

TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9636:2013

ISO 8870:2006

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN
THERMONUCLEASE TẠO THÀNH DO STAPHYLOCOCCI
DƯƠNG TÍNH VỚI COAGULASE**

*Milk and milk-based products – Detection of thermonuclease
produced by coagulase-positive staphylococci*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9636:2013 hoàn toàn tương đương ISO 8870:2006/IDF 83:2006;

TCVN 9636:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo
Lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm sữa - Phương pháp phát hiện thermonuclease tạo thành do staphylococci dương tính với coagulase

Milk and milk-based products – Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện DNase bền nhiệt (thermonuclease) tạo thành do staphylococci dương tính với coagulase trong sữa và sản phẩm sữa.

Có thể dùng enzym để làm chỉ thị về sự phát triển của tụ cầu khuẩn đã đạt đến mức gây hại và có thể phát hiện khả năng có mặt các độc tố đường ruột của tụ cầu khuẩn (staphylococcal enterotoxins).

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6263 (ISO 8261)¹⁾, *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

DNase bền nhiệt (thermonuclease)

Enzym tạo thành bởi staphylococci dương tính với coagulase, thủy phân axit deoxyribonucleic (ADN) với các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

¹⁾ TCVN 6263 (ISO 8261) đã được thay thế bằng TCVN 6507-5 (ISO 6887-5), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa*

4 Nguyên tắc

Sữa, sữa bột hoàn nguyên hoặc các sản phẩm sữa đã đồng hóa sau khi bổ sung sữa bột gầy, được chỉnh đến pH 3,8 và ly tâm. Phần nổi phía trên được làm kết tủa với axit tricloaxetic. Sau khi ly tâm, chỉnh pH của phần kết tủa đến pH 8,5 rồi bổ sung dung dịch đệm Tris. Sau đó làm nóng dung dịch 15 min trong nồi cách thủy đun sôi và kiểm tra hoạt độ của thermonuclease trong thạch toluidine blue O-DNA. Màu của thạch sẽ chuyển từ xanh sang hồng nếu thermonuclease tách phân tử ADN. Phản ứng màu này là do tính chất đổi màu của toluidine blue O.

5 Môi trường cấy và thuốc thử

5.1 Nguyên liệu cơ bản

Đối với thực hành trong phòng thử nghiệm, xem TCVN 6263 (ISO 8261).

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

Nếu môi trường và thuốc thử đã được chuẩn bị trước mà chưa sử dụng ngay thì bảo quản ở nơi tối, với nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C không quá 1 tháng, trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng, trừ khi có quy định khác.

5.2 Thạch toluidine blue O-DNA

5.2.1 Dung dịch đệm Tris

5.2.1.1 Thành phần

Tris(hydroxymetyl)aminometan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	6,06 g
Canxi clorua (CaCl ₂)	0,11 g
Nước	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan Tris(hydroxymetyl)aminometan và canxi clorua trong 980 ml nước. Chỉnh pH đến 9,0 và thêm nước đến 1 000 ml.

5.2.2 Môi trường cơ bản

5.2.2.1 Thành phần

Axit deoxyribonucleic (ADN) ^a	0,3 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Thạch	10,0 g
Đệm Tris (5.2.1)	1 000 ml

^a ADN được sử dụng phải chứng minh là thích hợp để phát hiện thermonuclease.

5.2.2.2 Chuẩn bị

Đun sôi các thành phần trong nồi cách thủy (6.2) cho đến khi ADN và thạch hòa tan hoàn toàn (khoảng 1,5 h).

5.2.3 Dung dịch toluidine blue O

5.2.3.1 Thành phần

Toluidine blue O (C ₁₅ H ₁₆ N ₃ SCI) ^a	0,31 g
Nước	10 ml

^a Toluidine blue O (Chỉ số màu: C.I. Basic blue 17; C.I. No. 52040)

5.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan toluidine blue O trong nước và đun nóng nhẹ rồi lọc qua lưới lọc (6.12).

5.2.4 Môi trường hoàn chỉnh

5.2.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.2.2)	1 000 ml
Dung dịch toluidine blue O (5.2.3)	3 ml

5.2.4.2 Chuẩn bị

Làm nguội môi trường cơ bản đến khoảng 50 °C. Bổ sung dung dịch toluidine blue O đã lọc và xoay bình để trộn.

Khi được bảo quản với các lượng nhỏ đựng trong chai hoặc bình có nắp đậy kín ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C thì môi trường hoàn chỉnh có thể bền đến vài tháng.

5.2.5 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển 13 ml môi trường hoàn chỉnh (5.2.4) hoặc môi trường bảo quản được làm nóng sơ bộ đến khoảng 50 °C vào các đĩa Petri (6.8). Để cho đặc lại.

Các đĩa đã chuẩn bị có thể được bảo quản ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C (lật úp đĩa và tránh bị khô) ở nơi tối đến khoảng 2 tháng.

5.3 Axit clohydric, $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$.

5.4 Natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$.

5.5 Axit tricloaxetic, $c(\text{CCl}_3\text{COOH}) = 3 \text{ mol/l}$.

Hòa tan 49,02 g axit tricloaxetic trong 100 ml nước.

5.6 Sữa bột gầy.

Sữa bột gầy không được chứa thermonuclease. Kiểm tra từng lô hàng mới sử dụng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

5.7 Môi trường canh thang não tim

5.7.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân từ mô tế bào động vật bằng enzym	10,0 g
Bột não bê	12,5 g
Bột tim bò	5,0 g
Glucose	2,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dinatri hydrophosphat, khan (Na_2HPO_4)	2,5 g
Nước	1 000 ml

5.7.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C. Chuyển các lượng 5 ml môi trường cấy vào ống nghiệm (6.11) có dung tích thích hợp.

Khử trùng môi trường 15 min ở 121 °C.

5.8 Vi sinh vật thử nghiệm (kiểm chứng dương tính)

Có thể sử dụng chủng *Staphylococcus aureus* dương tính thermonuclease bất kỳ làm vi sinh vật thử nghiệm.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ cần để chuẩn bị mẫu thử theo quy định trong TCVN 6263 (ISO 8261) và thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh vật thông thường và cụ thể như sau.

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp. Các dụng cụ thủy tinh dùng nhiều lần phải chịu được khử trùng lặp lại và phải trở về hóa học.

6.1 Tủ ấm, có thể duy trì ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ và ở nhiệt độ sôi (làm nóng hoặc làm nguội môi trường và các dung dịch đến nhiệt độ thích hợp).

6.3 Máy ly tâm, có thể tạo được lực li tâm trên 27 000 g.

6.4 Máy ly tâm, có thể tạo được lực li tâm trên 2 800 g.

6.5 Ống hình trụ rỗng, bằng kim loại, đường kính khoảng 2 mm, dùng để tạo các giếng trong thạch toluidine O-DNA.

6.6 Micropipet, dung tích danh nghĩa 0,01 ml.

6.7 Vòng cấy, bằng platin-iridi hoặc niken-crom, đường kính khoảng 3 mm.

6.8 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.9 Ống đong, dung tích danh nghĩa 10 ml, 100 ml và 1 000 ml.

6.10 Chai (lọ), có nắp đậy, để bảo quản thạch toluidine blue O-DNA.

6.11 Ống nghiệm, đường kính 15 mm và dài 100 mm.

6.12 Lưới lọc (ví dụ: gạc bông hấp thụ kiểu Ph. Eur. 20)¹⁾

¹⁾ Gạc bông hấp thụ kiểu Ph.Eur. 20 là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Bảo quản các mẫu thử sao cho không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử

8.1.1 Sữa

Chỉnh pH của 100 ml mẫu thử đến 3,8 bằng axit clohydric (5.3).

8.1.2 Sản phẩm sữa

Hòa 20 g mẫu thử và 5 g sữa bột gầy (5.6) trong 50 ml nước. Chỉnh pH của dung dịch đến 3,8 bằng axit clohydric (5.3).

Không cần thiết phải bổ sung sữa bột gầy đối với tất cả các sản phẩm sữa. Việc bổ sung này có thể bỏ qua đối với các trường hợp của sữa bột gầy, sữa bột nguyên chất hoặc casein. Việc bổ sung này là cần thiết đối với các trường hợp của whey bột, yoghurt, yoghurt trái cây và kem trái cây. Đối với các sản phẩm sữa khác, nên bổ sung sữa bột gầy.

Để kiểm tra phomat, có thể sử dụng quy trình chiết thay thế sau đây: Hòa 20 g phomat trong 100 ml nước (45 °C) trong máy trộn. Sau khi trộn, chỉnh pH về 4,5 bằng axit clohydric (6 mol/l). Chuyển huyền phù sang bình cầu đáy tròn dung tích 750 ml. Thêm nước sao cho khối lượng cuối cùng bằng 12,5 lần khối lượng phomat. Khuấy trộn huyền phù qua đêm trong nồi cách thủy ở 25 °C trong 16 h. Chỉnh lại pH về 4,5. Ly tâm rồi lọc huyền phù. Tiếp tục quy trình trong 8.1.3 với 100 ml dịch lọc.

Nếu không bổ sung sữa bột gầy thì hòa 20 g mẫu thử trong 40 ml nước. Chỉnh pH đến 3,8 bằng axit clohydric (5.3).

8.1.3 Quy trình chung

8.1.3.1 Dùng máy ly tâm (6.3) ly tâm mẫu thử với gia tốc từ 27 000 g đến 34 000 g tại 5 °C trong 20 min.

8.1.3.2 Gạn phần nổi phía trên. Cứ mỗi mililit mẫu bổ sung 0,05 ml axit tricloaxetic (5.5) lạnh và trộn.

8.1.3.3 Cho ly tâm ở 27 000 g đến 34 000 g tại 5 °C trong 20 min.

8.1.3.4 Hòa tan phần cặn trong 1 ml dung dịch đệm Tris (5.2.1). Chỉnh pH đến 8,5 bằng dung dịch natri hydroxit (5.4). Pha loãng dung dịch đến 2 ml bằng dung dịch đệm Tris và trộn.

8.1.3.5 Làm nóng dung dịch trong nồi cách thủy đun sôi (6.2) trong 15 min.

8.2 Chuẩn bị vi sinh vật thử nghiệm (kiểm chứng dương tính)

8.2.1 Cấy vi sinh vật thử nghiệm (5.8) vào canh thang não tim (5.7). Ủ ấm ở 37 °C trong 24 h. Dùng máy ly tâm (6.4) ly tâm ở 2 800 g đến 3 500 g trong 15 min. Gạn phần nổi phía trên.

8.2.2 Làm nóng phần nổi phía trên trong nồi cách thủy sôi (6.2) trong 15 min.

Phần nổi phía trên đã làm nóng khi được bảo quản ở 5 °C có thể bền được 4 tuần.

Mọi chủng *Staphylococcus aureus* (ví dụ: được phân lập từ sữa hoặc sản phẩm sữa) có thể cần kiểm tra về việc tạo thành thermonuclease theo cách tương tự như đối với vi sinh vật thử nghiệm, nếu cần.

8.3 Chuẩn bị thạch toluidine blue O-DNA

Dùng ống hình trụ rỗng (6.5), cắt 2 giếng rỗng trong thạch (5.2.5). Làm khô đĩa, mở nắp và lật úp mặt thạch rồi để trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C trong khoảng 60 min.

Nếu cần kiểm tra một số mẫu thì cần cắt đến 10 giếng rỗng trong đĩa thạch.

8.4 Phát hiện thermonuclease

8.4.1 Cho 10 µl kiểm chứng dương tính (8.2.2) vào một giếng và 10 µl mẫu thử (8.1.3.5) vào giếng còn lại.

8.4.2 Ủ các đĩa Petri (đậy nắp) ở 37 °C trong 4 h trong tủ ấm (6.1). Nếu sau 4 h cho kết quả âm tính thì ủ tiếp các đĩa đến 24 h.

9 Đánh giá và diễn giải kết quả

Khi có quầng màu hồng lan rộng 1 mm hoặc lớn hơn quanh giếng chứng tỏ có mặt thermonuclease (đối chiếu với kiểm chứng dương tính). Quầng không phải màu hồng thì không được coi là có hoạt tính thermonuclease.

Phép thử thermonuclease dương tính chứng tỏ staphylococci dương tính với coagulase đã phát triển ở mức bằng hoặc lớn hơn 10^6 trên một gam.

Trong trường hợp có hình thành độc tố đường ruột thì điều này có thể dẫn đến nồng độ độc tố cao đến mức gây bệnh. Do đó, khi sản phẩm cho kết quả dương tính trong phép thử thermonuclease cần được kiểm tra về sự có mặt của độc tố đường ruột.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn, cũng như mọi chi tiết bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) các kết quả thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] *Colour Index*, The Society of Dyers and Colourists, Bradford (England) and The American Association of Textile Chemists and Colourists, North Carolina (USA), 1971
-