

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8106 : 2009  
ISO/TS 26844 : 2006**

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –  
XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH –  
PHÉP THỬ PHÂN TÁN TRONG ống NGHIỆM**

*Milk and milk products –*

*Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test*

**HÀ NỘI – 2009**

## Lời nói đầu

TCVN 8106 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 26844 : 2006;

TCVN 8106 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Sữa và sản phẩm sữa – Xác định dư lượng kháng sinh – Phép thử phân tán trong ống nghiệm

*Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues –  
Tube diffusion test*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phép thử tác nhân ức chế vi sinh vật để phát hiện các loại kháng sinh trong sữa và các sản phẩm sữa.

Phương pháp này có thể áp dụng cho sữa nguyên liệu, sữa đã xử lý nhiệt và sữa bột hoàn nguyên.

### 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 4884 (ISO 4833), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C*

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.*

ISO 13969, *Milk and milk products – Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor tests (Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn mô tả chuẩn phép thử nghiệm tác nhân ức chế vi khuẩn)*

ISO 18330, *Milk and milk products – Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues (Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn mô tả chuẩn thử nghiệm miễn dịch hoặc thử nghiệm thụ cảm để phát hiện dư lượng kháng sinh)*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

**Chất kháng sinh** (antimicrobial substances)

Các chất thấy ức chế khi thử nghiệm theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

#### 3.2

**Giới hạn phát hiện** (limits of detection)

Mức nồng độ mà tại đó số phần trăm xác định mẫu dương tính được phát hiện.

VÍ DỤ 95 %.

### 4 Nguyên tắc

Mẫu sữa được cho vào 2 ống nghiệm đựng môi trường thạch có chứa *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (tương tự chủng C953 của NIZO). Các ống nghiệm này khác nhau về pH, chất bổ sung và kháng sinh bổ trợ. Các vi sinh vật sinh trưởng bình thường khi được ủ ấm sẽ làm thay đổi chất chỉ thị pH, làm đổi màu thạch từ đỏ tía sang vàng. Nếu trong sữa có chứa các chất làm ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật thì chất chỉ thị pH sẽ giữ nguyên màu đỏ tía.

Ống nghiệm A (pH 7,0; chứa chloramphenicol) có độ nhạy được tăng rõ rệt với dư lượng tetracycline, còn ống nghiệm B (pH 8,0; chứa trimethoprim) nhạy với dư lượng beta-lactam, macrolide, aminoglycoside, sulfonamide và trimethoprim.

### 5 Vi sinh vật thử nghiệm, môi trường nuôi cấy, dung dịch chuẩn và mẫu kiểm chứng

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

#### 5.1 Vi sinh vật thử nghiệm

Dùng huyền phù *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (tương tự chủng C953 của NIZO)<sup>1)</sup>, đã điều chỉnh để có thể đếm được khoảng 5 000 000 đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit (xem Phụ lục B về cách chuẩn bị). Kiểm tra chất lượng của mỗi mẻ mới của huyền phù vi sinh vật bằng cách xác định độ nhạy đối với các dung dịch chuẩn nêu trong Bảng 1.

---

<sup>1)</sup> Huyền phù *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 hoặc chủng C953 của NIZO là vi dụ về một sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm trên.

**Bảng 1 – Các dung dịch chuẩn dùng để thử độ nhạy của huyền phù vi sinh vật thử nghiệm**

Dung dịch chuẩn	Hàm lượng sữa µg/kg
Benzylpenicillin (Penixillin-G)	2
Sulfadiazine	150
Neomycin	30
Erythromycin	10
Oxytetracycline	100

Tiến hành kiểm tra với các dung dịch chuẩn và sữa kiểm chứng trong 5 lần theo quy trình mô tả trong Điều 9. Xác định độ nhạy của huyền phù vi sinh vật thử nghiệm đối với benzylpenicillin và oxytetracycline với ống A (5.2.5) và độ nhạy đối với sulfadiazine, neomycin và erythromycin với ống B (5.2.6). Tất cả các ống nghiệm trên phải thu được kết quả dương tính.

## 5.2 Môi trường nuôi cấy

Để tăng độ tái lập của phương pháp, nên sử dụng các thành phần cơ bản khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô khi chuẩn bị môi trường nuôi cấy. Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 5.2.1 Môi trường cơ bản

#### 5.2.1.1 Thành phần

Casein trypton	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Glucosa khan	1,0 g
Thạch	10 g đến 15 g
Nước	1 000 ml

CHÚ THÍCH: Môi trường cơ bản khô có bán sẵn, chẳng hạn Thạch Đếm Đĩa.

#### 5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước và đun nóng. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,2$ .

Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min.

Môi trường cơ bản đã chuẩn bị có thể lưu giữ tối đa được 3 tháng khi được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.2 Dung dịch bromocrezol tía

#### 5.2.2.1 Thành phần

Bromocrezol tía	250 g
Etanol, 96 %	5 ml
Nước	100 ml

#### 5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan bromocrezol tía trong etanol. Thêm nước đến 100 ml.

Dung dịch bromocrezol tía có thể lưu giữ tối đa được 6 tháng khi được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

### 5.2.3 Dung dịch chloramphenicol (CAP)

#### 5.2.3.1 Thành phần

Chloramphenicol	20,0 mg
Metanol	5 ml
Nước	100 ml

#### 5.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan chloramphenicol trong metanol. Thêm nước đến 100 ml.

Dung dịch chloramphenicol có thể lưu giữ tối đa được 1 tháng khi được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

### 5.2.4 Dung dịch trimethoprim (TMP)

#### 5.2.4.1 Thành phần

Trimethoprim	25,0 mg
Etanol, 96 %	5 ml
Nước	1 000 ml

#### 5.2.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan trimethoprim trong etanol. Thêm nước đến 1 000 ml.

Dung dịch TMP có thể lưu giữ tối đa được 1 tháng khi được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

### 5.2.5 Ống nghiệm A (pH = 7)

Làm tan chảy môi trường cơ bản (5.2.1). Để nguội môi trường trên nồi cách thủy (6.3) tới nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Thêm 1,5 ml dung dịch CAP (5.2.3) và 2 ml dung dịch bromocrezol tía (5.2.2) vào 100 ml môi trường cơ bản đã gia nhiệt, đồng thời giữ môi trường này trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Trộn kĩ môi trường.

Tiếp tục giữ môi trường trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dùng dung dịch NaOH 1 mol/l hoặc HCl 1 mol/l để chỉnh pH (xem 6.5) đến  $7,0 \pm 0,1$  ở nhiệt độ nói trên.

Sau đó, thêm một thể tích (khoảng 2 ml) huyền phù vi sinh vật thử nghiệm (5.1) vào mỗi 100 ml môi trường, sau khi ủ trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $4\text{ h } 15\text{ min} \pm 30\text{ min}$  mà không đổi màu chứng tỏ không có chất kháng sinh.

Trộn và phân phối vào các ống nghiệm (6.4) mỗi ống 1 ml môi trường thử nghiệm và để cho môi trường đông đặc.

Các ống A có thể được bảo quản tối đa 3 ngày ở nhiệt độ từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , với điều kiện các ống được giữ kín để không làm bay hơi (ví dụ dùng parafilm).

### 5.2.6 Ống nghiệm B (pH = 8)

Làm tan chảy môi trường cơ bản (5.2.1). Để nguội môi trường trên nồi cách thủy (6.3) tới nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Thêm 0,6 ml dung dịch TMP (5.2.4) và 2 ml dung dịch bromocrezol tía (5.2.2) vào 100 ml môi trường cơ bản đã gia nhiệt trước, đồng thời giữ môi trường trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Trộn kĩ môi trường.

Tiếp tục giữ môi trường trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dùng dung dịch NaOH 1 mol/l hoặc HCl 1 mol/l để chỉnh pH (xem 6.5) đến  $8,00 \pm 0,02$  ở nhiệt độ nói trên. Trong khi chỉnh, chú ý không để pH của môi trường vượt quá 8,05.

Sau đó, thêm một thể tích (khoảng 2 ml) huyền phù vi sinh vật thử nghiệm (5.1) vào mỗi 100 ml môi trường, sau khi ủ trên nồi cách thủy ở nhiệt độ  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $4\text{ h } 15\text{ min} \pm 30\text{ min}$  mà không đổi màu chứng tỏ không có chất kháng sinh.

Trộn và phân phối vào các ống nghiệm (6.4) mỗi ống 1 ml môi trường thử nghiệm và để cho môi trường đông đặc.

Các ống B có thể được bảo quản tối đa 3 ngày ở nhiệt độ từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , với điều kiện các ống được giữ kín để tránh bị bay hơi (ví dụ dùng parafilm).

### 5.3 Dung dịch chuẩn và mẫu kiểm chứng

Chỉnh các khối lượng cân sao để có độ tinh khiết và hàm lượng muối phù hợp với ISO 13969.

Để chuẩn bị các dung dịch chuẩn và mẫu kiểm chứng, giả sử 1 ml dung dịch tương đương với 1 g dung dịch.

#### 5.3.1 Dung dịch chuẩn và mẫu kiểm chứng benzylpenicillin

Để benzylpenicillin đạt được độ bền giới hạn, cần chuẩn bị các dung dịch chuẩn benzylpenicillin trước khi sử dụng và làm lạnh đông các mẫu sữa kiểm chứng trong ngày sử dụng ở nhiệt độ dưới  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 5.3.1.1 Dung dịch gốc chuẩn benzylpenicillin

Hoà tan  $20,0\text{ mg} \pm 0,1\text{ mg}$  benzylpenicillin trong 1 000 ml nước và trộn. Dung dịch gốc chuẩn này chứa benzylpenicillin 20 mg/l.

Dung dịch gốc chuẩn benzylpenicillin có thể lưu giữ tối đa được 2 ngày khi được bảo quản ở nhiệt độ từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 5.3.1.2 Dung dịch làm việc chuẩn benzylpenicillin

Pha loãng 10 ml dung dịch gốc chuẩn benzylpenicillin (5.3.1.1) bằng nước đến 1 000 ml và trộn. Dung dịch gốc làm việc này chứa benzylpenicillin-200  $\mu\text{g/l}$ .

##### 5.3.1.3 Mẫu sữa kiểm chứng Benzylpenicillin

Pha loãng 1 ml dung dịch làm việc chuẩn benzylpenicillin (5.3.1.2) bằng mẫu sữa âm tính với chất kháng sinh (5.4) đến 100 ml và trộn. Mẫu sữa kiểm chứng này chứa benzylpenicillin 2  $\mu\text{g/l}$ .

Mẫu sữa kiểm chứng benzylpenicillin có thể lưu giữ tối đa được 2 tháng khi được bảo quản trong các ống nghiệm (6.4) ở nhiệt độ dưới  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

CHÚ THÍCH 1 mg muối kali penicillin-G tinh khiết tương đương với 1 595 UI (đơn vị quốc tế) penicillin G. 1 mg muối natri penicillin-G tinh khiết tương đương với 1 670 UI penicillin G.

### 5.3.2 Dung dịch chuẩn oxytetracycline và mẫu kiểm chứng oxytetracycline

#### 5.3.2.1 Dung dịch gốc chuẩn oxytetracycline

Hoà tan  $5,0\text{ mg} \pm 0,1\text{ mg}$  oxytetracycline trong 10 ml dung dịch HCl 0,1 mol/l. Pha loãng bằng nước đến 100 ml và trộn. Dung dịch gốc chuẩn này chứa oxytetracycline 50 mg/l.

Dung dịch gốc chuẩn oxytetracycline có thể lưu giữ tối đa được 1 tuần khi được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### 5.3.2.2 Dung dịch làm việc chuẩn oxytetracycline

Pha loãng 10 ml dung dịch gốc chuẩn oxytetracycline (5.3.2.1) bằng nước đến 100 ml và trộn. Dung dịch gốc làm việc này chứa oxytetracycline 5 000 µg/l.

### 5.3.2.3 Mẫu sữa kiểm chứng oxytetracycline

Pha loãng 2 ml dung dịch làm việc chuẩn oxytetracycline (5.3.2.2) với mẫu sữa âm tính (5.4) đến 100 ml và trộn. Mẫu sữa kiểm chứng này chứa oxytetracycline 100 µg/l.

Mẫu sữa kiểm chứng oxytetracycline có thể lưu giữ tối đa được 3 tháng khi được bảo quản trong các ống nghiệm (6.4) ở nhiệt độ dưới -18 °C.

## 5.3.3 Dung dịch chuẩn sulfadiazine và mẫu kiểm chứng sulfadiazine

### 5.3.3.1 Dung dịch gốc chuẩn sulfadiazine

Hoà tan 15,0 mg ± 0,1 mg sulfadiazine trong 100 ml nước và trộn. Dung dịch gốc chuẩn này chứa sulfadiazine 150 mg/l.

Dung dịch gốc chuẩn sulfadiazine có thể lưu giữ tối đa được 2 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

### 5.3.3.2 Dung dịch làm việc chuẩn sulfadiazine

Pha loãng 10 ml dung dịch gốc chuẩn sulfadiazine (5.3.3.1) bằng nước đến 100 ml nước và trộn. Dung dịch gốc làm việc này chứa sulfadiazine 15 000 µg/l.

### 5.3.3.3 Mẫu sữa kiểm chứng sulfadiazine

Pha loãng 1 ml dung dịch làm việc chuẩn sulfadiazine (5.3.3.2) bằng sữa âm tính (5.4) đến 100 ml và trộn. Mẫu sữa kiểm chứng này chứa sulfadiazine 150 µg/l.

Mẫu sữa kiểm chứng sulfadiazine có thể lưu giữ tối đa được 2 tháng khi được bảo quản trong các ống nghiệm (6.4) ở nhiệt độ dưới -18 °C.

## 5.3.4 Dung dịch chuẩn neomycin và mẫu kiểm chứng neomycin

### 5.3.4.1 Dung dịch gốc chuẩn neomycin

Hoà tan 30,0 mg ± 0,1 mg neomycin trong 5 ml đệm phosphat 0,1 mol/l (pH = 8,0 ± 0,1) và trộn. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml và trộn. Dung dịch gốc chuẩn này chứa neomycin 30 mg/l.

Dung dịch gốc chuẩn neomycin có thể lưu giữ tối đa được 2 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

#### 5.3.4.2 Dung dịch làm việc chuẩn neomycin

Pha loãng 10 ml dung dịch gốc chuẩn neomycin (5.3.4.1) bằng nước đến 100 ml nước và trộn. Dung dịch gốc làm việc này chứa neomycin 3 000 µg/l.

#### 5.3.4.3 Mẫu sữa kiểm chứng neomycin

Pha loãng 1 ml dung dịch làm việc chuẩn neomycin (5.3.4.2) bằng sữa âm tính (5.4) đến 100 ml và trộn. Mẫu sữa kiểm chứng này chứa neomycin 30 µg/l.

Mẫu sữa kiểm chứng neomycin có thể lưu giữ tối đa được 2 tháng khi được bảo quản trong các ống nghiệm (6.4) ở nhiệt độ dưới -18 °C.

#### 5.3.5 Dung dịch chuẩn erythromycin và mẫu kiểm chứng erythromycin

##### 5.3.5.1 Dung dịch gốc chuẩn erythromycin

Hoà tan 20,0 mg ± 0,1 mg erythromycin trong 5 ml metanol. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml và trộn. Dung dịch gốc chuẩn này chứa erythromycin 20 mg/l.

Dung dịch gốc chuẩn erythromycin có thể lưu giữ tối đa được 2 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 0 °C đến +5 °C.

##### 5.3.5.2 Dung dịch làm việc chuẩn erythromycin

Pha loãng 5 ml dung dịch gốc chuẩn erythromycin (5.3.5.1) bằng nước đến 100 ml và trộn. Dung dịch gốc làm việc này chứa erythromycin 1 000 µg/l.

##### 5.3.5.3 Mẫu sữa kiểm chứng erythromycin

Pha loãng 1 ml dung dịch làm việc chuẩn erythromycin (5.3.5.2) bằng sữa âm tính (5.4) đến 100 ml và trộn. Mẫu sữa kiểm chứng này chứa erythromycin 10 µg/l.

Mẫu sữa kiểm chứng Sulfadiazine có thể lưu giữ tối đa được 2 tháng khi được bảo quản trong các ống nghiệm (6.4) ở nhiệt độ dưới -18 °C.

#### 5.4 Mẫu sữa âm tính (sữa không chứa chất kháng sinh)

Xem phương pháp thu được sữa kiểm chứng trong ISO 13969, hoặc sử dụng sữa nguyên chất tiệt trùng UHT không chứa các chất ức chế vi sinh vật.

### 6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay cho dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu đáp ứng được các yêu cầu quy định.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh vật thông thường và cụ thể như sau:

**6.1 Thiết bị hấp áp lực**, dùng để khử trùng ươm.

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

**6.2 Micropipet**, dung tích 1 000  $\mu$ l.

**6.3 Nồi cách thủy**, có nắp kín, được khống chế nhiệt ổn định, có thể tuần hoàn nước và duy trì nhiệt độ ổn định ở  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Ống nghiệm**, đường kính khoảng 16 mm và dài khoảng 80 cm.

**6.5 Máy đo pH**, có độ chính xác  $\pm 0,01$  đơn vị pH, được trang bị bộ điều chỉnh nhiệt độ tự động và điện cực thích hợp cho các phép đo trong chất lỏng ở  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ví dụ điện cực Ag/AgCl).

**6.6 Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,1 mg và có thể đọc đến 0,01 mg.

**6.7 Giá đựng ống nghiệm**, thích hợp để giữ ống nghiệm (6.4).

## 7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển hay bảo quản.

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

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Điều quan trọng là mẫu thử sữa dạng lỏng cần được thử nghiệm ngay. Hoàn nguyên mẫu sữa bột với nước cất trước khi thử nghiệm.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Mẫu kiểm chứng

Trên mỗi giá đựng ống nghiệm (6.7) đặt các ống nghiệm sau đây và thêm vào mỗi ống 0,3 ml sữa kiểm chứng dương tính hoặc mẫu sữa âm tính:

- a) ống A (5.2.5) chứa mẫu sữa kiểm chứng benzylpenicillin (5.3.1.3);
- b) ống A (5.2.5) chứa mẫu sữa kiểm chứng oxytetracycline (5.3.2.3);
- c) ống A (5.2.5) chứa mẫu sữa âm tính (5.4);

## **TCVN 8106 : 2009**

- d) ống B (5.2.6) chứa mẫu sữa kiểm chứng benzympenicillin (5.3.1.3);
- e) ống B (5.2.6) chứa mẫu sữa kiểm chứng sulfadiazine (5.3.3.3);
- f) ống B (5.2.6) chứa mẫu sữa âm tính (5.4).

Khi thử nghiệm một lượng lớn mẫu thử cho thấy phần lớn số mẫu thử không chứa chất kháng sinh thì các mẫu thử này được coi là mẫu âm tính.

### **9.2 Chuẩn bị ống nghiệm**

**9.2.1** Dùng pipet lấy 10 ml mẫu thử vào ống nghiệm thủy tinh. Gia nhiệt trên nồi cách thủy (6.3), giữ ở nhiệt độ 80 °C trong 10 min để bất hoạt các chất ức chế tự nhiên không bền nhiệt. Làm nguội nhanh về nhiệt độ phòng.

**9.2.2** Dùng pipet lấy 0,3 ml phần mẫu thử (9.2.1) cho vào các ống A và B tương ứng (5.2.5) đã dán nhãn.

**9.2.3** Giữ các ống A và B trên giá (6.7) ở nhiệt độ phòng trong 1 h để sữa được khuếch tán.

**9.2.4** Rót một lớp sữa lên trên thạch. Bọc các ống bằng giấy nhôm hoặc đậy nắp để tránh làm bay hơi nước.

Sau khi phân tán, đặt các ống vào nồi cách thủy (6.3) ở 70 °C trong 10 min để hoạt hoá các bào tử bằng sốc nhiệt.

### **9.3 Ủ**

Đặt các ống nghiệm (9.2.4) vào nồi cách thủy (6.3) ở nhiệt độ 63 °C. Ủ ở nhiệt độ này trong 4 h 15 min ± 30 min cho đến khi màu của các ống nghiệm liên quan (A hoặc B) với sữa âm tính chuyển hoàn toàn từ màu đỏ tía sang màu vàng.

Màu của các ống nghiệm liên quan (A hoặc B) với các mẫu sữa kiểm chứng ít nhất phải giữ được màu đỏ tươi khi lấy các ống nghiệm ra ngoài. Ngay sau đó, lấy tất cả các ống nghiệm (A hoặc B) ra khỏi nồi cách thủy và để nhiệt độ giảm xuống nhiệt độ phòng trong 10 min.

### **9.4 Diễn giải**

Quan sát và ghi nhận lại màu của các ống chứa các mẫu thử và mẫu kiểm chứng như sau:

- a) Toàn bộ hoặc một phần môi trường thử nghiệm rắn có màu đỏ tía trong bất kì ống nghiệm nào chứa mẫu thử hoặc mẫu kiểm chứng chứng tỏ có mặt của các chất ức chế vi sinh vật thử nghiệm và chứng tỏ phép thử là dương tính.

- b) Toàn bộ môi trường thử nghiệm rắn có màu vàng trong bất kì ống nghiệm nào chứa mẫu thử hoặc mẫu kiểm chứng chứng tỏ không phát hiện có các chất ức chế vi sinh vật thử nghiệm và chứng tỏ phép thử là âm tính.

Màu của các ống nghiệm chứa mẫu sữa âm tính phải là màu vàng, trong khi các ống nghiệm chứa mẫu sữa kiểm chứng phải giữ màu đỏ tía. Nếu không thì phải lặp lại phép thử nghiệm. Nếu các mẫu sữa kiểm chứng và/hoặc sữa âm tính phát triển màu khác nhau trong các lần lặp lại thì phải tìm ra nguyên nhân.

## 10 Kháng định (tùy chọn)

### 10.1 Yêu cầu chung

Quy trình thử kháng định dư lượng beta-lactam và sulfonamide được mô tả trong [4]. Hướng dẫn tiếp theo được nêu trong 10.2 và 10.3.

CHÚ THÍCH Sự có mặt của các chất kháng sinh lẫn chất ức chế trong mẫu thử có thể gây khó khăn trong việc kháng định này.

### 10.2 Kháng định beta-lactam

Có thể dùng beta-lactamaza để kiểm tra sự có mặt của dư lượng penixillin và cephalosporin trong các mẫu thử dương tính với ống A (5.2.5) và ống B (5.2.6). Nếu hoạt tính ức chế trong mẫu xử lí với beta-lactamaza bị mất tác dụng thì có thể coi như có mặt dư lượng beta-lactam.

Có thể phân biệt hai dạng enzym beta-lactamaza:

- penixillinaza (hoạt tính beta I), hoạt động mạnh hơn trong sự suy giảm penixillin, và
- cephalosporinaza (hoạt tính beta II), hoạt động mạnh hơn trong sự suy giảm cephalosporin.

VÍ DỤ Sau đây là quy trình thử nghiệm sử dụng penixillinaza. Thêm 2 ml penaza đậm đặc chứa 10 000 000 UI penaza/ml (có sẵn của hãng Becton, Dickinson and Company<sup>2)</sup> vào 100 ml môi trường thử nghiệm trong ống A (5.2.5) trước khi chỉnh pH. Trộn và phân phối vào mỗi ống 1 ml môi trường thử nghiệm và để cho mỗi trường đông đặc lại. Sau đó thực hiện quy trình thử nghiệm theo mô tả trong Điều 9.

Một số loại beta-lactam (ví dụ cephalixin) ít nhạy hơn với beta-lactamaza. Đối với các trường hợp này, nên xử lí trước mẫu sữa (dùng 0,3 ml penaza đậm đặc cho 1 ml mẫu thử ở nhiệt độ 37 °C trong 2 h).

### 10.3 Kháng định sulfonamide

Các mẫu thử dương tính trong ống B (5.2.6) có thể được kiểm tra về sự có mặt của dư lượng sulfonamide dùng dung dịch *p*-amino axit benzoic (PABA). Nếu hoạt tính của chất ức chế bị mất tác dụng trong mẫu xử lí với PABA, thì có thể coi như có dư lượng sulfonamide.

<sup>2)</sup> Penaza đậm đặc do Becton, Dickinson and Company sản xuất là ví dụ về một sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm trên.

## TCVN 8106 : 2009

VÍ DỤ Thêm 2 ml dung dịch *p*-amino axit benzoic (5 g/kg nước) vào 100 ml môi trường thử nghiệm trong ống B (5.2.6) sau khi đã bổ sung vi sinh vật thử nghiệm và trước khi chỉnh pH. Trộn và phân phối vào các ống mỗi ống 1 ml môi trường thử nghiệm và để cho môi trường đông đặc lại. Sau đó thực hiện quy trình thử nghiệm theo mô tả trong Điều 9.

### 10.4 Kháng định đối với các chất ức chế khác

Nếu các chất ức chế khác không nhận dạng được như beta-lactam và sulfonamide thì cần tiếp tục nhận diện bằng các phép thử nghiệm khác, như hệ thống thử nghiệm vi sinh vật nhiều đĩa, thử nghiệm miễn dịch hay các phương pháp hoá học (HPLC, LC-MS) (xem ISO 18330).

## 11 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả bằng cách chỉ ra sự có mặt hay không có mặt của các chất kháng sinh.

## 12 Độ chụm

Xem Phụ lục A về giới hạn phát hiện của một số chất kháng sinh có trong sữa đối với phương pháp phân tán trong ống nghiệm.

## 13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

**Phụ lục A**

(Tham khảo)

**Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu cộng tác**

Giới hạn phát hiện đối với phương pháp hai ống nghiệm, ống A (pH = 7) và ống B (pH = 8), tính bằng microgam trong một kilogam sữa, thu được từ một số nghiên cứu cộng tác<sup>[3]</sup> với sự tham gia của ba phòng thử nghiệm có kinh nghiệm của Hà Lan. Kết quả được đưa ra trong các Bảng A.1 đến A.5.

**Bảng A.1 – Beta-lactam**

<b>Beta-lactam</b>	<b>Ống nghiệm A</b> µg/kg	<b>Ống nghiệm B</b> µg/kg
Benzylpenicillin	2	3
Amoxicillin		3
Cloxacillin		20
Ceftiofur		50
Cephalexin		80

**Bảng A.2 – Macrolide**

<b>Macrolide</b>	<b>Ống nghiệm A</b> µg/kg	<b>Ống nghiệm B</b> µg/kg
Erythromycin		10
Spiramycin		200
Tylosin		20

**Bảng A.3 – Aminoglycoside**

<b>Aminoglycoside</b>	<b>Ống nghiệm A</b> µg/kg	<b>Ống nghiệm B</b> µg/kg
Dihydrostreptomycin		70
Neomycin		30
Kanamycin		500
Gentamicin		20

**Bảng A.4 – Tetracycline**

<b>Tetracycline</b>	<b>Óng nghiệm A</b> µg/kg	<b>Óng nghiệm B</b> µg/kg
Oxytetracycline	100	400
Tetracycline	100	300
Doxycycline	100	
Clotetracycline	200	> 800

**Bảng A.5 – Sulfonamide**

<b>Sulfonamide</b>	<b>Óng nghiệm A</b> µg/kg	<b>Óng nghiệm B</b> µg/kg
Dapsone		2
Sulphamethazine		400
Sulfadiazine		150



**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Chuẩn bị huyền phù vi sinh vật thử nghiệm****B.1 Vi sinh vật thử nghiệm**

Thu lấy chủng *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (tương tự chủng C953 của NIZO), ví dụ từ ATCC (<http://www.atcc.org/>)<sup>3)</sup> hoặc từ các nguồn khác.

**B.2 Chủng gốc****B.2.1 Thạch nghiêng****B.2.1.1 Thành phần**

Chất chiết nấm men	2 g
Pepton	5 g
Chất chiết thịt	1 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Mangan sulfat ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )	35 mg
Thạch	15 g
Nước cất	1 000 ml

CHÚ THÍCH Hỗn hợp thành phần cơ bản khô ngoài mangan sulfat có bán sẵn trên thị trường, ví dụ như Thạch Dinh dưỡng.

**B.2.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần vào nước bằng cách đun nóng. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,4 \pm 0,1$ . Khử trùng môi trường bằng hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Trước khi đông đặc, chuyển môi trường vào các ống nghiệm thủy tinh vô trùng và có nắp đậy (dung tích khoảng 10 ml) và để cho thạch đông đặc theo tư thế nằm nghiêng.

**B.2.2 Duy trì chủng thử nghiệm**

Ủ ống thạch nghiêng (B.2.1), dùng vòng cấy để cấy vạch chủng cấy thử nghiệm ATCC và để 48 h trong tủ ấm ở nhiệt độ  $63 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sau khi ủ, hơ đầu ống nghiệm trên ngọn lửa rồi mở một đường

<sup>3)</sup> Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm trên (xem chú thích 1).

## **TCVN 8106 : 2009**

nhỏ vào trong ống nghiệm và đậy bằng nút cao su vô trùng. Ống nghiệm chứa chủng gốc thu được như vậy có thể giữ trong vài tháng trong tủ lạnh ở nhiệt độ 5 °C hoặc có thể được giữ như huyền phù vi sinh vật thử nghiệm trong tủ lạnh đông sâu ở nhiệt độ dưới -20 °C.

### **B.3 Nhân chủng vi sinh vật thử nghiệm**

**B.3.1** Chuyển nhanh 20 ml thạch nghiêng (B.2.1) đã tan chảy vào một đĩa Petri vô trùng đường kính 140 mm và làm nguội đến nhiệt độ phòng.

**B.3.2** Dùng pipet vô trùng lấy 5 ml nước cất cho vào ống nghiệm chứa chủng gốc (B.2.2). Chuẩn bị huyền phù vi sinh vật thử nghiệm bằng cách dùng vòng cấy nhúng nhẹ vào chủng cấy từ thạch nghiêng và cấy vào ống chủng gốc.

**B.3.3** Dùng pipet vô trùng để lấy 0,5 ml huyền phù vi sinh vật thử nghiệm (B.3.2) cho vào các đĩa Petri chứa thạch đã đông đặc (B.3.1). Cấy đều lên khắp bề mặt thạch bằng que cấy thủy tinh.

**B.3.4** Ủ 72 h trong tủ ấm ở nhiệt độ 63 °C ± 1 °C.

**B.3.5** Dùng pipet vô trùng lấy dung dịch nước muối sinh lí/pepton vô trùng (8,5 g NaCl và 1,0 g pepton/kg nước) vào đĩa Petri đã cấy (B.3.4). Dàn đều lên khắp bề mặt bằng que cấy thủy tinh. Thu lấy huyền phù vi sinh vật thử nghiệm vào chai vô trùng. Đậy nút chai và lắc kĩ.

**B.3.6** Làm sạch huyền phù vi sinh vật thử nghiệm bằng cách li tâm với gia tốc 2 000 g trong 5 min. Gạn phần nổi phía trên và hoà lại các tế bào này vào dung dịch nước muối sinh lí/pepton vô trùng. Thực hiện bước này hai lần.

**B.3.7** Hoà các tế bào này vào dung dịch nước muối sinh lí/pepton vô trùng. Đun nóng trong 10 min ở nhiệt độ 80 °C để thúc đẩy sự hình thành các bào tử.

### **B.4 Chính nồng độ vi sinh vật thử nghiệm**

Chính nồng độ của huyền phù vi sinh vật thử nghiệm sao cho đạt khoảng 5 000 000 đơn vị hình thành khuẩn lạc trong một millilit, xác định được trên thạch đếm đĩa khi ủ ở nhiệt độ 63 °C trong khoảng từ 18 h đến 24 h [xem TCVN 4884 (ISO 4833)].

### **B.5 Bảo quản huyền phù vi sinh vật thử nghiệm**

Chia thành từng lượng nhỏ và bảo quản ở nhiệt độ dưới -20 °C trong tối đa 1 năm.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
  - [2] Nouws, J.F.M., LOEFFEN, G., SCHOUTEN, J., VAN EGMOND, H., KEUKENS, H. and STEGEMAN, H. Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of antibiotic residues and sulphonamides in raw milk. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 46, 1995, pp. 140-141
  - [3] *Instruction manual for the testing of herd bulk milk samples*. Netherlands Milk Control Station (MCS Nederland), Zutphen, 2003 (in Dutch)
  - [4] Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. *IDF Bulletin*, 258, 1991
  - [5] SUHREN, G. and BEUKERS, R. Delvotest S.P. for the detection of cloxacillin and sulfamethoxazole in milk. IDF interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 81, 1998, pp. 978-990
-