

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:1/9
--	----------------------------	---

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG

STAPHYLOCOCCI CÓ PHẢN ỨNG DƯƠNG TÍNH VỚI COAGULASE (STAPHYLOCOCCUS AUREUS VÀ CÁC LOÀI KHÁC) TRÊN ĐĨA THẠCH- KỸ THUẬT SỬ DỤNG MÔI TRƯỜNG THẠCH BAIRD-PARKER

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
1	Header	Thay đổi Header	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.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:2/9</p>
---	-----------------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase trên đĩa thạch có mặt trong các sản phẩm dùng cho con người hoặc thức ăn chăn nuôi, bằng cách đếm số khuẩn lạc thu được trên môi trường đặc (môi trường Baird-Parker) sau khi ủ trong điều kiện hiếu khí ở 37°C

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được tham chiếu theo: TCVN 4830-1:2005 (ISO 6888-1:1999)

III. Nguyên lý phương pháp

- Trong cùng một điều kiện, cấy các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu lên bề mặt của môi trường cấy đặc chọn lọc (dùng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng). Ủ các đĩa trong điều kiện hiếu khí ở 37°C và kiểm tra sau 24h và 48h.
- Tính số lượng *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase trong một mililit, hoặc trong một gam mẫu từ số lượng khuẩn lạc điển hình và/ hoặc không điển hình trên các đĩa ở các độ pha loãng đã chọn sao cho kết quả có ý nghĩa và được khẳng định bằng kết quả thử coagulase dương tính.

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:
 - 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;

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:3/9
--	----------------------------	---

các sản phẩm khác dễ phân hủy ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 ấm, có khả năng ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Nồi hấp autoclave
- Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ 44°C đến 47°C
- Máy đập mẫu Stomacher
- Thiết bị đếm khuẩn lạc
- Máy đo pH
- Đĩa petri
- Pipet 0,1 ml và 1ml
- Que tráng thủy tinh
- Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

- a. 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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:4/9
--	----------------------------	---

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

b. Môi trường BP (Baird - Parker) => Ghi chép vào “ **BM.VS.002.06**”

- Môi trường cơ bản:

Cân 58g môi trường trong 950ml nước chưng cất (tùy theo nhà sản xuất). Hoà tan bằng cách đun nóng.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C.

- Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng (nồng độ khoảng 20%)
- Dung dịch Kali Telurit:

Kali Telurit (K_2TeO_3) 1.0g

Nước 100ml

Hòa tan hoàn toàn Kali Telurit trong nước bằng cách đun nóng rất nhẹ. Lọc qua màng lọc 0.22µm để khử trùng. Bảo quản tối đa một tháng ở 3°C ± 2°C (loại bỏ dung dịch nếu có kết tủa trắng).

- Dung dịch Sulfamezathin (Sulfamethazin, sulfadimidin) -> chỉ bổ sung khi nghi ngờ sự có mặt của Proteus.

Sulfamezathin 0.2g

Dung dịch Natri Hydroxit (0.1mol/l) 10ml

Nước 90ml

Hòa tan Sulfamezathin trong dung dịch NaOH. Pha loãng bằng nước đến 100ml. Lọc qua màng lọc cỡ lỗ 0.22 µm để khử trùng. Bảo quản tối đa 1 tháng ở 3°C ± 2°C

- Môi trường BP hoàn chỉnh:**

Môi trường cơ bản 100ml

Dung dịch kali telurit 1.0ml

Nhũ tương lòng đỏ trứng (20%) 5.0ml

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:5/9
--	----------------------------	---

Dung dịch Sulfamezathin 2.5ml

Làm tan chảy môi trường cơ bản, sau đó làm nguội trong nồi cách thủy đến khoảng 47°C. Thêm lần lượt từng dung dịch còn lại đã được làm ấm ở 47°C, lắc kỹ sau khi thêm từng dung dịch.

Đổ một lượng thích hợp môi trường BP vào đĩa Petri vô trùng để thu được môi trường thạch dày khoảng 4mm và để cho đặc lại. Các đĩa có thể được bảo quản đến 24h ở nhiệt độ 3°C ± 2°C

c. Môi trường canh thang não-tim BHI (Brain-heart Infusion Broth)

=> Ghi chép vào “**BM.VS.002.06**”

Cân 37g trong 1000ml nước chưng cất (tùy theo nhà sản xuất). Hòa tan bằng cách đun nóng. Phân phối 5ml môi trường BHI vào ống nghiệm. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C.

d. Huyết tương thỏ:

Pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất ghi trên chai.

Huyết tương đã pha loãng phải được dùng ngay.

Trước khi sử dụng, kiểm tra từng mẻ huyết tương với các chủng *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase và *Staphylococci* phản ứng âm tính với coagulase.

III. Quy định thực hiện QA/QC

Mẫu blank

Mẫu QC: Sử dụng chứng dương *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

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 25g (hoặc 25ml) mẫu cần kiểm tra cho vào bình tam giác có chứa 225ml dung dịch muối pepton đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng 10⁻¹

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:6/9
--	----------------------------	---

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 hút 0.1ml mẫu thử (nếu sản phẩm là chất lỏng) hoặc 0.1ml dung dịch pha loãng (nếu sản phẩm ở dạng khác) vào đĩa thạch BP đã được làm khô bề mặt.
- Tốt nhất để đếm staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase với số lượng thấp, cấy 1 ml mẫu thử dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác, lên bề mặt một đĩa thạch lớn hoặc ba đĩa nhỏ.
- Lặp lại trình tự này với các dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet mới vô trùng đối với mỗi dung dịch pha loãng thập phân.

=> Lưu ý: Chỉ chọn hai dung dịch pha loãng thập phân liên tiếp để cấy các đĩa Petri sao cho thu được số đếm từ 15 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc trên mỗi đĩa Petri.

- Sử dụng dụng cụ dàn mẫu dàn chất cấy cẩn thận càng nhanh càng tốt, lên mặt đĩa thạch, cố gắng không chạm vào mép đĩa.
- Lật ngược các đĩa và đặt vào tủ ấm ở 37°C trong khoảng từ $24\text{h} \pm 2\text{h}$
- Sau khi ủ $24\text{h} \pm 2\text{h}$, đánh dấu vị trí các khuẩn lạc điển hình có mặt và các khuẩn lạc không điển hình có mặt dưới đáy của các đĩa.
- Ủ tiếp các đĩa ở 37°C trong khoảng từ $24\text{h} \pm 2\text{h}$, đánh dấu các khuẩn lạc điển hình và không điển hình mới xuất hiện => Ghi nhận vào biểu mẫu theo dõi kết quả *Staphylococci* dương tính với coagulase **“BM.VS.010.02”**

=> Khuẩn lạc điển hình có màu đen hoặc màu xám, bóng và lồi (có đường kính từ 1mm đến 1.5mm sau khi ủ trong 24h, và từ 1.5mm đến 2.5mm sau khi ủ 48h) và được bao quanh bởi một vùng trong rõ rệt, cũng có thể là mờ từng phần. Sau khi ủ trong ít nhất 24h, có thể xuất hiện một vòng màu trắng đục tiếp giáp với khuẩn lạc.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:7/9</p>
---	-----------------------------------	--

=> Khuẩn lạc không điển hình cùng kích cỡ như khuẩn lạc điển hình và có thể có một trong các hình thái sau:

- o Các khuẩn lạc đen bóng có hoặc không có viền trắng hẹp; không có vùng trong hoặc hầu như không nhìn thấy và không có vòng trắng đục hoặc rất khó nhìn thấy.
- o Các khuẩn lạc màu xám không có vùng trong.

=> Các khuẩn lạc khác là tất cả các khuẩn lạc còn lại có khả năng có mặt trên các đĩa mà không cho thấy biểu hiện bên ngoài điển hình hoặc không điển hình, thì được coi là hệ vi khuẩn nền.

3. Kháng định:

Từ mỗi đĩa chọn lấy 5 khuẩn lạc điển hình và 5 khuẩn lạc không điển hình

Từ mỗi khuẩn lạc đã chọn, dùng que cấy vô trùng, lấy một phần và chuyển vào ống nghiệm chứa môi trường BHI. Ủ ở 37°C trong 24h ± 2h.

Bằng kỹ thuật vô trùng, lấy 0.1ml mỗi dịch cấy cho vào ống chứa 0.3ml huyết tương thỏ. Ủ ở nhiệt độ 37°C

Nghiêng ống kiểm tra sự kết dính của huyết tương sau khi ủ từ 4h – 6h; nếu âm tính, ủ thêm 24h. Nếu thể tích kết dính chiếm hơn một nửa thể tích ban đầu của chất lỏng, thì phép thử coagulase là dương tính => Ghi nhận vào biểu mẫu theo dõi kết quả *Staphylococci* dương tính với coagulase **BM.VS.010.02**

Kiểm tra đối chứng: lấy 0.1ml môi trường BHI vô trùng vào một lượng huyết tương thỏ. Ủ ở 37°C. Phép thử hợp lệ khi kiểm tra huyết tương cho thấy không có dấu hiệu kết dính.

C. TÍNH KẾT QUẢ

a. Tính số lượng a các *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase đã được nhận dạng:

b_c

b_{nc}

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:8/9
--	----------------------------	---

$$a \rightarrow \sum C_c + \rightarrow \sum C_{nc}$$

$$=$$

$$A_c \quad A_{nc}$$

Trong đó:

A_c : Số lượng khuẩn lạc điển hình đã qua phép thử coagulase

A_{nc} : Số lượng khuẩn lạc không điển hình đã qua phép thử coagulase

b_c : Số lượng khuẩn lạc điển hình cho thấy có phản ứng dương tính với coagulase

b_{nc} : Số lượng khuẩn lạc không điển hình cho thấy có phản ứng dương tính với coagulase

c_c : Tổng số khuẩn lạc điển hình nhìn thấy trên đĩa.

c_{nc} : Tổng số khuẩn lạc không điển hình nhìn thấy trên đĩa.

b. Tính số lượng N *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase đã được nhận dạng có mặt trong sản phẩm, đơn vị tính CFU/ml hay CFU/g:

$$N = \frac{\sum a}{V \times (n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

Trong đó:

$\sum a$: Tổng số các khuẩn lạc *Staphylococci* có phản ứng dương tính với coagulase đã nhận biết trên tất cả các đĩa đã chọn.

V : Thể tích mẫu trên mỗi đĩa (ml)

n_1 : Số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ nhất.

n_2 : Số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ hai.

d : Hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất đã chọn

D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.010 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:9/9</p>
---	-----------------------------------	--

Sử dụng chủng dương Staphylococcus aureus ATCC 25923 cho khuẩn lạc dương tính với coagulase và sử dụng mẫu blank kiểm tra độ vô khuẩn.

Mẫu blank phải cho kết quả âm tính

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Ghi kết quả vào biểu mẫu *Staphylococci dương tính với coagulase* “**BM.VS.010.02**”

Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**