

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:1/6
--	----------------------------	--

**PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG *ESCHERICHIA COLI* DƯỠNG TÍNH
 β -GLUCURONIDAZA – KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 44° C SỬ
 DỤNG 5-BROMO-4-CLO-3-INDOLYL β -D-GLUCURONID.**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Lê Thùy Quyên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01		Thay đổi format SOP	01/03/2017

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 2/6</p>
---	-----------------------------------	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng *Escherichia Coli* dương tính β -glucuronidaza trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Phương pháp này sử dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44°C trên môi trường đặc có chứa thành phần tạo sắc để phát hiện enzyme β -glucuronidaza

II. Tài liệu tham khảo

- Phương pháp này tham khảo theo TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)

III. Nguyên lý phương pháp

- Cấy một lượng mẫu thử xác định hoặc với một lượng xác định huyền phù ban đầu lên hai đĩa chứa môi trường trypton-mật-glucuronid (TBX).
- Sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu cấy vào hai đĩa cho mỗi dung dịch pha loãng, trong cùng một điều kiện.
- Các đĩa này được ủ ở 44 °C \pm 1 °C trong 18 h đến 24 h rồi kiểm tra để phát hiện sự có mặt của các khuẩn lạc đặc trưng được coi là *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.
- Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam hoặc trên mililit mẫu

IV. An toàn Phòng thử nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, găng tay, khẩu trang... khi cần thiết
- Không ăn uống trong phòng thí nghiệm.
- Các môi trường sau khi nuôi cấy phải được hấp tiệt trùng trước khi thải.

V. Bảo quản mẫu

- Số lượng vi sinh vật trong mẫu tăng rất nhanh trong điều kiện nhiệt độ phòng, dẫn đến cho kết quả không chính xác so với thực tế.
- Để khắc phục ảnh hưởng này, nên thực hiện phân tích mẫu càng sớm càng tốt.
- Nếu không phân tích được ngay thì phải bảo quản mẫu:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 3/6
--	----------------------------	---

sản phẩm không dễ phân hủy: nhiệt độ môi trường (từ 18 °C đến 27 °C);

sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới - 15 °C, tốt nhất là dưới -18 °C;

các sản phẩm khác dễ phân hủy ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ 3 °C ± 2 °C và phải được phân tích mẫu không quá 24h.

Tham khảo TCVN 6404:2016, TCVN 6507-2 đến TCVN 6507-5

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

- Cân kỹ thuật
- Tủ ẩm, có khả năng ủ ở 44°C ± 1 °C
- Nồi hấp autoclave
- Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ 44°C đến 47°C
- Máy đập mẫu Stomacher
- Máy đo pH
- Micropipet 1ml
- Đĩa petri
- Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Dung dịch muối pepton: => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

- Pepton từ casein 1.0g
- Natri Clorua 8.5g
- Nước 1000ml
- Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần.
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là 7.0 ± 0.2 ở 25°C, nếu cần.
- Phân phối 9ml hỗn hợp trên vào mỗi ống nghiệm. Đậy nắp các ống nghiệm. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C

2. Môi trường TBX : => Ghi chép vào **BM.VS.002.06**

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 4/6</p>
---	-----------------------------------	---

- Cân môi trường theo quy định của nhà sản xuất, hòa tan bằng cách đun nóng. Khử trùng 121°C trong 15 phút.
- Chỉnh pH sao cho khi khử trùng pH là 7.2 ± 0.2 ở 25°C, nếu cần

III. Quy định thực hiện QA/QC

- Mẫu blank
- Mẫu QC: Sử dụng chứng dương *Escherichia coli* ATCC 25922

IV. Quy trình phân tích

1. Chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo:

- Dung dịch pha loãng ban đầu: Cân 10g (hoặc 10ml) mẫu cần kiểm tra cho vào bình tam giác có chứa 90ml dung dịch muối peptone đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng 10^{-1}
- Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo: Hút 1ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào ống nghiệm có chứa 9ml dung dịch muối pepton đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng 10^{-2}
 ⇒ Lặp lại các thao tác này với các độ pha loãng tiếp theo cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp cho việc cấy trong môi trường.

2. Cấy và ủ

- Dùng pipet vô trùng chuyển 1ml mẫu thử (nếu mẫu thử ở dạng lỏng) hoặc 1ml dung dịch pha loãng ban đầu (10^{-1}) (nếu sản phẩm ở dạng khác) vào hai đĩa petri vô trùng.
- Lặp lại quy trình trên cho các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, sử dụng một pipet mới vô trùng cho mỗi độ pha loãng.
- Rót vào mỗi đĩa petri khoảng 15 ml môi trường TBX mà trước đó đã được làm nguội đến khoảng từ 44°C đến 47°C trên nồi cách thủy.
- Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường và để yên cho hỗn hợp đông lại, để các đĩa petri trên mặt phẳng mát nằm ngang.
- Thời gian tính từ khi phân phối dịch cấy và đĩa đến khi rót môi trường không được quá 15 phút.
- Lật ngược các đĩa và để vào tủ ẩm để ở 44°C trong khoảng từ 18-24h. Tổng thời gian ủ không được quá 24h.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:5/6</p>
---	-----------------------------------	--

- Nếu nghi ngờ có mặt các tế bào ức chế thì ủ giai đoạn đầu khoảng 4h ở 37°C sau đó tăng nhiệt độ lên 44°C trong khoảng 18-24h. Nhiệt độ ủ không được vượt quá 45°C.

3. Đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc

- Sau giai đoạn ủ ấm quy định, đếm các khuẩn lạc điển hình (khuẩn lạc màu xanh) của Escherichia coli dương tính β -glucuronidaza trên mỗi đĩa thạch chứa ít hơn 150 CFU điển hình và ít hơn 300 CFU tổng số (điển hình và không điển hình) ghi chép **BM.VS.011.02**
- **C. TÍNH KẾT QUẢ**
- Tính số lượng khuẩn lạc của Escherichia coli dương tính β – glucuronidaza có mặt trong mẫu thử trên mililit hoặc trên gam sản phẩm từ hai độ pha loãng liên tiếp sử dụng công thức:

Trong đó:

$$N = \frac{\sum a}{V \times (n1 + 0.1n2) \times d}$$

- o $\sum a$: tổng số các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại sau hai độ pha loãng liên tiếp, có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 15 CFU màu xanh.
- o n1: số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ nhất
- o V: thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mL
- o n2: là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ hai.
- o d: hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại (d = 1 trong trường hợp các mẫu ở dạng lỏng khi mẫu thử được cấy trực tiếp)
- Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa.

D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

- Sử dụng chủng dương Escherichia coli ATCC 25922 cho khuẩn lạc màu xanh lá trên thạch TBX
- Dựa trên hướng dẫn công việc **HD.VS.001**

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Ghi kết quả vào biểu mẫu **BM.VS.011.02**

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.011 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:6/6</p>
---	-----------------------------------	---

- Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**