

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 4829 : 2005; TCVN 4830-1 : 2005;
TCVN 4830-2 : 2005; TCVN 4830-3 : 2005;
TCVN 4884 : 2005; TCVN 4991 : 2005;
TCVN 4992 : 2005; TCVN 6507-1 : 2005;
TCVN 6507-2 : 2005; TCVN 6507-3 : 2005;
TCVN 6507-4 : 2005

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM VỀ VI SINH VẬT
TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
CHUẨN BỊ MẪU THỬ – PHƯƠNG PHÁP THỬ
BAN HÀNH NĂM 2006**

HÀ NỘI - 2006

Mục lục	Trang
• Lời nói đầu	5
• TCVN 4829 : 2005 ISO 6579 : 2002	7
• TCVN 4830-1 : 2005 ISO 6888-1 : 1999	41
• TCVN 4830-2 : 2005 ISO 6888-2 : 1999	63
• TCVN 4830-3 : 2005 ISO 6888-3 : 2003	81
• TCVN 4884 : 2005 ISO 4833 : 2003	99
• TCVN 4991 : 2005 ISO 7937 : 2004	111
• TCVN 4992 : 2005 ISO 7932 : 2004	133

- TCVN 6507-1 : 2005
ISO 6887-1 : 1999

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 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

153
- TCVN 6507-2 : 2005
ISO 6887-2 : 2003

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 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.

161
- TCVN 6507-3 : 2005
ISO 6887-3 : 2003

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 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.

183
- TCVN 6507-4 : 2005
ISO 6887-4 : 2003

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 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản.

199

Lời nói đầu

TCVN 4829 : 2005 thay thế TCVN 4829 : 2001 (ISO 6579 : 1993);

TCVN 4829 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6579 : 2002, đính chính 01 : 2004;

TCVN 4830-1 : 2005 và TCVN 4830-2 : 2005 Thay thế TCVN 4830 – 89 (ISO 6888 : 1993);

TCVN 4830-1 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6888-1 : 1999 và Sửa đổi 1 : 2003;

TCVN 4830-2 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6888-2 : 1999 và Sửa đổi 1 : 2003;

TCVN 4830-3 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6888-3 : 2003;

TCVN 4884 : 2005 Thay thế TCVN 4884 : 2001 (ISO 4833 : 1991);

TCVN 4884 : 2005 hoàn toàn tương đương với ISO 4833 : 2003;

TCVN 4991 : 2005 Thay thế TCVN 4991 – 89 (ISO 7937 : 1985);

TCVN 4991 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 7937 : 2004;

TCVN 4992 : 2005 Thay thế TCVN 4992 – 89 (ISO 7932 : 1987);

TCVN 4992 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 7932 : 2004;

TCVN 6507-1 : 2005 Thay thế TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983);

TCVN 6507-1 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6887-1 : 1999;

TCVN 6507-2 : 2005 Thay thế TCVN 4833-2 : 2002 (ISO 3100-2 : 1998);

TCVN 6507-2 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6887-2 : 2003;

TCVN 6507-3 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6887-3 : 2003;

TCVN 6507-4 : 2005 hoàn toàn tương đương ISO 6887-4 : 2003, đính chính 1 : 2004;

TCVN 4829 : 2005; TCVN 4830-1 : 2005; TCVN 4830-2 : 2005; TCVN 4830-3 : 2005;

TCVN 4884 : 2005; TCVN 4991 : 2005; TCVN 4992 : 2005; TCVN 6507-1 : 2005;

TCVN 6507-2 : 2005; TCVN 6507-3 : 2005; TCVN 6507-4 : 2005 do Ban kỹ thuật TCVN/TC/F13 Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành số 227/QĐ-BKHCN ngày 17 tháng 02 năm 2006.

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 4829 : 2005

ISO 6579 : 2002

Xuất bản lần 3

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM
VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI - PHƯƠNG PHÁP
PHÁT HIỆN *SALMONELLA* TRÊN ĐĨA THẠCH**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the detection of Salmonella spp.*

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét tiếp thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Hy vọng rằng khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện *Salmonella* trên đĩa thạch

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the detection of Salmonella spp.*

CẢNH BÁO – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, các phép thử phát hiện *Salmonella*, đặc biệt là *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi chỉ được tiến hành trong các phòng thử nghiệm được trang bị thích hợp, dưới sự kiểm soát của cán bộ vi sinh có kinh nghiệm và phải hết sức thận trọng khi huỷ bỏ các nguyên vật liệu sau ủ.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện *Salmonella* trên đĩa thạch, trong đó có *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi.

Như đã được trình bày trong phần giới thiệu, tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm dùng cho con người và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.

CẢNH BÁO – Phương pháp này có thể không phát hiện được tất cả *Salmonella* Typhi và Paratyphi.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), 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 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân.

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa – Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Salmonella (*Salmonella*)

các vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc ít điển hình trên môi trường đặc chọn lọc và có những đặc điểm về sinh hoá và huyết thanh như được mô tả khi tiến hành thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

3.2

phát hiện *Salmonella* (*detection of Salmonella*)

việc xác định sự có mặt hay không có mặt *Salmonella* (3.1), trong một khối lượng hoặc thể tích cụ thể của sản phẩm, khi tiến hành thử nghiệm theo tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Yêu cầu chung

Qui trình phát hiện *Salmonella* cần qua bốn giai đoạn kế tiếp nhau (xem thêm phụ lục A).

CHÚ THÍCH: *Salmonella* có thể có mặt với số lượng nhỏ và thường kèm theo một lượng khá lớn các vi sinh vật thuộc họ *Enterobacteriaceae* hoặc các họ khác. Do đó cần tăng sinh sơ bộ để đảm bảo phát hiện một lượng nhỏ *Salmonella* hoặc *Salmonella* bị suy giảm hoạt tính.

4.2 Tăng sinh sơ bộ trong môi trường lỏng không chọn lọc

Cấy phân mẫu thử trong dung dịch đệm bacteriological peptone, nhiệt độ phòng, sau đó ở $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$

Đối với một số loại thực phẩm nhất định, cần phải sử dụng các quy trình tăng sinh sơ bộ khác. Xem 9.1.2.

Đối với số lượng lớn, thì làm nóng dung dịch đệm pepton đến $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi cấy phần mẫu thử.

4.3 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Cấy dịch tăng sinh chọn lọc thu được trong 4.2 vào môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (môi trường RVS) và môi trường Tetrathionat/novobioxin muller-kauffmann (môi trường MKTTn).

Môi trường RVS được ủ ở $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ và môi trường MKTTn được ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

4.4 Đổ đĩa và nhận dạng

Cấy dịch tăng sinh thu được trong 4.3 vào hai môi trường đặc chọn lọc:

- thạch deoxycholat lyzin xyloza (thạch XLD).
- một môi trường đặc chọn lọc bất kỳ khác bổ sung cho thạch XLD và đặc biệt thích hợp để phân lập các chủng *Salmonella*, *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi dương tính với lactoza; phòng thử nghiệm có thể chọn môi trường đó để sử dụng.

Thạch XLD được ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và được kiểm tra sau $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Môi trường thạch chọn lọc thứ hai được ủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH: Để tham khảo thạch Brilliant green (BGA), thạch bitmut sunfit, v.v...có thể được sử dụng làm môi trường đổ đĩa thứ hai.

4.5 Khẳng định để nhận dạng

Các khuẩn lạc *Salmonella* giả định được cấy truyền rồi đổ đĩa như mô tả trong 4.4, và khẳng định để nhận dạng chúng bằng các phép thử sinh hoá và huyết thanh thích hợp.

5 Môi trường cấy, thuốc thử và huyết thanh

5.1 Yêu cầu chung

Đối với thực hành của phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.2 Môi trường cấy và thuốc thử

CHÚ THÍCH: Do phương pháp có sử dụng nhiều loại môi trường cấy và thuốc thử, nên để thuận tiện và dễ dàng sử dụng các thành phần và việc chuẩn bị chúng được nêu trong phụ lục B.

5.2.1 Môi trường tăng sinh sơ bộ không chọn lọc: dung dịch đậm pepton

Xem B.1.

5.2.2 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ nhất: Môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (môi trường RVS).

Xem B.2.

5.2.3 Môi trường tăng sinh chọn lọc thứ hai: Môi trường Novobioxin tetrathionat Muller–Kauffmann (môi trường MKTTn)

Xem B.3.

5.2.4 Môi trường đổ đĩa đặc chọn lọc

5.2.4.1 Môi trường thứ nhất: Thạch deoxycholat lyzin xyloza (thạch XLD)

Xem B.4.

5.2.4.2 Môi trường thứ hai

Việc chọn môi trường thích hợp thứ hai là quyền lựa chọn của phòng thử nghiệm. Phải tuân thủ chính xác các chỉ dẫn của nhà sản xuất về việc chuẩn bị môi trường để sử dụng.

5.2.5 Thạch dinh dưỡng

Xem B.5.

5.2.6 Thạch TSI (triple sugar/iron agar)

Xem B.6.

5.2.7 Thạch urê (Christensen)

Xem B.7.

5.2.8 Môi trường L-Lyzin khử cacboxyl

Xem B.8.

5.2.9 Thuốc thử phát hiện β -galactosidaza (hoặc sử dụng các đĩa giấy làm sẵn theo chỉ dẫn của nhà sản xuất).

Xem B.9.

5.2.10 Thuốc thử phản ứng Voges-Proskauer (VP)

Xem B.10.

5.2.11 Thuốc thử phản ứng indol

Xem B.11.

5.2.12 Thạch dinh dưỡng nửa đặc

Xem B.12.

5.2.13 Dung dịch muối sinh lý

Xem B.13.

5.3 Huyết thanh

Có một số loại huyết thanh ngưng kết có chứa kháng thể của một hay một vài kháng nguyên O có bán sẵn; nghĩa là kháng huyết thanh chứa một hoặc nhiều hơn một nhóm "O" (còn được gọi là kháng nguyên "O" đơn giá hoặc đa giá), kháng huyết thanh Vi và kháng huyết thanh có chứa các kháng thể đối với một hay nhiều yếu tố H (còn được gọi là huyết thanh H đơn giá hoặc đa giá).

Cần thử trước các kháng huyết thanh để đảm bảo là chúng thích hợp cho việc phát hiện tất cả các loại *typ* huyết thanh *Salmonella*. Vấn đề trên được giải quyết bằng cách dùng kháng huyết thanh của một nhà cung cấp đã được công nhận (ví dụ, bởi cơ quan của chính phủ).

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

Thiết bị dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996)] và cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị để khử trùng khô (lò sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ sấy hoặc lò sấy, được thông gió bằng đối lưu, có thể vận hành từ 37 °C đến 55 °C.

6.3 Tủ ấm, có thể vận hành ở 37 °C ± 1 °C.

6.4 Nồi cách thủy có thể vận hành ở 115 °C ± 1 °C. Tủ ấm có thể vận hành ở 37 °C.

6.5 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C.

6.6 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở nhiệt độ ở 37 °C ± 1 °C.

Nên sử dụng nồi cách thủy (6.4, 6.5 và 6.6) có chứa chất kháng khuẩn vì liệu lây nhiễm *Salmonella* thấp.

6.7 Que cấy vòng vô trùng, có đường kính khoảng 3 mm hoặc 10 µl, hoặc **pipet vô trùng**.

6.8 pH mét, có độ chính xác ± 0,1 đơn vị pH ở 20 °C đến 25 °C.

6.9 Ống hoặc **bình thử nghiệm**, có dung tích thích hợp.

Có thể sử dụng chai hoặc bình không độc có nắp vận bằng kim loại hoặc bằng chất dẻo .

6.10 Pipet chia độ hoặc **pipet tự động**, có dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch 0,5 ml và 0,1 ml tương ứng.

6.11 Đĩa Petri, cỡ nhỏ (đường kính từ 90 mm đến 100 mm) và / hoặc cỡ lớn (đường kính 140 mm).

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn riêng về lấy mẫu cho sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Việc chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng phù hợp với các sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

9 Cách tiến hành (xem sơ đồ ở phụ lục A)

9.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

9.1.1 Yêu cầu chung

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và các tiêu chuẩn riêng liên quan đến sản phẩm. Xem TCVN 6263 (ISO 8261) đối với sữa và sản phẩm sữa.

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, trong trường hợp chung sử dụng môi trường tăng sinh sơ bộ được qui định trong tiêu chuẩn này. Hướng dẫn chi tiết về môi trường tăng sinh sơ bộ có thể tìm thấy trong các tài liệu tham khảo.

Nếu khối lượng qui định của phần mẫu thử khác 25 g, thì sử dụng một lượng cân thiết môi trường tăng sinh sơ bộ để có được dung dịch pha loãng 1/10.

Để giảm khối lượng công việc khi có nhiều phần mẫu thử lớn hơn 25 g từ lô hàng thực phẩm qui định cần kiểm tra, và khi có bằng chứng cho thấy việc trộn (gộp các phần mẫu thử) không ảnh hưởng đến kết quả của thực phẩm cụ thể đó, thì có thể trộn các phần mẫu thử. Ví dụ, nếu phải kiểm tra 10 phần mẫu thử 25 g, thì trộn 10 đơn vị để tạo thành phần mẫu thử 250 g và thêm 2,25 l môi trường tăng sinh sơ bộ. Cách khác, có thể trộn các lượng 0,1 ml (trong 10 ml môi trường RVS) và 1 ml (trong 10 ml môi trường MKTTn) môi trường tăng sinh sơ bộ từ 10 phần mẫu thử độc lập (xem 9.3.1) để tăng sinh trong 100 ml môi trường tăng sinh chọn lọc.

9.1.2 Chuẩn bị riêng huyền phù ban đầu đối với một số loại thực phẩm nhất định

CHÚ THÍCH: Phương pháp chuẩn bị cụ thể sau đây chỉ liên quan đến trường hợp của *Salmonella*. Việc chuẩn bị cụ thể để xác định các vi sinh vật khác được mô tả trong TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), TCVN 6507-4 (ISO 6887-4) và TCVN 6263 (ISO 8261).

9.1.2.1 Cacao và các sản phẩm có chứa cacao (ví dụ nhiều hơn 20 %).

Thêm dung dịch đệm pepton (5.2.1) tốt nhất là 50 g/l casein (tránh sử dụng casein axit), hoặc 100 g/l sữa bột gầy vô trùng, và sau khi ủ khoảng 2 h, thêm 0,018 g/l Brilliant green nếu thực phẩm có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn Gram dương cao.

9.1.2.2 Thực phẩm có tính axit và axit hoá

Đảm bảo rằng pH không xuống thấp hơn 4,5 trong suốt quá trình tăng sinh sơ bộ.

CHÚ THÍCH: pH của thực phẩm có tính axit và axit hoá sẽ ổn định hơn nếu sử dụng dung dịch đệm pepton nồng độ kép.

9.2 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc

Ủ huyền phù ban đầu (9.1) ở $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ trong $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.3 Tăng sinh chọn lọc

9.3.1 Chuyển 0,1 ml dịch tăng sinh thu được trong 9.2 vào ống chứa 10 ml môi trường RSV (5.2.2); chuyển 1 ml dịch tăng sinh thu được trong 9.2 vào ống chứa 10 ml môi trường MKTTn (5.2.3).

9.3.2 Ủ môi trường RVS (9.3.1) đã cấy dịch tăng sinh ở $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$, và môi trường MKTTn đã cấy dịch tăng sinh ở $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Cảnh thận không được để vượt quá nhiệt độ này là $41,5\text{ °C}$.

9.4 Đổ đĩa và nhận dạng

9.4.1 Sau khi ủ 24 h \pm 3 h, sử dụng dịch cấy thu được trong môi trường RVS (9.3.2), dùng que cấy vòng (6.7) cấy lên bề mặt của một đĩa Petri cỡ lớn (6.11) chứa môi trường chọn lọc đổ đĩa thứ nhất (thạch XLD, xem 5.2.4.1) sao cho thu được các khuẩn lạc phân lập tốt.

Trường hợp không có đĩa lớn, thì sử dụng hai đĩa nhỏ, chỉ dùng một que cấy vòng để cấy liên tiếp từng đĩa một.

Tiến hành tương tự đối với môi trường chọn lọc đổ đĩa thứ hai (5.2.4.2) sử dụng que cấy vòng vô trùng và các đĩa Petri như trên.

9.4.2 Sau khi ủ 24 h \pm 3 h, sử dụng dịch cấy thu được trong môi trường MKTTn (9.3.2), lặp lại cách tiến hành đã mô tả trong 9.4.1 với hai môi trường đổ đĩa chọn lọc.

9.4.3 Đối với môi trường đổ đĩa thứ nhất (5.2.4.1), lật ngược các đĩa (9.4.1 và 9.4.2) sao cho đáy hướng lên trên và đặt chúng trong tủ ấm (6.3) để ở 37 °C. Đối với môi trường đổ đĩa thứ hai (5.2.4.2), phải theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

9.4.4 Sau khi ủ 24 h \pm 3 h, kiểm tra các đĩa (9.4.3) về sự có mặt của các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình và các khuẩn lạc không điển hình mà có thể nghi là *Salmonella* (xem chú thích). Đánh dấu các vị trí của chúng trên đáy đĩa.

Khuẩn lạc *Salmonella* điển hình phát triển trên thạch XLD có tâm màu đen và vùng trong màu đỏ nhạt do sự thay đổi màu của chất chỉ thị.

CHÚ THÍCH: *Salmonella* biến thể âm tính H₂S (ví dụ, *S. Paratyphi A*) phát triển trên thạch XLD có màu hồng có tâm màu hồng sẫm. *Salmonella* dương tính với lactoza phát triển trên thạch XLD màu vàng, có hoặc không có tâm màu đen.

Ủ môi trường đặc chọn lọc thứ hai ở nhiệt độ thích hợp và sau một khoảng thời gian thích hợp kiểm tra để phát hiện sự có mặt với các khuẩn lạc, từ các đặc trưng của chúng mà có thể coi là *Salmonella* giả định.

9.5 Kháng định

9.5.1 Yêu cầu chung

Nếu thấy đáng tin cậy, có thể sử dụng các bộ thử nhận dạng có bán sẵn để kiểm tra sinh hoá *Salmonella*. Việc sử dụng các bộ thử nhận dạng này liên quan đến thử sinh hoá các khuẩn lạc. Sử dụng các bộ thử này theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH: Việc công nhận các khuẩn lạc *Salmonella* cần có bề dày kính nghiệm và hình dạng bên ngoài của chúng có thể thay đổi ít nhiều không chỉ từ huyết thanh này đến loại huyết thanh khác mà còn từ mẻ này đến mẻ khác của môi trường cấy chọn lọc được sử dụng.

9.5.2 Chọn khuẩn lạc để khẳng định

Để khẳng định, lấy từ mỗi đĩa (hai đĩa cỡ nhỏ hoặc một đĩa cỡ lớn) của từng môi trường chọn lọc (xem 9.4) ít nhất một khuẩn lạc được xem là điển hình hoặc nghi ngờ và bốn khuẩn lạc tiếp theo nếu khuẩn lạc đầu tiên là âm tính.

Nên lấy ít nhất năm khuẩn lạc để nhận dạng trong trường hợp nghiên cứu dịch tễ học. Nếu trên một đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc nghi ngờ, thì lấy tất cả các khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ đó để khẳng định.

Cấy ria các khuẩn lạc đã chọn trên bề mặt các đĩa thạch dinh dưỡng đã được làm khô trước (5.2.5), sao cho các khuẩn lạc phân lập tốt phát triển được. Ủ các đĩa đã cấy (9.4.3) ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Sử dụng các chủng cấy thuần khiết để khẳng định bằng phép thử sinh hoá và huyết thanh.

9.5.3 Khẳng định sinh hoá

9.5.3.1 Yêu cầu chung

Từ các khuẩn lạc đã chọn trong 9.5.2, dùng que cấy cấy vào các môi trường qui định trong 9.5.3.2 đến 9.5.3.7.

9.5.3.2 Thạch TSI (5.2.6)

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch và cấy đâm sâu xuống đáy. Ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Diễn giải những thay đổi trong môi trường như sau:

a) Cấy đâm sâu

- | | |
|-----------------------------|---|
| - màu vàng | glucoza dương tính (sử dụng glucoza) |
| - màu đỏ hoặc không đổi màu | glucoza âm tính (không sử dụng glucoza) |
| - màu đen | sinh hydro sunfua |
| - bọt hoặc vết rạn | sinh khí từ glucoza |

b) Bể mặt nghiêng của thạch

- màu vàng lactoza và/ hoặc sucroza dương tính (sử dụng lactoza và/ hoặc sucroza)
- màu đỏ hoặc không đổi màu lactoza và sucroza âm tính (không sử dụng lactoza cũng như không sử dụng sucroza)

Các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình thể hiện tính kiềm (màu đỏ) trên bề mặt nghiêng của thạch và khi cấy đâm sâu mang tính axit (màu vàng) có sinh khí (bọt khí) và (với khoảng 90 % trường hợp) sinh hydrosulfua (thạch bị đen) (9.5.3.8).

Khi *Salmonella* dương tính với lactoza được phân lập (xem 4.4), thì trên bề mặt nghiêng của thạch TSI có màu vàng. Do vậy, việc khẳng định sơ bộ các chủng *Salmonella* không chỉ dựa trên các kết quả của phép thử trên thạch TSI (xem 9.5.3).

9.5.3.3 Thạch urê (5.2.7)

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch. Ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ và kiểm tra thường xuyên.

Nếu phản ứng là dương tính, thì sự phân giải urê thành amoniac, làm phenol màu đỏ chuyển thành màu hồng và sau đó chuyển thành màu đỏ hồng. Phản ứng thường xuất hiện sau 2 h đến 4 h.

9.5.3.4 Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl (5.2.8)

Cấy ngay phía dưới bề mặt của môi trường lỏng. Ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Màu đục và đỏ tía sau khi ủ chứng tỏ phản ứng dương tính. Màu vàng là phản ứng âm tính.

9.5.3.5 Phát hiện β -galactosidaza (5.2.9)

Cho một vòng đầy các khuẩn lạc nghi ngờ vào trong ống có chứa 0,25 ml dung dịch muối (5.2.13).

Thêm 1 giọt toluen và lắc ống. Đặt ống này vào trong nồi cách thủy (6.6) đặt ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ và để trong vài phút (khoảng 5 phút). Thêm 0,25 ml thuốc thử để phát hiện β -galactosidaza và lắc đều.

Đặt lại ống vào nồi cách thủy để ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ và để trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$, kiểm tra ống thường xuyên.

Màu vàng cho thấy phản ứng dương tính. Phản ứng thường xuất hiện sau 20 phút.

Nếu sử dụng các đĩa giấy bán sẵn (5.2.9), thì theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

9.5.3.6 Môi trường phản ứng Voges-Proskauer (VP) (5.2.10)

Cho một vòng đầy các khuẩn lạc nghi ngờ vào ống vô trùng có chứa 3 ml môi trường VP

Ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Sau khi ủ, thêm hai giọt dung dịch creatin, ba giọt dung dịch etylic 1-naphtol và sau đó thêm hai giọt dung dịch kali hydroxit; lắc đều sau mỗi lần thêm từng loại thuốc thử.

Khi xuất hiện màu hồng đến màu đỏ sáng trong 15 phút chứng tỏ phản ứng dương tính.

9.5.3.7 Môi trường phản ứng indol (5.2.11)

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống chứa 5 ml môi trường trypton/ tryptophan.

Ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Sau khi ủ, thêm 1 ml thuốc thử Kovacs.

Nếu có xuất hiện một vòng màu đỏ chứng tỏ phản ứng dương tính. Khi xuất hiện một vòng màu nâu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.3.8 Giải thích các phép thử sinh hoá

Nói chung, *Salmonella* cho các phản ứng như trong bảng 1.

9.5.4 Kháng định huyết thanh và typ huyết thanh

9.5.4.1 Yêu cầu chung

Việc phát hiện sự có mặt của *Salmonella* kháng nguyên O, kháng nguyên Vi và kháng nguyên H được thử bằng sự ngưng kết trên phiến kính với huyết thanh thích hợp, từ các khuẩn lạc thuần khiết (9.5.2) và sau khi các chủng có thể tự ngưng kết đã bị loại trừ. Sử dụng kháng huyết thanh theo chỉ dẫn của nhà sản xuất nếu khác với mô tả dưới đây.

9.5.4.2 Loại trừ chủng tự ngưng kết

Cho một giọt dung dịch muối (5.2.13) lên phiến kính thủy tinh đã được làm sạch một cách cẩn thận. Dùng que cấy vòng (6.7) trộn đều dung dịch với khuẩn lạc cần thử, để thu được huyền phù đục và đồng nhất.

CHÚ THÍCH: Cũng có thể trộn đều khuẩn lạc cần thử trong một giọt nước, và sau đó trộn dung dịch này với một giọt dung dịch muối (5.2.13).

Lắc nhẹ phiến kính từ 30 giây đến 60 giây. Quan sát kết quả trên nền tối, tốt nhất là dùng kính lúp.

Nếu vi khuẩn ít nhiều có kết dính các đơn vị với nhau, thì chủng này được xem là tự ngưng kết, và sẽ không phải thử nghiệm tiếp vì không thể phát hiện kháng nguyên được.

Bảng 1 – Giải thích các phép thử sinh hoá

Phép thử * (9.5.3.2 đến 9.5.3.7)	Chủng <i>Salmonella</i>									
	S. Typhi		S.Paratyphi A		S.Paratyphi B		S.Paratyphi C		Các chủng khác	
	Phản ứng	% ^b	Phản ứng	% ^b	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^c	Phản ứng	% ^b
Thạch TSI sinh axit từ glucoza	+	100	+	100	+		+		+	100
Thạch TSI sinh khí từ glucoza	- ^d	0	+	100	+		+		+	92
Thạch TSI sinh axit từ lactoza	-	2	-	100	-		-		-	1
Thạch TSI sinh axit từ sucroza	-	0	-	0	-		-		-	1
Thạch TSI Hydro sunfua được tạo thành	+	97	-	10	+		+		+	92
Phân giải urê	-	0	-	0	-		-		-	1
Lyzin đã khử nhóm cacboxyl	+	98	-	0	+		+		+	95
Phản ứng β -galactosidaza	-	0	-	0	-		-		-	2 ^e
Phản ứng Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Sinh indol	-	0	-	0	-		-		-	1

* Từ tài liệu tham khảo [5].

^b Các tỷ lệ phần trăm này cho thấy rằng không phải tất cả các *typ* huyết thanh *Salmonella* cho các phản ứng đánh dấu + hoặc -. Các tỷ lệ phần trăm này có thể thay đổi tùy theo *typ* huyết thanh và trong các *typ* huyết thanh làm nhiễm độc thực phẩm từ các nơi khác nhau.

^c Các phần trăm này chưa có số liệu.

^d *Salmonella* Typhi là loại yếm khí.

^e Loài phụ arizonæ *Salmonella enterica* cho phản ứng lactoza dương tính hoặc âm tính nhưng luôn cho β -galactosidaza dương tính. Để nghiên cứu các chủng này có thể cần tiến hành các thử nghiệm bổ sung.

9.5.4.3 Kiểm tra kháng nguyên O

Sử dụng một khuẩn lạc thuần khiết không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành theo 9.5.4.2, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O (5.3) thay cho dung dịch muối (5.2.13).

Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

Lần lượt sử dụng huyết thanh đa giá và đơn giá.

9.5.4.4 Kiểm tra kháng nguyên Vi

Tiến hành theo 9.5.4.2, nhưng sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên Vi (5.3) thay cho dung dịch muối. Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

9.5.4.5 Kiểm tra kháng nguyên H

Cấy khuẩn lạc thuần khiết không có khả năng tự ngưng kết vào thạch dinh dưỡng nửa đặc (5.2.12). Ủ môi trường này ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Sử dụng chủng cấy này để kiểm tra kháng nguyên H, tiến hành theo 9.5.4.2, nhưng sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên H (5.3) thay cho dung dịch muối.

Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính.

9.5.5 Giải thích phản ứng sinh hoá và huyết thanh

Bảng 2 giải thích các kết quả của các phép thử khẳng định (9.5.3 và 9.5.4) tiến hành trên các khuẩn lạc đã dùng (9.5.2).

Bảng 2 – Giải thích các kết quả các phép thử khẳng định

Phản ứng sinh hoá	Tự ngưng kết	Phản ứng huyết thanh	Giải thích
Điển hình	Không	Kháng nguyên O, Vi hoặc H dương tính	Các chủng được coi là <i>Salmonella</i>
Điển hình	Không	Tất cả các phản ứng âm tính	Có thể là <i>Salmonella</i>
Điển hình	Có	Không thử nghiệm (xem 9.5.4.2)	
Phản ứng không điển hình	Không/ Có	Kháng nguyên O, Vi hoặc H dương tính	
Phản ứng không điển hình	Không/ Có	Tất cả các phản ứng âm tính	Không được coi là <i>Salmonella</i>

9.5.6 Xác nhận định danh

Các chủng được xem là *Salmonella*, hoặc có thể là *Salmonella* (xem bảng 2), phải được gửi đến trung tâm chuẩn *Salmonella* đã được công nhận để xác định *typ*.

Khi gửi đi để định dạng phải kèm theo tất cả thông tin liên quan đến các chủng đó và cho đủ được tách ra từ thực phẩm hay từ vụ ngộ độc thực phẩm.

10 Biểu thị kết quả

Căn cứ vào phần giải thích các kết quả, chỉ rõ có mặt hay không có mặt *Salmonella* trong phần mẫu thử x g hoặc x ml sản phẩm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Xem phụ lục C về số liệu thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- mọi sai lệch trong môi trường tăng sinh hoặc các điều kiện ủ đã sử dụng;
- tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với các chi tiết của sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- các kết quả thu được.

Báo cáo thử nghiệm cũng cần nêu rõ xem có thu được kết quả dương tính hay không khi chỉ sử dụng môi trường đổ đĩa (5.2.4) không qui định trong tiêu chuẩn này.

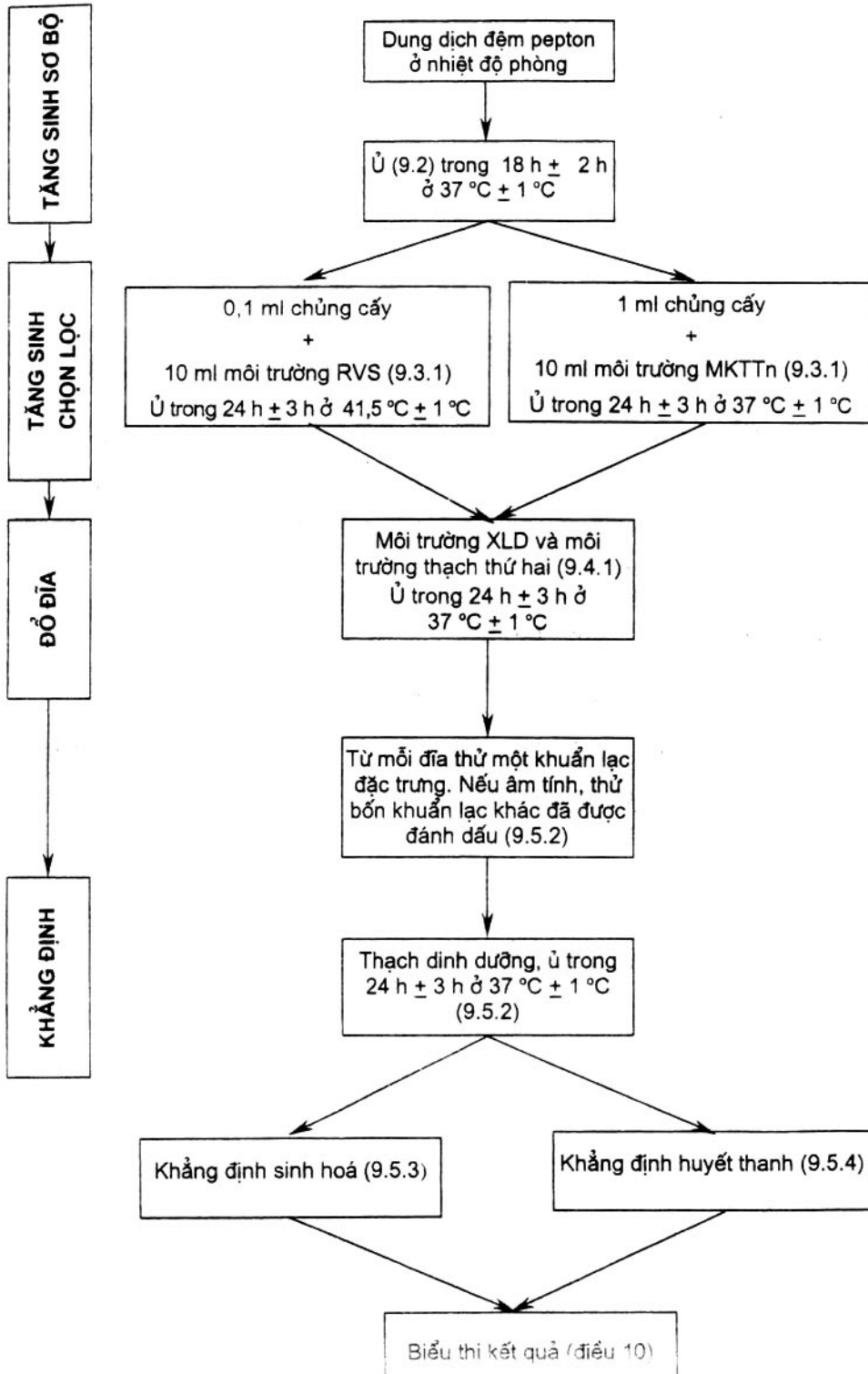
12 Đảm bảo chất lượng

Để kiểm tra khả năng của phòng thử nghiệm về phát hiện *Salmonella* bằng các phương pháp và môi trường mô tả trong tiêu chuẩn này, cần đưa các mẫu chuẩn ban đầu vào trong bình kiểm soát môi trường tăng sinh sơ bộ (xem 5.2.1). Tiến hành đối với các bình kiểm soát giống như đối với các chủng cần thử nghiệm.

Phụ lục A

(qui định)

Sơ đồ cách tiến hành



Phụ lục B

(qui định)

Thành phần và chuẩn bị môi trường cấy và thuốc thử**B.1 Dung dịch đệm pepton****B.1.1 Thành phần**

Pepton từ casein	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Nước	1 000 ml

B.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phối môi trường vào các bình (6.9) có dung tích thích hợp để thu được phần cần thiết cho thử nghiệm.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121°C .

B.2 Môi trường Rappaport-Vassiliadis với đậu tương (môi trường RVS)**B.2.1 Dung dịch A****B.2.1.1 Thành phần**

Pepton từ đậu tương	5,0 g
Natri clorua	8,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,4 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,2 g
Nước	1 000 ml

B.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng đến khoảng 70 °C, nếu cần.

Dung dịch này phải được chuẩn bị trong ngày cùng với việc chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh RVS.

B.2.2 Dung dịch B**B.2.2.1 Thành phần**

Magie clorua ngậm 6 phân tử nước ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	400,0 g
Nước	1 000 ml

B.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan magie clorua trong nước.

Do muối này hút ẩm mạnh, nên cần hoà tan hết lượng $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ trong hộp vừa mới mở, theo công thức. Ví dụ như 250 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ thì thêm 625 ml nước, để có dung dịch với tổng thể tích 788 ml và nồng độ khối lượng khoảng 31,7 g trên 100 ml $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Dung dịch có thể được giữ trong lọ thủy tinh tối màu có nắp đậy kín ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 năm.

B.2.3 Dung dịch C**B.2.3.1 Thành phần**

Oxalat xanh malachit	0,4 g
Nước	100 ml

B.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan oxalat xanh malachit trong nước.

Dung dịch này có thể được giữ trong lọ thủy tinh màu nâu ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 8 tháng.

B.2.4 Môi trường hoàn chỉnh**B.2.4.1 Thành phần**

Dung dịch A (B.2.1)	1 000 ml
Dung dịch B (B.2.2)	100 ml
Dung dịch C (B.2.3)	10 ml

B.2.4.2 Chuẩn bị

Cho 100 ml dung dịch B và 10 ml dung dịch C vào 1 000 ml dung dịch A.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $5,2 \pm 0,2$, nếu cần.

Phân phối các lượng 10 ml vào các ống thử nghiệm (6.9) trước khi sử dụng.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 115°C .

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Sử dụng môi trường chuẩn bị trong ngày .

CHÚ THÍCH: Thành phần của môi trường cuối cùng là: pepton từ đậu tương: 4,5 g/l; natri clorua: 7,2 g/l; kali dihydro phosphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$): 1,44 g/l; magie clorua khan (MgCl_2): 13,4 g/l hoặc magie clorua ngậm 6 phân tử nước ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 28,6 g/l; oxalat xanh malachit: 0,036 g/l.

B.3 Môi trường Novobioxin tetrathionat muller-kauffmann (Môi trường MKTTn) ⁽⁷⁾

B.3.1 Môi trường cơ bản

B.3.1.1 Thành phần

Cao thịt	4,3 g
Pepton từ casein	8,6 g
Natri clorua (NaCl)	2,6 g
Canxi cacbonat (CaCO_3)	38,7 g
Natri thiosulfat ngậm 5 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g
Mật bò dùng cho vi khuẩn học	4,78 g
Brilliant green	9,6 mg
Nước	1 000 ml

B.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi trong 5 phút.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $8,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Môi trường cơ bản có thể bảo quản được trong 4 tuần ở $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3.2 Dung dịch iot-iodua

B.3.2.1 Thành phần

Iot	20,0 g
Kali iodua (KI)	25,0 g
Nước	100 ml

B.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan hết kali iodua trong 10 ml nước, sau đó thêm iot và pha loãng bằng nước vô trùng đến 100 ml. Không đun nóng.

Bảo quản dung dịch đã chuẩn bị trong vật chứa kín, tối màu để ở nhiệt độ phòng.

B.3.3 Dung dịch Novobioxin

B.3.3.1 Thành phần

Muối natri novobioxin	0,04 g
Nước	5 ml

B.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối natri novobioxin trong nước và lọc để khử trùng.

Bảo quản đến 4 tuần ở $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3.4 Môi trường hoàn chỉnh

B.3.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (B.3.1)	1 000 ml
Dung dịch iot-iodua (B.3.2)	20 ml
Dung dịch novobioxin (B.3.3)	5 ml

B.3.4.2 Chuẩn bị

Bằng kỹ thuật vô trùng, cho 5 ml dung dịch novobioxin (B.3.3) vào 1 000 ml môi trường cơ bản (B.3.1). Trộn, sau đó thêm 20 ml dung dịch iot-iodua (B.3.2). Trộn kỹ.

Phân phối môi trường một cách vô trùng vào các bình vô trùng (6.9) có dung tích thích hợp để thu được các phần cần thiết cho thử nghiệm.

Sử dụng môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị trong ngày.

B.4 Thạch deoxycolat lyzin xyloza (thạch XLD) ^[7]**B.4.1 Môi trường cơ bản****B.4.1.1 Thành phần**

Bột cao nấm men	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Xyloza	3,75 g
Lactoza	7,5 g
Sucroza	7,5 g
L-Lyzin hydroclorua	5,0 g
Natri thiosulfat	6,8 g
Sắt (III) amoni xitrat	0,8 g
Phenol đỏ	0,08 g
Natri deoxycolat	1,0 g
Thạch	9 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

B.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản khô hoặc thành phần cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, liên tục khuấy, cho đến khi môi trường bắt đầu sôi. Tránh quá nhiệt.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,4 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Rót môi trường cơ bản vào các ống hoặc các bình (6.9) có dung tích thích hợp.

Đun nóng và khuấy liên tục cho đến khi môi trường sôi và thạch hoà tan. Không để quá nhiệt.

B.4.2 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển ngay vào nồi cách thuỷ (6.5) ở $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$, khuấy và rót vào các đĩa. Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch một cách cẩn thận (tốt nhất tháo bỏ nắp ra và úp bề mặt thạch xuống) cho vào lò sấy (6.2) để ở nhiệt độ từ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi bề mặt thạch khô.

Bảo quản các đĩa đã rót đến 5 ngày ở $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.5 Thạch dinh dưỡng

Cao thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Thạch	9 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

B.5.2 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 là $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Chuyển môi trường cấy vào trong các ống hoặc bình (6.9) có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.5.3 Chuẩn bị các đĩa thạch dinh dưỡng

Chuyển khoảng 15 ml môi trường nấu chảy vào các đĩa Petri nhỏ vô trùng (6.11) và tiến hành theo B.4.2.

B.6 Thạch TSI**B.6.1 Thành phần**

Cao thịt	3,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Lactoza	10,0 g
Sucroza	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Sắt (III) xitrat	0,3 g
Natri thiosulphat	0,3 g
Phenol đỏ	0,024 g
Thạch	9 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

B.6.2 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 là $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối môi trường các lượng 10 ml vào các ống nghiệm hoặc các đĩa.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C.

Đặt nghiêng để thạch có bề dày trên đáy từ 2,5 cm đến 5 cm.

B.7 Thạch urê (Christensen)**B.7.1 Môi trường cơ bản****B.7.1.1 Thành phần cơ bản**

Pepton	1,0 g
Glucoza	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	2,0 g
Phenol đỏ	0,012 g
Thạch	9 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

B.7.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.7.2 Dung dịch urê**B.7.2.1 Thành phần**

Urê	400 g
Nước vừa đủ	1 000 ml

B.7.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan urê trong nước. Lọc để khử trùng và kiểm tra độ vô trùng.

Xem 7.3.2 của TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996).

B.7.3 Môi trường hoàn chỉnh**B.7.3.1 Thành phần**

Môi trường cơ bản (B.7.1)	950 ml
Dung dịch urê (B.7.2)	50 ml

B.7.3.2 Chuẩn bị

Ở điều kiện vô trùng, cho dung dịch urê vào môi trường cơ bản, đã làm tan chảy trước và sau đó để nguội đến nhiệt độ từ $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Phân phối các lượng 10 ml môi trường hoàn chỉnh vào trong các ống vô trùng (6.9).

Đặt nghiêng ống nghiệm.

B.8 Môi trường L-Lyzin đã khử nhóm cacboxyl**B.8.1 Thành phần**

L-Lyzin monohydroclorua	5,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol đỏ tía	0,015 g
Nước	1 000 ml

TCVN 4829 : 2005

B.8.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Chuyển các lượng môi trường từ 2 ml đến 5 ml vào các ống cấy hẹp (6.9) có nắp vặn.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.9 Thuốc thử β -galactosidaza

B.9.1 Dung dịch đệm

B.9.1.1 Thành phần

Natri dihydro phosphat (NaH_2PO_4)	6,9 g
Natri hydroxit, dung dịch 10 mol/l	khoảng 3 ml
Nước vừa đủ	50 ml

B.9.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri dihydro phosphat trong khoảng 45 ml nước đựng trong bình định mức.

Dùng dung dịch natri hydroxit để chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Thêm nước vừa đủ 50 ml.

B.9.2 Dung dịch ONPG

B.9.2.1 Thành phần

o-Nitrophenyl β -D-galactopyranosit (ONPG)	0,08 g
Nước	15 ml

B.9.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan ONPG trong nước ở khoảng $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Làm nguội dung dịch.

B.9.3 Thuốc thử hoàn chỉnh**B.9.3.1 Thành phần**

Dung dịch đệm (B.9.1)	5 ml
Dung dịch ONPG (B.9.2)	15 ml

B.9.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch đệm vào dung dịch ONPG.

B.10 Thuốc thử phản ứng Voges-Proskauer (VP)**B.10.1 Môi trường VP****B.10.1.1 Thành phần**

Pepton	7,0 g
Glucosa	5,0 g
Dinatri hydro phosphat (K_2HPO_4)	5,0 g
Nước	1 000 ml

B.10.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $6,9 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$, nếu cần.

Chuyển các lượng môi trường 3 ml vào các ống nghiệm (6.9).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121^\circ C$.

B.10.2 Dung dịch creatin (*N*-amindinosarcosin)**B.10.2.1 Thành phần**

Creatin ngâm 1 phần tử nước	0,5 g
Nước	100 ml

B.10.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan creatin ngâm 1 phần tử nước trong nước

B.10.3 Dung dịch 1-Naphthol trong cồn

B.10.3.1 Thành phần

1-Naphtol	6 g
Etanol, 96 % (phần thể tích)	100 ml

B.10.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan 1-naphtol trong etanol.

B.10.4 Dung dịch kali hydroxit

B.10.4.1 Thành phần

Kali hydroxit	40 g
Nước	100 ml

B.10.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan kali hydroxit trong nước.

B.11 Thuốc thử phản ứng indol

B.11.1 Môi trường trypton/ tryptophan

B.11.1.1 Thành phần

Trypton	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
DL-Tryptophan	1 g
Nước	1 000 ml

B.11.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối các lượng 5 ml môi trường vào một số ống nghiệm (6.9).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C.

B.11.2 Thuốc thử Kovacs**B.11.2.1 Thành phần**

4-Dimethylaminobenzaldehyt	5 g
Axit clohydric, $\rho = 1,18$ g/ml đến 1,19 g/ml	25 ml
2-Metylbutan-2-ol	75 ml

B.11.2.2 Chuẩn bị

Trộn đều các thành phần trên.

B.12 Thạch dinh dưỡng nửa đặc**B.12.1 Thành phần**

Cao thịt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Thạch	4 g đến 9 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

B.12.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước, đun nóng nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển môi trường vào các bình (6.9) có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C.

B.12.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các lượng khoảng 15 ml môi trường mới chuẩn bị vào các đĩa Petri nhỏ vô trùng (6.11). Không để chỗ các đĩa thạch bị khô.

B.13 Dung dịch muối sinh lý**B.13.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 ml

TCVN 4829 : 2005

B.13.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri clorua trong nước.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối các lượng dung dịch vào trong các bình hoặc các ống (6.9) sao cho sau khi khử trùng mỗi bình hoặc ống chứa từ 90 ml đến 100 ml.

Khử trùng trong 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Phụ lục C

(tham khảo)

Các kết quả thử liên phòng thí nghiệm

Một phép thử cộng tác quốc tế được tổ chức năm 2000 bởi AFSSA Ploufragan tại Châu Âu và Hệ thống kiểm soát vi sinh tại Mỹ là một phần của dự án Châu Âu SMT CT 96 2098 [6]. Phép thử này gồm 11 phòng thử nghiệm của 9 nước Châu Âu và 10 phòng thử nghiệm của Mỹ tham gia thử nghiệm trên phomat tươi, bột trứng khô, thịt gia cầm nguyên liệu và vật liệu chuẩn. Các mẫu thực phẩm mỗi loại được thử nghiệm ở hai mức nhiễm bẩn khác nhau, có kiểm soát âm tính.

Các giá trị về các đặc trưng tính năng thu được từ phép thử liên phòng này được chỉ ra đối với từng loại mẫu trong các bảng từ C.1 đến C.4. Dữ liệu thu được từ một số phòng thử nghiệm đã loại trừ các tính toán vì các lý do kỹ thuật (các sai lệch so với thủ tục qui định).

Bảng C.1 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu phomat tươi

	Mẫu phomat tươi (không nhiễm)	Mẫu phomat tươi (nhiễm ở mức thấp)	Mẫu phomat tươi (nhiễm ở mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	23	23	23
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	21	21	21
Số lượng các mẫu được chấp nhận	105	105	105
Độ chính xác (đặc trưng), % [Accuracy (specificity)]	100	-	-
Độ chính xác (độ nhạy), % [Accuracy (sensitivity)]	-	74,3	83,8
Tinh theo (Accordance), %	100	83,8	95,2
Mức độ phù hợp (Concordance), %	100	60,5	71,7

Bảng C.2 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với các mẫu bột trứng khô

	Bột trứng khô (không nhiễm)	Bột trứng khô (nhiễm ở mức thấp)	Bột trứng khô (nhiễm ở mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	26	26	26
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	21	21	21
Số lượng các mẫu được chấp nhận	105	105	104
Độ chính xác (đặc trưng), % [Accuracy (specificity)]	100	-	-
Độ chính xác (độ nhạy), % [Accuracy (sensitivity)]	-	98,1	99
Tính theo (Accordance), %	100	96,2	98,1
Mức độ phù hợp (Concordance), %	100	96,2	98,1

Bảng C.3 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với thịt gia cầm nguyên liệu

	Thịt gia cầm nguyên liệu (không nhiễm)	Thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức thấp)	Thịt gia cầm nguyên liệu (nhiễm ở mức cao)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	25	25	25
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	20	20	20
Số lượng các mẫu được chấp nhận	100	99	100
Độ chính xác (đặc trưng), % [Accuracy (specificity)]	100	-	-
Độ chính xác (độ nhạy), % [Accuracy (sensitivity)]	-	98	100
Tính theo (Accordance), %	100	96,9	100
Mức độ phù hợp (Concordance), %	100	98	100

Bảng C.4 – Các kết quả phân tích dữ liệu thu được với vật liệu chuẩn

	Vật liệu chuẩn (viên nang chứa khoảng 5 cfu S.Typhimurium)
Số lượng phòng thử nghiệm trả lại kết quả	26
Số lượng mẫu trong một phòng thử nghiệm	5
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	1
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	25
Số lượng các mẫu được chấp nhận	125
Độ chính xác (đặc trưng), % [Accuracy (specificity)]	-
Độ chính xác (độ nhạy), % [Accuracy (sensitivity)]	94,4
Tính theo (Accordance), %	88,8
Mức độ phù hợp (Concordance), %	89,1

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử; huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 2 : Các nguyên tắc cụ thể về chuẩn bị thịt và sản phẩm thịt.
- [2] TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử; huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 3 : Các nguyên tắc cụ thể về chuẩn bị thủy sản và sản phẩm thủy sản.
- [3] TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử; huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 4 : Các nguyên tắc cụ thể về các sản phẩm khác sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, và thủy sản và sản phẩm thủy sản.
- [4] ISO/ TR 11133-1, *Microbiology of food and animal feeding stuff – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.*
- [5] Ewing, WH. và BALL, M.M. The biochemical reaction of the *genus Salmonella*. National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1996.
- [6] FELDSINE, P. et al. Recovery of *Salmonella* in selected Foods by the ISO 6579 *Salmonella* Culture Procedure and the AOAC International official Method of Analysis: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 2001.
- [7] Culture Media for food microbiology. In: Progress in Industrial Microbiology. Vol. 34 (Eds. Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W and Baird.
-