối vô trùng 10 mL (hoặc 20 mL) mỗi ống.

### Chuẩn bị môi trường BK169

- Thực hiện theo các bước chuẩn bị như trên.
- Trước khi cho vào ống, bổ sung novobiocin như sau:
- Hoàn nguyên chất bổ sung chọn lọc Novobiocin 10 mg (BS033) với 5 mL nước cất vô trùng hoặc 40 mg Novobiocin selective supplement (BS056) với 20 mL nước cất vô trùng.
- Trộn hoặc vortex để đảm bảo tan hoàn toàn, tránh tạo thành bọt.
- Thêm 40 mg dung dịch vô trùng Novobiocin.
- Trộn đều các thành phần.
- Phân phối vô trùng vào mỗi ống 10 mL (hoặc 20 mL)

## 6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

- Chuyển 1ml canh tăng sinh vào ống MKTTn hoàn chỉnh đã được chuẩn bị như trên hoặc vào môi trường pha sẵn ready-to-melt (BM078).
- Ủ trong  $24 \pm 3$  giờ:
  - ở  $36 \pm 2$  °C để phát hiện *Salmonellae* trong nước,
  - ở 34 đến 38°C để phát hiện *Salmonellae* trong các phương pháp vi sinh thực phẩm,
  - ở  $41,5 \pm 1$  °C để phát hiện *Salmonellae* trong chăn nuôi thú y.

## 7 KẾT QUẢ

Phân lập trên thạch XLD và trên môi trường phân lập chọn lọc thứ hai, với một vòng cấy  
Với sự hiện diện của các khuẩn lạc đặc trưng, tiến hành các test khẳng định cần thiết.

## 8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

- Môi trường dạng bột: bột màu trắng, chảy tự do, đồng nhất.
- Môi trường đã được chuẩn bị hoàn chỉnh: màu xanh hơi đục, nhiều kết tủa khi để lắng
- Phản ứng nuôi cấy đặc trưng của môi trường sau 24 giờ ủ ở 37 °C (NF EN ISO 11133; FD T 90-461):

| VI SINH VẬT                                                                                   |                                        | PHÁT TRIỂN               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| <i>Salmonella</i> Enteritidis<br>+ <i>Escherichia coli</i><br>+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | WDCM 00030<br>WDCM 00013<br>WDCM 00025 | > 10 khuẩn lạc đặc trưng |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium<br>+ <i>Escherichia coli</i><br>+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | WDCM 00031<br>WDCM 00012<br>WDCM 00025 | > 10 khuẩn lạc đặc trưng |
| <i>Escherichia coli</i>                                                                       | WDCM 00013                             | $\leq 100$ khuẩn lạc     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                                                  | WDCM 00008                             | <10 khuẩn lạc            |

## 9 BẢO QUẢN

Môi trường dạng bột: 2-30 °C

Môi trường đã được chuẩn bị hoàn chỉnh trong ống: 2-8 °C.

Chất bổ sung Novobiocin đông khô: 2-8 °C

- Hạn sử dụng được ghi trên nhãn.

Môi trường chuẩn bị trong ống : 180 ngày ở 2-25 °C

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

Môi trường cơ bản chuẩn bị trong ống hoặc lọ (\*): 30 ngày ở 2-8 °C

Môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị trong ống hoặc lọ (\*): 8 ngày ở 2-8 °C

(\*) 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 dạng bột (không có iodine và novobiocin):

|                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| Chai 500 g.....                              | BK169HA |
| <b>Môi trường bột khô (không có iodine):</b> |         |
| Chai 500 g.....                              | BK208HA |
| <b>Novobiocin Selective Supplement:</b>      |         |
| 10 ống x 10mg.....                           | BS03308 |
| 8 ống x 40mg.....                            | BS05608 |
| <b>Môi trường pha sẵn hoàn chỉnh:</b>        |         |
| 50 ống x 10mg.....                           | BM07808 |

## 11 THAM KHẢO

- Müller, L.. 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comptes Rendus de la Société de Biologie, 89 : 434-437.
- Kauffmann, F.. 1935. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonella bazillen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit, 117 : 26-32.
- Jeffries, L.. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae in feces. Journal of Clinical Pathology, 12 : 568-571.
- NF U47-100. Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.
- NF U47-101. Novembre 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux.
- NF U47-102. Janvier 2008. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.
- NF EN ISO 19250. Juin 2013. Qualité de l'eau. Recherche de *Salmonella* spp.
- 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)).
- FD T90-461. Août 2016. Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture.
- NF EN ISO 6579-1. Avril 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella - Partie 1 : recherche des Salmonella spp..
- NF EN ISO 6579-1/A1. March 2020. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1 : detection of Salmonella spp. - Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC

## 12 THÔNG TIN BỔ SUNG

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

Mã tài liệu: MKTTN\_ENv13

Ngày tạo: 06-2002

Cập nhật: 06-2020

Nguyên nhân cập nhật: Cập nhật theo tiêu chuẩn NF EN ISO 6579-1/A1