TÀI LIỆU KỸ THUẬT

CHROMOGENIC CRONOBACTER ISOLATION AGAR

PHÁT HIỆN *CRONOBACTER*

1 MỤC ĐÍCH

CCI Agar được sử dụng để phát hiện *Cronobacter* spp. trong thực phẩm và nguyên liệu dùng cho người và thức ăn chăn nuôi. Nó cũng được sử dụng để kiểm soát các mẫu môi trường sản xuất.
CCI Agar đặc biệt được sử dụng để phát hiện *Cronobacter sakazakii* và spp. trong sữa bột, các sản phẩm khô và các thành phần của chúng có trong thức ăn dành cho trẻ nhỏ.
Thành phần môi trường theo tiêu chuẩn NF EN ISO 22964.

2 LỊCH SỬ

Cronobacter sakazakii (trước đây là *Enterobacter sakazakii*) là một loại trực khuẩn Gram âm, di động, kỵ khí tùy ý, không bào tử, hình thành khuẩn lạc màu vàng sau 48-72 giờ ủ trên môi trường không chọn lọc.

Một tác nhân gây bệnh cơ hội (opportunistic pathogen), đáng chú ý là nguồn gốc của viêm màng não và viêm ruột, đặc biệt là ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Mặc dù tần suất khá thấp là 1/100000 nhưng tỷ lệ tử vong cao khoảng 20 đến 50%. Trong khi các chủng đã được phân lập từ các sản phẩm thực phẩm khác nhau, chỉ những sản phẩm dành cho thức ăn cho trẻ nhỏ hoặc trẻ nhỏ mới có liên quan đến các đợt lây nhiễm.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng 100% *Cronobacter sakazakii* dương tính với α-glucosidase trong khi đồng thời 100% các loài Enterobacter khác lại âm tính với enzym này. Trên cơ sở những quan sát này, chất nền tạo màu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-glucopyranoside (X-α-glucoside) đã được đề xuất để phân biệt chủng này với các thành viên khác của họ Enterobacteriacae.

3 NGUYÊN TẮC

Tryptone kích thích sự phát triển của Cronobacter.

Chiết xuất nấm men là một nguồn cung cấp vitamin B phức tạp.

Sodium chloride duy trì áp suất thẩm thấu.

Sodium desoxycholate cho phép ức chế hệ thực vật Gram dương.

Enzyme α-glucosidase thủy phân X-α-glucoside và giải phóng aglycone 5 bromo-4-chloro-indolol. Khi có oxy, aglycone này được đime hóa và tạo thành sắc tố bromo-chloro-indigo.

Sự kết hợp của ferric ammonium citrate và sodium thiosulfate cho phép phân biệt vi khuẩn đường ruột dương tính với H_2S và vi khuẩn Cronobacter.

4 THÀNH PHẦN

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

Trong 1 lit môi trường:

- Tryptone ..... 7.00 g
- Yeast extract ..... 3.00 g
- Sodium choride ..... 5.00 g
- Sodium desoxycholate ..... 0.25 g
- Ammonium iron citrate ..... 1.00 g
- Sodium thiosulfate..... 1.00 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl,α-D-glucopyranoside ..... 150.0 mg
- Bacteriological agar..... 14.2 g

pH cho môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C : 7,3 ± 0,2.

5 CHUẨN BỊ

- Hòa tan 31,6 g môi trường dạng bột (BK200) trong 1 lít nước cất hoặc nước khử ion.
- Khuấy từ từ cho đến khi tan hoàn toàn.
- Phân phối vào mỗi bình.
- Tiệt trùng trong nồi hấp ở 121 °C trong 15 phút.
- Làm nguội và duy trì môi trường ở trạng thái nóng chảy ở 47-50 ° C.
- Đổ vào đĩa Petri và để đông đặc trên bề mặt phẳng, lạnh.
- Làm khô đĩa trong tủ ấm

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Quy trình phát hiện cho Cronobacter theo NF EN ISO 22964:

• Thêm vô trùng 10 g hoặc 10 mL mẫu cần kiểm tra vào 90 mL Buffered Peptone Water

• Sử dụng máy trộn cơ học hoặc máy máy dập mẫu nếu cần.

• Ủ môi trường ở 36 ± 2 °C trong 18 ± 2 giờ.

• Phân lập lại (re-isolate) 0,1 mL môi trường tiền tăng sinh này trong 10 mL môi trường sàng lọc Cronobacter (BM155).

• Ủ ở 41,5 ± 1,0 °C trong 24 ± 2 giờ.

• Cấy ria để phân lập trên bề mặt thạch CCI (BM154) đã được đưa về nhiệt độ phòng, với 0,1 mL môi trường tăng sinh.

• Ủ ở 41,5 ± 1,0 °C trong 24 ± 2 giờ.

Ghi chú:

Đối với các cỡ mẫu lớn hơn, làm nóng trước Buffered Peptone Water đến 36 ± 2 °C.

Nồng độ các thử nghiệm có thể ảnh hưởng đến khả năng hồi phục của các chủng Cronobacter bị stress do sự hiện diện của hệ vi sinh nền cao. Người dùng phải xác định sự phù hợp của giao thức hoạt động của mình.

7 KẾT QUẢ

Hình dạng khuẩn lạc như sau:

VI SINH VẬT	KHUẨN LẠC ĐẶC TRƯNG
Cronobacter spp.	Khuẩn lạc xanh dương-lục lam 1-3 mm
Escherichia coli	Khuẩn lạc trắng với tâm xanh lá
Salmonella spp, Proteus	Khuẩn lạc với tâm đen
Vi khuẩn gram dương	Ức chế

Tiến hành các kiểm tra khẳng định như được mô tả trong Quy trình hướng dẫn

8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Môi trường bột khô: Bột màu be, chảy tự do và đồng nhất

Môi trường chuẩn bị: Thạch hổ phách, trong suốt

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 24 ủ ở 41,5 ° C

VI SINH VẬT		PHÁT TRIỂN	ĐẶC TRƯNG
Cronobacter sakazakii	WDCM 00214	Tốt, điểm 2	Khuẩn lạc lục-lam
Cronobacter muytjensii	WDCM 00213	Tốt, điểm 2	Khuẩn lạc lục-lam
Enterobacter cloacae	WDCM 00083	Tốt, điểm 1-2	Khuẩn lạc trắng
Staphylococcus aureus	WDCM 00034	Ức chế, điểm 0	-

9 BẢO QUẢN

Môi trường dạng bột: 2-30 °C

Môi trường đổ sẵn trong đĩa: 2-8 °C

Hạn sử dụng được ghi trên nhãn.

Môi trường đổ sẵn trong đĩa (*): 30 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 bột khô:
Chai 500 g..... BK200HA

Môi trường đổ sẵn trong đĩa (Ø 90 mm) :
20 đĩa BM15408

11 THAM KHẢO

Muytjens, H.L., van der ROS, van de Repe, J., and van Druten, H.A.. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. Journal of Clinical Microbiology, 20 : 684-686.

Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L., and Ferguson, J.. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infection Control and Hospital Epidemiology, 10 : 398-401.

Iversen, C., Drugan, P., and Forsythe, S.. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. International Journal of Food Microbiology, 96 : 133-139.

Lehner, A., and Stephan, R.. 2004. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Food Protection, 67(12) : 2850-2857.

Guillaume-Gentil, O., Sànnard, V., Kandhai, M.C., Marugg, J.D., and Joosten, H.. 2005. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. Journal of Food Protection, 68(1) : 64-69.

Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., and Beuchat, L.R.. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. International Journal of Food Microbiology, 104 : 1-34.

NF EN ISO 22964. Juin 2017. Microbiologie de la chaine alimentaire. Méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp

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: CCI AGAR_EN V5

Ngày tạo: 03-2016

Ngày sửa đổi: 02-2019

Mô hình sửa đổi: Bao bì mới, môi trường bột khô